

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research

栀子苷调节 Nrf2/HO-1 信号通路对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗及氧化应激损伤的研究

Research of geniposide on insulin resistance and oxidative stress damage in polycystic ovary syndrome rats by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway

马卿莲¹, 田 琴¹, 张 艳²,
杨 菁³

(1. 武汉市红十字会医院 妇产科, 湖北 武汉 430000; 2. 武汉大学 人民医院 检验科, 湖北 武汉 430029; 3. 武汉大学 人民医院 生殖医学中心, 湖北 武汉 430029)

MA Qing-lian¹, TIAN Qin¹,
ZHANG Yan², YANG Jing³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan 430000, Hubei Province, China;
2. Department of Laboratory Medicine, Wuhan University People's Hospital, Wuhan 430029, Hubei Province, China;
3. Reproductive Medicine Center, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430029, Hubei Province, China)

基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研基金资助项目(WJ2019F017)

作者简介: 马卿莲(1978-), 女, 副主任医师, 主要从事妇科内分泌相关的研究工作

通信作者: 杨菁, 主任医师

MP: 13507182023

E-mail: dryangqing@hotmail.com

摘要:目的 研究栀子苷调节核因子红细胞系 2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠胰岛素抵抗及氧化应激损伤的影响。方法 SD 大鼠通过灌胃来曲唑 21 d 来诱导建立 PCOS 模型,并随机分为空白组(不建模+生理盐水)、模型组(建模+生理盐水)、栀子苷低剂量实验组(建模+灌胃给予 400 mg·kg⁻¹栀子苷)、栀子苷高剂量实验组(建模+灌胃给予 800 mg·kg⁻¹栀子苷)、阳性对照组(建模+灌胃给予 0.34 mg·kg⁻¹炔雌醇环丙孕酮)、栀子苷高剂量+ML385 组(建模+灌胃给予 800 mg·kg⁻¹栀子苷+腹腔注射 30 mg·kg⁻¹ ML385),每组 10 只。用血糖仪、酶联免疫吸附法分别检测大鼠空腹血糖(FBG)和空腹胰岛素(FINS)水平,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);用酶联免疫吸附法测定血清性激素与炎性水平,用试剂盒法检测卵巢组织氧化应激指标水平;用苏木精-伊红(HE)染色法检测大鼠卵巢组织囊状卵泡数量;用原位末端标记法(TUNEL)检测大鼠卵巢颗粒细胞凋亡;用蛋白质印迹法(WB)检测各组大鼠卵巢组织凋亡和 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白相对表达水平。结果 栀子苷低、高剂量实验组、阳性对照组、栀子苷高剂量+ML385 组、空白组和模型组的 FBG 分别为(6.87±0.42)、(5.21±0.28)、(5.03±0.31)、(8.32±0.51)、(4.90±0.35)和(8.56±0.54) mmol·L⁻¹;FINS 分别为(16.13±1.62)、(10.46±1.37)、(10.21±1.51)、(20.67±1.82)、(9.82±1.14)和(21.45±2.05) mIU·L⁻¹;HOMA-IR 分别为 4.93±0.48、2.42±0.53、2.28±0.36、7.64±0.72、2.14±0.31 和 8.16±0.67,促卵泡激素(FSH)水平分别为(5.14±0.56)、(7.49±0.62)、(7.62±0.71)、(2.95±0.54)、(7.83±0.76)和(2.71±0.43) IU·L⁻¹;超氧化物歧化酶(SOD)分别为(42.91±3.22)、(56.45±4.16)、(58.02±3.98)、(32.16±2.85)、(59.73±4.35)和(30.84±2.74) U·mg prot⁻¹;Nrf2 蛋白相对表达水平分别为 0.67±0.08、1.10±0.12、1.12±0.13、0.26±0.07、1.13±0.14 和 0.24±0.06;HO-1 蛋白相对表达水平分别为 0.61±0.07、1.06±0.08、1.08±0.10、0.18±0.05、1.09±0.11 和 0.16±0.04;丙二醛(MDA)水平分别为(2.47±0.33)、(1.39±0.21)、(1.30±0.19)、(3.38±0.42)、(1.21±0.26)和(3.62±0.47) nmol·mg prot⁻¹;卵巢囊状卵泡数量分别为(9.60±0.74)、(4.30±0.57)、(4.10±0.71)、(14.20±0.98)、(3.90±0.65)和(15.10±1.13)个;卵巢颗粒细胞凋亡指数分别为(16.27±1.16)%、(7.48±0.91)%、(7.19±0.76)%、(23.86±1.23)%、(6.94±0.85)%和(25.31±1.42)%,模型组的上述指标与空白组比较;栀子苷低、高剂量实验组及阳性对照组的上述指标与模型组比较,栀子苷低剂量实验组的上述指标与栀子苷高剂量试验组比较,栀子苷高剂量+ML385 组与栀子苷高剂量实验组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 P<0.05)。结论 栀子苷可减轻 PCOS 大鼠胰岛素抵抗及氧化应激损伤,可能是通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路实现的。

关键词: 栀子苷;核因子红细胞系 2 相关因子 2/血红素加氧酶-1;多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;氧化应激

