

# 基于雌激素信号通路传导加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰的作用机制

韩丽颖<sup>1</sup>, 王帅<sup>1,2</sup>, 包永睿<sup>1,2</sup>, 李天娇<sup>1,2</sup>, 张凌巍<sup>3</sup>, 孟宪生<sup>1,2\*</sup>

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600;
2. 辽宁省中药多维分析专业创新技术中心, 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁大连 116600;
3. 丹东药业集团有限公司, 辽宁丹东 118303)

**[摘要]** **目的:**探讨加味八珍益母胶囊对卵巢早衰雌性大鼠血清性激素、性器官及雌激素信号通路传导的影响。**方法:**采用网络药理学分析,筛选加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰的关键靶点蛋白。选取雌性健康SD大鼠,采用卵巢摘除术建立大鼠卵巢早衰模型,将50只卵巢摘除的大鼠随机分为模型组,戊酸雌二醇组、加味八珍益母胶囊低、中、高剂量组,另取10只健康雌性大鼠设为假手术组,假手术组和模型组大鼠灌胃蒸馏水,其他给药组大鼠灌胃相应剂量药物。21 d后,测定雌性大鼠血清激素水平,包括雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕激素(P)、卵泡刺激素(FSH)及黄体生成素(LH);免疫荧光染色(IF)检测关键靶点蛋白雌激素受体1(ESR1)、雌激素代谢P4503A4酶(CYP3A4)和P45019A1酶(CYP19A1),在雌性大鼠子宫组织中的蛋白表达水平。**结果:**与模型组比较,加味八珍益母胶囊低、中、高剂量组明显升高雌性大鼠血清E<sub>2</sub>、P水平;均可改善雌性大鼠子宫内膜状态;升高雌性大鼠子宫组织中雌激素受体1(ESR1)、激素代谢酶CYP3A4及CYP19A1的阳性表达(P<0.05)。**结论:**加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰可能与其类激素样作用和激活雌激素信号通路有关。

**[关键词]** 加味八珍益母胶囊; 卵巢早衰; 卵巢摘除术; 雌激素信号通路

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0201-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221414 **[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.20220905.1301.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-09-05 15:49

## Mechanism of Jiawei Bazhen Yimu Capsule in Treatment of Premature Ovarian Failure Based on Estrogen Signaling Pathway

HAN Liying<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>1,2</sup>, BAO Yongrui<sup>1,2</sup>, LI Tianjiao<sup>1,2</sup>, ZHANG Lingwei<sup>3</sup>, MENG Xiansheng<sup>1,2\*</sup>

1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China;
2. Liaoning Professional Innovation Technology Center for Multidimensional Analysis of TCM, Liaoning Modern TCM Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China;
3. Dandong Pharmaceutical Group Co. Ltd., Dandong 118303, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Jiawei Bazhen Yimu capsule on serum sex hormones, sexual organs and estrogen signaling pathway in female rats with premature ovarian failure. **Method:** The key target proteins of Jiawei Bazhen Yimu capsule in the treatment of premature ovarian failure were screened out by network pharmacology analysis. Female healthy SD rats were selected, and the rat model of premature ovarian failure was established by ovariectomy. Fifty ovariectomized rats were randomly divided into a model group, an estradiol (E<sub>2</sub>) valerate group, and Jiawei Bazhen Yimu capsule low, medium, and high-dose

**[收稿日期]** 2022-06-12

**[基金项目]** 辽宁省揭榜挂帅项目(2021JH1/10400058)

**[第一作者]** 韩丽颖,在读硕士,从事药物分析研究,E-mail:13130802782@163.com

**[通信作者]** \* 孟宪生,教授,博士生导师,从事中药药效物质组学及作用机制整合研究,E-mail:mxsvvv@126.com

groups. Another 10 healthy female rats were set as a sham operation group. The sham operation group and the model group were given distilled water by gavage, and other administration groups were given corresponding doses of drugs by gavage. After 21 d, the serum hormone levels of female rats were measured, including  $E_2$ , progesterone (P), follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH). Immunofluorescence staining (IF) was used to detect the protein expression levels of estrogen receptor 1 (ESR1), estrogen metabolism P4503A4 enzyme (CYP3A4), and P45019A1 enzyme (CYP19A1) in the uterine tissues of female rats. **Result:** As compared with the model group, the serum  $E_2$  and P levels of female rats in the Jiawei Bazhen Yimu capsule low, medium, and high-dose groups were significantly increased. Jiawei Bazhen Yimu capsule improved the endometrial status of female rats and increased positive expression of ESR1, CYP3A4, and CYP19A1 in the uterine tissues of female rats ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The mechanism of Jiawei Bazhenyimu capsule in the treatment of premature ovarian failure may be related to its hormone-like effect and activation of the estrogen signaling pathway.

