

六味地黄丸治疗早发性卵巢功能不全模型小鼠的分子机制

李晓荣^{1, 2}, 仲佳雯^{2, 3, 4}, 罗玉雪^{2, 3, 4}, 高婷^{2, 3, 4}, 秦岭^{2, 3, 4}, 王雪怡⁵<https://doi.org/10.12307/2024.429>

投稿日期: 2023-06-20

采用日期: 2023-07-29

修回日期: 2023-08-16

在线日期: 2023-08-26

中图分类号:

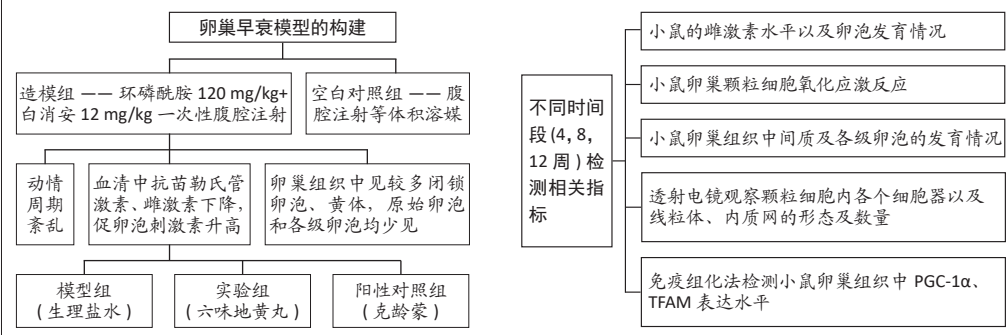
R459.9; R318; R271.1

文章编号:

2095-4344(2024)26-04151-07

文献标识码: B

文章快速阅读: 六味地黄丸改善氧化应激治疗早发性卵巢功能不全



文题释义:

早发性卵巢功能不全: 是一种常见的生殖内分泌疾病, 定义为40岁前卵巢功能停止, 临床特征是月经稀发或闭经伴促性腺激素升高和雌二醇水平降低。

氧化应激: 是指细胞表现出比抗氧化剂更高的活性氧水平, 导致氧化还原稳态失衡状态。活性氧包括氧自由基和非自由基的含氧物质, 是在氧化代谢过程中产生的促氧化分子。

摘要

背景: 在临床上, 大多数治疗早发性卵巢功能不全的方剂均以六味地黄丸为基础方演变而来, 并且取得了较好的疗效。目前对六味地黄丸的实验研究大多为体内动物模型的形态学观察及生理生化指标的检测, 而分子机制方面的研究报道较少。

目的: 探讨六味地黄丸治疗早发性卵巢功能不全的分子作用机制。

方法: 环磷酰胺120 mg/kg联合白消安12 mg/kg腹腔注射制备早发性卵巢功能不全小鼠模型, 然后用六味地黄丸混悬液对早发性卵巢功能不全小鼠进行干预, 干预12周采用ELISA法检测小鼠血清中促卵泡刺激素、促黄体生成素、雌二醇、抗苗勒氏管激素、8-羟脱氧鸟苷、总抗氧化能力、活性氧水平; 苏木精-伊红染色观察小鼠卵巢形态学改变; 透射电镜观察小鼠卵巢颗粒细胞超微结构及颗粒细胞线粒体的凋亡情况; 免疫组化法检测六味地黄丸对小鼠卵巢颗粒细胞中核受体转录辅激活因子(receptor gamma coactivator-1 alpha, PGC-1α)、线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)的表达水平。

结果与结论: ①与模型组比较, 实验组小鼠血清促卵泡刺激素、促黄体生成素、活性氧、8-羟脱氧鸟苷水平降低($P < 0.05$), 雌二醇、抗苗勒氏管激素、总抗氧化能力水平升高($P < 0.05$); ②苏木精-伊红染色发现模型组小鼠卵巢组织中闭锁卵泡和卵泡较多, 个别可见次级卵泡, 间质纤维化增生; 实验组小鼠卵巢组织可见大量闭锁卵泡, 卵泡较少, 边缘可见原始卵泡, 次级卵泡较少, 未见明显成熟卵泡; ③透射电镜发现实验组小鼠卵巢颗粒细胞内细胞器较完整; ④免疫组化结果显示, 实验组小鼠卵巢组织PGC-1α的表达水平在第4周稍有升高至第8, 12周无明显变化, 与模型组有明显差异; 实验组小鼠卵巢组织TFAM的表达水平在第4周时短暂升高, 然后稍有所下降, 但结果均与模型组有明显差异; ⑤结果表明, 六味地黄丸通过PGC-1α-TFAM-ROS信号通路在一定程度上抑制早发性卵巢功能不全小鼠卵巢颗粒细胞凋亡, 从而改善卵巢的内分泌功能, 提高机体抗氧化能力, 减轻氧化应激损伤程度。

关键词: 六味地黄丸; 早发性卵巢功能不全; 转录激活因子; 线粒体转录因子A; 活性氧

The molecular mechanism of *Liuwei Dihuang* Pill in the treatment of premature ovarian insufficiency in a mouse modelLi Xiaorong^{1, 2}, Zhong Jiawen^{2, 3, 4}, Luo Yuxue^{2, 3, 4}, Gao Ting^{2, 3, 4}, Qin Ling^{2, 3, 4}, Wang Xueyi⁵

¹General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Key Laboratory of Modernization of Minority Medicine, ³College of Traditional Chinese Medicine, ⁴Key Laboratory of Fertility Maintenance, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ⁵Yinchuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Li Xiaorong, MD, Associate chief physician, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Modernization of Minority Medicine of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

¹宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750000; 宁夏医科大学, ²少数民族医药现代化教育部重点实验室, ³中医学院, ⁴生育力保持重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004; ⁵银川市中医医院, 宁夏回族自治区银川市 750000

第一作者: 李晓荣, 女, 1984年生, 2014年广州中医药大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事中西医结合治疗不孕不育方面的研究。

通讯作者: 李晓荣, 博士, 副主任医师, 宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750000; 宁夏医科大学少数民族医药现代化教育部重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004

<https://orcid.org/0000-0002-2798-7808> (李晓荣)

基金资助: 国家自然科学基金项目 (82260947), 项目负责人: 李晓荣; 宁夏自然科学基金 (2023AAC05059), 项目负责人: 李晓荣

引用本文: 李晓荣, 仲佳雯, 罗玉雪, 高婷, 秦岭, 王雪怡. 六味地黄丸治疗早发性卵巢功能不全模型小鼠的分子机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26):4151-4157.



