

基于SIRT1/FoxO1信号通路探讨左归丸对卵巢早衰大鼠自噬的影响

王桂云, 刘祺志, 刘慧萍*, 王凯玲, 吴小兰, 周芳

(湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 研究左归丸通过调控细胞自噬对卵巢早衰 (POF) 大鼠卵巢功能的改善作用。方法 随机选取 7 只大鼠作为空白组, 剩余大鼠通过腹腔注射顺铂 (4.0 mg/kg) 建立 POF 模型, 通过观察动情周期变化以评估模型是否建立成功。将造模成功的 21 只大鼠随机均分为模型组、雌二醇组 (0.01 mg/mL) 和左归丸组 (1.85 g/kg), 每组 7 只, 连续给药 21 d。ELISA 法检测血清 E₂、FSH 及 LH 水平; HE 染色观察卵巢组织病理形态学; 免疫组化 (IHC) 法检测卵巢组织 LC3B、SIRT1、FoxO1 蛋白表达; RT-qPCR 法检测卵巢组织 LC3B、Beclin-1、Atg5 mRNA 表达; Western blot 法检测卵巢组织 SIRT1、FoxO1、Ac-FoxO1 蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢指数降低 ($P<0.01$); 血清 FSH 和 LH 水平升高 ($P<0.01$), E₂ 水平降低 ($P<0.01$); 卵巢结构紊乱, 以闭锁卵泡为主; 卵巢组织 LC3B、Beclin-1、Atg5 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), LC3B、Ac-FoxO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$), SIRT1、FoxO1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 雌二醇组和左归丸组大鼠卵巢指数升高 ($P<0.01$); 血清 FSH 和 LH 水平降低 ($P<0.01$), E₂ 水平升高 ($P<0.01$); 卵巢内原始卵泡数量增多, 闭锁卵泡数量减少; 卵巢组织中 LC3B、Beclin-1、Atg5 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), LC3B、Ac-FoxO1 蛋白表达降低 ($P<0.01$), SIRT1、FoxO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。结论 左归丸可能通过激活 SIRT1/FoxO1 信号通路来抑制细胞自噬, 从而改善 POF 大鼠病理状态, 调节大鼠性激素水平, 恢复内分泌平衡, 增强卵巢储备功能, 促进卵泡的正常发育, 延缓 POF 的进程。

关键词: 左归丸; 卵巢早衰; SIRT1/FoxO1 信号通路; 自噬

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)11-3601-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.010

Effects of Zuogui Pills on autophagy in rats with premature ovarian failure based on SIRT1/FoxO1 signaling pathway

WANG Gui-yun, LIU Qi-zhi, LIU Hui-ping*, WANG Kai-ling, WU Xiao-lan, ZHOU Fang

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

ABSTRACT: AIM To study the effect of Zuogui Pills on improving ovarian function in rats with premature ovarian failure (POF) by regulating autophagy. **METHODS** Seven rats were randomly selected as the blank group, and the remaining rats were injected with cisplatin (4.0 mg/kg) intraperitoneally to establish POF model. The success of the model was evaluated by observing the changes of estrous cycle. Twenty-one successful model of rats were randomly divided into model group and estradiol group (0.01 mg/mL) and Zuogui Pills group (1.85 g/kg), with 7 rats in each group, the drug was administered continuously for 21 days. Serum E₂, FSH and LH levels were detected by ELISA; HE staining was used to observe the pathological morphology of ovarian tissue; immunohistochemical (IHC) method was used to detect the protein expressions of LC3B, SIRT1 and FoxO1 in

收稿日期: 2025-01-06

基金项目: 湖南省自然科学基金联合项目 (2025JJ90029); 湖南省卫生健康高层次人才重大科研专项项目 (R2023168); 湖南省卫生健康委科研项目重点指导课题 (202305017379); 湖南省中医药科研项目 (B2023078); 国家教育部大学生创新项目 (S202410541010); 湖南省大学生创新项目 (S202410541010); 湖南中医药大学研究生创新基金 (2024CX014); 湖南中医药大学 2024 年“一方制药”研究生创新项目 (2024YF08)

作者简介: 王桂云 (1994—), 女, 博士生, 从事中医药防治女性内分泌疾病的研究。Tel: 15211148292, E-mail: 1471860560@qq.com

* 通信作者: 刘慧萍 (1979—), 女, 博士, 教授, 从事中医药防治女性内分泌疾病的研究。Tel: 13908484804, E-mail: 1074983953@qq.com

ovarian tissues; RT-qPCR method was used to detect the mRNA expressions of *LC3B*, *Beclin-1* and *Atg5* in ovarian tissues; the protein expressions of *SIRT1*, *FoxO1* and *Ac-FoxO1* in ovarian tissue was detected by Western blot.

