

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.12.003

西红花酸治疗 DHT 诱导的 PCOS 小鼠的机制研究*

胡巧云 王小丽 于东升 张佳 唐传峰 刘培玉 周雨 盛亮[△]

(南京医科大学基础医学院 药理学 江苏 南京 211166)

摘要 目的:观察西红花酸对双氢睾酮(Dihydrotestosterone, DHT)诱导的多囊卵巢综合症(Polycystic ovarian syndrome, PCOS)小鼠的疗效并探讨其作用机制。**方法:**妊娠 15-18 天给予孕鼠皮下注射 DHT 诱导子代雌鼠 PCOS 模型。待子鼠 8 周龄后,随机选择一半数量的 PCOS 小鼠连续 4 周西红花酸灌胃,作为西红花酸给药组(n=18)。给药期间检测体重和动情周期,待小鼠 16 周龄左右,通过眼球取血后处死,取出下丘脑、卵巢。采用 HE 染色观察卵巢组织的病理改变;ELISA 试剂盒检测血清中雌二醇(Estradiol, E2)、睾酮(Testosterone, T)、孕酮(Progesterone, P4)、促黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH);采用免疫组化、Western blot 和实时荧光定量 PCR 法检测下丘脑的前腹侧视旁核(Anteroventral periventricular, AVPV)、弓状核(Arcuate, ARC)的 kisspeptin 以及视前区(Preoptic area, POA)里 GnRH 的表达水平。**结果:**与对照组相比,PCOS 小鼠卵巢与体重的比值上升了 22.56%± 6.77%,动情周期延长,卵巢内出现大的空泡,闭锁卵泡数量增加了 138.74%± 33.22%,窦状卵泡、成熟窦状卵泡和黄体数量分别减少了 38.80%± 4.69%、56.35%± 7.32%和 63.77%± 7.25%,血清中 E2、P4 和 FSH 水平分别降低了 40.99%± 2.69%、56.91%± 5.25%、和 38.80%± 4.69%,而 T、LH 水平分别升高了 43.23%± 4.70%和 148.46%± 28.16%,下丘脑中 AVPV 中 kisspeptin 神经元表达减少,ARC 中 kisspeptin 神经元表达增多,POA 中 GnRH 神经元减少,而以上情况能够被西红花酸改善。**结论:**西红花酸分别通过促进和抑制下丘脑 AVPV 核和 ARC 核团的 kisspeptin 表达改善 PCOS 的病理变化。

关键词:西红花酸;多囊卵巢综合症;kisspeptin 神经元;下丘脑-垂体-卵巢轴

中图分类号:R-33;R711.75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)12-2211-07

Mechanism of Crocetin on the DHT-induced Polycystic Ovary Syndrome in Mice*

HU Qiao-yun, WANG Xiao-li, YU Dong-sheng, ZHANG Jia, TANG Chuan-feng, LIU Pei-yu, ZHOU Yu, SHENG Liang[△]

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of crocetin on polycystic ovary syndrome (PCOS) induced by dihydrotestosterone (DHT) in mice and explore its possible mechanism. **Methods:** Pregnant dams were subcutaneously (s.c.) injected with DHT from gestation day (GD)16 to GD18, and female offspring were analyzed as the prenatally DHT-treated mice models of PCOS. 50% of eight-week-old female offspring in PCOS group were treated with crocetin daily for 4 weeks by oral gavage, which were analyzed as crocetin treatment group (n=18). The body weight and estrous cycle were examined during the treatment. Sixteen weeks later, the mice were sacrificed after getting orbital blood and the hypothalami and ovaries were obtained. HE staining was used to observe the pathological change of ovarian tissue. The levels of serum estradiol (E2), testosterone (T), progesterone (P4), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were quantified using ELISA kit. Immunohistochemical, western blot and quantitative Real-time PCR methods were used to detect the expression of kisspeptin in anteroventral periventricular (AVPV), arcuate nucleus (ARC) and the expression of GnRH in the preoptic area (POA). **Results:** Compared with the control group, the ratio of ovary to body weight of in PCOS-mice was increased by 22.56%± 6.77%. PCOS-mice exhibited an obvious prolongation of diestrus and more atretic cyst-like follicles than the control group. The number of atretic cyst-like follicles was increased by 138.74%± 33.22%, whereas the numbers of large antral follicles, preovulatory follicles and corpus luteum were reduced by 38.80%± 4.69%, 56.35%± 7.32%, 63.77%± 7.25% respectively. The levels of E2, P4 and FSH in serum were reduced by 40.99%± 2.69%, 56.91%± 5.25%, 38.80%± 4.69% respectively, while the levels of T and LH were increased by 43.23%± 4.70%, 148.46%± 28.16% respectively. The expression of hypothalamic kisspeptin in AVPV and GnRH in POA was reduced, whereas the expression of kisspeptin in ARC was increased. Treatment of crocetin could prevent the prolongation of diestrus and reduction in corpora luteum, recover the levels of GnRH, FSH, LH, progesterone (P4), estradiol (E2) and testosterone (T), and increase the kisspeptin level in AVPV but reduce that in ARC. **Conclusion:** Crocetin improved the PCOS in mice via

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81400613, 81770862)

作者简介:胡巧云(1992-),硕士研究生,主要研究方向:分子药理,电话:15720801895, E-mail:15720801895@163.com

[△] 通讯作者:盛亮(1980-),教授,博士生导师,主要研究方向:分子药理, E-mail:lgsheng@njmu.edu.cn

(收稿日期:2018-02-04 接受日期:2018-03-08)

increasing AVPV-kisspeptin and reducing ARC-kisspeptin expression.

