

基于网络药理学探讨蛇床子治疗 排卵障碍型不孕症的作用机制

匡俊伟¹, 马卫东^{2*}, 夏纯¹

¹贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳

²贵州中医药大学第二附属医院妇科, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年2月16日; 录用日期: 2023年3月8日; 发布日期: 2023年3月24日

摘要

目的: 基于网络药理学研究蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的作用机制。方法: 从TCMSP、OMIM、Drugbank、GeneCards、PharmGkb数据库中确定蛇床子的潜在活性成分、作用靶点和疾病的差异基因, 取两者交集, 利用Cytoscape 3.9.0软件构建“中药-活性成分-交集靶点-疾病”调控网络图, string数据构建蛇床子和排卵障碍型不孕症的PPI网络; 通过R包进行GO和KEGG功能富集分析。结果: 经TCMSP数据库确定蛇床子有18个化合成分, 59个药物靶标; 经OMIM、Drugbank、GeneCards、PharmGkb数据库分析确定蛇床子治疗排卵障碍型不孕症靶点21个, 利用string数据构建蛇床子和排卵障碍型不孕症的靶点。GO分析表明生物过程(BP)涉及类固醇激素反应、生殖腺发育、排卵周期等, 细胞成分(CC)涉及孔隙复合体、薄膜筏、膜微区等区域, 分子功能(MF)涉及半胱氨酸型内肽酶活性与凋亡过程、肾上腺素能受体活性、类固醇结合等生物学过程。KEGG结果表明, 蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的传导途径主要包括雌激素信号通路、细胞凋亡、VEGF信号通路、PI3K-Akt信号通路、IL-17信号通路等。结论: 蛇床子改善排卵障碍型不孕症的作用机制可能是蛇床子中的beta-sitosterol、Stigmasterol、o-Isovaleryl columbianetin、O-Acetylcolumbianetin、Xanthoxylin N等有效成分通过影响AR、CASP3、PGR、PTGS2、ESR1等基因的表达进而调控了雌激素信号通路、细胞凋亡、VEGF信号通路、PI3K-Akt信号通路、IL-17信号通路等信号传导途径实现的。

关键词

网络药理学, 蛇床子, 排卵障碍型不孕症

To Explore the Mechanism of Cnidium Ossiformis in Treating Ovulation Disorder Infertility Based on Network Pharmacology

Junwei Kuang¹, Weidong Ma^{2*}, Chun Xia¹

*通讯作者。

文章引用: 匡俊伟, 马卫东, 夏纯. 基于网络药理学探讨蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的作用机制[J]. 药物资讯, 2023, 12(2): 93-101. DOI: 10.12677/pi.2023.122012

¹Second School of Clinical Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou
²Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Feb. 16th, 2023; accepted: Mar. 8th, 2023; published: Mar. 24th, 2023

Abstract

Objective: To study the mechanism of ovulatory dysfunction infertility treated by *Cnidium ossiformis* based on network pharmacology. **Methods:** From TCMSP, OMIM, Drugbank, GeneCards and PharmGkb databases, the potential active components, target sites and differential genes of the disease were determined, and the intersection of the two was selected. Cytoscape 3.9.0 software was used to construct the regulatory network diagram of “Traditional Chinese Medicine, active ingredient, intersection target-disease”, and PPI network of ovulatory dysfunction infertility was constructed with string data. Functional enrichment analysis of GO and KEGG was performed using R packets. **Results:** Eighteen compound components and 59 drug targets were determined by TCMSP database. Through the analysis of OMIM, Drugbank, GeneCards and PharmGkb databases, 21 targets for the treatment of ovulatory dysfunction infertility were determined, and the targets for the treatment of ovulatory dysfunction infertility and ovulatory dysfunction infertility were constructed using string data. GO analysis showed that biological process (BP) involved steroid hormone response, gonad development, ovulation cycle, cellular component (CC) involved pore complex, membrane raft, membrane microregion and other regions, molecular function (MF) involved cysteine-type endopeptidase activity and apoptosis process, adrenergic receptor activity, steroid binding and other biological processes. KEGG results showed that the main pathways of *cnidium ossium* in the treatment of ovulation disorder infertility include estrogen signaling pathway, apoptosis, VEGF signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, IL-17 signaling pathway, etc. **Conclusion:** The mechanism of *ambrosia cotyloides* ameliorating ovulation disorder infertility may be beta-sitosterol, Stigmasterol, o-Isovaleryl cumbianetin, O-Acetylcumbianetin, Xanthoxylin in *Ambrosia cotyloides* By affecting the expression of AR, CASP3, PGR, PTGS2, ESR1 and other genes, the active components such as N regulate the estrogen signaling pathway, cell apoptosis, VEGF signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, IL-17 signaling pathway and other signal transduction pathways.