Corresponding author: Li Xiaorong, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Key Laboratory of Modernization of Minority Medicine of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Most of the formulas for the clinical treatment of premature ovarian insufficiency have evolved from the basic formula of *Liuwei Dihuang Pills*, and have achieved good therapeutic efficacy. Currently, most of the experimental studies on *Liuwei Dihuang Pills* focus on morphological observations and physiological and biochemical detection of *in vivo* animal models, while fewer studies on molecular mechanisms have been reported.

OBJECTIVE: To explore the molecular mechanism of *Liuwei Dihuang Pills* in the treatment of premature ovarian insufficiency based on the receptor gamma coactivator-1 alpha/mitochondrial transcription factor A/reactive oxygen species pathway.

METHODS: Premature ovarian insufficiency model was established in mice by intraperitoneal injection of cyclophosphamide 120 mg/kg combined with busulfan 12 mg/kg, and then *Liuwei Dihuang Pill* suspension was used to intervene in premature ovarian insufficiency mice. After 12 weeks of intervention, the levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, anti-Mullerian hormone, 8-hydroxydeoxyguanosine, total antioxidant capacity and reactive oxygen species in serum of mice were detected by ELISA method. The morphological changes in mouse ovaries were observed by hematoxylin-eosin staining. The ultrastructure of mouse follicular granulosa cells and the apoptosis of granulosa cell mitochondria were observed by transmission electron microscopy. The expression levels of receptor gamma coactivator-1 alpha and mitochondrial transcription factor A in mouse ovarian granulosa cells were detected by immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, serum levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, reactive oxygen species, and 8-hydroxydeoxyguanosine were decreased in the experimental group ($P < 0.05$), and the levels of estradiol, anti-Mullerian hormone, and total antioxidant capacity were increased ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin staining showed that in the model group, there were more atretic follicles and corpus luteum forms, some secondary follicles, and interstitial fibrosis and hyperplasia; in the experimental group, a large number of atretic follicles, few corpus luteum forms, primordial follicles were observed at the edges but there were few secondary follicles and no mature follicles. Transmission electron microscopy showed that the organelles in ovarian granulosa cells of mice in the experimental groups were relatively intact. Immunohistochemical results showed that compared with the model group, the expression level of receptor gamma coactivator-1 alpha in the ovarian tissue of mice increased slightly in the experimental group at the 4th week, and there was no significant change at the 8th and 12th weeks. The expression level of mitochondrial transcription factor A in the ovarian tissues of mice in the experimental group was transiently increased at the 4th week, and then slightly decreased, which were all significantly different from those of the model group. To conclude, *Liuwei Dihuang Pills* inhibit ovarian granulosa cell apoptosis in mice with premature ovarian insufficiency to a certain extent through the receptor gamma coactivator-1 alpha/mitochondrial transcription factor A/reactive oxygen species signaling pathway, thereby improving the endocrine function of the ovary, enhancing the antioxidant capacity, and attenuating the degree of oxidative stress damage.

Key words: *Liuwei Dihuang Pill*; premature ovarian insufficiency; transcription activator; mitochondrial transcription factor A; reactive oxygen species

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82260947 (to LXR); Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2023AAC05059 (to LXR)

How to cite this article: LI XR, ZHONG JW, LUO YX, GAO T, QIN L, WANG XY. The molecular mechanism of *Liuwei Dihuang Pill* in the treatment of premature ovarian insufficiency in a mouse model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(26):4151-4157.

0 引言 Introduction

早发性卵巢功能不全是因卵巢内卵泡耗竭或破坏导致卵巢功能衰竭,进而出现持续性闭经的一种生殖内分泌失调性疾病^[1]。近年来,随着社会的发展、社会环境以及生态环境的变化,女性工作压力及生活压力与日俱增,导致目前早发性卵巢功能不全发病率不断增加。西医学认为早发性卵巢功能不全的病因主要包括遗传学因素、免疫性因素、医源性因素(包括化疗和放射治疗),其中放疗和化疗导致的卵巢损伤逐渐进入人们视野。环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是常用化疗药物之一,许多研究表明环磷酰胺会导致卵巢功能障碍,包括卵巢储备加速丧失、卵泡生成失调和类固醇紊乱^[2]。而卵巢是其生殖毒性作用的主要靶器官^[3],目前已有不少运用环磷酰胺和白消安制备早发性卵巢功能不全动物模型报道。在对早发性卵巢功能不全的治疗方面,临床上多采用激素替代治疗、免疫疗法、基因疗法等,克龄蒙是目前临床常用激素替代疗法的药物,主要用于更年期综合征等,疗效明确。但由于早发性卵巢功能不全复杂的病因和不明确的发病机制,从而导致治疗效果常常不尽人意。中医学近年来在早发性卵巢功能不全治疗方面具有独特优势,认为早发性卵巢功能不全的病因不外乎肝肾不足、肾阴耗伤,治法以滋补肝肾为主。在临床上,大多数治疗早发性卵巢功能不全的方剂均以六味地黄丸为基础方演变而来,并且取得了较好的疗效。目前对六味地黄丸的实验研究大多为体内动物模型的形态学观察及生理生化指标的检测,而分子机制方面的研究报道较

少。在人体内,活性氧物质导致的氧化应激是重要且广泛的病理过程,这也是引发细胞凋亡的关键环节,不仅参与线粒体介导的颗粒细胞凋亡,并且可以影响线粒体功能。有研究表明,过表达的线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)在一定程度上可以抑制线粒体氧化应激,减少活性氧的产生,改善细胞凋亡。另外,核受体转录辅激活因子(receptor gamma coactivator-1alpha, PGC-1α)和TFAM是介导线粒体新陈代谢中的重要调控因子,PGC-1α主要通过协调一系列的核转录因子来调控TFAM。

基于此,该研究选用六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠进行干预,基于PGC-1α-TFAM-ROS途径探讨六味地黄丸调控早发性卵巢功能不全小鼠卵巢颗粒细胞线粒体功能的机制,为六味地黄丸的临床应用提供更有力的实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,多组间比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析,组间比较经方差齐性检验后采用成组 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于2019年1-6月在宁夏医科大学大学生育力保持教育部重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级4周龄健康雌性ICR小鼠,体质量(20±2)g,购买于宁夏医科大学实验动物中心,合格证号:SCXK(宁)2015-0001。小鼠饲养在宁夏医科大学实验动物中

心动物房内,给予普通大小鼠生长繁殖饲料和纯净水,恒温恒湿,光暗周期 12 h/12 h 屏障环境,IVC 笼具分笼饲养。将小鼠适应性喂养 1 周,并通过阴道脱落细胞涂片观察,选择 118 只具有正常动情周期的小鼠。将小鼠按随机数字表法分为造模组和对照组,其中造模组 88 只,对照组 30 只。

