

四物汤对卵巢功能低下模型大鼠肠道菌群的影响

朱敏¹, 周阁^{1*}, 段金廉²

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210036;

2. 南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210023)

[摘要] 目的: 采用16S rRNA技术研究四物汤对雷公藤多苷致卵巢功能低下模型大鼠肠道菌群的影响, 探讨四物汤改善卵巢功能低下的作用机制。方法: 20只8周龄雌性SD大鼠随机分为4组, 分别为正常组、模型组、四物汤高、低剂量组。除正常组外, 其他3组均按50 mg·kg⁻¹灌胃雷公藤多苷片造模, 连续给药14 d, 第15天停止造模, 高剂量组按人临床日剂量(40 g)的3倍, 低剂量组按人临床日用量的1.5倍给药, 连续灌胃18 d, 模型组和正常组灌胃等体积生理盐水。第18天, 收集粪便用16S rRNA进行基因测序, 给药后1 h, 麻醉后腹主动脉取血, 采用放射免疫法检测激素水平, 取双侧卵巢, 包埋切片后苏木素-伊红(HE)染色进行病理学观察。结果: 与正常组比较, 模型组黄体生成素(LH)水平明显升高($P<0.05$), 雌二醇(E₂)水平明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, 四物汤高、低剂量组的LH水平均明显降低($P<0.05$), E₂水平均明显升高($P<0.05$), 四物汤给药后, 能不同程度扭转雷公藤多苷造成的血清促卵泡激素(FSH)、LH水平明显升高, E₂、孕酮(P)水平明显降低; 正常组有大量处于不同发育阶段的各级卵泡, 模型组中闭锁卵泡明显增多, 四物汤高剂量组可见大量成熟卵泡、次级卵泡及初级卵泡, 低剂量组黄体增加, 可见原始卵泡、次级卵泡; 与正常组和给药组比较, 模型组疣微菌门和Epsilonbacteraeota的丰度明显减少; 与正常组比较, 模型组在门、纲、目、科、属分类层面上均存在差异菌群, 其中模型组的厚壁菌门和拟杆菌门比例增加; 雷公藤多苷造模后, 毛螺菌科丰度明显降低, 瘤胃菌属UCG-005丰度明显增加; 四物汤给药组与正常组、模型组能明显区分开, 且给药组具有向正常组靠近的趋势。结论: 四物汤对雷公藤多苷致卵巢功能低下模型大鼠有改善作用, 其机制可能与调节肠道菌群多样性有关。

[关键词] 四物汤; 卵巢功能减退; 卵巢早衰; 16S rRNA; 肠道菌群

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0025-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221006 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220322.1905.024.html>

[网络出版日期] 2022-03-23 16:55

Effect of Siwutang on Diminished Ovarian Reserve in Rats Based on 16S rRNA Sequencing of Intestinal Flora

ZHU Min¹, ZHOU Ge^{1*}, DUAN Jiniao²

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210036, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine (TCM) Formulae, Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Siwutang (SWT) on intestinal flora in rats with diminished ovarian reserve (DOR) induced by *Tripterygium wilfordii* polyglycoside (TWP) based on 16S rRNA sequencing. **Method:** Twenty 8-week-old female SD rats were randomly assigned into four groups: blank group, model group, SWT high-dose group, and SWT low-dose group. Except the blank group, the other three

[收稿日期] 2022-01-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904238); 江苏省中医院高峰学术人才项目(y2018rc34)

