

· 基础研究 ·

# 补肾填精中药仙子益真胶囊对卵巢早衰模型小鼠卵巢 PI3K/AKT 通路的影响

黄晋琰 徐 珉 王彦彦 温丹婷 林夏静

**摘要 目的** 研究补肾填精中药仙子益真胶囊对卵巢早衰小鼠磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B (AKT)、Ki67 蛋白表达及各级卵泡数量的影响。**方法** 选用动情周期规律的 57 只 SPF 级雌性 C57BL/6J 型小鼠随机分为空白对照组(7 只)、模型组(50 只)。模型组使用雷公藤多苷片造模,将成功造模的 35 只小鼠随机分为模型组、益真低剂量组[仙子益真胶囊 0.75 g/(kg·d)]、益真中剂量组[仙子益真胶囊 1.5 g/(kg·d)]、益真高剂量组[仙子益真胶囊 3.0 g/(kg·d)]和西药组[戊酸雌二醇片 0.15 mg/(kg·d)],每组 7 只。给予相应药物治疗,治疗 21 天后采用 HE 染色法检测卵巢组织的形态变化,计算各级卵泡数目,免疫组化方法检测 Ki67 蛋白表达,Western blot 法检测小鼠卵巢 AKT 及 PI3K 蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,模型组原始卵泡、次级卵泡、窦状卵泡百分比降低,Ki67 表达、AKT 及 PI3K 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),闭锁卵泡百分比升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,益真低、中、高剂量组及西药组原始卵泡、次级卵泡、窦状卵泡百分比升高,闭锁卵泡百分比降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),Ki67 表达、AKT 及 PI3K 蛋白表达增高( $P < 0.05$ )。**结论** 补肾填精中药仙子益真胶囊改善卵巢功能的机制可能与提高了卵巢细胞中 PI3K/AKT 通路活性及细胞增殖状态相关,从而增加了原始卵泡、次级卵泡、窦状卵泡的含量,降低了闭锁卵泡的含量。

**关键词** 卵巢早衰;中医药治疗;磷脂酰肌醇 3 激酶;蛋白激酶 B;Ki67 蛋白

Effect of Shen-tonifying Traditional Chinese Herbs Xianzi Yizhen Capsules on PI3K/AKT Signaling Pathway of Mice with Premature Ovarian Failure HUANG Jin-yan, XU Min, WANG Yan-yan, WEN Dan-ting, and LIN Xia-jing *Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou(510120)*

**ABSTRACT Objective** To explore the effect of Shen-tonifying traditional Chinese herbs Xianzi Yizhen (XZYZ) Capsules on the express of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), Ki67 protein and follicle numbers at all levels of mice with premature ovarian failure. **Methods** Totally 57 female C57BL/6J mice of SPF level with regular estrous cycles were randomly divided into blank-control group ( $n = 7$ ) and model group ( $n = 50$ ). After the premature ovarian failure model was established by Glucosidorum Tripterygii Totorum, the modeled mice were divided into placebo group, low-dose XZYZ group [XZYZ capsules 0.75 g/(kg·d)], medium-dose XZYZ group [XZYZ capsules 1.5 g/(kg·d)], and high-dose XZYZ group [XZYZ capsules 3.0 g/(kg·d)] and Western medicine group [Estradiol Valerate tablets 0.15 mg/(kg·d)]. Each intervention group contains 7 mice. After 21 days of duration, follicle numbers at all levels were counted by HE staining of ovarian tissues, the express of Ki67 was tested by immunohistochemistry method and the express of AKT and PI3 were detected by Western blot method. **Results** The percentage of primordial follicle, secondary follicle and antral follicle of placebo group were lower than those of the blank-control group ( $P < 0.05$ ), as well as the express of Ki67, AKT and PI3 protein ( $P < 0.01$ ). The percentage of atretic follicle of placebo group was higher than that of the blank-control group ( $P < 0.01$ ). The percentage of primordial follicle, secondary follicle and antral follicle of intervention

基金项目: 国家中医药管理局全国名老中医传承工作室建设项目 (No. 1199ws02); 广东省中医药局科研课题 (No. 20152133)

作者单位: 广州中医药大学第二附属医院妇科 (广州 510120)

通讯作者: 徐 珉, Tel: 13922310114, E-mail: xumin3333@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180630.245

groups were higher than those of the placebo group ( $P < 0.05$ ), as well as the express of Ki67, AKT and PI3 protein ( $P < 0.05$ ). The percentage of atretic follicle of intervention groups was lower than that of the placebo group ( $P < 0.01$ ). Conclusion Shen-tonifying traditional Chinese herbs XZYZ capsules can improve the activity of PI3K/AKT signaling pathway, increase ovarian reserve of primordial follicle, secondary follicle and antral follicle and reduce the reserve of atretic follicle, thus to promote ovarian function.

