[文章编号] 1671-587X(2026)04-1043-08 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260416

白藜芦醇对女性卵巢颗粒细胞功能的调控作用和调控过程中SIRT1的作用机制

柯 慧，颜礼征，张 宇，毛记龙，姚宇飞
[海南医科大学第一附属医院，生殖健康及相关疾病研究与转化教育部重点实验室，海南省人类生殖与遗传重点实验室，海南省地方病（地中海贫血）临床医学研究中心，生殖医学中心，海南 海口 570102]

[摘 要] **目的：**探讨沉默信息调节因子1（SIRT1）对高龄女性卵巢颗粒细胞的调控作用，初步阐明SIRT1激活剂白藜芦醇（RESV）改善高龄女性卵巢颗粒细胞功能的机制。**方法：**纳入60例接受体外受精-胚胎移植（IVF-ET）的患者，包括30例高龄患者（高龄组，年龄≥40岁）和30例非高龄患者（非高龄组，年龄＜35岁）。采用密度梯度离心法收集高龄组和非高龄组女性患者卵泡液中的颗粒细胞样本各30例，每例高龄女性卵巢颗粒细胞分为对照组、RESV组和EX527（SIRT1抑制剂）组，对照组颗粒细胞不使用药物处理，RESV组颗粒细胞置于含100 μmol·L^{-1} RESV培养液中培养48 h，EX527组颗粒细胞置于含EX527的培养液中培养48 h，胰酶消化后收集颗粒细胞。采用实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测各组细胞中*SIRT1*、类固醇激素合成急性调节蛋白（*stAR*）、细胞色素P450家庭19（*CYP19*）和细胞色素P450家族17（*CYP17*）mRNA表达水平，Western blotting法检测各组细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3（Caspase-3）和B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）蛋白表达水平，化学发光法检测人绒毛膜促性腺激素（HCG）注射日各组细胞培养液中雌二醇水平，脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记（TUNEL）法检测各组细胞凋亡率。**结果：**RT-qPCR法，与非高龄组比较，高龄组患者颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）。与对照组比较，RESV组患者颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平均升高（$P<0.05$），EX527组患者颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）。与对照组比较，RESV组患者颗粒细胞中*StAR*、*CYP19*和*CYP17* mRNA及蛋白表达水平升高（$P<0.05$），EX527组患者颗粒细胞中*StAR*、*CYP19*和*CYP17* mRNA及蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。化学发光法，与对照组比较，RESV组患者颗粒细胞培养液中雌二醇水平升高（$P<0.05$），EX527组患者颗粒细胞培养液中雌二醇水平降低（$P<0.05$）。TUNEL法和Western blotting法，与对照组比较，RESV组患者颗粒细胞凋亡率降低（$P<0.05$），颗粒细胞中Bcl-2蛋白表达水平升高（$P<0.05$），Caspase-3蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；EX527组颗粒细胞凋亡率升高（$P<0.05$），颗粒细胞中Bcl-2蛋白表达水平降低（$P<0.05$），Caspase-3蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。**结论：**高龄女性卵巢颗粒细胞中SIRT1表达降低。RESV通过促进高龄女性颗粒细胞中SIRT1表达，从而抑制颗粒细胞凋亡，增加颗粒细胞中类固醇激素合成酶表达，促进颗粒细胞合成雌二醇。

[关键词] 沉默信息调节因子1；高龄；颗粒细胞；细胞凋亡；白藜芦醇
[中图分类号] R711.75 [文献标志码] A

[收稿日期] 2024-08-24 [录用日期] 2024-10-04
[基金项目] 海南省科技厅自然科学基金项目（821RC702）；海南省卫健委省级临床医学中心项目（2021）；海南省科技厅院士创新平台科研项目（2022）
[作者简介] 柯 慧（1987－），女，海南省海口市人，副主任医师，医学博士，主要从事高龄女性卵巢功能和卵巢低反应方面的研究。
[通信作者] 柯 慧，副主任医师（E-mail：kehui_kh@163.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Regulation effect of resveratrol on ovarian granulosa cell function in females and mechanism of SIRT1 in regulation process

