

- Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5536406.
- [15] Arias L F, Taborda-Murillo A. Mesangial proliferative glomerulonephritis: A glomerular disease or a non-specific morphological change? [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2017, 22(7): 575.
- [16] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases [J]. *Kidney Int*, 2021, 100(4S): S1-S276.
- [17] Kopple J D, Greene T, Chumlea W C, et al. Relationship between nutritional status and the glomerular filtration rate: results from the MDRD study [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(4): 1688-1703.
- [18] Ikizler T A, Burrowes J D, Byham-Gray L D, et al. KDOQI Clinical Practice Guideline for Nutrition in CKD: 2020 Update [J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(3 Suppl 1): S1-S107.
- [19] 刘翠兰, 王琳琳, 杨文, 等. 骨化三醇联合益肾化湿颗粒对糖尿病肾病微炎症及氧化应激的影响[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(23): 3994-3997.
- [20] Isaka Y. Targeting TGF- $\beta$  signaling in kidney fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2532.
- [21] Meng X M, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- [22] Heldin C H, Moustakas A. Signaling receptors for TGF- $\beta$  family members [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(8): a022053.
- [23] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [24] Xie M X, Wu Z J, Ying S, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell proliferation via ERK1/2-dependent SOX9 phosphorylation and acetylation by enhancing Cyclin D1 in rat Thy-1 nephritis [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(4): 572-590.
- [25] Ma F Y, Sachechithananthan M, Flanc R S, et al. Mitogen activated protein kinases in renal fibrosis [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009, 1(1): 171-187.
- [26] Kamato D, Burch M L, Piva T J, et al. Transforming growth factor- $\beta$  signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10): 2017-2024.

## 滋肾育胎丸水提液通过调控 TGF- $\beta$ 通路对 DOR 秀丽隐杆线虫卵巢储备功能的影响

许云, 陶丛珊, 刘泉, 姜孙旻, 姚荧\*  
(无锡市妇幼保健院, 江苏无锡 214000)

**摘要:** 目的 探讨滋肾育胎丸水提液对雷公藤甲素诱导的卵巢储备功能下降 (DOR) 秀丽隐杆线虫生育力的作用及其机制。方法 将年轻成虫期秀丽隐杆线虫随机分为空白对照组、雷公藤甲素组 (0.1 mg/mL) 和滋肾育胎丸水提液组 (5、10、20 mg/mL)。雷公藤甲素诱导构建秀丽隐杆线虫 DOR 模型, 滋肾育胎丸水提液处理 24、48 和 72 h 后, 统计后代数目、DTC 细胞荧光强度、凋亡细胞和卵母细胞数目, RT-qPCR 测定卵子发生相关通路基因的 mRNA 表达。结果 与空白对照组比较, 雷公藤甲素组秀丽隐杆线虫后代数目、DTC 细胞荧光强度和卵母细胞数目均减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 凋亡细胞数目升高 ( $P < 0.05$ ), *ced-3*、*ced-4* mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ ), *daf-4* mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与雷公藤甲素组比较, 滋肾育胎丸水提液 10 mg/mL 组线虫后代数目、DTC 细胞荧光强度、卵母细胞数目均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 凋亡细胞数目降低 ( $P < 0.01$ ), *ced-3*、*ced-4* mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ), *daf-4*、*sma-2*、*sma-3* mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )。结论 滋肾育胎丸水提液对雷公藤甲素致秀丽隐杆线虫卵巢储备功能下降有改善作用, 其可能通过 TGF- $\beta$  信号通路抑制细胞凋亡, 促进卵母细胞的发育而提高生育力。

**关键词:** 滋肾育胎丸水提液; 卵巢储备功能下降; 雷公藤甲素; 秀丽隐杆线虫; TGF- $\beta$

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2023)12-4142-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.049

收稿日期: 2022-04-20

基金项目: 无锡市卫生计生委中医药科研项目 (ZYKJ201916)

作者简介: 许云 (1992—), 女, 硕士, 主管中药师, 从事中药药理研究与临床药学工作。Tel: 13915332850, E-mail: xy13915332850@163.com

\*通信作者: 姚荧 (1974—), 女, 硕士, 主任药师, 从事临床合理用药研究。Tel: (0510) 82725161, E-mail: mary\_yy@163.com

