

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.17.014

麒麟丸对卵巢储备功能减退模型小鼠生育能力及卵巢组织 HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 信号通路的影响

朱芳芳¹, 邓高丕², 陈春林¹, 赖裕玲¹, 曾富玲¹, 郅洁²✉

1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东省广州市白云区机场路 12 号, 510080; 2. 广州中医药大学第一附属医院

摘要 目的 探讨麒麟丸对卵巢储备功能减退 (DOR) 小鼠生育能力的影响及可能作用机制。方法 36 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为空白组、模型组、麒麟丸组, 每组 12 只。麒麟丸组以麒麟丸混悬液 5.46 g/(kg·d) 灌胃, 空白组及模型组予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 20 ml/(kg·d) 灌胃, 共 5 周。灌胃 1 周后, 模型组和麒麟丸组腹腔注射环磷酰胺溶液 75 mg/kg 诱导 DOR 小鼠模型, 空白组腹腔注射生理盐水 10 ml/kg, 均每周 1 次, 共 4 周。用药期间每日观察动情周期, 用药结束后每组随机处死 6 只小鼠, Western Blot 法检测卵巢组织缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、B 淋巴细胞瘤-2 基因/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (Bnip3)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 (Beclin1) 蛋白表达。其余雌鼠正常饲养 7 周后, 与雄鼠合笼 4 周, 观察受孕时间、受孕数、吸收胎数及健康仔鼠数。结果 与空白组相比, 模型组雌鼠动情周期紊乱, 长期停滞于动情间期, 受孕时间延长, 吸收胎数量增加, 卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 麒麟丸组动情周期有所恢复, 受孕时间缩短, 卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 麒麟丸可调节 DOR 模型小鼠动情周期, 保护生育能力, 其作用机制可能与调控卵巢组织 HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 信号通路有关。

关键词 卵巢储备功能减退; 麒麟丸; 生育能力; 缺氧; 细胞自噬; HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 通路

卵巢储备功能减退 (diminished ovarian reserve, DOR) 是指女性卵母细胞数量和质量的下降, 临床表现为月经周期紊乱、不孕, 乃至过早绝经^[1]。麒麟丸由五子衍宗丸加减而来, 具有补肾健脾、益气养血的功效, 在男女生殖障碍疾病中应用广泛^[2]。课题组前期临床研究^[3-4]发现, 麒麟丸可提高 DOR 患者抗缪勒氏激素 (AMH) 水平, 调节月经周期及改善中医症状, 但其作用机制尚未阐明。

研究发现, 缺氧与卵泡发育和闭锁密切相关^[5], 是卵巢衰老^[6]、卵母细胞质量及数量下降^[7]、生育力降低的重要机制之一^[8]。轻度缺氧可激活卵巢内细胞自噬维持细胞存活与增殖, 但长时间、过度缺氧可诱导细胞自噬、凋亡和坏死等多

种细胞死亡途径, 导致卵泡闭锁^[9]。缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、B 淋巴细胞瘤 2 基因/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (Bnip3)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 (Beclin1) 信号通路是研究缺氧相关性自噬的重要通路^[10]。本研究观察麒麟丸对 DOR 模型小鼠动情周期及生育力的影响, 检测卵巢内 HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 信号通路蛋白表达水平, 探讨麒麟丸治疗 DOR 的可能作用机制。本研究通过广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会审查 (批件号: B201911-47)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 36 只, 6 周龄, 体重 16 ~ 18 g; SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 9 只 (已证明有生育能力), 10 周龄, 体重 23 ~ 25 g。均由广东省实验动物中心提供, 动物生产许可证编号: SCXK(粤)2018-0002。饲养条件: 温度 20 ~ 26 °C, 湿度 40% ~ 70%。连续阴道涂片 1 周, 观察动情周期正常后纳入实验。

基金项目: 广东省中医药建设专项名优中成药二次开发项目 (粤中医办函 [2017] 19 号); 国家自然科学基金 (81774358); 全国中医药创新骨干人才培养项目 (国中医药人教函 [2019] 128 号); 广东省名中医传承工作室 (粤中医办函 [2019] 5 号)

