

[药 理]

补肾助排汤对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞凋亡和线粒体自噬的影响

万文文¹, 黄灿灿¹, 张舒媛¹, 芮守月¹, 李鹤¹, 蔺文娟¹, 曹元菊¹, 岳斌¹,
陈元欢¹, 张平芳², 张小花^{1*}

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 岷县中医院, 甘肃岷县 748400)

摘要: 目的 探讨补肾助排汤对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响。方法 SD大鼠皮下注射60 mg/kg脱氢表雄酮(DHEA)21 d构建PCOS模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组、优思悦组(0.01 g/kg)和中药(补肾助排汤)低、中、高剂量组(8.82、17.64、35.28 g/kg),每组10只,另以10只皮下注射大豆油的大鼠为空白组。各组灌胃给药28 d后,观察大鼠一般状况、动情周期及卵巢的形态学变化;ELISA法检测血清睾酮水平;HE染色观察卵巢组织病理学;TUNEL染色检测卵巢颗粒细胞凋亡率;透射电镜观察卵巢组织线粒体超微结构及自噬变化;RT-qPCR和Western blot法检测卵巢组织线粒体自噬信号通路和卵巢颗粒细胞凋亡相关mRNA及蛋白表达。结果 与空白组比较,模型组大鼠失去规律动情周期;卵巢组织中出现大量的小卵泡,并呈现多囊样改变;血清睾酮水平升高($P<0.01$);卵泡颗粒细胞凋亡率升高($P<0.01$);杆状线粒体减少,肿胀的线粒体逐渐增多,且伴有线粒体膜损伤、线粒体嵴断裂,同时自噬现象也随之增多;卵巢组织Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3B、PINK1、Parkin mRNA及蛋白表达升高($P<0.01$),P62、Bcl-2 mRNA及蛋白表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药各剂量组和优思悦组大鼠行为表现出现不同程度的改善;卵巢组织中小卵泡数量减少;血清睾酮水平降低($P<0.01$);卵泡颗粒细胞凋亡率降低($P<0.01$);线粒体结构损伤程度减轻,自噬现象减少;中药低、中、高剂量组和优思悦组卵巢组织Bax、Caspase-3、Beclin1、LC3B、PINK1、Parkin mRNA及蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),P62、Bcl-2 mRNA及蛋白表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 补肾助排汤能够改善PCOS大鼠卵巢颗粒细胞凋亡,其作用与调控PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬相关。

关键词: 补肾助排汤;多囊卵巢综合征;卵巢颗粒细胞;细胞凋亡;线粒体自噬;PINK1/Parkin信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0772-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.009

Effect of Bushen Zhupai Decoction on apoptosis of ovarian granulosa cells and mitochondrial autophagy in rats with polycystic ovary syndrome

WAN Wen-wen¹, HUANG Can-can¹, ZHANG Shu-yuan¹, RUI Shou-yue¹, LI He¹,
LIN Wen-juan¹, CAO Yuan-ju¹, YUE Bin¹, CHEN Yuan-huan¹, ZHANG Ping-fang²,
ZHANG Xiao-hua^{1*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Min County Traditional Chinese Medicine Hospital, Minxian 748400, China)

ABSTRACT: AIM To explore the effect of Bushen Zhupai Decoction on the apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **METHODS** PCOS models were established by subcutaneous injection of 60 mg/kg dehydroepiandrosterone (DHEA) in SD rats for 21 days. The successfully modeled rats were

收稿日期: 2025-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(82260949); 2023年度甘肃省中医药管理局科研课题项目(GZKP-2023-44); 甘肃省中医药研究中心项目(zyzx-2023-13); 甘肃省高校教师创新基金资助项目(2024A-086); 兰州市科技计划项目(2023-ZD-237); 2025年甘肃省高校研究生“创新之星”项目(2025CXZX-928)

作者简介: 万文文(1997—),女,硕士生,研究方向为中医药防治多囊卵巢综合征的作用机制。E-mail: wanwenwen2@163.com

*通信作者: 张小花(1977—),女,硕士,副教授,硕士生导师,从事中医药调控女性神经内分泌的研究。E-mail: xiaohua7577@126.com

randomly divided into the model group, the Yousiyue [drospirenone and ethinylestradiol tablets (Ⅱ)] group (0.01 g/kg), and the low-, medium-, and high-dose groups of traditional Chinese medicine (Bushen Zhupai Decoction, 8.82, 17.64, 35.28 g/kg), with 10 rats in each group. Additionally, 10 rats subcutaneously injected with soybean oil were taken as the blank group. After 28 days of intragastric administration in each group, the general condition, estrous cycle and morphological changes of the ovaries of the rats were observed. Serum testosterone levels were detected by ELISA. HE staining was used to observe the histopathology of ovarian tissue. The apoptosis rate of ovarian granulosa cells was detected by TUNEL. The ultrastructure of mitochondria and the changes of autophagy in ovarian tissue were observed by transmission electron microscopy. The mRNA and protein expressions related to mitochondrial autophagy signaling pathways and apoptosis of ovarian granulosa cells in ovarian tissues were detected by RT-qPCR and Western blot. **RESULTS** Compared with the blank group, the rats in the model group lost their regular estrous cycles. A large number of small follicles appear in the ovarian tissue and show polycystic changes. The serum testosterone level increased ($P < 0.01$). The apoptosis rate of follicular granulosa cells increased ($P < 0.01$). The number of rod-shaped mitochondria decreased, while the number of swollen mitochondria gradually increased, accompanied by mitochondrial membrane damage and mitochondrial crest rupture. Meanwhile, the phenomenon of autophagy also increased. The mRNA and protein expressions of Bax, Caspase-3, Beclin1, LC3B, PINK1 and Parkin in ovarian tissue increased ($P < 0.01$), while the mRNA and protein expressions of P62 and Bcl-2 decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the behavioral performance of rats in each dose group of TCM and the Yousiyue group improved to varying degrees. The number of small follicles in ovarian tissue decreased. The serum testosterone level decreased ($P < 0.01$). The apoptosis rate of follicular granulosa cells decreased ($P < 0.01$). The degree of mitochondrial structural damage was alleviated and the phenomenon of autophagy was reduced. The mRNA and protein expressions of Bax, Caspase-3, Beclin1, LC3B, PINK1 and Parkin in the ovarian tissues of the low, medium and high-dose groups of TCM and the Yousiyue group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the mRNA and protein expressions of P62 and Bcl-2 increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** The Bushen Zhupai Decoction can improve the apoptosis of ovarian granulosa cells in PCOS rats, and its effect is related to the regulation of mitochondrial autophagy mediated by the PINK1/Parkin signaling pathway.

