

何氏育麟方通过调控 PI3K/Akt 信号通路对卵巢储备功能下降大鼠颗粒细胞的影响

王如烨, 章 勤, 方晓红*
(浙江中医药大学附属杭州市中医院, 浙江 杭州 310000)

摘要: **目的** 探讨何氏育麟方含药血清对卵巢储备功能减退 (DOR) 大鼠卵巢颗粒细胞线粒体功能及凋亡的影响。**方法** 分离并培养 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞, 设置对照组 1、模型组 1 [环磷酰胺 (CTX) 含药血清]、阳性组 1 (CTX 含药血清+补佳乐含药血清)、育麟方组 1 (CTX 含药血清+育麟方含药血清) 和对照组 2 (LY294002)、模型组 2 (LY294002+CTX 含药血清)、阳性组 2 (LY294002+CTX 含药血清+补佳乐含药血清)、育麟方组 2 (LY294002+CTX 含药血清+育麟方含药血清)。应用流式细胞术、荧光探针、RT-qPCR、Western blot 技术分别检测细胞活力、细胞周期及凋亡率、线粒体膜电位, 以及 ATP 水平, *PI3K*、*Akt* mRNA 表达, *PI3K*、p-Akt/Akt、PIP2、PIP3、Cyt C、Bax、Bcl-2 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 育麟方组颗粒细胞活力及线粒体膜电位、ATP 水平升高 ($P<0.01$), 凋亡率降低 ($P<0.01$), *PI3K*、*Akt* mRNA 表达及 p-Akt/Akt、PIP2、PIP3 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 同时伴随下游促凋亡蛋白 Cyt C、Bax 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$) 及抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 育麟方可能通过调控线粒体依赖性 *PI3K/Akt* 信号通路改善 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞线粒体功能, 抑制颗粒细胞凋亡。

关键词: 何氏育麟方; 卵巢储备功能减退; 细胞凋亡; 线粒体; *PI3K/Akt* 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)07-2382-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.044

卵巢储备功能减退 (DOR) 主要表现为卵子数量和质量下降、颗粒细胞分泌不足、生育能力下降和性激素失调^[1], 其发病人群正在逐渐年轻化^[2]。作为卵巢衰老的表现, 它除了临床症状外还会导致临床妊娠、活产率下降及流产率增加^[3]。因此, 如何改善 DOR 女性的卵巢储备功能是亟待解决的问题, 也是生殖医学研究的热点。

目前, DOR 的西医治疗仍无公认的有效方法^[4], 以激素替代、辅助生殖技术为主, 但无法从根本上解决患者的卵巢功能损伤问题。中医药在治疗 DOR 方面疗效显著, 可有效改善患者生殖激素水平与生育能力, 提高体外受精-胚胎移植技术 (IVF-ET) 成功率^[5]。育麟方是浙江何氏妇科验效临床的名方, 由《济阴纲目》苁蓉菟丝丸化裁而成, 目前已成为辨治肾虚型不孕症等疾病的有效方剂, 可改善 DOR 患者卵巢功能, 改善 DOR 大鼠卵泡数量及颗粒细胞超微结构, 抑制颗粒细胞凋亡^[6-8], 但其机制并未得到深入研究。

颗粒细胞凋亡被认为与线粒体功能障碍密切相关^[9], 而 *PI3K/Akt* 信号通路为经典的线粒体凋亡途径。本研究通

过构建体外颗粒细胞损伤模型, 给予育麟方含药血清干预, 探讨该方对线粒体依赖性颗粒细胞凋亡的调控作用, 阐明其分子作用机制。

1 材料

1.1 动物 22~24 d 雌性大鼠 10 只, 体质量 (35±15) g, 用于提取卵巢颗粒细胞; 8 周龄雌性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (220±10) g, 用于含药血清制备, 均购自浙江维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0001], 饲养于浙江中医药大学动物中心的 SPF 级动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (浙) 2021-0012], 温度 20~26 ℃, 12 h/12 h 光照/黑暗循环。研究经浙江中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号 202109-03)。

1.2 药材 育麟方由菟丝子 30 g、枸杞子 12 g、当归 10 g、川芎 10 g、熟地 10 g、巴戟天 10 g、肉苁蓉 10 g、仙灵脾 15 g、蛇床子 6 g、覆盆子 15 g、党参 15 g、炙甘草 3 g 组成, 均购自杭州市中医院中药库房, 经浙江中医药大学章勤教授鉴定为正品, 浸泡 30 min 后加蒸馏水煮沸 1 h, 过滤并浓缩至生药量 2 g/mL, 于 4 ℃冷藏。

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 浙江省中医药管理局项目 (2020ZA077); 全国名老中医专家传承工作室建设项目 (GZS202202); 中医药治疗妇科内分泌与代谢性疾病创新团队项目 (2022SJCXTD)

作者简介: 王如烨 (1995—), 女, 博士生, 研究方向为中西医结合治疗中医妇科生殖内分泌疾病。Tel: (0571) 88950525, E-mail: 449198556@qq.com

*通信作者: 方晓红 (1980—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向为中西医结合治疗中医妇科生殖内分泌疾病。Tel: (0571) 88950525, E-mail: fxb13527806@163.com

1.3 试剂 戊酸雌二醇片（补佳乐）（拜耳医药保健有限公司，批号 J20080036）。DMEM（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号 2445005）；胎牛血清（浙江天杭生物科技有限公司，批号 2445005）；胰蛋白酶消化酶（0.25%）（北京索莱宝科技有限公司，批号 A20220711）；环磷酰胺（cyclophosphamide, CTX）、PI3K/Akt 阻断剂 LY294002（美国 Sigma 公司，批号 C0768、L9908）；MTT、ATP 检测试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号 112020210209、220227500033）；SYBR Green qPCR 试剂盒 [翌圣生物科技（上海）股份有限公司，批号 H0108041]；逆转录试剂盒（江苏康为世纪生物科技股份有限公司，批号 36320）；Cyt C、Bax、Bcl-2、PI3K、 β -actin 一抗（美国 Affinity 公司，批号 AF0146、AF0120、AF6139、AF3242、AF7018）；PIP2 一抗（美国 Novus Biologicals 公司，批号 NBP2-76433）；Akt、p-Akt 一抗、二抗（美国 Cell Signaling Technology 公司，批号 9272、4060、7077）。

