

“益坤宁”对自然老化大鼠性激素的 调节及卵巢修复的研究*

□张广美** (哈尔滨医科大学第一临床医学院 哈尔滨 150010)

齐群艳 张旸旸 廖希慧 (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

刘国艺 崔清志 肖晓辉 (哈尔滨医科大学生理教研室 哈尔滨 150001)

摘要:目的:研究中药益坤宁对围绝经期大鼠卵巢功能和结构的影响。方法:选用11~13月龄雌性围绝经期wistar大鼠32只。随机将其分为模型组、益坤宁组、西药对照组。另选青年大鼠10只,月龄4个月,作为青年对照组,采用血清性激素分泌水平、血管内皮生长因子(VEGF)、颗粒细胞凋亡及细胞形态等指标来观察益坤宁对卵巢结构和功能的影响。结果:益坤宁组与模型组比较,各项指标差异均有显著性或极显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:研究证实益坤宁可升高围绝经期大鼠血清E2、P水平,降低血清FSH、LH水平;对围绝经期大鼠卵巢VEGF有促进作用;对卵巢颗粒细胞凋亡有抑制作用,提示益坤宁可以阻止卵泡闭锁,从而达到预防和延缓卵巢衰老的作用机制。

关键词:围绝经期 益坤宁 颗粒细胞凋亡 VEGF

围绝经期综合征是一种妇科常见病、多发病,发病年龄在40~60岁左右。目前,用中医药治疗围绝经期综合征取得比较肯定的成绩。本课题选用围绝经期大鼠,分别从细胞形态方面、内分泌角度、VEGF以及卵巢颗粒细胞凋亡多方面研究中药益坤宁治疗围绝经期综合征的机制,为临床运用提供理论和实验依据。

一、材 料

1. 实验动物

所有动物均为Wistar雌性大鼠,由上海斯莱克实

验动物中心提供。质量合格证号:SCXK(沪)2003-0003,微生物控制等级一级。11~13月龄大鼠32只,体重(320 ± 20)g,根据阴道脱落细胞检查,无规律性动情周期变化,确定为围绝经期大鼠。4月龄青年大鼠10只,体重(210 ± 20)g。置于哈尔滨医科大学生理实验室的动物室内适应性饲养1周。实验期间同一室内笼养,12h光照,12h黑暗的条件下,自由饮水,摄食颗粒饲料。大鼠全价颗粒饲料由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,室温18~22℃。

2. 药物及试剂

益坤宁由黑龙江省中医药大学附属二院门诊中药局提供,并经生药检验,由制剂室制作相应浓度的

收稿日期:2007-12-14

修回日期:2008-03-12

* 国家自然科学基金课题(30670484):中药益坤宁治疗围绝经期综合征药靶识别及作用机理的研究,负责人:张广美;黑龙江省自然科学基金(D2005-15):中药益坤宁治疗围绝经期综合征药靶识别及作用机理的研究,负责人:张广美。

** 联系人:张广美 教授,主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向:妇科肿瘤学研究,Tel:0451-88591665,E-mail:guangmeizhang@126.com。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 69

水煎剂,高压密封备用。利维爱:荷兰欧加农制药公司生产,中国南京欧加农制药有限公司包装,批号:H20051085。原位末端标记(TUNEL)检测细胞凋亡试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供;VEGF检测试剂盒由美国 SANTA CRUZ 公司和碧云天生物技术研究提供;性激素放免试剂盒由北京北方生物技术研究提供。

3. 主要仪器

倒置荧光显微镜、电热恒温干燥箱、LEICA 石蜡切片机、计算机图象分析仪、透射电镜。

二、方 法

1. 模 型

采用自然老化的初老动物模型,每日 1 次阴道细胞学涂片,连续 15 天。动情周期紊乱、动情间期延长为围绝经期大鼠模型,规则的 4~5 天动情周期为青年组大鼠模型。

2. 分组与用药

Wistar 雌性大鼠 42 只,随机分为模型组、益坤宁组各 11 只,利维爱组、青年组各 10 只。益坤宁组:给予生药量 4.3g/mL 益坤宁混悬液,每天 1 次灌胃;利维爱组:给予 0.26mg/kg 利维爱混悬液,每天 1 次灌胃;模型组、青年组每日灌服 3mL 的生理盐水。

