

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20230418.001

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20230418.0939.002.html>

## 道地通管汤对卵巢早衰大鼠的影响机制研究

龙云霞<sup>1</sup>, 钟义惠<sup>2</sup>, 吴媛媛<sup>1</sup>, 陈湫锦<sup>1</sup>, 杜立<sup>1</sup>, 郑虹<sup>1</sup>, 李胤颖<sup>1</sup>, 罗志娟<sup>1</sup>✉

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011; 2. 广西壮族自治区柳州市妇幼保健院, 广西柳州 545001)

**[摘要]** **目的:**探讨道地通管汤对卵巢早衰模型大鼠卵巢功能的影响机制。**方法:**将40只动情周期规律的SD雌性大鼠随机分为:空白组、模型组、阳性组(补佳乐 0.099 mg/kg)、道地通管汤高剂量组(1.4 g/100 g)、道地通管汤中剂量组(0.7 g/100 g)。模型组、阳性组、道地通管汤高剂量组、道地通管汤中剂量组采用雷公藤多苷片混悬液(50 mg/kg)连续灌胃14 d, 构建卵巢早衰大鼠模型。造模结束后, 各组分别给予相应干预剂, 连续28 d。干预结束后, 各组均取大鼠血清和卵巢组织。HE染色观察大鼠卵巢组织形态结构; ELISA法检测大鼠血清AMH水平; IHC检测卵巢组织中的Bcl-2、Bax及VEGF蛋白表达; TUNEL染色观察卵巢内的颗粒细胞凋亡情况。**结果:**与空白组相比, 模型组大鼠各级生长卵泡均减少, 闭锁卵泡增多; 血清AMH水平显著下降( $P < 0.01$ ); 卵巢组织Bax蛋白表达升高( $P < 0.01$ ); Bcl-2、VEGF蛋白表达降低( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 卵巢组织内卵泡颗粒细胞凋亡率升高( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各中药剂量组血清AMH水平均有不同程度升高, 以高剂量组AMH变化最为突出( $P < 0.05$ ); 中药高剂量组卵巢组织Bax蛋白表达下降( $P < 0.05$ ), Bcl-2、VEGF蛋白表达升高( $P < 0.05, P < 0.05$ )。中药高剂量组卵巢组织内卵泡颗粒细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ )。**结论:**道地通管汤可改善卵巢组织学形态, 缓解卵巢损伤, 其机制可能与改善POF模型大鼠性激素水平, 减低了Bax蛋白在卵巢组织内的表达水平, 升高了Bcl-2及VEGF蛋白在卵巢组织内的表达水平, 减低了卵巢组织内卵泡颗粒细胞的凋亡率有关。

**[关键词]** 卵巢早衰; 道地通管汤; VEGF; Bax; Bcl-2; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2023)12-0899-06

### Study on the mechanism of effect of Daodi Tongguan Decoction on rats with premature ovarian failure

LONG Yun-xia<sup>1</sup>, ZHONG Yi-hui<sup>2</sup>, WU Yuan-yuan<sup>1</sup>, CHEN Qiu-jin<sup>1</sup>, DU Li<sup>1</sup>, ZHENG Hong<sup>1</sup>, LI Yin-ying<sup>1</sup>, LUO Zhi-juan<sup>1</sup>✉

(1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 2. Liuzhou Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou 545001, China)

**[Foundation Project]:** This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (81360594); Autonomous Region Traditional Chinese Medicine Inheritance and Development Special Fund Project-Luo Zhijuan Guangxi Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio Construction Project ([2022]2)

**[Author]:** LONG Yun-xia, E-mail: 997464338@qq.com.

**[Correspondence to]:** LUO Zhi-juan, Chief Physician, Professor, Masteral Supervisor, E-mail: lzj60123@163.com.

Received: 2023-01-27 Revised: 2023-04-12

JHMU, 2023;29(12):899-904

**View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.**

**[ABSTRACT] Objective:** To investigate the mechanism of the effect of Daodi Tongguan Decoction on ovarian function in rats with premature ovarian failure. **Methods:** Forty SD female rats with regular estrous cycle were randomly divided into the blank group, the model group, the positive group (Bujiale 0.099 mg/kg), the Daodigitongguan decoction high-dose group (1.4 g/100 g) and the Daodigitongguan decoction medium-dose group (0.7 g/100 g). The model group, positive group, Daodi Tongguan De-

