

· 论著 ·

复方滋阴颗粒对去卵巢大鼠性激素和氧化应激水平的影响

钱 珺¹, 谢 凡¹, 卫克昭², 高建平², 李文艳¹ (1. 上海市浦东新区公利医院药剂科, 上海 200135; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的 研究复方滋阴颗粒对去卵巢大鼠性激素和氧化应激水平的影响。方法 实验分为模型组、六味地黄丸组、戊酸雌二醇组、滋肾养阴汤剂组和复方滋阴颗粒(低、中、高剂量)组、正常组和假手术组, 给药8周, 检测血清雌二醇(E2)、促卵泡素(FSH)、促黄体生成素(LH)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果 与模型组比较, 复方滋阴颗粒(简称“颗粒”)中、高剂量可显著升高E2水平, 中剂量可降低LH水平, 低、中、高剂量均可降低FSH水平; 颗粒中、高剂量可显著升高T-SOD、GSH-Px活性, 降低MDA水平, 低剂量则可升高T-SOD活性并降低MDA水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与戊酸雌二醇组比较, 低剂量可明显升高T-SOD活性($P<0.05$); 与汤剂组比较, 颗粒中、高剂量可明显升高GSH-Px活性($P<0.05$)。结论 复方滋阴颗粒对去卵巢围绝经期模型大鼠垂体-卵巢轴的性激素分泌功能的异常有逆转作用, 并提高其抗氧化能力。

[关键词] 复方滋阴颗粒; 围绝经期; 性激素; 抗氧化; 大鼠

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)05-0431-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201912023

Effects of compound Ziyin granule on sex hormones and oxidative stress levels of ovariectomized rats

QIAN Jun¹, XIE Fan¹, WEI Kezhao², GAO Jianping², LI Wenyan¹ (1. Department of Pharmacy, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of compound Ziyin granule (CZG) on sex hormones and oxidative stress levels of ovariectomized rats. **Methods** The experiment was divided into model group, Liuwei Dihuang pill group, estradiol valerate group, Zishen Yangyin Decoction group, CZG (low, medium, high dose) group, ormal group and sham operation group. After administration for 8 weeks, serum estradiol (E2), follicle stimulation hormone (FSH), luteotropic hormone (LH), total-superoxide dismutase (T-SOD), malonaldehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured. **Results** Compared with the model group, E2 was significantly raised at medium and high doses of CZG, LH was decreased at medium dose, and FSH was reduced at low, medium and high dose; medium and high dose of CZG were capable of remarkably increasing T-SOD, GSH-Px and decreasing MDA, and low dose raised T-SOD and reduced MDA ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with estradiol valerate group, low dose of CZG significantly increased T-SOD ($P<0.05$). Compared with decoction group, GSH-Px was remarkably raised at medium and high dose ($P<0.05$). **Conclusion** The CZG could reverse the abnormal function of sex hormone secretion in the pituitary-ovary axis of the ovariectomy perimenopausal model rat and improve its antioxidant capacity.

[Key words] compound Ziyin granule; perimenopause; sex hormones; antioxidation capacity; rats

围绝经期综合征(PMS)是指妇女从性成熟期步入老年期这一过渡阶段出现的一系列植物神经

系统功能紊乱所导致的症状, 又称“更年期综合征”。西医通常采用激素替代治疗, 但临床禁忌证较多^[1], 且获益-风险仍存在一定争议^[2]。中药复方具有多靶点、不良反应少、疗效肯定、不易复发等特点, 是PMS防治的理想选择之一^[3]。复方滋阴颗粒根据上海市浦东新区公利医院中医科临床经验方滋肾养阴汤(滋阴补肾方)改制而成, 具有便于服用、携带、储藏和运输的优点, 患者耐受性更好^[4]。经20余年临床应用和对该方先后进行的一系列临

[基金项目] 上海市浦东新区中医药研发创新专项(PDZYFCX-201701); 上海市临床药学重点专科建设项目(区属)经费资助(2018)

