

【 实验研究 】

制首乌水提物通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的细胞焦亡改善早发性卵巢功能不全

李锦虹¹, 余杭健², 王皓帆², 林 昶^{3*}, 朱 璨^{2*}

1. 贵州中医药大学 基础中医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 探究制首乌水提物 (PPMAE) 通过调控 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) /消素 D (GSDMD) 信号通路抑制细胞焦亡, 从而改善早发性卵巢功能不全 (POI) 的作用机制。方法 动情周期规律 (卵巢功能正常) 的雌性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、戊酸雌二醇 (EV, 0.18 mg·kg⁻¹, 阳性药) 组和 PPMAE 低、高剂量 (1、4 g·kg⁻¹) [1] 组, 每组 6 只。每天上午, 模型组及各药物组 ig 雷公藤多苷混悬液 (75 mg·kg⁻¹) 诱导 POI 模型, 对照组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液。每天下午则分别 ig 相应药物, 对照组与模型组 ig 0.9% 氯化钠溶液。阴道涂片检测动情周期, 检测卵巢指数; 苏木素-伊红 (HE) 染色与透射电镜分别观察卵泡发育及颗粒细胞超微结构; ELISA 检测血清卵泡刺激素 (FSH)、雌二醇 (E₂) 水平及卵巢组织乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量; 免疫荧光检测卵巢组织 ASC 斑点形成; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 检测卵巢组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 水平; 免疫组织化学染色检测卵巢组织白细胞介素 (IL) -1 β 、IL-18 含量。结果 与模型组比较, PPMAE 能显著改善 POI 大鼠动情周期紊乱、升高卵巢指数 ($P < 0.05$ 、 0.01), 改善卵巢病理损伤, 增加原始卵泡储备并减少闭锁卵泡 ($P < 0.01$ 、 0.001); 显著降低 LDH 释放, 降低血清 FSH 水平, 升高血清 E₂ 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。分子机制显示, PPMAE 可显著抑制 ASC 斑点形成, 下调 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的转录与蛋白表达, 并降低下游分子 IL-1 β 和 IL-18 含量 ($P < 0.05$ 、 0.001)。结论 PPMAE 可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路介导的细胞焦亡, 从而改善 POI。

关键词: 制首乌; 早发性卵巢功能不全; 细胞焦亡; NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路; 白细胞介素

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0022-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.003

Aqueous extract from processed *Polygonum multiflorum* ameliorates premature ovarian insufficiency by inhibiting pyroptosis via NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway

LI Jinhong¹, YU Hangjian², WANG Haofan², LIN Chang³, ZHU Can²

1. College of Basic Chinese Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. College of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objectives This study investigates whether aqueous extract from processed *Polygonum multiflorum* (PPMAE) alleviates premature ovarian insufficiency (POI) by inhibiting pyroptosis via the NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3)/cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1)/gasdermin D (GSDMD) pathway. **Methods** Female SD rats with regular estrous cycles (normal ovarian function) were randomly divided into a control group, a model group, an estradiol valerate (EV, 0.18 mg·kg⁻¹, positive drug) group, and low- and high-dose PPMAE (1 and 4 g·kg⁻¹) groups, with 6 rats in each group. Every morning, the model

收稿日期: 2025-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360952)

作者简介: 李锦虹 (1998—), 女, 硕士研究生, 从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究。E-mail: jh1142423226@163.com

*通信作者: 林 昶, 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理学研究。E-mail: linchang20042007@126.com

朱 璨, 女, 博士, 硕士生导师, 从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究。E-mail: zhucan056@gzy.edu.cn

group and each drug group were ig administered tripterygium glycosides suspension ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) to induce the POI model, while the control group was ig administered an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. Every afternoon, the corresponding drugs were ig administered, and the control group and the model group were ig administered 0.9% sodium chloride solution. Vaginal smears were used to detect estrous cycles, and the ovarian index was measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining and transmission electron microscopy were used to observe follicular development and granulosa cell ultrastructure. ELISA was used to detect serum follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E_2) levels, and lactate dehydrogenase (LDH) release in ovarian tissue. Immunofluorescence was used to detect ASC speck formation in ovarian tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD in ovarian tissue. Immunohistochemistry was used to detect the content of interleukin (IL)- 1β and IL-18 in ovarian tissue. **Results** Compared with the model group, PPMAE significantly improved estrous cycle disorders in POI rats, increased the ovarian index ($P < 0.05, 0.01$), improved ovarian pathological damage, increased the reserve of primordial follicles, and reduced atretic follicles ($P < 0.01, 0.001$); significantly reduced LDH release, decreased serum FSH levels, and increased serum E_2 levels ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Molecular mechanisms showed that PPMAE could significantly inhibit ASC speck formation, down-regulate the transcription and protein expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD, and reduce the content of downstream molecules IL- 1β and IL-18 ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** PPMAE may ameliorate POI by inhibiting pyroptosis through the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway.

Key words: processed *Polygonum multiflorum* Thunb.; premature ovarian insufficiency; pyroptosis; NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway; interleukin

早发性卵巢功能不全 (POI) 指女性 40 岁之前出现卵巢功能衰退, 主要源于卵泡池过早耗竭或卵泡功能受损^[1-2]。临床表现为月经稀发甚至闭经, 血清促卵泡激素 (FSH) 升高、雌二醇 (E_2) 降低。POI 的短期并发症 (如不孕症、围绝经期综合征等) 及远期并发症 (如骨质疏松、心血管疾病、认知功能障碍等) 严重影响了患者身心健康^[3-4]。目前, 常用激素替代疗法缓解 POI 症状, 但其无法恢复卵巢储备功能, 且长期应用可能增加乳腺癌、子宫内膜癌和静脉血栓栓塞的风险^[5]。因此, 探究安全有效的治疗策略至关重要。

中药具有多靶点作用和良好的安全性。中医学认为肾虚为 POI 核心病机, 补肾是主要治疗原则^[6-7]。制首乌为传统补益中药, 具有补肝肾、益精血之功, 常用于治疗衰老相关疾病^[8-9]。研究发现, 制首乌具有雌激素样活性^[10], 能改善卵巢功能衰退大鼠的动情周期并调节性激素水平^[11], 其主要活性成分二苯乙烯苷 (TSG) 具有抗炎、抗氧化作用^[12-13]。近年研究表明, 多种致病因素可激活卵巢局部的 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体, 进而启动天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (Caspase)-1 依赖性细胞焦亡, 加重卵巢损伤与功能衰退^[14-15]。然而, 制首乌能否调控细胞焦亡以改善 POI, 尚不清楚。本研究利用 POI 大鼠模型, 探究制首乌能否通过干预 NLRP3/Caspase-1/消皮素 D (GSDMD) 通路介导的细胞焦亡来改善 POI, 以期制首乌防治 POI

