

文章编号: 1005-0957 (2025) 02-0229-10

• 动物实验 •

电针通过 Hippo/YAP 通路调控卵巢早衰小鼠卵巢功能

凌乐乐^{1,2}, 王聪², 胡寅杰², 李冰融², 刘鹏², 张开勇², 李斯雯², 刘特³, 张必萌²

(1. 上海交通大学医学院, 上海 200001; 2. 上海交通大学医学院附属第一人民医院, 上海 200080; 3. 上海市中医老年医学研究所, 上海 200030)

【摘要】 目的 观察电针改善高脂高糖诱导的卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 小鼠卵巢功能与调控 Hippo/YAP 通路的分子机制。**方法** 将 45 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为对照组 (wild type, WT)、卵巢早衰组 (POF) 和电针治疗组 (electroacupuncture, EA), 每组 15 只。利用高脂高糖造模成功后, EA 组选取关元穴及双侧足三里和三阴交穴进行电针干预。用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠卵巢病理形态, 用马松染色 (Masson) 观察小鼠卵巢纤维化, 用菲律宾染色 (filipin) 检测小鼠卵巢总胆固醇; 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测小鼠血清卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、抗苗勒氏管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)、雌二醇激素 (estradiol, E₂)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 的水平; 使用免疫荧光染色标记小鼠卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 卵泡刺激素受体 (follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和增殖标志物 Ki67 的水平; 用逆转录定量实时荧光定量聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 Hippo/YAP 通路基因 YAP、TEAD1、TAZ、MST1、增殖相关基因 PCNA、凋亡相关基因 BAX、BCL2 的 mRNA 表达; 用 Western blot 法检测 Hippo/YAP 通路蛋白 p-YAP、YAP、TEAD1、TAZ、MST1 及凋亡相关蛋白 BAX、BCL2 的表达。**结果** 与 POF 组比较, EA 组干预后卵巢卵泡闭锁减少, 成熟卵泡增多, 卵巢纤维化程度减少, 卵巢总胆固醇降低; EA 组干预后性激素水平与脂代谢水平显著改善, FSH 激素水平显著降低 ($P < 0.05$), AMH 和 E₂ 激素水平显著升高 ($P < 0.05$), TG 和 TC 显著下降 ($P < 0.05$), HDL 显著上升 ($P < 0.05$), LDL 显著下降 ($P < 0.05$); EA 组干预后 FSHR、PCNA、Ki67 表达均上调; EA 组干预后激活了 Hippo/YAP 通路, 促进了 GCs 的增殖与抑制 GCs 的凋亡。**结论** 电针可能通过调节 Hippo/YAP 通路从而改善了卵巢的功能, 并且通过 Hippo/YAP 通路促进了 GCs 的增殖与抗凋亡水平。

【关键词】 电针; 卵巢早衰; Hippo/YAP 通路; 增殖; 凋亡; 小鼠**【中图分类号】** R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2024.13.3001

Electroacupuncture regulates ovarian function in mice with premature ovarian failure via Hippo/YAP pathway LING Lele^{1,2}, WANG Cong², HU Yinjie², LI Bingrong², LIU Peng², ZHANG Kaiyong², LI Siwen², LIU Te³, ZHANG Bimeng². 1. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200001, China; 2. Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China; 3. Shanghai Geriatrics Institute of Chinese Medicine, Shanghai 200030, China

[Abstract] Objective To observe the molecular mechanism of electroacupuncture (EA) in improving ovarian function and regulating the Hippo/YAP pathway in mice with premature ovarian failure (POF) induced by high fat and high sugar. **Method** Forty-five female C57BL/6 mice were randomized into a control group (wild type, WT), a

基金项目: 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划 2021 年-2023 年 [ZY (2021-2023)-0208]**作者简介:** 凌乐乐 (1998—), 男, 2021 级硕士生, Email: linglele@sjtu.edu.cn**通信作者:** 张必萌 (1974—), 男, 主任医师, Email: pjzhtiger08@aliyun.com

POF group, and an EA group, with 15 mice in each group. After the successful modeling with a high-fat and high-sugar diet, the EA group received EA at Guanyuan (CV4) and bilateral Zusanli (ST36) and Sanyinjiao (SP6) points. hematoxylin-eosin (HE) staining was adopted to observe ovarian pathological changes, Masson staining was used to observe ovarian fibrosis, and filipin staining was employed to detect ovarian total cholesterol in the mice. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of serum follicle-stimulating hormone (FSH), anti-Müllerian hormone (AMH), estradiol (E_2), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), and low-density lipoprotein (LDL). Immunofluorescence staining was used to label the expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and proliferation marker ki67 in the mice's ovarian granulosa cells (GCs). The reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was adopted to detect the mRNA expression of Hippo/YAP pathway genes YAP, TEAD1, TAZ, and MST1, proliferation-related gene PCNA, and apoptosis-related genes BAX and BCL2. Western blot was used to measure the expression of Hippo/YAP pathway proteins p-YAP, YAP, TEAD1, TAZ, and MST1 and apoptosis-related proteins BAX and BCL2. **Result** Compared to the POF group, the EA group had less follicular atresia, more mature follicles, reduced ovarian fibrosis, and a lower ovarian TC level after the intervention. After the intervention, the EA group showed improvement in sex hormone and lipid metabolism levels: the FSH level dropped significantly ($P<0.05$), and the AMH and E_2 levels increased significantly ($P<0.05$); the levels of TG and TC decreased markedly ($P<0.05$), the HDL level increased significantly ($P<0.05$), and the LDL level dropped markedly ($P<0.05$). In the EA group, the expression of FSHR, PCNA, and ki67 was up-regulated after the intervention. EA intervention activated the HIPPO/YAP pathway, promoting the proliferation of GCs and inhibiting the apoptosis of GCs. **Conclusion** EA may improve ovarian function by regulating the Hippo/YAP way, and EA can promote the proliferation and suppress the apoptosis of GCs via the Hippo/YAP pathway.

