

引用:杨永琴,申剑,王帅哲,马睿玲,胡杨,杨燕.补天大造丸干预早期卵巢功能不全大鼠免疫功能的作用机制[J].中医药导报,2025,31(6):49-54,66.

补天大造丸干预早期卵巢功能不全大鼠免疫功能的作用机制^{*}

杨永琴,申 剑,王帅哲,马睿玲,胡 杨,杨 燕
(甘肃中医药大学,甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的:探究补天大造丸对早期卵巢功能不全大鼠免疫功能及细胞因子的影响。方法:60只大鼠随机取10只为白色对照组,其余50只大鼠均通过腹腔注射环磷酰胺(75 mg/kg)构建卵巢功能减退模型。将50只造模成功的大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组、补天大造丸高剂量组、补天大造丸中剂量组、补天大造丸低剂量组,每组10只。补天大造丸高、中、低剂量组分别给予 23.580 、 11.790 、 5.895 g/kg 的补天大造丸灌胃,阳性对照组给予戊酸雌二醇片(补佳乐)灌胃,剂量为 $0.090 \text{ mg} / (\text{kg} \cdot \text{d})$ 。模型对照组与白色对照组则灌胃蒸馏水。所有灌胃操作均从造模当日开始,1次/d,连续28 d。模型对照组在造模后2周处死,其余各组在给药结束后,于动情期间处死。HE染色观察大鼠卵巢、子宫、组织变化,检测胸腺指数、脾脏指数、子宫指数及卵巢指数,血清性激素LH、FSH、E₂、AMH及INH-B水平,血清炎症因子IL-2、IL-10及TGF-β水平。结果:相较于白色对照组,模型对照组大鼠卵巢组织存在显著萎缩现象,各级卵泡数量减少,卵泡结构遭到破坏,黄体不仅数量稀少而且发育状况不佳。与模型对照组比较,药物干预组呈现出明显的改善态势,窦卵泡、原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡及成熟卵泡,卵细胞、卵丘、透明带、放射冠结构清晰可见,并且其卵泡外围环绕的颗粒细胞层数多于模型对照组,排列较为规则,黄体数量相比模型对照组更多,发育情况尚可。另外,与模型对照组比较,各给药组大鼠子宫内膜层出现明显增厚现象,腺腔增大,同时肌层也增厚,且排列紧密。与模型对照组比较,补天大造丸高、中、低剂量组大鼠胸腺指数、脾脏指数均下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型对照组比较,补天大造丸低、中、高剂量组子宫指数与卵巢指数均升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型对照组比较,补天大造丸高、中剂量组大鼠血清中LH、FSH水平下降($P < 0.01$),补天大造丸低剂量组大鼠血清中LH下降($P < 0.05$),FSH水平无明显变化($P > 0.05$);与模型对照组比较,补天大造丸高、中剂量组大鼠血清中E₂、AMH、INH-B水平上升($P < 0.01$),补天大造丸低剂量组E₂、AMH水平上升($P < 0.05$),INH-B水平无明显变化($P > 0.05$);与模型对照组比较,阳性对照组与补天大造丸高、中、低剂量组大鼠血清IL-2、TGF-β水平下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),IL-10表达上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:补天大造丸可调节免疫性早发性卵巢功能不全小鼠的血清生殖激素与细胞因子水平,减轻卵巢炎症反应,有效调控免疫紊乱状态,显著提升卵巢储备能力,发挥保护作用,从而为卵巢构建起一道防护屏障。

[关键词] 早发性卵巢功能不全;补天大造丸;TGF-β;IL-2;IL-10;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)06-0049-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.009

Effects of Butian Dazao Pill (补天大造丸) on Immune Function and Cytokines IL-2, IL-10 and TGF-β in Rats with Premature Ovarian Insufficiency

YANG Yongqin, SHEN Jian, WANG Shuaizhe, MA Ruiling, HU Yang, YANG Yan

(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou Gansu 730000, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of Butian Dazao pill on the immune function and cytokines in rats with premature ovarian insufficiency. Methods: A total of 10 rats were randomly selected as blank group from 60 rats. Except for the blank group, the remaining rats were given a single intraperitoneal injection

*基金项目:甘肃省中医药管理局科研课题项目(GZK-2018-10);敦煌医学与转化教育部重点实验室开放基金项目(DHYX17-03);甘肃省高等学校创新基金科研课题(2022B-120);甘肃中医药大学引进人才项目(2018YJRC-05)

