毛兰素对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响及机制Δ

房丽娜*，李妍仪，董　超，许丽丽，史兆松，李越东，杨　波，许再超#（承德市中心医院生殖医学科，河北 承德 067000）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）11-1339-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.11.10

摘　要　目的　探究毛兰素（ERI）对多囊卵巢综合征（PCOS）大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响及机制。**方法**　通过皮下注射脱氢表雄酮构建PCOS大鼠模型，将造模成功的大鼠随机分为PCOS组，ERI低、中、高剂量组（10、20、40 mg/kg）和ERI高剂量+维替泊芬组（40 mg/kg ERI+10 mg/kg维替泊芬），每组10只；另取10只正常大鼠作为正常组。各给药组大鼠灌胃相应剂量的ERI和/或腹腔注射维替泊芬，PCOS组和正常组大鼠灌胃等体积的1%二甲基亚砜，每日1次，连续6周。给药结束后，检测各组大鼠体重和空腹血糖（FPG），血清中雌二醇（E_2）、睾酮（T）、卵泡刺激素（FSH）、黄体生成素（LH）水平，观察卵巢组织形态学变化，分析卵巢组织细胞凋亡情况，检测卵巢组织中凋亡相关蛋白[B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、胱天蛋白酶3（Caspase-3）]和Hippo-YAP信号通路相关蛋白[大肿瘤抑制激酶1（LATS1）、磷酸化LATS1（p-LATS1）、Yes相关蛋白（YAP）、磷酸化YAP（p-YAP）、转录共激活子因子PDZ结合基序（TAZ）]表达水平。**结果**　与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组大鼠卵巢多囊特征减轻，闭锁卵泡数量减少，颗粒细胞层增厚，体重、FPG水平、T水平、LH水平、LH/FSH、囊性卵泡数量、细胞凋亡指数和Bax、Caspase-3、p-LATS1、p-YAP蛋白表达水平均显著降低或减少（$P<0.05$），黄体数量、E_2水平和Bcl-2、LATS1、YAP、TAZ蛋白表达水平均显著升高或增多（$P<0.05$）。与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组大鼠的上述指标变化均被抑制（$P<0.05$）。**结论**　ERI能促进PCOS大鼠卵巢颗粒细胞增殖，调节性激素水平，其作用机制可能与抑制Hippo-YAP信号通路有关。

关键词　毛兰素；颗粒细胞；多囊卵巢综合征；Hippo-YAP信号通路；卵巢功能；性激素

Effects of erianin on the apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with polycystic ovary syndrome and its mechanism

FANG Lina, LI Yanyi, DONG Chao, XU Lili, SHI Zhaosong, LI Yuedong, YANG Bo, XU Zaichao (Dept. of Reproductive Medicine, Chengde Central Hospital, Hebei Chengde 067000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of erianin (ERI) on the apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) and its mechanism. **METHODS** PCOS rat model was constructed by subcutaneous injection of dehydroepiandrosterone, and the successfully constructed rats were randomly divided into PCOS group, ERI low-dose, medium-dose and high-dose groups (10, 20, 40 mg/kg) and ERI high dose + verteporfin group (40 mg/kg ERI + 10 mg/kg verteporfin), with 10 rats in each group. Another 10 normal rats were selected as the normal group. Rats in each administration group were given corresponding dose of ERI and/or intraperitoneal injection of vitiporfin, and rats in the PCOS group and normal group were orally administered an equal volume of 1% dimethyl sulfoxide, once a day, for 6 consecutive weeks. After administration, the body weight, fasting blood glucose (FPG), serum levels of estradiol (E_2), testosterone (T), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were detected in each group; morphological changes in ovarian tissue were observed, and the apoptosis of ovarian tissue cells was analyzed. Apoptosis-associated proteins [B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase-3] and Hippo-YAP signaling pathway associated proteins [large tumor suppressor kinase 1 (LATS1), phosphorylated LATS1 (p-LATS1) and Yes associated protein (YAP), phosphorylated YAP (p-YAP), transcriptional co-activator with PDZ binding motif (TAZ)] were detected in ovarian tissue. **RESULTS** Compared with PCOS group, the ovarian polycystic characteristics of the ERI low-dose, medium-dose, and high-dose groups were reduced, the number of atretic follicles was reduced, and the granulosa cell layer was thickened; the body mass, FPG, T, LH, LH/FSH, the

