

丹参酮 II_A 调控 Akt1/FDX1 通路抑制颗粒细胞铜死亡改善大鼠卵巢早衰

李 瑞¹, 刘 洁¹, 张团笑², 张丽梅^{1*}

1. 川北医学院附属医院 中医科, 四川 南充 637000

2. 川北医学院, 四川 南充 637000

摘要: **目的** 探讨丹参酮 II_A 通过调控蛋白激酶 B (Akt1)/铁氧化还原蛋白 1 (FDX1) 信号抑制卵巢颗粒细胞的铜死亡, 改善环磷酰胺诱导的大鼠卵巢早衰的作用机制。**方法** 将 49 只雌性成年 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、丹参酮 II_A (10、20 mg/kg) 组、丹参酮 II_A+A-674563 组、丹参酮 II_A+siNC 组、丹参酮 II_A+siFDX1 组。采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血清雌二醇 (E₂) 和卵泡刺激素 (FSH) 的水平以及卵巢组织中二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶 (DLAT)、二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶 (DLST) 的水平; 原子吸收光谱法测定卵巢铜离子含量; 荧光探针法检测脂质活性氧 (ROS) 的水平; Western blotting 法分析 p-Akt1/Akt1、p-FDX1/FDX1 蛋白的表达; 免疫荧光化学法与末端脱氧核糖核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记法评估细胞增殖 (Ki67 阳性率) 与凋亡; 苏木精-伊红 (HE) 染色评估卵巢组织病理学变化。**结果** 与模型组相比, 丹参酮 II_A 各剂量组血清 E₂ 水平和原始卵泡数显著升高、FSH 显著降低; 铜离子含量、脂质 ROS、卵巢细胞凋亡率、组织纤维化/炎症评分均显著降低; p-Akt1/Akt1、p-FDX1/FDX1 及 Ki67 阳性率显著升高 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A 20 mg/kg 组相比, 丹参酮 II_A+A-674563 可剂量相关性逆转上述指标 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A+siNC 组相比, 丹参酮 II_A+siFDX1 组 E₂ 水平、卵泡数、p-Akt1/Akt1、p-FDX1/FDX1 及 Ki67 阳性率显著降低, 而 FSH、铜离子含量、脂质 ROS、卵巢凋亡率及组织损伤评分均显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 丹参酮 II_A 通过激活 Akt1/FDX1 信号, 抑制卵巢颗粒细胞铜死亡及凋亡, 改善激素失衡与组织病理损伤, 从而缓解卵巢早衰进展。

关键词: 丹参酮 II_A; 卵巢早衰; 卵巢颗粒细胞; 蛋白激酶 B/铁氧化还原蛋白 1 信号; 铜死亡

中图分类号: R285.5; R287.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)04-0889-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.04.003

Tanshinone II_A improves premature ovarian failure in rats by regulating Akt1/FDX1 signaling to inhibit granulosa cell cuproptosis

LI Rui¹, LIU Jie¹, ZHANG Tuanxiao², ZHANG Limei¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

2. North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanisms of tanshinone II_A regulates Akt1/FDX1 signaling to inhibit cuproptosis in ovarian granulosa cells, thereby ameliorating cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in rats. **Methods** Forty-nine adult female SD rats were randomly divided into control group, model group, tanshinone II_A (10, 20 mg/kg) group, tanshinone II_A+A-674563 group, tanshinone II_A+siNC group, tanshinone II_A+siFDX1 group. The levels of serum E₂, FSH, and the levels of DLAT and DLST in ovarian tissue were detected using ELISA. Ovarian copper ion content was determined by atomic absorption spectrophotometry, ROS levels were assessed using a fluorescence probe, expression of p-Akt1/Akt1 and p-FDX1/FDX1 proteins was analyzed by Western blotting, cell proliferation (Ki67 positivity rate) and apoptosis were evaluated using immunofluorescence chemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assays, respectively. And ovarian histopathological changes were assessed by HE staining. **Results** Compared to the model group, the tanshinone II_A group significantly increase serum E₂ levels and primordial follicle count, decreased FSH, copper ion content, lipid ROS, apoptosis rate, and tissue fibrosis/inflammation scores ($P < 0.05$), while p-Akt1/Akt1 and p-FDX1/FDX1 ratios, and Ki67 positivity rate were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with tanshinone II_A

收稿日期: 2026-01-12

基金项目: 四川省基层卫生事业发展研究中心科研项目 (SWFZ24-Y-32)

作者简介: 李 瑞, 女, 硕士, 研究方向为中医妇科学。E-mail: LiRui539@outlook.com

*通信作者: 张丽梅, 女, 教授, 硕士, 研究方向为中医妇科学。E-mail: meiyujian1976@126.com

20 mg/kg group, tanshinone II_A+A-674563 reversed above indicators ($P < 0.05$). Compared to the tanshinone II_A+siNC group, tanshinone II_A+siFDX1 group were significantly decreased E2 levels, follicle counts, p-Akt1/Akt1, p-FDX1/FDX1 ratios, and Ki67 positivity rates, while FSH, copper ion content, lipid ROS, apoptosis rates, and tissue damage scores were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone II_A ameliorates premature ovarian progression by activating the Akt1/FDX1 signaling, inhibiting granulosa cell cuproptosis and apoptosis, and improving hormonal imbalance and histopathological damage.