实验方案经宁夏医科大学动物实验伦理委员会批准,审批号为 IACUC-NYLAC-2019-090。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 药物 六味地黄丸购自北京同仁堂公司,按成人体质量 70 kg 计算,成人每天用量约为 12 g,采用人和小鼠体表面积换算法,算得 20 g 小鼠六味地黄丸的用量为 30.24 mg,灌胃体积为 0.2 mL,每粒六味地黄丸约 0.2 g,因此,将 1 粒六味地黄丸水蜜丸溶于 1.3 mL 生理盐水中,充分溶解,制成混悬液,一次不易配制过多,影响药效,故该实验一次配制约 39 mL,保存在 4 °C 冰箱中备用。

克龄蒙购自拜耳医药保健有限公司,按成人体质量 70 kg 计算,成人服用方法为在月经前半段周期连续服用 11 d 白片(每片含有 2 mg 戊酸雌二醇),然后再连续服 10 d 的橙片(每片含 1 mg 醋酸环丙孕酮与 2 mg 戊酸雌二醇片),根据人和小鼠体表面积换算法,20 g 小鼠戊酸雌二醇每日用量为 2 mg/378.9=0.005 mg,按小鼠体质量 10 mL/kg 灌胃,20 g 小鼠需灌胃 0.2 mL,则每 0.2 mL 混悬液中需含药 0.005 mg,得出所需灌胃的戊酸雌二醇药液质量浓度为 0.025 mg/mL。那么小鼠白片药液质量浓度为 0.025 mg/mL(只计戊酸雌二醇含量),浅橙色片药液质量浓度为 0.025 mg/mL(只计戊酸雌二醇含量)。故将 1 片白片和 1 片橙片分别溶于 80 mL 生理盐水中,充分混匀并溶解制成质量浓度为 0.025 mg/mL 的白片和橙片药物混悬液,储存在 4 °C 冰箱中备用。

1.3.3 试剂 环磷酰胺购自 Sigma 公司;白消安购自 APEX BIO 公司;苏木精染色液、兔二步法检测试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒、山羊血清工作液购自中杉金桥生物技术有限公司;伊红染色液购自九州柏林生物技术有限公司;小鼠抗苗勒氏管激素(anti-mullerian hormone, AMH)、雌激素(estradiol, E2)、促卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、8-羟脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)测定 ELISA 试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司;PGC-1 α 购自艾博抗贸易有限公司;TFAM 购自博奥森生物技术有限公司。

1.3.4 仪器 双目正置荧光显微镜、石蜡切片机购自 Leica 公司;高速冷冻离心机、Multiskan GO 酶标仪、-80 °C 低温冰箱购自 Thermo 公司;恒温生化培养箱购自上海跃进医疗器械有限公司;透射电镜购自日立公司(H-7650 型)。

1.4 方法

1.4.1 早发性卵巢功能不全模型制备 参考相关文献[4]方法

制备小鼠早发性卵巢功能不全模型,该造模方法造模时间短、简单易行、成功率高、死亡率低,是建立化疗所致早发性卵巢功能不全动物模型的良好选择,即用环磷酰胺 120 mg/kg+白消安 12 mg/kg 一次性腹腔注射,溶剂为二甲基亚砜,注射前用已配制好的 PBS 稀释。称取小鼠体质量并记录,通过摩尔浓度计算器,计算每只小鼠需注射溶液体积。然后抓取小鼠,使用注射器抽取上述计算量药物,将药物注入小鼠腹腔。对照组小鼠无需注射药物,仅在腹腔注射等体积溶媒。造模完成后取造模组和对照组小鼠各 6 只密切观察小鼠生存情况,采用阴道脱落细胞涂片法观察小鼠动情周期情况,连续观察 14 d。第 14 天对两组小鼠进行取材,采血检测相关激素水平,取卵巢行病理切片观察。

1.4.2 分组及药物干预 在建模后的第 14 天,造模组有 10 只小鼠死亡,剩余 72 只小鼠,对照组剩余 24 只小鼠,对剩余小鼠进行重新分组。抓取小鼠称质量并编号,将造模组随机分为 3 组,即模型组即阴性对照组(24 只)、实验组(24 只)、阳性对照组(24 只),对照组即空白对照组(24 只)。在造模完成的第 15 天开始,对模型组、实验组、阳性对照组、空白对照组小鼠给予药物及生理盐水进行干预,以药液体积与小鼠体质量为 10 mL/kg 灌胃,空白对照组和模型组小鼠灌胃生理盐水,实验组灌胃六味地黄丸混悬液,以上 3 组每日灌胃 1 次,共灌胃 12 周;阳性对照组给予克龄蒙混悬液,具体灌胃方法参考相关文献[5],以 4 d 为 1 个疗程,前 3 d 给予白片,第 4 天给予橙片,总体干预时间为 12 周。

1.4.3 小鼠动情周期检测 造模后密切观察各组小鼠生存情况,从最后一次灌胃的次日开始,采用阴道脱落细胞涂片法观察各组小鼠动情周期情况,连续观察 14 d。每日早晨 9:00 抓取小鼠,并将婴儿棉签用生理盐水浸湿,轻轻地在小鼠阴道内旋转两圈,均匀地涂抹在干净的载玻片上,在电子显微镜下观察载玻片上阴道脱落细胞的种类和形态并拍片,记录小鼠动情周期的变化。

1.4.4 ELISA 法测定小鼠血清激素水平 在干预第 4, 8, 12 周结束后的次日,每组每个时间点取 6 只小鼠,摘取眼球,采集眼球眶静脉血,用 1.5 mL 离心管收集小鼠血液,静置 4 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,取血清,按照 ELISA 试剂盒操作步骤,检测小鼠血清中激素水平。

1.4.5 苏木精-伊红染色法观察小鼠卵巢形态学改变 眼球眶静脉采血后取小鼠双侧卵巢,称质量并记录,随后放入 40 g/L 多聚甲醛中进行组织固定 24 h,常规组织脱水,石蜡包埋、制作石蜡切片,厚度为 5 μ m,苏木精-伊红染色观察卵巢组织结构变化。

1.4.6 免疫组化法检测小鼠卵巢组织中 PGC-1 α 、TFAM 表达水平 取石蜡组织切片,按照兔二步法检测试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒步骤进行免疫组化分析,进口山羊血清工作液封闭 1 h, DAB 显色后置于电子显微镜下观察并拍片。图片中棕黄色区域即为阳性结果。运用 Image-Pro-Plus 6.0 专业图片分析软件对阳性表达区域进行分析,通过累计吸光度与染色区