Δ**基金项目** 河北省医学科学研究课题（No.20241284）；承德市科技计划自筹经费项目（No.202204A006）

＊**第一作者** 主治医师，硕士。研究方向：辅助生殖技术、不孕症。E-mail：w06kcj@163.com

＃**通信作者** 副主任医师，硕士。研究方向：辅助生殖技术、不育症。E-mail：y28mgn@163.com

number of cystic follicles, cell apoptosis index, protein expressions of Bax, Caspase-3, p-LATS1 and p-YAP were greatly decreased ($P<0.05$); the number of corpus luteum, protein expressions of E_2, Bcl-2, LATS1, YAP and TAZ were greatly increased ($P<0.05$). Compared with ERI high-dose group, the above indexes in ERI high-dose + vitiporfin group were inhibited ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** ERI can promote the proliferation of ovarian granulosa cells and improve the level of sex hormones in PCOS rats, and its mechanism of action may be related to the inhibition of the Hippo-YAP signaling pathway.

KEYWORDS erianin; granulosa cell; polycystic ovary syndrome; Hippo-YAP signaling pathway; ovarian function; sex hormone

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）是育龄妇女最常见的内分泌异常疾病，总患病率为8%～15%，通常与女性不孕症、月经不规律、排卵功能障碍及妊娠并发症有关，还涉及胰岛素抵抗、代谢综合征和抑郁症的代谢紊乱等[1]。然而，PCOS具体的发病机制和病因尚不清楚。卵巢颗粒细胞为卵母细胞的发育提供营养和生长调节剂，在卵泡发育和排卵过程中起着至关重要的作用。颗粒细胞凋亡会导致卵泡闭锁，引起卵巢变性，进而引发PCOS[2]。因此，PCOS的发病与颗粒细胞增殖和凋亡的失调密切相关。

Hippo信号通路是一条以YES相关蛋白（YES associated protein，YAP）为下游效应器的激酶通路，能参与调节卵泡发育的所有阶段。研究发现，该信号通路可介导卵巢颗粒细胞自噬和凋亡，调节卵泡发育[3]。既往研究显示，石斛汤可提高PCOS患者的妊娠率[4－5]，而毛兰素（erianin，ERI）是石斛的主要活性成分之一。鉴于此，本研究通过构建PCOS大鼠模型，探究了ERI对PCOS大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响，并基于Hippo-YAP信号通路初步探讨了其作用机制，以期为PCOS的治疗提供新的方向。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Axio Observer A1型显微镜（德国Zeiss公司），罗氏®ACCU-CHEK血糖仪[罗氏诊断产品（上海）有限公司]，xMark酶标仪（美国Bio-Rad公司），Multifuge™ X1/X1R Pro离心机、E-Gel Imager凝胶成像系统（美国Thermo Fisher Scientific公司）等。

1.2 主要药品与试剂

ERI对照品（纯度≥98%，批号SE8460）购自北京索莱宝科技有限公司；脱氢表雄酮（dehydroepiandrosterone，DHEA）对照品（纯度99%，批号D106380）购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；维替泊芬对照品（YAP抑制剂，纯度99.26%，批号HY-B0146）购自美国MCE公司；雌二醇（estradiol，E_2）、黄体生成素（luteinizing hormone，LH）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（批号分别为BAS16134、BAS16165）均购自上海羽哚生物科技有限公司；卵泡刺激素（follicle stimulating hormone，FSH）、睾酮（testosterone，T）ELISA试剂盒和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗（批号分别为SBJ-R0049、SBJ-R0723、BI-WB021）均购自南京森贝伽生物科技有限公司；苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（批号abs9217）购自上海爱必信生物科技有限公司；TUNEL染色试剂盒（批号C11026-1）购自广州锐博生物科技有限公司；兔源B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、转录共激活子因子PDZ结合基序（transcriptional co-activator with PDZ binding motif，TAZ）多克隆抗体和兔源Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、胱天蛋白酶3（Caspase-3）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）单克隆抗体（批号分别为ab196495、ab176396、ab32503、ab184787、ab181602）均购自英国Abcam公司；兔源大肿瘤抑制激酶1（large tumor suppressor kinase 1，LATS1）、磷酸化LATS1（phosphorylated LATS1，p-LATS1）、YAP、磷酸化YAP（phosphorylated YAP，p-YAP）单克隆抗体（批号分别为3477、8654、4912、4911）均购自美国CST公司。

