

引用本文:张丽荣,闫洪超.红参对卵巢储备功能减退大鼠卵巢储备功能和卵巢组织磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路的影响[J].安徽医药,2024,28(7):1323-1327.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.07.011.



◇ 药学研究 ◇

## 红参对卵巢储备功能减退大鼠卵巢储备功能和卵巢组织磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路的影响

张丽荣<sup>1,2</sup>, 闫洪超<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>徐州医科大学研究生院,江苏 徐州 221006;<sup>2</sup>宿迁市妇幼保健院生殖医学科,江苏 宿迁 223800;<sup>3</sup>徐州医科大学附属医院生殖医学科,江苏 徐州 221006

通信作者:闫洪超,男,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向为生殖内分泌与不孕不育,Email:1015058194@qq.com

**摘要** **目的** 探讨红参对卵巢储备功能减退(DOR)大鼠卵巢功能的改善作用以及潜在机制。**方法** 2022年8—11月进行DOR大鼠模型建立实验。将48只SD雌性大鼠分为空白组、模型组、模型+雌二醇组以及模型+红参组,每组12只。采用腹腔注射去氧乙烯基环己烯(VCD)225 mg/kg建立DOR大鼠模型。模型组与空白组均给予0.9%氯化钠溶液灌胃,模型组+雌二醇组给予0.15 mg/kg戊酸雌二醇溶液灌胃,模型+红参组给予5 g/kg红参混悬液灌胃,1次/天,共30 d。30 d后比较各组大鼠治疗前后体质量变化;观察卵巢组织病理切片变化;检测血清促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇、促性腺激素释放激素(GnRH)和抗缪勒管激素(AMH)激素水平变化;蛋白质印迹法检测卵巢组织中磷脂酰肌醇3-激酶p85 $\alpha$ (PI3K p85 $\alpha$ )、蛋白激酶B(Akt)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)蛋白表达量和磷酸化水平。**结果** 用药后,模型+雌二醇组大鼠体质量差值为(15.0 $\pm$ 0.7)g高于模型组的(10.9 $\pm$ 1.3)g,体质量明显增加( $P<0.05$ )。模型+红参组大鼠体质量差值为(14.9 $\pm$ 0.4)g,高于模型组的(10.9 $\pm$ 1.3)g( $P<0.05$ ),但与模型+雌二醇组的(15.0 $\pm$ 0.7)g比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。病理切片显示,模型+雌二醇组和模型+红参组卵泡数量多于模型组,卵巢结构较为清晰,颗粒结构更为紧凑,黄体数量较模型组增多;ELISA实验显示,用药后,模型+红参组和模型+雌二醇组AMH、雌二醇和GnRH明显升高,FSH、LH明显降低( $P<0.05$ ),其中模型+红参组激素水平恢复更明显( $P<0.05$ )。蛋白质印迹法显示,与模型组比较,用药后,模型+红参组和模型+雌二醇组p-PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt和p-mTOR均显著下降( $P<0.05$ );与雌二醇组比较,模型+红参组p-PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt、p-mTOR水平降低( $P<0.05$ )。**结论** 红参可以有效改善DOR模型大鼠的内分泌,可能通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路参与改善卵巢功能。

**关键词** 红参; 卵巢储备功能; 雌二醇; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

### Effect of red ginseng on improving ovarian reserve function and PI3K / Akt / mTOR signaling pathway in ovarian tissue of rats with decreased ovarian reserve

ZHANG Lirong<sup>1,2</sup>, YAN Hongchao<sup>3</sup>

Author Affiliations:<sup>1</sup>Postgraduate Research Institute, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221006, China;

<sup>2</sup>Department of Reproductive Medicine, Suqian Women's and Children's Hospital, Suqian,

Jiangsu 223800, China;<sup>3</sup>Department of Reproductive Medicine, The Affiliated Hospital of

Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221006, China

**Abstract** **Objective** To explore the effect of red ginseng on improving ovarian function in rats with decreased ovarian reserve (DOR). **Methods** DOR rat model building experiments were performed between August 2022 and November 2022. Forty-eight SD female rats were randomly assigned into blank group, model group, model + estradiol group, and model + red ginseng group with 12 mice in each group. The DOR rat model was established by an intraperitoneal injection of 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) 225 mg/kg. Then both model group and blank group were given normal saline gavage, model group + estradiol group received 0.15 mg/kg valeric acid solution, and model + red ginseng group received 5 g/kg red ginseng suspension, once a day, 30 days in total. After 30 days, changes in body mass before and after treatment were compared, changes in ovarian histopathological sections were observed, and serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol, gonadotropin releasing hormone (GnRH) and anti-mullerian hormone (AMH) levels were tested. Western blotting detection was performed of phosphatidylinositol 3-kinase p85 $\alpha$  (PI3K p85 $\alpha$ ), protein kinase B (Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in ovarian tissue. **Results** After medication, the difference in body mass in the

model + estradiol group was  $(15.0 \pm 0.7)$  g, which was higher than that  $[(10.9 \pm 1.3)$  g] in the model group ( $P < 0.05$ ). The difference in body mass in the model + red ginseng group was  $(14.9 \pm 0.4)$  g, which was significantly higher than that  $[(10.9 \pm 1.3)$  g] in the model group ( $P < 0.05$ ), but statistics were not significant in comparison with the difference in model+estradiol group  $[(15.0 \pm 0.7)$  g] ( $P > 0.05$ ). The pathological section showed that the number of follicles in the model + estradiol and model + red ginseng groups was more than that in the model group, with clear ovarian structure and more compact granular structure, and the number of corpus luteum more than that in the model group. ELISA experiment showed that AMH, estradiol and GnRH levels in the model + red ginseng group and model + estradiol group significantly were increased, while FSH and LH levels were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the hormone level in the model + red ginseng group recovered more significantly ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that p-PI3K p85 $\alpha$ , p-Akt and p-mTOR levels were significantly decreased in model + red ginseng group and model + estradiol group in comparison with the model group ( $P < 0.05$ ), and p-PI3K p85 $\alpha$ , p-Akt and p-mTOR levels were decreased in model + ginseng group in comparison with model + estradiol group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Red ginseng can effectively improve the endocrine of DOR model rats, and may participate in improving ovarian function by regulating PI3K / Akt / mTOR signaling pathway.

**Keywords** Red ginseng; Ovarian reserve function; Estradiol; PI3K; Akt; mTOR

卵巢储备功能减退(DOR)的主要临床特征是卵巢功能障碍,病人月经周期正常,卵巢储备试验结果异常但未绝经<sup>[1]</sup>。在中国,育龄夫妇的不孕率已从20年前的3%上升到目前的15%,其中DOR导致的不孕占女性不孕总数的10%<sup>[2]</sup>。辅助生殖技术协会临床结果报告系统(SART CORS)报告称,在2004—2011年,确诊DOR的人数从19%增加到26%,而40岁以下病人的确诊人数增加了42%<sup>[3]</sup>。如果不进行及时有效的干预,DOR病人可能在1~6年内出现卵巢萎缩,并发展为原发性卵巢功能不全(POI)<sup>[4]</sup>。目前,治疗DOR的方法很少。常用的激素替代疗法(HRT)主要用于无生育需求的DOR妇女。HRT可有效缓解低雌激素症状,但停药后复发率高,且不能改善卵巢功能。根据我国传统中医理论,卵母细胞来源于肾精,DOR的基本发病机制与肾精不足有关。红参是由人参采集蒸制干燥而制成的,具有益气扶正,补肾填精的功能。根据以往报道,红参被证实具有改善生殖功能的生物活性<sup>[5]</sup>。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是调节细胞周期的重要细胞内信号通路,与细胞的休眠、增殖以及癌变直接相关<sup>[6]</sup>。PI3K/Akt/mTOR通路在原始卵泡发育的起始和存活中发挥着重要作用,并广泛参与卵母细胞生长和颗粒细胞增殖和凋亡。近年来,去氧乙烯基环己烯(VCD)腹腔注射诱导的卵巢储备功能减退模型已被广泛用来研究卵巢储备功能减退<sup>[7]</sup>,在DOR大鼠模型中,红参是否能发挥保护作用仍不清楚,潜在的潜在机制也不清楚。本研究拟从PI3K/Akt/mTOR信号通路入手,旨在探讨红参对VCD诱导的DOR大鼠的治疗原理和潜在机制,为红参的疗效提供更多科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级雌性3月龄SD大鼠48只,体重范围250~300 g,购自湖北省实验动物研究中心,