✉ 通讯作者: gjfks@qq.com

1.2 药物、试剂及仪器

麒麟丸 (广东太安堂药业股份有限公司, 批号 B20181202), 组成: 菟丝子、桑椹、枸杞子、覆盆子、锁阳、墨旱莲、淫羊藿、党参、山药、黄芪、何首乌、白芍、青皮、郁金、丹参, 打磨成细粉, 称取 1.911 g, 溶解于 7 ml 的 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液中, 配置成浓度为 0.273 g/ml 的麒麟丸药液。环磷酰胺 (批号 8H254B, 德国 Baxter Oncology GmbH)。总 RNA 提取试剂盒 (Trizol)、逆转录试剂盒、荧光染料 (SYBR), 批号分别为 204206、00728479、00775499, 美国赛默飞公司; SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 111420201123); HIF-1 α 一抗 (货号 36169, 美国 CST 公司); Bnip3 一抗 (北京四正柏生物科技有限公司, 批号 4ab093522); Beclin1 一抗、 β -actin 一抗及山羊抗兔二抗, 批号分别为 11306-1-AP, 20536-1-AP, SA00001-2, 美国 Proteintech 公司; CMC-Na (北京索莱宝科技有限公司, 批号 617023); 苏木素-伊红染液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 200526); 异氟烷 (深圳瑞沃德生命科技有限公司, 批号 1903715)。

Legend Micro 17R 微量低温离心机、Multiskan FC 型 iMark 酶标仪, 美国赛默飞公司; Power-PacTM 电泳仪、CFX96 荧光定量 PCR 仪、Chemi-DocTMMP 成像仪, 美国伯乐公司; IX71 显微镜, 日本奥林巴斯公司。

1.3 分组、造模及给药方法

将 36 只雌性小鼠按照随机数字表法分为空白组、模型组、麒麟丸组, 每组 12 只。根据课题组前期预实验结果, 麒麟丸组灌胃剂量为临床等效剂量的 2 倍, 即 5.46 g/(kg·d), 灌胃体积 20 ml/(kg·d), 其余各组灌胃等体积的 0.5% CMC-Na 溶液, 共 5 周。灌胃 1 周后, 模型组和麒麟丸组腹腔注射环磷酰胺溶液 75 mg/kg, 注射体积 10 ml/kg, 每周 1 次, 共 4 周, 以诱导 DOR 小鼠模型^[1-13], 空白组注射等体积的生理盐水, 每周 1 次, 共 4 周。

1.4 观察指标及方法

小鼠灌胃给药结束后第二天, 采用随机数字表法每组挑选 6 只小鼠, 异氟烷吸入麻醉后处死取材。取材方法: 沿下腹正中剖开腹腔, 分离出双侧子宫, 游离至近心端, 可见脂肪垫下包裹的淡粉色卵巢, 仔细分离双侧卵巢, 速冻于液氮后转移至 -80℃ 保存, 用于 Western Blot 法检测。每组剩余 6

只小鼠正常饲养, 用于后续生育力评价。

1.4.1 阴道涂片观察动情周期 每日早晨 8 点, 以生理盐水湿润消毒棉签后, 插入小鼠阴道深约 0.5 cm, 旋转一周, 将棉签上的分泌物均匀涂抹于载玻片并晾干, 滴加多聚甲醛固定 15 min, 苏木素浸 5 min, 盐酸酒精分化 10 s, 伊红染色 20 s, 流水冲洗后干燥封片, 显微镜下观察脱落细胞形态, 判断动情周期情况^[14]。

1.4.2 生育力评价 雌性小鼠在灌胃给药结束后正常饲养 7 周, 以超过两个完整的卵泡成熟周期, 使得随后的妊娠来源于休眠期的卵泡^[15-16]。所有雌性小鼠与雄性 C57BL/6 小鼠以 2:1 比例合笼 4 周, 每日早晨 8:00 检查雌鼠阴道栓, 未见阴道栓者行阴道涂片查精子, 见阴道栓或精子的雌鼠定为妊娠第 0 天, 并将孕鼠分笼饲养。妊娠第 19 天异氟烷吸入麻醉后剖宫查验妊娠情况, 记录受孕时间、受孕数、吸收胎数及健康仔鼠数。

1.4.3 Western Blot 法检测卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白表达 称取卵巢组织约 5 mg, 加 RIPA 冰上研磨裂解, 4℃ 条件下 12000 r/min 离心 10 min, 离心半径 5.8 cm, 取上清, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液及 RIPA 调整蛋白浓度后, 100℃ 煮 5 min 变性。SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上, 5% 牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 (β -actin 1:4000, 其余抗体 1:1000), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜后, 加入二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 显影曝光, 使用 Image J v 1.48 软件统计条带灰度值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间检验采用单因素方差分析, 使用 LSD 法进行多重比较。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠动情周期变化情况

