

# 养阴舒肝颗粒对 VCD 诱导卵巢功能下降大鼠 Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达的影响

王吉菊<sup>1</sup>, 刘建<sup>2</sup>, 黄旭春<sup>2</sup>, 曾玉燕<sup>2</sup>, 王小云<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510405; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

**[摘要]** 目的:探讨养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降模型大鼠卵巢功能及B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白的影响。方法:选取动情周期规则的雌性SD大鼠,取10只作为正常组,其余大鼠均采用 $160\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 去氧乙炔基环己烯(VCD)腹腔注射诱导卵巢功能下降模型,取造模成功的56只大鼠按体质量随机分为模型组,养阴舒肝颗粒低( $2.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),中( $4.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),高剂量组( $8.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和坤泰胶囊组,每组11只(模型组12只)。采用养阴舒肝颗粒和坤泰胶囊进行灌胃给药,干预治疗4周后进行卵巢称质量,计算各级卵泡的数目,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清性激素水平卵泡刺激素(FSH),雌二醇( $E_2$ ),抗缪勒氏管激素(AMH),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织Bcl-2, Bax, Caspase-3的表达量。结果:与正常组比较,模型组大鼠的卵巢质量和卵巢指数下降( $P < 0.01$ ),闭锁卵泡数目增多( $P < 0.01$ ),FSH水平升高( $P < 0.01$ ), $E_2$ 和AMH水平下降( $P < 0.05$ ),卵巢组织Bcl-2蛋白的表达减少( $P < 0.01$ ),Bax, Caspase-3蛋白的表达( $P < 0.01$ );与模型组比较,养阴舒肝颗粒可以增加模型大鼠的双侧卵巢质量( $P < 0.05, P < 0.01$ );养阴舒肝颗粒和坤泰胶囊可以增加卵巢指数( $P < 0.05, P < 0.01$ );养阴舒肝颗粒可以减少闭锁卵泡的数目( $P < 0.05$ );养阴舒肝颗粒和坤泰胶囊均可以降低FSH水平( $P < 0.05$ ),升高 $E_2$ 和AMH水平( $P < 0.05$ ),增加卵巢组织Bcl-2的表达( $P < 0.01$ ),同时抑制Bax, Caspase-3的表达( $P < 0.01$ )。结论:养阴舒肝颗粒可以提高卵巢功能下降模型大鼠的卵巢功能,其机制可能与抗细胞凋亡有关。

**[关键词]** 养阴舒肝颗粒; 卵巢功能下降; 去氧乙炔基环己烯(VCD); 细胞凋亡

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0159-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20182040

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180801.0952.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-08-01 14:45

## Effect of Yangyin Shugan Granule on Expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 Protein in Rats with VCD-induced Diminished Ovarian Function

WANG Ji-ju<sup>1</sup>, LIU Jian<sup>2</sup>, HUANG Xu-chun<sup>2</sup>, ZENG Yu-yan<sup>2</sup>, WANG Xiao-yun<sup>2\*</sup>

(1. The Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Yangyin Shugan granule (YYSG) on ovarian function in rats with diminished ovarian function, and explore its effect on B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3) protein expression. **Method:** SD female rats with estrous cycle rules were selected, 10 used as blank group, and the others were used to establish diminished ovarian function model by injecting  $160\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  4-vinylcyclohexenediepoxyde (VCD) into enterocoelia. 56 model rats with diminished ovarian function were randomly divided into 5 groups: model group, low-, middle-, high-

