

基于PI3K/Akt信号通路探讨哈蟆油对卵泡发育作用的影响

赵宏宇, 王玉, 孙雪缘, 宋莲莲, 刘新宇*, 邸琳*

(吉林省中医药科学院, 长春 130012)

[摘要] **目的:**探讨哈蟆油对大鼠卵巢卵泡发育、卵巢磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路及胚胎功能的影响,以及哈蟆油雌激素样作用机制。**方法:**雌性Wistar大鼠70只,随机分为正常组、戊酸雌二醇+黄体酮组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),克罗米芬($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,哈蟆油高、低剂量($400,200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,连续灌胃8周。灌胃7周时,所有大鼠测定发情周期。灌胃8周时,每组取4只大鼠进行产仔实验,其余大鼠在测定出发情期当天采血,测定血清雌二醇(E_2),孕酮(P),睾酮(T),促卵泡生成素(FSH),促黄体生成素(LH)含量,摘取子宫、卵巢,称量重量计算器官指数,一侧卵巢制成病理切片,进行不同发育阶段卵泡及黄体计数,另一侧卵巢进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PI3K/Akt信号通路mRNA及蛋白变化。雌性昆明种小鼠40只,随机分为正常组、哈蟆油14 d组($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),哈蟆油28 d组($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),哈蟆油56 d组($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。哈蟆油各组小鼠分别在灌胃14,28,56 d后与雄性小鼠合笼饲养,18 d后观察两侧子宫内胎鼠数目及发育不良胎鼠数目。**结果:**8周灌胃哈蟆油后,大鼠子宫指数明显降低($P<0.05$),血清LH明显降低($P<0.05$),卵巢中黄体数明显减少($P<0.01$),初级卵泡数明显减少($P<0.05$),卵泡闭锁率显著上升($P<0.01$),卵巢皮质层中出现短期内较多黄体或间质腺退化为间质的结构,卵巢PI3K和Akt mRNA表达水平显著升高($P<0.01$),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)mRNA和人第10号染色体缺失的磷酸酶(PTEN)mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);Akt蛋白磷酸化水平有降低趋势,差异无统计学意义;大鼠产仔数明显减少($P<0.05$)。小鼠不同时长灌胃哈蟆油后,受孕率不同程度下降,服用14 d受孕率最低仅30%。灌胃哈蟆油28 d,左右子宫怀胎差值明显增大($P<0.05$)。**结论:**哈蟆油长期灌胃后表现出与长期使用克罗米芬类似的使卵巢过度刺激进而呈现早衰的现象;短期灌胃出现怀孕率下降,一侧卵巢超数排卵,一侧卵巢排卵抑制等现象,对卵泡的影响机制需进一步研究。

[关键词] 哈蟆油; 卵巢; 卵泡; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路; 性激素

[中图分类号] R2-0;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0121-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212137

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210919.1508.002.html>

[网络出版日期] 2021-09-22 9:28

Effect of Ranae Oviductus on Follicular Development Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

ZHAO Hong-yu, WANG Yu, SUN Xue-yuan, SONG Lian-lian, LIU Xin-yu*, DI Lin*

(Jilin Academy of Chinese Medicine Science, Changchun 130012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Ranae Oviductus (RO) on ovarian follicular development, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, and pregnancy function in rats, and the estrogen-like mechanism of OR. **Method:** Seventy female Wistar rats were randomly divided into a normal group, a progynova+ luteohormone group ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}+40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), a clomiphene group ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low-dose($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) RO groups. Rats were administered correspondingly by gavage for eight weeks. After seven weeks of intragastric administration, the estrus cycle of all rats was measured. After eight weeks of intragastric administration, four rats from each group were selected to

[收稿日期] 20210814(008)

[基金项目] 吉林省健康卫生技术创新项目(2019J086);吉林省中医药科技项目(2020103)

[第一作者] 赵宏宇, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理、功能食品功能评价研究, E-mail: 169080112@qq.com

[通信作者] * 刘新宇, 副主任药师, 从事中药药理毒理研究, E-mail: 837796190@qq.com;

* 邸琳, 主任药师, 从事中药药理毒理研究, E-mail: dilin1964@163.com

give birth. For other rats, blood was collected on the day of estrus, and the serum levels of estradiol (E_2), progesterone (P), testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteotropic hormone (LH) were detected. Uterus and ovaries were extracted and weighed to calculate organ index. One ovary was made into pathological sections, and the follicles at different developmental stages and corpus luteum were counted. Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were performed on the other ovary to detect mRNA and protein changes in the PI3K/Akt signaling pathway. Forty female Kunming mice were randomly divided into a normal group and RO groups ($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) with 14 days, 28 days, and 56 days of intervention. Mice in the RO groups were raised with male mice in cages after intragastric administration of OR for 14, 28, and 56 days, respectively. After 18 days, the number of intrauterine fetuses on both sides and the number of stunted fetuses were counted. **Result:** After eight weeks of intragastric administration of OR, the rats showed decreased uterine index ($P < 0.05$), declining serum LH ($P < 0.05$), reduced luteum ($P < 0.01$), dwindled primary follicles ($P < 0.05$), and increased rate of follicle atresia ($P < 0.01$). Additionally, more luteal or interstitial glands degenerated into interstitial structures in the ovarian cortex in a short time. The mRNA expression levels of PI3K and Akt in the ovary were elevated ($P < 0.01$), while the mRNA expression levels of mTOR and PTEN were reduced ($P < 0.01$). The phosphorylation level of Akt protein showed a downward trend without significant difference. For the rats, the number of fetuses was decreased ($P < 0.05$). The pregnancy rate of mice was decreased to varying degrees after administration of RO for different durations, with the lowest in the 14 day RO group, as low as 30%. After 28 days of intragastric administration of RO, the difference in left and right uterine pregnancy increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Long-term administration of RO can lead to premature ovarian failure by over-stimulating the ovary, which is similar to clomiphene. Short-term administration can result in decreased pregnancy rate, excessive ovulation on one side, and inhibition of ovulation on the other side. The influence on follicles needs further exploration.

