

菟丝子总黄酮对大鼠卵巢储备功能减退的改善作用

顿彩虹¹, 白爱红¹, 谢文燕¹, 戚静宜²

(1. 漯河市妇幼保健院生殖遗传科, 河南漯河 462000; 2. 洛阳市中心医院生殖医学科, 河南洛阳 471699)

摘要:【目的】探讨菟丝子总黄酮通过卵泡刺激素(FSH)-环磷酸腺苷(cAMP)信号轴对大鼠卵巢储备功能减退的改善作用。【方法】从68只雌性SD大鼠中抽取10只为正常组, 其余构建卵巢储备功能减退模型。将成功建模的48只大鼠随机分为抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组, 每组12只。抑制剂组灌胃H-89 0.1 mg/kg, 抑制剂+菟丝子总黄酮组灌胃H-89 0.1 mg/kg+菟丝子总黄酮 530.1 mg/kg, 菟丝子总黄酮组灌胃菟丝子总黄酮 530.1 mg/kg, 模型组、正常组灌胃等体积生理盐水, 均连续4周, 每周休息1 d。给药4周后, 称取各组大鼠卵巢湿质量, 计算卵巢指数, 酶联免疫吸附分析(ELISA)检测大鼠血清性激素水平, 苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢组织形态学变化, ELISA法检测卵巢组织中cAMP含量, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测卵巢组织卵泡刺激素受体(FSHR)、蛋白激酶A(PKA)及磷酸化PKA(p-PKA)表达。【结果】模型组大鼠进食、二便、毛色、动情周期出现异常, 卵巢萎缩明显, 卵泡数量、黄体减少; 与模型组比较, 抑制剂组大鼠进食、二便、毛色、动情周期异常情况更严重, 卵巢萎缩更明显, 卵泡与黄体数量更少, 而抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组大鼠进食、二便、毛色、动情周期, 卵巢、卵泡与黄体数量明显改善。与正常组比较, 抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数降低, FSH、FSH/LH、E₂水平升高, 卵巢组织中cAMP含量降低, FSHR、p-PKA蛋白相对表达量降低($P < 0.05$); 与抑制剂组比较, 模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数升高, FSH、FSH/LH、E₂水平降低, 卵巢组织中cAMP含量升高, FSHR、p-PKA蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数升高, FSH、FSH/LH、E₂水平降低, 卵巢组织中cAMP含量升高, FSHR、p-PKA蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较, 菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数升高, FSH、FSH/LH、E₂水平降低, 卵巢组织中cAMP含量升高, FSHR、p-PKA蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。【结论】菟丝子总黄酮可能通过FSH-cAMP信号轴改善大鼠卵巢储备功能减退。

关键词: 菟丝子总黄酮; 卵巢储备功能减退; 卵泡刺激素-环磷酸腺苷信号轴; 性激素; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2022)02-0388-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbcm.2022.02.028

Improving Effect of Total Flavones from Semen Cuscutae on Hypofunction of Ovarian Reserve in Rats

DUN Cai-Hong¹, BAI Ai-Hong¹, XIE Wen-Yan¹, QI Jing-Yi²

(1. Dept. of Reproductive Genetics, Luohe Maternal and Child Health Hospital, Luohe 462000 Henan, China;

2. Dept. of Reproductive Biomedicine, Luoyang Central Hospital, Luoyang 471699 Henan, China)

Abstract: **Objective** To explore the improvement effect of total flavones from Semen Cuscuta on hypofunction of ovarian reserve in rats through follicle stimulating hormone(FSH)-cyclic adenosine monophosphate(cAMP) signal axis. **Methods** Ten from sixty-eight female SD rats were taken out as the normal group, the rest were used to construct ovarian reserve dysfunction model. Forth-eight successfully modeled rats were randomly divided into inhibitor group, model group, inhibitor+total flavones from Semen Cuscuta group and total flavones from Semen Cuscuta group, with 12 rats in each group. The inhibitor group was given gastric gavage of H-89 0.1 mg/kg, the inhibitor+total flavones from Semen Cuscuta group was given gastric gavage of H-89 0.1 mg/kg plus total flavones from Semen Cuscuta 530.1 mg/kg, the total flavones from Semen Cuscuta group was given gastric gavage of

