

梓醇调节 Hedgehog 通路对早发性卵巢功能不全大鼠的卵巢保护作用

丁 怡¹, 于 潇¹, 江 银^{1*}, 王玉超¹, 张 芳², 徐丁洁³

1. 山东中医药大学附属医院 妇科, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学 医学院, 山东 济南 250399

3. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 探究梓醇调节 Hedgehog 通路对早发性卵巢功能不全 (POI) 大鼠的卵巢保护作用。方法 将大鼠随机分为对照组, 模型组, 梓醇低、高剂量 (30、60 mg·kg⁻¹) 组, 梓醇 (60 mg·kg⁻¹) + GANT-61 (40 mg·kg⁻¹, Hedgehog 通路抑制剂) 组, 除对照组外, 每天ig 1次 50 mg·kg⁻¹ 的雷公藤多苷混悬液, 连续 14 d, 制备 POI 模型, 模型成功后每天 ip 给药 1 次, 连续给药 4 周。取卵巢组织计算大鼠卵巢指数; ELISA 测定血清激素雌二醇 (E₂)、黄体生成素 (LH) 和卵泡刺激素 (FSH) 水平; 试剂盒检测卵巢组织中活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (CAT) 水平; HE 染色观察卵巢组织结构并进行卵泡计数; TUNEL 检测卵巢组织细胞凋亡情况; Western blotting 检测卵巢组织 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、Shh、Gli1 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠卵巢组织形态明显损伤, 卵巢指数、血清 E₂ 水平、卵巢组织中 SOD 和 CAT 水平、生长卵泡数量、Bcl-2、Shh、Gli1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 血清 FSH 和 LH 水平、卵巢组织中 ROS 和 MDA 水平、闭锁卵泡数量、细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 梓醇 30、60 mg·kg⁻¹ 组大鼠卵巢组织形态损伤明显减轻, 卵巢指数、血清 E₂ 水平、卵巢组织中 SOD 和 CAT 水平、生长卵泡数量、Bcl-2、Shh、Gli1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 血清 FSH 和 LH 水平、卵巢组织中 ROS 和 MDA 水平、闭锁卵泡数量、细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); GANT-61 可减轻梓醇对 POI 大鼠卵巢的保护作用 ($P < 0.05$)。结论 梓醇可降低 POI 大鼠卵巢组织氧化应激、细胞凋亡, 调控血清激素水平, 进而改善卵巢功能, 可能是通过激活 Hedgehog 通路实现的。

关键词: 梓醇; Hedgehog 通路; 早发性卵巢功能不全; 雌二醇; 黄体生成素; 卵泡刺激素

中图分类号: 285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 09-2041-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.011

Ovarian protective effect of catalpol on premature ovarian insufficiency rats by regulating Hedgehog pathway

DING Yi¹, YU Xiao¹, JIANG Yin¹, WANG Yuchao¹, ZHANG Fang², XU Dingjie³

1. Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. School of Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250399, China

3. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: **Objective** To investigate the ovarian protective effect of catalpol on premature ovarian insufficiency (POI) rats by regulating the Hedgehog pathway. **Methods** Rats were randomly grouped into control group, model group, catalpol low and high dose (30 and 60 mg·kg⁻¹) group, and catalpol (60 mg·kg⁻¹) + GANT-61 (Hedgehog pathway inhibitor, 40 mg·kg⁻¹) group. Except for the control group, a 50 mg·kg⁻¹ suspension of *Tripterygium* glycosides was administered orally once a day for 14 consecutive days to prepare a POI model. After the model was successful, it was administered via ip once a day for four consecutive weeks. The wet weight and ovarian index of rat ovaries were calculated. ELISA was applied to measure serum hormones estradiol (E₂), luteinizing hormone (LH), and follicle stimulating hormone (FSH). The reagent kits were applied to detect reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (CAT) in ovarian tissue. HE staining was applied to observe

收稿日期: 2024-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174212、82104917); 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2022QH075)

第一作者: 丁 怡 (1982—), 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为中医妇科学月经病及内分泌的研究。E-mail: hakunamatta0221@163.com

