DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.05.017

基于AKT/mTOR信号通路探讨仙茅苷抗氧化缓解卵巢早衰模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的作用机制

孟宇豪[1],萧闵[2,3],张玮珩[1],陈思易[1],葛春蕾[1],何欢[1],江晓翠[2,3],吕银娟[1,3]
(1.湖北中医药大学基础医学院,湖北 武汉 430065;2.湖北中医药大学实验动物中心,湖北 武汉 430065;
3.湖北时珍实验室,湖北 武汉 430065)

摘要:目的 研究仙茅苷(Curculigoside,CUR)抗氧化缓解卵巢早衰(Premature ovarian failure,POF)模型小鼠的卵巢颗粒细胞(Granulosa cells,GCs)凋亡的作用机制。方法 将经过适应性喂养后的小鼠,分成空白组、模型组、CUR低剂量组、CUR中剂量组、CUR高剂量组,以及戊酸雌二醇组。利用环磷酰胺(Cyclophosphamide,CTX)腹腔注射复制小鼠模型,造模完成后,连续灌胃治疗14 d并且每日进行阴道涂片,末次给药24 h后称量小鼠体质量并处死小鼠,取血与卵巢组织,称量双侧卵巢组织湿重并计算卵巢指数,测定血清促卵泡激素(Follicle-stimulating hormone,FSH)、抗缪勒管激素(Anti-Müllerian Hormone,AMH)、雌二醇(Estradiol,E_2),卵巢进行苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining,HE)观察卵泡发育与黄体形态,并使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(原位末端凋亡法)(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling,TUNEL)测定GCs凋亡水平,检测卵巢组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase,GSH-Px)含量及丙二醛(Malondialdehyde,MDA)水平,使用蛋白印迹法(Western Blot,WB)检测卵巢蛋白激酶B(Protein kinase B,AKT)、p-AKT、雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin,mTOR)、p-mTOR的蛋白表达量。结果 与空白组相比,模型组小鼠动情周期紊乱、卵巢指数下降、见大量闭锁卵泡、GCs出现高水平凋亡、FSH水平明显上调、而AMH和E_2出现明显下降,说明成功复制了POF小鼠模型。与模型组相比,给予CUR后,能够提高抗氧化水平、活化AKT/mTOR信号通路,改善POF小鼠的动情周期、血清激素水平、减少GCs凋亡、促进卵泡发育,从而恢复卵巢储备功能。结论 CUR能改善CTX诱导的小鼠POF,其机制可能与活化AKT/mTOR信号通路发挥抗氧化作用缓解POF模型小鼠GCs凋亡有关。

关键词:卵巢早衰;卵巢储备功能下降;仙茅苷;AKT/mTOR信号通路;颗粒细胞凋亡
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)05-0074-11

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82104704);湖北省中医药管理局2023—2024年度中医药指导性项目(ZY2023F134)
作者简介:孟宇豪(2000-),男,山东济宁人,硕士在读,研究方向:方剂配伍及其应用、中医药防治生殖系统疾病。
通讯作者:吕银娟(1977-),女,河北赵县人,副教授、副主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:方剂配伍及其应用、藏象理论及其应用、中医药防治生殖系统疾病。E-mail:1053825845@qq.com。

[9] 加娜尔·兑山哈力,古丽霞,乔丽凤. 曼月乐与安宫黄体酮改善围绝经期排卵障碍性异常子宫出血患者月经量、经期时间及子宫内膜厚度的效果观察[J]. 实用妇科内分泌电子杂志,2021,8(10):47-50.
[10] 范蒙洁,王晓晔. 孕激素治疗异常子宫出血的研究进展[J]. 中国计划生育和妇产科,2022,14(7):31-32,63.
[11] 丁宁,姜秀新,徐世杰. 基于"女子以肝为先天"思想论治围绝经期无排卵性异常子宫出血[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13):191-198.
[12] 陆思敏,戴铭. 国医大师班秀文治疗围绝经期崩漏临床经验[J]. 中华中医药杂志,2022,37(6):3186-3188.
[13] 陆雯兰,于红娟. 围绝经期崩漏的中医临床研究进展[J]. 内蒙古中医药,2022,41(4):160-163.
[14] 吴雅楠,崔术,安明慧,等. 围绝经期排卵障碍性异常子宫出血的中医体质特点[J]. 妇儿健康导刊,2022(6):34-37.
[15] 杨玉培,刘杨杰,马惠荣,等. 排卵障碍性异常子宫出血证候分布特征的临床流行病学调查[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(12):89-96.
[16] 杨飞霞,王玉,夏鹏飞,等. 当归补血汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志,2021,46(11):2677-2685.
[17] 王文越,刘珊,吕琴,等. 黄芪-当归药对益气活血药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(6):207-216.
[18] 马艳春,吴文轩,胡建辉,等. 当归的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报,2022,50(1):111-114.
[19] 何海秋,黄国维,罗良涛. 川芎为"血中之气药"的内涵浅析[J]. 首都食品与医药,2023,30(7):10-12.
[20] 赵红. 川芎的鉴定方法及药理分析与临床应用[J]. 光明中医,2021,36(10):1730-1732.
[21] 张妍妍,韦建华,卢澄生,等. 桃仁化学成分、药理作用及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊,2022,40(1):234-241.
[22] 王佐梅,肖洪彬,李雪莹,等. 中药红花的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中华中医药杂志,2021,36(11):6608-6611.
[23] 徐明杰,赵迪,李龙宇,等. 水蛭素的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国现代中药,2021,23(4):747-754.
[24] 柳志诚,方永晟,杨国华,等. 水蛭素的药理作用研究进展[J]. 中国医药科学,2022,12(21):56-59,115.
[25] 徐英,王小文,李娜,等. 经典名方乌药汤的历史沿革与现代临床应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(10):31-38.
[26] 张晓帆,李婷,范红艳. 三七皂苷对心血管系统药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2023,44(2):149-152.

Exploring Mechanism of Curculigoside Antioxidation to Alleviate Apoptosis of Ovarian Granulosa Cells in Mice with Premature Ovarian Failure Model Based on AKT/mTOR Signaling Pathway

MENG Yuhao[1], XIAO Min[2,3], ZHANG Weiheng[1], CHEN Siyi[1], GE Chunlei[1], HE Huan[1], JIANG Xiaocui[2,3], LYU Yinjuan[1,3]
(1. College of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
2. Laboratory Animal Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China;
3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, Hubei, China)

Abstract: *Objective* To investigate the mechanism of action of curculigoside (CUR) antioxidation in alleviating apoptosis of ovarian granulosa cells (GCs) in mice with premature ovarian failure (POF). *Method* Mice after acclimatization feeding were divided into blank, model, CUR low - dose, CUR mid - dose and CUR high - dose groups, and estradiol valerate group. The mouse model was replicated by intraperitoneal injection of cyclophosphamide (CTX). After modeling, the mice were treated by gavage for 14 consecutive days and vaginal smears were performed daily, the body mass of the mice was weighed and the mice were killed 24 h after the last administration and the blood and ovary tissues were extracted, and the ovary tissues were weighed bilaterally to calculate the ovarian index. The levels of serum follicle stimulating hormone (FSH), anti - Müllerian hormone (AMH) and estradiol (E2) were measured. The ovaries were stained with hematoxylin - eosin (HE) staining to observe follicular development and corpus luteum morphology, and the apoptosis level of GCs was determined using terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP Nick - End Labeling (TUNEL), and the superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level were measured using protein peroxidase, glutathione peroxidase (GSH - Px) content and malondialdehyde (MDA) level in the ovary tissue. The protein expressions of ovarian protein kinase B (AKT), p - AKT, mammalian target of rapamycin (mTOR) and p - mTOR were detected using protein blotting (WB). *Results* Compared with the blank group, the mice in the model group showed disorganized estrous cycle, decreased ovarian index, large number of atretic follicles, high level of apoptosis of GCs and significantly up - regulated levels of FSH, whereas AMH and E2 showed a significant decrease, suggesting a successful replication of the POF mouse model. Compared with the model group, the administration of CUR intervention was able to increase the antioxidant level, activate the AKT/mTOR signaling pathway, improve the estrous cycle and serum hormone levels, reduce apoptosis of GCs, and promote follicular development in POF mice, thus restoring the ovarian reserve function. *Conclusion* CUR ameliorated mouse POF caused by CTX, and the mechanism may be related to the activation of Akt/mTOR signaling pathway to exert antioxidant effects to alleviate the apoptosis of GCs in POF model mice.

