

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.15.015

针刺对卵巢储备功能减退模型大鼠血清炎症因子及卵巢组织 Nrf2/HO-1/NLRP3 信号通路的影响

卢鸽, 解子婧, 汪倩, 李茜, 李红晓, 沈梅红*

南京中医药大学针灸推拿学院/养生康复学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023

摘要 目的 探讨针刺对卵巢储备功能减退模型大鼠动情周期的影响及可能作用机制。方法 将 40 只动情周期正常的 SD 雌性大鼠随机分为空白组、模型组、针刺组、激素组, 每组 10 只。除空白组外, 其余 3 组大鼠予雷公藤多苷片混悬液按 50 mg/(kg·d) 连续灌胃 14 天建立卵巢储备功能减退大鼠模型。针刺组在每日雷公藤多苷灌胃 1 h 后进行针刺干预, 选取“肾俞”“关元”“中脘”穴, 每次行针 10 s, 共留针 10 min。同时激素组进行雌激素、孕激素序贯疗法。实验第 8 天起观察大鼠动情周期, 第 15 天采用 HE 染色法观察各组大鼠卵巢中卵泡、黄体发育情况; 检测大鼠血清激素 [包括抗苗勒管激素 (AMH)、雌二醇 (E_2)、卵泡刺激素 (FSH)] 及炎症因子 [包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 21 (IL-21)、白细胞介素 10 (IL-10)] 水平; 检测卵巢组织中转录因子核因子 E_2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶 1 (HO-1) 蛋白表达及 Nrf2、HO-1、核苷酸结合寡聚化结构域受体 3 (NLRP3) mRNA 相对表达量。结果 与空白组比较, 模型组大鼠的动情周期延长或紊乱, 生长卵泡颗粒细胞层减少, 黄体萎缩, 闭锁卵泡和炎症浸润增多; 血清 AMH、 E_2 、IL-10 水平降低, FSH、TNF- α 、IL-21 水平升高, 卵巢组织中 Nrf2、HO-1 蛋白和 mRNA 表达降低, NLRP3 mRNA 升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 针刺组及激素组生长卵泡颗粒细胞层增多, 闭锁卵泡和炎症浸润减少; 血清 AMH、 E_2 、IL-10 升高, FSH、IL-21 下降; 卵巢组织中 Nrf2、HO-1 蛋白和 mRNA 增高, NLRP3 mRNA 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。针刺组和激素组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 针刺能够恢复卵巢储备功能减退模型大鼠的动情周期, 有效调节大鼠性激素水平, 可能通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 NLRP3 mRNA 表达, 从而抑制炎症反应。

关键词 卵巢储备功能减退; 针刺; 动情周期; 性激素; 炎症因子; 转录因子核因子 E_2 相关因子 2; 血红素氧合酶 1

卵巢储备功能减退 (diminished ovarian reserve, DOR) 是指育龄妇女与年龄相当的正常女性相比, 其卵母细胞的质量和/或数量下降, 生育能力降低^[1]。女性卵巢储备下降的过程是不可逆转的, 但其下降的速度不同, 发展至卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 的过渡时间差异很大^[2]。DOR 和 POF 不仅会影响女性的生殖能力, 更会因此增加罹患骨质疏松症、心血管疾病等疾病的风险^[3-4]。因此, 延缓 DOR 的进程对维持女性生殖和机体健康而言极为重要。针灸能够改善 DOR 女性的激素水平和生殖结局^[5], 无明显副作用, 并具有长期疗效^[6]。前期研究^[7]亦证实, 针

刺可通过改善卵巢氧化应激状态, 降低卵泡周围颗粒细胞的凋亡, 从而减轻雷公藤多苷片所致的激素水平紊乱、卵巢功能减退等副作用。临床试验^[8-9]表明, DOR 患者外周血中促炎细胞因子的水平显著升高, 可能与卵巢储备功能有一定的相关性。本研究拟通过雷公藤多苷灌胃建立 DOR 大鼠模型, 探究针刺对炎症反应影响及可能机制, 为临床治疗 DOR 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 SD 大鼠, 8 周龄, 体重 (190 ± 10) g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2013-0006, 合格证编号 20180006003316。大鼠常规饲养在通

基金项目: 国家自然科学基金 (81774408, 81973957)

