

补肾养血活血类中药复方调控线粒体稳态治疗 卵巢功能减退类疾病的研究进展

史薇¹, 刘敏¹, 王智超², 吴克明^{1*}

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075;

2. 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006)

[摘要] 卵巢功能减退类疾病主要包括卵巢储备功能减退、早发性卵巢功能不全、卵巢早衰等,是因多种原因造成女性生育力下降的一类疾病。卵巢颗粒细胞线粒体功能障碍会干扰生殖细胞能量供应路径,影响卵泡发育和卵子质量。因此,线粒体稳态在此类疾病发病机制中的作用逐渐受到重视。中医认为此类疾病的病机本质是肾气不足、精血亏虚、因虚致瘀,据此确立补肾养血活血为根本治疗方法,善用补肾益精和养血活血药物为主组成的中药复方,可有效改善卵巢性激素分泌及排卵功能以提高女性生殖能力,其临床疗效确切且具有异病同治的独特优势。补肾养血活血类中药复方对“气血”的作用与线粒体功能具有密切联系,越来越多的研究对补肾养血活血类中药复方调控线粒体稳态以发挥保护卵巢功能的相关作用机制进行了实验探索。基于此,该综述总结阐述了补肾益精与养血活血中药共用的复方动态调控线粒体稳态,用以治疗卵巢功能减退类疾病的实验研究,探讨补肾养血活血类中药复方通过改善线粒体功能、对抗线粒体氧化应激损伤和调节线粒体质量与数量等方式多效应、多靶点调控卵巢细胞内线粒体稳态,促进卵泡发育,延缓卵巢功能衰老的相关机制研究进展,以期为深层次研究中医药提高女性生育力提供新的角度。

[关键词] 补肾养血活血; 中药复方; 卵巢功能减退类疾病; 线粒体; 研究进展

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)01-0240-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221627

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220620.1655.004.html>

[网络出版日期] 2022-06-21 15:31

Effect of Chinese Herbal Compounds for Tonifying Kidney and Nourishing and Activating Blood on Mitochondrial Homeostasis in Treatment of Hypovarianism Diseases: A Review

SHI Wei¹, LIU Min¹, WANG Zhichao², WU Keming^{1*}

(1. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Modern Research Center for TCM of Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] Hypovarianism diseases mainly include diminished ovarian reserve, premature ovarian insufficiency, and premature ovarian failure, which decreased female reproductive capacity due to various causes. Mitochondrial dysfunction in ovarian cells can interfere with the pathway of mitochondrial energy supply to germ cells and affect follicular development and egg quality. Therefore, the role of mitochondrial homeostasis in the pathogenesis of such diseases has gradually received attention. Traditional Chinese medicine (TCM) believes that the pathogenesis of hypovarianism diseases is deficiency of kidney Qi, essence and blood as well as stasis caused by deficiency. Accordingly, tonifying kidney and nourishing and activating blood is established as the fundamental treatment. In TCM, Chinese herbal compounds for tonifying kidney, replenishing essence, and

[收稿日期] 2022-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873334)

[第一作者] 史薇,在读博士,从事中医药调控月经失调的机制研究,E-mail:601507503@qq.com

[通信作者] * 吴克明,教授,博士生导师,从事中医药调控月经失调的临床与机制研究,E-mail:wkmxs@163.com

nourishing and activating blood were mostly used, which can improve the secretion of ovarian hormones and ovulatory function to enhance female reproductive capacity. These compounds have definite clinical efficacy and unique advantage of treating different diseases with same method. The effect of Chinese herbal compounds for tonifying kidney and nourishing and activating blood on "Qi and blood" is closely related to mitochondrial function, and thus more and more studies have been conducted to explore the experimental mechanism of these Chinese herbal compounds in regulating mitochondrial homeostasis and protecting ovarian function. On this basis, the paper summarized and elaborated the experimental studies on the dynamic regulation of mitochondrial homeostasis in the treatment of hypovarianism diseases by Chinese herbal compounds for tonifying kidney, replenishing essence and nourishing and activating blood. Moreover, the paper reviewed the related mechanism of regulating mitochondrial homeostasis in ovarian cells, promoting follicular development, and delaying ovarian aging by Chinese herbal compounds for tonifying kidney and nourishing and activating blood through improving mitochondrial function, resisting mitochondrial oxidative stress damage as well as regulating mitochondrial quality and quantity in multi-effect and multi-target way, in order to provide a new perspective for further research on improving female fertility with Chinese medicine.

[Keywords] tonifying kidney and nourishing and activating blood; Chinese herbal compounds; hypovarianism diseases; mitochondria; research progress

卵巢功能减退类疾病主要包括卵巢储备功能减退(DOR)、早发性卵巢功能不全(POI)、卵巢早衰(POF)、月经失调、围绝经期综合征(MPS)及不孕症等,是以月经改变及生育力减退为主要临床表现的一系列疾病。全球育龄期夫妇不孕症发病率10%~15%^[1],卵巢功能减退引起的生殖力下降是女性不孕的主要原因之一。流行病学研究指出不予医疗干预的DOR患者可在1~6年内进展为POF^[2],即使在辅助生殖技术参与下,妊娠成功率仍不理想。人口问题与国家命运紧密相连,随着国家三孩生育政策的实施,一方面是育龄期女性在诸多因素影响下卵巢功能减退和生育力下降的现状,另一方面是因年龄等因素造成卵巢储备功能减退与高龄女性新增生育需求之间的矛盾。因此,改善卵巢细胞功能、延缓生殖衰老成为临床和科研亟需解决的问题。