Keywords: premature ovarian failure; decreased ovarian reserve function; sennosides; AKT/mTOR signaling pathway; granulosa cell apoptosis

卵巢早衰(Premature ovarian failure, POF)是指年龄小于40岁的女性出现非生理性的闭经并伴随高促卵泡激素(Follicle - stimulating hormone, FSH)、低雌二醇(Estradiol, E_2)等症状[1],患者主要表现为月经周期紊乱、生育能力下降,一部分患者甚至出现焦虑、抑郁等心理问题[2]。近年来POF患者越来越多[3],30岁以上患病率约为0.1%,35岁以上患病率为0.25%,40岁以上患病率约为1%[4],有逐步年轻化趋势[5],不孕是其最严重的并发症[6]。POF的发病机制尚不明晰,主要与癌症化疗、遗传因素、免疫低下、氧化应激(Oxidative Stress, OS)有关。无有效针对病因的治疗方法,目前此病治疗主要采用激素替代疗法(Hormone replacement therapy, HRT),虽然可以缓解症状,但是不能恢复卵巢功能,有效解决生育问题[7]。HRT还有可能增加血栓、癌症、中风和其他并发症的风险[8]。因此,寻找有效治疗药物成为亟待解决的问题。

仙茅苷(Curculigoside, CUR)是传统中药仙茅中的主要活性成分,分子式为 $C_{22}H_{26}O_{11}$,分子量为466.44[9]。CUR具有抗炎、抗氧化、增强免疫等药理作用[10]。研究表明,OS是卵巢衰老的关键性因素[11]。蛋白激酶B(Protein kinase B, AKT)/雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路参与细胞的生长、增殖、凋亡和自噬等过程,被证实与多种疾病的发生发展有关[12],AKT信号通路可介导OS[13]。研究表明,给予CUR干预后抗氧化酶系统被激活[14]。

本研究使用环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX)腹腔注射法,复制POF小鼠模型,以AKT/mTOR信号通路研究CUR对OS的调节,探讨CUR改善POF的作用机制,以期为药物研发拓展思路,为临床合理用药提供实验支持。

1 材料与仪器

1.1 动物

36只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级别Balb/c性成熟的雌性小鼠,6~8周龄,体质量为17~19 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖北中医药大学实验动物中心[syxk(鄂)2017-0067]SPF级屏障系统。全程自由饮食、进水。7 d适应性喂养后进行实验。动物实验获湖北中医药大学动物伦理委员会批准,批号

为:HUCMS06082041。动物实验参与人员均取得湖北省实验动物专业技术考试合格证书。

1.2 药品及主要试剂

环磷酰胺(上海源叶科技有限公司,货号:S30563);仙茅苷(武汉天植生物技术有限公司,货号:CFN97419);戊酸雌二醇(德国拜耳公司,国药准字:J20171038);超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase,GSH-Px)酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒、ECL 超敏发光液、RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司,货号:BC0175、BC0020、BC1195、PE0010、R0010);刘氏染色液(河南贝索生物科技有限公司,货号:BA4000、BA4007);β-actin、mTOR 抗体、p-mTOR 抗体、AKT 抗体、p-AKT 抗体、HRP-山羊抗兔、一步法末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(原位末端凋亡法)(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling,TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(FITC 绿色荧光)、通用型组织固定液、苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin staining,HE)染色液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:GB11001、GB111839、GB114686、GB111114、GB150002、GB23303、G1501、G1101、G1076、G2026、G2075);FSH ELISA 试剂盒、E_2 ELISA 试剂盒、抗缪勒管激素(Anti-Müllerian Hormone,AMH)ELISA 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司,批号:JYM0597Ra、JYM0608Ra、JYM00083Ra)。

1.3 仪器

ES-500 组织包埋机(上海寰熙医疗器械有限公司);HS-3345 型全自动切片机(金华华速科技有限公司);KZ-Ⅲ-F 型高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);CR21G 型冷冻高速离心机(日本日立公司);TSY-B 脱色摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司);E100 型显微镜、NikonDS-U3 成像系统(日本尼康公司);DYCZ-24DH 型电转仪、DYCZ-40D 转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

36 只小鼠,平均分为空白组,模型组,CUR 低剂量组、CUR 中剂量组、CUR 高剂量组,戊酸雌二醇组。适应性喂养 7 d,第 7 天给予 CTX(100 mg·kg^{-1})腹腔注射,单次足量给药,复制 POF 模型[15],空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水。从第 8 天开始,灌胃 0.1 mL/10 g 药液或生理盐水。根据“人与小鼠之间用药剂量换算表”计算药量,1 次·d^{-1},连续 14 d,CUR 低、中、高剂量组分别以 10、20 和 40 mg·kg^{-1}·d^{-1}的剂量行 CUR 灌胃治疗,戊酸雌二醇组采用戊酸雌二醇(0.13 mg·kg^{-1}·d^{-1})水溶液灌胃,其余两组使用生理盐水灌胃。实验流程见图 1。

2.2 体质量与卵巢指数检测

各组小鼠于末次灌胃 24 h 后称体质量,取血处死小鼠后,立即打开腹腔,分离两侧卵巢组织,用滤纸吸干表面液体,称量两侧卵巢湿重,计算卵巢湿重指数。计算公式:卵巢指数=卵巢湿重(mg)/体质量(g)×100%。

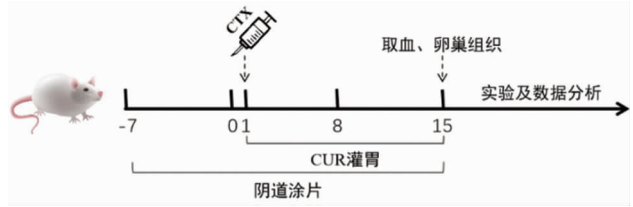


图 1 实验流程

2.3 观察小鼠动情周期

造模完成后,每日早上 9 点行阴道涂片。无菌棉签于生理盐水中浸润,于小鼠阴道内侧壁旋转 1 周后,均匀涂抹于玻片上,采用刘氏染色法染色,以光学显微镜观察脱落细胞的变化作为判断小鼠动情周期的依据。动情周期包括动情前期(Proestrus Stage,P)、动情期(Estrus Stage,E)、动情后期(Metestrus Stage,M)以及动情间期(Diestrus Stage,D)4 个时期。从第 1 天灌胃开始记录动情周期变化,并且绘制折线图。见表 1。

表 1 小鼠动情周期阴道涂片各期特点

阶段	时间/(h)	各期特点
动情前期	10	大量有核上皮细胞和少量角化细胞
动情期	42	大量无核角化细胞和少量上皮细胞
动情后期	12	有核上皮细胞、角质化上皮细胞和白细胞均匀存在
动情间期	48~72	大量白细胞和少量角质化上皮细胞以及黏膜