*通信作者: 江 银 (1986—), 女, 研究生, 主治医师, 研究方向为月经病与不孕症的研究。E-mail: 18678880370@163.com

ovarian tissue structure and perform follicle counting. TUNEL was applied to detect apoptosis in ovarian tissue cells. Western blotting was applied to detect the expression of Cleaved caspase-3, Bax, Bcl-2, Shh, and Gli1 proteins in ovarian tissue. **Results** Compared with the control group, the ovarian tissue morphology of rats in the model group was obviously damaged, the ovarian index, serum E_2 level, SOD and CAT levels in ovarian tissue, number of growing follicles, and Bcl-2, Shh, and Gli1 protein expression levels were obviously reduced ($P < 0.05$), the serum FSH and LH levels, ROS and MDA levels in ovarian tissue, number of atresia follicles, cell apoptosis rate, and Cleaved caspase-3 and Bax protein expression levels were obviously increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the morphological damage of ovarian tissue of rats in the catalpol groups was obviously reduced, the ovarian index, serum E_2 level, SOD and CAT levels in ovarian tissue, number of growing follicles, and Bcl-2, Shh, and Gli1 protein expression levels were obviously increased ($P < 0.05$), the serum FSH and LH levels, ROS and MDA levels in ovarian tissue, number of atresia follicles, cell apoptosis rate, and Cleaved caspase-3 and Bax protein expression levels were obviously reduced ($P < 0.05$). GANT-61 was able to alleviate the protective effect of catalpol on the ovaries of POI rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Catalpol can reduce oxidative stress and cell apoptosis in ovarian tissue of POI rats, regulate serum hormone level, and thereby improve ovarian function, which is possibly achieved by activating the Hedgehog pathway.

Key words: catalpol; Hedgehog pathway; premature ovarian insufficiency; estradiol; luteinizing hormone; follicle stimulating hormone

早发性卵巢功能不全(POI)是指40岁之前的妇女卵巢功能衰退,临床主要表现为月经稀发、闭经、不孕、性欲低下、血管舒缩障碍等^[1]。在环境污染加剧、高压和快节奏的生活影响下,POI的发病率呈逐年上升趋势,且趋于年轻化^[2]。POI治疗不及时可引起一系列代谢性疾病,加速各种老年病的出现,严重影响女性心理和身体健康。目前针对POI治疗西医主要采用激素干预,但副作用较大^[3]。中药因具有不良反应小、治标治本的优势而逐渐被广大医学者研究,大量研究表明中药对POI具有较好的治疗效果,补肾养精颗粒对POI具有一定的治疗效果,可抑制卵巢颗粒细胞凋亡,降低氧化应激,促进卵泡发育,保护卵巢功能^[4-5]。熟地黄补血养阴,填精益髓,为补肾养精颗粒的君药,梓醇是熟地黄中主要活性成分,具有抗炎、抗氧化等药理特性^[6],推测梓醇对治疗POI有一定效果。研究显示Hedgehog通路参与调控POI的发生,激活Hedgehog通路可抑制POI大鼠卵巢颗粒细胞凋亡,改善卵母细胞和颗粒细胞形态^[7]。抑制Hedgehog通路可减少原始卵泡数量,提高氧化应激和卵巢生殖细胞凋亡^[8]。推测Hedgehog通路参与POI的发生发展过程。本研究通过建立POI大鼠模型来探讨梓醇是否可通过调控Hedgehog通路来实现对POI大鼠卵巢的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

200~220 g的雌性SD大鼠60只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证

号SCXK(京)2020-0004。本实验方案经华北理工大学动物实验伦理委员会批准(批准文号LX2021122)。

1.2 主要试剂

梓醇(质量分数 $\geq 98\%$,批号2415-24-9)购自湖北翠园生物科技有限公司;Hedgehog通路抑制剂GANT-61(批号GANT61)购自MCE公司;雷公藤多苷(批号ICP003)购自远大医药黄石飞云制药有限公司;活性氧(ROS,批号A111986)、丙二醛(MDA,批号AS632153)、超氧化物歧化酶(SOD,批号AS632145)和过氧化氢酶(CAT,批号AS632148)试剂盒,雌二醇(E_2)(批号A112402)、卵泡刺激素(FSH)(批号A112412)、黄体生成素(LH)(批号A112020)ELISA试剂盒购自上海抚生实业有限公司;HE染色试剂盒(批号AYS-233081)、TUNEL试剂盒(批号AAT-B22823)、蛋白提取试剂盒(批号QYS-237016)购自上海齐源生物科技有限公司;Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、Shh、Gli1、 β -actin(批号b2302、ab32503、ab32124、ab308225、ab134906、ab5694、ab172730)一抗及二抗均购自英国Abcam公司。

1.3 主要仪器

722N紫外分光光度计购自山东博浩生物科技有限公司;BX53M显微镜购自无锡徕奥精密仪器有限公司;D-ZQP-86病理切片机购自山东莱恩德智能科技有限公司;YP-96酶标仪购自山东优云谱光电科技有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

取50只大鼠建立POI模型,每天ig 1次50 mg·kg⁻¹的雷公藤多苷混悬液,连续14 d,造模成功标志:大鼠动情周期紊乱^[7]。造模成功大鼠共42只,选取其中40只随机分为模型组,梓醇低、高剂量(30、60 mg·kg⁻¹)^[9]组,梓醇(60 mg·kg⁻¹)+GANT-61(40 mg·kg⁻¹)^[10]组,每组10只,每天ip给药1次,连续4周。剩余10只未造模大鼠作为对照组,每天ip等体积0.9%氯化钠溶液。

