

• 药理与临床 •

温经汤调控活化转录因子6/转录因子C/EBP同源蛋白通路抑制内质网应激改善卵巢储备功能下降模型的机制研究

刘鹏^{1,2,3}, 邢易^{1,2,3}, 郭权磊^{1,2,3}, 聂晓博⁴, 任艳青^{1,2,3*}

1. 河北中医药大学, 河北 石家庄 050091

2. 河北省中药配方颗粒技术创新中心, 河北 石家庄 050091

3. 中药材品质评价与标准化 河北省工程研究中心, 河北 石家庄 050091

4. 石家庄医学高等专科学校, 河北 石家庄 050500

摘要:目的 探究温经汤调控内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)介导的活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)/转录因子C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)信号通路改善卵巢储备功能下降(decreased ovarian reserve, DOR)的作用机制。方法 通过ig雷公藤多苷建立DOR大鼠模型,分为对照组、模型组、芬吗通组(采用第1~2天ig雌二醇片0.2 mg/kg,第3~5天ig雌二醇地屈孕酮片1.2 mg/kg的序贯疗法)及温经汤低、中、高剂量(4.85、9.70、19.40 g/kg)组,各组给药4周后计算卵巢及子宫指数;ELISA法检测血清抗缪勒管激素(anti-mullerian hormone, AMH)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、雌二醇(estradiol, E2)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)水平;苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色观察卵巢病理结构,并对各级卵泡进行计数;qRT-PCR检测各组大鼠卵巢组织ERS标志物葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、ATF6、CHOP mRNA表达;Western blotting检测GRP78、ATF6、CHOP、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12(cysteine aspartic acid specific protease-12, Caspase-12)蛋白表达水平。采用CCK-8法筛选雷公藤多苷的造模浓度;将人类卵巢颗粒KGN细胞分为对照组、雷公藤多苷组、雷公藤多苷+5%空白血清组、雷公藤多苷+5%温经汤血清组、ERS激动剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)组,CCK-8法检测温经汤对雷公藤多苷处理的KGN细胞活力的影响;Fluo-4 AM 钙离子(Ca²⁺)荧光探针检测各组细胞中Ca²⁺浓度;Western blotting检测各组细胞GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达水平。结果 与对照组比较,模型组大鼠卵巢及子宫指数显著下降($P < 0.05$ 、 0.01),血清AMH、E2水平显著降低($P < 0.01$),FSH、LH水平显著升高($P < 0.01$),卵巢组织颗粒细胞数量及层数较少、排列稀疏、卵巢皮质空洞,发育期卵泡数量显著减少($P < 0.01$),闭锁卵泡数量显著增加($P < 0.01$);卵巢组织GRP78、ATF6、CHOP mRNA及蛋白表达、Caspase-12蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠卵巢及子宫指数显著升高($P < 0.05$ 、 0.01),各给药组大鼠血清AMH水平均显著升高($P < 0.01$),FSH水平均降低($P < 0.01$),芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠血清LH水平显著降低($P < 0.01$),E2水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01),各给药组卵巢组织发育期卵泡数量增多,闭锁卵泡数量减少($P < 0.05$ 、 0.01),芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠卵巢组织GRP78、ATF6、CHOP mRNA及蛋白表达、Caspase-12蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。体外实验表明40、80、120、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 的雷公藤多苷能够显著抑制KGN细胞增殖($P < 0.05$);雷公藤多苷+5%空白血清组细胞存活率、Ca²⁺含量,GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达水平无明显变化($P > 0.05$);雷公藤多苷+5%温经汤血清组细胞存活率升高($P < 0.01$),Ca²⁺显著降低($P < 0.01$),GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 温经汤可显著提高大鼠卵巢储备功能,对DOR具有较好的治疗作用,其作用机制可能与调控ATF6/CHOP通路、抑制ERS有关。

关键词:温经汤;卵巢储备功能下降;雷公藤多苷;内质网应激;活化转录因子6;转录因子C/EBP同源蛋白;半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0121-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.013

收稿日期: 2024-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(82004400);国家自然科学基金项目(82174426);河北省自然科学基金项目(H2020423069);河北省自然科学基金项目(H2021423020)

作者简介: 刘鹏,女,硕士研究生,研究方向为中药药理学。E-mail: liupeng20222117@163.com

*通信作者: 任艳青,教授,博士生导师,从事中药药理学研究。E-mail: renyanqing2006@163.com

Mechanism of Wenjing Decoction regulating activating transcription factor 6/C/EBP homologous protein pathway and inhibiting endoplasmic reticulum stress to improve model of decreased ovarian reserve

LIU Peng^{1, 2, 3}, XING Yi^{1, 2, 3}, GUO Quanlei^{1, 2, 3}, NIE Xiaobo⁴, REN Yanqing^{1, 2, 3}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