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.21.013

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)21-3075-08

Abstract: Objective To explore the effects of geniposide on insulin resistance and oxidative stress damage in polycystic ovary syndrome (PCOS) rats by regulating the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods** A PCOS model was induced by gavage of letrozole for 21d and rats were randomly assigned into blank group (not modeled + normal saline), model group (modeled + normal saline), low-dose geniposide group (modeled + 400 mg · kg⁻¹ geniposide by gavage), high-dose geniposide group (modeled + 800 mg · kg⁻¹ geniposide by gavage), positive control group (modeled + 0.34 mg · kg⁻¹ ethinylestradiol and cyproterone by gavage) and high-dose geniposide + ML385 group (modeled + 800 mg · kg⁻¹ geniposide by gavage + 30 mg · kg⁻¹ ML385 by intraperitoneal injection), with 10 rats in each group. The levels of fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were measured by blood glucose meter and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and then homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. The levels of serum sex hormones and inflammatory were detected by ELISA and ovarian tissue oxidative stress index levels were detected by test kit, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to measure the number of cystic follicles in rat ovarian tissue. TdT-media duTP nict end labeling (TUNEL) method was used to measure apoptosis of rat ovarian granulosa cells. Moreover, Western blot (WB) was used to detect apoptosis and Nrf2/HO-1 signaling pathway related protein expression in ovarian tissues. **Results** The FBG levels in the low-dose geniposide group, high-dose geniposide group, positive control group, high-dose geniposide + ML385 group and control group, as well as the model group were (6.87 ± 0.42), (5.21 ± 0.28), (5.03 ± 0.31), (8.32 ± 0.51), (4.90 ± 0.35) and (8.56 ± 0.54) mmol · L⁻¹, respectively; FINS were (16.13 ± 1.62), (10.46 ± 1.37), (10.21 ± 1.51), (20.67 ± 1.82), (9.82 ± 1.14) and (21.45 ± 2.05) mIU · L⁻¹, respectively; HOMA-IR were 4.93 ± 0.48, 2.42 ± 0.53, 2.28 ± 0.36, 7.64 ± 0.72, 2.14 ± 0.31 and 8.16 ± 0.67, respectively; follicle-stimulating hormone (FSH) levels were (5.14 ± 0.56), (7.49 ± 0.62), (7.62 ± 0.71), (2.95 ± 0.54), (7.83 ± 0.76) and (2.71 ± 0.43) IU · L⁻¹, respectively; the superoxide dismutase (SOD) levels were (42.91 ± 3.22), (56.45 ± 4.16), (58.02 ± 3.98), (32.16 ± 2.85), (59.73 ± 4.35) and (30.84 ± 2.74) U · mg prot⁻¹, respectively. The relative protein expression levels of Nrf2 were 0.67 ± 0.08, 1.10 ± 0.12, 1.12 ± 0.13, 0.26 ± 0.07, 1.13 ± 0.14 and 0.24 ± 0.06, respectively; HO-1 were 0.61 ± 0.07, 1.06 ± 0.08, 1.08 ± 0.10, 0.18 ± 0.05, 1.09 ± 0.11 and 0.16 ± 0.04, respectively. The malondialdehyde (MDA) levels were (2.47 ± 0.33), (1.39 ± 0.21), (1.30 ± 0.19), (3.38 ± 0.42), (1.21 ± 0.26) and (3.62 ± 0.47) nmol · mg prot⁻¹, respectively. The number of ovarian antral follicles was 9.60 ± 0.74, 4.30 ± 0.57, 4.10 ± 0.71, 14.20 ± 0.98, 3.90 ± 0.65 and 15.10 ± 1.13, respectively. The ovarian granulosa cell apoptosis index was (16.27 ± 1.16)%, (7.48 ± 0.91)%, (7.19 ± 0.76)%, (23.86 ± 1.23)%, (6.94 ± 0.85)% and (25.31 ± 1.42)%, respectively. Compared blank group with the control group; compared model group with low-dose geniposide group, high-dose geniposide group and positive control group; compared low-dose geniposide group with high-dose geniposide group and compared high-dose geniposide group with high-dose geniposide + ML385 group, the differences of above indexes were all statistically significant (all *P* < 0.05). **Conclusion** Geniposide can alleviate insulin resistance and oxidative stress damage in PCOS rats, possibly by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: geniposide; nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1; polycystic ovary syndrome; insulin resistance; oxidative stress

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是女性群体中普遍发生的一种内分泌疾病, 排卵异常、卵巢囊肿和雄激素水平升高是其主要特征,

可导致月经紊乱、多毛、痤疮等并发症, 给女性生殖健康造成了严重负面影响^[1-2]。PCOS 病理生理学复杂, 代谢异常、炎症、胰岛素抵抗和氧化应激在 PCOS

发病机制中起到关键作用,改善代谢及进行抗炎、抗氧化处理可有效缓解 PCOS 临床症状^[3-4]。核因子 κ B 相关因子 2(nuclear factor κ B-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是机体主要的抗氧化信号,可以介导 PCOS 发病过程并与其病情进展关系密切,刺激 Nrf2/HO-1 信号激活可以缓解实验性 PCOS 中的性激素分泌异常、炎症和氧化还原失衡,减轻 PCOS 引发的卵巢细胞凋亡与炎症损伤^[5-6],因而,对 Nrf2/HO-1 信号进行药理学控制是治疗 PCOS 的潜在治疗方式。栀子苷是一种天然环烯醚萜苷类活性物质,作为栀子苷当归-地黄药对中的主要生物活性成分之一,可通过改善高雄激素状态、调节葡萄糖稳态、纠正脂质代谢等生理过程而在 PCOS 治疗中发挥重要作用^[7],能抑制妊娠期糖尿病大鼠胰岛素抵抗^[8];此外,栀子苷还可通过激活 Nrf2 信号而减轻蛛网膜下腔出血引发的脑氧化损伤与神经细胞凋亡^[9],由此推测,栀子苷可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号来治疗 PCOS。本研究旨在探讨栀子苷调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 PCOS 大鼠胰岛素抵抗及氧化应激损伤的作用及机制,为栀子苷应用于 PCOS 的临床治疗提供理论支持。

