

加减知柏地黄丸对抗瘦素诱导特发性性早熟模型的实验研究

徐雯^{1*}, 刘孟渊², 肖柳英², 韩超²

(1. 广州市中医医院, 广东 广州 510130; 2. 广州市中医中药研究所, 广东 广州 510130)

[摘要] 目的: 观察加减知柏地黄丸对抗特发性中枢性性早熟(idiopathic central precocious puberty, ICPP)的作用并初步探讨其作用机制。方法: 采用瘦素(Leptin)诱导幼龄雌性BALB/c小鼠建立ICPP小鼠模型, 以甲地孕酮为阳性对照药, 并另设GnRH-A(抑那通)对照组, 观察该中药复方对模型小鼠血清激素雌二醇(E₂)和黄体生成素(LH)水平、阴道开口情况、阴道脱落细胞涂片、子宫、卵巢重量及体重、子宫指数和卵巢指数、子宫和卵巢组织病理学变化等指标的影响。结果: 加减知柏地黄丸可抑制模型小鼠的阴道开口提前、子宫和卵巢重量增加、子宫指数和卵巢指数升高、及LH和E₂水平的升高, 实验中除GnRH-A组外, 模型组和各给药组的阴道脱落细胞涂片、子宫、卵巢病理切片镜下所见均无明显差别。实验所见加减知柏地黄丸、甲地孕酮对各观察指标的影响之间差别无统计学意义。结论: 加减知柏地黄丸对瘦素刺激诱导的ICPP模型具有一定的对抗作用, 其机制可能是通过抑制瘦素诱导启动的垂体—性腺轴功能, 抑制垂体分泌LH, 进而抑制E₂分泌, 或直接抑制瘦素对性腺的作用。

[关键词] 加减知柏地黄丸; 瘦素; 特发性中枢性性早熟

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)06-0062-04

性早熟是一种生长发育异常, 表现为青春期特征提前出现。一般认为青春期的发动需要一定体重和体脂的积累, 瘦素可能涉及获得临界体脂总量的神经内分泌通道的信号作用, 这很可能是青春期启动的一个允许因子。Farid F等用瘦素可促使小鼠的

性成熟提前^[1~2]。本实验拟用瘦素刺激未成熟雌性BALB/c小鼠诱导特发性中枢性性早熟(ICPP)动物模型, 观察加减知柏地黄丸对模型动物血清雌二醇(E₂), 黄体生成素(LH)水平、阴道开口情况、阴道脱落细胞涂片、子宫、卵巢重量及体重、子宫指数和卵巢指数、子宫和卵巢组织病理学变化等指标的影响, 探讨其对抗ICPP的作用机制。

1 材料

1.1 药物及试剂 加减知柏地黄丸, 其组分为知母10g, 黄柏10g, 生地10g, 泽泻10g, 茯苓10g, 丹皮10g, 炙龟板15g, 牛膝10g, 石斛10g。中药均选用

[收稿日期] 2007-11-26

[基金项目] 广东省中医药管理局资助(101039)

[作者简介] * 徐雯, Tel: 13610290311; E-mail: xuwenlaoshi@sina.com

购自广东一方药厂生产的颗粒剂,用蒸馏水溶解,密封蒸浴加热消毒。加减知柏地黄丸高、低剂量药液浓度分别为生药 $3.90 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.95 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。醋酸甲地孕酮片由上海信谊康捷药业有限公司生产,批号 030101,用蒸馏水配制成浓度为 $0.13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。抑那通针剂由日本武田药品工业株式会社生产,批号 368,配制时用原配的溶液溶解,再加灭菌注射用水稀释而成,浓度分别为 $157 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $118 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。瘦素购自 Pepro Tech 公司,用灭菌注射用水配制成 $66.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度,此剂量是根据预试验结果确定的最佳剂量。 E_2 , LH 检测试剂盒购自 DR lab. California USA。

