

基于 p53/AMPK 信号通路探讨补肾调泡周期疗法对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞的影响

何忆清, 王茜, 刘泉, 张颖, 魏逍萱, 杨硕*
(湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨补肾调泡周期疗法对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠卵巢颗粒细胞的影响。**方法** 将SD大鼠随机分成正常组、模型组、逍遥散组(11.97 g/kg)、三子汤组(15.75 g/kg)、补肾调泡周期疗法组、阳性药物组(克罗米芬5.25 g/kg), 每组6只。采用来曲唑(1 mg/kg)构建PCOS大鼠模型, 造模后正常组与模型组灌胃给予蒸馏水, 各给药组灌胃给予相应剂量药物, 持续12 d。记录大鼠体质量、卵巢质量及子宫质量, 瑞氏染色法观察大鼠动情周期, HE染色法观察卵巢组织形态, ELISA法检测大鼠血清性激素[促黄体生成素(LH)、促卵泡生长激素(FSH)、雌二醇(E₂)、睾酮(T)、孕酮(P)]及抗苗勒氏激素(AMH)水平, Western blot法检测大鼠卵巢颗粒细胞p53、AMPK、mTOR、Beclin 1、LC3蛋白表达, RT-qPCR法检测p53、AMPK、mTOR、Beclin 1 mRNA表达。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠体质量、卵巢质量升高($P<0.01$), 子宫质量降低($P<0.05$); 动情周期紊乱; 颗粒细胞减少, 囊性卵泡增加; 血清LH、LH/FSH、T、AMH水平升高($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、E₂、P水平降低($P<0.01$); 卵巢颗粒细胞p53、mTOR蛋白及mRNA表达降低($P<0.01$), AMPK、Beclin 1蛋白及mRNA表达升高($P<0.01$), LC3 II/I蛋白表达升高($P<0.01$)。与模型组比较, 补肾调泡周期疗法组大鼠卵巢质量降低($P<0.05$), 子宫质量升高($P<0.05$); 各动情阶段规律出现; 颗粒细胞层数增加, 优势卵泡可见; 血清LH、LH/FSH、T、AMH水平降低($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、E₂、P水平升高($P<0.05$, $P<0.01$); 卵巢颗粒细胞p53、mTOR蛋白及mRNA表达升高($P<0.05$, $P<0.01$), AMPK、Beclin 1蛋白及mRNA表达降低($P<0.01$), LC3 II/I表达降低($P<0.05$)。**结论** 补肾调泡周期疗法可通过调控p53/AMPK通路相关蛋白及自噬相关因子的表达, 调节PCOS大鼠卵巢颗粒细胞自噬平衡, 促进卵泡发育。

关键词: 补肾调泡周期疗法; 多囊卵巢综合征; 卵巢颗粒细胞; 自噬; p53/AMPK信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)06-1976-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.031

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期女性高发的生殖内分泌代谢性疾病, 在临床上以稀发排卵或无排卵、高雄激素血症(临床和/或生化表现)及卵巢多囊样改变为特征^[1]。临床常用治疗药物为达英-35、二甲双胍等^[2]。

补肾调泡周期疗法由全国名中医尤昭玲教授创立, 该疗法是尤教授结合30多年治疗妇科生殖疾病的临床经验, 专门针对育龄期PCOS患者卵泡发育异常所提出的补肾调泡、调肝周期序贯疗法, 具有恢复月经周期、促进卵泡发育及排卵、助孕的治疗效果。课题组前期系列研究证实, 补肾调泡周期疗法的组方(逍遥散、三子汤)可通过多维度调控生殖内分泌功能。通过培养SD大鼠原代卵巢颗粒细胞发现, 该疗法能促进卵巢颗粒细胞增殖, 其核心与升高抗苗勒氏激素(AMH)及其II型受体(AMHR2)、

Smad4蛋白及mRNA表达有关^[3]。该疗法通过调节PCOS大鼠卵巢组织AMH/AMHR2蛋白动态平衡, 改善卵泡发育异常^[4]; 且逍遥散核心中药可能通过调控子宫内膜血管内皮生长因子(VEGF)介导的血管生成通路, 增加子宫内膜微血管密度, 为改善PCOS患者子宫内膜容受性提供新的干预靶点^[5]。研究表明, 卵巢颗粒细胞在卵泡闭锁期间诱导自噬发生, 通过过度自我消化和降解细胞成分促进细胞凋亡, 维持自噬的稳态平衡, 促进卵泡发育^[6]。p53/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号转导通路对细胞自噬起到双向的调节作用, 可参与调控卵巢颗粒细胞自噬, 通过抑制PCOS卵巢颗粒细胞过度自噬, 可改善卵巢功能^[7]。

