

[13] 刘家媛, 江 涛, 王 洁, 等. 香鳞毛蕨有效部位乳膏对糠秕马拉色菌所致豚鼠感染模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 183-187.

[14] 金星姬, 王爱平, 乔建军, 等. 皮肤癣菌感染动物模型的建立及抗真菌治疗的评价[J]. 中华皮肤科杂志, 2009, 42(2): 125-128.

[15] 徐 宇, 杨国玲. 犬小孢子菌的致病机制和治疗研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11(1): 62-64.

[16] 张学沛, 朱盛山, 刘 静, 等. 评价中药体外抑菌法的研究进展[J]. 药物评价研究, 2014, 37(2): 188-192.

[17] 李 妍, 郭琼杰, 孙淑娟. 抗真菌药物联合应用的体外药效评价方法[J]. 抗感染药学, 2007, 4(2): 51-55.

孕康口服液对早发性卵巢功能不全小鼠的影响

许万枫¹, 苏 洁¹, 翁路安¹, 孙晨晨¹, 陈素红^{2*}, 吕圭源^{1*}
(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江工业大学, 浙江 杭州 310014)

摘要：目的 观察孕康口服液对早发性卵巢功能不全小鼠的影响。方法 采用正常动情周期 ICR 小鼠灌胃给予雷公藤多苷溶液 40 mg/kg 构建早发性卵巢功能不全模型，大鼠随机分为正常组、模型组及孕康口服液高、中、低剂量组（36、18、9 mL/kg），灌胃给药 10 周。给药期间定期观察小鼠动情周期；ELISA 法检测血清中雌二醇（E₂）、孕激素（P）、促卵泡生成素（FSH）、促黄体生成素（LH）、催乳素（PRL）、抗苗勒管激素（AMH）、抑制素 B（INHB）水平；HE 染色观察卵巢组织形态；TUNEL 染色检测卵巢颗粒细胞凋亡；免疫组化检测 Bax、Bcl-2 蛋白表达。**结果** 与模型组比较，孕康口服液高剂量组能缩短小鼠动情周期（*P*<0.05），改善卵巢组织形态学并增加窦状卵泡数量（*P*<0.05）；升高血清 E₂ 水平（*P*<0.05）；减少卵巢颗粒细胞凋亡数量，并能降低 Bax 表达以及升高 Bcl-2 表达。**结论** 孕康口服液能改善雷公藤多苷致小鼠早发性卵巢功能不全，其机制可能是通过调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达，减少卵巢颗粒细胞凋亡。

关键词：孕康口服液；早发性卵巢功能不全；卵巢颗粒细胞；凋亡

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2020)05-1180-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.014

Effects of Yunkang Oral Liquid on mice with premature ovarian insufficiency

XU Wan-feng¹, SU Jie¹, WENG Lu-an¹, SUN Chen-chen¹, CHEN Su-hong^{2*}, LÜ Gui-yuan^{1*}
(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the effects of Yunkang Oral Liquid (YKOL) on mice with premature ovarian insufficiency (POI). **METHODS** POI models were induced by intragastric administration of tripterygium wilfordii (40 mg/kg) in ICR mice during normal estrous cycle. The mice were randomly divided into normal control group, model group and high, medium and low dose YKOL groups for 10 weeks oral administration (36, 18, 9 mL/kg). Periodic observation of mice in estrous cycle was made during the administration; ELISA method was used to detect estradiol (E₂), progesterone (P), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), prolactin (PRL), anti-mullerian hormone (AMH) and inhibin B (INHB) levels; HE staining was used to observe the morphology of ovarian tissue; TUNEL staining was used to detect the apoptosis of ovarian granulosa cells; immunohisto-

收稿日期: 2019-09-17

基金项目: 浙江省重点实验室项目 (2012E10002)

作者简介: 许万枫 (1995—), 男, 硕士生, 研究方向为中药药理与新产品开发。E-mail: 940081377@qq.com

* 通信作者: 陈素红 (1973—), 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药药理与新产品开发。Tel: (0571) 86613601, E-mail: chensuhong@zjut.edu.cn

吕圭源 (1954—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理与新产品开发。Tel: (0571) 86613601, E-mail: lv.gy@263.net

chemistry was used to detect Bax and Bcl-2 protein expression. **RESULTS** Compared with the model group, the high-dose YKOL group shared shortened mice estrous cycle ($P<0.05$), improved morphology of ovary and increased number of sinusoidal follicles ($P<0.05$); increased serum E2 level ($P<0.05$); reduced number of ovarian granulosa cell apoptosis, and reduced Bax expression and increased Bcl-2 expression. **CONCLUSION** YKOL can improve the POI induced by tripterygium polyglycoside in mice, and the mechanism may be associated with the apoptosis reduction of ovarian granulosa cells via the Bcl-2 and Bax expression regulation.