1.2 动物 选用 18 d 日龄 BALB/c 雌性小鼠 60 只,由中国医学科学院上海实验动物中心提供,常规分笼饲养,自然照明,随意取食和饮水。

1.3 仪器 Mettler Toledo 电子天平 (1/1000), 贝克曼 GS-15R 台式冷冻高速离心机, Clinic Bio128C 酶标仪。

2 方法

2.1 动物分组 小鼠 19 d 日龄时称体重,随机分为 6 组:正常对照组(Normal-Control, NC 组)、ICPP 模型组(Model, M 组)、加减知柏地黄丸高剂量组(JJZB-H 组)、加减知柏地黄丸低剂量组(JJZB-L 组)、甲地孕酮阳性对照组(Positive-Control, PC 组)、抑那通对照组(GnRH-A 组);每组 10 只小鼠。

2.2 造模与给药 本实验参考 Farid F 的方法,给予幼龄 BALB/c 雌鼠腹腔注射瘦素造模^[2]。20 d 日龄时开始造模给药。NC 组给予生理盐水 ip,同时给予蒸馏水(DW) ig。M 组给予瘦素 ip,同时给予 DW ig。各给药组均予瘦素 ip,给药量均为 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重。同时, JJZB-H 组、JJZB-L 组分别予高、低剂量的加减知柏地黄丸药液 ig,剂量分别为 5 倍、2.5 倍的临床等效剂量(按 30Kg 体重患儿计算,下同),分别为生药 $116.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $58.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; PC 组给予甲地孕酮药液 ig,用量为临床等效剂量的 2.5 倍,为 $3.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 各组 ip 及 ig 的药物容量均按 $0.3 \text{ mL}\cdot 10 \text{ g}^{-1}$ 体重计算,均为上午给药,每天 1 次,连续 7 d,即小鼠 26 d 日龄时结束实验。此外, GnRH-A 组给予促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A)制剂注射用醋酸亮丙瑞林(商品名抑那通),同时给予瘦素 ip,给药量与给药方法均同前述各组,分别以抑那通首剂药液和次剂药液于右后肢处肌注,隔日 1 次,首剂药液

给药 1 次,次剂药液给药 2 次,共给药 3 次;抑那通首剂、次剂用量均为 2.5 倍临床等效剂量,分别为 $1.574 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $1.180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药容量为 $0.1 \text{ mL}\cdot 10 \text{ g}^{-1}$ 体重。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 阴道开口 据预试验观察正常 BALB/c 雌性小鼠阴道开口时间一般在日龄 26~28 d,以 27 d 较为集中。本实验瘦素给药后第 3 天(即 22 d 日龄)开始每天 4 pm 观察各组阴道开口,26 d 日龄时结束。

2.3.2 体重变化 每天记录各组小鼠体重变化,实验结束时,取实验前后体重进行比较。

2.3.3 阴道脱落细胞涂片 实验结束前 1 d, 4 pm 对各组动物进行阴道脱落细胞涂片,普通显微镜下观察阴道细胞变化情况。

2.3.4 血清 LH, E_2 含量测定 实验结束时,各组动物称量体重后,摘取眼球眼眶取血, $3500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C 离心 15 min,取上清,分别测定 LH, E_2 含量(ELISA 法)。

2.3.5 子宫、卵巢重量及病理切片观察 各组动物眼眶取血后,摘取子宫、卵巢分别称重后固定于 10% 福尔马林溶液,常规石蜡切片, H-E 染色,普通显微镜下观察其组织学变化。

3 结果

3.1 各组阴道开口情况比较 各组小鼠开始出现阴道开口的天数及小鼠数如表 1 示, NC 组造模第 5 天有 2/9 小鼠出现阴道开口,阴道开口的平均天数是 6.3 d。M 组造模第 3 天即有 2/10 小鼠出现阴道开口,阴道开口的平均天数是 4.6 d,比 NC 组提前 1.7 d ($P < 0.05$)。从造模第 4 天开始, M 组与 NC 组的阴道开口小鼠数比较即有差别,造模第 4, 5, 7 天, M 组小鼠的阴道开口较 NC 组提前 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠阴道开口数比较