KE Hui, YAN Lizheng, ZHANG Yu, MAO Jilong, YAO Yufei
(Key Laboratory of Reproductive Health Diseases Research and Translation of Ministry of Education, Hainan Provincial Key Laboratory for Human Reproductive Medicine and Genetic Research, Hainan Provincial Clinical Research Center for Thalassemia, Department of Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital, Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the regulatory effect of silent information regulator 1 (SIRT1) on ovarian granulosa cells of advanced-age women, and to preliminarily clarify the mechanism by which SIRT1 activator resveratrol (RESV) improves the function of ovarian granulosa cells of advanced-age women. **Methods**: Sixty patients underwent *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) were enrolled, including 30 advanced-age patients (advanced age group, age ≥40 years) and 30 non-advanced-age patients (non-advanced age group, age <35 years). Density gradient centrifugation was used to collect the granulosa cell samples from follicular fluid of female patients in advanced age group (n=30) and non-advanced age group (n=30). The granulosa cells from each advanced-age female patient were divided into control group, RESV group, and EX527 (SIRT1 inhibitor) group. The granulosa cells in control group were treated without any drug; the granulosa cells in RESV group were cultured in medium containing 100 μmol·L^{-1} RESV for 48 h; the granulosa cells in EX527 group were cultured in medium containing EX527 for 48 h. After trypsin digestion, the granulosa cells were collected. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *SIRT1*, steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*), cytochrome P450 family 19 (*CYP19*), and cytochrome P450 family 17 (*CYP17*) mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of cysteine-containing aspartate protease 3 (Caspase-3) and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins in the cells in various groups; chemiluminescence method was used to detect the estradiol level in the cell culture medium of the cells in various groups on the day of human chorionic gonadotropin (HCG) injection; terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method was used to detect the apoptotic rate of the cells in various groups. **Results**: The RT-qPCR results showed that compared with non-advanced age group, the expression levels of *SIRT1* mRNA and protein in the granulosa cells of the patients in advanced age group were decreased (P<0.05). Compared with control group, the expression levels of *SIRT1* mRNA and protein in granulosa cells of the patients in RESV group were increased (P<0.05), while those in EX527 group were decreased (P<0.05). Compared with control group, the expression levels of *StAR*, *CYP19*, and *CYP17* mRNA and protein in granulosa cells of the patients in RESV group were increased (P<0.05), while those in EX527 group were decreased (P<0.05). The chemiluminescence method results showed that compared with control group, the estradiol level in granulosa cell culture medium of the patients in RESV group was increased (P<0.05), while that in EX527 group was decreased (P<0.05). The TUNEL method and Western blotting method results showed that compared with control group, the apoptotic rate of the granulosa cells of the patients in RESV group was decreased (P<0.05), the expression level of Bcl-2 protein in the granulosa cells was increased (P<0.05), and the expression level of Caspase-3 protein was decreased (P<0.05); compared with control group, the apoptotic rate of granulosa cells of the patients in EX527 group was increased (P<0.05), the expression

level of Bcl-2 protein in the granulosa cells was decreased ($P<0.05$), and the expression level of Caspase-3 protein was increased ($P<0.05$). **Conclusion**: The expression of SIRT1 in ovarian granulosa cells of advanced-age women is decreased. RESV inhibits granulosa cell apoptosis, increases the expression of steroidogenic enzymes in granulosa cells, and promotes estradiol synthesis in granulosa cells by promoting the expression of SIRT1 in granulosa cells of advanced-age women.