**[Keywords]** Jiawei Bazhen Yimu capsule; premature ovarian failure; ovariectomy; estrogen signaling pathway

卵巢早衰(POF)是指女性在40岁前出现卵巢功能下降或卵巢衰竭的现象。由于机体性激素分泌异常,临床常表现为月经不调、闭经、性欲减退、阴道干涩、烦躁易怒等,严重会导致不孕,且发病率有逐年上升的趋势<sup>[1-4]</sup>。目前西医治疗手段仍采用雌激素代替法(HRT),长期服用增加诱发子宫内膜癌、心血管疾病、肝脏疾病的风险,不良反应大,严重影响妇女的身心健康<sup>[5-6]</sup>。在中国古代医书中没有卵巢早衰的记载,但是根据其病证和特点,属于中医记载中的“闭经”“年未老经水断”“不孕”等范畴。中医认为卵巢早衰因其肾气虚弱,天癸渐竭,波及肝脾,治疗则以补肾为主,佐以疏肝健脾<sup>[7]</sup>。中医临床治疗多采用针灸联合服用中药汤剂,以滋肾益阴、温肾助阳,调整脏腑阴阳,达到治疗的目的,其治疗手段疗效显著,不良反应小,价格低廉,逐年成为研究热点。

加味八珍益母胶囊由中华人民共和国卫生部标准《中药成方制剂》第11册中记载的加味八珍益母膏剂而来,由益母草、红花、赤芍、甘草、人参、泽兰等药味组成,其中赤芍、熟地黄、川芎、当归可活血补血;白术、甘草、茯苓、人参则为补气要药。具有活血化瘀、养血补气的功效,用于女性气血不足、月经不调、产后恶露不净等,临床广泛由于月经病的治疗及调节激素水平<sup>[8-9]</sup>。卵巢早衰患者多伴有闭经引起激素紊乱的现象,其病证及特点为中医中月经疾病的范畴。但加味八珍益母胶囊能否对大鼠血清性激素产生影响,进而改善卵巢早衰的作用及作用机制未见相关报道。本文通过摘除大鼠双侧卵巢复制卵巢早衰模型,以网络药理学为基础结

合大鼠血清激素水平、子宫组织形态和免疫荧光(IF)检测,探究加味八珍益母胶囊对卵巢早衰的改善及作用机制,为进一步扩大加味八珍益母胶囊的临床应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 健康雌性SD大鼠,体质量(200±20)g,购于辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。SPF级动物饲养于温度(25±2)℃、相对湿度(55±5)%、自然昼夜节律光照环境下,自由饮水进食。本实验由辽宁中医药大学伦理委员会批准,编号2020YS013(KT)-013-01。

**1.2 试剂与仪器** 加味八珍益母胶囊(丹东药业集团有限公司,生产批号201202),戊酸雌二醇片(法国DELPHARM Lille S.A.S公司,生产批号622A);生物医用胶(北京福爱乐科技发展有限公司,批号20200418);大鼠黄体生成素(LH)、大鼠雌二醇( $E_2$ )、大鼠孕激素/孕酮(P)、大鼠卵泡刺激素(FSH)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海朗顿生物科技有限公司,批号分别为BPE30623、BPE30608、BPE30580、BPE30597);苏木素-伊红(HE)染色套装、吉姆萨染液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120、20200916);DAPI染色液、一抗雌激素受体1(ESR1)、荧光二抗Cy3山羊抗兔(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1012、AC21:0027D、Gb21303),雌激素代谢P4503A4酶(CYP3A4)、P45019A1酶(CYP19A1)(大连万泽生物科技有限公司,批号分别为00048871、#21y0633)。SpectraMax Plus384型酶标仪(美国Molecular Devices公司),Eclipse Ci-L型正置白光拍

照显微镜(日本Nikon公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析方法

**2.1.1 加味八珍益母胶囊中主要活性成分筛选与对应靶点的收集** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)<sup>[10]</sup>检索加味八珍益母胶囊15味中药(益母草、甘草、茯苓、人参、泽兰、桃仁、红花、当归、熟地黄、川芎、赤芍、丹参、炮姜、香附、白术)的有效成分,并以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18为筛选标准,得到加味八珍益母胶囊活性成分。将其活性成分导入SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)(Probability>0.1),进一步获取对应作用靶点。

**2.1.2 加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰的靶点收集** 以“premature ovarian failure”为关键词从DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)数据库2021年检索收集卵巢早衰相关疾病靶点和基因库。应用在线 Draw Venn Diagram (bioinformatics. psb. ugent. be/webtools/Venn)对加味八珍益母胶囊化学成分和卵巢早衰的相关靶点取交集,得到两者的共同靶点,即加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰的潜在作用靶点。

**2.1.3 加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰关键靶点获取** 在STRING平台(<https://string-db.org/>)输入潜在作用靶点,筛选物种为“Homo Sapiens”,选取置信度(Medium Confidence, 0.4),获取蛋白质-蛋白质相互作用(PPI),并保存其TSV格式文件将其导入Cytoscape 3.7.0软件绘制PPI网络,进一步删除孤立作用靶点,用于后续进一步分析。

