

引用:周芳,曾晶,刘牧涯,陈嘉盈,王永连,尤昭玲.基于AMPK/SIRT1信号通路探讨补肾健脾方对卵巢储备功能下降大鼠能量代谢的影响[J].中医导报,2026,32(5):20-25,68.

基于AMPK/SIRT1信号通路探讨 补肾健脾方对卵巢储备功能下降大鼠 能量代谢的影响*

周芳^{1,2}, 曾晶¹, 刘牧涯², 陈嘉盈², 王永连², 尤昭玲¹
(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;
2.湖南中医药大学第一中医临床学院,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的:从能量代谢角度探讨补肾健脾(BSJP)方调控大鼠卵巢储备功能下降的机制。方法:将50只动情周期正常的雌性SD大鼠随机分成正常组10只和造模组40只。造模组予环磷酰胺75 mg/kg一次性腹腔注射造模。造模成功后随机分成模型组、西药组[芬吗通0.204 mg/(kg·d)]、BSJP等量组[6.43 g/(kg·d)]及BSJP高量组[12.85 g/(kg·d)],连续给药15 d。酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清中卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、抗米勒管激素(AMH)水平;苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠卵巢结构;免疫组化法检测卵巢AMPK蛋白表达量;蛋白质印迹法(Western blotting)及实时定量聚合酶链反应(qPCR)检测卵巢AMPK、SIRT1蛋白及基因表达量。结果:与正常组比较,模型组大鼠动情周期紊乱,FSH、LH水平明显升高($P<0.01$),E₂、AMH明显降低($P<0.01$);HE染色显示大鼠卵巢结构破坏;ATP水平、AMPK蛋白、SIRT1蛋白及基因表达降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与模型组比较,给药干预后各组大鼠FSH、LH水平均明显下降($P<0.01$),E₂、AMH均明显升高($P<0.01$);卵巢结构均有不同程度的恢复;西药组、BSJP高量组、BSJP等量组大鼠干预后ATP均增多($P<0.01$ 或 $P<0.05$);BSJP等量组及BSJP高量组大鼠免疫组化检测AMPK蛋白表达升高($P<0.01$),西药组AMPK蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);Western blotting检测西药组、BSJP高量组及BSJP等量组大鼠AMPK蛋白表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),西药组和BSJP高剂量组大鼠AMPK基因表达明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),BSJP等量组大鼠AMPK基因表达变化差异无统计学意义($P>0.05$),西药组和BSJP高量组大鼠SIRT1蛋白及基因表达量均显著升高($P<0.01$),BSJP等量组大鼠SIRT1蛋白表达量、基因表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:补肾健脾方能改善卵巢储备功能,其可能通过激活AMPK/SIRT1通路,促进AMPK、SIRT1表达,增加ATP合成,改善卵巢能量代谢障碍,从而治疗环磷酰胺对大鼠卵巢储备功能的损伤。

[关键词] 卵巢储备功能下降;补肾健脾方;AMPK/SIRT1通路;ATP;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)05-0020-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.05.004

Exploring the Effects of the Bushen Jianpi Formula (补肾健脾方) on Energy Metabolism in Rats with Diminished Ovarian Reserve Based on the AMPK/SIRT1 Signaling Pathway

ZHOU Fang^{1,2}, ZENG Jing¹, LIU Muya², CHEN Jiaying², WANG Yonglian², YOU Zhaoling¹

(1.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China;

2.The First Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

*基金项目:湖南省创新型省份建设专项项目(2023SK2050);长沙市自然科学基金项目(Kq2202452);湖南省卫生健康委重点指导项目(C202305017704);湖南省中医药管理局委托项目(D2023002);湖南中医药大学校级重点项目(2019XJJJ036);湖南中医药大学研究生创新课题校级项目(2023CX96)

