

网络出版时间: 2025-06-30 13:23:09 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0857.010>

黄芪总皂苷联合骨髓间充质干细胞调控 SDF-1/CXCR4 通路治疗自身免疫性卵巢早衰模型大鼠的作用及机制

赵莉娜^{1,2} 张宸铭^{1,2} 孙自学² 陈建设²

[¹ 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450046;

² 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院) 男科与生殖诊疗中心, 郑州 450002]

摘要 目的 探讨黄芪总皂苷联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)调控基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/CXC型趋化因子受体4(CXCR4)通路治疗自身免疫性卵巢早衰(POF)模型大鼠的作用及机制。方法 大鼠随机分为POF组、黄芪总皂苷组、BMSCs组、联合组、联合+SDF-1/CXCR4通路抑制剂(AMD3100)组、对照组,每组12只。除对照组外,其他组大鼠均需构建POF模型,建模成功后,开始处理,尾静脉注射的药物每周处理1次,腹腔注射的药物每天处理1次,持续4周。ELISA检测血清中抗卵巢抗体(AOAB)、 β -内啡肽(β -EP)、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (INF- γ)水平;检测卵巢指数的变化;HE染色检测卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数、闭锁卵泡数;流式细胞术检测卵巢中BMSCs数占比;qRT-PCR检测卵巢组织中细胞间质上皮转化因子(cMET)、肝细胞生长因子(HGF)、SDF-1、CXCR4 mRNA表达;Western blot检测卵巢组织中SDF-1、CXCR4蛋白水平。结果 与对照组比较,POF组血清中AOAB、TNF- α 、INF- γ 水平、卵巢中闭锁卵泡数升高, β -EP、VEGF水平、卵巢指数、卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数、SDF-1、CXCR4 mRNA及蛋白表达降低($P < 0.05$);与POF组比较,黄芪总皂苷组、BMSCs组、联合组血清中AOAB、TNF- α 、INF- γ 水平、卵巢中闭锁卵泡数降低, β -EP、VEGF水平、卵巢指数、卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数、BMSCs数占比、cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA及SDF-1、CXCR4蛋白表达升高,且联合组对应指标变化趋势最明显($P < 0.05$);AMD3100逆转了黄芪总皂苷联合BMSCs对POF大鼠的影响。结论 黄芪总皂苷联合BMSCs可能通过激活SDF-1/CXCR4通路抑制POF大鼠炎症、促进卵泡发育、提高卵巢中BMSCs数占比、促进BMSCs归巢,进而改善卵巢功能。

关键词 黄芪总皂苷;骨髓间充质干细胞;自身免疫性卵巢早衰;卵泡;归巢;炎症

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)07-1258-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.014

卵巢早衰(premature ovarian failure, POF)是一种常见的生殖疾病,其不仅影响卵母细胞的数量和质量,而且会降低妊娠率,增加流产率,严重影响女性的生活质量。既往研究^[1]表明,约10%~30%的POF是由自身免疫机制引起的。目前,激素替代疗法是治疗POF相关症状的最常见方法,然而,这种治疗方法有许多副作用,并增加了女性患乳腺癌和子宫内膜癌的风险。因此,找到更安全的POF治疗方法至关重要。研究^[2-3]表明,黄芪总皂苷可增强多囊卵巢综合征大鼠的卵巢功能,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植可促进POF大鼠卵巢功能重建。但黄芪总皂苷

联合BMSCs对POF大鼠的影响鲜有报道。相关研究^[4]显示,基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)/CXC型趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)通路的激活促进了大鼠薄型子宫内膜修复。但黄芪总皂苷联合BMSCs能否通过调控SDF-1/CXCR4通路影响大鼠POF尚不可知。因此,该研究主要探究黄芪总皂苷联合BMSCs对POF大鼠的影响及机制,为POF的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞 7周龄SPF级雌性SD大鼠72只,体质量(200 ± 5)g,购自杭州启真实验动物科技有限公司,许可证号为SCXK(浙)2022-0005。饲养环境温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度50%~70%。大鼠BMSCs购自武汉普诺赛生命科技有限公司。本研究获得河南中医药大学第二临床医学院动物实验伦理委员会批准,批准号:HNSZYYWZ-2022002037。

2025-03-07 接收

基金项目:河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(编号:2021JDZX2068)

作者简介:赵莉娜,女,副主任医师;

陈建设,男,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail: chenJiansheyin@126.com

1.2 试剂与仪器 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、SDF-1/CXCR4 通路抑制剂 AMD3100(货号: HY-153808、HY-153808A、HY-40046,美国 MCE 公司); 黄芪总皂苷(货号: 20231106,上海研生实业有限公司); 大鼠抗卵巢抗体(anti ovary antibody, AOAB)、 β -内啡肽(β -Endorphin, β -EP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ) 的 ELISA 试剂盒(货号: 20231223、20231129、20231009、20231119、20231124,上海美旋生物科技有限公司); 兔源一抗 SDF-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)、CXCR4 及二抗(批号: ab25117、ab8245、ab124824、ab6721,英国 Abcam 公司)。酶标仪(型号: SpectraMax iD3, 美谷分子仪器有限公司); 电子天平(型号: PX84ZH, 上海格赛德生物技术有限公司); 光学显微镜(型号: CX53, 日本奥林巴斯公司); 流式细胞仪(型号: CytoFLEX LX, 贝克曼库尔特国际贸易有限公司); 荧光定量 PCR(型号: Prism[®] 7500, 美国 ABI 公司); 成像系统(型号: ChemiDoc MP, 美国伯乐公司)。

