

黄芩素对雷公藤甲素诱导的小鼠卵巢细胞损伤的保护作用

黄 燕

中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院, 重庆 400037

摘要:目的 探讨黄芩素对雷公藤甲素诱导小鼠卵巢细胞损伤的保护作用。方法 健康雌性 BALB/C 小鼠随机分为对照组, 模型组, 黄芩素低、高剂量组。对照组 ig 含 5%二甲基亚砷的生理盐水, 模型组 ig 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雷公藤甲素, 黄芩素低、高剂量组分别 ig 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雷公藤甲素+100 mg/kg 黄芩素、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雷公藤甲素+500 mg/kg 黄芩素, 共给药 50 d。实验第 41 天起, 连续阴道涂片, 至第 47 天, 进行超排卵实验。第 50 天处死各组小鼠, 收集计数卵子。留取卵巢进行苏木精-伊红 (HE) 染色检测卵巢病理, 计数各级卵泡。测定各组小鼠卵巢组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和丙二醛 (MDA) 的量, 评价氧化应激水平。Western blotting 法检测小鼠卵巢细胞中氧化还原相关蛋白抗硫氧还蛋白还原酶 (TrxR)、硫氧还蛋白 (Trx)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、GSH-Px 的表达量。**结果** 雷公藤甲素显著引起小鼠卵巢损伤, 表现为卵泡数量显著减少, 卵巢间质区域结缔组织疏松; 并使 SOD 活性降低, GSH-Px 水平降低, MDA 水平增加; 黄芩素组小鼠卵巢发育较模型组有明显改善, 卵泡细胞数量增多, 间质区域结缔组织饱满。卵巢组织中 SOD 活性升高, GSH-Px 水平升高, MDA 水平降低。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠卵巢细胞中的 TrxR 表达量明显下降; 与模型组比较, 黄芩素组小鼠卵巢细胞中 TrxR 的表达量显著上升。**结论** 黄芩素可通过上调 TrxR 表达量提高小鼠卵巢组织的抗氧化能力, 对雷公藤甲素诱导的卵巢损伤起到保护作用。

关键词: 黄芩素; 雷公藤甲素; 卵巢损伤; 氧化应激; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛; 抗硫氧还蛋白还原酶
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)23-4946-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.020

Protective effect of baicalein on mouse ovarian injury induced by triptolide

HUANG Yan

The Second Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of baicalein on mouse ovarian injury induced by triptolide. **Methods** Female healthy BALB/C mice were randomized into four groups. The mice in control group were given water contained 5% DMSO. The mice in model group were given 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ triptolide orally. While the mice in baicalein treated groups were given 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ triptolide plus 100 mg/kg and 500 mg/kg baicalein, respectively. On the 41st d of experiment, continuous vaginal smear were made to measure the sexual cycle of mice. On the 47th d, the superovulation experiment was carried out. On the 50th d, the mice were sacrificed to collect the ovaries. Ovaries were examined by hematoxylin and eosin (HE) staining, and the levels of follicles were counted. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the ovarian tissue of each group were measured to evaluate the level of oxidative stress. Western blotting assay was performed to measure the expression levels of thioredoxin reductase (TrxR), thioredoxin (Trx), glutathione reductase (GR), and GSH-Px. **Results** Triptolide significantly induced ovarian damage, reduced the number of follicles, induced ovarian interstitial connective tissue regional osteoporosis, and decreased the activities of SOD and GSH-Px, while increased the content of MDA. On the contrary, when adding baicalein, the mice ovary development was obviously improved. The follicle cell number increased, and the connective tissue in interstitial region of ovary was well-stacked. The activity of SOD and GSH-Px in ovarian tissue was increased and the content of MDA was decreased. Western Blotting results showed that the expression levels of TrxR in model group mice were significantly down-regulated compared with those of control group. However, compared with control group, the expression levels of TrxR were significantly up-regulated by baicalein treatment. **Conclusion** Baicalein can enhance the anti-oxidative ability of mouse ovarian tissue by up-regulating TrxR expression, and may play an important role in the protection of ovarian injury induced by triptolide.

