

人参皂苷 Rg₁ 对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护作用及其分子机制

颜倩，石丹宁，杨佳迪，何悦双，赵丕文*（北京中医药大学生命科学学院，北京 102488）

摘要：目的 探究人参皂苷 Rg₁ 对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护作用及分子机制。方法 选取 22 ~ 24 d SD 的大鼠提取卵巢颗粒细胞进行原代培养，应用顺铂诱导建立卵巢早衰模型。设置正常组，模型组，人参皂苷 Rg₁ 低浓度组、中浓度组、高浓度组和雌二醇（E2）组。HE 染色及免疫细胞化学法进行颗粒细胞鉴定；CCK8 法检测人参皂苷 Rg₁ 作用 24 h、48 h 对顺铂损伤颗粒细胞的保护作用；Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡；Western blot 法检测 FSHR、PI3K、p-AKT、AKT、Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。结果 细胞形态观察和胞质 FSHR 表达检测结果均表明所提取细胞为卵巢颗粒细胞；顺铂处理 12 h 后，颗粒细胞增殖率呈剂量依赖性下降，而给予人参皂苷 Rg₁ 后，细胞增殖率下降被显著抑制，且呈剂量和时间依赖性；与模型组比较，人参皂苷 Rg₁ 和 E2 处理后卵巢颗粒细胞中 FSHR、PI3K、p-AKT/AKT 及 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平显著上升，而 PI3K 抑制剂干预后，Bcl-2 蛋白表达显著下降。结论 人参皂苷 Rg₁ 对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞具有保护作用，该保护作用可能通过激活 FSHR/PI3K/AKT 通路，抑制卵巢颗粒细胞凋亡实现。

关键词：人参皂苷 Rg₁；卵巢早衰；细胞凋亡；FSHR/PI3K/AKT；卵巢颗粒细胞

中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1028-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.011

Protective effect and molecular mechanism of ginsenoside Rg₁ on the senescence of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin

YAN Qian, SHI Dan-ning, YANG Jia-di, HE Yue-shuang, ZHAO Pi-wen* (School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the effect and molecular mechanism of ginsenoside Rg₁ on the senescence of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin. Methods Firstly, primary granulosa cells extracted from 22 — 24 d SD rats were cultured. Premature ovarian failure (POF) cell model induced by cisplatin was applied for the following experiments. Granulosa cells were divided into a normal group, a model group, ginsenoside Rg₁ low, medium, high concentration groups, and an estradiol (E2) group. The primary granulosa cells were identified by HE staining and immunocytochemistry. CCK8 assay was used to detect the protective effect of ginsenoside Rg₁ on the granulosa cells injured by cisplatin at 24 h and 48 h. The cell apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining. The protein expression of FSHR, PI3K, p-AKT, AKT, Bcl-2 and Bax were examined by Western blot. Results The expression of FSHR in the cytoplasm and cell morphology indicated that the extracted cells were granulosa cells. The proliferation rate of granulosa cells decreased in a dose-dependent manner after 12 h of cisplatin treatment, while the decrease in proliferation rate of granulosa cells was inhibited in a dose and time-dependent manner after ginsenoside Rg₁ treatment. Compared with the model group, the protein expression of FSHR, PI3K, p-AKT/AKT and Bcl-2/Bax in the ovarian granulosa cells increased significantly after ginsenoside Rg₁ and E2 treatment, while the protein expression of Bcl-2 decreased significantly after PI3K inhibitor intervention. Conclusion Ginsenoside Rg₁ can protect cisplatin-injured

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81673764）。

作者简介：颜倩，女，硕士研究生，主要从事常用妇科中药的药理机制研究，email: 1840888186@qq.com *通信作者：赵丕文，女，教授，博士研究生导师，主要从事常用妇科中药的药理机制研究，email: pwzhao@263.net

granulosa cells by activating FSHR/PI3K/AKT pathway and inhibiting the apoptosis of granulosa cells.

