

滋肾育胎丸对 DOR 大鼠内分泌的影响

樊耀华¹, 陈 思¹, 李 婧^{2*}, 赵 颖², 张芝桐¹, 陈颖慧¹, 黎子莹¹

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 研究滋肾育胎丸(党参、续断、巴戟天等)对卵巢储备功能低下(DOR)大鼠内分泌的影响。**方法** 灌胃 55 mg/(kg·d)雷公藤多苷诱导正常动情周期雌性 SD 大鼠 14 d 以建立 DOR 模型,再分为滋肾育胎丸高、低剂量组,补佳乐组,模型对照组,阴性对照组。给药 35 d 后,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清雌二醇(E₂)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、孕酮(P)水平,免疫组化法检测卵巢组织雌激素受体(ER)、卵泡刺激素受体(FSHR)、黄体生成素受体(LHR)表达。**结果** 与阴性对照组比较,模型对照组 E₂、FSH、LH、P 水平,ER、FSHR、LHR 表达有显著变化($P<0.05$),但两组体质量、卵巢指数、子宫指数、血清 FSH/LH 水平无显著性差异($P>0.05$)。与模型对照组比较,滋肾育胎丸高、低剂量组,补佳乐组 E₂ 水平升高,FSH、LH 水平降低,并且它们也促进 ER 表达,抑制 FSHR、LHR 过度表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同剂量组 P 水平显著升高($P<0.05$),高剂量组 FSH/LH 显著下降($P<0.05$),各干预组体质量、卵巢指数和子宫指数无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 滋肾育胎丸可通过影响卵巢组织激素受体表达、调节内分泌功能来改善 DOR 大鼠卵巢储备功能。

关键词: 滋肾育胎丸; 卵巢储备功能低下; 内分泌; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)11-2249-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.005

Effects of Zishen Yutai Pills on endocrine in DOR rats

FAN Yao-hua¹, CHEN Si¹, LI Jing^{2*}, ZHAO Ying², ZHANG Zhi-tong¹, CHEN Ying-hui¹, LI Zi-ying¹

(1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of Zishen Yutai Pills (*Codonopsis Radix*, *Dipsaci Radix*, *Morindae officinalis Radix*, etc.) on endocrine in diminished ovarian reserve (DOR) rats. **METHODS** Female SD rats with normal oestrous cycle were induced by intragastric administration of 55 mg/(kg·d) tripterygium glycosides for fourteen days to establish DOR model, and then divided into Zishen Yutai Pills high-, low-dose groups, Bujiale group, model control group and negative control group. After 35 days' administration, serum estradiol (E₂), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and progesterone (P) levels were detected by ELISA. And ovarian tissue estrogen receptor (ER), follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) and luteinizing hormone receptor (LHR) expressions were detected by immunohistochemical method. **RESULTS** Compared with the negative control group, there were significant changes in levels of E₂, FSH, LH, P, and expressions of ER, FSHR, LHR in the model control group ($P<0.05$), but there were no statistical significances in body weight, ovary index, uterus index and serum FSH/LH level between the two groups ($P>0.05$). Compared with the model control group, E₂ level was increased in the Zishen Yutai Pills high-, low-dose groups and Bujiale

收稿日期: 2017-07-13
基金项目: 广州中医药大学大学生创新创业训练项目(201510572105); 广州白云山中一药业有限公司罗元恺滋肾育胎丸中青年科研基金项目(140210)
作者简介: 樊耀华(1994—), 男, 硕士生, 从事中医学研究。E-mail: 384855699@qq.com
* 通信作者: 李 婧(1987—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药新药研发。Tel: (020) 36588217, E-mail: lijing_gzh@126.com

group, FSH, LH levels were decreased, and they also promoted ER expression and restrained FSHR, LHR excessive expressions, which were statistically significant ($P < 0.05$). P level was significantly increased in different dose groups ($P < 0.05$), FSH/LH in the high-dose group was obviously decreased ($P < 0.05$), and body weight, ovary index, uterus index in various intervening groups showed no statistical significances ($P > 0.05$). **CONCLUSION** Zishen Yutai Pills can improve ovarian reserve function in DOR rats by affecting the expression of ovarian tissue hormone receptor and regulating endocrine function.