组别	n	阴道开口数				
		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组	9	0	0	2	4	5
模型组	10	2	5 ³⁾	8 ³⁾	9	10 ³⁾
JJZB-H 组	10	0	0 ¹⁾	0 ²⁾	2 ²⁾	3 ²⁾
JJZB-L 组	9	0	0 ¹⁾	1 ²⁾	4	5 ¹⁾
GnRH-A 组	10	4	8 ⁴⁾	10 ⁴⁾	10 ⁴⁾	10 ⁴⁾
PC 组	10	0	2	4	6	8

注:与模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常对照组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)

GnRH-A 组造模第 3 天即有 4/10 小鼠出现阴道开口, 阴道开口的平均天数是 3.1 d, 比 NC 组提前 3.2 d ($P < 0.01$), 比 M 组提前 1.5 d ($P = 0.086$)。造模第 4~7 天, GnRH-A 组与 NC 组的阴道开口小鼠数比较, 差别均有显著性意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明 GnRH-A 组小鼠阴道开口较 NC 组提前, 尤其于造模第 4, 5 天明显提前。

JJZB-H 组造模第 6 天有 2/10 小鼠出现阴道开口, 于造模第 4~7 天对瘦素诱导的阴道开口提前均

有抑制作用, 尤以造模第 5~7 天抑制作用明显 ($P < 0.01$); JJZB-L 组造模第 5 天有 1/9 小鼠出现阴道开口, 于造模的第 4, 5, 7 天对瘦素诱导的阴道开口提前均有抑制作用, 尤以造模第 5 天抑制作用明显 ($P < 0.01$)。但高、低剂量组间差别无显著性意义。阳性对照药甲地孕酮对瘦素诱导的开口提前的对抗作用不明显, PC 组造模第 4 天即有 2/10 小鼠出现阴道开口。

3.2 各组子宫、卵巢重量及体重比较 结果见表 2。

表 2 各组子宫、卵巢重量及体重比较

组别 (n)	剂量 (mg·kg ⁻¹)	子宫重量 (mg)	卵巢重量 (mg)	体重 (g)
NC 组(9)	—	19.33 ± 8.46	10.89 ± 3.26	11.84 ± 1.47
M 组(10)	2	24.10 ± 7.14	12.00 ± 1.63	11.09 ± 0.78
JJZB-H 组(10)	116 900	17.20 ± 5.31 ¹⁾	8.90 ± 2.33 ²⁾	11.65 ± 0.67
JJZB-L 组(9)	58 500	17.00 ± 3.16 ¹⁾	10.89 ± 1.27	11.31 ± 0.61
GnRH-A 组(10)	1.574, 1.180	213.70 ± 85.40 ^{2,4)}	15.20 ± 4.24 ^{1,3)}	12.08 ± 0.99 ¹⁾
PC 组(10)	3.9	17.20 ± 5.61 ¹⁾	9.89 ± 3.66	11.01 ± 0.97

3.3 各组子宫、卵巢指数比较 为排除子宫、卵巢重量增加是由于体重变化影响所致, 比较各组子宫、卵巢指数(分别为子宫或卵巢重量与体重之比)的变化。结果见表 3。

表 3 各组子宫指数、卵巢指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别 (n)	剂量 (mg·kg ⁻¹)	子宫指数 (10 ⁻³ 子宫重量/体重)	卵巢指数 (10 ⁻³ 卵巢重量/体重)
NC 组(9)	—	1.726 ± 0.772	0.916 ± 0.228
M 组(10)	2	2.174 ± 0.642	1.087 ± 0.171
JJZB-H 组(10)	116 900	1.477 ± 0.452 ¹⁾	0.766 ± 0.206 ²⁾
JJZB-L 组(9)	58 500	1.510 ± 0.318 ¹⁾	0.964 ± 0.112
GnRH-A 组(10)	1.574, 1.180	17.60 ± 6.523 ^{2,4)}	1.280 ± 0.440 ³⁾
PC 组(10)	3.9	1.570 ± 0.534 ¹⁾	0.883 ± 0.315

