

基于 Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路探讨健脾益肾化浊方对多囊卵巢综合征大鼠卵巢功能的改善作用

张晓静¹, 陈苗², 冯亚宏^{1*}, 杜小利^{2*}, 季德江¹, 马会明²(1.宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院, 银川 750021; 2.宁夏医科大学, 银川 750001)

摘要: 目的 观察健脾益肾化浊方通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路调节多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)大鼠卵巢功能的作用机制。方法 SD 大鼠采用高脂饮食联合来曲唑造模, 将造模成功的大鼠随机分为空白对照组, 模型组, 健脾益肾化浊方高、中、低剂量组及阳性药二甲双胍组。应用 ELISA 法检测各组大鼠血清 LH、T 和 LH/FSH 水平; HE 染色观察大鼠卵巢组织的形态; 免疫组化法和 Western blotting 法检测各组大鼠 Bcl-2 相关蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)的蛋白表达。结果 ELISA 结果显示, 健脾益肾化浊方各剂量治疗组 LH、T 和 LH/FSH 水平明显下降, FSH 水平明显升高; HE 染色结果显示, 健脾益肾化浊方各剂量组的卵巢组织可得到明显改善; 免疫组化结果显示, Bax 在卵巢颗粒细胞、间质及黄体细胞中的表达升高, Bcl-2 在卵母细胞、黄体 and 卵泡液中表达升高, Caspase-3 在颗粒细胞、卵母细胞膜和间质中表达升高; Western blotting 结果显示, 健脾益肾化浊方各治疗组 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量下调, Bcl-2 蛋白相对表达量上调, Bax/Bcl-2 比值降低。结论 健脾益肾化浊方可通过下调 PCOS 大鼠卵巢组织 Bax、Caspase-3 蛋白的表达, 降低 Bax/Bcl-2 比值, 上调 Bcl-2 蛋白表达, 调整卵巢细胞增殖凋亡过程, 改善卵巢微环境, 调节内分泌水平, 促进卵泡的发育与成熟, 从而达到改善卵巢排卵功能的作用。

关键词: 多囊卵巢综合征; 健脾益肾化浊方; Bcl-2; Bax; Caspase-3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)20-2891-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223449

引用本文: 张晓静, 陈苗, 冯亚宏, 等. 基于 Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路探讨健脾益肾化浊方对多囊卵巢综合征大鼠卵巢功能的改善作用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(20): 2891-2896.

Improving Effect of Jianpi Yishen Huazhuo Recipe on Ovarian Function in Rats with Polycystic Ovary Syndrome Based on Bax/Bcl-2/Caspase-3 Pathway

ZHANG Xiaojing¹, CHEN Miao², FENG Yahong^{1*}, DU Xiaoli^{2*}, JI Dejiang¹, MA Huiming²(1.Ningxia Hui Autonomous Region Chinese Medicine Hospital and Chinese Medicine Research Institute, Yinchuan 750021, China; 2.Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the mechanism of Jianpi Yishen Huazhuo Recipe in regulating ovarian function in rats with polycystic ovary syndrome(PCOS) through the Bax/Bcl-2/Caspase-3 pathway. **METHODS** SD rats were fed with a high-fat diet combined with letrozole to establish a model of PCOS. The successfully modeled rats were randomly divided into blank control group, model group, high-, medium-, and low-dose Jianpi Yishen Huazhuo Recipe groups, as well as positive drug metformin group. ELISA was used to detect the serum levels of LH, T, and LH/FSH in each group of rats. HE staining was used to observe the morphology of ovarian tissue. Immunohistochemistry and Western blotting was used to detect the protein expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in ovarian tissues of rats. **RESULTS** ELISA results showed that the levels of LH, T, and LH/FSH in each dose group of Jianpi Yishen Huazhuo Recipe significantly decreased, while the level of FSH significantly increased. HE staining results showed that ovarian tissue in each dose group of Jianpi Yishen Huazhuo Recipe was significantly improved. Immunohistochemistry results showed that Bax expression increased in granulosa cells, interstitial cells, and luteal cells, while Bcl-2 expression increased in oocytes, luteal cells, and follicular fluid. Caspase-3 expression increased in granulosa cells, oocyte membranes, and interstitial cells. Western blotting results showed that the relative expression of Bax and Caspase-3 proteins decreased in each dose group of Jianpi Yishen Huazhuo Recipe, while the relative expression of Bcl-2 protein increased, and the ratio of Bax/Bcl-2 decreased. **CONCLUSION** Jianpi Yishen Huazhuo Recipe can improve ovarian ovulation function