[Keywords] Ranae Oviductus; ovary; follicle; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway; sex hormone

哈蟆油又称林蛙油,为中国林蛙输卵管干制品,我国自宋朝时期就有使用哈蟆油的记载,清朝时期被誉为“八珍之首”,是珍贵的保健品。哈蟆油味甘咸、性平、归肾、肺经,具有益精补肾、滋阴润肺的功效^[1]。现代科学研究表明,哈蟆油在抗疲劳、抗衰老、增强免疫力方面有一定的功效^[2-5],女性使用后在改善围绝经期症状方面有一定的疗效^[6-7]。在哈蟆油治疗绝经后骨质疏松症的报道^[8]中,患者虽然未能提高骨密度,但血清雌二醇(E_2)含量却提升了1倍。很多动物实验也报道服用哈蟆油后,动物血清 E_2 含量显著上升^[9-10],说明哈蟆油具有明显的雌激素样作用。

目前关于哈蟆油提升血清雌激素水平功能的研究,主要集中在林蛙油中的雌激素样物质上,多数研究认为服用后雌激素水平升高是通过外源性摄入哈蟆油中的雌激素样物质所起的作用,因此主要关注点在于服用哈蟆油后,激素水平变化、子宫和卵巢病理组织学变化以及风险性的评估。目前通过气相色谱-质谱联用检测到不同产地的哈蟆油

中 E_2 含量在 $3 \sim 7.65 \mu\text{g}$,但干虾仁和奶粉等产品中 E_2 含量也能达到 $1 \sim 2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[11],而且哈蟆油食用量远低于水产品和奶粉。再者口服 E_2 由于消化液分解失活以及较强的肝脏首过效应,能进入血液的微乎其微,几乎不能产生雌激素生物活性。因此哈蟆油的雌激素样作用来自于外源性激素补充没有充足的科学依据。

在实验室前期的研究中^[12],以 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃哈蟆油4周,正常大鼠的血清 E_2 显著升高,而去卵巢大鼠血清 E_2 并无明显变化,而且病理组织学检查中发现服用哈蟆油的正常大鼠卵巢中黄体增多,而康岚^[11]也发现大鼠服用哈蟆油后闭锁卵泡增多。提示哈蟆油的雌激素样作用可能是刺激大鼠卵巢的内源作用,且可能和卵巢中卵泡生长相关,由此提出假说“服用林蛙油刺激生长期卵泡发育,使发育成熟的卵泡相应增多,从而形成的黄体也增多,这个过程中增多的卵泡和黄体会导致服用者雌激素水平提高”,本次实验围绕该假说而设计。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

广泛存在于细胞中,是细胞增殖、生长、分化的重要信号通路,在原始卵泡激活、生长期卵泡发育中均有广泛研究^[13-14],本次实验通过研究服用哈蟆油后大鼠卵巢中PI3K/Akt信号通路变化希望为假说的验证提供更多证据。

1 材料

1.1 动物 雌性Wistar大鼠80只,体质量180~200 g;雌性昆明种小鼠40只,体质量20~22 g,均购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物合格证号SCXK(辽)2020-0001,动物使用许可证号SYXK(吉)2015-0009,由吉林省中医药科学院实验动物伦理委员会审核通过,符合实验动物伦理委员会规定(批准号JLSZYKXY2020011)。

1.2 药品与试剂 林蛙油,由通化德正堂野生资源开发有限公司提供,经吉林省中医药科学院邱琳主任药师鉴定为中国林蛙(*Rana chensinensis*)雌蛙输卵管干制品。戊酸雌二醇(法国DELPHARM Lille SAS公司,批号537A);克罗米芬片(塞浦路斯Medochemie Ltd公司,批号L1202);黄体酮软胶囊(浙江医药股份有限公司,批号190701);E₂,孕酮(P),促黄体生成素(LH),促卵泡生成素(FSH),睾酮(T)放射免疫法试剂盒(北京北方生物技术研究所有限公司,批号分别为E9096, E8896, E8696, E8596, E8996);革兰氏染色液(快速法)试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号419061);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号090120201014); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,磷酸化蛋白激酶B(p-Akt),辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(美国CST公司,批号分别为12-4970s, 2-12178s, 29-7074s);Akt,PI3K抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为400000238, 4000002268);牛血清白蛋白(BSA,美国VWR公司,批号20D0656194);SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号B08000150);聚偏氟乙烯(PVDF)印记膜,ECL化学发光显色试剂盒(德国密理博公司,批号分别为R9SA30527, 2203001);TRIzol,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)反转录试剂盒, TB Green™ Premix Ex Taq™ II 荧光染料(大连宝生物工程有限公司,批号分别为AJ31096A, AK71622A, AJF2574A)。

1.3 仪器 XH6080型放免仪(西安核仪器厂);HC-3618R型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);JA2003B型千分之一电子天平(上

海越平科学仪器有限公司);Y-2000型电子天平(常熟双杰测试仪器厂);L18-Y928型搅拌机(九阳股份有限公司);CX23型光学显微镜(日本Olympus公司);FLUOstar Omega型全自动酶标仪(德国BMG公司);SpectroArt200S型超微量核酸测定仪(美国Wealtec公司);Agilent Stratagene Mx3000P型Real-time PCR仪(美国安捷伦公司);Allegra X-30R型高速离心机(美国Beckman公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell型电泳槽,Trans-Blot SD型半干转印槽(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 哈蟆油样品制备及阳性药选择 哈蟆油的处理遵循传统方法以水泡发制备,以料液比1:100预先在蒸馏水中泡发16 h,经高速搅拌机搅拌3 min后备用,灌胃前需重新搅拌15 s。在前期实验中发现,哈蟆油水泡发后的凝胶状溶液经高速搅拌机搅拌后会分布的非常均匀易吸取,可见哈蟆油的水泡发液确为假塑性流体^[15],具有典型的剪切稀化现象,并在稀化后会维持一段时间,期间哈蟆油凝胶分布均匀且易被灌胃器抽取。

