

本文引用: 周芳, 曾晶, 王永连, 陈嘉盈, 刘牧涯. 基于相关细胞凋亡途径探讨补肾健脾方调控大鼠卵巢储备功能减退的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1167-1174.

基于相关细胞凋亡途径探讨补肾健脾方调控大鼠卵巢储备功能减退的机制研究

周芳, 曾晶*, 王永连, 陈嘉盈, 刘牧涯

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007

【摘要】目的 观察补肾健脾方对环磷酰胺诱导的卵巢储备功能减退大鼠模型卵巢功能的影响, 并基于肿瘤坏死因子诱导相关细胞凋亡途径探讨补肾健脾方调控大鼠卵巢储备功能减退的机制研究。**方法** 60只动情周期正常的健康雌性SD大鼠, 随机分成正常组10只和造模组50只, 造模组采用环磷酰胺75 mg/kg 单次腹腔注射造模。造模成功的大鼠再随机分为模型组、西药组[戊酸雌二醇0.103 mg/(kg·d)+黄体酮胶囊2.575 mg/(kg·d)]、补肾健脾方低剂量组[3.21 g/(kg·d)]、补肾健脾方中剂量组[6.43 g/(kg·d)]、补肾健脾方高剂量组[12.85 g/(kg·d)], 每组10只。正常组及模型组均予等体积蒸馏水灌胃, 每组干预1次/d, 干预14 d。检测各组大鼠动情周期、体质量、卵巢脏器指数、子宫脏器指数; ELISA法检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)含量; 免疫荧光法检测大鼠卵巢颗粒细胞内B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)蛋白表达情况; HE染色检测卵巢组织病理情况; Western blot法检测卵巢磷酸化蛋白激酶B (phosphorylated-protein kinase B, p-AKT)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)、自噬蛋白苜蓿素-1(Beclin-1)表达情况。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱, 可见卵巢结构紊乱、各级卵泡数量不同程度的减少、未见成熟卵泡, 卵巢间质中见到明显炎细胞浸润; 大鼠体质量、卵巢脏器指数和子宫脏器指数无明显变化; 血清TNF- α 、IFN- γ 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$); 卵巢颗粒细胞Bcl-2、Bax、Beclin-1蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$), p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组比较, 西药组及补肾健脾方低、中剂量组血清TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P<0.05$, $P<0.01$); 补肾健脾方中剂量组Bax蛋白表达水平降低($P<0.05$); 补肾健脾方高剂量组Bcl-2蛋白阳性表达升高($P<0.05$); 西药组、补肾健脾方低剂量组Beclin-1蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$), p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平升高($P<0.01$)。与西药组比较, 补肾健脾方高剂量组TNF- α 水平升高($P<0.01$); 补肾健脾方低、高剂量组IFN- γ 水平降低($P<0.05$); 补肾健脾方低剂量组Bax蛋白表达水平升高($P<0.05$), 补肾健脾方中剂量组Bcl-2蛋白水平表达升高($P<0.05$); 补肾健脾方中、高剂量组Beclin-1蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$), p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平降低($P<0.01$)。**结论** 补肾健脾方可改善卵巢病理变化、提高卵巢储备功能, 其机制可能通过抑制肿瘤坏死因子TNF- α 、IFN- γ 表达, 增强Bcl-2蛋白表达水平, 降低Bax蛋白表达水平, 激活mTOR通路抑制大鼠卵巢颗粒细胞的自噬与凋亡, 从而改善环磷酰胺造模所致的大鼠卵巢储备功能减退的影响。

【关键词】 卵巢储备功能减退; 补肾健脾方; 肿瘤坏死因子; 细胞自噬; 细胞凋亡

【中图分类号】 R285.5

【文献标志码】 A

【文章编号】 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.07.004

The mechanism of Bushen Jianpi Formula regulating diminished ovarian reserve in rats based on related apoptosis pathways

ZHOU Fang, ZENG Jing*, WANG Yonglian, CHEN Jiaying, LIU Muya

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

【收稿日期】 2023-12-26

【基金项目】 长沙市自然科学基金项目(Kq2202452); 湖南省卫生健康委员会重点指导项目(C202305017704); 湖南省中医药管理局委托项目(D2023002); 湖南中医药大学校级重点项目(2019XJJJ036); 湖南中医药大学研究生创新课题校级项目(2023CX96)。

【通信作者】 * 曾晶, 女, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 841825639@qq.com。