**2.2 动物造模、分组和给药<sup>[11-12]</sup>** 实验大鼠经适应性饲养1周后,禁食不禁水24 h,麻醉大鼠,背部切口法摘除雌性大鼠双侧卵巢。术后饲养2周,连续5 d收集受试大鼠的阴道涂片,光镜下观察特异性。如5 d内涂片细胞无显著变化,可以确认大鼠动情周期消失,卵巢摘除手术成功。手术大鼠随机分为5组,包括模型组,加味八珍益母胶囊低、中、高剂量组(低剂量,0.315、0.945、2.835 g·kg<sup>-1</sup>,为人临床等效剂量的1、3、9倍),戊酸雌二醇组(0.009 g·kg<sup>-1</sup>,为人临床等效剂量的1倍),另取10只健康大鼠为假手术组(背部切口不摘除卵巢)。假手术组和模型组灌胃蒸馏水,其他给药组大鼠灌胃相应剂量药物,每组10只均按10 mL·kg<sup>-1</sup>的灌胃容积以相应液体进行灌胃,1次/d,连续灌胃21 d。

**2.3 加味八珍益母胶囊对卵巢摘除大鼠子宫的影响** 灌胃21 d结束后,大鼠采用腹主动脉取血后处死<sup>[13]</sup>,取出子宫,以4%多聚甲醛固定液固定48 h,截取Y型子宫交叉处子宫组织,常规脱水、浸蜡、包埋、切片后进行HE染色,并固定封片。每组选取染色效果佳、组织较完整的切片2张,在20倍和200倍镜下分别在子宫内膜四边视野采集图片各3张。采用ImageJ 1.51软件进行图像分析,观察子宫内膜形态<sup>[14]</sup>。

**2.4 加味八珍益母胶囊对卵巢摘除大鼠血清生化指标的影响** 大鼠腹主动脉取血后,血液样本静置30 min后,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径10 cm),分离上层血清并于-80 °C冰箱保存。根据ELISA试剂盒说明书检测大鼠血清中性激素E<sub>2</sub>、P、FSH及LH水平。

**2.5 加味八珍益母胶囊对关键靶点蛋白的影响** 根据免疫荧光多标记染色技术<sup>[15]</sup>,取同一样本进行三标记检测。取固定在4%多聚甲醛中的大鼠子宫组织,切片修复、孵育一抗(ESR1 1:200, CYP3A4 1:200, CYP19A1 1:300)、二抗(1:300)、封片,切片于荧光显微镜下观察并采集图像,并用ImageJ 1.51图像分析软件进行半定量分析。切片免疫荧光实验结果判读:DAPI染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,蛋白阳性表达为相应荧光素标记的红光<sup>[16]</sup>。采用ImageJ 1.51软件进行分析,确定表达情况。

**2.6 统计学方法** 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 22.0软件和Graphpad Prism 8.0软件进行统计学分析。当每组数据符合正态分布时,组间比较采用One-way ANOVA法。若方差齐,组间差异比较采用最小显著性差异法(LSD);若方差不齐,组间差异比较采用Tamhane法。两组间的比较采用独立样本t检验。当每组数据不符合正态分布时,组间比较采用非参数检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学分析结果

**3.1.1 加味八珍益母胶囊中主要活性化合物及对应靶点** 通过TCMSP数据库,符合OB≥30%、DL≥0.18<sup>[17]</sup>共获得加味八珍益母胶囊中isopreleoheterin、preleoheterin、galeopsin、isorhamnetin等281个活性成分。通过SwissTargetPrediction数据库,获取加味八珍益母胶囊有效成分对应的作用靶点1 146个。

**3.1.2 加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰关键靶点**  
通过 Venn 图将加味八珍益母胶囊的 1 146 个作用靶点与疾病的 300 个作用靶点进行映射,得到 55 个加味八珍益母胶囊-卵巢早衰的共同靶点。通过 Cytoscape 3.7.2 软件, PPI 网络, 其中 1 个蛋白无交互作用。网络图由节点代表的靶点和边代表的靶

点之间的相互作用所组成,当靶点的度值和介数越大,节点越大,颜色越偏红,表明该靶点越重要,见增强出版附加材料。初步推测选定 ESR1、CYP3A4 及 CYP19A1 为加味八珍益母胶囊治疗卵巢早衰引起月经不调的关键靶点,用于后续实验。见表 1。