KEY WORDS: Zishen Yutai Pills; diminished ovarian reserve; endocrine; rats

卵巢储备功能下降 (diminished ovarian reserve, DOR) 以卵巢的卵泡数量减少、卵泡质量下降、导致生育能力降低及性激素缺乏为特征, 表现为月经不调、排卵障碍、不孕、性欲减退等, 进一步可发展为卵巢功能衰竭。流行病学发现, 在遗传、免疫、感染、药物、物理、手术等因素的影响下, DOR 在人群中的发生率为 10%, 一般需要 1 ~ 6 年发展为卵巢早衰^[1-3]。目前解决 DOR 患者不孕的主要手段是辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART), 然而 DOR 患者卵巢对促性腺激素的反应性差, 无成熟卵泡发育或获得成熟卵泡数减少, 卵子质量较差, 严重影响了 ART 的成功率, 故改善卵巢储备功能, 提高女性生育能力, 防治卵巢早衰, 同时提高 ART 的成功率, 是生殖医学研究的热点和难点^[4]。基于中医“异病同治”、“肾主生殖”的理论, 滋肾育胎丸在临床中不仅应用在自然流产的防治, 而且能辅助治疗 DOR^[5-6], 然而相关机制尚不明确, 故本实验建立 DOR 大鼠模型, 以补佳乐为阳性对照组, 探讨滋肾育胎丸对 DOR 模型内分泌的影响及具体机制。

1 材料

1.1 动物 12 周龄 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 60 只, 体质量 298.2 ~ 369.8 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 生产许可证号 SCXK(粤) 2013-0002。

1.2 药物及试剂 滋肾育胎丸 (组方为党参、续断、巴戟天、杜仲、菟丝子、熟地黄、砂仁、桑寄生、阿胶、首乌、艾叶、白术、鹿角霜、枸杞子, 广州白云山中一药业有限公司, 批号 V00043); 补佳乐 (戊酸雌二醇片, 拜耳医药保健有限公司广州分公司, 批号 20150415); 雷公藤多苷片 (远大医药黄石飞云制药有限公司, 批号 20150404), GTVision III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒 (上海基因科技, 批号 2016050401); 大鼠促卵泡素、大鼠黄体生成素、大鼠雌激素、大鼠孕激素/孕酮 (华美生物, 批号分别为 CSB-E06869 r、CSB-E12654 r、CSB-E07279 r、CSB-E07282 r)。

1.3 主要仪器 Leica TP1020 脱水机、Leica EG1140H 包埋机、Leica RM2255 切片机、Leica Autostainer XL 染色机 (徕卡显微系统 [上海] 贸易有限公司); Thermo Fisher Multiskan FC 酶标仪 (广东丹利科技有限公司); 奥林巴斯 IX71 倒置显微镜 (奥林巴斯 [中国] 有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备 筛选出规律动情周期的大鼠 50 只, 然后随机选取 8 只作为阴性对照组, 余下的为模型对照组。模型对照组大鼠按 55 mg/(kg · d) 的剂量灌胃雷公藤多苷片溶液, 阴性对照组给予等量的纯净水, 1 次/d, 连续 14 d。灌胃后第 1 天起每天阴道涂片, 苏木素-伊红 (HE) 染色后观察动情周期, 每 2 d 测定体质量 1 次。

2.2 分组及给药 筛选性周期紊乱的大鼠 40 只, 按体质量随机分为模型对照组, 补佳乐组, 滋肾育胎丸低、高剂量组, 每组 8 只。补佳乐组按 0.3 mg/(kg · d) 的剂量灌胃补佳乐溶液, 1 次/d; 滋肾育胎丸低、高剂量组分别按 0.79、3.15 mg/(kg · d) 的剂量灌胃相应剂量的滋肾育胎丸溶液, 低剂量 1 次/d, 高剂量 2 次/d; 模型对照组和空白对照组给予等量的溶剂, 1 次/d; 连续 35 d。

2.3 阴道涂片观察动情周期 在实验期间, 于每日灌胃前相同时段对各组大鼠进行阴道涂片, 并观察记录阴道脱落细胞等相关信息, 以判定动情。判定标准 (图 1): 动情间期见大量白细胞, 动情前期见大量核上皮细胞、少量角化上皮细胞, 动情期见满视野角化细胞, 动情后期见角化上皮细胞、核上皮细胞及白细胞。