动物生产许可证号SCXK(鄂)2020-0018,室温饲养,湿度50%。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

## 1.2 主要试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 红参购自长春净月立新参茸土特产经销部(吉林,中国),经鉴定为6年生红参。红参晒干、粉碎后过200目筛,制成红参粉备用。VCD购自美国Sigma公司提供,批号94956,配置为225 mg/kg剂量的VCD试剂,溶剂为芝麻油。芝麻油购自美国Sigma公司,批号3547。补佳乐(戊酸雌二醇片)购自拜耳医药保健公司,批号J20201038。促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇、促性腺激素释放激素(GnRH)和抗缪勒管激素(AMH)试剂盒购自科鹿(武汉)生物科技有限责任公司。p-PI3K p85 $\alpha$ 抗体(货号ab182651)、PI3K p85 $\alpha$ 抗体(货号ab133595)和GAPDH内参(货号ab181602)购自Abcam公司,p-Akt抗体、Akt抗体、p-mTOR抗体和mTOR抗体购自CST公司,BCA蛋白测定试剂盒(AS1086)购自美国ASPEN公司。

**1.2.2 仪器** 包埋机(JB-L5)武汉俊杰电子有限公司;病理切片机(RM2016)上海徠卡仪器有限公司;组织摊片机(JK-5)武汉俊杰电子有限公司;正置白光拍照显微镜(CX31)日本Canon;电泳仪(DYY-6C)北京市六一仪器厂;酶标仪(DR-200Bs)Diatek公司;扫描仪(LiDE110)日本Canon。

## 1.3 方法

**1.3.1 DOR大鼠模型建立** 于2022年8—11月进行DOR大鼠模型建立实验。大鼠适应性喂养两周后,每天进行阴道脱落细胞涂片观察,将动情周期规律的大鼠纳入实验,挑选出12只大鼠作为空白组,其余动物为模型组。空白组动物每日注射芝麻油;剩余模型组大鼠每日腹腔注射225 mg/kg剂量的VCD持续15 d。自造模第8天开始观察大鼠阴道细胞图片,动情周期 $\geq 6$  d或某阶段停止 $\geq 3$  d即可判断

造模成功。

**1.3.2 分组与给药** 取建模成功的大鼠分为模型组(12只)、模型+雌二醇组(12)只以及模型+红参组(12只),另取12只未进行DOR建模处理大鼠作为空白组,共4组。红参组于造模成功后第1天开始给予红参混悬液,红参剂量为5 g/kg,每日1次,干预30 d;模型组与空白组给予10 mL/kg 0.9%氯化钠溶液,模型组+雌二醇组给予戊酸雌二醇溶液,参照《中药药理实验方法》“人和动物体表面积折算的等效剂量”进行计算,补佳乐使用双蒸水溶解药品,制成0.15 mg/kg溶液,均给予每天1次灌胃,均干预30 d。红参给药剂量参考了Hong等<sup>[8]</sup>的实验设计。

