

☆ XXXX ☆

针刺通过MEK/ERK通路调控炎症反应和细胞凋亡改善早发性卵巢功能不全

郭丽红¹, 武晓红¹, 郝健亨^{1,2}, 常博雅², 刘璨莹³(¹山西医药学院, 山西吕梁 032200; ²山西中医药大学, 山西晋中 030619; ³成都中医药大学, 成都 610075)

【摘要】 目的:探讨针刺通过丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MEK/ERK)通路调控炎症反应和细胞凋亡改善早发性卵巢功能不全(POI)大鼠卵巢功能的可能机制。方法:SD大鼠采用随机数字表法分为空白组、POI组和针刺组,每组15只。POI组和针刺组大鼠连续15 d腹腔注射环磷酰胺复制POI模型。针刺组大鼠针刺“关元”和双侧“三阴交”,每次30 min,每日1次,治疗3周。观察各组大鼠动情周期;检测体质量、卵巢湿重并计算卵巢指数;HE染色观察卵巢病理形态并对各阶段卵泡计数;ELISA法检测血清抗缪勒管激素(AMH)、雌二醇(E2)、促卵泡生成素(FSH)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和卵巢IL-1 β 、IL-10、TNF- α 的含量;流式细胞术检测卵巢颗粒细胞凋亡水平;实时荧光定量PCR法检测卵巢MEK1/2、ERK1/2、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)及环氧合酶-2(COX-2)mRNA表达;Western blot法检测卵巢磷酸化(p)-MEK1/2、MEK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF- κ B p65、COX-2蛋白表达;免疫荧光法检测卵巢p-ERK1/2蛋白的表达。结果:与空白组相比,POI组动情周期紊乱率升高($P<0.01$),体质量、卵巢湿重与卵巢指数降低($P<0.01$);卵巢病理结构紊乱,原始、初级、次级、成熟卵泡数量下降($P<0.01$),闭锁卵泡数量升高($P<0.01$);血清FSH、IL-1 β 、TNF- α 和卵巢IL-1 β 、TNF- α 含量升高($P<0.01$),血清AMH、E2、IL-10和卵巢IL-10含量下降($P<0.01$);卵巢颗粒细胞凋亡水平提高($P<0.01$),MEK1/2、ERK1/2、Bax、NF- κ B p65、COX-2 mRNA表达升高($P<0.01$),Bcl-2 mRNA表达下降($P<0.01$);卵巢p-MEK1/2/MEK1/2、p-ERK1/2/ERK1/2、Bax、NF- κ B p65、COX-2蛋白表达升高($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达下降($P<0.01$);卵巢p-ERK1/2荧光表达增强($P<0.01$)。与POI组相比,针刺组上述指标均发生逆转($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:针刺能够改善POI大鼠卵巢功能,其作用可能与调控MEK/ERK信号通路,进而减轻卵巢炎症反应并抑制颗粒细胞凋亡有关。

【关键词】 早发性卵巢功能不全;针刺;MEK/ERK信号通路;炎症反应;细胞凋亡

Mechanism study of acupuncture regulating inflammatory response and apoptosis via the MEK/ERK pathway to improve premature ovarian insufficiency

Guo Lihong¹, Wu Xiaohong¹, Hao Jianheng^{1,2}, Chang Boya², Liu Liying³ (¹Shanxi Medical College, Lüliang 032200, Shanxi Province, China; ²Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; ³Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

【ABSTRACT】 Objective To explore the mechanism of acupuncture in improving ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) by regulating the inflammatory response and apoptosis via the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) pathway. **Methods** SD rats were randomly divided into blank, model and acupuncture groups, with 15 rats in each group. The POI model was established by intraperitoneal injection of cyclophosphamide for 15 consecutive days. Rats in the acupuncture group received

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260037

引用格式:郭丽红,武晓红,郝健亨,等.针刺通过MEK/ERK通路调控炎症反应和细胞凋亡改善早发性卵巢功能不全[J].针刺研究, XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82505759);山西省教育厅基金项目(No.2023L187);山西省高等学校教学改革创新立项项目(No. J2023-1661)

通信作者:郭丽红, E-mail:zyjysglh@163.com

acupuncture at “Guanyuan” (CV4) and bilateral “Sanyinjiao” (SP6) for 30 min, once daily for 3 weeks. The estrous cycle of rats was observed. Body weight and ovarian wet weight were measured, and the ovarian index was calculated. Ovarian histopathology was observed by HE staining, and follicles at different stages were counted. The serum levels of anti-Mullerian hormone (AMH), estradiol (E2), follicle-stimulating hormone (FSH), interleukin (IL)-1 β , IL-10, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the ovarian levels of IL-1 β , IL-10, and TNF- α , were detected by ELISA. The apoptosis level of granulosa cells was assessed by flow cytometry. The mRNA expressions of MEK1/2, ERK1/2, Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the ovary were detected by qPCR. The protein expressions of phosphorylated (p)-MEK1/2, MEK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2, Bax, Bcl-2, NF- κ B p65, and COX-2 were detected by Western blot. Immunofluorescence was used to detect the expression of p-ERK1/2 protein in ovarian tissue. **Results** Compared with the blank group, the POI group showed an increased disorder rate of the estrous cycle ($P<0.01$), and decreased body weight, ovarian wet weight, and ovarian index ($P<0.01$); disordered ovarian pathological structure, decreased numbers of primordial, primary, secondary, and mature follicles ($P<0.01$), and increased number of atretic follicles ($P<0.01$). Additionally, the contents of serum FSH, IL-1 β , and TNF- α , as well as ovarian IL-1 β and TNF- α were increased ($P<0.01$), whereas the contents of serum AMH, E2, IL-10, and ovarian IL-10 were decreased ($P<0.01$). The apoptosis level of granulosa cells was elevated ($P<0.01$). The mRNA expressions of MEK1/2, ERK1/2, Bax, NF- κ B p65 and COX-2 in the ovary were increased ($P<0.01$), while Bcl-2 mRNA expression was decreased ($P<0.01$). The protein expression p-MEK1/2/MEK1/2, p-ERK1/2/ERK1/2, Bax, NF- κ B p65 and COX-2 were increased ($P<0.01$), while Bcl-2 protein expression was decreased ($P<0.01$). The immunofluorescence expression of p-ERK1/2 in the ovary was enhanced ($P<0.01$). Compared with the POI group, all the above indicators were significantly reversed in the acupuncture group ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Acupuncture can improve ovarian function in POI rats. The mechanism may be related to regulating the MEK/ERK signaling pathway, thereby alleviating ovarian inflammatory response and inhibiting granulosa cell apoptosis.