3.4 各组血清 LH, E₂ 水平比较 结果见表 4。

表 4 各组血清 LH, E₂ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别 (n)	剂量 (mg·kg ⁻¹)	LH (mIU·mL ⁻¹)	E ₂ (pg·mL ⁻¹)
NC 组(9)	—	8.46 ± 1.29	1 628.15 ± 6.10
M 组(10)	2	10.51 ± 1.14	1 633.20 ± 7.89
JJZB-H 组(10)	116 900	8.67 ± 1.01 ²⁾	1 623.04 ± 6.75 ²⁾
JJZB-L 组(9)	58 500	8.53 ± 1.23 ²⁾	1 624.88 ± 8.78 ¹⁾
GnRH-A 组(10)	1.574, 1.180	13.62 ± 1.69 ^{2,4)}	1 648.93 ± 5.90 ^{2,4)}
PC 组(10)	3.9	8.69 ± 1.25 ²⁾	1 626.17 ± 6.33 ¹⁾

3.5 各组子宫、卵巢组织病理切片及阴道脱落细胞涂片观察

3.5.1 各组阴道脱落细胞涂片观察 各组小鼠阴道脱落细胞涂片除 GnRH-A 组可见到较多的角化细胞外, 其余各组仅可见少许角化细胞。

3.5.2 各组卵巢组织切片观察 各组卵巢组织切片镜下所见卵泡发育情况大致相同, 均可见初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡等各级卵泡。

3.5.3 各组子宫组织切片观察 各组子宫病理切片镜下所见, 除 GnRH-A 组外, 均可同时观察到子宫内膜增生期和分泌期的改变, 而 GnRH-A 组子宫病理切片镜下所见子宫内膜以分泌期改变为主。

4 讨论

第二性征的提前发育是 ICPP 的临床特征。在雌鼠(啮齿类动物)最能代表第二性征发育的指征即是阴道开口。实验发现加减知柏地黄丸对瘦素促进幼龄雌鼠阴道开口提前具有抑制作用。阳性对照药甲地孕酮在本实验中对瘦素诱导的开口提前的对抗作用不明显。

性腺轴功能的启动, 可促进其靶腺——子宫和卵巢的生长发育。实验结果显示瘦素能诱导 ICPP 模型的子宫和卵巢重量、子宫指数和卵巢指数均有增高的趋势, 这既可能因于瘦素作用于生殖中枢, 启动性腺轴, 也可能因于瘦素直接作用于卵巢、子宫所

致。高、低剂量的加减知柏地黄丸对瘦素诱导的子宫和卵巢重量增加、以及子宫指数和卵巢指数的升高均有抑制作用,高剂量组降低卵巢重量和卵巢指数的作用较明显,并显示一定的量效关系,高剂量组作用较强。甲地孕酮亦能抑制瘦素诱导的子宫重量和子宫指数的升高,同时亦有降低卵巢重量和卵巢指数的趋势。

观察各组小鼠体重的变化,可以反映性成熟的启动与体重和体内能量代谢的关系。实验中发现,瘦素可使模型小鼠体重略为减轻,但与正常对照组相比差别无统计学意义,提示瘦素调控生殖功能的生理作用并非继发于其对体重和能量平衡的调节。这是与临界体脂学说相不一致之处。但与 Ahima 的研究结果一致^[3]。高、低剂量的加减知柏地黄丸和甲地孕酮均无对抗瘦素减轻体重的作用。此外,实验结果表明,各组动物子宫、卵巢重量的变化与子宫指数和卵巢指数的变化基本一致,各药物对动物子宫、卵巢重量的影响及对子宫指数和卵巢指数的影响亦基本一致,可以认为瘦素及各药物对子宫、卵巢重量的影响与体重变化无关。