KEY WORDS: Yunkang Oral Liquid; premature ovarian insufficiency; tripterygium wilfordii; ovarian granulosa cells

早发性卵巢功能不全 (premature ovarin insufficiency, POI) 指女性在 40 岁以前出现卵巢功能减退, 主要表现为月经异常、雌激素下降、促性腺激素升高等^[1]。据调查^[2]显示, 40 岁女性 POI 发病率约为 1%, 30 岁为 0.1%, 20 岁为 0.01%。近年来, POI 发病率呈逐年升高且向低龄化发展, 严重威胁女性生殖健康。雷公藤多苷是治疗类风湿性关节炎的常用药物, 其副作用会引起 POI。目前临床上一一般采用激素替代疗法治疗 POI, 但其停药后易复发且副作用大, 因此尚缺乏治疗 POI 的有效药物。

中医认为“肾虚精亏、血海枯竭”为 POI 的主要病因, 并以补肾养血为主要治则。临床研究^[3-5]表明, 补肾养血中药能够通过调节性激素, 起到改善卵巢功能的作用。孕康口服液由山药、黄芪、当归、菟丝子、杜仲 (炒)、续断等 23 味中药组成, 具有补肾健脾、益气养血的功效, 临床上能有效预防及治疗流产^[6-8]。本实验室前期研究已发现孕康口服液能增加肾虚型、复发性及 LPS 诱导等多种流产模型动物的性激素水平, 促使卵巢黄体化, 维持卵泡正常发育^[9-13]。因此, 本研究进一步采用雷公藤多苷致 POI 模型小鼠, 通过对动情周期、内分泌激素、卵巢组织形态学以及卵巢颗粒细胞凋亡等进行检测, 探索孕康口服液对 POI 的作用及可能机制。

1 材料

1.1 动物 ICR 雌性小鼠 60 只, SPF 级, 体质量 (20±2) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证编号 20150000563246, 生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005。

1.2 药物与试剂 孕康口服液 (回音必齐齐哈尔制药有限公司, 国药准字 Z10970068); 醋酸甲羟孕酮片 (浙江仙琚制药股份有限公司, 国药准字 H33020715, 批号 160922); 戊酸雌二醇片 (法国 Delpharm Lille S. A. S. 公司, 国药准字 J20171038,

批号 411 A); 雷公藤多苷片 (浙江得恩德制药股份有限公司, 国药准字 Z33020422, 批号 1804138B); ELISA 试剂盒孕酮 (P, 批号 E20190101A)、雌二醇 (E₂, 批号 E20190101A)、抗苗勒管激素 (AMH, 批号 E20190101A)、抑制素 B (INHB, 批号 E20190101A)、催乳素 (PRL, 批号 E20190101A) 均购自上海源叶生物科技有限公司; ELISA 试剂盒促黄体生成素 (LH, 批号 MM-44039M1)、促卵泡生成素 (FSH, 批号 MM-0555M1) 购自江苏科特生物技术有限公司; 改良型柠檬酸钠抗原修复液 (货号 P0083)、BSA (货号 ST023)、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 C1088) 购自碧云天生物技术有限公司; 兔二步法免疫组化试剂盒 (货号 PV-6001) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Bax 抗体 (货号 14796s) 购自美国 CST 公司; Bcl-2 抗体 (货号 ab196495)、DAB 试剂盒 (货号 ab64238) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器 LEICARM2245 型半自动切片机 (德国 Leica 公司); Tissue-TekVIP5Jr 自动脱水机 (日本樱花检验仪器株式会社); MEIKOEC360 包埋机 (德国 Meiko 公司); BA410 生物显微镜 [麦克奥迪 (厦门) 电气股份有限公司]; Powerwave340 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); AXIO SCOPE. A1 正置荧光显微镜 (德国蔡司公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 通过阴道涂片法对 60 只 ICR 小鼠进行动情周期检测, 筛选得到 56 只正常动情周期 ICR 小鼠用于正式实验, 并将这 56 只正常动情周期 ICR 小鼠, 随机分为正常组 10 只、模型组 10 只、阳性组 9 只、孕康口服液高剂量组 9 只, 孕康口服液中剂量组 9 只, 孕康口服液低剂量组 9 只。造模期间, 除正常组外, 其余各组灌胃给予 40 mg/kg 雷公藤多苷溶液^[14], 正常组灌胃给予生理盐水, 1 次/d。通过动情周期变化, 在第 11 周确认造模成功后, 开始给药, 孕康口服液高、

