

抗苗勒氏管激素在免疫性卵巢早衰中的发病 意义及左归丸的作用机制

任锦锦¹, 朱玲^{2*}, 王松露¹, 郜洁², 罗颂平², 许丽锦²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510406)

[摘要] **目的:**研究抗苗勒氏管激素(AMH)在免疫性卵巢早衰(POF)中的发病意义及左归丸对 POF 小鼠 AMH 及其信号转导通路[AMH/活化素蛋白激酶 2(ALK2)/Smad1]的影响,探讨左归丸的作用机制。**方法:**8 周龄 Balb/c 雌性小鼠随机分为正常组、模型组、戊酸雌二醇组、左归丸组。以小鼠透明带 3 多肽建立 POF 动物模型,予左归丸及戊酸雌二醇进行治疗。电化学发光法检测小鼠血清 AMH,卵泡刺激素(FSH)的水平,光学显微镜检测小鼠生长卵泡比率,免疫组化法及蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测小鼠卵巢 AMH 及其信号转导蛋白 ALK2,Smad1 蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠血清 AMH 水平明显降低,FSH 水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,左归丸组明显升高小鼠血清 AMH 水平,明显降低 FSH 水平($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组小鼠卵巢生长卵泡比率明显减少($P < 0.01$),与模型组比较,左归丸组生长卵泡比率明显增高($P < 0.05$)。AMH,ALK2,Smad1 蛋白均在卵泡颗粒细胞胞浆表达。与正常组比较,模型组小鼠卵巢 AMH,ALK2,Smad1 蛋白表达明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,左归丸组小鼠卵巢 AMH 蛋白表达明显升高($P < 0.05$),免疫组化检测显示 ALK2,Smad1 表达均有上升,但无统计学差异,Western blot 检测显示 ALK2,Smad1 表达也均明显升高($P < 0.05$)。**结论:**POF 的发生与 AMH 分泌不足、卵巢 AMH 蛋白表达低下有关,其通过影响 AMH/ALK2/Smad1 信号转导,影响始基卵泡的募集,从而使卵泡消耗过快,卵巢功能过早衰竭,卵巢处于衰老状态。左归丸可促进 POF 小鼠 AMH 分泌,上调卵巢 AMH 蛋白的表达,并通过影响 AMH/ALK2/Smad1 信号转导,抑制始基卵泡的过快募集和消耗,改善卵巢功能。

[关键词] 卵巢早衰; 左归丸; 抗苗勒氏管激素; 信号转导

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0094-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016180094

Effect of Anti-mullerian Hormone in Immune Premature Ovarian Failure and Mechanism of Zuogui Wan

REN Jin-jin¹, ZHU Ling^{2*}, WANG Song-lu¹, GAO Jie², LUO Song-ping², XU Li-mian²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510406, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role of anti-mullerian hormone (AMH) in immune premature ovarian failure (POF), investigate the effects of Zuogui Wan (ZGW), which is the kidney tonifying recipe, on AMH and its signal transduction pathway AMH/ALK2/Smad1 in POF mice, and explore the mechanism of ZGW on treating immune POF. **Method:** The 8 weeks old Balb/c female mice were randomly divided into normal group, model group, Estradiol valerate (trade name: progynova) group and ZGW group. POF animal models were established by zona pellucida 3 polypeptides and then were treated with ZGW or positive control medicine of progynova. The levels of AMH and follicle-stimulating hormone (FSH) in serum of mice were detected by

[收稿日期] 20150702(004)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B021800227);广东省教育厅重点实验室“中医女性生殖调节与安全性研究”2011 年度开放基金项目(ZF201102);国家中医药管理局全国中医学学术流派传承工作室“岭南罗氏妇科流派传承工作室”;广东省首批名中医师承项目