【KEYWORDS】 Premature ovarian insufficiency; Acupuncture; MEK/ERK signaling pathway; Inflammatory Response; Apoptosis

随着我国人口老龄化进程的加速,国家相继出台多项生育支持与鼓励政策,旨在提升生育水平并缓解人口结构失衡带来的社会挑战。在此背景下,育龄女性生殖健康问题日益凸显,其中早发性卵巢功能不全(POI)已成为制约女性生育能力的重要因素之一。POI是指女性在40岁前卵巢功能衰竭,导致卵泡耗竭、雌激素缺乏和高促性腺激素水平升高,多表现为月经紊乱、不孕等症状,不仅严重威胁女性的生殖健康,还可能引发骨质疏松、心血管疾病及心理障碍等远期并发症,降低患者生活质量和整体健康水平^[1-2]。流行病学调查^[3-4]显示,POI的发病率逐年上升,且发病年龄呈年轻化趋势。当前,POI的临床治疗主要依赖激素替代疗法,虽可缓解部分症状,但存在疗效有限、个体差异大及长期用药安全等问题^[5-6]。已有研究^[7-8]提示针灸在改善POI患者激素水平和卵巢功能方面具有一定潜力,但其作用机制仍未完全阐明。

POI的发病机制复杂,其中炎症反应和细胞凋亡被视为POI发生发展的核心环节。卵巢局部炎症微环境失衡时,促炎因子的大量释放可损伤卵泡

颗粒细胞并加速卵泡闭锁;而颗粒细胞作为维持卵巢功能和卵泡发育的核心细胞,其凋亡水平升高又进一步破坏卵巢微环境,导致卵巢储备功能持续衰退,二者相互促进,形成“炎症反应-凋亡”恶性循环^[9-10]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员之一的丝裂原活化蛋白激酶激酶/细胞外信号调节激酶通路(MEK/ERK)在调控细胞增殖分化、炎症反应和凋亡中发挥重要作用,并广泛参与卵泡发育及颗粒细胞功能维持^[11]。已有研究^[12-13]表明,MEK/ERK通路活性变化可通过影响下游炎症因子和凋亡相关蛋白,参与多种卵巢疾病的发生发展。尽管目前研究显示针灸可改善POI患者激素水平和卵巢功能,但其是否通过调控MEK/ERK通路介导炎症反应与凋亡仍不明确。因此,本研究拟以POI大鼠模型为对象,探讨针刺通过MEK/ERK通路调控炎症反应-凋亡改善卵巢功能的潜在机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用45只7~8周龄雌性SD大鼠,体质

量(190 ± 10)g,购自北京斯贝福实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。所有动物饲养及实验操作均在山西中医药大学实验动物中心进行,饲养环境为12 h明/12 h暗循环,室温控制在(25 ± 2)℃,相对湿度(55 ± 5)%,大鼠自由摄食饮水。本实验方案经山西中医药大学动物伦理委员会审批,伦理批准号:2022DW266。

1.2 主要试剂和仪器

环磷酰胺(大连美仑),异氟烷(深圳瑞沃德),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、雌二醇(E2)试剂盒、促卵泡激素(FSH)试剂盒、白细胞介素(IL)-1 β 试剂盒、IL-10试剂盒、肿瘤坏死因子(TNF)- α 试剂盒(北京索莱宝),细胞筛网、细胞凋亡检测试剂盒、RNA提取液、一管化一步法基因组DNA去除与反转录试剂盒、MEK1/2抗体、磷酸化(p)-MEK1/2抗体、ERK1/2抗体、p-ERK1/2抗体、核因子 κ B p65亚基(NF- κ B p65)抗体、羊抗兔IgG二抗、GAPDH抗体、RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、ECL发光液、荧光二抗(武汉赛维尔),抗缪勒管激素(AMH)试剂盒、B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体、环氧化酶-2(COX-2)抗体(武汉爱博泰克)。

无菌针灸针(0.25 mm $\times$ 25 mm,苏州华佗),小动物专用吸入麻醉机(北京众实迪创),酶标仪(美国MD),离心机(美国SCILOGEX),石蜡切片机(美国赛默飞),流式细胞仪(美国BD),荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad),凝胶电泳仪、图像采集与分析系统(上海天能),转印电泳仪(武汉赛维尔),荧光显微镜、体视显微镜(德国Leica)。

1.3 造模及分组方法

大鼠购入后,在标准饲养环境下适应性喂养7 d。随后采用随机数字表法将大鼠分为空白组、POI组和针刺组,每组15只。POI组和针刺组大鼠首日腹腔注射环磷酰胺负荷剂量 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,随后以 $8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量每日腹腔注射1次,连续15 d;空白组同期腹腔注射等体积0.9%氯化钠溶液,每日1次,连续15 d。造模期间进行阴道涂片观察动情周期,当出现动情周期紊乱时,即视为模型制备成功^[14]。

1.4 干预方法

造模完成次日,针刺组大鼠参照文献[15]进行针刺干预:选取“关元”(腹正中线上,脐下约25 mm处)和双侧“三阴交”(后肢内踝尖直上10 mm处),穴位常规消毒后,将针灸针直刺进穴位约3 mm,

不施提插捻转手法,留针30 min,每日1次,连续3周。空白组与POI组大鼠在相同时间段仅进行抓取和固定处理,不予针刺干预。

1.5 观察指标及检测方法

动情周期观察:实验期间,每日固定时间采用阴道涂片法对各组所有大鼠进行动情周期观察,使用无菌0.9%氯化钠溶液浸湿的棉签进入大鼠阴道旋转1~2圈,取出后均匀涂抹于载玻片上,自然风干后进行HE染色,在光学显微镜下观察阴道涂片并判定动情周期。

取材方法:治疗结束后次日,将各组大鼠采用异氟烷吸入麻醉,经腹主动脉采血。采血后处死大鼠,分离双侧卵巢组织并称取湿重,将部分卵巢组织置于4%多聚甲醛固定液固定,用于HE和免疫荧光染色,部分新鲜卵巢用于流式细胞检测,部分卵巢置于-80℃冰箱冻存用于后续Western blot和PCR检测。

体质量、卵巢湿重与卵巢指数检测:称取各组所有大鼠体质量,取完血后处死大鼠,迅速分离双侧卵巢,去除周围脂肪,用滤纸轻轻吸去表面血液后立即称量卵巢湿重并计算卵巢指数。卵巢指数(mg/g)=卵巢湿重(mg) $\div$ 体质量(g)。

HE染色观察卵巢病理形态:随机选取各组5只大鼠双侧卵巢固定于4%多聚甲醛中,常规脱水、石蜡包埋并制成切片(4 μm);随机取每组5张切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,依次进行苏木精和伊红染液染色;梯度乙醇脱水;二甲苯透明封片;光学显微镜下观察卵巢病理变化并进行各级卵泡计数。

ELISA法检测血清AMH、E2、FSH、IL-1 β 、IL-10、TNF- α 含量:将各组所有大鼠血液室温静置1 h后,离心20 min取血清,按照ELISA试剂盒说明书,将标准品及各组血清样本加入包被有相应抗体的酶标板孔中,孵育、洗板后依次加入检测抗体及酶结合物,显色反应终止后,于酶标仪450 nm波长下测定各孔吸光度值,根据标准曲线计算各指标的含量。