2. Hebei Traditional Chinese Medicine Formula Granule Technology Innovate Center, Shijiazhuang 050091, China

3. Quality Evaluation & Standardization Hebei Province Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

4. Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050500, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Wenjing Decoction (温经汤) regulating the endoplasmic reticulum stress (ERS) mediated activating transcription factor 6/C/EBP homologous protein (ATF6/CHOP) pathway in the treatment of decreased ovarian reserve (DOR). **Methods** The DOR rat model was established by multi-glycosides of *Tripterygium* glycosides, then the rats were divided into control group, model group, femoston (FMT) group (Sequential therapy involving the administration of estradiol valerate suspension at a dosage of 0.2 mg/kg on days 1 to 2, followed by estradiol and dydrogesterone tablets at a dosage of 1.2 mg/kg on days 3 to 5), low-, medium- and high- dose groups (4.85, 9.70, 19.40 g/kg) of Wenjing Decoction. The ovarian and uterine indexes were calculated after four weeks of treatment, the levels of serum anti mullerian hormone (AMH), follicle stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), and luteinizing hormone (LH) were detected by ELISA method, hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological structure of ovary, and the follicles at all levels were counted, the mRNA expressions of ERS markers glucose regulatory protein 78 (*GRP78*), *ATF6*, *CHOP* in ovarian tissues of rats in each group were detected by qRT-PCR method, the protein expressions of *GRP78*, *ATF6*, *CHOP* and cysteine aspartic acid specific protease-12 (Caspase-12) were detected by Western blotting. The modeling concentration of GTW was screened using the CCK-8 method, and Human ovarian granulosa cells KGN cells were divided into control group, GTW group, GTW+5% blank serum group (GTW+K BXQ), GTW+ 5% Wenjing Decoction containing serum group (GTW+WJTXQ), and ERS agonists thapsigargin (TG) group. The effect of Wenjing Decoction on the viability of KGN cells treated with GTW was detected by CCK8 assay, then Ca^{2+} concentration in each group was detected by Fluo-4 AM calcium fluorescent probe, the protein expression levels of *GRP78*, *ATF6*, *CHOP* and Caspase-12 in cells of each group were analyzed by western blotting. **Results** Compared with control group, the ovarian and uterine indexes in the model group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), serum AMH and E2 levels were decreased ($P < 0.01$), FSH and LH levels were increased ($P < 0.01$), the number and layers of granulosa cells in the ovarian tissue of the model group were less, the arrangement was sparse, and the ovarian parenchyma was empty, and the number of developing follicles in the ovarian tissue of the model group decreased significantly ($P < 0.01$), and the number of atretic follicles were increased ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expressions of *GRP78*, *ATF6*, and *CHOP*, and the protein expressions of Caspase-12 in ovarian tissue were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the ovarian and uterine indexes in FMT group, WJTZ group, and WJTG group were increased obviously ($P < 0.05, 0.01$), the serum AMH level of rats in each administration group were significantly increased ($P < 0.01$), and the FSH level were significantly decreased ($P < 0.01$), and the serum LH level of rats in the FMT group, WJTZ group and WJTG group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the E2 level of rats in the FMT group, WJTZ group and WJTG group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The number of developing follicles at all levels in the ovarian tissue of each administration group were increased, and the number of atretic follicles were decreased ($P < 0.05, 0.01$). The mRNA and protein expressions of *GRP78*, *ATF6*, and *CHOP*, and the protein expression of Caspase-12 in the FMT group, WJTZ group and WJTG group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). *In vitro* experiments showed that GTW of 40, 80, 120, 200 and 500 $\mu\text{g/mL}$ could significantly inhibit KGN cells proliferation ($P < 0.05$). Compared with the GTW group, there was no significant change in cell viability, Ca^{2+} concentration, *GRP78*, *ATF6*, *CHOP*, and Caspase-12 protein expression levels in the GTW+K BXQ group ($P > 0.05$), while the cell viability was significantly increased ($P < 0.01$), and the Ca^{2+} concentration and protein expression levels of *GRP78*, *ATF6*, *CHOP*, and Caspase-12 were significantly decreased in the GTW+WJTXQ group ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Wenjing Decoction could significantly improve the ovarian reserve function of rats and has a good therapeutic effect on DOR, the mechanism might be related to regulating the ATF6/CHOP pathway and inhibiting ERS.

Key words: Wenjing Decoction; decreased ovarian reserve; *Tripterygium* glycosides; endoplasmic reticulum stress; activating transcription factor 6; C/EBP homologous protein; cysteine aspartic acid specific protease 12

卵巢储备功能下降 (decreased ovarian reserve, DOR) 是指由于窦卵泡数量减少, 卵母细胞数量及质量下降而导致卵巢功能衰退的疾病^[1]。近年来, DOR 发病率不断升高, 临床常用激素替代法进行治疗, 能够有效提高患者的雌激素水平, 缓解患者月经不调等临床症状, 但长期服用可能会增加雌激素相关肿瘤、子宫内膜增生、血栓等疾病发生的风险^[2-3]。中医认为肾主生殖, 肾精亏虚会导致女子闭经或者胎孕异常, 故肾虚为 DOR 的根本病机^[4], 而临床中肾阳虚型 DOR 为临床常见证型, 其中肾阳虚衰则导致虚寒入体, 冲任及胞宫失去温煦, 影响正常的生理功能, 因此中医治疗 DOR 应补肾的同时温煦胞宫, 散寒调经, 恢复卵巢功能。温经汤出自《金匱要略》, 由吴茱萸、桂枝、川芎、当归、赤芍、牡丹皮、人参、麦冬、阿胶、生姜、清半夏及甘草组成, 具有温阳散寒、补肾调经的功效, 临床上广泛用于治疗不孕症、痛经等气血亏虚, 冲任虚寒, 兼有瘀血的多种妇科疾病^[5], 其在 DOR 的治疗中能够有效提高 DOR 患者性激素水平, 改善患者的免疫功能, 进而缓解患者经期血少、月经延后甚或闭经等临床症状^[6-7]。但温经汤治疗 DOR 的作用机制尚不清晰, 限制了其临床应用, 因此探寻温经汤治疗 DOR 的作用机制十分必要。

DOR 的发生标志着卵巢趋于衰老, 此时卵巢处于内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 过度的环境中, ERS 介导的活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) /转录因子 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 信号通路被激活, 导致卵巢功能损伤, 参与 DOR 的发生^[8-9]。前期研究发现, 温经汤可拮抗 ERS 改善妇科寒凝血瘀证大鼠卵巢功能, 提示调控 ERS 是温经汤治疗卵巢相关疾病的重要靶点^[10], 鉴于 ATF6/CHOP 通路在 DOR 发病中的作用, 温经汤治疗 DOR 的具体机制是否与 ERS 介导的 ATF6/CHOP 通路有关值得进一步探究。本研究通过建立雷公藤多苷诱导的大鼠 DOR 模型及人类卵巢颗粒 KGN 细胞模型^[11-12], 从拮抗 ERS 的角度探讨温经汤治疗 DOR 的可能机制, 为温经汤治疗 DOR 提供实验依据, 为其开发奠定基础。

1 材料

1.1 动物和细胞株

SPF 级雌性 Wistar 大鼠, 48 只, 体质量 (180±20) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实

验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010, 动物饲养于屏障环境中, 本研究动物实验经河北中医药大学实验动物委员会批准 (批准号 DWLL202211007)。

人卵巢颗粒细胞 KGN (批号 CL0603) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

温经汤组成: 吴茱萸 12 g (批号 21105414)、桂枝 10 g (批号 21100831)、川芎 12 g (批号 21103132)、当归 9 g (批号 21092821)、赤芍 9 g (批号 21081911)、牡丹皮 6 g (批号 21073041)、人参 6 g (批号 21030201)、麦冬 9 g (批号 21100441)、阿胶 6 g (批号 21104123)、生姜 6 g (批号 21092111)、清半夏 6 g (批号 21102331)、生甘草 6 g (批号 21102321) 均为中药配方颗粒, 购自河北中医药大学国医堂, 由神威药业集团有限公司生产, 依据《中药配方颗粒国家药品标准》及《河北省中药配方颗粒质量标准》, 通过 HPLC 法对温经汤颗粒进行含量测定, 其中含吴茱萸碱 0.89 mg/g、吴茱萸次碱 0.64 mg/g、肉桂酸 2.03 mg/g、阿魏酸 1.72 mg/g、芍药苷 64.61 mg/g、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 的总量 5.71 mg/g、人参皂苷 Rb₁ 5.87 mg/g、6-姜辣素 1.62 mg/g、甘草苷 17.64 mg/g、甘草酸 32.47 mg/g。

