

实验研究

DOI:10. 13288/j. 11-2166/r. 2025. 06. 011

温阳化浊方对高龄模型小鼠生殖衰老、
卵巢机械微环境及子代生殖潜能的影响徐佳淇^{1,2}, 赵晓丽^{1,2}, 江楠^{1,2}, 李凯茜^{1,2}, 丁亚飞^{1,2}, 温子木^{1,2}, 贾滢瑛^{1,2}, 姜梦君³, 夏天^{1,2}✉

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区李七庄昌凌路 88 号, 300193; 2. 国家中医针灸临床医学研究中心; 3. 天津中医药大学

[摘要] **目的** 从卵巢机械微环境角度探讨温阳化浊方改善生殖衰老的可能作用机制。**方法** 实验设 5 个组: 20 只 3 月龄雌性小鼠设为 3 月龄组, 20 只 6 月龄雌性小鼠设为 6 月龄组, 20 只 5 月龄雌性小鼠设为 6 月龄+温阳化浊方组, 20 只 9 月龄雌性小鼠设为 9 月龄组, 20 只 8 月龄雌性小鼠设为 9 月龄+温阳化浊方组。6 月龄+温阳化浊方组、9 月龄+温阳化浊方组小鼠给予温阳化浊方 41.2 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 连续 4 周。其余三组不给予任何干预。ELISA 方法检测生殖激素水平; HE 染色计数各级卵泡数量; 测定卵巢组织透明质酸 (HA) 含量和胶原纤维含量, 评价卵巢机械微环境; 采用超数促排法观察各组小鼠获卵数, 以及产生的子代数量和出生体质量情况评价生育力; 观察各组小鼠子代雌性个体的卵母细胞体外受精和囊胚培养情况, 评价温阳化浊方对子代生殖潜能的影响。**结果** 与 3 月龄组比较, 6 月龄组、9 月龄组小鼠血清促性腺激素释放激素 (GnRH)、促卵泡素 (FSH) 和黄体生成素 (LH) 水平, 卵巢胶原纤维含量, 始基卵泡和次级卵泡数量, 获卵数、子代数量显著减少, 初级卵泡、窦卵泡和闭锁卵泡数量均升高, 抗缪勒管激素 (AMH)、卵巢基质 HA 含量及子代小鼠体外培养的卵母细胞受精率、卵裂率及囊胚形成率降低 ($P<0.05$)。与 6 月龄组比较, 6 月龄+温阳化浊方组小鼠血清 GnRH、FSH 和 LH 水平, 初级卵泡、窦卵泡和闭锁卵泡数量均显著减少, AMH、卵巢基质 HA 含量, 子代小鼠卵母细胞的受精率, 始基卵泡和次级卵泡数量, 获卵数和子代出生体质量增加 ($P<0.05$)。与 9 月龄组相比, 9 月龄+温阳化浊方组小鼠 GnRH、FSH、胶原纤维含量, 初级卵泡、窦卵泡和闭锁卵泡数量均减少, AMH、卵巢基质 HA 含量, 始基卵泡和次级卵泡数量, 获卵数、子代数量、出生体质量, 子代小鼠卵母细胞的受精率、卵裂率及囊胚形成率均增加 ($P<0.05$)。**结论** 温阳化浊方可明显改善生殖中期及晚期的卵巢储备力、生殖力及其子代生殖潜能, 其作用可能与改善衰老卵巢的机械微环境重塑作用相关, 且对生殖晚期卵巢机械微环境重塑作用, 及其子代生殖潜能的提高作用更为显著。**[关键词]** 生殖衰老; 卵巢机械微环境; 温阳化浊方; 卵巢储备力; 生殖激素; 生殖潜能

随着社会发展, 女性延迟生育趋势增加, 而女性生育力自 35 岁起便呈断崖式下降^[1]。卵巢衰老导致的卵母细胞数量和质量下降, 是高龄女性生育力降低的主要原因^[2]。卵巢微环境由基质内的免疫细胞、血管、神经、间质细胞及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 等组成^[3], 通过产生的各种激素、信号分子、代谢产物等, 调控卵母细胞的发育、成熟和排卵。卵巢机械微环境是指卵巢细

胞所处的物理学环境, 主要由 ECM、机械力信号传导系统以及细胞与 ECM 之间的相互作用组成^[4]。ECM 是卵巢机械微环境的重要组成部分, 主要由胶原蛋白、纤连蛋白、弹力蛋白、蛋白多糖等组成, 为卵巢提供机械支撑^[5], 其过度积累会导致组织纤维化, 组织硬度增加^[6]。卵巢纤维化是卵巢衰老的早期标志^[7], 衰老的卵巢机械微环境紊乱是限制卵泡发育, 影响卵巢储备力的重要原因^[8-9]。因此, 重塑卵巢机械微环境是改善高龄女性生育力的重要途径之一。

基金项目: 国家自然科学基金 (82274570)

✉ 通讯作者: xiatian76@163.com, (022)27987335

既往研究表明,“脾肾阳虚”的病理状态可引起水液代谢障碍,导致水湿内停,进而形成痰湿、瘀血等病理产物,最终引起脏腑功能失调,这一病理过程与肾或肝纤维化的发展机制类似,如炎症因子积累、氧化应激、ECM 过度沉积^[10-11]。故本团队认为,卵巢机械微环境紊乱是不孕症女性“脾肾阳虚,浊邪壅滞”导致病理产物积累的微观体现。温阳化浊方是本团队基于不孕症“脾肾阳虚,浊邪壅滞”的基本病机制制的经验方,前期研究证实,其对子宫内膜炎合并反复种植失败、卵巢储备功能减退、复发性流产等多种生殖障碍性疾病患者具有改善妊娠结局的作用^[12-14],且可改善子宫内膜炎性衰老,显著提高衰老小鼠的胚胎种植率^[15]。本研究基于卵巢机械微环境探讨温阳化浊方改善生殖衰老的作用机制,并探讨温阳化浊方对高龄小鼠后代生殖潜能的远期保护作用,为临床应用温阳化浊方提高高龄女性卵巢储备力、生育力,及其后代生殖潜力提供实验依据。本研究经南开医院实验动物伦理委员会批准(批准号: NKYY-DWLL-2023146)。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雌性 3 月龄(相当于生殖早期,体质量 19~21 g)、5 月龄(为温阳化浊方干预的生殖中期小鼠,体质量 20~23 g)、6 月龄(相当于生殖中期,体质量 21~24 g)、8 月龄(为温阳化浊方干预的生殖晚期小鼠,体质量 22~25 g)、9 月龄(相当于生殖晚期,体质量 23~25 g) C57BL/6JN 小鼠各 20 只, SPF 级雄性 8~10 周龄 C57BL/6JN 小鼠 20 只,体质量 22~24 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物使用许可证号: SCXK(京) 2016-0006。于南开医院动物实验中心的标准实验室条件下饲养:环境相对湿度(65±5)%,温度(22±2)℃,昼夜各 12 h,食水摄入自由,料垫定期更换。