通信作者:曾晶,女,副主任医师,研究方向为中医药防治不孕症

[Abstract] Objective: To explore the mechanism by which the Bushen Jianpi formula (BSJP) regulates diminished ovarian reserve in rats from the perspective of energy metabolism. Method: Totally 50 normal female SD rats were randomly divided into the normal group ($n=10$) and the modeling group ($n=40$). The modeling group was given cyclophosphamide (75 mg/kg) by one-time intraperitoneal injection. After successful modeling, the rats were randomly divided into a model group, a Western medicine group [Femoston 0.204 mg/(kg·d)], a BSJP equivalent-dose group [6.43 g/(kg·d)], and a BSJP high-dose group [12.85 g/(kg·d)], and the rats were treated continuously for 15 days. The levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E_2) and anti-Muller-tube hormone (AMH) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The ovarian structure of rats was observed by HE staining. The expression of AMPK protein in ovary was detected by immunohistochemistry. Ovarian AMPK, SIRT1 protein and gene expression were detected by Western blotting and Real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Results: Compared with the normal group, the estrous cycle of rats in the model group was disordered, the levels of FSH and LH were significantly increased ($P<0.01$), and E_2 and AMH were significantly decreased ($P<0.01$). HE staining showed that the ovarian structure of rats was severely damaged in the model group. The levels of ATP, AMPK protein, SIRT1 protein and gene expressions decreased in the model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the model group, after drug administration intervention, the levels of FSH and LH in each group of rats decreased significantly ($P<0.01$), and E_2 and AMH increased significantly ($P<0.01$). HE staining showed that the ovarian structures all recovered to varying degrees. The ATP of the ovaries increased significantly in the Western medicine group, BSJP equivalent-dose group and BSJP high-dose group ($P<0.01$ or $P<0.05$), and immunohistochemical tests showed that the expression of AMPK protein increased in the BSJP equivalent-dose group and BSJP high-dose group ($P<0.01$), while there was no statistically significant expression of AMPK protein in the Western medicine group ($P>0.05$). The expression of AMPK protein, detected by Western blotting, in the Western medicine group, BSJP equivalent-dose group and BSJP high-dose group was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expression of AMPK gene in the Western medicine group and BSJP high-dose group was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). There was no statistically significant change in the expression of AMPK gene in the BSJP equivalent-dose group ($P>0.05$). The expression levels of SIRT1 protein and gene in the Western medicine group and BSJP high-dose group were significantly increased ($P<0.01$), while there was no statistically significant change in the expression level of SIRT1 protein in BSJP equivalent-dose group ($P>0.05$). Conclusion: Bushen Jianpi formula can improve ovarian reserve function, possibly by activating the AMPK/SIRT1 signaling pathway, promoting the expression of AMPK and SIRT1, increasing ATP synthesis, and ameliorating ovarian energy metabolism disorders, thereby treating cyclophosphamide-induced damage to ovarian reserve function in rats.

[Keywords] decreased ovarian reserve function; Bushen Jianpi formula; AMPK/SIRT1 pathway; ATP; rat

卵巢储备功能下降(decreased ovarian reserve, DOR)严重影响女性生殖健康^[1-2],若不积极干预,可快速发展为卵巢早衰且无法逆转^[3]。临床常采用促排卵、周期性激素治疗,但卵泡质量无保证,且存在用药禁忌、副作用繁杂、需要长期治疗等风险^[4]。全国名中医尤昭玲教授创立“冰山论”^[5],提出“取肾之火,融冰醒泡”的治疗思路。临床发现补肾健脾(BSJP)方能改善卵巢相关激素水平,提高妊娠率^[6]。动物研究提示BSJP方能改善卵巢病理变化、提高卵巢储备功能,改善卵泡内部缺氧状态^[7-8]。

卵泡的数量和质量反映了卵巢储备功能。线粒体活性可能是决定生殖能力的关键因素^[9]。卵巢中颗粒细胞依靠线粒体合成大量三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),为卵泡发育和成熟提供必需能量^[10]。研究发现,5-单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是线粒体生

物发生和能量代谢的关键调节因子^[11]。沉默信息调节因子2相关酶类1(silence information regulator 2 related enzymes 1, SIRT1)可调控AMPK的表达^[12]。AMPK、SIRT1是能量代谢的核心,二者相互依赖、相互作用,维持能量平衡^[13]。据此推测,BSJP方可能通过调控AMPK/SIRT1信号通路改善能量代谢。本研究基于AMPK/SIRT1通路,从能量代谢角度,研究BSJP方干预DOR大鼠的作用机制,以期BSJP方临床应用提供可靠实验依据。

1 材 料

1.1 动物 50只SPF级健康雌性SD大鼠(8周龄左右),体重180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。于湖南中医药大学动物实验中心SPF级屏障环境中分笼饲养,温度(24±2)℃,湿度(60±5)%,12 h/12 h光暗交替,自由摄取食物、饮水,适应性喂

养7 d。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准(伦理号:20241111-91)。

1.2 药物 补肾健脾方组成:党参10 g(批号:CK23123101)、黄芪10 g(批号:RS23012401)、山药10 g(批号:NG23011403)、白术10 g(批号: SX23123001)、菟丝子10 g(批号:NG22123012)、橘叶10 g(批号:231101)、桑椹10 g(批号:2322068)、莲子10 g(批号:2321018)、甘草5 g(批号:ZR23123104)等。中药饮片均购于湖南中医药大学第一附属医院。药材加入10倍量水煮沸1 h,过滤出药液,再加入8倍量水煎煮30 min,合并混匀2次滤液,浓缩至含生药量2 g/mL,4℃冰箱冷藏备用。雌二醇片/雌二醇地屈孕酮片复合包装(商品名:芬吗通,2 mg/10 mg, Abbott Healthcare Products B.V.生产,进口药品注册证号:H20150345,批号:370667)。

