

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

王红梅¹, 郭瑞丽¹, 崔利娟¹, 姜李乐² (1. 焦作市人民医院, 焦作 454000; 2. 河南省人民医院生殖研究所, 郑州 450003)

摘要 目的: 探讨蛇床子素(OST)对卵巢储备功能减退(DOR)大鼠的改善作用及其可能机制。方法: 取80只大鼠, 64只以 $50 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 雷公藤多苷混悬液灌胃建立DOR大鼠模型, 随机分为模型组、OST低剂量组、OST中剂量组、OST高剂量组, 每组16只大鼠, 其余16只为空白组。OST低、中、高剂量组按照 $2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 分别腹腔注射20、40和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OST溶液, 空白组、模型组注射等体积生理盐水, $1 \text{次} \cdot \text{d}^{-1}$, 给药21 d。比较各组大鼠卵巢组织学形态变化、脏器指数和血清中抗苗勒管激素(AMH)、雌二醇激素(E2)、促黄体生成激素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、白细胞介素4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)水平, 以及卵巢组织中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性、丙二醛(MDA)水平和转录因子核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶1(HO-1)、核苷酸结合寡聚化结构域受体3(NLRP3)蛋白表达水平。结果: HE染色结果显示, OST各剂量组卵巢组织卵泡和黄体数较模型组增加; 与模型组比, OST各剂量组AMH、E2、IL-4、IL-10水平, 卵巢指数, 子宫指数, SOD、CAT活性和Nrf2、HO-1蛋白表达水平均升高, LH、FSH、IFN- γ 、TNF- α 、MDA水平和NLRP3蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。AMH、E2、IL-4、IL-10水平, 卵巢指数, 子宫指数, SOD、CAT活性和Nrf2、HO-1蛋白表达水平与OST呈剂量依赖性升高, LH、FSH、IFN- γ 、TNF- α 、MDA水平和NLRP3蛋白表达水平与OST呈剂量依赖性降低($P < 0.05$)。结论: OST可有效改善DOR大鼠内分泌代谢, 减轻卵巢炎症反应和氧化应激损伤, 恢复卵巢储备功能, 可能通过调控Nrf2/HO-1/NLRP3信号通路发挥作用。

关键词: 蛇床子素; 卵巢储备功能减退; 炎症因子; 氧化应激; 信号通路

中图分类号: R961.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)06-0664-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.06.009

Study on the Improvement Effects of Osthole on Diminished Ovarian Reserve Rats by Nrf2/HO-1/NLRP3 Axis

Wang Hongmei¹, Guo Ruili¹, Cui Lijuan¹, Jiang Lile² (1. Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454000, China; 2. Institute of Reproduction, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

Abstract Objective: To investigate the improvement effect of osthole (OST) on diminished ovarian reserve (DOR) rats and its possible mechanism. **Methods:** Eighty rats were taken as experimental subjects, 64 of which were made DOR rat model by intragastric administration of $50 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ tripterygium glycosides

suspension, randomly divided into model group, low dose of OST group, medium dose of OST group and high dose of OST group, there were 16 rats in each group, and the remaining 16 rats were blank group. The low, medium and high dose of OST groups were intraperitoneally injected with 20, 40 and 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OST solution at 2 $\text{mL} \cdot \text{d}^{-1}$, the blank group and model group were injected with equal volume of saline, once per day, for 21 days. The morphological changes of the ovaries, organ index, the levels of anti-Müllerian hormone (AMH), estradiol (E2), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), interleukin-4 (IL-4), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10) in serum, the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) level and the expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), hemeoxygenase-1 (HO-1), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) protein in ovarian tissue were compared. **Results:** The results of HE staining showed that the number of follicles and corpus luteum in the ovarian tissue of each dose group of OST increased compared with the model group. Compared with the model group, the levels of AMH, E2, IL-4, IL-10, ovarian index, uterine index, the activity of SOD and CAT, the expression levels of Nrf2, HO-1 protein increased, while the levels of LH, FSH, IFN- γ , TNF- α , MDA and the expression level of NLRP3 protein decreased in each dose group of OST ($P < 0.05$). AMH, E2, IL-4, IL-10 levels, ovarian index, uterine index, the activity of SOD and CAT, the expression levels of Nrf2, HO-1 protein increased in a dose-dependent manner with OST, the levels of LH, FSH, IFN- γ , TNF- α , MDA and the expression level of NLRP3 protein decreased in a dose-dependent manner with OST ($P < 0.05$). **Conclusion:** OST could effectively improve endocrine metabolism in DOR rats, reduce ovarian inflammation and oxidative stress damage, and restore ovarian reserve function, which may play a role by regulating the Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway.