**[收稿日期]** 20180424(011)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(2017A030313728)

**[第一作者]** 王吉菊,在读博士,从事中西医结合妇科研究, E-mail:wjj8910@163.com

**[通信作者]** \*王小云,主任医师,从事中西医结合妇科研究, E-mail:963256505@qq.com

dosage YYSG groups, and Kuntai capsule group,  $n = 11$  on each group ( $n = 12$  in model group). The YYSG groups ( $2.1, 4.2, 8.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and Kuntai capsule group had intragastric administration for 4 weeks after the model establishment. Then the ovarian weight was measured and follicle count was calculated. The levels of serum sex hormones [follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol ( $E_2$ ), and anti-mullerian hormone (AMH)] were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of Bcl-2, Bax, Caspase-3 in ovarian tissue were detected by Western blot. **Result:** As compared with the normal group, the ovary weight and ovary index were decreased ( $P < 0.01$ ), Atresia follicle count was decreased ( $P < 0.01$ ), FSH level was increased ( $P < 0.01$ ),  $E_2$  and AMH levels were decreased ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 protein expressions were decreased ( $P < 0.01$ ), and Bax and Caspase-3 protein expressions were increased ( $P < 0.01$ ) in model group. As compared with the model group, the ovary weights of YYSG groups were increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); YYSG granule and Kuntai capsule could increase the ovarian index ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); YYSG granule could reduce the numbers of atresia follicles ( $P < 0.05$ ); YYSG granule and Kuntai capsule could decrease FSH level but increase  $E_2$  and AMH levels ( $P < 0.05$ ), increase the expression of Bcl-2 protein ( $P < 0.01$ ), and decrease the expression levels of Bax, Caspase-3 protein ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** YYSG could improve the ovarian function of rats with diminished ovarian function and the mechanisms may be associated with anti-apoptosis.

**[Key words]** Yangyin Shugan granule; diminished ovarian function; 4-vinylcyclohexenediepoide (VCD); cell apoptosis

病理性卵巢功能下降是临床常见的卵巢功能障碍性问题之一。卵巢储备功能下降 (diminished ovarian reserve, DOR) 是指女性在 40 岁前由于各种因素导致卵巢功能障碍, 出现卵巢内存留的卵泡数量减少或质量减退, 从而导致生育力下降的一种疾病<sup>[1]</sup>。目前报道, DOR 在不孕人群中约占 10%, 且发病年龄均呈现年轻化趋势<sup>[2]</sup>。该病病因复杂, 现代研究尚未明确其发病机制, 进一步发展可导致卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 的发生<sup>[3-4]</sup>。西医对改善卵巢功能的治疗以辅助生殖技术、激素治疗为主, 但目前仍缺乏明确有效的治疗措施, 近年来中医药被广泛应用于提供卵巢功能的临床治疗和实验研究, 并取得了一定的研究进展<sup>[5-7]</sup>。

“养阴舒肝颗粒”是广东省中医院妇科主任、广东省名中医王小云教授经过 30 多年的临床实践应用, 总结而成的经验方。该方由六味地黄丸和逍遥丸加减而成, 组方严谨, 用药轻灵, 具有养阴疏肝、燮养天癸之功效, 临床观察表明养阴舒肝颗粒可以改善卵巢功能下降患者的卵巢功能<sup>[8-11]</sup>。基于养阴舒肝颗粒良好的临床疗效, 本研究将进一步从实验角度探讨该药的疗效及作用机制。本实验研究以去氧乙烯基环己烯 (VCD) 所致卵巢功能下降大鼠为模型, 通过检测大鼠的卵巢质量及卵巢指数、各级卵泡计数、性激素水平等探讨养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降模型大鼠卵巢功能的影响, 并通过分析卵巢组

织凋亡相关蛋白的表达水平进一步探讨其作用机制, 以期养阴舒肝颗粒改善卵巢功能提供实验依据, 同时为新药的研发提供科学基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 8 周龄 SD 系 SPF 级雌性大鼠, 体质量 180 ~ 220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证号 SYXK(湘)2014-0012。自由摄食和饮水, 动物室内自然光照, 通风良好, 室温保持在  $(22 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ , 明暗交替 (12 h: 12 h)。本研究所涉及的动物相关操作均在湖南斯莱克景达实验动物有限公司动物伦理委员会的批准下进行 (批准号 2010-116-6)

**1.2 药物及试剂** 养阴舒肝颗粒 (柴胡、白芍等组成), 每袋含生药 15.0 g, 临床用量为每日 45.0 g 生药, 由广东省中医院提供, 产批号 20161020。坤泰胶囊 (中国贵阳新天药业股份有限公司, 批号 140507); VCD 和芝麻油 (美国 Sigma 公司, 批号均为 BCBT2645); B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体 (美国 Immunoway 公司, 批号分别为 YT0470, YT0459, B5601); 内参  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (湖南 Auragene 公司, 批号为 SA001); 性激素卵泡刺激素 (FSH), 雌二醇 ( $E_2$ ), 抗缪勒氏管激素 (AMH) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒, 羊抗鼠二抗 (湖南 Auragene 公司, 批号分别为 AK0018JAN26028, AK0018JAN26029,

