

知柏地黄丸加减治疗特发性性早熟的疗效观察

岳上赛, 孙凤平*

(郑州大学附属儿童医院, 河南省儿童医院 郑州儿童医院, 郑州 450053)

[摘要] **目的:**评价知柏地黄丸加减治疗特发性性早熟(ICPP)女性患儿的临床疗效及探讨其可能的作用机制。**方法:**收集河南省儿童医院自2019年7月至2020年7月收治的ICPP女性患儿共78例,按随机信封法分为观察组和对照组,各39例。观察组给予知柏地黄丸加减治疗(1剂/d,分2次口服),对照组给予知柏地黄汤治疗(1剂/d,分2次口服),治疗周期3月。观察两组治疗前后乳核长径、最大卵泡直径、子宫、卵巢容积的变化情况及检测两组血清黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、催乳素(PRL)、雌激素(E_2)水平;在细胞水平上,检测知柏地黄丸加减与传统知柏地黄汤2种不同方药处理后下丘脑GT1-7细胞促性腺激素释放激素(GnRH)的分泌量及性早熟相关基因亲吻素-1(Kiss-1)、G蛋白偶联受体54(GPR54)mRNA的表达水平。**结果:**与本组治疗前比较,两组患儿治疗后血清性激素水平均显著下降($P<0.01$);治疗后,与对照组比较,观察组患儿乳核长径、最大卵泡直径明显缩小($P<0.01$);观察组临床有效率优于对照组($P<0.01$);细胞水平上,与传统知柏地黄汤组比较,知柏地黄丸加减组GT1-7细胞GnRH、Kiss-1、GPR54 mRNA表达水平明显降低。**结论:**知柏地黄丸加减能有效抑制ICPP患儿血清性激素水平,延缓性早熟患儿乳核及卵巢发育,较传统知柏地黄汤效果更明显,值得临床推广;抑制Kiss-1和GPR54 mRNA的表达水平可能是其治疗性早熟的作用机制之一。

[关键词] 特发性性早熟; 知柏地黄丸加减; 亲吻素-1; G蛋白偶联受体54; 促性腺激素释放激素

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0138-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221622

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220621.0828.001.html>

[网络出版日期] 2022-06-21 17:01

Efficacy of Modified Zhibai Dihuangwan on Idiopathic Precocious Puberty

YUE Shangsai, SUN Fengping*

(Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Children's Hospital,
Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450053, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the clinical efficacy of modified Zhibai Dihuangwan on children (female) with idiopathic precocious puberty (ICPP) and to explore the mechanism. **Method:** A total of 78 children with ICPP who were treated in Henan Children's Hospital from July 2019 to July 2020 were randomized into the observation group and control group by sealed envelope randomization with 39 in either group. The observation group was given modified Zhibai Dihuangwan (1 dose/day, oral, divided into two times) and the control group Zhibai Dihuangtang (1 dose/day, oral, divided into two times orally). The treatment lasted 3 months for both groups. The changes of mammary nucleus length, maximum follicular diameter, uterus, and ovarian volume before and after treatment in the two groups were observed, and serum luteinizing hormone (LH) level, follicle-stimulating hormone (FSH) level, prolactin (PRL) level, and estrogen (E_2) level were detected in the two groups. At the cellular level, the secretion of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and mRNA expression of precocious puberty-related genes Kiss-1 and G protein-coupled receptor 54 (GPR54) were

[收稿日期] 2022-02-07

[基金项目] 2022年河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20200676);2021年河南省科技攻关项目(222102310281)

[第一作者] 岳上赛, 硕士, 住院医师, 从事小儿内分泌的研究, E-mail: 1274472060@qq.com

[通信作者] * 孙凤平, 博士后, 副主任医师, 从事小儿内分泌的研究, E-mail: 1274472060@qq.com

measured. **Result:** Levels of serum sex hormones of the two groups were significantly decreased after treatment as compared with those before treatment ($P<0.01$). After treatment, the length of the mammary nucleus and the maximum follicular diameter in the observation group were smaller than those in the control group ($P<0.01$). The total clinical effective rate in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.01$). At the cellular level, the expression levels of GnRH, Kiss-1 and GPR54 mRNA in GT1-7 cells treated with modified Zhibai Dihuangwan were lower than those treated with traditional Zhibai Dihuangtang. **Conclusion:** Modified Zhibai Dihuangwan can effectively inhibit levels of serum sex hormones in children with ICPP and delay the development of mammary nucleus and ovary in children with precocious puberty. It is more effective than traditional Zhibai Dihuangtang, which is worthy of clinical promotion. The mechanism is the likelihood that it inhibits the expression of Kiss-1 and GPR54 mRNA.

