

基于转录组学探讨林蛙油对卵泡发育障碍大鼠的影响

何星瑶, 王玉, 王君淑, 王晓汇, 邱琳, 刘新宇, 赵宏宇, 张凤清

Transcriptomics-based Exploration of the Effects of Oviductus Ranae on Rats with Impaired Follicular Development

HE Xingyao, WANG Yu, WANG Junshu, WANG Xiaohui, DI Lin, LIU Xinyu, ZHAO Hongyu, and ZHANG Fengqing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070261>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

林蛙油提升雌激素的机制研究

Study on Mechanism of Oviductus Ranae Promoting Estrogen

食品工业科技. 2019, 40(19): 296-300 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.19.051>

林蛙油营养成分综合分析

Comprehensively analysis of components in Oviductus ranae

食品工业科技. 2017(04): 348-352 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.04.057>

林蛙卵油的提取、成分分析及抗氧化活性研究

Extraction, Component Analysis and Antioxidant Activity of *Rana chensinensis* Egg Oil

食品工业科技. 2020, 41(11): 60-65 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.11.009>

利用转录组学分析三峡肽素生物合成的基因簇

Analysis of Gene Clusters for Sanxiapeptin Biosynthesis by Transcriptomic Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(13): 156-162 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110192>

一种含姜黄食品对去卵巢模型鼠骨组织的影响

Effects of the food contained turmeric on bone tissue in ovariectomized rats

食品工业科技. 2017(11): 334-339 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.11.056>

内蒙古绒山羊不同部位骨骼肌的转录组分析

The transcriptomic analysis of different skeletal muscles of Cashmere goats

食品工业科技. 2017(10): 173-177 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.025>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

何星瑶, 王玉, 王君淑, 等. 基于转录组学探讨林蛙油对卵泡发育障碍大鼠的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(9): 26–35. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070261

HE Xingyao, WANG Yu, WANG Junshu, et al. Transcriptomics-based Exploration of the Effects of Oviductus Ranae on Rats with Impaired Follicular Development[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(9): 26–35. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070261

· 特邀主编专栏—组学分析技术在食品品质研究中的应用 (客座主编: 徐贞贞、张良晓、洪惠) ·

基于转录组学探讨林蛙油对卵泡发育障碍大鼠的影响

何星瑶^{1,2}, 王 玉², 王君淑³, 王晓汇^{1,2}, 邸 琳², 刘新宇², 赵宏宇^{2,*}, 张凤清^{1,*}

(1. 长春工业大学, 吉林长春 130012;

2. 吉林省中医药科学院 药效毒理评价中心, 吉林长春 130012;

3. 敦化市市场监督管理局, 吉林敦化 133700)

摘要:目的: 通过转录组学角度分析林蛙油对环磷酰胺所致卵泡发育障碍的影响, 为林蛙油的雌激素样作用机制研究提供充足的理论及实验依据。方法: 筛选后的雌性 Wistar 大鼠 60 只, 随机分为对照组 (C)、模型组 (M)、阳性药组 (P)、林蛙油低 (ORL)、高剂量组 (ORH); 除对照组外, 其余大鼠均腹腔注射环磷酰胺建立卵泡发育障碍大鼠模型; 除模型组外, 其余大鼠灌胃相应药物, 连续灌胃 14~16 d 后测定大鼠血清性激素含量; 摘取卵巢和子宫称量记录, 计算器官指数; 一侧卵巢与子宫做 HE 染色计算各级卵泡数量及子宫内膜厚度, 另一侧卵巢进行转录组学分析, 筛选差异基因, 对差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果: 大鼠卵泡发育障碍模型成功建立。与模型组大鼠相比, 林蛙油低、高剂量组大鼠子宫湿重和子宫指数显著升高 ($P<0.05$), 孕酮和雌二醇含量显著升高 ($P<0.05$); 林蛙油低、高剂量组大鼠窦前卵泡与黄体数量显著升高 ($P<0.05$), 子宫内膜厚度显著增加 ($P<0.01$), 差异有统计学意义, 林蛙油低剂量组大鼠窦状卵泡数量显著升高 ($P<0.05$); 转录组结果显示, 林蛙油低、高剂量组与模型组之间差异基因分别有 738、572 个; GO 富集分析分别富集到 1790、1616 个条目; KEGG 富集分析主要集中在 PI3K/Akt 信号通路与 B 细胞受体信号通路。结论: 林蛙油能有效改善环磷酰胺所致卵泡发育障碍大鼠的血清性激素水平、卵巢卵泡发育情况、子宫内膜萎缩等情况, 其分子机制可能与 PI3K/Akt、B 细胞受体等通路及基因有关。

关键词: 林蛙油, 卵泡发育障碍, 卵巢, 环磷酰胺, 转录组

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)09-0026-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070261



本文网刊:

Transcriptomics-based Exploration of the Effects of Oviductus Ranae on Rats with Impaired Follicular Development

HE Xingyao^{1,2}, WANG Yu², WANG Junshu³, WANG Xiaohui^{1,2}, DI Lin², LIU Xinyu²,
ZHAO Hongyu^{2,*}, ZHANG Fengqing^{1,*}

(1. Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;

2. Jilin Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences Pharmacological and Toxicological Evaluation Center,
Changchun 130012, China;

3. Market Supervision Administration of Dunhua, Dunhua 133700, China)

Abstract: Objective: The effects of Oviductus Ranae (OR) on cyclophosphamide-induced follicular developmental disorders were analyzed from the perspective of transcriptomics, which provided sufficient theoretical and experimental

收稿日期: 2023-07-27

基金项目: 吉林省自然科学基金 (YDZJ202201ZYTS264); 长春市科技发展计划项目 (21ZY62)。

作者简介: 何星瑶 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与功能食品开发, E-mail: 286410714@qq.com。

* 通信作者: 赵宏宇 (1987-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理、功能食品功能评价研究, E-mail: 169080112@qq.com。

张凤清 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物及功能食品开发, E-mail: 1044424827@qq.com。

basis for the study of estrogen-like mechanism of OR. Methods: Sixty screened female Wistar rats were randomly divided into control group (C), model group (M), positive group (P), OR low-dose (ORL) and high-dose group (ORH). Except for the control group, all rats were injected with cyclophosphamide intraperitoneally to establish the rat model of follicular development dysfunction. Except for the model group, the other rats were given corresponding drugs by gavage, and the serum sex hormone contents were determined after 14~16 days of continuous gavage. The ovaries and uterus were extracted and weighed for recording and calculating the organ index. One ovary and uterus were stained with HE staining to calculate the number of follicles at all levels and the thickness of the endometrium, while the other ovary was analyzed by transcriptome, and the differentially expressed genes were screened and analyzed by GO and KEGG enrichment analyses. Results: The results showed that the rat follicular development dysfunction model was successfully established. Compared with the rats in the M, the wet weight and index of the uterus of rats in the ORL and ORH significantly increased ($P<0.05$), and the contents of P and E_2 significantly increased ($P<0.05$). The number of preantral follicles and corpus luteum of rats in the ORL and ORH increased significantly ($P<0.05$), and the thickness of endometrium increased significantly ($P<0.01$), with statistically significant differences, and the number of antral follicles in the ORL increased significantly ($P<0.05$). The transcriptome results showed that there were 738 and 572 differential genes between the ORL, ORH and M, respectively. GO enrichment analysis enriched 1790 and 1616 entries and the KEGG enrichment analysis was mainly focused on the PI3K/Akt signaling pathway and the B-cell receptor signaling pathway. Conclusion: OR can effectively improve serum sex hormone levels, ovarian follicular development, and endometrial atrophy in rats with cyclophosphamide-induced follicular dysfunction, and its molecular mechanism may be related to pathways and genes such as PI3K/Akt and B-cell receptor.

