

同仁乌鸡白凤丸干预免疫性卵巢早衰模型小鼠的机制研究

张思玉, 陈霞, 刘丹, 朱晓光, 李晋生*

北京同仁堂股份有限公司科学研究所, 北京 100079

摘要: **目的** 探讨同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠的治疗作用及其作用机制。 **方法** 采用皮下多点注射小鼠透明带多肽 3 建立免疫性卵巢早衰小鼠模型。将小鼠随机分为对照组、模型组、戊酸雌二醇片组、同仁乌鸡白凤丸 (1.35、2.70、5.40 g/kg) 组, 各组连续 ig 给药 8 周。测定小鼠血浆雌二醇 (E₂)、卵泡刺激素 (FSH)、促性腺激素释放激素 (GnRH)、抗缪勒管激素 (AMH) 水平, 观察卵巢组织病理学改变并计数各级卵泡数, 检测小鼠脾细胞悬液 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞数量及比例, 比较小鼠卵巢组织 B 细胞淋巴瘤-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)、血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 表达的变化情况。 **结果** 与模型组比较, 同仁乌鸡白凤丸 1.35 g/kg 组小鼠血浆 E₂、FSH、GnRH 水平明显升高, 同仁乌鸡白凤丸 2.70、5.40 g/kg 组小鼠血浆 GnRH 水平明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。同仁乌鸡白凤丸 5.40 g/kg 组小鼠血浆 AMH 水平明显升高 ($P < 0.05$); 同仁乌鸡白凤丸各剂量组原始卵泡数、总卵泡数显著升高 ($P < 0.01$); 同仁乌鸡白凤丸 2.70、5.40 g/kg 组初级卵泡数、次级卵泡数显著升高, 闭锁卵泡数显著降低 ($P < 0.01$)。同仁乌鸡白凤丸 1.35 g/kg 组小鼠脾细胞悬液中 CD8⁺ 细胞百分比明显升高, CD4⁺/CD8⁺ 明显降低; 同仁乌鸡白凤丸 2.70 g/kg 组小鼠脾细胞悬液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例均明显升高、CD4⁺/CD8⁺ 明显降低; 同仁乌鸡白凤丸 5.40 g/kg 组小鼠脾细胞悬液中 CD8⁺ 细胞比例明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。同仁乌鸡白凤丸各剂量组小鼠卵巢 Bax 蛋白相对表达水平、Bax/Bcl-2 均明显降低 ($P < 0.01$); 同仁乌鸡白凤丸 1.35、2.70 g/kg 组小鼠卵巢 Caspase-3 蛋白相对表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。同仁乌鸡白凤丸 2.70、5.40 g/kg 组小鼠卵巢 VEGF 蛋白相对表达水平和同仁乌鸡白凤丸 1.35、2.70 g/kg 组小鼠卵巢 bFGF 蛋白相对表达水平均明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。 **结论** 同仁乌鸡白凤丸能够调节免疫性卵巢早衰引起的性激素水平紊乱, 促进卵巢功能恢复, 提高卵巢储备功能, 可能与调节机体免疫失衡、抑制卵巢细胞凋亡、调节相关生长因子表达水平等因素相关。

关键词: 同仁乌鸡白凤丸; 卵巢早衰; 免疫调节; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号: R287.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)03-0579-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.03.004

Mechanism of Tongren Wuji Baifeng Pills in intervening in immune premature ovarian failure model mice

ZHANG Siyu, CHEN Xia, LIU Dan, ZHU Xiaoguang, LI Jinsheng

Beijing Tongrentang Co., Ltd. Scientific Research Institute, Beijing 100079, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Tongren Wuji Baifeng Pills on immune premature ovarian failure model mice and its mechanism. **Methods** The mouse model of immune premature ovarian failure was established by subcutaneous injection of mouse zona pellucida polypeptide 3. Mice were randomly divided into control group, model group, Estradiol Valerate Tablets group, and Tongren Wuji Baifeng Pills (1.35, 2.70, 5.40 g/kg) groups, and administered by gavage for 8 weeks. The levels of E₂, FSH, GnRH, and AMH in mice were measured. Pathological changes of ovarian tissues were observed and the number of follicles at all levels was counted. The number and percentage of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ cells in mouse spleen cell suspension were detected. The expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, VEGF, and bFGF in mice ovarian tissues were compared. **Results** Compared with the model group, the plasma levels of E₂, FSH and GnRH in the Tongren Wuji Baifeng Pills 1.35 g/kg group were significantly increased, while the plasma GnRH levels in the Tongren Wuji Baifeng Pills 2.70 and 5.40 g/kg groups were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). The plasma AMH

收稿日期: 2025-11-25

基金项目: 北京市科技计划项目 (Z241100009024041)

