

• XXXX •

基于慢性铁过载介导氧化应激探讨益经汤治疗卵巢储备功能减退的作用机制

于静¹, 梁程程^{2*}, 胡恒³, 李哲¹, 储海静¹, 储继军^{2*}

(1. 安徽中医药大学第一临床医学院, 合肥 230001; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230001;
3. 合肥安建医院, 合肥 230001)

[摘要] 目的:探讨益经汤抑制慢性铁过载诱导的氧化应激改善小鼠卵巢储备功能的作用机制。方法:将72只动情周期正常的C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、益经汤低、中及高剂量组、脱氢表雄酮组,每组12只,空白组腹腔注射生理盐水,其余组均腹腔注射右旋糖酐铁 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每周1次,持续8周,制备慢性铁过载小鼠模型,最后1次腹腔注射结束,益经汤低、中、高剂量组予以益经汤水溶液 18.165 、 36.33 、 $72.66\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,脱氢表雄酮组予以脱氢表雄酮水溶液 $10.812\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,空白组和模型组给予等量蒸馏水灌胃,每天1次,连续给药4周。每周称量小鼠体重、监测小鼠进食量;阴道脱落细胞涂片观察小鼠动情周期变化;称量小鼠双侧卵巢及子宫湿重;苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠卵巢组织病理学改变;普鲁士蓝染色评估卵巢组织中铁离子的表达水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清性激素[卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、抗缪勒氏管激素(AMH)];生化检测卵巢组织中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平;冰冻切片活性氧(ROS)染色的方法检测小鼠卵巢组织内ROS表达水平;透射电镜观察小鼠卵巢组织线粒体超微结构;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测卵巢组织中铁重链蛋白1(Fth1)、铁轻链蛋白(Ftl)、转铁蛋白(Tf)、转铁蛋白受体1(TfR)、过氧化氢酶(Cat)、谷胱甘肽过氧化物酶1(GPX1)mRNA的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织Ft、Fth1、Ftl、Tf、TfR、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白的表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠体重显著减轻,动情周期严重紊乱($P<0.01$),子宫指数显著上升($P<0.01$),卵巢指数显著下降($P<0.01$),窦卵泡数量显著减少,闭锁卵泡数量显著增多,卵巢间质铁沉积信号显著增多;小鼠血清AMH、 E_2 水平和卵巢组织SOD活性、Tf、TfR蛋白和mRNA表达水平、GPX1与Cat mRNA表达均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),血清FSH和LH水平、MDA含量、Fth1、Ftl蛋白和mRNA表达水平明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),ROS荧光强度显著升高($P<0.01$),GPX4蛋白表达显著下降($P<0.01$),卵巢受损线粒体增多,线粒体嵴减少或消失。与模型组比较,益经汤低、中、高剂量组和脱氢表雄酮组体重有所上升,动情周期改善($P<0.05$, $P<0.01$),子宫指数明显下降($P<0.05$),卵巢指数明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),窦卵泡数量增多,闭锁卵泡数量减少,卵巢间质铁沉积信号显著减少;小鼠血清AMH、 E_2 水平和卵巢组织SOD活性、Tf、TfR蛋白和mRNA表达水平、GPX1与Cat mRNA表达均明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),血清FSH和LH水平、MDA含量、Fth1、Ftl蛋白和mRNA表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),ROS荧光强度明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),GPX4蛋白表达显著上升($P<0.01$),卵巢受损线粒体减少,线粒体形态显著改善。结论:益经汤通过上调Tf、TfR、GPX4的表达,下调Ft、Fth1、Ftl的表达,减轻慢性铁过载小鼠体内铁代谢紊乱,缓解卵巢组织氧化应激,恢复线粒体形态结构,改善小鼠卵巢储备功能。

[关键词] 益经汤;慢性铁过载;铁代谢;氧化应激;卵巢储备功能减退

[中图分类号] R271;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260139

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



[收稿日期] 2025-09-26

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(2408085QH280);安徽省高等学校科学研究项目(2023AH050781);安徽省卫生健康科研项目(AHWJ2023A30188);安徽中医药大学2024年度临床科研项目(2024YFYLCZX12)

[第一作者] 于静,在读硕士,从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究,Email:1974175457@qq.com

[通信作者] *梁程程,博士,主治医师,从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究,E-mail:952096176@qq.com

*储继军,博士,主任中医师,副教授,从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究,E-mail:chujijun8888@163.com

Exploring Mechanism of Yijing Decoction in Treating Decreased Ovarian Reserve Based on Oxidative Stress Mediated by Chronic Iron Overload

YU Jing¹, LIANG Chengcheng^{2*}, HU Heng³, LI Zhe¹, CHU Haijing¹, CHU Jijun^{2*}

(1. *The First Clinical Medical College of Anhui University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Hefei 230001, China*; 2. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM, Hefei 230001, China*; 3. *The Hospital of Hefei Anjian, Hefei 230001, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Yijing decoction to inhibit oxidative stress induced by chronic iron overload and improve ovarian reserve hypofunction in mice. **Methods:** Seventy-two female C57BL/6J mice with normal estrous cycles were randomly divided into six groups ($n=12$ per group): blank group, model group, Yijing decoction (YJD) low-dose group, medium-dose group, high-dose group, and dehydroepiandrosterone (DHEA) group. Mice in the blank group received intraperitoneal injections of normal saline, while those in all other groups were administered iron dextran (Sigma-Aldrich) at a dose of $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ once weekly for 8 weeks to establish a chronic iron overload model. Following the final injection, interventions were initiated and continued for 4 weeks. The low, medium, and high dose groups of YJD received oral gavage of Yijing decoction aqueous solution at doses of 18.165, 36.33, and $72.66\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. The DHEA group received DHEA aqueous solution at $10.812\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. The blank and model groups received an equivalent volume of distilled water by gavage once daily. Body weight was recorded weekly, and food intake was monitored throughout the treatment period. Vaginal smears were collected daily and stained with hematoxylin-eosin (HE) to assess estrous cycle regularity. At the end of the experiment, mice were euthanized, and bilateral ovaries and uteri were rapidly excised and weighed to calculate ovarian and uterine indices ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Ovarian tissues were fixed, embedded, and sectioned for hematoxylin and eosin (HE) staining to evaluate histopathological changes. Iron deposition in ovarian tissue was visualized using Prussian blue staining. Serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E_2), and anti-Müllerian hormone (AMH) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in ovarian homogenates were determined using commercial biochemical assay kits. Reactive oxygen species (ROS) levels in ovarian tissue were assessed by ROS fluorescence staining on frozen sections. Mitochondrial ultrastructure in ovarian tissue was examined by transmission electron microscopy (TEM). Total RNA was extracted from ovarian tissue for real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) to quantify mRNA expression of ferritin heavy chain 1 (Fth1), ferritin light chain (Ftl), transferrin (Tf), transferrin receptor 1 (TfR1), catalase (Cat), and glutathione peroxidase 1 (GPX1). Protein expression levels of Fth1, Ftl, Tf, TfR1, and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were analyzed by Western blot. **Results:** Compared with the blank group, mice in the model group exhibited significantly reduced body weight and severe estrous cycle disruption ($P<0.01$), a markedly increased uterine index ($P<0.01$), and a significantly decreased ovarian index ($P<0.01$). The number of antral follicles was significantly reduced, while atretic follicles were markedly increased, accompanied by pronounced iron deposition in the ovarian stroma. Serum levels of AMH and E_2 , as well as ovarian SOD activity, protein and mRNA expression of Tf and TfR1, and mRNA levels of GPX1 and Cat were all significantly downregulated ($P<0.05$, $P<0.01$). Conversely, serum FSH and LH levels, MDA content, protein and mRNA expression of Fth1 and Ftl, and ROS fluorescence intensity were significantly elevated ($P<0.05$, $P<0.01$), along with a marked decrease in GPX4 protein expression ($P<0.01$). TEM revealed an increased number of damaged mitochondria in ovarian tissue, characterized by loss or disappearance of mitochondrial cristae. Compared with the model group, treatment with low, medium, and high doses of YJD and DHEA significantly improved body weight and ameliorated estrous cycle irregularities ($P<0.05$, $P<0.01$), decreased the uterine index ($P<0.05$), and increased the ovarian index ($P<0.05$, $P<0.01$). These groups also showed increased numbers of antral follicles, reduced atretic follicles, and significantly diminished iron deposition in the ovarian stroma. Serum AMH and E_2 levels, ovarian SOD activity, protein and mRNA expression of Tf and TfR1, and mRNA levels of GPX1 and Cat were all significantly upregulated ($P<0.05$, $P<0.01$). In contrast, serum FSH and LH levels, MDA content, protein and mRNA expression of Fth1 and Ftl, and ROS fluorescence intensity were significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$), while GPX4 protein expression was markedly increased ($P<0.01$). Moreover, mitochondrial damage was alleviated, and mitochondrial ultrastructure was notably restored in ovarian tissue. **Conclusion:** Yijing decoction ameliorates ovarian reserve function in mice with chronic iron overload by upregulating the expression of Tf, TfR1, and GPX4, downregulating the expression of Fth1 and Ftl, thereby alleviating systemic iron metabolism disorders, reducing oxidative stress in ovarian tissue, and restoring mitochondrial morphology and structure.