Key words: Oviductus Ranae (OR); follicular developmental dysfunction; ovary; cyclophosphamide; transcriptome

林蛙油(Oviductus Ranae, OR), 中药名哈蟆油, 为中国林蛙(*Rana temporaria chensinensis* David)雌蛙输卵管干制品, 是珍贵的保健品。现代药理研究表明, 林蛙油中富含多种生物活性物质, 在抗疲劳、抗氧化、增强免疫力方面有一定的功效^[1-2], 在改善女性更年期综合征方面效果良好^[3-4]。动物研究中发现林蛙油对大鼠体内雌激素水平具有显著提高的作用, 并且其作用机理与卵巢卵泡发育有着密不可分的关系^[5-7]。

课题组为研究林蛙油的雌激素样作用已开展了几个阶段的研究: 在第一阶段研究中发现^[8] 林蛙油对去卵巢大鼠不体现出雌激素样作用, 由此发现林蛙油的雌激素样作用功能依赖于卵巢, 很可能是调节卵巢而产生的作用, 且林蛙油的雌激素样作用与外源雌激素作用不同, 是通过影响卵巢内生长期卵泡发育程度导致血清雌激素水平提升的结果。为进一步探讨林蛙油的雌激素样机制, 第二阶段进行了林蛙油对卵泡发育障碍大鼠和正常大鼠卵泡发育的研究, 在卵泡发育障碍模型中发现^[9], 林蛙油能够促进大鼠卵巢 PI3K 蛋白表达及 Akt 蛋白磷酸化水平, 能够下调卵泡发育障碍的大鼠卵巢内 PTEN mRNA 表达, 上调 PI3K 蛋白表达, 促进 Akt 蛋白磷酸化水平升高。在林蛙油对卵泡发育的影响中发现^[10], 大鼠连续灌胃林蛙油 8 周后, 血清激素、卵巢组织学变化和怀孕情况, 均出现了卵巢过度刺激进而呈现早衰的现象, PI3K/Akt 信号通路在 mRNA 水平上有上调作用; 经过前期一系列研究发现林蛙油的雌激素样作用可能是刺激大鼠卵巢并与卵泡的生长发育相关。

转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)技术是一种新型高通量测序技术, 可以对细胞或组织的转录组进行全面研究, 可以同时测量数千个基因的表达

水平并提供特定的功能途径与生物过程^[11]。近年来对卵巢的转录组测序研究中发现了幼鼠与成年鼠卵巢的转录组差异, 结果发现一些调节卵泡发育的关键基因与重要的功能通路如细胞凋亡等^[12]; 以及应用转录组学技术探索了环磷酰胺代谢产物损伤卵巢颗粒细胞的差异表达基因与信号通路的影响等^[13]。

本次研究中, 选用环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX)造模建立大鼠卵泡发育障碍模型, 依据前期实验经验选择林蛙油生物活性较好的灌胃周期, 进一步通过转录组学角度分析林蛙油的雌激素样作用对卵泡发育的影响并探索除 PI3K/Akt 信号通路以外的可能涉及到的信号通路, 为林蛙油的雌激素样作用机制研究提供充足的理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Wistar 大鼠 SPF 级、雌性、体质量 190 ± 20 g、60 只, 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; 林蛙油 通化德正堂野生资源开发有限公司, 经吉林省中医药科学院邸琳主任药师鉴定为中国林蛙(*Rana chensinensis*)雌蛙输卵管干制品; 环磷酰胺 大连美仑生物技术有限公司; 戊酸雌二醇 DELPHARM Lille SAS; 克罗米芬片 塞浦路斯 Medochemie Ltd 公司; 醋酸甲地孕酮分散片 青岛国海生物制药有限公司; 革兰氏染色液(快速法) 珠海贝索生物技术有限公司; 雌二醇(Estradiol, E_2)、孕酮(Progesterone, P)、促黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)、促卵泡生成素(Follicle stimulating hormone, FSH)、睾酮(Testosterone, T)放射免疫法试剂盒 北京北方生物技术研究所有限公司; 戊巴比妥钠 天津市光复精细化工研究所; 甲醛 分析纯, 辽宁泉瑞试剂有限公司。

XH 6080 型放免仪 西安核仪器厂; HC-3618R 高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司; JA 2003 B 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; CX 23 型光学显微镜 日本 Olympus 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与给药 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 190 ± 20 g, 饲养条件: 动物室温度 $20 \sim 26$ °C, 相对湿度 $55\% \sim 70\%$, 12 h 明/暗循环, 自由进食及饮水, 实验动物饲养于吉林省中医药科学院实验动物 SPF 级屏障系统 IVC 笼具内, 本实验由吉林省中医药科学院实验动物伦理委员会审核通过(批准号 JLSZKYDWLL2021-012), 符合实验动物伦理委员会规定。所有大鼠适应性饲养一周后行阴道涂片, 选择发情周期明确且周期在 4~5 d 的大鼠随机分为对照组(C)、模型组(M)、阳性药组(P)、林蛙油低(ORL)、高(ORH)剂量组, 每组 12 只大鼠。对照组腹腔注射等体积生理盐水, 除对照组外, 其余大鼠均腹腔注射环磷酰胺 14 d(首日 100 mg/kg, 后续 10 mg/kg)建立卵巢损伤大鼠模型; 造模次日, 林蛙油低、高剂量组以 200、400 mg/kg 灌胃剂量灌胃林蛙油溶液, 阳性药组选用人工周期加促排卵治疗方式, 每 5 d 为一个治疗循环, 前 3 d 灌胃戊酸雌二醇溶液 0.1 mg/kg、第 4 d 灌胃戊酸雌二醇溶液 0.1 mg/kg 和醋酸甲地孕酮溶液 0.8 mg/kg、第 5 d 不给药。末次给药前 2 d 灌胃枸橼酸氯米芬溶液 10 mg/kg 直至处理; 对照组灌胃等体积蒸馏水, 各组大鼠每次灌胃体积均为 20 mL/kg, 连续灌胃 14~16 d(依据处理时期, 灌胃时长之调整), 每间隔 3 d 称量体质量。

1.2.2 动物处理及取材 自造模 10 日起各组大鼠每日制作阴道涂片判断大鼠所在发情时期^[4], 从而计算发情周期。选择灌胃达到 14 d 以上且同时处于发情前期的大鼠处理。末次灌胃 2 h 后, 大鼠 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后腹主动脉采血, 3000 r/min 离心 10 min, 取血清 -20 °C 保存备用。摘取子宫、卵巢, 称量重量计算器官指数(器官指数=器官重量/体质量 $\times 1000$), 一侧卵巢及子宫 4% 多聚甲醛固定保存备用, 另一侧卵巢液氮保存备用。

1.2.3 血清性激素检测 取大鼠血清, 依照放免法试剂盒说明书中步骤操作, 测定其中 E_2 、P、T、FSH、LH 含量。

1.2.4 卵巢及子宫组织病理学观察 取于 4% 多聚甲醛固定 48 h 后的卵巢及子宫, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 苏木素-伊红(HE)染色后, 中性树胶封片。全切片扫描观察卵巢及子宫组织的形态学变化, 计算卵巢的窦前卵泡、窦状卵泡、成熟卵泡及黄体数目并测定各组子宫内膜厚度。