[第一作者] 任锦锦, 硕士, 从事卵巢功能障碍的中医药研究, Tel:13660740827, E-mail:635949191@qq.com

[通讯作者] * 朱玲, 博士, 主任中医师, 硕士生导师, 从事卵巢功能障碍的中医药研究, Tel:020-36585434, E-mail:lingzh@aliyun.com

electrochemical luminescence method. The follicle growth rate of the mice was detected by optical microscope. The expression levels of AMH, ALK2 and Smad1 in mouse ovary were detected by immunohistochemistry and Western blot assay. **Result:** As compared with the normal group, the AMH level was decreased and FSH level was increased in serum of model group mice ($P < 0.05$). As compared with the model group, the AMH level was increased and FSH level was decreased in serum of ZGW group ($P < 0.05$). As compared with the normal group, follicle growth rate was significantly decreased in model group mice ($P < 0.01$). As compared with the model group, follicle growth rate was increased in ZGW group ($P < 0.05$). As compared with the normal group, the protein expression levels of AMH, ALK2 and Smad1 were decreased in mice ovarian of model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, the protein expression levels of AMH were increased in mice ovarian of ZGW group ($P < 0.05$); the expression levels of ALK2 and Smad1 were increased in the immunohistochemistry method, but the difference was not significant; the expression levels of both ALK2 and Smad1 were significantly increased in Western blot assay ($P < 0.05$). **Conclusion:** The occurrence of POF was related to the insufficient secretion of AMH and poor expression of ovarian AMH protein. It affected the primordial follicle recruitment by affecting AMH/ALK2/Smad1 signal transduction, leading to fast follicle consumption, premature ovarian failure, and ovarian aging. ZGW can promote the secretion of AMH in POF mice, up-regulate AMH protein expression in ovary, inhibit the rapid collection and consumption of primordial follicles and improve ovarian function by affecting AMH/ALK2/Smad1 signal transduction.

[**Key words**] premature ovarian failure; Zuogui Wan; anti-mullerian hormone; signal transduction

卵巢早衰(POF)是指妇女 40 岁前出现卵巢功能衰退,表现为月经稀发、闭经、不孕,常伴烘热汗出、烦躁、失眠等症状和生殖道萎缩;内分泌表现为促性腺激素[卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)]水平高,雌激素水平低,2 次或以上血清 FSH $> 40 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$ 和/或 LH $> 30 \text{ mU} \cdot \text{L}^{-1}$,雌二醇(E_2) $< 73.2 \text{ pmol L}^{-1}$ (2 次检查间隔 1 个月以上)。患者骨密度降低,骨折风险高^[1],2 型糖尿病、卵巢癌、子宫癌的发病率增高,系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的患病率也明显增加^[2],严重影响妇女身心健康。其发病率为 1% ~ 3%,发病机制不明,治疗颇为棘手。

中医认为卵巢早衰的病机基础是肾精亏虚、天癸匮乏、冲任虚惫^[3]。左归丸出自明代温补名家张景岳的《景岳全书》,具有滋肾填精、养血填冲的作用,是补肾填精的代表方,是临床治疗卵巢早衰的常用方^[4],现为已上市药物。笔者前期的研究表明左归丸可增强免疫性卵巢早衰小鼠卵母细胞生长分化因子-9(GDF-9) mRNA 的表达,抑制卵泡凋亡,改善卵巢功能^[5-6]。抗苗勒氏管激素(anti-mullerian hormone, AMH)是目前仅发现的始基卵泡生长抑制因子,在调控卵泡募集、生长方面有重要作用,对其在卵巢的表达及信号转导调控的研究,将有助于阐明 POF 的发病机制及补肾中药复方左归丸治疗卵巢早衰的机制,为后期的研究提供一定的依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 8 周龄 Balb/c 小鼠,经检疫合格。雌性 40 只,雄性 8 只,平均体重 20 g,雌、雄按 6:1 的比例用有分隔的饲养笼饲养,以诱导小鼠的正常发情周期。筛选有规律动情周期的雌鼠进行实验。所有动物均由广东省动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002,动物饲养环境合格证号 SCXK(粤)2013-0092。

1.2 药物及试剂 小鼠透明带多肽粉剂[小鼠透明带 3(ZP3)的第 330 ~ 334 个氨基酸序列(NSSSQFQIHGPR),纯度 96.2%,杭州中肽生物有限公司,批号 CK0712801],弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 075K8925,105K8917),戊酸雌二醇(补佳乐,拜耳医药保健有限公司,批号 J20130009),左归丸(河南省宛西制药股份有限公司,批号 Z41020696);小鼠血清 AMH,FSH 检测试剂盒(美国 Cubsabio 公司,批号分别为 E13156m, E06871m);小鼠 AMH,活化素蛋白激酶 2(ALK2)及人信号转导分子 1(Smad1)蛋白检测抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 6886,5671,81378)。

