

修银玲, 孙凯旋, 于月新. 白藜芦醇对小鼠卵巢早衰的干预作用及可能机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 81-86, 93.
Xiu YL, Sun KX, Yu YX. Effect of resveratrol on premature ovarian failure in mice and its possible mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 81-86, 93.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.011

白藜芦醇对小鼠卵巢早衰的干预作用及可能机制

修银玲, 孙凯旋, 于月新*

(中国人民解放军北部战区总医院 生殖医学科, 沈阳 110000)

【摘要】 目的 观察白藜芦醇对卵巢早衰小鼠的干预作用,并阐述其可能机制。方法 40只两月龄雌性小鼠随机分为4组,分别为对照组(Control)、模型组(Model group)、20 mg/kg RES组(20 mg/kg RES group)和40 mg/kg RES组(40 mg/kg RES group),每组10只。测量小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠相对重量比;采用HE染色观察小鼠卵巢组织中卵泡数量变化;RT-qPCR法检测卵巢组织中CyclinD1、Wnt1和 β -catenin mRNA表达;免疫组化染色观察卵巢组织中 β -catenin蛋白表达;Western blot法检测卵巢组织中Mvh、Oct4、SOD2、Nrf2、Bax和Bcl-2蛋白表达。结果 20 mg/kg RES组和40 mg/kg RES组小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠重量比均高于模型组;与模型组比较,20 mg/kg RES组和40 mg/kg RES组小鼠原始卵泡数量增加、闭锁卵泡数量下降($P < 0.05$),而卵巢组织中CyclinD1、Wnt1和 β -catenin mRNA表达增加($P < 0.05$);与模型组比较,20 mg/kg RES组和40 mg/kg RES组小鼠卵巢组织中 β -catenin阳性蛋白表达升高,且呈浓度依赖性;与模型组比较,20 mg/kg RES组和40 mg/kg RES组小鼠卵巢组织中Mvh、Oct4、SOD2、Nrf2和Bcl-2蛋白表达升高,Bax表达下降($P < 0.01$)。结论 白藜芦醇对卵巢早衰小鼠具有保护作用,其机制可能与抑制卵巢细胞凋亡,激活Wnt/ β -catenin通路促进卵巢功能恢复有关。

【关键词】 白藜芦醇;卵巢早衰;小鼠;卵巢;卵泡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0081-06

Effect of resveratrol on premature ovarian failure in mice and its possible mechanism

XIU Yinling, SUN Kaixuan, YU Yuexin*

(Department of Reproductive Medicine, General Hospital of the Northern Theater, Shenyang 110000, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the protective effect of resveratrol in mice with premature ovarian failure and to explore its possible mechanism. **Methods** Forty two-month-old female mice were randomly divided into four groups: control group (Control), model group, 20 mg/kg RES group, and 40 mg/kg RES group with 10 mice in each group. Changes in body weight and the ovarian weight coefficient were assessed. Follicle number changes in mouse ovarian tissue were observed by HE staining. Relative mRNA expression of cyclin D1, Wnt1 and β -catenin in ovarian tissues was measured by RT-qPCR. β -catenin protein expression in ovarian tissue was detected by immunohistochemical staining. Mvh, Oct4, SOD2, Nrf2, Bax and Bcl-2 protein expression in ovarian tissues was detected by Western blot. **Results** Body weight, ovary weight, and ovary/mouse weight ratio in 20 and 40 mg/kg RES groups were higher than those in the model group. Compared with the model group, the number of primordial follicles was increased and the number of atresia follicles was decreased in 20 and 40 mg/kg RES groups ($P < 0.05$), while mRNA expression of cyclin D1, Wnt1 and β -catenin was increased in ovarian tissues ($P < 0.05$). Compared with the model group, β -catenin protein expression was increased in ovarian tissues in 20 and 40 mg/kg RES groups in a concentration-dependent manner. Compared with the model group, Mvh, Oct4, SOD2, Nrf2 and Bcl-2 protein expression was increased and Bax expression was decreased in

