with induction of a Th1-dominated cytokine response[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 127(2): 206-213.
[4] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 315-325.
[5] Boots A W, Haenen G R, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2-3): 325-337.
[6] Boots A W, Wilms L C, Swennen E L R, *et al*. *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers [J]. *Nutrition*, 2008, 24(7-8): 703-710.
[7] Farhadi L, Mohammadimotlagh H R, Seyfi P, *et al*. Low concentrations of flavonoid-rich fraction of shallot extract induce delayed-type hypersensitivity and TH1 cytokine IFNγ expression in BALB/c mice[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2014, 3(1): 16-25.
[8] Nair M P, Kandaswami C, Mahajan S, *et al*. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN-γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1593(1): 29-36.
[9] Park H J, Lee C M, Jung I D, *et al*. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(3): 261-267.
[10] 朱亚虹, 唐晓英. 头孢克肟联合左氧氟沙星治疗老年肺炎的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1229-1233.
[11] 陆 庆. 左氧氟沙星联合阿奇霉素治疗呼吸道合胞病毒感染 30 例[J]. 中国药业, 2013, 22(23): 70-72.
[12] Chakir H, Wang H, Lefebvre D E, *et al*. T-bet/Gata-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of Gata-3[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 278(1-2): 157-169.

补肾活血方对卵巢早衰小鼠颗粒细胞 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 表达的影响

刘慧萍, 曾柳庭, 胡立娟, 王 灿, 杨凯麟, 张国民*
(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

摘要: 目的 探索补肾活血方(紫石英、补骨脂、菟丝子等)对免疫性卵巢早衰(POF)小鼠卵泡壁颗粒细胞转化生长因子(TGF)-β1、TGF-βRII、Smad2/3 蛋白表达的影响。**方法** Balb/c 雌性小鼠皮下多点注射小鼠透明带 3 建立免疫性 POF 模型, POF 小鼠分成模型组, 阳性组(戊酸雌二醇)和补肾活血方低、中、高剂量组。干预 30 d 后, 卵巢组织作苏木精-伊红(HE)染色, 免疫组化法与蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测卵泡壁颗粒细胞和卵巢组织 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 的蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 补肾活血方各剂量组、阳性组卵巢成熟卵泡数目明显增多, 闭锁卵泡数目减少。卵泡壁颗粒细胞和卵巢组织 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 蛋白表达在补肾活血方各剂量组、阳性组中明显高于在模型组中($P < 0.05$)。**结论** 补肾活血方能通过上调颗粒细胞 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 的蛋白表达改善卵巢功能。

关键词: 补肾活血方; 卵巢早衰; 卵泡壁颗粒细胞; TGF-β1; TGF-βRII; Smad2/3
中图分类号: R285.5 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-1528(2017)09-1782-07
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.005

Effects of Bushen Huoxue Recipe on the expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 in granulosa cells in mice with premature ovarian failure

LIU Hui-ping, ZENG Liu-ting, HU Li-juan, WANG Can, YANG Kai-lin, ZHANG Guo-min*
(*Hunan University of Traditional Chinese Medicine*, *Changsha 410208*, *China*)

ABSTRACT: AIM To explore the effects of Bushen Huoxue Recipe (*Fluoritum*, *Psoraleae Fructus*, *Cuscutae*

收稿日期: 2016-12-27
基金项目: 国家自然基金项目(81303123); 湖南省教育厅创新平台项目(15K090); 湖南省重点实验室开放基金(2014XNFZ06); 湖南省大学生创新项目(2016-281); 国家级大学生创新项目(201510541002)
作者简介: 刘慧萍(1979—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事女性内分泌疾病病机研究
*通信作者: 张国民(1974—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事内分泌疾病病机研究。E-mail: 1074983953@qq.com

Semen, *etc.*) on the protein expressions of transforming growth factor (TGF) -β1, TGF-βRII and Smad2/3 in follicle wall granulosa cells in mice with autoimmune premature ovarian failure (POF). **METHODS** Balb/c female mice were subcutaneously injected with mouse zona pellucida 3 at multiple points to establish autoimmune POF model. POF mice were divided into model group, positive group (progynova), low-, middle- and high-dose of Bushen Huoxue Recipe groups. After intervention for 30 days, ovarian tissue was stained by hematoxylin-eosin (HE), and the protein expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 in follicle wall granulosa cells and ovarian tissue were detected by immunohistochemistry and Western blot, respectively. **RESULTS** Compared with the model group, the number of mature follicles in the Bushen Huoxue Recipe groups and the positive group was obviously increased, together with the decreased number of atretic follicles. The protein expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 in follicle wall granulosa cells and ovarian tissue in the Bushen Huoxue Recipe groups and the positive group were much higher than those in the model group ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Bushen Huoxue Recipe can improve ovarian function by up-regulating the protein expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 in granulosa cells.