1.3 试剂 环磷酰胺(200 mg/瓶,德国Baxter Oncology GmbH公司,批号:2F554A);苏木素染液(批号:BA-4041)、伊红染色液(批号:BA-4042)均购自珠海贝索生物技术有限公司;大鼠卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:RA20044-96T)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH) ELISA试剂盒(批号:RA20133-96T)、雌二醇(estradiol, E₂) ELISA试剂盒(批号:E-EL-R3022)、抗米勒管激素(anti-Müllerian hormone, AMH) ELISA试剂盒(批号:EK-R37835)均购自武汉华联生物技术有限公司;Trizol试剂(新景生物有限公司,批号:5301082);AMPK抗体(批号:BA07196914)、SIRT1抗体(批号:BB03_081306)、β-actin抗体(批号:AG07197947)均购自北京博奥森生物技术有限公司;ATP含量测试盒(南京建成生物技术有限公司,批号:20231267)。

1.4 仪器 酶标仪(Synergy2公司,型号:Bio-tek);隔水式恒温培养箱(金坛有限公司,型号:DHP-500);精密分析天平(瑞士Mettler公司,型号:AE240);冷冻离心机(力新仪器有限公司,型号:neofuge 15R);电泳仪(北京六一生物技术有限公司,型号:DYY-6C);实时定量PCR仪(美国Bio-Rad公司生产,型号:CFX Maestro);脱色摇床(北京六一生物技术有限公司,型号:WD-9405A)。

2 方法

2.1 DOR大鼠模型制备、分组及给药 50只8周龄健康雌性SD大鼠,体质量180~220 g,喂养1周后每日09:30:00进行阴道涂片,并镜下观察、记录。50只大鼠动情周期均正常,随机分为正常组10只和造模组40只,参考国内外文献[14-15]和预实验造模结果,采用一次性腹腔注射环磷酰胺75 mg/kg制备DOR模型。正常组予腹腔注射等体积生理盐水作为对照。造模后每天进行阴道细胞学涂片镜检,观察到大鼠失去正常动情周期提示造模成功^[6]。

依据随机数字表将造模成功的40只模型大鼠随机分为模型组、西药组、BSJP方等量组及BSJP方高量组(二倍量),每组10只。正常组、模型组予等体积蒸馏水灌胃;西药组予芬吗通砖红片0.204 mg/(kg·d)灌胃,第4天改用黄片0.204 mg/(kg·d),疗程6 d,两药同时停用1 d后,第8天开始重复下一疗程;BSJP生药临床用量为125 g/d,分别予BSJP方等、高量[6.43、12.85 g/(kg·d)]

灌胃。各组灌胃体积均为10 mL/(kg·d),1次/d,疗程15 d。

2.2 样本取材 给药15 d后处死大鼠取材。取材12 h前大鼠仅可饮水,逐个称重后腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,摘取大鼠卵巢。将左侧卵巢组织剔除多余组织称重后,浸入4%多聚甲醛溶液中固定。固定后,对组织进行病理染色,观察卵巢的病理形态学变化。将右侧卵巢组织放置在-80℃的冰箱中存储;完成腹主动脉采血,静置离心后取上层清液部分,置于-80℃冰箱待ELISA检测。

2.3 观察指标及检测方法

2.3.1 大鼠动情周期 每日上午09:30:00进行大鼠阴道脱落细胞涂片,按照瑞氏染液说明书进行染色后显微镜下观察,动情周期处于动态稳定的状态中,正常情况下主要根据细胞比例判断周期^[7]。动情前期:大量有核上皮细胞及少量角化上皮细胞;动情期:视野内大量无核角化细胞,无规则分布;动情后期:大量白细胞,夹杂部分无核细胞;动情间期:白细胞占大比例,有核细胞、无核细胞各少量存在其间。

2.3.2 ELISA法检测大鼠血清中性激素含量 腹主动脉采血,3 000 r/min、15 min离心后取上层血清保存于-80℃超低温冰箱。检测时严格按照ELISA试剂盒操作步骤:稀释标准品、加样、洗涤后检测吸光度(OD)值,指标包括FSH、LH、E₂、AMH。

2.3.3 HE染色观察大鼠卵巢形态结构 染色时取出卵巢予以梯度乙醇脱水,二甲苯透明后石蜡包埋、切成5 μm的切片。按照HE染色步骤染色后,脱水、封片、晾干。显微镜观察同时采集图像,Image Scope软件记录。

2.3.4 卵巢ATP含量检测 准确称取组织,按比例加入冷双蒸水后制成10%的匀浆液;取出部分离心(3 500 r/min, 10 min),取上清测定蛋白浓度;将剩余液体置于沸水浴中,煮10 min后漩渦混匀1 min;3 500 r/min、10 min离心后取上清液待测。配制试剂,设置空白管、标准管、对照管、测定管,按照要求分别加入标准液、试剂A/B、样本、双蒸水后37℃水浴30 min,加入试剂四,4 000 r/min、5 min离心后取300 μL上清液。加入显色剂后室温静置2 min,加入终止剂并室温静置5 min,测各管OD值。注意操作过程中严格按照步骤进行并注意混匀。

2.3.5 免疫组化法检测卵巢组织AMPK蛋白表达 取出包埋好的卵巢切片脱蜡,PBS冲洗3次,室温孵育10 min后蒸馏水冲洗,先滴加一抗(稀释浓度1:200),37℃避光孵育1~2 h后加二抗,再次37℃避光孵育30 min,最后滴加DAB显色液显色,苏木素复染,封片。光镜下观察拍照,Image J图像处理软件分析平均光密度。

