

[药 理]

基于 eNOS/ERK 信号通路探讨浓缩当归丸对早发性卵巢功能不全大鼠卵巢血管内皮细胞铁死亡的影响

凌晨¹, 刘晓丹¹, 马会明², 陈冬梅^{1*}

(1. 宁夏医科大学总医院, 宁夏干细胞与再生医学重点实验室, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏医科大学生殖力保持教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004)

摘要: **目的** 研究浓缩当归丸对二氧化乙烯基环己烯 (VCD) 诱导的早发性卵巢功能不全 (POI) 大鼠卵巢血管新生及铁死亡的作用。**方法** 体内实验选取 100 只动情周期正常的雌性 SD 大鼠, 其中 85 只腹腔注射 80 mg/kg VCD 建立 POI 模型, 15 只腹腔注射等体积玉米油作为正常组。将 75 只造模成功 (动情周期停滞或紊乱) 大鼠随机分为模型组、芬吗通组和浓缩当归丸低、中、高剂量组 (2.08、4.16、8.32 g/kg), 给药干预 21 d。给药结束后, ELISA 法检测血清雌二醇 (E₂)、抗缪勒管激素 (AMH)、促卵泡生成素 (FSH) 和黄体生成素 (LH) 水平; HE 染色观察卵巢病理学并进行卵泡计数; 免疫荧光染色观察血管分布; Western blot 法检测卵巢组织铁死亡相关蛋白 (ACSL4、FTH1、GPX4、SLC7A11、TFR) 表达。体外实验采用血管内皮细胞 (HUVEC) 铁死亡模型, 分析浓缩当归丸含药血清对血管形成、eNOS/ERK 信号通路相关蛋白 (VEGF、VEGFR II、eNOS、ERK1/2) 和铁死亡相关蛋白 (ACSL4、FTH1、GPX4、SLC7A11、TFR) 表达的影响。**结果** 与模型组比较, 浓缩当归丸组血清 E₂、AMH 水平升高 ($P < 0.01$), FSH 水平降低 ($P < 0.05$), 闭锁卵泡数量减少 ($P < 0.01$), 卵巢血管密度增加 ($P < 0.01$), FTH1、GPX4、SLC7A11、TFR 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ACSL4 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。浓缩当归丸含药血清可促进 HUVEC 血管生成, 上调 VEGFA、VEGFR II、eNOS 及 p-ERK1/2 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 浓缩当归丸可能通过激活 eNOS/ERK 信号通路抑制血管内皮细胞铁死亡, 改善卵巢血流与功能, 缓解 VCD 诱导的 POI。

关键词: 浓缩当归丸; 早发性卵巢功能不全; 铁死亡; eNOS/ERK 信号通路; 血管生成

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0407-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.008

Effects of concentrated Danggui Pills on ferroptosis in ovarian vascular endothelial cells of rats with premature ovarian insufficiency based on eNOS/ERK signaling pathway

LING Chen¹, LIU Xiao-dan¹, MA Hui-ming², CHEN Dong-mei^{1*}

(1. Key Laboratory of Stem Cells and Regenerative Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Key Laboratory of Fertility Preservation, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of concentrated Danggui Pills on ovarian angiogenesis and ferroptosis in rats with premature ovarian insufficiency (POI) induced by vinylcyclohexene dioxide (VCD). **METHODS** For *in vivo* experiments, one hundred female SD rats with regular estrous cycles were selected; eighty-five rats were intraperitoneally injected with 80 mg/kg VCD to establish the POI model, and 15 rats were intraperitoneally injected with an equal volume of corn oil as the normal control. The seventy-five successfully modeled rats (exhibiting arrested or disordered estrous cycles) were randomly divided into model group, Femoston group, and low-, medium-, and high-dose concentrated Danggui Pills groups (2.08, 4.16, 8.32 g/kg), with drug administration lasting 21 days. Following treatment, serum levels of estradiol (E₂), anti-Müllerian hormone

收稿日期: 2025-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82360968)

作者简介: 凌晨 (1999—), 男, 硕士在读, 从事衰老与再生医学的研究。E-mail: 1120873141@qq.com

* 通信作者: 陈冬梅 (1981—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事衰老与再生医学的研究。E-mail: chendm@nxmu.edu.cn

(AMH), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) were measured by ELISA; ovarian pathology was examined and follicle counts were performed using HE staining; vascular distribution was observed *via* immunofluorescence staining; and ferroptosis-related proteins (ACSL4, FTH1, GPX4, SLC7A11, TFR) in ovarian tissue were analyzed by Western blot. *In vitro* experiments utilized a vascular endothelial cell (HUVEC) ferroptosis model to assess the effects of serum containing concentrated Danggui Pills on angiogenesis and the expressions of eNOS/ERK signaling pathway proteins (VEGF, VEGFR II, eNOS, ERK1/2) and ferroptosis-related proteins (ACSL4, FTH1, GPX4, SLC7A11, TFR). **RESULTS** Compared with the model group, the levels of serum E₂ and AMH in the concentrated Danggui Pills group increased ($P < 0.01$), the level of FSH decreased ($P < 0.05$), the number of atresia follicles decreased ($P < 0.01$), the ovarian vascular density increased ($P < 0.01$), the protein expressions of FTH1, GPX4, SLC7A11, TFR increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expression of ACSL4 decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Concentrated serum containing Danggui Pills could promote the angiogenesis of HUVEC and up-regulate the protein expressions of VEGFA, VEGFR II, eNOS and p-ERK1/2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** Concentrated Danggui Pills may inhibit ferroptosis in vascular endothelial cells by activating the eNOS/ERK signaling pathway, thereby improving ovarian blood flow and function, and alleviating VCD-induced POI.

