

# 左归丸对大鼠卵泡发育与卵巢血管生成的影响

段恒, 周滢\*

(重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

**[摘要]** **目的:**探讨左归丸对大鼠卵巢卵泡发育与血管生成的影响。**方法:**将SD大鼠(160~170 g)随机分为空白对照组(A组)、结合雌激素组(B组)、左归丸成药低(C组)、高剂量组(D组)、左归丸浸膏低(E组)、高剂量组(F组), 各组  $n = 10$ 。分别灌服蒸馏水  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、结合雌激素混悬液  $65 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、左归丸混悬液  $1.875, 5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、左归丸浸膏相当于生药  $11, 33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每日1次, 连续15 d。计数大鼠卵巢各级卵泡及黄体; 计算生殖器官(卵巢、子宫及阴道)脏器指数; 采取酶免疫分析法测定血清雌二醇( $E_2$ )水平。将大鼠随机分为空白对照组、结合雌激素组( $65 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、左归丸成药组( $5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、左归丸浸膏组(相当于生药  $33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 各组  $n = 6$ 。应用墨汁灌注法观察卵巢血管。**结果:**D, F, B组均可增加大鼠窦状卵泡数( $21.70 \pm 10.40, 15.60 \pm 2.22, 15.60 \pm 8.04$ )个及卵泡总数( $32.10 \pm 11.57, 25.30 \pm 5.06, 29.10 \pm 18.62$ )个, B~F组均可增加大鼠卵巢指数( $0.68 \pm 0.11, 0.55 \pm 0.05, 0.68 \pm 0.08, 0.61 \pm 0.10, 0.68 \pm 0.03$ ), D~F, B组均可提高大鼠血清  $E_2$  水平( $86.92 \pm 5.05, 68.98 \pm 9.19, 87.16 \pm 10.37, 87.39 \pm 12.81$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 均  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ 。结合雌激素组、左归丸成药组、左归丸浸膏组的卵巢血管密度和管腔明显增大。结合雌激素组、左归丸浸膏组可增加卵巢小血管数( $13.33 \pm 2.50, 13.17 \pm 3.87$ )个, 结合雌激素组、左归丸成药组、左归丸浸膏组均可增加大鼠卵巢大血管数( $33.00 \pm 5.44, 34.33 \pm 8.59, 35.83 \pm 7.63$ )个及血管总数( $46.33 \pm 7.82, 45.00 \pm 10.84, 49.33 \pm 11.11$ )个,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。**结论:**左归丸可促进160~170 g大鼠卵泡发育和卵巢血管生成, 其促卵泡发育作用与提高雌激素水平、增加雌激素样效应及增加卵巢血管数有关。左归丸浸膏较成药丸剂作用更明显。

**[关键词]** 左归丸; 雌二醇; 卵泡; 卵巢血管

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0206-04

## Effect of Zuogui Wan on Follicular Development and Ovarian Angiogenesis in Rats

DUAN Heng, ZHOU Ying\*

(College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Zuogui Wan on follicular development and ovarian angiogenesis in the rats. **Method:** The SD rats (160-170 g) were divided into 6 groups: control group (group A), conjugated estrogens group (group B), Zuogui Wan patent medicine low dose group (group C), Zuogui Wan patent medicine high dose group (group D), Zuogui Wan decocted extract low dose group (group E), Zuogui Wan decocted extract low dose group (group F), 10 rats each group. The rats were separately administered with distilled water  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , conjugated estrogens  $65 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Zuogui Wan suspension  $1.875 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Zuogui Wan suspension  $5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Zuogui Wan extract equivalent to crude drug  $11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Zuogui Wan extract equivalent to crude drug  $33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , qd, for 15 d. Ovarian follicle and corpus luteum of rats were counted. Uterus indexes were counted. In addition,  $E_2$  in blood was determined by enzyme immunoassay (EIA). The rats were divided into 4 groups: control group, conjugated estrogens group ( $65 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Zuogui Wan patent