Keywords

Cyberpharmacology, Fructus Cnidii, Anovulatory Infertility

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

不孕症是妇科常见的难治性疾病，近年来不孕症患病率逐渐上升，已经成为影响女性生殖健康的重要疾病，其中排卵障碍型不孕症约占女性不孕症的 20%~30% [1]。排卵障碍型不孕症是卵巢由于某些原因影响出现排卵功能障碍而未能排卵及影响精子与卵子结合所导致的不孕，其病因复杂，是临床诊疗的重难点。

蛇床子是传统医学中常用的攻毒、杀虫、止痒类药物，其温肾助阳的功效常被忽略，《本草崇原》记载：“蛇床子，不独助男子，且有益妇人，乃世人舍此而求补药于远域，且近时但用为疮药，惜哉。”

国医大师何成瑶教授将蛇床子作为治疗排卵障碍型不孕的核心用药之一，取得了良好的临床疗效，但其具体作用机制尚不清楚[2]。我们使用网络药理学研究蛇床子与排卵障碍型不孕症之间的相互作用。网络药理学是一种以系统药理学为基础，研究药物与疾病相互作用的新兴学科[3]。在网络药理学中，药物-靶点网络使研究人员探究药物治疗疾病的作用机制更加简洁。疾病靶点可应用于药物设计、药物发现和生物标志物检测领域[4]。基于此，本研究运用网络药理学手段，尝试构建“成分-靶点-通路-疾病”多维网络，从而探索蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的潜在分子机制，为蛇床子的临床应用以及排卵障碍型不孕症相关疾病基础与临床研究提供一定的理论依据。

2. 方法

2.1. 蛇床子药物活性成分及靶点的收集

采用 TCMSP 数据库及查阅相关文献筛选蛇床子的有效成分及药物靶点。有效成分筛选标准为：口服生物利用度(Oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ，类药性(Drug likeness, DL) ≥ 0.18 。

2.2. 蛇床子靶点的获取

基于 TCMSP 2.3，将蛇床子的多个活性成分与潜在作用靶点逐个配对，筛选结束后，把蛇床子活性成分作用的蛋白质通过 UniProt 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org>)进行标准化，继而得到靶点蛋白的官方名称，以此可以预测蛇床子活性的作用靶点。

2.3. 排卵障碍型不孕症靶点的获取

用“Anovulatory infertility”作为关键词，在人类孟德尔遗传数据库 Drugbank、GeneCards、OMIM、PharmGkb 数据库中检索，得到排卵障碍型不孕症的相关靶点。与上述蛇床子的活性成分预测作用靶点取交集，得到蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的作用靶点。

2.4. “中药-有效成分-靶点-疾病”网络的构建

使用 Cytoscape 3.9.0 软件构建“中药-活性成分-交集靶点-疾病”调控网络图，并进行拓扑分析，通过 Cytoscape 3.9.0 软件中计算连接度(Degree)参数来评判药效成分与靶点的重要性。

2.5. 蛋白互作网络的构建与分析

将蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的潜在作用靶点输入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)，物种设定为“Homo sapiens”，获得蛋白与蛋白之间的相互作用关系，将数据保存为 TSV 格式，获得 PPI 网络信息，将信息导入 Cytoscape 3.9.0，绘制 PPI 网络并进行拓扑分析。

2.6. 富集分析

为了研究与潜在目标相关的生物学功能，我们通过“clusterProfiler”R 包进行了基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。“clusterProfiler”R 包作为一种富集工具，具有基于多种资源的集成基因聚类分析。GO 富集分析从三个维度对基因进行解释和注释，包括细胞成分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP)分析。KEGG 数据库主要用于通路分析。P ≤ 0.05 被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 中药化成分及靶点的获取

蛇床子有 18 个化成分，59 个药物靶标。其中，beta-sitosterol、Stigmasterol、o-Isovaleryl columbianetin、