1.3 卵巢抗原的制备 收集大鼠整个卵巢组织, 称重 0.9% 氯化钠溶液冲洗, 切碎, 在 Tris-HCl 缓冲液中研磨成匀浆后再用超声粉碎 5 min, 然后在低温下离心去除上清液, 调整浓度, 使每 0.1 mL 液体中含有 20 mg 卵巢组织。

1.4 建模与分组 大鼠通过皮下多点注射 0.25 mL 卵巢抗原免疫, 连续免疫 3 次, 每隔 14 d 免疫 1 次, 第 1 次免疫加入等量弗氏完全佐剂, 第 2、3 次免疫加入等量弗氏不完全佐剂的方式建模^[5]。以大鼠血清中 AOAB 水平升高、 β -EP、VEGF 水平降低, 卵巢指数降低, 卵巢病理显示成熟卵泡数、发育卵泡数降低, 闭锁卵泡数升高作为造模成功的依据。大鼠随机分为 POF 组、黄芪总皂苷组、BMSCs 组、联合组、联合 + AMD3100 组、对照组, 每组 12 只。对照组以 0.9% 氯化钠溶液代替卵巢抗原, 其它操作同造模过程。除对照组外, 其他组大鼠均需构建 POF 模型, 建模成功后, 开始处理, 各组处理剂量是在参考文献的基础上再进行预实验确定的, 黄芪总皂苷组^[6]: 大鼠腹腔注射 53.33 mg/kg 黄芪总皂苷, 且尾静脉注射 1 mL 0.9% 氯化钠溶液; BMSCs 组^[4]: 大鼠尾静脉注射 1 mL BMSCs 悬液(1×10^6 个/mL) 且腹腔注射与黄芪总皂苷等量的 0.9% 氯化钠溶液; 联合组: 大鼠腹腔注射 53.33 mg/kg 黄芪总皂苷且

尾静脉注射 1 mL BMSCs 悬液; 联合 + AMD3100 组^[4]: 大鼠腹腔注射 53.33 mg/kg 黄芪总皂苷和 5 mg/kg AMD3100, 且尾静脉注射 1 mL BMSCs 悬液; POF 组、对照组大鼠尾静脉注射 1 mL 0.9% 氯化钠溶液且腹腔注射与黄芪总皂苷等量的 0.9% 氯化钠溶液。尾静脉注射的药物每周处理 1 次, 腹腔注射的药物每天处理 1 次, 持续 4 周。

1.5 血清中 AOAB、 β -EP、VEGF、TNF- α 、INF- γ 水平的检测 末次处理 24 h 后, 麻醉所有大鼠, 收集腹主动脉血, 经离心得血清, 使用 ELISA 测定法检测血清 AOAB、 β -EP、VEGF、TNF- α 、INF- γ 水平。

1.6 卵巢指数的检测 采血后, 称量所有大鼠体质量, 麻醉并处死大鼠, 取大鼠双侧卵巢, 迅速称量卵巢湿重, 计算卵巢指数 = 双侧卵巢(mg) / 大鼠体质量(g)。

1.7 卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数、闭锁卵泡数的 HE 染色检测 随机取 6 只大鼠的卵巢组织, 用 4% 多聚甲醛固定卵巢 24 h, 乙醇梯度脱水, 并包埋在石蜡中。使用石蜡切片机制备一系列 5 μ m 组织切片, 切片用 HE 染色。观察卵巢形态并在光学显微镜下拍照。最后计算成熟卵泡数、发育卵泡数、闭锁卵泡数。

1.8 卵巢中 BMSCs 数占比的流式细胞术检测 取各组剩余 6 只大鼠的卵巢组织, 剪碎后用组织消化液消化 2 h 后过滤并收集滤液, 将滤液离心弃上清液, 加入 2 mL 红细胞裂解液裂解 5 min, 加入 5 mL 磷酸缓冲盐溶液离心后弃上清液, 于细胞沉淀中加入 RPMI-1640 培养基重悬细胞, 通过流式细胞仪检测细胞悬液中 BMSCs 数占比。

1.9 卵巢组织中细胞间质上皮转换因子(c-Mesenchymal-epithelial transition factor, cMET)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、SDF-1、CXCR4 mRNA 表达的检测 取卵巢组织, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。取 2 μ g 总 RNA 合成 cDNA。在 ABI Prism[®] 7500 型荧光定量 PCR 系统上使用特异性引物进行荧光定量 PCR。通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA 相对表达水平。本研究使用的引物序列见表 1。

1.10 卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白的检测 取卵巢组织, 用 RIPA 裂解缓冲液提取蛋白后, 进行蛋白质浓度测定。将 40 μ g 蛋白质样品加载到 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶的每个泳道中, 并进行电泳。蛋白质印迹电转移到聚偏二氟乙烯膜上。再将聚偏二氟乙烯膜预孵育在 5% 脱脂牛奶中

表1 引物序列

Tab.1 Primers sequence

Gene	Primers sequence (5'-3')
cMET	F: AAGTCGGACCACAGCGAT R: CGTTATCAAAAGTCTGTCTGG
HGF	F: GATACCACACGAACACAGCTTT R: TCATGGATCATACAGAATCA
SDF-1	F: GTTAGGGAAGGGCCCATAGC R: GACCTTTTCTGAATAGTGGCTC
CXCR4	F: TGCACCTGTCAGTGGCCG R: CTGGCCTTCATCAGTCTG
GAPDH	F: GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA R: GCCCCTCCTGTTATTATGG