作者简介: 张思玉, 女, 工程师, 研究方向为中药药理毒理学。E-mail: 379729210@qq.com

*通信作者: 李晋生, 男, 研究员, 研究方向为中药药理及安全性评价。E-mail: yarily@163.com

level in the Tongren Wuji Baifeng Pills 5.40 g/kg group was significantly increased ($P < 0.05$), the number of primary follicles and total follicles in the all dose of Tongren Wuji Baifeng Pills group was significantly increased ($P < 0.01$), the number of primary and secondary follicles and the number of closed follicles in the Tongren Wuji Baifeng Pills 2.70 and 5.40 g/kg groups were significantly increased, while the number of closed follicles was significantly decreased ($P < 0.01$). The percentage of CD8⁺ cells in the spleen cell suspension of mice in the Tongren Wuji Baifeng Pills 1.35 g/kg group was significantly increased, and the CD4⁺/CD8⁺ ratio was significantly decreased, the percentages of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells in the spleen cell suspension of mice in the Tongren Wuji Baifeng Pills 2.70 g/kg group were significantly increased, and the CD4⁺/CD8⁺ ratio was significantly decreased, the percentage of CD8⁺ cells in the spleen cell suspension of mice in the Tongren Wuji Baifeng Pills 5.40 g/kg group was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The protein relative expression levels of Bax and Bax/Bcl-2 in the ovaries of mice in each dose group of Tongren Wuji Baifeng Pills were significantly decreased ($P < 0.01$), the protein relative expression levels of Caspase-3 in the ovaries of mice in the Tongren Wuji Baifeng Pills 1.35 and 2.70 g/kg groups were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein relative expression levels of VEGF and bFGF protein in the ovaries of mice in the Tongren Wuji Baifeng Pills 2.70 and 5.40 g/kg groups and the Tongren Wuji Baifeng Pills 1.35 and 2.70 g/kg groups were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Tongren Wuji Baifeng Pills can regulate the sexual hormone level disorder caused by immune premature ovarian failure, promote the recovery of ovarian function, and improve ovarian reserve function, which may be related to regulating immune imbalance, inhibiting ovarian cell apoptosis, regulating the expression level of related growth factors.

Key words: Tongren Wuji Baifeng Pills; premature ovarian failure; immune regulation; Bcl-2; Bax; Caspase-3; VEGF; bFGF

卵巢早衰是指卵巢功能衰竭所导致的 40 岁之前即闭经的现象,特点是原发或继发闭经伴随血促性腺激素水平升高和雌激素水平降低的一种病症。卵巢早衰是导致女性不孕症的一个重要原因,但病因和发病机制尚不十分明确,为妇科疑难杂症。研究显示 10%~30%的卵巢早衰与自身免疫性疾病相关,且近年来自身免疫性卵巢早衰的发病率呈升高趋势^[1]。对于因免疫性因素导致的卵巢早衰患者,目前西医临床尚没有明确的治疗方案,主要以激素替代疗法和免疫调节剂治疗为主,但都存在一定的不良反应。

目前认为,卵巢颗粒细胞是卵泡发育重要的支持细胞,颗粒细胞功能减退或凋亡可能是卵巢功能下降的原因^[2]。B 细胞淋巴瘤-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)信号通路是细胞凋亡(程序性细胞死亡)中一条核心的线粒体依赖途径。其中,Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡,促进卵泡生长发育;Bax 蛋白促进细胞凋亡,加速卵泡闭锁,二者对卵巢卵泡各阶段的生长发育具有重要调节作用^[2]。Bcl-2 家族蛋白与 Caspase-3 蛋白之间的动态平衡又是 Bcl-2/Bax/ Caspase-3 信号通路调控细胞凋亡的核心。卵巢血流是维持卵泡生长、类固醇激素分泌及卵泡对促性腺激素敏感性的重要因素,血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)为血管内皮生长因子,可修复受损卵泡,改善受损卵巢血管通透性,尤其可以特异性促进类固醇激素生成器官的细胞增殖

存活和趋化,促进新生血管生成^[3]。因此调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路和促进新生血管生成可作为卵巢早衰的潜在治疗靶点。同仁乌鸡白凤丸可显著升高去势大鼠血清雌二醇含量^[4]。为探讨同仁乌鸡白凤丸治疗卵巢早衰的临床应用潜力,本研究以性激素水平、卵巢储备功能、T 淋巴细胞亚群、细胞凋亡信号通路及相关生长因子为切入点,通过动物实验研究观察同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰小鼠模型的影响及其可能的作用机制,旨在为药物用于治疗卵巢早衰提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,体质量 17~19 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证编号 110322221100673137,许可证编号 SCXK(京)2019-0008。实验动物饲养于屏障环境动物室内,日光灯照明,12 h 明暗周期,自由饮水、摄食,温度 20~26 °C,相对湿度 40%~70%。本实验经北京中研同仁堂医药研发有限公司实验动物福利伦理委员会审批通过(编号 YJY-2022-032901)。

1.2 药物和试剂

同仁乌鸡白凤丸(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂,9 g/丸,批号 22011128);戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司,每片含主要成分戊酸雌二醇 1 mg,批号 716A)。

小鼠透明带多肽 3(pZP3)第 330~342 个氨基酸序列(NSSSSQFQIHGPR,批号 AP206550)购自

安徽专肽生物技术有限公司；弗式完全佐剂（批号 SLCL9648）、弗式不完全佐剂（批号 SLCM4486）购自 Sigma 公司；雌二醇（E₂，批号 C0212040267）、卵泡刺激素（FSH，批号 C0228060286）、抗缪勒管激素（AMH，批号 C1021091089）ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司；促性腺激素释放激素（GnRH，批号 072405001107390725）ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司；APC 鼠 CD3 抗体（批号 100236）、PerCP 鼠 CD4 抗体（批号 100432）购自 Biolegend 公司；PE 鼠 CD8a 抗体（批号 E-AB-F1104D）购自 Elabscience 公司；Bcl-2 抗体（货号 A00040-1）购自 BOSTER 公司；Bax 抗体（货号 14796S）、Caspase-3 抗体（货号 14220S）、bFGF 抗体（货号 46879S）购自 Cell Signaling Technology；VEGF 抗体（abs131208）购自 Absin 公司。

