温肾养血方对无排卵模型大鼠卵巢质量和形态的影响

辛明蔚[1],张秋霞[2],赵 晖[2],杨亦龙[3],何军琴[1],梁欣韫[1],张 莹[1],杨 维[1],武 颖[1],尹晓丹[1]

(1.首都医科大学附属北京妇产医院中医科,北京 100026;
2.首都医科大学中药学院,北京 100069;3.首都医科大学,北京 100069)

[摘要]目的 探讨温肾养血方对无排卵大鼠子宫指数、卵巢指数及卵巢组织形态的影响。**方法** 采用丙酸睾酮皮下注射法复制无排卵大鼠模型。将模型大鼠分为模型组,西药组,温肾养血方大、中、小剂量组,分别给予生理盐水,枸橼酸氯米芬,温肾养血方大剂量(52 mg/kg)、中剂量(26 mg/kg)、小剂量(13 mg/kg)灌胃。另选22日龄大鼠作为正常组。连续灌胃21 d后,测定各组大鼠体质量、子宫指数和卵巢指数,光镜下观察卵巢组织形态。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠体质量无明显变化($P>0.05$),子宫指数和卵巢指数显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠体质量和子宫指数、卵巢指数无明显变化($P>0.05$)。温肾养血方大、中剂量组卵巢形态近似正常组,结构明显改善,多数卵巢可见发育期的各级卵泡,可见卵丘、卵细胞及典型黄体形成。西药组和温肾养血方小剂量组卵巢形态类似模型组,卵巢体积较小,卵巢表面苍白,无斑点,色泽苍白,卵泡数目少,卵泡较小,且形状不规则,多呈囊性扩张,无黄体。**结论** 温肾养血方能改善卵巢结构和促进卵泡发育。

[关键词]温肾养血方;无排卵月经;体质量;子宫指数;卵巢指数;卵巢;组织形态学

[中图分类号]R285.5;R711.75 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2015.03.023

温肾养血方是北京妇产医院中医科赵松泉教授的经验方,临床应用30余年,疗效显著[1-3]。为进一步阐明其作用机制,本实验利用无排卵大鼠动物模型,以温肾养血方进行干预,通过观察大鼠子宫和卵巢质量、卵巢形态学等相关指标,阐明温肾养血方促进卵泡发育的作用。

1 材料

1.1 药物 实验用中药饮片购自北京同仁堂股份有限公司。温肾养血方为首都医科大学附属北京妇产医院赵松泉主任医师自拟方,由柴胡、香附、木香、赤芍、泽兰、益母草、牛膝、鸡血藤、红花、丹参、当归、川芎、蒲黄、熟地黄、淫羊藿、山茱萸、菟丝子、枸杞子、覆盆子、鹿角、羌活、细辛、肉苁蓉等组成。水煎后浓缩成含生药2.6 g/mL的药液,4 ℃冰箱储存备用。枸橼酸氯米芬片,每片50 mg,高特制药有限公司·塞浦路斯生产,产品批号为ED104。

1.2 仪器 JA-1003电子分析天平:上海精科天平厂;LEICA RM2235轮转式石蜡切片机,LEICA HI1210摊片机,LEICA EG1150H包埋机:德国;Nikon生物显微镜,NIS-Elements Basic Research图像采集分析系统:日本。

基金项目:北京市中医药科技项目(QN-2011-03);首都中医药与护理学研究专项(〔2011〕799号)

作者简介:辛明蔚(1980-),女,博士研究生,主治医师

通信作者:张秋霞,zqx26@163.com

2 方法

2.1 动物分组及模型复制 将50只大鼠按随机数字表法随机分为模型组,温肾养血方大、中、小剂量组,西药组,每组10只。另取22日龄大鼠10只作为正常组。

无排卵大鼠模型[4](即雄激素致不孕大鼠模型)的复制:取9日龄SPF级雌性SD大鼠,于颈背部皮下注射丙酸睾酮1.25 mg(0.05 mL),至70日龄时阴道开口。连续阴道涂片2个性周期(每个性周期为5 d),阴道上皮无性周期变化,提示无排卵大鼠模型复制成功。同样,取9日龄雌性SD大鼠10只(正常组),于颈背部皮下注射等量蒸馏水,至70日龄时阴道开口。实验组及正常组均于22日龄时断奶,利用自然光照,室温维持在20 ℃左右,同样条件饲养,由专人饲养。