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2020AAC03430, 2022AAC03409); 宁夏重点研发计划项目(2022BEG03137); 宁夏卫生健康委科研课题(2021-NW-040); 国家中医药管理局 2022 年青年岐黄学者培养项目(国中医函[2022]256 号); 第七批自治区青年科技人才托举工程项目(宁科协发组字[2023]6 号)

作者简介: 张晓静, 女, 硕士, 住院医师 E-mail: 645161627@qq.com *通信作者: 冯亚宏, 女, 硕士, 主任医师, 硕士 E-mail: fengyahong1977@sina.com 杜小利, 女, 硕士, 教授, 硕士 E-mail: dxl_515@163.com

by downregulating the expression of Bax and Caspase-3 proteins in ovarian tissue of PCOS rats, reducing the ratio of Bax/Bcl-2, upregulating the expression of Bcl-2 protein, adjusting the process of ovarian cell proliferation and apoptosis, improving the ovarian microenvironment, regulating endocrine levels, and promoting follicular development and maturation.

KEYWORDS: polycystic ovarian syndrome; Jianpi Yishen Huazhuo recipe; Bcl-2; Bax; Caspase-3

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期女性常见的内分泌紊乱疾病,发病率为6%~15%^[1]。临床表现为慢性无排卵、高雄激素血症、痤疮、不孕、多毛、月经异常、卵巢多囊样变等^[2]。若不及时治疗,远期会引发心脑血管疾病、糖尿病以及妇科相关恶性肿瘤等,严重影响患者的生命安全和生活质量^[3]。PCOS进展可能涉及遗传、内分泌、代谢等多种因素,但其确切发病机制仍不清楚^[4]。卵巢颗粒细胞是卵泡中最重要的体细胞,可合成多种激素及生长因子,参与调控卵泡发育,而颗粒细胞异常凋亡、炎症反应可诱导病理进程^[5-6]。凋亡过程受多基因调控,研究表明,Caspase-3是最重要的细胞凋亡效应蛋白,能够参与多种途径诱导细胞凋亡,是凋亡的主要执行者^[7]。Bcl-2/Bax表达对卵泡的生长发育有调控作用^[8]。

宁夏回族自治区名中医王淑斌主任医师,宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院妇科主任冯亚宏医师认为脾肾两虚、湿浊内蕴是PCOS的关键病机,针对其病机特点,从脾肾论治,通过健脾补肾以扶正,祛痰化浊以祛邪,自拟健脾益肾化浊方治疗PCOS,临床疗效显著。本方由二仙汤和苍附导痰丸、四君子汤衍化而来,前期课题组临床研究本方治疗60例PCOS病例,已证实改善PCOS患者内分泌和卵巢功能方面疗效显著^[9]。前期基础研究证实,健脾益肾化浊方可通过抑制NLRP3炎症小体的激活,减少卵巢组织中NALP3、Caspase-1、NF- κ B、IL-18、IL-1 β 和IL-6炎症因子的释放,有效减轻PCOS炎症状态,改善卵巢功能,调节生殖内分泌水平,促进卵泡正常发育,从而发挥治疗作用^[10]。本研究以Bax/Bcl-2/Caspase-3凋亡途径为着眼点,探讨健脾益肾化浊方对PCOS卵巢功能改善的作用机制,旨在明确其关键作用靶点,以期为临床应用健脾益肾化浊方治疗PCOS及其改善卵巢功能方面提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

选取8周龄SPF级SD雌性大鼠60只,体质量200~220 g,动物生产许可证号:SCXK(宁)2020-0001。大鼠在宁夏医科大学动物实验中心(许可证号:10752309202000082)饲养,并通过宁夏医科大

学实验动物伦理委员会和宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院伦理审核。血清卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)等ELISA试剂盒均由江苏晶美生物科技有限公司提供,批号分别为JL13251, JL11473, JL11706。Caspase-3抗体(万类生物,货号:02117);Bax抗体(货号:50599)、Bcl-2抗体(货号:12789-1Ap)均购自Proteintech公司。以上抗体均为兔抗。全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:20211018);Caspase-9抗体(北京博奥森生物有限公司,批号:bs-0049R);促凋亡蛋白(Bax,批号:50599-2-1g)、抗凋亡蛋白(Bcl-2,批号:12789-1-AP)、Caspase-3抗体(批号:19677-1-AP)均购自美国Proteintech公司。

