

• XXXX •

三甲散加减方通过调控炎症机制与微血管生成改善糖尿病小鼠卵巢功能

刘金雪, 苏丽清*, 喻嵘, 刘琴, 阳缘乐, 易诗林, 张璐
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨糖尿病卵巢功能障碍小鼠的炎症损伤与微血管生成障碍机制及三甲散加减方的干预作用。方法:采用高糖高脂喂养联合链脲佐菌素(STZ)诱导制备糖尿病模型小鼠,经阴道涂片镜检确认动情周期紊乱后建立糖尿病卵巢功能障碍模型小鼠。造模成功的40只小鼠随机分为5组:模型组、三甲散加减方高剂量组(17.94 g·kg⁻¹)、三甲散加减方中剂量组(8.97 g·kg⁻¹)、三甲散加减方低剂量组(4.49 g·kg⁻¹)、西药组(二甲双胍,0.2 g·kg⁻¹)。选取8只同批次小鼠作为空白组。连续灌胃给药28 d后,检测空腹血糖(FBG);酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清抑制素B(INHB)、雌二醇(E₂)、卵泡刺激素(FSH)、抗缪勒管激素(AMH)、促黄体生成素(LH)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)水平;苏木素-伊红(HE)及马松(Masson)染色观察小鼠卵巢组织病理形态改变及卵泡计数;透射电镜观察卵巢组织超微结构;原位末端标记法(TUNEL)检测卵巢颗粒细胞凋亡情况;免疫荧光检测卵巢微血管数量;免疫组化及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、紧密连接蛋白-5(Claudin-5)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、核糖体蛋白S6激酶1(p70S6K1)、髓样分化因子88(MyD88)、核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠FBG、FSH、LH、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平显著升高($P<0.01$),E₂、AMH、INHB水平显著降低($P<0.01$);卵巢内卵泡发育不良、胶原纤维面积显著增加($P<0.01$);卵巢组织超微结构受损、微血管数量显著降低($P<0.01$),TUNEL阳性率显著增加($P<0.01$);VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1及p70S6K1蛋白表达显著下降($P<0.01$),MyD88与NF- κ B表达显著上升($P<0.01$);与模型组比较,三甲散加减方高、中剂量组及二甲双胍组小鼠FBG、FSH、LH、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平显著降低($P<0.01$),E₂、AMH、INHB水平显著升高($P<0.01$);卵巢内卵泡发育良好、胶原纤维面积显著减少($P<0.01$);卵巢组织超微结构改善、微血管数量显著增多($P<0.01$),TUNEL阳性率显著减少($P<0.01$);VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1、p70S6K1蛋白表达显著增高($P<0.01$),MyD88、NF- κ B蛋白表达显著降低($P<0.01$);三甲散加减方低剂量组上述指标改善差异无统计学意义。结论:三甲散加减方可通过降低血糖、调节激素水平、促进微血管再生、调节MyD88/NF- κ B信号通路等多重机制来改善糖尿病卵巢功能障碍小鼠的卵巢储备功能。

[关键词] 三甲散加减方; 2型糖尿病; 卵巢功能障碍; 微血管生成; 炎症

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251908

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX



Role of Modified Sanjiasan in Improving Ovarian Dysfunction in Diabetic Mice via Modulating Inflammatory Mechanism and Microangiogenesis

LIU Jinxue, SU Liqing*, YU Rong, LIU Qin, YANG Yuanle, YI Shilin, ZHANG Lu
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[收稿日期] 2025-09-17

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2025JJ90024);长沙市自然科学基金项目(kq2502206);湖南中医药大学校级科研项目重点项目(2024XJZA004);湖南省中医药管理局中医药科研项目(B2024001);湖南省教育厅科学研究项目青年项目(21B0379);湖南省大学生创新训练项目(S202412661005)

[第一作者] 刘金雪,在读硕士,从事中医药防治内分泌代谢性疾病和妇科疾病的相关研究,E-mail:1131346414@qq.com

[通信作者] *苏丽清,博士,副教授,副主任医师,从事中医药防治内分泌代谢性疾病和妇科疾病的临床与实验研究,E-mail:250638008@qq.com

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of inflammatory injury and microangiogenesis disorder in diabetic mice with ovarian dysfunction and the intervention effect of modified Sanjiasan. **Methods:** Diabetic model mice were established by high-glucose and high-fat diet combined with streptozotocin (STZ), and the model of diabetic mice with ovarian dysfunction was established after confirming estrous cycle disorder through vaginal smear examination. Forty successfully modeled mice were randomly assigned to five groups: a model group, high- (17.94 g·kg⁻¹), medium- (8.97 g·kg⁻¹), and low-dose (4.49 g·kg⁻¹) modified Sanjiasan groups, and a western medicine group (metformin, 0.2 g·kg⁻¹). Eight mice from the same batch were selected as the blank control group. After 28 days of consecutive intragastric administration, fasting blood glucose (FBG) was measured. The serum levels of inhibin B (INHB), estradiol (E₂), follicle-stimulating hormone (FSH), anti-Müllerian hormone (AMH), luteinizing hormone (LH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ovarian histopathology and follicle count were evaluated via hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Ultrastructure was observed by transmission electron microscopy (TEM). Apoptosis of ovarian granulosa cells was detected via terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. Microvascular density in ovary was quantified by immunofluorescence. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), Claudin-5, zonula occludens-1 (ZO-1), 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (p70S6K1), myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88), and nuclear factor kappa B (NF- κ B) was analyzed using immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Compared with the blank control group, the model group exhibited significantly elevated FBG, FSH, LH, TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels ($P < 0.01$), decreased E₂, AMH, and INHB levels ($P < 0.01$), poor follicular development, an increased collagen fiber area ($P < 0.01$), impaired ultrastructure of ovarian tissue, a decreased number of microvessels ($P < 0.01$), an increased TUNEL-positive rate ($P < 0.01$), reduced protein expression levels of VEGF, PDGF, Claudin-5, ZO-1, and p70S6K1 ($P < 0.01$), and increased MyD88 and NF- κ B expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, the high- and medium-dose modified Sanjiasan groups and the western medicine group showed decreased levels of FBG, FSH, LH, TNF- α , IL-6, and MCP-1 ($P < 0.01$), increased levels of E₂, AMH, and INHB ($P < 0.01$), improved ovarian follicular development, a reduced collagen fiber area ($P < 0.01$), improved ultrastructure of ovarian tissue, an increased number of microvessels ($P < 0.01$), a decreased TUNEL-positive rate ($P < 0.01$), upregulated protein expression levels of VEGF, PDGF, Claudin-5, ZO-1, and p70S6K1 ($P < 0.01$), and downregulated protein expression levels of MyD88 and NF- κ B ($P < 0.01$). None of these improvements were statistically significant in the low-dose modified Sanjiasan group. **Conclusion:** Modified Sanjiasan improves ovarian reserve in diabetic mice with ovarian dysfunction by reducing blood glucose, regulating hormones, promoting microangiogenesis, and modulating the MyD88/NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] modified Sanjiasan; type 2 diabetes mellitus; ovarian dysfunction; microangiogenesis; inflammation

糖尿病(DM)是一种以内分泌代谢长期紊乱为特征的慢性疾病,其核心标志为持续性高血糖。随着DM的发病年龄逐渐趋于年轻化^[1],DM所引发的生殖损伤正在引起医疗领域的广泛关注^[2-3]。据流行病学数据揭示,DM女性患者更容易表现出青春期和月经初潮延迟、月经不调(尤其是少经)、高雄激素血症(HA)、多囊卵巢综合征(PCOS)、早发性卵巢功能不全(POI)等与卵巢功能障碍相关的生殖内分泌疾病^[4-5]。研究表明,慢性低度炎症在DM及其微血管病变中发挥了重要作用^[6]。新近研究进一步证实,微血管病变是导致卵巢功能减退的重要病理基础^[7-8]。因此,慢性低度炎症可能是微血管病变介导的DM女性卵巢功能障碍的重要病理过程,但其具体的分子机制尚未完全明确。

三甲散出自明末温病名家吴又可著作《温疫论·主客交》,该方补能益肾培本,攻能行走攻窜,直入经络,无处不至,具有益气养阴、活血祛瘀、宣风透邪、搜剔通络、消痈散肿、破积攻坚等功效,在妇科疾病中应用广泛且疗效佳^[9]。本实验选用的三甲