2.4 HE 观察卵巢卵泡发育情况

小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(50 mg·kg^{-1})麻醉,进行眼球取血后,室温静置 1 h 后使用低温离心机离心 15 min(4 ℃,3000 r·min^{-1})收集上清并分装于 EP 管中,存于-80 ℃冰箱。取卵巢与子宫组织,生理盐水冲洗,室温下置于通用型组织固定液中固定 48 h,使用乙醇进行梯度脱水、再经过二甲苯透明、进行包埋、最后切片备用。脱蜡后,进行染色,再经过脱水、透化,封片。通过光学显微镜观察卵泡发育并采集图片。

2.5 TUNEL 法检测卵巢细胞凋亡

取卵巢组织石蜡切片(石蜡切片制作方法同“2.4”),根据 TUNEL 试剂盒说明书操作,经脱蜡、漂洗、孵育、苏木素复染封片,在荧光显微镜下观察卵巢组织细胞并拍照(细胞核呈荧光绿色为凋亡细胞);在 100 倍光学显微镜下以卵巢组织细胞层为观察边框,每张玻片随机选 5 个视野,计数凋亡细胞数和细胞总数,取平均值,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=(凋亡细胞数/细胞总数)×100%。

2.6 ELSIA 法

2.6.1 检测血清 FSH、E_2 及 AMH 水平 血清室温复融后,按照 ELISA 试剂盒步骤操作,检测血清 FSH、E2 及 AMH 的含量。

2.6.2 检测卵巢 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平 称取适量卵巢组织,按照 1∶10 的比例加入提取液(mL),进行冰浴匀浆;离心 10 min(4 ℃,8000 r·min^{-1}),取上清置冰上待测。按照 ELISA 试剂盒步骤操作,测定卵巢组织 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平。

2.7 蛋白印迹法(Western blot,WB)检测卵巢组织中 AKT、mTOR、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达

取单个卵巢组织,经裂解与定量制备蛋白。将提取的蛋白

经上样、转膜、封闭后，加入一抗（1∶1000），4 ℃孵育过夜；再次洗涤、加二抗孵育（1∶3000），洗膜后，用 ECL 发光液显影，扫描仪对条带测量结果摄像，Image J 软件分析并计算相应的蛋白条带与 β－actin 的灰度比值。

2.8 统计学分析

用 SPSS 29.0 软件进行数据分析，Graph Prism 8.0 软件进行图片分析。首先进行正态性检验，符合正态分布的数据再进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）；计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，计数资料用构成比（%）表示。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义，$P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 仙茅苷对 POF 小鼠动情周期的影响

造模前小鼠动情周期正常，造模后，除空白组小鼠动情周期正常外，其余各组小鼠动情周期都发生一定程度紊乱，在治疗完成后，给药各组大部分小鼠动情周期逐步恢复正常。说明造模干扰破坏了小鼠的卵巢功能，CUR 干预可改善卵巢功能。见插页XXⅢ图 2、图 3。

3.2 仙茅苷对 POF 小鼠体质量与卵巢指数的影响

造模前各组小鼠体质量差异无统计学意义；治疗完成后，与空白组比较，模型组小鼠体质量明显降低（$P<0.01$）、卵巢指数下降（$P<0.05$）。与模型组比较，所有给药组小鼠体质量均有不同程度的上升（$P<0.05$）、仙茅苷高剂量组小鼠卵巢指数上升（$P<0.05$）。见图 4、表 2。

3.3 仙茅苷对 POF 小鼠卵泡发育的影响

空白组小鼠卵巢组织形态正常，可见初级、次级卵泡逐步发育、黄体发育正常。模型组小鼠卵泡发育不良，可见较多卵泡出现闭锁。与空白组比较，模型组小鼠闭锁卵泡百分比显著上升（$P<0.01$）、正常卵泡百分比显著下降（$P<0.01$）。与模型组比较，给药各组正常卵泡百分比上升（$P<0.05$）、仙茅苷低、中剂量组和戊酸雌二醇组闭锁卵泡百分比下降（$P<0.05$）、仙茅苷高剂量组正常卵泡百分比显著下降（$P<0.01$）。CUR 和戊酸雌二醇对卵泡发育均有一定效果，仙茅苷高剂量组治疗效果明显，各级卵泡分布均匀。见插页XXⅢ图 5、图 6、表 3。

3.4 CUR 对 POF 小鼠卵巢颗粒细胞（Granulosa cells，GCs）凋亡的影响

各组小鼠卵泡中都发现呈现荧光绿色的凋亡 GCs，表明各组小鼠皆有不同程度 GCs 凋亡。与空白组比较，模型组凋亡明显（$P<0.01$），与模型组比较，给药各组凋亡减少（$P<0.05$）。见插页XXⅣ图 7、图 8、表 4。

3.5 仙茅苷对 POF 小鼠血清 AMH、FSH、E_2 的影响

与空白组比较，模型组小鼠血清 E_2 和 AMH 水平降低、血清 FSH 水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，给药各组血清 AMH、E_2 水平升高、血清 FSH 水平降低（$P<0.05$）。见图 9、表 5。

3.6 仙茅苷对 POF 小鼠卵巢组织中 MDA 水平、SOD 及 GSH－Px 活性的影响

与空白组比较，模型组 MDA 水平显著增加，SOD 及 GSH－Px 活性显著下降（$P<0.01$）；与模型组比较，给药各组能明显提升血清 SOD 及 GSH－Px 活性（$P<0.05$），给药各组均降低血清 MDA 水平（$P<0.05$）。见图 10、表 6。