Key words: ginsenoside Rg₁; premature ovarian failure; cell apoptosis; FSHR/PI3K/AKT; ovarian granulosa cell

近年来,由于环境污染及生活、工作压力的日益增加,卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)及其导致的生殖功能障碍发生率明显上升,引起了大家的普遍关注^[1]。POF是指在女性40岁以前出现卵巢功能衰退的现象,其发病率约1%^[2]。临床特征表现为闭经,伴随高促卵泡激素(FSH)和低雌激素水平^[3]等。

目前POF的发病机制尚不完全明确。临幊上,对POF患者常采取的治疗方法是雌激素替代疗法^[4],虽然可明显缓解症状,但由于激素治疗所带来的致癌等不良反应及高复发率等问题,使患者对激素治疗的依从性普遍较低,在临幊应用中受到一定限制。因此,寻找具有疗效确凿且不良反应小的抗POF药物并揭示其分子机制具有重要的理论和临幊意义。有研究者发现,人参主要活性成分人参皂苷Rg₁能明显改善POF的症状和体征^[5],但其发挥作用的分子机制尚待阐明。近年来研究发现FSH受体(FSHR)可介导激活细胞内多条信号通路,如PI3K/AKT通路,影响生殖细胞的生长发育^[6]。PI3K/AKT通路与POF发病机制关系密切,通过激活该通路,可显著抑制细胞的增殖与凋亡^[7]。此外,本课题组前期研究中已利用顺铂体外诱导卵巢颗粒细胞损伤,成功建立了POF模型^[8]。因此,本研究利用该模型深入探讨人参皂苷Rg₁对FSHR/PI3K/AKT通路的调控作用,揭示人参皂苷Rg₁对卵巢颗粒细胞保护作用的可能分子机制,为人参皂苷Rg₁应用于POF临幊治疗提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物

健康雌性SD大鼠16只,22~24 d,体质量为(55±2)g(北京华阜康生物科技股份有限公司),饲养在温度为(25±3)℃,湿度50%~60%,光照12 h,实验前适应性喂养7 d。动物使用许可证: SYXK[京]2020-0033。

1.2 试药

人参皂苷Rg₁(源叶生物,批号:RSZD-121106,纯度≥98%),β-雌二醇(E2,批号:100182-201906,纯度:96.3%,中国食品药品检定研究院),顺铂(源叶生物,批号:B24462)。Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 50/50 Mix(DMEM/F12)(Cellgro公

司,货号:10-092-CVR),HE染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),BCA蛋白定量试剂盒、Hoechst33258试剂盒(北京索莱宝公司),抗体FSHR、PI3K、p-AKT、AKT、Bcl-2、Bax、β-actin、Coralite594-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody(美国Proteintech),LY294002(Abcam,美国ab146593)。

2 方法

2.1 体外原代卵巢颗粒细胞的提取与培养

SD大鼠适应性喂养结束后,每只注射孕马血清促性腺激素(PMSG)50 IU,48 h后,无菌环境下提取双侧卵巢颗粒细胞进行培养。操作步骤如下:①取SD雌鼠,经颈椎脱臼处死,于75%乙醇中消毒3 min;②将SD雌鼠放入消毒托盘中取出双侧卵巢,并加入适量预冷PBS;③将卵巢表面的脂肪,包膜等处理干净后,放入预冷PBS的消毒托盘中清洗;④将卵巢移入无血清培养基中,并用1 mL一次性注射器刺破卵巢边缘的卵泡,使卵巢颗粒细胞充分释放;⑤处理完毕后,将含有卵巢颗粒细胞的无血清培养基移入EP管,离心(半径8 cm,1000 r·min⁻¹)10 min;⑥弃上清液,加入适量的PBS冲散细胞,1000 r·min⁻¹离心5 min;⑦再次弃上清液,加入一定量的含10%胎牛血清DMEM/F12培养基,并吹打均匀;⑧调整细胞悬液浓度,以1×10⁵个/孔接种于96孔板,于37℃、5%CO₂培养基中培养,3 d后换一次培养基。观察细胞贴壁情况,待细胞生长至75%~80%时用于后续实验。