1.3 仪器 Model680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),IX50 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),BG-sub MIDI 型多用途水平电泳仪(美国 Baygene 公司)。

2 方法

2.1 分组 40 只动情周期规律的 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠随机分为正常组、模型组、补佳乐组、左归丸组, 每组 10 只。

2.2 造模 参考文献 [7] 将 2 mg ZP3 粉末溶于 5 mL 三蒸水中, 配制成质量浓度为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 分别与等量的弗氏完全佐剂 (CFA), 弗氏不完全佐剂 (IFA) 配制成免疫试剂、免疫强化试剂。每只小鼠的双后脚掌 *ih* 及 *ip* 免疫试剂 0.15 mL (其中 CFA:0.075 mL, ZP3:0.03 mg)。造模第 14 天, 在相同的注射部位给每只小鼠注射免疫强化试剂 0.15 mL (其中 IFA:0.075 mL, ZP3:0.03 mg)。造模第 35 天进行第 2 次加强免疫。正常组小鼠于双后脚掌 *ih* 及 *ip* 0.15 mL 生理盐水。

2.3 给药 按小鼠与人之间的用药剂量公式进行换算, 临床成人剂量补佳乐 $1 \text{ mg} \cdot (60 \text{ kg} \cdot \text{d})^{-1}$, 左归丸 $18 \text{ g} \cdot (60 \text{ kg} \cdot \text{d})^{-1}$, 按小鼠平均体重 20 g 计算, 则小鼠用量补佳乐 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 左归丸 $2.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用蒸馏水分别溶解药物, 制成溶液, 调整浓度, 使各溶液质量浓度为补佳乐 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 左归丸 $0.18 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每只小鼠 *ig* 量均为 0.3 mL。模型组及正常组小鼠 *ig* 等量蒸馏水, 每日 *ig* 1 次, 共 4 周, 间隔 6 d 休息 1 d。

2.4 动情周期观察 自造模之日起, 每天早上 8 点左右取小鼠阴道脱落细胞, 涂片后光学显微镜下观察其动情周期的变化。

2.5 取材及检测指标 *ig* 4 周后, 取小鼠血清及卵巢组织备检。电化学发光法检测血清 AMH, FSH 的水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色通过光学显微镜检测卵巢生长卵泡情况; 免疫组化法及蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测卵巢组织中 AMH, ALK2, Smad1 蛋白的表达, 免疫组化法检测 AMH, ALK2, Smad1 蛋白的积分吸光度 *IA*。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组以上组间比较, 采用 Levene 法进行方差齐性检验, 方差齐性采用 Bonferroni 法进行方差分析; 方差不齐采用 Dunnett T3 法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

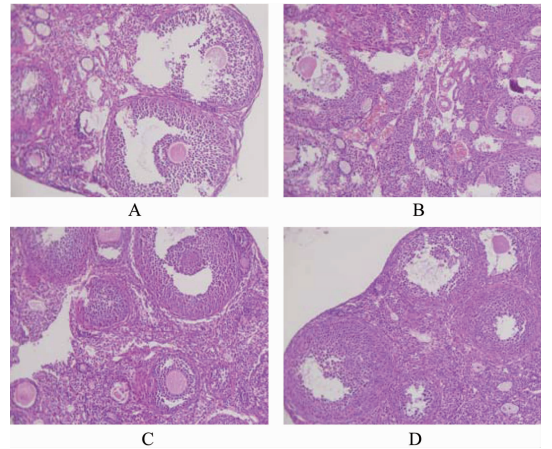
3.1 对 POF 小鼠一般情况的影响 模型鼠毛发光泽度下降, 眼屎增多, 大便质干, 精神萎靡, 喜蜷缩, 活动减少。左归丸组小鼠毛发光泽度可, 眼屎不多, 活动尚好, 补佳乐组小鼠表现与左归丸组相似。

3.2 对 POF 小鼠卵巢生长卵泡的影响 与正常组比较, 模型组小鼠卵巢生长卵泡比率降低明显 ($P < 0.01$); 与 POF 模型组比较, 左归丸组、补佳乐组小鼠生长卵泡比率均升高 ($P < 0.05$)。与补佳乐组比较, 左归丸组小鼠生长卵泡比率升高, 但差异无统计学意义。见表 1, 图 1。