KEY WORDS: Bushen Huoxue Recipe; premature ovarian failure; follicle wall granulosa cells; TGF-β1; TGF-βRII; Smad2/3

卵巢早衰（POF）在中医上可归属血枯、血隔、闭经、月经后期、脏燥、不寐、不孕等，本病的病因病机主要以肾虚为主，《素问·奇病论》云："胞络者，系于肾"，因肾主生殖，在调节因胞络失调所致月经不调或不孕方面具有重要作用。本课题组前期研究显示，补肾活血方具有调节卵巢、促进卵巢卵泡成熟排卵的功能[1-3]；体外研究表明，补肾活血方含药血清通过上调激活素受体（ActRIIA）、Smad2 和 Smad3 的表达，促进颗粒细胞增殖[4]。目前，作为转化生长因子（TGF-β）超家族成员的 BMPs（bone morphogenetic proteins）基因的突变导致卵泡发育和排卵严重失常，其中 TGF-β/Smad 信号通路涉及卵泡的生长发育、颗粒细胞和膜细胞的增殖与凋亡、类固醇激素的合成、卵母细胞成熟、排卵和黄体化[5-6]。Smad2 和 Smad3 蛋白作为 Smads 蛋白家族受体调节的成员，其主要功能是参与 TGF-β 和活化素信号通路内信号转导。目前利用 siRNA 转染研究显示[7]，Smad2 和 Smad3 分别参与 TGF-β1 上调和 PGE_2 的生成，进而参与卵巢调控排卵的发生和发展，在原始卵泡到初级卵泡的转变过程及有腔卵泡的形成过程中有重要作用[8-10]，Smad2 和 Smad3 基因同时敲除的小鼠生育能力大幅降低，无法形成正常的卵丘扩展和介导颗粒细胞与卵母细胞的信号传导[11]。在治疗排卵障碍型不孕方面的报道显示，补肾调冲法可以有效提高大鼠卵巢细胞内 TGF-β1、Smad3 及 P-Smad3 的表达[12]，但 TGF-β/Smad 信号通路在调控免疫性卵巢早衰小鼠卵泡颗粒细胞中的具体作用及机制目前尚未见报道。本研究主要观察 TGF-β1、TGF-βRII 受体和 Smad2/3 在免疫性 POF 小鼠卵泡颗粒细胞的表达，并探索在补肾活血方干预下的表达情况。

1 材料与方法

1.1 *动物* 选取 7～8 周龄、体质量 20～22 g 的健康雌性 Balb/c 小鼠 67 只（SYXK［湘］2013-0005），均经阴道脱落细胞涂片筛查动情周期正常。清洁环境饲养，室温 18～22 ℃，相对湿度 40%～60%，光照 12 h，普通饲料饲养，自由进食饮水。

1.2 *主要试剂和仪器* 小鼠透明带多肽溶液，小鼠透明带 3（ZP3）的第 330～342 个氨基酸序列（NSSSSQFQIHGPR），分析纯度 91.5%，杭州中肽生化有限公司（P00105）；弗氏完全佐剂（美国 Sigma 公司，F5881）；弗氏不完全佐剂（美国 Sigma 公司，F5506）；兔抗小鼠 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 多克隆抗体（武汉博士德生物工程有限公司，BA0290、BA0526、BA1395）；辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司，ZDR-5118）；全蛋白提取试剂盒（南京凯基生物科技发展有限公司，KGP2100）；BCA 蛋白质定量检测试剂盒（上海生工生物工程股份有限公司，C503031）；MP-120-2 型电子天平（上海第二天平仪器厂）；DMLB2 型双目显微镜、RM2255 型全自动轮转切片机（德国 Leica 公司）。阳性组戊酸雌二醇（补佳乐，惠氏制药有限公司）。补肾活血方：紫石英 15 g、补骨脂 15 g、菟

丝子 10 g、熟地 10 g、桑寄生 10 g、路路通 10 g、泽泻 10 g、乌药 10 g、桔梗 10 g、甘草 5 g，由湖南中医药大学第一附属医院药剂科对同一批中药材来源和品种进行鉴定、筛选、洗净、炮制、切片、烘干、粉碎，批号为 20150701。