表 1 加味八珍益母胶囊核心成分

Table 1 List of core components of Jiawei Bazhen Yimu capsules

编号(Mol ID)	活性成分	OB/%	DL	来源
MOL001418	galeopsin( 瓣花二萜)	61.02	0.38	益母草
MOL001420	ZINC04073977	38.00	0.76	益母草
MOL001421	preleoheterin(前益母草乙素)	85.97	0.33	益母草
MOL001422	iso-preleoheterin	66.29	0.33	益母草
MOL000098	quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	益母草、甘草、红花、香附
MOL001439	arachidonic acid(花生四烯酸)	45.57	0.20	益母草
MOL000354	isorhamnetin(异鼠李素)	49.60	0.31	益母草、甘草、香附
MOL000422	kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	益母草、甘草、红花、香附、人参
MOL000359	sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75	甘草、川芎、赤芍、熟地黄、香附
MOL000296	hederagenin(常春藤皂苷元)	36.91	0.75	茯苓、泽兰、桃仁
MOL000449	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76	人参、当归、赤芍、熟地黄、红花、香附
MOL000358	beta-sitosterol( $\beta$ -谷甾醇)	36.91	0.75	人参、当归、赤芍、泽兰、桃仁、红花、香附
MOL002714	baicalein(黄芩素)	33.52	0.21	赤芍、红花
MOL002776	baicalin(黄芩苷)	40.12	0.75	赤芍、红花、丹参
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	红花、丹参
MOL000006	luteolin(木犀草素)	36.16	0.28	红花、丹参、香附

**3.2 体内实验结果**

**3.2.1 大鼠一般形态及子宫指数** 大鼠子宫指数是判断大鼠子宫变化的重要指标。各组大鼠造模及给药后子宫指数,见表 2。模型组大鼠体质量较

假手术组明显升高、子宫质量较假手术组明显降低 ( $P<0.05$ ); 戊酸雌二醇组和加味八珍益母胶囊低、中、高剂量组较模型组大鼠体质量明显降低,子宫质量明显升高 ( $P<0.05$ ), 趋向于假手术组,见表 2。

表 2 各组大鼠体质量及子宫质量 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Body weight and uterus weight of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

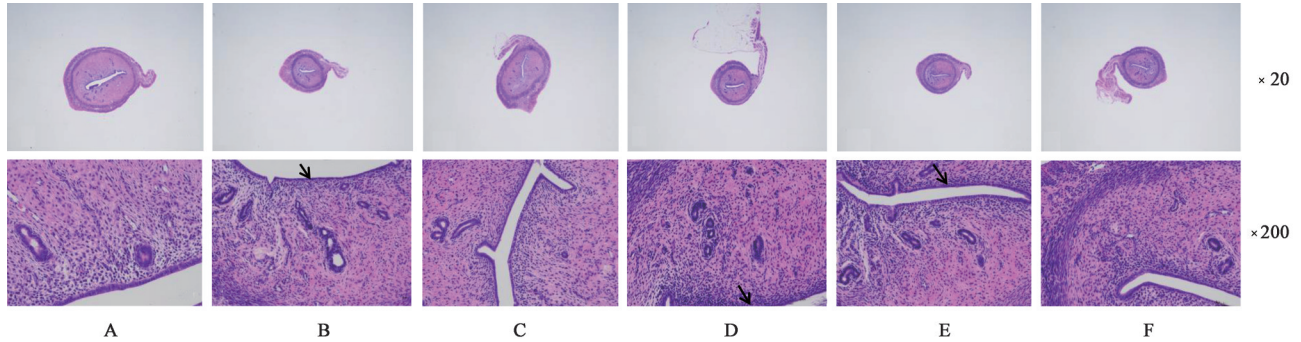
组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	体质量/g	子宫质量/g
假手术组		250.65 $\pm$ 3.26	0.80 $\pm$ 0.25
模型组		278.48 $\pm$ 4.32 <sup>1)</sup>	0.14 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
戊酸雌二醇组	0.009	252.60 $\pm$ 1.79	0.41 $\pm$ 0.07
加味八珍益母胶囊低剂量组	0.315	269.42 $\pm$ 3.62 <sup>2)</sup>	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
加味八珍益母胶囊中剂量组	0.945	268.19 $\pm$ 4.21 <sup>2)</sup>	0.28 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>
加味八珍益母胶囊高剂量组	2.835	265.79 $\pm$ 2.74 <sup>2)</sup>	0.39 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$

**3.2.2 加味八珍益母胶囊对卵巢摘除大鼠子宫的影响** 与假手术组比较,模型组子宫明显萎缩,体积变小,腔上皮变矮;戊酸雌二醇组子宫轻度萎缩,腔上皮改变不明显;加味八珍益母胶囊低、中剂量

组,子宫萎缩,少见腔上皮变矮;加味八珍益母胶囊高剂量组子宫轻度萎缩,腔上皮改变不明显。表明戊酸雌二醇组和加味八珍益母胶囊高剂量组对摘除卵巢后大鼠的子宫状态有较好改善作用,其中加

