



世界科学技术-中医药现代化

Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology

ISSN 1674-3849,CN 11-5699/R

《世界科学技术-中医药现代化》网络首发论文

题目： 滋肾安坤颗粒治疗免疫性 POI 小鼠疗效及对细胞因子 IL-2、IL-6、TGF- β 的影响

作者： 魏杜燃，彭桃，魏绍斌，吴扬，李茂雅，罗丹

收稿日期： 2022-07-02

网络首发日期： 2023-09-11

引用格式： 魏杜燃，彭桃，魏绍斌，吴扬，李茂雅，罗丹. 滋肾安坤颗粒治疗免疫性 POI 小鼠疗效及对细胞因子 IL-2、IL-6、TGF- β 的影响[J/OL]. 世界科学技术-中医药现代化. <https://link.cnki.net/urlid/11.5699.r.20230907.0902.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

滋肾安坤颗粒治疗免疫性POI小鼠疗效及对细胞因子IL-2、IL-6、TGF- β 的影响*

魏杜燃¹, 彭桃¹, 魏绍斌^{2**}, 吴扬¹, 李茂雅¹, 罗丹¹

(1. 成都中医药大学临床医学院 成都 610072; 2. 成都中医药大学附属医院 成都 610032)

摘要:目的 观察滋肾安坤颗粒治疗免疫性早发性卵巢功能不全(POI)小鼠疗效及对白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素6(IL-6)、转化生长因子 β (TGF- β)的影响。方法 筛选动情周期规律的雌性小鼠,以小鼠透明带3(ZP3)为抗原复制免疫性POI小鼠模型。设滋肾安坤颗粒低、高剂量进行治疗,以戊酸雌二醇为阳性对照。巴氏染色法观察动情周期,HE染色法观察卵巢组织形态学变化,ELISA法检测血清雌二醇(E2)、促卵泡激素(FSH)、抗苗勒管激素(AMH)、IL-2、IL-6、TGF- β 水平。结果 与空白对照组比较,模型组小鼠动情周期延长紊乱,卵巢间质炎性细胞浸润,生长卵泡减少,闭锁卵泡增多($P<0.05, P<0.01$);血清E2、AMH、TGF- β 水平降低($P<0.01$),血清FSH、IL-2、IL-6水平升高($P<0.01$)。与模型组比较,各治疗组动情周期紊乱、炎性细胞浸润有改善,其中滋肾安坤高剂量组生长卵泡增加,戊酸雌二醇组闭锁卵泡减少($P<0.05$);滋肾安坤高剂量组、戊酸雌二醇组血清E2、AMH、TGF- β 水平升高($P<0.05, P<0.01$),滋肾安坤高剂量组血清FSH、IL-6水平降低($P<0.05$),各治疗组血清IL-2水平降低($P<0.05, P<0.01$)。结论 滋肾安坤颗粒可改善免疫性POI小鼠血清生殖激素和IL-2、IL-6、TGF- β 水平,降低卵巢炎性反应,调节免疫紊乱,提高卵巢储备能力,发挥对卵巢的保护作用。

关键词:早发性卵巢功能不全 滋肾安坤颗粒 生殖激素 卵巢组织形态学 细胞因子

doi: 10.11842/wst.20220702004 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

早发性卵巢功能不全(Primary ovarian insufficiency, POI)是指女性40岁前卵巢功能减退,以月经异常,伴有促性腺激素升高和雌二醇降低为特征的一种临床综合征^[1]。POI患者常出现月经异常,生育能力低下,甚至可引起骨质疏松、心血管疾病和认知下降等长期后遗症^[2],严重影响患者的生活质量。目前西医主要采用激素替代疗法(HRT)缓解POI低雌激素相关症状,但需长期用药,而且其只能延缓卵巢功能的下降速度,不能逆转卵巢功能下降^[3],远期效果不佳。且长期的激素治疗易增加子宫内膜癌、乳腺癌及血栓栓塞性疾病的发生风险^[4]。中医药治疗POI从整体出发,辨证论治,调经助孕,其副作用小,患者接受性好,具有