1.2 主要试剂及仪器

小鼠促性腺激素释放激素(GnRH,货号: HS1391-Mu)、促卵泡素(FSH,货号: HB967-Mu)、黄体生成素(LH,货号: HB970-Mu)、抗缪勒管激素(AMH,货号: HB1334-Mu)、雌二醇(E₂,货号: HB975-Mu)、孕激素/孕酮(PROG,货号: HS094-Mu)、透明质酸(HA,货号: HB025-Mu) ELISA 试剂盒,上海恒远生物科技有限公司;孕马血清促性腺激素(PMSG,货号: P9970)、4%组织细胞固定液(PFA,货号: P1110)、苏木素-伊红

(HE)染色试剂盒(货号: G1120)、改良天狼星红染色试剂盒(货号: G1472),北京索莱宝科技有限公司;人绒毛膜促性腺激素(hCG),丽珠集团丽珠制药厂;受精液(货号: BN80001),北京拜尔迪生物技术有限公司。

台式低速离心机(型号: L530R),湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;高通量组织研磨仪(型号: xianou-24),南京先欧仪器制造有限公司;多功能酶标仪(型号: VLBLATGD2),美国 Thermo 公司;数字病理切片扫描仪(型号: KF-FL-005),上海聚慕医疗器械有限公司;石蜡切片机(型号: RM2235)、正置荧光显微镜(型号: DM6000 B),德国 Leica 公司;正置光学显微镜(型号: SZX2-ILLK)、体式显微镜(型号: SZX10),日本 Olympus 公司。

1.3 药物

温阳化浊方组成:黄芪 30 g,菟丝子 30 g,鹿角霜(先煎) 30 g,肉苁蓉 10 g,炒薏苡仁 10 g,茯苓 15 g,麸炒白术 10 g,苍术 5 g,巴戟天 10 g,车前子(包煎) 20 g,陈皮 10 g,荷梗 10 g,藿香 10 g,黄柏 5 g。饮片由安国市光明饮片加工厂提供。按标准煎药方法煎煮,浓缩至浓度为 9.56 g/ml 的药液。

1.4 分组及给药

实验设 5 个组:20 只 3 月龄雌性小鼠设为 3 月龄组,20 只 6 月龄雌性小鼠设为 6 月龄组,20 只 5 月龄雌性小鼠设为 6 月龄+温阳化浊方组,20 只 9 月龄雌性小鼠设为 9 月龄组,20 只 8 月龄雌性小鼠设为 9 月龄+温阳化浊方组。6 月龄+温阳化浊方组、9 月龄+温阳化浊方组小鼠给予温阳化浊方 42.1 g/(kg·d)灌胃,每日 1 次,连续 4 周。其余三组不给予任何干预。温阳化浊方灌胃剂量根据人与小鼠的等效剂量换算^[16]。

1.5 样本采集

采用随机数字表法从各组 20 只小鼠中选取 10 只小鼠,末次灌胃 2 h 后,摘取眼球收集外周血,室温静置 30 min 后,3000 g、4℃离心 15 min,离心半径 12 cm。吸取上清保存于-20℃,以备后续血清生殖激素水平检测使用。收集卵巢组织,一侧卵巢使用 PBS 漂洗,于 4%PFA 固定,4℃过夜,后于 75%乙醇中 4℃保存,以备后续天狼星红和 HE 染色实验使用;另一侧新鲜卵巢组织, PBS 漂洗保存于-40℃,以备后续卵巢基质透明质酸含量检测实验使用。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 小鼠卵巢机械微环境的检测 ELISA 方法检测卵巢基质 HA 含量：采用随机数字表法从各组 10 个卵巢组织中选取 6 个新鲜卵巢组织称重后（重量：17~21 mg）按 1:9 比例加入生理盐水，使用高通量组织研磨仪匀浆后，4℃ 12 000 g 离心 15 min，离心半径 12 cm，静置后取上清，参照试剂盒说明书方法检测 HA 含量。

天狼星红染色法检测卵巢胶原纤维含量：采用随机数字表法从各组 10 个卵巢组织中选取 6 个卵巢组织依次于 75% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II 中脱水；经二甲苯 I、二甲苯 II 透明，石蜡包埋切 5 μm 厚切片。经 65℃ 烤片 30 min；二甲苯脱蜡，梯度乙醇复水，苏木素滴染 15 min，蒸馏水漂洗，天狼星红避光染色 25 min，依此于 75%、85%、95%、无水乙醇中脱水，再于二甲苯中透明，最后在组织切片上滴加适量中性树胶封片，于正置荧光显微镜下观察，每张切片随机选取 5 个不重叠视野进行摄片记录，使用 Image J 1.54g 软件测定胶原纤维面积占比。

1.6.2 小鼠卵巢储备功能的检测 血清生殖激素水平：采用随机数字表法从各组 10 管血清中选取 6 管，采用 ELISA 方法检测血清 GnRH、FSH、LH、AMH、PROG 含量，参照各试剂盒说明书方法操作。

