

# 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

唐丽, 牟珍妮, 申思楠, 雷磊\*

(湖南中医药大学 中西医结合学院, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 观察助卵汤对环磷酰胺诱导的早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢储备功能的影响, 并基于磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路探讨助卵汤对大鼠早发性卵巢功能不全的保护机制。方法: 60只雌性SD大鼠随机分为正常组10只, 模型组50只, 模型组采用环磷酰胺(第1天 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 负荷剂量+第2~15天 $8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 小剂量维持)腹腔注射进行造模, 造模成功后随机分为模型组、阳性药物补佳乐组( $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )、助卵汤低、中、高剂量组( $14, 28, 56\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), 每组10只, 模型组与正常组予以等体积蒸馏水灌胃, 每日1次, 连续给药21 d。检测各组大鼠动情周期、体质量, 计算卵巢脏器指数与子宫脏器指数, 苏木素-伊红(HE)染色检测卵巢组织病理情况及卵巢切面各级卵泡计数, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清抗苗勒激素(AMH)、促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)、抑制素-B(INH-B)激素含量, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达, 免疫组化检测大鼠卵巢组织微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)蛋白的表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱, 体质量及卵巢脏器指数与子宫脏器指数减少, 原始卵泡数量减少, 次级卵泡和闭锁卵泡数量增多, FSH升高( $P<0.01$ ), LH升高( $P<0.05$ ), AMH水平下降( $P<0.05$ ), 卵巢组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达量均降低( $P<0.01$ ), LC3B蛋白表达量显著增加( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 补佳乐和助卵汤各剂量组上述指标均改善, AMH含量升高( $P<0.05$ ), FSH降低( $P<0.05$ ), LC3B蛋白表达量显著降低( $P<0.01$ ), PI3K、Akt、mTOR蛋白表达量均有升高趋势, 且补佳乐组和助卵汤低、中剂量组升高差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: 助卵汤可能通过激活PI3K/Akt/mTOR通路抑制卵巢颗粒细胞过度自噬的发生, 从而逆转造模对大鼠卵巢储备功能的影响。

**[关键词]** 早发性卵巢功能不全(POI); 助卵汤; 冰山论; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路; 自噬

**[中图分类号]** R2-0; R33; R289; R274.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0052-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20222444

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.r.20221213.1639.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-12-14 16:40:49

## Protective Mechanism of Zhuluan Decoction in Rats with Premature Ovarian Insufficiency Based on PI3K/Akt/mTOR Pathway

TANG Li, MU Zhenni, SHEN Sinan, LEI Lei\*

(College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Zhuluan decoction on the ovarian reserve function of rats with cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency, and explore the protective mechanism of Zhuluan decoction in the rat model of premature ovarian insufficiency based on the phosphatidylinositol-3-kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway. **Method:** Sixty female SD rats were randomly divided into normal group ( $n=10$ ) and model group ( $n=50$ ). The model group

**[收稿日期]** 2022-09-02

**[基金项目]** 湖南中医药大学校级科研基金重点项目(2020XJJ001)

**[第一作者]** 唐丽, 在读博士, 医师, 从事中西医结合妇产科生殖与内分泌疾病防治研究, E-mail: 1451962023@qq.com

**[通信作者]** \*雷磊, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合妇产科生殖与内分泌疾病防治研究, E-mail: leilei1398@qq.com

was given intraperitoneal injection of cyclophosphamide ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  loading dose on the 1<sup>st</sup> day +  $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  low-dose maintenance on the 2<sup>nd</sup> - 15<sup>th</sup> days). After successfully modeling, the rats were randomly divided into model group, positive drug (progynova) group ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and low-, medium-, and high-dose Zhuluan decoction groups ( $14, 28, 56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), with 10 rats in each group. The model group and the normal group were given equal volume of distilled water by gavage, once a day, continuous administration for 21 d. The estrous cycle and body weight of rats in each group were detected, and the ovarian organ index and uterine organ index were calculated. The ovarian tissue pathology and ovarian follicle counts at all levels were determined by hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of the serum antimullerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and inhibin-B (INH-B) of rats was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expression levels of PI3K, Akt, mTOR in the rat ovarian tissue were determined by Western blot. The microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) protein expression in the rat ovarian tissue was determined by immunohistochemistry. **Result:** As compared with the blank group, the estrous cycle of rats in the model group was disordered, the body weight, ovarian organ index, and uterine organ index decreased, the number of primordial follicles decreased, and the number of secondary follicles and atretic follicles increased. In the model group, FSH increased ( $P < 0.01$ ), LH increased ( $P < 0.05$ ), AMH level decreased ( $P < 0.05$ ), the protein expression levels of PI3K, Akt, and mTOR in the ovarian tissue decreased ( $P < 0.01$ ), and the protein expression level of LC3B increased significantly ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the above indexes were improved in the progynova group and different doses of Zhuluan decoction groups, the content of AMH increased ( $P < 0.05$ ), and FSH decreased ( $P < 0.05$ ). In the progynova group and different doses of Zhuluan decoction groups, the protein expression level of LC3B decreased obviously ( $P < 0.01$ ), and the protein expression levels of PI3K, Akt, and mTOR all showed an increasing trend. Moreover, there was a statistically significant difference in the progynova group and low- and medium-dose Zhuluan decoction groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Zhuluan decoction may inhibit the occurrence of excessive autophagy in ovarian granulosa cells by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway, thereby reversing the effect of modeling on ovarian reserve in rats.

