DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.018

“秩边透水道”针法对卵巢低反应小鼠线粒体功能障碍的影响

郝健亨[1,2],任佳[2],常博雅[2],王海军[2],冀来喜[2]
(1.山西医药学院,山西 吕梁 032200;2.山西中医药大学,山西 晋中 030619)

摘要:目的 探讨“秩边透水道”针法通过调节卵巢线粒体功能障碍改善卵巢低反应(poor ovarian response,POR)小鼠生殖功能的作用机制。方法 将筛选后动情周期规律的小鼠随机分成空白组、模型组和针刺组。模型组和针刺组小鼠给予雷公藤多苷混悬液(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})灌胃2周,空白组给予等体积的0.9%氯化钠溶液灌胃。造模完成后针刺组小鼠给予“秩边透水道”连续针刺治疗2周,1次/d,20 min/次,然后3组同时进行促排卵,次日完成取材。采用阴道脱落细胞涂片观察小鼠的动情周期变化;检测小鼠的获卵数、卵巢湿重与卵巢指数;使用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测血清中抗米勒管激素(anti-mullerian hormone,AMH)、促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone,FSH)、雌二醇(estradiol,E2)、促黄体生成激素(luteinizing hormone,LH)的含量;通过苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色和透射电镜观察卵巢的病理和超微结构改变;荧光染色检测卵巢组织线粒体膜转换孔通透性(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)改变;荧光定量PCR法检测卵巢组织核呼吸因子1(nuclear respiratory factor1,NRF1)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助活化因子1(peroxlsomeproliferator-activated receptor-γ coactlvator-1α,PGC-1α)和线粒体转录因子(mitochondrial transcription factor A,TFAM)mRNA表达水平;脱氧核苷酸转移酶dUTP末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)染色法检测卵巢组织阳性细胞凋亡率;免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织B淋巴细胞瘤-2(b-cell lymphoma-2,BCL-2)、BCL-2关联X的蛋白(BCL-2 associated x,BAX)、细胞色素C(cytochrome c,Cyt C)、半胱氨酸蛋白酶(cysteine-aspartic acid protease,Caspase)-9、Caspase-3蛋白表达水平。结果 与空白组比较,模型组小鼠动情周期紊乱率升高($P<0.01$);获卵数、卵巢湿重和卵巢指数降低($P<0.01$);血清中FSH和LH含量升高($P<0.01$),AMH和E2含量下降($P<0.01$);卵巢组织病理形态和内部线粒体形态结构变差;线粒体膜通透性提高($P<0.01$);PGC-1α、NRF1和TFAM mRNA表达水平降低($P<0.01$);阳性细胞凋亡量提高($P<0.01$);BAX、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3蛋白表达水平提高($P<0.01$,$P<0.05$),BCL-2蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组相比,针刺组小鼠动情周期紊乱率降低($P<0.01$);获卵数、卵巢湿重和卵巢指数提高($P<0.01$);血清中FSH和LH含量降低($P<0.01$),AMH和E2含量提高($P<0.01$);卵巢组织病理形态和内部线粒体结构改善;线粒体膜通透性降低($P<0.01$);PGC-1α、NRF1和TFAM mRNA表达水平提高($P<0.01$,$P<0.05$);阳性细胞凋亡量降低($P<0.01$);BAX、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3蛋白表达水平降低($P<0.01$,$P<0.05$),BCL-2蛋白表达水平提高($P<0.01$)。结论 “秩边透水道”针法可能通过调节线粒体生物合成和线粒体凋亡途径的关键因子,改善POR小鼠卵巢线粒体功能障碍,减少卵巢颗粒细胞凋亡,提高卵巢反应性。

关键词:秩边透水道;针刺;卵巢低反应;线粒体功能;凋亡
中图分类号:R245.3 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)11-0078-11

“Zhibian(BL54)-to-Shuidao(ST28)” Acupuncture on Mitochondrial Dysfunction in Poor Ovarian Response Mice

HAO Jianheng[1,2],REN Jia[2],CHANG Boya[2],WANG Haijun[2],JI Laixi[2]
(1. Shanxi University of Medicine,Lyuliang 032200,Shanxi,China;
2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine,Jinzhong 030619,Shanxi,China)

Abstract:*Objective* To explore the effect and mechanism of “Zhibian(BL54)-to-Shuidao(ST28)” acupuncture on improving the reproductive function of poor ovarian response(POR) mice by regulating ovarian mitochondrial dysfunction. *Methods* The screened mice with regular estrous cycles were randomly divided into a blank group,a model group and an acupuncture group. The mice in the model and acupuncture groups were administered Tripterygium wilfordii polysaccharide suspension(50 mg·kg^{-1}·d^{-1}) by gavage for 2 weeks,while the blank group received an equivalent volume of 0.9% sodium chloride solution

基金项目:国家自然科学基金项目(82074549);山西省中医药管理局基金项目(2023ZYYB048);山西省教育厅基金项目(2023L187)
作者简介:郝健亨(1993-),男,山西孝义人,讲师、主治医师,博士,研究方向:中医优势治疗技术。
通讯作者:冀来喜(1964-),男,山西太原人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中医优势治疗技术。E-mail:jlx@sxtcm.edu.cn。

by gavage. After modeling, the mice in the acupuncture group received continuous acupuncture treatment using "Zhibian (BL 54) – to – Shuidao (ST 28)" acupuncture for 2 weeks, once a day, 20 minutes for each time. Then the three groups simultaneously underwent ovulation induction, and the samples were collected on the next day. Vaginal smears were used to observe the changes in the estrous cycle of mice. The number of retrieved oocytes, ovarian wet weight and ovarian index were measured. The serum levels of anti – Müllerian hormone (AMH), follicle – stimulating hormone (FSH), estradiol (E2) and luteinizing hormone (LH) were detected using enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). The histopathological and ultrastructural changes in the ovary were observed through hematoxylin – eosin (HE) staining and transmission electron microscopy. The fluorescence staining was employed to detect the changes in mitochondrial membrane permeability pore (MPTP) permeability in ovarian tissues. The real – time fluorescent quantitative PCR was used to assess the mRNA expression levels of nuclear respiratory factor 1 (NRF1), peroxisome proliferator – activated receptor – γ coactivator – 1α (PGC – 1α) and mitochondrial transcription factor A (TFAM) in ovarian tissues. The terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP nick – end labeling (TUNEL) staining was conducted to determine the apoptotic rate of positive cells in ovarian tissues and Western blot analysis was utilized to quantify the relative protein expressions of B – cell lymphoma – 2 (BCL – 2), BCL – 2 – associated X protein (BAX), cytochrome C (Cyt C), cysteine – aspartic acid protease (Caspase) – 9 and Caspase – 3 in ovarian tissues. *Results* Compared with the blank control group, the model group showed a significantly increased rate of estrous cycle disorder ($P < 0.01$). The number of ovulations, ovarian wet weight and ovarian index decreased significantly ($P < 0.01$). The serum levels of FSH and LH increased ($P < 0.01$), while the levels of AMH and E2 decreased ($P < 0.01$). The pathological morphology of ovarian tissues and internal mitochondrial structure deteriorated. Mitochondrial membrane permeability increased ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of PGC – 1α, NRF1 and TFAM decreased to varying degrees ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The apoptotic rate of positive cells increased ($P < 0.01$). The protein expression levels of BAX, Cyt C, Caspase – 9 and Caspase – 3 increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the protein expression level of BCL – 2 decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the acupuncture group exhibited a significantly reduced rate of estrous cycle disorder ($P < 0.01$). The number of ovulations, ovarian wet weight and ovarian index increased significantly ($P < 0.01$). The serum levels of FSH and LH decreased ($P < 0.01$), while the levels of AMH and E2 increased ($P < 0.01$). The pathological morphology of ovarian tissues and internal mitochondrial structure improved. Mitochondrial membrane permeability decreased ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of PGC – 1α, NRF1 and TFAM increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The apoptotic rate of positive cells decreased ($P < 0.01$). The protein expression levels of BAX, Cyt C, Caspase – 9 and Caspase – 3 decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the protein expression level of BCL – 2 increased ($P < 0.01$). *Conclusion* The "Zhibian (BL54) – to – Shuidao (ST28)" acupuncture may improve the mitochondrial dysfunction in the ovaries of POR mice by regulating the key factors involved in mitochondrial biogenesis and the mitochondrial apoptosis pathway, thereby reducing granulosa cell apoptosis in the ovary and enhancing ovarian responsiveness.