1.3 实验动物

雌性SD大鼠65只，SPF级，8周龄，体重180～220 g，购自青岛隆和生物科技有限公司，动物生产许可证号为SCXK（鲁）2021-0002。大鼠饲养于温度（20±3）℃、相对湿度45%～65%的笼中，光照12 h/黑暗12 h循环，均自由饮食。

2 方法

2.1 PCOS大鼠模型制备

取50只大鼠，参照已有研究方法诱导PCOS大鼠模型：皮下注射DHEA（按每100 g体重给予6 mg DHEA，溶于0.2 mL注射油），每日1次，连续21 d[6]。造模大鼠阴道涂片持续以白细胞为主，血清E_2水平显著下降，T、LH水平和LH/FSH显著增高，且经病理观察发现卵巢组织呈多囊性改变，即可确定PCOS大鼠诱导成功。本研究造模过程中没有大鼠死亡。另随机选取10只正常大鼠作为正常组，以0.2 mL/d皮下注射与PCOS大鼠相同剂量的注射油。

2.2 大鼠分组与给药

将造模成功的PCOS大鼠随机分为PCOS组、ERI低剂量组、ERI中剂量组、ERI高剂量组和ERI高剂量+维替泊芬组，每组10只。给药前，各组大鼠先称重，然后ERI低、中、高剂量组大鼠根据相关文献[7]和前期预实验结果分别灌胃10、20、40 mg/kg的ERI（用1%二甲基亚砜溶解）；ERI高剂量+维替泊芬组大鼠灌胃40 mg/kg的ERI，同时腹腔注射10 mg/kg的维替泊芬[8]；PCOS组和正常组大鼠灌胃等体积的1%二甲基亚砜。大鼠每日给药1次，连续6周。

2.3 大鼠体重和空腹血糖水平检测

给药结束后，各组大鼠禁食12 h后称重，尾静脉采血，测定空腹血糖（fasting blood glucose，FPG）水平。

2.4 大鼠性激素水平检测

FPG水平检测完成后，麻醉大鼠，腹主动脉采血，以3 000 r/min离心15 min，分离血清，采用ELISA试剂盒检测各组大鼠血清中E_2、T、FSH、LH水平，并计算LH/FSH。然后将大鼠安乐死，收集其卵巢组织，将部分卵巢组织固定在4%的多聚甲醛溶液中24 h，剩余的卵巢组织保存在－80 ℃条件下，用于后续实验。

2.5 大鼠卵巢组织形态学变化观察

取4%多聚甲醛溶液中固定的卵巢组织，以石蜡包埋，切片，HE染色10 min，经漂洗、脱水后封片，在显微镜下观察各组大鼠卵巢组织的形态学变化，并计数随机5个视野内的囊性卵泡和黄体数量。

2.6 大鼠卵巢组织细胞凋亡情况分析

将卵巢组织切片脱蜡、水化，以蛋白酶K处理，加入TUNEL反应液，于37 ℃孵育60 min，然后加入以辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体，于37 ℃孵育30 min，用二氨基联苯胺对载玻片进行染色后再用苏木精复染，在显微镜下观察各组大鼠卵巢组织细胞凋亡情况（标记为绿色的细胞），并计算细胞凋亡指数。凋亡指数＝凋亡细胞数/总细胞数×100%。