[Abstract] Objective To observe the effects of Bushen Jianpi Formula (BSJPF) on ovarian function in rats with cyclophosphamide-induced decreased ovarian reserve function, and to investigate the mechanism of BSJPF regulating diminished ovarian reserve (DOR) in rats based on tumor necrosis factor-induced apoptosis pathway. **Methods** A total of 60 healthy female SD rats with normal estrous cycle were randomly divided into normal group (10 rats) and modeling group (50 rats). The modeling group was treated with a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide at 75 mg/kg to establish models. The successful modeling rats were then randomly divided into model group, western medicine control group (estradiol valerate 0.103 mg/kg·d + progesterone capsule 2.575 mg/kg·d), and low- (3.21 g/kg·d), medium- (6.43 g/kg·d), and high-dose (12.85 g/kg·d) BSJPF groups, with 10 rats in each group. Normal group and model group were given equal volume of distilled water by gavage once a day, for 14 consecutive days. Estrous cycle, body mass, ovarian organ index, and uterine organ index were checked. The content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) in serum of rats were determined by ELISA. The expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in ovarian granulosa cells were measured by immunofluorescence assay. HE staining was used to examine the pathological status of ovarian tissues. Western blot analysis was used to check the ovarian phosphorylated-protein kinase B (p-AKT), p-mammalian target of rapamycin (p-mTOR), and Beclin-1 expressions. **Results** Compared with the normal group, the estrous cycle of the model group was disturbed, the ovarian structure was disturbed, the number of follicles at all levels was reduced to different degrees, no mature follicles were seen, and obvious inflammatory cell infiltration was seen in the ovarian stroma. There were no significant changes in body mass, ovarian organ index, or uterine organ index. Serum levels of TNF- α and IFN- γ were higher ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expressions of Bcl-2, Bax, and Beclin-1 in ovarian granulosa cells were higher ($P<0.05$, $P<0.01$), while the protein expressions of p-AKT and p-mTOR were lower ($P<0.01$). Compared with model group, serum levels of TNF- α and IFN- γ were reduced in western medicine control group, and low- and medium-dose BSJPF groups ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression level of Bax protein in medium-dose BSJPF group decreased ($P<0.05$); the expression level of Bcl-2 protein in high-dose BSJPF group increased ($P<0.05$); Beclin-1 protein expressions in western medicine control group and low-dose BSJPF group decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and p-AKT and p-mTOR protein expression levels increased ($P<0.01$). Compared with western medicine control group, the level of TNF- α in high-dose BSJPF group increased ($P<0.01$); the levels of IFN- γ in the low- and high-dose BSJPF groups decreased ($P<0.05$); the expression level of Bax protein in low-dose BSJPF group increased ($P<0.05$), and the expression levels of Bcl-2 protein in medium-dose BSJPF group increased ($P<0.05$). In medium- and high-dose BSJPF groups, Beclin-1 protein expression levels increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and p-AKT and p-mTOR protein expression levels decreased ($P<0.01$). **Conclusion** BSJPF can decrease the pathological changes of ovary and strengthen ovarian reserve function. The mechanism may involve inhibiting the expressions of TNF- α and IFN- γ of tumor necrosis factor, increasing the expression of Bcl-2 and lowering the expression of Bax, and activating mTOR pathway to inhibit the autophagy and apoptosis of rat ovarian granulosa cells. The effects of cyclophosphamide modeling on DOR in rats were improved.

[Keywords] diminished ovarian reserve; Bushen Jianpi Formula; tumor necrosis factor; autophagy; apoptosis

卵巢储备功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)也称卵巢储备功能下降,是指卵巢产生卵泡的能力下降导致卵巢内可募集卵泡数量减少,伴或不伴卵母细胞质量下降,最终导致女性生育能力减弱的一种疾病^[1-2]。该病发生率为10%~35%^[3],呈逐年升高和年轻化趋势^[4],此阶段卵巢功能尚且可逆,一旦进一步发展为卵巢早衰,则不可逆转^[5],因而早期干预极为重要。现代医学运用激素替代、促排卵及辅助生殖技术等方法治疗,不仅存在诸多用药禁忌,且长期运用可致深静脉血栓、卵巢癌、乳腺癌等发生,更无法保证卵子质量^[6]。

全国名中医尤昭玲教授认为始基卵泡长期休眠

于卵巢之中,功能尚存,是治疗的靶点。补肾健脾方是尤昭玲教授从业几十年所创经验方,经过多年临床验证其能增加卵泡数量、改善卵泡质量、改善卵巢功能^[7]。研究表明,卵巢储备功能的下降多由于卵巢颗粒细胞的过度死亡而导致卵泡闭锁^[8]。颗粒细胞的死亡方式包括细胞自噬和细胞凋亡两种,卵泡闭锁通常在两者的共同作用下导致^[9]。前期基础研究证实,补肾健脾方可以通过激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(phosphorylated-protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated-mammalian target of rapamycin, mTOR)通路逆转大鼠卵巢储备功能减退,其

机制是抑制颗粒细胞过度自噬的发生和改善免疫平衡调节机制^[10]。B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)/Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)的蛋白表达水平受上游Bcl-2关联死亡启动因子(Bcl-2 associated death, BAD)调控,研究表明,Bcl-2/Bax的表达可以减少卵巢颗粒细胞凋亡,促进卵泡的生长发育和排卵^[11-12]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)等因子参与了炎症的激活和细胞凋亡的发生^[13-14]。本研究拟从细胞凋亡角度,探讨补肾健脾方调控大鼠卵巢储备功能减退的机制,进一步为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

70只SPF级雌性SD大鼠,8周龄,体质量180~220g[购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(湘)2019-0004],于湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心SPF级屏障环境中分笼饲养,温度(24 \pm 2)℃,湿度(60 \pm 5)%,12h明暗交替,适应性喂养7d。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审批号:LL2021101301)。