[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2020JH2/10300118)。

[作者简介] 修银玲(1990—),女,硕士,主治医师,研究方向:生殖医学研究。E-mail:xiuyinling@126.com

[通信作者] 于月新(1973—),女,博士,主任医师,研究方向:卵巢早衰。E-mail:yuyuexinpingan@163.com

ovarian tissues of 20 and 40 mg/kg RES groups ($P < 0.01$). **Conclusions** The protective effect of resveratrol in mice with premature ovarian failure may be related to inhibition of ovarian cell apoptosis and activation of the Wnt/ β -catenin pathway to promote recovery of ovarian functions.

【Keywords】 resveratrol; premature ovarian failure; mice; ovary; follicle

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指女性在 40 岁前由于卵巢内卵泡提前衰竭或卵泡发育停滞, 导致的卵巢功能丧失^[1]。POF 的特点是雌激素水平低下, 促性腺激素 (Gn) 水平升高, 与绝经后妇女相同^[2]。近几年, 卵巢早衰的发病率有上升趋势, 研究认为 POF 与染色体缺陷、毒素暴露和自身免疫性疾病有关, 但多数患者病因尚不明确。经典的化疗药物如环磷酰胺 (CTX) 和白消安 (BU) 具有严重的生殖毒性, 常用于构建 POF 动物模型^[3]。

白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是一种多酚类天然植物抗毒素, 广泛存在于葡萄、果桑和其他植物中, 它具有多种药理作用, 如抗肿瘤、免疫调节、抗炎、抗氧化、细胞保护、抗凋亡等^[4]。文献报道, RES 可以通过降低 LH/LH/FSH 比值和 TNF- α 水平来改善卵泡发育^[5]。本研究观察 RES 对卵巢早衰小鼠的干预作用, 并通过检测 Wnt/ β -catenin 信号通路和抗氧化等指标, 探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 40 只, 体重 (20 \pm 0.5) g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供 [SCXK(辽)2017-0001], 小鼠饲养于北部战区总医院动物实验科 [SYXK(辽)2018-0021], 本研究经北部战区总医院动物伦理委员会批准 (202005068), 所有动物实验符合 3R 指导原则。

1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇 (美国 Sigma 公司, 货号 L1645); 环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX, 美国 Sigma 公司, 货号 C0768) 和白消安 (Busulfan, BUS, 美国 Sigma 公司, 货号 B2635); 兔抗鼠 β -catenin 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 SAB4501254); 兔抗鼠 Mvh 抗体 (美国

Sigma 公司, 批号 SAB540697); 兔抗鼠 Oct4 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 ZRB100); 兔抗鼠 SOD2 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 T4929); 兔抗鼠 Nrf2 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 SAB4501926); 兔抗鼠 Bax 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 A5367); 兔抗鼠 Bcl-2 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 A8924); 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号 SR1110-200T); PCR 引物 (Invitrogen 公司); 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司, 批号 14E25L13D124)。蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

C57BL/6 小鼠经腹腔注射 CTX (120 mg/kg) 和 BU (30 mg/kg) 制成 POF 模型, 观察 4 周。将 RES 溶解于生理盐水中, 造模同时灌胃给药 28 d。将小鼠分为 4 组: 对照组 (Control)、模型组 (Model group)、20 mg/kg RES 组 (20 mg/kg RES group) 和 40 mg/kg RES 组 (40 mg/kg RES group), 每组 10 只。在治疗最后 1 d 测量并记录小鼠和卵巢的重量。

1.3.2 苏木精-伊红 (HE) 染色观察卵巢组织与卵泡计数

取小鼠卵巢组织, 4% 多聚甲醛固定过夜, 石蜡包埋。HE 染色后观察卵巢形态特征, 计算闭锁率 (闭锁卵泡占卵泡总数的比例) 和原始卵泡率 (原始卵泡占卵泡总数的比例)。

