

• 药理 •

六味地黄汤对悬吊应激小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴激素的影响

马 渊, 周文霞, 程军平, 张永祥
(北京毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目的: 观察悬吊应激雌性小鼠下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴功能的变化及六味地黄汤(LW)对其影响。方法: 用悬吊方法应激雌性小鼠(第1~3d悬吊30min,以后每3d增加30min),建立动物HPO轴功能失常模型,用放射免疫分析法检测下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)含量及血清雌二醇浓度,用Western blot检测垂体促黄体生成素(LH)水平。结果: 悬吊应激组小鼠体重下降,动情周期及动情间期延长,下丘脑GnRH、垂体LH水平下降,血清雌二醇浓度升高。口服LW对应激小鼠动情周期无明显影响,但能一定程度减少其体重的下降;同时,口服LW能显著提高应激小鼠下丘脑GnRH和垂体LH的水平,并能明显降低应激小鼠血清雌二醇的浓度。结论: 悬吊应激可导致雌性小鼠HPO轴功能紊乱,LW对应激小鼠HPO轴功能紊乱具有明显纠正作用。

关键词: 应激; 下丘脑-垂体-卵巢轴; 六味地黄汤; 促性腺激素释放激素; 促黄体生成素

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)06-0018-04

Effect of Liuwei Dihuang Decoction on Hypothalamus-pituitary-ovary

Axis in Hanging Stress-loaded Female Mice

MA Yuan, ZHOU Wen-xia, CHENG Jun-ping, ZHANG Yong-xiang
(Beijing Institute of pharmacology and toxicology, Beijing 100850)

Abstract: Object: To study the effect of Liuwei Dihuang (LW) decoction on stress induced imbalance of hypothalamus-pituitary-ovary (HPO) axis in female mice. Methods: Mice were subjected to hanging stress every day (30 min for the first 3 days, and after word increasing 30 min for every 3 days). The total duration of stress was 25 days. Radioimmunoassay (RIA) was used to test the concentrations of hypothalamic Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and serum estradiol, and the western blot technique was used to quantify the level of luteinizing hormone (LH) in the pituitary. Results: The body weights of stress-loaded mice were markedly increased and the estrus cycle and the diestrus was significantly prolonged in stress-loaded mice. Meanwhile, the concentrations of hypothalamic GnRH and pituitary LH in stress-loaded mice were significantly decreased, while the levels of serum estradiol were significantly increased. Oral administration of LW showed little effect on the oestrus cycle in stressed mice, but showed significantly improving effects on the levels of hypothalamic GnRH and pituitary LH. The serum estradiol concentration of stressed mice was significantly restored after LW administration. Conclusions: Stressing mice by hanging induced malfunction of HPO axis, and LW improved or restored the disturbance of HPO axis in stress-loaded mice.

Key words: Stress; Hypothalamus-pituitary-ovary Axis; Liuwei Dihuang decoction; Gonadotropin-releasing hormone; Luteinizing hormone

应激是指机体对各种内、外界刺激因素作出包括精神、神经、内分泌及免疫系统变化在内一系列非特异性反应的过程。应激对健康有双重作用。一方

面,应激能提高机体的适应能力,维持内环境的稳定,动员机体非特异性适应系统,产生对疾病的抵抗,增强体质和适应能力。另一方面,应激反应发生时间过长、程度过强或过弱,也会对机体造成不同程度的损伤^[1]。研究表明,应激与多种疾病的发生和发展有关,如老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)、Cushing氏综合征和一些精神疾病等。此外,应激亦

收稿日期: 2002-03-11

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G1999054401)

可导致生殖内分泌功能紊乱^[2]。统计资料显示,战争期间妇女生育率明显下降而妇科病患率升高,大负荷训练的运动员体内性激素水平明显下降^[3],女运动员比正常妇女更容易出现闭经或患月经病,说明应激对生殖内分泌功能尤其是对女性生殖内分泌功能具有明显影响。下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴的平衡是维持和调节生殖内分泌功能的关键,因此,研究应激对 HPG 轴各环节的影响对了解应激性生殖内分泌系统的变化规律,并对进一步寻找有效药物以改善或调节应激性生殖内分泌紊乱均具有重要意义。

