

· 基础研究 ·

雷帕霉素对肥胖小鼠卵巢功能的影响

周咏, 许丽, 肖月, 窦晓卫*, 李晶*

南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:研究雷帕霉素对母源性肥胖导致的卵巢功能异常的干预作用以及药物的安全性评估。方法:建立一种高脂饮食的雌性肥胖小鼠模型,然后随机分为注射雷帕霉素的处理组和注射PBS的对照组,24周后统计其排卵数目,收集卵母细胞进行纺锤体免疫荧光染色,以评估雷帕霉素对肥胖小鼠排卵功能及卵母细胞质量的影响,并通过蛋白免疫印迹分析和RT-qPCR分析检测卵巢相关基因在蛋白和mRNA表达水平的变化。结果:雷帕霉素处理的肥胖小鼠体重下降,其卵巢磷酸化核糖体蛋白(phosphorylated ribosomal protein 6, P-rps6)和磷酸化起始因子4E结合蛋白(phosphorylated 4E binding protein 1, P-4EBP1)的表达明显降低,且超排的卵母细胞数目与对照相比有增加趋势,但卵母细胞纺锤体染色结果显示卵母细胞质量无明显差异;处理后的卵巢肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)的mRNA表达水平增加;血清中雌激素和促卵泡激素都无明显变化。结论:雷帕霉素有改善排卵功能的趋势,尚未发现对卵母细胞质量有明显影响,为未来研究雷帕霉素对肥胖女性生育力的影响提供了实验基础。

[关键词] 雷帕霉素;肥胖;卵巢

[中图分类号] R589.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)09-1245-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20200902

Effects of rapamycin on ovarian function in obese mice

ZHOU Yong, XU Li, XIAO Yue, DOU Xiaowei*, LI Jing*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the intervention effect of rapamycin on ovarian dysfunction caused by maternal obesity and evaluate the safety of drugs. **Methods:** A female obesity mice model with high fat diet was established and then randomly divided into the treatment group injected with rapamycin and the control group injected with PBS. After 24 weeks, the number of ovulations was counted and the oocytes were collected for spindle operation. Immunofluorescence staining was used to evaluate the effect of rapamycin on ovulation function and oocyte quality in obese mice, and the expression of ovarian-related genes in protein and mRNA was detected by Western blot and RT-qPCR. **Results:** The weight of ovarian in rapamycin treated mice decreased. Expression of phosphorylated ribosomal protein (P-rps6) and the phosphorylated 4E binding protein (P-4EBP1) was significantly decreased in rapamycin-treated obese mice, and the number of superovulated oocytes increased compared with the control. But results of the oocyte spindle staining showed no significant difference in oocyte quality between two groups. The mRNA expression level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the ovary was increased after rapamycin treatment. There were no significant changes in serum estrogen and follicle stimulating hormone between two groups. **Conclusion:** Rapamycin has a tendency to improve ovulation function by inhibiting the mTOR signaling pathway. It was not found that rapamycin had a significant effect on oocyte quality. This study provided experimental basis for research of rapamycin on fertility in obese women in the future.

[Key words] rapamycin; obesity; ovary

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1245-1251, 1262]

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(2018M640502)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: flythesky267186@163.

com; ljwth@njmu.edu.cn

肥胖是全球性的公共卫生问题。随着经济发展,肥胖症的发病率明显上升,在育龄妇女中迅速增加,且肥胖女性怀孕难度加大,其流产率、先兆子

痢和先天性缺陷的风险更高^[1]。大量数据表明,肥胖对女性生殖的不利影响可能源于排卵功能降低和受损的卵母细胞质量^[2-3]。来自肥胖小鼠的卵母细胞在受精后经历减数分裂延迟和胚胎发育停滞。有研究报道母体代谢综合征诱导卵母细胞线粒体的结构、空间和代谢改变^[4],且肥胖母亲的卵母细胞异常线粒体通过雌性种系维持并传递给后代^[5]。另外,小鼠卵丘细胞通过分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)可以加速卵母细胞的衰老^[6]。各种内外环境都可能导致卵巢功能降低,预防与母体肥胖相关的生育问题是一个重大挑战。

雷帕霉素(rapamycin, Rapa)是一种自噬诱导剂,它的机制靶标(mechanistic target of rapamycin, mTOR)是高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,且是响应氨基酸、营养和激素信号的细胞生长和代谢的主要调节剂^[7]。mTOR的条件性敲除小鼠模型揭示了其在几种代谢组织关键功能中的作用,例如肌肉中的糖原合成,肝脏中的酮生成和脂肪生成^[8]。mTOR信号在肥胖症中过度激活,促进炎症反应和对胰岛素的抵抗^[9]。Rapa是mTORC1的抑制剂,用Rapa处理的动物,脂肪组织中促脂肪形成因子的表达降低,且抑制mTORC1可能导致产热增加^[7]。在肥胖动物模型中,Rapa治疗可以减少肥胖。在生殖相关领域,对大鼠使用Rapa治疗10周,发现它通过调节sirtuin信号抑制原始卵泡激活和卵泡发育来延迟卵巢衰老^[10]。且最近有研究显示,短期Rapa治疗能改善中老年小鼠卵母细胞质量并延长卵巢寿命^[11],但其对肥胖小鼠卵巢功能的影响尚未被报道。