2.2 给药方法 模型动物分组完成后,从80日龄起,分别给予相应药物。模型组和正常组给予12 mL/kg蒸馏水。西药组给予5.8 mg/kg(临床等效剂量)枸橼酸氯米芬蒸馏水混悬液,每日灌胃1次,5 d停药。温肾养血方小、中、大剂量组分别给予温肾养血方13、26、52 mg/kg,分别相当于成人临床剂量的3.5、7.0、14.0倍,每日灌胃1次,连续21 d。

2.3 取材方法 各组大鼠连续灌胃结束后,断头处死,取出子宫、双侧卵巢,去掉周围脂肪组织,将子宫、卵巢迅速置于电子天平,称质量,计算子宫指数和卵巢指数。

2.4 卵巢组织切片的制备 以上摘取的卵巢,置于4%多聚甲醛固定8~24 h,脱水,透明,石蜡包埋,连续切片,片厚5 μm,用于苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色。

2.5 统计学方法 实验数据采用SPSS 17.0统计软件包进行统计学分析。连续型变量采用"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"进行统计学描述。由于这是单因素非平衡设计的组合实验,故按研究目的分成3个组合。①正常组、模型组:采用两个独立样本t检验比较体质量和卵巢质量指数,采用Mann-Whitney U检验比较子宫指数;②模型组和温肾养血方大、中、小剂量组:采用单因素方差分析比较多组均数,采用LSD检验进行均数的多重比较;③西药组和温肾养血方大、中、小剂量组:采用单因素方差分析比较多组均数,采用LSD检验进行均数的多重比较。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 模型因素对大鼠体质量、子宫指数和卵巢指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量无明显变化($P>0.05$),子宫指数和卵巢指数显著减少($P<0.05$)。见表1。

表1 模型因素对大鼠体质量、子宫指数和卵巢指数的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量/g	子宫指数/(g/kg)	卵巢指数/(g/kg)
正常	10	238.58±18.29	2.41±1.14	0.76±0.14
模型	10	245.96±17.88	1.38±0.30*	0.40±0.08*

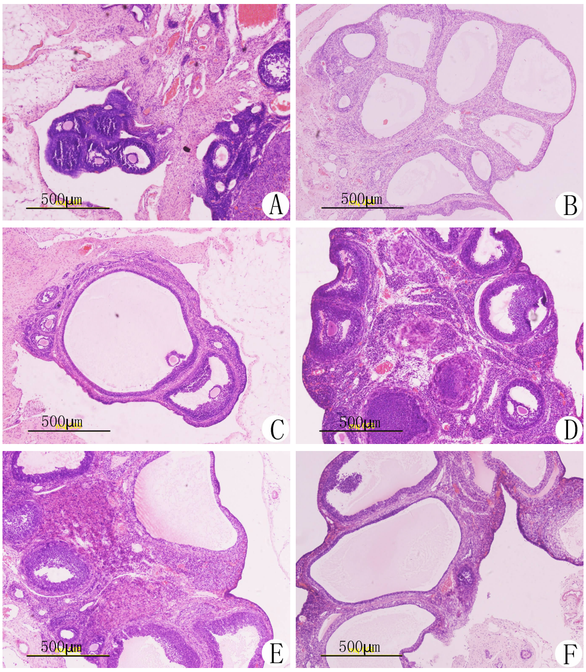
注:与正常组比较,$P<0.05$。

3.2 药物治疗对无排卵模型大鼠体质量、子宫指数和卵巢指数的影响 与模型组比较,各治疗组大鼠体质量、子宫指数和卵巢指数均无明显变化($P>0.05$);各治疗组之间体质量、子宫指数和卵巢指数比较,差异也无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 药物治疗对无排卵模型大鼠体质量、子宫指数和卵巢指数的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量/g	子宫指数/(g/kg)	卵巢指数/(g/kg)
模型	10	245.96±17.88	1.38±0.30	0.40±0.08
西药	10	214.05±19.56	1.31±0.28	0.40±0.08
温肾养血方(大)	10	238.96±18.57	1.42±0.24	0.40±0.06
温肾养血方(中)	10	243.90±10.71	1.34±0.20	0.42±0.07
温肾养血方(小)	10	234.47±14.90	1.36±0.20	0.40±0.05