[Keywords] Yijing decoction; chronic iron overload; iron metabolism; oxidative stress; decreased ovarian reserve

卵巢储备功能减退(DOR)是指女性卵巢皮层 内卵泡储存减少和产生成熟卵泡并排卵的能力下

降^[1]。近年来,DOR发病率逐渐升高并呈年轻化趋势,是造成女性生育能力减退的主要原因之一^[2]。现代医学认为,DOR发病可能与年龄、遗传、自身免疫性疾病、酶缺乏、微量元素缺乏及卵巢破坏性因素(手术、放化疗、感染)等有关^[3-4]。有研究发现,铁元素参与女性卵巢卵泡发育、排卵等过程^[5]。当机体内铁元素的积累超过正常需求量,铁在机体内过度沉积,导致铁负荷过载,又称铁过载^[6]。机内铁含量异常升高时,游离铁可通过芬顿(Fenton)反应催化产生活性氧(ROS)^[7],致使卵巢颗粒细胞氧化应激(OS),损伤卵巢功能,影响卵泡的发育和成熟,加速卵泡闭锁,减少卵巢储备,降低女性生育力,而铁过载通过加剧氧化应激,导致卵母细胞质量下降及卵巢功能障碍^[6-8]。

益经汤首载于《傅青主女科》,是临床治疗DOR的主要经方之一,疗效确切^[9]。课题组前期研究发现,益经汤可以减轻DOR炎症反应及氧化应激^[10-12],并从体外实验初步证实,益经汤含药血清可能通过缓解铁过载诱导的氧化应激损伤,恢复线粒体功能,改善卵巢颗粒细胞功能,进而改善卵巢功能。因此,本研究通过制备慢性铁过载小鼠模型,进一步探讨益经汤缓解慢性铁过载模型小鼠体内铁代谢紊乱,减缓氧化应激,改善卵巢储备功能的作用机制,以期为临床应用益经汤治疗DOR提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J小鼠80只,SPF级,8周龄,体重(20±2)g,购自杭州资源实验动物科技有限公司,实验动物合格证号SCXK(浙)2024-0004,分笼饲养于安徽中医药大学第一附属医院动物实验中心。

1.2 伦理 本实验经安徽中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号AZYFY-2024-2008)。

1.3 药物及试剂 右旋糖酐铁[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,货号I121239-100g];脱氢表雄酮(美国Woniex公司,批号W412210)。益经汤(党参15g、白芍12g、酸枣仁15g、杜仲12g、牡丹皮9g、柴胡9g,购自安徽协和成药业有限公司,批号分别为24010132、24030306、24030301、24031513、24012221、24050307;山药12g、当归9g,购自亳州卢谯药业有限公司,批号分别为2406030177、2405230117;白术9g、熟地黄12g、北沙参12g,购自安徽普仁中药饮片有限公司,批号分

别为2403222、2405053、2405141)由安徽中医药大学第一附属医院中药房提供,中药饮片经安徽中医药大学第一附属医院中药房张明生主任中药师鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》质量规定。制备方法:将所有药材用10倍蒸馏水浸泡30min,煎煮2次,过滤后合并滤液,浓缩至生药质量浓度为0.423g·mL⁻¹的益经汤水溶液。

卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、抗缪勒管激素(AMH)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司,货号分别为RXW203000M、RXW202015M、RXJ203008M、RXW202731M);丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)比色法试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为E-BC-K025-M、E-BC-K020-M);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,货号BL521A);铁轻链蛋白(Ftl)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号10727-1-AP);铁蛋白(Ft)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,货号BM4487);铁重链蛋白1(Fth1)抗体、转铁蛋白(Tf)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab183781、ab313583);转铁蛋白受体1(TfR1)抗体、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)抗体(上海埃必威生物技术有限公司,货号分别为CY6618、CY6959); β -微管蛋白(β -tubulin)抗体(成都正能生物技术有限公司,货号380628);山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号ZB-2301);苏木素-伊红(HE)染色液(安徽埃戈生物科技有限公司,货号分别为B006、B005);普鲁士蓝染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号B034);RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、2×SYBR Green qPCR Mix (With Rox)(山东思科捷生物科技股份有限公司,货号分别为AC0202、AG0305、AH0101)。

1.4 仪器 BioTekEpoch2型全波段酶标仪(美国BioTek公司);EPS300型电泳仪、转膜仪(上海天能生命科学有限公司);UVP Chemstudio型化学发光检测仪(德国Analytik-Jena公司);ABI Veriti型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];LightCycler480 II型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司);5430R型高速冷冻离心机、BioSpectrometer型紫外分光光度计(德国Eppendorf公司);L4-5K型低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司);JW-3022HR型医用离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司);JXFSTPRP-CLN

型冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 80只C57BL/6J小鼠适应性喂养1周,每日上午固定时间行阴道脱落细胞涂片,共筛选出72只动情周期正常的小鼠随机分成空白组、模型组,益经汤低、中、高剂量组及脱氢表雄酮组,每组12只,除空白组外,其余组均腹腔注射 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 右旋糖酐铁造模^[13],每周1次,持续8周。每周称量小鼠体质量和监测小鼠状态及进食、进水量,于第7次腹腔注射结束后开始观察动情周期,持续2周,如果小鼠的发情周期延长($>5\text{ d}$)、不完整,或持续停留在单一阶段超过3 d,则认为该小鼠具有发情周期紊乱。动情周期紊乱为造模成功^[14-15]。

2.2 分组给药与处理 第8次腹腔注射结束后,分别予以益经汤低、中、高剂量组益经汤水溶液,脱氢表雄酮组予以脱氢表雄酮水溶液灌胃。益经汤低剂量组灌胃剂量按与60 kg成人的体表面积等效剂量换算为 $18.165\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以成人日用量126 g为基准),2倍、4倍分别作为益经汤中、高剂量组灌胃剂量,即 36.33 、 $72.66\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,脱氢表雄酮灌胃剂量为 $10.812\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,空白组和模型组按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积蒸馏水灌胃,每天1次,连续给药30 d。