临床应用和研究价值。

四川省名中医魏绍斌教授基于30多年的临床经验,结合《傅青主女科》“经水出诸于肾”及《临证指南医案》中言“女子以肝为先天”的理论,从肝肾辨治POI。魏教授认为POI以肝肾阴虚、精血亏少为核心病机,在《景岳全书》归肾丸的基础上加减研制了院内制剂滋肾安坤颗粒,用治POI取得了确切的临床疗效。POI的病因错综复杂,大多数POI病例的原因仍然未知。据调查约5%~30%的POI患者有自身免疫性疾病,而卵巢是由环境或遗传因素激活导致的自身免疫性疾病的常见靶点^[5-6],故自身免疫功能的异常可能与POI的发生发展有着密切联系。因此本实验通过建

收稿日期:2022-07-02

修回日期:2022-10-02

* 成都中医药大学附属医院科技发展基金课题医院制剂专项(2017-D-YY-75):医院制剂滋肾安坤颗粒的开发研究,负责人:魏绍斌。

** 通讯作者:魏绍斌,教授,主任医师,硕博研究生导师,主要研究方向:中医药防治妇科疾病。

立免疫性POI小鼠模型,采用具有滋肾益肝,养血填精作用的滋肾安坤颗粒治疗,初步探究其疗效和作用机制,为中药新药的研发提供实验研究的证据。

1 材料

1.1 实验动物

BALB/c 雌性小鼠,SPF级,7-8周龄,体质量18-22 g,均由成都达硕实验动物技术有限公司提供并饲养。动物许可证号:SCXK(川)2020-030,伦理审查编号:2020DL-011。

1.2 药物与试剂

滋肾安坤浸膏,处方含黄芪、党参、熟地黄、当归、山茱萸、盐杜仲、菟丝子、枸杞子、淮山药等,由成都中医药大学附属医院药剂科提供(浓度 $1.175\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$);戊酸雌二醇(规格:1 mg/片,进口药品注册证号:H20160679,国药准字J20171038,Delpharm Lille SAS生产)。小鼠透明带多肽粉末:小鼠透明带3(ZP3)的第330-342个氨基酸序列(NSSSSQFQIHGPR)(纯度>95%,批号:271036,上海吉尔生化有限公司);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(批号:F5881、F5506,美国Sigma公司);雌二醇(E2)、促卵泡激素(FSH)、抗苗勒管激素(AMH)、白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素6(IL-6)、转化生长因子- β (TGF- β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(批号:ZC-38046、ZC-38059、ZC-38503、ZC-38059、ZC-37988、ZC-39042,上海苗彩生物科技有限公司)等。

1.3 仪器

JT-12S自动组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司);RS36型全自动染色机(常州派斯杰医疗设备有限公司);酶标仪(美谷分子仪器有限公司);数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)等。

2 方法

2.1 免疫性POI小鼠模型建立

取4 mg ZP3透明带多肽粉末溶于10 mL双蒸水,配成 $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液与弗氏完全佐剂按1:1配制20 mL免疫试剂,与弗氏不完全佐剂按1:1配制20 mL免疫强化试剂^[7]。小鼠适应性喂养7天后,连续7天阴道脱落细胞涂片观察,筛选动情周期规律的小鼠随机分为45只造模和13只空白对照组。每只造模小鼠于造模第1天均取0.15 mL免疫试剂腹部及双后

脚掌皮下多点注射,并于第14天、第35天取0.15 mL免疫强化试剂同法加强免疫。第三次皮下注射7天后,连续10天观察小鼠动情周期,随机取3只模型组和3只空白对照组小鼠双侧卵巢组织观察其病理变化,判断造模情况。空白对照组小鼠同期使用等量生理盐水皮下多点注射。

2.2 分组及给药

将造模成功后的鼠随机分为模型组、滋肾安坤低剂量组、滋肾安坤高剂量组、戊酸雌二醇组各10只。根据体表面积比换算,以小鼠与人体药物等效剂量倍数为9倍,滋肾安坤低、高剂量组每天给药剂量分别为 $11\ 750\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (1倍于临床等效剂量)、 $23\ 500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (2倍于临床等效剂量),戊酸雌二醇组每天给药剂量为 $0.15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (1倍于临床等效剂量);模型组和空白对照组灌等量蒸馏水。各组同一时间段灌胃,每天1次,连续28天。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 一般情况

