

引用:肖潇,滕秀香,危一飞,佟庆.益肾疏肝汤介导AMPK/PINK1/Parkin信号通路调控线粒体自噬修复DOR大鼠卵巢损伤的机制研究[J].中医导报,2025,31(11):20-25,50.

# 益肾疏肝汤介导AMPK/PINK1/Parkin信号通路调控线粒体自噬修复DOR大鼠卵巢损伤的机制研究\*

肖 潇<sup>1</sup>,滕秀香<sup>1</sup>,危一飞<sup>2</sup>,佟 庆<sup>1</sup>

(1.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010;

2.中国中医科学院望京医院,北京 100102)

**[摘要]** 目的:观察益肾疏肝汤对雷公藤所致卵巢储备功能减退(DOR)模型大鼠卵巢损伤的修复作用并探讨其机制。方法:32只SD大鼠随机分为空白组8只和造模组24只,予雷公藤制备DOR模型,成模后将造模组大鼠再随机分为模型组、中药组和西药组,每组8只。中药组予益肾疏肝汤灌胃,西药组予戊酸雌二醇药液灌胃,空白组和模型组予等体积生理盐水灌胃,连续15 d。观察大鼠动情周期,计算卵巢指数和子宫指数;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清抗米勒管激素(AMH)、卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E<sub>2</sub>)水平;HE染色观察卵巢组织形态;比色法检测卵巢中过氧化氢酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量;免疫组化法检测卵巢颗粒细胞中线粒体自噬相关蛋白的表达;蛋白质印迹法(Western blotting)检测卵巢组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/PTEN诱导假定激酶1(PINK1)/帕金森病蛋白2(Parkin)信号通路相关蛋白的表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠动情周期延长、紊乱,性腺指数显著降低;FSH水平显著升高,AMH、E<sub>2</sub>水平显著降低;卵巢组织病理切片显示生长卵泡数量明显减少,闭锁卵泡数量增多,SOD活性显著降低,MDA含量显著升高;卵巢颗粒细胞中微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)蛋白表达光密度(OD)值明显上升,PINK1、Parkin明显下降;AMPK、PINK1、Parkin蛋白相对表达量均明显降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,中药组、西药组SD大鼠动情周期缩短、趋于正常,性腺指数升高,血清FSH水平显著下降;AMH、E<sub>2</sub>水平显著提高;卵巢组织病理切片提示卵泡数目增多,损伤减少,SOD活性显著升高,MDA含量显著下降。卵巢颗粒细胞中LC3B蛋白OD值明显下降,PINK1、Parkin明显上升;AMPK、PINK1、Parkin蛋白相对表达量均明显上升( $P<0.05$ )。与中药组比较,西药组大鼠血清E<sub>2</sub>含量上升,卵巢LC3B蛋白OD值增加,卵巢组织中的AMPK、Parkin蛋白相对表达量下降( $P<0.01$ ),其余指标未见差异。结论:益肾疏肝汤能改善DOR模型大鼠卵巢受损状态,提高卵巢储备,其机制可能与激活AMPK/PINK1/Parkin信号通路、激活卵巢颗粒细胞线粒体自噬有关。

**[关键词]** 卵巢储备功能减退;益肾疏肝汤;线粒体自噬;AMPK/PINK1/Parkin;大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)11-0020-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.11.004

## Mechanism of Yishen Shugan Decoction (益肾疏肝汤) in Repairing Ovarian Injury in DOR Rats by Regulating Mitophagy via the AMPK/PINK1/Parkin Signaling Pathway

XIAO Xiao<sup>1</sup>, TENG Xiuxiang<sup>1</sup>, WEI Yifei<sup>2</sup>, TONG Qing<sup>1</sup>

(1.Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China;

2.Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** Objective: To observe the repair effects of Yishen Shugan decoction on ovarian damage in a rat model of diminished ovarian reserve (DOR) induced by tripterygium glycosides and to explore its underlying

\*基金项目:国家自然科学基金项目(81904241);国家重点研发计划-中医药现代化(2024YFC3505801);北京市中医药科技发展资金项目(BJZYQN-2025-33);首都医科大学附属北京中医医院青年创新项目(2024-0004)