KEYWORDS　Silent information regulator 1; Advanced age; Granulosa cells; Apoptosis; Resveratrol

随着晚婚晚育现象的增多，高龄女性群体生育需求越来越大。女性的生育能力从35岁开始下降，并在40岁以后快速下降。高龄女性生育能力下降是卵巢衰老的结果。随着年龄的增长，女性卵巢中卵母细胞数量逐渐减少，同时还伴有卵母细胞质量的下降，从而导致受精失败和胚胎质量下降，妊娠率降低，流产率增加。因此，许多高龄女性需要接受体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)助孕，但同样面临着助孕成功率低下的问题。沉默信息调节因子1（silent information regulator 1，SIRT1）是依赖氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide＋，NAD＋）的去乙酰化酶，具有抗衰老、抗细胞凋亡、抗氧化、调节卵巢功能和女性生育能力等作用。SIRT1在人卵巢组织和颗粒细胞中表达。颗粒细胞凋亡会影响卵母细胞的生长因子和营养物质，导致卵母细胞凋亡。颗粒细胞的功能与卵母细胞的发育密切相关，影响卵母细胞质量。SIRT1参与调节颗粒细胞增殖和凋亡。

白藜芦醇（resveratrol，RESV）是目前活性最强的SIRT1激活剂，是一种天然的多酚化合物，主要存在于葡萄、花生、大豆和浆果中，在红葡萄皮中含量尤其丰富，具有广泛的生物学作用，包括抗炎、抗氧化、抗衰老、免疫调节、改善卵巢功能和影响卵巢颗粒细胞增殖、细胞凋亡及激素分泌[1]。接受IVF-ET助孕的高龄女性中，RESV在卵巢颗粒细胞功能调节中如何发挥作用尚未完全阐明。因此，探讨RESV对高龄女性卵巢颗粒细胞功能的调控作用和调控过程中SIRT1的作用机制，有助于高龄女性改善颗粒细胞功能、延缓卵巢衰老，提高生育力和IVF-ET助孕的成功率。

1　资料与方法

1.1　研究对象　选取2022年4－12月在海南医科大学第一附属医院生殖中心接受IVF-ET的60例符合标准的女性患者，包括30例高龄患者和30例非高龄患者。高龄患者入选条件：年龄≥40岁(高龄组)；非高龄患者纳入选：年龄＜35岁（非高龄组)。非高龄患者标准与高龄患者配对。2组患者排除标准：内分泌疾病和染色体异常。2组患者基本信息见表1。所有研究对象已签署知情同意书。该项目通过本院伦理委员会审批，伦理审批号：2021（科研）第（86）号。

表1　2组患者基本信息

Tab. 1　Basic informations of patients in two groups　($n=30$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Age(year)	AFC	AMH [ρ_B/(μg·L^{-1})]	E2 level on HCG day[c_B/(pmol·L^{-1})]	Number of oocytes
Non-advanced age	32.37±1.77	7.03±1.33	1.84±0.35	6 459±2 133	6.40±1.38
Advanced age	41.50±1.38*	6.93±1.46	1.77±0.42	5 500±1 459*	6.03±1.47

*$P<0.05$ *vs* non-advanced age group; AFC: Antral follicle count; AMH: Anti-Miillerian hormone; HCG: Human chorionic gonadotropin.

1.2　主要试剂和仪器　胎牛血清、胰酶（0.25% Trypsin-EDTA）和杜尔贝科改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM)/F-12营养混合物(nutrient mixture F-12，F12）培养液（美国Gibco公司），RESV粉末和EX527（SIRT1抑制剂）粉末（美国Sigma公司），淋巴细胞分离液（美国Pharmacia公司），TRIzol试剂（美国Ambion公司），B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3（cysteine-aspartic acid protease 3，Caspase-3）和PCR引物（金唯智生物科技有限公司），逆转录试剂盒（日本TaKaRa公司），抗体（美国Abcam公司），蛋白Marker（美国Thermo公司），增强化学发光试剂（美国Millipore公司），雌二醇化学发光法检测试剂盒（美国Beckman公司），脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记

（Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling，TUNEL）细胞凋亡检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）。逆转录PCR仪、离心机和蛋白质浓缩仪（美国Eppendorf公司），CO_2培养箱（日本SANYO公司），超声破碎仪（美国Cole Parmer公司），十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）垂直电泳槽（美国Bio-Rad公司），酶标仪（美国宝特公司），核酸蛋白质分析仪（美国Beckman公司），荧光显微镜（日本Olympus公司），凝胶成像仪（德国GE公司）。

1.3 卵巢刺激方案 高龄组和非高龄组患者均使用拮抗剂方案，达到标准时给予扳机，扳机后32～36 h取卵。获得患者知情同意，捡卵后收集卵泡液。

1.4 卵泡液颗粒细胞培养 采用密度梯度离心法分离提纯卵泡液中的颗粒细胞。将收集的卵泡液在室温下200 g离心5 min。吸去上清，加入含0.2%透明质酸酶的磷酸盐缓冲液（phosphated buffer saline，PBS），室温下作用30 min。吸取细胞悬液置于淋巴细胞分离液表面，室温下150 g离心20 min后收集位于中间白色层的颗粒细胞。选用含10%牛血清的DMEM/F12培养液，37 ℃培养颗粒细胞24 h，换液去除未贴壁的血细胞和颗粒细胞，纯化颗粒细胞[2]。取高龄女性颗粒细胞样本30例，分为3组：对照组、RESV组和EX527（SIRT1抑制剂）组，对照组颗粒细胞不使用药物处理，RESV组颗粒细胞置于含100 μmol·L^{-1} RESV培养液中培养48 h，EX527组颗粒细胞置于含EX527的培养液中培养48 h，胰酶消化后收集颗粒细胞。

1.5 实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）法检测各组细胞中目的基因mRNA表达水平 使用TRIzol液充分裂解颗粒细胞，去除基因组DNA，提取RNA，然后将RNA逆转录合成cDNA。RT-qPCR法检测细胞中SIRT1、类固醇激素合成急性调节蛋白（steroidogenic acute regulatory protein，stAR）、细胞色素P450家庭19（cytochrome P450 family 19，CYP19）和细胞色素P450家族17（cytochrome P450 family 17，CYP17）mRNA表达水平。以β-actin作为内参，每个样本均检测3次，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA表达水平。所检测基因的引物序列见表2。

表2 RT-qPCR法引物序列

Tab. 2 Primer sequences detected by RT-qPCR method

Gene	Primer sequence（5′—3′）	Length（bp）
SIRT1		162
Forward	GGAGCAGATTAGTAGGCGGC	
Reverse	CTTGGACTCTGGCATGTCCC	
StAR		174
Forward	CAGACTTCGGGAACATGCCT	
Reverse	GGGACAGGACCTGGTTGATG	
CYP19		168
Forward	TGTGCAATGTGCTGTGGATTC	
Reverse	TCTCAATGAAGGCATGGGGG	
CYP17		222
Forward	TGGCTCTCTTGCTGCTTACC	
Reverse	GGTGGCCGACAATCACTGTA	
β-actin		101
Forward	TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC	
Reverse	ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG	

1.6 Western blotting法检测各组细胞中Caspase-3和Bcl-2蛋白表达水平 充分裂解颗粒细胞，离心裂解液后收集上清，BCA法测定蛋白浓度。准备蛋白缓冲液，进行SDS-PAGE电泳，80 V恒压电泳50 min，然后120 V恒压电泳，于溴酚蓝刚出凝胶底端停止电泳。聚偏氟乙稀（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜预处理，制作凝胶转印堆积层。低温条件下，100 V恒压60～120 min转膜。取出杂交膜，用5%脱脂奶粉溶液室温下封闭1 h。将膜放入一抗稀释液中37 ℃孵育2 h，再将膜放入对应的二抗稀释液中37 ℃孵育1 h。使杂交膜与化学荧光发光底物反应5 min，将膜移入暗盒显影，进行图像扫描。以GAPDH作为内参，采用Image J软件分析蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.7 化学发光法检测人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，HCG）注射日各组高龄女性颗粒细胞培养液中雌二醇水平 颗粒细胞培养完成后留取适量培养液。使用化学发光法试剂盒检测各组培养液中雌二醇水平。

