

肝豆补肾汤通过 AGE/RAGE/NF- κ B 信号通路 干预小鼠肝豆状核变性卵巢损伤

江鹏宇¹, 吴丽敏², 韩 辉¹

1. 安徽中医药大学第一附属医院脑病中心, 安徽 合肥 230031

2. 中国科学技术大学附属第一医院生殖与遗传分院, 安徽 合肥 230001

[摘要] **目的:** 探讨肝豆补肾汤对肝豆状核变性小鼠卵巢损伤的干预作用及机制。**方法:** 采用液相色谱-质谱法(LC-MS)分析肝豆补肾汤的化学成分。取40只6周龄雌性C3He-*Atp7b*^{fl/fl}小鼠随机分为模型对照组、青霉胺组(阳性对照)和肝豆补肾汤小、大剂量组,10只雌性DL同系小鼠为正常对照组。记录小鼠体重、卵巢质量以评估卵巢系数;采用络合比色法检测卵巢组织的铜含量;苏木精-伊红染色、透射电镜观察卵巢组织的形态及超微结构变化;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素、雌二醇和孕酮水平;RNA测序分析治疗前后组织差异表达基因变化,并对差异表达基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。构建硫酸铜诱导的卵巢颗粒细胞铜负荷模型,设置正常对照组、模型对照组和肝豆补肾汤小、中、大剂量组。定量逆转录聚合酶链反应检测FSH受体(FSHR)、类固醇生成急性调节蛋白(Star)、胰岛素样生长因子(IGF)-1、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、核因子 κ B(NF- κ B)的mRNA表达;ELISA法检测肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β 、IL-6水平;水溶性四氮唑-1比色法检测超氧化物歧化酶(SOD)水平;荧光探针结合流式细胞术测定活性氧含量和线粒体损伤;蛋白质印迹法检测B细胞淋巴瘤蛋白(BCL)-2、BCL-2相关X蛋白(BAX)、胱天蛋白酶(caspase)、晚期糖基化终末产物(AGE)、RAGE、NF- κ B蛋白表达水平。**结果:** 肝豆补肾汤样品中共含有1465种化学成分。与正常对照组比较,模型对照组体重、卵巢质量及卵巢系数降低(均 $P<0.01$)。小、大剂量肝豆补肾汤均可减轻组织铜含量(均 $P<0.01$),改善小鼠卵巢组织形态、超微结构损伤,上调血清FSH、黄体生成素、雌二醇和孕酮水平(均 $P<0.01$)。RNA测序结果显示,差异表达基因数有507个。KEGG富集分析结果显示,肝豆补肾汤的治疗机制重点涉及AGE/RAGE/NF- κ B信号通路。细胞实验结果显示,与模型对照组比较,肝豆补肾汤各剂量组FSHR、Star、IGF-1 mRNA表达水平升高,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平降



收稿日期(Received):2025-03-24 修改返回日期(Revised):2025-07-24 接受日期(Accepted):2025-09-24 网络预发表日期(Online):2025-11-07

基金项目(Funding): 国家自然科学基金(82374212,81673811);安徽省重点研究与开发计划(202204295107020044)

第一作者(First author): 江鹏宇, 博士研究生, 医师, 主要从事中西医结合治疗神经系统疾病研究;E-mail:18297475477@163.com;ORCID:0009-0002-8592-6736

通信作者(Corresponding author): 韩 辉, 主任医师, 副教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合治疗神经系统疾病研究;E-mail:hanhuidocor2022@163.com;ORCID:0009-0007-5909-8523

低, SOD 表达增加、活性氧荧光强度降低(均 $P < 0.01$), 中、大剂量组线粒体损伤率下降(均 $P < 0.01$)。与模型对照组比较, 肝豆补肾汤各剂量组促凋亡蛋白 BAX 和 caspase-3 表达减少(均 $P < 0.05$), 中、大剂量组抗凋亡蛋白 BCL-2 表达增加(均 $P < 0.05$)。与模型对照组比较, 肝豆补肾汤中、大剂量组 AGE、RAGE 和 NF- κ B 蛋白表达减少(均 $P < 0.05$), 各剂量组 RAGE、NF- κ B mRNA 表达水平下降(均 $P < 0.01$)。
结论: 肝豆补肾汤能改善肝豆状核变性卵巢损伤, 其作用机制可能与 AGE/RAGE/NF- κ B 信号通路有关。

[关键词] 肝豆状核变性; 卵巢损伤; 肝豆补肾汤; AGE/RAGE/NF- κ B 信号通路; 氧化应激; 铜代谢; 小鼠; 颗粒细胞

[中图分类号] R277.7 [文献标志码] A

Gandou Bushen decoction ameliorates ovarian injury in murine hepatolenticular degeneration via the AGE/RAGE/NF- κ B signaling pathway

JIANG Pengyu¹, WU Limin², HAN Hui¹ (1. Brain Disease Center, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Reproductive and Genetic Branch, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001, China)

Corresponding author: HAN Hui, E-mail: hanhuidocor2022@163.com, ORCID: 0009-0007-5909-8523

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and underlying mechanism of Chinese herbal medicine Gandou Bushen decoction (GBD) on ovarian injury in murine hepatolenticular degeneration (HLD) model. **Methods:** The chemical constituents of GBD were analyzed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Forty female C3He-Atp7b^{tm-J} mice (6-week-old) were randomly divided into model, penicillamine (positive control), low-dose GBD, and high-dose GBD groups. Ten DL syngeneic female mice served as the normal control group. Body and ovarian weights were measured to calculate the ovarian coefficient. Ovarian copper content was detected by complexometric colorimetry. Histopathological and ultrastructural changes were observed by hematoxylin-eosin staining and transmission electron microscopy, respectively. Serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, and progesterone were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). RNA sequencing was performed to identify differentially expressed genes, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. A copper overloaded cell model was established in ovarian granulosa cells (iCell-0114a) by treating them with copper sulfate. Cells were divided into normal control, model control, and low-, medium-, and high-dose GBD groups. The mRNA expressions of FSH receptor (FSHR), steroidogenic acute regulatory protein (StAR), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), receptor for advanced glycation end products (RAGE), and nuclear factor κ B (NF- κ B) were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were measured by ELISA. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured

using WST-1 assay. Reactive oxygen species (ROS) levels were measured using DCFH-DA fluorescence, and mitochondrial membrane potential was assessed using JC-1 staining coupled with flow cytometry. Protein expression of B-cell lymphoma 2 protein (BCL-2), BCL-2-associated X protein (BAX), caspase-3, advanced glycation end products (AGE), RAGE, and NF- κ B was determined by Western blotting. **Results:** A total of 1465 chemical components were identified in GBD. Compared with the normal control group, the model group showed decreased body weight, ovarian weight, and ovarian coefficient (all $P < 0.01$). GBD treatment alleviated tissue copper deposition (both $P < 0.01$), improved ovarian histomorphology and ultrastructure, and increased serum levels of FSH, LH, estradiol, and progesterone (all $P < 0.01$). RNA sequencing identified 507 differentially expressed genes. KEGG enrichment analysis indicated that the mechanism underlying GBD's protective effects primarily involved the AGE/RAGE/NF- κ B signaling pathway. In copper-overloaded granulosa cells, GBD dose-dependently increased the mRNA expression of *FSHR*, *Star*, and *IGF-1*, reduced the levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, increased SOD activity, and decreased ROS levels (all $P < 0.01$). The medium- and high-dose GBD groups showed a lower percentage of cells with mitochondrial depolarization (both $P < 0.01$). All GBD dose groups showed decreased expression of BAX and caspase-3 (all $P < 0.05$), while the medium- and high-dose groups showed increased BCL-2 expression (all $P < 0.05$). Furthermore, medium and high doses of GBD reduced the protein expression of AGE, RAGE, and NF- κ B (all $P < 0.05$), and all doses downregulated the mRNA expression of *RAGE* and *NF- κ B* (all $P < 0.01$). **Conclusion:** GBD ameliorates ovarian injury in HLD, and its mechanism of action is associated with the suppression of the AGE/RAGE/NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] Hepatolenticular degeneration; Injury of ovary; Gandou Bushen decoction; AGE/RAGE/NF- κ B signaling pathway; Oxidative stress; Copper metabolism; Mice; Granular cells

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2025, 54(6): 805-819.]