**[Keywords]** premature ovarian insufficiency; Zhuluan decoction; Bingshan theory; phosphatidylinositol-3-kinases/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway; autophagy

早发性卵巢功能不全(POI)是指妇女在月经初潮以后到40岁以前由于卵巢功能衰退而引起月经异常(闭经、月经稀发或频发)、生殖障碍、性欲下降、围绝经综合征等一系列病症<sup>[1]</sup>。现代POI的发病率不断上升,为1%~5%<sup>[2]</sup>,并不断趋于年轻化<sup>[3]</sup>,而导致本病的病因复杂,病证深重,严重影响妇女的身心健康及家庭和谐,是妇科疑难病症。临床治疗主要以激素替代治疗为主,然而该方法治标不治本,只能改善症状,停止干预后症状反复,且具有血栓形成风险增加、乳腺癌患病风险增加等不良反应,不宜长期使用,具有较多的局限性<sup>[4]</sup>。因此,寻找安全有效治疗POI的新方案十分迫切。

助卵汤是尤昭玲教授依据其创新性理论“冰山论”所创立的经验方,立“健脾补肾,暖巢养泡”之法,以后天脾胃水谷精微充养转圜,“唤醒冰山之下沉寂卵泡”,担当起行经孕育职责,临床疗效颇

丰<sup>[5-8]</sup>。前期已有研究发现助卵汤可通过提高小鼠卵巢细胞中沉默信息调节子1(SIRT1)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)/p53/p21通路活性,改变细胞凋亡状态,从而改善卵巢储备功能<sup>[9]</sup>。然而对其分子机制的研究尚不完善。自噬是程序性细胞死亡的另一种方式,已有研究表明自噬在POI发病进程中发挥重要作用<sup>[10-11]</sup>。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)激酶是自噬诱导过程中的关键分子,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)作为其上游分子,可激活mTOR从而抑制自噬的发生。现代研究表明PI3K/磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)/Akt通路<sup>[12]</sup>、PI3K/Akt/mTOR信号通路<sup>[13]</sup>的功能作用在原始生殖细胞发展和卵巢原始卵泡的动态储备,这些信号通路的失调可能导致卵巢生殖细胞肿瘤和卵巢功能障碍。且原始卵泡体外激活技术(IVA)原理与PI3K/Akt信号通路息息相关<sup>[14]</sup>,而IVA技术是POI

患者获取生育力的重要的现代技术手段。故本研究通过环磷酰胺建立卵巢早衰大鼠模型,给予尤氏助卵汤进行干预,从PI3K/Akt/mTOR自噬通路探讨助卵汤治疗早发性卵巢功能不全的疗效机制,以期POI的治疗提供新的思路。

## 1 材料

**1.1 动物** 8周龄SPF级雌性SD大鼠60只,体质量220~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2019~0004。分笼饲养于湖南中医药大学动物实验中心SPF级屏障环境中,温度(22±2)℃,湿度(50±5)%,12 h光暗交替,适应性喂养7 d。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(LL2021101301)。

**1.2 药物与试剂** 助卵汤由党参15 g、黄芪15 g、白术15 g、三七花5 g、橘叶10 g、葛根10 g、覆盆子10 g、枸杞子10 g、山药10 g、盐菟丝子15 g、莲子10 g、石斛10 g、玉竹10 g、百合10 g、甘草5 g组成,饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,由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;戊酸雌二醇片(补佳乐,1 mg/片,拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号J20171038);环磷酰胺(CTX,200 mg/瓶,德国Baxter Oncology GmbH公司,批号H20160467);瑞氏染液(北京索莱宝科技有限公司,货号G1040),苏木素、伊红染色液、免疫组化通用二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为ZLI-9610、ZLI-9613、PV9000);PI3K抗体、Akt抗体、mTOR抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为20584-1-AP、60203-2-Ig、66888-1-Ig);LC3B抗体[艾比玛特生物医药(上海)有限公司,货号T55992];甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Affinity公司,货号AF7021);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G、HRP标记山羊抗兔IgG(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为E-AB-1001、E-AB-1003);ECL高效化学发光试剂盒(美国Genview公司,货号GE2301-100ml);大鼠抗缪勒管激素(AMH)、大鼠促卵泡素(FSH)、大鼠黄体生成素(LH)、抑制素B(INH-B)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海抚生实业有限公司,货号分别为A109075-96T、A108205-96T、A107986-96T、6900-96T)。