末次给药结束后禁食不禁水12 h,称量体质量,腹腔注射1%戊巴比妥钠($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行麻醉,采取摘眼球法收集血液,离心后去上清液用于ELISA检测;取出双侧卵巢与子宫,每只老鼠取材位置相同,分别称量卵巢与子宫的湿重,随机选取一部分卵巢置于4%多聚甲醛固定后行HE染色及普鲁士蓝染色,一部分新鲜卵巢组织立即行ROS检测,一部分电镜固定液固定后行透射电镜,一部分存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)和Real-time PCR检测。

2.3 观察内容

2.3.1 观察小鼠一般情况及动情周期变化 每日观察小鼠的精神状态、毛发状况和饮食饮水等活动情况,造模第7周开始,每日上午固定时间用生理盐水蘸湿的极细无菌棉签轻柔插入小鼠阴道内,旋转以收集阴道脱落细胞,均匀涂抹在载玻片上,快速固定后HE染色,并在光学显微镜下观察并记录。造模结束后,连续灌胃第3周开始,再次收集小鼠阴道脱落细胞。参照文献描述识别有核、无核上皮细胞及白细胞,并根据其比例来判断动情周期变化。动情周期紊乱率=小鼠动情周期紊乱数/小鼠总数 $\times 100\%$ 。

2.3.2 称量小鼠子宫、卵巢质量,观察形态变化检测

子宫指数与卵巢指数 每组小鼠经麻醉摘取眼球法取血后,开腹取子宫及双侧卵巢称质量并观察子宫及卵巢形态。子宫指数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)=子宫湿质量/体质量;卵巢指数($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)=双侧卵巢湿质量/体质量。

2.3.3 HE染色检测小鼠卵泡发育情况 4%的多聚甲醛固定小鼠卵巢组织,石蜡包埋切片,进行HE染色,使用卵泡分类系统:窦前卵泡包含原始卵泡和初级卵泡,有腔卵泡包括次级卵泡和成熟卵泡,闭锁卵泡指进入退化过程的卵泡,于光学显微镜下观察卵泡发育情况。

2.3.4 普鲁士蓝染色评估小鼠卵巢组织中铁离子沉积 小鼠卵巢组织切片常规脱蜡去水,画疏水圈,蒸馏水洗净后,行普鲁士蓝染色15~30 min,洗净后行核固红染色5~10 min,洗净后常规脱水,封片后于光学显微镜下观察蓝色颗粒并采集图像。

2.3.5 ELISA检测小鼠血清性激素水平 按照ELISA试剂盒说明书步骤操作,采用酶标仪于450 nm波长处依次测定实验孔吸光度 A ,通过标准曲线计算样本血清FSH、LH、 E_2 、AMH水平。

2.3.6 比色法检测T-SOD和MDA水平 按照T-SOD和MDA试剂盒说明书步骤操作,采用酶标仪532 nm波长处依次测定实验孔 A ,通过标准曲线计算卵巢组织T-SOD于MDA水平。

2.3.7 冰冻切片ROS染色检测小鼠卵巢组织ROS水平 新鲜的小鼠卵巢组织立即冰冻切片10~20 μm ,室温下加磷酸盐缓冲液(PBS)200 μL ,吸除后滴加染色探针工作液100~200 μL ,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱避光孵育,洗净后滴加Hoechst 33342染色工作液100~200 μL ,再次避光孵育,洗净后封片,于荧光显微镜下观察ROS染色并采集图片,运用Image J软件进行定量分析。

2.3.8 透射电镜观察小鼠卵巢线粒体超微结构 将各组约 0.15 mm^2 的卵巢组织放入电镜固定液中固定2 h,经过脱水、浸透及包埋处理后,制备成70 nm的超薄切片。随后使用醋酸铀酰和柠檬酸铅对其进行染色,于透射电镜下观察并分析卵巢线粒体超微结构。

2.3.9 Real-time PCR检测小鼠卵巢组织Fth1、Ftl1、Tf、Tfr1、谷胱甘肽过氧化物酶1(GPX1)、过氧化氢酶(Cat)mRNA表达 用RNA提取试剂盒提取小鼠卵巢组织总RNA,测定浓度后反转录为cDNA,后进行Real-time PCR,设定程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,循环40次。内参选用 β -肌动蛋白(β -actin),采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法

计算目的 mRNA 相对表达量。各基因引物由生工生物工程(上海)有限公司设计并提供合成技术,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Tf	上游 GAGACGGAGACCTTGTGATTC	113
	下游 AACTGCTGAATTACTGGCTGTC	
Tfrl	上游 GGCTCTGGCTCTCACACTCTC	97
	下游 CTCCTCCGTTTCAGCCAGTT	
Fth1	上游 CAACTTACGCAAGATGGGTG	114
	下游 CTTAGCTCTCATCACC GTGT	
Ftl1	上游 CGTCAGAATTATTCACCGAGG	92
	下游 GCCACGTCATCCCGATCAAA	
GPX1	上游 TCAGTTCGGACACCAGAATG	102
	下游 CACTTCGCACTTCTCAAAC	
Cat	上游 AAGTCACCACTCCAGC	69
	下游 GGTGAGGACATCAGGTCT	
β -actin	上游 AGTGTGACGTTGACATCC	84
	下游 TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	

2.3.10 Western blot 检测小鼠卵巢组织 Ft、Fth1、Ftl、Tf、Tfrl、GPX4 蛋白表达 取小鼠卵巢组织 5 mg,等比例加入混合裂解液并研磨提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度。上样后经电泳分离、转膜、封闭、4℃孵育对应一抗过夜[抗体稀释浓度:Ft、Tf、Tfrl、GPX4 为 1:2 000,Ftl 为 1:5 000,Fth1 为 1:1 000, β -微管蛋白(β -tubulin)为 1:10 000],TBST 清洗后加入二抗(山羊抗兔 IgG 浓度为 1:10 000)室温孵育 2 h 后显影,以 β -tubulin 为内参,运用 Image J 软件进行定量分析,计算目的蛋白的相对表达量。

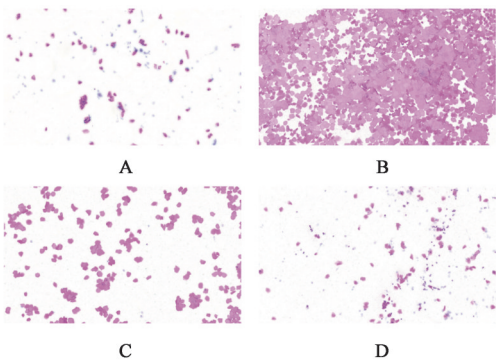
2.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述。方差齐采用单因素方差分析和 Tukey 检验;方差不齐采用 Welch's 方差分析和 Tamhane's T3 检验。动情周期紊乱率比较采用 Fisher 精确检验。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益经汤改善慢性铁过载小鼠一般情况及动情周期 造模期间,小鼠精神状态差、被毛黯淡、胡须脱落,进食量和饮水量明显减少,体质量明显减轻,经各药物干预后,小鼠精神状态好转、被毛浓密光滑、胡须脱落改善、进食饮水情况明显改善,与空白组相似。

正常动情周期见图 1。空白组小鼠动情周期规律。与空白组比较,模型组动情周期均显著紊

乱($P<0.01$),长期停滞在动情间期,阴道分泌物减少,甚或阴道干涩,无法取得阴道分泌物;益经汤低、中、高剂量及脱氢表雄酮干预 3 周后,小鼠动情周期明显改善($P<0.05$, $P<0.01$),逐渐规律。见表 2。