本研究使用喂食高脂(high fat, HF)饮食的小鼠作为肥胖模型,探索Rapa是否能改善母源肥胖引起的排卵功能变差和卵母细胞质量降低。

1 材料和方法

1.1 材料

用于实验的小鼠均获自南京医科大学模型动物研究中心,本研究经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准通过。HF饲料(New Brunswick公司,美国);Rapa(LC实验室,美国);葡萄糖、胰岛素(上海恒远公司);戊巴比妥(Sigma公司,美国);RIPA裂解液(Thermo公司,美国);蛋白酶抑制剂(Amresco公司,美国);鼠抗 β -Tubulin抗体、兔抗卵巢磷酸化核糖体蛋白(phosphorylated ribosomal protein 6, P-rps6)抗体、兔抗磷酸化起始因子4E结合蛋白(phosphorylated 4E binding protein 1, P-4EBP1)(CST

公司,美国);山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗(Thermo公司,美国);ECL发光液(GE公司,美国);PCR酶与实时荧光定量酶(南京诺唯赞公司);PCR引物与定量引物均由南京金斯瑞公司合成;妊娠母马血清促性腺激素、人绒毛膜促性腺激素、透明质酸酶、Triton X-100(Sigma公司,美国);Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG、碘化丙啶(Invitrogen公司,美国);数码化学发光成像仪(上海天能公司);点扫描激光共聚焦显微镜(Zeiss公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型的构建

将4周龄的雌性ICR小鼠24只饲养在恒温(22℃)、受控湿度和光照黑暗循环的通风笼中,在接受HF饮食12周后,将其随机分为两组,一组腹腔注射PBS作为对照组(12只),另一组腹腔注射Rapa(2 mg/kg)作为处理组(12只),每周1次,持续注射24周。

1.2.2 卵巢蛋白免疫印迹分析

收取处理组和对照组卵巢组织,加入RIPA裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物,提取卵巢蛋白。然后通过电泳分离蛋白质并转移到聚偏二氟乙烯膜上,在5%脱脂乳-TBST(含有0.1% Tween20的TBS)中封闭60 min后,将膜在4℃下与特异性抗体一起孵育过夜,然后用TBST洗膜3遍,二抗37℃下孵育1 h, TBST洗膜2遍, TBS洗膜1遍,加ECL发光液,使用数码化学发光成像仪曝光。

1.2.3 实时定量RT-PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测卵巢mRNA表达水平

用TRIzol试剂提取卵巢总RNA,逆转录成cDNA,然后在ABI Step One Plus平台上进行实时定量PCR。通过解链曲线分析评估PCR产物的特异性,使用肌动蛋白扩增信号作为内部对照进行各种mRNA的定量。使用的特异性引物如下:Actin上游5'-CCGTAAGACCTCTATGCC-3',下游5'-CTCAGTAACAGTCCGCCTA-3'; PGC-1 α 上游5'-TATGAGTGACATAGAGTGTGCT-3',下游5'-CCACTTCAATCCACCCAGAAAG-3'; Nrf1上游5'-AGCACGGAGTGACCCAAAC-3',下游5'-TGTACGTGGCTACATGGACCT-3'; Yy1上游5'-CAGTGGTTGAAGAGCAGATCAT-3',下游5'-AGGGAGTTTCTTGCCCTGT-CAT-3'; Esrra上游5'-CTCAGCTCTCTACCCAAACGC-3',下游5'-CCGCTTGGTGATCTCACACTC-3'; IL1- α 上游5'-CGAAGACTACAGTTCTGCCATT-3',下游5'-GACGTTTCAGAGGTTCTCAGAG-3'; IL-1 β

