资癸益冲方通过糖酵解代谢途径对小鼠早发性卵巢功能不全的影响Δ

张新苗[1*]，刘雪平[1]，郗红燕[1]，唐思玲[1]，李荣霞[1]，吴忠玉[1]，段彦苍[1,2,3#]（1.河北中医药大学研究生学院，石家庄 050091；2.河北省中西医结合生殖疾病协同创新中心，石家庄 050091；3.河北中西医结合肝肾病证研究重点实验室，石家庄 050091）

中图分类号 R965　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2024）20-2460-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.20.03

摘　要　目的 研究资癸益冲方调控糖酵解代谢途径对小鼠早发性卵巢功能不全（POI）的影响。**方法** 将80只SPF级C57BL/6N雌性小鼠分为正常组、模型组、资癸益冲方组（14.175 g/kg）、资癸益冲方+2-脱氧-D-葡萄糖（2-DG）组（资癸益冲方14.175 g/kg+糖酵解抑制剂2-DG 100 mg/kg），每组20只。除正常组外，其余各组小鼠腹腔注射环磷酰胺建立POI模型，造模成功后，各组小鼠给予相应药物。通过苏木精-伊红染色观察小鼠卵巢组织病理形态学变化及各级卵泡数量；采用放射免疫法检测小鼠血清中雌二醇（E_2）、血清抗米勒管激素（AMH）、卵泡刺激素（FSH）水平；TUNEL法检测小鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况；比色法检测小鼠卵巢组织中己糖激酶（HK）、丙酮酸激酶（PK）、乳酸脱氢酶（LDH）活性；Western blot法、实时荧光定量聚合酶链式反应检测小鼠卵巢组织中B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、胱天蛋白酶-3（caspase-3）、HK2、M2型PK（PKM2）、乳酸脱氢酶A（LDHA）蛋白及mRNA的表达。**结果** 与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢组织中原始卵泡、生长卵泡、窦卵泡数和卵巢颗粒细胞层数均显著增加（$P<0.05$），卵巢颗粒细胞排列整齐，闭锁卵泡数量、卵巢颗粒细胞凋亡数量均显著减少（$P<0.05$）；血清中E_2、AMH水平，卵巢组织中HK、PK、LDH活性，Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA蛋白及mRNA表达量均显著升高（$P<0.05$）；血清中FSH水平，卵巢组织中Bax、caspase-3蛋白及mRNA表达量和Bax/Bcl-2比值均显著降低（$P<0.05$）。2-DG可逆转资癸益冲方对POI模型小鼠上述指标的改善作用。**结论** 资癸益冲方可通过促进糖酵解来减少POI模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁，改善卵巢储备功能。

关键词 早发性卵巢功能不全；资癸益冲方；糖酵解；卵巢颗粒细胞；细胞凋亡

Effects of Zigui yichong formula on premature ovarian insufficiency in mice through glycolytic metabolic pathway

ZHANG Xinmiao[1], LIU Xueping[1], XI Hongyan[1], TANG Siling[1], LI Rongxia[1], WU Zhongyu[1], DUAN Yancang[1, 2, 3]（1. School of Graduate, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 2. Hebei Collaborative Innovation Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Reproductive Disease, Shijiazhuang 050091, China; 3. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Liver and Kidney Disease Syndrome Research, Shijiazhuang 050091, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of Zigui yichong formula on premature ovarian insufficiency (POI) in mice through glycolysis metabolic pathway. **METHODS** Eighty SPF C57BL/6N female mice were divided into normal group, model group, Zigui yichong formula group (14.175 g/kg), Zigui yichong formula+2-deoxy-D-arabino-hexose (2-DG) group (Zigui yichong formula 14.175 g/kg + glycolysis inhibitor 2-DG 100 mg/kg), with 20 mice in each group. Except for the normal group, POI model mice were induced by intraperitoneal administration of cyclophosphamide in the other groups. After the model was successfully established, each group was given corresponding drugs. HE staining was employed to observe the pathomorphological changes in ovarian tissue and to count follicles at all developmental stages; radioimmunoassay was conducted to measure the serum levels of estradiol (E_2), anti-Müllerian hormone (AMH), and follicle-stimulating hormone (FSH); TUNEL assay was employed to detect apoptosis in ovarian granulosa cells of mice; the activities of hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by colorimetry; Western blot and real-time fluorescence quantitative PCR were employed to analyze the protein and mRNA expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), caspase-3, HK2, pyruvate kinase M2 (PKM2), and lactate dehydrogenase A (LDHA). **RESULTS** Compared with model group, the number of primordial follicles, growing follicles, antral follicles and granulosa cells were increased significantly ($P<0.05$), and granulosa cells arranged neatly, but the