图 1 示, 给药第 1 周各组小鼠各动情阶段比例差异无统计学意义 (P > 0.05); 第 2 周造模后, 模型组和麒麟丸组动情周期紊乱, 动情间期逐渐延长; 自第 4 周起, 模型组小鼠长期停滞于动情间期, 麒麟丸组相较于空白组虽动情间期延长 (P < 0.05), 但仍有动情期表现。

2.2 各组小鼠生育力比较

每组各有 5 只小鼠受孕。表 1 示, 与空白组比

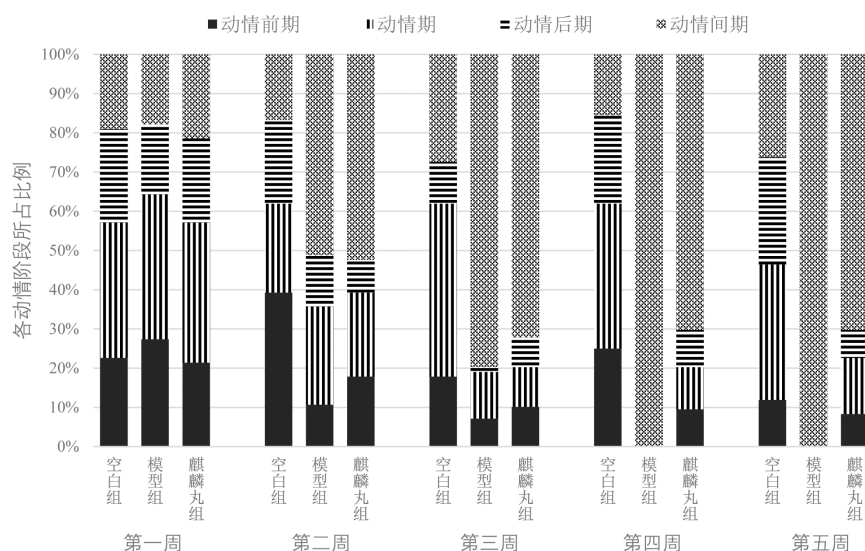


图 1 各组小鼠不同时间各动情阶段所占比例比较

表 1 各组小鼠生育力比较

($\bar{x} \pm s$)

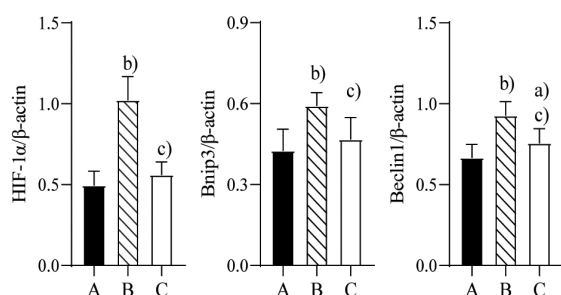
组别	鼠数	受孕时间/天	受孕数/个	吸收胎数/个	健康仔鼠数/个
空白组	5	1.60 ± 1.34	8.40 ± 1.14	0.60 ± 0.55	7.80 ± 1.30
模型组	5	5.80 ± 2.59 ^{b)}	8.20 ± 0.45	2.00 ± 1.00 ^{a)}	6.20 ± 1.30
麒麟丸组	5	2.40 ± 1.34 ^{c)}	8.60 ± 0.89	1.20 ± 0.84	7.40 ± 1.14

注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与空白组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

较, 模型组小鼠受孕时间显著延长, 吸收胎数显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 麒麟丸组小鼠受孕时间缩短 ($P < 0.05$), 受孕数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 吸收胎数有降低趋势, 健康仔鼠数有增加趋势, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组小鼠卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白表达比较

图 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠卵巢组织



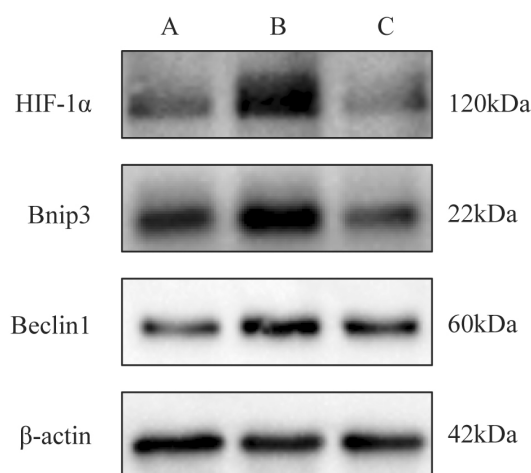
注: A, 空白组; B, 模型组; C, 麒麟丸组。

HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; Bnip3, B 淋巴细胞瘤 2 基因/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3; Beclin1, 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与空白组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白灰度值比较 ($n = 6$)

HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 麒麟丸组 HIF-1 α 、Bnip3 蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Beclin1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 麒麟丸组卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。各组小鼠卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白电泳图见图 3。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 麒麟丸组。

HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; Bnip3, B 淋巴细胞瘤 2 基因/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3; Beclin1, 自噬关键分子酵母 Atg6 同系物。

图 3 各组小鼠卵巢组织 HIF-1 α 、Bnip3、Beclin1 蛋白电泳图

3 讨论

根据 DOR 的临床表现可将其归属于中医学“血枯”“闭经”“经断前后诸证”“不孕症”等范畴。《素问·上古天真论篇》谓“二七而天癸至，任脉通，太冲脉盛，月事以时下，故有子，……七七，任脉虚，太冲脉衰少，天癸竭，地道不通，故形坏而无子也”，指出肾气盛衰、任脉通阻与女性月经情况及生育能力密切相关。《医学正传·妇人科》曰“月经全靠肾水施化，肾水既乏，则经血日以干涸。”《傅青主女科》亦云“经水出诸肾”“经本于肾”。虽然 DOR 的发病机制复杂，但现代医家基本形成了以肾虚为本，肝、脾、心、肾之间相互为病的认识^[17]，补肾填精、益气养血是本病的常用治法^[17-20]。麒麟丸具有补肾填精、益气养血的功效，其中菟丝子、覆盆子、枸杞子益肾固精，养肝敛阴；锁阳、淫羊藿补肾助阳，强健筋骨；墨旱莲、桑椹滋补肾阴，养血凉血；何首乌补益肝肾精血。诸药合用，精血相生，阴阳共调。党参、黄芪、山药入脾、肺经，补中益气，健脾养血；郁金、白芍、青皮入肝经，疏肝理气，柔肝养血；丹参入心、肝经，活血祛瘀通经。近年来，麒麟丸在女性月经不调、不孕症等疾病中的应用受到关注^[21-23]。徐晨等^[24]研究提示麒麟丸可提高 DOR 患者的卵巢储备功能，提高其在体外受精治疗中的卵巢反应性及临床妊娠率。

本研究通过腹腔注射环磷酰胺建立 DOR 小鼠模型，该剂量可显著降低小鼠卵巢储备能力，但又不致使其丧失生育能力^[12, 25]。造模 1 周后，小鼠动情周期紊乱，直至完全停滞于动情间期，在后期生育力实验中，模型组小鼠受孕时间显著延长，吸收胎数量增加，以上均与 DOR 患者的临床症状相似，提示 DOR 小鼠模型诱导成功。麒麟丸干预后，小鼠动情间期比例较模型组减少，提示麒麟丸对 DOR 模型小鼠动情周期的调节作用。在生育力实验中，麒麟丸组较模型组小鼠受孕时间缩短，提示对 DOR 小鼠生育力的提高。但各组间受孕数和健康仔鼠数无显著差异。分析其原因，一方面可能为本研究样本量较小，另一方面可能为环磷酰胺虽使小鼠卵巢池内卵泡数量衰减，但与年龄直接相关的卵母细胞质量在受孕过程中同样占据重要地位。

缺氧是能量代谢、细胞增殖和死亡过程中发生的一种生理应激。卵泡发育过程中，由于基底屏障阻隔了血管向卵泡内部的渗透，卵泡内形成局部低

氧环境^[26]，而卵泡及卵母细胞的发育潜能依赖于特定氧分压的调控^[27]。研究^[27]发现，HIF-1 α 水平与卵泡质量成反比，一定程度上可反映卵泡质量。本研究结果显示，模型组小鼠卵巢组织中 HIF-1 α 蛋白表达显著升高，提示 DOR 模型小鼠卵巢处于缺氧状态，而麒麟丸干预后小鼠 HIF-1 α 蛋白表达水平明显降低，提示麒麟丸能改善 DOR 小鼠卵巢缺氧状态。