材料与方法

1 材料

动物 5 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠(体质量为 120~140 g),由中国科学院上海药物研究所提供,动物生产许可证号:SCXK(沪)2020-0005,动物使用许可证号:SYXK(鄂)2025-0111。大鼠群养在温度 22~24℃、湿度 50%~60% 的 SPF 级动物饲养房中,维持 12 h/12 h 明/暗循环。本研究实验方案获得武汉大学人民医院伦理委员会批准(伦理批号:2025-030075)。

药品与试剂 栀子苷,规格:每瓶 20 mg,纯度: $\geq 98\%$,批号:20241125,购自上海同田生物技术有限公司;来曲唑,规格:每瓶 100 mg,纯度: $\geq 98\%$,批号:101045-201101、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒、大鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、睾酮(testosterone, T)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)与促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化

物酶(glutathione peroxidase, GPx)与过氧化氢酶(catalase, CAT)活性检测试剂盒,均购自北京索莱宝科技有限公司;大鼠促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)与空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)ELISA 试剂盒、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-山羊抗兔二抗、原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒,均购自上海生工生物工程股份有限公司;B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Nrf2/HO-1、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated protein, Bax)与 β -actin 兔抗大鼠一抗,均购自英国 Abcam 公司;ML385,规格:25 mg;纯度:99.59%,批号:M00240,购自北京百奥莱博科技有限公司。

仪器 Accu-Chek Active 罗氏血糖仪,瑞士罗氏血糖健康医护公司产品;DM3000 生物显微镜、G1150H 石蜡包埋机、RM2035 病理轮转切片机,均为德国 Leica 公司产品;LF-C600 化学发光成像分析仪、LF-600S 电泳电源、LF-Mini3 垂直电泳槽和 LF-ZY03 湿转电泳槽,均为北京龙方科技有限公司产品。

2 方法

2.1 大鼠 PCOS 模型构建、分组及动物处理

取 SD 大鼠,通过每天灌胃 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 来曲唑(溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,每天 1 次,给药 21 d)来诱导构建 PCOS 模型^[10],灌胃 21 d 后尾静脉采血检测,发现大鼠 FSH 水平显著降低且 LH 和 T 水平显著升高,表明 PCOS 造模成功,造模成功大鼠随机分为模型组、栀子苷低剂量实验组、栀子苷高剂量实验组、阳性对照组和栀子苷高剂量 + ML385 组,每组 10 只,另取 10 只 SD 大鼠用等剂量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃做为空白组。

成功造模次日进行药物干预:栀子苷低剂量实验组和栀子苷高剂量实验组大鼠分别以 400 和 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 栀子苷灌胃干预^[8],阳性对照组大鼠以 $0.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 炔雌醇环丙孕酮灌胃干预^[11],栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠以 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 栀子苷灌胃干预的同时用 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 ML385 腹腔注射^[12],栀子苷、阳性对照药炔雌醇环丙孕酮与 Nrf2 抑制剂 ML385 均溶于生理盐水,模型组与对照组大鼠均用等剂量 0.9% NaCl 进行灌胃与腹腔注射干预,每天干预 1 次,持续 4 周。

2.2 检测大鼠胰岛素抵抗、血清性激素与炎症水平、卵巢组织氧化应激指标水平、卵巢系数并采集标本^[11-12]

完成药物干预后次日称量体质量,提前禁食 12 h

后用血糖仪测定各组大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG);麻醉后进行尾静脉采血,离心采集血清,按照 ELISA 试剂盒说明指导用酶标仪测定 FSH、LH、T、IL-6、TNF-α 与 FINS 水平,按公式(1)计算胰岛素抵抗指数(homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR);以过量 CO₂ 处死后摘取卵巢称重,按公式(2)计算卵巢系数;冰上剪取卵巢组织约 150 mg,加入 RIPA 研碎匀浆,离心取上清,测定其中蛋白浓度,按 MDA 含量检测试剂盒说明书测定卵巢组织的 MDA 含量,按 SOD、GPx 与 CAT 活性检测试剂盒说明书测定卵巢组织 SOD、GPx 与 CAT 活性水平;剩余卵巢组织经水洗、固定、脱水、浸蜡包埋后进行病理切片备用。

$$\text{HOMA-IR} = \text{FBG}(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{FINS}(\text{mIU} \cdot \text{L}^{-1}) / 22.5 \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{卵巢系数} (10^{-4} \times \text{g/g}) = \text{卵巢质量} (10^{-4} \times \text{g}) / \text{体质量}(\text{g}) \quad \text{公式(2)}$$