因此, 本研究通过来曲唑构建PCOS大鼠模型, 基于p53/AMPK信号通路探讨补肾调泡周期疗法调控卵巢颗粒细胞自噬, 参与调控卵泡发育及排卵的作用机制。

收稿日期: 2025-02-06

基金项目: 国家自然科学基金(81503611); 湖南省自然科学基金面上项目(2025JJ50716); 湖南省教育厅重点基金项目(24A0257); 长沙市自然科学基金(kq2402176); 湖南中医药大学重点项目(2024XJZA003)

作者简介: 何忆清(1997—), 女, 硕士生, 从事中西医结合防治妇产科疾病的研究。Tel: 18692203893, E-mail: 1037595159@qq.com

* **通信作者:** 杨硕(1982—), 女, 博士, 副教授, 从事妇科疑难病症防治的研究。Tel: 18974973727, E-mail: 42180672@qq.com。

1 材料

1.1 动物 SPF级雌性SD大鼠36只,6周龄,体质量(180±20)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动物实验中心[实验动物使用许可证号SYXK(湘)2019-0009]。大鼠均采用灭菌的颗粒饲料进行喂养,自由饮水,12h光照/12h黑暗交替,环境温度(22±1)℃,相对湿度(55±5)%,每天定时更换垫料并进行环境消毒。本实验方案经湖南中医药大学动物实验中心伦理委员会审查通过(伦理号LL2021042802)。

1.2 药物 逍遥散组方饮片柴胡6g,当归、白术、白芍、茯苓各10g,生姜(自备)、薄荷各3g,炙甘草5g;三子汤组方饮片菟丝子、桑葚子、覆盆子、生地黄、熟地黄、北沙参、麦冬各10g,炙甘草5g,以上饮片均购于湖南中医药大学第一附属医院中药房,经该院药学教研室戴冰教授鉴定为正品。分别称取逍遥散及三子汤组方饮片,浸泡20min后进行第1次煎煮,其中逍遥散中生姜、薄荷后下,于关火前5min加入;过滤,药渣加水进行2次煎煮,时间为20min;将逍遥散、三子汤的2次药液分别合并,减压浓缩至1.67、1.15g/mL,4℃保存备用。来曲唑(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号211026KL),给药质量浓度为0.125mg/mL;枸橼酸钠氯米芬(塞浦路斯高特制药有限公司,批号M0706),给药质量浓度为1mg/mL。

1.3 试剂 瑞氏染液(北京索莱宝科技有限公司,货号G1040);p53、AMPK、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体(英国Abcam公司,货号ab131442、ab32047、ab32028);轻链3(LC3)、Beclin 1、磷酸化mTOR抗体(p-mTOR)[艾比玛特医药科技(上海)有限公司,货号T55992S、T55092S、T56571F];磷酸化AMPK抗体(p-AMPK)(杭州华安生物技术有限公司,货号ET1612-72);GAPDH抗体(美国Affinity公司,货号AF7021);ECL高效化学发光试剂盒(美国Genview公司,货号GE2301-100);苏木素-伊红(HE)染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号ZLI-1040、ZLI-9610);BCA蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号E-BC-K318-M、E-AB-1003);大鼠促卵泡生长激素(FSH)、睾酮(T)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、孕酮(P)AMH ELISA试剂盒(上海抚生实业有限公司,货号A108205-96T、A109234-96T、A107986-96T、A108219-96T、A107267-96T、A109075-96T);逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(上海近岸科技有限公司,批号E047-01B、E096-01A)。

1.4 仪器 HM355S型石蜡切片机(美国Thermo Fisher Scientific公司);Motic AE2000型号倒置荧光显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);MiniPROTEAN Tetra型电泳槽、CFX96实时荧光定量基因扩增仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 大鼠适应性饲养3d后,通过阴道涂片筛选动情周期正常的大鼠并纳入研究。按随机数字表法随机抽取6只作为正常组,正常组全程给予普通饲料,自由饮水;剩余30只大鼠每天灌胃来曲唑溶液(1mg/kg),连续21d,构建PCOS大鼠模型^[8]。大鼠阴道脱落细胞学检测显示上皮细胞数减少,白细胞升高,动情周期紊乱,动期间期延长且伴有体质量明显升高,提示造模成功^[4,8]。