[第一作者] 朱敏, 博士, 副主任中医师, 从事中药药效物质及中药制剂研究, E-mail: zhumin0902@126.com

[通信作者] * 周阁, 硕士, 主任中医师, 从事中西医结合生殖内分泌疾病的研究, E-mail: 56858371@qq.com

groups were underwent intragastric administration of TWP tablets at a dose of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 14 days. On day 15, the high-dose group was administrated at 3 times of the human dosage (40 g/person/day), the low-dose group at 1.5 times of the human dosage, and the model group and the blank group with the same volume of normal saline for 18 days. Then, feces were collected for 16S rRNA sequencing. One hour after administration, blood was sampled from abdominal aorta after anesthesia for the measurement of hormone levels by radioimmunoassay, and ovaries were sampled, embedded, sliced, and stained with haematoxylin-eosin (HE) for pathological observation. **Result:** The model group had higher level of luteinizing hormone (LH, $P < 0.05$) and lower level of estradiol (E_2 , $P < 0.05$) than the blank group. The SWT high-dose group and low-dose group had lower LH levels ($P < 0.05$) and higher E_2 levels than the model group ($P < 0.05$). SWT reversed the elevation in follicle-stimulating hormone (FSH) and LH levels and the decline in E_2 and progesterone (P) levels caused by TWP to some extent. There were a large number of follicles at different developmental stages in the blank group, while atretic follicles increased significantly in the model group. A large number of mature follicles, secondary follicles, and primary follicles were observed in the high-dose SWT group, and primordial follicles, secondary follicles, and increased corpus luteum in the low-dose SWT group. Compared with that in the blank group and the administration group, the abundance of *Verrucomicrobia* and *Epsilonbacteraeota* in the model group significantly reduced. Compared with the blank group, the model group had different intestinal flora in phylum, class, order, family, and genus levels. Specifically, the model group had increased proportions of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. After TWP modeling, the abundance of *Lachnospiraceae* decreased significantly while that of *Ruminococcaceae* UCG-005 increased significantly. SWT groups, blank group, and model group can be clearly distinguished, and SWT groups had a tendency to approach the blank group. **Conclusion:** SWT may improve the ovarian function of rats with TWP-induced DOR by regulating intestinal flora diversity.

[Keywords] Siwutang; diminished ovarian reserve (DOR); premature ovarian failure (POF); 16S rRNA; intestinal flora

卵巢功能低下(DOR)主要是指卵巢内卵母细胞的数量减少和(或)质量下降,同时伴有抗苗勒氏管激素水平降低、窦卵泡数减少、促卵泡激素水平升高,临床表现为月经初潮后到40岁前出现月经稀发,经量减少,渐至闭经以及生育能力减退或不孕,进一步可发展为早发性卵巢功能不全、卵巢早衰,同时骨质疏松、骨折、心血管疾病、抑郁、认知功能障碍等疾病的发病率也随之增加,给患者带来了巨大的困扰。生育年龄推迟已成为全球性问题,伴随着女性工作压力的增加、环境的变化等多种因素,DOR的发病率呈逐年上升和低龄化的趋势^[1]。目前西医在治疗DOR方面主要是采用激素替代疗法(HRT),但存在有较大不良反应的风险,如停药后易复发、长期使用激素会增加子宫内膜癌、乳腺癌等的发病率^[2],中医药在卵巢功能减退的治疗上具有独特的疗效优势,且没有激素治疗的不良反应^[3-5]。

四物汤方由当归、芍药、熟地黄、川芎4味药组成,最早见于唐代蔺道人《仙授理伤续断秘方》,宋代《太平惠民和剂局方》中始用于妇人诸疾的治疗。从古今医家治疗妇人卵巢功能低下相关疾病的用

药规律中可以发现四物汤由其养血、和血、调经的基本功效在卵巢功能减退乃至早衰的防治中具有核心组成的作用^[6-8],后世医家以四物汤为基础临证加减形成的方剂在DOR的治疗上取得了非常好的临床疗效^[9-14]。

现代研究显示,肠道菌群在女性生殖健康中发挥着重要作用,可通过直接或间接参与性激素调节、刺激炎症因子产生、影响免疫功能和代谢稳态、调节神经递质的合成等途径参与多种生殖内分泌疾病的发生^[15-23],如多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症、卵巢早衰等。四物汤对卵巢功能减退的疗效是否与调节肠道菌群有关,尚未见报道。本研究以雷公藤多苷所致卵巢功能减退模型大鼠为研究对象,基于16S rRNA高通量基因测序技术,阐释DOR模型大鼠肠道微生态多样性的变化及四物汤对DOR大鼠肠道菌群的调节作用,为进一步探讨四物汤改善DOR的作用机制提供研究基础。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雌性SD大鼠20只,体质量180~200 g,购于南通大学[许可证号SYXK(苏)

2019-0001],饲养于南京中医药大学附属医院基础药理实验室清洁级动物房内。动物实验取得了南京中医药大学附属医院实验动物伦理委员会的批准(批件号2019DW-16-02)。

1.2 药物 当归(批号180403)、白芍(批号180902)、川芎(批号180603)和熟地黄(批号181011)饮片均购自安徽省万生中药饮片有限公司,经南京中医药大学附属医院钱芳主任中药师鉴定,均符合2015年版《中华人民共和国药典》中的相关要求。称取以上4味饮片各200 g混合,第1次加5倍量水浸泡30 min后,大火煮沸后小火煎煮30 min,过滤后的药渣再加5倍量水大火煮沸后小火煎煮30 min,合并2次滤液,浓缩至生药质量浓度约1 g·mL⁻¹冷藏保存备用。雷公藤多苷片(浙江得恩德制药股份有限公司,批号1804138B)。