通信作者:佟庆,女,教授,研究方向为中西医结合治疗妇科生殖内分泌疾病

mechanisms. Methods: A total of 32 SD rats were randomly divided into control group ( $n=8$ ) and model establishment group ( $n=24$ ). The DOR model was established using tripterygium glycosides. After successful modeling, the model establishment group was further randomized into model group, Chinese medicine (Yishen Shugan decoction) group, and Western medicine (estradiol valerate) group, with 8 rats in each. The Chinese medicine group received Yishen Shugan decoction via intragastric administration, and the Western medicine group received estradiol valerate solution. The control group and model group received an equal volume of saline for 15 consecutive days. Ovarian injury repair was assessed by observing estrous cycles, calculating ovarian and uterine indices, measuring serum anti-Müllerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), and estradiol ( $E_2$ ) levels via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), analyzing ovarian histopathology via hematoxylin-eosin (HE) staining, evaluating superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in ovarian tissues using colorimetric assays, detecting mitochondrial autophagy-related protein expression in ovarian granulosa cells via immunohistochemistry, and analyzing adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkinson disease protein 2 (Parkin) signaling pathway via Western blotting. Results: Compared with the control group, the model group exhibited prolonged and irregular estrous cycles, significantly reduced ovarian and uterine indices, elevated FSH levels, decreased AMH and  $E_2$  levels, reduced ovarian follicular development with increased atretic follicles, decreased SOD activity, increased MDA content, upregulated LC3B protein expression, down-regulated PINK1 and Parkin protein expression, and reduced AMPK, PINK1 and Parkin protein levels ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the Chinese medicine group and Western medicine group showed improved estrous cycles, increased ovarian and uterine indices, reduced FSH levels, elevated AMH and  $E_2$  levels, enhanced ovarian follicular development, reduced ovarian damage, increased SOD activity, decreased MDA content, reduced LC3B expression, increased PINK1 and Parkin expression, and up-regulated AMPK, PINK1 and Parkin protein levels ( $P<0.05$ ). Compared with the Chinese medicine group, the Western medicine group showed higher  $E_2$  level, increased LC3B expression, and reduced AMPK and Parkin protein levels ( $P<0.01$ ), with no significant differences in other parameters. Conclusion: Yishen Shugan decoction can alleviate ovarian damage and improves ovarian reserve in DOR rats by activating the AMPK/PINK1/Parkin signaling pathway, thereby promoting mitochondrial autophagy in ovarian granulosa cells.

[Keywords] decreased ovarian reserve function; Yishen Shugan decoction; mitophagy; AMPK/PINK1/Parkin; rat

卵巢储备功能减退(decreased ovarian reserve, DOR)是妇科常见病、疑难病<sup>[1]</sup>。DOR以生育能力减低、月经紊乱、性激素波动为临床表现<sup>[2]</sup>, 给女性的生殖和身心健康造成了严重影响。目前临床尚无DOR切实有效的治疗方法, 中医药治疗DOR具有一定优势。益肾疏肝汤是国医大师柴嵩岩治疗DOR的学术思想精华, 并经多年临床验证。前期临床研究发现益肾疏肝汤治疗DOR有效, 不仅可显著改善患者临床症状, 还能调节性激素水平, 保护卵巢储备<sup>[3-6]</sup>。然而, 其治疗DOR的现代药理学机制尚不清楚。为探讨益肾疏肝汤治疗DOR的作用机制, 本研究通过动物实验探究益肾疏肝汤介导AMPK/PINK1/Parkin信号通路调控线粒体自噬改善DOR大鼠卵巢损伤的机制, 旨在为益肾疏肝汤治疗DOR提供理论依据, 并为益肾疏肝汤的深入研究和临床应用提供学术基础。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级健康雌性SD大鼠32只, 12周龄, 体重(180±20)g, 购于北京维通利华动物实验技术有限公司。动物生产许可证号: SCXK(京)2021-0006。动物质量合格证号: 110011240610625349。大鼠饲养于中国中医科学院实验动物中心, 3只/笼, 室温控制在22~26℃, 湿度为40%~50%, 昼夜

交替照明, 给予充足的饮水和食物, 自由摄食饮水。本实验由首都医科大学附属北京中医医院动物伦理委员会审查批准(审批号: 2024-02-70)。

1.2 药物 益肾疏肝汤(女贞子15g, 熟地黄10g, 墨旱莲15g, 北沙参20g, 石斛10g, 续断15g, 桑寄生15g, 菟丝子15g, 酒白芍10g, 月季花6g, 柴胡5g, 白梅花10g, 丹参10g, 桃仁10g, 瞿麦6g, 葛根6g, 甘草6g)饮片购于首都医科大学附属北京中医医院, 经北京中医药研究所韩旭阳副主任药师鉴定为正品。上述饮片按常规方法水煎、浓缩, 配制成益肾疏肝汤药液, 生药质量浓度为1.92g/mL。戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司, 1mg/片, 批号: H20120369), 用蒸馏水配成质量浓度为0.01mg/mL的混悬液。雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司, 10mg/片, 批号: 240102), 用蒸馏水配成质量浓度为5mg/mL的混悬液。

1.3 试剂 卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号: 20230401001)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)ELISA试剂盒(批号: 20230401002)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)ELISA试剂盒(批号: 20230401003)均

购自南京建成生物工程研究所;雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)ELISA试剂盒(批号:L20230615001)、抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)ELISA试剂盒(批号:L20230615002)均购自武汉云克隆科技股份有限公司;HE染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:2023061234);PINK1抗体(批号:23274-1-AR)、Parkin抗体(批号:14060-1-AP)、LC3B抗体(批号:14600-1-AP)、AMPK抗体(批号:GR320123-4)均购自英国Abcam公司;GAPDH抗体(杭州贤至生物科技有限公司,批号:20230615001)。

1.4 主要仪器 共聚焦显微镜(德国Zeiss公司,型号:LSM 780);台式玻片扫描机(德国Leica公司,型号:Aperio CS2);蛋白质印迹法(Western blotting)电泳系统(美国Bio-rad公司);高速冷冻离心机(美国Thermo fisher公司,型号:FRESCO 21);水平脱色摇床(北京六一生物科技有限公司,型号:WD-9405C)。