KEY WORDS: Bushen Zhupai Decoction; polycystic ovary syndrome; ovarian granular cells; apoptosis; mitophagy; PINK1/Parkin signaling pathway

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种由生殖内分泌紊乱引起的, 症状多样而发病机制复杂的系统性疾病^[1], 全球患病率约 8%~13%^[2], 我国患病率约 5.6%^[3]。该病以雄激素过高、排卵障碍、卵巢多囊样改变等为主要特征, 同时 PCOS 患者常伴有胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱及心脑血管疾病, 严重威胁女性的身心健康^[4-5]。因此寻求防治 PCOS 的理想方案, 已成为妇科临床亟待解决的重点问题。

目前 PCOS 的发病机制尚不清楚。研究显示卵巢颗粒细胞过度凋亡可能会促进 PCOS 的发展^[6]。正常情况下, 在窦前卵泡后期, 卵巢颗粒细胞促性腺激素会诱导颗粒细胞芳香化酶合成, 芳香化酶可使颗粒细胞将睾酮转化成雌激素, 从而促进卵泡发育, 形成优势卵泡^[7]。然而, 颗粒细胞过度凋亡

会阻止睾酮转变为雌激素, 导致雄激素累积, 发生高雄激素血症, 雄激素的大量积累又造成卵泡发育阻滞, 大量小窦状卵泡积聚, 卵巢发生多囊状改变^[8], 最终形成 PCOS。因此, 调控卵巢颗粒细胞凋亡以防治 PCOS 已然成为临床治疗和实验研究的焦点。另有研究发现, 线粒体损伤可参与调控 PCOS 卵巢颗粒细胞的凋亡^[9], 而线粒体损伤可诱发线粒体自噬。故本研究拟探讨补肾助排汤通过线粒体自噬途径发挥防治 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的分子机制。

1 材料

1.1 动物 60 只 SPF 级 SD 雌性大鼠, 4 周龄, 体质量 (100±20) g, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所 [实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2020-0002], 饲养于兰州兽医研究所 SPF 级动物房

[实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2020-0010]。适应性饲养后严格遵照动物伦理相关规定进行实验操作 (伦理编号 LVRIAEC-2024-057)。

1.2 药物与试剂 补肾助排汤 (仙茅 15 g、炙仙灵脾 12 g、熟地 15 g、当归 18 g、川芎 12 g、醋香附 15 g、丹参 12 g、鸡血藤 12 g、鹿角霜 12 g、盐巴戟天 12 g、麸炒枳实 12 g、厚朴 12 g、皂角刺 10 g、胆南星 9 g、连翘 9 g、桔梗 9 g) 饮片加 10 倍量蒸馏水, 浸泡 1 h, 按常规方法煎煮 2 次, 每次 40 min, 滤出药液, 并加热浓缩至每 1 mL 药液含生药 3.528 g, 高温灭菌冷却后置于 4 °C 冰箱保存备用, 使用时稀释至所需浓度; 优思悦 (屈螺酮 3 mg 和炔雌醇 0.02 mg×24 片, 拜耳医药保健有限公司, 批号 KTOCT9K)。脱氢表雄酮 (DHEA, 北京酷来搏科技有限公司, 批号 CD32193820); 大豆油 (上海阿拉丁生化科技有限公司, 批号 J2425748); 睾酮试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 ZC-10078); PINK1、Parkin 抗体 (美国 GeneTex 公司, 货号 GTX31581、GTX25667); LC3B II、P62、Beclin1 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab192890、ab109102、ab302669); Bax、Bcl-2 抗体 [艾比玛特医药科技 (上海) 有限公司, 货号 T40051F、T40056F]; active Caspase-3 抗体 (江苏佰嘉生物科技有限公司, 货号 IMB0019); 山羊抗兔 IgG (杭州华安生物技术有限公司, 货号 HA1001)。

1.3 仪器 Western blot 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号 JY-SCZ2+); 实时定量 PCR 仪 (西安天隆科技有限公司, 型号 Gentier 96R); 凝胶成像系统 (广州博鹭腾生物科技有限公司, 型号 GelVAC 50/60 Hz)。

2 方法

2.1 PCOS 大鼠模型构建 将 60 只大鼠适应性饲养 3 d 后, 随机选取 10 只作空白组, 其余 50 只作为造模组, 参考文献 [10-11] 报道进行造模。造模组大鼠每天上午颈部皮下注射 60 mg/kg DHEA (溶于 0.2 mL 大豆油中), 空白组大鼠每天颈部皮下注射 0.2 mL 大豆油, 连续造模 21 d, 期间给予标准饲料喂养。于造模第 12 天开始, 每日行阴道涂片检测动情周期, 连续 10 d, 大鼠失去完整的动情周期即为造模成功。

2.2 分组及药物干预 造模组 50 只大鼠造模成功后, 随机分为模型组、优思悦组和中药 (补肾助排汤) 低、中、高剂量组, 每组 10 只。按照体表

面积法换算, 中药低、中、高剂量组分别灌胃给予补肾助排汤 8.82、17.64、35.28 g/kg (相当于临床 70 kg 成人等效量的 0.5、1、2 倍); 优思悦组灌胃给予屈螺酮炔雌醇片 0.01 g/kg; 空白组和模型组大鼠灌胃给予等体积纯水, 灌胃体积 10 mL/kg, 每天 1 次, 连续给药 28 d。

