

论著·基础研究

# 当归芍药散对制动应激复合半乳糖诱导的 卵巢储备功能下降模型小鼠的干预作用<sup>△</sup>

张亚萍<sup>1</sup> 蒋珊珊<sup>2</sup> 庞俏燕<sup>1</sup> 王亚静<sup>2</sup> 邵昱玮<sup>1</sup> 游琛<sup>1</sup>

(1 广西中医药大学基础医学院,广西南宁市 530200;

2 广西中医药大学附属瑞康医院妇科,广西南宁市 530001)

**【摘要】 目的** 探讨当归芍药散对制动应激复合半乳糖诱导的卵巢储备功能下降(DOR)模型小鼠的干预作用。**方法** 选取 60 只正常动情周期的昆明小鼠,随机挑选 10 只小鼠为空白组,其余 50 只小鼠通过制动应激复合注射半乳糖建立 DOR 模型。造模结束后将模型小鼠随机分成模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组、西药组,各 10 只。中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组分别给予 24.44 g/(kg·d)、12.22 g/(kg·d)、6.11 g/(kg·d)的当归芍药散灌胃,西药组给予 0.13 mg/(kg·d)戊酸雌二醇灌胃,空白组、模型组小鼠给予等体积蒸馏水灌胃,连续干预 4 周。记录干预前后各组小鼠的一般情况。干预结束后,观察各组小鼠卵巢组织的形态学变化,并计算卵巢指数,检测血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌激素、抗米勒氏管激素(AMH)、抑制素 B 水平。**结果** 与空白组相比,模型组小鼠动情周期紊乱、卵巢指数下降、闭锁卵泡增多、生长卵泡减少,血清 FSH、LH 水平升高,而血清雌激素、抑制素 B 和 AMH 水平降低。与模型组相比,各药物干预组小鼠动情周期恢复正常、闭锁卵泡减少、生长卵泡增多,且中药低剂量组小鼠卵巢指数上升、血清雌激素和抑制素 B 水平升高,中药中剂量组小鼠血清 FSH 水平降低、血清雌激素水平升高,中药高剂量组小鼠血清 FSH 水平降低、AMH 水平升高,西药组小鼠血清 FSH 水平降低(均  $P < 0.05$ )。**结论** 当归芍药散可能通过调节 DOR 模型小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能,来减少闭锁卵泡数目、增加生长卵泡数目,以及降低血清 FSH 水平,升高血清雌激素、AMH、抑制素 B 水平,从而改善卵巢储备功能。

**【关键词】** 卵巢储备功能下降;当归芍药散;制动应激;半乳糖;卵巢激素;动情周期;模型小鼠

**【中图分类号】** R 271.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2023)04-0429-06

**DOI:**10.11675/j.issn.0253-4304.2023.04.11

## Intervention effect of Danggui Shaoyao Powder on diminished ovarian reserve model mice induced by immobilization stress combined with galactose

ZHANG Yaping<sup>1</sup>, JIANG Shanshan<sup>2</sup>, PANG Qiaoyan<sup>1</sup>, WANG Yajing<sup>2</sup>, SHAO Yuwei<sup>1</sup>, YOU Chen<sup>1</sup>

(1 School of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China; 2 Department of Gynecology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the intervention effect of Danggui Shaoyao Powder on diminished ovarian reserve (DOR) model mice induced by immobilization stress combined with galactose. **Methods** A total of 60 Kunming mice in normal estrous cycle were selected, and 10 mice were randomly selected as blank group, the remaining 50 mice received immobilization stress and injection of galactose to establish DOR model. After the end of modeling, model mice were randomly assigned to model group, high-dose Traditional Chinese Medicine group, medium-dose Traditional Chinese Medicine group, low-dose Traditional Chinese Medicine group, or Western Medicine group, with 10 mice in each group. Danggui Shaoyao Powder of 24.44 g/(kg·d), 12.22 g/(kg·d), and 6.11 g/(kg·d) was intragastrically administrated to the high-, medium-, and low-dose Traditional Chinese Medicine groups, respectively, and the Western Medicine group received intragastric administration of 0.13 mg/(kg·d) estradiol valerate, as well as mice in the blank and model groups received intragastric administration of distilled water with equivalent volume, for a 4-week continuous intervention. The general conditions of mice before and after intervention were recorded. After the