Key words: Crocetin; polycystic ovary syndrome (PCOS); Kisspeptin neurons; Hypothalamic-pituitary-ovary (HPO) axis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R711.75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)12-2211-07

前言

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种育龄期妇女常见的内分泌紊乱类疾病,其发病率为4-8%^[1]。主要特征为稀发排卵或无排卵,高雄激素血症和卵巢多囊样病变,主要临床表现为月经周期不规律,不孕,肥胖,血脂异常,多毛,等^[2]。但PCOS病因至今尚不明确,诊断标准不统一,治疗药物的使用方案混乱,对远期并发症也缺乏合理的防治措施,因此,寻找一种安全有效的治疗PCOS的药物成为当务之急。

藏红花又名番红花,属鸢尾科植物,是一种治疗原发性痛经,经前紧张等妇科疾病的传统中药^[3]。其主要成分西红花酸有改善胰岛素抵抗,抗氧化应激,抗炎等多种治疗作用^[4,5]。目前,多项研究证明胰岛素抵抗和糖代谢异常是PCOS的发病机制之一^[6],而且,PCOS患者的卵巢的局部胰岛素抵抗会导致卵巢功能障碍和内分泌异常^[7],另外,现代研究也证明炎症成为PCOS的另一个致病因素,局部炎症也会影响PCOS患者卵巢中的卵泡生长和发育^[8],导致卵巢生育功能的下降。因此,我们推测西红花酸对PCOS具有潜在的治疗作用^[9]并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂

选择6-8周龄SPF级C57BL/6J小鼠,雄鼠6只,雌鼠12只,体重(20±2)g,饲养环境:室温(22-24)℃相对湿度(55-65)%。双氢睾酮(Dihydrotestosterone, DHT)购自德国sigma公司(货号:521-18-6)。促黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)、雌二醇(Estradiol, E2)、睾酮(Testosterone, T)、孕酮(Progesterone, P4)ELISA试剂盒购自美国Uscn Life Science Inc公司(货号:CEA441Mu, RPA830Mu01, CEA461Ge, CEA458Ge, CEA459Ge);冰冻切片机购自德国Leica公司;显微镜购自德国Carl Zeiss公司;Kiss-1抗体、GnRH抗体购自美国millipore公司(货号:AB9754, MAB5456);生物素偶联羊抗兔IgG标记二抗、生物素偶联羊抗鼠IgG标记的二抗购自美国Abbkine公司(货号A21220-1, A21210-1);ABC试剂盒、DAB二氨基联苯胺显色试剂盒,购自美国Vector Laboratories公司(货号:ZD0605, SK-4100);山羊血清购自武汉博士德生物工程有限公司(货号:12D11B09);蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;β-actin购自武汉以来瑞特生物科技股份有限公司(货号:EAP1706);山羊抗兔IgG二抗购自中国伊莱瑞特生物技术有限公司;SYBR Green购自宝日医生物技术(北京)有限公司;Prime Script RT reagent试剂盒购自南京诺唯赞生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的构建 选择6-8周龄SPF级C57BL/6J小

鼠,雄鼠6只,雌鼠12只,雌雄小鼠以2:1合笼过夜,次日清晨检栓,观察到阴道栓时作为孕期第1天。孕期16到18天时,8只孕鼠皮下注射双氢睾酮(250 μg/只/天)^[10],4只孕鼠皮下注射其溶剂(1 μL DMSO和99 μL玉米油),双氢睾酮组母鼠产下的雌性子代小鼠随机分为模型组、给药组,溶剂组母鼠的雌性子代作为对照组,每组各18只。小鼠出生后21天到91天每周监测体重变化。小鼠8周后,给药组连续4周西红花酸灌胃(40 mg/kg),其他两组给予溶剂灌胃(0.3% NaOH溶于双蒸水),再连续检测24天动情周期,选取动情前期或动情间期时处死,数量各半,小鼠眼球取血后处死,取出下丘脑、卵巢或灌注,见图1A。

1.2.2 动情周期检测 小鼠出生后21天到91天,每周称重,监测各组小鼠体重变化。小鼠出生后84天,每天上午8点到9点,用0.9%生理盐水阴道涂片,检测动情周期变化,根据阴道上皮细胞(白细胞,有核细胞和角化细胞)的类型,来判断小鼠的动情前期(Proestrus, P)、动情期(Estrus, E)、动情后期(Metestrus, M)和动情间期(Diestrus, D)^[11]。

1.2.3 组织病理学观察 小鼠水合氯醛麻醉后,4%的多聚甲醛灌注后取卵巢组织,卵巢脱水后石蜡包埋,5 μm切片,进行HE染色。每6片计数一次窦状卵泡、成熟窦状卵泡以及黄体的数量,最后乘以6,得到每个卵泡和黄体的总数。为了避免重复计数,只计数含有可见核的卵母细胞的卵泡,按照之前描述的形态标准进行卵泡分期^[12]。每只小鼠使用一个卵巢,每个卵巢随机使用一个切片计数黄体的数量。

