胎盘多肽改善卵巢早衰大鼠卵巢功能及氧化应激的作用机制Δ

金　娟[1,2*]，肖　丽[1]，蒲　茜[3]，张　华[2]，余　蕾[1,3#]（1.贵州医科大学临床医学院，贵阳　550004；2.黔南州人民医院产科，贵州 都匀　558099；3.贵阳市妇幼保健院中心实验室，贵阳　550004）

中图分类号　R965；R711.75　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）21-2609-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.21.06

摘　要　目的　探究胎盘多肽调控Runt相关转录因子3（RUNX3）/Notch信号通路对环磷酰胺致卵巢早衰（POF）大鼠卵巢功能及氧化应激的影响。**方法**　通过腹腔注射环磷酰胺构建POF大鼠模型。将造模成功的60只POF大鼠随机分为模型组、胎盘多肽低（1 mg/kg）、高（2 mg/kg）剂量组和胎盘多肽+空载质粒组（2 mg/kg胎盘多肽+1 μg空载质粒）以及胎盘多肽+RUNX3沉默组[2 mg/kg胎盘多肽+1 μg RUNX3小干扰RNA质粒]，每组12只；另取12只健康大鼠作为对照组。以相应方法干预各组大鼠4周。末次给药后，测定大鼠血清中性激素[雌二醇（E_2）、抗米勒管激素（AMH）、卵泡刺激素（FSH）]水平和卵巢组织中氧化应激指标[丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、活性氧（ROS）]水平；检测大鼠卵巢组织病理和卵巢颗粒细胞凋亡情况；检测大鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白[胱天蛋白酶3（caspase-3）、活化的caspase-3（cleaved-caspase-3）、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）]与RUNX3/Notch信号通路相关蛋白的表达。**结果**　与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠卵巢正常卵泡数量增加，闭锁卵泡数量显著减少，血清中E_2、AMH水平和卵巢组织中SOD、CAT水平以及Bcl-2、RUNX3、Notch1蛋白表达水平均显著升高，血清中FSH水平、卵巢颗粒细胞凋亡率和卵巢组织中MDA、ROS水平以及cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组卵巢正常卵泡数量减少，上述指标水平显著逆转（$P<0.05$）。**结论**　胎盘多肽可能通过上调RUNX3/Notch信号通路，改善POF大鼠性激素分泌、氧化应激、卵巢颗粒细胞凋亡和卵巢功能，从而减轻其POF症状。

关键词　胎盘多肽；卵巢早衰；Runt相关转录因子3；Notch；卵巢功能；氧化应激

Mechanism of placental polypeptide in improving ovarian function and oxidative stress in rats with premature ovarian failure

JIN Juan[1,2], XIAO Li[1], PU Qian[3], ZHANG Hua[2], YU Lei[1,3]（1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Obstetrics, Qiannan Prefecture People's Hospital, Guizhou Duyun 558099, China; 3. Central Laboratory of Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital, Guiyang 550004, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the impact of placental polypeptide on the Runt-related transcription factor 3 (RUNX3)/Notch signaling pathway in rats with cyclophosphamide-induced premature ovarian failure (POF), and its effects on ovarian function and oxidative stress. **METHODS** A POF rat model was induced by intraperitoneal injection of cyclophosphamide. Sixty POF rats of the model were randomly assigned to model group, low-dose (1 mg/kg) and high-dose (2 mg/kg) placental polypeptide groups, placental polypeptide plus empty vector group [placental polypeptide (2 mg/kg), empty vector (1 μg)], and placental polypeptide plus RUNX3 silencing group [placental polypeptide (2 mg/kg), RUNX3 small interfering RNA (1 μg)], with 12 rats in each group. Additionally, 12 healthy rats were selected as a control group. The intervention lasted for 4 weeks for all groups. After the final administration, the levels of sex hormones [estradiol (E_2), anti-Müllerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH)] in rat serum and oxidative stress indicators [malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), reactive oxygen species (ROS)] in ovarian tissue were measured. The pathology of rat ovarian tissue and apoptosis of ovarian granulosa cells were examined; the expression of apoptosis-related proteins [caspase-3, cleaved-caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax)] and RUNX3/Notch signaling pathway-related proteins in rat ovarian tissue were detected. **RESULTS** Compared with the