Δ **基金项目** 河北省自然科学基金项目（No.H2023423023）；河北中医学院研究生创新资助项目（No.CXZZBS2023141）；河北中医学院优秀创新团队项目（No.YXTD2022003）

* **第一作者** 执业医师，硕士。研究方向：中医妇科。E-mail：704612297@qq.com

\# **通信作者** 教授，博士生导师，博士。研究方向：中医妇科。E-mail：duanyancang@163.com

number of atretic follicles and granulosa cells apoptosis were decreased significantly in Zigui yichong formula group ($P<0.05$); the serum levels of E_2 and AMH, the activities of HK, PK and LDH, protein and mRNA expressions of Bcl-2, HK2, PKM2 and LDHA were increased significantly ($P<0.05$); the serum levels of FSH, the protein and mRNA expressions of Bax and caspase-3, Bax/Bcl-2 ratio were decreased significantly ($P<0.05$). 2-DG could reverse the improvement effects of Zigui yichong formula on the above indexes of POI model mice. **CONCLUSIONS** Zigui yichong formula may inhibit the apoptosis of ovarian granulosa cells, reduce follicle atresia and improve ovarian reserve function by promoting glycolysis levels in POI model mice.

KEYWORDS premature ovarian insufficiency; Zigui yichong formula; glycolysis; ovarian granulosa cells; cell apoptosis

早发性卵巢功能不全（premature ovarian insufficiency，POI）是指女性40岁以前出现卵巢功能减退，以月经不调、闭经、促性腺激素升高和雌激素水平波动性降低为主要表现[1]。卵巢颗粒细胞异常凋亡导致的卵泡闭锁加速是诱发POI的重要机制[2]。在卵泡发育过程中，卵母细胞利用卵巢颗粒细胞糖酵解产生丙酮酸和乳酸，并将其作为能量底物，以促进卵泡的生长、发育和成熟[3]。卵巢颗粒细胞糖酵解水平降低会延缓卵泡的发育，加速卵泡闭锁，最终导致POI发生发展[4]。因此，笔者推测，糖酵解能力不足诱导的卵巢颗粒细胞凋亡可能是导致POI发生的机制之一。

资癸益冲方是第六、七批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师杜惠兰教授的临床经验用方，该方由熟地黄、紫河车、山萸肉、女贞子、枸杞子、白芍、黄芪、党参、白术、当归、香附、炙甘草组成，具有补肾填精、疏肝理脾之效，其治疗卵巢功能减退性疾病的临床疗效显著[5]。本课题组前期研究证实，资癸益冲方可改善POI模型小鼠的血清激素水平，减少卵巢颗粒细胞的凋亡，减少卵泡闭锁，保护卵巢储备功能[6]。但该方是否通过调控糖酵解减少POI模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡，进而保护卵巢储备功能尚不明确。为此，本研究基于糖酵解代谢途径探讨了资癸益冲方对POI模型小鼠卵巢储备功能的影响，以期为防治POI提供新的实验依据和治疗靶点。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Image Quant LAS 4000型化学发光成像系统（美国GE公司）；BX53型显微镜（日本Olympus公司）；NanoDrop 2000型分光光度计、7500 Fast型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪、AMAFD1000型活细胞显微成像仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Gel Logic 100型凝胶电泳系统（美国Bio-Rad公司）；FJ-2021型γ-放射免疫计数器（西安核仪器厂）；Versa Max型多功能酶标仪（美国Molecular Devices公司）。

1.2 主要药品与试剂

资癸益冲方配方颗粒购自神威大药房，其中熟地黄、紫河车、山萸肉、女贞子、枸杞子、白芍、黄芪、党参、白术、当归、香附、炙甘草均为免煎配方颗粒（批号分别为21102341、21072661、21092031、21080771、21081731、21093011、21081731、21102831、21101341、21092821、21061081、21101822）均由神威药业集团有限公司提供。