雷公藤多苷片 (批号 1A439A, 国药准字 Z33020422) 购自浙江得恩德制药股份有限公司; 芬吗通片 (含雌二醇 1 mg 和地屈孕酮 10 mg, 批号 368148, 进口药品注册证号 H201503460) 购自美国雅培生物学有限公司; 大鼠促卵泡素 (follicle stimulating hormone, FSH) ELISA 试剂盒 (批号 MM-70867R1)、大鼠雌二醇 (estradiol, E2) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0575R1)、大鼠抗缪勒管激素 (anti-mullerian hormone, AMH) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0219R1)、大鼠促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0624R1) 均购自武汉酶免生物科技有限公司; MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNase (批号 160543)、MonAmp™ ChemoHS qPCR Mix (批号 130541) 均购自莫纳生物科技有限公司; 4%多聚甲醛 (批号 P1110)、Mayer 苏木素染液 (批号 G4070)、RIPA 裂解液 (批号 BL504A)、PMSF 蛋白酶抑制剂 (批号 091423231124)、5×蛋白上样缓冲溶液 (批号 ATXA18081) 均购自北京索莱宝科技有限公司; CHOP 小鼠单克隆抗体 (批号 YM3668) 购自北京安诺伦公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔多克隆抗体 (批号 GB11002) 购自美国 Sigma 公司; ATF6 兔多克隆抗体 (批号 00118445) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 兔多克隆抗体 (批号 GB11098)、预染蛋白 Marker II (批号 MPC2312083)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 AC231119001) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; SuperKine™ 超敏型 ECL 发光液 (批号 ATWG26081) 购自武汉亚科因生物技术有限公司; KGN 细胞专用培养基 (批号 WH3124Z101) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-12 (cysteine aspartic acid specific protease-12, Caspase-12) 抗体 (批号 GB11169) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; ERS 激动剂毒胡萝卜素 (批号 263193) 购自美国 MCE 公司; Fluo-4AM (Ca²⁺ 荧光探针, 批号 S1060) 购自上海碧云天有限公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 批号 C6005) 购自苏州新赛美生物科技有限公司。

1.3 仪器

EG11508 型组织包埋机、RM2255 型全自动轮转式切片机、DFC450 C 型显微拍照系统 (德国莱卡公司); TU30H6 型独立送风隔离系统 (苏杭科技器材有限公司); Eppendorf AG 型逆转录 PCR 仪、CFX96 Touch 型实时荧光定量 PCR 仪、Power Pac HC 型电泳仪、JY-ZY2 转移电泳槽、ChemiDoc™ Imaging System 型超高灵敏化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); Mini Spin 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); SW-CJ-2FD 型洁净工作台 (苏净安泰空气技术有限公司); HERAcell vios 160i 型二氧化碳培养箱、Multiskan FC 型酶标仪、EVOS FL 型荧光显微镜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 药品溶液制备

将配方颗粒配制成质量浓度 1.88 g/mL (生药量) 的溶液, 梯度稀释质量浓度至 0.94、0.47 g/mL, 备用。

2.2 动物造模、分组及给药

随机取 8 只大鼠为对照组, 参照文献方法^[13]将剩余 40 只大鼠 ig 雷公藤多苷 (75 mg/kg) 进行造模, 1 次/d, 连续 21 d。依据动情周期进行判断模型是否成功, 判断标准为实验动物出现动情周期紊乱、动情周期延长、停滞或无固定周期, 即认为造模成功^[13]。

将造模成功的大鼠随机分为模型组、芬吗通组

(采用第 1~2 天 ig 雌二醇片 0.2 mg/kg, 第 3~5 天 ig 雌二醇地屈孕酮片 1.2 mg/kg 的序贯疗法) 及温经汤低、中、高剂量 (4.85、9.70、19.40 g/kg) 组, 每组 8 只, 按体表面积折算大鼠 ig 剂量分别相当于人临床等效剂量的 0.5、1.0、2.0 倍)。给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组及模型组 ig 相应体积的蒸馏水, 1 次/d, 连续 4 周。

2.3 大鼠血清卵巢储备功能相关激素水平检测

给药结束后, 称定大鼠体质量, 取血, 室温静置 2 h, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 按照试剂盒说明书检测血清 AMH、FSH、E2、LH 卵巢储备功能相关激素水平。

2.4 大鼠子宫及卵巢指数检测

摘取各组大鼠卵巢及子宫, 称定各组大鼠卵巢和子宫湿质量, 计算卵巢及子宫指数。

卵巢指数 = 卵巢湿质量/体质量

子宫指数 = 子宫湿质量/体质量

2.5 大鼠卵巢形态及各级卵泡数目检测

大鼠卵巢及子宫称定质量后在 4% 多聚甲醛中固定, 取出固定的卵巢组织, 经石蜡包埋后切片, 二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水, 然后依次用苏木素和伊红染色, 染色后切片经梯度乙醇脱水和二甲苯透明后用, 中性树脂封片, 于光学显微镜下观察并进行计数分析。

2.6 大鼠卵巢组织 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 相对表达检测

取 10 mg 组织加入 Trizol 低温匀浆提取总 RNA, 根据试剂盒逆转录成 cDNA, 加入引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 1。PCR 反应体系为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s; 60 °C 退火 30 s, 共进行 40 个循环。以 GAPDH 为参照基因, 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量。

2.7 Western blotting 检测大鼠卵巢组织 GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12 蛋白表达

取 10 mg 组织加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液进行匀浆提取总蛋白, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 加入蛋白上样缓冲 Buffer, 100 °C 金属浴变性 5 min。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗, 二抗室温孵育 50 min, TBST 清洗, ECL 发光液进行显影, 使用 Image-J 软件分析数据结果。

2.8 细胞培养及含药血清制备

KGN 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因 | 序列 (5'-3') | 长度/bp |
|-------|--|-------|
| GRP78 | F: GGAGGAGACAAGAAGGAGGATG R: TTGAATACACCGACGCAGGAATAG | 81 |
| ATF6 | F: TTTGGATTTGATGCCTTGGGAGTC R: CTGTGGACCGAGGAGAAGAGAC | 131 |
| CHOP | F: CCTCGCTCTCCAGATTCCAGTC R: TCATTCTCCTGCTCCTTCTCCTTC | 146 |
| GAPDH | F: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R: GACATACTCAGCACACGATCAC | 123 |

培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱常规培养。SPF级雌性Wistar大鼠随机分为对照组与温经汤(9.7 g/kg,临床等效剂量)组,每组8只,温经汤组大鼠相应药物(10 mL/kg),对照组ig等体积蒸馏水,1次/d,连续7d,末次给药2h后,腹主动脉取血,3000 r/min离心15 min,取血清,56℃水浴灭活后,经0.22 μm微孔滤膜滤过除菌,-20℃保存备用。

2.9 雷公藤多苷细胞造模浓度筛选

为保证体内外实验的一致性,将KGN细胞按5×10³个/孔接种于96孔板,用不同质量浓度的雷公藤多苷(10、20、40、80、120、200、500 μg/mL)处理细胞,每组6个复孔,37℃孵育24 h,孵育完成后每孔加入10 μL CCK-8,37℃孵育1 h后,于450 nm检测吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.10 对雷公藤多苷处理的KGN细胞增殖的影响