2.2 样本采集及卵巢指数计算

给药结束24 h后,对大鼠进行称质量,然后取大鼠腹主动脉血3 mL,保存待测;处死大鼠,取大鼠双侧卵巢组织,去除脂肪部分后称卵巢湿质量,计算卵巢指数,储存卵巢待检。

卵巢指数=卵巢湿质量/体质量

2.3 ELISA发检测血清E₂、FSH和LH水平

将大鼠新鲜血清于离心机中3 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清,按照ELISA试剂盒操作步骤依次加入底物溶液,反应试剂、终止试剂、显色试剂,然后用酶标仪检测吸光度(A)值,根据标准曲线计算各指标水平。

2.4 卵巢组织ROS、MDA、SOD和CAT水平检测

剪取小鼠部分新鲜卵巢组织,匀浆器中低温匀浆,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清,按照试剂盒说明书检测ROS、MDA、SOD和CAT水平。

2.5 HE染色观察卵巢组织形态并对卵泡计数

用4%的多聚甲醛固定大鼠卵巢组织、用乙醇梯度脱水、石蜡包埋后切片,脱蜡后HE染色,透明后封片观察卵巢组织形态并进行卵泡计数。

生长卵泡比例=生长卵泡数量/总卵母细胞数

闭锁卵泡比例=闭锁卵泡数/总卵母细胞数

2.6 TUNEL染色检测卵巢组织细胞凋亡

取“2.5”项多聚甲醛固定卵巢组织,石蜡包埋后切片,脱蜡水化后用蛋白酶K处理,TritonX-100通透后磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,进行TUNEL染色,加入抗荧光猝灭剂,观察细胞凋亡,计算凋亡率。

凋亡率=TUNEL阳性细胞数/总细胞数

2.7 Western blotting 检测大鼠卵巢组织中cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达

称取部分大鼠卵巢组织,加入裂解液冰浴研磨匀浆,提取组织总蛋白并进行定量检测,热水浴后将蛋白变性后进行SDS-PAGE电泳,转移至PVDF

膜上,封闭2 h后添加一抗Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、Shh、Gli1、 β -actin 4 °C孵育过夜,洗涤后加入二抗孵育,ECL显色后,用Image J软件分析蛋白灰度值。

2.8 统计分析

数据分析用Graphpad Prism 8.0.1,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,多组间比较用单因素方差分析,SNK-*q*检验组内两两差异。

3 结果

3.1 梓醇对POI大鼠卵巢指数的影响

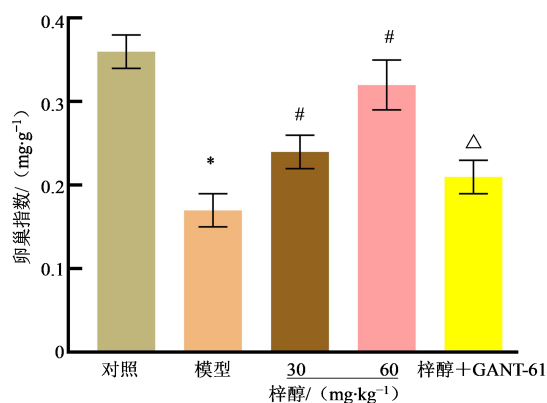
如图1所示,模型组大鼠卵巢指数显著低于对照组($P < 0.05$);梓醇30、60 mg·kg⁻¹组大鼠卵巢指数显著高于模型组($P < 0.05$);梓醇+GANT-61组大鼠卵巢指数显著低于梓醇高剂量组($P < 0.05$)。

3.2 梓醇对POI大鼠血清E₂、FSH和LH水平的影响

模型组大鼠血清E₂水平显著低于对照组,FSH和LH水平显著高于对照组($P < 0.05$);梓醇30、60 mg·kg⁻¹组大鼠血清E₂水平显著高于模型组,FSH和LH水平显著低于模型组($P < 0.05$);梓醇+GANT-61组大鼠血清E₂水平显著低于梓醇高剂量组,FSH和LH水平显著高于梓醇高剂量组($P < 0.05$)。见表1。

3.3 梓醇对POI大鼠卵巢组织中ROS、MDA、SOD、CAT水平的影响

模型组大鼠卵巢组织中SOD和CAT水平显著低于对照组,ROS和MDA水平显著高于对照



与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$;与梓醇60 mg·kg⁻¹组: Δ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs catalpol 60 mg·kg⁻¹ group.

