

五子衍宗丸通过调控 TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR 通路抑制颗粒细胞凋亡改善卵巢储备功能减退

梁云腾¹, 高倩², 李悦怡¹, 黄菁宇¹, 刘凯鲁¹, 洪艳丽¹, 周惠芳¹, 聂晓伟¹

¹南京中医药大学附属医院生殖医学科, 江苏 南京 210029; ²宜兴市中医医院妇产科, 江苏 宜兴 214200

摘要:目的 探讨五子衍宗丸对卵巢储备功能减退小鼠的治疗作用及潜在机制。方法 利用雷公藤多苷建立卵巢储备功能减退小鼠模型,将雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、五子衍宗丸低剂量组(五子衍宗丸-L, 1.82 g·kg⁻¹·d⁻¹)和五子衍宗丸高剂量组(五子衍宗丸-H, 3.64 g·kg⁻¹·d⁻¹), 8 只/组,灌胃给药 28 d。计算小鼠卵巢指数,通过 ELISA 检测激素水平,HE 染色观察卵巢组织形态。利用 RNA-seq 筛选五子衍宗丸治疗卵巢储备功能减退的关键信号通路。结合网络药理学,使用多重数据库分析五子衍宗丸的潜在作用靶点与通路。通过免疫组化和 Western blotting 检测小鼠卵巢组织中 TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR 通路关键蛋白表达, TUNEL 染色及 Western blotting 评估颗粒细胞(GCs)凋亡水平。此外,收集人 GCs 样本进行 Western blotting,验证该通路在卵巢储备功能减退患者中的表达。结果 与模型组相比,五子衍宗丸使卵巢指数恢复($P<0.05$),抗缪勒管激素及雌二醇水平升高,卵泡刺激素降低($P<0.05$),并改善卵巢组织形态,使 GCs 功能恢复,闭锁卵泡减少。RNA-seq 显示 PI3K/Akt 通路在五子衍宗丸治疗后显著富集。网络药理学显示, TGF- β 、PI3K-Akt 及凋亡通路是五子衍宗丸潜在作用的关键通路。免疫组化及 Western blotting 提示五子衍宗丸上调卵巢组织 TGF- β 1、PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白表达($P<0.05$), TUNEL 染色及 Western blotting 表明五子衍宗丸抑制 GCs 凋亡($P<0.05$)。卵巢储备功能减退患者 GCs 中 TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白表达下调($P<0.05$)。结论 五子衍宗丸通过上调 TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制 GCs 过度凋亡,从而改善卵巢储备功能。

关键词: 卵巢储备功能减退; 五子衍宗丸; 颗粒细胞; 凋亡; TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR 通路

Wuzi Yanzong Pill ameliorates diminished ovarian reserve in mice by inhibiting granulosa cell apoptosis via the TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway

LIANG Yunteng¹, GAO Qian², LI Yueyi¹, HUANG Jingyu¹, LIU Kailu¹, HONG Yanli¹, ZHOU Huifang¹, NIE Xiaowei¹

¹Department of Reproductive Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Yixing Traditional Chinese Medicine Hospital, Yixing 214200, China

Abstract: Objective To investigate the efficacy of Wuzi Yanzong Pill (WZYZP) for improving diminished ovarian reserve (DOR) in mice and explore the underlying mechanism. **Methods** Female C57BL/6J mice were randomly divided into control group, Tripterygium wilfordii polyglycoside-induced DOR model group, and two WZYZP groups treated with WZYZP at daily doses of 1.82 or 3.64 g/kg for 28 days ($n=8$). Ovarian index of the mice was calculated, hormone levels were detected with ELISA, and ovarian histopathological changes were observed using HE staining. RNA sequencing was performed to identify the key signaling pathways involved in WZYZP treatment for DOR. Network pharmacology analysis was used to predict the potential targets and pathways of WZYZP. Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect ovarian expressions of the key proteins in the TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway. Granulosa cell (GC) apoptosis levels were assessed with TUNEL staining and Western blotting. In addition, human GCs samples were collected from DOR patients for validating the expressions of the TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway using Western blotting. **Results** In the mouse models of DOR, WZYZP treatment significantly improved the ovarian index, increased anti-Müllerian hormone (AMH) and estradiol (E_2) levels, decreased follicle stimulating hormone (FSH) level, alleviated ovarian pathologies, enhanced GC function, and reduced atretic follicles. RNA-seq revealed significant enrichment of the PI3K/Akt pathway after WZYZP treatment. Network pharmacology analysis suggested that the TGF- β , PI3K-Akt, and apoptosis pathways were the key pathways potentially targeted by WZYZP. WZYZP treatment significantly upregulated the expressions of TGF- β 1, PI3K, Akt, and mTOR in mouse ovarian tissues and inhibited GC apoptosis. Western blotting of human GCs further verified the down-regulation of TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway in DOR patients. **Conclusion** WZYZP improves ovarian reserve by upregulating the TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and inhibiting excessive apoptosis of GCs.

Keywords: diminished ovarian reserve; Wuzi Yanzong Pill; granulosa cells; apoptosis; TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway

收稿日期: 2025-12-28

基金项目: 国家自然科学基金(82474567, 82074479); 江苏省自然科学基金(BK20251964); 宜兴市“陶都之光”科技攻关计划项目(2023SF12); 江苏省前沿技术研发计划(卫生健康领域)项目(BF2025618); 2025 年度江苏省中医院院级课题(Y25004)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82474567, 82074479).

作者简介: 梁云腾, 在读硕士研究生, E-mail: 15269546010@163.com

通信作者: 聂晓伟, 研究员, 博士生导师, E-mail: niexiao5715@163.com

卵巢储备功能减退(DOR)是一种以卵母细胞数量减少和质量下降为主要特征的生殖内分泌疾病,临床表现为生育能力降低、月经紊乱及性激素水平异常,严重影响女性生殖健康^[1]。其发病机制涉及年龄、医源性损伤、环境污染物、生活习惯、遗传等多种因素^[2]。DOR在不孕女性中发病率约为 10%^[3],且有年轻化趋势^[4]。若不及早干预,会进一步发展为早发性卵巢功能不全和卵

巢早衰^[5,6]。

现代医学多采用激素替代疗法、脱氢表雄酮和辅酶Q10等治疗DOR,但疗效有限,且长期使用存在风险^[7]。中医药在“肾主生殖”理论指导下,在改善卵巢功能方面显示出独特优势^[8]。五子衍宗丸(WZYZP)具有补肾填精、调节生殖功能等作用,被誉为“古今种子第一方”^[9],常用于治疗男性生殖系统疾病^[10]。近年来,临床研究表明WZYZP及其化裁方治疗DOR疗效显著,能有效改善DOR患者的卵巢反应性和激素水平,促进卵泡发育成熟,提高卵母细胞质量^[11,12],但其作用机制尚不明确。

颗粒细胞(GCs)作为卵泡结构和功能的关键组成部分,参与调控卵泡发育及卵母细胞成熟^[13]。研究表明DOR致病的核心驱动因素是GCs过度凋亡,导致卵泡发育不良或闭锁^[14-16]。因此推测WZYZP可能通过抑制GCs过度凋亡,发挥改善卵巢储备的作用。

PI3K/Akt/mTOR通路在调控颗粒细胞增殖与凋亡中发挥核心作用,参与原始卵泡激活和发育^[17,18]。该通路的异常抑制导致的GCs凋亡和原始卵泡耗竭是DOR发生的关键环节^[8,19-22],而激活该通路能促进细胞增殖和存活^[23]。此外,转化生长因子- β 1(TGF- β 1)作为一类多效性细胞因子,不仅参与卵泡生长发育,还通过调控下游PI3K/Akt信号通路影响细胞增殖和凋亡^[24-26]。

本研究综合运用动物实验、RNA-seq、网络药理学及人GCs实验验证,系统论证了WZYZP通过调控TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制GCs过度凋亡,从而改善DOR,为WZYZP防治DOR的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