[**缩略语**] 铜转运 ATP 酶 β (ATPase copper transporting beta, ATP7B); 液相色谱-质谱法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS); 苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE 染色); 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG); 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG); 卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH); 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA); 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF); 杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM); 细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK); 晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE); AGE 受体 (receptor for AGE, RAGE); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD); B 细胞淋巴瘤蛋白 (B-cell lymphoma protein, BCL); BCL-2 相关 X 蛋白 (BCL-2 associated X protein, BAX); 胱天蛋白酶 (cysteine aspartic acid specific protease, caspase); 核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B); 基因本体 (gene ontology, GO); 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG); 每千碱基外显子每百万映射片段片段数 (fragments per kilobase of exon model per

million mapped fragments, FPKM); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); FSH 受体(FSH receptor, FSHR); 类固醇生成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR); 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF); 水溶性四氮唑(water-soluble tetrazolium, WST); 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA); 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA); SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

肝豆状核变性是一种由 *ATP7B* 突变引起的常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病^[1]。该病全球患病率约为 1/30 000^[2], 但其遗传患病率可能远高于流行病学预估值, 且临床上存在漏诊^[3]。铜异常蓄积于大脑、肝脏等器官可造成多系统损伤, 导致患者出现神经、精神和肝损伤等表现^[4]。生殖系统损害在肝豆状核变性女性中也十分常见, 甚至可能成为诊断肝豆状核变性的首发症状^[5], 患者的临床表现有月经不调、妊娠受损或反复流产^[6-7]。

合理的治疗可以预防或逆转肝豆状核变性的许多症状。螯合剂是肝豆状核变性的常用治疗药物, 可诱导尿铜排泄以阻止疾病进展^[8], 但由于不良事件发生率较高, 其安全性存在较大争议^[9], 临床上往往需要停药或更改用药方案以限制或规避其严重不良反应^[10]。因此, 寻求更为安全的药物治疗方案是当前亟待解决的问题。目前, 药物研发范式正从单一靶点向多靶点转变^[11]。肝豆补肾汤由丹参、姜黄、黄连、杜仲、熟地黄、枸杞子、淫羊藿及大黄等十多味中药组成, 研究显示该方有助于优势卵泡发育, 改善肝豆状核变性患者的月经紊乱症状^[12]。由于肝豆补肾汤具有显著的疗效和良好的安全性, 目前已在临床实践中应用逾十年^[13], 但其治疗肝豆状核变性卵巢损伤的机制尚未完全阐明。本研究采用 LC-MS 对肝豆补肾汤的主要成分进行鉴定, 并通过 HE 染色、透射电镜和激素水平测试验证肝豆补肾汤对模型小鼠卵巢的保护作用; 利用 RNA 测序技术揭示肝豆补肾汤治疗肝豆状核变性卵巢损伤的机制, 并以铜过载卵巢颗粒细胞模型加以验证。本研究旨在为肝豆补肾汤治疗肝豆状核变性生殖系统损伤提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、动物、药物、试剂及仪器

小鼠卵巢颗粒细胞(iCell-0114a)购自中国镜

像绮点(上海)细胞技术有限公司。40 只 6 周龄雌性 C3He-*Atp7b*^{ts-J} 小鼠(毒乳小鼠)购自美国 Jackson 实验室, 10 只正常对照小鼠为雌性 DL 同系小鼠[实验动物使用许可证号 SYXK(皖)2021-009]。小鼠饲养于合肥综合性国家科学中心大健康研究院无特定病原体级动物房, 每天光照 12 h、黑暗 12 h, 温度 18~20 °C, 湿度 50%~60%, 允许自由摄食和饮水。

肝豆补肾汤含丹参 20 g, 黄连、莪术、姜黄、鸡血藤、杜仲、枸杞子、熟地黄、益母草、当归各 10 g, 菟丝子、大黄、淫羊藿各 6 g。所有药材均由安徽中医药大学第一附属医院中药房提供。青霉素(国药准字 H31022286)为中国上海上药信谊药厂有限公司产品; PMSG(20240401)为中国四川金科药业有限责任公司产品; 注射用 HCG(国药准字 H44020674)为中国丽珠医药集团股份有限公司产品; 硫酸铜(10008216)为中国国药集团化学试剂有限公司产品。

甲酸水溶液(94318)为美国 Honeywell 公司产品; 甲醇(A452-4)、乙腈溶液(A955-4)为美国 Fisher Chemical 公司产品; 戊二醛固定液(18426)、钨酸(115355)为美国 Ted Pella Inc 公司产品; 小鼠 FSH ELISA 试剂盒(JYM0417Mo)、小鼠黄体生成素 ELISA 试剂盒(JYM0341Mo)、小鼠雌二醇 ELISA 试剂盒(JYM0379Mo)、小鼠孕酮 ELISA 试剂盒(JYM0374Mo)、小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(JYM0218Mo)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(JYM0531Mo)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(JYM0012Mo)均为中国武汉基因美生物科技有限公司产品; 胎牛血清(04-001-1ACS)、DMEM 培养基(SH30022.01)为美国 Cytiva 公司产品; 活性氧检测试剂盒(S0033S)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(C2006)均为中国上海碧云天生物技术有限公司产品; CCK-8(BA00208)、AGE 抗体(bs-1158R)、RAGE 抗体(bs-0177R)均为中国北

京博奥森生物技术有限公司产品;TRIzol为(15596018)美国Life Technologies公司产品;铜离子检测试剂盒(E010-1-1)、SOD测定试剂盒(A001-3)为中国南京建成生物工程研究院产品;BAX多克隆抗体(50599-2-Ig)为美国Proteintech公司产品;重组抗caspase-3抗体(AB184787)、抗BCL-2抗体(AB32124)、抗NF- κ B p65抗体(AB32536)均为英国Abcam公司产品。

UHPLC Vanquish超高效液相色谱仪、Q-Exactive HFX质谱仪为德国Thermo Scientific公司产品;光学显微镜(CX41)、透射电镜(JEM1400)为日本Olympus公司产品;Agilent 2100生物分析仪为美国Agilent公司产品;酶联免疫检测仪(RT-6100)为中国深圳雷杜生命科学股份有限公司产品。

1.2 制备肝豆补肾汤

参照2020版《中国药典》中的标准及院内制剂规范^[14-16]进行制备。将所有药材用十倍量的蒸馏水浸泡30 min后,煮沸60 min得到第一次水煎液;将残余物用八倍体积的水再煎煮40 min,得到第二次水煎液;将两次水煎液混匀、离心、浓缩,最后在真空烘箱中干燥成粉末备用。

1.3 LC-MS鉴定肝豆补肾汤成分

利用UHPLC Vanquish超高效液相色谱仪系统进行LC-MS分析。流速设定为0.3 mL/min,样品进样体积设定为4 μ L。移动相由0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸乙腈溶液组成。使用Q-Exactive HFX质谱仪采集数据。

1.4 实验动物分组及标本采集

将10只DL小鼠设为正常对照组,并将40只模型小鼠随机分为四组:模型对照组、青霉胺组(阳性对照)、肝豆补肾汤小剂量组和肝豆补肾汤大剂量组,每组各10只。模型对照组和正常对照组给予等渗氯化钠溶液;青霉胺组给予青霉胺0.1 g/kg;肝豆补肾汤组的给药剂量按70 kg体重成人表面积6.25倍的日用量换算,肝豆补肾汤小剂量组的给药剂量是肝豆补肾汤大剂量组的1/2(分别为5.7和11.4 g/kg)。各组均以20 mL/kg容量灌胃,每天1次,连续4周。

灌胃结束后第二天9:00—10:00,各组注射10 IU PMSG。24 h后每组取4只小鼠注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉。左侧卵巢保存于甲醛中用于HE染色,右侧卵巢固定于戊二醛

溶液中用于透射电镜观察。注射PMSG 48 h后,将每组剩余6只小鼠腹腔注射10 IU HCG。间隔14 h后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,从眼静脉收集血液标本,离心,取血清,−80 $^{\circ}$ C保存。随后,脱颈法处死小鼠并取双侧卵巢置于−80 $^{\circ}$ C保存,以备铜含量测定和RNA测序分析。

1.5 根据体重和卵巢质量计算卵巢系数

所有小鼠在麻醉前称重,麻醉后取出双侧卵巢,经等渗氯化钠溶液冲洗、滤纸吸干后称重,计算卵巢系数:卵巢系数=双侧卵巢质量 $\div$ 小鼠体重 $\times 100\%$ ^[17]。

1.6 络合比色法检测卵巢组织铜含量

根据铜离子检测试剂盒说明书,将双蒸水、标准品和卵巢组织上清液分别加至96孔板中。使用酶联免疫检测仪,设置主波长600 nm,辅助波长700 nm,检测吸光度值^[18]。

1.7 HE染色观察卵巢组织形态

将各组小鼠卵巢组织切片后放入干燥箱,66 $^{\circ}$ C烤片20 min。经二甲苯溶液处理三次,每次5 min;用100%、95%和80%乙醇溶液分别处理3 min。苏木素溶液浸染5 min,1%盐酸乙醇分化后使用饱和碳酸锂溶液蓝化数秒,流水冲洗干净。95%乙醇脱水2 min,伊红染色液浸染数秒。常规脱水、透明、封片,显微镜观察卵巢组织的形态变化。

1.8 透射电镜观察卵巢组织超微结构

取新鲜卵巢组织切成约1 mm³的组织块,于2.5%戊二醛中固定24 h。经磷酸盐缓冲液浸洗,置于1%锇酸固定液中固定2 h,并通过85%、90%和100%乙醇溶液进行脱水。使用环氧丙烷透明处理30 min,在1:1制备的环氧树脂和环氧丙烷混合液中浸透2 h后包埋于环氧树脂中。将包埋后的组织块烘烤并取出切片,厚度为70 nm。将切片进行双染,双蒸水冲洗,于透射电镜下观察卵巢组织的超微结构变化。