2.2 卵巢颗粒细胞鉴定

2.2.1 HE染色 将颗粒细胞接种于含爬片的24孔板,培养基体积为1 mL/孔,细胞数量1×10⁶个/孔,按照HE染色试剂盒说明书进行操作,具体步骤如下:①移除旧培养基,PBS洗涤3次,每次5 min;②在37℃下,用4%多聚甲醛先固定20 min,然后PBS洗涤3次,每次5 min;③苏木素染色2 min,自来水冲洗2 min;④盐酸乙醇分色2 s,快速取出并用自来水小心冲洗3 min;⑤醇溶性伊红染色2 min,自来水冲洗;⑥无水乙醇脱水,并用二甲苯透明化处理。封片后镜下观察细胞形态并拍照。

2.2.2 免疫细胞化学法 以1×10⁶个/孔的密度将颗粒细胞接种于含爬片的24孔板中,使用免

疫细胞化学法测定 FSHR 表达量。具体操作如下：①弃培养基后用 PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；②先用 4% 多聚甲醛于 37 ℃ 下固定 15 min，接着 PBS 洗涤 3 次，每次 3 min；③每孔加 0.5 mL 5% BSA 室温封闭 1 h 后弃掉；④每孔加 0.5 mL FSHR 一抗（1:250），4 ℃ 过夜，次日 PBS 洗涤 3 次，每次 10 min；⑤每孔加 0.5 mL 相对应的羊抗兔二抗（1:200），室温条件下，避光孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，每次 10 min；⑥将含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂滴加于载玻片上，盖上爬片，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.3 CCK8 法

2.3.1 实验分组 不同质量浓度人参皂苷 Rg₁（0~400 ng·mL⁻¹）处理颗粒细胞 24 h，用于研究人参皂苷 Rg₁ 对颗粒细胞的毒副作用，并根据结果选择人参皂苷 Rg₁ 低、中、高浓度。不同质量浓度顺铂（0~80 μg·mL⁻¹）处理颗粒细胞 12 h，用于建立 POF 模型，并选出最佳造模浓度。然后，将细胞分为正常组、模型组、人参皂苷 Rg₁ 低（顺铂+低浓度人参皂苷 Rg₁）、中（顺铂+中浓度人参皂苷 Rg₁）、高浓度组（顺铂+高浓度人参皂苷 Rg₁）和 E2 组（顺铂+β-雌二醇），并分别培养 24、48 h，用于研究人参皂苷 Rg₁ 对顺铂作用下颗粒细胞的影响，并根据实验结果选择最佳人参皂苷 Rg₁ 的浓度。

2.3.2 细胞活力检测 以 1×10^5 个/孔将颗粒细胞接种于 96 孔板，每组 5 个复孔，药物处理结束后，将含 10% CCK8 无血清 DMEM/F12 培养基加入每个孔中，100 μL/孔，并在 37 ℃ 下继续培养 2.5 h，于 450 nm 处检测吸光值。

2.4 Hoechst 33258 染色

按“2.3.1”项下方法进行细胞的分组与给药，用 4% 多聚甲醛固定后加入 Hoechst 33258 染色液反应 5 min。其他操作同“2.2.2”项下⑤⑥的步骤。

2.5 Western blot

使用预冷 PBS 清洗细胞后，用含 1% PMSF 和 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞，提取总蛋白。离心后吸取上清液，进行 BCA 蛋白定量。用 12% SDS-PAGE 分离蛋白，将蛋白转移到 PVDF 膜（100 V 75 min）。然后，室温下封闭 1.5 h，再将膜与一抗：FSHR 抗体（1:1000）、PI3K 抗体（1:1000）、Akt 抗体（1:1000）、p-AKT 抗体（1:1000）、Bax 抗体（1:1000）、Bcl-2 抗体（1:1000）和 β-actin 抗体（1:5000）在 4 ℃ 孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min 后，加入对应的二抗（1:10 000）室温孵育 1 h。再用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min，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。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析，实验结果以均值 ± 标准差表示，组间差异用单因素方差分析检验，两两比较采用独立样本 t 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 卵巢颗粒细胞的鉴定