卵巢储备功能下降 (diminished ovarian reserve, DOR) 是指卵巢皮质区内的卵母细胞数量减少和 (或) 质量下降, 属于生殖系统功能退行性疾病<sup>[1]</sup>, 进一步可发展为卵巢早衰。随着我国女性生育年龄的延迟, DOR 的发病率持续增高并呈现年轻化态势, 其在女性不孕因素中约占 10%<sup>[2]</sup>, 严重影响了女性的生殖健康和生活质量。

滋肾育胎丸源于全国中医妇科泰斗罗元恺教授经验方, 临床研究发现其可以显著改善不孕症患者的卵巢储备功能<sup>[3-7]</sup>, 但对其作用机制研究较少, 因此进一步深入探讨滋肾育胎丸对 DOR 的干预作用机制对于临床合理用药具有重要意义。

秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*, 以下简称线虫, 是目前生命科学研究中重要的模式动物之一, 具有分化完整、结构简单的生殖系统, 与哺乳动物卵子发生的生理过程高度保守。调控卵子发生的细胞凋亡通路, 调控卵母细胞质量的转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 信号通路, 在线虫和哺乳动物之间也高度保守<sup>[8]</sup>。这些基础研究的快速发展, 为以线虫为模型的药物筛选和机制研究打下了很好的基础。本实验拟采用可致卵巢功能下降的雷公藤甲素进行应激暴露<sup>[9-10]</sup>, 构建线虫 DOR 模型, 研究滋肾育胎丸水提液改善卵巢储备功能的作用机制, 明确其治疗靶点和分子通路, 为滋肾育胎丸的临床应用提供理论依据。

## 1 材料

1.1 动物 秀丽隐杆线虫虫株, 野生型线虫 N2, MD701 (bcIs39v)、JK2868 (qIs56v), 均来源于美国明尼苏达大学线虫遗传中心。

1.2 药物 滋肾育胎丸 (国药准字 Z44020008, 批号 A01026) 购自广州白云山中一药业有限公司。将药丸碾碎成粉末, 称取 15.00 g, 用适量去离子水浸泡 30 min, 大火煮沸后转小火熬制 30 min, 过滤后取滤液, 滤渣再次用适量的去离子水浸泡 30 min, 大火煮沸后转小火熬制 25 min, 过滤后, 合并 2 次滤液, 定容至 50 mL, 此时贮备液质量浓度为 300 mg/mL (按生药量计)<sup>[11]</sup>。临用时, 用纯水配制成 5、10、20 mg/mL 使用。

1.3 试剂 雷公藤甲素对照品 (纯度 98%, 批号 FY105B211) 购自南通飞宇生物科技有限公司, 称取 1.0 mg 雷公藤甲素, 溶于 50.0  $\mu$ L 二甲基亚砜, 50  $^{\circ}$ C 超声振荡 30 min, 摇匀, 用 K 溶液配制为 1 mg/mL 溶液。胰蛋白酶、酵母提取物 (英国 Oxoid 公司, 批号 3176539、4263680-02); 琼脂糖 (美国 HydraGene 公司, 批号 EZ6789A160); TRIzol (德国 BioFrox 公司, 批号 R0016); PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix (日本 TaKaRa 公司, 批号 AL22263A); FSE DNA Green Master (瑞士 Roche 公司, 批号 54460200); Triton-X-100 (广东光华科技股份有限公司, 批号 201811106)。

1.4 仪器 正置荧光显微镜 Axio ScopeA1 (德国 Zeiss 公司); Nanodrop1000 Spectrophotometer (美国 Thermo Fisher

Scientific 公司); LightCycler96 Real-Time PCR (瑞士 Roche 公司); 连续变倍体视显微镜 XTZ-E (上海光学仪器六厂)。

## 2 方法

2.1 线虫分组、造模与给药 线虫培养于含有大肠杆菌 OP50 的线虫生长培养基 (nematode growth medium, NGM), 20  $^{\circ}$ C 恒温培养, 同步化获得大量年轻成虫期线虫<sup>[12]</sup>。在表面涂布有大肠杆菌 OP50 的直径 30 mm 的琼脂培养基上, 加入 200  $\mu$ L 0.1 mg/mL 雷公藤甲素溶液, 使其均匀分布于培养基表面。待其晾干后将年轻成虫期线虫转移到加入雷公藤甲素溶液的培养基中, 于 20  $^{\circ}$ C 培养箱中处理 10 h, 制备 DOR 线虫模型<sup>[10]</sup>。同期, 另挑取未喂饲雷公藤甲素的线虫 10 条作为空白组。将造模线虫随机分为雷公藤甲素组和滋肾育胎丸水提液 5、10、20 mg/mL 组, 每组 10 条。各组线虫分别处理 24、48、72 h, 转移至无药物处理液的 NGM 培养基中, 观察后代数目、DTC 细胞荧光强度、粗线期凋亡细胞数目、终变期卵母细胞数目。处理 48 h 后, 检测线虫细胞凋亡通路、TGF- $\beta$  通路关键基因 mRNA 表达。

