

隐丹参酮调节SDF-1/CXCR4轴对卵巢功能不全大鼠的保护作用[△]

瞿 淳^{1*}, 马惠荣^{2#}, 冯 丹¹, 丑 丹¹, 张 喻¹, 李红梅¹(1. 武汉市中医医院妇科, 武汉 430014; 2. 河北中医药大学中医妇科教研室, 石家庄 050020)

中图分类号 R965;R711.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)24-2998-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.24.06



摘要 目的 基于基质细胞衍生因子1(SDF-1)/趋化因子CXC亚家族受体4(CXCR4)轴,探究隐丹参酮对卵巢功能不全(POI)大鼠的保护作用及潜在机制。方法 采用腹腔注射乙烯基环己烯(VCD)的方法建立POI大鼠模型,并将造模成功的大鼠分为模型组、隐丹参酮低剂量组(50 mg/kg)、隐丹参酮高剂量组(100 mg/kg)、隐丹参酮高剂量+AMD3100组(100 mg/kg 隐丹参酮+2.5 mg/kg CXCR4抑制剂AMD3100),每组10只;另取大鼠10只,以生理盐水代替VCD注射,作为对照组。各药物组大鼠灌胃或(和)腹腔注射相应药液,每天1次,连续4周。检测各组大鼠血清中雌二醇(E₂)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)水平和卵巢组织中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平,观察其卵巢组织形态,检测其卵巢组织细胞凋亡情况以及其中SDF-1、CXCR4 mRNA和胱天蛋白酶3(caspase-3)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2关联X蛋白(Bax)、SDF-1、CXCR4蛋白的表达情况。结果 与对照组比较,模型组大鼠卵巢萎缩,原始卵泡数量减少,闭锁卵泡数量增多,损伤明显;其血清中E₂水平,卵巢组织中SOD、GSH-Px水平,以及卵巢组织中SDF-1、CXCR4 mRNA的表达和Bcl-2、SDF-1、CXCR4蛋白的表达均显著降低或下调;血清中FSH和LH水平,卵巢组织中ROS和MDA水平,细胞凋亡率,以及卵巢组织中caspase-3、Bax蛋白的表达均显著升高或上调(P<0.05)。与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠卵巢组织病变明显好转,各定量指标均显著改善(P<0.05);AMD3100可显著逆转隐丹参酮对上述指标的改善作用(P<0.05)。结论 隐丹参酮可通过激活SDF-1/CXCR4轴来减少POI大鼠卵巢组织细胞凋亡,减轻氧化应激,调节血清激素水平,进而改善卵巢损伤。

关键词 隐丹参酮;卵巢功能不全;氧化应激;激素;SDF-1/CXCR4轴

Protective effect of cryptotanshinone on premature ovarian insufficiency rats by regulating the SDF-1/CXCR4 axis

QU Zhun¹, MA Huirong², FENG Dan¹, CHOU Dan¹, ZHANG Yu¹, LI Hongmei¹(1. Dept. of Gynecology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China; 2. Dept. of Traditional Chinese Medicine Gynecology, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050020, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the protective effect of cryptotanshinone on premature ovarian insufficiency (POI) rats and its potential mechanism based on stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXC subfamily receptor 4 (CXCR4) axis. **METHODS** POI rat model was established by intraperitoneal injection of vinylcyclohexene (VCD). The successfully modeled rats were randomly divided into model group, cryptotanshinone low-dose group (50 mg/kg), cryptotanshinone high-dose group (100 mg/kg), and cryptotanshinone high-dose+AMD3100 group (100 mg/kg cryptotanshinone+2.5 mg/kg CXCR4 inhibitor AMD3100), with 10 rats in each group. Another 10 rats were injected with normal saline instead of VCD as the control group. Rats in each drug group were given intragastrical or (and) intraperitoneal injection of the corresponding drug once a day for 4 weeks. The levels of estradiol (E₂), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in serum and reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in ovarian tissue were detected in each group. The morphology of ovarian tissue was observed. The cell apoptosis of ovarian tissue, as well as the mRNA expressions of SDF-1, CXCR4 and the protein expressions of caspase-3, B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), SDF-1, CXCR4 were detected. **RESULTS** Compared with the control group, the ovarian atrophied, the number of primitive follicles decreased, the number of atretic follicles increased, and the damage was obvious in the model group. Serum E₂ level, SOD and GSH-Px levels in ovarian tissue, the mRNA expressions of SDF-1 and CXCR4, and the protein expressions of Bcl-2, SDF-1 and CXCR4 in ovarian tissue were all significantly decreased or down-regulated; the levels of FSH and LH in serum, ROS and MDA levels in ovarian tissue, the cell apoptosis rate, and the protein expressions of caspase-3 and Bax in ovarian tissue were increased or upregulated significantly (P<0.05). Compared with model group, the ovarian tissue lesions of rats in cryptotanshinone low-dose and high-dose groups were