RESULTS Compared with the blank group, the ovarian index of the model group decreased ($P<0.01$); serum FSH and LH levels increased ($P<0.01$) and E_2 level decreased ($P<0.01$); the structure of ovary is disordered, especially atresia follicle; the mRNA expressions of *LC3B*, *Beclin-1* and *Atg5* in ovarian tissue increased ($P<0.01$), while the protein expressions of *LC3B* and *Ac-FoxO1* increased ($P<0.01$), while the protein expressions of *SIRT1* and *FoxO1* decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the ovarian index of rats in estradiol group and Zuogui Pills group increased ($P<0.01$); serum FSH and LH levels decreased ($P<0.01$) and E_2 level increased ($P<0.01$); the number of primordial follicles in ovary increased and the number of atresia follicles decreased; the mRNA expressions of *LC3B*, *Beclin-1* and *Atg5* in ovarian tissue decreased ($P<0.01$), while the protein expressions of *LC3B* and *Ac-FoxO1* decreased ($P<0.01$), while the protein expressions of *SIRT1* and *FoxO1* increased ($P<0.01$). **CONCLUSION** Zuogui Pills may inhibit autophagy by activating *SIRT1/FoxO1* signaling pathway, thus improving the pathological state of POF rats, regulating the level of sex hormones in rats, restoring endocrine balance, enhancing ovarian reserve function, promoting the normal development of follicles and delaying the progress of POF.

KEY WORDS: Zuogui Pills; premature ovarian failure; *SIRT1/FoxO1* signaling pathway; autophagy

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是一种以雌激素水平降低、促性腺激素水平升高和闭经等为临床表现的疾病^[1-2]。目前西医治疗 POF 以雌激素替代疗法为主, 长期使用雌激素可引发子宫内膜增生、月经紊乱、高血压及糖尿病等^[3]。左归丸首次见于《景岳全书·新方八阵》, 其主要功效为补肾生精兼活血^[4]。研究发现左归丸对 POF 具有良好的治疗作用^[5-6], 但其具体的作用机制尚未完全阐明。因此, 深入研究左归丸治疗 POF 的潜在机制, 对明确其疗效和扩大临床应用范围具有重要意义。

自噬是溶酶体介导的细胞内降解途径, 通过清除受损细胞器和代谢物维持稳态。在卵巢中, 自噬调控卵泡发育与凋亡, 适度自噬可抵抗氧化应激, 但过度自噬可能导致 POF^[7-8]。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, *SIRT1*) / 叉头框蛋白 1 (forkhead box protein o1, *FoxO1*) 通路是自噬关键调控途径。*FoxO1* 通过调控蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, *LC3*)、自噬相关蛋白 5 (autophagy-related protein 5, *Atg5*) 和 *Beclin-1* 等蛋白影响自噬^[9], 而 *SIRT1* 通过去乙酰化 *FoxO1* 抑制自噬^[10]。研究表明, *SIRT1/FoxO1* 信号通路介导的自噬可通过调节氧化应激延缓衰老^[11-14], 但其在左归丸卵巢保护中的作用尚未明确。本研究拟探讨左归丸是否通过 *SIRT1/FoxO1* 信号通路调控自噬, 从而改善 POF 大鼠卵巢功能, 以揭示其潜在机制。

1 材料

1.1 药物 左归丸由熟地黄 24 g、川牛膝 9 g、山茱萸 12 g、山药 12 g、鹿角胶 12 g、菟丝子 12 g、枸杞子 12 g、龟板胶 12 g 组成, 药材由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供。取上述药材 (除鹿角胶和龟板胶), 加水至完全覆盖药材, 浸泡 30 min 后煎煮 30 min, 随后将烊化的鹿角胶和龟板胶加入药液, 混匀, 浓缩后备用。戊酸雌二醇片 (规格 1 mg/片, 批号 730A, 德国拜耳公司), 配制成 0.01 mg/mL 的溶液备用; 顺铂 (批号 GC11908, 美国 GlpBio 公司), 配制成 1 mg/mL 的溶液备用。

1.2 实验动物 健康雌性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 140~180 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004], 饲养于湖南中医药大学 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2019-0009], 温度 (22±2)℃, 相对湿度 (50±10)%, 12 h/12 h 光/暗周期 (光照时间为 8:00 至 20:00), 自由摄食标准实验饲料及饮水。所有实验操作严格遵循实验动物伦理委员会的动物研究指导原则, 经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批通过 (伦理批号 LLBH-202303240001)。

