

· 方药研究 ·

益胃汤对初老雌性大鼠卵巢细胞凋亡线粒体通路的影响

李 燕¹ 谭万信² 王 毅² 郭蓉晓² 周淑芳²

(1. 贵阳中医学院妇科教研室, 贵州省贵阳市市东路 50 号, 550002; 2. 成都中医药大学)

[摘 要] **目的** 探讨益胃汤延缓初老雌性大鼠卵巢机能衰老的机理。 **方法** 4~6 月龄雌性 SD 大鼠为正常对照组; 10~12 月龄、阴道细胞学表现动情期延长的雌性 SD 大鼠作为初老大鼠模型, 随机分为益胃汤高剂量组、益胃汤中剂量组、益胃汤低剂量组、己烯雌酚组、模型对照组。灌药 4 周后, 取左侧卵巢用于检测卵巢 Bcl-2、Bax、Caspase³、细胞色素 C。 **结果** 与模型对照组比较, 益胃汤可使卵巢 Bcl-2 表达增强, Bax 表达减弱, Bcl-2/Bax 比例增加 ($P<0.05$), Caspase 表达减少, 细胞色素 C 减少, 卵巢细胞凋亡减少, 但达不到正常对照组水平 ($P>0.05$), 且益胃汤高、中、低剂量组在实验中呈现一定的量效关系。 **结论** 益胃汤通过抑制线粒体通路引起的级联反应抑制初老雌性大鼠卵巢细胞凋亡, 这可能是其延缓卵巢机能衰老的机理之一。

[关键词] 益胃汤; 卵巢; 细胞凋亡; 线粒体通路; 初老雌性大鼠; 中医药疗法

Effect of Yiwei Decoction on Mitochondrion Path of Ovary Apoptosis of the Primary Senile Female Rats

LI Yan¹, TAN Wanxin², WANG Yi², et al.

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism of "Yiwei Decoction (Decoction for reinforcing the stomach) in delaying the aging of the primary senile rat ovary. **Methods** The 4~6 months old SD female rats were set to be normal control group. The 10~12 months old SD female rats with vaginal cytological oestrus elongation were set as the primary senile female rat models, who were randomized into 5 groups: high dose Yiwei Decoction group; middle dose Yiwei Decoction group; low dose Yiwei Decoction group; diethylstilbestrol group; model control group. The intervention by gavage lasted 4 weeks. The left ovaries were tested by immunohistochemical method to observe the expression of Bcl-2, Bax, Caspase³ and cytochrome C. **Results** Compared with the model control group, Yiwei Decoction could increase the expression of Bcl-2, decrease the expression of Bax, increase the proportion of Bcl-2/Bax ($P<0.05$), decrease the expression of Caspase³, Cytochrome C, and ovary apoptosis, but not to the degree of the normal control group. And the high, middle and low dose Yiwei Decoction groups presented a dose-effect relationship. **Conclusion** The results showed that Yiwei Decoction can restrain ovary apoptosis through inhibiting the cascade reaction caused by mitochondrion path. This might be one of the mechanisms of Yiwei Decoction delaying the aging of ovary in primary senile rat.

Key Words Yiwei Decoction (Decoction for reinforcing the stomach); Ovary; Apoptosis; Mitochondrion path; Primary senile female rat; TCM therapy

改善绝经前期特殊病理生理内环境是延缓女性生殖轴机能衰老、防治绝经前期易发疾病的治本措施, 卵巢是整个生命周期不断进行连续修复的动态系统, 细胞凋亡是维持这个动态修复系统的重要机制^[1], 本实验通过对雌性初老模型大鼠(相类于绝经前期)的研究, 拟从卵巢细胞凋亡线粒体通路入手, 探求益胃汤方药对绝经前期卵巢功能的影响及作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 雌性大鼠, 10~12 月龄, 符合初老模型动物 50 只, 体重(310±20)g; 正常大鼠 10 只, 4~6 月

龄, 体重(230±20)g, 由成都中医药大学实验动物中心提供[动物生产合格证号: SCXK(川) 2003-11 号]。初老大鼠模型: 选 10~12 月龄雌性大鼠, 采取阴道脱落细胞涂片巴氏染色连续观察 4 个动情周期, 以阴道细胞学表现动情周期长、之后持续动情、反复假妊娠时, 作为初老大鼠模型^[2]。正常大鼠模型: 选择 4~6 月龄雌性大鼠阴道细胞学涂片, 每日 1 次, 连续 5 天, 以角化细胞指数高于 50% 者为正常模型。

