

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.15.013

健脾益肾化浊方对多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡蛋白及PI3K/AKT/mTOR通路的影响

陈苗^{1,2}, 马会明³, 冯亚宏⁴, 张晓静⁴, 陈冬梅⁵, 罗嘉琦^{1,2}, 杜小利^{1,2}✉

1. 宁夏医科大学中医学院, 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利街1160号, 750004; 2. 宁夏区域高发病中西医结合防治研究重点实验室; 3. 宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室; 4. 宁夏中医医院暨中医研究院; 5. 宁夏医科大学总医院宁夏干细胞与再生医学重点实验室

[摘要] 目的 探讨健脾益肾化浊方治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的可能作用机制。方法 70只SD雌性大鼠随机分为空白组和模型组各15只,二甲双胍组,健脾益肾化浊方低、中、高剂量组各10只。除空白组外,其余各组均采用来曲唑灌胃联合高脂饲料喂养21天构建PCOS模型。造模成功后,空白组和模型组用10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃;二甲双胍组用盐酸二甲双胍片100 mg/(kg·d)灌胃;健脾益肾化浊方低、中、高剂量组分别用健脾益肾化浊方药物混悬液1.275、2.55、5.10 g/(kg·d)灌胃,干预30天。将卵巢称重并计算卵巢指数;ELISA法测定大鼠血清促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、睾酮(T)、抗苗勒管激素(AMH)和雌二醇(E₂)水平;HE染色观察卵巢组织形态改变;免疫组织化学染色法检测大鼠卵巢组织半胱氨酸天冬氨酸酶3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸酶9(Caspase-9)和磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)蛋白阳性表达;Western blot法检测大鼠卵巢组织促凋亡蛋白(BAX)、抗凋亡蛋白(Bcl-2)、Caspase-9、细胞色素C(Cytochrome-C)和PI3K、AKT、mTOR蛋白相对表达。结果 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织以囊性扩张卵泡为主,颗粒细胞层减少,间质增生明显;卵巢指数、血清T、LH、AMH、卵巢组织Caspase-3、Caspase-9平均光密度和BAX/Bcl-2值、Cytochrome-C、Caspase-9蛋白相对表达量明显升高,血清E₂、FSH及卵巢组织PI3K、AKT、mTOR平均光密度和蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,健脾益肾化浊方各剂量组和二甲双胍组卵巢组织多囊样改变得到改善,可见各级卵泡和黄体,颗粒细胞层增厚,卵巢指数、血清LH、AMH、卵巢组织Caspase-9平均光密度和蛋白相对表达明显降低,血清E₂、FSH,卵巢组织PI3K和AKT平均光密度,PI3K、AKT和mTOR蛋白相对表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);二甲双胍组和健脾益肾化浊方中、高剂量组血清T水平和Caspase-3平均光密度显著下降,健脾益肾化浊方低、高剂量组和二甲双胍组mTOR平均光密度显著增加、BAX/Bcl-2值明显降低,二甲双胍组和健脾益肾化浊方高剂量组卵巢组织Cytochrome-C蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与二甲双胍组相比,健脾益肾化浊方低剂量组血清T水平明显升高,健脾益肾化浊方中剂量组BAX/Bcl-2值显著升高($P<0.05$);与健脾益肾化浊方中剂量组相比,健脾益肾化浊方高剂量组Cytochrome-C蛋白表达显著降低($P<0.05$)。结论 健脾益肾化浊方可抑制PCOS大鼠卵巢颗粒细胞凋亡蛋白表达,从而维持内分泌平衡以改善卵巢生殖功能,其机制可能与激活PI3K/AKT/mTOR信号通路有关。

[关键词] 多囊卵巢综合征;健脾益肾化浊方;颗粒细胞;细胞凋亡;PI3K/AKT/mTOR信号通路

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,

PCOS)是一种常见的影响女性生殖健康的内分泌和代谢疾病,主要表现为雄激素过高、排卵功能障碍或B超下卵巢呈多囊样形态^[1]。PCOS患者远期易出现肥胖、2型糖尿病、心脑血管病和妇科肿瘤等疾病,严重影响女性生活质量和心理健康^[2]。近

基金项目:国家自然科学基金(81660813);宁夏自然科学基金(2020AAC03430,2022AAC03216);宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室/宁夏区域高发病中西医结合防治研究重点实验室开放课题(311/20020502)

✉ 通讯作者:dxl_515@163.com

年来,中医药治疗 PCOS 取得了较好疗效^[3],可通过恢复月经周期、促进排卵、提高卵泡质量、调节性激素和糖脂代谢平衡等有效提高妊娠率,并在一定程度上缓解患者的焦虑和抑郁^[4]。PCOS 病因复杂,诸多学者认为 PCOS 的病机特点为“肾虚为本,痰湿瘀血为标”^[5]。健脾益肾化浊方是宁夏中医医院暨中医研究院王淑斌多年的临床经验方,具有“健脾益肾、化浊助运(孕)”之功。前期研究^[6]表明,健脾益肾化浊方在调节 PCOS 患者性激素水平、提高卵泡质量和改善卵巢功能方面疗效显著。