[Key words] Electroacupuncture; Premature ovarian failure; Hippo/YAP pathway; Proliferation; Apoptosis; Mice

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指女性在青春期后到 40 岁之前由于各种原因导致卵巢内卵泡破坏或耗竭而发生卵巢功能衰竭, 引起促性腺激素水平升高、雌激素水平下降, 表现为闭经、不孕, 并可能伴有一系列围绝经期症状的一类妇科疾病, 对育龄期妇女生殖健康构成严重威胁。欧洲胚胎与生殖学会给出的诊断标准为闭经或者少经至少 4 个月, 间隔至少 4 周的两次卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 水平均大于 25 IU/L^[1]。流行病学调查显示 POF 的发病率在 20 岁之前的女性中每 10 000 名女性有 1 人发病, 30 岁之前的女性中每 1 000 名女性有 1 人发病, 在 40 岁之前的女性中每 100 名女性就有 1 人发病^[2-3]。

针灸作为中医独特的治疗方式, 具有安全有效、不良反应少等特点, 在临床治疗卵巢早衰中也有着较为突出的疗效。针灸治疗能改善提高患者的雌二醇 (estradiol, E_2) 水平, 降低 FSH 与黄体生成素

(luteinizing hormone, LH), 改善围绝经期症状, 恢复卵巢组织正常形态, 且无明显不良反应, 其机制与针灸调节下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus-pituitary-ovarian axis, HPOA)、神经-免疫-内分泌的网络调节、有关信号通路的调控改变有关^[4-6]。

Hippo 通路及其下游效应因子转录协同激活因子 Yes 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP) 和具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 具有调控动物发育和再生过程中的器官生长和细胞可塑性的功能^[7]; 卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 在卵巢中为卵泡发育提供必要的物理支持和微环境, 在维持女性生育能力方面发挥着关键作用^[8]; 调节 Hippo 通路影响颗粒细胞自噬、增殖与抑制凋亡^[9-10]。本研究通过电针治疗高脂高糖诱导的 POF 小鼠, 观察其对小鼠卵巢功能与脂代谢水平的影响, 探究其调控 Hippo/YAP 通路可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45 只 C57BL/6 雌性小鼠, 体质量(18 ± 2) g, 由上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院动物实验中心提供, 动物许可证号为 SYXK(沪)2019-0028, 光周期为 12 h 暗/12 h 亮, 湿度为(60 ± 10)%, 小鼠适应性饲养 1 周。实验方案由上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院动物伦理委员会批准(2020AW126)。

1.2 主要试剂与仪器

p-YAP 抗体(AF3328)、YAP 抗体(AF6328)、TEAD1 抗体(DF3141)、TAZ 抗体(DF4653)、MST1 抗体(DF7691)、GAPDH 抗体(AF7021)、PCNA 抗体(AF0239)均购于 Affinity Biosciences; Ki67(PB9026, 博士德); BA 抗体(2772)、BCL2 抗体(3498)、HRP 标记的小鼠来源二抗(7076)、HRP 标记的兔来源二抗(7074)均购于 Cell Signaling Technology; 卵泡刺激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)抗体(22665-1-AP, Proteintech); 山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 555, ab150078); 山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 647, ab150115); Fluoroshield™ 封固剂(含 DAPI) (Sigma, F6057); 抗苗勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH) 酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒(JM-0739H1)、E₂ 的 ELISA 试剂盒(JM-02849M2)、FSH 的 ELISA 试剂盒(JM-02838M1)、甘油三酯(triglyceride, TG) ELISA 试剂盒(JM-03100M2)、总胆固醇(serum total cholesterol, TC) ELISA 试剂盒(JM-02912M2)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL) ELISA 试剂盒(JM-03081M2)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL) ELISA 试剂盒(JM-03106M2)均购于江苏晶美生物科技有限公司; HyperPure RNA Isolation Kit(TQ301-01)、EasyZol Reagent (TQ102)、HyperScript III RT SuperMix for 荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) (R102)、2x S6 Universal SYBR qPCR(Q204)均购于新贝生物科技有限公司; 异氟烷(瑞普生物药业有限公司); 高脂饲料(Research diets, D12492); SDZ-V 电针灸仪(苏州医疗用品厂有限公司); 正置光学显微镜(Nikon Eclipse Ci-L, 日本尼康); 成像系统(Nikon DS-Fi2, 日本尼康)。

1.3 模型制备

造模方法参照参考文献^[11], 45 只 C57BL/6 雌性小鼠被随机分为 3 组, 对照组(wild type, WT)、卵巢早衰组(premature ovarian failure, POF)和电针治疗组(electroacupuncture, EA), 每组 15 只。POF 组和 EA 组喂食高脂饮食(8 g/kg)并每天灌胃 1 次 200 μ L 的 30%乳果糖, 持续 8 周。WT 组小鼠每天喂食正常饮食, 并接受 200 μ L 生理盐水灌胃, 持续 8 周。造模完成后, 以 FSH 水平升高, E₂ 和 AMH 水平降低、各级卵泡显著减少及闭锁卵泡增多表明 POF 模型构建成功。

1.4 干预方法

EA 组小鼠在关元穴及双侧足三里和三阴交穴进行为期 4 周的电针干预, 每次 30 min, 隔日 1 次。采用直径 0.18 mm、长 13 mm 的针灸针, 进针深度为 2~5 mm, 然后连接到 SDZ-V 电针, 使用频率为 1~3 Hz 和 0.1~1 mA 强度的连续波刺激小鼠^[12]。

1.5 指标检测

通过吸入 3%异氟烷对小鼠进行终末麻醉, 并将小鼠颈椎离断处死。确认死亡后立即进行心脏穿刺采血, 以 3 000 r/min 的速度离心 15 min, 离心后将获得的血清放置在 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存; 将小鼠放置在冰上取双侧卵巢组织, 将游离于卵巢的附着脂肪去除, 对取出的卵巢称重记录, 然后将部分卵巢于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存备用, 用于组织病理学实验的卵巢放入 4%的多聚甲醛中固定后备用。

1.5.1 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)染色观察 POF 小鼠卵巢病理形态

将所有新鲜组织在室温下用 4%多聚甲醛浸泡 30 min; 组织经乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋, 然后将组织切片(厚度为 6 μ m)并浸泡在二甲苯中进行脱蜡; 组织切片用苏木精-伊红染色, 最后用二甲苯清洗, 并用中性树脂密封, 在正置光学显微镜下观察卵巢形态特征并计数正常卵泡数与闭锁卵泡数。