注:A.动情前期;B.动情期;C.动情后期;D.动情间期
图 1 小鼠阴道脱落细胞涂片(HE,×100)
Fig. 1 Smear of exfoliated cells from vagina of mice (HE,×100)

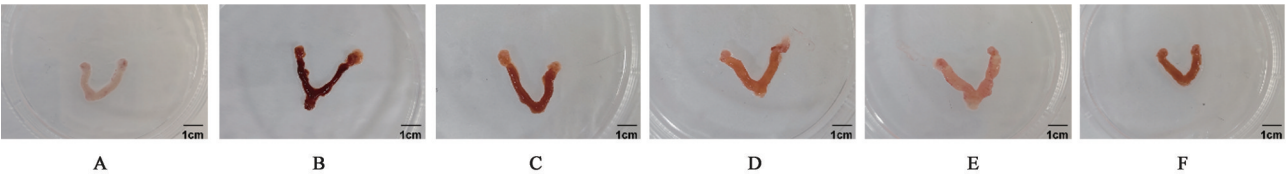
表 2 益经汤对慢性铁过载小鼠动情周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 2 Effect of Yijing decoction on estrogen cycle of mice with chronic iron overload ($\bar{x} \pm s$, $n=12$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	紊乱率(1~15 d)	紊乱率(16~30 d)
空白组		0	0
模型组		100 ¹⁾	83.30% ¹⁾
益经汤低剂量组	18.165	83.30%	50% ²⁾
益经汤中剂量组	36.33	75%	25% ³⁾
益经汤高剂量组	72.66	75%	30% ²⁾
脱氢表雄酮组	10.812 5	75%	30% ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 3-表 7 同)

3.2 益经汤改善慢性铁过载小鼠卵巢及子宫指数 肉眼观察,空白组卵巢与子宫组织表面光滑,颜色明亮;与空白组比较,模型组卵巢颜色明显变深,形态显著减小,子宫形态显著增大,子宫指数与卵巢指数显著降低($P<0.01$);与模型组比较,益经汤低剂量组子宫指数与卵巢指数差异无统计学意义,益经汤中、高剂量组及脱氢表雄酮组子宫指数与卵巢指数明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 2、表 3。

3.3 益经汤改善慢性铁过载小鼠卵巢及卵巢周围脂肪组织铁沉积现象 HE 染色结果显示,空白组小鼠卵泡结构清晰,颗粒细胞层排列紧密,可见各级卵泡,偶见闭锁卵泡。与空白组比较,模型组卵泡结构相对清晰,但颗粒细胞层排列疏松,闭锁卵泡显著增多,且卵巢间质含铁血黄素堆积,呈棕黄色颗粒状;与模型组比较,益经汤低剂量组颗粒细



注:A.空白组;B.模型组;C.益经汤低剂量组;D.益经汤中剂量组;E.益经汤高剂量组;F.脱氢表雄酮组(图3-图7同)

图2 益经汤对慢性铁过载小鼠子宫、卵巢形态的影响

Fig. 2 Effect of Yijing decoction on morphology of uterus and ovaries in mice with chronic iron overload

表3 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢、子宫指数的影响(̄x±s,n=12)
Table 3 Effect of Yijing decoction on ovarian and uterine indices in mice with chronic iron overload (̄x±s,n=12) mg·g⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	卵巢指数	子宫指数
空白组		0.002 0±0.000 6	0.003 2±0.000 6
模型组		0.001 0±0.000 2 ¹⁾	0.005 3±0.001 8 ¹⁾
益经汤低剂量组	18.165	0.001 1±0.000 3	0.003 9±0.001 1
益经汤中剂量组	36.33	0.001 4±0.000 2 ²⁾	0.003 2±0.001 4 ²⁾
益经汤高剂量组	72.66	0.001 5±0.000 3 ²⁾	0.003 7±0.001 7 ³⁾
脱氢表雄酮组	10.812 5	0.001 5±0.000 4 ²⁾	0.003 7±0.001 5 ²⁾

胞层排列、闭锁卵泡、卵巢间质含铁血黄素堆积现象无明显改善,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮

组颗粒细胞层排列紧密、闭锁卵泡显著减少、卵巢间质含铁血黄素堆积现象显著改善。

空白组脂肪组织染色均匀,脂滴溶解后的空泡区域呈无色透明,胞质边缘及间质呈淡嗜酸性,细胞核染色质均匀,呈淡蓝色,无脂肪变性;与空白组比较,模型组观察到明显的含铁血黄素堆积,脂肪大量变性,且脂肪细胞胞质内及脂肪小叶见较多含铁血黄素堆积;与模型组比较,益经汤低剂量组仍可观察到较为明显的含铁血黄素堆积及脂肪变性,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组脂肪组织内含铁血黄素堆积现象及脂肪变性情况显著改善。见图3。

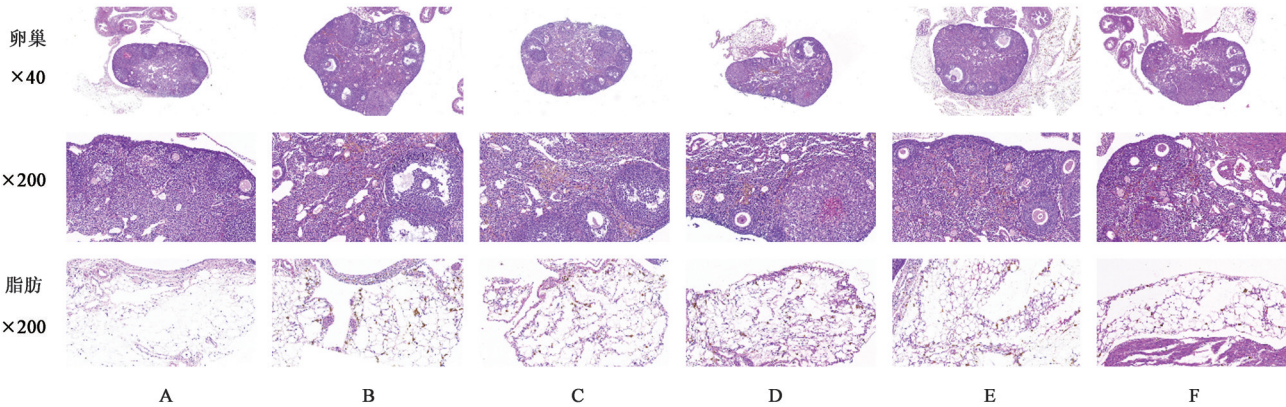


图3 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织及卵巢周围脂肪组织病理学的影响(HE)

Fig. 3 Effect of Yijing decoction on histopathology of ovarian tissue and periovarian adipose tissue in mice with chronic iron overload (HE)

普鲁士蓝染色结果显示,空白组小鼠卵巢与脂肪组织染色均匀,无蓝色铁沉积信号;与空白组比较,模型组卵巢组织间质与闭锁卵泡周围见多灶性蓝色铁沉积信号,且卵泡内可观察到少量铁沉积信号;与模型组比较,益经汤低剂量组卵巢组织间质与闭锁卵泡周围见多灶性蓝色铁沉积信号,但卵泡内未观察到铁沉积信号,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组卵巢组织间质与卵泡周围蓝色铁沉积信号显著降低,且卵泡内无铁沉积信号。

