

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.12.015

实验研究

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

孔文娟¹, 苏先芝¹, 刘一斐¹, 韩福国², 刘清飞², 史云^{3*}

1. 北京中医药大学第一临床医学院, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 清华大学药学院; 3. 北京中医药大学东直门医院

摘要 目的 探讨加减归肾丸治疗卵巢储备功能减退的可能作用机制。方法 将 90 只 ICR 雌性小鼠随机分为空白对照组、模型组、雌二醇组和加减归肾丸低、中、高剂量组, 每组 15 只。除空白对照组外, 其余小鼠腹腔注射二氧化乙烯环己烯溶液 160 mg/(kg·d) 连续 15 天建立卵巢储备功能减退小鼠模型。造模成功后加减归肾丸高、中、低剂量组分别灌服加减归肾丸混悬液 57.0、28.5、14.3 g/(kg·d), 雌二醇组灌服戊酸雌二醇 0.15 mg/(kg·d), 空白对照组和模型组每日灌服 0.1 ml/10 g 生理盐水, 共干预 30 天。HE 染色观察卵巢组织病理形态学变化, 酶联免疫法检测血清促卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E₂)、抗缪勒管激素 (AMH) 水平, Western Blot 法检测小鼠卵巢组织中磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 蛋白表达。结果 病理结果显示, 模型组较空白对照组始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡数量明显减少, 闭锁卵泡明显增多, 黄体数量稀少。雌二醇组和加减归肾丸高剂量组卵泡数量较为丰富, 可见到较多黄体。加减归肾丸中、低剂量组主要以闭锁卵泡为主, 可见少量黄体。与空白对照组比较, 模型组小鼠血清 FSH、LH 显著升高, AMH、E₂ 显著降低, 卵巢组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白含量均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 加减归肾丸中、高剂量组和雌二醇组血清 FSH、LH 显著降低, AMH 显著升高, 卵巢组织 PI3K、AKT 蛋白升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。加减归肾丸高剂量组各指标与雌二醇组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 加减归肾丸可能通过影响卵巢组织 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 从而改善卵巢功能, 并且以高剂量效果更佳。

关键词 加减归肾丸; 卵巢储备功能; 卵巢组织; 雌二醇; PI3K/AKT/mTOR 信号通路; 二氧化乙烯环己烯

卵巢储备功能减退 (diminished ovarian reserve, DOR) 主要表现为卵巢内卵母细胞数量减少, 或伴有质量下降, 是常见的女性内分泌疾病之一^[1]。近年来 DOR 的发病率呈逐年上升趋势, 可达 10%^[2]。导致 DOR 的病因较为复杂, 主要包括遗传因素、免疫因素、相关酶缺乏、感染及环境因素、特发性因素以及医源性因素等^[3]。DOR 患者主要表现为月经周期、经期及经量的紊乱, 育龄期妇女可伴有不孕, 若不及时治疗, 可发展为早发性卵巢功能不全, 甚至卵巢早衰。加减归肾丸是全国名老中医专家张玉珍教授的经验方, 是基于《景岳全书》归肾丸化裁而来。前期临床研究^[4]发现,

加减归肾丸能够有效改善卵巢早衰及 DOR 患者的临床症状, 改善内分泌水平; 离体实验^[5]发现, 加减归肾丸含药血清能够有效抑制大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡。磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是调节细胞周期的重要细胞内信号通路, 与细胞的休眠、增殖、癌变和寿命直接相关^[6]。为进一步揭示加减归肾丸治疗 DOR 作用的分子机制, 本研究拟从 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的角度探讨其对卵巢卵母细胞及颗粒细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 ICR 雌性小鼠 90 只, 7 周龄, 体质量 25 ~ 30 g, 购自北京维通利华公司, 批号 SCXK

基金项目: 国家自然科学基金 (81202717); 国家重点研发计划 (2016YFE0113700)

* 通讯作者: zsysun@163.com, (010) 84013150

(京) 2016-0006, 于北京中医药大学东直门医院 SPF 级屏障动物房饲养, 温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (55 ± 5) %。