流式细胞术检测卵巢颗粒细胞凋亡水平:随机取各组5只大鼠左侧卵巢组织40 mg,置于含1 mL PBS的培养皿中。在体视显微镜下,用无菌注射器针头轻轻挑破卵泡,释放颗粒细胞,经200目细胞筛过滤后获得颗粒细胞混悬液;然后4℃离心5 min,弃上清,PBS重悬洗涤2次,调整细胞浓度至 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ 个细胞/mL。按照试剂盒说明书操作,

取适量粒细胞悬液,加入 Annexin V-FITC 和 PI 工作液,避光条件下室温孵育 15 min;孵育结束后采用流式细胞仪检测粒细胞凋亡水平。

ELISA 法检测卵巢 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 含量:随机取各组 5 只大鼠左侧卵巢组织 40 mg,加入组织裂解液充分匀浆,4℃离心 15 min,收集上清。根据 ELISA 试剂盒说明书,将标准品及样本加入包被有相应抗体的酶标板孔中,室温孵育后洗板;依次加入生物素标记抗体和酶结合物,洗涤后加入显色底物反应,终止反应后于酶标仪上测定 450 nm 处吸光度值,根据标准曲线计算其不同指标的含量。

实时荧光定量 PCR 法检测卵巢组织 MEK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF- κ B p65、COX-2 mRNA 表达:随机选取各组 5 只大鼠右侧卵巢组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明,将 RNA 反转录为 cDNA;以该 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增:95℃预变性 3 min;95℃变性 10 s,58~62℃退火 30 s,共 40 个循环。反应结束后采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法以 GAPDH 为内参计算各基因的相对表达。引物序列由武汉赛维尔合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
MEK1/2	上游 GACGAGCAGCAGCGG	126
	下游 CTTGAACACCACTCCACCATTG	
ERK1/2	上游 CCAGAGTGGCTATCAAGAAG	123
	下游 GGATGTCTCGGATGCCTA	
Bax	上游 CGAATTGGCGATGAACTGGA	109
	下游 CAAACATGTCAGCTGCCACAC	
Bcl-2	上游 GACTGAGTACCTGAACCGGCATC	135
	下游 CTGAGCAGCGTCTTCAGAGACA	
NF- κ B p65	上游 GACCTGGAGCAAGCCATTAG	123
	下游 CACTGTCACTGGAAGCAGA	
COX-2	上游 TTTGTTGAGTCATTACCCAGACAG	169
	下游 ACGATGTGTAAGGTTTCAGGGA	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

注:MEK 为丝裂原活化蛋白激酶,ERK 为细胞外信号调节激酶,Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白,Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2,NF- κ B p65 为核因子 κ B p65 亚基,COX-2 为环氧合酶-2。

Western blot 法检测卵巢组织 p-MEK1/2、MEK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF- κ B p65、COX-2 蛋白表达:随机选取各组 5 只大鼠右侧卵巢组织 40 mg,加入适量 RIPA 裂解液进行充分裂解;4℃离心 15 min 取上清测定蛋白浓度;按等量蛋白进行电泳分离后,将蛋白转移至 PVDF 膜;转膜完成后,使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h;随后分别加入一抗和内参:MEK1/2、Bcl-2(1:5 000),ERK1/2、Bax、Bcl-2、GAPDH (1:1 000),p-MEK1/2、p-ERK1/2(1:500),4℃孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次;再加入相应二抗(1:5 000),于室温孵育 1.5 h;TBST 洗膜后,滴加 ECL 发光试剂上机显影,使用 Image J 分析灰度值,并计算目的蛋白相对表达水平。

免疫荧光法检测卵巢组织 p-ERK1/2 蛋白的表达:随机取上述每组 5 个大鼠卵巢石蜡切片,脱蜡至水后,采用枸橼酸缓冲液进行抗原修复;室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭非特异性结合 30 min;后加入 p-ERK1/2 一抗(1:800),4℃孵育过夜。次日 PBS 清洗后,加入二抗(1:500)避光孵育 1 h;使用 DAPI 对细胞核进行复染;抗荧光淬灭封片后,采用荧光显微镜观察并采集图像,用 Image J 软件分析荧光强度。

1.6 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。计数资料以百分比(%)表示,计量资料以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐性时进行 LSD 法事后检验,方差不齐时采用 Tamhane's T_2 检验;两两比较采用 Dunnett's t_3 检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠动情周期比较

大鼠动情周期通常持续 4~5 d,分为动情前期(有核上皮细胞为主)、动情期(角化上皮细胞为主)、动情后期(角化上皮细胞与白细胞混合)和动情间期(白细胞为主,伴少量有核和角化上皮细胞)。当动情周期时长超过 5 d 或长时间滞于某期,为动情周期紊乱。接受治疗后,与空白组相比,POI 组大鼠的动情周期延长,节律紊乱,长时间停留在动情间期,紊乱率升高($P<0.01$);与 POI 组相比,针刺组大鼠的动情周期改善,紊乱率下降($P<0.01$)。见图 1、表 2。

2.2 各组大鼠体质量、卵巢湿重与卵巢指数比较
与空白组相比,POI组体质量、卵巢湿重与卵巢

指数降低($P<0.01$);与POI组相比,针刺组体质量、
卵巢湿重与卵巢指数升高($P<0.01$)。见图2。

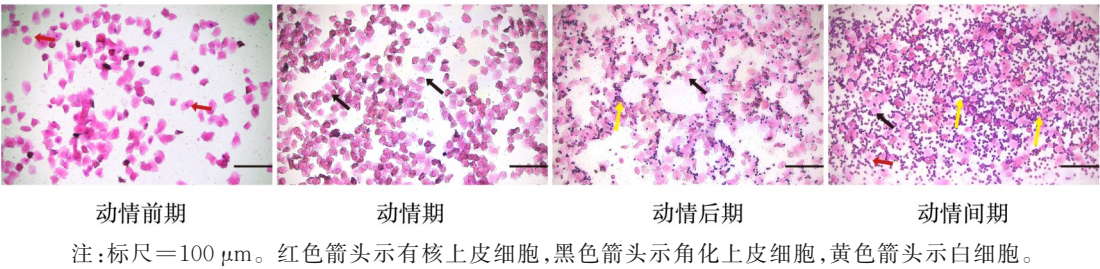


图1 大鼠不同阶段动情周期标志性涂片比较(HE染色)

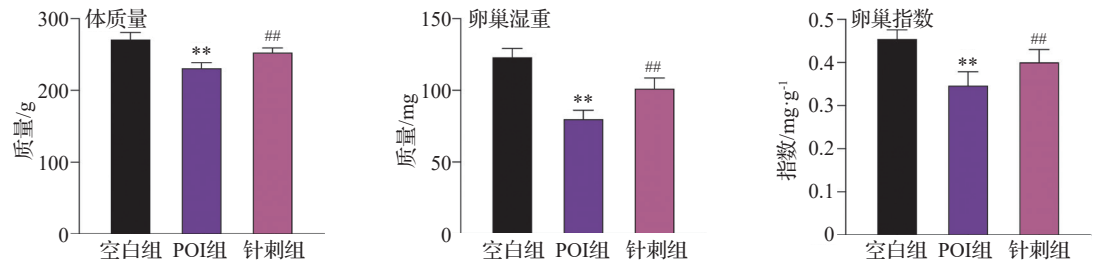
Fig. 1 Comparison of representative vaginal cytology at different stages of the estrous cycle of rats (HE staining)