1.4 仪器 SpectraMax iD3 酶标仪（美国 MD 公司）；Micro17R 低温高速离心机、BB150 细胞培养箱、Nanodrop onemRNA 定量仪（美国 Thermo 公司）；AE2000 光学显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司）；Mastercycler PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）；LightCycler®96 实时荧光定量 PCR 仪（瑞士罗氏公司）。

2 方法

2.1 含药血清制备 将 60 只 8 周龄大鼠随机分为对照组、模型组（CTX）、阳性组（补佳乐，0.21 mg/kg）、育麟方组（30.4 g/kg）^[10-11]，每组 15 只，模型组和各给药组均腹腔注射 CTX（首日 50 mg/kg，之后 8 mg/kg 连续 14 d）进行造模，补佳乐组和育麟方组灌胃给予相应剂量药物，对照组和模型组灌胃给予去离子水，连续 7 d。末次给药后 1 h，无菌条件下腹主动脉取血，静置后离心，分离得到含药血清。将同组大鼠含药血清混匀，56℃水浴 30 min 灭活，0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌，冻存管分装，于-70℃保存。

2.2 颗粒细胞提取与培养 将 10 只 22~24 d 大鼠^[12-13]适应性喂养 1 d，注射孕马血清促性腺激素（50 IU/只），48 h 后用 10% 水合氯醛麻醉后处死，于无菌条件下摘除卵巢，PBS 冲洗 3 次，去除周围脂肪和被膜，用 1 mL 注射器针头刺破卵巢卵泡，收集颗粒细胞，加入 0.3 mL 2.5% 胰酶，反复吹打悬液使颗粒细胞团块分离，加入 1 mL 含血清培养液终止消化，静置 10 min，悬液离心后弃上清，加入 10% 胎牛血清 0.2 mL，吹打均匀。应用血球小板计数，以 5.0×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板中，在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养，观察贴壁情况，待细胞长满瓶底至 75%~80% 融合时用于实验。

2.3 分组与干预 将细胞分为对照组 1、模型组 1 [环磷酰胺（CTX）含药血清]、阳性组 1（CTX 含药血清+补佳乐含药血清）、育麟方组 1（CTX 含药血清+育麟方含药血

清）及对照组 2（LY294002）、模型组 2（LY294002+CTX 含药血清）、阳性组 2（LY294002+CTX 含药血清+补佳乐含药血清）、育麟方组 2（LY294002+CTX 含药血清+育麟方含药血清），每组均设 3 个平行复孔。

2.4 MTT 实验检测细胞活力 计数对数生长期的细胞，0.25% 胰酶消化后按每孔 5.0×10^3 个的密度接种于 96 孔板，加药干预后每孔加 20 μ L MTT 溶液（5 mg/mL），37℃培养箱中孵育 4 h，离心后吸弃培养基，每孔加 100 μ L DMSO，轻摇使紫蓝色结晶彻底溶解，使用酶标仪检测 490 nm 波长处光密度（OD）值，计算细胞活力，公式为细胞活力 = $[(OD_{处理组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组})]\times100\%$ 。

2.5 流式细胞技术检测细胞周期和凋亡 从培养瓶中用含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞，用 PBS 液洗涤细胞并离心，弃上清，取单细胞悬液，离心后弃上清，用乙醇固定，4℃保存过夜。次日，用 PBS 液洗去固定液，加入 RNase，在 37℃水浴箱中静置 30 min，加入 PI 试剂染色，充分混匀，于 4℃冰箱中避光反应 30 min，上机检测，观察各组离体细胞的细胞周期和凋亡情况。

2.6 线粒体凋亡检测

2.6.1 JC-1 法检测线粒体膜电位（MMP） 用 DMSO 溶解 JC-1，配制成 1 mg/mL 溶液，于-20℃避光保存。将细胞及 JC-1 用 PBS 混匀，使后者终浓度为 5 μ mol/L，振荡孵育，洗涤，重悬，于荧光显微镜下观察红色荧光和绿色荧光，正常线粒体显橘红色荧光，提示线粒体处于极化状态而病理形态下显绿色荧光，通过 Image J 软件分析红绿荧光强度，以红光/绿光荧光强度比值表示线粒体膜电位。

2.6.2 荧光素酶法检测细胞 ATP 水平 收集对数生长期的细胞，吸弃培养液，胰酶消化并收集细胞，在检测孔或检测管内加入 20 μ L 样品或标准品，混匀后测定 RLU 值，再代入标准曲线方程中计算 ATP 水平。

2.7 RT-qPCR 法检测 PI3K、Akt mRNA 表达 TRIzol 法提取细胞总 RNA，经琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，分光光度计校验其纯度，RNA 逆转录后以 25 μ L 反应体系进行 PCR 扩增，95℃预变性 5 min，94℃变性 1 min，不同温度下退火 40 s，72℃延伸 1 min，循环 30 次，72℃充分延伸 10 min，所有样本均设 3 个平行孔。实验结束后，记录每个反应管中荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数（C_T 值），通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目标基因相对于内参 GAPDH 的倍数来比较基因的表达差异。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向(5'→3')	反向(5'→3')
PI3K	AGTGGTGACAGCCCTAGACT	TTGAGGGCGCTTCACCTAC
Akt	ACATGGCCCCGGTTAAAAA	AGTTGTTGAGTGGGGACTCG
GAPDH	AAGGTCGGTGTGAACGGATT	CTTTGTCACAAGAGAAGGCAGC