HE 染色结果显示，细胞贴壁生长，体积较大，呈多角梭形，细胞核位于细胞中央，为深蓝色，呈卵圆形或者不规则形；胞质为淡红色，染色均匀，边缘清晰（见图 1）。免疫细胞化学法结果显示，卵巢颗粒细胞的特异性标志物 FSHR 在胞质中大量表达，呈红色，在核呈深蓝色，结果表明分离到的细胞是卵巢颗粒细胞（见图 2）。

3.2 人参皂苷 Rg₁ 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

应用 0、12.5、25、50、100、200、300、400 ng·mL⁻¹ 的人参皂苷 Rg₁ 作用于颗粒细胞后，细胞存活率分别为 100%、100.94%、100.03%、101.28%、99.86%、100.02%、100.74%、101.78%，表明在此质量浓度范围内，人参皂苷 Rg₁ 并未对颗粒细胞产生毒性作用（见图 3A）。人参皂苷 Rg₁ 在 100、200、300 ng·mL⁻¹ 时，细胞的存活率较为稳定。所以本实验选取 100、200、300 ng·mL⁻¹ 分别作为人参皂苷 Rg₁ 低、中、高浓度进行后续实验。

3.3 顺铂诱导的 POF 模型建立

如图 3B 所示，与正常组相比，顺铂作用于颗粒细胞 12 h 后，细胞的存活率随着顺铂质量浓度的增加而下降。基于顺铂处理卵巢颗粒细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})，选取 40 μg·mL⁻¹ 顺铂处理细胞 12 h 作为后续 POF 模型建立的条件。

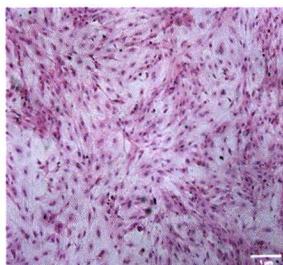
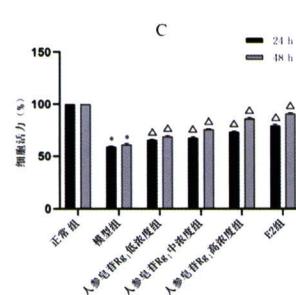
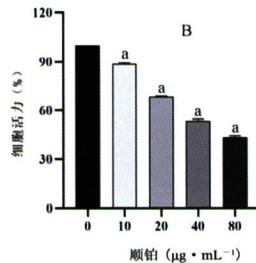
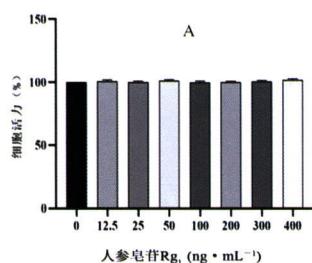
3.4 人参皂苷 Rg₁ 对卵巢颗粒细胞的保护作用

如图 3C 所示，40 μg·mL⁻¹ 顺铂处理 12 h 后，再使用低浓度、中浓度和高浓度人参皂苷 Rg₁ 处理后，其存活率随着人参皂苷 Rg₁ 质量浓度的增加显著提高，且高质量浓度对细胞的保护作用最为明显。以上结果表明，人参皂苷 Rg₁ 可保护顺铂诱导的细胞损伤，在高质量浓度时作用效果最佳。因此，选取高质量浓度人参皂苷 Rg₁ 用于完成后续分子机制的研究。

3.5 人参皂苷 Rg₁ 对卵巢颗粒细胞凋亡的影响

与正常组相比，模型组胞核呈亮蓝色荧光，并出现固缩与破碎现象；与模型组相比，高质量浓度人参皂苷 Rg₁ 组和 E2 组胞核荧光强度降低，且核固缩与破碎现象显著减少（见图 4）。