提供新的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0005。饲养环境温度为 24~26 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%, 12 h 灯照、12 h 黑暗模拟昼夜交替, 实验期间大鼠自由摄食和饮水。实验方案经贵州中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 20241013001), 所有操作均遵循相关伦理要求。

1.2 药物与主要试剂

制首乌 (北京同仁堂贵阳药店, 批号 240301) 经贵州中医药大学药学院林昶副教授鉴定为制首乌 processed *Polygonum multiflorum* Thunb., 本品质检结果显示^[16], TSG 质量分数为 0.72%, 大黄素与大黄素-3-甲醚总质量分数为 0.53%, 均符合《中国药典》2025 版中制首乌的质量控制标准^[17]。取制首乌饮片, 加入 8 倍量纯水浸泡 30 min 后, 煎煮 25 min, 滤过; 药渣再加 5 倍量水, 同法煎煮 25 min 后滤过^[16]; 合并 2 次滤液, 经减压干燥并粉碎, 得到制首乌水提物 (PPMAE) 粉末, 提取率为 16.1%。

雷公藤多苷片 (批号 20240701) 购自湖南千金协力药业; 戊酸雌二醇 (EV, 批号 821A) 购自德国拜耳集团; FSH (货号 E-EL-R0391)、 E_2 (货号 E-OSEL-R0001)、乳酸脱氢酶 (LDH, 货号 E-BC-K766-M) 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒均购自

Elabscience 公司; 兔源一抗: ASC (货号 DF6304)、Caspase-1 (货号 AF5418)、cleaved Caspase-1 (货号 AF4005)、白细胞介素 (IL) -1 β (货号 DF6251)、IL-18 (货号 DF6252) 与 GAPDH (货号 AF7021) 购自 Affinity 公司; NLRP3 (货号 27458-1-AP) 购自 Proteintech 公司; GSDMD (全长+N 端, 货号 A24476) 购自 ABclonal 公司。PCR 引物由上海生物工程股份有限公司合成。

1.3 主要仪器

SOPTOP CX40 荧光显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司); HT7800 透射电子显微镜 (日立公司); Panoramic SCAN II 病理切片扫描仪 (3DHISTECH Kft 公司); KZ-III-F 高速低温组织研磨仪 (赛维生物科技发展有限公司); μ Quant 光谱仪 (BioTek 公司); PowerPac Basic 电泳仪 (Bio-Rad Laboratories 公司); D3024R 台式高速冷冻型微型离心机 (SCILOGEX 公司); CFX Connect 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组干预与取材

分组前, 每日定时采集大鼠阴道分泌物, 光镜下观察细胞涂片, 连续 10 d, 以筛选动情周期规律 (卵巢功能正常) 大鼠。将筛选出的大鼠随机分为对照组、模型组、EV (0.18 mg·kg⁻¹, 阳性药) 组和 PPMAE 低、高剂量 (1、4 g·kg⁻¹)^[11] 组, 每组 6 只。每日上午, 模型组及各药物组 ig 雷公藤多苷混悬液 (75 mg·kg⁻¹) 诱导 POI 模型^[18], 对照组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液。每天下午则分别 ig 相应药物, 对照组与模型组 ig 0.9% 氯化钠溶液。连续干预 28 d, ig 体积均为 10 mL·kg⁻¹。末次给药次日, 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血。摘取双侧卵巢, 称量后迅速将左卵巢置于 4% 多聚甲醛固定液; 右卵巢切取 2 mm×2 mm×2 mm 置入 2.5% 戊二醛固定液, 其余部分液氮速冻后转移至 -80 °C 保存。

2.2 动情周期及卵巢指数测定

在分组干预的 28 d 内, 每日定时采集并观察阴道脱落细胞涂片, 以监测动情周期。取材后, 计算卵巢指数 (卵巢湿质量/体质量)。

2.3 ELISA 法检测血清 FSH、E₂ 水平

采血后室温静置 2 h, 3 000×g 离心 15 min, 取上清, -20 °C 保存备用。严格按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测血清中 FSH 与 E₂ 含量, 每个样本设复孔 5~6 个。

2.4 苏木精-伊红 (HE) 染色与各级卵泡计数

卵巢经 4% 多聚甲醛固定后, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 制备 4 μ m 厚度切片, 进行 HE 染色, 光镜下观察及采图。取卵巢最大横截面的连续 3 张组织切片, 根据卵泡形态学特征分类计数^[19]: 原始卵泡 (卵母细胞外周为单层梭形颗粒细胞)、生长卵泡包括初级卵泡 (单层或多层立方/柱状颗粒细胞包绕, 可见透明带) 和次级卵泡 (初级卵泡继续发育, 颗粒细胞间出现液腔)、成熟卵泡 (体积最大, 凸向卵巢表面)、闭锁卵泡 (卵母细胞及颗粒细胞退化, 透明带皱缩), 由 2 名研究人员独立完成各级卵泡计数^[20]。

2.5 透射电镜观察颗粒细胞超微结构

卵巢皮质经 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛混合固定液预固定, 1% 锇酸后固定。常规予乙醇梯度脱水、丙酮置换、树脂-丙酮混合液透明, 包埋, 切取 0.8 μ m 切片。甲苯胺蓝染色定位后, 选择生长卵泡壁区域制备 90 nm 超薄切片, 乙酸铀和柠檬酸铅染色, 置于透射电子显微镜下观察成像。

2.6 卵巢乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测

取卵巢制备 10% 组织匀浆, 匀浆液于 3 000~4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清, 4 °C 保存备用。严格按照 LDH 试剂盒说明书操作, 酶标仪于 490 nm 波长下测定吸光度 (A) 值, 计算样品中 LDH 活性。

2.7 免疫荧光检测 ASC 斑点形成

石蜡切片依次经脱蜡、水化、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断, 以及血清封闭后, 加入 ASC 一抗 (1:200) 孵育, 漂洗后滴加 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (1:200) 孵育, 显色, DAPI 复染细胞核。封片, 荧光显微镜下观察采图, ASC 呈红色荧光, 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)。Image J 软件对平均荧光强度进行半定量分析, 即提取红色通道图像, 调整阈值以尽可能选中所有荧光, 选择 “Mean gray value” 值。

2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 水平

取卵巢组织, 按试剂盒说明书提取总 RNA, 测定 RNA 浓度与纯度。按试剂盒操作说明, 反转录为 cDNA 后进行扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 10 s、60 °C 30 s, 共 40 个循环, 引物序列见表 1。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