2.3 样本采集与制备 各组大鼠药物干预 28 d 后取材。大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉, 经腹主动脉取血, 随后颈椎脱臼法处死大鼠。取卵巢, 肉眼观察卵巢的形态、大小、颜色等情况, 以预冷的 0.9% 氯化钠冲洗干净, 各组大鼠取一侧卵巢放于电镜液中固定 (3 只), 或于 4% 多聚甲醛中固定 (7 只); 取另一侧卵巢放于 -80 °C 冷冻。从实验动物的适应性喂养 (3 d)、疾病模型构建 (21 d)、药物干预 (28 d)、取材 (1 d), 共经历了 53 d。

2.4 指标检测

2.4.1 一般状态观察 实验过程中, 定期观察大鼠摄食、毛发、行为、体质量等一般活动情况。

2.4.2 动情周期 于造模第 12 天开始, 每天行阴道涂片检测大鼠动情周期, 连续 10 d, 以验证大鼠造模是否成功。药物干预 18 d 后, 再行阴道涂片观察大鼠动情周期, 连续 10 d, 观察补肾助排汤及优思悦的干预情况。

2.4.3 卵巢形态学观察 取材时, 将子宫和卵巢剥离出体外, 观察各组大鼠卵巢大小、颜色及子宫长度、血液供应等情况。

2.4.4 HE 染色观察卵巢组织病理变化 取固定于 4% 多聚甲醛中的卵巢组织, 经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察病理学变化。

2.4.5 ELISA 法检测血清睾酮水平 大鼠全血于低温离心机离心后取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清睾酮水平。

2.4.6 TUNEL 法观察卵巢颗粒细胞凋亡情况 取卵巢组织石蜡切片, 脱蜡后加入 TUNEL 反应液 37 °C 避光孵育 60 min, 经 PBS 清洗后, 于显微镜下观察并拍照。

2.4.7 透射电镜观察卵巢颗粒细胞线粒体超微结构 切取大小约 1~2 mm³ 的新鲜卵巢组织, 放置于 4 °C 预冷的 2.5% 电镜固定液中固定 2.5 h, 用乙醇进行逐级梯度脱水处理, 脱水完成后进行包埋、切片、电子染色等步骤, 最后置于透射电镜下观察并拍照。

2.4.8 RT-qPCR 法检测卵巢组织自噬通路及凋亡相关指标 mRNA 表达 将 Trizol 裂解液加入大鼠卵巢组织中,按照试剂盒说明书提取 RNA,超微光光度计检测 RNA 浓度,再反转录为 cDNA,随后进行扩增反应,结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	长度/bp
GAPDH	正向 TGATGGGTGTGAACCACGAG	152
	反向 AGTGATGGCATGACTGTGG	
PINK1	正向 GAAAAGGCCAGATGTCGTC	166
	反向 TTTGCTGAACCCAAGGCTTC	
Parkin1	正向 AAGGAGCTGCAGAATCACCT	194
	反向 AGGATATGGCTGCTGAGGTC	
P62	正向 TGATTGACTCCCTCTCCAGATGC	99
	反向 CCGCTCCGATGTCATAGTTCTTGG	
Bcl-2	正向 AGGGCTCTGAACTTCATGCT	183
	反向 TCAGGAAGTTCAGGCCTCAG	
LC3B	正向 TCTTGGACGCTTGTACGCAT	138
	反向 TTGTGTGCTCTCTCAACCCG	
Bax	正向 GAGACACCTGAGCTGACCTT	111
	反向 CTGCAGCTCCATGTTGTTGT	
Caspase3	正向 GCAGCAGCCTCAAATTGTTGAC	144
	反向 TGCTCCGGCTCAAACCATC	
Beclin1	正向 ACATCTGGCACAGTGGACAGTTTG	125
	反向 AGCATGGAGCAGCAACACAGTC	

2.4.9 Western blot 法检测卵巢组织自噬及凋亡相

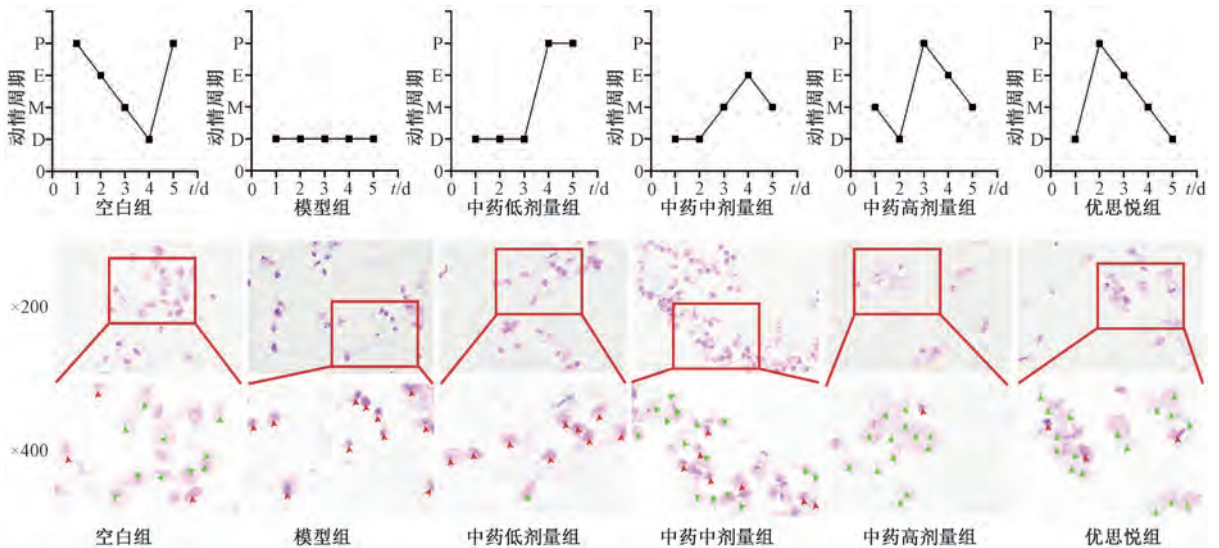
关蛋白表达 取卵巢组织约 0.1 g,剪碎,加入含蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解,经匀浆、离心后取上清,加入 Loading Buffer 煮沸变性。蛋白上样,经电泳、转膜、孵育一抗、二抗后,曝光、显影,通过 Image J 软件分析条带灰度值。