2.7 大鼠卵巢组织中凋亡和Hippo-YAP信号通路相关蛋白表达检测

取各组大鼠冻存的卵巢组织，提取总蛋白，在RIPA缓冲液中裂解，使用BCA试剂盒定量蛋白质浓度，变性后电泳分离，转移到硝化纤维素膜上，用5%脱脂奶粉封闭；加入Bax、Bcl-2、Caspase-3、LATS1、p-LATS1、YAP、p-YAP、TAZ一抗（稀释比例均为1∶1 000）和GAPDH（稀释比例为1∶5 000），在4 ℃下孵育过夜，然后加入二抗（稀释比例为1∶5 000），孵育1 h，以ECL显影；用Image J软件量化条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值表示蛋白的表达水平。

2.8 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。数据用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 ERI对大鼠体重和FPG水平的影响

与正常组比较，PCOS组大鼠给药前体重和给药后体重、FPG水平均显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组大鼠给药后体重、FPG水平均显著降低（$P<0.05$）；与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组大鼠给药后体重、FPG水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠体重和FPG水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	体重/g		FPG/（mmol/L）
	给药前	给药后	
正常组	239.46±18.52	275.36±21.41	4.08±0.53
PCOS组	273.49±21.35[a]	352.73±24.27[a]	6.59±0.81[a]
ERI低剂量组	258.92±20.28	320.86±22.64[b]	5.73±0.69[b]
ERI中剂量组	255.38±19.64	299.51±19.73[b]	5.17±0.55[b]
ERI高剂量组	265.41±22.57	280.64±17.28[b]	4.61±0.39[b]
ERI高剂量+维替泊芬组	254.18±21.65	338.46±23.68[c]	5.92±0.75[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与ERI高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2 ERI对大鼠性激素水平的影响

与正常组比较，PCOS组大鼠血清中E_2水平显著降低，T、LH水平和LH/FSH均显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组大鼠血清中E_2水平均显著升高，T、LH水平和LH/FSH均显著降低（$P<0.05$）；与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组大鼠血清中E_2水平显著降低，T、LH水平和LH/FSH均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组大鼠性激素水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

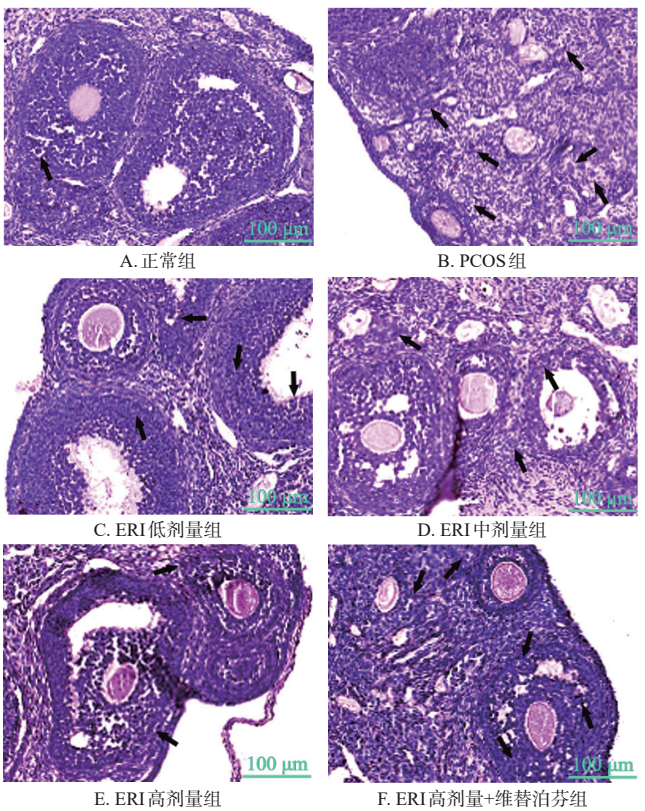
组别	E_2/（pg/mL）	T/（ng/mL）	LH/（mIU/mL）	FSH/（mIU/mL）	LH/FSH
正常组	124.95±15.38	4.27±0.52	14.62±1.73	12.53±1.16	1.32±0.15
PCOS组	63.58±7.24[a]	9.41±1.02[a]	38.25±4.79[a]	11.36±1.37	3.37±0.42[a]
ERI低剂量组	78.42±8.03[b]	8.18±0.42[b]	30.37±3.69[b]	11.95±1.03	2.54±0.29[b]
ERI中剂量组	91.56±10.64[b]	6.64±0.75[b]	22.75±2.48[b]	12.28±1.19	1.85±0.21[b]
ERI高剂量组	113.75±12.69[b]	5.29±0.59[b]	17.42±1.94[b]	12.59±1.36	1.38±0.14[b]
ERI高剂量+维替泊芬组	71.35±7.41[c]	8.93±0.91[c]	33.95±4.27[c]	11.38±1.25	2.98±0.33[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与ERI高剂量组比较，$P<0.05$。