1.9 ELISA法测定生殖激素水平

收集血液标本,自然静置20 min后以1000 $\times$ g离心20 min,然后使用ELISA试剂盒分析血清FSH、黄体生成素、雌二醇和孕酮水平。

1.10 RNA测序筛选差异表达基因并进行GO和KEGG富集分析

从正常对照组、模型对照组和肝豆补肾汤大剂量组卵巢组织中提取总RNA,并使用Agilent

2100 生物分析仪检测 RNA 的完整性和总量。库检合格后,将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求进行混合,后用 Illumina NovaSeq 6000 测序,产生 150 bp 配对末端读数。去除接头和聚 N 序列(含连续未知碱基的序列)以及低质量读数以将读数进行过滤,并利用 HISAT2(2.0.5)将双端清洁读数与参照基因组进行比对。利用 featureCounts(1.5.0-p3)计算映射到每个基因的读数。然后根据基因长度计算每个基因的 FPKM,并计算映射到该基因的读数。以 $P < 0.05$ 和 $\log_2$ 差异倍数 > 1 为筛选标准,采用 DESeq2 进行差异表达基因分析。使用 clusterProfiler 软件进行差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析。

1.11 细胞培养和分组

卵巢颗粒细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM(含 100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)中,并置于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳恒温培养箱中。细胞每 2~3 d 传代一次,培养至对数生长期时备用。

取对数生长期的卵巢颗粒细胞接种于 96 孔板(每孔约 1×10^4 个)中,分为正常对照组、模型对照组和肝豆补肾汤组。正常对照组仅加入 DMEM;模型对照组分别加入含不同浓度硫酸铜(0、100、200、300、400、500 和 600 μ mol/L)的 DMEM,在不同时段(12、24、48、72 h)加入 CCK-8 以筛选硫酸铜的最佳浓度。肝豆补肾汤组分别加入含不同浓度的肝豆补肾汤冻干粉(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mg/mL)和最佳作用浓度硫酸铜的 DMEM。在硫酸铜最佳作用时间点分别换液三次后,弃培养液,每孔加入 10 μ L CCK-8,继续培养 1 h 后在酶联免疫检测仪 450 nm 处测量各孔的吸光度值,确定肝豆补肾汤的最佳作用剂量。

1.12 定量逆转录 PCR 检测细胞功能及 AGE/RAGE/NF- κ B 通路相关基因 mRNA 表达

收集卵巢颗粒细胞,加入 1 mL TRIzol 提取总 RNA,匀浆后依次用氯仿、异丙醇和 75% 乙醇处理。将 RNA 逆转录为 cDNA,然后进行 PCR 扩增。扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C, 1 min;95 $^{\circ}$ C, 20 s;60 $^{\circ}$ C, 1 min,循环 40 次。内参基因 β -actin 上游引物 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3',下游引物 5'-TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA-3';FSHR 上游引物 5'-TAAGCACCTTCCAGATGTTC-3',下游引物 5'-ATCACACTTTCAAAGCTCAG-3';StAR 上游引物 5'-GGTTCAGGCCCTAAAATAA-3',下游引物

5'-ATTCTTGAGCCCATAAAGCA-3';IGF-1 上游引物 5'-CCTGTCCACCCTTGAGAATC-3',下游引物 5'-TAGCACCACATTGGCATAGC-3';RAGE 上游引物 5'-ACGGGACTCTTTACTACTGCG-3',下游引物 5'-CCTTCAGGCTCAACCAAC-3';NF- κ B 上游引物 5'-GCTCCTGTTCGAGTCTCCAT-3',下游引物 5'-TTGCGCTTCTCTTCAATCCG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量。

1.13 ELISA 法测定 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平

收集卵巢颗粒细胞,使用磷酸盐缓冲液稀释细胞悬液,经反复冻融裂解细胞,随后于 1000 $\times g$ 离心 20 min。收集上清液,使用 ELISA 试剂盒分析 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达水平。

1.14 WST-1 比色法测定 SOD 水平

将细胞样本裂解并离心后,取 20 μ L 上清液,按照 SOD 测定试剂盒说明书检测细胞 SOD 水平。

1.15 荧光探针结合流式细胞术测定活性氧含量和线粒体损伤

收集各组细胞并调整细胞浓度至 $(1 \sim 10) \times 10^6$ /mL;加入 10 μ mol/L DCFH-DA 荧光探针,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,其间每隔 3~5 min 混匀。同时将未染色细胞作为阴性对照。孵育后,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次以去除未内化探针。采用流式细胞术检测活性氧水平。

收集各组细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次。取 10 万~60 万个细胞重悬于 0.5 mL 培养基中。用 500 μ L JC-1 染色工作液重悬细胞,37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中孵育 20 min,600 $\times g$ 离心 4 min 收集细胞,利用 JC-1 试剂盒染色缓冲液洗涤两次,再用适量 JC-1 染色缓冲液重悬,最后使用流式细胞仪对细胞进行检测。计算线粒体损伤率,即线粒体膜电位受损细胞(绿色荧光)占全部细胞的比例。

1.16 蛋白质印迹法检测细胞凋亡及 AGE/RAGE/NF- κ B 通路相关蛋白表达

收取细胞样本,加入 RIPA 细胞裂解液 600 μ L 裂解。12 000 $\times g$ 离心 15 min,收集总蛋白。将 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样品缓冲液以 1:4 的比例加入收集的蛋白样品中。蛋白质在沸水浴中加热 15 min 以充分变性。将蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内,每孔加 5~10 μ L,80 V 恒压电泳,时间为 1 h。将预先裁好与胶条同样大小的滤纸和聚偏氟乙烯膜(预先在甲醇中浸泡 2~

3 min)浸入转膜缓冲液中 5 min,在恒定电流下转移。用 5%脱脂奶粉在室温下密封 2 h 后,加入 BAX、caspase-3、BCL-2、AGE、RAGE 和 NF-κB 抗体,caspase-3 和 NF-κB 抗体稀释比例为 1:5000,BAX 和 BCL-2 抗体稀释比例为 1:2000,其余抗体稀释比例均为 1:1000。用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1.2 h。加入洗涤液,每次洗涤 10 min,共洗涤三次。使用电化学发光试剂盒检测蛋白,然后使用 ImageJ 软件分析蛋白水平。

1.17 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。使用 GraphPad Prism 9.0 绘图。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单向方差分析,两个独立样本比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝豆补肾汤成分鉴定结果

肝豆补肾汤在正离子和负离子模式下的基峰离子色谱图见附图 1,图中标峰化学成分见附表 1。肝豆补肾汤样品中共含有 1465 种化学成分,主要为生物碱类(18.5%)、萜类(15.7%)、脂肪酸类(10.9%)、聚酮类(6.3%)、苯丙素类(4.8%)、类黄酮类(8.2%)、酚酸类(4.5%)、木脂素类(2.6%)等,其中值得关注的化合物包括黄连素、丹酚酸 B、表小檗碱、巴马汀、木兰素、迷迭香酸、大黄酸等(附表 2)。

2.2 肝豆补肾汤改善模型鼠卵巢系数、促进卵巢组织铜代谢

与正常对照组比较,模型对照组卵巢系数降低,卵巢组织中铜含量增加(均 *P*<0.01);与模型对

照组比较,青霉胺组及肝豆补肾汤大、小剂量组卵巢系数均有升高趋势,卵巢组织的铜含量减小(均 *P*<0.01)。见表 1。结果提示,肝豆补肾汤可促进卵巢组织铜代谢,在一定程度上改善卵巢系数。

2.3 肝豆补肾汤改善模型鼠卵巢组织病理损伤和超微结构损伤

HE 染色结果显示,正常对照组各级卵泡发育正常,其中卵母细胞呈圆形,颗粒细胞在周围包绕,排列整齐;模型对照组卵巢出现明显的病理变化,包括卵泡萎缩,闭锁卵泡增加,成熟卵泡减少;肝豆补肾汤小剂量组、大剂量组闭锁卵泡减少,次级卵泡和窦状卵泡形态较模型对照组改善。见图 1。结果提示,肝豆补肾汤可改善卵巢组织的病理损伤。

透射电镜观察发现,与正常对照组比较,模型对照组线粒体明显改变,如线粒体数减少,明显肿胀,空泡线粒体增加,线粒体嵴减少或消失。与模型对照组比较,青霉胺组和肝豆补肾汤大剂量组线粒体结构明显改善,异常线粒体减少。见图 2。结果提示,肝豆补肾汤可改善卵巢超微结构损伤。

2.4 肝豆补肾汤提升模型鼠血清生殖激素水平

与正常对照组比较,模型对照组血清 FSH、黄体生成素、雌二醇、孕酮水平均降低(均 *P*<0.01);与模型对照组比较,青霉胺组和不同剂量肝豆补肾汤组血清 FSH、黄体生成素、雌二醇、孕酮水平均升高(均 *P*<0.01),且肝豆补肾汤组升高程度与药物剂量显著相关。见表 2。结果提示,肝豆补肾汤可调控铜负荷造成的生殖激素紊乱。