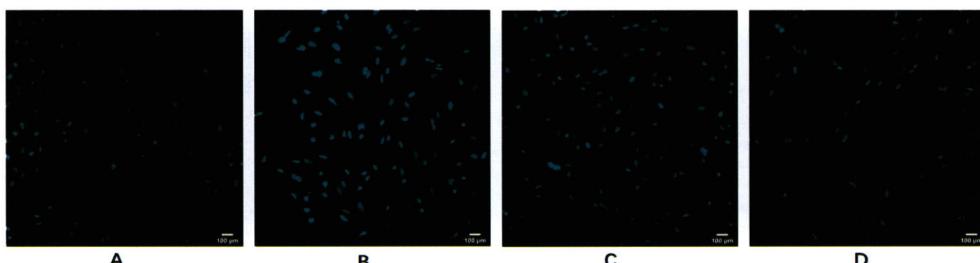
3.6 Western blot 检测细胞内相关蛋白的变化

图 1 卵巢颗粒细胞形态 (HE 染色, $\times 200$)Fig 1 Morphological of ovarian granulosa cells (HE staining, $\times 200$)图 3 人参皂苷 Rg₁ 对颗粒细胞增殖的影响Fig 3 Effect of ginsenoside Rg₁ on granulosa cell proliferation

A. 人参皂苷 Rg₁ 对颗粒细胞的毒性作用 (toxicity of ginsenosid Rg₁ to granulosa cells); B. 顺铂对颗粒细胞的抑制作用 (inhibition of cisplatin on granulosa cells); C. 人参皂苷 Rg₁ 对卵巢颗粒细胞的保护作用 (protective effect of ginsenosid Rg₁ on ovarian granulosa cells)

注: 与顺铂 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $^aP < 0.05$; 与正常组比较, $^*P < 0.05$; 与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$ 。

Note: Compared with the 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ cisplatin group, $^aP < 0.05$; compared with the normal group, $^*P < 0.05$; compared with the model group, $^\Delta P < 0.05$.

图 4 人参皂苷 Rg₁ 对顺铂损伤的颗粒细胞凋亡的影响 (Hoechst 33258 染色, $\times 200$)Fig 4 Effect of ginsenosid Rg₁ on the apoptosis of cisplatin-injured granulosa cells (Hoechst 33258 staining, $\times 200$)

A. 正常组 (normal group); B. 模型组 (model group); C. 人参皂苷 Rg₁ 高浓度组 (high concentration ginsenosid Rg₁ group); D. E2 组 (E2 group)

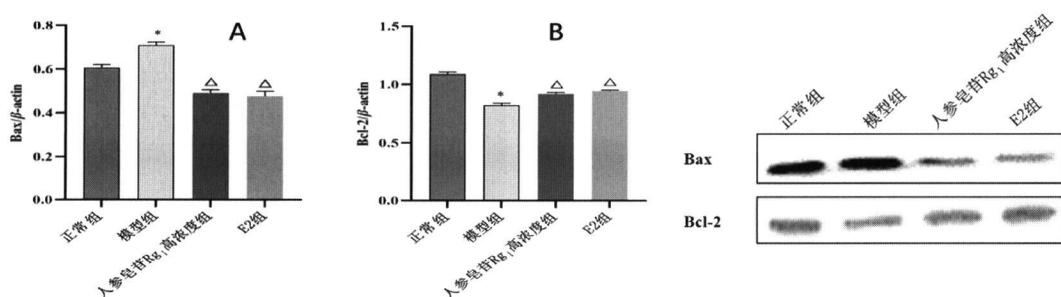
与正常组相比, 模型组中 FSHR、PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达均显著减少, Bax 蛋白表达均增加; 与模型组相比, 人参皂苷 Rg₁ 高浓度组和 E2 组中 FSHR、PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达水平均表达增加, Bax 的表达减少 (见图 5 及图 6); 与人参皂苷 Rg₁ 高浓度组和 E2 组相比, 人参皂苷 Rg₁ 高浓度 + 抑制剂组和 E2 + 抑制剂组中 Bcl-2 蛋白表达均明显减少 (见图 7)。