1.3 *动物分组、建模及取材* 将 67 只雌性 Balb/c 小鼠按随机数字表法分出 10 只为空白组，其余 57 只用于造模。造模方法为取 6 mg ZP3 透明多肽粉末，加入 6 mL 双蒸水配成溶液，与弗氏完全佐剂按 1∶1 比例配制成免疫试剂，与弗氏不完全佐剂按 1∶1 比例配制成免疫强化试剂（均呈乳白色黏稠油状）。上午 9 点，每只小鼠给予 0.15 mL 免疫试剂注射双后脚掌处及腹腔皮下，14 d 后以 0.15 mL 免疫强化试剂再次注射双后脚掌处及腹腔皮下以加强免疫，建立免疫性 POF 模型。空白组每次造模时，每只小鼠予 0.15 mL 双蒸水注射双后脚掌处及腹腔皮下。从注射免疫试剂第 8 天开始，每天上午 9 点对所有小鼠进行宫颈黏液涂片和阴道脱落细胞 HE 染色，光镜下连续观察 12 d（约 2 个性周期），查看小鼠动情周期，结果显示有 5 只小鼠仍未发生动情周期紊乱变化，予以剔除，剩余的 52 只小鼠中的 2 只取卵巢进行 HE 染色，观察卵泡形态以进一步确定 POF 模型，将另外 50 只小鼠随机分为模型组，阳性组，补肾活血方低、中、高剂量组，加上造模前的空白组，每组 10 只，共 60 只。补肾活血方低、中、高剂量组给药剂量分别按“人和动物体表面积折算的等效剂量表”折算成临床成人用药剂量的 1、2、4 倍，均煎成浓缩剂，分别为每 1 mL 含生药 0.54、1.08、2.16 g。阳性组 1 mg/片，按每人每天 1 mg 计，根据小鼠与人的体表面积进行换算，用冷开水溶解药片，制成溶液，调整剂量，使每 1 mL 溶液含阳性药 0.01 mg。于造模后 1 周开始灌胃给药，空白组和模型组均予冷开水 0.3 mL，阳性组予阳性药水溶液 0.3 mL；补肾活血方低、中、高剂量组分别予由补肾活血方浓缩剂稀释而成的水剂 0.3 mL，分别为每 1 mL 含生药 0.54、1.08、2.16 g，连续 30 d（每周停止1 d）。

1.4 *指标检测*

1.4.1 *小鼠体质量、动情周期检测* Balb/c 小鼠造模前先试养 1 周，随后注射免疫试剂和免疫强化试剂，最后进行药物干预，每隔 7 d 称体质量 1 次，注射试剂造模后增加次数，每天上午 9 点阴道脱落细胞涂片。

1.4.2 *病理形态学观察* 取卵巢称重后，加到 4% 多聚甲醛溶液中固定，梯度酒精脱水，石蜡包埋，切片，脱蜡，常规 HE 染色，做病理切片。观察卵巢内正常卵泡和闭锁卵泡的数目、结构、细胞形态等参数变化。

1.4.3 *免疫组化检测各组小鼠卵巢组织 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白表达* 取下其中一侧卵巢，置于 4% 多聚甲醛溶液中固定备用，然后进行梯度酒精脱水，石蜡包埋，切片，脱蜡，再采用免疫组织化学 SP 二步法检测卵巢组织 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白的表达，应用免疫组化半定量分析方法，镜下选取区域进行照片拍摄，利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析图片，按照标准的操作方法进行累计光密度（IOD）、面积以及平均密度的测量，结果导入 Excel。随后，运用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析处理，比较不同组别测量结果之间的差异。

1.4.4 *Western blot 检测小鼠卵巢组织蛋白 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白表达* 无菌状态下迅速取下对侧卵巢，迅速分组放入无菌 EP 管，放置在 -80 ℃冰箱中备用，取另一侧卵巢组织（约 100 mg）剪碎，加入 1 mL RIPA 的同时加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂高速匀浆，冰上孵育 30 min，4 ℃下 12 000 r/min 离心 5 min，吸取上清液，BCA 蛋白质定量法检测蛋白质含有量，确定蛋白质上样总量后，取样品与 5 × SDS 凝胶上样缓冲液混合，使总体积为 20 μL，蛋白变性后 SDS-PAGE 电泳 2 ~ 3 h，转至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉的 TBS 溶液封闭 3 h，TBST 溶液洗 3 次，分别与兔抗小鼠 β-Actin 抗体（1 ∶ 1 000）、兔抗小鼠 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 抗体（1 ∶ 200）反应，4 ℃静置过夜，TBST 溶液洗 3 次，HRP 标记的二抗（1 ∶ 1 000）5 ~ 8 mL 室温下孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，用 Western 印迹荧光检测试剂盒显示于 X 线片，扫描后使用 Image Pro-Plug6.0 图像分析软件测定目的条带的 IOD，以 β-Actin 为内参，以目的条带与 β-Actin 条带 IOD 值的比值作为该目的蛋白的相对表达量。