△基金项目:广西自然科学基金(2020GXNSFAA297164);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0350);广西一流学科建设开放课题(2019XK001,2019XK175);广西中医药大学杰出青年基金项目(2018JQ001);全国名老中医药专家传承工作室建设项目([2022]75);广西中医药大学“桂派杏林青年英才”项目(2022C029)

第一作者简介:张亚萍,博士,教授,研究方向:妇科疾病的防治。



end of intervention, morphological changes of ovarian tissues of mice in various groups were observed, and ovarian index of mice in various groups was calculated, as well as the levels of serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estrogen, anti-Müllerian hormone (AMH), and inhibin B of mice in various groups were detected.

**Results** Compared with the blank group, mice in the model group presented as disturbed estrous cycle, decreased ovarian index, increased atretic follicles, and decreased growing follicles, as well as elevated levels of serum FSH and LH, while decreased levels of serum estrogen, inhibin B, and AMH. Compared with the model group, mice in the various drug intervention groups presented as normal estrous cycle, decreased atretic follicles, increased growing follicles, and elevated ovarian index and levels of serum estrogen and inhibin B in the low-dose Traditional Chinese Medicine group, as well as decreased level of serum FSH and elevated level of serum estrogen in the medium-dose Traditional Chinese Medicine group; moreover, decreased level of serum FSH and elevated level of serum AMH in the high-dose Traditional Chinese Medicine group, and decreased level of serum FSH in the Western Medicine group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Danggui Shaoyao Powder may through regulating the function of hypothalamus-pituitary gland-ovarian axis of DOR model mice to reduce the number of atretic follicles, and increase the number of growing follicles, as well as to decrease the level of serum FSH, and increase the levels of serum estrogen, AMH, and inhibin B, so as to improve the ovarian reserve function.

**【Key words】** Diminished ovarian reserve, Danggui Shaoyao Powder, Immobilization stress, Galactose, Ovarian hormone, Estrous cycle, Model mice

随着现代社会生活压力的增大,女性下丘脑-垂体-卵巢轴对压力的反应更加强烈<sup>[1]</sup>,这导致生殖功能受到抑制,造成卵巢功能障碍<sup>[2]</sup>。卵巢储备功能下降(diminished ovarian reserve, DOR)是一种由卵巢中卵泡数量减少和/或质量下降引起的较为常见的卵巢功能障碍症状。目前DOR动物实验模型的构建方法有使用药物(化疗药物、免疫抑制剂、干扰代谢类药物)、射线照射、环境毒物(如去氧乙烯基环己烯)等。半乳糖属于干扰代谢类药物,应用半乳糖造模是一种经典的动物衰老模型构建方法,具有简便、经济、稳定的特点<sup>[3]</sup>。半乳糖可以直接攻击卵巢,并促进卵巢卵泡储备功能的消耗及DOR的发生,具有卵巢毒性<sup>[4-5]</sup>。研究发现当归芍药散在减轻卵巢损伤、改善卵巢储备功能方面具有一定的治疗效果<sup>[6-7]</sup>。但目前其效果及具体作用机制尚未明确。本研究采用制动应激复合半乳糖建立具有肝郁脾虚症状的DOR小鼠模型,并予以当归芍药散干预,观察当归芍药散对DOR模型小鼠卵巢激素水平的影响,为当归芍药散用于治疗DOR提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 60只无特定病原体级昆明雌性小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[动物合格证号SYXK(湘)2016-0002],4~6周龄,体重 $(20 \pm 2)$ g,适应性饲养1周,自由饮水和摄食。动物房内室温保持在 $(22 \pm 2)$ ℃,通风良好,保持12 h光暗循环。