1.2 药物及试剂

药物: 益胃汤制剂制备工艺据文献[3]拟订, 由北沙参、生地黄、麦冬、玉竹、冰糖组成, 剂量比例为 30:10:15:10:6, 制成浓度为 2g 生药/ml 的煎剂。处方中药材均购于成都市中药材市场, 经成都中医药大学药学院专家鉴定, 均符合《中华人民共和国药典》2000

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371795)、四川省科技厅基金资助项目(30371795), 四川省教育厅基金资助项目(30371795)
通讯作者: 李燕, liyan2000315@163.com, 13985494092

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

版(一部)相关项目的规定。

试剂:Bcl-2 鼠单克隆IgG 1(Santa Cruz 公司,相应二抗及试剂盒购自北京中山生物技术有限公司,批号:C-2);Bax 兔多克隆IgG 1(同上,批号:N-20);Caspase 羊多克隆IgG 1(同上,批号:L-18);兔、大鼠、小鼠细胞色素 C(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA 0781)。

1.3 动物分组与给药

采用 SAS 统计软件 proc plan 过程步对实验动物进行完全随机化分组,将 48 只动物进行随机分为 6 组,每组 8 只,无脱失。正常对照组:4~6 月龄的青年雌性大鼠;益胃汤高剂量组:给予益胃汤 27g/kg 体重,相当于成人剂量的 20 倍,以生理盐水按 13.5ml/kg 配成混悬液灌胃给药;益胃汤中剂量组:给予益胃汤 13.5g/kg 体重,相当于成人剂量的 10 倍,以生理盐水按 13.5ml/kg 配成混悬液灌胃给药;益胃汤低剂量组:给予益胃汤 6.75g/kg 体重,相当于成人剂量的 5 倍,以生理盐水按 13.5ml/kg 配成混悬液灌胃给药;己烯雌酚组:给予己烯雌酚 0.0042g/kg 体重,相当于成人剂量的 5 倍,以 5%羧甲基纤维素钠水溶液按 13.5ml/kg 配成混悬液灌胃给药;模型对照组:灌胃等容积生理盐水(13.5ml/kg)。以上各组大鼠每天灌胃 1 次,连续 4 周。

1.4 观察指标

末次灌胃后 24h,断头处死大鼠。取左侧卵巢用 4%多聚甲醛固定。用免疫组化法检测卵巢细胞凋亡通路指标 Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax、Caspase³、细胞色素 C。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 及 S-N-K 分析。

2 结果

附表示,与模型对照组比较,益胃汤可使卵巢 Bcl-2 表达增强,Bax、Caspase³、细胞色素 C 表达减弱 ($P < 0.01$);Bcl-2/Bax 比例增加 ($P < 0.01$);卵巢细胞凋亡减少,且益胃汤高、中、低剂量组存在量效关系。与正常对照组比较,益胃汤各组卵巢 Bcl-2 表达减弱 ($P <$

0.01);Caspase³、细胞色素 C 表达升高 ($P < 0.01$);Bcl-2/Bax 比例下降 ($P < 0.01$),益胃汤低剂量组 Bax 表达升高 ($P < 0.05$)。卵巢细胞凋亡增加。与己烯组比较,益胃汤高、中剂量组卵巢 Bcl-2 表达减弱但无统计学意义 ($P > 0.05$),益胃汤低剂量组有统计学意义 ($P < 0.01$)。益胃汤高剂量组 Bax 表达减弱 ($P < 0.05$)。益胃汤高剂量组 Bcl-2/Bax 比例升高 ($P > 0.05$),益胃汤中剂量组比例下降 ($P > 0.05$),益胃汤低剂量组比例下降 ($P < 0.01$)。益胃汤高剂量组 Caspase³ 表达减少 ($P < 0.05$),益胃汤中剂量组比例下降 ($P > 0.05$),益胃汤低剂量组比例升高 ($P < 0.01$)。益胃汤高、中剂量组细胞色素 C 减少 ($P > 0.05$),益胃汤低剂量组增加 ($P < 0.05$)。卵巢细胞凋亡有减少趋势。

4 讨论

绝经前期性生殖轴机能衰老主要表现为卵巢内卵泡数明显减少且易发生卵泡发育不全,及卵泡难以发育成熟而呈现月经周期紊乱,且常为无排卵性,细胞凋亡可能是卵巢清除卵泡的方式。