名称	序列 (5'→3')		大小/bp
<i>NLRP3</i>	F-GCGGTCTACGTCTTCTTCTTTCC	R-CATCCGCAGCCAGTGAGCAGAG	106
<i>Caspase-1</i>	F-ACACATTGAAGTGCCCAGGC	R-TGAGTCCACGCCACCATAACAC	74
<i>GSDMD</i>	F-GGCACATTCCAGTGCTCCGAGTGTC	R-TGAGTCCACGCCACCATAACAC	149
<i>GAPDH</i>	F-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	R-TTTGAGGGTCCAGCGACCTT	220

2.9 Western blotting 检测 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路的蛋白表达

取卵巢组织，加入 RIPA 裂解液匀浆，4 ℃、12 000×g 离心 10 min，收集上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量总蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜。室温下 5% 脱脂牛奶封闭，分别加入 NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD 一抗（1：1 000），4 ℃孵育过夜。加入 HRP 标记二抗（1：10 000）室温孵育。ECL 化学发光法显影，Image J 软件进行条带灰度值分析。

2.10 免疫组织化学染色检测 IL-1β、IL-18 含量

取石蜡切片，经脱蜡、水化、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断及血清封闭后，加入 IL-1β、IL-18 一抗（1：200），4 ℃孵育过夜。滴加 HRP 标记二抗（1：200）孵育，DAB 显色。苏木素复染，脱水、透明、封片。光镜下观察并拍照，棕黄色为阳性表达，采用 Image J 软件进行半定量分析，测量各视野的积分吸光度值与总面积，计算平均吸光度值（积分吸光度值/总面积）。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 26.0 进行统计分析，GraphPad Prism 10.4.1 作图。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据符合正态分布且方差齐，采用单因素方差分析，否则采用非参数检验。

3 结果

3.1 PPMAE 对 POI 大鼠动情周期、卵巢指数及血清性激素水平的影响

大鼠典型动情周期如图 1 所示，动情前期：较多有核上皮细胞；动情期：大量角化上皮细胞；动情后期：角化上皮细胞、有核上皮细胞及白细胞混合存在；动情间期：白细胞为主。如表 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠动情周期个数明显减少（ $P<0.05$ ），多滞留于动情后期及间期，其卵巢指数亦显著降低（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，PPMAE 高剂量能显著恢复模型大鼠的动情周期（ $P<0.05$ ）和卵巢指数（ $P<0.01$ ）。血清性激素方面，与对照组相比，

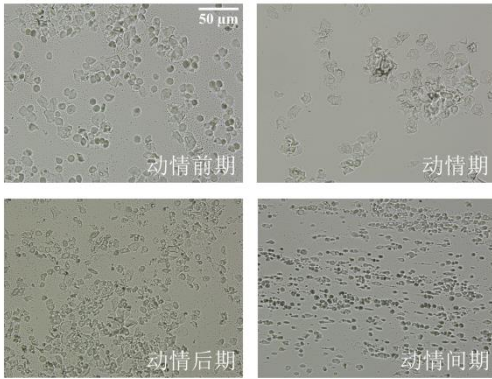


图 1 动情周期各阶段典型阴道细胞涂片（×200）
Fig. 1 Representative cytological images of four stages of estrous cycle (×200)

表 2 各组大鼠动情周期、卵巢指数及血清性激素水平（ $\bar{x} \pm s$ ， $n=6$ ）
Table 2 Estrous cycle, ovarian index and serum levels in rats ($\bar{x} \pm s$ ， $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动情周期/个	卵巢指数/%	FSH/(ng·mL ⁻¹)	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	5.500±0.500	0.063±0.002	322.150±67.117	178.968±18.210
模型	—	4.000±0.258 [#]	0.052±0.004 [#]	799.587±107.410 ^{###}	134.662±11.511 [#]
EV	0.000 18	5.167±0.601	0.060±0.004	301.057±40.110 ^{***}	200.710±12.548 ^{**}
PPMAE	1	5.333±0.615	0.055±0.003	325.127±51.677 ^{***}	196.036±3.339 ^{**}
	4	5.500±0.342 [*]	0.065±0.004 ^{**}	307.100±45.884 ^{***}	184.412±15.660 [*]

与对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.001$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ 。

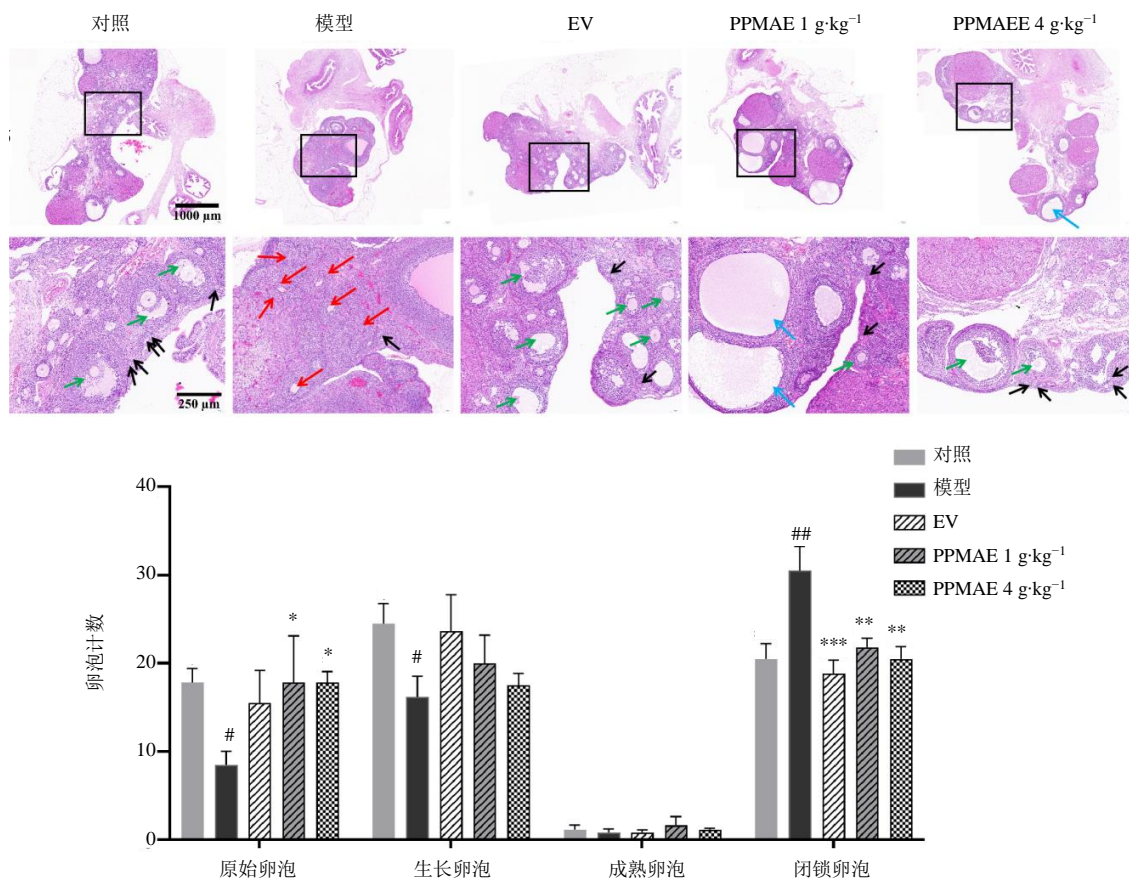
[#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.001$ vs control group；^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group.