Keywords: Zhibian (BL54) – to – Shuidao (ST28); acupuncture; poor ovarian response; mitochondrial function; apoptosis

卵巢低反应(poor ovarian response,POR)是指女性在接受不同辅助生殖治疗的过程中,卵巢对促排卵药物刺激的反应减弱的一种临床现象,通常表现为卵泡数量显著减少,同时伴随卵子质量的降低,最终可能导致受精率和胚胎质量下降[1]。POR 的发病机制尚未完全明确,可能与年龄增长、卵巢疾病、线粒体异常以及生活方式等因素有关[2]。目前 POR 的治疗需要综合考虑患者的个体情况,通过不同类型的促排卵方案或配合其他辅助生殖技术以提高成人受孕率[3-4]。然而部分患者对于当前的治疗效果并不理想,此外激素类药物的过度使用还可能造成患者体液平衡失调,肾功能受损,卵巢破裂等危险,因此需要一些补充代替疗法来减少药物过量刺激,进而提高 POR 患者的受孕率。

线粒体在细胞内起着关键的能量生产和维持细胞稳态的作用。在卵巢的生理和病理过程中,线粒体主要参与卵泡的生发和排卵的调节以确保卵子数量的平衡,与卵巢储备不足、多囊卵巢综合征、卵巢癌等卵巢疾病密切相关[5-7]。正常情况下,卵巢细胞内稳定的线粒体膜电位维持能够产生足够的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)进行能量供应;当线粒体功能受损时会改变线粒体膜通透性导致细胞内重要分子如细胞色素 C(cytochrome c,Cyt C)的释放,从而激活半胱氨酸蛋白酶(cysteine – aspartic acid protease,Caspase)引发的一系列凋亡反应,对卵巢细胞命运产生重要影响。针灸作为补充代替的常见治疗手段,近些年来逐步应用于 POR 的治疗中[8-9]。"秩边透水道"针法是经"秩边"向"水道"斜向透刺使经气传达至前阴部的一种特殊针法,对于多种生殖或泌尿系统疾病均有较好的疗效[10-11]。前期研究发现[11],"秩边透水道"针法可能通过调节早发性卵巢功能不全大鼠卵巢内线粒体凋亡途径的关键因子改善其卵巢功能,但其是否可以通过改善线粒体功能进而提高卵巢反应性目前尚不清楚,因此,本研究旨在探讨"秩边透水道"针法对 POR 小鼠卵巢线粒体功能障碍的影响,以期为针刺改善 POR 提供实验室依据。

1 材料

1.1 动物

55 只鼠龄为 8 ~ 9 周、体质量(18 ± 1) g 的 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠[动物生产许可证号:SCXK(京) – 2019 – 0010,北京斯贝福动物有限公司],于山西中医药大学动物实验中心适应性喂养 1 周(温度:25 ℃左右、湿度:55% 左右)。本实验通过山西中医药大学伦理委员会批准(审批号:

AWE202303382)。

1.2 主要试剂和仪器

雷公藤多苷片(货号:Z43020138,湖南千金协力药业有限公司);人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,HCG)、孕马血清促性腺释放激素(pregnant mare serum gonadotropin,PMSG)、鼠胚胎干细胞维持培养液(mouse embryonic stem cell maintenance medium 2,M2)(货号:M2520、M2620、M1250,南京爱贝生物科技有限公司);促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone,FSH)、低水平的抗米勒管激素(anti-mullerian hormone,AMH)、促黄体生成激素(luteinizing hormone,LH)、雌二醇(estradiol,E2)酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(货号:MU30265、MU30399、MU30382、MU30395,武汉贝茵莱生物科技公司);冰冻切片组织线粒体膜转换孔通透性(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)荧光检测试剂盒(货号:GMS10095,上海杰美基因医药科技有限公司);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色试剂盒(货号:DH0020,北京雷根生物技术有限公司);一步法脱氧核苷酸转移酶dUTP末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒、RNA提取液、实时荧光定量反转录聚合酶链反应逆转录试剂盒、B淋巴细胞瘤-2(b-cell lymphoma-2,BCL-2)抗体、BCL-2关联X的蛋白(BCL-2 associated x,BAX)抗体、细胞色素C(cytochrome c,Cyt C)抗体、半胱氨酸蛋白酶(cysteine-aspartic acid protease,Caspase)-9抗体、Caspase-3抗体、β-肌动蛋白(beta-actin,β-actin)抗体、HRP-山羊抗兔(货号:G1501、G3013、G3337、GB13375、GB114122、GB11080、GB11053、GB115600、GB11001、GB23303,武汉赛维尔生物技术有限公司)。

0.25 mm×13 mm一次性无菌针灸针(批号:20162200970,苏州华佗医疗器械有限公司);低温高速离心机、超低温冷冻储存箱(型号:Pico 21、Forma 900,德国Thermo Scientific公司);石蜡切片机、超薄切片机(型号:RM 2145、Leica UC7,德国LEICA公司);凝胶电泳仪、凝胶成像分析仪(型号:PowerPac Basic、HOOD-Ⅱ,美国BIO-RAD公司);荧光显微镜(型号:ECLIPSE Ci-S,日本Nikon公司);酶标仪(型号:Spectra Max Plus384,美国Molecular Devices公司);透射电子显微镜(型号:HT7800,日本HITACHI公司);倒置生物显微镜(型号:NIB-100,宁波永新光学股份有限公司);电子天平(型号:GE1005,上海佑科仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模

适应性喂养1周期间通过阴道涂片法筛选出动情周期正常的小鼠45只,按随机数字法分成空白组、模型组、针刺组($n=15$)。依据课题组前期研究基础造模。每日上午对模型组和针刺组小鼠给予雷公藤多苷片混悬液灌胃(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})制备POR小鼠模型[12];空白组给予等体积的0.9%氯化钠溶液,共灌胃2周。如出现动情周期紊乱,则模型制备成功。

2.2 干预方法与取材

针刺组:参照小鼠腧穴大致范围并结合前期研究基础进行取穴[13-14]。每日下午先将小鼠呈俯卧位固定四肢,用75%的酒精消毒,然后选用规格为0.25 mm×13 mm针灸针分别从双侧"秩边"穴(定位:小鼠股骨大转子与第四荐骨连线中点骨性缝隙)刺向其"水道"穴(定位:小鼠剑突至耻骨联合上缘上2/3与下1/3交界处下约8 mm,正中线旁开约3 mm),进针约5 mm,不行提插捻转手法,20 min/次,1次/d,连续治疗14 d;空白组和模型组只进行固定,不进行其他干预。治疗结束后,各组小鼠给予腹腔注射10 IU的PMSG,48 h后给予腹腔注射10 IU的HCG,次日完成血清和卵巢组织取材。

