

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-02-002

· 专家论坛 ·
· EXPERT FORUM ·

丹酚酸 B 促进卵巢早衰小鼠卵泡发育的研究^①

刘品月^②, 刘雨, 唐根云, 李明^③

(湖南医药学院基础医学院, 湖南怀化 418000)

专家简介 李明, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤机制、代谢疾病与生殖研究工作, 担任高等学校创新健康科普教育联盟理事, 湖南省干细胞临床研究学术委员会委员, *Frontiers in Endocrinology*, *Clinica Chimica Acta* 杂志审稿人。主持/参与国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金青年项目、湖南省自然科学基金面上项目 5 项。在 *Cell Death & Disease*, *BMC cancer*, *Acta Biochim Biophys Sin* 等国内外知名杂志发表 SCI 论文 20 余篇。



摘要 目的: 探究丹酚酸 B 对卵巢早衰模型小鼠卵泡发育的影响。方法: 选取 27 只 6 周龄雌性昆明小鼠, 按照随机数字表法分为对照组、模型组和实验组, 每组 9 只, 对每只小鼠均给药, 定期测量体重, 给药结束后收集小鼠血清和卵巢组织。ELISA 检测血清 E2、AMH 和 FSH 水平; HE 染色观察卵巢窦状卵泡; 免疫组化检测颗粒细胞 PCNA 的表达; TUNEL 检测卵巢颗粒细胞凋亡情况; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 测定卵巢组织中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达和其蛋白表达情况。结果: 模型组小鼠体重明显低于对照组和实验组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组血清 E2 和 AMH 水平升高且 FSH 水平降低, 窦状卵泡数量增多, 颗粒细胞中 PCNA 与 Bcl-2 表达增加, 同时 Bax 表达减少, 凋亡细胞数量减少 ($P < 0.05$)。结论: 丹酚酸 B 能抑制卵巢早衰小鼠颗粒细胞凋亡, 促进卵泡发育。

关键词: 卵巢早衰; 丹酚酸 B; 颗粒细胞; 卵泡发育

中图分类号: R711.75

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)02-0010-08

Salvianolic acid B promotes follicular development in mice with premature ovarian failure^①

LIU Pinyue^②, LIU Yu, TANG Genyun, LI Ming^③

(School of Basic Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of salvianolic acid B on follicular development in premature ovarian failure mice. Methods: 27 six-week-old female Kunming mice were divided into the control group

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(81703821); 湖南省教育厅科学研究项目(18C1146)。

② 第一作者简介: 刘品月, 硕士, 讲师, 研究方向为生殖异常。

③ 通信作者: 李明, E-mail: liming8311@163.com。

by the table of random number, model group and experimental group, each with nine mice. Each mouse was given the drug, weight was measured at regular intervals, and serum and ovarian tissue were collected after administration. Serum E2, AMH and FSH levels were detected by ELISA; HE staining was used to observe ovarian sinusoidal follicles; the expression of PCNA in granulosa cells was detected by immunohistochemistry; ovarian granulosa cell apoptosis was detected by TUNEL; the mRNA expressions of Bcl-2 and Bax, and their protein expressions were determined by PCR and Western blot. Results: The body weight of mice in the model group was significantly lower than that in control group and experimental group ($P < 0.05$); compared with the model group, serum E2 and AMH were increased and FSH levels were decreased in experimental group, and the number of sinus follicles was increased, the expressions of PCNA and Bcl-2 in granulosa cells were increased, and the apoptosis of granulosa cells was decreased, the expression of Bax was decreased at the same time ($P < 0.05$). Conclusion: Salvianolic acid B can inhibit granulosa cell apoptosis and promote follicle development in premature ovarian failure mice.