散加减方是在经典名方三甲散的基础上,去蝉蜕、穿山甲,并增用水蛭化裁而来,现代药理学证实,该方及其主要药物成分具有显著的降血糖、改善微循环及抗炎作用^[10-11]。本研究基于炎症损伤与微血管生成障碍机制,初步探讨三甲散加减方对DM卵巢功能障碍小鼠的治疗作用,为临床治疗DM卵巢功能障碍及拓宽三甲散加减方临床应用范围提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级4周龄C57BL/6J雌性小鼠,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号SCXK(湘)2019-0004,于湖南中医药大学动物实验中心SPF级动物房饲养,实验单位使用许可证号SYXK(湘)2019-0009。

1.2 伦理 经湖南中医药大学动物委员会批准,伦理审查批号HNUCM21-2403-03。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ)、0.1柠檬酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为S8050、C1013);抑制素B(INHB)、雌二醇(E₂)、卵泡刺激素

(FSH)、抗缪勒管激素(AMH)、促黄体生成素(LH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为m1301823、m1001962、m1001910、m1037597、m1063366、YJ002095、YJ063159、YJ037840);二甲苯(国药集团上海有限公司,批号10023418);无水乙醇(天津市致远化学试剂有限公司,批号10023418);一步法原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(上海翊圣生物,批号40306ES50);CD34抗体(英国Abcam公司,批号ab81289);多聚甲醛溶液、戊二醛固定液、磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2-7.6)、PBS-牛血清白蛋白(BSA)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液($5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、伊红染色液、苏木素染色液、丽春红染液、马松(Masson)染色液、缓冲甘油、枸橼酸盐缓冲液/三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)抗原修复液、山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG, H+L)二抗、山羊抗兔IgG(H+L)二抗(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号分别为AW10056b、AW10092a、AWI0129a、AWI0120a、AWC0293a、AWI0029a、AWI0001a、AWB0225b、AWI0253a、AWT0124a、AWI0113a/AWI0153a、AWS0001、AWS0002);血管内皮生长因子(VEGF)抗体、血小板衍生生长因子(PDGF)抗体、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)抗体、核糖体蛋白S6激酶1(p70S6K1)抗体、髓样分化因子88(MyD88)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为66828-1-Ig、13449-1-AP、21773-1-AP、14485-1-AP、23230-1-AP、10494-1-AP);紧密连接蛋白-5(Claudin-5)抗体、核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-10296R、bs-0465R)。

1.4 药物及其制备 三甲散加减方:鳖甲12g(湖南仁上正元中药饮片有限公司,批号24041001);龟甲12g、僵蚕6g(湖南衡岳中药饮片有限公司,批号分别为24040302、24042705);水蛭3g、当归6g(湖南三湘中药饮片有限公司,批号分别为2024031301、2024031604);土鳖虫12g(湖南省松龄堂中药饮片有限公司,批号24012403),生牡蛎6g(长沙新林制药有限公司,批号240501);白芍9g、炙甘草3g(亳药千草中药饮片有限公司,批号分别为2405056、2403211)。所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。鳖甲、龟甲、生牡蛎武火先煎30min后加入其他药材经水煎煮2次,过

滤取汁,合并2次药液,在恒温水浴条件下通过旋转蒸发浓缩,制备成高($17.94\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中($8.97\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低($4.49\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)3种不同剂量浓度的药汁,完成灭菌处理后存放于4℃冰箱中备用。盐酸二甲双胍片($0.25\text{ g}/\text{片}$,石家庄以岭药业股份有限公司,国药准字H20054790,批号B2401001)。

1.5 仪器 GL-88B型旋涡混合器、TS-92型摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-24DN型电泳槽、DYCZ-40D型转膜仪、DYY-6C型恒温箱(北京六一生物科技有限公司);PHS-3C型精密PH计、JB-13型磁力搅拌器(上海仪电科学仪器股份有限公司);JJ224BC型电子天平(美国双杰公司);BioPreP-24型生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司);DHP-500型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司);M199型切片刀[徠卡相机贸易(上海)有限公司];YD-315型切片机(金华市益迪医疗设备有限公司);BMJ-A型包埋机(常州市中威电子仪器有限公司);JEM1400型透射电子显微镜(日本电子株式会社);BA410T型光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 采用STZ腹腔注射联合持续高糖高脂喂饲的方法构建T2DM模型^[12],具体步骤如下:选取4周龄C57BL/6J小鼠70只,进行为期4周的高糖高脂饲料喂养。造模前1d,小鼠禁食8h(不禁水),将STZ溶解于 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH值4.0的柠檬酸钠缓冲液中,按照 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量对造模小鼠行腹腔注射,1次/d,连续注射5d,继续给予高糖高脂饲料喂饲2周。在STZ注射后第3、7、14天,通过小鼠尾静脉采血检测FBG,3次检测结果均显示 $\text{FBG}>11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 提示T2DM模型造模成功(剔除血糖不达标的10只小鼠及造模过程中死亡的2只小鼠,造模成功率为82.86%)^[12]。后连续14d取T2DM模型小鼠阴道脱落细胞涂片,镜下观察显示小鼠动情周期停滞、延长、紊乱即DM卵巢功能障碍模型构建成功^[13](剔除动情周期未出现明显异常的18只小鼠,造模成功率为68.97%)。造模成功后的40只小鼠随机分为5组:模型组,中药高、中、低剂量组,西药组(二甲双胍)。空白组选取4周龄C57BL/6J雌鼠8只,均置于SPF级环境中饲养。空白组饲喂普通饲料,模型组饲喂高糖高脂饲料。中药组分别给予三甲散加减方临床等效剂量(中剂量)、低剂量、高剂量(8.97 、 4.49 、 $17.94\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,西药组给予二甲双胍($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,其余组给予等量生理

盐水灌胃,每日定时1次,连续给药28 d。以上各组灌胃剂量[按人(70 kg)和动物体表面积折算的等效剂量比值表换算]及腹腔注射剂量均参照参考文献[14]。

2.2 空腹血糖检测 小鼠禁食不禁水8 h,采用尾静脉取血,用血糖仪测量各组小鼠FBG。

2.3 ELISA检测血清性激素及卵巢组织炎症因子的含量 全血标本于室温放置2 h后于4 °C 3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6 cm),取上清,参照ELISA试剂盒操作步骤进行操作检测血清E₂、FSH、AMH、INHB、LH、TNF- α 、IL-6、MCP-1的含量。

2.4 苏木素-伊红(HE)、Masson染色检测卵巢组织病理形态改变情况 60 °C烤片12 h后进行常规切片脱蜡至水,将切片置于二甲苯中20 min,3次。然后依次在100%,100%,95%,85%和75%乙醇中每级放置5 min。再用蒸馏水浸洗5 min。进行HE、Masson染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察卵泡及卵巢间质纤维化情况。

2.5 电镜检测卵巢组织超微结构 留取卵巢组织,2.5%戊二醛固定,脱水处理后环氧树脂浸透包埋,超薄切片(厚度70 μ m),醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察各组卵巢组织超微结构的改变。

2.6 TUNEL检测卵巢颗粒细胞凋亡情况 留取卵巢组织,置于4%多聚甲醛中固定48 h,常规组织脱水、石蜡包埋切片(4 μ m),晾干备用。脱蜡处理后,按试剂盒指定比例配制TUNEL反应混合液。在含有适量蛋白酶K的缓冲液中对组织切片进行抗原修复处理,使用PBS对组织切片进行彻底清洗。TUNEL反应混合液均匀涂抹在切片上于37 °C恒温环境孵育1 h。孵育完成后,PBS冲洗切片。DAPI染料进行细胞核染色5 min,用PBS洗涤3次,中性树脂封片处理。荧光显微镜下观察切片并拍照。

2.7 免疫荧光检测卵巢微血管密度 切片脱蜡至水同2.4。pH值6.0柠檬酸缓冲液水浴锅中加热使抗原修复,0.3% Tri-Ton的Tris缓冲盐溶液(TBS)透膜处理10 min。将切片浸入0.01 M柠檬酸钠抗原修复液(pH值6.0)进行热修复抗原。冷却后0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH值7.2~7.6)洗涤3 min×3次。切片置于硼氢化钠溶液中室温下30 min,水漂洗5 min。切片置于75%乙醇溶液中浸泡15 s~1 min。切片置于苏丹黑染液中室温下5 min,水冲洗3 min。10%正常血清/5% BSA封闭60 min。后经由