PCOS大鼠模型按随机数字表法分为模型组、逍遥散组、三子汤组、补肾调泡周期疗法组和阳性药物组。正常组、模型组每天灌胃给予蒸馏水;逍遥散组、三子汤组分别按11.97、15.75g/kg剂量(均为临床等效剂量的2倍)灌胃给药^[4],连续12d,即3个动情周期;补肾调泡周期疗法组用逍遥散灌胃2d、三子汤灌胃2d,序贯给药12d;阳性药物组前7d灌胃给予蒸馏水,后5d灌胃给予克罗米芬(5.25g/kg)。

2.2 大鼠一般情况观察 每天定时监测并记录大鼠体质量,2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,经腹主动脉采血,3000r/min离心15min,取血清,-80℃冰箱保存;分离大鼠卵巢及子宫,并记录其质量,将一侧卵巢固定于4%多聚甲醛中,用于病理形态观察;另一侧卵巢于-80℃保存,用于后续检测。

2.3 瑞氏染色法观察大鼠动情周期 每天上午8:00~9:00进行阴道细胞学检测,取无菌棉签用生理盐水浸湿后,旋转进入大鼠阴道内轻轻刮取脱落细胞,随即均匀涂布于载玻片上,经室温自然干燥后,严格按照瑞氏染液说明书进行染色,置于光学显微镜下观察并拍照。

2.4 HE染色法观察卵巢组织病理形态 取经多聚甲醛固定后的卵巢组织,梯度乙醇脱水,石蜡包埋并切成4μm切片。切片经二甲苯脱蜡处理后,按照常规HE染色流程进行细胞核染色(苏木精5min)和胞质染色(伊红1min),再经梯度乙醇脱水及二甲苯透明化处理,以中性树脂封固,在显微镜下观察并拍照。

2.5 ELISA法检测血清性激素及AMH水平 从-80℃冰箱中取出大鼠血清,在冰浴条件下复温,从4℃冰箱中取出ELISA试剂盒,在室温环境下平衡30min,按照试剂盒说明书检测血清LH、FSH、E₂、T、P及AMH水平。

2.6 Western blot法检测卵巢颗粒细胞p53、AMPK、mTOR、Beclin 1、LC3蛋白表达 取冻存的卵巢组织,加入RIPA蛋白裂解液,通过低温组织研磨仪制备组织匀浆,冰上裂解后离心15min,取上清液,BCA法测定蛋白浓度,并调整蛋白质量浓度为2μg/μL,作为上样液。取上样液10μL,经过SDS-PAGE电泳后转膜,封闭1h后,加入1:2000的一抗p53、AMPK、mTOR、Beclin 1、LC3和1:10000的内参抗体GAPDH,4℃孵育过夜,洗膜后加入1:10000二抗,37℃振荡孵育1h,洗膜,加入ECL显影后拍照,分析蛋白的相对表达。

2.7 RT-qPCR 法检测卵巢颗粒细胞 *p53*、*AMPK*、*mTOR*、*Beclin 1* mRNA 表达 取卵巢组织适量,按照试剂盒说明书提取总 RNA,经逆转录合成双链 cDNA,再进行扩增,反应程序为 95 °C 3 min; 95 °C 20 s, 60 °C 15 s, 72 °C 30 s, 45 个循环;每个样本设置 3 次重复实验。在 PCR 扩增反应结束后,对熔解曲线进行分析以验证产物特异性,记录各样本的循环阈值 (C_T) 并计算其平均值。以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算靶基因的相对表达。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
<i>AMPK</i>	正向 ACAGGAGAATAATGAATGAAGCCAA
	反向 ATGCCATTTTGCTTTCCCTTACACCT
<i>Beclin 1</i>	正向 CAGTGTGTGCTCCATGCT
	反向 TGCACACAGTCCAGAAAAGC
<i>p53</i>	正向 CCTCACCATCATCACACTGGAAGAC
	反向 GTCTCTCCAGGACAGGCACAAAC
<i>mTOR</i>	正向 AAAACCTCAGCATCCAGAGATACGC
	反向 CATCAGAGTCAAGTGGTCATAGTCCG
β -actin	正向 CACCCGCGAGTACAACCTTC
	反向 CCCATACCCACCATCACACC

