

定坤丹对雷公藤多苷诱导卵巢储备功能低下小鼠 性激素和卵泡计数的影响

陈燕霞, 袁苑, 马堃*, 范晓迪, 王凯莉, 田彩蝶, 李敏
(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的:建立雷公藤多苷诱导卵巢储备功能低下(DOR)小鼠模型,探讨定坤丹对DOR的治疗作用,为其临床应用提供科学依据。方法:将60只动情周期规律的雌性小鼠随机分为空白组、模型组、定坤丹低、中、高剂量组和戊酸雌二醇组,每组10只。除空白组外,其余各组予40 mg·kg⁻¹雷公藤多苷混悬液灌胃;同时定坤丹低、中、高剂量组分别予1.64,3.28,6.56 g·kg⁻¹定坤丹混悬液灌胃,戊酸雌二醇组予0.15 mg·kg⁻¹戊酸雌二醇混悬液灌胃,1次/d,连续30 d。观察小鼠的一般状况、体质量、性腺指数和动情周期变化,采用放射免疫法检测血清促卵泡生成素(FSH),促黄体生成素(LH)和雌激素(E₂)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢形态和卵泡计数。结果:与空白组比较,模型组小鼠动情周期处于紊乱状态,子宫和卵巢指数明显下降(P<0.05),血清FSH水平明显上升(P<0.05),LH呈上升趋势,E₂呈下降趋势,各级生长卵泡和黄体数减少、闭锁卵泡明显增加(P<0.05)。与模型组比较,定坤丹组半数小鼠恢复规律动情周期,戊酸雌二醇组小鼠动情周期停滞在动情期;定坤丹中、高剂量组和戊酸雌二醇组小鼠子宫和卵巢指数增加,血清FSH值明显下降(P<0.05),LH呈下降趋势;定坤丹高剂量组和戊酸雌二醇组血清E₂值明显上升(P<0.05);定坤丹能增加各级生长卵泡和黄体数、减少闭锁卵泡数,其中以中剂量效果更佳(P<0.05),戊酸雌二醇组能明显增加原始卵泡、窦状卵泡和黄体数(P<0.05),但不能减少闭锁卵泡数。结论:定坤丹能够通过改善血清性激素,促进卵泡发育、减少卵泡闭锁从而对DOR起到治疗作用。

[关键词] 定坤丹; 卵巢储备功能低下; 雷公藤多苷; 性激素; 卵泡计数

[中图分类号] R2-0;R285.5;R289;R977.1+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0078-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201339

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200511.1324.001.html>

[网络出版日期] 2020-5-11 15:20

Effect of Dingkundan on Sex Hormone and Follicle Count in Mice of Tripterygium Wilfordii Polyglycosides Induced Diminished Ovarian Reserve

CHEN Yan-xia, YUAN Yuan, MA Kun*, FAN Xiao-di, WANG Kai-li, TIAN Cai-die, LI Min
(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a mouse model of diminished ovarian reserve (DOR) induced by tripterygium wilfordii polyglycosides (TWP), and to explore the therapeutic effect of Dingkundan (DKD) on DOR, so as to provide scientific basis for its clinical application. **Method:** The 60 female Blab/c mice with regular estrous cycle were randomly divided into blank group, model group, low, medium and high-dose DKD group, DKD group and estradiol valerate group, with 10 mice in each group. Except the blank group, the other groups were given 40 mg·kg⁻¹ TWP suspension. Meantime, low, medium and high-dose DKD group were given 1.64, 3.28, 6.56 g·kg⁻¹ DKD suspension respectively, and estradiol valerate group was given 0.15 mg·kg⁻¹ estradiol valerate suspension by gastric lavage once a day for 30 days. The general condition, body weight, estrous cycle and gonad index of mice were observed, serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing

[收稿日期] 20191029(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81674019);中国中医科学院博士研究生创新人才培养基金项目(CX201910)