域面积的比值计算平均吸光度，即为小鼠卵巢组织中 PGC-1 α 、TFAM 的表达水平。

1.4.7 透镜下观察小鼠卵巢颗粒细胞线粒体的凋亡情况 在干预 12 周结束后的次日，各组取 1 只小鼠，分离出小鼠双侧卵巢，固定在 2.5% 戊二醛固定液中，按顺序石蜡包埋、切片、枸橼酸铅和醋酸双氧铀双染色，在透射电镜下观察卵巢组织中颗粒细胞线粒体的凋亡情况。

1.5 主要观察指标 ①小鼠动情周期的变化；②血清中激素水平及氧化相关指标；③小鼠卵巢组织中颗粒细胞线粒体的凋亡情况；④卵巢组织中 PGC-1 α 、TFAM 表达水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计分析软件对平均吸光度值进行统计，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数间比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，当各组方差齐时，多个样本均数之间的多重比较采用 LSD- t 检验，组间比较经方差齐性检验后采用成组 t 检验；当各组方差不齐时用 Dunnett 法进行均数间的两两比较，检验水准为 $\alpha=0.05$ ， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过宁夏医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 造模评价

2.1.1 小鼠动情周期的变化 模型评价组小鼠动情周期出现紊乱，表现为连续动情间期、后期或间期和后期交替，动情期和动情前期仅出现 1 d，甚至不出现；模型评价对照组小鼠动情周期大致正常，可检测到 2 个正常的动情周期，持续 4 d，各个时期细胞表现相对较典型，其动情周期细胞形态如图 1 所示。

2.1.2 小鼠血清中 AMH、FSH、E2 水平 模型评价组小鼠血清中 AMH、E2 水平均高于模型评价对照组 ($P < 0.05$)；FSH 水平低于模型评价对照组 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 | 两组小鼠血清激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 1 | Comparison of serum hormone levels between two groups of mice

组别	抗苗勒氏管激素 (pg/mL)	促卵泡刺激素 (U/L)	雌激素 (pmol/L)
模型评价组	174.87 $\pm$ 13.66	16.95 $\pm$ 1.81	190.98 $\pm$ 24.35
模型评价对照组	154.42 $\pm$ 9.31	19.72 $\pm$ 1.88	157.40 $\pm$ 16.70
t 值	3.031	-2.597	2.786
P 值	0.013	0.027	0.019

2.1.3 小鼠卵巢组织形态观察 如图 2 所示，模型评价组小鼠卵巢组织中可见较多闭锁卵泡，黄体较多，原始卵泡和各级卵泡均少见，间质不同程度纤维化；模型评价对照组小鼠卵巢组织中也可见少量闭锁卵泡，黄体存在，边缘可见原始卵泡，次级卵泡和成熟卵泡数量较模型评价组多。

2.2 六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠动情周期的影响 如表 2 所示，干预 12 周后，空白对照组小鼠动情周期基本正常，模型组小鼠动情周期以动情间期和动情后期为主，实验组小鼠动情周期紊乱、动情周期延长，阳性对照组小鼠动情周期以动情前期和动情期为主。

表 2 | 各组小鼠动情周期变化情况
Table 2 | Changes of estrous cycle in mice

组别	动情周期变化
空白对照组	基本正常
模型组	以动情间期和动情后期为主
实验组	动情周期紊乱，动情周期延长
阳性对照组	以动情前期和动情期为主

2.3 六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠血清中 FSH、LH、E2、T-AOC、ROS、8-OHdG、AMH 水平的影响 见表 3-5。

表 3 | 各组小鼠干预 4 周后血清相关激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 3 | Comparison of serum hormone levels in mice after 4 weeks of intervention

指标	空白对照组	模型组	实验组	阳性对照组
FSH(U/L)	13.45 $\pm$ 0.53 ^{bc}	18.37 $\pm$ 0.54 ^a	18.40 $\pm$ 0.41 ^{ab}	17.64 $\pm$ 0.54 ^{ab}
LH(pg/mL)	2 880.00 $\pm$ 515.75 ^{bc}	4 050.00 $\pm$ 283.25 ^{ac}	3 520.00 $\pm$ 496.83 ^{ab}	3 385.83 $\pm$ 275.83 ^a
E2(pmol/L)	187.42 $\pm$ 5.59 ^{bc}	149.71 $\pm$ 7.00 ^{ac}	169.61 $\pm$ 4.45 ^{ab}	172.50 $\pm$ 6.10 ^a
AMH(pg/mL)	171.46 $\pm$ 3.57 ^{bc}	151.57 $\pm$ 6.23 ^{ac}	159.45 $\pm$ 6.08 ^{ab}	163.68 $\pm$ 2.93 ^a
T-AOC(U/mL)	7.42 $\pm$ 0.69 ^{bc}	4.31 $\pm$ 0.59 ^{ac}	6.38 $\pm$ 1.02 ^{ab}	5.81 $\pm$ 1.05 ^a
ROS(IU/mL)	198.73 $\pm$ 9.97 ^{bc}	245.72 $\pm$ 8.06 ^{ac}	233.56 $\pm$ 6.99 ^{ab}	230.04 $\pm$ 8.46 ^a
8-OHdG(ng/L)	84.89 $\pm$ 3.94 ^{bc}	111.69 $\pm$ 3.89 ^a	113.83 $\pm$ 7.10 ^a	107.98 $\pm$ 4.23 ^a

表注：与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ；与阳性对照组相比，^c $P < 0.05$ 。FSH：促卵泡刺激素；LH：促黄体生成素；E2：雌激素；AMH：抗苗勒氏管激素；T-AOC：总抗氧化能力；ROS：活性氧物质；8-OHdG：8-羟脱氧鸟苷。

表 4 | 各组小鼠干预 8 周后血清相关激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 4 | Comparison of serum hormone levels in mice after 8 weeks of intervention

指标	空白对照组	模型组	实验组	阳性对照组
FSH(U/L)	14.33 $\pm$ 0.49 ^{bc}	17.71 $\pm$ 0.58 ^a	16.41 $\pm$ 0.89 ^{ab}	16.86 $\pm$ 0.96 ^a
LH(pg/mL)	3 417.33 $\pm$ 213.87 ^{bc}	4 317.50 $\pm$ 240.12 ^{ac}	3 725.33 $\pm$ 118.00 ^a	3 666.67 $\pm$ 153.87 ^a
E2(pmol/L)	181.67 $\pm$ 7.24	162.96 $\pm$ 5.16 ^{ac}	176.81 $\pm$ 3.89 ^b	175.68 $\pm$ 6.28
AMH(pg/mL)	170.05 $\pm$ 4.34 ^{bc}	159.25 $\pm$ 4.10 ^a	163.97 $\pm$ 6.05 ^a	164.31 $\pm$ 3.19 ^a
T-AOC(U/mL)	7.55 $\pm$ 0.82	5.50 $\pm$ 0.84 ^{ac}	7.61 $\pm$ 1.03 ^b	7.24 $\pm$ 1.40
ROS(IU/mL)	227.27 $\pm$ 11.89 ^c	274.12 $\pm$ 8.46 ^{ac}	240.31 $\pm$ 12.10 ^b	243.37 $\pm$ 11.53 ^a
8-OHdG(ng/L)	86.26 $\pm$ 2.38 ^{bc}	111.28 $\pm$ 3.87 ^{ac}	97.88 $\pm$ 3.42 ^{ab}	95.03 $\pm$ 3.20 ^a