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360594);自治区中医药民族医药事业传承与发展专项资金项目—罗志娟广西名中医传承工作室建设项目([2022]2)

**[作者简介]** 龙云霞, E-mail: 997464338@qq.com。

**[通讯作者]** 罗志娟, 主任医师, 教授, 硕士生导师, E-mail: lzj60123@163.com。

**[收稿日期]** 2023-01-27 **[修回日期]** 2023-04-12 **网络出版时间:** 2023-04-18 12:08:26

coction high-dose group and Daodi Tongguan decoction medium-dose group were given *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets suspension (50 mg/kg) by continuous gavage for 14 days to establish a rat model of premature ovarian failure. After the modeling, each group was given the corresponding intervention agent for 28 consecutive days. After the intervention, serum and ovarian tissue were collected from rats in each group. The morphological structure of rat ovarian tissue was observed after HE staining. Serum AMH level was determined by ELISA. The expressions of Bcl-2, Bax and VEGF in ovarian tissue were detected by IHC. The apoptosis of granulosa cells in ovary was observed by TUNEL. **Results:** Compared to the normal group, the growth follicles in the model group were reduced and the atretic follicles were increased. Serum AMH level was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The expression of Bax protein in ovarian tissue was increased ( $P < 0.01$ ). The protein expressions of Bcl-2 and VEGF were decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate of follicular granulosa cells in ovarian tissue was increased ( $P < 0.01$ ). Compared to the molding group, the serum AMH level in the TCM dose groups was increased to varying degrees, and the change of the AMH in high-dose group was the most significant ( $P < 0.05$ ). The expression of Bax protein in ovarian tissue decreased ( $P < 0.05$ ), while the expression of Bcl-2 and VEGF protein increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of follicular granulosa cells in ovarian tissue was decreased in the high dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Daodi Tongguan Decoction can improve the histological morphology of ovary and relieve ovarian injury, and its mechanism may be related to improving the sex hormone level of POF model rats, reducing the expression level of Bax protein in ovarian tissue, increasing the expression level of Bcl-2 and VEGF protein in ovarian tissue, and reducing the apoptosis rate of follicular granulosa cells in ovarian tissue.

[KEYWORDS] Premature ovarian failure; Daodi Tong guan soup; VEGF; Bax; Bcl-2; Apoptosis

卵巢早衰 (premature ovarian failure POF) 是一种以闭经、雌激素水平低、促性腺激素水平升高以及 40 岁前女性缺少成熟卵泡为特征的疾病<sup>[1]</sup>。POF 尚无明确病因,其影响因素可能有遗传因素、自身免疫系统疾病因素、医源性因素、病毒感染因素、环境因素等<sup>[2]</sup>。伴随着社会生活压力的逐渐加剧,女性 POF 发病率也逐年升高,约有 1% 的女性受到该疾病的影响,且发病人群越来越趋向年轻化<sup>[3]</sup>。目前治疗手段有限,以激素替代疗法为主,激素替代疗法副作用较明显,可能会增加妇女罹患乳房癌症、中风和胆囊疾病等风险<sup>[4]</sup>。中医药在此疾病治疗上具有较大优势,且副作用较小。道地通管汤是广西名中医罗志娟教授的临床验方,由黄芪、桂枝、土茯苓、玄参、三七、大血藤等 10 余味中药组成,具有益气健脾、清热利湿、活血化瘀的功效。在前期研究<sup>[5]</sup>已证实该方可改善盆腔的血运,减轻局部的微循环障碍,加快修复受损组织,对输卵管性不孕具有明显疗效,且该方治疗方式为灌肠,较口服用药无胃肠道反应。卵巢血管受损,会导致卵巢血液循环不佳,引发卵泡发育和排卵受损,闭锁卵泡增多,这可能是 POF 发生的原因之一<sup>[6]</sup>。本次实验在前期研究基础上,探究道地通管汤治疗卵巢早衰的疗效及机制,为该方剂的后续拓展开发提供实验数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠,雌性,7~8 周龄,体重 180~200 g,从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入, [质量合格编号:430727211100682662]。于广西中