模型组大鼠 FSH 水平显著升高 ($P < 0.001$)、 E_2 水平明显降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各治疗组均能有效逆转上述激素异常 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.2 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢组织形态和储备功能的影响

如图 2 所示，对照组大鼠卵巢结构完整，可见

处于不同发育阶段的卵泡，包括原始卵泡、生长卵泡和成熟卵泡，而模型组卵巢萎缩，颗粒细胞排列紊乱，原始卵泡和生长卵泡数量明显减少 ($P < 0.05$)，闭锁卵泡显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较，各治疗组闭锁卵泡均显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001)，且均有增加模型大鼠原始卵泡储备的趋势，其中 PPMAE 组具有统计学差异 ($P < 0.05$)。



黑框示放大区域，箭头示卵泡类型：黑色（原始卵泡）、绿色（生长卵泡）、蓝色（成熟卵泡）、红色（闭锁卵泡）。与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

Black boxes indicate observed areas. Arrows denote follicle types: black (primordial), green (growing), blue (mature), and red (atretic) follicles. [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 2 卵巢组织形态学与卵泡计数 ($\times 50$, $\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Ovarian histomorphology and follicle count ($\times 50$, $\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

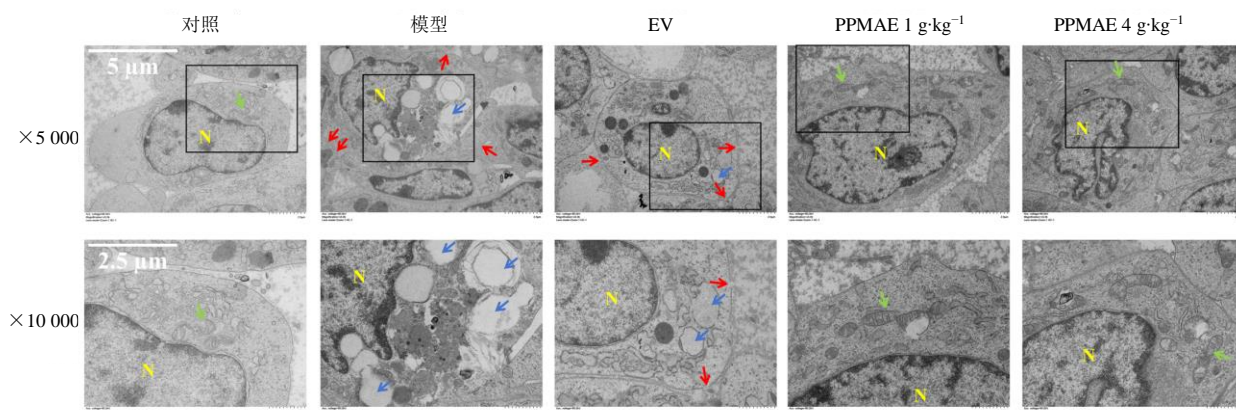
3.3 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢颗粒细胞超微结构的影响

透射电镜显示 (图 3)，对照组大鼠卵巢颗粒细胞结构正常，线粒体嵴清晰，核形态规则。而模型组细胞肿胀、胞质空泡化、胞质疏松；高倍视野下，进一步观察到明显的胞质空泡及部分膜结构破裂，提示出现焦亡样损伤。与模型组比较，EV 组细胞肿胀有所减轻，但膜破裂仍然明显；PPMAE 组的胞质

空泡和膜破裂则明显减少，细胞形态接近于对照组。表明各药物组均可不同程度改善模型大鼠颗粒细胞的焦亡样损伤。

3.4 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢 LDH 活性的影响

LDH 是细胞膜完整性的重要指标。如图 4 所示，模型组 LDH 释放活性显著高于对照组 ($P < 0.001$)，表明模型组卵巢细胞存在膜破裂。而 PPMAE ($P < 0.001$) 和 EV ($P < 0.01$) 均能显著降

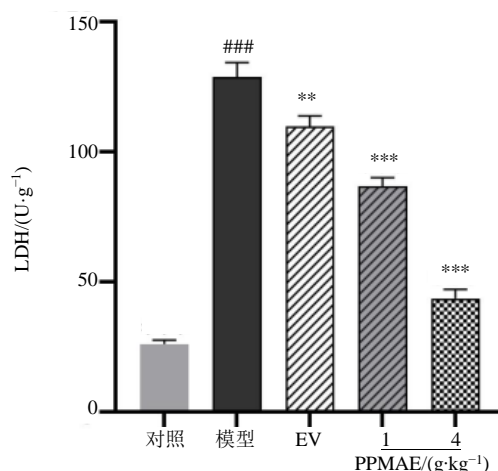


黑框示放大区域, N-细胞核; 绿色箭头-线粒体; 红色箭头-膜结构破裂; 蓝色箭头-胞质空泡化。

Black boxes indicate observed areas. N-nucleus; green arrows-mitochondria; red arrows-membrane rupture; blue arrows-cytoplasmic vacuolization.