[作者简介] 钱 珺, 硕士, 药师, 研究方向: 中药活性成分与质量标准研究, Email: qianjun9334@163.com

[通讯作者] 李文艳, 硕士, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 中药新药和临床药学研究, Email: liwenyan_linda@163.com

床研究证实,滋肾养阴方在改善 PMS 症候、调节雌激素受体及其相关蛋白的表达方面均有效验^[5-7]。本课题组前期已顺利建立该颗粒的制备工艺和质控方法^[8-9]。现以去卵巢大鼠为模型,研究复方滋阴颗粒对其性激素和氧化应激水平的影响,为该颗粒剂的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

HH-4 型水浴锅(江苏杰瑞尔电器有限公司); TGL-16G-A 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); JA5003AL 型天平(上海景天电子仪器有限公司); Biotek Synergy HT 型酶标仪(香港基因有限公司)。

1.2 药物及配制方法

复方滋阴颗粒、滋肾养阴汤剂均为上海市浦东新区公利医院药剂科自制,颗粒批号:171202,常温干燥避光保存,1.00 g 浸膏粉相当于 4.21 g 生药;汤剂浓度为 167 g 生药/150 ml 剂。六味地黄丸(兰州佛慈制药股份有限公司,批号:17C204),戊酸雌二醇片(拜耳广州分公司,批号:383A)分别临用前研磨后定容至所需浓度。注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号:F7112104),临用前加入注射用水现配现用。

1.3 试剂

T-SOD 试剂盒(羟胺法,批号:20180726)、MDA 试剂盒(批号:20180730)、GSH-Px 测定试剂盒(比色法,批号:20180731)均购于南京建成生物工程研究所;大鼠 FSH ELISA 试剂盒(批号:201807)、E2 ELISA 试剂盒(批号:201807)、LH ELISA 试剂盒(批号:201807)均购于上海哈灵生物科技有限公司。

1.4 动物

雌性 SD 大鼠,72 只,清洁级,体重 200~220 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002。饲养于上海中医药大学动物实验中心,温度 22~24 °C,湿度(40±5)%,每天 12 h 光照。适应性饲养 1 周后用于实验。

1.5 方法

1.5.1 围绝经期大鼠模型的建立

除正常组外,其他雌性大鼠以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,假手术组大鼠切除两侧卵巢下方的部分脂肪组织后缝合,其他大鼠均切除两侧卵巢。术后 3 d,每日 1 次肌内注射青霉素 20 万 U,从第 4 天开始连续 5 d 阴道涂片观察动情周期,以动情周期无变化确定去除卵巢彻底^[10]。

1.5.2 分组及给药方式

除正常组和假手术组,将造模成功的大鼠随机分为模型组、六味地黄丸组(0.9 g 生药/kg)、戊酸雌二醇组(0.2 mg/kg)、滋肾养阴汤剂组(16.7 g 生药/kg)和复方滋阴颗粒低、中、高剂量组(5.0、10.0、20.0 g 生药/kg)。手术后第 7 天开始,各药物组动物给予相应药液灌胃,正常组、假手术组和模型组大鼠给予等容积的蒸馏水灌胃,每日 1 次,每 5 d 称体重 1 次,随体重调整给药量,连续灌胃给药 8 周。

1.5.3 取材及指标检测方法

将灌胃 8 周的大鼠禁食不禁水 12 h,依据体重灌胃给药后,用 25% 乌来糖(0.4 ml/100 g)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,室温静置 1.0 h 后离心 10 min,转速 4 000 r/min,取上层血清用于测定指标。采用 ELISA 法检测血清中 E2、FSH、LH 浓度;分别采用羟胺法和 DTNB 法检测血清中 T-SOD 和 GSH-Px 活性,采用 TBA 法检测血清 MDA 含量。所有操作均按试剂盒说明书进行。