2.5 统计学分析 通过 Graphpad Prism 9.0 软件进行处理,计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾助排汤对 PCOS 大鼠一般情况的影响 造模过程中,模型组大鼠体质量与空白组相似,呈稳定上升趋势,未见明显的体质量异常变化。造模结束后,大鼠背部毛发干枯,无光泽,反应较为迟钝,双目无神,倦怠少动。28 d 后,各给药组大鼠行为表现均有不同程度的改善,毛发光泽逐渐恢复,自主活动逐渐增多,其中以中药高剂量组情况好转最为明显。

3.2 补肾助排汤对 PCOS 大鼠动情周期的影响 空白组大鼠动情周期规律,以淡紫色无核角化细胞为主,给予 DHEA 注射造模后,大鼠动情周期紊乱,多停留在动情间期,以蓝紫色有核上皮细胞为主;各给药组大鼠均有不同程度的好转,其中中药高剂量组及优思悦组改善最为显著,动情周期逐渐恢复规律,呈周期性变化。见图 1。



注:红色三角标注有核上皮细胞,绿色三角标注无核角化细胞。P 为动情前期, E 为动情期, M 为动情后期, D 为动情间期。

图 1 各组大鼠动情周期变化 (HE 染色)

Fig. 1 Changes of estrous cycle in rats in each group (HE staining)

3.3 补肾助排汤对 PCOS 大鼠子宫及卵巢组织形

态的影响 与空白组比较,模型组大鼠卵巢体积增

大，且伴有瘀点、瘀斑的分布；与模型组比较，各给药组大鼠卵巢组织均有不同程度的改善，子宫长

度未见明显变化，见图2。

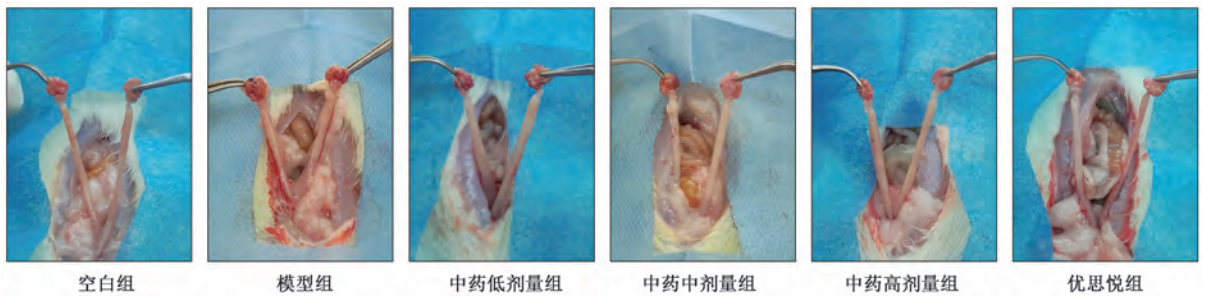


图2 各组大鼠子宫及卵巢形态学变化

Fig. 2 Morphological changes of uterus and ovary in rats in each group

3.4 补肾助排汤对PCOS大鼠卵巢组织病理结构的影响 空白组大鼠卵巢结构正常，有正常成熟卵泡，卵泡内颗粒细胞排列紧密良好，在即将排卵的卵泡中可见成熟或将成熟的卵子；模型组大鼠卵巢囊性扩张小卵泡及闭锁卵泡增多，卵巢颗粒细胞排

列松散，数量减少；各给药组大鼠卵巢小卵泡和闭锁卵泡数量较模型组均有不同程度的减少，中药高剂量组改善最明显，部分样本卵泡内可见成熟卵泡，见图3。

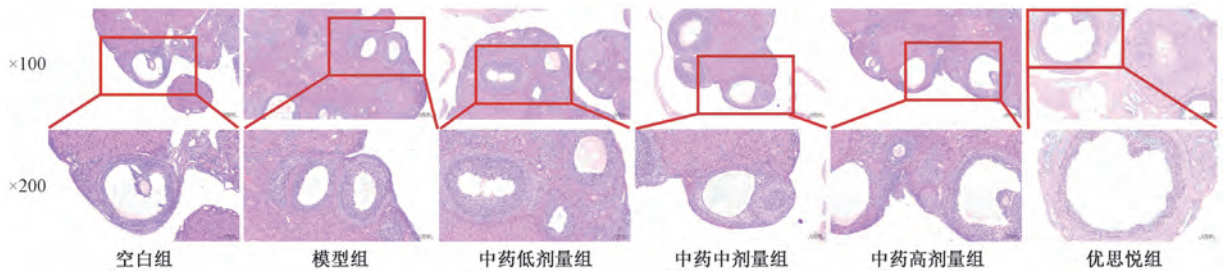
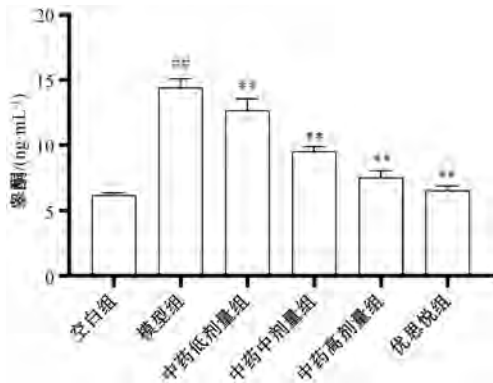