1.3 试剂 雌二醇 (estradiol, E_2) ELISA 试剂盒 (厦门仑昌硕生物科技有限公司, 货号 YD30267); 促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 货号

M1059034V); 促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号 E-EL-R0026c); 戊巴比妥钠 (美国 Merck 公司, 货号 2209116); LC3B、SIRT1、FoxO1 抗体 (Alpha Applied Bioscience 公司, 货号 A16954、A21557、A14713); Ac-FoxO1 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 28757-1-ap); RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 货号 Y1410]; SuperScript Ⅲ RT 逆转录、SYBR qPCR Mix 试剂盒 (北京百奥创新科技有限公司, 货号 05275701、05256502)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 随机选取 7 只大鼠作为空白组, 不进行任何处理; 其余 21 只大鼠腹腔注射顺铂 (4.0 mg/kg) 以建立 POF 大鼠模型, 连续 7 d 通过大鼠阴道涂片观察其动情周期变化。正常大鼠动情周期应该按动情前期、动情期、动情后期和动情间期的顺序循环依次出现, 且一个周期平均为 4~5 d, 若动情周期杂乱无章或延长 (超过 6 d) 或长期停留在某一时期则认为大鼠动情周期紊乱, 提示模型建立成功^[15]。将造模成功的大鼠按照数字表法随机分为模型组、雌二醇组和左归丸组。按临床等效剂量换算给药剂量, 空白组和模型组灌胃给予无菌水; 雌二醇组灌胃给予雌二醇片水溶液 (0.01 mg/mL); 左归丸组灌胃给予 1.85 g/kg 左归丸浓缩药液^[16]。连续给药 21 d 后, 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (1.5 mL/kg) 进行麻醉, 经腹主动脉采血, 处死后分离双侧卵巢, 一侧卵巢固定于 4% 多聚甲醛中, 另一侧卵巢置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 体质量增量与卵巢指数测定 根据各组大鼠实验前后体质量的差值, 计算体质量增量。使用精密电子天平称量双侧卵巢的湿重, 并计算卵巢指数, 公式为 卵巢指数 = 卵巢湿重/大鼠体质量×100%。

2.3 ELISA 法检测血清 E₂、FSH 和 LH 水平 将冷冻保存的血清样本取出, 于室温平衡至完全解冻; 同时将 ELISA 试剂盒的所有试剂和标准品放置于室温平衡。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测大鼠血清 E₂、FSH 和 LH 水平。

2.4 HE 染色观察卵巢组织病理变化 取出于多聚甲醛中固定的卵巢组织, 依次置于不同体积分数 (70%、80%、90%、95%、100%) 的酒精中每级脱水 10 min, 置于二甲苯中透明化处理, 制成石蜡

块, 用切片机切割约 5 μm 的连续切片。依次将切片进行脱蜡、HE 染色、透明和封片处理, 最后于显微镜下观察卵巢组织病理变化。

2.5 免疫组化 (IHC) 法检测卵巢组织 LC3B、SIRT1 和 FoxO1 蛋白表达 取卵巢组织石蜡切片, 脱蜡, 抗原修复, 灭活内源酶, 孵育一抗, 孵育二抗, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 封片, 干燥后, 于显微镜下选取黄色区域进行拍摄, 通过 Image J 软件分析阳性表达区域, 以评估蛋白表达。

2.6 RT-qPCR 法检测卵巢组织 LC3B、Beclin-1、Atg5 mRNA 表达 取于 -80 ℃ 冰箱保存的卵巢组织, 将组织在液氮中迅速研磨, 立即加入 Trizol 试剂进行充分裂解匀浆; 接着加入氯仿离心分层, 吸取上清液后加入异丙醇沉淀 RNA; 随后用乙醇清洗沉淀, 短暂干燥后溶于无 RNase 水中即为总 RNA, 将总 RNA 逆转录为 cDNA, 随后进行 PCR 扩增反应, 扩增反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 65 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 终延伸 5 min。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 LC3B、Beclin-1、Atg5 mRNA 相对表达量。引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列
β -actin	正向 5'-CTGAACGTCAAATTGTCCGAGA-3' 反向 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
LC3B	正向 5'-CCAAGCCTTCTCCTCTCTGG-3' 反向 5'-TCTCCTGGGAGGGCATAGACC-3'
Beclin-1	正向 5'-GCCTCTGAAACTGGACACGA-3' 反向 5'-CTTCCTCCTGGCTCTCTCT-3'
Atg5	正向 5'-GACCACAAGCAGCTCTGGAT-3' 反向 5'-ACAGGACGGAACAGCTCTG-3'