O-Acetylcolumbianetin、Xanthoxylin N 等物质是蛇床子中含有排卵障碍型不孕症靶点较多的成分。

3.2. 疾病靶点的获取

1618 个疾病靶点与 59 个药物靶标取交集后，共获得 21 个差异基因(见图 1)。

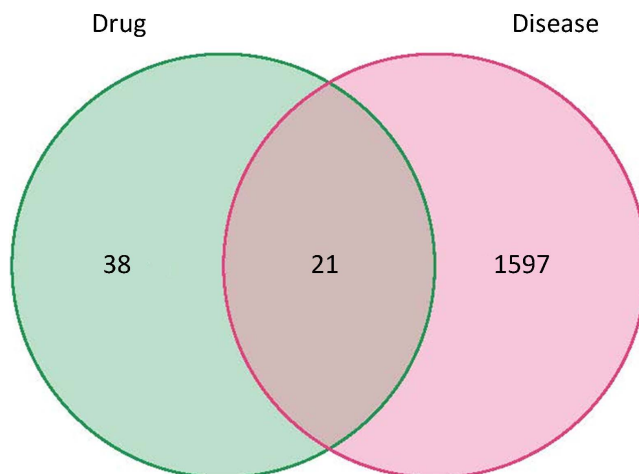


Figure 1. Venn of drug target and disease target

图 1. 药物靶点与疾病靶点的韦恩图

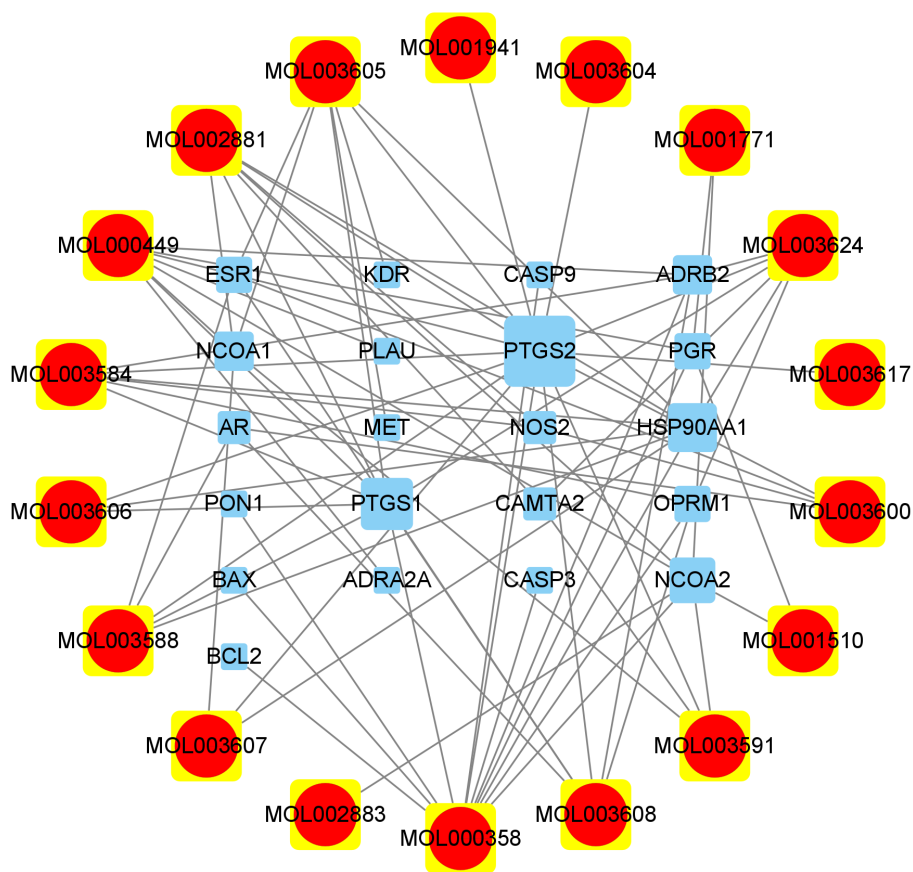


Figure 2. Traditional Chinese medicine—active ingredients—target—disease network diagram

图 2. 中药 - 有效成分 - 靶点 - 疾病网络图

3.3. “中药 - 有效成分 - 靶点 - 疾病”网络的构建及主要有效成分筛选

使用 Cytoscape 3.9.0 绘制蛇床子有效成分治疗排卵障碍型不孕症的基因网络图(图 2)。基于蛇床子活性成分与排卵障碍型不孕症疾病靶点的相互作用,采用 Cytoscape 软件构建“药物 - 活性成分 - 交集靶点 - 疾病”网络,结果见图 2。图中 39 个节点分别代表药物、疾病、交集靶点、活性成分等,79 个线代表两节点之间的互作关系。结果显示,其中度值前五的药物分别是 beta-sitosterol、Stigmasterol、o-Isovaleryl cumbianetin、O-Acetylcumbianetin、Xanthoxylin N。度值前五的靶点是 PTGS2、PTGS1、HSP90AA1、NCOA2、ADRB2。

3.4. 蛋白互作网络的构建与分析

结果见图 3。AR、CASP3、MET、PGR、HSP90AA1、PTGS2、ESR1、NCOA2、NCOA1、BAX、CASP9、BCL2、KDR、NOS2、PLAU、OPRM1、PTGS1 可能是在蛇床子治疗排卵障碍型不孕症中发挥重要作用的核心靶点。