1.3 试剂 通用型组织固定液、苏木素-伊红(HE)染液、分化液、返蓝液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号分别为YP184309、G1005、G1005-3、G1005-4);二甲苯、无水乙醇、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为10023418、100092683、10004160);血清促卵泡生产激素(FSH)、促黄体生成激素(LH)、雌二醇(E₂)、孕酮(P)放免测定盒(北京华英生物技术研究所,批号分别为20181230、2018123、20181230、20181230);DNA抽提试剂盒[安诺伦(北京)生物科技有限公司,货号D5625-02];2%琼脂糖凝胶(法国Biowest公司,货号BY-R0100),FastPfu聚合酶(北京全式金生物技术股份有限公司,货号M20105);AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒(美国Axygen公司,货号AP-GX-50G)。

1.4 仪器 JJ-12J型脱水机、JB-P5型包埋机、JB-L5型冻台(武汉俊杰电子有限公司),RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),GFL-230型烤箱(天津市莱玻瑞仪器设备有限公司),防脱载破片(武汉塞维尔生物科技有限公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜、Nikon DS-U3型成像系统(日本尼康公司),XH-6020型全自动放免计数仪(西安核仪器厂),ABSON MiFly-6型小型离心机(合肥艾本森科学仪器有限公司),Eppendorf 5424R型高速台式冷冻离心机(德国Eppendorf公司),NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司),DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂),ABI geneamp 9700型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司),Illumina Miseq

MISEQ型测序仪、Illumina hiseq HISEQ型测序仪(美国Illumina公司),BioTek Elx800型酶标仪(美国BioTek公司),TBS380微型荧光计(美国TurnerBioSystems公司),M220Covaris M220(Gene Company Limited公司),QL-901型涡旋混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司),TL-48R型粉碎研磨仪(上海万柏生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 雌性SD大鼠20只,随机分为4组,分别为正常组、模型组、四物汤高、低剂量组。参照文献造模方法^[24-28],除正常组,其他3组均按50 mg·kg⁻¹灌胃雷公藤多苷片制造DOR模型,连续给药14 d,第15天停止造模,四物汤高剂量组按人临床日用量(40 g)的3倍,四物汤低剂量组按人临床日用量的1.5倍给药,模型组和正常组灌胃等体积生理盐水,连续灌胃18 d。第18天,收集粪便于-80 °C保存用于16S rRNA基因测序,给药后1 h,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血,用于放射免疫法检测血清中激素表达水平,取双侧卵巢,于组织固定液中保存,包埋切片后HE染色进行病理学观察。

2.2 大鼠血清性激素的检测 所取大鼠血液3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm)后取血清,采用放射免疫法检测血清中FSH、LH、E₂和P水平,按照试剂盒的操作说明进行检测。

2.3 大鼠卵巢组织形态学观察 动物实验末,取大鼠卵巢组织,剔除脂肪后用组织固定液固定,经常规脱水后,石蜡包埋制片切片,HE染色,光学显微镜观察卵巢组织形态学变化。

2.4 肠道菌群Illumina Miseq测序分析 参照试剂盒说明书进行大鼠粪便中总DNA的提取,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量,用338F和806R引物对V3-V4可变区进行PCR扩增,用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit进行纯化,Tris-HCl洗脱,2%琼脂糖电泳检测。利用QuantiFluor™-ST进行检测定量,根据Illumina MiSeq平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建PE 2×300的文库,利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序,原始测序序列使用Trimmomatic软件质控,使用FLASH软件进行拼接。使用UPARSE软件(version 7.1<http://drive5.com/uparse/>),根据97%的相似度对序列进行OTU聚类,并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。利用RDP classifier(<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释,比

对Silva数据库(SSU123),设置比对阈值为70%。对测序结果进行微生物多样性的分析。

3 结果

3.1 四物汤对DOR大鼠血清性激素FSH、LH、E₂、P水平的影响

与正常组比较,模型组LH水平升高

($P<0.05$), E₂水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,四物汤高、低剂量组的LH水平明显降低($P<0.05$), E₂水平明显升高($P<0.05$),四物汤低剂量组明显升高P水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 四物汤对DOR大鼠血清FSH、LH、E₂和P水平的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