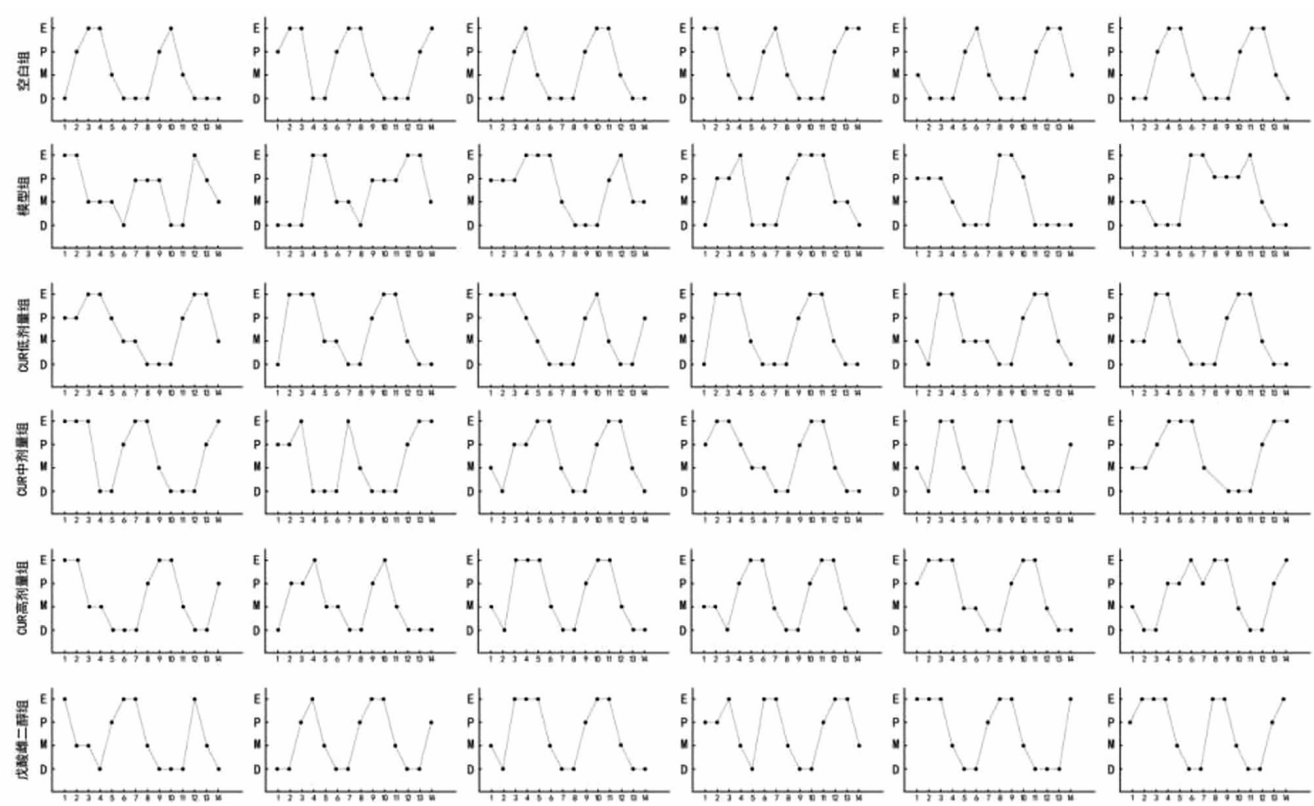
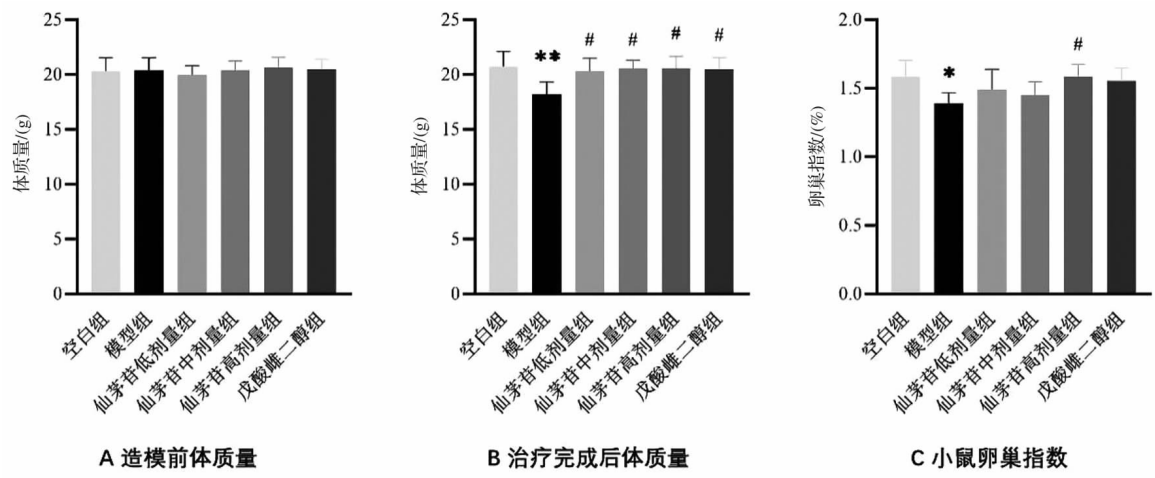


图 3 小鼠治疗期间动情周期折线图



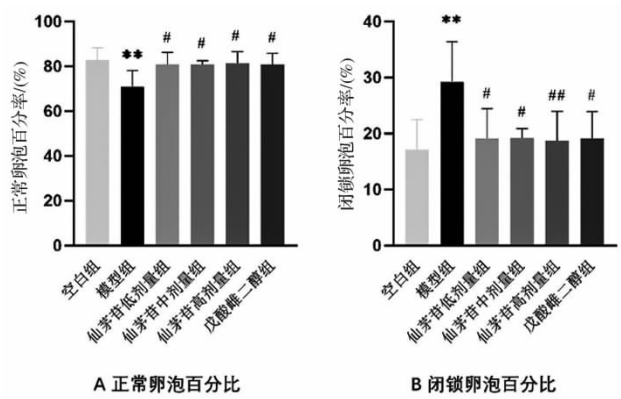
注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较 $P<0.05$。

图 4 各组小鼠体质量与卵巢指数比较

表 2 各组小鼠体质量和卵巢指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	造模前体质量/(g)	治疗完成后体质量/(g)	卵巢指数/(%)
空白组	6	20.25±1.255 0	20.67±1.402 0	1.585±0.117 90
模型组	6	20.33±1.169 0	18.17±1.125 0＊＊	1.392±0.074 68＊
仙茅苷低剂量组	6	19.92±0.861 2	20.25±1.214 0#	1.492±0.144 40
仙茅苷中剂量组	6	20.33±0.875 6	20.50±0.774 6#	1.450±0.095 92
仙茅苷高剂量组	6	20.58±0.970 4	20.50±1.140 0#	1.585±0.087 12#
戊酸雌二醇组	6	20.42±0.970 4	20.42±1.114 0#	1.552±0.094 53

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



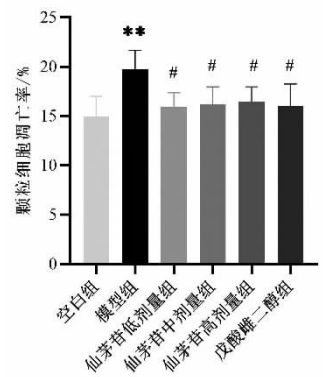
注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较 $P<0.01$。

图 6 各组小鼠正常卵泡百分比与闭锁卵泡百分比比较

表 3 各组小鼠正常卵泡百分比与闭锁卵泡百分比比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	正常卵泡百分比/(%)	闭锁卵泡百分比/(%)
空白组	6	82.84±5.329	17.16±5.328
模型组	6	70.83±7.178＊＊	29.17±7.178＊＊
仙茅苷低剂量组	6	80.84±5.253#	19.16±5.253#
仙茅苷中剂量组	6	80.83±1.667#	19.17±1.667#
仙茅苷高剂量组	6	81.30±5.246#	18.70±5.246##
戊酸雌二醇组	6	80.91±4.782#	19.09±4.782#

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，$P<0.01$。



注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

图 8 各组小鼠 GCs 凋亡率比较

表 4 各组小鼠 CGs 凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	卵巢颗粒细胞凋亡率/(%)
空白组	6	14.93±2.062
模型组	6	19.75±1.897＊＊
仙茅苷低剂量组	6	15.88±1.498#
仙茅苷中剂量组	6	16.18±1.758#
仙茅苷高剂量组	6	16.47±1.474#
戊酸雌二醇组	6	15.98±2.263#

注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

表 5 各组小鼠血清 AMH、FSH、E_2 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	AMH/(ng/mL)	FSH/(U/L)	E_2/(ng/mL)
空白组	6	2.268±0.117 4	16.91±0.464 8	220.0±7.412
模型组	6	1.970±0.128 5＊＊	18.52±0.971 0＊＊	199.9±10.36＊＊
仙茅苷低剂量组	6	2.210±0.142 0#	17.21±0.399 3#	215.2±7.149#
仙茅苷中剂量组	6	2.225±0.109 7#	17.17±0.625 3#	215.8±8.868#
仙茅苷高剂量组	6	2.242±0.116 0#	17.11±0.639 7#	217.6±8.347#
戊酸雌二醇组	6	2.197±0.147 9#	17.10±0.735 8#	217.2±7.259#

注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

3.7 CUR 对 POF 小鼠卵巢组织 AKt/mTOR 信号通路的影响

与空白组相比，模型组 p－AKT/AKT 和 p－mTOR/mTOR 显著下降($P<0.01$)。与模型组相比，CUR 低、中、高 3 组 p－

AKT/AKT 和 p - mTOR/mTOR 上升（$P < 0.05$）。见图 11、表 7。

表 6 各组小鼠 MDA 水平、SOD 活性以及 GSH - Px 含量比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	GSH - Px/(U/mL)
空白组	6	2.522 ± 0.111 50	282.9 ± 9.881	1 128 ± 47.65
模型组	6	2.785 ± 0.163 90**	258.7 ± 10.410**	1 014 ± 54.12**
仙茅苷低剂量组	6	2.562 ± 0.119 80#	277.4 ± 9.196#	1 100 ± 55.14#
仙茅苷中剂量组	6	2.562 ± 0.120 10#	279.9 ± 8.198#	1 101 ± 42.28#
仙茅苷高剂量组	6	2.571 ± 0.094 29#	277.8 ± 13.370#	1 101 ± 31.67#
戊酸雌二醇组	6	2.552 ± 0.085 70#	280.1 ± 8.095#	1 109 ± 48.13#

