

## 枸杞多糖通过下调 miR-23a 减轻顺铂诱导的颗粒细胞损伤

刘柳青<sup>1</sup>, 王坤<sup>1</sup>, 王雪晴<sup>2</sup>, 杜冰心<sup>3</sup>

安徽中医药大学<sup>1</sup>中医学院,<sup>2</sup>药学院,安徽合肥 230012;<sup>3</sup>上海中医药大学附属曙光医院安徽医院妇科,安徽合肥 230038

**摘要:**目的 研究枸杞多糖(LBP)对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞的保护作用及其潜在机制。方法 采用顺铂(2.5 μg/mL, 24 h)诱导人颗粒细胞样肿瘤细胞系(KGN)建立KGN损伤模型,采用不同浓度LBP(100、500、1000 mg/L)干预受损KGN,各组细胞分别用细胞计数试剂盒-8检测细胞活力,流式细胞术检测凋亡率,ELISA法检测抗苗勒管激素(AMH)水平,透射电镜观察超微结构,Western blotting检测凋亡相关蛋白(Bax、caspase-3、Bcl-2)及PI3K/AKT信号通路的表达情况,RT-qPCR法检测微小RNA(miR)-23a表达情况。通过慢病毒转染构建miR-23a过表达/敲低模型,验证LBP的作用机制。结果 顺铂抑制KGN活力( $P<0.01$ ),诱导凋亡( $P<0.01$ ),降低AMH水平( $P<0.01$ ),造成染色质凝聚、细胞核固缩、细胞质空泡化等超微结构异常,并增加促凋亡基因Bax、caspase-3的表达( $P<0.01$ ),减少抑凋亡基因Bcl-2的表达( $P<0.05$ ),下调PI3K/AKT信号通路的表达与活化( $P<0.01$ ),上调miR-23a的含量( $P<0.01$ )。LBP干预可不同程度地逆转上述损伤,中剂量LBP作用24 h可改善KGN细胞活力、凋亡率、内分泌功能和超微结构( $P<0.01$ )。中剂量LBP通过下调miR-23a( $P<0.01$ )激活PI3K/AKT通路( $P<0.01$ ),抑制Bax、caspase-3( $P<0.01$ ),上调Bcl-2( $P<0.05$ )。miR-23a过表达削弱LBP的保护作用,而敲低miR-23a则增强其疗效( $P<0.01$ )。结论 LBP通过抑制miR-23a表达,激活PI3K/AKT通路,抑制顺铂诱导的KGN凋亡,为保护卵巢功能提供了潜在治疗策略。

**关键词:** 枸杞多糖; miR-23a; KGN; 细胞凋亡; PI3K/AKT信号通路

## *Lycium barbarum* polysaccharides alleviates cisplatin-induced granulosa cell injury by downregulating miR-23a

LIU Liuqing<sup>1</sup>, WANG Kun<sup>1</sup>, WANG Xueqing<sup>2</sup>, DU Bingxin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Traditional Chinese Medicine, <sup>2</sup>College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; <sup>3</sup>Department of Gynecology, Anhui Hospital of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

**Abstract: Objective** To evaluate the protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) against cisplatin-induced ovarian granulosa cell injury and investigate its possible mechanisms. **Methods** Human granulosa-like tumor cell line (KGN) were treated with 2.5 μg/mL cisplatin for 24 h, followed by treatment with 100, 500, and 1000 mg/L LBP, and the changes in cell viability, apoptosis, level of anti-Müllerian hormone (AMH), and cell ultrastructure were detected with CCK-8 assay, flow cytometry, ELISA and transmission electron microscopy. The cellular expressions of Bax, caspase-3, Bcl-2, and the PI3K/AKT pathway proteins were analyzed using Western blotting, and the expression of miR-23a was detected with RT-qPCR. KGN cell models with lentivirus-mediated miR-23a overexpression or knockdown were used to verify the therapeutic mechanism of LBP. **Results** Cisplatin treatment significantly inhibited cell viability, induced apoptosis, decreased AMH level, caused ultrastructural abnormalities, increased Bax and caspase-3 expression, and lowered Bcl-2 expression in KGN cells. Cisplatin also suppressed the activation of the PI3K/AKT signaling pathway and upregulated miR-23a expression in the cells. LBP intervention obviously alleviated cisplatin-induced injuries in KGN cells, and in particular, LBP treatment at the medium dose for 24 h significantly improved KGN cell viability, reduced apoptosis, enhanced their endocrine function, and ameliorated ultrastructural abnormalities. Mechanistically, medium-dose LBP obviously activated the PI3K/AKT pathway by downregulating miR-23a in cisplatin-treated cells, subsequently inhibiting Bax and caspase-3 while upregulating Bcl-2. Overexpression of miR-23a weakened while knockdown of miR-23a significantly enhanced the protective effects of LBP. **Conclusion** LBP alleviates cisplatin-induced apoptosis in KGN cells by inhibiting miR-23a expression and activating the PI3K/AKT pathway, suggesting a potential therapeutic strategy for ovarian function preservation.

**Keywords:** *Lycium barbarum* polysaccharides; miR-23a; KGN cells; cell apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway

枸杞多糖(LBP)是传统中药枸杞子中具有较高提取、利用价值的活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗衰老、生

殖保护、神经保护、免疫调节等多种药理作用<sup>[1]</sup>。枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实,能够滋补肝肾、养血益精,可参与对肾主生殖的生理功能的促进和修复,有助于生殖功能的保护,常被用于改善卵巢功能的中药复方之中,如归肾丸<sup>[2,3]</sup>、左归丸<sup>[4]</sup>等传统方剂及部分当代名医的经验方<sup>[5-8]</sup>。而LBP作为枸杞生物活性的重要组成成分,已被证实能够改善卵巢功能衰退实验动物的卵巢功能,降低其卵泡刺激素水平,减少卵泡闭锁,调节动情周期<sup>[9-12]</sup>;体外研究则提

收稿日期:2025-04-23

基金项目:新安医学教育部重点实验室开放课题(2024xayx12);安徽中医药大学徽学研究中心开放基金科研项目(2024HXYYJZX11);安徽省高等学校自然科学基金项目(2022AH050494);安徽中医药大学第一批高层次人才支持计划(2022rcyb003);安徽中医药大学科研基金项目(2021zrzd13)

作者简介/通信作者:刘柳青,博士,讲师,E-mail: liuliuqing@ahtcm.edu.cn

示,LBP可以改善卵巢功能,缓解卵巢衰老,减轻生殖毒性药物对颗粒细胞(GC)的损伤,且这一保护作用与抑制GC凋亡有一定关系<sup>[13-15]</sup>。

微小RNA(miRNA)是参与调节细胞生长、分化、凋亡等生理过程的重要非编码RNA,其异常表达与疾病的病理状态密切相关,是新兴的疾病标志物和潜在的治疗靶点,在卵巢功能的调节、衰退与修复中亦具有不可忽视的作用<sup>[16]</sup>。目前关于LBP改善卵巢功能、调节GC的机制探索多从下游信号通路角度开展<sup>[12,14]</sup>,鲜有涉及上游miRNA调控作用的研究报道,LBP是否通过特定miRNA经下游通路介导调节GC凋亡、影响卵巢功能尚有待于进一步研究。因此,本研究聚焦与卵巢功能<sup>[17-19]</sup>和GC凋亡<sup>[17,20]</sup>关系密切的miR-23a,假设LBP可以通过调节miR-23a减轻顺铂诱导的GC损伤。基于此设计实验检测经不同处理后的GC状态,具体处理组别主要有顺铂单独处理组、顺铂+LBP共处理组、以及顺铂+LBP+过表达/低表达miR-23a组,检测指标涵盖GC的活力、凋亡状况、PI3K/AKT信号通路的表达情况以及miR-23a的表达水平,旨在从非编码RNA层面深入探索LBP改善卵巢功能的潜在分子机制,为卵巢功能保护策略拓展新的潜在调控靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

