

# 基于因子分析的定经汤调节卵巢早衰生物学机制研究

张磊, 邓树泳, 张琰, 王秀凤, 罗来成\*  
(广东药学院基础学院, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:**探讨定经汤调节卵巢早衰的生物学机制。**方法:**SD 大鼠 90 只,随机分为 3 组:正常组、模型组、定经汤干预组;分别检测其与卵巢早衰相关的生物分子: $\beta$ -内啡肽( $\beta$ -EP)、白介素-1(IL-1)、一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、促性腺激素释放激素(GnRH)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇( $E_2$ )、孕酮(P)、促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(CORT);利用因子分析方法探究定经汤干预下各生物分子之间的相互调控关系,并探寻定经汤调节卵巢早衰过程中的关键生物分子。**结果:**定经汤干预状态的生殖内分泌网络主调控因子主要包括垂体-卵巢轴上的 4 个生物分子,垂体-肾上腺轴靶腺层生物分子 CORT 以及部分下丘脑生物分子;IL-1 是定经汤干预状态生殖内分泌网络主调控因子与其他公共因子共有的下丘脑部位的生物分子。**结论:**定经汤一方面可以直接调节垂体-肾上腺轴生物分子,另一方面又可以通过下丘脑间接调节垂体-肾上腺轴生物分子;各调控因子之间起枢纽作用的生物分子为 IL-1。

**[关键词]** 定经汤; 卵巢早衰; 生物学机制; 因子分析; 主调控因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0237-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013200237

## Study on Biological Mechanisms of Premature Ovarian Failure in Rats by Curing with Dingjing Decoction Based on Factor Analysis

ZHANG Lei, DENG Shu-yong, ZHANG Yan, WANG Xiu-feng, LUO Lai-cheng\*

**[收稿日期]** 20130117(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073073)

**[第一作者]** 张磊, 硕士, 从事生物系统与数值计算研究, Tel:13450415421, E-mail:zhanglei.st@163.com

**[通讯作者]** \* 罗来成, 教授, 从事生物信号处理研究, Tel:13560443416, E-mail:llc1963@163.com

- [ 2 ] 王春妍, 杨世忠, 迟宝荣. 大承气汤对急性肝衰竭大鼠肠源性内毒素血症生物学效应的阻断作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(6):356.
- [ 3 ] 李文, 郑芳, 张集圣. 大承气汤对急性细菌性腹膜炎家兔重要脏器血流的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 1999, 5(2):114.
- [ 4 ] 谢文利, 林秀珍, 齐刚. 大承气汤颗粒剂对大鼠肠平滑肌细胞内三磷酸肌醇的影响[J]. 中草药, 1999, 30(12):923.
- [ 5 ] Yoon J H, Gores G J. Death receptor-mediated apoptosis and the liver[J]. J Hepatol, 2002, 37:400.
- [ 6 ] 臧国庆, 周霞秋, 俞红, 等. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  诱导肝细胞凋亡在暴发性肝衰竭中的作用[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(3):163.
- [ 7 ] Faubion W A, Gores G J. Death receptors in liver biology and pathobiology[J]. Hepatology, 1999, 29(1):1.
- [ 8 ] Juo P, Woom S, Kuoc J, et al. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas[J]. Cell Growth Differ, 1999, 10(12):797.
- [ 9 ] Fuentes-Prior P, Salvesen G S. The protein structures that shape caspase activity. specificity, activation and inhibition[J]. Biochem J, 2004, 384(Pt2):201.
- [ 10 ] 葛海燕, 甄真. Fas 相关死亡结构域蛋白介导的肝细胞凋亡在肝脏疾病中的作用[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2010, 4(4):455.
- [ 11 ] 朱海鹏, 高志良, 谭德明, 等. 酸枣仁汤对小鼠试验性急性肝衰竭的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8):718.