* 通讯作者: mhshen@njucm.edu.cn

风、12 h 明暗交替、室温 25 ℃、湿度 (55 ± 5) % 的环境中, 自由进食饮水。

1.2 药物、试剂与仪器

雷公藤多苷片 (10 mg/片, 湖南千金协力制药有限公司, 国药准字 Z43020138); 戊酸雌二醇片 (1 mg/片, 拜耳医药, 国药准字 J20130009); 黄体酮胶囊 (100 mg/粒, 浙江爱生药业有限公司, 国药准字 H20031099)。

多聚甲醛 (货号 BL539A)、苏木素-伊红 (HE) 染色液 (货号 BL700B), Biosharp 公司; 大鼠抗苗勒管激素 (AMH, 货号 RA20211)、雌二醇 (E₂, 货号 RA20666)、卵泡刺激素 (FSH, 货号 RA20044)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α, 货号 20035)、白细胞介素 21 (IL-21, 货号 RA20183)、白细胞介素 10 (IL-10, 货号 RA20090) 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒, 均为 Bioswamp 公司产品; 大鼠转录因子核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2) 抗体 (货号 ab137550)、大鼠血红素氧合酶 1 (HO-1) 抗体 (货号 ab13243), 英国 Abcam 公司; 免疫组化试剂盒 (货号 SA1022)、DAB 显色试剂盒 (货号 AR1022), 武汉博士德生物工程有限公司; 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号 AJ10935A)。

全自动组织包埋装置 (美国 SAKURA 公司, 型号 Tissue-Tek TEC-5); 石蜡切片机 (德国 Leica 公司, 型号 RM2145); 荧光多功能显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 U-ND6-2); 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司, 型号 ELX800); 实时荧光定量 PCR 仪器 (美国 Applied Biosystems 公司, 型号 Veriti 96 well thermal cycle); 华佗牌一次性针灸针 (0.20 mm × 13 mm, 苏州医疗用品有限公司)。

1.3 分组及造模方法

适应性喂养 3 天, 连续进行 10 天阴道脱落细胞涂片, 有两个完整动情周期的 40 只大鼠纳入实验, 根据随机数字表法分为空白组、模型组、针刺组、激素组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组参考前期研究^[7]选择雷公藤多苷片制备 DOR 大鼠模型, 将雷公藤多苷片研磨后加入生理盐水, 配置成浓度为 5 mg/ml 的混悬液, 大鼠按 50 mg/(kg · d) 连续灌胃 14 d, 每日 1 次。从造模第 8 天起观察大鼠阴道脱落细胞涂片, 涂片显示动情周期明显延长 (≥6 天) 或在某一阶段停滞无改变 ≥3 天者为动情周期紊乱, 提示造模成功^[10]。

1.4 干预方法

空白组每日予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。针刺组在雷公藤多苷灌胃 1 h 后进行针刺干预, 针刺方案: 根据《实验针灸学实验指导及技能训练》^[11] 穴位定位方法, 选取“肾俞”“关元”“中脘”穴。针刺方法: 一日针刺双侧“肾俞”穴, 一日针刺“关元”穴与“中脘”穴, 隔日交替针刺, 腹部腧穴向内下方斜刺 2 mm, 背部腧穴向内下方斜刺 5 mm。每 5 min 以平补平泻手法捻转行针 1 次, 每次行针 10 s, 共留针 10 min。激素组在雷公藤多苷灌胃 1 h 后进行雌孕激素序贯疗法: 第 1 ~ 4 天予戊酸雌二醇片混悬液 0.1 mg/(kg · d) 灌胃, 第 4 天加用黄体酮胶囊混悬液 0.8 mg/(kg · d) 灌胃, 第 5 天停药, 重复此疗法 3 次。

造模及针刺或激素干预治疗均持续 14 天。

1.5 取材方法

在实验第 15 天将所有大鼠麻醉取材。取材前禁食不禁水 12 h, 采用 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉, 取下腔静脉血液 4 ml, 室温静置 30 min 后 4000 r/min 离心 15 min 取其上清液, 用于检测血清激素和炎症因子。用消毒镊子摘取两侧卵巢, 其中右侧卵巢放于 4% 多聚甲醛溶液中, 用于 HE 染色和免疫组织化学染色; 左侧卵巢放于液氮中, 用于提取 RNA。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠动情周期变化 造模第 8 天开始, 每日早上 8:30 抓取大鼠, 将医用棉签用生理盐水浸湿后沾取大鼠阴道脱落细胞, 将脱落细胞均匀涂抹在载玻片上。在显微镜下观察脱落细胞的变化, 判断大鼠的动情周期。正常大鼠的动情周期一般 4 ~ 5 d, 包括动情前期、动情期、动情后期以及动情间期。不同阶段的阴道涂片表现为^[12]: 镜下见大量的有核上皮细胞和少量白细胞为动情前期, 持续 12 ~ 15 h; 镜下大量的角质化、大而无规则的无核上皮细胞为动情期, 持续 25 ~ 27 h; 有核上皮细胞、角质化上皮细胞和白细胞均匀存在为动情后期, 6 ~ 8 h; 大量白细胞和少量角质化上皮细胞为动情间期, 45 ~ 47 h。