2.2 后代数目测定 后代数目是指将一个年轻成虫期线虫放入培养皿中处理, 处理结束后, 每隔 24 h 将线虫转至 1 个新的 NGM 培养皿, 直至线虫停止产卵, 于体视显微镜下观察, 将每天所产子代数 (各期幼虫和受精卵) 相加, 即得该线虫的后代数。

2.3 DTC 细胞荧光强度分析 于荧光显微镜下观察处理结束后的 JK2868 线虫 (GFP 特异性标记 DTC 细胞的转基因线虫), 分别在 U 型性腺臂双侧远端顶部确定 DTC 细胞, 荧光显微镜下 DTC 细胞为边界清晰、亮绿色伞状细胞, 固定曝光时间, 定焦拍照, 应用 Image J 软件对 DTC 细胞的荧光强度进行分析。

2.4 粗线期细胞凋亡数目测定 于荧光显微镜下观察处理结束后的 MD701 线虫 (GFP 特异性标记生殖腺凋亡细胞的转基因线虫), 凋亡细胞呈亮绿色圆形纽扣状。于荧光显微镜下统计线虫单侧性腺臂减数分裂区凋亡细胞的数目。

2.5 终变期卵母细胞数目测定 于显微镜下观察处理结束后的 N2 线虫, 统计线虫单侧性腺臂远端 Loop 区转折处到性腺臂近端纳精囊之间卵母细胞的数目。

2.6 线虫卵子发生相关通路关键基因 mRNA 表达检测 每组取约 6 000 条线虫, 以 TRIzol 法提取 RNA 后, 逆转录为 cDNA, 配制 25  $\mu$ L 体系 (cDNA 2  $\mu$ L、FSE DNA Green Master 12.5  $\mu$ L、正向引物 1.0  $\mu$ L、反向引物 1.0  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L), 在荧光实时定量 PCR 仪上进行扩增反应, 条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 s, 特异退火 30 s, 采集荧光信号 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 并绘制熔解曲线。目的基因的引物用 Primer 5.0 设计, 序列见表 1。以比较域值法测定目的基因相对表达, 以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  相对定量法计算目的基因与内参基因荧光的比值, 用于表示目的基因的表达情况。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 24.0 软件进行处理, 计量资

表1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	片段长度/bp	退火温度/℃
<i>act-3</i> 正向	ATCCGTAAGACTGTACGCCAAC	130	62.93
<i>act-3</i> 反向	GGCGGATGATCTTGATCTTCATGG	130	61.63
<i>ced-3</i> 正向	ACGGGAGATCGTGA AAGC	388	55.56
<i>ced-3</i> 反向	AGAGTTGGCGGATGA AAG	388	55.56
<i>ced-4</i> 正向	AGTCACTCGCAATGGCTCT	418	59.02
<i>ced-4</i> 反向	GCTGATGAACGACGGAAT	418	55.17
<i>sma-6</i> 正向	GCCAAGACGGTGTCTCTGAA	304	59.97
<i>sma-6</i> 反向	TATCAGCCGCCACGAATTGA	304	59.82
<i>daf-4</i> 正向	GCCAAGGACGATCATTTCGC	358	59.97
<i>daf-4</i> 反向	TCCACGAGAGGCACATTTCC	358	60.04
<i>sma-2</i> 正向	GCGGTCACTAGATGGACGAC	439	60.25
<i>sma-2</i> 反向	TGGCAGGACATGTTGGAA	439	59.89
<i>sma-3</i> 正向	AAGTCTGCCGAATACCACCG	204	60.11
<i>sma-3</i> 反向	GAAGTTCAAGCCAGCAAGGC	204	60.04
<i>sma-4</i> 正向	CGCCGATGGCAACATCTCTA	179	60.25
<i>sma-4</i> 反向	ATCGAGAACGTCGGAGCATC	179	59.97