收稿日期: 2020-12-23

作者简介: 顿彩虹(1977-), 女, 副主任医师; E-mail: song8547y@163.com

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: LHGJ20191216)

530.1 mg/kg, the model group and the control group were given gastric gavage of equal volume of normal saline. All the treatments lasted for 4 consecutive weeks and one day rest per week. After 4 weeks of administration, the wet mass of ovaries of rats in each group was weighed and the ovarian index was calculated, the serum sex hormone levels of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the morphological changes of ovarian tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, Western Blot was used to detect the expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), protein kinase A (PKA) and phosphorylated PKA (p-PKA) in ovarian tissue. **Results** Rats in the model group showed anomalies of feeding, defecation, hair color and estrous cycle, obvious atrophy of ovary, decreased number of follicles and luteum; compared with the model group, the anomalies of feeding, defecation, hair color and estrous cycle was much severer, atrophy of ovary was more obvious, number of follicles and luteum was more decreased in the inhibitor group, while the condition of feeding, defecation, hair color and estrous cycle, atrophy of ovary, number of follicles and luteum in the inhibitor plus total flavones from Semen Cuscuta group and total flavones from Semen Cuscuta group were significantly improved. Compared with the normal group, the wet mass and ovarian index of left and right ovaries in the inhibitor group, model group, inhibitor plus total flavones from Semen Cuscuta group and total flavones from Semen Cuscuta group were decreased, the levels of FSH, FSH/LH and E_2 were increased, the content of cAMP in ovarian tissue was decreased, and protein relative expression contents of FSHR and p-PKA were decreased ($P < 0.05$); compared with the inhibitor group, the wet mass and ovarian index of left and right ovaries in the model group, inhibitor+total flavones from Semen Cuscuta group and total flavones from Semen Cuscuta group were increased, the levels of FSH, FSH/LH and E_2 were decreased, the content of cAMP in ovarian tissue was increased, and the protein relative expression contents of FSHR and p-PKA were increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the wet mass and ovarian index of left and right ovaries in the inhibitor plus total flavones from Semen Cuscuta group and total flavones from Semen Cuscuta group were increased, the levels of FSH, FSH/LH and E_2 were decreased, the content of cAMP in ovary was increased, and the protein relative expression contents of FSHR and p-PKA were increased ($P < 0.05$); compared with the inhibitor plus total flavones from Semen Cuscuta group, the wet mass and ovarian index of left and right ovaries in the total flavones from Semen Cuscuta group were increased, the levels of FSH, FSH/LH and E_2 were decreased, the content of cAMP in ovary was increased, and the protein relative expression contents of FSHR and p-PKA were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Total flavones from Semen Cuscuta may improve the hypofunction of ovarian reserve function in rats through FSH-cAMP signal axis.

Keywords: total flavones from Semen Cuscuta; hypofunction of ovarian reserve; FSH-cAMP signal axis; sex hormones; rats

卵巢储备功能是指卵巢皮质区域卵泡生长、发育、形成可受精卵泡的功能,反映女性生育潜能及生殖内分泌功能^[1]。若卵巢储备功能下降,将减少卵巢内储存的可募集卵泡数目,导致卵巢形成卵子的能力减弱、卵泡质量下降,影响女性的生育能力,表现为闭经、月经稀发、不孕甚至卵巢早衰等^[2-3]。中医在调节女性生殖功能失调性疾病方面具有独到之处,对卵巢储备功能减退主要从肝肾辨证论治入手,同时兼顾痰湿、气血等,