1.2 仪器

Universal Hood II型化学发光仪(美国Bio-Rad公司);Epoch型全波长酶标仪(美国BioTek公司);BX41型普通光学显微镜(日本Olympus公司);Aperi LV1型切片扫描仪(德国Leica公司);JE203GE型精密电子天平(美国Mettler公司)。

1.3 药物制备

自拟健脾益肾化浊方(党参15 g,黄芪30 g,茯苓15 g,白术15 g,菟丝子15 g,淫羊藿10 g,桑寄生15 g,仙茅10 g,陈皮12 g,苍术15 g,荷叶12 g,香附12 g),本方由四君子汤、二仙汤和苍附导痰丸衍化而来。药材购于宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院医院药局,并由药剂科煎制。将健脾益肾化浊方制备成中药水煎剂,按成人服用剂量折算成大鼠用量,分别按药物浓度为含生药25, 15, 5 g $\cdot$ mL⁻¹的高、中、低剂量制备浓煎药汁,待使用时稀释。

1.4 PCOS模型大鼠制备

采用数字随机法将动情周期正常的雌性大鼠以1:5比例随机分为空白对照组和模型组,称取体质量。空白对照组正常喂饲普通饲料及饮水;模型组采用高脂饮食联合来曲唑造模^[6],即给予来曲唑(1 mg $\cdot$ kg⁻¹)与高脂乳剂(猪油+胆固醇,猪油:胆固醇=10:3)灌服,高脂乳剂给药量为15 mL $\cdot$ kg⁻¹,每日上午定时灌胃,连续20 d,筛选体质量增高、动情周期紊乱的大鼠纳入模型组

和给药组进行实验。

1.5 动物分组及给药

除空白对照组外,造模成功大鼠随机分为5组:模型组,中药高($40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组及二甲双胍阳性对照组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每组10只。中药及西药各治疗组给予等容积不等浓度药液灌胃,模型组及空白组给予等量生理盐水,灌胃容积 $1\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$,1次 $\cdot\text{d}^{-1}$,共计20 d。

1.6 标本采集与检测

1.6.1 大鼠动情周期检测 每日9:00,各实验组大鼠开始进行阴道涂片,显微镜下观察细胞的种类和形态,结合阴道涂片检查结果,判断大鼠性周期的各个时期。

1.6.2 血清激素水平检测 各组大鼠灌胃结束后,20:00开始禁食,次日20:00以水合氯醛将大鼠进行麻醉,腹主动脉取血5~8 mL,离心后收集血清,采用ELISA法检测各实验组大鼠血清中FSH、LH、T水平。

1.6.3 卵巢病理切片 麻醉后处死大鼠,随机选取一侧卵巢,用10%中性甲醛固定24 h,石蜡包埋,HE染色,于B $\times$ 41显微镜下观察卵巢病理改变及卵泡发育情况。

1.6.4 免疫组化法检测卵巢 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白阳性表达 取大鼠卵巢组织适量,进行石蜡切片、烘烤、二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水 and 枸橼酸微波修复、山羊血清封闭、Bcl-2、Bax、Caspase-3 孵育过夜,二氨基联苯胺显色、中止、苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,

(抗体稀释比为1:250),在光学显微镜下观察并采集图像,黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。

1.6.5 Western blotting 检测大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白相对表达量 分别取大鼠的卵巢组织适量,剪碎、研磨、裂解后,于4℃、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液,采用BCA法测蛋白浓度。SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、TBST洗3次,一抗Bax、Bcl-2、Caspase-3孵育过夜(抗体稀释比为1:1 000)、复温、TBST洗3次、二抗室温孵育1 h、TBST洗3次、ECL化学发光,并用Image J软件对各条带进行灰度值分析。采用Image J V 1.8.0.112图像分析软件进行分析,以目标蛋白条带与内参 β -actin蛋白条带的灰度值之比表示目标蛋白的表达水平。

1.7 统计学方法

所有数据均采用Graph Pad Prism 9进行统计分析,2组比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较,以 $P<0.05$ 为数据差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA法检测血清激素FSH、LH、T、LH/FSH水平