1.2.4 血清激素水平检测 血清4℃离心分离,保存在-80℃。血清中LH、FSH、E2、T、P4水平检测严格按照相应试剂盒的操作步骤进行。

1.2.5 免疫组织化学检测 小鼠在出生后108-112天后,在动情前期或动情间期被处死。4%多聚甲醛灌注后,取出完整的脑组织,在4%多聚甲醛中固定过夜后,在蔗糖溶液中梯度脱水。在冰冻切片机内,将视前区(Preoptic area, POA)(从前囟+0.74到+0.5 mm),前腹侧视旁核(Anteroventral periventricular, AVPV)(从前囟+0.38到+0.02 mm)和弓状核(Arcuate, ARC)(从前囟-1.22到-1.58 mm)24切片(30 μm),脑片用1%正常胎羊血清封闭60 min,然后在兔抗Kisspeptin多克隆抗体(1:1000)或小鼠抗GnRH多克隆抗体(1:500)在4℃过夜。二抗37℃孵育1 h, DAB显色。计数POA中的GnRH阳性和AVPV、ARC中的kisspeptin阳性细胞。根据之前描述的方法,通过Image J测量AVPV、ARCkisspeptin免疫反应性的光密度。每8只小鼠获得的值的平均作为每组平均值。

1.2.6 Western blot检测 将AVPV和ARC剥离出下丘脑,加入RIPA后组织匀浆,冰上裂解30 min,提取组织的总蛋白。在SDS-PAGE凝胶中加入25 μg蛋白样品,样品的浓缩压为60 V,分离压为100 V。100 V恒压湿转,2 h后取出PVDF膜,用5%的脱脂牛奶封闭1 h。将PVDF膜孵一抗后4℃过夜。次日

PVDF膜洗净后,室温孵育二抗1h后再用TBST溶液洗净。滴加ECL发光液,利用化学成像仪检测化学发光信号。

1.2.7 实时荧光定量PCR检测 用Trizol法裂解下丘脑中的AVPV、ARC和POA,提取总RNA并检测其纯度与浓度。将RNA逆转录成cDNA,将SYBR Green、ddH₂O、引物和cDNA混合,进行PCR扩增,用2^{-ΔΔCT}法来计算基因水平的变化。引物序列为:kiss-1上游:5'-GAATGATCTCAATGGCTTCTTG-3',下游5'-TTTCCCAGGCATTAACGAGTT-3';GnRH上游:5'-GGGAAAGAGAAACACTGAACA-3',下游5'-GGACAGTACATTGCAAGTGCT-3';内参36B4上游:5'-AAGCGGTCCTGGCATTGTCT-3',下游5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGT-3'。

1.3 统计学方法

本研究测量指标的数据以平均值±标准误差(SE)显示。

使用ANOVA法分析组间差异,随后进行Bonferroni post-hoc分析或适当的Student's t检验。P<0.05差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西红花酸对PCOS小鼠体重和发情周期的影响

西红花酸的化学结构,见图1B。小鼠体重不受出生前暴露在高DHT条件下影响,见图1C,但是DHT诱导的PCOS模型组卵巢的重量以及卵巢重量与体重的比值增加了22.56%±6.77%(P<0.05),而西红花酸给药组小鼠的卵巢恢复正常水平(P<0.05),见图1D。和正常组小鼠规律的动情周期相比,PCOS组小鼠动情周期明显延长,尤其是动情间期时程延长(P<0.05),给予西红花酸治疗后,可以有效地逆转这一病理变化(P<0.05),见图1E。