3. 测定方法

用药 4W 后,于最后 1 次给药 24h 后,摘眼球取血辅助断头取血,静置后离心,用放免法测定性激素四项:E2、P、FSH、LH,按试剂盒说明书进行;颈椎脱臼处死,剖取大鼠卵巢标本,固定后用免疫组化法测定 VEGF,按试剂盒说明书进行,按积分光密度判定结果;用 HE 染色进行卵巢组织形态学观察;用 TUNEL 和电镜观察卵巢颗粒细胞凋亡。

4. 判定标准

原位末端标记(TUNEL)判定标准:根据切片中卵巢组织中卵泡内颗粒细胞免疫组织化学染色的深浅分 4 级:未被染色的为阴性表达(-);深棕色为弱阳性表达(+);棕黄色为中度阳性表达(++);棕褐色为强阳性表达(+++)。为了统计方便予以半定量计分:

1,2,3,4 分别对应-,+,++,+++。每张切片至少察 3 个视野。

VEGF 判定标准:同凋亡检测。

5. 统计学处理

有关数据采用 t 检验或 R 分析法进行统计学处理。

三、实验结果

1. 血清检测结果从表 1 可以看出,经益坤宁与西药利维爱治疗后,大鼠血清 E2 值升高($P<0.01$),P 值升高($P<0.05$),差异具有极显著性和显著性。益坤宁与利维爱均能明显降低大鼠血清 FSH、LH 水平,差异具有显著性和极显著性($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

2. 免疫组化法检测血管内皮生长因子结果:(VEGF 主要表达在卵泡颗粒细胞和卵泡膜细胞中)

研究表明:青年组 VEGF 呈强阳性表达。用

表 1 各组大鼠血清 E2、P、FSH、LH 测定结果

组别	N	E2(Pg/ml)	P(ng/l)	FSH(mlu/ml)	LH(mlu/ml)
青年组	10	17.75±4.90*** [▲]	25.17±4.23*	5.66±1.92**	10.22±1.31**
模型组	11	5.02±2.08 [△]	13.70±4.08	8.09±0.92	12.85±0.59
益坤宁组	11	9.97±2.46*** [△]	19.87±2.76*	7.10±2.05*	11.21±0.63**
西药组	10	11.06±2.32**	14.07±3.56*	6.34±1.35*	10.59±1.34**

注:与模型组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与西药组比较 $\Delta P<0.01$, $\Delta P>0.05$

表 2 各组大鼠卵巢 VEGF 积分光密度的比较 ($\bar{x}\pm s$)

	n	积分光密度
青年组	10	42.32±2.17*
模型组	11	8.89±0.89
益坤宁组	11	19.83±0.89*
西药组	10	25.89±2.70*

注:与模型组比较 * $P<0.01$

表 3 各组大鼠卵泡颗粒细胞凋亡阳性表达比较

组别	N	P	C		D	阳性积分	阳性积分率
		(-)	(+)	(++)	(+++)		
青年组	10	7	3			14**	30%
模型组	11		3	4	4	29	100%
益坤宁组	11	7	3	2		17**	36.3%
西药组	11	5	3	3		19**	50%

注:与模型组比较 * $P<0.01$

药组益坤宁组及西药对照组均有不同程度阳性表达,与模型组比较都能使 VEGF 积分光密度增强,前三组与模型组鼠比较均有极显著性差异($P<0.01$)。见表 2。

3. HE 染色结果(显微镜观察结果)

青年组:大鼠卵巢组织内有较多的各级生长卵泡及黄体,亦可见成熟卵泡,体积较大,卵泡液较多,卵母细胞突出于卵泡腔内形成卵丘,卵泡隆起于卵巢表面。

模型组:大鼠生长卵泡较少,黄体数量较少,可见较多的闭锁卵泡,卵泡细胞溶解,颗粒细胞消失,卵泡膜内层细胞肥大,泡质内有大量闭锁黄体。

益坤宁组:可见各级生长卵泡增多,黄体数量亦增多,闭锁卵泡较少。

西药组:可见生长卵泡较多,闭锁卵泡较少。

4. 原位末端标记(TUNEL)法检测卵泡颗粒细胞凋亡结果

模型组卵泡颗粒细胞凋亡呈强阳性表达;青年对照组呈弱阳性表达,凋亡细胞染成棕色,而且颜色较浅与模型组比较有极显著性差异($P<0.01$)。益坤宁组及西药对照组虽然也有不同程度的卵泡颗粒细胞凋亡的阳性表达,但与模型组鼠比较均有极显著性差异($P<0.01$)。见表 3、图 2。