LH 是初情期的标志及预测排卵常用的最显著的激素标志。LH 优势性升高,亦为 ICPP 的临床标志之一^[4]。本实验发现瘦素能诱导 ICPP 模型的 LH、E₂ 升高,提示瘦素可提前启动垂体——性腺轴功能,给促性腺激素分泌以许可信号。这与 Chehab 等的实验结果亦不一致, Chehab 等于雌鼠出现动情期的 29 日龄时,采血测定 LH、E₂,结果均显示低于 PBS 组,该学者认为与实验组动情期较早出现是一致的^[2]。本实验发现 ICPP 模型的 LH、E₂ 升高,可能因于 26d 日龄的动物处于不同的动情周期如排卵前期所致;同时发现不同剂量的加减知柏地黄丸和甲地孕酮均能对抗瘦素诱导 LH、E₂ 升高的作用;实验发现 GnRH-A 组 LH、E₂ 水平最高,表明抑那通短期给药,不但无对抗瘦素诱导的 ICPP 的作用,相反,与瘦素有协同刺激垂体——性腺轴功能,促进性早熟的作用。

观察阴道上皮细胞学的周期性变化,可推测各个相应时期卵巢、子宫状态和激素分泌变化,如大量角化细胞的出现表明动情期的出现。本实验各组小鼠阴道脱落细胞涂片仅 GnRH-A 组可见到较多的角化细胞,这与 GnRH-A 组 E₂ 水平较高一致,表明抑

那通可使幼龄雌鼠动情期明显地提前出现;其余各组仅见少许角化细胞,表明瘦素虽可使垂体——性腺轴功能提前启动, LH、E₂ 升高,但未能使幼龄雌鼠动情期提前出现,这可能因于给予瘦素处理时间过短之故。

各组子宫病理切片镜下所见,正常对照组及各给药组均可同时观察到子宫内膜增生期和分泌期的变化,而 GnRH-A 组子宫内膜呈分泌期改变,提示 GnRH-A 组子宫内膜呈分泌期改变系排卵后所致,其排卵期较其它组提前。各组卵巢病理切片镜下所见卵泡发育情况大致相同,均可见初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡等各级卵泡,这可能是因于本实验瘦素处理时间、实验周期均过短的缘故,也可能因于卵巢卵泡发育主要受 FSH 调控之故,但给与瘦素刺激后 FSH 变化如何? 本实验因采集血清较少,未作检测。

ICPP 的病理机制主要因于 HPGA 功能的提前发动,瘦素诱导的性早熟模型是否亦存在垂体——性腺轴之上的下丘脑 GnRH 及其受体的表达和分泌的增加,以及药物的干预作用如何? 尚须进一步研究。

抑那通是下丘脑分泌的长效促性腺激素释放激素拟似剂,近年用以治疗 ICPP。本实验设抑那通组,旨在观察抑那通短暂给药对瘦素诱导性早熟的效应,结果发现抑那通对瘦素促进阴道开口提前、增加子宫和卵巢重量及其重量指数、以及诱导 LH 和 E₂ 分泌增加等效应,均有明显的协同促进作用,并有促进幼龄雌性小鼠阴道上皮角化细胞的出现、子宫内膜由增生期向分泌期转化的作用,表明抑那通诱导性成熟作用更明显。

[参考文献]

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372: 425-432.
- [2] Farid F, Chehab, Khalid Mounzih, Ronghua Lu, *et al.* Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*[J]. Vol. 1997, 88-90.
- [3] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting[J]. *Nature*, 1996, 382: 250-252.
- [4] 宋文惠,王德芬. 瘦素与青春发育[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2000, 16(5): 328.