2.4 取材 末次给药 1 h, 眼眶静脉窦采血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清。末次给药后 24 h 取大鼠卵巢、子宫, 称重后计算各自的脏器指数, 4% 中性甲醛溶液固定, 48 h 后脱水、石蜡包埋、连续切片。

2.5 检测指标

2.5.1 酶联免疫吸附测定法测定血清 E₂、FSH、

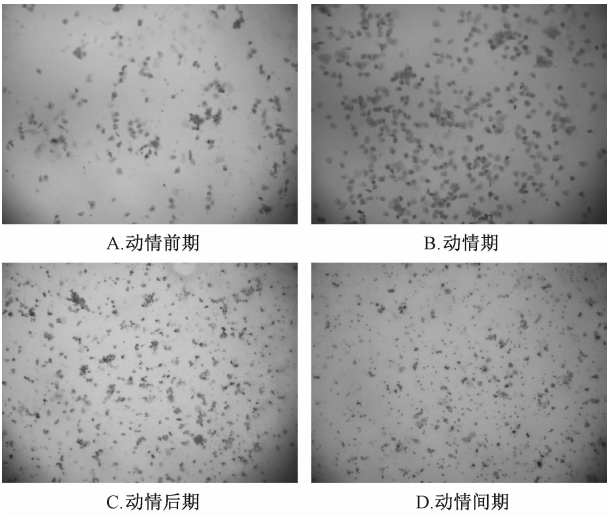


图 1 阴道涂片观察动情周期图 (×100)

Fig.1 Charts of estrous cycle observed by vaginal smear (×100)

LH 及 P 取血清,按照试剂盒说明测定 E₂、FSH、LH 及 P 的含有量。

2.5.2 免疫组化法检测卵巢组织 ER、FSHR、LHR 的表达 按照试剂盒说明操作,封片后置于

普通显微镜 400 倍下观察拍照,每个标本挑取 3 个不同视野进行拍照。再运用 Image-Pro Plus 5.1 图像处理系统,对照片进行分析。照片中免疫组化染色的阳性表达为棕黄色反应,通过测量照片中棕黄色部分来反映 FSHR、LHR、ER 表达量。测定并记录每张照片的平均面积、平均光密度值,计算累积密度值 (IOD)。

2.6 统计学分析 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析;计量资料数据方差齐,或经转换后方差齐,则采用组间两两比较的单因素方差分析;若数据经转换后方差仍不齐,采用秩和检验进行统计分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 一般临床情况 在实验期间,各组大鼠的一般临床情况及大小便均未见异常,无死亡现象。采用重复测量方法统计分析体质量 (表 1),与阴性对照组比较,模型对照组大鼠体质量无显著性差异 ($P > 0.05$);与模型对照组比较,各给药组大鼠体质量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 Effect of Zishen Yutai Pills on body weight of DOR rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	体质量/g						
	1 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d
阴性对照组	329.8 ± 12.3	356.7 ± 15.4	359.4 ± 26.2	366.6 ± 31.4	378.4 ± 20.7	370.3 ± 19.8	375.3 ± 30.3
模型对照组	318.1 ± 28.0	345.1 ± 33.2	349.6 ± 30.5	349.0 ± 28.6	352.0 ± 27.9	353.9 ± 30.0	362.0 ± 29.3
滋肾育胎丸高剂量组	323.2 ± 21.3	350.7 ± 28.1	355.2 ± 32.2	363.9 ± 30.4	364.4 ± 31.3	366.2 ± 31.9	374.1 ± 29.0
滋肾育胎丸低剂量组	312.9 ± 24.5	348.2 ± 22.8	344.4 ± 22.7	351.5 ± 19.0	352.4 ± 22.9	353.5 ± 26.7	359.5 ± 23.4
补佳乐组	309.2 ± 23.5	346.7 ± 31.5	343.4 ± 36.7	338.3 ± 31.9	340.5 ± 33.7	348.2 ± 35.5	358.6 ± 34.3

3.2 动情周期观察 以 2 个动情周期 10 d 作为观察点,即 1 ~ 10、11 ~ 20、21 ~ 30、31 ~ 40、41 ~ 49 d,并将动情周期紊乱分为性周期延长 (7 d 以上)、无明显性周期、性周期停滞,其中将性周期延长分为动情间期延长、动情前期延长、动情期延长、动情后期延长进行统计 (表