3.3 各组大鼠卵巢形态学比较 正常组大鼠卵巢组织明显增大,部分卵巢表面有红斑,各级生长发育都可见,卵泡数目较多,可见不同发育期卵泡及优势卵泡,未见囊性扩张卵泡。卵巢表现出较多黄体,说明卵巢已有排卵。模型组及温肾养血方小剂量组卵巢体积较小,卵巢表面苍白,无斑点,色泽苍白,卵泡数目少,卵泡较小,且形状不规则,多呈囊性扩张,内含大量浆液性物质,腔内无卵丘及卵细胞,卵泡壁颗粒层细胞稀疏,层次明显减少,无黄体。西药组大鼠卵巢可见不同发育期卵泡,体积虽大但形状不规则,细胞结构较紊乱,周围透明带厚薄不均匀,颗粒细胞层次减少,少量黄体形成。黄体细胞排列松散紊乱。温肾养血方大、中剂量组大鼠卵巢的结构明显改善,多数卵巢可见发育期的各级卵泡,扩张卵泡的颗粒层增厚,卵泡发育,卵泡内结构清晰,可见卵丘、卵细胞及典型黄体形成,黄体细胞大而圆,胞浆丰富。间质腺较模型组明显增多。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.西药组;D.温肾养血方大剂量组;E.温肾养血方中剂量组;F.温肾养血方小剂量组。

图1 各组大鼠卵巢组织形态比较(HE染色,10×10倍)

4 讨论

王冰曰:"肾气全盛,冲任脉通,经血渐盈,应时而下,冲为血海,任主胞胎,二脉相资,故能有子。"肾阴癸水是经血的物质基础,血是月经的主要成分。肾气封藏有度,肝气疏泄有序,经血通过经脉,汇于血海,达于胞宫,血充气畅,应时而下。冲任二脉隶属肝肾,肝藏血,肾藏精,乙癸同源,精血互生,脾统血,为后天之本,气血生化之源。女子又以肝为先天,以血为本。温肾养血方中淫羊藿、肉苁蓉、鹿角温补肾阳,且温而不燥,润而生精;女贞子、覆盆子、枸杞子、山茱萸、菟丝子滋补肝肾之阴,同时取"阴中求阳"之意;柴胡、木香、香附疏肝解郁理气;丹参、赤芍、生蒲黄、鸡血藤、红花、当归、益母草补血活血,疏通经脉,化瘀生新;刘寄奴、苏木祛瘀通络;牛膝引药

