

补肾方剂左归丸(汤)对小鼠早期胚胎发育的影响*

冯前进 冯玛莉 王玉良 杨艳华 武玉鹏

内容提要 本研究通过体外用药、体外用给药小鼠血清及在体用药三种方式,以酒精制成胚胎发育迟缓模型,以气血双补方八珍汤作对照,应用补肾阴方左归丸(汤),对体外培养的小鼠 2 细胞期(2CE)至囊胚期胚胎发育进行了动态观察。结果表明:用给药小鼠血清或在体应用左归汤者,体外培养的 2CE 至囊胚各期胚胎的发育率均显著高于酒精模型组,八珍汤组各期胚胎发育率略高于模型组,但无显著性差异;体外用药对早期胚胎发育未见明显作用。

关键词 左归丸 早期胚胎发育 体外培养

Effect of Zuoguiwan on Early Embryonic Development of Mice FENG Qian-jin, FENG Ma-li, WANG Yu-liang, et al *Shanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan (030012)*

Effects of Zuoguiwan (ZGW, a prescription for reinforcing Kidney Yin) on early embryonic development were observed by using embryonic developmental retardation model of mice formed by alcohol. Drug was given in three ways: add ZGW into cultural medium directly (group A), add the serum of mice received ZGW (group B) and cultured the embryo taken from ZGW treated mice (group C). The result was compared with that treated with Bazhen decoction (BZD, a prescription for supplementing Qi and blood). Results showed that the in vitro developmental rate of embryo from 2-cell stage to blastula stage in group B and C, which approached to normal control group, was higher than that in untreated model obviously. While in BZW group, it was higher than in normal control group only in certain stage. However, adding ZGW directly into culture medium didn't reveal marked effect on early embryonic development.

Key words Zuoguiwan, early embryonic developmental, culture in vitro

早期胚胎体外培养技术是研究实验胚胎学及发育遗传学的重要手段。本研究应用小鼠早期胚胎培养技术,体外与在体实验相结合,动态观察早期胚胎各期(2CE 至囊胚)的发育率,研究中药补肾阴代表方左归丸(汤)对早期胚胎发育的作用,以探讨补肾方剂对早期胚胎发育的影响及其作用机制,试图阐明中医“肾主生殖、发育”的本质内涵。

材料与方法

1 药物及试剂 左归丸(汤):熟地黄 8g 山药 4g 枸杞子 4g 山茱萸 4g 川牛膝 3g 菟丝子 4g 鹿角胶 4g(烊化) 龟甲胶 4g(烊化),水煎 2 次,1 次 2h,滤过,合并煎煮滤液,浓缩至 100%煎剂,置 4℃ 备用;八珍汤:人参 3g 白术 3g 茯苓 3g 甘草 2g 当归 5g 川芎 4g 白芍 6g 熟地黄 6g

制备方法、浓度同上;酒精:无水乙醇(分析纯)以蒸馏水配制成 40%乙醇溶液,临用现配;基础培养液:含 20%新生牛血清(NBS)的 M16(NaCl 94.66 mmol/L、KCl 4.78 mmol/L、CaCl₂·2H₂O 1.71 mmol/L、KH₂PO₄ 1.19 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 1.19 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、乳酸钠 23.28 mmol/L、丙酮酸钠 0.33 mmol/L、葡萄糖 5.56 mmol/L、青霉素 10 万 u/L、链霉素 0.05 g/L、酚红 0.01 g/L);孕马血清促性素(PMSG):长春生物制品研究所产品;绒毛膜促性腺素(HCG):上海生物化学制药厂产品。

2 动物 昆明种小鼠,体重 26±2 g,购于中国医学科学院实验动物中心。

3 投药方式

3.1 体外用药 将左归丸(汤)、八珍汤以基础培养液稀释 10 倍,3000 rpm,离心 20 min,取上清以 1 N NaOH 调 pH 至 7.2,再以基础培养液稀释至

* 国家中医药管理局科研基金资助课题(No. 89 B001)

山西省中医药研究院(太原 030012)

不同终浓度(0(正常对照), 0.1 mg/ml(小剂量), 1 mg/ml(中剂量), 10 mg/ml(大剂量)), 作为体外用药实验培养液, 于体外培养正常小鼠 2 CE。

3.2 体外用给药小鼠血清 取小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分 4 组, 每组 10 只, 模型组以酒精 15 ml/kg 灌胃; 左归丸或八珍汤组以酒精 15 ml/kg 同时加左归汤或八珍汤 30 ml/kg(相当于生药 30 g/kg)灌胃; 正常对照组以等量生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 连续 10 天。于末次灌胃后 40 min, 眼眶取血, 每组各鼠血合并为 1 份, 分别制备各组鼠血清, 56°C 灭活 30 min, 以含 5% 鼠血清的基础培养液作为体外用给药小鼠血清的实验培养液, 于体外培养正常小鼠 2 CE。

3.3 在体用药 取小鼠 48 只, 随机均分 4 组, 模型组分别予小剂量酒精(15 ml/kg)、大剂量酒精(18 ml/kg), 左归丸(汤)组或八珍汤组予大、小剂量酒精加左归汤或八珍汤(剂量同上), 正常对照组以等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 10 天后处死小鼠, 取 2 CE, 以基础培养液于体外培养。