人颗粒细胞样肿瘤细胞系(KGN)来自中国科学院细胞库(中国上海)。

慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司构建,包括Lv-miR-23a-3p-mimics及其阴性对照Lv-miR-23a-3p-mimics-NC, Lv-miR-23a-3p-inhibitors及其阴性对照Lv-miR-23a-3p-inhibitors-NC。微小RNA(miRNA)引物由上海生工生物有限公司合成。

LBP、顺铂(CDDP)(MCE中国上海皓元生物医药科技有限公司)。胎牛血清、DMEM/F-12培养基(Gibco),青霉素G(江苏博奥森生物技术有限公司),硫酸链霉素(Invitrogen),细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(江苏凯基生物技术股份有限公司),Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(联科生物技术股份有限公司),胰酶、RIPA裂解缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术股份有限公司),PBS(Hyclone),抗苗勒管激素(AMH)ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),TRIzol试剂盒(Invitrogen),PrimeScriptRT试剂盒(Takara),Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus(novoprotein),聚偏二氟乙烯膜、增强型化学发光试剂盒(Biosharp),兔抗p-PI3K、鼠抗PI3K(Bioss),兔抗p-AKT、兔抗AKT(CST),兔抗Bcl-2、兔抗Bax、兔抗caspase-3(Abcam),鼠抗 $\beta$ -actin(Proteintech)。

细胞培养箱(Thermo),流式细胞仪(Becton Dickinson),酶标仪(深圳杜雷生命科学股份有限公司),离心机、高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器设备有限公司),倒置显微镜(OLYMPUS),透射电子显微镜(TEM)(日本日立公司),切片机(徕卡),数码相机Morada(Olympus Soft Image Solutions GmbH),普通PCR仪(杭州晶格科学仪器有限公司),常温微量离心机、低速迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),荧光定量PCR仪、NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific),微孔板迷你离心机(杭州奥盛仪器有限公司),电泳仪、电泳槽、转膜仪(上海天能科技有限公司),磁力加热搅拌器(常州市人和仪器厂),自动曝光仪(上海培清科技有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 顺铂剂量筛选及KGN损伤模型的建立 KGN在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素G和0.1 mg/mL硫酸链霉素的DMEM/F-12培养基中培养,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的湿润环境中,待对数生长期用于实验。

将细胞分为5组:空白组(NC)、顺铂1.25  $\mu$ g/mL组(CDDP 1.25)、顺铂2.5  $\mu$ g/mL组(CDDP 2.5)、顺铂5  $\mu$ g/mL组(CDDP 5)、顺铂10  $\mu$ g/mL(CDDP 10)。各组分别处理0、12、24、48 h后,通过CCK-8检测以选择顺铂的最佳剂量及最佳处理时长,从而建立KGN损伤模型。

1.2.2 LBP剂量筛选及处理时长确定 将对数生长期细胞分为5组:空白组(NC)、模型组(MC:CDDP)、LBP低剂量组(LBP-L:CDDP+LBP 100 mg/L)、LBP中剂量组(LBP-M:CDDP+LBP 500 mg/L)、LBP高剂量组(LBP-H:CDDP+LBP 1000 mg/L)。MC及LBP各剂量组均予1.2.1中确定的最佳剂量及最佳处理时长的顺铂建立KGN损伤模型,后LBP各组分别予不同浓度LBP处理。LBP处理12、24、48 h后各组分别进行CCK-8检测,以明确LBP处理的最佳剂量及时长。

1.2.3 慢病毒转染 将细胞分为5组:空白组(NC)、Lv-miR-23a-inhibitor-阴性对照组(inhibitor-NC;加入10  $\mu$ L的Lv-miR-23a-3p-inhibitor-NC进行转染)、Lv-miR-23a-inhibitor组(inhibitor;加入10  $\mu$ L的Lv-miR-23a-3p-inhibitor进行转染)、Lv-miR-23a-mimic-阴性对照组(mimic-NC;加入10  $\mu$ L的Lv-miR-23a-3p-mimic-NC进行转染)、Lv-miR-23a-mimic组(mimic;加入10  $\mu$ L的Lv-miR-23a-3p-mimic进行转染)。各组转染48 h后,通过qRT-PCR检测miR-23a的表达验证转染效果。

1.2.4 慢病毒转染KGN后的顺铂和LBP处理 将细胞分为7组:空白组(NC)、模型组(MC:CDDP)、LBP组(LBP:CDDP+LBP)、Lv-miR-23a-inhibitor-NC+LBP

组 (inhibitor-NC+LBP: Lv-miR-23a-3p-inhibitor-NC 转染 +CDDP+LBP)、Lv-miR-23a-inhibitor+LBP 组 (inhibitor+LBP: Lv-miR-23a-3p-inhibitor 转染 +CDDP+LBP)、Lv-miR-23a-mimic-NC+LBP 组 (mimic-NC+LBP: Lv-miR-23a-3p-mimic-NC 转染 +CDDP+LBP)、Lv-miR-23a-mimic+LBP 组 (mimic+LBP: Lv-miR-23a-3p-mimic 转染 +CDDP+LBP)。慢病毒转染方法同 1.2.3, 顺铂剂量和处理时间同 1.2.2, LBP 治疗采取 1.2.2 中确定的最佳剂量和最佳处理时长。

1.2.5 CCK-8 检测细胞活力 收集各组细胞, 将细胞种植于 96 孔板 (5×10<sup>3</sup> 细胞/孔) 至细胞单层铺满孔底, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 孵育过夜, 倒置显微镜下观察。各组培养不同时间后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 继续培养 1~4 h。在酶联免疫检测仪测量各孔的吸光值 A<sub>450nm</sub>。同时设置空白孔 (培养基、CCK-8)。

1.2.6 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡 收集待测细胞并用 PBS 重悬。根据试剂盒说明, 用 Annexin V 和碘化丙啶 (PI) 双重染色识别凋亡细胞。通过流式细胞仪分析凋亡情况。

1.2.7 ELISA 法检测 AMH 依据 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清中 AMH 的水平。

1.2.8 TEM 观察细胞形态 采用 TEM 观察细胞超微结构的改变。收集细胞并立刻固定到 2.5% 戊二醛中 24 h, 1% 锇酸后固定 2 h, 然后用 70% 乙醇醋酸铀染色 3 h, 最后用乙醇脱水并包埋。包埋物行冠状切片 (切片厚度 70 nm, 切片机型号为 leica UC-7), 铅电子染色。拍照以观察其细胞凋亡的结构。