卵泡发育情况及各级卵泡数量：采用 HE 染色法，随机选取各组 5 个卵巢石蜡组织，切片厚度 5 μm，使用苏木素染色 3 min，流动水冲洗 1 min，0.1% 盐酸-乙醇溶液分化 20 s，流动水冲洗 1 min，PBS 溶液蓝化 5 min，流动水冲洗 1 min，75%、85%、95% 乙醇各 10 s，伊红染色 2 min，后续脱水、透明、封片同前。于光学显微镜下观察小鼠卵巢结构，计数卵巢中始基卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦状卵泡和闭锁卵泡的数量。计数方式：每隔 5 个连续的组织切片进行 1 次计数，每一张切片上仅对卵母细胞核清晰可见的卵母细胞核进行计数，从而确保每个卵泡只被计数 1 次，避免重复计数的可能性。

1.6.3 小鼠生殖功能的检测 超数促排卵方法^[17]后观察各组获卵数：采用随机数字表法从各组剩余 10 只小鼠中选取 5 只小鼠，腹腔注射 10 IU PMSG，46 h 后注射 10 IU hCG。16 h 后颈椎脱臼处死，打开腹腔，剪取输卵管和卵巢，置于盛有 PBS 的培养皿中，在体式显微镜下用 1 ml 注射针头划开输卵管壶腹部，使成熟的卵丘-卵母细胞复合体（COCs）

流出，100 IU 透明质酸酶滴消化 5 min，反复吹打至脱去颗粒细胞，观察和比较各组获卵数。

小鼠子代数量、出生体重：将各组剩余 5 只雌性小鼠优先按雌雄 2:1 比例进行合笼，剩余雌鼠按雌雄比 1:1 进行合笼，次日清晨查栓，以阴道见栓为合笼成功。妊娠小鼠正常饲养至子代出生，记录各组小鼠子代数量、出生体质量。

1.6.4 小鼠子代生殖潜能的评价 为研究温阳化浊方干预对高龄小鼠子代生殖潜能的远期影响，实验采用随机数字表法选取各组产生的子代 4 周龄雌性小鼠 6 只，通过超数促排卵方法获取成熟 COCs，置于 HTF 受精滴。选取 10 周龄雄性小鼠 1~2 只收集精子，将精子悬液转移至精子获能液中，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。将精子加入受精滴内与 COCs 结合，次日将受精卵转移至 M16 培养液滴中，反复吹打以去除多余精子后，移入新液滴中，覆盖矿物油，在 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养至第 5 天囊胚阶段。显微镜下每日观察早期胚胎发育情况。受精率=二细胞胚胎数/获卵数×100%；卵裂率=四细胞胚胎数/二细胞胚胎数×100%；囊胚形成率=囊胚形成数/二细胞胚胎数×100%（受精后的最初阶段，受精卵会细胞分裂形成二细胞，然后二细胞会细胞分裂形成四细胞）。

1.7 统计学方法

采用 SPSS Statistics 26.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，用均值±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。采用 Levene's test 进行方差齐性检验，若样本数据方差齐，多组比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD 检验；若方差不齐，则使用 Dunnett's *T*^{*} 检验进行组间多重比较。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清生殖激素水平比较

表 1 示，与 3 月龄组比较，6 月龄组、9 月龄组和 9 月龄+温阳化浊方组小鼠血清 GnRH、FSH 和 LH 水平均升高，AMH 水平降低（*P* < 0.05）；6 月龄+温阳化浊方组小鼠 AMH 水平也显著降低（*P* < 0.05）。与 6 月龄组比较，9 月龄组小鼠血清 GnRH、FSH 和 LH 水平均升高，AMH 和 E₂ 水平均降低（*P* < 0.05）；6 月龄+温阳化浊方组小鼠血清 GnRH、FSH 和 LH 水平均显著降低，AMH 水平明显升高（*P* < 0.05）。与 9 月龄组比较，9 月龄+温阳化浊方组小鼠 GnRH 和 FSH 水平均降低，AMH 水平升高

表 1 各组小鼠血清生殖激素水平比较

Table 1 Comparison of serum reproductive hormone levels among groups of mice

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GnRH/ng·L ⁻¹	FSH /U·L ⁻¹	LH /pg·ml ⁻¹
3 月龄组	6	53.02±3.54	15.68±1.81	50.13±1.98
6 月龄组	6	58.67±3.28 ^{a)}	18.67±1.42 ^{a)}	53.88±1.56 ^{a)}
9 月龄组	6	68.20±3.83 ^{a) b)}	22.80±2.43 ^{a) b)}	57.53±2.17 ^{a) b)}
6 月龄+温阳化浊方组	6	54.04±2.56 ^{b)}	16.35±1.98 ^{b)}	51.54±1.87 ^{b)}
9 月龄+温阳化浊方组	6	61.48±1.91 ^{a) c) d)}	18.62±1.84 ^{a) c) d)}	55.36±1.88 ^{a) d)}

组别	鼠数	AMH/ng·ml ⁻¹	E ₂ /pmol·L ⁻¹	P/pmol·L ⁻¹
3 月龄组	6	13.89±1.60	210.60±59.56	2165.58±370.89
6 月龄组	6	9.70±0.57 ^{a)}	218.00±49.54	2168.92±309.79
9 月龄组	6	6.70±1.00 ^{a) b)}	156.70±59.59 ^{b)}	2439.05±319.76
6 月龄+温阳化浊方组	6	11.58±0.94 ^{a) b)}	204.90±33.60	2437.00±263.70
9 月龄+温阳化浊方组	6	9.61±0.50 ^{a) c) d)}	200.88±28.37	2469.25±287.64