**1.3.3 观察指标以及方法** 最后一次干预后称取大鼠体质量,按照30 mg/kg戊巴比妥对大鼠进行麻醉处理,取全血室温下半径8 cm、3 000 r/min离心15 min,取上清-80℃冷冻保存;随后动物进行安乐死,摘取大鼠卵巢,分离两侧卵巢并称质量,所有左侧卵巢于液氮速冻,后于-80℃保存,右侧卵巢置于4%多聚甲醛中固定24 h。

**1.3.4 组织学观察** 取出固定的卵巢组织,置于梯度乙醇进行脱水,然后使用二甲苯进行透明。将透明后的组织块放于石蜡中进行包埋,然后放于切片机进行切片。切片展平后放于二甲苯进行脱蜡,采用苏木精-伊红染色法(HE)染色:先使用苏木精进行染色3 min,然后冲洗后加入1%乙醇分化,1%氨水溶液返蓝,然后加入伊红进行染色2 min,酒精脱水后进行中性树胶封片,显微镜进行观察拍照。

**1.3.5 血清AMH、FSH、LH、雌二醇和GnRH激素水平检测** 根据ELISA试剂盒说明书进行操作,酶标仪450 nm处测定吸光度,根据样品吸光度计算血清AMH、FSH、LH、雌二醇和GnRH激素水平。

**1.3.6 卵巢组织中p-PI3K p85α、PI3K p85α、p-Akt、Akt、p-mTOR和mTOR蛋白表达量检测** 取冷冻的左侧卵巢100 mg,根据蛋白质印迹法实验说明书提取组织块中的总蛋白,使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,然后对样品蛋白进行电泳、转至

PVDF膜上,封闭2 h后加入一抗p-PI3K p85α(1:500)、PI3K p85α(1:2 000)、p-Akt(1:1 000)、Akt(1:2 000)、p-mTOR(1:500)和mTOR(1:1 000),摇床4℃过夜,使用TBST洗膜后再次加入二抗(1:10 000),室温摇床孵育1 h后使用TBST洗膜。将PVDF膜放于成像仪显影,Image J进行灰度分析。

**1.4 统计学方法** 采用SPSS 22.0进行统计分析,经Shapiro-Wilk检验,服从正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 造模前后大鼠体质量变化情况组内和组间比较** 模型组大鼠体质量差值为(10.9±1.3)g比空白组(27.4±0.8)g生长缓慢,体质量明显减少( $t=37.44$ ,  $P<0.05$ );用药后,模型+雌二醇组大鼠体质量为(15.0±0.7)g高于模型组,体质量明显增加( $t=9.62$ ,  $P<0.05$ )。模型+红参组大鼠体质量差值为(14.9±0.4)g,与模型组差异比较有统计学意义( $t=10.19$ ,  $P<0.05$ ),但与模型+雌二醇组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.2 各组大鼠卵巢组织形态** 空白组大鼠卵巢可以观察到发育期的卵泡,颗粒细胞结构紧凑;模型组大鼠卵巢卵泡数量减少并发生闭锁,颗粒细胞层排列紊乱,黄体数量减少;模型+雌二醇组和模型+红参组卵泡细胞数量多于模型组,卵巢结构较清晰,颗粒结构紧凑,黄体数量较模型组增多。见图1。

**2.3 各组大鼠AMH、FSH、LH、雌二醇和GnRH激素水平比较** 模型组与空白组相比,AMH、雌二醇和GnRH明显降低,FSH、LH明显升高( $P<0.05$ ),用药后,模型+红参组和模型+雌二醇组AMH、雌二醇和GnRH明显升高,FSH、LH明显降低,与模型组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中模型+红参组激素水平恢复更明显( $P<0.05$ )。见表1。

**2.4 卵巢组织中p-PI3K p85α、PI3K p85α、p-Akt、Akt、p-mTOR和mTOR蛋白表达量检测** 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织p-PI3K p85α、p-Akt和