上游5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3',下游5'-ATCT-TTTGGGGTCCGTCAACT-3'; IL-6 上游5'-TAGTCC-TTCCTACCCCAATTTCC-3',下游5'-TTG-GTCCTTAGCCACTCCTTC; TNF- α 上游5'-CCCTCA-CACTCAGATCATCTTCT-3',下游5'-GCTACGACGT-GGGCTACAG-3'; IL-4 上游5'-GGTCTCAACCC-CCAGCTAGT-3',下游5'-GCCGATGATCTCTCTCA-AGTGAT-3'; IL-10 上游5'-GCTCTTACTGACTG-GCATGAG-3',下游5'-CGCAGCTCTAGGAGCAT-GTG-3'; Sirt1 上游5'-GCTGACGACTTCGACGACG-3',下游5'-TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT-3'; Sirt2 上游5'-GCCTGGGTTCCCAAAGGAG-3',下游5'-GAGCGGAAG-TCAGGGATACC-3'; Sirt3 上游5'-ATCCCGGACTT-CAGATCCCC-3',下游5'-CAACAT-GAAAAAGGG-CTTGGG-3'; Sirt6 上游5'-ATGTCG-GTGAATTATGCAGCA-3',下游5'-GCTGGAGGACT-GCCACATTA-3'; Fshr 上游5'-CCTTGCTCCTGGTC-TCCTTG-3',下游5'-CTCGGTCACCTTGCTATCTTG-3'; Lhr 上游5'-CGCCCGACTATCTCTCACCTA-3',下游5'-GACAGATTGAGGAGGTTGTCAAA; Cyp17 α 上游5'-GCCC-AAGTCAAAGACACCTAAT-3',下游5'-GTACCCAGGCGAAGAGAATAGA-3'; Cyp19 α 上游5'-ATGTTCT-TGGAAATGCTGAACCC-3',下游5'-AGGACCTGGTATTGAAGACGAG-3'; Star 上游5'-ATGTTCTCCTCGCTACGTTCAAG-3',下游5'-CCCAGT-GCTCTCCAGTTGAG-3'。

1.2.4 血清激素的测量

为了避免不同动情周期对血清激素水平的影响,在戊巴比妥(3 mg/100 mL,腹腔内)麻醉条件下,在发情期的8:00—10:00通过眼眶静脉取血。在4℃下离心血清(350 μ L)并储存在-80℃直至分析。使用北京北方生物技术研究所提供的RIA试剂盒测量雌激素(estrogen, E2)和促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)的水平。

1.2.5 葡萄糖耐受试验(glucose tolerance test, GTT)和胰岛素耐受试验(insulin resistance test, IIT)

对于GTT试验,在小鼠禁食12 h后测血糖,然后腹腔注射葡萄糖(2 g/kg体重),分别在30、60、90、120 min测血糖。对于IIT试验,在小鼠禁食4 h后测血糖,随即腹腔注射胰岛素(0.75 U/kg),同样每隔半小时测1次血糖,从尾静脉收集血样,通过Hemocue B葡萄糖分析仪测量葡萄糖浓度。

1.2.6 卵母细胞收集和免疫荧光

通过腹腔内注射妊娠母马血清促性腺激素,

46~48 h后使用人绒毛膜促性腺激素对小鼠进行超排卵,在人绒毛膜促性腺激素注射后14~15 h从输卵管收集卵母细胞。通过在含有0.1%透明质酸酶的M2培养基中移液来除去颗粒细胞。将卵母细胞分类为M II(具有第一极体)、成熟停滞(没有极体排出的生发泡破裂)或退化(细胞质碎片)。将卵母细胞在4%多聚甲醛中固定45 min,然后在室温下用0.5% Triton X-100穿透20 min。在1% BSA/PBS中封闭1 h后,将卵母细胞在4℃下与抗 β -Tubulin抗体一起孵育过夜。在1% BSA/PBS中洗涤3次后,将它们与Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG在室温下孵育1 h。然后用0.01 mg/mL碘化丙啶染核10 min,最后使用激光扫描共聚焦显微镜拍摄图片。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述;实验组与对照组实验数据的均值比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rapa对高脂肥胖小鼠体型与体重的影响

在HF饮食喂养24周后,观察到处理组小鼠体型明显比对照组小鼠小,统计分析每月体重测量结果,注射Rapa的HF小鼠体重更轻,且在第20周和24周,两组体重差异具有统计学意义(图1)。

2.2 Rapa处理后卵巢相关蛋白的表达情况

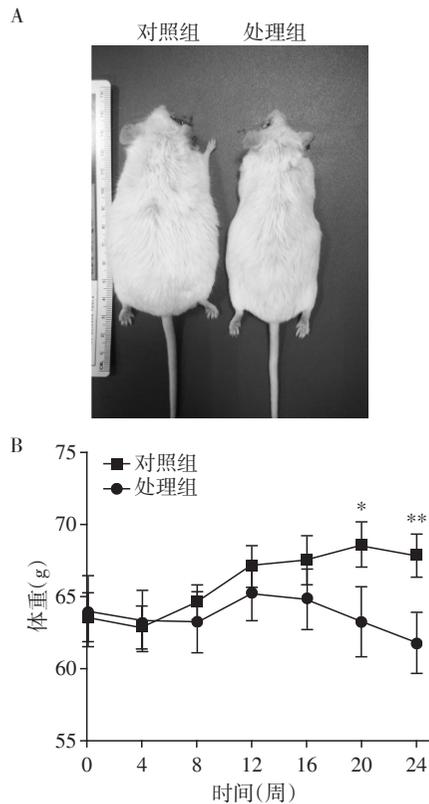
取处理组和对照组小鼠卵巢进行相关蛋白Western blot检测,结果显示处理组小鼠mTOR下游P-rps6和P-4EBP1的蛋白表达水平明显降低(图2),由于mTOR可以激活卵巢内原始卵泡通路,因此推测Rapa对卵巢内原始卵泡的储备有积极作用。