自造模第1天起每天观察并记录各组小鼠的精神状态、食欲、毛发、活动情况等,1周称1次体质量。

2.3.2 动情周期

各组均于灌胃治疗第19天起,每日9:00进行阴道涂片及巴氏染色,显微镜下观察有核和角化的上皮细胞与白细胞的比例,判断动情周期。

2.3.3 ELISA法检测血清E2、FSH、AMH、IL-2、IL-6、TGF- β 水平

小鼠末次灌胃结束后禁食12 h,每组随机选取8只小鼠眼眶静脉丛采血, 4°C 冰箱静置2 h,以 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低速离心15 min,取上层清液,冻存于 -80°C 冰箱待检。检测时严格按照按ELISA试剂盒说明步骤操作,在450 nm波长下测定小鼠血清中E2、FSH、AMH、IL-2、IL-6、TGF- β 吸光度值(OD值),绘制标准曲线图,计算E2、FSH、AMH、IL-2、IL-6、TGF- β 浓度。

2.3.4 卵巢组织形态学观察

小鼠采血后即取双侧卵巢,左侧卵巢冻存于 -80°C 冰箱备用,右侧卵巢置于10%甲醛固定12-24 h待检,最后颈椎脱臼处死小鼠。将固定卵巢组织经脱水、包埋、切片、HE染色、镜检观察卵巢组织最大切面的卵巢结构、各级卵泡数量、炎细胞浸润等。40倍镜下观察组织大体病变,采集100倍和400倍图片,进一步观察其更细微的病变。

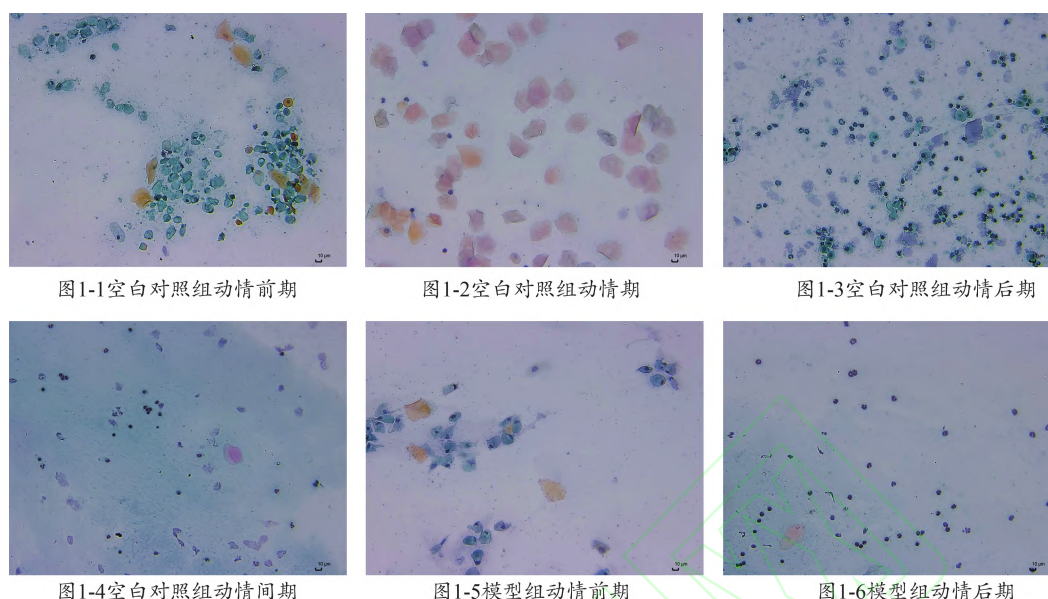


图1 空白对照组与模型组小鼠阴道细胞涂片

表1 小鼠生长卵泡及闭锁卵泡计数($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	生长卵泡(个)	闭锁卵泡(个)
空白对照组	7.83 ± 2.56	21.00 ± 4.00
模型组	5.00 ± 1.41 [#]	31.83 ± 4.83 ^{##}
滋肾安坤低剂量组	5.33 ± 1.20	30.33 ± 8.66
滋肾安坤高剂量组	7.33 ± 2.68 [*]	28.50 ± 7.84
戊酸雌二醇组	5.33 ± 1.21	23.17 ± 5.53 [*]

