

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.15.012
文章编号: 1005-8982 (2021) 15-0067-07

妇科疾病专题·论著

葛根素对顺铂诱导小鼠卵巢早衰的作用研究*

张洪英¹, 梁瑞¹, 曹长顺¹, 柯宗文¹, 杜益茗¹, 杨艳凤², 梁艳明³

(1. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州市中医院, 辽宁 锦州 121000;
3. 锦州市中心医院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: **目的** 探讨葛根素对顺铂诱导小鼠卵巢早衰的作用。**方法** 选取雌性C57BL/6J小鼠,随机分为3组,每组10只。给药途径均为腹腔注射。模型组给予生理盐水(4.0 ml/kg×9 d),顺铂(4.5 mg/kg×9 d)及生理盐水(4.0 ml/kg×5 d);实验组给予葛根素(200.0 mg/kg×9 d),葛根素(200.0 mg/kg×5 d)及顺铂(4.5 mg/kg×5 d);对照组给予同体积生理盐水14 d。实验第9天,称重小鼠并记录,观察小鼠一般活动。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中激素水平;HE染色观察卵巢组织形态结构;免疫荧光染色检测小鼠卵巢组织中Cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax的表达;Western blotting法检测小鼠卵巢组织中Cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达量。**结果** 模型组小鼠一般情况差;实验组小鼠相对于模型组,一般情况有所改善;对照组、模型组及实验组小鼠的体重有差异,其中模型组与对照组相比体重呈现下降趋势,实验组相比模型组体重下降更加平缓($P < 0.05$)。模型组小鼠动情间期占动情周期的比例高于对照组($P < 0.05$);实验组小鼠动情间期占动情周期的比例低于模型组($P < 0.05$)。模型组小鼠血清FSH水平升高($P < 0.05$),E2、AMH水平降低($P < 0.05$),实验组小鼠血清E2、AMH水平较模型组升高($P < 0.05$),FSH水平降低($P < 0.05$)。对照组小鼠卵巢组织可见不同发育阶段的卵泡,成熟卵泡位于卵巢的边缘,颗粒细胞规则排列;模型组小鼠卵泡闭锁,颗粒细胞减少、排列紊乱;实验组小鼠闭锁卵泡减少,颗粒细胞有序排列且数目多。Cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax在3组小鼠卵巢组织中均有表达,且以颗粒细胞为主。模型组与对照癌比较,卵巢组织细胞中Bax、Cleaved caspase-3蛋白相对表达量增加($P < 0.05$),Bcl-2蛋白相对表达量减少($P < 0.05$);实验组与模型组相比,卵巢组织细胞中Bax、Cleaved caspase-3蛋白相对表达量减少($P < 0.05$),Bcl-2蛋白相对表达量增加($P < 0.05$)。**结论** 葛根素可以抑制卵巢组织细胞凋亡,恢复顺铂损伤小鼠卵巢的功能,改善小鼠一般活动。

关键词: 卵巢早衰;葛根素;凋亡

中图分类号: R711.75

文献标识码: A

Effect of puerarin on cisplatin induced premature ovarian failure in mouse*

Hong-ying Zhang¹, Rui Liang¹, Chang-shun Cao¹, Zong-wen Ke¹,
Yi-ming Du¹, Yan-feng Yang¹, Yan-ming Liang³

(1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Jinzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 3. Jinzhou Central Hospital, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To reveal the anti-apoptotic effect of puerarin on ovarian tissue cells, and to explain its protection of premature ovarian failure induced by cisplatin in mice. **Methods** Female C57BL/6J mice were randomly divided into three groups, 10 mice in each group receiving medicine by intraperitoneal injection. Model

收稿日期: 2021-01-05

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金(No:20180550352)