△ 基金项目 河北省自然科学基金项目(No.H2022423334);武汉市医学科研项目(No.WZ19A09);武汉市中医药科研项目(No.WZ22A10)

* 第一作者 主治医师,硕士。研究方向:妇科杂病的防治。E-mail:k26awn@163.com

通信作者 主任医师,教授,博士。研究方向:中医妇科、生殖内分泌。E-mail:mahuirong@126.com

significantly improved, and each quantitative index was significantly improved ($P < 0.05$). AMD3100 could significantly reverse the improvement effect of cryptotanshinone on the above indexes ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** Cryptotanshinone can reduce ovarian cell apoptosis and oxidative stress in POI rats by activating the SDF-1/CXCR4 axis, regulating serum hormone levels, thereby improving ovarian injury.

KEYWORDS cryptotanshinone; premature ovarian insufficiency; oxidative stress; hormone; SDF-1/CXCR4 axis

卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 是指女性 40 岁之前卵巢衰老后, 由于卵母细胞减少、卵巢生理活动丧失所引发的生殖内分泌紊乱、月经紊乱、闭经、不孕等异常表现的临床综合征^[1]。研究指出, 随着环境污染加重、生活方式改变和生活压力增大, POI 的发病率逐年上升, 且趋于年轻化^[2]。

目前, POI 的发病机制尚不清楚, 西医治疗以激素干预为主, 但副作用较大且患者易复发, 而中药具有较好的治疗效果, 且毒副作用小^[3]。隐丹参酮是从中药丹参中提取的有效成分, 具有调节卵巢生殖功能的作用^[4]。匡洪影等^[5]研究表明, 隐丹参酮可调节多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 大鼠卵巢颗粒细胞的内分泌机能; Huang 等^[6]研究表明, 隐丹参酮可减少卵巢早衰大鼠颗粒细胞凋亡, 减轻卵巢损伤, 调控激素分泌, 从而恢复卵巢功能。可见, 隐丹参酮对卵巢功能具有一定的改善作用, 但具体作用机制尚不清楚。

基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 属于趋化因子家族, 可通过激活趋化因子 CXC 亚家族受体 4 (CXC subfamily receptor 4, CXCR4) 来促进多种间充质干细胞的迁移和归巢, 并将干细胞募集到损伤部位, 从而促进组织修复和再生^[7]。研究表明, 激活 SDF-1/CXCR4 轴可促进人羊膜间充质干细胞的迁移和归巢, 改善 POI 大鼠的卵巢功能^[7]。由此本课题组推测, SDF-1/CXCR4 轴可能是药物干预 POI 的潜在靶点。为此, 本研究拟探讨隐丹参酮能否通过调控 SDF-1/CXCR4 轴来发挥对 POI 大鼠的卵巢保护作用, 旨在为隐丹参酮的开发应用及 POI 的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、ABI 7500 型聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (美国 ABI 公司)、VMM4200 型显微镜 [迈格仪器 (苏州) 有限公司]、UV3000 型紫外分光光度计 (上海精科实业有限公司)、XMP-50 型成像系统 (深圳市光明光学仪器有限公司)、LD-4080 型病理切片机 (上海聚慕医疗器械有限公司) 等。