2.5 肝豆补肾汤影响模型鼠卵巢组织基因表达

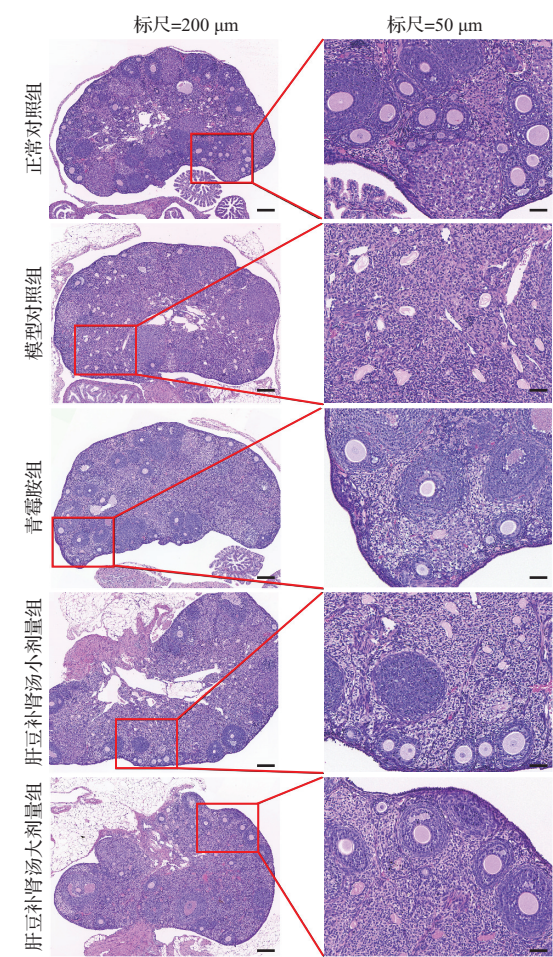
与正常对照组比较,模型对照组有 2174 个差异表达基因;与模型对照组比较,肝豆补肾汤组有 1119 个差异表达基因。其中共有的差异表达基因数(即交集部分)为 507 个。

GO 富集分析结果显示(附图 2A),生物过程排名前三的是细胞对 β 干扰素的反应、对 β 干扰素的反应、细胞外结构组织,细胞组分排名前三的是细胞外基质、胶原蛋白三聚体、胶原蛋白三聚体复合物,分子功能排名前三的是细胞外基质结构组

表 1 各组卵巢系数和卵巢组织铜含量比较
Table 1 Comparison of ovarian coefficients and copper content in ovarian tissues among different groups of mice

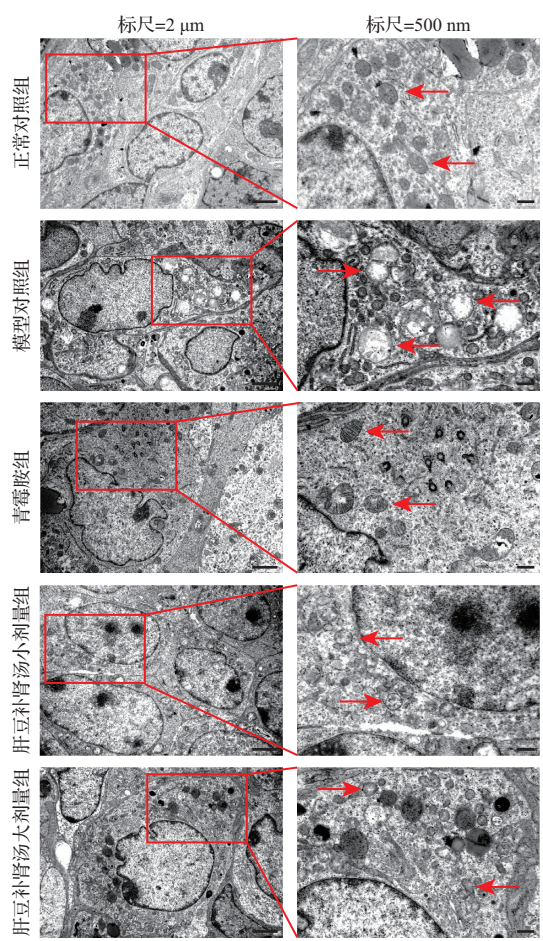
组 别	体重(g)	卵巢质量(mg)	卵巢系数(%)	铜含量(μmol/L) [#]
正常对照组	24.10±0.29**	21.9±1.4**	0.091±0.005**	0.69±0.34**
模型对照组	22.83±0.81	17.4±2.8	0.076±0.010	22.55±1.66
青霉胺组	23.78±0.67*	19.5±2.8	0.082±0.010	6.51±0.80**
肝豆补肾汤小剂量组	23.19±0.85	18.1±2.8	0.078±0.009	13.04±1.60**
肝豆补肾汤大剂量组	23.40±0.78	18.8±2.5	0.080±0.008	7.61±0.93**

与模型对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01。[#]*n*=6。



正常对照组各级卵泡发育正常;模型对照组出现卵泡萎缩,闭锁卵泡增加,成熟卵泡减少;青霉胺组及肝豆补肾汤各剂量组闭锁卵泡减少,次级卵泡和窦状卵泡形态改善.红色矩形指示局部放大区域.

图1 各组小鼠卵巢组织形态(苏木精-伊红染色)
Figure 1 Ovarian tissue morphology of mice in each group (hematoxylin and eosin staining)



正常对照组正常线粒体数多;模型对照组正常线粒体数减少,异常线粒体(肿胀、空泡、嵴消失)增多;青霉胺组及肝豆补肾汤各剂量组线粒体结构改善,异常线粒体减少.红色矩形指示局部放大区域,箭头指示线粒体.

图2 各组小鼠卵巢组织超微结构
Figure 2 Ovarian tissue ultrastructure of mice in each group

成、赋予抗张强度的细胞外基质结构组成、GTP酶活性。

KEGG分析结果显示(附图2B、附表3),AGE-RAGE信号通路、谷胱甘肽代谢、TNF信号通路、

类固醇生成通路等显著富集,提示肝豆补肾汤可能通过靶向AGE/RAGE/NF-κB信号通路发挥治疗作用。

2.6 硫酸铜和肝豆补肾汤剂量的确定

硫酸铜在不同时段呈剂量依赖地抑制卵巢颗粒细胞增殖;在300 μmol/L硫酸铜处理24 h时,卵巢颗粒细胞存活率为50.5%(图3A)。因此,本研究使用300 μmol/L硫酸铜作为最佳剂量,以制备铜过载卵巢颗粒细胞模型。

与0.8、1.6和3.2 mg/mL浓度比较,肝豆补肾汤浓度为0.1、0.2、0.4 mg/mL时细胞存活率升高优势明显,且细胞存活率随药物浓度增加而升高(均 $P<0.05$),

表2 各组小鼠激素水平比较
Table 2 Comparison of hormone levels among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	FSH (ng/mL)	黄体生成素 (pg/mL)	雌二醇 (pg/mL)	孕酮 (ng/mL)
正常对照组	56.4±2.5**	8271±119**	241.1±6.5**	13.81±0.94**
模型对照组	18.6±1.1	1847±123	90.1±4.4	2.52±0.29
青霉胺组	44.2±0.9**	5425±200**	176.3±2.6**	9.62±0.22**
肝豆补肾汤小剂量组	28.5±1.2**	2607±91**	118.2±7.0**	4.60±0.47**
肝豆补肾汤大剂量组	45.0±0.5**	5784±197**	181.8±2.0**	10.00±0.53**

与模型对照组比较,** $P<0.01$. FSH:卵泡刺激素.