注:与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.4 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计,数据均使用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析,事后多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

空白对照组小鼠一般情况良好;造模小鼠逐渐精神欠佳、毛暗淡、反应淡漠、行动迟缓、双后脚掌出现不同程度肿胀,体质量较空白对照组减轻;另在第1次注射免疫试剂后,有2只造模小鼠死亡。治疗后,与模型组比较,滋肾安坤高剂量组和戊酸雌二醇组小鼠精神明显好转,毛发逐渐有光泽,活动变灵敏,双足肿胀也明显好转;滋肾安坤低剂量组小鼠一般情况略有改善;各治疗组体质量无明显差异。

3.2 动情周期观察

空白对照组小鼠动情周期为4-5天,动情前期以有核上皮细胞为主,动情期以如“落叶状”分布的角化

细胞为主,动情后期可见角化细胞及白细胞,动情间期以白细胞为主。与空白对照组比较,模型组小鼠动情周期延长紊乱,其一次动情周期约为7-9天,且多停留在动情前期和后期,但相对不典型。与模型组比较,各治疗组动情周期有所改善,其中滋肾安坤高剂量组和戊酸雌二醇组小鼠动情周期改善明显,其一次动情周期约为5-7天(见图1)。

3.3 卵巢组织形态学观察

空白对照组小鼠卵巢皮质和髓质清晰可辨,颗粒细胞排列整齐,可见各级正常发育的生长卵泡,闭锁卵泡少。与空白对照组比较,模型组小鼠卵巢结构不清晰,间质内出现不同程度炎性细胞浸润,颗粒层细胞变性坏死;其生长卵泡减少,闭锁卵泡增多,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组小鼠卵巢组织间质内炎细胞浸润和颗粒层细胞变性坏死有改善趋势,生长卵泡变多,闭锁卵泡减少;其中滋肾安坤高剂量组生长卵泡增加明显,戊酸雌二醇组闭锁卵泡减少明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表1,图2)。

3.4 滋肾安坤颗粒对免疫性POI小鼠血清E2、FSH、AMH水平的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠血清E2、AMH水平降低,FSH水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组E2、FSH、AMH水平均有好转趋势,其中滋肾安坤高剂量组和戊酸雌二醇组小鼠血

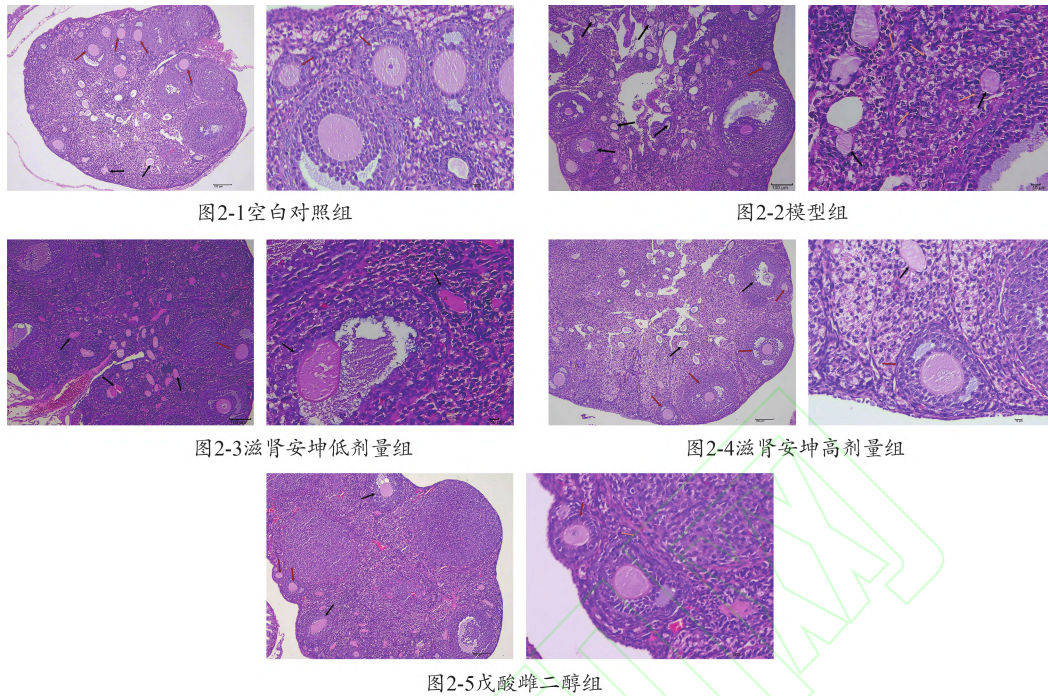


图2 各组小鼠卵巢组织形态学比较(左×100,右×400)