1.2.5 转录组测序及数据分析 提取各组大鼠卵巢

组织(每组随机选取 3 只)总 RNA, 经检测合格后用于 RNA-seq。构建 cDNA 文库, 利用 Illumina Nova-Seq 6000 型测序平台进行高通量测序, FastQC 评估原始测序数据质量, 过滤得到 Clean reads。使用 TopHat2 的升级版 HISAT2(<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) 软件将过滤后的 Reads 比对到参考基因组上。随后进行参考基因比对、冗余序列分析、均一性分布及基因覆盖率等分析。样本处理、上机测序及数据可视化分析均由上海派森诺生物科技股份有限公司协助完成。

1.2.6 差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)筛选 采用 DESeq 基于负二项分布对基因表达进行差异分析, 筛选差异表达基因条件为: 表达差异倍数 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$, 显著性 $P < 0.05$ 。筛选后分别得到模型组与对照组 DEGs、阳性药组与模型组 DEGs, 林蛙油低、高剂量与模型组 DEGs。利用派森诺基因云绘制火山图, 韦恩图及热图。

1.2.7 GO 功能和 KEGG 富集分析 基于基因本体数据库(Gene Ontology, GO)与京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG), 进行 GO 及 KEGG 富集分析, 找出与整个基因组背景相比, 差异基因显著富集的 GO term 与 KEGG pathway; 并综合分析结果, 以确定差异基因行使的主要生物学功能。

1.3 数据处理

使用 SPSS 20.0 进行统计学分析, 数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本均数间比较采用 Oneway ANOVA, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 大鼠一般情况观察

如表 1 所示, 对照组大鼠精神状态良好, 活动敏捷, 皮毛光滑, 反应灵敏; 模型组大鼠随造模时间延长, 活动减少, 多数时间呈蜷缩状, 精神萎靡, 皮毛黯淡, 与对照组相比, 体质量极显著减轻($P < 0.01$); 阳性药组大鼠给药一段时间后, 反应较敏捷, 皮毛稍有光泽, 暴躁易怒, 体质量与模型组相比无显著性差异; 林蛙油低、高剂量组大鼠给药一段时间后, 精神状态良好, 皮毛光滑, 活动量相对增多, 体质量相比模型组有上升趋势但无显著性差异。

表 1 各组大鼠体质量($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	初始体质量(g)	给药7 d体质量(g)	最终体质量(g)
对照组	201.65 $\pm$ 11.19	217.71 $\pm$ 12.13	218.15 $\pm$ 14.76
模型组	199.75 $\pm$ 7.13	194.45 $\pm$ 14.46**	189.46 $\pm$ 14.61**
阳性药组	200.56 $\pm$ 10.74	193.42 $\pm$ 9.46	183.03 $\pm$ 8.99
林蛙油低剂量组	200.08 $\pm$ 12.76	194.59 $\pm$ 13.90	191.50 $\pm$ 7.99
林蛙油高剂量组	200.65 $\pm$ 9.89	187.95 $\pm$ 12.84	200.13 $\pm$ 11.91

注: 与对照组大鼠比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组大鼠比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 表 2~表 4 同。

2.2 林蛙油对大鼠卵巢、子宫湿重及器官指数的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠卵巢、子宫质量以及卵巢指数均降低, 具有极显著差异 ($P<0.01$), 子宫指数显著降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, 阳性药组大鼠子宫质量以及子宫指数均升高, 具有极显著差异 ($P<0.01$); 林蛙油低剂量组大鼠子宫质量以及子宫指数均显著升高 ($P<0.05$), 林蛙油高剂量组大鼠子宫质量以及子宫指数均升高, 具有极显著差异 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠卵巢、子宫湿重及器官指数 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)
Table 2 Ovarian, uterine wet weight and organ index of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	卵巢质量 (mg)	卵巢指数 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	子宫质量 (mg)	子宫指数 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照组	99.50±14.71	0.45±0.06	479.63±122.79	2.15±0.53
模型组	68.38±12.08**	0.35±0.05**	293.38±87.36**	1.50±0.39*
阳性药组	65.38±6.65	0.35±0.03	453.38±108.09###	2.48±0.59##
林蛙油低剂量组	73.75±8.99	0.39±0.05	415.50±130.60#	2.16±0.66#
林蛙油高剂量组	78.88±6.98	0.40±0.05	516.13±162.49###	2.56±0.73##

2.3 林蛙油对大鼠血清性激素含量的影响

如表 3 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 FSH、LH 含量显著上升, P、T、E₂ 含量显著降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 阳性药组大鼠血清中 FSH、

表 3 各组大鼠血清性激素含量 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 3 Serum sex hormone levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	FSH($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	LH($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	P($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	T($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	E ₂ ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照组	1.57±0.18	3.69±0.75	4.28±1.70	0.075±0.05	18.01±14.34
模型组	2.10±0.49*	3.97±0.47*	2.46±0.54*	0.025±0.01*	5.45±1.21*
阳性药组	1.54±0.41#	2.97±0.48#	4.23±1.43#	0.051±0.02#	18.68±10.15##
林蛙油低剂量组	1.68±0.40#	3.42±0.56#	4.45±1.63#	0.071±0.04#	16.57±12.18#
林蛙油高剂量组	1.82±0.58#	3.29±1.11	6.48±2.89#	0.062±0.04	22.07±12.38##

LH 含量显著降低 ($P<0.05$), P、T 含量显著上升 ($P<0.05$), E₂ 含量上升, 差异有极显著性 ($P<0.01$); 林蛙油低剂量组大鼠血清中 FSH、LH 含量显著降低 ($P<0.05$), P、T、E₂ 含量显著上升 ($P<0.05$); 林蛙油高剂量组大鼠血清中 FSH 含量显著降低 ($P<0.05$), P 含量显著上升 ($P<0.05$), E₂ 含量上升, 差异有极显著性 ($P<0.01$)。

综合表 2、表 3 数据可知, 环磷酰胺可导致大鼠的 FSH、LH 水平上升, P、E₂ 水平降低, 可能因其直接的靶器官毒性导致卵巢萎缩以及子宫无法响应周期而增厚, 表明腹腔注射环磷酰胺致卵巢损伤模型造模成功; 阳性药组通过外源激素补充的方式提高了大鼠血清中孕激素和雌激素含量, 从而对子宫起到了保护作用但对于卵巢没有明显改善, 而林蛙油组表现出与阳性药类似的子宫保护作用, 同时对卵巢也有一定的保护作用。

2.4 林蛙油对大鼠卵巢、子宫组织病理形态的影响

如表 4、图 1、图 2 所示, 对照组大鼠卵巢可见皮质髓质结构清晰, 皮质内可见不同发育阶段的各级卵泡和新鲜黄体, 颗粒细胞饱满丰富, 髓质层内可见丰富血管; 子宫切片镜下可见子宫内膜较厚, 子宫腔大, 腺体及结缔组织丰富。

表 4 各组大鼠各级卵泡数量及子宫内膜厚度 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 4 Number of follicles at each level and endometrial thickness in each group of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	窦前卵泡(个)	窦状卵泡(个)	黄体(个)	子宫内膜上皮细胞厚度(μm)
对照组	13.67±3.21	17.00±2.65	5.67±2.08	316.47±40.58
模型组	7.33±1.53*	10.00±1.00*	1.33±0.58*	120.57±32.17**
阳性药组	23.33±6.66#	35.67±14.19#	3.33±0.58#	294.31±37.68###
林蛙油低剂量组	15.00±3.61#	15.00±2.65#	5.33±1.53#	346.57±32.70##
林蛙油高剂量组	12.33±2.52#	14.33±3.06	5.00±1.73#	315.99±46.85##