图1 梓醇对POI大鼠卵巢指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of catalpol on ovarian index of POI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

表1 梓醇对POI大鼠血清E₂、FSH和LH水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 1 Effects of catalpol on serum E₂, FSH, and LH levels in POI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	E ₂ /(nmol·L ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/(IU·L ⁻¹)
对照	—	25.61±2.78	16.37±1.82	6.23±0.72
模型	—	9.82±1.04*	33.24±3.16*	15.68±1.43*
梓醇	30	14.36±1.59 [#]	27.49±2.54 [#]	12.56±1.38 [#]
	60	20.47±2.26 [#]	21.73±2.31 [#]	8.94±0.87 [#]
梓醇+GANT-61	60+40	12.94±1.67 [△]	29.62±3.27 [△]	13.41±1.29 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与梓醇 60 mg·kg⁻¹ 组: [△] $P<0.05$ 。* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs catalpol 60 mg·kg⁻¹ group.

组($P<0.05$);梓醇 30、60 mg·kg⁻¹组大鼠卵巢组织中SOD和CAT水平显著高于模型组,ROS和MDA水平显著低于模型组($P<0.05$);梓醇+GANT-61组大鼠卵巢组织中SOD和CAT水平显著低于梓醇高剂量组,ROS和MDA水平显著高于梓醇高剂量组($P<0.05$)。见表2。

3.4 梓醇对POI大鼠卵巢组织形态和卵泡的影响

如图2所示,对照组大鼠卵巢组织结构完整;模型组大鼠卵巢组织明显萎缩、体积变小,黄体 and 生长卵泡数量明显减少、闭锁卵泡数量增多,颗粒细胞数量减少;梓醇 30、60 mg·kg⁻¹组大鼠卵巢组织形态有明显改善;与梓醇高剂量组相比,梓醇+GANT-61组大鼠卵巢组织损伤程度明显加重。

如图3所示,模型组大鼠卵巢组织中生长卵泡数量显著低于对照组,闭锁卵泡数量显著高于对照

组($P<0.05$);梓醇 30、60 mg·kg⁻¹组大鼠卵巢组织中生长卵泡数量显著高于模型组,闭锁卵泡数量显著低于模型组($P<0.05$);梓醇+GANT-61组大鼠卵巢组织中生长卵泡数量显著低于梓醇高剂量组,闭锁卵泡数量显著高于梓醇高剂量组($P<0.05$)。

3.5 梓醇对POI大鼠卵巢组织细胞凋亡的影响

模型组大鼠卵巢组织细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$);梓醇 30、60 mg·kg⁻¹组大鼠卵巢组织细胞凋亡率显著低于模型组($P<0.05$);梓醇+GANT-61组大鼠卵巢组织细胞凋亡率显著高于梓醇高剂量组($P<0.05$)。结果见图4、5。

3.6 梓醇对POI大鼠卵巢组织中cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达的影响

如图6、7所示,模型组大鼠卵巢组织中Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达水平显著低于对照组,cleaved

表2 梓醇对POI大鼠卵巢组织中ROS、MDA、SOD和CAT水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 2 Effects of catalpol on ROS, MDA, SOD, and CAT levels in ovarian tissues of POI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ROS/%	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
对照	—	93.58±11.62	2.14±0.32	146.74±16.83	94.27±11.58
模型	—	227.46±24.38*	8.63±1.07*	52.28±6.49*	22.39±3.16*
梓醇	30	186.23±17.54 [#]	6.48±0.76 [#]	83.57±10.26 [#]	46.53±5.92 [#]
	60	138.14±14.76 [#]	3.87±0.54 [#]	114.16±13.72 [#]	68.78±8.34 [#]
梓醇+GANT-61	60+40	192.75±21.49 [△]	6.82±0.83 [△]	75.34±9.68 [△]	41.62±5.57 [△]