1.2 主要药品与试剂

隐丹参酮对照品 (批号 AG3357, 纯度 $\geq 98\%$) 购自成都普瑞法科技开发有限公司; CXCR4 抑制剂 AMD3100 的对照品 (批号 T3002A, 纯度 $\geq 99\%$) 购自美国 MCE 公司; 乙烯基环己烯 (vinylcyclohexene, VCD; 批

号 H3526a, 纯度 $\geq 99\%$) 购自上海易恩化学技术有限公司; 雌二醇 (estradiol, E_2)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 (批号分别为 EY-01H675、EY-01H483、EY-01H261、EY-01H1728、EY-01H2424、EY-01H7365、EY-01H5836) 均购自上海一研生物科技有限公司; 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 D6038) 购自上海赛培森生物科技有限公司; 蛋白提取试剂盒 (批号 AF0327c) 购自上海酶澳生物科技有限公司; 兔抗天蛋白酶 3 (caspase-3)、B 细胞淋巴瘤 2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、SDF-1、CXCR4、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗 (批号分别为 ab145046、ab141423、ab32503、ab155090、ab181020、ab8226、ab172730) 均购自英国 Abcam 公司; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (批号 KL190102) 购自上海康郎生物科技有限公司; TUNEL 凋亡试剂盒 (批号 BA1975) 购自上海尚宝生物科技有限公司; ECL 试剂 (批号 JF0125) 购自河北品科研生物科技有限公司; qRT-PCR 实验所用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为体重 180~200 g 的 SPF 级雌性 SD 大鼠 (60 只), 购自广东南模生物科技有限公司, 生产许可证号为 SCXK (粤) 2022-0062。所有大鼠均饲养于温度 (22 ± 2) °C、相对湿度 (60 ± 5) %、每 12 h 昼夜交替的动物房内, 自由摄食、饮水。本研究方案经武汉贝赛模式生物中心实验动物福利与伦理管理委员会审批, 编号为 BSMS 动 (福) 第 2023-04-237A 号。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

取大鼠 50 只, 腹腔注射 VCD 80 mg/kg (以玉米油为溶剂, 剂量参考相关文献^[8]), 每天 1 次, 连续 14 d, 以复制 POI 模型。造模期间, 每天进行阴道上皮脱落细胞涂片检查, 观察其动情周期变化情况, 若无变化或周期明显延长, 则表明造模成功^[8]。本研究共 7 只大鼠造模失败, 其余 43 只造模成功。从造模成功的大鼠中随机选取 40 只, 分为模型组、隐丹参酮低剂量组、隐丹参酮高剂量

组、隐丹参酮高剂量+AMD3100组,每组10只。取剩余大鼠10只,以生理盐水代替VCD注射,作为对照组。

隐丹参酮低、高剂量组大鼠分别灌胃50、100 mg/kg的隐丹参酮(以二甲基亚砷为溶剂,剂量参考相关文献^[6])并腹腔注射与AMD3100等体积的生理盐水;隐丹参酮高剂量+AMD3100组大鼠灌胃100 mg/kg的隐丹参酮并腹腔注射2.5 mg/kg的AMD3100(以水为溶剂,剂量参考相关文献^[9]),对照组和模型组大鼠以相同方式灌胃并腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续4周。

2.2 样本采集

末次给药后,抽取各组大鼠主动脉血3 mL,备测;然后将大鼠麻醉,断头处死,取其卵巢组织,备测。

2.3 血清中E₂、FSH、LH水平检测

取“2.2”项下各组大鼠血液样品,静置后以3 500 r/min离心10 min,收集上层血清,根据相应试剂盒说明书方法操作,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法以酶标仪检测其血清中E₂、FSH、LH水平。

2.4 卵巢组织中ROS、MDA、SOD、GSH-Px水平检测

取“2.2”项下各组大鼠卵巢组织适量,低温匀浆后,以4 000 r/min离心10 min,取上清液,按照相应试剂盒说明书方法操作,分别采用化学荧光法、硫代巴比妥酸法、羟胺法、比色法以紫外分光光度计检测其卵巢组织中ROS、MDA、SOD、GSH-Px水平。