Key words: tanshinone II_A; premature ovarian failure; ovarian granulosa cells; Akt1/FDX1 signaling; cuproptosis

卵巢早衰是育龄女性生育力丧失的重要病因,其特征为 40 岁前闭经、雌激素水平降低及卵泡刺激素 (FSH) 升高^[1-2]。目前卵巢早衰全球发病率已经达到 1%~3%,且呈上升趋势^[3-4]。颗粒细胞作为卵泡发育的核心功能细胞,其损伤是卵巢早衰的核心病理环节,颗粒细胞功能障碍导致卵泡闭锁加速、激素合成异常及卵母细胞支持微环境破坏^[5]。目前的研究虽证实抗氧化、抗凋亡治疗可部分缓解卵巢早衰,但对颗粒细胞新型死亡模式(如铜死亡)的调控机制尚未阐明,且缺乏针对特定信号轴的靶向干预策略^[6]。因此,探索颗粒细胞死亡的新型分子通路,并开发其特异性保护剂,是突破当前卵巢早衰治疗瓶颈的关键方向。丹参酮 II_A 作为传统中药丹参的主要活性成分,已被证实通过抗炎、抗氧化及抗纤维化作用改善多囊卵巢综合征和化疗性卵巢损伤^[7-11]。现有研究显示,丹参酮 II_A 可通过上调卵巢组织抗氧化能力改善老龄小鼠卵巢储备功能减退^[9],亦可通过调控磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt1) 信号通路发挥抗凋亡、抗炎作用,在生殖系统损伤性疾病中展现出明确的保护效应^[12],提示其在卵巢早衰治疗中具有潜在应用价值。铜死亡是近期发现的铜依赖性细胞死亡方式,由线粒体脂酰化蛋白聚集触发^[13],而铁氧化还原蛋白 1 (FDX1) 作为铜死亡的关键执行分子,其活性受 Akt1 信号直接调控^[14-15]。本研究旨在探讨丹参酮 II_A 通过 Akt1/FDX1 信号介导的铜死亡对卵巢早衰的调控作用和潜在机制。

1 材料

49 只 SPF 级健康成年雌性 SD 大鼠,3 月龄,体质量 (231±14) g,生产许可证号 SCXK (沪) 2023-0005,购于上海斯莱克实验动物中心。本研究中的所有动物实验均经川北医学院附属医院实验动物伦理委员会审批通过,伦理审批批号 (2024102936)。

丹参酮 II_A (质量分数≥98%,货号 T4952) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。Akt1 抑制剂(A-674563,

质量分数≥99%,货号 HY-10422) 购于美国 MedChemExpress 公司。FDX1 siRNA (货号 siR08052301226) 及阴性对照 siRNA (siNC, 货号 siN0000001-1-5) 购于广州锐博生物科技有限公司。环磷酸胺 (质量分数≥98%,货号 C0768) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。大鼠雌二醇 (E₂) ELISA 试剂盒 (货号 CSB-E06871r) 购于武汉华美生物工程有限公司。大鼠 FSH ELISA 试剂盒 (货号 MBS701448) 购于美国 MyBioSource 公司。铜离子检测试剂盒 (货号 BC1860) 购于北京索莱宝科技有限公司。脂质 ROS 荧光探针 C11-BODIPY581/591 (货号 D3861) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶 (DLAT) (货号 ER2124) 购于武汉菲恩生物科技有限公司。二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶 (DLST) (货号 ELI-44581r) 购于美国 LSBIO 公司。抗 p-Akt1(Ser473)兔单抗 (货号#4060)、抗 Akt1 兔单抗 (货号#2938)、内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 鼠单抗 (货号#5174) 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。抗 FDX1 兔多抗 (货号 34182-1-AP) 购于武汉 Proteintech 公司,抗 p-FDX1(Ser12)兔多抗 (货号 FDX1-Ser12) 定制于武汉 Proteintech 公司。Ki67 兔单抗 (货号 ab15580) 均购于英国 Abcam 公司。

2 方法

2.1 大鼠的分组与处理

将 49 只 SD 大鼠用随机数表法随机分为对照组 (ip 生理盐水 1 mL/kg)、模型组 (ip 环磷酸胺 50 mg/kg 联合生理盐水^[16])、丹参酮 II_A (10、20 mg/kg) 组 (在模型组基础上分别 ip 丹参酮 II_A 10、20 mg/kg^[17])、丹参酮 II_A+A-674563 组 (在模型组基础上 ip 分别给予丹参酮 II_A 20 mg/kg 联合 A-674563 10 mg/kg^[18])、丹参酮 II_A+siNC 组 (在模型组基础上 ip 丹参酮 II_A 20 mg/kg,同时卵巢局部注射 siNC 30 nmol/L,3 d 注射 1 次)、丹参酮 II_A+siFDX1 组 (在模型组基础上 ip 丹参酮 II_A 20 mg/kg,同时卵巢局部注射 siFDX1 30 nmol/L,3 d 注射 1 次),以上