通信作者:杨永琴,女,副教授,研究方向为中西医结合治疗妇科生殖内分泌疾病

of cyclophosphamide at a dose of 75 mg/kg to construct a model of ovarian hypofunction. After the successful replication of the model, 50 successfully modeled rats were randomly divided into model control group, positive control group, high dose group of Butian Dazao pill (high dose group), medium dose group of Butian Dazao pill (medium dose group), and low dose group of Butian Dazao pill (low dose group), with 10 rats in each group. The high, medium and low dose groups were given Butian Dazao pill at doses of 23.580, 11.790, and 5.895 g/kg respectively. The positive control group was given Progynova at a dose of 0.090 mg/(kg·d) for intragastric administration. The model control group and the blank group were given distilled water for intragastric administration. The intragastric administration was started on the day of model construction, once a day for 28 consecutive days. The rats in the model control group were executed during the diestrus stage 2 weeks after model construction, and the rats in the other groups were executed during the diestrus stage after the end of drug administration. The changes in the ovaries, uteri, and tissues were observed by HE staining. The thymus index, spleen index, uterine index, and ovarian index were detected. The expression levels of serum LH, FSH, E₂, AMH, INH-B, IL-2, IL-10 and TGF-β were measured. Results: HE staining showed that, compared with the blank group, the ovarian tissues of the rats in the model control group were significantly atrophied under naked-eye observation, and that the number of follicles at all levels was reduced. The follicular structure was damaged in model group, and the corpora lutea were few and poorly developed. Compared with the model control group, the drug intervention groups showed improvements. Sinus follicles, primordial follicles, primary follicles, secondary follicles, and mature follicles could be seen in positive control group, high dose group, medium dose group, and low dose group. The structures of oocytes, cumulus oophorus, zona pellucida, and corona radiata could be seen. The positive control group, high dose group, medium dose group, and low dose group showed more layers of granulosa cells surrounding the follicles than model control group, and they were arranged regularly. The positive control group, high dose group, medium dose group, and low dose group showed more corpora lutea than model control group, and their development was acceptable. Compared with the model control group, the endometrial layer was significantly thickened in positive control group, high dose group, medium dose group, and low dose group showed more. The glandular cavity was enlarged, and the muscular layer was thickened and arranged densely in positive control group, high dose group, medium dose group, and low dose group showed more. Compared with the model control group, the thymus index and spleen index decreased in high, medium and low dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model control group, the uterine index and ovarian index increased in high, medium and low dose groups ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the model control group, the levels of LH and FSH in the serum decreased in high and medium dose group ($P<0.01$). The level of LH in the serum decreased in low dose group ($P<0.05$), while the level of FSH showed no significant change in low dose group ($P>0.05$). Compared with the model control group, the levels of E₂, AMH, and INH-B in the serum increased in the high and medium dose groups ($P<0.01$). The levels of E₂ and AMH in the serum increased in low dose group ($P<0.05$), while the level of INH-B showed no significant change in low dose group ($P>0.05$). Compared with the model control group, the level of serum IL-2 and TGF-β decreased in Progynova group, high dose group, medium dose group and low dose group ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the expression of IL-10 increased in Progynova group, high dose group and medium dose group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Conclusion: Butian Dazao pill can improve the levels of serum reproductive hormones and cytokines in mice with immune premature ovarian insufficiency, reduce the ovarian inflammatory reaction, regulate the immune disorder, improve the ovarian reserve capacity, and play a protective role in the ovaries.

[Keywords] premature ovarian insufficiency; Butian Dazao pill; TGF-β; IL-2; IL-10; rat

女性在40岁前出现卵巢内卵泡提前耗竭,月经稀发或闭经>4个月,间隔4周的2次血清卵泡刺激素(FSH)水平均>25 IU/L,称为早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)。POI的更严重阶段为卵巢早衰,表现为40岁以前出现闭经、FSH>40 IU/L、雌激素水平降低,并伴有不同程度的围绝经期症状^[1-2]。POI患者自发受孕的机会非常有限,受孕可能性为

4%~8%^[3]。目前临床尚无疗效明确的治疗方案^[4]。激素补充疗法为治疗POI最常用的方法。该方法虽可缓解多种围绝经期症状,但无法从根本上恢复卵巢功能和生育能力,且具有诱发静脉血栓及癌症等风险^[5]。

近年来,中医药针对POI干预机制的研究已获得了一些的成果与进展。补肾中药能促进卵泡发育,使卵巢质量指数

增加,卵巢内雌、孕激素受体增加,并能促进子宫内膜生长^[9],从而改善卵泡功能。中医学认为本病以肾虚为本。肾藏精,主生殖,为先天之本。后天失养、房劳多产、手术、放疗化疗等致肾虚,精血无从化源,则表现为月经失调、腰酸、乏力、性欲降低等临床症状。古人提到“经水出诸肾”^[1],《黄帝内经》直言“肾气盛,天癸至,月经方能以时下”^[1]。《黄帝内经》记载“肾者主蛰,封藏之本,精之处也”。《傅青主妇科》认为“经本于肾”“经水出诸肾”,均说明女子的生长、发育及生殖与肾息息相关。肾精亏虚,致使精血匮乏,便无法为卵泡的发育、成熟提供滋养。故而,肾虚乃是本病的根本病机所在。柴松岩教授认为,肾虚是卵巢早衰病理的主要矛盾,故补肾填精是其辨治卵巢早衰的基本用药法则^[9]。补天大造丸出自《医学心悟》卷三,可补五脏虚损,主治虚劳,临床用来治疗早期卵巢功能低下有较好的效果。

在大多数POI病例当中,病因尚未确定,但现已发现遗传因素、感染、环境因素、医源性因素及自身免疫因素等潜在病因均可能诱发POI^[10]。自身免疫功能失调可能攻击卵巢,导致卵巢功能损伤^[11]。多种免疫抗原被认为是由POI患者体内抗体,如抗卵母细胞抗体、抗透明带抗体等所介导的卵巢自身免疫性损伤的可能靶点^[12]。