料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 雷公藤甲素致线虫卵巢储备功能下降模型评判 如表2所示,与空白对照组比较,N2线虫经0.1 mg/mL雷公藤甲素处理10 h后,后代数目、卵母细胞数量减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果显示雷公藤甲素对线虫的生育能力和卵母细胞形成能力有抑制作用,可用于构建卵巢储备功能下降模型。

表2 雷公藤甲素对N2线虫生育能力的影响(个,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	后代数目	72 h 卵母细胞数目
空白对照组	144.5 ± 10.3	9.7 ± 0.4
雷公藤甲素组	102.2 ± 6.3 <sup>#</sup>	4.8 ± 0.4 <sup>##</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

3.2 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫后代数目的影响 如表3所示,与空白对照组比较,雷公藤甲素组后代数目减少( $P < 0.01$ );与雷公藤甲素组比较,滋肾育胎丸水提液5、10、20 mg/mL组线虫后代数目均增加( $P < 0.01$ ),滋肾育胎丸水提液1、2.5 mg/mL组线虫后代数目无明显变化

表4 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫卵母细胞数的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	卵母细胞数目/个		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	—	9.7 ± 0.3	9.3 ± 0.4	9.7 ± 0.4
雷公藤甲素组	0.1	5.5 ± 0.3 <sup>##</sup>	5.2 ± 0.5 <sup>##</sup>	4.8 ± 0.4 <sup>##</sup>
滋肾育胎丸水提液组	5	7.7 ± 0.4 <sup>**</sup>	7.4 ± 0.4 <sup>**</sup>	8.1 ± 0.4 <sup>**</sup>
	10	8.4 ± 0.3 <sup>**</sup>	8.3 ± 0.6 <sup>**</sup>	8.9 ± 0.6 <sup>**</sup>
	20	6.3 ± 0.5	6.0 ± 0.3	6.5 ± 0.3 <sup>**</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与雷公藤甲素组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

3.4 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫DTC伞状细胞荧光强度的影响 如表5所示,处理24、48 h后,与空白对照组比较,雷公藤甲素组线虫DTC伞状细胞荧光强度减弱( $P < 0.05$ );与雷公藤甲素组比较,滋肾育胎丸水提液10 mg/mL组线虫DTC伞状细胞荧光强度增强( $P < 0.05$ )。

( $P > 0.05$ )。因此,后续实验使用5、10、20 mg/mL这三个剂量进行。

表3 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫后代数目的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	后代数目/个
空白对照组	—	144.5 ± 10.4
雷公藤甲素组	0.1	102.2 ± 6.3 <sup>##</sup>
滋肾育胎丸水提液组	1	112.9 ± 8.0
	2.5	134.0 ± 14.4
	5	162.8 ± 14.1 <sup>**</sup>
	10	231.9 ± 12.5 <sup>**</sup>
	20	185.7 ± 18.8 <sup>**</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与雷公藤甲素组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

3.3 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫卵母细胞数量的影响 如表4所示,与空白对照组比较,雷公藤甲素组线虫卵母细胞数量减少( $P < 0.01$ );与雷公藤甲素组比较,处理24、48 h后,滋肾育胎丸水提液5、10 mg/mL组线虫卵母细胞数量均增加( $P < 0.01$ ),处理72 h后,滋肾育胎丸水提液各剂量组线虫卵母细胞数量均增加( $P < 0.01$ )。

3.5 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫凋亡细胞数量的影响 如表6所示,处理24、48、72 h后,与空白对照组比较,雷公藤甲素组线虫凋亡细胞数量均增加( $P < 0.05$ );与雷公藤甲素组比较,滋肾育胎丸水提液5、10 mg/mL组线虫凋亡细胞数量均减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表5 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫DTC细胞荧光强度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	DTC细胞荧光强度/AU		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	—	0.096±0.008	0.083±0.007	0.066±0.004
雷公藤甲素组	0.1	0.070±0.006 <sup>#</sup>	0.057±0.008 <sup>#</sup>	0.050±0.005
滋肾育胎丸水提液组	5	0.050±0.003	0.059±0.006	0.053±0.003
	10	0.092±0.007 <sup>*</sup>	0.079±0.004 <sup>*</sup>	0.068±0.006
	20	0.069±0.007	0.058±0.004	0.046±0.009

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05;与雷公藤甲素组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.05。