[第一作者] 陈燕霞,在读博士,从事妇科生殖内分泌的研究,E-mail:chenyanxia555@sina.com

[通信作者] *马堃,研究员,博士生导师,从事妇科生殖内分泌的临床与科研工作,Tel:010-64089750,E-mail:makun12348@sina.com

hormone (LH) and estradiol (E_2) were determined by radioimmunoassay, ovarian morphology and follicle count were observed by hematoxylin-eosin staining (HE) staining. **Result:** Compared with the blank group, most of the mice in model group had disordered estrous cycle, uterine and ovarian indexes decreased ($P < 0.05$), serum FSH increased ($P < 0.05$), LH was on an upward trajectory, E_2 was on a downward trend, and the number of growth follicles and corpus luteum decreased and the number of atresia follicles increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, half of the mice in DKD group resumed regular estrous cycle, however, the estrous cycles of mice in estradiol valerate group were stagnated during estrous period. In medium-dose, high-dose DKD group and estradiol valerate group, the uterine and ovarian indexes of the mice were increased, the serum FSH value decreased ($P < 0.05$) and serum LH was on a downward trend, high-dose DKD group and estradiol valerate group increased the levels of serum E_2 ($P < 0.05$). In DKD group, the number of growth follicles and corpus luteum were increased and the number of atresia follicles were reduced ($P < 0.05$), with the best effect at medium dosage. And in estradiol valerate group, the number of primitive follicles, sinusoidal follicles and corpus luteum were increased ($P < 0.05$), but the number of atresia follicles had no difference to the model group. **Conclusion:** DKD can improve serum sex hormones, promote follicular development and reduce follicular atresia, which can play a therapeutic role in the treatment of DOR.

[Key words] Dingkundan (DKD); diminished ovarian reserve; tripterygium wilfordii polyglycosides; sex hormone; follicle count

卵巢储备功能低下(DOR)可导致女性生育力下降,生殖寿命缩短,严重影响女性的生殖和身心健康。流行病学调查显示,年轻女性中DOR的发病率高达10%左右^[1]。2016年美国全国辅助生殖技术调查显示,DOR女性约占助孕人群的30%^[2]。随着全球生育年龄的后移,寻求生育的高龄妇女逐年不断攀升,毫无疑问DOR的发病率也随之激增。目前有关DOR的发病机制尚不明确,大多患者病因不明,临床治疗仍较为困难。

对于大多数哺乳动物而言,原始卵泡的形成与数量决定发生在出生前或新生阶段^[3]。在随后的生殖周期中,原始卵泡逐渐被激活,进而发育为初级卵泡、次级卵泡、窦状卵泡,最终发育成熟并排卵^[4]。任何影响卵泡池中原始卵泡数量及质量的因素,都将影响女性的生育能力和生殖寿命。中医认为女子以肾为本,以血为用,肾虚血瘀是贯穿DOR发生发展全过程的基本病机,临床和实验研究证实补肾活血中药对卵巢功能具有较好的保护作用^[5-6]。定坤丹作为妇科经典用药,在临床中已沿用数百年,该方由清代《竹林寺女科证治》中补经汤化裁而来,书中云:“妇人二十五六岁,血海虚冷,经水不调,腰腹疼痛,或下白带……此气血两虚也,补经汤、温经丸主之。”方中含有八珍汤、逍遥散、柴胡疏肝散、理中汤、胶艾汤和当归芍药散等名方于一体,共奏补益肝肾、益气养血、活血疏肝之功效,广泛应用于痛经、月经不调、不孕症等妇科疾病中,疗效显著。临

床研究表明,定坤丹对DOR患者的卵巢和内分泌功能具有较好保护作用^[7-8]。本研究采用雷公藤多苷构建DOR小鼠模型,观察定坤丹对模型小鼠卵巢储备的影响,为临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 8周龄SPF级雌性BLAB/c小鼠80只,体质量18~20 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。分笼饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级动物房,自由摄食饮水,人工控制室内照明(8:00~20:00光照,20:00~次日8:00黑暗)。本研究所涉及的动物实验均符合动物伦理委员会的准则。

1.2 药物 雷公藤多苷片(每片80 mg,含雷公藤多苷10 mg),湖北黄石飞云制药有限公司生产,批号20180720;定坤丹(每丸10.8 g),山西广誉远国药有限公司生产,批号20180921;戊酸雌二醇片(商品名补佳乐,每片含雌二醇1 mg),拜耳医药有限公司生产,批号H20160679。

1.3 试剂 瑞氏-姬姆萨复合染液,苏木素染液,伊红染色液,中性树胶封片剂(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为G1020, G1080, G1100, G8590);促卵泡生成激素(FSH),雌二醇(E_2),黄体生成激素(LH)放射免疫试剂盒(北京北方生物技术有限公司,批号分别为20180720, 20180720, 20180720)。