医药大学的 SPF 级动物实验室饲养所购大鼠。适应性喂养 (7 d) 后,通过阴道脱落细胞涂片,观察大鼠两个动情周期 (10 d) 的变化情况,从中筛选 40 只具有规律动情周期的大鼠纳入后续实验。

1.1.2 药物 道地通管汤组方:土茯苓、玄参、黄芪、桂枝、三七、大血藤等药物,共 186 g,经水煎浓缩至生药量为 3.5、7.0 g/mL 的药液。雷公藤多苷片 (湖南千金协力药业有限公司、国药准字:Z43020138) 补佳乐 (拜耳医药保健有限公司、国药准字:J20171038) 以上药物均由广西中医药大学第一附属医院提供。

1.1.3 试剂 HE 试剂盒 (索莱宝公司、货号 G1120-100); FSH 试剂盒、E2 试剂盒、AMH 试剂盒 (伊特生命公司,货号分别为 YT003287-96T、YT003296-96T、YT002952-96T); Bax 一抗 (货号 AF0120)、Bcl-2 一抗 (货号 AF6139)、VEGF 一抗 (货号 AF5131),抗体均购于 Affinity 生物公司; DAPI 染色液 (博士德公司,货号 AR1177); tunel 试剂盒 (碧云天公司,红光,货号 C1089,绿光,货号 C1086)。

1.1.4 仪器设备 高速冷冻离心机,美国 Thermo, 型号 FRESCO 21; ASP300S 型脱水机,徕卡显微系统有限公司; RM2255 型全自动轮转式切片机,徕卡显微系统有限公司,微孔板恒温孵育器,中国米欧,型号 MT70-2; 酶标仪,北京普朗新技术有限公司,型号 DNM-9602; 光学显微镜,日本 OLYMPUS, 型号 BX43; 成像系统,日本 OLYMPUS; 型号 UC90。

### 1.2 方法

1.2.1 分组及造模方法 将经过筛选的 40 只具有正常动情周期的大鼠进行随机分组,分别为空白

组、模型组、阳性组、道地通管汤高剂量组、道地通管汤中剂量组,共5组,每组8只。除空白组大鼠外,其余各组大鼠均予雷公藤多苷片灌胃,剂量为50 mg/kg,连续14 d,建立卵巢早衰大鼠模型<sup>[7]</sup>,同时从造模第4 d起,每天行阴道脱落细胞涂片,至造模结束,若大鼠动情周期杂乱无章或延长( $\geq 6$  d)或长期停留在某一时期则认为造模成功<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 给药** 卵巢早衰大鼠模型建立成功后,给药量均按前期课题组所用的体表面积折算公式计算<sup>[9]</sup>,计算出各治疗组给药剂量,分别给药。阳性药组灌胃补佳乐0.099 mg/kg,道地通管汤高、中剂量组分别灌肠给予道地通管汤1.4 g/100 g、0.7 g/100 g。空白组、模型组大鼠均通过灌肠给予生理盐水2 mL/d,连续给药28 d。

**1.2.3 取材** 末次给药后,予大鼠禁食,次日予异氟烷使大鼠完全麻醉后,行腹主动脉取血,分离血清后,分装到EP管中,置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。分离出双侧卵巢,剥离多余的组织,一侧卵巢组织置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱以保存备用,另一侧卵巢组织完全浸泡于4%多聚甲醛溶液中固定备用切片。

**1.2.4 卵巢组织形态学观察** 将固定完全的卵巢组织,进行石蜡包埋、切片、烤片及HE染色处理后,在电子显微镜下观察卵巢组织形态结构,同时对各级卵泡进行计数。

**1.2.5 血清 AMH 水平检测** ELISA 法检测血清

AMH水平。以上操作均按照试剂说明书步骤进行。

**1.2.6 卵巢组织中Bax、Bcl-2、VEGF蛋白表达** 取卵巢组织石蜡样本,经切片、摊片、烤片、脱蜡、抗原修复、封闭、抗体孵化、DAB显色、苏木素复染,封片后于显微镜下观察。运用Image J图像处理软件,计算每张图片的光密度值。根据阳性细胞面积总和占视野面积的百分比进行统计分析。