2.8 统计学分析 通过 SPSS 29.0 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示,符合正态性且方差齐,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 2 各组大鼠体质量、卵巢质量及子宫质量比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	体质量/g	卵巢质量/mg	子宫质量/g
正常组	275.00±23.45	52.83±4.58	0.45±0.10
模型组	329.17±27.56**	72.17±11.72**	0.29±0.04*
逍遥散组	313.00±26.49	64.67±11.84	0.35±0.06
三子汤组	310.67±25.73	65.00±8.17	0.37±0.14
补肾调泡周期疗法组	303.00±14.45	58.67±14.49#	0.42±0.10#
阳性药物组	298.17±34.35#	58.50±7.87#	0.23±0.04 Δ ▲▲§§

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与逍遥散组比较, Δ $P<0.05$;与三子汤组比较,▲ $P<0.01$;与补肾调泡周期疗法组比较,§ $P<0.01$ 。

3.3 补肾调泡周期疗法对 PCOS 大鼠卵巢组织病理形态的影响 正常组大鼠卵巢组织可见各个发育阶段的卵泡有序分布,卵母细胞结构完整清晰,颗粒细胞呈规律性复层排列。与正常组比较,模型组大鼠卵巢组织中囊性卵泡扩张增加,黄体生成数量减少,颗粒细胞层变薄且排列紊乱,未见成熟卵泡。逍遥散组、三子汤组、补肾调泡周期疗法组及阳性药物组卵巢组织中囊性卵泡减少,可见优势卵泡,黄体及各级卵泡可见,颗粒细胞呈复层有序排列。结果表明,各药物组可通过调控卵泡发育进程进而不同程度地改善 PCOS 大鼠的卵巢组织病理状态。见图 2。

3.4 补肾调泡周期疗法对 PCOS 大鼠血清性激素及 AMH 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 LH、LH/FSH、T、AMH 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), FSH、 E_2 、P 水平降低 ($P<0.01$),提示模型构建成功。与模型组比较,各给药组血清 LH、LH/FSH、AMH 水平降低 ($P<$

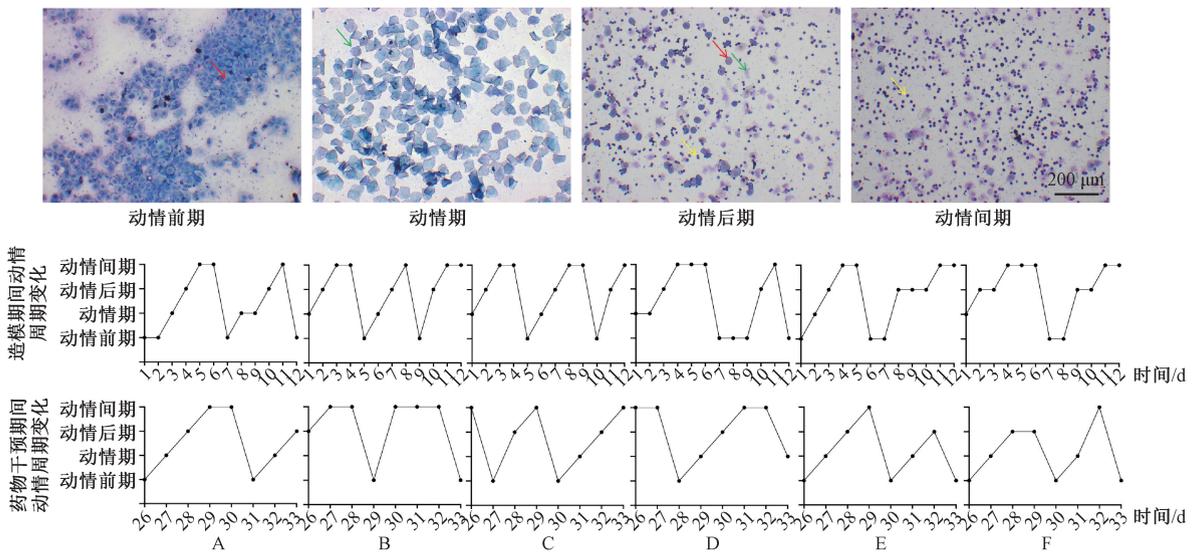
3 结果

3.1 补肾调泡周期疗法对 PCOS 大鼠体质量、卵巢质量及子宫质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量、卵巢质量升高 ($P<0.01$),子宫质量降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,补肾调泡周期疗法组大鼠卵巢质量降低 ($P<0.05$)、子宫质量升高 ($P<0.05$);阳性药物组大鼠体质量、卵巢质量降低 ($P<0.05$)。分别与逍遥散组、三子汤组、补肾调泡周期疗法组比较,阳性药物组大鼠子宫质量均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,补肾调泡周期疗法组能降低 PCOS 大鼠卵巢质量,升高子宫质量,作用效果优于其组方逍遥散组、三子汤组,且对子宫质量的改善优于阳性药物组。见表 2。