3.5. 富集分析

基因本体(GO)分析结果显示(图 4),生物过程(BP)涉及类固醇激素反应、生殖腺发育、排卵周期、生殖结构发育、生殖系统发育、节律过程、细胞对药物的反应、细胞对类固醇激素刺激的反应、细胞内类固醇激素受体信号通路。细胞成分(CC)涉及孔隙复合体、薄膜筏、膜微区、膜区、髓磷脂鞘、核染色质、枝晶末端、神经元细胞体、内吞囊腔、转录活性染色质、高密度脂蛋白颗粒、蛋白质 - 脂质复合物。分子功能(MF)涉及半胱氨酸型内肽酶活性与凋亡过程、肾上腺素能受体活性、类固醇结合、RNA 聚合酶 II 通用转录起始因子结合、儿茶酚胺结合、核受体结合、四吡咯结合、雌激素受体结合、一般转录起始因子结合、激素受体结合。

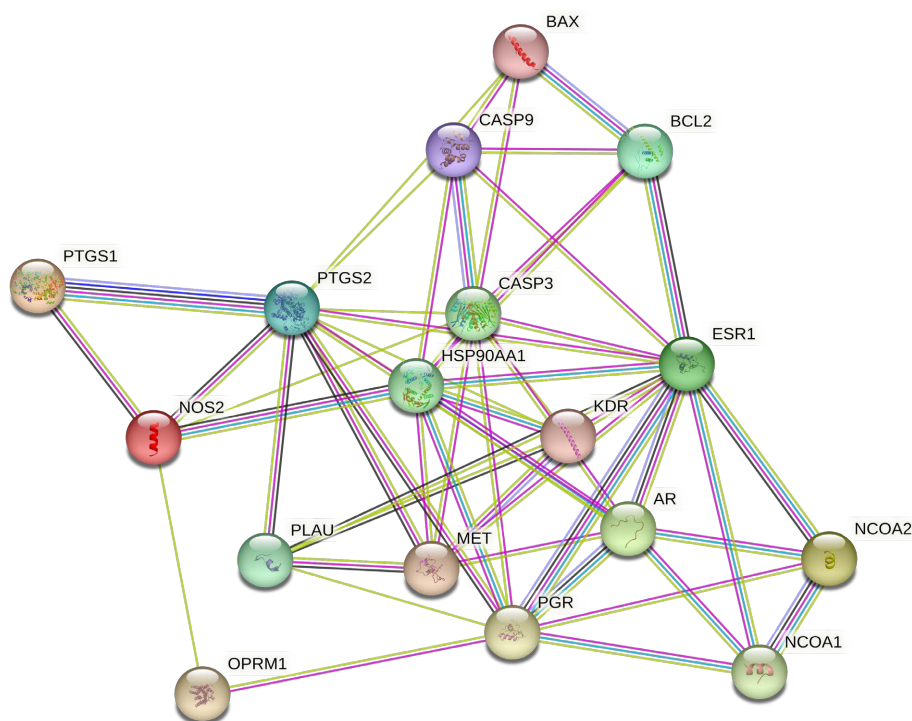


Figure 3. Construction and analysis of PPI protein interaction network

图 3. PPI 蛋白互作网络的构建与分析