图3 各组大鼠卵巢组织病理学变化 (HE 染色)

Fig. 3 Histopathological changes of ovaries in rats in each group (HE staining)

3.5 补肾助排汤对PCOS大鼠血清睾酮水平的影响 与空白组比较，模型组大鼠血清睾酮水平升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清睾酮水平均降低 ($P < 0.01$)，见图4。

3.6 补肾助排汤对PCOS大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响 空白组大鼠仅可观察到零星散在的卵巢颗粒细胞凋亡；与空白组比较，模型组大鼠存在大量集中的卵巢颗粒细胞凋亡，细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$)，见图5。



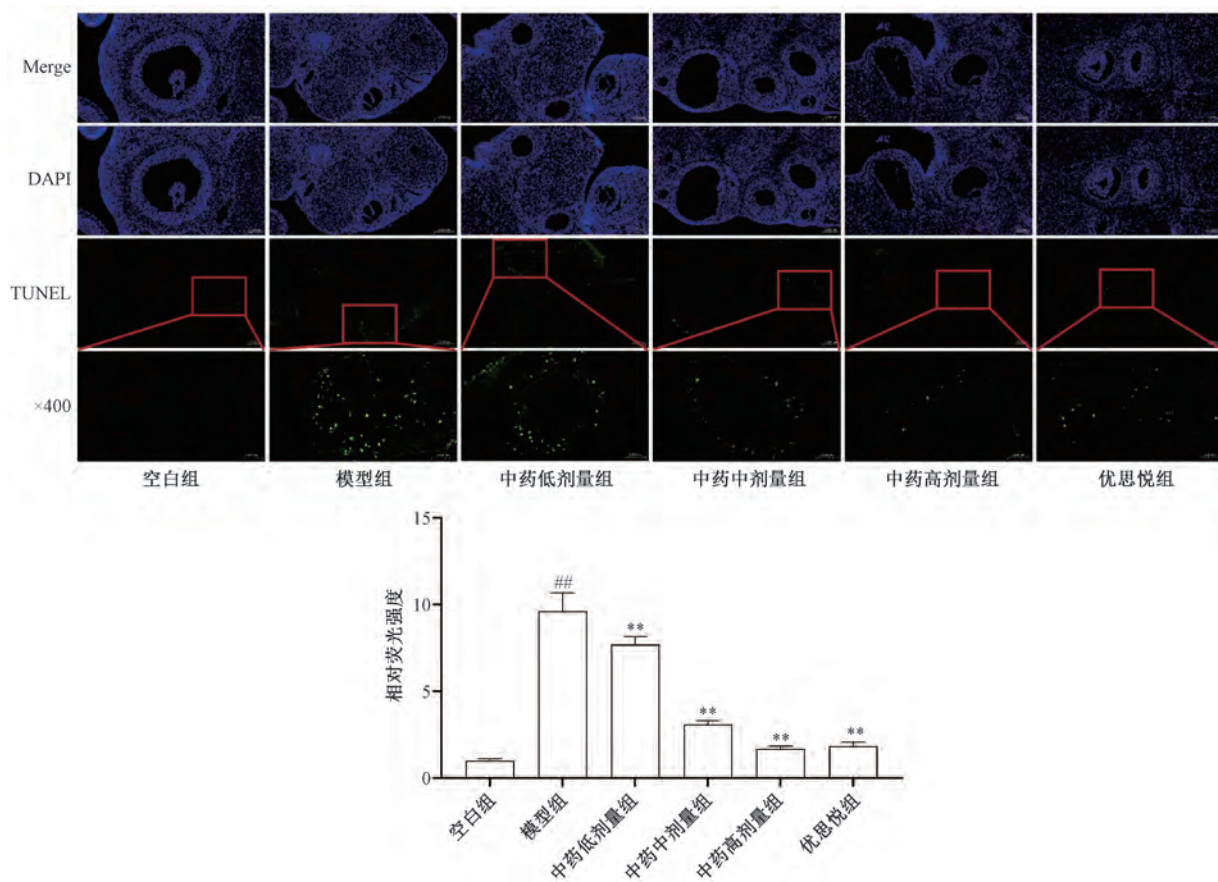
注：与空白组比较， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^{**}P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠血清睾酮水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Comparison of serum testosterone levels in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 补肾助排汤对PCOS大鼠卵巢组织线粒体超微结构的影响 空白组大鼠卵巢颗粒细胞中正常线粒体较多，以杆状线粒体为主；模型组大鼠卵巢颗粒细胞中异常线粒体较多，线粒体嵴消失，线粒体结构肿胀、变形，并以球形线粒体为主，少见杆状线粒体；各给药组大鼠卵巢颗粒细胞中异常线粒体数量均有所减少，见图6。

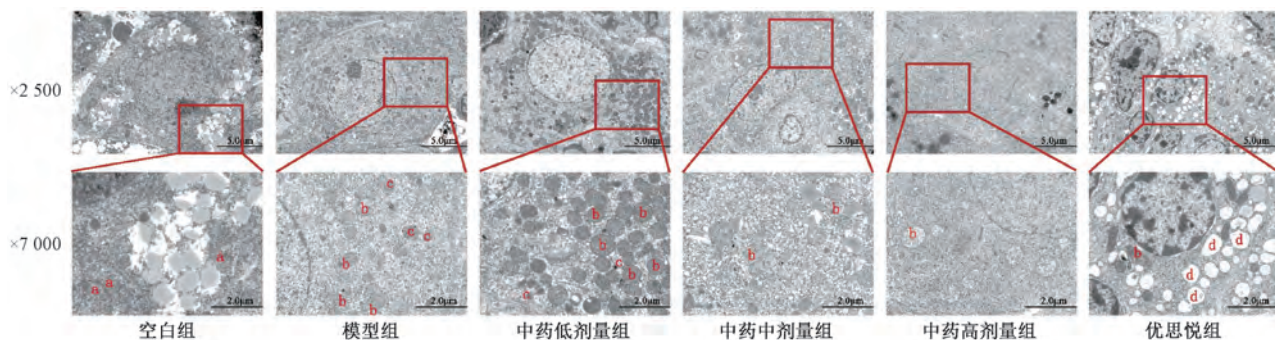
3.8 补肾助排汤对PCOS大鼠卵巢组织线粒体自噬及凋亡相关指标mRNA表达的影响 与空白组比较，模型组大鼠卵巢组织中线粒体自噬相关因子 *PINK1*、*Parkin*、*LC3B*、*Beclin1* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)，*P62* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；卵