为验证哈蟆油雌激素样作用符合“外源激素补充假说”或“促卵泡发育假说”,阳性药依照两种假说选择雌激素、孕酮补充剂和促排卵药两套方案,分别是戊酸雌二醇+黄体酮胶囊以及克罗米芬片,与哈蟆油进行对比。

2.2 动物分组及取材 雌性Wistar大鼠80只,所有大鼠采阴道分泌物涂片,快速革兰氏染色法染色^[16],观察并测定发情周期,选择发情周期明确且周期在4~5 d的雌性大鼠70只,将其随机分为正常组、戊酸雌二醇+黄体酮组、克罗米芬组、哈蟆油高、低剂量组。正常组大鼠灌胃蒸馏水,戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠灌胃戊酸雌二醇1 mg·kg⁻¹和黄体酮40 mg·kg⁻¹,克罗米芬组大鼠灌胃克罗米芬10 mg·kg⁻¹,哈蟆油高、低剂量组大鼠灌胃哈蟆油400, 200 mg·kg⁻¹[11],哈蟆油高剂量组大鼠上、下午2次灌胃哈蟆油溶液,其他组大鼠上午灌胃受试样品,下午灌胃同体积蒸馏水,所有大鼠每次灌胃体积均为20 mL·kg⁻¹,每日2次,连续灌胃8周,每周称量体质量。每组取4只大鼠进行产仔实验,末次灌胃后,与雄性大鼠合笼10 d,怀孕后期单笼饲养并记录产仔数。其他大鼠在测定出第2个发情期到来当天,末次灌胃1 h后戊巴比妥钠麻醉采血,3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径8.1 cm),取血清,保存至-20 °C备用;摘取子宫、卵巢,称量质量,

计算器官指数(器官指数=器官重量/体质量×1 000),一侧卵巢4%多聚甲醛固定保存备用,另一侧卵巢液氮保存备用。

2.3 指标检测

2.3.1 一般情况观察及发情周期检测 每日观察大鼠外观及活动状态,灌胃7周后,所有大鼠每日灌胃受试物后采阴道分泌物涂片,快速革兰氏染色法染色,观察并测定发情周期,直至测定到第2次发情期,计算两次发情期之间时间作为发情周期。

2.3.2 血清性激素检测 取2.2项下的大鼠血清,依照放免法试剂盒说明书中步骤操作,测定其中E₂,P,T,FSH,LH含量。

2.3.3 不同发育阶段卵泡及黄体计数^[17-18] 取2.2项下4%多聚甲醛固定的大鼠卵巢,固定48 h后常规脱水,石蜡包埋,选取卵巢切面最大位置切片,行苏木素-伊红(HE)染色,中性树胶封片。显微镜下观察,不同发育阶段的卵泡,根据结构对其分类计数,本实验中不对原始卵泡进行统计,闭锁卵泡也针对闭锁的初级卵泡和次级卵泡(即生长期卵泡闭锁情况)进行统计。卵泡闭锁率=闭锁卵泡数/(初级卵泡数+次级卵泡数+闭锁卵泡数)×100%。

卵泡镜下分类标准:初级卵泡,100倍镜下观察,1~3层颗粒细胞紧密围绕包裹初级卵母细胞的卵泡;次级卵泡,颗粒细胞层结构紧密,出现明显卵泡腔和卵丘结构的窦状卵泡和成熟卵泡,如切片位置有卵母细胞还可观察透明带和放射冠结构确认;闭锁卵泡,颗粒细胞层疏松,颗粒细胞发生固缩,卵泡结构坍塌大量颗粒细胞无规则的脱落至卵泡腔,以及发生纤维化间质化的卵泡;黄体,400倍镜下观察,外层膜黄体细胞和内部粒黄体细胞胞浆充盈,细胞质中充满黄色颗粒和脂滴,发育良好的新鲜黄体作为黄体计数,退化过程中的黄体不予计数。

2.3.4 Real-time PCR检测卵巢中PI3K, Akt, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和人第10号染色体缺失的磷酸酶(PTEN)mRNA表达水平 在低温、灭酶条件下用TRIzol试剂从卵巢组织中提取总RNA,用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,定量PCR反应程序:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,57℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环。结果以β-actin作为内参,采用2^{-ΔΔCt}相对定量法分析各mRNA表达的影响。引物由吉林省库美生物科技有限公司合成,引物序列见表1。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢中PI3K, Akt, p-Akt蛋白表达水平 低温条件下提取

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PTEN	上游 TGTAAGCTGGAAAGGGACG	20
	下游 CCTCTGACTGGGAATTGTGAC	21
PI3K	上游 GGATGCTGAATGGTACTGGG	20
	下游 TGTAAGAGTGTAATCGCCGTG	21
Akt	上游 GCCCTCAAGTACTCATTCCAG	21
	下游 ACACAATCTCCGACCATAG	20
mTOR	上游 ATTCAATCCATAGCCCCGTC	20
	下游 TGCATCACTCGTTCATCCTG	20
β-actin	上游 ACCTTCTACAATGAGCTGCG	20
	下游 CTGGATGGCTACGTACATGG	20

卵巢组织蛋白,用BCA试剂盒定量,经SDS-PAGE凝胶电泳分离后转印到PVDF膜上,用含5%BSA的TBST缓冲液封闭20 min,加入相应抗体PI3K, Akt, p-Akt, β-actin(稀释倍数均为1:1 000),室温孵育20 min, TBST洗膜,加入二抗(1:2 000),室温孵育20 min,将PVDF膜浸泡到TBST溶液中,配制化学发光液,将其滴加到PVDF膜目的蛋白条带上,室温避光孵育2 min,使用化学发光系统采集条带图片,利用Image J软件对条带灰度值进行定量分析。