**1.3 仪器** Bsis Hei-VAP型旋转蒸发器(德国Heidolph公司),Heraeus Fresco 17型超速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),Mini-

PROTEAN Tetra型电泳槽、Mini Trans-Blot型转膜槽、Gel Doc XR+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),CytationTM3型多功能酶标仪(美国BioTek公司),MOTIC/BA410E+S5型生物显微镜及摄像系统(中国麦克奥迪实业集团有限公司)。

## 2 方法

**2.1 POI大鼠模型制备及给药方法** 将60只SD雌性大鼠分笼适应性喂养7 d,连续进行阴道分泌物涂片1周并行瑞氏染色观察动情周期,60只大鼠动情周期均正常,纳入实验,采用随机数字表法分为正常组10只和模型组50只。各组均喂养普通饲料,正常饮水。造模参考文献[15-17]建立POI大鼠模型,第1天予以50 mg·kg<sup>-1</sup>负荷剂量CTX腹腔注射给药,后8 mg·kg<sup>-1</sup>小剂量腹腔注射给药维持14 d。并自造模第1天起继续监测动情周期14 d,出现动情周期紊乱、延长甚至停滞提示造模成功。正常组予以等体积生理盐水腹腔注射给药。

将造模成功的50只大鼠按随机数字表法分为模型组、阳性药补佳乐组、助卵汤低、中、高剂量组,每组10只。助卵汤低、中、高剂量分别予以14、28、56 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,其中低剂量是大鼠与60 kg成人的等效剂量,中、高剂量分别为低剂量的2、4倍;补佳乐组予以补佳乐0.1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃;模型组与正常组予以等体积蒸馏水灌胃,各组灌胃体积均为10 mL·kg<sup>-1</sup>,每日1次,连续给药21 d。

### 2.2 检测指标及方法

#### 2.2.1 动物体质量、卵巢脏器指数与子宫脏器指数

大鼠适应性喂养1周后、造模给药前后、取材时分别称取大鼠体质量并予以记录,开始给药后每隔3 d测量体质量并记录;取材时分别称取双侧卵巢及子宫质量,计算卵巢脏器指数(双侧卵巢质量/体质量×100%)及子宫脏器指数(子宫质量/体质量×100%)。

**2.2.2 动情周期** 每天上午8:00—9:00行阴道涂片检查,涂片后参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可判断动情周期<sup>[18]</sup>。记录并统计各组大鼠造模后动情周期变化,正常周期持续4~5 d,有序;≥5 d但有序进展为动情周期延长;动情周期无规律可循为动情周期紊乱;停滞在动情周期的某一阶段为动情周期停滞。动情周期紊乱、动情周期延长甚至停滞则提示造模成功。

**2.2.3 苏木素-伊红(HE)染色检测卵巢组织病理情况及卵巢切面各级卵泡计数** 取出固定在4%多聚甲醛中的一侧大鼠卵巢,梯度乙醇脱水,二甲苯透

明,石蜡包埋,切片(5  $\mu\text{m}$ 连续切片),脱蜡复水,常规HE染色、盐酸乙醇分化,二甲苯透明,中性树脂胶封片,置于通风橱中晾干后显微镜下观察并选取大致相同卵巢切面进行各级卵泡计数并记录。

**2.2.4 ELISA检测大鼠血清中AMH、FSH、LH、INH-B含量** 全血3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径6 cm),吸取上层血清,参照ELISA试剂盒操作步骤进行操作,以空白孔调零,450 nm波长依序测定各孔的吸光度A。根据样品的A由标准曲线计算AMH、FSH、LH、INH-B含量。

**2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达** 将冻存的卵巢组织取出研磨匀浆,取上清弃沉淀,参照BCA蛋白质浓度测定试剂盒说明书测定蛋白含量,调整蛋白浓度为2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。制备5%浓缩胶+10%分离胶,将样品与标准品蛋白按10  $\mu\text{L}$ /孔进行上样,电泳、封闭、孵育对应一抗(PI3K, 1:1 000; Akt, 1:10 000; mTOR, 1:20 000; GAPDH, 1:20 000)和二抗[PI3K为兔抗,二抗选择羊抗兔IgG(1:10 000); Akt、mTOR、GAPDH为鼠抗,二抗选择羊抗鼠IgG(1:10 000)]。ECL显影液显影,凝胶成像系统曝光显影成像,用Image J软件进行蛋白定量分析。