2.3.6 蛋白质印迹法(Western blotting)检测卵巢组织AMPK、SIRT1蛋白表达 RIPA裂解大鼠新鲜卵巢组织后研磨,BCA定量。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,稀释一抗(TBST溶解的5%脱脂牛奶,磷酸化蛋白使用TBST溶解的5%BSA),4℃孵育过夜,用TBST在室温下脱色摇床上洗3次,5 min/次。将二抗用TBST稀释3 000倍,室温下孵育30 min后洗3次。去尽残液,包好,放入暗匣中曝光。最后用显影、定影试剂进行显影和定影。Image J软件分析条带灰度值。

2.3.7 Real-time PCR法检测各组大鼠卵巢AMPK、SIRT1基

因表达 从卵巢组织中提取RNA后反转录得到cDNA,以cDNA为模板,提前按照目的基因设计合成qPCR引物,并以此进行real-time PCR。根据扩增结果,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算RQ值。

2.4 统计学方法 应用软件SPSS 30.0、GraphPadPrism10.1.0、Image J、Image Scope统计、分析数据及图片,计量资料用“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用Tukey检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 BSJP方对DOR大鼠动情周期的影响 大鼠正常动情周期约4~5 d,造模后,阴道细胞涂片镜检观察到模型大鼠无性周期变化(≥ 3 d)或动情周期延长(≥ 6 d),提示大鼠动情周期紊乱。予以BSJP方和西药芬吗通干预后,大鼠动情周期恢复至正常状态。(见图1)

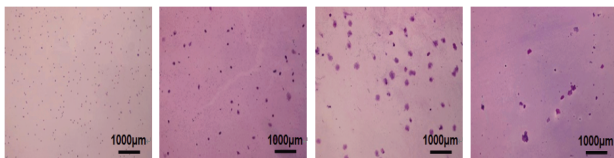


图1 大鼠正常动情周期(GIEMSA, $\times 4$)

3.2 BSJP方对DOR大鼠血清中FSH、LH、 E_2 、AMH水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清FSH及LH水平显著上升、 E_2 及AMH水平显著下降($P<0.01$)。与模型组比较,给药干预后,各给药组大鼠FSH及LH水平显著降低、 E_2 及AMH水平显著升高($P<0.01$)。(见表1)

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

组别	n	剂量/[mg/(kg·d)]	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	E_2 (pg/mL)	AMH(ng/L)
正常组	10		0.45±0.09	0.47±0.04	1.06±0.08	1.10±0.06
模型组	10		1.06±0.08 ^a	1.04±0.11 ^a	0.43±0.07 ^a	0.44±0.07 ^a
西药组	10	0.204	0.57±0.09 ^b	0.58±0.06 ^b	0.87±0.07 ^b	0.61±0.05 ^b
BSJP等量组	10	6.430	0.81±0.07 ^b	0.84±0.10 ^b	0.58±0.09 ^b	0.60±0.10 ^b
BSJP高量组	10	12.850	0.63±0.06 ^b	0.62±0.09 ^b	0.81±0.09 ^b	0.82±0.08 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

3.3 BSJP方对DOR大鼠卵巢结构的影响 正常组大鼠卵巢结构未见病理改变,各级卵泡发育正常、数量未见减少,卵巢间质组织结构清晰。模型组大鼠卵巢结构明显紊乱,闭锁卵泡占比增大,仅夹杂少量成熟卵泡,卵巢间质组织粘连。西药组大鼠各级卵泡及成熟卵泡明显存在,闭锁卵泡占比明显减少,间质组织较清晰。经中药干预的大鼠卵巢功能有一定程度的恢复,BSJP高量组大鼠卵巢形态改善更明显,视野内未见闭锁卵泡,各级卵泡数量较西药组稍有增加。(见图2)

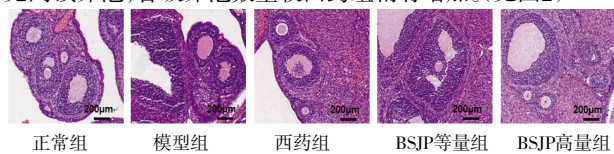


图2 各组大鼠卵巢组织病理形态(HE染色, $\times 100$)

3.4 BSJP方对DOR大鼠卵巢组织中ATP含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠ATP水平明显减少($P<0.01$);与模型组比较,西药组、BSJP等量组、BSJP高量组大鼠干预后ATP均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表2)

表2 各组大鼠卵巢组织 ATP 含量比较 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{mol/g}$)

组别	n	剂量/[mg/(kg·d)]	ATP
正常组	10		117.46±6.53
模型组	10		59.89±4.64 ^a
西药组	10	0.204	76.46±4.15 ^c
BSJP等量组	10	6.430	79.63±4.29 ^b
BSJP高量组	10	12.850	98.75±5.08 ^c