表2 各组大鼠动情周期紊乱情况比较
Table 2 Comparison of estrous cycle disorder rates of rats
in the 3 groups

组别	只数	造模后			干预后		
		正常/ 只	紊乱/ 只	紊乱 率/%	正常/ 只	紊乱/ 只	紊乱 率/%
空白组	15	15	0	0	15	0	0
POI组	15	0	15	100**	0	15	100**
针刺组	15	0	15	100**	12	3	20##

注:与同时间空白组比较,** $P<0.01$;与同时间POI组比较,## $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠卵巢病理损伤情况比较
空白组卵巢结构完整,不同发育阶段卵泡数量
丰富、形态正常,颗粒细胞层排列紧密,间质分布均
匀,无明显炎症反应或纤维化;POI组卵巢结构紊
乱,卵泡数量减少且多为闭锁卵泡,颗粒细胞层变
薄松散伴纤维化;针刺组卵巢病理损伤较POI组改
善,卵泡数量增多,形态趋于正常。见图3。与空白
组相比,POI组卵巢中原始、初级、次级、成熟卵泡
数量减少($P<0.01$),闭锁卵泡数量增加($P<0.01$);
与POI组相比,针刺组原始、初级、次级、成熟卵泡
数量增加($P<0.01$, $P<0.05$),闭锁卵泡数量减少($P<$



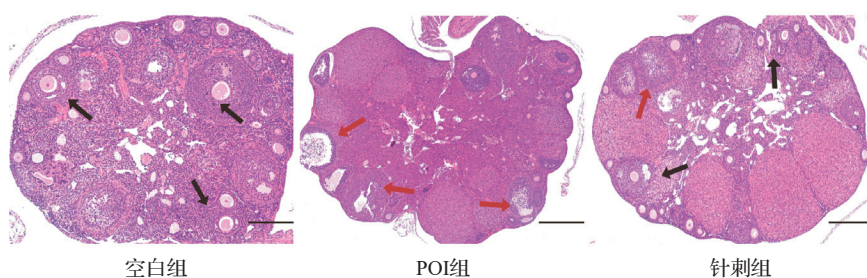
注:与空白组比较,** $P<0.01$;与POI组比较,## $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠体质量、卵巢湿重与卵巢指数比较($\bar{x}\pm s$,15只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of body weight, ovarian wet weight, and ovarian index of rats in the 3 groups
($\bar{x}\pm s$, 15 rats/group)

2.4 各组大鼠血清AMH、E2、FSH、IL-1 β 、IL-10、
TNF- α 含量比较
与空白组相比,POI组血清FSH、IL-1 β 和
TNF- α 含量升高($P<0.01$),AMH、E2和IL-10含
量下降($P<0.01$);与POI组相比,针刺组血清FSH、
IL-1 β 和TNF- α 含量下降($P<0.01$),AMH、E2和
IL-10含量升高($P<0.01$)。见图5。

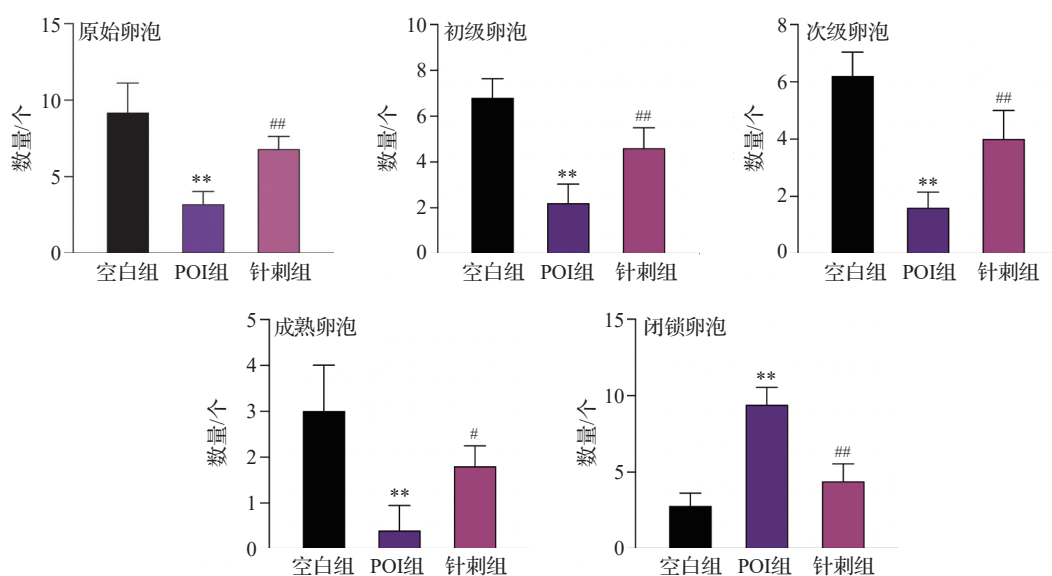
2.5 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡水平比较
图6中右上、右下象限数值之和为细胞总凋亡
率。与空白组相比,POI组卵巢颗粒细胞凋亡水平
提高($P<0.01$);与POI组相比,针刺组卵巢颗粒细
胞凋亡水平下降($P<0.01$)。见图6。
2.6 各组大鼠卵巢IL-1 β 、IL-10、TNF- α 含量比较
与空白组相比,POI组卵巢IL-1 β 、TNF- α 含
量升高($P<0.01$),IL-10含量下降($P<0.01$);与POI



注:标尺=100 μm 。黑色箭头示各阶段发育正常的卵泡,红色箭头示闭锁卵泡。

图3 各组大鼠卵巢病理损伤情况比较(HE染色)