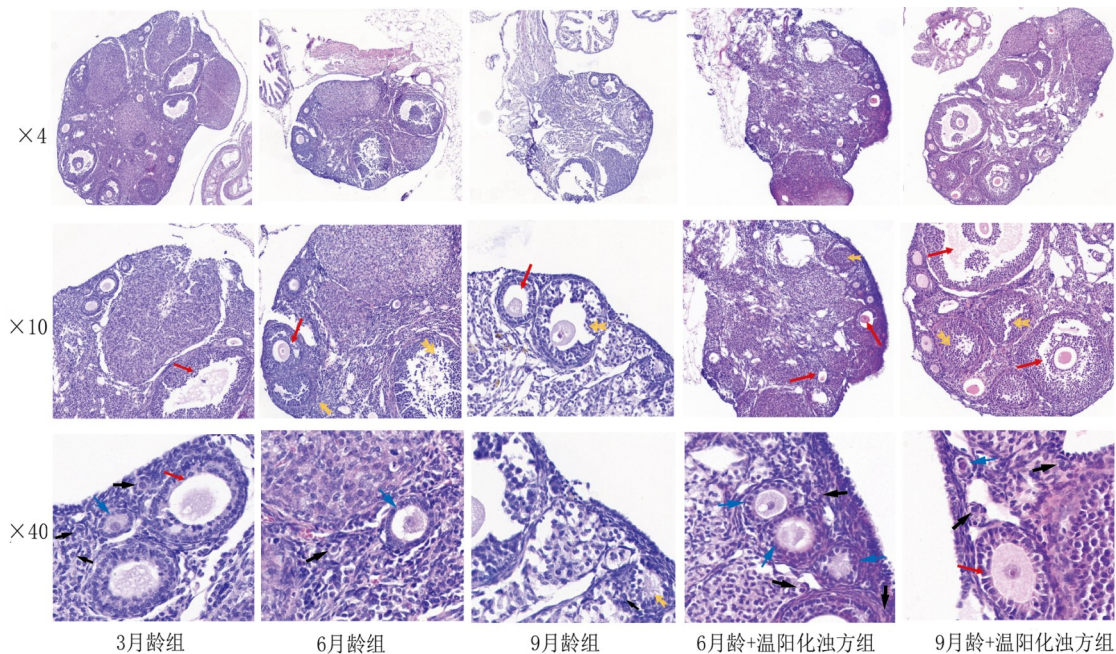
注：GnRH，促性腺激素释放激素；FSH，促卵泡素；LH，黄体生成素；AMH，抗缪勒管激素；E₂，雌二醇；P，孕酮。
a) 与 3 月龄组比较， $P<0.05$ ；b) 与 6 月龄组比较， $P<0.05$ ；c) 与 9 月龄组比较， $P<0.05$ ；d) 与 6 月龄+温阳化浊方组比较， $P<0.05$ 。

($P<0.05$)。各组间血清 P 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与 6 月龄+温阳化浊方组比较，9 月龄+温阳化浊方组小鼠 GnRH、FSH 和 LH 水平均升高，AMH 水平降低 ($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠卵泡发育情况比较

图 1 示，3 月龄组小鼠卵泡结构完整，颗粒细胞排列规则整齐。6 月龄组小鼠生长卵泡数量减少，可见闭锁卵泡；9 月龄组始基卵泡数量较少，颗粒细胞排列松散，甚至掉落至卵泡腔；6 月龄+

温阳化浊方组小鼠次级卵泡数量较 6 月龄组增加，卵泡中颗粒细胞排列较整齐；9 月龄+温阳化浊组始基卵泡数量较 9 月龄组增加，各级生长卵泡结构清晰。表 2 示，与 3 月龄组比较，6 月龄组和 9 月龄组小鼠始基卵泡和次级卵泡数量显著减少，初级卵泡、窦卵泡和闭锁卵泡数量显著增加 ($P<0.05$)；6 月龄+温阳化浊方组小鼠初级卵泡和次级卵泡数量减少 ($P<0.05$)；9 月龄+温阳化浊方组小鼠始基卵泡和次级卵泡数量减少 ($P<0.05$)。与 6 月龄



注：黑色箭头所指部位为始基卵泡；蓝色箭头所指部位为初级卵泡；红色箭头所指部位为窦卵泡；黄色箭头所指部位为闭锁卵泡。

图 1 各组小鼠卵巢组织病理形态 (HE 染色)

Figure 1 Ovarian tissue pathological morphology in each group of mice (HE staining)

表 2 各组小鼠卵泡发育情况比较

Table 2 Effects of WYHZ on the development of mice follicles

(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	始基卵泡	初级卵泡	次级卵泡	窦卵泡	闭锁卵泡
3月龄组	5	142.33±18.82	55.33±5.03	81.67±4.04	12.67±2.08	4.00±3.46
6月龄组	5	84.67±11.15 ^{a)}	70.67±9.71 ^{a)}	52.00±5.57 ^{a)}	17.33±2.08 ^{a)}	9.66±1.53 ^{a)}
9月龄组	5	57.00±4.36 ^{a) b)}	90.00±3.61 ^{a) b)}	38.00±7.00 ^{a) b)}	21.33±1.53 ^{a)}	13.33±3.06 ^{a)}
6月龄+温阳化浊方组	5	128.67±1.53 ^{b)}	42.67±4.51 ^{a) b)}	67.00±10.54 ^{a) b)}	11.00±3.61 ^{b)}	4.00±1.00 ^{b)}
9月龄+温阳化浊方组	5	106.00±13.00 ^{a) c) d)}	44.33±7.51 ^{c)}	60.33±7.51 ^{a) c)}	13.00±2.65 ^{c)}	7.33±4.16 ^{c)}

注: a) 与 3 月龄组比较, $P<0.05$; b) 与 6 月龄组比较, $P<0.05$; c) 与 9 月龄组比较, $P<0.05$; d) 与 6 月龄+温阳化浊方组比较, $P<0.05$ 。

组比较, 9 月龄组小鼠始基卵泡和次级卵泡数量减少, 初级卵泡数量增加 ($P<0.05$), 6 月龄+温阳化浊方组小鼠始基卵泡和次级卵泡数量增加, 初级卵泡、窦卵泡和闭锁卵泡数量减少 ($P<0.05$)。与 9 月龄组比较, 9 月龄+温阳化浊方组小鼠始基卵泡和次级卵泡数量增加, 初级卵泡、窦卵泡和闭锁卵泡数量减少 ($P<0.05$)。与 6 月龄+温阳化浊方组比较, 9 月龄+温阳化浊方组小鼠始基卵泡数量减少 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠生殖能力比较