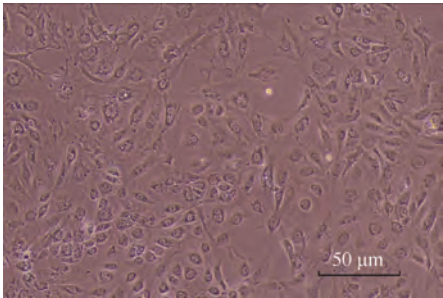
2.8 Western blot 法检测 PI3K/Akt 信号通路及凋亡相关蛋白表达 收集各组细胞，提取总蛋白后经 SDS-PAGE 凝胶电泳，电转移至 PVDF 膜上，封闭，分别加 PIP3、PIP2、

p-Akt、Cyt C、Bax、Bcl-2 一抗 4 ℃ 孵育过夜，TBST 漂洗后加二抗并显色，用 Image J 图像分析系统对蛋白条带进行分析，蛋白相对表达以目的蛋白与内参蛋白条带光密度的比值表示。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 16.0 软件进行处理，若数据符合正态分布，以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，组间比较采用单因素方差分析和配对 t 检验；若不符合正态分布，则采用非参数检验中多个独立样本 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 原代大鼠卵巢颗粒细胞形态 大鼠卵巢颗粒细胞培养后贴壁聚集生长，体积较大，呈梭形或星形，伪足延伸，相互连接；细胞核位于细胞中央，呈卵圆形或者不规则形；胞质为淡红色，边缘清晰，见图 1。



注：标尺为 50 μm。

图 1 原代大鼠卵巢颗粒细胞形态 (×100)

3.2 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞活性的影响 由表 2 可知，与对照组 1 比较，模型组 1、对照组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞活性降低 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 原代大鼠卵巢颗粒细胞活性升高 ($P<0.01$)；与对照组 2 比较，模型组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞活性降低 ($P<0.01$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞活性升高 ($P<0.01$)。

表 2 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	细胞活性/%
对照组 1	100.00±7.47
模型组 1	33.36±3.80 ^{▲▲}
阳性组 1	75.65±5.55 ^{★★}
育麟方组 1	80.21±2.43 ^{★★}
对照组 2	41.46±3.17 ^{▲▲}
模型组 2	22.33±2.56 ^{##}
阳性组 2	66.90±4.90 ^{**}
育麟方组 2	63.45±5.90 ^{**}

注：与对照组 1 比较，^{▲▲} $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，^{★★} $P<0.01$ ；与对照组 2 比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组 2 比较，^{**} $P<0.01$ 。

3.3 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞周期分布的影响 由图 2 可知，在相同的培养环境下与对照组 1 比较，模型组 1、对照组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞在 G_0/G_1 期细胞数量减少 ($P<0.01$)，S 期细胞数量增多 ($P<0.01$)， G_2/M 期细胞数量无明显变化 ($P>0.05$)；与模型组 1 比较，阳

性组 1、育麟方组 1 原代大鼠卵巢颗粒细胞在 G_0/G_1 期细胞数量增加 ($P<0.01$)，S 期细胞数量减少 ($P<0.05$)， G_2/M 期细胞数量明显无变化 ($P>0.05$)；与对照组 2 比较，模型组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞在 G_0/G_1 期和 S 期细胞数量减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)， G_2/M 期细胞数量增加 ($P<0.01$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞在 G_0/G_1 期细胞数量增加 ($P<0.01$)，S 期细胞数量无明显变化 ($P>0.05$)， G_2/M 期细胞数量减少 ($P<0.01$)。

3.4 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响 由图 3 可知，与对照组 1 比较，模型组 1、对照组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 原代大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)；与对照组 2 比较，模型组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)。

3.5 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞线粒体膜电位变化的影响 由图 4 可知，与对照组 1 比较，模型组 1、对照组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞线粒体膜电位降低 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 原代大鼠卵巢颗粒细胞线粒体膜电位升高 ($P<0.01$)；与对照组 2 比较，模型组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞线粒体膜电位降低 ($P<0.05$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞线粒体膜电位升高 ($P<0.01$)。