1.6 统计方法

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。结果采用($\bar{x}\pm s$)形式表示。采用单因素方差分析方法,LSD 法用于组间的两两比较,对于方差不齐者,采用 Dunnett's T3 法分析,对于正态不齐者,采用秩和检验法分析。以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 对性激素水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清 E2 显著降低,FSH 水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比,六味地黄丸组、戊酸雌二醇组、滋肾养阴汤剂组、复方滋阴颗粒中、高剂量组大鼠血清 E2 水平显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),所有给药组大鼠血清 FSH 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),六味地黄丸组、汤剂组、颗粒中剂量组大鼠 LH 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与戊酸雌二醇组相比,颗粒高剂量对 E2 水平的影响弱于戊酸雌二醇($P<0.05$),而颗粒中剂量组的 FSH 水平明显高于戊酸雌二醇组($P<0.05$);而与六味地黄丸组、汤剂组相比,颗粒低、中、高剂量组则均无明显差异。具体见表 1。

2.2 对氧化应激水平的影响

与正常组相比,假手术组大鼠血清的 T-SOD 活性没有显著降低。与假手术组相比,模型组大鼠血清的 T-SOD 和 GSH-Px 活性显著降低

表1 复方滋阴颗粒对围绝经期模型大鼠性激素水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量(g生药/kg)	E2(ng/L)	FSH(IU/L)	LH(ng/L)
正常组	—	6.36±0.06	2.57±0.02	438.03±3.89
假手术组	—	6.86±0.13	2.63±0.04	437.49±2.92
模型组	—	4.56±0.11 [#]	2.94±0.02 [#]	428.50±1.55
六味地黄丸组	0.9	6.76±0.13 ^{**}	2.60±0.03 ^{**}	393.35±2.38 [*]
戊酸雌二醇组	0.2 mg/kg	6.94±0.11 ^{**}	2.62±0.02 ^{**}	408.66±2.66
滋肾养阴汤组	16.7	6.10±0.12 ^{**}	2.60±0.02 ^{**}	383.42±3.05 [*]
复方滋阴颗粒组				
低剂量	5.0	6.03±0.18	2.56±0.03 ^{**}	382.25±6.30
中剂量	10.0	6.73±0.10 ^{**}	2.71±0.03 ^{*▲}	367.96±2.13 ^{**}
高剂量	20.0	5.80±0.14 ^{*▲}	2.70±0.02 ^{**}	370.22±4.91

注：“—”表示不给药。^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, 与模型组比较; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, 与假手术组比较; [▲] $P<0.05$, 与戊酸雌二醇组比较。

($P<0.05$), MDA 含量没有显著变化。与模型组相比, 各给药组大鼠血清 T-SOD 活性显著升高, MDA 含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 戊酸雌二醇组与复方滋阴颗粒中、高剂量组大鼠血清 GSH-Px 活性显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与六味地黄丸组相比, 颗粒低、中、高剂量组在 T-SOD、MDA 和 GSH-Px 水平均无明显差异; 与戊酸雌二醇组相比, 颗粒低剂量升高 T-SOD 活性的作用强于戊酸雌二醇、使 GSH-Px 活性升高的作用弱于戊酸雌二醇($P<0.05$), 而颗粒中、高剂量组则无明显差异; 与滋肾养阴汤剂组相比, 颗粒中、高剂量升高 GSH-Px 水平作用更明显($P<0.05$), 而颗粒低剂量与汤剂比则无明显差异。具体见表2。

3 讨论

目前学术界较为认可的 PMS 的发病机制是围

绝经期性器官逐渐萎缩, 卵巢停止排卵, 以 E2 为主的雌激素和孕激素水平不断降低, 对下丘脑-垂体反馈抑制作用减弱, 进而 LH 和 FSH 浓度升高; 同时卵泡产生抑制素减少, 使 LH 和 FSH 浓度升高, 下丘脑-垂体对雌激素敏感性降低, 最终导致内分泌和植物神经系统紊乱, 引起一系列临床症状^[11]。从中医诊治角度, 本病属阴虚证, 病因多为肾精亏损, 天葵衰竭, 精血两虚, 冲任不调, 其中肾精亏损是其根本所在。因此治疗当以补肾虚为主^[12-13]。方中生地、菟丝子共为君药, 奏填精益髓, 滋补肾阴之效; 女贞子、墨旱莲、黄精、山茱萸共为臣药, 助君药共行滋阴养血, 益肝肾而补精之效; 佐药茯苓、泽泻、淮山药利水渗湿, 健脾宁心; 牡丹皮清热凉血, 制诸药温涩之性。现代药理学研究证明, 女贞子、墨旱莲、菟丝子黄酮提取物具有雌激素样活性^[14]。本实验中模型组大鼠血清 E2 明显降低, FSH 水平