1.2 主要药物与试剂

补肾健脾方:菟丝子10g,莲子10g,白术10g,石斛10g,桑椹10g,黄精10g,党参10g,玉竹10g,黄芪10g,甘草5g,三七花10g,橘叶10g,山药10g。中药饮片均于湖南中医药大学第一附属医院购买,经湖南中医药大学第一附属医院药学教研室主任戴冰教授鉴定为正品。

环磷酰胺(规格:200mg/瓶,德国百特制药有限公司,批号:2F554A);戊酸雌二醇片(补佳乐,规格:1mg/片,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号:J20171038);Bax一抗(稀释比1:200)、Bax二抗(CY3山羊抗兔,稀释比1:300)、Bcl-2一抗(稀释比1:200)、Bcl-2二抗(CY3山羊抗小鼠,稀释比1:300)(赛维尔生物科技有限公司,批号:GB114122、GB21303、GB13439、GB21301);TNF- α 、IFN- γ ELISA试剂盒(武汉华联生物技术有限公司,批号:RA20666-96T、RA20211-96T)。

1.3 主要仪器

酶标分析仪、酶标洗板机(杭州奥盛仪器有限公

司,型号:AMR-100、APW-200);病理切片机(上海徠卡仪器有限公司,型号:RM2016);超速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:Heraeus Fresco 17型);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);脱色摇床、涡旋混合器、掌上离心机(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:DS-2S100、MV-100、MS6000),正置光学显微镜、正置荧光显微镜(日本尼康,型号:NIKON ECLIPSE E100、NIKON ECLIPSE C1);成像系统(日本尼康,型号:NIKON DS-U3);扫描仪(北京博知源生物科技有限公司,型号:Pannoramic MIDI)。

2 方法

2.1 DOR大鼠模型制备、分组及给药方法

70只8周龄健康雌性SD大鼠,适应性喂养7d后,每天进行1次阴道细胞学涂片观察,连续2周。选出动情周期正常的大鼠60只,随机分为正常组10只和造模组50只,参考文献[15-16]和预实验造模结果,采用环磷酰胺75mg/kg一次性腹腔注射制备DOR大鼠模型。正常组腹腔注射等体积生理盐水。造模后第1天起,进行阴道细胞学涂片,观察大鼠动情周期,连续2周,涂片显示无性周期变化(\geq 2个性周期)或动情周期明显延长(\geq 6d),提示动情周期紊乱,即造模成功^[17]。

依据随机数字表将造模成功的模型大鼠随机分为模型组、西药组以及补肾健脾方低、中、高剂量组,每组10只。正常组、模型组予等体积蒸馏水灌胃;参照灌服剂量[D]按动物与人体表面积比值系数(R)公式 $[D_{鼠}=D_{人}\times R_{鼠}/R_{人}]$ 换算^[18]。西药组予补佳乐0.103mg/(kg·d)灌胃,第4天开始加用黄体酮胶囊2.575mg/(kg·d)^[19]。补肾健脾方生药临床用量为125g/d,补肾健脾方低、中、高剂量组分别予3.21、6.43、12.85g/(kg·d)灌胃。各组灌胃体积均为10mL/(kg·d),1次/d,疗程14d。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 大鼠动情周期 每天上午8:30~9:30进行大鼠阴道细胞涂片,按照瑞氏染液说明书进行染色,显微镜下观察,根据有核和角化的上皮细胞和白细胞的比例判断动情周期^[20],连续观察2周。观察并记录各组大鼠造模后动情周期变化。

2.2.2 大鼠体质量、卵巢脏器指数与子宫脏器指数 大鼠适应性喂养 7 d 后,隔天记录大鼠体质量。取材时称取大鼠体质量、双侧卵巢质量及子宫质量,计算卵巢脏器指数及子宫脏器指数。卵巢指数=卵巢湿质量(g)/体质量(g)×100%;子宫指数=子宫湿质量(g)/体质量(g)×100%。

2.2.3 大鼠卵巢病理形态学 将去除周围脂肪组织的卵巢用 4%多聚甲醛固定,取出后石蜡包埋、切片(5 μm)。HE 染色后,脱水、中性树胶封片,晾干。显微镜观察并采集图像,用 Image Scope 软件记录。

2.2.4 大鼠外周血清 TNF-α、IFN-γ 水平 大鼠腹主动脉取血,以 3 000 r/min 离心 15 min(离心半径 10 cm)后取上层血清后于-80 °C超低温保存待检。检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,标准品稀释、加样后,设标准品孔、空白孔、样本孔。于样本孔中先加样品稀释液 40 μL,然后再加待测样品 10 μL,每孔加入酶标试剂 50 μL,封板后置于 37 °C温育 60 min。倒去液体,甩干后每孔加满洗涤液,静置 30 s 后倒掉,重复 5 次后拍干。各孔先后加入 A、B 显色剂各 50 μL,轻轻振荡混匀,37 °C避光显色 15 min,450 nm 波长按序测量各孔吸光度。