**1.2.7 TUNEL染色检测大鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况** 取卵巢组织石蜡切片,按照检测试剂盒说明书进行染色操作,完成染色后观察组织凋亡情况,细胞凋亡率=(凋亡细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ 。

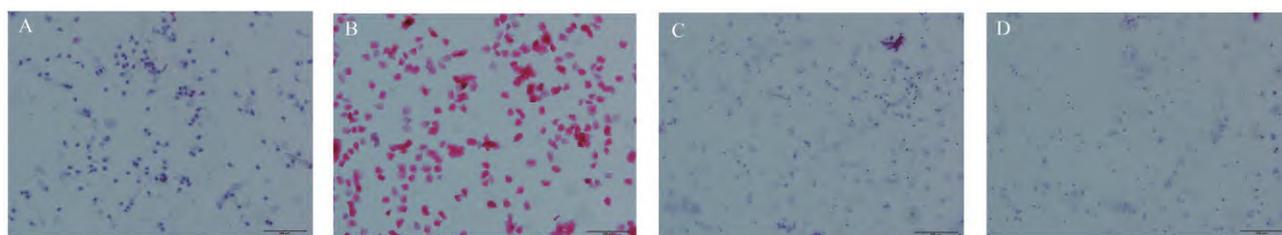
### 1.3 统计学处理

统计学分析使用Graphpad Prism6.0软件进行数据处理,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况及动情周期改变

与空白组大鼠相比,造模大鼠在造模期间,毛色晦暗无光泽,食欲一般,行动较缓,对周围事物比较敏感,喜倦缩角落,应激表现强烈。造模期间,阴道涂片观察发现,造模组大鼠动情期缩短或消失,间期延长,多数处于动情前期及间期。大鼠动情周期各时期阴道脱落细胞图,见图1。



A: 动情前期; B: 动情期; C: 动情后期; D: 动情间期

图1 大鼠动情周期各时期阴道脱落细胞图(HE,  $\times 200$ )

Fig 1 Estrous cycle of rats(HE,  $\times 200$ )

### 2.2 道地通管汤对POF大鼠卵巢组织形态学的变化

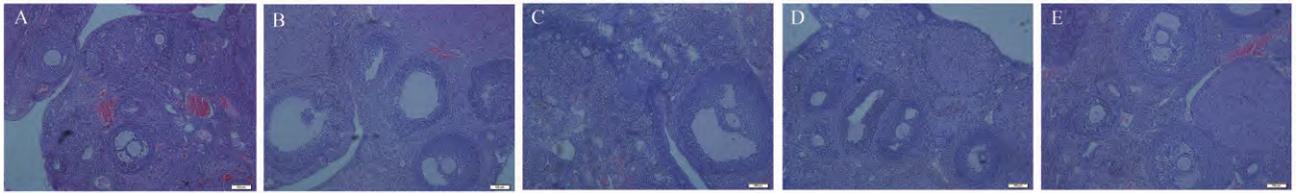
与空白组相比,模型组大鼠的卵巢内各级生长卵泡、黄体数量减少,闭锁卵泡的数量增多,生长卵泡内的颗粒细胞层数减少、排列紊乱,表现为核固缩,卵巢内血管减少;与模型组相比,阳性组、道地通管汤高、中剂量组大鼠卵巢内各级生长卵泡及黄体数量增多,闭锁卵泡较少,卵泡内颗粒细胞饱满、排列整齐、发育良好,卵巢内血供较丰富,见图2。

### 2.3 道地通管汤对POF大鼠血清AMH的影响

与空白组相比,各组AMH值均显著下降( $P < 0.01$ );与模型组相比,治疗组AMH均有不同程度上调,尤以道地通管汤高剂量组上调最为显著( $P < 0.01$ ),模型组与阳性组、中药中剂量组之间比较无差异( $P > 0.05$ ),见表1。