1.6.2 血清激素以及炎症因子检测 采用 ELISA 法检测血清 FSH、E₂、AMH、TNF-α、IL-21、IL-10, 按试剂盒操作步骤进行, 使用酶标仪在 450 nm 波长进行吸光度 (OD) 检测, 按照标准品及 OD 值绘制标准曲线, 获得直线回归方程式, 计算出样品中激素和炎症因子的实际浓度。

1.6.3 卵巢组织病理观察 采用 HE 染色法观察卵巢中卵泡、黄体发育情况。每组选取 6 只卵巢石蜡包块,连续切 6 μm 的薄片,每只卵巢选取 2 张切片经过二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水,用苏木素染液染 3 min,经过自来水冲洗、1% 盐酸酒精分化、1% 氨水溶液返蓝后,再用伊红染液染 2 min,最后脱水、封片,在 40 倍和 100 倍显微镜视野下观察。

1.6.4 卵巢组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达 采用免疫组化法检测,每组选取 3 只卵巢石蜡包块,切片、脱蜡后放入柠檬酸抗原修复缓冲液中进行抗原修复,然后将切片放入 3% 双氧水溶液中阻断内源性过氧化物酶,血清封闭后依次加入一抗、二抗,再用 DAB 显色液染色、苏木素复染细胞核,最后脱水封片,阳性表达为棕黄色。每张切片随机选取 3 个 400 倍视野,并用 Image J 1.8.0 图像分析软件处理,测定每个视野的 Nrf2、HO-1 阳性细胞数比例,取平均值。

1.6.5 卵巢组织 Nrf2、HO-1、核苷酸结合寡聚化结构域受体 3 (NLRP3) mRNA 表达 采用 Real time-PCR (TaqMan 探针法) 法检测,每组取 3 只大鼠卵巢,研磨后分离蛋白、提取 RNA,并检测 RNA 浓度,使用 1 μg RNA 进行逆转录 (20 μl 体系),获得模版 DNA (cDNA)。选择 20 μl 体系进行 Real time-PCR 反应,cDNA 1 μl 。引物由 Applied Biosystems 公司合成,探针 ID 号: Nrf2: Rn00582415_m1; HO-1: Rn00561387_m1; GAPDH: Rn01775763_g1。反应条件按说明书: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 1 min, 扩增 40 个循环。反应结束后分析 CT 值,使用 GAPDH 作为内部参照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析 mRNA 相对表达量。

1.7 统计学方法

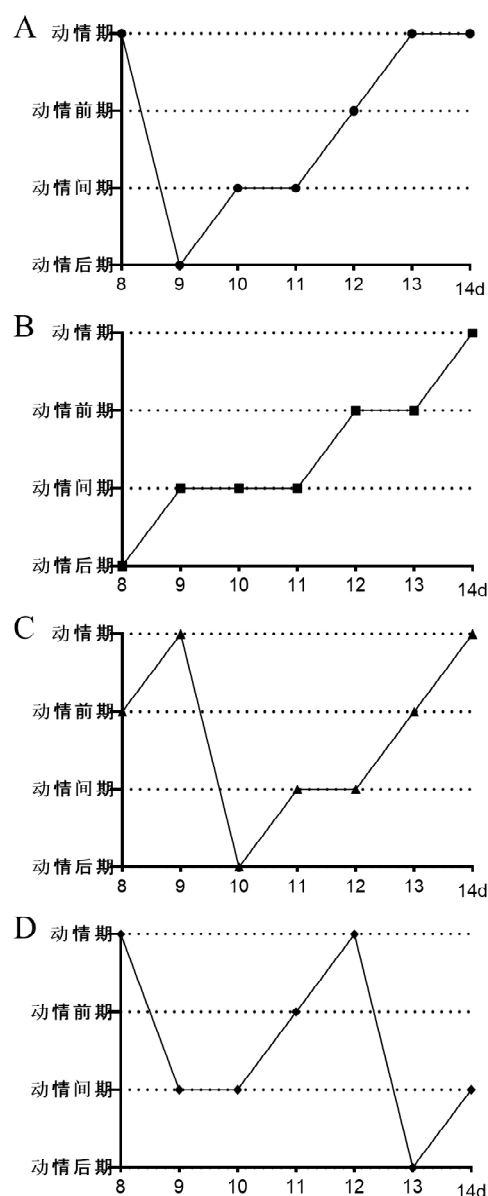
采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,组间差异用 Dunnett 检验。计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