与对照组相比, 模型组大鼠卵巢切片镜下可见卵巢体积明显萎缩, 卵泡发育不良, 无成熟卵泡, 颗粒细胞排列稀疏, 窦前、窦状卵泡、黄体数量显著减少

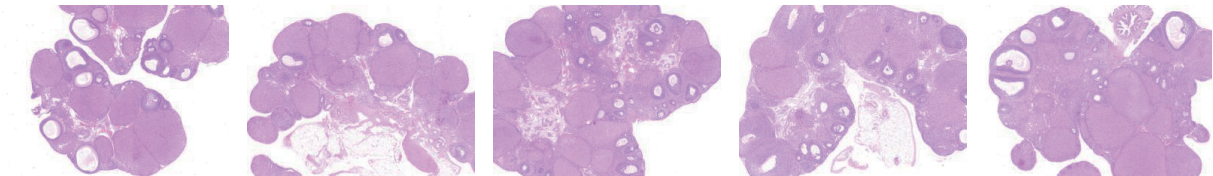


图 1 林蛙油对大鼠卵巢病理的影响(HE, 40×)

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

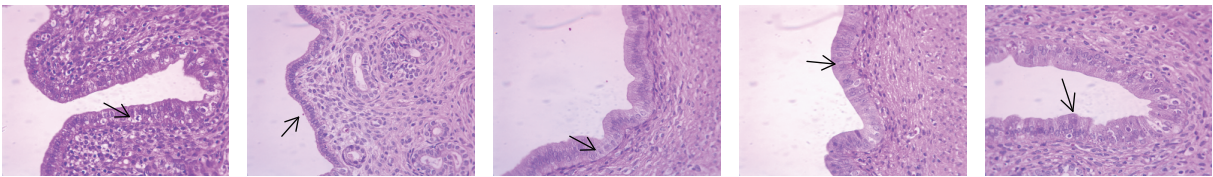


图 2 林蛙油对大鼠子宫病理的影响(HE, 400×)

Fig.2 Effect of Oviductus Ranae on uterine histopathology in rats (HE, 400×)

注: 箭头所指为子宫内膜上皮细胞。

($P<0.05$); 子宫切片镜下可见腺体数量减少, 子宫内
膜呈单层立方上皮, 子宫内膜上皮细胞厚度变薄, 差
异有极显著性($P<0.01$), 基质中血管少, 基质细胞数
量少、子宫间质萎缩, 结缔组织不丰富。表明环磷酰
胺对卵泡数量及子宫均有负面影响, 本实验卵巢损伤
模型成立。

与模型组相比, 大鼠卵巢切片镜下可见阳性药
组和林蛙油低剂量组窦前、窦状卵泡、黄体数量显著
增多($P<0.05$), 林蛙油高剂量组窦前卵泡、黄体数量
显著增多($P<0.05$); 大鼠子宫切片镜下可见阳性药
组、林蛙油低、高剂量组子宫内膜上皮细胞厚度均增
加, 差异有极显著性($P<0.01$); 表明阳性药及林蛙油
均能改善环磷酰胺所致的卵泡与子宫的发育障碍, 促
进窦前、窦状卵泡的生长发育, 改善子宫组织结构。
阳性药组大鼠的窦前、窦状卵泡数量的显著提升提
示可能与实验末期给予的枸橼酸氯米芬刺激卵泡发
育有关。

2.5 转录组测序数据分析

结果显示各实验组样本可比对到参考基因组上
的序列占总序列的比例均大于 96%, Q30(测序质量
分数大于 30 的碱基占所有碱基的百分数)均大于

93%, 表明测序质量良好, 测序数据准确可靠。见
表 5。

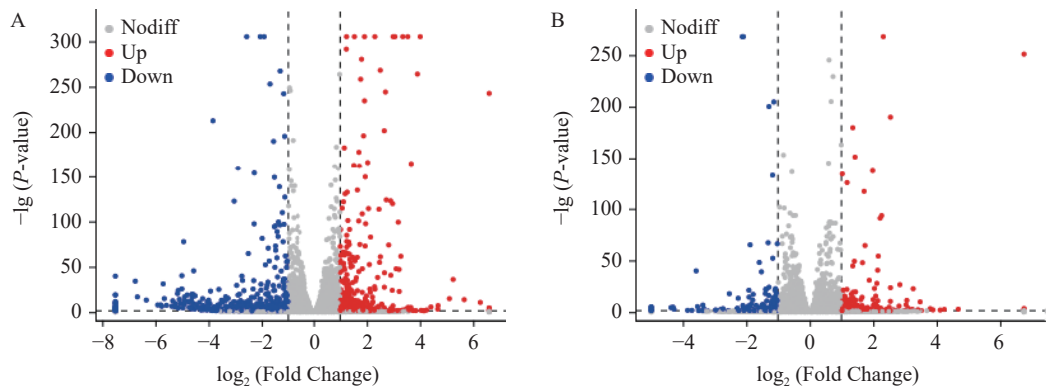
2.6 分析差异表达基因

如图 3A 所示, 与对照组相比, 模型组 DEGs
共 1024 个, 其中 458 个基因表达上调, 566 个基因表
达下调。如图 3B 所示, 与模型组相比, 阳性药组
DEGs 共 353 个, 其中 190 个基因表达上调, 163 个
基因表达下调。如图 3C 所示, 与模型组相比, 林蛙
油低剂量组 DEGs 共 738 个, 其中 233 个基因表达
上调, 505 个基因表达下调。如图 3D 所示, 林蛙油
高剂量组 DEGs 共 572 个, 其中 276 个基因表达上
调, 296 个基因表达下调。结果提示其可能为林蛙油
对卵巢损伤大鼠卵泡发育的作用靶点。

如图 3E、3F 所示, 对各组差异基因进行韦恩图
分析发现, 四对差异比较中的共同交集基因共有
71 个, 对照/模型组与林蛙油低剂量/模型组和林蛙油
高剂量/模型组之间成对的差异基因的共同交集基因
分别有 173、108 个, 而对照/模型组与阳性药/模型组
之间成对的差异基因的共同交集基因分别有 28 个,
这说明林蛙油不同剂量之间以及阳性药对卵巢损伤
大鼠卵泡保护作用中, 所调控的基因表达存在差异,

表 5 Clean reads 的质量与比对结果
Table 5 Quality of Clean reads and comparison results

分组	样本	原始下机序列数/ Raw Reads	高质量序列数/ Clean Reads	比对上基因组序列数(占比)/ Mapped Reads	比对到基因组多点位序列数(占比)/ MultiMap Reads	Q30(%)
对照组	C1	43631782	40908448	39409271 (96.34%)	1447354 (3.67%)	94.55
	C2	40008052	37570112	36201256 (96.36%)	1347740 (3.72%)	94.8
	C3	38806704	36385996	35125725 (96.54%)	1299363 (3.70%)	95.26
模型组	M1	37965490	35522690	34165452 (96.18%)	1237438 (3.62%)	94.7
	M2	38529572	35731040	34411288 (96.31%)	1237339 (3.60%)	95.06
	M3	42234012	39387660	37881230 (96.18%)	1356855 (3.58%)	94.8
阳性药组	P1	40504324	38051094	36627497 (96.26%)	1292352 (3.53%)	93.66
	P2	37090822	34893192	33548098 (96.15%)	1215725 (3.62%)	93.45
	P3	42430986	39755366	38302480 (96.35%)	1364371 (3.56%)	94.29
林蛙油低剂量组	ORL1	38945140	36533160	35102889 (96.09%)	1273600 (3.63%)	93.86
	ORL2	40821930	38151586	36659609 (96.09%)	1334098 (3.64%)	94.14
	ORL3	41582086	39025586	37496806 (96.08%)	1393452 (3.72%)	93.89
林蛙油高剂量组	ORH1	37637168	35132098	33747715 (96.06%)	1150073 (3.41%)	94.86
	ORH2	44982322	42089650	40429333 (96.06%)	1378792 (3.41%)	94.74
	ORH3	38943374	36467686	35033122 (96.07%)	1173460 (3.35%)	94.78