阻断膜 1 h, 在 4 ℃ 下与一抗 SDF-1 (1 : 3 000)、GAPDH (1 : 3 000)、CXCR4 (1 : 4 000) 过夜孵育, 再与二抗 (1 : 5 000) 一起孵育 1 h。最后, 使用 ECL 试剂和 ChemiDoc MP 成像系统可视化蛋白质表达信号。使用 ImageJ 软件计算蛋白灰度值。

1.11 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及事后 SNK- η 检验进行多组重复数据之间的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪总皂苷联合 BMSCs 对大鼠血清中 AOAB、 β -EP、VEGF、TNF- α 、INF- γ 水平的影响 与对照组比较, POF 组血清中 AOAB、TNF- α 、INF- γ 水平升高, β -EP、VEGF 水平降低 ($P < 0.05$); 与 POF 组比较, 黄芪总皂苷组、BMSCs 组、联合组血清中 AOAB、TNF- α 、INF- γ 水平降低, β -EP、VEGF 水平升高 ($P < 0.05$); 与黄芪总皂苷组、BMSCs 组比较, 联合组血清中 AOAB、TNF- α 、INF- γ 水平降低, β -EP、VEGF 水平升高 ($P < 0.05$); 与联合组比较, 联合 + AMD3100 组血清中 AOAB、TNF- α 、INF- γ 水平升高, β -EP、VEGF 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表2 各组大鼠血清中 AOAB、 β -EP、VEGF、TNF- α 、INF- γ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Tab.2 Comparison of serum levels of AOAB, β -EP, VEGF, TNF- α , and INF- γ in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Group	AOAB (ng/mL)	β -EP (U/mL)	VEGF (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	INF- γ (pg/mL)
Control	0.60 $\pm$ 0.05	80.55 $\pm$ 3.96	260.67 $\pm$ 12.99	56.65 $\pm$ 2.34	25.54 $\pm$ 1.01
POF	1.94 $\pm$ 0.18 [*]	41.15 $\pm$ 2.03 [*]	138.88 $\pm$ 6.75 [*]	123.34 $\pm$ 5.78 [*]	79.93 $\pm$ 3.03 [*]
Total saponins of astragalus membranaceus	1.23 $\pm$ 0.09 [#]	47.73 $\pm$ 2.02 [#]	152.26 $\pm$ 7.14 [#]	108.54 $\pm$ 5.13 [#]	68.89 $\pm$ 3.05 [#]
BMSCs	1.04 $\pm$ 0.08 [#]	56.69 $\pm$ 2.17 [#]	180.54 $\pm$ 8.93 [#]	93.23 $\pm$ 4.01 [#]	57.78 $\pm$ 2.18 [#]
Combination	0.73 $\pm$ 0.06 ^{#&∇}	68.83 $\pm$ 3.02 ^{#&∇}	235.55 $\pm$ 10.64 ^{#&∇}	71.14 $\pm$ 3.13 ^{#&∇}	33.45 $\pm$ 1.58 ^{#&∇}
Combination + AMD3100	1.15 $\pm$ 0.12 ^{Δ}	51.77 $\pm$ 2.44 ^{Δ}	168.85 $\pm$ 7.15 ^{Δ}	98.99 $\pm$ 4.05 ^{Δ}	60.65 $\pm$ 2.93 ^{Δ}

^{*} $P < 0.05$ vs Control group; [#] $P < 0.05$ vs POF group; [&] $P < 0.05$ vs Total saponins of astragalus membranaceus group; ^{∇} $P < 0.05$ vs BMSCs group;

^{Δ} $P < 0.05$ vs Combination group.

2.2 黄芪总皂苷联合 BMSCs 对大鼠卵巢指数的影响 与对照组比较, POF 组卵巢指数降低 ($P < 0.05$); 与 POF 组比较, 黄芪总皂苷组、BMSCs 组、联合组卵巢指数升高 ($P < 0.05$); 与黄芪总皂苷组、BMSCs 组比较, 联合组卵巢指数升高 ($P < 0.05$); 与联合组比较, 联合 + AMD3100 组卵巢指数降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

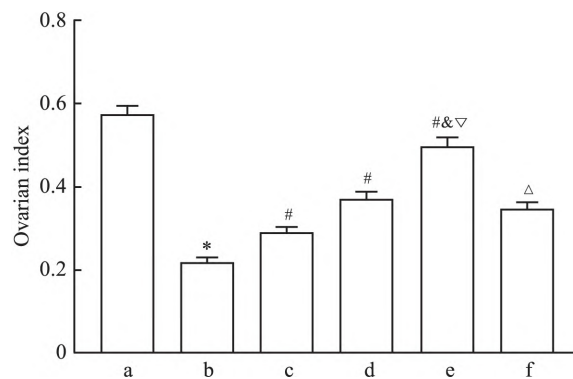


图1 各组大鼠卵巢指数比较

Fig.1 Comparison of ovarian index in rats in each group

a: Control group; b: POF group; c: Total saponins of astragalus membranaceus group; d: BMSCs group; e: Combination group; f: Combination + AMD3100 group; ^{*} $P < 0.05$ vs Control group; [#] $P < 0.05$ vs POF group; [&] $P < 0.05$ vs Total saponins of astragalus membranaceus group; ^{∇} $P < 0.05$ vs BMSCs group; ^{Δ} $P < 0.05$ vs Combination group.