表注：与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ；与阳性对照组相比，^c $P < 0.05$ 。FSH：促卵泡刺激素；LH：促黄体生成素；E2：雌激素；AMH：抗苗勒氏管激素；T-AOC：总抗氧化能力；ROS：活性氧物质；8-OHdG：8-羟脱氧鸟苷。

表 5 | 各组小鼠干预 12 周后血清相关激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 5 | Comparison of serum hormone levels in mice after 12 weeks of intervention

指标	空白对照组	模型组	实验组	阳性对照组
FSH(U/L)	14.49 $\pm$ 0.96 ^{bc}	18.23 $\pm$ 0.60 ^a	17.06 $\pm$ 0.49 ^{ab}	17.23 $\pm$ 0.62 ^a
LH(pg/mL)	3 559.17 $\pm$ 108.88	4 110.00 $\pm$ 362.59 ^{ac}	3 771.67 $\pm$ 241.07 ^{ab}	3 740.00 $\pm$ 124.58
E2(pmol/L)	183.64 $\pm$ 8.14	161.82 $\pm$ 4.70 ^{ac}	176.27 $\pm$ 8.89 ^b	180.79 $\pm$ 5.70
AMH(pg/mL)	169.27 $\pm$ 3.63	158.16 $\pm$ 4.04 ^{ac}	166.34 $\pm$ 4.04 ^b	167.88 $\pm$ 4.73
T-AOC(U/mL)	9.17 $\pm$ 1.45	6.97 $\pm$ 0.80 ^{ac}	8.38 $\pm$ 1.03 ^b	9.49 $\pm$ 1.06
ROS(IU/mL)	242.15 $\pm$ 10.43 ^{bc}	283.81 $\pm$ 15.18 ^a	260.44 $\pm$ 11.71 ^{ab}	269.50 $\pm$ 11.44 ^a
8-OHdG(ng/L)	85.28 $\pm$ 3.10 ^{bc}	105.08 $\pm$ 3.79 ^{ac}	98.76 $\pm$ 3.80 ^{ab}	99.21 $\pm$ 2.99 ^a

表注：与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$ ；与阳性对照组相比，^c $P < 0.05$ 。FSH：促卵泡刺激素；LH：促黄体生成素；E2：雌激素；AMH：抗苗勒氏管激素；T-AOC：总抗氧化能力；ROS：活性氧物质；8-OHdG：8-羟脱氧鸟苷。

4 周时，空白对照组 FSH、LH、ROS、8-OHdG 表达水平低于其他 3 组 ($P < 0.05$)，E2、T-AOC、AMH 表达水平高于其他 3 组 ($P < 0.05$)；实验组 FSH 表达水平高于阳性对照组 ($P < 0.05$)，阳性对照组 FSH 表达水平低于模型组 ($P < 0.05$)；实验组和阳性对照组 LH、ROS 表达水平低于模型组 ($P < 0.05$)；实验组和阳性对照组 E2、AMH、T-AOC 表达水平高于模型组；

实验组和阳性对照组 8-OHdG 表达水平差异无显著性意义。

8 周时, 空白对照组 FSH、LH、8-OHdG 表达水平低于其他 3 组 ($P < 0.05$), AMH 表达水平高于其他 3 组 ($P < 0.05$), ROS 表达水平低于模型组和阳性对照组 ($P < 0.05$), 空白对照组、实验组、阳性对照组 E2、T-AOC 表达水平高于模型组 ($P < 0.05$), 空白对照组、实验组 FSH 表达水平低于模型组 ($P < 0.05$); 实验组和阳性对照组 LH、ROS、8-OHdG 表达水平低于模型组 ($P < 0.05$); 空白对照组、实验组和阳性对照组 AMH 表达水平差异无显著性意义。

12 周时, 空白对照组 FSH、ROS、8-OHdG 表达水平低于其他 3 组 ($P < 0.05$); 实验组 FSH、ROS 表达水平低于模型组 ($P < 0.05$); 模型组 LH 表达水平高于其他 3 组 ($P < 0.05$); 模型组 E2、T-AOC、AMH 表达水平低于其他 3 组 ($P < 0.05$); 实验组和阳性对照组 8-OHdG 表达水平低于模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠卵巢形态学的影响 如图 3 所示, 干预 4 周后, 空白对照组小鼠卵巢组织中可见少量闭锁卵泡和黄体, 边缘可见原始卵泡、次级卵泡和成熟卵泡; 模型组小鼠卵巢组织中可见闭锁卵泡较多, 黄体较多, 原始卵泡少见, 个别具有次级卵泡; 实验组小鼠卵巢组织中闭锁卵泡较多, 间质纤维化增生, 黄体较多, 边缘偶见原始卵泡, 次级卵泡少见, 未见明显成熟卵泡; 阳性对照组小鼠卵巢组织中闭锁卵泡较少, 间质纤维化增生不明显, 黄体较多, 边缘偶见原始卵泡和次级卵泡。

干预 8 周后, 空白对照组小鼠卵巢组织中可见少量闭锁卵泡和黄体, 次级卵泡较多, 余各级卵泡均可见; 模型组小鼠卵巢组织中可见闭锁卵泡较多, 黄体较多, 个别可见次级卵泡, 并且可见卵泡空泡; 实验组小鼠卵巢组织中闭锁卵泡较多, 黄体较多, 边缘可见原始卵泡和次级卵泡, 未见明显成熟卵泡, 可见卵泡空泡; 阳性对照组小鼠卵巢组织中闭锁卵泡较少, 间质纤维化增生不明显, 黄体较多, 边缘可见原始卵泡, 次级卵泡增多。