4 讨论

POF 是一种由遗传和免疫等原因引起的发生在 40 岁以下女性的内分泌紊乱性疾病^[9], 伴有多组织、器官功能障碍, 如心血管、骨骼系统相关疾病的发生, 甚至促使患者提前衰老, 影响其寿命^[10-11]。临幊上激素替代疗法虽能明显改善患者

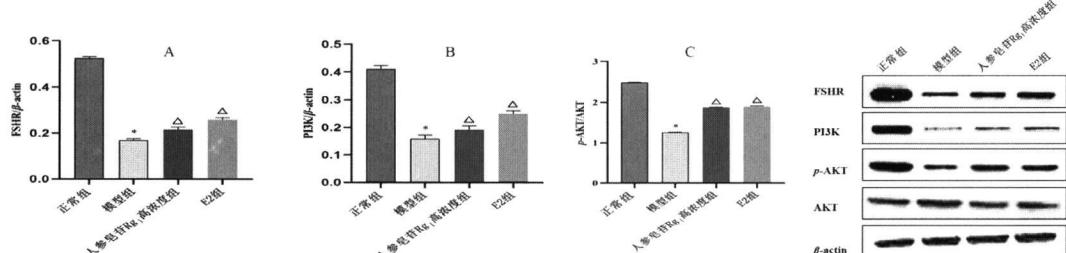
的症状与体征, 但也增加了子宫内膜癌、乳腺癌和静脉栓塞性疾病等发生的风险^[12]。近年来, 研究发现, 人参皂苷 Rg₁ 可显著提高卵巢组织的抗衰老能力和 POF 小鼠的生育能力^[13-14]。课题组前期研究也发现, 通过激活 PI3K/AKT 通路与抑制颗粒细胞凋亡可改善 POF, 保护卵巢功能^[8, 15]。因此, 本研究从体外提取原代卵巢颗粒细胞, 探讨人参皂苷 Rg₁ 是否通过调控 FSHR/PI3K/AKT 途径发挥抗 POF 作用。

顺铂是临幊一线常用化疔药物, 其对肿瘤细胞具有明确的杀伤作用, 但其对正常组织细胞的结构和功能也有损伤, 研究表明, 顺铂可导致 POF^[16]。另外, 在顺铂诱导的 POF 大鼠模型中, 血清 FSH 显著升高, 且其卵巢组织衰退性改

图 5 人参皂苷 Rg₁ 对顺铂损伤的颗粒细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响Fig 5 Effect of ginsenosid Rg₁ on Bax and Bcl-2 expression in cisplatin-injured granulosa cells

注：与正常组比较，*P < 0.05；与模型组比较，△P < 0.05。

Note: Compared with the normal group, *P < 0.05; compared with the model group, △P < 0.05.

图 6 人参皂苷 Rg₁ 对顺铂损伤的颗粒细胞内 FSHR/PI3K/AKT 信号通路关键蛋白表达的影响Fig 6 Effect of ginsenosid Rg₁ on the expression of key proteins in FSHR/PI3K/AKT signaling pathway in cisplatin-injured granulosa cells

注：与正常组比较，*P < 0.05；与模型组比较，△P < 0.05。

Note: Compared with the normal group, *P < 0.05; compared with the model group, △P < 0.05.

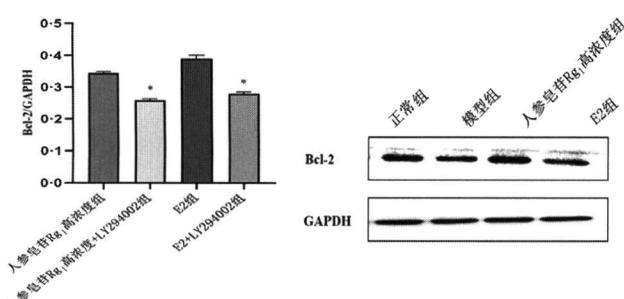


图 7 PI3K 抑制剂对顺铂损伤的颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of PI3K inhibitor on the expression of Bcl-2 protein in cisplatin-injuri granulosa cells

注：与不加抑制剂组比较，*P < 0.05。

Note: Compared with the without inhibitor group, *P < 0.05.