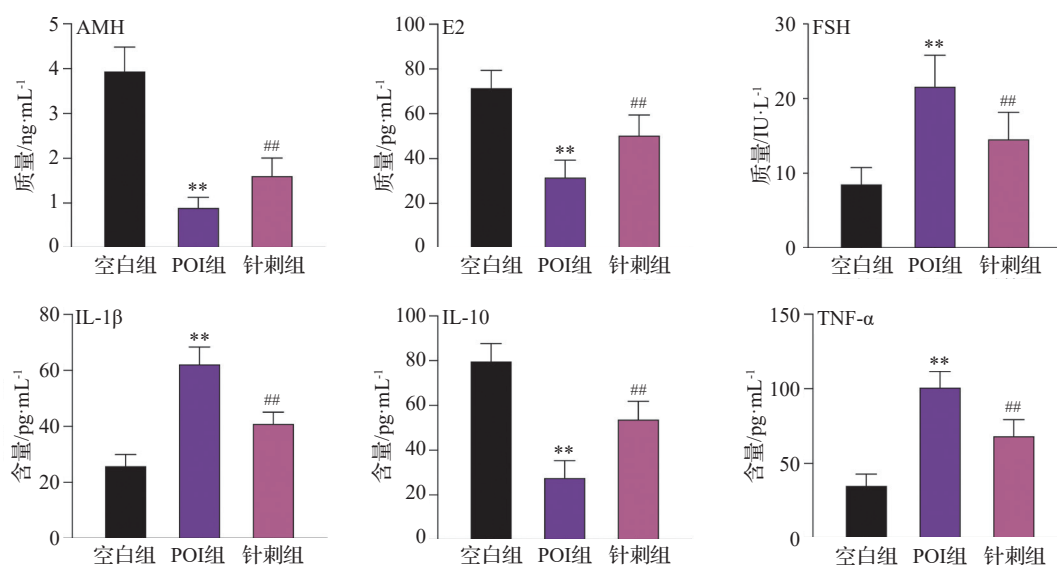
Fig. 3 Comparison of ovarian histopathological damage of rats in the 3 groups (HE staining)



注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与POI组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.001$ 。

图4 各组大鼠不同类型卵泡数量比较($\bar{x} \pm s$, 5只鼠/组)

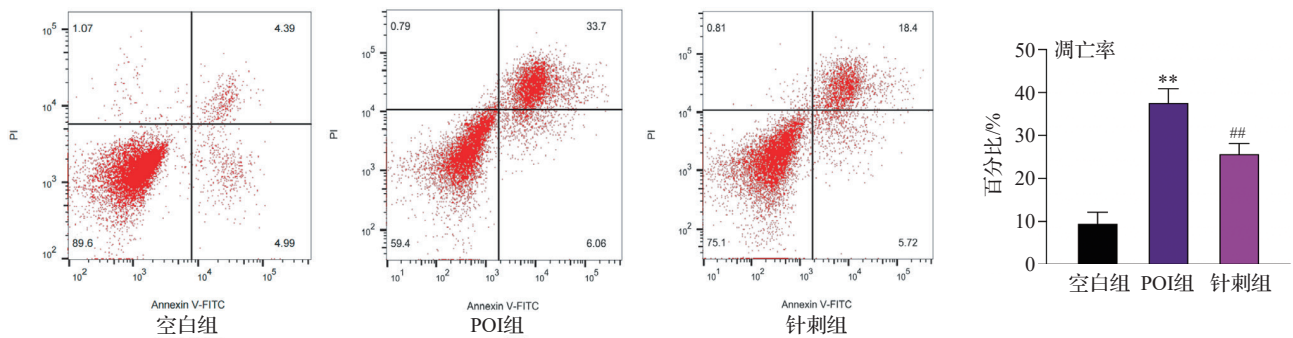
Fig. 4 Comparison of different types of follicle numbers of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 5 rats/group)



注:AMH为抗缪勒管激素,E2为雌二醇,FSH为促卵泡生成素,IL-1β为白细胞介素1β,IL-10为白细胞介素10、TNF-α为肿瘤坏死因子-α。与空白组比较,** $P < 0.01$;与POI组比较,### $P < 0.001$ 。

图5 各组大鼠血清AMH、E2、FSH、IL-1β、IL-10、TNF-α含量比较($\bar{x} \pm s$, 15只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of serum AMH, E2, FSH, IL-1β, IL-10 and TNF-α contents of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 15 rats/group)



注:PI为碘化丙啶,FITC为异硫氰酸荧光素,Annexin V为膜联蛋白V。右上象限为晚期凋亡细胞,右下象限为早期凋亡细胞。与空白组比较,** $P<0.01$;与POI组比较,## $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡水平比较($\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

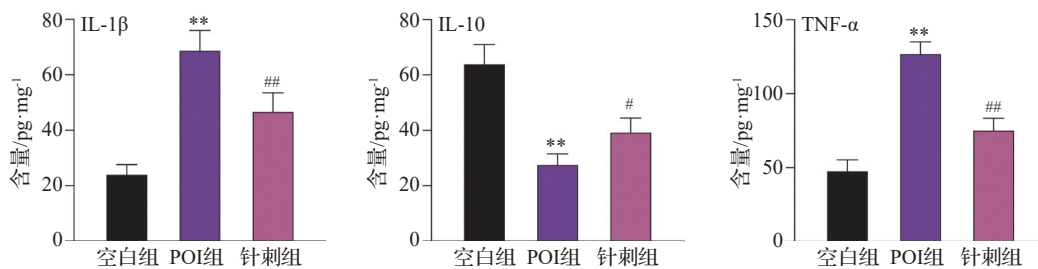
Fig. 6 Comparison of granulosa cell apoptosis of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)

组相比,针刺组卵巢IL-1 β 、TNF- α 含量下降($P<0.01$),IL-10含量升高($P<0.05$)。见图7。

2.7 各组大鼠卵巢MEK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF- κ B p65、COX-2 mRNA表达比较

与空白组相比,POI组卵巢MEK1/2、ERK1/2、

Bax、NF- κ B p65、COX-2 mRNA表达升高($P<0.01$),Bcl-2 mRNA表达下降($P<0.01$);与POI组相比,针刺组卵巢MEK1/2、ERK1/2、Bax、NF- κ B p65、COX-2 mRNA表达下降($P<0.01$),Bcl-2 mRNA表达升高($P<0.05$)。见图8。



注:IL-1 β 为白细胞介素1 β ,IL-10为白细胞介素10,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 。与空白组比较,** $P<0.01$;与POI组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图7 各组大鼠卵巢IL-1 β 、IL-10、TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of ovarian IL-1 β , IL-10 and TNF- α contents of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)

2.8 各组大鼠卵巢p-MEK1/2、MEK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF- κ B p65、COX-2蛋白表达比较

与空白组相比,POI组卵巢p-MEK1/2/MEK1/2、p-ERK1/2/ERK1/2比值及Bax、NF- κ B p65、COX-2蛋白表达升高($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达下降($P<0.01$);与POI组相比,针刺组卵巢p-MEK1/2/MEK1/2、p-ERK1/2/ERK1/2比值及Bax、NF- κ B p65、COX-2蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2蛋白表达升高($P<0.05$)。见图9。