### 2.4 道地通管汤对POF大鼠卵巢组织VEGF、Bax及bcl-2蛋白表达的影响

Bax、Bcl-2、VEGF均表达于卵巢颗粒细胞、各级卵泡和黄体细胞中。与空白组相比,模型组中



A: 空白组; B: 模型组; C: 阳性组; D: 道地通管汤高剂量组; E: 道地通管汤中剂量组

图2 给药后各组大鼠卵巢组织形态图(HE, ×200)

Fig 2 Ovarian tissue morphology of rats in each group after administration (HE, ×200)

表1 道地通管汤对POF大鼠血清AMH的影响(n=8, x̄±s)

Tab 1 Effect of Daodi Tongguan Decoction on serum AMH of POF rats (n=8, x̄±s)

| 组别        | AMH(pg/mL)     |
|-----------|----------------|
| 空白组       | 4 261±513.4    |
| 模型组       | 2 731±568.7**  |
| 阳性组       | 3 146±328.0**  |
| 道地通管汤高剂量组 | 3 582±483.5*** |
| 道地通管汤中剂量组 | 3 023±344.2**  |
| F         | 27.04          |

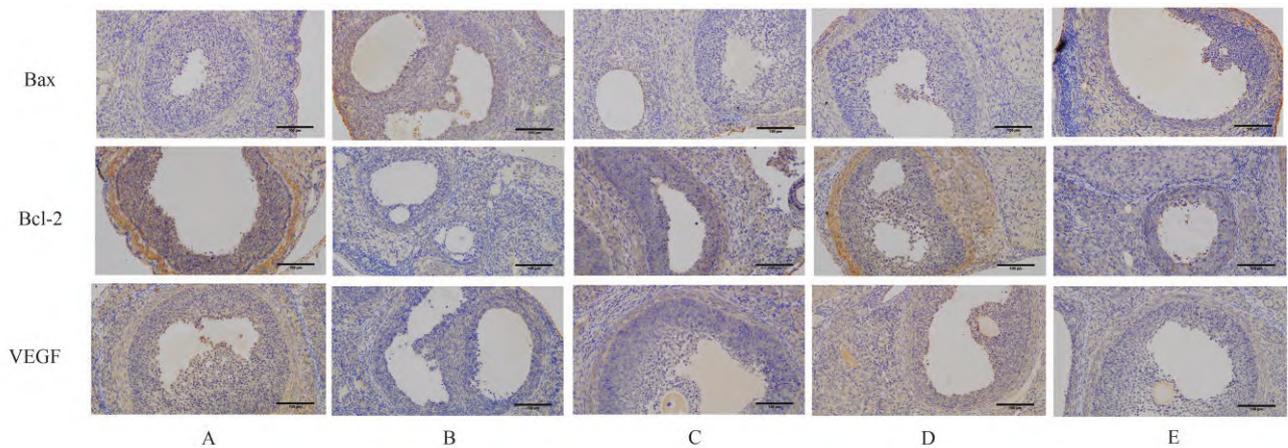
注:与空白组比较,\*\*P<0.01;与模型组比较,\*\*\*P<0.01。

达减弱(P<0.01, P<0.05);与模型组相比,阳性组、道地通管汤高剂量组 Bax 蛋白表达减弱(P<0.01, P<0.05),道地通管汤高剂量组 Bcl-2 和 VEGF 蛋白表达增强(P<0.05, P<0.05)。见图3、表2。

2.5 道地通管汤对 POF 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响

与空白组相比,模型组大鼠卵泡颗粒细胞凋亡水平显著升高(P<0.01);与模型组相比,道地通管汤高剂量组和阳性组卵泡的颗粒细胞凋亡水平降低(P<0.05),道地通管汤中剂量组卵泡颗粒细胞凋亡水平减低,但未达到统计学差异(P>0.05),见图4、表3。

Bax 蛋白表达增强(P<0.01), Bcl-2、VEGF 蛋白表



A: 空白组; B: 模型组; C: 阳性组; D: 道地通管汤高剂量组; E: 道地通管汤中剂量组

图3 道地通管汤对POF大鼠卵巢组织Bax、Bcl-2、VEGF蛋白的影响(免疫组化, ×200)