Keywords: osthole; diminished ovarian reserve; inflammatory factor; oxidative stress; signaling pathway

卵巢储备功能减退 (Diminished Ovarian Reserve, DOR) 是指女性在40岁前卵母细胞数量或质量下降, 导致卵巢功能衰退、生殖力降低的一种妇科疾病^[1]。在中医学中, DOR被归入“妇人血枯”的范畴^[2]。蛇床子素 (Osthole, OST) 又名甲氧基欧芹酚, 属于香豆素类植物雌激素, 是蛇床子的主要有效组成成分^[3], 现代中药药理研究表明 OST 在多囊卵巢综合征疾病治疗中发挥了抗氧化应激的作用^[4], 且常被用于组方治疗“妇人血枯”之症。有研究表明 DOR 大鼠卵巢组织中转录因子核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2, Nrf2) 和血红素氧合酶 1 (Hemeoxygenase 1, HO-1) 的蛋白表达水平下降^[5], 即 Nrf2 信号通路参与了卵巢储备功能的调节^[6]。基于 OST 对多囊卵巢综合征卵巢功能作用, 本研究以雷公藤多苷给大鼠灌胃建立 DOR 模型, 探讨 OST 是否会通过调控 Nrf2/HO-1/核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor Protein 3, NLRP3) 轴改善 DOR 大鼠的卵巢储备功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级雌性SD大鼠, 80只, 10w龄, 体质量 (200 ± 20) g, 由上海南方模式生物科技股份有限公司提供, 许可证号SCXK (沪) 2017-0010, 室温饲养, 实验前适应性饲养5 d。

1.1.2 药物、主要试剂和仪器

OST (纯度: $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司), 雷公藤多苷 (纯度: $> 98\%$, 上海依赫生物科技有限公司), 雌二醇 (Estradiol, E2)、促黄体生成激素 (Luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH) 放射免疫检测试剂盒 (均为美国Beckman公司), 抗苗勒管激素 (Anti-Müllerian Hormone, AMH)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素4 (Interleukin-4, IL-4)、白细胞介素10 (Interleukin-10, IL-10)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢

酶 (Catalase, CAT) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) ELISA试剂盒 (均为美国DSL公司), BCA蛋白定量分析试剂盒 (美国Sigma-Aldrich公司), Nrf2抗体、HO-1抗体、NLRP3抗体 (均为英国Abcam公司), 生物素化山羊抗兔Ig G (H+L) (美国Abcam公司), RM2235徕卡切片机 (德国徕卡显微系统贸易公司), PowerPac电泳仪 (美国BIO-RAD公司), iBright CL750成像系统 (美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 DOR大鼠模型建立

80只大鼠连续10 d进行阴道细胞涂片观察动情周期, 随机选择64只动情周期完整的大鼠, 以 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 雷公藤多苷生理盐水混悬液灌胃, 按 $50 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 连续灌胃14 d^[7]。从造模第8天起观察大鼠阴道细胞涂片, 动情周期 $\geq 6 \text{ d}$ 或在某一阶段停滞 $\geq 3 \text{ d}$ 为动情周期紊乱, 即造模成功^[8]。

1.2.2 干预方法

取建模成功的64只大鼠随机分为模型组、OST低剂量组、OST中剂量组、OST高剂量组, 剩余大鼠为空白组, 每组16只。OST低、中、高剂量组按照 $2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 分别腹腔注射20、40和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OST^[9], 空白组、模型组注射等体积生理盐水, 1次 $\cdot \text{d}^{-1}$, 连续21 d。