中、低剂量组为临床等效剂量 4、2、1 倍（36、18、9 mL/kg），阳性组给药剂量为临床等效剂量（戊酸雌二醇 0.15 mg/kg，连续 4 d；用醋酸甲羟孕酮片 1.5 mg/kg，仅 1 d，停药 1 d，继续按以上序贯方法用药），连续给药 10 周。

2.2 动情周期观察 本实验观察小鼠在不同给药时间段的动情周期变化，并以此来判断是否有药效。故将整个给药过程分为 3 个阶段，给药第 1 阶段为第 1~2 周，给药第 2 阶段为第 4~5 周，给药第 3 阶段为第 9~10 周。每天早晨 9 点对所有小鼠进行阴道脱落细胞涂片检查，显微镜观察脱落细胞形态。具体操作为用移液枪吸取 150 μ L 生理盐水，滴入小鼠阴道，反复抽吸 3 次，将液体滴在载玻片上，盖上盖玻片后置于光学显微镜下观察。判定标准为（1）动情前期，大量椭圆形有核上皮细胞，伴少量角化上皮细胞；（2）动情期，大量角化上皮细胞，呈落叶堆叠状；（3）动情后期，数量相近的角化上皮细胞、白细胞及有核上皮细胞；（4）动情间期，以白细胞为主，少量上皮细胞和黏液。

2.3 子宫和卵巢指数测定 末次给药后，于动情间期，眼眶取血，脱颈小鼠，取出完整子宫和双侧卵巢，用电子天平称取子宫和双侧卵巢湿重后。卵巢指数=（脏器湿重/小鼠处死前体质量） $\times$ 100%。

2.4 血清内分泌激素水平检测 末次给药后，眼眶静脉丛取血，37 $^{\circ}$ C 静置 0.5 h，3 500 r/min，离心 10 min，吸取上清，-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用 ELISA 法检测血清中 E₂、P、FSH、LH、PRL、AMH、INHB 水平。

2.5 卵巢组织形态学观察 将 4% 多聚甲醛固定的子宫和卵巢组织进行脱水、包埋、切制 4 μ m 厚的石蜡切片后，进行常规 HE 染色。于光学显微镜下观察组织形态，并每组选取 6 个切片，观察卵巢中窦前卵泡、窦状卵泡、排卵前卵泡、黄体 and 闭锁卵泡数目。

2.6 卵巢颗粒细胞凋亡情况观察 将卵巢组织石蜡切片脱蜡，梯度乙醇分化，滴加不含 DNase 的蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，PBS 洗涤后，滴加 TUNEL 检测液 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min，PBS 洗涤后，用抗荧光淬灭封片液封片后，荧光显微镜下观察拍照。

2.7 卵巢颗粒细胞中 Bcl-2、Bax 表达检测 将卵巢组织石蜡切片脱蜡、梯度乙醇分化、微波抗原修复和 3% 过氧化氢处理后，5% BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h，滴加一抗 Bcl-2（1：200）、Bax（1：400），4 $^{\circ}$ C 过夜，PBS 洗涤后，滴加抗酶标山羊抗兔 IgG 聚合物 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，PBS 洗涤后，DAB 显色，苏木素复染，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，显微镜下观察拍照。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 孕康口服液对动情周期的影响 正常小鼠动情周期是 1 个时间段，一般为 5~6 d，一个完整的动情周期表现为动情前期、动情期、动情后期和动情间期的循环交替；而动情周期不正常的小鼠，常表现为无动情周期循环或动情周期延长。

与正常组比较，在整个给药阶段中，模型组动情周期延长的小鼠数量增加，平均动情周期延长（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。与模型组比较，在整个给药阶段中，阳性组动情周期延长的小鼠数量减少，平均动情周期天数均缩短，其中给药第 1、3 阶段，平均动情周期天数缩短（ $P<0.05$ ）；给药第 2 阶段，孕康口服液组动情周期延长的小鼠数量减少，平均动情周期天数有缩短趋势，但差异无统计学意义；给药第 3 阶段，孕康口服液高剂量组动情周期延长的小鼠数量减少，平均动情周期天数缩短（ $P<0.05$ ）。见表 1~2。

表 1 孕康口服液对 POI 模型小鼠动情周期的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=9\sim 10$ ）

Tab.1 Effects of YKOL on estrous cycle of POI mouse models（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=9\sim 10$ ）