Keywords: premature ovarian failure; salvianolic acid B; granulosa cells; follicular development

随着我国社会老龄化进程的加快和国家生育政策的改革,生育问题受到广泛关注,同时也促进了生殖健康相关研究的发展。卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指女性 40 岁之前因卵泡耗尽或停止发育所致卵巢功能减退的疾病状态,其发病率逐年增高且日益年轻化,成为危害女性生育能力的因素之一^[1-2]。POF 常表现为原发性或继发性闭经伴随促性腺激素升高和雌激素水平降低,并伴有不同程度的围绝经期综合征、骨质疏松、心血管疾病、自身免疫力下降甚至自杀倾向等^[3-4]。有大量研究表明,卵巢早衰的发生与卵泡中颗粒细胞的异常凋亡密切相关^[5-7]。卵泡中的颗粒细胞给卵母细胞提供营养支持,并对排卵和黄体功能有重要的调节作用。颗粒细胞可合成分泌大量雌二醇 (estradiol, E2)、孕激素 (progesterone, P), 并分泌在卵泡早期发育过程中起重要作用的抗苗勒管激素 (anti-mullerian hormone, AMH)。E2、P 及 AMH 通过负反馈调节参与卵泡发育^[8]。因此,颗粒细胞的数量和功能对卵泡发育和卵巢功能维持至关重要。研究发现活性氧是卵泡闭锁的促发因素之一,而抗氧化剂能显著地抑制颗粒细胞凋亡和卵泡闭锁^[9]。丹酚酸类化合物是丹参中的有效成分,其中含量最高的水溶性成分丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 具有很强的抗氧化、清除自由基的作用^[10],但 Sal B 对卵巢早衰的作用尚未见报道。本研究通过 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 构建卵巢早衰模型小鼠,使用 Sal B 进行预防

性干预,发现 Sal B 对卵巢早衰小鼠卵泡颗粒细胞的凋亡有抑制作用,提示 Sal B 可能通过抑制颗粒细胞的凋亡来维持卵泡发育,缓解卵巢早衰。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 27 只 6 周龄雌性昆明小鼠 (购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司), 实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0004。所有小鼠在动物实验中心饲养, 正常进食饮水, 室温 20 ~ 23 °C、湿度 50% ~ 65%, 昼夜交替光照。本研究通过湖南医药学院动物伦理委员会审批, 实验动物伦理批号: 湖医伦审 2022 (A01011) 号。

1.1.2 药物与主要试剂 丹酚酸 B (购自上海源叶生物科技有限公司); D-半乳糖 (购自上海麦克林生化科技有限公司); E2、FSH、AMH、ELISA 试剂盒 (购自上海酶联生物科技有限公司); TUNEL 试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司); PCNA 兔单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司); HRP-羊抗兔 IgG 二抗试剂盒 (购自武汉博士德生物工程有限公司); 组织细胞 RNA 提取试剂盒 [购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; All-One RT Master Mix 试剂盒 (购自镇江爱必梦生物科技有限公司); Sybr Green qPCR Master Mix 试剂盒 (购自上海星汉生物科技有限公司); Bcl-2 兔多克隆抗体、Bax 兔单克隆抗体、GAPDH 兔多克隆抗体 (购自武汉博士德生物

工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及处理 27只6周龄雌性昆明小鼠适应性喂养1周后,按照随机数字表法分为:A对照组(9只)、B模型组(9只)、C实验组(9只)。对照组连续颈背部皮下注射0.9%氯化钠水溶液42d,于第15天开始,每天同时腹腔注射等量0.9%氯化钠水溶液;模型组、实验组连续颈背部皮下注射D-gal溶液($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)42d,第15天开始模型组每天同时腹腔注射等体积的0.9%氯化钠水溶液,实验组每天同时腹腔注射等体积Sal B溶液($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)至42d止。给药结束后所有动物经戊巴比妥钠麻醉后取血,待血液凝固离心取血清冻存,处死后收集卵巢组织,一侧用4%多聚甲醛固定,另外一侧冻存。

1.2.2 ELISA法检测小鼠激素水平 ELISA试剂盒室温平衡30min。取血清样本置于冰上溶解。设置空白、标准、待检样品3个孔进行加样,所有操作严格按照说明书进行,滴加终止液后15min内在酶标仪450nm处检测各孔OD值,根据标准品OD值及浓度绘制标准曲线,计算出各样本浓度。