1.5 分组及造模 32只大鼠适应性喂养7 d,采用随机数字表法分成空白组8只、造模组24只。空白组大鼠不予处理,造模组大鼠予雷公藤多苷片混悬液(50 mg/kg)灌胃14 d,1次/d<sup>[7-8]</sup>。造模结束后次日(第15日),观察大鼠阴道涂片,出现某一周期时间延长、周期紊乱表现,表明造模成功。将24只成模大鼠随机分为模型组、中药组、西药组,每组8只。造模成功后次日(第16日)开始给药。根据人和动物体表面积折算的等效剂量计算,中药组予益肾疏肝汤药液(16.38 g/kg)灌胃(相当于临床等效剂量),西药组予戊酸雌二醇药液(0.1 mg/kg)灌胃,空白组和模型组予0.9%氯化钠注射液3 mL灌胃,1次/d,连续15 d。

1.6 取材 0.3%戊巴比妥钠(10 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血2 mL,室温静置30 min,4 ℃、1 500×g离心15 min,取上清液,于-20 ℃保存备用。颈椎脱臼处死大鼠,无菌条件下取出子宫、卵巢并称重,左侧卵巢冰浴,右侧卵巢分为两部分,一部分卵巢置于10%中性甲醛溶液中浸泡,另一部分卵巢放于-80 ℃冰箱备用。

## 1.7 观察指标

1.7.1 大鼠动情周期 细棉签蘸取0.9%氯化钠注射液,大鼠阴道内轻旋转2圈,阴道涂片。风干后,将涂片置于苏木素染料中浸泡3 min,流水冲洗,浸泡于1%盐酸酒精溶液中分化10 s,流水冲洗,伊红染料中浸泡1 min,水洗。显微镜下观察脱落细胞的种类和形态,判断SD大鼠动情周期。记录造模期和给药期动情次数。

1.7.2 性腺指数 根据末次称量时大鼠子宫、卵巢湿质量、体质量计算性腺指数。卵巢指数=双侧卵巢湿质量/体质量。子宫指数=子宫湿质量/体质量。

1.7.3 血清性激素水平 采用ELISA检测血清AMH、FSH、E<sub>2</sub>含量,严格按试剂盒说明书操作。

1.7.4 卵巢形态学观察 卵巢用10%中性甲醛固定24 h,石蜡包埋,制成5 μm切片,HE染色后,显微镜观察卵巢形态、各级卵泡数目,采用ImageScope软件记录。

1.7.5 卵巢组织中SOD活性和MDA水平 取各组大鼠卵巢组织,每组6份,冰浴条件下加入0.9%氯化钠注射液,匀浆、离心后,吸取裂解液,采用SOD测定试剂盒检测SOD活性,MDA测定试剂盒检测MDA水平,采用酶标仪于532 nm处检测各管吸

光度值。

1.7.6 免疫组化法检测PINK1、Parkin、LC3自噬相关蛋白的表达 每组6份卵巢组织石蜡切片脱蜡、抗原修复,洗涤、封闭。吸尽卵巢组织表面的封闭液,立即滴加稀释好的PINK1(1:2 000)、Parkin(1:200)、LC3(1:200)一抗,置于4 ℃冰箱中孵育过夜。PBS洗涤3次,5 min/次,滴加含3%FBS的PBST按1:75稀释二抗,37 ℃孵育1 h。DAB显色、染色、脱水、封片。通过光学显微镜采集20倍放大的数码图像,阳性细胞的细胞质呈棕色染色。分别计算PINK1、Parkin、LC3的表达情况,利用Image-pro plus软件分析各切片的积分光密度(integrated optical density, IOD)值。

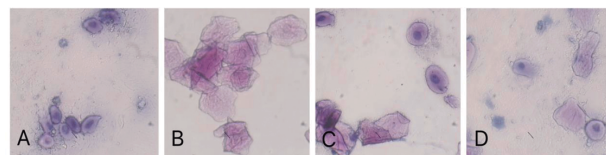
1.7.7 Western blotting检测AMPK、PINK1、Parkin相关蛋白的表达 加入RIPA裂解液提取卵巢组织蛋白(每组6份),BCA法测定蛋白浓度,蛋白浓度调整为2 μg/μL,上样,凝胶电泳,转膜,封闭,加入AMPK、PINK1、Parkin一抗(稀释比例均为1:1 000),4 ℃水平摇床孵育过夜,TBST洗膜,加二抗,室温孵育60 min,TBST洗膜,化学发光、显影成像,以GAPDH为内参,应用Image J软件对条带进行灰度分析。

1.8 统计学方法 采用SPSS 25.0统计软件进行数据统计。计量资料均呈正态分布,采用“均数±标准差”(x̄±s)描述,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD检验;计数资料组间比较选用χ<sup>2</sup>检验。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结 果

实验过程中各组大鼠均无死亡。空白组大鼠状态良好,被毛光滑,饮食正常;模型组大鼠精神状态差,被毛稀松,饮食减少;中药组、西药组大鼠上述表现较模型组有所改善,精神状态转佳,被毛逐渐光滑,饮食量增加。

2.1 动情周期 各组大鼠阴道脱落细胞涂片、染色,评价动情周期效果满意。造模结束后,与空白组比较,其余3组大鼠动情次数明显减少(P<0.01)。给药结束后,与空白组比较,模型组大鼠动情次数仍明显减少(P<0.01);与模型组比较,中药组、西药组大鼠动情次数增加(P<0.05);中药组与西药组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。(见图1、表1)



注:A.动情前期;B.动情期;C.动情后期;D.动情间期。

图1 大鼠阴道脱落细胞 (HE染色,×400)