1.5.2 马松染色(Masson)观察小鼠卵巢纤维化

切片常规脱蜡至水, 用 Weigert 铁苏木素染色液染色 10 min; Masson 蓝化液返蓝 5 min; 丽春红品红染色液染色 10 min; 95%乙醇快速脱水; 无水乙醇脱水 3 次, 每次 10 s; 二甲苯透明 3 次, 每次 2 min; 用中性树脂密封, 在正置光学显微镜下观察卵巢纤维化程度。

1.5.3 菲律宾染色(filipin)检测小鼠卵巢总胆固醇

将卵巢组织切片放进 60 $^{\circ}$ C 烘箱, 孵育 30 min, 水

解液铺满整个样品表面,室温下孵育 1 h,小心移去水解液,加入清理液清洗样品表面,移去清理液后加上抗干扰液,铺满整个切片样品表面,室温下孵育 10 min,移去切片上的抗干扰液后加上染色液,铺满整个切片表面,室温下避免孵育 30 min,清洗样品表面,在荧光显微镜下观察胆固醇阳性呈现蓝色荧光。

1.5.4 ELISA 检测小鼠血清 FSH、AMH、E₂ 激素水平与 TG、TC、HDL、LDL 脂代谢水平

分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂)和待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;每孔加入酶标试剂 100 μ L,空白孔除外;用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 min;将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用;小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干;每孔先加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min;每孔加终止液 50 μ L 终止反应;以空白孔调零,根据试剂盒说明书波长依序测量各个指标的吸光度(OD 值);测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

1.5.5 免疫荧光染色检测小鼠卵巢 FSHR、PCNA、Ki67 表达

石蜡组织切片在 60 $^{\circ}$ C 的烤箱中烘烤 30 min,然后浸入二甲苯溶液中,在摇床上摇晃 10 min,重复 3 次。结束后,将切片浸入无水乙醇溶液中,然后用双蒸水清洗切片,并将其置于煮沸的抗原修复溶液中,自然冷却后再重新加热溶液并将切片放回沸腾的溶液中,待自然冷却后取出切片,用双蒸水清洗 2 min,然后在 37 $^{\circ}$ C 的烘箱中干燥 5 min。将切片完全暴露于封闭液中,并在 37 $^{\circ}$ C 的烘箱中孵育 1 h 后用一抗(1:200)在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 冲洗后加入对应的二抗(1:200),37 $^{\circ}$ C 烘箱中孵育 1 h。孵育结束后使用 TBST 溶液洗涤。最后在切片上滴加含有 DAPI 组织封片剂,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,后续在荧光显微镜下观察。

1.5.6 逆转录定量实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 Hippo/YAP 通路及凋亡相关基因 mRNA 表达

利用 Trizol 方法提取总 RNA,然后将提取的 1 000 ng RNA 与 2 μ L 8x g DNA 去除剂和 RNAs ddH₂O

混合,形成 16 μ L 反应体系,并在 42 $^{\circ}$ C 下加热 2 min。然后加入 4 μ L 5x RT SuperMix,并在 37 $^{\circ}$ C 下逆转录 cDNA 15 min,在 85 $^{\circ}$ C 下逆转录 5 s。配置一个 20 μ L 的 PCR 反应系统,其中包括 10 μ L 2x S6 Universal SYBR qPCR 混合液,0.4 μ L 前引物,0.4 μ L 后引物,7.2 μ L ddH₂O,和 2 μ L 提取的 RNA。逆转录反应采用 QuantStudio 6 Flex 实时荧光 PCR 系统,首先在 95 $^{\circ}$ C 下预变性 30 s,然后在 95 $^{\circ}$ C 下变性 10 s,退火和延伸 30 s,最后将溶解曲线反应程序设置为 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 30 s 和 95 $^{\circ}$ C 15 s。以 18S rRNA 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法求出各个基因 mRNA 的相对表达量。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	产物长度
PCNA	F-CAAGTGGAGAGCTTGGCAATGG	112 bp
	R-GCAAACGTTAGGTGAACAGGCTC	
MST1	F-CCTTGGTGCTTCACATCTCGAC	122 bp
	R-GAGCCACGATACTGTTTACCTG	
TAZ	F-GTCACCAACAGTAGCTCAGATCC	129 bp
	R-GTTGCTGAGGAAGTCTTCTGGAG	
TEAD1	F-TCCGCTTTCCTTGAACAGCAGAG	92 bp
	R-GGGTCACTGTAAGAATGGTTGGC	
YAP1	F-CCAGACGACTTCTCAACAGTG	149 bp
	R-GCATCTCCTTCCAGTGTGCCAA	
BAX	F-AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	103 bp
	R-TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA	
BCL2	F-CCGGGAGAACAGGTATGATAAC	94 bp
	R-GCATCTCCAGCATCCACTC	
18S rRNA	F-GTAACCCGTTGAACCCATT	151 bp
	R-CCATCCAATCGTAGTAGCG	

1.5.7 Western blot 检测 Hippo/YAP 通路及凋亡相关蛋白表达

将从小鼠卵巢提取的总蛋白,使用 BCA 法对蛋白浓度进行测定,然后通过使用 10%的 SDS-PAGE 胶,每个上样孔加入 40 μ g 样品,在 SDS-PAGE 电泳液中进行电泳将样品目的蛋白进行分离,通过湿法转膜,使用转膜液将蛋白转至 PVDF 膜上,然后将 PVDF 膜进行封闭,封闭完成后 TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,然后加入一抗 p-YAP(1:1 000)、YAP(1:1 000)、TEAD1(1:1 000)、TAZ(1:1 000)、MST1(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,次日用 TBST 洗涤 3 次后使用二抗(1:1 000)在室温下

孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后,使用增强化学发光法显影液对目的蛋白进行显影。以 GAPDH 为内参,使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值定量分析。

1.6 统计学方法

使用 Graph Pad Prism 9 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以均数±标准差表示;如呈正态分布且方差齐,比较则用 t 检验和单因素方差分析(含多重比较);如果数据不呈正态分布,比较则用 Mann-Whitney 检验和 Kruskal-Wallis 检验(含多重比较)。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠卵巢组织形态与纤维化程度比较