Δ **基金项目**　贵州省卫生健康委科学技术基金项目（No. gzwjkj2020-1-148）

＊**第一作者**　副主任医师，硕士。研究方向：卵巢早衰的药物治疗及机制。E-mail：jinjuanjuyan937@sina.com

＃**通信作者**　主任技师，博士。研究方向：妇产科疾病诊治和机制。E-mail：myyl2004@163.com

model group, the low and high doses of placental polypeptide groups showed an increase in the number of normal follicles and a marked decrease in the number of atretic follicles, with significant increases in the serum levels of E_2 and AMH, the ovarian tissue levels of SOD and CAT, as well as the expression levels of Bcl-2, RUNX3 and Notch1 proteins, and significant decreases in the serum FSH levels, the ovarian granulosa cell apoptosis rate, and the ovarian tissue levels of MDA and ROS, as well as the expression levels of cleaved-caspase-3, caspase-3 and Bax proteins ($P<0.05$); the changes in the high-dose group were significantly more pronounced ($P<0.05$). Compared with the high-dose placental polypeptide group and the placental polypeptide plus empty vector group, the placental polypeptide plus RUNX3 silencing group showed a decrease in the number of normal follicles and a significant reversal of the above indicators ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Placental polypeptide may alleviate the symptoms of rats with POF by upregulating the RUNX3/Notch signaling pathway, improving sex hormone secretion, oxidative stress, ovarian granulosa cell apoptosis and ovarian function.

KEYWORDS placental polypeptide; premature ovarian failure; Runt-related transcription factor 3; Notch; ovarian function; oxidative stress

卵巢早衰（premature ovarian failure，POF）是女性40岁前发生卵巢功能衰竭的一种常见妇科疾病，以闭经、性欲减退、不孕等为主要临床症状，极大威胁女性生活质量和生殖健康[1]。卵巢储备功能下降引起的卵泡质量低下及数量减少是POF的主要病理现象，与活性氧（reactive oxygen species，ROS）大量产生引发的氧化应激密切相关；卵巢颗粒细胞是卵巢的主要功能细胞，研究发现，减轻卵巢氧化应激和抑制颗粒细胞凋亡可改善环磷酰胺诱导的POF[2]。Runt相关转录因子3（Runt-related transcription factor 3，RUNX3）是一种抗氧化因子，上调RUNX3可降低ROS水平，减轻甲基苯丙胺诱导的慢性肺部过氧化损伤[3]。Notch信号通路在卵巢原始卵泡的形成和颗粒细胞的增殖过程中发挥着重要的生理作用，上调Notch1的表达能促进POF小鼠卵泡成熟，改善卵巢功能障碍[4]。另有研究表明，RUNX3可调节Notch信号转导[5]。由此推测，上调RUNX3/Notch信号通路可能是治疗POF的有效途径。

胎盘多肽是提取自胎盘的一种小分子活性功能肽，可清除自由基、调控免疫、抑制过氧化反应。胎盘多肽注射液可用于治疗细胞免疫功能降低或失调引起的疾病、术后愈合或病毒性感染引起的疾病以及各种原因所致的白细胞减少症。基础研究发现，胎盘多肽注射液能改善卵巢储备功能减退大鼠的卵巢功能[6]。也有临床研究显示，胎盘多肽注射液可改善卵巢储备功能下降患者性激素水平和临床症状[7]。由此推测，胎盘多肽可能是POF的潜在治疗药物。本研究以RUNX3/Notch信号通路为切入点，通过构建POF大鼠模型，分析胎盘多肽注射液对POF大鼠卵巢功能及氧化应激的作用及可能机制，以期为临床POF的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括WX-SY96A型酶标仪（济南程腾生物技术有限公司）、DM3000型显微镜（德国Leica公司）、ChemoLum 8300型凝胶成像系统（德国CMVC公司）等。

1.2 主要药品与试剂

胎盘多肽注射液（国药准字H20046260，批号20230427，规格4 mL）购自贵州泰邦生物制品有限公司；注射用环磷酰胺（国药准字H32026196，批号20230317，规格0.5 g）购自江苏恒瑞医药股份有限公司；空载质粒、RUNX3小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）质粒、苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂盒、TUNEL染色试剂盒、RIPA裂解液、化学发光试剂（批号分别为BP52401、BP28595、BP29111、BP48921、BP57920、BP38189）均购自标普（常州）生物科技有限公司；雌二醇（estradiol，E_2）、抗米勒管激素（anti-Müllerian hormone，AMH）、卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone，FSH）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、ROS酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒和BCA试剂盒（批号分别为YM26100、YM49202、YM52275、YM40200、YM49916、YM58290、YM47103、YM39197）均购自广州市益满生物科技有限公司；兔源胱天蛋白酶3（caspase-3）、活化的caspase-3（cleaved-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）、β-肌动蛋白（β-actin）、RUNX3、Notch1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）单克隆抗体和辣根过氧化物酶

标记的羊抗兔IgG二抗（批号分别为JD59900、JD59014、JD67265、JD58001、JD40288、JD58930、JD72933、JD54920、JD59880）均购自天津俊达生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级10周龄雌性SD大鼠，体重249～267 g，购自贵州医科大学实验动物中心，动物生产许可证号为SCXK（贵）2023-0002。所有大鼠均分笼饲养在维持屏障环境的动物房中，温度为（24±2）℃，相对湿度为（55±5）%，每12 h明暗交替。本研究经贵阳市妇幼保健院科研伦理委员会批准，批准号为（2020-49）号。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