将KGN细胞分为对照组、雷公藤多苷组、雷公藤多苷+5%空白血清组、雷公藤多苷+5%温经汤血清组、ERS激动剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)组,每组6个复孔,24 h后避光加入CCK-8,于450 nm检测A值,计算细胞存活率。

2.11 KGN细胞内Ca²⁺浓度检测

将KGN细胞按5×10³个/孔接种于96孔板,

分组同“2.10”项下方法,每组3个复孔,PBS清洗3次,每孔加入100 μL配置好的Fluo-4 AM工作液(2 μmol/L),室温避光孵育40 min,孵育完成后PBS清洗3次,室温孵育30 min,采用Image-J软件进行荧光强度分析。

2.12 KGN细胞中GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12的蛋白表达水平检测

按照“2.10”项下分组及处理干预KGN细胞24 h,PBS清洗3次,加入500 μL裂解液(RIPA:PMSF=100:1)裂解30 min,刮取细胞,按照“2.7”项下方法进行Western blotting检测。

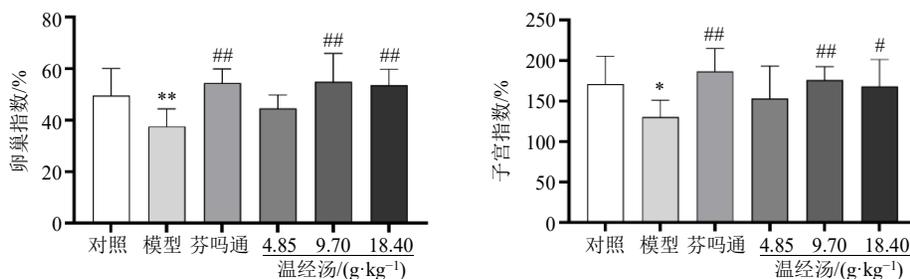
2.13 统计学分析

应用SPSS 26.0软件进行数据统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布,应用单因素方差分析进行统计处理,LSD法进行两两比较。

3 结果

3.1 对DOR大鼠卵巢及子宫指数的影响

如图1所示,与对照组大鼠比较,模型组大鼠卵巢及子宫指数显著下降($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,温经汤低剂量组大鼠卵巢及子宫指数有升高趋势,芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠卵巢及子宫指数均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 下图同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图1 温经汤对DOR大鼠卵巢及子宫指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effects of Wenjing Decoction on ovary and uterine index in DOR rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 对 DOR 大鼠卵巢功能相关激素水平的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 AMH、E2 水平显著降低 ($P < 0.01$), FSH、LH 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组

大鼠血清 AMH 水平均明显升高 ($P < 0.01$), FSH 水平均明显降低 ($P < 0.01$), 芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠血清 LH 水平显著降低 ($P < 0.01$), E2 水平显著升高 ($P < 0.05、0.01$)。

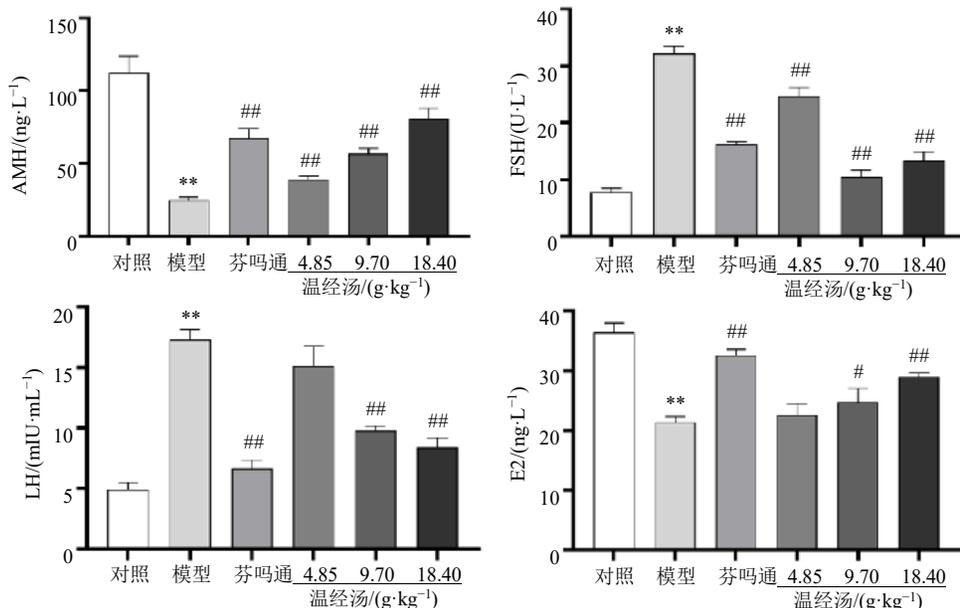


图 2 温经汤对 DOR 大鼠血清 AMH、FSH、LH、E2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of Wenjing Decoction on AMH, FSH, LH and E2 levels in serum of DOR rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 对 DOR 大鼠卵巢组织病理结构以及各级卵泡数量的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠卵巢组织中颗粒细胞较多且排列整齐紧密, 可见各级卵泡; 与对照组比较, 模型组大鼠卵巢组织颗粒细胞数量及层数较少、排列稀疏、卵巢皮质空洞, 发育期卵泡数量显著减少 ($P < 0.01$), 闭锁卵泡数量显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠卵巢组织颗粒细胞增多, 温经汤高剂量组大鼠卵巢组织发育期卵泡数量显著增多 ($P < 0.05$), 温经汤中、高剂量组闭锁卵泡数量显著减少 ($P < 0.05、0.01$)。

3.4 对 DOR 大鼠卵巢组织 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 相对表达量的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 对 DOR 大鼠卵巢组织 GRP78、ATF6、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达水平的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠卵

巢组织 GRP78、ATF6、CHOP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05、0.01$); 与模型组比较, 芬吗通组、温经汤各剂量组大鼠卵巢组织 GRP78、ATF6、CHOP 蛋白表达量均显著降低 ($P < 0.05、0.01$), 芬吗通组及温经汤中、高剂量组大鼠卵巢组织 Caspase-12 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05、0.01$)。