2.2.5 大鼠卵巢颗粒细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达 依次将制备好的石蜡切片脱蜡至水,修复抗原,自然冷却后 PBS(pH 7.4)清洗 OCT 胶,画圈血清封闭,滴加配好的一抗,4 °C孵育过夜,PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,加入二抗,避光孵育 50 min,PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min,抗荧光淬灭封片剂封片后拍照,用 Image Pro Plus 6.0 软件进行计算分析。

2.2.6 大鼠卵巢组织 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白及 Beclin-1 的蛋白表达 RIPA 裂解大鼠卵巢组织后

研磨,BCA 定量。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,加入 Beclin-1(1:1 000)、p-AKT(1:1 000)、p-mTOR(1:1 000),4 °C孵育过夜。再加入二抗(1:5 000,HRP 标记)室温孵育 1 h,ECL 显影后拍照,用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.3 统计学分析

应用软件 SPSS 29.0、GraphPad Prism 10.1.0 统计分析数据。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用单因素方差分析组间均值的比较,事后多重比较采用 Tukey 检验;两样本的均数比较采用独立样本 *t* 检验;自身前后对照采用配对 *t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠动情周期的情况

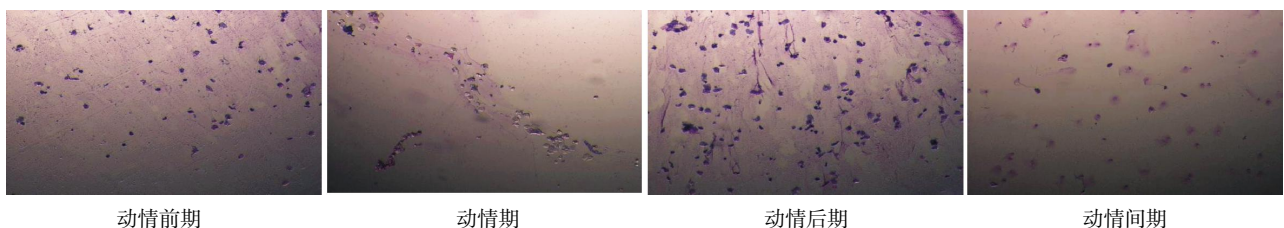
正常组动情前期可见有核上皮细胞夹杂无核角化细胞;动情期可见大量无核角化细胞,形态欠规则;动情后期同时可见有核上皮细胞、白细胞和无核角化细胞;动情间期可见大量白细胞,偶见有核上皮细胞。详见图 1。

3.2 大鼠体质量以及卵巢、子宫脏器指数的情况

各组大鼠给药前后体质量、卵巢脏器指数、子宫脏器指数之间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见表 1。

3.3 大鼠卵巢组织结构病理改变

正常组大鼠卵巢结构清晰,包括原始卵泡、初级卵泡等各级卵泡发育良好,可见完整的卵母细胞,卵巢间质中未见明显炎细胞浸润。模型组大鼠卵巢结构明显紊乱,原始卵泡、初级卵泡等各级卵泡均数目减少,闭锁卵泡显著增多,未见成熟卵泡,卵巢间质中见明显炎细胞浸润。西药组及中药各剂量组卵巢组织病理形态较模型组改善,各级卵泡及成熟卵泡



动情前期

动情期

动情后期

动情间期

图 1 正常组大鼠动情周期 GIEMSA 染色(×40)

Fig.1 Estrual cycle of rats GIEMSA (×40)

表1 补肾健脾方对DOR大鼠体质量、卵巢脏器指数和子宫脏器指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 1 Effects of Bushen Jianpi Decoction on body mass, ovarian organ index and uterine organ index of DOR rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	给药前体质量/g	给药后体质量/g	卵巢脏器指数/ $\times 10^{-3}$	子宫脏器指数/ $\times 10^{-3}$
正常组	189.75±9.54	289.75±22.17	0.34±0.05	3.35±0.14
模型组	207.38±9.03	301.13±12.15	0.31±0.02	3.12±0.09
西药组	183.51±9.33	299.13±16.30	0.37±0.06	3.28±0.11
补肾健脾方低剂量组	203.25±10.13	307.05±19.11	0.35±0.06	3.19±0.08
补肾健脾方中剂量组	195.88±9.88	291.20±19.88	0.29±0.04	3.28±0.11
补肾健脾方高剂量组	209.95±9.57	310.95±11.57	0.33±0.05	3.11±0.10

数量增加;而西药组、补肾健脾方低剂量组仍见部分闭锁卵泡,卵巢间质可见少量炎细胞浸润及纤维化;补肾健脾方中剂量组大鼠卵巢组织病理形态改善较西药组、补肾健脾方低剂量组明显,闭锁卵泡较少,补肾健脾方高剂量组改善最明显,各级卵泡数明显增加,成熟卵泡数量明显增加,未见闭锁卵泡。详见图2。