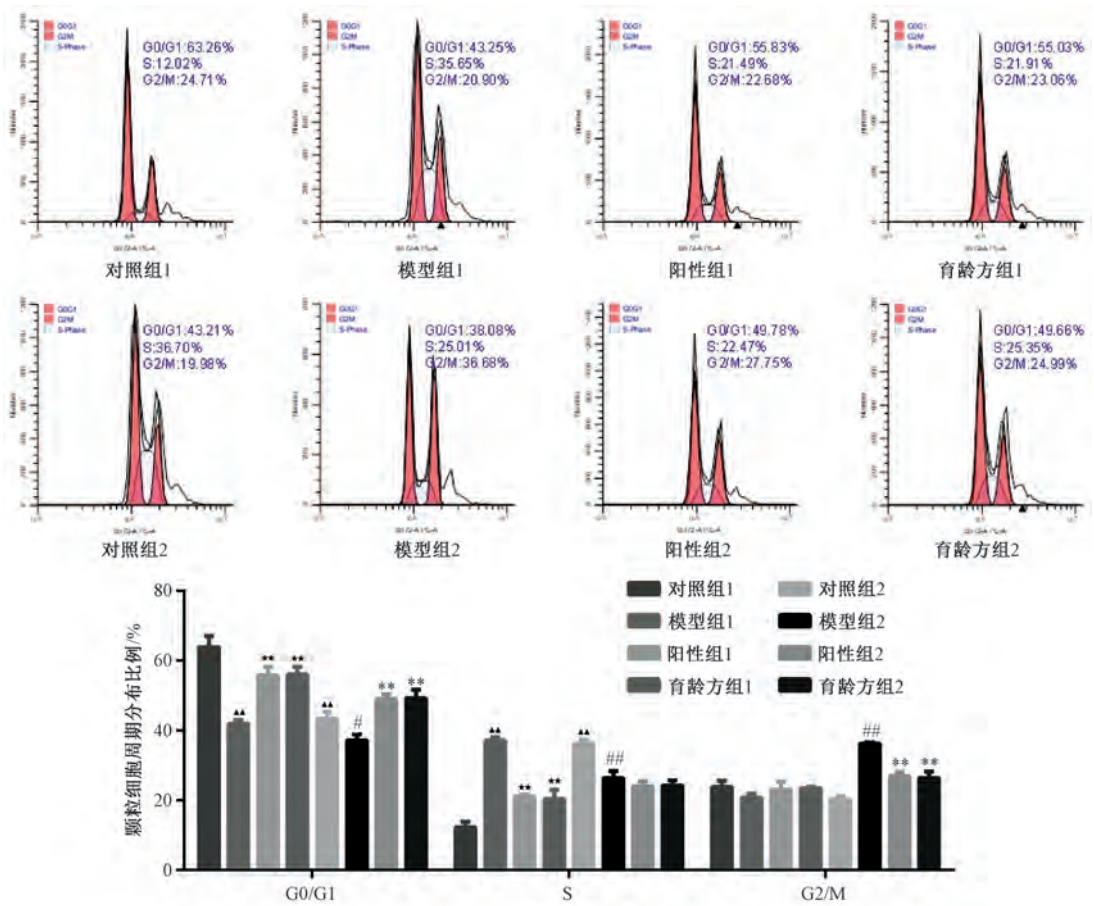
3.6 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 ATP 水平的影响 由表 3 可知，与对照组 1 比较，模型组 1、对照组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞 ATP 水平降低 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 原代大鼠卵巢颗粒细胞 ATP 水平升高 ($P<0.01$)；与对照组 2 比较，模型组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞 ATP 水平降低 ($P<0.01$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 原代大鼠卵巢颗粒细胞 ATP 水平升高 ($P<0.01$)。

表 3 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 ATP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	ATP/(nmol·L ⁻¹)
对照组 1	2 015.49±145.47
模型组 1	791.56±63.71 ^{▲▲}
阳性组 1	1 646.83±132.21 ^{★★}
育麟方组 1	1 567.91±146.52 ^{★★}
对照组 2	740.41±81.69 ^{▲▲}
模型组 2	424.87±38.65 ^{##}
阳性组 2	1 218.01±90.07 ^{**}
育麟方组 2	1 275.81±83.56 ^{**}

注：与对照组 1 比较，^{▲▲} $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，^{★★} $P<0.01$ ；与对照组 2 比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组 2 比较，^{**} $P<0.01$ 。

3.7 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达的影响 由图 5 可知，与对照组 1 比较，模型组 1、对照组 2 颗粒细胞 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 颗粒细胞 *PI3K*、*Akt* mRNA



注：与对照组 1 比较， $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ ；与模型组 1 比较， $\star\star P<0.01$ ；与对照组 2 比较， $\# P<0.05$ ， $\#\# P<0.01$ ；与模型组 2 比较， $\star\star P<0.01$ 。

图 2 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞周期分布的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表达升高 ($P<0.01$)；与对照组 2 组比较，模型组 2 颗粒细胞 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 颗粒细胞 *PI3K*、*Akt* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。

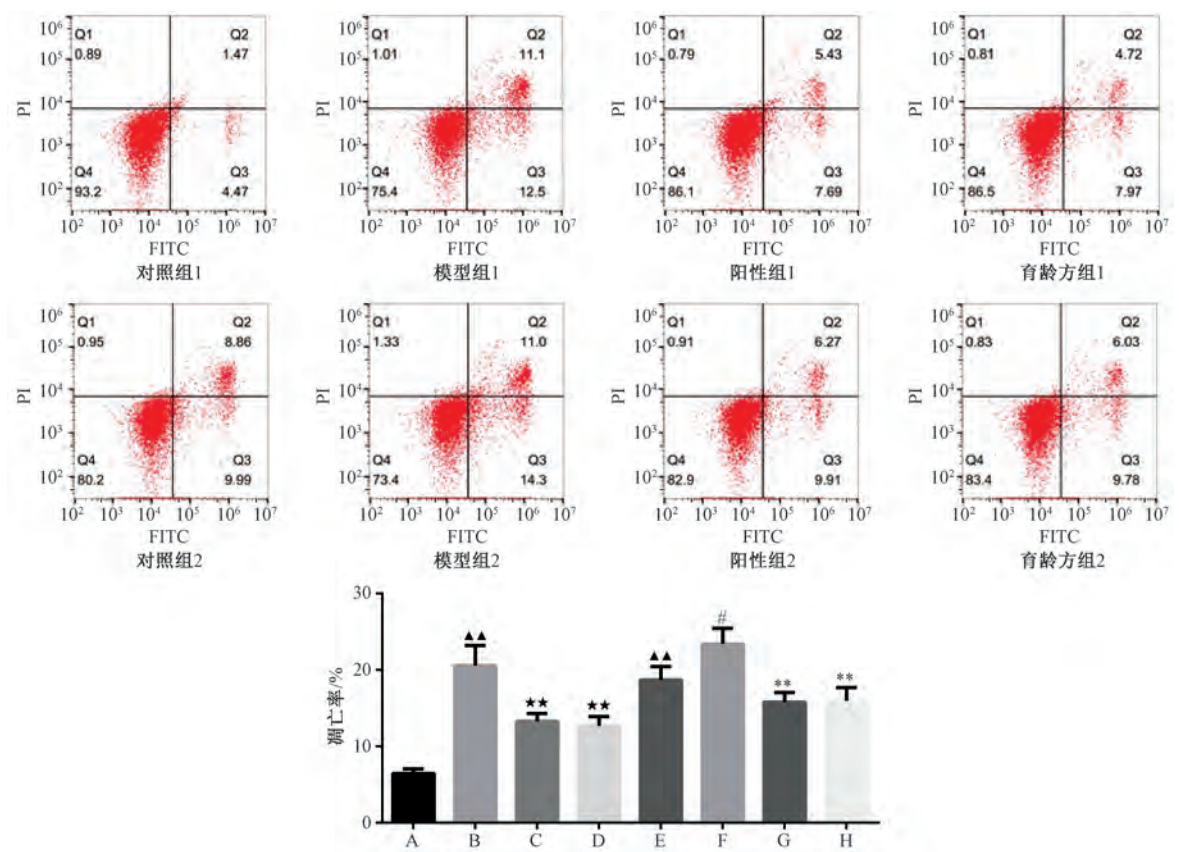
3.8 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 *PI3K*、*PIP2*、*PIP3*、*Akt*、*p-Akt* 蛋白表达的影响 由图 6 可知，与对照组 1 比较，模型组 1 颗粒细胞 *PIP2*、*PIP3*、*p-Akt* 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 颗粒细胞 *PIP2*、*PIP3*、*p-Akt* 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 颗粒细胞 *PIP2*、*PIP3*、*p-Akt* 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.9 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 *Cyt C*、*Bax*、*Bcl-2* 蛋白表达的影响 由图 7 可知，与对照组 1 比较，模型组 1 颗粒细胞 *Cyt C*、*Bax* 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，*Bcl-2* 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组 1 比较，阳性组 1、育麟方组 1 颗粒细胞 *Cyt C*、*Bax* 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，*Bcl-2* 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与对照组 2 比较，模型组 2 颗粒细胞 *Cyt C*、*Bax* 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，*Bcl-2* 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组 2 比较，阳性组 2、育麟方组 2 颗粒细胞 *Cyt C*、*Bax* 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，*Bcl-2* 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