2.4 小鼠胚胎实验 选择雌性昆明种小鼠40只,将其随机分为正常组、哈蟆油14 d组、哈蟆油28 d组、哈蟆油56 d组。正常组小鼠灌胃蒸馏水,哈蟆油各组小鼠灌胃哈蟆油剂量为400 mg·kg⁻¹,每日分上、下午各灌胃1次(哈蟆油样品配制方式同1.2.1项),灌胃体积20 mL·kg⁻¹,正常组小鼠灌胃等体积蒸馏水。哈蟆油各组小鼠灌胃14, 28, 56 d后与雄性小鼠按2:1合笼饲养5 d,每日更换雄性小鼠,正常组小鼠在灌胃21 d与哈蟆油组小鼠做同样处置。所有小鼠合笼交配18 d后,选取怀孕成功且体质量大于50 g的小鼠,戊巴比妥钠麻醉开腹,观察两侧子宫内胎鼠数目及发育不良胎数目,不良胎标准为有胎盘位但胎鼠发育初期停滞萎缩、胎鼠发育缓慢体积明显低于其他胎鼠、胎鼠与胎盘发育不良致缺血颜色灰白等。

2.5 统计学处理 使用SPSS 20.0进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数间比较采用One-way ANOVA,发情周期稳定率、产仔率、怀胎率采用卡方检验,以P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况及发情周期 哈蟆油高、低剂量

组大鼠外观状态良好,体质量增长正常,能观察到“发情前期-发情期-发情后期-间期”的稳定发情周期,与正常组大鼠比较,发情周期天数有延长趋势,无显著性差异;克罗米芬组大鼠后期状态萎靡,毛发枯槁发黄,与正常组大鼠比较,体质量增长速度显著降低($P<0.01$),观察不到明确发情周期,阴道分泌物涂片长期观察到大量有核细胞和无核角化细

胞,由于无明确发情周期,无法计算发情周期天数;戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠外观状态良好,与正常组大鼠比较,体质量增长速度有降低趋势,差异无统计学意义,部分大鼠发情周期紊乱,观察不到明确的发情周期,考虑可能受外源激素影响所致,其中发情周期稳定的大鼠测得发情周期天数与正常组大鼠比较无明显差异。见表2。

表2 哈蟆油对大鼠体质量及发情周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=14$)

Table 2 Effect of *Ranae Oviductus* on body weight and estrus cycle in rats ($\bar{x}\pm s, n=14$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	初始体质量/g	最终体质量/g	发情周期稳定率/%	发情周期/d
正常		200.17±7.78	260.16±13.50	100	4.00±0.59
哈蟆油	400	200.48±7.07	260.38±15.94	100	4.54±0.78
	200	200.30±6.73	264.64±15.62	100	4.31±0.75
克罗米芬	10	200.52±6.93	229.20±19.97 ²⁾	0 ²⁾	-
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	200.68±7.18	251.84±13.68	35.7 ¹⁾	4.10±0.65

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表3-9同)。

3.2 对大鼠子宫、卵巢湿重及器官指数的影响 与正常组大鼠比较,哈蟆油高、低剂量组大鼠卵巢指数无明显差异,子宫指数明显降低($P<0.05$),呈现一定的剂量关系;克罗米芬组大鼠卵巢和子宫萎缩严

重,卵巢指数和子宫指数皆显著降低($P<0.01$);服用戊酸雌二醇+黄体酮大鼠,卵巢指数显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),子宫指数无明显变化。见表3。

表3 哈蟆油对大鼠子宫、卵巢湿重及器官指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of *Ranae Oviductus* on wet weight of uterus and ovary and organ index in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	卵巢质量/mg	卵巢指数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	子宫质量/mg	子宫指数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
正常		136.70±22.04	0.51±0.08	477.60±91.75	1.79±0.32
哈蟆油	400	134.44±23.38	0.50±0.09	378.33±74.38 ¹⁾	1.40±0.25 ¹⁾
	200	138.33±13.68	0.51±0.05	404.00±60.56	1.46±0.25 ¹⁾
克罗米芬	10	77.78±15.64 ²⁾	0.35±0.07 ²⁾	284.00±44.24 ²⁾	1.28±0.23 ²⁾
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	103.22±11.78 ²⁾	0.41±0.05 ²⁾	412.88±85.03	1.64±0.39

3.3 对大鼠血清 E_2 ,P,LH,FSH,T含量的影响 与正常组大鼠比较,哈蟆油高剂量组大鼠各血清性激素含量均无明显变化;哈蟆油低剂量组大鼠血清LH明显降低($P<0.05$),FSH有降低的趋势, E_2 有降低趋势,P有升高趋势,差异均无统计学意义;克罗

米芬组大鼠血清FSH明显降低($P<0.05$),血清T明显降低($P<0.05$);戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠血清 E_2 明显上升($P<0.05$),血清P有上升趋势,血清LH和FSH有降低趋势,但差异均无统计学意义。见表4。

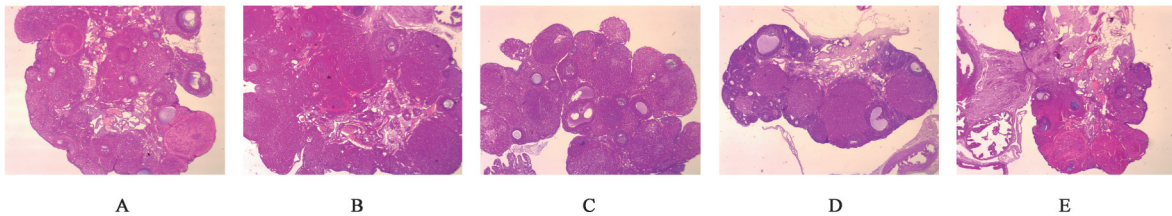
表4 哈蟆油对大鼠血清性激素含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of *Ranae Oviductus* on serum sex hormone content in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$E_2/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	$P/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{LH}/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{FSH}/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{T}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常		8.25±2.71	6.39±2.79	5.29±2.17	3.13±0.85	0.08±0.05
哈蟆油	400	8.46±3.71	7.70±4.54	4.33±1.15	2.98±0.86	0.06±0.03
	200	5.90±2.38	8.71±4.90	3.05±1.26 ¹⁾	2.63±1.01	0.05±0.05
克罗米芬	10	6.44±2.70	8.16±5.69	4.32±1.96	2.26±0.67 ¹⁾	0.03±0.02 ¹⁾
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	17.35±10.78 ¹⁾	10.43±5.79	3.58±1.19	2.52±1.03	0.09±0.06