AK0018JAN26031, SA009)。

**1.3 仪器** AE41 光学显微镜(德国 Motic 公司); TDZ5-WS 离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂); DNM-9606 酶标仪(北京普朗新技术有限公司); YT-6C 生物组织摊烤片机(湖北孝感); Trans-Blot SD Cell 型蛋白印迹电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型的制备** 大鼠购回后,适应性喂养 1 周,每天上午 8:30 行大鼠阴道脱落上皮细胞学检查,选取动情周期规则的雌性 SD 大鼠,取 10 只作为正常组。参考预实验及文献方法<sup>[12]</sup>,除正常组外,其余 SD 雌性大鼠每天 1 次腹腔注射 160 mg·kg<sup>-1</sup> VCD,即 2.5 mL·kg<sup>-1</sup> VCD 溶液(VCD 溶于芝麻油中,VCD 溶液 5 mL 含 VCD 0.15 mL 和芝麻油 4.85 mL),连续注射 15 d。正常组每天 1 次腹腔注射等剂量生理盐水,连续注射 15 d。每天上午 8:30 行大鼠阴道脱落上皮细胞学检查,光镜下连续观察大鼠的动情周期变化。若大鼠阴道涂片显示大鼠动情周期延长、动情周期紊乱则提示造模成功。

**2.2 动物分组** 将造模成功的 56 只大鼠按体质量随机分为模型组,养阴舒肝颗粒低、中、高剂量组和坤泰胶囊组,每组 11 只(模型组 12 只)。

**2.3 动物给药** 按照“体表面积”换算法:大鼠的有效剂量 = 人的临床剂量 × 0.018 × 5(《中药药理研究方法学》)得出各组的给药剂量分别为养阴舒肝颗粒低、中、高剂量给药剂量为 2.1, 4.2, 8.4 g·kg<sup>-1</sup>分别相当于临床等效剂量的 1/2, 1, 2 倍,坤泰胶囊给药剂量为 1.08 g·kg<sup>-1</sup>相当于临床等效剂量的 2 倍,给药体积均为 10 mL·kg<sup>-1</sup>。正常组和模型组给予 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体积的蒸馏水灌胃,各组大鼠均每天给药 1 次,连续给药 4 周。

## 2.4 观察指标和测定方法

**2.4.1 卵巢质量及卵巢指数** 末次给药后禁食(不禁水)12 h,用 1% 戊巴比妥钠水溶液按大鼠的体质量进行腹腔注射麻醉,分离大鼠双侧卵巢,剥离周围的筋膜及脂肪组织,进行称质量,并计算卵巢指数。

$$\text{卵巢指数} = \frac{\text{卵巢质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})} \times 100\%$$

**2.4.2 ELISA 测定 FSH, E<sub>2</sub>, AMH 水平** 腹主动脉取血 5 mL,进行 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 制备血清,严格按照说明书方法采用酶联免疫法测量血清性激素(FSH, E<sub>2</sub>, AMH)水平。