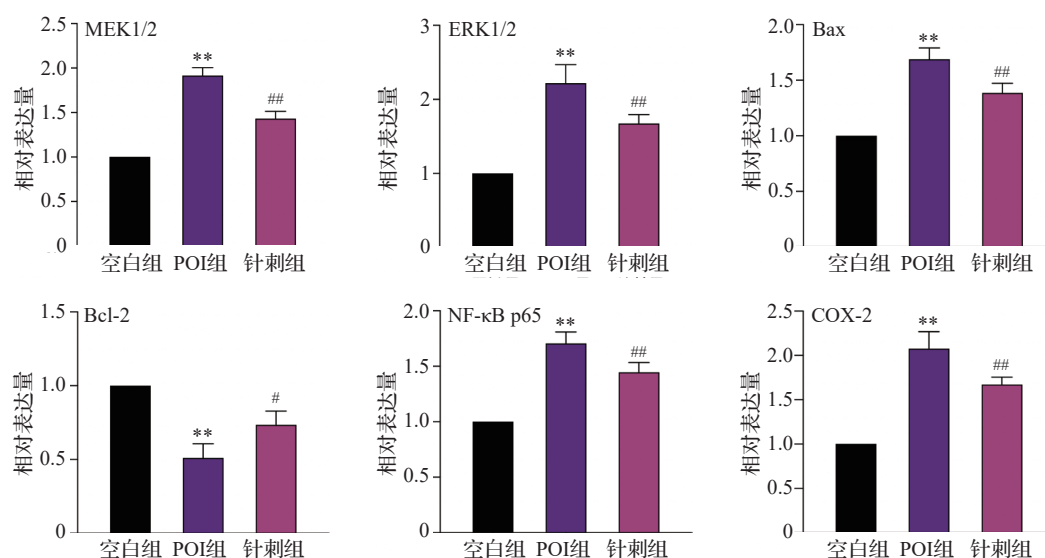
2.9 各组大鼠卵巢p-ERK1/2蛋白荧光表达比较

图中p-ERK1/2蛋白呈现绿色荧光,主要分布在颗粒细胞周围。与空白组相比,POI组卵巢p-ERK1/2蛋白荧光表达增强($P<0.01$);与POI组相比,针刺组卵巢p-ERK1/2蛋白荧光表达下降

($P<0.01$)。见图10。

3 讨论

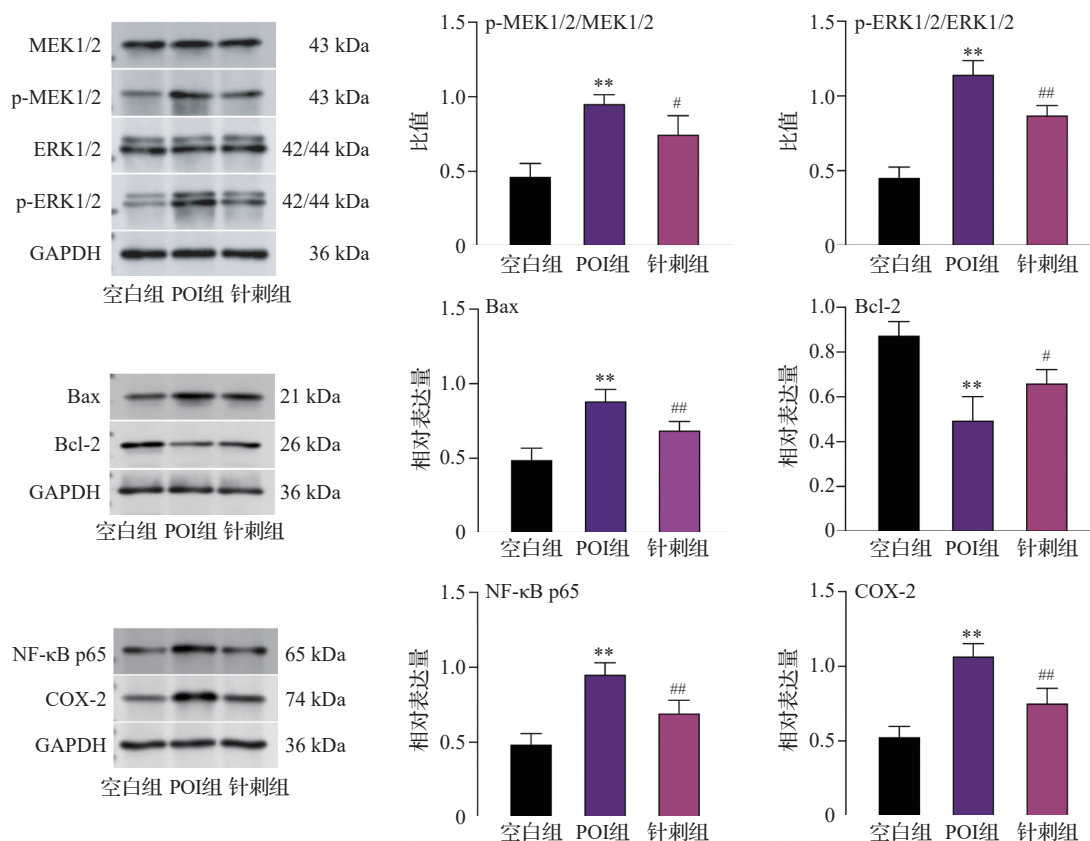
POI是指女性在40岁之前出现的卵巢功能过早衰退状态,其主要特征包括卵泡储备加速耗竭、卵巢内分泌功能减退及生殖能力下降。临床上常表现为月经紊乱或闭经,伴随雌激素水平降低、促性腺激素异常升高,并可进一步引发不孕及一系列内分泌相关并发症^[16]。在本研究中,与空白组相比,POI组大鼠出现动情周期延长和不规律等紊乱情况,卵巢湿重及卵巢指数降低;血清AMH和E2含量下降,FSH含量升高。同时卵巢结构完整性受损,形态异常,成熟卵泡数量减少,闭锁卵泡比例增加。这些变化与临床POI患者的表现基本一致^[17],表明POI大鼠模型复制成功,为后续机制探讨和干



注:MEK为丝裂原活化蛋白激酶,ERK为细胞外信号调节激酶,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,NF-κB p65为核因子κB p65亚基,COX-2为环氧合酶-2。与空白组比较,** $P<0.01$;与POI组比较,## $P<0.05$,# $P<0.01$ 。

图8 各组大鼠卵巢MEK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF-κB p65、COX-2 mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