**2.2.6 免疫组化检测大鼠卵巢组织LC3B蛋白的表达** 将制备好的石蜡切片烤片65  $^{\circ}\text{C}$ ,1 h,常规脱蜡至水,柠檬酸钠抗原修复,参照免疫组化通用二步法检测试剂盒说明书进行相关操作,1:200稀释一抗LC3B。用Image J软件进行蛋白定量分析。

**2.3 统计学分析** 采用SPSS 25.0统计软件和GraphPad Prism 8.0.1进行数据分析,计量数据资料均使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据符合正态分布且符合方差齐性检验采用单因素方差分析,组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD),不符合正态分布使用独立样本非参数检验,方差不齐者进行事后检验,计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对POI大鼠体质量及卵巢和子宫脏器指数的影响** 与正常组比较,模型组大鼠体质量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,补佳乐组和助卵汤高剂量组小鼠体质量明显升高( $P<0.05, P<0.01$ )。与正常组比较,模型组大鼠子宫和卵巢脏器指数均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,补佳乐组、助卵汤中、高剂量组大鼠子宫指数显著升高( $P<0.01$ ),补佳乐组、助卵汤高剂量组卵巢指数均显著升高( $P<0.01$ );与

补佳乐组比较,助卵汤高剂量组差异无统计学意义。见表1。

表1 助卵汤对POI大鼠体质量、子宫脏器指数与卵巢脏器指数的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 1 Effect of Zhuluan decoction on body weight, uterine index and ovarian index of rats of POI ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	体质量变化值/g	子宫脏器指数/ $\times 10^{-3}$	卵巢脏器指数/ $\times 10^{-3}$
正常组		49.80 $\pm$ 3.77	2.38 $\pm$ 0.15	0.54 $\pm$ 0.06
模型组		36.60 $\pm$ 3.29 <sup>2)</sup>	1.69 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	0.35 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>
补佳乐组	0.000 1	46.00 $\pm$ 5.39 <sup>3)</sup>	2.36 $\pm$ 0.23 <sup>4)</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>4)</sup>
助卵汤低剂量组	14	28.40 $\pm$ 7.23	1.81 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.04
助卵汤中剂量组	28	40.00 $\pm$ 4.64	2.06 $\pm$ 0.13 <sup>4)</sup>	0.37 $\pm$ 0.05
助卵汤高剂量组	56	47.40 $\pm$ 6.66 <sup>4)</sup>	2.29 $\pm$ 0.18 <sup>4)</sup>	0.44 $\pm$ 0.06 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2-表6同)

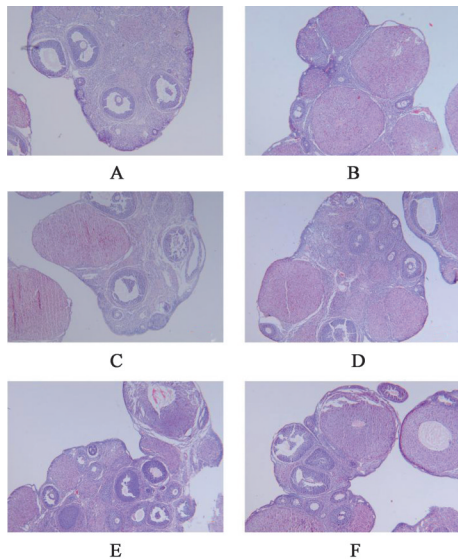
**3.2 对POI大鼠动情周期的影响** CTX造模后,大鼠动情周期出现延长、紊乱甚至停滞。给予补佳乐及中药助卵汤干预后,大鼠动情周期紊乱、延长、停滞现象改善并逐渐恢复正常。

**3.3 对POI大鼠卵巢的保护作用**

**3.3.1 对POI大鼠卵巢病理结构的影响** 正常组卵巢组织结构完整,形态规则,卵泡发育正常,卵丘、卵母细胞结构清晰;与正常组比较,模型组卵巢明显缩小,形态不规则,发育不良,卵泡数量减少,卵丘、卵母细胞结构不清晰;与模型组比较,补佳乐组和中药干预组卵巢缩小情况改善,卵泡数量增多,发育完整,卵丘、卵母细胞结构较模型组清晰。见图1。

**3.3.2 助卵汤对POI大鼠卵巢各级卵泡数目的影响** 与正常组比较,模型组原始卵泡数目显著减少( $P<0.01$ ),次级卵泡及闭锁卵泡数目显著增多( $P<0.01$ );与模型组比较,各治疗组原始卵泡数量显著增加( $P<0.01$ ),闭锁卵泡数目显著减少( $P<0.01$ ),补佳乐组次级卵泡数量明显减少( $P<0.05$ ),初级卵泡、成熟卵泡数目统计各组的差异均无统计学意义。见表2。