每组各 7 只大鼠, 共给药 14 d。末次给药 24 h 后 ip 3%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠, 取血清(-80 °C 保存)及双侧卵巢(部分液氮速冻, 部分 4%多聚甲醛固定), 其中卵巢称质量后计算卵泡数。

2.2 ELISA 法检测血清 E₂、FSH 和卵巢 DLAT、DLST 的水平

将包被有捕捉抗体的 96 孔板预先备好, 将标准品和经 1:5 稀释处理后的血清样本分别加入各自孔中, 每孔加入 100 μL。依次加入 50 μL 生物素化标记的检测抗体(1:1000), 接着加入辣根过氧化物酶标记的亲合素, 每孔加入量为 100 μL, 浓度通常为 1:5000 稀释, 再加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物后进行 15 min 显色, 采用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度(A)值, 计算浓度。

$$\text{激素浓度} = (A_{\text{样本}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白}})$$

取各组卵巢组织, 按 1:9 质量体积比加入预冷 PBS 缓冲液(含蛋白酶抑制剂), 冰浴匀浆后于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度并统一稀释至相同浓度。分别参照 DLAT、DLST ELISA 试剂盒说明书进行操作: 将待测样本加入预包被相应抗体(抗 DLAT 单克隆抗体、抗 DLST 抗体)的酶标板中, 37 °C 孵育 90 min; 洗板后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 °C 孵育 60 min; 再次洗板后加入 TMB 显色液, 避光孵育 15 min; 终止反应后, 于 450 nm 波长处测定 A 值。根据各自标准曲线计算样本中相应蛋白浓度, 每样本设置复孔, 实验重复 3 次。

2.3 HE 染色和评分

取卵巢组织经固定、脱水、石蜡包埋后, 制成 4~5 μm 厚切片; 进行常规 HE 染色, 依次经脱蜡、水化、苏木素染核、伊红染胞浆、脱水透明后封片; 于光学显微镜下观察组织形态、纤维化区域、炎性细胞浸润及卵泡结构, 每张切片随机选取多个非重叠高倍视野进行拍照, 依据 Gibson-Corley 半定量评分法^[9], 由 2 位经过双盲处理的病理医师分别独立评分。在评分过程中先对切片中纤维化区域进行评定, 评分范围为 0~3 分。0 分, 无明显胶原沉积(正常); 1 分, 轻度纤维化(纤维化区域<25%); 2 分, 中度纤维化(25%≤纤维化区域<50%); 3 分, 重度纤维化(纤维化区域≥50%, 伴结构破坏)。随后对炎性细胞浸润情况进行评分, 评分范围同样为 0~3 分。0 分, 无炎性细胞浸润; 1 分, 轻度浸润(少量散在炎性细胞, 面积<25%); 2 分, 中度浸润

(明显的灶性炎性浸润, 面积 25%~50%); 3 分, 重度浸润(大量弥漫性炎性细胞浸润, 面积>50%)。另外计算卵泡闭锁率。

$$\text{卵泡闭锁率} = \text{闭锁卵泡数} / \text{总卵泡数}$$

2.4 免疫荧光化学染色

组织经过石蜡包埋并进行切片, 行脱蜡及水化步骤, 随后利用 3% H₂O₂ 处理切片以阻断内源性过氧化物酶活性。切片采用枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)在微波处理下修复抗原表位, 修复完成后滴加 Ki67 一抗(1:200), 并在 4 °C 下过夜孵育; 次日洗涤后, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:500), 在 37 °C 恒温箱中孵育 30 min; 孵育结束后洗涤, 滴加 DAPI 染液(蓝色)对细胞核进行染色, 避光孵育 10 min, 随后用抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察, Ki67 阳性信号呈绿色, 细胞核呈蓝色, 计算 Ki67 阳性率。

$$\text{Ki67 阳性率} = \text{阳性细胞数} / \text{总细胞数}$$

2.5 TUNEL 染色

通过蛋白酶 K 对切片进行 20 min 消化处理, 随后立即用 PBS 清洗, 滴加 TUNEL 反应液, 于 37 °C 下在避光条件下孵育 1 h。反应结束后, 对切片进行 10 min 的 DAPI 染色, 计算凋亡率。

$$\text{凋亡率} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}$$

2.6 铜离子含量的检测

从卵巢组织中称取 50 mg 样本并进行充分匀浆, 根据试剂盒说明加入 0.5 mL 的提取液以使细胞壁充分裂解, 将匀浆液 10000×g 离心 10 min, 取上清液与显色剂按照 1:3 比例混合, 显色反应在室温下静置 10 min, 然后在 562 nm 波长下用分光光度计测定 A 值, 计算铜含量。

$$\text{铜含量} = (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白}})$$

2.7 荧光探针染色法检测脂质过氧化物(ROS)水平

从新鲜卵巢组织制备成单细胞悬液, 向细胞悬液中加入终浓度为 5 μmol/L 的 C11-BODIPY 探针, 在 37 °C 孵育 30 min, 于流式细胞仪中进行检测, 得到每个样本的中位荧光强度(MFI)。