绝经前期生殖轴机能逐步衰老及其相应病理发生,主要由绝经前期机体的“内因”所决定和导致。因此,改善绝经前期的特殊病理生理内环境(内因),既有助于延缓生殖轴机能的衰老,又可起到预防绝经前期相关疾病发生的作用,此即中医学“必伏其所主”的用意。中医学自《黄帝内经》伊始,已对女性生长、发育、生殖、衰老的全过程有了甚为明晰的分阶段论述,其中女子“五七阳明脉衰,……六七三阳脉衰于上”是具代表性的经典之说。《内经》所云“五七”、“六七”的阳明、三阳脉衰不仅可引起了颜面、肌肤、毛发的改变,而且会因“冲脉隶于阳明”的特定关系,导致月经之本的冲脉功能失常,引发女性生殖生理的衰退。并因之逐渐形成“七七”之年“太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也”,即生殖机能的衰竭。故张景岳有“女为阴体,……故其衰也,自阳明始”之说^[4]。补益阳明津气既可改善“阳明脉衰”,又使冲脉获阳明津气所资,从而延缓绝经前期“阳明脉衰”渐至“三阳脉衰”,终至“太冲脉衰

附表 益胃汤对初老大鼠卵巢细胞凋亡线粒体通路的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2($\times 10^6$)	Bax($\times 10^6$)	Bcl-2/Bax	Caspase ³ ($\times 10^6$)	细胞色素 C($\times 10^6$)
正常对照组	8	6.78 $\pm$ 1.76	2.79 $\pm$ 0.52	2.50 $\pm$ 0.82	0.81 $\pm$ 0.06	1.37 $\pm$ 0.21
模型对照组	8	2.26 $\pm$ 0.84 **	4.24 $\pm$ 0.61 **	0.56 $\pm$ 0.23 **	2.80 $\pm$ 0.11 **	5.40 $\pm$ 0.62 **
己烯雌酚组	8	5.29 $\pm$ 1.28 * Δ	3.13 $\pm$ 0.41 Δ	1.69 $\pm$ 0.35 * Δ	1.57 $\pm$ 0.12 * Δ ○	2.70 $\pm$ 0.41 * Δ
益胃汤高剂量组	8	4.67 $\pm$ 1.33 * Δ	2.59 $\pm$ 0.29 Δ ▲	1.81 $\pm$ 0.52 * Δ	1.40 $\pm$ 0.18 * Δ ▲	2.16 $\pm$ 0.40 * Δ
益胃汤中剂量组	8	4.18 $\pm$ 1.30 * Δ	3.12 $\pm$ 0.48 Δ ○	1.39 $\pm$ 0.54 * Δ	1.50 $\pm$ 0.14 * Δ	2.28 $\pm$ 0.32 * Δ
益胃汤低剂量组	8	3.26 $\pm$ 1.00 * Δ ▲○	3.36 $\pm$ 0.44 * Δ ○○	0.97 $\pm$ 0.29 * Δ ▲○○	2.37 $\pm$ 0.18 * Δ ▲○○●	3.39 $\pm$ 0.28 * Δ ▲○○●

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组比较, Δ $P < 0.05$, Δ ▲ $P < 0.01$;与己烯雌酚组比较,○ $P < 0.05$,○○ $P < 0.01$;与益胃汤高剂量组比较,● $P < 0.05$,○○● $P < 0.01$ 。

少,天癸竭”这一过渡时期的生理病理进程,起到延缓生殖轴机能衰老的作用。因此,改善绝经前期生殖生理的特殊病理生理内环境,需着眼于“阳明、三阳脉衰”,尤其是“阳明脉衰”,从培补阳明入手,以“补益阳明津气”为法。

益胃汤中沙参入胃、肺,功能益胃生津、养阴清肺;生地黄养阴生津,清热凉血,能“补肾中真阴”以资后天;玉竹养阴润燥、生津止渴;冰糖味甘而性平,补中益气,和胃润肺,生津止渴。诸药合用,具补阳明津气之功。胃中津气充沛,“谷气盛则血海满”,可期“月事以时下”。

Bcl-2 家族可分为 Bcl-2 和 Bax 两大亚族,前者抗细胞凋亡而后者促细胞凋亡。抑制凋亡的 Bcl-2 亚族,主要存在于线粒体外层膜上,促进凋亡的 Bax 亚族,多存在于线粒体膜上和内质网膜上。Bax 与 Bcl-2 有很高的同源性,两者可形成同源或异源二聚体。Bcl-2 与 Bax 的比例不同可影响细胞凋亡,Bcl-2>Bax,细胞趋于存活;Bax>Bcl-2 则细胞趋于凋亡^[5]。细胞凋亡信号通路途径可能起着重要作用。Erkan 等^[6]研究培养的人近曲小管细胞发现,内源性通路中的 Bcl-2 家族成员受到激活,可作用于线粒体膜,使其通透性增高,导致线粒体中细胞色素 C 及其他促凋亡蛋白如 Caspases 酶的释放和激活,引起级联反应,最终导致底物降解和凋亡的发生。