**1.2 主要药物、试剂及仪器** 当归芍药散饮片由当归10 g、白芍30 g、白术12 g、泽泻15 g、川芎15 g、茯苓

12 g组成,当归芍药散饮片共计94 g,由广西中医药大学附属瑞康医院提供。小鼠促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、抗米勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)、抑制素B的ELISA试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司(批号:E-EL-M0511c、E-EL-M0057c、E-EL-M0113c、E-EL-M0698c);雌激素的ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司(批号:CSB-E07280m);HE染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(批号:G1120);D-半乳糖购自美国Sigma-Aldrich Lab & Product Materials公司(批号:G0750);戊酸雌二醇(补佳乐)购自拜耳医药保健有限公司广州分公司(批号:J20171038)。5430/R小型台式高速冷冻离心机购自Eppendorf公司;SQP型电子天平购自Satorius公司;Infinite M200 Pro型多功能酶标仪购自TECAN公司;BX53型荧光正置显微镜购自OLYMPUS公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物造模:**(1)采用颈背注射半乳糖联合制动应激建立DOR小鼠模型<sup>[8]</sup>。先于小鼠颈背部皮下注射D-半乳糖(1 g/mL),剂量为0.2 mL/10 g;然后将小鼠放入前面管壁打孔的50 mL离心管内,盖上离心管的盖子,将小鼠尾巴露出管外,将封闭的离心管放到水平工作台上,3~5 h后解除制动。1次/d,共干预4周。(2)肝郁脾虚型DOR小鼠模型建模成功的标准<sup>[9-11]</sup>。小鼠出现体重下降、毛色萎黄无光泽、活动和饮食减少、大便溏等肝郁脾虚宏观表征,阴道细胞涂片提示动情周期紊乱,卵巢形态上可见生长卵泡减少,而闭锁卵泡相对增多,血清FSH、LH水平升高,雌激素水平下降。

1.3.2 动物分组和干预方法:以阴道脱落细胞学筛选 60 只具有连续 3 个动情周期的小鼠进行实验(动情周期的评判标准见后文“1.4.2”)。采用随机数字表法挑选 10 只小鼠作为空白组,其余 50 只小鼠(造模组)用于建立 DOR 小鼠模型。建模结束后,采用随机数字表法将造模组小鼠分成模型组(蒸馏水)、中药高剂量组(高剂量当归芍药散)、中药中剂量组(中剂量当归芍药散)、中药低剂量组(低剂量当归芍药散)、西药组(戊酸雌二醇),各 10 只。当归芍药散组方的临床用量为 94.0 g/d,参考《中药药理研究方法学》<sup>[12]</sup>中人与小鼠体表面积的计算方法,得出小鼠的等效剂量为 12.22 g/(kg·d),将该剂量设为中药中剂量组的用药剂量,中药高剂量组、中药低剂量组的用药剂量分别为 24.44 g/(kg·d)、6.11 g/(kg·d);用蒸馏水煎煮两次药材并过滤,混合两次所得药液,用旋转蒸发仪分别浓缩出浓度为 1.222 g/mL、2.444 g/mL、0.611 g/mL 的当归芍药散药液。戊酸雌二醇(补佳乐)临床用量为 1 mg/d,小鼠等效剂量为 0.13 mg/(kg·d),将药物研磨成粉末,用蒸馏水配成 0.013 mg/mL 药液。各中药剂量组与西药组小鼠均采用灌胃给药,用量按每次 0.1 mL/10 g 体质量计算(每周称一次体重,体质量取最近一次的称重数值),1 次/d,连续干预 6 d 后休息 1 d,共干预 4 周。空白组、模型组小鼠给予灌胃等体积蒸馏水,干预频次和时间同其余组。

1.3.3 取材:在最后一次给药结束后记录各组小鼠体重,24 h 后摘除单侧眼球并采血 1.5~3.0 mL,血液装入 EP 管,室温放置,2 h 内使用离心机以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,放入 -20 ℃ 冰箱保存待检。采血后处死小鼠,取出双侧卵巢,使用生理盐水冲洗,吸水纸吸出多余水分后称取双侧卵巢重量,并计算卵巢指数。然后使用组织固定液固定卵巢组织,保存于 4 ℃ 冰箱,在 24 h 内将卵巢组织包埋,用于后续实验。其中,模型组有 1 只小鼠因取材不佳,未纳入后续研究。