**3.4 对POI大鼠血清AMH、FSH、LH、INH-B激素含量的影响** 与正常组比较,模型组AMH值明显降低( $P<0.05$ ),FSH与LH水平均明显升高( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,各治疗组AMH水平明显升高( $P<0.05$ ),FSH水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),且助卵汤各剂量组与补佳乐组比较差异无统计学意义,补佳乐组和助卵汤中剂量组LH水平明



注:A.正常组;B.模型组;C.补佳乐组;D.助卵汤低剂量组;E.助卵汤中剂量组;F.助卵汤高剂量组(图2和图3同)

图1 助卵汤对POI大鼠卵巢结构的病理影响(HE,×40)

Fig. 1 Pathological effects of Zhuluan decoction on ovary structure of POI rats (HE,×40)

显著降低( $P<0.05$ )。见表3。

**3.5 对POI大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组PI3K、Akt、mTOR蛋白表达均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,补佳乐组、助卵汤低剂量组PI3K、Akt、mTOR蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ),助卵汤中剂量组PI3K、Akt蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ),助卵汤高剂量组

上述蛋白表达与模型组比较差异均无统计学意义;与补佳乐组比较,助卵汤低剂量组PI3K、Akt、mTOR蛋白表达差异无统计学意义。见图2、表4。

### 3.6 对POI大鼠卵巢组织LC3B蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组LC3B蛋白表达显著增加( $P<0.01$ );与模型组比较,补佳乐组及助卵汤各剂量组LC3B蛋白表达量显著降低( $P<0.01$ ),与补佳乐组比较,助卵汤各剂量组LC3B蛋白表达差异无统计学意义。见图3、表5。

## 4 讨论

中医没有POI的病名,从临床特点来看归属于“血枯”“闭经”“不孕”等范畴。尤昭玲教授等认为POI是以肾虚为基本病机<sup>[19]</sup>,卵巢中担当卵泡已耗竭,肾虚先天封藏已尽,无法发挥生殖功能,故而立“健脾补肾,暖巢养泡”之法,通过后天脾胃充养转圜,激活冰山之下沉寂卵泡,发挥生殖内分泌作用。

助卵汤由冰山理论指导而成,由黄芪、菟丝子、党参、白术、覆盆子等药物组成,以黄芪、菟丝子为君药,黄芪具有补气升阳健脾、生津养血等效用。阳丽等<sup>[20]</sup>研究发现黄芪多糖可以抑制多囊卵巢综合征(PCOS)卵巢颗粒细胞自噬现象,从而缓解自噬过度对机体的影响,改善PCOS大鼠卵巢功能。也有研究发现黄芪多糖通过miRNA-27a/FBXW7信号通路抑制卵巢癌细胞生长,发挥对机体的保护

表2 助卵汤对POI大鼠各级卵泡数目的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of Zhuluan decoction on number of follicles at all levels in POI rats ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡	成熟卵泡	闭锁卵泡
正常组		6.80±1.48	1.40±1.14	7.60±2.07	0.80±0.45	2.40±1.14
模型组		2.20±0.84 <sup>2)</sup>	1.20±1.20	11.80±2.17 <sup>2)</sup>	0.40±0.55	8.40±2.07 <sup>2)</sup>
补佳乐组	0.000 1	5.20±1.92 <sup>4)</sup>	1.20±0.84	8.00±2.24 <sup>3)</sup>	0.20±0.45	4.40±1.14 <sup>4)</sup>
助卵汤低剂量组	14	5.20±0.84 <sup>4)</sup>	2.60±2.07	13.80±2.59	0.40±0.55	4.60±1.14 <sup>4)</sup>
助卵汤中剂量组	28	6.20±1.64 <sup>4)</sup>	1.80±0.84	12.00±2.83	0.40±0.55	2.60±1.14 <sup>4)</sup>
助卵汤高剂量组	56	8.80±1.92 <sup>4)</sup>	1.40±1.67	10.00±1.58	0.60±0.55	2.60±1.14 <sup>4)</sup>