味八珍益母胶囊高剂量组效果更好,低、中剂量组具有改善作用,但效果差于高剂量组,见图1。



注:A假手术组;B模型组;C戊酸雌二醇组;D加味八珍益母胶囊低剂量组;E加味八珍益母胶囊中剂量组;F加味八珍益母胶囊高剂量组(图3-图5同);黑色箭头表示腔上皮变矮

图1 各组大鼠子宫组织形态的变化(HE)

Fig. 1 Changes in uterine tissue morphology of rats in each group (HE)

**3.2.3 加味八珍益母胶囊对卵巢摘除大鼠血清生化指标的影响** 与假手术组比较,模型组 $E_2$ 、P表达显著降低( $P<0.01$ ),FSH、LH表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,戊酸雌二醇组明显升高 $E_2$ 水平( $P<0.05$ ),加味八珍益母胶囊低、中、高剂量组明

显升高 $E_2$ 及P水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),降低FSH、LH水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),并随剂量升高显著性增强,加味八珍益母胶囊对卵巢早衰大鼠体内激素的影响见表3。结果表明加味八珍益母胶囊升高大鼠体内 $E_2$ 和P水平,具有类激素样作用。

表3 加味八珍益母胶囊对卵巢早衰大鼠体内激素的影响( $\bar{x}\pm s$ , $n=10$ )

Table 3 Effect of Jiawei Bazhen Yimu capsule on hormones in rats with premature ovarian failure ( $\bar{x}\pm s$ , $n=10$ )

分组	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	$E_2/ng\cdot L^{-1}$	$P/\mu g\cdot L^{-1}$	$LH/U\cdot L^{-1}$	$FSH/U\cdot L^{-1}$
假手术组		$55.16\pm 4.61$	$1.82\pm 0.05$	$0.35\pm 0.05$	$0.63\pm 0.14$
模型组		$38.08\pm 4.13^{2)}$	$0.81\pm 0.04^{2)}$	$0.80\pm 0.10^{2)}$	$1.42\pm 0.25^{2)}$
戊酸雌二醇组	0.009	$97.52\pm 5.54^{3)}$	$0.91\pm 0.07^{4)}$	$0.69\pm 0.14^{4)}$	$0.95\pm 0.05^{4)}$
加味八珍益母胶囊低剂量组	0.315	$44.88\pm 3.60^{3)}$	$1.17\pm 0.05^{3)}$	$0.79\pm 0.07^{3)}$	$1.24\pm 0.03^{3)}$
加味八珍益母胶囊中剂量组	0.945	$50.02\pm 5.11^{4)}$	$1.27\pm 0.02^{3)}$	$0.67\pm 0.16^{3)}$	$1.03\pm 0.07^{3)}$
加味八珍益母胶囊高剂量组	2.835	$58.06\pm 5.03^{4)}$	$1.52\pm 0.13^{4)}$	$0.59\pm 0.07^{4)}$	$0.80\pm 0.04^{4)}$

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表4同)

**3.2.4 加味八珍益母胶囊对ESR1、CYP3A4及CYP19A1关键靶点的影响** 雌激素受体1(ESR1)、雌激素代谢P4503A4酶(CYP3A4)和P45019A1酶(CYP19A1)在各组大鼠子宫的细胞核和细胞质都有染色,DAPI则染色于细胞核;ESR1显黄色;CYP3A4显绿色;CYP19A1显红色,见图2-图5。用ImageJ 1.51图像分析软件进行半定量分析荧光值,发现模型组大鼠子宫ESR1、CYP3A4及CYP19A1的平均荧光值明显低于假手术组大鼠子宫组织中的表达;加味八珍益母胶囊给药组较模型组大鼠子宫组织中ESR1、CYP3A4及CYP19A1表达升高,具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表4。

#### 4 讨论

卵巢早衰是多因素导致卵巢生长耗竭、提前闭

锁或遭遇破坏引起的过早衰竭,表现为低雌激素及高促性腺激素<sup>[18]</sup>。在中医范畴,卵巢早衰属于“闭经”“月经后期”“不孕”“血枯”等。本实验以摘除卵巢复制卵巢早衰动物模型<sup>[19]</sup>,摘除卵巢后大鼠性激素分泌紊乱,子宫状态改变,表明造模成功。子宫指数及HE染色能够反映出摘除卵巢后子宫状态,灌胃加味八珍益母胶囊后,子宫状态有所改善,提示加味八珍益母胶囊能够改善摘除卵巢后大鼠子宫状态。

近年来血清学指标在POF诊断中得到较好的发展,依据其水平变化有助于及时评估病情,为临床诊断提供可靠依据。 $E_2$ 是最活跃的一类雌激素,能够促进性器官发育。 $E_2$ 与P主要由卵巢合成和分泌<sup>[20-21]</sup>。FSH、LH均由脑垂体分泌,为促性腺激素,