3.2 补肾调泡周期疗法对 PCOS 大鼠动情周期的影响 正常组大鼠动情周期为 4~5 d,动情周期 4 个阶段规律出现,动情前期以有核上皮细胞为主;动情期以角化鳞状上皮细胞为主;动情后期白细胞、角化鳞状上皮细胞、有核上皮细胞三者混合存在;动情间期以白细胞为主。模型组大鼠动情周期紊乱,且大部分时间处于动情间期或动情后期;经过 3 个动情周期后,模型组大鼠动情周期依旧紊乱。逍遥散组、三子汤组、补肾调泡周期疗法组及阳性药物组大鼠均能出现动情期,且各动情阶段规律出现。结果表明,逍遥散组、三子汤组、补肾调泡周期疗法组及阳性药物组均能改善 PCOS 大鼠动情周期紊乱,恢复正常动情周期。见图 1。

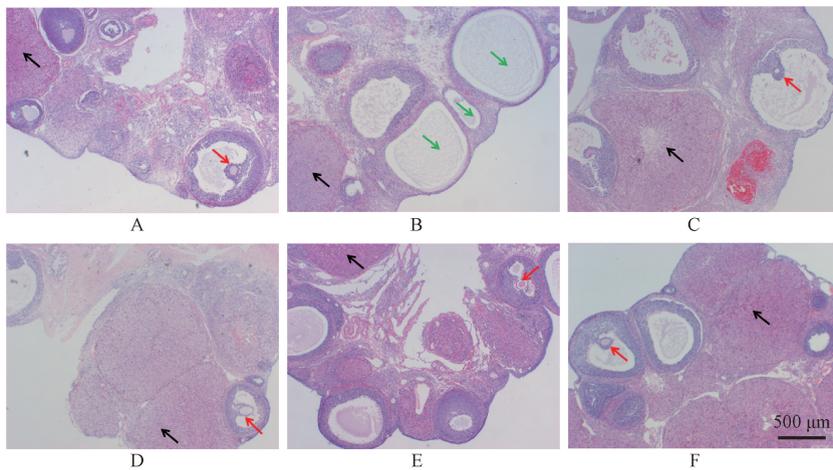
0.05, $P<0.01$), FSH、P 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);三子汤组、补肾调泡周期疗法组、阳性药物组血清 E_2 水平升高 ($P<0.01$);逍遥散组、补肾调泡周期疗法组、阳性药物组血清 T 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,补肾调泡周期疗法能调整紊乱的血清性激素水平,降低血清 AMH 表达,且对血清 E_2 的调控优于逍遥散,对血清 T 的调控优于三子汤。见表 3。

3.5 补肾调泡周期疗法对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 *p53*、*AMPK*、*mTOR*、*Beclin 1*、*LC3* 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠卵巢颗粒细胞 *p53*、*p-mTOR*/*mTOR* 蛋白表达降低 ($P<0.01$), *p-AMPK*/*AMPK*、*Beclin 1*、*LC3 II*/*I* 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组 *p-mTOR*/*mTOR* 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), *p-AMPK*/*AMPK*、*Beclin 1*、*LC3 II*/*I* 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$);逍遥散组、补肾调泡周期疗法组、阳性



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为逍遥散组，D 为三子汤组，E 为补肾调泡周期疗法组，F 为阳性药物组。红色箭头指示有核上皮细胞，绿色箭头指示角化鳞状上皮细胞，黄色箭头指示白细胞。

图 1 各组大鼠动情周期变化 (瑞氏染色, ×100)



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为逍遥散组，D 为三子汤组，E 为补肾调泡周期疗法组，F 为阳性药物组。红色箭头指示卵母细胞，黑色箭头指示黄体，绿色箭头指示囊性卵泡。

图 2 各组大鼠卵巢组织病理形态 (HE 染色, ×40)