可促进性腺轴恢复正常,增强卵巢功能,防止出现病理性改变,平衡性激素分泌^[4]。菟丝子为旋花科植物菟丝 *Cuscuta chinensis* Lam. 的种子,味辛、甘,性微温,入肝、肾经,具有补肾益精、养肝明目、安胎的功效。菟丝子为温阳补肾之要药,可改善机体内分泌,增强性功能,具有抗氧化、调节免疫等作用^[5]。菟丝子总黄酮为菟丝子的主要成分,现代药理研究表明,其可改善大鼠生殖内分泌系统损伤^[6],对下丘脑-垂体-性腺轴有多方面

作用,可恢复下丘脑-垂体促性腺功能,增加垂体、卵巢对激素的反应性,促进卵泡发育,提高卵巢激素受体数量与功能,有类雌激素样活性^[7-8]。本研究构建卵巢储备功能减退大鼠模型,旨在探讨菟丝子总黄酮改善卵巢储备功能的作用及其可能机制,以期为临床应用菟丝子总黄酮改善卵巢储备功能提供实验基础,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF级健康雌性SD大鼠68只,21日龄,体质量(50±2)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。实验单位为河南中医药大学动物实验中心。实验开展前适应性饲养1周,自由摄食水,自然光照。

1.2 药物、试剂与仪器 菟丝子总黄酮(纯度>98%,购自上海谱振生物科技有限公司,批号:20191204)。去氧乙烯基环己烯(4-cinylcyclohexene diepoxide, VCD)、环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号通路抑制剂H-89(纯度>99%,碧云天生物技术有限公司);促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)、雌二醇(E₂)、cAMP酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(上海士锋生物科技有限公司);兔抗大鼠卵泡刺激素受体(FSHR)、PKA、磷酸化PKA(p-PKA)、β-actin单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)抗体(艾美捷科技有限公司)。电子天平(奥豪斯仪器有限公司);-80℃超低温冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);恒温冰冻切片机、EG1150组织包埋机(德国Leica公司);全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);Image-Pro Plus 6.0图像分析软件(美国Media Cybernetics公司)。

1.3 分组与造模 68只21日龄的雌性大鼠适应性饲养1周后达28日龄,阴门开启,经阴道脱落细胞涂片筛查,性周期正常。抽取10只大鼠设为正常组,其余构建卵巢储备功能减退模型^[9],方法:取VCD溶于芝麻油,配制浓度为80 mg/kg,每天1次,连续腹腔注射15 d,0.2 mL/只。正常组腹腔注射等体积芝麻油,每天1次。造模期间每日上午7:00—8:00进行阴道涂片,阴道上皮无动情周

期变化,或动情周期明显延长,则提示卵巢储备功能减退大鼠造模成功^[10]。造模成功大鼠48只,成功率为82.76%,随机分为抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组,每组12只。

1.4 干预方法 造模成功后次日给药:抑制剂组灌胃H-89 0.1 mg/kg^[11],菟丝子总黄酮组灌胃菟丝子总黄酮530.1 mg/kg^[12],抑制剂+菟丝子总黄酮组先灌胃菟丝子总黄酮530.1 mg/kg再灌胃H-89 0.1 mg/kg,模型组、正常组灌胃等体积生理盐水,均连续4周,每周休息1 d。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 取材 给药结束后,用戊巴比妥钠麻醉大鼠,经腹主动脉取血5 mL。处死大鼠,分离两侧卵巢组织,称质量。继而将卵巢组织处理如下:一份液氮冷冻;一份以40 g/L多聚甲醛固定24 h,冲洗后滤纸吸干多余水分,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,制作蜡块保存。

1.5.2 观察大鼠一般状况及测定卵巢湿质量、卵巢指数 观察大鼠一般状况,包括形态、活动、毛色、体质量等,称两侧卵巢湿质量,计算卵巢指数,公式:左侧(右侧)卵巢指数=左侧(右侧)卵巢湿质量(mg)/大鼠体质量(g)。