2.5 卵巢组织形态观察

取“2.2”项下各组大鼠卵巢组织适量,以4%多聚甲醛溶液固定24 h;取部分,经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后切片,进行HE染色后,使用显微镜观察其卵巢组织的形态学变化。

2.6 卵巢组织细胞凋亡检测

采用TUNEL法检测。取“2.5”项下各组大鼠经固定的卵巢组织适量,经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后切片,按照试剂盒说明书方法进行TUNEL染色,使用显微镜观察其卵巢组织细胞凋亡情况并计算细胞凋亡率:细胞凋亡率=TUNEL阳性细胞(呈紫红色)数/总细胞数×100%。

2.7 卵巢组织中SDF-1、CXCR4 mRNA表达检测

采用qRT-PCR法检测。取“2.2”项下各组大鼠卵巢组织适量,低温匀浆。取部分,以Trizol试剂提取总RNA,经纯度、含量检测后,将RNA逆转录为cDNA,再进行PCR扩增。反应体系包括cDNA模板1.6 μL,2×Ultra SYBR Mixture 10 μL,正、反向引物各0.8 μL,ddH₂O 6.8 μL。反应条件如下:95 °C预变性30 s;95 °C变性15 s,60 °C退火/延伸30 s,共40个循环。以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算SDF-1、CXCR4 mRNA的相对

表达量,结果以对照组为参照进行归一化处理。SDF-1的正向引物为5'-GAGCCAACGTCAAACATCTGAA-3',反向引物为5'-TCCAGGTACTCTTGATCCACTTTA-3',产物大小为142 bp;CXCR4的正向引物为5'-AGTGACCCTCTGAGGCGTTTG-3',反向引物为5'-GAAGCAGGGTTCCTTGTGGAGT-3',产物大小为115 bp;β-actin的正向引物为5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3',反向引物为5'-GTCCTCCTGCTTGCTGATCC-3',产物大小为126 bp。

2.8 卵巢组织中caspase-3、Bax、Bcl-2、SDF-1、CXCR4蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.7”项下各组大鼠卵巢组织匀浆适量,以裂解液裂解后提取总蛋白,经定量后将其煮沸变性。取变性蛋白适量,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上,以脱脂奶粉室温封闭2 h;洗膜后,加入caspase-3、Bax、Bcl-2、SDF-1、CXCR4、β-actin一抗(稀释比例均为1:1 500),于4 °C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),于37 °C下孵育2 h;洗膜后,以ECL试剂显影。成像后,使用Image J软件分析蛋白的相对表达量(即各目的蛋白与内参蛋白β-actin的条带灰度值比值)。

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.1软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 隐丹参酮对大鼠血清中E₂、FSH、LH水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中E₂水平显著降低,FSH、LH水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠血清中E₂水平均显著升高,FSH、LH水平均显著降低($P<0.05$)。与隐丹参酮高剂量组比较,隐丹参酮高剂量+AMD3100组大鼠血清中E₂水平显著降低,FSH、LH水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠血清中E₂、FSH、LH水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	E ₂ /(nmol/L)	FSH/(IU/L)	LH/(IU/L)
对照组	24.72±2.59	17.28±1.62	6.23±0.57
模型组	10.34±1.24 ^a	32.47±2.93 ^a	15.87±1.36 ^a
隐丹参酮低剂量组	14.87±1.68 ^b	27.52±2.48 ^b	12.41±1.15 ^b
隐丹参酮高剂量组	19.56±2.17 ^b	22.64±2.17 ^b	8.74±0.82 ^b
隐丹参酮高剂量+AMD3100组	13.61±1.46 ^c	28.39±2.75 ^c	13.67±1.24 ^c