现代研究显示,PCOS 的发生与卵巢颗粒细胞凋亡相关^[7]。颗粒细胞参与卵细胞成熟和卵子排出等功能活动,其凋亡直接影响卵泡发育^[8]。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) 通路为 PCOS 的生殖内分泌过程相关,在蛋白合成和能量代谢中起着积极作用,同时能促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[9-10]。本研究探讨健脾益肾化浊方对 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡相关蛋白及 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响,探求健脾益肾化浊方治疗 PCOS 的可能作用机制,为其临床应用提供科学依据。本研究经宁夏医科大学实验动物伦理委员会和宁夏中医研究院伦理委员会批准(伦理批号:IACUC-NYLAC-2020-143)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级雌性健康 SD 大鼠 70 只,6~8 周龄,体重质量 (200±20) g,购自宁夏医科大学实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK(宁)2020-0001,在宁夏医科大学实验动物中心统一饲养,温度 (23±2) °C,相对湿度 60%±10%,自由饮水,12 h 周期性光照。

1.2 药物

健脾益肾化浊方组成:黄芪 30 g,党参 15 g,茯苓 15 g,白术 15 g,淫羊藿 10 g,仙茅 10 g,菟丝子 15 g,桑寄生 15 g,陈皮 12 g,苍术 15 g,荷叶 12 g,香附 12 g。免煎颗粒由广东一方制药有限公司生产。来曲唑片 (2.5 mg/片,江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:H19991001);盐酸二甲双胍片 (0.5 g/片,中美上海施贵宝制药有限公司,批号:H20023370)。

1.3 主要试剂及仪器

全蛋白提取试剂盒 (批号:20211018),江苏凯基生物技术股份有限公司;BCA 蛋白含量检测试剂盒 (批号:20220217),江苏凯基生物技术股份

有限公司;ECL 超敏发光液 (批号:1060051911),北京兰博利德生物技术有限公司;半胱氨酸天冬氨酸酶 9 (Caspase-9)、AKT、mTOR 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号:bs-0049R、bs-0115R、bs-1992R 和 bs-0061R),北京博奥森生物有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体和二抗羊抗小鼠 IgG-HRP (批号:G0100、S0100),北京兰博利德技术有限公司;促凋亡蛋白 (BAX)、抗凋亡蛋白 (Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸酶 3 (Caspase-3) 和细胞色素 C (Cytochrome-C) 抗体 (批号:50599-2-Ig、12789-1-AP、19677-1-AP、10933-1-AP),美国 Proteintech 公司;PI3K (批号:WL03380),万类生物有限公司;苏木素染色液 (批号:180301),北京博奥拓达科技有限公司;伊红染液 (批号:G1100),北京索莱宝科技有限公司;二氨基联苯胺 (DAB) 显色液 (批号:ZLI-9018),北京中杉金桥生物技术有限公司;戊巴比妥钠 (批号:AM00469),北京化学试剂公司;羧甲基纤维素钠 (批号:Q/HG 32161-93),天津市凯通化学试剂有限公司;多聚甲醛 (批号:30525-89-4),天津市大茂化学试剂厂;卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、睾酮 (T)、抗苗勒管激素 (AMH) 和雌二醇 (E_2) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (批号:JL13251、JL11706、JL11473、JL12462 和 JL11525),上海江莱生物科技有限公司。普通饲料 (蛋白 20%、碳水化合物 70%、脂肪 10%,批号:21080114),江苏省协同医药生物工程有限责任公司;高脂饲料 (蛋白 20%、碳水化合物 35%、脂肪 45%,批号:D12492),美国 Research Diets 公司。

化学发光仪 (美国 Bio-Rad 公司,Universal Hood II 型);全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司,Epoch 型);普通光学显微镜 (日本 Olympus 公司,BX41 型);血糖仪 (中国 Sinocare 公司,GA-7 型);切片扫描仪 (德国 Leica 公司,Aperio LV1 型);精密电子天平 (美国 METTLER 公司,JE203GE 型)。

1.4 造模、分组及给药

通过阴道涂片观察发现 70 只雌性 SD 大鼠均满足动情周期规律。在 Excel 2010 中产生 70 个随机数,将 70 只大鼠分为空白组和模型组各 15 只,二甲双胍组和健脾益肾化浊方低、中、高剂量组各 10 只。空白组给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃加普通饲料喂养,其余各组用来曲唑溶于 1% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 中,予 1 mg/(kg·d) 灌胃,联

合高脂饲料喂养 21 天诱导 PCOS 模型^[11]。21 天后按照随机数字表法抽取空白组和模型组各 5 只大鼠取材,以模型大鼠动情周期紊乱,卵巢组织出现多囊样改变,视为模型建立成功^[12]。

造模成功后,二甲双胍组给予盐酸二甲双胍溶于 1% CMC-Na 制成的溶液 100 mg/(kg·d) 灌胃。健脾益肾化浊方低、中、高剂量组分别给予健脾益肾化浊方 1.275、2.55、5.10 g/(kg·d) 剂量灌胃,灌胃剂量按《药理实验方法学》^[13] 中人体表面积法计算,中剂量为人与大鼠等效剂量,低、高剂量分别为中剂量的 1/2 和 2 倍。空白组和模型组每日给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。因健脾益肾化浊方高剂量组每日灌胃溶液体积超过大鼠一次灌胃容量,故分为早晚 2 次灌胃,其余各组均每天 1 次,共干预 30 天。

