

- [J]. 中医药学刊,2004,22(2):381-383
- 3 郭芳彬. 蜂产品中黄酮类化合物的保健作用[J]. 养蜂科技,2005,2:28-29
- 4 郭芳彬. 蜂胶中黄酮类化合物的保健功能[J]. 蜜蜂杂志,2005,9:28-31
- 5 杨明,隋殿军,孙红,等. 蜂胶总黄酮对急性心肌缺血大鼠心肌梗塞和血液流变学的影响[J]. 中成药,2005,27(9):1057-1059
- 6 董捷,闫继红,孙丽萍. 蜂胶复合软胶囊对实验大鼠血脂的调节作用[J]. 蜜蜂杂志,2003,12:5-6
- 7 焦连庆,于敏. 正交试验法优化蜂胶黄酮的提取工艺研究. 特产研究,2003,(4):49-51
- 8 叶陆星,胡福良,玄红专. 蜂胶的提取方法及影响因素. 蜜蜂杂志,2002,(7):16
- 9 吴平谷,叶之扬. 蜂胶有效成分的分离与鉴定. 卫生研究,2000,29(2):123-124
- 10 张云香,杨志孝,安蔚,等. 不同溶剂对蜂胶黄酮提取率影响的研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(1):9-10
- 11 胡福良,詹耀锋,朱威,等. 不同方法提取的蜂胶液调节血脂作用的实验研究[J]. 中国蜂业,2006,57(5):13-16
- 12 家药典委员会. 中华人民共和国药典一部. 北京:化学工业出版社,2005:250
- 13 杨林莎,王东. 蜂胶提取工艺的研究. 中国现代应用药学杂志,2005,22(2):135-137
- 14 张建和,符伟玉,余戟. 蜂胶醇冷浸法提取物中总黄酮含量的测定[J]. 广东医学院学报,2004,22(4):419-420
- 15 刘香,刘振,段更利. 紫外分光光度法测定蜂胶搽剂中总黄酮的含量[J]. 贵阳医学院学报,2005,30(3):230-231
- 16 刘元法,王兴国,金青哲. 超声波技术提取蜂胶黄酮类功能性物质的研究[J]. 食品科学,2004,25(6):35-39

(收稿:2009-12-18)

左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠的治疗作用

李红梅 钟志勇 苗竹林 韦相才 范强

摘要 目的 通过对 BALB/c 小鼠多点注射透明带多肽,造成免疫性卵巢早衰模型,研究左归丸对免疫性卵巢早衰模型的治疗作用。**方法** (1)建立小鼠免疫性卵巢早衰模型:以小鼠透明带 3 所合成透明带多肽为免疫原,以其免疫 SPF 级 BALB/C 雌性小鼠。以出现动情周期紊乱、卵巢细胞受损,表示造模成功。(2)造模成功后,将 BALB/c 小鼠随机分为模型组、左归丸高、中、低剂量组,泼尼松组、己烯雌酚组和对照组,共灌胃给药 4 周。**结果** 模型组小鼠在第 3~8 周的体重与对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$)。模型组仅有 16.7% (2/12) 的动物维持正常的性周期,而空白对照组有 91.7% (11/12) 的动物维持正常的性周期。模型组小鼠卵巢中颗粒细胞、卵母细胞的凋亡率与对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 左归丸可能具有改善免疫性卵巢早衰小鼠症状的作用。

关键词 左归丸 卵巢早衰 性周期 细胞凋亡

Treatment Effect of Zuogui Pill on Immune Premature Ovarian Failure Rats. Li Hongmei, Zhong Zhiyong, Miao Zhulin, Wei Xiangcai, Fan Qiang. Guangdong Family Planning Research Institute of Science and Technology, Guangdong 510600, China

Abstract Objective To explore the treatment effect of Zuogui pill (ZGP) on immune premature ovarian failure rats. **Methods** Female mice model of POF was established by multiple sites subcutaneous injection of zona pellucida 3, and treated with different dosage ZGP (low, middle and high), with prednisone and diaethylstilbestrol as positive control. We detected apoptosis rate of granulosa and oocyte of murine ovaries by tunel method and observed the change of sexual cycle and weight. **Results** Compared with the control group, the weight of model group rat in the third to eighth weeks was significant difference ($P < 0.05$). Only 16.7% (2/12) maintained the sexual cycle in the model mice, 91.7% (11/12) in control group, 16.7% in low dosage ZGP, 25% in middle dosage ZGP and 50% in high dosage ZGP. Granulosa cell and Oocyte apoptosis rate in the model mice was higher. The differences were significant as compared with the low, middle and high dosage ZGP and control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Zuogui pill may have some prevention and treatment action on POF.