**KEYWORDS** premature ovarian failure; treatment of traditional Chinese medicine; phosphatidylinositol 3 kinase; protein kinase B; Ki67 protein

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是妇科内分泌领域的常见病,是指卵巢内卵泡耗竭或被破坏,或因手术切除卵巢而发生的卵巢功能衰竭,出现持续性闭经和卵巢萎缩,体内雌激素水平低落、促性腺激素高达绝经期水平的现象,临床上伴见不同程度的潮热多汗、阴道干涩、性欲下降等绝经前后诸症<sup>[1]</sup>。研究发现,卵泡的正常生长、成熟、排卵和黄体形成过程中,通过多条信号通路形成复杂的网络系统进行调控<sup>[2]</sup>。其中磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路在卵泡发育中起到重要作用,在人类卵母细胞中,PI3K 通路中个信号分子异常表达可能会导致原始卵泡生存和发育的缺陷,造成卵巢的病理状态,引起 POF<sup>[3]</sup>。调节 PI3K/AKT 通路信号分子在卵巢中的表达,对改善颗粒细胞的生存及卵泡的发育,有效恢复卵巢功能有重要意义<sup>[4]</sup>。

目前中医治疗方面已有研究表明,补肾中药能够改善下丘脑—垂体—卵巢性腺轴调控功能,促进卵泡生长发育、成熟,一定程度上能够改善月经和生殖功能<sup>[5]</sup>。2014 年一项 Meta 分析发现中药能有效改善 POF 患者卵巢性激素水平,一定程度恢复了卵巢功能,长期使用安全且患者受益更多<sup>[6]</sup>。补肾填精中药制剂仙子益真胶囊为广东省名中医李丽芸教授经验方,有滋肾养阴,益精养血之功,在治疗月经失调、不孕不育等疾病中有较好的临床疗效<sup>[7-9]</sup>。本实验拟采用补肾填精中药仙子益真胶囊干预治疗 POF 小鼠,通过观察小鼠卵巢 ki67 表达水平,Western blot 实验检测小鼠卵巢 AKT 及 PI3K 的蛋白表达水平,研究基于 PI3K/AKT 通路调节卵泡增殖与凋亡的作用,为进一步阐述补肾填精中药仙子益真胶囊在治疗 POF 的作用机理提供实验依据和理论基础。

## 材料与方

1 动物 健康雌性 C57BL/6J 小鼠 57 只,体重 (21.24 ± 0.93) g,由广东省中医院科研动物实验中心提供,购自北京维通利华实验动物技术有限公司

[许可证号 SCXK(京)2016-0011],动物合格证号为 11400700203531。所有小鼠均经阴道脱落细胞涂片筛查动情周期正常。清洁环境饲养,室温恒温 24 ℃,相对湿度 60%,自然昼夜节律光照,普通饲料饲养,自由进食饮水。本实验通过广东省中医院实验动物伦理委员会审核, No. 2016041。

2 药物 所有实验药物均购自广东省中医院药房。雷公藤多苷片,远大医药黄石飞云制药有限公司出品,批号 20161001,规格为 10 mg/片。仙子益真胶囊为广东省中医院院内制剂(批号 160904),其主要成分为熟地、女贞子、旱莲草、川断、菟丝子、仙灵脾。由院内制剂室按上述药物组成分别选料,经过清洁、干燥、粉碎、消毒、浸泡、提取、制粒,粉碎装胶囊,每粒重 0.5 g,约含生药量 1.65 g。戊酸雌二醇片(补佳乐),拜耳医药保健有限公司出品(批号:2016278A),1 mg/片。