3.3 ERI对大鼠卵巢组织形态学变化的影响

正常组大鼠卵巢颗粒细胞完整且排列规律，可见不同阶段的卵泡、成熟卵母细胞和黄体。与正常组比较，PCOS组大鼠卵巢呈多囊特征改变，可见严重闭锁性卵泡和少量成熟卵泡及颗粒细胞层，囊性卵泡数量增加，

黄体数量减少（$P<0.05$）；与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组大鼠卵巢多囊特征减轻，闭锁性卵泡数量减少，颗粒细胞层增厚和聚集，囊性卵泡数量减少，黄体数量增多（$P<0.05$）；与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组大鼠卵巢呈多囊特征改变，伴黄体、颗粒细胞层减少和卵泡闭锁，囊性卵泡数量增加，黄体数量减少（$P<0.05$）。结果见图1、表3。



A. 正常组　B. PCOS组　C. ERI低剂量组　D. ERI中剂量组　E. ERI高剂量组　F. ERI高剂量+维替泊芬组

→：病变卵泡。

图1　各组大鼠卵巢组织HE染色图

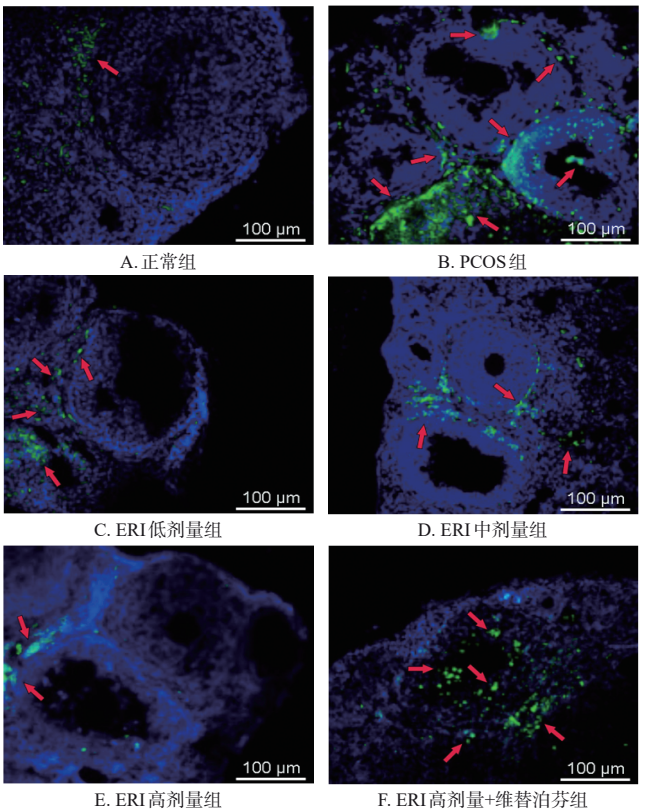
表3　各组大鼠卵巢组织中囊性卵泡和黄体数量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，个）

组别	囊性卵泡	黄体
正常组	3.98±0.13	13.45±0.98
PCOS组	15.02±1.05[a]	6.13±0.25[a]
ERI低剂量组	12.69±0.96[b]	7.89±0.38[b]
ERI中剂量组	10.31±0.85[b]	9.03±0.42[b]
ERI高剂量组	8.12±0.64[b]	10.21±0.63[b]
ERI高剂量+维替泊芬组	13.04±1.01[c]	7.51±0.32[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与ERI高剂量组比较，$P<0.05$。