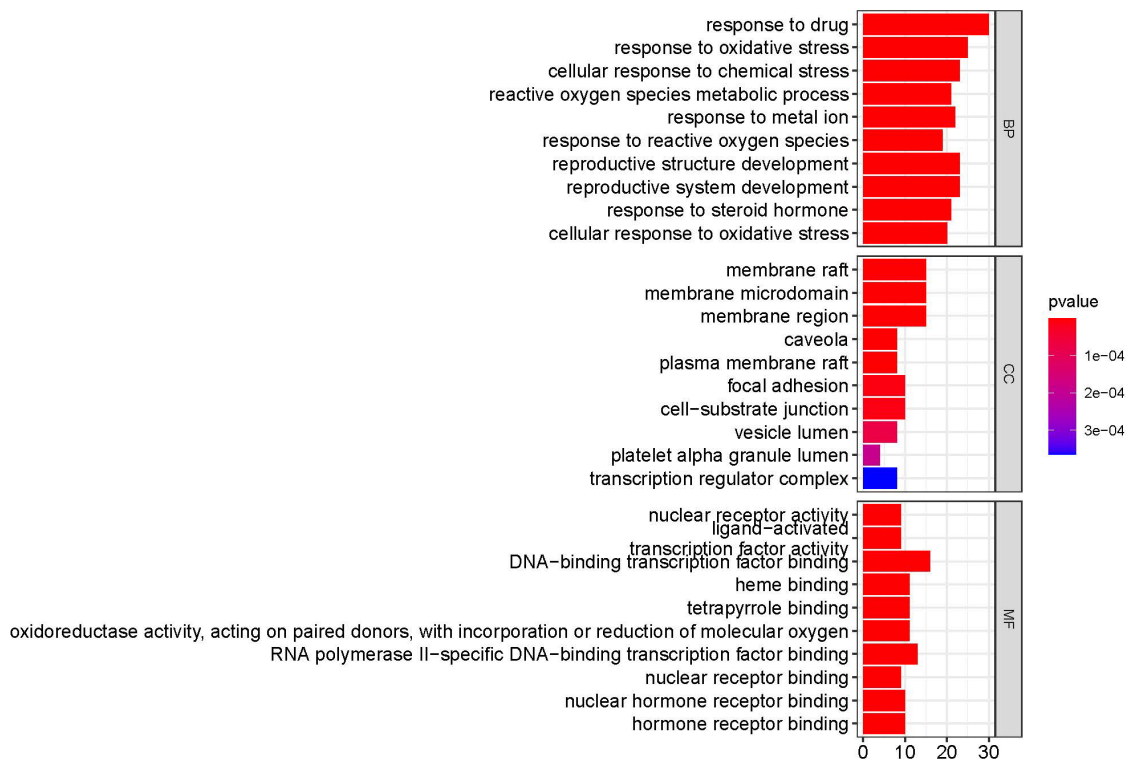


Figure 4. GO analysis bar chart
图 4. GO 分析条形图

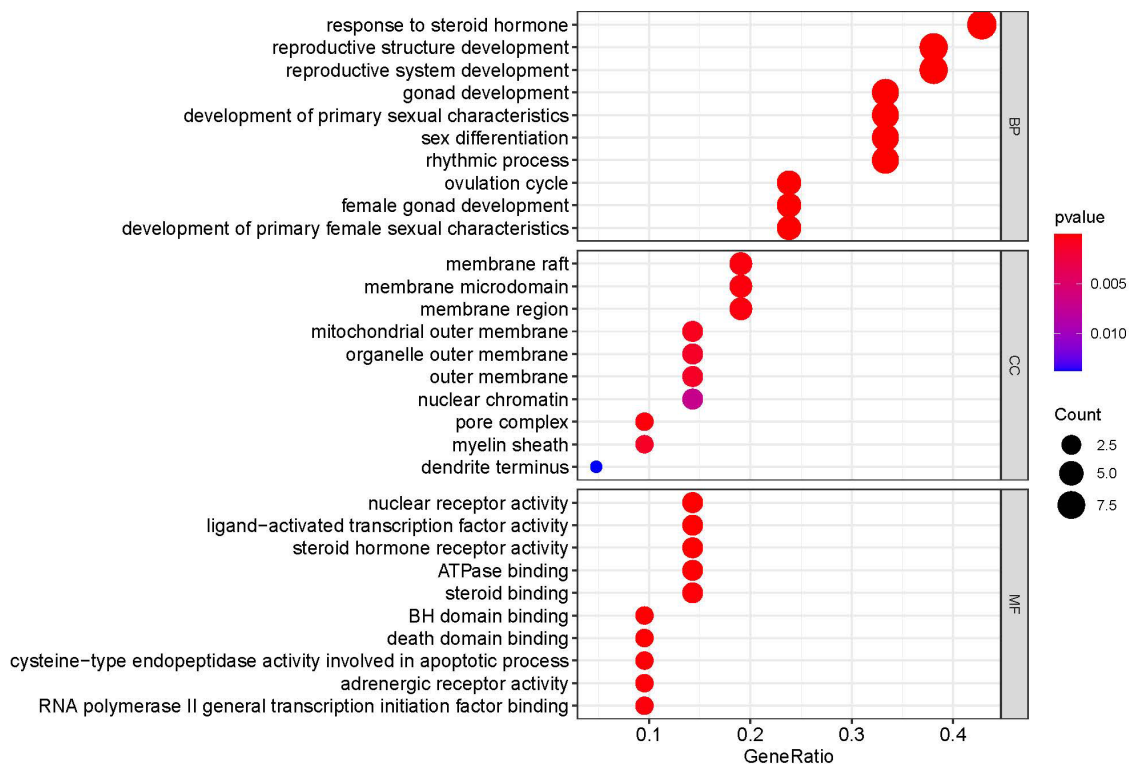


Figure 5. KEGG analysis bubble chart
图 5. KEGG 分析气泡图

基因组百科全书(KEGG)分析结果表明(图 5), 蛇床子治疗排卵障碍型不孕症的信号通路包括雌激素信号通路、细胞凋亡、p53 信号通路、甲状腺激素信号通路、VEGF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、内分泌抵抗、NF- κ B 信号通路、钙信号通路、血清素能突触、内质网中的蛋白质加工、花生四烯酸代谢、孕激素介导的卵母细胞成熟、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、鞘磷脂信号通路、神经营养素信号通路、卵母细胞减数分裂、精氨酸生物合成。