表 1 左归丸对 POF 小鼠卵巢生长卵泡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of Zuogui Wan on ovarian follicles in POF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 生长卵泡比率/% |
|-----|-------------------------------------|------------------------|
| 正常 | - | 0.645 ± 0.063 |
| 模型 | - | $0.310 \pm 0.095^{1)}$ |
| 补佳乐 | 0.15×10^{-3} | $0.398 \pm 0.014^{2)}$ |
| 左归丸 | 2.7 | $0.431 \pm 0.022^{2)}$ |

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



A. 正常组; B. 模型组; C. 左归丸组; D. 补佳乐组 (图 2 同)

图 1 左归丸对 POF 小鼠卵巢生长卵泡的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Zuogui Wan on ovarian follicles in POF mice (HE, $\times 200$)

3.3 对 POF 小鼠血清 AMH, FSH 水平的影响 与正常组比较, 模型组小鼠血清 AMH 水平明显降低, FSH 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 左归丸组明显升高小鼠血清 AMH 水平, 补佳乐组、左归丸组均明显降低小鼠血清 FSH 水平 ($P < 0.05$), 补佳乐组小鼠血清 AMH 水平虽有升高, 但差异无统计学意义。与补佳乐组比较, 左归丸组小鼠血清 AMH 水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 左归丸对 POF 小鼠卵巢 AMH 及其信号传导蛋白 ALK2, Smad1 蛋白表达的影响

3.4.1 免疫组化技术检测 AMH 及其信号传导蛋白 ALK2, Smad1 蛋白均在卵泡颗粒细胞胞浆表达。与正常组比较, 模型组小鼠卵巢 AMH, ALK2, Smad1

表 2 左归丸对 POF 小鼠血清 AMH, FSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Zuogui Wan on AMH and FSH levels in serum of POF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | AMH/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | FSH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-----|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 正常 | - | 8.328 ± 1.304 | 2.710 ± 0.865 |
| 模型 | - | 4.150 ± 1.144 ¹⁾ | 12.492 ± 1.793 ¹⁾ |
| 补佳乐 | 0.15 × 10 ⁻³ | 5.439 ± 1.510 | 10.532 ± 2.374 ²⁾ |
| 左归丸 | 2.7 | 7.527 ± 1.878 ^{2,3)} | 7.989 ± 2.766 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与补佳乐组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3,4 同)。

表 3 左归丸对 POF 小鼠卵巢组织 AMH, ALK2, Smad1 蛋白表达 (IA) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Zuogui Wan on AMH, ALK2 and Smad1 protein expression in ovarian tissue of POF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | AMH | ALK2 | Smad1 |
|-----|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 0.045 ± 0.006 | 0.050 ± 0.008 | 0.028 ± 0.003 |
| 模型 | - | 0.029 ± 0.007 ¹⁾ | 0.034 ± 0.005 ¹⁾ | 0.016 ± 0.004 ¹⁾ |
| 补佳乐 | 0.15 × 10 ⁻³ | 0.044 ± 0.005 ²⁾ | 0.036 ± 0.005 | 0.027 ± 0.005 ²⁾ |
| 左归丸 | 2.7 | 0.045 ± 0.008 ²⁾ | 0.041 ± 0.006 | 0.025 ± 0.005 |

蛋白均明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,补佳乐组、左归丸组均明显升高小鼠卵巢 AMH 蛋白 ($P < 0.05$),补佳乐组明显升高小鼠卵巢 Smad1 蛋白 ($P < 0.05$),补佳乐组、左归丸组也明显升高小鼠卵巢 ALK2 蛋白,但无统计学差异。见表 3,图 2。

3.4.2 Western blot 技术检测 与正常组比较,模型组小鼠卵巢 AMH, ALK2, Smad1 蛋白的表达均明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,补佳乐组、左归丸组小鼠卵巢 AMH, ALK2, Smad1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。与补佳乐组比较,左归丸组小鼠卵巢 AMH, Smad1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$),