1.2.3 小鼠卵巢组织石蜡切片制备及HE染色 将4%多聚甲醛固定后的卵巢水洗,梯度酒精脱水后二甲苯透明,浸蜡,包埋,制成卵巢石蜡组织块。切片机切成厚度为5 μm 的石蜡切片,常规HE染色,封片。光学显微镜下观察卵巢组织和窦状卵泡并摄取图像。

1.2.4 免疫组织化学染色检测颗粒细胞增殖细胞核抗原(PCNA)表达 取卵巢石蜡组织切片常规二甲苯及梯度酒精脱蜡复水,PBS水洗3次,5min/次。抗原修复(98 $^{\circ}\text{C}$ 枸橼酸钠抗原修复液处理10min),冷却至室温,10%山羊血清室温封闭10min。滴加一抗(1:100)置于湿盒中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,取出恢复至室温,PBS水洗3次,5min/次。滴加辣根酶标记二抗,然后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min,PBS水洗3次,5min/次。滴加DAB显色剂显微镜下控制显色时间,流水冲洗后苏木精复染,脱水封片,干燥后于光学显微镜下观察并摄取图像。

1.2.5 TUNEL法检测颗粒细胞凋亡情况 取卵巢石蜡组织切片常规二甲苯及梯度酒精脱蜡复水,滴加20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不含DNase的蛋白酶K,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用15min,

PBS水洗3次,5min/次。配制TUNEL检测液,向卵巢组织中滴加50 μl 检测液置于湿盒中,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1h,加入终止液,37 $^{\circ}\text{C}$ 终止30min,PBS水洗3次,5min/次,滴加新鲜配制的DAB溶液室温显色,蒸馏水洗3次,5min/次,苏木精复染1min,流水冲洗,干燥后封片,于光学显微镜下观察并摄取图像。

1.2.6 qPCR检测卵巢组织中Bax和Bcl-2 mRNA的表达 将卵巢组织剪碎加1ml Trizol(R1200-100),置于预冷的匀浆器中研磨溶解细胞,按照组织细胞RNA提取试剂盒说明提取卵巢组织总RNA。用Nano Drop 2000分光光度计测定总RNA的浓度。取出100ng RNA,使用All-One RT Master Mix试剂盒将总RNA逆转为cDNA。最后,采用Sybr Green qPCR Master Mix试剂盒按照说明书,使用特定的引物(5'-3')(Bax:正义引物:CATGTTTTCTGACGGCAACTT,反义引物:CCAGATCACGCCATTTCA;Bcl-2:正义引物:AAGAGCAGACGGATGGAAAAAGG,反义引物:GGGCAAAGA AATGCAAGTGAATG;GAPDH:正义引物:GACCTGACCTGCCGTCTAG,反义引物:AGGAGTGGGTGTCCCTGT)在qPCR仪上测定Bax、Bcl-2 mRNA水平。反应体系如下:10nm的正义、反义引物各0.2 μl ,50ng cDNA,10 μl qPCR Master Mix(2 \times),最后无菌水定容至20 μl 。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火20s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20s,反应40个周期。以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算Bax和Bcl-2 mRNA相对表达量。

1.2.7 Western blot法检测Bax和Bcl-2蛋白的表达 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的卵巢组织加裂解液经超声波破碎仪破碎,充分裂解后提取总蛋白,离心,取上清液用BCA蛋白定量试剂盒定量。10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,经转膜、封闭后,滴加Bcl-2一抗(1:1000)、Bax一抗(1:1000)和GAPDH一抗(1:5000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用PBST洗涤3次,10min/次。加入对应的二抗(1:10000)室温孵育1h。再用PBST洗涤3次,10min/次,用BCL发光底物后使用凝胶成像仪显影,通过Image J软件统计条带灰度值。