[Keywords] idiopathic precocious puberty; modified Zhibai Dihuangwan; kisspeptin-1; G protein-coupled receptor 54; gonadotropin releasing hormone

性早熟是指女孩8岁以前、男孩9岁以前出现第二性征,或女孩10岁以前月经初潮、男孩11岁以前遗精的一种常见的儿童内分泌疾病^[1]。近年来,随着社会环境、生活方式及饮食习惯的改变,其发病率呈现逐渐上升的趋势^[2]。性早熟患儿性腺发育的提前可使生长时间缩短,骨骺提前闭合最终会导致成年身高矮小^[3],从而带来一系列心理、家庭甚至社会问题^[4-5]。按发病机制和临床表现,该病可分为中枢性性早熟(CPP)、外周性性早熟(PPP)和不完全性性早熟。临床上将中枢性性早熟无器质性病变者称为特发性性早熟(ICPP)。ICPP女孩多见,约占女孩CPP的80%以上^[6]。西医以促性腺激素释放激素类似物(GnRH α)为治疗ICPP的主要手段,虽然能延缓性腺发育,但具有一定的局限性,有研究指出,8.3岁以后的患儿使用GnRH α 治疗可能对改善成人身高意义不大^[7];同时,从长远来看,GnRH α 对患儿生殖能力、卵巢储备功能、脂质代谢及记忆力、认知能力等社会心理功能的影响有待进一步观察^[8-9]。近年来,随着对儿童性早熟研究的不断深入,中医药治疗ICPP的优势逐渐凸显^[10-11]。根据课题组的前期统计工作,ICPP患儿大多以阴虚火旺为主证,兼有痰湿壅滞或肝郁化火证,这一结果与《中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)》^[12]中所提出的辨证分型相一致,推荐使用知柏地黄丸为主方进行治疗。传统的知柏地黄丸方出自《医宗金鉴》,又名六味地黄丸加黄柏知母方,为治疗阴虚火旺证之名方。但是,在临床工作中本课题组发现,对于年龄偏大(>6岁),体型偏胖,处于性发育分期tanner 2~3期者,知柏地黄丸疗效欠佳^[13]。而在原方中加入夏枯草、柴胡,并减去具有补益作用的茯苓、山药、山茱萸后,大多数病例的临床表现都得到了改

善,本课题组将其命名为知柏地黄丸加减方:知母9g、黄柏9g、熟地黄24g、牡丹皮9g、泽泻9g、夏枯草9g、柴胡9g,该方能够有效抑制ICPP患儿性腺发育及骨龄进展,临床疗效确切。性发育由下丘脑-垂体-性腺轴的启动而激活,目前研究发现,由亲吻素-1(Kiss-1)编码的神经递质是下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)最重要的调控因子,Kiss-1与内源性G蛋白偶联受体54(GPR54)结合后能刺激GnRH的释放,从而发挥促性腺激素效应,GPR54是该效应实现表达的唯一介导受体^[14],国内外多项研究表明双酚A、环境改变等可影响GPR54、KISS-1 mRNA表达从而引起性发育^[15],但尚未有经中药干预后下丘脑细胞GPR54、Kiss-1 mRNA表达情况的研究。本研究旨在临床疗效与细胞水平2个层面上探讨知柏地黄丸加减治疗ICPP的作用,通过对下丘脑细胞GPR54、Kiss-1 mRNA表达水平的测定,对知柏地黄丸加减治疗ICPP患儿做更进一步的研究,以期指导临床。

1 临床资料

1.1 一般资料 收集河南省儿童医院中医科自2019年7月至2020年7月收治的ICPP女性患儿,共78例,无脱落病例。采用区组随机分组方法,将年龄按顺序相邻的6位患儿作为一个区组,由SAS9.1产生随机数字,采用随机信封法将研究对象分为2组。观察组39例,平均年龄(6.87 \pm 0.52)岁,骨龄(7.87 \pm 0.45)岁,平均身高(130.23 \pm 3.83)cm,平均体质量(22.57 \pm 3.41)kg,平均病程(5.9 \pm 1.2)个月;对照组39例,平均年龄(6.83 \pm 0.49)岁,骨龄(7.83 \pm 0.49)岁,平均身高(130.23 \pm 3.98)cm,平均体质量(22.69 \pm 4.05)kg,平均病程(6.1 \pm 1.4)个月;两组患儿在年龄、骨龄、身高、体质量、病程等方面差异无统计学意