表1 各组大鼠动情周期紊乱情况

组别	n	第1-15天					第16-30天				
		正常	延长	停滞	无周期	紊乱比例/%	正常	延长	停滞	无周期	紊乱比例/%
空白组	8	7	1	0	0	12.5	7	1	0	0	12.5
模型组	8	0	3	4	1	100.0 <sup>a</sup>	0	4	3	1	100.0 <sup>a</sup>
中药组	8	0	3	3	2	100.0 <sup>a</sup>	5	2	1	0	37.5 <sup>ab</sup>
西药组	8	0	2	4	2	100.0 <sup>a</sup>	4	2	1	1	50.0 <sup>ab</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>P<0.05。

2.2 性腺指数 与空白组比较,模型组大鼠卵巢指数、子宫

指数明显降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药组、西药组大鼠卵巢指数、子宫指数升高( $P<0.05$ );中药组与西药组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(见表2)

表2 各组大鼠性腺指数比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,mg/g)

组别	<i>n</i>	卵巢指数	子宫指数
空白组	8	0.62±0.11	2.63±0.57
模型组	8	0.38±0.02 <sup>a</sup>	1.84±0.15 <sup>a</sup>
中药组	8	0.59±0.01 <sup>b</sup>	2.36±0.46 <sup>b</sup>
西药组	8	0.54±0.10 <sup>b</sup>	2.30±0.12 <sup>b</sup>
<i>F</i>		12.820	5.974
<i>P</i>		0.000	0.003

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

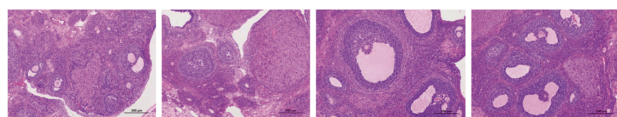
2.3 血清性激素水平 与空白组比较,模型组大鼠血清AMH、E<sub>2</sub>含量明显减少( $P<0.01$ ),FSH含量明显增加( $P<0.01$ );与模型组比较,中药组、西药组大鼠血清AMH、E<sub>2</sub>含量明显增加( $P<0.01$ ),FSH含量明显减少( $P<0.01$ );与中药组比较,西药组大鼠血清AMH含量降低,E<sub>2</sub>含量上升( $P<0.05$ ),FSH水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(见表3)

表3 各组大鼠血清AMH、FSH、E<sub>2</sub>水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	AMH/(pg/mL)	FSH/(mIU/mL)	E <sub>2</sub> /(pg/mL)
空白组	8	0.84±0.02	0.52±0.06	1.93±0.21
模型组	8	0.62±0.05 <sup>a</sup>	0.89±0.11 <sup>a</sup>	1.26±0.09 <sup>a</sup>
中药组	8	0.74±0.04 <sup>ab</sup>	0.72±0.10 <sup>ab</sup>	1.51±0.13 <sup>b</sup>
西药组	8	0.69±0.08 <sup>abc</sup>	0.68±0.04 <sup>ab</sup>	1.68±0.08 <sup>abc</sup>
<i>F</i>		26.946	27.142	33.090
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与中药组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

2.4 卵巢组织形态 空白组大鼠卵巢结构清晰,各级卵泡发育良好,成熟卵泡中可见卵母细胞完整,卵泡液及颗粒细胞层次多,间质未见典型炎症细胞浸润及纤维化;模型组大鼠卵巢结构紊乱,各级卵泡数目均明显减少,发育不良,闭锁卵泡数增多,未见成熟卵泡,卵泡液少,颗粒细胞层次明显减少且排列紊乱,间质见大量炎症细胞浸润及纤维化;中药组大鼠卵巢组织病理形态明显改善,各级卵泡数增加,闭锁卵泡明显减少,可见完整的卵母细胞,卵泡液含量、颗粒细胞层次均增多;西药组大鼠卵巢组织病理形态较模型组稍有改善,闭锁卵泡减少,卵泡液含量、颗粒细胞层次均增多,间质见少量炎症细胞浸润及纤维化。(见图2)



空白组 模型组 中药组 西药组

图2 各组大鼠卵巢组织形态 (HE染色,×100)

2.5 卵巢组织中SOD活性和MDA水平 与空白组比较,模型组大鼠卵巢SOD活性明显降低( $P<0.01$ ),MDA水平明显增加( $P<0.01$ );与模型组比较,中药组、西药组大鼠血清SOD活性明显增加( $P<0.01$ ),中药组MDA水平明显减少( $P<0.01$ );与中

药组比较,西药组大鼠SOD活性降低( $P<0.05$ ),MDA水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。(见表4)

表4 各组大鼠卵巢中SOD活性、MDA水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mL)
空白组	6	58.42±3.82	0.62±0.21
模型组	6	36.57±0.32 <sup>a</sup>	0.99±0.29 <sup>a</sup>
中药组	6	49.71±1.24 <sup>ac</sup>	0.72±0.14 <sup>b</sup>
西药组	6	46.29±0.88 <sup>acd</sup>	0.78±0.08 <sup>b</sup>
<i>F</i>		115.350	3.730
<i>P</i>		0.000	0.028

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与中药组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

2.6 卵巢组织中线粒体自噬相关蛋白阳性表达IOD值 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织LC3B蛋白阳性表达IOD值明显增加,PINK1、Parkin蛋白阳性表达IOD值明显减少( $P<0.01$ );与模型组比较,中药组及西药组卵巢LC3B蛋白阳性表达IOD值明显减少,PINK1、Parkin蛋白阳性表达IOD值明显增加。与中药组比较,西药组卵巢LC3B蛋白阳性表达IOD值增加,PINK1、Parkin蛋白阳性表达组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。(见表5、图3)