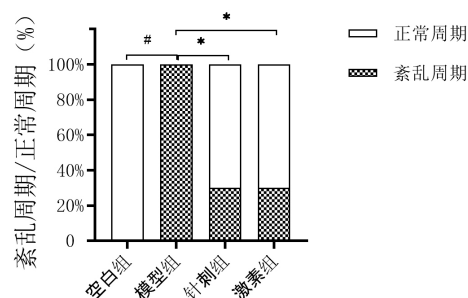
2.1 各组大鼠动情周期变化

各组大鼠动情周期变化见图 1。各组大鼠紊乱周期与正常周期比值见图 2。与空白组比较,模型组大鼠为紊乱的动情周期 ($P < 0.01$); 与模型组比较,针刺组和激素组大鼠紊乱周期与正常周期比值明显减小 ($P < 0.01$); 而针刺组和激素组差异

无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: A,空白组; B,模型组; C,针刺组; D,激素组
图 1 各组大鼠动情周期变化曲线图



注: 与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.01$

图 2 各组大鼠紊乱周期与正常周期比值比较

2.2 各组大鼠卵巢组织肉眼及病理观察结果

卵巢肉眼可见,空白组卵巢红润充盈,形态正常;模型组卵巢苍白萎缩;与模型组相比,针刺组与激素组大鼠卵巢整体萎缩苍白情况均有改善。HE 染色病理结果:空白组大鼠卵巢光镜下可见各级卵泡,窦卵泡体积大,卵泡颗粒细胞层多且紧凑有序,黄体丰富,闭锁卵泡少。模型组大鼠卵巢光镜下窦卵泡较小,卵泡颗粒细胞层减少且排列疏松,萎缩黄体 and 闭锁卵泡增多,炎性浸润增多;针刺组大鼠卵巢光镜下窦卵泡较大,颗粒细胞层较模型组增多,黄体发育较好,闭锁卵泡减少,炎性浸润减少;激素组大鼠卵巢光镜下卵泡颗粒细胞层增多,黄体发育较正常,闭锁卵泡减少,炎性浸润减少。

2.3 各组大鼠血清激素水平比较

图 3 示,与空白组比较,模型组大鼠血清 AMH、 E_2 含量显著降低,FSH 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组、激素组大鼠血清

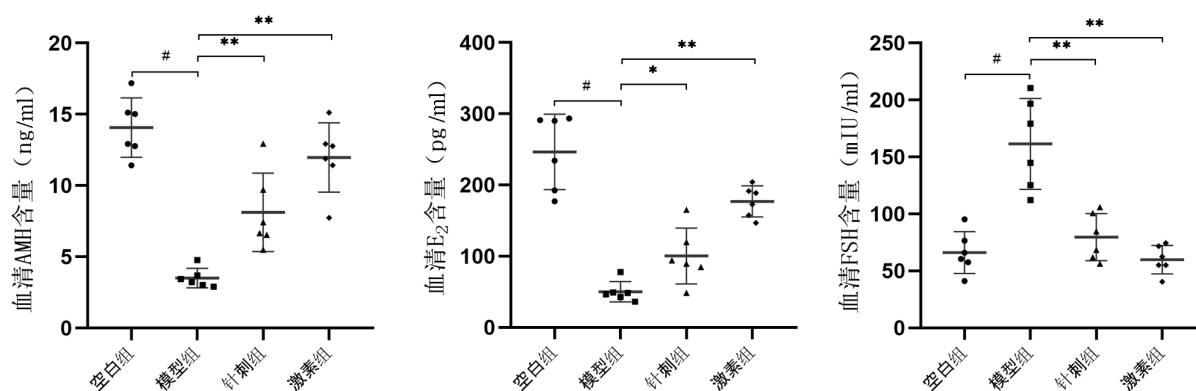
AMH、 E_2 明显升高,FSH 显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);针刺组和激素组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠血清炎症因子水平比较