注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图5 各组卵巢颗粒细胞凋亡情况比较 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Comparison of apoptosis of ovarian granulosa cells in each group ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：a 为正常线粒体，b 为异常线粒体，c 为自噬体，d 为异常内质网。

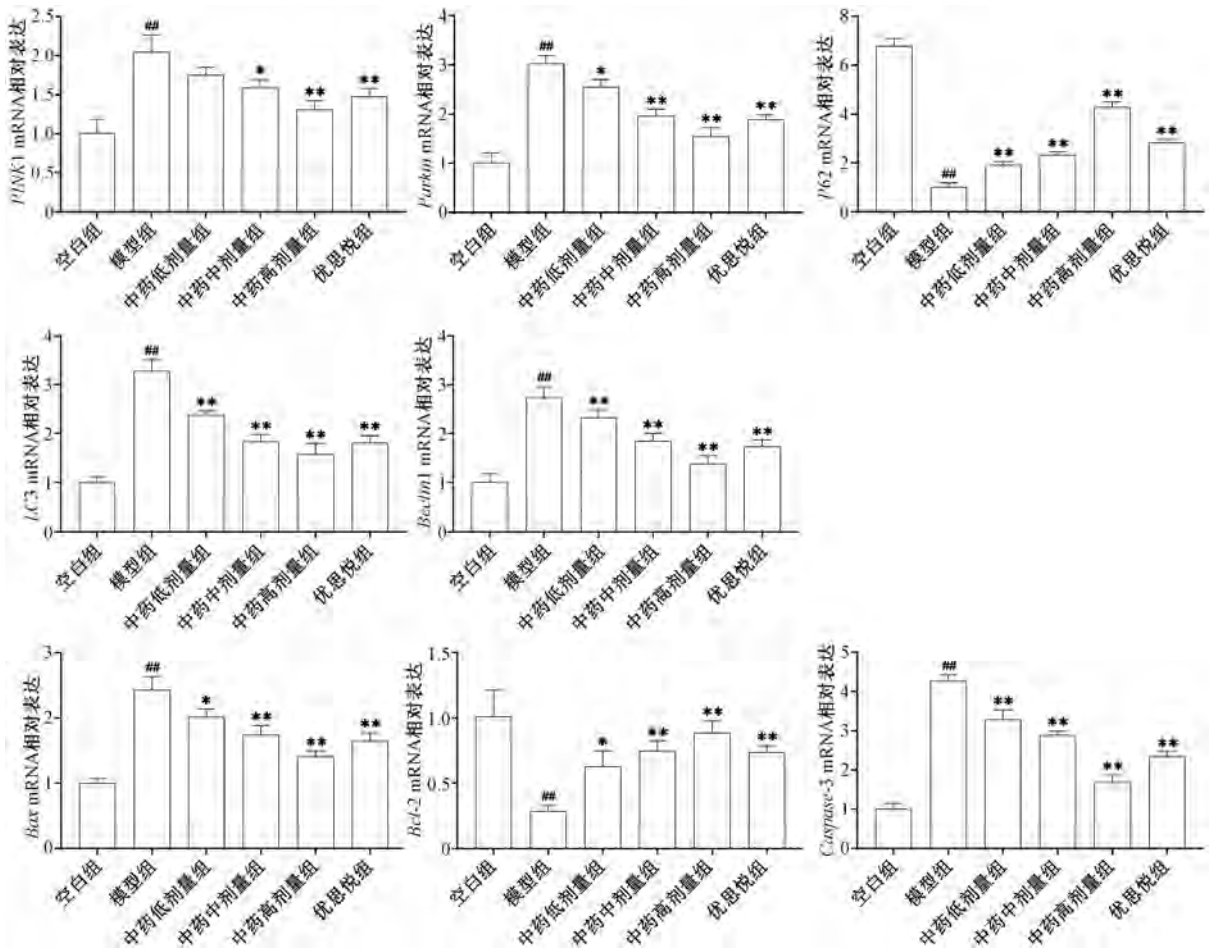
图6 各组大鼠卵巢组织线粒体超微结构

Fig. 6 Ultrastructure of mitochondria in ovarian tissue of rats in each group

巢颗粒细胞凋亡相关因子 *Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 除中药低剂量组大鼠卵巢组织 *PINK1* mRNA 表达无明显变化外 ($P > 0.05$), 其余各给药组大鼠卵巢组织 *PINK1*、*Parkin*、*LC3B*、*Beclin1*、*Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *P62*、*Bcl-2* mRNA 表达均升

高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图7。

3.9 补肾助排汤对PCOS大鼠卵巢组织线粒体自噬及凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织线粒体自噬相关蛋白 *PINK1*、*Parkin*、*LC3B*、*Beclin1* 表达升高 ($P < 0.01$), *P62* 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 卵巢颗粒细胞凋亡相关蛋白 active *Caspase-3* 表达升高 ($P < 0.01$), *Bcl-2*/



注：与空白组比较，# $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图7 各组大鼠卵巢组织 *PINK1*、*Parkin*、*P62*、*Beclin1*、*LC3B*、*Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3* mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

