

[30]

Prudent J, McBride H M. The mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites: a signalling platform for cell death[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 47: 52-63.

[31]

Bock F J, Tait S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.

[32]

Pacilli A, Calienni M, Margarucci S, et al. Carnitine-acyltransferase system inhibition, cancer cell death, and prevention of myc-induced lymphomagenesis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(7): 489-498.

[33]

Wei M C, Zong W X, Cheng E H, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. *Science*, 2001, 292(5517): 727-730.

二至天癸方对早发性卵巢功能不全小鼠卵巢功能及 Treg/Th1 免疫平衡的影响

王晓琪¹, 魏超峰¹, 刘丹琪², 吴海萃³, 连 方^{3*}

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 山东 济南 250014; 2. 上海交通大学附属国际和平妇幼保健院, 上海 200030; 3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

摘要: **目的** 探究二至天癸方对早发性卵巢功能不全 (POI) 小鼠卵巢功能及免疫稳态的调节作用。**方法** 50 只雌性小鼠随机分为空白组、模型组和二至天癸方低、中、高剂量组 (2.73、5.46、10.92 g/kg), 每组 10 只, 采用皮下多点注射透明带 3 多肽 (ZP3) 构建 POI 小鼠模型, 灌胃给药 28 d, 期间监测动情周期变化。给药结束后, 计算卵巢指数; HE 染色观察卵巢组织病理变化; ELISA 法检测血清 E₂、FSH、AMH、IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-10、TGF- β 1、IL-23 水平; RT-qPCR 法检测卵巢组织 *Foxp3*、*ROR γ t*、*IL-17A*、*IL-10*、*IFN- γ* 、*T-bet* mRNA 表达; 流式细胞术检测脾脏及卵巢组织中调节性 T 细胞 (CD4⁺Foxp3⁺Treg) 和辅助性 T 细胞 1 (CD4⁺IFN- γ ⁺Th1) 比例; Western blot 法检测卵巢组织 T-bet、Foxp3 蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠卵巢指数降低 ($P<0.01$), 动情周期紊乱, 各级生长卵泡数量减少 ($P<0.01$), 闭锁卵泡数量增多 ($P<0.01$); 血清 AMH、E₂、IL-10、TGF- β 1 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、IFN- γ 、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$); 卵巢组织 *Foxp3*、*IL-10* mRNA 和 Foxp3 蛋白表达降低 ($P<0.01$), *IFN- γ* 、*T-bet*、*ROR γ t* mRNA 和 T-bet 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 卵巢及脾脏组织 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例降低 ($P<0.01$), CD4⁺IFN- γ ⁺Th1 细胞比例升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 二至天癸方中、高剂量组小鼠卵巢指数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 动情周期紊乱减轻, 各级生长卵泡数量增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 闭锁卵泡数量减少 ($P<0.01$); 血清中 E₂、AMH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、IFN- γ 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$); 卵巢组织 *IL-10* mRNA 和 Foxp3 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), *IFN- γ* 、*T-bet* mRNA 和 T-bet 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 卵巢及脾脏组织 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), CD4⁺IFN- γ ⁺Th1 细胞比例降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 二至天癸方高剂量组小鼠血清 IL-10、TGF- β 1 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 卵巢组织 *Foxp3* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 二至天癸方能有效改善 POI 小鼠卵巢功能和结构损伤, 其作用机制可能与调节 Treg/Th1 细胞平衡, 抑制相关促炎因子释放, 促进抗炎因子表达, 从而改善卵巢局部免疫炎症微环境密切相关。

关键词: 二至天癸方; 早发性卵巢功能不全; T 淋巴细胞; 炎症因子; Treg/Th1 免疫平衡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2026)07-2188-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.07.009

Effects of Erzhi Tiangui Formula on ovarian function and Treg/Th1 immune balance in mice with premature ovarian insufficiency

WANG Xiao-qi¹, WEI Chao-feng¹, LIU Dan-qi², WU Hai-cui³, LIAN Fang^{3*}

收稿日期: 2025-08-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174429, 82274573)

作者简介: 王晓琪 (2000—), 硕士在读, 从事中医药防治不孕症的临床与基础研究。E-mail: wangxqi2000@163.com

* 通信作者: 连 方 (1957—), 博士, 主任医师, 从事中医药防治不孕症的临床与基础研究。E-mail: lianfangbangong@163.com

