

菟丝子黄酮对心理应激雌性大鼠海马-下丘脑-垂体-卵巢轴性激素受体的影响

柯江维¹, 王建红², 赵 宏^{2*}

(1. 江西省儿童医院, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

生殖内分泌系统是易受应激损伤的一个系统, 心理应激可引起生殖内分泌紊乱, 引发生殖内分泌疾病。目前西医对此类疾病尚缺乏有效的调节手段, 主要以激素替代治疗, 长期应用激素均有明显的副作用, 且疗效不确定, 而中医药具有整体调控和多靶点、多方式调节的特点, 因而对女性卵巢功能失调类疾病的防治显示出一定的优势。现代中西医结合基础研究表明, 肾与下丘脑-垂体-卵巢轴及生殖内分泌相关。中医认为卵巢功能失调与肾、肝、脾、瘀血有密切关系, 肾虚是其根本原因, 肾虚是由于介导神经内分泌免疫网络系统平衡功能的相关物质的基因表达出现异常, 使神经内分泌免疫的功能失衡^[1], 治疗当以补肾为主, 因肾为先天之本, 藏经, 主生殖, 补肾中药对下丘脑、垂体、卵巢等存在着多元性和双向性的调节作用。菟丝子是旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的成熟种子, 为温补肾阳的要药, 在中医临床上应用广泛, 尤其在治疗生殖内分泌失调类疾病方面。菟丝子主要成分为黄酮类化合物, 本研究研究了菟丝子黄酮对模型大鼠海马-下丘脑-垂体雌激素受体 (ER) 及卵巢促卵泡激素受体 (FSHR)、促黄体 (生成) 激素受体 (LHR) 的影响。

1 材料

1.1 药物: 菟丝子药材经江西省儿童医院中药鉴定教研室鉴定为菟丝子 *C. chinensis* Lam. 的成熟种子, 经溶剂提取, 聚酰胺柱色谱分离得黄酮提取物, 聚酰胺薄层色谱表明含有槲皮素、金丝桃苷、紫云英苷和槲皮素-3-O- β -半乳糖-7-O- β -葡萄糖 4 个组分, 与文献报道一致^[2]; 以芦丁为标准对照品, 比色法测定黄酮质量分数为 40% ~ 45%。实验中配成 10、5 mg/mL 混悬液 (分别相当于生药 2、1 g/mL)。调经促孕丸 (北京同仁堂制药厂), 购自南昌市黄庆仁药店, 批号 2030118, 实验中配成 90 mg/mL 溶液。

1.2 主要试剂: ER 兔多克隆抗体 (美国 Neo-

Markers 公司生产); FSHR 羊多克隆 (R-20) 抗 IgG、Lutropin (S-20) 羊多克隆抗 IgG (均由美国 Santa Cruze 公司生产); SP9001 Rabbit SP Kit、SP9003 Goat SP Kit (均由北京中山公司生产); 聚氧乙烯 20、牛血清白蛋白 (BSA)、硫酸镍铵。

1.3 仪器: DVPM 图像分析仪 (南京长城信息技术公司); Imago-proplus 图像分析软件 (美国冷泉仪器公司); Olympus 1×70 倒置显微镜 (日本生产); 美的 KD25B—C 型黑金星微波炉 (产自广东省顺德市); 切片机 (上海机械厂); 声-光-电复合应激刺激装置 (自制)。

1.4 动物: SD 雌性大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 江西省实验动物中心提供。室温 (20±2) , 自然光照, 自由进水进食。

2 方法

2.1 动物分组: 取 SD 大鼠 50 只, 适应 2 d, 以后每天检查阴道涂片观察动情周期的变化。随机分为 5 组: 正常对照组, 模型组, 菟丝子黄酮高、低剂量组, 阳性对照组 (调经促孕丸组), 选择连续有 2 个正常动情周期的大鼠用于造模实验, 其余淘汰。

2.2 给药方法: 上述 5 组动物, 分别 ig 给予生理盐水、生理盐水、菟丝子黄酮 20、10 g/kg、调经促孕丸 0.9 g/kg。给药同时, 除正常对照组外, 各组进行心理应激刺激^[3], 造模 20 d。造模停止后, 各组继续给药 5 d, 每天 1 次, 即给药共 25 d。