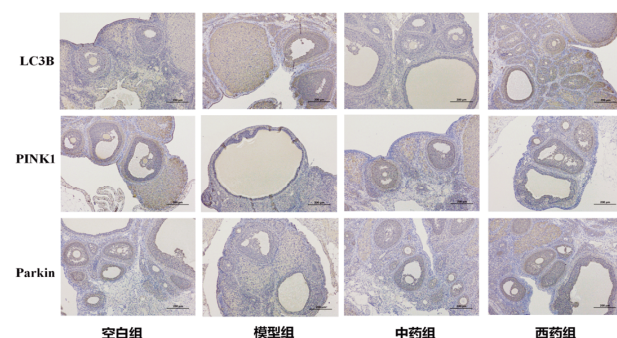


图3 各组大鼠卵巢组织线粒体自噬相关蛋白阳性表达情况 (IHC,×100)

表5 各组大鼠卵巢组织中PINK1、Parkin、LC3B蛋白阳性表达IOD值比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,×10<sup>4</sup>)

组别	<i>n</i>	LC3B	PINK1	Parkin
空白组	6	6.66±0.79	17.11±3.01	19.34±3.34
模型组	6	14.67±0.64 <sup>b</sup>	5.68±0.79 <sup>b</sup>	7.84±1.54 <sup>b</sup>
中药组	6	9.64±2.19 <sup>bc</sup>	13.09±1.78 <sup>c</sup>	13.42±1.95 <sup>bc</sup>
西药组	6	11.06±1.40 <sup>cd</sup>	12.34±1.24 <sup>ac</sup>	13.11±1.14 <sup>bc</sup>
<i>F</i>		33.951	36.806	24.008
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与中药组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

2.7 卵巢组织中AMPK、PINK1、Parkin相关蛋白相对表达水平 与空白组比较,模型组卵巢组织中AMPK、PINK1、Parkin蛋白的相对表达量显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,中药组及西药组卵巢组织中的AMPK、PINK1、Parkin蛋白相对表达量显著升高( $P<0.01$ )。与中药组比较,西药组卵巢组织中的AMPK、Parkin蛋白相对表达量下降( $P<0.05$ )。(见表6、图4)



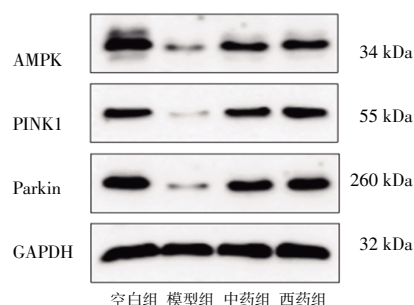


图4 大鼠卵巢 AMPK、PINK1、Parkin 表达水平表达

表6 大鼠卵巢组织 AMPK、PINK1、Parkin 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AMPK/GAPDH	PINK1/GAPDH	Parkin/GAPDH
空白组	6	1.08±0.05	0.76±0.11	0.96±0.21
模型组	6	0.45±0.11 <sup>b</sup>	0.29±0.05 <sup>b</sup>	0.32±0.05 <sup>b</sup>
中药组	6	0.89±0.05 <sup>ac</sup>	0.66±0.12 <sup>c</sup>	0.82±0.15 <sup>ac</sup>
西药组	6	0.80±0.05 <sup>bcd</sup>	0.61±0.09 <sup>c</sup>	0.71±0.12 <sup>acd</sup>
F		91.341	18.110	23.511
P		0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与中药组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

DOR主要表现为卵泡数量减少或卵泡闭锁,其本质是卵巢微环境中卵泡发育潜能衰退,核心环节包括卵母细胞质量下降、颗粒细胞凋亡增加及卵泡闭锁加速。其发病机制与氧化应激、线粒体功能障碍及细胞程序性死亡密切相关,其中,线粒体功能障碍又是氧化应激及细胞程序性死亡的关键诱发因素。近年研究表明,线粒体功能障碍是DOR的关键病理基础。线粒体作为细胞的“能量工厂”,卵巢[尤其卵母细胞与颗粒细胞(GCs)]对线粒体功能高度依赖——卵母细胞需大量三磷酸腺苷(ATP)[支持减数分裂,GCs需通过线粒体代谢维持激素合成及旁分泌支持。DOR状态下,线粒体出现结构异常(肿胀、嵴断裂)、功能紊乱[ATP生成减少、活性氧(ROS)蓄积],导致卵母细胞减数分裂阻滞、染色体分离异常(非整倍体率升高);GCs凋亡增加(线粒体膜电位降低触发Caspase级联反应);卵泡微环境恶化(炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 分泌增多),最终加速卵泡闭锁与卵巢储备耗竭。

线粒体自噬是调控线粒体功能的关键机制,可选择性清除受损或功能失调的线粒体,调控线粒体稳态、线粒体质量和能量稳态,从而调节线粒体功能障碍,进而减少氧化应激反应,保护甚至恢复受损卵巢<sup>[9-10]</sup>。其激活依赖经典的AMPK/PINK1/Parkin信号通路。