取64只大鼠用于构建POF大鼠模型[8]：第1天，大鼠腹腔注射环磷酰胺60 mg/kg（用生理盐水配制成质量浓度为6 mg/mL的药液，以10 mL/kg体积注射）；随后，大鼠腹腔注射环磷酰胺10 mg/kg（用生理盐水配制成质量浓度为1 mg/mL的药液，以10 mL/kg体积注射），每天1次，连续14 d。造模期间，每天固定时间刮取大鼠阴道分泌物制备阴道涂片，以观察大鼠动情周期。大鼠动情周期分为：动情前期（持续17～21 h，涂片上全是有核上皮细胞，可能伴随少量角化细胞）、动情期（持续9～15 h，涂片上全是无核角化细胞或有少量上皮细胞）、动情后期（持续10～14 h，涂片上有核上皮细胞、角化细胞、白细胞均可见）、动情间期（持续60～70 h，涂片上可见大量白细胞及少量上皮细胞和黏膜）。若大鼠动情周期紊乱或延长或长时间停留在某一时期则表示造模成功[8]。取造模成功的POF大鼠60只，随机分为模型组、胎盘多肽低剂量组、胎盘多肽高剂量组、胎盘多肽+空载质粒组、胎盘多肽+RUNX3沉默组，每组12只。另取12只健康大鼠作为对照组。

胎盘多肽低、高剂量组大鼠分别尾静脉注射胎盘多肽注射液1、2 mg/kg（用生理盐水配制成质量浓度分别为0.1、0.2 mg/mL的胎盘多肽药液，以10 mL/kg体积注射，每天1次）[9]；胎盘多肽+空载质粒组大鼠尾静脉注射胎盘多肽注射液2 mg/kg（用生理盐水配制成质量浓度为0.2 mg/mL的胎盘多肽药液，以10 mL/kg体积注射，每天1次）和空载质粒1 μg（剂量根据其说明书设置，每2 d注射1次）；胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠尾静脉注射胎盘多肽注射液2 mg/kg（用生理盐水配制成质量浓度为0.2 mg/mL的胎盘多肽药液，以10 mL/kg体积注射，每天1次）和RUNX3 siRNA质粒1 μg（剂量根据其说明书设置，每2 d注射1次）；对照组、模型组大鼠尾静脉注射生理盐水10 mL/kg。所有大鼠连续给药4周。

2.2 血清性激素指标测定

末次给药结束24 h后，各组大鼠吸入乙醚麻醉，采集其尾静脉血，于4 ℃下以4 400 r/min离心14 min，取上层血清，按相应ELISA试剂盒说明书方法操作，以酶标仪检测大鼠血清中E_2、AMH、FSH水平。

2.3 卵巢组织样本采集及制备

取血后，各组大鼠断头处死，开腹取出卵巢，其中左侧卵巢组织存于－70 ℃备用；右侧卵巢组织置于4%多聚甲醛溶液中固定，以不同浓度乙醇梯度脱水后浸入热石蜡中包埋，将冷却后的石蜡组织块固定在切片机中连续切片，得到约5 μm厚的组织薄片，备用。

2.4 卵巢组织病理改变和卵巢颗粒细胞凋亡情况观察

取“2.3”项下各组大鼠卵巢组织切片，浸入二甲苯中脱蜡，以不同浓度乙醇梯度脱水后，根据相应试剂盒说明书方法分别进行HE、TUNEL染色，使用显微镜观察。其中，HE染色用于观察卵巢组织病理改变，并使用Image J软件计数闭锁卵泡数量（闭锁卵泡指有异常结构的卵泡，如卵泡液浓缩、卵泡变性、颗粒层增厚或腔内充满组织纤维物质）。TUNEL染色用于观察卵巢颗粒细胞的凋亡情况（凋亡细胞呈黄色或棕黄色，正常细胞呈蓝色），并使用Image J软件计算卵巢颗粒细胞凋亡率。卵巢颗粒细胞凋亡率（%）＝凋亡卵巢颗粒细胞数/卵巢颗粒细胞总数×100%。

2.5 卵巢组织中氧化应激指标水平检测

取“2.3”项下冻存的各组大鼠卵巢组织适量，解冻后研碎匀浆，取部分匀浆于4 ℃下以5 600 r/min离心15 min，取上清液，按相应ELISA试剂盒说明书方法操作，以酶标仪检测MDA、SOD、CAT、ROS水平。