2.3 指标检测及方法

2.3.1 一般情况和动情周期检测 日常观察记录小鼠活动情况,精神状态、毛色变化或其他非正常行为表现,其间通过阴道脱落细胞检测小鼠动情周期,将阴道分泌物置于载玻片上行常规HE染色,封片后在光学显微镜下观察其动情周期改变。

2.3.2 获卵数、卵巢湿重与卵巢指数检测 取各组小鼠双侧卵巢,吸去多余水分后利用电子天平称取双侧卵巢质量,并计算得出对应的卵巢指数(小鼠两侧卵巢湿重/处死前末次测得的体质量)。将取出的小鼠双侧输卵管置于M2培养液中,使用一次性针头将其挑开,将流出的卵母细胞复合液滴通过移液枪转移到卵细胞洗涤液培养皿中培养5 min,于倒置显微镜下统计卵母细胞个数。

2.3.3 ELISA法检测小鼠血清AMH、FSH、LH、E2含量 将稀释后的标准品分别加入空白孔和标准孔中各100 μL,样品孔中则加入样品100 μL,混匀后37 ℃条件下孵育90 min;倒出所有液体后在每孔加入100 μL生物素化抗体工作液,37 ℃条件下孵育1 h;各孔中依次加入酶偶联工作液100 μL和底物溶液90 μL避光条件下孵育30 min;每孔加入50 μL终止液停止反应;最后通过酶标仪检测各孔在450 nm波长处的吸光度值,并根据标准曲线计算对应的AMH、FSH、LH和E2浓度。

2.3.4 HE染色法检测小鼠卵巢组织病理形态 将小鼠卵巢组织固定48 h,按要求进行脱水、透明、浸蜡、包埋等操作,最终制备成5 μm石蜡切片。将部分切片脱蜡至水,使用苏木素染色3 min,梯度乙醇脱水后,使用伊红染色5 min,脱水后使用中性树胶封片,在光学显微镜下观察卵巢病理学改变。

2.3.5 透射电镜检测小鼠卵巢组织线粒体结构 使用缓冲液洗涤新鲜的卵巢组织;浸入戊二醛溶液中固定2 h;清洗后使用锇酸固定;然后完成梯度脱水、包埋聚合、切片、染色等操作,最后在透射电镜下观察线粒体的形态结构变化。

2.3.6 荧光染色法检测卵巢组织线粒体膜通道孔通透性 将未经固着处理的卵巢冰冻切片置于室温下,先滴加预冷的清理液,然后滴加钙黄绿素-AM(Calcein acetoxymethyl ester,Calcein-AM)染色液在37 ℃培养箱孵育30 min,再次滴加清理液清洗,封片后在荧光显微镜下观察,绿色荧光减弱表明MPTP活性增强。

2.3.7 荧光定量PCR法检测卵巢组织过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助活化因子1(peroxlsomeproliferator-activated receptor-γ coactlvator-1α,PGC-1α)、卵巢组织核呼吸因子1(nuclear respiratory factor1,NRF1)和线粒体转录因子(mitochondrial transcription factor A,TFAM)mRNA表达 提取小鼠卵巢组织总RNA;然后将其反转录合成cDNA,以该cDNA作为模板完成相应的PCR扩增(条件:95 ℃预变性30 s,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,40个循环结束)。扩增结束后读取各孔的Ct值,

将 GAPDH 作为内参对照，通过 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 公式分别计算 PGC－1α、NRF1 和 TFAM 的 mRNA 相对表达量。引物序列由武汉赛维尔生物公司设计。见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5′－3′)	产物长度/(bp)
PGC－1α	上游 CTGGGTGGATTGAAGTGGTGTA	204
	下游 AGTGGTCACGGCTCCATCTGT	
NRF1	上游 CGCAGCACCTTTGGAGAATG	216
	下游 CCCCGACCTGTGGAATACTTG	
TFAM	上游 CTGTGGAGGGAGCTACCAGAAG	118
	下游 GCTGACTTGGAGTTAGCTGCTCT	
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

2.3.8 TUNEL 染色法检测卵巢组织阳性细胞凋亡率 将卵巢石蜡切片先进行逐级脱蜡，滴加蛋白酶 K 后置于 37 ℃恒温箱中孵育 20 min；PBS 缓冲液洗 3×5 min 后滴加破膜液，37 ℃孵育 20 min；滴加平衡缓冲液室温孵育 10 min；然后加入反应液 37 ℃恒温箱孵育 1 h；后滴加 4′,6－二胺－2－苯基吲哚(4′,6－Diamidino－2－phenylindole，DAPI)复染细胞核，封片后在荧光显微镜下拍照(DAPI 发蓝光，阳性表达发红光)，每张切片随机挑选 5 个视野，计算阳性细胞凋亡率(%)＝阳性细胞凋亡数(个)/总细胞数(个)×100%。

2.3.9 免疫印迹法(Western blot)法检测卵巢组织 BAX、BCL－2、Cyt C、Caspase－9、Caspase－3 蛋白相对表达量 将小鼠卵巢组织放入研磨管内，加入裂解液，提取其总蛋白并测定其浓度。先制胶，后使用湿转法转运 2 h，用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，TBST 洗膜 3×5 min 后加入不同稀释后的一抗(BAX、BCL－2，Cyt C、Caspase－9、Caspase－3 稀释比为 1∶1000，β－actin 稀释比为 1∶3000)，放入 4 ℃冰箱孵育过夜。次日先用 TBST 洗膜 3×5 min，加入二抗孵育 2 h(稀释比为 1∶5000)，再次洗膜 3×5 min，最后滴加显影液进行显影，通过 Image J 软件测定条带灰度值。

2.4 统计学方法

本研究通过 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析，计量资料采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较通过单因素方差进行分析，进一步比较时，方差齐采用 LSD 检验，方差不齐选用 Tamhane 检验，两两比较使用 Dunnett's t 检验。计数资料采用百分率(%)表示，组间比较采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 时差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况和动情周期比较

实验过程中未出现动物死亡。空白组小鼠饮食可，精神较好，活动规律；模型组小鼠饮食减少，精神变差，不喜活动；针刺组小鼠饮食、精神与活动均得到改善。正常小鼠动情周期分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期。见插页Ⅻ图 1。动情前期多为有核上皮细胞；动情期多为无核上皮细胞；动情后期以白细胞和无核上皮细胞为主；动情间期以白细胞、有核和无核上皮细胞共存为主。与空白组比较，模型组小鼠在造模期间动情周期紊乱率提高($P<0.01$)；模型组和针刺组之间差异无统计学意义。治疗后，与空白组比较，模型组小鼠动情周期紊乱升高($P<0.01$)；与模型组相比，针刺组小鼠动情周期紊乱降低($P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠动情周期比较 单位：%

组别	n	造模期间				治疗期间			
		周期正常/(只)	周期不明显/(只)	周期延长/(只)	紊乱率/(%)	周期正常/(只)	周期不明显/(只)	周期延长/(只)	紊乱率/(%)
空白组	15	15	0	0	0	15	0	0	0
模型组	15	0	3	12	100**	0	2	13	100**
针刺组	15	0	4	11	100**	11	2	2	27△△