3.4 对大鼠卵巢各时期卵泡的影响 正常组大鼠卵巢切片镜下可见皮质内不同发育阶段的各级卵泡和新鲜黄体,卵泡周围为由皮质内纤维结缔组织间质支撑,髓质层内可见丰富血管,血管截面直径较大。与正常组比较,哈蟆油高剂量组大鼠卵巢黄体数显著减少($P<0.01$)。哈蟆油低剂量组大鼠初级卵泡数明显减少($P<0.05$),黄体数明显减少($P<0.05$),卵泡闭锁率显著上升($P<0.01$)。哈蟆油组大鼠卵巢中观察到皮质层中较多的纤维化间质结构,其中无卵泡,考虑为短期内大量间质腺(次级卵泡闭锁形成)以及黄体退化而形成。克罗米芬组大鼠

初级卵泡、次级卵泡、黄体均显著减少($P<0.01$),卵泡闭锁率显著上升($P<0.01$)。克罗米芬组大鼠卵巢萎缩严重,卵巢切片面积明显较小,皮质层内各阶段卵泡均较少,该组所有大鼠的卵巢切片中均未观察到新鲜黄体,髓质层萎缩严重,内部血管较少且血管截面直径小。戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠初级卵泡、次级卵泡显著减少($P<0.01$),卵泡闭锁率显著上升($P<0.01$)。戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠卵巢有一定程度的萎缩,皮质层内各阶段卵泡数相应减少,但能观察到新鲜的黄体,髓质层基本正常,可见丰富的血管,血管截面直径较大。见图1,表5。



A. 正常组; B. 哈蟆油高剂量组; C. 哈蟆油低剂量组; D. 克罗米芬组; E. 戊酸雌二醇+黄体酮组

图1 哈蟆油对大鼠卵巢组织病理的影响(HE, ×40)

Fig. 1 Effect of Oviductus Ranae on ovarian histopathology in rats (HE, ×40)

表5 哈蟆油对大鼠卵巢各时期卵泡的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Ranae Oviductus on follicles of rat ovary at various stages ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	初级卵泡/个	次级卵泡/个	黄体/个	闭锁卵泡/个	卵泡闭锁率/%
正常		9.70±4.37	9.50±3.78	2.80±1.55	17.40±9.04	46.31±11.07
哈蟆油	400	7.11±4.59	7.33±5.07	0.67±0.71 ²⁾	16.44±9.21	54.71±13.20
	200	4.89±2.62 ¹⁾	7.22±4.68	1.33±0.71 ¹⁾	22.33±6.89	65.38±11.85 ²⁾
克罗米芬	10	3.89±3.10 ²⁾	5.56±3.74 ²⁾	0.00±0.00 ²⁾	19.00±10.46	67.53±10.48 ²⁾
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	4.22±2.11 ²⁾	4.67±2.23 ¹⁾	2.00±1.12	15.67±5.74	63.98±11.21 ²⁾

3.5 对卵巢 PI3K, Akt, mTOR, PTEN mRNA 表达水平的影响 与正常组大鼠比较,哈蟆油高剂量组大鼠卵巢 PI3K, Akt mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$), mTOR, PTEN mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$);哈蟆油低剂量组大鼠卵巢 PI3K, Akt mRNA

表达水平显著升高($P<0.01$), mTOR mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$);克罗米芬组大鼠卵巢 Akt mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$);戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠卵巢 mTOR, PTEN mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$)。见表6。

表6 哈蟆油对卵巢 PI3K, Akt, mTOR, PTEN mRNA 表达水平影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Ranae Oviductus on mRNA expression levels of PI3K, Akt, mTOR and PTEN in ovary ($\bar{x}\pm s, n=6$)

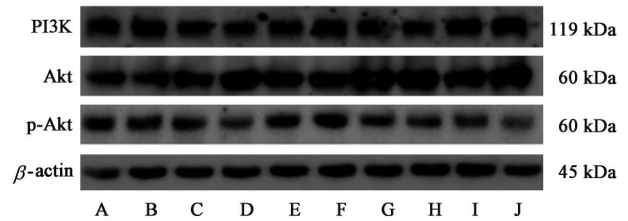
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PI3K	Akt	mTOR	PTEN
正常		1.00±0.04	1.00±0.03	1.00±0.03	1.00±0.05
哈蟆油	400	1.46±0.05 ²⁾	1.52±0.06 ²⁾	0.83±0.04 ²⁾	0.69±0.05 ²⁾
	200	1.25±0.06 ²⁾	1.82±0.05 ²⁾	0.89±0.01 ²⁾	0.93±0.09
克罗米芬	10	0.91±0.08	1.45±0.05 ²⁾	1.00±0.02	0.95±0.04
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	0.99±0.06	1.10±0.27	0.69±0.01 ²⁾	0.79±0.01 ²⁾

3.6 对卵巢中 PI3K, Akt, p-Akt 蛋白表达水平及 Akt 磷酸化水平的影响 与正常组大鼠比较,各组

大鼠卵巢 PI3K 蛋白表达水平均无明显变化。克罗米芬组和戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠卵巢 Akt 蛋白