**2.4.3 各级卵泡计数** 将大鼠卵巢放于置 10% 甲

醛固定,脱水、包埋、切片,显微镜下计算各级卵泡的数量,即原始卵泡(包括始基卵泡和初级卵泡),次级卵泡,成熟卵泡和闭锁卵泡的数量。

**2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平** 提取卵巢组织蛋白质,加入 SDS 组织裂解液,按照 BCA 法测定组织蛋白浓度。将样品进行凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗孵育(稀释比例为 1:500),4 °C 静置过夜。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育(稀释比例为 1:15 000),充分洗涤 5 次,化学发光,显影,定影,蒸馏水冲洗终止。以 β-actin 为内参,采用 Image J 图像分析软件进行分析。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组数据差异性检验采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对卵巢功能下降大鼠卵巢质量及卵巢指数的影响** 与正常组比较,模型组大鼠的双侧卵巢质量、卵巢指数均显著下降( $P < 0.01$ )。与模型组比较,养阴舒肝颗粒低、高剂量组的双侧卵巢质量和卵巢指数均增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),中剂量组的左侧卵巢质量显著增加( $P < 0.01$ ),坤泰胶囊组的卵巢指数增加( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降大鼠卵巢质量的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Effect of Yangyin Shugan granule (YYSG) granule on ovarian weight and ovarian index in rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	左侧卵巢质量/mg	右侧卵巢质量/mg	卵巢指数
正常	-	10	47.10 ± 10.66	50.38 ± 10.41	29.95 ± 6.14
模型	-	12	29.34 ± 8.29 <sup>1)</sup>	30.78 ± 7.15 <sup>1)</sup>	19.51 ± 4.73 <sup>1)</sup>
养阴舒肝颗粒	2.1	11	36.83 ± 7.79 <sup>2)</sup>	38.83 ± 9.23 <sup>2)</sup>	24.51 ± 4.90 <sup>2)</sup>
	4.2	11	38.87 ± 19.32 <sup>3)</sup>	37.76 ± 15.08	28.23 ± 6.32 <sup>3)</sup>
	8.4	11	45.86 ± 9.46 <sup>3)</sup>	47.43 ± 11.88 <sup>3)</sup>	31.88 ± 5.55 <sup>3)</sup>
坤泰胶囊	1.08	11	30.49 ± 17.02	30.48 ± 18.14	24.50 ± 4.77 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对卵巢功能下降大鼠各级卵泡数目的影响** 与正常组比较,模型组大鼠的始基卵泡、初级卵泡数目明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ ),闭锁卵泡数目显著增多( $P < 0.01$ )。与模型组比较,养阴舒肝颗粒低和中剂量组的闭锁卵泡数目明显减少( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 对卵巢功能下降大鼠血清性激素水平的影响**

表 2 养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降大鼠卵泡计数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of YYSG granule on follicle count in ovarian function decline rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	始基卵泡	初级卵泡	次级卵泡	成熟卵泡	闭锁卵泡
正常	-	10	9.4 ± 6.1	7.1 ± 5.2	4.0 ± 1.9	2.2 ± 1.9	0.9 ± 0.7
模型	-	12	3.1 ± 2.2 <sup>2)</sup>	2.9 ± 3.0 <sup>1)</sup>	2.7 ± 0.9	1.5 ± 1.8	3.7 ± 3.7 <sup>2)</sup>
养阴舒肝颗粒	2.1	11	3.8 ± 2.1	3.5 ± 2.2	2.8 ± 1.4	1.8 ± 1.5	1.2 ± 0.6 <sup>3)</sup>
	4.2	11	4.0 ± 3.1	3.8 ± 2.0	3.0 ± 2.5	1.9 ± 1.6	1.3 ± 0.9 <sup>3)</sup>
	8.4	11	5.1 ± 4.8	4.4 ± 5.3	3.5 ± 2.5	2.1 ± 1.6	2.8 ± 3.3
坤泰胶囊	1.08	11	5.4 ± 4.8	5.0 ± 5.9	3.7 ± 2.3	2.5 ± 1.7	3.0 ± 2.7

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P < 0.05(表 3 同)。

与正常组比较,模型组大鼠的血清 FSH 水平明显升高,E<sub>2</sub> 和 AMH 水平降低(P < 0.05, P < 0.01)。与模型组比较,养阴舒肝颗粒高剂量组和坤泰胶囊组的 FSH 水平降低,E<sub>2</sub> 和 AMH 水平升高(P < 0.05);见表 3。

表 3 养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降大鼠血清 FSH, E<sub>2</sub>, AMH 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

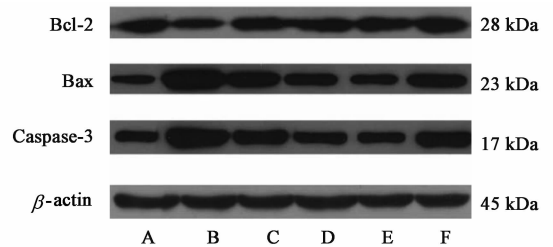
Table 3 Effect of YYSG granule on level of AMH, E<sub>2</sub> and FSH in ovarian function decline rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	FSH /μg·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	AMH /μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	10	3.74 ± 0.23	108.13 ± 20.30	9.38 ± 2.13
模型	-	12	4.13 ± 0.49 <sup>2)</sup>	87.53 ± 14.77 <sup>1)</sup>	7.30 ± 1.58 <sup>1)</sup>
养阴舒肝颗粒	2.1	11	3.90 ± 0.48	93.69 ± 12.48	7.42 ± 1.59
	4.2	11	3.88 ± 0.41	102.09 ± 13.44	7.79 ± 1.97
	8.4	11	3.81 ± 0.38 <sup>3)</sup>	103.96 ± 21.62 <sup>3)</sup>	9.02 ± 2.86 <sup>3)</sup>
坤泰胶囊	1.08	11	3.78 ± 0.28 <sup>3)</sup>	106.22 ± 15.31 <sup>3)</sup>	9.12 ± 2.05 <sup>3)</sup>