1.5 *统计学处理* 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间分析采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *对小鼠体质量、动情周期的影响* 阴道脱落细胞结果显示，与空白组相比，造模后小鼠动情周

期紊乱；体质量结果显示，排除灌胃的影响，在所有干预组中补肾活血方高剂量组和阳性组的体质量增加最快，模型组体质量增加最慢；空白组 HE 染色显示，小鼠具有动情前期、动情期以及动情后期、动情间期，造模后模型组则显示一直停留在动情前期和动情间期。见图 1。

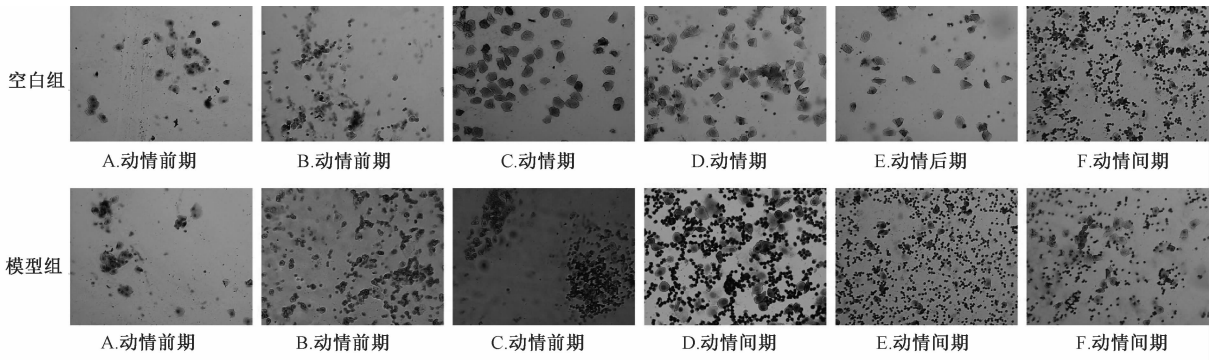


图 1 模型组与空白组阴道脱落细胞（HE，×100）

Fig. 1 Vaginal exfoliated cells in the model group and the blank group（HE，×100）

2 次免疫试剂注射（第 9、23 天黑色箭头）后，造模小鼠体质量下降，给药干预后体质量逐步增加。见图 2。

2.2 对各组小鼠卵巢组织形态学的影响 模型组卵巢体积缩小，卵巢皮质内见少量初级卵泡及生长卵泡，成熟卵泡数目明显减少，闭锁卵泡增加，次级卵泡排列松散，闭锁卵泡多间质、纤维血管、间质腺；补肾活血方中、低剂量组初级卵泡、成熟卵泡数目相对于模型组增多，闭锁卵泡数目相对减少；补肾活血方高剂量组和阳性组卵巢皮质内见大量初级卵泡及窦状卵泡，较多近成熟卵泡，黄体增多且生长良好。相比模型组卵泡内颗粒细胞核固缩，间质紊乱，补肾活血方各剂量组和阳性组卵巢间质和卵泡形态结构接近空白组。见图 3。