4. 讨论

排卵障碍是女性不孕症的重要原因之一, 约占女性不孕症的 20%~30%。现代医学认为排卵障碍的发生主要涉及下丘脑-垂体-卵巢轴病变及其他一些内分泌病变[5]。来曲唑、枸橼酸克罗米芬等促排药物是西医促排卵治疗的一线用药[6]。大量研究表明, 相对于单纯的西医治疗, 结合中医药疗法治疗排卵障碍或有更优的疗效[7]。有学者应用温肾促卵方治疗排卵障碍型不孕症, 药物组成包含覆盆子、菟丝子、续断、熟地黄、党参、桃仁、红花等, 结果显示, 观察组患者的受孕率明显高于单纯使用枸橼酸氯米芬胶囊治疗的对照组患者[8]。夏桂成教授以调周法为基础, 自拟补天种玉丹加减治疗排卵障碍, 临床观察表明患者的排卵和自然受孕情况得到极大改善[9]。傅汝梅教授认为脾肾亏虚、冲任损伤是排卵障碍型不孕症的主要病机, 提出“养泡助卵”的思想, 自拟山紫三子助孕汤加减以补肾健脾、调动冲任气血, 从而提高排卵率, 临床疗效显著[10]。杜惠兰教授以“肝肾并重, 长排同调”为原则, 运用补肾调经 II 号方、补肾调经 III 号方加减调补肝肾, 明显提高排卵障碍型不孕症患者的排卵率及妊娠率[11]。国医大师何成瑶教授在“阴阳交感、冲气为和”的中医生殖观理论指导下, 提出“养精不唯填精, 亦在温枢三焦”、“育胞不求形变, 而求气化交感”的观点, 丰富了不孕症的中医治疗思路[12]。笔者在跟师学习时发现何成瑶教授时常用蛇床子治疗排卵障碍型不孕症。《名医别录》记载:“蛇床子能温中下气, 令妇人子脏热, 男子阴强。久服轻身, 令人有子。”《本草蒙筌》记载:本品“妇人无娠, 最宜久服。”现代药理研究表明, 蛇床子具有促性腺激素样作用与雌激素样作用, 其雌激素样作用可能与其增加子宫雌激素受体的表达及提高血清雌二醇水平有关[13][14]。

本研究表明, *beta-sitosterol*、*Stigmasterol*、*o-Isovaleryl columbianetin*、*O-Acetylcolumbianetin*、*Xanthoxylin N* 等物质是蛇床子中含有排卵障碍型不孕症靶点较多的成分。其中, β -谷甾醇(*beta-sitosterol*)是一种植物甾醇类雌激素, 研究表明, β -谷甾醇(*beta-sitosterol*)具有雌激素活性, 可作用于卵巢颗粒细胞促进其产生 E2, E2 能够维持卵泡的生长发育[15]。豆甾醇(*Stigmasterol*)是一种有机化合物, 属于植物甾醇, 是医药上制造孕酮的原料[16], 孕酮是维持妊娠所必需的孕激素, 能通过降低子宫肌的兴奋性、维持蜕膜反应、抑制受精卵着床后的免疫排斥反应等起到保胎的作用。*o*-异戊酰基哥伦比亚甾元(*O-Isovaleryl columbianetin*)、*o*-乙酰基哥伦比亚甾元(*O-Acetylcolumbianetin*)均是蛇床子素中的主要成分, 相关研究表明蛇床子素能够一定程度升高血清雌二醇含量, 改善内分泌紊乱, 促进卵泡生长发育及排卵[17]。此外, 蛇床子素可能通过调控 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路蛋白水平减轻卵巢的氧化应激损伤和炎症反应, 从而改善内分泌紊乱, 促进卵泡正常生长发育, 恢复卵巢功能[18]。