4 讨论

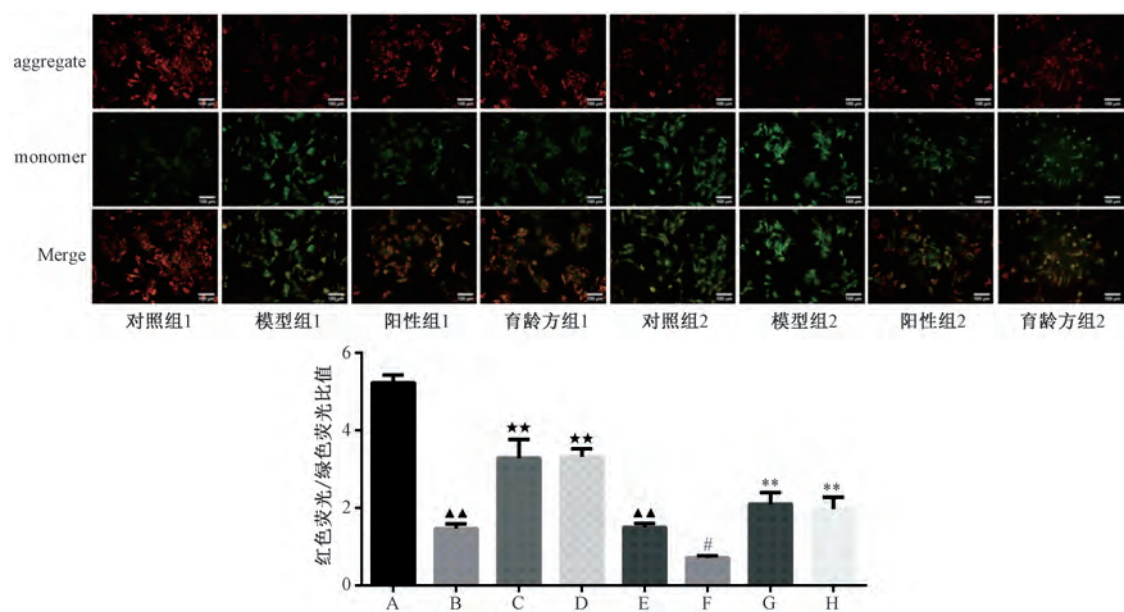
DOR 归属于中医“经水早断”“月经过少”“闭经”“不孕”等范畴，“肾藏精、主生殖”理论是对人体生殖功能的高度概括，卵子数量的多少及质量的优劣主要取决于肾精的盛衰，只有肾气充盛，天癸方旺盛，冲任血海盈满，经水方按时而至，继而有子。由此可见，肾藏精气之盛衰与女性生殖最为密切，肾精肾气犹如人体生发之“动力之源”，与现代医学中的线粒体功能不谋而合，线粒体通过不断合成 ATP 给细胞供能，以维持生殖细胞活性，相当于肾气温养胞宫，不断推动生殖之精发生生长。育麟方由《济阴纲目》中的苁蓉菟丝丸加减化裁而成，方中以菟丝子、淫羊藿为君，补肾温阳；枸杞子、巴戟天、肉苁蓉、覆盆子为臣，补肝肾益精血；当归、川芎、熟地黄，补血调血，补而不滞；川芎养血活血，蛇床子益肾壮阳，诸药相伍，以滋补肾精为核心，阴阳同补，佐以养精血，血充精足，胞宫得以温养，肾精得之充养，故生殖细胞生发之“动能”有所来源，则卵巢储备功能得以改善。

近年来，线粒体活性被认为与生殖能力息息相关，其功能障碍可导致卵巢颗粒细胞的功能障碍与凋亡，导致卵泡闭锁甚至衰竭，引起卵巢储备功能下降^[14-15]，故线粒体依赖性颗粒细胞凋亡与 DOR 的发生发展关系密切。*PI3K/Akt* 信号通路被认为是经典的线粒体凋亡途径^[16]，也是调节细胞的增殖、生长和凋亡重要的信号通路，其中 *PI3K*