2.3 Rapa处理后小鼠排卵情况比较

分别对两组小鼠进行超排卵,统计分析显示处理组小鼠排出的卵母细胞比对照组多,但差异无统计学意义,其中处理组不正常卵泡占总卵泡的百分比低于对照组(图3A)。另外,处理组排卵的小鼠数目是对照组的两倍(图3B),表明Rapa对肥胖小鼠的排卵功能可能有益。

2.4 Rapa处理后小鼠卵母细胞的纺锤体染色

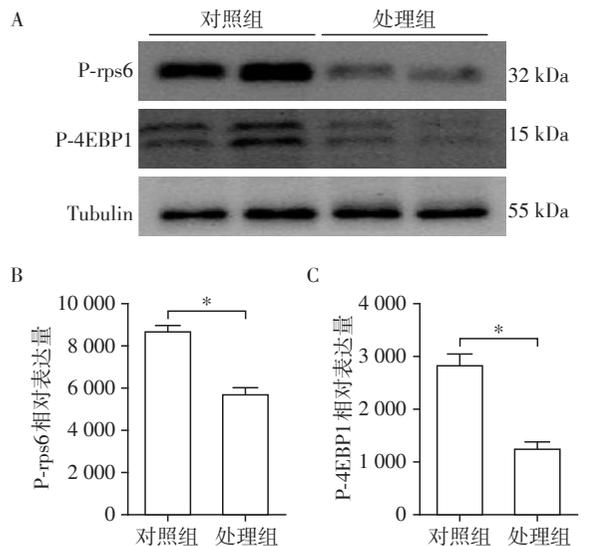
对两组小鼠超排后取出的卵母细胞进行纺锤体染色(图4A),两组卵母细胞都有正常和异常的纺锤体,异常纺锤体占总卵母细胞的比例分析发现,两组相差不明显(图4B),说明Rapa对肥胖小鼠卵母细胞纺锤体无明显影响。



A: Rapa处理24周后与对照组小鼠体型的比较; B: 两组体重变化趋势图。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 小鼠体型与体重的变化

Figure 1 Changes in body shape and body weight of mice

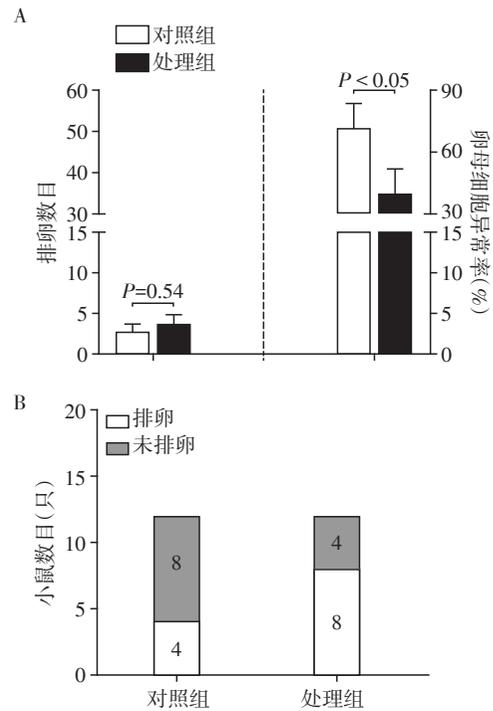


A: 两组小鼠卵巢中P-rps6和P-4EBP1蛋白的表达; B、C: P-rps6(B)和P-4EBP1(C)两种蛋白灰度扫描的统计结果。两组比较, * $P < 0.05$ 。

图2 两组小鼠卵巢内蛋白的表达情况

Figure 2 Protein expression of ovary in mice of two groups

2.5 Rapa处理高脂小鼠卵巢中mRNA的相对表达
取两组小鼠卵巢以检测mRNA的相对表达情



A: 两组小鼠卵巢超排卵后排卵数目和异常卵母细胞占总卵母细胞的百分比; B: 超排卵的小鼠数目统计。

图3 两组小鼠的排卵情况

Figure 3 Comparison of ovulation in mice of two groups

况, 结果(图5)显示TNF- α 明显下降, 但氧化和线粒体功能的关键调节因子PGC-1 α 、Nrf-1、Yy1、Esrra无显著差异, 促炎因子IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10和去乙酰化酶Sirt1、Sirt2、Sirt3、Sirt6变化不明显, 促卵泡生成素受体Fshr、黄体生成素受体Lhr与细胞色素Cyp17 α 、CYP19 α 和Star都没有明显的统计学差异, 说明Rapa可能通过降低TNF- α mRNA的表达来延缓卵巢衰老, 而对卵巢抗氧化和抗炎症无明显影响。