[通信作者] 梁艳明, E-mail: 48409962@qq.com

group was given normal saline (9 days) and cisplatin with normal saline (4.5 mg/kg × 5 days). The experimental group was given puerarin (200.0 mg/kg × 9 d) and puerarin with cisplatin (200.0 mg/kg and 4.5 mg/kg × 5 d). The Reference group was given the same volume of normal saline for 14 days. On the 9th day of the experiment, weight of mice were recorded to observe general activities. Concentration of hormone in plasma through the ELISA method and expression of apoptosis related proteins (cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bax) in mouse ovary through the Western blotting were detected. **Results** The general condition of mice in the experimental group was better than that in the model group; the body weight of the control group, model group, and experimental group were different. Compared with the control group, the weight of the model group showed a downward trend, and the weight loss of the experimental group was more gentle than that of the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The proportion of estrous intervals in the estrous cycle was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), while the proportion of estrous intervals in the experimental group was lower in the model group ($P < 0.05$); in the model group, the levels of serum FSH increased ($P < 0.05$), while the levels of E2 and AMH decreased ($P < 0.05$). The levels of serum E2 and AMH in the experimental group were higher than those in the model group ($P < 0.05$), and FSH level decreased ($P < 0.05$). HE staining showed that follicles at different developmental stages could be observed in the ovarian tissue of mice in the control group. Besides, the mature follicles were located at the edge of the ovary, and the granulosa cells arranged regularly. In the model group, the follicles were atresia, and granulosa cells decreased and arranged disorderly. However, in the experimental group, atresia follicles decreased, granulosa cells arranged orderly, and the number of granulosa cells was larger. Apoptosis-related proteins were expressed in all the three groups, mainly granulosa cells. In the model group, the expression of Bax and Cleaved caspase-3 increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of Bax and Cleaved caspase-3 decreased ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 increased ($P < 0.05$) in the experimental group. **Conclusion** Puerarin can restrain apoptosis of ovarian tissue, restore the function of ovary injured by cisplatin, and improve the general activities of mice.

Keywords: premature ovarian failure; puerarin; apoptosis

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是 < 40 岁女性因卵泡耗尽或停止发育所致卵巢功能减退到一定阶段所呈现的疾病状态^[1]。导致 POF 的因素很多, 如化疗或放疗、医源性因素、遗传变异、自身免疫性卵巢萎缩、各种环境因素(病毒、毒素和吸烟)等^[2]。顺铂是目前应用最为广泛的化疗药物之一, 能损伤卵巢功能结构^[3-4], 严重影响女性的身心健康。激素替代疗法已成为治疗 POF 的首选方案, 但也存在很大的致病风险。近年来由于化疗药物的广泛应用, 使 POF 的发病率逐年上升。对患有恶性肿瘤的育龄女性患者来说, 化疗损伤性腺功能, 是导致 POF 的一个重要原因。随着恶性肿瘤育龄女性患者远期生存率的升高, 为满足这些患者的生育需求及提高其生活质量, 临床需要寻找新的治疗 POF 的方法。葛根素是从葛根中提取的主要成分^[5], 具有与植物雌激素大豆异黄酮相似的化学结构^[6], 而且有抗凋亡的作用^[7]。葛根素在治疗 POF 的研究报道甚少。本研究应用顺铂诱导复制小鼠卵巢早衰模型, 探讨葛根素对顺铂诱导小鼠卵巢早衰的作用, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 30 只 6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠, 体重 19 ~ 24 g, 购自北京围通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0006, 1100111911080486。所有小鼠在 SPF 级动物实验中心饲养, 自由进食饮水, 室温 20 ~ 23℃、湿度 50% ~ 65%, 12 h/12 h 昼夜交替光照。小鼠随机分为对照组、模型组及实验组, 每组 10 只。所有实验操作均符合锦州医科大学动物伦理委员会要求。

1.1.2 药物和试剂 顺铂粉剂(购自美国 Sigma 公司), 葛根素注射液(购自成都天台山制药有限公司), Cleaved caspase-3 多克隆抗体、Bcl-2 多克隆抗体、Bax 多克隆抗体(购自美国 Abcam 公司), 山羊血清、过氧化氢、PBS、柠檬酸、柠檬酸钠、荧光二抗、PI、抗荧光衰减封片剂(购自北京中山生物技术有限公司), 小鼠 E2、FSH、AMH 的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(购自江苏酶标生物公司), DAB 显色试剂盒(购自上海碧云天生物公司)。

1.1.3 实验仪器 BT224S 电子秤、PB-21PH 仪(德国赛多利斯有限公司), LEICA-TP1020 全自动脱水机、LEICA-EG-1150H 包埋机、低温超速离心机(德国徕卡公司), SZX-7 体视显微镜、BX41 正置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司), 酶标仪(英国 Biochrom Anthos 公司), 光学显微镜(德国莱卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的复制 小鼠给药途径均为腹腔注射。模型组先给予 9 d 生理盐水 (4.0 ml/kg), 再给予 5 d 顺铂 (4.5 mg/kg) 及生理盐水 (4.0 ml/kg)。实验组先给予 9 d 葛根素 (200.0 mg/kg), 再给予 5 d 葛根素 (200.0 mg/kg) 及顺铂 (4.5 mg/kg)。对照组给予同体积生理盐水 14 d。实验第 9 天时, 称重小鼠并记录, 观察小鼠的活动、饮食及皮毛光泽度。实验第 15 天脱颈处死所有小鼠, 迅速心尖取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液待测。将小鼠卵巢标本放入 Davison's 溶液中固定 24 h, 待石蜡包埋切片。