1.5 标本采集

干预结束后,所有大鼠禁食不禁水 12 h,称重后腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 0.04 g/kg 麻醉,于心尖部采血,静置后离心取上清(4℃,半径 10 cm,3500 r/min,离心 15 min),用于 ELISA 检测。按照随机数字表法各组选出 3 只大鼠,取双侧卵巢并称重,一侧卵巢于液氮中冷冻后在 -80℃ 冰箱保存,用于蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测;另一侧在 4% 多聚甲醛中固定,脱水后进行石蜡包埋,用于苏木精-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色实验。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠卵巢指数 按照随机数字表法每组选出 5 只大鼠用精密电子天平称取双侧卵巢湿重,计算卵巢指数。卵巢指数(%)=卵巢湿重/体质量×100%。

1.6.2 ELISA 法检测血清激素水平 严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤检测 FSH、LH、T、AMH 和 E₂ 水平,酶标仪测量各孔在 450 nm 处吸光度值,计算标准曲线下各样品含量。

1.6.3 HE 染色观察大鼠卵巢形态学变化 卵巢组织脱水包埋后切片(厚度 5 μm),置于温箱中烘烤 2 h,严格按照标准程序进行 HE 染色、中性树胶封片后在显微镜下观察病理改变并采集图像。

1.6.4 免疫组织化学染色检测卵巢组织中 Caspase-3、Caspase-9 和 PI3K、AKT、mTOR 表达 将固定后的卵巢组织脱水包埋后切片(厚度 5 μm)、烘烤 2 h、二甲苯脱蜡、不同浓度酒精复水、枸橼酸微波修复后冷却,山羊血清封闭,滴加一抗(Caspase-3 和 Caspase-9 稀释比例为 1:200,PI3K、AKT、mTOR 稀释比例为 1:250)于 4℃ 冰箱过夜。使用 DAB

显色,磷酸盐缓冲液(PBS)中止后苏木素复染,梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,通风干燥后在显微镜下观察并采集图像。使用 Image J 1.x 软件对阳性表达进行分析统计。

1.6.5 Western blot 法检测卵巢组织中 BAX、Bcl-2、Caspase-9、Cytochrome-C 和 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达 将冻存的卵巢组织加入裂解液于冷冻研磨机研磨后,离心(4℃、12 000 r/min、半径 10 cm、离心 15 min)取上清,BCA 试剂盒进行蛋白定量。根据蛋白浓度等体系计算后,按照相应体积加 5× Buffer 煮 8 min,电泳、转膜(PVDF 膜)、5% 脱脂奶粉封闭、1×TBST 洗 3 遍,滴加一抗 BAX、Bcl-2、Caspase-9、Cytochrome-C、PI3K、AKT、mTOR(均为 1:1000)和内参 β-actin 或 GAPDH(1:6000)4℃ 孵育过夜,次日复温后洗 3 次,室温下孵二抗羊抗小鼠 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-HRP(1:10 000)1 h、1×TBST 洗 3 遍后滴加 ECL 发光液曝光,采用 Image J 1.x 软件进行条带灰度值分析。

1.7 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析。计量资料均符合正态分布,用($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;方差不齐者多组间比较采用 Welch 检验,两两比较采用 Dunnett-T^{*} 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中因造模灌胃等不适死亡 7 只,最终空白组 8 只,其余每组 9 只完成实验。

2.1 各组大鼠卵巢指数比较

表 1 示,与空白组比较,模型组卵巢指数明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,健脾益肾化浊方低、中、高剂量组和二甲双胍组卵巢指数显著降低($P < 0.01$);二甲双胍组和健脾益肾化浊方低、中、高剂量组卵巢指数组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清性激素水平比较

表 2 示,与空白组相比,模型组大鼠血清 LH、T、AMH 水平显著升高,FSH 和 E₂ 明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,二甲双胍组和健脾益肾化浊方各剂量组 LH 和 AMH 水平显著降低、FSH 和 E₂ 水平显著升高,二甲双胍组和健脾益肾化浊方中、高剂量组 T 水平显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与二甲双胍组相比,健脾益肾化浊方低剂量组 T 水平明显升高($P < 0.05$);二甲双胍

表 1 各组大鼠卵巢指数比较

Table 1 Comparison of ovarian index of rats in each group
(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	卵巢指数
空白组	5	0.0168 $\pm$ 0.0020
模型组	5	0.0379 $\pm$ 0.0021 ^{a)}
二甲双胍组	5	0.0192 $\pm$ 0.0004 ^{b)}
健脾益肾化浊方低剂量组	5	0.0190 $\pm$ 0.0013 ^{b)}
健脾益肾化浊方中剂量组	5	0.0177 $\pm$ 0.0007 ^{b)}
健脾益肾化浊方高剂量组	5	0.0189 $\pm$ 0.0010 ^{b)}

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

组和健脾益肾化浊方各剂量组 LH、AMH、 E_2 、FSH 水平组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠卵巢组织 HE 染色结果

图 1 示, 空白组卵巢组织形态正常, 可见不同发育阶段的卵泡, 颗粒细胞排列整齐、颗粒层较厚, 发育良好; 与空白组相比, 模型组卵巢可见多个囊性扩张卵泡, 卵泡颗粒层明显变薄, 间质增生

明显, 未见卵母细胞; 与模型组相比, 在各药物组卵巢形态恢复, 颗粒细胞层明显增加, 排列整齐, 无明显间质增生。二甲双胍组卵巢组织可见原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡及黄体; 健脾益肾化浊方各剂量组同样有各级卵泡以及黄体分布, 各药物组间未见明显差异。

2.4 各组大鼠卵巢组织 Caspase-3、Caspase-9、PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达比较