KEY WORDS: concentrated Danggui Pills; premature ovarian insufficiency; ferroptosis; eNOS/ERK signaling pathway; angiogenesis

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 导致女性生育能力下降, 并增加因长期雌激素缺乏引发的多种疾病的发生和死亡风险。延缓卵巢衰老已成为维持女性生育力和内分泌功能的重要策略^[1]。典型的 POI 多见于 40 岁以下女性, 以闭经、高促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和低雌二醇 (estradiol, E₂) 为特征, 伴随卵巢微循环障碍与纤维化加重^[2]。中医认为 POI 与“肾阴不足, 冲任失养”相关, 其关键病机之一在于卵巢微血管重构障碍, 导致卵泡缺血缺氧、颗粒细胞凋亡和雌激素分泌减少^[3]。浓缩当归丸作为经典补益气血中药, 既往临床研究表明含当归复方可改善患者 FSH、促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、E₂ 及抗缪勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH) 水平^[4]。基础实验也发现, 当归补血汤可促进缺氧环境下血管内皮细胞增殖与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达, 提示其具有促血管生成的潜力^[5]。然而, 当归单药是否能够独立改善卵巢微循环与储备功能, 其机制尚不明确。在 POI 状态下, 氧化应激与脂质过氧化加剧, 铁积累可诱发血管内皮细胞铁死亡, 进一步损害卵巢血供与卵泡发育。本研究旨在探讨浓缩当归丸是否通过激活内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) / 细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号

通路, 抑制卵巢血管内皮细胞铁死亡, 促进血管新生, 从而改善卵巢功能, 以期为临床应用提供理论依据, 并为补益中药在女性生殖健康领域的应用提供实验支持。

1 材料

1.1 实验动物 100 只 SPF 级性成熟雌性 SD 大鼠, 10 周龄, 体质量 230~250 g, 购买并饲养于宁夏医科大学动物实验中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (宁) 2020-0001, 实验动物使用许可证号 SYXK (宁) 2020-0001], 独立通风笼分笼饲养 (每笼 3 只), 自由进食和饮水, 12 h/12 h 昼夜交替, 适应饲养 1 周。本实验内容已通过宁夏医科大学总医院医学科研伦理审查委员会批准 (伦理审查号 KYLL-2023-0064)。

1.2 细胞 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs, 批号 DFVE22121901) 购自国家干细胞转化资源库。

1.3 药物 二氧化乙烯基环己烯 (4-vinylcyclohexene diepoxide, VCD) (1.094 g/mL, 批号 BCBV1352, 德国 Merck 公司), 参照文献 [6] 方法, 大鼠每日腹腔注射剂量为 80 mg/kg。浓缩当归丸 (每丸相当于生药 0.25 g, 国药准字 Z62020672, 批号 211236, 兰州佛慈制药股份有限公司), 成人日常用量为每日 10~40 丸, 即 2.5~10 g/d, 在此范围内, 等比选取低、中、高剂量为 2.5、5、10 g/d, 根据《中药药理实验方法学》, 以体表面积换算, 按照临床人类常用剂量换算为大鼠灌胃剂量为

2.08、4.16、8.32 g/kg。取浓缩当归丸42丸(含当归原药约10 g)研磨后置于10 mL蒸馏水中,60℃隔水加热搅拌直至完全溶解,冷却至室温后定容至20 mL,制得原药混悬液,分别以低、中、高剂量1.25、2.5、5 mL/(天·只)灌胃。雌二醇/地屈孕酮片复合包装(芬吗通,含E₂1 mg/片和地屈孕酮10 mg/片,国药准字HJ20150346,荷兰Abbott Biologicals B. V.公司),按照临床人类常用剂量换算为大鼠灌胃剂量为E₂0.3 mg/kg、地屈孕酮3 mg/kg,溶于生理盐水中配制成灌胃溶液。

1.4 试剂 E₂、AMH、FSH、LH ELISA检测试剂盒(货号JL11525、JL12462、JL10239、JL11706)均购自上海江莱生物科技有限公司;GPX4、FTH1、转铁蛋白受体(TFR)、VEGF、VEGFR II、 β -tubulin抗体(货号ET1706-45、ET1610-78、M1510-17、ET1604-28、ET1608-33、EM0103)均购自杭州华安生物技术有限公司;SLC7A11、ACSL4、山羊抗兔IgG(H+L)-HRP抗体、Matrigel Matrix基质胶(货号31460、PA1-16775、PA5-27137、356234)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;eNOS、Erk1+Erk2抗体(货号ab300071、ab76299)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司; α -SMA、磷酸化(phosphorylation, p-)ERK1/2抗体(货号14968S、4370S)均购自美国Cell Signaling Technology公司;YF488羊抗兔二抗(货号Y6105L)购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司;铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(Fer-1)、铁死亡诱导剂Erastin(货号HY-100579、HY-15763)均购自美国MedChemExpress公司。

1.5 仪器 Olympus BX51型显微镜(日本Olympus公司);JXFSTPRP-CL型全自动冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Centrisart® D-16C型高速低温离心机(德国Sartorius公司);KD-BM II型石蜡包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);GE-AmershamImager 600型多功能成像仪(美国GE公司)。

2 方法

2.1 POI大鼠模型制备 具有正常动情周期的100只雌性SD大鼠适应性喂养7 d,随机选取15只大鼠作为正常组,腹腔注射玉米油,连续15 d;其余85只大鼠诱导建立POI模型,每天腹腔注射80 mg/kg VCD(0.3 mL VCD溶于9.7 mL玉米油),连续15 d^[6]。在POI大鼠模型制备结束前,连续5 d,每天早上9时采集阴道脱落细胞,观察其动

情周期变化;并结合血浆激素水平和卵巢组织形态学判断模型成功与否。

2.2 分组与给药 将造模成功的大鼠随机分为模型组、芬吗通组和浓缩当归丸低、中、高剂量组,正常组和模型组灌胃给予生理盐水;芬吗通组以5 d为1个周期重复给药,前3 d用白色片(含E₂1 mg),第4、5天用灰色片(含E₂1 mg和地屈孕酮10 mg);浓缩当归丸低、中、高剂量组分别灌胃给予2.08、4.16、8.32 g/kg浓缩当归丸药液,每天1次,连续给药21 d。