Key words Zuogui pill; Premature ovarian failure; Sexual cycle; Cells apoptosis

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(07001360),广东省人口与计划生育资助项目(2008005)

作者单位:510600 广州,广东省计划生育研究所(李红梅、苗竹林、韦相才、范强);528248 广州,广东省医学实验动物中心(钟志勇)

通讯作者:李红梅,电子信箱:lihongmei@yahoo.com.cn

自身免疫性卵巢早衰具有肾虚血亏血瘀的病机特点,从补肾养血活血入手治疗卵巢早衰取得了令人鼓舞的疗效,左归丸出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,由熟地 8 两、山药炒 4 两、枸杞 4 两、山茱萸 4 两、川牛膝 3 两、菟丝子 4 两、鹿角胶 4 两、龟板胶 4 两八味药组成,主要表现为滋肾阴,养精血的作用,它全方的配伍注重于调节肾的阴阳平衡于补肾之中,以平为期,虽为补阴血之剂,然补阴之中寓有补阳之用,共达补肾精、养精血、化瘀血之功。自身免疫性卵巢早衰具有肾虚血亏血瘀的病机特点,从补肾养血活血入手治疗卵巢早衰取得了令人鼓舞的疗效,临床上用此治疗更年期综合征,可消除红热汗出、烦躁易怒、口干咽燥等症状,能增加阴道分泌物,改善外阴、阴道干涩症状,并有报道对雌激素水平不足的闭经也有较好的疗效,可使卵巢早衰患者成功妊娠^[1,2]。本次实验用 ZP3 的氨基酸片段免疫动物,使它们产生 AZAb,由于 AZAb 的作用,产生了免疫性卵巢炎,使卵巢受损,卵巢颗粒细胞受到破坏,因而出现卵巢、免疫功能下降,以及卵巢形状、功能等的改变导致 AOD。我们通过对左归丸干预的免疫性卵巢早衰小鼠卵巢细胞凋亡的影响研究,了解卵巢超微结构的变化及卵巢局部调控机制,探讨其治疗免疫性卵巢早衰的机制,揭示补肾活血法在调节卵巢功能方面的重要意义。现在我们对卵巢自分泌因子的表达及卵泡凋亡在卵巢早衰发病机制中的研究目前尚在初始阶段,全面深入开展其治疗卵巢早衰机制的相关研究不仅有助于我们阐明此类疾病的发病机制,且将有助于我们寻找治疗该病的有效途径,为提高卵巢储备功能、防治卵巢老化、维护女性健康的生殖功能、延缓衰老开辟新的思路。

材料与方法

1. 实验材料:(1)实验对象: BALB/c 小鼠,雌性,15~18g,90 只,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:2008A023。(2)实验环境: SPF 级 BALB/c 小鼠饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级实验动物室,动物实验环境设施合格证号:粤监证字 2007C099,室内保持 20~25℃,自由饮水、进食,昼夜间断照明,每周换水 3 次,换垫料 2 次,水料充足,SPF 级饲料产自广东省医学实验动物中心。

2. 实验药物:(1)受试药物:小鼠透明带多肽(其分析纯度>95%):由杭州中肽生物有限公司提供,批号:CC-11-030。弗氏完全佐剂:Sigma 公司产品,批号:038K8726;弗氏不完全佐剂:Sigma 公司产品,批号:086K8905。泼尼松:广东华南药业有限公司,批号:070502。临床剂量为 20mg/60(kg·d)。己烯雌酚:合肥久联制药有限公司,批号:20080104。

临床剂量为 1mg/60(kg·d)。左归丸:河南省宛西制药股份有限公司(批号:071203)。临床剂量为:1 次 9g(约 90 粒),2 次/粒。低剂量为临床剂量的 5 倍、中剂量为临床剂量的 10 倍,高剂量为临床剂量的 20 倍。(2)药物的配制方法:小鼠透明带多肽溶液的配制:称取 1mg 的透明带 3 粉末,加入三蒸水配成 0.2mg/ml 的溶液。免疫试剂:将小鼠透明带多肽溶液:弗氏完全佐剂按照 1:1 的比例混合,搅拌 30min,充分混匀。免疫强化试剂:将小鼠透明带多肽溶液:弗氏不完全佐剂按照 1:1 的比例混合,搅拌 30min,充分混匀。Tunnel 细胞凋亡试剂盒:Roche 公司产品,批号为 1449220。