5. 电镜结果

青年组:高倍下颗粒细胞多层排列,胞质丰富,透明带形成;颗粒细胞内线粒体清晰基质密度适中,相邻细胞间可见紧密连接结构。

模型组:颗粒细胞形态不规则,细胞间隙明显增大,胞质内线粒体出现空泡变;部分细胞核固缩、染色质凝聚,相邻细胞间连接结构消失。

益坤宁组:核膜结构清晰,胞质内粗面内质网丰富,线粒体空泡变,部分颗粒细胞核固缩,染色质凝聚,形成凋亡细胞的改变。

西药组:核膜结构清晰,胞质内粗面内质网丰富,部分颗粒细胞核固缩,染色质凝聚。如图 3。

四、讨论

卵巢功能衰退是围绝经期的最早变化也是围绝

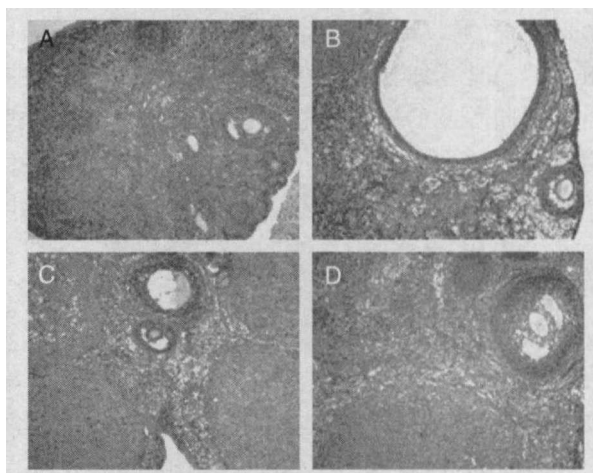


图 1

注:A 青年组(X10):可见成熟卵泡,体积较大,卵泡液增多;B 模型组(X10):生长卵泡较少,卵泡细胞溶解,颗粒细胞消失;C 益坤宁组(X10):各级生长卵泡增多,闭锁卵泡较少;D 西药组(X10):生长卵泡较多,闭锁卵泡较少。

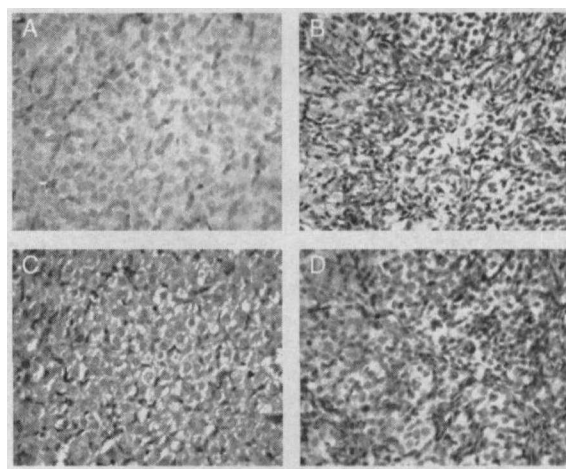


图 2

注:a 围绝经期模型组(X400):凋亡细胞染成深棕色,呈强阳性;b 青年组(X400):凋亡细胞染成棕褐色,呈弱阳性;c 益坤宁组(X400):凋亡细胞染成棕黄色,呈中阳性;d 西药组(X400):凋亡细胞染成棕黄色,呈中阳性。

经期最根本的特征,公认卵巢的衰老原因是卵子的消耗。此时期,卵巢渐趋停止排卵,卵泡闭锁,雌激素分泌减少。近年研究表明,颗粒细胞的凋亡是卵泡闭锁的机制之一,颗粒细胞凋亡触发了卵泡闭锁^[1-2]。有核细胞在遗传基因调控下,通过外源性 DNA 内切酶的激活和经过一系列内部机制发生的单位细胞的自灭

(死亡)过程,称为程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD)又称细胞凋亡^[3]。原位末端标记法检测模型组有不同程度的卵泡颗粒细胞凋亡阳性表达,益坤宁组及西药对照组虽然也有不同程度的卵泡颗粒细胞凋亡的阳性表达,但与模型组鼠比较均有极显著性差异($P<0.01$)。证明了益坤宁对围绝经期大鼠卵巢组织形态有显著影响,从而证实了益坤宁对围绝经期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡有预防和延缓作用。同时有研究表明 E2 水平下降是因为颗粒细胞大量凋亡,使雌激素分泌减少造成的^[4]。经益坤宁组治疗 4 周,E2、P 水平明显上升,FSH、LH 值降低,与模型组比较差异有显著性($P<0.05$)。本实验中可见,益坤宁可以改善围绝经期大鼠性激素水平的紊乱,使其下丘脑-垂体-卵巢轴的功能得到改善,内环境趋于稳定,从而