注:生长卵泡↑;闭锁卵泡↑;炎性细胞↑。

表2 小鼠血清 E2、FSH、AMH 水平($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	E2 浓度 ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	FSH 浓度 ($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AMH 浓度($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白对照组	48.46±2.54	55.10±2.73	3.00±0.14
模型组	42.61±4.20 ^{##}	62.95±4.61 ^{##}	2.71±0.11 ^{##}
滋肾安坤低剂量组	45.17±2.97	59.68±2.76	2.81±0.14
滋肾安坤高剂量组	46.27±2.30 [*]	58.91±3.93 [*]	2.92±0.19 [*]
戊酸雌二醇组	46.69±3.63 [*]	59.77±3.80	2.95±0.19 ^{**}

注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

清 E2、AMH 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);滋肾安坤高剂量组小鼠血清 FSH 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)(见表 2)。

3.5 滋肾安坤颗粒对免疫性 POI 小鼠血清 IL-2、IL-6、TGF-β 水平的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠血清 IL-2、IL-6 水平升高, TGF-β 水平下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,各治疗组小鼠血清 IL-2、IL-6、TGF-β 水平有改善趋势。其中滋肾安坤低、高剂量组及戊酸雌二醇组血清 IL-2 水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);滋肾安坤高剂量组 IL-6 水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);滋肾安坤高剂量组、戊酸雌二醇组 TGF-β 水平上升,差异具有统计学意义($P<0.05$)(见表 3)。

表3 小鼠血清 IL-2、IL-6、TGF-β 水平($\bar{x}\pm s, n = 8$)

组别	IL-2 浓度($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-6 浓度 ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TGF-β 浓度 ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白对照组	255.93±9.54	77.79±4.80	639.41±38.18
模型组	286.91±19.95 ^{##}	87.34±5.24 ^{##}	548.25±70.75 ^{##}
滋肾安坤低剂量组	271.28±14.85 [*]	82.20±4.80	578.66±40.81
滋肾安坤高剂量组	262.01±13.48 ^{**}	80.24±5.11 [*]	609.81±31.04 [*]
戊酸雌二醇组	269.74±15.86 [*]	82.00±8.66	603.31±35.19 [*]

注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

4 讨论

POI 是指女子未到“七七”之年而出现天癸早竭,年未老而经水先断,可归于祖国医学中月经过少、月经后期、闭经、不孕、经水早断等范畴。肾为先天之本,藏精,司元气,天癸亦藏于肾中,天癸早竭,则多责之于肾。《素问·阴阳应象大论》曰:“肾生骨髓,髓生肝”,而女子以肝为先天,故肾藏精,肝藏血,精血相生,肾阴与肝阴相互滋养。若肝肾阴伤,肾精不充,精血匮乏,则可发展为天癸早竭。魏绍斌教授应用归肾丸加减“异病同治”治疗卵巢功能减退类疾病(肾虚精亏型)的临床研究表明其可改善患者临床症状,增加子宫体积,改善 E2 和 FSH 激素水平^[8]。徐京晓等^[9]发现归肾丸联合芬吗通可有效改善卵巢功能减退患者