六味地黄汤(LW)是滋补肾阴的经典名方,临床用于多种疾病的治疗,如糖尿病、高血压等,用于更年期综合征、性功能低下、儿童性早熟等生殖内分泌相关疾病亦具有显著疗效^[4]。应激是生殖内分泌疾病的重要诱因,因此研究 LW 对应激所致的生殖内分泌功能紊乱具有重要意义。本研究以慢性悬吊雌性小鼠为应激模型,观察了 LW 对慢性应激雌性小鼠性周期的影响及对下丘脑-垂体-卵巢(HPO)各环节激素水平的影响。

1 材料与方

1.1 药物 六味地黄汤由本室制备,熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓购于北京同仁堂药店,按 8:4:4:3:3:3 的配伍比例混合,加水浸泡 12h,以 600ml/100g 生药的比例加水煎煮两次,每次 2h,过滤后合并煎液,浓缩至 1g 生药/ml 备用。

1.2 试剂 雌二醇检测试剂盒为天津协和生物技术研究所产品,促性腺激素释放激素(GnRH)检测试剂盒为中国人民解放军海军放射免疫技术研究所产品,鼠促黄体生成素(LH)抗体购自美国 Santa cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 动物、分组及给药 Balb/c 小鼠,雌性,6~8 周龄,军事医学科学院动物中心提供,饲养室温度 18~22℃,随意进食和饮水。按体重随机分为 5 组,每组 16 只,即正常对照组、应激组 LW5、10 及 15g/kg 给药组,LW 组予以相应剂量药物灌胃,对照组及应激组则灌以等体积蒸馏水,每日灌胃 1 次,连续 25d。

1.4 方法

1.4.1 悬吊应激实验^[5,8] 将小鼠尾朝上头朝下固定于水面上,水温 18~22℃,悬吊高度以前肢刚接触水面为准,每天 1 次,连续 25d,并循序增加应激强度,第 1~3d 应激 30min,以后每 3d 增加 30min,应激

时间 9:00 am~3:00pm,每 5 日记录小鼠体重,每日上午 8 时取阴道涂片记录动情周期^[9],于实验第 25d 取动情间期小鼠断头处死,取下丘脑、垂体、双侧卵巢于液氮中冻存,分离血清于-70℃冰箱冻存。

1.4.2 GnRH 雌二醇检测^[10] 放射免疫检测 GnRH 雌二醇按试剂盒操作说明书进行。

1.4.3 Western blots 检测垂体 LH^[11] 将动物垂体称重后裂解,以 800μg/孔上样量于 15% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电压 60/100V,以 1.8mA/cm² 半干转印 1hr,5% 脱脂奶粉封闭,一抗 1:400,二抗 1:600,化学发光法(ECL)显色,底片曝光后扫描测定。

1.4.4 统计学处理 数据处理使用 SPSS 软件,多组间比较用 oneway-ANOVA。

2 结果

2.1 六味地黄汤对悬吊应激小鼠体重及动情周期的影响 见图 1 及表 1。悬吊第 5~25d,应激组小鼠体重持续下降,与对照组比较差别显著($P < 0.05$, $P < 0.01$);口服给予 LW 能一定程度减轻应激组小鼠体重的下降,其中,悬吊第 15、20d 时,LW10 和 15g/kg 给药组小鼠体重明显回升,与应激组比较差别显著($P < 0.01$)。连续悬吊 25d,应激组小鼠动情周期显著延长,其中,动情间期明显延长,动情间期在动情周期中所占百分率明显上升($P < 0.01$),而动情期无明显变化($P > 0.05$),其在动情周期中所占百分率明显下降($P < 0.01$)。口服给予 LW 对悬吊应激小鼠的动情周期无明显影响($P > 0.05$)。