延缓卵巢衰退进程。

卵巢内有丰富的血管以维持卵泡的生长。卵巢中的血管新生对卵泡生长、优势卵泡形成、排卵起重要作用⁵。近年研究表明,围绝经期大鼠卵巢发生退行性变化,管壁增厚,管腔缩小、狭窄,卵巢血管内皮生长因子减少,造成了卵巢功能的减退^[6]。血管内皮生长因子(VEGF)又称血管渗透因子(VPF)是与血管再生有关的细胞生长因子,能够刺激内皮细胞增殖和新生血管的生成。研究表明益坤宁组及西药对照组 VEGF 有不同程度阳性表达,与模型组鼠比较均有极显著性差异($P<0.01$)。证明了益坤宁对血管再生和卵泡生长起着一定的作用,从而延缓卵巢的衰老。

VEGF 在闭锁卵泡高表达可能与这些细胞的凋亡有关^[7],卵泡颗粒细胞的增殖和分化是卵泡不断发育至成熟的基本条件,即它的凋亡是闭锁内周期性血管形成伴随血流呈周期性改变,与卵巢性激素周期性分泌相关。卵泡的生长发育依赖于局部血管的形成,VEGF 能促使卵泡周围微血管生成,从而使卵泡可以得到更多的血液中促卵泡激素(FSH)和黄体生成素(LH)的作用而发育。KamatBr 等^[8]研究认为 VEGF 在卵巢上的表达与促性腺激素、雌激素(E)、孕激素(P)有关。卵巢产生的 VEGF 可能是垂体调节卵巢 E、P 分泌的中介因子,与卵巢性激素周期性分泌相关。

中医认为妇女围绝经期综合症是由于肾气渐虚,精血不足,冲任失调,致使卵巢功能衰退的表现。因此补肾中药可以调整性腺轴,改善卵巢功能^[9],延缓卵巢老化,从而达到延缓衰老的作用。目前,用中医药治疗围绝经期综合征取得较为肯定的成绩。益坤宁方是在《金匱要略》“桂枝加龙骨牡蛎汤”基础上加减而成。由黄芪、桂枝、龙骨、牡蛎、当归、柴胡、白芍、麦冬、茯苓、甘草组成,以补肾,调阴阳为主,兼以健脾,通过调节生殖内分泌系统,从而延缓卵巢功能的衰退进程,是临床比较有效的方剂。据本实验结果我们推测,益坤宁一方面可以抑制细胞凋亡,改善围绝经期大鼠性激素水平的紊乱,从而改善性腺轴,使内环境趋于稳定;另一方面通过卵巢内调节提高卵巢内部血流,从而延缓卵巢功能的衰退进程。