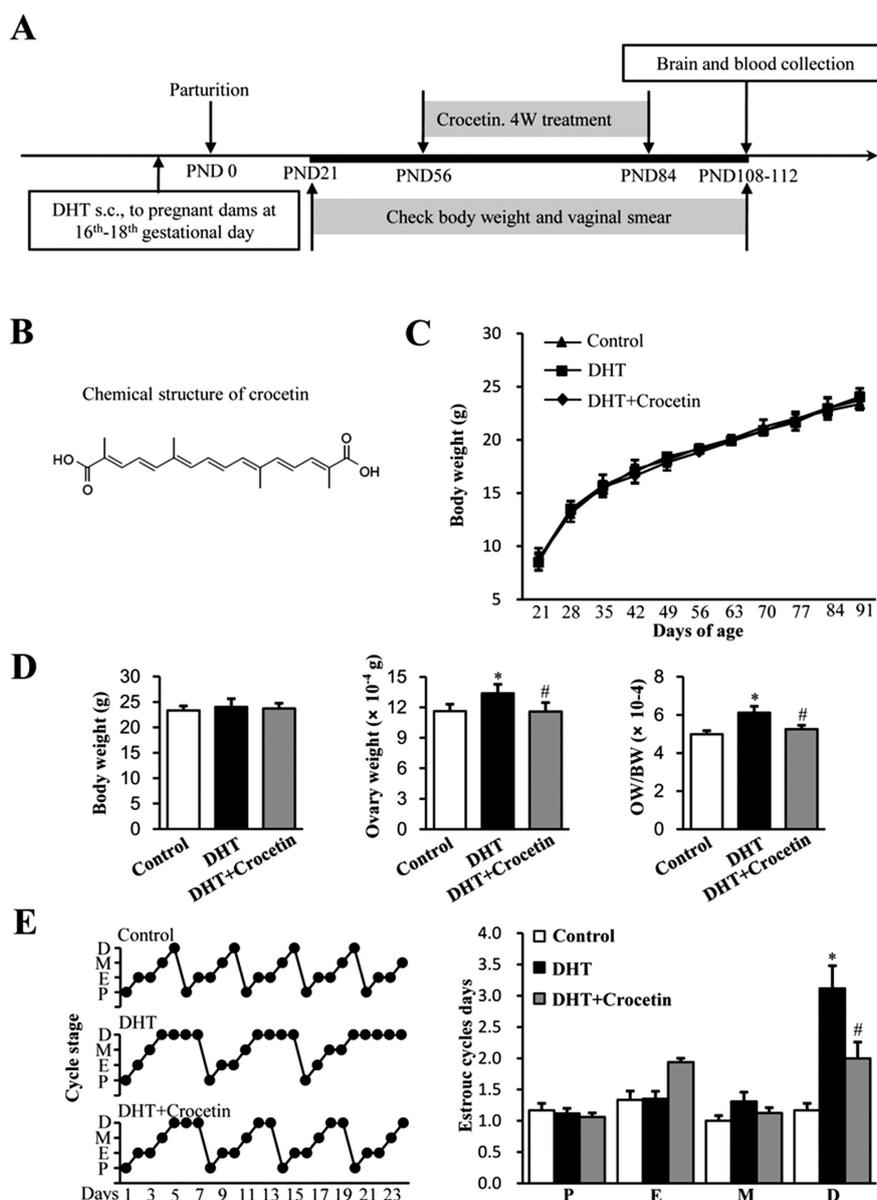


图1 西红花酸对PCOS小鼠体重和发情周期的影响

Fig.1 Effects of crocetin on body weight and estrous cycle in mice with PCOS

注:与对照组相比,*P<0.05,n=18;与模型组相比,#P<0.05,n=18。

Note: compared with control group, *P<0.05, n=18; compared with model group, #P<0.05, n=18.

2.2 西红花酸对 PCOS 小鼠卵泡发育和排卵的影响

DHT 处理过的小鼠, 卵巢内出现大的空泡, 与之前报道的研究结果相一致^[13,14], 见图 2A。另外, 和对照组小鼠相比, PCOS 模型组小鼠的成熟窦状卵泡、窦状卵泡和黄体的数量分别减少了 $56.35\% \pm 7.32\%$ 、 $38.80\% \pm 4.69\%$ 和 $63.77\% \pm 7.25\%$ ($P < 0.05$), 而闭锁卵泡数量增多了 $138.74\% \pm 33.22\%$ ($P < 0.05$),

这就揭示了 PCOS 小鼠卵巢的生育功能衰竭。但是西红花酸可以改善 PCOS 小鼠的卵泡发育不良以及排卵障碍, 使成熟窦状卵泡、窦状卵泡和黄体的数量分别恢复到正常水平的 $71.43\% \pm 7.03\%$ 、 $79.69\% \pm 6.25\%$ 和 $73.91\% \pm 7.10\%$, 与 PCOS 模型组相比, 闭锁卵泡数量下降了 $44.53\% \pm 11.24\%$ ($P < 0.05$), 见图 2B。

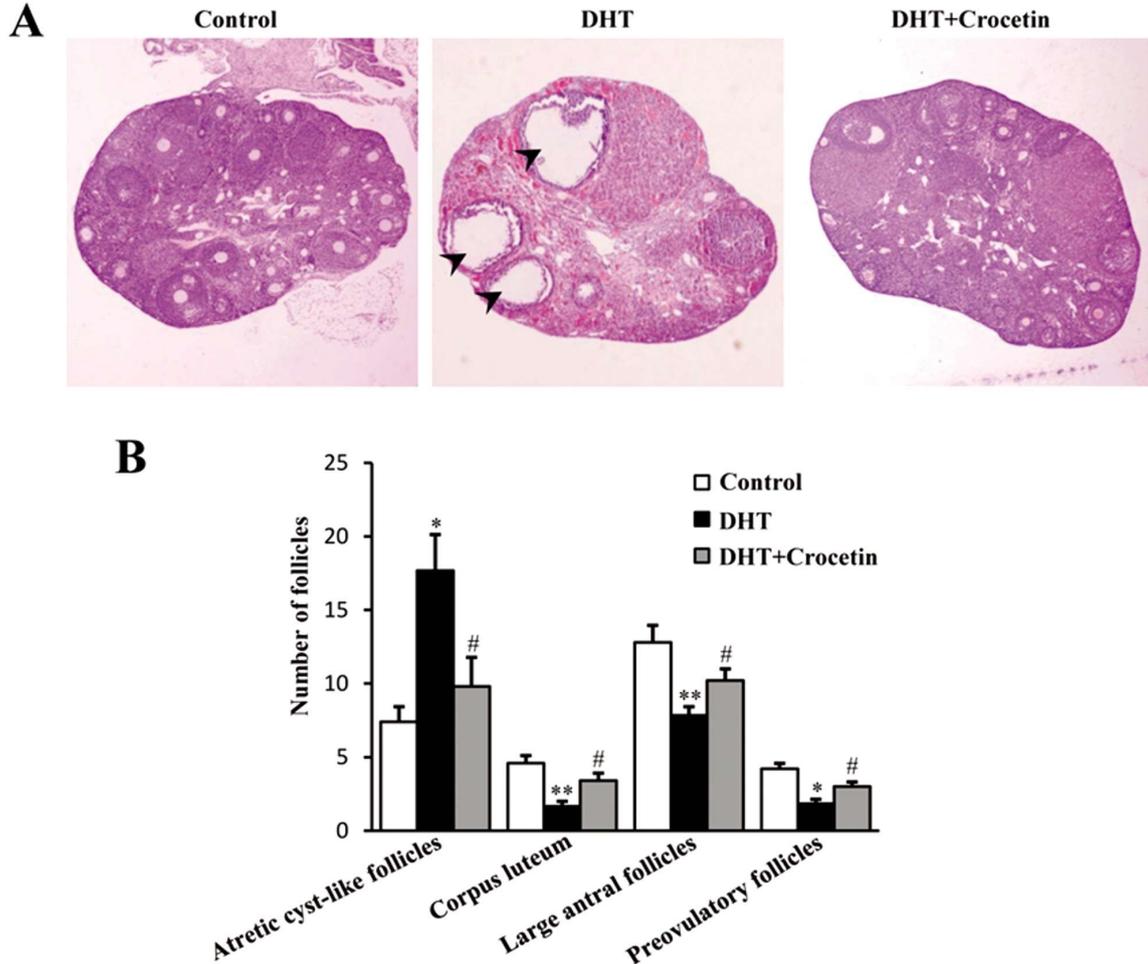


图 2 西红花酸对 PCOS 小鼠卵泡发育和排卵的影响(HE, $\times 50$)