#### 1.4 观察指标

1.4.1 一般情况:开始造模的第 1 天、造模当天和干预开始后每周的最后 1 d,记录小鼠的体重,观察其饮食、皮毛、二便、活动等情况。

1.4.2 动情周期:小鼠 4~6 周龄起,每天早上 7:30,采用阴道脱落细胞学检测小鼠的动情周期,持续观察 15 d。使用棉签沾取生理盐水后插入小鼠阴道内旋转 1 周后取出,于清洁载玻片中央滚动 1 周。晾干进行 HE 染色,在显微镜下观察阴道上皮脱落细胞情况。小鼠动情周期分为动情前期、动情期、动情后期、动情间期,一般经历 4~5 d<sup>[13]</sup>。根据涂片中观察到的各类型细胞相对比例确定样品采集当天小鼠所处的发情周期阶段。在动情前期,细胞几乎为成簇的形

状良好的圆形有核上皮细胞;在动情期,细胞主要是角化的鳞状上皮细胞,呈密集的簇状分布;在动情后期,以小的染色深的白细胞为主,可见角化的鳞状上皮细胞,常呈碎片状;在动情间期,白细胞仍占优势,也可能存在角化鳞状上皮细胞,此期与动情后期的主要区别是动情间期有核上皮细胞。见图 1。

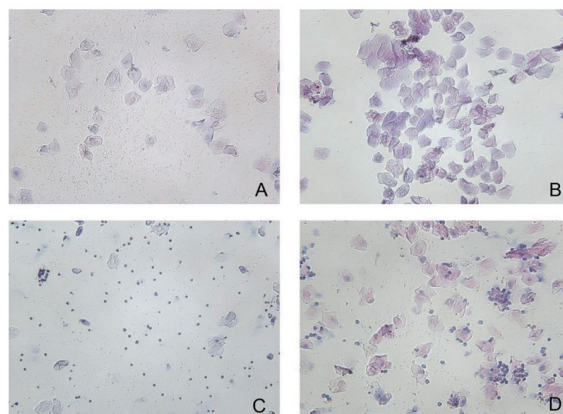


图 1 空白组小鼠阴道脱落细胞学检测结果(HE 染色, ×200)

注:A 为动情前期;B 为动情期;C 为动情后期;D 为动情间期。

1.4.3 卵巢镜下结构:将各组包埋的卵巢组织制成 5 μm 厚的组织切片,放入 45 ℃ 的恒温箱中烘干 3 h,使用二甲苯脱蜡 5 min,梯度乙醇水化 5 min,自来水冲洗 3 次,HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜观察镜下卵巢组织形态学变化。

1.4.4 卵巢指数:取出各组小鼠卵巢后,去掉表面的筋膜及脂肪组织,生理盐水清洗,然后使用吸水纸吸取多余的水分,电子秤称量双侧卵巢湿重。卵巢指数按以下公式计算:卵巢指数 = 双侧卵巢湿重(g)/小鼠体重(g) × 100%。

1.4.5 血清 FSH、LH、雌激素、AMH 和抑制素 B 激素水平:采用 ELISA 检测各组小鼠血清 FSH、LH、雌激素、AMH 和抑制素 B 的水平。将标准品工作液 100 μL 放入酶标板中,加入待测样本 100 μL,37 ℃ 孵育 90 min;弃液,加入生物素化抗体 100 μL,37 ℃ 温育 1 h;弃液,加入 350 μL 洗涤液,浸泡 2 min,重复洗涤 3 次;弃液,加酶结合物工作液 100 μL,避光,37 ℃ 温育 30 min 左右;弃液,洗涤 3 次,加 90 μL 底物溶液,37 ℃ 温育 15 min 左右,加终止液 50 μL。采用酶标仪测 450 nm 波长处的光密度,根据标准品工作液的浓度和光密度值,使用 CurveExpert 软件进行计算。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验;不符合正态分布的计量资料以 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表



示,组间比较采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠的一般情况 开始造模后,造模组小鼠饮食减少,大便稍溏,皮毛变黄无光泽,喜寐,活动减少,呈烦躁、抵抗状态;随着时间的延长,小鼠开始精神萎靡,抵抗行为减少,动情周期逐渐紊乱(图2)。给予药物干预后,模型组与各药物干预组的小鼠体重呈上升的趋势,但除中药中剂量组外,其余组小鼠体重在干预结束时均轻于空白组小鼠。各药物干预组小鼠饮食量增大,大便正常,皮毛变白有光泽,活动量增多,动情周期恢复正常,其中,中药低剂量组和中药中剂量组小鼠的状态恢复较快。见图3、图4。

