

• 论 著 •

益肾活血助孕汤对排卵障碍性不孕症模型大鼠卵巢颗粒细胞钙浓度的影响*

占葆娥, 龚永慧, 花纯宏, 关丽娜, 张春雷
(广东省深圳市中医院检验科 518033)

摘要:目的 探讨益肾活血助孕汤治疗排卵障碍性不孕症的机制。方法 构建排卵障碍性不孕症大鼠模型, 给予益肾活血助孕汤治疗, 检测卵巢颗粒细胞内 Ca^{2+} (Ca_i^{2+}) 浓度。结果 与对照组比较, 模型组卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度显著降低 ($P < 0.05$); 中药治疗组 Ca_i^{2+} 浓度明显高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 益肾活血助孕汤能提高排卵障碍性不孕症模型大鼠卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度, 从而达到治疗排卵障碍性不孕症的目的。

关键词: 中草药; 排卵; 钙; 卵巢

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)12-1302-02

Effects of tonifying kidney-promoting blood flow-assist fetation soup on calcium ion of ovaries-granulocytes in the rat modle of ovulation failure

Zhan Bao'e, Gong Yonghui, Hua Chunhong, Guan Li'na, Zhang Chunlei

(Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518033, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of tonifying kidney-promoting blood flow-assist fetation soup for the treatment of ovulation failure. **Methods** Rat model of ovulation failure was constructed and treated with tonifying kidney-promoting blood flow-assist fetation soup and then the contents of intracellular Ca^{2+} (Ca_i^{2+}) in ovaries-granulocytes were measured. **Results** Compared with control group, the level of Ca_i^{2+} in ovaries-granulocytes significantly decreased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the level of Ca_i^{2+} in ovaries-granulocytes increased significantly in treated group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tonifying kidney-promoting blood flow-assist fetation soup could increase the level of Ca_i^{2+} in ovaries-granulocytes of the rat model of ovulation failure and could be used for the therapy of ovulation failure.

Key words: drugs, Chinese herbal; ovulation; calcium; ovary

不孕症是女性常见病之一, 排卵障碍则是导致女性不孕的最常见原因。诱发排卵是治疗排卵功能障碍的主要措施, 但目前整体疗效并不理想。在临床应用过程中, 化学合成药物治疗虽可获得较高的排卵率, 但由于其对卵子发育及子宫内膜的影响, 妊娠率较低, 但某些药物价格昂贵、用法复杂、不良作用较多、易导致多胎妊娠, 且疗效不稳定, 一旦停药, 不易建立和恢复正常的排卵周期, 不能从整体上调节生殖内分泌环境。中药在排卵障碍性不孕症的治疗上有一定优势, 但缺乏明确的理论支持^[1]。研究发现, 细胞内 Ca^{2+} 浓度和卵泡的成熟和排卵密切相关, 细胞内 Ca^{2+} 水平异常可以导致排卵障碍, 从而引发不孕^[2-4]。为此, 笔者构建了不孕大鼠模型, 并以中药进行干预, 观察其颗粒细胞内 Ca^{2+} (intracellular Ca^{2+} , Ca_i^{2+}) 浓度的变化, 以探讨中药治疗排卵障碍性不孕症的具体机制, 为临床治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 研究对象 广州中医药大学动物中心提供的 SD 雌性大鼠 60 只, 性周期表现正常, 体质量 220~250 g; 随机分为健康对照组(简称对照组)、排卵障碍性不孕症模型组(简称模型组)和中药治疗模型组(简称中药治疗组), 每组 20 只。

1.2 方法 (1)模型构建: 在卵泡早期给予大鼠羟基豚 300 mg/(kg·d)灌胃, 持续灌胃 19 d 后, 加大羟基豚用量至 500 mg/(kg·d), 隔日进行阴道脱落细胞涂片检查, 仅表现为核上皮或局化上皮, 无周期性变化时判为排卵受抑, 表示建模成功。