注：**与空白组比较，$P<0.01$；△△与模型组比较，$P<0.01$。

3.2 各组获卵数、卵巢湿重与卵巢指数的影响

与空白组相比，模型组获卵数、卵巢湿重与卵巢指数不同程度降低($P<0.01$)；与模型组相比，针刺组获卵数、卵巢湿重与卵巢指数不同程度提高($P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组小鼠获卵数、卵巢湿重与卵巢指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	获卵数量/(个)	卵巢湿重/(g)	卵巢指数/(%)
空白组	15	21.87±2.00	0.020±0.003	0.095±0.011
模型组	15	12.27±1.75**	0.013±0.001**	0.071±0.007**
针刺组	15	16.40±2.01△△	0.016±0.002△△	0.084±0.008△△

注：**与空白组比较，$P<0.01$；△△与模型组比较，$P<0.01$。

3.3 各组小鼠血清 AMH、FSH、LH、E2 含量比较

与空白组相比，模型组小鼠血清中 FSH 和 LH 含量升高($P<0.01$)，AMH 和 E2 含量下降($P<0.01$)；与模型组比较，针刺组小鼠血清中 FSH 和 LH 含量降低($P<0.01$)，AMH 和 E2 含量升高($P<0.01$)。见表 4。

表 4 各组小鼠血清 FSH、LH、AMH 和 E2 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FSH/(IU·L^{-1})	LH/(U·mL^{-1})	AMH/(ng·mL^{-1})	E2/(ng·mL^{-1})
空白组	6	8.25±2.73	29.08±7.86	3.06±0.33	314.70±33.80
模型组	6	24.29±1.52**	79.22±8.41**	1.16±0.31**	117.10±26.49**
针刺组	6	16.15±0.66△△	53.30±3.35△△	2.11±0.24△△	233.30±19.98△△

注：**与空白组比较，$P<0.01$；△△与模型组比较，$P<0.01$。

3.4 各组小鼠卵巢组织形态比较

与空白组相比，模型组小鼠卵巢组织形态异常，各级卵泡结构紊乱且正常卵泡数量减少，各级闭锁卵泡数量提高；与模型组相比，针刺组小鼠卵巢形态改善，各级正常卵泡数量提高。见插页Ⅻ图 2。

3.5 各组小鼠卵巢组织线粒体超微结构比较

与空白组相比，模型组小鼠卵巢组织线粒体数量减少，出现不完整或肿胀现象，同时内嵴发生断裂缺失现象；与模型组相比，针刺组小鼠卵巢组织内线粒体数量得到明显提高，受损的形态结构也得到不同程度恢复。见插页Ⅺ图 3。

3.6 各组小鼠卵巢组织线粒体膜通透性比较

与空白组相比，模型组小鼠卵巢组织中绿色荧光减弱，膜通透性提高($P<0.01$)；与模型组比较，针刺组小鼠卵巢组织中绿色荧光增强，膜通透性降低($P<0.01$)。见插页Ⅻ图 4、表 5。

3.7 各组小鼠卵巢组织 PGC－1α、NRF1 和 TFAM mRNA 表达水平比较

与空白组相比，模型组小鼠卵巢组织 PGC－1α、NRF1 和 TFAM mRNA 表达水平降低($P<0.01$)；与模型组相比，针刺组小鼠卵巢组织 PGC－1α、NRF1 和 TFAM mRNA 表达水平提高

($P<0.01$,$P<0.05$)。见表 6。

表 5 各组小鼠卵巢组织线粒体膜通透性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	荧光强度
空白组	5	29.35±5.15
模型组	5	11.89±2.84**
针刺组	5	20.27±2.30△△

注:**与空白组比较,$P<0.01$;△△与模型组比较,$P<0.01$。

表 6 各组小鼠卵巢组织 PGC-1α、NRF1 和 TFAM mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PGC-1α	NRF1	TFAM
空白组	5	0.95±0.07	0.97±0.13	0.97±0.15
模型组	5	0.14±0.06**	0.10±0.03**	0.18±0.05**
针刺组	5	0.34±0.09△△	0.24±0.05△	0.36±0.08△

注:**与空白组比较,$P<0.01$;△△与模型组比较,$P<0.01$;△与模型组比较,$P<0.05$。

3.8 各组小鼠卵巢组织阳性细胞凋亡率比较

红色荧光代表阳性凋亡细胞。与空白组相比,模型组小鼠卵巢阳性细胞凋亡率增加($P<0.01$);与模型组相比,针刺组小鼠卵巢阳性细胞凋亡率减少($P<0.01$)。见插页Ⅻ图 5、表 7。

表 7 各组小鼠卵巢组织阳性细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	阳性细胞凋亡率/(%)
空白组	5	7.12±2.20
模型组	5	33.24±5.06**
针刺组	5	15.34±3.06△△

注:**与空白组比较,$P<0.01$;△△与模型组比较,$P<0.01$。

3.9 各组小鼠卵巢组织 BAX、BCL-2、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量比较

与空白组相比,模型组小鼠卵巢中 BAX、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量增加($P<0.01$),BCL-2 蛋白相对表达量减少($P<0.01$);与模型组相比,针刺组小鼠卵巢中 BAX、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量减少($P<0.01$,$P<0.05$),BCL-2 蛋白相对表达量增加($P<0.05$)。见图 6、表 8。

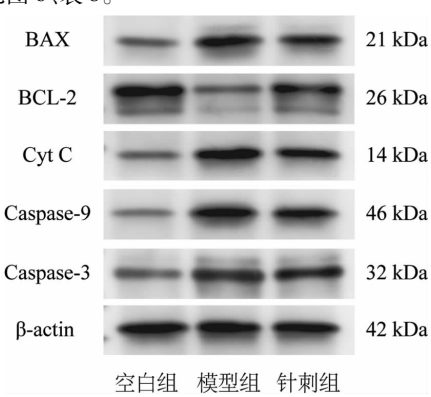


图 6 各组小鼠卵巢组织 BAX、BCL-2、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量比较

表 8 各组小鼠卵巢组织 BAX、BCL-2、Cyt C、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量比较(/β-actin,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	BAX	BCL-2	Cyt C	Caspase-9	Caspase-3
空白组	4	0.40±0.08	0.93±0.12	0.43±0.06	0.47±0.08	0.47±0.07
模型组	4	0.98±0.09**	0.51±0.08**	1.02±0.11**	1.05±0.13**	0.87±0.05**
针刺组	4	0.76±0.07△△	0.74±0.10△	0.75±0.10△△	0.81±0.07△	0.72±0.06△

注:**与空白组比较,$P<0.01$;△与模型组比较,$P<0.05$;△△与模型组比较,$P<0.01$。

4 讨论

雷公藤具有较强生殖毒性,会造成生殖器官功能下降。研究表明[15-17],雷公藤多苷的使用会导致卵巢功能减退,导致卵子产生和排卵的困难,因此本研究使用雷公藤多苷灌胃的方法建立了POR模型[12,18]。POR情况下,由于卵巢功能受损和卵泡发育受限,因此在促排后排卵仍然困难。本研究发现,模型组小鼠卵巢形态结构紊乱,正常卵泡个数降低,获卵数、卵巢湿重与卵巢指数均不同程度降低。FSH、LH、AMH 和 E2 的变化可以反映卵巢功能和动情周期等关键信息[19]。本研究发现,模型组小鼠动情周期紊乱率增加,血清雌激素含量出现明显紊乱,综合以上因素提示 POR 小鼠模型成功建立。中医认为 POR 核心病机是肾精不足。肾精亏虚则气血精微物质的化生无法维系胞宫的正常功能,导致卵泡发育不良[20]。此外,长期生活压力和不良的情感状态也会造成卵巢局部的气血供应,导致排卵不畅。“秩边透水道”是一种广泛用于多种生殖疾病治疗的针法[10-11]。其中“秩边”为足太阳膀胱经腧穴,与肾经相表里,有益肾精通经络之功;“水道”为足阳明胃经腧穴,与脾经相表里,有通水道滋肾精之效。从“秩边”向“水道”方向斜刺,可以刺激盘丛神经与阴部神经,对卵巢产生良性调节。本研究发现,针刺后小鼠卵巢内闭锁卵泡数减少,获卵数、卵巢湿重与卵巢指数提高,血清多种雌激素表达水平趋于平衡,提示“秩边透水道”针法可能通过修复卵巢病理结构和纠正雌激素紊乱进而改善 POR 小鼠卵巢功能。