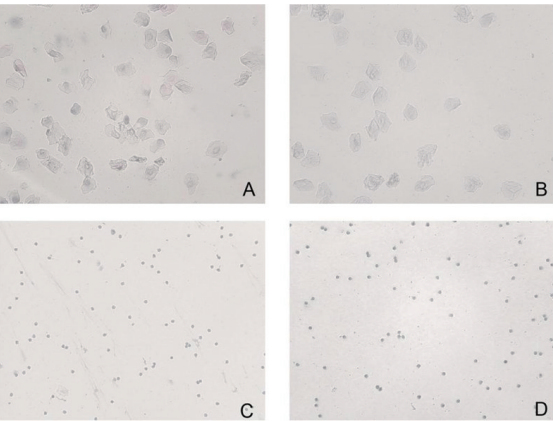


图2 模型组小鼠阴道脱落细胞学检测结果(HE染色,  $\times 200$ )  
注:A为动情前期;B为动情前期;C为动情后期;D为动情后期。

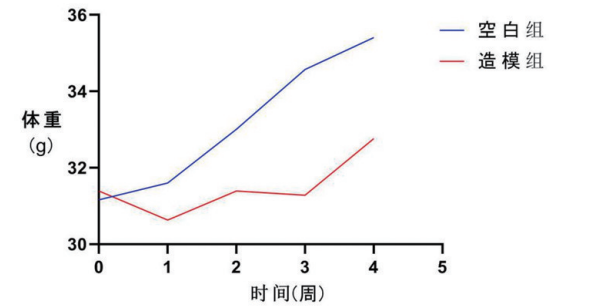


图3 造模后小鼠体重变化情况

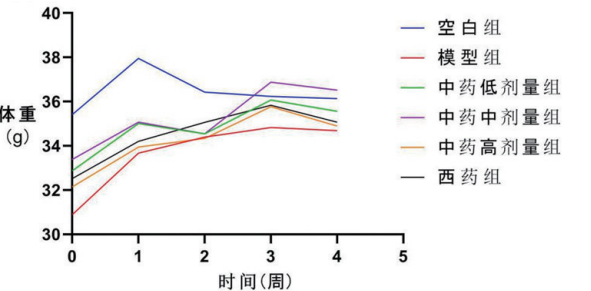


图4 药物干预后各组小鼠体重变化情况

2.2 药物干预后各组小鼠卵巢形态结构的变化情况 与空白组相比,模型组小鼠的卵巢体积减小,生长卵泡数目、成熟卵泡数目减少,闭锁卵泡数目增多,黄体体积缩小,卵巢实质破坏,出现纤维化和较大的间质孔;给予药物干预后,与模型组相比,各药物干预组小鼠生长卵泡数目增多,闭锁卵泡数目减少,卵巢实质结构有所改善,纤维化现象和较大的间质孔数目减少,其中中药中剂量组的改善较为明显。见图5。

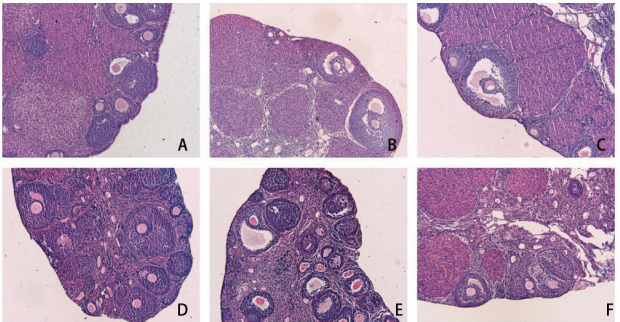


图5 各组小鼠卵巢组织形态改变(HE染色,  $\times 100$ )  
注:A为空白组;B为模型组;C为中药低剂量组;D为中药中剂量组;E为中药高剂量组;F为西药组。

2.3 各组小鼠卵巢指数的比较 与空白组相比,模型组、中药高剂量组和西药组小鼠的卵巢指数均降低(均  $P < 0.05$ );与模型组和西药组相比,中药低剂量组小鼠的卵巢指数均升高(均  $P < 0.05$ )。见表1。