1.2.3 激素水平检测

末次干预结束后各组大鼠空腹12 h, 准确称取体质量后, 以 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥麻醉大鼠, 快速心脏取血5 mL, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min (离心半径为10 cm), 取离心后1 mL血清样本用放射免疫法检测血清AMH、E2、LH、FSH水平。

1.2.4 IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10水平检测

取上述“1.2.3”节中的血清样本1 mL, 按照ELISA试剂盒说明书检测, 酶标仪测定OD值 (450 nm), 根据样品吸光度值计算样品IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10水平。

1.2.5 卵巢脏器指数观察

摘取各组大鼠卵巢和子宫, 清除脂肪结缔组织后准确称取卵巢和子宫湿质量, 计算脏器指数。卵巢指数 (%) = [卵巢湿质量 (mg) / 体质量 (g) \times 100%], 子宫指数 (%) = [子宫湿质量 (mg) / 体质量 (g) \times 100%]。

1.2.6 组织学观察

取8只大鼠左侧卵巢于10%中性甲醛中固定48 h, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋后, 制作厚度为 $6 \mu\text{m}$ 的连续切片, 采用常规HE染色: 苏木素染液染3 min, 冲洗、1%盐酸酒精分化、1%氨水溶液返蓝, 伊红染液染2 min, 最后脱水、封片, 显微镜下观察卵巢形态学变化。

1.2.7 卵巢组织SOD、MDA、CAT检测

取各组剩余8只大鼠卵巢组织, 加入1 mL磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer, PBS) 制成匀浆, 匀浆液 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min (离心半径为10 cm), 获得上清。采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。按照ELISA试剂盒说明书检测, 酶标仪于波长450 nm处测定SOD、CAT吸光度, 于波长535 nm处测定MDA吸光度, 根据样品吸光度值计算样品SOD、CAT和MDA水平。

1.2.8 卵巢组织Nrf2、HO-1、NLRP3蛋白表达量检测

取“1.2.7”节卵巢组织样本100 mg置于1.5 mL无酶EP管中, 加入0.6 mL RIPA裂解液充分裂解, 匀浆摇匀, 静置后于离心机离心 (4°C 、 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、10min), 取上清。BCA试剂盒蛋白定量, 取 $20 \mu\text{g}$ 样本与等量上样缓冲液混匀进行SDS-PAGE电泳, 100 V电转30 min, 转至PVDF膜上, 加入适量封闭液室温封闭2 h, 将膜放入1:2000稀释的Nrf2、HO-1、NLRP3一抗中, 4°C 摇床孵育过夜, TBST洗膜, 再放入1:10000稀释的二抗中, 室温摇床孵育1 h, TBST洗膜。将PVDF膜置于凝胶成像仪的显影区, ECL显影, Image J软件分析条带。

1.3 统计学分析

采用软件SPSS 24.0分析处理数据, 计量资料均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多样本计量资料比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠激素水平比较

与空白组比, 模型组E2、AMH水平降低, LH、FSH水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比, OST各剂量组E2、AMH水平升高, LH、FSH水平降低 ($P < 0.05$); E2、AMH水平与OST呈剂量依赖性升高, LH、FSH水平与OST呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠激素水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	E2/ (pg · mL ⁻¹)	LH/ (mIU · mL ⁻¹)	FSH/ (mIU · mL ⁻¹)	AMH/ (ng · mL ⁻¹)
空白组	42.36 ± 3.14	3.47 ± 0.43	3.86 ± 0.92	8.41 ± 0.81
模型组	21.67 ± 3.21 ^a	7.91 ± 0.64 ^a	15.23 ± 1.32 ^a	3.23 ± 0.64 ^a
OST 低剂量组	25.74 ± 3.77 ^{ab}	6.84 ± 0.71 ^{ab}	12.34 ± 1.21 ^{ab}	4.62 ± 0.66 ^{ab}
OST 中剂量组	32.44 ± 3.64 ^{abc}	5.74 ± 0.62 ^{abc}	9.84 ± 1.17 ^{abc}	5.74 ± 0.58 ^{abc}
OST 高剂量组	38.93 ± 3.91 ^{abcd}	4.56 ± 0.57 ^{abcd}	6.12 ± 1.24 ^{abcd}	7.82 ± 0.60 ^{abcd}