线粒体结构及功能正常是卵泡浆成熟的重要标志^[3-6],为卵泡发育提供所需能量,促使卵巢排出健康的卵子,发挥卵巢的生殖功能。据此,许多学者认为因线粒体功能障碍而引起能量供应不足所诱发的细胞质与细胞核发育不同步可能是卵子质量低下、卵巢功能减退的重要原因^[7-9]。线粒体在多种因素刺激下易发生肿胀、嵴断裂甚至空泡化等形态和结构缺失、通透性及膜电位改变、遗传突变等异常,导致活性氧(ROS)累积增加和三磷酸腺苷(ATP)生成减少等功能损伤^[10],由此造成的能量代谢失衡可能是DOR、POI和POF等卵巢功能减退类

疾病的重要发病机制^[11]。为避免线粒体功能障碍引起卵巢细胞能量代谢失衡诱发细胞异常程序性死亡,线粒体会通过动力学、生物合成和自噬等自身调节方式应对细胞内线粒体病理性改变,以保护线粒体功能。尽管线粒体功能正常对于保护卵巢细胞微环境内稳态和延缓卵巢功能减退具有重要意义,但线粒体参与卵巢衰老进程的具体机制目前尚未完全阐明。

卵子是胚胎形成、发育及妊娠结局的决定性因素,如何提高卵子质量仍是中西医临床治疗的重点与难点。经历了千年的探索实践及总结,中医药形成了对卵巢功能减退类疾病的独特理论认知,即肾是藏精之所,也是维系胞宫、经水运行和主胎孕产的根本。女性生理功能以血为本,经、孕、产、乳数伤于气血,形成女性“血常不足,气非有余”的生理病理特点。“气为血之帅”,肾气不足则温煦胞宫和推血运行功能减弱,日久必生瘀血阻滞胞宫胞络而发病。依据以上理论,本课题组认为肾气不足、精血亏虚,因虚致瘀是此类疾病的基本病机,确立补肾养血活血为根本治疗大法,发现配伍以补肾益精和养血活血类中药为主的中药复方新加苁蓉菟丝汤在治疗卵巢功能减退类疾病方面取得良好的临床疗效^[12]。另有临床研究表明补肾养血活血法指导下组成的中药复方可发挥中医药整体调控优势,改善冻融胚胎移植周期子宫内膜血流状态、提高临床妊娠率^[13],此类复方可能通过调控线粒体相关机制保护卵巢细胞^[14-16]。此外,基础研究也证实补肾

健脾养血活血方可通过抑制线粒体DNA(mtDNA)的缺失突变延缓衰老^[17]。据此,本文将从改善线粒体功能、对抗氧化应激损伤、调控线粒体质量与数量动态稳定3个方面进行论述,总结阐述补肾养血活血类中药复方调控线粒体稳态发挥对卵巢细胞的保护效应机制。

1 补肾养血活血类中药复方调节线粒体形态、数量及功能

线粒体是细胞能量供应器,线粒体数量、形态和功能变化均可影响卵巢细胞活性。卵巢颗粒细胞(GCs)内线粒体氧化磷酸化(OXPHOS)产生大量ATP是卵泡生长发育和成熟获取能量的重要途径^[18]。因此,诸多学者认为颗粒细胞线粒体功能稳定对维持正常卵泡发育具有至关重要的作用^[19-20],将线粒体功能作为评价卵子潜力的重要参考指标之一^[21-23]。

细胞内ATP含量测定和线粒体膜电位(MMP)是评估细胞OXPHOS水平及线粒体活性和功能的重要指标^[24-27]。研究发现卵子质量和胚胎发育情况

与线粒体ATP合成功能有关,在高极化阶段(即膜电位升高)时ATP生成功能增强,而在细胞凋亡或坏死初期ATP合成因氧化应激损害而降低^[28]。线粒体活力直接影响MMP表达,对卵母细胞发育具有负面作用,可最终影响胚胎异常发育^[29]。线粒体的OXPHOS过程主要依赖于多重酶复合体的活性,其中复合体I-IV组成了电子传递链,而复合体V作为三磷酸腺苷合成酶参与ATP产生为细胞供能。LIU等^[30]发现高龄女性颗粒细胞ATP水平明显下降,同时伴有复合体V表达水平降低,进一步证实了卵巢功能与线粒体能量代谢密切相关。

实验证实乌黄汤、补肾调经方和毓麟珠可明显改善小鼠卵母细胞内线粒体含量及形态,提高MMP表达,促进ATP合成以改善细胞活性^[31-33]。左归丸、二仙汤和温肾填精汤均可增强细胞内ATP合成,为细胞存活和功能稳定提供必需的能量供应^[34-37]。具体方药组成对线粒体形态、数量及功能相关指标调节情况见表1。

表1 补肾养血活血类中药复方对卵巢及其细胞线粒体形态、数量及功能的影响

Table 1 Effect of tonifying kidney, nourishing and activating blood chinese herbal compounds on mitochondrial morphology, quantity and function of ovary and its cell