2.7 Western blot 法检测卵巢组织 SIRT1、FoxO1、Ac-FoxO1 蛋白表达 取于 -80 ℃ 冰箱保存的卵巢组织, 将组织碎片放入预冷的研磨管中, 加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液, 在冰上进行机械研磨或匀浆, 充分裂解卵巢组织, 4 ℃ 离心 15 min, 吸取上清液 (即总蛋白溶液), 分装后于 -80 ℃ 保存。采用 BCA 法检测蛋白浓度, 将蛋白浓度调整至一致。配制电泳凝胶, 上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜。以 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h, 洗膜 3 次; 加一抗 SIRT1、FoxO1、Ac-FoxO1、 β -actin 于 4 ℃ 孵育过夜, 再次洗膜 3 次; 加相应的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗于室温下摇床孵育 1 h, 洗膜 3 次; 将

PVDF膜置于ECL发光液中,于凝胶成像仪中显影。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin为内参,对目的蛋白进行半定量分析。

2.8 统计学分析 通过GraphPad Prism软件进行处理,若服从正态分布,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后检验采用LSD法;若不服从正态分布,则使用非参数统计法。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 左归丸对POF大鼠动情周期变化的影响 大鼠的动情周期通常持续4~5 d,包括动情前期、动情期、动情后期和动情间期4个阶段。动情前期以核上皮细胞为主;动情期多为无核的角化上皮细胞;动情后期有大量白细胞,同时可见少量角化上皮细胞和核上皮细胞;动情间期主要为白细胞,混有少量上皮细胞,见图1。本实验结果显示,空白组大鼠动情周期正常;而顺铂造模2周后,造模组则动情周期紊乱,未观察到完整的动情周期,表明

表2 各组大鼠体质量增量及卵巢指数比较($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

Tab. 2 Comparison of body weight gain and ovarian index of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	体质量/g	体质量增量/g	卵巢指数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
空白组	257.000 \pm 7.853	80.345 \pm 4.760	0.307 \pm 0.242
模型组	203.857 \pm 9.173 ^{**}	34.098 \pm 2.090 ^{**}	0.151 \pm 0.049 ^{**}
雌二醇组	238.857 \pm 13.969 ^{##}	67.045 \pm 3.261 ^{##}	0.244 \pm 0.033 ^{##}
左归丸组	229.143 \pm 8.513 ^{##}	53.028 \pm 4.874 ^{##}	0.247 \pm 0.021 ^{##}

注:与空白组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.3 左归丸对POF大鼠血清 E_2 、FSH和LH水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清FSH和LH水平升高($P<0.01$), E_2 水平降低($P<0.01$),提示POF大鼠卵巢内分泌减退;与模型组比较,左归丸和雌二醇组大鼠血清FSH和LH水平

表3 各组大鼠血清 E_2 、FSH及LH水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

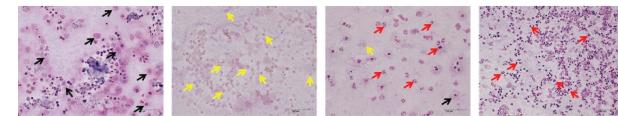
Tab. 3 Comparison of serum E_2 , FSH and LH levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	E_2 /($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	FSH/($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LH/($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	59.304 \pm 1.167	2.403 \pm 0.670	4.023 \pm 0.755
模型组	8.439 \pm 0.983 ^{**}	37.983 \pm 1.122 ^{**}	37.104 \pm 3.214 ^{**}
雌二醇组	44.253 \pm 7.105 ^{##}	11.303 \pm 2.555 ^{##}	14.333 \pm 1.629 ^{##}
左归丸组	37.062 \pm 19.183 ^{##}	14.907 \pm 1.085 ^{##}	14.851 \pm 0.941 ^{##}

注:与空白组比较,^{**} $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.4 左归丸对POF大鼠卵巢组织病理形态学的影响 空白组卵巢组织可见大量原始卵泡和部分成熟卵泡;模型组卵巢结构紊乱,且以闭锁卵泡为主,表明模型组大鼠卵巢功能受损;与模型组比较,左归丸组卵巢组织可见原始卵泡数量较多,卵巢结构有所改善;雌二醇组大鼠卵巢形态也明显恢复正常,各级卵泡数量增多,其卵巢结构接近空白组,