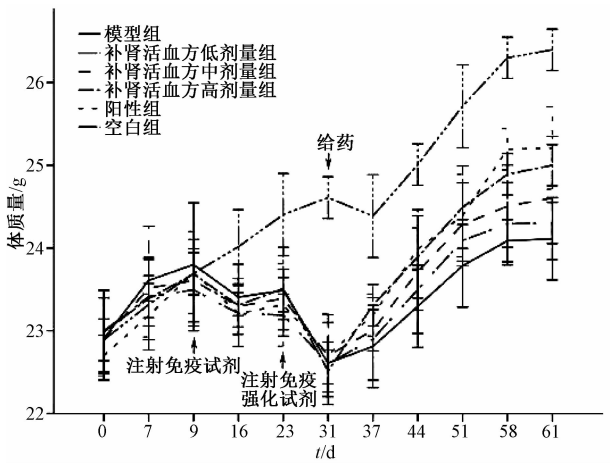
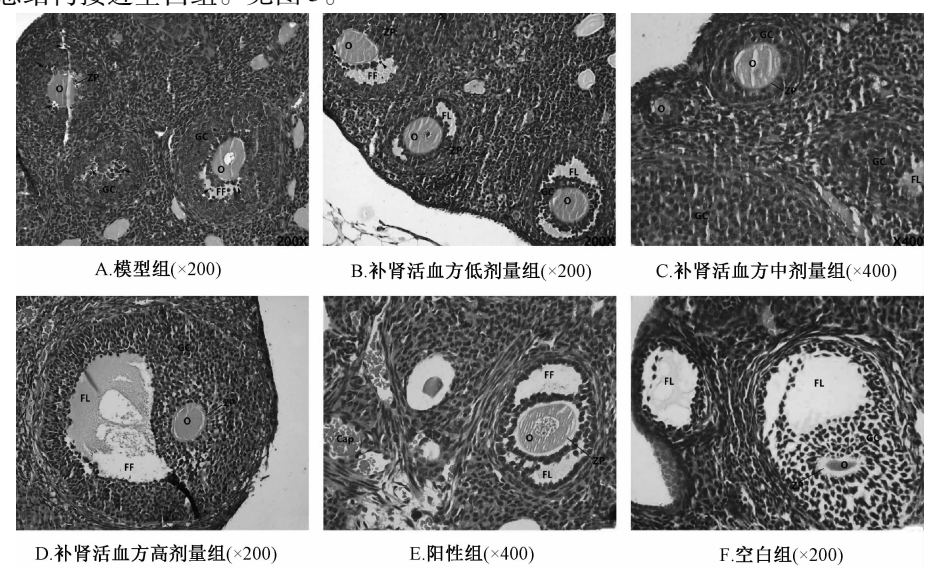


图 2 各组小鼠的体质量变化

Fig. 2 Body weight changes of mice in each group

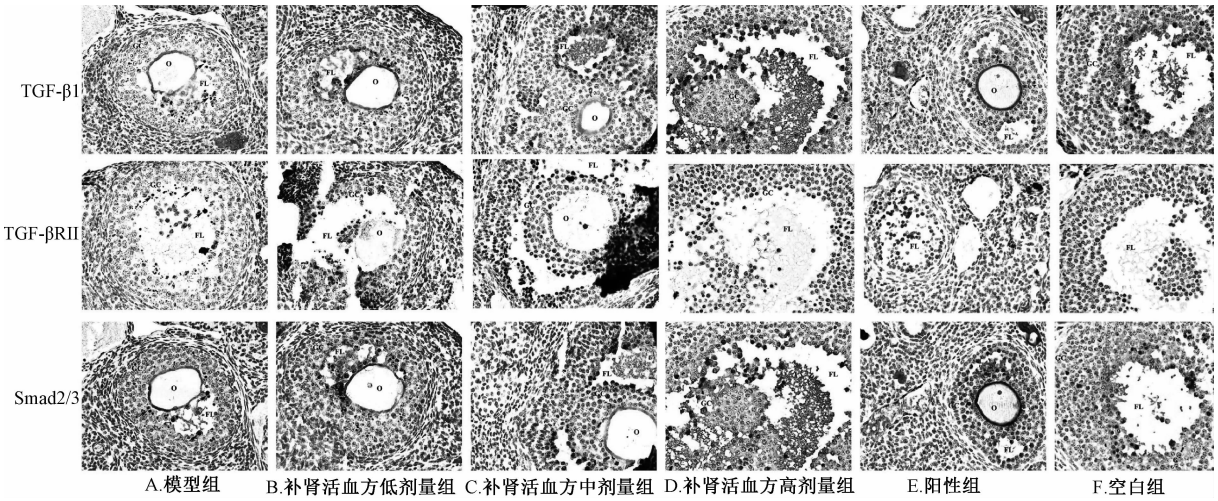


注：O 为卵母细胞，FL 为卵泡液，FF 为卵泡腔，GC 为颗粒细胞，ZP 为透明带，Cap 为血管，黑色箭头为白细胞

图 3 各组小鼠卵巢组织 HE 染色

Fig. 3 HE staining of ovarian tissue of mice in each group

2.3 对小鼠卵巢卵泡壁颗粒细胞 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白表达的影响 图 4 显示，模型组 TGF-β1、Smad2/3 在窦状卵泡的颗粒细胞胞质弱表达；补肾活血方低、中剂量组窦状卵泡中部分区域较强表达；高剂量组、阳性组和空白组窦状卵泡中大部分区域强表达，TGF-βRII 在模型组窦状卵泡的颗粒细胞胞质弱表达，补肾活血方各剂量组、阳性组和空白组窦状卵泡中部分区域较强表达。