(1. Frist Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. International Peace Maternity and Child Health Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 3. The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the regulatory effects of Erzhi Tiangui Formula (EZTGF) on ovarian function and immune homeostasis in mice with premature ovarian insufficiency (POI). **METHODS** Fifty female mice were randomly divided into a blank group, a model group, and low-, medium-, and high-dose EZTGF groups (2.73, 5.46, and 10.92 g/kg), with 10 mice in each group. The POI mouse model was established by subcutaneous multi-point injection of zona pellucida 3 (ZP3) peptide. The mice were administered by intragastric gavage for 28 days, during which the estrous cycle changes were monitored. After the intervention, the ovarian index was calculated. HE staining was used to observe the pathological changes of ovarian tissues. ELISA was used to detect the serum levels of E₂, FSH, AMH, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-10, TGF-β1, and IL-23. RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of *Foxp3*, *RORγt*, *IL-17A*, *IL-10*, *IFN-γ* and *T-bet* in ovarian tissues. Flow cytometry was used to detect the proportions of regulatory T cells (CD4⁺Foxp3⁺ Treg) and T helper 1 cells (CD4⁺IFN-γ⁺ Th1) in the spleen and ovarian tissues. Western blot was used to detect the protein expressions of T-bet and Foxp3 in ovarian tissues. **RESULTS** Compared with the blank group, the model group showed a decreased ovarian index ($P<0.01$), disordered estrous cycle, reduced number of growing follicles at all levels ($P<0.01$), and increased number of atretic follicles ($P<0.01$). Serum levels of AMH, E₂, IL-10 and TGF-β1 were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while FSH, IFN-γ and TNF-α levels were increased ($P<0.01$). In ovarian tissues, the *Foxp3* and *IL-10* mRNA expressions, as well as Foxp3 protein expression were decreased ($P<0.01$), whereas the *IFN-γ* and *T-bet* mRNA expressions, and RORγt and T-bet protein expressions were increased ($P<0.01$). The proportion of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells in the ovary and spleen was decreased ($P<0.01$), while the proportion of CD4⁺IFN-γ⁺ Th1 cells was increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the medium- and high-dose ETPF groups showed an increased ovarian index ($P<0.05$, $P<0.01$), alleviated disordered estrous cycle, increased number of growing follicles at all levels ($P<0.05$, $P<0.01$), and decreased number of atretic follicles ($P<0.01$). Serum levels of E₂ and AMH were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), while FSH, IFN-γ and TNF-α levels were decreased ($P<0.01$). In ovarian tissues, the *IL-10* mRNA expression and Foxp3 protein expression were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the *IFN-γ* and *T-bet* mRNA expressions, and T-bet protein expression were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The proportion of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells in the ovary and spleen was increased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the proportion of CD4⁺IFN-γ⁺ Th1 cells was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the high-dose EZTGF group showed increased serum levels of IL-10 and TGF-β1 ($P<0.05$, $P<0.01$), as well as increased *Foxp3* mRNA expression in ovarian tissues ($P<0.01$). **CONCLUSION** Erzhi Tiangui Formula can effectively improve the ovarian function and structural damage in POI mice. The underlying mechanism may be closely related to regulating the Treg/Th1 cell balance, inhibiting the release of related pro-inflammatory cytokines, and promoting the expression of anti-inflammatory cytokines, thereby improving the local immune inflammatory microenvironment of the ovary. **KEY WORDS:** Ezhi Tiangui Formula; premature ovarian insufficiency; T lymphocytes; inflammatory cytokines; Treg/Th1 immune balance

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 是指女性在 40 岁以前发生卵巢功能减退, 以月经紊乱、高促性腺激素和低雌激素状态为主要特征, 全球发病率约为 3.7%, 并呈现上升及年轻化趋势^[1-2]。POI 严重损害患者的生育力与心理健康, 其中免疫因素占据重要地位, 约

20% 的 POI 与卵巢自身免疫直接相关, 30% 患者合并其他自身免疫性疾病^[1]。免疫性 POI 的核心病理机制为自身免疫攻击卵巢组织, 其中 T 淋巴细胞亚群失衡尤为重要调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 数量减少及功能衰竭, 导致免疫抑制能力减弱, 促炎因子异常活化和释放, 进而损伤卵

巢功能。Treg 细胞过继转移疗法为 POI 的免疫干预提供新思路,但面临靶向性、安全性等挑战^[3]。

中医药凭借其多靶点、整体调节的优势在 POI 的治疗中发挥重要作用,连方教授基于“调整脏腑,调气和血”的原则创制二至天癸方,该方汲取二至丸、四物汤等经典方义,具补肾填精、养血调气之效^[4]。前期研究表明,该方可改善卵巢颗粒细胞内质网应激^[5],抑制氧化应激损伤^[6],并改善高龄女性体外受精-胚胎移植结局^[7],还可重塑 T 淋巴细胞亚群平衡,增强母胎界面免疫耐受以提高胚胎着床率^[8],但该方对免疫性 POI 的作用机制尚未阐明。本研究拟探讨二至天癸方对 POI 小鼠卵巢结构及功能的改善作用,并重点关注其对卵巢局部 T 淋巴细胞平衡及相关炎症因子的影响,以阐明其部分作用机制,为中医药防治 POI 提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠 50 只,6 周龄,体质量 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006],饲养于山东中医药大学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2023-0031],环境温度 (22±2)℃,相对湿度 (55±5)%,12 h/12 h 明暗交替光照周期,自由摄食饮水。本实验经山东中医药大学附属医院伦理委员会审批通过 (伦理批号 SDSZYAWWE 20250401002)。

1.2 药物与试剂

二至天癸方由女贞子 15 g、墨旱莲 15 g、枸杞子 15 g、菟丝子 15 g、熟地黄 12 g、当归 12 g、白芍 12 g、川芎 9 g、制香附 12 g、甘草 6 g 组成,所用药物为颗粒剂,由山东中医药大学附属医院药物制剂室批量制作,院内批号 (01) FZ032-03。透明带 3 多肽 (zona pellucida 3 peptide, ZP3, NSSSQFQIHGPR, 纯度 97%,货号 NR-13) 购自吉尔生化 (上海) 有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂 (美国 Sigma 公司,批号 F5881、F5506);促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、雌二醇 (estradiol, E₂)、抗缪勒管激素 (anti-müllerian hormone, AMH) ELISA 检测试剂盒 (货号 E-EL-M3015、E-OSEL-M0008、E-EL-M0511) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;干扰素-γ (interferon-gamma, IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)、白细胞介素 (interleukin,

2190

IL)-17A、IL-10、IL-23 转化生长因子-β1 (transforming growth factor-beta 1, TGF-β1) ELISA 检测试剂盒,小鼠 Treg 细胞、辅助性 T 淋巴细胞 1 型 (T helper cell type 1, Th1) 检测试剂盒 (货号 70-EK280/3-48、70-EK282/4-48、70-EK217/4-48、70-EK210/4-48、70-EK223-48、70-EK981-48、KTR201、KTH201) 购自杭州联科生物技术股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 P0010) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司;RIPA 裂解液 (货号 P6730) 购自北京索莱宝科技有限公司;Super-PAGE™免染预制胶 (货号 LK404) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司;T 盒转录因子 (T-box expressed in T cells, T-bet) 抗体、叉头状螺旋转录因子 P3 (forkhead box protein P3, Foxp3) 抗体、内参 GAPDH 抗体 (货号 13700-1-AP、85128-4-RR、60004-1-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