Proteinase K处理后进行PBS清洗。加入一抗(CD34,1:100)4 °C过夜,PBS冲洗5 min×3次。加入二抗50~100 μ L抗-兔-IgG标记荧光抗体后37 °C孵育90 min,PBS冲洗5 min×3次。最后DAPI工作液37 °C染核10 min、PBS冲洗5 min×3次后缓冲甘油封片。于荧光显微镜下观察。

2.8 免疫组化检测卵巢组织血管生成相关因子VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1及信号通路分子MyD88、NF- κ B、p70S6K1表达 切片脱蜡至水同

2.4项。热修复抗原同**2.7项**。加入1%高碘酸室温15 min灭活内源性酶后PBS冲洗3 min×3次。滴加稀释一抗VEGF(1:200)、PDGF(1:200)、Claudin-5(1:200)、ZO-1(1:200)、MyD88(1:100)、NF- κ B(1:100)、p70S6K1(1:200)4 °C过夜,PBS冲洗5 min×3次。滴加二抗辣根过氧化物酶(HRP,1:200)37 °C孵育30 min,PBS冲洗5 min×3次。滴加显色剂DAB工作液50~100 μ L于室温下孵育1~5 min,蒸馏水冲洗。苏木素复染5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS返蓝。乙醇各级脱水后取出置于二甲苯10 min×2次,中性树胶封片、显微镜观察,采用Image J软件分析蛋白的平均积分吸光度AA。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织血管生成相关因子VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1及信号通路分子MyD88、NF- κ B、p70S6K1表达 组织蛋白提取同**2.3项**,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法测定各组总蛋白浓度进行蛋白定量。电泳分离蛋白质后250 mA条件下转膜,室温下封闭90 min。加入稀释后的一抗VEGF(1:1 000)、PDGF(1:1 000)、Claudin-5(1:1 000)、ZO-1(1:5 000)、MyD88(1:5 000)、NF- κ B(1:1 000)、p70S6K1(1:2 000)、GAPDH(1:5 000)一起孵育,孵育结束后1×PBST冲洗10 min×3次。后加入二抗HRP(1:5 000)室温孵育90 min。最后使用增强型化学发光(ECL)法显影,凝胶成像系统成像。

2.10 统计学分析 采用SPSS 27.0软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,完全随机设计多样本计量资料若满足正态性及方差齐性,则用单因素方差分析,组间两两比较使用最小显著性差异法(LSD);若不满足方差齐性,则用韦尔奇检验进行分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 三甲散加减方对DM小鼠FBG的影响 与空白组比较,其余各组小鼠FBG显著增高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组差异无统计学意义。给药

28 d后,与模型组比较,中药高、中剂量组和二甲双胍组FBG显著降低($P<0.01$),中药低剂量组差异无统计学意义。见表1。

表1 三甲散加减方对DM小鼠FBG的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of modified Sanjiasan on FBG in DM mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前1天	给药28 d后
空白组		6.00±0.88	6.04±0.62
模型组		17.60±2.34 ¹⁾	17.50±2.04 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	17.46±2.11 ¹⁾	9.59±1.45 ²⁾
中药中剂量组	8.97	17.89±2.39 ¹⁾	9.70±1.29 ²⁾
中药低剂量组	4.49	16.58±2.27 ¹⁾	15.13±1.76
二甲双胍组	0.2	17.38±2.07 ¹⁾	7.79±1.29 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表2-表10同)

3.2 三甲散加减方对DM小鼠血清E₂、AMH、INHB、LH、FSH水平表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠血清E₂、AMH、INHB水平显著降低($P<0.01$),FSH、LH水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,中药高、中剂量组及二甲双胍组FSH、LH水平显著降低($P<0.01$),E₂、AMH、INHB水平显著升高($P<0.01$),中药低剂量组对血清性激素水平的改善差异无统计学意义。见表2。

3.3 三甲散加减方对DM小鼠血清TNF- α 、IL-6、MCP-1水平表达的影响 与空白组比较,模型组

小鼠血清TNF- α 、IL-6、MCP-1水平显著升高($P<0.01$),提示DM卵巢功能障碍小鼠血清炎症因子水平紊乱。与模型组比较,中药高、中剂量组及二甲双胍组TNF- α 、IL-6、MCP-1水平显著降低($P<0.01$),中药低剂量组TNF- α 、IL-6、MCP-1水平降低差异无统计学意义。见表3。

3.4 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织卵泡情况的影响 HE染色显示,空白组小鼠卵巢组织各级卵泡正常发育、数量较多,卵泡生长活跃,卵泡液充足,颗粒细胞形态完整且排列整齐,微血管网络丰富且清晰可见。模型组和中药低剂量组卵泡发育不良,各级卵泡数明显减少,闭锁卵泡及空腔卵泡较多,颗粒细胞及微血管网络稀疏。其余给药组小鼠卵巢内均可见各阶段发育卵泡,其中原始卵泡、次级卵泡及窦卵泡均较模型组有增多趋势,初级卵泡变化不明显,闭锁卵泡有减少趋势,黄体变化不明显,颗粒细胞层形态接近空白组且紧密排列,微血管网较模型组有明显增多。见图1。

3.5 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织间质纤维化情况的影响 Masson染色显示,与空白组小鼠卵巢组织染色比较,模型组小鼠蓝色染色胶原纤维面积显著增加($P<0.01$),经三甲散加减方干预后,各给药组小鼠卵巢组织蓝染胶原纤维面积均减少,尤其是中药高、中剂量组和二甲双胍组蓝染面积显著减少($P<0.01$),中药低剂量组差异无统计学意义。见表4、图2。

表2 三甲散加减方对DM小鼠血清E₂、AMH、INHB、LH、FSH含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of modified Sanjiasan on serum levels of E₂, AMH, INHB, LH and FSH in DM mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E ₂ /pmol·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	AMH/ng·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	INHB/ng·L ⁻¹
空白组		54.71±4.37	14.97±2.49	1679.08±59.25	21.31±1.34	22.32±2.06
模型组		14.43±1.70 ¹⁾	38.91±3.82 ¹⁾	774.07±56.92 ¹⁾	34.61±2.48 ¹⁾	10.75±1.18 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	37.32±4.63 ²⁾	26.01±2.80 ²⁾	1228.89±94.42 ²⁾	24.95±1.71 ²⁾	16.23±1.38 ²⁾
中药中剂量组	8.97	37.35±3.81 ²⁾	26.62±2.47 ²⁾	1223.88±132.78 ²⁾	27.21±2.19 ²⁾	15.50±1.18 ²⁾
中药低剂量组	4.49	14.61±1.99	38.02±3.99	840.59±82.86	33.65±2.42	10.66±0.94
二甲双胍组	0.2	34.08±3.65 ²⁾	25.61±2.56 ²⁾	1195.29±86.66 ²⁾	24.78±2.10 ²⁾	16.56±2.13 ²⁾

3.6 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织超微结构的影响 透射电镜下观察卵巢组织超微结构,绿色箭头表示正常线粒体,红色箭头表示受损线粒体。结果如下,空白组卵巢颗粒细胞及微血管内皮细胞形态规则,胞核居中,线粒体结构正常,数量丰富,且聚集分布在细胞核周围,内部无明显肿胀,内膜嵴结构清晰可见。模型组和中药低剂量组微血管内皮细胞形态不规则,胞核皱缩,线粒体结构受损,肿胀明显,出现嵴变短或消失,内外膜破损,数量减

少。其余给药组较模型组均有所改善。见图3。

3.7 三甲散加减方对DM小鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况的影响 TUNEL荧光检测显示,绿色荧光区域为TUNEL检测荧光标记的卵巢颗粒细胞凋亡区域。与空白组比较,模型组TUNEL阳性率显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,中药高中剂量组及二甲双胍组TUNEL阳性率显著减少($P<0.01$),中药低剂量组TUNEL阳性率减少,但差异无统计学意义。见图4、表5。

表3 三甲散加减方对DM小鼠血清TNF- α 、IL-6、MCP-1含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of modified Sanjiasan on serum TNF- α , IL-6 and MCP-1 in DM mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6	MCP-1
空白组		59.00±5.82	40.36±4.32	21.32±1.64
模型组		153.42±7.53 ¹⁾	105.46±11.76 ¹⁾	68.57±3.96 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	97.15±10.41 ²⁾	66.23±4.89 ²⁾	45.19±5.95 ²⁾
中药中剂量组	8.97	116.19±8.37 ²⁾	73.48±6.03 ²⁾	49.29±3.00 ²⁾
中药低剂量组	4.49	144.14±9.61	97.13±8.57	69.38±3.56
二甲双胍组	0.2	95.48±10.84 ²⁾	63.96±5.10 ²⁾	47.46±2.87 ²⁾