腹腔注射顺铂可以导致大鼠卵巢功能受损,提示POF大鼠模型建立成功。



注:黑色箭头所指为核上皮细胞,黄色箭头所指为无核的角化上皮细胞,红色箭头所指为白细胞。

图1 大鼠动情周期示意图($\times 200$)

Fig. 1 Schematic diagram of estrus cycle in rats ($\times 200$)

3.2 左归丸对POF大鼠体质量增量及卵巢指数的影响 与空白组比较,模型组大鼠体质量增量及卵巢指数均降低($P<0.01$),提示卵巢功能受损;与模型组比较,左归丸组和雌二醇组大鼠体质量增量及卵巢指数均升高($P<0.01$),说明两种干预均有助于改善卵巢功能。进一步比较显示,左归丸组与雌二醇组大鼠的卵巢指数差异无统计学意义($P>0.05$),表明两者对卵巢功能的改善效果相近。结果见表2。

表2 各组大鼠体质量增量及卵巢指数比较($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

Tab. 2 Comparison of body weight gain and ovarian index of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

降低($P<0.01$), E_2 水平升高($P<0.01$),提示左归丸和雌二醇可以改善卵巢功能;左归丸组与雌二醇组大鼠血清激素水平无差异($P>0.05$),提示2组干预在调节血清性激素水平方面效果相近,见表3。

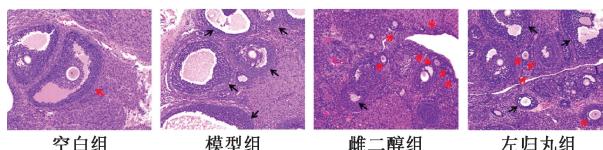
表3 各组大鼠血清 E_2 、FSH及LH水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

Tab. 3 Comparison of serum E_2 , FSH and LH levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	E_2 /($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	FSH/($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LH/($\text{mIU}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	59.304 \pm 1.167	2.403 \pm 0.670	4.023 \pm 0.755
模型组	8.439 \pm 0.983 ^{**}	37.983 \pm 1.122 ^{**}	37.104 \pm 3.214 ^{**}
雌二醇组	44.253 \pm 7.105 ^{##}	11.303 \pm 2.555 ^{##}	14.333 \pm 1.629 ^{##}
左归丸组	37.062 \pm 19.183 ^{##}	14.907 \pm 1.085 ^{##}	14.851 \pm 0.941 ^{##}

见图2。

3.5 左归丸对POF大鼠卵巢组织LC3B、SIRT1和FoxO1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组LC3B蛋白表达升高($P<0.01$),SIRT1和FoxO1蛋白表达降低($P<0.01$);与模型组比较,左归丸组和雌二醇组大鼠卵巢组织LC3B蛋白表达降低($P<0.01$),SIRT1和FoxO1蛋白表达升高

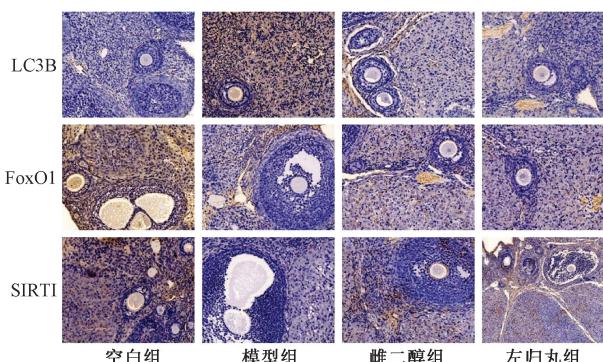


注: 黑色箭头所指为闭锁卵泡, 红色箭头所指为原始卵泡和成熟卵泡。

图2 各组大鼠卵巢组织形态学变化 (HE, $\times 100$)

Fig. 2 Morphological changes of ovarian tissue in rats in each group (HE, $\times 100$)

($P<0.01$); 左归丸组与雌二醇组 LC3B、SIRT1 和 FoxO1 蛋白表达无显著差异 ($P>0.05$), 见图 3、表 4。



注: 棕黄色区域代表阳性表达。

图3 各组大鼠卵巢组织 LC3B、FoxO1 和 SIRT1 蛋白免疫组化染色 ($\times 200$)

Fig. 3 Immunohistochemical of LC3B, FoxO1 and SIRT1 proteins in ovarian tissues of rats in each group ($\times 200$)