与空白对照组比较,模型组大鼠血清LH、T和LH/FSH水平显著升高($P<0.01$),FSH水平有所下降($P<0.05$),差异均具有统计学意义。与模型组相比,二甲双胍阳性对照组和健脾益肾化浊方各剂量组LH、T和LH/FSH水平明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),FSH水平明显升高($P<0.05$),差异有统计学意义,见图1。

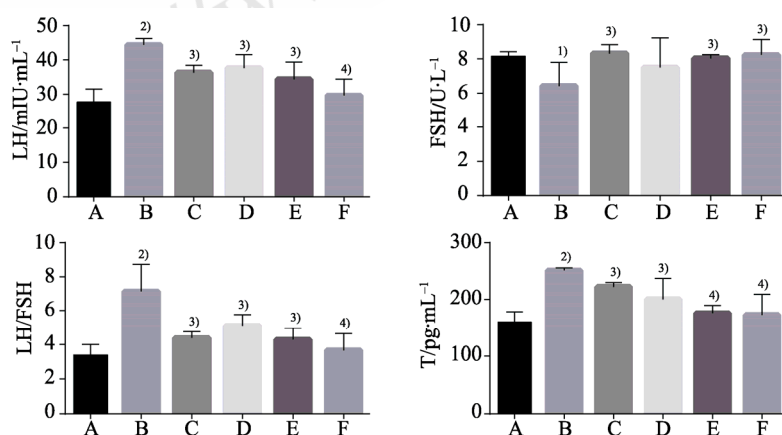


图1 各组大鼠血清LH、FSH、T、LH/FSH水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

A-空白对照组; B-模型组; C-小剂量治疗组; D-中剂量治疗组; E-高剂量治疗组; F-阳性对照组。与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Comparison of rat serum LH, FSH, T, LH/FSH levels by group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

A-blank control group; B-model group; C-low-dose treatment group; D-medium dose treatment group; E-high dose treatment group; F-positive control group. Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

2.2 HE 染色 PCOS 大鼠卵巢组织形态学结果

与空白对照组比较,模型组大鼠卵巢组织可见多个大小不等的囊性扩张卵泡,颗粒细胞明显减少,黄体数量减少,未见原始卵泡和各发育阶段的卵泡,间质纤维化明显;与模型组比较,二甲双胍组及健脾益肾化浊方各剂量组卵巢组织可见各个发育阶段的卵泡,可见成熟卵泡和黄体,颗粒细胞层增厚,见图 2。

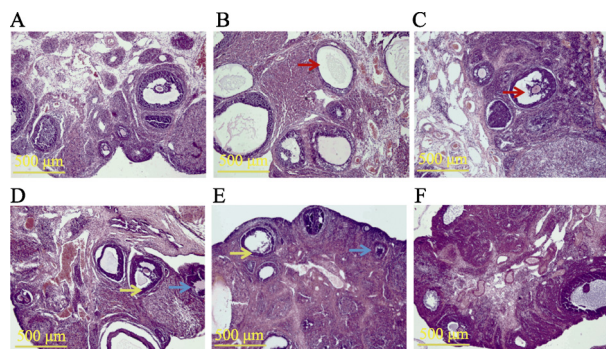


图 2 各组大鼠卵巢组织 HE 染色(100×)

A-空白对照组; B-模型组; C-小剂量治疗组; D-中剂量治疗组; E-高剂量治疗组; F-阳性对照组。红色箭头标注的为卵泡状态对比,蓝色箭头标注的为黄体对比,黄色箭头标注的为颗粒细胞对比。

Fig. 2 Rat ovarian tissue HE staining(100×)

A-blank control group; B-model group; C-low dose treatment group; D-medium dose treatment group; E-high dose treatment group; F-positive control group. The red arrow marks the contrast of follicular state, the blue arrow marks the luteal contrast, and the yellow arrow marks the granulosa cell contrast.