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

3.5 BSJP方对DOR大鼠卵巢组织中AMPK蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠AMPK蛋白阳性表达降低($P<0.01$);与模型组比较,BSJP等量组及BSJP高量组大鼠AMPK蛋白表达水平均升高($P<0.01$),而西药组大鼠AMPK蛋白表达则差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表3、图3)

表3 各组大鼠卵巢组织 AMPK 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/[mg/(kg·d)]	AMPK
正常组	10		9.25±0.75
模型组	10		3.05±1.02 ^a
西药组	10	0.204	3.70±1.41
BSJP等量组	10	6.430	5.70±1.43 ^b
BSJP高量组	10	12.850	8.25±0.60 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

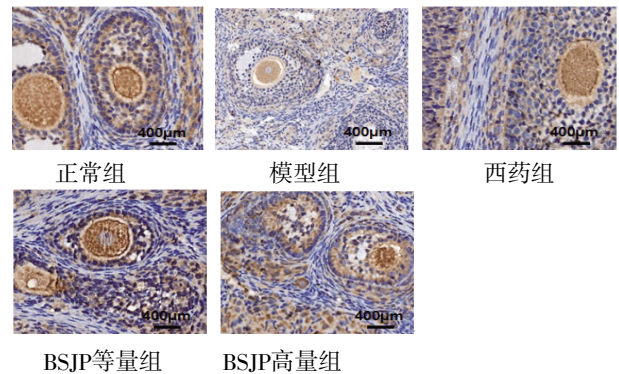


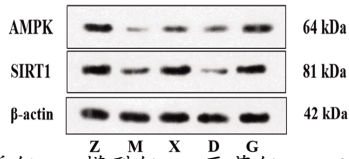
图3 各组大鼠卵巢组织中 AMPK 阳性表达情况 (免疫组化染色, $\times 200$)

3.6 BSJP方对DOR大鼠卵巢组织中AMPK、SIRT1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠卵巢AMPK及SIRT1蛋白表达水平均显著下降($P<0.01$)。与模型组比较,西药组和BSJP高量组大鼠AMPK和SIRT1蛋白表达均显著升高($P<0.01$),BSJP等量组大鼠AMPK蛋白表达有所升高($P<0.05$)、而SIRT1蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表4、图4)

表4 各组大鼠卵巢组织中 AMPK、SIRT1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/[mg/(kg·d)]	AMPK/ β -actin	SIRT1/ β -actin
正常组	10		1.03±0.02	0.99±0.03
模型组	10		0.19±0.01 ^a	0.35±0.09 ^a
西药组	10	0.204	0.41±0.05 ^b	0.93±0.04 ^b
BSJP等量组	10	6.430	0.33±0.05 ^c	0.31±0.07 ^d
BSJP高量组	10	12.850	0.71±0.13 ^b	0.84±0.01 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$,^d $P>0.05$ 。



注:Z.正常组;M.模型组;X.西药组;D.BSJP等量组;G.BSJP高量组。

图4 各组大鼠卵巢组织中AMPK、SIRT1蛋白表达条带图
3.7 BSJP方对DOR大鼠卵巢组织中AMPK、SIRT1基因表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠AMPK mRNA、SIRT1 mRNA表达量均明显降低 ($P<0.01$);与模型组比较,BSJP高量组大鼠AMPK mRNA、SIRT1 mRNA表达量明显升高 ($P<0.01$),西药组大鼠AMPK mRNA、SIRT1 mRNA表达量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),BSJP等量组大鼠AMPK mRNA、SIRT1 mRNA表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(见表5、图5-7)

表5 各组大鼠卵巢组织中AMPK、SIRT1基因表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/[mg/(kg·d)]	AMPK mRNA	SIRT1 mRNA
正常组	10		1.00±0.10	1.00±0.08
模型组	10		0.42±0.06 ^a	0.20±0.06 ^a
西药组	10	0.204	0.65±0.11 ^b	0.55±0.11 ^c
BSJP等量组	10	6.430	0.55±0.09 ^d	0.33±0.10 ^d
BSJP高量组	10	12.850	0.75±0.08 ^e	0.66±0.11 ^e

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$,^d $P>0.05$ 。

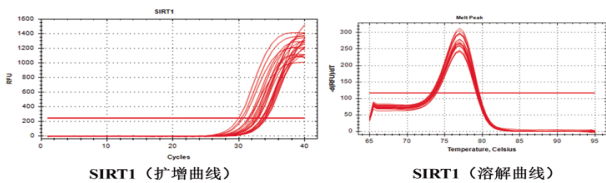


图5 SIRT1 mRNA的扩增曲线(左)和溶解曲线(右)

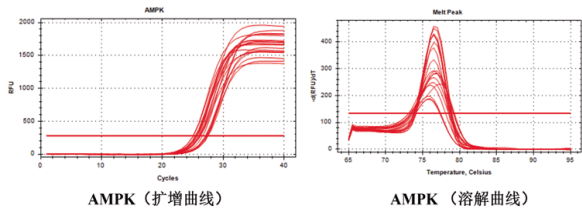


图6 AMPK mRNA的扩增曲线(左)和溶解曲线(右)