组别	给药第 1 阶段/只			给药第 2 阶段/只			给药第 3 阶段/只		
	正常	延长	无周期	正常	延长	无周期	正常	延长	无周期
正常组	7	3	0	9	1	0	10	0	0
模型组	1	7	2	2	8	0	1	9	0
阳性组	4	5	0	6	3	0	8	1	0
孕康口服液高剂量组	1	6	2	3	6	0	5	4	0
孕康口服液中剂量组	1	6	2	3	4	2	4	5	0
孕康口服液低剂量组	0	7	2	3	5	1	2	7	0

表 2 孕康口服液对 POI 模型小鼠平均动情周期天数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9\sim 10$)

Tab. 2 Effects of YKOL on average estrous cycle days of POI mouse models ($\bar{x}\pm s$, $n=9\sim 10$)

组别	给药第 1 阶段/d	给药第 2 阶段/d	给药第 3 阶段/d
正常组	6.2±1.3	5.7±0.7	5.4±0.5
模型组	7.9±2.0 [*]	8.6±2.4 [*]	8.2±1.6 ^{**}
阳性组	6.1±0.9 [#]	6.3±0.5	5.8±0.7 [#]
孕康口服液高剂量组	8.0±1.8	7.5±1.5	6.1±0.8 [#]
孕康口服液中剂量组	8.1±1.6	7.4±2.2	6.8±1.1
孕康口服液低剂量组	8.4±1.6	7.8±1.8	6.9±1.1

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.2 孕康口服液对卵巢组织形态与各级卵泡数量的影响 与正常组比较,模型组颗粒细胞层数减少,窦前卵泡、窦状卵泡和黄体数量减少,闭锁卵泡数量增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,阳性组颗粒细胞层数增加,窦前卵泡和窦状卵泡数量增加 ($P<0.01$);孕康口服液高剂量组窦状卵泡数量增加 ($P<0.05$)。孕康口服液各剂量组颗粒细胞层数增加,窦前卵泡、窦状卵泡数量有增加趋势,闭锁卵泡数量有减少趋势;孕康口服液高、中剂量组排卵前卵泡数量有增加趋势,孕康口服液高、低剂量组黄体数量有增加趋势,但差异均无统计学意义。见图 1~2、表 3。

3.3 孕康口服液对血清内分泌激素水平的影响 与正常组比较,模型组血清 E_2 、P、AMH 水平降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,孕康口服液高剂量组和阳性组 E_2 水平升高 ($P<0.05$),孕康口服液中剂量组和阳性组 AMH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 4。

表 3 孕康口服液对 POI 模型小鼠各级卵泡数量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 3 Effects of YKOL on follicle number of POI mouse models ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	窦前卵泡	窦状卵泡	排卵前卵泡	黄体	闭锁卵泡
正常组	13.8±3.6	4.3±0.8	1.2±1.5	12.8±6.5	1.0±0.6
模型组	5.0±2.5 ^{**}	1.8±0.8 ^{**}	1.3±1.4	4.7±1.5 ^{**}	2.5±1.6 [*]
阳性组	12.5±3.4 ^{##}	4.2±1.2 ^{##}	0.8±0.8	6.3±4.7	1.8±1.0
孕康口服液高剂量组	7.7±0.8	3.3±1.5 [#]	1.5±1.0	5.7±2.7	1.8±0.8
孕康口服液中剂量组	6.7±3.1	2.7±0.8	2.3±1.2	4.2±2.5	2.0±1.4
孕康口服液低剂量组	7.2±2.0	2.5±1.0	1.2±1.2	5.8±1.3	2.3±1.5

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表 4 孕康口服液对 POI 模型小鼠血清内分泌激素水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9\sim 10$)

Tab. 4 Effects of YKOL on serum endocrine hormone levels of POI mouse models ($\bar{x}\pm s$, $n=9\sim 10$)

组别	E_2 / ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	P/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	FSH/ ($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LH/ ($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)	PRL/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AMH/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	INHB/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
正常组	43.85±8.10	9.52±1.20	42.60±6.28	4.49±0.65	26.23±3.29	3 415.00±737.94	27.19±3.86
模型组	38.69±2.58 [*]	7.56±1.21 [*]	60.33±26.18	5.84±2.66	24.75±2.88	2 765.00±222.75 [*]	26.81±5.06
阳性组	44.78±3.99 [#]	8.56±1.44	47.90±7.85	4.27±0.73	24.60±2.31	3 618.33±654.26 ^{##}	24.74±3.79
孕康口服液高剂量组	43.99±4.73 [#]	8.54±2.29	40.59±6.45	4.11±0.66	24.59±1.69	3 286.85±663.03	25.14±5.30
孕康口服液中剂量组	42.25±4.39	8.21±3.05	48.08±6.31	4.38±0.53	24.42±1.91	3 366.48±945.47 [#]	28.13±4.23
孕康口服液低剂量组	41.21±3.17	8.40±1.73	46.51±6.69	4.83±0.72	24.79±1.84	3 251.67±429.79	28.32±1.56