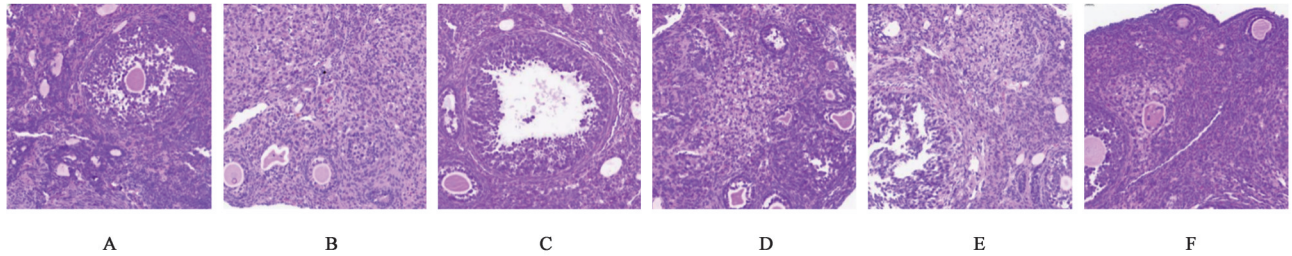
3.8 三甲散加减方对DM小鼠卵巢微血管数量的影响 免疫荧光检测显示,红色荧光区域为CD34标记的卵巢微血管。与空白组比较,模型组小鼠卵巢微血管数量差异显著($P<0.01$)。与模型组比较,中药高中剂量组及二甲双胍组微血管数量显著增多($P<0.01$),中药低剂量组微血管数量增多差异无统计学意义。见图4、表6。

表4 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织间质纤维化阳性面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of modified Sanjiasan on ovarian stromal fibrosis area in DM mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	纤维化阳性面积/%
空白组		0.251 2±0.009 0
模型组		0.684 7±0.072 9 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	0.446 5±0.029 2 ²⁾
中药中剂量组	8.97	0.506 6±0.006 3 ²⁾
中药低剂量组	4.49	0.607 9±0.040 1
二甲双胍组	0.2	0.404 8±0.056 5 ²⁾

3.9 三甲散加减方对DM小鼠卵巢血管生成相关因子VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠卵巢VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药高中剂量组及二甲双胍组VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1蛋白表达显著升高($P<0.01$),中药低剂量组上述指标均升高不明显,差异无统计学意义。见图5、表7及图6、表8。



注:A.模型组;B.空白组;C.中药高剂量组;D.中药中剂量组;E.中药低剂量组;F.二甲双胍组(图2-图8同)
图1 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织形态的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of modified Sanjiasan on ovarian histomorphology in DM mice (HE, ×400)

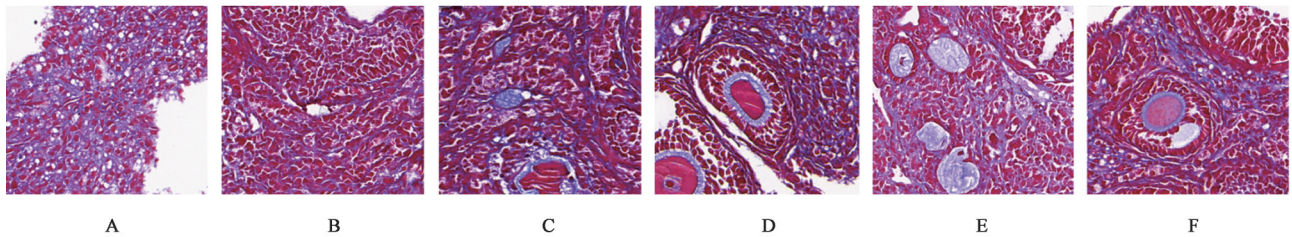


图2 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织间质纤维化的影响(Masson,×400)
图2 Effect of modified Sanjiasan on ovarian histomorphology in DM mice (Masson, ×400)

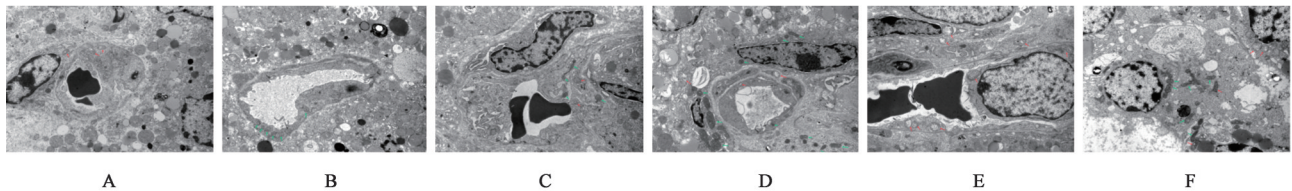


图3 三甲散加减方对DM大鼠卵巢组织超微结构的影响(电镜,×8 000)
图3 Effect of modified Sanjiasan on ovarian ultrastructure in DM mice (EM, ×8 000)

表5 三甲散加减方对DM小鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of modified Sanjiasan on ovarian granulosa cell apoptosis in DM mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TUNEL阳性率/%
空白组		0.220 4±0.034 9
模型组		0.801 3±0.044 7 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	0.414 0±0.023 0 ²⁾
中药中剂量组	8.97	0.578 8±0.048 9 ²⁾
中药低剂量组	4.49	0.745 4±0.060 3
二甲双胍组	0.2	0.401 2±0.065 1 ²⁾

表6 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织微血管数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of modified Sanjiasan on ovarian microvessel density in DM mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	微血管数量/个
空白组		82.67±5.51
模型组		26.00±4.58 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	62.67±6.43 ²⁾
中药中剂量组	8.97	63.67±3.06 ²⁾
中药低剂量组	4.49	32.00±2.65
二甲双胍组	0.2	62.33±4.93 ²⁾

3.10 三甲散加减方对DM小鼠卵巢信号通路分子MyD88、NF-κB、p70S6K1蛋白表达的影响 免疫组化及Western blot结果显示,与空白组比较,模型组小鼠卵巢MyD88、NF-κB蛋白表达显著升高($P<0.01$),p70S6K1蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模

型组比较,中药高中剂量组及二甲双胍组MyD88、NF-κB蛋白表达显著降低($P<0.01$),p70S6K1蛋白表达显著升高($P<0.01$),中药低剂量组上述蛋白表达水平逆转不明显,差异无统计学意义。见图7、表9及图8、表10。

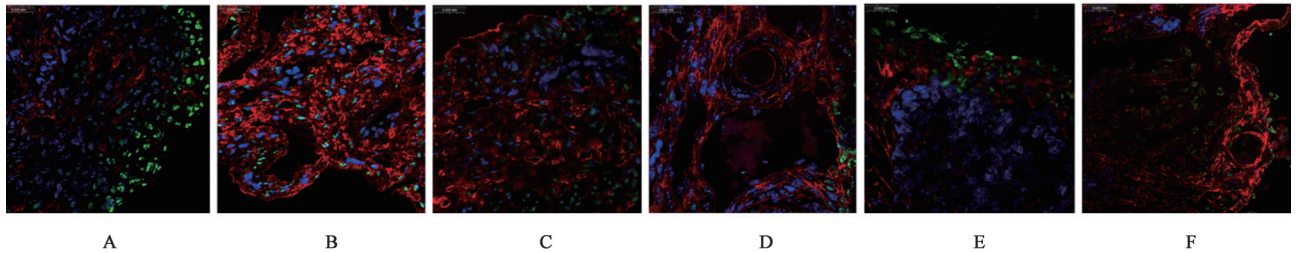


图4 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织微血管数量的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effect of modified Sanjiasan on ovarian microvessel density in DM mice (IF, ×400)