2.3 ER、FSHR 和 LHR 检测: 迅速取大鼠海马、下丘脑、垂体及卵巢, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 作病理切片, 进行免疫组化试验。ER 检测用 N-DAB 显色法, 阳性物质是蓝黑色而不是棕黄色, 位于神经元的细胞核内; FSHR 检测用 DAB 显色法, 阳性物质是棕黄色, 主要位于卵巢颗粒细胞的细胞膜上; LHR 检测用间接方法测定^[4,5], 即用抗黄体生成素 (LH) 抗体与黄体生成素结合位点反应, 来判断

* 收稿日期: 2005-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (39960026)

作者简介: 柯江维 (1972—), 男, 硕士研究生, 主管检验师, 主要从事心理应激与免疫和内分泌系统疾病的研究, 近年发表相关学术论文 10 余篇。Tel: (0791) 6813632 6951537 E-mail: kjjw0791@163.com

LHR 量的多少,二者是成正比的关系。用 DAB 显色,阳性物质是棕黄色,主要位于卵泡内膜细胞、间质细胞和黄体颗粒细胞的细胞膜上。用 DVPM 图像分析仪分别定量分析 ER 和 FSHR、LHR。每种组织选 10 张切片,每张切片随机观察 10 个视野(40×物镜),测定积分吸光度(IA),以 IA 分别表示 ER、FSHR、LHR 在相应组织表达的相对强度。

2.4 统计学方法:各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 t 检验,在 SPSS10.0 软件包上完成。

3 结果

3.1 对大鼠海马中 ER 水平的影响:见表 1。与正常组比较,模型组大鼠海马内 ER 的水平明显降低,差异显著($P < 0.05$);菟丝子黄酮高、低剂量组和调经促孕丸组 ER 的水平明显高于模型组,差异非常显著($P < 0.01$);菟丝子黄酮高、低剂量组与调经促孕丸组比较,差异显著($P < 0.05, 0.01$),说明在海马部位虽然菟丝子黄酮两个剂量都达不到调经促孕丸组的效果,但高剂量比低剂量作用大些。

3.2 对大鼠下丘脑中 ER 水平的影响:见表 1。与正常组比较,模型组大鼠下丘脑内 ER 水平明显降低,差异显著($P < 0.05$);菟丝子黄酮高、低剂量组和调经促孕丸组下丘脑内 ER 水平明显高于模型组,差异显著($P < 0.01, 0.05$);菟丝子黄酮高剂量组和调经促孕丸组 ER 水平比较,差异无显著性($P > 0.05$);而菟丝子黄酮低剂量组和调经促孕丸组 ER 水平比较,差异非常显著($P < 0.01$),说明在下丘脑部位菟丝子黄酮高剂量作用效果接近调经促孕丸。

3.3 对大鼠垂体中 ER 水平的影响:见表 1。与正常组比较,模型组大鼠垂体内 ER 水平明显降低,差异非常显著($P < 0.01$);菟丝子黄酮高剂量组和调经促孕丸组 ER 水平与模型组比较,差异非常显著($P < 0.01$),而菟丝子黄酮低剂量组不能阻止垂体 ER 水平下降的趋势,说明在垂体部位菟丝子黄酮高剂量作用明显好于低剂量。

3.4 对大鼠卵巢 FSHR 和 LHR 水平的影响:见表 2。与正常组比较,模型组大鼠卵巢内 FSHR 水平明显升高,而 LHR 水平明显降低,差异非常显著($P < 0.01$);菟丝子黄酮高、低剂量组 FSHR 水平与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$),而菟丝子黄酮高、低剂量组 LHR 水平与模型组比较差异显著($P < 0.01, 0.05$)。说明高剂量菟丝子黄酮对上调卵巢内 LHR 的表达作用显著,但不能下调卵巢内 FSHR 的表达;调经促孕丸组 FSHR 和 LHR 水平