HE 染色可见 WT 小鼠卵巢成熟卵泡,与 WT 比较,POF 小鼠卵巢闭锁卵泡增多,证明高脂高糖诱导小鼠卵巢早衰模型有效。EA 小鼠干预后卵巢成熟卵泡增多。Masson 染色显示 WT 小鼠卵巢组织未见明显纤维化;与 WT 比较,POF 小鼠卵巢纤维化程度增加。电针干预后有效改善了小鼠卵巢纤维化的程度。详见图 1。

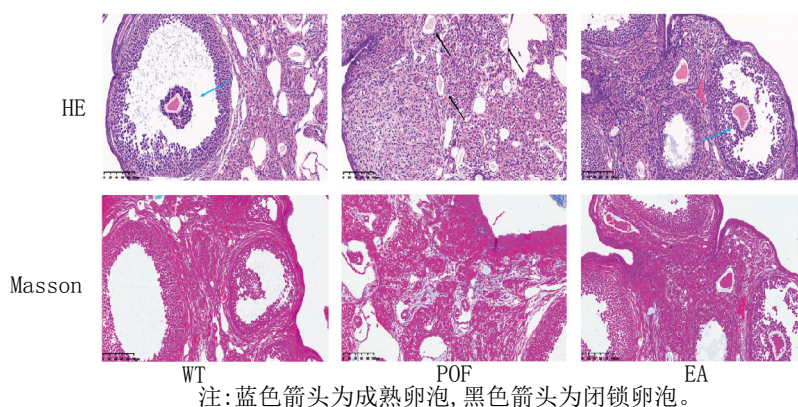


图 1 3 组小鼠卵巢组织形态与纤维化程度比较 (HE, $\times 200$; Masson, $\times 200$)

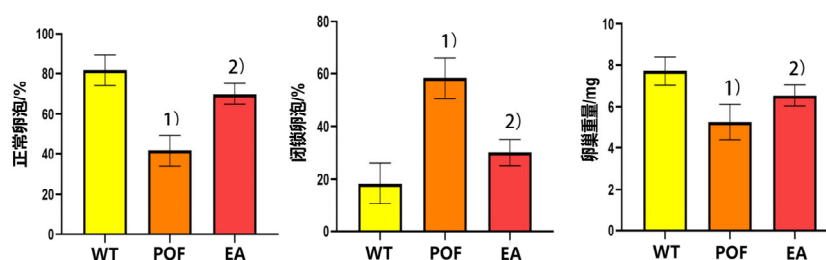


图 2 3 组小鼠正常卵泡数目、闭锁卵泡数目与卵巢重量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.2 3 组小鼠成熟卵泡数目、闭锁卵泡数目与卵巢重量比较

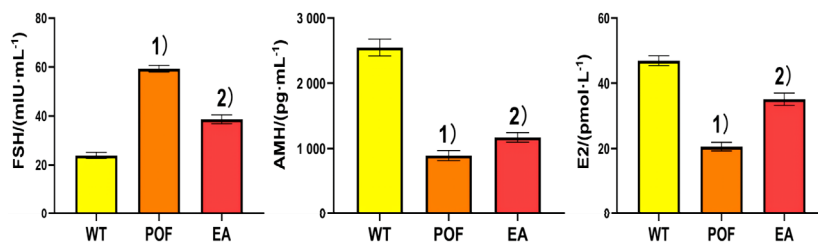
与 WT 比较,POF 小鼠正常卵泡数量比例降低 ($P<0.05$);与 POF 比较,EA 小鼠正常卵泡数量比例增加 ($P<0.05$)。与 WT 比较,POF 闭锁卵泡数量比例增加 ($P<0.05$);与 POF 比较,EA 小鼠闭锁卵泡数量比例降低 ($P<0.05$)。与 WT 比较,POF 小鼠卵巢重量显著降低 ($P<0.05$);与 POF 比较,EA 小鼠干预后卵巢重量增加 ($P<0.05$)。详见图 2。

2.3 3 组小鼠性激素水平比较

与 WT 比较,POF 小鼠 FSH 激素水平显著升高 ($P<0.05$), AMH 激素水平显著降低 ($P<0.05$), E_2 激素水平显著降低 ($P<0.05$)。电针干预后则能显著改善小鼠血清激素水平,与 POF 小鼠比较,EA 小鼠 FSH 激素水平显著降低 ($P<0.05$), AMH 激素水平显著升高 ($P<0.05$), E_2 激素水平显著升高 ($P<0.05$)。详见图 3。

2.4 3 组小鼠卵巢颗粒细胞总胆固醇水平比较

FILIPIN 染色结果显示 POF 小鼠卵巢在高脂高糖诱导下颗粒细胞中含有大量胆固醇,在电针干预后染色胆固醇在颗粒细胞中的含量减少,提示电针干预能降低卵巢总胆固醇,减轻了高脂高糖对卵巢的损伤作用。详见图 4。



注:与 WT 比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与 POF 比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 3 3 组小鼠性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

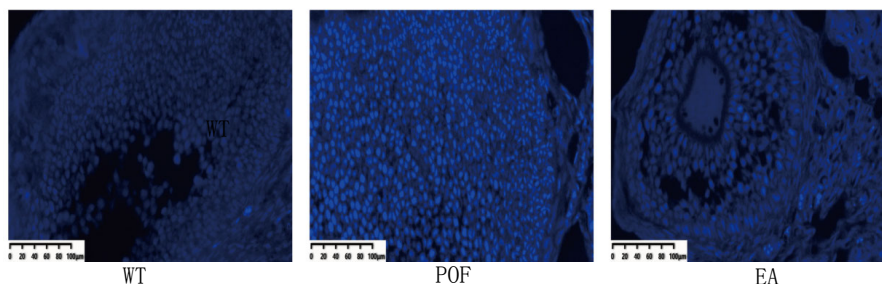
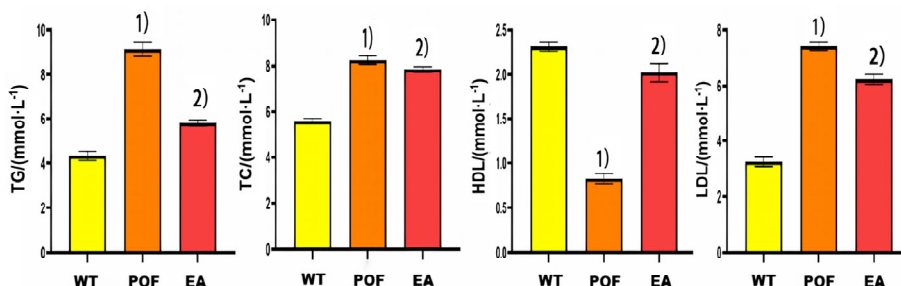