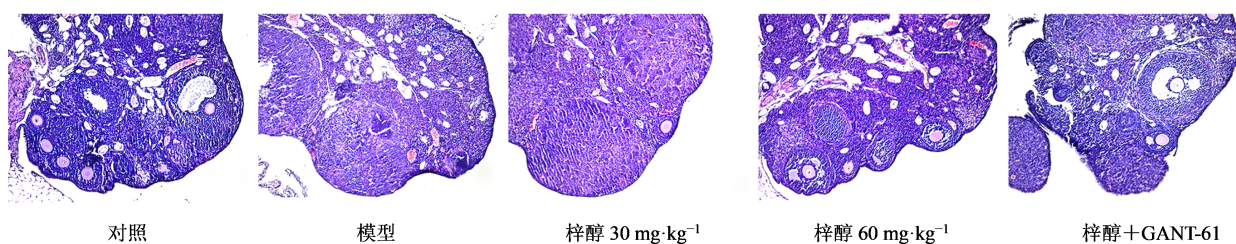
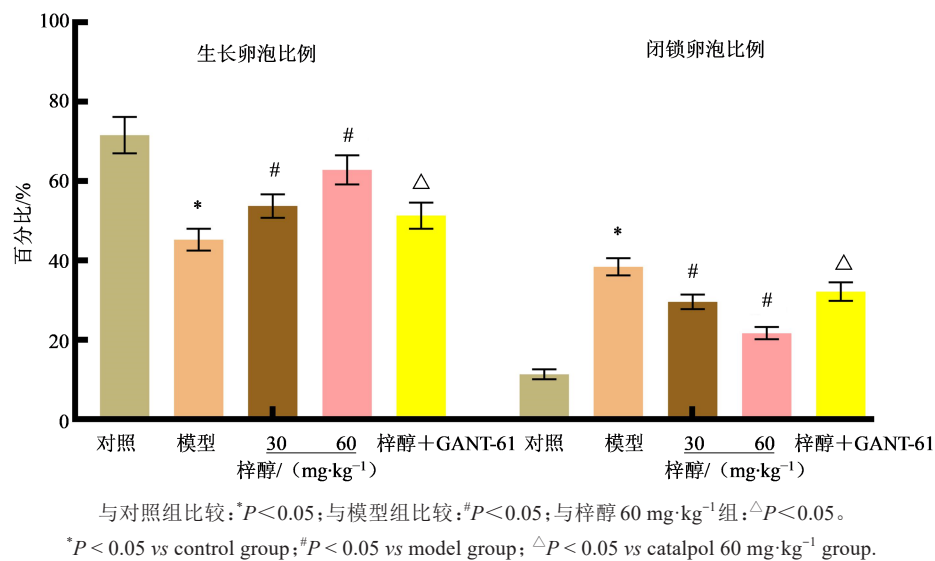
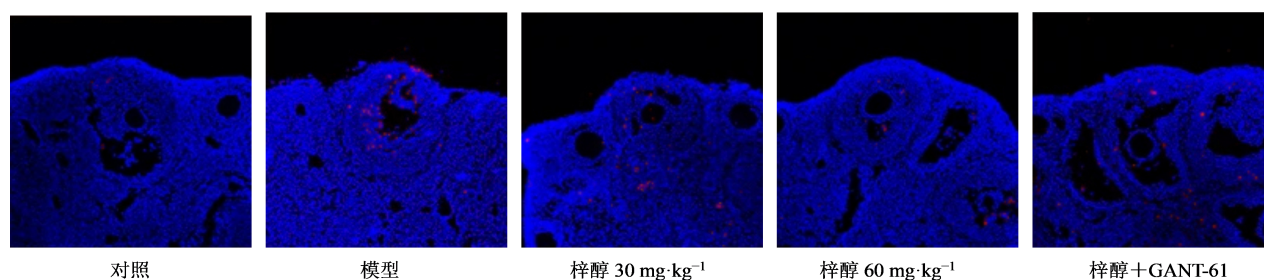
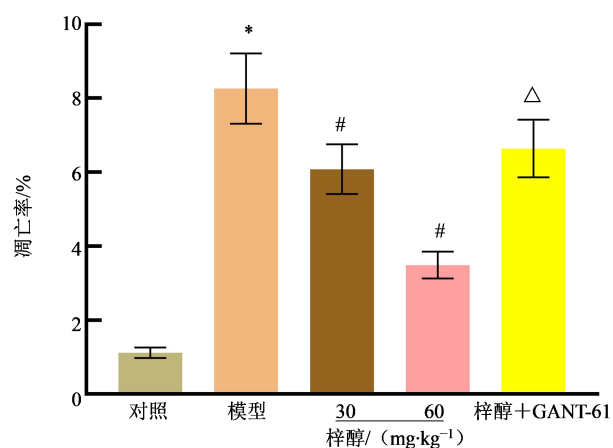
与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与梓醇 60 mg·kg⁻¹ 组: [△] $P<0.05$ 。* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs catalpol 60 mg·kg⁻¹ group.

图2 HE染色观察各组大鼠卵巢组织病理变化(×100)

Fig. 2 HE staining observation of pathological changes in ovarian tissue of rats in each group (×100)

图3 梓醇对POI大鼠生长卵泡和闭锁卵泡比例的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 3 Effect of catalpol on proportion of growing follicles and blocked follicles in POI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)图4 TUNEL染色检测卵巢组织细胞凋亡($\times 200$)Fig. 4 TUNEL staining for detecting apoptosis of ovarian tissue cells ($\times 200$)

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与梓醇 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组: $\Delta P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs catalpol 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group.