本研究旨在探讨补天大造丸对早期卵巢功能不全大鼠免疫功能的影响,为中医药治疗早期卵巢功能不全提供新的理论依据和治疗策略。

1 材 料

1.1 药物 补天大造丸:人参20 g,黄芪(蜜炙)30 g,白术30 g,当归(酒蒸)15 g,酸枣仁(去壳,炒)15 g,远志15 g(去心,甘草水泡,炒),白芍15 g(酒炒),山药15 g(乳蒸),茯苓15 g(乳蒸),枸杞子40 g(酒蒸),熟地黄40 g(九蒸九晒),紫河车3.5 g,鹿角7 g(熬膏),龟甲7 g(与鹿角同熬膏)。以龟甲胶、鹿胶和药,炼蜜为丸。将上述丸药依据人与大鼠体表面积法换算一日剂量为23.580、11.790、5.895 g/kg,装瓶冷藏备用,应用时以蒸馏水调配。

紫河车购自湖南省南国药都中药饮片有限公司,其余饮片购自甘肃中医药大学附属医院,均经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师鉴定为正品。注射用环磷酰胺(百特国际有限公司,批号:HJ20160467);戊酸雌二醇片(商品名:补佳乐,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号:693A)。

1.2 主要试剂 促卵泡激素(follicle-stimulating hormone,FSH)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:E20230623-66523B)、雌二醇(estriadiol,E₂)ELISA试剂盒(批号:E20230618-88523B)、黄体生成素(luteinizing hormone,LH)ELISA试剂盒(批号:E20230608-52126B)、抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone,AMH)ELISA试剂盒(批号:E20230621-87425B)、抑制素B(inhibin B,INH-B)ELISA试剂盒(批号:E202306003-88745B)、白细胞介素-2(interleukin-2,IL-2)ELISA试剂盒(批号:E20230604-99851B)、白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)ELISA试剂盒(批号:E20230606-77523B)及转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)ELISA试剂盒(批号:E20230603-11236B)均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 高通量冷冻组织研磨仪(宁波新芝生物科技

股份有限公司,型号:Scientz-48L);全自动酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司,型号:SpectraMax i3x];电泳转印系统(美国伯乐公司,型号:041BR111152);凝胶成像分析系统(广州博鹭腾生物科技有限公司,型号:Gel View 6000Plus)。

1.4 动物 SPF级12周龄健康雌性SD大鼠60只,体质量220~240 g,购自甘肃中医药大学,动物生产许可证号:SYXK(甘)2004-0006。动物实验经甘肃中医药大学伦理委员会审批(编号:SY2023-968)。通过阴道脱落细胞涂片筛查,确保所有大鼠的动情周期均处于正常状态。实验室温度20~25 ℃,每日光照时长14 h,相对湿度45%~55%,正常饮食,适应性饲养7 d后开始实验。

2 方 法

2.1 分组、造模与给药

2.1.1 分组 60只大鼠随机取10只为空白对照组,余下50只大鼠进行卵巢功能减退模型造模。

2.1.2 造模 按照75 mg/kg的剂量给予环磷酰胺(使用生理盐水将其配制成1 mL药液),以单次腹腔注射的方式进行给药。给药完成后,从造模第2天开始每日固定时间对造模大鼠行阴道脱落细胞观察,当大鼠呈现出精神萎靡、喜好蜷卧、活动量少、出现脱毛现象、易于被激惹等外在表现时,且动情周期发生紊乱或无发情周期,则说明造模成功^[10]。

2.1.3 给药 造模成功的50只大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组、补天大造丸高剂量组、补天大造丸中剂量组及补天大造丸低剂量组,每组10只。补天大造丸高、中、低剂量组依据《中药药理研究方法学》的标准,分别按照23.580、11.790、5.895 g/kg的剂量给予补天大造丸;阳性对照组参照《中药药理研究方法学》,将补佳乐与生理盐水配制成混悬液,按照0.090 mg/(kg·d)的剂量灌胃。模型对照组与空白对照组则灌胃蒸馏水(10 mL/kg)。从造模当日起,每天灌胃1次,持续28 d。模型对照组在造模后2周,给药各组在给药结束之后,统一于动情间期处死。

2.2 标本采集 在末次给药操作完成之后,大鼠整夜禁食不禁水。次日,测量大鼠的体质量。腹主动脉采血,同时摘取大鼠的双侧卵巢。将所采集的血液样本在4 ℃条件下静置1 h,3 000 r/min(离心半径为16 cm)离心10 min,分离血清置于EP管中,-20 ℃冰箱保存备用。随后,将卵巢完整地游离出来,迅速放置在4%多聚甲醛(温度4 ℃)溶液中固定24 h。制作切片时,选取卵巢的最大平面作为待检测面,按照常规的石蜡包埋程序操作,制成4 μm厚切片,用于后续的免疫组化检测分析。

2.3 检测指标

2.3.1 一般情况 实验期间观察大鼠摄食、饮水、毛发、活动、精神、体质量变化等基础情况。

2.3.2 动情周期检测 每日用生理盐水冲洗大鼠阴道,采集阴道脱落细胞,涂片并巴氏染色,镜下观察脱落细胞的形态,判断动情周期变化。动情周期判断标准:动情间期,大量白细胞,持续45~47 h;动情前期,核上皮细胞和白细胞为主,持续12~15 h;动情期,大量扁平无核上皮细胞分布,持续25~27 h;动情后期,有核上皮细胞、角质化无核上皮细胞及白细胞均匀存在,持续6~8 h^[12]。

2.3.3 血清E₂、FSH、AMH、IL-2、IL-10、TGF-β水平 ELISA法

检测血清E₂、FSH、AMH、IL-2、IL-10、TGF-β水平,严格遵循ELISA试剂盒所提供的说明步骤开展操作。在特定的450 nm波长条件下,测定大鼠血清中E₂、FSH、AMH、IL-2、IL-10、TGF-β的吸光度值(即OD值)。依据所测定的数据绘制标准曲线图,进而计算得出E₂、FSH、AMH、IL-2、IL-10、TGF-β的水平。