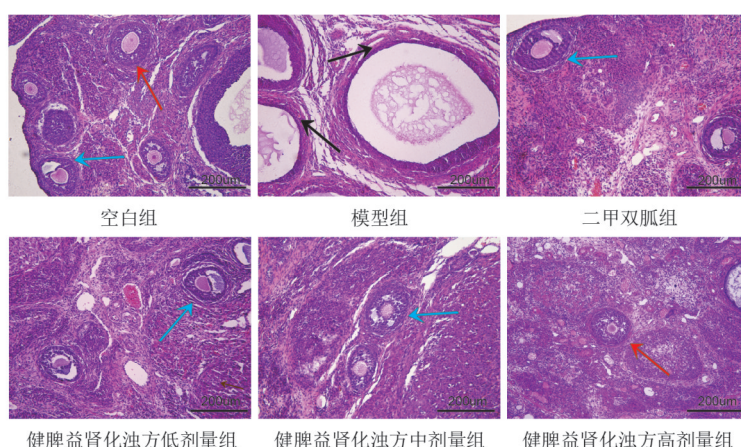
表 3 示, 与空白组相比, 模型组 Caspase-3 和 Caspase-9 平均光密度值显著升高, PI3K、AKT 和 mTOR 平均光密度显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组相比, 二甲双胍组和健脾益肾化浊方中、高剂量组 Caspase-3 平均光密度值显著降低, 各药物组 Caspase-9 平均光密度值显著下降、PI3K 和 AKT 平均光密度显著升高, 健脾益肾化浊方低、高剂量组和二甲双胍组 mTOR 平均光密度显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各药物组 Caspase-3、

表 2 各组大鼠血清 LH、FSH、T、 E_2 和 AMH 水平比较Table 2 Comparison of serum LH, FSH, T, E_2 and AMH levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LH/mIU·ml ⁻¹	T/pg·ml ⁻¹	AMH/pg·ml ⁻¹	E_2 /pmol·l ⁻¹	FSH/IU·l ⁻¹
空白组	8	27.7 $\pm$ 3.8	143.8 $\pm$ 17.8	1972.5 $\pm$ 467.3	50.1 $\pm$ 3.8	8.3 $\pm$ 0.09
模型组	9	44.4 $\pm$ 1.9 ^{a)}	246.6 $\pm$ 18.7 ^{a)}	3428.6 $\pm$ 311.5 ^{a)}	28.0 $\pm$ 4.5 ^{b)}	5.6 $\pm$ 0.01 ^{b)}
二甲双胍组	9	35.4 $\pm$ 0.8 ^{c)}	127.0 $\pm$ 6.5 ^{d)}	2257.0 $\pm$ 425.4 ^{c)}	40.9 $\pm$ 9.6 ^{c)}	8.3 $\pm$ 0.50 ^{c)}
健脾益肾化浊方低剂量组	9	37.7 $\pm$ 3.9 ^{c)}	200.3 $\pm$ 36.8 ^{c)}	2792.7 $\pm$ 498.0 ^{c)}	34.9 $\pm$ 8.9 ^{c)}	7.5 $\pm$ 1.73 ^{c)}
健脾益肾化浊方中剂量组	9	34.4 $\pm$ 5.0 ^{c)}	175.9 $\pm$ 13.2 ^{c)}	2922.2 $\pm$ 355.4 ^{c)}	41.4 $\pm$ 1.8 ^{c)}	8.1 $\pm$ 0.20 ^{c)}
健脾益肾化浊方高剂量组	9	29.7 $\pm$ 4.8 ^{c)}	172.6 $\pm$ 36.1 ^{c)}	2515.2 $\pm$ 448.1 ^{c)}	36.1 $\pm$ 4.1 ^{c)}	8.2 $\pm$ 0.89 ^{c)}

注: FSH, 促卵泡生成素; LH, 促黄体生成素; T, 睾酮; AMH, 抗苗勒管激素; E_2 , 雌二醇。

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, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$; e) 与二甲双胍组比较, $P < 0.05$ 。



注: 红色箭头指向初级卵泡, 可见颗粒层排列整齐; 蓝色箭头指向次级卵泡, 可见透明带; 黑色箭头指向囊性扩张卵泡, 可见颗粒层明显减少。

图 1 各组大鼠卵巢组织病理学形态 (HE 染色, $\times 200$)

Figure 1 Histopathological morphology of rat ovaries in each group

表3 各组大鼠卵巢组织中 Caspase-3、Caspase-9、PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白阳性表达比较

Table 3 Comparison of positive expressions of Caspase-3, Caspase-9, PI3K, AKT and mTOR proteins in ovarian tissues of rats in each group (平均光密度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Caspase-3	Caspase-9	PI3K	AKT	mTOR
空白组	3	0.401±0.145	0.187±0.073	0.379±0.032	0.359±0.051	0.351±0.045
模型组	3	0.566±0.066 ^{a)}	0.424±0.031 ^{b)}	0.264±0.020 ^{a)}	0.217±0.013 ^{a)}	0.223±0.023 ^{a)}
二甲双胍组	3	0.412±0.055 ^{c)}	0.341±0.008 ^{c)}	0.353±0.051 ^{c)}	0.310±0.051 ^{c)}	0.355±0.021 ^{c)}
健脾益肾化浊方低剂量组	3	0.493±0.072	0.312±0.080 ^{c)}	0.397±0.078 ^{c)}	0.309±0.066 ^{c)}	0.372±0.069 ^{c)}
健脾益肾化浊方中剂量组	3	0.443±0.067 ^{c)}	0.312±0.046 ^{c)}	0.355±0.060 ^{c)}	0.395±0.023 ^{d)}	0.310±0.059
健脾益肾化浊方高剂量组	3	0.355±0.062 ^{d)}	0.308±0.042 ^{d)}	0.368±0.030 ^{c)}	0.318±0.053 ^{c)}	0.356±0.019 ^{c)}