2 ~ 3)。实验中筛选有动情周期的大鼠共 50 只,造模后性周期紊乱的大鼠共 42 只,随机抽取动情周期紊乱的 40 只进行分组。实验期间,模型对照组大鼠动情间期明显延长,阴道涂片以大量白细胞为主;滋肾育胎丸高、低剂量组,以及补佳乐组动情周期逐渐恢复。

表 2 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠动情周期的影响 ($n = 8$)

Tab.2 Effect of Zishen Yutai Pills on estrous cycle of DOR rats ($n = 8$)

组别	1 ~ 10 d				11 ~ 20 d				21 ~ 30 d				31 ~ 40 d				41 ~ 49 d			
	正常	延长	无	停滞	正常	延长	无	停滞	正常	延长	无	停滞	正常	延长	无	停滞	正常	延长	无	停滞
阴性对照组	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0	7	1	0	0	7	1	0	0
模型对照组	8	0	0	0	0	7	0	1	0	7	0	1	0	6	1	1	0	6	1	1
滋肾育胎丸高剂量组	7	1	0	0	0	8	0	0	2	6	0	0	7	1	0	0	7	1	0	0
滋肾育胎丸低剂量组	8	0	0	0	0	6	1	1	3	4	1	0	5	2	1	0	7	0	1	0
补佳乐组	8	0	0	0	0	8	0	0	3	5	0	0	6	2	0	0	8	0	0	0

表 3 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠动情周期延长的影响 (n=8)

Tab. 3 Effect of Zishen Yutai Pills on prolonged estrous cycle of DOR rats (n=8)

组别	1~10 d				11~20 d				21~30 d				31~40 d				41~49 d			
	J	Q	D	H	J	Q	D	H	J	Q	D	H	J	Q	D	H	J	Q	D	H
阴性对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
模型对照组	0	0	0	0	5	2	0	0	5	2	0	0	5	1	0	0	5	0	0	1
滋肾育胎丸高剂量组	0	1	0	0	7	0	0	1	5	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
滋肾育胎丸低剂量组	0	0	0	0	6	0	0	0	4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
补佳乐组	0	0	0	0	5	2	0	1	4	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0

注: J 代表动情间期延长, 涂片表现为大量白细胞; Q 代表动情前期延长, 涂片表现为大量有核细胞; D 代表动情期延长, 涂片表现为大量角化上皮细胞; H 代表动情后期延长, 涂片表现为角化上皮细胞、核上皮细胞及白细胞

3.3 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠卵巢、子宫指数的影响 脏器指数 (表 4): 卵巢指数采用方差分析, 子宫指数采用 log 转换后方差分析。与阴性对照组比较, 模型对照组大鼠卵巢、子宫指数无显著性差异 ($P>0.05$); 与模型对照组比较, 各给药组大鼠卵巢、子宫指数无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 4 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠卵巢、子宫指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 4 Effects of Zishen Yutai Pills on indices of ovary and uterus of DOR rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量	卵巢/ ($\times 10^{-2}$)	子宫/ ($\times 10^{-2}$)
阴性对照组	—	4.50±0.56	18.9±8.1
模型对照组	—	3.92±0.55	19.4±4.6
滋肾育胎丸高剂量组	3.15 g/kg	4.37±0.35	20.2±4.6
滋肾育胎丸低剂量组	0.79 g/kg	4.13±0.70	23.9±8.8
补佳乐组	0.3 mg/kg	4.39±0.61	19.7±3.3

表 5 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠血清性激素的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 5 Effects of Zishen Yutai Pills on serum sex hormones in DOR rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	E ₂ /(ng·L ⁻¹)	FSH/(U·L ⁻¹)	LH/(ng·L ⁻¹)	P/(pmol·L ⁻¹)	FSH/LH/(U·ng ⁻¹)
阴性对照组	78.96±10.65 [*]	22.22±2.90 [*]	1.53±0.29 [*]	95.66±14.19 ^{**}	14.79±1.60
模型对照组	45.65±19.26	86.41±2.87	3.94±0.75	73.61±9.47	23.18±6.62
滋肾育胎丸高剂量组	93.10±19.33 [*]	22.26±4.31 [*]	1.67±0.10 [*]	95.58±10.20 ^{**}	13.53±3.20 [*]
滋肾育胎丸低剂量组	75.39±22.80 [*]	30.42±12.40 [*]	1.79±0.24 [*]	89.80±8.73 [*]	18.11±9.69
补佳乐组	82.29±11.65 [*]	25.41±7.40 [*]	1.51±0.30 [*]	79.72±15.55	18.52±8.52