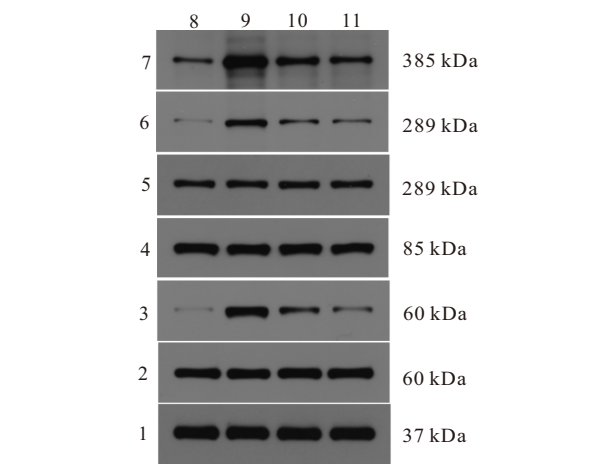
表1 各组SD雌性大鼠激素水平变化/ $\bar{x} \pm s$

| 组别      | 鼠数/只 | AMH/(μg/L)               | FSH/(μg/L)                | LH/(μg/L)                 | 雌二醇/(ng/L)                  | GnRH/(ng/L)                 |
|---------|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白组     | 12   | 3.68±0.32                | 27.92±2.32                | 26.75±3.32                | 146.54±15.99                | 630.18±53.86                |
| 模型组     | 12   | 2.04±0.18 <sup>①</sup>   | 58.27±8.21 <sup>①</sup>   | 55.10±4.45 <sup>①</sup>   | 65.38±5.57 <sup>①</sup>     | 313.01±24.83 <sup>①</sup>   |
| 模型+雌二醇组 | 12   | 2.58±0.25 <sup>①②</sup>  | 47.72±3.16 <sup>①②</sup>  | 44.01±4.07 <sup>①②</sup>  | 88.75±7.49 <sup>①②</sup>    | 420.63±50.54 <sup>①②</sup>  |
| 模型+红参组  | 12   | 3.12±0.24 <sup>①②③</sup> | 38.30±3.20 <sup>①②③</sup> | 34.99±4.71 <sup>①②③</sup> | 115.84±13.54 <sup>①②③</sup> | 536.94±56.87 <sup>①②③</sup> |
| F值      |      | 23.25                    | 22.08                     | 25.60                     | 27.94                       | 24.55                       |
| P值      |      | <0.001                   | <0.001                    | <0.001                    | <0.001                      | <0.001                      |

注:AMH为抗米勒管激素,FSH为促卵泡生成素,LH为黄体生成素,GnRH为促性腺激素释放激素。

①与空白组比较, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与模型+雌二醇组比较, $P<0.05$ 。

p-mTOR 表达增加( $P<0.05$ ), PI3K p85 $\alpha$ 、Akt 和 mTOR 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 用药后, 模型+红参组和模型+雌二醇组 p-PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt 和 p-mTOR 均显著下降( $P<0.05$ ); 与雌二醇组比较, 模型+红参组 p-PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt、p-mTOR 水平降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 2, 表 2。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—蛋白激酶B(Akt); 3—磷酸化的 Akt(p-Akt); 4—磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 $\alpha$  亚基(PI3K p85 $\alpha$ ); 5—哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR); 6—磷酸化的 mTOR(p-mTOR); 7—磷酸化的 PI3K p85 $\alpha$ (p-PI3K p85 $\alpha$ ); 8—空白组; 9—模型组; 10—模型+雌二醇组; 11—模型+红参高剂量组。

图 2 SD 雌性大鼠卵巢组织 p-PI3K p85 $\alpha$ 、PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt、Akt、p-mTOR 和 mTOR 蛋白表达量检测