1.2.9 RT-qPCR 分析检测 miR-23a 表达 按照制造商的说明使用 TRIzol 试剂盒, 从每组裂解的 KGN 细胞中提取总 RNA。使用 NanoDrop 2000 测定提取 RNA 的浓度。使用 PrimeScriptRT 试剂盒进行 cDNA 合成, 并在

Bio-Rad CFX96 系统上使用 SYBR Green Master Mix (Takara) 完成 qRT-PCR。RT-qPCR 过程包括总共 40 个扩增周期: 95 °C 变性 15 s; 58 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 42 s。基于 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算 miR-23a 的相对表达量, 并与 U6 的表达标准化。引物如下: miR-23a-3p, 正向: 5'-ACACTCCAGCTGGGATCACATTGCCAGGG-3' 和反向: 5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3'; U6, 正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 和反向: 5'-ACGCTTCACGAATTCGCGT-3'。

1.2.10 Western blotting 法检测蛋白表达 待测细胞在含有 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解缓冲液中裂解, 通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量蛋白质浓度。等量的蛋白质在 SDS-PAGE 上用 12% 凝胶分离。电泳后, 将凝胶转移到聚偏二氟乙烯膜。膜在 10% 脱脂牛奶 (在 PBS, pH 7.2, 含 0.1% Tween-20) 中封闭 2 h, 然后在 4 °C 下用一抗过夜, 随后在室温下用辣根过氧化物酶偶联的二抗 (抗兔或抗鼠 IgG, 稀释倍数 1:20 000) 1 h。用增强型化学发光试剂盒检测条带, 并使用 ImageJ 软件进行密度分析。使用的一抗为: 抗 p-PI3K (1:500), 抗 PI3K (1:1000), 抗 p-AKT (1:2000), 抗 AKT (1:1000), 抗 Bcl-2 (1:1000), 抗 Bax (1:1000), 抗 Caspase-3 (1:5000)。

1.2.11 统计学分析 使用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差表示, 单因素方差分析用于评估多组间差异, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 顺铂损伤 KGN 的细胞活力

通过 CCK-8 检测, 可见顺铂对 KGN 活力的损伤具有一定的剂量依赖性和时间依赖性 (表 1, 图 1)。根据不同处理时长的量效关系和半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 选择 2.5 μg/mL 顺铂处理 24 h 为后续实验的造模方案。

表 1 顺铂处理 0、12、24、48 h 后各组细胞活力

Tab.1 KGN cell viability after cisplatin treatment at different concentrations for 0, 12, 24, and 48 h (n=6, Mean±SD)

Group	CDDP exposure duration(h)			
	0	12	24	48
NC	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
CDDP 1.25	0.97±0.15	0.87±0.10	0.65±0.07 <sup>a</sup>	0.61±0.07 <sup>a</sup>
CDDP 2.5	0.98±0.14	0.77±0.09 <sup>b</sup>	0.50±0.03 <sup>a</sup>	0.41±0.04 <sup>a</sup>
CDDP 5	0.94±0.12	0.65±0.08 <sup>a</sup>	0.42±0.03 <sup>a</sup>	0.28±0.04 <sup>a</sup>
CDDP 10	0.97±0.10	0.55±0.10 <sup>a</sup>	0.32±0.03 <sup>a</sup>	0.25±0.06 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.01, <sup>b</sup>P<0.05 vs NC group.

### 2.2 LBP 改善顺铂损伤 KGN 的活力

观察 LBP 对顺铂损伤 KGN 在细胞活力方面的改善效果, 并筛选最佳治疗时长。CCK-8 检测结果显示,

顺铂损伤细胞活力后, 中剂量 LBP 作用 24 h、48 h 均可见显著改善 (P<0.01, 表 2), 故选择 24 h 为 LBP 治疗最佳时长以进行后续实验。

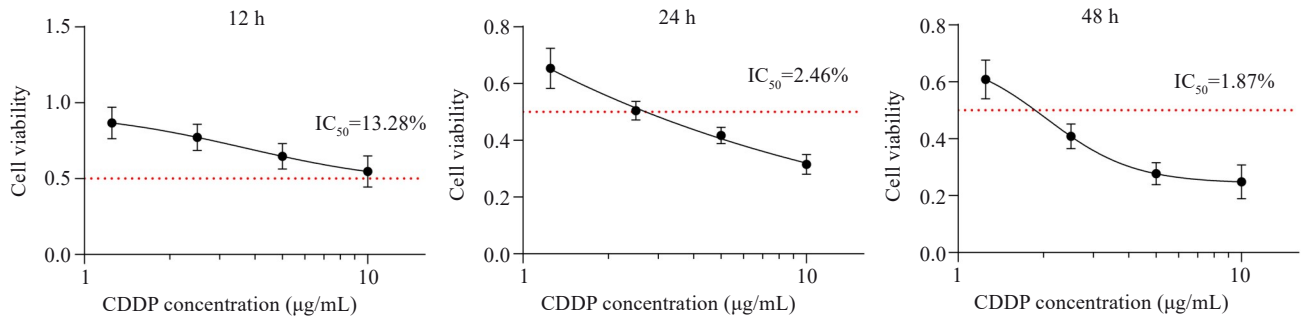


图1 不同处理时长下顺铂的IC<sub>50</sub>曲线

Fig.1 IC<sub>50</sub> curves of cisplatin in KGN cells with different exposure durations.

表2 LBP处理12、24、48 h后各组细胞活力

Tab.2 KGN cell viability after LBP treatment for 12, 24, and 48 h (n=6, Mean±SD)

Group	LBP exposure duration (h)		
	12	24	48
NC	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
MC	0.71±0.04 <sup>a</sup>	0.59±0.06 <sup>a</sup>	0.52±0.07 <sup>a</sup>
LBP-L	0.72±0.04	0.74±0.03 <sup>c</sup>	0.58±0.07 <sup>c</sup>
LBP-M	0.80±0.09	0.85±0.06 <sup>c</sup>	0.74±0.04 <sup>c</sup>
LBP-H	0.76±0.11	0.70±0.06 <sup>f</sup>	0.65±0.04 <sup>df</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01, <sup>d</sup>P<0.05 vs MC group; <sup>e</sup>P<0.01, <sup>f</sup>P<0.05 vs LBP-M group.

2.3 LBP改善顺铂损伤KGN的凋亡

与空白组相比,模型组经顺铂处理的KGN凋亡率显著升高(P<0.01);与模型组相比,LBP各剂量组细胞凋亡率得到改善,且中剂量组的凋亡率显著低于低、高剂量组(P<0.01,表3,图2)。

2.4 LBP改善顺铂损伤KGN的内分泌功能

与空白组相比,模型组KGN分泌AMH显著减少(P<0.01);与模型组相比,LBP各治疗组KGN分泌AMH的情况得到显著改善,且中剂量组疗效最佳(P<0.01,表4)。

2.5 LBP改善顺铂损伤KGN超微结构

TEM观察各组KGN形态与结构特点(图3)。与空白组相比,对照组KGN细胞核中的染色质凝聚、边缘

表3 各组KGN凋亡率

Tab.3 Apoptosis rate of KGN cells in different groups (n=3, Mean±SD)

Group	Apoptosis rate (%)
NC	5.27±0.22
MC	45.70±1.14 <sup>a</sup>
LBP-L	29.29±0.52 <sup>cc</sup>
LBP-M	16.55±0.02 <sup>c</sup>
LBP-H	27.82±0.28 <sup>cc</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01 vs MC group; <sup>cc</sup>P<0.01 vs LBP-M group.