1.2.2 小鼠阴道涂片 每天观察 3 组小鼠的饮食、活动及皮毛变化等情况, 每天 8:00 将 10 μ l 生理盐水注入小鼠阴道内, 反复冲洗 3 次后用消毒棉签插入小鼠阴道约 0.4 cm, 轻柔转动取出分泌物后置于载玻片上, 亚甲蓝染色, 观察结果。

1.2.3 ELISA 法检测 E2、FSH 及 AMH 水平 ELISA 试剂盒室温平衡 30 min。血清标本置冰上溶解 30 min。标准品稀释, 分别设置空白、标准、待检样品 3 个孔, 加样, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 洗涤后加入酶标试剂 50 μ l, 温育, 依次加显色液 A、B, 37 $^{\circ}$ C 显色 10 min, 滴加终止液, 加入终止液的 15 min 内在酶标仪 450 nm 处检测各孔的光密度(OD)值, 根据标准品的 OD 值及浓度绘制标准曲线, 计算出各样品的浓度。

1.2.4 小鼠卵巢组织石蜡切片制备及 HE 染色 室温下, 固定好的卵巢组织放入组织盒内水洗, 置于脱水机中, 梯度酒精脱水及二甲苯透明, 浸蜡, 置入包埋框中, 放平其底部, 倒入液体石蜡, 制成卵巢石蜡组织块。石蜡组织切片, 厚度为 5 μ m。切片在 53 $^{\circ}$ C 温水中展开, 平整贴附在载玻片上, 60 $^{\circ}$ C 烤片机烤片 3 h, 脱蜡水化, 苏木精染色, 分化反蓝处理, 伊红染色, PBS 水洗, 脱水透明封片, 光学显微镜观察结果。

1.2.5 免疫荧光染色 卵巢石蜡组织切片 60 $^{\circ}$ C 烤

片机烤片 45 min, 常规二甲苯及梯度酒精脱蜡至水, PBST 水洗 3 次, 每次 5 min, 抗原修复(98 $^{\circ}$ C 柠檬酸抗抗原修复液处理 10 min), 自然冷却 20 min, 加速冷却至室温, 10% 山羊血清室温封闭 60 min, 滴加一抗(1:200)置于湿盒中, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 取出湿盒恢复至室温, 滴加二抗室温避光孵育 30 min, PBST 水洗 3 次, 每次 5 min, 滴加抗荧光淬灭剂, 盖好盖玻片, 应用荧光显微镜激发光 460~550 nm 激发出绿色荧光图, 激发光 530~550 nm 激发出红色荧光图, 取图并分析结果。

1.2.6 western blotting 法检测 Cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量 将细胞裂解液 RIPA 加入各组卵巢组织, 置于冰面裂解 30 min, 卵巢组织经研磨后吸出 1.5 ml 置于 EP 管, 5 000 r/min 离心 5 min, 吸出 1.5 ml 上清液, 用 BCA 法测定卵巢组织中蛋白浓度, 根据 SDS-PAGE 试剂盒制胶, 电泳, 将胶片上的蛋白湿转印至 PVDF 膜, 将转印膜置于 1% BSA 中, 室温封闭 2 h, 加一抗稀释液 Cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax (浓度为 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤, 加入 HRP 标记的山羊抗兔的二抗, 室温中孵育 1 h, 采用底物化学发光 ECL 法显影, β -actin 为内参。

1.3 统计学方法

数据分析 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析或重量复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

正常组小鼠的毛光亮、动作灵敏、活跃、摄食频繁, 对外界刺激的反应性良好。模型组小鼠毛色泽暗淡、活动少、摄食少、对外界刺激的反应性差。实验组小鼠毛的光泽度、活动、摄食对外界刺激的反应性及灵活性相对模型组有改善。