表达水平显著升高($P<0.01$),哈蟆油高、低剂量组大鼠卵巢 Akt 蛋白表达水平有升高趋势,但差异无统计学意义。各组大鼠卵巢 p-Akt 蛋白表达水平无明显变化。与正常组大鼠比较,克罗米芬组和戊酸雌二醇+黄体酮组大鼠卵巢 Akt 蛋白磷酸化水平明显降低($P<0.05$),哈蟆油高剂量组大鼠卵巢 Akt 蛋白磷酸化水平有降低趋势,但差异无统计学意义。见图 2,表 7。

3.7 对大鼠产仔情况的影响 哈蟆油高、低剂量组大鼠在合笼 10 d 内皆成功受孕,与正常组大鼠比较,哈蟆油低剂量组产仔数明显减少($P<0.05$),且合笼至产仔的时间较正常组增长,停止哈蟆油灌胃后,部分大鼠未能在第 1 个发情周期内怀孕,如果缩短雌性大鼠的合笼时间至 5 d,可能有部分大鼠无法受孕。服用克罗米芬大鼠全部未受孕。服用戊酸



A, B. 正常组; C, D. 哈蟆油高剂量组; E, F. 哈蟆油低剂量组; G, H. 克罗米芬组; I, J. 戊酸雌二醇+黄体酮组

图 2 卵巢中 PI3K, Akt, p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of PI3K, Akt and p-Akt protein in ovary

雌二醇+黄体酮大鼠受孕率 75%,产仔数与正常组比较无明显差异。考虑到母鼠有啃食死胎现象,产仔率不能完全反应排卵情况,因此后续实验采用了怀胎实验,直接观察胎鼠,避免此现象对结果数据产生影响。见表 8。

表 7 哈蟆油对卵巢 PI3K, Akt, p-Akt 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Ranae Oviductus on expression of PI3K, Akt, p-Akt protein in ovary ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	p-Akt/Akt
正常		1.14±0.10	0.73±0.03	1.01±0.01	1.39±0.05
哈蟆油	400	0.98±0.02	0.92±0.02	0.92±0.22	1.00±0.26
	200	1.07±0.02	0.78±0.08	0.94±0.02	1.22±0.15
克罗米芬	10	0.84±0.22	1.04±0.13 ²⁾	0.72±0.08	0.69±0.01 ²⁾
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	1.12±0.15	1.08±0.28 ²⁾	0.72±0.06	0.70±0.24 ²⁾

表 8 哈蟆油对大鼠产仔数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 8 Effect of Ranae Oviductus on birth of rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	怀孕率/%	产仔数/只	合笼-产仔时间/d
正常		100	14.75±2.50	23.25±0.50
哈蟆油	400	100	7.75±7.80	26.00±2.71
	200	100	6.75±5.32 ¹⁾	25.50±2.08
克罗米芬	10	0 ¹⁾	0.00±0.00 ²⁾	-
戊酸雌二醇+黄体酮	1+40	75	11.00±2.00	25.00±2.00

3.8 哈蟆油不同服用时间对小鼠怀胎情况的影响

正常组小鼠怀孕率 100%,与正常组小鼠比较,哈蟆油 14 d 组小鼠怀孕率明显降低($P<0.05$),其他哈蟆油不同服用时间雌性小鼠怀孕率不同程度下降。与正常组小鼠比较,各组成功怀孕的雌鼠总怀胎数无显著性差异,但哈蟆油 28 d 组及 56 d 组标准差较大,表现出怀胎数两极分化趋势。与正常组小鼠比较,服用哈蟆油有怀不良胎数增加的趋势,差异无统计学意义。与正常组小鼠比较,服用哈蟆油 28 d 两侧子宫怀胎差值明显增大($P<0.05$)。哈蟆油 28 d 组中出现多只雌鼠两侧子宫怀胎差值在 7 只以上的情况,最大差值达到 11 只。两侧子宫怀胎差值较大

往往也出现怀胎多一侧的子宫内不良胎数较多,两者具有一定相关性。见表 9。

4 讨论

女性卵巢中的卵泡发育过程不仅影响着女性排卵生育功能,同时也决定了女性月经周期、更年期、绝经期时间以及各时期性激素水平,对依赖于雌激素水平的骨密度、外观皮肤状态、脂肪代谢等都有重要影响。卵泡发育过程大体可以分为四个阶段,原始卵泡-初级生长卵泡-次级生长卵泡-成熟卵泡。原始卵泡作为卵泡发育的起点,同时也是卵泡储备形式,在女性出生前就已经存在于其卵巢皮质层浅层,形成后处于休眠状态,随着时间推进,整

表 9 哈蟆油对小鼠怀孕数量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 9 Effect of Ranae Oviductus on gestation of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	怀孕率/%	总胎数/只	不良胎数/只	左右子宫怀孕差/只
正常		11	100	15.45±2.25	0.36±0.50	0.91±1.44
哈蟆油 14 d	400	10	30 ¹⁾	14.67±1.15	1.33±1.53	0.67±1.15
哈蟆油 28 d	400	9	77.7	15.86±4.38	1.28±2.21	4.71±3.99 ¹⁾
哈蟆油 56 d	400	9	66.6	14.67±4.08	1.17±1.60	1.50±1.52

个原始卵泡池中原始卵泡以相对稳定的速度被激活^[19],转变为初级卵泡,但这个激活过程不受促性腺激素调控,目前研究认为原始卵泡的激活受卵巢内 PI3K 信号通路调控^[20],特别是 PI3K 的负调控因子 PTEN^[21],但其上游调控机制目前仍然未知。原始卵泡一旦激活转变为初级卵泡便进入一个不可逆的生长过程,初期卵母细胞快速增长,颗粒细胞增殖,颗粒细胞层数增加,更重要的是细胞内产生了促性腺激素受体,开始接受下丘脑和垂体的调控,但研究显示在形成卵泡腔之前的初级卵泡阶段,卵泡生长并不依赖于促性腺激素,主要受卵母细胞-颗粒细胞-膜层细胞相互协调的调控^[22]。随着卵泡继续生长至卵泡腔形成,即到达次级卵泡阶段,细胞内产生足够的促性腺激素受体,卵泡开始真正的响应月经周期(发情周期),随着月经初期下丘脑大量分泌 FSH 和 LH,次级卵泡快速生长成熟,直至排卵期生长成为成熟卵泡,在垂体分泌的 LH 达到峰值时发生排卵,而后排卵后的卵泡转化为黄体。但实际上能完成整个卵泡生长过程的卵泡不到总数的 1%,99% 以上的卵泡在原始卵泡-成熟卵泡的发育过程中的不同阶段闭锁退化,甚至在原始卵泡休眠状态中直接闭锁。卵泡闭锁是的一种自发的、受基因调控的程序性死亡,其机制复杂,目前还未明确,主流的假说包括“最优卵泡及卵母细胞选择”“外层颗粒细胞损伤”等^[23-24]。