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与隐丹参酮高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.2 隐丹参酮对大鼠卵巢组织中 ROS、MDA、SOD、GSH-Px 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 SOD、GSH-Px 水平均显著降低,ROS、MDA 水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠卵巢组织中 SOD、GSH-Px 水平均显著升高,ROS、MDA 水平均显著降低($P < 0.05$)。与隐丹参酮高剂量组比较,隐丹参酮高剂量+AMD3100 组大鼠卵巢组织中 SOD、GSH-Px 水平均显著降低,ROS、MDA 水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠卵巢组织中 ROS、MDA、SOD、GSH-Px 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ROS/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)	SOD/(ng/mL)	GSH-Px/(U/mL)
对照组	65.32±6.14	3.65±0.38	4.76±0.48	86.74±9.52
模型组	127.54±9.83 ^a	7.84±0.73 ^a	2.14±0.24 ^a	32.51±3.46 ^a
隐丹参酮低剂量组	106.73±8.57 ^b	6.37±0.56 ^b	3.06±0.32 ^b	53.38±5.24 ^b
隐丹参酮高剂量组	82.46±7.34 ^c	4.83±0.47 ^c	3.94±0.41 ^c	71.65±6.87 ^c
隐丹参酮高剂量+AMD3100组	110.89±9.26 ^c	6.79±0.71 ^c	2.68±0.27 ^c	48.92±4.75 ^c

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与隐丹参酮高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3.3 隐丹参酮对大鼠卵巢组织形态变化的影响

对照组大鼠卵巢组织无异样;与对照组比较,模型组大鼠卵巢萎缩,卵巢皮层中原始卵泡数量明显减少,有部分细胞出现坏死,闭锁卵泡数量增多,颗粒层排列松散。与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠卵巢组织上述病变均有明显改善;与隐丹参酮高剂量组比较,隐丹参酮高剂量+AMD3100 组大鼠卵巢组织病理损伤显著加重。结果见图 1。

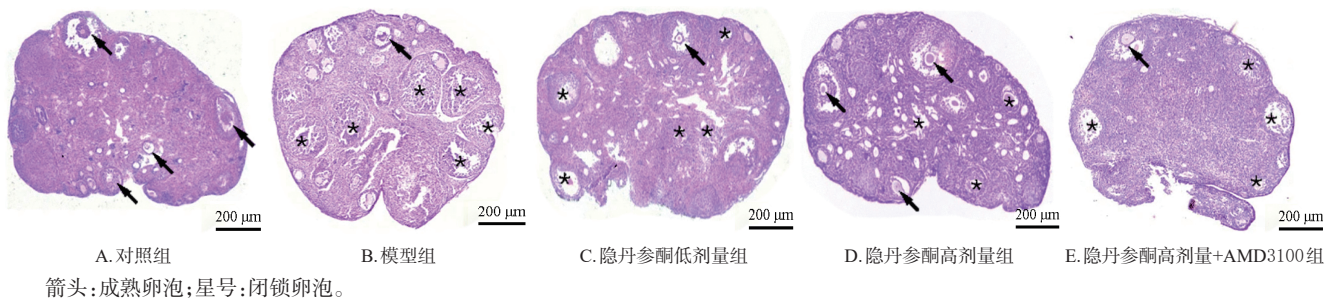


图 1 各组大鼠卵巢组织形态的显微图(HE 染色)

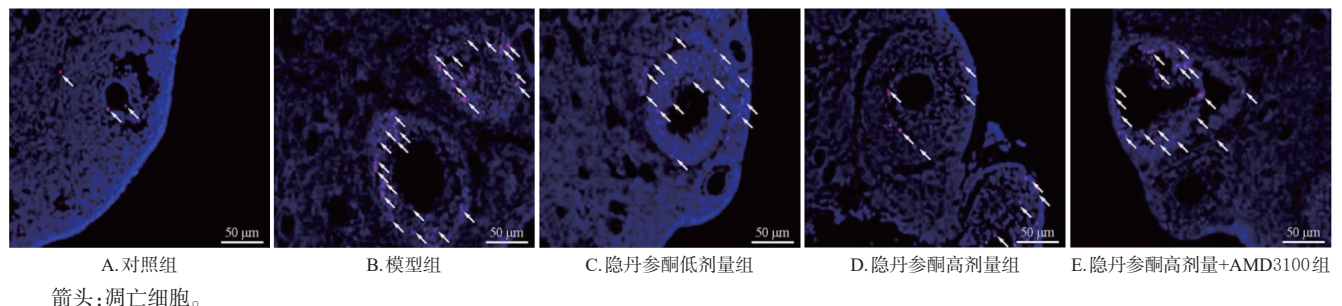


图 2 各组大鼠卵巢组织细胞凋亡的显微图(TUNEL 染色)