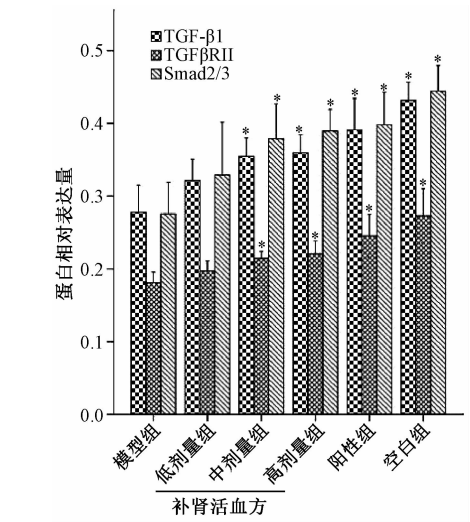


注：O 为卵母细胞，FL 为卵泡液，GC 为颗粒细胞，黑色箭头为白细胞

图 4 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白在卵泡壁颗粒细胞的表达（Ⅰ，×400）

Fig. 4 Expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 protein in follicle wall granulosa cells (Ⅰ, ×400)

图 5 显示，与模型组相比，TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白表达在补肾活血方中、高剂量组，阳性组，空白组中显著增加（$P<0.05$），低剂量组无明显差异（$P>0.05$）；TGF-β1 表达补肾活血方中、高剂量和阳性组组间比较无显著性差异（$P>0.05$）；TGF-βRII 表达阳性组，补肾活血方中、高剂量组组间比较无显著性差异（$P>0.05$）；Smad2/3 补肾活血方低、中、高剂量和阳性组组间比较无显著性差异（$P>0.05$）。



注：与模型组比较，* $P<0.05$

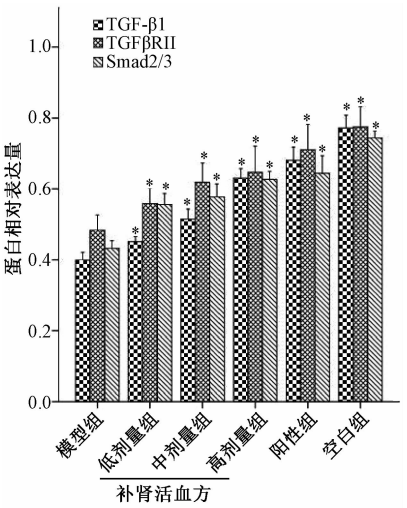
图 5 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白在卵泡壁颗粒细胞的表达（Ⅱ）

Fig. 5 Expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 protein in follicle wall granulosa cells (Ⅱ)

2.4 对小鼠卵巢组织 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白表达的影响 图 6 显示，与模型组相比，补肾活血方各剂量组、阳性组、空白组 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；TGF-β1 表达在补肾活血方各剂量组、阳性组、空白组组间比较都有显著性差异（$P<0.05$）；TGF-βRII 表达在补肾活血方各剂量组、阳性组、空白组组间比较，仅高、中剂量组之间无显著性差异（$P>0.05$）；TGF-βRII 表达在补肾活血方各剂量组、阳性组、空白组组间比较，仅高剂量组和阳性组之间无显著性差异（$P>0.05$）；Smad2/3 表达在补肾活血方低、中剂量组组间无显著性差异（$P>0.05$），高剂量组和阳性组组间亦然（$P>0.05$）。

3 讨论

目前公认导致卵巢早衰（POF）的因素涉及遗传、免疫、感染、医源性、心理等，在 POF 治疗方面也大多采用激素替代或对有生育要求者合并使用促排卵、赠卵及辅助生育技术[9]，但会引起如生殖系统癌变、卵巢过度刺激综合征等副作用及社会伦理问题。而补肾方药治疗卵巢早衰方面通过多途径、多环节的共同协调来调节卵泡的发育，内经曰：“肾藏精，主生殖”、“肾气盛，天癸至，任脉