环磷酰胺（批号WXBDO289V，纯度≥98%）购自美国Sigma公司；2-脱氧-D-葡萄糖（2-deoxy-D-arabino-hexose，2-DG）（批号HY-13966，纯度99.93%）购自美国MCE公司；雌二醇（estradiol，E_2）试剂盒、卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone，FSH）试剂盒（批号分别为S10950204、S10950198）均购自天津市协和医药科技有限公司；血清抗米勒管激素（anti-Müllerian hormone，AMH）试剂盒（批号HY-10659）购自北京华英生物技术研究所；TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、己糖激酶（hexokinase，HK）试剂盒、丙酮酸激酶（pyruvate kinase，PK）试剂盒、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒（批号分别为ATWH17081、ATWE11101、ATWD25101、ATWE18101）均购自亚科因（武汉）生物技术有限公司；兔源B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体、鼠源Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体、鼠源胱天蛋白酶-3（caspase-3）抗体、兔源HK2抗体、兔源M2型PK（pyruvate kinase M2，PKM2）抗体、兔源乳酸脱氢酶A（lactate dehydrogenase A，LDHA）抗体（批号分别为26593-1-AP、60267-1-lg、66470-2-lg、22029-1-AP、15822-1-AP、19987-A-AP）均购自美国Proteintech公司；RNA提取试剂盒（批号R6831-01）购自美国Omega公司；逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒（批号分别为MR05101M、MQ00401S）均购自莫纳（苏州）生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级C57BL/6N雌性小鼠80只，7～8周龄，体重16～19 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。所有动物均饲养于河北中医药大学SPF级实验动物中心，室内温度（24±2）℃，相对湿度40%～70%，光照时间08：00－20：00，适应性喂养7 d。本实验经河北中医药大学伦理委员会审核批准，批件编号DWLL202302006。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

根据随机数字表法将80只小鼠分为正常组、模型组、资癸益冲方组和资癸益冲方+2-DG（糖酵解抑制剂）组，每组20只。除正常组外，其余各组小鼠一次性腹腔注射环磷酰胺75 mg/kg诱导POI模型，从造模第2天起每天10：00行阴道脱落细胞涂片，观察2个动情周期，若阴道上皮细胞无动情周期变化或周期延长、紊乱，则提示造模成功[7]。造模成功后，资癸益冲方组小鼠灌胃资

癸益冲方14.175 g/kg[8]，同时腹腔注射等体积生理盐水；资癸益冲方+2-DG组小鼠灌胃资癸益冲方14.175 g/kg和腹腔注射2-DG 100 mg/kg[9]；正常组和模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水和腹腔注射等体积生理盐水，每日1次，连续给药7 d。

2.2 样本采集

末次给药后行小鼠阴道脱落细胞涂片，选择动情前期小鼠，予持续吸入异氟烷进行麻醉，眼球取血。血样静置2 h，以3 500 r/min离心15 min，取上层血清，冻存备用。摘取小鼠双侧卵巢，每组取5个新鲜卵巢组织，置于4%多聚甲醛中固定，石蜡包埋、切片，备用；剩余卵巢组织用液氮速冻后，转移至－80 ℃冰箱中保存，备用。

2.3 小鼠卵巢组织病理形态学观察及各级卵泡计数

取“2.2”项下各组5只小鼠冻存的卵巢组织切片，脱蜡、苏木精-伊红（HE）染色、脱水、透明、封固后，晾干，在显微镜下观察卵巢组织病理形态；每张切片任选5个视野，对原始卵泡、生长卵泡、窦卵泡以及闭锁卵泡进行计数。

2.4 小鼠血清中E_2、FSH、AMH水平检测

采用放射免疫法检测。取“2.2”项下各组10只小鼠冻存的上层血清，按试剂盒说明书进行操作，检测血清中E_2、FSH、AMH水平。

2.5 小鼠卵巢颗粒细胞凋亡检测

采用TUNEL法检测。取“2.2”项下各组5只小鼠冻存的卵巢组织切片，按试剂盒说明书进行操作，加入TUNEL工作液孵育和4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染核后，采用活细胞显微成像仪观察卵巢颗粒细胞凋亡情况。使用Image J软件分析荧光强度，荧光强度越强，表示卵巢颗粒细胞凋亡数量越多。

2.6 小鼠卵巢组织中糖酵解关键酶活性检测

采用比色法检测。取“2.2”项下各组5只小鼠冻存的卵巢组织，按质量体积比1∶10（g/mL）加入Extraction Buffer，在冰浴中匀浆，于4 ℃以8 000 r/min离心10 min，收集上清液，采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将收集的上清液以及按试剂盒说明书配制的工作液依次加入96孔板中，室温放置20 s，采用酶标仪分别检测HK、PK、LDH在450、340、450 nm波长处的光密度（optical density，OD）值，记为OD1，然后取出，再于室温放置140 s，同法检测OD值，记为OD2，计算其酶活性：酶活性＝3 215×（OD1－OD2）/Cpr，式中Cpr为测量值标准化常数。

2.7 小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下各组5只小鼠冻存的卵巢组织，加入蛋白裂解液，充分破碎和匀浆后，以14 000 r/min离心10 min，提取蛋白，采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，煮沸变性。取变性后的蛋白样品进行电泳，转膜，脱脂牛奶封闭2 h，加入Bcl-2、Bax、caspase-3、HK2、PKM2、LDHA、β-actin一抗（稀释比例分别为1∶2 000、1∶5 000、1∶2 000、1∶2 000、1∶2 000、1∶2 000、1∶4 000），4 ℃孵育过夜；加入对应二抗（稀释比例1∶5 000），室温摇床孵育1 h，洗膜，应用ECL化学发光法检测。使用Image J软件分析条带灰度值，以目的条带与内参（β-actin）的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。