2.3 HE 和 TUNEL 染色法分别检测大鼠卵巢组织囊状卵泡数量与卵巢颗粒细胞凋亡^[12]

取出卵巢组织石蜡切片,脱蜡至水,行 HE 或 TUNEL 染色,均按各自试剂盒说明指导进行染色,水洗、封片,用光学显微镜拍照观察染色情况,定量 HE 染色后大鼠卵巢组织囊状卵泡数量,定量 TUNEL 染色后卵巢颗粒细胞凋亡数与细胞总数,按公式(3)计算卵巢颗粒细胞凋亡指数。

$$\text{卵巢颗粒细胞凋亡指数} = \text{卵巢颗粒细胞凋亡数} / \text{卵巢颗粒细胞总数} \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

2.4 蛋白质印迹法检测各组大鼠卵巢组织凋亡和 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达^[12]

取出卵巢组织蛋白样品液,于沸水浴内进行蛋白变性,取蛋白(每孔 25 μg)上样进行电泳、湿转,进行蛋白封闭后孵育抗体行抗原抗体反应,抗体均以 3%

牛血清白蛋白稀释,稀释比为 Bcl-2(1:1 000)、Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:1 000)、Bax(1:2 000)、β-actin(1:2 000)、二抗(1:2 000),一抗于 4 ℃ 孵育过夜、二抗于 37 ℃ 孵育 2 h,蛋白进行 ECL 显色后拍照,定量蛋白灰度值后按公式(4)计算各组蛋白相对表达。

$$\text{蛋白相对表达} = \text{待测蛋白}(\text{Bcl-2、Nrf2、HO-1、Bax}) \text{灰度值} / \text{内参蛋白}(\beta\text{-actin}) \text{灰度值} \quad \text{公式(4)}$$

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析进行多组间比较,组间两两进一步比较行 SNK-q 检验。

结 果

1 各组大鼠胰岛素抵抗检测结果

与对照相比,模型组大鼠的 FBG、FINS 水平和 HOMA-IR 均显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组相比,栀子苷低、高剂量实验组和阳性对照组大鼠的 FBG、FINS 水平和 HOMA-IR 均显著降低(均 $P < 0.05$),栀子苷高剂量实验组的上述指标均显著低于低剂量实验组(均 $P < 0.05$),栀子苷高剂量实验组与阳性对照组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与栀子苷高剂量实验组相比,栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠的 FBG、FINS 水平和 HOMA-IR 均显著升高(均 $P < 0.05$),见表 1。

2 各组大鼠血清性激素与炎性因子水平检测结果

与对照组相比,模型组大鼠的 FSH 水平显著降低($P < 0.05$),LH、T、IL-6 与 TNF-α 水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。与模型组相比,栀子苷低、高剂量实验组和阳性对照组大鼠的 FSH 水平显著升高,栀子苷高剂量实验组显著高于低剂量实验组(均 $P < 0.05$);LH、T、IL-6 与 TNF-α 水平均显著降低(均 $P < 0.05$),

表 1 各组大鼠空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平和胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS) and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Dose	FBG (mmol · L ⁻¹)	FINS (mIU · L ⁻¹)	HOMA-IR
Blank	10	-	4.90 ± 0.35	9.82 ± 1.14	2.14 ± 0.31
Model	10	-	8.56 ± 0.54 [*]	21.45 ± 2.05 [*]	8.16 ± 0.67 [*]
Low-dose geniposide	10	400 mg · kg ⁻¹	6.87 ± 0.42 [#]	16.13 ± 1.62 [#]	4.93 ± 0.48 [#]
High-dose geniposide	10	800 mg · kg ⁻¹	5.21 ± 0.28 ^{#△}	10.46 ± 1.37 ^{#△}	2.42 ± 0.53 ^{#△}
Positive control	10	0.34 mg · kg ⁻¹	5.03 ± 0.31 ^{#△}	10.21 ± 1.51 ^{#△}	2.28 ± 0.36 ^{#△}
High-dose geniposide + ML385	10	800 mg · kg ⁻¹ geniposide + 30 mg · kg ⁻¹ ML385	8.32 ± 0.51 [▲]	20.67 ± 1.82 [▲]	7.64 ± 0.72 [▲]

Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with low-dose geniposide group, [△] $P < 0.05$; Compared with high-dose geniposide group, [▲] $P < 0.05$.

栀子苷高剂量实验组显著低于低剂量实验组 (均 $P < 0.05$); 栀子苷高剂量实验组的上述指标与阳性对照组比较, 在统计学上差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与栀子苷高剂量实验组相比, 栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠的 FSH 水平显著降低 ($P < 0.05$), LH、T、IL - 6 与 TNF - α 水平均显著升高 (均 $P < 0.05$), 见表 2。

3 各组大鼠卵巢组织氧化应激水平检测结果

与对照组相比, 模型组大鼠的 SOD、GPx 和 CAT 水平均显著降低 (均 $P < 0.05$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 栀子苷低、高剂量实验组和阳性对照组大鼠的 SOD、GPx 和 CAT 水平均显著升高, 栀子苷高剂量实验组的上述指标均显著高于低剂量实验组 (均 $P < 0.05$); MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$), 栀子苷高剂量实验组显著低于低剂量实验组 ($P < 0.05$); 栀子苷高剂量实验组与阳性对照组比较, 在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与栀子苷高剂量实验组相比,

栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠的 SOD、GPx 和 CAT 水平均显著降低 (均 $P < 0.05$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