化,细胞核高度固缩,细胞质出现空泡结构;与模型组相比,LBP各组细胞损伤减轻,线粒体空泡化减少。

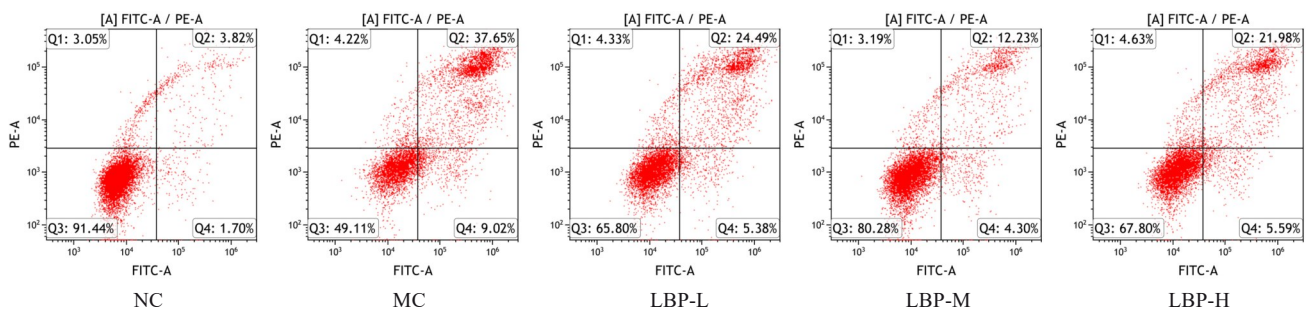


图2 各组KGN凋亡情况

Fig.2 KGN cell apoptosis in each group.

表4 各组AMH水平

Tab.4 AMH levels in KGN cell in each group (n=6, Mean±SD)

Group	AMH (pg/mL)
NC	370.05±14.23
MC	45.99±2.23 <sup>a</sup>
LBP-L	155.49±9.19 <sup>ce</sup>
LBP-M	209.59±11.30 <sup>c</sup>
LBP-H	182.18±6.44 <sup>ce</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01 vs MC group; <sup>e</sup>P<0.01 vs LBP-M group.

2.6 LBP改善顺铂损伤KGN凋亡相关蛋白

与空白组相比,模型组促凋亡蛋白Bax、caspase-3上调(P<0.01),抑凋亡蛋白Bcl-2下调(P<0.05),表明模型组KGN凋亡水平增加;与模型组相比,LBP各组促凋亡蛋白Bax、caspase-3下调(P<0.01),抑凋亡蛋白Bcl-2上调(LBP-L组P<0.01,其余P<0.05),LBP能减轻KGN凋亡(表5,图4)。

2.7 LBP调控顺铂损伤KGN的PI3K/AKT信号通路

与空白组相比,模型组p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT的蛋白相对表达量下调(P<0.01);与模型组相比,LBP-M、LBP-H组p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT的蛋白相对表达量上调,LBP-L组p-PI3K、p-AKT、AKT的蛋白相对表达量上调(P<0.01,表6,图5)。

2.8 LBP可调节顺铂损伤KGN的miR-23a表达

与空白组相比,模型组KGN中miR-23a上调,而LBP的治疗可下调miR-23a表达(P<0.01,表7)。

2.9 慢病毒转染效果验证

与未经转染的空白组KGN相比,转染Lv-miR-23a-inhibitor的KGN中miR-23a减少,转染Lv-miR-23a-mimic的KGN中miR-23a增加(P<0.01),而转染Lv-miR-23a-inhibitor-NC、Lv-miR-23a-mimic-NC的KGN中miR-23a变化不显著(表8)。

2.10 LBP通过调节miR-23a改善顺铂损伤KGN的结构与功能

综合以上结果,可见LBP-M总体疗效最佳,故以LBP 500 mg/L作用24 h的LBP处理方案继续后续实验。通过CCK-8检测,可见在LBP改善顺铂诱导KGN的活力降低和凋亡增加的基础上(P<0.01),miR-23a的下调可进一步增加KGN细胞活力(P=0.307),减少KGN细胞凋亡(P<0.01),而其过表达则明显削弱了LBP的抑凋亡作用(P<0.01,表9,图6)。通过TEM亦可观察到模型组KGN染色质高度凝聚、细胞核严重固缩、核膜断裂、细胞质较多空泡形成的现象在LBP组得到改善,而miR-23a敲低组与LBP组相比可见更轻的染色质聚集和细胞质空泡改变,miR-23a过表达组则呈现出比LBP组更严重的染色质聚集和更多的细胞质空泡改变(图7)。

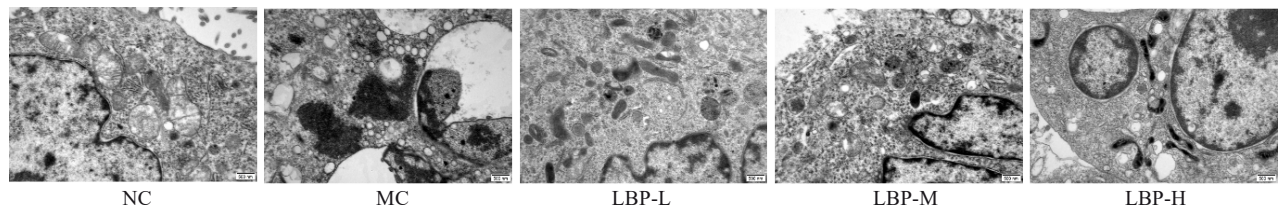


图3 各组KGN的超微结构

Fig.3 Ultrastructure of KGN cells in each group (TEM, original magnification: ×25000).

表5 各组KGN凋亡相关蛋白相对表达量

Tab.5 Relative expression levels of apoptosis-related proteins in KGN cells in each group (n=3, Mean±SD)

Group	Bax	Caspase-3	Bcl-2
NC	0.21±0.01	0.14±0.00	0.42±0.04
MC	0.45±0.02 <sup>a</sup>	0.42±0.01 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>b</sup>
LBP-L	0.39±0.01 <sup>ce</sup>	0.37±0.00 <sup>ce</sup>	0.25±0.02 <sup>c</sup>
LBP-M	0.28±0.03 <sup>c</sup>	0.27±0.00 <sup>c</sup>	0.38±0.04 <sup>d</sup>
LBP-H	0.36±0.02 <sup>ce</sup>	0.32±0.00 <sup>ce</sup>	0.28±0.00 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>P<0.01, <sup>b</sup>P<0.05 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01, <sup>d</sup>P<0.05 vs MC group; <sup>e</sup>P<0.01 vs LBP-M group.

miR-23a的表达变化也影响了KGN分泌AMH的情况。在LBP减轻顺铂诱导KGN的AMH分泌抑制的基础上(P<0.01),miR-23a的敲低进一步改善了KGN的内分泌功能,而其过表达则削弱了LBP的治疗效果