注: 与模型对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与补佳乐组比较, [#] $P<0.05$

3.5 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠卵巢组织 ER、FSHR、LHR 蛋白表达的影响 与阴性对照组比较, 模型对照组的卵巢 ER、FSHR、LHR 表达水平差异显著, 有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组比较, 滋肾育胎丸高、低剂量组和补佳乐组的卵巢 ER、FSHR、LHR 表达水平差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 6、图 2。

4 讨论

目前常用的 DOR 模型包括化学毒物模型、化学药物模型、药物损伤模型等, 其中雷公藤多苷诱导的 DOR 模型使用较广, 另外曹俊岩等^[7-8]根据以

3.4 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠血清性激素水平的影响 与阴性对照组比较, 模型对照组 E₂、FSH、LH、P 水平变化差异显著, 有统计学意义 ($P<0.05$); FSH/LH 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型对照组比较, 滋肾育胎丸高、低剂量组和补佳乐组的 E₂ 水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 滋肾育胎丸高、低剂量组的 P 水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 滋肾育胎丸高、低剂量组和补佳乐组的 FSH、LH 水平下降差异显著, 有统计学意义 ($P<0.05$); 滋肾育胎丸高剂量组的 FSH/LH 比值下降差异显著, 有统计学意义 ($P<0.05$)。补佳乐组与滋肾育胎丸高剂量组的 P 水平差异显著, 有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 5。

方测证原理, 从细胞因子领域验证了雷公藤多苷致 DOR 模型符合中医肾虚症候属性。在此基础上, 本课题组进一步摸索造模方法, 实验结果显示, 相对于阴性对照组, 模型对照组动情周期紊乱, 动情间期明显延长, 阴道涂片以白细胞为主。以往研究表明^[9], 阴道黏膜上皮为复层扁平上皮, 在动情间期时, 雌激素含有量较低, 角化上皮细胞及核上皮细胞很少, 上皮变薄, 白细胞浸润, 此时阴道涂片以白细胞为主; 动情前期, 雌激素分泌逐渐增加, 但对阴道上皮的刺激作用仍然很低, 故上皮细胞增殖速度缓慢, 以核上皮细胞为主; 动情期, 雌

表 6 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠卵巢性激素受体表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 6 Effects of Zishen Yutai Pills on ovary sex hormone receptor expressions of DOR rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ER	FSHR	LHR
阴性对照组	0.028 1 ± 0.002 8 *	0.032 8 ± 0.005 4 *	0.031 7 ± 0.004 2 *
模型对照组	0.012 0 ± 0.002 8	0.047 2 ± 0.014 2	0.052 4 ± 0.006 9
滋肾育胎丸高剂量组	0.027 4 ± 0.006 4 *	0.034 2 ± 0.005 9 *	0.035 9 ± 0.008 9 *
滋肾育胎丸低剂量组	0.027 0 ± 0.003 9 *	0.035 1 ± 0.006 1 *	0.037 4 ± 0.007 0 *
补佳乐组	0.027 3 ± 0.005 1 *	0.034 1 ± 0.006 9 *	0.035 3 ± 0.007 9 *