1.5.3 ELISA法检测血清性激素水平 取大鼠腹主动脉血液标本,取血后快速置入促凝管内,室温静置1 h,3 000 r/min离心(离心半径10 cm)10 min,取血清待用。按照ELISA试剂盒说明书检测血清FSH、LH、E₂水平,并计算FSH/LH。应用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度值,计算各指标浓度。

1.5.4 苏木素-伊红(HE)染色法观察卵巢组织形态学变化 取卵巢组织蜡块,制作5 μm切片,展片;干净玻片捞片,烘干;二甲苯脱蜡,梯度酒精水洗,常规苏木素染色10 min;水洗,1%盐酸酒精分色20 s,1%氨水溶液返蓝;自来水冲洗15 min,1%伊红水溶液复染5 min;水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察卵巢形态学变化。

1.5.5 ELISA法检测卵巢组织中cAMP含量 取液氮冷冻的卵巢组织,匀浆,以3 000 r/min(离心半径10 cm)离心10 min,取上清。用96孔板,每孔加入50 μL抗体,加入10 μL标准品,室温孵育2 h,洗板,显色,终止,读板,450 nm波长上机检测,570 nm波长校正。二喹啉甲酸(BCA)法检

测组织总蛋白浓度, 计算各组大鼠卵巢组织中 cAMP 含量, 公式: cAMP 含量=ELISA 检测浓度值/各样本 BCA 结果。

1.5.6 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测卵巢组织 FSH-cAMP 信号轴相关蛋白 FSHR、PKA、p-PKA 表达 取液氮冷冻的卵巢组织在冰盒中研磨, 匀浆后置入低温离心机, 以 4℃、20 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 20 min, 取上清。BCA 法检测蛋白浓度, 根据蛋白浓度, 按上样量 40 μg 计算样本稀释浓度, 沸水浴 10 min 变性, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后湿法转膜。将硝酸纤维素膜置入 50 g/L 脱脂奶粉中封闭 2 h; 再取出置入一抗稀释液[兔抗大鼠 FSHR、PKA、p-PKA、β-actin(内参)单克隆抗体, 稀释比例分别为 1:500、1:1 000、1:2 500]中孵育过夜; TBST 洗膜后, 再置入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000 稀释)中, 室温下孵育 1 h; TBST 洗膜, 电化学发光试剂(ECL)显色。经成像系统采集硝酸纤维素膜上的蛋白信号, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算目的条带灰度值。结果以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示。

1.6 统计方法 采用 SPSS 25.0 统计软件分析数据, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并进行正态分布检验与 Levene 检验。符合正态分布且方差齐者, 用单因素方差分析、LSD-*t* 比较, 方差不齐者用 Welch 检验、Dunnett's T3 比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况比较 实验过程中正常组大鼠饮食、活动、二便等情况均正常, 皮毛整

洁、有光泽, 体质量渐增, 动情周期规律; 模型组大鼠进食、二便次数减少, 大便稀, 毛色枯燥, 有脱毛, 体质量渐降, 动情周期延长、紊乱, 镜下见上皮细胞增多, 多于动情间期; 抑制剂组大鼠异常表现较模型组严重, 抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组则相对轻微。

2.2 各组大鼠卵巢湿质量与卵巢指数比较 表 1 结果显示: 各组大鼠卵巢湿质量、卵巢指数组间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与正常组比较, 抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数均降低($P < 0.05$)。与抑制剂组比较, 模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数均升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数均升高($P < 0.05$); 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较, 菟丝子总黄酮组的左侧和右侧卵巢湿质量及卵巢指数均升高($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠性激素水平比较 表 2 结果显示: 各组大鼠 FSH、FSH/LH、E₂ 水平组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), LH 水平组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较, 抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的 FSH、FSH/LH、E₂ 水平升高($P < 0.05$)。与抑制剂组比较, 模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的 FSH、FSH/LH、E₂ 水平降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的 FSH、FSH/LH、E₂ 水平降低($P < 0.05$); 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较, 菟丝子总黄酮组的 FSH、FSH/LH、E₂ 水平降