2.8 小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关基因表达检测

采用实时荧光定量PCR检测。取“2.2”项下各组5只小鼠冻存的卵巢组织，按照试剂盒说明书提取RNA，并测定RNA纯度及浓度，逆转录获取cDNA，配制qPCR反应体系（20 μL），包括qPCR Mix 10 μL，正、反向引物各0.4 μL，Low ROX Dye 0.2 μL，DNA模板1 μL，无核酸酶水8 μL。扩增条件为95 ℃预变性10 min；95 ℃变性10 s，60 ℃延伸退火30 s，共40个循环。以β-actin为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算Bcl-2、Bax、caspase-3、HK2、PKM2、LDHA mRNA表达量，并以正常组为参照进行归一化处理。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计、合成，引物序列与产物大小见表1。

表1 PCR引物序列与产物大小

基因	引物序列	产物大小/bp
Bcl-2	正向引物：5′-TGTAGAGAGGAGAACGCAGGTAGTG-3′	83
	反向引物：5′-GGCTTCTTCTTCTGTGTGGTG-GTC-3′	
Bax	正向引物：5′-GCTACAGGGTTTCAT-CCAGGATCG-3′	140
	反向引物：5′-TGCTGTCCAGTTCATCTCCAATTCG-3′	
caspase-3	正向引物：5′-GAAACTCTTCATCATTCAGGCC-3′	250
	反向引物：5′-GCGAGTAAGAATGTGCATAAAT-3′	
HK2	正向引物：5′-TGATCGCCTGCTTATTCACGG-3′	112
	反向引物：5′-AACCGCCTAGAAATCTCCAGA-3′	
PKM2	正向引物：5′-GCCGCCTGGACATTGACTC-3′	145
	反向引物：5′-CCATGAGAGAAATTCAGCCGAG-3′	
LDHA	正向引物：5′-TGTCTCCAGCAAAGACTACTGT-3′	155
	反向引物：5′-GACTGTACTTGACAATGTTGGGA-3′	
β-actin	正向引物：5′-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3′	154
	反向引物：5′-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3′	

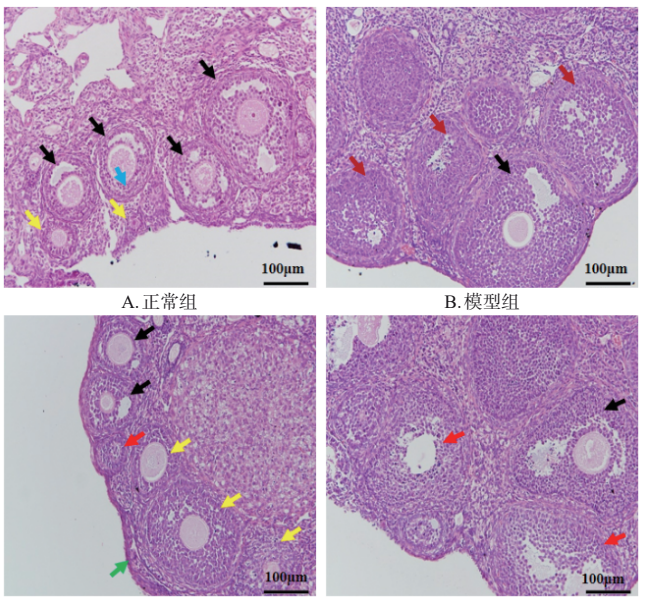
2.9 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析；如方差齐，采用LSD-t检验进行两两比较；如方差不齐，则采用Dunnett's $T3$检验。计数资料以百分率表示，组间比较采用χ^2检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 各组小鼠卵巢组织病理形态学及各级卵泡数量比较

正常组小鼠卵巢组织可见各级卵泡发育良好，卵巢颗粒细胞层数多、排列密集；与正常组比较，模型组小鼠卵巢组织中原始卵泡、生长卵泡、窦卵泡数量和卵巢颗粒细胞层数均显著减少，闭锁卵泡数量显著增多（$P<0.05$）；与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢组织中原始卵泡、生长卵泡、窦卵泡数量和卵巢颗粒细胞层数均显著增多，卵巢颗粒细胞排列整齐，闭锁卵泡数量显著减少（$P<0.05$）；与资癸益冲方组比较，资癸益冲方+2-DG组小鼠卵巢组织中原始卵泡、生长卵泡、窦卵泡数量和卵巢颗粒细胞层数均显著减少，闭锁卵泡显著增多（$P<0.05$）。结果见图1、表2。