表3 助卵汤对POI大鼠血清AMH、FSH、LH、INH-B激素含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Zhuluan decoction on serum AMH, FSH, LH and INH-B hormone levels in POI rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AMH/ng·L <sup>-1</sup>	FSH/U·L <sup>-1</sup>	LH/U·L <sup>-1</sup>	INH-B/ng·L <sup>-1</sup>
正常组		3 403.28±81.10	8.78±0.20	41.90±1.02	36.23±2.45
模型组		2 676.40±29.33 <sup>1)</sup>	11.45±0.18 <sup>2)</sup>	54.32±1.75 <sup>1)</sup>	35.46±3.10
补佳乐组	0.000 1	3 260.34±22.96 <sup>4)</sup>	8.99±0.09 <sup>4)</sup>	43.19±0.83 <sup>3)</sup>	34.72±2.43
助卵汤低剂量组	14	3 175.18±68.89 <sup>3)</sup>	8.95±0.05 <sup>3)</sup>	44.05±0.64	34.38±3.60
助卵汤中剂量组	28	3 239.05±45.62 <sup>4)</sup>	8.84±0.11 <sup>4)</sup>	42.30±0.96 <sup>3)</sup>	34.14±2.84
助卵汤高剂量组	56	3 190.39±51.88 <sup>4)</sup>	9.25±0.09 <sup>4)</sup>	46.31±1.70	34.07±2.93

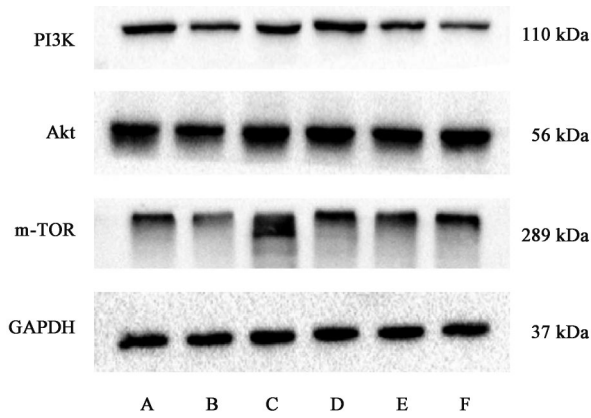


图2 POI大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of PI3K, Akt and mTOR in ovarian tissue of POI rats

表4 助卵汤对各组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Zhuluan decoction on expression of PI3K, Akt, mTOR proteins in ovarian tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	PI3K /GAPDH	Akt /GAPDH	mTOR /GAPDH
正常组		0.80±0.06	1.06±0.08	1.15±0.01
模型组		0.39±0.15 <sup>2)</sup>	0.66±0.13 <sup>2)</sup>	0.73±0.03 <sup>2)</sup>
补佳乐组	0.000 1	1.10±0.05 <sup>4)</sup>	1.17±0.06 <sup>4)</sup>	1.27±0.26 <sup>4)</sup>
助卵汤低剂量组	14	0.83±0.23 <sup>4)</sup>	0.97±0.08 <sup>4)</sup>	1.16±0.14 <sup>4)</sup>
助卵汤中剂量组	28	0.73±0.09 <sup>4)</sup>	0.98±0.06 <sup>4)</sup>	0.79±0.19
助卵汤高剂量组	56	0.42±0.04	0.78±0.14	0.72±0.08

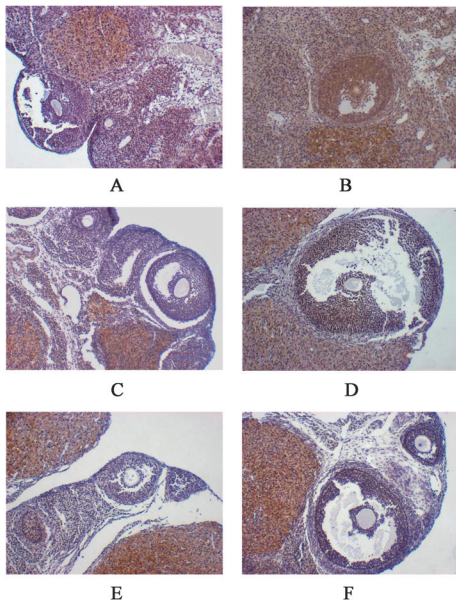


图3 助卵汤对POI大鼠卵巢组织LC3B蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of Zhuluan decoction on expression of LC3B protein in ovarian tissue of POI rats (IHC, ×200)

表5 助卵汤对POI大鼠卵巢组织LC3B蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Zhuluan decoction on expression of LC3B protein in ovarian tissue of POI rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LC3B
正常组		0.09±0.01
模型组		0.23±0.02 <sup>2)</sup>
补佳乐组	0.000 1	0.13±0.02 <sup>4)</sup>
助卵汤低剂量组	14	0.15±0.01 <sup>4)</sup>
助卵汤中剂量组	28	0.13±0.03 <sup>4)</sup>
助卵汤高剂量组	56	0.11±0.02 <sup>4)</sup>