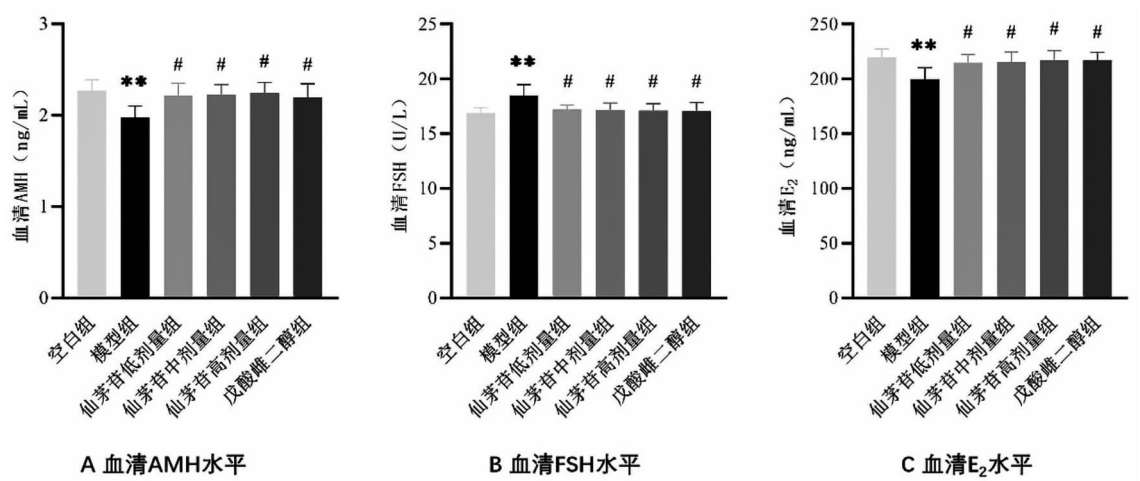
注：**与空白组比较，$P < 0.01$；#与模型组比较，$P < 0.05$。

4 讨论

POF 是不孕症的重要原因之一。由 POF 导致的不孕占各因素所致不孕的比例高达 10%[16]，大大缩短了女性的生育年龄。CTX 是一种烷基化药物，用于多种癌症化疗，通过干扰 DNA 复制，抑制细胞分裂和增殖，导致细胞死亡，被认为是最具性腺毒性的药物[17]。CTX 可诱导 POF，具体表现为原始卵泡衰竭，生长卵泡凋亡和闭锁[18]，各阶段卵泡数量明显减少，未见成熟卵泡[19]。本研究制备小鼠 POF 模型，采用 CTX（100 mg·kg^{-1}）一次性足量腹腔注射方法。模型组小鼠动情周期紊乱；卵巢指数下降；卵泡发育不良，排列顺序紊乱，见大量闭锁卵泡；GCs 出现大量凋亡；血清激素出现异常，FSH 水平明显上调，而 AMH 和 E_2 明显下降。说明成功复制了 POF 模型。

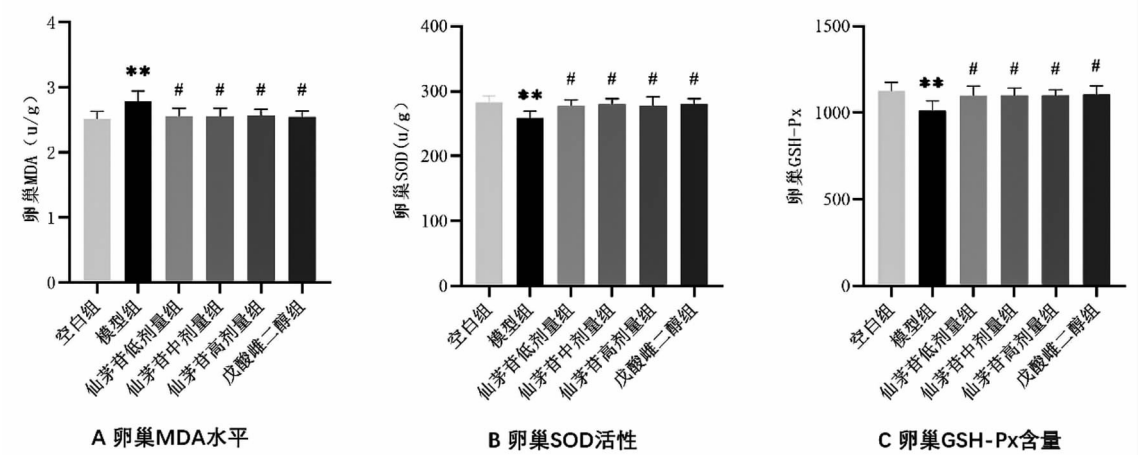
GCs 分泌 AMH 与 E_2 两种激素，对卵巢功能具有重要的调控作用。AMH 对卵巢储备起到重要作用[20]。AMH 是临床评价卵巢衰老的金指标，可以抑制原始卵泡的激活，并预测卵巢中剩余卵泡的数量[21]。E_2 可以抑制 FSH 分泌，FSH 水平升高可加速卵泡的补充，使卵泡池耗竭[22]。本研究显示 CUR 及戊酸雌二醇给药后，激素水平会有所改善，AMH 和 E_2 出现明显下降，FSH 水平明显上调。AMH 水平下调说明卵巢储备功能下降，GCs 分泌 E_2 的减少，使得 FSH 的抑制作用减少，FSH 出现明显上调，加速卵泡池的耗竭，导致 POF。

化疗药物不仅仅导致小鼠各阶段卵泡数量明显减少，而且影响卵泡发育成熟[19]。有研究表明，在 POF 患者的卵巢中卵泡闭锁加速，导致正常卵泡数量少而闭锁卵泡数量较多，破坏原始卵泡以及发育中的卵泡，表明 POF 患者在卵泡的发育成熟方面存在缺陷[23]。GCs 是调节卵泡发育和功能的关键辅助



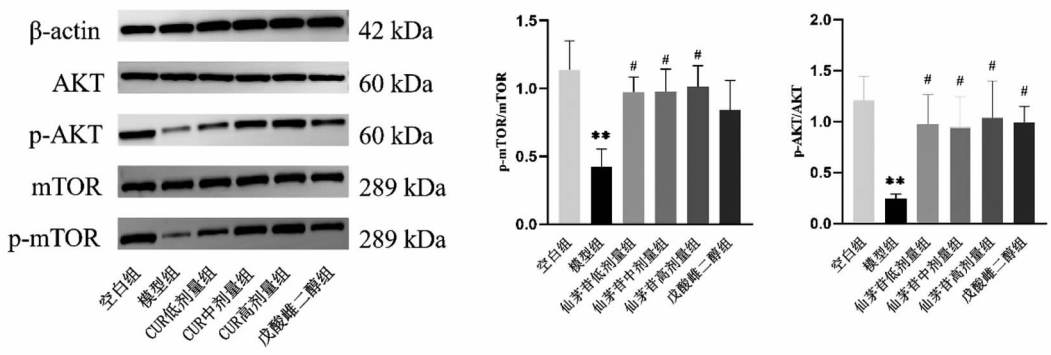
注：**与空白组比较，$P < 0.01$；#与模型组比较，$P < 0.05$。