A.正常组　B.模型组

C.资癸益冲方组　D.资癸益冲方+2-DG组

黑色箭头：成熟卵泡；黄色箭头：生长卵泡；蓝色箭头：卵巢颗粒细胞；红色箭头：闭锁卵泡；绿色箭头：原始卵泡。

图1　各组小鼠卵巢组织病理形态学的显微图

表2　各组小鼠卵巢组织中各级卵泡数量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，个）

组别	原始卵泡	生长卵泡	窦卵泡	闭锁卵泡
正常组	13.75±2.99	22.25±4.27	12.50±2.65	4.25±1.50
模型组	5.50±2.08[a]	9.50±2.89[a]	5.25±2.21[a]	13.75±3.50[a]
资癸益冲方组	11.25±2.50[b]	17.25±2.75[b]	10.25±1.25[b]	6.00±1.82[b]
资癸益冲方+2-DG组	7.00±2.58[c]	11.25±2.99[c]	5.00±1.41[c]	11.50±2.38[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与资癸益冲方组比较，$P<0.05$。

3.2　各组小鼠血清中E2、FSH、AMH水平比较

与正常组比较，模型组小鼠血清中E_2、AMH水平均显著降低，FSH水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，资癸益冲方组小鼠血清中E_2、AMH水平均显著升高，FSH水平显著降低（$P<0.05$）；与资癸益冲方组比较，资癸益冲方+2-DG组小鼠血清中E_2、AMH水平均显著降低（$P<0.05$），FSH水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

表3　各组小鼠血清中E_2、FSH、AMH水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	E_2/(pg/mL)	AMH/(ng/mL)	FSH/(mIU/mL)
正常组	35.07±1.40	6.05±0.08	1.03±0.22
模型组	19.14±1.43[a]	2.79±0.18[a]	3.53±0.32[a]
资癸益冲方组	29.06±1.91[b]	5.09±0.15[b]	1.45±0.11[b]
资癸益冲方+2-DG组	23.03±1.53[c]	3.85±0.18[c]	2.67±0.17[c]

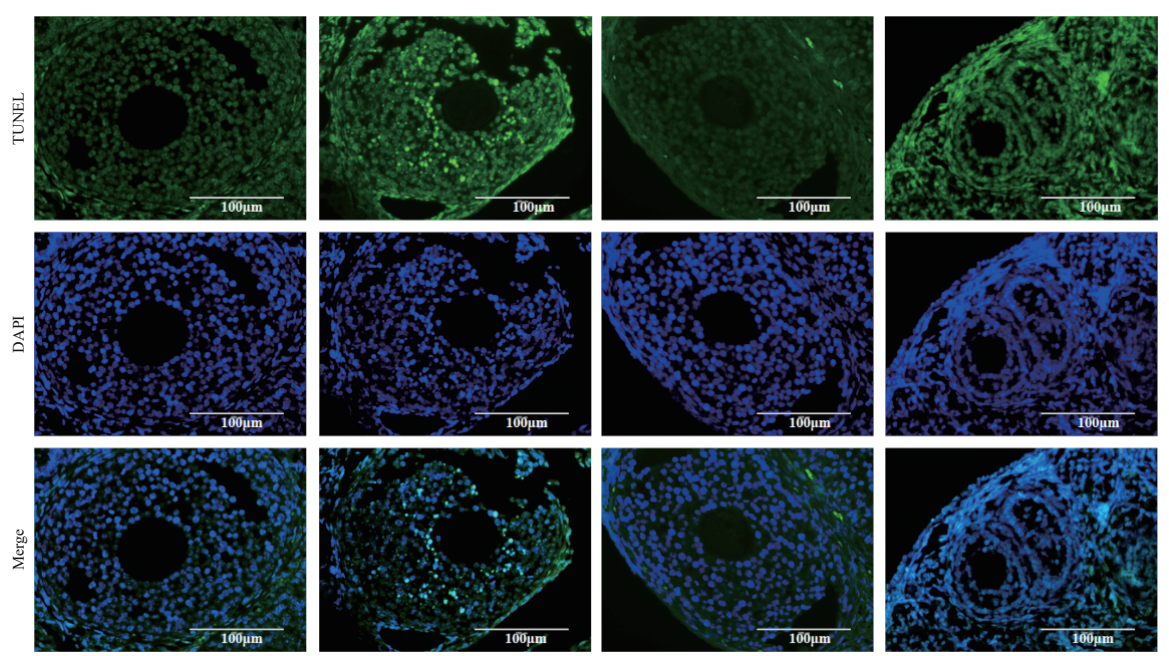
a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与资癸益冲方组比较，$P<0.05$。