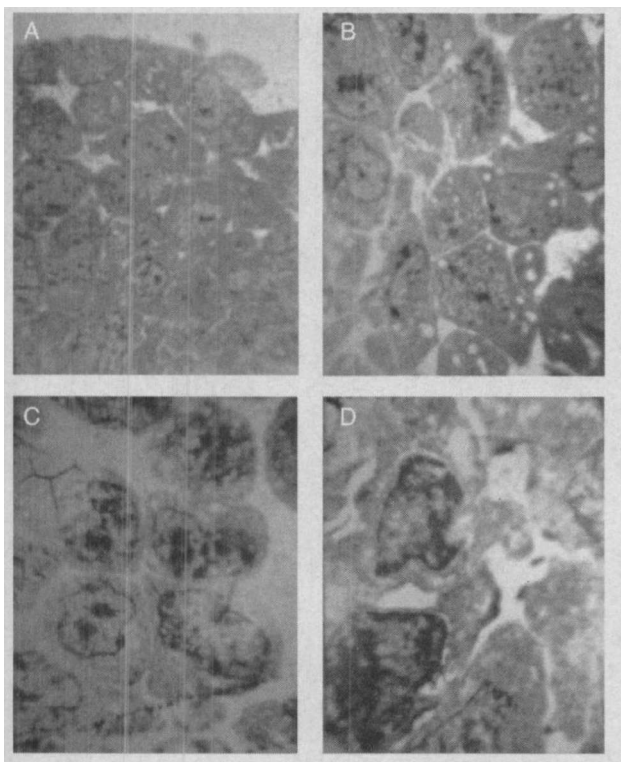


图 3

注:青年组 A1:颗粒细胞多层排列,胞质丰富,相邻细胞间可见紧密连接结构;模型组 B1:细胞间隙明显增大,胞质内线粒体出现空泡变,相邻细胞间连接结构消失;益坤宁组 C1:核膜结构清晰,线粒体空泡变,部分颗粒细胞核固缩,染色质凝聚;西药组 D1:核膜结构清晰,胞质内粗面内质网丰富,部分颗粒细胞染色质凝聚。

参考文献

- 1 Tilly JL, et al. Endocrinology 1991;129:2799.
- 2 Hughes Jr FM, et al. Endocrinology 1991;129:2415.
- 3 Kerr J F R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;24:239.
- 4 张雅萍, 王秀霞, 刘丽. 坤宁安丸对更年期大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及其相关基因 Bcl2 和 Fas 表达影响的实验研究. 中国中医药科技, 2001, 8(5): 2951.
- 5 Koos R D. Increased expression of vascular endothelial growth permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. Bio21 Reprod, 1995, 52(6): 1426~1435.
- 6 张晓金, 归绥琪, 徐丛剑. 补肾复方调控更年期大鼠卵巢功能的实验研究. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(19): 2044.
- 7 张雯. EG-VEGF 在人正常卵巢周期的表达. 四川大学硕士学位论文, 2005, 5(31).
- 8 Kamat Br, Brown LF, Manseau EJ, et al. Expression of vascular permeability factor or vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. Am J Pathol, 1995, 146: 157~165.
- 9 丁原全, 等. 补肾复方对围绝经期大鼠卵巢 VEGF 影响的实验研究. 中医药学刊, 2006, 4(24): 2404.

"Yi Kun Ning" and Its Effects on Regulating Aging Rats' Sex Hormone and on Ovary Repair

Zhang Guangmei

(First Clinical Medical School of Harbin Medical University, Harbin 150010, Heilongjiang Province)

Qi Qunyan

(Traditional Chinese Medicine University of Heilongjiang, Harbin 150040, Heilongjiang Province)

We made an experiment to observe the effects of Yi Kun Ning on the functionalities and structures of peri-menopause (PM) rats' ovary. In the experiment, thirty-two female wistar rats aged between 11 and 13 months (PM) were divided into a model group, a Yi Kun Ning group, and a western drug group. 10 other female rats aged 4 months were selected as a young control group. Sex hormone level, vascular endothelial growth factor (VEGF), granulosa cell apoptosis, cell morphology, and other indicators were measured to observe the effects of Yi Kun Ning on the functionalities and structures of rats' ovary. Experimental results show that there is a significant or very significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$) difference between the Yi Kun Ning group and the model group. The experiment confirms that Chinese medicine Yi Kun Ning is able to increase serum E2 and P levels in PM rats, with a reduced FSH and LH levels. It plays a role in increasing ovarian VEGF, and an inhibitory role on granulosa cell apoptosis. As a result, Yi Kun Ning prevents follicle atresia, and hence prevents and retards the aging of ovary.

Keywords: peri-menopause (PM); Yi Kun Ning; granulosa cell apoptosis; vascular endothelial growth factor (VEGF).

(责任编辑:王 瑀, 责任译审:邹春申)

全国首个有机中药材基地在亳州产生

日前,安徽德昌药业饮片有限公司中药材种植基地通过瑞士生态市场研究所(IMO)有机产品认证,认证面积 150 亩。中药材种植基地通过 IMO 的有机认证,这在国内还是首家。

有机产品生产基地是在最近 3 年内未使用过农药、化肥等违禁物质,种子或种苗来自于自然界,未经基因工程技术改造过,产品在收获、清洗、干燥、储存和运输过程中避免污染,从常规生产

系统向有机生产转换需要两年以上的时间,必须有完善的质量控制和跟踪审查体系、完整的生产和销售记录档案。

瑞士生态市场研究所是专业从事有机食品、生态纺织品、生态森林产品的国际认证机构。德昌药业中药材基地通过有机认证,将进一步增强出口竞争力,引导中药材种植向规范化、规模化、基地化发展。

(文 摘)