图 3 颗粒细胞透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron micrographs of granulosa cells



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 4 LDH 释放活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 LDH release activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

低模型大鼠 LDH 活性, 提示其可改善卵巢细胞破裂性死亡。

3.5 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢 ASC 斑点形成的影响

ASC 斑点的形成是焦亡炎症小体组装的标志物。与对照组相比, 模型组大鼠颗粒细胞中 ASC 表达显著增多 ($P < 0.05$), 表明 POI 模型颗粒细胞焦亡被激活。PPMAE 能显著抑制模型大鼠颗粒细胞 ASC 斑点的形成 ($P < 0.05$), 而 EV 组无统计学差异, 提示 PPMAE 抑制炎症小体组装的效力较 EV

更佳。见图 5。

3.6 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的影响

NLRP3/Caspase-1/GSDMD 是细胞焦亡经典通路。qRT-PCR 和 Western blotting 结果表明 (图 6、7), 与对照组相比, 模型组卵巢 NLRP3、Caspase-1 (cleaved Caspase-1)、GSDMD (N-GSDMD) 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.001$)。与模型组比较, PPMAE 可有效逆转上述通路的激活 ($P < 0.05, 0.001$)。结果表明, PPMAE 在转录水平和翻译水平上均能抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路, 从而减轻卵巢细胞焦亡。

3.7 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢 IL-1 β 与 IL-18 水平的影响

IL-1 β 和 IL-18 是细胞焦亡下游促炎因子。如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组 IL-1 β ($P < 0.05$) 和 IL-18 ($P < 0.001$) 表达均显著增强。与模型组比较, EV 组、PPMAE 组中 IL-18 水平均明显下调 ($P < 0.001$), EV 组和 PPMAE 高剂量组中 IL-1 β 表达亦显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

POI 是生殖内分泌领域难题, 其终末阶段为卵巢早衰 (POF), 近年来发病率呈明显上升且年轻化趋势, 严重影响了患者生活质量。中医学虽无 POI 病名, 但可归属于“年未老经水断”“闭经”“不孕”等范畴。本病主要责之于肾, 肾藏精主生殖, 为天癸之源、冲任之本、气血之根, 与胞宫相系。众多医家亦认为肾虚是 POI 核心病机, 或兼夹肝心脾失

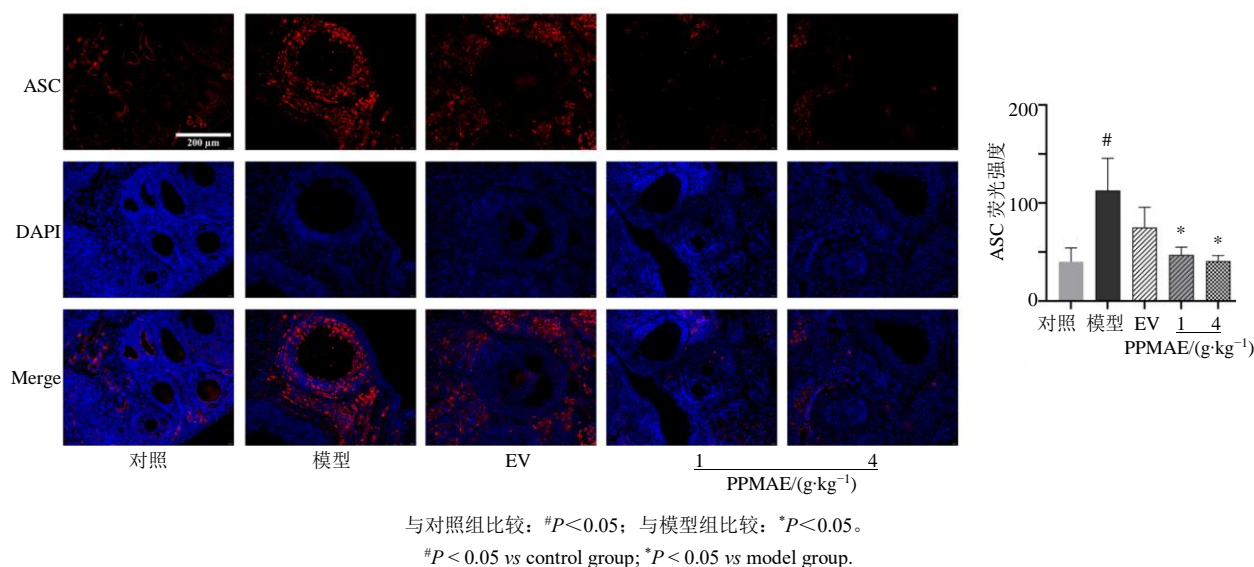


图 5 卵巢组织 ASC 的免疫荧光分析 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)
 Fig. 5 Immunofluorescence of ASC specks in ovaries ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