图 4 示,与空白组比较,模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-21 显著增多,IL-10 显著减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组、激素组大鼠血清 IL-21 显著下降,IL-10 显著增多 ($P < 0.01$),而 TNF- α 差异无统计学意义 ($P > 0.05$);针刺组和激素组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

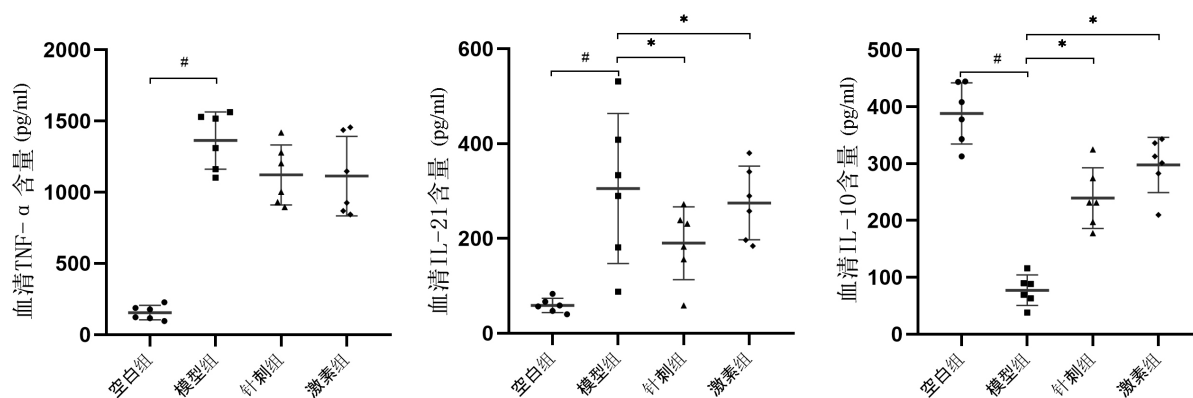
2.5 各组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达比较

图 5 示,与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 阳性细胞表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,针刺组、激素组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 阳性细胞表达显著增高 ($P < 0.01$);针刺组和激素组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



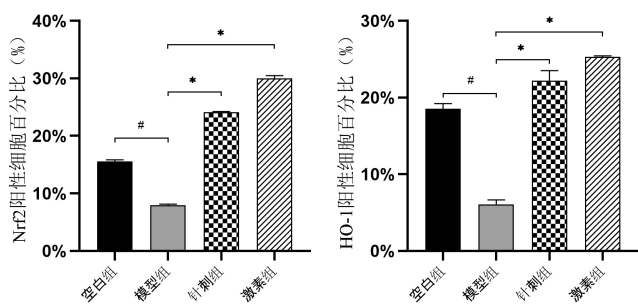
注: AMH, 抗苗勒管激素; E_2 , 雌二醇; FSH, 卵泡刺激素; 与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 各组大鼠血清激素水平比较



注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-21, 白细胞介素 21; IL-10, 白细胞介素 10; 与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 各组大鼠血清炎症因子水平比较

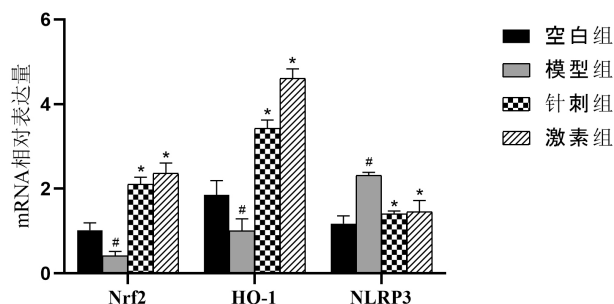


注: Nrf2, 转录因子核因子 E₂ 相关因子 2; HO-1, 血红素氧合酶 1; 与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.01$

图 5 各组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 阳性细胞百分比比较

2.6 各组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 和 NLRP3 mRNA 表达比较

图 6 示, 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 相对表达量显著降低, 而 NLRP3 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 针刺组、激素组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 相对表达量均显著增加, NLRP3 mRNA 显著降低 ($P < 0.01$); 针刺组和激素组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: Nrf2, 转录因子核因子 E₂ 相关因子 2; HO-1, 血红素氧合酶 1; NLRP3, 核苷酸结合寡聚化结构域受体 3; 与空白组比较, # $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.01$