空白组脂肪细胞大小均一,无铁沉积信号;与空白组比较,模型组脂肪细胞严重变性,且细胞周围可见蓝色铁沉积信号,累及脂肪小叶;与模型组

比较,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组脂肪组织内铁沉积信号显著减少。见图4。

3.4 益经汤缓解慢性铁过载小鼠卵巢功能

ELISA结果显示,与空白组比较,模型组小鼠血清FSH、LH均升高,血清AMH与E₂显著下降(P<0.01);与模型组比较,益经汤低剂量组除血清E₂明显改善(P<0.05),AMH、FSH与LH虽有所改善,但差异无统计学意义,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组AMH与E₂水平明显上升,FSH与LH水平明显下降(P<0.05,P<0.01)。见表4。

3.5 益经汤改善慢性铁过载小鼠卵巢组织氧化应

激水平 比色法结果显示,与空白组比较,模型组

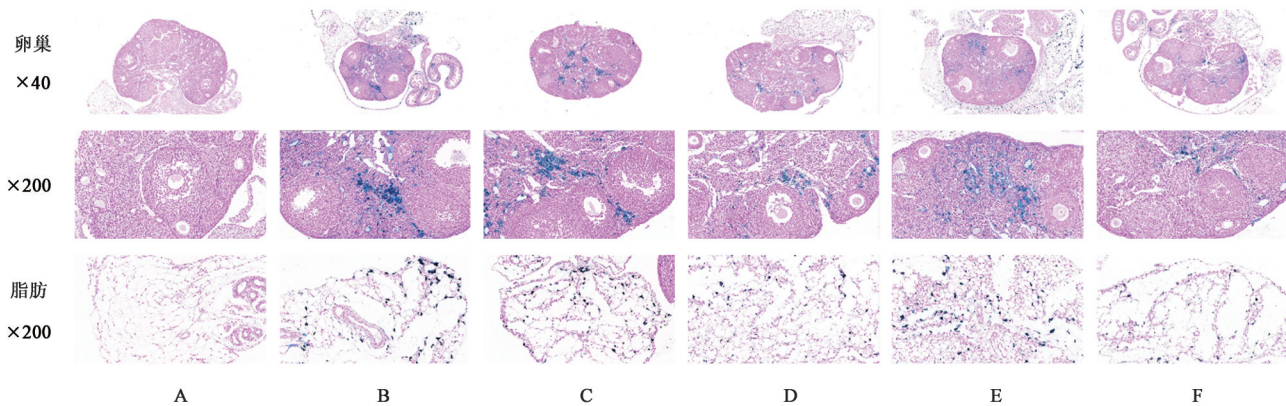


图4 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织及卵巢周围脂肪组织铁沉积的影响(普鲁士蓝)

Fig. 4 Effect of Yijing decoction on iron deposition in ovarian tissue and periovarian adipose tissue in mice with chronic ironoverload (prussian blue)

表4 益经汤对慢性铁过载小鼠血清性激素水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	AMH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	E_2 / $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$	FSH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	LH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		331.34 $\pm$ 83.39	4.16 $\pm$ 0.80	5.30 $\pm$ 2.80	24.43 $\pm$ 6.94
模型组		93.05 $\pm$ 45.60 ¹⁾	0.62 $\pm$ 0.23 ¹⁾	13.76 $\pm$ 3.12 ¹⁾	54.45 $\pm$ 12.45 ¹⁾
益经汤低剂量组	18.165	124.25 $\pm$ 35.02	1.15 $\pm$ 0.48 ²⁾	12.92 $\pm$ 1.83	46.91 $\pm$ 9.67
益经汤中剂量组	36.33	174.18 $\pm$ 26.05 ²⁾	2.04 $\pm$ 0.43 ³⁾	8.83 $\pm$ 1.47 ²⁾	36.29 $\pm$ 9.77 ³⁾
益经汤高剂量组	72.66	218.99 $\pm$ 42.58 ²⁾	2.94 $\pm$ 0.60 ³⁾	5.89 $\pm$ 1.40 ³⁾	26.89 $\pm$ 5.36 ³⁾
脱氢表雄酮组	10.812 5	282.65 $\pm$ 51.95 ³⁾	3.66 $\pm$ 0.65 ³⁾	5.10 $\pm$ 2.11 ³⁾	23.65 $\pm$ 5.05 ³⁾

MDA 含量显著上升($P<0.01$),SOD 活力显著下降($P<0.01$);与模型组比较,益经汤低、中、高剂量组与脱氢表雄酮组 MDA 含量明显下降($P<0.05$),SOD 活力明显上升($P<0.05$);冰冻切片结果显示,与空白组比较,模型组 ROS 荧光强度显著增强($P<0.01$);与模型组比较,益经汤低、中、高剂量组与脱氢表雄酮组,ROS 荧光强度显著减弱($P<0.01$)。见图 5、表 5。

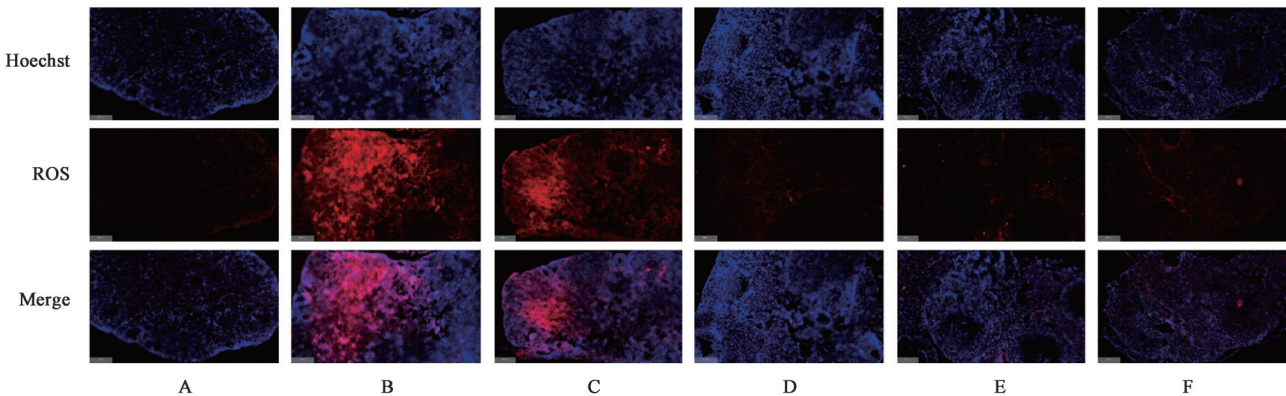


图5 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织 ROS 堆积的影响(DHE 荧光染色, $\times 40$)

Fig. 5 Effect of Yijing decoction on ROS accumulation in ovarian tissue of mice with chronic iron overload (DHE fluorescence staining, $\times 40$)

3.6 益经汤改善慢性铁过载小鼠卵巢组织线粒体超微结构 空白组小鼠卵巢组织线粒体结构完整,细胞核形态规则,分布均匀;与空白组比较,模型组受损线粒体明显增多,细胞核形态不规则,线粒体出现萎缩、水肿或膜破裂,嵴结构减少甚或消失,呈空泡化;与模型组比较,益经汤低剂量组无显著改变,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组的受损线粒体数量减少,细胞核形态较为规则,少量线粒体出现水肿或萎缩,嵴结构恢复。见图 6。

表5 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织氧化应激水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ROS	MDA/μmol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
空白组		45.04±1.67	2.46±0.97	54.36±3.41
模型组		100.37±13.88 ¹⁾	11.77±0.55 ¹⁾	23.70±0.74 ¹⁾
益经汤低剂量组	18.165	72.26±13.18 ²⁾	9.54±0.71 ²⁾	30.17±1.04 ²⁾
益经汤中剂量组	36.33	50.99±5.49 ³⁾	7.41±0.58 ³⁾	38.03±1.15 ²⁾
益经汤高剂量组	72.66	40.31±8.17 ³⁾	4.96±0.47 ³⁾	45.72±3.43 ²⁾
脱氢表雄酮组	10.812 5	47.21±5.52 ³⁾	3.48±0.58 ³⁾	51.97±3.93 ³⁾