Key words: baicalein; triptolide; ovary injury; oxidative stress; SOD; GSH-Px; MDA; TrxR

收稿日期: 2017-06-20

作者简介: 黄 燕 (1985—), 硕士, 主治医师, 研究方向为生殖医学。Tel: 13883904771 E-mail: 286894630@qq.com

卵子质量是影响人类生殖生育能力、胚胎质量的关键因素之一。卵巢及卵泡的正常发育直接影响着卵泡的生长、启动、排卵、黄体形成以及激素分泌等卵巢基本功能^[1]。临床上的一些抗肿瘤药物在发挥治疗作用的同时,可能会对卵巢的发育造成影响,破坏正常的卵巢颗粒细胞,甚至形成卵巢早衰^[2]。雷公藤甲素又称雷公藤内酯、雷公藤内酯醇,是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根、叶、花及果实中提取的一种环氧二萜内酯类化合物,是雷公藤提取物的主要活性成分。大量体内、外的研究证明,雷公藤甲素对多种癌症如白血病、乳腺癌、胰腺癌及肺癌等均有良好的抗肿瘤活性^[3-4]。

卵巢损伤与氧化应激有关,正常情况下机体内活性氧(ROS)的产生和清除处于动态平衡状态,所以对机体并无有害影响。而多种内源性或外源性有害刺激可打破这种平衡,导致 ROS 大量生成而超过抗氧化系统的清除能力,机体就会形成氧化应激状态,引起 DNA 氧化损伤和蛋白质的表达异常,产生细胞毒效应,最终对机体造成不可逆损害。研究发现,ROS 所致的氧化应激是造成卵巢损伤的重要因素^[5-6]。

黄芩素(baicalein)是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中提取的一种化学成分,具有降低脑血管阻力、改善脑循环、增加脑血流量及抗血小板凝集的作用,临床用于脑血管病后瘫痪的治疗。医学研究表明,这些功效与其对氧自由基的清除(抗氧化)能力有关^[7-8]。本研究利用黄芩素的强氧化剂特性,通过检测细胞凋亡和抗氧化水平,研究黄芩素对雷公藤甲素诱导的大鼠卵母细胞损伤的保护作用及相关机制,探讨黄芩素对卵母细胞凋亡和氧化应激的抑制作用,为黄芩素在抗癌药物用药过程中降低氧化应激、减少凋亡的发生提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

雷公藤甲素(批号 SMB00325,质量分数 $\geq 98\%$)、黄芩素(批号 465119,质量分数 98%)、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;孕马血清促性腺激素(PMSG)购自上海市计划生育科学研究所;人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自丽珠集团丽珠制药厂;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒,细胞浆蛋

白抽提试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司。抗硫氧还蛋白还原酶(TrxR)、硫氧还蛋白(Trx)、谷胱甘肽还原酶(GR)、GSH-Px 和 β -actin 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;所用化学试剂均为分析纯,购于北京化学试剂厂;磷酸盐缓冲液(PBS)为本实验室配制;蒸馏水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

1.2 实验动物

健康雌性 7 周龄 BALB/C 小鼠,体质量(20 ± 2) g,由北京市维通利华实验动物中心提供,动物许可证编号 SCXK(京)2011-0011,动物经过适应性饲养 1 周后用于实验。所有动物实验均遵循实验动物的伦理要求和实验动物管理条例。

1.3 仪器

Leica EG1150 石蜡包埋机、Leica M2235 石蜡切片机、LEICA TCS SP5 共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);DYY-12C 型电脑三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);DW-86L30 超低温冰箱(杭州艾普仪器设备有限公司);MS II Minishaker 涡旋振荡器(德国 Ika 公司);METTLER XS205 微量分析天平(南京皓海科学仪器仪表有限公司);IX71 PHELI 倒置荧光显微镜及成像系统(日本 Olympus 公司);Eppendorf-5427 台式冷冻离心机、Eppendorf-5424 小型高速离心机(北京东南仪诚实验室设备有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 小鼠卵巢损伤模型的制备及给药

8 周龄雌性 BALB/C 小鼠随机分为 4 组,每组 10 只。对照组每天 ig 含 5% DMSO 的生理盐水,模型组 ig 给予 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雷公藤甲素,黄芩素低剂量组同时 ig 给予 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雷公藤甲素和 100 mg/kg 黄芩素,黄芩素高剂量组同时 ig 给予 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 雷公藤甲素和 500 mg/kg 黄芩素(药物均溶解于含 5% DMSO 的生理盐水中)。用药量根据小鼠体质量变化随时调整。每日 1 次,连续给药 50 d。每只小鼠每日 ig 总量不超过 200 μL 。观察和记录给药 50 d 内各组小鼠的生长情况。