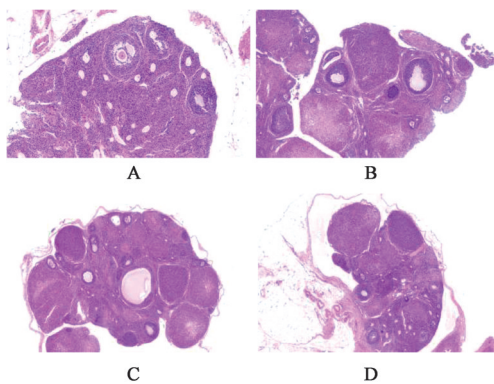
Table 1 Effect of Siwutang on serum FSH, LH, E₂ and P levels in DOR rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	P/μg·L ⁻¹
正常组		16.95±0.47	5.86±0.34	40.94±1.35	57.03±7.56
模型组		20.97±1.44	7.12±1.94 ¹⁾	28.35±1.41 ¹⁾	47.51±5.07
四物汤高剂量组	10.8	16.76±0.73	4.69±0.06 ²⁾	36.42±1.27 ²⁾	52.78±6.22
四物汤低剂量组	5.4	18.86±0.78	5.42±0.79 ²⁾	38.74±1.15 ²⁾	61.25±8.93 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$

3.2 四物汤对DOR模型大鼠卵巢组织形态学的影响

正常组有大量处于不同发育阶段的各级卵泡,其中初级卵泡生长活跃,模型组中闭锁卵泡明显增多,四物汤高剂量组虽有少量闭锁卵泡,但可见大量成熟卵泡,次级卵泡及初级卵泡,四物汤低剂量组黄体增加,可见原始卵泡,次级卵泡。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.四物汤高剂量组;D.四物汤低剂量组

图1 四物汤对DOR大鼠卵巢组织病理学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Siwutang on ovarian histopathology of DOR rats (HE,×100)

3.3 四物汤对DOR模型大鼠肠道微生物测序结果的影响

3.3.1 序列长度分布

通过Illumina Miseq测序得到原始序列插入片段长度为468 bp,测序长度为PE300,原始序列数目为1 225 770×2,总碱基数目为737 913 540。优化序列数目为1 225 770,优化碱基数目为507 053 210,优化序列平均长度为413.660 972 287。见增强出版附加材料,序列长度分布在300~500 bp范围内,与16S rDNA V3-V4区序列长度大致吻合。

3.3.2 肠道菌群分类单元(OTUs)分析

分别在各个分类水平:domain(域)、kingdom(界)、phylum(门)、class(纲)、order(目)、family(科)、genus(属)和species(种)统计各样本的群落组成,保留至少在3个样本中序列数都≥5的OTU,按最小序列数抽平,一共获得了1 052个OUT。其中包括domain:1; kingdom:1; phylum:13; class:20; order:31; family:61; genus:174; species:326。正常组有12个门,18个纲,27个目,55个科,159个属,286个种,896个OTU,模型组有11个门,18个纲,28个目,57个科,160个属,285个种,908个OTU,四物汤高剂量组有12个门,18个纲,27个目,55个科,159个属,297个种,924个OTU,四物汤低剂量组有13个门,20个纲,29个目,59个科,164个属,300个种,903个OTU。物种丰度和均匀度见增强出版附加材料中Rank-abundance曲线。

3.3.3 多样性及稀释曲线分析

Alpha多样性是指一个特定区域或者生态系统内的多样性,Alpha多样性指数包括一系列统计学的分析指数,Sobs指数是实际观测到的OUT数目,Chao和Ace指数用来评价物种丰富度,数值越大丰富度越高,Shannon指数基于丰富度和均匀度2个方面,结果显示,各组菌群具有较高的丰富度和多样性,但组间差异无统计学意义,见增强出版附加材料。稀释曲线是从样本中随机抽取一定数量的序列,统计这些序列所代表的物种数目,以序列数和物种数构建曲线,见增强出版附加材料中所示稀释曲线趋于平缓,说明本次测序数据量足够,可以反映样本中绝大多数的微生物多样性信息。