Fig.2 Effects of crocetin on follicle growth and ovulation in mice with PCOS

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 18$;与模型组相比, # $P < 0.05$, $n = 18$ 。

Note: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 18$; compared with model group, # $P < 0.05$, $n = 18$ 。

2.3 西红花酸对 PCOS 小鼠生殖激素水平的影响

出生前暴露在高 DHT 条件下的小鼠, E2 和 P4 水平分别降低了 $40.99\% \pm 2.69\%$ 和 $56.91\% \pm 5.25\%$ ($P < 0.05$), T 水平增高了 $43.23\% \pm 4.70\%$ ($P < 0.01$), 这种血清中 " 高雄低雌 " 状态正是典型的 PCOS 病症, 证明成功构建小鼠 PCOS 模型, 而西红花酸可以纠正血清中 E2、P4 和 T 的水平, 使 E2、P4 和 T 的水平分别恢复到正常水平的 $94.64\% \pm 2.96\%$ 、 $75.97\% \pm 6.91\%$ 、 $111.39\% \pm 6.26\%$ ($P < 0.05$), 见图 3A-C。和对照组小鼠相比, PCOS 模型组的小鼠体内 LH 水平升高了 $148.46\% \pm 28.16\%$ ($P < 0.05$), 相反地, FSH 水平下降了 $38.80\% \pm 4.69\%$ ($P < 0.05$), 因此 DHT 的诱导作用使 LH 与 FSH 的比值明显升高, 与 PCOS 模型组小鼠相比, 西红花酸给药组的小鼠 LH 和 FSH 水平恢复到正常水平的 $140.11\% \pm 12.16\%$ 和 $68.33\% \pm$

6.75% ($P < 0.05$), 见图 3E-F。

2.4 西红花酸对 PCOS 小鼠下丘脑 Kisspeptin 和 GnRH 神经元的影响

在雌性动物体内, 下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴(hypothalamic-pituitary-ovary axis, HPO 轴)参与调控生殖系统的功能。下丘脑中的 kisspeptin 能激活 GnRH 神经元, 从而刺激垂体释放 FSH 和 LH。因此, 我们检测了在下丘脑中的 GnRH 神经元和 kisspeptin 神经元的活性。和对照组小鼠相比, PCOS 模型组小鼠在动情前期, DHT 处理分别导致 POA 和 AVPV 的 GnRH 和 kisspeptin 免疫阳性神经元数量减少了 $84.38\% \pm 6.25\%$ 和 $49.60\% \pm 4.45\%$ ($P < 0.05$), 但是在动情间期 ARC 中的 kisspeptin 免疫阳性神经元数量增加了 $77.01\% \pm 15.09\%$ ($P < 0.05$), 而西红花酸给药组小鼠的 GnRH 神经元和 kisspeptin 神经

元的活性都得到了逆转, 动情前期的 POA 和 AVPV 的 GnRH 和 kisspeptin 免疫阳性神经元数量恢复到正常水平的 $71.88\% \pm 6.50\%$ 和 $85.48\% \pm 6.08\%$, 并且动情间期 ARC 中的 kisspeptin 免疫阳性神经元数量恢复到正常水平的 $133.33\% \pm 11.60\%$ ($P < 0.05$), 见图 4A。与免疫组化结果一致的是, PCOS 模型组小鼠的 kisspeptin 的蛋白质水平在 AVPV 中降低了 $45.65\% \pm 6.32\%$ 但在 ARC 中增加了 $62.14\% \pm 14.7\%$ ($P < 0.05$), 而西红花酸给药组小鼠的 kisspeptin 的蛋白质水平在 AVPV 和 ARC 中被逆转, 分别恢复到 $74.98\% \pm 7.07\%$ 和 $106.61\% \pm 5.83\%$ ($P < 0.05$), 见图 4B。从 POA, AVPV 和 ARC

分离出的脑组织用于 mRNA 水平分析, 在 DHT 处理条件下, PCOS 模型组小鼠动情前期的 POA 中的 GnRH 和 AVPV 中的 kiss-1 的 mRNA 水平分别下降了 $31.73\% \pm 1.81\%$ 和 $40.87\% \pm 5.95\%$ ($P < 0.01$), 而在动情间期 ARC 中的 kiss-1 mRNA 水平增加了 $28.01\% \pm 8.04\%$ ($P < 0.05$), 并且与其之前治疗结果一致, 西红花酸也减弱了 GnRH 和 Kiss-1 mRNA 水平的变化 ($P < 0.05$), 给药组小鼠动情前期的 POA 中的 GnRH 和 AVPV 中的 kiss-1 的 mRNA 水平分别恢复到正常水平的 $88.92\% \pm 8.83\%$ 和 $94.76\% \pm 4.59\%$, 并且动情间期 ARC 中的 kiss-1 mRNA 水平也恢复到正常水平的 $102.07\% \pm 6.00\%$, 见图 4C。