1.4 仪器 XH-6080型放免仪(西安中核核仪器有

限公司);JT-12S型脱水机,JB-P7型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2235型病理切片机(德国Lecai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);DB-B2型烤片机(常州国华电器有限公司);NIKON CI-S型倒置显微镜,NIKON DS-U3成像系统(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 动物筛选及分组 将80只小鼠称体质量后,适应性喂养3 d,连续12 d观察动情周期变化,选取60只周期规则的小鼠纳入实验,按照随机数字表法分为6组,每组各10只,分别为空白组、模型组、定坤丹低、中、高剂量组和戊酸雌二醇组。

2.2 造模及给药 根据文献及前期预实验结果,予 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 雷公藤多苷混悬液连续灌胃30 d,小鼠卵巢卵泡计数减少,当动情周期全部紊乱时提示DOR小鼠模型建立成功^[9]。故本研究每日上午空白组予生理盐水灌胃,其余各组予 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 雷公藤多苷混悬液灌胃造模;下午各治疗组分别予相应药物进行干预。按药理实验中小鼠与人体等效剂量换算公式计算^[10-11],定坤丹低、中、高剂量组分别予 $1.64, 3.28, 6.56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 定坤丹混悬液灌胃,相当于人临床用量0.5,1,2倍;戊酸雌二醇组予以 $0.15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 戊酸雌二醇混悬液灌胃;空白组和模型组予等量生理盐水灌胃,给药容积为 $12.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,各组均连续灌胃30 d。

2.3 标本采集 末次给药当天下午各组小鼠禁食不禁水,次日麻醉取材。麻醉前称体质量,1%戊巴比妥钠溶液以 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度进行腹腔注射麻醉,采用眼眶取血,室温静置2 h,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径8.4 cm)离心10 min,取上清液再次离心,将收集到的血清标记好储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,待测。脱颈处死后,剖开腹腔,取出完整子宫和卵巢,去掉外周附着的筋膜和脂肪组织,电子天平称质量并记录,每组取6个卵巢用4%多聚甲醛固定。

2.4 观察指标

2.4.1 一般状况及体质量 每日观察各组小鼠的存活情况,记录其外观体征、行为活动、精神状态、进食、大小便等变化。各组小鼠分别于纳入实验(第0天)、适应性喂养第3天、筛选动情周期第12天、给药第7天、给药第14天、给药21天干预、药物干预第28天称量体质量。

2.4.2 动情周期 每日上午9点进行阴道脱落细胞涂片,用移液器吸取生理盐水 $15\text{ }\mu\text{L}$,注入小鼠阴道内,反复抽吸3~5次,将其涂于事先标记好的载玻

片上,待晾干后用95%乙醇固定30 min,再用瑞氏-姬姆萨复合染液染色后在光学显微镜下观察脱落细胞形态,以确定小鼠所处动情周期阶段,通过连续涂片判定动情周期正常、延长、停滞和无周期小鼠数目及比例。

2.4.3 性腺指数 小鼠性腺指数按以下公式计算:卵巢指数=双侧卵巢湿重(g)/处死前小鼠体质量(g) $\times 100\%$,子宫指数=子宫湿重(g)/处死前小鼠体质量(g) $\times 100\%$ 。

2.4.4 放射免疫法检测血清性激素水平 采用放射免疫法检测血清FSH,LH和 E_2 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作,将标准品及样本加标记物抗体后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育20 h, $3\ 800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径8.4 cm)离心15 min,弃上清液,留沉淀物待测。

2.4.5 苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢形态和卵泡计数 将甲醛固定的卵巢组织脱水、包埋、切片,HE染色后,将组织切片置于光学显微镜下观察卵巢组织形态和卵泡结构,并计算各级卵泡和黄体数目。

2.5 统计学方法 所有数据均采用SPSS 16.0统计软件进行处理。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,方差齐者采用LSD分析,方差不齐者用两独立样本非参数检验;计数数据采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对DOR小鼠一般状况和体质量的影响 与空白组比较,模型组小鼠体毛松散稍晦暗,个别小鼠出现易激惹或喜蜷缩。与模型组比较,定坤丹中、高剂量组小鼠体毛致密有光泽,各组小鼠进食、活动、大小便均无明显异常。各组小鼠在干预前体质量与喂养时间呈正比,组间比较均无统计学差异,予雷公藤多苷及药物灌胃后小鼠体质量先呈下降趋势,随后逐渐上升。与空白组比较,给药第7,14天各组小鼠体质量明显下降($P<0.05$),随后定坤丹组小鼠体质量增加速度较戊酸雌二醇组和模型组快。见表1。