图 6 各组大鼠卵巢组织中 Nrf2、HO-1、NLRP3 mRNA 相对表达量比较

3 讨论

根据 DOR 的临床表现可归属于中医学“月经先后不定期”“经水早断”“不孕症”等疾病范畴。《素问·上古天真论篇》云“女子七岁肾气盛, ……二七而天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下, 故有子, ……七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也。”肾气与冲脉、任脉的盛衰与女性的生殖过程密切相关^[3]。冲任之本在肾, 肾气亏虚则会引起冲任虚衰, 天癸乏源。本研究选用双侧“肾俞”补肾益气, 任脉与

足三阴经的交会穴“关元”调理冲任, 佐以膻会“中脘”补益脾胃以滋气血。临床亦以补肾调冲任为治疗 DOR 的主要思路^[4]。

雷公藤多苷广泛用于治疗癌症和自身免疫性疾病, 主要有效成分是雷公藤甲素, 其生殖毒性通过抑制卵泡颗粒细胞增殖导致 DOR 的发生^[5]。AMH 和 E₂ 均由生长卵泡的颗粒细胞分泌产生, AMH 调节卵泡的生长发育, 是卵巢储备的重要标志物, 反映卵巢中生长卵泡的数量; E₂ 对于卵泡生长发育的维持起重要作用, 并通过负反馈抑制 FSH 的分泌, 随着卵巢储备功能的减退, AMH 与 E₂ 均呈下降趋势^[6]。在本研究中, 与空白组相比, 模型组大鼠的动情周期紊乱, 血清 AMH、E₂ 含量下降, FSH 含量升高, 提示雷公藤多苷灌胃可导致大鼠的卵巢储备降低。而与模型组相比, 针刺和激素疗法均能拮抗雷公藤多苷引起的大鼠动情周期异常, 并改善大鼠血清激素的水平, 阻抑大鼠卵巢储备功能的减退, 且二者之间无显著差异。此结果与针刺能够有效调节卵巢早衰患者的性激素分泌及月经周期, 恢复卵巢功能的临床报道^[7]相似。

卵巢储备功能与卵巢炎症密切相关, 持续的炎症反应加速卵巢衰老^[8]。TNF- α 和 IL-21 是促炎细胞因子, 介导慢性炎症, 在细胞凋亡、增殖以及免疫反应中起关键作用^[9-20]。在 POF 女性及雌性大鼠体内, TNF- α 、IL-21 均呈高水平表达^[21-22], TNF- α 还会抑制颗粒细胞合成分泌雌激素、破坏卵泡微环境^[23-24]。IL-10 是重要的抗炎细胞因子, 通过抑制 TNF- α 、IL-21 等促炎细胞因子而发挥抗炎作用, 限制炎症对卵巢组织的破坏^[9]。本研究显示, 模型组大鼠卵巢组织炎症浸润增多, 血清中促炎细胞因子 TNF- α 、IL-21 增多, 抗炎细胞因子 IL-10 减少, 提示 DOR 大鼠卵巢存在炎症损伤。与模型组相比, 针刺明显升高 IL-10, 降低 IL-21 的释放, 说明针刺能够有效降低 DOR 大鼠卵巢的炎症水平, 减轻炎症损伤, 改善卵巢的炎症环境以保护卵泡发育。

Nrf2 是碱性亮氨酸拉链家族转录因子的成员, 调控多种抗氧化应激、抗炎基因的转录, 其活化是细胞的主要防御机制之一^[25]。研究^[26-27]证明, 激活的 Nrf2 途径在应激条件下保护卵泡细胞。HO-1 是 Nrf2 的下游抗氧化反应元件之一, 在基础环境下, 细胞质中的 Nrf2 与其抑制因子结合, 受其泛素化修饰, 进一步被蛋白酶体系降解^[28]。Nrf2、HO-1 的表达具有抗炎作用, 通过调节炎症反应减

轻组织和器官的损伤^[29-30]。NLRP3 可促进促炎细胞因子的分泌,加剧细胞损伤,诱导细胞焦亡^[31]。抑制 NLRP3 炎症信号可以减轻炎症反应,对组织起保护作用^[32]。本研究结果表明,针刺可拮抗雷公藤多苷诱导的 Nrf2、HO-1 蛋白和 mRNA 表达减少,上调的 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 NLRP3 的表达,进而促进血清中的抗炎细胞因子 IL-10 和抑制促炎细胞因子 IL-21 的释放,改善卵巢的炎症反应,减轻卵泡的炎性损伤和卵巢储备功能减退。今后将通过 Nrf2 基因敲除或特异性抑制剂、激动剂来进一步深入研究,探讨针刺通过 Nrf2/HO-1 信号通路调控 NLRP3 以抑制雷公藤多苷所致的大鼠卵巢储备功能减退的作用机制。