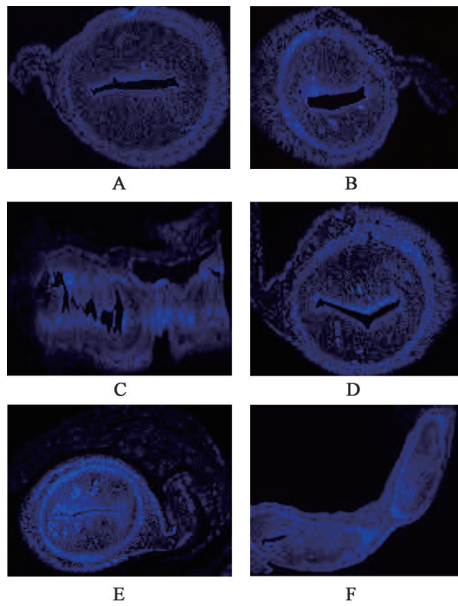


图2 各组大鼠子宫组织细胞染色(免疫荧光,×40)  
Fig. 2 Expression of cell of rats in each group (IF,×40)

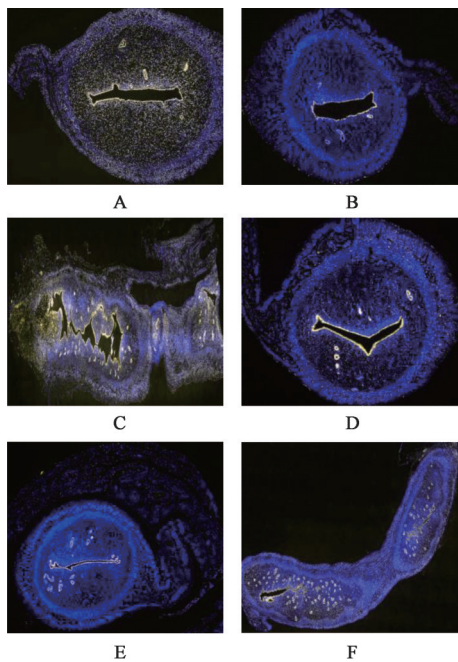


图3 各组大鼠子宫组织中ESR1的表达(免疫荧光,×40)  
Fig. 3 Expression of ESR1 in uterus of rats in each group (IF,×40)

能够调节雌激素的分泌。P、FSH、LH与E<sub>2</sub>均属性激素指标,作为卵巢功能的预测指标,其水平可随着月经周期的改变而变化,若卵巢储备功能下降时,P、FSH、LH及E<sub>2</sub>水平均改变<sup>[22]</sup>。对于女性,其LH与FSH共同作用,促进卵泡成熟,分泌雌激素、排卵,以及黄体的生成和维持,分泌孕激素和雌激素。本实验中,摘除大鼠双侧卵巢后,E<sub>2</sub>和P比假手术组明显降低( $P<0.05$ );而FSH和LH比假手术组明显升高( $P<0.05$ ),说明血清中E<sub>2</sub>、P、FSH及LH含量水

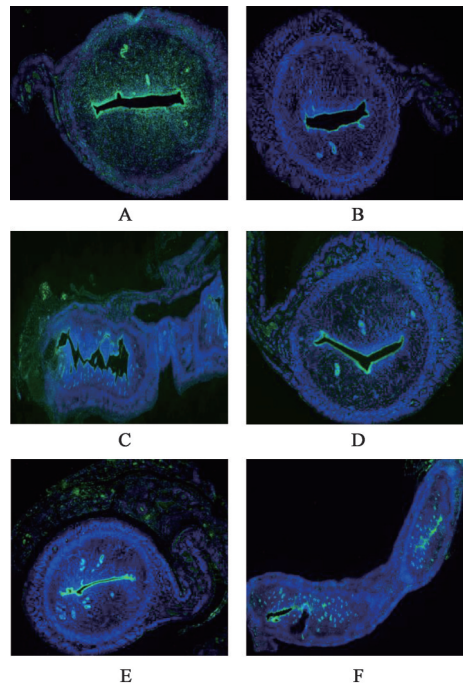


图4 各组大鼠子宫组织中CYP3A4的表达(免疫荧光,×40)  
Fig. 4 Expression of CYP3A4 in uterus of rats in each group (IF,×40)

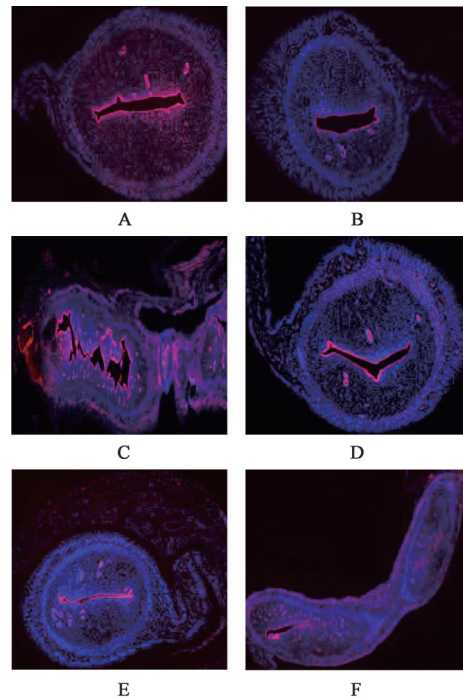


图5 各组大鼠子宫组织中CYP19A1的表达(免疫荧光,×40)  
Fig. 5 Expression of CYP19A1 in uterus of rats in each group (IF,×40)