下行，走而能补，使气血得以畅行。以上诸药意在补肝肾之精，使气舒精足血畅，卵子成熟排出，月经如期而至，以摄精成孕。

卵泡的发生是一个复杂的过程，从原始卵泡开始发育到优势卵泡的形成需要大约1年的时间。依次经过始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡及排卵前卵泡4个阶段。无排卵多表现为卵泡在排卵前的闭锁。Flerko等[5]认为卵泡膜毛细血管血流量的减少在导致大多数卵泡于窦前期闭锁中发挥重要作用。有研究证实，与正常妇女相比，不孕症患者卵巢动脉舒张期血流呈高阻抗、无成熟卵泡且卵巢甾体激素变化无规律，提示卵泡发育障碍、无排卵及不育患者存在卵巢血液供应障碍，且生殖器官血液供应与卵泡发育和生殖内分泌水平密切相关[6-7]。温肾养血方于补肾药物中配伍大剂量的补血活血药物，其促进卵泡发育的作用机制可能与促进卵巢局部血液循环，影响卵巢的旁分泌和自分泌功能有关。方中鸡血藤，陆象咸云："曾见妇人合药服之，多年不育者，后皆有子。"(《本草纲目拾遗》)《本草纲目》曰："泽兰走血分，故能治水肿，涂痈毒，破瘀血，消癥瘕，而为妇人要药。"药理学研究[8]表明，泽兰水煎剂能对抗体外血栓形成，有轻度抑制凝血系统与增强纤溶活性的作用。《本草蒙筌》谓蒲黄"味甘，气平，无毒，血病必用，消瘀血凝积、癥瘕崩带殊功，调女人月候不匀，去产妇儿枕作痛"。药理学研究表明，蒲黄水浸液、煎剂或50%乙醇浸液均有促进凝血作用，且作用显著而持久。蒲黄多种制剂能够降低血压、减轻心脏负荷，增加冠脉血流量，改善微循环，提高机体耐低氧能力，减轻心肌缺血性病变。《本草备要》谓牛膝"补肝肾，泻恶血。"《药性解》曰："益母本功治血，故入诸阴之经。行血而不伤新血，养血而不滞瘀血，所以为胎产圣药。"药理学研究[9]表明，丹参能改善血液流变性，降低血液黏度，抑制血小板和凝血功能，激活纤溶，对抗血栓形成。本方中配伍羌活、细辛两味辛温药物，颇有深意。隋·巢元方《诸病源候论·妇人杂病诸候》中认为，女子不孕有内外两方面因素。内因是劳伤气血，正虚方使邪气有机可乘，"妇人挟疾无子，皆由劳伤血气，冷热不调，而受风寒客于子宫，致使胞内生病，或月经涩闭，或崩血带下，致阴阳之气不和，经血之行乖候，故无子"。外因是六淫邪气直中胞宫。"子脏冷无子者，由将摄失宜，饮食不节，乘风取冷，或劳伤过度，致风冷之气乘其经血，结于子脏，故使无子"。认为风寒之邪入内客于胞宫，可致宫寒。血得寒则凝结，冲任、胞宫受损，导致月水不利或不通，则不能摄精成孕。指出正气亏虚、风寒外侵是导致宫寒不孕的病机。因此，温肾养血方中配伍祛风散寒的羌活、细辛可以去除沉疴痼疾，鼓动"肾间动气"，打通冲任二脉。《本草经疏》曰："羌活性温，味辛、苦，气厚于味，浮而升，阳也。手足太阳行经风药，并入足厥阴、少阴经气分。女子疝瘕者，寒湿乘虚中肾家所致也，苦能燥湿，温能澼寒，辛能发散，寒湿去而肾脏安，故主女子疝瘕，及疗诸贼风，百节痛风无久新也。"蒋昌烈[10]临床发现，不论何部位，只要在活血化瘀药中加入细辛，可增强镇痛与活血逐瘀作用。其曾对照观察四肢骨折、脱位及身体各部位软组织损伤之肿痛较重者55例，加用细辛者较单用活血化瘀药者疼痛减轻快，瘀肿消退快。

本研究结果表明，模型复制后大鼠体质量无明显变化，大鼠子宫指数和卵巢指数明显降低($P<0.05$)。各治疗组大鼠子宫指数和卵巢指数较模型组无明显变化($P>0.05$)，可能与样本量小有关。有研究[11]表明，丹参具有促进卵泡发育和减少细胞凋亡的作用，能够提高卵泡存活率。文献[12]报道淫羊藿可增加小鼠子宫质量。肉苁蓉能增强下丘脑-垂体-卵巢的促黄体功能，使大鼠子宫质量比对照组明显增加[11]。菟丝子、红花、丹参、肉苁蓉等中药可提高血清雌激素水平，但淫羊藿、女贞子、川牛膝可使血清雌激素水平有所下降[13]。以上这些研究提示，中药复方作用机制和靶点可能是复杂的、综合的、系统的，中药复方的各种成分一起作用维持机体平衡，达到阴阳平衡，单一研究某种药物的作用机制尚不能完整清楚地阐明中药复方的作用机制。