2.3.4 卵巢与子宫组织病理变化 摘取并完整剥离各实验组大鼠的卵巢和子宫组织,称取其质量,依据特定公式(1)计算脏器指数。具体公式(1)为:脏器指数=脏器质量(g)÷体质量(g)×100%。随后,将获取的子宫和卵巢组织置于4%多聚甲醛溶液中,使其充分固定,以保持组织的形态与结构完整性。固定完成后,采用苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin,HE)染色技术对组织切片进行染色处理,通过显微镜对染色后的卵巢、子宫切片进行细致观察,重点关注其形态结构特征,包括细胞的形态、排列方式、组织的分层结构以及是否存在病理改变等方面的情况,从而为深入探究卵巢、子宫在实验条件下的生理病理变化提供直观且可靠的形态学依据。各级卵泡的分类参照文献[13]的分类方法。

2.3.5 胸腺指数及脾脏指数的检测 摘取并完整剥离各实验组大鼠的胸腺和脾脏组织,称取其质量,依据公式(1)计算脏器指数。

2.4 统计学方法 采用GraphPad Prism软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布的数据采用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示。计量资料多组间比较用单因素方差分析;组间两两比较若符合正态分布且方差齐,采用SNK检验;若符合正态分布但方差不齐,则采用Dunnett's T3检验或独立样本t检验;若不符合正态分布,则采用Kruskal-Wallis H检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 各组大鼠卵巢组织及子宫形态变化

3.1.1 各组大鼠卵巢组织变化 空白对照组各级生长卵泡数量相对较多,闭锁卵泡数量则较少,并且生长卵泡的颗粒细胞呈现出规则的形态。模型对照组大鼠卵巢明显萎缩,各级卵泡数量稀少,卵泡结构遭到破坏,黄体不仅数量少,而且形态很不规则。与模型对照组比较,各给药组大鼠可见各级窦卵泡、原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡及成熟卵泡,卵细胞、卵丘、透明带、放射冠等结构清晰;同时,其卵泡外围环绕的颗粒细胞层数多于模型对照组,颗粒细胞形态规整且充盈饱满,黄体数目较模型对照组增多,形态规则,与空白对照组相似。(见图1)

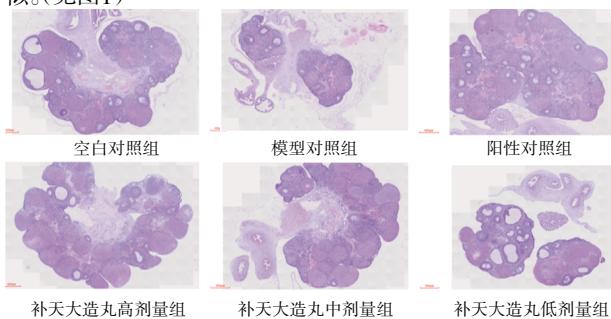


图1 各组大鼠卵巢组织病理学改变 (HE, ×20)

3.1.2 各组大鼠子宫形态变化 空白对照组大鼠子宫内膜较厚,腺腔明显,全肌层明显增厚,细胞饱满,排列致密;模型对照组大鼠子宫内膜薄,内膜上皮细胞和腺体上皮细胞薄,腺腔小,全层肌松弛。模型对照组大鼠子宫内膜薄,内膜上皮细胞和腺体上皮细胞薄,腺腔小,全层肌松弛。阳性对照组大鼠子宫内膜层较模型对照组增厚,腺泡扩大,全层肌完整细胞多有密集趋势。补天大造丸各剂量组大鼠子宫内膜层较模型对照组增厚,腺泡扩大,全层肌完整细胞多有密集趋势。(见图2)

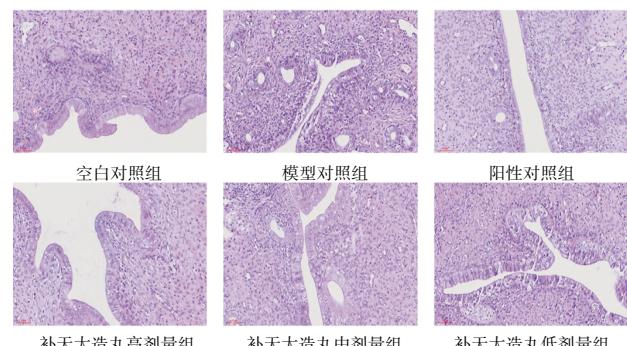


图2 各组大鼠子宫组织病理学改变 (HE, ×200)

3.2 脏器指数

3.2.1 胸腺指数及脾脏指数 与模型对照组比较,阳性对照组与补天大造丸中剂量组大鼠胸腺指数下降($P < 0.01$),补天大造丸高、低剂量组大鼠胸腺指数有所下降($P < 0.05$);补天大造丸各剂量组大鼠胸腺指数与阳性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与空白对照组比较,模型对照组大鼠脾脏指数上升($P < 0.01$);与模型对照组比较,补天大造丸各剂量组脾脏指数均下降($P < 0.01$),阳性对照组脾脏指数下降($P < 0.05$);与阳性对照组比较,补天大造丸高、中剂量脾脏指数有所下降($P < 0.05$),补天大造丸低剂量组脾脏指数变化无差异($P > 0.05$)。(见表1)