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

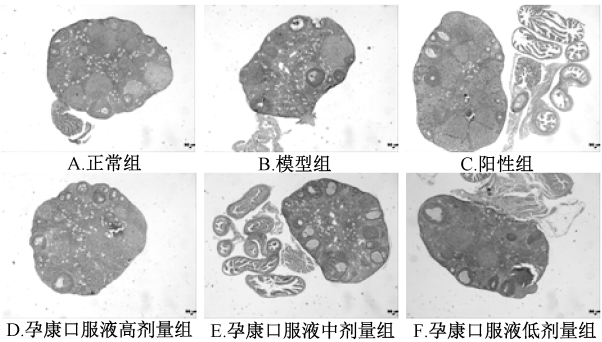


图 1 各组卵巢组织 HE 染色 (×40)

Fig. 1 HE staining of ovarian tissue in each group (×40)

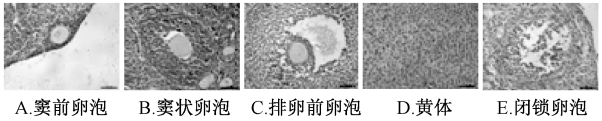


图 2 各级卵泡 HE 染色 (×400)

Fig. 2 HE staining of follicular morphology at various levels (×400)

3.4 孕康口服液对子宫指数和卵巢指数的影响
与正常组比较,模型组子宫指数与卵巢指数降低 ($P<0.05$);与模型组比较,阳性药组子宫指数升高 ($P<0.01$),孕康口服液各剂量组子宫指数与卵巢指数有升高趋势,但差异无统计学意义。见表5。

表5 孕康口服液对POI模型小鼠子宫指数和卵巢指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9\sim 10$)

Tab.5 Effects of YKOL on uterine and ovarian variables of POI mouse models ($\bar{x}\pm s$, $n=9\sim 10$)

组别	子宫指数/%	卵巢指数/%
正常组	0.352±0.178	0.077±0.014
模型组	0.250±0.053 *	0.057±0.021 *
阳性组	0.455±0.076 ##	0.068±0.027
孕康口服液高剂量组	0.292±0.109	0.059±0.016
孕康口服液中剂量组	0.268±0.100	0.058±0.016
孕康口服液低剂量组	0.289±0.107	0.066±0.013

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。
3.5 孕康口服液对卵巢颗粒细胞凋亡的影响
与正常组比较,模型组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡数量增加,Bcl-2 阳性表达减少,Bax 阳性表达增加。与模型组比较,孕康口服液各剂量组和阳性组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡数量减少,Bcl-2 阳性表达增多,Bax 阳性表达减少。见图3~5。

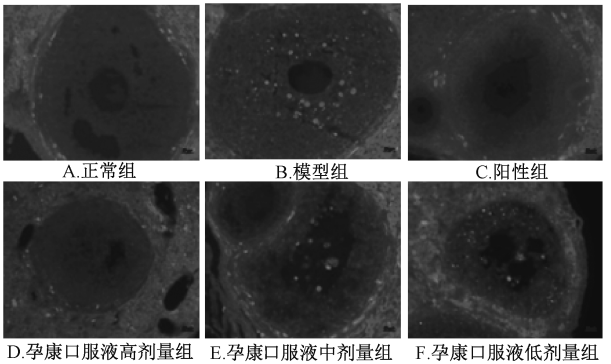


图3 孕康口服液对卵巢颗粒细胞凋亡的影响 ($\times 400$)
Fig.3 Effects of YKOL on apoptosis of ovarian granulosa cells ($\times 400$)

4 讨论

POI 是一种多病因所致的卵巢功能低下疾病,多数患者病因并不明确^[15-16]。雷公藤多苷片常用于治疗类风湿性关节炎,肾病综合征等疾病的同时,副作用也越来越引人注目,尤其是使用药物过量引起的POI。临床研究^[17-18]表明,雷公藤多苷可导致POI,患者表现为月经不调或闭经, E_2 水平下降,FSH、LH 水平升高。同时现代药理结果^[19-20]表明,雷公藤多苷可制备POI 动物模型,