2.8 Western blotting

从 100 mg 组织样本中提取总蛋白, 用含 1% 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、去乙酰化酶抑制剂的 RIPA 裂解液对样本进行充分裂解, 随后使用 BCA 法定量蛋白浓度, 并将各样本中 30 μg 蛋白依据 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离。采用湿转法将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶在室温

下封闭膜面 1 h 以阻断非特异性结合, 将膜分别置于含有目标蛋白一抗的封闭液中进行孵育, 包括磷酸化 Akt1 (p-Akt1) (1:1 000)、kt1 (1:1 000)、磷酸化 FDX1 (p-FDX1) (1:1 000)、FDX1 (1:800)、内参 GAPDH (1:10 000), 于 4 °C 过夜孵育。用 TBST 洗涤后加入 HRP 标记二抗(1:5 000), 在室温下孵育 1 h。通过 ECL 试剂显影, 在暗室下利用成像仪记录蛋白条带, 使用 Image J 软件对条带进行定量分析, 计算目标蛋白表达量。

2.9 统计学方法

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 先经过 Shapiro-Wilk 正态性检验及 Levene 方差齐性检验。对于符合正态分布且方差齐的数据, 多组比较采用单因素方差分析

(ANOVA), 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; 若数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用非参数检验 (Kruskal-Wallis H 检验), 组间两两比较采用 Bonferroni 法校正。

3 结果

3.1 丹参酮 II_A 对大鼠卵巢内分泌功能与卵泡储备的影响

与模型组相比, 丹参酮 II_A 各剂量组的 E₂ 水平、原始卵泡数均显著升高, FSH 显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。与丹参酮 II_A 20 mg/kg 组比, 丹参酮 II_A+A-674563 组 E₂ 水平和原始卵泡数显著降低, FSH 显著升高 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A+siNC 组比, 丹参酮 II_A+siFDX1 组 E₂ 水平和原始卵泡数显著降低, FSH 显著升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清激素水平与卵泡数量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Comparison of serum hormone levels and follicle numbers in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	FSH/(mIU·mL ⁻¹)	原始卵泡数
对照	—	45.31 ± 3.47	12.35 ± 1.24	25.65 ± 2.30
模型	—	18.76 ± 2.35*	35.62 ± 3.20*	8.77 ± 1.21*
丹参酮 II _A	10 mg·kg ⁻¹	28.41 ± 2.83 [#]	24.55 ± 2.37 [#]	15.64 ± 1.89 [#]
	20 mg·kg ⁻¹	36.83 ± 3.40 ^{#&}	18.24 ± 1.68 ^{#&}	20.40 ± 2.11 ^{#&}
丹参酮 II _A +A-674563	20 mg·kg ⁻¹ +10 mg·kg ⁻¹	22.38 ± 2.50 [@]	29.41 ± 2.42 [@]	12.37 ± 1.52 [@]
丹参酮 II _A +siNC	20 mg·kg ⁻¹ +30 nmol·L ⁻¹	36.72 ± 3.42	18.20 ± 1.47	20.35 ± 2.27
丹参酮 II _A +siFDX1	20 mg·kg ⁻¹ +30 nmol·L ⁻¹	20.67 ± 2.23 [^]	30.14 ± 3.18 [^]	10.44 ± 1.31 [^]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 20 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A+siNC 组比较: [^] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 10 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 20 mg·kg⁻¹ group; [^] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A + siNC group.

3.2 丹参酮 II_A 对大鼠卵巢组织病理学损伤的作用

对照组卵巢组织形态正常, 无明显充血出血; 模型组和丹参酮 II_A 10 mg/kg 组卵巢间质可见充血出血区域, 伴随卵泡数量减少; 丹参酮 II_A 20 mg/kg 组和丹参酮 II_A+siNC 组卵巢组织充血出血明显改善, 卵泡数量增加, 丹参酮 II_A+A-674563 组和丹参酮 II_A+siFDX1 组可见充血出血区域, 并伴随卵泡数量减少, 见图 1。

与模型组相比, 丹参酮各剂量组间质纤维化评分、炎性浸润评分及卵泡闭锁率均显著降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性。与丹参酮 20 mg/kg 组相比, 丹参酮 II_A+A-674563 组间质纤维化评分、炎性浸润评分及卵泡闭锁率均显著升高 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A+siNC 组比, 丹参酮 II_A+siFDX1 组间质纤维化评分、炎性浸润评分及卵泡闭锁率均显著升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

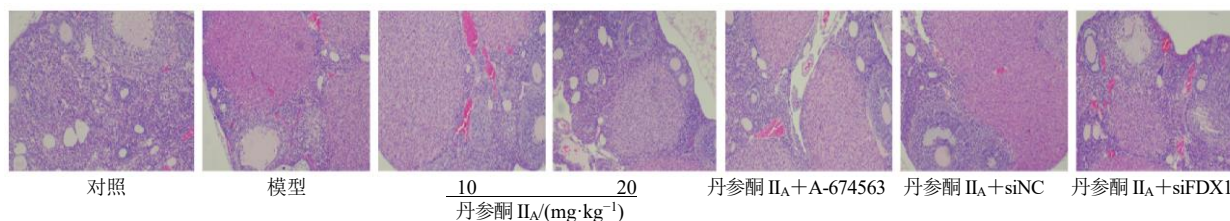


图 1 HE 染色观察各组大鼠卵巢细胞的病理变化 (×100)