变与化疗药应用于人体导致的 POF 病变过程很相似^[17]。因此，本实验利用顺铂诱导卵巢颗粒细胞损伤来建立 POF 模型。

FSH 是哺乳动物生殖与发育的重要激素，可促进卵泡的发育、卵母细胞的成熟和性类固醇激素的合成^[18]。POF 患者检查结果主要显示为血清 FSH 值增高和卵泡发育不成熟，其原因可能是卵巢组织上 FSH 受体 (FSHR) 的功能减弱或受损，导致对 FSH 刺激不敏感，从而抑制卵泡的发育^[19]。本研究结果显示，人参皂苷 Rg₁ 可显著增强细胞中 FSHR 表达，即人参皂苷 Rg₁ 可通过上调 FSHR 的表达，促进对卵巢颗粒细胞的增殖生长。

FSH 与靶细胞表面 FSHR 结合后，可激活 PI3K/AKT 信号通路^[20]，促进生殖系统的发育与成熟。在 D-半乳糖诱导的 POF 模型中，姜黄素可通过激活 PI3K/AKT 信号通路，有效抑制颗粒细胞凋亡和卵巢损伤^[21]。在环磷酰胺和白消安诱导的小鼠 POF 模型中，胚胎干细胞来源细胞外小囊泡可以通过激活 PI3K/AKT 通路，明显提高血清性激素水平，增加卵泡数量和减少凋亡细胞数量^[22]。Wang 等^[23]研究表明，针刺百会、关元和太冲等可通过上调 PI3K/AKT 通路关键蛋白的表达，抑制颗粒细胞凋亡和改善卵泡的发育，从而减轻环磷酰胺诱导的 POF。本研究结果显示，人参皂苷 Rg₁ 可明显提高 PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达，提示人参皂苷 Rg₁ 可通过上调 FSHR 蛋白的表达，激活下游 PI3K/AKT 途径中关键蛋白的表达。

PI3K/AKT 通路不但是影响 POF 的重要途径，还是影响细胞凋亡的重要途径。在卵巢颗粒细胞凋亡过程中，Bcl-2 和 Bax 两种调控因子通过形成同 / 异源二聚体的形式发挥重要作用。Bcl-2 和 Bax 两者互为拮抗作用，当 Bax 蛋白水平表达上调时，Bax 可与 Bax 结合形成同源二聚体，促进颗粒细胞的凋亡。反之当 Bcl-2 水平上调时，Bcl-2 可与 Bax 形成异源二聚体，抑制颗粒细胞凋亡^[24-25]。本研究结果显示，人参皂苷 Rg₁ 可显著增强 Bcl-2 蛋白表达并降低 Bax 表达，而加入

PI3K 抑制剂后, Bcl-2 蛋白表达显著降低, 即人参皂苷 Rg₁ 可通过激活 FSHR/PI3K/AKT 途径, 抑制颗粒细胞凋亡, 保护卵巢的功能。

综上所述, 人参皂苷 Rg₁ 可能通过激活 FSHR/PI3K/AKT 信号通路, 抑制顺铂损伤的颗粒细胞凋亡, 从而保护卵巢颗粒细胞免受损伤。该实验结果或为深入了解中药人参的药理作用机制和 Rg₁ 的进一步研究提供参考。