1.3 实验仪器

3K15 高速冷冻离心机（SIGMA）；Epoch 2 酶标仪（BioTek Instruments, Inc.）；ACEA 流式细胞仪 Novocyte（安捷伦公司）；JXFSTPRP-CLN 冷冻研磨仪（上海净信实业发展有限公司）；Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统（美国 LICOR 公司）；Bio-Rad 小型垂直电泳转印系统（美国伯乐公司）。

2 方法

2.1 模型制备与分组

实验动物适应性喂养后，小鼠按体质量随机分为对照组和模型组。将 10 mg pZP3 粉末，加入 10 mL 生理盐水配成溶液，与弗式完全佐剂按照 1:1 配制成免疫试剂，与弗式不完全佐剂按照 1:1 配制成免疫强化试剂。模型组于第 0 天每只小鼠 0.15 mL 免疫试剂注射双后脚掌处及腹部皮下，第 14 天给与免疫强化试剂 0.15 mL 再次注射双后脚掌处及腹部皮下加强免疫，建立免疫性卵巢早衰模型^[5]。连续 12 d 对所有小鼠进行阴道脱落细胞涂片，光学显微镜下观察小鼠动情周期变化情况，出现动情周期紊乱表示模型制备成功。将造模组造模成功的小鼠按体质量随机分为模型组、戊酸雌二醇片（0.15 mg/kg）组、同仁乌鸡白凤丸高（1.35、2.70、5.40 g/kg）组，每组各 12 只。

2.2 药物干预

大鼠给药量按照人与动物给药剂量换算方法进行药物剂量换算，同仁牛黄清心丸说明书人服用剂量是每日 18 g，成人体质量按照 60 kg 计算，人

与小鼠换算系数为 9，则折算大鼠的灌服剂量为 18 g/60 kg×9=2.70 g/kg，此临床等效剂量设为中剂量，以中剂量的 2 倍 5.4 g/kg 为高剂量，以中剂量的 1/2 倍 1.35 g/kg 为低剂量；戊酸雌二醇片说明书人服用剂量是每日 1 mg，折算小鼠的 ig 剂量为 1 mg/60 kg×9=0.15 mg/kg。各给药组小鼠分别 ig 给与相应药物，对照组和模型组小鼠 ig 给与等体积纯化水，连续给药 8 周。

2.3 观察指标

末次给药后，用异氟烷吸入麻醉小鼠，经门静脉取血置肝素抗凝管中，以 1 000×g 离心 15 min 取血浆，解剖取小鼠卵巢、脾。将脾组织置细胞培养基中，进行流式细胞术检测。将一侧卵巢置多聚甲醛固定液中，苏木精-伊红（HE）染色进行组织病理学检查，另一侧卵巢置-80 °C 冰箱冷冻保存，用于检测其他指标。（1）血浆性激素水平：按照 ELISA 检测试剂盒说明书，测定小鼠血浆中 E₂、FSH、GnRH 水平。（2）卵巢储备功能：按照 ELISA 检测试剂盒说明书，测定血浆中 AMH 水平。小鼠卵巢组织置多聚甲醛固定液中固定 48 h 后，逐级酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋、切片（厚度 0.4 μm）。切片脱蜡、水化、HE 染色，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封固，在光学显微镜下拍照采集图像，计数各级卵泡数量，观察卵巢组织形态变化。（3）T 淋巴细胞亚群：制备脾细胞悬液，经组织消化、淋巴细胞分离、细胞染色，采用流式细胞仪检测脾细胞悬液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞数量及百分比。（4）Western blotting 法检测卵巢组织中细胞凋亡因子和相关生长因子蛋白表达水平：取小鼠卵巢组织用 RIPA 组织/细胞裂解液提取总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度，将各个样本蛋白浓度调整一致。10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质的样品，然后转移到 NC 膜上。室温封闭，洗膜，随后加入 Bcl-2、Bax、Caspase-3、VEGF、bFGF、β-肌动蛋白（β-actin）一抗，4 °C 孵育，洗膜后加入带荧光的二抗室温孵育，洗膜，运用 Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光双功能成像系统分析图像，检测时以 β-actin 为内参。

2.4 统计学方法

运用 SPSS V27.0 进行分析，数据使用 $\bar{x} \pm s$ 进行记录。数据符合正态分布，多个样本均数比较采用单因素方差分析（one-way-ANOVA），方差齐者用 LSD 检验，不齐者用独立样本 *t* 检验，计数资料

用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 血浆性激素水平

与模型组比较, 同仁乌鸡白凤丸 5.40 g/kg 组小鼠血浆 E₂、FSH、GnRH 水平明显升高, 同仁乌鸡白凤丸 1.35、2.70g/kg 组小鼠血浆 GnRH 水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见表 1。