2.3 黄芪总皂苷联合 BMSCs 对大鼠卵巢中卵泡数的影响 与对照组比较, POF 组大鼠卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数降低, 闭锁卵泡数升高 ($P < 0.05$); 与 POF 组比较, 黄芪总皂苷组、BMSCs 组、联合组大鼠卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数升高, 闭锁卵泡数降低 ($P < 0.05$); 与黄芪总皂苷组、BMSCs 组比较, 联合组大鼠卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数升高, 闭锁卵泡数降低 ($P < 0.05$); 与联合组比较, 联合 + AMD3100 组大鼠卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数降低, 闭锁卵泡数升高 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 3。

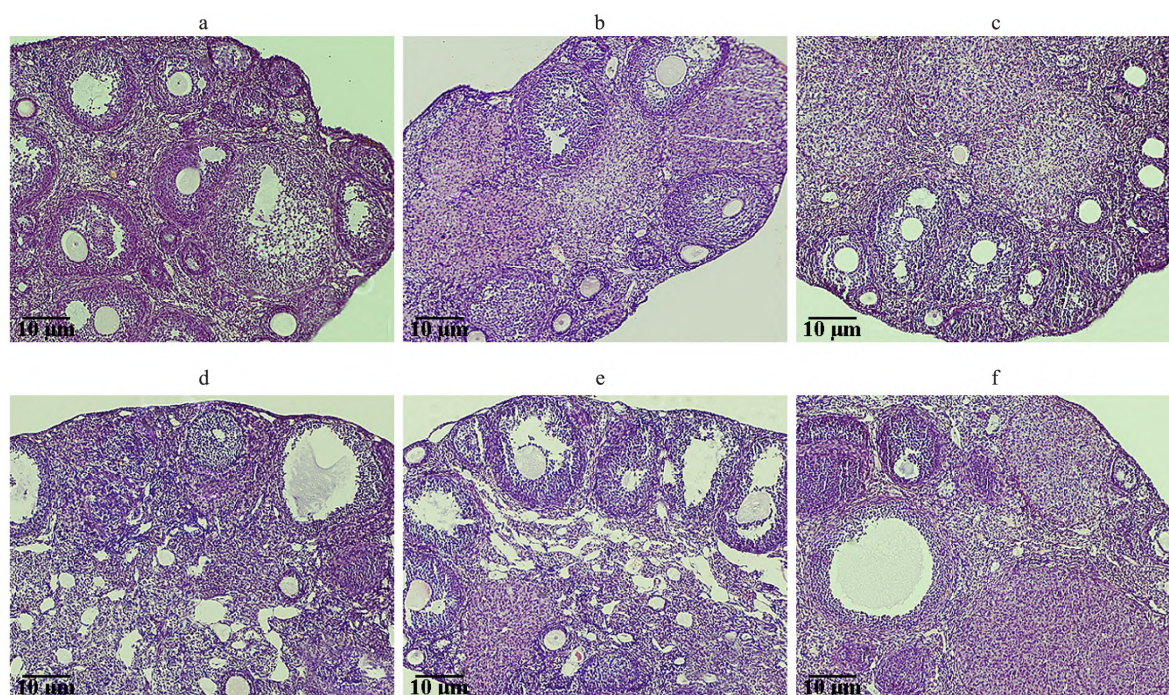


图2 大鼠卵巢的HE染色 ×20

Fig. 2 Pathological examination of rat ovaries HE ×20

a: Control group; b: POF group; c: Total saponins of astragalus membranaceus group; d: BMSCs group; e: Combination group; f: Combination + AMD3100 group.

表3 各组大鼠卵巢中成熟卵泡数、发育卵泡数、闭锁卵泡数比较($\bar{x} \pm s$ $n=6$)Tab.3 Comparison of the number of mature follicles, developing follicles, and atretic follicles in the ovaries of rats in each group($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

Group	Mature follicles (number)	Developing follicles (number)	Atretic follicles (number)
Control	5.23 ± 0.20	21.53 ± 1.05	2.45 ± 0.12
POF	1.26 ± 0.10 [*]	14.68 ± 0.63 [*]	9.88 ± 0.41 [*]
Total saponins of astragalus membranaceus	2.08 ± 0.13 [#]	16.00 ± 0.71 [#]	8.05 ± 0.39 [#]
BMSCs	2.95 ± 0.16 [#]	18.17 ± 0.83 [#]	6.78 ± 0.31 [#]
Combination	4.34 ± 0.21 ^{#&▽}	20.22 ± 0.95 ^{#&▽}	4.10 ± 0.19 ^{#&▽}
Combination + AMD3100	2.59 ± 0.13 ^Δ	17.78 ± 0.83 ^Δ	7.03 ± 0.32 ^Δ

^{*} $P < 0.05$ vs Control group; [#] $P < 0.05$ vs POF group; [&] $P < 0.05$ vs Total saponins of astragalus membranaceus group; [▽] $P < 0.05$ vs BMSCs group; ^Δ $P < 0.05$ vs Combination group.