表2 复方滋阴颗粒对围绝经期模型大鼠血清氧化应激水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量(g生药/kg)	MDA(nmol/ml)	T-SOD(U/ml)	GSH-Px(酶活力单位)
正常组	—	5.60±0.10	26.53±0.77	689.19±1.91
假手术组	—	5.78±0.09	24.03±0.25	669.60±7.95
模型组	—	6.59±0.20	21.12±0.36 [#]	608.79±3.33 [#]
六味地黄丸组	0.9	5.28±0.10 ^{**}	26.84±0.38 ^{**}	629.77±3.67
戊酸雌二醇组	0.2 mg/kg	4.69±0.10 ^{**}	24.39±0.20 [*]	668.24±4.15 ^{**}
滋肾养阴汤组	16.7	4.40±0.07 ^{**}	25.62±0.56 [*]	621.89±3.44
复方滋阴颗粒组				
低剂量	5.0	4.72±0.10 ^{**}	28.30±0.54 ^{**▲}	627.04±2.79 [▲]
中剂量	10.0	5.28±0.07 [*]	26.50±0.37 ^{**}	670.17±5.78 ^{*△}
高剂量	20.0	4.93±0.12 ^{**}	25.09±0.22 ^{**}	674.04±6.10 ^{**△}

注：“—”表示不给药。^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, 与模型组比较; [#] $P<0.05$, 与假手术组比较; [▲] $P<0.05$, 与戊酸雌二醇组比较; [△] $P<0.05$, 与滋肾养阴汤组比较。

明显升高,与临床PMS的激素变化吻合;复方滋阴颗粒、汤剂组均能显著升高血清E2水平,降低FSH和LH水平,作用与六味地黄丸、戊酸雌二醇相当。

衰老的机体存在着一定的抗氧化能力下降趋势,围绝经期阴虚火旺的症状与代谢过程中氧化还原反应增强有关^[15]。体内MDA含量升高,SOD、GSH-Px等抗氧化酶活性降低,使过多的自由基聚集,线粒体内膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,导致新陈代谢紊乱,调节功能失调,加速衰老。SOD是需氧生物体内唯一可以消耗超氧化物自由基的酶蛋白,可阻断超氧化物自由基引发的一级反应,较高的SOD浓度对清除内环境代谢及药物等外环境引入的氧离子起积极作用;GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,可阻断脂质过氧化物引发的二级反应,减少对机体的损害;MDA则是脂质过氧化重要产物之一,具有细胞毒性^[16]。三者均为反映机体自由基水平和清除自由基能力的主要指标。大量药理学研究结果表明,方中女贞子、墨旱莲、菟丝子、山茱萸、黄精等药味均具有抗氧化、抗衰老的作用。本研究结果表明,复方滋阴颗粒较其他组可显著升高血清T-SOD和GSH-Px活性,具有一定优势。

本研究证实复方滋阴颗粒可逆转去卵巢围绝经期模型大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴性激素分泌功能的异常情况,提高雌激素水平,并可提高机体抗氧化能力。与传统汤剂比较,该颗粒药效一致,且在剂型上有一定优势。本课题组将进一步进行复方滋阴颗粒的毒理学等研究,为其安全性提供依据。

【参考文献】

[1] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 绝经期管理与激素补充治疗临床应用指南(2012版)[J]. 中华妇产科杂志, 2013,

48(10): 795-799.