3.6 雷公藤多苷干预 KGN 细胞质量浓度确定

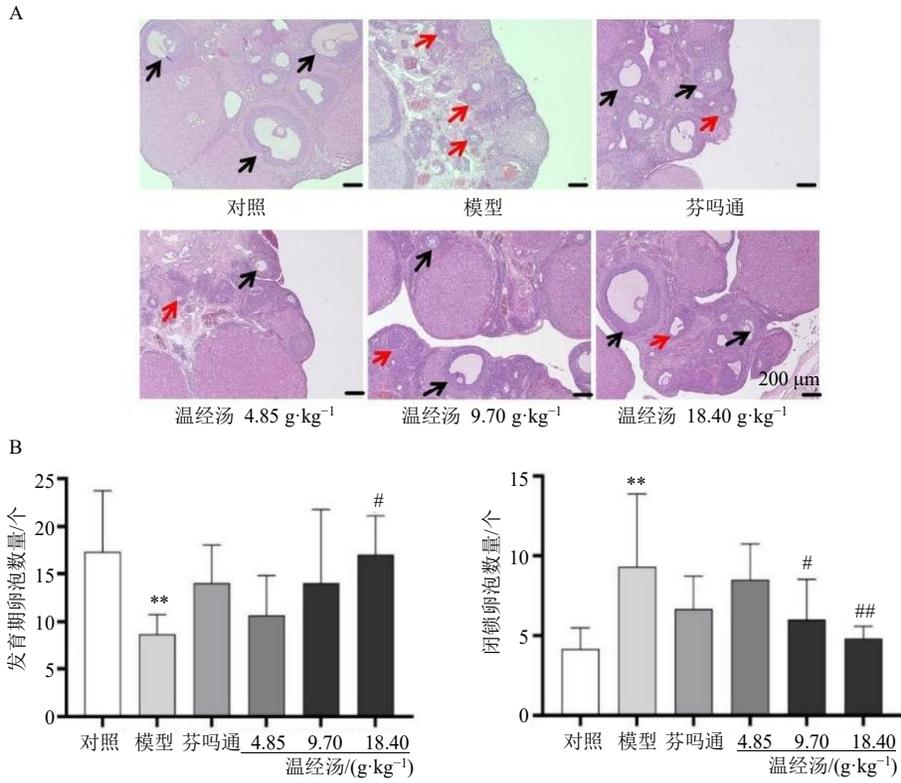
如图 6 所示, 40、80、120、200、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的雷公藤多苷均能显著抑制 KGN 细胞增殖 ($P < 0.05$), 且其抑制作用呈剂量相关性, 选用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为雷公藤多苷的造模浓度, 此时细胞存活率为 (68.6 ± 4.1) %。

3.7 对雷公藤多苷处理的 KGN 细胞增殖的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 雷公藤多苷组及 TG 组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$); 与雷公藤多苷组比较, 雷公藤多苷+5%温经汤血清组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$), 雷公藤多苷+5%空白血清组细胞存活率无显著变化。

3.8 对雷公藤多苷损伤的 KGN 细胞内 Ca²⁺浓度的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 雷公藤多苷组及



黑色箭头代表发育期卵泡，红色箭头代表闭锁卵泡。

Black arrows represent developing follicles and red arrows represent atretic follicles.

图3 卵巢病理结构 (A) 及温经汤对 DOR 大鼠各级卵泡数量影响 (B) (×50; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Pathological structure of ovary (A) and effect of Wenjing decoction on number of follicles at all levels in DOR rats (B) (×50; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

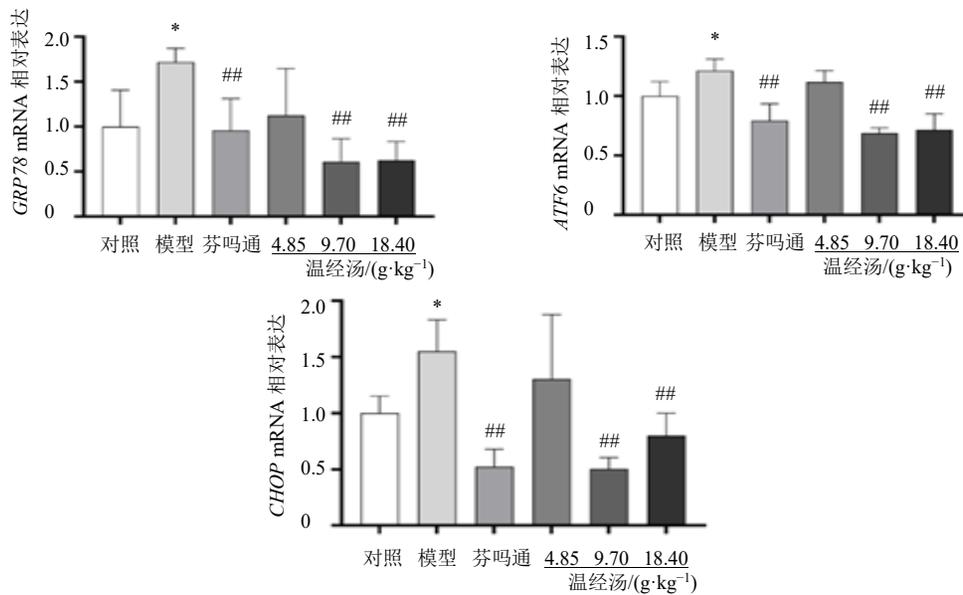


图4 温经汤对 DOR 大鼠卵巢组织 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of Wenjing Decoction on relative expression of GRP78, ATF6 and CHOP mRNA in ovarian tissues of DOR rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

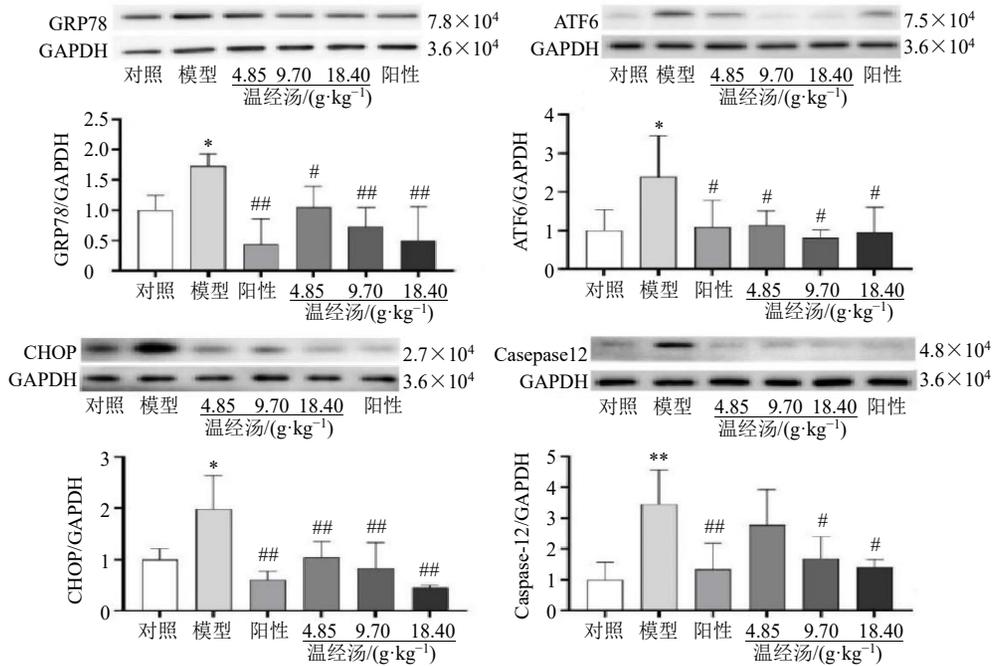


图5 温经汤对DOR大鼠卵巢组织GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of Wenjing Decoction on protein expression levels of GRP78, ATF6, CHOP and Caspase-12 in ovarian tissues of DOR rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