1.2 药物

加减归肾丸组成: 菟丝子 20 g (批号 19002151), 淫羊藿 15 g (批号 19009061), 女贞子 15 g (批号 18035681), 熟地黄 15 g (批号 19007561), 北柴胡 10 g (批号 19005001), 当归 10 g (批号 19007911), 白芍 15 g (批号 19007081), 丹参 20 g (批号 18026972) 等, 均为提取物颗粒, 购自北京康仁堂药业有限公司。二氧化乙烯环己烯 (VCD, 货号 BCBV1352, 美国 Sigma 公司), 用前用芝麻油 (美国 Spectrum 公司, 批号 2GC0155) 溶解配备为浓度 32 mg/ml 溶液。补佳乐 (戊酸雌二醇片, 批号 J20171038), 拜耳医药保健有限公司。

1.3 主要试剂、仪器

mTOR 抗体 (批号 2983)、AKT 抗体 (批号 4685), CST 公司; PI3K 抗体 (批号 ab191606)、GAPDH 优质内参 (批号 ab181602)、辣根酶标记山羊抗鼠-HRP (批号 ab6789), Abcam 公司; 蛋白提取试剂盒 (批号 GPP1814)、膜封闭液 (批号 GPP1819)、BSA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 GPP1818)、Western 转膜液 (批号 GPP1817)、ECL 试剂盒 (批号 GPP1824)、HE 染色试剂盒 (批号 GPB1826), 均为 GenePool 公司产品; 促卵泡生成素 (FSH) ELISA 试剂盒 (货号 EIA-2424)、促黄体生成素 (LH) ELISA 试剂盒 (货号 EIA-2348)、雌二醇 (E_2) ELISA 试剂盒 (货号 EIA-2386)、抗缪勒管激素 (AMH) ELISA 试剂盒 (货号 EIA-2425M), 均为 Elisa Biotech 公司产品; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜, 型号 SCGVU01RE), Millipore 公司; 中性树胶 (货号 G8590), 索莱宝生物科技有限公司。

双垂直电泳槽 (型号 MP-8001)、转移槽 (型号 MP-3030)、电泳仪 (型号 PP-1150), CAVOY 公司; 温控摇床 (型号 TS-2000A), 其林贝尔公司; 酶标仪 (型号 ELx800), BioTek 公司; 脱水机 (型号 JJ-42J)、包埋机 (型号 JB-P5), 武汉俊杰电子有限公司; 病理切片机 (型号 RM2016), 上海徕卡仪器有限公司; 组织摊片机 (型号 KD-P), 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; 全景扫描仪 (型号 Panoramic MIDI), 3DHISTECH 公司。

1.4 分组及干预方法

小鼠适应性喂养 2 周后, 每天行阴道细胞涂片

观察, 将动情周期规律的小鼠纳入实验, 按照随机数字法选出 15 只作为空白对照组。从第 15 天开始, 按照课题组前期造模方法^[7], 空白对照组每日腹腔注射芝麻油, 其余小鼠腹腔注射 VCD 溶液 5 ml/(kg·d) [即 160 mg/(kg·d)], 连续 15 日, 建立 DOR 小鼠模型。从第 30 天开始, 每日仅涂片, 观察动情周期, 当小鼠 50% 动情周期紊乱时, 视为造模成功。将造模成功的小鼠按照随机数字法分为模型组、雌二醇组和加减归肾丸低、中、高剂量组, 每组 15 只。加减归肾丸高、中、低剂量组分别每日每只小鼠灌服中药混悬液 57.0、28.5、14.3 g/kg, 其中, 中剂量为临床等效剂量; 雌二醇组每日灌服戊酸雌二醇 0.15 mg/kg, 空白对照组和模型组每日灌服 0.1 ml/10 g 生理盐水, 共干预 30 天。

1.5 观察指标及方法

给药第 31 天取血, 室温放置 30 min 后, 以 4200 r/min 在室温下离心 15 min (离心半径 16 cm), 取上层血清, -80°C 保存; 取小鼠卵巢, 按照随机数字法选 8 只小鼠右侧卵巢置于 4% 多聚甲醛液中固定 24 h, 其余卵巢组织置于冷冻管, 放入液氮中冷冻, 再放入 -80°C 保存。

1.5.1 HE 染色 将卵巢组织浸没于 4% 多聚甲醛 24 h 进行固定; 取出固定材料, 置入梯度酒精进行脱水, 然后置于无水乙醇二甲苯进行透明; 将透明结束的组织置于石蜡中浸蜡包埋; 将修整好的蜡块置于石蜡切片机上连续切片, 片厚 3 μm ; 将切片漂浮于 40 $^{\circ}\text{C}$ 温水表面展平, 烘烤后放于二甲苯脱蜡、脱二甲苯, 蒸馏水中洗去酒精后苏木素染色 6 min, 镜检着色满意后入伊红染液染色 3 min; 酒精脱水, 最后中性树胶封片。切片于全景扫描仪中观察并采集图像。