见图 3B。因此,将 0.1、0.2、0.4 mg/mL 确定为后续实验中肝豆补肾汤小、中、大给药剂量。

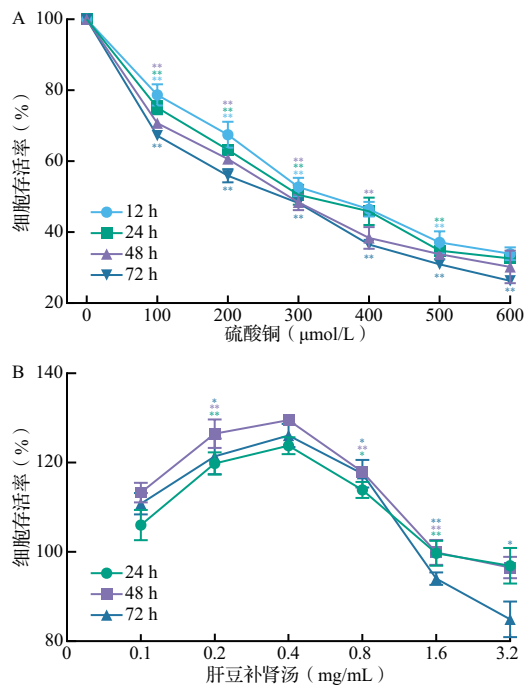
2.7 肝豆补肾汤促进铜过载卵巢颗粒细胞功能相关 mRNA 表达修复

与正常对照组比较,模型对照组 *FSHR*、*StAR*、*IGF-1* mRNA 表达减少(均 $P<0.01$);与模型对照组比较,肝豆补肾汤各剂量组 *FSHR*、*StAR*、*IGF-1* mRNA 表达均增加(均 $P<0.01$)。见表 3。结果提

示,肝豆补肾汤促进铜过载卵巢颗粒细胞中关键基因 mRNA 表达。

2.8 肝豆补肾汤降低铜过载卵巢颗粒细胞炎症水平

与正常对照组比较,模型对照组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平升高(均 $P<0.01$);与模型对照组比较,肝豆补肾汤各剂量组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平降低(均 $P<0.01$),见表 4。结果提示,肝豆补肾汤降低铜过载卵巢颗粒细胞炎症水平作用。



A: 不同浓度硫酸铜处理后细胞存活率变化;B: 不同浓度肝豆补肾汤处理后细胞存活率变化. 与同时段前一浓度比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 硫酸铜和肝豆补肾汤处理后卵巢颗粒细胞增殖情况

Figure 3 Effects of copper sulfate and Gandou Bushen decoction on the proliferation of ovarian granulosa cells

表3 各组卵巢颗粒细胞中 *FSHR*、*StAR* 和 *IGF-1* mRNA 表达水平比较

Table 3 Expression levels of *FSHR*, *StAR*, and *IGF-1* mRNA in each group

(x̄±s, n=6)			
组 别	<i>FSHR</i>	<i>StAR</i>	<i>IGF-1</i>
正常对照组	1.00±0.04**	1.00±0.06**	1.00±0.04**
模型对照组	0.64±0.04	0.54±0.08	0.53±0.04
肝豆补肾汤小剂量组	0.75±0.01**	0.70±0.01**	0.63±0.02**
肝豆补肾汤中剂量组	0.83±0.02**	0.78±0.01**	0.72±0.01**
肝豆补肾汤大剂量组	0.89±0.02**	0.84±0.02**	0.83±0.06**

与模型对照组比较, ** $P<0.01$. *FSHR*: 卵泡刺激素受体; *StAR*: 类固醇生成急性调节蛋白; *IGF-1*: 胰岛素样生长因子 1.

表4 各组卵巢颗粒细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 和 IL-6 表达水平比较

Table 4 Expression levels of $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, and IL-6 in each group

(pg/mL, x̄±s, n=6)			
组 别	$\text{TNF-}\alpha$	$\text{IL-1}\beta$	IL-6
正常对照组	507±30**	57.0±3.8**	54±5**
模型对照组	1093±19	165.7±4.4	320±4
肝豆补肾汤小剂量组	1032±6**	143.5±5.6**	290±7**
肝豆补肾汤中剂量组	943±11**	108.1±1.6**	245±5**
肝豆补肾汤大剂量组	739±28**	90.3±3.4**	203±6**

与模型对照组比较, ** $P<0.01$. $\text{TNF-}\alpha$: 肿瘤坏死因子- α .

2.9 肝豆补肾汤减少铜过载卵巢颗粒细胞中氧化应激和线粒体损伤发生

与正常对照组比较,模型对照组 SOD 表达减少、活性氧荧光强度升高;与模型对照组比较,肝豆补肾汤各剂量组 SOD 表达增加、活性氧荧光强度降低(均 $P<0.01$)。见附图 3A 和表 5。结果提示,肝豆补肾汤减少抗铜过载卵巢颗粒细胞的氧化水平。

与正常对照组比较,模型对照组线粒体损伤率更高($P<0.01$);与模型对照组比较,肝豆补肾汤中、大剂量组线粒体损伤率下降(均 $P<0.01$),见附图 3B 和表 5。结果提示,肝豆补肾汤可减少铜过载卵巢颗粒细胞线粒体损伤的发生。

2.10 肝豆补肾汤抑制铜过载卵巢颗粒细胞凋亡相关蛋白表达

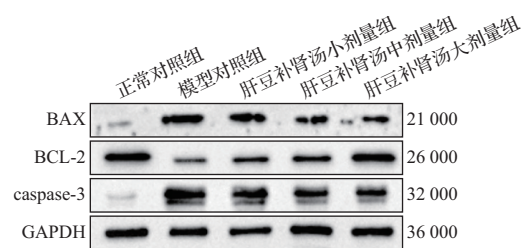
与正常对照组比较,模型对照组促凋亡蛋白 BAX 和 caspase-3 表达增加(均 $P<0.01$),抗凋亡蛋白 BCL-2 表达减少($P<0.01$);与模型对照组比较,肝豆补肾汤各剂量组 BAX 和 caspase-3 蛋白减少(均 $P<0.05$),肝豆补肾汤中剂量组、大剂量组 BCL-2 蛋白表达增加(均 $P<0.05$)。见图 4 和表 6。提示肝豆补肾汤具有一定的抗凋亡作用。

表5 各组卵巢颗粒细胞中SOD、活性氧水平和线粒体损伤率比较

Table 5 SOD, reactive oxygen species levels, and mitochondrial damage rates in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	SOD (U/mg prot)	活性氧 荧光强度	线粒体 损伤率(%)
正常对照组	17.68±0.32**	38 352±1808**	8.33±0.50**
模型对照组	8.16±0.25	188 315±6285	20.33±1.38
肝豆补肾汤 小剂量组	9.13±0.18**	161 580±2562**	18.50±0.26
肝豆补肾汤 中剂量组	13.05±0.24**	113 366±1519**	17.17±0.55**
肝豆补肾汤 大剂量组	15.78±0.60**	96 064±4673**	14.10±0.17**

与模型对照组比较, ** $P<0.01$. SOD:超氧化物歧化酶.



BCL: B 细胞淋巴瘤蛋白; BAX: BCL-2 相关 X 蛋白; caspase: 胱天蛋白酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图4 各组凋亡相关蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoretograms of apoptosis-related proteins in each group

表6 各组卵巢颗粒细胞中凋亡相关蛋白表达水平比较
Table 6 Expression levels of apoptosis-related proteins in each group

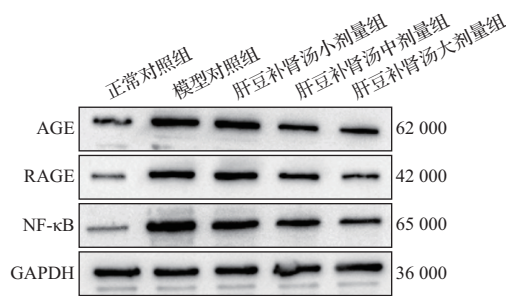
组别	BAX	BCL-2	caspase-3
正常对照组	0.13±0.05**	1.27±0.09**	0.12±0.03**
模型对照组	1.06±0.06	0.53±0.05	1.55±0.05
肝豆补肾汤小剂量组	0.80±0.07*	0.64±0.02	1.15±0.10**
肝豆补肾汤中剂量组	0.47±0.09**	0.74±0.09*	0.79±0.09**
肝豆补肾汤大剂量组	0.29±0.09**	0.94±0.03**	0.66±0.08**

与模型对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. BCL: B 细胞淋巴瘤蛋白; BAX: BCL-2 相关 X 蛋白; caspase: 胱天蛋白酶.

2.11 肝豆补肾汤抑制 AGE/RAGE/NF-κB 通路的激活

与正常对照组比较,模型对照组 AGE、RAGE、NF-κB 蛋白和 RAGE、NF-κB mRNA 表达水平上调(均 $P<0.01$);与模型对照组比较,肝豆补肾汤中、大剂量组 AGE、RAGE 和 NF-κB 蛋白表达水平均表现出不同程度的下降(均 $P<0.05$),肝豆补肾汤

各剂量组 RAGE、NF-κB mRNA 表达水平均下调(均 $P<0.01$)。见图 5 和表 7。结果提示,肝豆补肾汤可能通过靶向 AGE/RAGE/NF-κB 通路发挥治疗作用,从而改善卵巢损伤。



AGE:晚期糖基化终末产物;RAGE:AGE 受体;NF-κB:核因子 κB;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图5 各组 AGE/RAGE/NF-κB 信号通路相关蛋白电泳图

Figure 5 Electrophoretograms of AGE/RAGE/NF-κB signaling pathway-related proteins in each group

3 讨论

作为一种潜在可治疗的遗传性铜代谢障碍疾病,肝豆状核变性的特征是铜的病理性积累。女性肝豆状核变性患者通常存在生殖系统损伤的症状^[6,19]。研究表明,铜可以进入并在卵巢中蓄积,进而导致卵巢功能受损^[20]。目前,肝豆状核变性的主要药物治疗策略是降低患者体内的铜水平,尚无法针对 ATP7B 的潜在突变进行根治。降铜治疗将在患者的整个生命周期中持续^[21],故规避药物的毒副作用非常重要。青霉胺是目前治疗肝豆状核变性的首选药物,但其存在许多不良反应,包括胃肠道症状、过敏反应、重症肌无力和自身免疫性疾病等^[22]。因此,仍须开发更合适的药物治疗肝豆状核变性。