2.3 免疫组织化学染色检测 PCOS 大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白阳性表达结果

Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白在各组卵巢组织中均有表达, Bax 主要在卵泡颗粒细胞、间质以及黄体中表达, Bcl-2 主要在卵母细胞、黄体 and 卵泡液中表达, Caspase-3 在颗粒细胞、卵母细胞膜和间质中有所表达, 见图 3~5。

2.4 Western blotting 检测 PCOS 大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白相对表达结果

与空白对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量明显上调($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达量明显下调($P<0.05$), Bax/Bcl-2 比值升高($P<0.05$); 与模型组比较,二甲双胍组和健脾益肾化浊方各剂量组 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量下调, Bcl-2 蛋白相对表达量上调, Bax/Bcl-2 比值降低。各治疗组间差异无统计学意义。结果见图 6。

3 讨论

中医学没有与 PCOS 对应的病名, 根据临床表现及历代医家的论述, 可归属于“不孕”“癥瘕”

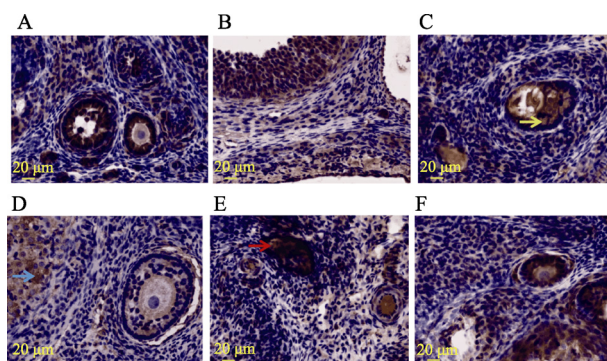


图 3 各组大鼠卵巢组织 Bax 蛋白免疫组化的表达(100×)
A-空白对照组; B-模型组; C-小剂量治疗组; D-中剂量治疗组; E-高剂量治疗组; F-阳性对照组。红色箭头标注的为颗粒细胞, 蓝色箭头标注的为间质, 黄色箭头标注的为黄体细胞。

Fig. 3 Expression of Bax protein immunohistochemistry in rat ovarian tissue by group(100×)

A-blank control group; B-model group; C-low dose treatment group; D-medium dose treatment group; E-high dose treatment group; F-positive control group. The red arrow marks granulosa cells, the blue arrow marks stroma, the yellow arrow marks luteal cells.

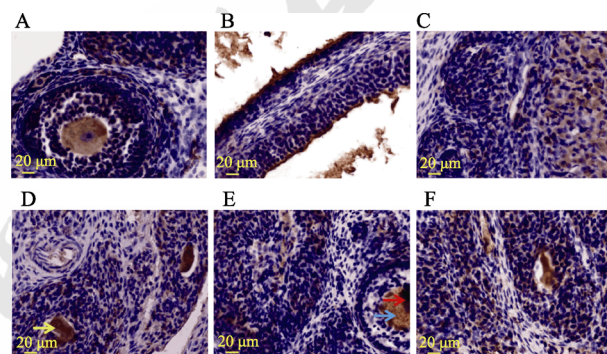


图 4 各组大鼠卵巢组织 Bcl-2 蛋白免疫组化的表达(100×)
A-空白对照组; B-模型组; C-小剂量治疗组; D-中剂量治疗组; E-高剂量治疗组; F-阳性对照组。红色箭头标注的为卵泡细胞, 蓝色箭头标注的为卵泡液, 黄色箭头标注的为黄体细胞。

Fig. 4 Expression of Bcl-2 protein immunohistochemistry in rat ovarian tissue by group(100×)

A-blank control group; B-model group; C-low dose treatment group; D-medium dose treatment group; E-high dose treatment group; F-positive control group. The red arrow marks follicular cells, the blue arrow marks follicular fluid, the yellow arrow marks luteal cells.

“月经后期”“闭经”等范畴, 关于该病的病因病机有众多论述。傅青主曾曰:“脾为后天之本, 肾乃先天之本, 脾非先天之气不能化, 肾非后天之气不能生。”说明生殖功能的正常依赖于脾、肾二脏的协调^[11]。《景岳全书·痰饮》中记载:“痰即水也, 其本在肾, 其标在脾”“五脏之病, 虽具能生痰, 然无由乎脾肾, 盖脾主湿, 湿动则为痰; 肾主水, 水泛亦为痰, 故痰之化无不在脾, 而痰之本无不在肾。”强调了肾阳不足, 脾阳不得温煦, 亦或是脾虚不振, 不能化气行水, 最终均可导致水液停滞, 痰湿瘀阻, 壅滞子宫、胞脉而致 PCOS 的发生^[12]。有研究表明, 脾肾阳虚证在 PCOS 中