4 讨论

DM在中医归属“消渴”范畴。DM卵巢功能损伤可理解为消渴病变证于卵巢,消渴迁延不愈,虚痰瘀毒胶结,累及卵巢,出现生殖系病证。DM卵巢功能障碍以慢性低度炎症介导的卵巢微血管病变为病理基础,属于久病痼疾,病程中气阴耗损,热毒、痰湿、瘀血等内生之邪相互搏结,久病入络,符合“主客交”邪正抗争,胶结锢着于血脉而形成顽症痼疾的病机特点。本研究选用的三甲散加减方组方包括鳖甲、龟甲、水蛭、土鳖虫、生牡蛎、僵蚕、白芍、当归、甘草,系在吴氏三甲散方的基础上去穿山甲、蝉蜕增水蛭而成。蝉蜕味甘性寒,长于疏散外邪。然本病属经久难愈之顽疾,非外感所致,故去除原方中蝉蜕。另因穿山甲已不再载入《中华人民共和国药典》,故本方改用水蛭替代,以达通络逐瘀之效。本方中鳖甲柔肝血而除蒸热、搜风通络,龟甲与其同为灵动攻走之物,共奏滋阴行瘀之效。牡蛎滋阴泄热,育阴潜阳。土鳖虫、水蛭破瘀滞而通经络。僵蚕味咸性平,化痰散结。当归、白芍、甘草

益气补中养血,白芍、甘草合用,有酸甘化阴之效,白芍、当归合用可养血活血,并与叶天士之“散血”法遥相呼应^[15]。现代药理研究表明,僵蚕、土鳖虫、牡蛎、当归等均长于调节糖脂代谢,具有降血糖功效^[16-19]。土鳖虫可改善大鼠体内血液循环状态^[16],而其抗血栓机制可能与改善炎症微环境相关^[20]。牡蛎主要通过其丰富的生物活性成分发挥抗炎作用^[18]。当归可改善微循环障碍并具有抗炎效应^[19]。水蛭唾液提取物可显著降低DM大鼠FBG水平^[21],且药用水蛭具有良好的抗炎、抗纤维化作用^[22]。二甲双胍作为经典降糖药物,多项研究证实其可通过调节代谢恢复卵巢激素水平,抑制卵巢衰老^[23-24],此外,该药物还可通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)依赖性和非依赖性途径抑制NF-κB信号通路活化,进而改善DM微血管病变^[25],故本研究选择二甲双胍作为阳性药物,以便进行疗效对比和机制探讨。研究结果显示,模型组小鼠存在卵巢功能病理损伤,经连续28 d给药干预后,各给药组小鼠的卵巢功能均出现不同程度的改善。这表明三甲散加减

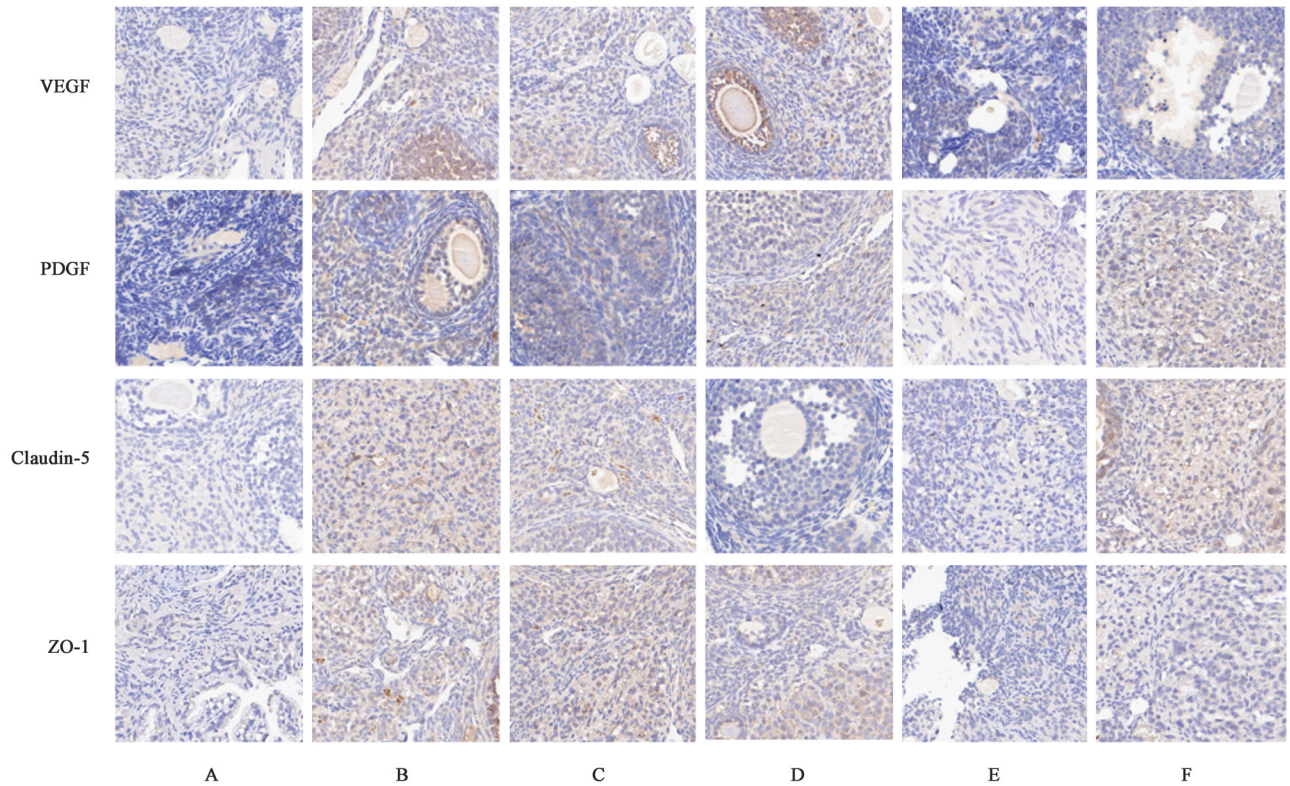


图5 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of modified Sanjiasan on ovarian VEGF, PDGF, Claudin-5, ZO-1 expression (IHC, ×400)

表7 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1 AA值的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of modified Sanjiasan on AA value VEGF, PDGF, Claudin-5, ZO-1 in ovarian tissue of DM mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF	PDGF	Claudin-5	ZO-1
空白组		0.512 2±0.036 8	0.315 6±0.017 2	0.384 6±0.023 3	0.606 7±0.012 4
模型组		0.010 1±0.002 7 ¹⁾	0.095 6±0.014 3 ¹⁾	0.024 1±0.007 2 ¹⁾	0.193 8±0.035 3 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	0.356 3±0.040 2 ²⁾	0.274 5±0.019 5 ²⁾	0.292 5±0.012 9 ²⁾	0.475 3±0.044 1 ²⁾
中药中剂量组	8.97	0.327 9±0.019 8 ²⁾	0.241 8±0.008 4 ²⁾	0.264 9±0.022 4 ²⁾	0.438 0±0.036 6 ²⁾
中药低剂量组	4.49	0.024 8±0.011 3	0.115 1±0.015 2	0.028 9±0.018 7	0.248 6±0.015 8
二甲双胍组	0.2	0.317 1±0.026 6 ²⁾	0.295 0±0.022 7 ²⁾	0.315 7±0.024 6 ²⁾	0.488 4±0.068 9 ²⁾

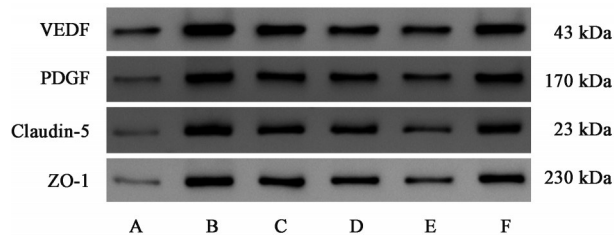


图6 小鼠卵巢组织VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1蛋白表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of VEGF, PDGF, Claudin-5, ZO-1 in mouse ovarian tissue

方可改善DM小鼠的血糖水平,并通过调节激素水平、促进微血管再生、调控MyD88/NF-κB信号通路缓解慢性低度炎症状态等机制改善DM小鼠的卵巢储备功能。

卵巢储备功能是指女性卵巢产生卵子数量和

质量的潜能,是评估卵巢健康状况和生殖能力的重要指标。E₂、AMH、INHB、LH、FSH是反映卵巢储备功能的重要内分泌激素。实验结果表明,模型组小鼠血清FSH、LH水平升高,E₂、AMH、INHB水平降低,进一步验证了DM代谢紊乱状态对卵巢功能的损害,证明DM卵巢功能障碍模型成功建立。三甲散加减方干预可调节异常的血清性激素水平,提示该方对卵巢内分泌功能具有明确的改善作用。这种激素水平的改善可能与以下机制相关,一方面,三甲散加减方通过改善糖代谢以发挥抗炎作用,降低高糖对卵巢颗粒细胞的损伤^[26];另一方面,该方可有效改善卵巢微循环,增强血供与营养输送,支持颗粒细胞的激素合成功能^[27]。此外,AMH水平