作用<sup>[21]</sup>。菟丝子具有补益肝肾、固精安胎之效,现代药理学研究发现菟丝子具有雌激素样作用和抗衰老作用<sup>[22-23]</sup>。上述两药共为君药,健脾补肾、暖巢养泡,促进冰山之下沉寂于卵巢基质的始基卵泡发挥功能;辅以党参、白术、覆盆子等增强健脾补肾之功,促进卵泡生长发育。课题组前期研究发现助卵汤可通过提高小鼠卵巢细胞中SIRT1/NF- $\kappa$ B/p53/p21通路活性,改变细胞凋亡状态,从而改善卵巢储备功能<sup>[9]</sup>,而有研究表明,上调SIRT1能抑制雷帕霉素靶蛋白C1(mTORC1),进而诱导自噬造成卵泡闭锁<sup>[24]</sup>,且FSH可通过c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路抑制NF- $\kappa$ B的表达、促进p65表达,诱导颗粒细胞自噬进而导致卵泡闭锁<sup>[25]</sup>。卵泡闭锁是POI发病的关键环节<sup>[26]</sup>,卵泡颗粒细胞凋亡与自噬作为细胞程序性死亡的两种方式,共同参与卵泡闭锁的调控过程<sup>[27-28]</sup>。故本研究通过化疗药物环磷酰胺建立大鼠POI模型,从激素水平等方面验证助卵汤对卵巢的保护作用并从自噬角度进一步探索助卵汤治疗POI的作用机制。

本研究结果显示,环磷酰胺造模后,大鼠体质量、卵巢和子宫脏器指数明显减少,动情周期紊乱,提示造模方法可行,而阳性药物补佳乐及助卵汤均能改善造模对大鼠上述指标的影响;卵泡发育方面,造模后主要影响原始卵泡、次级卵泡、闭锁卵泡的数量,造模后原始卵泡数量减少,次级卵泡和闭锁卵泡数量增多,提示环磷酰胺造成卵巢功能损伤的机制可能是过度刺激卵泡池卵泡的发育,使其向次级卵泡和闭锁卵泡快速发展,从而导致卵泡池的枯竭,卵巢储备功能下降,而补佳乐和助卵汤的干预也能减缓这一进程,从而保护卵巢功能;激素水平方面,造模后大鼠FSH、LH水平明显升高,AMH水平显著下降,进一步验证了化疗药物环磷酰胺对卵巢功能的损害,补佳乐和助卵汤干预后FSH、LH

水平下降,AMH水平上升,进一步证明了中药助卵汤对卵巢功能的保护作用,而INH在造模前后及药物干预后差异均不明显,考虑种族检测指标差异性可能,其检测的必要性及有效性有待临床进一步研究。以上指标均证明化疗药物环磷酰胺对卵巢功能的影响,提示模型复刻成功,并验证了中药助卵汤对卵巢功能的保护作用。

自噬在卵泡发育过程中的作用是双刃剑,一方面过度自噬可促进细胞凋亡诱导卵泡闭锁;另一方面自噬可通过维持线粒体稳态保护卵泡发育过程。基于课题组前期研究可初步推断助卵汤通过抑制过度自噬改变细胞凋亡状态,从而阻断卵泡闭锁进程。目前比较肯定的自噬抑制类信号通路主要有两条,一是Class I PI3K通路,当机体血糖水平高时,可接收胰岛素受体传来的信号,进而抑制自噬作用;二是依赖mTOR途径的自噬。mTOR是自噬诱导过程中的关键分子,激活mTOR通路、Akt和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路可抑制自噬,而负调控mTOR通路可促进自噬。PI3K作为mTOR上游分子,可与生长因子受体(EGFR)结合改变Akt的蛋白结构并使其活化,并以磷酸化作用激活mTOR从而抑制自噬的发生。已有较多研究证实该通路与POI的发生发展密切相关,该通路失调可能导致卵巢功能障碍<sup>[29-30]</sup>。本研究通过Western blot检测大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR、GAPDH蛋白表达,发现模型组与正常组比较,PI3K、Akt、mTOR蛋白表达量均降低,而补佳乐组及中药低中剂量组均能改善造模对该通路蛋白的影响,提示助卵汤可能通过上调PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白调节卵泡周期及发育过程,从而改善化疗药物对卵巢功能的损伤;LC3作为自噬过程标志物,免疫组化结果显示,模型组LC3B蛋白表达量明显增加,药物干预组表达量下降,提示助卵汤可能通过激活PI3K/Akt/mTOR通路抑制卵巢颗粒细胞过度自噬的发生,从而逆转CTX造模对大鼠生殖内分泌功能的影响。