2.6 E2和FSH的表达水平

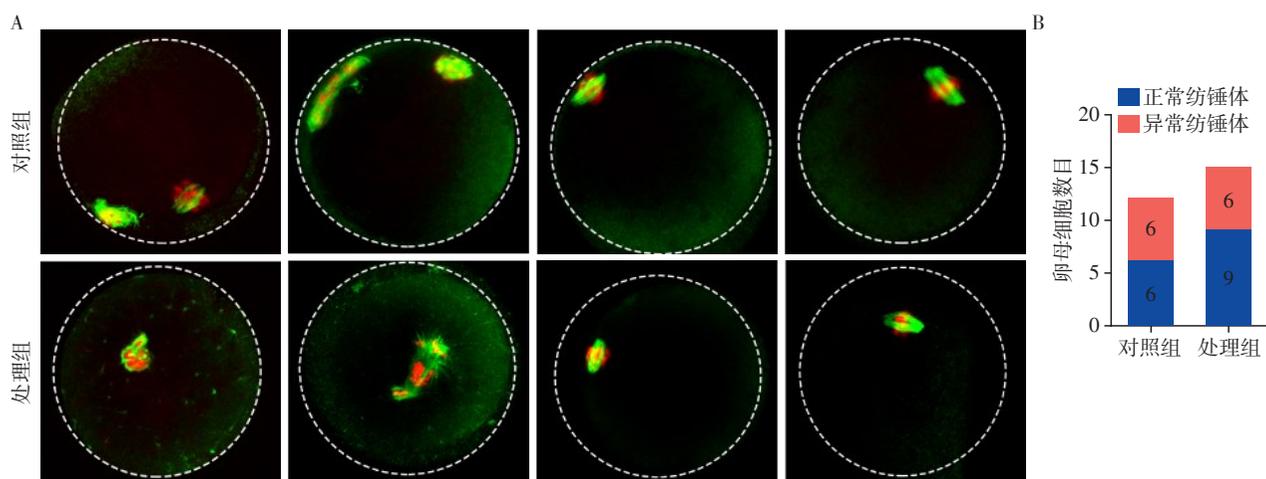
E2与肥胖密切相关, 两者均与子宫的生长发育和子宫内膜的增殖呈正相关^[12]。分别测量两组小鼠血清中E2和FSH水平(图6), 统计结果显示对照组和处理组两种激素水平差异都无统计学意义, 说明Rapa未引起肥胖小鼠这两种激素水平的变化。

2.7 GTT与ITT试验结果

分别对两组小鼠进行GTT和ITT试验, Rapa处理的肥胖小鼠和对照组都显示对葡萄糖不耐受和对胰岛素抵抗(图7), 说明Rapa对其不产生影响。

2.8 Rapa处理对高脂小鼠卵巢重量的影响

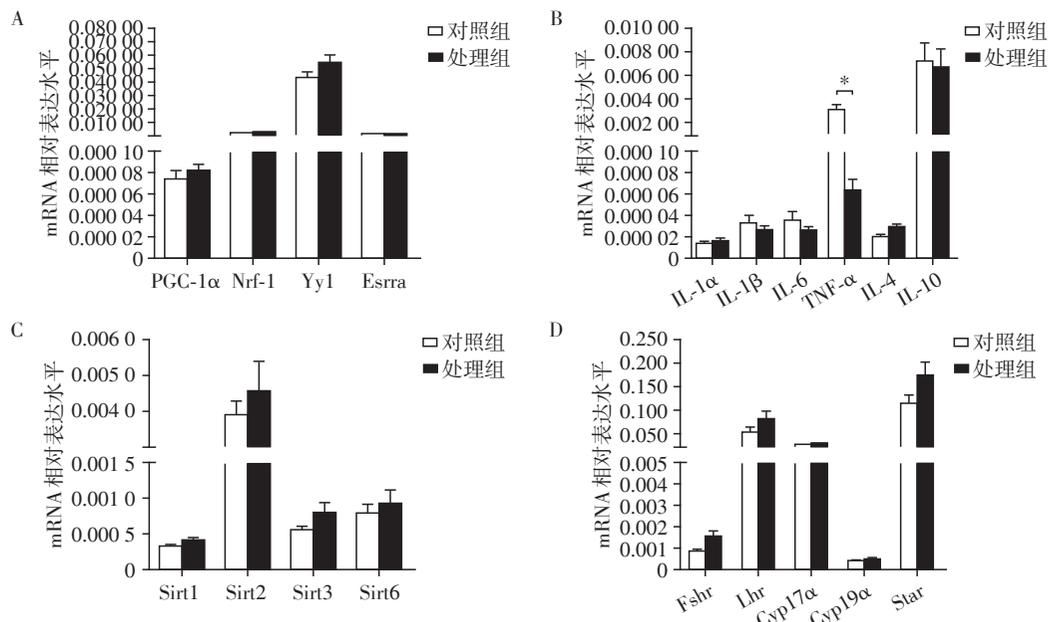
与对照组比较, 处理组小鼠的卵巢更轻, 且占小鼠总体重的系数有降低趋势, 可见Rapa有减轻小鼠卵巢重量的作用(图8)。