Fig. 1 HE staining observation of the pathological changes of ovarian cells in each group of rats (× 100)

表 2 各组卵巢组织损伤评分 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 2 Ovarian tissue injury scores of each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	间质纤维化评分	炎性浸润评分	卵泡闭锁率/%
对照	—	0.47 ± 0.09	0.31 ± 0.04	10.23 ± 1.12
模型	—	2.52 ± 0.13*	2.42 ± 0.21*	65.67 ± 6.75*
丹参酮 II _A	10 mg·kg ⁻¹	1.63 ± 0.12 [#]	1.55 ± 0.17 [#]	42.30 ± 5.61 [#]
	20 mg·kg ⁻¹	1.12 ± 0.17 ^{#&}	0.87 ± 0.09 ^{#&}	25.43 ± 3.44 ^{#&}
丹参酮 II _A + A-674563	20 mg·kg ⁻¹ + 10 mg·kg ⁻¹	2.01 ± 0.20 [@]	1.82 ± 0.20 [@]	48.76 ± 5.80 [@]
丹参酮 II _A + siNC	20 mg·kg ⁻¹ + 30 nmol·L ⁻¹	1.12 ± 0.13	0.90 ± 0.09	25.39 ± 3.41
丹参酮 II _A + siFDX1	20 mg·kg ⁻¹ + 30 nmol·L ⁻¹	2.23 ± 0.27 [^]	1.94 ± 0.22 [^]	55.07 ± 6.33 [^]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 20 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A + siNC 组比较: [^] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 10 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 20 mg·kg⁻¹ group; [^] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A + siNC group.

3.3 丹参酮 II_A 对大鼠卵巢颗粒细胞增殖与凋亡的调控作用

与模型组相比,丹参酮 II_A 各剂量组 Ki67 阳性率显著增加,卵巢细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),且呈剂量相关性。与丹参酮 20 mg/kg 组相比,丹参

酮 II_A + A-674563 组卵巢颗粒 Ki67 阳性率显著降低,细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A + siNC 组相比,丹参酮 II_A + siFDX1 组 Ki67 阳性率显著降低,细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$),见图 2、表 3。

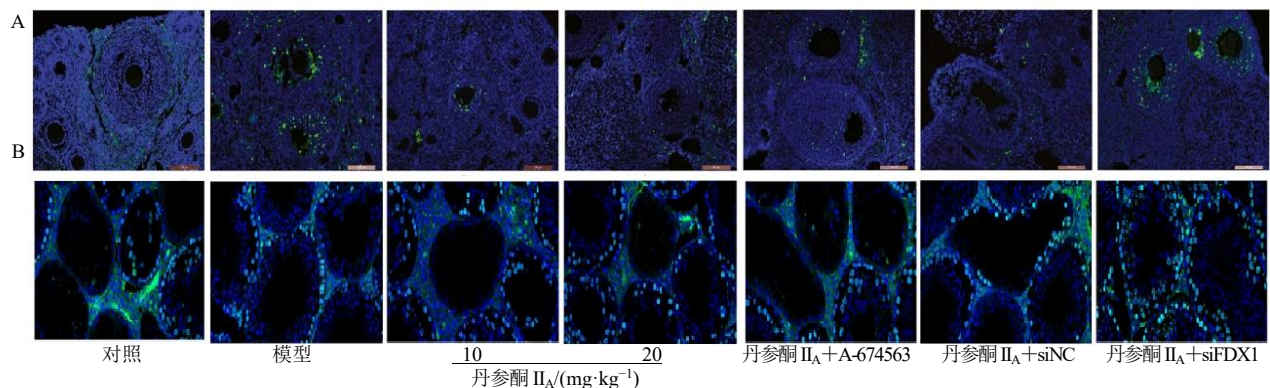


图 2 各组大鼠卵巢细胞 TUNEL 染色 (A, ×100) 与 Ki67 免疫荧光染色图 (B, ×400)

Fig. 2 TUNEL staining of ovarian cells (A, ×100) and Ki67 immunofluorescence staining diagram (B, ×400) in each group of rats

表 3 各组大鼠卵巢细胞凋亡率与 Ki67 阳性率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 3 Comparison of apoptosis rate and Ki67 positive rate of ovarian cells in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	卵巢细胞凋亡率/%	Ki67 阳性率/%
对照	—	5.31 ± 0.57	85.60 ± 7.21
模型	—	28.40 ± 3.28*	40.28 ± 5.60*
丹参酮 II _A	10 mg·kg ⁻¹	18.71 ± 2.30 [#]	61.32 ± 6.81 [#]
	20 mg·kg ⁻¹	12.37 ± 1.50 ^{#&}	74.49 ± 7.40 ^{#&}
丹参酮 II _A + A-674563	20 mg·kg ⁻¹ + 10 mg·kg ⁻¹	23.55 ± 2.67 [@]	55.60 ± 6.31 [@]
丹参酮 II _A + siNC	20 mg·kg ⁻¹ + 30 nmol·L ⁻¹	12.41 ± 1.26	75.42 ± 7.43
丹参酮 II _A + siFDX1	20 mg·kg ⁻¹ + 30 nmol·L ⁻¹	26.14 ± 2.10 [^]	50.20 ± 5.71 [^]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 20 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A + siNC 组比较: [^] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 10 mg·kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 20 mg·kg⁻¹ group; [^] $P < 0.05$ vs tanshinone II_A + siNC group.

