

· 论著 ·

补肾调肝中药抗大鼠卵巢衰老作用及其机制的实验研究

徐 波¹, 王俊玲¹, 刘晓伟²

(1. 南方医科大学附属深圳市妇幼保健院, 广东 深圳 518028; 2. 南方医科大学中医学院, 广东 深圳 518028)

摘要: 目的 探讨补肾调肝中药是否具有抗大鼠卵巢衰老的作用及其可能的机制。 方法 采用随机对照的研究方法进行实验动物分组, 放射免疫的方法进行血清 E2, IGF-1 的测定, ELISA 的方法进行 Inhibin B 的测定, 免疫组织化学的方法进行大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的检测。 结果 补肾调肝中药具有提高更年期与老年期组大鼠血清 E2 和降低 FSH 水平的倾向。补肾调肝中药处理不同年龄阶段的大鼠后对 Inhibin B 的水平无影响。IGF-1 在中年期和老年期药物治疗配对组有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与青春组大鼠比较, 老年大鼠卵巢颗粒细胞平均灰度值降低($P < 0.01$), 中年期和老年期药物治疗配对组有显著差异($P < 0.05$)。 结论 补肾调肝中药具有抗大鼠卵巢衰老的作用, 其机制可能与卵巢局部调节因子有关。

关键词: 卵巢衰老; 中医药

Empirical Study of Bushentiaogan Recipe on Rat Against Ovarian Ageing

XU Bo¹, WANG Jun-lin¹, LIU Xiao-wei²(1. Shenzhen maternal and child health care centre, South Medical University, Shenzhen 518028, China;
2. TCM college, South Medical University)

Abstract: Objective to investigate whether the bushentiaogan recipe possess function on rat against ovarian ageing and its potential mechanism. Methods rats were divided in trabant grouping. Blood serum E2, IGF-1 were determined by radioimmunity. Inhibin B was determined by ELISA. Granule cells apoptosis of rat were determined by immunohistochemical technology. Results Bushentiaogan recipe can improve serum E2 and decrease FSH level in climacteric and gerontic rats. It has no effect on Inhibin B level in different age grades. There is significant deviation in middle-age and gerontic rat on IGF-1 level after handling. The average gray scale of granule cells in gerontic rats decreased compared with the youth rats. It is significant deviation in middle-age and gerontic rat after handling. Conclusion The bushentiaogan recipe possess function on rat against ovarian ageing and its potential mechanisms may have relationship with local regulatory factors in ovary.

Key words: ovarian ageing; chinese medicine

卵巢衰老后由于性激素合成分泌功能下降, 可引起一系列严重并发症, 如绝经后骨质疏松, 绝经后综合症、心血管疾病、肥胖症及糖尿病, 对妇女身心健康造成极大的危害, 并加重家庭、社会负担。卵巢衰老后引起的一系列并发症, 目前多用雌激素替代疗法, 但长期应用外源性激素, 有致子宫内膜癌、乳腺癌等的危险^[1]。我国传统医学是医学界的宝库, 目前已经发现有些中药具有抗衰老的作用。本文从影响卵巢功能的局部因素着手, 通过研究大鼠不同年龄阶段卵细胞凋亡及其相关因子胰岛素样生长因子 1 (IGF-1), 抑制素 B (InhibinB) 表达水平的变化, 探讨卵巢衰老, 补肾调肝中药抗大鼠

卵巢衰老的作用及其机制, 为中医药抗卵巢衰老的研究, 最终开发抗卵巢衰老的新型中药奠定基础。

1 资料与方法

1.1 补肾调肝方的制备

补肾调肝方由肉苁蓉 15g、菟丝子 15g、川断 15g、蛤蚧 1对、白芍 20g、麦芽 30g、远志 10g、甘草 10g 组成, 购于南方医科大学附属南方医院中药房, 由中医学院药用植物鉴定教研室专家鉴定, 中药新药实验室协助制备。常规煎煮 2 次后取汁, 低剂量用蒸馏水稀释, 高剂量经 75℃ 恒温水浴浓缩, 制成含生药高压灭菌, 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 实验动物分组及处理