雷公藤多苷片(TWP,浙江得恩德制药股份有限公司);生理盐水(万物生物科技有限公司);五子衍宗丸(北京同仁堂股份有限公司);4%多聚甲醛溶液(科隆化学用品有限公司);小鼠抗缪勒管激素(AMH)、卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E_2) ELISA试剂盒(Elabscience);抗TGF- β 1、PI3K、Akt、mTOR、BAX、Bcl-2、Caspase3、GAPDH、 β -actin抗体(Cell Signaling Technology);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔/鼠IgG、BCA试剂盒、RIPA裂解缓冲液、TUNEL凋亡试剂盒、DAPI染色试剂(Beyotime);ECL试剂盒(Biosharp);PVDF膜(Millipore);DAB、HE染色试剂盒(Servicebio);酶标仪、离心机(Bio Tek);电泳仪、转膜仪(Tanon)。

1.2 动物实验

1.2.1 药品制备 对于体质量60 kg的成年女性标准,WZYZP公认临床剂量为12 g/d,按体表面积换算得小鼠等效剂量为 $1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,据此设WZYZP低、高

剂量组分别为 $1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $3.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。TWP的公认临床剂量为 $1 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,根据文献研究,设定小鼠给药剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[27,28]。WZYZP和TWP均制备成混悬液。

1.2.2 实验动物及分组 32只SPF级C57BL/6J雌性小鼠,6~8周龄,体质量16~18 g[苏州斯贝福生物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(苏)2022-0006]。实验经南京中医药大学附属医院伦理委员会批准(伦理批号:2024DW-060-01)。小鼠饲养于室温 $22 \sim 25^\circ\text{C}$ 、12 h光暗周期环境中,自由饮食饮水。按随机数字表法将小鼠分为对照组(CON)、模型组(DOR)、WZYZP低剂量组(WZYZP-L)和WZYZP高剂量组(WZYZP-H),8只/组。

1.2.3 DOR模型建立及给药 适应性喂养7 d后,DOR组、WZYZP-L组和WZYZP-H组小鼠每日灌胃TWP $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,持续14 d,以建立DOR模型。CON组每日灌胃等体积生理盐水。在TWP灌胃首日起,WZYZP-L和WZYZP-H组每日分别灌胃WZYZP $1.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $3.64 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,CON组和DOR组灌胃等体积生理盐水,持续28 d。实验结束后小鼠安乐死,采集血清和卵巢组织。

1.2.4 卵巢指数计算 去除卵巢脂肪和结缔组织后称质量,计算卵巢指数:卵巢指数(%)=卵巢湿质量(mg)/体质量(g) $\times 100\%$ 。

1.2.5 血清激素检测 使用ELISA试剂盒测量小鼠血清AMH、FSH和 E_2 水平。使用酶标仪测定吸光度 $A_{450\text{nm}}$,计算激素浓度。

1.2.6 卵巢HE染色 卵巢组织经4%多聚甲醛固定,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,厚度 $6 \sim 7 \mu\text{m}$,进行HE染色。

1.2.7 小鼠卵巢GCs的RNA测序(RNA-seq) 提取卵巢组织总RNA,进行分光光度纯度验证、浓度检测以及RNA完整性评估。使用mRNA富集方案制备测序文库并进行双端测序。原始测序数据过滤后获得干净读数,与参考基因组比对。使用DESeq R包鉴定差异表达基因(DEG),标准为Fold Change ≥ 2 且 $P < 0.05$ 。对DEGs进行GO分类和KEGG富集分析。

1.2.8 网络药理学 WZYZP由枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子组成,在TCMSP、TCMID、BATMAN等数据库中依次检索。活性成分的筛选标准为口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 以及类药性(DL) ≥ 0.18 。利用Uniprot数据库对靶点基因名称标准化并去重,得到药物活性成分及作用靶点。从GeneCards和OMIM数据库获取DOR相关靶点,汇总后去重得到DOR疾病靶点。使用Venny在线工具绘制WZYZP和DOR靶点交集的韦恩图。采用Cytoscape软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络。通过STRING数据库构建蛋白质-蛋白

质相互作用(PPI)网络。使用R clusterProfiler包对交集靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析,以 $P<0.05$ 为筛选条件进行可视化分析。

1.2.9 免疫组织化学 卵巢组织切片脱蜡、水化,柠檬酸盐缓冲液中高温抗原修复,3%过氧化氢溶液孵育。BSA封闭后分别与一抗TGF- β 1、PI3K、Akt (1:1000)及辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(1:100)孵育。DAB显色,苏木精复染,乙醇脱水、二甲苯透明后封片。在光学显微镜下观察,每张切片随机采集6个视野的图像($\times 200, \times 400$),阳性表达为棕黄色,采用Image J提取图片阳性平均光密度值,GraphPad Prism绘制柱状图。

1.2.10 Western blotting 使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液提取卵巢组织总蛋白。经SDS-PAGE凝胶分离后转移至PVDF膜,与一抗TGF- β 1、PI3K、Akt、mTOR、Caspase3、BAX、Bcl-2、GAPDH、 β -actin (1:1000) 4℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(1:1000)孵育后显影曝光。

1.2.11 TUNEL 染色 切片脱蜡、水化,蛋白酶K处理,加入现配的TdT和dUTP酶反应混合液孵育。DAPI复染,滴加荧光封片液,在显微镜下观察。

1.3 人颗粒细胞 Western blotting

随机选取2022年9月~2023年12月在南京中医药大学附属医院生殖医学中心行IVF/ICSI的DOR患者和对照患者各3例,取卵时收集GCs。本研究经南京中医药大学附属医院伦理委员会批准(伦理批号:2022NL-200-03)。所有参与者均签署知情同意书。提取GCs总蛋白,SDS-PAGE凝胶分离后转移至PVDF膜,与一抗TGF- β 1、PI3K、Akt、mTOR、Caspase3、BAX、Bcl-2、GAPDH、 β -actin (1:1000) 4℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(1:1000)孵育后显影曝光。

1.4 统计学分析

所有统计分析均使用GraphPad Prism 8.0软件通过Student's *t*检验和单因素方差分析等方法进行评估。计量资料表示为均数 $\pm$ 标准差。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验均独立重复3次。实验流程示意图采用BioGDP.com绘制^[29]。

2 结果

2.1 WZYZP恢复DOR小鼠的卵巢指数、激素水平及组织形态学改变

通过TWP构建DOR小鼠模型并予WZYZP治疗(图1A)。与CON组相比,DOR组卵巢指数降低($P<0.05$),WZYZP低、高剂量组卵巢指数较DOR组升高($P<0.05, P<0.01$,图1B)。

ELISA检测显示,DOR组AMH及 E_2 水平显著低

于CON组($P<0.001$),FSH显著升高($P<0.001$)。与DOR组相比,WZYZP-L组AMH及 E_2 升高($P<0.05$),FSH降低($P<0.05$),WZYZP-H组AMH及 E_2 水平升高($P<0.001, P<0.01$),FSH降低($P<0.001$,图1C~E)。

HE染色显示,CON组小鼠卵巢结构正常,各级卵泡发育良好,卵母细胞形态饱满,GCs呈多层致密排列。与对照组相比,DOR组卵巢体积缩小,生长卵泡和成熟卵泡数量减少,卵母细胞萎缩,GCs出现排列无序和层数减少等凋亡改变,闭锁卵泡占比增加。WZYZP治疗后,卵巢体积增大,生长卵泡和成熟卵泡数量增加,卵母细胞形态饱满,GCs排列紧密有序、层数增多,闭锁卵泡减少(图1F)。