本实验研究提示,益胃汤及己烯雌酚均能使 Bcl-2 升高,使 Bax 降低,从而改变了细胞凋亡的抑制/促进比例,使初老模型大鼠卵巢细胞色素 C 明显减少,Caspase³ 表达明显下降,从而阻断线粒体通路的传导途径,使凋亡信号不能继续下传,抑制卵巢细胞凋亡,但达不到青年组水平,而且益胃汤高、中、低剂量组在实验中呈现有一定的量效关系。实验证实,益胃汤通过抑制线粒体通路引起的级联反应抑制初老雌性大鼠卵巢细胞凋亡,这可能是其延缓卵巢机能衰老的机理之一。

参考文献

[1]李育,王明艳,马红,等.卵巢颗粒细胞凋亡的调控机制[J].临床和实验医学杂志,2007,6(4):160-161.
[2]程化奇,熊舜华,殷新尤,等.大鼠更年期实验模型研究[J].上海实验动物科学,1993,13(4):192.
[3]谢秀琼.中药新制剂开发与运用[M].北京:人民卫生出版社,2000:46.
[4]彭锦,闪增郁,孔令诩.试论“健运阳明”是中年女性养生的重要方法[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(7):22-23.
[5]陕声国,张端莲,刘昱,等. Bcl-2 和 Bax 在皮肤血管瘤组织中的表达及意义[J].中华医学美容美容杂志,2008,14(2):118-121.
[6]Erkan E, Devarajan P, Schwartz GJ. Mitochondria are the major targets in albumin-induced apoptosis in proximal tubule cells[J]. Jam Soc Nephrol, 2007, 18(4):1199-1208.

(收稿日期:2008-04-16;修回日期:2009-03-22)

[编辑:行 之]

中国中医科学院针灸研究所北京国际针灸培训中心(国内培训部)
招 生 简 章

北京国际针灸培训中心自1975 年成立以来已经发展成为一所知名的专业培训机构。中心始终以面向世界普及中医针灸知识为宗旨,为完善世界卫生组织“完善针灸培训方法,为世界各国医生提供培训”的任务而努力工作。三十多年来,培训中心已为世界上一百多个国家和地区的万名医务工作者提供了中医针灸、推拿、中药、气功等方面的培训,欢迎广大医务工作者前来参加培训与进修。

全国高级针灸进修班 学费:2260 元。9 月 4 日~9 月 17 日。此班为著名中医针灸专家临床经验传授班,属于国家级 I 类中医药继续教育项目,授予 12 学分。将主要讲授有关中风、类风湿、头痛、运动肌损伤、呼吸系、消化系、神经系、妇科、皮科等疾病治疗经验、验方效穴的临床介绍及火针、头针、耳针、眼针等多种针法临床应用和操作技巧。所聘专家,均为从事中医针灸临床 30 余年,知识渊博,技艺精湛,闻名中外的著名专家、名医。将邀请中国工程院院士、中国针灸学会高级顾问程莘农教授,中国针灸学会高级顾问、“三通法”创始人、北京针灸学会会长贺普仁教授,中国针灸学会高级顾问田从豁教授,及王岱、张士杰、金伯华、周德安、王居易、张世雄、李定忠、王本显、蒋达树、卢鼎厚、金嫣丽、王京喜、吴中朝、杨威、杨金生、彭增福等数十名著名专家亲自授课,表演手法、传授特技、答疑解惑。通过学习,学员的医术将有显著提高。持本班结业证书上岗、出国均有效。

全国高级推拿进修班及高级按摩师资格取证班 学费:2280 元。7 月 31 日~8 月 13 日。本着使学员学到和掌握更丰富、更全面的推拿、按摩理论知识和技能,顺利通过考核,优先竞争上岗的办学宗旨,将高级推拿进修班与高级按摩师取证班合二为一,我中心重视理论联系实际,突出名师指导下的操练,使学员打下扎实的技术功底,练就一身过硬的技术本领,通过多期培训,考试通过率达 99%,此班将邀请著名骨伤推拿专家臧福科、庞承泽、董福慧、赵永刚教授等亲自授课和指导操练。学习班结束后,考核通过颁发中华人民共和国劳动和社会保障部印制的高级按摩师资格证书及中国中医科学院针灸研究所北京国际针灸培训中心结业证书。该班请提前报名,报名时务必将身份证复印件,蓝底彩色 2 寸照片二张寄到中心。

全国中医减肥“经络调理师—子午经络手法”进修班 学费:3800 元。8 月 15 日~8 月 22 日。

全国实用针灸、推拿(初级)进修班 学费:1200 元。9 月 9 日~9 月 19 日。

联系地址:北京市东直门内南小街 16 号(邮编:100700) 中国中医科学院针灸研究所北京国际针灸培训中心,电话、传真:010-84049008、64014411(转 2789),手机短信:13671280701,13391675516,联系人:赵长龙,欢迎咨询并索取 2009 年招生简章。