4 早期胚胎体外培养及观察

4.1 小鼠 2 CE 的获得及培养方法见文献^①。取雌性小鼠, 每只腹腔注射 PMSG 10 IU, 48 h 后腹腔注射 HCG, 并与雄性小鼠 1:1 合笼, 于次日晨检查雌鼠, 取有阴栓者, 注射 HCG 48 h 后处死小鼠, 取输卵管置 20% NBS·PBS 中, 体视显微镜下从输卵管伞端进针, PBS 冲胚胎, 此时多为 2 CE, 20% NBS·PBS 洗 2 次, 移至基础或实验培养液中, 液体石蜡覆盖, 5% CO₂, 37°C 培养 72 h。

4.2 各期胚胎的动态观察见文献^②。分别于体外培养后 0, 24, 48, 72 h 于倒置镜下计数 2 CE、桑椹期及囊胚期胚胎数及总胚胎数, 计算各期胚胎发育率, 用 χ^2 测定显著性。

结 果

1 体外应用补肾方剂对小鼠 2 CE 发育的作用 以不同剂量的体外用药实验培养液体外培养正常小鼠 2 CE 72 h, 囊胚发育率: 正常对照组为 47.8%; 左归丸组小剂量为 50.8%, 中剂量为 51.5%, 大剂量为 24.2%; 八珍汤组小剂量为 46.5%, 中剂量为 47.6%; 大剂量为 18.0%。左归丸或八珍汤中, 小剂量组各期发育率与正常对照组无差异, 两药大剂量组囊胚发育率低于正常对照组($P < 0.05$)。

2 体外用给药小鼠血清对小鼠 2 CE 发育的作用 见表 1。模型组小鼠血清体外培养正常小鼠 2 CE 72

h, 各期发育率均显著低于正常对照组; 左归丸组小鼠血清体外培养正常小鼠 2 CE 72 h, 各期发育率均明显高于模型组, 8 CE 及囊胚发育率均显著高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 八珍汤组桑椹及囊胚发育率略高于模型组, 但无显著性差异。

表 1 用药小鼠血清对体外培养 2 CE 胚胎发育的影响 (胚胎数(%))

组别	体外培养时间(h)			
	0 (2 CE)	24 (8 CE)	48 (桑椹)	72 (囊胚)
正常对照	110	60(54.5)**	36(32.7)**	33(30.0)**
模 型	106	23(21.7)	10(9.4)	6(5.7)
左 归 丸	124	52(41.9)**	26(21.0)*	31(25.0)**
八 珍 汤	103	27(26.2)	16(15.5)	14(13.6)

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 表内数据为 3 批实验平均测定值

3 在体用药对小鼠 2 CE 体外发育的作用

3.1 在体小剂量酒精造型应用补肾方剂对小鼠 2 CE 发育的作用 见表 2。在体造型小鼠 2 CE 体外培养 72 h, 各期发育率均显著低于正常对照组($P < 0.01$), 左归丸组各期发育率均显著高于模型组($P < 0.01$), 八珍汤组各期发育率较模型组略高, 但无显著性差异。

表 2 在体用药对体外培养的 2 CE 胚胎发育的影响 (胚胎数(%))

组别	体外培养时间(h)			
	0 (2 CE)	24 (8 CE)	48 (桑椹)	72 (囊胚)
正常对照	176	137(77.8)**	127(72.2)**	71(40.3)**
模 型	183	71(38.8)	38(20.8)	19(10.4)
左 归 丸	154	101(65.6)**	80(51.9)**	46(29.9)**
八 珍 汤	136	62(45.6)	43(31.6)	17(12.5)

注: 与模型组比较, ** $P < 0.01$; 表内数据为 3 批实验平均测定值

3.2 在体大剂量酒精造型应用补肾方剂对小鼠 2 CE 发育的作用

3.2.1 获取 2 CE 后形态学观察 正常对照组小鼠胚胎均处于 2 CE, 透明带圆, 卵裂球大小均等, 每个卵裂球透亮, 细胞质均匀, 无明显大颗粒, 卵周隙(卵细胞和透明带的空间)较小, 卵裂球充实, 卵裂线清晰; 模型组小鼠胚胎细胞分裂多处于 2 CE, 但结构异常, 许多透明带不圆, 卵裂球多数大小不一, 或皱缩或胀大, 多数细胞萎缩、变形, 卵周隙变大, 卵裂球形态不规则, 细胞质颗粒不均, 色暗或淡, 细胞膜不清, 卵裂界线不清; 左归丸组小鼠 2 CE 形态结构与正常对照组相似; 八珍汤组小鼠 2 CE 形态与

正常对照组基本相似, 卵周隙较大。

3.2.2 体外培养 72 h 各期发育率 模型组小鼠 2 CE 发育受阻, 体外未见进一步分裂; 左归丸组小鼠 2 CE 体外培养发育与正常对照组无差异, 囊胚发育率分别为 57.3%, 46.5% (2 次平均), 八珍汤组小鼠 2 CE 体外多数发育至 8 CE 后未见进一步分裂。