图 4 3 组小鼠卵巢总胆固醇比较 (filipin, $\times 400$)

2.5 3 组小鼠血清 TG、TC、HDL 和 LDL 水平比较

与 WT 小鼠比较, POF 小鼠血清 TG 显著上升 ($P < 0.05$), 血清 TC 显著上升 ($P < 0.05$), 血清 HDL 显著下降 ($P < 0.05$), 血清 LDL 显著上升 ($P < 0.05$); 与 POF

小鼠比较, EA 小鼠血清 TG 显著下降 ($P < 0.05$), TC 显著下降 ($P < 0.05$), HDL 显著上升 ($P < 0.05$), LDL 显著下降 ($P < 0.05$)。提示电针干预能改善小鼠的整体脂代谢水平。详见图 5。



注:与 WT 比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与 POF 比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 5 3 组小鼠血清 TG、TC、HDL、LDL 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.6 3 组小鼠 FSHR 蛋白表达比较

免疫荧光染色结果显示, 与 WT 比较, POF 小鼠卵巢中正常生长功能的 GCs 数降低; 与 POF 小鼠比较, EA 组在电针治疗后正常生长功能的 GCs 数升高。因此电针治疗改善了卵泡的生成和卵巢功能。详见图 6。

2.7 3 组小鼠 Ki67 蛋白表达比较

Ki67 是用于检测增殖细胞的最常规分子标志物, 定位于细胞核。利用免疫荧光染色标记 Ki67 结果显示, 与 WT 小鼠比较, POF 小鼠的 GCs 增殖能力下降; 与 POF 小鼠比较, EA 小鼠颗粒细胞在电针治疗后相对恢复了 POF 小鼠 GCs 的增殖能力。因此电针治疗能有助于卵泡与卵巢功能的恢复。详见图 7。

2.8 3 组小鼠 PCNA 蛋白表达比较

PCNA 同样是用于检测增殖细胞的常规分子标志

物, 定位于细胞核。免疫荧光染色结果显示, 与 WT 小鼠比较, POF 小鼠的 GCs 增殖能力下降; 与 POF 小鼠 GCs 相比, 电针干预后相对恢复了 POF 小鼠的 GCs 的增殖能力。提示电针干预能有助于卵泡与卵巢功能的恢复。详见图 8。

2.9 3 组小鼠卵巢 MST1、YAP、TEAD1、TAZ、PCNA、BAX 和 BCL2 mRNA 表达水平比较

与 WT 小鼠比较, POF 小鼠卵巢 MST1 mRNA 显著增多 ($P < 0.05$), YAP mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), TEAD1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), TAZ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 POF 小鼠比较, EA 小鼠卵巢 MST1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), YAP mRNA 表达水平显著增多 ($P < 0.05$), TEAD1 mRNA 表达水平显著增多 ($P < 0.05$), TAZ mRNA

表达水平显著增多 ($P < 0.05$)。与 WT 小鼠比较, POF 小鼠卵巢 PCNA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 POF 小鼠比较, EA 小鼠卵巢 PCNA mRNA 表达水平显著增多 ($P < 0.05$)。与 WT 小鼠比较, POF 小鼠卵巢凋亡促进基因 BAX mRNA 表达水平显著增多 ($P < 0.05$), 凋亡抑制基因 BCL2 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 POF 小鼠比较, EA 小鼠卵巢凋亡促进基因 BAX mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 凋亡抑制基因 BCL2 mRNA 表达水平显著增多 ($P < 0.05$)。详见图 9。

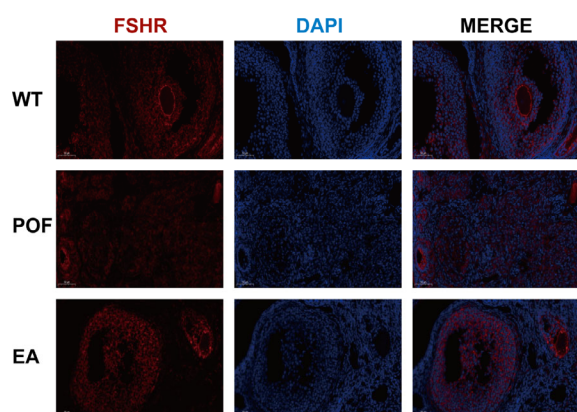


图 6 3 组小鼠 FSHR 表达水平比较 ($\times 400$)

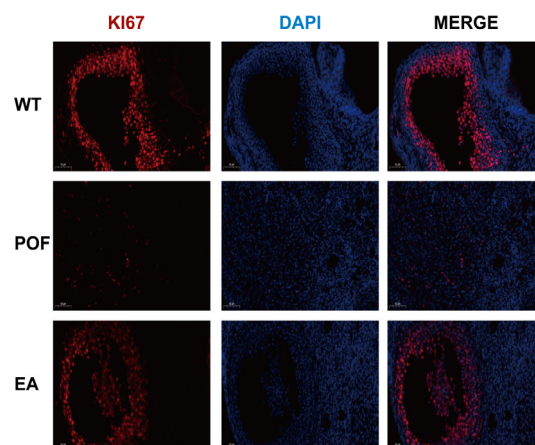


图 7 3 组小鼠 Ki67 蛋白表达水平比较 ($\times 400$)