A: 两组小鼠卵巢卵母细胞β-Tubulin的免疫荧光染色(×40),对照组和处理组各4只;B: 两组卵母细胞正常纺锤体和异常纺锤体的数目统计。

图4 两组小鼠卵母细胞纺锤体的比较

Figure 4 Comparison of oocyte spindles in mice of two groups



A: 两组氧化和线粒体功能相关调节因子的比较;B: 两组促炎因子的比较;C: 两组去乙酰化酶的比较;D: 两组激素受体和细胞色素的比较。两组比较, $P < 0.01$ 。

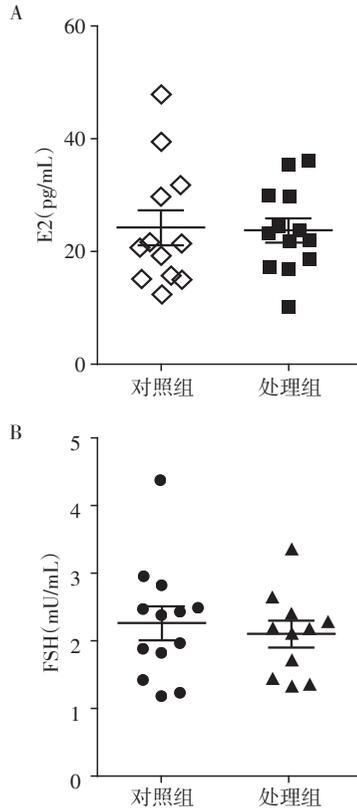
图5 小鼠卵巢中mRNA的相对表达水平

Figure 5 Expression levels of mRNA in ovary of mice

3 讨论

全球肥胖症的患病率显著上升,其对女性的生育能力产生较大负面影响^[13]。据报道,这种影响主要是由于下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamus - pituitary - ovary, HPO)轴的功能改变引起的^[14]。肥胖女性通常具有较高的胰岛素循环水平,这是增加卵巢雄激素生成的刺激因素,由于过量的脂肪组织,这些雄激素在周围被芳香化酶转化成雌激素,导致HPO轴上的负反馈并影响促性腺激素的产生,表现为排

卵功能障碍^[15]。另外,有大量文献支持肥胖对卵泡的影响,接受辅助生殖技术治疗的肥胖女性,检测到其卵泡环境改变,卵泡液中的胰岛素、甘油三酯和炎症标志物(如乳酸、C反应蛋白)水平较高^[16-17]。有研究表明,在饮食诱导肥胖的小鼠模型中,卵巢内出现更多的闭锁卵泡,卵母细胞更小,成熟的可能性更小,对肥胖小鼠中这些异常卵母细胞的检查发现,减数分裂非整倍体的发生率很高,减数分裂纺锤体出现碎片化,染色体在中期时未在赤道板上正确排列^[18]。本研究通过卵母细胞纺锤体染色发现,



A: 两组小鼠E2表达水平的比较; B: 两组小鼠FSH表达水平的比较。

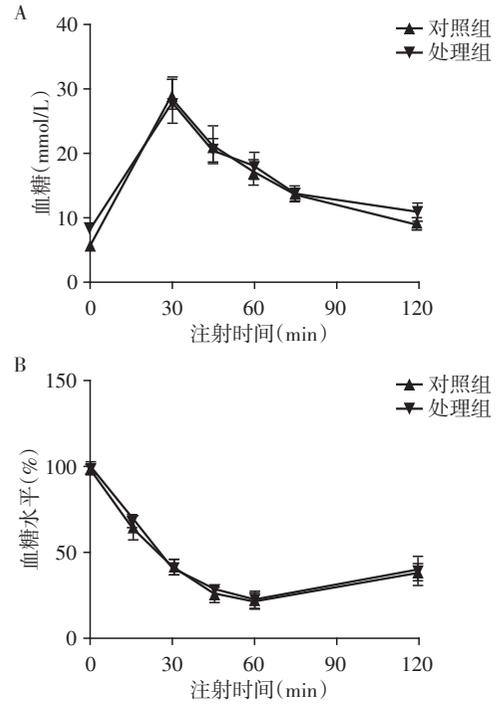
图6 小鼠E2和FSH的表达

Figure 6 Expression of E2 and FSH in mice

肥胖小鼠存在异常纺锤体,提示改善肥胖小鼠卵巢功能的研究具有非常重要的意义。

Rapa是一种预防器官移植排斥的免疫抑制药物^[19],能控制各种细胞的生长、增殖和运动,因此其参与代谢和免疫^[20]。许多研究已经证明了Rapa对肥胖啮齿动物代谢的影响,其通过刺激脂解作用从而影响脂质代谢,从而抑制脂肪生成和减少肥胖^[21-22]。本研究显示Rapa处理的高脂肥胖小鼠比对照组体型小,体重更轻。