(P<0.01,表10)。

检测各组细胞miR-23a的表达情况,可见在LBP扭转顺铂造成的miR-23a上调的基础上(P<0.01),转染Lv-miR-23a-inhibitor可进一步下调miR-23a的表达,

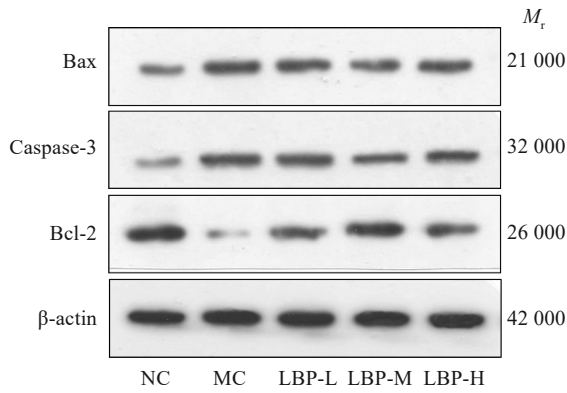


图4 Western blotting法检测各组Bax、Caspase、Bcl-2的表达

Fig.4 Expressions of Bax, caspase and Bcl-2 in KGN cells in each group detected by Western blotting.

表6 各组KGN PI3K/AKT信号通路蛋白相对表达量

Tab.6 Relative protein expression levels of the PI3K/AKT signaling pathway in KGN cells in each group (n=3, Mean±SD)

Group	p-PI3K	PI3K	p-AKT	AKT
NC	0.25±0.01	0.47±0.01	0.47±0.01	0.48±0.01
MC	0.06±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>a</sup>
LBP-L	0.09±0.01 <sup>ce</sup>	0.24±0.02 <sup>f</sup>	0.29±0.01 <sup>ce</sup>	0.41±0.01 <sup>ce</sup>
LBP-M	0.16±0.01 <sup>c</sup>	0.38±0.00 <sup>c</sup>	0.42±0.02 <sup>c</sup>	0.46±0.01 <sup>c</sup>
LBP-H	0.12±0.01 <sup>ce</sup>	0.31±0.00 <sup>ce</sup>	0.35±0.01 <sup>ce</sup>	0.43±0.01 <sup>ce</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01 vs MC group; <sup>e</sup>P<0.01, <sup>f</sup>P<0.05 vs LBP-M group.

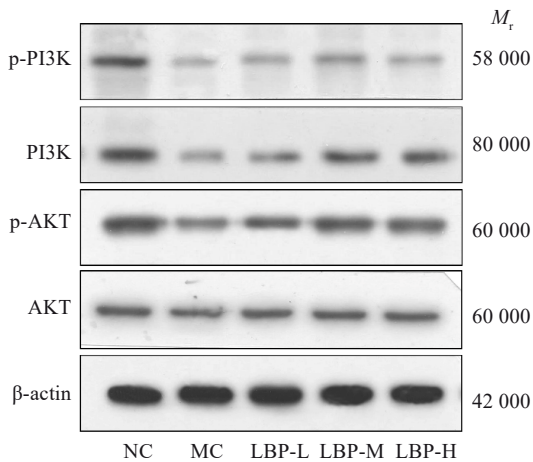


图5 Western blotting法检测各组p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT的表达

Fig.5 Expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT in KGN cells in each group detected by Western blotting.

而转染Lv-miR-23a-mimic可削弱LBP下调miR-23a的作用(P<0.01,表11)。

### 2.11 LBP通过调节miR-23a调控KGN中PI3K/AKT信号通路和细胞凋亡相关蛋白的表达

miR-23a表达的变化可影响LBP对KGN中PI3K/

表7 各组KGN miR-23a表达量

Tab.7 miR-23a expression levels in KGN cells in each group (n=6, Mean±SD)

Group	MiR-23a
NC	1.00±0.02
MC	2.50±0.13 <sup>a</sup>
LBP-L	1.89±0.05 <sup>ce</sup>
LBP-M	1.56±0.06 <sup>c</sup>
LBP-H	1.66±0.08 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01 vs MC group; <sup>e</sup>P<0.01 vs LBP-M group.

表8 慢病毒转染对miR-23a表达的影响

Tab.8 Effect of lentiviral transfection on miR-23a expression in KGN cells (n=6, Mean±SD)

Group	MiR-23a
NC	1.00±0.09
inhibitor-NC	1.02±0.07
inhibitor	0.43±0.02 <sup>ab</sup>
mimic-NC	0.98±0.06
mimic	1.65±0.04 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>b</sup>P<0.01 vs inhibitor-NC group; <sup>h</sup>P<0.01 vs mimic-NC group.

表9 miR-23a对KGN细胞活力和凋亡率的影响

Tab.9 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on KGN cell viability and apoptosis rate (Mean±SD)

Group	Cell viability (n=6)	Apoptosis rate (% , n=3)
NC	1.00±0.00	5.50±0.53
MC	0.41±0.03 <sup>a</sup>	44.49±0.38 <sup>a</sup>
LBP	0.74±0.06 <sup>c</sup>	18.20±0.84 <sup>c</sup>
inhibitor-NC+LBP	0.76±0.08 <sup>c</sup>	17.32±0.23 <sup>c</sup>
inhibitor+LBP	0.88±0.09 <sup>c</sup>	13.12±0.39 <sup>cei</sup>
mimic-NC+LBP	0.76±0.04 <sup>c</sup>	17.64±0.35 <sup>c</sup>
mimic+LBP	0.64±0.09 <sup>d</sup>	27.62±0.73 <sup>cej</sup>

<sup>a</sup>P<0.01 vs NC group; <sup>c</sup>P<0.01, <sup>d</sup>P<0.05 vs MC group; <sup>e</sup>P<0.01 vs LBP group; <sup>i</sup>P<0.01 vs inhibitor-NC+LBP group; <sup>j</sup>P<0.01 vs mimic-NC+LBP group.

AKT信号通路和细胞凋亡相关蛋白表达的调节。LBP上调顺铂损伤KGN的PI3K/AKT信号通路表达(P<0.01),在此基础上,miR-23a的敲低进一步促进了该通路中关键蛋白的表达和活化(P<0.01),而其过表达则削弱了LBP的上调作用(PI3K:P<0.05,其余P<0.01,表12、图8);LBP可减少顺铂损伤KGN中促凋亡蛋白Bax、caspase-3的表达、增加抑凋亡蛋白Bcl-2的表达(P<0.01),在此基础上,miR-23a的敲低进一步减少了Bax、caspase-3的表达、增加了Bcl-2的表达,而其过表达则起到了相反的作用(P<0.01,表13、图9)。