注：与模型组比较，* $P<0.05$

图 6 TGF-β1、TGF-βRII 和 Smad2/3 蛋白在卵巢组织的表达

Fig. 6 Expressions of TGF-β1, TGF-βRII and Smad2/3 protein in ovarian tissue

通，太冲脉盛，则月事以时下……”，月经正常是卵泡能够正常发育、成熟、逸出的外在表现。卵泡发育需要一定的物质基础，既中医之“精”，肾藏之精气是月经产生的原动力，因此中医药促卵成熟和排卵是以补肾气为主导，补肾活血和调理冲任是调节卵泡发育的重要治法。本课题组前期研究发现，补肾活血方能通过调控免疫性卵巢早衰小鼠卵泡凋亡调控基因（Bcl-2/Bax）蛋白表达以改善卵巢功能[2]，其血清可促进 SD 大鼠卵巢颗粒细胞激活素 ActA 的分泌，以及上调 ActRIIA、Smad2、Smad3 的表达和颗粒细胞增殖分化[4]。本研究进一步探索补肾活血方提高免疫性 POF 小鼠颗粒细胞质量，促进其增殖分化的作用机制。

影响卵泡发育和细胞增殖分化的因素涉及多条信号通路，主要包括 WNT/β-catenin[13]、Nodal[14]、FGF[15]、BMP/Smads[16] 等及其下游因子。TGF-β/Smad 信号通路之间复杂的分子相互作用参与调控卵泡发育和卵巢颗粒细胞的生长分化，TGF-β 配体与 II 型受体（TβRII）结合后，构象发生改变，从而被 I 型受体（TβRI）识别而形成 TβRII-TGFβs-TβRI 复合物；Ⅱ型受体发生自身磷酸化而激活，活化的 TβRII 可磷酸化激活 TβRI，进而使 TβRI 特异性地识别和活化 Smad2 和 Smad3 蛋白，并使其磷酸化，从而与 Smad4 形成复合物，转运入细胞核调控靶基因的表达[17]。Smad2 和 Smad3 一直是维持卵巢发育和功能的重要因素[18-19]，多项研究显示，Smad3 基因敲除的小鼠生育力降低，并表现为颗粒细胞增殖抑制[20-21]，Smad2/3 在新形成原始卵泡中的颗粒细胞发挥着重要的因素[8]，2 种基因被同时敲除的小鼠导致生育能力大幅降低，无法形成正常的卵丘扩展和介导颗粒细胞与卵母细胞的信号传导[11]。Yang 等[22]进一步研究表明，TGF-β 通过 Smad2 和 Smad3 抑制 CyclinD2 的降解，激活 CDK4（cyclin-dependent kinases 4），促进颗粒细胞 DNA 的合成。

本研究发现，与空白组相比，免疫性因素所致的卵巢早衰小鼠卵泡中颗粒细胞 TGF-β1、TGF-βRII、Smad2/3 的蛋白表达明显降低，HE 检测发现卵泡闭锁显著增加；加用补肾活血方后，三者明显升高（$P<0.05$），高剂量组表达量明显高于低剂量组（$P<0.05$）。结合本课题组的前期研究[4]，补肾活血方调控卵泡的发育以及促进颗粒细胞的增殖不仅与 ActA/Smads 通路有关，同时还通过 TGF-β1/Smads 通路促进雌二醇 E_2 的分泌，改善卵巢的局部微环境。

补肾活血方的立方主要是基于肾气虚及冲任胞脉阻滞所造成月经异常的基本病机，利用补肾活血是调经种子主要的治疗方法。方中重用紫石英温补肾阳，熟地平补肾阴，两药合用为君药；补骨脂、菟丝子、桑寄生合用为臣药，以使肾阴得养，肾阳得化；路路通、泽泻走冲任而活血利水通胞络，祛瘀而通滞；乌药、桔梗条畅气机，使气血调达，冲任通畅，月经得以至，卵子得以顺利排出，合用共为佐药；甘草调和诸药而为使。现代药理研究提示，方中单味药的部分药理作用能通过对下丘脑-垂体-卵巢轴的调节，从而改善女性生殖内分泌功能，促进卵泡正常发育成熟，如菟丝子等有类激素样作用，通过提高雌激素及其受体水平，平衡生长因子的分泌，促进颗粒细胞的增殖与分化，改善卵巢内微环境，调节卵巢成熟和排出。颗粒细胞是卵巢的功能单位，其增殖分化与卵泡发育密切相关。TGF-β1 由卵巢颗粒细胞分泌，而颗粒细胞表面又存在 TGF-β 受体，同时它也能促进窦前卵泡生长、颗粒细胞增生与分化。本研究显示，补肾活血方能明显促进免疫性 POF 小鼠 TGF-β1/Smads 信号通路的传导，进而促进颗粒细胞的增殖和分化。由于本实验只研究了 TGF-β 途径的 TGF-β1 配体，TGF-β 超家族的其他配体分子还包括 ActA、BMP（bone morphogenetic protein）等一系列配体因子，其卵巢内部各种因子相互作用、各种信号通路交互联系构成的局部微环境在卵巢早衰发生发展过程中的改变

仍有待明确的阐述，同时补肾活血方在治疗免疫性 POF 小鼠时，是否能通过增加 Smads 的表达而增强其他细胞因子的信号转录，还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 王慧民，朱雪梨，胡丽莎，等. 补肾活血法对卵巢早衰免疫因素干预的临床观察[J]. 江西医药，2010，45(12)：1172-1174.