**[收稿日期]** 20110817(007)

**[基金项目]** 重庆医科大学校级课题(XBYB2008091)

**[第一作者]** 段恒, 讲师, 博士, 从事中医药调控女性生殖研究, Tel:13452905193, E-mail: duanduan2006@126.com

**[通讯作者]** \* 周滢, Tel:13512337203, E-mail: cr8093@126.com

medicine group ( $5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Zuogui Wan decocted extract group (equivalent to crude drug  $33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 6 rats each group. Ovarian micrangium was measured by perfusion of ink. **Results:** D, F, B groups increased antral follicles ( $21.70 \pm 10.40$ ,  $15.60 \pm 2.22$ ,  $15.60 \pm 8.04$ ) and total follicles ( $32.10 \pm 11.57$ ,  $25.30 \pm 5.06$ ,  $29.10 \pm 18.62$ ); B-F groups increased ovary index ( $0.68 \pm 0.11$ ,  $0.55 \pm 0.05$ ,  $0.68 \pm 0.08$ ,  $0.61 \pm 0.10$ ,  $0.68 \pm 0.03$ ); D-F, B groups increased  $E_2$  level in blood of the rats ( $86.92 \pm 5.05$ ,  $68.98 \pm 9.19$ ,  $87.16 \pm 10.37$ ,  $87.39 \pm 12.81$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , all  $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ . Ovarian blood vessel density and lumen in conjugated estrogens group, Zuogui Wan patent medicine group and Zuogui Wan decocted extract group were increased significantly. Conjugated estrogens group and Zuogui Wan decocted extract group group increased ovarian small blood vessels ( $13.33 \pm 2.50$ ,  $13.17 \pm 3.87$ ), conjugated estrogens group, Zuogui Wan patent medicine group and Zuogui Wan decocted extract group increased ovarian large blood vessels ( $33.00 \pm 5.44$ ,  $34.33 \pm 8.59$ ,  $35.83 \pm 7.63$ ) and the total number of blood vessels ( $46.33 \pm 7.82$ ,  $45.00 \pm 10.84$ ,  $49.33 \pm 11.11$ ),  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ . **Conclusion:** Zuogui Wan can improve follicular development and ovarian angiogenesis in 160-170 g rats. The effect may be related to improving the level of  $E_2$ , estrogenlike effect and ovarian blood vessels. Zuogui Wan decocted extract is more effective than Zuogui Wan patent medicine.

[**Key words**] Zuogui Wan; estradiol; follicles; ovarian micrangium

补肾名方左归丸出自《景岳全书》,由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶组成(比例为8:4:4:4:3:4:4:4)。本实验通过研究左归丸对幼龄大鼠卵泡发育与卵巢血管生成的影响和对大鼠雌激素水平及其效应的影响,以探讨左归丸促卵泡发育的作用及其机制,以及丰富“补肾生脉”<sup>[1]</sup>的理论意义。同时,对传统名方左归丸浸膏与成药丸剂不同剂型的药效予以比较。

## 1 材料

**1.1 动物** 雌性清洁级 SD 大鼠 84 只,体质量 160 ~ 170 g,购自重庆医科大学动物实验中心。实验动物使用许可证号 SCXK(渝)2007-0001。

**1.2 药物** 左归丸浸膏,含生药  $1.65 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,水浸出物,由重庆医科大学中医药学院中药教研室提供,批号 20101022;结合雌激素(倍美力), $0.625 \text{ mg}/\text{片}$ ,爱尔兰惠氏药厂生产,批号 100326;左归丸, $45 \text{ g}/\text{瓶}$ ,含生药  $0.1 \text{ g}/\text{丸}$ ,河南省宛西制药股份有限公司出品,批号 100102。

**1.3 试剂和仪器** 美国 R&D 大鼠雌二醇( $E_2$ ) ELISA 试剂盒、70% 墨汁低分子右旋糖酐液、美国 BIO-RAD model 680 酶标仪、奥林巴斯 BX40 光学显微镜。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 将 60 只 160 ~ 170 g 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。空白对照组(A组)灌服蒸馏水  $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,每日 1 次,连续 15 d。结合雌激素组(B组)灌服结合雌激素混悬液  $65 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于成人剂量的 6.25 倍);左归丸成药低剂量组(C

组)、高剂量组(D组)分别灌服左归丸混悬液  $1.875, 5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (分别相当于成人剂量的 6.25, 18.75 倍);左归丸浸膏低剂量组(E组)、高剂量组(F组)分别灌服左归丸浸膏相当于生药 11, 33  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于成人剂量的 6.25, 18.75 倍)。以上各组灌服次数和天数均与空白对照组相同。