平与卵巢功能密切相关,模型建立成功。灌胃给药后,加味八珍益母胶囊对卵巢摘除大鼠血清中E<sub>2</sub>及P具有升高作用,降低FSH及LH水平,其作用机制可能是通过刺激肾上腺皮质等部位代偿性分泌相关激素。结果表明加味八珍益母胶囊虽具有类激

表4 各组大鼠子宫组织中ESR1、CYP3A4、CYP19A1蛋白荧光表达 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Fluorescence expression of ESR1, CYP3A4 and CYP19A1 protein in uterine tissues of rats in each group ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ESR1	CYP3A4	CYP19A1
假手术组		47.45±2.14	40.90±3.16	41.02±2.24
模型组		22.62±1.31 <sup>2)</sup>	24.64±1.21 <sup>1)</sup>	25.78±1.45 <sup>2)</sup>
戊酸雌二醇组	0.009	104.41±6.23	83.22±2.13	172.44±4.95
加味八珍益母胶囊低剂量组	0.315	31.08±1.27 <sup>3)</sup>	38.98±1.41 <sup>4)</sup>	49.03±1.35 <sup>3)</sup>
加味八珍益母胶囊中剂量组	0.945	43.69±1.75 <sup>4)</sup>	47.06±1.55 <sup>3)</sup>	57.82±2.40 <sup>4)</sup>
加味八珍益母胶囊高剂量组	2.835	69.41±2.02 <sup>3)</sup>	56.97±1.36 <sup>3)</sup>	72.37±3.07 <sup>4)</sup>

素样作用,但是不能取代卵巢功能而保证机体性激素正常水平。

网络药理学初步筛选的关键靶点 ESR1、CYP3A4 及 CYP19A1,通过免疫荧光染色发现,加味八珍益母胶囊增加三者在大鼠子宫的阳性表达。已有现代研究表明,ESR1 是介导雌激素发挥生物学作用的核内生物大分子<sup>[23]</sup>。ESR1 为雌激素受体 1,雌激素可直接与核内雌激素受体 ESR1 结合,活化靶基因的转录,刺激雌激素受体信号转导途径<sup>[24-27]</sup>。CYP3A4 及 CYP19A1 是细胞色素 P450 家族中重要的药物代谢酶,在机体雌激素信号通路传导途径中起到重要代谢作用<sup>[28-31]</sup>。可见加味八珍益母胶囊用于卵巢早衰,不单是其类激素样作用,而是通过多靶点、多方面作用发挥治疗卵巢早衰的效果。

在本实验中,雌性大鼠摘除双侧卵巢后会出现大鼠体内激素分泌失调,灌胃加味八珍益母胶囊后可增加大鼠体内 E<sub>2</sub> 及孕激素水平,升高子宫组织中 ESR1、CYP3A4 及 CYP19A1 阳性表达。初步推断是通过雌激素信号通路发挥激素样作用,调节激素失衡及改善子宫状态达到治疗的效果,与戊酸雌二醇激素作用相类似。本实验初步揭示了加味八珍益母胶囊雌激素样作用及治疗卵巢早衰的作用机制,为加味八珍益母胶囊的科学内涵和临床合理应用奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[ 1 ] 罗晓玲,张蕾,吴兰华. 低雌激素水平对绝经后妇女血压、血脂及骨密度的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018,33(24):5877-5879.

[ 2 ] 曹雯雯,赵颜,冯晓玲. 卵巢早衰的中西医研究进展[J]. 中医学报,2020,35(1):81.

[ 3 ] LIM Y M, JEONG K, LEE S R, et al. Association between premature ovarian insufficiency, early

menopause, socioeconomic status in a nationally representative sample from Korea[J]. Maturitas, 2019, 121:22-27.

[ 4 ] Christin-Maitre S, Bouchard P. Genes and ovarian insufficiency [J]. Ann Endocrinol, 1999, 60 (2) : 118-122.

[ 5 ] KALANTARIDOU S N, NAKA K K, BECHLIOULIS A, et al. Premature ovarian failure, endothelial dysfunction and estrogen-progestogen replacement[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17(3): 101-109.

[ 6 ] 崔永魁,吴晓婕,潘晓华. 激素替代疗法联合坤泰胶囊治疗卵巢早衰的临床疗效[J]. 川北医学院学报, 2021,36(4):517-520.