BMJ-Ⅲ型组织包埋机 (常州市中威电子仪器有限公司);P250 FLASH 型数字切片扫描仪 (济南丹吉尔电子有限公司);RM2016 型轮转式切片机、DM IL LED 型荧光倒置显微镜 (上海徕卡仪器有限公司);KZ-5F-3D 型高通量组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司);480 型实时定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司);PEP-mini4-A 型双垂直电泳仪、PTM-mini4 型转印电泳仪 (上海雅酶生物医药科技有限公司);V300 型扫描仪 (日本 Epson 公司);EasyFLO 2 型全光谱流式细胞仪 [普康 (杭州) 健康科技有限公司];蛋白印迹多功能显影仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 POI 模型小鼠建立与分组处理

BALB/c 小鼠适应性饲养 1 周后,连续监测 2 个动情周期,筛选动情周期规律的小鼠纳入本研究,随机分为空白组、模型组和二至天癸方低、中、高剂量组,每组 10 只,除空白组外,其余各组小鼠采用皮下多点注射 ZP3 的方法复制免疫性 POI 小鼠模型^[9-10]。将 10 mg ZP3 多肽溶于 10 mL 双蒸水,按照 1:1 比例加入等量弗氏完全佐剂配制成免疫试剂,另外按照 1:1 比例等量加入弗氏不完全佐剂配制成免疫强化试剂。实验第 0 天,皮下多点注射免疫试剂 0.15 mL (含 ZP3 75 μg)。第 14 天,于相同部位注射免疫强化试剂 0.15 mL (含 ZP3 75 μg)。首次免疫约 5 周后,观察小鼠动情周期,发现连续 2 个动情周期紊乱,视为造模成功,并记录该时间点。造模成功

后, 各组随即开始为期 4 周的药物干预。根据人与小鼠体表面积换算公式, 将二至天癸方的成人剂量换算为等效剂量, 二至天癸方低、中、高剂量组分别灌胃二至天癸方 2.73、5.46、10.92 g/kg, 空白组和模型组灌胃给予等体积生理盐水, 每天 1 次。

2.2 动情周期监测及卵巢指数计算 于每天上午 9:00 对小鼠进行阴道涂片, 苏木素-伊红 (HE) 染色后, 在光学显微镜下观察细胞形态以判定动情周期。末次给药后, 异氟烷麻醉小鼠, 取卵巢组织, 用生理盐水清洗, 滤纸擦干, 称定质量, 计算小鼠卵巢指数, 公式为卵巢指数 = 卵巢质量/体质量×100%。

2.3 HE 染色检测卵巢组织病理学 去除卵巢周围组织, 4% 多聚甲醛固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 水化, HE 染色, 脱水, 封片, 在显微镜下观察卵巢组织病理形态。

2.4 ELISA 法检测血清性激素及炎症因子水平 小鼠麻醉后, 摘眼球取血, 5 200 r/min 离心 15 min, 取上清, 然后严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 分别检测血清性激素 E₂、FSH、AMH 及炎症因子 IFN-γ、TNF-α、IL-17A、IL-10、TGF-β1、IL-23 水平。

2.5 RT-qPCR 法检测卵巢组织 *RORγt*、*Foxp3*、*IL-17A*、*IL-10*、*IFN-γ*、*T-bet* mRNA 表达 提取卵巢组织 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度, 反转录成 cDNA 后进行扩增反应, 以 *GAPDH* 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算各目的基因 mRNA 相对表达, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	序列	产物长度/ bp
<i>Foxp3</i>	正向 5'-AAGATGCCATCCGCCACAAC-3'	86
	反向 5'-TCATCTACGGTCCACACTGCTC-3'	
<i>IL-10</i>	正向 5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGAAATG-3'	133
	反向 5'-GCCGCATCCTGAGGGTCTTC-3'	
<i>T-bet</i>	正向 5'-ATGTACGCATCTGTTGATACGAGTG-3'	95
	反向 5'-TGGTTCGATAGAAGAGGTGAGAAGG-3'	
<i>IFN-γ</i>	正向 5'-GGAAGTGGCAAAAGGATGGTGAC-3'	117
	反向 5'-TGACGCTTATGTTGTTGCTGATGG-3'	
<i>RORγt</i>	正向 5'-CCCAGATGCTGTCAAGTTTGG-3'	98
	反向 5'-TTCCTGTTGCTGCTGCTGTTG-3'	
<i>IL-17A</i>	正向 5'-TGGCGGCTACAGTGAAGGC-3'	115
	反向 5'-AGGGAGTTAAAGACTTTGAGGTTGAC-3'	
<i>GAPDH</i>	正向 5'-GGCAAAATCAACGGCACAGTCAAG-3'	81
	反向 5'-TCGCTCTCGAAGATGGTGATGG-3'	