表 1 各组大鼠卵巢湿质量与卵巢指数比较

Table 1 Comparison of ovarian wet mass and ovarian index of rats in various groups

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	左侧卵巢湿质量/mg	右侧卵巢湿质量/mg	卵巢指数/(mg·g ⁻¹)
正常组	10	52.34 ± 4.63	49.36 ± 5.17	0.35 ± 0.02
抑制剂组	12	35.31 ± 3.14 ^①	33.48 ± 3.25 ^①	0.21 ± 0.03 ^①
模型组	12	37.81 ± 2.17 ^{①②}	35.35 ± 2.48 ^{①②}	0.25 ± 0.01 ^{①②}
抑制剂+菟丝子总黄酮组	12	40.69 ± 1.74 ^{①②③}	37.98 ± 1.58 ^{①②③}	0.28 ± 0.02 ^{①②③}
菟丝子总黄酮组	12	43.72 ± 1.25 ^{①②③④}	40.48 ± 1.44 ^{①②③④}	0.31 ± 0.03 ^{①②③④}
F 值		61.198	45.711	59.172
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, 与抑制剂组比较; ③ $P < 0.05$, 与模型组比较; ④ $P < 0.05$, 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较

表2 各组大鼠性激素水平比较

Table 2 Comparison of sex hormone levels of rats in various groups

($\bar{x} \pm s$)

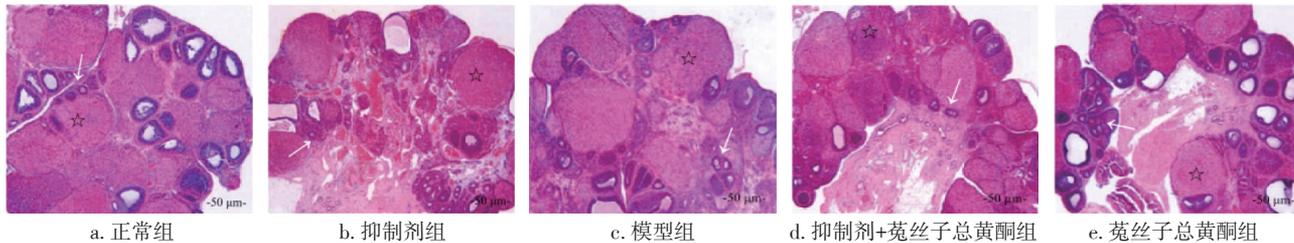
组别	鼠数/只	FSH/(mU·mL ⁻¹)	LH/(mU·mL ⁻¹)	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	FSH/LH
正常组	10	17.22 ± 0.55	1.31 ± 0.05	135.67 ± 9.42	13.15 ± 0.54
抑制剂组	12	30.37 ± 2.18 ^①	1.28 ± 0.04	281.64 ± 10.28 ^①	23.73 ± 0.65 ^①
模型组	12	27.15 ± 1.78 ^{①②}	1.25 ± 0.06	241.42 ± 10.69 ^{①②}	21.72 ± 0.24 ^{①②}
抑制剂+菟丝子总黄酮组	12	24.16 ± 1.25 ^{①②③}	1.31 ± 0.09	199.45 ± 12.15 ^{①②③}	18.44 ± 0.33 ^{①②③}
菟丝子总黄酮组	12	20.21 ± 0.75 ^{①②③④}	1.29 ± 0.04	155.64 ± 11.36 ^{①②③④}	15.67 ± 0.45 ^{①②③④}
F值		144.898	2.044	341.515	972.935
P值		<0.001	0.101	<0.001	<0.001

①P<0.05, 与正常组比较; ②P<0.05, 与抑制剂组比较; ③P<0.05, 与模型组比较; ④P<0.05, 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较