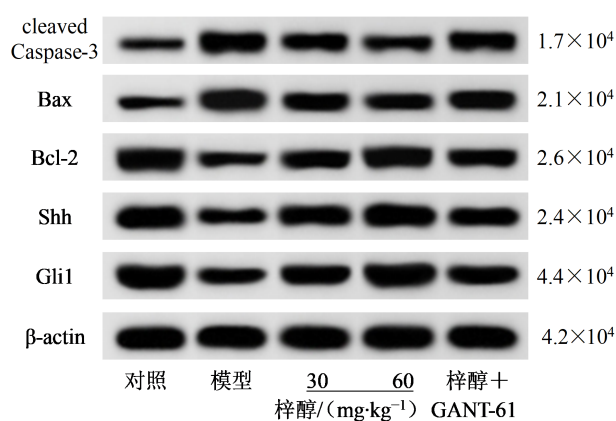
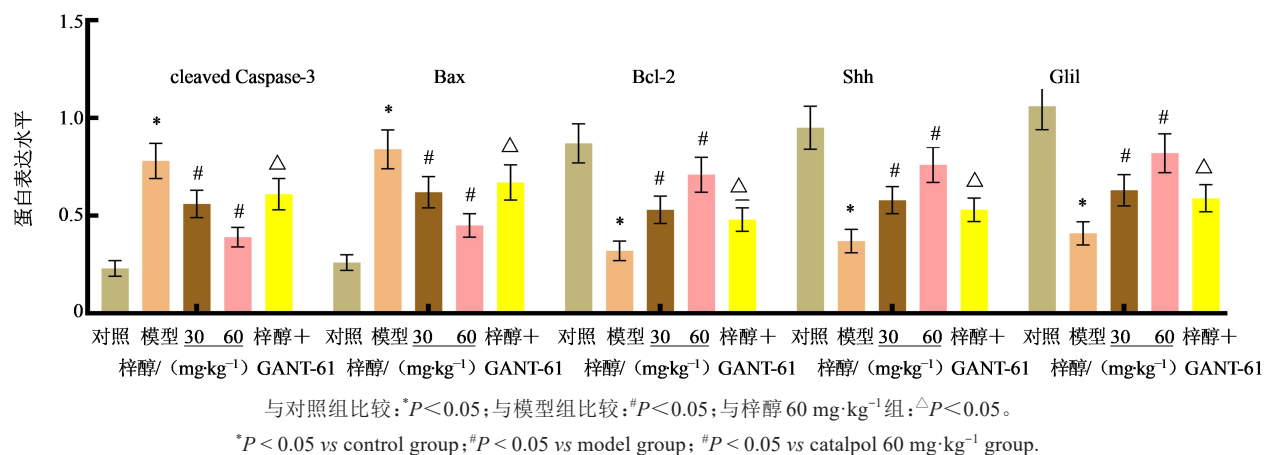
图5 梓醇对POI大鼠卵巢组织细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 5 Effect of Zichun on apoptosis of ovarian tissue cells in POI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

图6 各组大鼠卵巢组织相关蛋白表达

Fig. 6 Expression of ovarian tissue related proteins in each group of rats

Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); 梓醇 30、60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠卵巢组织中 Bcl-2、Shh、Gli1 蛋白表达水平显著高于模型组, cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著低于模

图7 各组大鼠卵巢组织 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、Shh、Gli1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)Fig. 7 Comparison of expression of cleaved Caspase-3, Bax, Bcl-2, Shh, and Gli1 proteins in ovarian tissues of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

型组($P < 0.05$);梓醇+GANT-61组大鼠卵巢组织中Bcl-2、Shh、Gli1蛋白表达水平显著低于梓醇高剂量组,Cleaved caspase-3和Bax蛋白表达水平显著高于梓醇高剂量组($P < 0.05$)。

4 讨论

POI是一种育龄期女性卵巢早衰的生殖健康类妇科疾病,调查显示,POI发病率为1%~2%^[11]。有研究显示POI的主要发病机制为卵泡功能障碍和卵泡衰竭,但POI的具体发病机制尚未完全清楚^[12]。目前尚无有效的手段可治愈POI患者,化学药主要是通过激素补充治疗来改善雌激素缺乏,但不能从根本上改善卵巢功能,停药易复发,且不良反应较大,还有引起血栓、癌症等疾病的风险^[13]。中医药因其独特的疗效和优势逐渐成为医学工作者研究重点,研究显示中药可对POI具有很好的治疗效果,补肾养精颗粒是由多种中药组成的中药方剂,研究显示其对POI具有很好的治疗效果^[14-15]。而梓醇是中药方剂补肾养精颗粒的君药的成分,推测梓醇可能对POI也有一定疗效。

