

补肾疗更浸膏对去势更年期模型大鼠下丘脑 β -内啡肽与自由基代谢的影响

阳松威¹, 郭建生^{1,2*}, 王晓倩¹, 刘顶鼎¹, 黄琳桂¹

(1. 湖南中医药大学 中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学 药学院, 长沙 410208)

[摘要] **目的:**研究补肾疗更浸膏对去势更年期模型大鼠下丘脑 β -内啡肽含量与自由基代谢功能的影响,并探讨作用机制。**方法:**手术摘除雌性SD大鼠双侧卵巢复制更年期综合征模型,阴道细胞涂片检查模型成功后,将其随机分为正常组,假手术组,模型组,戊酸雌二醇片组($0.18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),坤泰胶囊组($1.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),补肾疗更浸膏低、中、高剂量组($4.5, 9, 18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只。除正常组、假手术组与模型组小鼠 ig 给予等量蒸馏水外,各组小鼠按照剂量要求 ig 给药,每天1次,连续4周。末次给药24h后,腹主动脉取血,酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性与丙二醛(MDA)含量,取下丘脑测定 β -内啡肽(β -EP)含量。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血清SOD, GSH-Px活性明显降低($P < 0.01$),MDA含量明显升高($P < 0.01$),下丘脑 β -EP含量明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,补肾疗更浸膏高、中剂量组大鼠血清SOD, GSH-Px活性明显升高($P < 0.01$),MDA含量明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),下丘脑 β -EP含量明显升高($P < 0.05$);补肾疗更浸膏低剂量组大鼠血清GSH-Px活性明显升高($P < 0.05$)。**结论:**补肾疗更浸膏可通过调节去势大鼠下丘脑 β -EP水平调控下丘脑-垂体-卵巢轴功能;并通过调节血液中SOD, GSH-Px活性及MDA含量增强去势大鼠抗氧化能力,起到延缓更年期氧化衰老进程的作用。

[关键词] 补肾疗更浸膏; 更年期; β -内啡肽; 自由基代谢; 作用机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0148-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210148

Effect of Busheng Liaogeng Extract on Free Radical Metabolism and β -endorphin in Hypothalamus of Ovariectomized Rat Model in Menopause YANG Song-wei¹, GUO Jian-sheng^{1,2*}, WANG Xiao-qian¹, LIU Ding-ding¹, HUANG Lin-gui¹ (1. Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Busheng Liaogeng extract on β -endorphin (β -EP) in the hypothalamus and free radicals of rat model in menopause, and explore the mechanism of action. **Method:** Climacteric syndrome models were established by surgical removal of the bilateral ovaries of female SD rats. After successful modeling by vaginal smears test, the rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, estradiol valerate tablets group ($0.18\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Kuntai capsule group ($1.08\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Busheng Liaogeng extract low, medium and high dose groups ($4.5, 9, 18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), $n = 10$ in each group. The rats in various treatment groups received ig administration according to corresponding doses, once daily for 4 weeks, and the rats in control group, sham operation group and model group were ig administered with the same volume of distilled water. 24 h after the last administration, abdominal aortic blood was taken to measure serum superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) content using enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) method, and hypothalamus was taken to measure β -EP

[收稿日期] 20150428(013)

[基金项目] 湖南省新药研发-企业委托课题项目(2014)

[第一作者] 阳松威,在读硕士,从事中药新药研究与开发, Tel:15200832653, E-mail:646972015@qq.com

[通讯作者] *郭建生, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事中药药性理论与中药新药研究, Tel:0731-88458239, E-mail:gjs7878@126.com

content. **Result:** Compared with the normal group, serum SOD, and GSH-Px activity were significantly lower in model group ($P < 0.01$), MDA content was significantly higher ($P < 0.01$), and hypothalamus β -EP content was significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the model group, serum SOD and GSH-Px activity in Busheng Liaogeng extract high-dose and middle-dose group were significantly higher ($P < 0.01$), MDA content was significantly lower ($P < 0.01$, $P < 0.05$), hypothalamus β -EP content was significantly higher ($P < 0.05$), and serum GSH-Px in Busheng Liaogeng extract low dose group was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion:** Busheng Liaogeng extract can regulate hypothalamus-pituitary-ovarian axis functions by adjusting the level of hypothalamus β -EP in ovariectomized rats; and increase antioxidant capacity by adjusting SOD, MDA, and GSH-Px levels in blood, with a delayed menopause role for oxidative aging process.