与模型组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$);菟丝子黄酮高剂量组 FSHR 和 LHR 与调经促孕丸比较差异无显著性($P > 0.05$),而低剂量组 FSHR 和 LHR 水平与调经促孕丸组比较差异显著($P < 0.05$)。

表 1 菟丝子黄酮对心理应激大鼠海马、下丘脑和垂体 ER 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of flavonoids from *Semen Cuscutae* on ER level in hippocampus, hypothalamus and pituitary of rats exposed to psychological stress ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	各部位 ER 水平		
			海马	下丘脑	垂体
正常	-	9	22.33±6.97	32.65±4.90	42.45±7.86
模型	-	8	13.45±2.87*	18.19±1.12*	24.44±6.86**
菟丝子黄酮	10	8	27.03±2.63	34.18±6.79	28.43±1.66
	20	9	37.84±6.99	47.65±15.95	50.24±2.50
调经促孕丸	0.9	8	49.70±8.47	56.48±19.60	45.42±4.64

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
与模型组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$
与调经促孕丸组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group
 $P < 0.05$ $P < 0.01$ vs model group
 $P < 0.05$ $P < 0.01$ vs Tiaojingcuyun Pill group

表 2 菟丝子黄酮对心理应激大鼠卵巢内 FSHR 和 LHR 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of flavonoids from *Semen Cuscutae* on FSHR and LHR levels in ovary of rats exposed to psychological stress ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	FSHR	LHR
正常	-	9	68.97±16.21	99.16±12.93
模型	-	9	102.44±8.28*	72.03±10.47**
菟丝子黄酮	10	8	101.90±13.60	84.74±15.07
	20	9	97.89±15.98	104.31±16.70
调经促孕丸	0.9	8	86.68±16.71	101.60±15.40

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $P < 0.05$
 $P < 0.01$; 与调经促孕丸组比较: $P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs normal group; $P < 0.05$ $P < 0.01$ vs model group; $P < 0.05$ vs Tiaojingcuyun Pill group

4 讨论

本课题组对菟丝子的生殖内分泌调节作用进行了较多研究。发现菟丝子对下丘脑-垂体-性腺轴功能有多方面的作用^[6],它能促进下丘脑-垂体促性腺功能,提高垂体对促性腺激素释放激素的反应性,促进卵泡发育,对血浆 LH 水平虽无明显影响,但能增强卵巢 HCG/LH 受体数目与功能;菟丝子及菟丝子黄酮可明显增加幼年雄鼠睾丸及附睾质量^[7];并发现其本身具有类雌激素样活性。

菟丝子属于补益肝肾的中药,菟丝子有效部位菟丝子黄酮对心理应激导致的卵巢内分泌功能降低

具有明显的调节作用^[8],它能够显著提高心理应激大鼠雌二醇(E₂)、黄体酮(P)的水平,同时也能提高垂体 LH 的水平,下丘脑 β-内啡肽(β-EP)的水平,但并不影响垂体 FSH 水平。本研究发现心理应激大鼠海马-下丘脑-垂体 ER 及卵巢 LHR 水平下降,而卵巢 FSHR 水平升高,菟丝子黄酮能上调模型大鼠海马-下丘脑-垂体 ER 及卵巢 LHR 的表达,但对卵巢 FSHR 表达的影响不明显,可能是由于 FSHR 和 LHR 在卵巢分布的部位不同,如 FSHR 主要分布在颗粒细胞表面,而 LHR 主要分布在卵泡内膜细胞表面,造成 FSHR 和 LHR 对菟丝子黄酮作用的敏感程度不同,而且菟丝子黄酮对模型大鼠海马-下丘脑-垂体 ER 及卵巢 LHR 表达的影响呈现一定的量效关系。上调心理应激大鼠海马-下丘脑-垂体 ER 及卵巢 LHR 的表达是菟丝子黄酮调节下丘脑-垂体-卵巢轴功能的部分机制,菟丝子黄酮是治疗心理应激大鼠卵巢内分泌失调的较好药物。

References:

[1] Shen Z Y. Contempration and practice on research from kid-

ney essence to syndrome essence [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2000, (4): 6.