线粒体对于卵子的发育、排卵和受精过程都有重要影响[21-22]。线粒体膜通透性的调控是维持细胞内能量平衡的关键因素,当线粒体膜通透性受损时,可能导致细胞内外质子和物质的不适当交换,抑制 ATP 的合成,同时促进凋亡分子的释放,阻碍正常卵子的发育成熟[23]。我们通过透射电镜观察发现,模型组卵巢组织线粒体数量减少,线粒体形态结构出现异常,通过荧光染色发现线粒体膜通透性提高;针刺后卵巢组织线粒体数量和形态结构得到不同程度改善,膜通透性降低,提示“秩边透水道”针法可能改善卵巢组织线粒体损伤并帮助平衡线粒体膜通透性。

线粒体生物合成涉及合成新的线粒体以维持细胞内线粒体的数量和功能,对于卵子的发育成熟有重要意义[24]。PGC-1α、NRF1 和 TFAM 在此过程中协同作用,共同维持线粒体的数量和质量。其中 PGC-1α 的作用类似于线粒体生物合成的“启动器”,通过激活 NRF1 和 TFAM 的表达以确保线粒体生物合成所需的蛋白质和分子的正常供应。NRF1 通过调节线粒体相关基因的正常转录,以确保线粒体数量和质量,而 TFAM 则通过维护线粒体 DNA 的复制和转录,促进新线粒体的产生。当组织受到损伤时会降低 PGC-1α、NRF1 和 TFAM 的表达,影响线粒体生物合成。楚玉凤等研究发现[25],雷公藤多苷可能通过调节 PGC-1α 等线粒体相关指标诱导卵巢颗粒细胞凋亡。刘雪平等研究发现[26],环磷酰胺诱导的早发性卵巢功能不全模型小鼠卵巢组织内 PGC-1α、NRF1、TFAM 蛋白表达减少,资癸益冲方能通过调节 PGC-1α/NRF1/TFAM 信号通路,有效改善卵巢线粒体生物合成。本研究发现,模型组卵巢组织 PGC-1α、NRF1、TFAM mRNA 表达降低;针刺后卵巢组织 PGC-1α、NRF1、TFAM mRNA 表达升高,提示“秩边透

水道”针法可能通过调控 PGC－1α/NRF1/TFAM 信号通路维持卵巢内线粒体数量和质量。

线粒体依赖性细胞凋亡通路是内源性细胞凋亡的一个主要机制，有助于维持卵泡库的平衡，并确保只有高质量的卵子能够参与受精。然而，随着女性年龄的增长、药物的毒性作用或其他外界环境的刺激，卵巢中内源性凋亡信号异常激活，BCL－2 家族蛋白的平衡被打破，BAX 的活性增加会在线粒体膜上形成孔道，使线粒体内的 Cyt C 被释放到细胞质中形成凋亡体以诱导 Caspase－9 激活，Caspase－9 异常表达会激活凋亡执行酶 Caspase－3 进而引发细胞核 DNA 降解和细胞结构的破坏，导致卵巢反应下降。JIANG X 等研究发现[27]，多囊卵巢综合征大鼠会出现内源性凋亡信号通路的异常激活，导致卵巢线粒体功能障碍，使用苍附导痰汤治疗可以通过抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞凋亡以改善卵巢功能。PENG H 等[28]和 WANG L 等[29]发现卵巢早衰会提高卵巢颗粒细胞凋亡，使用左归丸或护阳养坤方可以通过调节 BCL－2 家族成员蛋白抑制卵巢组织内线粒体凋亡，从而保护卵泡发育抵抗卵巢衰老。本研究发现，针刺干预后卵巢内阳性细胞凋亡水平降低，BAX、Cyt C、Caspase－9、Caspase－3 蛋白表达水平降低，BCL－2 蛋白表达水平提高，提示“秩边透水道”针法可能通过调节线粒体凋亡途径，改善卵巢细胞凋亡。

综上所述，“秩边透水道”针法可以改善 POR 小鼠卵巢线粒体结构，减少卵巢颗粒细胞凋亡，提高卵巢反应性。其机制可能与调节线粒体生物合成和凋亡通路上的关键因子相关（插页Ⅷ图 7），该研究为针刺作为 POR 的补充代替治疗方案提供了实验室依据。

参考文献

[1] ABU－MUSA A, HAAHR T, HUMAIDAN P. Novel physiology and definition of poor ovarian response; clinical recommendations[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): E2110.
[2] 伍洁洁，张丽华，苏同生. 卵巢低反应发病机制研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志，2019，6(41)：187－188.
[3] 蒋慧敏，罗晓芳，王凤笛，等. 卵巢低反应的评估和治疗策略新进展[J]. 重庆医科大学学报，2022，47(10)：1149－1153.
[4] CONFORTI A, ESTEVES S C, CIMADOMO D, et al. Management of women with an unexpected low ovarian response to gonadotropin[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2019, 10: 387.
[5] 黄佳梅，蔡紫璨，张花，等. 补肾生精调和气血法调控 Bcl－2 相关线粒体凋亡信号通路改善大鼠卵巢储备功能的研究[J]. 广州中医药大学学报，2023，40(1)：155－162.
[6] DABRAVOLSKI S A, NIKIFOROV N G, EID A H, et al. Mitochondrial dysfunction and chronic inflammation in polycystic ovary syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 3923.
[7] DE RASMO D, CORMIO A, CORMIO G, et al. Ovarian cancer: a landscape of mitochondria with emphasis on mitochondrial dynamics [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1224.
[8] 谢庆龄，兰颖，朱昕昀，等. 针刺对体外受精卵巢低反应患者胚胎质量及临床妊娠率的影响[J]. 中华中医药杂志，2023，38(1)：419－422.
[9] 杨婷，苟文婕，王薇，等. 传统针刺疗法对波塞冬第三分组 POR 患者 IVF－ET 辅助治疗效果及细胞因子的影响：随机对照研究[J]. 生殖医学杂志，2022，31(11)：1513－1519.
[10] 刘璇，王海军，张黎，等. “秩边透水道”针法对子宫内膜异位症大鼠 Beclin－1、LC3 调节作用的研究[J]. 上海针灸杂志，2021，40(12)：1492－1499.
[11] 马梦娜，司佳弘，金晓飞，等. “秩边透水道”针法调控早发性卵巢功能不全大鼠颗粒细胞凋亡的作用[J]. 时珍国医国药，2022，33(2)：495－498.
[12] 郝健亨，赵越梦，王海军，等. 白藜芦醇对卵巢低反应小鼠保护作用的机制研究[J]. 中国中药杂志，2023，48(21)：5888－5897.
[13] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第 3 部分：小鼠[J]. 针刺研究，2021，46(5)：445－446.
[14] 郝健亨，王海军，曹玉霞，等. “秩边透水道”针刺对卵巢低反应小鼠 PI3K/AKT/FOXO3a 通路的影响[J]. 中国针灸，2024，44(7)：821－830.
[15] 常博雅，任佳，金旭，等. “秩边透水道”针法对卵巢低反应小鼠 Notch1/Hes1/JAG1 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药，2024，35(5)：1264－1268.
[16] 梁策，高慧. 雷公藤制剂致卵巢早衰的研究进展[J]. 中华中医药杂志，2015，30(10)：3588－3590.
[17] LU G, ZHU Y, LI H, 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.
[18] 郝健亨，常博雅，任佳，等. 白藜芦醇调控 Hippo 信号通路对卵巢低反应小鼠卵巢保护作用的机制研究[J]. 中国中药杂志，2024，49(3)：744－753.
[19] ILIODROMITI S, NELSON S M. Ovarian response biomarkers: physiology and performance[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2015, 27(3): 182.
[20] 王英姿. 卵巢低反应中医研究进展[J]. 中华中医药杂志，2020，35(7)：3542－3544.
[21] ZHANG J, BAO Y, ZHOU X, et al. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17(1): 1－15.
[22] WANG T, ZHANG M, JIANG Z, et al. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging[J]. Am J Reprod Immunol, 2017, 77(5): e12651.
[23] 崔娜，郝桂敏，赵志明，等. 颗粒细胞凋亡及线粒体膜电位与卵巢功能的相关性研究[J]. 河北医药，2011，33(6)：818－820.
[24] SUN L, TIAN H, XUE S, et al. Circadian clock genes REV－ERBs inhibits granulosa cells apoptosis by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy in polycystic ovary syndrome[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 658112.
[25] 楚玉凤，王静，王彤，等. 枸杞多糖减轻雷公藤多苷致卵巢颗粒细胞损伤的研究[J]. 宁夏医科大学学报，2022，44(5)：466－471.
[26] 刘雪平，宿滋，李荣霞，等. 基于线粒体能量代谢途径探讨资癸益冲方改善早发性卵巢功能不全小鼠卵巢功能的作用机制[J]. 中华中医药杂志，2023，38(5)：2361－2366.
[27] JIANG X, TAI H, XIAO X, et al. Cangfudaotan decoction inhibits mitochondria－dependent apoptosis of granulosa cells in rats with polycystic ovarian syndrome[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 962154.
[28] PENG H, ZENG L, ZHU L, et al. Zuogui Pills inhibit mitochondria－dependent apoptosis of follicles in a rat model of premature ovarian failure[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 238: 111855.
[29] WANG L, LI M, LIU J, et al. Protective effect of Huyang Yangkun Formula on ovarian function in premature ovarian insufficiency rats based on apoptotic mechanism[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114477.