将 24 只 160 ~ 170 g 大鼠随机分为 4 组,空白对照组、结合雌激素组、左归丸成药组、左归丸浸膏组给药方法分别同 A 组、B 组、D 组、F 组。每日给药 1 次,连续 15 d。

## 2.2 检测指标及方法

**2.2.1 大鼠卵巢组织形态学观察** 末次给药 24 h 后处死大鼠,大鼠卵巢在 4% 多聚甲醛固定液中固定好后,经常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚  $5 \mu\text{m}$ ),作常规 HE 染色。奥林巴斯 BX40 光学显微镜计数各级卵泡及黄体数目。

**2.2.2 生殖器官质量法**<sup>[2]</sup> 末次给药 24 h 后,称取大鼠体质量。处死大鼠后,立即取出卵巢、子宫及阴道,以电子分析天平称湿质量,并计算脏器指数。

卵巢(子宫、阴道)指数 = 卵巢(子宫、阴道)质量/体质量  $\times 100\%$

**2.2.3 血清  $E_2$  水平检测** 末次给药 24 h 后,摘眼球法眼眶动静脉取血约 3 mL 置于干净试管中,放入  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中过夜后,以  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,用于测定血清  $E_2$ 。采用酶免疫分析法。操作规程按美国 R&D 大鼠  $E_2$  ELISA 试剂盒说明书进行,以美国 BIO-RAD model 680 酶标仪测定血清  $E_2$  含量。

**2.2.4 墨汁灌注法**<sup>[3]</sup> 大鼠禁食 12 h, 2% 戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉, 称体重, 打开胸腔, 自胸主动脉插管, 剪开右心耳放血, 用 1% 温热肝素生理盐水(约 200 mL)冲洗血管; 待流出液体变澄清后, 用夹子夹住管子, 换盛有 70% 墨汁低分子右旋糖酐的灌注瓶, 在上述压力下继续灌注, 观察到眼、耳、舌、四肢以至全身出现均匀的浓黑色后, 灌注终止, 结扎进出心脏的大血管。取卵巢固定好后, 经常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚 5 μm), 作常规 HE 染色。奥林巴斯 BX40 光学显微镜观察并计数卵巢血管

(黄体血管不计数在内)。

**2.3 统计学处理** 所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件包处理。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对大鼠卵巢各级卵泡及黄体的影响** 左归丸成药高剂量组、左归丸浸膏高剂量组、结合雌激素组均可增加大鼠窦状卵泡数及卵泡总数(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05)。见表 1。

表 1 左归丸对大鼠卵巢各级卵泡及黄体的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	窦前卵泡数	窦状卵泡数	成熟卵泡数	黄体数	卵泡总数
空白对照	-	4.60 ± 5.04	8.90 ± 3.07	0.70 ± 0.82	11.20 ± 6.94	14.20 ± 8.46
结合雌激素	65 × 10 <sup>-6</sup>	11.70 ± 10.58	15.60 ± 8.04 <sup>1)</sup>	1.80 ± 0.42 <sup>2)</sup>	18.50 ± 2.99 <sup>2)</sup>	29.10 ± 18.62 <sup>1)</sup>
左归丸成药	1.875	7.40 ± 0.97	11.00 ± 5.23	0.40 ± 0.52	14.40 ± 3.31	18.80 ± 6.41
	5.625	9.30 ± 4.64 <sup>1)</sup>	21.70 ± 10.40 <sup>2)</sup>	1.10 ± 0.74	20.20 ± 4.98 <sup>2)</sup>	32.10 ± 11.57 <sup>2)</sup>
左归丸浸膏(生药量)	11	9.10 ± 2.96 <sup>1)</sup>	12.20 ± 7.15	0.40 ± 0.52	11.20 ± 4.80	21.70 ± 9.60
	33	7.40 ± 3.10	15.60 ± 2.22 <sup>2)</sup>	2.30 ± 0.48 <sup>2)</sup>	13.40 ± 3.95	25.30 ± 5.06 <sup>2)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>*P* < 0.05, <sup>2)</sup>*P* < 0.01(表 2~3 同)。