3 试剂及仪器 主要试剂有:伊红(天津光复精细化工有限公司,批号 17372-87-1),苏木素(美国 SIGMA 公司,批号 H9627-100G),抗体稀释液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 111097A),Ki-67 抗体、AKT 抗体、PI3K 抗体(美国 Cell Signaling Technology,批号 0003,0020,0006),全蛋白抽提试剂盒(凯基生物,批号 20170305),β-巯基乙醇(Amresco,批号 2463C048),TEMED(Sigma,批号 WX-BB7431V),BCA 蛋白定量试剂盒(Biomiga,批号 PW0104),HRP 标记的 GAPDH 优质内参(上海康成生物工程有限公司,批号 1612),BeyoECL Star(碧云天公司,批号 2017P0018A),Goat Anti-rabbit IgG(KPL,批号 10147552),Immobilon-P PVDF 膜(Millipore Corporation,批号 K4DA1854S),SDS、丙烯酰胺、甘氨酸(VETEC,批号 V900859, WX-BB7019V, WXBC5827V),溴酚蓝、甲叉双丙烯酰胺(BIOSHARP,批号 R-0126, M7256),Albumin Bovine V(BIOSHARP,批号 1073507),Ammonium Persulphate(MDBio,批号 L0101301),其余常规试剂为国产分析纯。

主要仪器有:酶标仪(Thermo,型号 Multiskan FC),凝胶成像分析仪(培清,型号 JS-680B),漩涡混合器(上海精科实业有限公司,型号 XW-80A),台式高速冷冻离心机(湘南湘仪,型号 TGL-16),转移电泳槽(广州誉维生物科技仪器有限公司,型号 VEA-186),垂直电泳槽(广州誉维生物科技仪器有限公司,型号 VEA-180B),组织切片机(Leica,型号 RM2245),显微镜(Olympus,型号 BX61),显微镜成像系统(Olympus,型号 DP72),染色机(SAKURA,型号 TissuEA-Tek DRS 2000)。

4 造模及分组 选择性周期正常的健康雌性 C57BL/6J 小鼠 57 只,编号按随机数字表法随机分为 2 组:空白对照组 7 只,模型组 50 只。空白对照组予等容量生理盐水喂养。模型组参照文献[10]造模方法,用雷公藤多甙片 50 mg/(kg·d),连续喂养 14 天造模。模型建立开始,每天通过观察小鼠阴道脱落细胞涂片,了解小鼠动情周期变化,当出现动情周期延长,阴道角化上皮细胞减少,有核上皮细胞混杂,表示建立模型成功。共有 35 只小鼠造模成功,予以编号,按随机数字表法随机分为模型组、益真低、中、高剂量组、西药组进行给药,每组 7 只。

5 给药方法 益真低剂量组:仙子益真胶囊 0.75 g/(kg·d),相当于成人常规用量;益真中剂量组:仙子益真胶囊 1.5 g/(kg·d),相当于成人常规用量的 2 倍;益真高剂量组:仙子益真胶囊 3.0 g/(kg·d),相当于成人常规用量的 3 倍;西药组:戊酸雌二醇片 0.15 mg/(kg·d);空白对照组及模型组等容量生理盐水喂养。连续喂养 21 天。

6 动物处理和取材 实验末次给药结束后,在动情周期,各组小鼠禁食 24 h,不禁水,以颈椎脱臼法,处死小鼠,摘除小鼠双侧卵巢,一侧卵巢组织置于 4% 多聚甲醛中固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片 2 μm,脱蜡,常规 HE 染色,光镜下观察染色后的病理切片,详细观察并记录卵巢组织的形态学变化。摘除另一侧卵巢冻于 -80 °C 冰箱用于提取蛋白。

7 各级卵泡百分比 HE 染色的小鼠卵巢切片于 20 倍光学显微镜下观察,计数每张切片上各级卵泡计数。各级卵泡分类参照 Myers M 等<sup>[11]</sup>的分类方法:(1)原始卵泡:包括始基卵泡和初级卵泡;(2)次级卵泡;(3)窦状卵泡;(4)闭锁卵泡。计数方法:以每个卵巢切面上不同发育阶段卵泡占整个卵泡切面上总卵泡细胞数的百分比表示各级卵泡的数目。

8 Ki67 蛋白表达检测 各组小鼠卵巢组织 Ki67 蛋白表达采用免疫组织化学 SP 二步法检测,所

有切片显微镜下盲法观察,以卵巢颗粒细胞呈黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。结果采用半定量积分法,对每个点的阳性细胞率及阳性细胞着色强度分别进行分级记分,然后根据两项之和确定其阳性强度。