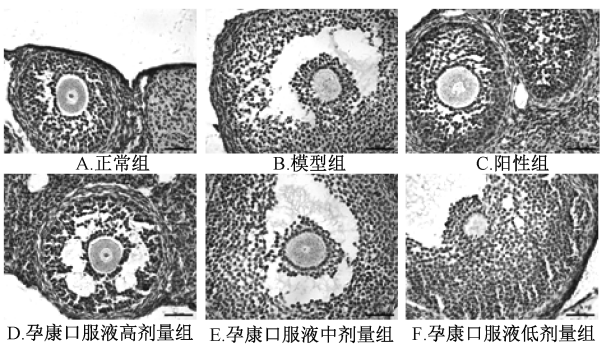


图4 孕康口服液对卵巢颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\times 400$)
Fig.4 Effects of YKOL on Bcl-2 protein expression in ovarian granulosa cells ($\times 400$)

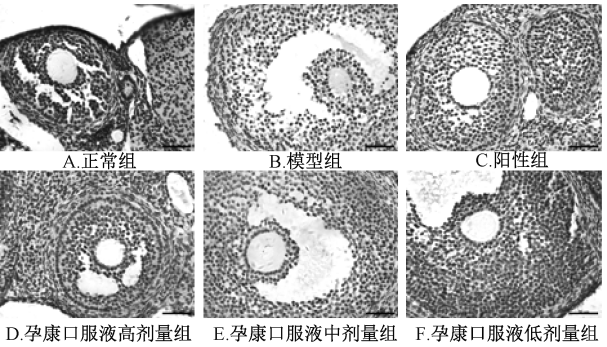


图5 孕康口服液对卵巢颗粒细胞 Bax 蛋白表达的影响 ($\times 400$)
Fig.5 Effects of YKOL on Bax protein expression in ovarian granulosa cells ($\times 400$)

模型动物出现动情周期延长或无动情周期,各级卵泡数量减少, E_2 、P 等性激素水平紊乱,还能促使卵巢颗粒细胞凋亡。本实验采用雷公藤多苷制备POI 模型小鼠,结果显示模型小鼠出现平均动情周期延长,颗粒细胞层数减少,窦前卵泡、窦状卵泡和黄体数量减少,闭锁卵泡数量增加,血清 E_2 、P、AMH 水平降低,卵巢颗粒细胞凋亡数量增加,提示造模成功。

西医临床上,POI 患者一般采用激素替代疗法、赠卵移植法、促排卵法、免疫抑制疗法和基因疗法。卵子捐赠是患者实现怀孕的唯一可靠方法,但其存在一系列并发症和伦理问题,未得到有效应用,故临床上一一般采用激素替代疗法。激素替代疗法目前常用于治疗无生育要求的POI 患者,此法通过周期性补充雌孕激素,经负反馈作用使促性腺激素水平降低,从而减少卵泡受到的刺激,并协同体内FSH 诱导卵泡颗粒细胞上的自身促性腺激素受体生成,使卵泡复苏。但此法只能改善低雌激素

引起的症状，并不能从根本上恢复卵巢正常的内分泌功能，且停药后易复发。有报道^[21]表明，长期用药可加大中风、心脏病、腿部及肺部栓塞的患病率，影响血糖、血脂、肝肾等功能，尤其是会增加患乳腺癌和子宫内膜癌的患病率。因此，目前临床上尚缺乏用于治疗 POI 的有效药物。

中医学将 POI 归为“经闭”“血枯”“年未老经水断”“不孕症”等范畴。《素问·上古天真论》载，“女子七岁，肾气盛，齿更发长；二七而天癸至，任脉通，太冲脉盛，月事以时下，故有子……；七七，任脉虚，太冲脉衰少，天癸竭，地道不通，故形坏而无子也”；《傅青主女科》中论述，“经水早断，似乎肾水衰涸”。肾乃先天之本，主生殖，肾气盛、天癸至、任通冲盛、胞宫定期藏泄，则月事以时下。肾藏精，肾中精气为化血之源，若肾精亏损，则天癸不充，任冲气血不足，胞脉失于濡养，致肾-天癸-冲任-胞宫轴功能紊乱，月经不至。由此可见女子月经不仅与肾中精气有关，还与气血的盈亏密切相关。故中医认为“肾虚精亏、血海枯竭”为 POI 的主要病因，并将补肾养血作为主要治则^[22]。临床研究^[3-5]表明，补肾养血中药能够通过调节性激素，起到改善卵巢功能的作用。