2.3 标本采集与处理 给药21 d后,在大鼠动情前/间期使用戊巴比妥钠麻醉,心脏采血,分离得到血清,用于ELISA检测;手术取双侧卵巢组织,一侧于4%多聚甲醛中固定,用于HE染色和免疫组织化学染色,另一侧用液氮速冻后于-80℃保存,用于Western blot检测。

2.4 大鼠动情周期监测 阴道脱落细胞涂片,巴氏染色后于显微镜下观察大鼠动情周期,判断标准参考文献[7]报道。动情周期停滞>5 d表示大鼠动情周期紊乱,动情周期正常率=正常大鼠只数/大鼠总只数×100%。

2.5 ELISA法检测血清激素水平 按照ELISA试剂盒说明书步骤操作,检测大鼠血清E₂、AMH、FSH和LH水平。

2.6 HE染色观察卵巢组织形态 卵巢组织于4%多聚甲醛中4℃固定24 h后,进行梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋,5 μ m切片,每组选取3只大鼠的卵巢,每个卵巢以100 μ m间隔选取2张切片,按照常规步骤进行HE染色,拍照并计数卵泡。

2.7 免疫荧光染色法检测卵巢血管分布 取卵巢组织石蜡切片,在常规方法基础上重复脱蜡1次,10%山羊血清封闭,加一抗 α -SMA(1:200)4℃孵育过夜,用PBS做阴性对照,使用荧光二抗YF488羊抗兔(1:1 000)显色后DAPI复染细胞核,封片后于荧光显微镜下观察染色结果并拍照。

2.8 Western blot法检测各目的蛋白表达 使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取大鼠卵巢组织和HUVECs细胞的全蛋白,BCA法检测蛋白浓度。蛋白变性后进行电泳、转膜、封闭,分别加入一抗GPX4、FTH1、TFR、VEGF、VEGFR II、SLC7A11、ACSL4、eNOS、ERK1/2、p-ERK1/2(1:1 000)和 β -tubulin(1:5 000)4℃孵育过夜,TBST漂洗后加入山羊抗兔IgG(H+L)-HRP

二抗(1:20 000)室温孵育1 h,化学发光仪成像并保存图片,以 β -tubulin为内参,采用Image J软件计算目的蛋白相对表达。

2.9 含药血清制备 采用随机数字表法将12只雌性8周龄SD大鼠随机分为对照组和浓缩当归丸,浓缩当归丸组灌胃给予4.16 g/kg浓缩当归丸,对照组灌胃给予等体积生理盐水,连续给药5 d。最后1次给药1 h后,大鼠腹腔注射50 mg/kg戊巴比妥钠进行麻醉,心脏采血。全血在室温下静置1 h,3 000 r/min离心10 min,获得血清。合并同组血清,56℃灭活30 min,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,于-80℃保存备用。

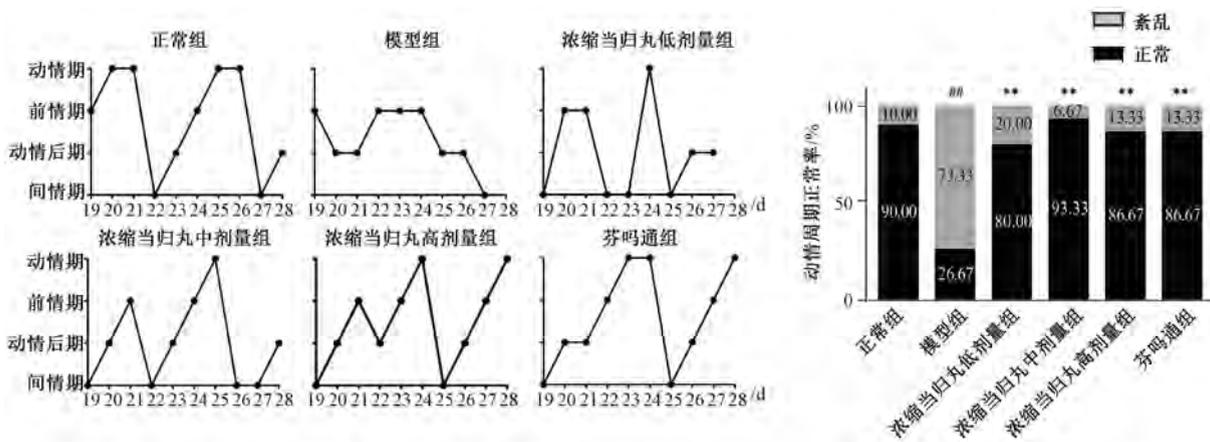
2.10 血管形成实验检测浓缩当归丸含药血清的体外促血管形成能力 将基质胶在4℃冰上孵化,150 μ L预冷凝胶包被48孔板,37℃凝固30 min,每孔加入 4×10^5 个HUVECs细胞。将HUVECs细胞分为对照组(10% FBS+90% DMEM)、Erastin组(10 μ mol/L Erastin+10% FBS+90% DMEM)、Fer-1组(10 μ mol/L Ferrostatin-1 +10% FBS+90% DMEM)

和浓缩当归丸低、中、高剂量组(3%、6%、9%含药血清+7% FBS+90% DMEM培养基),于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h。使用Olympus BX51倒置显微镜对管状网络进行成像。采用Image J软件分析分支和节点数量及管长度。

2.11 统计学分析 通过GraphPad Prism9.0软件进行处理,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较LSD检验;计数资料以卡方检验验证差异性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 浓缩当归丸对POI大鼠动情周期的影响 正常组大鼠动情周期正常率为90.00%,模型组动情周期正常率为26.67%,浓缩当归丸低、中、高剂量组动情周期正常率分别为80%、93.33%和86.67%,芬吗通组动情周期正常率为86.67%,各组动情周期正常率均较模型组有显著差异($P < 0.05$),见图1。