[2] 张凡,张广美. 女性绝经综合征的研究进展[J]. 中国临床研究, 2017, 30(8): 1131-1133, 1137.
 [3] 何霞霞,刘笑梅,尚成英. 中医药治疗围绝经期失眠症的系统评价[J]. 西部中医药, 2016, 29(11): 61-65.
 [4] 徐青青. 中药颗粒剂优点与不足[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(22): 141-142.
 [5] 李文艳,吴昆仑,姚佳晨,等. 滋肾养阴汤对去卵巢大鼠性激素水平及抗氧化能力的影响[J]. 中成药, 2013, 35(4): 673-676.
 [6] 吴昆仑,唐蕊蕊,都乐亦,等. 滋阴补肾法治围绝经期综合征对性激素水平的影响[J]. 中成药, 2010, 32(2): 347-348.
 [7] 唐蕊蕊,吴昆仑,都乐亦,等. 滋阴补肾方对围绝经期综合征患者雌激素及雌激素受体的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(2): 27-30.
 [8] 林启焰,王晗雪,李文艳,等. 滋肾养阴颗粒的质量标准研究[J]. 中草药, 2017, 48(16): 3338-3342.
 [9] 林启焰,谢凡,程雪梅,等. 滋肾养阴颗粒剂提取工艺研究[J]. 中成药, 2017, 39(1): 213-215.
 [10] 王鑫国,郭秋红,白霞,等. 乌鸡白凤丸对去卵巢大鼠雌激素分泌的影响[J]. 中成药, 2003, 25(1): 67-68.
 [11] BERLANGA C, MENDIETA D, ALVA G, et al. Failure of tibolone to potentiate the pharmacological effect of fluoxetine in postmenopausal major depression[J]. J Womens Health (Larchmt), 2003, 12(1): 33-39.
 [12] 任婕,王天芳,李力,等. 更年期综合征常见中医证候及其症状分布特点的文献分析[J]. 江苏中医药, 2008, 40(4): 67-70.
 [13] 刘雁峰,肖承棕,王铁枫,等. 更年期综合征中医用药特点、症状及证型分布的现代文献分析[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(2): 125-130.
 [14] 罗克燕,杨丹莉,徐敏. 菟丝子总黄酮对排卵障碍大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴性激素水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 258-260.
 [15] 顾文聪,赵伟康,韩志芬. 阴虚火旺更年期综合征患者血浆过氧化脂质及性激素的变化[J]. 中医杂志, 1990, 31(9): 45-47.
 [16] 常君瑞,徐东群. 甲醛对机体超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和丙二醛的影响[J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 653-655.

[收稿日期] 2019-12-05 [修回日期] 2020-03-09
 [本文编辑] 李睿旻

(上接第408页)

[3] MERGENHAGEN K A, WATTENGEL B A, SKELLY M K, et al. Fact versus fiction: a review of the evidence behind alcohol and antibiotic interactions[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(3): e02167-e02119.
 [4] 郑文科,张俊华,杨丰文,等. 从湿毒疫论治新型冠状病毒肺炎[J]. 中医杂志, 2020, 61(12): 1024-1028.
 [5] 毛昀,苏毅馨,薛鹏,等. 金花清感颗粒治疗新型冠状病毒肺炎作用机制探讨[J]. 中药材, 2020(6): 1-8.
 [6] 凌晓颖,陶嘉磊,孙逊,等. 基于网络药理学的连花清瘟方冠状病毒的物质基础及机制探讨[J]. 中草药, 2020, 51(7): 1723-

1730.

[7] 许洪彬,李珮馨,綦向军,等. 基于网络药理学和分子对接疏风解毒胶囊治疗新型冠状病毒的机制研究[J]. 中药材, 2020(6): 1-11.
 [8] 陈刚,周地,李宁. 藿香正气方肠道保护作用的研究进展[J]. 重庆医学, 2020, 49(11): 1-5.
 [9] 霍志鹏,刘元雪,郝磊,等. 藿香正气防治新型冠状病毒肺炎潜在应用的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 405-410.

[收稿日期] 2020-07-06 [修回日期] 2020-08-19
 [本文编辑] 李春德