缺氧条件下，HIF-1 α 在细胞内堆积，进入细胞核与缺氧诱导因子 1 β (HIF-1 β) 生成异质二聚体转录因子，绑定缺氧反应元素，促进靶基因 Bnip3 的表达^[28]。Bnip3 作为 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 家族的一员，以 HIF-1 依赖或非依赖机制在缺氧等应激刺激下表达增加^[29]。Bnip3 可与自噬关键因子 Beclin-1 竞争结合 Bcl-2，使 Beclin1 与 Bcl-2 解离，诱导自噬发生^[30]。因此，HIF-1 α /Bnip3/Beclin-1 通路是缺氧诱导自噬的重要激活通路^[31]。本研究结果发现，模型组小鼠卵巢组织中 HIF-1 α 、Bnip3 及 Beclin-1 蛋白表达均显著升高，提示 DOR 小鼠卵巢在过度缺氧状态下激活了自噬，而麒麟丸组 HIF-1 α 、Bnip3 及 Beclin-1 蛋白表达均显著下降，提示其可能通过调节此通路逆转小鼠卵巢内的缺氧及自噬状态，从而发挥提高 DOR 小鼠生育力的作用。

综上所述，麒麟丸可能通过抑制卵巢组织 HIF-1 α /Bnip3/Beclin-1 信号通路发挥保护卵巢功能和提高生育力的作用。但本研究中未添加 HIF-1 α /Bnip3/Beclin-1 通路抑制剂组进行比较分析，后续将围绕这一问题进一步开展实验，以明确麒麟丸的具体药物作用环节。

参考文献

- [1] PASTORE LM, CHRISTIANSON MS, STELLING J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR [J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(1): 17-23.
- [2] 庄义修, 陈维勤, 蔡宗成. 麒麟丸的制备及临床应用 [J]. 中药材, 2004, 27(9): 708-709.
- [3] 廖慧妍, 郜洁, 邱媛, 等. 麒麟丸治疗卵巢储备功能下降月经不调患者 60 例多中心单盲随机对照临床研究 [J]. 中医杂志, 2019, 60(24): 2107-2112.
- [4] 廖慧妍, 郜洁, 邱媛, 等. 麒麟丸治疗月经不调临床疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(12): 1911-1915.
- [5] ZHOU J, YAO W, LI C, et al. Administration of follicle-

- stimulating hormone induces autophagy via upregulation of HIF-1 α in mouse granulosa cells [1]. Cell Death Dis, 2017,8(8): e3001.
- [6] MOLINARI E, BAR H, PYLE AM, et al. Transcriptome analysis of human cumulus cells reveals hypoxia as the main determinant of follicular senescence [J]. Mol Hum Reprod, 2016,22(8): 866-876.
- [7] PARRAGUEZ VH, URQUIETA B, PÉREZ L, et al. Fertility in a high-altitude environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative stress [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2013,11: 24. doi: 10.1186/1477-7827-11-24.
- [8] VAN BLERKOM J, ANTCZAK M, SCHRADER R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics [J]. Hum Reprod, 1997,12(5): 1047-1055.
- [9] YADAV AK, YADAV PK, CHAUDHARY GR, et al. Autophagy in hypoxic ovary [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(17): 3311-3322.
- [10] BELLOT G, GARCIA-MEDINA R, GOUNON P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains [J]. Mol Cell Biol, 2009,29(10): 2570-2581.
- [11] GOLDMAN KN, CHENETTE D, ARJU R, et al. mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017,114(12): 3186-3191.
- [12] 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.
- [13] 朱芳芳, 王焱哲, 郅洁, 等. 基于自噬研究麒麟丸对环磷酰胺诱导的卵巢储备功能减退模型小鼠卵巢储备功能的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021,36(4): 1989-1994.
- [14] 靳光, 薛艳蓉. 小鼠发情周期阴道上皮细胞形态变化的研究 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2016,24(6): 6-8.
- [15] KALICH-PHILOSOPH L, RONESS H, CARMELY A, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility [J]. Sci Transl Med, 2013,5(185): 162r-185r.
- [16] MEIROW D, NUGENT D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction [J]. Hum Reprod Update, 2001,7(6): 535-543.
- [7] 韩靖佩, 夏天. 卵巢储备功能下降的中西医发病机制研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2019,35(3): 157-160.
- [8] 张丽娟, 陶仕英, 赵丕文. 卵巢功能早衰中西医结合病因病机与治疗研究进展 [J]. 新中医, 2014,46(10): 205-207.
- [9] 薛岩岩, 王铁蓉. 早发性卵巢功能不全的中西医发病机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021,23(1): 204-207.
- [20] 孔文娟, 苏先芝, 刘一斐, 等. 加减归肾丸对卵巢储备功能减退模型小鼠卵巢组织 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2020,61(12): 1085-1089.
- [21] 陈琰. 麒麟丸联合雌二醇片/雌二醇地屈孕酮片复合包装对薄型子宫内膜不孕患者血清性激素水平及妊娠率的影响 [J]. 黑龙江医药科学, 2019,42(1): 69-70.
- [22] 曹凯飞, 胡雅君. 麒麟丸联合氯米芬对 WHO II 型排卵障碍性不孕妊娠结局的影响 [J]. 湖北中医杂志, 2020,42(2): 9-12.
- [23] 谢红英, 温雅兰. 麒麟丸治疗黄体功能不全致不孕不育的临床观察 [J]. 光明中医, 2018,33(2): 197-198.
- [24] 徐晨, 王亮, 李文, 等. 麒麟丸对卵巢储备功能减退患者体外受精-胚胎移植的影响 [J]. 发育医学电子杂志, 2016,4(3): 158-161.
- [25] MEIROW D, LEWIS H, NUGENT D, et al. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool [J]. Hum Reprod, 1999,14(7): 1903-1907.
- [26] VAN MONTFOORT A, ARTS E, WIJNANDTS L, et al. Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle [J]. Hum Reprod Open, 2020,2020(1): z36.
- [27] 赖志文. 利用小鼠生理性卵巢衰老模型研究缺氧诱导因子-1 α 在卵巢衰老过程中作用 [J]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [28] IVAN M, KONDO K, YANG H, et al. HIF1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing [J]. Science, 2001, 292(5516): 464-468.
- [29] BELLOT G, GARCIA-MEDINA R, GOUNON P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains [J]. Mol Cell Biol, 2009,29(10): 2570-2581.
- [30] ABRAHAMSEN H, STENMARK H, PLATTA HW. Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: tuning class III phosphatidylinositol 3-