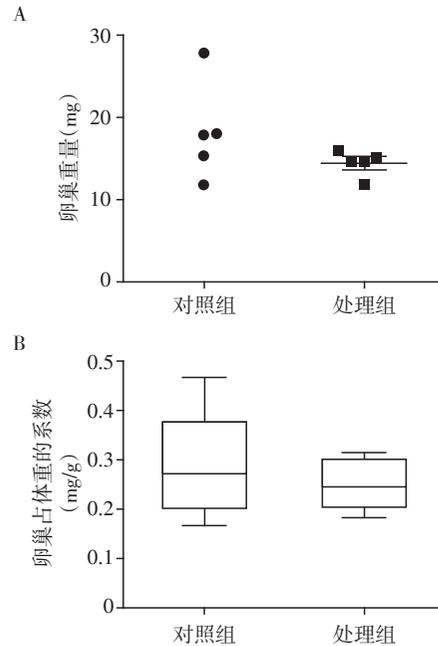
遗传、药理学和临床研究的数据已经证实,mTOR信号在调节女性生殖中起着至关重要的作用。mTOR信号参与卵巢中的各种过程,包括卵巢储备、卵泡发育、卵母细胞减数分裂成熟、卵巢老化、卵巢体细胞的增殖和类固醇生成等^[23]。mTOR信号在卵巢中有两个至关重要的功能。首先,卵母细胞和原始卵泡颗粒细胞中mTOR表达的升高激活了原始卵泡,这在卵巢储备保护应用方面具有巨大潜力^[24]。第二,抑制mTOR阻碍卵母细胞减数分裂成熟,这可能有利于研究mTOR抑制药物用于生育相关疾病。原始卵泡激活是青春期后卵泡发育的



A: GTT实验,注射葡萄糖后每隔半小时检测的小鼠血糖值; B: ITT实验,注射胰岛素后每隔半小时检测的小鼠血糖水平变化。

图7 两组GTT与ITT检测结果

Figure 7 Results of GTT and ITT in two groups



A: 两组小鼠卵巢重量的比较; B: 两组小鼠卵巢占总体重的系数比较。

图8 两组小鼠卵巢重量的比较

Figure 8 Comparison of ovary weight in mice of two groups

开始,决定卵巢储备和生殖寿命。为了研究mTOR信号在这一过程中的作用,使用了多种基因修饰的

小鼠,比如 TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) 和 TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) 突变引起的 mTOR 信号增强激活 rps6 和 4EBP1 信号并促进蛋白质翻译,导致原始卵泡的过度激活^[25]。在卵母细胞发育过程中,卵母细胞减数分裂成熟包括翻译的激活和蛋白质合成的增加,这与 mTORC1 信号转导有密切关系。mTORC1 依赖 rps6 和 4EBP1 参与蛋白质合成。rps6 为 mRNA 翻译做准备的决定信号,4EBP1 有助于整体 CAP (catabolic activative protein) 蛋白依赖性翻译。尽管这两个信号都在 mTORC1 的下游,但它们在物种中表现出不同的表达。此外,Rapa 也显示出不同的效果。在东北林蛙的卵母细胞中,rps6 活性在孕酮刺激后增加,Rapa 以剂量依赖性方式阻断孕酮诱导的卵母细胞生发泡破裂。在哺乳动物卵母细胞中,牛、猪和鼠模型中显示 4EBP1 在减数分裂成熟过程中逐渐磷酸化。在小鼠卵母细胞中,包含 Rapa 和 eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) 抗体的 mTOR-4EBP1-eIF4E 抑制剂不阻断减数分裂进程,但导致纺锤体形态和染色体排列异常,进而导致染色体非整倍性。这表明 mTOR 信号的中断下调参与纺锤体组装和染色体排列的特定 mRNA 的翻译^[20,26]。然而,目前还没有关于 Rapa 对肥胖小鼠卵巢功能的研究。本研究用是否加 Rapa 处理 HF 肥胖小鼠模型以研究其对排卵功能和卵母细胞质量的影响。通过 Western blot 检测发现,Rapa 通过降低 P-rps6 和 P-4EBP1,抑制 mTOR 通路而有利于卵泡储备,两组小鼠卵巢超排后卵母细胞数目的比较,发现其对 HF 肥胖小鼠排卵有改善的趋势,但卵母细胞纺锤体染色结果显示,未发现 Rapa 对卵母细胞质量产生明显影响。下面可进一步做卵子的体外受精实验,比较受精率、卵裂率及可移植胚胎率等以完善卵母细胞质量的检测,还可以检测 Rapa 对肥胖小鼠生育力的影响。

综上所述,本研究通过 Rapa 处理 HF 肥胖小鼠模型,发现其对肥胖小鼠排卵有积极影响,但对卵母细胞质量的改善尚不明显,这为后续研究肥胖小鼠生殖力奠定了基础。

[参考文献]

[1] MACHTINGER R, COMBELLES C M, MISSMER S A, et al. The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes [J]. Hum Reprod, 2012, 27(11):3198-3207

[2] LEARY C, LEESE H J, STURMEY R G. Human embryos

from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities [J]. Hum Reprod, 2015, 30(1): 122-132