图 9 各组小鼠血清 AMH、FSH、E_2 比较



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

图 10 各组小鼠 MDA 水平、SOD 以及 GSH - Px 活性比较



注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

图 11 各组小鼠卵巢组织 p－AKT/AKT、p－mTOR/mTOR 的蛋白表达

表 7 各组小鼠卵巢组织 p－AKT/AKT、p－mTO/mTOR 的蛋白表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	p－AKT/AKT	p－mTOR/mTOR
空白组	6	1.207 ± 0.235 5	1.137 ± 0.215 9
模型组	6	0.242 ± 0.047 2＊＊	0.421 ± 0.133 7＊＊
仙茅苷低剂量组	6	0.978 ± 0.288 7#	0.973 ± 0.111 2#
仙茅苷中剂量组	6	0.946 ± 0.299 2#	0.980 ± 0.163 3#
仙茅苷高剂量组	6	1.038 ± 0.360 7#	1.014 ± 0.154 1#
戊酸雌二醇组	6	0.991 ± 0.157 0#	0.844 ± 0.215 3

注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

细胞[24]，作为卵巢的基本功能单位，在病理状态下起到重要的调节作用[25]。有研究表明 POF 患者的卵泡发育异常主要是由 GCs 的凋亡引起的[26]，GCs 的异常凋亡可导致 POF[27]。CTX 导致发育中卵泡的 GCs 发生凋亡，随后休眠的卵泡会替代补充，最终导致原始卵泡池过早耗尽[28]。有实验数据支持，POF 模型组 GCs 的凋亡水平明显高于空白组[29]。当 10% 的 GCs 发生凋亡时，卵泡发生闭锁[30]。我们通过 TUNEL 观察 GCs 的凋亡状态，发现 POF 模型组 GCs 出现大量凋亡，给予 CUR 与戊酸雌二醇干预之后在一定程度上抑制了 GCs 的凋亡。

有研究提示 OS 可能是 POF 的潜在病因[28]。CTX 建造 POF 模型[31]、半乳糖建造 POF 模型[32]以及老年性的 POF 模型[33]都会出现 OS 系统的异常，造成 POF。OS 被认为是导致 GCs 凋亡的主要原因[34]。在卵泡发育过程中，高水平 OS 会增加 GCs 和基质细胞的凋亡，影响卵母细胞发育以及成熟，而且会损害卵母细胞线粒体的功能，直接抑制卵母细胞的成熟，抗氧化治疗可改善 OS 和 mtDNA 损伤[35]。已有研究报道 OS 可使卵泡和卵母细胞数量减少[36]。MDA 反映了脂质过氧化的程度，间接代表了细胞损伤的程度[37]。SOD 和 GSH－Px 是关键的抗氧化分子，它们通过清除 ROS 和脂质过氧化物来保护卵巢免受 OS 带来的损伤[38]。本研究结果显示模型组小鼠卵巢 MDA 水平显著增加，SOD 及 GSH－Px 活性显著下降，给予 CUR 干预之后抗氧化能力增强，MDA 水平下降，反映了卵巢受 OS 损伤的程度，也是给予 CUR 治疗后恢复的标志。本研究发现 CUR 发挥抗氧化作用，能够通过降低 OS 程度和恢复卵巢正常的抗氧化酶水平，防治 CTX 诱导的卵巢 OS 所带来的损伤。

研究表明，中药能够激活 AKT/mTOR 通路，给予中药干预后大鼠卵巢内成熟卵泡数量增多，闭锁卵泡数量减少，卵巢指数增加，血清激素水平得到改善[39]。AKT 又称蛋白激酶 B，是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，mTOR 位于 AKT 的下游。AKT 活化后可直接磷酸化 mTOR，使其激活，mTOR 被激活后可调控细胞的生长和增殖[40]。使用 AKT 激活剂和 mTOR 激活剂对卵泡的生长有促进作用，表明 AKT/mTOR 通路的激活可以促进卵泡的发育成熟[41]。本研究发现给予 CUR 干预后，AKT/mTOR 通路被激活，可能是改善 POF 的潜在机制之一。

综上所述，CUR 可以改善 POF 小鼠的动情周期、血清激素水平、减少 GCs 凋亡、促进卵泡发育，从而改善 POF，恢复卵巢储备功能，其作用机制可能与活化 Akt/mTOR 信号通路发挥抗氧化作用缓解 POF 模型小鼠的 GCs 凋亡有关。

参考文献

[1] ZHOU Y, ZHOU J H, XU X, et al. Matrigel/umbilical cord－derived mesenchymal stem cells promote granulosa cell proliferation and ovarian vascularization in a mouse model of premature ovarian failure [J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(15): 782－796.

[2] LIN J, WU D H, JIA LY, et al. The treatment of complementary and alternative medicine on premature ovarian failure [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6677767.

[3] CRACIUNAS L, ZDOUKOPOULOS N, VINAYAGAM S, et al. Hormone therapy for uterine and endometrial development in women with premature ovarian insufficiency [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2022, 10(10): CD008209.

[4] CHON S J, UMAIR Z, YOON M S. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 672890.

[5] 张晓静，冶尕西，季德江，等. 近 5 年卵巢早衰的发病机制及中西医治疗进展[J]. 实用中医内科杂志，2022，36(12)：79－82.

[6] FU Y X, JI J, SHAN F, et al. Human mesenchymal stem cell treatment of premature ovarian failure: new challenges and opportunities [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 161.

[7] HUANG Q Y, CHEN S R, CHEN J M, et al. Therapeutic options for premature ovarian insufficiency: an updated review [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 28.

[8] UMER A, KHAN N, GREENE D L, et al. The therapeutic potential of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells for the treatment of premature ovarian failure [J]. Stem Cell Rev Rep, 2023, 19(3): 651－666.

[9] ZUO A X, SHEN Y, JIANG Z Y, et al. Three new phenolic glycosides from Curculigo orchioides G [J]. Fitoterapia, 2010, 81(7):