收稿日期: 2008-05-14

基金项目: 广东省中医药局科研立项 103118

实验动物:健康 Wistar 大鼠 70 只,大鼠及饲料购自南方医科大学实验动物中心(动物合格证号:粤检证字第 2005A048 号)。随机分为 A 组(青春期,5 月龄大鼠)10 只;B 组(中年期,10 月龄大鼠)20 只,分为 B1 组(中药处理)和 B2 组(对照),每组各 10 只;C 组(更年期,18 月龄大鼠)20 只。分为 C1 组(中药处理)和 C2 组(对照),每组各 10 只;D 组(老年期,24 月龄大鼠)20 只。分为 D1 组(中药处理)和 D2 组(对照),每组各 10 只。在室温 22-26℃ 安静环境下饲养,喂以固定的平衡饲料。所有动物置于同一室内饲养,观察其动情周期情况。如果出现动情周期,则在动情周期当日取眼眶静脉血 2ml;如果未出现动情周期,则在角化细胞百分数最大值当日取血,标本冻存于-20℃ 冰箱中保存。饲养一周后处死 A 组大鼠,剖取卵巢标本,常规处理后,-30℃ 冻存备检。B1、C1、D1 组大鼠与 B2、C2、D2 组大鼠分别给予补肾调肝方水煎浓缩液 1ml(每毫升含生药 4.19 毫克)灌胃和给予生理盐水 1ml 灌胃,每天一次,连续四周。四周后观察其动情周期,如果出现动情周期,则在动情周期当日取眼眶静脉血 2ml;如果未出现动情周期,则在角化细胞百分数最大值当日取血,血清标本冻存于-20℃ 冰箱中保存。一周后处死大鼠,剖取卵巢标本,常规处理后,-30℃ 冻存备检。

1.3 实验试剂和仪器

E2、FSH、IGF-1 放射免疫试剂盒,分别购至北京北方生物研究所和 SANTACRUZ 公司;Inhibin B 检测试剂盒购自美国 Diagnostic Systems Laboratories 公司;细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司。LeicaRM2135 切片机(德国 Leica 公司);HH.SY11 Wi 电热恒温水浴锅(北京长源实验设备厂);可调式微量加样器(法国 GilsonSAS 公司);Olympus 光学显微镜(日本 Olympus 公司);StatFax 2100 型全自动酶联免疫分析仪(美国 Awareness 公司);高速台式离心机(上海医用分析仪器厂);Q550CW 图像分析系统(德国 LEICA 公司)。

1.4 统计学分析

实验结果用 SPSS10.0 统计软件分析,用均数±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。多个样本均数比较用单因素方差分析,两组间均数的比较采用独立样本 t 检验,显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 阴道脱落细胞学

每天下午 3 点,各组取大鼠阴道脱落细胞做涂片,置光学显微镜下观察其动情周期变化。统计每组大鼠出现动情周期的例数。A 组为 2%,B1、B2 组分别为 5%与 7%,C1、C2 组分别为 70%与 25%,D1、D2 组分别为 90%与 35%。A、B1、B2 组三组之间无显著差异($P > 0.05$),C1、D1 组无显著差异($P >$

0.05),C1、C2 有显著差异($P < 0.01$),D1、D2 组有显著差异($P < 0.01$)。说明补肾调肝中药有抗大鼠卵巢衰老作用的趋势。

2.2 血清 E₂、FSH 测定

大鼠用乙醚麻醉后,从心脏抽取血液,离心制备血清,-20℃ 冻存,备用。用放免法测定血清 E₂、FSH 含量(见表 1)。

表 1 各组大鼠血清 E₂、FSH 比较

组别	例数	E ₂ (ng/L)	FSH(Iu/L)
A 组	10	15.06 ± 0.01	1.26 ± 0.85
B2 组	10	14.12 ± 0.80	1.34 ± 0.52 [#]
B1 组	10	14.27 ± 0.20	1.28 ± 0.38 [#]
C2 组	10	8.04 ± 0.21 ^{**}	3.98 ± 0.57 ^{**}
C1 组	10	12.10 ± 0.16 [*]	1.51 ± 0.55 [*]
D2 组	10	7.06 ± 0.21 ^{**}	4.08 ± 0.34 [*]
D1 组	10	11.10 ± 0.05 [*]	2.70 ± 0.28 [*]