3.2 对DOR小鼠动情周期的影响 通过前期筛选发现,BALB/c小鼠动情周期一般为5~6 d,表现为以白细胞为主的动情间期、有核细胞为主的动情前期、无核角化细胞为主的动情期和3种细胞共存的动情后期规律交替出现。见图1。给药30 d后,与空白组比较,模型组小鼠绝大多数出现动情周期紊乱($P<0.05$),表现为周期延长、停滞或无明显周期;

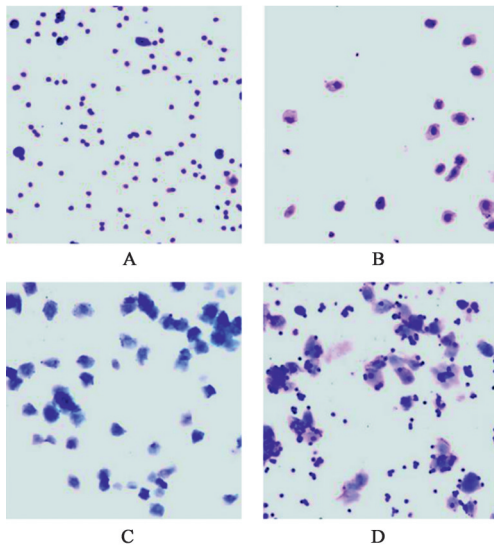
表1 定坤丹对DOR小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Dingkundan on body weight in DOR mice($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第0天	第3天	筛选动情周期第12天	给药第7天	给药第14天	给药第21天	给药第28天
空白	-	17.71±0.53	18.80±0.42	19.58±0.54	20.18±0.67	20.37±0.84	20.31±0.78	20.18±0.53
模型	-	17.31±0.93	18.61±1.00	19.41±0.81	19.14±0.64 ¹⁾	19.04±0.64 ¹⁾	19.75±0.52	19.78±0.51
定坤丹	1.64	17.54±0.83	18.49±0.65	19.42±0.75	19.36±0.82 ¹⁾	19.27±0.84 ¹⁾	20.21±0.76	20.16±0.60
	3.28	17.56±0.73	18.87±0.31	19.64±0.71	19.48±0.76 ¹⁾	19.41±0.85 ¹⁾	19.80±1.01	19.98±0.73
	6.56	17.54±0.78	18.56±0.73	19.44±0.64	19.44±0.73 ¹⁾	19.46±0.65 ¹⁾	20.05±0.70	19.99±0.78
戊酸雌二醇	1.5×10 ⁻⁴	17.73±0.77	18.45±0.53	19.43±0.44	19.26±0.39 ¹⁾	19.44±0.36 ¹⁾	19.64±0.71	19.77±0.59

注:与空白组比较¹⁾P<0.05。

与模型组比较,定坤丹低、中、高剂量组均有小鼠恢复正常周期(P<0.05),而戊酸雌二醇组小鼠周期均停滞在动情期阶段。见表2。



A. 动情间期; B. 动情前期; C. 动情期; D. 动情后期

图1 小鼠阴道脱落细胞涂片(瑞氏-姬姆萨,×200)

Fig. 1 Mouse vaginal exfoliated cell smear(Wright-Gimsa,×200)

3.3 对DOR小鼠性腺指数的影响 与空白组比较,模型组小鼠子宫指数和卵巢指数均明显下

降(P<0.05),定坤丹低、中、高剂量组和戊酸雌二醇组小鼠子宫指数无统计学差异;与空白组和戊酸雌二醇组比较,定坤丹低剂量组小鼠卵巢指数明显下降(P<0.05),其余各治疗组小鼠卵巢指数与空白组比较无统计学差异。定坤丹低、中、高剂量组小鼠子宫指数和卵巢指数随药物浓度增加呈上升趋势。见图2,表3。

3.4 对DOR小鼠血清性激素的影响 与空白组比较,模型组小鼠血清FSH明显上升(P<0.05),血清LH呈上调趋势,E₂呈下调趋势;与模型组比较,定坤丹中、高剂量组和戊酸雌二醇组血清FSH明显下降(P<0.05),定坤丹低剂量组血清FSH呈下降趋势;与模型组比较,定坤丹给药组血清LH呈下降趋势,但差异无统计学意义;与模型组、定坤丹低、中剂量组比较,定坤丹高剂量组和戊酸雌二醇组血清E₂明显升高(P<0.05)。见表4。