表 3 示, 与 3 月龄组比较, 6 月龄组、9 月龄组和 9 月龄+温阳化浊方组小鼠获卵数、子代数量减少 ($P<0.05$), 9 月龄组的子代出生体质量亦下降 ($P<0.05$), 6 月龄+温阳化浊方组小鼠子代数量减少, 出生体质量增加 ($P<0.05$)。与 6 月龄组比较, 9 月龄组小鼠获卵数、子代数量、出生体质量减少 ($P<0.05$), 6 月龄+温阳化浊方组小鼠获卵数和子代出生体质量增加 ($P<0.05$)。与 9 月龄组比较, 9 月龄+温阳化浊方组小鼠获卵数、子代数量、出生体质量增加 ($P<0.05$)。与 6 月龄+温阳化浊组比较, 9 月龄+温阳化浊组子代数量和出生体质量均减少 ($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠卵巢机械微环境情况比较

表 4 示, 与 3 月龄组比较, 6 月龄组、9 月龄

表 4 各组小鼠卵巢基质 HA、胶原纤维含量比较

Table 4 Comparison of ovarian stroma HA and collagen fiber content among groups of mice

(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HA/ng·ml ⁻¹	胶原纤维面积占比/%
3月龄组	6	255.08±3.61	1.56±0.22
6月龄组	6	227.93±3.80 ^{a)}	2.62±0.21 ^{a)}
9月龄组	6	205.78±6.41 ^{a) b)}	4.70±0.47 ^{a) b)}
6月龄+温阳化浊方组	6	239.40±1.95 ^{a) b)}	2.16±0.21 ^{a)}
9月龄+温阳化浊方组	6	225.62±9.28 ^{a) c) d)}	3.09±0.34 ^{a) c) d)}

注: HA, 透明质酸。

a) 与 3 月龄组比较, $P<0.05$; b) 与 6 月龄组比较, $P<0.05$; c) 与 9 月龄组比较, $P<0.05$; d) 与 6 月龄+温阳化浊方组比较, $P<0.05$ 。

组、6 月龄+温阳化浊方组和 9 月龄+温阳化浊方组小鼠的卵巢基质 HA 含量降低, 胶原纤维含量增加 ($P<0.05$)。与 6 月龄组比较, 9 月龄组小鼠卵巢基质 HA 含量降低, 胶原纤维含量增加 ($P<0.05$); 6 月龄+温阳化浊方组小鼠卵巢基质 HA 含量增加 ($P<0.05$)。与 9 月龄组比较, 9 月龄+温阳化浊方组小鼠卵巢基质 HA 含量增加, 胶原纤维含量降低 ($P<0.05$)。与 6 月龄+温阳化浊方组比较, 9 月龄+温阳化浊方组小鼠卵巢基质 HA 含量降低, 胶原纤维含量增加 ($P<0.05$)。使用天狼星红染液对小鼠卵巢中的胶原纤维进行染色处理, 并在偏振光条件下观察结果。图 2 示, 3 月龄组、6 月龄组、

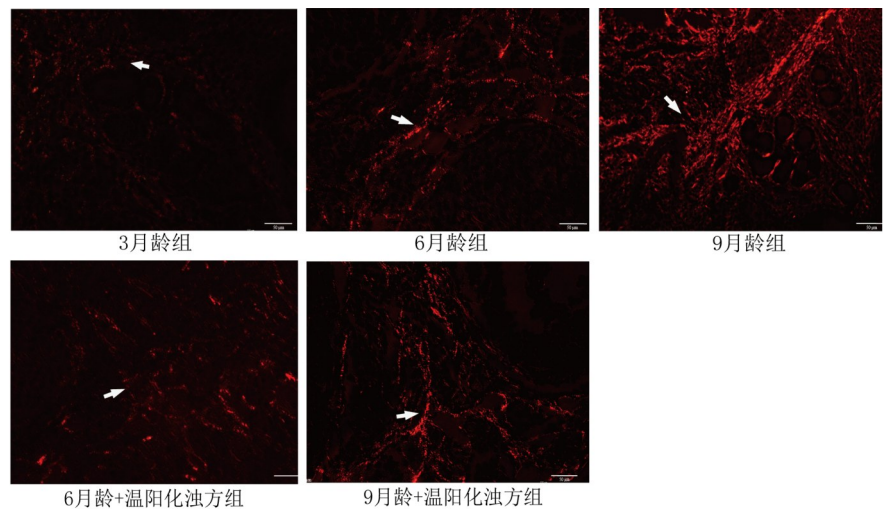
表 3 各组小鼠生殖能力比较

Table 3 Comparison of reproductive ability among groups of mice

(个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	获卵数/个	子代数量/只	出生体质量/g
3月龄组	5	20.67±2.52	20.67±1.53	1.22±0.15
6月龄组	5	14.33±1.15 ^{a)}	12.67±0.58 ^{a)}	1.27±0.14
9月龄组	5	7.33±0.58 ^{a) b)}	6.33±1.53 ^{a) b)}	1.01±0.13 ^{a) b)}
6月龄+温阳化浊方组	5	18.00±2.65 ^{b)}	14.33±1.53 ^{a)}	1.40±0.12 ^{a) b)}
9月龄+温阳化浊方组	5	13.67±1.53 ^{a) c)}	9.67±1.53 ^{a) c) d)}	1.24±0.15 ^{c) d)}

注: a) 与 3 月龄组比较, $P<0.05$; b) 与 6 月龄组比较, $P<0.05$; c) 与 9 月龄组比较, $P<0.05$; d) 与 6 月龄+温阳化浊方组比较, $P<0.05$ 。



注：箭头所指部位有明显的胶原纤维分布；标尺=50 μm。
图2 各组小鼠卵巢组织胶原纤维分布情况（天狼星红染色，×40）
Figure 2 Distribution of collagen fibers in ovarian tissue of each group of mice

9月龄组小鼠卵巢内胶原纤维的红色染色逐渐明显，且分布范围呈逐步扩大的趋势；6月龄+温阳化浊组小鼠卵巢内胶原纤维的红色染色范围较6月龄组缩小；9月龄+温阳化浊组小鼠卵巢内胶原纤维的红色染色范围较9月龄组缩减，且红色程度相对减弱。