2.1.1 小鼠体重变化 实验第 10 天、第 11 天、第 12 天、第 13 天、第 14 天 3 组小鼠体重比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点小鼠的体重有差异 ($F=397.937, P=0.000$); ②3 组小鼠的体重有差异 ($F=16.386, P=0.000$); ③3 组小鼠体重的变化趋势有差异 ($F=546.834, P=0.000$), 模型组与对照组相比体重呈现下降趋势, 实验组与模型组相比小鼠体重下降更加平缓。见表 1 和图 1。

表 1 3组小鼠体重比较 (n=10, g, $\bar{x} \pm s$)

组别	第10天	第11天	第12天	第13天	第14天	第15天
对照组	21.16 ± 0.84	21.22 ± 0.85	21.24 ± 0.79	21.32 ± 0.73	21.52 ± 0.68	21.54 ± 0.72
模型组	22.24 ± 1.48	20.92 ± 1.33	19.18 ± 1.38	18.00 ± 1.17	16.56 ± 1.06	15.66 ± 1.02
实验组	23.18 ± 0.70	22.66 ± 0.67	21.80 ± 0.69	21.20 ± 0.53	21.32 ± 0.63	20.68 ± 0.59

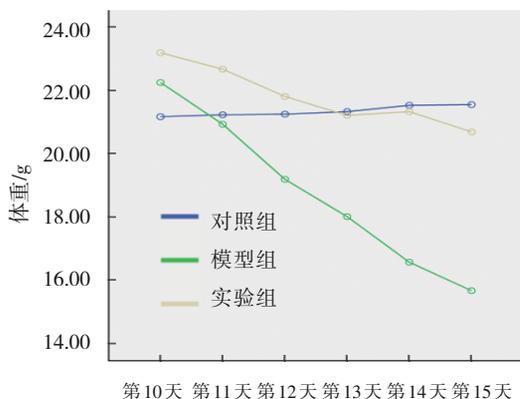


图 1 3组小鼠体重随时间变化趋势

2.1.2 动情周期观察 正常小鼠动情周期(4~6 d)分为4个阶段,各个时期阴道脱落细胞的变化为:

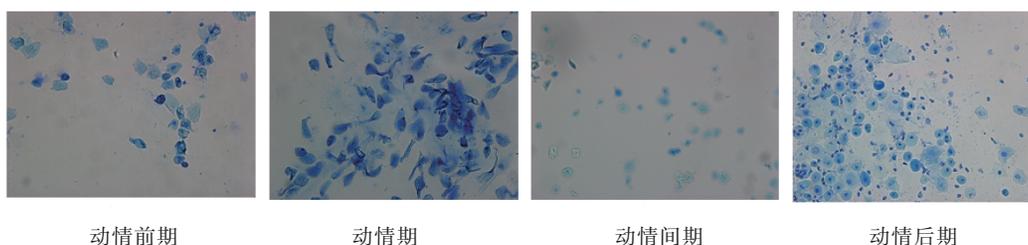
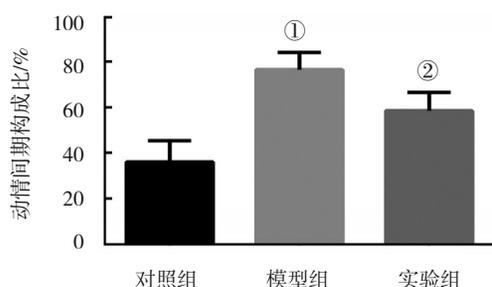


图 2 正常小鼠动情周期4个时期的阴道图 (亚甲蓝染色×400)



①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 3组小鼠动情间期构成比比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

2.2 3组小鼠血清E2、AMH、FSH水平比较

3组小鼠血清E2、AMH和FSH水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较,与对照组比较,模型组小鼠血清E2和AMH水平降低,FSH水平

①动情前期见大量的有核上皮细胞和少量的角化细胞,无白细胞;②动情期可见满视野的无核角化上皮细胞和少量有核上皮细胞;③动情后期有大量的白细胞出现,见少量的有核上皮细胞;④动情间期则出现大量的白细胞(见图2)。实验过程中通过阴道分泌物涂片发现,对照组有正常的动情周期,动情周期较为规则。3组的动情间期构成比(动情间期与总动情周期的比值)分别为对照组($36.33 \pm 0.09\%$),模型组($76.62 \pm 0.08\%$),实验组($58.33 \pm 0.08\%$),3组比较,差异有统计学意义($F = 29.955$, $P = 0.000$);进一步两两比较,模型组小鼠动情间期构成比高于对照组($P < 0.05$);实验组小鼠动情间期构成比低于模型组($P < 0.05$)(见图3)。