3.4 对卵巢功能下降大鼠卵巢组织 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量显著下降,促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达量显著增加(P < 0.01);与模型组比较,养阴舒肝颗粒低、中、高剂量组和坤泰胶囊组的 Bcl-2 蛋白的表达量明显增多,Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达量明显减少(P < 0.01),见图 1 和表 4。

#### 4 讨论

卵巢功能下降是妇科内分泌领域及生殖领域的常见问题。王小云教授认为情志因素是女性卵巢功能障碍相关疾病的重要病因之一<sup>[13-15]</sup>。加之现代生活和工作压力的增大,使得女性情志致病尤为突出,长期的情志变化影响肾-天癸-冲任-胞宫轴的功能。又肝肾同源,肾气化生天癸。肾气旺盛是女性



A. 正常组;B. 模型组;C. 养阴舒肝颗粒低剂量组;D. 养阴舒肝颗粒中剂量组;E. 养阴舒肝颗粒高剂量组;F. 坤泰胶囊组

图 1 各组大鼠卵巢组织 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein in ovarian tissue of each group by electrophoresis

表 4 养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降大鼠卵巢组织 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of YYSG granule on expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein in ovarian tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2 /β-actin	Bax /β-actin	Caspase-3 /β-actin
正常	-	0.82 ± 0.06	0.48 ± 0.06	0.54 ± 0.06
模型	-	0.57 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.74 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.35 ± 0.06 <sup>1)</sup>
养阴舒肝颗粒	2.1	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>	1.36 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.04 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	4.2	1.08 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.06 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.83 ± 0.08 <sup>2)</sup>
	8.4	0.88 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.76 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>2)</sup>
坤泰胶囊	1.08	0.74 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.16 ± 0.06 <sup>2)</sup>	1.09 ± 0.08 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.01。

月经规律来潮最重要和直接的前提条件,肾阴不足,精亏不能化血,可导致肝肾阴虚,水不涵木,故肝气郁滞、肝肾阴虚是导致卵巢功能下降的重要病机之一。治疗当养肝肾阴精与疏通气血二者同用,养阴舒肝方就是该法的具体应用。养阴舒肝颗粒方在经典方剂一贯煎的基础上结合女性卵巢功能下降特殊的病因病机加减而来,由柴胡、白芍等药物组成,具有疏肝解郁,滋阴养肝,健脾养血之效,适用于肾虚肝郁型卵巢功能下降患者。

细胞凋亡是卵巢功能下降的病理特征之一。细胞凋亡的过程中受多种基因的调节,其中抗凋亡因子 Bcl-2 与促凋亡因子 Bax 发挥关键的作用,当 Bcl-2 蛋白的表达量增加,Bax 蛋白的表达量减少时,细胞趋于存活,反之则细胞趋于凋亡。Caspase 是凋亡发生的标志蛋白酶<sup>[16-17]</sup>,正常状态下以酶原的形式存在,当凋亡过程开始发生是,Caspase 被激活,继而活化的 Caspase-3 可以引起一系列级联反应,最终导致细胞凋亡的发生。在卵巢内,颗粒细胞作为卵泡重要的组成部分,在卵泡膜细胞及卵母细胞的发育、成熟和分泌过程中起着关键的调控作用,颗粒细胞的凋亡与各期卵泡的闭锁关系密切,颗粒细胞的异常凋亡将直接影响卵母细胞的质量和发育潜能<sup>[18]</sup>。既往研究表明,原始卵泡和初级卵泡的过早过快凋亡是 VCD 导致卵巢功能下降或衰退的重要机制之一,VCD 可以加快了卵巢内卵泡闭锁的速度,引发细胞的凋亡过程,尤其是增加原始卵泡、初级卵泡中的前凋亡 Bax 蛋白和 Bad 蛋白的表达<sup>[19-20]</sup>。