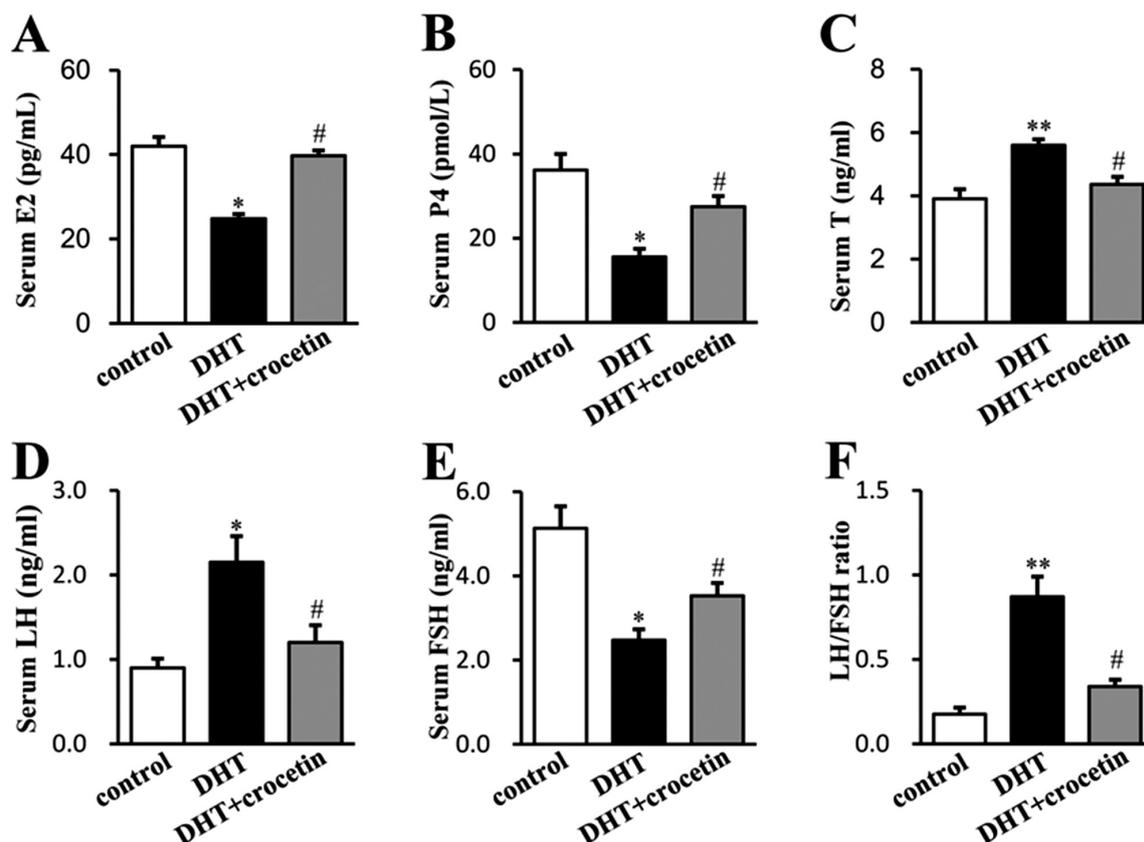


图3 西红花酸对 PCOS 小鼠生殖激素水平的影响

Fig.3 Effect of crocetin on reproductive hormone levels in mice with PCOS

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 18$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, $n = 18$ 。

Note: compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 18$; compared with model group, # $P < 0.05$, $n = 18$ 。

3 讨论

高雄激素水平被认为是导致 PCOS 的关键因素。异常的雄激素水平与胰岛素抵抗和下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴紊乱有关, 导致血清中 LH 水平升高^[15]。由于下丘脑中促性腺激素释放激素(GnRH)脉冲释放的频率增加, LH 水平和 LH/FSH 比值的升高^[16], 会引起卵巢内雄激素过多^[17]。过量的雄激素也会损害 GnRH 功能亢进时的负反馈调节, 从而增加 LH 水平^[18]。因此, PCOS 不只是一种卵巢疾病, 也是一种涉及到整个 HPO 轴的疾病, 其中, GnRH 的分泌在促性腺激素分泌异常中起关键作用。

本研究通过产前暴露 DHT 条件下, 复制小鼠 PCOS 模型, 首次揭示了西红花酸对 PCOS 的治疗作用。与以前的研究一致^[14,19], DHT 处理过的小鼠动情周期时程延长, 卵巢增大, 黄体数

目减少, 卵巢中闭锁卵泡和多囊肿数目增加, 这与多囊卵巢综合症患者排卵障碍非常相似。另外, 藏红花是用于治疗妇科疾病的传统中草药^[3], 其主要成分之一的西红花酸可逆转小鼠 DHT 诱导的 PCOS 的病理变化。

卵泡颗粒细胞内激素分泌的改变是卵泡发育和成熟受阻的一个重要原因, 导致 PCOS 29 中卵泡生长的过早停滞。E2 可以抑制颗粒细胞和黄体细胞的凋亡^[20], 并引起 FSH 和 LH 的释放, 而 FSH 和 LH 可以促进卵泡成熟和排卵^[21]。但是卵巢内过量的雄激素会导致卵泡闭锁。睾酮通过 PI3K/Akt/Foxo3a 途径激活原始卵泡, 并抑制卵母细胞中生长分化因子 9 的表达, 从而抑制窦前卵泡发育^[22]。在本研究中, 由于 DHT 的诱导作用, 降低了 PCOS 模型小鼠的血清中 E2 水平, 但升高了血清中 T 水平, 这可能会导致卵巢产生病理变化和功能障碍。因此,