升高($P < 0.05$);与模型组比较,实验组小鼠血清E2和AMH水平升高,FSH水平降低($P < 0.05$)。见表2。

2.3 3组小鼠卵巢组织形态

对照组可见不同发育阶段的卵泡,成熟卵泡处于卵巢的边缘,颗粒细胞规则排列,有时呈现

表 2 3组小鼠血清激素水平比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

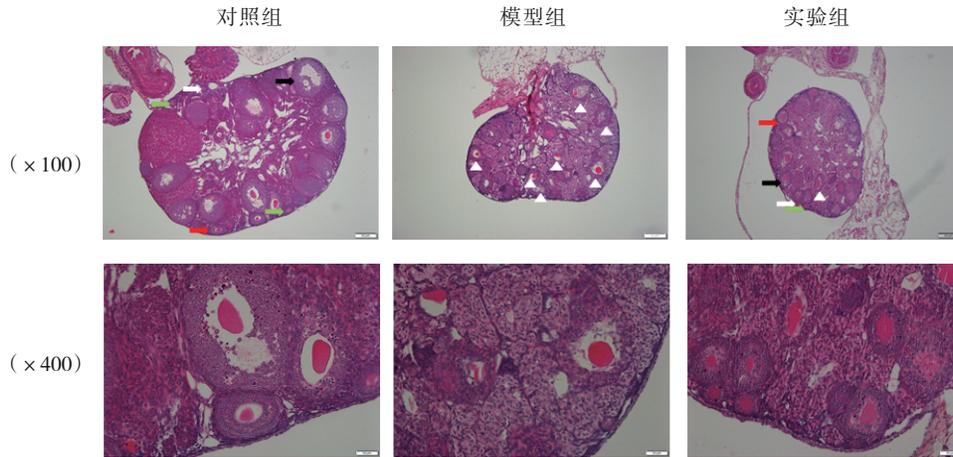
组别	E2/(pmol/L)	AMH/(mIU/ml)	FSH/(Pg/ml)
对照组	117.79 ± 2.81	40.01 ± 0.69	2.59 ± 0.12
模型组	74.55 ± 2.81 ^①	23.70 ± 2.09 ^①	3.60 ± 0.04 ^①
实验组	98.00 ± 6.24 ^②	65.38 ± 3.15 ^②	3.12 ± 0.04 ^②
F值	100.131	358.040	180.365
P值	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

放射状; 模型组的卵巢间质出现纤维化改变, 卵泡闭锁, 卵泡颗粒细胞减少、排列紊乱, 甚至消失、转化为结缔组织细胞; 实验组可见闭锁卵泡很少, 成熟卵泡处于卵巢边缘, 颗粒细胞有序排列并且数目多。见图 4。

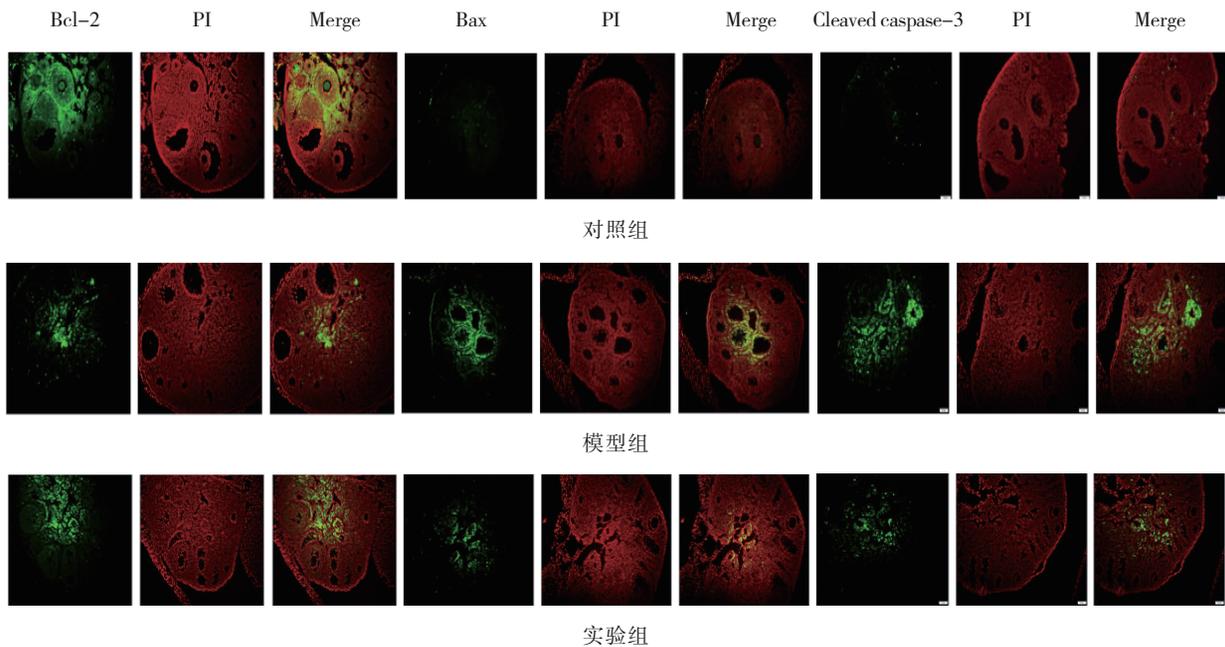
2.4 3 组小鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 的表达