[责任编辑 邹晓翠]

(Basic School of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[ Abstract ] Objective:** Explore the biological mechanisms of the premature ovarian failure in rats by curing with Dingjing decoction. **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into three groups: normal groups, model groups and Dingjing decoction groups; biomolecules which associated with premature ovarian failure:  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ -EP), interleukin-1 (IL-1), nitric oxide synthase (NOS), nitric oxide synthase (NO), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), gonadotropin releasing hormone (GnRH), corticotropin releasing hormone (CRH), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol ( $E_2$ ), progesterone (P), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol (CORT) were detected. Regulation relations of biological molecules were explored in curing by Dingjing decoction based on factor analysis. And to explore the key biomolecules in premature ovarian failure by curing with Dingjing decoction. **Result:** The master regulatory factor mainly contains 4 pituitary-ovarian axis biomolecules, pituitary-adrenal axis biomolecule CORT and parts of hypothalamus biomolecules in curing state by Dingjing decoction. And IL-1 is common biomolecules in the hypothalamus part of the curing state's first and second common factor. **Conclusion:** On the one hand, Dingjing decoction can adjust the pituitary-adrenal axis molecules directly, on the other hand, it can indirectly adjust the pituitary-adrenal axis molecules by hypothalamus. Among the factors, the molecules IL-1 play a pivotal role.

**[ Key words ]** Dingjing decoction; premature ovarian failure; biological mechanisms; factor analysis; master regulatory factor

卵巢早衰是指女性在 40 岁以前因卵巢内卵泡耗竭引起的以闭经、不育、雌激素缺乏及促性腺激素水平升高为特征的一种疾病,是妇科内分泌领域的常见病<sup>[1]</sup>。处于生育期的妇女提早闭经,在心理上会产生沉重包袱,婚姻生活质量下降,从而产生一系列心理和社会问题。西医对卵巢早衰一般采取雌激素治疗<sup>[2]</sup>,但长期使用有可能引发妇科肿瘤的发生。

对于肾虚肝郁型卵巢早衰,中医十分强调补肾疏肝。明末清初著名医家傅山所著的《傅青主女科》中的定经汤,主治肾虚肝郁型月经不调,即诸如月经先后无定期、闭经、稀发、不孕等,治疗效果明显<sup>[3]</sup>。定经汤由当归、白芍、菟丝子、熟地黄、山药、白茯苓、柴胡、荆芥穗组成,其中菟丝子、熟地黄补肾填精;当归、白芍养肝柔肝,山药、白茯苓健脾益气;柴胡、荆芥穗疏肝解郁,药虽 8 味,组方精妙,配伍得当,共奏滋肾疏肝之功,为治肾虚肝郁型卵巢早衰的代表方。

本文为了探究定经汤补肾疏肝的生物学机制,选取与卵巢早衰相关的生物分子进行因子分析。生物分子主要包括下丘脑生物分子 8 个,分别为  $\beta$ -内啡肽 ( $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -EP)、白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、一氧化氮 (nitric oxide synthase, NO)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone

receptor, PR)、促性腺激素释放激素 (gonadotropin releasing hormone, GnRH)、促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH);垂体-卵巢轴生物分子 4 个,分别为促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol,  $E_2$ )、孕酮 (progesterone, P);垂体-肾上腺轴生物分子 2 个,分别为促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 和皮质醇 (cortisol, CORT)。通过因子分析,寻找定经汤治疗卵巢早衰时各生物分子之间的相关关系,进而结合卵巢早衰的相关背景知识分析隐藏在這些相关关系中的各生物分子之间的相互调控作用,从而揭示定经汤调节卵巢早衰的生物学机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与分组** SD 大鼠,SPF 级,200 ~ 220 g,雌性,由广东省实验动物中心提供,许可证号 SCXK (粤)2008-0002。基础饲料由广东省实验动物中心提供。大鼠购进后适应 3 d,以后每天观察动情期变化,选择连续有 2 个正常动情期的大鼠用于实验,按体重随机分为 3 组,正常组、模型组、定经汤干预组,每组 30 只。

