

补肾益冲丸延缓大鼠卵巢早衰实验研究

宁晔, 刘小婷, 宁艳, 单志群, 许志茆

深圳市中医院妇产科, 广东 深圳 518033

[摘要] 目的: 研究补肾益冲丸对卵巢早衰大鼠动物的干预作用。方法: 建立卵巢早衰大鼠动物模型, 在上述模型基础上, 相应给药, 监测空白对照组、中药组、倍美力组、造模对照组大鼠的情况及检测血清激素 [促卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E_2)]、抗卵巢抗体水平。结果: 造模第 10 天开始, 中药组、倍美力组、造模对照组 3 组大鼠均不同程度出现容易激惹、大便秘结, 毛无光泽, 体毛蓬松, 脱毛的症状, 动情周期紊乱等, 有的阴道涂片仅有动情间期的白细胞。灌胃后 30 天, 中药组、倍美力组 FSH、LH 降低, E_2 升高, 与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。灌胃后 30 天, 中药组血清抗卵巢抗体下降, 与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 补肾益冲丸对卵巢早衰模型大鼠的 FSH、LH、 E_2 有改善作用, 亦可调节免疫功能, 改善机体免疫状态, 恢复卵巢功能, 而达到治疗卵巢早衰的功效。

[关键词] 卵巢早衰; 补肾益冲丸; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R711.75 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 06-0268-02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.06.126

卵巢早衰 (POF) 是指妇女在 40 岁以前由于卵巢功能衰退而引起月经失调、不孕、性功能降低、更年期综合征等一系列症状的疾病。因此, 探讨 POF 的有效治疗方法十分必要。中医药具有整体调控和多靶点、多方式调节的特点, 特别是能提高卵巢对促性腺激素的反应性和卵巢中性激素受体的含量, 促使卵巢功能恢复和改善, 且与西药相比无任何毒副作用, 安全而有效, 因而对女性卵巢功能失调类疾病的防治显示出优势^[1]。

补肾益冲丸是取得广东省药监局批准文号的科研制剂, 研究表明, 该药可提高排卵和妊娠率, 对接受试管婴儿助孕技术患者胚胎着床、成功妊娠的疗效肯定^[2]。在本院临床上长期用于治疗月经失调、不孕症等病症。近年来随着 POF 患者的日益增多, 本药被用于此病肾虚型患者的治疗, 临床疗效明显。现拟通过 POF 动物模型的实验研究, 揭示补肾益冲丸对 POF 的作用机理。

1 材料与方

1.1 实验动物 清洁级雌性成熟未交配过的 SD 大鼠 40 只, 12 周龄, 体重 250~270 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物 中药制备: 补肾益冲丸由广东省药监局批准、深圳市中医院制剂室提供 (2000 年深卫制剂第 3P-036 号, 2003 年广东省药监局批准文号: 粤药制字 Z03030012), 每 10 g 含生药 21.9 g, 组成: 熟地黄, 当归、白芍、山茱萸、黄精、

紫河车粉, 鹿角胶、续断、菟丝子、巴戟天、淫羊藿、香附。用法: 实验时按所需分量将药丸配置成混悬液备用。倍美力溶液制备: 每片 0.625 mg [由美国惠氏艾尔斯特制药公司艾尔斯特药厂制造, 惠氏制药有限公司分装, 生产批号 0502090, 国药准字 (2001) J-51 (2) 号], 生理盐水溶解定容。

1.3 造模方法 所有雌性大鼠每天进行阴道细胞涂片检查, 选择动情周期 4~5 天的大鼠, 随机分为中药组、倍美力组、造模对照组、空白对照组。中药组、倍美力组、造模对照组以雷公藤多甙片 50 mg/kg 灌胃造模, 每天 1 次, 连续灌胃 14 天^[3]。空白对照组: 连续生理盐水 2 mL/kg 灌胃 14 天。中药组: 造模结束后 24 h 用补肾益冲丸混悬液 (按成人等效剂量 8 倍于成人剂量) 24 g/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 30 天。倍美力组: 造模结束后 24 h 用倍美力 0.075 mg/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 30 天。造模对照组: 造模结束后 24 h 用生理盐水 2 mL/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 30 天。空白对照组: 继续生理盐水灌胃 2 mL/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 30 天。

1.4 一般情况观察 活动: 有无活动抑制、嗜睡、厌食、旋转、轻瘫等行为异常。粪便、尿液或身体其他排出物有无带血。有无立毛、体毛蓬松、脱发, 肿胀、肿块、损伤等情况。若有动物死亡, 记录死亡数量及原因, 考虑中途因灌药 / 喂养不当等死亡原因。

1.5 采血检测 灌胃后第 1 天及处死当天各组大鼠, 乙醚吸入麻醉后, 眼眶下静脉丛取血。取血 3 mL 注入干燥管, 离

[收稿日期] 2014-12-30

[基金项目] 深圳市科技计划项目 (201102200)