注:与正常组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ 。

图1 浓缩当归丸对POI大鼠动情周期的影响($\chi^2, n=15$)

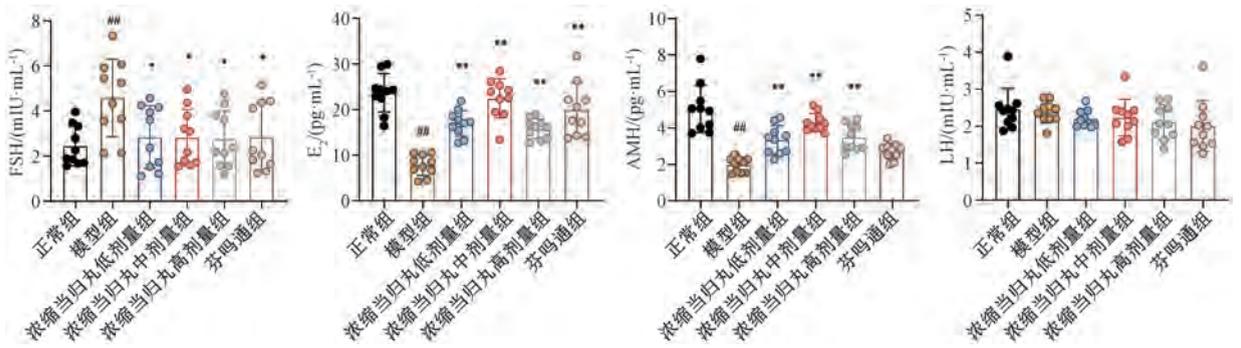
Fig. 1 Effects of concentrated Danggui Pills on estrous cycle of POI rats ($\chi^2, n=15$)

3.2 浓缩当归丸对POI大鼠性激素水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清FSH水平升高($P < 0.01$), E_2 和AMH水平降低($P < 0.01$);与模型组比较,浓缩当归丸各剂量组大鼠血清FSH水平降低($P < 0.05$), E_2 和AMH水平升高($P < 0.01$),芬吗通组大鼠血清FSH水平降低($P < 0.05$), E_2 水平升高($P < 0.01$);各组大鼠血清LH水平均无显著差异($P > 0.05$),见图2。

3.3 浓缩当归丸对POI大鼠卵巢组织形态的影响 正常组大鼠卵巢组织形态规则,可见不同发育阶段的卵泡;模型组大鼠卵巢组织结构紊乱,卵泡

总数减少($P < 0.05$),闭锁卵泡数量增加($P < 0.05$);浓缩当归丸中、高剂量组大鼠卵巢组织结构有所改善,卵泡总数增加($P < 0.01$),闭锁卵泡数量降低($P < 0.05$),髓质区域毛细血管组织数量增多;芬吗通组大鼠卵泡总数增加($P < 0.01$),但闭锁卵泡数量无明显变化($P > 0.05$),见图3。

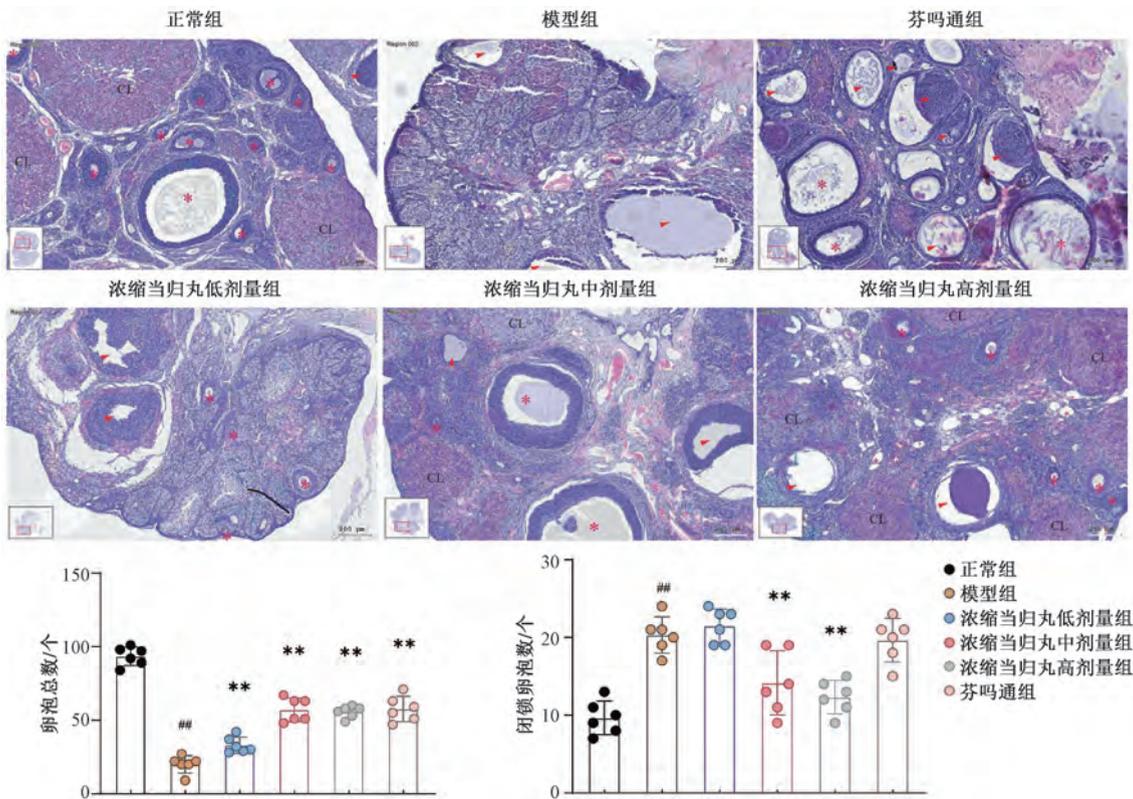
3.4 浓缩当归丸对POI大鼠卵巢组织内血管数量和分布的影响 正常组大鼠卵巢组织内绿色荧光标记的微血管网络分布均匀、信号强度高;模型组大鼠卵巢组织内绿色荧光信号明显减弱,血管密度和分支数量下降,提示卵巢血管生成受损。浓缩当归