[ 7 ] 胥风华,侯亚宁,葛鹏玲,等. 卵巢早衰中医治疗特色[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(1):25-28.

[ 8 ] 郭东艳,周桦,范好,等. 生地黄汤对卵巢早衰大鼠卵巢保护作用及机制的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2019,44(21):4698-4703.

[ 9 ] 张引儒. 八珍益母丸加减治疗气血虚弱型闭经 42 例[J]. 内蒙古中医药,2014,33(24):10.

[ 10 ] 陈媛妮,苏慧森. 八珍益母汤治疗闭经一例[J]. 河南中医,2012,32(5):653.

[ 11 ] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.

[ 12 ] 周宇,贾玉玲,严大为,等. 两种小鼠卵巢早衰模型比较[J]. 上海医学,2018,41(8):489-494.

[ 13 ] 王海丹. 乌鳖颗粒治疗卵巢功能早衰的机理研究[D]. 南京:南京中医药大学,2011.

[ 14 ] 万军,包奇昌. 去氢吴茱萸碱对实验性胃溃疡大鼠胃黏膜的保护作用及机制研究[J]. 中草药, 2020, 51 (18):4698-4703.

[ 15 ] 王艺娟,陈耀星,李国平. 雌二醇对卵巢摘除大鼠子宫组织结构的影响[J]. 福建畜牧兽医,2009,31(6): 4-5.

[ 16 ] 于爱莲,乔云波,张延玲,等. 应用免疫荧光双标记染色技术检测乙型肝炎病毒感染胎盘膜联蛋白 V 的表达(英文)[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007

- (50):10213-10216.
- [17] 赵雪莹,司丽娜,魏萌,等. 侧脑室注射促性腺激素抑制激素/RF 酰胺相关肽-3对卵巢摘除术后补充雌激素大鼠子宫腔液影响的蛋白质组学分析[J]. 解剖学报,2021,52(4):499-505.
- [18] 葛飞,张瑶,侯鉴宸,等. 基于网络药理学及大鼠体内实验的方法探讨麻黄细辛附子汤干预偏头痛的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20220917.
- [19] 沈炜,陈学奇. 调经汤对卵巢早衰模型大鼠卵巢功能影响的实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2017,27(12):1040.
- [20] 白东义,韩慧,佟春玲,等. 葛根素对摘除卵巢小鼠血清激素含量的影响[J]. 中国兽医杂志,2010,46(3):90-92.
- [21] 李晓红,秦光彪,秦友德. 卵巢分泌激素及调节的研究近况[J]. 黑龙江动物繁殖,1997(4):41-43.
- [22] 蔡小华,李涛,欧建平,等. 抗缪勒管激素与性激素预测卵巢反应性的临床研究[J]. 检验医学与临床,2019,16(17):2493-2496,2578.
- [23] COOKE P S, MESA A M, SIROHI V K, et al. Role of nuclear and membrane estrogen signaling pathways in the male and female reproductive tract [J]. Differentiation,2021,118:24-33.
- [24] MARLA S, MORTLOCK S, HOUSHDARAN S, et al. Genetic risk factors for endometriosis near estrogen receptor 1 and coexpression of genes in this region in endometrium [J]. Mol Hum Reprod, 2021, doi: 10.1093/molehr/gaaa082.
- [25] BAGHEL K, SRIVASTAVA R. Effect of estrogen and stress on estrogen receptor 1 in the HPG axis of immature male Gallus gallus domesticus; Involvement of anti-oxidant system[J]. Theriogenology, 2020, 155: 98-113.
- [26] 程泽能,周宏灏. 雌二醇生物合成和代谢酶的遗传变异对骨质疏松的影响[J]. 中国药理学报:英文版,2000,21(7):587.
- [27] 李晓梅,王雅芝,何天目,等. 基于网络药理学的骨康胶囊治疗骨质疏松用药规律及作用机制网络研究[J]. 世界中医药,2022,doi:11.5529.R.20220406.1727.008.
- [28] 唐晓霞,侯翠,张婉璐,等. 子宫肌瘤与雌激素代谢酶CYP1A1和COMT基因多态性的关系[J]. 中国病案,2020,21(5):86-89.
- [29] 李雪,阮祥燕,谷牧青,等. 孕激素受体膜组分1促进雌孕激素诱导的乳腺癌细胞增生的研究——雌二醇与周期序贯及连续联合比较[J]. 首都医科大学学报,2019,40(2):237-243.
- [30] COLLINS J M, WANG D. Co-expression of drug metabolizing cytochrome P450 enzymes and estrogen receptor alpha (ESR1) in human liver: Racial differences and the regulatory role of ESR1 [J]. Drug Metab Pers Ther,2021,36(3):205-214.
- [31] 高晓斐,徐萌,张静,等. 醒脑益智方对T2DM痴呆小鼠性激素信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):81-85.

[责任编辑 顾雪竹]