低(P<0.05)。

2.4 各组大鼠卵巢组织形态变化比较 图1结果显示: 正常组卵巢体积较大, 卵泡生长活跃, 黄体发育良好; 模型组卵巢萎缩明显, 卵泡数量减

少, 黄体减少; 与模型组比较, 抑制剂组卵巢萎缩更明显, 卵泡与黄体数量更少, 而抑制剂组+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组卵巢、卵泡与黄体数量明显改善。



→: 指向生长卵泡; ☆: 表示黄体

图1 各组大鼠卵巢组织形态变化比较(HE染色, ×100)

Figure 1 Comparison of histomorphological changes of ovarian tissue of rats in various groups (by HE staining, × 100)

2.5 各组大鼠卵巢组织中cAMP含量比较 表3结果显示: 各组大鼠卵巢组织中cAMP含量组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。与正常组比较, 抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组卵巢组织中cAMP含量降低(P<0.05)。与抑制剂组比较, 模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的cAMP含量升高(P<0.05); 与模型组比较, 抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组cAMP含量升高(P<0.05); 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较, 菟丝子总黄酮组cAMP含量升高(P<0.05)。

2.6 各组大鼠卵巢组织中FSH-cAMP信号通路相关蛋白表达比较 表4、图2结果显示: 各组大鼠FSHR、p-PKA蛋白相对表达量组间比较差异有统计学意义(P<0.05), PKA蛋白相对表达量组间比较差异无统计学意义(P>0.05)。与正常组比较, 抑制剂组、模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮

表3 各组大鼠卵巢组织中cAMP含量比较

Table 3 Comparison of content of cAMP in ovarian

tissue of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$, pmol·mg⁻¹)

组别	鼠数/只	cAMP
正常组	10	68.95 ± 4.25
抑制剂组	12	36.12 ± 3.18 ^①
模型组	12	40.18 ± 2.97 ^{①②}
抑制剂+菟丝子总黄酮组	12	47.42 ± 3.08 ^{①②③}
菟丝子总黄酮组	12	56.28 ± 3.13 ^{①②③④}
F值		46.247
P值		<0.001

①P<0.05, 与正常组比较; ②P<0.05, 与抑制剂组比较; ③P<0.05, 与模型组比较; ④P<0.05, 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较

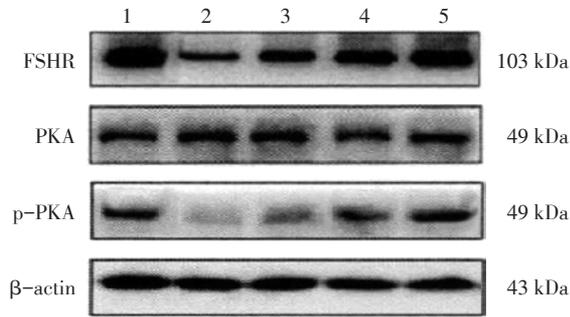
组、菟丝子总黄酮组的FSHR、p-PKA蛋白相对表达量降低(P<0.05)。与抑制剂组比较, 模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的

表4 各组大鼠卵巢组织中FSHR、PKA、p-PKA蛋白相对表达量比较

Table 4 Comparison of protein relative expression of FSHR, PKA and p-PKA in ovarian tissue of rats in various groups

组别	鼠数/只	FSHR	PKA	p-PKA
正常组	10	1.41 ± 0.34	0.74 ± 0.15	0.61 ± 0.03
抑制剂组	12	0.50 ± 0.11 ^①	0.76 ± 0.09	0.04 ± 0.01 ^①
模型组	12	0.89 ± 0.06 ^{①②}	0.75 ± 0.08	0.11 ± 0.03 ^{①②}
抑制剂+菟丝子总黄酮组	12	1.07 ± 0.03 ^{①②③}	0.77 ± 0.11	0.33 ± 0.04 ^{①②③}
菟丝子总黄酮组	12	1.22 ± 0.05 ^{①②③④}	0.79 ± 0.12	0.55 ± 0.03 ^{①②③④}
F值		13.415	0.087	220.977
P值		<0.001	0.984	<0.001