血清FSH、 E_2 、LH水平可反映体内激素水平情况,卵巢功能不全患者主要表现为FSH水平升高和 E_2 水平降低,促性腺激素LH可与FSH共同作用促进卵泡成熟、分泌雌激素、排卵等,卵巢功能降低时 E_2 合成受阻,促进FSH和LH水平升高,进而影响卵巢分泌功能及生殖功能^[16]。本研究结果显示POI大鼠血清FSH和LH水平显著升高, E_2 水平显著降低,表明POI引起大鼠激素水平紊乱,梓醇治疗后可显著改善激素水平失调,且梓醇高剂量组优于低剂量组。POI发病机制复杂,而氧化应激是其致病机制

之一,研究显示氧化应激可抑制卵母细胞的核和细胞质成熟,并引起细胞凋亡,进一步引起卵巢功能衰竭,进而诱发POI。氧化应激主要是体内产生大量ROS,对组织造成氧化损伤,造成细胞死亡和组织器官功能丧失;MDA是氧化代谢产物,是氧化损伤程度的标志;SOD和CAT是为过氧化物酶,可清除ROS,降低体内ROS水平,进而减轻氧化损伤^[17]。本研究结果显示,POI大鼠卵巢组织中ROS和MDA水平显著升高,SOD和CAT水平显著降低,POI引起大鼠氧化损伤。梓醇干预后可显著提高抗氧化能力,降低氧化损伤。POI发病的直接病因是卵母细胞和颗粒细胞大量凋亡,cleaved Caspase-3和Bax蛋白属于促凋亡蛋白,通过激活凋亡通路,促进细胞凋亡;Bcl-2为抗凋亡蛋白,可抑制细胞凋亡^[18]。本研究结果显示,梓醇可通过调控相关凋亡蛋白表达来降低细胞凋亡,通过卵巢组织细胞凋亡实验进一步证实该结果。POI的发病机制与卵泡数量和功能有关,卵泡数量降低和功能障碍可诱发POI。本研究通过HE染色发现,梓醇干预后可显著提高生长卵泡数量,降低卵巢组织损伤,改善卵巢功能。提示梓醇可调控血清激素水平,降低POI大鼠卵巢组织氧化应激、细胞凋亡和组织损伤,改善卵巢功能。

Hedgehog通路是一条具有调控作用的高度保守的信号通路,该通路被激活后,Shh可促使Smo与Ptch1发生解离,而游离的Smo可激活其下游Gli1因子,发挥其生物学调控作用^[19]。Jiang等^[19]研究显示激活Hedgehog通路可降低氧化应激和炎症,改善卵巢早衰大鼠卵巢功能和雌性生殖干细胞的增殖

能力。Fan等^[20]研究显示激活Hedgehog通路可改善POI大鼠卵巢早衰和骨质疏松。本研究结果显示,POI大鼠卵巢组织中Shh、Gli1蛋白表达水平显著降低,Hedgehog通路被抑制。梓醇干预后可显著提高Shh、Gli1蛋白表达水平,激活Hedgehog通路。为进一步验证梓醇的作用靶点,本研究在梓醇治疗的基础上用Hedgehog通路抑制剂GANT-61进行干预,结果显示GANT-61可减轻梓醇对POI大鼠卵巢的改善作用。