表6 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫凋亡细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	凋亡细胞数目/(个)		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	—	9.2±0.9	9.0±1.1	8.7±0.6
雷公藤甲素组	0.1	13.2±1.5 <sup>#</sup>	12.6±0.8 <sup>#</sup>	11.2±0.9 <sup>#</sup>
滋肾育胎丸水提液组	5	7.6±1.1 <sup>**</sup>	7.9±0.7 <sup>**</sup>	7.5±0.7 <sup>*</sup>
	10	5.4±0.5 <sup>**</sup>	6.6±1.1 <sup>**</sup>	7.0±1.1 <sup>**</sup>
	20	10.5±0.8	10.2±0.7	10.5±1.0

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05;与雷公藤甲素组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.05,<sup>\*\*</sup>*P*<0.01。

3.6 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫卵子发生相关信号通路基因mRNA表达的影响 如表7~8所示,与空白对照组比较,雷公藤甲素组线虫细胞凋亡通路*ced-3*、*ced-4* mRNA表达升高 (*P*<0.05),TGF-β信号通路上*daf-4* mRNA表达降低 (*P*<0.05);与雷公藤甲素组比较,滋肾育胎丸水提液10 mg/mL组线虫细胞*ced-3*、*ced-4* mRNA表达降低 (*P*<0.05),*daf-4*、*sma-2*、*sma-3* mRNA表达升高 (*P*<0.05)。

表7 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫凋亡通路基因mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	<i>ced-3</i>	<i>ced-4</i>
空白对照组	—	1.00±0.00	1.00±0.00
雷公藤甲素组	0.1	1.22±0.02 <sup>#</sup>	1.26±0.03 <sup>#</sup>
滋肾育胎丸水提液组	10	0.95±0.01 <sup>*</sup>	0.8±0.06 <sup>*</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05;与雷公藤甲素组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.05。

表8 滋肾育胎丸水提液对DOR线虫TGF-β通路基因mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	<i>sma-6</i>	<i>daf-4</i>	<i>sma-2</i>	<i>sma-3</i>	<i>sma-4</i>
空白对照组	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
雷公藤甲素组	0.1	1.00±0.12	0.76±0.05 <sup>#</sup>	0.90±0.05	0.93±0.04	0.95±0.10
滋肾育胎丸水提液组	10	1.21±0.14	1.53±0.12 <sup>*</sup>	1.61±0.04 <sup>*</sup>	1.61±0.08 <sup>*</sup>	1.01±0.26

注:与空白对照组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05;与雷公藤甲素组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.05。

#### 4 讨论

中医理论认为肾主宰女性生殖机能的发育、旺盛与衰退,对女性卵巢生理功能起决定作用。滋肾育胎丸方中菟丝子和人参能补肾益精,而巴戟天、续断和杜仲能协同菟丝子补肾壮阳,白术和党参有补气健脾之功,全方合奏滋补肝肾、益气培元之功,临床上多用于脾肾虚弱型卵巢储备功能减退的治疗<sup>[13-14]</sup>。

滋肾育胎丸包含多种中药成分,检测任何一种活性成分均不能很好的体现其复方整体疗效,最好采用复方给药。但秀丽隐杆线虫体积极其微小,成年线虫也仅1.0 mm左右长,无法采用啮齿类动物的给药方式。常规的线虫给药途径多采用将药物配制成溶液铺涂在琼脂培养板上给药。滋肾育胎丸为浓缩水蜜丸,为较好的保留复方中的有效成分,且利于给药,本实验对药物进行了水提,配制成适宜秀丽隐杆线虫给药的形式,但水提液和蜜丸状药物在制备方法上还是存在差异,可能会导致药物成分的改变,也可能影响药物的药理作用,这些尚需进一步的研究。本实验先就滋肾育胎丸水提液提高生育力的药理作用进行初步研究。

本研究发现低剂量滋肾育胎丸水提液能提高DOR秀丽

隐杆线虫后代数目,提示其具有恢复卵巢功能的作用,继而确定低剂量滋肾育胎丸水提液能恢复DTC细胞,降低凋亡细胞、提高终变期卵母细胞的生成。凋亡是卵母细胞发生中必不可少的过程,与雷公藤甲素组比较,10 mg/mL滋肾育胎丸水提液能降低*ced-3*、*ced-4* mRNA表达,提示药物能通过抑制细胞凋亡来提高卵母细胞的生成。