孕康口服液由山药、黄芪、当归、狗脊（去毛）、菟丝子、桑寄生、杜仲（炒）、续断、补骨脂、党参、茯苓、砂仁、白术（焦）、阿胶、苧麻根、地黄、山茱萸、枸杞子、乌梅、白芍、益智、黄芩、艾叶等 23 味药组成，其中续断、桑寄生、杜仲、菟丝子和枸杞子等具有固肾纳气的功效；当归、芍药、阿胶等可养血；黄芪、党参、白术等具有健脾益气的功效；诸药合用，可达“补肾养血”的功效，临床上能有效预防及治疗流产^[6-8]。本课题组前期研究^[9-13]发现，采用肾虚型流产模型大鼠、复发性流产模型小鼠以及 LPS 诱导流产模型小鼠，孕康口服液能增加模型动物的性激素水平，促使卵巢黄体化，维持卵泡正常发育。因此，基于孕康口服液“补肾养血”的功效以及前期发现改善卵巢功能，推测其可能具有改善 POI 的作用。本研究通过雷公藤多苷溶液灌胃成功建立 POI 模型小鼠，观察了孕康口服液对 POI 小鼠的药效作用。研究显示，孕康口服液能明显缩短 POI 模型小鼠动情周期，改善卵巢组织形态学并增加窦状卵泡数量，表明孕康口服液具有改善雷公藤多苷所致 POI 模型的作用。在明确药效作用基础上，还进一

步对可能的机制进行了研究。

现代研究^[23-24]表明，POI 与内分泌激素之间有着密切的联系。过高的 LH 水平将引起卵母细胞的过早发育，但不成熟，导致卵泡闭锁或不排卵。异常（过高或过低）的 PRL 水平将引起黄体功能不全，卵泡中 FSH 分泌不足，进而导致卵泡发育不成熟。E₂ 是由子宫和卵巢分泌的性激素，P 是由卵巢黄体细胞分泌，2 者的主要功能是促进子宫、卵巢等性器官的发育成熟，同时 E₂ 能通过负反馈调节，降低高浓度的 FSH 水平，从而调节卵泡的正常发育。AMH 是肽类生长因子，最早在初级卵泡的颗粒细胞层表达，其浓度与发育卵泡数密切相关^[25]。INHB 是转化生长因子 B 超家族成员之一，其主要由卵巢窦卵泡颗粒细胞分泌，可反馈性地抑制 FSH，对生殖功能具有调节作用^[26-27]。由此可见，各种内分泌激素的分泌水平与卵泡的发育或闭锁密切相关。本研究显示，孕康口服液能明显升高 POI 模型小鼠血清 E₂ 和 AMH 水平，一定程度上可以降低 FSH 和 LH 水平，升高 P 水平，对 PRL 和 INHB 无显著影响。表明孕康口服液可以通过调节 E₂ 和 AMH 等内分泌激素，从而产生改善卵巢功能的作用。其中 FSH、LH 水平未显著下降的原因可能是在小鼠动情间期取血，2 种激素水平表达较弱；对 INHB 未有显著影响的原因，可能是 INHB 较 AMH 不敏感。

另有研究^[28]表明，卵巢颗粒细胞凋亡是导致卵泡闭锁、卵泡数目减少的主要原因。卵巢颗粒细胞为卵母细胞的成熟和减数分裂提供重要的营养和信号；在一定条件下，卵巢颗粒细胞可以直接间接地引起卵泡闭锁加快，从而导致 POI。Bcl-2 和 Bax 属于 Bcl-2 家族，是参与颗粒细胞凋亡的重要因子，Bcl-2 具有抑制凋亡作用，Bax 具有促进凋亡作用，Bax 的过度表达能拮抗 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用，从而促使细胞凋亡。TUNEL 检测结果显示，雷公藤多苷能引起卵巢颗粒细胞凋亡，而孕康口服液能减少卵巢颗粒细胞的凋亡；免疫组化结果显示，雷公藤多苷能降低颗粒细胞中 Bcl-2 蛋白表达，升高 Bax 蛋白表达，而孕康口服液能升高颗粒细胞中 Bcl-2 蛋白表达，降低 Bax 蛋白表达。表明孕康口服液可能通过调节 Bcl-2 以及 Bax 的蛋白表达，从而起到减少卵巢颗粒细胞凋亡的作用。

因此，具有“补肾养血”功效的孕康口服液对雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全模型小鼠卵巢颗粒细胞具有改善作用，其机制可能是其能调节凋

亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达, 继而减少卵巢颗粒细胞凋亡, 调节 E₂ 和 AMH 等内分泌激素水平, 从而增加卵巢窦状卵泡, 并改善卵巢功能。

参考文献:

[1] Webber L, Davies M, Anderson R, *et al.* ESHRE guideline: management of women with premature ovarian insufficiency[J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(5): 926-937.

[2] Falorni A, Minarelli V, Eads C M, *et al.* A clinical research integration special program (CRISP) for young women with primary ovarian insufficiency[J]. *Panminerva Med*, 2014, 56(4): 245-261.