1.3.3 RT-qPCR 检测 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达

采用 TRIzol 试剂提取卵巢总 RNA, 按照 PrimeScript RT-kit 方法, 通过逆转录获得 cDNA, 并按照 TB-Green-Mix-kit 说明书进行 RT-qPCR。表 1 列出了 RT-qPCR 引物序列, 内参采用 GAPDH。

表 1 引物序列 (5'-3')

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
CyclinD1	GATGAGGAAGTTGCTAGAA	TCGTCAGCCAATCGGTAAGTAG
Wnt1	GGTTTCTACTACGTTGCTACTGG	GGAATCCGTCACAGGTTTCGT
β -catenin	AACGGCTTTCGGTTGAGCTG	TGGCGATATCCAAGGGCTTC
GAPDH	GTCCTAGACAAAACGAGCGT	TGTCTCCACTCATAGTTGTTG

1.3.4 免疫组化染色观察卵巢组织 β -catenin 蛋白表达

卵巢组织石蜡切片经脱蜡、水化,3%过氧化氢中孵育 10 min,阻断非特异性反应,切片加 β -catenin 一抗孵育 4 h,然后加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗处理 15 min,DAB 显色试剂盒显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片,以 PBS 溶液作为一抗的阴性对照。

1.3.5 Western blot 法检测 Mvh、Oct4、 β -catenin、SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

取各组小鼠卵巢组织 50 μ g,RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,将膜清洗 3 次,然后二抗室温孵育 2 h,用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析,结果以目的蛋白相对表达量表示,目的蛋白相对表达量=目的蛋白 IOD 值/内参 β -actin IOD 值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行数据分析,数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间的统计学差异采用 t 检验,多组数据采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

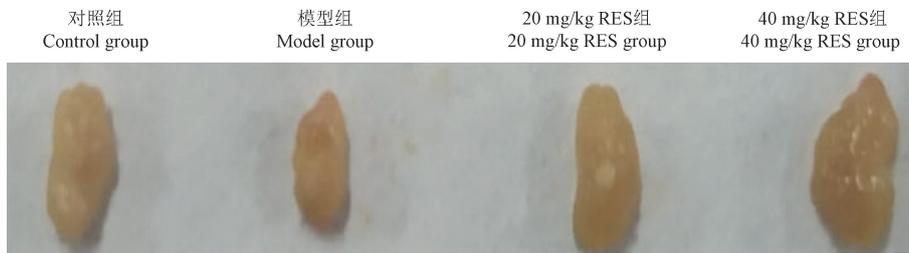


图 1 各组小鼠卵巢形态比较

Figure 1 Comparison of ovarian morphology between groups of mice

表 2 小鼠重量、卵巢重量和卵巢/小鼠重量比($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Mice weight, ovary weight and ovary/mice weight ratio

组别 Groups	小鼠重量(g) Mice weight	卵巢重量(g) Ovarian weight	卵巢/小鼠重量比 Ovary/mice weight ratio
对照组 Control group	39.42 \pm 1.14	0.0310 \pm 0.0027	0.000786 \pm 0.000049
模型组 Model group	25.60 \pm 0.66**	0.0067 \pm 0.0014**	0.000265 \pm 0.000054**
20 mg/kg RES 组 20 mg/kg RES group	30.24 \pm 1.57###	0.0157 \pm 0.0025###	0.000519 \pm 0.000077###
40 mg/kg RES 组 40 mg/kg RES group	33.50 \pm 0.87###	0.0204 \pm 0.0028###	0.000608 \pm 0.000085###

注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,### $P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, ### $P<0.01$.