干预 12 周后, 空白对照组小鼠卵巢组织中可见大量闭锁卵泡, 黄体少见, 各级卵泡均可见; 模型组小鼠卵巢组织中可见闭锁卵泡和黄体较多, 个别可见次级卵泡, 间质纤维化增生; 实验组小鼠卵巢组织可见大量闭锁卵泡, 黄体较少, 边缘可见原始卵泡, 次级卵泡较少, 未见明显成熟卵泡; 阳性对照组小鼠卵巢组织中可见闭锁卵泡较多, 黄体较多, 原始卵泡罕见, 次级卵泡较多。

2.5 六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠卵巢颗粒细胞线粒体的影响 如图 4 所示, 空白对照组小鼠卵巢颗粒细胞内细胞器完整, 内质网和线粒体较多, 线粒体形态完整, 规则, 线粒体嵴清晰, 未发现凋亡细胞; 模型组小鼠卵巢颗粒细胞内细胞器较少, 内质网明显增宽, 线粒体可见基质溶解和空洞, 线粒体嵴模糊, 可见细胞凋亡小体; 实验组小鼠卵巢颗粒细胞内细胞器较完整, 高尔基体和内质网较多, 内质网稍有增宽, 线粒体轻度基质溶解; 阳性对照组小鼠卵巢颗粒细胞内细胞器较完整, 内质网和线粒体较多, 可见高尔基体,

其中线粒体形态较完整, 线粒体嵴清晰, 未见线粒体基质溶解。

2.6 六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠卵巢组织中 PGC-1 α 表达水平的影响 如图 5 所示, 小鼠卵巢组织中 PGC-1 α 的阳性表达区域主要位于细胞质中, 卵泡颗粒细胞层也有一定表达。干预 4 周后, 与模型组比较, 实验组 PGC-1 α 表达水平升高 ($P < 0.05$); 干预 8 周后, 与空白对照组比较, 实验组 PGC-1 α 表达水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 实验组 PGC-1 α 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 干预 12 周后, 与模型组比较, 实验组 PGC-1 α 表达水平仍显著升高 ($P < 0.01$); 与实验组比较, 阳性对照组 PGC-1 α 表达水平较高 ($P < 0.05$)。

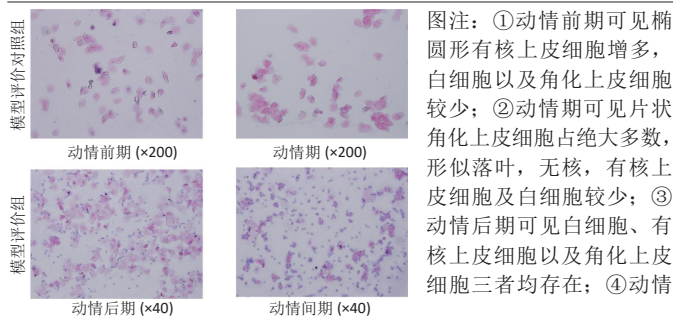
2.7 六味地黄丸对早发性卵巢功能不全小鼠卵巢组织中 TFAM 表达水平的影响 如图 6 所示, 小鼠卵巢组织中 TFAM 的阳性表达区域主要位于细胞质中, 卵巢间质及卵丘表达明显, 卵泡颗粒细胞层无明显表达。干预 4 周, 与模型组和阳性对照组比较, 实验组 TFAM 表达水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 干预 8, 12 周, 与模型组比较, 实验组 TFAM 表达水平较高 ($P < 0.05$), 阳性对照组与模型组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

早发性卵巢功能不全是一种妇科内分泌疾病, 主要表现为月经初潮或青春期推迟, 第二性征发育正常, 临床上常见的症状有月经失调、闭经、性功能下降、不孕、围绝经期综合征等。早发性卵巢功能不全发病率为 0.3%–1.0%, 随着年龄的增长, 其发病率逐渐上升, 并逐渐出现了年轻化的趋势, 已对女性生活质量及身体健康产生严重影响。

中医学认为早发性卵巢功能不全的病机为肾虚肝郁, 以肾虚为本, 治疗上多以调补肝肾为基本治法。六味地黄丸由熟地黄、山药、山萸肉、泽泻、丹皮、茯苓共 6 味药物组成, 现代药理研究显示六味地黄丸药理作用主要包括促皮质激素样、耐缺氧、疲劳、抗低温、降低血脂、抗动脉硬化, 对血液病、妇女更年期综合征、心血管、脑血管疾病具有显著效果^[6]。另有研究发现六味地黄丸对大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴具有较好的调节作用^[7], 促进卵巢功能的恢复, 也帮助提升雌激素水平, 促进内分泌的改善。刘肖林等^[8]研究发现与以雌孕激素替代为主的治疗方法相比, 采用六味地黄丸治疗早发性卵巢功能不全能够从根本上解决问题, 证实了六味地黄丸在临床治疗早发性卵巢功能不全的优势。

早发性卵巢功能不全在激素水平通常表现为 FSH 水平上升及 E2 水平下降^[9]。已有研究表明: 早发性卵巢功能不全患者血清 AMH 水平明显低于正常同龄女性, 与绝经期妇女水平相当^[10]。LH 和 FSH 均由垂体分泌, 共同调节 E2 的表达。通过对六味地黄丸及克龄蒙干预后早发性卵巢功能不全小鼠进行血清 E2、FSH、LH、AMH 水平检测, 在干预前, 小鼠 E2、AMH 水平较低, FSH、LH 水平较高, 符合早发性卵巢功能不全激素水平表现, 经六味地黄丸和克龄蒙分别干预 12 周后, 小鼠血清中 FSH、LH 水平较早发性卵巢功能不全



间期可见大量白细胞出现，体积相对较小，有核上皮细胞及角化上皮细胞较少。

图 1 | 两组小鼠阴道脱落细胞形态

Figure 1 | Morphology of vaginal exfoliated cells in mice

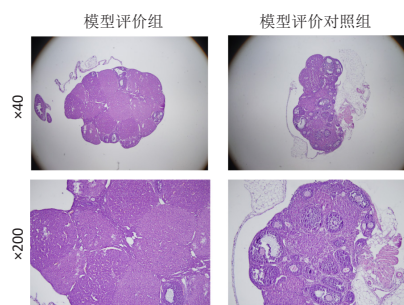


图 2 | 两组小鼠卵巢组织形态 (苏木精 - 伊红染色)
Figure 2 | Morphology of the ovarian in mice (hematoxylin-eosin staining)