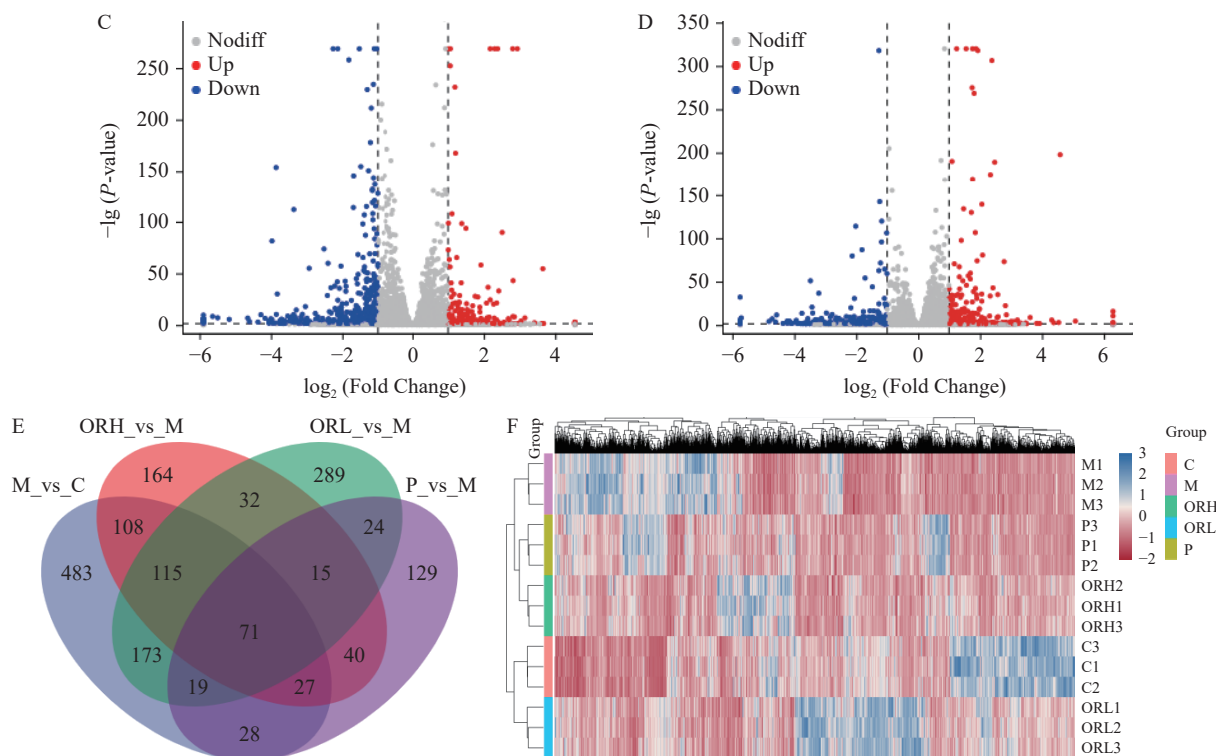


图 3 林蛙油对卵巢损伤大鼠差异表达基因(DEGs)的影响

Fig.3 Effect of Oviductus Ranae on differentially expressed genes (DEGs) in ovarian-injured rats

注: A.模型组与对照组(M vs C)DEGs 火山图; B.阳性药组与模型组(P vs M)DEGs 火山图; C.林蛙油低剂量组与模型组(ORL vs M)DEGs 火山图; D.林蛙油高剂量组与模型组(ORH vs M)DEGs 火山图; E.DEGs 韦恩图; F.DEGs 热图。红色表示表达上调的基因,蓝色表示表达下调的基因。

而这种差异可能是作用的机制所在。

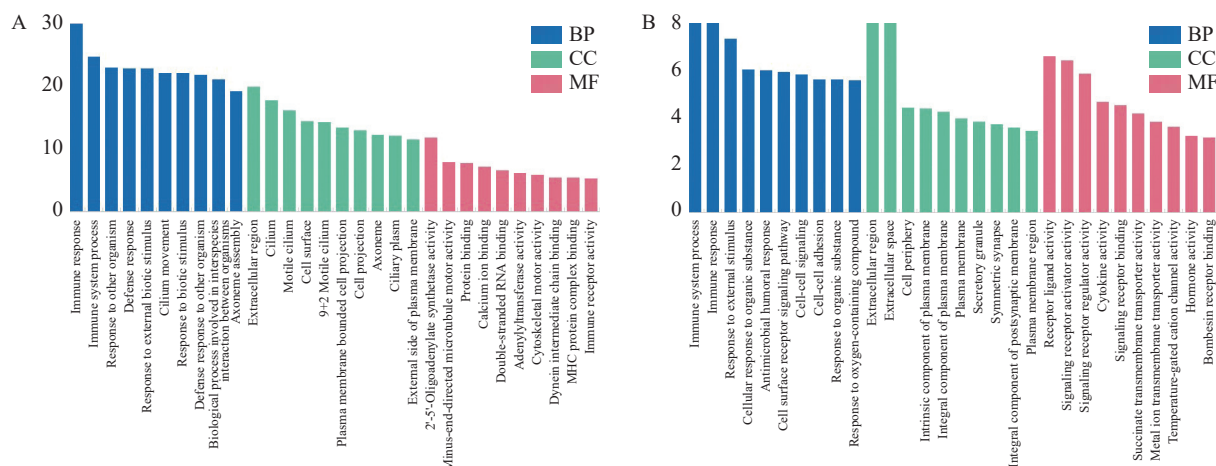
2.7 差异表达基因的 GO 生物学功能分析

基因本体(Gene Ontology, GO)生物数据库用于对基因及其蛋白功能进行注释,主要分为生物学过程(biological process, BP)、细胞组件(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三个类别^[15]。将各实验组 DEGs 进行富集分析,结果如下。

如图 4A 所示,对照组与模型组 DEGs 共富集到 1767 个 GO 条目,其中在 BP 中共富集到 1357 条,主要富集在免疫反应、免疫系统过程、对其他生物的反应、防御反应、对外部生物刺激的反应等途

径;在 CC 中共富集到 159 条,主要富集在细胞外区、活动纤毛、细胞表面等途径;在 MF 中共富集到 251 条,主要富集在 2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性、蛋白质结合、钙离子结合等途径。

如图 4B 所示,阳性药组与模型组 DEGs 共富集到 1268 个 GO 条目,其中在 BP 中共富集到 1023 条,主要富集在免疫系统过程、免疫反应、对外部生物刺激的反应、细胞对有机物的反应等途径;在 CC 中共富集到 85 条,主要富集在细胞外区、细胞外间隙、质膜等途径;在 MF 中共富集到 160 条,主要富集在受体配体活性、信号受体激活剂活性、信号受体调节活性等途径。