从PI3K、Akt、mTOR蛋白表达结果来看,助卵汤高剂量组与模型组表达差异无统计学意义,考虑高剂量药物过于浓稠,不利于大鼠的利用吸收,后续实验可进一步摸索其他更适浓度。本研究进一步完善了助卵汤治疗POI的疗效机制,但其作用机制复杂多样,靶点丰富,后期将进一步在细胞及动物研究层面展开探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 倪淑瑶,林岚. 早发性卵巢功能不全中西医研究概况[J]. 实用中医药杂志,2020,36(11):1510-1513.
- [2] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:357-360.
- [3] 吴小燕,崔晓萍,范美玲,等. 左归丸治疗卵巢早衰临床及实验研究进展[J]. 中医学报,2020,35(3):568-572.
- [4] 唐瑞怡,陈蓉. 早发性卵巢功能不全激素补充治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2018,34(3):261-265.
- [5] 曾倩. 尤氏妇科临证心悟[M]. 北京:中国中医药出版社,2017:7-12.
- [6] 胡金芳,刘慧萍,张楚洁,等. 尤昭玲运用助卵方治疗卵巢早衰经验[J]. 中华中医药杂志,2021,36(6):3369-3372.
- [7] 周紫琼,杜雪莲,黄剑美. 尤氏卵巢早衰方治疗肾虚血虚型卵巢早衰的临床疗效研究[J]. 中医临床研究,2020,12(29):103-106.
- [8] 罗翔祚,谈珍瑜,邱冉冉. 尤昭玲补脾益肾治疗卵巢早衰经验[J]. 湖南中医杂志,2016,32(3):29-31.
- [9] 邓敦,吴阳,申思楠,等. 护卵汤对早发性卵巢功能不全模型小鼠SIRT1/NF- $\kappa$ B/p53/p21通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(15):36-42.
- [10] 姚婷,杨红梅,崔立华,等. 自噬在早发性卵巢功能不全病理机制中的作用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2022,41(4):313-317.
- [11] 万云慧,陈晓勇. 早发性卵巢功能不全的颗粒细胞自噬机制研究进展[J]. 重庆医科大学学报,2020,45(5):612-614.
- [12] FELICI M D, KLINGER F G. PI3K/PTEN/Akt signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions[J]. Int J Mol Sci,2021,22(18):9838.
- [13] LI N, LIU L. Mechanism of resveratrol in improving ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency[J]. J Obstet Gynaecol Res,2018,44(8):1431-1438.
- [14] LEE H N, CHANG E M. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency[J]. Clin Exp Reprod Med,2019,46(2):43-49.
- [15] 张玉林. 人羊膜上皮细胞修复大鼠卵巢功能不全的实验研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2020.
- [16] LING L, FENG X, WEI T, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism [J]. Stem Cell Res

- Ther, 2019, 10(1):46.
- [17] FU X, HE Y, WANG X, et al. Overexpression of miR-21 in stem cells improves ovarian structure and function in rats with chemotherapy-induced ovarian damage by targeting PDCD4 and PTEN to inhibit granulosa cell apoptosis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):187.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 阳丽, 吴湘, 李昂, 等. 黄芪多糖调控Sirt1/FoxO1通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(10):93-98.
- [21] GUO Y, ZHANG Z, WANG Z, et al. Astragalus polysaccharides inhibit ovarian cancer cell growth via microRNA-27a/FBXW7 signaling pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3):BSR20193396.
- [22] SUN X M, SONG H, YAN X J, et al. Screening and determination of estrogen-like quality markers of *Cuscuta chinensis*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51:2671-2679.
- [23] 孙向明, 宋辉, 赵丽珠, 等. 菟丝子拟雌激素作用体内直接作用物质的发现[J]. *药学学报*, 2021, 56(7):1826-1831.
- [24] 江银, 王徽, 于潇, 等. 枸杞多糖调控AMPK/Sirt自噬途径延缓D-gal诱导的卵巢早衰的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(22):6175-6182.
- [25] DU L, GU T, ZHANG Y, et al. Transcriptome profiling to identify key mediators of granulosa cell proliferation upon FSH stimulation in the goose (*Anser cygnoides*) [J]. *Br Poult Sci*, 2018, 59:416-421.
- [26] ZHANG H, LUO Q, LU X, et al. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9:20.
- [27] PAN Y, YANG S, CHENG J, et al. Whole-transcriptome analysis of lncRNAs mediated ceRNA regulation in granulosa cells isolated from healthy and atresia follicles of Chinese buffalo [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8:680182.
- [28] 王鑫, 蒋易龙, 王泽龙, 等. 细胞程序性死亡在卵泡闭锁中的作用及机制[J]. *生理学报*, 2022, doi:10.13294/j.aps.2022.0076.
- [29] 刘蔚, 曹俊岭, 荆志伟, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对帕金森病伴发抑郁模型大鼠的神经保护作用及对AMPK/mTOR信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(8):21-29.
- [30] 李琰珉. 褪黑素调控PI3K/Akt/mTOR自噬通路治疗早发性卵巢功能不全的机制研究[D]. 济南:山东大学, 2020.
- [责任编辑 孙丛丛]