**1.2 试剂及仪器** 0.9% 氯化钠注射液 (藁城市四海药业有限公司),总蛋白 (total protein, TP) 药盒 (中生北控股份有限公司),NOS 药盒 (南京建成生

物工程研究所), CRH, GnRH,  $\beta$ -EP, IL-1, NO 药盒(北京华英生物技术研究所),  $E_2$ , P(美国 Sigma 公司), 7160 型全自动生化仪(日本日立), TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂), r-911 型全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司), 声-光-电复合应激刺激装置自制。

### 1.3 动物造模及处理方法<sup>[4]</sup>

**1.3.1 造模** 用声-光-电复合刺激(先声-光刺激 10 s, 再声-光-电刺激 60 s, 最后电刺激 5 s), 造模 20 d, 5 次/d, 5 次间隔不定, 1 h 内完成。声、光、电 3 种刺激参数恒定: 声音强度 65 dB; 光照强度 500 lux, 为闪烁状, 频率 1 次/s, 亮时 500 lux, 灭时 300 lux; 电压 24 ~ 36 V。

**1.3.2 给药方法** 于造模同日给药。正常对照组和模型组灌蒸馏水, 用药组灌定经汤药物溶液, 给药时间为 25 d(即为在应激刺激 20 d 后再继续给药 5 d), 每天 1 次。

**1.3.3 观察指标** 股动脉取血,  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ , 20 min, 取上清液。取下丘脑, 用新华滤纸吸干组织液和血液, 加生理盐水 1 mL(含  $0.05\ mol \cdot L^{-1}$  醋酸  $20\ \mu L$ )。研磨使组织充分粉碎。离心速度  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ , 离心 10 min 取上清。沉淀加生理盐水 0.5 mL(含  $0.05\ mol \cdot L^{-1}$  醋酸  $20\ \mu L$ )。离心速度  $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ , 离心 10 min 取上清液, 2 次上清合并, 用  $0.05\ mol$  的 NaOH  $25\ \mu L$ (调 pH 7.4)。吸取上清液  $10\ \mu L$  加入定量的蛋白试剂中, 通过测定其吸光度(A)测定蛋白含量。采用放射免疫分析法测定血清中的  $E_2$ , P, LH, FSH, CORT, ACTH 和 NO, 以及下丘脑匀浆液中的 CRF, IL-1,  $\beta$ -End 和 GnRH。采用免疫组织化学法测定下丘脑匀浆液中的 NOS, PR 和 ER。

### 1.4 数据预处理

**1.4.1 数据归一化** 由于各生物分子的单位不同, 变化范围不同, 因此首先对实验所得的各生物分子的指标值进行归一化处理。

**1.4.2 剔除异常值** 在动物实验以及生物分子指标值测量过程中常常由于外界条件或主观条件的意外变更更使得到的数据混有异常值, 本研究采用格拉布斯准则<sup>[5]</sup>剔除异常值。

**1.5 生物分子分组的因子分析方法** 因子分析是多元统计分析中的一个重要内容, 其基本思想就是根据变量内部的相关性大小对变量分组, 使组内变量间高相关、组间变量间低相关<sup>[6]</sup>, 得到的每一组组合的变量称为公共因子, 结合所研究问题的相关

背景知识可以来分析每个公共因子的实际意义。即因子分析中的公共因子通常是一个不能直接测量却可能具有实际意义的隐变量。因子分析的主要步骤为: 首先对数据样本进行标准化处理, 计算样本的相关矩阵 R, 并求出相关矩阵 R 的特征根和特征向量, 然后根据累积方差贡献率确定主因子的个数, 计算其因子载荷矩阵, 得到对应的因子模型。通过对模型进行分析, 同时结合卵巢早衰的相关背景知识及前期研究揭示各公共因子的实际意义, 从而进一步了解定经汤调节卵巢早衰的生物学机制。

本研究是直接 SPSS 18.0 统计软件来实现生物分子因子分析的, 采用主成分法进行因子提取, 最大方差旋转法进行因子旋转, 并将正交旋转后的因子载荷矩阵作为提取公共因子的依据。