AMPK是细胞能量稳态的核心调控因子,由 $\alpha$ 催化亚基和 $\beta$ 、 $\gamma$ 调节亚基组成,其通过感知细胞内AMP/ATP比值变化而被激活,在能量匮乏时促进分解代谢、抑制合成代谢以维持能量平衡<sup>[11]</sup>。近年研究发现,AMPK除代谢调控外,还可通过磷酸化ULK1等关键节点激活线粒体自噬<sup>[12-13]</sup>,并通过调控线粒体分裂蛋白动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1,DRP1)增强线粒体分裂,为线粒体自噬提供结构基础<sup>[7,14]</sup>。PINK1/Parkin介导线粒体自噬维持线粒体稳态,AMPK通过双重途径调控

PINK1/Parkin通路:一方面,AMPK直接磷酸化PINK1,促进其在线粒体外膜的稳定聚集<sup>[8]</sup>;另一方面,AMPK激活Unc-51样激酶1复合物,通过Unc-51样激酶1介导的AMPK-Parkin相互作用增强Parkin的线粒体转位效率<sup>[12-13]</sup>。活化的Parkin通过泛素化线粒体膜蛋白形成泛素链,募集自噬受体蛋白OPTN和核域10蛋白52(nuclear domain 10 protein 52,NDP52),最终通过LC3介导的自噬体完成受损线粒体的清除。该通路构成AMPK/PINK1/Parkin轴,成为调控线粒体质量控制的关键信号网络<sup>[13]</sup>。针对该通路的干预在骨科、肾脏、消化等疾病领域的效果已得到证实<sup>[15-18]</sup>。在妇科卵巢疾病领域,相关文献显示对AMPK通路的激活具有促进自噬保护卵巢的作用,针对PINK1/Parkin通路的激活也被发现有相同作用<sup>[19-20]</sup>,但尚无文献证实激活AMPK/PINK1/Parkin轴可以促进线粒体自噬改善卵巢功能。但鉴于该通路在其他疾病领域已得到验证,针对该通路的干预在妇科疾病治疗中应具有潜力。

中医中虽无DOR的病名,但可归属于“月经过少”“不孕”等疾病范畴。柴嵩岩教授认为肾虚是DOR发病的根本原因,肾虚肝郁证为DOR的常见证型。益肾疏肝汤源是其治疗DOR多年的临床积累。该方补肾疏肝的同时可养血柔肝、调和阴阳。肾阴主静,主抑制,主滋润;肾阳主动,主推动,主温煦。肾阴阳平衡与自噬的平衡调节不谋而合,线粒体自噬可能是肾阴阳调控状态的微观体现。现代药理学研究发现,益肾疏肝汤中有效成分可激活线粒体自噬<sup>[21-22]</sup>。鉴于此,我们推测益肾疏肝汤可能通过调节线粒体自噬相关因子表达→减少卵巢氧化应激反应→修复受损卵巢→提高卵巢储备功能→治疗DOR,并通过本研究加以验证。

本研究采用雷公藤多苷片混悬液灌胃制备大鼠DOR模型,造模后SD大鼠精神状态差、动情周期紊乱,性腺指数下降,血清AMH、E<sub>2</sub>水平下降,FSH水平升高,各级卵泡数目明显减少,大量卵泡闭锁,SOD活性降低,MDA升高,DOR造模效果满意。经益肾疏肝汤干预后,DOR大鼠精神状态转佳,动情周期缩短并趋于正常,性腺指数较前提高;大鼠血清AMH、E<sub>2</sub>水平显著升高,FSH水平显著下降,大鼠卵巢结构较前恢复,SOD活性增加,MDA水平下降,均提示了益肾疏肝汤可以调节性腺轴,有效地改善DOR大鼠性激素水平,减少氧化应激反应,修复受损卵巢。其中,益肾疏肝汤在提高AMH水平方面较戊酸雌二醇更具优势。这与其他补肾疏肝类中药治疗DOR实验结果一致<sup>[23-25]</sup>。

免疫组化及Western blotting结果均提示,雷公藤多苷干预后,大鼠LC3B蛋白表达明显增加,PINK1、Parkin蛋白IOD值明显减少( $P<0.01$ ),这提示DOR大鼠线粒体自噬受到抑制。益肾疏肝汤干预后,卵巢LC3B蛋白表达明显减少,PINK1、Parkin蛋白表达明显增加。其中LC3B减少提示自噬流畅通:在完整的线粒体自噬过程中,自噬体与溶酶体融合后,LC3B会被溶酶体水解酶降解(LC3B-II→LC3B-I),因此LC3B蛋白减少可能反映自噬体成功与溶酶体融合,受损线粒体被有效降解(即“自噬完成”)。这与益肾疏肝汤“促进线粒体自噬”的目标一致。PINK1/Parkin表达升高直接提示线粒体自噬启动信号的增强。DOR大鼠卵巢线粒体因功能障碍(如ATP减

少、ROS蓄积)可导致膜电位降低。其途径可能为:(1)上游调控AMPK:AMPK是线粒体自噬的关键上游激酶,可通过抑制mTOR(自噬负调控因子)并磷酸化PINK1(丝氨酸102/105位点)稳定其在线粒体外膜的定位。益肾疏肝汤可能通过调节能量代谢(如改善线粒体ATP合成)或直接激活AMPK,促进PINK1的稳定积累。(2)下游促进Parkin招募:PINK1积累后招募Parkin至线粒体外膜,催化外膜蛋白泛素化。以上提示益肾疏肝汤可激活AMPK/PINK1/Parkin信号通路相关蛋白表达,促进线粒体自噬、改善线粒体功能,可能较戊酸雌二醇更具优势。这与研究<sup>[26-28]</sup>结果基本一致。