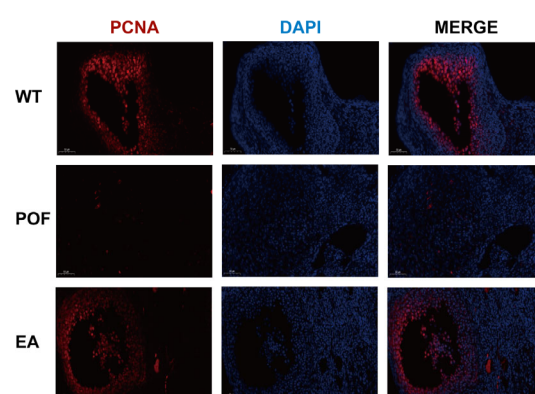
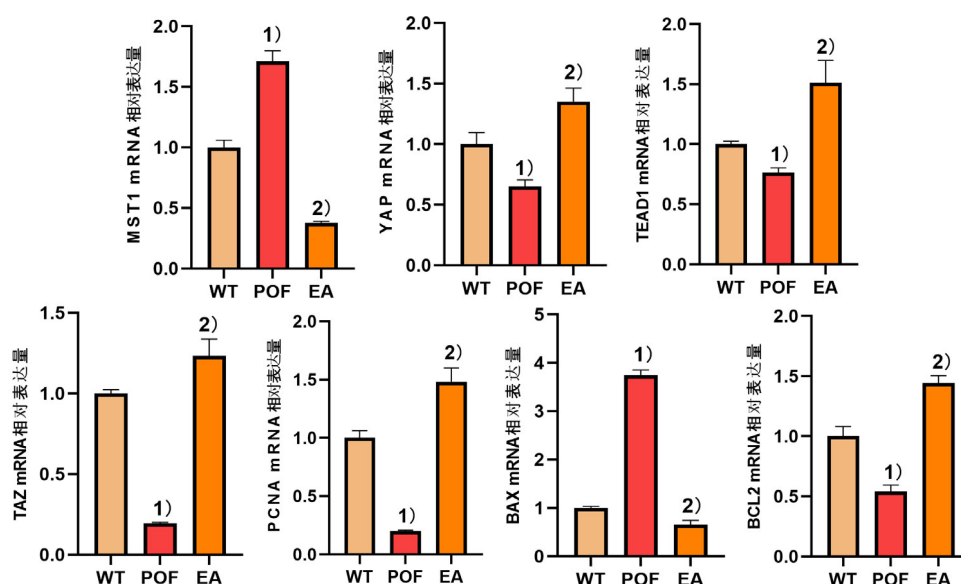


图 8 3 组小鼠 PCNA 蛋白表达水平比较 ($\times 400$)



注:与 WT 比较 ¹⁾ $P < 0.05$; 与 POF 比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 9 3 组小鼠卵巢 MST1、YAP、TEAD1、TAZ、PCNA、BAX 和 BCL2 mRNA 表达水平比较 ($n=6$)

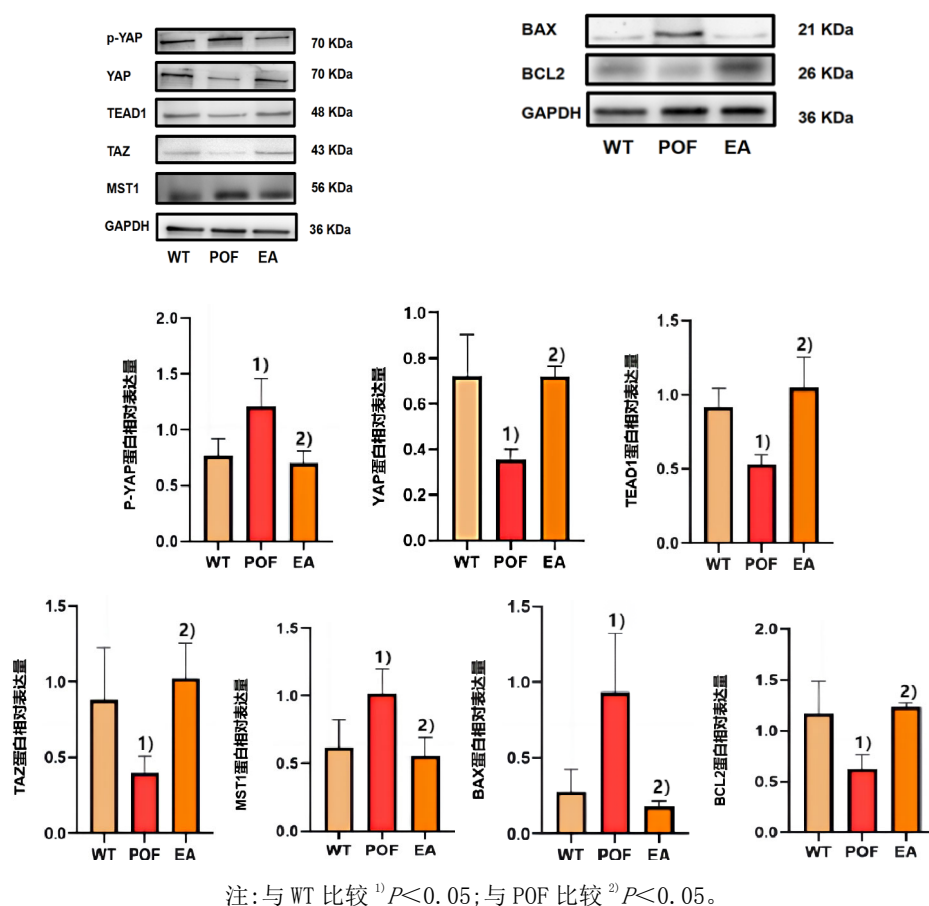
2.10 3 组小鼠卵巢 p-YAP、YAP、TEAD1、TAZ、MST1、BAX 和 BCL2 蛋白表达水平比较

与 WT 比较, POF 卵巢 p-YAP ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多, YAP ($P < 0.05$) 蛋白表达显著降低, TEAD1 ($P < 0.05$) 蛋白表达显著降低, TAZ ($P < 0.05$) 蛋白表达

显著降低, MST1 ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多; 与 POF 比较, EA 卵巢 p-YAP ($P < 0.05$) 蛋白表达显著降低, YAP ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多, TEAD1 ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多, TAZ ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多, MST1 ($P < 0.05$) 蛋白表达降低。Western blot 结果