注：与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图2 浓缩当归丸对大鼠血清性激素水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of concentrated Danggui Pills serum sex hormone levels in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)



注：标尺 200 μm 。红色星号标记各级卵泡，红色三角标记闭锁卵泡，CL 标记黄体。与正常组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图3 浓缩当归丸对 POI 大鼠卵巢组织形态及卵泡数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

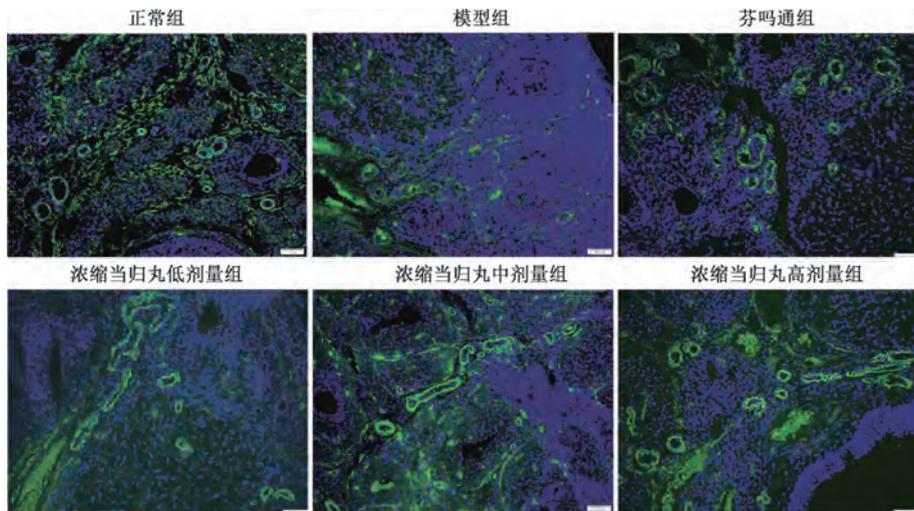
Fig. 3 Effects of concentrated Danggui Pills on ovary histomorphology and follicle number in POI rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

丸各剂量组大鼠卵巢组织中绿色荧光标记的血管数量增加，荧光强度恢复至接近正常组水平，且微血管分支更为丰富、网络结构更为完整，见图4。

3.5 浓缩当归丸对 POI 大鼠卵巢组织铁死亡相关蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织促铁死亡蛋白 ACSL4 表达升高 ($P<0.01$)，而抗氧化/铁结合蛋白 FTH1、GPX4、SLC7A11 和 TFR 表达降低 ($P<0.05, P<0.01$)；与模型组比

较，浓缩当归丸中、高剂量组及芬吗通组大鼠卵巢组织 FTH1、GPX4、SLC7A11 和 TFR 蛋白表达升高 ($P<0.05, P<0.01$)，浓缩当归丸低、中剂量组大鼠卵巢组织 ACSL4 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$)，见图5。

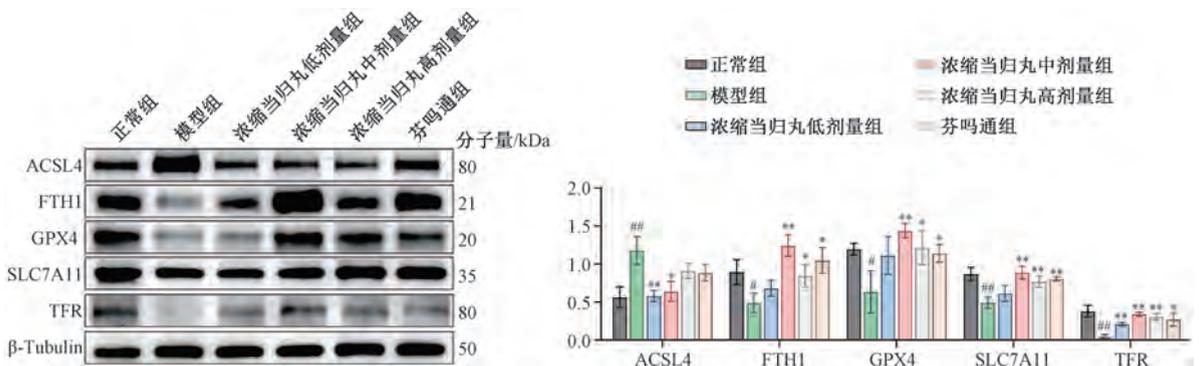
3.6 浓缩当归丸含药血清对 HUVECs 细胞血管生成的影响 对照组内皮细胞形成了完整、分支丰富的管状网络；Erastin 处理后，管网结构严重受损；



注：标尺 100 μm。

图 4 浓缩当归丸对 POI 大鼠卵巢组织内血管分布的影响

Fig. 4 Effects of concentrated Danggui Pills on the distribution of blood vessels in ovary tissue of POI rats



注：与正常组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 5 浓缩当归丸对 POI 大鼠卵巢组织 ACSL4、FTH1、GPX4、SLC7A11、TFR 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of concentrated Danggui Pills on the protein expressions of ACSL4, FTH1, GPX4, SLC7A11 and TFR in ovary of POI rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fer-1 可部分恢复管网；浓缩当归丸各剂量组则呈剂量依赖性修复，低剂量组恢复较有限，中剂量组几乎恢复至对照组水平，高剂量组管网最为完整，分支和连通性与对照组相当。与对照组比较，Erastin 组节点数、主连接点数和管总长度均减少 ($P<0.01$)；与 Erastin 组比较，浓缩当归丸含药血清各剂量组节点数、主连接点数和管总长度均增加 ($P<0.01$)，见图 6。