1.5.2 血清 AMH、FSH、LH、 E_2 检测 按照试剂盒说明书操作, 采用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.5.3 卵巢组织中 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达

采用 Western Blot 法检测, 将卵巢组织按照实验试剂说明书进行蛋白的提取、裂解得到组织总蛋白产物, 并进行蛋白浓度测定、配胶、电泳、转膜, 在 5% 脱脂牛奶里加入 PVDF 膜在室温下摇床反应 30 min; 加一抗 PI3K、AKT、mTOR, 浓度均为 1 : 5000, 放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 次日用 1 $\times$ TBST 缓冲液冲洗 5 min, 反复 3 次; 加羊抗小鼠-HRP 1 : 5000 稀释, 室温轻摇 50 min, 冲洗 5 min, 反复 4 次; 将 PVDF 膜浸泡于 ECL 中显色, 最后用

Quantity One v. 4. 6. 2 软件进行读取蛋白表达情况。

1.6 统计方法

使用 SPSS 23.0 软件进行数据分析, 服从正态分布且方差齐性的数据用均值 $\pm$ 标准差表示, 使用单因素方差分析方法, 并使用 LSD-*t* 法进行多重比较。均双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠卵巢组织病理结果

图 1 示, 空白对照组卵巢组织内卵泡数量丰富, 始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡轮廓清晰可见, 并有大量黄体分布。模型组各级卵泡数量明显减少, 闭锁卵泡明显增多, 黄体数量稀少; 雌二醇组卵泡数量较为丰富, 可见到较多黄体及少量闭锁卵泡, 卵巢边缘可见到少量始基卵泡。加减归肾丸高剂量组卵泡数量丰富, 各级卵泡均可见到, 黄体数量较多, 可见到少量闭锁卵泡, 其次为加减归肾丸中剂量组; 加减归肾丸低剂量组主要以闭锁卵泡为主, 可见少量黄体, 且黄体形态不规则。

2.2 各组小鼠血清 AMH、FSH、LH、 E_2 水平比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组小鼠血清 FSH、LH 升高, AMH、 E_2 降低 ($P < 0.01$); 与模

型组比较, 加减归肾丸中、高剂量组和雌二醇组血清 FSH、LH 降低, AMH 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 加减归肾丸高剂量组和雌二醇组 E_2 升高 ($P < 0.01$); 与雌二醇组比较, 加减归肾丸低、中剂量组血清 AMH、 E_2 降低, FSH 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 加减归肾丸低剂量组血清 LH 升高 ($P < 0.01$); 与加减归肾丸低剂量组比较, 加减归肾丸中剂量组血清 AMH 升高, FSH 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 加减归肾丸高剂量组血清 FSH、LH 降低, AMH、 E_2 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与加减归肾丸中剂量组比较, 加减归肾丸高剂量组 AMH、 E_2 升高 ($P < 0.01$)。

2.3 各组小鼠卵巢组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组小鼠卵巢组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白含量均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 加减归肾丸中、高剂量组及雌二醇组 PI3K、AKT 均升高 ($P < 0.01$), 而 mTOR 蛋白含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与雌二醇组对比, 加减归肾丸低剂量组 PI3K、AKT 水平降低, 加减归肾丸中剂量组 PI3K