2.2 RNA-seq提示PI3K/Akt通路为WZYZP治疗DOR的核心通路

对小鼠卵巢组织进行RNA-seq分析,与DOR组相比,WZYZP处理后共鉴定出603个DEGs,包括414个上调基因和189个下调基因(图2A、B)。GO分类分析表明DEGs主要富集于细胞过程、单细胞生物过程、代谢过程等生物学过程,细胞器、细胞膜等细胞组分,以及结合、催化活性、信号转导活性等分子功能(图2C)。KEGG通路富集分析提示PI3K/Akt通路为最显著富集的通路(图2D)。

2.3 网络药理学分析WZYZP治疗DOR的机制

通过检索数据库,并剔除重复的成分及靶点后,共得到99个活性成分和969个药物靶点。在数据库中检索DOR靶点,去重后得到1311个靶点。将药物靶点和疾病靶点取交集后得到313个共同靶点(图3A)。

利用Cytoscape构建“药物-成分-靶点-疾病”网络(图3B),包含412个节点和2893条边,节点代表成分和靶点,边代表成分与靶点之间的靶向关系。该网络图可见93个活性成分作用于313个靶点。通过STRING数据库构建PPI网络,鉴定出IL6、AKT1、TP53、EGFR、IL1B、TNF等核心靶点(图3C)。

对交集靶点进行GO功能富集分析,生物学过程主要涉及TGF- β 1生成调控、PI3K/PKB信号传导及凋亡信号通路的调控等;分子功能主要包括TGF- β 受体结合、PI3K结合等(图3D)。KEGG共富集到208条信号通路,关键靶点显著富集于TGF- β 信号通路、PI3K-Akt信号通路、mTOR信号通路及细胞凋亡等(图3E)。

2.4 WZYZP上调TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR通路

免疫组化显示,TGF- β 1、PI3K、Akt集中在颗粒细胞及卵母细胞的细胞质和细胞核中(图4A)。与对照组相比,DOR组GCs中TGF- β 1、PI3K、Akt表达降低($P<0.05$)。与DOR组相比,WZYZP-L组PI3K、Akt表达量升高($P<0.05$),TGF- β 1略有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$),WZYZP-H组TGF- β 1、PI3K、Akt表达量

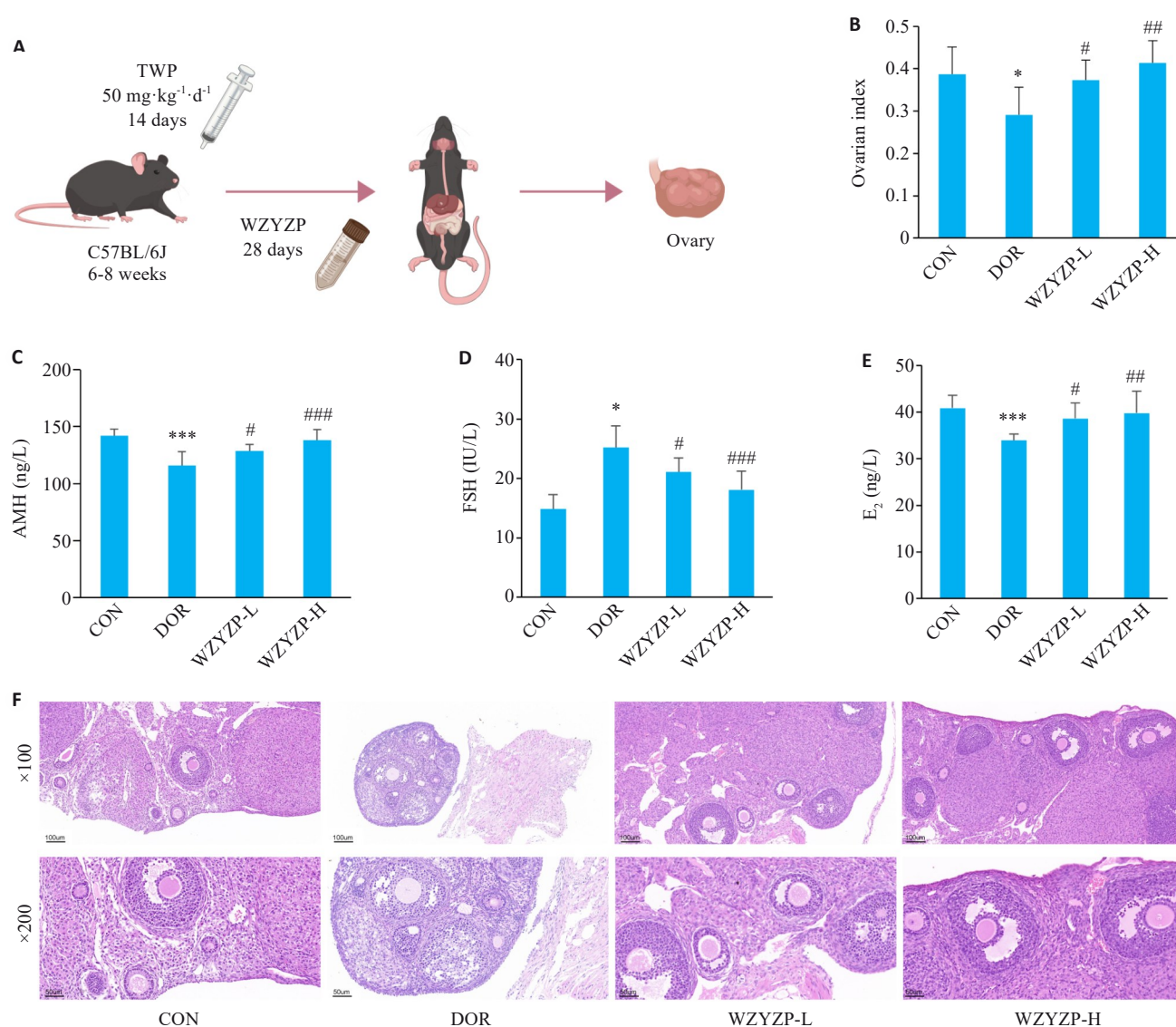


图1 五子衍宗丸减轻TWP诱导的卵巢毒性

Fig.1 Wuzi Yanzong Pill (WZYZP) alleviates Tripterygium wilfordii polyglycoside-induced ovarian toxicity. **A**: Animal experimental protocol. **B**: Comparison of ovarian index among the groups. **C-E**: ELISA detection of AMH, FSH, and E₂ levels in each group. **F**: HE staining of the ovarian tissues in each group (Scale bar=100 μm or 50 μm). Data are presented as Mean±SD (n=8). DOR: Diminished ovarian reserve; AMH: Anti-Müllerian hormone; E₂: Estradiol; FSH: Follicle stimulating hormone. *P<0.05, ***P<0.001 vs CON group, #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs DOR group.

均显著升高($P<0.01$,图4B~D)。

Western blotting 表明,与对照组相比,DOR 组 TGF-β1、PI3K、Akt、mTOR 表达均下降($P<0.05$)。与 DOR 组相比,WZYZP-L 组 TGF-β1、Akt、mTOR 表达量升高($P<0.05$),PI3K 升高不显著($P>0.05$),WZYZP-H 组 TGF-β1、PI3K、Akt、mTOR 表达量均显著升高($P<0.01$,图5)。

2.5 WZYZP 抑制 DOR 小鼠颗粒细胞凋亡

TUNEL 染色显示,DOR 组 GCs 凋亡率显著高于对照组($P<0.001$),WZYZP 低、高剂量组 GCs 凋亡率显著低于 DOR 组($P<0.001$,图6A、B)。

Western blotting 检测凋亡相关蛋白显示,与对照组相比,DOR 组促凋亡蛋白 Caspase3、BAX 表达量升高

($P<0.05$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 下降($P<0.05$)。与 DOR 组相比,WZYZP-L 组 Caspase3、BAX 表达下降($P<0.05$),Bcl-2 表达上升($P<0.05$),WZYZP-H 组 Caspase3、BAX 表达量下降($P<0.05$),Bcl-2 显著升高($P<0.001$,图6C~F)。