[**Key words**] Busheng Liaogeng extract; menopause; β -endorphin; free radical metabolism; mechanism

更年期综合征是更年期妇女由于卵巢功能衰退,机体雌激素水平下降,代偿性引起内分泌功能失调,导致下丘脑-垂体-卵巢轴功能紊乱,同时伴随植物神经功能紊乱的一组复杂证候群,主要临床表现为阵发性潮热、月经紊乱、心悸失眠、腰酸背痛等^[1-2]。目前常用雌激素替代疗法(HRT)对该病进行治疗,可明显缓解更年期症状,改善更年期妇女生活质量,但是长期使用可导致生殖系统增殖、水钠潴留、增加心血管病变等不良反应,因而其使用受到各方争议^[3-4]。相比而言中医药对更年期综合征的治疗具有丰富的临床经验,相关研究亦取得了积极成果,具有疗效肯定、副作用少等优点,对其疗效与机制的研究越来越受到人们的关注。

补肾疗更浸膏具有补肾填精、益气活血之功效,临床使用对更年期综合征具有良好疗效。本研究以手术摘除双侧卵巢大鼠复制更年期综合征模型,通过研究补肾疗更浸膏对更年期模型大鼠下丘脑 β -内啡肽(β -EP)与自由基代谢的影响,探讨补肾疗更浸膏对更年期综合征的干预作用,从而为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,雌性,体重(180 ± 20)g,合格证号SCXK(湘)2011-0003。湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.2 药物 补肾疗更浸膏(熟地黄、肉苁蓉、锁阳、党参、龙骨、赤芍、益母草、阿胶、紫河车按6:6:3:6:4:4:6:4:3:3比例组成,经煎煮、过滤、浓缩、离心与烘干操作后制成浸膏,每克浸膏粉含生药量3.3g,浸膏粉由湖南省中医药研究院提供,批号20140605),戊酸雌二醇片(德国拜耳医药保健有限公司,批号113A),坤泰胶囊(中国贵阳新天药业股份有限公司,批号140507)。

1.3 试剂 水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号20130426),甲醛(天津市百世化工有限公司,批号20130805),氯化钠注射液(河北天成药业股份有限公司,批号A14010409),注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号J3102101),BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号00061410),大鼠酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒:超氧化物歧化酶(SOD,批号E-12409),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号E-11023),丙二醛(MDA,批号E-11199), β -内啡肽(β -EP,批号E-11202),均由美国R&D公司提供。

1.4 仪器 TGL-16型台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),PW-812型全自动酶标洗板机(汇松公司),MB-530型酶标仪(汇松公司),THZ-C型恒温震荡器(强乐公司),MTIC B型光学显微镜(Motic公司),FB223型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),LD型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司)。

2 方法

2.1 更年期综合征大鼠模型制备 取SD雌性大鼠80只,按体重与随机数字表随机分为正常组(10只)、假手术组(10只)、模型组(60只)。模型组大鼠手术摘除双侧卵巢,术后连续青霉素处理5d以防感染。术后第6天开始连续5d进行阴道细胞涂片检查,以确定卵巢摘除完全^[5-6]。假手术组不摘除卵巢,仅切除卵巢周围部分脂肪组织,正常组不做任何处理。

2.2 分组及给药 造模成功以后,将模型组大鼠随机分为模型组,戊酸雌二醇片组($0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),坤泰胶囊组($1.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),补肾疗更浸膏低、中、高剂量组($4.5, 9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组10只。各组均按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体积*ig*给药,正常组、假手术组与模型组*ig*给予等量蒸馏水,每天1次,连续4周。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠血清 SOD, MDA, GSH-Px 含量测定 于末次给药 24 h 后,以 10% 水合氯醛 ip 麻醉大鼠,腹主动脉采血,室温静置 40 min 后,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 制备血清,液氮保存,参照试剂盒说明书步骤,采用 ELISA 法测定大鼠血清中 SOD, GSH-Px 活性与 MDA 的含量。

2.3.2 下丘脑 β-EP 含量测定 大鼠腹主动脉取血后,沿头部枕骨大孔处剪断大脑,迅速在冰盘上剥离全脑并分离下丘脑组织,制备组织匀浆,参照试剂盒说明书步骤,经 BCA 蛋白定量后采用 ELISA 法测定下丘脑 β-EP 的含量。