注：Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸酶3；Caspase-9，半胱氨酸天冬氨酸酶9；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。

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， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

Caspase-9、PI3K、AKT 和 mTOR 平均光密度值组间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组大鼠卵巢组织 BAX/Bcl-2 值、Caspase-9、Cytochrome-C、PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白相对表达比较

表4示，与空白组相比，模型组 BAX/Bcl-2 值及 Caspase-9 和 Cytochrome-C 蛋白表达显著增加，PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组相比，二甲双胍组和健脾益肾化浊方低、高剂量组卵巢组织 BAX/Bcl-2 值明显降低，二甲双胍组和健脾益肾化浊方高剂量组卵巢组织 Cytochrome-C 蛋白表达显著降低，健脾益肾化浊方各剂量组和二甲双胍组卵巢组织 Caspase-9

蛋白表达显著降低，PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。健脾益肾化浊方中剂量组 BAX/Bcl-2 值显著高于二甲双胍组，健脾益肾化浊方高剂量组 Cytochrome-C 蛋白表达明显低于健脾益肾化浊方中剂量组 ($P<0.05$)。健脾益肾化浊方各剂量组和二甲双胍组卵巢组织 Caspase-9、PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠卵巢组织 BAX、Bcl-2、Caspase-9、Cytochrome-C、PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白电泳图见图2、图3、图4。

3 讨论

根据 PCOS 临床表现，可归属于中医学“肥

表4 各组大鼠卵巢组织 BAX/Bcl-2、Caspase-9、Cytochrome-C、PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白相对表达比较

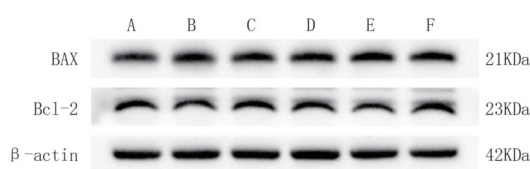
Table 4 Comparison of relative expression of BAX/Bcl-2, Caspase-9, Cytochrome-C, PI3K, AKT and mTOR proteins in ovarian tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BAX/Bcl-2	Caspase-9/GAPDH	Cytochrome-C/GAPDH
空白组	3	0.775±0.134	0.538±0.123	0.684±0.063
模型组	3	1.062±0.172 ^{a)}	1.186±0.053 ^{b)}	0.926±0.122 ^{a)}
二甲双胍组	3	0.784±0.150 ^{c)}	0.960±0.076 ^{c)}	0.763±0.105 ^{c)}
健脾益肾化浊方低剂量组	3	0.833±0.150 ^{c)}	0.903±0.067 ^{c)}	0.835±0.034
健脾益肾化浊方中剂量组	3	1.166±0.082 ^{c)}	0.908±0.099 ^{c)}	0.975±0.023
健脾益肾化浊方高剂量组	3	0.915±0.063 ^{c)}	0.848±0.044 ^{d)}	0.688±0.153 ^{c) f)}

组别	鼠数	PI3K/ β -actin	AKT/ β -actin	mTOR/ β -actin
空白组	3	0.856±0.087	1.053±0.079	0.845±0.059
模型组	3	0.598±0.028 ^{a)}	0.508±0.206 ^{a)}	0.356±0.189 ^{b)}
二甲双胍组	3	0.854±0.195 ^{c)}	0.660±0.223 ^{c)}	0.717±0.158 ^{c)}
健脾益肾化浊方低剂量组	3	1.058±0.187 ^{d)}	0.713±0.134 ^{c)}	0.897±0.097 ^{d)}
健脾益肾化浊方中剂量组	3	0.921±0.061 ^{c)}	0.927±0.267 ^{d)}	0.798±0.118 ^{c)}
健脾益肾化浊方高剂量组	3	1.003±0.216 ^{d)}	0.701±0.166 ^{c)}	0.725±0.101 ^{c)}

注：BAX，促凋亡蛋白；Bcl-2，抗凋亡蛋白；Caspase-9，半胱氨酸天冬氨酸酶9；Cytochrome-C，细胞色素C；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。

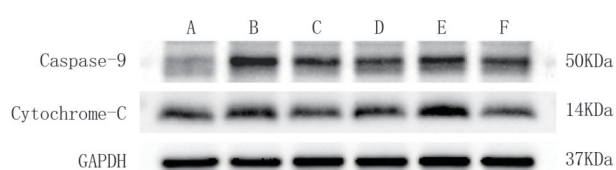
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与空白组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ ；e) 与二甲双胍组比较， $P<0.05$ ；f) 与健脾益肾化浊方中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，二甲双胍组；D，健脾益肾化浊方低剂量组；E，健脾益肾化浊方中剂量组；F，健脾益肾化浊方高剂量组；BAX，促凋亡蛋白；Bcl-2，抗凋亡蛋白。