注: 与空白组比, ^a*P* < 0.05; 与模型组比, ^b*P* < 0.05; 与 OST 低剂量组比, ^c*P* < 0.05; 与 OST 中剂量组比, ^d*P* < 0.05。

2.2 各组大鼠IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10水平比较

与空白组比, 模型组IL-4、IL-10水平降低, IFN- γ 、TNF- α 水平升高 (*P* < 0.05); 与模型组比, OST各剂量组IL-4、IL-10水平升

高, IFN- γ 、TNF- α 水平降低 (*P* < 0.05); IL-4、IL-10水平与OST呈剂量依赖性升高, IFN- γ 、TNF- α 水平与OST呈剂量依赖性降低 (*P* < 0.05)。见表2。

表2 各组大鼠IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、IL-10水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	IL-4/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	IFN- γ / (ng · L ⁻¹)	TNF- α / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-10/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白组	117.34 ± 8.12	43.26 ± 6.78	30.45 ± 6.54	78.21 ± 6.43
模型组	53.47 ± 6.23 ^a	97.64 ± 7.33 ^a	83.16 ± 6.77 ^a	24.31 ± 5.73 ^a
OST 低剂量组	67.12 ± 7.24 ^{ab}	82.45 ± 7.11 ^{ab}	68.31 ± 5.98 ^{ab}	34.46 ± 5.79 ^{ab}
OST 中剂量组	84.66 ± 7.46 ^{abc}	67.81 ± 7.43 ^{abc}	57.74 ± 5.64 ^{abc}	52.24 ± 6.37 ^{abc}
OST 高剂量组	102.94 ± 8.65 ^{abcd}	56.49 ± 6.91 ^{abcd}	41.37 ± 6.12 ^{abcd}	64.89 ± 6.78 ^{abcd}

注: 与空白组比, ^a*P* < 0.05; 与模型组比, ^b*P* < 0.05; 与 OST 低剂量组比, ^c*P* < 0.05; 与 OST 中剂量组比, ^d*P* < 0.05。

2.3 各组大鼠脏器指数比较

与空白组比, 模型组卵巢指数和子宫指数降低 (*P* < 0.05); 与模型组比, OST各剂量组卵巢

指数和子宫指数升高 (*P* < 0.05); 卵巢指数和子宫指数与OST呈剂量依赖性升高 (*P* < 0.05)。见表3。

表3 各组大鼠脏器指数比较 ($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	卵巢指数 /%	子宫指数 /%
空白组	71.25 ± 4.52	246.79 ± 23.62
模型组	42.15 ± 3.26 ^a	165.68 ± 19.54 ^a
OST 低剂量组	49.96 ± 3.63 ^{ab}	186.91 ± 18.42 ^{ab}
OST 中剂量组	57.18 ± 3.37 ^{abc}	203.48 ± 20.29 ^{abc}
OST 高剂量组	64.57 ± 4.28 ^{abcd}	221.75 ± 22.83 ^{abcd}

注: 与空白组比, ^a*P* < 0.05; 与模型组比, ^b*P* < 0.05; 与 OST 低剂量组比, ^c*P* < 0.05; 与 OST 中剂量组比, ^d*P* < 0.05。

2.4 各组大鼠卵巢组织形态学比较

空白组大鼠卵巢可见不同发育时期卵泡，黄体丰富，卵泡颗粒细胞层多、发育良好、紧凑有序，闭锁卵泡少；模型组大鼠卵巢组织卵泡数减少，卵泡颗粒细胞层减少且排列疏松，闭锁卵泡和