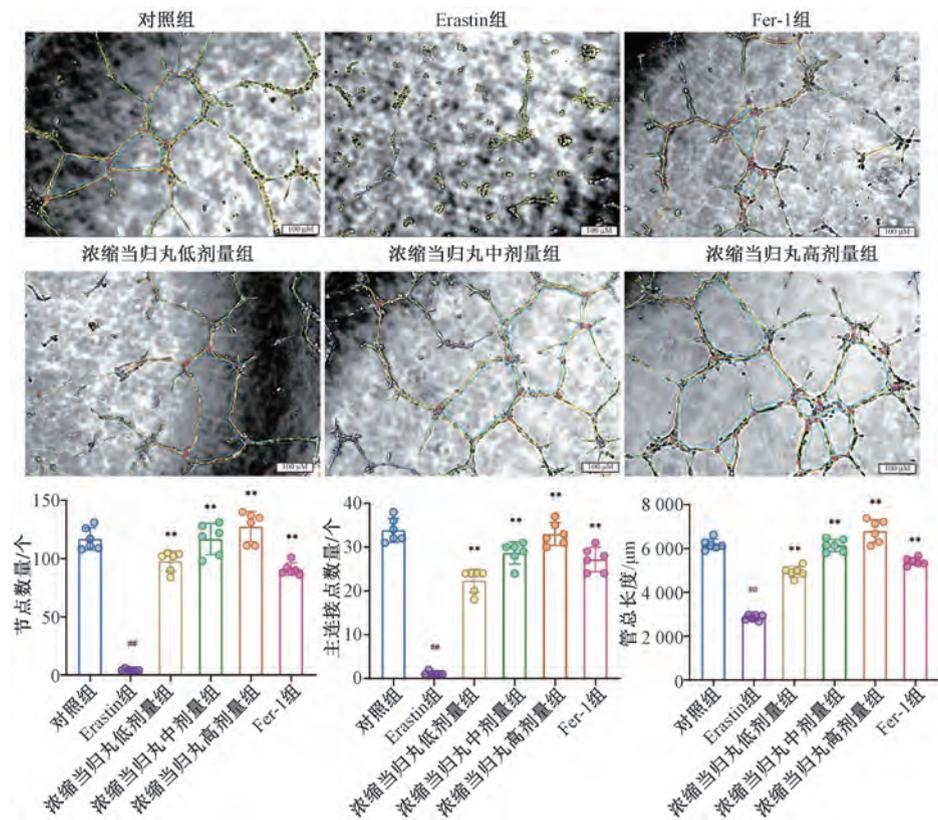
3.7 浓缩当归丸含药血清对 HUVECs 细胞 eNOS/ERK 信号通路和 VEGF-A/VEGFR II 蛋白表达的影响 与对照组比较，Erastin 组细胞 VEGF-A、VEGFR II、eNOS、p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与 Erastin 组比较，浓缩当归丸含药血清中、高剂量组和 Fer-1 组细胞 VEGF-A、VEGFR II、eNOS、p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P<0.05$,

$P<0.01$)，见图 7。

3.8 浓缩当归丸含药血清对 HUVECs 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响 与对照组比较，Erastin 组细胞 ACSL4 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，GPX4、TFR、FTH1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与 Erastin 组比较，浓缩当归丸含药血清各剂量组和 Fer-1 组细胞 GPX4、TFR、FTH1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，浓缩当归丸含药血清高剂量组和 Fer-1 组细胞 ACSL4 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，见图 8。

4 讨论

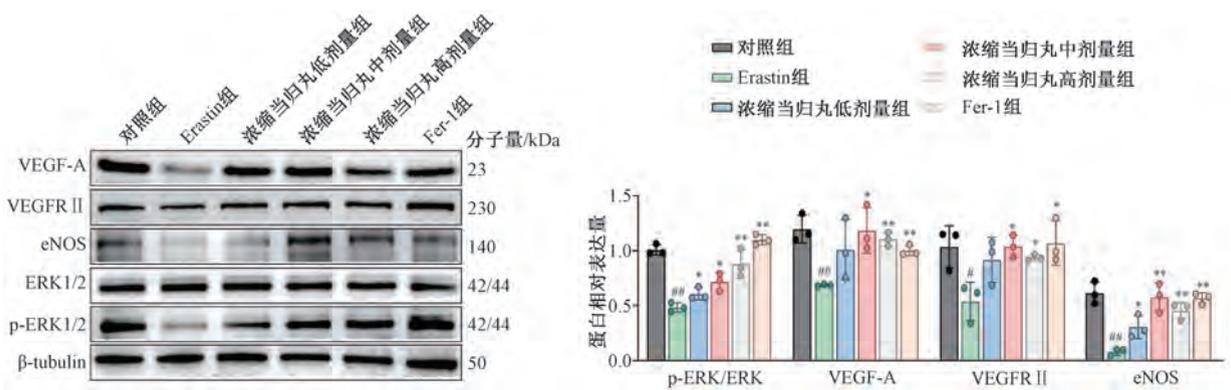
在成年哺乳动物中，卵巢是生理性血管生成与重塑最显著且最快的器官之一，其微循环障碍可导致卵泡发育闭锁和卵巢功能下降^[8-9]。卵泡发育与排卵高度依赖卵巢局部血管、固有神经及神经血管耦合，因而 POI 卵巢内血管密度、分布异常可能



注：标尺 100 μm。与正常组比较，## $P < 0.01$ ；与 Erastin 诱导组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 6 浓缩当归丸含药血清对 HUVECs 细胞血管生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effects of serum containing concentrated Danggui Pills on angiogenesis of HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注：与对照组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与 Erastin 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