3.3.4 物种组成分析

Venn图可用于统计多组样

本中所共有和独有的OTUs数目,能较直观反映不同样本中物种组成相似性及重叠情况(见增强出版附加材料),共检测到3 631个OTU,正常组和模型组共有814个,模型组和四物汤高剂量组共有820个,模型组和四物汤低剂量组共有800个,正常组和四物汤高剂量组共有828个,正常组和四物汤低剂量组共有801个,四物汤高、低剂量组共有824个。对各组中每个样本在门和属水平上的数量进行统计,根据分类学分析的结果,可以得知样本在各分类水平上的分类对比情况。群落柱形图可以直观反应群落组成种类和相对丰度。合并丰度<0.001的物种,在门水平上,各组厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)均是最主要的物种,两者相对丰度达94%以上,其次有变形菌门(Proteobacteria)、软壁菌门(Tenericutes)、放线菌门(Actinobacteria)和蓝细菌(Cyanobacteria)。与正常组和2个给药组比较,模型组少了疣微菌门(Verrucomicrobia)和Epsilonbacteraeota,与正常组比较,模型组的厚壁菌门和拟杆菌门比例增加,分布见增强出版附加材料。合并丰度<0.01的物种,在属水平上,各组主要存在Muri菌(*Muribaculaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、毛螺菌科NK4A136属(*Lachnospiraceae* NK4A136)、瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*-UCG-005, 014)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、普氏菌(*Prevotella*_9)、布劳特氏菌(*Blautia*)等,分布情况见增强出版附加材料,造模后,毛螺菌属丰度明显降低,瘤胃菌属UCG-005丰度明显增加。

3.3.5 β 多样性分析 β 多样性分析通过对不同样本的物种多样性进行组间比较分析,研究不同分样本间群落组成的相似性或差异性。其中PCA分析即主成分分析,可有效找出数据中最主要的元素和结构,去除噪音和冗余,将复杂数据降维,揭示隐藏在复杂数据背后的简单结构,主要基于欧氏距离,直接利用OTU丰度表,不涉及距离算法的选择,从宏观层面反映样本之间群落组成的离散和聚集情况。见增强出版附加材料,模型组和正常组能显著分开,各自的样本间距离均较近,物种组成相似度高,给药组高、低剂量之间的距离也较近,能与模型组和正常组区别开,但四物汤高、低剂量之间区别差异无统计学意义,由此可见,大鼠在雷公藤多苷造模后,与正常组比较,粪便的菌群结构出现了明显的变化,四物汤给药后对菌群结构有显著的影响,在一定程度上能扭转雷公藤多苷的影响,向正

常组偏移,具有改善卵巢早衰模型大鼠肠道菌群的作用。PCoA分析与PCA分析类似,不受限于距离算法,反映样本间群落组成的相似性和差异性,选用bray_curtis距离算法,分析结果和PCA分析结果相似,正常组、模型组和给药组大鼠粪便的肠道菌群组内相对聚集,组间明显分开,造模和给药前后肠道菌群的物种结构存在明显差异,见增强出版附加材料。

3.3.6 物种差异分析 LEfSe多级物种差异判别分析是用于发现不同各组样本中最能解释组间差异的物种以及这些物种对组间差异的影响程度,适用于多层次的生物学标识和特征的发现和解释,首先使用克氏秩和检验检测具有显著丰度差异的特征,并找到与丰度有显著性差异的类群,再用LDA判别分析来估算物种丰度对差异影响的大小。由LEfSe多级物种层级图可见增强出版附加材料,模型组与正常组比较,在门、纲、目、科、属分类层面上均存在差异菌群。在门水平上,模型组的疣微菌门(Verrucomicrobia)和迷踪菌门(Elusimicrobia)显著下调,Patescibacteria显著上调,见增强出版附加材料。在属水平上,见增强出版附加材料,考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、异杆菌属(*Allobaculum*)、毛螺菌科UCG-010属(*Lachnospiraceae*_UCG-010)、链球菌属(*Streptococcus*)差异有显著统计学意义($P<0.01$);克里斯滕森菌科R-7(*Christensenellaceae*_R-7)、瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)、韦荣球菌科(*Erysipelotrichaceae*)、瘤胃球菌科UCG-013属(*Ruminococcaceae*_UCG-013)、阿克曼氏菌属(*Akkermansia*)、瘤胃梭菌属(*Ruminiclostridium*)、副杆菌属(*Parabacteroides*)、毛螺菌科UCG-001属(*Lachnospiraceae*_UCG-001)、杜氏杆菌属(*Dubosiella*)和Tyzzerella差异有明显统计学意义($P<0.05$)。

LDA判别柱形图统计多组中有显著差异的物种类群,LDA分值越大,代表物种丰度对差异效果影响越大,分析结果见增强出版附加材料,LDA Score>设定值3.5的属正常组有5个,均属于阿克曼氏菌属和疣微菌门,模型组有2个,均属于瘤胃球菌科,高剂量给药组有5个,分布于克里斯滕森菌科,别样棒菌属,阿托波菌科,红螯菌科,低剂量给药组有2个,分别是布劳特氏菌属和韦荣球菌科。