本研究采用 VCD 腹腔注射诱导的卵巢功能下降模型,探讨养阴舒肝颗粒对卵巢功能下降模型大鼠卵巢功能和细胞凋亡机制的影响。研究证实,VCD 可以诱导大鼠卵巢功能出现下降,表现为卵巢质量、卵巢指数下降,始基卵泡、初级卵泡数目减少,闭锁卵泡数目增多,血清 FSH 水平升高,E<sub>2</sub>,AMH 水平下降,养阴舒肝颗粒能够显著提高模型大鼠的卵巢功能,即增加卵巢质量、卵巢指数,减少闭锁卵泡数目,调节血清性激素水平。同时,养阴舒肝颗粒能够上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,下调促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达水平,发挥良好的卵巢保护作用。

综上所述,养阴舒肝颗粒可以改善 VCD 毒性引起的卵巢功能下降,其可能与调控卵巢组织细胞凋亡密切相关,具体机制有待进一步深入研究。

#### [参考文献]

[1] Cohen J, Chabbert-Buffet N, Darai E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder—a plea for universal definitions[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32 (12):1709-1712.

[2] Scott R T, Leonardi M R, Hofmann G E, et al. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population[J]. Obstet Gynecol, 1993, 82(4):539-544.

[3] Webber L, Davies M, Anderson R, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature

ovarian insufficiency[J]. Hum Reprod, 2016, 31(5):926-937.

[4] Tucker E J, Grover S R, Bachelot A, et al. Premature ovarian insufficiency: new perspectives on genetic cause and phenotypic spectrum [J]. Endocr Rev, 2016, 37(6):609-635.

[5] 李微,张娜. 女性生育力保存技术的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(5):409-412.

[6] 田甜,蔡勤华,杨文. 卵巢储备功能下降的中西医结合研究进展[J]. 中医临床研究, 2017, 9(17):141-143.

[7] 熊晓莉,王巧英,曾晓霞,等. 十补丸加味治疗脾肾阳虚型卵巢功能早衰的疗效及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7):223-227.

[8] 曹晓静,王小云. 养阴舒肝胶囊对 POI 患者卵巢功能的影响及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4):188-192.

[9] 顿晶晶,王小云. 王小云治疗本虚挟瘀型卵巢储备功能下降案举隅[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4):1304-1306.

[10] 陈玲. 养阴舒肝胶囊对卵巢功能低下影响的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2013.

[11] 饶玲铭. 王小云教授学术经验总结及滋肾养阴疏肝法治疗月经过少的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2016.

[12] Frye J B, Lukefahr A L, Wright L E, et al. Modeling perimenopause in Sprague-Dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure [J]. Comp Med, 2012, 62(3):193-202.

[13] 曹晓静. 王小云教授“养与疏”法辨治卵巢早衰的临证经验[C]//全国中西医结合卵巢功能调控专题学术会议集, 2014:186-191.

[14] 冯璇,王小云. 王小云教授“以情胜情”法治疗更年期女性情志障碍经验[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3):789-792.

[15] 饶玲铭,王小云. 王小云教授治疗妇科疾病经验总结[J]. 中医药导报, 2017, 23(10):10-13.

[16] 孔晓霞. 白藜芦醇对大鼠卵泡发育和卵母细胞凋亡的影响及其相关调控机制研究[D]. 汕头:汕头大学, 2010.

[17] 杨晓葵,宋蕊,贾婵维,等. 大鼠窦状卵泡颗粒细胞中磷酸化蛋白激酶 B 表达与凋亡的关系[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(8):14-15.

[18] 赵笛. 基于 FOXO3a 转录因子探讨二仙汤对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护机制[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.

[19] HU X, Christian P J, Thompson K E, et al. Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades[J]. Biol Reprod, 2001, 65(1):87-93.

[20] 耿利华,谈勇. 坤泰胶囊对卵巢储备功能下降大鼠卵巢凋亡调控蛋白 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8):138-143.

[责任编辑 周冰冰]