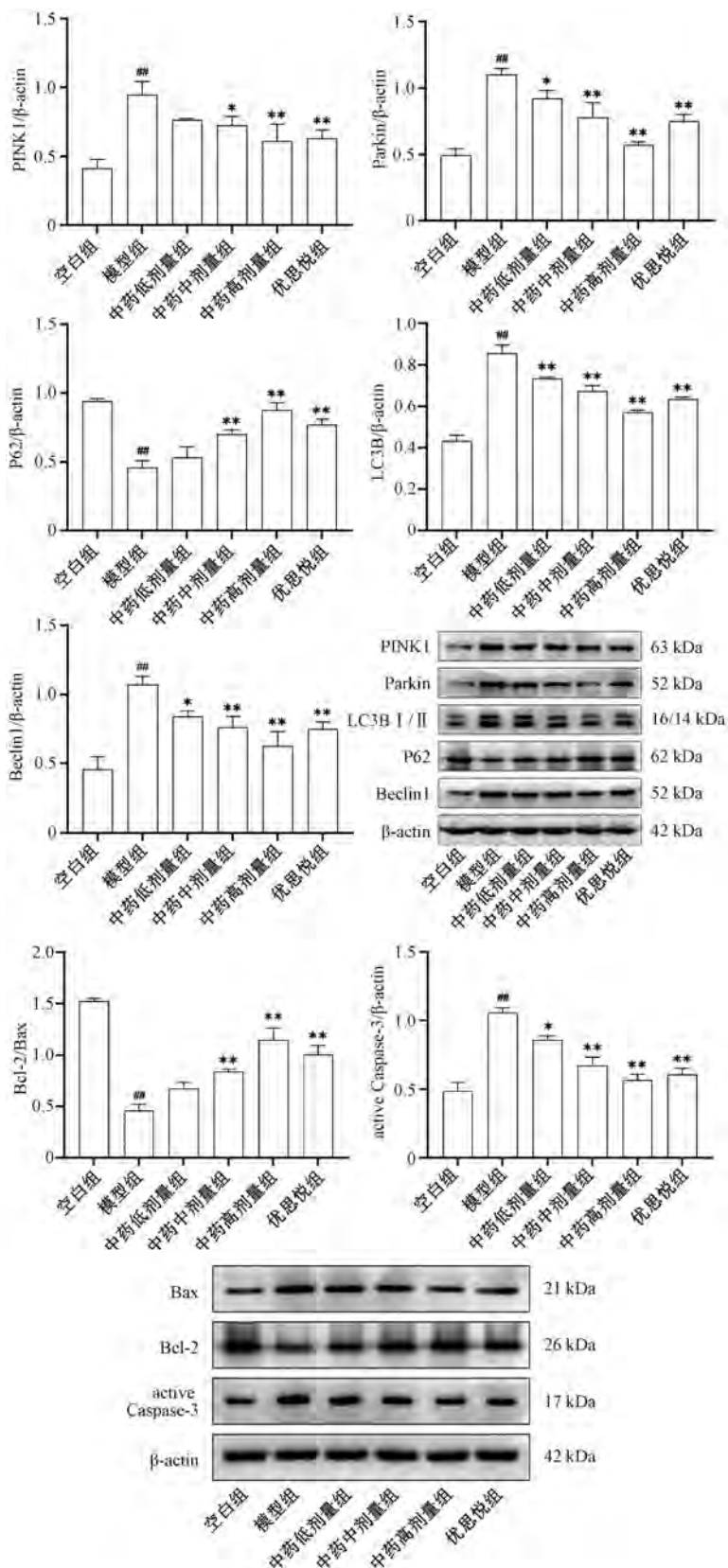
Fig. 7 Comparison of mRNA expressions of *PINK1*, *Parkin*, *P62*, *Beclin1*, *LC3B*, *Bax*, *Bcl-2* and *Caspase-3* in ovarian tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Bax 比值降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，中药中、高剂量组和优思悦组大鼠卵巢组织 *PINK1*、*Parkin*、*LC3B*、*Beclin1*、active *Caspase-3* 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，*P62* 蛋白和 *Bcl-2*/*Bax* 比值升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 8。

4 讨论

细胞凋亡是细胞主动程序性死亡，特征为细胞体积缩小、染色质凝聚及线粒体等细胞器结构和功能损伤，伴随分子生物学改变，最终清除细胞以维持内环境稳定^[12]。在 PCOS 患者中，卵巢颗粒细胞过度凋亡是卵泡闭锁的关键诱因^[13]，通过破坏卵泡生物学功能与细胞间平衡，引发卵母细胞和卵泡膜细胞凋亡，导致卵泡闭锁^[14]。本研究结果显示，模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡明显增加，卵巢组织可见闭锁小卵泡增多，*Bax*、*Caspase-3* 表达升高，*Bcl-2* 表达降低，提示颗粒细胞凋亡增多会阻碍卵泡发育与排卵，导致 PCOS 排卵功能障碍。

线粒体自噬是细胞清除损伤线粒体的自我修复过程，自噬小体吞噬受损线粒体后与溶酶体融合形成自噬溶酶体以降解受损线粒体，是人体进行自我修复及维持细胞健康的重要环节^[15]。线粒体结构异常是引发细胞凋亡的关键，其损伤或坏死会激活线粒体自噬，线粒体正常自噬可维持代谢平衡，过度激活则会使线粒体严重受损，造成代谢及功能失衡，进而导致细胞凋亡^[16]。本研究结果显示，模型大鼠卵巢线粒体结构和数量异常，球形线粒体增多，杆状减少，线粒体嵴模糊，并出现融合断裂现象，细胞质中自噬小体和自噬溶酶体明显增多，提示线粒体自噬被过度激活。进一步研究发现，模型大鼠 *PINK1*、*Parkin*、*Beclin1*、*LC3B* 表达升高，*P62* 表达降低，提示 *PINK1*/*Parkin* 介导的线粒体自噬参与 PCOS 发病，其异常激活程度与卵巢颗粒细胞凋亡呈正相关。因此，线粒体自噬水平或可作为评估颗粒细胞线粒体状态及药物疗效的重要方向。