表 3 各组大鼠血清性激素及 AMH 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

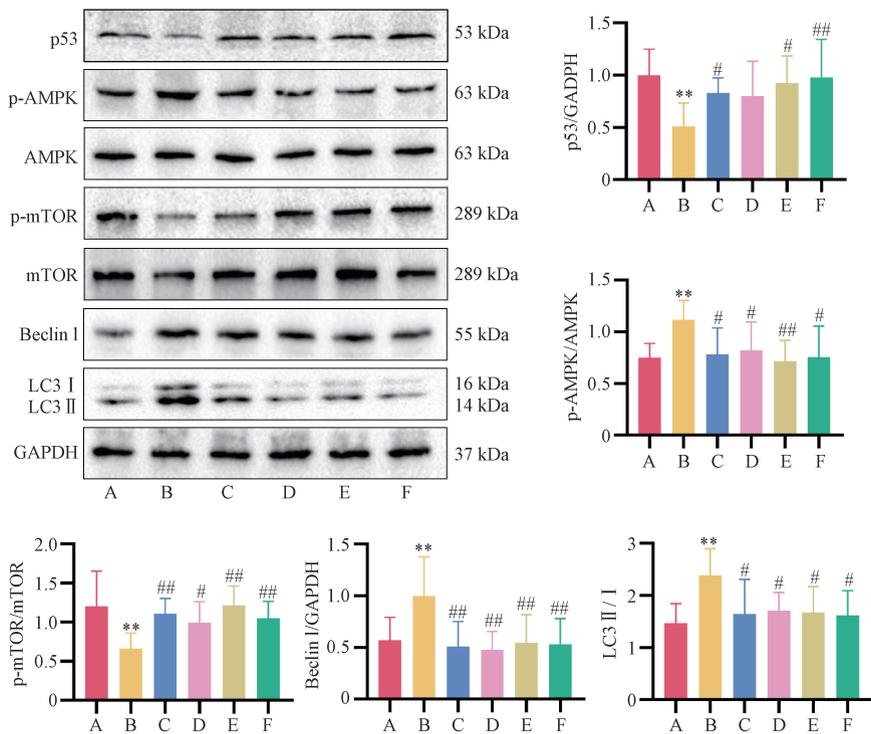
组别	LH/(IU·L ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/FSH	E ₂ /(pmol·L ⁻¹)	T/(pg·mL ⁻¹)	P/(ng·mL ⁻¹)	AMH/(pg·mL ⁻¹)
正常组	11.44±3.50	9.23±1.93	1.30±0.51	37.81±6.50	222.01±37.85	7.85±1.48	3485.49±281.51
模型组	22.08±6.93**	6.11±1.30**	3.68±1.23**	22.87±6.52**	304.06±45.53**	5.43±0.70**	4092.31±463.73*
逍遥散组	16.26±5.30#	8.93±1.78##	1.87±0.76###	27.61±4.14	237.20±63.31#	8.15±0.95###	3115.91±472.03##
三子汤组	11.86±4.01###	8.12±2.42#	1.47±0.31###	34.74±8.66##	272.71±29.53	7.96±1.50###	3385.59±771.10#
补肾调泡周期疗法组	16.36±3.21#	8.30±0.70#	1.97±0.34###	33.91±4.94##	242.60±34.76#	8.52±1.48###	3368.84±451.69#
阳性药物组	12.38±3.51###	8.46±1.50#	1.52±0.53###	35.61±4.12##△	226.53±31.08###	7.35±0.88#	3461.67±295.21#

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；与逍遥散组比较，△ P<0.05。

药物组 p53 蛋白表达升高 (P<0.05, P<0.01)。结果表明，补肾调泡周期疗法可升高 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 p53 蛋白表达，抑制 AMPK 蛋白磷酸化，促进 mTOR 蛋白磷酸化，降低自噬因子 Beclin 1 表达，抑制 LC3 I 向 LC3 II 的转化。见图 3。

3.6 补肾调泡周期疗法对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 p53、

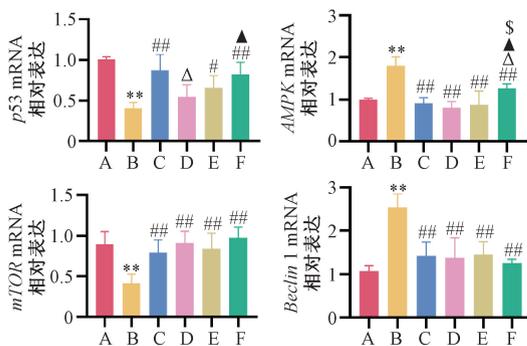
AMPK、mTOR、Beclin 1 mRNA 表达的影响 与正常组比较，模型组大鼠卵巢颗粒细胞 p53、mTOR mRNA 表达降低 (P<0.01)，AMPK、Beclin 1 mRNA 表达升高 (P<0.01)。与模型组比较，各给药组 mTOR mRNA 升高 (P<0.01)，AMPK、Beclin 1 mRNA 表达降低 (P<0.01)；逍遥散组、补肾调泡周期疗法组、阳性药物组 p53 mRNA 表达升高 (P<