萎缩黄体增多，见大量炎性细胞浸润；OST各剂量组卵巢组织结构较清晰，可见各级卵泡，颗粒细胞层较模型组增多，黄体数目增多，闭锁卵泡减少，见少量炎性细胞浸润。卵巢组织改善情况随OST剂量呈增加趋势。见图1。

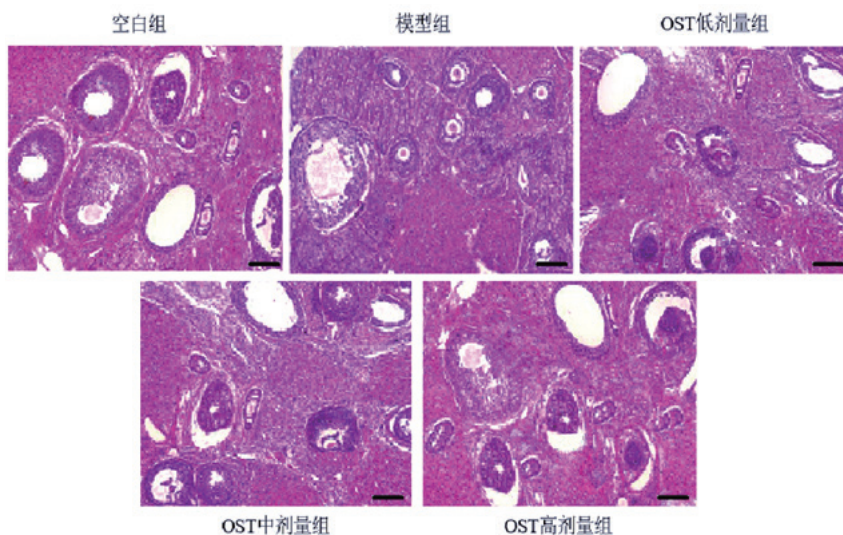


图1 卵巢组织学观察 (HE × 100, 标尺 = 50 μm)

2.5 卵巢组织SOD、MDA、CAT比较

与空白组比，模型组大鼠卵巢组织中SOD、CAT水平降低，MDA水平升高 ($P < 0.05$)；与模型组比，OST各剂量组大鼠卵巢组织中SOD、CAT

水平升高，MDA水平降低 ($P < 0.05$)；SOD、CAT水平与OST呈剂量依赖性升高，MDA水平与OST呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$)。见表4。

表4 各组大鼠卵巢组织 SOD、MDA、CAT 比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD/ (U · mg ⁻¹)	MDA/ (U · mg ⁻¹)	CAT/ (g · L ⁻¹)
空白组	96.21 ± 7.29	3.41 ± 0.47	6.45 ± 0.41
模型组	54.47 ± 6.87 ^a	7.63 ± 0.81 ^a	2.74 ± 0.46 ^a
OST 低剂量组	65.34 ± 5.12 ^{ab}	6.73 ± 0.71 ^{ab}	3.54 ± 0.39 ^{ab}
OST 中剂量组	76.23 ± 7.31 ^{abc}	5.44 ± 0.49 ^{abc}	4.23 ± 0.36 ^{abc}
OST 高剂量组	87.64 ± 6.93 ^{abcd}	4.62 ± 0.46 ^{abcd}	5.39 ± 0.51 ^{abcd}

注：与空白组比，^a $P < 0.05$ ；与模型组比，^b $P < 0.05$ ；与 OST 低剂量组比，^c $P < 0.05$ ；与 OST 中剂量组比，^d $P < 0.05$ 。