免疫荧光染色结果显示 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3 在 3 组小鼠卵巢组织中均有表达, 且以颗粒细胞为主。见图 5。



白色箭头: 始基卵泡; 绿色箭头: 初级卵泡; 红色箭头: 次级卵泡; 黑色箭头: 窦卵泡; 白三角形: 闭锁卵泡。

图 4 3 组小鼠卵巢组织形态 (HE 染色)



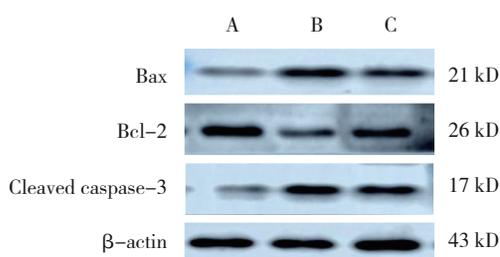
凋亡细胞显示为绿色荧光, 细胞核用 PI 染色, 显示为红色荧光。

图 5 3 组小鼠卵巢 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 的表达 (免疫荧光染色 × 200)

2.5 3 组小鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白相对表达量比较

3 组小鼠卵巢组织 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 模型组与对照组比较, 卵巢组织

细胞 Bcl-2 蛋白相对表达量减少, Bax、Cleaved caspase-3 蛋白相对表达量增加 ($P < 0.05$); 实验组与模型组比较, 卵巢组织 Bcl-2 蛋白相对表达量增加, Bax、Cleaved caspase-3 蛋白相对表达量减少 ($P < 0.05$)。见图 6 和表 3。



A:对照组; B:模型组; C:实验组。

图6 3组小鼠卵巢组织Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3蛋白表达

表3 3组小鼠卵巢组织Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Cleaved-caspase-3
对照组	96.52 ± 1.33	46.42 ± 2.13	96.07 ± 4.18
模型组	55.95 ± 1.75 ^①	100.21 ± 1.22 ^①	139.99 ± 2.77 ^①
实验组	89.18 ± 2.11 ^②	63.94 ± 2.54 ^②	113.71 ± 5.32 ^②
F值	452.710	542.075	82.301
P值	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

POF是早发性卵巢功能不全(premature ovarian insufficiency, POI)的最后阶段。近年来化疗药物的广泛应用是POF发病率逐年提升的主要因素^[8]。卵巢由含有大量卵泡的皮质和髓质构成,成熟卵泡位于卵巢边缘。卵泡是由卵母细胞及其周围排列规则、具有分泌雌激素功能的颗粒细胞等结构组成。POF的特点是垂体分泌的FSH水平升高,雌激素不足^[9-11]。POF主要临床表现有月经量减少、生育率低,潮热多汗、神经质、性欲减退,此外还有心脑血管疾病及骨质疏松、泌尿生殖道萎缩、抑郁症等风险,严重者有自杀倾向^[12]。POF的治疗方法很多,如激素替代治疗、免疫疗法、低温保卵技术及卵巢移植、心理治疗、干细胞治疗、基因治疗、中药及天然植物提取物治疗。激素替代治疗可以改善POF女性的潮热及阴道和泌尿系统症状,有助于保持骨骼健康,减少骨质疏松的机会,还可预防心脏病^[13],但是存在很大的患病风险如乳腺癌、子宫内膜癌及静脉血栓栓塞等^[14-16]。骨髓间充质干细胞(BMSC)对恢复顺铂引起POF中的受损卵巢起重要作用^[17],还可以在化疗引起的POF小鼠模型中恢复卵巢激素的产生并重新激活卵泡形成^[18]。POF的治疗方法很多,但尚