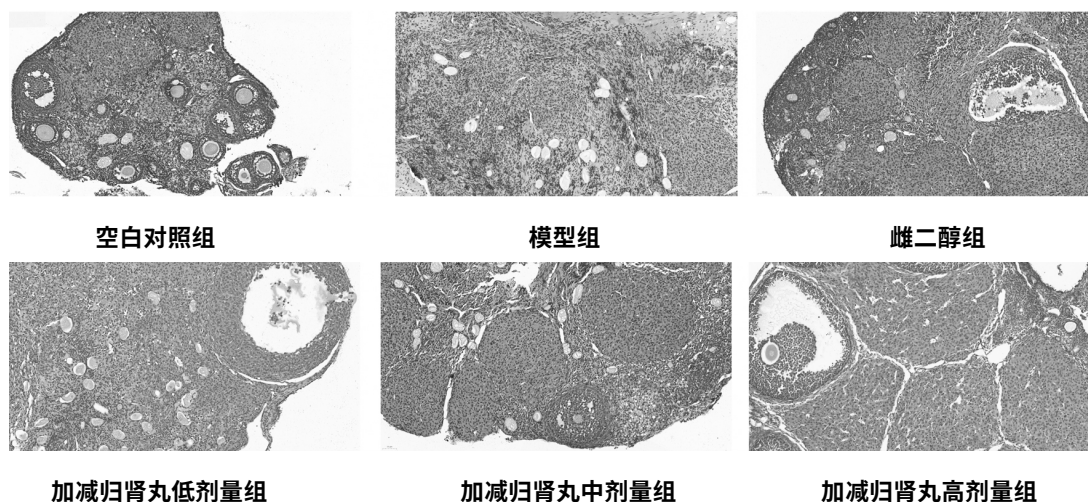


图 1 各组小鼠卵巢组织 HE 染色病理切片图 ($\times 20$)

表 1 各组小鼠血清 AMH、FSH、LH、 E_2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AMH (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	E_2 (pg/ml)
空白对照组	15	1.397 $\pm$ 0.192	11.541 $\pm$ 2.645	2.497 $\pm$ 1.750	29.642 $\pm$ 6.026
模型组	15	0.447 $\pm$ 0.085*	26.948 $\pm$ 4.374*	4.639 $\pm$ 1.646*	12.345 $\pm$ 4.074*
雌二醇组	15	1.538 $\pm$ 0.143 $\Delta\Delta$	13.035 $\pm$ 4.744 $\Delta\Delta$	1.926 $\pm$ 0.830 $\Delta\Delta$	24.793 $\pm$ 5.210 $\Delta\Delta$
加减归肾丸低剂量组	15	0.465 $\pm$ 0.110 $\Delta\Delta$	22.804 $\pm$ 6.854 $\Delta\Delta$	4.216 $\pm$ 1.188 $\Delta\Delta$	15.273 $\pm$ 4.040 $\Delta\Delta$
加减归肾丸中剂量组	15	1.055 $\pm$ 0.188 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	18.232 $\pm$ 5.516 $\Delta\Delta\Delta$	3.230 $\pm$ 1.181 Δ	16.457 $\pm$ 3.300 $\Delta\Delta$
加减归肾丸高剂量组	15	1.451 $\pm$ 0.191 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	14.014 $\pm$ 4.538 $\Delta\Delta\Delta$	2.653 $\pm$ 0.964 $\Delta\Delta\Delta$	23.173 $\pm$ 4.592 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: AMH, 抗缪勒管激素; FSH, 促卵泡生成素; LH, 黄体生成素; E_2 , 雌二醇; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与雌二醇组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与加减归肾丸低剂量组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$; 与加减归肾丸中剂量组比较, $\diamond P < 0.01$

表 2 各组小鼠卵巢组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PI3K	AKT	mTOR
空白对照组	15	0.598 ± 0.006	0.495 ± 0.050	0.455 ± 0.056
模型组	15	0.383 ± 0.018 **	0.208 ± 0.028 **	0.281 ± 0.098 *
雌二醇组	15	0.540 ± 0.022 Δ	0.434 ± 0.053 Δ	0.346 ± 0.101
加减归肾丸低剂量组	15	0.403 ± 0.029 $\Delta\Delta$	0.305 ± 0.061 $\Delta\Delta$	0.271 ± 0.055
加减归肾丸中剂量组	15	0.487 ± 0.029 $\Delta\Delta\Delta$	0.357 ± 0.038 Δ	0.320 ± 0.047
加减归肾丸高剂量组	15	0.534 ± 0.028 $\Delta\Delta\Delta\Diamond$	0.416 ± 0.045 $\Delta\Delta$	0.360 ± 0.039

注: PI3K, 磷脂酰肌醇 3-激酶; AKT, 蛋白激酶 B; mTOR, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与雌二醇组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与加减归肾丸低剂量组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$; 与加减归肾丸中剂量组比较, $\Diamond P < 0.05$

水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与加减归肾丸低剂量组比较, 加减归肾丸中剂量组 PI3K 水平升高, 加减归肾丸高剂量组 PI3K、AKT 水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与加减归肾丸中剂量组比较, 加减归肾丸高剂量组 PI3K 水平升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