2.6 DOR 患者 GCs 中 TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR 通路下调及凋亡水平升高

与对照组相比,DOR 组患者 GCs 中 TGF-β1、PI3K、Akt、mTOR、Bcl-2 表达量均显著下降($P<0.01$),Caspase3、BAX 表达量显著升高($P<0.001$,图7)。

3 讨论

DOR 作为一种复杂的生殖内分泌疾病,严重影响女性生育能力及内分泌平衡^[30]。现代医学仍以激素替

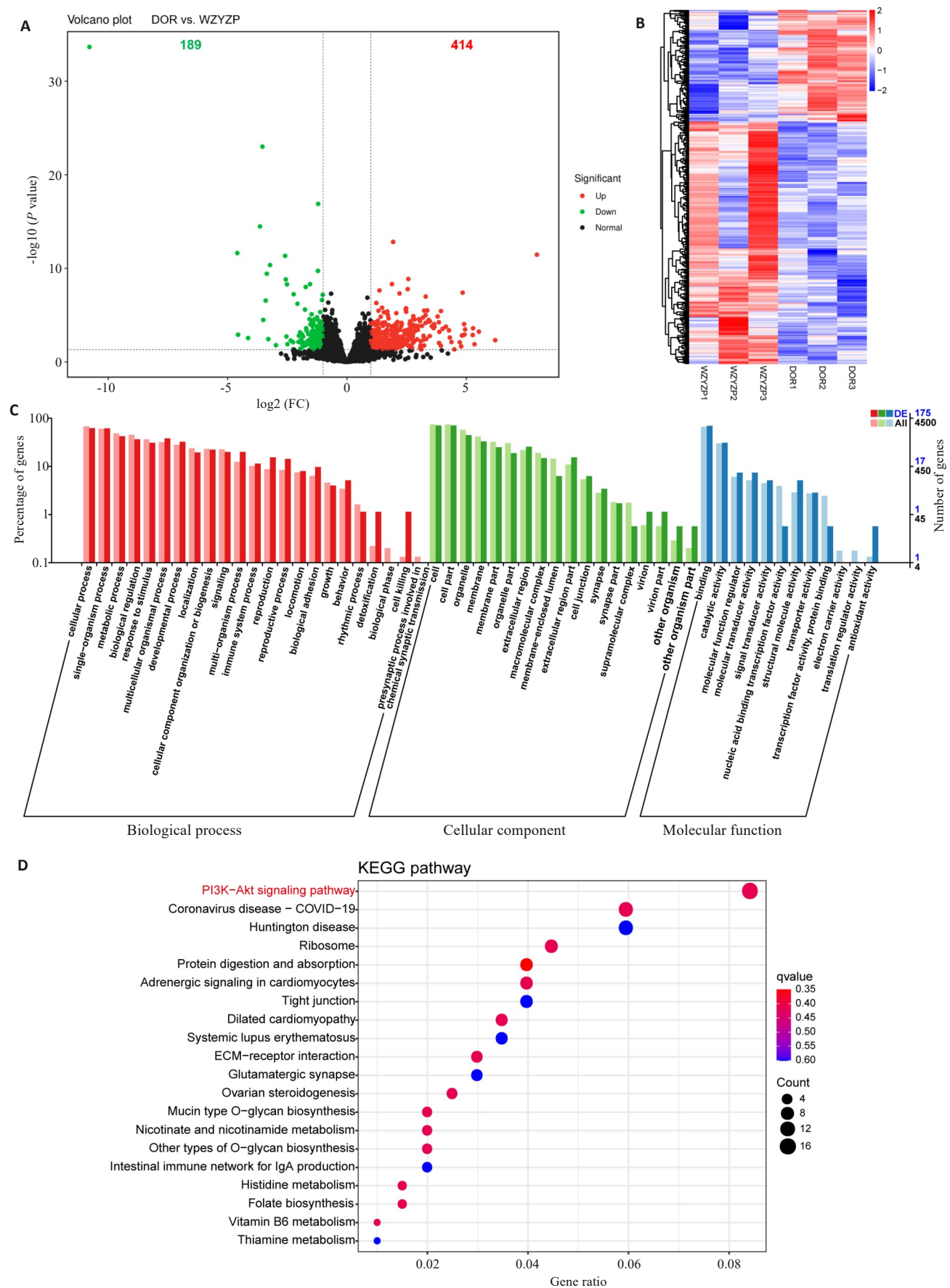


图2 RNA-seq检测WZYZP处理前后小鼠卵巢颗粒细胞的转录水平

Fig.2 RNA-seq of transcriptional levels in mice granulosa cells (GCs) before and after WZYZP treatment. **A:** Volcano plot of differentially expressed genes in mice GCs before and after WZYZP treatment ($n=3$). **B:** Heatmap of differentially expressed genes in mice GCs before and after WZYZP treatment ($n=3$). **C:** GO analysis of differentially expressed genes ($n=3$). **D:** Dotplot of KEGG pathway enrichment analysis ($n=3$).