义,具有可比性。本次研究所纳入病例经我院伦理委员会批准,批准号(2020)医伦审第97号。

1.2 西医诊断标准 按照中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组制定的《中枢性性早熟诊断与治疗共识(2015)》^[16]中CPP的标准进行诊断。第二性征提前出现:女孩8岁前,男孩9岁前出现第二性征发育。以女孩出现乳房结节,男孩睾丸容积增大为首表现。线性生长加速:年生长速率高于正常儿童。骨龄超前:骨龄超过实际年龄1岁或1岁以上。性腺增大:盆腔B超显示女孩子子宫、卵巢容积增大,且卵巢内可见多个直径>4 mm的卵泡;男孩睾丸容积≥4 mL。HPGA功能启动,血清促性腺激素及性激素达青春期水平。

1.3 中医辨证标准 按照《中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)》^[12]中证型阴虚火旺证拟定,主证为女孩提前出现乳房发育,阴道分泌物增多,阴唇发育,色素沉着,月经来潮;男孩提前出现睾丸增大,阴茎增粗,可有阴茎勃起,有胡须,喉结,阴囊皮肤皱褶增加、着色,变声,甚至有夜间遗精。次证为伴五心烦热、潮热、怕热、颧红、盗汗、烦躁易怒、咽干口渴、小便短黄、大便干结;舌诊为舌红绛、少苔或无苔;脉诊为脉细数。

1.4 纳入标准 符合阴虚火旺型性早熟的诊断标准;性发育分期 Tanner 2-3期;彩超示卵巢容积≥1 mL或可见多个径≥4 mm卵泡;骨龄超越年龄2年以内;患儿家长签署知情同意书同意入组者;女性患儿;年龄4~8岁。

1.5 排除标准 继发性性早熟;合并有严重的感染、恶性肿瘤、心肺肝肾功能疾病、血液系统疾病和严重精神系统疾病的患儿;染色体异常;研究期间因外感等原因服用其他药物者。

2 方法

2.1 药物及临床给药方法 观察组给予知柏地黄丸加减方颗粒剂(中药免煎颗粒,广东一方制药有限公司),药物组成:知母9 g(批号9037411),黄柏9 g(批号9105671),熟地黄24 g(批号A1081571),牡丹皮9 g(批号9069121),泽泻9 g(批号9080211),夏枯草9 g(批号9032531),柴胡9 g(批号9081521),1剂/d,分早晚2次冲服;对照组给予知柏地黄汤(中药免煎颗粒,广东一方制药有限公司),药物组成:知母6 g(批号9037411),黄柏6 g(批号9105671),熟地黄24 g(批号A1081571),山药12 g(批号8111601),山茱萸12 g(批号9036831),牡丹皮9 g(批号9069121),泽泻9 g(批号9080211),茯

苓9 g(批号9102381),1剂/d,分早晚2次冲服。疗程3月。

2.2 临床指标及测量方法 身高、体质量测量:入组患儿于治疗前、治疗3月后由同一测量人、同一时间段、同一身高测量仪、体重测量仪测量身高、体质量;检测骨龄,并由经验丰富的专科医师采用GP图谱法评估;乳核直径测量:由经验丰富的高级医师采用测量尺测量左乳核指数(LMNI)、右乳核指数(RMNI);子宫、卵巢检测:由超声科专科医师检测子宫体积(UV),左侧卵巢体积(LOV),右侧卵巢体积(ROV),左最大卵泡直径(LMFD),右最大卵泡直径(RMFD)。

2.3 血清检测指标及方法 分别于治疗前和治疗3月后,清晨患儿空腹情况下,对患儿静脉采血,取血清,血液采集后室温静置1 h,3 000 r·min⁻¹,4℃离心15 min(离心半径9.6 cm),分离血清,离心管分装,-80℃保存。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中促黄体激素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、催乳素(PRL)、雌激素(E₂)水平,操作方法参照ELISA试剂盒说明书。