促排卵效果,提高患者的性激素及AMH水平,抑制炎症因子TNF- α 水平,且不良反应小。同时张圣江等^[10]研究表明归肾丸加减治疗肾虚型卵巢储备功能下降不孕症,不仅可改善临床症状及卵巢功能,还可提高妊娠率及免疫调节因子TGF- β 的表达。而滋肾安坤颗粒正是由归肾丸化裁而来,方用黄芪、党参益气升阳,鼓舞气血生化;熟地滋阴养血,益精填髓,为补血填精之良药;当归养血活血以调经;山茱萸、杜仲、枸杞子、菟丝子等肝肾同补;辅以淮山药等补后天以养先天,全方补而不滞,滋而不腻。诸药合用,借其阴阳互化,精生血长之力,奏滋肾益肝,养血填精之效。现代药理研究表明,滋肾安坤颗粒中的药物含有多糖类、黄酮类、植物甾醇类等成分,具有雌激素样活性,并可抑制机体炎症反应,调节免疫应答。如黄芪含有水溶性的黄芪多糖,在免疫调节、炎症等方面具有显著的生物活性^[11];熟地黄水提取物可以活化辅助性T细胞,促进IL-2、IFN- γ 等细胞因子的产生,进而促进其相关抗体的产生,发挥其免疫调节作用^[12];菟丝子总黄酮具有较好的雌激素活性,可明显促进性未成熟小鼠子宫增重,增加子宫内膜厚度等,调节下丘脑-垂体-性腺轴的紊乱状态^[13-14]。

动情周期异常是卵巢功能衰竭的显著特征^[15],血清AMH、FSH、E2水平也可作为评价小鼠卵巢功能的指标。其中E2主要由卵巢颗粒细胞生成,可调节卵泡的发育以及成熟,增强发育卵泡对促性腺激素的敏感性,促优势卵泡形成;作为转化生长因子 β (TGF- β)家族成员之一的AMH是由卵巢的窦前卵泡和小窦状卵泡的颗粒细胞合成并分泌,对卵泡的发育至关重要,可反映卵巢储备功能,在临床上常作为女性生育能力诊断和预后的标志物^[16]。卵巢功能不全可见原始卵泡缺乏或不足、卵泡生长发育异常、卵泡提前耗竭等。POI是病因复杂且进行性发展的疾病,机体发生自身免疫异常,产生抗透明带抗体是导致POI发病的一个重要原因^[17]。故本实验通过ZP3建立免疫性POI小鼠模型,检测显示其动情周期延长紊乱、血清FSH浓度上升、血清AMH和E2浓度下降以及生长卵泡减少、闭锁卵泡增多、炎细胞浸润等与人类自身免疫性POI的表现较为符合。本研究中各治疗组小鼠生殖激素水平和卵巢形态均有改善,其中滋肾安坤高剂量组对小鼠生长卵泡和促卵泡激素的改善趋势更为明显。其表明滋肾安坤颗粒能够在一定程度上改

善免疫性POI小鼠生殖激素水平和卵巢形态,提高卵巢储备能力。

免疫性POI发生相关的细胞因子有肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(INF)及白细胞介素(IL)家族、转化生长因子 β (TGF- β)等^[18]。其中IL-2主要由活化的CD4⁺T细胞产生,可诱导和激活机体多种免疫细胞发挥效应,是评价机体免疫功能的重要指标之一。而IL-6作为一种促炎和调节免疫的多效能细胞因子,参与机体的炎症反应和免疫应答。TGF- β 是一种有效的免疫抑制因子,通过影响细胞分化和细胞增殖而发挥作用^[19]。另有研究表明辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)与POI的发生发展存在一定相关性,其表达的失衡可引发免疫调节紊乱以致卵巢组织破坏、衰竭^[20]。进一步综合分析发现,Th17细胞和Treg细胞共享由TGF- β 介导的共同信号通路:在T细胞抗原受体/共刺激信号及TGF- β 与IL-6的刺激下可激活转录激活因子3(STAT3)进而诱导转录因子RAR相关孤儿受体(ROR) γ t的表达以驱动幼稚的CD4⁺T细胞分化为Th17细胞,以引起自身免疫和炎症;同时STAT3还通过下调叉头转录因子蛋白3(Foxp3)的表达来抑制Treg细胞分化;但在没有促炎细胞因子的情况下,TGF- β 驱动CD4⁺T细胞分化为具有负免疫调节功能的Treg细胞,产生抗炎细胞因子IL-10和TGF- β ,以抑制免疫反应及维持免疫稳态^[21]。而IL-2具有刺激传统T细胞以促进免疫和维持Treg细胞以控制免疫的双向调节作用^[22]。其免疫效应与各种亚型免疫细胞所处的状态,表面IL-2R的类型和强度、IL-2的来源和浓度等相关^[23]。如低剂量的IL-2在Treg细胞发育中不可或缺,通过调节STAT5通路和Foxp3表达来维持Treg细胞扩增和功能抑制免疫,而高剂量的IL-2同时可激活幼稚T细胞和NK细胞促进免疫^[24]。在本研究中模型组小鼠血清IL-2、IL-6水平显著升高,TGF- β 水平显著降低;而滋肾安坤颗粒高剂量组IL-2、IL-6水平明显下降,TGF- β 水平上升,且有优于戊酸雌二醇组的趋势。由此推测,免疫性POI的发生发展可能与IL-2、IL-6以及TGF- β 的表达具有相关性,一定程度上体现了现代免疫学所指出的免疫失衡是疾病的根本原因;而滋肾安坤颗粒可能通过影响IL-2、IL-6、TGF- β 水平,在免疫和炎症之间取得平衡,从而降低免疫性POI小鼠卵巢炎性反应,调节免疫紊乱,对卵巢起到保护作用。