2.6 卵巢组织中凋亡和RUNX3/Notch信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.5”项下各组剩余的卵巢组织匀浆，与RIPA裂解液混合，以BCA法测出其总蛋白浓度后煮沸变性处理。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3%牛血清白蛋白溶液在25 ℃下封闭2 h；洗膜后，加入cleaved-caspase-3、caspase-3、Bcl-2、Bax、β-actin、RUNX3、Notch1、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶750），4 ℃下孵育12 h；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶3 400），25 ℃下孵育2 h；洗膜后，经化学发光法显色后，于凝胶成像系统下成像，采用Image J软件定量分析各蛋白的条带灰度值，以cleaved-caspase-3、caspase-3、Bcl-2、Bax与内参β-actin，RUNX3、Notch1与内参GAPDH的条带灰度值比值表示上述蛋白的表达水平。

2.7 统计学处理

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$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 胎盘多肽对POF大鼠性激素水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中E_2、AMH水平均显著降低，FSH水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠血清中E_2、AMH水平均显著升高，FSH水平均显著降低，且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。与胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽高剂量组大鼠血清中E_2、AMH、FSH水平差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠血清中E_2、AMH水平均显著降低，FSH水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠血清性激素水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	E_2/(ng/L)	AMH/(μg/L)	FSH/(U/L)
对照组	83.14±10.61	7.03±1.14	51.24±8.22
模型组	48.49±6.43[a]	3.51±0.63[a]	241.58±32.46[a]
胎盘多肽低剂量组	65.24±8.36[b]	5.12±0.95[b]	145.59±17.63[b]
胎盘多肽高剂量组	77.15±9.56[bc]	6.43±1.02[bc]	64.33±9.55[bc]
胎盘多肽+空载质粒组	76.84±9.72	6.38±1.05	63.98±8.92
胎盘多肽+RUNX3沉默组	51.04±6.21[de]	3.77±0.61[de]	237.95±29.71[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与胎盘多肽低剂量组比较，$P<0.05$；d：与胎盘多肽高剂量组比较，$P<0.05$；e：与胎盘多肽+空载质粒组比较，$P<0.05$。

3.2 胎盘多肽对POF大鼠卵巢组织病理的影响

对照组大鼠卵巢形态正常，有不同发育阶段的卵泡，少见闭锁卵泡。与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织中正常卵泡较少，闭锁卵泡数显著增多（$P<0.05$）；与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠卵巢组织中正常卵泡有所增加，闭锁卵泡数均显著减少，且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。胎盘多肽高剂量组大鼠卵巢组织的病理结果与胎盘多肽+空载质粒组相似，闭锁卵泡数相当，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠卵巢组织中正常卵泡数减少，闭锁卵泡数显著增多（$P<0.05$）。结果见表2、图1。

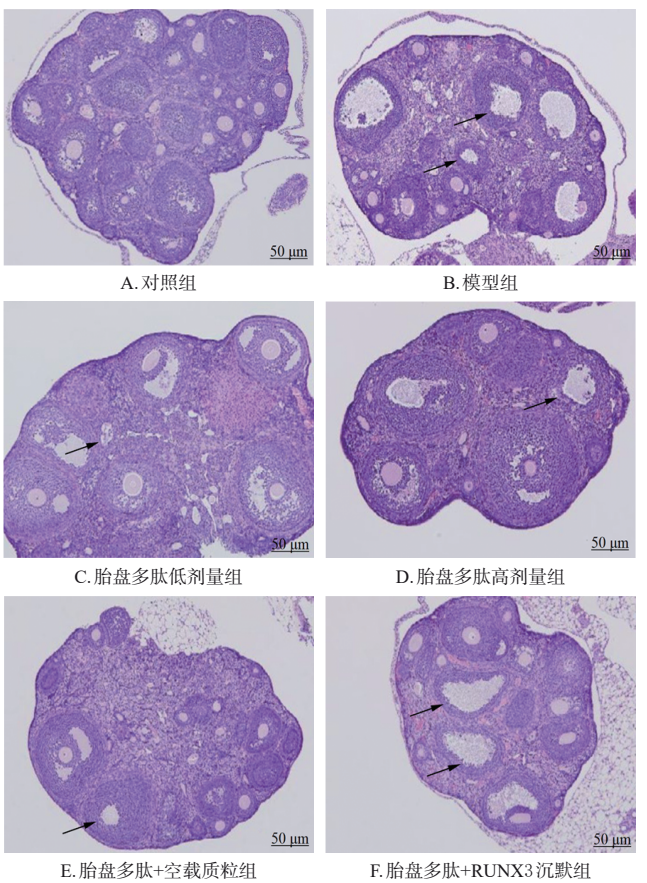
3.3 胎盘多肽对POF大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响

与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织中颗粒细胞凋亡增多，卵巢颗粒细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡有所减少，卵巢颗粒细胞凋亡率均显著降低，且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。与胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽高剂量组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率差异无统计学意义（$P>0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡增多，卵巢颗粒细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）。结果见表2、图2。