(2)治疗方法: 对照组和模型组给予生理盐水灌胃; 中药治疗组给予益肾活血助孕汤[枸杞子 15 g, 熟地 15 g, 鹿角胶(炸化) 15 g, 肉苁蓉 15 g, 续断 12 g, 紫河车 10 g, 制何首乌 15 g, 白芍 15 g, 紫石英 30 g, 巴戟天 10 g, 泽兰 15 g, 益母草 30 g]灌胃, 按公式 $dB = dA \times RB/RA \times (WA/WB)^{1/3}$ 计算用药剂量, 其中 d 为每千克体质量用药剂量 (mg/kg)、W 为比重系数、R 为平均体质量 (kg)、A 和 B 分别代表人和大鼠, 治疗持续 4 周后处死大鼠。(3)标本采集及检测: 各组大鼠均在处理 4 周后, 按每 100 g 体质量给予 10% 水合氯醛 0.5~0.8 mL 进行麻醉, 麻醉成功后从大鼠背部正中切开, 取出卵巢, 显微镜下剔出表面脂肪组织和被膜后, 将卵巢组织放置于盛有 L15 的培养基、10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素的平皿中, 平皿置于冰上, 显微镜下以 4.5 mm 针头针刺释放颗粒细胞, 用 4 mL 规格的 EP 管收集, 1 200 r/min 离心 5 min, PBS 冲洗 3 次后再次离心, 弃上清, 加入培养基重悬, 均匀种于培养瓶中, CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞长满瓶底后, 以 0.25% 胰酶消化细胞, PBS 冲洗 3 次后 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集颗粒细胞, 采用无血清培养基继续培养 24 h, 应用钙敏感指示剂 Fura-2/AM 测定卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度。将负载 Fura-2 的卵巢颗粒细胞置于荧光显微镜下, 钙荧光的激发波长为 340 nm/380 nm, 发射波长为 510 nm。荧光信号经 Felix 专用软件处理。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件包进行统计学分析。

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目(201003193)。

计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用 t 检验; $P < 0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结果

对照组、模型组和中药治疗组卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度分别为(178 ± 6)、(127 ± 3)和(169 ± 4)nmol/L;模型组卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度低于对照组($P < 0.05$),中药治疗组卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度高于模型组($P < 0.05$)。

3 讨论

笔者在前期研究中构建了排卵障碍性不孕症大鼠模型,与健康大鼠比较,不孕大鼠血清促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体激素(luteotrophic hormone, LH)、雌二醇(estradiol, E2)、孕酮(progesterone, P)水平降低($P < 0.05$),而催乳素(prolactin, PRL)、睾酮(testosterone, T)水平升高($P < 0.05$);模型大鼠经中药益肾活血助孕汤处理后各指标水平均呈不同程度的改善,并发现益肾活血助孕汤除通过调节垂体功能外,也可直接影响卵巢组织 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的表达,后者可能是其治疗排卵障碍不孕症的有效靶点之一^[5-7]。近期研究发现,多种生殖系统激素(如 T、E2、P 等)可与 GABA A 受体亚基特异性结合,对其功能进行调节,其中 P、GABA 等均可直接导致激活生殖系统 GABA A 受体,介导 Cl^- 外流,发挥细胞膜去极化作用,并通过激活临近的高电压激活的电压依赖型钙通道(voltage-dependent calcium channels, VDCCS)引起细胞外 Ca^{2+} (extracellular Ca^{2+} , Ca_e^{2+})内流;在生殖母细胞中, Ca_e^{2+} 内流进一步通过钙离子诱导的钙离子释放(Ca^{2+} induced- Ca^{2+} release, CICR)激活 Ca^{2+} 相关的 CaM/cAMP、ERK/MAPK 等信号转导途径,最终可致包括 CREB 在内的多种相关转录因子的磷酸化,启动基因转录,促进细胞分裂、配子发生等过程,提示 Ca^{2+} 是多条信号通路的交汇点, Ca^{2+} 水平的异常可引起排卵障碍,是导致排卵障碍性不孕症的重要因素^[8-10]。