中草药被认为是天然的“组合化学库”,也是药物发现的绝佳来源。肝豆补肾汤是临床治疗肝豆状核变性生殖系统损害的常用经验方,但其疗效背后的机制尚待发掘。本研究通过非靶向代谢组学技术成功鉴定了肝豆补肾汤的主要成分,为了解药物与疾病靶点之间的联系打开了突破口。铜针对卵巢的生殖毒性源于直接损伤和激素干扰引起的共毒性^[23]。研究显示,肝豆补肾汤中所含的小檗碱可以通过抑制铁死亡来改善肝豆状核变性中铜沉积引起的卵巢损伤^[24]。本研究通

表7 各组 AGE/RAGE/NF-κB 通路相关蛋白及其 mRNA 表达水平比较
Table 7 Expression levels of AGE/RAGE/NF-κB pathway-related proteins and mRNAs in each group

组 别	蛋白质(n=3)			mRNA(n=6)	
	AGE	RAGE	NF-κB	RAGE	NF-κB
正常对照组	0.30±0.09**	0.36±0.09**	0.18±0.10**	1.03±0.28**	1.00±0.02**
模型对照组	1.03±0.10	1.09±0.07	1.07±0.11	2.49±0.05	1.78±0.04
肝豆补肾汤小剂量组	0.83±0.09	0.80±0.10*	0.88±0.09	2.13±0.11**	1.55±0.05**
肝豆补肾汤中剂量组	0.73±0.06*	0.61±0.10**	0.58±0.04**	1.88±0.05**	1.45±0.02**
肝豆补肾汤大剂量组	0.48±0.09**	0.46±0.03**	0.38±0.06**	1.39±0.13**	1.20±0.03**

与模型对照组比较,*P<0.05,**P<0.01。AGE:晚期糖基化终末产物;RAGE:AGE受体;NF-κB:核因子κB;mRNA:信使RNA。

过 HE 染色和透射电镜观察证实肝豆补肾汤可修复肝豆状核变性模型小鼠卵巢组织形态和线粒体结构损伤。研究显示,卵泡发育与性激素水平密切相关^[25]。Yang 等^[20]发现,暴露于铜纳米粒可显著降低雌性大鼠 FSH、黄体生成素和孕酮水平。另有研究显示,铜还能降低血清雌二醇水平^[26-27]。本文资料显示,模型小鼠血清 FSH、黄体生成素、雌二醇、孕酮水平均显示出不同程度的下降,青霉胺和肝豆补肾汤可显著提升铜过载下血清 FSH、黄体生成素、雌二醇和孕酮水平,缓解生殖激素紊乱。有趣的是,我们发现肝豆补肾汤对于血清激素水平的修复能力甚至优于单纯的铜螯合剂,这可能得益于中药本身对于激素表达水平的促进作用。此外,肝豆状核变性的药物开发中铜排泄能力格外重要。本文资料显示,肝豆补肾汤可明显减少模型小鼠卵巢组织铜含量,证实肝豆补肾汤对于卵巢组织具有一定的铜排泄作用。上述结果说明,肝豆补肾汤具有应用于肝豆状核变性卵巢受损修复的潜力。

为探究肝豆补肾汤的潜在机制,研究进行了 RNA 测序分析。本文资料显示,507 个差异表达基因可作为肝豆补肾汤干预治疗肝豆状核变性卵巢损伤的潜在靶点。KEGG 富集分析显示,AGE/RAGE 信号通路是富集程度较高的通路之一。据报道,AGE/RAGE 信号通路的激活及其有害作用被称为 AGE/RAGE 应激^[28]。AGE 是游离还原糖与蛋白质、脂质或核酸间非酶促反应的结果,通过与 RAGE 相互作用影响不同病理状态或疾病的发生进展^[29]。AGE/RAGE 信号通路能诱导促炎性细胞因子的表达,通过激活 NF-κB 刺激活性氧的产生并上调 RAGE^[30]。RAGE 是细胞凋

亡过程中关键的信号通路,其活化控制凋亡、增殖、自噬或炎症等关键的细胞功能^[31]。因此,肝豆补肾汤可能通过调节 AGE/RAGE/NF-κB 信号通路改善炎症、氧化应激及凋亡水平来修复铜过载导致的卵巢损伤,这为后续的细胞实验奠定了研究基础和方向。

卵巢颗粒细胞作为卵巢组织的基本成分,在维持激素合成和排卵等正常卵巢功能方面发

挥着不可或缺的作用。本研究采用经硫酸铜诱导的卵巢颗粒细胞构建铜负荷模型细胞,并通过多时段观察不同给药浓度下模型细胞的存活率成功筛选出肝豆补肾汤的适宜剂量,并证实其在促进细胞增殖方面发挥作用。FSHR 是一种 G 蛋白偶联受体,且仅位于卵巢颗粒细胞中,其与配体 FSH 结合后可促进多种信号通路触发卵泡成熟和雌激素产生^[32]。铜暴露可阻碍 FSH 与 FSHR 结合,进而抑制 FSHR/CYP19A1 通路,导致卵巢颗粒细胞类固醇合成功能障碍,并改变 *SF-1* 启动子上的 DNA 甲基化^[33]。类固醇生成能力是卵巢颗粒细胞的重要功能,是卵母细胞正常生长发育和细胞增殖分化的重要诱导因子^[34]。游离胆固醇被转运到线粒体后可通过 StAR 进一步从线粒体外膜转移到线粒体内膜,可见 StAR 在参与类固醇生成限速步骤中发挥关键调节作用^[35]。Zhang 等^[36]指出,铜可能是一种有效的内分泌干扰物,包括 StAR 在内的类固醇生物合成 mRNA 水平随着铜浓度的增加而显著下降,并表现出生殖毒性。IGF-1 是卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞有丝分裂和卵巢类固醇产生的重要刺激剂,是细胞发育以及下丘脑和垂体的激素反馈信号所必需的^[37]。研究显示,猪卵巢中 IGF-1 可通过促进颗粒细胞增殖、卵泡窦形成和减少细胞凋亡刺激卵泡的生长和发育^[38]。重金属暴露是生殖障碍的重要原因。本文资料显示,铜过载可以抑制卵巢颗粒细胞中 FSHR 和 StAR 的表达,与先前的研究结果一致^[33];IGF-1 的表达水平也呈现明显下调;经肝豆补肾汤干预后,FSHR、StAR、IGF-1 的表达水平均显著提升。可见肝豆补肾汤在一定程度上发挥了对卵巢颗粒细胞的保护作用,其具有促进卵巢

颗粒细胞增殖及功能修复的能力。

炎症是身体对有害刺激的特征性反应,旨在消除损伤源并使组织恢复到功能性稳态^[39]。肝豆状核变性患者体内促炎性细胞因子升高,且炎症水平与疾病严重程度呈正比^[40]。在肝豆状核变性患者中,病理性铜暴露可通过诱导炎症和泛凋亡导致睾丸损伤和生精受损^[41]。肝豆状核变性中不同部位的炎症反应可能与铜蓄积的程度有关^[42],目前对卵巢组织或细胞炎症的研究仍相对缺乏。本文资料显示,铜过载可以诱导卵巢颗粒细胞炎症的发生。肝豆补肾汤可抑制炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达,证实肝豆补肾汤具有抗炎作用。活性氧含量增加是铜诱导细胞毒性的主要因素^[43]。肝豆状核变性铜沉积可引起睾丸的氧化应激、线粒体损伤和细胞凋亡造成生精功能受损^[44]。卵巢颗粒细胞对活性氧敏感,过量活性氧产生可能超过抗氧化防御系统的极限,诱发卵巢颗粒细胞功能障碍甚至细胞凋亡^[45]。研究表明,铜可显著增加卵巢组织及卵巢颗粒细胞内氧化产物活性氧和丙二醛的水平,诱导氧化应激对卵巢产生毒性作用^[20,46]。线粒体在产生ATP以及细胞损伤时传递细胞内外信号的过程中发挥关键作用,是卵巢颗粒细胞的重要细胞器^[47]。持续的线粒体功能障碍使氧化应激并产生卵巢颗粒细胞损伤,进而导致细胞凋亡增加、增殖减少、生物学功能受损和卵泡发育异常,甚至卵巢疾病^[48-49]。铜暴露诱导卵巢颗粒细胞凋亡由caspase依赖性细胞凋亡信号通路触发,且miRNA可能参与这一过程^[50]。本文资料显示,模型组卵巢颗粒细胞的SOD水平较低,而活性氧水平、线粒体损伤率较高,促凋亡蛋白BAX和caspase-3表达水平明显升高,抗凋亡蛋白BCL-2水平降低;经肝豆补肾汤干预后,细胞内SOD水平升高,活性氧水平、线粒体损伤率显著下调,凋亡相关蛋白的表达得到抑制。