注：A 为对照组 1，B 为模型组 1，C 为阳性组 1，D 为育麟方组 1，E 为对照组 2，F 为模型组 2，G 为阳性组 2，H 为育麟方组 2。与对照组 1 比较，▲▲ $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，** $P<0.01$ ；与对照组 2 比较，# $P<0.05$ ；与模型组 2 比较，** $P<0.01$ 。

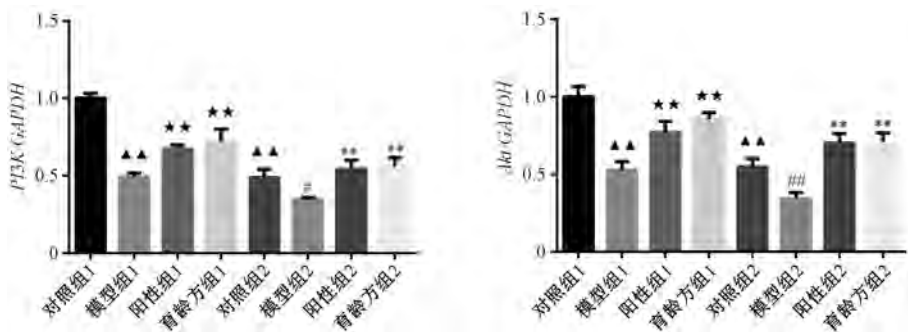
图 3 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：JC-1 染色图标尺为 100 μm 。A 为对照组 1，B 为模型组 1，C 为阳性组 1，D 为育麟方组 1，E 为对照组 2，F 为模型组 2，G 为阳性组 2，H 为育麟方组 2。与对照组 1 比较，▲▲ $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，** $P<0.01$ ；与对照组 2 比较，# $P<0.05$ ；与模型组 2 比较，** $P<0.01$ 。

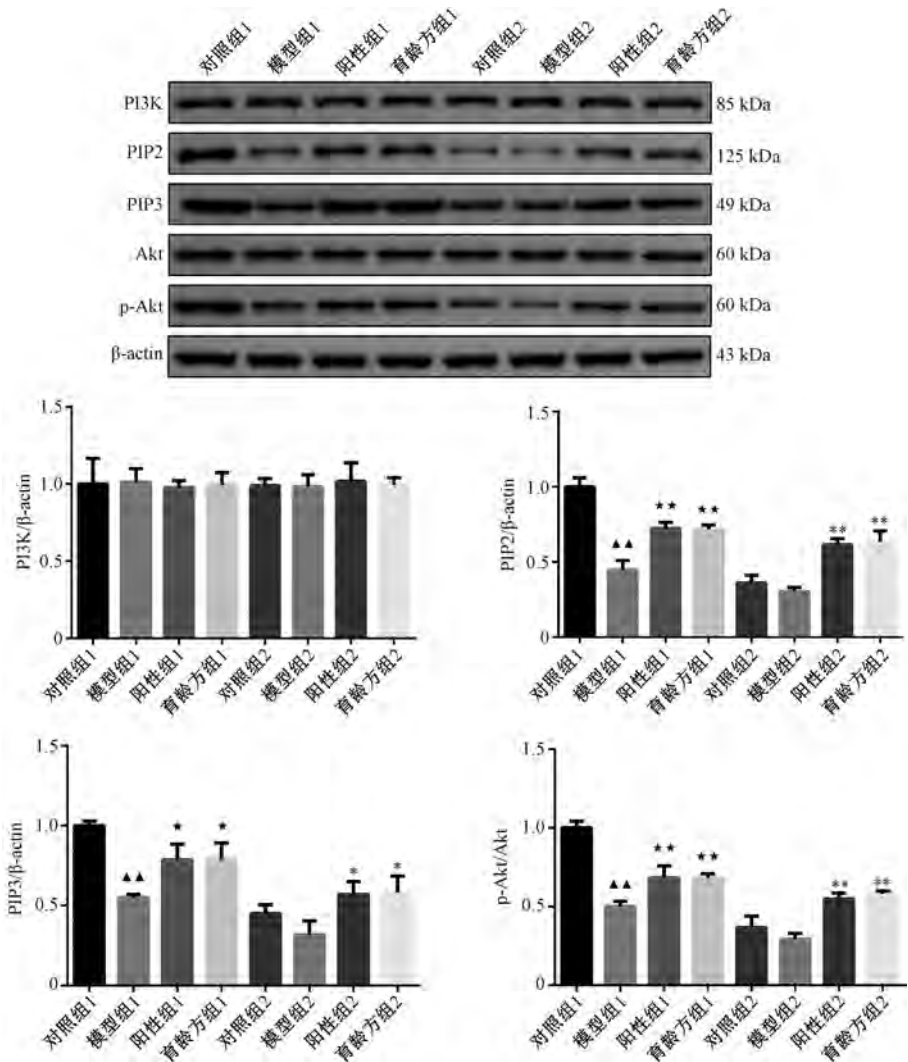
图 4 育麟方对 DOR 大鼠卵巢颗粒细胞线粒体膜电位变化的影响 ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

是肌醇与磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol, PI）的重要激酶，作为细胞外信号刺激的应答者，其使磷脂酰肌醇二磷酸（PIP2）磷酸化为磷脂酰肌醇三磷酸（PIP3），从而导致 Akt 的磷酸化和激活；Akt 作为 PI3K 的下游产物，在该



注：与对照组 1 比较，^{▲▲} $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，^{**} $P<0.01$ ；与对照组 2 比较，[#] $P<0.05$ ，^{###} $P<0.01$ ；与模型组 2 比较，^{**} $P<0.01$ 。

图 5 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 PI3K、Akt mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