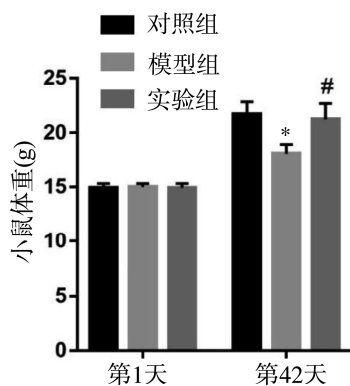
1.3 统计学方法

采用SPSS 26.0统计软件分析数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;多组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重变化

小鼠体重变化是反映其一般情况的指标之一。实验第 1 天,3 组小鼠体重比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);第 42 天时,模型组小鼠体重明显低于对照组 ($P<0.05$),显示 D-gal 能抑制小鼠体重的增长;同时发现实验组小鼠体重高于模型组 ($P<0.05$),说明 Sal B 能缓解 D-gal 抑制的小鼠体重增长情况,见图 1。



与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$

图 1 3 组小鼠第 1 天、第 42 天体重情况

2.2 小鼠血清 E2、FSH、AMH 水平

血清 E2 水平能在一定程度上反映颗粒细胞的功能。AMH 水平是评价卵巢储备功能的临床指标

之一。ELISA 检测结果表明:与对照组比较,模型组小鼠血清 E2 和 AMH 水平降低,FSH 水平升高 ($P<0.05$);与模型组比较,实验组小鼠血清 E2 和 AMH 水平升高,FSH 水平降低 ($P<0.05$),见表 1。此结果说明 D-gal 使得小鼠卵巢功能下降,Sal B 可改善小鼠卵巢功能。

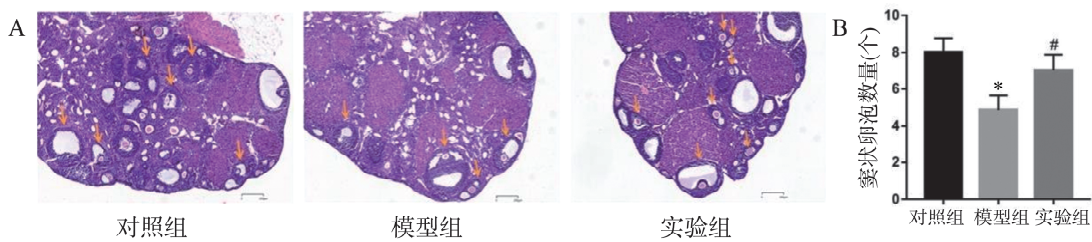
表 1 3 组小鼠血清激素水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	E2 (pmol/L)	FSH (pg/ml)	AMH (mIU/ml)
对照组	108.67±3.50	4.82±0.95	51.52±6.28
模型组	67.88±5.77*	8.18±1.53*	27.04±3.39*
实验组	87.62±5.73#	6.45±1.33#	68.41±7.9#

与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$

2.3 小鼠卵巢形态及窦状卵泡数量变化

为了观察各组小鼠卵巢组织结构和窦状卵泡数量,将卵巢组织切片进行 HE 染色。结果显示:对照组可见多个不同发育阶段的卵泡,窦状卵泡数量较多,卵泡中颗粒细胞规则排列;模型组卵巢内窦状卵泡数量明显减少;实验组也可见大量的窦状卵泡,见图 2。此结果表明,经 D-gal 诱导的模型小鼠中卵泡发育异常,经 Sal B 的预防性干预可维持卵泡的正常发育。