3.3.7 功能预测分析 通过PICRUST软件对OTU丰度表进行标准化,依据每个OTU对应的

Greengene ID, 比对到 COG 库, 获得 OTU 对应的 COG 家族信息, 计算 COG 的丰度, 根据比对到 COG 库的 COG 编号可以从 eggNOG 数据库中解析到各个 COG 的描述信息及其功能信息, 从而得到功能丰度谱。见增强出版附加材料, 依据大鼠肠道菌群所预测到的 COG 功能有 24 条, 包括碳水化合物运输和代谢, 转录, 氨基酸转运与代谢, 复制、重组和修复, 翻译、核糖体结构与生物合成, 细胞壁/膜/包膜生物合成, 能源生产和转换, 信号传导机制, 无机离子转运与代谢, 辅酶转运与代谢等的功能丰度较高。

4 讨论

卵巢储备功能是指卵巢内存留卵泡的数量和质量, 反映女性的生育潜能, DOR 主要提示患者生育力降低, 临床可表现为月经紊乱, 月经量少进而闭经, 反复自然流产以及不孕, 直接影响到了女性朋友生殖健康和生活质量, 但其发病原因至今仍不明确, 据文献报道, 认为可能与遗传因素^[29]、年龄因素^[30-31]、医源性因素^[32]、免疫及感染因素^[33-34]、环境因素^[35-36]、社会心理及生活方式^[37-38]有关。目前研究认为肠道菌群与卵巢早衰的关系主要体现在自身免疫以及参与性激素调节两个方面。认为肠道菌群能通过直接或间接的途径参与性激素的调节^[40-41], 或者通过影响免疫相关细胞因子如调节性 T 细胞 (Treg)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、辅助性 T 细胞 17 (Th17) 等的表达而改善卵巢早衰^[22, 39]。

本研究通过 16S rRNA 测序方法探究四物汤对雷公藤多苷致卵巢功能减退大鼠肠道微生态的影响, 结果显示, 雷公藤多苷给药后大鼠肠道菌群有显著的变化, 菌群多样性较正常组明显降低, 在门水平上, 模型组疣微菌门和 Epsilonbacteraeota 丰度显著降低, 厚壁菌门和拟杆菌门比例增加。在属水平上, 模型组毛螺菌属丰度明显降低, 瘤胃菌属 UCG-005 丰度明显增加, 说明卵巢功能减退状态下的大鼠肠道菌群与正常组相比发生了明显的改变。

有研究报道疣微菌门是一个很有研究价值的门, 其中阿克曼氏菌属 (*Akkermansia*) 就属于疣微菌门, 被认为在人类肠道微生物群中发挥着重要的作用, 具有益生菌特性^[42]。厚壁菌门具有调节免疫的作用, 厚壁菌门、拟杆菌门和瘤胃球菌对雌激素的生成和代谢都有影响^[43-45]。毛螺菌科被认为是维持肠道健康的关键菌群, 参与多种膳食纤维、碳水化合物的消化代谢及糖转运等生物过程^[46]。厚壁菌门、拟杆菌门、疣微菌门、Epsilonbacteraeota、毛螺菌

属和瘤胃菌属等这些差异菌群及其组成结构的变化, 有可能是卵巢功能减退的致病机制之一。

四物汤对 DOR 大鼠肠道微生态有明显的影 响, 能显著恢复肠道菌群多样性, 增加有益菌的含量, 使肠道菌群组成向正常大鼠的方向偏移。从肠道菌群功能分析看, 四物汤对肠道微生态多样性的调节, 可能通过能量代谢、生物修复与合成、信号传导和激素代谢等途径, 发挥改善卵巢功能的作用。

现代医学研究认为, 卵巢衰老与线粒体功能异常密切相关^[47-48], 氧化应激带来的线粒体功能障碍是导致卵巢衰老的重要因素^[49-50], 线粒体在细胞的能量代谢、细胞周期和信号传导中发挥着核心的作用。前期研究显示四物汤具有较强的抗氧化活性^[51-52], 结合本研究的结果推测, 四物汤有可能通过恢复肠道菌群稳态, 改善线粒体能量代谢, 减轻自由基对卵巢颗粒细胞的损伤, 促进卵泡的发育而发挥改善卵巢功能减退的作用, 具体的作用机制还需要深入探究。另有文献报道四物汤方及其组成药味有植物雌激素样活性, 作用途径可能与调控雌激素受体 α (ER α)、ER β 的表达有关^[53], 肠道菌群与雌激素受体的表达之间是否有关联, 也需要进一步的实验验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SULLIVAN S D, SARREL P M, NELSON L M. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause[J]. Fertil Steril, 2016, 106(7): 1588-1599.
- [2] 唐瑞怡, 陈蓉. 早发性卵巢功能不全激素补充治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34(3): 261-265.
- [3] 李晓阳, 曹妍杰, 羊璞, 等. 针药联合治疗早发性卵巢功能不全疗效的 Meta 分析[J]. 世界中医药, 2021, 16(13): 1982-1989, 1997.
- [4] 王月娇, 徐莲薇, 刘小菲, 等. 卵巢储备功能下降的中医研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(6): 1047-1050.
- [5] 侯秀丽, 郑晶. 中医药改善卵巢储备功能下降的研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 150-153.
- [6] 夏桂成. 实用中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 4-6, 483.
- [7] 沈斌. 卵巢早衰病因病机的古代文献研究[J]. 中医文献杂志, 2016, 34(6): 13-15.
- [8] 沈劼, 王旭东, 李新霞, 等. 卵巢早衰古今用药规律探析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(21):