与青春组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $P > 0.05$ 。

与药物组相比: $P < 0.05$, $P < 0.01$, # $P > 0.05$ 。

血清激素水平测定显示 FSH 水平升高, E₂ 水平下降是卵巢衰老最主要特征,其中最敏感的是血清 FSH 水平升高,FSH 升高是卵巢衰老的早期指标。补肾调肝中药具有提高更年期与老年期组大鼠血清 E₂ 和降低 FSH 水平的倾向($P < 0.01$),对中年期大鼠的作用,二组比较无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 血清 Inhibin B 测定

Inhibin B 测定,采用双抗体夹心酶联免疫吸附技术(sandwichELISA),线性范围 7~1000pg/ml,结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清 Inhibin B 测定比较

组别	例数	Inhibin B(Iu/L)
A 组	10	6.68 ± 0.61
B2 组	10	6.16 ± 0.04
B1 组	10	6.07 ± 0.00 [#]
C2 组	10	4.40 ± 0.21 [*]
C1 组	10	4.10 ± 0.16 ^{*#}
D2 组	10	3.07 ± 0.12 ^{**}
D1 组	10	3.00 ± 0.05 ^{***#}

与青春组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $P > 0.05$

与药物组相比: $P < 0.05$, $P < 0.01$, # $P > 0.05$

从实验可见青春组与中年期组和老年期组有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),但药物治疗配对组无显著差异($P > 0.05$),表明 Inhibin B 与卵巢衰老的发生显著相关,补肾调肝中药处理不同年龄阶段的大鼠后对 Inhibin B 的水平无影响。

2.4 IGF-1 测定

采用放射免疫方法测定, 结果见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IGF-1 测定比较

组别	例数	IGF-1 ng/ml
A 组	10	368.56 ±120.11
B2 组	10	337.98 ±126.50 [#]
B1 组	10	368.63 ±115.13
C2 组	10	228.09 ±185.23
C1 组	10	306.64 ±121.16
D2 组	10	204.78 ±115.14
D1 组	10	289.53 ±102.75

与治疗组相比: $P < 0.05$, $P < 0.01$, $\# P > 0.05$

从实验可见更年期和老年期药物治疗配对组有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明补肾调肝中药可以上调更年期和老年期大鼠卵巢局部生长因子 IGF-1 的水平。

2.5 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的表达

给药 4 周后各组动物处死取材, 迅速分离卵巢, 置于 10% 的中性甲醛溶液中固定 24h 小时, 常规程序脱水后石蜡包埋, 组织块连续切片, 厚 5 μ m, 分别行 HE 染色、免疫组化染色, 显微镜下观察, 每张切片随机选包含卵泡颗粒细胞的 3 个视野, 采用 Q550CW 图像分析系统进行灰度分析, 根据切片中卵巢组织卵泡内颗粒细胞免疫组织化学染色的深浅分为 4 级, 细胞质呈棕色为阳性, 未被染色为阴性表达(-), 浅棕色为弱阳性表达(+), 棕黄色为中度阳性表达(++), 棕褐色为强阳性表达(+++). 镜下观察, 灰度分析结果显示, 与青春组大鼠比较, 老年大鼠卵巢颗粒细胞平均灰度值降低 ($P < 0.01$), 中年期和老年期药物治疗配对组有显著差异 ($P < 0.05$). 说明衰老可以使卵巢颗粒细胞凋亡加重, 而补肾调肝中药可以不同程度地抑制卵巢颗粒细胞的凋亡。

3 讨论

近 10 年来, 卵巢早衰的发生率有升高的趋势。我国目前已逐渐向老年社会迈进, 研究卵巢衰老及抗卵巢衰老的方法对延缓妇女衰老过程, 提高妇女生活质量也具有重要的意义。卵巢衰老的相关病因复杂, 发病机理尚不清楚^[9]。目前西医治疗多采用雌孕激素的人工周期疗法, 但由于有副作用和禁忌证, 患者难以接受。研究如何使用中药, 减缓卵巢功能衰退的速度提高卵巢功能, 提高生活质量, 是目前生殖内分泌临床研究的一项重要课题, 值得进一步研究。