图2 各组大鼠卵巢组织BAX、Bcl-2蛋白电泳图

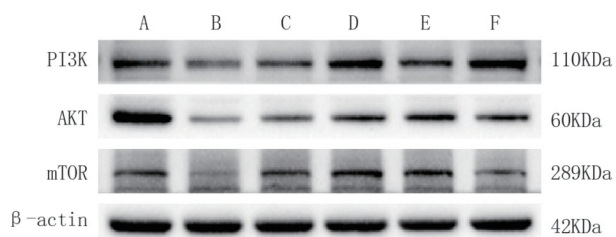
Figure 2 Electrophoresis of BAX and Bcl-2 proteins in ovarian tissues of rats in each group



注：A，空白组；B，模型组；C，二甲双胍组；D，健脾益肾化浊方低剂量组；E，健脾益肾化浊方中剂量组；F，健脾益肾化浊方高剂量组；Caspase-9，半胱氨酸天冬氨酸酶9；Cytochrome-C，细胞色素C。

图3 各组大鼠卵巢组织Caspase-9、Cytochrome-C蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of Caspase-9 and Cytochrome-C proteins in ovarian tissues of rats in each group



注：A，空白组；B，模型组；C，二甲双胍组；D，健脾益肾化浊方低剂量组；E，健脾益肾化浊方中剂量组；F，健脾益肾化浊方高剂量组；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。

图4 各组大鼠卵巢组织PI3K、AKT和mTOR蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoresis of PI3K, AKT and mTOR proteins in ovarian tissues of rats in each group

胖”“闭经”“窠囊”“不孕”等范畴。《景岳全书》云：“五脏之病，虽俱能生痰，然无由乎脾肾。盖脾主湿，湿动则为痰；肾主水，水泛亦为痰。故痰之化无不在脾，而痰之本无不在肾。”中医学认为，人体阳气之根为肾阳，卵子的正常排出有赖于肾阳的充足^[14]。若肾阳亏虚，推动无力，导致卵子排出不畅；中焦脾脏无肾阳温煦，运化失常，血海空虚，无法为卵子提供营养^[15]。同时脾肾阳虚致水液运行失常、酿生痰湿，导致痰湿内盛，形体肥

胖；而肾阳不足，血运受阻，血行不畅成“瘀”，痰凝血瘀互结成“窠囊”，阻滞冲任胞宫而为病，这是PCOS患者卵巢多囊的主要原因^[16]。因此，PCOS主要病机为脾肾两虚、瘀血痰浊，治以健脾益肾、化浊助运。健脾益肾化浊方中淫羊藿、仙茅、菟丝子、桑寄生补肾壮阳益精血；黄芪、党参、茯苓、白术益气健脾化湿；陈皮、苍术、香附燥湿化痰，理气调经；配合荷叶升清降浊，凉血化痰。全方温而不燥，凉而不寒，具有健脾益肾温阳、理气燥湿化浊之功。

本研究结果发现，相较于空白组，模型组大鼠卵巢指数明显增加，血清LH、T、AMH显著升高，FSH和E₂明显降低，卵巢HE染色出现典型多囊样病理表现，提示动物模型建立成功。除健脾益肾化浊方低剂量组血清T水平与模型组比较无明显变化外，健脾益肾化浊方各剂量和二甲双胍均可明显改善模型组大鼠卵巢多囊样改变，降低卵巢指数和血清LH、T、AMH，升高FSH和E₂水平；除健脾益肾化浊方低剂量血清T明显高于二甲双胍组和健脾益肾化浊方中、高剂量组外，其余指标在各治疗组差异无统计学意义。提示健脾益肾化浊方中、高剂量和二甲双胍均可改善PCOS大鼠卵巢多囊样改变，调节激素紊乱以维持内分泌平衡，使卵泡正常发育。

卵泡中最重要的功能细胞是颗粒细胞，激素的合成以及卵泡的发育均有赖于颗粒细胞，颗粒细胞过度凋亡可直接影响PCOS进程^[8]。细胞凋亡受Bcl-2家族和Caspase家族等多个因素调控，BAX作为促凋亡蛋白与抑凋亡蛋白Bcl-2作用拮抗，BAX/Bcl-2失衡可引起半胱氨酸天冬氨酸酶的级联反应，使Cytochrome-C释放，最终激活Caspase-3，引发细胞凋亡^[17]。研究发现，PCOS大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率明显高于正常大鼠，导致多数卵泡发育停留在窦状卵泡阶段，发育停止^[18]，通过下调卵巢组织BAX蛋白表达、促进Bcl-2表达，可抑制PCOS卵巢颗粒细胞凋亡的发生^[19]。在本研究中，相比于空白组，模型组大鼠卵巢组织Caspase-9、Caspase-3、Cytochrome-C蛋白表达及BAX/Bcl-2值明显增加，提示凋亡相关蛋白表达明显增加，PCOS大鼠卵巢组织颗粒细胞发生了凋亡反应，导致卵泡发育异常。给药后Caspase-3蛋白表达在二甲双胍组和健脾益肾化浊方中、高剂量组显著下降，BAX/Bcl-2值在健脾益肾化浊方低、高剂量组和二甲双胍组明显降低，Cytochrome-C蛋白表达在二甲双胍组和健脾益肾化浊方高剂量组显著降低，而Caspase-9蛋

白表达在各给药组均显著下降,且各给药组间差异无统计学意义。表明健脾益肾化浊方高剂量和二甲双胍均可明显抑制卵巢组织颗粒细胞凋亡相关蛋白表达,进而改善卵泡质量,提示抑制卵巢组织颗粒细胞凋亡反应发生可能是改善 PCOS 卵泡发育的有效途径之一。