表4 各组大鼠卵巢组织 LC3B、FoxO1 和 SIRT1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Comparison of protein expressions of LC3B, FoxO1 and SIRT1 in ovaries of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	LC3B	FoxO1	SIRT1
空白组	0.274±0.025	0.639±0.068	0.564±0.011
模型组	0.606±0.029 **	0.299±0.025 **	0.275±0.113 **
雌二醇组	0.255±0.012 ##	0.483±0.154 ##	0.430±0.025 ##
左归丸组	0.242±0.010 ##	0.479±0.020 ##	0.426±0.018 ##

注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

3.6 左归丸对 POF 大鼠卵巢组织 LC3B、Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织 LC3B、Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 左归丸组和雌二醇组大鼠卵巢组织 LC3B、Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达降低 ($P<0.01$); 左归丸组与雌二醇组 LC3B、Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达无显著差异

($P>0.05$), 见表 5。

表5 各组大鼠卵巢组织 LC3B、Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Comparison of mRNA expressions of LC3B, Beclin-1 and Atg5 in ovarian tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	LC3B	Beclin-1	Atg5
空白组	0.683±0.275	0.720±0.243	0.463±0.582
模型组	3.993±0.936 **	5.053±0.496 **	5.823±0.439 **
雌二醇组	1.453±0.081 ##	1.370±0.095 ##	1.233±0.146 ##
左归丸组	1.777±0.129 ##	1.843±0.228 ##	2.173±0.280 ##

注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

3.7 左归丸对 POF 大鼠卵巢组织 SIRT1、FoxO1 和 Ac-FoxO1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织 SIRT1 和 FoxO1 蛋白表达降低 ($P<0.01$), Ac-FoxO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 左归丸和雌二醇组大鼠卵巢组织 SIRT1 和 FoxO1 蛋白表达升高 ($P<0.01$), Ac-FoxO1 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 左归丸组与雌二醇组 SIRT1、FoxO1 和 Ac-FoxO1 蛋白表达无显著差异 ($P>0.05$), 见图 4、表 6。

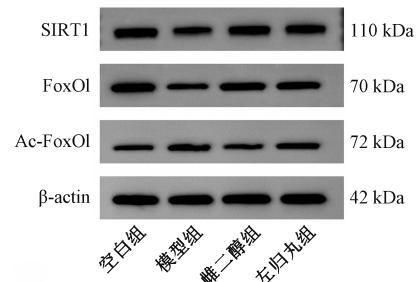


图4 各组大鼠卵巢组织 SIRT1、FoxO1 和 Ac-FoxO1 蛋白条带图

Fig. 4 Bands of SIRT1, FoxO1 and Ac-FoxO1 proteins in ovarian tissues of rats in each group

表6 各组大鼠卵巢组织 SIRT1、FoxO1 和 Ac-FoxO1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Comparison of protein expressions of SIRT1, FoxO1 and Ac-FoxO1 in ovarian tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	SIRT1	FoxO1	Ac-FoxO1
空白组	0.850±0.036	1.050±0.076	0.240±0.053
模型组	0.457±0.055 **	0.443±0.051 **	0.507±0.051 **
雌二醇组	0.770±0.040 ##	0.857±0.055 ##	0.183±0.045 ##
左归丸组	0.697±0.025 ##	0.773±0.075 ##	0.360±0.056 ##

注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

4 讨论

POF 的中医病机以肾虚为核心, 治疗以补肾填精为主, 可促进卵泡发育, 改善卵巢功能^[17]。

左归丸专治真阴不足诸证，方中熟地黄为君滋肾填精，配伍枸杞、山萸肉等滋阴益精，龟鹿二胶沟通任督，共奏滋阴补阳之效。顺铂是一种经典的抗肿瘤药物，通过与DNA形成加合物抑制细胞增殖。然而，顺铂的毒性作用不仅局限于肿瘤细胞，对卵巢颗粒细胞、卵母细胞及基质细胞亦可造成不可逆的损伤^[18-19]。本研究通过腹腔注射顺铂成功构建POF模型，模型大鼠表现为动情周期紊乱等典型特征。而左归丸干预能显著改善POF大鼠的卵巢功能，增加体质量及卵巢指数，促进卵泡发育（各级卵泡数量增加，闭锁卵泡减少），并调节血清性激素水平（提高E₂水平，降低FSH和LH水平），有效改善内分泌紊乱。这些结果表明，左归丸对顺铂诱导的卵巢损伤具有保护作用，为临床应用提供了实验依据。