表 1 六味地黄汤对悬吊小鼠动情周期的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 11$)

组别	剂量 (g/kg)	动情周期 (d)	动情期		动情间期	
			(d)	%	(d)	%
对照组	-	7.3 ± 1.6	4.4 ± 1.4	60 ± 13	1.9 ± 0.8	27 ± 11
应激组	-	10.5 ± 3.0* *	4.1 ± 1.1	40 ± 8* *	4.6 ± 1.4* *	45 ± 10*
LW	5	9.2 ± 1.7	3.9 ± 0.5	44 ± 12	4.0 ± 1.9	42 ± 17
	10	8.2 ± 1.5	3.4 ± 1.0	42 ± 11	3.7 ± 1.2	46 ± 13
	15	9.3 ± 1.8	3.9 ± 0.9	43 ± 9	4.7 ± 1.6	51 ± 13

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较

2.2 六味地黄汤对悬吊应激小鼠血清雌二醇、垂体 LH、下丘脑 GnRH 水平的影响 见图 2~图 4。与正常对照组比较,悬吊应激 25d 的雌性小鼠血清雌二醇水平显著升高,垂体 LH 水平显著下降,下丘脑 GnRH 含量有下降趋势,但无统计学意义。连续口服给予 LW5、10、15g/kg 能明显降低悬吊应激小鼠血清雌二醇水平,与应激组比较差别显著($P < 0.01$);连续口服给予各剂量 LW 亦能不同程度纠正悬吊应激小鼠垂体 LH 水平的下降,其中,LW 10g/kg 给药组作

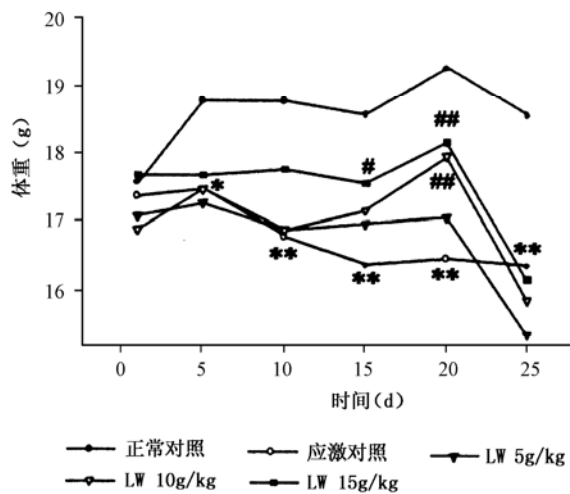


图 1 LW 对悬吊应激小鼠体重的影响

注: 与同日正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同日应激对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 15$

用最为显著 ($P < 0.05$, 与应激组比较)。此外, 连续口服给予 LW 5g/kg 则能使悬吊应激小鼠下丘脑 GnRH 水平明显升高 ($P < 0.05$, 与应激组比较)。

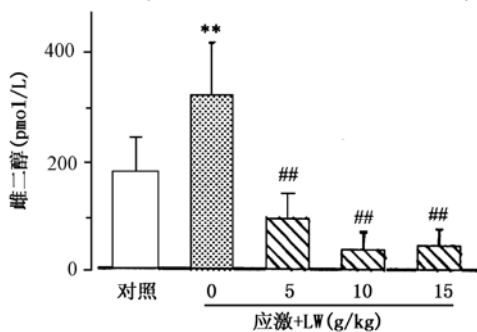


图 2 LW 对悬吊应激小鼠血清雌二醇水平的影响
注: $\bar{x} \pm s$, $n = 6$

3 讨论

应激反应的显著特征是下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴功能亢进, 表现为下丘脑大量促肾上腺激素释放激素 (CRH) 分泌, 促使垂体分泌 ACTH 增加, 进而刺激肾上腺皮质释放糖皮质激素, 使血浆皮质酮水平明显升高。同时, 应激过程中 CRH 及糖皮质激素的大量释放可在下丘脑、垂体、性腺多水平对 HPG 轴产生抑制作用, 从而导致生殖内分泌功能的紊乱^[12]。