Fig 3 Effect of Daodi Tongguan Decoction on Bax, Bcl-2, VEGF protein in ovarian tissue of POF rats (IHC, ×200)

表2 道地通管汤对POF大鼠卵巢组织的VEGF、Bax及bcl-2蛋白表达平均积分吸光度的影响(n=8, x̄±s)

Tab 2 Effect of Daodi Tongguan Tang on the average integrated absorbance of VEGF, Bax, and Bcl-2 protein expression in ovarian tissue of POF rats (n=8, x̄±s)

| 组别        | Bax 蛋白              | Bcl-2 蛋白                | VEGF 蛋白               |
|-----------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| 空白组       | 0.052 93±0.007 044  | 0.203 2±0.051 51        | 0.214 7±0.065 69      |
| 模型组       | 0.494 1±0.026 22**  | 0.001 211±0.000 136 9** | 0.044 37±0.000 479 7* |
| 阳性组       | 0.021 75±0.014 91** | 0.087 92±0.024 83*      | 0.119 5±0.010 69      |
| 道地通管汤高剂量组 | 0.130 4±0.129 2#    | 0.144 7±0.009 818#      | 0.175 2±0.025 17#     |
| 道地通管汤中剂量组 | 0.215 7±0.090 06    | 0.0247 2±0.003 614**    | 0.084 14±0.009 147    |
| F         | 13.93               | 20.65                   | 9.098                 |

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。



A: 空白组; B: 模型组; C: 阳性组; D: 道地通管汤高剂量组; E: 道地通管汤中剂量组

图4 道地通管汤对POF大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响(tunel染色,  $\times 200$ )Fig 4 Effect of Daodi Tongguan Decoction on apoptosis of ovarian granulosa cells in POF rats (tunel staining,  $\times 200$ )表3 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率比较( $n=8, \bar{x} \pm s$ )Tab 3 Comparison of apoptosis rate of ovarian granulosa cells of rats in each group ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 凋亡率/%               |
|-----------|---------------------|
| 空白组       | 3.6 $\pm$ 1.140     |
| 模型组       | 54 $\pm$ 16.32**    |
| 阳性组       | 27.2 $\pm$ 9.550*#  |
| 道地通管汤高剂量组 | 31.4 $\pm$ 13.13**# |
| 道地通管汤中剂量组 | 38.8 $\pm$ 10.66**  |
| F         | 13.13               |

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

### 3 讨论

目前建立POF动物模型的方法有很多种,如化疗药物造模法、放射损伤造模法、自身免疫损伤造模法、雷公藤多苷片造模法等<sup>[10]</sup>。本次实验中,本课题选用了国内运用较为广泛的雷公藤多苷片造模法,该方法简单、可重复性高,所诱导的模型可高度模拟临床上因使用雷公藤多苷片治疗而造成卵巢早衰的妇女的疾病状态<sup>[11]</sup>。本次实验中,经雷公藤多苷片干预后的大鼠,AMH水平普遍降低。与FSH、E2随月经周期变化波动较大不同,AMH随月经周期可变性很小<sup>[12]</sup>。在目前性激素检测,窦卵泡计数、细胞因子、卵巢体积检量等常用来检测卵巢储备功能的方法中,有研究表明AMH可能是目前所有检测方法中准确度最高的一种<sup>[13]</sup>,所以本次实验选取AMH作为POF模型大鼠性激素水平评估。本次实验参考大鼠动情周期表现、卵巢形态学改变及AMH水平变化,可以推断本次的POF模型建立是成功的。

在中医古籍中并无卵巢早衰这一病名,可根据POF临床症状归属中医“血枯”,“经水早断”,“不孕”和“脏燥”等疾病范畴<sup>[14]</sup>。女子以血为本,气血充盈,肾精充足,则可滋润冲任、下养胞宫,反之气血亏虚无法濡养肾精,则妇人天癸竭,地道不通,形坏而无子,导致POF的发生<sup>[15]</sup>。脾主运化,为后天之本,气血生化之源,若脾失健运,运化失常,则经血化生无源,胞宫失于濡养,脾失健运,又易水湿内生,导致胞宫气血运行不畅,而致经闭、不孕等症。