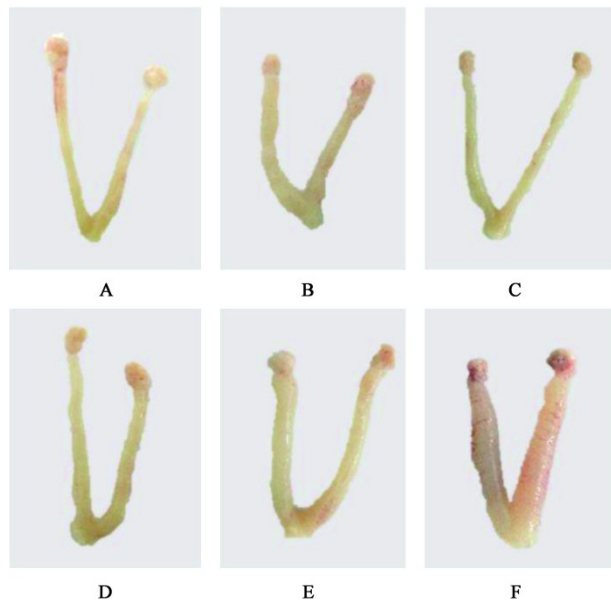
3.5 对DOR小鼠卵巢组织形态和卵泡计数的影响 镜下观察,空白组卵巢结构清晰,各级生长卵泡数较多、形态正常,颗粒细胞呈多层且排列整齐,卵泡液含量较多,可见多个发育好、体积大的黄体;与空白组比较,模型组部分卵巢萎缩,各级生长卵

表2 定坤丹对DOR小鼠动情周期的影响($\chi^2, n=10$)

Table 2 Effect of Dingkundan on estrous cycle in DOR mice($\chi^2, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第4~15天/个					紊乱 比例/%	第30~43天/个				紊乱 比例/%
		正常	正常	延长	停滞	无周期		正常	延长	停滞	无周期	
空白	-	10	9	1	0	0	10	8	1	1	0	20
模型	-	10	2	3	3	2	80 ¹⁾	0	4	3	3	100 ¹⁾
定坤丹	1.64	10	3	4	1	2	70 ¹⁾	5	2	2	1	50 ^{1,2,3)}
	3.28	10	2	6	1	1	80 ¹⁾	6	2	1	1	40 ^{2,3)}
	6.56	10	2	5	2	1	80 ¹⁾	5	4	0	1	50 ^{1,2,3)}
戊酸雌二醇	1.5×10 ⁻⁴	10	0	0	10	0	100 ¹⁾	0	0	10	0	100 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与戊酸雌二醇组比较³⁾P<0.05;与定坤丹低剂量组比较⁴⁾P<0.05;与定坤丹中剂量组比较⁵⁾P<0.05(表3~5同)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 定坤丹低剂量组; D. 定坤丹中剂量组; E. 定坤丹高剂量组; F. 戊酸雌二醇组(图3同)

图2 定坤丹对DOR小鼠子宫和卵巢结构的影响

Fig. 2 Effect of Dingkundan on uterine and ovarian shape in DOR mice

表3 定坤丹对DOR小鼠性腺指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Dingkundan on gonad index in DOR mice($\bar{x}\pm s, n=10$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	子宫指数	卵巢指数
空白	-	0.345±0.024	0.107±0.014
模型	-	0.271±0.032 ¹⁾	0.071±0.010 ¹⁾
定坤丹	1.64	0.293±0.026	0.065±0.013 ^{1,3)}
	3.28	0.304±0.023	0.087±0.012
	6.56	0.299±0.015	0.096±0.015
戊酸雌二醇	1.5×10 ⁻⁴	0.298±0.034	0.098±0.012

表4 定坤丹对DOR小鼠血清性激素的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Dingkundan on serum sex hormone in DOR mice($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹
空白	-	2.39±0.32	5.18±0.25	23.40±1.22
模型	-	3.56±0.14 ¹⁾	5.33±0.23	22.16±0.56
定坤丹	1.64	3.03±0.15	5.00±0.31	21.72±0.67
	3.28	2.89±0.26 ²⁾	5.08±0.43	21.73±0.65
	6.56	2.90±0.19 ²⁾	5.27±0.40	26.10±1.31 ^{2,4,5)}
戊酸雌二醇	1.5×10 ⁻⁴	2.88±0.1 ²⁾	5.38±0.31	25.89±0.96 ^{2,4,5)}