910 - 913.
[10] LIAN W S, WU R W, CHEN Y S, et al. microRNA - 29a mitigates osteoblast senescence and counteracts bone loss through oxidation resistance - 1 control of FoxO3 methylation[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(8): 1248.
[11] HOMER H A. Understanding oocyte ageing: can we influence the process as clinicians? [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2021, 33(3): 218 - 224.
[12] WANG T, LIU K W, WEN L Z, et al. Autophagy and gastrointestinal diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 529 - 556.
[13] 马晓飞, 焦彦如, 张俊杰. 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠炎症反应、氧化应激和PI3K/Akt信号通路的影响[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(1): 29 - 36.
[14] LI F, HUANG H, ZHAO P, et al. Curculigoside mitigates dextran sulfate sodium - induced colitis by activation of KEAP1 - NRF2 interaction to inhibit oxidative damage and autophagy of intestinal epithelium barrier[J]. Int J Mol Med, 2023, 52(5): 107.
[15] LIU X, SONG Y F, ZHOU F R, et al. Network and experimental pharmacology on mechanism of Si - Wu - Tang improving ovarian function in a mouse model of premature ovarian failure induced by cyclophosphamide[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115842.
[16] BUNNEWELL S J, HONESS E R, KARIA A M, et al. Diminished ovarian reserve in recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta - analysis[J]. Fertil Steril, 2020, 113(4): 818 - 827.
[17] IQUBAL A, IQUBAL M K, SHARMA S, et al. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide - induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision[J]. Life Sci, 2019, 218: 112 - 131.
[18] QIN X S, ZHAO Y, ZHANG T Y, et al. TrkB agonist antibody ameliorates fertility deficits in aged and cyclophosphamide - induced premature ovarian failure model mice[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 914.
[19] ZHANG S H, LIU Q, CHANG M Y, et al. Chemotherapy impairs ovarian function through excessive ROS - induced ferroptosis[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(5): 340.
[20] CEDARS M I. Evaluation of female fertility - AMH and ovarian reserve testing[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(6): 1510 - 1519.
[21] BOUSFIELD G R, HARVEY D J. Follicle - stimulating hormone glycobiology[J]. Endocrinology, 2019, 160(6): 1515 - 1535.
[22] LIU R X, ZHANG X Y, FAN Z H, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 299.
[23] MCGLACKEN - BYRNE S M, CONWAY G S. Premature ovarian insufficiency[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2022, 81: 98 - 110.
[24] WANG J Q, CHU K, WANG Y H, et al. Procr - expressing granulosa cells are highly proliferative and are important for follicle development[J]. iScience, 2021, 24(2): 102065.
[25] WANG S Q, LIN S J, ZHU M M, et al. Acupuncture reduces apoptosis of granulosa cells in rats with premature ovarian failure via restoring the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6311.
[26] LUO X L, LIU W X, ZHAO M J, et al. The evaluation of sea cucumber (Acaudina leucoprocta) peptide on sex hormone regulation in normal and premature ovarian failure female mice[J]. Food Funct, 2023, 14(3): 1430 - 1445.
[27] GUO L, LIU X C, CHEN H, et al. Decrease in ovarian reserve through the inhibition of SIRT1 - mediated oxidative phosphorylation[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(5): 2335 - 2347.
[28] LI J H, LONG H, CONG Y Y, et al. Quercetin prevents primordial follicle loss via suppression of PI3K/Akt/Foxo3a pathway activation in cyclophosphamide - treated mice[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2021, 19(1): 63.
[29] PARK H S, CHUGH RM, EL ANDALOUSSI A, et al. Human BM - MSC secretome enhances human granulosa cell proliferation and steroidogenesis and restores ovarian function in primary ovarian insufficiency mouse model[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 4525.
[30] SEMBA R D, NICKLETT E J, FERRUCCI L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010, 65(9): 963 - 975.
[31] LIU J, YANG Y, HE Y S, et al. Erxian decoction alleviates cisplatin - induced premature ovarian failure in rats by reducing oxidation levels in ovarian granulosa cells[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 304: 116046.
[32] SHANG Z J, FAN M L, ZHANG J T, et al. Red ginseng improves D - galactose - induced premature ovarian failure in mice based on network pharmacology[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8210.
[33] LUTI S, FIASCHI T, MAGHERINI F, et al. Relationship between the metabolic and lipid profile in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization[J]. Mol Reprod Dev, 2020, 87(9): 986 - 997.
[34] AGARWAL A, SALEH R A, BEDAIWY M A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction[J]. Fertil Steril, 2003, 79(4): 829 - 843.
[35] MASUDUL HOQUE S A, UMEHARA T, KAWAI T, et al. Adverse effect of superoxide - induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 163: 344 - 355.
[36] WEI J H, YUAN X Y, ZHANG J M, et al. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 198: 22 - 26.
[37] ZIA A, FARKHONDEH T, POURBAGHER - SHAHRI A M, et al. The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111119.
[38] CAUSER A J, SHUTE J K, CUMMINGS M H, et al. Circulating biomarkers of antioxidant status and oxidative stress in people with cystic fibrosis: a systematic review and meta - analysis[J]. Redox Biol, 2020, 32: 101436.
[39] 肖贾丽珏, 李涵, 周锦宏, 等. 基于Akt/mTOR信号通路探讨养精种玉汤对卵巢早衰大鼠的作用[J]. 中成药, 2023, 45(5): 1476 - 1481.
[40] WEI X Y, LUO L F, CHEN J Z. Roles of mTOR signaling in tissue regeneration[J]. Cells, 2019, 8(9): 1075.
[41] CHENG Y, KIM J, LI X X, et al. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: synergistic effects of AKT stimulators[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117769.

基于 AKT/mTOR 信号通路探讨仙茅苷抗氧化缓解卵巢早衰模型小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的作用机制