表8 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of modified Sanjiasan on protein expression of VEGF, PDGF, Claudin-5, ZO-1 in DM mice ovarian tissue ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF	PDGF	Claudin-5	ZO-1
空白组		0.69±0.07	0.71±0.08	0.77±0.10	0.57±0.07
模型组		0.06±0.04 ¹⁾	0.04±0.01 ¹⁾	0.04±0.01 ¹⁾	0.04±0.01 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	0.48±0.09 ²⁾	0.48±0.03 ²⁾	0.46±0.06 ²⁾	0.38±0.04 ²⁾
中药中剂量组	8.97	0.36±0.14 ²⁾	0.42±0.10 ²⁾	0.34±0.10 ²⁾	0.32±0.02 ²⁾
中药低剂量组	4.49	0.18±0.11	0.14±0.04	0.10±0.03	0.09±0.01
二甲双胍组	0.2	0.57±0.02 ²⁾	0.55±0.09 ²⁾	0.52±0.01 ²⁾	0.43±0.02 ²⁾

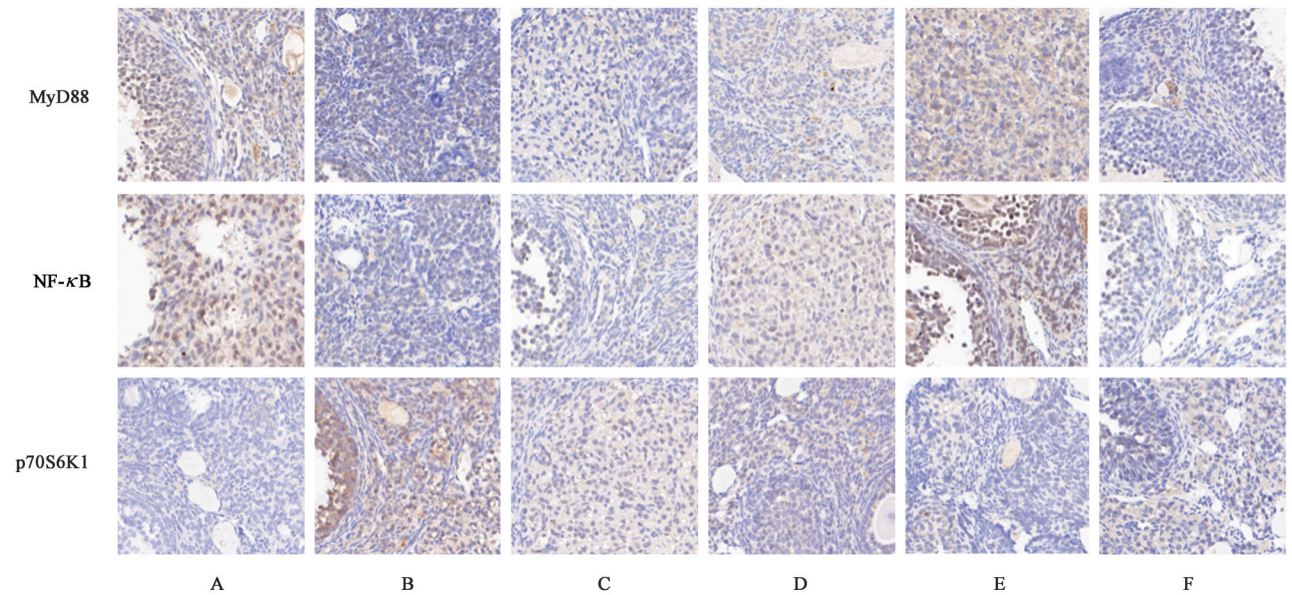


图7 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织MyD88、NF-κB、p70S6K1蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 7 Effect of modified Sanjiasan on MyD88, NF-κB, p70S6K1 protein expression in DM mice ovarian tissue (IHC, ×400)

表9 三甲散加减方对DM小鼠卵巢组织MyD88、NF-κB、p70S6K1 AA值的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of modified Sanjiasan on AA value of MyD88, NF-κB, p70S6K1 in ovarian tissue of DM mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MyD88	NF-κB	p70S6K1
空白组		0.175 1±0.024 9	0.143 6±0.023 1	0.321 1±0.053 7
模型组		0.538 2±0.039 8 ¹⁾	0.581 9±0.081 5 ¹⁾	0.021 5±0.006 4 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	0.230 8±0.027 0 ²⁾	0.223 1±0.038 9 ²⁾	0.182 3±0.039 4 ²⁾
中药中剂量组	8.97	0.294 9±0.040 4 ²⁾	0.306 7±0.044 8 ²⁾	0.210 2±0.070 7 ²⁾
中药低剂量组	4.49	0.513 2±0.047 3	0.527 2±0.059 0	0.046 4±0.012 5
二甲双胍组	0.2	0.210 2±0.037 7 ²⁾	0.217 3±0.035 1 ²⁾	0.195 4±0.060 5 ²⁾

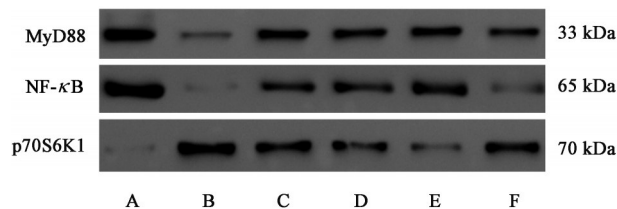


图8 小鼠卵巢组织MyD88、NF-κB、p70S6K1蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of MyD88, NF-κB, p70S6K1 protein expression in mouse ovarian tissue

升高提示三甲散加减方可能具有保护原始卵泡储备、延缓卵巢衰老进程的作用,此为该区区别于单

纯降糖药物的独特优势。

现有研究指出,高糖环境促使晚期糖基化终末产物(AGEs)与其受体RAGE结合,不仅直接激活NF-κB信号传导通路,还可通过激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶和线粒体呼吸链促进活性氧生成,间接激活该通路,形成双重激活机制。MyD88/NF-κB信号通路激活后可启动炎症级联反应,释放多种促炎细胞因子,构建慢性炎症环境^[28]。炎症因子可穿透血脑屏障干扰下丘

表 10 三甲散加减方对 DM 小鼠卵巢组织 MyD88、NF- κ B、p70S6K1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of modified Sanjiasan on protein expression of MyD88, NF- κ B, p70S6K1 in DM mice ovarian tissue ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MyD88	NF- κ B	p70S6K1
空白组		0.04±0.01	0.04±0.08	0.72±0.06
模型组		0.67±0.09 ¹⁾	0.69±0.13 ¹⁾	0.05±0.03 ¹⁾
中药高剂量组	17.94	0.32±0.06 ²⁾	0.31±0.08 ²⁾	0.53±0.04 ²⁾
中药中剂量组	8.97	0.38±0.03 ²⁾	0.38±0.01 ²⁾	0.42±0.11 ²⁾
中药低剂量组	4.49	0.58±0.02	0.58±0.02	0.11±0.06
二甲双胍组	0.2	0.19±0.06 ²⁾	0.15±0.05 ²⁾	0.37±0.11 ²⁾

脑-垂体-卵巢轴,诱导卵巢颗粒细胞凋亡,破坏卵泡免疫微环境^[26]。其中 TNF- α 作为关键的促炎细胞因子,可通过介导慢性炎症抑制颗粒细胞雌激素合成与分泌,破坏卵泡微环境,并与胰岛素抵抗密切相关^[29];IL-6 通过抑制胰岛素受体磷酸化直接参与卵泡发育障碍^[30];MCP-1 作为 CC 趋化因子(CC)亚家族典型代表,可募集单核细胞、记忆 T 淋巴细胞及嗜碱性粒细胞至卵巢组织,加重局部炎症反应,其水平与胰岛素抵抗指数呈正相关^[31]。实验结果显示,模型组小鼠血清 TNF- α 、IL-6、MCP-1 水平显著升高,卵巢组织中 MyD88、NF- κ B 信号分子表达增强,证实慢性炎症是 DM 状态下卵巢损伤的核心病理环节,而 MyD88/NF- κ B 信号通路在其中发挥关键作用,此结论与多项研究结果一致^[25,32]。三甲散加减方干预可改善 DM 小鼠的糖代谢紊乱,进而抑制 MyD88/NF- κ B 信号通路活化,降低 TNF- α 、IL-6、MCP-1 水平,最终缓解卵巢慢性炎症状态,这种多靶点效应能更有效地阻断炎症网络的复杂相互作用^[33-34]。