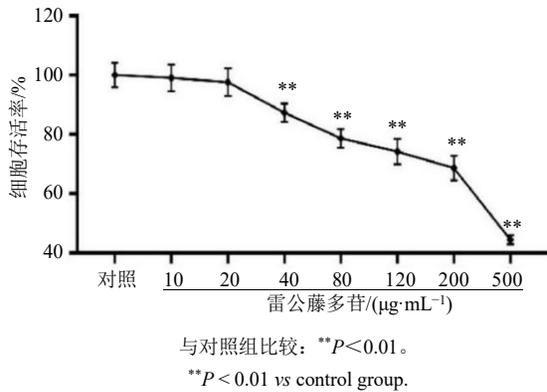


图6 不同浓度雷公藤多苷对KGN细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of GTW on survival rate of KGN cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

TG组细胞Ca²⁺荧光强度明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 雷公藤多苷+5%空白血清组细胞荧光强度无明显变化, 雷公藤多苷+5%温经汤血清组细胞荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。

3.9 对雷公藤多苷损伤的KGN细胞GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达的影响

如图9所示, 与对照组比较, 雷公藤多苷组及TG组细胞GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 雷公藤多苷+5%空白血清组相关蛋白表达量无显

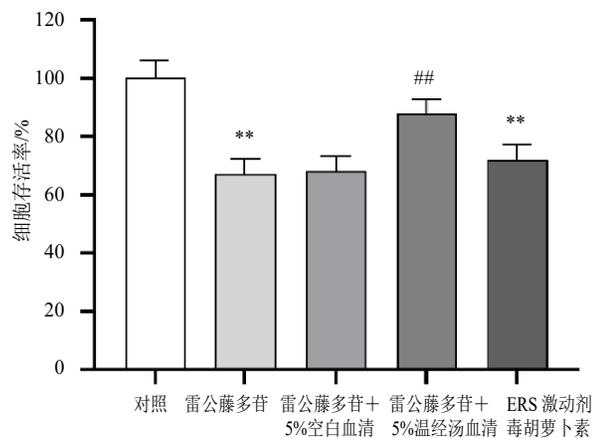


图7 温经汤对GTW干预的KGN细胞增殖的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与雷公藤多苷组比较, ## $P < 0.01$, 图8、9同。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs Tripterygium glycosides group, same as figure 8, 9.

图7 温经汤对GTW干预的KGN细胞增殖的影响
Fig. 7 Effect of Wenjing Decoction on proliferation of KGN cells with GTW intervention

著差异, 雷公藤多苷+5%温经汤血清组细胞GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

DOR是指卵巢内卵母细胞的数目减少、质量降低, 生育能力下降的疾病, 临床发现DOR患者下

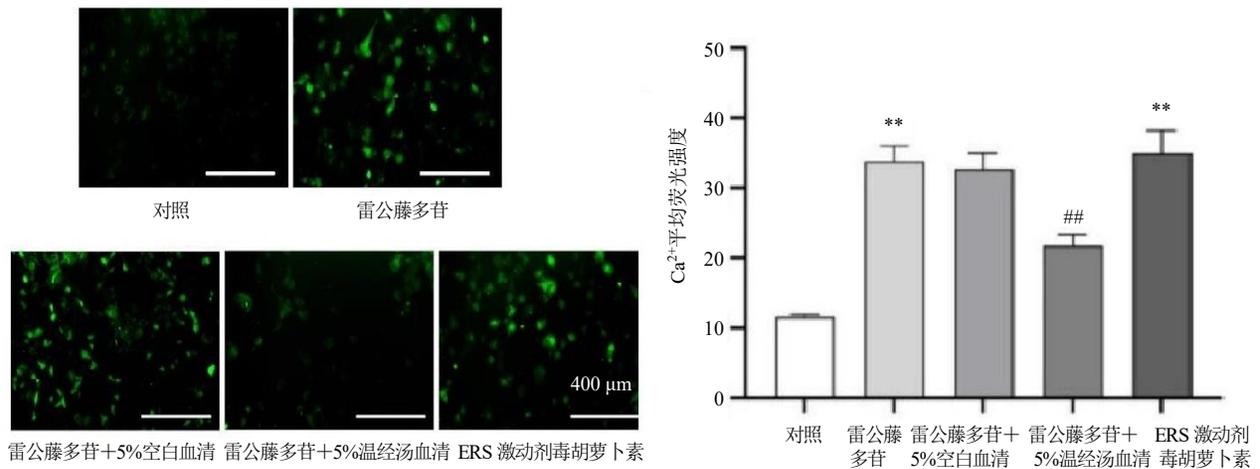


图 8 温经汤对雷公藤多苷处理的 KGN 细胞中 Ca²⁺含量的影响 (×100)

Fig. 8 Effect of Wenjing Decoction on Ca²⁺ content of KGN cells treated with *Tripterygium glycosides* (× 100)