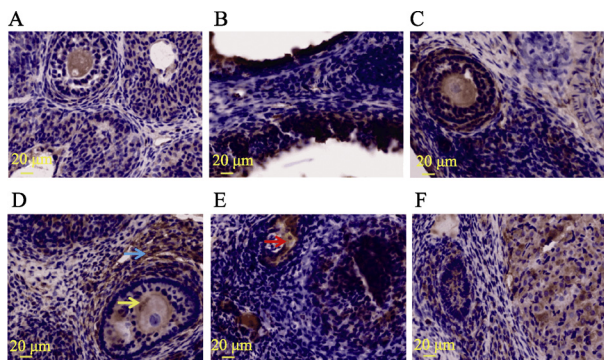


图5 各组大鼠卵巢组织 Caspase-3 蛋白免疫组化的表达(100×)

A-空白对照组; B-模型组; C-小剂量治疗组; D-中剂量治疗组; E-高剂量治疗组; F-阳性对照组。红色箭头标注的为颗粒细胞, 蓝色箭头标注的为间质, 黄色箭头标注的为卵母细胞膜。

Fig. 5 Expression of Caspase-3 protein immunohistochemistry in rat ovarian tissue in each group(100×)

A-blank control group; B-model group; C-low dose treatment group; D-medium dose treatment group; E-high dose treatment group; F-positive control group. The red arrow marks granulosa cells, the blue arrow marks stroma, the yellow arrow marks oocyte membranes.

医证型分布结果中位居第三位, 是除肾虚血瘀证及脾虚痰湿证后最常见的证型^[13]。因此, 临床治疗本病多以健脾温肾、化痰利水、活血逐瘀为主要治法^[14]。

健脾益肾化浊方由宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院自治区名中医王淑斌主任医师、冯亚宏主任医师, 根据多年临床经验总结得出。本方由四君子汤、二仙汤、苍附导痰丸衍化而来。方中以黄芪、党参健脾益气, 仙茅、淫羊藿补肾

壮阳助气化, 同时温化脾阳, 四药合为君药; 菟丝子、桑寄生补益肝肾, 白术健脾益气以利水, 茯苓利水渗湿以健脾, 为臣药; 苍术、荷叶健脾化湿, 香附行三焦之气, 并引诸药入肝经, 陈皮行气调中, 燥湿化痰, 为佐药。本方基于“肾主生殖”“脾主运化”“肥人多痰湿”等理论, 以“脾肾两虚、痰湿瘀阻”作为 PCOS 的关键病因病机为着眼点, 以“健脾温肾、化痰利水、活血逐瘀”为主要治疗大法, 从而实现调节下丘脑-垂体-卵巢轴(H-P-O 轴)功能平衡状态。

有研究结果显示, 细胞凋亡在卵泡的发育成熟中起着至关重要的作用^[15]。不正常的细胞凋亡的调控机制可能存在 PCOS 的发病过程中。细胞凋亡是机体内细胞的程序性死亡, 在机体内环境的维持和多个系统的发育中发挥重要作用, 细胞凋亡受 Bcl-2 家族、Caspase 家族等多个基因的严格调控^[16]。Bcl-2 家族蛋白是一类维持线粒体的完整性的关键蛋白, 其通过调节促凋亡与抗凋亡之间的平衡来实现^[17]。Bax 可通过增强线粒体膜通透性, 改变跨膜电位, 从而促使线粒体内细胞色素 C 释放到细胞质中, 引起半胱氨酸天冬氨酸酶的级联反应, 最终导致 Caspase-3 被激活, 引发细胞的凋亡^[18-19]。Bcl-2 蛋白可以通过抑制凋亡蛋白引发的一系列信号激活发挥抗凋亡作用^[20-21]。本研究结果显示, 健脾益肾化浊方各剂量治疗组 LH、T 和 LH/FSH 水平明显下降, FSH 水平明显