2.2 阴道涂片及染色

于 ig 给药的第 41 天起,连续 10 d 进行阴道涂片。具体方法为从背部固定小鼠,暴露阴道,棉签蘸少量生理盐水,插入小鼠阴道内旋转 1 周,取出后将棉签于载玻片上涂抹,风干后,置入 95%乙醇中固定 15 min,巴氏染色封片后,根据阴道涂片,计算小鼠的动情周期。

2.3 小鼠超排卵实验

超排卵实验按照文献所述方法进行^[9], 实验第 47 天, 各组小鼠分别 ip 10 U HCG, 48 h 后, 分别 ip 5 U HCG, 18 h 后, 各组小鼠内眦取血, 脱颈椎处死, 分离双侧输卵管, 用注射器吸取含 4% BSA 的 HEPES 溶液, 充分冲洗双侧输卵管中的卵子至培养皿。

2.4 小鼠卵母细胞提取及计数

卵泡计数实验按照文献所述方法进行^[10], 各组小鼠脱颈椎处死, 在超净工作台中手术打开小鼠腹腔, 分别取出双侧输卵管, 置于有 PBS 的培养皿中, 在体视镜下用 1 mL 注射器针头划破输卵管壶腹部, 观察到有絮状物释出, 此即为卵丘卵母细胞复合体, 立即拍照并计数。同时对卵细胞形态进行评价, 卵泡浆饱满、颗粒细胞致密为优质卵泡, 卵泡浆不饱满, 颗粒细胞分布不均匀等为异常卵泡, 然后用透明质酸酶消化掉颗粒细胞, 用 PBS 反复冲洗, 获得 MII 期卵母细胞, 计数优质卵泡数量。

2.5 小鼠卵母细胞内 SOD、MDA 和 GSH-Px 测定

将分离得到的小鼠卵母细胞加入 PBS, 2 500 r/min 离心 5 min 后分离上清, 按 SOD、MDA 和 GSH-Px 试剂盒说明书操作, 分别测定上清液中 SOD 的活性及 MDA、GSH-Px 的水平。

2.6 Western blotting 法测定小鼠卵母细胞中氧化还原相关蛋白的表达量

将分离得到的小鼠卵母细胞参照试剂盒说明书进行细胞浆蛋白抽提操作, 提取细胞总蛋白并测定浓度, 蛋白样品加入 1/5 体积的 5×上样缓冲液, 沸水煮沸 5 min, 根据蛋白浓度以 20 μg/孔上样, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转至 PVDF 膜上, 用室温封闭 1 h, 加入 1:1 000 稀释的 TrxR、Trx、GR、GSH-Px 蛋白抗体, 4 ℃过夜。以 β-actin 作为内参, TBST 洗膜 3 次, 加入 1:1 000 稀释的

辣根酶标记的兔抗山羊 IgG, 室温孵育 2 h, 洗膜 3 次, ECL 发光液显色, 观察各条带深浅变化。

2.7 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计处理。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 黄芩素对卵母细胞损伤小鼠性动周期的影响

阴道涂片巴氏染色后, 连续观察 10 d 各组小鼠的阴道脱落上皮细胞变化。小鼠平均性动周期为对照组 (4.1±0.6) d、模型组 (7.3±1.6) d、黄芩素低剂量组 (5.7±1.3) d、黄芩素高剂量组 (4.8±1.5) d。与对照组相比, 模型组小鼠性动周期明显延长 ($P<0.05$), 黄芩素组小鼠性动周期缩短, 且随着黄芩素剂量的增大, 对性动周期的恢复作用增强 ($P<0.05$), 呈剂量依赖效应。由此可见, 黄芩素能够改善雷公藤甲素诱导的 BALB/C 小鼠性动周期延长。

3.2 黄芩素对卵母细胞损伤小鼠卵巢病理的影响

HE 染色结果 (图 1) 提示对照组小鼠卵巢各级卵泡 (原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡) 分布广泛, 原始卵泡主要分布在卵巢皮质区; 模型组小鼠卵巢各级卵泡数量较对照组减少, 特别是进展期卵泡减少, 且黄体较多, 各级闭锁卵泡增多, 间质区域结缔组织疏松。黄芩素低、高剂量组小鼠各级卵泡细胞较饱满, 各级卵泡并存, 间质较模型组致密。