3.2 卵巢储备功能

组织病理学结果显示, 模型组小鼠卵巢出现典型的早衰情况, 主要表现为: 卵巢皮质中不同发育阶段的卵泡(原始、初级、次级卵泡)显著减少, 闭锁卵泡数量较对照组明显增加; 部分样本的卵泡腔形态结构异常, 呈现不规则形态, 卵泡腔内颗粒层细胞欠丰富且排列紊乱。给予同仁乌鸡白凤丸各

剂量组治疗后, 小鼠卵巢组织结构与模型组相比均有不同程度的改善, 表面上皮和白膜层完整, 薄层结缔组织致密, 卵泡腔形态结构正常, 颗粒层丰富; 卵泡计数情况与模型组相比, 皮质中原始、初级卵泡、次级卵泡数目均明显增多, 闭锁卵泡数量减少。可见同仁乌鸡白凤丸对该试验条件下造成的小鼠卵巢早衰具有一定的治疗改善作用, 能够提高模型小鼠卵巢储备功能, 见图 1。

与模型组比较, 同仁乌鸡白凤丸 5.40 g/kg 组小鼠血浆 AMH 水平明显升高 ($P < 0.05$); 同仁乌鸡白凤丸各剂量组原始卵泡数、总卵泡数均显著升高 ($P < 0.01$); 同仁乌鸡白凤丸 2.70、5.40 g/kg 组初级卵泡数、次级卵泡数显著升高, 闭锁卵泡数显著降低 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠血浆性激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of Tongren Wuji Baifeng Pills on plasma sex hormone levels in immune-induced ovarian premature senescence model mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	FSH/(ng·mL ⁻¹)	GnRH/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	40.08±13.34	4.00±1.48	422.79±132.00
模型	—	26.56±10.65**	2.15±0.95**	291.80±138.68*
戊酸雌二醇片	1.5×10 ⁻⁴	51.70±15.69##	4.44±1.39##	511.36±245.70#
同仁乌鸡白凤丸	1.35	32.40±11.34	2.19±1.06	715.40±148.13##
	2.70	29.60±10.71	1.65±0.61	452.58±190.05#
	5.40	37.41±9.14#	4.11±1.11##	448.27±166.73#

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

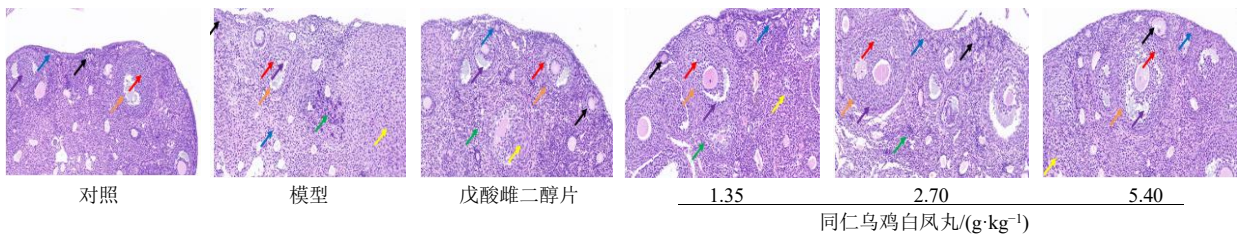


图 1 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢组织病理学变化的影响 (HE, ×20)

Fig. 1 Effect of Tongren Wuji Baifeng Pills on the histological changes of the ovarian tissue in mice with autoimmune ovarian premature aging model (HE, ×20)

表 2 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠血浆 AMH 水平及卵巢组织各级卵泡计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of Tongren Wuji Baifeng Pills on plasma AMH levels and ovarian follicle counts in immune-induced ovarian premature senescence model mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AMH/(ng·mL ⁻¹)	原始卵泡数	初级卵泡数	次级卵泡数	闭锁卵泡数	总卵泡数
对照	—	0.51±0.29	9.17±2.33	13.50±3.87*	11.67±1.44	1.25±0.97	35.58±2.31
模型	—	0.24±0.10**	0.58±0.79**	7.08±1.93*	5.67±1.50**	4.50±1.31**	17.83±2.17**
戊酸雌二醇片	1.5×10 ⁻⁴	0.45±0.20##	8.83±1.53##	12.92±2.35##	9.83±1.64##	2.25±1.22##	33.83±3.19##
同仁乌鸡白凤丸	1.35	0.27±0.22	6.33±1.83##	7.25±2.63	7.25±2.30	3.75±1.48	24.58±5.37##
	2.70	0.22±0.13	7.42±2.35##	10.25±1.86##	9.25±2.42##	2.08±1.08##	29.00±2.92##
	5.40	0.33±0.12#	7.92±1.08##	13.17±2.41##	10.92±2.91##	2.42±1.00##	34.42±2.47##

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

3.3 T 淋巴细胞亚群

与模型组比较, 同仁乌鸡白凤丸 1.35 g/kg 组小鼠脾细胞悬液中 CD8⁺ 细胞比例明显升高, CD4⁺/CD8⁺ 明显降低; 同仁乌鸡白凤丸 2.70 g/kg 组