3.4 丹参酮 II_A 对大鼠卵巢铜死亡核心标志物的调控作用

与模型组相比,丹参酮各剂量组铜离子含量、脂质 ROS、DLAT、DLST 水平均显著降低 ($P < 0.05$),且呈浓度相关性。与丹参酮 II_A 20 mg/kg 组

相比,丹参酮 II_A + A-674563 组铜离子含量、DLAT、DLST 水平及脂质 ROS 水平均显著上调 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A + siNC 组比,丹参酮 II_A + siFDX1 组上述铜死亡核心标志物水平均显著上调 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠卵巢铜离子含量脂质 ROS 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Comparison of copper ion content in the ovaries and lipid ROS levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	铜离子含量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	脂质 ROS (RFU)	DLAT/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DLST/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	—	2.15 ± 0.21	125.62 ± 12.31	412.37 ± 35.28	398.54 ± 32.17
模型	—	5.91 ± 0.52*	320.44 ± 28.76*	1 047.82 ± 98.43*	1 085.63 ± 95.26*
丹参酮 II _A	10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	4.21 ± 0.40#	245.47 ± 21.22#	836.45 ± 72.69#	865.21 ± 78.34#
	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	3.15 ± 0.34#&	180.27 ± 18.45#&	576.29 ± 51.48#&	594.73 ± 53.62#&
丹参酮 II _A + A-674563	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	4.86 ± 0.51@	290.31 ± 25.65@	935.46 ± 84.51@	958.92 ± 86.27@
丹参酮 II _A + siNC	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.08 ± 0.32	180.18 ± 15.73	572.18 ± 50.33	589.36 ± 52.18
丹参酮 II _A + siFDX1	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.03 ± 0.54^	310.12 ± 27.49^	1 008.54 ± 92.67^	1 032.45 ± 94.38^

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A + siNC 组比较: ^ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group; ^ $P < 0.05$ vs tanshinone II_A + siNC group.

3.5 丹参酮 II_A 对大鼠卵巢 Akt1/FDX1 信号通路的调控与直接互作验证

与模型组相比,丹参酮 II_A 各剂量组 p-Akt1/Akt1、p-FDX1/FDX1 蛋白的表达水平显著上调 ($P < 0.05$),且呈剂量相关性。与丹参酮 II_A 20 mg/kg 组相比,丹参酮 II_A + A-674563 组 p-Akt1/Akt1、p-FDX1/FDX1 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与丹参酮 II_A + siNC 组相比,丹参酮 II_A + siFDX1 组 p-FDX1/FDX1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),见图 3、表 5。

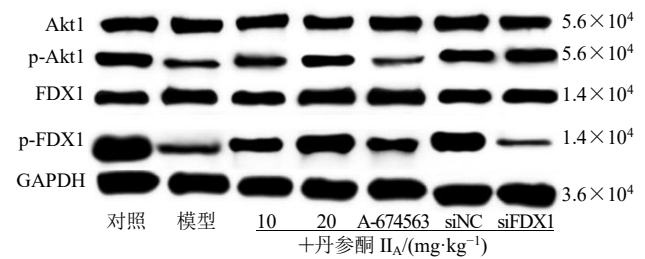


图 3 Western blotting 法检测各组大鼠卵巢 Akt1/FDX1 通路关键蛋白的表达

Fig. 3 Western blotting method was used to detect the expression of key proteins in the Akt1/FDX1 pathway of the ovaries in each group of rats

4 讨论

现有关于卵巢早衰机制研究多聚焦于颗粒细

表 5 各组大鼠卵巢 Akt1/FDX1 通路关键蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 5 Comparison of key protein expressions in the Akt1/FDX1 pathway of the ovaries of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量	p-Akt1/Akt1	p-FDX1/FDX1
对照	—	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.12
模型	—	0.29 ± 0.06*	0.25 ± 0.05*
丹参酮 II _A	10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.53 ± 0.05#	0.65 ± 0.08#
	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.87 ± 0.08#&	0.85 ± 0.09#&
丹参酮 II _A + A-674563	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.11 ± 0.02@	0.50 ± 0.06@
丹参酮 II _A + siNC	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.85 ± 0.09	0.84 ± 0.07
丹参酮 II _A + siFDX1	20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 30 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.88 ± 0.12	0.18 ± 0.05^

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$; 与丹参酮 II_A + siNC 组比较: ^ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs tanshinone II_A 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group; ^ $P < 0.05$ vs tanshinone II_A + siNC group.