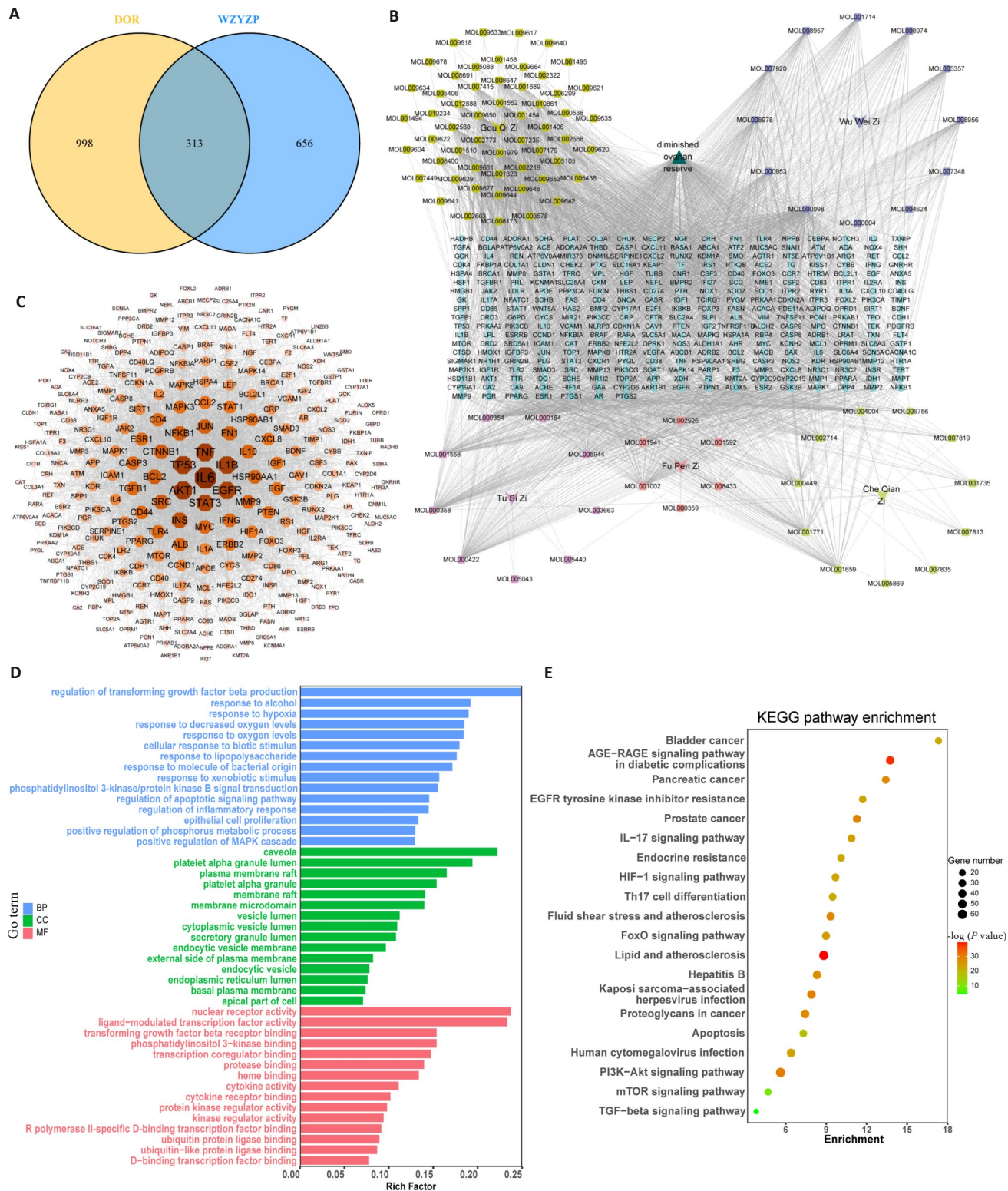


图3 网络药理学探讨五子衍宗丸(WZYZP)治疗卵巢储备功能减退(DOR)的作用机制

Fig.3 Network pharmacology analysis of the mechanisms of WZYZP for treating diminished ovarian reserve (DOR). **A:** Venn diagram of shared targets between WZYZP and DOR. **B:** Medicine-component-target-disease map. **C:** PPI network diagram. **D:** GO analysis of the shared targets, categorized into Biological Processes (BP), Cellular Components (CC), and Molecular Functions (MF). **E:** Dotplot of KEGG pathway enrichment analysis.

代等疗法为主,难以从根本上逆转卵巢功能的衰退趋势^[31]。而中医药具有多成分、多靶点、整体调节等特点^[32],能够通过调控不同通路改善DOR,有效调节患者激素水平,缓解临床症状,改善妊娠结局^[33, 34]。

中医认为DOR属于“闭经”“不孕”等范畴,其根本病机在于肾精亏虚,冲任失调^[35]。WZYZP作为补肾填精的经典名方,方中菟丝子温补肾阳,枸杞子滋补肾阴,二者阴阳双补,共为君药;覆盆子、五味子补肾涩精,共

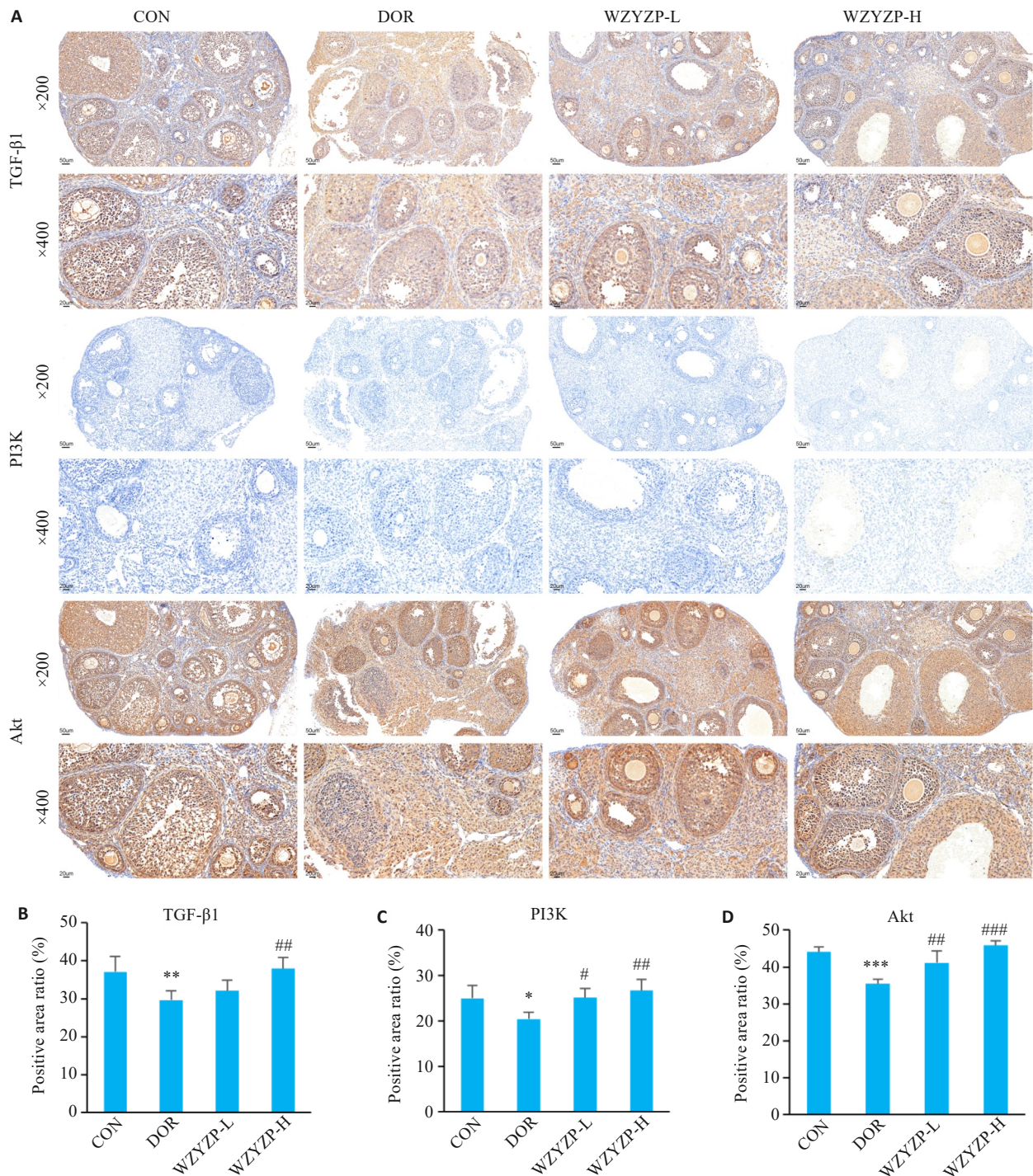


图4 五子衍宗丸上调DOR小鼠中TGF-β1、PI3K及Akt的表达

Fig.4 WZYZP upregulates ovarian expressions of TGF-β1, PI3K, and Akt in DOR mice. A: Immunohistochemistry for TGF-β1, PI3K and Akt in mouse ovaries (Scale bar=50 μm or 20 μm). B-D: Expression levels of TGF-β1, PI3K and Akt in mouse ovaries (Mean±SD, n=5). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs CON group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs DOR group.

为臣药;车前子利水渗湿,平衡全方温补之性,为佐药。诸药相配,补中寓泻,补而不腻,共奏益肾填精、调理冲任之效^[9]。目前,已有临床研究证实WZYZP对DOR有改善作用^[36]。

研究表明,TWP通过加速原始卵泡激活和增加闭锁卵泡,以及改变GCs凋亡机制,引发卵巢损伤,导致DOR的发生^[19]。因此,TWP的生殖毒性可用于诱导

DOR小鼠模型。本研究采用 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的TWP建立DOR小鼠模型。TWP处理后,小鼠AMH和 E_2 水平降低,FSH升高。AMH由生长卵泡的GCs分泌,能准确反映窦卵泡池的大小,是卵巢储备最可靠的标志物之一^[37]。AMH水平降低,表明GCs功能受损,卵巢储备减少。高度异常的FSH对DOR有特异性,也是DOR的可靠预测指标,且FSH升高可刺激GCs分泌 E_2 ,导致 E_2 水