3.4 隐丹参酮对大鼠卵巢组织细胞凋亡的影响

与对照组[(1.43±0.16)%]比较,模型组大鼠卵巢组织凋亡细胞增多,凋亡率[(8.57±0.83)%]显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠卵巢组织凋亡细胞均明显减少,凋亡率[(6.24±0.59)%、(3.78±0.36)%]均显著降低($P < 0.05$)。与隐丹参酮高剂量组比较,隐丹参酮高剂量+AMD3100 组大鼠卵巢组织凋亡细胞增多,凋亡率[(6.85±0.72)%]显著升高($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.5 隐丹参酮对大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 mRNA 表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 mRNA 的相对表达量均显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠上述指标均显著升高($P < 0.05$)。与隐丹参酮高剂量组比较,隐丹参酮高剂量+AMD3100 组大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 mRNA 的相对表达量均显著降低($P < 0.05$)。结果见表 3。

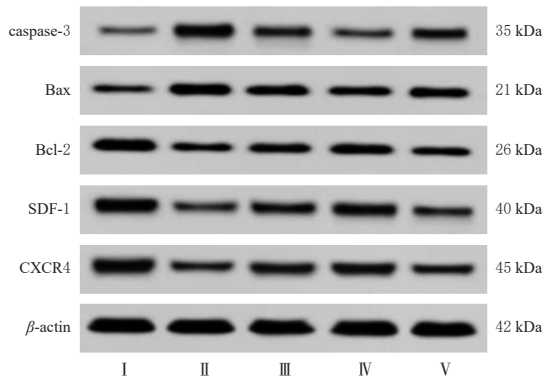
3.6 隐丹参酮对大鼠卵巢组织中相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bax 蛋白的相对表达量均显著升高,Bcl-2、SDF-1、CXCR4 蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,隐丹参酮低、高剂量组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bax 蛋白的相对表达量均显著降低,Bcl-2、SDF-1、CXCR4 蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。与隐丹参酮高剂量组比较,隐丹参酮高剂量+AMD3100 组大鼠卵巢组织中 caspase-3、Bax 蛋白的相对表达量均显著升高,Bcl-2、SDF-1、CXCR4 蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$)。结果见图 3、表 4。

表3 各组大鼠卵巢组织中SDF-1、CXCR4 mRNA的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SDF-1 mRNA	CXCR4 mRNA
对照组	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.09
模型组	0.37 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.03 ^a
隐丹参酮低剂量组	0.54 ± 0.04 ^b	0.48 ± 0.03 ^b
隐丹参酮高剂量组	0.78 ± 0.07 ^b	0.72 ± 0.06 ^b
隐丹参酮高剂量+AMD3100组	0.49 ± 0.05 ^c	0.43 ± 0.04 ^c

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与隐丹参酮高剂量组比较, $P < 0.05$ 。



I: 对照组; II: 模型组; III: 隐丹参酮低剂量组; IV: 隐丹参酮高剂量组; V: 隐丹参酮高剂量+AMD3100组。

图3 各组大鼠卵巢组织中相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠卵巢组织中相关蛋白的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	caspase-3	Bax	Bcl-2	SDF-1	CXCR4
对照组	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.81 ± 0.07	1.03 ± 0.09	0.94 ± 0.08
模型组	0.73 ± 0.06 ^a	0.76 ± 0.07 ^a	0.35 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.04 ^a
隐丹参酮低剂量组	0.54 ± 0.05 ^b	0.57 ± 0.06 ^b	0.48 ± 0.05 ^b	0.63 ± 0.06 ^b	0.54 ± 0.05 ^b
隐丹参酮高剂量组	0.38 ± 0.04 ^b	0.43 ± 0.04 ^b	0.67 ± 0.06 ^b	0.79 ± 0.07 ^b	0.73 ± 0.04 ^b
隐丹参酮高剂量+AMD3100组	0.59 ± 0.06 ^c	0.62 ± 0.05 ^c	0.41 ± 0.04 ^c	0.60 ± 0.05 ^c	0.42 ± 0.03 ^c