2 结果

2.1 小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠相对重量比

与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢体积明显变大;20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠重量比均高于模型组,见图 1、表 2。

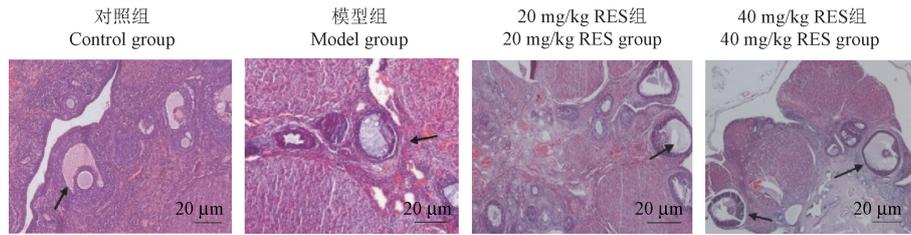
2.2 HE 染色观察小鼠卵巢组织的病理变化

与对照组相比,模型组小鼠原始卵泡数量下降($P<0.01$),而与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠原始卵泡数量增加($P<0.05$)。

与对照组相比,模型组小鼠闭锁卵泡数量增加($P<0.01$),而与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠闭锁卵泡数量下降($P<0.05$),见图 2、图 3。

2.3 小鼠卵巢中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达

与对照组比,模型组小鼠卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达下降($P<0.01$),而与模型组比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达增加($P<0.05$),见图 4。

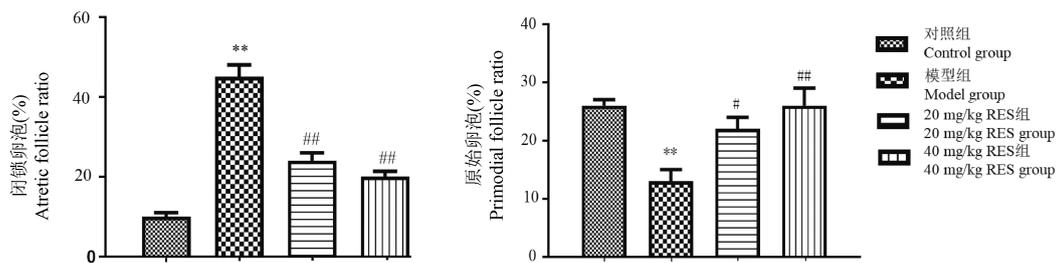


注:箭头所指示均为成熟卵泡。

图 2 白藜芦醇对小鼠卵巢组织的影响(HE)

Note. Arrows indicate mature follicles.

Figure 2 Effect of resveratrol on ovarian tissue of mice

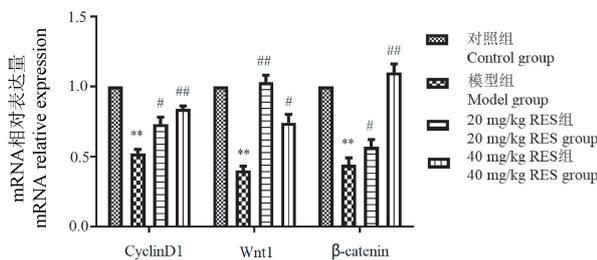


注:与对照组相比,*** $P < 0.01$;与模型组相比,## $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。

图 3 小鼠卵巢中原始卵泡和闭锁卵泡比例($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, ## $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Ratio of the primordial and atresia follicles in the ovaries



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

图 4 小鼠卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β-catenin mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Relative expression level of CyclinD1, Wnt1 and β-catenin mRNA in mouse ovarian tissue

2.4 卵巢组织中 β-caterin 蛋白表达情况

与对照组比,模型组小鼠卵巢组织中 β-caterin 阳性蛋白表达下降,而与模型组比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 β-caterin 阳性蛋白表达升高,见图 5。

2.5 卵巢组织中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达情况

与对照组相比,模型组小鼠卵巢组织中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达下降($P < 0.001$),而与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织