卵泡另一主要功能是生成雌激素,卵泡颗粒细胞是雌二醇生成的主要场所,细胞内有大量芳香化酶,可将卵泡内膜细胞生成的睾酮转化为雌二醇后释放至外周血液中,从初级卵泡阶段开始,伴随着卵泡生长颗粒细胞增多,直到成熟卵泡,雌二醇生成量逐渐增大,卵泡排卵后逐步转化为黄体,黄体颗粒细胞拥有合成孕酮的功能。人体的晚期次级卵泡和成熟卵泡一般不发生闭锁,如若发生未排卵即发生闭锁黄素化,称为未破裂卵泡黄素化综合征^[25],属于疾病范畴,而猫和啮齿类动物等的晚期次级卵泡闭锁却可以正常发生,次级卵泡闭锁后发

生黄素化称为“间质腺”,类似成熟卵泡排卵后生成黄体的反应,同样可以分泌孕酮,但分泌功能弱于黄体。

本次研究中选择克罗米芬作为促排卵机制的阳性药,其促排卵的主要机制是通过竞争性结合下丘脑的雌激素受体,降低雌激素对下丘脑的反馈抑制,从而使下丘脑大量分泌促性腺激素释放激素(GnRH),继而垂体大量分泌 FSH 和 LH,刺激超过正常数目的次级卵泡成熟。在实验过程中,由于给药周期过长,大鼠长期过度刺激排卵,后期反而发生了明显的卵巢早衰的一系列现象,包括发情周期紊乱,卵巢和子宫萎缩,卵巢各级生长卵泡数目减少,卵泡闭锁率增大,没有黄体生成,失去产仔能力等。服用戊酸雌二醇+黄体酮的大鼠,由于外源激素的长期补充,自身雌激素分泌器官功能受抑制,部分大鼠发情周期紊乱,卵巢发生了一些萎缩,但由于血清雌激素水平良好,子宫基本正常,卵巢各级生长卵泡数目减少,卵泡闭锁率升高,但能正常生成黄体,因而产仔能力基本正常。

在之前的实验中^[12],连续 4 周灌胃 200 mg·kg⁻¹ 哈蟆油,大鼠出现了雌激素水平升高,卵巢内观察到较多黄体的现象。本次实验加倍了灌胃时间和剂量,连续 8 周灌胃 200,400 mg·kg⁻¹ 哈蟆油,低剂量组大鼠反而出现了雌二醇降低,孕酮少量增加的趋势,新鲜黄体的数目明显减少,与之前 4 周灌胃实验结果截然相反,体现出大鼠卵巢功能抑制的表现。其他方面,哈蟆油组大鼠发情周期略有延长,但基本稳定,没有出现紊乱,卵巢质量稳定,子宫质量出现了降低的现象,子宫质量高度依赖于雌二醇水平,结合雌二醇表现,可以判断近期雌二醇水平是偏低的。大鼠促性腺激素水平整体降低,一般雌激素水平降低,会反馈给下丘脑和垂体导致促激素水平升高,但克罗米芬组大鼠也出现了促激素水平降低的现象,考虑可能与之前高促状态或其他对下丘脑、垂体内有反馈抑制的因子有关系,还需要进一步研究,但促性腺激素水平降低的情况与卵泡闭锁率

升高是相符的。在PI3K/Akt信号通路方面,哈蟆油组的PI3K和Akt mRNA表达水平都有明显上升,PTEN mRNA表达水平都有明显下降,但PI3K和Akt蛋白水平没有明显变化,甚至Akt蛋白磷酸化水平有降低的趋势,可见卵巢内mRNA水平有促进生长发育增殖的趋势,但蛋白表达水平却没有变化,这种表现可能与卵巢卵泡过度使用进入衰退耗竭状态有关。

大鼠卵巢病理组织学方面,卵泡闭锁率明显上升,高剂量组新鲜黄体明显较少,在多只大鼠的卵巢切片中未观察到新鲜黄体,多数大鼠卵巢黄体颗粒细胞的细胞质不充盈,黄体质量较差,无法达到正常组新鲜黄体的标准,但较多的次级闭锁卵泡黄素化成为间质腺,间质腺具有分泌孕酮功能,这与雌激素水平降低,孕酮的性激素检测结果稍高相符。有趣的是,在哈蟆油组大鼠的卵巢切片上观察到卵巢皮质层内特殊的纤维化间质非常多,这些间质结构上有别于正常卵巢间质,体积较大,外观呈近圆形,边缘非常清晰相对独立,在这些间质的浅层几乎不存在原始卵泡,内部也不存在生长期卵泡,经判断,这些间质很可能是黄体或者晚期次级卵泡闭锁退化过程中的产物,由于退化时间不久,还未充分代谢转化成正常的卵巢间质结构,由此推断,在之前一段时间,卵巢可能出现黄体或次级卵泡数目的高峰,数目上明显超过正常组。克罗米芬组也有类似的间质结构,但由于卵巢衰退太久,严重萎缩,所以数目很少,从病理组织学考虑,哈蟆油组大鼠卵巢的状态接近于卵巢过度激活使用后的衰退早期。