梓醇可能是通过激活Hedgehog通路来调控血清激素水平,降低POI大鼠卵巢组织氧化应激、细胞凋亡和卵巢组织损伤,改善卵巢功能。POI发生机制复杂,中药成分在动物体内作用靶点不唯一,后续还需探究其他通路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Guo X, Zhu Y, Guo L, et al. BCAA insufficiency leads to premature ovarian insufficiency via ceramide-induced elevation of ROS [J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15(4): e17450-e17459.
- [1] Guo X, Zhu Y M, Guo L, et al. BCAA insufficiency leads to premature ovarian insufficiency via ceramide-induced elevation of ROS [J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15(4): e17450.
- [2] Chen Y, Zhao Y, Miao C Y, et al. Quercetin alleviates cyclophosphamide-induced premature ovarian insufficiency in mice by reducing mitochondrial oxidative stress and pyroptosis in granulosa cells [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 138.
- [3] Shekari S, Stankovic S, Gardner E J, et al. Penetrance of pathogenic genetic variants associated with premature ovarian insufficiency [J]. *Nat Med*, 2023, 29(7): 1692-1699.
- [4] 张兵, 王丽, 左瑾楠, 等. 补肾养精颗粒调控HIF-1 α /VEGF信号通路干预早发性卵巢功能不全模型大鼠的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(9): 4148-4153.
Zhang B, Wang L, Zuo J N, et al. Mechanism of Bushen Yangjing Granules on HIF-1 α /VEGF signaling pathway in premature ovarian insufficiency model rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(9): 4148-4153.
- [5] 张芳, 丁怡, 于潇, 等. 补肾养精颗粒调控早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢颗粒细胞凋亡机制研究[J]. *山东中医药大学学报*, 2022, 46(3): 365-372, 378.
Zhang F, Ding Y, Yu X, et al. Mechanism of Bushen Yangjing Granule(补肾养精颗粒) in regulating apoptosis of ovarian granulosa cell in model rats with premature ovarian insufficiency [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2022, 46(3): 365-372, 378.
- [6] 郑伟, 张芳, 张若乾, 等. 补肾养精颗粒对卵巢储备功能减退不孕患者周期性预处理的疗效[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(22): 3540-3544.
Zheng W, Zhang F, Zhang R Q, et al. Effect of Bushen Yangjing Granule periodic pretreatment on infertility patients with diminished ovarian reserve [J]. *J Pract Med*, 2019, 35(22): 3540-3544.
- [7] 于潇, 王玉超, 刘金星, 等. 补肾养精颗粒灌胃对早发性卵巢功能不全大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的抑制作用及其机制[J]. *山东医药*, 2022, 62(26): 12-16.
Yu X, Wang Y C, Liu J X, et al. Inhibitory effect of Bushen Yangjing Granule on apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with premature ovarian insufficiency and its mechanism [J]. *Shandong Med J*, 2022, 62(26): 12-16.
- [8] Jiang Y, Zhu D T, Liu W F, et al. Hedgehog pathway inhibition causes primary follicle atresia and decreases female germline stem cell proliferation capacity or stemness [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 198.
- [9] 黄睿, 卓惠勇, 郑佑相, 等. 梓醇对大鼠急性脊髓损伤的神经保护作用及其机制研究[J]. *海峡药学*, 2023, 35(3): 1-5.
Huang R, Zhuo H Y, Zheng Y X, et al. Neuroprotective effect of catalpol on acute spinal cord injury in rats and its mechanism [J]. *Strait Pharm J*, 2023, 35(3): 1-5.
- [10] Li L L, Gan H. Intact fibroblast growth factor 23 regulates chronic kidney disease-induced myocardial fibrosis by activating the sonic hedgehog signaling pathway [J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(18): e026365.
- [11] Evangelinakis N, Geladari E V, Geladari C V, et al. The influence of environmental factors on premature ovarian insufficiency and ovarian aging [J]. *Maturitas*, 2024, 179: 107871.
- [12] Wang Y X, Jiang J Q, Zhang J L, et al. Research progress on the etiology and treatment of premature ovarian insufficiency [J]. *Biomed Hub*, 2023, 8(1): 97-107.
- [13] Umer A, Khan N, Greene D L, et al. The therapeutic potential of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells for the treatment of premature ovarian failure [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(3): 651-666.
- [14] 张芳, 师伟, 刘震, 等. 基于Rho/ROCK信号通路探讨补肾养精颗粒改善早发性卵巢功能不全模型大鼠卵巢功能的机制[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(5): 2678-2683.
Zhang F, Shi W, Liu Z, et al. Mechanism of Bushen Yangjing Granules in improving ovarian fibrosis in POI model rats based on Rho/ROCK signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(5): 2678-2683.

- [15] 王文静, 刘金星. 补肾养精颗粒调节早发性卵巢功能不全模型大鼠卵泡颗粒细胞凋亡机制研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(1): 87-91.
- Wang W J, Liu J X. Mechanism of Bushen Yangjing Granules in regulating follicular granulosa cell apoptosis of model rats with premature ovarian insufficiency [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2019, 43(1): 87-91.
- [16] 周绵莉, 喻小兰, 施后渊, 等. 二仙汤通过 AMPK/mTOR 通路保护早发性卵巢功能不全小鼠免受氧化应激及凋亡影响 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2022, 8 (12): 4889-4896.
- Zhou M L, Yu X L, Shi H Y, et al. Erxian decoction protects primary ovarian insufficiency mice from oxidative stress and apoptosis via AMPK/mTOR pathway [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 8(12): 4889-4896.
- [17] Lin X Y, Bai D P, Wei Z X, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216711.
- [18] Wang R, Song F X, Li S N, et al. Salvianolic acid A attenuates CCl₄-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 1889-1900.
- [19] Jiang Y, Zhang Z Y, Cha L J, et al. Resveratrol plays a protective role against premature ovarian failure and prompts female germline stem cell survival [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3605.
- [20] Fan W S, Meng Y, Zhang J, et al. To investigate the mechanism of Yiwei Decoction in the treatment of premature ovarian insufficiency-related osteoporosis using transcriptomics, network pharmacology and molecular docking techniques [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 19016.

[责任编辑 兰新新]