3.4 大鼠血清中 TNF- α 、IFN- γ 水平比较

与正常组比较,模型组 TNF- α 、IFN- γ 水平均升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,西药组和补肾健脾方低、中剂量组 TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P<0.05, P<0.01$),补肾健脾高剂量组 IFN- γ 水平降低($P<0.05$);与西药组比较,补肾健脾高剂量组 TNF- α 水平升高($P<0.01$),补肾健脾方低、高剂量组 IFN- γ 水平降低($P<0.05$)。详见表2。

3.5 大鼠卵巢颗粒细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组 Bcl-2、Bax 表达水平升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,西药组及补肾健脾方中剂量组 Bax 蛋白表达水平降低($P<0.05$),补肾健脾高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平升高;与西药组比较,补肾健脾方高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.05$),补肾健脾方低剂量组 Bax 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见表3及图3—4。

表2 补肾健脾方对DOR大鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)Table 2 Effects of Bushen Jianpi Formula on serum levels of TNF- α and IFN- γ in rats with DOR ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

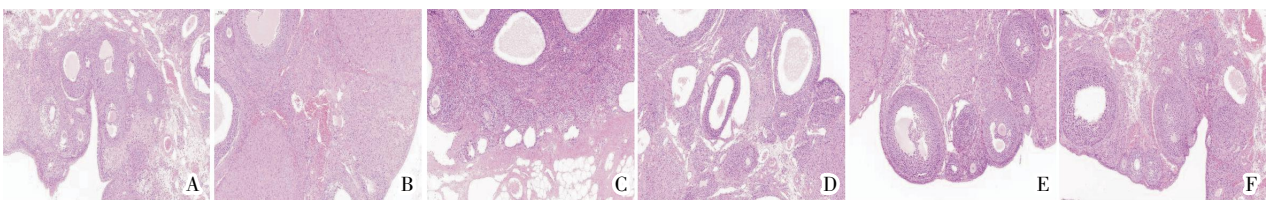
组别	TNF- α	IFN- γ
正常组	0.074±0.031	0.207±0.021
模型组	0.151±0.027**	0.383±0.042*
西药组	0.089±0.012** [^]	0.275±0.027* [^]
补肾健脾方低剂量组	0.076±0.033** [^]	0.254±0.033* [^]
补肾健脾方中剂量组	0.092±0.041** [^]	0.281±0.039* [^]
补肾健脾方高剂量组	0.138±0.025** [^]	0.254±0.033* [^]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,[^] $P<0.01$;与西药组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表3 各组大鼠卵巢颗粒细胞内Bax、Bcl-2蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 3 Protein expression levels of Bax and Bcl-2 in ovarian granulosa cells of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	Bcl-2	Bax
正常组	325.45±43.46	22.54±5.01
模型组	1 210.63±117.13**	87.62±11.14*
西药组	1 167.68±175.36**	40.24±6.34* [^]
补肾健脾方低剂量组	1 172.35±160.29**	72.49±7.29* [#]
补肾健脾方中剂量组	1 236.12±151.24**	43.39±3.37* [^]
补肾健脾方高剂量组	1 635.07±504.35** [^]	69.43±6.15*

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$;与西药组比较,[#] $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠卵巢组织病理形态 HE 染色($\times 100$)Fig.2 Pathological morphology of ovarian tissue in each group HE($\times 100$)

注:A.正常组;B.模型组;C.西药组;D.补肾健脾方低剂量组;E.补肾健脾方中剂量组;F.补肾健脾方高剂量组。

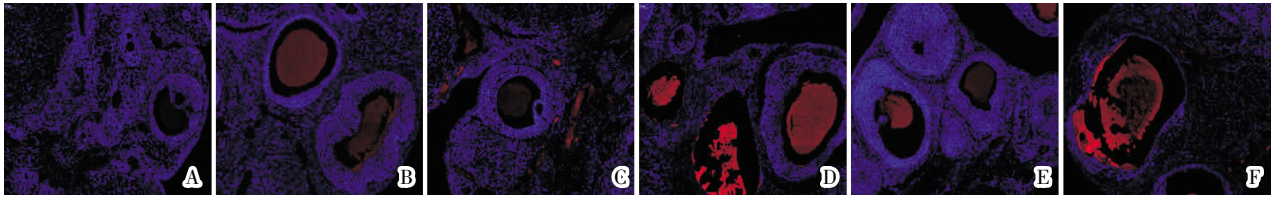


图 3 Bcl-2 蛋白阳性表达情况免疫荧光染色(×100)

Fig.3 Positive expression of Bcl-2 protein immunofluorescence staining (×100)

注: A.正常组; B.模型组; C.西药组; D.补肾健脾方低剂量组; E.补肾健脾方中剂量组; F.补肾健脾方高剂量组。

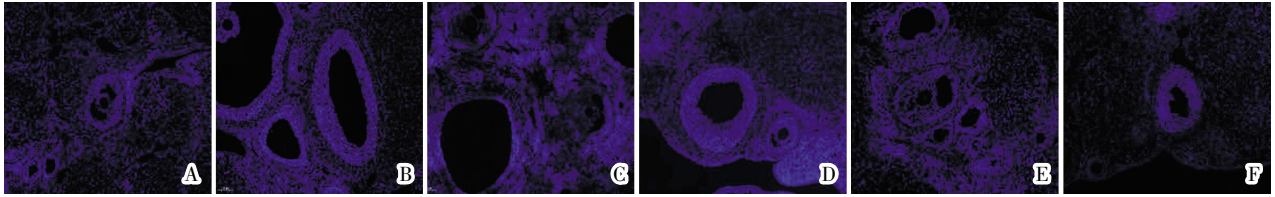


图 4 Bax 蛋白阳性表达情况免疫荧光染色(×100)