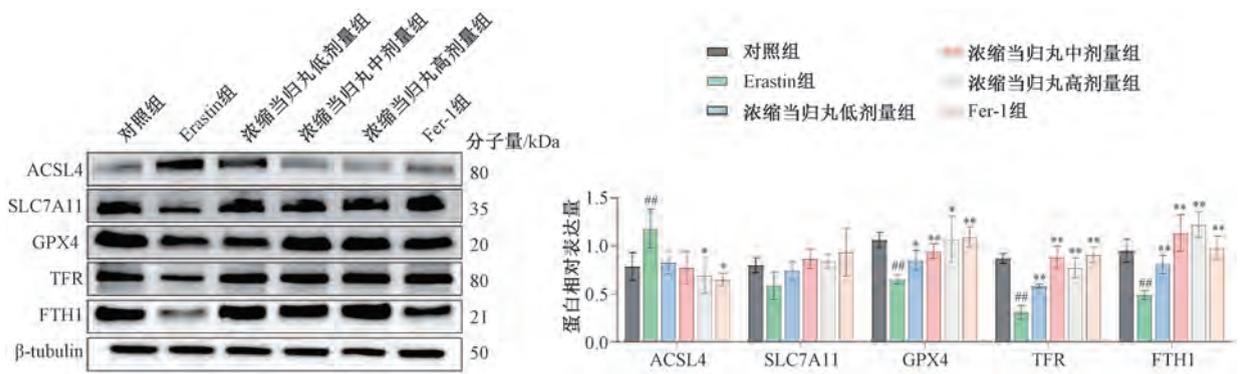
图 7 浓缩当归丸含药血清对 HUVECs 细胞 VEGF-A、VEGFR II、eNOS、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of serum containing concentrated Danggui Pills on the protein expressions of VEGF-A, VEGFR II, eNOS and p-ERK1/2 in HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

是窦状卵泡不能成熟并闭锁的主要原因。中医药治疗能促进功能不全卵巢的血管新生、重塑卵泡周围血管，为受损卵泡提供所需的细胞因子、营养和激素^[10-11]。

当归在微循环障碍环境中表现出以功能性再血管化为核心的促重塑作用^[12]。研究显示，在缺血再灌注模型中，当归可通过上调 p38MAPK/HIF-1/

VEGF 轴起到抗凋亡和抗氧化作用，推动血管成熟，改善局部灌注与功能恢复^[13-14]。黄芪-当归配伍在心肌梗死与重构中显示保护效应，且对剂量与配比敏感，提示“补气活血”组合可协同提升内皮保护与新生血管功能^[15]。新构型当归多糖可上调 VEGFA 等血管生成标志物，增强内皮增殖与迁移，促进血管修复^[16]。在代谢层面，当归及相关



注：与正常组比较，## $P < 0.01$ ；与 Erastin 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 8 浓缩当归丸含药血清对 HUVECs 细胞 ACSL4、FTH1、GPX4、SLC7A11、TFR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 8 Effects of serum containing concentrated Danggui Pills on the protein expressions of ACSL4, FTH1, GPX4, SLC7A11 and TFR in HUVECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

方剂通过抑制铁死亡、维持 SIRT1 介导的线粒体稳态，缓解内皮代谢应激、减少微血管稀疏，从而提高血管重塑效率与稳定性^[17]。含当归的制剂还能促进内皮细胞增殖，加速创面愈合，增加微血管数量并上调 VEGF 与 miRNA-21 表达^[18]。由此可见，当归通过内皮保护、HIF-1/VEGF 主导的血管生成及代谢/细胞死亡调控，促进缺血相关疾病中的有利血管重塑。本研究动物实验结果显示，浓缩当归丸可促进卵巢局部血管生成与微循环改善，维持卵泡生长并恢复卵巢分泌功能。

铁死亡是一种以铁依赖性脂质过氧化为核心的调控性细胞死亡方式。本研究动物与细胞实验均显示，POI 模型 ACSL4 表示升高，提示脂质过氧化底物富集。SLC7A11 抑制与 GPX4 失活破坏 System Xc⁻/GSH/GPX4 抗氧化屏障；FTH1 与 TFR 下降削弱铁封存与转运，促成游离铁积累^[19]。浓缩当归丸对铁死亡的抑制呈剂量依赖性。Erastin 诱导铁死亡时，eNOS、p-ERK/ERK、VEGF-A、VEGFR II 等表达降低，说明铁死亡产生的大量 ROS 不仅破坏内皮细胞膜，还抑制 eNOS 活性，削弱下游 ERK 信号；并增强铁-过氧化氮自由基反应，加剧脂质过氧化，形成恶性循环^[20]。eNOS 产生的 NO 通过促血管舒张、减轻炎症和抑制血小板聚集对维持血管功能至关重要；抑制 eNOS 与 NO 生成会增加内皮细胞凋亡^[21-22]。ERK 作为 MAPK 家族成员，参与调控内皮细胞生长、分化、增殖与存活^[23-24]；ERK2 缺失会导致内皮增殖下降，eNOS 表达减弱及动脉生成减少^[22,25]。川芎与当归提取物能增加 ERK 磷酸化并促进 eNOS 表达，保护细胞免受氧化损伤^[26]。黄芪与当归配伍可增加磷酸

化 eNOS 表达并促进血管生成^[15]。本研究体外血管形成实验中，Erastin 组管网节点、连通性与总长度均减少，与上述信号通路抑制相对应。浓缩当归丸高剂量组管网总长度和节点数得以恢复，提示其既可通过降低脂质底物与游离铁直接阻断铁死亡，也可通过重建 eNOS/ERK/VEGF 轴改善微循环，实现双重保护。由此可见，浓缩当归丸具备“铁稳态-抗氧化-血管生成”多靶点优势，其有效成分如阿魏酸、多糖与挥发油可能通过上调 Nrf2/HO-1 通路，提高谷胱甘肽与 Ferritin 表达；激活 PI3K/Akt-eNOS 及 ERK1/2 促进血管生成；调节铁转运 (TF/TFR) 与铁输出 (FPN)，降低游离铁^[27-28]，多层次作用共同构成其抗铁死亡的综合效应。