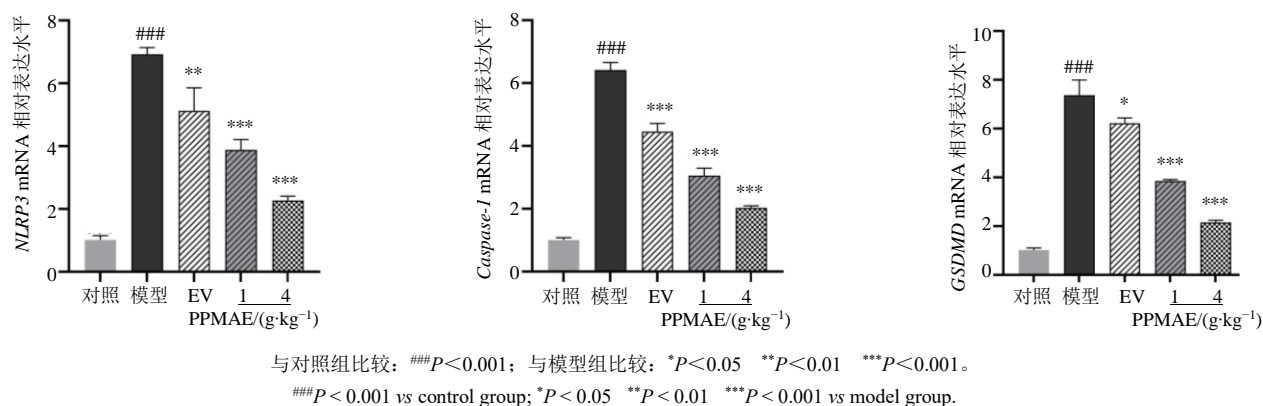


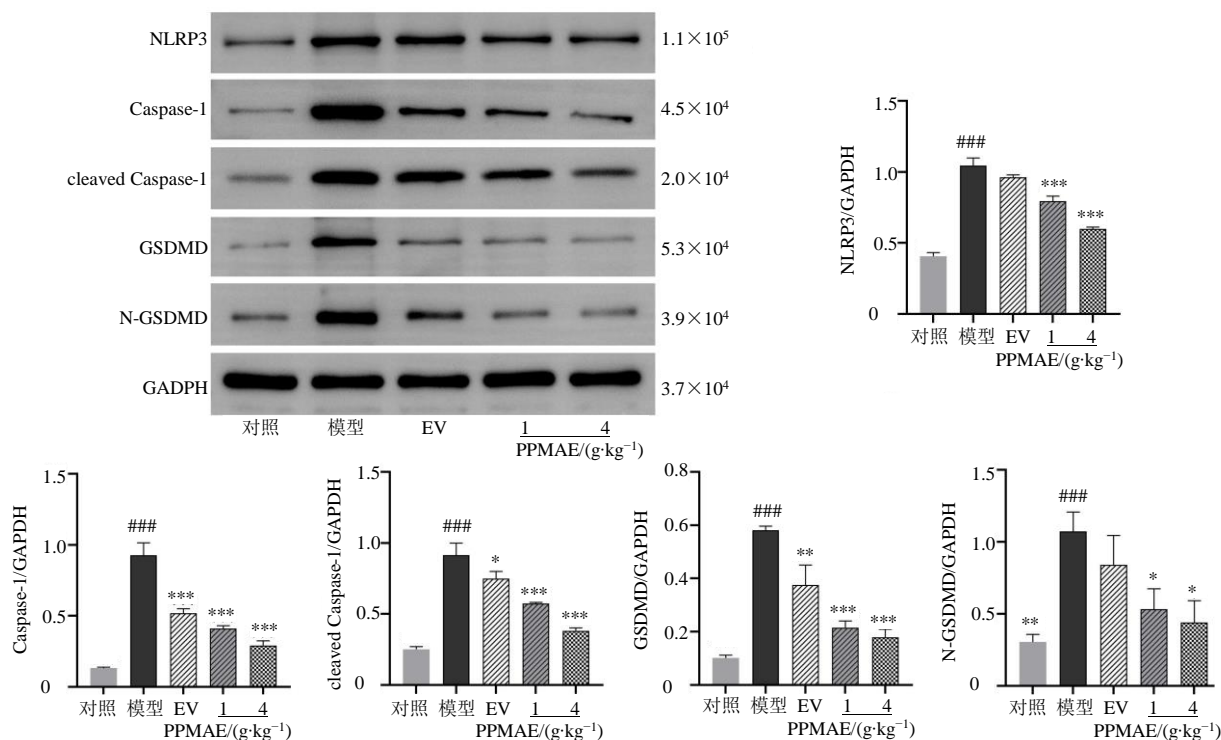
图 6 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 通路 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
 Fig. 6 Relative mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1, GSDMD ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

调, 终致天癸虚少, 经水早断, 故治疗以补肾为原则^[21-22]。制首乌是传统补益中药, 具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等功效。《开宝本草》记载其“久服长筋骨, 益精髓, 延年不老”。研究发现, 制首乌主要成分 TSG 能抑制 NLRP3 主导 (cleaved Caspase-1、GSDMD-N) 的神经炎症, 进而改善血管性认知障碍^[23]。前期研究表明, 制首乌具有雌激素样作用, 能改善雷公藤多苷诱导的大鼠卵巢功能减退, 促进卵泡发育^[11]。本研究进一步探讨制首乌通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路从而保护卵巢功能的机制。

女性生殖衰老主要归因于原始卵泡池的不可逆耗竭, 卵泡的数量储备与发育潜能共同决定了卵巢功能^[24-25]。本研究显示, POI 模型大鼠动情周期

明显紊乱, 停滞于动情后期或间期, 表明 POI 大鼠卵巢内分泌功能障碍。PPMAE 治疗可显著修复 POI 大鼠动情周期, 提高卵巢指数, 恢复血清 FSH 和 E₂ 水平至正常范围。组织学进一步揭示, PPMAE 能明显改善卵泡内颗粒细胞排列, 减缓原始卵泡耗竭、减少闭锁卵泡数量。以上结果表明, PPMAE 能保护原始卵泡储备、抑制卵泡过度闭锁, 调节血清性激素水平稳态, 有效延缓卵巢储备功能减退。

颗粒细胞是卵泡内最大的细胞群, 在卵泡的发育成熟和闭锁过程中起主导作用。颗粒细胞过度死亡会破坏卵泡微环境稳态, 加速卵泡闭锁, 导致卵巢功能衰退^[26]。本研究透射电镜显示, 模型大鼠颗粒细胞出现膜破裂、胞质空泡化等焦亡形态特征, 同时 LDH 释放活性显著升高, 共同提示了在雷公

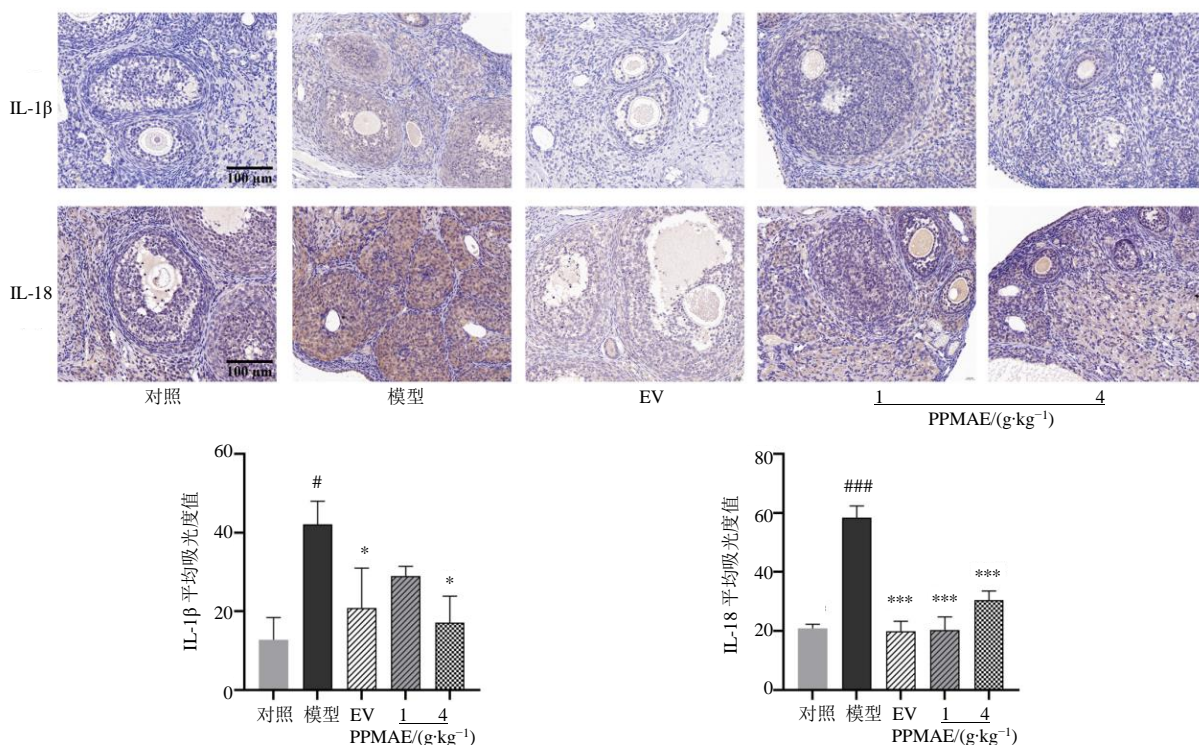


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 7 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Relative protein expressions of NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: # $P < 0.05$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.05$ #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 8 卵巢组织 IL-1 β 与 IL-18 免疫组化分析 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Immunohistochemical analyses of IL-1 β and IL-18 in ovaries ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