PI3K/AKT/mTOR 作为与增殖、凋亡相关的经典通路,在维持女性正常生殖功能中发挥着关键作用^[20]。研究发现,PI3K/AKT/mTOR 通路在 PCOS 中被抑制,导致卵母细胞在成熟过程中受损,颗粒细胞增殖与分化受阻,卵泡的生长发育异常^[21]。此外,在 PCOS 患者及 PCOS 动物模型中都存在 PI3K/AKT/mTOR 信号通路异常,且该通路在调节 PCOS 激素和代谢指标等方面发挥着重要作用^[22-24]。在本研究中,模型组大鼠卵巢组织中 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达相较于空白组明显下调,给药后除 mTOR 平均光密度值在健脾益肾化浊方中剂量组增加不显著外,PI3K、AKT 平均光密度值和 PI3K、AKT、mTOR 蛋白相对表达在健脾益肾化浊方各剂量和二甲双胍组均显著升高,且各给药组间差异无统计学意义,表明 PI3K/AKT/mTOR 通路在 PCOS 大鼠中受到抑制,而健脾益肾化浊方各剂量组和二甲双胍干预对 PI3K/AKT/mTOR 信号轴具有激活作用,可促进 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白表达。可见调控 PI3K/AKT/mTOR 通路可能是抑制 PCOS 卵巢组织颗粒细胞凋亡的靶点,且激活该通路蛋白表达对维持内分泌平衡和卵巢正常功能具有正向调节作用。

综上所述,健脾益肾化浊方可改善 PCOS 模型大鼠内分泌水平,改善卵巢组织病理改变,恢复卵巢功能,降低卵巢组织 BAX/Bcl-2、Cytochrome-C、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达,抑制卵巢颗粒细胞凋亡反应的发生,其机制可能与激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。本研究不足之处在于以上结果中未筛选出统一的健脾益肾化浊方最佳剂量,可在今后的研究中增加给药浓度梯度和重复实验次数以得到最佳剂量;另外,本研究未能通过糖脂代谢方面的研究深入观察健脾益肾化浊方对 PCOS 的保护作用,今后需进一步探索。

参考文献

- [1] FINSTERER J. Mitochondrial dysfunction in polycystic ovary syndrome[J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(5): 1435-1442.
- [2] 袁莹莹, 赵君利. 多囊卵巢综合征流行病学特点[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(3): 261-264.
- [3] 李康梅, 戴明明, 蒋越, 等. 卵泡发育不良的中医病因病

- 机及中医药治疗研究进展[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(18): 37-40.
- [4] 郭浩洋, 张思琪, 王丽娜, 等. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗排卵障碍的中西医综合分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(2): 197-200.
- [5] 孙森, 王玉艳, 孟小钰, 等. 基于“肾虚、痰湿、血瘀”的现代生物学基础探讨 PCOS 中医病机的科学内涵[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(6): 1412-1415.
- [6] 冯亚宏, 张晓静, 杜翠忠. 健脾益肾化浊方治疗肥胖型多囊卵巢综合征 60 例临床观察[J]. *母婴世界*, 2021, 21(1): 100.
- [7] PENG SL, WU QF, XIE Q, et al. PATL2 regulated the apoptosis of ovarian granulosa cells in patients with PCOS [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2021, 37(7): 629-634.
- [8] ROBERTS JA, CARPENTER RM, BLYTHE SN, et al. FSH/AMH ratio and adipocyte size are linked to ovarian dysfunction[J]. *Endocr Res*, 2020, 45(3): 174-189.
- [9] 陈翠, 徐传花. PI3K/AKT/mTOR 通路参与多囊卵巢综合征患者子宫内膜病变的研究进展[J]. *中医药通报*, 2022, 21(8): 57-60.
- [10] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587.
- [11] 尹萍, 路璐, 陈媛媛, 等. 来曲唑联合 45% 高脂饲料诱导生殖内分泌及代谢表型异常的多囊卵巢综合征大鼠模型研究[J]. *药实践杂志*, 2019, 37(5): 422-426.
- [12] 黄千千, 王娇剑, 宋殿荣. 多囊卵巢综合征鼠类动物模型的构建[J]. *国际妇产科学杂志*, 2022, 49(3): 261-266, 277.
- [13] 李晓, 胡亦明, 韦春昕, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨黑逍遥散对 AD 模型大鼠神经炎症的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 33-41.
- [14] 史昭, 高媛, 魏绍斌. 魏绍斌治疗多囊卵巢综合征性不孕症经验介绍[J]. *中医临床杂志*, 2018, 30(9): 1624-1626.
- [15] 常珍珍, 王金权, 乔丽, 等. 王氏益经汤联合常规疗法治疗多囊卵巢综合征肾虚痰湿证的疗效及对肠-脑轴调节作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(13): 145-151.
- [16] 冉雪梦. 基于窠囊论治肥胖型多囊卵巢综合征[J]. *中医药通报*, 2022, 21(4): 29-31.
- [17] 李樊, 李隐侠, 舒嘉傲, 等. 热应激通过钙信号调控卵巢颗粒细胞凋亡和雌激素合成[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(5): 1278-1285.
- [18] 毕晓英, 许珂, 赵艳晓, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 通路研究杜仲总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平及卵巢组织自噬的影响[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(1): 82-86.
- [19] 张萍, 王维斌, 邵岩飞, 等. 二陈汤对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(11): 941-950.
- [20] WANG M, XIA L, FU G. Lipopolysaccharide pretreatment

inhibits oxidative stress-induced endothelial progenitor cell apoptosis via a TLR4-mediated PI3K/Akt/NF- κ B p65 signaling pathway [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2019, 65(4):101-106.