卵巢衰老是一个复杂的生物学过程。卵巢早衰的机制尚未阐明, 可能与遗传因素、免疫因素、激素受体异常、酶缺陷

及异常有关, 此外, 卵巢卵泡生成障碍及闭锁加速也是重要的原因之一。如果能促进卵泡的发育或减少卵泡的闭锁, 就有可能使卵巢的功能延长。近年来研究表明颗粒细胞的凋亡是触发卵泡闭锁的根本原因。细胞凋亡是一系列基因指导的生物学过程。这些基因在卵泡颗粒细胞中的不同表达调节着卵泡的发育和闭锁。此外, 卵巢分泌的细胞因子、激素, 也通过自分泌/旁分泌的作用影响卵泡的发育和闭锁。颗粒细胞分泌的胰岛素样生长因子 (IGF-1) 能刺激颗粒细胞 DNA 的合成, 促进卵泡发育, 并能有效抑制体外预排卵卵泡颗粒细胞凋亡的发生。颗粒细胞分泌的抑制素 B(inhibin B) 的含量在衰老的卵巢中明显减少。目前, 抑制素 B 被公认为是衡量卵巢贮备能力、卵巢衰老的理想指标^[9]。

卵巢衰老后引起的一系列并发症, 目前多用雌激素替代疗法, 虽有一定的疗效, 但长期应用外源性激素, 有致子宫内膜癌、乳腺癌等的危险。我国传统医学是医学界的宝库, 目前已经发现有些中药具有抗衰老的作用。施艳秋[4]报道, 乌鳖口服液能提高血清 E2, 降低 LH, FSH 水平, 能恢复女性卵巢功能, 调节内分泌, 改善症状, 延缓衰老的过程。李会云[5]等也探讨了滋补肝肾类中药对更年期综合征的临床疗效总有效率 96%, 认为滋补肝肾类中药具有延缓卵巢功能衰退和改善更年期症状的作用。

中医学认为卵巢早衰属“血枯”、“血隔”、“闭经”等范畴, 肾气不足, 肾精亏耗是本病发病的基本病因; 气血虚弱, 是本病发病的次要病因, 其次情志郁结, 气血暗耗, 冲任失调或六淫时毒, 浸淫胞脉, 扰乱冲任是本病发病的主要诱因。肾虚血亏, 虚实夹杂, 以肾虚为主导, 血虚为基础, 虚为本, 实为标, 虚多实少形成了卵巢早衰的病机特点。

近来的研究也表明补肾中药能调节内分泌, 改善症状, 延缓卵巢的衰老过程。肝主疏泄, 能畅达气机, 调节情志, 肝气调达, 气流畅通, 冲任和调, 则经、孕、产、乳正常; 一有情志所伤, 至肝气郁滞, 气郁血瘀, 郁久化火, 暗耗气血, 不能荣肾填精, 滋润冲任, 血海空虚, 渐致本病。故有“女子以肝为先天”之说, 肾主生殖, 调节冲任, 肝肾同源。因此强调补肾调肝为治疗卵巢衰老的基本法则^[9]。

本方中肉苁蓉补肾助阳益精血, 与菟丝子平补阴阳, 川断肝肾同补, 三者同用补肾为君; 蛤蚧为血肉有情之品, 加强补肾作用为臣; 白芍养血敛阴柔肝, 麦芽“虽为脾胃之药, 而实善疏肝气”, 远志苦泄温通, 擅疏通气血之雍滞, 三者调肝为佐; 甘草调和诸药为使; 共呈补肾调肝之法。本研究结果已经显示: 补肾调肝中药能不同程度抑制大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡, 并可能通过上调卵巢局部因子 IGF-1 的分泌达到延缓卵巢衰老的作用。因此, 我们认为, 补肾调肝类中药具有抗衰老的作用, 其对卵巢的作用有可能通过影响卵巢的局部调节

因素达到延缓卵巢衰老的目的。相关研究值得进一步进行。

参考文献:

- [1]王玉真,陈新娜,李美芝.卵巢早衰治疗策略探讨[J].中国实用妇科与产科杂志, 2002, 18(12): 734- 736
- [2]谭贝加, 马红. 卵巢早衰研究进展[J]. 天津中医药, 2007, 24 (3): 260- 261
- [3]Swanton A, Child T. Reproduction and ovarian ageing [J]. J Br Menopause Soc. 2005, 11(4):126- 31.
- [4]施艳秋, 时燕萍, 朱萱萱等. 乌鳖口服液治疗卵巢功能早衰的临床与实验研究总结[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4 (3): 424- 427.
- [5]李会云, 高镇南. 中医药治疗绝经前后诸症 50 例[J]. 陕西中医, 2002, 23 (5): 409.
- [6]贺爱华. 中医论治卵巢早衰[J]. 吉林中医药, 2007, 27 (7): 1- 2.

编辑/任鸿兰

对感觉统合失调儿童进行体育游戏训练的实验研究

邓邦桐¹, 邱永红¹, 范永强²

(1 广东省广州医学院, 广东 广州 510182; 2. 广州医学院荔湾医院, 广东 广州 510170)

摘要: 目的 本研究主要考察体育游戏对治疗儿童感觉统合失调的干预效果。方法 本研究采用滑板滑梯等专门的体育游戏实验, 对 1141 名患有感觉统合失调的儿童进行干预。结果 体育游戏干预的有效率在 91%以上, 干预效果有显著性差异。结论 对患有感觉统合失调的儿童进行体育游戏干预疗效明显; 建议及早对这类儿童进行体育游戏干预。

关键词: 儿童; 体育游戏; 感觉统合失调; 干预; 有效率

1 提出问题

感觉统合失调(Sensory Integration Dysfunction, 简称 SID)是在儿童生长发育过程中由于各种各样原因导致的一系列功能障碍。美国心理学家、南加州大学的爱尔丝博士(Dr. Jean Ayles)在 1969 年就通过将脑神经学与发展心理学相结合, 根据对脑功能研究、职业治疗及实验研究结果指出:人的大脑将从各种感觉器官传来的感觉信息进行多次分析、综合处理, 并作出正确的应答, 使个体在外界环境的刺激中和谐有效地运作^[1]。当大脑对感觉信息的统合发生问题时, 就会使肌体不能有效地运作。任何原因使个案无法将环境中所接触到的各种感觉刺激加以组织、整合, 使整个身体不能和谐有效地运作, 称为感觉统合失调 (Sensory Integration Dysfunction, SID)^[2]。

从目前国内外研究报道看, 感觉统合失调的病因可能是生物、心理、社会等因素共同作用的结果, 可造成儿童学习与交往困难及行为障碍, 严重影响儿童的心理健康发展。据报道, 儿童感觉统合失调在学龄前及学龄儿童中发病率较高, 2004 年吴汉荣^[3]等通过对 264 名 3~6 岁的儿童调查中发现,

高达 36.74%的儿童有不同程度的感觉统合失调。2001 年在北京的调查研究中发现, 感觉统合失调的儿童为 29.4%^[4], 而南京地区 2539 名 6~11 岁的学龄儿童进行调查的结果显示, 33.67%的学龄儿童存在不同程度的感觉统合失调症^[5]。2004 年在合肥适龄儿童的调查中, 感觉统合失调的发病率也高达 34.7%^[6]。可见, 相当数量的感觉统合失调障碍儿童的存在, 严重地困扰着我国教育的发展。

2 研究对象与方法

2.1 研究对象

本研究的对象为广州医学院儿童感觉统合训练基地 2004 年 12 月~2006 年 12 月在训的 1141 例 3~13 岁有感觉统合失调儿童, 平均年龄 6.93±5.25。其中男童 871 人, 占 76.3%, 女童 270 人, 占 23.7%, 经“爱尔丝儿童感觉统合能力量表”测评, 1141 名儿童 SID 值均在 40 分以下。

从失调的程度看, 男童患有轻度失调 82 人, 占 9.41%; 中度失调 383 人, 占 43.97%; 重度失调 406 人, 占 46.62%。女童患有轻度失调 17 人, 占 6.30%; 中度失调 142 人, 占 52.60%; 重度失调 111 人, 占 41.10% (如表 1)。

收稿日期: 2008-04-23