研究显示,AGE和RAGE的表达水平在具有内分泌问题的女性中升高^[51]。另外,AGE能抑制原代人卵巢颗粒细胞和人卵巢颗粒细胞瘤细胞的增殖,与黄体生成素受体下调和黄体酮分泌减少有关^[52]。AGE与RAGE的相互作用促使卵巢氧化应激、炎症产生以及乙二醛酶和沉默信息调节因子1活性降低,导致类固醇生成改变、排卵功能障碍、内皮损伤和胰岛素抵抗^[53]。因此,AGE

和RAGE在卵巢疾病的发病机制中具有重要意义。研究显示,铜可以促进AGE形成和RAGE的表达^[54]。Wang等^[55]研究表明,曲恩汀作为铜螯合剂处理后抑制了APP/PS1小鼠大脑淀粉样蛋白生成途径,包括靶向RAGE和NF- κ B下调。NF- κ B可以影响细胞免疫、增殖、炎症、存活、死亡等各种过程,因为其参与细胞稳态,对诸多基因的转录具有影响,如IL-6、TNF- α 、细胞间黏附分子1、环氧合酶2、诱生型一氧化氮合酶等^[56]。作为一种模式识别受体,RAGE过表达会触发多种信号传递事件,至少部分涉及p21大鼠肉瘤蛋白、MAPK和PI3K/Akt,这些信号最终导致NF- κ B激活^[57]。一项研究发现,AGE、RAGE和NF- κ B在引发活性氧介导的线粒体功能障碍和细胞凋亡中发挥作用,从而导致脂肪性肝炎^[58]。因此,靶向抑制AGE、RAGE和NF- κ B活化可能是减轻铜诱导卵巢损伤的一种有益策略。本文资料重点关注AGE/RAGE/NF- κ B信号通路,并发现在模型卵巢颗粒细胞中硫酸铜可升高AGE、RAGE和NF- κ B蛋白及RAGE、NF- κ B mRNA的表达水平。然而,在肝豆补肾汤作用后,AGE、RAGE、NF- κ B蛋白的高表达受到限制,RAGE、NF- κ B mRNA表达得到下调,提示肝豆补肾汤在一定程度上抑制了AGE/RAGE/NF- κ B信号通路的激活。

综上,肝豆补肾汤可以缓解模型小鼠卵巢组织的损伤及生殖激素紊乱,并减少组织中铜积累,这种对卵巢损伤的保护作用可能是通过靶向AGE/RAGE/NF- κ B信号通路抑制铜过载来实现的。本研究结果凸显了肝豆补肾汤在治疗肝豆状核变性生殖系统损伤的独特价值,为其更好地投入临床应用提供了理论支持。

本文附加文件见电子版。



志谢 本研究得到国家自然科学基金(82374212, 81673811)和安徽省重点研究与开发计划(202204295107020044)支持

Acknowledgements This study was supported by National Natural Science Foundation of China (82374212, 81673811) and Clinical Special Translational Project of Anhui Provincial Science and Technology Department (202204295107020044)

作者贡献 江鹏宇、吴丽敏和韩辉参与论文选题和设计

或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容.所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责.具体见电子版

Author Contributions JIANG Pengyu, WU Limin and HAN Hui participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者(E-mail: hanhuidocor2022@163.com)处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at hanhuidocor2022@163.com

医学伦理 本研究遵循国家和合肥综合性国家科学中心大健康研究院有关实验动物管理和使用的规定,通过合肥综合性国家科学中心大健康研究院实验动物福利与伦理委员会审查(IHM-AP-2024-051)

Ethical Approval All applicable national guidelines and Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center regulations for the care and use of animals were followed, and the research protocol of animal experiments was approved by the Ethics Committee of Institute of Health and Medicine, Hefei Comprehensive National Science Center (IHM-AP-2024-051)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2025. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] SHRIBMAN S, POUJOIS A, BANDMANN O, et al. Wilson's disease: update on pathogenesis, biomarkers and treatments[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2021, 92(10): 1053-1061.
- [2] SANDAHL T D, LAURSEN T L, MUNK D E, et al. The prevalence of Wilson's disease: an update[J]. *Hepatology*, 2020, 71(2): 722-732.
- [3] GAO J, BRACKLEY S, MANN J P. The global prevalence of Wilson disease from next-generation sequencing data[J]. *Genet Med*, 2019, 21(5): 1155-1163.
- [4] AGGARWAL A, BHATT M. Wilson disease[J]. *Curr Opin Neurol*, 2020, 33(4): 534-542.
- [5] KAUSHANSKY A, FRYDMAN M, KAUFMAN H, et al. Endocrine studies of the ovulatory disturbances in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration) [J]. *Fertil Steril*, 1987, 47(2): 270-273.
- [6] PFEIFFENBERGER J, BEINHARDT S, GOTTHARDT D N, et al. Pregnancy in Wilson's disease: management and outcome[J]. *Hepatology*, 2018, 67(4): 1261-1269.
- [7] TARNACKA B, RODO M, CICHY S, et al. Procreation ability in Wilson's disease[J]. *Acta Neurol Scand*, 2000, 101(6): 395-398.
- [8] SHRIBMAN S, MARJOT T, SHARIF A, et al. Investigation and management of Wilson's disease: a practical guide from the British Association for the Study of the Liver[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(6): 560-575.
- [9] WEISS K H, THURIK F, GOTTHARDT D N, et al. Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with Wilson disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(8): 1028-1035.e1-2.
- [10] MEDICI V, HEFFERN M C. Monitoring and treatment of Wilson disease: progress and challenges[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(12): 1063-1065.
- [11] MEDINA-FRANCO J L, GIULIANOTTI M A, WELMAKER G S, et al. Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery[J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(9-10): 495-501.
- [12] 刘千琢, 韩 辉, 房新如, 等. 肝豆补肾汤通过抑制铁死亡和内质网应激改善肝豆状核变性模型 TX 小鼠卵巢组织损伤[J]. *安徽中医药大学学报*, 2024, 43(1): 67-73.
LIU Qianzhuo, HAN Hui, FANG Xinru, et al. Gandou Bushen decoction alleviates ovarian tissue damage in TX mice with hepatolenticular degeneration by inhibiting ferroptosis and endoplasmic reticulum stress[J]. *Journal of Anhui University of Chinese Medicine*, 2024, 43(1): 67-73. (in Chinese)
- [13] 韩 辉, 金仁桃, 吴丽敏, 等. 补肾化痰祛瘀中药治疗 Wilson 病患者月经不调临床观察[J]. *中医药临床杂志*, 2015, 27(10): 1431-1433.
HAN Hui, JIN Rentao, WU Limin, et al. Effects of Chinese medicine for tonifying the kidney and resolving phlegm and blood stasis in treating patients in Wilson's disease with irregular menses of anovulia: a report of 20 cases[J]. *Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 27(10): 1431-1433. (in Chinese)
- [14] 尹兴斌, 曲昌海, 董晓旭, 等. 《中国药典》2020 年版一部收录中成药制法规律分析[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(16): 275-281.
YIN Xingbin, QU Changhai, DONG Xiaoxu, et al. Preparation regularity of Chinese patent medicine in Chinese Pharmacopoeia (2020 edition, Vol. I)[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47(16): 275-281. (in Chinese)
- [15] XU L, LIU Y, WU H, et al. Rapid identification of