2.6 流式细胞术检测脾脏及卵巢组织 T 淋巴细胞比例 取新鲜脾脏及卵巢组织, 置于预冷 PBS 中洗涤。卵巢组织转移至含消化液 (4 mg/mL 胶原酶Ⅳ + 0.01 mg/mL DNA 酶, RPMI-1640 配制) 的培养皿中, 37 ℃ 消化 20 min, 期间轻柔吹打数次; 加入等体积含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基终止消化。将消化后的卵巢组织及洗涤后的脾脏组织分别置于 70 μm 无菌筛网上研磨过滤。收集细胞悬液, 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清; PBS 重悬细胞沉淀, 小心叠加于淋巴细胞分离液上, 梯度离心后收集中间白膜层细胞。Treg 细胞检测: 细胞经 FVD、CD45、CD4 表面染色, 固定破膜后进行胞内 Foxp3 染色。Th1 细胞检测: 取适量细胞重悬于完全培养基, 加入刺激剂及阻断剂, 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中刺激 4 h (期间每 30 min 混匀 1 次), 刺激结束后进行 CD3、CD4 表面染色及胞内 IFN-γ 染色。所有染色步骤均严格按照相应试剂盒说明书进行, 最后使用光谱流式细胞仪检测, 流式数据采用 FlowJo 软件进行分析。

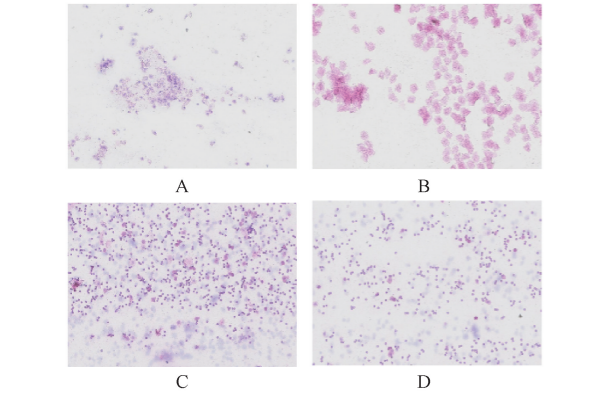
2.7 Western blot 法检测卵巢组织 T-bet、Foxp3 蛋白表达 使用 RIPA 裂解液裂解小鼠卵巢组织, 离心后取上清, 并采用 BCA 法进行蛋白定量。将蛋白样品与上样缓冲液混合, 于 100 ℃ 煮沸 5 min 进行变性。10% PAGE 凝胶电泳分离, 转移至 PVDF 膜上, 封闭, 洗膜后加入一抗 T-bet (1:1 000)、Foxp3 (1:10 000)、GAPDH (1:100 000) 4 ℃ 孵育过夜。次日, 加入相应 HRP 标记的二抗, 室温摇床孵育 1 h, 洗膜后采用 ECL 化学发光液检测蛋白条带, 通过 Image J 软件分析条带灰度值, 计算目标蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 27.0 软件进行处理, 计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据经正态性、方差齐性检验, 符合正态分布和方差齐性时, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法; 符合正态分布但方差不齐时采用韦尔奇方差分析; 不符合正态分布时采用克鲁斯卡尔-沃利斯 H 秩和检验。计数资料以频数 (百分数) 表示, 组间比较采用卡方检验。P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 二至天癸方对 POI 小鼠动情周期及卵巢指数的影响 空白组小鼠动情周期规律, 4~5 d 循环 1 次。与空白组比较, 模型组小鼠动情周期明显紊乱, 长期停滞在动情前期或动情期延长, 或未见完

整动情周期，提示造模成功。与模型组比较，二至天癸方各剂量组小鼠动情周期逐渐恢复，且二至天癸方高剂量组小鼠动情周期接近正常组，见图 1、表 2。

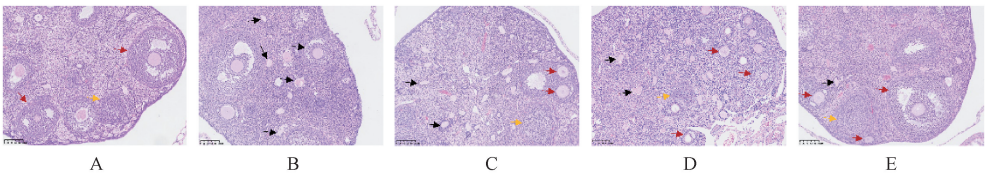


注：A 为动情前期，B 为动情期，C 为动情后期，D 为动情间期。

图 1 小鼠正常动情周期 (HE, ×100)
Fig.1 Normal estrous cycle in mice (HE, ×100)
表 2 各组小鼠动情周期紊乱率比较
Tab.2 Comparison of estrus cycle disorder rate of mice in each group

组别	正常动情周期	紊乱动情周期	紊乱率/%
	数量/只	数量/只	
空白组	10	0	0
模型组	0	10	100 ^{**}
二至天癸方低剂量组	5	5	50 [#]
二至天癸方中剂量组	7	3	30 ^{##}
二至天癸方高剂量组	9	1	10 ^{##}

注：与空白组比较，^{**} $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为二至天癸方低、中、高剂量组。红色箭头指示生长卵泡，黑色箭头指示闭锁卵泡，黄色箭头指示黄体。

图 2 各组小鼠卵巢组织 HE 染色 (×20)
Fig.2 HE staining of ovarian tissue of mice in each group (×20)

表 4 各组小鼠卵巢各级卵泡计数比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$) Tab.4 Comparison of ovarian follicle counts of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)				
组别	原始	窦前	窦状	闭锁
空白组	18.67±4.13	14.67±4.18	6.33±1.63	4.50±2.74
模型组	8.67±2.16 [*]	7.50±1.52 ^{**}	2.83±1.72 ^{**}	12.17±2.48 ^{**}
二至天癸方低剂量组	9.00±1.79	7.83±1.94	3.17±1.33	10.83±1.47 ^{##}
二至天癸方中剂量组	11.83±1.60 [#]	8.83±1.72 [#]	3.83±1.47 [#]	9.67±2.16 ^{##}
二至天癸方高剂量组	13.83±1.72 ^{##}	11.50±1.87 ^{##}	5.00±1.41 ^{##}	8.00±1.41 ^{##}