表 1 定经汤干预状态卵巢早衰相关生物分子正交旋转后的因子载荷矩阵(取其前 4 列)

指标	$f_1$	$f_2$	$f_3$	$f_4$
$\beta$ -EP	0.191	<u>0.938</u>	0.046	0.130
IL-1	<u>0.411</u>	<u>0.866</u>	-0.063	0.100
NOS	<u>-0.789</u>	0.362	0.312	-0.169
NO	<u>0.800</u>	0.095	0.318	-0.150
ER	0.068	0.007	0.016	<u>0.966</u>
PR	<u>0.747</u>	0.158	-0.199	-0.100
GnRH	-0.228	<u>0.836</u>	-0.193	0.013
CRH	0.191	<u>0.708</u>	-0.067	-0.245
FSH	<u>0.803</u>	0.294	-0.365	-0.003
LH	<u>0.803</u>	0.125	-0.361	-0.034
$E_2$	<u>0.844</u>	0.354	-0.242	0.139
P	<u>-0.862</u>	-0.122	-0.115	-0.286
ACTH	-0.187	-0.160	<u>0.836</u>	0.074
CORT	<u>-0.601</u>	0.023	<u>0.510</u>	-0.318

注: 表中前 8 个生物分子为下丘脑生物分子, 中间 4 个为垂体-卵巢轴生物分子, 最后 2 个为垂体-肾上腺轴生物分子; 各列中有下划线的因子载荷值对应的指标属于其所在的公共因子。

## 2 结果与讨论

对定经汤干预状态的卵巢早衰相关生物分子  $\beta$ -EP, IL-1, NOS, NO, ER, PR, GnRH, CRH, FSH, LH,  $E_2$ , P, ACTH 和 CORT 的经过预处理的指标值进行因子分析, 得到定经汤干预状态卵巢早衰相关生物分子正交旋转后的因子载荷矩阵, 见表 1。

取前 4 列公共因子的总方差贡献率达到 81.390%, 即这 4 个公共因子可以在 81.390% 的程度上解释所有生物分子包含的全部信息。每一生物分子在每一公共因子上的因子载荷值越大说明与这

一公共因子的关联程度越大。笔者按照因子载荷值的大小将关联程度分为 3 个层次,当因子载荷值  $< 0.4$  时,认为该生物分子与此公共因子关联程度较弱;当因子载荷值  $> 0.6$  时,认为该生物分子与所在公共因子关联程度较强;当因子载荷值处于  $0.4 \sim 0.6$  时,认为该生物分子与其所在的公共因子有一定关联。根据此原则可见:第 1 个公共因子  $f_1$  与 P,  $E_2$ , FSH, LH, NO, NOS, PR 和 CORT 有较强联系,与 IL-1 有一定联系,并且方差贡献率占 44.507%,提示  $f_1$  是反映定经汤全方干预下卵巢早衰相关生物分子之间的调控关系的公共因子,可称之为定经汤全方干预生殖内分泌网络主调控因子。这一公共因子主要包括垂体-卵巢轴上的 4 个生物分子,垂体-肾上腺轴靶腺层生物分子 CORT 以及下丘脑生物分子 NO, NOS, PR 和 IL-1。这一公共因子显示了给卵巢早衰大鼠注射定经汤全方后垂体-卵巢轴上的 4 个生物分子以及垂体-肾上腺轴靶腺层生物分子 CORT 在药物作用下有所好转,并将此作用反馈到下丘脑。可以称之为定经汤干预状态垂体-卵巢轴和垂体-肾上腺轴对下丘脑的反馈作用因子。第 2 个公共因子  $f_2$  与  $\beta$ -EP, IL-1, GnRH 和 CRH 有较强联系,方差贡献率占 19.826%,4 个生物分子均处于下丘脑部位,提示  $f_2$  是反映下丘脑部位的调控因子,可以称之为定经汤干预状态下丘脑自调控因子。第 3 个公共因子  $f_3$  与 ACTH 有较强联系,与 CORT 有一定联系,方差贡献率占 8.711%,反映定经汤干预状态垂体-肾上腺轴靶腺层对垂体层的反馈,反映垂体-肾上腺轴内部关系密切,与其他轴相关性弱,说明此状态垂体-肾上腺轴相对独立。这与正常状态一致<sup>[7]</sup>,说明在定经汤干预下,卵巢早衰大鼠生殖内分泌网络趋于正常这种平衡态。第 4 个公共因子  $f_4$  与 ER 有较强联系,方差贡献率占 8.346%,反映在定经汤干预下 ER 的作用相对独立。