小鼠脾细胞悬液中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例均明显升高、CD4⁺/CD8⁺ 明显降低; 同仁乌鸡白凤丸 5.40 g/kg 组小鼠脾细胞悬液中 CD8⁺ 细胞比例明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见表 3。

表 3 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠脾 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 3 Effects of Tongren Wuji Baifeng Pills on the subsets of splenic T lymphocytes in immune-ovarian premature senescence model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照	—	40.52 ± 2.31	25.52 ± 2.03	25.58 ± 1.55	1.00 ± 0.04
模型	—	33.28 ± 6.58**	24.44 ± 1.72	21.54 ± 2.01**	1.14 ± 0.05**
戊酸雌二醇片	1.5 × 10 ⁻⁴	37.57 ± 2.89	26.28 ± 0.70 [#]	25.03 ± 0.52 ^{##}	1.05 ± 0.02 ^{###}
同仁乌鸡白凤丸	1.35	34.77 ± 3.78	25.20 ± 0.87	23.73 ± 1.45 [#]	1.07 ± 0.06 ^{##}
	2.70	39.69 ± 2.59 ^{##}	26.11 ± 0.81 [#]	24.69 ± 1.32 ^{##}	1.06 ± 0.03 ^{##}
	5.40	37.67 ± 4.04	25.56 ± 1.17	23.38 ± 1.50 [#]	1.10 ± 0.04

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

3.4 细胞凋亡因子

与模型组比较, 同仁乌鸡白凤丸各剂量组小鼠卵巢 Bax 蛋白相对表达水平、Bax/Bcl-2 均明显降低 ($P < 0.01$); 同仁乌鸡白凤丸 1.35、2.70 g/kg 组小鼠卵巢 Caspase-3 的蛋白相对表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2、表 4。

3.5 相关生长因子

与模型组比较, 同仁乌鸡白凤丸 2.70、5.40 g/kg 组小鼠卵巢 VEGF 蛋白相对表达水平和同仁乌鸡白凤丸 1.35、2.70 g/kg 组小鼠卵巢 bFGF 蛋白相对表达水平均明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 3、表 5。

4 讨论

中医药在治疗卵巢早衰等妇科疾病中, 具有整体调理、多系统调节、标本兼治、预防远期并发症

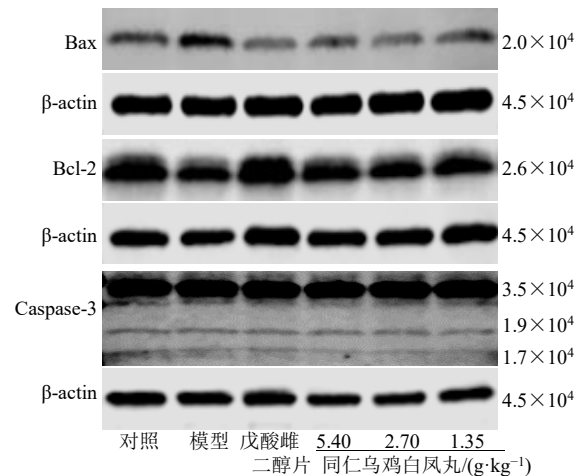


图 2 各组细胞凋亡因子蛋白表达情况

Fig. 2 Expression of apoptosis factor proteins in each group

表 4 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢细胞凋亡因子蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 4 Influence of Tongren Wuji Baifeng Pills on the relative expression of apoptosis-related protein factors in ovarian cells of mice with immune-induced premature ovarian failure model ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/Bcl-2	Caspase-3/β-actin
对照	—	0.059 ± 0.018	4.035 ± 1.322	0.016 ± 0.007	0.022 ± 0.016
模型	—	0.119 ± 0.007**	2.885 ± 1.022	0.045 ± 0.014**	0.039 ± 0.022*
戊酸雌二醇片	1.5 × 10 ⁻⁴	0.042 ± 0.015 ^{##}	3.330 ± 1.142	0.014 ± 0.008 ^{##}	0.019 ± 0.003 [#]
同仁乌鸡白凤丸	1.35	0.041 ± 0.014 ^{##}	2.158 ± 0.608	0.020 ± 0.009 ^{##}	0.021 ± 0.012 [#]
	2.70	0.035 ± 0.012 ^{##}	2.813 ± 1.220	0.015 ± 0.009 ^{##}	0.019 ± 0.011 [#]
	5.40	0.050 ± 0.013 ^{##}	3.554 ± 1.491	0.016 ± 0.008 ^{##}	0.023 ± 0.011

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

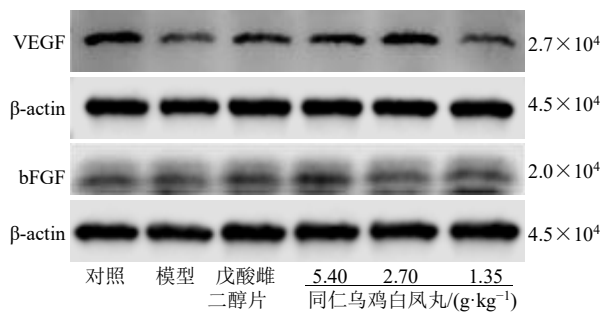


图 3 各组细胞生长因子蛋白表达情况

Fig. 3 Expression of growth factor proteins in each group

表 5 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢相关生长因子蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effects of Tongren Wuji Baifeng Pills on the relative expression of ovarian-related growth factor proteins in immune-induced ovarian premature senescence model mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		VEGF/β-actin	bFGF/β-actin
对照	—	0.070±0.013	0.540±0.081
模型	—	0.040±0.013**	0.358±0.115*
戊酸雌二醇片	1.5×10 ⁻⁴	0.061±0.013#	0.388±0.124
同仁乌鸡白凤丸	1.35	0.028±0.018	0.591±0.149##
	2.70	0.062±0.014#	0.518±0.133#
	5.40	0.068±0.017##	0.438±0.116

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ##P<0.01。

*P<0.05 **P<0.01 vs control group; #P<0.05 ##P<0.01 vs model group.