复方	药物组成	干预对象	造模机制及方式	指标作用
乌黄汤	山茱萸、菟丝子、肉苁蓉、鸡血藤、丹参、乌药等	24周龄雌性小鼠卵母细胞	自发性模型(动情周期紊乱小鼠)	ATP ↑, MMP ↑, 线粒体含量 ↑, 线粒体形态改善
补肾调经方	枸杞子、女贞子、淫羊藿、菟丝子、肉苁蓉、山茱萸、地黄、当归等	8~10周龄雌性昆明小鼠卵母细胞	卵巢低反应模型(重复性促性腺激素+人绒毛膜促性腺激素造模)	ATP ↑, MMP ↑, 线粒体含量 ↑
二仙汤	仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归等	11月龄雌性小鼠卵巢颗粒细胞	自然衰老模型(自然衰老小鼠)	ATP ↑, MMP ↑, 线粒体含量 ↑, 线粒体呼吸链复合物 ↑
毓麟珠	当归、熟地黄、人参、菟丝子、杜仲、川芎等	7~8周龄BALB/c雌性小鼠卵母细胞	自身免疫模型(小鼠透明带3透明带多肽粉+弗氏完全佐剂造模)	MMP ↑, 线粒体含量 ↑, 线粒体形态改善
左归丸	熟地黄、菟丝子、枸杞子、山萸肉、山药、牛膝等	11月龄小鼠卵巢颗粒细胞	自然衰老模型(自然衰老小鼠)	ATP ↑, MMP ↑
温肾填精方	熟地黄、山茱萸、菟丝子、淫羊藿、肉苁蓉、山药等	4~6周龄昆明雌性小鼠卵巢组织	核酸代谢抑制模型(羟甲基脲造模)	ATP ↑

注: ↑, 升高; ↓, 降低(表2、表3同)

2 补肾养血活血类中药复方对抗线粒体氧化应激损伤

在细胞应激反应中,线粒体抗氧化系统是细胞应激状态下启动线粒体调控的初级防线^[38]。既往研究证实氧化应激对女性生殖存在负面影响,可能是女性生育力减退的重要原因^[39]。SOUBANNIER等^[40]发现线粒体呼吸状态决定了细胞氧化应激程度,提示线粒体呼吸链是生物体内ROS产生的重要位点。因细胞能量代谢失衡ROS快速累积造成的

线粒体氧化损伤是导致线粒体功能障碍的重要因素^[41]。大量ROS会引起细胞钙离子内稳态受损,ATP合成停滞,线粒体膜电位改变,最终导致卵母细胞老化^[42]。

氧化应激增强是诱导卵母细胞自噬和凋亡的主要因素之一^[43]。卵巢内ROS与抗氧化物失衡可启动细胞凋亡路径关键信号^[44-45],有研究发现颗粒细胞凋亡与ROS含量呈正相关^[46]。细胞衰老伴随ROS过量产生和抗氧化酶生成减少^[47],不仅造成

蛋白质、脂类、核酸损伤^[48],还会导致线粒体肿胀和嵴断裂等形态损伤及ATP合成障碍、线粒体膜电位失衡等功能损伤,进一步启动细胞凋亡程序^[49]。钟静文^[50]对经典补肾方剂五子衍宗丸进行网络药理学分析发现其可能是通过干预线粒体及凋亡受体提高抗氧化酶活性,减少氧化应激反应发生,从而抑制细胞凋亡,达到促卵泡发育的目的。

线粒体也是ROS诱导氧化损伤的主要靶细胞器。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)等构成了线粒体抗氧化系统,可响应ROS作为信使所产生的氧化还原信号,参与细胞氧化-抗氧化动态平衡调节机制^[51],有

利于维护细胞线粒体功能稳定。此外,线粒体内氧化-抗氧化失衡可以影响卵巢甾体激素合成,干扰女性内分泌功能^[44-45,52],导致卵泡发育障碍。范丽洁^[32]用在体和离体实验证明补肾调经方可以降低细胞内ROS、丙二醛(MDA)和活性氧自由基8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平,提高SOD和GSH-Px表达,对抗氧化应激损伤,避免更多线粒体丧失功能甚至死亡,发挥对于卵母细胞的保护效应。此外,补肾促卵方、毓麟珠、资癸益冲方、二仙汤、补肾调冲方等^[33,53-56]均可以通过平衡细胞内线粒体氧化-抗氧化水平,发挥改善卵巢生殖细胞功能的作用。方药组成对线粒体氧化应激相关指标调节见表2。

表2 补肾养血活血类中药复方对卵巢及其细胞线粒体氧化应激的影响

Table 2 Effect of tonifying kidney, nourishing and activating blood chinese herbal compounds on oxidative stress in mitochondria of ovary and its cell

复方	药物组成	干预对象	造模机制及方式	指标作用
补肾调经方	山茱萸、枸杞子、女贞子、淫羊藿、菟丝子、肉苁蓉、熟地黄、当归等	8~10周龄雌性昆明小鼠卵母细胞	卵巢低反应模型(重复性促性腺激素+人绒毛膜促性腺激素造模)	ROS↓,SOD↑,MDA↓,GSH-Px↑,8-OHdG↓
补肾促卵方	菟丝子、女贞子、枸杞子、桑寄生、续断、当归、川牛膝等	8周雌性Balb/c小鼠卵巢组织	自身免疫模型(雷公藤多苷造模)	SOD↑,MDA↓,CAT↑,GSH-Px↑,8-OHdG↓
毓麟珠	当归、熟地黄、人参、菟丝子、杜仲、川芎等	7~8周龄Balb/c雌性小鼠卵母细胞	自身免疫模型(小鼠透明带三透明带多肽粉+弗氏完全佐剂造模)	ROS↓,SOD↑,MDA↓,GSH-Px↑
资癸益冲方	山萸肉、紫河车、熟地黄、当归、白芍、炙黄芪、枸杞子、女贞子、党参、白术、香附	SD大鼠卵巢组织	自身免疫模型(环磷酰胺造模)	SOD↑,MDA↓,CAT↑,GSH-Px↑
二仙汤	仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归等	15月龄SD雌性大鼠卵巢组织	自然衰老模型(自然衰老小鼠)	SOD↑,MDA↓,CAT↑,GSH-Px↑
补肾调冲方	菟丝子、巴戟天、肉苁蓉、鹿角霜、熟地黄、当归、川芎、紫石英、五味子	3~4周龄雌性ICR小鼠卵母细胞	氧化应激模型(3-硝基丙酸造模)	SOD↓,CAT↓,GSH-Px↓