3.3 黄芩素及雷公藤甲素对小鼠超排卵子数量的影响

超排卵实验后, 立即于显微镜下观察并计数各组小鼠输卵管中的卵子。对照组小鼠超排卵子体积大而饱满, 数量多, 平均 (78.5±20.2) 个。模型组小鼠所排卵子体积较小, 光泽度、饱满度差, 平均 (23.9±7.6) 个, 数量较对照组明显减少 ($P<0.05$)。

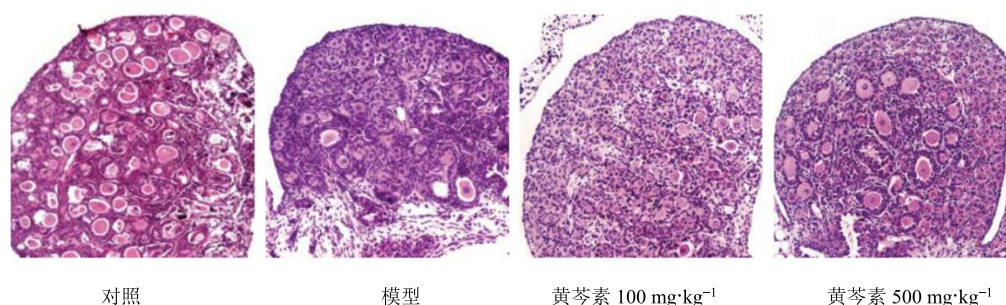


图 1 各组小鼠卵巢组织病理学观察 (HE, ×40)

Fig. 1 Pathomorphology of ovaries tissue of mice in each group (HE, × 40)

黄芩素组小鼠超排卵子的质量和数量较模型组均有明显改善,黄芩素低剂量组超排卵子数量(51.7±11.5)个,黄芩素高剂量组超排卵子数量(64.6±21.3)个,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果提示黄芩素能缓解雷公藤甲素诱导的小鼠超排卵功能降低。

3.4 黄芩素对卵母细胞损伤小鼠各级卵子数量的影响

小鼠各级卵泡数量如表 1 所示。与对照组比较,模型组小鼠各级卵泡数量显著减少,而闭锁卵泡数量增加。与模型组比较,黄芩素低、高剂量组小鼠卵巢原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡数量均增多,而闭锁卵泡明显减少。结果表明黄芩素能够改善雷公藤甲素诱导的小鼠各级卵泡丢失,促

进卵泡的正常发展、成熟。

3.5 黄芩素对小鼠卵母细胞中 SOD 活性及 GSH-Px、MDA 量的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠卵母细胞中 SOD 酶活性显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,黄芩素组小鼠卵母细胞 SOD 酶活性升高($P<0.05$);与对照组比较,模型组小鼠卵母细胞中 MDA 量显著升高,黄芩素处理后 MDA 量降低($P<0.05$);模型组小鼠卵母细胞中 GSH-Px 量较对照组显著降低,而黄芩素处理后 GSH-Px 水平升高($P<0.05$)。结果显示,雷公藤甲素可引起小鼠卵母细胞内氧化应激,而黄芩素可以剂量依赖性地拮抗雷公藤甲素引起的氧化应激。

表 1 黄芩素对卵母细胞损伤小鼠各级卵泡数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of baicalein on the number of follicles at different levels in mouse oocytes ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	原始卵泡/个	初级卵泡/个	次级卵泡/个	成熟卵泡/个	闭锁卵泡/个
对照	—	48±7	40±5	84±18	28±8	12±4
模型	—	29±6 [#]	16±6 [#]	52±13 [#]	10±5 [#]	33±12 [#]
黄芩素	100	37±11 [*]	33±12 [*]	73±21 [*]	23±7 [*]	16±5 [*]
	500	44±9 [*]	36±7 [*]	66±17 [*]	23±12 [*]	18±7 [*]

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$, 下表同

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group, same as below table

表 2 黄芩素对小鼠卵母细胞中 SOD 活性及 MDA、GSH-Px 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of baicalein on levels of SOD, MDA, and GSH-Px in mouse oocytes ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(μmol·L ⁻¹)	GSH-Px/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	22.25±2.18	2.10±0.32	105.68±14.54
模型	—	12.58±1.22 [#]	4.31±0.32 [#]	67.87±8.80 [#]
黄芩素	100	19.53±1.21 [*]	3.38±0.28 [*]	93.46±10.40 [*]
	500	20.33±1.05 [*]	2.46±0.19 [*]	104.57±13.24 [*]