A. 卵巢 HE 染色图,橙色箭头所示为窦状卵泡;B. 卵巢窦状卵泡统计图。与对照组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, # $P<0.05$

图 2 3 组小鼠卵巢形态及窦状卵泡数量

2.4 颗粒细胞中增殖相关蛋白 PCNA 表达情况

对照组卵泡内可见大量的棕黑色颗粒细胞,模型组窦状卵泡中阳性颗粒细胞明显减少,实验组卵

泡中阳性颗粒细胞数量则比模型组有明显增多,见图 3。由此可见,D-gal 能抑制卵泡内颗粒细胞增殖,而 Sal B 能改善 D-gal 抑制颗粒细胞增殖的情况。

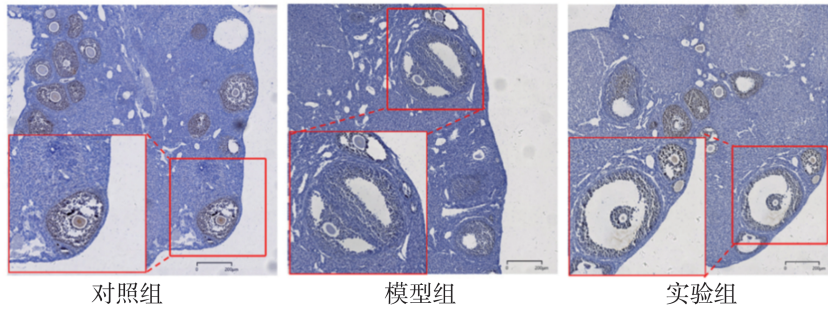


图 3 3 组小鼠卵巢内颗粒细胞增殖相关蛋白 PCNA 表达情况

2.5 颗粒细胞凋亡情况

通过 TUNEL 法检测各组卵巢颗粒细胞的凋亡情况,结果发现:对照组窦状卵泡中可见少量棕褐色的颗粒细胞,模型组中的窦状卵泡内存在着大量的

棕褐色颗粒细胞,实验组窦状卵泡内棕褐色颗粒细胞数量明显减少,见图 4。这些结果说明,D-gal 会导致卵泡内颗粒细胞大量凋亡,而 Sal B 能明显抑制 D-gal 诱导的颗粒细胞凋亡。

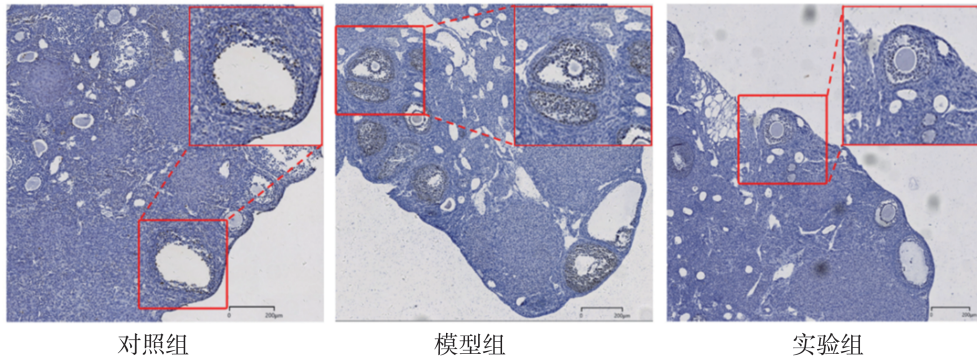
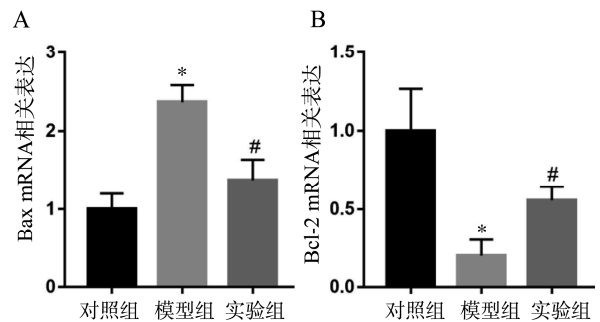


图 4 3 组小鼠卵巢内颗粒细胞凋亡情况

2.6 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达情况

3 组小鼠卵巢组织 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平见图 5。模型组中 Bax mRNA 的表达明显高于对照组和实验组,见图 5A;而与对照组和实验组比较,模型组中的 Bcl-2 mRNA 的表达明显下降,见图 5B。这些结果表明 D-gal 能上调 Bax mRNA 的表达,同时下调 Bcl-2 mRNA 的表达,Sal B 能有效抑制 D-gal 引起的 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达变化。