注：与空白组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

与空白组比较，模型组小鼠卵巢指数降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，二至天癸方各剂量组小鼠卵巢指数升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 3。

表 3 各组小鼠卵巢湿重及指数比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Tab.3 Comparison of wet weight and index of ovaries of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	卵巢湿重/mg	卵巢指数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
空白组	40.72±1.86	1.91±0.11
模型组	24.76±3.40 ^{**}	1.30±0.18 ^{**}
二至天癸方低剂量组	30.28±1.09 ^{##}	1.58±0.09 [#]
二至天癸方中剂量组	35.80±0.99 ^{##}	1.80±0.07 ^{##}
二至天癸方高剂量组	37.88±0.59 ^{##}	1.87±0.08 ^{##}

注：与空白组比较，^{**} $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

3.2 二至天癸方对 POI 小鼠卵巢结构及卵泡计数的影响 空白组小鼠卵巢形态正常，结构清晰，血运丰富，各级卵泡发育正常；模型组小鼠卵巢皮髓质结构异常，颗粒细胞层数减少，各级卵泡数量减少，伴随卵泡闭锁增多，证实模型建立成功；二至天癸方干预后，小鼠卵巢组织学结构改善，血运改善，卵泡发育完整，闭锁减少，见图 2。如表 4 所示，与空白组比较，模型组原始、窦前、窦状卵泡数减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)，闭锁卵泡数增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，二至天癸方中、高剂量组原始、窦前、窦状卵泡数增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)，闭锁卵泡数减少 ($P<0.01$)。

3.3 二至天癸方对 POI 小鼠血清 E₂、AMH、FSH 水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠血清 E₂、AMH 水平降低 ($P<0.01$),FSH 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,二至天癸方低剂量组小鼠

血清 E₂ 水平升高 ($P<0.01$),FSH 水平降低 ($P<0.01$),二至天癸方中、高剂量组小鼠血清 E₂、AMH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),FSH 水平降低 ($P<0.01$),见表 5。

表 5 各组小鼠血清 E₂、FSH、AMH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Comparison of serum E₂, FSH and AMH levels in mice of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	E ₂ /(pmol·L ⁻¹)	FSH/(mIU·mL ⁻¹)	AMH/(pg·mL ⁻¹)
正常组	83.38±5.65	14.14±0.51	8.42±1.11
模型组	42.68±6.94**	34.71±4.46**	2.56±0.18**
二至天癸方低剂量组	60.88±3.98##	28.37±3.80##	3.29±0.33
二至天癸方中剂量组	74.31±4.47##	21.19±0.99##	4.26±0.14 [#]
二至天癸方高剂量组	82.33±1.37##	19.60±0.68##	4.97±0.49##

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.4 二至天癸方对 POI 小鼠血清炎症因子水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠血清 TGF-β1、IL-10 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),TNF-α、IFN-γ 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,二至

天癸方中剂量组小鼠血清 TNF-α、IFN-γ 水平降低 ($P<0.01$),高剂量组小鼠血清 TGF-β1、IL-10 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),TNF-α、IFN-γ 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 6。

表 6 各组小鼠血清 TGF-β1、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IL-17A、IL-23 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Comparison of serum levels of TGF-β1, IL-10, TNF-α, IFN-γ, IL-17A and IL-23 in mice of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	TGF-β1	IL-10	TNF-α	IFN-γ	IL-17A	IL-23
空白组	70.54±6.51	30.23±5.27	31.81±6.37	85.28±6.58	5.31±1.59	0.71±0.17
模型组	60.37±4.72*	19.21±1.27**	51.45±5.73**	132.83±3.09**	4.68±1.21	0.80±0.14
二至天癸方低剂量组	63.07±11.31	22.91±3.63	43.47±3.48	120.89±5.98	4.68±1.21	0.71±0.22
二至天癸方中剂量组	66.77±6.72	23.88±2.04	36.48±2.88##	110.61±5.77##	4.37±0.73	0.88±0.09
二至天癸方高剂量组	68.94±3.71 [#]	27.17±1.19##	39.60±4.13##	93.42±2.77##	5.00±1.03	0.84±0.08

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.5 二至天癸方对 POI 小鼠卵巢组织炎症因子转录水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠卵巢组织 *Foxp3*、*IL-10* mRNA 表达降低 ($P<0.01$),*T-bet*、*IFN-γ*、*RORγt* mRNA 表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,二至天癸方低剂量组小鼠卵巢组织 *IFN-γ* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),中剂

量组小鼠卵巢组织 *T-bet*、*IFN-γ* mRNA 降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),*IL-10* mRNA 表达升高 ($P<0.05$),高剂量组小鼠卵巢组织 *T-bet*、*IFN-γ* mRNA 表达降低 ($P<0.01$),*Foxp3*、*IL-10* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 7。

表 7 各组小鼠卵巢组织 *Foxp3*、*IL-10*、*T-bet*、*IFN-γ*、*RORγt*、*IL-17A* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