无长期应用于临床的方法。

有研究通过体内及体外实验证实了葛根素可以竞争E2受体,抑制雌激素发生作用,从而在子宫内膜异位症中起调控作用^[19]。本研究结果发现,模型组小鼠毛色泽暗淡、活动少、摄食少、对外界刺激的反应性差,体重下降明显,动情间期延长。虽然实验组的E2水平相对于模型组增加,但并不能证明葛根素有改善卵巢功能的作用。随之检测小鼠血清FSH、AMH水平,结果显示,相较于模型组,实验组小鼠血清FSH水平降低,AMH水平升高,这表示模型复制成功,同时表明,葛根素可以改善顺铂损伤的卵巢功能。小鼠卵巢组织切片HE染色结果显示,相对于模型组,实验组可见闭锁卵泡少,成熟卵泡位于卵巢周围,颗粒细胞排列有序且数目多,这通过体内实验证明葛根素对顺铂损伤的小鼠卵巢结构及功能具有保护作用。

凋亡是通过清除机体内病变细胞来维持正常组织生长的一种重要的程序性细胞死亡^[20]。凋亡途径的失调是导致人类疾病的重要因素。Bax是Bcl-2家族中重要组成部分,它包含BH1、BH2、BH33个结构域,并能诱导线粒体外膜释放细胞色素C,导致Caspase家族的激活引起级联反应^[21-22]。Bcl-2家族抗凋亡蛋白包括的Bcl-2和Bcl-X,可以通过阻止细胞色素C的释放,从而抑制凋亡发生^[23-24]。YU等^[7]通过体外实验证明葛根素可以通过调控Bax和Bcl-2的活性来抑制细胞色素C的释放和Cleaved caspase-3的降解,来抑制hFOB1.19细胞的凋亡。YUAN等^[24]通过实验证实葛根素通过抑制NF- κ B的级联反应,从而下调Bax及上调Bcl-2,对LPS诱导的H9c2心肌细胞凋亡具有保护作用。有研究指出在体外实验中葛根素对于卵巢颗粒细胞具有保护作用^[25-26]。本研究免疫荧光染色检测结果显示Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3在3组小鼠卵巢组织中均有表达,且以颗粒细胞为主。Western blotting法检测Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3蛋白相对表达量发现,模型组与对照组相比,卵巢组织细胞中Bax、Cleaved caspase-3蛋白相对表达量增加,Bcl-2蛋白相对表达量减少;实验组与模型组比较,卵巢组织细胞中Bax、Cleaved caspase-3蛋白相对表达量减少,Bcl-2蛋白相对表达量增加。因为卵巢由浅层的皮质和深层髓质构成,皮质占大多数,并且被大量的卵泡所占据,

卵泡主要是由卵母细胞及其周围的颗粒细胞构成, 结果表明凋亡蛋白大多数表达在颗粒细胞中。CHENG 等^[19]通过免疫组织化学及免疫蛋白印记等技术发现顺铂诱导的小鼠 POF 模型中, 颗粒细胞异常凋亡, 小鼠卵巢组织细胞 Bax 上调, Bcl-2 下调。本研究结果与其他研究结果一致。

综上所述, 顺铂可导致小鼠卵巢组织细胞凋亡, 以颗粒细胞为主, 引起卵巢功能减退。葛根素能抑制卵巢组织细胞凋亡, 恢复卵巢功能, 改善 POF 小鼠的一般活动及状态。葛根素对顺铂损伤的小鼠卵巢结构及功能均有保护作用, 为临床治疗化疗引起的 POF 提供新的治疗思路, 同时为完善葛根素的临床应用提供参考。

参 考 文 献 :