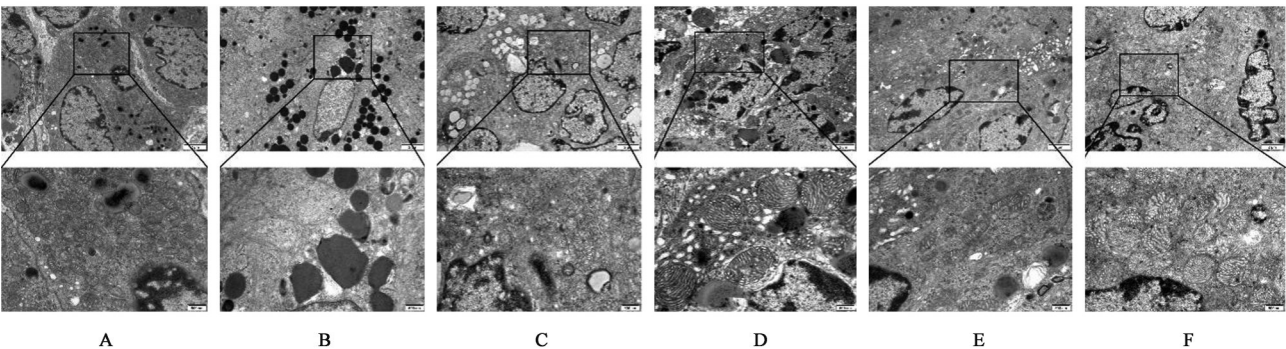


图6 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢线粒体的影响 (透射电镜,×10 000,×30 000)
Fig. 6 Effect of Yijing decoction on mitochondria of ovaries in mice with chronic iron overload (TEM,×10 000,×30 000)

3.7 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织Ftl、Fth1、Tf、Tfr1、GPX1、Cat mRNA表达的影响 Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组Ftl与Fth1 mRNA表达显著上升($P<0.01$),Cat、Tf、Tfr1与GPX1 mRNA表达均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,益经汤低剂量组Ftl、Fth1表达明显下降($P<0.05$),Tf、Tfr1表达明显升高($P<0.05$),Cat表达有所下降,GPX1表达有所升高,但差异无统计学意义,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组Ftl与Fth1 mRNA表达显著下降($P<0.01$),Cat、Tf、Tfr1与GPX1 mRNA表达均显著上升($P<0.01$)。见表6。

表6 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织Ftl1、Fth1、Tf、Tfr1、GPX1和Cat mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ftl1	Fth1	Tf	Tfr1	GPX1	Cat
空白组		1.00±0.09	1.00±0.08	1.00±0.12	1.00±0.06	1.00±0.22	1.00±0.07
模型组		2.29±0.14 ¹⁾	2.82±0.19 ¹⁾	0.19±0.02 ¹⁾	0.35±0.03 ¹⁾	0.17±0.03 ¹⁾	0.51±0.04 ¹⁾
益经汤低剂量组	18.165	1.64±0.17 ²⁾	1.62±0.32 ²⁾	0.45±0.06 ²⁾	0.63±0.10 ²⁾	0.25±0.04	0.42±0.06
益经汤中剂量组	36.33	1.01±0.24 ³⁾	1.03±0.07 ³⁾	0.70±0.02 ³⁾	0.85±0.05 ³⁾	0.65±0.07 ³⁾	0.96±0.07 ³⁾
益经汤高剂量组	72.66	1.00±0.04 ³⁾	1.10±0.15 ³⁾	0.80±0.11 ³⁾	0.98±0.12 ³⁾	0.92±0.03 ³⁾	0.97±0.09 ³⁾
脱氢表雄酮组	10.812 5	1.18±0.18 ³⁾	1.26±0.06 ³⁾	0.68±0.07 ³⁾	0.93±0.03 ³⁾	0.66±0.04 ³⁾	0.97±0.09 ³⁾

3.8 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织Ft、Ftl、Fth1、Tf、Tfr1、GPX4蛋白表达的影响 Western blot结果显示,与空白组比较,模型组Ft、Ftl、Fth1蛋白表达量均显著升高($P<0.01$),Tf、Tfr1、GPX4蛋白表达量均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,益经汤低剂量组Ft、Ftl蛋白表达明显降低($P<0.05$),其余蛋白表达水平有所变化,但差异无统计学意义,益经汤中、高剂量组与脱氢表雄酮组,Ft、Ftl、Fth1蛋白表达量均明显下降($P<0.05, P<0.01$),Tf、Tfr1、GPX4蛋白表达量均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见图7、表7。

4 讨论

DOR的发病率逐年升高,发病原因复杂,虽有报道其与年龄、生活方式及微量元素缺乏或堆积等有关,但具体机制并不明确。近年来,有研究发现,摄入过量的铁剂,使得机体内发生铁沉积,进而诱发卵巢组织OS,导致卵巢功能下降^[13],但并未深入

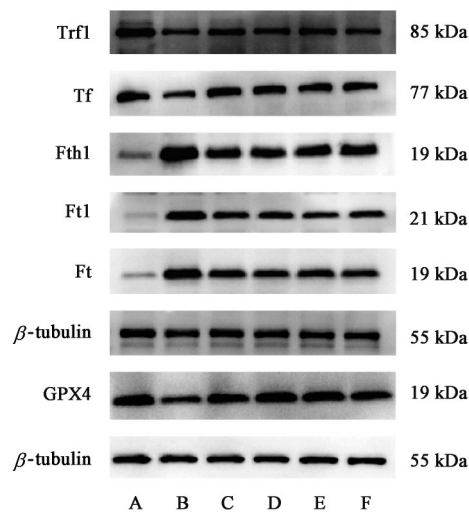


图7 慢性铁过载小鼠卵巢组织 Ft、Ftl、Fth1、Tf、Tfr1 和 GPX4 蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of Ft, Ftl, Fth1, Tf, Tfr1 and GPX4 protein expression in ovaries of chronic iron overload mice

探讨其具体发病机制,故本文建立慢性铁过载模型,以铁代谢和氧化应激为切入点,探讨益经汤调节铁代谢,改善卵巢储备功能的具体机制。

DOR在中医学中归属于“月经过少”“闭经”“不孕”等范畴,其核心病机与“肾-天癸-冲任-胞宫”生殖轴功能失调密切相关。《傅青主女科·调经》云^[15]:“妇人经来断续,经来而量少色淡……此肝肾之虚也。方用益经汤”。“肾藏精,主生殖”,肾精是维持人体生命活动、化生天癸、促进生殖功能成熟的物质基础;肾精亏虚则天癸不足,冲任失调,胞宫失于濡养,功能减退,从而引发月经异常与生育障碍。此外,肝肾同源,肾精亏虚常导致肝血不足,肝血不足反加重肾精损耗;心肾相交,水火既济,心神不宁亦扰动胞宫功能。因此DOR的病机虽以肾虚为本,却与肝、心功能失调密切相关。故基于其病机,治以补肾填精,调畅天癸,疏肝宁心,通调冲任。益经汤全方以熟地黄为君药,滋阴补肾、填精益髓;臣以当归、白芍养血和血,调经止痛,杜仲补肝肾,强筋