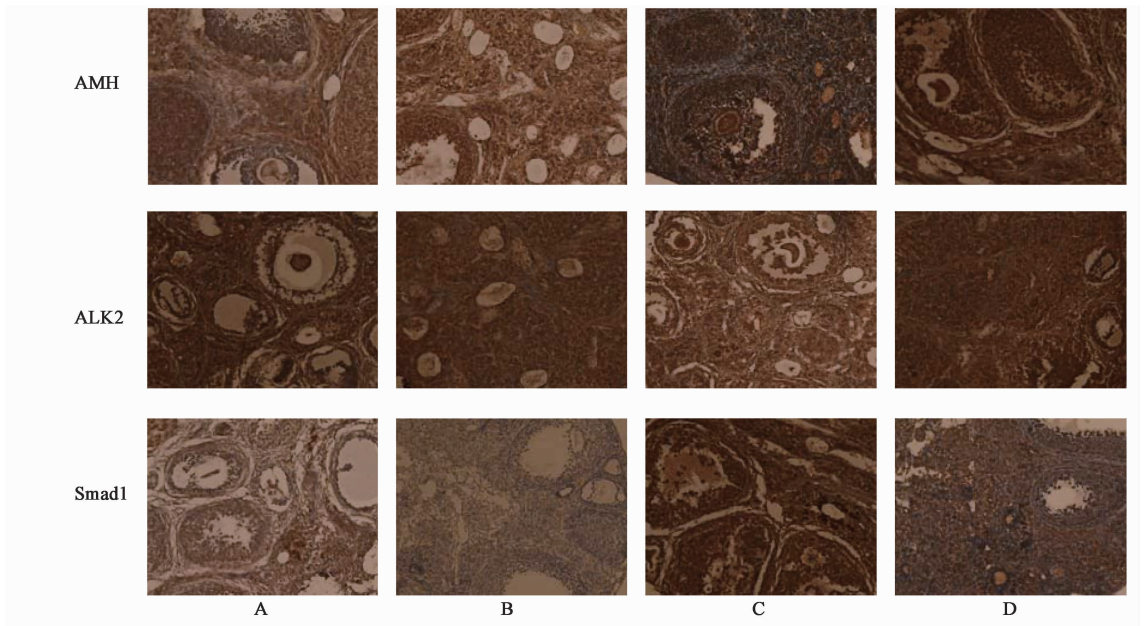


图 2 免疫组化检测各组 POF 小鼠卵巢组织 AMH, ALK2, Smad1 蛋白的表达 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 AMH, ALK2 and Smad1 protein expression in ovarian tissue of POF mice by immunohistochemical (IHC, ×200)

而 ALK2 蛋白表达则明显下降 ($P < 0.05$)。见表 4,图 3。

4 讨论

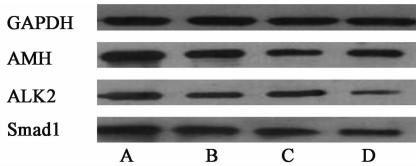
始基卵泡的募集以及之后向初级卵泡的转化、卵泡的生长在卵巢生物学上具有重大意义,直接影响了女性一生中能够提供的卵子数及卵巢的功能。

如卵泡募集过快或生长障碍,都可导致卵巢早衰。AMH 是目前所知的唯一抑制始基卵泡生长的因子,能够很好地反映卵泡储备^[8]。研究表明,排卵正常的女性其血清 AMH 水平的变化比 FSH 等激素水平出现的早^[9],且能够精确评估促性腺激素分泌过多的年轻女性的卵巢储备功能,尤其是 FSH 升高但却

表 4 左归丸对 POF 小鼠卵巢组织中 AMH, ALK2, Smad1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Zuogui Wan on AMH, ALK2 and Smad1 protein expression in ovarian tissue of POF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | AMH/GAPDH | ALK2/GAPDH | Smad1/GAPDH |
|-----|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常 | - | 1.031 ± 0.026 | 0.710 ± 0.020 | 1.169 ± 0.061 |
| 模型 | - | 0.178 ± 0.066 ¹⁾ | 0.273 ± 0.034 ¹⁾ | 0.375 ± 0.013 ¹⁾ |
| 补佳乐 | 0.15 × 10 ⁻³ | 0.477 ± 0.020 ²⁾ | 0.553 ± 0.023 ²⁾ | 0.698 ± 0.0187 ²⁾ |
| 左归丸 | 2.7 | 0.647 ± 0.031 ^{2,3)} | 0.477 ± 0.039 ^{2,3)} | 0.769 ± 0.011 ^{2,3)} |