3 讨论

本研究旨在揭示红参是否能有效改善 DOR 女性的卵巢储备。有研究发现, 不良的外部环境条件是导致女性发生 DOR 的关键影响因素。VCD 是制造橡胶、塑料以及杀虫剂的副产品, 在环境中分布广泛。而目前已有研究证实, VCD 导致的卵巢功能减退与女性发生的 DOR 类似, 目前已有研究运用 VCD 建立 DOR 模型以模拟环境污染导致的女性卵巢功能减退。由于 DOR 的发生, 卵巢分泌的雌激素减退, 进而导致一系列的临床症状, 包括内分泌异常、生殖系统萎缩以及骨质疏松, 因此在本研究中

我们选择使用补佳乐作为阳性对照药物。红参是由人参采集蒸制干燥而制成的, 自 1123 年于韩国《高丽图经》第一次记载。《郑祖实录》中记载, 红参具有大补元气, 镇静安神、滋阴补血等功效。《本草纲目》记载红参可“治男妇一切虚证”, 具有益气扶正的功能。根据以往报道, 红参被证实具有改善生殖功能的生物活性。例如, 红参抑制衰老 C57BL/6 小鼠卵巢氧化应激反应和 NLRP3 炎症小体基因表达<sup>[9]</sup>。因此, 本研究拟通过建立 DOR 大鼠模型, 深入探讨红参对 DOR 大鼠卵巢功能的作用和机制。

DOR 的诊断是基于高浓度的促性腺激素、低水平的 AMH 以及低的卵泡数。根据美国生殖医学会委员会的意见, AMH 可以作为 DOR 的评判标准之一。由早期卵泡颗粒细胞产生的 AMH 能够反映原始卵母细胞池的大小。它与促性腺激素无关, 因此在月经周期内和月经周期之间保持相对一致。因此, 与基础血清 FSH、LH 和雌二醇水平相比, AMH 是卵巢功能障碍更优秀的预测因子。此外, 在本研究中我们还检测了血清 GnRH 水平。GnRH 是由下丘脑以脉冲的方式分泌的一种激素, 并通过触发垂体前叶来刺激分泌 FSH 和 LH<sup>[10]</sup>。FSH 和 LH 作用于颗粒细胞和卵泡膜细胞, 刺激卵泡成熟和触发排卵。排卵后, FSH 和 LH 刺激成熟卵泡的残余部分形成黄体。黄体生长并分泌孕酮和雌二醇, 提升子宫内膜的容受性<sup>[11]</sup>。由于目前并没有一个单一的卵巢储备指标能够对 DOR 具有 100% 的灵敏度和特异度, 因此本研究结合生化和影像学来共同评估卵巢储备的变化。本研究对大鼠卵巢组织进行切片染色观察, 结果发现, 模型组大鼠卵巢组织内卵泡数量极少, 均以闭锁卵泡的形态出现; 而激素检测结果发现, AMH、雌二醇和 GnRH 明显降低, FSH、LH 明显升高( $P<0.05$ ), 说明造模成功。使用红参进行治疗后, 模型+红参组卵泡细胞数量多于模型组, 卵巢结构较为清晰, 颗粒结构更为紧凑, 黄体数量较模型组增多, 说明红参可以增加 DOR 大鼠的卵泡数量。此外, 本研究发现, 在红参治疗后, 雌二醇水平的升高通过负