（正文见 74－81 页）

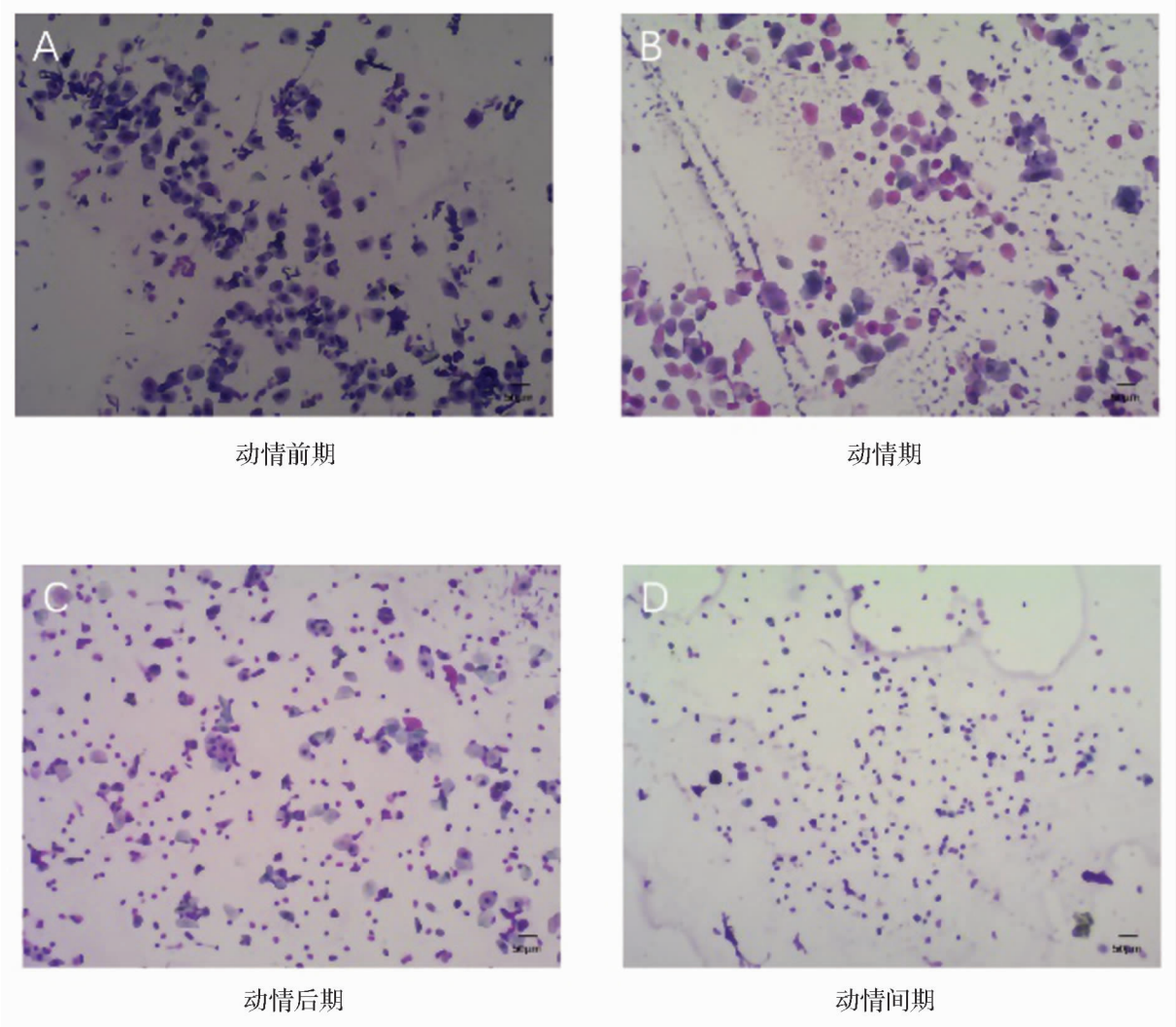


图 2　小鼠动情周期各时期阴道脱落细胞图（×40）

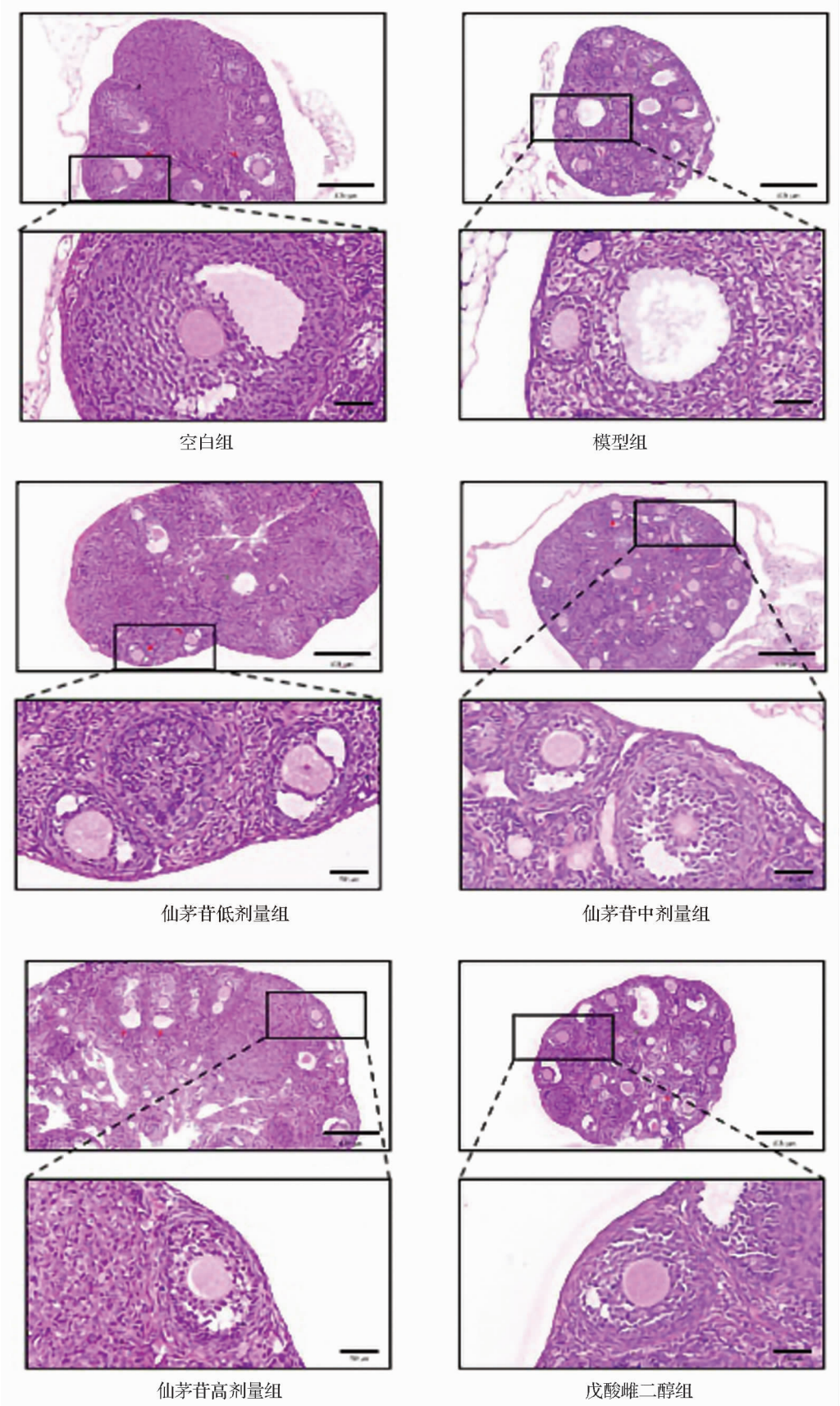


图 5　各组小鼠卵巢组织形态学变化(HE,低倍数 ×10,高倍数 ×40)

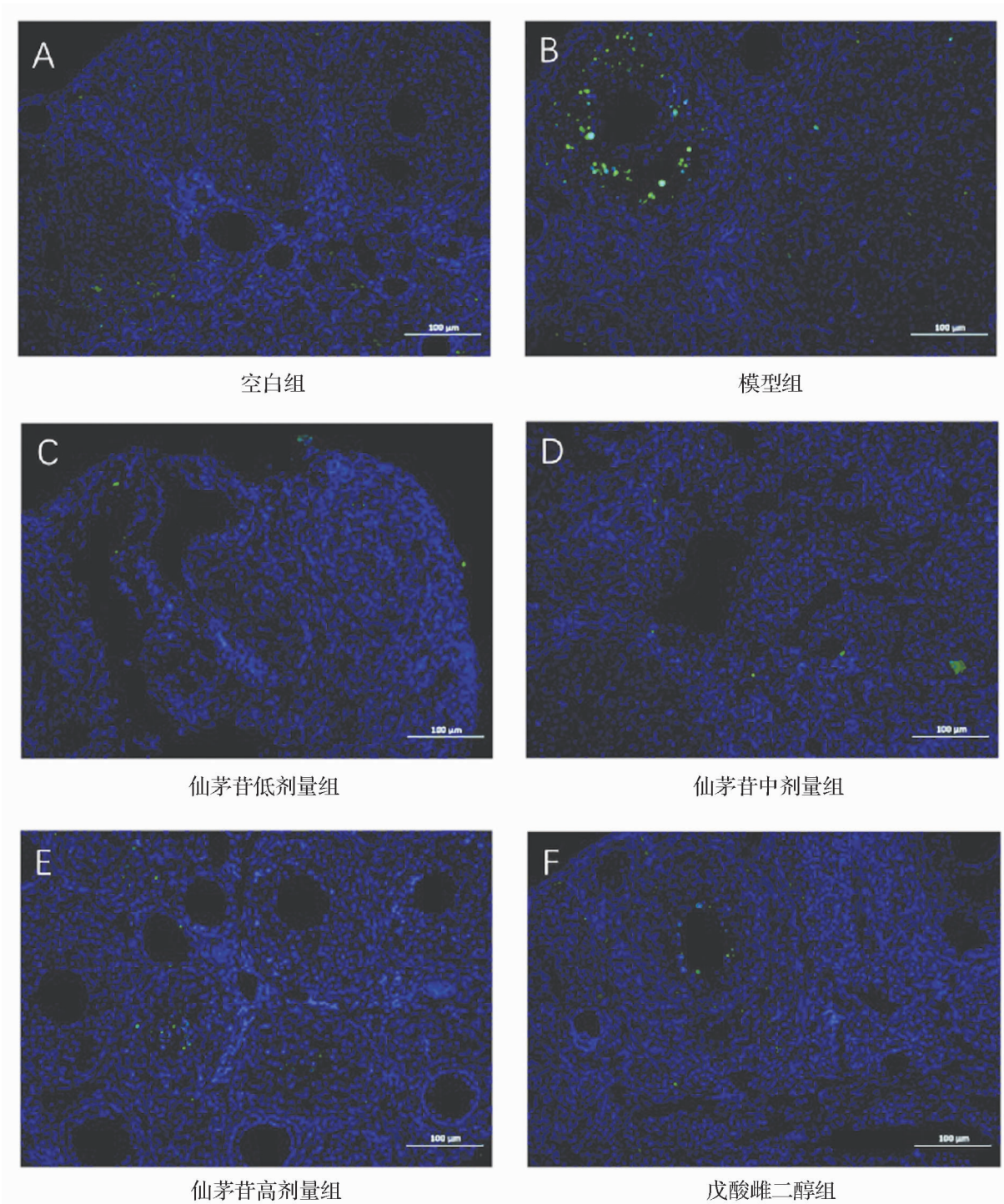


图 7 小鼠 GCs 凋亡的影响(tunel 染色, ×200)