2.4 黄芪总皂苷联合 BMSCs 对大鼠卵巢中 BMSCs 数占比的影响 与对照组比较,POF 组大鼠卵巢中 BMSCs 数占比变化差异无统计学意义($P > 0.05$);与 POF 组比较,黄芪总皂苷组、BMSCs 组、联合组大鼠卵巢中 BMSCs 数占比升高($P < 0.05$);与黄芪总皂苷组、BMSCs 组比较,联合组大鼠卵巢中 BMSCs 数占比升高($P < 0.05$);与联合组比较,联合 + AMD3100 组大鼠卵巢中 BMSCs 数占比降低($P < 0.05$)。见图 3。

2.5 黄芪总皂苷联合 BMSCs 对大鼠卵巢组织中

cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA 表达的影响 与对照组比较,POF 组大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 mRNA 表达降低($P < 0.05$);与 POF 组比较,黄芪总皂苷组、BMSCs 组、联合组大鼠卵巢组织中 cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA 表达升高($P < 0.05$);与黄芪总皂苷组、BMSCs 组比较,联合组大鼠卵巢组织中 cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA 表达升高($P < 0.05$);与联合组比较,联合 + AMD3100 组大鼠卵巢组织中 cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。见表 4。

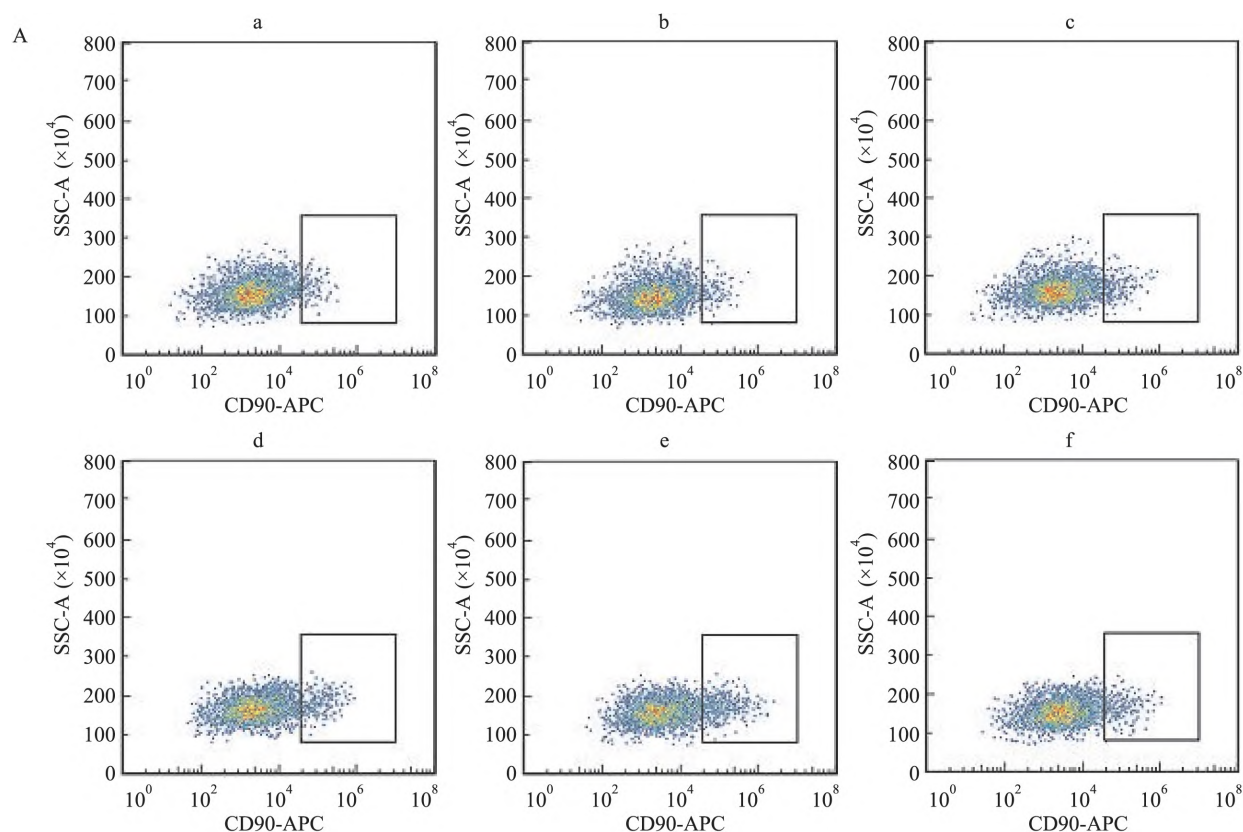


图3 大鼠卵巢中 BMSCs 数占比的检测

Fig.3 Detection of the proportion of BMSCs in the ovaries of rats

A: Flow diagram of the proportion of BMSCs in the ovaries of rats; B: Statistical histogram of the proportion of BMSCs in the ovaries of rats; a: Control group; b: POF group; c: Total saponins of astragalus membranaceus group; d: BMSCs group; e: Combination group; f: Combination + AMD3100 group; [#] $P < 0.05$ vs POF group; [&] $P < 0.05$ vs Total saponins of astragalus membranaceus group; [▽] $P < 0.05$ vs BMSCs group; [△] $P < 0.05$ vs Combination group.

表4 各组大鼠卵巢组织中 cMET、HGF、SDF-1、CXCR4 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$ $n=6$)Tab.4 Comparison of cMET, HGF, SDF-1, and CXCR4 mRNA expression in ovarian tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s$ $n=6$)

Group	cMET mRNA	HGF mRNA	SDF-1 mRNA	CXCR4 mRNA
Control	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
POF	1.01 ± 0.02	1.02 ± 0.02	0.32 ± 0.03 [*]	0.20 ± 0.02 [*]
Total saponins of astragalus membranaceus	1.19 ± 0.08 [#]	1.23 ± 0.09 [#]	0.44 ± 0.04 [#]	0.29 ± 0.02 [#]
BMSCs	1.54 ± 0.12 [#]	1.57 ± 0.13 [#]	0.58 ± 0.05 [#]	0.40 ± 0.04 [#]
Combination	1.95 ± 0.15 ^{#&▽}	1.83 ± 0.17 ^{#&▽}	0.72 ± 0.07 ^{#&▽}	0.70 ± 0.06 ^{#&▽}
Combination + AMD3100	1.27 ± 0.12 [△]	1.35 ± 0.14 [△]	0.50 ± 0.05 [△]	0.39 ± 0.03 [△]

^{*} $P < 0.05$ vs Control group; [#] $P < 0.05$ vs POF group; [&] $P < 0.05$ vs Total saponins of astragalus membranaceus group; [▽] $P < 0.05$ vs BMSCs group;

[△] $P < 0.05$ vs Combination group.