中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖性,见图 6。

2.6 卵巢组织中 SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况

与对照组相比,模型组小鼠卵巢组织中 SOD2、Nrf2 和 Bcl-2 表达下降,Bax 表达升高($P < 0.001$);与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 SOD2、Nrf2 和 Bcl-2 表达升高,Bax 表达下降($P < 0.001$),且呈浓度依赖性,见图 7。

3 讨论

40 岁前自然绝经这一临床现象称之为卵巢功能早衰,是危害女性健康的重要因素之一,目前各种中西医治疗方法效果均不理想^[6]。因此,为恢复卵巢功能寻找替代治疗药物至关重要。白藜芦醇是一种存在于多种植物中的非黄酮类多酚化合物,它具有抗菌、抗癌、抗炎、抗氧化等多方面的药理活性^[7]。在癌细胞中,RES 具有强大的抗炎作用和抗氧化作用,并发现可诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞^[8-9]。

本实验中,模型组小鼠体重、卵巢重量低于对

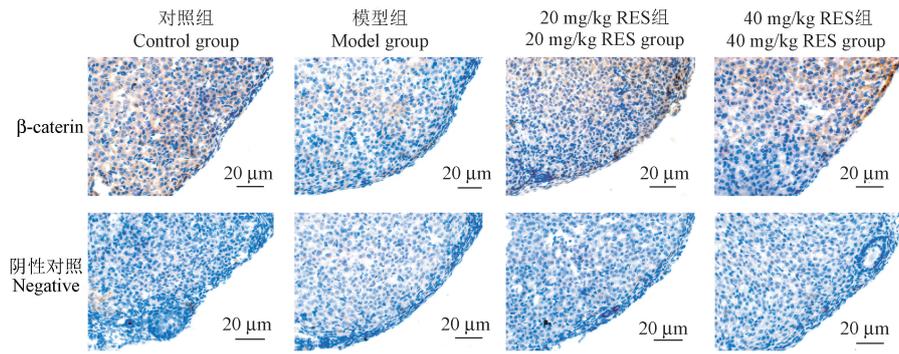
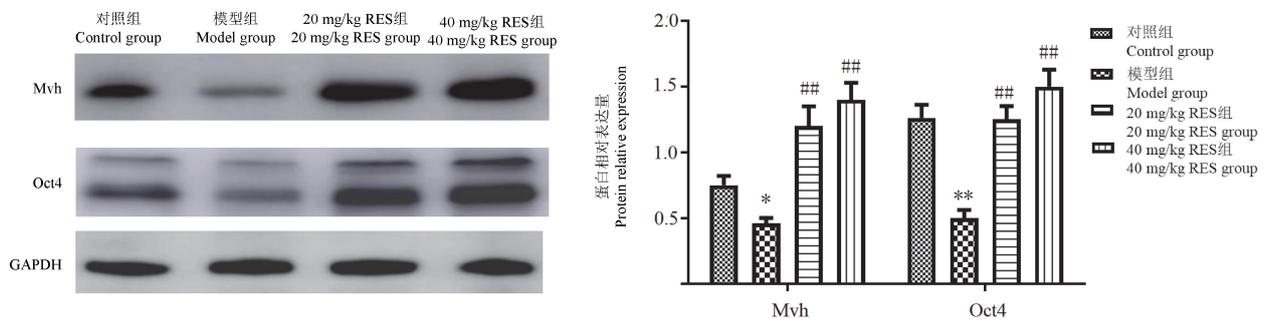


图 5 小鼠卵巢组织中 β -catenin 蛋白表达(免疫组化)

Figure 5 Protein expression of β -catenin in mice ovarian tissue (immunohistochemistry)