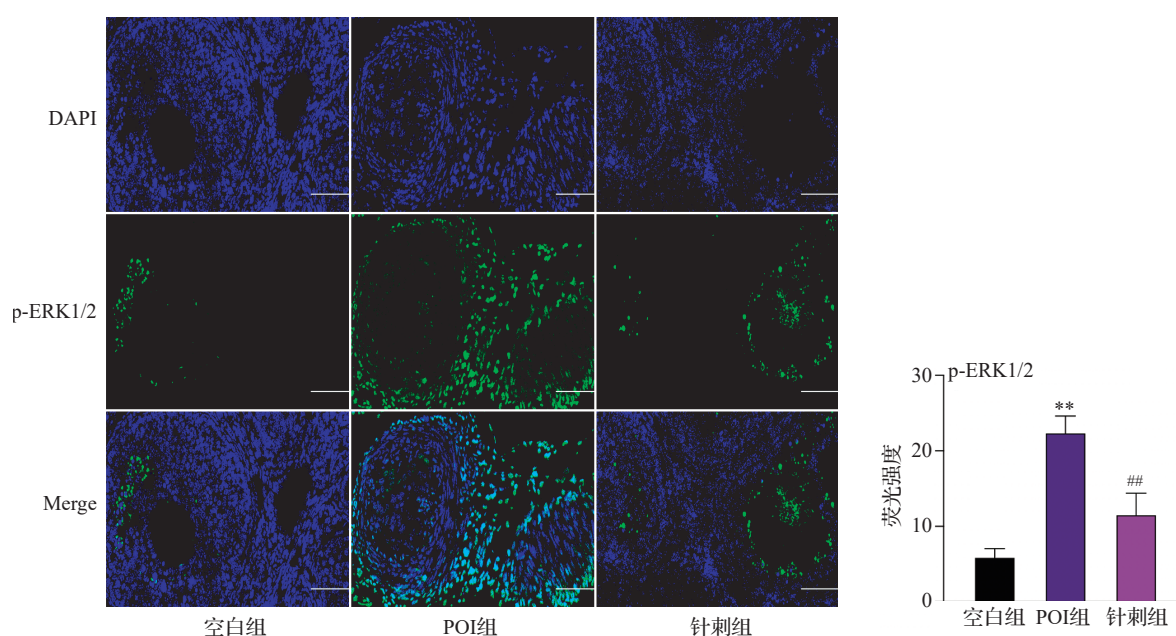
Fig. 8 Comparison of ovarian MEK1/2, ERK1/2, Bax, Bcl-2, NF-κB p65 and COX-2 mRNA expression of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)



注:MEK为丝裂原活化蛋白激酶,p-MEK为磷酸化丝裂原活化蛋白激酶,ERK为细胞外信号调节激酶,p-ERK为磷酸化细胞外信号调节激酶,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,NF-κB p65为核因子κB p65亚基,COX-2为环氧合酶-2。与空白组比较,** $P<0.01$;与POI组比较,## $P<0.05$,# $P<0.01$ 。

图9 各组大鼠卵巢p-MEK1/2、MEK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、Bax、Bcl-2、NF-κB p65、COX-2蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of ovarian p-MEK1/2, MEK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2, Bax, Bcl-2, NF-κB p65 and COX-2 protein expression of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)



注:p-ERK为磷酸化细胞外信号调节激酶。标尺=50 μm ,p-ERK1/2阳性表达呈现绿色荧光。与空白组比较,** $P<0.01$;与POI组比较,## $P<0.01$ 。

图10 各组大鼠卵巢p-ERK1/2蛋白荧光表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,5只鼠/组)

Fig. 10 Comparison of ovarian p-ERK1/2 protein expression of rats in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 5 rats/group)

预研究提供了可靠的实验基础。

中医认为,POI属于“闭经”“不孕”等范畴,其核心病机以肾虚为本,兼夹肝郁、血瘀等标证^[18-19]。肾主生殖,肾精亏虚则卵巢失养,卵泡发育受阻,导致卵巢功能衰退;而肝郁、血瘀等兼证则会导致气血运行不畅,瘀阻冲任二脉,影响卵巢气血濡养。基于此,中医治疗POI以补肾益精、调理冲任、疏调气血为核心治疗原则。针刺作为中医外治法的重要组成部分,具有疏通经络、调和气血等功效,在POI治疗中疗效确切。本研究选取“关元”“三阴交”为干预穴位:关元为任脉要穴,且为任脉与足三阴经之交会穴,具有温补元气、益肾填精、调理冲任之功;三阴交为脾、肝、肾三经交会穴,具有健脾益气、滋养肝肾、活血化瘀之效。两穴配伍可补肾益精、协调冲任,从整体上改善卵巢功能失调状态^[20]。既往动物实验研究^[21]提示,针刺能够调控动情周期及性激素水平,进而改善卵巢功能。本研究结果显示,针刺干预后,POI大鼠动情周期紊乱得到改善,卵巢湿重及卵巢指数升高;血清性激素水平紊乱得到纠正;卵巢病理损伤改善,卵泡闭锁程度减轻,提示针刺能够有效改善POI大鼠的卵巢功能。

MEK/ERK信号通路是MAPK家族的重要组成部分,在卵巢生理与病理过程中发挥关键调控作用。该通路广泛参与卵泡发育、颗粒细胞增殖与存

活及卵巢局部微环境稳态的维持。已有研究^[22-23]表明,MEK/ERK信号异常与卵巢功能减退密切相关,其活化状态的改变可通过影响炎症反应及细胞凋亡过程,推动卵巢功能损伤并参与多种卵巢疾病的发生发展。本研究结果显示,POI组卵巢MEK1/2、ERK1/2 mRNA表达升高,p-MEK1/2/MEK1/2、p-ERK1/2/ERK1/2蛋白表达比值升高;免疫荧光进一步表明,卵巢颗粒细胞周围p-ERK1/2荧光阳性信号明显增强,提示MEK/ERK通路在POI状态下被异常激活。针刺干预后,上述指标被不同程度逆转,提示针刺可能有效抑制MEK/ERK通路的异常激活。

在炎症反应层面,MEK/ERK信号通路可通过调控多种炎症相关转录因子的活性,进而影响炎症介质的表达,是连接细胞内信号转导与炎症反应的重要枢纽。当该通路异常激活时,促炎信号持续增强,炎症因子释放增加,可破坏卵泡发育所需的微环境稳态,加重颗粒细胞损伤并促进卵泡闭锁^[24-25]。本研究结果显示,POI模型组卵巢中NF- κ B p65和COX-2蛋白及其mRNA表达升高,同时卵巢及血清中促炎因子IL-1 β 、TNF- α 表达升高,而抗炎因子IL-10水平下降,提示POI状态下卵巢局部及全身均存在炎症反应增强。针刺后,上述炎症相关指标不同程度改善,提示针刺可能通过抑制MEK/ERK

通路活性,减轻卵巢局部及系统性炎症反应,从而改善POI相关病理状态。

在细胞凋亡层面,MEK/ERK信号通路可以通过调节Bax、Bcl-2等凋亡相关蛋白的表达,参与维持颗粒细胞增殖与凋亡之间的动态平衡,从而对卵泡发育及卵巢储备功能发挥重要调控作用。当该信号通路异常激活或调控失衡时,促凋亡信号相对增强,可导致颗粒细胞凋亡水平升高,进而加速卵泡闭锁进程,促进卵巢功能减退^[26-27]。本研究显示,POI模型组卵巢中促凋亡蛋白Bax表达升高,抗凋亡蛋白Bcl-2表达下降;同时流式细胞术结果显示卵巢颗粒细胞凋亡水平明显升高。针刺干预后,Bax表达下调、Bcl-2表达上调,颗粒细胞凋亡率降低,提示针刺可能通过调节MEK/ERK信号通路,恢复促凋亡与抗凋亡信号之间的平衡,从而维持颗粒细胞存活,延缓卵泡闭锁进程。