Fig.4 Positive expression of Bax protein immunofluorescence staining(×100)

注: A.正常组; B.模型组; C.西药组; D.补肾健脾方低剂量组; E.补肾健脾方中剂量组; F.补肾健脾方高剂量组。

3.6 大鼠卵巢组织 Beclin-1、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组 Beclin-1 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$);与模型组比较,西药组和补肾健脾方低剂量组 p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平升高($P<0.01$), Beclin-1 蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$);与西药组比较,补肾健脾方中、高剂量组 Beclin-1 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$), p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。详见表 4、图 5。

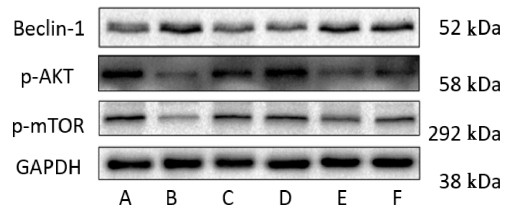


图 5 各组大鼠卵巢组织 Beclin-1、p-AKT、p-mTOR 蛋白的表达

Fig.5 Expression of Beclin-1, p-AKT and p-mTOR

proteins in ovarian tissue of rats in each group

注: A.正常组; B.模型组; C.西药组; D.补肾健脾方低剂量组; E.补肾健脾方中剂量组; F.补肾健脾方高剂量组。

表 4 各组大鼠卵巢组织 Beclin-1、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 4 Comparison of Beclin1, p-AKT and p-mTOR protein relative expression levels in ovarian tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

分组	Beclin-1	p-AKT	p-mTOR
正常组	0.627±0.061	0.497±0.077	0.661±0.211
模型组	1.021±0.058**	0.123±0.061**	0.214±0.173**
西药组	0.665±0.049 [~]	0.339±0.091 [~]	0.568±0.317 [~] **
补肾健脾方低剂量组	0.711±0.047 [~] **	0.377±0.068 [~]	0.597±0.338 [~] **
补肾健脾方中剂量组	1.025±0.030 [~] **	0.155±0.047 [~] **	0.243±0.134 [~] **
补肾健脾方高剂量组	0.976±0.044 [~] **	0.137±0.088 [~] **	0.337±0.187 [~] **

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, [~] $P<0.05$, [~]** $P<0.01$;与西药组比较, [#] $P<0.05$, [#]** $P<0.01$ 。

4 讨论

DOR 是导致排卵障碍性不孕的常见原因,经过 1~6 年可发展为卵巢早衰^[21],临床妊娠率仅 2%~4%^[22]。中医治疗 DOR 优势突出,能调节卵巢生殖轴的激素分泌、降低卵巢氧化损伤程度、促进卵子生长发育、调整月经周期、提高生育能力,临床效果显著^[23],有多靶点、多环节、毒副作用少等优势^[24]。

DOR 无中医学病名,通常归属于“月经过少”“不孕”^[25]范畴。《医学正传·妇人科》载:“月水全赖肾水施化,肾水既乏,则经水日以干涸。”肾为生殖之根,肾精亏则阴血少,胞宫不能满溢,可致闭经甚至不孕等^[26],可见肾精盛衰直接影响经血盈亏及育胎。脾虚无以运化则精血生化乏源,可致肾精亏虚、天癸不

充,严重影响卵巢储备功能^[27]。肾乃先天之本、脾为后天之本,共调女子“经、带、胎、产”,对女子“调经种子”至关重要^[28]。尤昭玲教授认为患者卵巢中担当繁育之责的卵泡虽已凋亡,但深眠冰山之下的始基卵泡保存尚好,功能尤存^[23]。病机以脾肾亏虚为主,运用补肾健脾方加减,以养先后天之精,滋阴增液、暖巢养泡,促进始基卵泡的复苏,重新担当月经、繁育之责^[29],则能事半功倍。

补肾健脾方,源于五子衍宗丸,具有补肾益精、种嗣衍宗之效。补肾健脾方在其基础上,减收涩之五味子、下行之车前子,加桑椹、莲子,增强补肾益精之效。方中党参、黄芪、白术均益气健脾;党参又有生津之效,合石斛益胃生津之效显,辅以玉竹滋阴清热,合用而健脾补气、滋阴增液,助益补肾益精,濡养卵泡,促进卵泡发育、成熟。方中怀山药健脾补肺、温肾益精;酒黄精补脾气、润肺生津;莲肉补脾益肾涩精、养心安神。三药合用,正所谓“先天生后天,后天养先天”。为宣散胞宫脉络之瘀,善用橘叶、三七花,轻清宣气、活血调经、因势利导,促进卵泡破膜。炙甘草调和诸药。