DOR 可归属于中医学“月经先期”“月经后期”“月经先后无定期”“不孕”等范畴。近年来众多医家对本病的病机进行了探索^[8-9], 张玉珍教授认为, DOR 的病机是脾肾亏虚、肝郁血瘀, 导致肾-天癸-冲任-胞宫轴的异常^[10], 故治疗上需从肝、脾、肾三经同调。加减归肾丸方以菟丝子平补阴阳, 淫羊藿补肾助阳, 女贞子滋补肾阴, 熟地黄补精益髓, 柴胡疏肝, 白芍柔肝, 当归、丹参活血活络, 全方共奏补肾健脾、疏肝活血之功。

近年来, 环境因素对女性生殖健康的影响日益受到人们的重视, 有研究发现不良的环境因素可加速女性卵巢储备功能下降^[11]。VCD 是制造橡胶、塑料、杀虫剂等副产品, 在生活中广泛分布, 研究^[12]证实, VCD 所致的卵巢功能减退类似于女性生理性的卵巢衰老过程。因此, 本研究选用 VCD 建立 DOR 模型更符合当今环境污染影响女性的生殖功能状态。此外, 伴随卵巢功能下降, 卵巢分泌的雌激素减低, 低雌激素水平给女性带来了一系列问题, 例如泌尿生殖系统萎缩、心血管意外及骨质疏松等^[13]。因此我们选用天然雌激素戊酸雌二醇作为阳性对照药。

本研究病理结果显示, 模型组小鼠卵巢组织内主要以闭锁卵泡为主, 各级卵泡数目明显少于空白对照组; 血清 AMH、 E_2 水平降低, FSH、LH 水平升高, 从病理及内分泌角度说明造模成功。应用加减归肾丸干预后, 加减归肾丸中、高剂量组与模型组相比, 各级卵泡数目增多, 闭锁卵泡数目减少; 血清 AMH、 E_2 水平升高, FSH、LH 水平降低, 特

别是加减归肾丸高剂量组效果更明显, 并与雌二醇组效果相当, 说明加减归肾丸高剂量能够增加卵泡数量, 改善激素水平, 延缓卵巢衰老。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路是细胞内重要的信号转导通路, 参与卵母细胞的生长、发育、闭锁及颗粒细胞的增殖、分化^[14], 而卵泡的过快凋亡可能导致卵巢过早衰老^[15]。Johna 等^[16]研究发现, PI3K 通路中各信号分子异常表达可能会导致原始卵泡生长及发育缺陷, 造成卵巢的病理状态。本研究表明, 与空白对照组比较, 模型组小鼠卵巢组织 PI3K、AKT、mTOR 蛋白含量均明显降低。与模型组比较, 加减归肾丸中、高剂量组和雌二醇组小鼠卵巢组织 PI3K、AKT 蛋白含量升高, 且加减归肾丸高剂量组效果与雌二醇组相当, 说明加减归肾丸高剂量能通过调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路改善卵巢储备功能, 延缓卵巢衰老, 其更广泛、更明确的分子机制有待今后进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Practice committee of the American society for reproductive medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2015, 103 (3): 9-17.
- [2] MAHESHWARI A, FOWLER P, BHATTACHARYA S. Assessment of ovarian reserve: should we perform tests of ovarian reserve routinely [J]. Hum Rep, 2006, 21 (11): 2729-2735.
- [3] 王超君, 吴洁. 卵巢储备功能减退病因及处理 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31 (8): 723-726.
- [4] 史云, 张玉珍. 补肾健脾 调肝活血法治疗卵巢功能早衰临床观察 [J]. 中医药学刊, 2006, 24 (6): 1174-1176.
- [5] 史云, 张玉珍, 刘清飞. 加减归肾丸含药血清对卵巢颗粒细胞凋亡的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18 (1): 37-39.
- [6] ZHOU L, XIE Y, LI S, et al. Rapamycin prevents cyclophosphamide-induced over-activation of primordial follicle pool through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in vivo