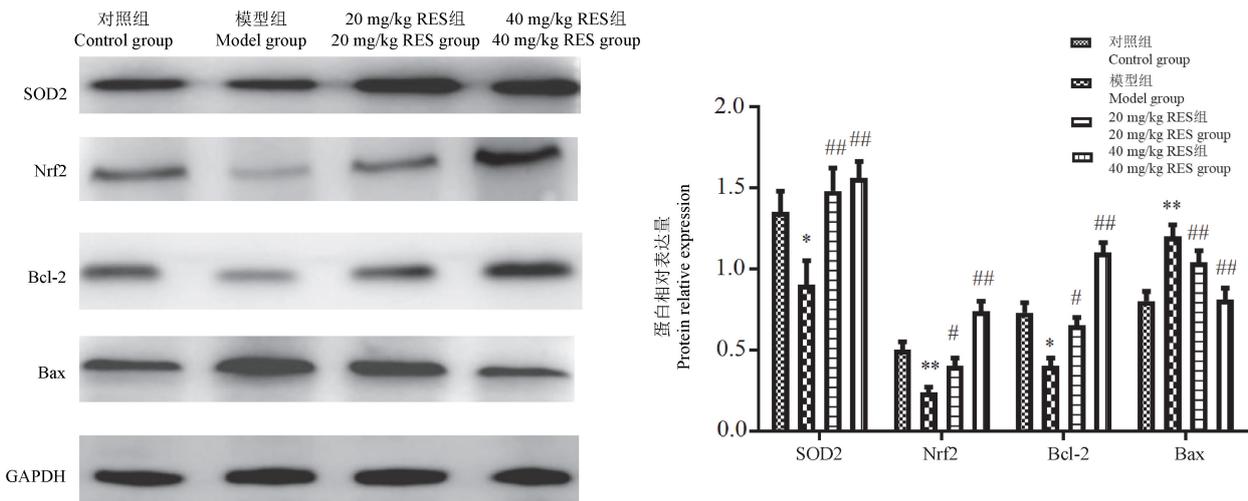


注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 6 白藜芦醇对卵巢组织中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of resveratrol on the expression of Mvh and Oct4 proteins in ovarian tissues



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 7 白藜芦醇对卵巢组织中 SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 7 Effect of resveratrol on the expression of SOD2, Nrf2, Bax and Bcl-2 proteins in ovarian tissues

对照组;HE 染色观察发现,与对照组比较,模型组小鼠卵巢体积和成熟卵泡数量减少,而闭锁卵泡数量增加;Western blot 检测发现,POF 小鼠卵巢 Mvh 和 Oct4 蛋白表达低于对照组,这些结果说明 POF 小鼠建模成功^[10]。

白藜芦醇能消除 POF 的免疫损伤,恢复卵巢功能,但其具体机制尚不明确^[11]。Mvh 是生殖细胞标志基因,Oct4 是胚胎干细胞标志物,通常以 Mvh 和 Oct4 作为指标评价雌性生殖干细胞(FGSCs)在小鼠体内的存活情况^[12]。HE 染色观察发现,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠原始卵泡数量低于对照组,但高于模型组;Western blot 法检测发现,RES 组 Mvh 和 Oct4 蛋白表达高于模型组,提示 RES 可能通过维持 FGSCs 的存活来保护卵巢功能,这与 HE 染色观察结果基本一致。

Wnt/ β -catenin 通路是经典的 Wnt 通路,参与机体许多重要生理活动,包括胚胎早期发育、生殖系统发育等^[13]。 β -catenin 蛋白是 Wnt 通路激活的重要标志,已被证明能持续增强 FSH 分泌,促进卵泡发育^[14];CyclinD1 位于 β -catenin 下游,是重要的细胞周期调控蛋白^[15-16]。免疫组化观察发现,模型组卵巢组织中 β -catenin 蛋白表达低于对照组,说明在 POF 小鼠卵巢组织中, β -catenin 表达下调,会抑制卵泡发育,可能对卵巢功能有一定影响,而 RES 组 β -catenin 阳性蛋白表达升高,且呈浓度依赖性,提示 RES 可能上调 β -catenin 表达,增强 FSH 分泌,促进卵泡发育;RT-qPCR 法检测发现,RES 组 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达均高于模型组,且 40 mg/kg RES 组 β -catenin mRNA 表达高于 20 mg/kg RES 组。这些结果进一步说明 RES 可能通过上调 Wnt1 mRNA 表达,使细胞质中的 β -catenin mRNA 表达增加,进入细胞核,从而激活 Wnt/ β -catenin 通路的下游靶基因 CyclinD1 mRNA,促进卵泡发育,有助于卵巢功能恢复,这与免疫组化观察结果基本一致。