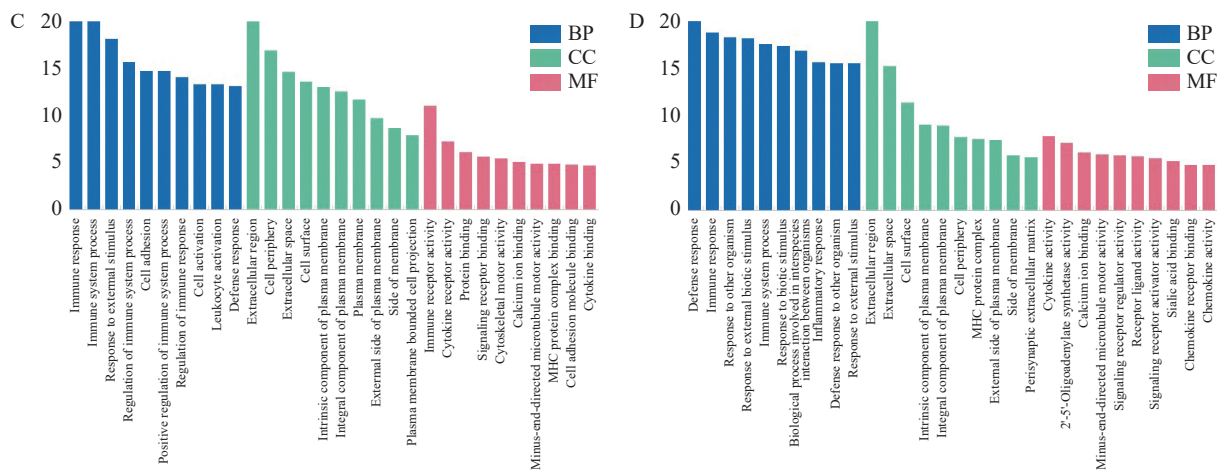


图4 差异表达基因 GO 富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

注: A.模型组与对照组(M vs C)GO 富集分析结果; B.阳性药组与模型组(P vs M)GO 富集分析结果; C.林蛙油低剂量组与模型组(ORL vs M)GO 富集分析结果; D.林蛙油高剂量组与模型组(ORH vs M)GO 富集分析结果。

如图 4C、4D 所示, 林蛙油低、高剂量组与模型组 DEGs 分别共富集到 1790、1616 个 GO 条目, 在 BP 中分别富集到 1416、1291 条, 主要富集在免疫反应、防御反应、免疫系统过程、对外部生物刺激的反应、细胞黏附等途径; 在 CC 中分别富集到 153、128 条, 主要富集在细胞外区、细胞外围、细胞外间隙等途径; 在 MF 中分别富集到 221、197 条, 主要富集在细胞因子受体活性、免疫受体活性、2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性、钙离子结合等途径。

2.8 差异表达基因的 KEGG 代谢与信号通路分析

对照组与模型组 DEGs 的 KEGG 富集分析结果如图 5A 所示, 涉及到 43 个信号通路, 富集的重要信号通路主要包括丙型肝炎、细胞黏附分子、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用、甲型流感等。阳性药组与模型组 DEGs 的 KEGG 富集分析结果如图 5B 所示, 涉及到 32 个信号通路, 富集的重要信号通路主要包括 JAK/STAT 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、癌症中的转录调控异

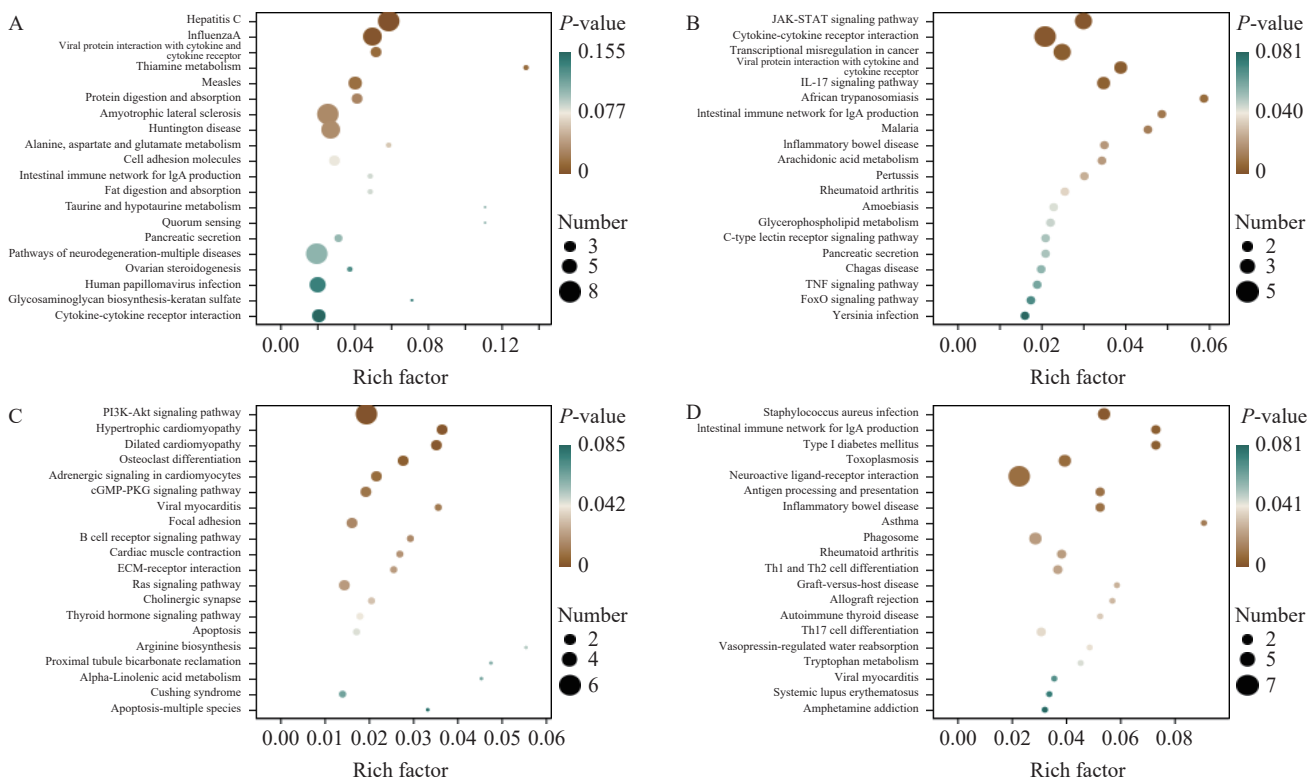


图5 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

注: A.模型组与对照组(M vs C)KEGG 富集分析结果; B.阳性药组与模型组(P vs M)KEGG 富集分析结果; C.林蛙油低剂量组与模型组(ORL vs M)KEGG 富集分析结果; D.林蛙油高剂量组与模型组(ORH vs M)KEGG 富集分析结果。

常、IL-17 信号通路等。林蛙油低、高剂量组与模型组 DEGs 的 KEGG 富集分析结果如图 5C、5D 所示, 分别涉及到 47、35 个信号通路, 富集的重要信号通路主要包括 PI3K/Akt 信号通路、破骨细胞分化、病毒性心肌炎、B 细胞受体信号通路、IgA 产生的肠道免疫网络、抗原处理和呈递、炎症性肠病、吞噬体等。

综合 GO 及 KEGG 富集分析结果发现, 林蛙油能够通过参与机体的代谢调节进而保护受损卵巢的功能及卵泡的发育, 通过免疫反应、防御反应激活细胞外区、细胞表面上受体靶标等保护卵巢, 进而通过细胞因子、黏附因子、分泌因子等介导卵巢内细胞间、细胞与细胞外基质的相互作用进而影响卵泡的发育, 各组间比较得出的富集重要信号通路(如 PI3K/Akt、B 细胞受体信号通路等)提示其可能为林蛙油对卵巢损伤大鼠卵泡发育作用的关键调控通路。

3 讨论

近年来化疗所致的女性性腺损害在临床上已达成共识^[16]。在化疗药物类别中, 环磷酰胺在临床中对卵巢的毒性很具代表性, 并具有剂量依赖性效应^[17-18], 使用环磷酰胺造模为好的选择, 因此本实验选用环磷酰胺为造模用药^[19], 并且在预实验中对环磷酰胺的剂量进行了筛选, 确定了 100 mg+10 mg 为最佳给药剂量, 该造模剂量下, 大鼠体重及器官指数下降明显, 且无死亡率, 可保证一定的进食饮水等生活状态。