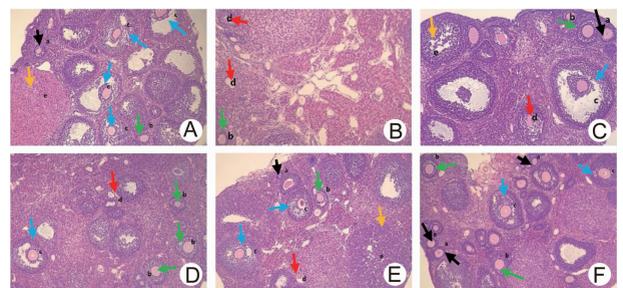
9 小鼠卵巢 AKT 及 PI3K 蛋白表达检测 采用 Western blot 法检测小鼠卵巢 AKT 及 PI3K 蛋白表达。提取各组小鼠卵巢总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度,Western blot 检测小鼠卵巢 AKT 及 PI3K 蛋白表达。取 10 mL TBST 液加 0.75 g Albumin Bovine V 混匀,分别与 1:1 000 稀释的 AKT 抗体及 PI3K 抗体配制一抗溶液,4 °C 孵育过夜,加入二抗 (Goat Anti-rabbit IgG 1:10 000 稀释加 10 mL TBST 液加 0.75 g Albumin Bovine V 混匀),孵育 1 h,制膜。扫描 PVDF 膜上各条带,用 IPWIN60 软件对蛋白印迹进行光密度分析,计算每个蛋白条带的灰度 (IOD) 值,用以表达卵巢蛋白 AKT 及 PI3K 的相对表达值。

10 统计学方法 数据采用 SPSS 20.0 统计分析软件处理,计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用单因素方差分析进行多组间差异性比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组小鼠卵巢组织形态学影响(图 1) 镜下观察空白对照组卵巢结构清晰,可见各级生长卵泡形态正常,卵泡内卵丘、卵母细胞可见,颗粒细胞呈多层。模型组卵巢结构紊乱,内可见较多囊泡,颗粒细胞层数较少,排列疏松,黄体数目较少。益真低剂量组、益真中剂量组、益真高剂量组、西药组内,卵巢组织中各级卵泡数目及黄体数目较模型空白组增多,细胞排列紧密,颗粒细胞呈多层,形态学与空白对照组接近。

2 各组各级卵泡百分比比较(表 1) 与空白对



注: A 为空白对照组; B 为模型组; C 为西药组; D 为益真低剂量组; E 为益真中剂量组; F 为益真高剂量组; 图中标识: 黑色箭头为原始卵泡; 绿色箭头为次级卵泡; 蓝色箭头为窦状卵泡; 红色箭头为闭锁卵泡; 黄色箭头为黄体

图 1 各组小鼠卵巢组织变化 (HE 染色, ×100)

表 1 各组小鼠各级卵泡百分比的比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	原始卵泡	次级卵泡	窦状卵泡	闭锁卵泡
空白对照	7	37.314 ± 8.589	18.800 ± 7.128	23.429 ± 4.958	20.371 ± 6.011
模型	7	23.057 ± 10.829*	7.457 ± 5.118**	9.514 ± 5.016**	33.900 ± 7.985**
益真低剂量	7	42.633 ± 4.617 $\Delta\Delta$	21.950 ± 5.974 $\Delta\Delta$	20.733 ± 6.447 $\Delta\Delta$	20.533 ± 5.825 $\Delta\Delta$
益真中剂量	7	36.943 ± 6.905 $\Delta$	22.143 ± 6.362 $\Delta\Delta$	18.214 ± 6.409 $\Delta$	22.271 ± 5.163 $\Delta\Delta$
益真高剂量	7	37.850 ± 11.291 $\Delta$	25.900 ± 11.980 $\Delta$	18.117 ± 5.939 $\Delta$	19.517 ± 7.017 $\Delta\Delta$
西药	7	43.900 ± 12.790 $\Delta\Delta$	26.286 ± 13.463 $\Delta\Delta$	24.100 ± 8.706 $\Delta\Delta$	19.443 ± 11.589 $\Delta$