| 表 2 各组 SD 雌性大鼠卵巢组织中 p-PI3K p85 $\alpha$ 、PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt、Akt、p-mTOR 和 mTOR 蛋白表达量比较/ $\bar{x} \pm s$ |      |                                |                   |                                |                 |                                |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 组别                                                                                                           | 鼠数/只 | p-PI3K p85 $\alpha$            | PI3K p85 $\alpha$ | p-Akt                          | Akt             | p-mTOR                         | mTOR            |
| 空白组                                                                                                          | 12   | 0.30 $\pm$ 0.01                | 0.90 $\pm$ 0.02   | 0.06 $\pm$ 0.01                | 0.95 $\pm$ 0.04 | 0.07 $\pm$ 0.001               | 0.54 $\pm$ 0.10 |
| 模型组                                                                                                          | 12   | 1.20 $\pm$ 0.05 <sup>①</sup>   | 0.89 $\pm$ 0.02   | 0.86 $\pm$ 0.13 <sup>①</sup>   | 0.96 $\pm$ 0.02 | 0.68 $\pm$ 0.04 <sup>①</sup>   | 0.53 $\pm$ 0.08 |
| 模型+雌二醇组                                                                                                      | 12   | 0.65 $\pm$ 0.02 <sup>①②</sup>  | 0.90 $\pm$ 0.03   | 0.44 $\pm$ 0.10 <sup>①②</sup>  | 0.96 $\pm$ 0.02 | 0.30 $\pm$ 0.02 <sup>①②</sup>  | 0.55 $\pm$ 0.09 |
| 模型+红参组                                                                                                       | 12   | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>①②③</sup> | 0.90 $\pm$ 0.03   | 0.21 $\pm$ 0.07 <sup>①②③</sup> | 0.96 $\pm$ 0.02 | 0.20 $\pm$ 0.05 <sup>①②③</sup> | 0.55 $\pm$ 0.08 |
| F 值                                                                                                          |      | 480.97                         | 0.06              | 47.19                          | 0.04            | 198.30                         | 0.02            |
| P 值                                                                                                          |      | <0.001                         | 0.981             | <0.001                         | 0.987           | <0.001                         | 0.997           |

注: p-PI3K p85 $\alpha$  为磷酸化的磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 $\alpha$  亚基, PI3K p85 $\alpha$  为磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 $\alpha$  亚基, p-Akt 为磷酸化的蛋白激酶 B, Akt 为蛋白激酶 B, p-mTOR 为磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白。

①与空白组比较,  $P<0.01$ 。②与模型组比较,  $P<0.01$ 。③与模型+雌二醇组比较,  $P<0.01$ 。

反馈机制导致FSH和LH含量的降低,进而以同样的方式提高GnRH水平。这表明红参对DOR的改善作用机制之一与调节性腺激素有关,从而改善卵巢储备功能。

PI3K/Akt/mTOR信号通路是细胞内重要的信号转导通路,参与调控细胞的生存、增殖、生长和代谢<sup>[12]</sup>。也有研究发现,PI3K/Akt/mTOR通路在原始卵泡发育的起始和存活中发挥着重要作用,并广泛参与卵母细胞生长和颗粒细胞增殖和凋亡<sup>[6]</sup>。既往研究表明,VCD通过上调PI3K、Akt、mTOR蛋白磷酸化导致原始卵泡过度激活,同时,激活PI3K/Akt/mTOR通路可促进原始卵泡过度丢失,导致生长卵泡发生凋亡<sup>[13]</sup>。此外,研究表明雌二醇通过调控PI3K/Akt/mTOR通路在疾病中发挥作用<sup>[14-16]</sup>。本研究结果显示,与模型组相比,红参治疗组和雌二醇治疗组的p-PI3K p85 $\alpha$ 、p-Akt和p-mTOR水平显著下调,提示红参和雌二醇均可能通过PI3K/Akt/mTOR依赖机制抑制VCD诱导的原始卵泡过度激活并损害细胞凋亡。

如今,由于DOR的药物治疗带来了一些健康风险和副作用,越来越多的DOR妇女更倾向于膳食纤维的补充和寻求中医中药的治疗<sup>[17]</sup>。中草药是从植物中提取的原料,没有或很少进行工业加工,在全球范围内越来越受到更多人的关注。红参是一种中草药,对治疗女性不孕症,包括DOR、卵巢早衰、围绝经期综合征等有良好的临床疗效<sup>[18-19]</sup>。我们的研究为红参的有益作用提供了科学依据。

总体来说,我们的研究证明了红参治疗DOR大鼠的良好效果和潜在机制,并推测红参可能通过下调PI3K/Akt信号通路的磷酸化表达,促进卵泡生长,升高血清AMH、GnRH和雌二醇水平,降低血清FSH和LH水平。表明红参可能是一个治疗DOR有前景的药物。