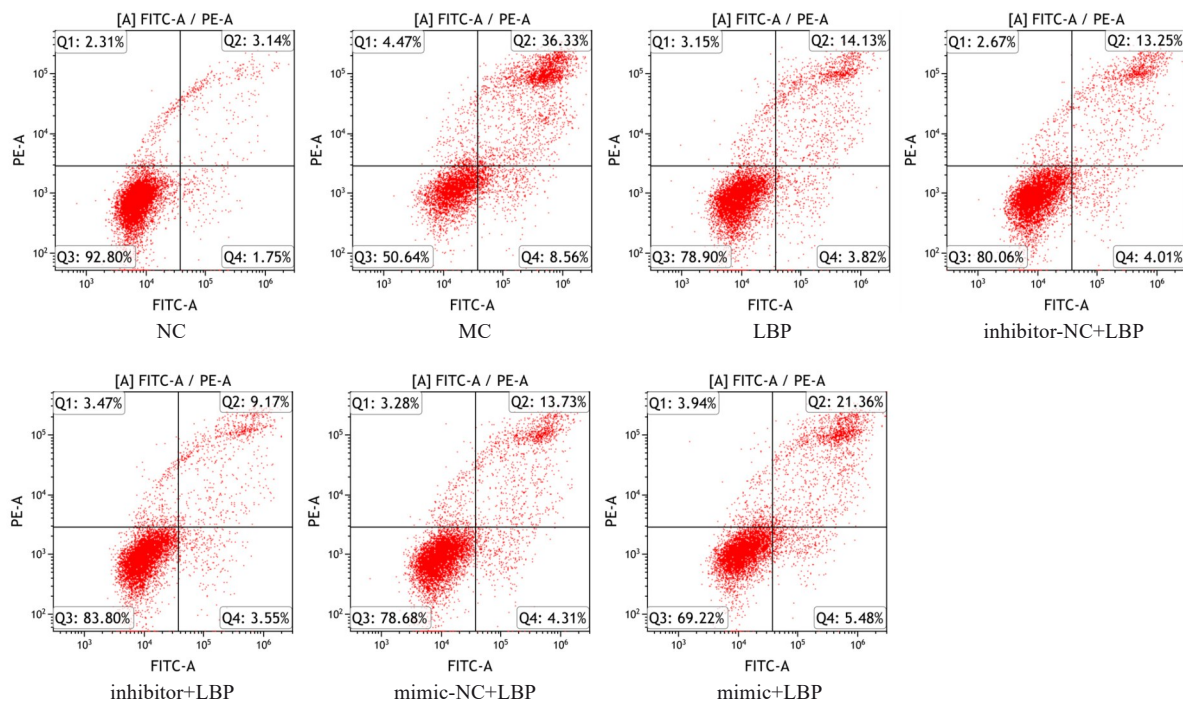


图6 miR-23a对LBP调节细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on LBP-mediated regulation of KGN cell apoptosis.

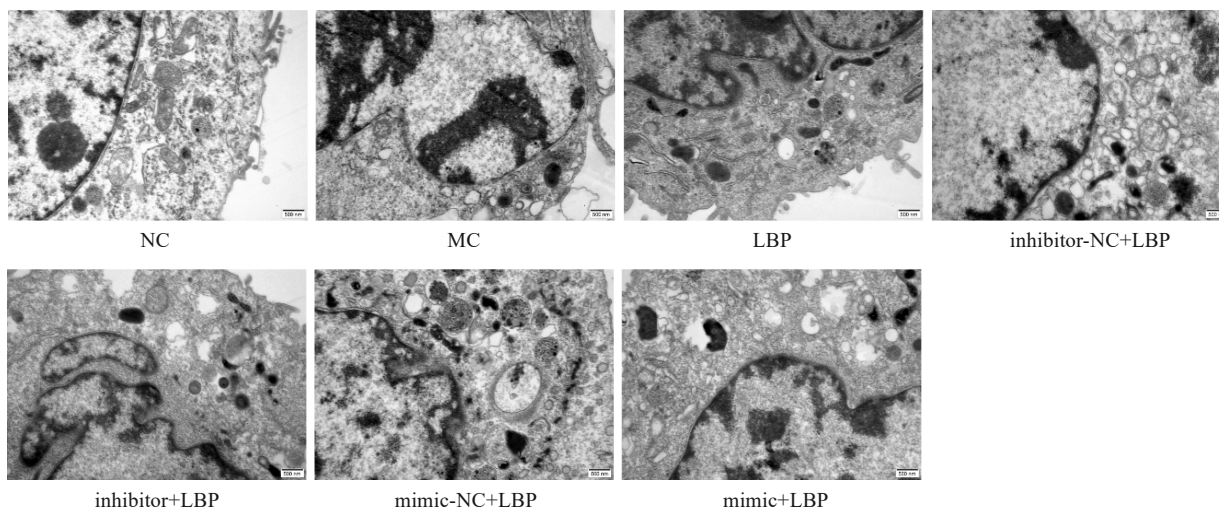


图7 miR-23a对KGN超微结构的影响

Fig.7 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on the ultrastructure of KGN cells (TEM, ×25000).

### 3 讨论

卵巢功能的过早衰退或丧失是女性生殖领域研究者极为关注的问题,因为它与女性的生育能力下降密切相关。根据不同的临床表现(月经和生育结局)、性激素水平以及其他辅助检查的结果,研究者们提出了包括卵巢早衰、早发性卵巢功能不全、卵巢储备功能减退、卵巢低反应等在内的不同概念,以反映卵巢功能衰退的不同程度或不同阶段<sup>[21]</sup>。过往研究已表明,上述多种卵巢功能衰退性疾病的发病机制与GC的过度凋亡关系密切<sup>[22-25]</sup>。

GC是卵泡中的重要体细胞,对卵母细胞的发育和

成熟至关重要。它们可通过释放类固醇激素和生长因子,参与调节卵泡发育和女性卵巢功能的正常维持;同时,它们也是闭锁卵泡中首先发生凋亡的细胞,在卵泡闭锁过程中发挥启动和介导作用<sup>[26]</sup>。细胞凋亡是一个有序的细胞死亡过程,它涉及细胞停止生长和分裂,并最终导致细胞程序性死亡,而不会使其内容物溢出到周围环境中<sup>[27]</sup>。适当水平的GC凋亡和卵泡闭锁对于优势卵泡的筛选和卵泡正常发育的维持至关重要<sup>[28]</sup>,但异常高水平的GC凋亡和卵泡闭锁则会导致卵巢功能及生殖能力的过早衰退<sup>[29]</sup>。

在本研究中,我们亦发现,具有生殖毒性的顺铂会

表 10 miR-23a对KGN分泌AMH的影响

Tab. 10 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on AMH secretion in KGN cells ( $n=6$ , Mean $\pm$ SD)

Group	AMH (pg/mL)
NC	358.92 $\pm$ 16.15
MC	54.23 $\pm$ 5.93 <sup>a</sup>
LBP	217.87 $\pm$ 8.79 <sup>c</sup>
inhibitor-NC+LBP	212.64 $\pm$ 7.93 <sup>c</sup>
inhibitor+LBP	259.52 $\pm$ 6.73 <sup>cei</sup>
mimic-NC+LBP	210.80 $\pm$ 8.02 <sup>c</sup>
mimic+LBP	163.54 $\pm$ 5.61 <sup>cej</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs NC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs MC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs LBP group; <sup>i</sup> $P<0.01$  vs inhibitor-NC+LBP group; <sup>j</sup> $P<0.01$  vs mimic-NC+LBP group.