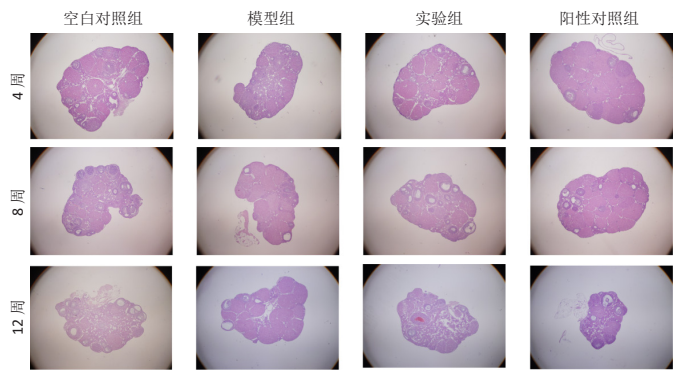
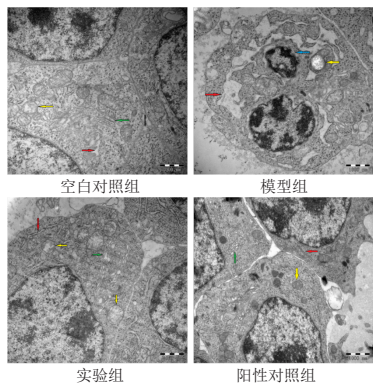
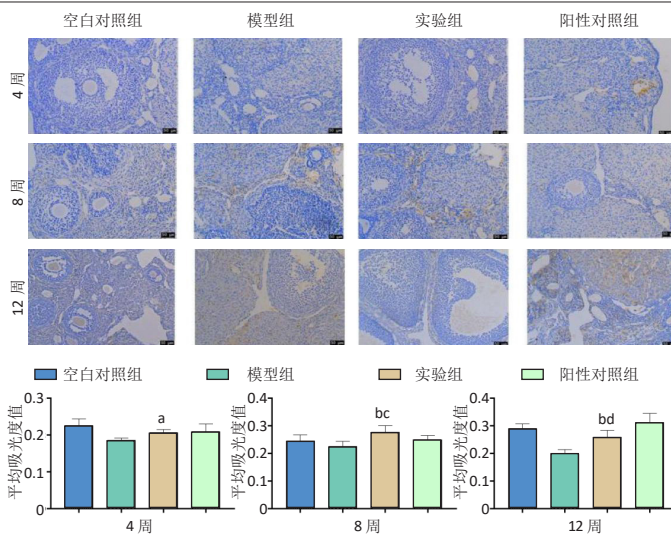


图 3 | 各组小鼠 4, 8, 12 周卵巢组织形态变化 (苏木精 - 伊红染色, ×40)
Figure 3 | Morphological changes of ovarian tissue in mice at 4, 8 and 12 weeks of intervention (hematoxylin-eosin staining, ×40)



图注：黄色箭头表示线粒体，红色箭头表示内质网，蓝色箭头表示细胞凋亡小体，绿色箭头表示高尔基体。
图 4 | 各组小鼠卵巢颗粒细胞线粒体形态 (透射电镜, ×20 000)
Figure 4 | Mitochondrial morphology of mouse ovarian granulosa cells in each group (transmission electron microscopy, ×20 000)

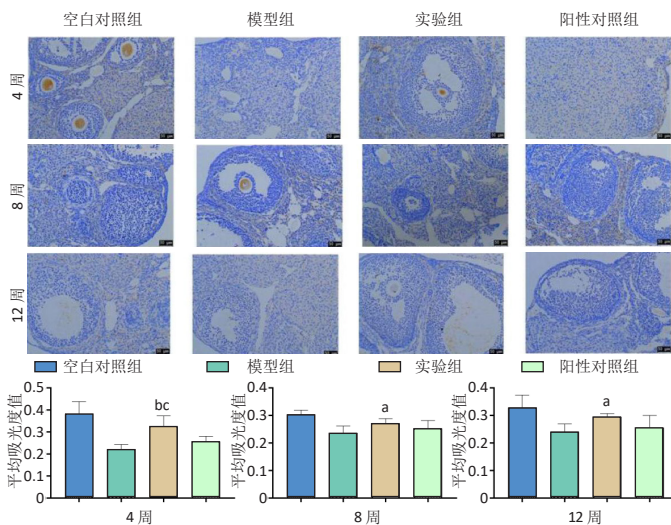
小鼠有所降低，E2、AMH 水平有所升高，表明六味地黄丸在一定程度上改善了卵巢的内分泌功能，提升了小鼠血清激素水平。ROS 是卵泡内微环境之一，和 T-AOC 共同参与颗粒细胞的凋亡过程，ROS 参与线粒体介导的颗粒细胞凋亡，并影响颗粒细胞线粒体功能^[11]，8-OHdG 是氧化应激导致 DNA 损



图注：与模型组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与空白对照组比较，^c $P < 0.05$ ；与阳性对照组比较，^d $P < 0.05$ 。

图 5 | 干预 4, 8, 12 周后各组小鼠卵巢组织 PGC-1 α 表达水平 (免疫组化, 标尺: 50 μ m)

Figure 5 | The expression level of receptor gamma coactivator-1 alpha in mouse ovarian tissue after 4, 8 and 12 weeks of intervention (immunohistochemistry, scale bars: 50 μ m)



图注：与模型组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与阳性对照组比较，^c $P < 0.05$ 。

图 6 | 干预 4, 8, 12 周后各组小鼠卵巢组织 TFAM 表达水平 (免疫组化, 标尺: 50 μ m)
Figure 6 | Expression of mitochondrial transcription factor A in mouse ovarian tissue after 4, 8 and 12 weeks of intervention (immunohistochemistry, scale bars: 50 μ m)

伤的特异性产物，可充分反映出细胞氧化损害的严重程度。该实验分别采用六味地黄丸及克龄蒙干预 12 周后，对早发性卵巢功能不全小鼠进行血清 ROS、T-AOC、8-OHdG 水平检测，从检测结果得出六味地黄丸干预的实验组 ROS、8-OHdG 表达水平平均比生理盐水干预的模型组水平有所降低，T-AOC 表达水平升高；采用克龄蒙干预的阳性对照组与模型组相比，ROS 平均表达水平较模型组低，但差异无显著性意义，8-OHdG 表达水平较低，T-AOC 表达水平升高，说明六味地黄丸可以提高机体抗氧化能力，并在一定程度上减轻氧化应激损伤程度。

现代研究表明无论哪种原因导致的早发性卵巢功能不全均会伴有颗粒细胞的凋亡^[12]。卵泡由居于核心的卵母细胞及周围的颗粒细胞和卵泡膜细胞组成，颗粒细胞是卵泡的功能

单位,对卵泡的生长发育有重要调控作用,其凋亡会诱导卵泡发生闭锁^[13]。卵泡闭锁是通过细胞凋亡方式实现的,细胞凋亡发生于卵泡发育的每个阶段。颗粒细胞卵泡闭锁是早发性卵巢功能不全的关键特征,颗粒细胞凋亡是卵巢早衰发生的起始因素^[14]。采用六味地黄丸及克龄蒙对早发性卵巢功能不全小鼠干预12周后进行苏木精-伊红染色,六味地黄丸干预小鼠卵巢组织可见闭锁卵泡,黄体较少,边缘可见原始卵泡,次级卵泡存在,未见明显成熟卵泡;克龄蒙干预小鼠卵巢组织中可见闭锁卵泡较多,黄体较多,原始卵泡罕见,次级卵泡较多。说明六味地黄丸在一定程度上可以促进卵泡发育。