kinase activity and tumor suppression [1]. FEBS Lett, 2012, 586(11): 1584-1591.

[1] KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, et al.

Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [1]. J Cell Biol, 2000, 150(6): 1507-1513.

Effects of *Qilin Pills* (麒麟丸) on Fertility and HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 Signaling Pathway in Ovarian Tissues in Diminished Ovarian Reserve Model Mice

ZHU Fangfang¹, DENG Gaopi², CHEN Chunlin¹, LAI Yuling¹, ZENG Fuling¹, GAO Jie²

1. The First Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510080; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Qilin Pills* (麒麟丸) on fertility in diminished ovarian reserve (DOR) model mice as well as the related mechanism. **Methods** Thirty-six female C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: blank group, model group and *Qilin Pills* group, with 12 mice in each group. *Qilin Pills* group was gavaged with 5.46 g/(kg · d) of *Qilin Pills* suspension, while the blank group and model group were gavaged with 20 ml/(kg · d) of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution for 5 weeks. One week after the gavage, 75mg/kg of cyclophosphamide solution was intraperitoneally injected into the mice in model group and *Qilin Pills* group to induce the model of DOR, while 10 ml/kg of normal saline was intraperitoneally injected into the blank group, once per week for four weeks. The mice were tested daily for vaginal smears during treatment; after the medication, six mice in each group were randomly selected to be killed; Western blotting was used to detect hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), B-cell lymphoma-2/adenovirus E1B interacting protein 3 (Bnip3) and the homolog of autophagy key molecule yeast Atg6 (Beclin1) protein expression. After seven-week normal feeding, the remaining mice were caged with male mice for 4 weeks, and the time of conception, number of conceptions, number of absorbed fetus and number of healthy offspring were observed. **Results** Compared to the blank group, the model group's estrous cycle was disordered and stagnated at the estrous period; the conception time was prolonged, and the number of absorbed embryos increased; the protein expression of HIF-1 α , Bnip3 and Beclin1 in the ovarian tissue was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those of the model group, the estrous cycle of *Qilin Pills* group was restored, and the conception time was shortened; the HIF-1 α , Bnip3 and Beclin1 protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Qilin Pills* can regulate the estrous cycle of DOR model mice and protect its fertility, which may be related to the regulation of HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 signaling pathway.

Keywords diminished ovarian reserve; *Qilin Pills* (麒麟丸); fertility; hypoxia; autophagy; HIF-1 α /Bnip3/Beclin1 pathway

(收稿日期: 2021-02-06; 修回日期: 2021-05-18)

编辑: 王利芬