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$

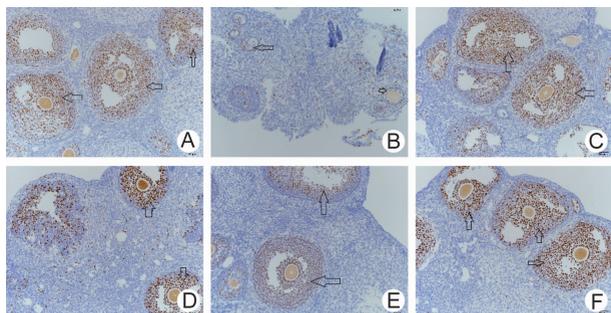
照组比较,模型组原始卵泡、次级卵泡、窦状卵泡百分比降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),闭锁卵泡百分比升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,益真低、中、高剂量组及西药组原始卵泡、次级卵泡、窦状卵泡百分比升高,闭锁卵泡百分比降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。益真各剂量组与西药组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

3 各组小鼠卵巢组织中 Ki67 的表达比较(表 2, 图 2) 空白对照组、益真低剂量组、益真中剂量组、益真高剂量组、西药组小鼠各级卵泡染色较深,而模型组各级卵泡几乎不着色或着色浅。与空白对照组比较,模型组 Ki67 表达降低,而益真各剂量组及西药组均较模型组增高( $P < 0.05$ )。益真各剂量组与西药组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组小鼠卵巢组织中 ki67 表达记分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Ki67 表达记分
空白对照	7	3.286 ± 0.756
模型	7	1.429 ± 0.535*
益真低剂量	7	2.833 ± 0.983 $\Delta$
益真中剂量	7	2.571 ± 0.983 $\Delta$
益真高剂量	7	3.000 ± 0.817 $\Delta$
西药	7	3.429 ± 0.534 $\Delta$

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组对照, $\Delta P < 0.05$

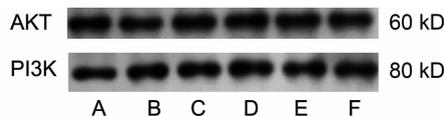


注:A 为空白对照组;B 为模型空白组;C 为西药组;D 为益真低剂量组;E 为益真中剂量组;F 为益真高剂量组;箭头所指为 Ki67 表达

图 2 各组小鼠卵巢组织中 Ki67 的表达分布 (免疫组化染色,  $\times 200$ )

4 各组小鼠卵巢组织中 AKT 及 PI3K 蛋白表达比较(图 3, 表 3) 与空白对照组比较,模型组 AKT

及 PI3K 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ ),而益真各剂量组及西药组均较模型组升高( $P < 0.05$ )。益真各剂量组与西药组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为西药组;D 为益真低剂量组;E 为益真中剂量组;F 为益真高剂量组

图 3 各组小鼠卵巢组织中 AKT 及 PI3K 蛋白电泳图

表 3 各组小鼠卵巢组织中 AKT 及 PI3K 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AKT	PI3K p85
空白对照	7	0.810 ± 0.102	0.520 ± 0.068
模型	7	0.434 ± 0.057*	0.299 ± 0.046*
益真低剂量	7	0.987 ± 0.221 $\Delta$	0.653 ± 0.097 $\Delta$
益真中剂量	7	0.796 ± 0.157 $\Delta$	0.573 ± 0.073 $\Delta$
益真高剂量	7	0.727 ± 0.272 $\Delta$	0.493 ± 0.173 $\Delta$
西药	7	0.803 ± 0.269 $\Delta$	0.560 ± 0.129 $\Delta$

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

## 讨 论

中医学无 POF 病名,根据临床症状属“月经过少”、“血枯”、“血隔”、“闭经”、“月水先闭”、“经水早断”等范畴。其病机以肝、脾、肾虚为主要原因<sup>[12]</sup>,其中肾虚为本病的根本<sup>[13]</sup>。有研究发现,“肾”与生殖轴、生殖内分泌密切相关<sup>[14]</sup>,补肾药能整合调节生殖轴内分泌生物因子之间的关系,起到改善机体功能的作用<sup>[15]</sup>,补肾药能通过调控卵泡凋亡因子改善卵巢功能<sup>[16]</sup>。

李丽芸教授是当代岭南中医妇科的代表性人物,广东省名中医,尊先师罗元愷教授“脾肾为本、气血为用”的理论观点,认为肾为先天之本,藏五脏六腑之精;与胞宫、天癸、冲任、督带关系尤为密切;而脾为后天之本,与胃互资气血生化,女子一生经历经、孕、产、乳,屡伤于血,故治疗妇科病首重在肾,同时应顾护脾胃,保养气血。其经验方仙子益真胶囊,由熟地、女贞