TNF- α 、IFN- γ 可诱发炎症,损伤卵巢颗粒细胞,与促进颗粒细胞凋亡联系密切^[30-31]。本实验研究结果显示,造模后大鼠动情周期紊乱,TNF- α 、IFN- γ 含量升高,提示卵巢发生炎症反应、功能受损,用药后TNF- α 、IFN- γ 含量下降,提示补肾健脾方改善卵巢功能,可能与方中党参、三七花等药具有免疫调节作用有关^[32-33]。Bcl-2/Bax被称为“凋亡开关”,参与诱导或抑制凋亡过程,从而恢复卵巢功能^[34]。NIE等^[35]研究发现,环磷酸腺苷提高了活性氧自由基在细胞内的表达水平,Beclin-1表达上调,自噬过度激活,卵泡损伤增加。PI3K/AKT/mTOR通路是调控自噬的关键信号通路,Beclin-1是自噬标志性蛋白,其表达与自噬程度呈正相关^[36-37]。此次实验研究模型组Bcl-2、Bax、Beclin-1表达升高,p-AKT和p-mTOR蛋白表达下降,给药治疗后改善了环磷酸腺苷对通路的影响,提示中药通过激活PI3K/AKT/mTOR通路,活化BAD调控Bcl-2/Bax和Beclin-1的表达,以此减少卵巢颗粒细胞自噬,可能与石斛可抑制抗凋亡蛋白^[38]、菟丝子具有雌性生殖功能调节^[39]等药理作

用密切相关。

本实验研究结果显示,造模后大鼠体质量、子宫和卵巢脏器指数未有明显变化,而阴道涂片显示大鼠动情周期紊乱、卵巢结构损伤,提示环磷酸腺苷造模成功。与正常组相比,TNF- α 、IFN- γ 、Bcl-2、Bax、Beclin-1表达升高,p-AKT和p-mTOR蛋白表达下降,各治疗组给药后各指标均较模型组有所改善,卵巢功能有明显好转。综上所述,补肾健脾方治疗DOR,其机制可能通过抑制肿瘤坏死因子TNF- α 、IFN- γ 表达,增强Bcl-2蛋白表达水平,降低Bax蛋白表达水平,激活mTOR通路抑制卵巢颗粒细胞的自噬及凋亡,从而改善卵巢储备功能,疗效显著,安全性高,值得临床推广。

参考文献

- [1] JASWA E G, MCCULLOCH C E, SIMBULAN R, et al. Diminished ovarian reserve is associated with reduced euploid rates via preimplantation genetic testing for aneuploidy independently from age: Evidence for concomitant reduction in oocyte quality with quantity[J]. *Fertility and Sterility*, 2021, 115(4): 966-973.
- [2] 徐玲, 彭雪梅, 邓磊, 等. 补肾育阴调冲方治疗肾虚型卵巢储备功能下降不孕的随机双盲对照临床研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2024, 40(1): 78-82.
- [3] JIAO Z X, BUKULMEZ O. Potential roles of experimental reproductive technologies in infertile women with diminished ovarian reserve[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2021, 38(10): 2507-2517.
- [4] 王世宣. 卵巢衰老的影响因素、临床评价及管理策略共识[J]. *实用妇产科杂志*, 2019, 35(11): 823-827.
- [5] 尹芳. 补肾疏肝方改善IVF-ET失败患者卵巢储备功能下降的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [6] 乔林, 熊英, 徐克惠. “中国绝经管理和绝经激素治疗指南(2018)”解读[J]. *实用妇产科杂志*, 2019, 35(3): 184-187.
- [7] 曾晶, 周芳, 刘天洋, 等. 补肾健脾方治疗卵巢储备功能减退相关不孕脾肾两虚证临床观察[J]. *中医药导报*, 2024, 30(1): 70-74.
- [8] 赵昱璇, 梁启惠, 陈雯, 等. 基于“肾主生殖”理论探讨中医治疗DOR型不孕症的生物学机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 320-326.
- [9] 潘雨. 非编码RNA调控水牛卵泡颗粒细胞功能的机制研究[D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- [10] 唐丽, 牟珍妮, 申思楠, 等. 基于PI3K/Akt/mTOR通路探讨助卵汤对大鼠早发性卵巢功能不全的保护作用机制[J]. *中国实*