- 42-45.
- [9] 康开彪,王贵霞,王晓萍,等. 四物汤免疫作用改善卵巢早衰症状的研究现状[J]. 西部中医药, 2013, 26(2):119-121.
- [10] ZHOU F, SONG Y, LIU X, et al. Si-Wu-Tang facilitates ovarian function through improving ovarian microenvironment and angiogenesis in a mouse model of premature ovarian failure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280:114431.
- [11] 李顺景. 加味四物汤联合西药治疗卵巢早衰32例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(15):102-103.
- [12] 刘佳. 四物合剂辅助治疗卵巢早衰临床研究[J]. 新中医, 2019, 51(2):175-177.
- [13] 武虹波,赵丕文,孙丽萍,等. 四物合剂干预顺铂作用卵巢颗粒细胞E₂分泌水平的实验研究[J]. 环球中医药, 2017, 10(4):447-451.
- [14] 王玉洁. 四物合剂治疗56例卵巢早衰的疗效观察[J]. 中国社区医师:医学专业, 2013, 15(9):224-225.
- [15] CAO L B, LEUNG C K, LAW P W, et al. Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure[J]. *Life Sci*, 2020, 262:118543.
- [16] TORRES P J, HO B S, ARROYO P, et al. Exposure to a healthy gut microbiome protects against reproductive and metabolic dysregulation in a PCOS mouse model [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(5):1193-1204.
- [17] GARCÍA-PEÑARRUBIA P, RUIZ-ALCARAZ A J, MARTÍNEZ-ESPARZA M, et al. Hypothetical roadmap towards endometriosis: Prenatal endocrine-disrupting chemical pollutant exposure, anogenital distance, gut-genital microbiota and subclinical infections [J]. *Hum Reprod Update*, 2020, 26(2):214-246.
- [18] YURTDAS G, AKDEVELIOĞLU Y. A new approach to polycystic ovary syndrome: The gut microbiota[J]. *J Am Coll Nutr*, 2020, 39(4):371-382.
- [19] HE F F, LI Y M. Role of gut microbiota in the development of insulin resistance and the mechanism underlying polycystic ovary syndrome: A review[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1):73.
- [20] WANG L, ZHOU J, GOBER H J, et al. Alterations in the intestinal microbiome associated with PCOS affect the clinical phenotype [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133(12):110958.
- [21] QI X, YUN C, SUN L, et al. Gut microbiota-bile acid-interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome[J]. *Nat Med*, 2019, 25(8):1225-1233.
- [22] 赵婷婷,裴丽霞,胡荣魁,等. 卵巢早衰与肠道菌群关系研究思路探讨[J]. 中国微生物学杂志, 2021, 33(4):469-473.
- [23] 张碧云,肖小敏,钟兴明,等. 肠道菌群紊乱与女性生殖内分泌疾病相关性研究现状[J]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2021, 17(4):488-491.
- [24] 高慧,杨涓,韩冰,等. 药物型卵巢早衰动物模型的研究[J]. 国医论坛, 2007, 22(3):22-26.
- [25] ZHANG T, YAN D, YANG Y, et al. The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 81:223-232.
- [26] 焦存,芦现杰,尹俊艳,等. 坤泰胶囊治疗卵巢早衰的Meta分析[J]. 世界中医药, 2021, 16(10):1552-1556.
- [27] 杨涓,高慧,夏天,等. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠卵泡发育的影响[J]. 中医杂志, 2011, 52(7):592-595.
- [28] 郝娟,王春莲,王培嵩,等. 雷公藤多甙片致卵巢早衰大鼠动物模型的研究[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(12):1866-1870.
- [29] PELOSI E, FORABOSCO A, SCHLESSINGER D. Genetics of the ovarian reserve[J]. *Front Genet*, 2015, 6:308.
- [30] 陈衍,唐金艳,马晓蓉,等. 寿胎丸治疗早发性卵巢功能不全的网络药理学研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(18):2672-2679, 2685.
- [31] AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON GYNECOLOGIC PRACTICE AND PRACTICE COMMITTEE. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589 [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(3):633-634.
- [32] D'AVILA Â M, BIOLCHI V, CAPPE, et al. Age, anti-müllerian hormone, antral follicles count to predict amenorrhea or oligomenorrhea after chemotherapy with cyclophosphamide [J]. *J Ovarian Res*, 2015, 8:82.
- [33] DE SOUZA F H, DA SILVA C A, YAMAKAMI L Y, et al. Reduced ovarian reserve in patients with adult polymyositis[J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(10):1795-1799.
- [34] 杨伟伟,张洛琴,顾平. 加减二仙汤联合西医药物治疗卵巢早衰闭经的疗效观察[J]. 世界中医药, 2020, 15(6):878-882.
- [35] CASERTA D, BORDI G, DI SEGNI N, et al. The influence of cigarette smoking on a population of infertile men and women [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 287(4):813-818.
- [36] SCHUH-HUERTA S M, JOHNSON N A, ROSEN M