[21] QIU Z, DONG J, XUE C, et al. Liuwei Dihuang Pills alleviate the polycystic ovary syndrome with improved insulin sensitivity through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 111965. doi: 10.1016/j.jep. 2019. 111965.

[22] XIONG H, HU Q, JIANG Q. Protective effects of lido-

caine on polycystic ovary syndrome through modulating ovarian granulosa cell physiology via PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cytotechnology*, 2022, 74(2):283-292.

[23] 王毅, 王海娇, 祁麟, 等. 桃核承气汤对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 [J]. *天津医药*, 2023, 51(6):596-601.

[24] 李建南, 于凤英, 沈欢欢, 等. 桂枝茯苓丸联合西医药物治疗多囊卵巢综合征的疗效及对 PI3K/AKT/mTOR 通路的调节作用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2023, 15(2): 197-200, 204.

Effects of *Jianpi Yishen Huazhuo Formula* (健脾益肾化浊方) on Ovarian Granulosa Cell Apoptosis Protein and PI3K/AKT/mTOR Pathway in Polycystic Ovary Syndrome Model Rats

CHEN Miao^{1,2}, MA Huiming³, FENG Yahong⁴, ZHANG Xiaojing⁴, CHEN Dongmei⁵, LUO Jiaqi^{1,2}, DU Xiaoli^{1,2}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004; 2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Research on High Incidence Disease, Ningxia Regional; 3. Key Laboratory of Fertility Maintenance of Ministry of Education, Ningxia Medical University; 4. Ningxia Chinese Medicine Research Center; 5. Ningxia Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Jianpi Yishen Huazhuo Formula* (健脾益肾化浊方, JYHF) in treating polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** Seventy SD female rats were randomly divided into blank group and model group with 15 rats each, metformin group, JYHF low-, medium- and high-dose groups with 10 rats each. Except for the blank group, all the other groups were fed with letrozole orally combined with high-fat diet for 21 days to establish the PCOS model. After successful modeling, the blank group and the model group were intragastrically administered with 10 ml/(kg·d) of normal saline, while the metformin group was administered with 100 mg/(kg·d) of metformin hydrochloride tablets by gavage, and the JYHF low-, medium- and high-dose groups were administered intragastrically with 1.275, 2.55, and 5.10 g/(kg·d) of JYHF suspension respectively, all for 30 days. The ovaries were weighed and the ovarian index was calculated, and serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T), anti-Müllerian hormone (AMH) and estradiol (E_2) levels were measured through ELISA. HE staining was used to observe the morphological changes of ovarian tissue. Immunohistochemical staining was used to detect caspase-3, caspase-9 and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), mammalian target of rapamycin (mTOR) protein positive expression. Western blot was performed to detect relative expressions of rat ovarian tissue pro-apoptotic protein (BAX), anti-apoptotic protein (Bcl-2), Caspase-9, Cytochrome-C, PI3K, AKT, and mTOR proteins. **Results** Compared to those in the blank group, the ovarian tissue of the rats in the model group was dominated by cystic dilated follicles, and the granulosa cell layer was reduced, with obvious interstitial hyperplasia; the ovarian index, serum T, LH, AMH, as well as Caspase-3 and Caspase-9 average optical density, BAX/Bcl-2 value, the relative expression of Cytochrome-C and Caspase-9 proteins significantly increased, while serum E_2 and FSH levels, average optical density and protein expression of PI3K, AKT, mTOR in ovarian tissue significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the polycystic changes of ovarian tissue in all JYHF groups and the metformin group were improved, with follicles and corpus luteum at all levels seen, and the granulosa cell layer thickened; the ovarian index, serum LH, AMH, average optical density and relative protein expression of Caspase-9 in the ovarian tissue were significantly reduced, while serum E_2 , FSH, average optical density of PI3K and AKT in the ovarian tissue, and relative protein expression of PI3K, AKT and mTOR significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The serum T level and Caspase-3 average optical density in the metformin group and JYHF medium- and high-dose groups were reduced than those in the model group, while mTOR average optical density increased significantly, and BAX/Bcl-2 value decreased in the JYHF low- and high-dose groups and metformin group than the model group; the expression of Cytochrome-C protein in ovarian tissue significantly decreased in the metformin group and JYHF high-dose group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the metformin group, the low-dose JYHF group had a significantly higher serum T level, and the medium-dose JYHF group had a significantly higher BAX/Bcl-2 value ($P < 0.05$); the expression of Cytochrome-C protein in the high-dose JYHF group was significantly lower than that in the medium-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** JYHF can inhibit the expression of apoptotic protein in ovarian granulosa cells of PCOS rats, thereby maintaining endocrine balance and improving ovarian reproductive function. The mechanism may be related to the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords polycystic ovary syndrome; *Jianpi Yishen Huazhuo Formula* (健脾益肾化浊方); granulosa cells; apoptosis; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

(收稿日期: 2023-02-13; 修回日期: 2023-04-19)

[编辑: 王利芬]