骨,助熟地黄增强补肾之力;党参、白术、山药,健脾益气,资助天生化之源;佐以柴胡、牡丹皮疏肝解郁,调畅气机,使气血调和,经血自通,酸枣仁养心除烦安神,心肾同治。全方共奏补肾填精、疏肝解郁、调经养血之功。本研究结果显示,慢性铁过载导致小鼠体质量下降、动情周期紊乱、子宫指数升高、卵巢指数降低、窦卵泡数量减少及闭锁卵泡增多,卵巢组织内有明显的系统性铁沉积,血清AMH、E₂水平显著降低,LH、FSH水平显著升高,提示外源性铁已显著进入小鼠生殖系统,使卵泡发育受阻,加速卵泡池的耗竭,影响“下丘脑-垂体-卵巢”轴的正常反馈调节,进一步证实慢性铁过载对卵巢结构与功能的破坏作用。而益经汤干预后,各剂量组小鼠体质量回升,动情周期趋于规律,子宫指数下降,卵巢指数上升,窦卵泡数量显著增加,闭锁卵泡显著减少,表明益经汤不仅作用于卵巢局部,还能改善全身状态和内分泌调控,但其具体作用机制仍不清楚。

近年来,慢性铁过载作为一种潜在的非遗传性致病因素,逐渐受到关注。机体铁稳态依赖于铁储存蛋白(Ferritin,由Fth1和Ftl亚基组成)和铁转运蛋白(转铁蛋白Tf及其受体Tfr1)的精密调控。有研究发现^[16-17],Ft通过储存过多的铁,减少自由铁离子的浓度,降低脂质过氧化反应的可能性,抑制铁死亡。然而高剂量的铁负荷在机体组织内沉积时,Ft会代偿性升高以防止OS,这使得Ftl和Fth1代偿性升高^[18]。且长期铁沉积使机体抗氧化防御系统清除能力失衡,导致ROS过度累积,SOD、CAT等抗氧化酶活性下降,引发OS,造成细胞结构和功能的损伤^[19-20]。OS可诱导颗粒细胞凋亡,破坏卵泡闭锁的正常调控,导致原始卵泡过早耗竭,加速卵巢早衰^[21]。且MDA等脂质过氧化产物的积累也会损伤卵母细胞线粒体功能,影响卵子质量,降低受精能力^[20-22]。此外,OS还可干扰类固醇激素合成相关酶的表达,导致雌激素水平紊乱,进而影响

表7 益经汤对慢性铁过载小鼠卵巢组织 Ft、Ftl、Fth1、Tf、Tfr1 和 GPX4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Yijing decoction on protein expression of Ft, Ftl, Fth1, Tf, Tfr1 and GPX4 proteins in ovarian tissues of mice with chronic iron overload ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ft/β-tubulin	Ftl/β-tubulin	Fth1/β-tubulin	Tf/β-tubulin	Tfr1/β-tubulin	GPX4/β-tubulin
模型组		1.89±0.25 ¹⁾	2.24±0.38 ¹⁾	2.01±0.13 ¹⁾	0.67±0.01 ¹⁾	0.67±0.01 ¹⁾	0.39±0.05 ¹⁾
益经汤低剂量组	18.165	1.36±0.09 ²⁾	1.68±0.29 ²⁾	1.67±0.21	0.84±0.10	0.84±0.10	0.59±0.05
益经汤中剂量组	36.33	1.34±0.08 ²⁾	1.36±0.22 ³⁾	0.98±0.24 ³⁾	0.97±0.18 ²⁾	0.97±0.18 ²⁾	0.90±0.03 ³⁾
益经汤高剂量组	72.66	1.22±0.08 ³⁾	1.38±0.25 ³⁾	1.03±0.23 ³⁾	0.97±0.17 ²⁾	0.97±0.17 ²⁾	0.95±0.19 ³⁾
脱氢表雄酮组	10.812 5	1.17±0.05 ³⁾	1.38±0.27 ³⁾	1.11±0.16 ³⁾	0.98±0.18 ²⁾	0.98±0.18 ²⁾	0.90±0.19 ³⁾

注:设正常组各指标蛋白表达量均为1

发情周期和生育力^[23-25]。为维持氧化-抗氧化系统的稳定性,机体会产生与脂质过氧化酶拮抗的抑制酶,而GPX4是其关键的一种,能特异性清除细胞膜上的脂质过氧化物,防止铁死亡/铁过载的发生^[26-28]。裴娇娇等^[29]研究发现,早发性卵巢功能不全小鼠卵巢组织GPX4蛋白表达显著下降,上调GPX4的表达可以抑制铁死亡,显著改善小鼠卵巢功能。益经汤能有效调节铁代谢,增强小鼠卵巢抗氧化防御能力,维持小鼠卵泡池的稳定,延缓卵巢储备的耗竭进程,有效改善卵巢功能^[30-32]。本研究结果显示,慢性铁过载导致小鼠卵巢铁储存相关蛋白和基因表达显著上升,铁转运蛋白Tf、Tfr1表达显著下降,MDA含量与ROS荧光强度显著增强,SOD活性与Cat mRNA水平明显下降,且卵巢组织线粒体体积肿胀、嵴结构模糊甚至消失,呈空泡样,GPX1 mRNA和GPX4蛋白表达均显著下降,提示小鼠卵巢内铁沉积,会诱发铁代谢紊乱,使得脂质过氧化反应增强,抗氧化防御体系受损,进一步降低卵巢储备功能。而益经汤干预后,各剂量组Fth1和Tf1的mRNA及蛋白表达均显著下调,Tf及其受体Tfr1的表达均显著下降,SOD活性、GPX1、Cat mRNA及GPX4蛋白表达均呈现剂量依赖性回升,MDA水平、ROS荧光强度显著减弱。提示益经汤通过上调GPX4表达,能有效抑制铁死亡通路,保护卵泡颗粒细胞和卵母细胞免受氧化损伤,有效清除过量自由基,重建氧化-抗氧化平衡,为卵泡发育提供更为稳定的微环境;这一过程是通过促进机体铁的合理转运与利用,避免铁在卵巢局部过量沉积,减轻铁毒性,从而达到卵巢储备功能的恢复(增强出版附加材料)。这一发现为中医药调控微量元素代谢提供了新的科学依据。

综上所述,慢性铁过载引发OS和线粒体损伤,致使小鼠卵巢储备功能下降。益经汤则通过下调Ft、Fth1、Tf1表达,减少铁在卵巢的异常沉积,上调Tf、Tfr1、GPX4等蛋白表达,促进铁的合理转运并增强抗氧化能力,缓解氧化应激,修复线粒体结构,保护卵泡发育,进而改善卵巢储备功能。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] STEINER A Z, PRITCHARD D, STANCZYK F Z, et al. Association between biomarkers of ovarian reserve and infertility among older women of reproductive age[J]. JAMA, 2017, 318(14): 1367-1376.
- [2] ZHANG Q L, LEI Y L, DENG Y, et al. Treatment progress in diminished ovarian reserve: Western and Chinese medicine[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(4): 361-367.