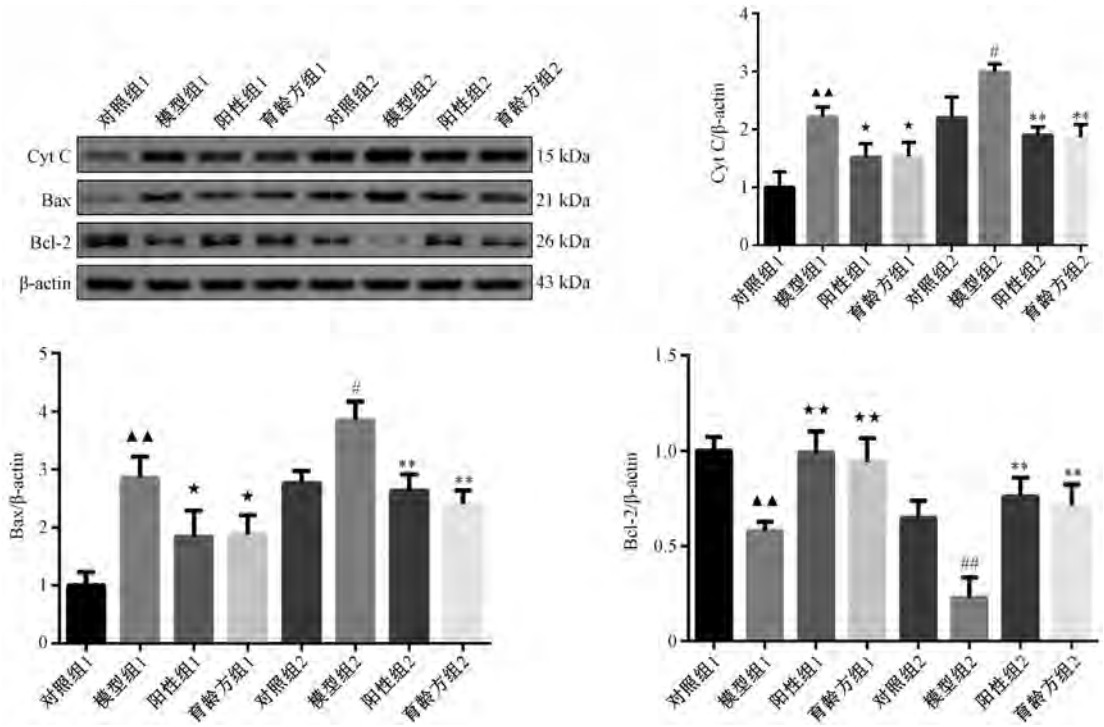
注：与对照组 1 比较，^{▲▲} $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与模型组 2 比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 6 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 PI3K、PIP2、PIP3、Akt、p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

通路中起到了关键作用，可通过调节下游促凋亡蛋白（如 Bax 等）和抗凋亡蛋白（如 Bcl-2 等）的磷酸化表达来调节细胞的功能。促凋亡蛋白可通过破坏线粒体膜的完整性，使线粒体内小分子物质释放，膜电位丢失，细胞色素 C（Cyt C）等促凋亡小分子蛋白释放进入细胞质中，招募细胞质中的 caspase-9 酶原形成凋亡复合体，进而导致细胞凋

亡^[17-18]；反之，抗凋亡蛋白则可以抑制这一过程，而 Akt 的活化可以抑制下游促凋亡蛋白的表达，提高抗凋亡蛋白表达，从线粒体凋亡的角度调控细胞凋亡过程^[19]。

本研究发现，与模型组比较，育麟方组颗粒细胞的活力以及线粒体膜电位和 ATP 水平上升，颗粒细胞的凋亡率下降，PI3K、Akt mRNA 相对表达量及 p-Akt/Akt、PIP2、



注：与对照组 1 比较，^{△△} $P<0.01$ ；与模型组 1 比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ ；与对照组 2 比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组 2 比较，^{**} $P<0.01$ 。

图 7 育麟方对 DOR 大鼠颗粒细胞 Cyt C、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

PIP3 相对蛋白表达也有不同程度提高，伴随下游促凋亡相关蛋白 Cyt C、Bax 表达降低与抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白表达上升；在加入 PI3K 抑制剂 LY294002 及育麟方含药血清的细胞组中，这些功能被抑制；单纯的 PI3K 抑制剂组与对照组比较，同样有抑制作用，说明抑制 PI3K 可使下游关键靶点 Akt 的磷酸化受到抑制，进而降低颗粒细胞的各项生理功能促进了凋亡的进程。另外，在抑制 PI3K 同时加入育麟方含药血清后，后者作用受到了抑制，证实 PI3K/Akt 信号通路在育麟方降低颗粒细胞线粒体依赖性凋亡的过程中起着重要的作用。

综上所述，育麟方能抑制 DOR 大鼠颗粒细胞凋亡，改善线粒体膜电位及 ATP 水平，减少凋亡相关蛋白表达，可能是基于调控 PI3K/Akt 信号通路实现。上述结果为育麟方在治疗卵巢储备功能下降中的应用提供了分子生物学理论依据，也为该方后续开发和应用提供了实验基础。

参考文献：

[1] Scantamburlo V M, Linsingen R V, Centa L J R, *et al.* Association between decreased ovarian reserve and poor oocyte quality[J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2021, 64(6): 532-539.

[2] Hu S, Xu B, Jin L. Perinatal outcome in young patients with diminished ovarian reserve undergoing assisted reproductive technology[J]. *Fertil Steril*, 2020, 114(1): 118-124.

[3] Broekmans F J, Kwee J, Hendriks D J, *et al.* A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(6): 685-718.

[4] Zhang Q L, Lei Y L, Deng Y, *et al.* Treatment progress in diminished ovarian reserve; Western and Chinese medicine[J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(4): 361-367.