“秩边透水道”针法对卵巢低反应小鼠线粒体功能障碍的影响

（正文见 78－83 页）

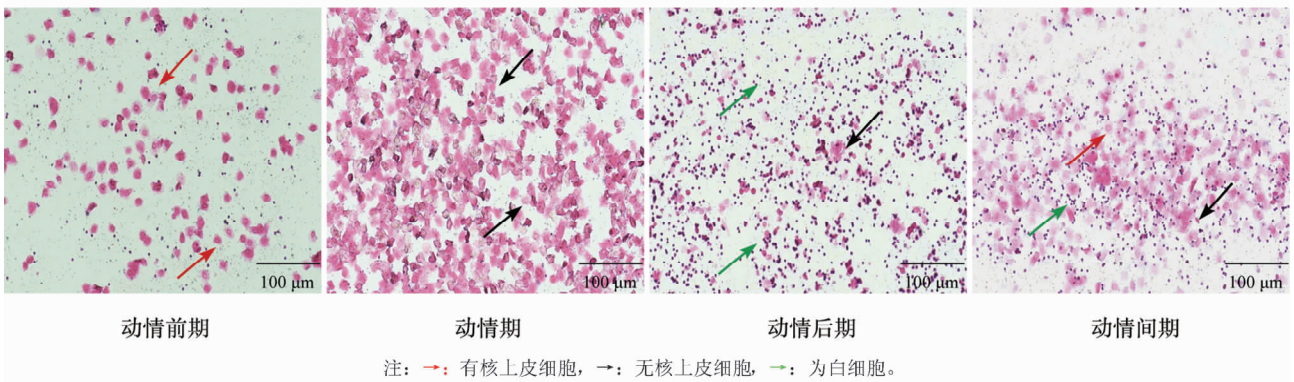


图 1　不同动情周期阴道脱落细胞形态学比较（HE 染色，×100）

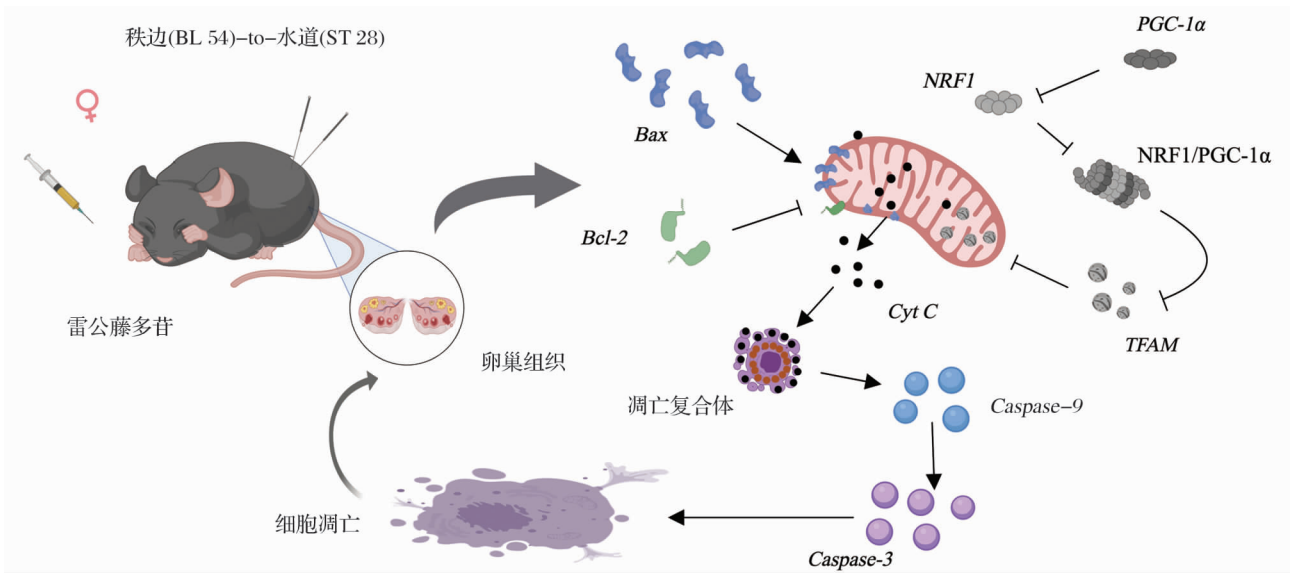


图 7　“秩边透水道”针法调节 POR 小鼠线粒体功能障碍机制

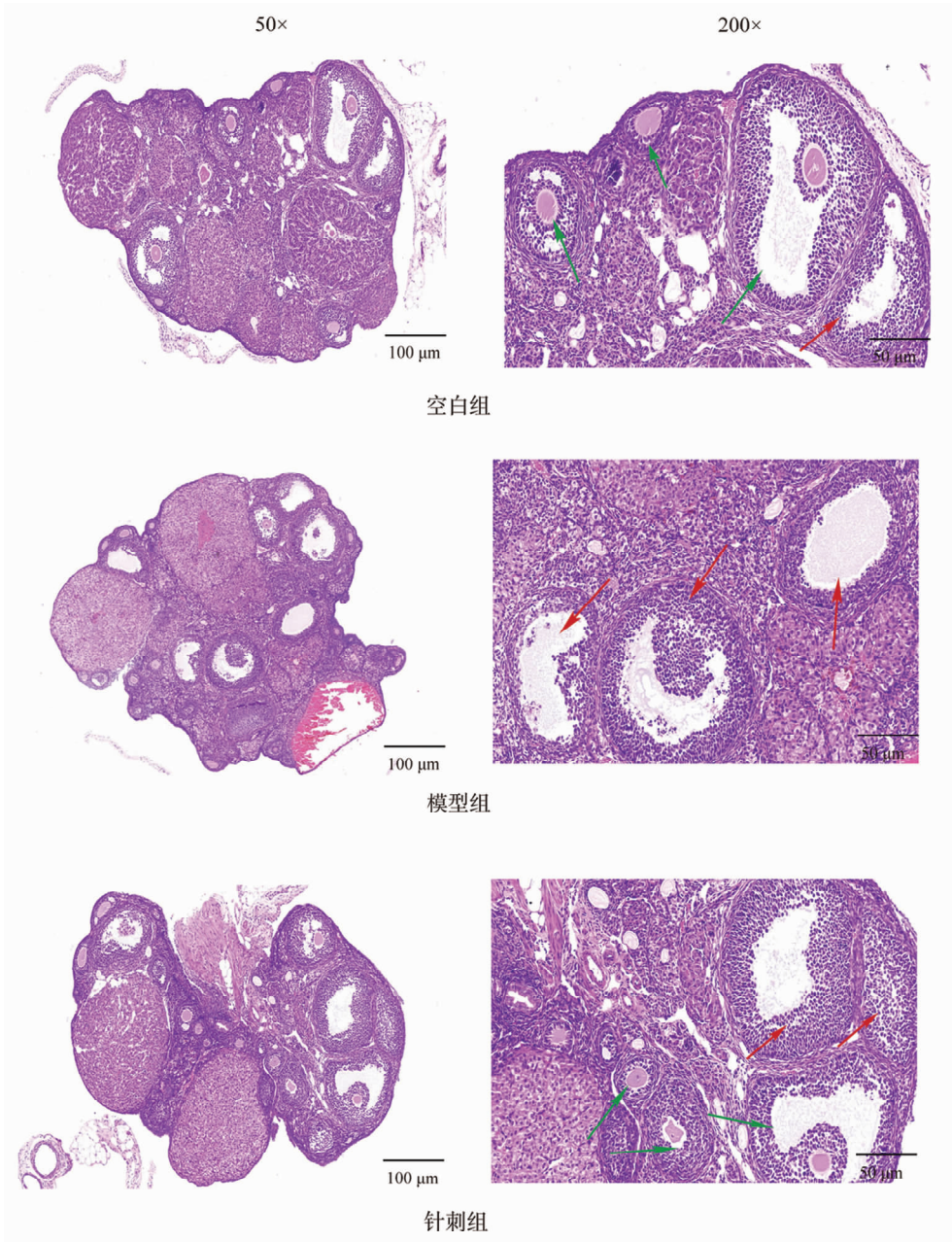


图 2　各组小鼠卵巢组织形态比较(HE, ×50, ×200)