3 补肾养血活血类中药复方调节线粒体质量控制

线粒体质量控制是细胞通过调控线粒体数量及质量并维持线粒体内环境稳态和功能稳定的一系列重要机制,其过程复杂而精细,涉及防御外界干扰物、修复应激损伤、清除堆积产物与更新线粒体等多层次调控阶段^[57]。线粒体动力学、线粒体自噬和线粒体生物合成这3种不同机制的协调配合共同构成了线粒体质量控制系统。

线粒体动力学包括线粒体分裂与融合,是线粒体数量和质量控制的基础。线粒体融合蛋白1/2(Mfn1/2)、视神经萎缩蛋白1(OPA1)主要参与线粒体内膜和外膜融合^[58];而内源性动力相关蛋白1(Drp1)、线粒体裂解蛋白1(Fis1)和线粒体分裂因子(Mff)主要参与线粒体分裂^[59]。正常情况下,线粒体的融合和分裂这2个反向机制相互协调共同维系细胞内线粒体数量及功能的动态稳定。压力状态下,功能受损的线粒体可以分裂产生部分受损和严

重受损的子代,前者与正常线粒体进行物质交换以恢复线粒体形态完整性及生物功能对抗应激,后者则被线粒体自噬选择性降解清除^[60-63]。研究证实敲低Mfn2可抑制线粒体融合进程,使MMP和ATP水平明显下降,影响线粒体形态和功能^[64-68],此外Mfn2还参与PINK1/Parkin介导的线粒体自噬。而Drp1表达增加引起线粒体过度分裂可导致GCs线粒体功能障碍和对葡萄糖摄取能力下降,严重影响卵母细胞发育和卵泡成熟^[69]。

线粒体生物合成和线粒体自噬可促进线粒体自身的更新与降解,是调控线粒体数量和质量的双重保障机制。过氧化物酶体增殖激活受体γ辅激活因子-1α(PGC-1α)是线粒体合成的主要调控因子,通过激活负责线粒体基因转录和复制的关键因子核受体核呼吸因子1/2(NRF1/2),促进线粒体转录因子A(mTFA)调控mtDNA参与线粒体数量及功能的调节。近年来PGC-1α在调控卵泡发育和闭锁、

卵巢激素合成与分泌等方面的作用渐受关注^[70]。ZHANG等^[71]和MARTINEZ-REDONDO等^[72]发现PGC-1 α 可能参与调节抑制素、抗苗勒管激素(AMH)和雌激素受体(ER)及其相关受体的基因活性及表达。DIMAURO等^[73]研究发现线粒体功能减退往往伴随着mtDNA的异常增高,临床研究也证实DOR患者颗粒细胞mtDNA变异率高达66%^[74]。线粒体自噬是通过包裹和降解受损线粒体的自我清除机制^[75]。线粒体损伤或功能障碍时细胞可通过ROS大量累积、释放有毒细胞因子方式等启动PINK/Parkin和Bnip3介导的线粒体自噬途径^[76-78],清除受损线粒体,维持细胞内环境稳态,避免细胞死亡。线粒体动力学调控也是线粒体自噬

前的关键环节^[79],研究证实高龄小鼠GCs较适龄组Drp1和OPA1 mRNA表达显著增高,PINK/Parkin通路被激活,线粒体动态平衡被打破,卵巢细胞活性下降功能受损^[80]。

卵巢功能减退的发病机制可能与线粒体合成数量和功能紊乱密切相关^[81]。郑凌琦^[31]发现乌黄汤可增加PGC-1 α 和NRF1/2的mRNA表达,促进线粒体生物合成;董文然等^[36]发现温肾填精方可通过干预线粒体融合和分裂机制恢复线粒体功能。诸多实验均证实补肾养血活血类中药复方可调控细胞内线粒体数量及质量,维护细胞内环境稳态,保护卵巢细胞活力,改善卵巢储备功能。具体方药组成对线粒体质量控制相关指标调节情况见表3。

表3 补肾养血活血类中药复方对卵巢及其细胞线粒体质量控制的影响

Table 3 Effect of tonifying kidney, nourishing and activating blood Chinese herbal compounds on mitochondrial quality control of ovary and its cell

复方	药物组成	干预对象	造模机制及方式	指标作用
乌黄汤	山茱萸、菟丝子、肉苁蓉、鸡血藤、丹参、乌药等	24周龄雌性小鼠卵母细胞	自发性模型(动情周期紊乱小鼠)	PGC-1 α \uparrow , NRF1/2 \uparrow 蛋白表达和mRNA
温肾填精方	熟地黄、淫羊藿、肉苁蓉、山茱萸、山药、菟丝子等	4~6周龄昆明雌性小鼠卵巢组织	核酸代谢抑制模型(羟基脲造模)	Mfn1 \uparrow , OPA1 \uparrow , Drp1 \uparrow , Fis1 \uparrow mRNA
左归丸	熟地黄、菟丝子、枸杞子、山萸肉、山药、牛膝等	11月龄小鼠卵巢颗粒细胞	自然衰老模型(自然衰老小鼠)	PGC-1 α \uparrow , OPA1 \uparrow , PINK1 \uparrow 蛋白表达
二仙汤	仙茅、淫羊藿、巴戟天、当归等	11月龄雌性小鼠卵巢颗粒细胞	自然衰老模型(自然衰老小鼠)	PGC-1 α \uparrow , PINK \uparrow 蛋白表达
新加苁蓉菟丝子汤	菟丝子、肉苁蓉、覆盆子、山茱萸、鸡血藤、淫羊藿、熟地黄、当归、枸杞子等	7~8周龄雌性SD大鼠卵巢组织	自身免疫模型(雷公藤甲素造模)	LC3 II/LC3 I \downarrow , p62 \uparrow 蛋白水平及mRNA