**3.2 对大鼠生殖器官指数及血清 E<sub>2</sub> 水平的影响** 左归丸成药低剂量组、左归丸成药高剂量组、左归丸浸膏低剂量组、左归丸浸膏高剂量组、结合雌激素组均可增加大鼠卵巢指数(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。左归丸成药

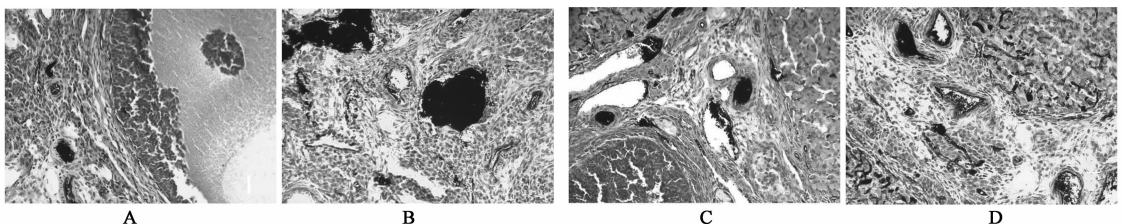
高剂量组、左归丸浸膏低剂量组、左归丸浸膏高剂量组、结合雌激素组均可提高大鼠血清 E<sub>2</sub> 水平(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 2。

表 2 左归丸对大鼠生殖器官指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	卵巢指数/g·kg <sup>-1</sup>	子宫指数/g·kg <sup>-1</sup>	阴道指数/g·kg <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>
空白对照	-	0.44 ± 0.11	2.16 ± 0.06	1.04 ± 0.10	51.92 ± 11.46
结合雌激素	65 × 10 <sup>-6</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>2)</sup>	2.14 ± 0.26	1.28 ± 0.22 <sup>1)</sup>	87.39 ± 12.81 <sup>2)</sup>
左归丸成药	1.875	0.55 ± 0.05 <sup>1)</sup>	1.93 ± 0.33	1.10 ± 0.17	57.09 ± 9.82
	5.625	0.68 ± 0.08 <sup>2)</sup>	2.27 ± 0.24	1.06 ± 0.10	86.92 ± 5.05 <sup>2)</sup>
左归丸浸膏(生药量)	11	0.61 ± 0.10 <sup>1)</sup>	2.13 ± 0.24	1.17 ± 0.15	68.98 ± 9.19 <sup>1)</sup>
	33	0.68 ± 0.03 <sup>2)</sup>	2.48 ± 0.47	1.00 ± 0.32	87.16 ± 10.37 <sup>2)</sup>

**3.3 对大鼠卵巢血管数目的影响** 左归丸成药组、左归丸浸膏组、结合雌激素组均可增加大鼠卵巢血管数目(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。与空白对照组相

比,左归丸成药组、左归丸浸膏组、结合雌激素组的卵巢血管密度和管腔内径明显增大,如图 1,表 3 所示。



A. 空白对照组; B. 结合雌激素组 65 μg·kg<sup>-1</sup>; C. 左归丸成药组 5.625 g·kg<sup>-1</sup>; D. 左归丸浸膏组相当于生药 33 g·kg<sup>-1</sup>

图 1 左归丸对大鼠卵巢血管数目的影响(卵巢血管墨汁灌注结合 HE 染色, ×400)

表3 左归丸对大鼠卵巢血管数目的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$<10 \mu\text{m}$ 血管数/个	$\geq 10 \mu\text{m}$ 血管数/个	血管总数/个
空白对照	-	$8.50 \pm 1.38$	$25.33 \pm 4.63$	$33.83 \pm 5.95$
结合雌激素	$65 \times 10^{-6}$	$13.33 \pm 2.50^{2)}$	$33.00 \pm 5.44^{1)}$	$46.33 \pm 7.82^{1)}$
左归丸成药	5.625	$10.67 \pm 2.25$	$34.33 \pm 8.59^{1)}$	$45.00 \pm 10.84^{1)}$
左归丸浸膏(生药量)	33	$13.17 \pm 3.87^{1)}$	$35.83 \pm 7.63^{1)}$	$49.33 \pm 11.11^{1)}$