2.6 黄芪总皂苷联合 BMSCs 对大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白表达的影响 与对照组比较, POF 组大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白降低 ($P < 0.05$); 与 POF 组比较, 黄芪总皂苷组、BMSCs 组、

联合组大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白升高 ($P < 0.05$); 与黄芪总皂苷组、BMSCs 组比较, 联合组大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白升高 ($P < 0.05$); 与联合组比较, 联合 + AMD3100 组大鼠卵巢

组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

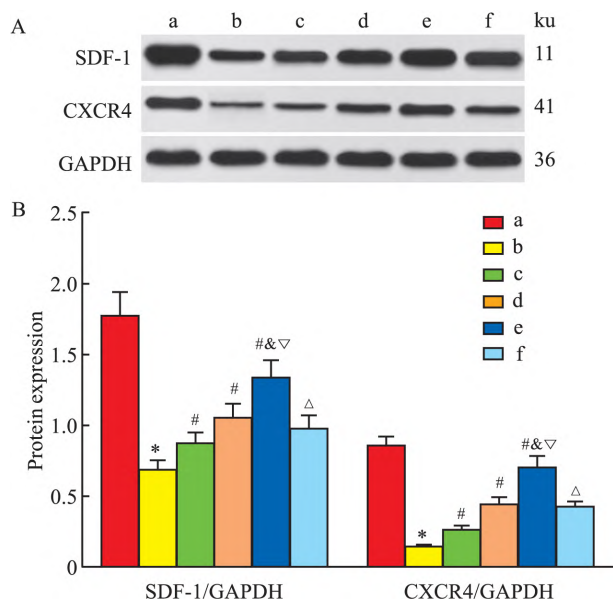


图 4 卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白的检测结果

Fig. 4 Detection results of SDF-1 and CXCR4 proteins in ovarian tissue

A: Protein expression blot; B: Statistical results of protein expression data; a: Control group; b: POF group; c: Total saponins of astragalus membranaceus group; d: BMSCs group; e: Combination group; f: Combination + AMD3100 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs POF group; & $P < 0.05$ vs Total saponins of astragalus membranaceus group; ∇ $P < 0.05$ vs BMSCs group; Δ $P < 0.05$ vs Combination group.

3 讨论

POF 是指女性在 40 岁之前因卵巢衰竭而出现闭经、不孕、绝经等生殖系统异常的一种疾病。自身免疫系统紊乱是其主要病因之一,主要表现为自身免疫抗体 AOAB 等水平上升。本研究中 POF 大鼠血清中 AOAB 水平变化表明成功构建了 POF 大鼠模型。 β -EP 含量降低会导致卵巢功能异常^[7]; VEGF 可改善受损卵巢血管的通透性,进而促进卵巢发挥正常功能^[8]。本研究中 POF 组血清中 β -EP、VEGF 水平、卵巢指数低于对照组,表明 POF 大鼠卵巢功能异常。有研究^[9]表明,卵泡的发育直接影响卵巢功能;而炎症在卵泡发育过程中起着重要的作用^[10]。本研究中炎症可导致 POF 大鼠卵泡发育异常,进而影响卵巢功能。提示抑制炎症,促进卵泡发育对于维持卵巢正常功能至关重要。此外, BMSCs 具有自我更新能力、多能性、低免疫原性、损伤趋化性等优点,其在修复卵巢损伤和恢复卵巢功

能方面具有巨大的潜力^[11]。HGF、cMET 作为归巢相关因子, HGF 在组织损伤后被激活并释放到循环中,随后刺激 BMSCs 上特异性受体 cMET 的表达,最终二者共同调节 BMSCs 迁移和归巢到病变部位,进而达到修复组织损伤的目的^[12]。本研究中,对照组与 POF 组卵巢中 BMSCs 数占比、cMET、HGF mRNA 表达变化差异无统计学意义,这可能是由于卵巢局部微环境的改变导致 POF 大鼠存在骨髓抑制,因此即使有少量归巢的 BMSCs 也可能无法恢复卵巢正常功能。提示提高卵巢中 BMSCs 数占比,促进 BMSCs 归巢也是恢复 POF 大鼠卵巢功能的有效途径之一。

黄芪总皂苷具有抗炎和免疫调节特性。据报道^[13],黄芪总皂苷可修复小鼠薄型子宫内膜。且已有 BMSCs 能促进 POF 小鼠卵泡发育和卵巢组织结构恢复的研究^[14]。本研究结果提示黄芪总皂苷联合 BMSCs 可能是治疗 POF 的有效方式之一。