3.4　ERI对大鼠卵巢组织细胞凋亡的影响

与正常组[(5.83±0.46)%]比较，PCOS组[(18.53±1.92)%]大鼠卵巢组织细胞凋亡指数显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组卵巢组织细胞凋亡指数[(15.73±1.64)%、(11.26±1.38)%、(8.69±0.93)%]均显著降低（$P<0.05$）；与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组[(16.49±1.72)%]大鼠卵巢组织细胞凋亡指数显著升高（$P<0.05$）。结果见图2。



A. 正常组　B. PCOS组　C. ERI低剂量组　D. ERI中剂量组　E. ERI高剂量组　F. ERI高剂量+维替泊芬组

→：凋亡细胞。

图2　各组大鼠卵巢组织TUNEL染色图

3.5　ERI对大鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白表达的影响

与正常组比较，PCOS组大鼠卵巢组织中Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高，Bcl-2蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组大鼠卵巢组织中Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著降低，Bcl-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组大鼠卵巢组织中Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高，Bcl-2蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。结果见图3、表4。



A：正常组；B：PCOS组；C：ERI低剂量组；D：ERI中剂量组；E：ERI高剂量组；F：ERI高剂量+维替泊芬组。

图3　各组大鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白表达的电泳图

3.6　ERI对大鼠卵巢组织中Hippo-YAP信号通路相关蛋白表达的影响

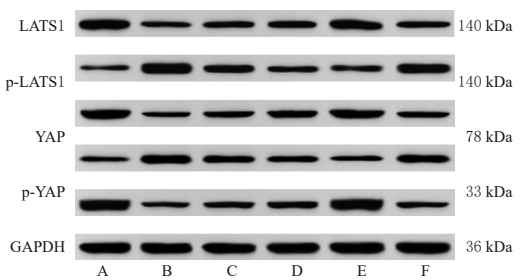
与正常组比较，PCOS组大鼠卵巢组织中p-LATS1、p-YAP蛋白表达水平均显著升高，LATS1、YAP、TAZ蛋

表4　各组大鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
正常组	0.47±0.05	0.97±0.10	0.37±0.05
PCOS组	0.95±0.10[a]	0.38±0.04[a]	0.85±0.09[a]
ERI低剂量组	0.83±0.09[b]	0.52±0.06[b]	0.74±0.08[b]
ERI中剂量组	0.69±0.08[b]	0.79±0.09[b]	0.56±0.07[b]
ERI高剂量组	0.57±0.06[b]	0.91±0.10[b]	0.43±0.05[b]
ERI高剂量+维替泊芬组	0.87±0.09[c]	0.43±0.05[c]	0.77±0.08[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与ERI高剂量组比较，$P<0.05$。

白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与PCOS组比较，ERI低、中、高剂量组大鼠卵巢组织中p-LATS1、p-YAP蛋白表达水平均显著降低，LATS1、YAP、TAZ蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与ERI高剂量组比较，ERI高剂量+维替泊芬组大鼠卵巢组织中p-LATS1、p-YAP蛋白表达水平均显著升高，LATS1、YAP、TAZ蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表5。