表 11 慢病毒转染对LBP调节miR-23a表达的影响

Tab. 11 Effect of lentiviral transfection on LBP-mediated regulation of miR-23a expression in KGN cells ( $n=6$ , Mean $\pm$ SD)

Group	MiR-23a
NC	1.00 $\pm$ 0.05
MC	2.49 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
LBP	1.58 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
inhibitor-NC+LBP	1.58 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
inhibitor+LBP	1.20 $\pm$ 0.05 <sup>cei</sup>
mimic-NC+LBP	1.59 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
mimic+LBP	1.99 $\pm$ 0.12 <sup>cej</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs NC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs MC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs LBP group; <sup>i</sup> $P<0.01$  vs inhibitor-NC+LBP group; <sup>j</sup> $P<0.01$  vs mimic-NC+LBP group.

表 12 miR-23a对LBP调节PI3K/AKT信号通路相对表达量的影响

Tab. 12 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on LBP-mediated regulation of PI3K/AKT signaling pathway in KGN cells ( $n=3$ , Mean $\pm$ SD)

Group	p-PI3K	PI3K	p-AKT	AKT
NC	0.34 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.00
MC	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
LBP	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
inhibitor-NC+LBP	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.43 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
inhibitor+LBP	0.29 $\pm$ 0.00 <sup>cei</sup>	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>cei</sup>	0.40 $\pm$ 0.02 <sup>cei</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>cei</sup>
mimic-NC+LBP	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
mimic+LBP	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>cej</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>ej</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>ej</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>ej</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs NC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs MC group; <sup>c</sup> $P<0.01$ , <sup>i</sup> $P<0.05$  vs LBP group; <sup>i</sup> $P<0.01$  vs inhibitor-NC+LBP group; <sup>j</sup> $P<0.01$  vs mimic-NC+LBP group.

增加KGN的凋亡,降低细胞活力,破坏细胞结构;而LBP的干预则能够减少细胞凋亡,减轻顺铂对细胞活力和结构负面影响,从而证实了LBP对KGN结构和功能的保护、修复作用,并表明这些治疗作用可能是通过

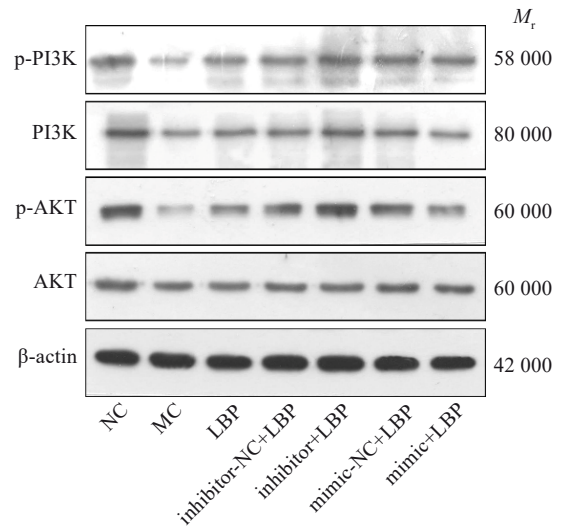


图 8 Western blotting 法检测 miR-23a 对 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 表达的影响

Fig.8 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on the expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT detected by Western blotting.

表 13 miR-23a对LBP调节凋亡相关蛋白相对表达量的影响

Tab. 13 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on LBP-mediated regulation of apoptosis-related protein expressions in KGN cells ( $n=3$ , Mean $\pm$ SD)

Group	Bax	Caspase-3	Bcl-2
NC	0.15 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.01
MC	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
LBP	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
inhibitor-NC+LBP	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
inhibitor+LBP	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>cei</sup>	0.14 $\pm$ 0.04 <sup>cei</sup>	0.45 $\pm$ 0.01 <sup>cei</sup>
mimic-NC+LBP	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
mimic+LBP	0.40 $\pm$ 0.03 <sup>ej</sup>	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>ej</sup>	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>cej</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs NC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs MC group; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs LBP group; <sup>i</sup> $P<0.01$  vs inhibitor-NC+LBP group; <sup>j</sup> $P<0.01$  vs mimic-NC+LBP group.

LBP的抗细胞凋亡作用实现的,而其调节细胞凋亡的具体作用机制仍有待深入探索。

GC的增殖、凋亡等生命活动受到许多因素的调节,近年来,miRNA在其中发挥的作用格外瞩目。miRNAs是由20~24个核苷酸组成的单链非编码RNA分子,是多种生物学过程的重要调节因子,且在不同组织、不同疾病中存在差异性表达。研究表明,miRNA与GC生理、病理和卵巢功能的调节密切相关<sup>[30,31]</sup>,在卵巢早衰患者血浆<sup>[17]</sup>、GC<sup>[18]</sup>中和卵巢低反应患者的黄素化GC<sup>[19]</sup>中,miR-23a就显著表现出异常的上调状态;进一步的研究发现,miR-23a可诱导GC凋亡<sup>[17,20]</sup>。这可能是其参与卵泡闭锁、卵巢功能衰退的重要病理基础,也可能是药物改善卵巢功能的关键起效环节。

本实验发现,顺铂损伤的KGN中miR-23a显著高

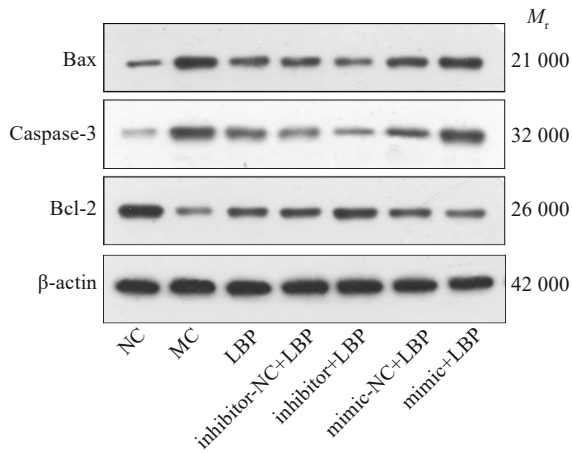


图9 Western blotting 法检测 miR-23a 对 Bax、caspase-3、Bcl-2 表达的影响  
Fig.9 Effect of miR-23a overexpression and knockdown on expressions of Bax, caspase-3 and Bcl-2 detected by Western blotting.

表达,提示在GC损伤的过程中,miR-23a的上调可能是关键病理环节。同时,LBP的治疗不仅修复了KGN结构与功能,改善了细胞凋亡,还下调了异常升高的miR-23a,这提示LBP可能通过调节miR-23a的表达来减轻KGN凋亡、修复其结构与功能。为了验证这一猜想,我们设计挽救实验,通过构建miR-23a过表达与敲低模型,观察到miR-23a过表达可削弱LBP修复KGN损伤的疗效,而miR-23a敲低则可加强LBP的疗效,进一步表明LBP通过靶向抑制miR-23a减轻KGN损伤,确认了miR-23a在LBP调节KGN作用机制中的关键地位。