① $P < 0.05$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, 与抑制剂组比较; ③ $P < 0.05$, 与模型组比较; ④ $P < 0.05$, 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较



1. 正常组; 2. 抑制剂组; 3. 模型组; 4. 抑制剂+菟丝子总黄酮组; 5. 菟丝子总黄酮组

图2 大鼠卵巢组织中FSHR、PKA、p-PKA蛋白Western Blot电泳条带图

Figure 2 Western Blot bands of FSHR, PKA and p-PKA proteins in ovarian tissue of rats

FSHR、p-PKA蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组的FSHR、p-PKA蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 与抑制剂+菟丝子总黄酮组比较, 菟丝子总黄酮组的FSHR、p-PKA蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。

3 讨论

卵巢作为女性生殖器官, 负责卵子的产生与排出, 分泌的激素对女性的经、带、胎、产过程具有调节作用。随着女性年龄的增长, 卵巢功能日渐衰退, 致卵巢储备功能减退, 影响受孕能力, 甚或伴发闭经并至全身其他系统疾病。卵巢储备功能减退涉及遗传、医源性、环境等影响因素, 发病机制目前尚不完全清楚^[13]。本研究通过腹腔注射VCD构建卵巢储备功能减退实验动物模

型, 高度模拟了女性卵巢储备功能减退状态。可见造模后的大鼠形态、活动、毛色、动情周期等出现异常变化, 卵巢湿质量减轻, 卵巢指数下降, 而经菟丝子总黄酮治疗后则明显改善, 提示菟丝子总黄酮可恢复卵巢储备功能减退大鼠动情周期, 增加卵巢质量, 纠正降低的卵巢指数, 改善卵巢储备功能。本研究经HE染色观察大鼠卵巢组织形态学与卵泡情况后, 发现模型组卵巢明显萎缩, 卵泡数量减少, 闭锁卵泡增多, 而菟丝子总黄酮组卵巢体积增大, 皮质内可见大量生长卵泡, 较多接近成熟卵泡, 提示菟丝子总黄酮可促进卵巢储备功能减退大鼠卵巢各级卵泡发育。

血清性激素是反映卵巢储备功能的指标。FSH是腺垂体促性腺激素细胞合成、分泌的糖蛋白类促性腺激素, 其分泌可影响卵巢内卵泡的发育、排卵^[14]。LH通过与卵巢膜细胞LH受体结合, 刺激卵泡膜细胞分泌雄激素, 从而为雌激素的产生提供原料。卵巢储备功能减退初期, FSH、LH均上升, 前者早于后者, 且更显著, FSH/LH比值升高则可预判卵巢储备功能减退。E₂由卵巢膜细胞、颗粒细胞分泌, 在FSH和LH作用下合成, 是评价卵巢储备功能的常用指标^[15]。膜细胞合成的雄激素进入颗粒细胞, 在芳香化酶P450作用下转化为雌激素。长期高E₂、FSH/LH水平不利于优势卵泡发育, 因而恢复FSH、E₂、LH水平对卵巢早衰的治疗十分重要。本研究结果显示, 与模型组比较, 菟丝子总黄酮组的FSH、E₂、FSH/LH比值下降, 提示菟丝子总黄酮具备调节血清性激素功能的作用, 体现了其类雌激素样作用。