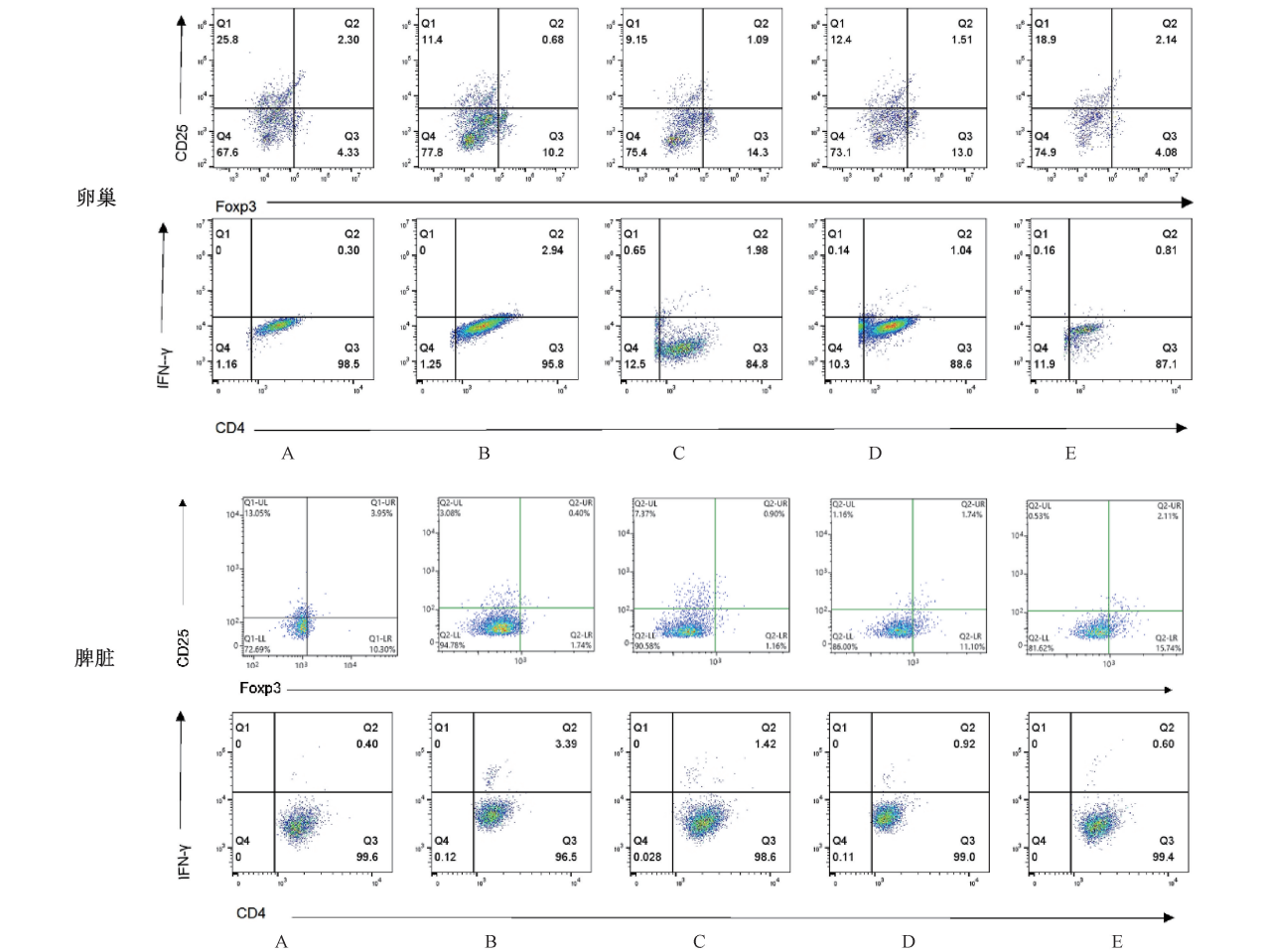
Tab. 7 Comparison of mRNA expressions of *Foxp3*, *IL-10*, *T-bet*, *IFN-γ*, *RORγt* and *IL-17A* in ovarian tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	<i>Foxp3</i>	<i>IL-10</i>	<i>T-bet</i>	<i>IFN-γ</i>	<i>RORγt</i>	<i>IL-17A</i>
空白组	1.03±0.30	1.01±0.14	1.02±0.25	1.02±0.24	1.03±0.29	1.01±0.17
模型组	0.38±0.12**	0.51±0.06**	5.33±1.22**	8.99±2.19**	1.68±0.12**	1.75±0.90
二至天癸方低剂量组	0.43±0.06	0.61±0.05	4.11±0.57	3.68±1.46##	1.60±0.05	1.52±0.65
二至天癸方中剂量组	0.53±0.16	0.77±0.02 [#]	2.65±1.83 [#]	3.09±1.75##	1.52±0.21	1.30±0.14
二至天癸方高剂量组	0.91±0.27##	0.81±0.24 [#]	1.92±1.05##	1.55±0.57##	1.39±0.09	1.29±0.36

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.6 二至天癸方对 POI 小鼠脾脏及卵巢组织 Th1、Treg 细胞比例的影响 与空白组比较,模型组小鼠脾脏及卵巢组织 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞活化数量减少 ($P<0.01$),CD4⁺IFN-γ⁺Th1 细胞活化数量增加 ($P<0.01$),证实了 ZP3 诱导的 POI 小鼠模型

处于致炎状态,卵巢内存在炎症细胞浸润;与模型组比较,二至天癸方各剂量组小鼠脾脏和卵巢组织 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞活化数量增加 ($P<0.01$),CD4⁺IFN-γ⁺Th1 细胞活化数量减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 3、表 8。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为二至天癸方低、中、高剂量组。
图 3 各组小鼠卵巢组织和脾脏组织 Treg、Th1 细胞比例流式图

Fig. 3 Proportional flow chart of Treg and Th1 cells in ovarian tissue and spleen tissue of mice in each group

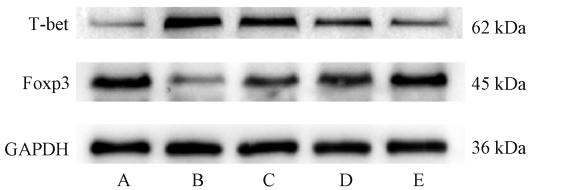
表 8 各组小鼠卵巢组织 CD4⁺T 淋巴细胞亚群比例比较（%， $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