- [1] WU Y Y, LIANG C Y, LIU T T. Protective roles and mechanisms of polysaccharides from *Dendrobium officinale* on natural aging-induced premature ovarian failure[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 101: 953-960.
- [2] POURESMAEILI F, FAZELI Z. Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes[J]. *International Journal of Fertility & Sterility*, 2014, 8(1): 1-12.
- [3] OKTEM O, OKTAY K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve[J]. *Cancer Research*, 2007, 67(21): 10159-10162.
- [4] 韩萍, 邢军, 何艳舫, 等. 亮丙瑞林对顺铂所致大鼠卵巢毒性保护的实验研究[J]. *现代妇产科进展*, 2009(7): 37-41.
- [5] 楚纪明, 马树运, 李海峰, 等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. *食品与药品*, 2015, 17(2): 142-146.
- [6] 徐轶尔, 李秋红, 杨菲菲. 中药葛根的药理药[J]. *吉林中医药*, 2010, 30(11): 993-994.
- [7] YU D, MU S, ZHAO D, et al. Puerarin attenuates glucocorticoid-induced apoptosis of hFOB1.19 cells through the JNK- and Akt-mediated mitochondrial apoptotic pathways[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 36(2): 345-354.
- [8] CHELSEA A, STEPHANIE M E, CAREY K A, et al. Live birth outcomes after adolescent and young adult breast cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2018, 142(10): 1994-2002.
- [9] ANNA J F. Premature ovarian insufficiency: Pathogenesis and management[J]. *Journal of Mid-Life Health*, 2015, 6(4): 147.
- [10] 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 Research & Therapy*, 2019, 10(1): 198.
- [11] VUJOVIC S, IVOVIC M, TANCIC-GAJIC M, et al. Premature ovarian failure[J]. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 2012, 140: 806-811.
- [12] KIM M J, YIM G, PARK H Y. Vasomotor and physical menopausal symptoms are associated with sleep quality[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(2): e0192934.
- [13] WEBBER L, ANDERSON R A, DAVIES M, et al. HRT for women with premature ovarian insufficiency: a comprehensive review[J]. *Human Reproduction Open*, 2017, 2017(2): hox007. DOI: 10.1093/hropen/hox007..
- [14] 王丽, 张伶俐. 激素补充治疗的安全性研究进展[J]. *实用妇产科杂志*, 2016, (4): 262-265.
- [15] 孙晓寅, 莊志刚. 性激素与乳腺癌关系的研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2018, 37(9): 76-81.
- [16] WU X Y, CAI H, KALLIANPUR A, et al. Impact of premature ovarian failure on mortality and morbidity among Chinese women[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89597.
- [17] LIU J B, ZHANG H Y, ZHANG Y, et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats[J]. *Molecules and Cells*, 2014, 37(12): 865.
- [18] MOHAMED S A, SHALABY S M, ABDELAZIZ M, et al. Human mesenchymal stem cells partially reverse infertility in chemotherapy-induced ovarian failure[J]. *Reproductive Sciences*, 2018, 25(1): 51-63.
- [19] CHENG W, CHEN L Z, YANG S S, et al. Puerarin suppresses proliferation of endometriotic stromal cells partly via the MAPK signaling pathway induced by 17 β -estradiol-BSA[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45529.
- [20] NAGATA S, TANAKA M. Programmed cell death and the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(5): 333.
- [21] TAIT S W G, GREEN D R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(9): 621-632.
- [22] SHI Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis[J]. *Molecular Cell*, 2002, 9(3): 459-470.
- [23] VERMA S, SINGH A, MISHRA A. Complex disruption effect of natural polyphenols on Bcl-2-Bax: Molecular dynamics simulation and essential dynamics study[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2014, 33(5): 1-33.
- [24] YUAN Y, ZHOU H, WU Q Q, et al. Puerarin attenuates the inflammatory response and apoptosis in LPS-stimulated cardiomyocytes[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 11(2): 415-420.
- [25] 刘震坤, 董克勤, 金影. 葛根对雷公藤诱导的卵巢早衰模型大鼠的治疗作用[J]. *中国老年学杂志*, 2013(19): 128-129.
- [26] 熊敏. 不同浓度葛根素对顺铂致大鼠卵巢颗粒细胞损伤的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(12): 2751-2754.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 张洪英, 梁瑞, 曹长顺, 等. 葛根素对顺铂诱导小鼠卵巢早衰的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(15): 67-73.

Cite this article as: ZHANG H Y, LIANG R, CAO C S, et al. Effect of puerarin on cisplatin induced premature ovarian failure in mouse[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(15): 67-73.