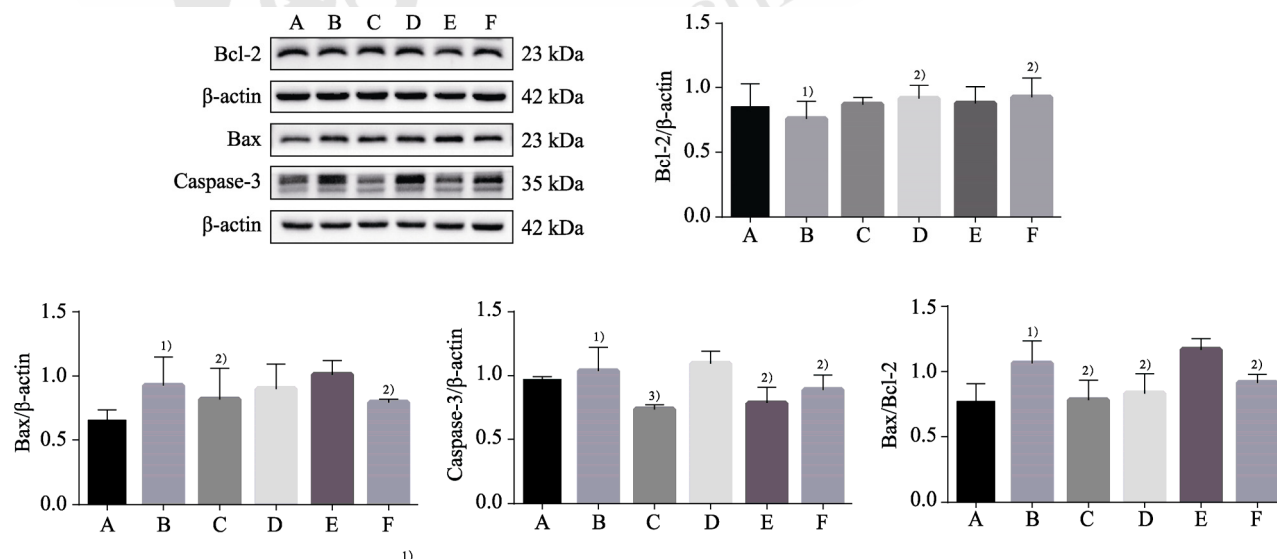


图6 各组大鼠卵巢组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-空白对照组; B-模型组; C-小剂量治疗组; D-中剂量治疗组; E-高剂量治疗组; F-阳性对照组。与空白对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Rat ovarian tissue Bax, Bcl-2, Caspase-3 protein expression in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-blank control group; B-model group; C-low dose treatment group; D-medium dose treatment group; E-high dose treatment group; F-positive control group. Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

升高, 卵巢组织可见各个发育阶段的卵泡, 可见成熟卵泡和黄体, 颗粒细胞层增厚。以上激素改变与文献报道 PCOS 患者激素水平结果一致^[22], 证明健脾益肾化浊方可改善 PCOS 卵巢多囊样改变, 调节体内激素水平, 改善卵巢内环境。为进一步探讨其改善卵巢功能的作用机制, 基于 Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路, 检测了卵巢组织中的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 相关蛋白的表达影响。结果显示, Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白在各组卵巢组织中均有表达, 健脾益肾化浊方各治疗组 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达量下调, Bcl-2 蛋白相对表达量上调, Bax/Bcl-2 比值降低。可见健脾益肾化浊方可有效降低 Bax/Bcl-2 比值, 上调 Bcl-2 蛋白表达, 从而调整卵巢细胞增殖凋亡过程, 达到改善卵巢排卵功能的治疗作用。

综上所述, 健脾益肾化浊方可通过下调 PCOS 卵巢组织 Bax、Caspase-3 蛋白的表达, 降低 Bax/Bcl-2 比值, 上调 Bcl-2 蛋白表达, 调整卵巢细胞增殖凋亡过程, 改善卵巢微环境, 调节内分泌水平, 促进卵泡的发育与成熟, 从而达到改善卵巢排卵功能的作用。本实验从组织、细胞层次, 蛋白水平进行了研究, 为健脾益肾化浊方治疗 PCOS 提供了实验数据, 进一步证实本方在改善卵巢功能方面有显著优势, 值得临床进一步开发使用。