西红花酸可能是通过纠正 PCOS 小鼠的激素分泌紊乱而发挥 治疗效果的。

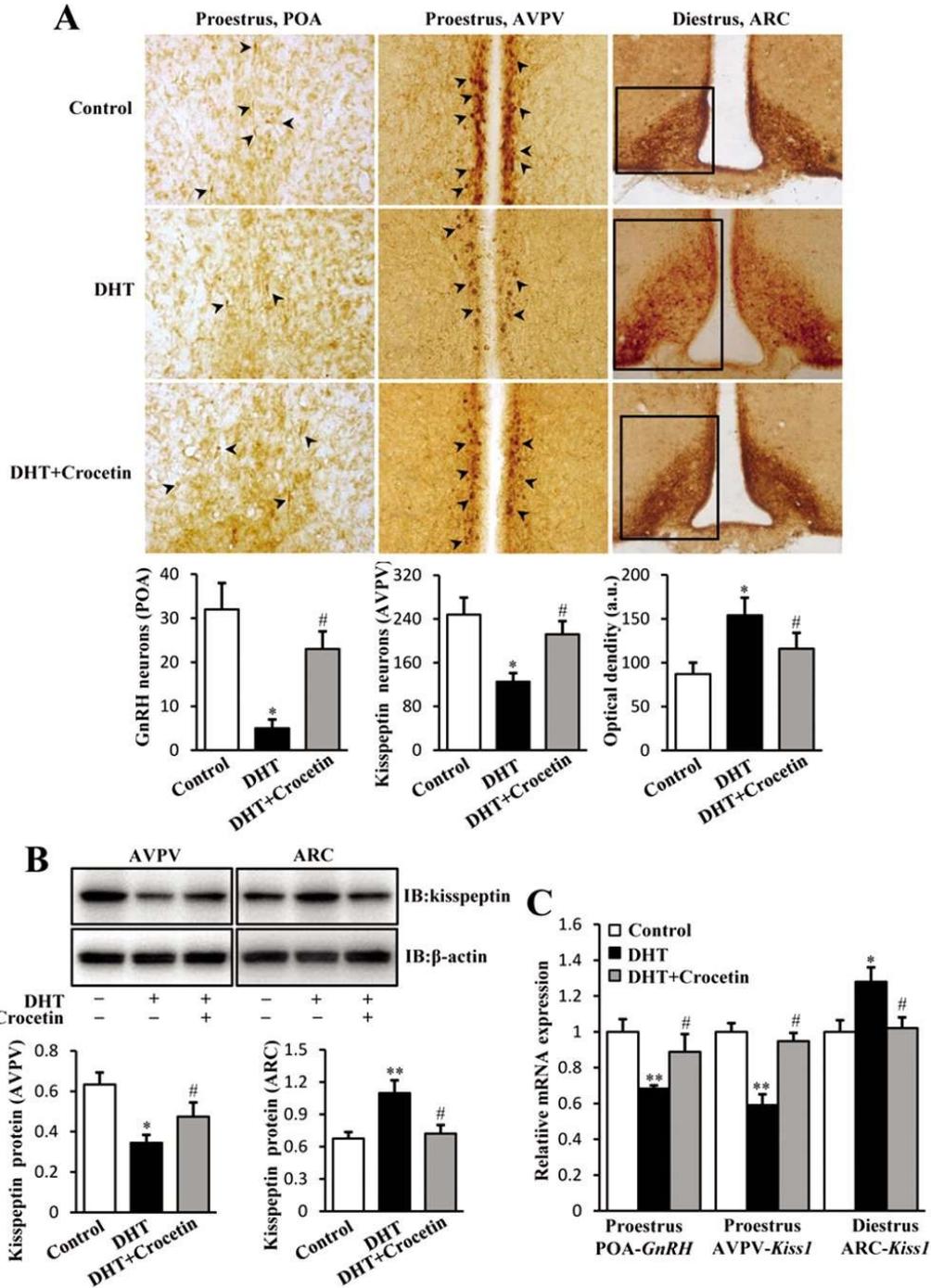


图 4 西红花酸对 PCOS 小鼠下丘脑 Kisspeptin 和 GnRH 神经元的影响 (× 100)

Fig.4 The effect of crocetin on hypothalamic kisspeptin and GnRH neurons in mice with PCOS

注:与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01, n=9;与模型组相比, #P<0.05, n=9。

Note:compared with control group, *P<0.05, **P<0.01, n=9; compared with model group, #P<0.05, n=9.

PCOS 卵巢激素分泌紊乱主要是由卵泡膜细胞的类固醇合成缺陷引起的,其功能受 HPO 轴的调控。GnRH 神经元直接将 GnRH 脉冲肽分泌到垂体中,使垂体脉冲式释放 LH 和 FSH。相反,高水平的雄激素通过受损的负反馈来增加 LH。LH 脉冲频率的增加是 PCOS 的经典指标之一,也是上游 GnRH 分泌失调和引起卵泡发育受阻的下游雄激素分泌过多的原因^[23]。因此,我们推测低 E2 水平和高雄激素水平引起血清中 LH 水平的升高,从而改变 LH 脉冲释放以及导致 FSH 分泌水平相对

不足,这可能影响正常的卵泡发育和排卵。

Kisspeptin 是 G 蛋白偶联受体 54(G protein-coupled receptor 54, GPR54)天然配体。近年发现,Kisspeptin/GPR54 参与下丘脑-垂体-卵巢轴生殖调控,通过调节下丘脑 GnRH 神经元活性来调控垂体 LH 和 FSH 分泌水平。Kisspeptin 神经元是促性腺激素分泌,排卵和生育的关键调控因子。在啮齿动物中,两个主要的 kisspeptin 神经元群位于下丘脑的 ARC 和 AVPV 中。AVPV 中的 Kisspeptin 神经元作为雌激素正反馈的作用