综上,益肾疏肝汤可恢复DOR模型大鼠动情周期,提高性腺指数,调节血清性激素水平,改善DOR大鼠氧化应激状态,修复卵巢损伤,提高卵巢储备功能,其机制与介导AMPK/PINK1/Parkin信号通路,激活线粒体自噬有关。

### 参考文献

- [1] JIAO Z X, BUKULMEZ O. Potential roles of experimental reproductive technologies in infertile women with diminished ovarian reserve[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(10): 2507-2517.
- [2] 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识专家组, 中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 卵巢储备功能减退临床诊治专家共识[J]. *生殖医学杂志*, 2022, 31(4): 425-434.
- [3] 肖潇, 刘艳霞, 邢玉, 等. 益肾疏肝汤治疗卵巢储备功能下降所致月经过少病[J]. *中医学报*, 2023, 38(3): 616-621.
- [4] 肖潇, 刘艳霞, 孙文华, 等. 补肾疏肝法治疗月经过少肾虚肝郁证的临床研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(2): 145-149, 154.
- [5] 滕秀香, 姚海洋. 益肾疏肝汤治疗卵巢早衰肾虚肝郁证小样本前瞻性临床研究[J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(11): 104-106.
- [6] 滕秀香, 李培培, 姚海洋, 等. “益肾疏肝汤”联合人工周期疗法治疗卵巢早衰肾虚肝郁证的临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(1): 93-96.
- [7] WANG Z Y, YANG T, ZENG M M, et al. Miquelianin in Folium Nelumbinis extract promotes white-to-beige fat conversion via blocking AMPK/DRP1/mitophagy and modulating gut microbiota in HFD-fed mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 181: 114089.
- [8] EGAN DF, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy[J]. *Science*, 2011, 331(6016): 456-461.
- [9] ASHRAF R, KUMAR S. Mfn2-mediated mitochondrial fusion promotes autophagy and suppresses ovarian cancer progression by reducing ROS through AMPK/mTOR/ERK signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11): 573.
- [10] LIN M L, HUA R, MA J, et al. Bisphenol A promotes autophagy in ovarian granulosa cells by inducing AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathway[J]. *Environ Int*, 2021, 147: 106298.
- [11] HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: An energy sensor that regulates all aspects of cell function[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1895-1908.
- [12] IORIO R, CELENZA G, PETRICCA S. Mitophagy: Molecular mechanisms, new concepts on parkin activation and the emerging role of AMPK/ULK1 axis[J]. *Cells*, 2021, 11(1): 30.
- [13] GONG J Q, GU H F, ZHAO L, et al. Phosphorylation of ULK1 by AMPK is essential for mouse embryonic stem cell self-renewal and pluripotency[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 38.
- [14] WU Q, LIU J, MAO Z G, et al. Ligustilide attenuates ischemic stroke injury by promoting Drp1-mediated mitochondrial fission via activation of AMPK[J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153884.
- [15] 杨红, 杨惠, 陈永鑫, 等. 基于PINK1/Parkin/铁死亡信号探讨艳山姜挥发油防治糖尿病肾病的作用机制[J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(17): 2338-2344.
- [16] JIN Z Z, CHANG B H, WEI Y L, et al. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113092.
- [17] ZHOU J W, MENG L C, HE Z Q, et al. Melatonin exerts a protective effect in ameliorating nephrolithiasis via targeting AMPK/PINK1-Parkin mediated mitophagy and inhibiting ferroptosis in vivo and in vitro[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110801.
- [18] CAO S T, XIAO H, LI X, et al. AMPK-PINK1/parkin mediated mitophagy is necessary for alleviating oxidative stress-induced intestinal epithelial barrier damage and mitochondrial energy metabolism dysfunction in IPEC-J2[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(12): 2010.
- [19] XU G Q, DONG Y, WANG Z, et al. Melatonin attenuates oxidative stress-induced apoptosis of bovine ovarian granulosa cells by promoting mitophagy via SIRT1/FoxO1 signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12854.
- [20] JIA Z C, LI Y Q, WANG P X, et al. ErZhiTianGui Decoction alleviates age-related ovarian aging by regulating mitochondrial homeostasis and inhibiting ferroptosis[J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17(1): 12.
- [21] 韩宏, 刘文洁, 陈芳, 等. 铁皮石斛多糖对缺氧/复氧诱导星形胶质细胞AMPK/ULK1通路相关自噬的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(17): 2110-2115.
- [22] 糜晓霞, 徐明畅, 王莉, 等. 葛根素缓解镉致大鼠神经细胞线粒体结构损伤和Pink1/Parkin介导的线粒体自噬[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(2): 276-281.