参考文献

- [1] Practice committee of the American society for reproductive medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2015, 103(3): e9-e17.
- [2] TAL R, SEIFER DB. Ovarian reserve testing: a user's guide [J]. Am J Obstet Gynecol, 2017, 217(2): 129-140.
- [3] PAL L, BEVILACQUA K, ZEITLIAN G, et al. Implications of diminished ovarian reserve (DOR) extend well beyond reproductive concerns [J]. Menopause, 15(6): 1086-1094.
- [4] QUINN MM, CEDARS ML. Cardiovascular health and ovarian aging [J]. Fertil Steril, 2018, 110(5): 790-793.
- [5] 周莉,夏有兵,马翔,等. 针灸序贯疗法对卵巢储备功能下降患者 IVF-ET 的影响 [J]. 中国针灸, 2016, 36(1): 25-28.
- [6] WANG Y, LI Y, CHEN R, et al. Electroacupuncture for reproductive hormone levels in patients with diminished ovarian reserve: a prospective observational study [J]. Acupunct Med, 2016, 34(5): 386-391.
- [7] 陈思,樊耀华,李婧,等. 滋肾育胎丸对 DOR 大鼠模型 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 重庆医学, 2018, 47(14): 1853-1856.
- [8] 章玉玲,杨涛,倪维. 抗苗勒管激素、IL-21 联合性激素检测在预测卵巢早衰中的诊断价值 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(10): 1110-1112.
- [9] 蔡慧华,何援利,付霞霏,等. 卵巢早衰及卵巢功能减退患者血清 IL-21 的水平变化 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(5): 458-460.
- [10] CRUZ G, FERNANDOIS D, PAREDES AH. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation [J]. Reproduction, 2017, 153(2): R59-R68.
- [11] 李忠仁. 实验针灸学实验指导及技能训练 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 327-329.
- [12] WESTWOOD FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging [J]. Toxicol Pathol, 2008, 36(3): 375-384.
- [13] 吕润,连方. 卵巢储备功能减退的中西医研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(98): 123-124.
- [14] 杜鑫,王慧丹,韩旭,等. 针灸治疗育龄期女性卵巢功能减退选穴规律及对生殖轴的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(11): 2784-2786.
- [15] ZHANG J, LIU L, MU X, et al. Effect of triptolide on estradiol release from cultured rat granulosa cells [J]. Endocr J, 2012, 59(6): 473-481.
- [16] 韩晓洁,商文金. 抗苗勒氏管激素在不同卵巢储备功能患者的表达及相关性分析 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2019, 20(4): 358-360.
- [17] 姚敏,王芹,潘红玲,等. 针刺治疗卵巢早衰及对患者细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 表达水平的影响 [J]. 中国针灸, 2019(11): 1181-1184.
- [18] FULLER EA, SOMINSKY L, SUTHERLAND JM, et al. Neonatal immune activation depletes the ovarian follicle reserve and alters ovarian acute inflammatory mediators in neonatal rats [J]. Biol Reprod, 2017, 97(5): 719-730.
- [19] BOSHTAM M, ASGARY S, KOUHPAYEH S, et al. Aptamers against pro- and anti-inflammatory cytokines: a review [J]. Inflammation, 2017, 40(1): 340-349.
- [20] FINA D, CARUSO R, PALLONE F, et al. Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007, 7(4): 288-291.
- [21] 张文红,赵彦鹏,李果,等. 滋肾益经活血汤治疗卵巢早衰患者 50 例临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(8): 670-671.
- [22] 徐文君,高慧,李杨. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平及 TNF- α 、IFN- γ 蛋白表达的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 953-957.
- [23] 庄笑梅,姜恩魁,冯俐. TNF- α 对雌性大鼠生殖轴调控作用的研究 [J]. 锦州医学院学报, 2003, 24(4): 5-9.
- [24] KIM GA, LEE Y, KIM HJ, et al. Intravenous human endothelial progenitor cell administration into aged mice enhances embryo development and oocyte quality by reducing inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(12): 1905-1913.
- [25] STEEL R, COWAN J, PAYERNE E, et al. Anti-inflammatory effect of a cell-penetrating peptide targeting the