大鼠产仔实验中,哈蟆油组大鼠产仔数明显减少,实际表现为部分大鼠产仔数接近正常组大鼠,而部分大鼠产仔数非常少的两极分化情况。母鼠有啃食死胎的补充营养的情况,由于大鼠往往在夜间产仔,而次日白天才能进行计数统计,所以无法准确统计死胎,包含死胎的实际产仔数可能高于统计值,而且大鼠合笼时间10 d,部分大鼠并未能在第一个发情周期内怀孕,可能为停药一段时间后,才能恢复产仔能力,因此吸取产仔实验的经验,补充了小鼠怀孕实验,观察哈蟆油不同服用时间对小鼠怀孕情况的影响。小鼠怀孕实验合笼时间为5 d,也就是保证小鼠可交配时间只包含一个发情周期,服用哈蟆油14 d,小鼠怀孕率仅为30%,结合之前的研究分析,这可能和短期服用大剂量哈蟆油导致次级卵泡过多升高雌激素,抑制促性腺激素而导致无法

排卵有关,但缺乏更多的实验证据,需待进一步进行实验验证,服用28 d和56 d,怀孕率有一定提高,但仍然明显低于正常组(怀孕率100%),服用哈蟆油28 d,大量小鼠出现左右子宫怀孕数差值较大的情况,最严重小鼠的一侧子宫怀孕数高达16只,而正常小鼠一侧子宫怀孕一般在6~8只,一侧子宫怀孕数高导致该侧胎鼠发育迟缓,且不良胎数较高。这种一侧怀孕数高,另一侧低的情况,反映出双侧卵巢可能一侧在超排状态,而一侧在抑制状态。

综上,哈蟆油对大、小鼠卵巢及卵泡发育表现出较大的生物活性,长期灌胃后表现出与长期使用克罗米芬类似的使卵巢过度刺激进而呈现早衰的现象,发育成熟卵泡减少(黄体减少,产仔数降低),闭锁或形成间质腺的卵泡增多,整个PI3K/Akt信号通路在DNA转录表达方面表现出促进作用,但在蛋白表达方面没有变化甚至略有抑制;短期灌胃出现怀孕率下降,一侧子宫超数排卵,另一侧子宫排卵抑制等现象。由于实验设计之初低估了哈蟆油在卵巢卵泡方面的生物活性,灌胃周期设计过长,导致对卵巢刺激影响过度,但也为明确哈蟆油对卵巢卵泡的影响机制提供了新的实验证据。根据实验结果,将调整机制假说,并将对哈蟆油短期灌胃的效果进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 姜大成. 中国林蛙与蛤蟆油[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2010:219.
- [2] 赵宏宇,刘回民,李稼晖,等. 林蛙油保健功能及其蛋白分离纯化的研究进展[J]. 农产品加工:学刊,2013,127(7):48-51.
- [3] 王丹彤,王丹辉. 林蛙油化学成分及药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报,2015,31(6):1127-1129.
- [4] YAO H, WANG X J, HUANG L P, et al. Effect of Oviductus Ranae on Cyclin D₁, CDK6 and P15 expressions in the liver tissue of aged male rats[J]. J South Med Univ, 2010, 30(5): 1044-1046.
- [5] LING X M, ZHANG X H, TAN Y, et al. Protective effects of Oviductus Ranae-containing serum on oxidative stress-induced apoptosis in rat ovarian granulosa cells[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 208(8):138-148.
- [6] LI X, SUI X, YANG Q, et al. Oviductus Ranae protein hydrolyzate prevents menopausal osteoporosis by regulating TGF β /BMP2 signaling[J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 299(3): 873-882.

- [7] WANG D H, WU W, TIAN J M, et al. Effect of *Ranae Oviductus* and *Ranae Oviductus* eggs on bone metabolism and osteoporosis [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(7):532-538.
- [8] 王丹辉, 贲越, 韩梅. 林蛙油治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. *中医正骨*, 2014, 26(1):27-30.
- [9] 康岚, 李娜, 姜大成. 林蛙油的雌激素样作用研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(8):25-31.
- [10] LIANG L, ZHANG X H, ZHOU Y, et al. Protective effect of *Oviductus Ranae* capsules on the reproductive organs of aged mice [J]. *J South Med Univ*, 2008, 28(6):982-985.
- [11] 康岚. 林蛙油中雌激素成分的分析及其药理作用研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2015.
- [12] 赵宏宇, 王玉, 刘新宇, 等. 林蛙油提升雌激素机制研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19):296-300.
- [13] 曹婉宁, 董晓英. mTOR通路参与卵泡生长发育相关机制的研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2016, 25(5):469-472.
- [14] 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.
- [15] 龙文敏. 食品胶对林蛙油凝胶特性的影响及其产品创制[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [16] 张婷, 王颖, 王莉. 大鼠阴道涂片两种染色方法比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12):98-101.
- [17] 郑翔, 毕文杰. 卵巢显微制片及观察计数的规范化方法[J]. *实验科学与技术*, 2016, 14(5):37-40, 73.
- [18] 孙莉. 组织学与胚胎学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [19] 张炎, 张华. 哺乳动物卵巢卵泡发育调控机制研究进展[J]. *生理学报*, 2020, 72(1):63-74.
- [20] ZHANG H, LIU K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood [J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(6):779-786.
- [21] REDDY P, LIU L, ADHIKARI D, et al. Oocytespecific deletion of *Pten* causes premature activation of the primordial follicle pool [J]. *Science*, 2008, 319(5863):611-613.
- [22] CLARKE H J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2018, 7(1):e294.
- [23] HULAS-STASIAK M, GAWRON A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(10):967-975.
- [24] MORAIS R, THOMÉ R, LEMOS F, et al. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(2):467-478.
- [25] 朱娜, 谈勇. 未破裂卵泡黄素化综合征[J]. *长春中医药大学学报*, 2015, 31(1):96-99.

[责任编辑 孙丛丛]