表1 各组大鼠胸腺指数、脾脏指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	胸腺指数/%	脾脏指数/%
空白对照组	6		0.29 ± 0.04	0.21 ± 0.01
模型对照组	6		0.26 ± 0.02	0.39 ± 0.06 ^a
阳性对照组	6	0.090 mg/kg	0.17 ± 0.05 ^b	0.32 ± 0.02 ^c
补天大造丸高剂量组	6	23.580 g/kg	0.20 ± 0.03 ^e	0.26 ± 0.01 ^{bd}
补天大造丸中剂量组	6	11.790 g/kg	0.19 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.02 ^{bd}
补天大造丸低剂量组	6	5.895 g/kg	0.19 ± 0.02 ^e	0.28 ± 0.01 ^b
<i>F</i>			13.434	26.752
<i>P</i>			0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型对照组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^d $P < 0.05$ 。

3.2.2 子宫指数及卵巢指数 与空白对照组比较,模型对照组大鼠子宫、卵巢指数均下降($P < 0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组和补天大造丸高、中剂量组大鼠子宫指数、卵巢指数增加($P < 0.01$);补天大造丸低剂量组大鼠卵巢指数增加($P < 0.01$),子宫指数增加($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,补天大造丸低剂量组大鼠子宫、卵巢指数下降($P < 0.01$),补天大造丸高剂量组子宫指数下降($P < 0.01$),卵巢指数下降($P < 0.05$),补天大造丸中剂量组子宫、卵巢指数变化无差异($P > 0.05$)。

(见表2)

表2 各组大鼠子宫指数与卵巢指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	子宫指数/%	卵巢指数/%
空白对照组	6		0.60 ± 0.08	0.18 ± 0.02
模型对照组	6		0.18 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.01 ^a
阳性对照组	6	0.090 mg/kg	0.47 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.01 ^b
补天大造丸高剂量组	6	23.580 g/kg	0.32 ± 0.01 ^{bd}	0.11 ± 0.01 ^{be}
补天大造丸中剂量组	6	11.790 g/kg	0.37 ± 0.01 ^{be}	0.13 ± 0.01 ^b
补天大造丸低剂量组	6	5.895 g/kg	0.27 ± 0.02 ^{cd}	0.09 ± 0.01 ^{bd}
F			101.218	121.744
P			0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^aP<0.01;与模型对照组比较,^bP<0.01,^cP<0.05;与阳性对照组比较,^dP<0.01,^eP<0.05。

3.3 血清LH、FSH、E₂、AMH及INH-B水平 与空白对照组比较,模型对照组大鼠血清LH、FSH水平升高(P<0.01);与模型对照组比较,阳性对照组与补天大造丸高、中剂量组大鼠血清中LH、FSH水平下降(P<0.01),补天大造丸低剂量组大鼠血清中LH下降(P<0.05),FSH水平无明显变化(P>0.05);与阳性对照组比较,补天大造丸高、低剂量组大鼠血清中LH、FSH水平上升(P<0.01),补天大造丸中剂量组大鼠血清LH水平上升(P<0.01),FSH水平差异无统计学意义(P>0.05)。与空白对照组比较,模型对照组大鼠血清E₂、AMH、INH-B水平下降(P<0.01);与模型对照组比较,阳性对照组与补天大造丸高、中剂量组大鼠血清中E₂、AMH、INH-B水平上升(P<0.01),补天大造丸低剂量组E₂、AMH水平上升(P<0.05),INH-B水平无明显变化(P>0.05);与阳性对照组比较,补天大造丸高、低剂量组大鼠血清E₂、AMH、INH-B水平下降(P<0.01),补天大造丸中剂量组INH-B水平下降(P<0.01),E₂水平有所下降(P<0.05),AMH水平差异无统计学意义(P>0.05)。(见表3)

3.4 各组大鼠血清IL-2、IL-10及TGF-β表达水平 与空白对照组比较,模型对照组大鼠血清IL-2水平升高(P<0.01),IL-10水平下降(P<0.01);与模型对照组比较,阳性对照组和补天大造丸高、中剂量组大鼠血清IL-2水平下降(P<0.01),IL-10水平上升(P<0.01),补天大造丸低剂量组大鼠血清IL-2水平下降(P<0.05),IL-10水平上升(P<0.05);与阳性对照组比较,补天大造丸各剂量组大鼠血清IL-2水平均上升(P<0.01),补天大造丸高、中、低剂量组大鼠血清IL-10水平下降(P<0.01或P<0.05)。空白对照组大鼠血清TGF-β水平低于模型对照组

(P<0.01);阳性对照组和补天大造丸高、中、低剂量组大鼠血清TGF-β水平均低于模型对照组(P<0.01或P<0.05);各剂量补天大造丸高、中、低剂量组大鼠TGF-β水平高于阳性对照组(P<0.01)。(见表4)