目前用于应激研究的动物模型主要有束缚应激、冷应激、环境应激 (隔离、放入新群体等) 及悬吊应激等, 不同的应激方式对机体所产生的效应有所区别。Bao 等早在 80 年代研究发现, 小鼠每天给予悬吊应激, 连续 15d, 体重明显下降, 雄性小鼠的交配次数明显减少, 雌性小鼠的动情周期紊乱, 表现为动

情期缩短, 间期延长, 同时伴有体温下降。给予红参制剂具有明显的改善作用^[5,6]。另有研究发现, 悬吊应激可导致雄性小鼠性交次数减少甚至缺损, 血浆睾酮水平降低, 雌性小鼠性周期延长, 血清雌二醇水平显著降低^[7,8], 提示悬吊应激可引起动物生殖内分泌功能低下或紊乱。因此, 悬吊应激模型可用于调节生殖内分泌功能药物的研究。然而, 目前对于悬吊应激所引起的 HPG 轴的变化规律尚缺乏深入了解。

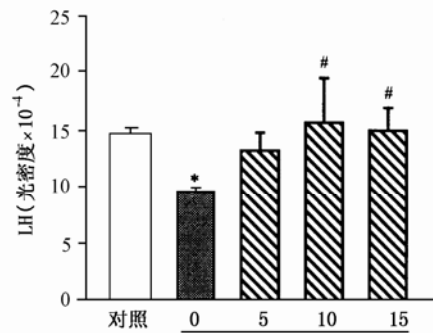
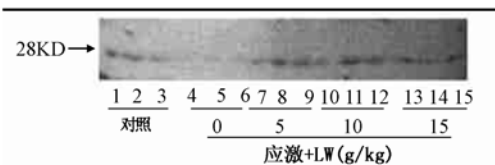


图 3 LW 对悬吊应激小鼠垂体 LH 水平的影响
注: $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

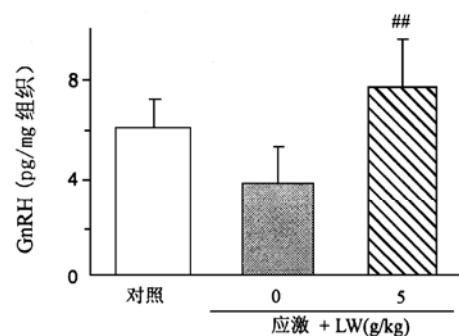


图 4 LW 对悬吊应激小鼠下丘脑 GnRH 水平的影响
注: $\bar{x} \pm s$, $n = 4$

本研究选用雌性 Ball/c 小鼠, 观察了悬吊应激对小鼠性周期的影响, 在此基础上, 又系统观察了应激小鼠 HPO 轴各环节激素水平的变化。结果表明, 小鼠给予悬吊应激 25d 后动情周期显著延长, 动情间期在动情周期中所占百分率明显上升, 提示小鼠性周期明显紊乱。进而研究发现, 处于动情间期的应激小鼠血清雌二醇浓度明显升高, 但下丘脑 GnRH 及垂体 LH 水平则明显降低。一般来讲, 血清性激

素水平的变化与性机能具有密切关系,但亦有研究表明,血清性激素水平的升高不一定意味着生殖功能的增强。正常雌性动物血清性激素浓度在动情间期降至全周期最低点,从而减弱其对上层中枢的负反馈抑制,使下丘脑 GnRH、垂体 FSH 和 LH 水平在间期末期逐渐升高,并进一步刺激卵巢中卵泡的发育和诱发排卵。此外,对人类运动应激的研究表明,大负荷运动使血清促性腺激素和性激素水平显著下降^[3],但当应激强度处于耐受极限的 70%~75% 时,血清性激素水平升高,血清促性腺激素水平下降,但此时性腺功能并无提高,血清性激素水平的升高可能与体内性激素代谢廓清率下降有关^[13]。我们考虑悬吊应激小鼠动情间期血清雌激素水平的升高有两种可能性,一是应激导致了下丘脑功能减退,使 GnRH 分泌或释放能力下降,另一种可能是一种保护性调控机制,即机体通过降低下丘脑和垂体水平的调节激素来提高或维持正常的血清雌激素水平,其确切机制有待进一步深入研究。但应激小鼠动情周期延长,动情间期延长提示卵巢功能处于低下或紊乱状态, Bao^[5,6] 等的研究也支持这一点。