#### 4 讨论

根据卵泡的形态、大小、生长速度和组织学特征,可将卵泡生长过程分为原始卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡和成熟卵泡4个阶段<sup>[4-5]</sup>。原始卵泡是卵母细胞储备的唯一形式,且其在胎儿期已成定局,出生后不再增多<sup>[6]</sup>。故在观察卵巢组织形态时,不计数始基卵泡数目。从原始卵泡发育到成熟卵泡,雌激素均起一定的作用,协调卵泡刺激素促进卵泡发育<sup>[4-5]</sup>。研究发现晚幼大鼠(160~170 g)较早幼大鼠(60~80 g)更为适用于促卵泡发育药物的药效研究<sup>[7]</sup>。实验结果显示,左归丸浸膏高剂量组、左归丸成药高剂量组、结合雌激素组均可增加大鼠窦状卵泡数及卵泡总数, $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ 。可见,左归丸促卵泡发育的表现与结合雌激素相似。生殖器官指数可反应雌激素的作用。实验结果显示,左归丸浸膏高、低剂量组、左归丸成药高、低剂量组、结合雌激素组均可增加大鼠卵巢指数, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。随着卵泡发育, $E_2$ 合成能力增强。实验结果显示,左归丸浸膏高、低剂量组、左归丸成药高剂量组、结合雌激素组均可提高大鼠血清  $E_2$  水平, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。在此短期实验中左归丸浸膏较成药丸剂对幼龄大鼠雌激素水平的提高更为明显。

墨汁灌注法<sup>[3]</sup>是经典的器官内血管观察方式,尤其对于微小血管的观察。墨汁灌注结合 HE 染色,既能更加清晰地观察血管的形态与分布,又可以观察到血管与周围组织的关系。本实验发现,左归丸浸膏组、左归丸成药组、结合雌激素组的卵巢血管密度和管腔明显增大。左归丸浸膏组、左归丸成药组、结合雌激素组均可增加大鼠卵巢血管总数、卵巢大血管数目, $P < 0.05$ ;左归丸浸膏组、结合雌激素组均可增加卵巢小血管数, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。表明,左归丸浸膏和成药丸剂均可促进幼龄大鼠卵巢血管生成,左归丸浸膏较成药丸剂对卵巢血管生成的作用更显著;结合雌激素对大鼠卵巢小血管数的增加更为明显,左归丸则更倾向于增加大血管数。

左归丸功效补肝肾,益精血,用于肝肾精血虚损,从《内经》“精不足者,补之以味”而立法,方中熟地黄、山药、山萸肉补肝肾益阴血;龟板胶、鹿角胶为补肾要药,前者补阴,后者补阳,二药合用峻补精血,调和阴阳;再加菟丝子、枸杞子平补肝肾,川牛膝以壮腰膝。本实验通过观察左归丸对幼龄大鼠卵泡发育与卵巢血管生成的影响,证实了其具有“补肾填精益血”之功。

综上,“补肾填精益血”的左归丸可以促进幼龄大鼠卵泡发育,其作用与提高雌激素水平和增加雌激素样效应,以及增加卵巢血管数目有关。左归丸浸膏和成药丸剂均可促进幼龄大鼠卵巢血管生成,左归丸成药可增加卵巢大血管数,左归丸浸膏既可增加卵巢大血管数,也可增加小血管数;结合雌激素对卵巢小血管数的增加更为明显,左归丸则更倾向于增加大血管数。左归丸可能通过增加卵巢血管密度和增大卵巢血管管腔从而增加卵巢局部血循来促进卵泡的发育,浸膏较丸剂作用更明显。

#### [参考文献]

- [1] 张树成,吴志奎,蔡连香,等.由补肾中药促进组织血管生成实验论提出“补肾生脉”的理论意义[J].中医药学刊,2005,23(6):1078.
- [2] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2003:1539.
- [3] 郭鹂,任东青.微循环学基础与实验方法[M].西安:第四军医大学出版社,2005:210.
- [4] 乐杰.妇产科学[M].5版.北京:人民卫生出版社,2000:22.
- [5] 乐杰.妇产科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:15.
- [6] 曹泽毅.中华妇产科学(上册)[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:32.
- [7] 陆华,段恒.补肾中药复方对不同发育阶段大鼠卵泡发育的影响[J].浙江中医杂志,2009,44(4):249.

[责任编辑 聂淑琴]