2.4 疗效指标 参照《小儿内分泌学》^[17]《中药新药临床研究指导原则》^[18]《中医病证诊断疗效标准》^[19]中有关标准判定,治愈:乳房硬结完全消散缩小至B₁期,阴道分泌物完全消失,子宫卵巢恢复至幼稚水平,性激素恢复至青春期前水平,骨龄增长减慢,低于生活年龄及身高年龄增长。显效:乳房由B₃期明显缩小至B₂期,或由B₄期缩小至B₃期,乳房硬结部分消散,阴道分泌物较前减少明显,子宫卵巢较前缩小明显,性激素水平较前降低明显,骨龄增长等于生活年龄或身高年龄的增长。有效:乳房有缩小但不明显,阴道分泌物少量减少,子宫、卵巢容积稍减小,年龄增长等于骨龄增长。无效:乳房无缩小,阴道分泌物无减少,子宫卵巢无缩小,性激素水平无降低;骨龄增长快于生活年龄及身高年龄的增长。总有效率=(治愈例数+显效例数+有效例数)/总例数×100%。

2.5 安全性指标 监测治疗前后患儿的生命体征,肝、肾功能、血常规及不良反应。

2.6 细胞处理方法 GT1-7细胞属于产生GnRH的小鼠下丘脑细胞系,将其暴露于2种方剂提取物中24 h,可导致细胞生长受到抑制。将GT1-7细胞分为空白组、知柏地黄汤组和知柏地黄丸加减组。将对数生长期GT1-7细胞调整密度为4×10⁵个/mL,接种于96孔板中,每孔细胞悬液200 μL,培养24 h后

分别弃原培养基,空白组不加药物,知柏地黄汤组加入传统知柏地黄汤,知柏地黄丸加减组加入知柏地黄丸加减方,使两组药物处理的药物终质量浓度为1、2、3、4、5 g·L⁻¹。在24 h计算两者药物的最大抑制浓度,并以该浓度进行后续实验。两种方剂的半抑制浓度(IC₅₀)分别为28、25 mg·L⁻¹。将GT1-7细胞在传统知柏地黄汤(28 mg·L⁻¹)和知柏地黄丸加减方(25 mg·L⁻¹)中暴露4、8、12、16、20 h,用ELISA检测GnRH的分泌。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检查GnRH、Kiss-1、GPR54 mRNA表达,取药物处理前后GT1-7细胞,采用总RNA提取试剂盒提取总RNA,检测其纯度与浓度,采用反转录试剂盒将总RNA逆转录成cDNA,以此cDNA为模板进行PCR扩增,根据扩增曲线读取循环数(C_t),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照,计算各组细胞相关基因mRNA表达量,基因的相对表达量为2^{-ΔΔC_t}。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GnRH	上游GCCGCTGTTGTTCTGTT	17
	下游CTCCTCCTTGCCCATCT	
GPR54	上游TAGTCGGGAACACTACTGGTCAT	22
	下游GGTACGCAGCACAGAAGGAA	20
Kiss-1	上游GGGGGACCTCATCGTGCCAG	20
	下游CGCCTGCCGCTTTCCGTA	18
GAPDH	上游TGACTTCAACAGCGACACCCA	21
	下游CACCTGTTGCTGTAGCCAAA	

表2 两组患儿治疗前后FSH、LH、PRL、E₂、UV、ROV、LOV水平比较($\bar{x}\pm s, n=39$)

Table 2 Comparison of FSH, LH, PRL, E₂, UV, ROV, LOV levels between two groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s, n=39$)

组别	时间	FSH/U·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	PRL/μg·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	UV/cm ³	LOV/cm ³	ROV/cm ³
观察组	治疗前	3.23±0.14	1.69±0.17	7.22±0.07	21.18±0.20	2.45±0.30	1.35±0.24	1.35±0.24
	治疗后	1.93±0.04 ¹⁾	1.32±0.31 ¹⁾	6.05±0.07 ¹⁾	1.73±0.46 ¹⁾	2.33±0.28 ¹⁾	1.27±0.24 ¹⁾	1.29±0.24 ¹⁾
对照组	治疗前	3.17±0.18	1.63±0.25	7.23±0.13	21.12±0.17	2.45±0.33	1.35±0.33	1.34±0.25
	治疗后	1.87±0.21 ¹⁾	1.33±0.17 ¹⁾	6.09±0.21 ¹⁾	1.83±0.42 ¹⁾	2.37±0.31 ¹⁾	1.32±0.33 ¹⁾	1.31±0.25 ¹⁾

注:与本组治疗前比较¹⁾P<0.01(表4同)