Tab. 8 Comparison of CD4⁺T lymphocyte subsets in ovarian tissue of mice in each group（%， $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

组别	卵巢组织		脾脏组织	
	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg/CD4 ⁺ T	CD4 ⁺ IFNγ ⁺ Th1/CD4 ⁺ T	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg/CD4 ⁺ T	CD4 ⁺ IFNγ ⁺ Th1/CD4 ⁺ T
空白组	2.26±0.11	0.38±0.08	3.21±0.64	0.35±0.04
模型组	0.75±0.09**	2.53±0.36**	0.14±0.10**	3.40±0.26**
二至天癸方低剂量组	1.35±0.22##	1.86±0.12 [#]	0.60±0.18	1.74±0.11##
二至天癸方中剂量组	1.78±0.10##	1.08±0.10##	1.13±0.27 [#]	0.94±0.12##
二至天癸方高剂量组	2.04±0.11##	0.79±0.20##	1.87±0.21##	0.49±0.10##

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

3.7 二至天癸方对 POI 小鼠卵巢组织 T-bet、Foxp3 蛋白表达的影响 与空白组比较，模型组小鼠卵巢组织 T-bet 蛋白表达升高（ $P<0.01$ ），Foxp3 蛋白表达降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，二至天癸方各剂量组小鼠卵巢组织 T-bet 蛋白表达降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），二至天癸方中、高剂量组小鼠卵巢组织 Foxp3 蛋白表达升高（ $P<0.01$ ），见图 4、表 9。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为二至天癸方低、中、高剂量组。
图 4 各组小鼠卵巢组织 T-bet、Foxp3 蛋白条带图
Fig. 4 Protein bands of T-bet and Foxp3 in ovarian tissues of mice in each group

表 9 各组小鼠卵巢组织 T-bet、Foxp3 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 9 Comparison of T-bet and Foxp3 protein expressions in ovarian tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	T-bet/GAPDH	Foxp3/GAPDH
空白组	1.00±0.15	1.00±0.04
模型组	3.68±0.17**	0.61±0.05**
二至天癸方低剂量组	3.10±0.13 [#]	0.65±0.03
二至天癸方中剂量组	2.49±0.57 ^{##}	0.83±0.03 ^{##}
二至天癸方高剂量组	1.52±0.23 ^{##}	0.92±0.02 ^{##}

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

POI 与自身免疫紊乱密切相关，其核心在于 T 淋巴细胞亚群失衡，即 Treg 细胞功能衰竭与效应 T 细胞异常活化^[11]。在自身免疫性 POI 模型小鼠中，已证实存在脾脏 Treg 细胞比例下降^[12]。此外，临床研究证实 POI 患者存在外周血 Treg 数量减少和效应 T 细胞异常活化，其中 CD8⁺T 细胞浸润与卵巢萎缩程度呈正相关^[13-14]。最新单细胞研究提示，CD8⁺T 细胞和单核细胞显著下调与 AMH 水平呈正相关，或可作为 POI 诊断的潜在免疫标志物^[15]。

中医学将 POI 归属于“血枯”“经水早断”范畴，其核心病机在于肾精亏，致天癸化源匮乏，冲任血海空虚，胞宫失养，故未老经断^[16]。此过程常累及肝脾，致气血失调、冲任失调，形成本虚标实之候^[17]。二至天癸方以“补肾填精为主，养血疏肝为辅”为治则，方中菟丝子温肾填精，女贞子滋水涵木，二者相须为用，共为君药，成阴阳互济之枢，共调肝肾阴阳之本^[18]；佐以墨旱莲凉血养阴，枸杞子填精养血，协同四物汤调和冲任气血，更入香附疏肝理气，全方共奏补肾调肝、养血填精调和冲任之效。本研究采用 ZP3 皮下注射诱导 POI 模型，模型小鼠出现动情周期紊乱，体质量及卵巢指数下降，生殖内分泌紊乱，与既往报道一致^[19]。经二至天癸方干预后，卵巢组织病理学改善，生殖内分泌指标及动情周期亦趋于正常。

卵巢功能的正常维系高度依赖于其局部免疫微环境的精密稳态^[20]。在 POI 病理过程中，在 POI 病理过程中，过度活化的 Th1 细胞通过分泌 IFN- γ 和 TNF- α ，介导卵巢损伤与雌二醇合成障碍^[21-22]。Treg 细胞通 TIGIT 等分子抑制树突状细胞分泌 IL-12^[23]，并分泌 IL-10 诱导免疫耐受分子表达^[24]，从而遏制 Th1 细胞的活化与扩增^[25]。因此，POI

中 Treg 细胞数量减少或功能衰竭，将直接导致免疫稳态失衡，加剧卵巢免疫损伤。动物实验证实，过继性移植 Treg 细胞可显著改善 POI 卵巢功能，表现为成熟卵泡数量增加，颗粒细胞凋亡减少，E₂ 水平升高及卵巢淋巴细胞浸润减轻^[26]。因此，靶向 Treg 以恢复 Treg/Th1 平衡，可为 POI 的免疫干预提供转化方向。本研究发现，POI 模型小鼠外周血中由 Th1 等细胞产生的促炎因子 TNF- α 、IFN- γ 水平升高，而主要由 Treg 细胞产生的抗炎因子 IL-10、TGF- β 水平则降低。脾脏及卵巢组织中 Foxp3⁺ Treg 细胞比例降低，而 IFN- γ ⁺ Th1 细胞比例升高；卵巢组织中促炎转录因子 *T-bet* 及其调控的效应因子 *IFN- γ* mRNA 表达升高，与 Th17 细胞分化相关的转录因子 *ROR γ t* mRNA 表达也升高，而 Treg 的特征性转录因子 *Foxp3* 及其功能介质 *IL-10* mRNA 表达降低；卵巢组织中 Foxp3 蛋白表达降低，而 T-bet 蛋白表达升高。经二至天癸方干预后，小鼠脾脏及卵巢组织 Treg 细胞比例增加，伴随其分泌的 IL-10 和 TGF- β 水平升高；而 Th1 细胞比例降低，其分泌的 IFN- γ 和 TNF- α 水平也同步降低，说明二至天癸方可能通过促进 Treg 细胞增殖及功能，抑制 Th1 细胞的异常活化，最终重塑卵巢免疫微环境稳态。