2.4 统计学分析 实验数据采用 SPSS 19.0 软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较,计量资料首先

做正态性和方差齐性检验,满足方差齐性,采用单因素方差分析,不满足方差齐性采用非参数法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去势更年期模型大鼠血清 SOD, MDA, GSH-Px 的影响 与正常组、假手术组比较,模型组大鼠血清 SOD, GSH-Px 活力明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$),MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$),正常组与假手术组比较,SOD, GSH-Px 活力与 MDA 含量差异无统计学意义,提示造模成功。与模型组比较,补肾疗更浸膏高、中剂量组大鼠血清 SOD, GSH-Px 活力明显升高 ($P < 0.01$),MDA 含量明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$);低剂量组大鼠血清 GSH-Px 活力明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 补肾疗更浸膏对去势更年期模型大鼠血清 SOD, MDA, GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Busheng Liaogeng extract on serum SOD, GSH-Px activity and MDA content in ovariectomized rat model of menopause ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/ng·L ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹
正常	-	149.3 ± 22.3	10.5 ± 1.6	101.6 ± 9.3
假手术	-	145.1 ± 13.5	10.5 ± 2.2	100.3 ± 6.3
模型	-	112.6 ± 32.0 ¹⁾	13.2 ± 2.0 ¹⁾	84.1 ± 16.5 ¹⁾
戊酸雌二醇片	1.8 × 10 ⁻⁴	157.8 ± 35.7 ³⁾	10.6 ± 1.3 ³⁾	105.7 ± 16.4 ³⁾
坤泰胶囊	1.08	144.4 ± 30.9 ²⁾	11.1 ± 1.1 ²⁾	104.4 ± 17.1 ³⁾
补肾疗更浸膏	4.5	137.8 ± 21.7	12.0 ± 3.3	96.1 ± 9.5 ²⁾
	9.0	147.8 ± 13.3 ³⁾	11.1 ± 0.7 ²⁾	101.5 ± 6.1 ³⁾
	18.0	163.6 ± 46.2 ³⁾	10.9 ± 1.0 ³⁾	105.7 ± 16.1 ³⁾

注:与正常组及假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对去势更年期模型大鼠下丘脑 β-EP 的影响 与正常组、假手术组比较,模型组大鼠下丘脑 β-EP 含量明显降低 ($P < 0.01$),正常组与假手术组比较,β-EP 含量差异无统计学意义,提示造模成功。经补肾疗更浸膏治疗后,与模型组比较,补肾疗更浸膏高、中剂量组大鼠下丘脑 β-EP 含量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

研究发现卵巢衰老与卵巢老化、卵细胞过度耗竭与体内自由基含量有密切关系。实验研究证明,更年期模型鼠血清脂质过氧化物(LPO),MDA 水平与正常组比较显著升高,SOD, GSH-Px 活性降低,说明更年期模型大鼠因内分泌功能紊乱,相关组织器官加速氧化衰老,自由基清除酶活性降低,其代谢产物在细胞间累积,从而破坏正常细胞结构和功能,导致机体自由基代谢紊乱,从而引起更年期综合症的

表 2 补肾疗更浸膏对去势更年期模型大鼠下丘脑 β-EP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Busheng Liaogeng extract on hypothalamus β-EP content in ovariectomized rat model of menopause ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	β-EP/ng·g ⁻¹
正常	-	88.47 ± 21.85
假手术	-	87.32 ± 21.79
模型	-	62.58 ± 14.39 ¹⁾
戊酸雌二醇	1.8 × 10 ⁻⁴	80.84 ± 15.69 ²⁾
坤泰胶囊	1.08	76.65 ± 14.03
补肾疗更浸膏	4.5	72.23 ± 6.85
	9.0	77.60 ± 6.42 ²⁾
	18.0	80.60 ± 23.56 ²⁾

发生^[7-8]。SOD 能清除细胞内自由基和脂质过氧化物,能将超氧自由基转化为 H₂O₂,进而转化成可造成 DNA 链断裂的高活性羟自由基,而 GSH-Px 可以