4 讨论

线粒体为细胞提供能量是细胞存活必要条件,这一过程依赖于线粒体自身形态及功能正常、对抗氧化损伤及线粒体自身数量与质量的动态平衡。既往诸多研究通过临床试验证实补肾养血活血类中药复方治疗卵巢功能减退类疾病疗效良好^[15-17],通过基础研究探究中医药治疗此类疾病涉及氧化应激、细胞自噬与凋亡等多种机制^[56,82]。研究证实补肾养血活血类中药复方可以通过改善线粒体功能紊乱、纠正氧化-抗氧化失衡、调节线粒体质量控制等多种机制共同调控线粒体数量及质量,减少细胞自噬及凋亡相关通路激活,保护卵巢细胞功能,延缓卵巢生殖寿命衰老进程。

中医根据不同临床表现将卵巢功能减退类疾病归属于“月经先后不定期”“经量过少”“闭经”“不孕”等范畴。早在《黄帝内经》记载“人始生,先成精”,强调先天之精是人类生育繁衍的物质基础。肾精化生肾气,肾气充盛则天癸至,开启女性孕育

后代的生殖时段,女子七七理论详细论述了肾气盛衰对天癸从泌至到竭绝整个过程的影响。肾中精气充盛,气血和调对于女性卵巢生殖功能具有重要意义,补肾养血活血类中药复方调控精气血的作用与线粒体功能密切相关。气属阳而无形,包括人体生命原动力元气、灌注心脉以运血的宗气和水谷精微所化之营气,“气”的功能与现代医学所认知的作为动力和能量工厂的线粒体发挥的功能十分相似。肾中所藏精气与女性生殖最为密切,早期线粒体通过分化促进细胞生长增殖,当成熟的细胞达到一定数量共同体现脏器功能,与肾气激发、推动、促进生殖之精作用类似。“气主煦之”,线粒体通过不断合成ATP给细胞供能以维持细胞活性相当于肾气温养胞宫。血属阴而有形,明代虞抟《医学正传》云:“月经全借肾水施化,肾水既乏,则经血日以干涸”,血液运行如常时由血红蛋白为卵巢细胞提供存活所必须的氧气,为卵巢细胞线粒体功能创造优势微环境。“血主濡之”,妇人以血为本,精血是天癸至

经水行的物质基础。线粒体是细胞存活的动力基础,卵巢细胞活性决定了卵巢功能。卵子发育起源于原始生殖细胞,在内分泌作用下生殖细胞经过募集、筛选到最终排出完成从始基卵泡到成熟卵泡的生长发育、成熟或闭锁的动态周期性变化过程。与此同时,子宫内膜受卵巢分泌性激素的影响周期性增殖、分泌及脱落。《黄帝内经》载:“女子二七天癸至,任脉通,太冲脉盛……女子七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭”,肾中精气充足则血液化生有源,任脉为阴脉之海调节气血运行,由此可见线粒体为生殖细胞和子宫内膜细胞存活提供所需能量,以确保其发挥生殖功能,这与中医的精气血作用类似。

尽管在中药复方中已有经典方二仙汤、自拟方新加苁蓉菟丝子汤等^[37,53-54,56,82]实验研究探索了线粒体介导的促卵泡发育与延缓卵巢衰老的效应与机制,但从中药有效成分、有效部位对卵巢细胞内线粒体的作用研究相对不足。目前仅有一些文献报道补肾益精或养血活血单味药物活性成分对神经、心肌、胰岛等细胞线粒体的保护作用。如补肾益精中药菟丝子和肉苁蓉主提取物金丝桃苷和松果菊苷可抑制神经和胰岛细胞内ROS过度产生,维护线粒体形态及功能,减少细胞凋亡^[83-85];而地黄提取物梓醇则通过AMPK信号通路参与线粒体生物合成,调节氧化应激和凋亡蛋白表达^[86-88]。养血活血类代表药物丹参主要有效成分丹参酮I和II可通过增加抗氧化酶表达对抗氧化应激损伤,保护心肌和神经细胞线粒体功能,抑制细胞的凋亡并提高细胞活力^[89-91]。另有报道补肾养血活血中药复方可以抑制小鼠肾线粒体DNA缺失与突变,改善卵泡发育,延缓机体衰老进程^[17,82]。综上所述,补肾益精或养血活血单味药有效成分可通过干预线粒体发挥抗氧化抗凋亡作用,而补肾养血活血中药复方则能通过调控线粒体形态、数量及功能、对抗氧化应激损伤、调节细胞自噬和凋亡等多层次保护卵巢功能,延缓卵巢衰老。然而,目前尚无补肾养血活血中药复方活性物质成分群影响线粒体功能的研究报道,其配伍组成的中药复方内活性剂有效成分如何经线粒体途径对卵巢生殖细胞产生积极作用及其相关分子机制等方面仍待进一步探索研究。