胞凋亡、氧化应激、自噬等经典细胞死亡途径^[1, 5], 仅有少量研究提示铜死亡异常激活可能参与卵泡闭锁与卵巢损伤^[6], 但尚未明确铜死亡在卵巢早衰中的具体调控机制及靶向干预策略。既往关于丹参酮 II_A 在卵巢损伤中的研究, 多证实其可通过抗氧化、抗凋亡途径改善卵巢功能^[9, 12]。本研究基于环磷酸腺苷诱导的卵巢早衰大鼠模型, 结合丹参酮 II_A 剂量梯度干预、Akt1 特异性抑制及 FDX1 基因沉默回救策略, 提出丹参酮 II_A 通过激活 Akt1/FDX1 信号抑制颗粒细胞铜死亡改善卵巢早衰的科学假说, 系统阐明了丹参酮 II_A 对卵巢内分泌功能、组织病理损伤、颗粒细胞增殖凋亡、铜死亡进程及核心信号通路的调控效应。

卵巢内分泌稳态依赖卵泡发育与颗粒细胞类固醇合成协同调控, E₂ 下降、FSH 升高是卵巢早衰核心生化特征, 本质是颗粒细胞芳香化酶 (CYP19A1) 活性降低及下丘脑-垂体-卵巢轴 (HPO 轴) 负反馈失衡^[20]。本研究显示, 丹参酮 II_A 可剂量相关性上调 E₂、下调 FSH, 且该修复作用可被 Akt1 抑制剂或 FDX1 沉默逆转。这表明丹参酮 II_A 并非单纯依赖 HPO 轴调节, 而是通过 Akt1/FDX1 信号维持颗粒细胞存活与功能稳态, 与既往研究中丹参酮 II_A 激活 PI3K/Akt 通路促进 CYP19A1 表达、减少颗粒细胞凋亡的结论一致^[20]。

铜死亡的核心是细胞内铜离子稳态失衡, 过量铜离子破坏铁硫簇蛋白稳定性、引发脂质 ROS 积累, 最终导致细胞死亡^[21]。FDX1 作为铜代谢关键蛋白, 其介导的铁硫簇降解是铜死亡启动核心步骤, 研究证实 Akt1 可直接磷酸化 FDX1^[15], 而且 Akt1 磷酸化可调控 FDX1 活性维持铜稳态^[15]。这充分支持 Akt1/FDX1 信号可作为细胞铜死亡的核心调节机制。铜死亡的核心特征为铜离子稳态失衡、线粒体脂酰化蛋白异常聚集及蛋白脂酰化水平紊乱, 其中 DLAT、DLST 是铜死亡途径中关键的线粒体脂酰化蛋白, FDX1 是蛋白脂酰化与铜死亡的上游核心调控分子, 脂质 ROS 为铜死亡伴随的次级氧化应激指标。本研究发现, 丹参酮 II_A 可显著降低卵巢铜离子积累与脂质 ROS 生成, 丹参酮 II_A 20 mg/kg 组抗铜死亡效果最显著, 且 Akt1 抑制剂或 FDX1 沉默可完全逆转该效应。这与 Sun 等^[15]研究中 Akt1 激活通过磷酸化 FDX1 减少铜介导的脂质过氧化损伤的结论一致, 证实丹参酮 II_A 通过 Akt1/FDX1 信号维持铜稳态、抑制脂质 ROS, 是改

善卵巢早衰的核心机制。

颗粒细胞凋亡增加、增殖能力下降是卵巢早衰卵泡耗竭的直接原因, Ki67 阳性率与凋亡率分别反映颗粒细胞增殖活性与卵巢损伤程度^[22]。本研究显示丹参酮 II_A 可剂量相关性提高 Ki67 阳性率、降低凋亡率, 丹参酮 II_A 20 mg/kg 组接近正常细胞稳态水平。从信号通路看, p-Akt1 可激活抗凋亡蛋白、抑制促凋亡蛋白维持细胞存活, FDX1 可通过调控线粒体铁硫簇组装维持 ATP 合成以支持增殖; 模型组 p-Akt1/Akt1、p-FDX1/FDX1 比值显著降低, 丹参酮 II_A 可显著上调两者磷酸化水平, 而 Akt1 抑制剂或 FDX1 沉默可阻断该效应, 表明 Akt1 是 FDX1 上游调控因子, 丹参酮 II_A 通过 Akt1/FDX1 信号双重调控铜死亡与增殖与凋亡平衡。

卵巢早衰的组织病理特征为卵巢间质纤维化、炎症浸润及卵泡闭锁率升高, 这些改变直接破坏卵巢结构完整性、加剧颗粒细胞损伤^[23]。本研究显示, 丹参酮 II_A 可显著减轻上述病理损伤, 丹参酮 II_A 20 mg/kg 组卵巢形态接近正常, 且该修复作用可被 Akt1 抑制剂或 FDX1 沉默逆转。机制上, 卵巢纤维化与 TGF- β /Smad 通路激活相关, 铜过载可通过 NF- κ B 通路促进炎症因子释放, 而丹参酮 II_A 已被证实可抑制 TGF- β /Smad 通路、调节铜代谢降低 NF- κ B 活性^[12, 24], 进一步验证 Akt1/FDX1 信号调控的铜稳态是其抗病理损伤的关键。

综上所述, 丹参酮 II_A 通过激活 Akt1/FDX1 信号通路, 维持颗粒细胞铜离子稳态、抑制脂质 ROS 积累以减轻铜死亡损伤, 同时调控颗粒细胞增殖-凋亡平衡、改善卵巢内分泌功能, 并缓解间质纤维化与卵泡闭锁。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dai W J, Yang H, Xu B, *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) alleviate excessive autophagy of ovarian granular cells through VEGFA/PI3K/AKT/mTOR pathway in premature ovarian failure rat model [J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 198.
- [2] Dong Z, Zhang L, Wang W, *et al.* ZnSO₄ Protects against premature ovarian failure through PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway [J]. *Theriogenology*, 2023, 207: 61-71.
- [3] Panay N, Anderson R A, Bennie A, *et al.* Evidence-based guideline: Premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Reprod Open*, 2024, 2024(4): hoac065.