3.2 两组患儿治疗前后LMNI、RMNI、LMFD、RMFD比较 与本组治疗前比较,治疗后两组患儿LMNI、RMNI、LMFD、RMFD水平均显著降低(P<0.01),治疗后与对照组比较,观察组LMNI、RMNI、LMFD和RMFD水平均显著降低(P<0.01)。见表3。

2.7 试剂和仪器 LH、FSH试剂盒(罗氏诊断产品上海有限公司,批号分别为17672964、18198301); PRL、E₂试剂盒(上海纪宁实业有限公司有限公司,货号分别为JN3363、JN4042); GnRH试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号CSB-E06880h); Kiss-1试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,货号E-EL-H6099); GPR54试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司,货号EH2126); GT1-7细胞(上海冠导生物工程有限公司,货号GD-C9819076), DMEM培养液、胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为11965-092、25200-056); 总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,货号分别为DP419、KR211、FP411]。CKX53型生物显微镜(奥林巴斯中国有限公司), Form371型CO₂恒温培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司), Light Cycler 96型PCR仪(Roche公司), SpectraMax iD3型多功能酶标仪(Molecular Devices公司)。

2.8 统计学方法 用SPSS 22.0统计软件和Graphpad 8.0.2进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,若被检数据符合正态齐性、方差齐,组间比较采用独立样本t检验,组内比较采用配对t检验,反之采用秩和检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 两组患儿治疗前后FSH、LH、PRL、E₂、UV、ROV和LOV比较 与本组治疗前比较,治疗后两组患儿FSH、LH、PRL、E₂、UV、ROV和LOV水平均降低(P<0.01)。见表2。

3.3 两组患者临床疗效比较 治疗后观察组临床疗效为89.74%(35/39),明显高于对照组的71.79%(28/39)($\chi^2=4.04, P<0.01$)。见表4。

3.4 两组患儿临床安全性比较 在本次临床研究过程中,两组患儿治疗前后肝肾功能、血常规均正常,观察组无不良反应情况,仅对照组有2例患儿出

表3 两组患儿治疗前后LMNI、RMNI、LMFD和RMFD水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=39$)

Table 3 Comparison of LMNI, RMNI, LMFD and RMFD between two groups before and after treatment ($\bar{x}\pm s, n=39$)

组别	时间	LMNI/cm ²	RMNI/cm ²	LMFD/mm	RMFD/mm
观察组	治疗前	8.47±1.59	8.70±1.52	6.76±0.59	6.87±0.33
	治疗后	3.02±0.32 ¹⁾	3.10±0.05 ¹⁾	3.05±0.52 ¹⁾	3.09±0.19 ¹⁾
对照组	治疗前	8.41±1.51	8.84±1.54	6.51±0.49	6.94±0.34
	治疗后	3.24±0.14 ^{1,2)}	3.34±0.15 ^{1,2)}	3.27±0.31 ^{1,2)}	3.31±0.21 ^{1,2)}

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P<0.01$;治疗后与对照组比较²⁾ $P<0.01$

表4 两组患儿临床疗效比较

Table 4 Comparison of clinical efficacy between two groups

组别	例(%)				
	治愈	显效	有效	无效	总有效
观察组	4(10.26)	9(23.07)	22(56.41)	4(10.26)	35(89.74) ¹⁾
对照组	2(5.13)	12(30.76)	14(35.89)	11(28.21)	28(71.79)

现服药后恶心,24 h后症状自行缓解,继续服药。两组患儿均未出现严重不良反应。

3.5 两种方剂对GT1-7细胞分泌GnRH的影响

与空白组比较,知柏地黄汤组与知柏地黄丸加减组GnRH水平均显著降低($P<0.01$),在同一作用时间与知柏地黄汤组比较,知柏地黄丸加减组GnRH水平显著降低($P<0.01$)。见表5。

3.6 2种方剂对GT1-7细胞性早熟相关基因表达的

表5 2种方剂对GT1-7细胞GnRH分泌抑制作用的比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of inhibitory effect of two prescriptions on GnRH secretion in GT1-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	时间/h	GnRH/U·L ⁻¹
空白组	4	189.67±13.87
	8	210.67±17.61
	12	327.00±29.14
	16	253.00±22.87
	20	172.00±12.53
知柏地黄汤组	4	113.00±20.07 ¹⁾
	8	116.67±19.14 ¹⁾
	12	102.33±19.01 ¹⁾
	16	82.67±20.31 ¹⁾
	20	70.33±19.65 ¹⁾
知柏地黄丸加减组	4	100.33±14.46 ¹⁾
	8	90.66±17.21 ¹⁾
	12	78.00±14.00 ¹⁾
	16	28.33±8.50 ^{1,2)}
	20	19.00±4.36 ^{1,2)}