3.3　各组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡情况比较

正常组、模型组、资癸益冲方组、资癸益冲方+2-DG组小鼠卵巢颗粒细胞荧光强度分别为25.95±9.07、60.36±9.53、29.56±2.76、44.65±2.36（$n=5$）。与正常组比较，模型组小鼠卵巢颗粒细胞荧光强度显著升高（$P<0.05$），提示卵巢颗粒细胞凋亡数量显著增加；与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢颗粒细胞荧光强度显著降低（$P<0.05$），提示卵巢颗粒细胞凋亡数量显著减少；与资癸益冲方组比较，资癸益冲方+2-DG组小鼠卵巢颗粒细胞荧光强度显著升高（$P<0.05$），提示卵巢颗粒细胞凋亡数量显著增加。结果见图2。

3.4　各组小鼠卵巢组织中HK、PK、LDH活性比较

与正常组比较，模型组小鼠卵巢组织中HK、PK、LDH活性均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢组织中HK、PK、LDH活性均显著升高（$P<0.05$）；与资癸益冲方组比较，资癸益冲方+2-DG组



A.正常组　B.模型组　C.资癸益冲方组　D.资癸益冲方+2-DG组

图2　各组小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的显微图

小鼠卵巢组织中HK、PK、LDH活性均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

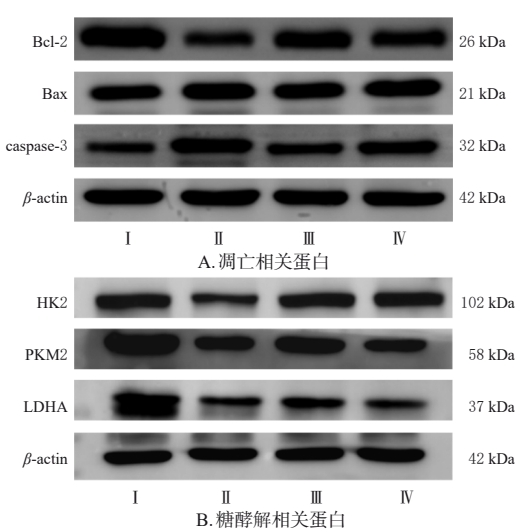
表4　各组小鼠卵巢组织中HK、PK、LDH活性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$，U/mg）

组别	HK	PK	LDH
正常组	220.24±73.35	288.38±26.52	3.64±0.34
模型组	49.04±14.16[a]	57.61±7.58[a]	1.86±0.01[a]
资癸益冲方组	149.24±51.47[b]	247.67±32.14[b]	3.25±0.22[b]
资癸益冲方+2-DG组	60.88±16.20[c]	118.13±18.00[c]	1.98±0.06[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与资癸益冲方组比较，$P<0.05$。

3.5　各组小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关蛋白表达比较

与正常组比较，模型组小鼠卵巢组织中Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA蛋白表达量均显著降低，Bax、caspase-3蛋白表达量及Bax/Bcl-2比值均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢组织中Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA蛋白表达量均显著升高，Bax、caspase-3蛋白表达量及Bax/Bcl-2比值均显著降低（$P<0.05$）；与资癸益冲方组比较，资癸益冲方+2-DG组小鼠卵巢组织中Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA蛋白表达量均显著降低，Bax、caspase-3蛋白表达量及Bax/Bcl-2比值均显著升高（$P<0.05$）。结果见图3、表5。



Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：资癸益冲方组；Ⅳ：资癸益冲方+2-DG组。

图3　各组小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关蛋白表达的电泳图

表5　各组小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	Bcl-2	Bax	caspase-3	Bax/Bcl-2	HK2	PKM2	LDHA
正常组	1.32±0.17	0.74±0.07	0.48±0.11	0.49±0.09	1.13±0.12	1.56±0.38	0.87±0.07
模型组	0.63±0.10[a]	0.98±0.06[a]	0.93±0.19[a]	2.10±0.38[a]	0.72±0.10[a]	0.38±0.15[a]	0.66±0.07[a]
资癸益冲方组	0.89±0.07[b]	0.79±0.09[b]	0.56±0.15[b]	0.84±0.08[b]	0.97±0.08[b]	1.03±0.08[b]	0.81±0.04[b]
资癸益冲方+2-DG组	0.67±0.08[c]	0.95±0.05[c]	0.91±0.12[c]	1.37±0.24[c]	0.76±0.06[c]	0.58±0.14[c]	0.69±0.04[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与资癸益冲方组比较，$P<0.05$。