卵泡是卵巢局部与循环雌激素的主要来源,雌激素水平受FSH调控,FSH调节卵巢颗粒细胞膜中芳香化酶基因表达,并触发cAMP依赖的信号级联调节芳香化酶基因转录,诱导雌激素生物合成。FSH-cAMP/PKA信号转导通路是经典的调节卵巢功能的通路之一,FSH与颗粒细胞上分布的FSHR特异性结合,通过细胞膜上G蛋白受体激活cAMP,增加细胞中cAMP浓度,打破cAMP平衡^[16]。据报道^[17],cAMP在卵巢发育过程中可调控卵母细胞成熟与卵泡发育。高浓度的cAMP激活细胞内PKA,活化(磷酸化)的PKA转录激活目的基因,促使特异性蛋白合成并分泌至卵巢内,促进卵泡的发育。本研究结果显示:从抑制剂组到模型组、抑制剂+菟丝子总黄酮组、菟丝子总黄酮组,卵巢组织中FSHR、p-PKA蛋白表达水平及cAMP含量逐渐升高,提示菟丝子总黄酮可能通过调节FSH,激活cAMP/PKA信号转导通路,增加卵巢局部cAMP含量,促进卵泡发育,从而改善卵巢的储备功能。

综上所述,菟丝子总黄酮可能通过激活FSH-cAMP/PKA信号转导通路,发挥对卵巢储备功能减退大鼠卵巢储备功能的保护作用。

参考文献:

- [1] LEW R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2019, 55: 2-13.
- [2] XU Y, NISENBLAT V, LU C, et al. Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 29.
- [3] ATA B, SEYHAN A, SELI E. Diminished ovarian reserve versus ovarian aging: overlaps and differences [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2019, 31(3): 139-147.
- [4] 林淑莹, 刘雁峰, 吴丽婷. 卵巢储备功能下降的中医用药规律探讨 [J]. *环球中医药*, 2018, 11(1): 114-116.
- [5] 赖晓健, 陈仕玺, 赖国银, 等. 中草药淫羊藿和菟丝子对日本鳊卵巢发育的影响 [J]. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 314-321.
- [6] 张博, 苏杭, 任献青, 等. 基于高通量转录组测序的菟丝子黄酮改善雷公藤多苷片致大鼠生殖损伤的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3478-3485.
- [7] 李锦英, 张兆萍, 叶金飞, 等. 基于网络药理学的菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的作用机制研究 [J]. *中国药房*, 2020, 31(18): 2202-2209.
- [8] 王永霞, 马娜, 钟兴明, 等. 菟丝子总黄酮对卵巢早衰大鼠卵巢功能的作用研究 [J]. *医学综述*, 2019, 25(13): 2695-2699.
- [9] 钱颖仪, 刘雁峰. 七子益肾理冲汤对DOR大鼠卵巢储备的影响 [J]. *天津中医药*, 2018, 35(6): 450-453.
- [10] 蔡彬彬, 王素霞, 祝雨田, 等. 育麟方对卵巢储备功能减退大鼠卵巢颗粒细胞超微结构及功能的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(6): 3074-3077.
- [11] 桂雄斌, 伏广虎, 王明刚. 补气通窍方调控变应性鼻炎大鼠外周TNF- α , IL-1 β , IL-6含量的实验研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(9): 25-27.
- [12] 黄长盛, 贺守第, 管雁丞, 等. 菟丝子黄酮和槲皮素对雷公藤多苷致卵巢早衰大鼠卵巢功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(6): 667-670.
- [13] COLLINS G, PATEL B, THAKORE S, et al. Primary ovarian insufficiency: current concepts [J]. *South Med J*, 2017, 110(3): 147-153.
- [14] FURAT RENCBER S, KURNAZ OZBEK S, ERALDEMIJR C, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 55.
- [15] ARAO Y, HAMILTON K J, WU S P, et al. Dysregulation of hypothalamic-pituitary estrogen receptor α -mediated signaling causes episodic LH secretion and cystic ovary [J]. *FASEB J*, 2019, 33(6): 7375-7386.
- [16] RICCETTI L, SPERDUTIS, LAZZARETTI C, et al. The cAMP/PKA pathway: steroidogenesis of the antral follicular stage [J]. *Minerva Ginecol*, 2018, 70(5): 516-524.
- [17] CAI X, FU H, WANG Y, et al. Depletion of GPSM1 enhances ovarian granulosa cell apoptosis via cAMP-PKA-CREB pathway in vitro [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 136.

【责任编辑:侯丽颖】