[作者简介] 宁晔 (1974-), 女, 主管护师。

心,取血清,储存于-20℃冰箱备用,用以检测血清激素[促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)]水平。采用罗氏电化学发光法测定。将血清放入测定管后由 Elecsys 2010 Roche 全自动电化学发光免疫分析仪(瑞士 Roche 公司)自动完成。用间接 ELISA 方法检测抗卵巢抗体,试剂盒由上海玉兰生物技术研究所提供,每次实验均按试剂盒说明书操作。血清按 1:20 稀释,结果以酶标仪读数判断。

1.6 卵巢检测 处死各组大鼠后,观察双侧卵巢大体解剖,并取下双侧卵巢组织,用 10%(体积分数)的甲醛液固定,常规石蜡包埋、切片,待做 HE 染色及免疫组织化学分析,光镜观察卵巢的组织形态改变、卵泡的大小发育情况。

1.7 统计学方法 结果以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS11.0 软件进行

统计分析。先以 AVONA 进行方差分析(样本量小时用 Kruskal-Wallis H 检验),计量资料再用 *t* 检验在分组均值之间做成对比较。活仔率等计数资料用 χ^2 检验。

2 实验结果

2.1 一般形态 造模第 10 天开始,中药组、倍美力组、造模对照组 3 组大鼠均不同程度出现容易激惹、大便干结,毛无光泽,体毛蓬松,脱毛的症状,动情周期紊乱等,有的阴道涂片仅有动情间期的白细胞。

2.2 各组大鼠血清激素变化比较 见表 1。造模结束后 30 天,中药组、倍美力组 FSH、LH 降低, E₂ 升高,与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清激素变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FSH(mIU/mL)		LH(mIU/mL)		E ₂ (pg/mL)	
		造模结束后第 1 天	造模结束后第 30 天	造模结束后第 1 天	造模结束后第 30 天	造模结束后第 1 天	造模结束后第 30 天
空白对照组	10	11.05± 1.36	11.26± 1.85	8.16± 1.39	8.08± 1.92	754.39± 80.47	748.41± 88.02
中药组	10	13.25± 1.67 ^①	11.20± 1.74	8.85± 1.26 ^①	8.02± 0.87	602.75± 68.46 ^①	725.59± 82.48
倍美力组	10	13.83± 2.01 ^①	12.94± 1.15	8.74± 1.31 ^①	8.26± 1.26	608.76± 89.43 ^①	738.29± 65.47
造模对照组	10	13.71± 1.62 ^①	13.68± 2.53 ^①	8.95± 2.03 ^①	8.56± 1.73 ^①	612.58± 76.17 ^①	638.59± 74.39 ^①

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$

2.3 各组大鼠血清抗卵巢抗体变化比较 见表 2。造模结束后 30 天,中药组血清抗卵巢抗体下降,与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清抗卵巢抗体变化比较($\bar{x} \pm s$) OD

组别	n	造模结束后第 1 天	造模结束后第 30 天
空白对照组	10	1.49± 0.18	1.50± 0.25
中药组	10	1.92± 0.25 ^①	1.61± 0.38
倍美力组	10	1.95± 0.33 ^①	1.91± 0.24 ^①
造模对照组	10	1.93± 0.27 ^①	1.89± 0.19 ^①

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$

3 讨论

POF 为临床常见病、疑难病,其发病率逐年增加,其发生率约为 1%,卵巢状态与正常绝经后相似,严重影响妇女身心健康。其发病原因尚不明确,有学者认为可能与自身免疫、遗传因素,促性腺激素及其受体传导缺陷,原始卵泡储备少,以及物理化学因素等有关^[4]。探讨 POF 的有效治疗方法十分必

要。本研究探讨补肾益冲丸对 POF 大鼠动物的干预作用,初步阐明了作用机理。实验结果表明,补肾益冲丸对 POF 造模大鼠的 FSH、LH、E₂ 有改善作用,亦可调节免疫功能,改善机体免疫状态,恢复卵巢功能,而达到治疗 POF 的功效。

[参考文献]

- [1] 张蕾,曲季芬. 卵巢早衰的中医药治疗研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 10-12.
- [2] 许爽君,杨水清,王建萍,等. 补肾益冲丸的毒理学实验研究[J]. 中国中医急症, 2007, 16(7): 852-853.
- [3] 高慧,杨涓,夏天,等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵巢相关因子 TNF- α 、IFN- γ 蛋白和基因表达的影响[J]. 国医论坛, 2008, 23(3): 38-39.
- [4] 王迪华,梁雪雯,周红. 逍遥助卵煎对卵巢早衰患者血清性激素水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(33): 4687-4688.

(责任编辑: 骆欢欢)