2.5 各组小鼠子代生殖潜能比较

表5示，与3月龄组比较，6月龄组和9月龄组子代小鼠体外培养的卵母细胞受精率、卵裂率及囊胚形成率均显著降低 ($P<0.05$)，6月龄+温阳化浊方组和9月龄+温阳化浊方组囊胚形成率降低 ($P<0.05$)。与6月龄组比较，9月龄组子代小鼠囊胚形成率降低；6月龄+温阳化浊方组子代小鼠卵母细胞的受精率提高 ($P<0.05$)，卵裂率、囊胚形成率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与9月龄组比较，9月龄+温阳化浊方组的子代小鼠卵母细胞的受精率、卵裂率及囊胚形成率均升高 ($P<0.05$)。

3 讨论

“脾肾阳虚，浊邪壅滞”是卵巢机械微环境紊乱的主要病机。卵巢机械微环境紊乱主要表现为炎症因子积累、ECM结构改变（如胶原纤维过度沉积）等^[18]。伴随卵巢衰老，卵巢胶原纤维含量增加，透明质酸含量降低，卵巢组织硬度增加，产生的机械束缚限制卵泡生长、发育，导致排卵障碍^[19-20]。中医理论认为，肾为先天之本，主藏精，主生殖，若女子先天禀赋不足，或后天调养失宜，易耗损肾中真阳，以致命门火衰，胞宫失于温养，不能摄精成孕。肾阳不足则温煦与气化无力，不能推动水液代谢，导致水湿停滞。同时，脾阳不振则运化失司，水湿代谢与转输失常，导致水湿内停，而脾的运化功能有赖于肾阳温煦以维持正常，肾阳不足，脾阳亦失其温养，进而导致运化水谷精微及代谢水湿的能力进一步减退，故脾肾阳虚促使湿、痰、饮、瘀等浊邪壅滞积聚。卵巢作为“藏于阴而

表5 各组小鼠子代早期胚胎发育情况比较
Table 5 Comparison of early embryo development in offspring among groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	获卵总数/个	受精率/%	卵裂率/%	囊胚形成率/%
3月龄组	6	132	75.55±4.34	98.85±1.99	91.89±7.21
6月龄组	6	113	54.38±12.43 ^{a)}	72.88±9.52 ^{a)}	61.68±15.14 ^{a)}
9月龄组	6	72	50.88±11.48 ^{a)}	62.70±11.25 ^{a)}	41.51±1.44 ^{a) b)}
6月龄+温阳化浊方组	6	119	74.10±13.04 ^{b)}	84.26±16.74	72.22±10.02 ^{a)}
9月龄+温阳化浊方组	6	94	76.56±0.65 ^{c)}	83.14±5.16 ^{c)}	71.04±6.30 ^{a) c)}

注：a) 与3月龄组比较， $P<0.05$ ；b) 与6月龄组比较， $P<0.05$ ；c) 与9月龄组比较， $P<0.05$ 。

象于地”的奇恒之府，易受浊邪侵袭。湿浊痰饮其性黏腻胶着，重浊趋下，易壅滞于下焦卵巢之中，导致卵巢微环境紊乱，阻碍卵泡激活、发育、成熟和排卵，降低生殖能力。有研究^[21]发现补肾养精颗粒可通过降低 Rho 激酶 1、转化生长因子 β 、白细胞介素 1 等表达，改善卵巢纤维化，进而促进早发性卵巢功能不全模型大鼠的卵泡发育，改善卵巢功能。温阳化浊方中以黄芪、鹿角霜为君，补气温阳，助阴强精；臣以肉苁蓉、巴戟天、菟丝子，温肾助阳，调冲促孕，同时加用茯苓、炒白术、炒薏苡仁健脾益气，使气血生化有源，血脉通畅，荣养卵巢；佐以苍术燥湿化浊，车前子淡渗以利湿，陈皮温运以化痰浊，荷梗通宣以理郁浊，藿芳香以蠲秽浊；最后以黄柏为使，引诸药入肾经，同时清热燥湿坚阴，防诸药过于温燥。全方温补脾肾之阳，兼顾益气调血，化湿蠲浊，填精益髓。

卵巢衰老是女性年龄相关性卵巢储备功能逐渐衰退，从而导致女性生殖潜能降低的首要因素^[22]。始基卵泡池自胚胎期开始建立，在出生后，由于卵泡的激活、发育、排卵和闭锁，使得始基卵泡池不断被消耗，逐渐导致卵巢衰老^[23]。延缓或逆转卵巢衰老过程，是重塑高龄女性生殖能力的潜在干预策略。随着年龄增长，卵巢储备功能逐渐减退，表现为血清 AMH 水平降低，FSH 水平升高^[24]。高龄产妇往往面临高风险，如早产、低出生体重儿、围产期死亡等不良妊娠结局的发生率显著增加^[25]。据报道，与年轻鼠相比，老龄鼠的子代出生数量及体质量均显著降低^[26]。本研究结果显示，3 月龄组、6 月龄组和 9 月龄组小鼠血清 FSH 水平随年龄增加呈逐步升高趋势，而 AMH 水平则逐渐下降，获卵数及子代出生数量也逐渐减少，表明随着年龄的增长，小鼠卵巢储备力、生殖力在不断下降。温阳化浊方干预后，显著改善 6 月龄组及 9 月龄组小鼠生殖激素水平，始基卵泡与次级卵泡数量增加，闭锁卵泡数量减少，显著增加高龄小鼠的获卵数，子代出生数量及体质量，提示温阳化浊方可改善高龄女性卵巢储备力和生育力，为高龄女性生育力下降提供了潜在的解决方案。

胶原纤维是卵巢 ECM 的主要成分，为卵巢组织提供机械稳定性，其含量可直接影响卵巢的机械特性（如硬度），进而影响卵泡生长发育^[27]。HA 是一种存在于 ECM 中的糖胺聚糖，通过调节 ECM 的流动性，维持卵巢组织的稳态性，影响原始生殖