注: 与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠卵巢组织 PINK1、Parkin、P62、Beclin1、LC3B、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Comparison of protein expressions of PINK1, Parkin, P62, Beclin1, LC3B, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in ovarian tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

中医药基于“肾为先天之本”“肾主生殖”理论调控卵巢功能的疗效显著。本课题组以补益先天肾气发挥充盈天癸、调补冲任作用，配合行气以畅胞脉、散结以破瘀结药物，创制补肾助排汤以防治PCOS，尤其对肾虚型患者疗效显著^[17]。本方由经典名方“二仙汤”与“四物汤”加减化裁而来，以仙茅、炙仙灵脾温肾助阳，熟地、当归、川芎养血活血，鹿角霜、盐巴戟天助肾火，丹参、鸡血藤活血通瘀，醋香附、麸炒枳实、桔梗、厚朴调畅气机，皂角刺破滞通透、破卵以助排，佐胆南星、连翘化上焦痰热，助皂角刺破卵散结。本研究结果显示，该方可降低模型大鼠线粒体自噬水平和卵巢颗粒细胞过度凋亡，同时降低血清睾酮水平，这或是其调节线粒体自噬、缓解颗粒细胞凋亡的重要因素。研究表明，睾酮与PCOS患者体内TNF- α 、IL-6等炎症介质呈正相关^[18-19]，其水平降低提示慢性炎症缓解，线粒体损伤及颗粒细胞凋亡程度减轻。

本研究电镜结果显示，优思悦组卵巢颗粒细胞异常线粒体数量减少，形态有所恢复，但局部出现内质网异常，表现为内质网形态扁平展开，粗面内质网核糖体丢失。该药主要成分屈螺酮及炔雌醇并无直接抗炎及抗氧化应激作用，主要通过调控下丘脑—垂体—卵巢轴调节性激素水平，结合血清雄激素变化，提示其可能通过降低睾酮水平以缓解卵巢颗粒细胞线粒体损伤^[20]。但是何原因导致内质网异常，有待深入研究。

综上所述，补肾助排汤可通过调控PINK1/Parkin介导的线粒体自噬改善线粒体损伤，降低雄激素水平，从而发挥防治PCOS卵巢颗粒细胞凋亡的作用。

参考文献:

[1] Dokras A, Stener-Victorin E, Yildiz B O, et al. Androgen Excess-Polycystic Ovary Syndrome Society: position statement on depression, anxiety, quality of life, and eating disorders in polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2018, 109(5): 888-899.

[2] Zeng X, Xie Y J, Liu Y T, et al. Polycystic ovarian syndrome: correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 214-221.

[3] Li R, Zhang Q, Yang D, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in women in China: a large community-based study[J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(9): 2562-2569.

[4] 郭 飞, 史颖莉. GnRH 脉冲治疗在多囊卵巢综合征不孕

患者中的应用进展[J]. *中国妇幼保健*, 2022, 37(22): 4327-4330.

[5] Huddleston H G, Dokras A. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome[J]. *JAMA*, 2022, 327(3): 274-275.

[6] Xu Y, Pan C S, Li Q, et al. The ameliorating effects of Bushen Huatan Granules and Kunling Wan on polycystic ovary syndrome induced by dehydroepiandrosterone in rats[J]. *Front Physiol*, 2021, 12(1): 525145-525162.

[7] Lai F N, Liu J C, Li L, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate impairs steroidogenesis in ovarian follicular cells of prepubertal mice[J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(3): 1279-1292.

[8] Gao Y, Chen J, Ji R, et al. USP25 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome by modulating the PI3K/AKT pathway via deubiquitinating PTEN[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 779718.

[9] 肖 潇. 益肾疏肝汤干预卵巢储备功能减退的临床研究及机制探讨[D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.

[10] 乔诗清, 王 停, 闫永煌, 等. 非肥胖型多囊卵巢综合征大鼠模型的建立及评价研究[J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(8): 965-975.

[11] 邓丽玲, 罗 佩, 侯丽莹, 等. 脱氢表雄酮诱导多囊卵巢大鼠高雄激素血症模型的实验研究[J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(3): 146-148.

[12] Creagh E M. Caspase crosstalk, integration of apoptotic and innate immune signaling pathways[J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(12): 631-640.

[13] Azhary J M K, Harada M, Takahashi N, et al. Endoplasmic reticulum stress activated by androgen enhances apoptosis of granulosa cells via induction of death receptor 5 in PCOS[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(1): 119-132.

[14] 徐秋霞, 乔岩岩. 颗粒细胞凋亡影响多囊卵巢综合征患者卵泡闭锁的研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2024, 32(1): 214-219.

[15] Poole L P, Macleod K F. Mitophagy in tumorigenesis and metastasis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(8): 3817-3851.

[16] 蒋永旭, 丁明聪, 赵泽义, 等. 苦丁冬青苷 D 对人 HCC-1806 乳腺癌细胞增殖、凋亡、自噬的影响及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(6): 805-813.

[17] 袁荣荣, 李 鹤, 蔺文娟, 等. 态靶辨治在肾虚血瘀型多囊卵巢综合征中的应用——补肾助排汤[J]. *内蒙古中医药*, 2024, 43(11): 89-91.

[18] Shabbir S, Khurram E, Moorthi V S, et al. The interplay between androgens and the immune response in polycystic ovary syndrome[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 259.

[19] Mancini A, Bruno C, Vergani E, et al. Oxidative stress and low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome: controversies and new insights[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1667.

[20] 梁 迪, 郭宝芝, 周新华. 优思悦联合二甲双胍治疗肥胖型多囊卵巢综合征的效果及对血清 Asprosin 水平、糖脂代谢的影响[J]. *临床医学*, 2021, 41(4): 105-107.