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与隐丹参酮高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

POI是育龄期女性的常见内分泌疾病,发病率为1%~2%^[2]。临床实践显示,POI可引发一系列并发症,如生殖器官萎缩、心脑血管疾病、骨质疏松、老年痴呆等,且目前尚无有效治疗手段,严重威胁女性健康^[10]。隐丹参酮是传统中药的活性成分,可调控PCOS大鼠的激素水平,降低其炎症反应和卵巢组织损伤,改善卵巢功能^[11];同时,该成分还可通过调节雌激素通路来改善PCOS大鼠子宫内膜的内分泌代谢功能^[12]。可见,隐丹参酮具有调控激素水平、改善卵巢功能的活性。

E_2 、FSH、LH具有调控卵泡成熟、调节排卵周期的功能,血清中 E_2 、FSH、LH水平能反映体内激素水平,当POI发生时,患者血清中FSH、LH水平均显著升高,而 E_2 水平则显著降低,进而影响卵巢内分泌功能及生殖功能^[13]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中FSH、LH水平均显著升高, E_2 水平显著降低;与模型组比较,隐丹参酮各剂量组大鼠血清中FSH、LH水平均显著降低, E_2 水

平均显著升高。进一步通过HE染色观察其卵巢组织形态发现,与对照组比较,模型组大鼠卵巢萎缩,原始卵泡数量明显减少,闭锁卵泡数量增多,而隐丹参酮可改善POI大鼠的卵巢组织损伤。这提示该成分可显著改善POI大鼠的激素失调,减轻其卵巢损伤。

氧化应激是诱发POI的因素之一。其中,ROS的过量聚集会破坏细胞结构,从而诱导细胞凋亡;MDA是脂质过氧化产物,可反映机体的氧化损伤程度;SOD是一种抗氧化酶,具有减少ROS的作用;GSH-Px是一种过氧化物酶,可分解ROS,降低体内ROS水平^[13]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中ROS、MDA水平均显著升高,SOD、GSH-Px水平均显著降低,提示POI大鼠体内存在氧化应激损伤。与模型组比较,隐丹参酮各剂量组大鼠卵巢组织中SOD、GSH-Px水平均显著升高,ROS、MDA水平均显著降低,提示大鼠抗氧化能力增强,氧化应激损伤有所减轻。

Bcl-2为抗凋亡蛋白,Bax为促凋亡蛋白,两者可通过激活caspase-3蛋白来促进细胞凋亡^[6]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中caspase-3、Bax蛋白的表达和细胞凋亡率均显著上调或升高,Bcl-2蛋白的表达显著下调;与模型组比较,隐丹参酮各剂量组大鼠卵巢组织中caspase-3、Bax蛋白的表达和细胞凋亡率均显著下调或降低,Bcl-2蛋白的表达均显著上调,提示隐丹参酮可抑制POI大鼠卵巢组织的细胞凋亡。

CXCR4是SDF-1的受体,其信号转导在干细胞迁移和募集过程中具有重要作用。研究指出,激活SDF-1/CXCR4轴可激活干细胞中的相关通路,促进干细胞从骨髓迁移至外周血中,进一步归巢到受损组织,最终促进组织修复;而抑制SDF-1/CXCR4轴可减少POI大鼠归巢间充质干细胞的数量,减弱间充质干细胞对POI的干预效果^[14]。Xiu等^[15]研究表明,激活SDF-1/CXCR4轴可促进肝损伤大鼠干细胞迁移、归巢,从而促进肝损伤修复。本研究结果发现,与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中SDF-1、CXCR4 mRNA及蛋白的表达均显著下调,提示POI的发生可能与SDF-1/CXCR4轴受到抑制有关;经隐丹参酮干预后,大鼠卵巢组织中SDF-1、CXCR4 mRNA及蛋白的表达均显著上调,提示经隐丹参酮干预后SDF-1/CXCR4轴被激活。为进一步验证隐丹参酮对卵巢功能的改善作用与该信号轴的相关性,本研究在隐丹参酮的基础上联用了CXCR4抑制剂AMD3100,结果显示,AMD3100可显著逆转隐丹参酮对POI大鼠上述指标的改善作用。