注：与模型对照组比较，* $P < 0.05$

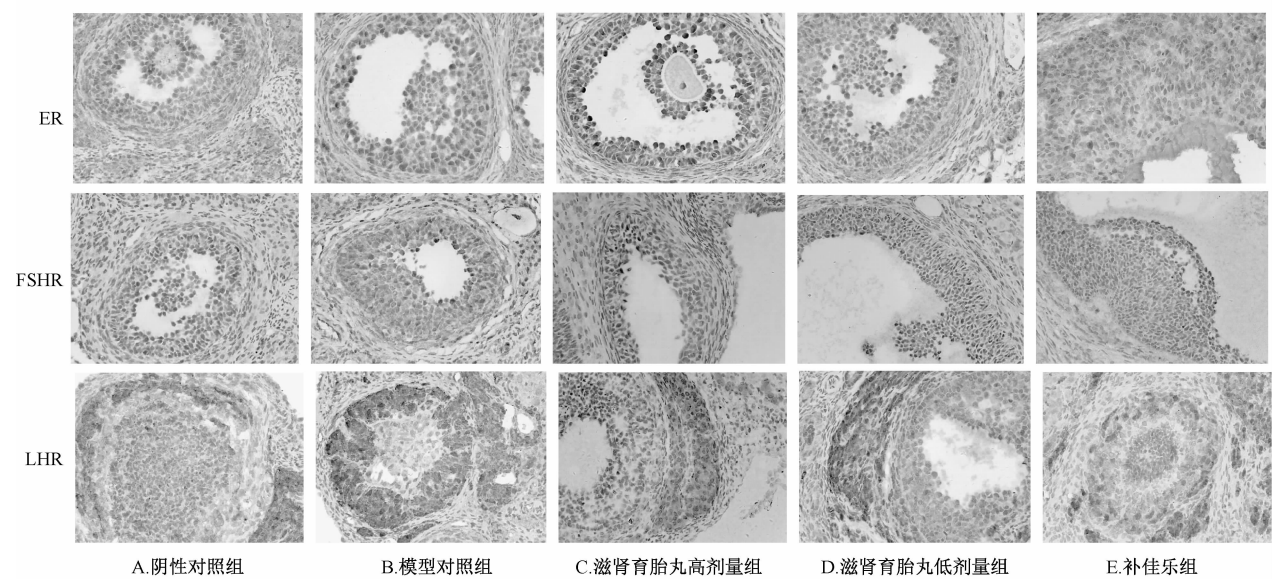


图 2 大鼠卵巢性激素受体表达的免疫组化照片 (×400)

Fig. 2 Immunohistochemical images of sex hormone receptor expressions of rats (×400)

激素水平达到阈值，明显刺激阴道上皮增厚，上皮细胞增殖迅速，且细胞之间连接较为疏松易脱落；动情后期是动情期向动情间期的过渡，所以角化上皮细胞、核上皮细胞及白细胞均可见，故阴道涂片以白细胞为主，可提示雌激素处于低水平状态，并且此模型血清性激素的变化表现为 E_2 下降，FSH、LH 升高，符合临床 DOR 患者的特征。相对于阴性对照组，模型对照组大鼠的一般情况无显著差异。由此可得出结论，55 mg/(kg·d) 雷公藤多苷悬浊液灌胃 SD 大鼠 14 d 可成功诱导 DOR 模型，并且该剂量下诱导的模型既满足了造模要求，又满足了大体层面对大鼠无明显影响的要求，在一定程度上提高模型的生存率。

现代众多医家认为，DOR 的病位在肾、胞宫，涉及肝、脾、冲任，其病机关键为“肾虚”，在此基础上，各医家在脾虚、肝郁、血瘀、冲任失调以及肾气-天癸-冲任-子宫生殖轴失衡等方面侧重不同^[10-15]。滋肾育胎丸是全国著名中医罗元恺教授的经验方，由广州白云山中一药业集团生

产，由党参、续断、巴戟天、杜仲、菟丝子等中药组成，具有补肾健脾、养血安胎的功能，在“异病同治”、“肾主生殖”的理论指导下，临床上滋肾育胎丸其能明显改善 DOR 患者的临床症状，同时降低 FSH 水平。本实验表明，滋肾育胎丸以补肾为基础，同时兼顾健脾，脾健则水谷有常，水谷之精化作气血，在“精气同源”、“精血同源”的生理基础下，气血濡养先天之精；在肾精充足的前提下，滋肾育胎丸通过肾气-天癸-冲任-子宫生殖轴，最终促进胞宫的功能恢复，故动情周期逐渐恢复正常，卵巢组织性激素受体与性激素内分泌也趋向正常。

经滋肾育胎丸干预后，DOR 模型大鼠动情周期逐渐规律，可能因促进 DOR 模型大鼠的卵泡发育相关。在体质量以及卵巢、子宫指数方面，滋肾育胎丸对 DOR 模型无明显影响 ($P > 0.05$)，提示对该模型无器质性的影响。另外，滋肾育胎丸可升高 DOR 模型血清 E_2 、P 水平，降低血清 LH、FSH 水平，与临床观察一致^[5]，同时可提高 DOR 模型