(本文图1见插图7-3)

### 参考文献

- [1] PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2020, 114(6): 1151-1157.
- [2] ZHOU Z, ZHENG D, WU H, et al. Epidemiology of infertility in China: a population-based study[J]. BJOG, 2018, 125(4): 432-441.
- [3] BUTTS SF, RATCLIFFE S, DOKRAS A, et al. Diagnosis and treatment of diminished ovarian reserve in assisted reproductive technology cycles of women up to age 40 years: the role of insurance mandates[J]. Fertil Steril, 2013, 99(2): 382-388.
- [4] PASTORE LM, CHRISTIANSON MS, STELLING J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR[J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(1): 17-23.
- [5] KANG KA, YAO CW, PIAO MJ, et al. Anticancer effect of Korean red ginseng via autophagy- and apoptosis-mediated cell death[J]. Nutrients, 2022, 14(17): 3558.
- [6] YU L, WEI J, LIU P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 32: 69-94.
- [7] LEE HJ, PARK MJ, JOO BS, et al. Effects of coenzyme Q10 on ovarian surface epithelium-derived ovarian stem cells and ovarian function in a 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced murine model of ovarian failure[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2021, 19(1): 59.
- [8] HONG YJ, KIM N, LEE K, et al. Korean red ginseng (Panax ginseng) ameliorates type 1 diabetes and restores immune cell compartments[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(2): 225-233.
- [9] CHEI S, OH HJ, JANG H, et al. Korean red ginseng suppresses the expression of oxidative stress response and NLRP3 inflammasome genes in aged C57BL/6 mouse ovaries[J]. Foods, 2020, 9(4): 526.
- [10] 熊露, 胡雅君, 李金丽, 等. 促性腺激素释放激素拮抗剂对顺铂化疗中小鼠卵巢的保护作用[J]. 安徽医药, 2021, 25(7): 1286-1289.
- [11] SHI Y, LI L, ZHOU J, et al. Efficacy of electroacupuncture in regulating the imbalance of AMH and FSH to improve follicle development and hyperandrogenism in PCOS rats[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 113: 108687. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108687.
- [12] 郭芬, 王晓雪. 柚皮苷调控PI3K/Akt/eNOS通路控制2型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的作用探讨[J]. 安徽医药, 2021, 25(4): 645-649.
- [13] DOU X, JIN X, CHEN X, et al. Bu-Shen-Ning-Xin decoction alleviates premature ovarian insufficiency (POI) by regulating autophagy of granulosa cells through activating PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Gynecol Endocrinol, 2022, 38(9): 754-764.
- [14] HANG X, ZHANG Z, NIU R, et al. Estrogen protects articular cartilage by downregulating ASIC1a in rheumatoid arthritis[J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 843-858.
- [15] BAI X, GUO X, ZHANG F, et al. Resveratrol combined with 17 $\beta$ -estradiol prevents IL-1 $\beta$  induced apoptosis in human nucleus pulposus via the PI3K/AKT/Mtor and PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway[J]. J Invest Surg, 2021, 34(8): 904-911.
- [16] HU Y, XU J, SHI SJ, et al. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) promotes porcine granulosa cell estradiol production and proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Theriogenology, 2022, 194: 1-12.
- [17] 康华, 马建新, 王旭初, 等. 疏肝滋肾方治疗肝郁肾虚型卵巢储备功能减退临床研究[J]. 河北中医, 2023, 45(10): 1627-1630.
- [18] SHANG Z, FAN M, ZHANG J, 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.
- [19] SEO SK, HONG Y, YUN BH, et al. Antioxidative effects of Korean red ginseng in postmenopausal women: a double-blind randomized controlled trial[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 753-757.

(收稿日期: 2023-02-21, 修回日期: 2023-05-23)