靶点,参与排卵前期 GnRH / LH 脉冲形成,而 ARC 中的 kisspeptin 神经元受雌激素负反馈调节^[24],被认为是调节 LH 脉冲频率的 GnRH 脉冲形成的关键调节因子。下丘脑 Kisspeptin-GnRH 系统功能障碍可能是 PCOS 发病机制之一^[14]。大鼠在动情前期时,kisspeptin 神经元的表达在 AVPV 中较高,而动情间期时在 ARC 中较高^[25]。在我们的研究中,小鼠出生前暴露于 DHT 条件下可以明显降低动情前期时 AVPV 中 kiss-1 mRNA 和 kisspeptin 蛋白的表达水平,但明显增加了动情间期 ARC 中 kiss-1 mRNA 和 kisspeptin 蛋白的表达水平。因此,高水平的 DHT 通过干扰下丘脑 kisspeptin 的表达,改变 GnRH / LH 脉冲释放频率,阻碍正常卵泡的正常生长发育和排卵。西红花酸可以逆转 AVPV 和 ARC 中 kisspeptin 神经元的异常表达,这可能是其对 PCOS 有治疗作用的原因之一。

综上所述,我们的研究证实了给予西红花酸治疗可以减轻 DHT 诱导的 PCOS 症状。西红花酸的治疗作用可能是由于 AVPV 和 ARC 中的 kisspeptin 的表达,血清中 E2、P4、T、LH 和 FSH 的水平以及卵巢的结构和功能病变得纠正。此外,由于上述 HPO 轴的功能部分作为因果相互作用,所以西红花酸作用的特异性靶标仍有待查找。

参考文献(References)

- [1] Krishnan A, Muthusami S. Hormonal alterations in PCOS and its influence on bone metabolism[J]. *J Endocrinol*, 2017, 232(2): R99-r113
- [2] Kokosar M, Benrick A, Perfiljev A, et al. A Single Bout of Electroacupuncture Remodels Epigenetic and Transcriptional Changes in Adipose Tissue in Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 1878
- [3] Broadhead GK, Chang A, Grigg J, et al. Efficacy and Safety of Saffron Supplementation: Current Clinical Findings[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 56(16): 2767-2776
- [4] Yan J, Qian Z, Sheng L, et al. Effect of crocetin on blood pressure restoration and synthesis of inflammatory mediators in heart after hemorrhagic shock in anesthetized rats[J]. *Shock*, 2010, 33(1): 83-87
- [5] Nam KN, Park YM, Jung HJ, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 648(1-3): 110-116
- [6] Majid H, Masood Q, Khan AH. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR): A Better Marker for Evaluating Insulin Resistance Than Fasting Insulin in Women with Polycystic Ovarian Syndrome [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2017, 27 (3): 123-126
- [7] Qu J, Wang Y, Wu X, et al. Insulin resistance directly contributes to androgenic potential within ovarian theca cells [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(5 Suppl): 1990-1997
- [8] Zhao Y, Zhang C, Huang Y, et al. Up-regulated expression of WNT5a increases inflammation and oxidative stress via PI3K/AKT/NF-kappaB signaling in the granulosa cells of PCOS patients [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(1): 201-211
- [9] Agha-Hosseini M, Kashani L, Aleyaseen A, et al. Crocus sativus L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial [J]. *Bjog*, 2008, 115 (4): 515-519
- [10] Van Houten EL, Visser JA. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function?[J]. *Reprod Biol*, 2014, 14(1): 32-43
- [11] Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2007, 80(2): 84-97
- [12] Caldwell AS, Middleton LJ, Jimenez M, et al. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(8): 3146-3159
- [13] Osuka S, Iwase A, Nakahara T, et al. Kisspeptin in the Hypothalamus of 2 Rat Models of Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Endocrinology*, 2017, 158(2): 367-377
- [14] Kondo M, Osuka S, Iwase A, et al. Increase of kisspeptin-positive cells in the hypothalamus of a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31(3): 673-681
- [15] Blank SK, McCartney CR, Marshall JC. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 351-361
- [16] Tackling insulin resistance. Control of etiology in type 2 diabetes[J]. *MMW Fortschr Med*, 2000, 142(21): 66-67
- [17] De Leo V, Musacchio MC, Cappelli V, et al. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 38
- [18] Moore AM, Campbell RE. Polycystic ovary syndrome: Understanding the role of the brain [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2017, 46: 1-14
- [19] Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Iwasa T, et al. Kisspeptin mRNA expression is increased in the posterior hypothalamus in the rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *Endocr J*, 2017, 64(1): 7-14
- [20] Casarini L, Riccetti L, De Pascali F, et al. Estrogen Modulates Specific Life and Death Signals Induced by LH and hCG in Human Primary Granulosa Cells In Vitro[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5)
- [21] Kishi H, Kitahara Y, Imai F, et al. Expression of the gonadotropin receptors during follicular development [J]. *Reprod Med Biol*, 2018, 17 (1): 11-19
- [22] Yang JL, Zhang CP, Li L, et al. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis[J]. *Endocrinology*, 2010, 151(2): 774-782
- [23] Yaffe K, Kanaya AM, Lindquist K, et al. PPAR-gamma Pro12Ala genotype and risk of cognitive decline in elders [J]. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(1): 78-83
- [24] Kajta M, Rzemieniec J, Litwa E, et al. The key involvement of estrogen receptor beta and G-protein-coupled receptor 30 in the neuroprotective action of daidzein[J]. *Neuroscience*, 2013, 238: 345-360
- [25] Uenoyama Y, Tomikawa J, Inoue N, et al. Molecular and Epigenetic Mechanism Regulating Hypothalamic Kiss1 Gene Expression in Mammals[J]. *Neuroendocrinology*, 2016, 103(6): 640-649