子、早莲草、川断、菟丝子、仙灵脾组成,有滋肾养阴,益精养血之功。既往研究显示,补肾中药周期疗法可促进肾中阴阳平衡及其协调转化,达到健全黄体功能以助孕的目的<sup>[17]</sup>;补肾中药益真胶囊通过观察围排卵期经阴道多普勒超声下卵子大小、形态及卵巢间质血流的变化,提示可改善高龄不孕妇女围排卵期卵巢间质血流,加快卵泡生长,减少小卵泡排卵,具有改善卵子质量,提高卵巢储备的作用<sup>[18]</sup>,对卵巢功能衰退有较好的治疗作用。

本实验研究中,模型组卵巢组织内可见较多囊泡,颗粒细胞层数较少,排列疏松,黄体数目较少,各级卵泡计数与空白对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),从卵泡质量及数量上反映了实验中所用的模型复制方法是成功的。应用补肾填精制剂仙子益真胶囊后,低、中、高剂量组卵巢组织中各级卵泡数目及黄体数目较模型组增多,细胞排列紧密,颗粒细胞呈多层,卵巢中各级卵泡计数明显优于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示补肾填精中药能够改善卵巢卵泡的质量,使之逐步恢复正常水平。

Ki67 是一种增殖细胞相关的核抗原,它主要表达于增殖分化的细胞中,在静止细胞中很少表达<sup>[19,20]</sup>,可作为标记细胞增殖状态的抗原,在益真低、中、高剂量组小鼠卵巢中 ki67 的含量表达增高,提示补肾中药有提高细胞增殖状态的作用。

PI3K/AKT 信号通路是一条与细胞增殖、分化密切相关的通路,近年来,许多学者借助于基因突变模型研究该通路和卵泡发育的关系,证明在卵泡中存在完整的 PI3K/AKT 信号通路,调节着卵泡的闭锁或凋亡<sup>[21,22]</sup>。在卵母细胞中,PI3K/AKT 通路决定着卵泡的静止和激活,在颗粒细胞中同样存在 PI3K/AKT 信号通路,调节着颗粒细胞的增殖与分化,进一步的调节着卵泡的发育和排卵<sup>[13,24]</sup>。AKT 基因缺失的小鼠次级卵泡的颗粒细胞增殖减少,成熟卵泡数目减少,闭锁卵泡数目增多,动情周期延长,生育能力下降<sup>[25]</sup>。应用补肾填精中药仙子益真胶囊后,小鼠卵巢中 PI3K 及 AKT 蛋白含量增加,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示补肾中药可能通过提高 PI3K/AKT 通路活性,达到提高卵巢功能的作用。这与相关研究结果有一致性<sup>[26,27]</sup>。

综上所述,补肾填精中药仙子益真胶囊具有增强卵巢功能,改善卵巢卵泡的质量的功能,对 POF 有较好的治疗作用,其作用机制可能与提高了卵巢细胞中 PI3K/AKT 通路活性及细胞增殖状态相关,从而增加了原始卵泡、次级卵泡、窦状卵泡的含量,降低了闭锁

卵泡的含量,进而提高了卵巢功能,改善了 POF 的情况。另外,益真低、中、高 3 个剂量组在各级卵泡含量、Ki67 染色及 PI3K、AKT 蛋白测定中,组间比较无差异,提示在治疗过程中,增加补肾中药的剂量,对提高卵巢细胞的活性可能无明显意义。这也提示在治疗过程中,注意同类别中药的叠加使用,包括在饮食方面的摄入,可能并不增加治疗效果。POF 的病因复杂,如何恢复促进卵泡的发育,促进卵巢功能的复原,还有待深入研究。