[2] 刘慧萍，尤昭玲，雷 磊，等. 补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵泡凋亡调控基因（Bcl-2/Bax）蛋白的影响[J]. 中华中医药学刊，2010，28(5)：1036-1038.

[3] 付灵梅，尤昭玲，陈海涛. 补肾活血方对 PCO 大鼠卵巢 COX-1 mRNA 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报，2009，29(4)：18-20.

[4] 陈明辉. 补肾活血方含药血清对卵巢颗粒细胞 ActA/Smads 信号通路的影响[D]. 长沙：湖南中医药大学，2015.

[5] Kuo F T，Fan K，Ambartsumyan G，*et al*. Relative expression of genes encoding SMAD signal transduction factors in human granulosa cells is correlated with oocyte quality[J]. *J Assist Reprod Genet*，2011，28(10)：931-938.

[6] Li X，Tripurani S K，James R，*et al*. Minimal fertility defects in mice deficient in oocyte-expressed Smad4[J]. *Biol Reprod*，2012，86(1)：1-6.

[7] 方兰兰. EGF 相关因子和 TGF-β1 对人颗粒细胞排卵相关基因表达及相关信号通路的调控作用研究[D]. 郑州：郑州大学，2015.

[8] Coutts S M，Childs A J，Fulton N，*et al*. Activin signals via SMAD2/3 between germ and somatic cells in the human fetal ovary and regulates kit ligand expression[J]. *Dev Biol*，2008，314(1)：189-199.

[9] Xu J，Oakley J，Mcgee E A. Stage-specific expression of Smad2 and Smad3 during folliculogenesis[J]. *Biol Reprod*，2002，66(6)：1571-1578.

[10] Billiar R B，St Clair J B，Zachos N C，*et al*. Localization and developmental expression of the activin signal transduction proteins Smads 2，3，and 4 in the baboon fetal ovary[J]. *Biol Reprod*，2004，70(3)：586-592.

[11] Li Q，Pangas S A，Jorgez C J，*et al*. Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells *in vivo*[J]. *Mol Cell Biol*，2008，28(23)：7001-7011.

[12] 黄 昕. 补肾调冲法对肾虚排卵障碍型不孕大鼠卵巢 Smad3、P-Smad3 表达水平影响研究[D]. 成都：成都中医药大学，2013.

[13] Wang S B，Xing B S，Yi L，*et al*. Expression of Frizzled 2 in the mouse ovary during oestrous cycle[J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*（*Berl*），2010，94(4)：437-445.

[14] Le G J，Joubin K，Giraldez A J，*et al*. Nodal stability determines signaling range[J]. *Curr Biol*，2005，15(1)：31-36.

[15] Thisse B，Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development[J]. *Dev Biol*，2005，287(2)：390-402.

[16] Yu C，Zhang Y L，Fan H Y. Selective Smad4 knockout in ovarian preovulatory follicles results in multiple defects in ovulation[J]. *Mol Endocrinol*，2013，27(6)：966-978.

[17] Massagué J. TGF-beta signal transduction[J]. *Annu Rev Biochem*，1998，67：753-791.

[18] Chang H，Brown C W，Matzuk M M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily[J]. *Endocr Rev*，2002，23(6)：787-823.

[19] Drummond A E，Dyson M，Le M T，*et al*. Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signalling pathways[J]. *Mol Cell Endocrinol*，2003，202(1-2)：53-57.

[20] Tomic D，Brodie S G，Deng C，*et al*. Smad 3 may regulate follicular growth in the mouse ovary[J]. *Biol Reprod*，2002，66(4)：917-923.

[21] Tomic D，Miller K P，Kenny H A，*et al*. Ovarian follicle development requires Smad3[J]. *Mol Endocrinol*，2004，18(9)：2224-2240.

[22] Yang P，Roy S K. Transforming growth factor B1 stimulated DNA synthesis in the granulosa cells of preantral follicles：negative interaction with epidermal growth factor[J]. *Biol Reprod*，2006，75(1)：140-148.