泡数减少、闭锁卵泡数增多,颗粒细胞层数减少且排列疏松紊乱,黄体数减少、部分黄体体积较小,间质血管数减少;与模型组比较,定坤丹低剂量组卵巢组织形态有所改善;定坤丹中、高剂量组卵巢

形态与空白组相似,各级生长卵泡结构清晰,闭锁卵泡数减少,间质血管丰富;戊酸雌二醇组小鼠卵巢形态也与空白组接近,但闭锁卵泡数增多。见图3。

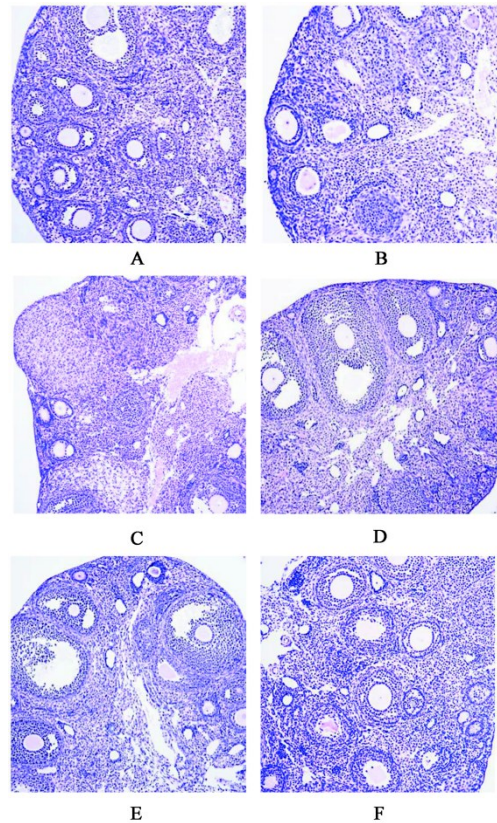


图3 定坤丹对DOR小鼠卵巢组织形态的影响(HE, ×100)

Fig. 3 Effect of Dingkundan on ovarian morphology in DOR mice(HE, ×100)

与空白组比较,模型组小鼠原始卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡和黄体数明显减少($P<0.05$),排卵前卵泡呈下降趋势,闭锁卵泡数明显增多($P<0.05$)。与模型组比较,定坤丹低剂量组闭锁卵泡数明显减少($P<0.05$),各级生长卵泡和黄体数呈上升趋势;定坤丹中剂量组各级生长卵泡和黄体数明显增多($P<0.05$),闭锁卵泡明显减少($P<0.05$);定坤丹高剂量组原始卵泡、窦状卵泡明显增加($P<0.05$),窦前卵泡、黄体数呈上升趋势,闭锁卵泡明显减少($P<0.05$)。与模型组比较,戊酸雌二醇组原始卵泡、窦状卵泡和黄体数明显增加($P<0.05$)。见表5。

4 讨论

卵巢储备功能是指卵巢皮质区卵泡生长、发育并形成可受精卵母细胞的能力,主要取决于卵巢内尚存的可募集卵泡数量和质量,可反映女性的生育潜能^[12]。由于各种原因使卵巢内卵泡数量减少、卵

表5 定坤丹对DOR小鼠各级卵泡计数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Dingkundan on follicle counts in DOR mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

个

组别	剂量/g·kg ⁻¹	原始卵泡	窦前卵泡	窦状卵泡	排卵前卵泡	黄体	闭锁卵泡
空白	-	21.67±1.23	8.83±0.95	4.83±0.48	1.67±0.33 ⁵⁾	4.50±0.43	6.17±0.65
模型	-	14.00±1.24 ¹⁾	6.33±0.92 ¹⁾	2.33±0.49 ¹⁾	1.17±0.47 ⁵⁾	2.50±0.43 ¹⁾	10.67±1.17 ¹⁾
定坤丹	1.64	15.67±1.36	7.17±0.65	3.67±0.49	1.33±0.21 ⁵⁾	3.17±0.31	8.17±0.91 ²⁾
	3.28	19.33±1.80 ²⁾	8.83±0.79 ²⁾	4.67±0.21 ²⁾	2.83±0.31	4.00±0.37 ²⁾	6.67±0.49 ²⁾
	6.56	18.33±1.69 ²⁾	7.50±0.85	4.67±0.80 ²⁾	1.50±0.43 ⁵⁾	3.50±0.81	6.33±0.84 ^{2,3)}
戊酸雌二醇	1.5×10 ⁻⁴	18.50±1.06 ²⁾	8.17±0.95	4.17±0.70 ²⁾	1.50±0.43 ⁵⁾	4.33±0.49 ²⁾	8.83±0.48