细胞迁移，卵泡发育和排卵^[28]。Nagamatsu 等^[29]发现卵巢 ECM 中胶原纤维含量的下降，导致卵巢皮质机械应力降低，从而促进原始卵泡激活以及初级卵泡的生长。有研究表明，卵巢质地会随着年龄的增长而逐渐僵硬，这一现象与卵巢基质 HA 对卵巢僵硬程度的调节作用有关，卵巢内的总 HA 含量会随年龄的增长而降低^[20]。本实验结果表明，3 月龄组、6 月龄组和 9 月龄组小鼠的卵巢组织中，HA 含量随年龄增长呈逐步下降趋势，而胶原纤维含量则逐渐上升，这表明随着年龄的增长，小鼠卵巢组织的纤维化程度在不断提高。在温阳化浊方干预后，6 月龄组小鼠基质 HA 含量显著增加，而胶原纤维含量无显著变化，提示温阳化浊方可通过提高 HA 含量，以改善生殖中期小鼠的卵巢纤维化；9 月龄组小鼠在给予温阳化浊方干预后，卵巢基质中 HA 含量亦显著增加，并且伴随胶原纤维含量的显著降低，提示温阳化浊方不仅可通过增加 HA 含量以改善卵巢纤维化，还能通过降低胶原纤维含量以达到这一结果。因此，与生殖中期小鼠相比，温阳化浊方在改善生殖晚期小鼠卵巢纤维化方面作用更为明显。

高龄妊娠会增加其后代女性月经不调、生育力下降的风险^[30]，高龄女性的后代生育能力显著降低，新生儿死亡率显著增加^[31]。本实验结果显示，与 3 月龄组比较，6 月龄组和 9 月龄组小鼠子代体外培养的卵母细胞受精卵、卵裂率及囊胚形成率均显著降低，提示母代年龄与其子代生殖潜能有关，且随着母代年龄增长，其子代卵母细胞的发育潜能呈下降的趋势。在给予温阳化浊方干预后，6 月龄组小鼠子代卵母细胞受精率显著提高；9 月龄组小鼠子代卵母细胞不仅在受精率方面有显著提高，其卵裂率及囊胚形成率均显著提高，提示生殖中期及晚期小鼠经温阳化浊方干预能改善其子代卵母细胞的发育潜能，并且温阳化浊方对生殖晚期小鼠的子代卵母细胞发育潜能的改善作用更为明显。

综上所述，温阳化浊方可通过重塑衰老卵巢机械微环境，改善高龄小鼠的卵巢储备力和生殖力，同时对子代生殖潜力具有远期保护作用，且对生殖晚期小鼠的改善作用更为明显。本研究仅考察了温阳化浊方对卵巢基质中 HA 和胶原纤维含量的影响，而未对其具体的影响机制进行深层次探究。此外，未对卵巢机械微环境如何影响卵泡发育的机械生物信号转导展开进一步的研究和阐述。

参考文献

- [1]GRUHN JR, ZIELINSKA AP, SHUKLA V, et al. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span [J]. *Science*, 2019, 365(6460): 1466–1469.
- [2]AHMED TA, AHMED SM, EL-GAMMAL Z, et al. Oocyte aging: the role of cellular and environmental factors and impact on female fertility [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1247: 109–123. doi: 10.1007/5584_2019_456.
- [3]KINNEAR HM, TOMASZEWSKI CE, CHANG AL, et al. The ovarian stroma as a new frontier [J]. *Reproduction*, 2020, 160(3): R25–R39.
- [4]SHAH JS, SABOUNI R, CAYTON VAUGHT KC, et al. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(7): 1135–1148.
- [5]GARGUS ES, ROGERS HB, MCKINNON KE, et al. Engineered reproductive tissues [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(4): 381–393.
- [6]BERKHOLTZ CB, SHEA LD, WOODRUFF TK. Extracellular matrix functions in follicle maturation [J]. *Semin Reprod Med*, 2006, 24(4): 262–269.
- [7]MCCLOSKEY CW, COOK DP, KELLY BS, et al. Metformin abrogates age-associated ovarian fibrosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(3): 632–642.
- [8]STEWART S, OU W, ARANDA-ESPINOZA H, et al. Micromechanical characterizations and viscoelastic modeling reveal elastic and viscoelastic heterogeneities in ovarian tissue and the significant viscoelastic contribution to the apparent elastic modulus determined by AFM indentation [J]. *Acta Biomater*, 2023, 168: 286–297. doi: 10.1016/j.actbio.2023.07.010.
- [9]CHAN CJ, BEVILACQUA C, PREVEDEL R. Mechanical mapping of mammalian follicle development using Brillouin microscopy [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1133.
- [10]刘铃姝, 刘宏伟, 牛喜平. 加味真武汤对脾肾阳虚型慢性肾脏病患者肾纤维化及肾功能指标的影响 [J]. *哈尔滨医药*, 2023, 43(3): 132–134.
- [11]何杰, 张鹏海, 张锋, 等. 温阳软肝饮联合恩替卡韦治疗脾肾阳虚型慢性乙型肝炎肝纤维化的临床观察 [J]. *中国中医药科技*, 2024, 31(5): 857–859.
- [12]宫政, 宋佳怡, 董融, 等. 温阳化浊方治疗慢性子宫内膜炎对反复种植失败患者妊娠结局的影响: 一项随机对照研究 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2024, 44(4): 353–358.
- [13]胡祖贤, 张珂, 宋佳怡, 等. 温阳化浊方对反复种植失败患者冻融胚胎移植周期妊娠结局的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(9): 1038–1041.
- [14]邱韵恒, 马赛花, 马甜甜, 等. 温阳化浊方对不明原因复发性流产患者妊娠结局的影响 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2024, 44(4): 347–352.
- [15]赵晓丽, 戎蓓蕾, 江楠, 等. 温阳化浊方改善高龄小鼠子宫内膜容受性的机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(9): 5338–5344.
- [16]WOJCIKOWSKI K, GOBE G. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(1): 22–27.
- [17]李秦, 朱德生, 刘玉林, 等. 不同激素对哺乳动物超数排卵作用的研究 [J]. *实验动物科学与管理*, 1997, 14(3): 1–6.
- [18]ISOLA JVV, HENSE JD, OSÓRIO CAP, et al. Reproductive Ageing: Inflammation, immune cells, and cellular senescence in the aging ovary [J]. *Reproduction*, 2024, 168(2): e230499.
- [19]AKAIWA M, FUKUI E, MATSUMOTO H. Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 deficiency alleviates age-dependent depressed ovulation associated with ovarian collagen deposition in mice [J]. *Reprod Med Biol*, 2020, 19(1): 50–57.
- [20]AMARGANT F, MANUEL SL, TU Q, et al. Ovarian stiffness increases with age in the mammalian ovary and depends on collagen and hyaluronan matrices [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(11): e13259.
- [21]张芳, 师伟, 刘震, 等. 基于 Rho/ROCK 信号通路探讨补肾养精颗粒改善早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢功能的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(5): 2678–2683.
- [22]WU M, HUANG Y, ZHU Q, et al. Adipose tissue and ovarian aging: potential mechanism and protective strategies [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 80: 101683. doi: 10.1016/j.arr.2022.101683.
- [23]MAGANHIN CC, BARACAT MCP, CARVALHO KC, et al. Evidence that melatonin increases inhibin beta-A and follistatin gene expression in ovaries of pinealectomized rats [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(7): 1455–1464.
- [24]ROBERTSON DM, LEE CH, BAERWALD A. Interactions between serum FSH, inhibin B and antral follicle count in the decline of serum AMH during the menstrual cycle in late reproductive age [J]. *Endocrinol Diabetes Metab*, 2021, 4(2): e00172. doi: 10.1002/edm2.172.
- [25]MILLER EC, WILCZEK A, BELLO NA, et al. Pregnancy, preeclampsia and maternal aging: from epidemiology to functional genomics [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 73: 101535. doi: 10.1016/j.arr.2021.101535.
- [26]TARÍN JJ, GÓMEZ-PIQUER V, MANZANEDO C, et al. Long-term effects of delayed motherhood in mice on postnatal development and behavioural traits of offspring [J].