综上所述，本研究发现二至天癸方可有效上调 POI 模型小鼠 Treg 细胞比例及功能，抑制 Th1 细胞极化，通过重塑 Treg/Th1 免疫平衡改善卵巢炎症微环境与功能。

参考文献：

[1] Nash Z, Davies M. Premature ovarian insufficiency[J]. *BMJ*, 2024, 384: e077469.

[2] Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, *et al.* The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis [J]. *Climacteric*, 2019, 22(4): 403-411.

[3] Cacciottola L, Camboni A, Dolmans M M, *et al.* Immune system regulation of physiological and pathological aspects of the ovarian follicle pool throughout the female reproductive lifespan[J]. *Hum Reprod*, 2025, 40(1): 12-22.

[4] 李 然, 郭 颖. 基于网络药理学及分子对接探讨二至天癸方治疗女性不孕症的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(1): 126-133.

[5] 柳晓亮, 刘丹琪, 连 方, 等. 二至天癸方改善卵巢早衰大鼠卵巢功能的机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(11): 2022-2028.

[6] 苏 原. 基于 SIRT1/STAT3 通路探讨二至天癸方对肾虚型卵巢储备功能减退患者卵巢颗粒细胞氧化应激的影响[D].

济南：山东中医药大学，2024.

[7] 贾志诚, 李永谦, 王培璇, 等. 二至天癸方改善高龄女性体外受精-胚胎移植结局的 Meta 分析[J]. 中国性科学, 2024, 33(5): 113-118.

[8] 王艺绚, 庞聪慧, 吴海萃, 等. 基于 sPD-1 和 Th17/Treg 相关细胞因子探讨二至天癸方辨治肾虚型反复种植失败的疗效和机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 139-145.

[9] 于明玥, 汤 玲, 孙晓卉, 等. 基于中西医临床病证特点的卵巢储备功能减退动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(9): 240-248.

[10] 何瑞芬, 杨永秀, 梁晓磊. 卵巢储备功能减退动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 254-259.

[11] Savukoski S M, Silvén H, Pesonen P, *et al.* Excess of severe autoimmune diseases in women with premature ovarian insufficiency: a population-based study[J]. *Hum Reprod*, 2024, 39(11): 2601-2607.

[12] 杨雨涛, 李欣然, 谢嘉欣, 等. 微 RNA-21 和 Peli1 在自身免疫性早发性卵巢功能不全小鼠体内的表达及意义[J]. 海军军医大学学报, 2022, 43(5): 575-580.

[13] Jiao X, Zhang X, Li N, *et al.* Treg deficiency-mediated Th1 response causes human premature ovarian insufficiency through apoptosis and steroidogenesis dysfunction of granulosa cells[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(6): e448.

[14] Zhou G, Gu Y, Zhang M, *et al.* Identification of genetically engineered strategies to manipulate nano-platforms presenting immunotherapeutic ligands for alleviating primary ovarian insufficiency progression[J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 246.

[15] Yu Z, Zhang X, Nong Y, *et al.* Analysis of post-transcriptional regulatory signatures and immune cell subsets in premature ovarian insufficiency based on full-length transcriptome[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 5533.

[16] 张 萍, 徐燕文, 周紫嫣, 等. 中药调控 PI3K/Akt 信号通路治疗卵巢储备功能减退研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(23): 266-275.

[17] 张家玮, 卢 威, 赵 敏, 等. 从“中年振基”思想探讨早发性卵巢功能不全的防治策略[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(14): 2730-2733.

[18] Jia Z, Li Y, Wang P, *et al.* ErZhiTianGui Decoction alleviates age-related ovarian aging by regulating mitochondrial homeostasis and inhibiting ferroptosis[J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17(1): 12.

[19] 王海丹, 郭红玉, 马蔚蓉, 等. 自身免疫型卵巢早衰模型的研究[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 563-569.

[20] Grosbois J, Devos M, Demeestere I. Implications of nonphysiological ovarian primordial follicle activation for fertility preservation[J]. *Endocr Rev*, 2020, 41(6): bnaa020.

[21] Chang H M, Pan H H, Cheng J C, *et al.* Growth differentiation factor 8 suppresses cell proliferation by up-regulating CTGF expression in human granulosa cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 422: 9-17.

[22] Yang Y F, Cheng S Y, Wang Y L, *et al.* Accumulated inflammation and fibrosis participate in atrazine induced ovary toxicity *in vivo*[J]. *Environ Pollut*, 2024, 360: 124672.

[23] Joller N, Lozano E, Burkett P R, *et al.* Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses[J]. *Immunity*, 2014, 40(4): 569-581.

[24] Lucca L E, Axisa P P, Singer E R, *et al.* TIGIT signaling restores suppressor function of Th1 Tregs[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(3): e124427.

[25] Lucca L E, Axisa P P, Singer E R, *et al.* TIGIT signaling restores suppressor function of Th1 Tregs[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(3): e124427.

[26] 卓爱萍, 王 袁, 杨雨涛, 等. 过继转移过表达 Pellino-1 的调节性 T 细胞对自身免疫性早发性卵巢功能不全小鼠卵巢功能的修复作用[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(4): 409-417.