- chemical profile in Gandou decoction by UPLC-Q-TOF-MSE coupled with novel informatics UNIFI platform [J]. **J Pharm Anal**, 2020, 10(1):35-48.
- [16] WEI T, HAO W, TANG L, et al. Comprehensive RNA-seq analysis of potential therapeutic targets of Gandou-Fu-Mu decoction for treatment of Wilson disease using a toxic milk mouse model[J]. **Front Pharmacol**, 2021, 12: 622268.
- [17] YU J, ZHAI D, HAO L, et al. Cryptotanshinone reverses reproductive and metabolic disturbances in PCOS model rats via regulating the expression of CYP17 and AR[J]. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2014, 2014: 670743.
- [18] 王路瑶, 吴丽敏, 王婷婷, 等. 肝豆补肾汤通过 SIRT3/FOXO3 α 通路调节褪黑素合成改善 Wilson 病模型 TX 小鼠认知障碍[J]. **四川大学学报(医学版)**, 2025, 56(1): 102-111.
WANG Luyao, WU Limin, WANG Tingting, et al. Gandou Bushen decoction ameliorates cognitive impairment in Wilson disease model TX mice by regulating melatonin synthesis via the SIRT3/FOXO3 α pathway [J]. **Journal of Sichuan University (Medical Sciences)**, 2025, 56(1): 102-111. (in Chinese)
- [19] IORIO G G, CONFORTI A, VALLONE R, et al. Reproductive function of long-term treated patients with hepatic onset of Wilson's disease: a prospective study [J]. **Reprod Biomed Online**, 2021, 42(4): 835-841.
- [20] YANG J, HU S, RAO M, et al. Copper nanoparticle-induced ovarian injury, follicular atresia, apoptosis, and gene expression alterations in female rats[J]. **Int J Nanomedicine**, 2017, 12: 5959-5971.
- [21] LUCENA-VALERA A, RUZ-ZAFRA P, AMPUERO J. Wilson's disease: overview[J]. **Med Clin (Barc)**, 2023, 160(6): 261-267.
- [22] SCHILSKY M L, CZLONKOWSKA A, ZUIN M, et al. Trientine tetrahydrochloride versus penicillamine for maintenance therapy in Wilson disease (CHELATE): a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial [J]. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, 2022, 7(12): 1092-1102.
- [23] LUO J, ZHANG M, DENG Y, et al. Copper nanoparticles lead to reproductive dysfunction by affecting key enzymes of ovarian hormone synthesis and metabolism in female rats[J]. **Ecotoxicol Environ Saf**, 2023, 254: 114704.
- [24] LIU Q Z, HAN H, FANG X R, et al. Berberine alleviates ovarian tissue damage in mice with hepatolenticular degeneration by suppressing ferroptosis and endoplasmic reticulum stress[J]. **J Integr Med**, 2024, 22(4): 493-502.
- [25] ZHENG M, ANDERSEN C Y, RASMUSSEN F R, et al. Expression of genes and enzymes involved in ovarian steroidogenesis in relation to human follicular development[J]. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 2023, 14: 1268248.
- [26] ZHAO C, CHU P, TANG X, et al. Exposure to copper nanoparticles or copper sulfate dysregulated the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, gonadal histology, and metabolites in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. **J Hazard Mater**, 2023, 457: 131719.
- [27] ANCHORDOQUY J P, LORENTI S N, POLERO G S, et al. Parenteral copper administration at the beginning of a fixed-time artificial insemination protocol in beef cattle: effect on ovarian function and pregnancy rates [J]. **Biol Trace Elem Res**, 2022, 200(4): 1617-1625.
- [28] SEMCHYSHYN H. Is carbonyl/AGE/RAGE stress a hallmark of the brain aging?[J]. **Pflugers Arch**, 2021, 473(5): 723-734.
- [29] WAGHELA B N, VAIDYA F U, RANJAN K, et al. AGE-RAGE synergy influences programmed cell death signaling to promote cancer[J]. **Mol Cell Biochem**, 2021, 476(2): 585-598.
- [30] MACLEAN M, DERK J, RUIZ H H, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and DIAPH1: implications for vascular and neuroinflammatory dysfunction in disorders of the central nervous system[J]. **Neurochem Int**, 2019, 126: 154-164.
- [31] XIE J, MÉNDEZ J D, MÉNDEZ-VALENZUELA V, et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)[J]. **Cell Signal**, 2013, 25(11): 2185-2197.
- [32] LIU H, XU X, HAN T, et al. A novel homozygous mutation in the FSHR gene is causative for primary ovarian insufficiency[J]. **Fertil Steril**, 2017, 108(6): 1050-1055.e2.
- [33] CHEN Y, SUN Y, WU P, et al. Copper exposure disrupts ovarian steroidogenesis in human ovarian granulosa cells via the FSHR/CYP19A1 pathway and alters methylation patterns on the SF-1 gene promoter[J]. **Toxicol Lett**, 2022, 356: 11-20.
- [34] FAN H, HE J, BAI Y, et al. Baicalin improves the functions of granulosa cells and the ovary in aged mice through the mTOR signaling pathway[J]. **J Ovarian Res**, 2022, 15(1): 34.
- [35] FANG L, CHANG H M, CHENG J C, et al. TGF- β 1 downregulates StAR expression and decreases progesterone production through Smad3 and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa cells[J/OL]. **J Clin Endocrinol Metab**, 2014, 99(11): E2234-E2243.
- [36] ZHANG L H, LUO Z, SONG Y F, et al. Effects and mechanisms of waterborne copper exposure influencing ovary development and related hormones secretion in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. **Aquat Toxicol**, 2016, 178: 88-98.
- [37] ROYCHOUDHURY S, BULLA J, SIROTKIN A V, et al. *In vitro* changes in porcine ovarian granulosa cells induced by copper[J]. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**, 2014, 49(6): 625-633.
- [38] HAN Y, WANG S, WANG Y, et al. IGF-1 inhibits

- apoptosis of porcine primary granulosa cell by targeting degradation of Bim_{EL}[J]. **Int J Mol Sci**, 2019, 20(21): 5356.
- [39] PIEDRA-QUINTERO Z L, WILSON Z, NAVA P, et al. CD38: an immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity[J]. **Front Immunol**, 2020, 11: 597959.
- [40] WU P, DONG J, CHENG N, et al. Inflammatory cytokines expression in Wilson's disease[J]. **Neurol Sci**, 2019, 40(5): 1059-1066.
- [41] ZHAO D, WU L, FANG X, et al. Copper exposure induces inflammation and PANoptosis through the TLR4/NF- κ B signaling pathway, leading to testicular damage and impaired spermatogenesis in Wilson disease [J]. **Chem Biol Interact**, 2024, 396: 111060.
- [42] TERWEL D, LÖSCHMANN Y N, SCHMIDT H H, et al. Neuroinflammatory and behavioural changes in the Atp7B mutant mouse model of Wilson's disease[J]. **J Neurochem**, 2011, 118(1): 105-112.
- [43] LIU X J, LUO Z, XIONG B X, et al. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*[J]. **Ecotoxicol Environ Saf**, 2010, 73(6): 1286-1291.
- [44] CHEN K, WU L, LIU Q, et al. Glutathione improves testicular spermatogenesis through inhibiting oxidative stress, mitochondrial damage, and apoptosis induced by copper deposition in mice with Wilson disease[J]. **Biomed Pharmacother**, 2023, 158: 114107.
- [45] LIU S, JIA Y, MENG S, et al. Mechanisms of and potential medications for oxidative stress in ovarian granulosa cells: a review[J]. **Int J Mol Sci**, 2023, 24 (11): 9205.
- [46] ZOU L, CHENG G, XU C, et al. Copper nanoparticles induce oxidative stress via the heme oxygenase 1 signaling pathway *in vitro* studies[J]. **Int J Nanomedicine**, 2021, 16: 1565-1573.
- [47] CHISTIAKOV D A, SHKURAT T P, MELNICHENKO A A, et al. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review[J]. **Ann Med**, 2018, 50(2): 121-127.
- [48] WANG Y, LI N, ZENG Z, et al. Humanin regulates oxidative stress in the ovaries of polycystic ovary syndrome patients via the Keap1/Nrf2 pathway[J]. **Mol Hum Reprod**, 2021, 27(2): gaaa081.
- [49] WANG Y, YANG Q, WANG H, et al. NAD⁺ deficiency and mitochondrial dysfunction in granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome[J]. **Biol Reprod**, 2021, 105(2): 371-380.
- [50] CHEN Y, GUAN F, WANG P, et al. Copper exposure induces ovarian granulosa cell apoptosis by activating the caspase-dependent apoptosis signaling pathway and corresponding changes in microRNA patterns[J]. **Ecotoxicol Environ Saf**, 2023, 264: 115414.
- [51] RUDNICKA E, SUCHTA K, GRYMOWICZ M, et al. Chronic low grade inflammation in pathogenesis of PCOS [J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(7): 3789.
- [52] LIN P H, CHANG C C, WU K H, et al. Dietary glyco-toxins, advanced glycation end products, inhibit cell proliferation and progesterone secretion in ovarian granulosa cells and mimic PCOS-like symptoms[J]. **Biomolecules**, 2019, 9(8): 327.
- [53] TATONE C, DI EMIDIO G, PLACIDI M, et al. AGEs-related dysfunctions in PCOS: evidence from animal and clinical research[J]. **J Endocrinol**, 2021, 251(2): R1-R9.
- [54] AASETH J, SKALNY A V, ROOS P M, et al. Copper, iron, selenium and lipo-glycemic dysmetabolism in Alzheimer's disease[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(17): 9461.
- [55] WANG C Y, XIE J W, XU Y, et al. Trientine reduces BACE1 activity and mitigates amyloidosis via the AGE/RAGE/NF- κ B pathway in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. **Antioxid Redox Signal**, 2013, 19(17): 2024-2039.
- [56] EBRAHIMI N, ABDULWAHID A R R, MANSOURI A, et al. Targeting the NF- κ B pathway as a potential regulator of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. **Cell Mol Life Sci**, 2024, 81(1): 106.
- [57] YU W, TAO M, ZHAO Y, et al. 4'-methoxyresveratrol alleviated AGE-induced inflammation via RAGE-mediated NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway [J]. **Molecules**, 2018, 23(6): 1447.
- [58] SYED A A, REZA M I, SHAFIQ M, et al. Naringin ameliorates type 2 diabetes mellitus-induced steato-hepatitis by inhibiting RAGE/NF- κ B mediated mitochondrial apoptosis[J]. **Life Sci**, 2020, 257: 118118.

[本文编辑 余 方 刘丽娜]