血管反应是炎症过程的核心环节,血管内皮细胞则是炎症反应的重要靶点。过度炎症可诱发内皮细胞一系列病理改变,最终导致血管内皮功能障碍^[35],破坏其在维持卵巢功能中的屏障作用,进而成为纤维化进程的关键启动因素^[36]。卵巢作为女性生殖系统的核心器官,其功能实现依赖于正常的血管供应^[37],卵巢血管密度和血管生成强度的显著降低是卵巢功能衰退的关键机制^[8]。高糖环境下,线粒体功能障碍与活性氧过度生成可致内皮细胞结构与功能损伤,这成为 DM 微血管病变的核心机制^[38]。Masson 染色结果显示模型组小鼠卵巢存在纤维化倾向;透射电镜观察发现模型组卵巢微血管内皮细胞形态扭曲、线粒体受损且数量减少,直接

证实 DM 引发的卵巢功能障碍与血管内皮细胞超微结构损伤密切相关。HE 染色、免疫荧光与 TUNEL 检测结果显示模型组小鼠卵巢微血管生成受阻,继而引发颗粒细胞凋亡及卵泡发育不良,此现象与既往关于微血管新生障碍导致卵泡闭锁的研究结论相符^[7-8]。三甲散加减方的干预可逆转上述病理变化,提示该方可通过修复血管内皮结构、促进血管新生以阻断纤维化进程,最终恢复卵巢功能。

为阐明三甲散加减方改善卵巢微血管损伤的分子机制,本研究检测了血管再生相关关键蛋白的表达水平。血管再生指在原有的血管内皮细胞上增殖与迁移形成新生血管网络,以维持血液循环的生理过程,该过程受促血管生成因子和抗血管生成因子调控。VEGF 作为目前已知活性最强的促血管生成因子,在卵巢组织中呈高度表达。研究表明,VEGF 不仅参与卵泡生长发育的调控,其表达水平还与卵巢血流量及微血管密度呈正相关^[39],PDGF 作为重要的卵巢局部调节因子,在卵母细胞和颗粒细胞中均有分布,二者协同维持卵泡微环境稳态^[40]。血管内皮细胞间的紧密连接结构通过调节血管内皮通透性维持微血管稳态,进而影响组织器官功能^[41]。紧密连接由跨膜蛋白家族[闭合蛋白(Occludin)和紧密连接蛋白家族(Claudins)]及膜周蛋白家族(ZOs 蛋白)等构成。闭合蛋白-5(Claudin-5)作为表达最丰富的内皮特异性紧密连接分子,高度表达于卵巢血管^[42]。ZO-1 作为 ZO 蛋白家族的代表性成员,广泛分布于上皮及内皮细胞中,并已被证实存在于卵丘细胞与卵母细胞中^[43]。p70S6K1 作为 VEGF 信号通路的上游调控因子,参与 VEGF 介导的血管再生过程,为下游信号传导提供关键调控节点^[44]。实验发现,模型组小鼠卵巢组织中 VEGF、PDGF、Claudin-5、ZO-1 蛋白表达显著降低,提示 DM 状态下卵巢微血管内皮细胞的紧密连接结构受损,血管通透性增高,微血管密度减小,出现血管再生障碍。同时,模型组 p70S6K1 蛋白表达下调,提示 DM 环境下 VEGF/p70S6K1 信号轴受抑制是卵巢微血管损伤的重要病理环节。三甲散加减方干预后,上述蛋白表达均有回升,表明三甲散加减方可能通过激活 VEGF/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/p70S6K1 信号通路,修复血管内皮细胞的紧密连接结构,上调促血管生成因子表达,从而促进卵巢微血管再生,改善卵巢微循环功能。

值得注意的是,高、中剂量三甲散加减方与二甲双胍虽在改善糖代谢、炎症及激素水平方面均具

备显著效果,但其作用机制存在差异。二甲双胍主要通过AMPK信号通路改善胰岛素敏感性^[45],其对卵巢的保护多为系统代谢改善的间接效应^[46];而三甲散加减方除调节代谢外,更能直接作用于卵巢微环境,通过抑制炎症、促进微血管新生及抗颗粒细胞凋亡等途径发挥靶向保护作用,兼具系统代谢调控与卵巢组织直接修复的双重功效,充分展现了中药复方治疗复杂疾病的整合优势。

综上所述,三甲散加减方通过调节微血管生成及NF- κ B炎症信号通路等多重机制,重建生殖内分泌稳态。本研究不仅揭示了三甲散加减方多靶点、多层次的整体调控特点,还观察到其疗效具有明确的剂量依赖性,提示存在最低有效剂量阈值,为临床剂量优化提供了实验依据。当然,本研究仍存在一定局限性,样本量相对有限,可能影响部分结果的统计效力。后续研究应扩大样本规模、延长观察周期、细化剂量梯度设计,进一步探索三甲散加减方在DM卵巢功能障碍防治中的系统价值,为推动其临床转化提供更充分的证据支持。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国糖尿病防治指南(2024版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2025, 17(1): 16-139.
Chinese Diabetes Society. Guideline for the prevention and treatment of diabetes mellitus in China (2024 edition)[J]. Chin J Diabetes Mellitus, 2025, 17(1): 16-139.

[2] 朱怡睿, 张莹. 糖尿病对生殖功能的影响[J]. 医学综述, 2021, 27(4): 771-777.
ZHU Y R, ZHANG Y. Effects of diabetes mellitus on reproductive functions[J]. Med Recapitulate, 2021, 27(4): 771-777.

[3] ZAIMI M, MICHALOPOULOU O, STEFANAKI K, et al. Gonadal dysfunction in women with diabetes mellitus[J]. Endocrine, 2024, 85(2): 461-472.

[4] CODNER E, MERINO P M, TENA-SEMPERE M. Female reproduction and type 1 diabetes: From mechanisms to clinical findings[J]. Hum Reprod Update, 2012, 18(5): 568-585.

[5] ARJMAND A T, NOURI M, ARJMAND S T. Surprisingly low infertility rate in married type 2 diabetic women: A rather curious paradox to the current opinion of insulin resistance as the joint pathogenesis of polycystic ovary syndrome and type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Syndr, 2015, 9(4): 201-204.

[6] ZHAO L, HU H, ZHANG L, et al. Inflammation in diabetes complications: Molecular mechanisms and therapeutic

interventions[J]. Med Comm, 2024, 5(4): e516.

[7] GUO Y, XUE L, TANG W, et al. Ovarian microenvironment: Challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage[J]. Hum Reprod Update, 2024, 30(5): 614-647.

[8] MU L, WANG G, YANG X, et al. Physiological premature aging of ovarian blood vessels leads to decline in fertility in middle-aged mice[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 72.

[9] 陈晨, 史佳妮, 苑玉琼, 等. 虫类药在妇科疾病中的应用经验[J]. 中医杂志, 2024, 65(2): 224-228.
CHEN C, SHI J N, YUAN Y Q, et al. Experience of medicinal insects for gynaecological diseases[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 65(2): 224-228.

[10] 栗晓东, 高仲军, 何敬, 等. 三甲散加减对晚期喉癌患者免疫指标和炎性因子的影响[J]. 河北医药, 2021, 43(13): 1990-1993.
LI X D, GAO Z J, HE J, et al. Effects of Sanjia powder on the immune indexes and inflammatory cytokines in patients with advanced laryngeal cancer[J]. Hebei Med J, 2021, 43(13): 1990-1993.

[11] 徐由立, 王宝家, 周文亮, 等. 加减三甲散对肝纤维化模型大鼠微血管生成和血管活性调节因子表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(5): 1059-1062, 1118.
XU Y L, WANG B J, ZHOU W L, et al. Effects of modified Sanjia powder on pathological angiogenesis and expressions of vaso-activating factors in liver fibrosis model rats[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2018, 45(5): 1059-1062, 1118.