SDF-1 可通过其特异性受体 CXCR4 作用于间充质干细胞,对于间充质干细胞归巢于损伤组织至关重要^[15]。据报道^[16],激活 SDF-1/CXCR4 通路促进移植的 BMSCs 迁移到受伤的子宫内,可用于治疗大鼠宫腔粘连。本研究中黄芪总皂苷联合 BMSCs 可上调 POF 大鼠卵巢组织中 SDF-1、CXCR4 蛋白表达,推测黄芪总皂苷联合 BMSCs 可能通过激活 SDF-1/CXCR4 通路改善 POF 大鼠卵巢功能。为验证猜想,本研究用 SDF-1/CXCR4 通路抑制剂 AMD3100 进行了恢复实验,结果显示,AMD3100 逆转了黄芪总皂苷联合 BMSCs 对 POF 大鼠的影响,证实了推测的合理性。未单独设置 AMD3100 组是考虑到 AMD3100 单独处理会加重大鼠 POF,不利于病情恢复,不符合动物实验 3R 原则。

综上所述,黄芪总皂苷联合 BMSCs 可能通过激活 SDF-1/CXCR4 通路抑制 POF 大鼠炎症、促进卵泡发育、提高卵巢中 BMSCs 数占比、促进 BMSCs 归巢,进而改善卵巢功能。考虑到本研究中的模型为 POF(免疫系统错误地将卵巢组织内的生殖细胞当做外来异物进行攻击),故仅仅用离体培养的大鼠卵巢颗粒细胞诱导 POF 模型,未用雷公藤多苷、环磷酸胺、D-半乳糖等诱导剂构建 POF 模型以佐证实验结论是本研究设计的不足之一,后期将深入探究。此外,未补充基因通路富集分析以进一步明确 SDF-1/CXCR4 通路是否是联合疗法调控大鼠 POF 的主要作用途径是本研究的另一缺陷,这将是课题组下一步研究的重点方向之一。

参考文献

- [1] Wang Z, Wei Q, Wang H, et al. Mesenchymal stem cell therapy using human umbilical cord in a rat model of autoimmune-induced premature ovarian failure [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 3249495. doi: 10.1155/2020/3249495.
- [2] Wen M, Chen W, Zhou Q, et al. Astragaloside IV regulates autophagy-mediated proliferation and apoptosis in a rat model of PCOS by activating the PPAR γ pathway [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25(7): 882–9. doi: 10.22038/IJBMS.2022.64475.14179.
- [3] 李 琴, 敖洪峰, 李 蕾, 等. 高压氧暴露协同骨髓间充质干细胞移植对卵巢早衰大鼠卵巢功能重建的研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2020, 45(11): 1551–6. doi: 10.13406/j.cnki.cyx.002619.
- [3] Li Q, Ao H F, Li L, et al. Ovarian functional reconstruction in rats with premature ovarian failure through hyperbaric oxygen combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2020, 45(11): 1551–6. doi: 10.13406/j.cnki.cyx.002619.
- [4] 郝赛楠, 夏洪君, 席 瑾, 等. 电针联合骨髓间充质干细胞移植通过调节 SDF-1/CXCR4 轴促进薄型子宫内膜修复的机制研究 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(9): 870–80. doi: 10.13702/j.1000-0607.20220942.
- [4] Hao S N, Xia L J, Xi J, et al. Electroacupuncture combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation promotes repair of thin endometrium by regulating SDF-1/CXCR4 signaling [J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(9): 870–80. doi: 10.13702/j.1000-0607.20220942.
- [5] 黄 琳, 陈玉兴, 黄雪君, 等. 加减益经颗粒对自身免疫性卵巢早衰大鼠的影响 [J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(4): 504–7, 511. doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2015.04.019.
- [5] Huang L, Chen Y X, Huang X J, et al. Effect of Jiajianying granule on rats with autoimmune premature ovarian failure [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2015, 31(4): 504–7, 511. doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2015.04.019.
- [6] 刘建春, 张红珍, 李俊莲, 等. 黄芪总皂苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的神经保护及修复机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(11): 6700–4.
- [6] Liu J C, Zhang H Z, Li J L, et al. Neuroprotective effect and repair mechanism of total saponins of Astragalus on experimental autoimmune encephalomyelitis in mice [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(11): 6700–4.
- [7] 阿卜力孜·克热木, 阿孜古丽·要力瓦斯, 穆拉迪力·约麦尔, 等. 慢性应激对卵巢早衰大鼠血清中 E2、FSH、LH 及 β -EP 水平的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(3): 631–4. doi: 10.13193/j.issn.1673-7717.2019.03.028.
- [7] Abliz K, Azguri Y, Muradil Y, et al. Effect of chronic stress on serum levels of E2, FSH, LH and β 5-EP in rats with premature ovarian failure [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2019, 37(3): 631–4. doi: 10.13193/j.issn.1673-7717.2019.03.028.
- [8] 蒋玲玲, 汤卫春, 康心怡, 等. 坤泰胶囊联合雌孕激素替代疗法对卵巢早衰的疗效及对 Treg、Th17、VEGF 的影响 [J]. *中药材*, 2023, 46(9): 2336–40. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2023.09.039.
- [8] Jiang L L, Tang W C, Kang X Y, et al. Effect of Kuntai capsule combined with estrogen progesterone replacement therapy on premature ovarian failure and influence on Treg, Th17 and VEGF [J]. *J Chin Med Mater*, 2023, 46(9): 2336–40. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2023.09.039.
- [9] Han S, Li H, Lu R, et al. Effect and mechanism of pearl on ovarian function of rats with premature ovarian failure induced by Tripterygium glycosides [J]. *J Tradit Complement Med*, 2023, 13(4): 368–78. doi: 10.1016/j.jtcme.2023.02.004.
- [10] 李 杨, 聂 岚, 罗 婷, 等. 基于 NLRP3 通路探讨线粒体自噬在 PCOS 卵巢组织炎症反应中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(9): 1573–82. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.012.
- [10] Li Y, Nie L, Luo T, et al. Study on the role of mitochondrial autophagy in ovarian inflammation in PCOS based on NLRP3 pathway [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(9): 1573–82. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.012.
- [11] Huang Y, Zhu M, Liu Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure: mechanisms and prospects [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 997808. doi: 10.3389/fimmu.2022.997808.
- [12] Huang Y, Hu R, Liu Z, et al. Bushen Huoxue recipe ameliorates ovarian function via promoting BMSCs proliferation and homing to ovaries in POI mice [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155630. doi: 10.1016/j.phymed.2024.155630.
- [13] 刘利英, 高 晓. 黄芪总皂苷对薄型子宫内膜的修复作用及机制探究 [J]. *安徽医药*, 2023, 27(10): 1933–6. doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.10.006.
- [13] Liu L Y, Gao X. Repair effect of total saponins of Astragalus on thin endometrium and its mechanism [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2023, 27(10): 1933–6. doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.10.006.
- [14] 彭 静, 肖 娜, 程腊梅. 骨髓来源间充质干细胞对卵巢早衰小鼠的修复作用 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43(1): 7–13. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.01.002.
- [14] Peng J, Xiao N, Cheng L M. Therapeutic potential of BMSCs for premature ovarian failure in mice [J]. *J Cent South Univ Med Sci (Health Sci)*, 2018, 43(1): 7–13. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.01.002.
- [15] Ling L, Hou J, Liu D, et al. Important role of the SDF-1/CXCR4 axis in the homing of systemically transplanted human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) to ovaries in rats with chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency (POI) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 79. doi: 10.1186/s13287-022-02759-6.
- [16] Wang Z, Xia L, Cheng J, et al. Combination therapy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation and electroacupuncture for the repair of intrauterine adhesions in rats: mechanisms and functional recovery [J]. *Reprod Sci*, 2024, 31(8): 2318–30. doi: 10.1007/s43032-024-01465-3.