临床中医治疗排卵障碍性不孕症的方法较多,常用的有养肝滋肾、益气固肾活血法、从心脾辨治、疏肝养血法、补肾调冲法、通补冲任法等,均有一定的疗效^[11-12]。笔者以益肾活血助孕汤对排卵障碍性不孕症模型大鼠进行治疗,发现对照组、模型组和中药治疗组卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度分别为(178 ± 6)、(127 ± 3)和(169 ± 4)nmol/L;与对照组比较,模型组 Ca_i^{2+} 浓度降低($P < 0.05$),中药干预能提高卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度($P < 0.05$),说明益肾活血助孕汤能提高排卵障碍性不孕症模型大鼠卵巢颗粒细胞 Ca_i^{2+} 浓度,从而达到治疗排卵障碍性不

孕症的目的。

参考文献

- [1] 马灵芝. 促排卵汤对高雄激素所致不孕小鼠的实验研究[J]. 河北中医, 2004, 26(7): 554-556.
- [2] Mostallino MC, Sanna E, Concas A, et al. Plasticity and function of extrasynaptic GABA(A) receptors during pregnancy and after delivery[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(Suppl1): 74-83.
- [3] Biggio G, Cristina Mostallino M, et al. GABA(A) receptor function and gene expression during pregnancy and postpartum[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 85(1): 73-94.
- [4] Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish[J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165(3): 438-455.
- [5] Søgaard R, Ebert B, Klaerke D, et al. Triton X-100 inhibits agonist-induced currents and suppresses benzodiazepine modulation of GABA(A) receptors in Xenopus oocytes[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(5): 1073-1080.
- [6] Morton CM, Rosenow J, Wong C, et al. Intrathecal baclofen administration during pregnancy: a case series and focused clinical review[J]. PMR, 2009, 1(11): 1025-1029.
- [7] Belelli D, Harrison NL, Maguire J, et al. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function[J]. J Neurosci, 2009, 29(41): 12757-12763.
- [8] Maffucci JA, Gore AC. Chapter 2: hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2009, 274(1): 69-127.
- [9] Neal-Perry GS, Zeevalk GD, Shu J, et al. Restoration of the luteinizing hormone surge in middle-aged female rats by altering the balance of GABA and glutamate transmission in the medial preoptic area[J]. Biol Reprod, 2008, 79(5): 878-888.
- [10] Hurley JH, Ballard CJ, Edenberg HJ. Altering the relative abundance of GABA A receptor subunits changes GABA- and ethanol-responses in Xenopus oocytes[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2009, 33(6): 1089-1096.
- [11] 薛海琴, 施艳秋. 排卵功能障碍性不孕治疗近况[J]. 实用中医杂志, 2009, 25(2): 123-124.
- [12] 景彦林, 谭洁. 补肾调周法治疗排卵障碍性不孕疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(34): 5088-5089.

(收稿日期: 2011-03-15)

(上接第 1301 页)

综上所述,三种方法各有优缺点,需根据实际情况选择合适的方法,或采取联合检测,以便为临床诊疗提供及时准确的依据。

参考文献

- [1] 曹阳,熊将军. 两种方法检测淋球菌的临床应用评价[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(11): 869-870.
- [2] Martin IM, Ison CA. Detection of mixed infection of Neisseria gonorrhoeae[J]. Sex Transm Infect, 2003, 79(1): 56-58.
- [3] Vickerman P, Peeling RW, Watts C, et al. Detection of gonococcal infection: pros and cons of a rapid test[J]. Mol Diagn, 2005, 9(4): 175-179.
- [4] 张秀珍. 当代细菌检验与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 208.

- [5] Ng L, Martin I. The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2005, 16(1): 15-25.
- [6] 赵亮. 两种淋球菌检测方法对比[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(14): 169-170.
- [7] 向华国,熊礼宽,涂植光. 淋病奈瑟氏菌感染的实验诊断进展[J]. 重庆医学, 2006, 25(21): 1991-1997.
- [8] 黄培忠,马超,黄静. 淋病奈瑟菌 3 种检测方法结果分析[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(20): 1750-1751.
- [9] 陈响,肖红. 常见性传播疾病实验室指标的评价[J]. 辽宁医学杂志, 2004, 18(6): 322-323.
- [10] 黄宇烽,许瑞吉. 男科诊断学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1999: 10.

(收稿日期: 2011-04-22)