参考文献

- [1] Wesevich V, Kellen AN, Pal L. Recent advances in understanding primary ovarian insufficiency [J]. F1000Res, 2020, 9: 1101.
- [2] Choe SA, Sung J. Trends of premature and early menopause: a comparative study of the US National Health and Nutrition Examination Survey and the Korea National Health and Nutrition Examination Survey [J]. J Korean Med Sci, 2020, 35 (14): e97.
- [3] Demayo S, Giannone L, Monastero A, et al. Reality of premature ovarian failure in Argentina [J]. Rev Assoc Med Bras, 2019, 65 (3): 419-423.
- [4] Vujošić S, Ivović M, Tančić-Gajić M, et al. Endometrium receptivity in premature ovarian insufficiency-how to improve fertility rate and predict diseases? [J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34 (12): 1011-1015.
- [5] Liu XH, Cai SZ, 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, 2021, doi: 10.2174/1871523020666210830164152.
- [6] Banerjee AA, Joseph S, Mahale SD. From cell surface to signalling and back: the life of the mammalian FSH receptor [J]. FEBS J, 2021, 288 (8): 2673-2696.
- [7] 姜凤丽, 王晓滨, 宗婧, 等. PI3K-Akt/mTOR 信号通路对卵巢早衰相关性研究进展 [J]. 黑龙江科学, 2019, 10 (2): 50-51.
- [8] 赵笛, 赵丕文, 武虹波, 等. 二仙汤对顺铂所致大鼠卵巢早衰模型中卵巢颗粒细胞增殖及周期的影响 [J]. 环球中医药, 2017, 10 (2): 131-136.
- [9] Lim YM, Jeong K, Lee SR, et al. Association between premature ovarian insufficiency, early menopause, socio-economic status in a nationally representative sample from Korea [J]. Maturitas, 2019, 121: 22-27.
- [10] Schipper I, Louwers YV. Premature and early menopause in relation to cardiovascular disease [J]. Semin Reprod Med, 2020, 38 (4): 270-276.
- [11] Tsiligiannis S, Panay N, Stevenson JC. Premature ovarian insufficiency and long-term health consequences [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2019, 17 (6): 604-609.
- [12] Patel H, Arruarana V, Yao L, et al. Effects of hormones and hormone therapy on breast tissue in transgender patients: a concise review [J]. Endocrine, 2020, 8 (1): 6-15.
- [13] He L, Wang X, Cheng D, et al. Ginsenoside Rg₁ improves pathological damages by activating the p21-p53-STK pathway in ovary and BaxBcl-2 in the uterus in premature ovarian insufficiency mouse models [J]. Mol Med Rep, 2021, 23 (1): 37.
- [14] He L, Ling L, Wei T, et al. Ginsenoside Rg₁ improves fertility and reduces ovarian pathological damages in premature ovarian failure model of mice [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017, 242 (7): 683-691.
- [15] 杨蕾, 王继峰, 牛建昭, 等. 二仙汤含药血清对顺铂干预的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 表达的影响 [J]. 世界中医药, 2017, 12 (4): 865-869.
- [16] 丁艳, 张静, 陶然, 等. 顺铂治疗导致卵巢早衰的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38 (6): 845-848.
- [17] 梁丹, 曹保利, 李继坤, 等. 顺铂诱导大鼠卵巢早衰的实验研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21 (26): 2873-2875.
- [18] Juárez-Rendón KJ, García-Ortiz JE. Evaluation of four genes associated with primary ovarian insufficiency in a cohort of Mexican women [J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35 (8): 1483-1488.
- [19] Zhuandi G, Tuanjie C, Luju L, 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.
- [20] Zhang H, Qin F, Liu A, et al. Kuntai capsule attenuates premature ovarian failure through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 239: 111885.
- [21] Yan Z, Dai Y, Fu H, et al. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice [J]. J Mol Endocrinol, 2018, 60 (3): 261-271.
- [22] Liu M, Qiu Y, Xue Z, et al. Small extracellular vesicles derived from embryonic stem cells restore ovarian function of premature ovarian failure through PI3K/AKT signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11 (1): 3.
- [23] Wang S, Lin S, Zhu 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.
- [24] Vartak SV, Iyer D, Santhoshkumar TR, et al. Novel Bcl-2 inhibitor, Disarib induces apoptosis by disruption of Bcl-2-BAK interaction [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 131: 16-28.
- [25] Rahmani M, Nkwocha J, Hawkins E, et al. Cotargeting Bcl-2 and PI3K induces Bax-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells [J]. Cancer Res, 2018, 78: 3075-3086.

(收稿日期: 2022-01-03; 修回日期: 2022-02-19)