综上所述,隐丹参酮可通过激活SDF-1/CXCR4轴来减少POI大鼠卵巢组织细胞凋亡,减轻氧化应激,调节血清激素水平,改善卵巢组织损伤。但隐丹参酮对POI大鼠的影响可能还涉及其他靶点/通路,具体作用机制尚需深入探索。

参考文献

- [1] CACCIOTTOLA L, DONNEZ J, DOLMANS M M. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation prior to iatrogenic premature ovarian insufficiency[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2022, 81:119-133.
- [2] TUCKER E J, BAKER M J, HOCK D H, et al. Premature ovarian insufficiency in CLPB deficiency: transcriptomic, proteomic and phenotypic insights[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022, 107(12):3328-3340.
- [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] WEN M X, DOU X Q, ZHANG S Z, et al. CTBP1-AS up-regulation is associated with polycystic ovary syndrome and can be effectively downregulated by cryptotanshinone [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(1):245.
- [5] 匡洪影, 马珂昕, 李威, 等. 隐丹参酮调节 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞生殖内分泌机能的机制研究[J]. *中医药学报*, 2017, 45(5):40-44.
- KUANG H Y, MA K X, LI W, et al. Mechanism of cryptotanshinone regulating reproductive endocrine dysfunction in the granulosa cells of PCOS rats[J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2017, 45(5):40-44.
- [6] HUANG J Z, ZENG F, XU Q G, et al. Cryptotanshinone decreases granulosa cell apoptosis and restores ovarian function in mice with premature ovarian failure[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2020, 39(3):277-283.
- [7] LING L, HOU J Y, LIU D D, et al. Important role of the SDF-1/CXCR4 axis in the homing of systemically transplanted human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) to ovaries in rats with chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency (POI) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):79.
- [8] 罗嘉琦, 杜小利, 陈冬梅, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨浓缩当归丸对缓解卵巢功能不全大鼠卵巢氧化应激损伤的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(13):1-9.
- LUO J Q, DU X L, CHEN D M, et al. Effect and mechanism of Nongsuo dangguiwan in relieving oxidative stress in premature ovarian insufficiency rats based on Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(13):1-9.
- [9] 刘玄林, 熊伟. 槲皮素调节 SDF-1/CXCR4 轴对下肢动脉硬化闭塞症大鼠的治疗作用[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(4):455-460.
- LIU X L, XIONG W. Therapeutic effect of quercetin on rats with arteriosclerosis occlusive disease of the lower extremities by regulating SDF-1/CXCR4 axis[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2023, 40(4):455-460.
- [10] XU B Y, LI Z Q, LI S, et al. Pathogenic variants in TSC2 might cause premature ovarian insufficiency through activated mTOR induced hyperactivation of primordial follicles[J]. *Fertil Steril*, 2022, 118(6):1139-1149.
- [11] YANG Y J, YANG L, QI C, et al. Cryptotanshinone alleviates polycystic ovary syndrome in rats by regulating the HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5):3851-3861.
- [12] LIU Y C, WANG J W, LI J, et al. Mechanism of cryptotanshinone to improve endocrine and metabolic functions in the endometrium of PCOS rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt. 3):117346.
- [13] 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, 24(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, 24(12):4889-4896.
- [14] LING L, HOU J Y, WANG Y, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the migration and homing of human amnion-derived mesenchymal stem cells to ovaries in rats with premature ovarian insufficiency[J]. *Cell Transplant*, 2022, 31:9636897221129171.
- [15] XIU G H, LI X L, YIN Y Y, et al. SDF-1/CXCR4 augments the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of lipopolysaccharide-induced liver injury by promoting their migration through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Cell Transplant*, 2020, 29:963689720929992.
- (收稿日期:2024-04-25 修回日期:2024-09-05)
(编辑:张元媛)