[5] Xia T, Ma R H, Mu W, *et al.* Traditional Chinese medicine for diminished ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis[J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(2): 93-102.

[6] 何嘉琳, 俞 佳. 育麟方加减治疗不同年龄女性卵巢储备功能下降 30 例疗效观察[J]. *中国中医药科技*, 2011, 18(6): 521-522.

[7] 何嘉琳. 育麟方治疗肾虚型卵巢储备功能下降患者 50 例临床研究[C] //2011 年浙江省中医药学会妇科分会学术年会暨中西医结合防治生殖障碍疾病高级培训班文集. 杭州: 杭州市中医院, 2011: 7.

[8] 缪晨韵, 章 勤, 马 景, 等. 育麟方改善老龄小鼠卵巢储备功能的实验研究[J]. *浙江中医杂志*, 2018, 53(7): 491-492.

[9] Ben-Meir A, Burstein E, Borrego-Alvarez A, *et al.* Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(5): 887-895.

[10] 蔡彬彬, 王素霞, 祝雨田, 等. 育麟方对卵巢储备功能减退大鼠卵巢颗粒细胞超微结构及功能的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(6): 3074-3077.

[11] 蔡彬彬, 何嘉琳, 王素霞. 育麟方对卵巢储备功能降低大鼠颗粒细胞分泌功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(15): 138-141.

[12] Nie X, Sheng W, Hou D, *et al.* Effect of Hyperin and Icariin on steroid hormone secretion in rat ovarian granulosa cells[J].

Clin Chim Acta, 2019, 495: 646-651.

[13] 王美玲, 董玉婷, 叶晓锋, 等. 双氢睾酮对大鼠原代卵泡颗粒细胞抗苗勒管激素表达的影响[J]. 解剖学报, 2020, 51(3): 367-372.

[14] 沈浩玥, 韩 乐, 包文秀, 等. 线粒体异常与卵巢储备功能减退的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(8): 1161-1165.

[15] Zhang J, Liu Y, Yao W, *et al.* Initiation of follicular atresia: gene networks during early atresia in pig ovaries [J] . *Reproduction*, 2018, 156(1): 23-33.

[16] Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(3): 195-203.

[17] Zhang J, Li L, Peng Y, *et al.* Surface chemistry induces mitochondria-mediated apoptosis of breast cancer cells *via* PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(1): 172-185.

[18] Chen Q, Xu H, Xu A, *et al.* Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in ischemia-damaged mitochondria [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118834.

[19] Liu H, Wang J, Tao Y, *et al.* Curcumin inhibits colorectal cancer proliferation by targeting miR-21 and modulated PTEN/PI3K/Akt pathways[J]. *Life Sci*, 2019, 221: 354-361.

基于 SIRT3/AMPK 通路探讨齐墩果酸对病毒性心肌炎小鼠炎症及纤维化损伤的影响

杨丽霞, 徐丹桂, 陈 琦, 黎 明*
(三峡大学第三临床医学院·国药葛洲坝中心医院儿科,湖北 宜昌 443000)

摘要: **目的** 探究齐墩果酸对病毒性心肌炎 (VMC) 小鼠炎症及纤维化损伤的影响。**方法** 采用腹腔注射柯萨奇 B3 病毒 (CVB3) 构建 VMC 小鼠模型, 并随机分为模型组、齐墩果酸组、SIRT3 抑制剂 (3-TYP) 组、齐墩果酸+3-TYP 组, 每组 15 只; 另取 15 只小鼠作为正常组, 各组给予相应药物处理 7 d。采用超声心动图检测心功能, ELISA 法检测血清心肌损伤标志物 [肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌钙蛋白 (cTnI)]、炎症因子 [白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)] 水平, 流式细胞术检测外周血辅助性 T 细胞 17 (Th17)/调节性 T 细胞 (Treg) 比例以评价免疫功能, HE、Masson 及 TUNEL 染色观察心肌组织炎症、纤维化、凋亡等病理损伤, 免疫荧光法、免疫组化法分别检测心肌组织 SIRT3、转化生长因子- β (TGF- β) 阳性表达, 蛋白印迹法检测 SIRT3/AMPK 通路及下游相关蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠饮食减少, 萎靡、耸毛、弓背蜷缩行为增多, 出现死亡, 心肌细胞病理损伤严重, 心率、左心室射血分数、心肌组织 SIRT3 阳性表达、SIRT3、p-AMPK/AMPK 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径、血清 CK-MB、cTnI、IL-1 β 、IL-6 水平、外周血 Th17/Treg 比例、心肌胶原容积分数、心肌细胞凋亡率、TGF- β 阳性表达、p-NF- κ B/NF- κ B、Bax、TGF- β 、p-Smad3/Smad3、 α -SMA、FN 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 齐墩果酸可缓解小鼠 VMC 病理症状, 上调 SIRT3/AMPK 通路相关蛋白表达 ($P<0.05$), 下调其介导的炎症、凋亡、纤维化反应 ($P<0.05$), 而 3-TYP 可逆转齐墩果酸的上述作用 ($P<0.05$)。**结论** 齐墩果酸可能通过激活 SIRT3/AMPK 通路, 抑制 CVB3 感染引起的 VMC 小鼠心肌组织炎症、凋亡及纤维化反应, 从而改善 VMC 小鼠心功能。

关键词: 齐墩果酸; 病毒性心肌炎; 心肌损伤; 炎症; 凋亡; 纤维化; SIRT3/AMPK 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)07-2389-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.045

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 湖北省卫生计生委中医药、中西医结合科研指导性项目 (鄂卫生计生通 [2017] 20 号-7)

作者简介: 杨丽霞 (1987—), 女, 主治医师, 从事小儿心血管疾病研究。Tel: 15926957506, E-mail: yanglixia649@163.com

* 通信作者: 黎 明 (1980—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事小儿心血管疾病研究。Tel: 13872452564, E-mail: 2814908325@qq.com