- [4] Touraine P, Chabbert-Buffet N, Plu-Bureau G, *et al.* Premature ovarian insufficiency [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10(1): 63.
- [5] Chen Y, Zhao Y, Miao C Y, *et al.* Quercetin alleviates cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency in mice by reducing mitochondrial oxidative stress and pyroptosis in granulosa cells [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 138.
- [6] Wu S, Gan M, Wang Y, *et al.* Copper mediated follicular atresia: Implications for granulosa cell death [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 477: 135391.
- [7] Yang C K, Mu Y G, Li S H, *et al.* Tanshinone II_A: a Chinese herbal ingredient for the treatment of atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1321880.
- [8] Zhou J, Jiang Y Y, Wang X X, *et al.* Tanshinone II_A suppresses ovarian cancer growth through inhibiting malignant properties and angiogenesis [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(20): 1295.
- [9] Bai L, He G Z, Gao C H, *et al.* Tanshinone II_A enhances the ovarian reserve and attenuates ovarian oxidative stress in aged mice [J]. *Vet Med Sci*, 2022, 8(4): 1617-1625.
- [10] 胡月华, 陈强, 邢海生, 等. 丹参酮 II_A 通过抑制 miR-376b-5p 降低急性心肌梗死大鼠致炎细胞因子分泌并减轻心肌损伤研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 3887-3894.
- [11] Zhan Y S, Xu X Q, Luo Xi, *et al.* Preparation of tanshinone II_A self-soluble microneedles and its inhibition on proliferation of human skin fibroblasts [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(2): 251-262.
- [12] Xu Z, Cai K, Su S L, *et al.* Salvianolic acid B and tanshinone II_A synergistically improve early diabetic nephropathy through regulating PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117356.
- [13] Yang B, Pan M Y, Tao T Y, *et al.* Tanshinone II_A promotes METTL3/METTL14-mediated FDX1 m6A modification to induce cuproptosis in bladder cancer [J]. *Toxicol Res*, 2025, 14(4): tfaf123.
- [14] Guo Q D, Ma M N, Yu H, *et al.* Dexmedetomidine enables copper homeostasis in cerebral ischemia/reperfusion via ferredoxin 1 [J]. *Annal Med*, 2023, 55(1): 2209735.
- [15] Sun Z C, Xu H Z, Lu G M, *et al.* AKT1 phosphorylates FDX1 to promote cuproptosis resistance in triple-negative breast cancer [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(17): e2408106.
- [16] Zheng S Y, Ma M Y, Chen Y X, *et al.* Effects of quercetin on ovarian function and regulation of the ovarian PI3K/Akt/FoxO3a signalling pathway and oxidative stress in a rat model of cyclophosphamide-induced premature ovarian failure [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2022, 130(2): 240-253.
- [17] Li S, Yang K, Cao W L, *et al.* Tanshinone II_A enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived exosomes in myocardial ischemia/reperfusion injury via up-regulating miR-223-5p [J]. *J Control Release*, 2023, 358: 13-26.
- [18] Ding H R, Wang J L, Tang Z T, *et al.* Mesenchymal stem cells improve glycometabolism and liver regeneration in the treatment of post-hepatectomy liver failure [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 412.
- [19] Gibson-Corley K N, Olivier A K, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research [J]. *Vet Pathol*, 2013, 50(6): 1007-1015.
- [20] Deng D S, Wu Y K, Wu K M, *et al.* Dihydroberberine alleviates Th17/Treg imbalance in premature ovarian insufficiency mice via inhibiting Rheb/mTOR signaling [J]. *Mol Med*, 2024, 30(1): 194.
- [21] Guo J H, Sun Y, Liu G Y. The mechanism of copper transporters in ovarian cancer cells and the prospect of cuproptosis [J]. *J Inorg Biochem*, 2023, 247: 112324.
- [22] Tao F Y, Zhai Q F, Cao Y Q, *et al.* Inhibition of p38 MAPK/NF-κB p65 signaling pathway activity by rare ginsenosides ameliorates cyclophosphamide-induced premature ovarian failure and KGN cell injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326: 117944.
- [23] Umer A, Khan N, Greene D L, *et al.* The therapeutic potential of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells for the treatment of premature ovarian failure [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(3): 651-666.
- [24] Jiang Y, Hu F F, Li M, *et al.* Tanshinone II_A ameliorates the development of dermal fibrosis in systemic sclerosis [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2024, 51(2): e13834.

[责任编辑 高源]