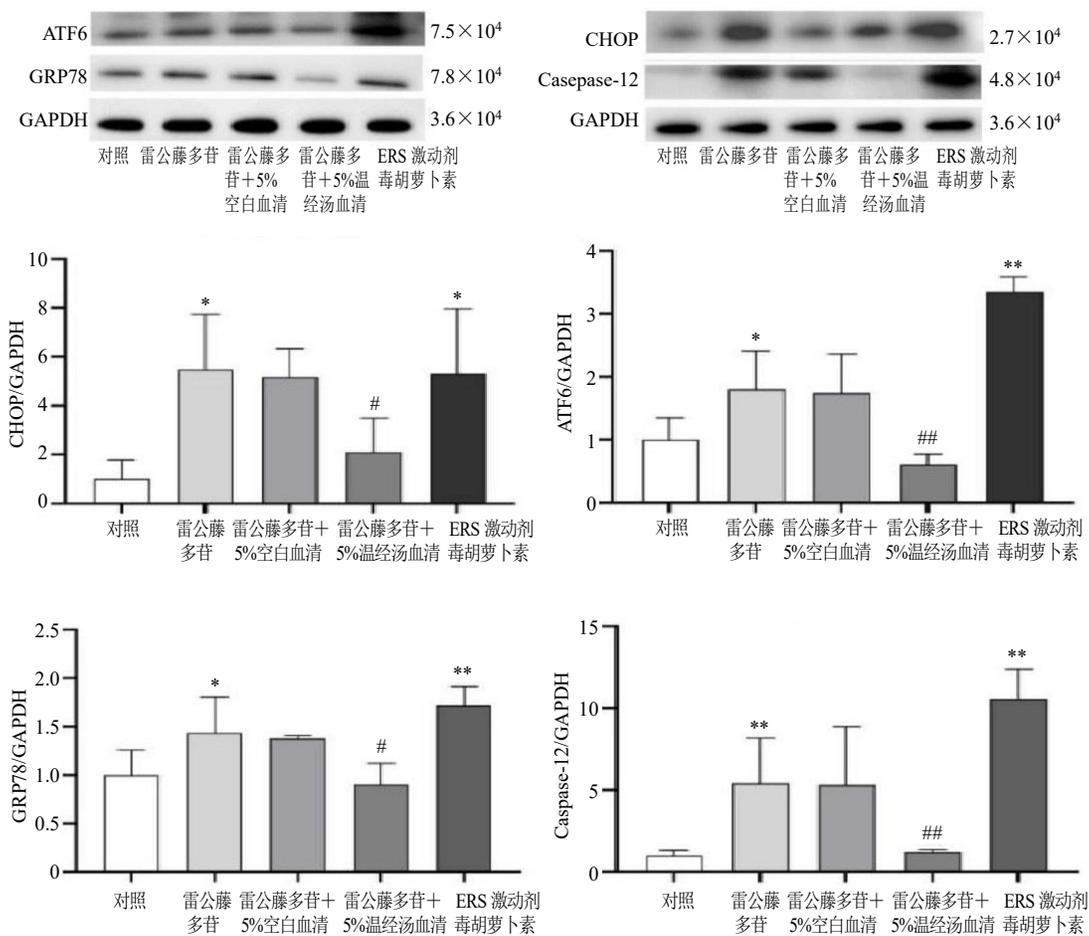


图 9 温经汤对雷公藤多苷处理的 KGN 细胞 GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of Wenjing Decoction on protein expression levels of GRP 78, ATF 6, CHOP and Caspase-12 in KGN cells treated with *Tripterygium glycosides* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamic-pituitary-ovarian axis, HPOA) 神经内分泌功能异常, 导致体内激素水平紊乱, 窦卵泡数减少, AMH 及雌激素水平下降, FSH 水平升高, 盆腔超声显示卵巢萎缩, 卵泡正常发育受阻, 卵母细胞发育异常, 未成熟卵泡提前闭锁^[14]。西医临床主要采用激素替代疗法、抗氧化疗法、脱氢表雄酮等治疗 DOR。其中激素替代疗法最为常用, 能够通过孕激素或雌激素人为维持月经周期规律, 通过负反馈机制降低血清 FSH 水平, 恢复卵泡生长发育, 促进排卵^[15]。但此治疗方法并不适合长期应用, 会增加雌激素相关肿瘤发生风险, 且存在停药复发的现象^[2]。在中医认识中, DOR 属于“不孕”“闭经”“月经血少”等病证, 中医提出的“肾-天癸-冲任-胞宫”轴指出肾是女性发育生殖的本源, 若肾气虚衰、则天癸不至, 胞脉失养, 胎元难成, 导致 DOR 的发生^[16]。“肾-天癸-冲任-胞宫”轴与 HPOA 功能极为相似, 研究发现, 补肾调经或补肾活血中药能够直接或间接作用于卵巢, 调节 HPOA 功能, 提高 AMH 且降低 FSH 水平, 改善卵巢内分泌环境, 促进卵泡发育, 改善卵巢的储备功能^[17]。本研究发现温经汤治疗后 DOR 大鼠血清 AMH、E2 水平升高, FSH、LH 水平降低, 卵巢及子宫指数升高, 萎缩程度减轻, 温经汤还可显著增加发育期卵泡数量, 减少闭锁卵泡数量, 提示温经汤能够缓解卵巢病变, 影响卵泡的生长发育以及改善卵巢储备功能, 对“肾-天癸-冲任-胞宫”轴的调控产生了积极影响^[18-19]。

ERS 是指当内质网受到如缺氧、钙耗竭、炎症等刺激时发生的一系列保护机制, 研究发现持续或过度的 ERS 主要激活下游蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) /活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) /CHOP、ATF6/CHOP、肌醇依赖性激酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α) /c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路, 进而促进多种衰老相关疾病的发生发展^[20-23]。在卵巢衰老的过程中, 也有 ERS 的参与, 研究发现 ERS 对卵巢功能的调节亦依赖于上述 3 条信号通路, 其中 PERK/ATF4/CHOP 通路及 IRE1 α -JNK 通路被激活可抑制卵泡发育, 致卵泡发育障碍, 卵泡趋于枯竭, 损伤卵巢功能^[24], 而 ATF6/CHOP 通路则被证明参与 DOR 的发病机制, 研究发现在 DOR 患者卵巢颗粒细胞中 ATF6 及

CHOP 表达升高^[25-27]。在 ATF6/CHOP 通路中, ATF6 是一种位于 ER 膜上的感应蛋白, 可影响卵巢颗粒细胞的增殖分化及生理功能, ERS 时 GRP78 与错误或未折叠蛋白结合, 游离并被激活, 参与卵巢功能调节^[28]。而 CHOP 作为其下游转录因子可被 ATF6 激活, 而 CHOP 又可调节 Caspase-12 等相关因子, 参与卵泡的生长发育^[29]。因此, 本研究主要针对 ERS 介导的 ATF6/CHOP 通路进行探讨, 观察了温经汤对 ATF6/CHOP 通路及相关因子表达的影响, 实验发现与模型组相比各给药组大鼠卵巢组织内 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 及蛋白表达降低, 初步证实了温经汤对 ATF6/CHOP 通路的调控作用。

为进一步验证其作用机制, 本课题组前期应用 TG 进行 KGN 细胞干预, 观察温经汤对 TG 处理的 KGN 细胞的细胞毒作用, 结果显示 TG 所诱导的 ERS 对 KGN 细胞具有毒性作用, 使 KGN 细胞增殖受到抑制, 温经汤可有效缓解 TG 诱导的 ERS, 提示温经汤可抑制过度或持续的 ERS 导致的细胞毒性作用, 内质网为其改善卵巢功能的靶细胞器。本研究中体外实验采用雷公藤多苷进行 KGN 细胞的处理, 文献研究表明, 雷公藤多苷及其主要成分雷公藤甲素所诱导的生殖毒性均与 ERS 相关, 可诱导卵巢颗粒细胞凋亡, 影响小鼠卵泡发育^[30], 本研究体内实验结果表明雷公藤多苷所诱导的大鼠 DOR 也与 ERS 有关, 因此, 本研究为保持体内外实验一致性, 采用雷公藤多苷干预 KGN 细胞, 使用 TG 作为阳性药, 结果表明雷公藤多苷组及 TG 组细胞存活率降低且细胞中 GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12 蛋白表达水平显著升高, 提示 ERS 的发生, 而雷公藤多苷+5%温经汤血清组细胞存活率升高, GRP78、ATF6、CHOP、Caspase-12 蛋白表达水平降低, 提示温经汤能够有效抑制 ATF6/CHOP 及相关因子表达, 抑制卵巢颗粒细胞 ERS。