The effect and mechanism of total saponins of astragalus membranaceus combined with bone marrow mesenchymal stem cells in treating autoimmune premature ovarian failure model rats by regulating the SDF – 1 / CXCR4 pathway

Zhao Lina^{1 2}, Zhang Chenming^{1 2}, Sun Zixue², Chen Jianshe²

[¹ *The Second Clinical College of Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046;*

² *Andrology and Reproductive Medicine Center, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine*

(The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Zhengzhou 450002]

Abstract **Objective** To explore the effect and mechanism of total saponins of astragalus membranaceus combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) regulating the stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) /chemokine receptor 4(CXCR4) pathway in the treatment of autoimmune premature ovarian failure (POF) model rats. **Methods** Rats were randomly divided into POF group, total saponins of astragalus membranaceus group, BMSCs group, combination group, combination + SDF-1 /CXCR4 pathway inhibitor (AMD3100) group, and control group, with 12 rats in each group. Except for the control group, all other groups of rats needed to construct a POF model. After successful modeling, treatment would begin. The drug injected into the tail vein once a week, and the drug injected into the abdominal cavity once a day for 4 weeks. ELISA was applied to detect the levels of anti ovarian antibodies (AOAB), β -endorphin (β -EP), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (INF- γ) in serum. Changes in ovarian index were detected. HE staining was applied to detect the number of mature follicles, developing follicles, and blocked follicles in the ovary. Flow cytometry was applied to detect the proportion of BMSCs in the ovaries. QRT-PCR was applied to detect the mRNA expression of mesenchymal transition factor (cMET), hepatocyte growth factor (HGF), SDF-1, and CXCR4 in ovarian tissue. Western blot was applied to detect SDF-1 and CXCR4 proteins in ovarian tissue. **Results** Compared with the control group, the serum levels of AOAB, TNF- α , INF- γ , and the number of blocked follicles in the ovaries were higher, while the serum levels of β -EP, VEGF, ovarian index, the numbers of mature follicles and developing follicles in the ovary, the expression of SDF-1, CXCR4 mRNA and protein were lower in the POF group ($P < 0.05$). Compared with the POF group, the serum levels of AOAB, TNF- α , INF- γ , and the number of blocked follicles in the ovaries were lower, while the serum levels of β -EP, VEGF, ovarian index, the numbers of mature follicles and developing follicles in the ovary, the proportion of BMSCs, the expression of cMET, HGF, SDF-1, CXCR4 mRNA and SDF-1, CXCR4 protein were higher in the total saponins of astragalus membranaceus group, BMSCs group, and combination group, and the corresponding indicators in the combination group showed the most obvious change trend ($P < 0.05$). AMD3100 reversed the effect of total saponins of astragalus membranaceus combined with BMSCs on POF rats. **Conclusion** The combination of total saponins of astragalus membranaceus and BMSCs may inhibit inflammation in POF rats, promote follicular development, increase the proportion of BMSCs in the ovaries, and promote their homing by activating the SDF-1 /CXCR4 pathway, thereby improving ovarian function.

Key words total saponins of astragalus membranaceus; bone marrow mesenchymal stem cells; autoimmune premature ovarian failure; ovarian follicle; homing; inflammation

Fund program Scientific Research Project of National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine, Henan Provincial Health Commission (No. 2021JDZX2068)

Corresponding author Chen Jianshe, E-mail: chenJiansheyin@126.com