4 各组大鼠卵巢系数以及卵巢囊状卵泡数量检测结果

栀子苷低、高剂量实验组、阳性对照组、栀子苷高剂量 + ML385 组、对照组和模型组的卵巢系数分别为 (7.30 ± 0.21)、(6.28 ± 0.19)、(6.14 ± 0.14)、(8.15 ± 0.22)、(6.01 ± 0.18) 和 (8.33 ± 0.25) $10^{-4} \times g \cdot g^{-1}$, 卵巢囊状卵泡数量分别为 (9.60 ± 0.74)、(4.30 ± 0.57)、(4.10 ± 0.71)、(14.20 ± 0.98)、(3.90 ± 0.65) 和 (15.10 ± 1.13) 个。与对照相比, 模型组大鼠卵巢系数以及卵巢囊状卵泡数量均显著升高 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 栀子苷低、高剂量实验组和阳性对照组大鼠的卵巢系数以及卵巢囊状卵泡数量均显著降低 (均 $P < 0.05$), 栀子苷高剂量实验组的上述指标均显著低于低剂量实验组 (均 $P < 0.05$), 栀子苷高剂量实验组与阳性对照组比较,

表 2 各组大鼠血清促卵泡激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、睾酮 (T)、白细胞介素 - 6 (IL - 6) 与肿瘤坏死因子 - α (TNF - α) 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of FSH, LH, T, IL - 6 and TNF - α in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	FSH (IU · L ⁻¹)	LH (IU · L ⁻¹)	T (μg · L ⁻¹)	IL - 6 (ng · L ⁻¹)	TNF - α (ng · L ⁻¹)
Control	7.83 ± 0.76	4.03 ± 0.61	2.17 ± 0.34	10.14 ± 1.85	21.64 ± 4.27
Model	2.71 ± 0.43 *	15.14 ± 1.17 *	7.86 ± 0.73 *	64.59 ± 3.13 *	135.79 ± 6.35 *
Low - dose geniposide	5.14 ± 0.56 #	9.72 ± 0.83 #	5.24 ± 0.47 #	38.42 ± 2.61 #	80.36 ± 5.46 #
High - dose geniposide	7.49 ± 0.62 # Δ	4.40 ± 0.57 # Δ	2.43 ± 0.60 # Δ	11.83 ± 1.90 # Δ	24.43 ± 3.91 # Δ
Positive control	7.62 ± 0.71 # Δ	4.23 ± 0.74 # Δ	2.30 ± 0.35 # Δ	10.76 ± 1.74 # Δ	23.35 ± 4.10 # Δ
High - dose geniposide + ML385	2.95 ± 0.54 $\blacktriangle$	14.68 ± 0.93 $\blacktriangle$	7.39 ± 0.80 $\blacktriangle$	62.48 ± 2.87 $\blacktriangle$	130.81 ± 6.22 $\blacktriangle$

Dose and n refer to Table 1; FSH: Follicle - stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone; T: Testosterone; IL - 6: Interleukin - 6; TNF - α : Tumor necrosis factor - α ; Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, # $P < 0.05$; Compared with the low - dose geniposide group, Δ $P < 0.05$; Compared with the high - dose geniposide group, $\blacktriangle$ $P < 0.05$.

表 3 各组大鼠卵巢组织丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT) 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the levels of MDA, SOD, GPx and CAT in ovarian tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	MDA (nmol · mg prot ⁻¹)	SOD (U · mg prot ⁻¹)	GPx (U · mg prot ⁻¹)	CAT (U · mg prot ⁻¹)
Control	1.21 ± 0.26	59.73 ± 4.35	163.24 ± 17.35	97.63 ± 11.27
Model	3.62 ± 0.47 *	30.84 ± 2.74 *	87.62 ± 10.93 *	49.75 ± 7.56 *
Low - dose geniposide	2.47 ± 0.33 #	42.91 ± 3.22 #	121.33 ± 15.42 #	70.40 ± 8.63 #
High - dose geniposide	1.39 ± 0.21 # Δ	56.45 ± 4.16 # Δ	152.47 ± 16.27 # Δ	91.58 ± 10.84 # Δ
Positive control	1.30 ± 0.19 # Δ	58.02 ± 3.98 # Δ	159.15 ± 13.84 # Δ	94.71 ± 9.75 # Δ
High - dose geniposide + ML385	3.38 ± 0.42 $\blacktriangle$	32.16 ± 2.85 $\blacktriangle$	93.56 ± 11.60 $\blacktriangle$	53.49 ± 6.92 $\blacktriangle$

Dose and n refer to Table 1; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; CAT: Catalase; Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, # $P < 0.05$; Compared with the low - dose geniposide group, Δ $P < 0.05$; Compared with the high - dose geniposide group, $\blacktriangle$ $P < 0.05$.