的优势, 并且适合长期调理, 通过持续用药稳定卵巢功能^[6]。卵巢早衰在中医中没有明确的病名, 但根据其临床表现可归为“血枯”“闭经”“经水早断”“血隔”等范畴, 相当于胞宫功能未老先衰, 肾虚常常作为其首要考虑的病因。《素问·上古天真论》曰: “女子七岁, 肾气盛, 齿更发长, 二七天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下……七七任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也”。由于肾气衰弱使得肾精不足, 天癸逐渐衰竭, 冲任二脉虚损, 肾气-天癸-冲任-胞宫失去正常的调节反馈功能, 使得经血的产生受阻, 胞宫失养而致不孕^[7]。五脏之中肝血肾精同源互补, 疏泄封藏互相制约, 肝藏血充足, 肝之疏泄功能正常, 则冲任二脉通畅, 卵子得以排出^[8]。《傅青主女科》载: “脾为后天, 肾为先天, 脾非先天之气不能化, 肾非后天之气不能生”。肾藏精, 主

骨髓, 脾主运化, 为气血生化之源。天癸虽然来源于先天, 但必须受后天水谷精微的滋养, 脾功能正常, 则气血充沛, 冲任得养。此外, 血瘀则冲任不畅, 气血无以顺利下行, 胞宫、胞脉、胞络失去滋养, 血海不能满溢而致经闭^[9]。因此中药治疗卵巢早衰要以补肾填精为主, 兼治以补血活血、疏肝健脾宁心。同仁乌鸡白凤丸方中乌鸡补肝益肾健脾; 鹿角补肾助阳活血; 当归、川芎、白芍、熟地黄为四物合方, 佐以丹参, 共奏补血活血调经之功; 红参、黄芪、山药、甘草同为补气药, 补中益气、健脾益肺; 生地黄、青蒿、银柴胡、天冬, 共同发挥清热凉血、养阴生津的作用; 佐以牡蛎、桑螵蛸、芡实, 有重镇安神、收敛固涩止带之效; 方中又配以香附, 既能疏肝解郁又能调经止痛, 为妇科调经之要药。全方共同发挥补肾疏肝健脾、补血活血调经之功效, 与中医对卵巢早衰的治法相符。

卵巢早衰最主要的临床症状为性激素分泌异常。下丘脑-垂体-卵巢轴(HPO)是一个完整的神经-内分泌调节系统, 其可通过激素分泌的相互影响对机体生殖功能发挥重要的调节作用。下丘脑通过分泌 GnRH 调节垂体黄体生成素(LH)和 FSH 的释放, 在 FSH 和 LH 的作用下诱导卵巢颗粒细胞分泌 E₂, 促进卵泡发育成熟以及排卵^[10]。当 HPO 轴功能紊乱时会引起机体的激素分泌异常, 进而影响卵泡的生长发育及排卵功能, 最终影响卵巢的储备功能^[11]。本研究结果显示, 经同仁乌鸡白凤丸干预治疗后模型小鼠血浆 E₂、FSH、GnRH 水平均明显升高, 提示药物可通过调节 HPO 轴促进性激素释放, 对免疫性卵巢早衰模型小鼠性激素水平紊乱具有一定的调节作用。

部分卵巢早衰患者存在体液或细胞免疫紊乱, 说明免疫失衡可能参与卵巢早衰的发生^[12-13]。近年来研究发现, 由于机体对 HPO 轴的一个或多个组织抗原产生免疫应答, 产生自身抗体, 从而对性激素水平调节产生影响, 使卵泡过度闭锁, 由此可见自身免疫因素在一定程度上可影响卵巢的生殖功能。自身免疫功能异常时可直接或间接地参与了卵泡的发育和闭锁过程, 从而对卵巢储备功能造成影响, 自身免疫功能异常与卵巢早衰的发生、发展密切相关^[14-15]。CD4⁺与 CD8⁺T 细胞是细胞免疫中发挥主要作用的 T 淋巴细胞亚群, CD4⁺T 细胞为辅助性淋巴细胞, 而 CD8⁺为细胞毒性 T 细胞, 主要功能是特异性杀伤靶细胞^[16]。当机体发生感染或受到

其他外界因素影响时, T 淋巴细胞亚群以及辅助性 T 淋巴细胞之间的动态平衡被打破, 进而导致自身免疫疾病的发生^[17]。本研究结果显示, 免疫性卵巢早衰模型小鼠自身免疫反应失衡, 给予同仁乌鸡白凤丸干预治疗对 T 细胞亚群的改变具有一定的回调作用, 提示药物能够通过调节机体的 T 细胞亚群平衡, 发挥对免疫功能紊乱的调节作用。