[3] 张邵宁. 补肾养血汤在卵巢早衰治疗中的应用研究[J]. *四川中医*, 2016, 34(9): 137-139.

[4] 李善霞, 张艳红, 何东云, 等. 补肾养血方对肾阴虚型卵巢储备功能下降和卵巢早衰的临床作用[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(6): 1246-1249.

[5] 郑小平, 高微微, 洪巧超, 等. 补肾益气养血方联合激素替代疗法治疗卵巢早衰临床研究[J]. *新中医*, 2019, 51(2): 166-169.

[6] 王晓霞, 刘冬梅. 回音必孕康口服液治疗先兆流产疗效观察[J]. *中国误诊学杂志*, 2006, 6(22): 4345-4346.

[7] 卢伟波. 烯丙雌二醇片联合孕康口服液治疗早期先兆流产临床研究[J]. *实用中西医结合临床*, 2019, 19(2): 83-85.

[8] 李 珍. 孕康口服液联合绒毛促性素治疗先兆性流产的疗效观察[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(7): 1310-1313.

[9] 陈 波, 施秋秋, 梁凯伦, 等. 孕康口服液调节复发性流产小鼠内分泌系统及 VEGF 信号通路降低流产率的作用和机制[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(9): 1894-1900.

[10] 鲁文杰, 吕圭源, 徐俞悦, 等. 孕康口服液及其不同药效部位对肾虚流产大鼠外周血及 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 134-137.

[11] 施秋秋, 颜美秋, 余欢欢, 等. 孕康口服液对 LPS 诱导小鼠流产的保胎及免疫耐受调节作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1227-1232.

[12] 郑 祥, 郭林峰, 戴明珠, 等. 孕康口服液对胚胎着床障碍大鼠的安胎作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2018, 34(6): 543-547.

[13] 戴明珠, 吕圭源, 徐俞悦, 等. 孕康口服液对肾虚-黄体抑制型先兆流产大鼠的安胎作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(1): 9-12; 18.

[14] 吴克明, 湛 婕, 熊 巍. 雷公藤多甙对雌性小鼠生殖功能影响的实验研究[J]. *中医研究*, 2007, 20(4): 28-33.

[15] Li J, Shen F H, Guan C W, *et al.* Activation of Nrf2 protects against triptolide-induced hepatotoxicity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e100685.

[16] Li X J, Jiang Z Z, Zhang L Y. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 67-79.

[17] 杨 涓, 董江川, 韩 冰. 雷公藤多苷对女性生殖内分泌系统的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006, 20(5): 437-440.

[18] 张婷婷, 马晓莉. 雷公藤多苷致卵巢早衰 1 例[J]. *解放军医学院学报*, 2017, 38(12): 1167-1168.

[19] 刘 杰, 张 茜, 陈 瑛. 雷公藤对雌性大鼠性激素水平、卵巢内细胞凋亡以及骨代谢状况影响的联合观察与分析[J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(14): 1303-1306.

[20] Liu J, Jiang Z, Liu L, *et al.* Triptolide induces adverse effect on reproductive parameters of female Sprague-Dawley rats[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2011, 34(1): 1-7.

[21] Kalantaridou S N, Naka K K, Bechlioulis A, *et al.* Premature ovarian failure, endothelial dysfunction and estrogen-progestogen replacement[J]. *Trends Endocrino Metab*, 2006, 17(3): 101-109.

[22] 张艳萍, 吕玉珍. 补肾养血汤佐治卵巢早衰效果观察[J]. *实用中医药杂志*, 2018, 34(6): 696-697.

[23] 刘彩霞, 高美华, 常继贤. 女性内分泌及免疫紊乱在不孕症中的作用研究[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(11): 14-15.

[24] 宫 剑, 邢 超, 李 倩. 复发性流产女性内分泌和免疫学因素分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(3): 381-383.

[25] Nie X, Dai Y, Zheng Y, *et al.* Establishment of a mouse model of premature ovarian failure using consecutive superovulation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(5): 2341-2358.

[26] Makanji Y, Zhu J, Mishra R, *et al.* Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review[J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(5): 747-794.

[27] 祖丽胡玛尔·艾尼外尔, 阿比达·阿不都卡德尔, 苏比努尔·买买提, 等. 抑制素 B 和窦卵泡计数评估卵巢储备功能的临床意义[J]. *实用妇科内分泌杂志 (电子版)*, 2017, 4(25): 69-71.

[28] Worku T, Rehman Z, Talpur H, *et al.* MicroRNAs: new insight in modulating follicular atresia: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 333-346.