细胞质量降低从而导致生育能力下降,即可称为DOR^[13],是卵巢低反应的最常见病因^[14]。若不进行及时干预,则可在1~6年间进一步发展为卵巢早衰^[15]。现代医学有关DOR的发病机制尚不十分清楚,除年龄外,目前主要认为与基因遗传、免疫内分泌、促性腺激素作用障碍、酶缺陷等因素相关。临床治疗主要有激素替代、辅助生殖技术、恶性肿瘤患者生育力保存等,但疗效仍有待进一步提高。

中医认为,肾主生殖,为先天之本、元气之根,肾藏精,精生血。卵子属肾中生殖之精,卵泡的正常发育有赖于精血的滋养,卵子的顺利排出有赖于肾气的鼓动。若肾中精气不足,无力推动血行,则致血瘀;反之,血行不畅,脉络瘀阻,亦可影响肾的封藏,有碍肾中精气的化生,导致肾虚。故肾虚日久必致血瘀,血瘀又可加重肾虚,两者互为因果使卵泡发育不良、成熟延迟、闭锁,最终出现DOR^[16]。此外,由于肝肾同源,精血不足,水不涵木,则肝主疏泄功能失常,亦有碍卵子的排出,加重肾虚血瘀之证。由此可知,肾虚血瘀是贯穿于DOR发病全过程的基本病机,并与肝气郁滞密切相关。

定坤丹主要由补益肝肾之鹿茸、鹿角霜、熟地黄、枸杞子、杜仲、川牛膝,益气养血之红参、阿胶、当归、白芍,活血化瘀之西红花、川芎、三七粉、延胡索、益母草、五灵脂、鸡血藤膏,疏肝解郁之香附、柴胡、乌药,健脾益气之白术、茯苓、砂仁、炙甘草等30味药物精心炮制而成。全方配伍严谨,养精血,祛恶血,补而不滞,养而不腻,攻而不伤,疏而不散,共奏补益肝肾、益气养血、活血疏肝之功效,临床研究显示定坤丹可明显提高不孕不育患者的妊娠率^[17]。有学者通过研究定坤丹联合克罗米芬对比单纯使用克罗米芬促排卵效果,结果发现定坤丹可以提高克罗米芬的排卵率和妊娠率^[18-19],多项临床试验证实定坤丹可明显改善和恢复DOR患者的卵巢储备功能^[20]。

本研究在前期预实验的基础上采用40 mg·kg⁻¹雷公藤多苷混悬液^[9],每日1次连续灌胃30 d构建DOR小鼠模型。与空白组比较,雷公藤多苷造模期间小鼠体质量先呈下降趋势,随后各组小鼠体质量逐渐上升。实验期间,模型组大部分小鼠动情周期处于紊乱状态,子宫和卵巢指数下降;血清FSH水平上升,LH呈上调趋势,E₂呈下调趋势;卵巢组织病理切片提示模型小鼠卵巢形态受损,原始卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡及黄体数目均明显减少,闭锁卵泡增多。这些结果均符合DOR诊断指征^[21],故可在此期间内给予相应药物进行干预。

本实验结果显示,予定坤丹和戊酸雌二醇片治疗后,各干预组小鼠体质量逐渐恢复至与正常小鼠相当,其中定坤丹组小鼠体质量增加速度较戊酸雌二醇组和模型组快。脾胃为后天之本、气血生化之源,脾气健则水谷能正常转化成精微物质,以养四肢肌肉,定坤丹组方蕴含四君子汤之意,红参、白术、茯苓、炙甘草健脾益气,促使小鼠体质量较快恢复、毛发浓密有光泽。定坤丹干预组小鼠约半数左右动情周期恢复正常状态,而空白组小鼠动情周期停滞在动情期,这与单纯使用雌激素有关,在下一步的实验中可改用雌孕激素序贯疗法进行干预,以避免出现类似情况。除低剂量组外,中、高剂量组小鼠子宫和卵巢指数恢复至与空白组相当,因此推测定坤丹可以改善卵巢储备功能。基础血清FSH水平是反映卵巢功能的重要指标之一,也是临床最常用的评估指标^[22]。定坤丹低、中、高剂量组小鼠血清FSH与模型组比较均呈下降趋势,其中中、高剂量组作用与戊酸雌二醇相当,且高剂量组在升高血清E₂水平方面与戊酸雌二醇相当,说明定坤丹能改善DOR小鼠性激素水平,其降低FSH和升高E₂的作用与剂量有关。卵巢组织病理切片观察各级生长卵泡和闭锁卵泡计数能直观的反映卵巢储备功能,是诊断DOR的金标准^[2]。定坤丹各组均能增