AMH 属于转化生长因子 β (TGF- β) 超家族, 主要由窦前卵泡和窦状卵泡颗粒细胞分泌, 其作用在于能够抑制卵泡过快生长耗竭, 提高卵巢储备功能^[18]。AMH 可抑制始基卵泡的募集, 降低卵泡对 FSH 的敏感性, 是目前已知唯一抑制始基卵泡生长的因子, 在调控卵泡募集和生长方面有重要作用, 能够很好地反映卵巢的储备功能^[19]。AMH 是应用于反映卵巢储备功能降低、原发性卵巢功能不全和诊断卵巢早衰的血清学指标^[20]。血清中 AMH 水平稳定, 不受月经周期变化和 FSH、LH 等促性腺激素的影响, 而与卵泡数目的多少有关, 当卵巢功能不全时 AMH 水平明显下降, 卵巢组织形态发生改变, 卵巢内早期生长卵泡缺乏。卵巢由含有大量卵泡的皮质和髓质构成, 成熟卵泡位于卵巢边缘。卵泡是由卵母细胞及其周围排列规则、具有分泌雌激素功能的颗粒细胞等结构组成。本研究结果显示, 同仁乌鸡白凤丸能够促进抗缪勒管激素分泌, 改善卵巢组织形态, 增加生长卵泡、减少闭锁卵泡, 从而发挥卵巢保护作用, 提高卵巢储备功能。

目前认为, 卵巢颗粒细胞是卵泡发育重要的支持细胞, 颗粒细胞功能的减退或凋亡很可能是卵巢功能下降的原因。女性一生中只有 0.1% 卵泡可以发育成熟并完成排卵, 其余卵泡在不同阶段发生闭锁, 颗粒细胞凋亡是卵泡闭锁的重要因素之一^[21]。在细胞凋亡过程中, Bcl-2 家族蛋白是发挥重要调控作用的一类因子^[22]。其中, Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡, 促进卵泡生长发育; Bax 促进细胞凋亡, 加速卵泡闭锁, 二者的比值介导细胞进入凋亡阶段的进程, 对卵巢卵泡各阶段的生长发育具有重要调节作用^[23]。文献显示, Bcl-2 表达增加后可结合 Bax 形成异源二聚体, 通过抑制 Bax 的活性并抑制细胞凋亡; Bax 表达增加时可结合 Bcl-2 形成同源二聚体, 通过活化 Caspase-9 酶切 Caspase-3 酶原, 且激活 caspase-3 表达对该剪切有促进作用, 进而启动 Caspase 级联反应, 最终诱导细胞发生凋亡^[24]。本研究结果显示, 同仁乌鸡白凤丸能够下调 Bax、

Caspase-3 蛋白相对表达水平和 Bax/Bcl-2 比值, 从而抑制免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡, 促进卵泡生长, 保护卵巢组织。

卵巢早衰的原因主要是原始卵泡储备过少、闭锁或者耗竭太快。卵巢血供是反应卵巢储备功能的重要指标。卵巢血流是维持卵泡生长, 类固醇激素分泌及卵泡对促性腺激素敏感性的重要因素^[25]。VEGF、bFGF 为两种血管内皮生长因子, 可修复受损卵泡, 改善受损卵巢血管通透性, 尤其可以特异性的促进类固醇激素生成器官的细胞增殖存活和趋化, 促进新生血管生成, 从而减缓卵泡耗竭^[26]。bFGF 在黄体生成中起到重要的作用, 主要表现在能促进卵泡黄体的生长发育, 还能给黄体实体提供营养^[27]。有研究报道, 卵巢血流的 80%~90% 是供给黄体的^[28]。相关研究表明, 卵巢早衰大鼠卵巢组织 VEGF、bFGF 蛋白表达明显减少, 说明卵泡发育与血管生成受阻^[29-30]。本研究结果显示, 同仁乌鸡白凤丸能够上调 VEGF、bFGF 蛋白相对表达水平, 改善受损卵巢血管通透性, 促进新生血管生成。

综上所述, 同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠具有较好的治疗作用。具体药效学作用表现在能够调节卵巢早衰引起的性激素水平紊乱, 恢复卵巢功能, 能够升高抗缪勒管激素水平、改善卵巢组织形态、减少卵泡闭锁, 从而提高卵巢储备功能、减轻卵巢组织病理损伤, 发挥治疗疾病的作用。同仁乌鸡白凤丸发挥治疗卵巢早衰药效作用的关键起效环节可能包括: 调节机体的 T 淋巴细胞亚群平衡, 调节免疫失衡; 通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路, 抑制卵巢颗粒细胞凋亡, 促进卵泡生长, 保护卵巢组织; 通过上调 VEGF、bFGF 蛋白表达, 改善受损卵巢血管通透性, 促进新生血管生成。研究结果提示同仁乌鸡白凤丸对免疫性卵巢早衰具有较好的临床应用价值, 其深入的作用机制有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李静, 王建红. 卵巢早衰的研究现状 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(6): 1172-1175.
- [2] 张丽娜, 郑锦, 刘特, 等. 补肾活血方对卵巢早衰模型大鼠性激素水平及颗粒细胞凋亡调控相关因子的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(7): 72-76.
- [3] 徐文君, 高慧, 李杨. 补肾调冲方剂灌胃的卵巢早衰大鼠血清性激素水平和卵巢组织 VEGF、bFGF 蛋白表达