氧化应激是POF的重要致病机制，其通过活性氧（ROS）累积破坏细胞稳态，而自噬作为细胞自我保护机制可降解受损成分维持内环境平衡。研究表明，适度自噬能缓解氧化损伤，但过度自噬则导致细胞损伤^[20-21]。SIRT1作为NAD⁺依赖性去乙酰化酶，在卵巢颗粒细胞和卵母细胞中通过调控自噬发挥关键作用。一方面通过去乙酰化FoxO1调控自噬相关基因表达，另一方面通过SIRT1/FoxO1通路减轻氧化应激损伤^[22-23]。激活该通路不仅能抑制氧化应激，还可改善卵巢衰老^[12]，而抑制FoxO1介导的过度自噬能有效保护颗粒细胞^[24]，提示SIRT1/FoxO1通路在维持卵巢功能中的核心调控作用。本研究发现，POF大鼠卵巢组织LC3B、Beclin-1和Atg5 mRNA以及LC3B蛋白表达升高，表明POF大鼠卵巢组织中自噬水平呈现被激活的状态；而SIRT1和FoxO1蛋白表达降低，LC3B蛋白表达升高，这表明自噬的激活可能与SIRT1表达下调从而引起LC3B水平上调有关。在给予左归丸和雌二醇干预后，大鼠卵巢组织中SIRT1和FoxO1蛋白表达升高，同时自噬相关因子LC3B、Beclin-1和Atg5表达降低，表明可能通过调控SIRT1/FoxO1信号通路抑制过度自噬。

综上所述，左归丸可能通过激活SIRT1/FoxO1信号通路来抑制细胞自噬，从而改善POF大鼠病理状态，调节大鼠性激素水平，恢复内分泌平衡，增强卵巢储备功能，促进卵泡的正常发育，延缓POF的进程。本研究为左归丸治疗POF提供了新的理论依据，也表明了抑制过度自噬可能是左归丸发挥疗效的重要途径之一。

参考文献：

- [1] Yuan Z, Zhang Y, He X, et al. Engineering mesenchymal stem cells for premature ovarian failure: overcoming challenges and innovating therapeutic strategies[J]. *Theranostics*, 2024, 14(17): 6487-6515.
- [2] Xekouki P, Konstantinidou A, Tatsi C, et al. HNF1A gene mutations and premature ovarian failure (POF): evidence from a clinical paradigm combining MODY 3 and POF[J]. *Hormones (Athens)*, 2024, 23(2): 345-350.
- [3] Dai F, Wang R, Deng Z, et al. Comparison of the different animal modeling and therapy methods of premature ovarian failure in animal model[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 135-149.
- [4] 王月, 张骞文, 潘可盈, 等. 左归丸治疗卵巢早衰的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(3): 143-149.
- [5] 焦存, 芦现杰, 张梅红, 等. 基于转录组学分析左归丸治疗环磷酰胺诱导卵巢早衰大鼠的分子机制[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(3): 328-334.
- [6] 赵敏, 张金融, 华江环, 等. 基于SLC7A11/GPX4通路调控铁死亡探讨左归丸对环磷酰胺所致卵巢早衰大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(17): 60-66.
- [7] Lin M, Hua R, Ma J, et al. Bisphenol A promotes autophagy in ovarian granulosa cells by inducing AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathway[J]. *Environ Int*, 2021, 147: 106298.
- [8] Lu X, Bao H, Cui L, et al. hUMSC transplantation restores ovarian function in POI rats by inhibiting autophagy of theca-interstitial cells via the AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 268.
- [9] Wu Q, Hu Y, Jiang M, et al. Effect of autophagy regulated by Sirt1/FoxO1 pathway on the release of factors promoting thrombosis from vascular endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4132.
- [10] 钟桂兰, 周知, 王茹, 等. 紫檀芪对宫颈癌细胞自噬及SIRT1-FoxO1信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(8): 1439-1443.
- [11] Mei Z G, Huang Y G, Feng Z T, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FoxO1 signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(13): 13187-13205.
- [12] Ding C, Zou Q, Wang F, et al. HGF and BFGF secretion by human adipose-derived stem cells improves ovarian function during natural aging via activation of the SIRT1-FoxO1 signaling pathway[J]. *Cell Physiol Bioche*, 2018, 45(4): 1316-1332.
- [13] Lapierre L R, Kumsta C, Sandri M, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging[J]. *Autophagy*, 2015, 11(6): 867-880.
- [14] Lim C J, Lee Y M, Kang S G, et al. Aquatide activation of SIRT1 reduces cellular senescence through a SIRT1-FoxO1-autophagy axis[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(5): 511-518.
- [15] 王尚嘉, 李丹, 卢路艳, 等. 基于AMPK/mTOR信号通