表4 各组大鼠血清IL-2、IL-10及TGF-β水平比较

组别	n	给药剂量	IL-2	IL-10	TGF-β
空白对照组	6		174.75 ± 11.09	87.89 ± 3.81	129.40 ± 5.62
模型对照组	6		360.15 ± 16.21 ^a	52.40 ± 1.98 ^a	298.40 ± 9.51 ^a
阳性对照组	6	0.090 mg/kg	204.28 ± 17.16 ^b	80.22 ± 2.95 ^b	159.79 ± 16.02 ^b
补天大造丸高剂量组	6	23.580 g/kg	278.25 ± 13.57 ^{bd}	65.36 ± 0.98 ^{bd}	236.73 ± 7.85 ^{bd}
补天大造丸中剂量组	6	11.790 g/kg	249.51 ± 13.33 ^{bd}	73.98 ± 3.59 ^{be}	195.81 ± 11.73 ^{bd}
补天大造丸低剂量组	6	5.895 g/kg	320.63 ± 13.15 ^{cd}	61.44 ± 4.26 ^{cd}	257.34 ± 12.79 ^{cd}
F			144.617	102.923	193.648
P			0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^aP<0.01;与模型对照组比较,^bP<0.01,^cP<0.05;与阳性对照组比较,^dP<0.01,^eP<0.05。

4 讨论

POI会引发女性月经紊乱、不孕及其他多种远期并发症,因此应对POI患者尽早筛查诊断并进行早期干预,将改善患者卵巢功能作为治疗的重点。POI可能由遗传或其他免疫性疾病引发,患者机体免疫稳态失衡,细胞免疫和体液免疫产生的促炎症因子和自身抗体共同导致卵巢损伤,以致卵巢功能下降^[14]。炎症因子的异常表达,会导致卵巢内部细胞遭受免疫攻击,使得卵泡持续耗竭,从而进一步加剧卵巢的损伤。在卵巢功能不全及卵巢早衰的相关临床研究中均发现多种炎症因子的水平异常,如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、干扰素-γ及多种白细胞介素^[15]。TNF-α是促炎症细胞因子,可介导慢性炎症对卵巢造成损伤,影响卵泡发育^[16]。薛岩岩等^[17]认为,POI患者IFN-γ和抗肾上腺皮质抗体(anti-adrenocortical antibody, AAA)水平显著增加,但TGF-β水平降低,这可能与免疫细胞的功能减弱和FOXP3基因表达水平降低有关。POI患者中IL-10、TGF-β异常升高或降低,证明炎症因子在POI发病机制中发挥着作用^[18]。研究^[19]发现,肾阴虚POI患者外周血清中IL-10水平明显高于肾阳虚POI患者,IL-10水平可为POI中医证型分型提供参考价值。

POI为现代病名,《黄帝内经》有“年四十而阴气自半也,起居衰矣”的论述,40岁这一时间节点与西医界定早衰的年

表3 各组大鼠血清LH、FSH、E₂、AMH及INH-B水平比较

组别	n	给药剂量	LH/(mIU/mL)	FSH/(IU/L)	E ₂ /(pmol/L)	AMH/(pg/mL)	INH-B/(pg/mL)
空白对照组	6		21.02 ± 1.76	5.88 ± 0.43	65.94 ± 4.49	4 065.84 ± 168.86	49.89 ± 2.46
模型对照组	6		48.9 ± 1.32 ^a	12.14 ± 0.36 ^a	30.64 ± 1.49 ^a	1 932.82 ± 105.96 ^a	24.45 ± 1.61 ^a
阳性对照组	6	0.090 mg/kg	26.29 ± 1.38 ^b	7.42 ± 0.20 ^b	59.51 ± 2.59 ^b	3 301.44 ± 87.53 ^b	44.94 ± 1.90 ^b
补天大造丸高剂量组	6	23.580 g/kg	37.19 ± 1.59 ^{bd}	9.66 ± 0.42 ^{bd}	45.92 ± 2.66 ^{bd}	2 772.24 ± 115.58 ^{bd}	31.68 ± 2.15 ^{bd}
补天大造丸中剂量组	6	11.790 g/kg	34.7 ± 1.34 ^{bd}	8.12 ± 0.52 ^b	53.47 ± 3.15 ^{be}	3 147.35 ± 253.02 ^b	38.17 ± 3.27 ^{bd}
补天大造丸低剂量组	6	5.895 g/kg	42.5 ± 1.64 ^{cd}	11.45 ± 0.71 ^d	38.81 ± 2.11 ^{cd}	2 370.78 ± 240.95 ^{cd}	26.22 ± 1.13 ^d
F			274.725	162.533	123.611	110.544	131.089
P			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^aP<0.01;与模型对照组比较,^bP<0.01,^cP<0.05;与阳性对照组比较,^dP<0.01,^eP<0.05。

龄相同。《傅青主女科》也依据女性行经年龄提出“年未至七而经水先断者”，指出“年未老经水断”这一病证，为POI的中医诊治提供了早期理论基础。结合POI的临床表现与疾病特征来看，它可被纳入中医学中“闭经”“血枯”“月经过少”“不孕”“妇人脏躁”等范畴。近些年，中医领域各专家秉持审证求因的理念，从脏腑阴阳的角度展开论治，并对气血经络进行综合调理，均收获了较为理想的疗效。