岭南大部分地区,常年气候较湿热,湿易困脾,所以该地区居民脾胃病多发<sup>[16]</sup>,根据“百病皆由脾胃衰而生”及异病同治的指导思想,岭南医家在诸多疾病治疗中常运用具有清热利湿、益气健脾功效的药物,以求脾胃安则身安。受上述学术思想启发,结合前期研究成果,我们对道地通管汤治疗POF的可行性开展了研究。道地通管汤是岭南医家罗志娟教授自创的妇科临床验方,全方大部分药材取于岭南地区的道地药材,全方具有益气健脾,清热祛湿,活血化瘀的功效。方中以黄芪、桂枝益气健脾,鉴于岭南气候较为湿热,脾易为湿困,加以土茯苓、玄参等药清热利湿,又以POF病程较长,中医素有“久病必瘀”之说,遂再佐以三七、大血藤活血化瘀,从而达到健脾胃、清湿热、化瘀阻的效果。“脾胃和则血自生”“妇人所重在血,血能构精,胎孕乃成”,脾胃功能正常,方得气血充盈,妇人才能月经正常来潮,胎孕有成。

既往有实验证实VEGF、Bax及Bcl-2这3个蛋白与POF的发生存在相关联系。VEGF参与卵泡膜血管的生成<sup>[17]</sup>,而卵泡膜血管是卵泡从血液中吸取自身生长所需营养物质及激素的通道<sup>[18]</sup>。郭建飞等<sup>[19]</sup>研究发现一定浓度的外源性VEGF可以提高颗粒细胞的活力,降低细胞凋亡率。Bax和Bcl-2在卵巢组织中均有表达,在闭锁卵泡可检测到高Bax和/或低Bcl-2表达以及二者比值增高样改变<sup>[20]</sup>。诸多实验证实POF模型大鼠卵巢中的VEGF蛋白表达减少,提高VEGF蛋白的表达,或许可促进Bcl-2蛋白表达,降低Bax蛋白表达量,减少闭锁卵泡的发生<sup>[21,22]</sup>。在本次实验中,与模型组相比,中药治疗组大鼠卵巢组织病理形态均有不同程度改善,血清AMH值均有不同程度上升,且与所用药物浓度存在一定正相关性。根据上述结果,本课题组推测道地通管汤具有调节体内激素水平,改善内环境,缓解卵巢损伤的作用。与空白组相比,模型组大鼠卵巢组织Bax蛋白表达及卵泡中颗粒细胞凋亡率升高,VEGF、Bcl-2蛋白表达减弱。除伤口愈合及肿瘤等特殊病理情况下,绝大部分器官都不会主动重塑血管系统。但卵巢较为特殊,其血管

系统会伴随排卵周期变化发生血管生成和血管通透性增加的改变<sup>[23]</sup>。VEGF在新生血管的构建过程中起着重要的作用,新生血管的数量决定着组织的营养环境<sup>[24]</sup>。VEGF表达减少提示雷公藤多苷可能阻断了卵巢内部分新生血管的形成,卵巢内的营养供给通道减少,卵泡发育过程过早中止,迫使闭锁卵泡增多,导致了POF的发生。其次VEGF的表达减少可能打破了Bax和Bcl-2之间的调控平衡,启动了促凋亡机制,进一步加剧了闭锁卵泡的发生。从本次实验结果来看,与模型组相比,道地通管汤治疗组VEGF、Bcl-2表达升高,Bax表达下降,说明道地通管汤具有促进卵巢内血管生成,改善卵巢营养环境,抑制促凋亡蛋白表达的作用。

综上所述,本研究结果显示道地通管汤可以改善POF大鼠的血清激素水平及卵巢组织结构,减少卵巢中颗粒细胞的凋亡,减缓POF的进程。其具体机制可能与调节POF大鼠卵巢组织中VEGF、Bcl-2、Bax蛋白的表达,促进卵巢内受损组织修复及减少卵巢中颗粒细胞的凋亡有关。该研究为POF的治疗提供了新思路,同时也为扩大道地通管汤的应用提供了理论支持。