阻断线粒体呼吸链电子传递过程中产生自由基的链式反应,从而降低脂质过氧化物最终产物MDA的水平,维持细胞内环境,避免细胞受到过氧化物的损伤^[9-12]。本研究发现,补肾疗更浸膏可有效降低更年期模型大鼠MDA含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),增加SOD($P < 0.01$)及GSH-Px($P < 0.05$, $P < 0.01$)活性,从而起到增强更年期机体抗氧化作用,缓解女性更年期症状。

β -EP是一种活性较强的内源性阿片肽(EOP),由下丘脑弓状核及垂体中叶合成与分泌,可以影响中枢单胺类神经递质的代谢,调节植物神经对身体各脏腑功能的支配作用,改善植物神经功能失调症状,同时调节促性腺激素释放激素(GnRH)分泌及月经周期,维持机体神经内分泌功能的相对稳定^[13]。其主要机制为 β -EP可与GnRH神经元上的 β -EP受体结合,抑制GnRH释放神经元活动,从而抑制垂体释放促黄体生成素(LH)^[14]。

此外还有研究发现,下丘脑 β -EP的活力和分泌下降可引起体温调节中枢异常,导致外周血管扩张,从而造成潮热症状的发生,临床常表现为午后潮热,烘热汗出等^[15]。虽然目前暂无充分证据说明潮热症状的发生时 β -EP含量异常的结果,但是普遍认为二者是伴发现象, β -EP可作为衡量潮热症状程度的标准之一,具有参考价值^[16]。本研究发现,补肾疗更浸膏可明显升高模型大鼠血清 β -EP含量($P < 0.05$),提示补肾疗更浸膏可能通过调节内源性阿片肽水平间接调控下丘脑-垂体-卵巢轴功能,改善内分泌失调状态,并抑制外周血管扩张改善潮热症状,从而发挥出较好的调节更年期综合征症状的作用,然而其具体调节机制,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 刘姗姗,潘五九,王伟明. 中药治疗女性更年期综合征作用机理研究现状[J]. 黑龙江中医药,2014,41(1):54-55.
[2] 曾春燕,叶云. 雌激素替代疗法治疗更年期综合征的研究进展[J]. 中国药房,2014,25(18):1696-1697.
[3] Bolego C, Rossoni G, Fadini G P, et al. Selective estrogen receptor alpha agonist provides widespread heart and vascular protection with enhanced endothelial progenitor cell mobilization in the absence of

uterotrophic action [J]. FASEB J, 2010, 24(7): 2262-2263.
[4] Woodis C B. Hormone therapy for the management of menopausal symptoms: pharmacotherapy update [J]. Pharm Pract, 2010, 23(6): 540-541.
[5] 马堃,李连达. 中医药治疗更年期综合征药效学试验的基本要求[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 214-216.
[6] 杜永红,李沛雯,韩冰. 补肾调冲方对更年期综合征大鼠模型神经内分泌调节机制的研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(4): 8-9.
[7] 王亚凡,封纪珍. 围绝经期综合征的治疗进展[J]. 河北医药, 2010, 1(3): 223-224.
[8] 满玉晶,赵丽妍,陈月,等. 围绝经期综合征中西医发病机制探讨[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(13): 138-139.
[9] Li Yan, Han Xiaodong. Microcystin-LR causes cytotoxicity effects in rat testicular Sertoli cells [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 33(2): 318-326.
[10] He Bing, Zhao Sheng, Zhang Wei, et al. Effect of sodium salicylate on oxidative stress and insulin resistance induced by free fatty acids [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(1): 49-53.
[11] Shen X, Tang Q, Wu J, et al. Effect of vitamin E supplementing on oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity [J]. Int J Vitam Nutr Res, 2009, 79(4): 255-263.
[12] Del Rio D, Stewart A J, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005, 15(4): 316-328.
[13] Contijoch A M, Malamed S, Sarkar D K, et al. Beta endorphin regulation of LHRH release at the median eminence level: immunocytochemical and physiological evidence in hens [J]. Neuroendocrinology, 1993, 57(2): 365-372.
[14] 秦丽娟,卫红霞,郭述真. β -内啡肽与女性生殖内分泌[J]. 山西医科大学学报, 2007, 38(4): 361.
[15] 于英,李芬,张巧利,等. 更年期妇女潮热与 β -内啡肽、雌二醇及促黄体生成素的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(12): 1676-1678.
[16] Strauss J F, Barbieri R L. 林守清主译. Reproductive endocrinology [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 426.

[责任编辑 聂淑琴]