加小鼠生长卵泡和黄体计数,并减少闭锁卵泡数目,其中定坤丹中剂量组疗效最佳且优于戊酸雌二醇,单纯补充雌激素虽能在一定程度促进卵泡发育,但卵泡闭锁并无明显改善。肾藏精、主封藏,肝藏血、主疏泄,卵泡的发育成熟需要精血的濡养,卵子的顺利排出需要肝肾之气的鼓动,同时脾胃化生的精微物质也是卵泡发育所必需的。定坤丹不仅可以通过补益肝肾、益气养血促进原始卵泡发育成为窦状卵泡,还可通过疏肝解郁、理气活血促进卵子排出,从而减少卵泡异常闭锁,改善和恢复正常卵巢卵巢储备。

综上所述,本研究证实定坤丹能通过改善性激素水平,促进卵泡正常发育成熟,减少卵泡闭锁,起到保护卵巢储备的功能,从而对DOR发挥治疗作用。

[参考文献]

[1] FERRARETTI A P, LA M A, FAUSER B C, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: the Bologna criteria[J]. Hum Reprod, 2011, 26(7): 1616-1624.

[2] POI T E G G O, WEBBER L, DAVIES M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.

[3] 张华,代燕丽,张佳伟. 原始卵泡的激活与临床应用[J]. 山东大学学报:医学版, 2018, 56(4): 8-17.

[4] GORE A C, CHAPPELL V A, FENTON S E, et al. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals [J]. Endocr Rev, 2015, 36(6): 1-150.

[5] 马堃,袁苑,张会仙. 补肾促卵方治疗早发性卵巢功能低下导致不孕症的临床研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1075-1079.

[6] 张会仙,马堃,佟雅婧. 补肾活血中药治疗卵巢储备功能低下的系统评价[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4464-4473.

[7] 谈珍瑜,游卉,尤昭玲. 定坤丹治疗卵巢储备功能下降致月经后期肾虚证的临床观察[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(5): 406-409.

[8] 谢美群. 定坤丹联合克罗米酚治疗卵巢储备功能低下不孕症患者的效果观察[J]. 中国妇幼保健, 2018,

33(23): 5541-5543.

[9] 袁苑,陈燕霞,马堃,等. 探索建立雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的小鼠模型[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1895-1903.

[10] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.

[11] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006: 10.

[12] 王昱涵,姜燕华,向丽华,等. 二仙汤对去卵巢大鼠心功能和血压动态演变的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(3): 53-61.

[13] 陈文俊,李慧芳,周蓓蓓,等. 卵巢储备功能低下评估及治疗方法研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(1): 19-22.

[14] DEVINE K, MUMFORD S L, WU M, et al. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181, 536 cycles from the society for assisted reproductive technology clinic outcomes reporting system [J]. Fertil Steril, 2015, 104(3): 612-619.

[15] 韩玉芬,程淑蕊,敬文娜,等. 卵巢储备功能下降的预测及治疗[J]. 中国计划生育学杂志, 2007, 136(2): 117.

[16] 马堃,李敏. 补肾促卵冲剂治疗排卵障碍性不孕“肾虚血瘀”作用机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4445-4450.

[17] 刘颖. 定坤丹治疗女性不孕不育的疗效分析[J]. 中外女性健康研究, 2018, 2: 67-68.

[18] 谢美群. 定坤丹联合克罗米酚治疗卵巢储备功能低下不孕症患者的效果观察[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(23): 5541-5543.

[19] 陈兰,谈勇,陈淑萍. 克罗米芬与定坤丹对PCOS不孕症临床促排卵和临床妊娠疗效的研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(20): 4035-4039.

[20] 谈珍瑜,游卉,尤昭玲. 定坤丹治疗卵巢储备功能下降致月经后期肾虚证的临床观察[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(5): 406-409.

[21] 严大为,周莉,孙祖越. 卵巢功能早衰动物模型的建立及其评价指标的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(3): 486-492.

[22] 苏先芝,史云. 卵巢储备功能评估的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2017, 36(3): 260-264.

[责任编辑 孙丛丛]