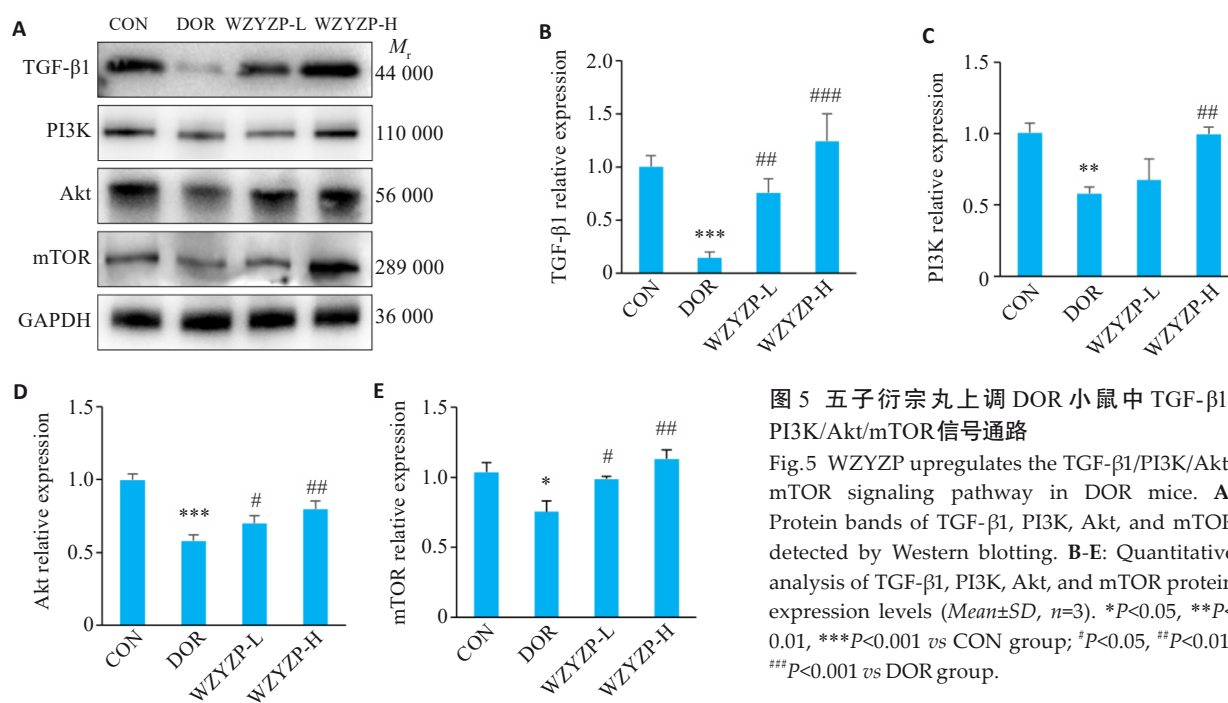


图5 五子衍宗丸上调DOR小鼠中TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR信号通路

Fig.5 WZYZP upregulates the TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in DOR mice. **A:** Protein bands of TGF-β1, PI3K, Akt, and mTOR detected by Western blotting. **B-E:** Quantitative analysis of TGF-β1, PI3K, Akt, and mTOR protein expression levels ($Mean \pm SD$, $n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs CON group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs DOR group.

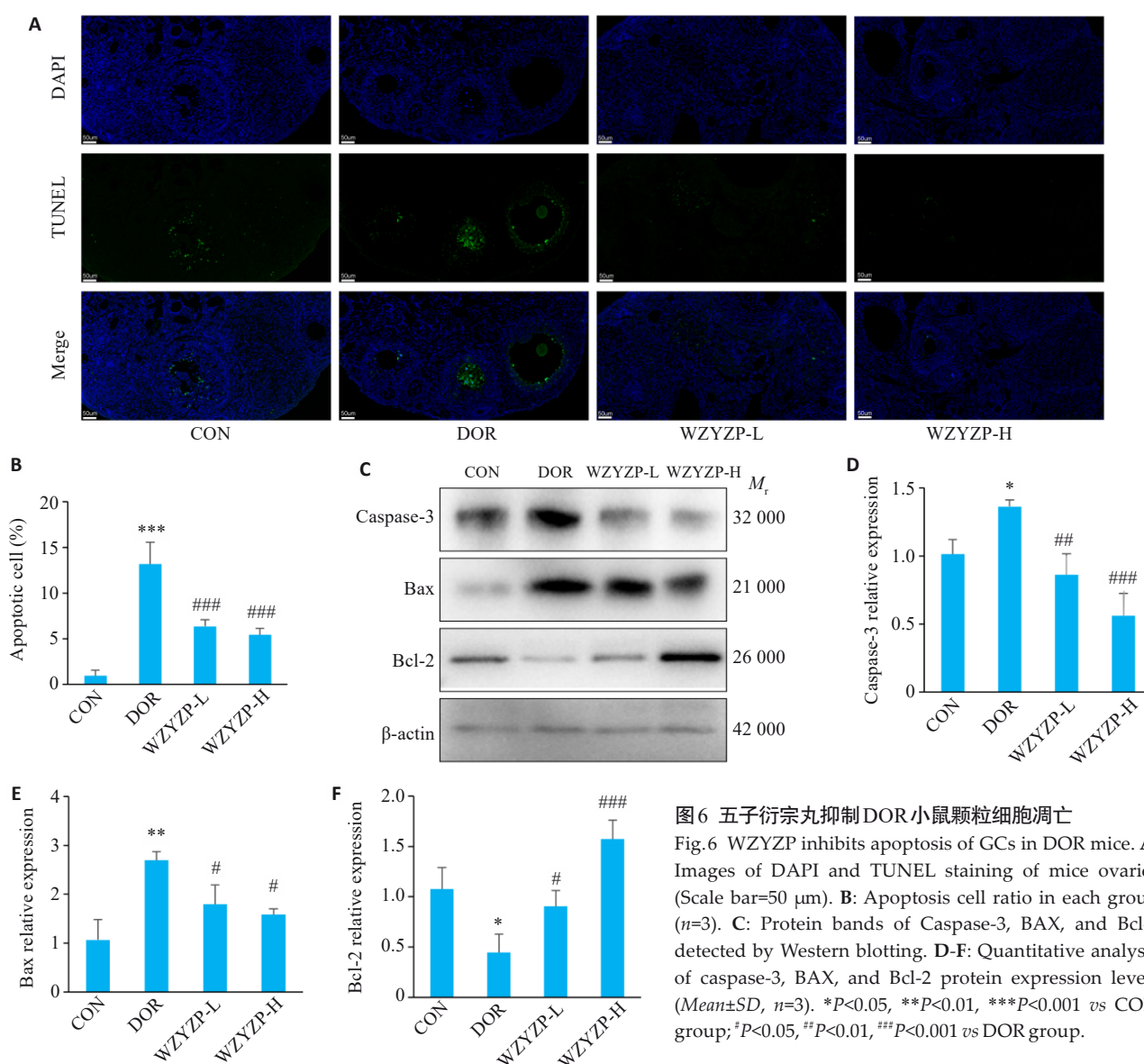


图6 五子衍宗丸抑制DOR小鼠颗粒细胞凋亡

Fig.6 WZYZP inhibits apoptosis of GCs in DOR mice. **A:** Images of DAPI and TUNEL staining of mice ovaries (Scale bar=50 μm). **B:** Apoptosis cell ratio in each group ($n=3$). **C:** Protein bands of Caspase-3, BAX, and Bcl-2 detected by Western blotting. **D-F:** Quantitative analysis of caspase-3, BAX, and Bcl-2 protein expression levels ($Mean \pm SD$, $n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs CON group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs DOR group.