表1 各组小鼠卵巢指数的比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	卵巢指数
空白组	10	$0.036 \pm 0.009$
模型组	9	$0.024 \pm 0.012^*$
中药低剂量组	10	$0.033 \pm 0.011^{\#}$
中药中剂量组	10	$0.028 \pm 0.008$
中药高剂量组	10	$0.025 \pm 0.011^*$
西药组	10	$0.024 \pm 0.006^{*a}$
F值		2.737
P值		0.028

注:与空白组比较,  $*P < 0.05$ ;与模型组比较,  $\#P < 0.05$ ;与中药低剂量组比较,  $aP < 0.05$ 。

2.4 各组小鼠激素水平的比较 与空白组相比,模型组小鼠血清FSH、LH水平升高,血清雌激素、抑制素B、AMH水平下降(均  $P < 0.05$ )。与模型组相比,中药低剂量组小鼠血清雌激素、抑制素B水平升高(均  $P < 0.05$ );中药中剂量组小鼠血清FSH水平下降,血清雌激素水平升高(均  $P < 0.05$ );中药高剂量组小鼠血清FSH水平下降,血清AMH水平升高(均  $P < 0.05$ );西药组小鼠血清FSH下降( $P < 0.05$ )。见表2。

表 2 各组小鼠激素水平的比较

组别	n	FSH( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL)	LH[ $M(P_{25}, P_{75})$ , ng/mL]	雌激素[ $M(P_{25}, P_{75})$ , pg/mL]	AMH[ $M(P_{25}, P_{75})$ , ng/mL]	抑制素 B[ $M(P_{25}, P_{75})$ , pg/mL]
空白组	10	118.714 ± 45.653	73.696(44.002, 127.082)	5 257.568(4 607.083, 5 652.378)	18.096(13.481, 24.655)	43.720(38.873, 63.622)
模型组	9	198.836 ± 66.296 *	232.420(175.327, 364.326) *	3 603.520(2 541.358, 4 020.334) *	8.736(6.500, 10.984) *	30.839(27.364, 36.883) *
中药低剂量组	10	180.863 ± 70.626	140.485(55.105, 288.440)	4 758.339(4 432.658, 5 500.427) #	7.774(6.666, 18.584)	46.417(39.127, 54.482) #
中药中剂量组	10	128.871 ± 52.149 #	124.790(42.967, 245.091)	4 759.521(4 651.638, 5 151.357) #	11.427(4.861, 24.059)	39.225(34.102, 58.943)
中药高剂量组	10	142.098 ± 78.920 #	223.937(119.992, 286.105)	4 282.247(4 041.148, 4 753.161)	15.987(14.855, 22.008) #	37.363(35.605, 46.399)
西药组	10	143.106 ± 37.367 #	145.574(69.223, 258.515)	4 409.501(3 682.778, 4 957.079)	11.791(8.915, 14.271)	46.365(34.371, 49.234)
F/H 值		2.554	11.463	18.193	15.936	13.766
P 值		0.038	0.043	0.003	0.007	0.017

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

3 讨 论

半乳糖血症是一种遗传性的代谢疾病,会影响机体的半乳糖代谢能力,与卵巢储备功能密切相关。半乳糖代谢在 Leloir 途径中主要涉及 3 种酶,包括半乳糖激酶、半乳糖 1-磷酸尿嘧啶转移酶和 UDP-半乳糖 4 环氧酶<sup>[14]</sup>。半乳糖 1-磷酸尿嘧啶转移酶的严重缺乏会导致半乳糖及其代谢产物积聚,引发半乳糖血症,对机体产生毒性作用,长期并发症包括女性的轻度发育迟缓、智力缺陷、语言发育障碍、骨密度降低和运动障碍<sup>[15]</sup>。此外,半乳糖及其代谢产物在卵巢中可直接攻击卵母细胞和卵泡,导致卵巢池闭锁加速和卵泡成熟受阻,引起卵巢功能障碍、月经周期紊乱和生育能力下降<sup>[16]</sup>。制动应激是研究慢性压力相关疾病常用的模型之一,可引起卵巢功能的紊乱和减退。连晓媛等<sup>[17]</sup>应用重复制动应激刺激大鼠,使大鼠出现性月经周期紊乱、雌二醇水平下降、孕酮水平趋向更年期水平。李兰英等<sup>[18]</sup>认为,制动应激可致大鼠生殖内分泌功能紊乱,血清雌二醇、抑制素 B、FSH 水平下降。王佩等<sup>[19]</sup>研究发现,制动应激可引起大鼠内分泌功能失常,导致大鼠雌二醇水平明显降低,性周期紊乱,其认为制动应激可能通过下丘脑-垂体-卵巢轴影响卵巢的分泌功能,损害卵巢功能,导致卵巢储备功能下降。