综上所述,滋肾安坤颗粒可改善免疫性POI小鼠血清生殖激素和IL-2、IL-6、TGF- β 水平,降低卵巢炎性反应,调节免疫紊乱,提高卵巢储备能力,发挥对卵巢的保护作用。但是该实验中滋肾安坤颗粒尚未达到逆转卵巢功能下降的效果,提示POI应注重未病先防,既病防变;同时可考虑延长治疗时间,以进一步提高疗效。考虑到POI患者发病多为育龄期女性,其生

育能力的改善对患者至关重要,而中医药具有调经助孕种子的优势,故有必要进一步研究其对远期妊娠率的影响。由于中药是通过多成分、多靶点、多通路调控疾病,以达到整体系统的治疗,加之POI的发病因素复杂,不仅局限于卵巢炎性反应、免疫功能紊乱,因此,针对其他病因的中医药作用靶点和疗效机制还有待进一步的实验研究以探索和证实。

参考文献

- Webber L, Davies M, Anderson R, et al. ESHRE Guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*, 2016, 31(5):926-937.
- Panay N, Anderson R A, Nappi R E, et al. Premature ovarian insufficiency: An international menopause society white paper. *Climacteric*, 2020, 23(5):426-446.
- 邓敦, 吴阳, 申思楠, 等. 护卵汤对早发性卵巢功能不全模型小鼠SIRT1/NF- κ B/p53/p21通路的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(15):36-42.
- 曹金翔, 吴洁. 早发性卵巢功能不全激素补充治疗利弊评价. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36(3):227-230.
- Chen H, Song L, Xu X, et al. The effect of icariin on autoimmune premature ovarian insufficiency via modulation of Nrf2/HO-1/Sirt1 pathway in mice. *Reprod Biol*, 2022, 22(2):100638.
- Szeliga A, Calik-Ksepka A, Maciejewska-Jeske M, et al. Autoimmune diseases in patients with premature ovarian insufficiency—our current state of knowledge. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2594.
- 朱玲, 章雅琼, 彭艳丽, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢GDF-9/Smad2信号转导的影响. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(11):1367-1371.
- 袁文姣. 归肾丸加减“异病同治”治疗卵巢功能减退类疾病(肾虚精亏型)的临床研究. 成都: 成都中医药大学硕士学位论文, 2015.
- 徐京晓, 张吟, 茅菲. 归肾丸对卵巢功能减退患者的临床疗效观察. *中药材*, 2020, 43(3):738-740.
- 张圣江, 周杨, 高明松, 等. 归肾丸加减治疗肾虚型卵巢储备功能下降不孕症疗效及对血GDF-9、BMP-10影响. *中国计划生育学杂志*, 2022, 30(2):291-295.
- 芮雯, 李婵艺, 陈宏远. 黄芪多糖的结构表征与生物活性研究进展. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(2):264-270.
- 严斐霞, 谢永艳, 陈畅, 等. 熟地黄炮制过程中的化学成分变化和药理作用研究进展. *时珍国医国药*, 2021, 32(10):2493-2495.
- 张馨元, 孙向明, 宋辉, 等. 菟丝子总黄酮的提取方法筛选及其雌激素活性研究. *中国药理学杂志*, 2021, 56(1):23-28.
- 苗明三, 彭孟凡, 闫晓丽. 菟丝子总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠模型的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5):143-150.
- Zhang H Q, Luo Q Q, Lu X Y, et al. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):20.
- Sinha N, Driscoll C S, Qi W J, et al. Anti-Müllerian hormone treatment enhances oocyte quality, embryonic development and live birth rate. *Biol Reprod*, 2022, 107(3):813-822.
- 靳琦, 尹平, 郑慧敏. 早发性卵巢功能不全动物模型研究概述. *中华中医药杂志*, 2022, 37(1):305-308.
- 赵蕾, 李培培, 韩璐. 补肾中药治疗免疫性早发性卵巢功能不全的机制研究进展. *山东医药*, 2020, 60(17):109-111.
- Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5):a021873.
- 何玲, 刘慧萍, 张国民, 等. Th17/Treg细胞与卵巢早衰的关系. *中华中医药学刊*, 2017, 35(4):897-899.
- Lee G R. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3):730.
- Abbas A K, Trotta E, Simeonov D R, et al. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol*, 2018, 3(25):eaat1482.
- 郭旭雪, 聂汉祥, 陈千慧, 等. 白细胞介素2与调节性T细胞介导的免疫耐受. *国际免疫学杂志*, 2017, 40(4):424-428.
- Glassman C R, Su L, Majri-Morrison S S, et al. Calibration of cell-intrinsic interleukin-2 response thresholds guides design of a regulatory T cell biased agonist. *eLife*, 2021, 10:e65777.