A. 正常组; B. 左归丸组; C. 补佳乐组; D. 模型组

图 3 Western blot 检测各组 POF 小鼠卵巢组织中 AMH, ALK2, Smad1 蛋白的表达

Fig. 3 AMH, ALK2 and Smad1 protein expression in ovarian tissue of POF mice by Western blot

不符合临床 POF 诊断标准的患者^[10]。AMH 可抑制始基卵泡的募集,降低卵泡对 FSH 的敏感性,从而削弱优势卵泡的募集,减少原始卵泡数量的消耗^[11]。当 AMH 缺乏时,始基卵泡到生长卵泡、成熟卵泡的转化加强,导致原始卵泡数量的减少,卵泡池过早耗竭^[12]。本研究表明 POF 模型小鼠血清 AMH 水平及卵巢 AMH 蛋白表达均较正常组明显下降,血清 FSH 水平较正常组明显升高;生长卵泡比率明显降低,提示 POF 小鼠 AMH, FSH 水平处于衰老状态。

调控卵泡发育的重要通路是转化生长因子-β (TGF-β) 超家族/Smads 信号转导系统^[13], AMH 为 TGF-β 家族成员之一, Smads 蛋白是迄今为止唯一被证明的 TGF-β 受体作用的底物。AMH 由卵巢颗粒细胞表达,田勇等^[14]的研究表明 AMH 蛋白在始基卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦状卵泡的颗粒细胞中均有表达,且 AMH 蛋白在整个卵巢组织中的表达量随鼠龄增加而降低,在间质中的表达则随鼠龄增加而增强,认为 AMH 蛋白可能在卵泡发育及卵巢衰老中起重要调控作用。AMH 生物学效应的发挥需首先与颗粒细胞和卵泡膜细胞的 AMHR II 特异性结合,形成的复合体磷酸化激活 AMHR I (ALK2, ALK3 和 ALK6),胞质内 Smad 蛋白是活化 AMHR I 的直接效应分子,若活化的 AMHR I 特异性磷酸化激活 R-Smad (Smad1/Smad5/Smad8),则激活物与 Smad4 结合成复合物,转移到核内,与相关的 DNA 元件结合,促进靶基因的转录和表达;若活

化的 AMHR I 特异性磷酸化激活 I-Smads,则激活物与 Smad4 结合成的复合物作为负调节因子,抑制靶基因的激活及转录。

本研究表明 AMH 及其信号转导蛋白 ALK2, Smad1 均在卵泡颗粒细胞胞浆表达。与正常组比较,POF 小鼠卵巢 AMH 蛋白表达明显减少,其信号转导蛋白 ALK2, Smad1 的表达亦减少。提示免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 AMH 蛋白表达减弱,并通过影响 AMH/ALK2/Smad1 信号转导的调控,导致卵泡募集增加,卵泡耗竭增快,卵巢功能过早衰竭。

中医学认为肾藏精,主生殖,为天癸之源、冲任之本、气血之根,在女性月经及生殖功能方面起着主导作用。“经本于肾”、“经水出诸肾”。卵巢为女性内生殖器官,而肾主宰着生殖功能的协调,是肾-天癸-冲任-胞宫生殖轴的核心。肾藏精,精血互化,精足则易于摄精生血化为月经。肾精充足是卵巢内分泌功能正常的基础;肾虚则精衰,卵巢功能低下。

卵巢功能的正常与否与肾精的盛衰密切相关,肾精亏耗是 POF 发生的基本病机^[6],治疗以补肾填精为法。左归丸由 8 味药物组成,其中熟地黄为君以滋肾阴、养精血;臣以山茱萸养肝滋肾、山药补脾益阴、枸杞子补肾益精,并在肾肝脾三阴并补的基础上配伍龟、鹿二胶血肉有情之品,以填精补髓,滋生真阴,共助熟地黄滋肾阴养精血;佐以菟丝子温阳益阴,合鹿角胶,“阳中求阴”,使肾中阴精的产生有阳气作为化生动力而源源不绝,佐川牛膝通利血脉,活血化瘀,补肾强腰。全方配伍于补肾之中注重调节肾的阴阳平衡,以平为期,补阳之用隐于补阴血之中,共达益肾精、充精血、化瘀血之功效,是补肾填精法的代表方。