REFERENCES

- [1] XUE S Y, YANG G Y. Progress in diagnosis and therapy of polycystic ovary syndrome[J]. Chin J Endocrinol Metab(中华内分泌代谢杂志), 2020, 36(1): 88-92.
- [2] HE C Y, HUANG W, ZHOU F, et al. The expression of serum human epididymal protein 4 in early pregnancy of patients with polycystic ovary syndrome and its correlation with adverse pregnancy outcome[J]. Hebei Med J(河北医药), 2022, 44(5): 733-736.
- [3] LIU Z Q, LIU L M, CHEN Q Q. Effect of whole-course health education on self-management ability and pregnancy outcome of patients with polycystic ovary syndrome[J]. China J Health Psychol(中国健康心理学杂志), 2022, 30(7): 1003-1007.
- [4] YU L Y, SUN Z G. The research status of epigenetic pathogenesis of polycystic ovary syndrome[J]. Chin J Hum Sex(中国性科学), 2019, 28(8): 77-80.
- [5] WEI C F, LIAN F. Research progress in microRNAs in ovarian granulosa cells[J]. J Int Reproductive Health/Family Plan(国际生殖健康/计划生育杂志), 2020, 39(4): 314-318.
- [6] LIMA P D A, NIVET A L, WANG Q, et al. Polycystic ovary syndrome: Possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages[J]. Biol Reprod, 2018, 99(4): 838-852.
- [7] LIN S, ZHU H, QIN H Z, et al. Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on apoptosis of SMMC-7721 cells and expression of Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(19): 73-79.
- [8] WEN D T, PENG X, ZHENG W L, et al. Study on the mechanism of action of Xianzi Yizhen capsules on diminished ovarian reserve function in rats based on Bcl-2/Bax apoptosis[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2022, 39(7): 1615-1621.
- [9] FENG Y H, ZHANG X J, DU C Z. Clinical observation on 60 cases of obese polycystic ovary syndrome treated with Jianpi Yishen Huazhuo recipe[J]. Chin Baby(母婴世界), 2021(1): 100.
- [10] CHEN M, DU X L, FENG Y H, et al. Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on ovarian function in rats with polycystic ovary syndrome based on NLRP3 inflammatory pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2022, 28(20): 61-70.
- [11] RAO L, ZHU H L. Research progress on treatment of polycystic ovary syndrome from spleen and kidney[J]. J Tradit Chin Med Lit(中医文献杂志), 2019, 37(2): 70-72.
- [12] QIAN L Q, LI S N, YU Y, et al. XIA Guicheng's experience in treating infertility caused by polycystic ovary syndrome[J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2020, 61(20): 1775-1778.
- [13] LI X B, LAN X Y, OU A H, et al. Distribution of Chinese medicine syndrome patterns and its laws in patients with polycystic ovarian syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2011, 31(3): 323-326.
- [14] HOU A/E/E M, CHU J J, LIU M, et al. Study on the law of Chinese medicine in the treatment of polycystic ovary syndrome with deficiency of spleen and kidney in recent ten years[J]. J Shaanxi Univ Chin Med(陕西中医药大学学报), 2022, 45(4): 76-81.
- [15] CHEN L, LI M, SUN Y, et al. Study on apoptosis gene of ovarian granulosa cells in patients with polycystic ovary syndrome[J]. Chin J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2011, 27(6): 692-693, 696.
- [16] LI L J, LIU W T, LUO H H, et al. Effects of total flavonoids from *Semen Cuscuta* on apoptosis related proteins Bax, Bcl-2 and Caspase-3 of mouse testicular Leydig cells[J]. Acad J Chin PLA Med Sch(解放军医学院学报), 2022, 43(2): 199-204.
- [17] CUI J, PLACZEK W J. Post-transcriptional regulation of anti-apoptotic Bcl2 family members[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 308.
- [18] ZHANG Y, YANG X, GE X H, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice[J]. Biomed Pharmacother, 2019(109): 726-733.
- [19] HAN X J, SUN J P, ZHANG M Y, et al. Effect of resveratrol on endoplasmic reticulum stress and apoptosis in rabbit with acute lung injury[J]. Acad J Chin PLA Med Sch(解放军医学院学报), 2020, 41(4): 364-368.
- [20] VARDIYAN R, EZATI D, ANVARI M, et al. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax[J]. Clin Exp Reprod Med, 2020, 47(3): 155-160.
- [21] WANG Y G, DOU Y Q, ZHAO S. Protective effect of ginsenoside Rg1 on intestinal IEC-6 cell injury induced by radiation: An *in vitro* experiment[J]. Acad J Chin PLA Med Sch(解放军医学院学报), 2020, 41(3): 284-288, 293.
- [22] CUI Y, ZHAO D L, ZHANG G N. Predictive value of serum ADMA and ghrelin levels on obesity and insulin resistance in PCOS patients[J]. Chin J Birth Health Hered(中国优生与遗传杂志), 2022, 30(8): 1424-1429.

收稿日期: 2022-10-08

(本文责编: 沈倩)