综上,本研究表明,POI大鼠卵巢中MEK/ERK信号通路活性异常,针刺干预可以改善POI大鼠的生殖内分泌异常,减轻卵巢病理损伤,其作用可能与调控MEK/ERK通路,抑制卵巢局部炎症反应并减少颗粒细胞凋亡有关。本研究仅探讨了针刺通过MEK/ERK通路分别调控炎症反应和凋亡的作用,未深入分析炎症反应与凋亡之间的内在联系,未来我们将进一步研究以明确二者的协同作用机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Chon S J, Umair Z, Yoon M S. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 672890.
- [2] McGlacken-Byrne S M, Conway G S. Premature ovarian insufficiency[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2022, 81: 98-110.
- [3] Rudnicka E, Kruszezwska J, Klicka K, et al. Premature ovarian insufficiency - aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation[J]. *Pm*, 2018, 17(3): 105-108.
- [4] Sharata E E, Attya M E, Khalaf M M, et al. Decoding premature ovarian insufficiency: a full spectrum review from epidemiology to management with emphasis on cyclophosphamide-evoked ovarian injury[J]. *Food Chem Toxicol*, 2025, 205: 115719.
- [5] Huang Q Y, Chen S R, Chen J M, et al. Therapeutic options for premature ovarian insufficiency: an updated review[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 28.
- [6] Torrealday S, Kodaman P, Pal L. Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management[J]. *F1000Res*, 2017, 6: 2069.
- [7] 黄艳辉, 韩会玲, 田永强. 基于“心-肾-冲任-胞宫”生殖轴的针药联合对早发性卵巢功能不全的临床疗效研究[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(14): 2704-2708.
Huang Y H, Han H L, Tian Y Q. Clinical efficacy of acupuncture combined with medicine based on the heart-kidney-Chong Ren-uterus reproductive axis for premature ovarian insufficiency (in Chinese)[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2025, 36(14): 2704-2708.
- [8] 万小曼, 韦禹岐, 陈慧, 等. “双固一通”针刺联合火龙罐治疗肾虚血瘀型早发性卵巢功能不全的临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2025, 40(8): 4326-4330.
Wan X M, Wei Y Q, Chen H, et al. “Shuanggu Yitong” acupuncture combined with Huolong pot therapy for the clinical study of premature ovarian insufficiency (in Chinese)[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2025, 40(8): 4326-4330.
- [9] Shi Y Q, Zhu X T, Zhang S N, et al. Premature ovarian insufficiency: a review on the role of oxidative stress and the application of antioxidants[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1172481.
- [10] Deng T R, He J, Yao Q Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve ovarian function in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through inhibiting apoptosis and inflammation *via* a paracrine mechanism[J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(6): 1718-1732.
- [11] Shaul Y D, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res*, 2007, 1773(8): 1213-1226.
- [12] Lu H, Zheng G L, Gao X, et al. Propofol suppresses cell viability, cell cycle progression and motility and induces cell apoptosis of ovarian cancer cells through suppressing MEK/ERK signaling *via* targeting circVPS¹³C/miR-145 axis[J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 30.
- [13] 徐芳, 梁锦铃, 潘紫萌, 等. LncRNA SRA通过MEK/ERK/GATA4通路调控KGN细胞系炎症作用的机制研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(6): 881-891.
Xu F, Liang J L, Pan Z M, et al. Mechanism of LncRNA SRA regulating chronic inflammation in KGN through MEK/ERK/GATA4 pathway (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2023, 45(6): 881-891.
- [14] 付霞霏, 何援利. 化疗所致卵巢早衰动物模型的建立[J]. *广东医学*, 2008, 29(12): 1952-1954.
Fu X F, He Y L. Establishment of rat model of chemotherapy-induced premature ovarian failure (in Chinese)[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2008, 29(12): 1952-1954.
- [15] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分: 大鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [16] Nash Z, Davies M. Premature ovarian insufficiency[J]. *Bmj*, 2024, 384: e077469.

- [17] Luisi S, Orlandini C, Regini C, et al. Premature ovarian insufficiency: from pathogenesis to clinical management[J]. J Endocrinol Invest, 2015, 38(6): 597-603.
- [18] 田赛男, 唐丽, 王圣羽, 等. 早发性卵巢功能不全在中医药的发展研究[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(11): 2969-2981.
Tian S N, Tang L, Wang S Y, et al. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of premature ovarian insufficiency (in Chinese) [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2025, 50(11): 2969-2981.
- [19] 贾紫千, 冯晓玲, 杜惠兰, 等. 早发性卵巢功能不全患者612例中医证候学特征的多中心研究[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(11): 6126-6131.
Jia Z Q, Feng X L, Du H L, et al. Multicenter study on the traditional Chinese medicine syndrome characteristics of 612 patients with premature ovarian insufficiency (in Chinese)[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2024, 39(11): 6126-6131.
- [20] 勾明会, 杨会生, 刘思雨, 等. 基于中医传承辅助平台的针刺治疗早发性卵巢功能不全的取穴规律[J]. 世界中医药, 2022, 17(10): 1453-1458.
Gou M H, Yang H S, Liu S Y, et al. Acupoint selection regularity of acupuncture for premature ovarian insufficiency based on data mining in TCMISS (in Chinese) [J]. World Chinese Medicine, 2022, 17(10): 1453-1458.
- [21] 郝健亨, 赵越梦, 兰颖, 等. 针刺对卵巢低反应小鼠卵巢的保护机制[J]. 针刺研究, 2024, 49(10): 1001-1009.
Hao J H, Zhao Y M, Lan Y, et al. Study on the protective effect of acupuncture on poor ovarian response in mice (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2024, 49(10): 1001-1009.
- [22] Zhao H, Dinh T H, Wang Y F, et al. The roles of MAPK signaling pathway in ovarian folliculogenesis [J]. J Ovarian Res, 2025, 18(1): 152.
- [23] Duan J X, Xu A L, Xie J H, et al. GPR30-mediated the MEK/ERK signaling pathway promotes porcine oocyte maturation and development[J]. Theriogenology, 2025, 246: 117537.
- [24] Wang F, Li Y M, Li R Y, et al. U0126 and BAY11-7082 inhibit the progression of endometriosis in a rat model by suppressing the MEK/ERK/NF- κ B pathway [J]. Womens Health Rep (New Rochelle), 2023, 4(1): 65-77.
- [25] Han Y, Luo H N, Wang H, et al. SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF- κ B signaling with anti-inflammatory functions[J]. Apoptosis, 2017, 22(10): 1260-1272.
- [26] 范素, 房繁恭. 针刺调控不同信号通路改善卵巢储备功能研究进展[J]. 针刺研究, 2022, 47(7): 644-648.
Fan S, Fang Y G. Research progress of acupuncture for the improvement of ovarian reserve by regulating different signal pathways (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2022, 47(7): 644-648.
- [27] Zhao S, Gu T T, Weng K Q, et al. Phosphoproteome reveals extracellular regulated protein kinase phosphorylation mediated by mitogen-activated protein kinase-regulating granulosa cell apoptosis in broody geese [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(15): 12278.

收稿日期: - - 修回日期: - -