左归丸能升高免疫性 POF 小鼠外周血中雌二醇 (E₂) 含量,减缓血清 FSH 的升高,抑制抗透明带抗体 (AZPAb) 的产生^[15];降低环磷酸胺所致 POF 大鼠血清 FSH, LH 水平,升高血清 E₂ 水平,呈量效关系^[16]。

本研究表明经左归丸治疗后 POF 小鼠血清

AMH 水平及卵巢 AMH 蛋白表达显著升高,血清 FSH 水平明显下降,生长卵泡比率明显增高。表明左归丸可改善 POF 小鼠生殖内分泌水平及卵泡生长。

左归丸组小鼠卵巢 AMH 蛋白表达较模型组明显上升,其信号转导蛋白 ALK2, Smad1 的表达亦有明显改善(免疫组化法提示其表达均有上升,但差异不显著;Western blot 法提示其表达也均有上升,且差异显著),表明左归丸可上调 POF 小鼠卵巢 AMH 蛋白的表达,并通过影响 AMH/ALK2/Smad1 信号转导通路的调控,抑制始基卵泡的过快募集,减少始基卵泡的消耗,保存卵巢储备,从而发挥治疗免疫性卵巢早衰的作用。

笔者的研究结果提示免疫性卵巢早衰的发生与 AMH 分泌不足、卵巢 AMH 蛋白表达不足有关,并通过 AMH/ALK2/Smad1 信号转导进行调控,导致始基卵泡募集过快,消耗增加,卵巢功能过早衰竭,卵巢处于衰老状态。左归丸可促进 POF 小鼠 AMH 分泌,上调卵巢 AMH 蛋白的表达,并通过影响 AMH/ALK2/Smad1 信号转导的调控,抑制始基卵泡的过快募集和过度消耗,抑制卵泡凋亡^[6],改善卵巢储备功能,达到治疗免疫性卵巢早衰的作用。

[参考文献]

[1] Leite-Silva P, Bedone A, Pinto-Neto A M, et al. Factors associated with bone density in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure [J]. Arch Gynecol Obstet, 2009, 280 (2): 177-181.

[2] Wu X, Cai H, Kallianpur A, et al. Impact of premature ovarian failure on mortality and morbidity among Chinese women [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e89597.

[3] 朱玲,罗颂平. 卵巢早衰病因病机再认识 [J]. 新中医, 2015, 47 (4): 327-329.

[4] 胡颖,许良智,谭卓林. 左归丸加减治疗卵巢早衰的系统评价 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (8): 2305-2310.

[5] 朱玲,罗颂平,许丽绵,等. 左归丸对小鼠自身免疫性卵巢损伤的保护作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25 (10): 920-924.

[6] 朱玲,罗颂平,许丽绵,等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠卵巢 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23 (4): 381-386.

[7] 章雅琼. 卵巢早衰的中医体质和左归丸对卵巢早衰小鼠卵泡募集信号转导影响的研究 [D]. 广州:广州中医药大学, 2013.

[8] 陈秀英,李斌. 抗苗勒管激素在女性生殖系统的研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2013, 40 (2): 123-125.

[9] Tremellen K P, Kolo M, Gilmore A, et al. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2005, 45 (1): 20-24.

[10] Knauff E A, Eijkemans M J, Lambalk C B, et al. Anti-Müllerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94 (3): 786-792.

[11] Visser J A, Jong F H, Laven J S, et al. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function [J]. Reproduction, 2006, 131 (1): 1-9.

[12] Durlinger A L, Gruijers M J, Kramer P, et al. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 2001, 142 (11): 4891-4899.

[13] 田春花,胡蓉,贾韶彤,等. 抗苗勒管激素及其型受体基因多态性与卵巢储备功能的关系 [J]. 华中科技大学学报:医学版, 2012, 41 (3): 315-319.

[14] 田勇,赖志文,石良艳,等. AMH 蛋白在性成熟小鼠卵泡发育不同阶段及自然衰老过程卵巢组织中的表达变化 [J]. 现代妇产科进展, 2012, 21 (12): 936-940.

[15] 李红梅,苗竹林. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠性激素的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 27 (13): 1161-1164.

[16] 刘秀云,秦佳佳. 左归丸对大鼠化疗导致的卵巢早衰防治作用的研究 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23 (1): 5-9.

[责任编辑 周冰冰]