2.6 卵巢组织Nrf2、HO-1、NLRP3蛋白表达量比较

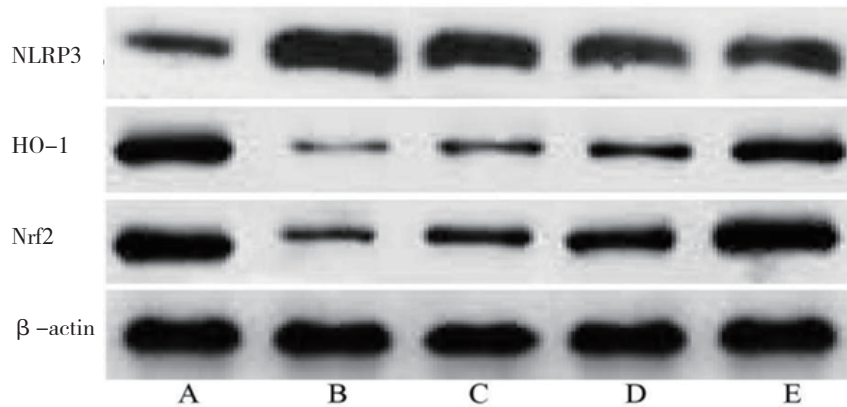
与空白组比，模型组大鼠卵巢组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平降低，NLRP3蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)；与模型组比，OST各剂量组大

鼠卵巢组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平升高，NLRP3蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)；Nrf2、HO-1蛋白表达水平与OST呈剂量依赖性升高，NLRP3蛋白表达水平与OST呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$)，见表5，图2。

表5 卵巢组织Nrf2、HO-1、NLRP3蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Nrf2	HO-1	NLRP3
空白组	0.97 ± 0.09	0.95 ± 0.10	0.72 ± 0.06
模型组	0.43 ± 0.05 ^a	0.31 ± 0.05 ^a	1.24 ± 0.12 ^a
OST 低剂量组	0.54 ± 0.06 ^{ab}	0.47 ± 0.06 ^{ab}	1.12 ± 0.09 ^{ab}
OST 中剂量组	0.67 ± 0.07 ^{abc}	0.68 ± 0.08 ^{abc}	1.01 ± 0.10 ^{abc}
OST 高剂量组	0.82 ± 0.08 ^{abcd}	0.83 ± 0.09 ^{abcd}	0.90 ± 0.09 ^{abcd}

注：与空白组比，^a $P < 0.05$ ；与模型组比，^b $P < 0.05$ ；与 OST 低剂量组比，^c $P < 0.05$ ；与 OST 中剂量组比，^d $P < 0.05$ 。



注：A. 空白组；B. 模型组；C. OST 低剂量组；D. OST 中剂量组；E. OST 高剂量组

图2 卵巢组织 Nrf2、HO-1、NLRP3 蛋白检测

3 讨论

DOR的患病率在患有不育症的妇女占比约为10%，目前存在上升趋势，并逐渐年轻化，给患者的家庭生活带来了挫折和痛苦^[10]。中医学辩证认为DOR病理是肾虚，与冲任、肝、脾功能失调有关。目前西医治疗方法主要为激素补充疗法且存在明显副作用。OST具有抗炎^[11]、抗肿瘤^[12]和抗氧化^[13]等作用，常用于男科、妇科、皮肤科疾病等的治疗。《本草纲目》中记载蛇床子“乃右肾命门、少阳，三焦气分之药”；神农列之为上品，可“暖丈夫阳气，助女人阴气”。因此，本研究建立DOR大鼠模型，深入探讨OST对DOR大鼠卵巢功能的改善作用及其机制。

本研究中，OST各剂量组卵巢指数和子宫指数较模型组升高，HE结果显示卵巢组织中黄体 and 成熟卵泡数升高，提示了OST促进卵泡生长、发育，恢复卵巢储备功能。AMH是预测卵巢储备的重要

标志物，反映卵巢中生长卵泡数量^[14]；E2维持卵泡生长发育，并负反馈调控FSH^[15]；FSH、LH是反映卵巢储备能力的间接指标，FSH/LH失衡预示卵巢储备能力降低^[16]。本研究中OST各剂量组AMH、E2水平升高，FSH、LH水平降低，提示OST可以改善DOR大鼠内分泌紊乱，促进卵泡生长发育及排卵，改善卵巢储备能力。炎症和氧化应激损伤是改变卵巢储备功能的重要因素。持续的炎症反应加速卵巢衰老，TNF- α 和IFN- γ 是促炎细胞因子，抑制雌激素合成分泌^[17]、破坏卵泡微环境。IL-10和IL-4是抗炎细胞因子，限制炎症对卵巢组织的破坏^[18]。有研究表明氧自由基增多，会影响卵母细胞的生长发育，导致卵泡闭锁，卵巢内氧化应激压力上升促使卵巢衰老^[19]，增加卵泡凋亡，致使女性生育力下降^[20]。MDA是评估氧化应激损伤的重要指标，反映了脂质过氧化反应的程度^[21]。SOD在生物体内催化超氧阴离子(O₂⁻)生成氧和过氧化