注：A为正常组，B为模型组，C为逍遥散组，D为三子汤组，E为补肾调泡周期疗法组，F为阳性药物组。与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

图3 各组大鼠卵巢颗粒细胞 p53、AMPK、mTOR、Beclin 1、LC3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

0.05, $P < 0.01$)。分别与逍遥散组、三子汤组、补肾调泡周期疗法组比较，阳性药物组 AMPK mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$)。结果表明，补肾调泡周期疗法通过调控 p53、AMPK、mTOR、Beclin 1 mRNA 表达，抑制自噬水平，促进卵泡发育；补肾调泡周期疗法及其组方对 AMPK mRNA 的调控优于阳性药物。见图 4。



注：A为正常组，B为模型组，C为逍遥散组，D为三子汤组，E为补肾调泡周期疗法组，F为阳性药物组。与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ ；与逍遥散组比较， $\Delta P < 0.05$ ；与三子汤组比较， $\blacktriangle P < 0.05$ ；与补肾调泡周期疗法组比较， $\$ P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠卵巢颗粒细胞 p53、AMPK、mTOR、Beclin 1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

补肾调泡周期疗法针对以排卵障碍为主要临床表现的 PCOS 患者，在月经周期的第 1~6 天应用逍遥散疏肝调经；

第 7~16 天运用三子汤补肾健脾、护卵养泡，促进卵泡发育与子宫内膜发育同步。本研究显示，该疗法能改善大鼠卵巢组织病理状态，调节血清性激素水平，降低血清 AMH 水平，其调控大鼠卵巢质量及子宫质量的效果优于其组方及阳性药物组。阳性药物组虽能实现促排卵，但子宫质量低于补肾调泡周期疗法组。促排卵药克罗米芬可能引发卵巢过度刺激及内膜抑制^[9]。子宫内膜作为胚胎着床和妊娠结局的关键因素，亦是治疗 PCOS 不孕症需考量的问题，相较于其他组方及阳性药物组，补肾调泡周期疗法组疗效确切，能够达到助卵与调膜并重的良好效果。

自噬是细胞通过溶酶体降解自身成分的过程^[10]。p53/AMPK 信号轴对自噬具有双相调控作用，其中 p53 的功能与其在细胞内的分布密切相关，核内 p53 通过转录调控促进自噬，胞质 p53 则抑制 mTOR 活性间接抑制自噬^[11]。AMPK 作为进化保守的蛋白激酶，通过影响细胞内的代谢和能量平衡，在多种代谢性疾病及衰老进程中发挥重要的调控作用^[12]。mTOR 是调节细胞生长、存活和自噬信号通路的核心节点，对自噬的启动具有关键性作用^[13]。p53 通过 Sestrin1/2 介导的磷酸化作用促进 AMPK 活化，活化的 AMPK 通过抑制 mTOR 复合体活性，进而增强细胞自噬水平^[14]。Beclin 1 通过与 Atg14L 等因子结合，促进 Beclin 1-Vps34-Vps15 复合物的形成，其表达与自噬活性正相关^[15]。LC3 蛋白被广泛用作自噬体的标记物，自噬过程中，LC3 蛋白经剪切产生细胞浆定位的 LC3 I，LC3 I 被修饰和加工后产生 LC3 II，并定位于自噬体内膜和外膜，二者的转

化率可用于监测自噬活性^[16]。本研究发现,模型组 Beclin 1 蛋白及 mRNA、LC3 II/I 蛋白表达升高,而以上指标在补肾调泡周期疗法组中下降,表明 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞中自噬异常激活。与模型组比较,补肾调泡周期疗法组 p53、p-mTOR/mTOR 蛋白表达升高, p-AMPK/AMPK 蛋白表达降低,表明该疗法可能通过调控 p53/AMPK 信号通路调控卵巢颗粒细胞自噬水平,维持卵泡内稳态平衡并发挥促排卵的作用。