3.6　各组小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关基因表达比较

与正常组比较，模型组小鼠卵巢组织中Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA mRNA表达量均显著降低，Bax、caspase-3 mRNA表达量及Bax/Bcl-2比值均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢组织中Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA mRNA表达量均显著升高，Bax、caspase-3 mRNA表达量及Bax/Bcl-2比值均显著降低（$P<0.05$）；与资癸益冲方组比较，资癸益冲方+2-DG组小鼠卵巢组织中Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA mRNA表达量均显著降低，Bax、caspase-3 mRNA表达量及Bax/Bcl-2比值均显著升高（$P<0.05$）。结果见表6。

表6　各组小鼠卵巢组织中凋亡和糖酵解相关基因表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	Bcl-2	Bax	caspase-3	Bax/Bcl-2	HK2	PKM2	LDHA
正常组	1	1	1	1	1	1	1
模型组	0.63±0.11[a]	1.95±0.15[a]	3.52±0.52[a]	3.12±0.32[a]	0.29±0.13[a]	0.46±0.07[a]	0.41±0.08[a]
资癸益冲方组	0.85±0.10[b]	1.22±0.13[b]	1.94±0.59[b]	1.44±0.01[b]	0.81±0.17[b]	0.79±0.04[b]	0.80±0.09[b]
资癸益冲方+2-DG组	0.55±0.13[c]	1.57±0.16[c]	3.08±0.37[c]	2.92±0.39[c]	0.55±0.14[c]	0.61±0.07[c]	0.53±0.04[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与资癸益冲方组比较，$P<0.05$。

4　讨论

POI病因复杂，已知的发病因素包括遗传、医源性、免疫、代谢、环境等，确切的发病机制仍不明确[1]。目前，临床针对POI尚无有效的治疗方法，尽管激素替代疗法可有效缓解POI患者低雌激素症状，但POI患者的卵巢储备功能与自然受孕率仍然很低，且长期使用激素可能引发不良反应，患者停药后病情易反复。因此，寻找有效治疗POI的方法，恢复患者卵巢储备功能和生育能力是国内外研究的热点。

卵巢颗粒细胞作为卵泡的重要组成部分，通过与卵母细胞的紧密接触和缝隙连接为卵母细胞的发育和成熟提供营养成分和交换信息[10]。卵巢颗粒细胞异常凋亡会加速卵泡闭锁，降低卵巢储备功能，从而诱导POI的发生发展[2]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组小鼠卵巢组织中原始卵泡、生长卵泡和窦卵泡数量和卵巢颗粒细胞层数均显著减少，闭锁卵泡数量和卵巢颗粒细胞凋亡数量均显著增多，血清中E_2、AMH水平和卵巢组织中Bcl-2蛋白及mRNA表达量均显著降低，血清中FSH水平与卵巢组织中Bax、caspase-3蛋白及mRNA表达量及Bax/Bcl-2比值均显著升高。以上结果表明，环磷酰胺可导致小鼠激素水平紊乱、卵巢颗粒细胞凋亡数量和闭锁卵泡数量增多，卵巢储备功能下降。

充足的能量供应在维持细胞功能与抵抗细胞异常凋亡中具有十分重要的作用，卵巢颗粒细胞合成和分泌雌激素等过程需要消耗大量能量[11]，因此，维持高效的能量代谢对维持卵巢颗粒细胞的正常功能尤为重要。在卵泡发育过程中，卵巢颗粒细胞由于血管供应少而处于相对低氧的状态，这使得卵巢颗粒细胞更倾向于通过糖酵解来产生能量[12]。HK2、PKM2、LDHA是糖酵解过程

中的关键限速酶，其表达的高低可以直接反映糖酵解的水平[13-14]。马惠荣等[15]在环磷酰胺诱导的POI大鼠中发现，糖酵解关键限速酶HK2、PKM2、LDHA活性下降，凋亡卵巢颗粒细胞增加。本研究结果显示，与正常组比较，模型组小鼠卵巢组织中HK、PK、LDH活性和HK2、PKM2、LDHA蛋白及mRNA表达量均显著降低，卵巢颗粒细胞凋亡数量增加。以上结果表明，环磷酰胺诱导POI模型小鼠的糖酵解水平降低，卵巢颗粒细胞凋亡水平升高。