发现凋亡相关基因蛋白表达也同时发生了改变,与 WT 比较,POF 卵巢 BAX ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多, BCL2 ($P < 0.05$) 蛋白表达显著降低;与 POF 比较, EA

卵巢 BAX ($P < 0.05$) 蛋白表达显著降低, BCL2 ($P < 0.05$) 蛋白表达显著增多。详见图 10。



注:与 WT 比较 ¹⁾ $P < 0.05$;与 POF 比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

图 10 3 组小鼠卵巢 p-YAP、YAP、TEAD1、TAZ、MST1、BAX 和 BCL2 蛋白表达水平比较 ($n=3$)

3 讨论

卵巢早衰 (POF) 的发生发展尚不完全清楚,可能与遗传学、免疫、酶缺乏、化疗、环境及医源性因素有关。当前常见的 POF 治疗手段包括激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT)、原始卵泡细胞体外激活技术 (in-vitro activation, IVA) 和干细胞疗法,但这些疗法都有其局限性与不完善的方面,其中 HRT 为临床最常见的治疗手段,但因雌激素治疗有其相应的适应证与禁忌证,乳腺癌、肝损伤、血管栓塞、不明原因阴道出血等都不适合运用 HRT 治疗^[3,13],且长期使用激素可导致子宫出血及乳腺类疾病的发生。IVA 技术妊娠的成功率存在着不确定性且该技术对年龄相关的卵母细胞质量下降无益,在 8 项相关 IVA 临床治疗研究中,IVA 技术患者妊娠成功率在 1.25% 到 60% 不等^[14];干细胞疗法常因异体干细胞免疫排斥与自体干细胞的来源不足,侵入性手术等原因具有局限性^[15]。

中医学认为,肾为先天之本,唯有肾气充盛才可使

生育功能正常运行,反之,肾气虚衰则可致卵巢早衰,最终闭经。关元是调控人体生殖的元气关藏之处,具有补益元气、培肾固本的作用。现代研究表明,针刺关元穴产生的信号会沿着一定的外周和中枢径路逐步传导到脑的高级部位,进而启动免疫-神经-内分泌网络系统,从而恢复卵巢的正常机能^[16]。三阴交为交会穴,同调脾、肝、肾三脏,具有健脾、疏肝、补肾的作用。足三里,胃之下合穴,合穴是胃腑之气在下肢部相合之处,经气由此深入于胃腑之处,具有健脾和胃、补虚强壮的功效。脾胃运化功能正常,则气血充足,肾精化生有源,胞宫得养。过往研究显示,针刺足三里能够提高老年雌性大鼠卵巢组织自身抗氧化能力,延缓卵巢组织的衰老^[17]。还有临床研究表明,针灸治疗 POF 的有效率超过 85% 且不良反应少,在调节糖脂代谢控制肥胖方面更是具有得天独厚的优势^[18]。本研究实验结果表明电针 (关元-足三里-三阴交) 治疗高脂高糖饮食诱导的 POF 具有一定疗效,电针治疗后,POF 小鼠的性激素水平明显

恢复,闭锁卵泡比例显著减少,成熟卵泡比例增多。

中国女性的生活环境、饮食习惯、生活节律以及社会压力等因素发生改变,其中以高脂高糖饮食习惯变化尤为明显。高脂高糖饮食会诱发卵巢的脂质过氧化状态,脂质过氧化物(LPO)、丙二醛(MDA)、超氧阴离子和羟自由基等氧化物含量升高,而超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、腺苷三磷酸等抗氧化物降低^[11-19]。卵巢活性氧水平升高形成大量超氧阴离子,并且腺苷三磷酸水平降低,诱导线粒体 DNA(mtDNA)损伤并导致核 DNA 断裂和卵母细胞凋亡^[20];因此过往许多基础研究证明,电针治疗卵巢早衰具有良好的治疗效果,电针对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响可能是减弱小鼠 POF 的机制之一^[21],能有效抑制 POF 小鼠卵巢氧化应激、 Fe^{2+} 的积累、肠道微生物群的改变可能是电针治疗的潜在机制之一^[22],可改善卵巢功能,调节 POF 引起的肝肾代谢紊乱^[23]。本研究发现高脂高糖诱导的小鼠 POF 模型,小鼠脂代谢水平发生异常,GCs 颗粒细胞富含了大量胆固醇,但在电针穴位刺激一段时期后,小鼠整体脂代谢水平发生改善,发现在小鼠卵巢中 GSs 细胞在电针的治疗后,细胞中总胆固醇含量下降;其可能原因是过量的胆固醇引起 ROS 以及脂质过氧化标志物 MDA 等生成增加,同时耗竭超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等进一步导致氧化应激增强,而电针治疗则缓解了这一进程。

在 POF 中,卵巢生理功能和生殖能力受到卵巢卵泡功能障碍或耗竭的伤害。颗粒细胞和卵母细胞是卵泡的组成部分。颗粒细胞在卵泡进化,激活和功能中起着关键作用,GCs 的过度凋亡是滤泡闭锁的关键机制,可引发卵泡功能障碍和卵巢生理变化,这表明促进颗粒细胞的增殖可以挽救受损的卵巢结构和功能^[10];哺乳动物中 Hippo 通路的核心包括激酶级联、MST1/2 和 LATS1/2,以及下游效应器、转录辅激活剂 YAP 和 TAZ^[24]。Hippo 通路的这些核心成分控制着涉及细胞增殖、存活、移动、干性和分化的转录程序^[25-26],在卵泡发生中,Hippo 通路通过调节原始卵泡发育和 GC 增殖起着至关重要的作用;YAP、TEAD 和 TAZ 水平升高以及 MST1 和 LATS1/2 水平抑制可促进卵巢卵泡发育^[27]。目前尚未有关于电针调控 Hippo/YAP 通路治疗 POF 的研究,过往研究发现通过 Lnc826 介导的 Hippo 通路调节小胶质细胞极化是电针治疗缺血性脑损伤的一个可能机制^[28]。本研究中,电针干预 POF 小鼠后,FSHR 在颗粒