机制上,PI3K/AKT信号通路参与了顺铂诱导的KGN损伤过程。PI3K/AKT信号通路是调控细胞增殖、凋亡、分化等过程的重要通路,并广泛分布于卵巢组织中,可参与GC增殖、凋亡等生命活动的调控过程,进而参与对卵巢功能的调节<sup>[3, 8, 32]</sup>。在本实验中,LBP治疗可显著激活KGN的PI3K/AKT通路,上调抗凋亡蛋白Bcl-2并抑制促凋亡蛋白Bax、caspase-3表达。值得注意的是,过表达miR-23a可削弱LBP对PI3K/AKT通路的激活效果,扭转LBP对Bcl-2、Bax、caspase-3的作用,而敲低miR-23a则可增强其对PI3K/AKT通路、Bcl-2、Bax、caspase-3的调节效应。这一结果拓展了此前对LBP通过PI3K/AKT信号通路调节GC凋亡的认识,表明miR-23a可能是LBP调控PI3K/AKT通路和KGN凋亡的上游关键因子,其下调可能通过解除对下游信号的抑制,恢复通路活性,抑制KGN凋亡,从而发挥卵巢保护作用。

本研究的创新之处在于,观察了LBP改善GC功能过程中miR-23a的关键性作用,探索了LBP通过信号通路调节GC凋亡的上游调控路径,为从非编码RNA层面阐发LBP卵巢保护作用的分子机制提供了证据;不足之

处在于,尚缺乏基于实验动物的体内实验验证,其通过调节miR-23a改善卵巢功能的起效机制有待进一步证实,有必要结合本次研究结果开展动物实验研究,为论证LBP的起效机制提供更多证据。

本研究揭示了miR-23a可能为调节GC异常凋亡的关键基因,LBP可能通过抑制miR-23a的表达,激活PI3K/AKT信号通路,减轻GC凋亡,修复受损细胞结构和内分泌功能,进而参与对卵泡发育、卵巢功能的保护。这一发现为卵巢功能保护及相关疾病的治疗提供了新的分子靶点与治疗策略。未来需进一步探索miR-23a的上下游调控网络,验证调节因子之间的靶向关系,并通过体内实验验证LBP在卵巢功能减退性疾病动物模型中对miR-23a的调节作用和临床患者中的适用性,以推动其临床转化应用。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

**参考文献:**

- [1] 谢文,陈华国,赵超,等. 枸杞多糖的生物活性及作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 349-59.
- [2] 朱文渊,杜彦芳. 归肾丸对卵巢储备功能减退小鼠模型卵巢自噬的影响[J]. 河北中医药学报, 2023, 38(4): 11-5.
- [3] 邵芷若,关永格. 基于网络药理学探讨归肾丸治疗卵巢早衰的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(11): 1332-42.
- [4] 阳松威,孙晓峰,贺又舜,等. 左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响[J]. 中成药, 2016, 38(4): 717-22.
- [5] 李兰,钟达源,杨开锋,等. 基于名医验案探讨卵巢早衰用药规律[J]. 中国医药导报, 2020, 17(30): 165-8.
- [6] 刘柳青,刘雁峰,王悦竹,等. 卵巢储备功能下降中医证型特点及用药规律文献挖掘研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(6): 33-8.
- [7] 刘柳青,刘雁峰,王悦竹,等. 基于数据挖掘浅析刘雁峰治疗卵巢储备功能下降经验[J]. 中国临床保健杂志, 2021, 24(1): 54-8.
- [8] 刘柳青,刘雁峰,王悦竹,等. 补肾调肝方对卵巢储备功能下降合并慢性心理应激大鼠卵巢功能的影响及机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4459-65.
- [9] 孙慧霞,郭哲,许静. 枸杞多糖对顺铂化疗诱导的大鼠卵巢早衰模型的卵巢保护作用[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 578-84.
- [10] 黄恬,郝晓霞,邱小华,等. 枸杞多糖对自身免疫性卵巢早衰模型小鼠的保护作用[J]. 药学研究, 2014, 33(8): 437-40.
- [11] 韦敏,郑生智,马红,等. 枸杞多糖对自然衰老雌性大鼠卵巢保护作用机制的探讨[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1915-8.
- [12] 江银,王徽,于潇,等. 枸杞多糖调控AMPK/Sirt1自噬途径延缓D-gal诱导的卵巢早衰的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6175-82.
- [13] 楚玉凤,王静,王彤,等. 枸杞多糖减轻雷公藤多苷致卵巢颗粒细胞损伤的研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2022, 44(5): 466-71.
- [14] 刘晓丹,凌晨,刘璐,等. 枸杞糖肽激活CAMKK2/AMPK/MCU信号通路改善大鼠卵巢颗粒细胞衰老[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(6): 1116-25.
- [15] 王恒泉,柴茹,周健,等. 枸杞多糖对2,4-二氯苯氧乙酸所致雌性大鼠生殖系统损伤的保护作用[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(11): 1270-7.

- [16] Liu LQ, Fang YY. The role of ovarian granulosa cells related-ncRNAs in ovarian dysfunctions: mechanism research and clinical exploration[J]. *Reprod Sci*, 2025, 32(7): 2098-120.
- [17] Yang X, Zhou Y, Peng S, et al. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis[J]. *Reproduction*, 2012, 144(2): 235-44.
- [18] Zhang L, Mao B, Zhao X, et al. Translation regulatory long non-coding RNA 1 (TRERNA1) sponges microRNA-23a to suppress granulosa cell apoptosis in premature ovarian failure[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2173-80.
- [19] Luo HN, Han Y, Liu J, et al. Identification of microRNAs in granulosa cells from patients with different levels of ovarian reserve function and the potential regulatory function of miR-23a in granulosa cell apoptosis[J]. *Gene*, 2019, 686: 250-60.
- [20] Nie M, Yu S, Peng S, et al. miR-23a and miR-27a promote human granulosa cell apoptosis by targeting SMAD5[J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(4): 98.
- [21] 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.
- [22] Zhou W, Chen A, Ye Y, et al. LIPUS combined with TFSC alleviates premature ovarian failure by promoting autophagy and inhibiting apoptosis[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2023, 39(1): 2258422.
- [23] 任佳, 常博雅, 崔梦洁, 等. “秩边”透“水道”对卵巢低反应小鼠卵巢组织内/外源性凋亡相关因子表达的影响[J]. *针刺研究*, 2025, 50(2): 123-30, 140.
- [24] Yan J, Zhang X, Zhu K, et al. Sleep deprivation causes gut dysbiosis impacting on systemic metabolomics leading to premature ovarian insufficiency in adolescent mice[J]. *Theranostics*, 2024, 14(9): 3760-76.
- [25] Zhao ZY, Fan QG, Zhu QY, et al. Decreased fatty acids induced granulosa cell apoptosis in patients with diminished ovarian reserve[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39(5): 1105-14.
- [26] Telfer EE, Grosbois J, Odey YL, et al. Making a good egg: human oocyte health, aging, and *in vitro* development[J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(4): 2623-77.
- [27] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582-92.
- [28] Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia[J]. *J Reprod Dev*, 2004, 50(5): 493-514.
- [29] Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view[J]. *Front Endocrinol: Lausanne*, 2018, 9: 61.
- [30] Tu J, Cheung AH, Chan CL, et al. The role of microRNAs in ovarian granulosa cells in health and disease[J]. *Front Endocrinol: Lausanne*, 2019, 10: 174.
- [31] Luo JL, Sun ZG. microRNAs in POI, DOR and POR[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2023, 308(5): 1419-30.
- [32] 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): E6311.

(编辑:余诗诗)