注:与同时间空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与同时间知柏地黄汤组比较²⁾ $P<0.01$ (表6同)

影响 与空白组比较,知柏地黄汤组与知柏地黄丸加减组GnRH、Kiss-1、GPR54 mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$),在药物作用8 h,与知柏地黄汤组比较,知柏地黄丸加减组GnRH、Kiss-1、GPR54 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$)。见表6。

表6 不同药物处理GT1-7细胞中GnRH、Kiss-1和GPR54 mRNA表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of GnRH, Kiss-1 and GPR54 mRNA expression in GT1-7 cells treated with different drugs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	时间/h	GnRH	KiSS-1	GPR54
空白组	4	2.19±0.24	0.24±0.03	0.12±0.01
	8	4.25±0.75	0.44±0.06	0.34±0.02
	12	3.67±0.40	0.35±0.04	0.29±0.04
	16	2.23±0.16	0.24±0.04	0.22±0.03
知柏地黄汤组	4	2.02±0.13 ¹⁾	0.18±0.01 ¹⁾	0.09±0.01 ¹⁾
	8	3.25±0.16 ¹⁾	0.32±0.02 ¹⁾	0.20±0.08 ¹⁾
	12	2.23±0.27 ¹⁾	0.20±0.02 ¹⁾	0.19±0.08 ¹⁾
	16	1.79±0.23 ¹⁾	0.18±0.01 ¹⁾	0.17±0.07 ¹⁾
知柏地黄丸加减组	4	2.01±0.27 ¹⁾	0.19±0.02 ¹⁾	0.06±0.02 ¹⁾
	8	2.35±0.33 ^{1,2)}	0.22±0.04 ^{1,2)}	0.12±0.02 ^{1,2)}
	12	1.49±0.18 ^{1,2)}	0.13±0.03 ^{1,2)}	0.14±0.13 ^{1,2)}
	16	1.28±0.11 ^{1,2)}	0.11±0.01 ^{1,2)}	0.14±0.03 ^{1,2)}

4 讨论

根据性早熟的临床症状,可将其归为祖国医学“乳疔”“月经先期”等范畴^[20]。小儿肝常有余,脾肾常不足,若恣食肥甘厚腻及血肉有情之品,可助气长火、暗耗阴液,阴不制阳则阴阳失衡,肝经郁热则相火亢盛,从而导致肾失封藏,化生“天癸”,扰动血海则天癸早至,乳房乃肝经之分野,肝失疏泄、痰湿阻滞则见乳房硬结^[21]。因此,本病的病理基础乃阴虚火旺,病位源于肝肾,这与杨文庆等^[22]中医证素兼夹证研究结果相一致,几乎所有性早熟患儿均有阴虚火旺证的表现,故2015年的《中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)》^[12]中将阴虚火旺证作为性

早熟辨证的主要证型,治当滋阴补肾、清泻相火,推荐知柏地黄汤加减治疗该证。

传统知柏地黄汤中以熟地黄为君,味甘,质润入肾,为补肾阴之要药,正如《景岳全书·本草正》中言其可“大补血衰,滋培肾水,填骨髓,益真阴,专补肾中元气……秉至阴之德,气味纯正,故能补五脏之真阴”;佐以泽泻、牡丹皮、知母、黄柏,《本草再新》曰:泽泻可“泻肾经之邪火”,乃“利水第一良品”,能利能渗,利可泄肾浊、清相火,渗可燥湿坚阴,以防熟地黄滋腻之弊;牡丹皮微寒,性苦、辛,入血分而善于清透阴分伏热,为清泄虚热之要药;黄柏性苦寒,主入肾经而善泻下焦相火,《珍珠囊》云黄柏“补肾不足、壮骨髓”,指出其不但有清热之效,还有滋补作用;知母入三焦,善泻无根之火,同时性甘润可制黄柏之苦燥,上药合用,滋肾阴,泻相火,去火保阴,正本清源,共奏滋阴补肾、清泻相火之功。