Nrf2、HO-1 和 SOD 是体内抗氧化应激和维持氧化还原平衡的几个重要因子。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗氧化酶,可分为 SOD1、SOD2 等,具有清除自由基,保护机体免受氧自由基损伤^[17-18]。Nrf2 为调控机体抗氧化应激反应的核转录因子,能够显著诱导机体的内源性抗氧化应答^[19]。Western blot 检测发现,模型组 SOD2 和 Nrf2 蛋白表达低于对照组($P < 0.05$),提示 POF 可抑制

SOD2 和 Nrf2 蛋白表达,导致 ROS 积累,使卵巢功能受损。而 RES 组 SOD2 和 Nrf2 蛋白表达高于模型组($P < 0.05$),且呈浓度依赖性,提示当 POF 诱发卵巢氧化应激时,RES 可促进 Nrf2 激活并进入细胞核,启动下游抗氧化基因 SOD2 表达,起到清除自由基作用,延缓卵巢衰老。

Bax 和 Bcl-2 均是 Bcl-2 家族的重要分子,Bcl-2 为抗凋亡蛋白,而 Bax 为促凋亡蛋白。Western blot 检测发现,与对照组比较,模型组小鼠卵巢组织中 Bcl-2 表达下降,Bax 表达升高,说明 POF 可促进卵巢细胞凋亡,损害卵巢功能;与模型组比较,RES 组 Bcl-2 表达增加,Bax 表达减少,说明 RES 可抑制卵巢细胞凋亡,提高细胞存活率。

综上所述,白藜芦醇对卵巢早衰小鼠具有保护作用,其机制可能与抑制卵巢细胞凋亡,以及激活 Wnt/ β -catenin 通路促进卵巢功能恢复有关。

参考文献:

- [1] Sukur YE, Kivancli IB, Ozmen B, et al. Ovarian aging and premature ovarian failure [J]. J Turk Ger Gynecol Assoc, 2014, 15(3): 190-196.
- [2] 胥风华,侯亚宁,葛鹏玲,等. 卵巢早衰中医治疗特色 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 25-28.
- [3] 朱玲,章雅琼,彭艳丽,等. 左归丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢 GDF-9/Smad 2 信号转导的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1367-1371.
- [4] Li T, Chen LL, Yu YY, et al. Resveratrol alleviates hypoxia/reoxygenation injury-induced mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 2774-2780.
- [5] Rencber SF, Ozbek SK, Eraldemir C, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study [J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1): 55.
- [6] Menezes C, Pravata GR, Yela DA, et al. Women with premature ovarian failure using hormone therapy do not experience increased levels of depression, anxiety and stress compared to controls [J]. J Affect Disord, 2020, 273(1): 562-566.
- [7] El-Readi MZ, Eid SY, Abdelghany AA, et al. Resveratrol mediated cancer cell apoptosis, and modulation of multidrug resistance proteins and metabolic enzymes [J]. Phytomedicine, 2019, 55(46): 269-281.
- [8] Ozturk Y, Gunaydin C, Yalcin F, et al. Resveratrol enhances apoptotic and oxidant effects of paclitaxel through TRPM2 channel activation in DBTRG glioblastoma cells [J]. Oxidative Med Cell Longev, 2019, 46(5): 19865-19878.

(下转第 93 页)