中医认为，POI发病的基本病机是肾精亏耗且与肝脾关系密切。资癸益冲方中熟地黄、紫河车补肾益精养血，为君药；山茱萸、女贞子、枸杞子、白芍补肝肾、益精血，黄芪、党参、白术健脾益气以助生血，7味药共为臣药；当归、香附疏肝行气、养血和血，使补而不滞，共为佐药；甘草味甘性平，性和而缓，能调和诸药，为使药。诸药合用，补肾填精，疏肝理脾，使气血调和、任通冲盛、氤氲有时。本研究结果显示，与模型组比较，资癸益冲方组小鼠卵巢原始卵泡、生长卵泡和窦卵泡数量均显著增加，闭锁卵泡数量显著减少，血清中E_2、AMH水平与卵巢组织中HK、PK、LDH活性和Bcl-2、HK2、PKM2、LDHA蛋白及mRNA表达量均显著升高，血清中FSH水平和卵巢组织中Bax、caspase-3蛋白及mRNA表达量和Bax/Bcl-2比值均显著降低，卵巢颗粒细胞凋亡数量减少。以上结果表明，资癸益冲方可以改善POI模型小鼠的血清激素水平，提高糖酵解水平，减少小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡和卵泡闭锁，改善卵巢储备功能。为了进一步验证糖酵解降低是否能通过影响卵巢颗粒细胞凋亡诱导POI的发生，本研究在资癸益冲方的基础上加用糖酵解抑制剂2-DG，结果显示，2-DG可逆转资癸益冲方对POI模型小鼠上述指标的改善作用。这提示，糖酵解水平降低导致的小鼠卵巢颗粒细胞凋亡数量增加可能是诱导POI发生的关键因素。

综上所述，资癸益冲方可通过促进糖酵解来减少POI模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁，改善卵巢储备功能。

参考文献

[1] CHON S J, UMAIR Z, YOON M S. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 672890.

[2] ZHANG X J, ZHANG R H, HAO J, et al. miRNA-122-5p in POI ovarian-derived exosomes promotes granulosa cell apoptosis by regulating BCL9[J]. Cancer Med, 2022, 11(12): 2414-2426.

[3] TU H Y, LEI X C, HUO P, et al. Energy demand and its regulatory mechanism during folliculogenesis[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2019, 41(3): 408-414.

[4] ZHANG X D, ZHANG W B, WANG Z J, et al. Enhanced glycolysis in granulosa cells promotes the activation of primordial follicles through mTOR signaling[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(1): 87.

[5] LI T L, LIU J, LIU K, et al. Alpha-ketoglutarate ameliorates induced premature ovarian insufficiency in rats by inhibiting apoptosis and upregulating glycolysis[J]. Reprod Biomed Online, 2023, 46(4): 673-685.

[6] 刘雪平，宿滋，李荣霞，等. 基于线粒体能量代谢途径探讨资癸益冲方改善早发性卵巢功能不全小鼠卵巢功能的作用机制[J]. 中华中医药杂志，2023，38(5)：2361-2366.
LIU X P, XIU Z, LI R X, et al. Study on the mechanism of Zigui Yichong Formula in improving ovarian function of POI mice based on mitochondrial energy metabolism pathway[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(5): 2361-2366.

[7] 陆星星，任豆豆，徐华洲，等. 资癸益冲方对卵巢储备功能下降模型大鼠卵巢氧化损伤的影响及其作用机制[J]. 北京中医药大学学报，2020，43(7)：561-568.
LU X X, REN D D, XU H Z, et al. Effects of Zigui Yichong Formula on ovarian oxidative damage in rats with diminished ovarian reserve and its mechanism[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(7): 561-568.

[8] XIU Z, TANG S L, KONG P, et al. Zigui-Yichong-Fang protects against cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency via the SIRT1/Foxo3a pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 314: 116608.

[9] BARILOVITS S J, NEWSOM K J, BICKFORD J S, et al. Characterization of a mechanism to inhibit ovarian follicle activation[J]. Fertil Steril, 2014, 101(5): 1450-1457.

[10] RICHANI D, POLJAK A, WANG B, et al. Oocyte and cumulus cell cooperativity and metabolic plasticity under the direction of oocyte paracrine factors[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2024, 326(3): E366-E381.

[11] ZHANG C H, LIU X Y, WANG J. Essential role of granulosa cell glucose and lipid metabolism on oocytes and the potential metabolic imbalance in polycystic ovary syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16247.

[12] FONTANA J, MARTÍNKOVÁ S, PETR J, et al. Metabolic cooperation in the ovarian follicle[J]. Physiol Res, 2020, 69(1): 33-48.

[13] CHELAKKOT C, CHELAKKOT V S, SHIN Y, et al. Modulating glycolysis to improve cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2606.

[14] HUANG L E, LIANG A H, LI T L, et al. Mogroside Ⅴ improves follicular development and ovulation in young-adult PCOS rats induced by letrozole and high-fat diet through promoting glycolysis[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 838204.

[15] 马惠荣，陈景伟，杜惠兰. 杜惠兰教授对卵巢功能减退性疾病治疗经验的研究[J]. 河北中医药学报，2022，37(1)：41-43，48.
MA H R, CHEN J W, DU H L. Professor Du Huilan's experience in treatment of ovarian hypofunction diseases[J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 2022, 37(1): 41-43, 48.

（收稿日期：2024-04-15　修回日期：2024-09-23）
（编辑：邹丽娟）