A. 卵巢组织中 Bax mRNA 表达水平统计图;B. 卵巢组织中 Bcl-2 mRNA 表达水平统计图。与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

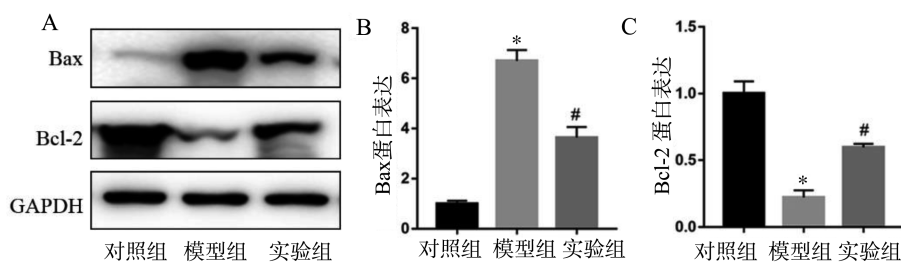
图 5 3 组小鼠卵巢组织 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达水平

2.7 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况

Western blot 检测结果表明:与对照组比较,模型组卵巢组织 Bcl-2 蛋白表达显著减少,Bax 蛋白表达增加($P < 0.05$);与模型组比较,实验组 Bcl-2 蛋白表

达增加,Bax 表达减少($P<0.05$),见图 6。以上结果进一步提示,Sal B 能有效抑制 D-gal 诱导的颗粒细

胞凋亡发生。



A. 卵巢组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达图;B. 卵巢组织中 Bax 蛋白统计分析图;C. 卵巢组织中 Bcl-2 蛋白统计分析图。与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

图 6 3 组小鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白表达情况

3 讨论

POF 常导致低雌激素状态及生育能力下降。POF 和半乳糖血症有关,半乳糖血症是由于 1-磷酸半乳糖尿苷转移酶缺乏导致。因此,可以利用 D-gal 建立 POF 模型,且此模型的表现同其他非遗传原因引起的 POF 表现较为一致,可以为 POF 病理研究动物模型奠定基础^[11-14]。

POF 的治疗方法很多,如激素替代治疗、免疫疗法、卵巢移植、干细胞治疗、基因治疗等,但这些治疗方法都有一定的依赖性或副作用。丹参作为一种古老的中药材,其临床应用历史可追溯到 2 000 多年前^[15]。药典记载丹参的主要功效为祛瘀止痛、活血通经、补血益气等。现代研究认为丹参具有抗氧化、改善微循环等作用。丹参在临床上也常用于治疗女性生殖系统疾病,如月经不调、多囊卵巢综合征等^[16]。在治疗卵巢早衰的中医药方中,丹参也是必不可少的中药材^[17-18]。丹酚酸类化合物是丹参中的主要有效成分。含量最高的水溶性成分 Sal B 具有很强的抗氧化作用。Sal B 的抗氧化作用主要表现为:①丹酚酸 B 比维生素 E 作用强数百倍,是当今发现的抗氧化活性最强的天然产物之一。②清除羟自由基的作用。③清除超氧阴离子的作用^[19]。因此,本研究采用 D-gal 成功构建 POF 小鼠模型,对实验组使用 Sal B 腹腔注射进行预防性给药。本研究结果显示,实验组中的小鼠激素水平得到改善,窦状卵泡明显增加,卵泡中颗粒细胞凋亡情况也有明显改