3.6 黄芩素对小鼠卵母细胞中 TrxR、Trx、GR、GSH-Px 蛋白表达量的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠卵母细胞中的 TrxR 蛋白表达量明显下降,而 Trx、GR、GSH-Px 蛋白表达量未受影响;加入黄芩素后,TrxR 的表达量显著上升,Trx、GR、GSH-Px 蛋白表达量没有明显变化。说明雷公藤甲素引起卵母细胞产生氧化应激主要与 TrxR 有关,而黄芩素可以逆转雷公藤甲素引起的 TrxR 蛋白表达量降低。

4 讨论

卵巢中的卵泡在维持雌性生殖功能上具有重要作用,如分泌的雌激素对生殖器官发挥广泛的生理

作用,特别是为卵细胞的生长和发育提供了重要的微环境,另外卵泡还可分泌抑制素、卵母细胞成熟抑制因子等调节卵巢功能的物质。当各种原因损伤卵巢功能时,其颗粒细胞凋亡加速,导致卵巢功能下降甚至发生卵巢过早衰竭,卵巢分泌女性激素的能力下降,从而出现一系列围绝经期综合征症状^[1]。本研究发现雷公藤甲素可引起小鼠性动周期延长,超排卵子质量及数量明显下降,各级进展期卵泡数量减少,闭锁卵泡增多。这些结果说明雷公藤甲素可对小鼠的卵巢功能造成损伤。而黄芩素可以剂量依赖地逆转由雷公藤甲素诱导的卵巢损伤,说明黄芩素可以缓解雷公藤甲素的毒性。

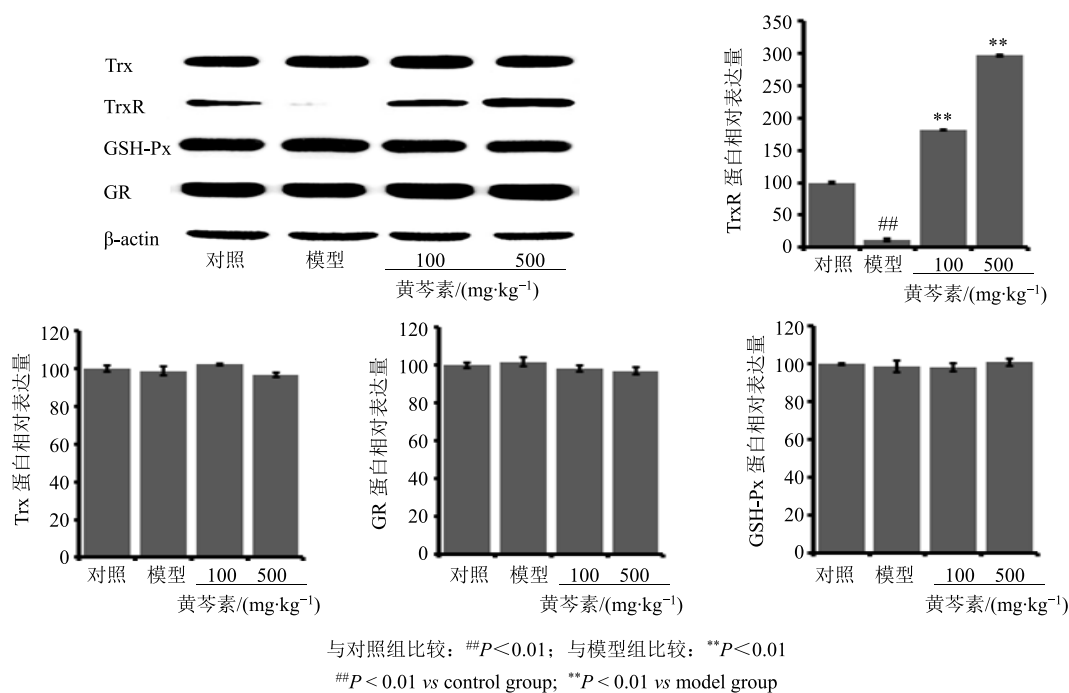


图 2 黄芩素对小鼠卵母细胞中 TrxR、Trx、GR、GSH-Px 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of baicalein on expression of TrxR, Trx, GR, and GSH-Px in mouse oocytes ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