TGF-β信号通路在卵泡的发育中也起着重要作用,是调节秀丽隐杆线虫卵母细胞质量的信号通路,在秀丽隐杆线虫和哺乳动物中高度保守<sup>[8]</sup>。*sma-6*和*daf-4*编码I型和II型受体,配体受体复合物募集和磷酸化信号传导蛋白,该蛋白由*sma-2*、*sma-3*、*sma-4*和*sma-9*编码形成<sup>[15-17]</sup>。磷酸化后的信号传导蛋白进入细胞核,与DNA结合后通过调控下游基因,调控卵母细胞质量<sup>[18]</sup>。与雷公藤甲素组比较,10 mg/mL滋肾育胎丸水提液能升高*daf-4*、*sma-2*、*sma-3* mRNA表达。TGF-β与细胞凋亡有相关性<sup>[19]</sup>,提示药物可能通过TGF-β通路影响细胞凋亡,从而促进卵母细胞的生成。

综上所述,滋肾育胎丸水提液可以通过影响TGF-β通路抑制细胞凋亡,从而提高卵母细胞的质量和数量,促进

卵母细胞的发育成熟,提高卵巢储备功能。但滋肾育胎丸成分复杂,富含丰富的活性物质,其具体的活性成分和作用机制尚需进一步的研究。

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: 358.

[ 2 ] Rasool S, Shah D. Fertility with early reduction of ovarian reserve: the last straw that breaks the Camel's back[J]. *Fertil Res Pract*, 2017, 3(1): 15.

[ 3 ] 马新想,崔海玲,张富青. 滋肾育胎丸对不孕症患者卵巢储备功能及妊娠结局的影响[J]. *陕西中医*, 2019, 40(2): 198-200.

[ 4 ] 张 莉,周 丽. 滋肾育胎丸治疗不孕症女性卵巢储备功能及妊娠结局的效果[J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2020, 7(13): 27; 31.

[ 5 ] 马 瑶,李 慧,杨 丽,等. 滋肾育胎丸结合枸橼酸氯米芬对不明原因不孕肾虚型患者子宫内膜容受性及妊娠结局的影响[J]. *中国当代医药*, 2021, 28(3): 182-184; 188.

[ 6 ] 刘思诗,赵 颖. 滋肾育胎丸对 IVF-ET 女性卵巢储备功能影响的临床研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2016, 33(4): 469-472.

[ 7 ] 庞震苗,梁 菁,钟秀驰,等. 滋肾育胎丸治疗卵巢储备功能下降 300 例临床研究[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15(24): 43-45.

[ 8 ] Luo S J, Kleemann G A, Ashraf J M, et al. TGF- $\beta$  and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance[J]. *Cell*, 2010, 143(2): 299-312.

[ 9 ] 梁 策,高 慧. 雷公藤制剂致卵巢早衰的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3588-3590.

[ 10 ] Ruan Q L, Xu Y, Xu R, et al. The adverse effects of triptolide on the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*: Oogenesis impairment and decreased oocyte quality [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 464.

[ 11 ] 段紫云. 八味沉香丸对 AD 线虫的治疗作用及其机制研究 [D]. 兰州:兰州大学, 2017.

[ 12 ] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.

[ 13 ] 董炳君,王庆一. 滋肾育胎丸治疗脾肾虚弱型卵巢储备功能减退的临床疗效[J]. *中国实用医药*, 2021, 16(26): 177-179.

[ 14 ] 史 云,杨胜华,陶莉莉,等. 滋肾育胎丸治疗脾肾虚弱型卵巢储备功能减退临床观察[J]. *山东中医药大学学报*, 2013, 37(4): 292-294.

[ 15 ] Liang J, Lints R, Foehr M L, et al. The *Caenorhabditis elegans* schnurri homolog sma-9 mediates stage- and cell type-specific responses to DBL-1 BMP-related signaling [J]. *Development*, 2003, 130(26): 6453-6464.

[ 16 ] Savage C, Das P, Finelli A L, et al. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(2): 790-794.

[ 17 ] Savage-Dunn C, Maduzia L L, Zimmerman C M, et al. Genetic screen for small body size mutants in *C. elegans* reveals many TGF- $\beta$  pathway components [J]. *Genesis*, 2003, 35(4): 239-247.

[ 18 ] Massagué J. How cells read TGF-beta signals[J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2000, 1(3): 169-178.

[ 19 ] 刘 镛,赵琴平,董惠芬,等. TGF- $\beta$  信号传导通路及其生物学功能[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(1): 77-83.