讨 论

《景岳全书》中记载: 左归丸治肝肾精血亏损; 功能壮水滋阴。根据中医肾主生长、发育、生殖基本理论, 本实验观察到体外用给药小鼠血清及在体应用补肾方剂左归丸者, 体外培养的 2 CE 至囊胚各期胚胎发育率均明显高于酒精模型组, 而气血双补方八珍汤组各期胚胎发育率略高于模型组, 但无统计学意义, 其对早期胚胎发育的促进作用远不及补肾方剂左归丸; 二方剂单纯体外应用对早期胚胎发育均未见明显作用, 体外大剂量对胚胎发育有抑制作用, 可能由于药物在体外培养液中浓度过高, 渗透压增高所致。因此早期胚胎发育有赖于中医学“肾”的支持, 通过“肾”的整体调节而实现的。

以现代医学推测补肾方剂可能通过增强肝、肾解毒功能, 降低酒精的血清浓度或补肾方剂经肝、肾生物转化为对胚胎有益的未知物质, 促进生殖内分泌系统的分泌功能, 抑或促进蛋白、小分子多肽^[3]、氨基

酸等对胚胎发育有益物质的合成、释放, 从而减少有害因素的损伤。在体以酒精造型后应用补肾方剂, 由于在体阶段胚胎处于卵巢和输卵管, 故推测除通过上述作用外, 尚可能与改善卵母细胞及胚胎在体发育阶段的微环境有关, 包括卵泡成熟所在的卵巢, 成熟排卵后精子获能, 受精卵进行第一次分裂的重要部位输卵管, 输卵管上皮分泌输卵管液、单胺氧化酶^[4]及甾体激素等, 这些因素均有助于胚胎发育, 因此补肾方剂似可通过促进输卵管上皮分泌而有利于胚胎发育。

综观上述, 我们推想“肾”本质的内涵很可能是整合与调控机体生殖、生长、发育的一系列脏腑器官功能的高度统一, 以上是作者运用现代实验胚胎学手段探讨“肾”生理功能的尝试。

参 考 文 献

1. 陈秀兰, 孟春玲. 哺乳动物早期胚胎体外培养的研究. 遗传 1984; 6(5): 20.
2. 陈秀兰, 谭丽玲, 荣瑞章. 家畜胚胎移植. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 59—61.
3. Rajesh K, Naz TM, Thomas F. Metabolism of murine and human embryos: Search for a growth indicator in vitro culture medium. Am J Obstet Gynecol 1988; 159(6): 1590.
4. Donnez J, Genen E, Casanas F, et al. Monoamine oxidase reactivity in the human fallopian tube. Fert Steril 1985; 43(3): 488.

(收稿: 1995—09—20 修回: 1996—08—24)

番泻叶促进术后肠功能恢复的疗效观察

王丽娜 李翠萍 李美生

临床资料 180 例均为 1986~1994 年住院妇科手术患者, 年龄 30~60 岁, 平均 42 岁; 其中腹式子宫全切 80 例, 腹膜外子宫全切 40 例, 卵巢肿瘤摘除术 60 例。均采用连续硬膜外麻醉, 药物为普鲁卡因 (过敏者改用利多卡因), 术前晚流质饮食, 手术当日早晨禁食, 术前一日晚及手术当日晨起各灌肠 1 次。将 180 例用随机数字表分为番泻叶组 (90 例)、大承气汤组 (60 例)、空白组 (30 例)。

治疗方法 番泻叶组: 取番泻叶 25 g, 沸水 300 ml 冲泡 10 min, 备用。大承气汤组: 大黄 10 g (后下) 芒硝 10 g (另包冲服) 枳实 6 g 厚朴 6 g, 加水 300 ml, 煎至 150 ml, 取汁后再加水 250 ml, 煎至 150 ml, 两汁混匀共 300 ml 备用。上两组均于术后 12 h 开始少量频服, 24 h 服完 300 ml 药液, 次日

照上量继服, 至排气排便为止。空白组术后不服用任何药物。

结 果 开始排气、排便时间: 番泻叶组分别为 33.72 ± 2.50 h、 33.93 ± 2.49 h; 大承气汤组分别为 37.80 ± 6.00 h、 41.67 ± 9.08 h; 空白组分别为 60.10 ± 3.20 h、 65.40 ± 4.30 h。番泻叶组促排气排便起效时间明显早于大承气汤组和空白组 (P 均 < 0.01), 且服药 3 天内番泻叶组的排便次数明显少于大承气汤组 ($P < 0.01$)。说明番泻叶促肠功能恢复既不伤阴液, 又有利于术后整体功能的恢复。

体 会 患者术后主要为“腑气不通”。“阴血不足”, 故治疗上就要润肠通腑, 固护阴液。实践证明, 小剂量番泻叶能疏通腑气, 润肠通便, 又不伤阴液, 明显优于大承气汤组。且单味番泻叶用之简便, 价格低廉, 疗效可靠, 副作用小, 不失为手术后促使肠功能恢复的首选药物。