在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与栀子苷高剂量组实验相比,栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠的卵巢系数以及卵巢囊状卵泡数量均显著升高(均 $P < 0.05$),见图 1。

5 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡检测结果

栀子苷低剂量实验组、栀子苷高剂量实验组、阳性对照组、栀子苷高剂量 + ML385 组和对照组、模型组的卵巢颗粒细胞凋亡指数分别为 $(16.27 \pm 1.16)\%$ 、 $(7.48 \pm 0.91)\%$ 、 $(7.19 \pm 0.76)\%$ 、 $(23.86 \pm 1.23)\%$ 、 $(6.94 \pm 0.85)\%$ 、 $(25.31 \pm 1.42)\%$ 。与对照组相比,模型组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡指数显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,栀子苷低剂量实验组、栀子苷高剂量实验组、阳性对照组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡指数均显著降低($P < 0.05$),栀子苷高剂量实验组相比其低剂量实验组进一步显著降低($P < 0.05$),栀子苷高剂量实验组相比阳性对照组在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$);与栀子苷高剂量实验组相比,栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡指数显著升高($P < 0.05$)。

6 各组大鼠卵巢组织凋亡相关蛋白和 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达检测结果

与对照组相比,模型组大鼠 Bcl-2、Nrf2 与 HO-1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),Bax 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,栀子苷低剂量实验组、栀子苷高剂量实验组、阳性对照组大鼠 Bcl-2、Nrf2 与 HO-1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$),栀子苷高剂量实验组相比,低剂量实验

组进一步显著升高($P < 0.05$);Bax 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.05$),栀子苷高剂量实验组相比其低剂量实验组进一步显著降低($P < 0.05$);栀子苷高剂量实验组相比阳性对照组在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$);与栀子苷高剂量实验组相比,栀子苷高剂量 + ML385 组大鼠 Bcl-2、Nrf2 与 HO-1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$),Bax 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.05$),见图 2 和表 4。

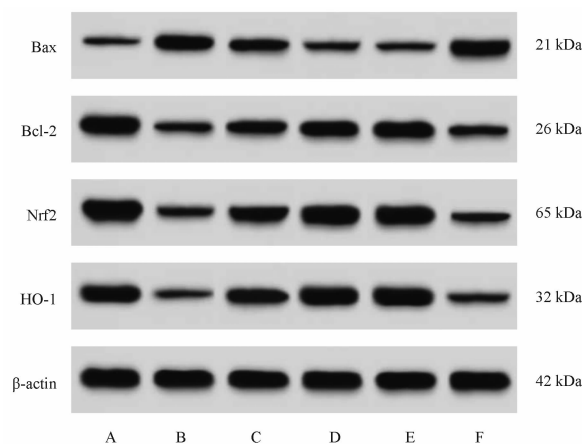


图 2 蛋白质印迹(WB)检测各组大鼠卵巢组织凋亡和 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达

Figure 2 Apoptosis and expression of proteins related to the Nrf2/HO-1 signaling pathway in ovarian tissues of rats in each group detected by westernblot (WB)

A: Control group; B: Model group; C: Low-dose geniposide group; D: High-dose geniposide group; E: Positive control group; F: High-dose geniposide + ML385 group.

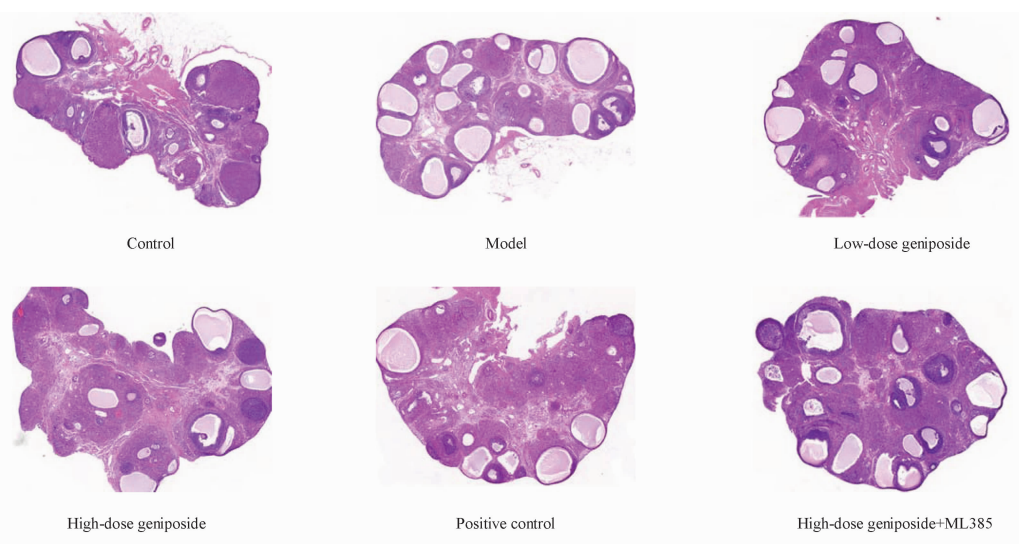


图 1 各组大鼠卵巢组织形态的苏木精-伊红(HE)染色图($\times 200$)

Figure 1 Hematoxylin-eosin (HE) staining images of ovarian tissue morphology of rats in each group ($\times 200$)