A：正常组；B：PCOS组；C：ERI低剂量组；D：ERI中剂量组；E：ERI高剂量组；F：ERI高剂量+维替泊芬组。

图4　各组大鼠卵巢组织中Hippo-YAP信号通路相关蛋白表达的电泳图

表5　各组大鼠卵巢组织中Hippo-YAP信号通路相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	LATS1/GAPDH	p-LATS1/GAPDH	YAP/GAPDH	p-YAP/GAPDH	TAZ/GAPDH
正常组	0.93±0.10	0.38±0.05	0.91±0.10	0.25±0.04	1.07±0.10
PCOS组	0.43±0.05[a]	0.95±0.07[a]	0.38±0.05[a]	0.84±0.05[a]	0.35±0.04[a]
ERI低剂量组	0.58±0.07[b]	0.79±0.08[b]	0.55±0.07[b]	0.72±0.08[b]	0.54±0.06[b]
ERI中剂量组	0.71±0.08[b]	0.57±0.06[b]	0.72±0.08[b]	0.59±0.07[b]	0.70±0.08[b]
ERI高剂量组	0.89±0.10[b]	0.42±0.04[b]	0.84±0.06[b]	0.36±0.04[b]	0.98±0.09[b]
ERI高剂量+维替泊芬组	0.52±0.05[c]	0.89±0.09[c]	0.41±0.06[c]	0.79±0.08[c]	0.44±0.04[c]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与ERI高剂量组比较，$P<0.05$。

4　讨论

DHEA刺激大鼠模型表现出与人类PCOS相似的卵巢、内分泌和代谢特征，如多囊卵巢、雄激素过多和葡萄糖耐受不良，被广泛应用于PCOS的研究[9]。已有研究表明，T水平升高表明雄激素的过度表达，可导致循环高雄激素血症和激素失衡，进而引发PCOS和体重增加；下丘脑-垂体-性腺轴在调节生殖功能和高雄激素血症中起着至关重要的作用，PCOS大鼠表现出LH水平和LH/FSH升高，这表明下丘脑-垂体-性腺轴被破坏，出现了卵巢生理异常；E_2水平降低与发情周期异常和多发性囊肿形成有关[10]。本研究采用DHEA诱导PCOS大鼠模型，并使用低、中、高剂量的ERI进行干预后发现，PCOS大鼠的卵巢多囊特征减轻，闭锁卵泡数量减少，颗粒细胞层增厚，体重、FPG水平、T水平、LH水平、LH/FSH下降，E_2水平升高，这提示ERI能够改善PCOS大鼠肥胖，调节性激素水平，减少卵巢组织的多囊特征改变。

颗粒细胞是卵巢的主要组成部分，其凋亡是PCOS卵巢储备功能减弱的原因。*Bcl-2*是抑制细胞凋亡的原癌基因，*Bax*是促凋亡基因[11]。Caspase-3是细胞凋亡的主要执行者，对染色质凝聚、DNA断裂、细胞核和细胞膜空泡化至关重要，并与凋亡小体的形成过程有关[12]。ERI已被发现能够通过抑制Caspase-3上调和Bax/Bcl-2平衡中断等途径引发细胞凋亡，进而改善葡萄糖诱导的肾小管上皮细胞损伤[13]。本研究结果发现，经低、中、高剂量ERI干预后的PCOS大鼠的卵巢组织细胞凋亡减少，细胞凋亡指数和Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著降低，Bcl-2蛋白表达水平升高，这提示ERI能通过减少卵巢组织细胞凋亡，改善大鼠PCOS。由于颗粒细胞是影响卵泡发育的关键因素之一，且是组成卵泡的最大细胞群，而卵泡的数量和质量直接影响卵巢的生命力，故本研究推测卵巢组织中凋亡的细胞为颗粒细胞，后期将对颗粒细胞进行特异性标记，进而确定凋亡的细胞类型。

Hippo信号通路通过调节细胞增殖和凋亡来控制器官发育。Hippo信号通路激活导致YAP/TAZ复合物磷酸化，使其滞留在细胞质中并最终降解，致使生长促进基因表达减少，细胞增殖和器官发育被抑制[5]。已有研究显示，激活Hippo-YAP信号通路，可导致雌性小鼠生育能力降低[14]。本研究结果发现，经低、中、高剂量ERI干预后，PCOS大鼠卵巢组织中p-LATS1、p-YAP蛋白表达水平均显著降低，LATS1、YAP、TAZ蛋白表达水平均显著升高，这提示ERI能抑制Hippo-YAP信号通路激活，促进卵巢颗粒细胞增殖。为进一步探究ERI通过调节Hippo-YAP信号通路在PCOS中的作用，本研究在高剂量ERI干预的基础上使用YAP抑制剂维替泊芬处理PCOS大鼠，发现ERI对PCOS大鼠性激素水平、卵巢组织形态学及细胞凋亡的调节和改善作用被抑制。这进一步验证了ERI可能通过抑制Hippo-YAP信号通路在PCOS中发挥改善作用。

综上所述，ERI能促进PCOS大鼠卵巢颗粒细胞增殖，调节性激素水平，其作用机制可能与抑制Hippo-YAP信号通路有关。

参考文献

[1] SHRIVASTAVA S, CONIGLIARO R L. Polycystic ovarian syndrome[J]. Med Clin North Am, 2023, 107(2): 227-234.