线粒体是个多功能的细胞器,是ROS生产的主要场所。在卵巢中,卵母细胞和颗粒细胞中的线粒体功能对卵巢的发育、功能维持都十分重要^[15]。线粒体是细胞内氧化供能的主要场所,线粒体是颗粒细胞内含量丰富的细胞器,线粒体还参与E2等类固醇激素的合成,线粒体功能增强有助于维持卵泡正常功能^[16]。透射电镜观察结果显示,六味地黄丸和克龄蒙均可以上调小鼠卵巢颗粒细胞线粒体数目和影响内质网的形态,从而改善线粒体功能,在一定程度上抑制了颗粒细胞的凋亡。

PGC-1 α 被称为“主调节因子”,参与线粒体生物发生,它与核呼吸因子(即NRF-1, NRF-2)相互作用,启动NRF转录,然后激活TFAM。TFAM对于mtDNA的复制和线粒体编码基因的转录至关重要,可导致线粒体的生成^[17]。PGC-1 α 是线粒体生物合成的主要调节因子,可以刺激核呼吸因子和TFAM表达,使编码线粒体蛋白的基因表达上调,增加线粒体生物合成^[18]。PGC-1 α 是线粒体生物发生的氧化应激诱导调节因子,PGC-1 α 的过度表达会导致线粒体DNA的拷贝数增加,线粒体体积与线粒体含量增加,可以防止应激诱导的细胞凋亡。近年的研究显示,TFAM是一种新的免疫原性癌细胞死亡介质,可刺激细胞凋亡通路,导致免疫原性细胞死亡^[19]。TFAM可调控mtDNA的复制和转录,当TFAM转运缺失,则会导致线粒体活性丧失并最终导致细胞凋亡。而TFAM可通过增加mtDNA的稳定性减轻线粒体的氧化损伤^[20]。该实验中,相比于模型组,六味地黄丸干预小鼠卵巢组织中PGC-1 α 、TFAM表达水平均升高,说明六味地黄丸可以上调早发性卵巢功能不全小鼠卵巢组织中PGC-1 α 和TFAM表达水平,可以在一定程度上改善早发性卵巢功能不全小鼠卵巢颗粒细胞线粒体的功能。

综上所述,六味地黄丸通过PGC-1 α -TFAM-ROS途径在一定程度上抑制早发性卵巢功能不全小鼠卵巢颗粒细胞凋亡,从而改善卵巢的内分泌功能,提高机体抗氧化能力,并在一定程度上减轻氧化应激损伤程度。

作者贡献:李晓荣负责论文选题、实验设计与论文指导;罗玉雪和王雪怡负责动物实验;仲佳雯负责数据统计分析及论文撰写;高婷负责数据收集和文章的校对;秦岭负责文献检索。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 张鸿艳. 卵巢早衰的中西医治疗研究进展 [J]. 中国校医, 2021, 35(6): 472-474.
- [2] XU H, BAO X, KONG H, et al. Melatonin Protects Against Cyclophosphamide-induced Premature Ovarian Failure in Rats. Hum Exp Toxicol. 2022;41: 9603271221127430.
- [3] 魏天琴, 凌丽, 冯秀山, 等. 环磷酰胺对大鼠卵巢结构与功能的影响及机制 [J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(3): 195-200.
- [4] 刘慧莹, 任春娥, 姜爱芳. 两种造模方法导致大鼠卵巢早衰模型的比较研究 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(28): 4869-4872.
- [5] 欧阳进. 右归丸对自身免疫性卵巢早衰模型小鼠 IL-6、IL-17、IL-21 水平的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [6] 林茂堂. 六味地黄丸(汤)药理研究及临床应用新进展 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(14): 135-136.
- [7] 梁秋峰, 曹云桂, 陈奇. 六味地黄丸治疗卵巢早衰的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(17): 3508-3512.
- [8] 刘肖林, 吴梓春, 戴晖. 六味地黄丸治疗卵巢早衰的临床效果观察 [J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版), 2019, 6(1): 72-73.
- [9] 薛如梅, 袁玉影, 张冬梅. 卵巢早衰病因及治疗研究进展 [J]. 中国当代医药, 2022, 29(32): 23-27.
- [10] 黄旭春, 曹晓静, 林楠, 等. 卵巢早衰中医诊疗指南评价与修订 [J]. 河南中医, 2019, 39(1): 82-86.
- [11] ANDREYEV AY, KUSHNAREVA YE, MURPHY AN, et al. Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. Biochemistry (Mosc). 2015;80(5):517-531.
- [12] 刘慧萍, 曾柳庭, 张国民, 等. 颗粒细胞与卵母细胞自噬对卵泡发育和闭锁的调控 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(1): 67-74.
- [13] 张颖, 李先强, 李亚娜, 等. 颗粒细胞凋亡影响家禽卵泡闭锁的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(12): 4725-4733.
- [14] JIANG XL, TAI H, KUANG JS, et al. Jian-Pi-Yi-Shen decoction inhibits mitochondria-dependent granulosa cell apoptosis in a rat model of POF. Aging (Albany NY). 2022;14(20):8321-8345.
- [15] 佟超. 线粒体异常与卵巢早衰 [J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(4): 23-27.
- [16] 加秀凤, 陈瑞, 罗丹, 等. 调经养巢方对卵巢早衰模型大鼠卵巢超微结构及细胞凋亡的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(2): 5-9.
- [17] CHEN Y, ZHAO Y, MIAO C, et al. Quercetin alleviates cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency in mice by reducing mitochondrial oxidative stress and pyroptosis in granulosa cells. J Ovarian Res. 2022;15(1): 138.
- [18] 申屠路媚, 牟艳玲. 线粒体功能障碍机制及其相关疾病研究进展 [J]. 生命科学, 2018, 30(1): 87-93.
- [19] 梅雯, 熊伟, 赵一. 哺乳动物线粒体DNA转录调节因子研究进展 [J]. 生物技术, 2022, 32(4): 506-512.
- [20] IKEDA M, IDE T, FUJINO T, et al. Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. PLoS One. 2015;10(3):e0119687.

(责任编辑: YJ, MZH, ZN, WL)