在定经汤干预状态 IL-1 和 CORT 均与 2 个公共因子有一定联系。其中 IL-1 是  $f_1$  和  $f_2$  共有的生物分子,即 IL-1 是生殖内分泌网络主调控因子和下丘脑自调控因子之间的枢纽;CORT 是  $f_1$  和  $f_3$  共有的生物分子,即 CORT 是垂体-卵巢轴和垂体-肾上腺轴对下丘脑的反馈作用因子与垂体-肾上腺轴自反馈作用因子之间的枢纽。

### 3 结论

根据因子分析的结果,定经汤干预状态的主调控因子显示了给卵巢早衰大鼠注射定经汤全方后垂体-卵巢轴上的 4 个生物分子以及垂体-肾上腺轴靶

腺层生物分子 CORT 在药物作用下均有所改善,并将此作用反馈到下丘脑;定经汤全方起到枢纽作用的关键生物因子为 IL-1,这与以往研究相符<sup>[8]</sup>。可见一方面定经汤可以直接调节垂体-肾上腺轴生物分子,另一方面定经汤先调节  $f_1$  和  $f_2$  共有的下丘脑生物分子 IL-1,又由此为桥梁将作用反馈到下丘脑,而下丘脑对垂体-肾上腺轴起调控作用<sup>[9]</sup>,即定经汤又可以通过下丘脑间接调节垂体-肾上腺轴生物分子。

综上,因子分析方法可以初步揭示定经汤调节卵巢早衰的生物学机制,当然影响卵巢早衰的生物分子可能不止 14 个,加入更多相关生物分子将得到更全面的因子分析模型。同时为了进一步揭示定经汤中各药物所起作用可以对定经汤进行拆方研究。

### [参考文献]

- [1] 庄笑梅,岳立群,姜恩魁. 细胞因子对女性生殖轴调控作用研究现状 [J]. 辽宁医学院学报, 2002, 23(5):60.
- [2] Connor Kevin A, Ginsberg Abigail B, Maksimova Elena, et al. Stress induced sensitization of the hypothalamic pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression [J]. Neuroend, 2004, 80(4):252.
- [3] 巩晓芳. 《傅青主女科》定经汤证治特点述析 [J]. 中医研究, 2012, 25(9):8.
- [4] 王建红,王敏璋,伍庆华,等. 心理应激大鼠卵巢内分泌功能降低模型的实验研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4):204.
- [5] 张璇,程敏熙,肖凤平. 利用 Origin 对数据异常值的剔除方法进行比较 [J]. 实验科学与技术, 2012, 10(1):74.
- [6] 黄润龙. 数据统计与分析技术—SPSS 软件实用教程 [M]. 北京:高等教育出版社, 2004:285.
- [7] 王秀凤,胡翊健,王建红,等. 基于因子分析的正常、肾虚状态大鼠垂体-靶腺轴激素相关性研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4):990.
- [8] Evan T Keller, Zhang Jian, Yao Zhi, et al. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (Macaca mulatta) model of menopause [J]. J Reproductive Immunol, 2001, 50(1):41.
- [9] 宋淑霞,吕占军,侯洁,等. 益气补肾方药对肾虚小鼠细胞因子 IL-1、IL-2 及 IL-12 基因表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(2):101.

[责任编辑 邹晓翠]