3. 仪器:显微镜:日本奥林巴斯病理图像分析系统,型号 BX41。

4. 实验方法:小鼠免疫性卵巢早衰模型建立: BALB/c 小鼠 90 只,随机分为对照组 10 只和模型组 80 只。对照组注射生理盐水;模型组按文献方法,以小鼠透明带 3 的第 330~342 个氨基酸序列(NSSSQFQIHGPR)所合成透明带多肽为免疫原,以其免疫 SPF 级 BALB/C 雌性小鼠。在足底及腹部皮肤皮下多点注射,连续 3 次,每 2 周 1 次,第 1 次加入等量弗氏完全佐剂,第 2 次和第 3 次加入等量弗氏不完全佐剂以制备免疫性 POF 动物模型。造模之日起,每天早上 8:00 阴道脱落细胞涂片观察小鼠动情周期的变化。以出现动情周期紊乱表示造模成功。对动情周期无影响,阴道脱落细胞涂片示卵巢功能未抑制者予以剔除。造模成功后,将 BALB/c 小鼠随机分为模型组、左归丸高、中、低剂量组,泼尼松组、己烯雌酚组,每组 $n=12$ (左归丸高剂量组 $n=13$)。对照组和模型组给予生理盐水,左归丸高、中、低剂量组给予相应浓度的药物,泼尼松组和己烯雌酚组给予相应浓度的药物。均于第 3 次免疫后开始灌胃,共灌胃 4 周,每周休息 1 天。第 3 次免疫 4 周后摘眼球取血,分离血清放 -80℃ 备用;常规无菌方法留双侧卵巢备用,采用 Tunnel 方法检测颗粒细胞与卵母细胞的细胞凋亡数。统计方法:采用 SPSS10.0 统计软件,结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P<0.05$ 为有显著性差异, $P<0.01$ 为有非常显著性差异。

结 果

1. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠日常情况的影响:从首次免疫后至第 25 天开始,模型组小鼠表现为易激惹,大便干结,动情期不典型,角化细胞数减少,与上皮细胞、白细胞并见;第 35 天左右出现动情周期紊乱,动情间期延长,渐至无动情周期,仅为动情间期的白细胞,时可见上皮细胞相混杂。小鼠逐渐表现为活动频度减少,对刺激反应冷漠,皮毛无光泽。己烯雌酚治疗组只见动情期角化细胞。左归丸低、中、高剂量组、泼尼松组较模型组的情况略好,上皮细胞数较多。左归丸低、中、高剂量组、泼尼松治疗组出现动情周期紊乱的时间较模型组晚,仍有动情周期性变化,但动情期角化细胞数减少;小鼠出现易激惹、大便干结症

状的出现时间较模型组晚,未见明显的反应冷漠。

2. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠体重变化情况 (表 1):实验结果表明,模型组小鼠在第 3 周、第 4 周、第 5 周、第 6 周、第 7 周、第 8 周的体重与对照组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。泼尼松组小鼠在

第 9 周、第 10 周的体重,己烯雌酚组小鼠在第 10 周的体重,左归丸低剂量组小鼠在第 6 周、第 9 周的体重均与模型组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。其余给药组小鼠的体重与模型组比较,均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, g$)