卵巢组织的 ER 表达，抑制 FSHR、LHR 的过度表达，故认为滋肾育胎丸用于 DOR 是有效的，并且可以拮抗雷公藤多苷导致的卵巢功能低下。因高、低剂量组结果的差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ），提示滋肾育胎丸治疗 DOR 主要是通过调节内分泌性激素水平，其有效剂量可能为 0.79 g/kg 体质量。然而，本实验样本量较少，需在临床中扩大以进一步验证。

由本实验可知，滋肾育胎丸与补佳乐相同的作用靶点有卵巢组织的 ER、LHR、FSHR，两者均能升高血清 E_2 ，降低血 FSH、LH。相对于模型对照组，补佳乐组 FSH/LH 比值降低，但无显著性差异（ $P>0.05$ ），可能是因为相对于高剂量的滋肾育胎丸，补佳乐降低血清 LH 水平的程度更大，而两者降低血清 FSH 水平相当，故补佳乐组的 FSH/LH 比值较滋肾育胎丸高剂量组大，不能与模型组形成显著差异。另外，相对于补佳乐，滋肾育胎丸能显著升高 P 水平（ $P<0.05$ ），进一步促进雌激素与孕激素对下丘脑的负反馈作用，说明滋肾育胎丸可整体调整全身的内分泌状态，从而达到更好的治疗效果。

综上所述，滋肾育胎丸对 DOR 模型内分泌的作用机制可能是促进 ER 的表达与甾体激素的合成，以及抑制 FSHR、LHR 的过度表达。甾体激素合成增多，血清 E_2 、P 水平升高，形成负反馈作用于下丘脑，导致促性腺激素分泌减少。在 E_2 和 FSH 的协同作用下，促进次级卵泡发育成窦状卵泡，增加了卵泡数量。同时，因 FSH 水平逐渐降至正常值，“选择”现象的生理调节机制恢复，促使优势卵泡发育，提高卵泡质量。

致谢 本研究于广州中医药大学第一附属医院岭南医学研究中心中医妇科学实验室完成，特此感谢。

参考文献：

[1] Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve—should we perform tests of ovarian reserve routinely? [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(11): 2729-2735.

[2] 韩玉芬, 程淑蕊, 敬文娜, 等. 卵巢储备功能下降的预测及治疗[J]. 中国计划生育学杂志, 2007, 136(2): 117.

[3] 杨 兰, 王爱华, 范倩倩, 等. 卵巢储备功能下降女性的生命质量及危险因素分析[J]. 中国循证医学杂志, 2013, 13(11): 1294-1297.

[4] 许小凤, 谈 勇. 卵巢储备功能低下中医证治路径探析[J]. 环球中医药, 2010, 3(5): 325-327.

[5] 赵 颖, 曹 蕾, 罗颂平. 滋肾育胎丸的临床应用与研究[J]. 世界中医药, 2011, 6(4): 318-319.

[6] 史 云, 杨胜华, 陶莉莉, 等. 滋肾育胎丸治疗脾肾虚弱型卵巢储备功能减退临床观察[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(4): 292-294.

[7] 曹俊岩, 范宏元, 曾 莉, 等. 从细胞因子研究雷公藤多苷致大鼠卵巢功能低下模型的中医证候属性[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2282-2283.

[8] 陆樱瑜, 沈明洁, 李佳慧, 等. 卵巢储备功能下降动物模型研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(12): 996-999.

[9] Marcondes F K, Blandchi F J, Tanno A P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations[J]. *Braz J Biol*, 2002, 62(4A): 609-614.

[10] 朱 玲, 陈春晓, 尹薇薇. 72 例卵巢储备功能低下女性的病机研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(11): 1233-1234.

[11] 刘思诗, 赵 颖. 张玉珍教授治疗卵巢功能减退病案 1 则举隅[J]. 新中医, 2014, 46(6): 230-231.

[12] 陈 静, 王春艳. 胡国华教授治疗卵巢早衰及卵巢储备功能低下的经验[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(10): 988-990.

[13] 陈 舒, 何嘉琳. 何嘉琳治疗卵巢储备功能下降的临床经验[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(1): 22-23, 27.

[14] 竺卫达, 齐 聪. 齐聪运用补肾健脾法治疗卵巢储备功能下降经验[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(8): 22-23.

[15] 李慧芳, 谈 勇. 谈勇教授治疗卵巢储备功能下降经验介绍[J]. 中医药导报, 2015, 21(19): 81-83, 87.