卵巢反应的预测主要基于内分泌标志物和卵巢储备功能的检测,前者包括血清 FSH、LH、雌激素水平、后者则包括窦卵泡计数、AMH 水平等<sup>[20]</sup>。DOR 可导致血清 FSH、LH 水平升高及雌激素水平下降,但 3 者在动情周期中的变异性较高,只能用于辅助评估卵巢储备功能,不能作为确诊的金标准。AMH 在动情周期内和动情周期间期变异性更小,已被证实在辅助生殖技术中可以准确预测卵巢对促性腺激素刺激的反应<sup>[21-22]</sup>,被认为是卵巢储备评估中最有价值的标志物。AMH 主要由窦前卵泡和窦状卵泡的颗粒细胞分泌,其表达从占优势的卵泡期开始减少。AMH 对最初的卵泡募集具有抑制作用,从而避免了原始卵

泡池的过早消耗,延缓卵巢储备功能的下降<sup>[23]</sup>。抑制素 B 也是早期窦卵泡和优势卵泡的颗粒细胞的产物,在排卵前期抑制垂体分泌 FSH 并诱导 FSH 从非主导性卵泡中撤出,从而促进单个优势卵泡的发育。抑制素 B 被认为可以反映促性腺激素在窦卵泡池中的反应,随着卵巢储备的减少,FSH 随之升高,抑制素 B 水平随着卵巢对垂体负反馈功能逐渐消除而逐渐下降<sup>[24]</sup>。

近年来,不孕症患者日益增多,其中 DOR 是导致女性不孕的重要原因。当归芍药散是出自《金匱要略》的良方,研究表明,当归芍药散可以减弱 D-半乳糖引起的衰老模型的氧化应激反应,促进了其抗凋亡作用<sup>[25]</sup>。本实验采用制动应激复合半乳糖建立肝郁脾虚型 DOR 小鼠模型,结果显示,与空白组相比,模型组小鼠饮食减少,大便稍溏,皮毛变黄无光泽,喜寐,活动与抵抗减少,动情周期紊乱,卵巢指数下降,闭锁卵泡增多,生长卵泡减少,血清 FSH、LH 水平升高,血清雌激素、抑制素 B 和 AMH 水平降低,提示制动应激复合半乳糖可以影响小鼠卵巢储备功能,使其出现肝郁脾虚的表现,与临床上肝郁脾虚的症状相似,提示模型建立成功。给予当归芍药散干预后,与模型组相比,各药物干预组小鼠闭锁卵泡减少,生长卵泡增多,且中药低剂量组小鼠卵巢指数上升、血清雌激素、抑制素 B 水平升高,中药中剂量组小鼠血清 FSH 水平降低、血清雌激素水平升高,中药高剂量组小鼠血清 FSH 水平降低、AMH 水平升高(均  $P < 0.05$ )。因此,我们推测当归芍药散可能通过调节 DOR 模型小鼠的下丘脑-垂体-卵巢轴的激素水平,来减少闭锁卵泡数量、增加生长卵泡数量、降低血清 FSH 水平,升高血清雌激素、AMH、抑制素 B 水平,从而改善卵巢储备功能。戊酸雌二醇是天然雌激素,可通过下丘脑-垂体-性腺轴负反馈来抑制 FSH 分泌,从而减少卵泡的消耗,常用于 DOR 的治疗<sup>[26]</sup>。本研究中,西药组血清 FSH 水平下降,说明戊酸雌二醇在临床应用中具有一定的效果,但其血清 LH、雌激素、抑制素 B、AMH 水平与模型组比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),推测可能与样本量不足有关。