- [3] 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识专家组, 中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(4): 425-434.
- Expert Group of Consensus on Clinical Diagnosis and Management of Diminished Ovarian Reserve, Reproductive Endocrinology and Fertility Preservation Section, Chinese Society on Fertility Preservation, Chinese Preventive Medicine Association. Expert consensus on clinical diagnosis and treatment of diminished ovarian reserve[J]. J Reprod Med, 2022, 31(4): 425-434.
- [4] 李文燕, 丁澍, 熊湘蕾, 等. 卵巢储备功能减退的代谢异常及干预策略[J]. 中国生育健康杂志, 2025, 36(3): 297-302.
- LI W Y, DING S, XIONG X L, et al. Metabolic abnormalities and intervention strategies in diminished ovarian reserve[J]. Chin J Reprod Health, 2025, 36(3): 297-302.
- [5] LI S, ZHOU Y, HUANG Q, et al. Iron overload in endometriosis peritoneal fluid induces early embryo ferroptosis mediated by HMOX1[J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 355.
- [6] NI Z, LI Y, SONG D, et al. Iron-overloaded follicular fluid increases the risk of endometriosis-related infertility by triggering granulosa cell ferroptosis and oocyte dysmaturity[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(7): 579.
- [7] WU Y, YANG R, LAN J, et al. Iron overload modulates follicular microenvironment via ROS/HIF-1 α /FSHR signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 196: 37-52.
- [8] YAN F, LI K, XING W, et al. Role of iron-related oxidative stress and mitochondrial dysfunction in cardiovascular diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, doi: 10. 1155/2022/5124553.
- [9] 张凯宁, 杜小利, 王峻榕. 《傅青主女科》辨治早发性卵巢功能不全思想探析[J]. 河北中医, 2025, 47(2): 326-329, 335.
- ZHANG K N, DU X L, WANG J R. Exploration of Fu Qingzhu's gynecology on the differentiation and treatment of premature ovarian insufficiency[J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2025, 47(2): 326-329, 335.
- [10] 胡恒, 储继军, 李哲, 等. 基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路探讨益经汤改善卵巢储备功能减退大鼠卵巢炎症反应的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(11): 20-30.
- HU H, CHU J J, LI Z, et al. Mechanism of Yijing decoction in ameliorating ovarian inflammatory response in rats with diminished ovarian reserve via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(11): 20-30.
- [11] 童嘉欣, 储继军. 储继军论治卵巢储备功能减退不孕症经验[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2025, 49(4): 162-165.
- TONG J X, CHU J J. Professor Chu Jijun's experience in treating infertility due to diminished ovarian reserve[J]. Chin J Libr Inf Sci Tradit Chin Med, 2025, 49(4): 162-165.
- [12] 梁程程, 于静, 胡恒, 等. 益经汤含药血清对人卵巢颗粒细胞铁过载诱导氧化应激的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2025, 32(9): 105-112.
- LIANG C C, YU J, HU H, et al. Effects of drug-containing serum of Yijing decoction on iron overload-induced oxidative stress in

- human ovarian granulosa cells[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2025, 32(9): 105-112.
- [13] QIN X, LIANG D, HU M, et al. Chronic overload of concentration-dependent iron exerts different effects on ovarian function in C57BL/6J mice[J]. Biol Reprod, 2021, 104(6): 1347-1359.
- [14] 张萍, 杨丽娟, 陈胜辉, 等. 养精种玉汤调控 SIRT1/PGC-1 α 信号通路改善卵巢储备功能减退大鼠线粒体功能及氧化应激损伤的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(7): 46-55.
- ZHANG P, YANG L J, CHEN S H, et al. Mechanism of Yangjing Zhongyu decoction in improving mitochondrial function and alleviating oxidative stress injury in rats with diminished ovarian reserve by regulating the SIRT1/PGC-1 α pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(7): 46-55.
- [15] LI H X, SHI L, LIANG S J, et al. Moxibustion alleviates decreased ovarian reserve in rats by restoring the PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Integr Med. 2022, 20(2): 163-172.
- [16] 黄梦雪. 《傅青主女科》益经汤治疗早发性卵巢功能不全的思路与启发[J]. 中医文献杂志, 2021, 39(6): 42-43, 68.
- HUANG M X. Insights and inspiration from Yijing decoction in Fu Qingzhu's gynecology for treating premature ovarian insufficiency[J]. J Tradit Chin Med Lit, 2021, 39(6): 42-43, 68.
- [17] YANG C, WUA, TAN L, et al. Epigallocatechin-3-gallate alleviates liver oxidative damage caused by iron overload in mice through inhibiting ferroptosis[J]. Nutrients, 2023, 15(8): 1993.
- [18] WANG Z X, MA J, LI X Y, et al. Quercetin induces p53-independent cancer cell death through lysosome activation by the transcription factor EB and reactive oxygen species-dependent ferroptosis[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(5): 1133-1148.
- [19] ZHAO J, DONG L, GONG X, et al. Hepcidin/HIF-1 α is involved in the endogenous recovery and ferroptosis after cerebral ischemia in mice[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2025, 1871(8): 168022.
- [20] LOY S L, CHEUNG Y B, FORITIER M V, et al. Age-related nomograms for antral follicle count and anti-Mullerian hormone for subfertile Chinese women in Singapore[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189830.
- [21] ZHANG J, SU T, FAN Y, et al. Spotlight on iron overload and ferroptosis: Research progress in female infertility[J]. Life Sci, 2024, 340: 122370.
- [22] LI H, CAI S, MU H, et al. HIGD1A alleviates oxidative stress related ovarian hypofunction by enhancing granulosa cell functions via NF- κ B/SOD2 signaling pathway[J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12(34): e03828.
- [23] YAN H, YI C, MIN Z, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in ovarian follicular fluid of women with diminished ovarian reserve during *in vitro* fertilization[J]. J Ovarian Res, 2023, 16(1): 206.
- [24] HUANG X, PAN H C, YIN F, et al. The role of estrogen in mitochondrial disease[J]. Cell Mol Neurobiol, 2025, 45(1): 68.
- [25] O'REILLY D J, HEAZELL P E A, GREENWOOD S, et al. Sex-specific alterations in placental mitochondria, oxidative damage and apoptosis in mice of advanced maternal age [J]. Reproduction, 2025, 170(4): e250160.
- [26] WANG M, ZHANG Q B, MA S, et al. Broadening horizons: The role of ferroptosis in polycystic ovary syndrome[J]. Frontiers in Endocrinology, 2024, 15: 1390013.
- [27] LI X, QIAN S, HOU Z, et al. Activation of the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway by cGAMP mitigates oxidative stress and ferroptosis in ischaemic stroke[J]. Biochem Pharmacol, 2025, 242(Pt 2): 117334.
- [28] WU R, WANG T, XU X, et al. Phoenixin-14 alleviates premature ovarian failure by inhibiting ferroptosis through SLC7A11/GPX4 [J]. Drug Dev Res, 2025, 86(5): e70110.
- [29] 裴娇娇, 腊晓琳. 褪黑素通过抑制铁死亡改善环磷酰胺和白消安诱导的早发性卵巢功能不全小鼠的研究[J]. 中国医药科学, 2025, 15(8): 4-8, 21.
- PEI J J, LA X L. Melatonin ameliorates premature ovarian insufficiency induced by cyclophosphamide and busulfan in mice by inhibiting ferroptosis[J]. China Med Sci, 2025, 15(8): 4-8, 21
- [30] ASPERTI M, BELLINI S, GRILLO E, et al. H-ferritin suppression and pronounced mitochondrial respiration make hepatocellular carcinoma cells sensitive to RSL3-induced ferroptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 169: 294-303.
- [31] 牛逸琳, 陈烁, 陈雨诗, 等. 益经汤对环磷酰胺所致卵巢早衰小鼠的治疗作用研究[J]. 广东药科大学学报, 2024, 40(1): 1-7.
- NIU Y L, CHEN S, CHEN Y S, et al. Therapeutic effects of Yijing decoction on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in mice[J]. J Guangdong Pharm Univ, 2024, 40(1): 1-7.
- [32] 万云慧, 陈晓勇, 陶莉莉. 加减益经汤对DOR模型大鼠p53表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(6): 1339-1340.
- WAN Y H, CHEN X Y, TAO L L. Effects of modified Yijing decoction on P53 expression in rats with diminished ovarian reserve (DOR)[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(6): 1339-1340.

[责任编辑 孙丛丛]