目前关于林蛙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林蛙油中的雌激素样物质所起的作用, 关于外源激素制备大鼠高雌激素血症模型的研究中^[20]发现从外源激素机制考虑, 林蛙油中的雌二醇不足以将服用者血清雌二醇含量显著提升。前期实验室研究^[8]已证实正常大鼠服用林蛙油后血清雌二醇显著上升, 但各器官指数却没有显著的变化, 并不符合使用外源雌激素的结果。提示林蛙油确实有作用于性腺轴中“垂体—卵巢”部分的内源途径来提升机体雌激素。

本研究结果显示, 林蛙油及阳性药均能改善造模对大鼠子宫指标的影响, 对卵巢指标也有改善的趋势; 病理方面提示林蛙油及阳性药的干预能缓解卵泡因发育不完整而导致闭锁无法正常排卵, 导致雌激素减少这一进程, 从而保护卵巢与子宫功能, 且林蛙油的干预效果更趋近于正常对照组; 激素水平方面提示林蛙油和阳性药干预后大鼠血清中 FSH、LH 含量下降, P、E₂ 含量上升, 进一步证明了林蛙油对卵巢功能及卵泡发育的促进作用, 以上指标均证明环磷酰胺对卵巢功能的影响, 提示卵巢损伤模型复刻成功, 同时验证了林蛙油对卵巢损伤大鼠卵泡发育的促进作用, 与前期研究阶段结果一致。

转录组学方面 GO 及 KEGG 富集结果可证实林蛙油及阳性药对卵巢保护作用的途径存在不同, 与

对照组相比, 模型组富集结果说明环磷酰胺对大鼠细胞产生了烷化作用, 可能导致细胞的 RNA 发生改变^[21], 使胞外功能出现障碍, 抗病毒的能力下降从而导致免疫能力下降, 从而导致各个器官的发育障碍; 与模型组相比, 林蛙油低、高剂量组富集结果提示林蛙油可能通过免疫系统反应和防御反应等生物学过程, 调节细胞外区、免疫受体活性、细胞因子活性等功能对卵巢损伤大鼠卵泡发育有促进作用, 且 PI3K/Akt、B 细胞受体、抗原处理和呈递等通路可能为其作用的主要调控机制。阳性药组富集结果提示阳性药通过参与大鼠体内的免疫系统过程, 进而影响细胞外区功能及改善受体配体活性来改善卵巢损伤情况, JAK/STAT、IL-17 等信号通路可能为其作用的主要调控机制。

体内各种细胞因子、内分泌因子的调控作用是必不可少的, 它们共同作用决定卵母细胞及不同发育阶段卵泡的存活或凋亡^[22]; 机体中有两条经典的细胞凋亡途径, 分别是细胞外途径和细胞内途径^[23-24]。卵巢+局部多因子调节系统和网络以旁分泌、自分泌形式参与卵巢周期性优势卵泡选择、排卵、性激素合成等^[25]。黏附因子通过介导卵巢内细胞间、细胞与细胞外基质的相互作用进而影响卵泡的发育^[26]。PI3K 作为细胞内非常重要的信号转导分子, PI3K 蛋白在卵巢内的表达含量能够反映卵巢的发育状态^[27-28]。Akt 能够激活细胞凋亡级联反应中调控蛋白, 增强抗凋亡基因的表达, 通过磷酸化多种转录因子, 抑制凋亡基因的表达, 促进细胞生长^[29-30]。本研究中林蛙油组在 PI3K/Akt 信号通路有显著富集, 由此认为 PI3K/Akt、B 细胞受体等信号通路可能为林蛙油雌激素样作用的主要调控机制, 林蛙油的雌激素样作用可能通过免疫系统反应和防御反应等生物学过程, 调节细胞外区、免疫受体活性、细胞因子活性等功能对卵巢损伤大鼠卵泡发育起到保护作用, 且该结论与前阶段实验相一致。

4 结论

综上所述, 林蛙油能有效改善环磷酰胺所致的卵巢损伤大鼠的血清性激素水平、卵巢卵泡发育情况、子宫内膜萎缩等情况, 其分子机制可能与 PI3K/Akt、B 细胞受体等通路及基因有关。本研究从整体水平揭示了林蛙油对卵巢损伤大鼠卵泡发育改善情况的转录组学特征, 为林蛙油的雌激素样作用机制提供了理论与实验依据, 为后续实验提供了研究基础。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 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.
- [ZHAO H Y, LIU H M, LI J H, et al. Research progress on the