在正常情况下, 机体内 ROS 的产生和 ROS 清除系统处于动态平衡状态。由于种种原因, 导致 ROS 产生增多或/和机体清除 ROS 能力的下降, 机体就会出现氧化应激^[12]。当机体处于氧化应激状态时, 体内组织细胞 ROS 量相对升高, 超过机体的清除能力, 可导致机体组织脂质过氧化水平升高, 引起 DNA 氧化损伤和蛋白质的表达异常, 对机体造成损害。氧化应激使机体处于易损状态, 同时能增强致病因素的毒性作用, 可导致基因突变, 不仅与多种疾病的发生发展有关, 也是造成卵巢损伤的原因之一^[13-14]。本研究发现雷公藤甲素处理的小鼠卵母细胞中出现氧化应激, 而黄芩素可以显著降低氧化应激水平, 提示黄芩素对小鼠卵巢受损的保护作用可能与其抗氧化功能有关。通过比较细胞内与氧化还原反应密切相关的蛋白或酶表达量的变化, 发现雷公藤甲素处理卵母细胞后, TrxR 的表达量显著降低, 而黄芩素的加入可以显著上调 TrxR 的表达量。TrxR、Trx 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 一起构成了人体内重要的氧化还原系统-Trx 系统, TrxR 活性增加可以使 Trx 转化为还原状态, 发挥体内的抗氧化功能, 本实验结果提示黄芩素的抗氧化作用可能是通过上调 TrxR 的表达量进而提高 TrxR 的活性而产生的。

综上所述, 黄芩素对雷公藤甲素诱导的小鼠卵

巢损伤起到保护作用。本研究为临床应用黄芩素提供了一定的参考, 也为更合理地使用雷公藤甲素及其制剂提供了新的依据。

参考文献

- [1] Grier H J, Neidig C L, Quagio-Grassiotto I. Development and fate of the postovulatory follicle complex, postovulatory follicle, and observations on folliculogenesis and oocyte atresia in ovulated common snook, *Centropomus undecimalis* [J]. *J Morphol*, 2017, 278(4): 547-562.
- [2] Jang H, Lee O H, Lee Y, *et al*. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/Akt/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(3): 336-347.
- [3] Xi C, Peng S, Wu Z, *et al*. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90(4): 531-541.
- [4] Li R, Lu K, Wang Y, *et al*. Triptolide attenuates pressure overload-induced myocardial remodeling in mice via the inhibition of NLRP3 inflammasome expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 69-75.
- [5] Karapinar O S, Pinar N, Özcan O, *et al*. The effect of dexpanthenol on experimentally induced ovarian ischaemia/reperfusion injury: A biochemical and histopathological evaluation [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 295(3): 777-784.

- [6] Nayki U, Onk D, Balci G, *et al.* The effect of melatonin on oxidative stress and apoptosis in experimental diabetes mellitus-related ovarian injury [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(5): 421-426.
- [7] Shin S C, Li C, Choi J S. Effects of baicalein, an antioxidant, on the bioavailability of doxorubicin in rats: possible role of P-glycoprotein inhibition by baicalein [J]. *Pharmazie*, 2009, 64(9): 579-583.
- [8] Chan S H, Hung C H, Shih J Y, *et al.* Baicalein is an available anti-atherosclerotic compound through modulation of nitric oxide-related mechanism under oxLDL exposure [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 42881-42891.
- [9] Singavarapu R, Buchinsky N, Cheon D J, *et al.* Whole ovary immunohistochemistry for monitoring cell proliferation and ovulatory wound repair in the mouse [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8(1): 98.
- [10] Demir B, Bozdag G, Sengul O, *et al.* The impact of unilateral salpingectomy on antral follicle count and ovarian response in ICSI cycles: Comparison of contralateral side [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(9): 741-744.
- [11] de Tarso S G S, Gastal G D A, Bashir S T, *et al.* Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2017, 29(3): 448-457.
- [12] Newsholme P, Cruzat V F, Keane K N, *et al.* Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes [J]. *Biochem J*, 2016, 473(24): 4527-4550.
- [13] Zhang R, Liu H, Bai H, *et al.* Oxidative stress status in Chinese women with different clinical phenotypes of polycystic ovary syndrome [J]. *Clin Endocrinol*, 2017, 86(1): 88-96.
- [14] Papalou O, Victor V M, Diamanti-Kandarakis E. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(18): 2709-2722.