- [1] J Ovarian Res, 2017, 10(1): 56.
- [2] SHIN D, HA J, HONG SB, et al. Schisandrae fructus reduces symptoms of 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian failure in mice [J]. EvidBased Complement Alternat Med, 2017, 2017(12): 1-9.
- [3] 王春梅, 汤玲. 肖承惊运用益肾理冲法治疗卵巢储备功能下降经验 [J]. 中医杂志, 2019, 60(14): 1188-1190.
- [4] 王静, 夏桂成. 夏桂成从“心-肾-子宫轴”学说论治早发性卵巢功能不全经验 [J]. 中医杂志, 2018, 59(7): 554-557, 576.
- [5] 廖慧慧, 赵颖, 史云. 张玉珍教授治疗卵巢早衰的思路与方法 [J]. 环球中医药, 2015, 8(7): 780-782.
- [6] RICHARDSON MC, GUO M, FAUSER BC, et al. Environmental and developmental origins of ovarian reserve [J]. Hum Reprod, 2014, 20(3): 353-369.
- [7] 周蓓蓓, 陈文俊, 谈勇. 坤泰胶囊对 VCD 所致 POI 模型大鼠的疗效探究 [J]. 中成药, 2017, 9(4): 695-700.
- [8] 陈子江, 田秦杰, 乔杰, 等. 早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(9): 577-581.
- [9] GROSBOIS J, DEMEESTERE I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation [J]. Hum Reprod, 2018, 33(9): 1705-1714.
- [10] 刘传明, 丁利军, 李佳音, 等. 衰老导致卵巢功能低下研究进展 [J]. 遗传, 2019, 41(9): 816-826.
- [11] JOHNA GB, SHIDLER MJ, BESMER P, et al. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation [J]. Devel Biol, 2009, 331(2): 292-299.

Effects of Modified *Guishen Pills* (归肾丸) on PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Ovarian Tissue of Hypofunction of Ovarian Reserve Model Mice

KONG Wenjuan¹, SU Xianzhi¹, LIU Yifei¹, HAN Fuguo², LIU Qingfei², SHI Yun³

1. The First Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Tsinghua University; 3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of the treatment of ovarian reserve dysfunction with modified *Guishen Pills* (归肾丸). **Methods** A total of 90 female ICR mice were randomly divided into a blank control group, a model group, a estradiol group and modified *Guishen Pills* low, medium and high dose group, with 15 in each group. Except for blank control group, mice were intraperitoneally injected with ethylene dioxide cyclohexene solution 160 mg/(kg · d) for 15 consecutive days to establish model of decreased ovarian reserve function. After successful modeling, the *Guishen Pills* high-dose, medium-dose and low-dose groups were administrated with modified *Guishen Pills* suspension 57. 0, 28. 5 and 14. 3 g/(kg · d), respectively; the estradiol group was administrated with estradiol valerate 0. 15 mg/(kg · d); the blank control group and the model group were administrated with normal saline 0. 1 ml/10 g each day and all mice were inventoried for 30 days. HE dyeing was used to observe ovarian tissue pathology morphology, and enzyme-linked immunoassay method was used to detect serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E₂), muller tube hormone (AMH) level. Western Blot method was used to detect phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), mammals rapamycin target protein (mTOR) protein expression in ovarian tissue of mice. **Results** Pathological results showed that compared with the blank group, the number of primordial follicles, presinus follicles and sinusoid follicles in the model group decreased significantly, the number of atretic follicles increased significantly, and the number of luteum was rare. The number of follicles was more abundant in the estradiol group and the high-dose group of *Guishen Pills*, in which many luteums can be seen. In modified *Guishen Pills* middle and low dose groups, atretic follicles were dominant with a small amount of corpus luteum. Compared with the blank control group, serum FSH and LH in the model group were significantly increased, AMH and E₂ were significantly decreased, and the protein contents of PI3K, AKT and mTOR in ovarian tissues were all decreased (*P* < 0. 05 or *P* < 0. 01). Compared with the model group, serum FSH and LH were significantly reduced, AMH was significantly increased, and PI3K and AKT proteins in ovarian tissues were significantly increased in the *Guishen Pills* middle and high dose groups and estradiol groups (*P* < 0. 05 or *P* < 0. 01). There was no significant difference between the *Guishen Pills* high dose group and the estradiol group in all indexes (*P* > 0. 05). **Conclusion** The modified *Guishen Pills* may improve ovarian function by affecting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian tissues, and the effect is better at a high dose.

Keywords modified *Guishen Pills* (归肾丸); ovarian reserve function; ovarian tissue; estradiol; PI3K/AKT/mTOR pathway; ethylene dioxide cyclohexene

(收稿日期: 2019 - 10 - 31; 修回日期: 2019 - 12 - 17)

编辑: 邓 媛