表2 各组大鼠卵巢组织闭锁卵泡数、卵巢颗粒细胞凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	闭锁卵泡数/个	卵巢颗粒细胞凋亡率/%
对照组	2.07±0.45	10.73±2.32
模型组	11.86±2.39[a]	61.64±10.46[a]
胎盘多肽低剂量组	7.04±1.68[b]	38.12±6.23[b]
胎盘多肽高剂量组	3.75±0.84[bc]	19.56±3.57[bc]
胎盘多肽+空载质粒组	3.81±0.91	20.47±3.76
胎盘多肽+RUNX3沉默组	10.22±2.15[de]	58.73±9.35[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与胎盘多肽低剂量组比较，$P<0.05$；d：与胎盘多肽高剂量组比较，$P<0.05$；e：与胎盘多肽+空载质粒组比较，$P<0.05$。



A. 对照组　B. 模型组　C. 胎盘多肽低剂量组　D. 胎盘多肽高剂量组　E. 胎盘多肽+空载质粒组　F. 胎盘多肽+RUNX3沉默组

箭头：闭锁卵泡。

图1 各组大鼠卵巢组织病理学变化显微图（HE染色）

3.4 胎盘多肽对POF大鼠卵巢组织中氧化应激水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织中MDA、ROS水平均显著升高，SOD、CAT水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠卵巢组织中MDA、ROS水平均显著降低，SOD、CAT水平均

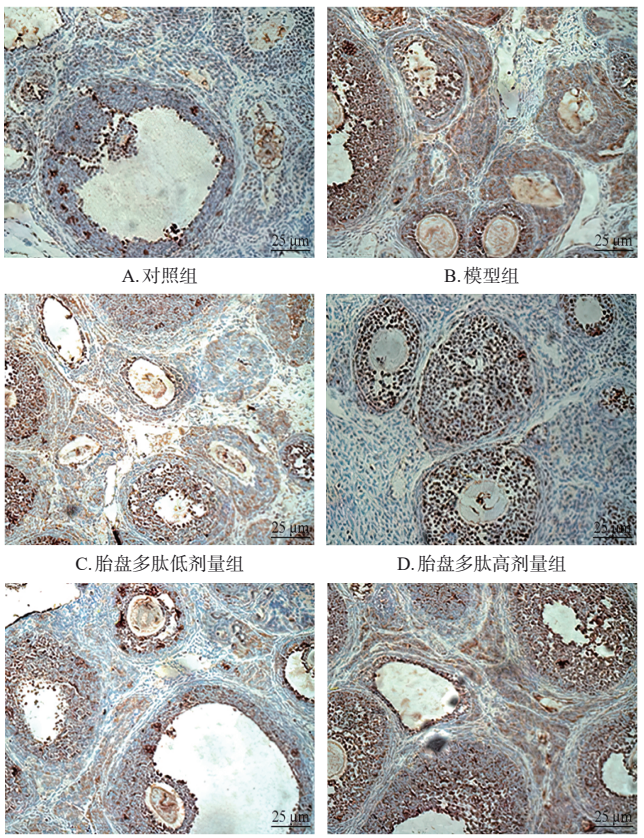


图2　各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡显微图（TUNEL染色）

显著升高，且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。与胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽高剂量组大鼠卵巢组织中MDA、SOD、CAT、ROS水平的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠卵巢组织中MDA、ROS水平均显著升高，SOD、CAT水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

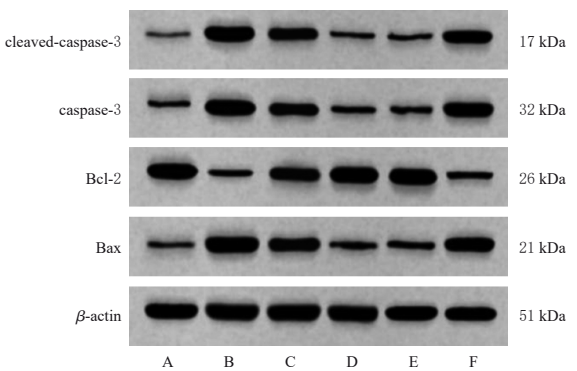
表3　各组大鼠卵巢组织中MDA、SOD、CAT、ROS水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)	CAT/(U/mg)	ROS/(U/mg)
对照组	3.19±0.47	26.83±4.72	87.42±11.52	37.16±5.42
模型组	14.27±2.65^{a}	8.25±1.18^{a}	46.18±7.14^{a}	63.05±9.06^{a}
胎盘多肽低剂量组	9.43±1.36^{b}	14.07±3.03^{b}	61.55±8.03^{b}	53.08±6.44^{b}
胎盘多肽高剂量组	5.56±0.83^{bc}	19.16±4.05^{bc}	74.06±9.82^{bc}	44.51±5.91^{bc}
胎盘多肽+空载质粒组	5.47±0.79	18.95±3.86	73.81±9.64	43.98±5.72
胎盘多肽+RUNX3沉默组	13.98±2.48^{de}	9.14±1.09^{de}	47.97±6.95^{de}	61.74±9.14^{de}