- health care function of forest frog oil and its protein isolation and purification[J]. *Journal of Agricultural Product Processing*, 2013, 127(7): 48–51.]
- [2] 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. [WANG D T, WANG D H. Research on chemical composition and pharmacological effect of oil of *Linnaeus chinensis*[J]. *Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 31(6): 1127–1129.]
- [3] LI X, SUI X, YANG Q, et al. Oviductus Ranae protein hydrolyzate prevents menopausal osteoporosis by regulating TGF β /BMP2 signaling[J]. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2019, 299(3): 873–882.
- [4] 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]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 208(8): 138–148.
- [5] 郭宪一, 范红艳. 林蛙油的药理作用研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2020, 41(3): 209–211. [GUO X Y, FAN H Y. Progress of pharmacological effects of oil from *Froglossus lindenberghii*[J]. *Journal of Jilin Medical College*, 2020, 41(3): 209–211.]
- [6] 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): 25–30, 24. [KANG L, LI N, JIANG D C. Study on estrogen-like effect of oil from forest frog[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(8): 25–30, 24.]
- [7] LIANG L, ZHANG X H, ZHOU Y, et al. Protective effect of Oviductus Ranae capsules on the reproductive organs of aged mice[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2008, 28(6): 982–985.
- [8] 赵宏宇, 王玉, 刘新宇, 等. 林蛙油提升雌激素的机制研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19): 296–300. [ZHAO H Y, WANG Y, LIU X Y, et al. Study on the mechanism of estrogen enhancement by forest frog oil[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2019, 40(19): 296–300.]
- [9] 孙雪缘, 王玉, 何星瑶, 等. 林蛙油对雷公藤所致大鼠卵泡发育障碍的影响[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(13): 398–406. [SUN X Y, WANG Y, HE X Y, et al. Effect of forest frog oil on the follicular development disorder in rats caused by *Lei Gong Teng*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(13): 398–406.]
- [10] 赵宏宇, 王玉, 孙雪缘, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨蛤蟆油对卵泡发育作用的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(21): 121–130. [ZHAO H Y, WANG Y, SUN X Y, et al. Exploring the effect of toad oil on follicular development based on PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulas*, 2021, 27(21): 121–130.]
- [11] KHATOON Z, FIGLER B, ZHANG H, et al. Introduction to RNA-Seq and its applications to drug discovery and development[J]. *Drug Development Research*, 2014, 75(5): 324–330.
- [12] PAN L, GONG W, ZHOU Y, et al. A comprehensive transcriptomic analysis of infant and adult mouse ovary[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2014, 12(5): 239–248.
- [13] KALICH-PHILOSOPH L, RONESS H, CARMELY A, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(185): 185ra62.
- [14] 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. [ZHANG T, WANG Y, WANG L. Comparison of two staining methods for rat vaginal smears[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2018, 28(12): 98–101.]
- [15] CARSON S A, KALLEN A N. Diagnosis and management of infertility: A review[J]. *JAMA*, 2021, 326(1): 65–76.
- [16] OVERBEEK A, VAN DEN BERG M H, VAN LEEUWEN F E, et al. Chemotherapy-related late adverse effects on ovarian function in female survivors of childhood and young adult cancer: A systematic review[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2017, 53: 10–24.
- [17] FAUBION S S, KUHLE C L, SHUSTER L T, et al. Long-term health consequences of premature or early menopause and considerations for management[J]. *Climacteric*, 2015, 18(4): 483–491.
- [18] 王洋, 张斐, 许洁夏, 等. 三种卵巢早衰大鼠造模方法比较研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(10): 1225–1230. [WANG Y, ZHANG F, XU J X, et al. Comparative study of three methods of modeling premature ovarian failure in rats[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2022, 42(10): 1225–1230.]
- [19] 李芳媛, 薛晴. 卵巢早衰动物模型的建立[J]. *中国计划生育学杂志*, 2021, 29(8): 1770–1775. [LI F Y, XUE Q. Establishment of an animal model of premature ovarian failure[J]. *Chinese Journal of Family Planning*, 2021, 29(8): 1770–1775.]
- [20] 马青, 师伟, 刘少玲, 等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠血清 E₂、P、PGE₂、PGF_(2 α)、TXB₂ 及 6-Keto-PGF_(1 α) 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(5): 1281–1284. [MA Q, SHI W, LIU S L, et al. Effects of warming menstruation and resolving blood stasis to relieve pain on serum E₂, P, PGE₂, PGF_(2 α), TXB₂ and 6-Keto-PGF_(1 α) in rats with primary dysmenorrhea with cold-congealed blood stasis syndrome[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 35(5): 1281–1284.]
- [21] 杨晓, 张小爱, 吴志豪, 等. 2', 5'-寡腺苷酸合成酶 1 基因多态性与自发性早产和胎膜早破易感性的病例对照研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(9): 898–902. [YANG X, ZHANG X A, WU Z H, et al. A case-control study of 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1 gene polymorphism and susceptibility to spontaneous preterm labor and premature rupture of membranes[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2015, 17(9): 898–902.]
- [22] 程立立, 刘少华, 刘珊, 等. 卵丘颗粒细胞中卵母细胞分泌因子表达水平对卵母细胞成熟度的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2023, 31(5): 951–956. [CHENG L L, LIU S H, LIU S, et al. Influence of oocyte secretion factor expression level in granulosa cells of the ovarian mound on oocyte maturation[J]. *Chinese Journal of Eugenics and Genetics*, 2023, 31(5): 951–956.]
- [23] 程宇凌, 任艳萍. Caspase-3 和核因子- κ B 在细胞凋亡外途径中的双向作用研究进展[J]. *广东医学*, 2016, 37(18): 2837–2840. [CHENG Y L, REN Y P. Progress of bidirectional roles of caspase-3 and nuclear factor- κ B in extra-apoptotic pathways[J]. *Guangdong Medicine*, 2016, 37(18): 2837–2840.]
- [24] GREEN L J, ZHOU H, PADMANABHAN V, et al. Adipose-derived stem cells promote survival, growth, and maturation of early-stage murine follicles[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 102.
- [25] 董智钰, 李燕, 张泰巍, 等. 逍遥散加减方对高催乳素血症大鼠卵巢内分泌及旁分泌机制的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 752–757. [DONG Z Y, LI Y, ZHANG T W, et al. Effects of the addition and subtraction formula of Yiwu San on the mechanism of ovarian autocrine and paracrine secretion in hyperprolactinemic rats[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 36(2): 752–757.]

- [26] MUZZI L, DI TUCCI C, GALATI G, et al. Endometriosis-associated infertility: Surgery or IVF? [J]. *Minerva Obstetrics and Gynecology*, 2021, 73(2): 226–232.
- [27] GROSBOIS J, DEMEESTERE I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during *in vitro* human follicle activation [J]. *Human Reproduction*, 2018, 33(9): 1705–1714.
- [28] MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI M, EKRAMI E M, AGHDAS S, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by polyphenols: Implication for cancer therapy [J]. *Life Sciences*, 2020, 255: 117–481.
- [29] ZHOU J, JIANG Y Y, CHEN H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(2): e12739.
- [30] 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.
- [JIANG F L, WANG X B, ZONG J, et al. Research progress on the correlation between PI3K-Akt/mTOR signaling pathway and premature ovarian failure [J]. *Heilongjiang Science*, 2019, 10(2): 50–51.]

客座主编



徐贞贞, 现任中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所研究员、博士生导师, 中国农业科学院“农科英才”杰出青年英才; 中国农业大学兼职教授、博士生导师; 主要从事果蔬基料化加工与质量控制技术研究。兼任国家标准样品技术委员会 (SAC/TC118) 委员; 中国食品科学技术学会果蔬加工技术分会秘书长、食品安全与标准技术分会委员、青年工作委员会委员; 中国农学会食物与营养专委会常务委员; 农业农村部农产品加工标准化技术委员会委员; *J FOOD PROCESS PRES* 和《食品工业科技》编委, *J INTEGR AGR* 和 *AGR COMMS* 青年编委等。近五年先后主持“十四五”国家重点研发计划课题, 国家自然科学基金优青、面上等多项国家省部项目。获神农中华农业科技奖科学研究类成果一等奖、教育部优秀成果技术发明奖一等奖等省部级与行业奖励 5 项。



张良晓, 中国农业科学院油料作物研究所研究员, 博士生导师, 国家花生产业体系质量安全与营养品质评价岗位科学家。入选国家青年拔尖人才、农业农村部农业科研杰出人才、中国农业科学院“农科英才”杰出青年英才。兼任国际油菜咨询委员会理事、国际食物营养与安全协会、中国农学会农产品质量安全分会副秘书长、*Oil Crop Science* 副主编、*BMC Chemistry* 编委、《食品工业科技》青年编委等学术兼职。主要从事油料质量安全与风险评估研究。主持“十四五”国家重点研发计划课题、国家自然科学基金面上等国家级项目。第一、通讯或并列通讯作者发表论文 92 篇, SCI 收录论文 55 篇; 第一发明人获授权发明专利 8 件, 其中国际专利 3 件。获湖北省技术发明一等奖 (第二完成人)、中国农学会青年科技奖、中国农业科学院-大北农优秀青年人才奖等奖励。



洪惠, 博士, 中国农业大学食品科学与营养工程学院教授, 博士生导师, 中国农业大学杰出人才, 食品营养与安全系副主任, 加拿大阿尔伯塔大学农业食品与营养系博士后, 中国农业大学-美国康奈尔大学联合培养博士, 中国农业大学青年新星, 北京水产学会理事, 中央电视台 CCTV-9 纪录频道《螃蟹的征途》《鲜生史》《大国小鲜》科学顾问, *Food Science of Animal Products*、《肉类研究》编委。主要从事水产品营养品质、贮运保鲜与加工, 动物蛋白质资源的高值化利用技术与理论研究、小分子活性肽的功能评价与开发, 人工智能与食品科学前沿交叉。近年来在本领域国际主流学术期刊上发表论文 50 余篇, Google 学术论文总引用约 4900 次; 入选 2022 年《全球 2% 顶尖科学家》榜单; 授权发明专利 3 项, 出版专著 2 部。主持多项科研项目, 包括国家自然科学基金 3 项、国家重点研发项目子课题 3 项, 作为骨干参与现代农业产业技术体系大宗淡水鱼加工研究室质量安全与营养品质评价岗位工作。分别以主要参与人和主持人获得教育部科技进步二等奖 1 项和中国商业联合会科技进步一等奖 1 项。