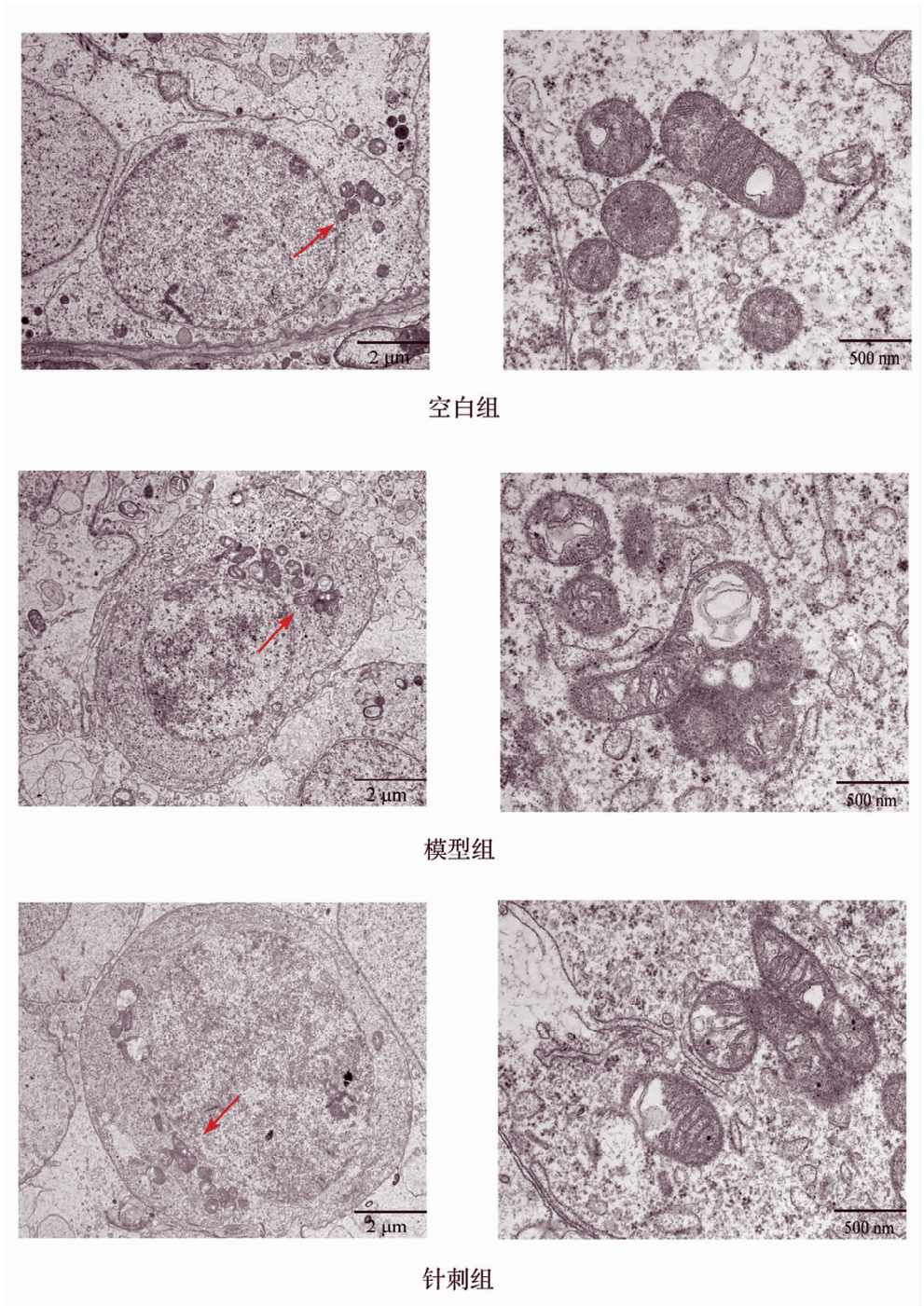


图 3　各组小鼠卵巢组织线粒体超微结构比较（透射电镜，×4000，×20 000）

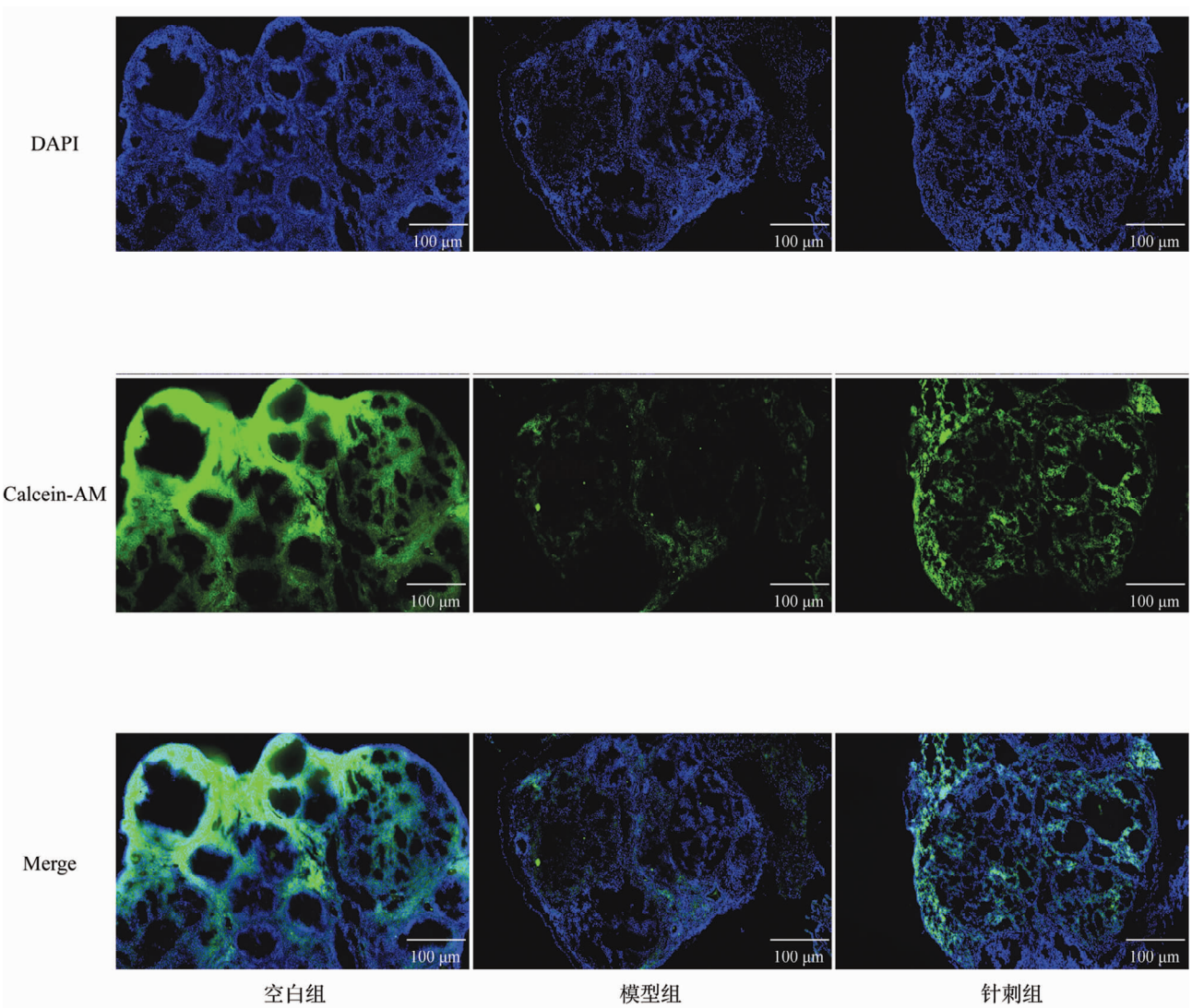