近年来通过现代医学手段,许多研究证实卵巢功能减退类疾病模型中可见线粒体形态及功能异常。据此,现代中医将“阴阳气血”与“线粒体能量”相联系,将“肾藏精主生殖”与“线粒体相关网络机制”相结合,从宏观和微观2个层面诠释中医药对于

卵巢功能的保护作用,充分体现了中医思维体系中整体观念的多角度、多效应、多靶点优势。目前在调控卵巢细胞线粒体稳态的效应及机制方面的研究仍处于探索阶段,中医药对于线粒体分裂与融合、线粒体生物合成和自噬、细胞自噬和凋亡等方面的双向动态调节作用及多通路之间交互作用等许多未知领域仍需要进一步深入探究,从更多维度、更深层次探索和揭示以补肾养血活血为代表治法的中医药改善卵子质量、促进卵泡发育、治疗卵巢功能减退类疾病、延缓生殖衰老性疾病的效应作用机制和药理作用靶点,对于提高临床疗效、规范临床治疗、促进中医学术传承具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 张若鹏. 高通量基因表达谱测序差异与体外受精—胚胎移植结局相关性研究[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
- [2] 韩玉芬,程淑蕊,敬文娜,等. 卵巢储备功能下降的预测及治疗[J]. 中国计划生育学杂志, 2007, 15(2):117.
- [3] WILDING M, COPPOLA G, DALE B, et al. Mitochondria and human preimplantation embryo development [J]. *Reproduction*, 2009, 137(4): 619-624.
- [4] VAN BLERKOM J, DAVIS P W, LEE J. Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after *in-vitro* fertilization and embryo transfer [J]. *Hum Reprod*, 1995, 10(2):415-424.
- [5] VAN BLERKOM J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: Engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence [J]. *Reproduction*, 2004, 128(3): 269-280.
- [6] ZENG H T, YEUNG W S B, CHEUNG M P L, et al. *In vitro*-matured rat oocytes have low mitochondrial deoxyribonucleic acid and adenosine triphosphate contents and have abnormal mitochondrial redistribution[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(3):900-907.
- [7] 王宝娟,宫政,宏佳怡,等. SIRT1通过抑制卵母细胞衰老改善储备功能的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2020, 39(1):45-48.
- [8] MIAO Y L, KIKUCHI K, SUN Q Y, et al. Oocyte agings: Cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility [J]. *Hum Reprod Update*, 2009, 15(5):575-585.
- [9] KEEFE D, KUMAR M, KALMBACH K. Oocyte

- competency is the key to embryo potential[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(2):317-322.
- [10] 张越. 补肾活血方改善卵巢储备功能的临床疗效及调控线粒体 SIRT3 的机理研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2020.
- [11] CHATZISPYROU I A, ALDERS M, GUERRERO-CASTILLO S, et al. A homozygous missense mutation in ERALL encoding a mitochondrial rRNA chaperone, causes perrault syndrome [J]. *Hum Molecular Genetics*, 2017, 26(13):2541-2550.
- [12] 贺宇. 补肾养血活血法治疗卵泡发育障碍类疾病的导师临床经验总结及实验研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2020.
- [13] 辛喜艳, 李东, 郭佳, 等. 补肾养血活血法改善冻融胚胎移植周期子宫内膜血流状态提高临床妊娠率的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1):469-472.
- [14] 辛明蔚, 李玛建, 何军琴, 等. 资坤汤治疗卵巢储备功能下降月经后期阴虚血燥证的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13):138-143.
- [15] 梁韵茹, 李孔益, 李妙华, 等. 当归调经养血合剂治疗卵巢储备功能下降临床研究[J]. *新中医*, 2021, 53(3):90-94.
- [16] 孙爱军, 唐旭东, 张巧利, 等. 卵巢储备功能降低不孕症中西医结合治疗的理论与临床试验研究探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8):148-157.
- [17] 王正引, 张小如, 兰风华. 补肾健脾养血活血方对老年小鼠肾线粒体 DNA 缺失突变的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(11):652-654.
- [18] SUTTON-MCDOWALL M L, GILCHRIST R B, Thompson J G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence [J]. *Reproduction*, 2010, 139(4):685-695.
- [19] LOUNAS A, VERNOUX N, GERMAIN M, et al. Mitochondrial sub-cellular localization of cAMP-specific phosphodiesterase 8A in ovarian follicular cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 28(9):12493.
- [20] ZHAO W P, WANG H W, LIU J, et al. Mitochondrial respiratory chain complex abnormal expressions and fusion disorder are involved in fluoride-induced mitochondrial dysfunction in ovarian granulosa cells[J]. *Chemosphere*, 2019, 215:619-625.
- [21] 朱静, 周怡然, 陈蓓丽, 等. 卵巢储备功能减退与线粒体遗传异常[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2017, 36(5):417-420.
- [22] CHIARATTI M R, MEIRELLES F V. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(1):1-2.
- [23] WANG T R, ZHANG M, JIANG Z L, et al. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2017, 77(5):e12651.
- [24] BEN-MEIR A, YAHALOMI S, MOSHE B, et al. Coenzyme Q-dependent mitochondrial respiratory chain activity in granulosa cells is reduced with aging [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(3):724-727.
- [25] EICHENLAUB-RITTER U. Oocyte ageing and its cellular basis[J]. *Int J Dev Biol*, 2012, doi:10.1387/ijdb.120141ue.
- [26] SELESNIEMI K, LEE H J, MUHLHAUSER A, et al. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(30):12319-12324.
- [27] SEUL-KI L, ZHAO M H, JUNG-WOO K, et al. The association of mitochondrial potential and copy number with pig oocyte maturation and developmental potential[J]. *J Reprod Dev*, 2014, 60(2):128-135.
- [28] LEMASTERS J J, QIAN T, BRADHAM C A, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 1999, doi:10.1023/A:1005419617371.
- [29] PELLESTOR F, ANAHORY T, HAMAMAH S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes[J]. *Cytogen Genome Res*, 2005, 111(3/4):206-212.
- [30] LIU Y F, HAN M, LI X S, et al. Age-related changes in the mitochondria of human mural granulosa cells [J]. *Hum Reprod (Oxford, England)*, 2017, 32(12):2465-2473.
- [31] 郑凌琦. 卵巢储备功能下降中医证素分析及乌黄汤对小鼠线粒体能量代谢影响[D]. 北京:北京中医药大学, 2021.
- [32] 范丽洁. 补肾法改善氧化应激提高重复 COS 卵母细胞线粒体功能与调控 Nrf2 信号通路的关系[D]. 石家庄:河北医科大学, 2017.
- [33] 杨珍, 冯逊逊, 董晓英. 毓麟珠通过改善小鼠卵巢微环境防治早发性卵巢功能不全的作用机制研究[J]. *生殖医学杂志*, 2020, 29(2):231-237.
- [34] 赵新永, 孙岩, 赵鸿森, 等. 左归丸对自然衰老小鼠卵母细胞线粒体功能的改善作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(8):924-929.
- [35] 李清瑜. 左归丸联合西曲瑞克经 SIRT1/P53/P21 通路平衡卵泡氧化应激反应改善环磷酰胺所致的卵巢储备下降的实验研究[D]. 广州:暨南大学, 2020.
- [36] 董文然, 刘奕, 陆华. 温肾填精方及其拆方对肾阳虚不孕小鼠生殖功能的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(8):