PPI 结果显示, AR、CASP3、PGR、PTGS2、ESR1 等关键靶点参与了排卵障碍型不孕症的发展, 且能被蛇床子所干预。AR 是一种类固醇受体蛋白, Takeda [19]等通过研究发现 AR 在哺乳动物体内各器官、组织的表达十分广泛, 其中雌雄性生殖器官中表达量最高。Takayama 等[20]发现 AR 在各级卵泡的卵泡膜细胞上均有表达, AR 介导的雄激素作用对于正常卵泡发育至关重要[21]。动物实验表明, AR 敲除小鼠的卵巢颗粒细胞线粒体形态明显异常, 引起生成 ATP 减少以及异常的线粒体生物合成, 进而影响窦前卵泡生长及卵泡闭锁过程, 同时卵母细胞成熟率显著下降[22]。CASP3 具有半胱氨酸蛋白酶活性, 是细胞凋亡过程中激活的关键激酶, 也是细胞凋亡的主要效应因子。激活的 CASP3 使底物 PARP

(poly-ADP-ribose polymerase)发生水解, 其水解产物促进细胞骨架降解和 DNA 片段化[23] [24]。PGR 是配体活化的转录因子, 在排卵前卵巢的颗粒细胞中特异性表达。大量研究证明孕酮对于排卵的作用必不可少, 而孕酮的生理作用通过 PGR 来介导, 相关研究表明, PGR 的表达显著影响排卵前卵泡的破裂和卵母细胞的释放[25]。PTGS2 是生物体内前列腺素合成起始步骤的关键酶, 已证实在多种病理生理过程中有着重要作用, 例如影响肿瘤、癌症的形成, 且与排卵、胚胎移植、蜕膜、分娩等多种繁殖性能有关[26] [27]。研究表明, PTGS2 基因缺陷可导致卵巢发育过程中黄体的缺乏、卵母细胞的突变及第一极体的未能排出, 从而导致多种动物繁殖失败。ESR1 基因存在于 6q25 染色体上, 其编码产物 ER- α 可与雌激素结合, 起到刺激促性腺激素分泌、调节卵泡生成的生理作用[28]。因此, 研究 AR、CASP3、PGR、PTGS2、ESR1 等靶点的表达和调控对排卵障碍型不孕症的发病机制和治疗具有重要意义。

KEGG 结果表明, 蛇床子对排卵障碍型不孕症患者雌激素信号通路、细胞凋亡、VEGF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路等信号传导途径起到主要调控作用。大量研究证明, 雌激素信号通路与卵母细胞的生长发育及排卵过程密切相关。雌激素通过两种信号通路介导其细胞作用, 这两种信号通路被分为“核起始的雌激素信号通路”和“膜起始的雌激素信号通路”[29]。在核起始的雌激素信号通路中, 雌激素结合 ER α 或 ER β 受体后转位至细胞核, 与应答元件(estrogen response element, ERE)结合后激活下游信号通路[30]。在膜起始的雌激素信号通路中, 雌激素也能与质膜上的 ER 亚群(mER)或 G-蛋白偶联受体(GPR30)结合发挥作用, 继而影响下游转录因子[31]。有研究表明, 雌激素与 ER β 受体结合能提高卵巢颗粒细胞增殖能力, 同时降低颗粒细胞凋亡因子 FoxO3 的表达, 减少颗粒细胞凋亡, 对卵子的生长发育和排卵过程至关重要[32]。PI3K-Akt 信号通路影响着始基卵泡的生长、发育过程, 同时与颗粒细胞的增生、分化密不可分[33]。

参考文献

- [1] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 369.
- [2] 冷安明, 杨静, 张向华, 周佐涛. 何成瑶教授应用蛇床子治疗排卵障碍性不孕症用药规律研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(18): 74-76.
- [3] Boezio, B., Audouze, K., Ducrot, P. and Taboureau, O. (2017) Network-based Approaches in Pharmacology. *Molecular Informatics*, 6, 11-12. <https://doi.org/10.1002/minf.201700048>
- [4] Ning, K., Zhao, X., Poetsch, A., Chen, W.-H. and Yang, J. (2017) Computational Molecular Networks and Network Pharmacology. *BioMed Research International*, 2017, Article ID: 7573904. <https://doi.org/10.1155/2017/7573904>
- [5] 许茜亚, 全松. 排卵障碍性不孕症的诊疗策略[J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(5): 328-332.
- [6] 周荷玲, 李洁, 王珺. 不同超促排卵方案对体外受精-胚胎移植患者妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2022, 37(22): 4241-4244. <https://doi.org/10.19829/j.zgfybj.issn.1001-4411.2022.22.035>
- [7] 罗江萍, 王宏涛. 中医辨证周期给药治疗排卵障碍性不孕症的临床研究[J]. 中医临床研究, 2022, 14(8): 102-104.
- [8] 柳琼. 温肾促卵方治疗排卵障碍性不孕症疗效及对子宫动脉血流、排卵情况的影响[J]. 四川中医, 2022, 40(04): 169-172.
- [9] 张玉涵. 基于数据挖掘研究国医大师夏桂成教授补天种玉丹治疗排卵障碍性不孕症的遣方规律[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
- [10] 陈彦辛, 傅汝梅. 傅汝梅“养泡助卵”思想治疗排卵障碍性不孕症的经验[J]. 四川中医, 2022, 40(2): 10-13.
- [11] 管凤丽, 曹玉聪, 杨玉培, 杜惠兰. “肝肾并重, 长排同调”法治疗排卵障碍性不孕症经验[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4055-4058.
- [12] 罗来卫, 程力, 邹燕. 何成瑶教授从肾虚肝郁论治排卵障碍性不孕经验[J]. 中西医结合研究, 2021, 13(6): 421-423.
- [13] 刘建新, 张文平, 连其深. 蛇床子的植物雌激素样作用[J]. 中国临床 康复, 2005, 9(23): 186-189.
- [14] 张夏微, 张丹参, 薛贵平, 等. 蛇床子素对大鼠雌激素样作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7):