- Nrf2/Keap1 interaction [J]. ACS Med Chem Lett, 2012, 3(5): 407–410.
- [6] AKINO N, WADA-HIRAIKE O, TERAOKA H, et al. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 470: 96–104. doi: 10.1016/j.mce.2017.10.002.
- [7] AKINO N, WADA-HIRAIKE O, ISONO W, et al. Activation of Nrf2/Keap1 pathway by oral Dimethylfumarate administration alleviates oxidative stress and age-associated infertility might be delayed in the mouse ovary [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17(1): 23.
- [8] LOBODA A, DAMULEWICZ M, PYZA E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): 3221–3247.
- [9] YAN J, LI J, ZHANG L, et al. Nrf2 protects against acute lung injury and inflammation by modulating TLR4 and Akt signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 121: 78–85. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.557.
- [10] KONG X, THIMMULAPPA R, CRACIUN F, et al. Enhancing Nrf2 pathway by disruption of Keap1 in myeloid leukocytes protects against sepsis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(8): 928–938.
- [11] 张昭强, 杨一帆, 闫京锐, 等. 晚期糖基化白蛋白通过上调核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3 诱导巨噬细胞焦亡 [J]. 生理学报, 2019, 71(6): 846–854.
- [12] 刘湘, 乔丽菲, 刘垚君, 等. 芍药苷对脑缺血再灌注损伤大鼠 NLRP3 炎症体信号通路相关因子表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(10): 40–44.

Effects of Acupuncture on Serum Inflammatory Factors and Nrf2/HO-1/NLRP3 Signaling Pathway in the Hypo-ovarian Reserve Function Model Rats

LU Ge, XIE Zijing, WANG Qian, LI Qian, LI Hongxiao, SHEN Meihong

School of Acupuncture and Tuina/Regimen and Rehabilitation College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023

ABSTRACT Objective To explore the effects and possible mechanism of acupuncture on the estrous cycle of rat model of hypo-ovarian reserve function. **Methods** A total of 40 SD female rats with normal estrus cycle were randomly divided into a blank group, a model group, an acupuncture group and a hormone group, with 10 rats in each group. Except for the blank group, rats were given tripterygium wilfordii polyglycoside tablet suspension at 50 mg/(kg · d) for 14 days to establish hypo-ovarian reserve dysfunction model rat. In the acupuncture group, acupuncture intervention was performed one hour after gavage of tripterygium wilfordii polyglycoside every day, and the acupoints of “Shenshu” (BL23), “Guanyuan” (CV4) and Zhongwan (CV12) were selected, the needling was given for 10 s each time with retention for 10 minutes. Meanwhile, the hormone group was given sequence therapy of estrogen and progesterone. The estrous cycle of rats was observed from the 8th day of the experiment. On the 15th day. HE staining method was used to observe the development of follicles and corpus luteum in the ovaries of each group of rats; serum hormones including anti-Müllerian hormone (AMH), estradiol (E₂), follicle stimulating hormone (FSH) and inflammatory factors including tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 21 (IL-21), interleukin 10 (IL-10) levels were detected. The level of transcription factor nuclear factor E₂ related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1) protein expression and Nrf2, HO-1, nucleotide binding oligomerization domain receptor 3 (NLRP3) relative mRNA expression quantity were detected. **Results** Compared with the blank group, the model group had prolonged or disordered estrous cycle, decreased granulosa cell layer of growth follicle, atrophy of corpus luteum, increased atresia follicle and inflammatory infiltration; serum AMH, E₂, IL-10 levels decreased, the levels of FSH, TNF-α and IL-21 increased, the expression of Nrf2, HO-1 protein and mRNA in ovarian tissue decreased, and the NLRP3 mRNA increased (P < 0.01). Compared with the model group, the growth follicle granular cell layer increased in the acupuncture group and the hormone group, the atresia follicles and inflammatory infiltration decreased; serum AMH, E₂, IL-10 increased, FSH, IL-21 decreased; Nrf2, HO-1 and mRNA protein in ovarian tissue increased, NLRP3 mRNA decreased (P < 0.05 or P < 0.01). There was no significant difference in all indicators between the acupuncture group and the hormone group (P > 0.05). **Conclusion** Acupuncture can restore the estrous cycle of rats with hypo-ovarian reserve function and effectively regulate the level of sex hormones in rats. The action may be related to inhibition of the NLRP3 mRNA expression by Nrf2/HO-1 signaling pathway to inhibit the inflammatory response. **Keywords** diminished ovarian reserve; acupuncture; estrous cycle; sex hormones; inflammatory factors; transcription factor nuclear factor E₂ related factor 2; heme oxygenase 1

(收稿日期: 2019-11-30; 修回日期: 2020-02-25)

编辑: 邓 媛