性早熟患儿多因恣食肥甘厚腻及血肉有情之品而助湿生痰、脾胃受困,茯苓淡渗利水,其性趋下,东垣谓其为“阳中之阴,降而下”,不利于升发脾阳,正如其所创补中益气汤取四君子汤中的其他3味药而舍茯苓,意在与此,且《本草衍义补遗》云:“茯苓,仲景利小便多用之,此治暴新病之要药也,若阴虚者,恐未为宜”,故本课题组在原有知柏地黄汤基础上减去茯苓,同时舍去湿盛中满而有积滞者的山药,山茱萸性温而酸涩,多用恐留湿助热,亦去之,加入清泻肝热、软坚散结之夏枯草、柴胡,使滋阴而不至壅遏留湿,降火之余外加软坚散结之力,所成之方即本课题组所研究的知柏地黄丸加减方。

对传统知柏地黄汤和知柏地黄丸加减方治疗后的女性性早熟患儿临床特征进行统计分析后结果得出,尽管两者都可以降低血清性激素水平,但知柏地黄丸加减方可以更有效地抑制儿童的卵泡和乳房发育,延缓性发育进展。查阅文献,发现尽管柴胡、夏枯草可改善性早熟患儿临床症状的研究既往已有报道^[23],但山药、山茱萸等滋补之品对于性早熟患儿性发育进展的影响却鲜有人研究。根据梁博程等^[24]的实验,六味地黄丸中山药、山茱萸和茯苓所含化合物马兜铃酮、 α -考绕咖烯、甾醇、尿囊素、鞘氨醇A及齿孔醇等药效成分可通过血管紧张素原等作用靶点促进人体的雌激素水平,这可能是导致舍去山药、山茱萸、茯苓后的知柏地黄丸加减方能更有效抑制性发育进展的原因。

Kiss-1/GPR54 通路在调控女性生殖系统发育

方面起着重要作用,不仅可以有效激活 GnRH 神经元、控制青春期的定时发作,还能动态调节成年期性腺轴^[25-27]。在细胞水平上,本课题组选取 GT1-7 细胞作为知柏地黄丸加减方对 ICPP 作用的研究对象。GT1-7 细胞属于小鼠的下丘脑细胞系,在多种信号通路参与调控细胞活性、表型形态、基因表达、激素储存和脉冲分泌 GnRH 等,具有 GnRH 神经元的多种功能特性^[28-29],在调节 GnRH 分泌过程中不分泌其他激素和调控因子,是体外研究 ICPP 分子机制的理想模型^[30]。实验结果发现知柏地黄丸加减方在抑制 Kiss-1 和 GPR54 mRNA 基因水平的同时,对 GnRH 的分泌同样起着抑制作用,且较传统知柏地黄汤的抑制作用更强,提示知柏地黄丸加减方具有更好地抑制性发育的作用。LEE 等^[31]发现,单独使用夏枯草可以抑制 GT1-7 细胞中 GnRH mRNA 和 GnRH 蛋白的表达,此与本课题组的研究结果相一致,因此,本课题组有理由相信,知柏地黄丸加减方中的有效成分可能是通过 RNA 水平调控的 Kiss-1/GPR54 通路来抑制 GnRH 的合成、释放,从而起到抑制下丘脑-垂体-性腺轴的作用^[32],但仍需大样本数据进行相关性研究及验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BRITO V N, SPINOLA-CASTRO A M, KOCHI C, et al. Central precocious puberty revisiting the diagnosis and therapeutic management [J]. Arch Endocrinol Metab, 2016, 60(2): 163-172.
- [2] TUNG Y C. Central precocious puberty in girls: Increasing with time [J]. Pediatr Neonatol, 2021, 62(2): 127-128.
- [3] GANGAT M, RADOVICK S. Precocious puberty [J]. Minerva Pediatr, 2020, 72(6): 491-500.
- [4] LEE M H, KIM S H, OH M, et al. Age at menarche in Korean adolescents: Trends and influencing factors [J]. Reprod Health, 2016, doi: 10.1186/s12978-016-0240-y.
- [5] ZHAO L, ZHONG Y. Effects of central precocious puberty on physical and sexual development in children [J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2014, 16(5): 555-559.
- [6] 王卫平, 毛荫, 李廷玉, 等. 儿科学[M]. 第八版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 426-429.
- [7] PETER H. Commentary: Cognitive, emotional, and psychosocial functioning of girls treated with pharmacological puberty blockage for idiopathic