补天大造丸来源于《医学心悟》，大补阴阳气血，可治阴阳两虚、气血不足所致的五脏虚损。方中人参、黄芪、白术、茯苓、山药补脾肺之气；熟地黄、白芍、当归、枸杞子、龟甲培补阴精，以滋养阴血；鹿角胶、紫河车助真阳而填精髓；酸枣仁、远志敛阴止汗，宁心止悸。补肾类中药具备促进卵巢血管生成的能力，能够显著改善卵巢血供状况，有力推动卵泡的生长发育进程，促使卵泡数量、黄体数量增加及卵泡直径增大；补肾类中药还可实现卵巢质量指数的提升，升高卵巢内雌孕激素受体的数量，促进子宫内膜生长，从而改善卵泡功能^[20]。黄小琼^[21]实验结果显示，特定剂量的归肾丸能够显著提升卵巢早衰小鼠次级卵泡、成熟卵泡及黄体的数量，同时降低闭锁卵泡的数量。并且，归肾丸可降低细胞因子IL-17与IL-1 β 的表达水平，且这种调节作用呈现出一定的剂量依赖性。由此可见，归肾丸汤剂能够通过对细胞因子IL-1 β 和IL-17的调节，有效改善自身免疫紊乱状态，进而发挥改善卵巢卵泡功能的功效。江二喜^[22]认为，左归丸能下调免疫性卵巢早衰小鼠IL-6、IL-17水平，增强卵巢组织INHB mRNA表达，升高INHB含量，从而改善卵巢储备功能。许万枫等^[23]研究发现，孕康口服液（山药、黄芪、当归、狗脊、菟丝子等）灌胃雷公藤多苷致POI模型小鼠后，POI小鼠卵巢组织形态学改善，窦卵泡数量增加，血清E₂和AMH水平明显升高，FSH、LH出现一定程度下降，表明孕康口服液可通过调节生殖内分泌水平达到提高卵巢功能的作用。

本研究结果显示，与模型对照组比较，各药物干预组卵巢组织均有改善现象，窦卵泡、原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡可辨别，卵细胞、透明带、卵丘、放射冠明显，囊被外侧暗红粒细胞排列较模型对照组整齐，黄体形状增多、大小不一。各药物干预组子宫内膜层较模型对照组有所增厚，腺腔明显，肌层纤维密布。补天大造丸低剂量组大鼠胸腺指数、脾指数、子宫指数和卵巢指数低于模型对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。补天大造丸中剂量组大鼠血清LH水平低于模型对照组($P<0.01$)；补天大造丸低剂量组大鼠血清LH水平低于模型对照组($P<0.05$)；补天大造丸高、中剂量组大鼠血清E₂水平高于模型对照组($P<0.01$)；补天大造丸高、中剂量组大鼠血清AMH水平高于模型对照组($P<0.01$)，INH-B表达水平高于模型对照组($P>0.05$)；补天大造丸低剂量组大鼠血清E₂水平高于模型对照组($P<0.05$)；补天大造丸低剂量组大鼠血清IL-2水平低于模型对照组($P<0.05$)，IL-10表达水平高于模型对照组($P<0.01$)；补天大造丸高、中剂量组小鼠血清LH、FSH、E₂水平下降($P<0.01$)；补天大造丸高、中、低剂量组大鼠血清TGF- β 水平下降($P<0.05$)。结果表明，补天大造丸可调节免疫性卵巢早衰小鼠血清生殖激素及细胞因子水平，缓解卵巢的炎症反

应，调节免疫功能异常，从而改善卵巢储备功能。

补天大造丸治疗POI机制暂不明确，值得进一步深入研究。本研究仅测试了部分指标，许多免疫因子等还需要开展后期研究。因此，在后续还需开展大量临床试验及细胞物理化学实验，进一步探明其对其他类型免疫细胞及免疫相关细胞因子的影响。

参考文献

- [1] CHRISTIANSON M S, WODI P, TALAAT K, et al. Primary ovarian insufficiency and human papilloma virus vaccines: A review of the current evidence[J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 222(3):239–244.
- [2] 陈子江,田秦杰,乔杰,等.早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2017,52(9):577–581.
- [3] MĘCZEKALSKI B, MACIEJEWSKA-JESKE M, PODFIGURNA A. Reproduction in premature ovarian insufficiency patients – from latest studies to therapeutic approach[J]. Prz Menopauzalny, 2018, 17(3):117–119.
- [4] 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.
- [5] 郁琦,唐瑞怡.全方位提升早发性卵巢功能不全的诊治水平[J].中国实用妇科与产科杂志,2023,39(9):865–868.
- [6] 朱春兰,夏亦冬.中药结合激素替代疗法治疗卵巢早衰研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(10):92–95.
- [7] 黄帝内经[M].长春:吉林文史出版社,2017.
- [8] 张文红,王玉荣,冯明.傅山女科临证运用[M].太原:山西科学技术出版社,2009:71.
- [9] 滕秀香,柴松岩.辨治卵巢早衰用药规律的回顾性研究[J].中国中医药信息杂志,2009,16(8):3.
- [10] COX L, LIU J H. Primary ovarian insufficiency: An update[J]. Int J Womens Health, 2014, 6:235–243.
- [11] 丁怡,于潇,王玉超,等.川芎嗪调节Wnt/ β -catenin信号通路对早发性卵巢功能不全大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响[J].中药材,2024,47(8):2046–2051.
- [12] FORGES T, MONNIER-BARBARINO P, FAURE G C, et al. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology[J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(2):163–175.
- [13] SHARIF K, WATAD A, BRIDGEWOOD C, et al. Insights into the autoimmune aspect of premature ovarian insufficiency[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6):101323.
- [14] 吕美琪,相珊,连方.免疫型早发性卵巢功能不全的中西医诊疗进展[J].中国中西医结合杂志,2024,44(1):115–119.
- [15] 梁嘉丽,邝兆民,杨静,等.补肾阴及补肾阳法对化疗诱导的卵巢早衰大鼠外周血TNF- α 、IFN- γ 水平及卵巢颗粒细胞凋亡的影响[J].中国病理生理杂志,(下转第66页)