- 验方剂学杂志, 2023, 29(4): 52-59.
- [11] LI S Y, CHEN J L, FANG X L, et al. Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to inhibit chemotherapy induced human granulosa cell apoptosis[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2017, 33(6): 476-479.
- [12] 肖 潇, 刘艳霞, 危一飞, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨益肾疏肝汤对卵巢储备功能减退大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴及卵巢颗粒细胞凋亡的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2023, 32(8): 1023-1029.
- [13] HAN G T, ZHANG Y B, LI H H. The combination treatment of curcumin and probucol protects chondrocytes from TNF- α induced inflammation by enhancing autophagy and reducing apoptosis via the PI3K-Akt-mTOR pathway[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 5558066.
- [14] 熊 露, 刘 莉, 胡雅君. TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 及生殖激素在卵巢早衰中的水平变化及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(6): 745-748.
- [15] 林光耀, 张米佳, 叶 涛, 等. 一次性腹腔注射环磷酰胺致卵巢储备功能下降模型大鼠意外死亡的病理分析[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(6): 730-735.
- [16] XIE Q, LIAO Q Y, WANG L J, et al. The dominant mechanism of cyclophosphamide-induced damage to ovarian reserve: Premature activation or apoptosis of primordial follicles?[J]. *Reproductive Sciences*, 2024, 31(1): 30-44.
- [17] 王景尚, 张 莹, 杨 维, 等. 温肾养血颗粒对卵巢储备功能低下模型大鼠卵巢储备功能及子宫内膜形态的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(5): 2931-2935.
- [18] 刘 凯. 补肾活血方对去卵巢大鼠骨质疏松症血清 IL-6、TNF- α 水平的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [19] 潘丽贞, 王 英, 钟文亮, 等. 补肾活血序贯法对薄型子宫内膜大鼠内膜形态及 VEGF、Vimentin、CK12 蛋白表达的影响[J]. *中国中医药科技*, 2024, 31(2): 205-210.
- [20] 谢蓬蓬. 加减益经汤基于 SDF-1/CXCR4 调控 Th17/Treg 免疫平衡改善卵巢储备功能减退的临床观察及实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2021.
- [21] 刘小莉, 李春瑶, 赵粉琴. 左归丸联合激素替代治疗卵巢储备功能下降的经验总结[J]. *中医临床研究*, 2021, 13(11): 102-104.
- [22] ZANGMO R, SINGH N, KUMAR S, et al. Role of dehydroepiandrosterone in improving oocyte and embryo quality in IVF cycles[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2014, 28(6): 743-747.
- [23] 邢艺璇, 唐 诗, 刘未艾, 等. 基于“冰山论”辨治卵巢储备功能减退性不孕症: 全国名中医尤昭玲学术思想与临床经验研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(5): 775-779.
- [24] 刘恭雪, 曹焕泽, 蔡平平. 中药复方治疗卵巢储备功能减退 Meta 分析[J]. *河南中医*, 2021, 41(11): 1703-1712.
- [25] 章小娟, 赵 锐, 陈 阳, 等. 针灸调周法治疗肾虚血瘀型卵巢储备功能下降的临床观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(7): 1678-1684.
- [26] 朱文渊, 杜彦芳. 归肾丸对卵巢储备功能减退小鼠模型卵巢自噬的影响[J]. *河北中医药学报*, 2023, 38(4): 11-15.
- [27] 王秀青, 夏 敏, 姚 瑶, 等. 夏敏辨治卵巢储备功能下降不孕症验案举隅[J]. *实用中医药杂志*, 2023, 39(6): 1229-1232.
- [28] 吕孝丽, 郜 洁, 周月希, 等. 罗颂平治疗卵巢储备功能下降不孕症经验[J]. *中医杂志*, 2020, 61(13): 1139-1141.
- [29] 伍 琴, 张韞玉, 刘慧萍, 等. 尤昭玲教授治疗早发性卵巢功能不全经验[J]. *陕西中医*, 2021, 42(7): 941-943.
- [30] JIANG Y, ZHANG Z Y, CHA L J, et al. Resveratrol plays a protective role against premature ovarian failure and prompts female germline stem cell survival[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3605.
- [31] 艳 秋, 杨亚林, 杨佩诗, 等. 朱氏调经方对早发性卵巢功能不全的疗效及炎症免疫损伤的影响[J]. *世界中医药*, 2023, 18(15): 2190-2194.
- [32] 张重阳, 于 森, 陈荣昌, 等. 党参药理作用的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(5): 765-770.
- [33] 魏馨瑶. 三七花蛋白的提取纯化、功能性质及其抗凝血活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021.
- [34] 林光耀. 葆青颗粒对卵巢储备功能下降模型大鼠性激素水平和 Bax、Bcl-2、VEGF 的影响[D]. 泸州: 西南医科大学, 2022.
- [35] NIE Z Y, ZHANG L, CHEN W, et al. The protective effects of pretreatment with resveratrol in cyclophosphamide-induced rat ovarian granulosa cell injury: in vitro study[J]. *Reproductive Toxicology*, 2020, 95: 66-74.
- [36] 白 俊, 赵晓鹏, 王海静, 等. 补肾活血法调控 PI3K/AKT/mTOR 通路修复卵巢颗粒细胞自噬损伤机制研究[J]. *陕西中医*, 2023, 44(5): 547-551.
- [37] XU H D, QIN Z H. Beclin-1, Bcl-2 and Autophagy[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 109-126.
- [38] 王治丹, 代云飞, 罗尚娟, 等. 铁皮石斛化学成分及药理作用的研究进展[J]. *华西药学杂志*, 2022, 37(4): 472-476.
- [39] 王 莹, 张婧如, 田 伟, 等. 菟丝子及其提取物药理机制研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(11): 1961-1964.

(本文编辑 田梦妍)