- Hum Reprod, 2003, 18(8): 1580–1587.
- [27] UMEHARA T, WINSTANLEY YE, ANDREAS E, et al. Female reproductive life span is extended by targeted removal of fibrotic collagen from the mouse ovary [J]. Sci Adv, 2022, 8(24): eabn4564. doi: 10.1126/sciadv.abn4564.
- [28] RASHKI GHALENO L, PENNISI CP, SHAHVERDI A, et al. Exploring the role of hyaluronic acid in reproductive biology and beyond: applications in assisted reproduction and tissue engineering [J]. Adv Biol (Weinh), 2024, 8(6): e2300621.
- [29] NAGAMATSU G, SHIMAMOTO S, HAMAZAKI N, et al. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes [J]. Sci Adv, 2019, 5(6): eaav9960. doi: 10.1126/sciadv.aav9960.
- [30] MOORE AM, XU Z, KOLLI RT, et al. Persistent epigenetic changes in adult daughters of older mothers [J]. Epigenetics, 2019, 14(5): 467–476.
- [31] REYNOLDS TS, LYNCH CD, HADE EM, et al. Maternal age at delivery and fertility of the next generation [J]. Paediatr Perinat Epidemiol, 2020, 34(6): 629–636.

Effect of *Wenyang Huazhuo Formula* (温阳化浊方) on Reproductive Aging, Ovarian Mechanical Microenvironment, and Offspring Reproductive Potential in Aged Model Mice

XU Jiaqi^{1,2}, ZHAO Xiaoli^{1,2}, JIANG Nan^{1,2}, LI Kaixi^{1,2}, DING Yafei^{1,2}, WEN Zimu^{1,2}, JIA Yingying^{1,2}, JIANG Mengjun³, XIA Tian^{1,2}

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193; 2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanisms of *Wenyang Huazhuo Formula* (温阳化浊方, WHF) in improving reproductive aging from the perspective of the ovarian mechanical microenvironment. **Methods** The experiment included five groups, 3-month group (20 female mice at 3 months of age), 6-month group (20 female mice at 6 months of age), 6-month + WHF group (20 female mice at 5 months of age treated with WHF), 9-month group (20 female mice at 9 months of age), and 9-month + WHF group (20 female mice at 8 months of age treated with WHF). The 6-month + WHF group and 9-month + WHF group were orally administered WHF 41.2 g/(kg·d) once daily for 4 consecutive weeks. The other three groups received no intervention. Reproductive hormone levels were measured by ELISA. HE staining was used to count the numbers of various stages of follicles. Ovarian hyaluronic acid (HA) content and collagen fiber content were measured to evaluate the ovarian mechanical microenvironment. Superovulation was performed to observe the number of eggs obtained, as well as the number of offspring and birth weight to assess fertility. The in vitro fertilization and blastocyst culture of oocytes from female offspring in each group were observed to evaluate the effect of WHF on offspring reproductive potential. **Results** Compared with the 3-month group, the 6-month group and 9-month group showed significantly decreased serum levels of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH), decreased ovarian collagen content, and reduced numbers of primordial and secondary follicles. In contrast, the numbers of primary follicles, antral follicles, and atretic follicles increased. The levels of anti-Müllerian hormone (AMH), ovarian HA content, and the fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst formation rate of oocytes from offspring were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the 6-month group, the 6-month + WHF group showed significantly reduced serum levels of GnRH, FSH, and LH, with a significant decrease in primary follicles, antral follicles, and atretic follicles as well as increase of AMH levels, ovarian HA content, number of primordial and secondary follicle, egg count, and offspring birth weight ($P < 0.05$). Compared with the 9-month group, the 9-month + WHF group exhibited reduced GnRH, FSH, and collagen fiber content, as well as reduced number of primary follicles, antral follicles, and atretic follicles. However, AMH levels, ovarian HA content, number of primordial and secondary follicle, egg count, offspring numbers, birth weight, fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst formation rate of oocytes from offspring all significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** WHF can significantly improve the ovarian reserve, fertility, and reproductive potential in offspring during reproductive mid-life and late-life stages. Its effect may be related to the remodeling of the mechanical microenvironment of aging ovaries. Moreover, the effect on the mechanical microenvironment remodeling of late-stage ovaries and the improvement of the offspring reproductive potential is more significant.

Keywords reproductive aging; ovarian mechanical microenvironment; *Wenyang Huazhuo Formula* (温阳化浊方); ovarian reserve; reproductive hormones; reproductive potential

(收稿日期: 2024-10-17; 修回日期: 2024-11-30)

[编辑: 王利芬]