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与胎盘多肽低剂量组比较，$P<0.05$；d：与胎盘多肽高剂量组比较，$P<0.05$；e：与胎盘多肽+空载质粒组比较，$P<0.05$。

3.5　胎盘多肽对POF大鼠卵巢组织中凋亡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cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax蛋白表达水平均显著升高，Bcl-2蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠卵巢组织中cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax蛋白表达水平均显著降低，Bcl-2蛋白表达水平均显著升高，且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。与胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽高剂量组大鼠卵巢组织中cleaved-caspase-3、caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达水平的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠卵巢组织中cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax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：对照组；B：模型组；C：胎盘多肽低剂量组；D：胎盘多肽高剂量组；E：胎盘多肽+空载质粒组；F：胎盘多肽+RUNX3沉默组。

图3　各组大鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白表达的电泳图

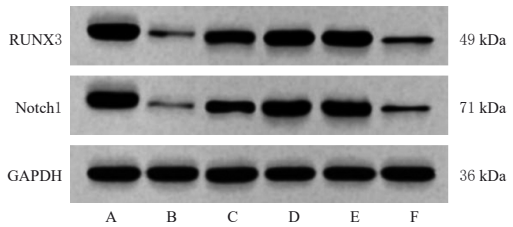
表4　各组大鼠卵巢组织中凋亡相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	cleaved-caspase-3/β-actin	caspase-3/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
对照组	0.11±0.02	0.15±0.03	1.37±0.29	0.13±0.03
模型组	1.14±0.13^{a}	1.31±0.29^{a}	0.18±0.03^{a}	1.22±0.24^{a}
胎盘多肽低剂量组	0.62±0.07^{b}	0.72±0.11^{b}	0.77±0.12^{b}	0.69±0.13^{b}
胎盘多肽高剂量组	0.18±0.03^{bc}	0.23±0.05^{bc}	1.28±0.22^{bc}	0.19±0.04^{bc}
胎盘多肽+空载质粒组	0.19±0.04	0.21±0.04	1.25±0.20	0.20±0.03
胎盘多肽+RUNX3沉默组	1.05±0.12^{de}	1.24±0.25^{de}	0.25±0.05^{de}	1.12±0.21^{de}

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与胎盘多肽低剂量组比较，$P<0.05$；d：与胎盘多肽高剂量组比较，$P<0.05$；e：与胎盘多肽+空载质粒组比较，$P<0.05$。

3.6　胎盘多肽对POF大鼠卵巢组织中RUNX3/Notch信号通路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RUNX3、Notch1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，胎盘多肽低、高剂量组大鼠卵巢组织中RUNX3、Notch1蛋白表达水平均显著升高，且高剂量组的变化更明显（$P<0.05$）。与胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽高剂量组大鼠卵巢组织中RUNX3、Notch1蛋白表达水平的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与胎盘多肽高剂量组和胎盘多肽+空载质粒组比较，胎盘多肽+RUNX3沉默组大鼠卵巢组织中RUNX3、Notch1蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4、表5。



A：对照组；B：模型组；C：胎盘多肽低剂量组；D：胎盘多肽高剂量组；E：胎盘多肽+空载质粒组；F：胎盘多肽+RUNX3沉默组。

图4　各组大鼠卵巢组织中RUNX3/Notch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RUNX3/Notch信号通路相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	RUNX3/GAPDH	Notch1/GAPDH
对照组	1.33±0.22	1.29±0.23
模型组	0.12±0.03[a]	0.10±0.02[a]
胎盘多肽低剂量组	0.78±0.09[b]	0.63±0.06[b]
胎盘多肽高剂量组	1.22±0.17[bc]	1.14±0.20[bc]
胎盘多肽+空载质粒组	1.26±0.19	1.15±0.21
胎盘多肽+RUNX3沉默组	0.17±0.03[de]	0.18±0.04[de]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与胎盘多肽低剂量组比较，$P<0.05$；d：与胎盘多肽高剂量组比较，$P<0.05$；e：与胎盘多肽+空载质粒组比较，$P<0.05$。