组别	剂量	第 1 周体重	第 2 周体重	第 3 周体重	第 4 周体重	第 5 周体重	第 6 周体重	第 7 周体重	第 8 周体重	第 9 周体重	第 10 周体重
对照组	—	16.3 ± 0.6	17.9 ± 0.6	18.8 ± 0.6	19.1 ± 0.5	19.6 ± 0.7	20.5 ± 0.8	21.2 ± 0.8	21.1 ± 1.0	21.4 ± 1.0	21.9 ± 0.9
模型组	—	16.4 ± 0.6	17.4 ± 0.8	17.4 ± 0.7 ^{△△}	18.5 ± 0.8 [△]	18.8 ± 0.8 [△]	19.7 ± 1.0 [△]	19.9 ± 1.1 ^{△△}	20.1 ± 0.9 [△]	21.4 ± 0.9	21.6 ± 1.3
泼尼松组	3.03mg/kg	16.1 ± 0.4	17.8 ± 0.6	17.9 ± 1.0	18.4 ± 0.9	18.8 ± 1.0	20.0 ± 1.1	19.7 ± 1.2	19.5 ± 0.7	19.3 ± 0.9 ^{**}	20.3 ± 1.0 [*]
己烯雌酚组	0.15mg/kg	16.4 ± 0.6	17.8 ± 0.4	17.9 ± 0.6	19.1 ± 0.8	19.0 ± 0.6	20.2 ± 0.7	20.2 ± 0.6	20.8 ± 0.6	21.7 ± 0.7	22.9 ± 0.9 ^{**}
左归丸低剂量组	0.075g/kg	16.3 ± 0.7	17.5 ± 1.1	17.3 ± 1.0	17.9 ± 1.1	18.2 ± 1.0	18.8 ± 1.2 [*]	19.6 ± 1.4	20.1 ± 1.4	19.8 ± 1.7 ^{**}	20.7 ± 1.7
左归丸中剂量组	0.15g/kg	16.3 ± 4.4	17.8 ± 4.8	17.4 ± 4.9	18.6 ± 5.0	18.7 ± 5.2	20.1 ± 5.6	19.8 ± 5.6	20.6 ± 5.7	21.3 ± 5.9	21.8 ± 6.2
左归丸高剂量组	0.3g/kg	16.4 ± 4.5	17.9 ± 4.7	17.7 ± 5.0	18.7 ± 5.2	18.8 ± 5.2	20.0 ± 5.5	20.2 ± 5.6	20.5 ± 5.7	20.8 ± 5.6	21.6 ± 5.8

与对照组比较, [△] $P < 0.05$ 和 ^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 和 ^{**} $P < 0.01$

3. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠性周期的影响 (表 2):实验结果表明,各组小鼠进行皮下注射后,均行阴道脱落细胞涂片观察性周期。空白对照组有 91.7% (11/12) 的动物、模型组有 16.7% (2/12) 的动物、泼尼松组 25% (3/12)。左归丸低剂量组 16.7%

(2/12) 的动物、左归丸中剂量组 25% (3/12) 的动物、左归丸高剂量组 46.15% (6/13) 的动物仍维持正常的性周期,其余动物均表现为性周期紊乱。己烯雌酚组所有动物均表现为性周期紊乱。

表 2 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠性周期的影响 (只)

组别	n	性周期正常	性周期紊乱			合计
			动情期缩短	性周期延长	无明显周期	
对照组	12	11	0	1	0	1
模型组	12	2	1	3	6	10
泼尼松组	12	3	0	8	1	9
己烯雌酚组	12	0	0	11	1	12
左归丸低剂量组	12	2	0	0	10	10
左归丸中剂量组	12	3	0	2	7	9
左归丸高剂量组	13	6	0	4	3	7

4. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢凋亡的影响 (表 3):实验结果表明,模型组小鼠卵巢中颗粒细胞的凋亡率与对照组比较,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。左归丸低剂量组和高剂量组小鼠卵巢中颗粒细胞的凋亡率与模型组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。模型组小鼠卵母细胞的凋亡率与对照组比较,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。己烯雌酚组、左归丸低剂量组、中剂量组和高剂量组小鼠的卵母细胞的凋亡率与模型组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 3 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢颗粒细胞和卵母细胞的凋亡率影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	颗粒细胞凋亡率	卵母细胞凋亡率
对照组	12	5.60 ± 1.94	2.25 ± 0.79
模型组	12	12.42 ± 2.42 ^{△△}	7.08 ± 1.65 ^{△△}
泼尼松组	12	10.25 ± 2.12	7.12 ± 1.48
己烯雌酚组	12	9.40 ± 2.96	4.90 ± 0.99 ^{**}
左归丸低剂量组	12	8.05 ± 2.45 ^{* *}	4.40 ± 1.60 ^{**}
左归丸中剂量组	12	9.31 ± 3.38	5.19 ± 0.92 [*]
左归丸高剂量组	13	8.60 ± 1.76 ^{**}	4.90 ± 1.70 [*]

与对照组比较, ^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 和 ^{**} $P < 0.01$