- 路探究当归芍药散对环磷酰胺诱导的卵巢早衰大鼠卵巢功能的保护作用[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2025, 54(1): 80-85.
- [16] Peng H, Zeng L, Zhu L, et al. Zuogui Pills inhibit mitochondria-dependent apoptosis of follicles in a rat model of premature ovarian failure[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111855.
- [17] 肖贾丽珏, 李涵, 周锦宏, 等. 基于Akt/mTOR信号通路探讨养精种玉汤对卵巢早衰大鼠的作用[J]. 中成药, 2023, 45(5): 1476-1481.
- [18] Li Z, Qi H, Li Z, et al. Research progress on the premature ovarian failure caused by cisplatin therapy[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1276310.
- [19] Tao H, Chen Z, Yao B, et al. Galaxamide alleviates cisplatin-induced premature ovarian insufficiency via the PI3K signaling pathway in HeLa tumor-bearing mice[J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 1060.
- [20] Hou L, Gu T, Weng K, et al. Effects of oxidative stress on the autophagy and apoptosis of granulosa cells in broody geese[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2154.
- [21] Wu M, Luo Q, Nie R, et al. Potential implications of polyphenols on aging considering oxidative stress, inflammation, autophagy, and gut microbiota[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021, 61(13): 2175-2193.
- [22] Alam F, Syed H, Amjad S, et al. Interplay between oxidative stress, SIRT1, reproductive and metabolic functions[J]. *Curr Res Physiol*, 2021, 4: 119-124.
- [23] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: impact on the aging process[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 14(2): 3834-3859.
- [24] Shen M, Cao Y, Jiang Y, et al. Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FoxO1-mediated autophagy: Implication of an antioxidation-independent mechanism[J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 138-157.

芩藿方对高脂饮食诱导的肥胖小鼠炎症及 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的影响

雷耀华¹, 王璟², 刘杉¹, 田嫖¹, 李晓亮¹, 庄馨瑛^{1,2*}

(1. 云南中医药大学中药学院暨云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南昆明 650500; 2. 云南省教育厅云南特色饮片炮制研究重点实验室, 云南昆明 650500)

摘要: 目的 探讨芩藿方对于高脂饮食诱导的肥胖症小鼠的改善作用。方法 采用高脂饲料喂养方法诱导建立肥胖小鼠模型, 将造模成功的小鼠随机分为模型组、奥利司他组(15.6 mg/kg)和芩藿方低、高剂量组(13.5、22.5 g/kg), 另取正常小鼠为对照组, 每组10只, 药物连续干预8周。给药结束后, 检测小鼠体质量、腹围、空腹血糖(FBG)、糖耐量, 并计算口服葡萄糖耐量实验(OGTT)曲线下面积(AUC)、Lee's指数、脂肪指数; 采用血液生化仪检测小鼠血清TC、TG、LDL-C、HDL-C水平; ELISA法检测血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平; HE染色观察附睾白色脂肪和肝组织病理变化; RT-qPCR和Western blot法检测肝组织TLR4、MyD88和NF-κB mRNA和蛋白表达。结果 与模型组比较, 萎藿方各剂量组小鼠体质量、腹围、Lee's指数降低($P<0.01$); OGTT-AUC降低($P<0.01$); 内脏脂肪指数降低($P<0.05$, $P<0.01$); 血清TG、TC、IL-6、IL-1β水平降低($P<0.01$); 附睾脂肪细胞直径减小, 排列紧密且规则, 肝组织脂滴空洞减少, 肝细胞形态恢复; TLR4、MyD88、NF-κB mRNA和蛋白表达均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 萎藿方能有效改善肥胖小鼠的糖脂代谢, 减轻炎症, 其机制可能与抑制TLR4/MyD88/NF-κB信号通路有关。

关键词: 萎藿方; 肥胖症; 糖脂代谢; 炎症反应; TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)11-3607-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.011

收稿日期: 2025-01-16

基金项目: 云南省科技厅—云南中医药大学应用基础研究联合专项基金(202301AZ070001-057); 云南省南药可持续利用研究重点实验室科技人才和平台计划项目(202105AG070012)

作者简介: 雷耀华(1998—), 男, 硕士生, 研究方向为中药、民族药与天然产物活性及作用机制。E-mail: 1501856912@qq.com

*通信作者: 庄馨瑛(1980—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药、民族药与天然产物活性及作用机制。E-mail: zhuangxinying@aliyun.com