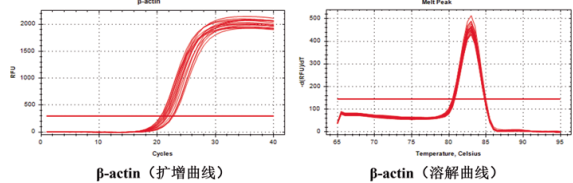


图7 内参基因(β -actin)的扩增曲线(左)和溶解曲线(右)

4 讨论

DOR是导致排卵障碍性不孕的常见原因,临床妊娠率只有2%~4%^[18]。DOR发病率为10%~35%^[19],且有逐年攀升和年轻化趋势^[20],若不及时干预,可迅速发展为卵巢早衰^[21]。目前,针对DOR不孕的治疗,西医主要使用性激素替代、免疫调节、辅助生殖技术^[22]等,然而均存在不同程度的局限性。中医药疗法

因安全性更高,副作用更小,且在缓解临床症状和提高患者生育能力和生活质量等方面有显著优势,已成为治疗DOR的重要手段。

根据DOR临床症状,可将其归入中医学“月经过少”“月经后期”“闭经”“不孕”等范畴。《医学正传》记载“月水全赖肾水施化”,肾精的盛衰直接影响经血的盈亏及孕育的难易。全国名中医尤昭玲针对DOR的病机特点,提出“冰山论”,将尚未担当繁育之责的始基卵泡比喻成沉眠于冰山之下,可以运用温补肾脾之药,取肾之火,融化冰山,唤醒这些卵泡使其担当孕育之责^[23]。BSJP方是尤昭玲团队的临床经验方,临床使用率高,安全有效^[6]。该方在五子衍宗丸合四君子汤基础上加减而成。菟丝子、枸杞子、莲子取“以子补子”之义,补肾益精以暖巢养泡,党参、黄芪、山药、莲子益气健脾,以期“后天补养先天”助巢长泡。橘叶疏肝理气通络,促进卵泡破膜。炙甘草调和诸药。全方共奏补肾益精,疏肝理气之功,补而不滞,行而不伤,特别适合有妊娠要求的DOR患者。现代药理学发现,方中多种中药活性成分均能调节AMPK及其交互信号通路,能调控肿瘤细胞能量代谢^[24],为本方提供能量代谢相关的生物学基础。本实验以能量代谢改善卵巢功能为切入点,进一步探索BSJP方对DOR的作用机制。

卵子发育、成熟、排出及分泌激素等多种生物学过程均需要大量能量的参与。卵巢颗粒细胞内存在大量细胞器线粒体,其与卵泡发育、卵巢储备功能密切相关^[25]。线粒体是细胞的能量工厂,ATP均由线粒体通过氧化磷酸化过程产生,为各组织器官提供能量。已有大量研究证实,卵巢功能减退类疾病存在线粒体形态和功能异常^[26-27]。线粒体能量代谢障碍会干扰卵巢颗粒细胞能量供应途径,致其卵泡生长发育过程缺乏所必需的能量供应,严重损害卵泡发育和成熟过程,引起DOR^[28-29]。AMPK和SIRT1是细胞内两个关键的能量和代谢感受器及调节器。AMPK是体内的“能量感受器”,AMP激活AMPK后磷酸化下游因子,调节细胞的能量代谢,SIRT1是其下游效应器之一,二者常相互作用^[30]。AMPK/SIRT1轴共同调控细胞的能量稳态、氧化应激、线粒体功能、自噬和炎症反应等过程。AMPK/SIRT1通路在卵巢功能维持中的作用主要有5个方面:(1)维持线粒体健康。AMPK激活可以增加NAD⁺水平从而激活SIRT1,SIRT1反过来也可以激活AMPK,形成一个正反馈循环,共同维持卵巢细胞的能量稳态和线粒体健康。(2)抗氧化应激:AMPK/SIRT1轴共同增强卵巢细胞抵抗氧化损伤的能力,延缓卵泡闭锁和卵巢衰老。(3)抑制炎症反应:AMPK多种途径抑制NF- κ B激活,SIRT1抑制NF- κ B转录活性,AMPK/SIRT1抑制炎症有助于保护卵泡免受炎症损伤。(4)促进自噬:AMPK启动自噬,SIRT1促进自噬体的形成和成熟。AMPK/SIRT1协同激活自噬,维持细胞稳态。(5)延缓细胞衰老:SIRT1是著名的“长寿蛋白”,可抑制细胞衰老相关分泌表型,维持基因组稳定性。AMPK通过调节代谢、抑制mTOR信号(促衰老通路)等,间接延缓衰老。

本研究选择雌性SD大鼠为研究对象,选择《卵巢储备功能减退临床诊治专家共识》^[31]推荐的芬吗通作为阳性对照药,运用临床常规血清FSH、LH、E₂、AMH等指标来评价卵巢功