#### 作者贡献度说明:

龙云霞:实验设计及操作、分析数据、撰写论文;罗志娟、钟义惠、吴媛媛:设计实验,并对论文提出指导意见;陈淑锦、杜立、郑虹、李胤颖:参与实验资料收集。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

#### 参考文献

- Chon SJ, Umair Z, Yoon MS. Premature ovarian insufficiency: Past, present, and future[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:672890.
- 张晓静,冶尔西,季德江,等.近5年卵巢早衰的发病机制及中西医治疗进展[J].*实用中医内科杂志*,2022,36(12):79-82.
- Laven JS. Primary ovarian insufficiency [J]. *Semin Reprod Med*, 2016, 34(4): 230-234.
- Bhardwaj P, Au CC, Benito-Martin A, et al. Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression [J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2019,189:161-170.
- 罗志娟,马钰婷,吴媛媛,等.道地通管汤对输卵管炎性不孕家兔PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>(2a)、CRP、IL-6的影响[J].*广西医学*,2012,34(11):1509-1511.
- Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection[J]. *Hum Reprod Update*,2019,25(6):673-693.
- 张琴,嵇波,谢亚娜,等.温针结合电针对卵巢早衰大鼠血清性激素及炎症因子的影响[J].*中国中医药信息杂志*,2021,28(9):62-67.
- 陈峰荣,周彤,尚坤.二至丸对卵巢早衰大鼠治疗作用及机制的实验研究[J].*中华中医药学刊*,2022,40(7):145-149,271-273.
- 潘小敏,吴媛媛,罗志娟,等.道地通管汤对输卵管炎大鼠转化生长因子-β II型受体和Smad2的mRNA表达的影响[J].*广西医学*,2016,38(9):1189-1191,1196.
- 王洋,张斐,许洁夏,等.三种卵巢早衰大鼠造模方法比较研究[J].*中国中西医结合杂志*,2022,42(10):1225-1230.
- 孟天琦,马宏博.雷公藤生殖毒性机制研究进展[J].*中华中医药学刊*,2020,38(3):196-198.
- Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve: Update on assessing ovarian function [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2020,105(11):3361-3373.
- Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility[J].*Assist Reprod Genet*, 2020,37(1):89-100.
- 崔楠,杨琪,杨亚楠,等.卵巢早衰的中医病机及其方剂现代药理探索[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2022,24(5):2064-2070.
- 胡金芳,刘慧萍,张楚洁,等.尤昭玲运用助卵方治疗卵巢早衰经验[J].*中华中医药杂志*,2021,36(6):3369-3372.
- 吴奕芳.岭南医家诊治脾胃病临床文献整理及其学术经验研究[D].广州中医药大学,2018.
- Souza SS, Alves BG, Alves KA, et al. Heterotopic autotransplantation of ovarian tissue in a large animal model: Effects of cooling and VEGF [J]. *PloS One*, 2020, 15(11):e0241442.
- Orisaka M, Miyazaki Y, Shirafuji A, et al. The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review[J]. *Reprod Med Biol*, 2021,20(2):169-175.
- 邬建飞. VEGF对牦牛卵泡颗粒细胞增殖与功能的影响 [D];西南民族大学,2022.
- 严如根,齐芳华,何静,等.益肾调经方对卵巢储备功能减退大鼠卵巢组织PTEN/PI3K/AKT信号通路的影响[J].*中药材*,2022(7):1723-1729.
- Ling L, Feng X, Wei T, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019,10(1):46.
- 林光耀,张米佳,叶涛,等.葆青颗粒对卵巢储备功能下降模型大鼠性激素水平和Bax、Bcl-2、VEGF的影响[J].*中国中医基础医学杂志*,2022,28(4):540-544.
- Soygur B, Laird DJ. Ovary development: Insights from a three-dimensional imaging revolution [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021,9:698315.
- Devesa J, Caicedo D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10:450.

[本文编辑] 宋睿璞 邹洲 朱金月