[3] SOHRABI M, ROUSHANDEH A M, ALIZADEH Z, et al. Effect of a high fat diet on ovary morphology, *in vitro* development, *in vitro* fertilisation rate and oocyte quality in mice [J]. Singapore Med J, 2015, 56(10):573-579

[4] REYNOLDS K A, BOUDOURES A L, CHI M M, et al. Adverse effects of obesity and/or high-fat diet on oocyte quality and metabolism are not reversible with resumption of regular diet in mice [J]. Reprod Fertil Dev, 2015, 27(4):716-724

[5] SABEN J L, BOUDOURES A L, ASGHAR Z, et al. Maternal metabolic syndrome programs mitochondrial dysfunction via germline changes across three generations [J]. Cell Rep, 2016, 16(1):1-8

[6] KONG Q Q, WANG J, XIAO B, et al. Cumulus cell-released tumor necrosis factor (TNF) - α promotes post-ovulatory aging of mouse oocytes [J]. Aging, 2018, 10(7): 1745-1757

[7] MAO Z, ZHANG W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7):2043

[8] SENGUPTA S, PETERSON T R, LAPLANTE M, et al. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing [J]. Nature, 2010, 468 (7327): 1100-1104

[9] PERL A. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging [J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1346(1):33-44

[10] ZHANG X M, LI L, XU J J, et al. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression [J]. Gene, 2013, 523(1):82-87

[11] DOU X W, SUN Y, LI J Z, et al. Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice [J]. Aging Cell, 2017, 16(4):825-836

[12] 张媛媛,张日华,薛一.肥胖与雌激素的相互关系及其对子宫的作用研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(8):1060-1065

[13] BROUGHTON D E, MOLEY K H. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact [J]. Fertil Steril, 2017, 107(4):4840-4847

[14] GOLDSAMMLER M, MERHI Z, BUYUK E. Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1):45

(下转第 1262 页)

- [22] DAVIS E C, POPPER P, GORSKI R A. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area[J]. Brain Res, 1996, 734(1-2):10-18
- [23] 杨芬,唐晓燕,吴鹏,等. PI3K/mTOR抑制剂NVP-BEZ235体内外对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(5):569-576
- [24] MANIN M, BARON S, GOOSSENS K, et al. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells[J]. J Biochem, 2002, 366(Pt 3):729-736
- [25] DE BOO H A, HARDING J E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis[J]. J Obstet Gynaecol, 2006, 46(1):4-14
- [26] SIMMONS R. Developmental origins of adult metabolic disease[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2006, 35(1):193-204
- [27] DRAKE A J, WALKER B R, SECKL J R. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Compar Physiol, 2005, 288(1):34-38
- [28] WATERLAND R A, JIRTLE R L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases[J]. Nutrition, 2004, 20(1):63-68

[收稿日期] 2020-05-11

(上接第1251页)

- [15] HOHOS N M, SKAZNIK-WIKIEL M E. High-fat diet and female fertility[J]. Endocrinology, 2017, 158(8):2407-2419
- [16] BOU NEMER L, SHI H, CARR B R, et al. Effect of body weight on metabolic hormones and fatty acid metabolism in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization: a pilot study[J]. Eprod Sci, 2019, 26(3):404-411
- [17] BUYUK E, ASEMOTA O A, MERHI Z, et al. Serum and follicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 levels are elevated in obese women and are associated with poorer clinical pregnancy rate after *in vitro* fertilization: a pilot study[J]. Fertil Steril, 2017, 107(3):632-640
- [18] JUNGHEIM E S, SCHOELLER E L, MARQUARD K L, et al. Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring[J]. Endocrinology, 2010, 151(8):4039-4046
- [19] WALDNER M, FANTUS D, SOLARI M, et al. New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation[J]. Br J Clin Pharmacol, 2016, 82(5):1158-1170
- [20] BLENIS J. TOR, the gateway to cellular metabolism, cell growth, and disease[J]. Cell, 2017, 171(1):10-13
- [21] WANG Y, HE Z, LI X. Chronic rapamycin treatment improved metabolic phenotype but inhibited adipose tissue browning in high-fat diet-fed C57BL/6J mice[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(9):1352-1360
- [22] HAN J, WANG Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism[J]. Protein Cell, 2018, 9(2):145-151
- [23] LIU W, ZHANG C, WANG L. Successful reversal of ovarian hyperstimulation syndrome in a mouse model by rapamycin, an mTOR pathway inhibitor[J]. Mol Hum Reprod, 2019, 25(8):445-457
- [24] SUN X, SU Y, HE Y. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators[J]. Cell Cycle, 2015, 14(5):721-31
- [25] MENSAH L B, GOBERDHAN D C I, WILSON C. mTORC1 signalling mediates PI3K-dependent large lipid droplet accumulation in Drosophila ovarian nurse cells[J]. Biol Open, 2017, 6(5):563-570
- [26] GUO Z X, YU Q. Role of mTOR signaling in female reproduction[J]. Front Endocrinol, 2019, 10(3):692-701

[收稿日期] 2019-09-10