表 4 各组大鼠卵巢组织 B 细胞淋巴瘤 -2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤 -2 (Bcl - 2) Bcl - 2、核因子红细胞系 2 相关因子 2 (Nrf2) 与血红素加氧酶 -1 (HO - 1) 蛋白相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative expression levels of Bax, Bcl - 2, Nrf2 and HO - 1 proteins in ovarian tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Bax	Bcl - 2	Nrf2	HO - 1
Control	0.17 ± 0.03	0.97 ± 0.11	1.13 ± 0.14	1.09 ± 0.11
Model	0.94 ± 0.10 *	0.21 ± 0.05 *	0.24 ± 0.06 *	0.16 ± 0.04 *
Low - dose geniposide	0.56 ± 0.06 #	0.57 ± 0.07 #	0.67 ± 0.08 #	0.61 ± 0.07 #
High - dose geniposide	0.19 ± 0.04 # [△]	0.95 ± 0.08 # [△]	1.10 ± 0.12 # [△]	1.06 ± 0.08 # [△]
Positive control	0.18 ± 0.05 # [△]	0.96 ± 0.10 # [△]	1.12 ± 0.13 # [△]	1.08 ± 0.10 # [△]
High - dose geniposide + ML385	0.92 ± 0.09 [▲]	0.22 ± 0.06 [▲]	0.26 ± 0.07 [▲]	0.18 ± 0.05 [▲]

Dose and *n* refer to Table 1; Bcl - 2: B - cell lymphoma - 2; Bax: Bcl - 2 associated protein; Nrf2: Nuclear factor E2 - related factor 2; HO - 1: Heme oxygenase - 1; Compared with the control group, * *P* < 0.05; Compared with the model group, # *P* < 0.05; Compared with the low - dose geniposide group, [△] *P* < 0.05; Compared with the high - dose geniposide group, [▲] *P* < 0.05.

讨 论

改变生活方式与饮食干预是 PCOS 治疗的首选,当没有带来较好结果时,会进行手术干预,或使用抗雄激素、排卵药物和噻唑烷二酮等药物来改善患者排卵功能,恢复其胰岛素敏感性,但手术可带来创伤,长期使用药物会导致一些药物不良反应,因此探寻新型药物来兼顾治疗的安全性和有效性至关重要^[13-14]。本研究通过灌胃来曲唑来诱导建立 PCOS 模型,结果显示,造模大鼠 FSH 水平降低且 LH、T 水平升高,且大鼠卵巢囊状卵泡数量明显增多、卵巢颗粒细胞大量凋亡并发生胰岛素抵抗,表明造模大鼠症状符合 PCOS 临床特征,提示造模成功。

PCOS 的病因目前尚不清楚,但炎症和氧化应激被认为与 PCOS 的发生关系密切,可造成高卵巢颗粒细胞异常凋亡和胰岛素抵抗,中医药作为较为安全的治疗方式,可通过改善胰岛素抵抗、高雄激素血症、氧化应激、慢性低度炎症和代谢异常等机制来延缓 PCOS 进展^[15-16]。栀子苷是一种天然来源的活性成分,具有改善糖脂代谢、抗氧化、抗炎与抗凋亡等多种药理作用,可通过抑制炎症与氧化应激反应减轻重症胰腺炎大鼠肝损伤,还可制胰岛素抵抗和糖异生,改善整个糖脂代谢网络,能作为对抗代谢疾病的有效药物^[17-18]。本研究以不同剂量栀子苷干预 PCOS 大鼠,可降低 PCOS 大鼠 FBG、FINS、LH、T、IL - 6 与 TNF - α 水平、HOMA - IR、MDA 水平、卵巢系数、卵巢囊状卵泡数量、卵巢颗

粒细胞凋亡指数和 Bax 蛋白相对表达水平,并升高其 FSH 水平、SOD、GPx 与 CAT 水平、Bcl - 2 蛋白相对表达水平,高剂量栀子苷对 PCOS 大鼠上述病理指标的改善作用更强,表明栀子苷可改善 PCOS 大鼠性激素分泌、葡萄糖代谢,抑制其氧化应激、炎症与卵巢颗粒细胞凋亡,减轻大鼠胰岛素抵抗及卵巢多囊样病变症状,促使卵巢功能恢复正常,高剂量栀子苷对 PCOS 大鼠病理症状的改善作用与阳性对照药炔雌醇环丙孕酮相似,提示栀子苷可作为 PCOS 的候选治疗药物,具有较强临床应用价值。

Nrf2/HO - 1 作为调控机体氧化还原平衡的重要信号通路,在 PCOS 病情进展中起到抗氧化与细胞保护作用,研究显示,激活 Nrf2/HO - 1 信号通路可抑制 PCOS 小鼠氧化应激和卵巢颗粒细胞凋亡,进而改善其发情周期障碍、多囊卵巢与雄激素升高症状^[19],并可以减轻 PCOS 大鼠卵巢功能障碍与胰岛素抵抗^[20]。本研究显示,Nrf2/HO - 1 信号通路在 PCOS 大鼠体内处于失活状态,以栀子苷干预 PCOS 大鼠,可刺激该信号通路激活,表明 Nrf2/HO - 1 信号通路介导栀子苷对 PCOS 大鼠胰岛素抵抗及氧化应激损伤的抑制作用;以栀子苷和 Nrf2 抑制剂 ML385 联合干预 PCOS 大鼠,可减弱栀子苷单独干预对 PCOS 大鼠内分泌、葡萄糖代谢的改善作用,拮抗其对 PCOS 大鼠的抗炎与抗氧化作用,消除其对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡、胰岛素抵抗及卵巢多囊样病变症状的缓解作用,最终揭示栀子苷通过激活 Nrf2 信号来减轻 PCOS 大鼠胰岛素抵抗及氧化应激损伤是其药理机制之一。但 PI3K/AKT、TLR4、NF - κB 等通路也在 PCOS 病理机制中发挥关键调控作用,但本研究未对其是否可