- 变化 [J]. 山东医药, 2016, 56(47): 41-43.
- [4] 王鑫国, 郭秋红, 白霞, 等. 乌鸡白凤丸对去卵巢大鼠雌激素分泌的影响 [J]. 中成药, 2003, 1: 69-70.
- [5] 蔡慧华, 付霞霏, 任旭雯, 等. 透明带 3 多肽诱导的免疫性卵巢早衰小鼠模型子宫组织中 Ki-67、ER 的表达 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(7): 992-997.
- [6] 陈瑶, 唐丽, 田赛男, 等. 雷磊文献计量视域下中医药防治卵巢衰老研究现状与热点分析 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4369-4386.
- [7] 李祖昂, 崔晓萍, 马瑞, 等. 卵巢早衰证候分类学的研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(4): 920-923.
- [8] 尤昭玲. 补肾化痰法治疗多囊卵巢综合征心得 [J]. 江苏中医药, 2006(3): 11.
- [9] 李长艳, 尤昭玲. 尤昭玲教授治疗卵巢早衰经验 [J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(3): 18-20.
- [10] Li J L, He P Y, Zhang J, *et al.* Orcinol glucoside improves the depressive-like behaviors of perimenopausal depression mice through modulating activity of hypothalamic-pituitary-adrenal/ ovary axis and activating BDNF-TrkB-CREB signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5795-5807.
- [11] 韩洁, 刘子怡, 方振, 等. 重复制动应激对雌性大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(3): 245-249.
- [12] 谢江燕, 赵俪梅, 东亚君, 等. 卵巢早衰的免疫学研究进展 [J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(4): 259-262.
- [13] Silva C A, Yamakami L Y S, Aikawa N E, *et al.* Autoimmune primary ovarian insufficiency [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(4-5): 427-430.
- [14] 曾富玲, 孙维峰. 卵巢早衰的免疫因素研究进展 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2018, 37(4): 316-319.
- [15] 沈雁, 潘峰. 多囊卵巢综合征患者 Th1/Th2 失衡的临床意义 [J]. 中华内分泌外科杂志, 2018, 12(5): 419-421, 429.
- [16] 李健, 陈渊, 张鹏. Tc17 细胞: 一组新型的细胞毒性 T 细胞 [J]. 天津医科大学学报, 2015, 21(2): 182-185.
- [17] 葛盛, 刘瑜. 逍遥散加味对肝郁肾虚型卵巢早衰患者的卵巢储备功能及免疫指标的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(5): 509-512.
- [18] Weenen C, Laven J S E, Von Bergh A R M, *et al.* Anti-miillerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial cyclic follicle recruitment [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(2): 77-83.
- [19] Li H W R, Nelson S M. Clinical application of AMH measurement in assisted reproduction [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 606744.
- [20] Barbotin A L, Peigné M, Malone S A, *et al.* Emerging roles of anti-müllerian hormone in hypothalamic-pituitary function [J]. *Neuroendocrinology*, 2019, 109(3): 218-229.
- [21] 刘雪玲, 胡春艳, 刘港, 等. 卵巢早衰发病机制及相关治疗机制的最新研究进展 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2021, 31(6): 541-548.
- [22] 王雪峰, 何援利. 凋亡调节基因 bcl-2/bax 与卵巢早衰的关系 [J]. 生殖与避孕, 2008, 28(8): 487-490.
- [23] Anvekar R A, Ascioffa J J, Missert D J, *et al.* Born to be alive: A role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment [J]. *Front Oncol*, 2011, 1(34): 34.
- [24] Miao R C, Xu X S, Wang Z X, *et al.* Synergistic effect of nutlin-3 combined with aspirin in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through activation of Bcl-2/Bax signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3735-3743.
- [25] 王玉洁, 宁琳. 四物合剂联合坤泰胶囊治疗卵巢储备功能下降及卵巢早衰的临床观察 [J]. 中国医学创新, 2014, 11(10): 118-120.
- [26] 王玮, 张云, 刘昆, 等. 坤泰胶囊对 SD 大鼠生育力和早期胚胎毒性的研究 [J]. 中成药, 2012, 34(10): 1869-1873.
- [27] 莫中福, 吕晓梅, 吕英璞, 等. 不同时期妇女卵巢组织中 bFGF 免疫组化的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5: 520.
- [28] 莫中福, 殷秀玲, 尹青, 等. 外源性 bFGF 对 DahlS 高血压大鼠卵巢功能的影响 [J]. 生殖与避孕, 2003, 4: 244-247.
- [29] 徐文君, 高慧, 李杨. 基于“治末病”思想观察中药补肾调冲方对卵巢早衰 2 种相关生长因子表达的影响 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(2): 117-123.
- [30] Xu X F, Tan Y, Jiang G R, *et al.* Effects of Bushen Tianjing Recipe in a rat model of tripterygium glycoside-induced premature ovarian failure [J]. *Chin Med*, 2017, 12: 10.

[责任编辑 高源]