藤多苷诱导的 POI 模型中存在细胞焦亡。给予 PPMAE 治疗能有效保持颗粒细胞膜完整性,减少胞质空泡化,并显著降低 LDH 释放活性。表明 PPMAE 可改善 POI 大鼠颗粒细胞焦亡样改变,从而减少细胞死亡,保护卵巢功能。

近年研究发现,NLRP3 介导的颗粒细胞焦亡是驱动 POI 发生发展的重要机制^[14-15]。NLRP3 被激活时,会募集接头蛋白 ASC,组装成 NLRP3-ASC-Caspase-1 复合体。活化的 Caspase-1 可切割 GSDMD 产生具有孔道形成活性的 N-GSDMD,同时促使 IL-1 β 和 IL-18 的前体成熟并释放,引发细胞焦亡,进一步放大炎症反应^[27]。ASC 作为中枢衔接蛋白,其寡聚化是一个关键控制点;抑制 ASC 可能比抑制 Caspase-1 等下游效应分子更有效地阻断焦亡信号传导^[28]。本研究结果显示,模型组大鼠卵巢颗粒细胞 ASC 表达较正常大鼠增强,且 NLRP3、cleaved-Caspase-1 和 N-GSDMD 的 mRNA 及蛋白水平均显著升高,表明 POI 大鼠卵巢颗粒细胞存在过度焦亡。PPMAE 治疗后,颗粒细胞 ASC 斑点明显减弱,

NLRP3、cleaved-Caspase-1 和 N-GSDMD 的表达亦显著下调。表明 PPMAE 可抑制 ASC 寡聚化这一上游事件来抑制炎症小体的组装,观察到的 N-GSDMD 水平下降与膜完整性的改善直接相关,这与上述透射电镜和 LDH 检测结果一致。并且焦亡下游促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 的减少,也证实了 PPMAE 对 POI 大鼠卵巢细胞焦亡的抑制作用。

综上所述(图 9),PPMAE 可通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路介导的细胞焦亡,有效改善 POI,其作用机制包括抑制上游的 NLRP3 炎症小体组装及 ASC 斑点形成,以及阻断下游 Caspase-1 对 GSDMD 及 IL-1 β 、IL-18 前体的切割,从而抑制了细胞膜孔道形成及炎症因子成熟释放。PPMAE 对 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路转录及蛋白表达水平的双重抑制作用,最终减轻了细胞焦亡性损伤,维持其超微结构与功能,并改善了卵巢微环境。药效学结果表明,PPMAE 干预能显著恢复 POI 大鼠的动情周期,增加原始卵泡储备,减少卵泡过度闭锁,调节血清 FSH 和 E₂ 水平,这些

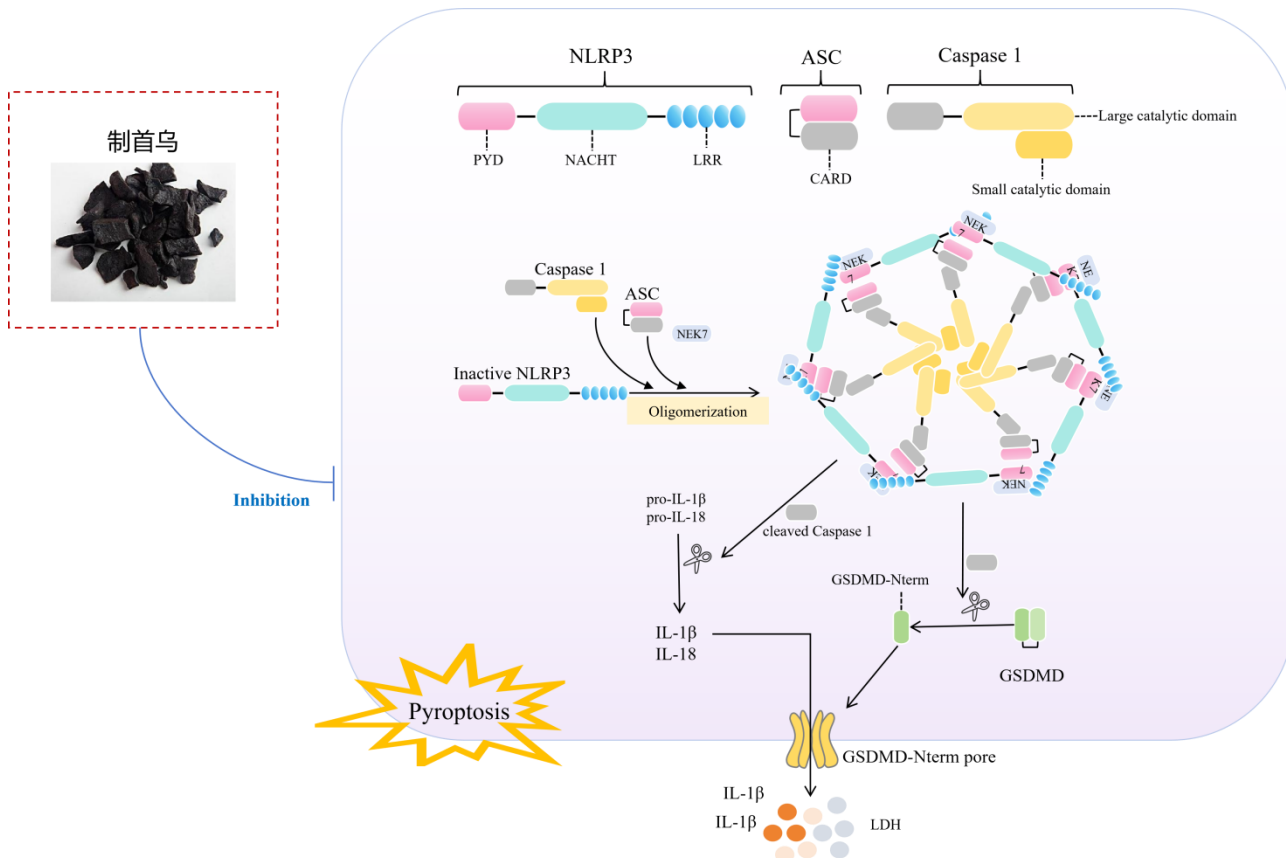


图 9 PPMAE 通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路介导的细胞焦亡改善 POI

Fig. 9 PPMAE ameliorates POI by inhibiting pyroptosis via NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway

保护作用与其抑制焦亡通路的结果相一致。

本研究结果为 PPMAE 靶向细胞焦亡以防治 POI 提供了新的实验依据,也凸显了中药多靶点在调控复杂病理过程中的潜在优势。然而,PPMAE 中发挥抗焦亡作用的具体成分仍有待进一步鉴定与验证。未来研究可综合利用活性成分分离鉴定技术,结合焦亡特异性抑制剂、细胞 siRNA 干扰、动物基因敲除等手段,系统阐明 PPMAE 的活性成分、精确作用靶点及其分子机制,为其临床应用提供更坚实的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Touraine P, Chabbert-Buffet N, Plu-Bureau G, et al. Premature ovarian insufficiency [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10(1): 63.
- [2] Wang F X, Liu Y F, Ni F D, et al. BNC1 deficiency-triggered ferroptosis through the NF2-YAP pathway induces primary ovarian insufficiency [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5871.
- [3] Dai W, Xu B, Ding L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency mouse model by suppressing ferritinophagy-mediated ferroptosis in granulosa cells [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 222: 101-114.
- [4] Federici S, Rossetti R, Moleri S, et al. Primary ovarian insufficiency: Update on clinical and genetic findings [J]. Front Endocrinol, 2024, 15:1464803.
- [5] Ai G, Meng M, Guo J, et al. Adipose-derived stem cells promote the repair of chemotherapy-induced premature ovarian failure by inhibiting granulosa cells apoptosis and senescence [J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 75.
- [6] 田赛男, 唐丽, 王圣羽, 等. 早发性卵巢功能不全在中医药的发展研究 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(11): 2969-2981.
Tian S N, T L, Wang S Y, et al. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine in treatment of premature ovarian insufficiency [J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, 50(11): 2969-2981.
- [7] Huang Y, Zhang Q, Shen D, et al. Mechanisms of He Shi Yu Lin formula in treating premature ovarian insufficiency: Insights from network pharmacology and animal experiments [J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 254.
- [8] Zhu C, Li J H, Tang W C, et al. 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside (TSG) from *Polygonum multiflorum* Thunb.: A Systematic Review on Anti-Aging [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(7): 3381.
- [9] Qian J, Hou M Q, Wu X, et al. A review on the extraction, purification, detection, and pharmacological effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside from *Polygonum multiflorum* [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109923.
- [10] Mu C L, Li X Y, Yang J M, et al. Spatial transcriptome and single nucleus transcriptome sequencing reveals *Tetrahydroxy Stilbene* glucoside promotes ovarian organoids development through the Vegfa-Ephb2 pair [J]. Adv Sci, 2024, 12(4): e2410098.
- [11] 朱璨, 李尧锋, 彭芳, 等. 制首乌对大鼠卵巢功能减退的影响 [J]. 医学研究生学报, 2018, 31(6): 602-607.
Zhu C, Li Y, Peng F, et al. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* preparata on diminished ovarian reserve in rats [J]. J Med Postgra, 2018, 31(6): 602-607.
- [12] Lin H Y, Yang Y N, Chen Y F, et al. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-Glucoside improves female ovarian aging [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 862045.
- [13] Gao D, Hao J P, Li B Y, et al. Tetrahydroxy stilbene glycoside ameliorates neuroinflammation for Alzheimer's disease via cGAS-STING [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 953: 175809.
- [14] Ma Y, Nong W H, Zhong O, et al. Nicotinamide mononucleotide improves the ovarian reserve of POI by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis of ovarian granulosa cells [J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 236.
- [15] 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.
- [16] Zhu C, Li J H, Li Y F, et al. Pharmacological evaluation of *Polygoni Multiflori Radix* praeparata extract: Inhibition of panoptosis in alleviating premature ovarian insufficiency [J]. Curr Issues Mol Biol, 2025, 47(7): 569.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2025.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2025.
- [18] Chen J Z, Wang N N, Peng Z L, et al. Zishen Yutai Pill ameliorates ovarian reserve by mediating PI3K-Akt pathway and apoptosis level in ovary [J]. J Ovarian Res, 2025, 18(1): 61.
- [19] Uslu B, Dioguardi C C, Haynes M, et al. Quantifying growing versus non-growing ovarian follicles in the mouse [J]. J Ovarian Res, 2017, 10(1): 3.
- [20] 李和, 李继承. 组织学与胚胎学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 304.

- Li H, Li J C. *Histology and Embryology* [M]. 3rd Ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2015: 304
- [21] 冯晓玲, 李力, 曲凡, 等. 早发性卵巢功能不全中西医结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2022, 63(12): 1193-1198.
- Feng X L, Li L, Qu F, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of premature ovarian insufficiency with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(12): 1193-1198.
- [22] 欧燕, 王琪, 张泰魏, 等. 国医大师刘尚义从“天癸虚损渐竭”辨治卵巢储备功能减退经验 [J]. 时珍国医国药, 2025, 36(2): 355-358.
- Ou Y, Wang Q, Zhang T W, et al. TCM master Liu Shangyi's experience of differentiating and treating diminished ovarian reserve from “Gradual Deficiency and Exhaustion of Tiangui” [J]. J Li Shizhen Tradit Chin Med, 2025, 36(2): 355-358.
- [23] 汪晨. 两种补肾中药有效成分对血管性认知障碍的作用及机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- Wang C. Study on the effects and mechanisms of two effective ingredients of kidney tonifying traditional Chinese medicine on vascular cognitive impairment [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [24] Telfer E E, Grosbois J, Odey Y L, et al. Making a good egg: Human oocyte health, aging, and *in vitro* development [J]. Physiol Rev, 2023, 103(4): 2623-2677.
- [25] Bao S L, Yin T L, Liu S. Ovarian aging: Energy metabolism of oocytes [J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 118.
- [26] Ali I, Padhiar A A, Wang T, et al. Stem cell-based therapeutic strategies for premature ovarian insufficiency and infertility: A focus on aging [J]. Cells, 2022, 11(23): 3713.
- [27] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [28] Xiao L, Magupalli V G, Wu H. Cryo-EM structures of the active NLRP3 inflammasome disc [J]. Nature, 2023, 613(7944): 595-600.

[责任编辑 兰新新]