介导栀子苷对 PCOS 大鼠的治疗作用进行探讨,存在一定不足之处,后续还需通过网络药理学及拯救实验等更多研究进行深入探讨。

本研究提示:栀子苷可阻止 PCOS 大鼠性激素分泌异常、氧化应激与炎症,减轻 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞凋亡、胰岛素抵抗与卵巢多囊样病变症状,改善卵巢功能,刺激 Nrf2/HO-1 信号通路活化传导可能是栀子苷对 PCOS 大鼠发挥治疗作用的药理机制之一,本研究首次证实了栀子苷对 PCOS 的潜在治疗作用,并初步探究了其药理机制,有助于其在 PCOS 临床治疗中的开发应用。

参考文献:

- [1] HELVACI N, YILDIZ B O. Polycystic ovary syndrome as a metabolic disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2025, 21 (4): 230—244.
- [2] SU P, CHEN C, SUN Y. Physiopathology of polycystic ovary syndrome in endocrinology, metabolism and inflammation [J]. *J Ovarian Res*, 2025, 18 (1): 34—43.
- [3] MOTTA A B. Polycystic ovary syndrome and oxidative stress. Natural treatments [J]. *Curr Med Chem*, 2025, 32 (8): 1457—1468.
- [4] RIZK F H, EL SAADANY A A, ELSHAMY A M, *et al*. Ameliorating effects of adropin on letrozole - induced polycystic ovary syndrome *via* regulating steroidogenesis and the microbiota inflammatory axis in rats [J]. *J Physiol*, 2024, 602 (15): 3621—3639.
- [5] AYODEJI A J, ODETAYO A, AKINTOYE O O, *et al*. Carvedilol and clomiphene combination therapy alleviates inflammation and redox imbalance in experimental PCOS; Role of Nrf2/HMOX-1 and NfκB signaling [J]. *Niger J Physiol Sci*, 2024, 39 (2): 259—266.
- [6] HUI M, HU S, YE L, *et al*. PAK2/beta - catenin/c - Myc/PKM2 signal transduction suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in polycystic ovary syndrome[J/OL]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 677: 54—62. 2023 - 08 - 02 [2025 - 06 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37549602/>.
- [7] LI X, ULLAH I, HOU C, *et al*. Network pharmacology and molecular docking study on the treatment of polycystic ovary syndrome with angelica sinensis - radix rehmanniae drug pair[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102 (46): e36118—e36125.
- [8] 亢丽娟,董海平,宋艳艳. 栀子苷调节 HMGB1 - RAGE 信号通路对妊娠期糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 解剖学研究, 2024, 46 (2): 176—182, 190.
- [9] XIAO X, SUN S, LI Y, *et al*. Geniposide attenuates early brain injury by inhibiting oxidative stress and neurocyte apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49 (7): 6303—6311.
- [10] AJIBARE A J, AKINTOYE O O, FAMUREWA A C, *et al*. Synergistic action of virgin coconut oil and clomiphene in reversing endocrine dysregulation in letrozole - model of polycystic ovarian syndrome in rats; Role of Nrf2/HMOX-1 Pathway [J]. *J Med Food*, 2023, 26 (9): 683—691.
- [11] 唐虹, 李林霞, 华宇, 等. 茯苓酸改善多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的作用及机制研究 [J]. 中国药房, 2024, 35 (1): 57—62.
- [12] 赵洪强, 时敬爱, 王金权, 等. 大豆异黄酮调节 Nrf2/HO-1 信号通路对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织损伤的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58 (8): 699—707.
- [13] STAŃCZAK N A, GRYWALSKA E, DUDZIŃSKA E. The latest reports and treatment methods on polycystic ovary syndrome [J]. *Ann Med*, 2024, 56 (1): 2357737—2357757.
- [14] CHANG K J, CHEN J H, CHEN K H, *et al*. The pathophysiological mechanism and clinical treatment of polycystic ovary syndrome: A molecular and cellular review of the literature [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (16): 9037—9060.
- [15] SEN B, GONULTAS S, ALBAYRAK C, *et al*. Evaluation of oxidative stress and inflammation in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2024, 67 (4): 414—420.
- [16] 李东楠, 向蓉, 汪海洋, 等. 卵巢颗粒细胞凋亡在多囊卵巢综合征中的调控机制及中医药干预研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2024, 51 (6): 692—697.
- [17] GAO S, FENG Q. The beneficial effects of geniposide on glucose and lipid metabolism: A review [J/OL]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 3365—3383. 2022 - 09 - 30 [2025 - 06 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36213380/>.
- [18] 王丹, 刘捷, 张细元, 等. 栀子苷通过 Nrf2/Keap1/ARE 通路减轻重症胰腺炎大鼠的肝损伤 [J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38 (6): 631—635.
- [19] JI R, JIA F, CHEN X, *et al*. Carnosol inhibits KGN cells oxidative stress and apoptosis and attenuates polycystic ovary syndrome phenotypes in mice through Keap1 - mediated Nrf2/HO-1 activation [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (4): 1405—1421.
- [20] YE Y, ZHOU W, REN Y, *et al*. The ameliorating effects of Guizhi Fuling Wan combined with rosiglitazone in a rat ovarian model of polycystic ovary syndrome by the PI3K/AKT/NF-κB and Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2023, 39 (1): 2254848—2254859. (收稿日期 2025 - 06 - 27)