善,提示 Sal B 可能通过抑制颗粒细胞凋亡维持卵泡发育,进而改善 D-gal 诱导的 POF。

通常情况下,卵巢功能的衰竭时间主要取决于卵巢内卵泡的数目与卵泡闭锁速度,卵泡消耗过快,卵巢将过早进入衰竭状态^[20]。颗粒细胞为卵母细胞的成熟提供营养支持和重要的信号转导,所以颗粒细胞的状态对卵泡的发育和卵巢功能的维持具有重要作用。在一定条件下,颗粒细胞的凋亡可以直接或间接地使得卵泡停止发育出现闭锁,进而导致卵巢早衰^[21-23]。这可能是由于颗粒细胞受垂体释放的促性腺激素(FSH、LH)的刺激分泌 E2、P 和 AMH 来调节卵泡发育^[24]。AMH 是现在临床上广泛用于检测卵巢储备功能的重要指标^[25]。POF 患者常表现为血清 FSH 水平升高,E2、P 和 AMH 水平降低伴卵泡发育不成熟^[26]。本研究结果显示,模型组小鼠血清 E2 和 AMH 水平明显低于对照组,实验组的 E2 和 AMH 水平高于模型组,FSH 呈现相反的变化。以上结果与 HE 染色显示的窦状卵泡数量相对应。

另外,使用 PCNA 免疫组化和 TUNEL 法分析各组卵巢卵泡中颗粒细胞增殖和凋亡情况也可以发现,在 POF 小鼠卵巢中,窦状卵泡内 PCNA 阳性颗粒细胞较少,TUNEL 阳性颗粒细胞明显增加。这部分结果也证实了颗粒细胞增殖、凋亡改变与 POF 发生的关系。但经 Sal B 干预后的 POF 小鼠窦状卵泡数量明显增加,与模型组比较,PCNA 阳性细胞明显增加而 TUNEL 阳性颗粒细胞减少,说明 Sal B 可抑制

颗粒细胞凋亡。在颗粒细胞凋亡的过程中, Bcl-2 基因具有促进颗粒细胞生存的作用, Bax 基因是 Bcl-2 基因家族中的一员, 但其可诱导颗粒细胞的凋亡。Bcl-2 和 Bax 通过形成同/异源二聚体的形式参与凋亡过程, 两者具有拮抗作用^[27-28]。qPCR 和 Western blot 结果显示, 模型组 Bcl-2 表达明显降低, 同时 Bax 表达显著升高, 而实验组较模型组 Bcl-2 表达增高, Bax 表达明显降低, 说明 Sal B 的预防性给药可抑制颗粒细胞的凋亡, 促进卵泡的发育。

综上所述, 可以推测出 Sal B 可抑制卵泡中颗粒细胞的凋亡, 从而维持卵泡的发育和改善卵巢功能, 缓解 POF 发展进程, 这将为 Sal B 用于治疗 POF 提供理论依据。

参考文献:

- [1] LIU X H, CAI S Z, ZHOU Y, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates premature ovarian failure of D-gal induced POF mice through downregulating p16INK4a and upregulating SIRT1 expression[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022, 22(3): 318-327.
- [2] 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.
- [3] GHAREMANI-NASAB M, GHANBARI E, JAHANBANI Y, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4217-4226.
- [4] TAKAHASHI A, YOUSIF A, HONG L, et al. Premature ovarian insufficiency: pathogenesis and therapeutic potential of mesenchymal stem cell[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 99(5): 637-650.
- [5] ROSSETTI F, RIZZOLIO F, PRAMPARO T, et al. A susceptibility gene for premature ovarian failure(POF) maps to proximal Xq28[J]. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12(10): 829-834.
- [6] EBRAHIMI M, AKBARI ASBAGH F. The role of autoimmunity in premature ovarian failure[J]. *Iran J Reprod Med*, 2015, 13(8): 461-472.
- [7] MASSIN N, MÉDUFU G, BACHELOT A, et al. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure[J]. *Mol Cell Endocr*, 2008, 282(12): 95-100.
- [8] ANDERSON R A, BREWSTER D H, WOOD R, et al. The impact of cancer on subsequent chance of pregnancy: a population-based analysis[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(7): 1281-1290.
- [9] SPRINGER L N, MCASEY M E, FLAWS J A, et al. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats[J]. *Toxicol Appl Pharmac*, 1996, 139(2): 394-401.
- [10] TANG Y B, WA Q D, PENG L Y, et al. Salvianolic acid B suppresses ER stress-induced NLRP3 inflammasome and pyroptosis via the AMPK/FoxO4 and syndecan-4/Rac1 signaling pathways in human endothelial progenitor cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 8332825.
- [11] LI Y K, QIU W, ZHANG Z, et al. Oral oyster polypeptides protect ovary against d-galactose-induced premature ovarian failure in C57BL/6 mice[J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100(1): 92-101.
- [12] 刘小虎, 赵志慧, 周玥, 等. PI3K/Akt/mTOR 自噬通路 在人参皂苷 Rg1 延缓 D-gal 诱导的卵巢早衰小鼠模型 卵巢早衰中的作用[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24): 6036-6042.
- [13] 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.
- [14] ROSTAMI DOVOM M, NOROOZZADEH M, MOSAFFA N, et al. Induced premature ovarian insufficiency by using D galactose and its effects on reproductive profiles in small laboratory animals: a systematic review [J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 96.
- [15] GUO Y B, LI Y, XUE L M, et al. Salvia miltiorrhiza: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporotic drugs [J]. *Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1401-1416.
- [16] LIAO W T, CHIANG J H, LI C J, et al. Investigation on the use of traditional Chinese medicine for polycystic ovary syndrome in a nationwide prescription database in Taiwan[J]. *J Clin Med*, 2018, 7(7): 197.
- [17] 刘丹, 姚海洋, 滕秀香. 国医大师柴松岩闭经经验案举隅[J]. *中国生育健康杂志*, 2020, 31(1): 60-63.
- [18] 李玲玲, 马素娟, 刘蔚霞. 补肾疏肝方联合人工周期治疗卵巢早衰肾虚肝郁证临床研究[J]. *中医学报*, 2018,

- 33(4):634-638.
- [19] 田影,何克江,朱靖博.丹酚酸B的体外抗氧化活性[J].大连工业大学学报,2008,27(4):304-308.
- [20] GU Y, XU Y. Successful spontaneous pregnancy and live birth in a woman with premenstrual ovarian insufficiency and 10 years of amenorrhea: a case report [J]. *Front Med*, 2020,7(11):18.
- [21] 刘鹏,李向臣,姚雅馨,等.卵巢颗粒细胞凋亡的调控因素[J].现代生物医学进展,2009,9(13):2562-2564.
- [22] LIU S Z, JIANG L G, ZHONG T, et al. Effect of acrylamide on oocyte nuclear maturation and cumulus cells apoptosis in mouse in vitro [J]. *PLoS One*, 2015,10(8):1-13.
- [23] NI Z X, LI Y S, SONG D, et al. Iron-overloaded follicular fluid increases the risk of endometriosis-related infertility by triggering granulosa cell ferroptosis and oocyte dysmaturity [J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(7):579.
- [24] 李娟,徐琳,高洋.卵巢早衰病因机制与治疗研究进展及现状[J].中国医药科学,2021,11(2):58-61.
- [25] KARAKAS S E. New biomarkers for diagnosis and management of polycystic ovary syndrome [J]. *Clin Chim Acta*, 2017,471:248-253.
- [26] GONG Z D, CHE T J, LAI L J, et al. FSH receptor binding inhibitor restrains follicular development and possibly attenuates carcinogenesis of ovarian cancer through down-regulating expression levels of FSHR and ER β in normal ovarian tissues [J]. *Gene*, 2018,668:174-181.
- [27] 张纯,徐晓娟,姚莉娟,等.改良多囊卵巢综合征大鼠模型卵泡颗粒细胞中凋亡调控蛋白 Bcl-2/ Bax 表达的研究 [J]. *四川中医*, 2016,34(6):34-37.
- [28] CAHYADI A, UGRASENA I D G, ANDARSINI M R, et al. Relationship between Bax and Bcl-2 protein expression and outcome of induction phase chemotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022,23(5):1679-1685.

[收稿日期:2022-11-16]

[责任编辑:杨建香 英文编辑:阳雨君]