综上所述，本研究揭示了铁死亡在卵巢血管内皮损伤中的关键作用，证明浓缩当归丸可通过多靶点协同抑制铁死亡并激活 eNOS/ERK/VEGF 信号，最终促进 POI 模型大鼠血管重塑与卵巢功能恢复，为 POI 的干预提供了新的药理思路。

参考文献：

- [1] Wang X, Chen Z J. A decade of discovery: The stunning progress of premature ovarian insufficiency research in china[J]. *Biol Reprod*, 2022, 107(1): 27-39.
- [2] Moghadam A R E, Moghadam M T, Hemadi M, et al. Oocyte quality and aging[J]. *JBRA Assist Reprod*, 2022, 26(1): 105-122.
- [3] 李宛静. 中医药多途径介入高龄再次 IVF-ET 患者的助孕疗效观察及补肾活血方方法改善肾虚血瘀模型大鼠卵巢功能的机制研究[D]. 成都：成都中医药大学，2020.
- [4] 孔小娟, 杨红灵, 薛 艳, 等. 右归丸、双丹养血胶囊对原发性卵巢功能不全患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2024,

- 46(6): 2118-2120.
- [5] Wang L, Liu J, Nie G, *et al.* Danggui buxue tang rescues folliculogenesis and ovarian cell apoptosis in rats with premature ovarian insufficiency[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: e6614302.
- [6] Xu X, Wang J, Jin X, *et al.* Bu-shen-ning-xin decoction ameliorates premature ovarian insufficiency by suppressing oxidative stress through rno_circrna_012284/rno_mir-760-3p/hbegf pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: e155920.
- [7] 邢莎莎, 虎 娜, 田瑞莹, 等. 黄芪甲苷减轻环磷酸腺苷诱导的早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢炎症反应[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(4): 684-693.
- [8] Robinson R S, Woad K J, Hammond A J, *et al.* Angiogenesis and vascular function in the ovary[J]. *Reproduction*, 2009, 138(6): 869-881.
- [9] Fraser H M, Wulff C. Angiogenesis in the primate ovary[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2001, 13(7-8): 557-566.
- [10] Feng Y, Cui P, Lu X, *et al.* Clarity reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: e44810.
- [11] Ding D, Liu S, Liu F, *et al.* Exploring the role of Chinese herbal medicine in the long-term management of postoperative ovarian endometriotic cysts: a systematic review and meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: e1376037.
- [12] Lam H W, Lin H C, Lao S C, *et al.* The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extract on huvec *in vitro* and zebrafish *in vivo*[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(1): 195-211.
- [13] Cheng C Y, Ho T Y, Hsiang C Y, *et al.* *Angelica sinensis* exerts angiogenic and anti-apoptotic effects against cerebral ischemia-reperfusion injury by activating p38MAPK/HIF-1 α /VEGF-A signaling in rats[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45 (8): 1683-1708.
- [14] Han Y, Chen Y, Zhang Q, *et al.* Overview of therapeutic potentiality of *angelica sinensis* for ischemic stroke[J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: e153652.
- [15] Chen L, Song M, Zhang L, *et al.* The protective effects of different compatibility proportions of the couplet medicines for *Astragali Radix* and *Angelica sinensis Radix* on myocardial infarction injury[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 165-175.
- [16] Zhou M J, Zhou G S, Liu J, *et al.* Structural characterization of a novel polysaccharide from *Angelica sinensis (oliv.)* diels and the evaluation of its angiogenic activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 319(Pt 4): e145667.
- [17] 贾 婷, 齐 丹, 马 静, 等. 当归补血汤对射血分数保留型心力衰竭大鼠心肌组织铁死亡的影响[J]. *中成药*, 2024, 46(11): 3629-3635.
- [18] 陈海军. 当归补血复合微囊经 JAK2/STAT3 信号传导途径促进组织创伤修复机制的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [19] Mishima E, Nakamura T, Doll S, *et al.* Recommendations for robust and reproducible research on ferroptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2025, 26(8): 615-630.
- [20] Lee W C, Dixon S J. Mechanisms of ferroptosis sensitization and resistance[J]. *Dev Cell*, 2025, 60(7): 982-993.
- [21] Bu S, Nguyen H C, Nikfarjam S, *et al.* Endothelial cell-specific loss of enos differentially affects endothelial function[J]. *PLoS One*, 2022, 17(9): e0274487.
- [22] Sjoberg E, Melssen M, Richards M, *et al.* Endothelial VEGFR2-PLC γ signaling regulates vascular permeability and antitumor immunity through eNOS/Src[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(20): e161366.
- [23] Taguchi K, Narimatsu H, Matsumoto T, *et al.* ERK-containing microparticles from a diabetic mouse induce endothelial dysfunction[J]. *J Endocrinol*, 2019, 241(3): 221-233.
- [24] Ricard N, Scott R P, Booth C J, *et al.* Endothelial ERK1/2 signaling maintains integrity of the quiescent endothelium[J]. *J Exp Med*, 2019, 216(8): 1874-1890.
- [25] Ricard N, Zhang J, Zhuang Z W, *et al.* Isoform-specific roles of ERK1 and ERK2 in arteriogenesis[J]. *Cells*, 2019, 9(1): e38.
- [26] Hou Y Z, Zhao G R, Yang J, *et al.* Protective effect of *Ligusticum chuansiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide[J]. *Life Sci*, 2004, 75(14): 1775-1786.
- [27] Cao Y, Wang Y, Li Y, *et al.* Angelic acid triggers ferroptosis in colorectal cancer cells *via* targeting and impairing NRF2 protein stability[J]. *J Nat Med*, 2025, 79(1): 82-94.
- [28] Wu X, Pan X, Kang J, *et al.* Ferulic acid inhibits ox-LDL-induced ferroptosis and apoptosis in RAW 264.7 cells *via* the HIF-1 signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: e1524736.