[2] Jin X, Li J S, Yan W M. Study of flavone content in *Semen Cuscutae* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1992, 17(5): 292.

[3] Wang J H, Wang M Z, Wu Q H, et al. Experimental study on the establishment of ovarian endocrine patterns in female rats exposed to psychologic stress [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* (中国实验动物学报), 2002, 12(4): 204-206.

[4] Zhang W T, Tan L, Zheng Y. Study on the gonadotropin receptors in fetal ovaries with immunohistochemistry [J]. *J Henan Med Univ* (河南医科大学学报), 2001, 35(1): 8-9.

[5] Ma N, Zheng Y, Liu D Q. FSH receptor, LH receptor are determined in fetal ovaries [J]. *J Contin Educ Physicians* (医师进修杂志), 2000, 23(4): 35-36.

[6] Li B R, She Y C. Effects of kidney tonifying medicine on the function of anterior pituitary-hypothalamus-sex gland axis [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 1984, 25(7): 63.

[7] Qin D N, She Y C. Effects of flavonoids of *Semen Cuscutae* on the reproductive system in male rats [J]. *Asian J Androl*, 2000, 2(2): 99-102.

[8] Wang J H, Wang M Z, Wu Q H, et al. Effects of flavonoids from *Semen Cuscutae* on ovarian endocrine in female rats exposed to psychologic stress [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1099-1101.

鲜姜有效部位对实验性高脂血症大鼠血脂和一氧化氮水平的影响

武彩霞¹,程秀民²,丁华^{1*},魏欣冰¹,孙霞¹,韩梅¹,宋芸¹

(1. 山东大学医学院 药理学研究所, 山东 济南 250012; 2. 山东大学药学院, 山东 济南 250012)

鲜姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎, 作为药用已有悠久的历史。近年来有研究报道鲜姜具有抗炎^[1]、抗氧化^[2]、降低胆固醇、抗动脉粥样硬化等作用^[3,4], 具有良好的开发应用前景。但在鲜姜的成分中, 其所含特色成分挥发油和姜辣素的量太低, 直接食用鲜姜, 多有不便之处, 如过于辛辣、难以服用、难以控制用量等。这使其作为药用受到很大限制。鲜姜现有的提取方法虽有多种, 如煎煮法、冷轧法、蒸馏法、渗滤法、超临界二氧化碳萃取法等, 但所得提取物不具有或不完全具有鲜姜的天然特性, 或不能同步实现固体化, 皆不尽人意。目前, 根据鲜姜所含主要成分的性质, 采用先进的提取工艺, 已将鲜姜的特性成分挥发油及姜辣素合并提取并处理加工为固体物质, 称之为鲜姜有效部位, 此

物质性质稳定, 保留了鲜姜的天然活性和天然风味, 为开发鲜姜的药用价值提供了重要条件。本研究观察了鲜姜有效部位对实验性高脂血症大鼠血脂和 NO 水平的影响。

1 材料与与方法

1.1 主要药品与试剂: 鲜姜有效部位为山东莱芜产鲜姜经液-固萃取法所得的粉末状物质, 由山东大学药学院提供, 批号 2004-04-06。制备过程: 取鲜姜, 洗净泥沙, 晾干表面水分, 用榨汁机榨取姜汁, 滤过。滤液中加入 β-环糊精, 加热至 40℃, 搅拌萃取 4 h, 静置沉淀。弃去上层液, 收集沉淀, 抽滤, 得滤饼。滤饼于 50℃ 烘干, 粉碎、过筛即得 (经测定, 提取物中含总挥发油 6.1%、总姜辣素 5.2%)。洛伐他汀, 浙江海正药业生产, 批号 20040214。总胆固醇

* 收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30271584); 山东省自然科学基金项目 (Y2000C13)

作者简介: 武彩霞(1973—), 女, 山东沂水人, 讲师, 硕士研究生, 现工作单位山东医学高等专科学校, 已发表论文 8 篇, 主要从事心血管药理研究工作。Tel: 13969936918 E-mail: wcxzd@eyou.com

* 通讯作者 丁华 Tel: (0531) 88382605 E-mail: dinghua@sdu.edu.cn