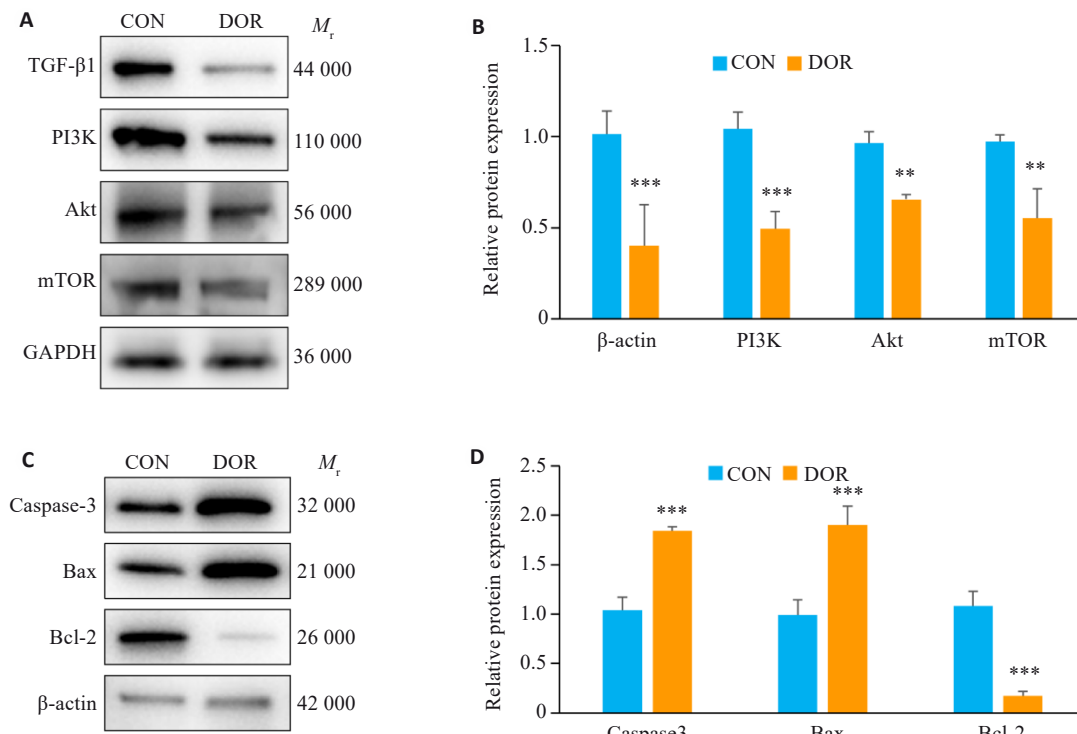


图7 DOR患者颗粒细胞中TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR信号通路下调及凋亡相关蛋白上调

Fig. 7 Down-regulation of the TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and up-regulation of apoptosis-related proteins in GCs of DOR patients. **A**: Protein bands of TGF-β1, PI3K, Akt, and mTOR detected by Western blotting. **B**: Quantitative analysis of TGF-β1, PI3K, Akt, and mTOR protein expression levels. **C**: Protein bands of caspase-3, BAX, and Bcl-2 detected by Western blotting. **D**: Quantitative analysis of caspase-3, BAX, and Bcl-2 protein expression levels. Data are presented as $Mean \pm SD$ ($n=3$). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs CON group.

平升高^[38]。经WZYYP干预,DOR小鼠卵巢指数升高,激素水平和卵巢组织结构恢复,GCs层数增多,闭锁卵泡减少,证明WZYYP可以减轻TWP诱导的卵巢毒性,保护GCs,改善DOR小鼠的卵巢功能。

本研究通过转录组学分析,将PI3K/Akt通路鉴定为WZYYP干预后最显著富集的信号通路。PI3K/Akt/mTOR通路在细胞增殖、凋亡、DNA修复和蛋白质合成等过程中起关键作用,广泛分布于卵巢组织中,参与调控GCs凋亡、原始卵泡募集、卵母细胞成熟^[39,40]。随后,通过网络药理学分析了WZYYP的潜在作用靶点与通路,发现TGF-β通路、PI3K-Akt通路及凋亡是其主要涉及的通路,说明WZYYP通过调控该通路抑制GCs过度凋亡,改善DOR。作为卵泡微环境中的关键细胞因子,TGF-β1在卵母细胞和GCs中广泛存在,可以通过调节GCs的增殖和凋亡来影响卵泡发育^[41]。PI3K/Akt/mTOR作为TGF-β1的下游通路已被广泛报道^[42],TGF-β1能通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路有效抑制细胞凋亡和自噬能力^[43,44]。本研究通过免疫组化和Western blotting检测了TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR通路在小鼠卵巢中的表达水平,结果表明该通路在DOR小鼠卵巢中下调,WZYYP干预后上调,证实WZYYP通过该通路发挥作用。

GCs在卵母细胞发育和成熟中起关键作用,GCs异常凋亡会导致卵泡丢失^[45]。DOR状态下,卵巢GCs凋亡被过度激活^[46]。Bcl-2家族是细胞凋亡的关键调控因子,通过促凋亡蛋白BAX和抗凋亡蛋白Bcl-2发挥作用,BAX通过与Bcl-2形成异二聚体来抑制其功能,Bcl-2和BAX之间的动态平衡是调控细胞凋亡和存活的关键^[47]。Bcl-2抑制细胞色素c的释放和Caspase-3的激活。作为细胞凋亡执行阶段的关键蛋白,Caspase-3直接反映细胞凋亡的程度^[48]。通过分析TUNEL染色和凋亡相关蛋白表达,发现DOR小鼠卵巢中Caspase-3、BAX表达量升高,Bcl-2表达减少,凋亡水平升高,WZYYP干预后Caspase-3、BAX表达量降低,Bcl-2表达减少,说明WZYYP能有效抑制GCs凋亡,保证营养物质和信号分子正常分泌,进而改善卵巢功能。

本研究还通过人GCs实验验证了TGF-β1/PI3K/Akt/mTOR通路对DOR的关键作用。Western blotting结果显示DOR患者GCs中该通路的关键蛋白及抗凋亡蛋白表达均显著下调,促凋亡蛋白显著上调,表明DOR患者GCs中该通路下调,GCs过度凋亡。这不但与小鼠模型中的发现相互印证,还将动物实验的结论直接与人类DOR联系起来,极大地增强了本研究发现的临床相关性与转化潜力。

本研究仍存在一定局限,如DOR小鼠模型虽被广泛应用,但难以完全模拟人类DOR的复杂病因,未检测TGF- β 1等关键分子的mRNA表达水平,未使用特异性抑制剂验证TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR通路在WZYZP作用中的必要性等,这些问题将在后续研究中进一步探索。