- P, et al. Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(2): 594-608.
- [37] LERCHBAUM E, RABE T. Vitamin D and female fertility [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2014, 26(3): 145-150.
- [38] MANN E, SINGER D, PITKIN J, et al. Psychosocial adjustment in women with premature menopause: A cross-sectional survey [J]. *Climacteric*, 2012, 15(5): 481-489.
- [39] ADLERCREUTZ H, PULKKINEN M O, HÄMÄLÄINEN E K, et al. Studies on the role of intestinal bacteria in metabolism of synthetic and natural steroid hormones [J]. *J Steroid Biochem*, 1984, 20(1): 217-229.
- [40] FAYED A E. Review article: Health benefits of some physiologically active ingredients and their suitability as yoghurt fortifiers [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(5): 2512-2521.
- [41] JEONG S Y, KANG S, HUA C S, et al. Synbiotic effects of β -glucans from cauliflower mushroom and *Lactobacillus fermentum* on metabolic changes and gut microbiome in estrogen-deficient rats [J]. *Genes Nutr*, 2017, 12: 31.
- [42] GÓMEZ-GALLEGO C, POHL S, SALMINEN S, et al. *Akkermansia muciniphila*: A novel functional microbe with probiotic properties [J]. *Benef Microbes*, 2016, 7(4): 571-584.
- [43] YAN J, CHARLES J F. Gut microbiome and bone: To build, destroy, or both? [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(4): 376-384.
- [44] 巩彦龙,董万涛,宋敏,等. 基于16S rDNA序列分析骨质疏松大鼠肠道菌群结构变化及固本增骨方的调控机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5): 2040-2045.
- [45] 闫蕴孜,孙凌云,徐钰莹,等. 转移性结直肠癌中医治疗优势人群的肠道菌群及TB淋巴细胞亚群特征分析 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(9): 1391-1399.
- [46] 吴娟,滕钰浩,董伟,等. 健脾养胃方加减对胃癌化疗患者肠道菌群的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(6): 497-502.
- [47] MAY-PANLOUP P, BOUCRET L, CHAO DE LA BARCA J M, et al. Ovarian ageing: The role of mitochondria in oocytes and follicles [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(6): 725-743.
- [48] TITUS S, STOBZKI R, OKTAY K. Impaired DNA repair as a mechanism for oocyte aging: Is it epigenetically determined? [J]. *Semin Reprod Med*, 2015, 33(6): 384-388.
- [49] HUSSEIN M R. Apoptosis in the ovary: Molecular mechanisms [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(2): 162-177.
- [50] YADAV P K, TIWARI M, GUPTA A, et al. Germ cell depletion from mammalian ovary: Possible involvement of apoptosis and autophagy [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 36.
- [51] 朱敏,马宏跃. 四物汤及其组方的抗氧化活性研究 [J]. *江西中医药*, 2012, 43(9): 70-71.
- [52] 唐于平,黄美艳,张彦华,等. 四物汤类方与组方药材及其所含主要芳香酸体外抗氧化活性比较与量效关系研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(1): 64-67.
- [53] 卢迪,赵丕文,陈梦,等. 四物汤基于雌激素受体亚型介导的雌激素样效应及其分子机理的研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(5): 1074-1077.

[责任编辑 周冰冰]