能^[32],选择AMPK/SIRT1作为能量代谢的评估指标。本研究结果显示,DOR模型组大鼠动情周期紊乱,卵巢结构严重破坏,FSH、LH水平明显升高,E₂、AMH、ATP水平均下降,AMPK蛋白、SIRT1蛋白及基因表达降低。给予芬吗通及BSJP方干预后,卵巢结构有不同程度的恢复,FSH、LH水平下降,E₂、AMH水平明显升高。BSJP高量组ATP均明显增多,BAMPK、SIRT1蛋白及基因表达量均升高,BSJP等量组AMPK基因表达无明显变化,SIRT1蛋白表达量稍有降低、基因表达稍高。提示BSJP高量组效果优于等量组,临床应用时可适当调整剂量。由此可见,本研究证实BSJP方可能通过激活AMPK/SIRT1通路,上调上游因子AMPK的表达,作用于SIRT1,调整卵巢内能量代谢平衡,从而改善激素水平,提高卵巢储备功能。本实验结果与前期研究结果BSJP方可能通过激活HIF-1 α /VEGF通路改善卵泡内部缺氧状态,调控血管生成、激活mTOR通路抑制大鼠卵巢颗粒细胞的自噬与凋亡的结论相一致^[7-8]。

本研究仍然存在不足,在找到BSJP方可以通过激活AMPK/SIRT1信号通路达到改善能量代谢后,未使用相关抑制剂或者激动剂进行反向通路验证,还需进一步研究论证。

综上所述,BSJP方可以改善DOR大鼠卵巢线粒体功能,维持线粒体健康,最终发挥治疗DOR的目的。从中医“未病先防,既病防变”的角度出发,针对卵巢储备功能下降,应积极预防、尽早发现、尽早治疗。BSJP方是靶向线粒体能量代谢逆转卵巢功能的潜在方剂,值得深入研究。

参考文献

- [1] CONFORTI A, CARBONE L, DI GIROLAMO R, et al. Therapeutic management in women with a diminished ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Fertil Steril*,2025,123(3): 457-476.
- [2] LEE D Y. Diminished ovarian reserve: A narrative review of etiologies and possible therapeutic approaches[J]. *J Menopausal Med*,2025,31(2):85-94.
- [3] WANG J, SUN X G, YANG Z X, et al. Epigenetic regulation in premature ovarian failure: A literature review[J]. *Front Physiol*,2022,13:998424.
- [4] CAVALCANTE M B, SAMPAIO O G M, C?MARA F E A, et al. Ovarian aging in humans: Potential strategies for extending reproductive lifespan[J]. *Geroscience*,2023,45(4):2121-2133.
- [5] 邢艺璇,唐诗,刘未艾,等.基于“冰山论”辨治卵巢储备功能减退性不孕症:全国名中医尤昭玲学术思想与临床经验研究[J].*湖南中医药大学学报*,2023,43(5):775-779.
- [6] 曾晶,周芳,刘天洋,等.补肾健脾方治疗卵巢储备功能减退相关不孕脾肾两虚证临床观察[J].*中医导报*,2024,30(1):70-74.
- [7] 周芳,曾晶,王永连,等.基于相关细胞凋亡途径探讨补肾健脾方调控大鼠卵巢储备功能减退的机制研究[J].*湖南中医药大学学报*,2024,44(7):1167-1174.
- [8] 周芳,曾晶,王永连,等.补肾健脾方对卵巢储备功能下降大鼠血管生成的影响[J].*世界中医药*,2025,20(16):2840-2847.
- [9] PAHAL S, MAINALI N, BALASUBRAMANIAM M, et al. Mitochondria in aging and age-associated diseases[J]. *Mitochondrion*,2025,82:102022.
- [10] GŁÓD P, MARYNOWICZ W, HOMA J, et al. Low doses of bisphenol F and S affect human ovarian granulosa cells by reducing the number of active mitochondria and ATP synthesis[J]. *Toxicol Lett*, 2025,405:41-50.
- [11] SHARMA A, ANAND S K, SINGH N, et al. AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis[J]. *Exp Cell Res*,2023,428(1):113614.
- [12] YOU Y Z, LIANG W. SIRT1 and SIRT6: The role in aging-related diseases[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*,2023,1869(7):166815.
- [13] GUAN G Q, CHEN Y X, DONG Y L. Unraveling the AMPK-SIRT1-FOXO pathway: The in-depth analysis and breakthrough prospects of oxidative stress-induced diseases[J]. *Antioxidants (Basel)*,2025,14(1):70.
- [14] 张飒,高慧,徐文君,等.环磷酸胺致大鼠卵巢储备功能低下的模型对照研究[J].*中医临床杂志*,2018,30(1):100-104.
- [15] YADAV A K, YADAV P K, CHAUDHARY G R, et al. Autophagy in hypoxic ovary[J]. *Cell Mol Life Sci*,2019,76(17):3311-3322.
- [16] 张亚萍,游琛,韦玉娜,等.基于TGF- β 1/Smads信号通路探讨当归芍药散对卵巢储备功能低下模型大鼠的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2021,27(21):47-54.
- [17] 陈思充,陈子豪,高青华,等.不同阴道涂片方法的比较及对大鼠动情周期的判断[J].*解剖科学进展*,2023,29(1):93-95,102.
- [18] CONFORTI A, CARBONE L, DI GIROLAMO R, et al. Therapeutic management in women with a diminished ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Fertil Steril*,2025,123(3):457-476.
- [19] 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.
- [20] 李芳,姚玉华.中医药治疗卵巢储备功能低下研究进展[J].*光明中医*,2023,38(15):3062-3066.
- [21] 田赛男,唐丽,王圣羽,等.早发性卵巢功能不全在中医药的发展研究[J].*中国中药杂志*,2025,50(11):2969-2981.
- [22] ISHIZUKA B. Current understanding of the etiology, symptomatology, and treatment options in premature ovarian insufficiency (POI) [J]. *Front Endocrinol*,2021,12:626924.