Efficacy of Zishen Ankun Granules in Treatment of Mice with Immune Premature Ovarian Insufficiency and Its Influence on Cytokines IL-2, IL-6 and TGF- β

Wei Duran¹, Peng Tao¹, Wei Shaobin², Wu Yang¹, Li Maoya¹, Luo Dan¹

(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;

2. Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610032, China)

Abstract: Objective To observe efficacy of Zishen Ankun Granules in treatment of mice with immune premature ovarian insufficiency (POI) and its influence on cytokines interleukin 2 (IL2), interleukin 6 (IL6) and transforming growth factor- β (TGF- β) Methods Screening female mice with regular estrus to establish immune POI mice model with zona pellucida 3 (ZP3) as antigen. Low and high doses of Zishen Ankun Granules were set up for treatment, and estradiol valerate was used as a positive control. Observing the estrous cycle of mice by papanicolaou staining, observing the morphological changes of ovarian tissues by HE staining, and detecting serum estradiol (E2), follicle-stimulating hormone (FSH), anti mullerian hormone (AMH), IL2, IL6 and TGF- β levels by ELISA. Results Compared with the blank control group, the estrous cycle of model group was prolonged and disordered, inflammatory cell were infiltrated in the ovarian stroma, growth follicles were decreased, and atresia follicles were increased ($P<0.05$, $P<0.01$); serum E2, AMH and TGF- β levels were decreased ($P<0.01$), serum FSH, IL2 and IL6 levels were increased ($P<0.01$). Compared with model group, the estrous cycle disorder and inflammatory cell infiltration were improved in each treatment group, in which the growing follicles increased in the high dose group of Zishen Ankun and the atretic follicles decreased in the estradiol valerate group ($P<0.05$); serum E2, AMH and TGF- β levels were increased in Zishen Ankun high dose group and estradiol valerate group ($P<0.05$, $P<0.01$), Serum FSH and IL6 levels in Zishen Ankun high-dose group were decreased ($P<0.05$), Serum IL2 levels was decreased in each treatment group ($P<0.05$, $P<0.01$). Conclusion Zishen Ankun granules can improve the levels of serum reproductive hormone, IL2, IL6 and TGF- β in immune POI mice, reduce the inflammatory response of ovary, regulate immune disorders, improve the ovarian reserve capacity, and play a protective role on the ovary.

Keywords: Premature ovarian insufficiency, Zishen Ankun granules, Reproductive hormone, Ovarian histomorphology, Cytokines

(责任编辑: 李青)