参考文献：

[1] 赵松泉.排卵汤治疗95例各种排卵功能失调的观察[J].天津中医,1985,2(4):8-9.
[2] 赵松泉.排卵汤治疗不孕症100例疗效观察[J].北京中医杂志,1993,12(2):29-30.
[3] 李玲.应用赵松泉老中医排卵方治疗不孕症42例[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(13):13-14.
[4] 俞瑾,杨淑萍,张月萍,等.雄激素致高胰岛素高雄激素无排卵大鼠模型[J].生殖医学杂志,1993,2(4):215-219.
[5] Flerko B,Setalo G,Tima L. Reproduction and development:advances in physiological sciences Vol. 15[M]. Budapest:Pergamon press and Akademia Kiado press,1980:79-89.
[6] 周莉,亓蓉,梁莹,等.经阴道彩色多普勒观察卵巢血流灌注与卵泡发育的关系[J].生殖与避孕,2008,28(7):441-443.
[7] 苏继莲,罗洁,应伟雯.不孕妇女卵巢血供彩色多普勒特点与卵巢功能的相关性研究[J].实用妇产科杂志,2008,24(4):223-225.

[8] 南京中医药大学.中药大辞典[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2010:2063-2064.
[9] 侯家玉.中药药理学:新世纪全国高等中医药院校规划教材[M].北京:中国中医药出版社,2007:145-146.
[10] 蒋昌烈.细辛治跌打损伤效果好[J].中医杂志,1993,34(6):327.
[11] 唐飞,张魏,吴永根,等.丹参注射液对冻融小鼠卵巢移植早期光镜结构及超微结构的影响[J].解剖学报,2011,42(4):542-547.
[12] 赵丕文,王大伟,王玲巧,等.用小鼠子宫增重法筛选淫羊藿等10种中药雌激素样作用的实验研究[J].北京中医药大学学报,2006,29(10):686-689.
[13] 张晓晖,刘素香,徐敏.植物雌激素与中药研究[J].中药新药与临床药理,2002,13(4):261-264.

(收稿日期:2014-12-04;编辑:曹健)

Effects of Wenshen Yangxue Decoction on Ovarian Quality and Morphology of Anovulatory Rats

XIN Ming-wei[1], *ZHANG Qiu-xia*[2], *ZHAO Hui*[2], *YANG Yi-long*[3], *HE Jun-qin*[1], *LIANG Xin-yun*[1], *ZHANG Ying*[1], *YANG Wei*[1], *WU Ying*[1], *YIN Xiao-dan*[1]

(1. *Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing* 100026, *China*; 2. *College of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*; 3. *Capital Medical University, Beijing* 100069, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To study the effects of Wenshen Yangxue Decoction (WYD, for warming the kidney and nourishing the blood) on uterine index, ovarian index, and ovarian morphology of anovulatory rats. **Methods** Anovulatory rats were reproduced by subcutaneous injection of testosterone propionate, and divided into model group, Western medicine group, high-dose WYD group, medium-dose WYD group, and low-dose WYD group. Rats in the above groups were given normal saline solution, clomiphene citrate, 52 mg/kg WYD, 26 mg/kg WYD, and 13 mg/kg WYD, respectively, by gavage. Some other 22-day-old rats were enrolled into normal group. After 21 days of continuous gavage, the body weight, uterine index, and ovarian index in each group were measured, and ovarian morphology was observed using light microscopy. **Results** Rats in the model group had significantly lower uterine and ovarian indices than those in the normal group ($P<0.05$), while there was no significant difference in body weight between the two groups ($P>0.05$). There were no significant differences in body weight, uterine index, and ovarian index between the model group and each medication group ($P>0.05$). Ovarian morphology in the high-dose and medium-dose WYD groups were similar to that in the normal group, with substantially improved structures, follicles at different stages of development observed in most of ovaries, and observed formation of cumuluses, eggs, and typical corpus luteum. Ovarian morphology in the Western medicine group and low-dose WYD group were similar to that in the model group, with a small ovarian size, gray and spotless ovaries, few, small, and mostly cystically dilated follicles, and no corpus luteum. **Conclusion** WYD can improve ovarian structure and promote follicle development.

[**Key words**]Wenshen Yangxue Decoction; anovulatory menstruation; body weight; uterine index; ovarian index; ovary; morphology