4　讨论

POF作为一种常见的妇科疾病，在我国女性中发病率逐年升高[10]，给妇女身心健康造成严重负面影响。临床以促排卵及免疫治疗、激素替代疗法为主，但长期应用存在高血压、骨质疏松、妇科肿瘤等疾病发病率上升的风险，因此探寻疗效确切与安全可靠的新型疗法已成为目前的研究热点[11]。炎症和氧化应激是造成POF大鼠卵巢颗粒细胞凋亡、卵泡数量减少及卵巢功能减退的主要因素，抑制氧化应激可有效恢复POF大鼠卵巢功能[12]。本研究通过腹腔注射环磷酰胺构建POF大鼠模型，结果显示，模型组大鼠卵巢正常卵泡数量较少，存在较多闭锁卵泡，血清中E_2、AMH水平和卵巢组织中SOD、CAT水平降低，血清中FSH水平、卵巢颗粒细胞凋亡率和卵巢组织中MDA、ROS水平升高，表明POF大鼠卵巢功能较差，性激素分泌异常，伴随着氧化应激反应和卵巢颗粒细胞严重凋亡，提示POF大鼠模型构建成功。

胎盘多肽作为健康人胎盘提取物，主要含有脂肪酸、核酸、蛋白质、氨基酸及各种细胞因子等，具有明显的抗氧化与免疫增强作用。临床研究显示，胎盘多肽可抑制骨髓炎儿童炎症反应，降低患儿术后感染，还可抑制病毒性脑炎患儿机体氧化应激反应[13-14]。动物实验发现，胎盘多肽能改善卵巢储备功能减退大鼠性激素分泌，促使卵巢中卵泡成熟与数量增加，是治疗卵巢储备功能减退的有效药物[6]。本研究结果显示，POF大鼠经不同剂量胎盘多肽注射液干预后卵巢闭锁卵泡数量减少，正常卵泡数量增加，血清中E_2、AMH水平和卵巢组织中SOD、CAT水平升高，血清中FSH水平、卵巢颗粒细胞凋亡率和卵巢组织中MDA、ROS水平降低，且高剂量胎盘多肽上述指标的变化更明显。这与李娅等[6]研究结果相似，表明胎盘多肽可改善POF大鼠性激素分泌和卵巢功能，增强大鼠抗氧化活力，抑制氧化应激反应，减轻卵巢颗粒细胞凋亡。这提示胎盘多肽注射液可能是未来临床用于治疗POF的有效药物。

Notch是调节细胞侵袭、黏附、增殖、凋亡和分化的重要信号，可介导卵巢功能维持、卵泡发育及颗粒细胞的增殖、分化过程。研究表明，上调Notch1蛋白表达可减少POF模型仓鼠卵巢细胞凋亡，改善性激素分泌及卵巢功能障碍[15]。RUNX3是Notch信号的上游调控因子，可参与细胞凋亡、炎症和氧化应激过程[16]。研究发现，增强RUNX3表达可明显减少ROS生成，降低氧化应激水平，减轻坐骨神经损伤大鼠疼痛[17]。本研究结果显示，模型组大鼠卵巢组织中Bcl-2、RUNX3、Notch1蛋白表达水平均较对照组降低，cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax蛋白表达水平均较对照组升高，表明POF大鼠卵巢组织凋亡相关蛋白异常表达且RUNX3/Notch信号通路处于抑制状态。经不同剂量胎盘多肽注射液处理后，POF大鼠卵巢组织中Bcl-2、RUNX3、Notch1蛋白表达水平均升高，cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax蛋白表达水平均降低，且高剂量组上述蛋白的变化更明显。这提示胎盘多肽注射液能调控卵巢组织中凋亡相关蛋白表达并激活RUNX3/Notch信号通路。本研究进一步在高剂量胎盘多肽基础上沉默RUNX3，结果发现，沉默RUNX3能够逆转高剂量胎盘多肽对POF大鼠性激素分泌、氧化应激、卵巢颗粒细胞凋亡和卵巢功能的改善效果，提示上调RUNX3/Notch信号通路可能是胎盘多肽注射液改善POF大鼠的作用机制。

综上所述，胎盘多肽注射液可能通过上调RUNX3/Notch信号通路，改善POF大鼠性激素分泌、氧化应激、卵巢颗粒细胞凋亡和卵巢功能，减轻其POF症状。但胎盘多肽注射液能否通过其他信号通路改善POF模型大鼠症状有待后续研究。

参考文献

[1] PELLICER N，COZZOLINO M，DIAZ-GARCÍA C，et al. Ovarian rescue in women with premature ovarian insufficiency：facts and fiction[J]. Reprod Biomed Online，2023，46(3)：543-565.

[2] ZHAO Y T，YIN H W，HU C Y，et al. Tilapia skin peptides restore cyclophosphamide-induced premature ova-

rian failure via inhibiting oxidative stress and apoptosis in mice[J]. Food Funct,2022,13(3):1668-1679.