综上所述,本研究系统阐明了WZYZP通过调控TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR通路,抑制GCs过度凋亡,有效改善DOR的分子机制。这些发现不仅支持WZYZP的临床推广应用,也为中医药在生殖医学领域的现代化研究提供了新的思路和实验依据。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Li HY, Cai SY, Mu HB, et al. HIGD1A alleviates oxidative stress related ovarian hypofunction by enhancing granulosa cell functions via NF- κ B/SOD2 signaling pathway[J]. *Adv Sci*, 2025, 12(34): e03828.
- [2] Hu NY, Xin N, Wang Y, et al. CTB alleviated premature ovarian insufficiency induced by cigarette smoke exposure in mice through activating CREB1 by P300-mediated histone acetylation modifications[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2025, 302: 118625.
- [3] Zhang QL, Lei YL, Deng Y, et al. Treatment progress in diminished ovarian reserve: western and Chinese medicine[J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(4): 361-7.
- [4] Han PN, Xu HS, Yuan YY, et al. The role of growth hormone in assisted reproductive technology for patients with diminished ovarian reserve: from signaling pathways to clinical applications[J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1551126.
- [5] Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2018, 35(1): 17-23.
- [6] Gao F, Yu Y, Wang FW, et al. The altered hypothalamic network functional connectivity in diminished ovarian reserve and regulation effect of acupuncture: a randomized controlled neuroimaging study protocol[J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1598943.
- [7] Armeni E, Paschou SA, Goulis DG, et al. Hormone therapy regimens for managing the menopause and premature ovarian insufficiency[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, 35(6): 101561.
- [8] Cao WL, Liu SL, Zhang LF, et al. Therapeutic strategies in traditional Chinese medicine for premature ovarian failure: Modulation of oxidative stress and autophagy-apoptosis via the AMPK/mTOR pathway[J]. *Biosci Trends*, 2025, 19(5): 545-56.
- [9] Cui FL, Zhang YS, Fan Y. Adjuvant treatment with Wu-Zi-Yan-Zong formula for abnormal sperm parameters associated with male infertility: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1580705.
- [10] Chen ZM, Mingyue AO, Liao YJ, et al. Wuzi Yanzong prescription from Traditional Chinese Medicine for male infertility: a narrative review[J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 43(2): 416-28.
- [11] 朱芳芳,王焱哲,郜洁,等.基于自噬研究麒麟丸对环磷酰胺诱导的卵巢储备功能减退模型小鼠卵巢储备功能的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 1989-94.
- [12] 纪利娜,张秀艳,梁紫影,等.加味五子衍宗丸周期分期治疗对卵巢低反应肾虚证患者助孕结局的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(14): 106-10.
- [13] Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(2): 303-16.
- [14] Shen T, Yu Q, Zhang J, et al. Jiawei Qingxin Zishen Decoction mitigates granulosa cell apoptosis and enhances ovarian reserve through Netrin/UNC5B signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 355: 120686.
- [15] Chen W, Dong L, Liang QH, et al. NEAT1 inhibits granulosa cell apoptosis and promotes cell growth and migration through the miR-130a-3p/BMP6 axis[J]. *Reprod BioMedicine Online*, 2025, 51(6): 104870.
- [16] Fan YT, Chang YJ, Wei LN, et al. Apoptosis of mural granulosa cells is increased in women with diminished ovarian reserve[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(6): 1225-35.
- [17] Hu LL, Su T, Luo RC, et al. Hippo pathway functions as a downstream effector of AKT signaling to regulate the activation of primordial follicles in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1578-87.
- [18] Bindels J, Squatrito M, Bernet L, et al. The mTOR inhibitor rapamycin counteracts follicle activation induced by ovarian cryopreservation in murine transplantation models[J]. *Medicina*, 2023, 59(8): 1474.
- [19] Chen JZ, Wang NN, Peng ZL, et al. Zishen Yutai pill ameliorates ovarian reserve by mediating PI3K-Akt pathway and apoptosis level in ovary[J]. *J Ovarian Res*, 2025, 18(1): 61.
- [20] Zatalian N, Dalman A, Afsharian P, et al. Metformin protects prepubertal mice ovarian reserve against cyclophosphamide via regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and Yap-1[J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17(1): 251.
- [21] Wang C, Feng Y, Chen Y, et al. Proximity extension assay revealed novel inflammatory biomarkers for follicular development and ovarian function: a prospective controlled study combining serum and follicular fluid[J]. *Front Endocrinol*, 2025, 16: 1525392.
- [22] 黄菁宇. 补肾促排卵汤通过表观遗传修饰改善DOR小鼠氧化应激的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [23] Vidal-Sabanés M, Bonifaci N, Navaridas R, et al. Endometrial cancer progression driven by PTEN-deficiency requires miR-424(322)~503[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16: 705.
- [24] Liu Y, Jiang LJ, Liu HF, et al. Distinct roles of HMOX1 on tumor epithelium and macrophage for regulation of immune microenvironment in ovarian cancer[J]. *Int J Surg*, 2025, 111(10): 6725-42.
- [25] Hu WJ, Xie X, Xu JB. *Epimedium*-derived exosome-loaded GelMA hydrogel enhances MC3T3-E1 osteogenesis via PI3K/Akt pathway[J]. *Cells*, 2025, 14(15): 1214.
- [26] Zhou JJ, Qiao E, He ZY, et al. Fibulin 5 mediates pulmonary artery smooth muscle cell dysfunction and vascular remodelling in congenital heart disease associated pulmonary arterial hypertension via TGF- β 1/PI3K/AKT signalling[J]. *Respir Res*, 2025, 26(1): 276.

- [27] 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): 254-9.
- [28] 林华丹, 王旭, 陈春宏, 等. 三种卵巢储备功能减退小鼠模型的效果比较[J]. 中国比较医学杂志, 2025, 37(5): 51-9.
- [29] Jiang S, Li HQ, Zhang L, et al. Generic Diagramming Platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics[J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(D1): D1670-6.
- [30] Monteleone P, Mascagni G, Giannini A, et al. Symptoms of menopause: global prevalence, physiology and implications[J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(4): 199-215.
- [31] Dong L, Wu HC, Qi FH, et al. LncRNA NEAT1 participates in diminished ovarian reserve by affecting granulosa cell apoptosis and estradiol synthesis via the miR-204-5p/ESR1 axis[J]. J Ovarian Res, 2025, 18(1): 102.
- [32] Zhang XY, Zhang N, Dong ZB, et al. The role of Chinese herbal medicine in diminished ovarian reserve management[J]. J Ovarian Res, 2025, 18(1): 90.
- [33] 陈瑶, 田赛男, 王彬安, 等. 归肾丸治疗卵巢功能减退性疾病的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(2): 317-24.
- [34] 李瑄, 林蓉, 苏嘉文, 等. 滋肾安神汤联合生长激素对卵巢储备功能减退患者体外受精-胚胎移植临床结局的影响[J]. 实用医学杂志, 2025, 41(20): 3283-7.
- [35] 辛喜艳, 鞠瀚儒, 李东. 补肾调血法改善卵巢储备功能减退患者 IVF-ET 妊娠结局的中医机理探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2025, 31(10): 1730-4.
- [36] 高语浓. 加减五子衍宗丸干预肾虚肝郁证 DOR 不孕症 IVF-ET 临床疗效观察[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2025.
- [37] 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): 425-34.
- [38] Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and management of infertility: a review[J]. JAMA, 2021, 326(1): 65-76.
- [39] Bai Q, Ban YW, Zhao LF, et al. Mitochondrial protein COX5B orchestrates antiviral autophagy and apoptosis to restrict SRBSDV propagation in *Sogatella furcifera*[J]. Autophagy, 2026: 22(3): 567-85.
- [40] Andrade GM, da Silveira JC, Perrini C, et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185045.
- [41] He YX, Gan ML, Ma JF, et al. TGF- β signaling in the ovary: Emerging roles in development and disease[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 306(Pt 4): 141455.
- [42] Luo KX. Signaling cross talk between TGF- β /smad and other signaling pathways[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(1): a022137.
- [43] Tang QY, Markby GR, MacNair AJ, et al. TGF- β -induced PI3K/AKT/mTOR pathway controls myofibroblast differentiation and secretory phenotype of valvular interstitial cells through the modulation of cellular senescence in a naturally occurring *in vitro* canine model of myxomatous mitral valve disease[J]. Cell Prolif, 2023, 56(6): e13435.
- [44] Li MN, Wang LB, Luo YZ, et al. RNA-seq analysis of the biological process and regulatory signal of TGF- β 1-mediated changes in ovarian granulosa cells in small-tail Han sheep[J]. Theriogenology, 2025, 234: 9-18.
- [45] Jiang LL, Yang SJ, Zhang CL. Sigma-1 receptor-mediated high mobility group A1 silencing alleviates endoplasmic reticulum stress-induced ovarian granulosa cell apoptosis: an *in vitro* cell experimental study[J]. BJOG, 2025, 132(Suppl 2): 120-31.
- [46] Yan JM, Zhang XY, Zhu KX, et al. Sleep deprivation causes gut dysbiosis impacting on systemic metabolomics leading to premature ovarian insufficiency in adolescent mice[J]. Theranostics, 2024, 14(9): 3760-76.
- [47] Xue HW, Zhang SY, Lu J, et al. Pfaffia glomerata ameliorates BPA-induced reproductive impairments in mice by suppressing apoptosis via PI3K/AKT signaling activation[J]. Pharmaceuticals, 2025, 18(11): 1614.
- [48] Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis[J]. J Cell Biol, 2022, 221(6): e202201159.

(编辑: 吴锦雅)