- 2654-2659.
- [37] 赵新永, 王丽君, 周飞. 二仙汤对自然衰老小鼠卵巢颗粒细胞线粒体的改善作用[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(4):10-14.
- [38] 孙秀玉. 白藜芦醇基于线粒体质量控制的抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的分子机制研究[D]. 北京: 中央民族大学, 2018.
- [39] WANG S, HE G L, CHEN M, et al. The role of antioxidant enzymes in the ovaries[J]. *Oxidative Med and Cellul Long*, 2017, doi:10.1155/2017/4371714.
- [40] SOUBANNIER V, RIPPSTEIN P, KAUFMAN B A, et al. Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e52830.
- [41] ÁVILA J, GONZALEZ-FERRENDEZ R, ROTOLI D, et al. Oxidative stress in granulosa-lutein cells from in vitro fertilization patients [J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(12):1656.
- [42] FUJII J, IUTOSHI Y, OKADA F. Fundamental roles of reactive oxygenspecies and protective mechanisms in the female reproductive system [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, doi:10.1186/1477-7827-3-43.
- [43] TIWARI M, PRASAD S, TRIPATHI A, et al. Apoptosis in mammalian oocytes: A review [J]. *Apoptosis*, 2015, doi:10.1007/s10495-015-1136-y.
- [44] DEVINE J P, PERREAULT S D, LUDERER U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity[J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(2):1-10.
- [45] WU Y, ZHANG N, LI Y H, et al. Citrinin exposure affects oocyte maturation and embryo development by inducing oxidative stress-mediated apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2017, doi:10.18632/oncotarget.15776.
- [46] ALMEIDA C P, FERREIRA M C, SILVEIRA C O, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells-a review [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(10):1276-1281.
- [47] ZIA A, FARKHONDEH T, POURBAGHER-SHAHRI A M, et al. The roles of mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in aging and senescence[J]. *Curr Mol Med*, 2022, 22(1):37-49.
- [48] HAMANAKA R B, CHANDEL N S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes [J]. *Trend Biochem Sci*, 2010, 35(9):505-513.
- [49] WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(22):2922-2933.
- [50] 钟静文. 基于网络药理学和分子对接探讨五子衍宗丸治疗卵巢早衰的分子机制[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [51] KOTIADIS V N, DUCHEN M R, OSELLAME L D. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(4):1254-1265.
- [52] MAGANHIN C C, SIMOES R S, FUNCHS L F, et al. Melatonin influences on steroidogenic gene expression in the ovary of pinealectomized rats [J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(1):291-298.
- [53] 陈燕霞. 补肾促卵方调控PI3K和Nrf2信号通路保护卵巢储备功能低下的机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020.
- [54] 陆星星, 任豆豆, 徐华洲, 等. 资癸益冲方对卵巢储备功能下降模型大鼠卵巢氧化损伤的影响及其作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(7):561-568.
- [55] 周勇. 基于cAMP/PKA/CREB信号通路探讨二仙汤对围绝经期综合征模型大鼠的作用及机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [56] 曹颖. 补肾调冲方通过抑制ROS改善小鼠卵母细胞质量的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [57] CHU C T. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: Implications for Parkinson disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(1):28-37.
- [58] GAO S, HU J J. Mitochondrial fusion: The machineries in and out[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 31(1):62-74.
- [59] FAN H L, HE Z J, HUANG H F, et al. Mitochondrial quality control in cardiomyocytes: A critical role in the progression of cardiovascular diseases [J]. *Front Physiol*, 2020 March 27, 11(27):252.
- [60] ATKINS K, DASGUPTA A, CHEN K H, et al. The role of Drp1 adaptor proteins MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission: implications for human disease [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(21):1861-1874.
- [61] ROY M, REDDY P H, IJIMA M, et al. Mitochondrial division and fusion in metabolism [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.001.
- [62] MEYER J N, LWUTHNER T C, LUZ A L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity [J]. *Toxicology*, 2017, doi: 10.1016/j.tox.2017.07.019.
- [63] GONG G, SONG M, CSORDAS G, et al. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic

- maturation in mice [J]. *Science*, 2015, 350 (6265) : add2459.
- [64] WANG L J, SONG S, LIU X M, et al. Low MFN2 expression related to ageing in granulosa cells is associated with assisted reproductive technology outcome [J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 38 (2) : 152-158.
- [65] CAMPOS J C, BOZI L H M, BECHARA L R G, et al. Mitochondrial quality control in cardiac diseases [J]. *Front Physiol*, 2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00479.
- [66] CHEN Y, LIU Y Q, DORN G W. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis [J]. *Circ Res*, 2011, 109 (12) : 1327-1331.
- [67] DORN G W. Parkin-dependent mitophagy in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.023.
- [68] CHANDHOK G, LAZAROU M, NEUMANN B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease [J]. *Biol Rev*, 2018, 93 (2) : 933-949.
- [69] 朱金玲. MC-LR 导致卵巢颗粒细胞线粒体功能障碍和葡萄糖摄入量减少的机制研究 [D]. 南京: 南京大学, 2020.
- [70] 葛婷, 杨晓葵. PGC-1 α 与卵巢功能及相关研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2021, 40 (2) : 142-146.
- [71] ZHANG G, WAN Y, ZHANG Y, et al. Expression of mitochondria-associated genes (PPARGC1A, NRF-1, Bcl-2 and Bax) in follicular development and atresia of goat ovaries [J]. *Reprod Domest Anim*, 2015, 50 (3) : 465-473.
- [72] MARTINEZ-REDONDO V, PETERSSON A T, RUAS J L. The hitchhiker's guide to PGC-1 α isoform structure and biological functions [J]. *Diabetologia*, 2015, doi:10.1007/s00125-015-3671-z.
- [73] DIMAURO S, SCHON E A. Mitochondrial respiratory-chain diseases [J]. *N Engl J Med*, 2003, doi:10.1056/NEJMra022567.
- [74] BOUCRET L, BARCA J M C D L, MORINIERE C, et al. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30 (7) : 1653-1664.
- [75] DRAKE L E, SPRINGER M Z, POOLE L P, et al. Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.008.
- [76] ASHRAFI G, SCHWARZ T L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondrial [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20 (1) : 31-42.
- [77] NAH J, MIYAMOTO S, SADOSHIMA J. Mitophagy as a protective mechanism against myocardial stress [J]. *Compr Physiol*, 2017, 7 (4) : 1407-1424.
- [78] SONG M, MIHARA K, CHEN Y, et al. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts [J]. *Cell Metab*, 2015, 21 (2) : 273-286.
- [79] IKEDA Y, SHIRAKABE A, BRADY C, et al. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.019.
- [80] 黄川梦圆. 高龄与卵巢颗粒细胞线粒体功能变化的相关性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [81] VAN BLERKOM J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11 (5) : 797-813.
- [82] 郜然然. 补肾养血活血法经 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控凋亡及自噬流促卵泡发育的分子机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [83] ZHOU L Y, YAO M, TIAN Z R, et al. Echinacoside attenuates inflammatory response in a rat model of cervical spondylotic myelopathy via inhibition of excessive mitochondrial fission [J]. *Free Radical Bio Med*, 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.014.
- [84] ZHANG Y L, YU X M, WANG M M, et al. Hyperoside from *Z. bungeanum* leaves restores insulin secretion and mitochondrial function by regulating pancreatic cellular redox status in diabetic mice [J]. *Free Radical Bio Med*, 2021, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.320.
- [85] DENG M, ZHAO J Y, TU P F, et al. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNF α -induced apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 505 (1/3) : 11-18.
- [86] XU D Q, LI C J, JIANG Z Z, et al. The hypoglycemic mechanism of catalpol involves increased AMPK-mediated mitochondrial biogenesis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, doi: 10.1038/s41401-019-0345-2.

- [87] ZHANG Y K, WANG C Y, JIN Y, et al. Activating the PGC-1 α /TERT pathway by catalpol ameliorates atherosclerosis via modulating ROS production, DNA damage, and telomere function: Implications on mitochondria and telomere link [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi:10.1155/2018/2876350.
- [88] GAO X J, XU J J, LIU H B. Protective effects of catalpol on mitochondria of hepatocytes in cholestatic liver injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2424-2432.
- [89] ZHANG Z Y, HE H, QIAO Y, et al. Tanshinone II_A pretreatment protects H9c2 cells against anoxia/reoxygenation injury: Involvement of the translocation of Bcl-2 to mitochondria mediated by 14-3-3 η [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/3583921.
- [90] SUK-HYUN W, HYO-JEONG L, SOO-JIN J, et al. Tanshinone II_A induces mitochondria dependent apoptosis in prostate cancer cells in association with an inhibition of phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(11):1828-1834.
- [91] DE OLIVEIRA M R, Schuck P F, BOSCO S M D. Tanshinone I induces mitochondrial protection through an Nrf2-dependent mechanism in paraquat-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6):4597-4608.

[责任编辑 张丰丰]