- 1031-1032.
- [15] 曾莉萍, 徐贤柱, 饶华, 等. 杜仲叶 β -谷甾醇对成骨细胞和卵巢颗粒细胞的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1051-1053.
- [16] 徐志超. 新型植物甾醇路线法合成黄体酮及其关键中间体的研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
- [17] 鲍君杰, 谢梅林, 朱路佳. 蛇床子素治疗去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 591-592.
- [18] 王红梅, 郭瑞丽, 崔利娟, 姜李乐. 蛇床子素通过 Nrf2/HO-1/NLRP3 轴对大鼠卵巢储备功能减退的改善作用研究[J]. 中国药事, 2022, 36(6): 664-671. <https://doi.org/10.16153/j.1002-7777.2022.06.009>
- [19] Takeda, H., Chodak, G., Mutchnik, S., Nakamoto, T. and Chang, C. (1990) Immunohistochemical Localization of Androgen Receptors with Mono- and Polyclonal Antibodies to Androgen Receptor. *Journal of Endocrinology*, **126**, 17-25. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1260017>
- [20] Takayama, K., Fukaya, T., Sasano, H., *et al.* (1996) Endocrinology: Iminunohistochemical Study of Steroidogenesis and Cell Proliferation in Polycystic Ovarian Syndrome. *Human Reproduction*, **11**, 1387-1392. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019405>
- [21] Sen, A. and Hammes, S.R. (2010) Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. *Molecular Endocrinology*, **24**, 1393-1403. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0006>
- [22] Wang, R.-S., Chang, H.-Y., Kao, S.-H., *et al.* (2015) Abnormal Mitochondrial Function and Impaired Granulosa Cell Differentiation in Androgen Receptor Knockout Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 9831-9849. <https://doi.org/10.3390/ijms16059831>
- [23] Raff, M. (1998) Cell Suicide for Beginners. *Nature*, **396**, 119-122. <https://doi.org/10.1038/24055>
- [24] Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., *et al.* (1998) A Caspase-Activated DNase That Degrades DNA during Apoptosis, and Its Inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- [25] 康岳华. 孕酮受体基因(PGR)介导小鼠排卵的关键信号分子研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆大学, 2014.
- [26] Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., *et al.* (1997) Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2-Deficient Mice. *Cell*, **91**, 197-208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80402-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80402-X)
- [27] Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., *et al.* (1995) Renal Abnormalities and an Altered Inflammatory Response in Mice Lacking Cyclooxygenase II. *Nature*, **378**, 406-409. <https://doi.org/10.1038/378406a0>
- [28] Lazaros, L., Pamporaki, C., Vlahos, N., *et al.* (2014) The Follicular Outcome after Standard Gonadotropin Stimulation is Associated with *ER α* and *ER β* Genotypes. *Endocrine*, **47**, 930-935. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0249-3>
- [29] 屈超, 刘中洋, 裘荣刚, 王晓波. 雌激素信号通路概述[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(3): 448-450.
- [30] Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a Novel Receptor Expressed in Rat Prostate and Ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5925-5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>
- [31] Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton Jr, A.R. and Bland, K.I. (2002) Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis. *Molecular Endocrinology*, **16**, 70-84. <https://doi.org/10.1210/mend.16.1.0758>
- [32] 马会明, 张永芳, 王蒙蒙, 等. 雌激素对卵巢颗粒细胞雌激素受体- β 和转录因子叉头蛋白 3 表达的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(5): 50-55.
- [33] Wang, L.-Q., Liu, J.-C., Chen, C.-L., *et al.* (2016) Regulation of Primordial Follicle Recruitment by Cross-Talk between the Notch and Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN)/AKT Pathways. *Reproduction, Fertility, and Development*, **28**, 7-12. <https://doi.org/10.1071/RD14212>