- Immunopathol, 2022, 44(5):625–648.
- [6] FARINA M, VIEIRA L E, BUTTARI B, et al. The Nrf2 pathway in ischemic stroke: A review[J]. Molecules, 2021, 26(16):5001.
- [7] 皮桂芳, 刘梨.《黄帝内经》在脑卒中患者情志护理中的应用[J].中国社区医师, 2020, 36(35):92–93.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社, 2020:719.
- [9] 喻长远, 田永立.丹参颗粒对大鼠及沙土鼠局灶性脑血管损伤的影响[J].中国中医基础医学杂志, 2005, 11(9):670–672.
- [10] 陈超, 聂郁林, 陆心恬, 等.改良线栓法建立SD大鼠局灶性脑缺血再灌注模型[J].神经损伤与功能重建, 2023, 18(10):569–573.
- [11] 李红香.基于中医文献的中风病研究[D].南京:南京中医药大学, 2011.
- [12] 喻腾云, 谢钰汝, 黄琴.真中风与类中风概念分类浅述[J].中国民族民间医药, 2015, 24(15):44–45.
- [13] 林震溪.张景岳非风学说的理论研究[D].福州:福建中医药大学, 2020.
- [14] 徐娜, 杨宇峰.历代医家论中风病之因机理论框架[J].辽宁中医药大学学报, 2019, 21(3):75–77.
- [15] 张艾嘉, 王爽, 王萍, 等.缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治[J].中国实验方剂学杂志, 2020, 26(5):227–240.
- [16] 张奎明, 崔应麟, 葛鸾蝶, 等.基于“病理-方证”探讨康益胶囊治疗缺血性脑卒中的机制[J].中华全科医学, 2022, 20(2):307–310.
- [17] ZHU H M, WANG Z Q, YU J X, et al. Role and mechanisms of cytokines in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage[J]. Prog Neurobiol, 2019, 178:101610.
- [18] 郭佩鑫, 邹伟.出血性脑卒中与细胞焦亡相关研究进展[J].中国医药导报, 2023, 20(34):61–64.
- [19] QIN J, YANG X, ZHANG R X, et al. Monocyte mediated brain targeting delivery of macromolecular drug for the therapy of depression[J]. Nanomedicine, 2015, 11(2):391–400.
- [20] 杨恋, 陈伟.长春西汀与胞二磷胆碱治疗脑梗死的临床效果[J].慢性病学杂志, 2023, 24(1):62–64.
- [21] FORRESTER S J, KIKUCHI D S, HERNANDES M S, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling[J]. Circ Res, 2018, 122(6):877–902.
- [22] 李家正, 秦文秀, 许军峰.中医药抑制铁死亡在缺血性脑卒中防治中的研究进展[J].中医药导报, 2024, 30(8):98–102.
- [23] GUO C, YIN Y, DUAN J L, et al. Neuroprotective effect and underlying mechanism of sodium danshensu [3-(3, 4-dihydroxyphenyl) lactic acid from Radix and Rhizoma Salviae miltiorrhizae =Danshen] against cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. Phytomedicine, 2015, 22(2):283–289.
- [24] 韩晓娟, 陈礴, 侯海文.SIRT1/TLR4/NF-κB在丹参素治疗大鼠心肌梗死的保护作用[J].中国循证心血管医学杂志, 2020, 12(4):443–445.
- [25] 毛平, 夏卉莉, 袁秀荣, 等.怀牛膝多糖抗凝血作用实验研究[J].时珍国医国药, 2000, 11(12):1075–1076.
- [26] CHENG Q, SHEN Y T, CHENG Z H, et al. Achyranthesbidentata polypeptide k suppresses neuroinflammation in BV2 microglia through Nrf2-dependent mechanism[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(20):575.

(收稿日期:2024-10-26 编辑:时格格)

(上接第54页)2017, 33(1):139–142.

- [16] 姚敏, 王芹, 潘红玲, 等.针刺治疗卵巢早衰及对患者细胞因子TNF-α、IFN-γ表达水平的影响[J].中国针灸, 2019, 39(11):1181–1184.
- [17] 薛岩岩, 王轶蓉.早发性卵巢功能不全中西医发病机制研究进展[J].辽宁中医药大学学报, 2021, 23(1):204–207.
- [18] XIONG J, TAN R, WANG W, et al. Evaluation of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and FOXP3 mRNA in premature ovarian insufficiency[J]. Climacteric, 2020, 23(3):267–272.
- [19] 鲁佳琳.早发性卵巢功能不全患者外周血IL-10、IL-17与TGF-β1与不同中医分型的相关性[D].南京:南京中医药大学, 2022.
- [20] 朱春兰, 夏亦冬.中药结合激素替代疗法治疗卵巢早衰研究进展[J].辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10):92–95.
- [21] 黄小琼.归肾丸对免疫性卵巢早衰小鼠的治疗作用和机理研究[D].广州:华南农业大学, 2016.
- [22] 江二喜.左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠血清性激素及IL-6、IL-17水平的影响[J].贵州医科大学学报, 2018, 43(8):909–912.
- [23] 许万枫, 苏洁, 翁路安, 等.孕康口服液对早发性卵巢功能不全小鼠的影响[J].中成药, 2020, 42(5):1180–1186.

(收稿日期:2024-10-09 编辑:罗英姣)