讨 论

目前,卵巢早衰的发病率为 1.0% ~ 3.8%,患者在 40 岁之前出现闭经、不孕不育、一系列更年期症状及老龄化表现,如潮热、烦躁失眠、阴道干燥、性交困难,患者可出现骨质疏松、动脉粥样硬化及心肌梗死等。目前认为,在自身免疫性卵巢早衰的发病机制、早期诊断及新的治疗方法等方面,仍有许多需要进一步研究之处。本实验根据抗透明带抗体可以引起自身免疫性卵巢炎,并且可以加速卵母细胞的破坏和耗竭而致自身免疫性卵巢早衰这个原理,以卵母细胞透明带的片段建立了小鼠的自身免疫性卵巢早衰动物模型。实验结果表明,从第 1 次免疫后的约第 25 天开始,模型组小鼠表现为易激惹,大便干结,动情期不典型,角化细胞数减少,与上皮细胞、白细胞并见;第 35 天左右出现动情周期紊乱,动情间期延长,渐至无动情周期,仅为动情间期的白细胞,时可见上皮细胞相混杂。小鼠逐渐表现为活动频度减少,对刺激反应冷漠,皮毛无光泽。模型组小鼠在第 3 周、第 4 周、第 5 周、第 6 周、第 7 周、第 8 周的体重与对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$)。模型组仅有 16.7% (2/12) 的动物维持正常的性周期,而空白对照组有 91.7% (11/12) 的动物维持正常的性周期,结

果提示本实验所注射透明带片段有效地影响了卵巢的功能。模型组小鼠卵巢中颗粒细胞、卵母细胞的凋亡率与对照组比较,具有显著性差异($P < 0.05$)。实验结果提示本实验所注射透明带片段可能成功诱导了小鼠发生自身免疫性卵巢炎,导致卵巢细胞的凋亡。

实验研究表明,左归丸低、中、高剂量组出现动情周期紊乱的时间较模型组晚,仍有动情周期性变化,但动情期角化细胞数减少;小鼠出现易激惹、大便干结症状的出现时间较模型组晚,未见明显的反应冷漠。左归丸低剂量组 16.7% (2/12) 的动物、左归丸中剂量组 25% (3/12) 的动物、左归丸高剂量组 50% (6/12) 的动物维持正常的性周期。左归丸低、中、高剂量组小鼠卵巢中颗粒细胞、卵母细胞的凋亡率与模型组比较显著性降低($P < 0.05$)。结果提示,左归丸可能具有改善免疫性卵巢早衰小鼠症状的作用。

参考文献

- 1 朱玲,陈彬彬,黄泉智,等. 左归丸临床与实验研究进展[J]. 国医论坛, 2003, 18(2): 51-53
- 2 Chao SL, Huang LW, Yen HR. Pregnancy in premature ovarian failure after therapy using Chinese herbal medicine[J]. Chang Gung Med J, 2003, 26(6): 449-452

(收稿: 2009-12-31)

(修回: 2010-01-25)

泌尿内科脾肾气虚证量表因子结构的分析研究

赵 平 张法荣

摘 要 **目的** 探索泌尿内科脾肾气虚证量表的因子结构,并对因子分析进行评价。**方法** 采用 SPSS13.0 统计软件对泌尿内科脾肾气虚证量表进行探索性因子分析与评价。**结果** 量表符合脾虚、肾虚、气虚及其他一般情况的四因子建构,通过效度分析证实因子分析结果可靠。**结论** 泌尿内科脾肾气虚证量表具有较好的因子结构效度,可推广应用于中医临床。

关键词 量表 脾肾气虚证 因子分析

Factor Analysis of the Rating Scale of Pi Shen Qi Xu in Nephrology. Zhao Ping, Zhang Farong. Department of Nephrology, Taian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong 271000, China

Abstract **Objective** To study the factor structure in rating scale of deficiency of spleen and kidney of nephrology and estimate it. **Methods** Factor analyse in deficiency of spleen and kidney rating scale in nephrology was made using SPSS13.0. **Results** The scale was composed of four factors: Pi Xu; Shen Xu; Qi Xu and other general things. Validity analyse indicated that the result was credible. **Conclusion** The rating scale of Pi Shen Qi Xu in nephrology has good construct validity and it can be extensively used in Traditional Chinese Medicine.

Key words Rating scale; Pi Shen Qi Xu; Factor analysis

基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(2005-156)

作者单位:271000 山东省泰安市中医医院肾内科(赵平);山东中医药大学附属医院科研科(张法荣)

通讯作者:赵平,电子邮箱:pansyiping@yahoo.com.cn