内质网的调控与 Ca²⁺密切相关, 卵巢颗粒细胞 ERS 发生时, Ca²⁺内流进入细胞质中, 引起 Ca²⁺稳态失衡^[31], 诱导卵巢颗粒细胞发生凋亡进而影响卵巢的储备功能^[9]。本研究发现雷公藤多苷组及 TG 组细胞中 Ca²⁺浓度显著升高, 提示 ERS 的发生, 而雷公藤多苷+5%温经汤血清组细胞中 Ca²⁺浓度显著降低, 提示温经汤能够有效降低 KGN 细胞内 Ca²⁺浓度, 缓解 ERS。

综上, 本研究通过雷公藤多苷构建 DOR 大鼠模型及 KGN 细胞损伤模型, 初步揭示了温经汤可

缓解卵巢病理结构损伤,明显改善大鼠卵巢储备功能,减轻卵巢颗粒细胞损伤,上述作用与其控ATF6/CHOP信号通路,减轻ERS有关,本研究为温经汤的现代临床应用及开发提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lu G, Zhu Y Y, Li H X, *et al.* Effects of acupuncture treatment on microRNAs expression in ovarian tissues from *Tripterygium glycoside*-induced diminished ovarian reserve rats [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 968711.
- [2] 王蕾, 马欣原, 冯欣, 等. 辅酶Q10片联合雌二醇片/雌二醇地屈孕酮片治疗早发性卵巢功能不全所致不孕症的临床研究 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(3): 538-543.
- [3] Deligdisch-Schor L. Hormone therapy effects on the uterus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1242: 145-177.
- [4] 向罗珺, 金子涵, 申玉华, 等. 补肾调周法治疗肾虚血瘀型卵巢储备功能下降的临床观察 [J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(8): 103-106.
- [5] 谢雪莲, 朱名宸. 金匱温经汤治疗妇科疾病的研究进展 [J]. *湖北中医杂志*, 2024, 46(8): 51-54.
- [6] 曾根, 王韞琪, 戴海青. 加减温经汤治疗肾虚血瘀型卵巢储备功能减退患者的疗效观察及对T淋巴细胞亚群水平的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(8): 1206-1210.
- [7] 汤传梅, 沙丹. 金匱温经汤对肾虚血瘀型免疫性卵巢早衰患者性激素水平及临床证候积分的影响 [J]. *新中医*, 2021, 53(14): 1-5.
- [8] 苏娜, 蔡平平, 严如根, 等. 内质网应激—凋亡途径与卵巢衰老关系研究进展 [J]. *山东医药*, 2022, 62(26): 94-97.
- [9] Kim S, Kim D K, Jeong S, *et al.* The common cellular events in the neurodegenerative diseases and the associated role of endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 5894.
- [10] 徐丁洁, 张相杰, 徐洪, 等. 金匱温经汤对妇科虚寒证模型大鼠子宫、卵巢 GRP78、Nrf-2 表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(9): 1964-1967.
- [11] 何瑞芬, 杨永秀, 梁晓磊. 卵巢储备功能减退动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(2): 254-259.
- [12] 刘佳, 罗丽, 谢成松, 等. 麒麟丸对卵巢颗粒细胞损伤的修复作用研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(1): 183-188.
- [13] Li H X, Shi L, Liang S J, *et al.* Moxibustion alleviates decreased ovarian reserve in rats by restoring the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Integr Med*, 2022, 20(2): 163-172.
- [14] Zhang Q L, Lei Y L, Deng Y, *et al.* Treatment progress in diminished ovarian reserve: Western and Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(4): 361-367.
- [15] 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.
- [16] 吴松宇, 杨润雨, 冯晓玲. 中医对卵巢储备功能下降的认知及针灸治疗现状 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2023, 18(4): 844-848.
- [17] 李善霞, 何东云, 张艳红, 等. 补肾养血方治疗肾阴虚型卵巢储备功能下降的临床观察 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(2): 361-364.
- [18] 夏心瑀, 梁艳, 董莉, 等. 从“肾-天癸-冲任-胞宫”生殖轴及“玄府理论”论卵巢早衰的针刺治疗 [J]. *上海中医药大学学报*, 2024, 38(4): 87-91.
- [19] 吴志明, 史晓东, 郭健, 等. 补肾调经方基于下丘脑-垂体-卵巢轴防治雷公藤多苷所致月经不调机制研究 [J]. *江西医药*, 2020, 55(5): 520-525.
- [20] Liu B, Huang B, Liu J, *et al.* *Dendrobium nobile* Lindl alkaloid and metformin ameliorate cognitive dysfunction in senescence-accelerated mice via suppression of endoplasmic reticulum stress [J]. *Brain Res*, 2020, 1741: 146871.
- [21] Wang F, Gu Y Z, Xu C, *et al.* Transplantation of fecal microbiota from APP/PS1 mice and Alzheimer's disease patients enhanced endoplasmic reticulum stress in the cerebral cortex of wild-type mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 858130.
- [22] Motawi T K, Al-Kady R H, Abdelraouf S M, *et al.* Empagliflozin alleviates endoplasmic reticulum stress and augments autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: Targeting the GRP78/PERK/eIF2 α /CHOP pathway and miR-211-5p [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 362: 110002.
- [23] Chen H, Sun H M, Wu B, *et al.* Artesunate delays the dysfunction of age-related intestinal epithelial barrier by mitigating endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response [J]. *Mech Ageing Dev*, 2023, 210: 111760.
- [24] Yao J W, Ma Y F, Lin X, *et al.* The attenuating effect of the intraovarian bone morphogenetic protein 4 on age-related endoplasmic reticulum stress in chicken follicular cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4175613.
- [25] Cheng B Y, Shi Y Z, Wu Q J, *et al.* Selenium protects follicular granulosa cells from apoptosis induced by mercury through inhibition of ATF6/CHOP pathway in laying hens [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2023, 201(11): 5368-5378.

- [26] Jiang L L, Cui J Q, Zhang C L, *et al.* *Sigma-1* receptor is involved in diminished ovarian reserve possibly by influencing endoplasmic reticulum stress-mediated granulosa cells apoptosis [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9041-9065.
- [27] 姜李乐. *Sigma-1* 受体对卵巢储备低下患者颗粒细胞内质网应激凋亡通路的调控研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [28] Xiong Y J, Chen H T, Lin P F, *et al.* ATF6 knockdown decreases apoptosis, arrests the S phase of the cell cycle, and increases steroid hormone production in mouse granulosa cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(3): C341-C353.
- [29] 史露露, 周惠芳. 补肾助孕方对黄体功能不全模型大鼠卵巢内质网应激的调节 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(16): 84-89.
- [30] Zeng Y, Sun H, Li Y, *et al.* Exposure to triptolide affects follicle development in NIH mice: Role of endoplasmic reticulum stress in granulosa cell apoptosis [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2017, 36(1): 82-92.
- [31] Sun Z S, Zhang H, Wang X, *et al.* TMCO1 is essential for ovarian follicle development by regulating ER Ca²⁺ store of granulosa cells [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(9): 1686-1701.

[责任编辑 罗 曦]