- central precocious puberty [J]. *Front Psychol*, 2017, doi: 10.3389/fpsyg.
- [8] DE SANCTIS V, SOLIMAN A T, DI MAIO S, et al. Long-term effects and significant adverse drug reactions (ADRs) associated with the use of gonadotropin-releasing hormone analogs (GnRHa) for central precocious puberty: A brief review of literature [J]. *Acta Biomed*, 2019, 90(3):345-359.
- [9] VURALLI D, GONC N E, OZON Z A, et al. Which parameters predict the beneficial effect of GnRHa treatment on height in girls with central precocious puberty [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2021, doi: 10.1111/cen.14420.
- [10] SUN W, HAN X, WANG Y, et al. Effectiveness of ZiYin Xiehuo granules and Zishen Qinggan granules on partial precocious puberty in girls: A multicenter, randomized, single-blind, controlled trial[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38(5):740-745.
- [11] LIN Y C, CHANG T T, CHEN H J, et al. Characteristics of traditional Chinese medicine usage in children with precocious puberty: A nationwide population-based study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205:231-239.
- [12] 林甦, 杨文庆, 俞建. 中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)[J]. *中医儿科杂志*, 2016, 12(13):1-5.
- [13] 孙凤平, 韩雪, 葛国岚. 知柏地黄丸化裁方治疗特发性性早熟疗效观察[J]. *中医药学报*, 2018, 46(2):86-89.
- [14] KERMAH B A, GORE A C. Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model [J]. *Neuroendocrinology*, 2012, 96(1):1-12.
- [15] LOSA-WARD S M, TODD K L, MCCAFFREY K A, et al. Disrupted organization of rfamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed to bisphenol A [J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(2):28.
- [16] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 中枢性性早熟诊断与治疗共识(2015)[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(6):412-417.
- [17] 颜纯, 王慕逖. 小儿内分泌学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006:316-317.
- [18] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002:366-388.
- [19] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012:234.
- [20] 任娟, 李辉, 叶进. 单纯乳房早发育的中医药治疗现状[J]. *中医儿科杂志*, 2019, 15(6):113-116.
- [21] 李珊珊, 赵芮莹, 佟庆. 柴嵩岩诊治小儿性早熟经验[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(5):124-125.
- [22] 杨文庆, 李淑闽, 林甦, 等. 女童特发性中枢性性早熟中医证素特点研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(1):31-34.
- [23] 郭春彦, 张萌, 柳静, 等. 基于文献的中药治疗女童性早熟用药规律研究[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(15):167-170.
- [24] 梁博程, 史晓林, 许超, 等. 基于中药系统药理学方法研究六味地黄丸治疗骨质疏松症的药效成分、作用靶点及作用特点[J]. *中医正骨*, 2019, 31(4):1-7.
- [25] TANG R, DING X, ZHU J. Kisspeptin and polycystic ovary syndrome [J]. *Front Endocrinol*, 2019, doi: 10.3389/fendo.
- [26] OSUKA S, NAKANISHI N, MURASE T, et al. Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary [J]. *Reprod Med Biol*, 2018, 18(2):151-160.
- [27] LEON S, BARROSO A, VAZQUEZ M J, et al. Direct actions of kisspeptins on GnRH neurons permit attainment of fertility but are insufficient to fully preserve gonadotropic axis activity[J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep19206.
- [28] SON Y L, UBUKA T, SOGA T, et al. Inhibitory action of gonadotropin-inhibitory hormone on the signaling pathways induced by kisspeptide in GnRH neuronal cell line, GT1-7 [J]. *FASEB J*, 2016, 30(6):2198-2210.
- [29] CHASON R J, KANG J H, GERKOWICZ S A, et al. GnRH agonist reduces estrogen receptor dimerization in GT1-7 cells: Evidence for cross-talk between membrane-initiated estrogen and GnRH signaling [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 404:67-74.
- [30] FICHNA P, FICHNA M, ZURAWA K, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutation in a sibling [J]. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(3):264-267.
- [31] LEE S H, KWAK S C, KIM D K, et al. Effects of Huang Bai (Phellodendri Cortex) and three other herbs on GnRH and GH levels in GT1-7 and GH3 cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 10.1155/2016/9389028.
- [32] CHENG M, YE X D, MIAO Y P, et al. Experimental study on therapeutic effect of Dabuyin Wan on true precocious puberty in female rats [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2013, 38(3):386-390.

[责任编辑 张丰丰]