[12] 苏丽清, 喻嵘, 吴勇军, 等. 左归降糖舒心方对糖尿病心肌病MKR鼠心肌细胞损伤和凋亡的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(2): 554-562.
SU L Q, YU R, WU Y J, et al. Effects of Zuogui Jiangtang Shuxin decoction on cardiomyocyte damage and apoptosis in MKR mice with diabetic cardiomyopathy[J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2022, 24(2): 554-562.

[13] 邓敦, 吴阳, 申思楠, 等. 护卵汤对早发性卵巢功能不全模型小鼠SIRT1/NF- κ B/p53/p21通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 36-42.
DENG D, WU Y, SHEN S N, et al. Effect of Huluan decoction on SIRT1/NF- κ B/p53/p21 pathway in model mice with premature ovarian insufficiency[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(15): 36-42.

[14] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2005: 48-49.
HE S L, W J, W J J. TCM Research Design & Statistics[M]. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 2005: 48-49.

[15] 党思捷, 吴文军, 苏悦, 等. “阴阳交”理论新解[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2112-2114.
DANG S J, WU W J, SU Y, et al. New interpretation of the theory of "Yin Yang Jiao"[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(5): 2112-2114.

[16] 姜珊, 王少平, 代龙, 等. 土鳖虫活性肽组分对急性血瘀模型大鼠血液流变学、血脂四项指标及血液因子含量的影响

- [J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 175-180.
- JIANG S, WANG S P, DAI L, et al. Effects of active peptide components of *Eupolyphaga steleophaga* on blood rheology, four indicators of blood lipids and blood factor levels in rats with acute blood stasis [J]. Food Machinery, 2020, 36(1): 175-180.
- [17] 王瑶, 高奎旭, 王静雅, 等. 基于糖谱法的僵蚕多糖结构特征分析及抗氧化活性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(16): 1882-1889.
- WANG Y, GAO K X, WANG J Y, et al. Structural characteristics and antioxidant activities of polysaccharides from *Bombyx* based upon saccharide mapping [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(16): 1882-1889.
- [18] 任雨雨, 王冰严, 王建, 等. 牡蛎药理作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2026, 28(4): 49-54.
- REN Y Y, WANG B Y, WANG J, et al. Study on pharmacological effects of oyster [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2026, 28(4): 49-54.
- [19] 牟春燕, 殷越, 沈子芯. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2024, 43(5): 544-551.
- MOU C Y, YIN Y, SHEN Z X, Research progress on chemical components and pharmacological effects of Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*) [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2024, 43(5): 544-551.
- [20] 罗淑芳, 黄博宁, 何广铭, 等. 土鳖虫通过改善炎症抑制深静脉血栓形成的机制研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(12): 4917-4926.
- LUO S F, HUANG B N, HE G M, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker inhibits deep vein thrombosis via anti-inflammation [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2022, 24(12): 4917-4926.
- [21] MOHAMMED A A, MOHAMMED G A, MOHAMED A, et al. *In vivo* anti-hyperglycemic activity of saliva extract from the tropical leech *Hirudinaria manillensis* [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(5): 488-493.
- [22] 韩瑾, 宋研博, 孙永康, 等. 水蛭药理作用及其在脑病中的应用 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(5): 147-150.
- HAN J, SONG Y B, SUN Y K, et al. Pharmacological action of Shuizhi (Leech) and its application in encephalopathy [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(5): 147-150.
- [23] SAADATI S, MASON T, GODINI R, et al. Metformin use in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): Opportunities, benefits, and clinical challenges [J]. Diabetes Obes Metab, 2025, 27(S3): 31-47.
- [24] WU C, CHEN D, STOUT M B, et al. Hallmarks of ovarian aging [J]. Trends Endocrinol Metab, 2025, 36(5): 418-439.
- [25] ROHM T V, MEIER D T, OLEFSKY J M, et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders [J]. Immunity, 2022, 55(1): 31-55.
- [26] ORISAKA M, MIZUTANI T, MIYAZAKI Y, et al. Chronic low-grade inflammation and ovarian dysfunction in women with polycystic ovarian syndrome, endometriosis, and aging [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1324429.
- [27] CAVALCANTI G S, CARVALHO K C, FERREIRA C S, et al. Granulosa cells and follicular development: A brief review [J]. Rev Assoc Med Bras, 2023, 69(6): e20230175.
- [28] ASSIS S I S, AMENDOLA L S, OKAMOTO M M, et al. The prolonged activation of the p65 subunit of the nf-kappa-B nuclear factor sustains the persistent effect of advanced glycation end products on inflammatory sensitization in macrophages [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(5): 2713.
- [29] YE H, SONG Y, YE W, et al. Serum granulosa cell-derived TNF- α promotes inflammation and apoptosis of renal tubular cells and PCOS-related kidney injury through NF- κ B signaling [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(12): 2432-2444.
- [30] VASYUKOVA E, ZAIKOVA E, KALININA O, et al. Inflammatory and anti-inflammatory parameters in PCOS patients depending on body mass index: A case-control study [J]. Biomedicines, 2023, 11(10): 2791.
- [31] ROSTAMTABAR M, ESMAEILZADEH S, TOURANI M, et al. Pathophysiological roles of chronic low - grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(2): 824-838.
- [32] AHMED M, RIAZ U, LV H, et al. Nicotinamide mononucleotide restores NAD⁺ levels to alleviate LPS-induced inflammation via the TLR4/NF- κ B/MAPK signaling pathway in mice granulosa cells [J]. Antioxidants (Basel), 2024, 14(1): 39.
- [33] LI L, YANG L, YANG L, et al. Network pharmacology: A bright guiding light on the way to explore the personalized precise medication of traditional Chinese medicine [J]. Chin Med, 2023, 18(1): 146.
- [34] DUAN X, WANG N, PENG D. Application of network pharmacology in synergistic action of Chinese herbal compounds [J]. Theory Biosci, 2024, 143(3): 195-203.
- [35] 梁若男, 吕鹏飞, 徐一丹, 等. 炎症信号通路在糖尿病肾病中的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2025, 22(22): 178-183.
- LIANG R N, LYU P F, XU Y D, et al. Research progress on inflammatory signaling pathway in diabetic nephropathy [J]. Chin Med J, 2025, 22(22): 178-183.
- [36] GU M, WANG Y, YU Y. Ovarian fibrosis: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets [J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 139.
- [37] DEVASA J, CAICEDO D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 450.
- [38] AN Y, XU B, WAN S, et al. The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction [J]. Cardiovasc Diabetol, 2023, 22(1): 237.
- [39] GUZMÁN A, HERNÁNDEZ - CORONADO C G, GUTIÉRREZ C G, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) system as a key regulator of ovarian follicle angiogenesis and growth [J]. Mol Reprod Dev, 2023, 90(4): 201-217.

- [40] GAO J, SONG Y, HUANG X, et al. The expression of platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor- II in patients with polycystic ovary syndrome and its correlation with pregnancy outcomes [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(5):5671678.
- [41] 张嘉昕, 杨雪媛, 丛馨. 血管内皮细胞间紧密连接的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2021, 52(3):187-192.
ZHANG J X, YANG X Y, CONG X. Research progress of tight junction in vascular endothelial cells [J]. *Prog Physiol Sci*, 2021, 52(3):187-192.
- [42] RODEWALD M, HERR D, FRASER H M, et al. Regulation of tight junction proteins occludin and claudin 5 in the primate ovary during the ovulatory cycle and after inhibition of vascular endothelial growth factor [J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13(11):781-789.
- [43] CAO L, YANG T, HUANG S, et al. Expression patterns of ZO-1/2 and their effects on porcine oocyte *in vitro* maturation and early embryonic development[J]. *Theriogenology*, 2021, 161:262-270.
- [44] 陈慧, 张晖, 谢家童, 等. 中医药靶向干预 PI3K/Akt 信号通路治疗肝癌的研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2025, 34(9):1304-1309.
CHEN H, ZHANG H, XIE J T, et al. Research progress in the treatment of liver cancer with targeted intervention of traditional Chinese medicine via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2025, 34(9):1304-1309.
- [45] FORETZ M, GUIGAS B, VIOLLET B. Metformin: Update on mechanisms of action and repurposing potential [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2023, 19(8):460-476.
- [46] LANDRY D A, YAKUBOVICH E, COOK D P, et al. Metformin prevents age-associated ovarian fibrosis by modulating the immune landscape in female mice [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(35):eabq1475.

[责任编辑 周冰冰]