六味地黄汤的主要功效是滋补肾阴,主治多种表现有肾阴虚证的疾病,现代临床试验发现,其对更年期综合征、女性不孕、功能性子宫出血、前列腺增生等内分泌平衡失调相关的疾病均具有一定的疗效^[14];实验药理学研究观察到, LW 对中老龄大鼠血清性激素水平具有调节作用,增加大鼠垂体重量,并使 LH 分泌细胞的数量增加^[15]。我们以往研究发现,口服给予 LW 对 SAMP8 睾丸间质细胞分泌睾酮能力低下具有明显改善作用,提示 LW 对睾丸的内分泌功能具有调节作用^[16]。本研究发现,口服六味地黄汤能提高悬吊应激小鼠动情间期下丘脑 GnRH 及垂体 LH 水平、降低血清雌二醇水平,纠正 HPG 轴功能的紊乱,提示调节 HPG 轴的机能平衡是 LW 的重要药理作用之一,是临床防治生殖内分泌平衡失调性疾病的药理学基础。关于 LW 调节 HPG 轴的作用环节及途径等问题正在研究之中。

参考文献:

[1] Olf M. Stress, depression and immunity: the role of defense

and coping styles[J]. Psychiatry Res, 1999, Jan 18, 85(1): 7-15.

[2] Hendrick V, Gitlin M, Altshuler L, et al. Antidepressant medications, mood and male fertility [J]. Psychoneuroendocrinology, 2000, 25(1): 37-51.

[3] Susan E, Ariel, Richard M, et al. Decreased hypothalamic gonadotropin releasing hormone secretion in male marathon runners[J]. The new England journal of medicine, 1986, 14: 411-417.

[4] 李继红. 六味地黄汤治疗更年期综合征 50 例报告[J]. 中华中西医杂志, 2001, 2(1): 68.

[5] Bao T, Ueyama T, Hinata K, et al. Effects of Red Ginseng, Vitamins and their preparations(III): Effect on sex and learning behaviors in stressed male mice[J]. 药理与治疗(日), 1984, 12(4): 1470-1476.

[6] Bao T, Saito H. Effects of Red Ginseng, Vitamins and their preparations (IV): Effect on sex cycle in stressed female mice[J]. 药理与治疗(日), 1984, 12(4): 1477-1481.

[7] 连晓媛, 张均田. 重复应激造成小鼠性行为缺陷[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(3): 273-274.

[8] 连晓媛, 丁岩, 张均田. 应激性生殖内分泌功能低下动物模型[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(10): 673-675.

[9] 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979, 141-142.

[10] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 下册, 1511-1517.

[11] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 上册, 64-67.

[12] Berga S. Behaviorally induced reproductive compromise in women and men [J]. Semir Reprod Endocrinol, 1997, 15(1): 47-53

[13] Sutton J, Coleman M, Casey G. Testosterone production rate during exercise[J]. Activity Science, 1976, 72.

[14] 李兴林. 女性不孕症性功能障碍分析[J]. 右江民族医学院学报, 1998, 20(4): 602.

[15] 陈健安, 高崎悦司, 铃木辙. 六味地黄汤对大鼠下丘脑-垂体-性腺轴组织器官形态和性激素的影响[J]. 江苏医药, 1999, 20(3): 46-47.

[16] 程军平, 张永祥. 六味地黄汤对快速老化模型小鼠睾丸间质细胞睾酮分泌功能的影响[J]. 军事医学科学院院刊, 2001, 25(1): 42-44.