综上所述,当归芍药散可能通过调节 DOR 模型小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能,发挥调节卵泡发育以及性激素水平的作用,从而改善卵巢储备功能,但其具体作用机制、有效剂量、作用时间等,仍需进一步研究探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, et al. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [J]. J Neuroendocrinol, 2004, 16 (3): 272-278.
- [2] Fotsing D, Ngoupaye GT, Ouafu AC, et al. Effects of *Gladiolus dalenii* on the stress-induced behavioral, neurochemical, and reproductive changes in rats [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 685.
- [3] Haider S, Liaquat L, Shahzad S, et al. A high dose of short term exogenous D-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process [J]. Life Sci, 2015, 124: 110-119.
- [4] Rostami Dovom M, Noroozadeh M, Mosaffa N, et al. Induced premature ovarian insufficiency by using D galactose and its effects on reproductive profiles in small laboratory animals: a systematic review [J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 96.
- [5] Fridovich-Keil JL, Gubbels CS, Spencer JB, et al. Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia [J]. J Inherit Metab Dis, 2011, 34(2): 357-366.
- [6] 张亚萍, 游琛, 韦玉娜, 等. 基于 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路探讨当归芍药散对卵巢储备功能低下模型大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 47-54.
- [7] 蒋珊珊, 王亚静, 庞俏燕, 等. 当归芍药散对卵巢储备功能下降小鼠 PI3K/AKT/FOXO3a 信号通路的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(6): 1335-1338.
- [8] 梁磊, 张绪慧, 周毅, 等. 哈蟆油胶囊对衰老模型小鼠生殖器官的保护作用 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(6): 982-985.
- [9] 刘燕, 邹小娟, 丁秀芳, 等. 基于复合应激的肝郁脾虚证小鼠模型的建立与评价 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1840-1844.
- [10] 李雅文. 新加归肾丸对雷公藤多苷致卵泡发育障碍模型大鼠卵巢组织 FOXO3a、HIF-1 $\alpha$ 、IGF-1R 调控机制的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [11] 孙玉英, 陈淑萍, 谈勇. 滋阴补阳序贯法联合西药对 DOR 大鼠卵巢 Smad2、Smad3、Smad7 mRNA 表达的影响 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2018, 47(3): 300-304.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 33-34.
- [13] McLean AC, Valenzuela N, Fai S, et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification [J]. J Vis Exp, 2012(67): e4389.
- [14] Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism [J]. J Biol Chem, 2003, 278(45): 43885-43888.
- [15] Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability [J]. Am J Hum Genet, 2014, 95(6): 754-762.
- [16] van Erven B, Berry GT, Cassiman D, et al. Fertility in adult women with classic galactosemia and primary ovarian insufficiency [J]. Fertil Steril, 2017, 108(1): 168-174.
- [17] 连晓媛, 丁岩, 陈奇, 等. 重复制动应激对雌性大鼠卵巢功能的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(6): 373-376.
- [18] 李兰英, 王佩娟, 彭蕴茹, 等. 补肾活血汤对制动应激雌性大鼠生殖内分泌功能紊乱的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 144-147.
- [19] 王佩娟, 彭蕴茹, 罗宇慧, 等. 补肾活血汤对制动应激所致卵巢功能减退大鼠的影响 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(5): 407-411.
- [20] Broer SL, Dölleman M, Opmeer BC, et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis [J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(1): 46-54.
- [21] Iliodromiti S, Anderson RA, Nelson SM. Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(6): 698-710.
- [22] Broer SL, Dölleman M, van Disseldorp J, et al. Prediction of an excessive response in *in vitro* fertilization from patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: an individual patient data meta-analysis [J]. Fertil Steril, 2013, 100(2): 420-9. e7.
- [23] Dewailly D, Laven J. AMH as the primary marker for fertility [J]. Eur J Endocrinol, 2019, 181(6): D45-D51.
- [24] Randolph JFJ, Harlow SD, Helmuth ME, et al. Updated assays for inhibin B and AMH provide evidence for regular episodic secretion of inhibin B but not AMH in the follicular phase of the normal menstrual cycle [J]. Hum Reprod, 2014, 29(3): 592-600.
- [25] Lan Z, Liu JP, Chen LY, et al. Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in D-galactose-induced senescent mice [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 386-395.
- [26] 栾素娟, 崔青, 张玉花, 等. 坤泰胶囊在卵巢储备功能降低的不孕症患者中的应用 [J]. 中成药, 2017, 39(6): 1318-1320.

(收稿日期: 2022-12-03 修回日期: 2023-01-25)