图4 各组小鼠卵巢组织线粒体膜通透性比较(荧光染色,×200)

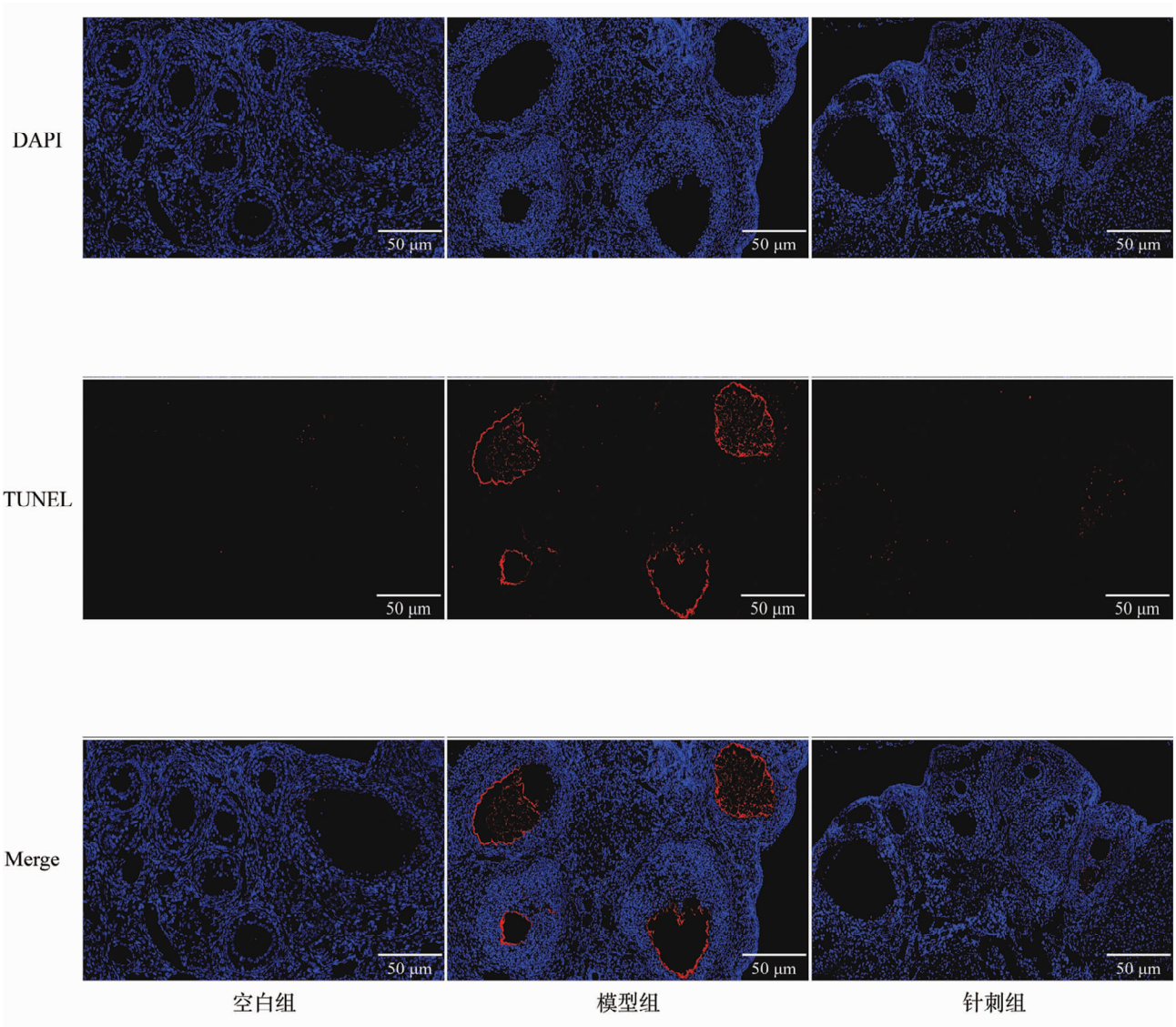


图 5 各组小鼠卵巢组织阳性细胞凋亡情况比较(TUNEL 染色,×200)