AMH 作为早期卵泡颗粒细胞分泌的卵泡调控因子,其水平异常升高可抑制 FSH 诱导的雌激素合成并降低 FSH 受体表达,影响原始卵泡的募集和选择性生长^[17-18]。PCOS 卵巢组织中 AMH/AMHR2 异常高表达与卵泡发育障碍密切相关^[4]。研究表明,AMH 干预可降低卵巢组织 p62 水平,减少叉头蛋白 O3A (FOXO3A) 磷酸化并升高 LC3 II 蛋白水平,促进自噬体生物合成。这些结果表明 AMH 可能通过 FOXO3A 信号轴激活自噬以抑制原始卵泡生长,影响卵巢储备^[19-20]。本研究发现,模型组血清 AMH 水平升高,补肾调泡周期疗法组中降低,且趋势变化与自噬因子 LC3 及 Beclin 1 表达一致。

综上所述,卵巢颗粒细胞过度自噬可能是引起 PCOS 卵泡发育异常的原因,补肾调泡周期疗法可升高 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞中 p53 蛋白表达,抑制 AMPK 蛋白磷酸化,促进 mTOR 蛋白磷酸化,降低自噬因子 Beclin 1 的表达并抑制 LC3 I 向 LC3 II 的转化,从而抑制卵巢颗粒细胞过度自噬并促进卵泡正常发育。值得注意的是,血清 AMH 的表达趋势与自噬因子 LC3 II、Beclin 1 一致,补肾调泡周期疗法是否通影响血清 AMH 的表达从而影响卵巢颗粒自噬还需要进一步验证。

参考文献:

[1] 谢 幸,孔北华,段 涛. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2018.

[2] 刘文琼,左 新. 中医药治疗多囊卵巢综合征实验研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(10): 248-252.

[3] 王 茜,何忆清,苏艳红,等. 补肾调泡周期疗法组方对大鼠原代卵巢颗粒细胞增殖、分泌及 AMH、AMHR2、Smad4 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(7): 904-913.

[4] 陈 乐,杨 硕,尤昭玲,等. 补肾调泡周期法对多囊卵巢模型大鼠卵巢 AMH 及 AMHR II 表达的调控[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(11): 1314-1321.

[5] 王 茜,何忆清,李哲靓,等. 基于网络药理学探讨逍遥散调控多囊卵巢综合征子宫内膜容受性的作用机制及实验验证[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(1): 69-79.

[6] Yang T, Wang L, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-451a plays a role in polycystic ovary syndrome by regulating ovarian granulosa cell proliferation and apoptosis[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(6): 583.

[7] Liu Q J, Fang Q, Ji S Q, *et al.* Resveratrol-mediated apoptosis in renal cell carcinoma *via* the p53/AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin autophagy signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 502-508.

[8] 贾莉婷,刘艳丽,马葆靖,等. 两种多囊卵巢综合征大鼠模型造模方法的比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2011, 46(4): 538-542.

[9] 张楚欣,程宇立,胡红林,等. 当归散对克罗米芬诱导的大鼠低容受性子官内膜的作用机制研究[J]. 中医学报, 2023, 51(12): 15-21.

[10] Liu S Z, Yao S J, Yang H, *et al.* Autophagy: Regulator of cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 648.

[11] Tang J J, Di J H, Cao H, *et al.* P53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2015, 363(2): 101-107.

[12] 张宸崧,王子涵,陈燕雯,等. 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (AMPK): 能量、葡萄糖感受器和代谢性疾病治疗靶标[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2022, 61(3): 325-345.

[13] 马 桦,齐大河,陈雯玥,等. AMPK 及 mTOR 与多囊卵巢综合征的关系及中药干预研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(2): 164-170.

[14] Budanov A V, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling[J]. *Cell*, 2008, 134(3): 451-460.

[15] Zhang Q, Grunberger J W, Khurana N, *et al.* Beclin-1-mediated autophagy suppresses silica nanoparticle-induced testicular toxicity *via* the inhibition of Caspase 8-mediated cell apoptosis in Leydig cells[J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1863.

[16] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.

[17] 李 蓉,徐慧玉,金 丽,等. 抗米勒管激素临床应用专家共识(2023年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2023, 39(4): 431-439.

[18] Bedenk J, Vrtaćnik-bokal E, Virant-klun I. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2020, 37(1): 89-100.

[19] Lecot-connan T, Boumerdassi Y, Magnin F, *et al.* Anti-Müllerian hormone induces autophagy to preserve the primordial follicle pool in mice[J]. *FASEB J*, 2024, 38(5): e23506.

[20] Sonigo C, Beau I, Grynberg M, *et al.* AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice[J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 1278-1287.