(下转第68页)

- atractylodis macrocephalae using the fusion of spectrum-image in VNIR and SWIR ranges (VNIR-SWIR-FuSI)[J]. *Sensors*, 2019,19(9):2045.
- [11] PAN Y X, ZHANG H X, CHEN Y, et al. Applications of hyperspectral imaging technology combined with machine learning in quality control of traditional Chinese medicine from the perspective of artificial intelligence: A review[J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2024, 54(8):2850-2864.
- [12] ZHANG H X, PAN Y X, LIU X Y, et al. Recognition of the rhizome of red ginseng based on spectral-image dual-scale digital information combined with intelligent algorithms[J]. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2023, 297: 122742.
- [13] ZHANG L, GUAN Y, WANG N, et al. Identification of growth years for *Puerariae Thomsonii Radix* based on hyperspectral imaging technology and deep learning algorithm[J]. *Sci Rep*, 2023, 13:14286.
- [14] 殷文俊,唐建飞,郑洁,等.基于拉曼光谱实时监测甘草配方颗粒的提取过程[J].*中草药*, 2021, 52(18):5560-5568.
- [15] HU H Q, MEI Y L, WEI Y P, et al. Rapid identification of moxa wool storage period based on hyperspectral imaging technology and machine learning [J]. *Heliyon*, 2024, 10(18):e37650.
- [16] 吴龙国,马玲,张瑶,等.基于高光谱成像技术的包衣甘蓝种子色度检测[J].*分析测试学报*, 2025, 44(3):454-463.
- [17] JIN C, ZHOU X Y, HE M Y, et al. A novel method combining deep learning with the Kennard-Stone algorithm for training dataset selection for image-based rice seed variety identification[J]. *J Sci Food Agric*, 2024, 104(13):8332-8342.
- [18] 李杨,李翠玲,王秀,等.高光谱成像的黄瓜病虫害识别和特征波长提取方法[J].*光谱学与光谱分析*, 2024, 44(2): 301-309.
- [19] LI W L, SHI Y, HUANG X W, et al. Study on the diffusion and optimization of sucrose in gaido seak based on finite element analysis and hyperspectral imaging technology[J]. *Foods*, 2024, 13(2):249.

(收稿日期:2025-07-28 编辑:时格格)

(上接第25页)

- [23] 曾晶,尤昭玲.尤昭玲教授基于“生殖链”假说运用“生殖五论”治疗妇科生殖疾病的经验[J].*湖南中医药大学学报*, 2024, 44(4):643-649.
- [24] 马祯慧,李洪霖,李娜娜,等.中药调控AMPK信号通路抗消化道肿瘤的研究进展[J].*药物评价研究*, 2025, 48(7): 1992-2003.
- [25] CECCHINO G N, GARCÍA-VELASCO J A, RIAL E. Reproductive senescence impairs the energy metabolism of human luteinized granulosa cells[J]. *Reprod Biomed Online*, 2021, 43(5):779-787.
- [26] CHIANG J L, SHUKLA P, PAGIDAS K, et al. Mitochondria in ovarian aging and reproductive longevity[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 63: 101168.
- [27] TIOSANO D, MEARS J A, BUCHNER D A. Mitochondrial dysfunction in primary ovarian insufficiency[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(10):2353-2366.
- [28] MASUDUL HOQUE S A M, UMEHARA T, KAWAI T, et al. Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 163:344-355.
- [29] LABARTA E, DE LOS SANTOS M J, ESCRIBÁ M J, et al. Mitochondria as a tool for oocyte rejuvenation[J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(2):219-226.
- [30] 赵芮竹,任鑫悦,王宇航,等.基于AMPK/SIRT1自噬通路探讨黄连解毒汤防治脓毒症小鼠急性肝损伤的作用机制[J].*中国中药杂志*, 2025, 50(2):507-514.
- [31] 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.
- [32] LI Q, GENG X D, ZHENG W, et al. Current understanding of ovarian aging[J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 55(8):659-669.

(收稿日期:2025-09-23 编辑:罗英姣)