利益冲突:无。

## 参 考 文 献

- [1] 石一复,郝敏主编. 卵巢疾病[M]. 北京:人民军医出版社, 2014: 451.
- [2] 周团萍,崔毓敏,千日成. 卵泡发育过程中的 Wnt 信号通路[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(2): 128-131.
- [3] Johna GB, Shidlera MJ, Besmer P, et al. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle activation but is dispensable for primordial follicle activation[J]. Devel Biol, 2009, 331(2): 292-299.
- [4] Sun XH, Su YP, He Y, et al. New strategy for in activation of pri-mordial follicles with m TOR and PI3K stimulators[J]. Cell Cycle, 2015, 14(5): 721-731.
- [5] 徐晓琴,徐向荣. 补肾中药对卵巢早衰患者卵巢储备功能及免疫调节影响[J]. 中华全科医学, 2014, 12(12): 2004-2005.
- [6] 沈慰,俞超芹. 从肾论治卵巢早衰[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(6): 653-656.
- [7] 翟家乐,杜娟,林芸,等. 仙子益真、仙芪益真胶囊序贯治疗肾虚型经间期出血疗效观察[J]. 中国民间疗法, 2015, 23(9): 43-44.
- [8] 梁洁莎,陈志霞,黎小斌. 益真 2 号胶囊治疗女性免疫性不孕 36 例临床研究[J]. 新中医, 2015, 42(6): 38-39.
- [9] 陈蓉,樊湘珍. 益肾胶囊治疗围绝经期妇女月经失调 76 例[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 695-696.
- [10] 郝娟,王春莲,王培嵩,等. 雷公藤多甙片致卵巢早衰大鼠动物模型的研究[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(12): 1866-1870.
- [11] Myers M, Britt KL, Wreford NG, et al. Methods for quantifying follicle numbers within the mouse ovary[J]. Reproduction, 2004, 127(5): 569-580.
- [12] 万云慧. 张玉珍教授治疗卵巢早衰之经验浅析[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1721-1722.
- [13] 刘慧敏. 李翠萍教授防治卵巢早衰的经验[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2011, 18(5): 32-33.
- [14] 罗来成,伍庆华,李静,等. 卵巢早衰及中药干预状态

- 生殖内分泌网络因子调控关系的演变[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1808.
- [15] 罗来成, 王建红, 马娜, 等. 补肾药对心理应激下生殖轴内分泌网络影响的因子分析模型[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(7): 1062.
- [16] 梁策, 高慧, 张腾. 中药补肾调冲方对卵巢早衰大鼠激素水平和卵巢 Bc1-2/Bax 表达的影响[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(5): 359-364.
- [17] 顾春晓, 徐珉, 李丽芸. 补肾法治疗黄体不健性不孕症 30 例临床研究[J]. 国医论坛, 2008, 23(4): 18-19.
- [18] 徐珉, 黄健玲, 司徒仪, 等. 补肾中药益真 I、II 号胶囊对高龄不孕妇女围排卵期卵巢间质血流的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(7): 833-837.
- [19] 梁竹巍, 王蕊, 李春霞. 多囊卵巢综合征子宫内膜生存素和 Ki-67 的表达及临床特征研究[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(17): 2414-2417.
- [20] 孙明霞, 梦雅平, 张军力. Ki-67 抗原在临床疾病中的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41(11): 1336-1337.
- [21] Reddy P, Liu L, Adhikari D, et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool [J]. Science, 2008, 319(5863): 611-613.
- [22] Fan HY, Liu ZL, Cahill N, et al. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells [J]. Molecular Endocrinol, 2008, 22(9): 2128-2140.
- [23] Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, et al. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation [J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6186.
- [24] Zhang MJ, Su YQ, Sugiu K, et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes [J]. Science, 2010, 330(6002): 366-369.
- [25] Brown C, LaRocca J, Pietruska J, et al. Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKB alpha / AKT [J]. Biol Reprod, 2010, 82(2): 246-256.
- [26] 赵笛, 赵丕文, 武虹波, 等. 二仙汤对顺铂所致大鼠卵巢早衰模型中卵巢颗粒细胞增殖及周期的影响[J]. 环球中医药, 2017, 10(2): 131-136.
- [27] 胡立娟, 刘慧萍, 曾柳庭, 等. 补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠 PI3、Akt、Bcl2 蛋白的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(9): 2282-2284.

(收稿: 2017-10-29 在线: 2018-08-30)

责任编辑: 汤 静

## 欢迎订阅 2019 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖; 2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”, 列入中国期刊方阵; 2002—2016 年连续 14 年被评为“百种中国杰出学术期刊”; 3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助; 4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”; 2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录, 如: 中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引 (Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引 (WPRIM) 等; 为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 被编入《中文核心期刊要目总览》, 每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本, 月刊, 128 页; 铜版纸印刷, 彩色插图。国内定价: 30.00 元/期。全年定价: 360.00 元。国际标准刊号: ISSN 1003-5370, 国内统一刊号: CN 11-2787/R, 国内邮发代号: 2-52, 国外代号: M640。国内外公开发行, 在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62874291; E-mail: cjim@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。