氢, CAT在生物体内催化过氧化氢还原成水, SOD和CAT在机体氧化平衡中有至关重要的作用^[22]。本研究中OST各剂量组IL-10和IL-4水平、SOD和CAT活性升高, TNF- α 、IFN- γ 和MDA水平降低, 提示OST可以减少炎症因子释放, 减轻卵巢组织过氧化, 改善炎症反应, 降低氧化应激损伤, 促进卵巢储备功能恢复。

Nrf2信号通路的激活不仅调控机体氧化还原反应, 也调控炎症反应, 其活化是细胞的主要防御机制之一^[23]。研究证明, HO-1作为Nrf2的下游抗氧化靶因子, 通过调节免疫和炎症反应减轻组织和器官的损伤^[24]。NLRP3作为Nrf2/HO-1信号通路下游因子可促进促炎细胞因子的分泌, 加剧细胞损伤^[25]。有研究表明调节Nrf2/HO-1蛋白及mRNA含量可以改善卵巢功能损伤, 恢复大鼠的卵巢功能^[6]。本研究中OST各剂量组卵巢组织中Nrf2、HO-1蛋白表达水平升高, NLRP3蛋白表达水平降低, 提示了OST可能是通过调控Nrf2/HO-1/NLRP3信号通路蛋白水平减轻DOR大鼠的炎症反应和氧化应激损伤。

综上所述, OST可减轻DOR大鼠炎症反应和氧化应激损伤, 改善内分泌紊乱, 促进卵泡正常生长发育, 恢复卵巢储备功能, 其作用机制可能与调控Nrf2/HO-1/NLRP3信号通路有关, 为临床治疗DOR提供理论支持。

参考文献:

- [1] Pereira N. Laparoscopic Ovarian Surgery to Induce Follicular Response in Patients with Premature Ovarian Insufficiency, Diminished Ovarian Reserve, or Resistant Ovary Syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2020, 114 (6): 1197.
- [2] 叶晨书, 沈明霞. 卵巢储备功能下降的病因与治疗研究[J]. *医学信息*, 2021, 34 (10): 47-49.
- [3] 黄韵, 罗鸣, 王瑛, 等. 蛇床子植物学相关研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2020, 28 (6): 644-650.
- [4] 贾丽娜, 康学智, 李亚明, 等. 蛇床子素上调PPAR γ 表达改善多囊卵巢大鼠卵巢功能[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31 (2): 69-73.
- [5] 汪倩, 卢鸽, 李红晓, 等. 基于Nrf2/HO-1信号通路探讨艾灸对卵巢储备功能减退大鼠的炎症调控机制[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44 (3): 280-288.
- [6] Chen J, Lu XS, Lv JQ, et al. Expression and Localization of Nrf2 Protein in Ovary of Mice of Different Ages[J]. *MCHCC*, 2017, 32 (22): 5722-5724.
- [7] Zhu S, Wang Y, Chang X, et al. The Protective Effect of Pre-moxibustion on Reproductive Hormones Profile of Rats with Tripterygium Glycosides-Induced Ovarian Damage[J]. *Complement Med Res*, 2020, 27 (6): 1-9.
- [8] 孙玉英, 陈淑萍, 谈勇. 滋阴补阳序贯法联合西药对卵巢储备功能下降排卵障碍性不孕大鼠TGF- β 1/Smads信号通路的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43 (10): 1068-1074.
- [9] 卢晓声, 吴昊, 习海涛, 等. 蛇床子素对卵巢组织氧化应激损伤的作用[J]. *中国现代医生*, 2020, 58 (16): 35-39.
- [10] Demir M, Senem ZY. The Effect of Growth Hormone Adjuvant Therapy on Assisted Reproductive Technologies Outcomes in Patients with Diminished Ovarian Reserve or Poor Ovarian Response[J]. *J Gynecol Obstet Hum*, 2020, 50 (2): 101982.
- [11] Yang Q, Kong L, Huang W, et al. Osthole Attenuates Ovalbumin-Induced Lung Inflammation via the Inhibition of IL-33/ST2 Signaling in Asthmatic Mice[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46 (4): 1389-1398.
- [12] Bae H, Lee J, Song J, et al. Osthole Interacts with an ER-Mitochondria Axis and Facilitates Tumor Suppression in Ovarian Cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 236 (2): 1025-1042.
- [13] Singh L, Kaur A, Garg S, et al. Skimmetin/Osthole Mitigates Pain-Depression Dyad via Inhibiting Inflammatory and Oxidative Stress-Mediated Neurotransmitter Dysregulation[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36 (1): 111-121.
- [14] Liu XH, Wu XH, Yang S. Changes and Correlations of Anti-Müllerian Hormone and Stem-Cell Factors in Different Ovarian Reserve Patients During GnRH-Antagonist Protocol and the Effects on Controlled Ovarian Hyperstimulation Outcomes[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 300 (6): 1773-1783.
- [15] Haltia UM, Pihlajoki M, Andersson N, et al. Functional Profiling of FSH and Estradiol in Ovarian Granulosa Cell Tumors[J]. *J Endo Soc*, 2020, 4 (4): 34.
- [16] 周洪梅, 董金菊, 马梦玲. AMH联合E2、FSH/LH检测对不孕症患者卵巢储备功能及反应性的评估作用[J]. *中国性科学*, 2020, 29 (8): 71-75.

- [17] Kim GA, Lee Y, Kim HJ, et al. Intravenous Human Endothelial Progenitor Cell Administration into Aged Mice Enhances Embryo Development and Oocyte Quality by Reducing Inflammation, Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis[J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80 (12) : 1905–1913.
- [18] Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, et al. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review[J]. *Inflammation*, 2016, 40 (1) : 1–10.
- [19] 何欣, 王彤, 马延敏. 氧化应激对女性生殖系统的损伤作用[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25 (6) : 1–2, 104.
- [20] 梁程程, 杨红, 齐聪, 等. 氧化应激对卵巢储备功能下降的影响及中西医抗氧化治疗研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41 (7) : 885–889.
- [21] Deba Z, Jambale TA, Swamy P, et al. Study of Levels of Malondialdehyde, Super Oxide Dismutase and HsCrp in Serum of Non-Obese Patients with Polycystic Ovarian Syndrome[J]. *Int J ClinBiochem and Res*, 2017, 4 (2) : 191–194.
- [22] Chandra AS, Shanmugapandiyan P. Cardioprotective Efficacy of Tridax Procumbens Methanolic Extract in Doxorubicin Induced Oxidative Cardiac Damage[J]. *Res J Phar Technol*, 2020, 13 (1) : 110–113.
- [23] Akino N, Wada-Hiraike O, Isono W, et al. Activation of Nrf2/Keap1 Pathway by Oral Dimethylfumarate Administration Alleviates Oxidative Stress and Age-Associated Infertility Might Be Delayed in the Mouse Ovary[J]. *Reprod Bio Endocrinol*, 2019, 17 (1) : 23.
- [24] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 System in Development, Oxidative Stress Response and Diseases: An Evolutionarily Conserved Mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73 (17) : 3221–3247.
- [25] Bian H, Wang G, Huang J, et al. Dihydrolipoic Acid Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Behavioral Deficits and Neuroinflammation via Regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 Signaling in Rat[J]. *J Neuroinflamm*, 2020, 17 (1) : 166.

(收稿日期 2021年12月15日 编辑 邹宇玲)