[2] GAO Y, CHEN J, JI R, et al. USP25 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome by modulating the PI3K/AKT pathway via deubiquitinating PTEN[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 779718.

[3] HAN S S, ZHAO X Y, ZHANG Y, et al. miR-34a-5p promotes autophagy and apoptosis of ovarian granulosa cells via the Hippo-YAP signaling pathway by targeting LEF1 in chicken[J]. Poult Sci, 2023, 102(2): 102374.

[4] 张聪敏,韩长月. 石斛汤治疗多囊卵巢综合征不孕症疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(11): 2290-2292.
ZHANG C M, HAN C Y. Curative effect of Shihu decoction treating polycystic ovary syndrome infertility[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2013, 40(11): 2290-2292.

[5] 张聪敏,韩长月. 石斛汤联合促排卵药治疗多囊卵巢综合征不孕症的临床观察[J]. 河北中医, 2013, 35(12): 1817-1819.
ZHANG C M, HAN C Y. Clinical observation of Shihu decoction combined with ovulation stimulator on infertility with polycystic ovarian syndrome[J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2013, 35(12): 1817-1819.

[6] 白雪,于月新,郑春杨,等. miR-296-3p调节多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞凋亡的作用机制[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(4): 20-29.
BAI X, YU Y X, ZHENG C Y, et al. Mechanism of miR-296-3p regulating granulosa cell apoptosis in rats with polycystic ovary syndrome[J]. China Biotechnol, 2023, 43(4): 20-29.

[7] 龚宇,杨文健,李鸣一. 毛兰素通过JNK/c-Jun信号通路对2型糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用机制研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(4): 663-668, 849.
GONG Y, YANG W J, LI M Y. Study on the protective mechanism of erianin on liver injury in type 2 diabetic rats through the JNK/c-Jun signaling pathway[J]. Anhui Med Pharm J, 2023, 27(4): 663-668, 849.

[8] GONG S S, MA H F, ZHENG F, et al. Inhibiting YAP in endothelial cells from entering the nucleus attenuates blood-brain barrier damage during ischemia-reperfusion injury[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 777680.

[9] SUN P P, ZHANG Y M, SUN L L, et al. Kisspeptin regulates the proliferation and apoptosis of ovary granulosa cells in polycystic ovary syndrome by modulating the PI3K/Akt/ERK signalling pathway[J]. BMC Womens Health, 2023, 23(1): 15.

[10] ZHOU Y Y, LAN H, DONG Z W, et al. Rhamnocitrin attenuates ovarian fibrosis in rats with letrozole-induced experimental polycystic ovary syndrome[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 5558599.

[11] CHEN X H, HE H Z, LONG B C, et al. Acupuncture regulates the apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovarian syndrome-related abnormal follicular development through LncMEG3-mediated inhibition of miR-21-3p[J]. Biol Res, 2023, 56(1): 31.

[12] SHEN H R, XU X, LI X L. Berberine exerts a protective effect on rats with polycystic ovary syndrome by inhibiting the inflammatory response and cell apoptosis[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2021, 19(1): 3.

[13] CHEN M F, LIOU S S, KAO S T, et al. Erianin protects against high glucose-induced oxidative injury in renal tubular epithelial cells[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 126: 97-105.

[14] ZENG L J, ZHOU C, XU W Q, et al. The ovarian-related effects of polystyrene nanoplastics on human ovarian granulosa cells and female mice[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 257: 114941.

（收稿日期：2024-02-17　修回日期：2024-04-27）

（编辑：邹丽娟）