[3] SHI L, LIU B Y, WANG X, et al. RUNX3-dependent oxidative epithelial-to-mesenchymal transition in methamphetamine-induced chronic lung injury[J]. Cell Stress Chaperones,2020,25(5):793-802.

[4] GUO S H,QUAN S,ZOU S Y. Roles of the Notch signaling pathway in ovarian functioning[J]. Reprod Sci,2021,28(10):2770-2778.

[5] FENG Z,LIU Y X,CHEN H X. Integrated analysis of the expression, involved functions, and regulatory network of RUNX3 in melanoma[J]. Comb Chem High Throughput Screen,2022,25(9):1552-1564.

[6] 李娅,罗小光,陈睿. 基于“治未病”理论探讨穴位注射对卵巢储备功能减退大鼠PI3K、AKT、FOXO3a表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2022,37(4):2254-2258.
LI Y,LUO X G,CHEN R. Discussion on the effect of acupoint injection on the expression of PI3K, AKT, FOXO3a in rats with decreased ovarian reserve function based on the preventive treatment theory[J]. China J Tradit Chin Med Pharm,2022,37(4):2254-2258.

[7] 亓丁,张跃辉,王冰,等. 电针联合胎盘多肽注射液足三里注射治疗卵巢储备功能下降临床疗效及对性激素水平的影响[J]. 河北中医,2021,43(1):117-120,125.
QI D,ZHANG Y H,WANG B,et al. Clinical observation of electroacupuncture combined with placental polypeptide injection on treatment of decreased ovarian reserve function by Zusanli injected[J]. Soc Secur Stud,2021,43(1):117-120,125.

[8] 何毓婕,曲涛,王桐,等. 松花粉对环磷酰胺致卵巢早衰大鼠的卵巢保护作用[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(6):1005-1013.
HE Y J,QU T,WANG T,et al. Protective effect of pine pollen on ovaries of rats with premature ovarian failure induced by cyclophosphamide[J]. Nat Prod Res Dev,2022,34(6):1005-1013.

[9] 黄丹,余蕾,朱玲龑,等. 熊去氧胆酸联合胎盘多肽对孕鼠肝内胆汁淤积的治疗作用[J]. 现代妇产科进展,2020,29(5):363-367.
HUANG D,YU L,ZHU L Y,et al. Effect of ursodeoxycholic acid combined with placental polypeptide on intrahepatic chole-stasis in pregnant rats[J]. Prog Obstet Gynecol,2020,29(5):363-367.

[10] 许梦婷,李芳,王莉莉. 卵巢功能早衰的病因与治疗研究进展[J]. 中国预防医学杂志,2022,23(5):394-400.
XU M T,LI F,WANG L L. Research progress on etiology and treatment of premature ovarian failure[J]. Chin Prev Med,2022,23(5):394-400.

[11] HU H Q,ZHANG J C,XIN X Y,et al. Efficacy of natural products on premature ovarian failure:a systematic review and meta-analysis of preclinical studies[J]. J Ovarian Res,2024,17(1):46.

[12] ZHENG S Y,MA M Y,CHEN Y X,et al. Effects of quercetin on ovarian function and regulation of the ovarian PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway and oxidative stress in a rat model of cyclophosphamide-induced premature ovarian failure[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol,2022,130(2):240-253.

[13] 袁悦,李金磊,查巍. 胎盘多肽注射液联合负压封闭引流技术治疗儿童骨髓炎的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(15):1711-1714.
YUAN Y,LI J L,ZHA W. Clinical trial of placental polypeptide injection combined with negative pressure closed drainage technique in the treatment of pediatric osteomyelitis[J]. Chin J Clin Pharmacol,2022,38(15):1711-1714.

[14] 郝丹丹. 醒脑静注射液联合胎盘多肽对病毒性脑炎患儿外周血细胞因子、氧化应激和免疫功能的影响[J]. 河北医药,2017,39(11):1647-1649.
HAO D D. Effects of Xingnaojing injection combined with placental polypeptide on cytokines, oxidative stress and immune function in peripheral blood of children with viral encephalitis[J]. Hebei Med J,2017,39(11):1647-1649.

[15] ZHAO W,DONG L W. Long non-coding RNA HOTAIR overexpression improves premature ovarian failure by up-regulating Notch-1 expression[J]. Exp Ther Med,2018,16(6):4791-4795.

[16] ZHANG L,LUO P,MAO X G,et al. Lemur tyrosine kinase 2 has a tumor-inhibition function in human glioblastoma by regulating the RUNX3/Notch pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,2023,1870(7):119509.

[17] LI Y Y,LI H L,HAN J S. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 modulates pain sensitivity by suppressing the ROS-RUNX3 pathway in a rat model of neuropathy[J]. J Cell Physiol,2020,235(4):3864-3873.

（收稿日期:2024-05-16　修回日期:2024-09-18）
（编辑:舒安琴）