(下转第50页)

中原料药材的真伪。由于药材生产加工、运输中,不同原料或产品间存在交叉污染的可能性,且分子鉴定技术的方法有极高的灵敏度<sup>[29]</sup>,因此,不能离开定量而简单定性,避免误判。

本研究采用多重荧光定量PCR技术,能在一个反应体系中一次性成功检测出山银花的所有种源,全过程大约2 h。该方法和传统方法相比不但节省了检测原料及试剂成本,还大大缩短了检测时间<sup>[26]</sup>,特别是为涉及金银花掺假的食品药品安全应急执法检测提供了较为可靠且快捷的补充方法。

# 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典—一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:30–31,221.
- [2] 张志美,郭时金,付石军,等.金银花活性成分及药理作用研究进展[J].家畜生态学报,2013,34(6):89–91.
- [3] 郑义,陈晓兰,丁宁,等.金银花和山银花有效成分测定及比较分析[J].甘肃农业大学学报,2015,50(4):170–174,180.
- [4] 欧水平,张文志,陈灵.金银花与山银花抗病毒酚酸类和黄酮类成分的差异性研究[J].中国药房,2015,26(33):4750–4752.
- [5] 胡律江,罗江南,郭慧玲,等.金银花和山银花差异性比较[J].江西中医药大学学报,2019,31(5):120–124.
- [6] 李文沛,俸婷婷,周英.金银花、山银花药效与安全性研究[J].山地农业生物学报,2018,37(4):89–94.
- [7] 郭娅,王文婷,何世新.银翘解毒丸中山银花替代金银花投料掺假研究[J].海峡药学,2022,34(11):44–47.
- [8] 王立伟,徐达,安丽娜,等.金银花及其制剂中掺伪山银花的快速鉴别研究[J].中国药业,2019,28(1):39–44.
- [9] 杨倩茹,赵媛媛,郝江波,等.金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(7):1204–1211.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典—一部[M].北京:化学工业出版社,2005:21–22,152–153.
- [11] 成差群,谭秀芬,钟碧莲.金银花和山银花的鉴别与归属[J].中国地方病防治杂志,2017,32(6):686–687.
- [12] 高珊,郭月秋,刘斯亮.现时金银花与山银花比较鉴别分析[J].中国医药科学,2017,7(1):52–55,154.
- [13] 姜军华,吴良发,许妍,等.小儿咽扁颗粒中掺伪山银花检

验方法研究[J].中国药事,2023,37(4):443–449.

- [14] 张泽帅,裴洁荣,叶瑞平,等.非线性化学振荡指纹图谱法鉴别金银花、山银花及其混合品[J].中成药,2023,45(6):2067–2072.
- [15] 林永强,王淑华,徐丽华,等.金银花与山银花的鉴别方法研究[J].药学研究,2013,32(2):69–71.
- [16] 伍婷,杜家会,李振斌,等.金银花与山银花现代鉴别方法研究概况[J].中国民族民间医药,2022,31(15):61–64.
- [17] 罗姣姣,李旭东,赵豆豆,等.GC–MS指纹图谱技术结合多元统计分析对“银花”类药材的鉴定[J].化学研究与应用,2024,36(5):990–996.
- [18] 梁巧文,欧阳美子,陈波,等.忍冬属药材金银花与山银花的微性状和显微鉴别的差异比较[J].海峡药学,2023,35(7):29–32.
- [19] 龚美蓉,陈凤丽,曹晨,等.实时荧光定量PCR技术及其在中医药研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(22):238–241.
- [20] 齐大明,董诚明,刘天亮,等.基于指纹图谱对金银花与山银花的区分及各品种金银花质量评价[J].中草药,2023,54(6):1946–1952.
- [21] 安钢力.实时荧光定量PCR技术的原理及其应用[J].中国现代教育装备,2018(21):19–21.
- [22] 蒋超,侯静怡,黄璐琦,等.快速PCR方法在金银花真伪鉴别中的应用[J].中国中药杂志,2014,39(19):3668–3672.
- [23] 李倩,陈燕,窦霞,等.金银花、山银花、川银花化学成分及药理作用研究进展[J].中国民族民间医药,2023,32(15):67–72.
- [24] 韦晶玥,罗诗雯,冯龄燃,等.金银花与山银花活性成分抗炎作用及机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(11):273–281.
- [25] 时圣明,潘明佳,王洁,等.分子鉴定技术在中药中的应用[J].中草药,2016,47(17):3121–3126.
- [26] 刘霞宇,陈亮,乔永刚,等.金银花花器官实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J].山西农业科学,2017,45(4):514–517.

(收稿日期:2025–04–01 编辑:罗英姣)

# (上接第25页)

- [23] 杨永琴,申剑,王帅哲,等.补天大造丸干预早期卵巢功能不全大鼠免疫功能的作用机制[J].中医导报,2025,31(6):49–54,66.
- [24] 程成,张晶,朱柯璇,等.基于“八脉隶乎肝肾”理论探讨张晶治疗早发性卵巢功能不全经验[J].中医导报,2025,31(6):186–188,200.
- [25] 李艳华,薛晓鸥,李颖,等.补肾疏肝法联合五行音乐对肝郁型小鼠卵巢储备功能的影响[J].中医学报,2021,36(9):1980–1984.

- [26] 史薇,银雪梅,王智超,等.新加苁蓉菟丝子汤通过调控AMPK/SIRT1信号通路对卵巢储备功能减退大鼠线粒体功能的影响[J].中成药,2023,45(10):3221–3227.
- [27] 史薇,刘敏,王智超,等.新加苁蓉菟丝子汤含药血清对雷公藤甲素诱导下人卵巢颗粒细胞线粒体能量代谢、氧化应激及动力学的影响[J].中药材,2023,46(10):2573–2578.
- [28] 方育恩,舒蒙蒙,杨炜敏,等.针药结合辅助治疗卵巢储备功能减退的临床观察及对颗粒细胞线粒体活性的影响[J].北京中医药大学学报,2022,45(11):1168–1174.

(收稿日期:2025–05–26 编辑:罗英姣)