细胞中的表达增高,FSHR 是 GCs 在调节卵泡功能和活性方面发挥重要作用的关键分子,这提示电针通过调节颗粒细胞改善了卵巢的功能和活性;本研究还发现在增殖标志物 Ki67,PCNA 和凋亡标志物 BAX、BCL2 在免疫荧光、RT-qPCR、Western blot 实验均证明在电针干预下促进了 GCs 增殖能力与抗凋亡水平,改善了高脂高糖对 GCs 的损伤,从而提高卵泡的活性。为了探究电针改善卵巢功能的具体机制本研究继续利用 RT-qPCR、Western blot 实验检测了 Hippo 通路的关键基因,发现在电针干预下能调控 Hippo 通路的关键分子。因此,调节 Hippo 通路是电针改善卵巢功能恢复、激活颗粒细胞增殖和刺激卵泡生长的潜在机制。

综上所述,电针可能通过调节 Hippo/YAP 通路从而改善了卵巢的功能并且通过 Hippo/YAP 通路促进了 GCs 的增殖与抗凋亡能力,因此为电针作为一种安全的治疗 POF 方法提供了基础理论依据。但本实验仍有不足之处,本实验中没有利用原代细胞进行细胞水平层面的验证,设计中缺少回复性实验,电针具体如何调节 Hippo 通路的机制尚不得而知,需要进一步的研究。

参考文献

- [1] THE ESHRE GUIDELINE GROUP ON POI, L WEBBER, M DAVIES, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency[J]. *Hum Reprod*, 2016(5):926-937.
- [2] COULAM C B, ADAMSON S C, ANNEGERS J F. Incidence of premature ovarian failure[J]. *Obstet Gynecol*, 1986(4):604-606.
- [3] MARYAM G, ELHAM G, YALDA J, et al. Premature ovarian failure and tissue engineering[J]. *J Cell Physiol*, 2020(5):4217-4226.
- [4] 张晓静,冶尔西,季德江,等.近 5 年卵巢早衰的发病机制及中西医治疗进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2022(12):79-82.
- [5] 袁士鑫,周艳丽,刘江涛,等.针灸治疗肾虚血瘀型卵巢早衰[J]. *中医学报*, 2022(11):2452-2456.
- [6] 崔华,杨文韬,程光宇,等.针刺调控不同信号通路改善帕金森病的研究进展[J]. *中医学报*, 2023(11):2339-2346.
- [7] MOYA I M, HALDER G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine[J]. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol*, 2019(4):211–226.
- [8] MARUO T, LAOAG-FERNANDEZ J B, TAKEKIDA S, *et al.* Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis during follicular development[J]. *Gynecol Endocrinol*, 1999(6):410–419.
 - [9] HAN S, ZHAO X, 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(2):102374.
 - [10] LI Z, ZHANG M, ZHENG J, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes improve ovarian function and proliferation of premature ovarian insufficiency by regulating the hippo signaling pathway[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021(12):711902.
 - [11] LIU T, JING F, HUANG P, *et al.* Thymopentin alleviates premature ovarian failure in mice by activating YY2/Lin28A and inhibiting the expression of let-7 family microRNAs[J]. *Cell Prolif*, 2021(8):e13089.
 - [12] GENG Z, LIU P, YUAN L, *et al.* Electroacupuncture attenuates ac4C modification of P16 mRNA in the ovarian granulosa cells of a mouse model premature ovarian failure [J]. *Acupunct Med*, 2023(1):27–37.
 - [13] LIN J, LI XL, SONG H, *et al.* A general description for Chinese medicine in treating premature ovarian failure[J]. *Chin J Integr Med*, 2017(2):91–97.
 - [14] WANG W, TODOROV P, ISACHENKO E, *et al.* In vitro activation of cryopreserved ovarian tissue: a single-arm meta-analysis and systematic review[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2021:258–264.
 - [15] LIU M, QIU Y, XUE Z, *et al.* Small extracellular vesicles derived from embryonic stem cells restore ovarian function of premature ovarian failure through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020(1):3.
 - [16] 张慧, 张露芬, 李晓泓, 等. 逆针关元穴对自然更年期大鼠超氧化物歧化酶和一氧化氮合酶活性的调节[J]. 中国临床康复, 2005(31):147–149.
 - [17] 白巍, 姜国华, 徐强, 等. 针刺足三里、关元穴对更年期雌性大鼠卵巢 NO、SOD、MDA 含量影响[J]. 中医药学报, 2009(6):90–91.
 - [18] 袁龙, 刘鹏, 李冰融, 等. 针灸相关疗法治疗卵巢早衰疗效的网状 Meta 分析 [J]. 上海中医药杂志, 2022(1):19–27.
 - [19] ZHU X, LIU J, PAN H, *et al.* Thymopentin treatment of murine premature ovarian failure via attenuation of immune cell activity and promotion of the BMP4/Smad9 signalling pathway[J]. *Int J Med Sci*, 2021(15):3544–3555.
 - [20] DEVINE J P, PERREAULT D S, LUDERER U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity[J]. *Biol Reprod*, 2012(2):27.
 - [21] ZHANG H, QIN F, LIU A, *et al.* Electro-acupuncture attenuates the mice premature ovarian failure via mediating PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Life Sciences*, 2018:217169–217175.
 - [22] GENG Z, NIE X, LING L, *et al.* Electroacupuncture may inhibit oxidative stress of premature ovarian failure mice by regulating intestinal microbiota[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022:4362317.
 - [23] CHEN M, HE Q D, GUO J J, *et al.* Electro-acupuncture regulates metabolic disorders of the liver and kidney in premature ovarian failure mice[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022(13):882214.
 - [24] YU Y S, SUI H S, HAN Z B, *et al.* Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors[J]. *Cell Res*, 2004(4):341–346.
 - [25] MA S, MENG Z, CHEN R, *et al.* The hippo pathway: biology and pathophysiology[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019(1):577–604.
 - [26] HU L L, SU T, LUO R C, *et al.* Hippo pathway functions as a downstream effector of AKT signaling to regulate the activation of primordial follicles in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019(2):1578–1587.
 - [27] FU M, HU Y, LAN T, *et al.* The hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022(1):376–376.
 - [28] CHEN S, WANG L, YUAN Y *et al.* Electroacupuncture regulates microglia polarization via lncRNA-mediated hippo pathway after ischemic stroke[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2023(9):11–17.