1.8 各组颗粒细胞凋亡率检测 颗粒细胞经培养贴壁后，去除培养液，PBS缓冲液洗涤后使用4%多聚甲醛固定30 min，洗涤细胞后，室温下在含0.3% Triton X-100的PBS缓冲液中孵育5 min。洗涤细胞后于TUNEL检测液中避光37 ℃孵育1 h。

充分洗涤细胞后，于适量DAPI染色液中室温孵育5 min，洗涤细胞后使用荧光显微镜观察颗粒细胞凋亡情况，经DAPI染色的细胞核呈蓝色，TUNEL阳性细胞为凋亡细胞，细胞核经TUNEL试剂染色呈绿色，细胞凋亡率为同一视野内绿色细胞核数占蓝色细胞核总数的百分率，每份颗粒细胞样本计算3个随机视野的平均凋亡率。

1.9　统计学分析　采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。各组患者颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平，各组高龄女性颗粒细胞中*SIRT1*、*STAR*、*CYP19*和*CYP17* mRNA及蛋白表达水平，HCG日雌二醇水平，颗粒细胞凋亡率以及细胞中Bcl-2和Caspase-3蛋白表达水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，2组间样本均数比较采用两独立样本t检验，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用SNK-q检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　高龄组和非高龄组患者颗粒细胞中*SIRT1* mRNA及蛋白表达水平　与非高龄组（3.10±1.16，0.44±0.17）比较，高龄组患者颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平（1.66±0.87，0.25±0.15）均降低（$P<0.05$）。

2.2　各组高龄女性颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平　与对照组（2.79±1.48，0.28±0.18）比较，RESV组高龄女性颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平（6.11±2.84，0.62±0.20）均升高（$P<0.05$），EX527组高龄女性颗粒细胞中*SIRT1* mRNA和蛋白表达水平（1.64±1.20，0.13±0.07）均降低（$P<0.05$）。

2.3　各组高龄女性颗粒细胞中*StAR*、*CYP19*和*CYP17* mRNA及蛋白表达水平　与对照组（3.50±1.76，0.55±0.32）比较，RESV组高龄女性颗粒细胞中*StAR* mRNA和蛋白表达水平（6.68±2.64，0.81±0.29）升高（$P<0.05$），EX527组颗粒细胞中*StAR* mRNA和蛋白表达水平（1.98±1.01，0.31±0.24）降低（$P<0.05$）。与对照组（3.04±1.55，0.44±0.31）比较，RESV组高龄女性颗粒细胞中*CYP19* mRNA和蛋白表达水平（4.72±2.34，0.67±0.25）升高（$P<0.05$），EX527组高龄女性颗粒细胞中*CYP19* mRNA和蛋白表达水平（1.85±1.24，0.28±0.28）降低（$P<0.05$）。与对照组（5.11±3.10，0.48±0.34）比较，RESV组高龄女性颗粒细胞中*CYP17* mRNA和蛋白表达水平（8.15±2.96，0.81±0.35）升高（$P<0.05$），EX527组高龄女性颗粒细胞中*CYP17* mRNA和蛋白表达水平（2.62±1.79，0.27±0.25）降低（$P<0.05$）。

2.4　HCG注射日各组高龄女性细胞培养液中雌二醇水平　与对照组（3 730 pmol·L^{-1}±1 656 pmol·L^{-1}）比较，RESV组高龄女性细胞培养液中雌二醇水平（5 298 pmol·L^{-1}±2 274 pmol·L^{-1}）升高（$P<0.05$），EX527组高龄女性细胞培养液中雌二醇水平（2 664 pmol·L^{-1}±964 pmol·L^{-1}）降低（$P<0.05$）。

2.5　各组高龄女性颗粒细胞凋亡率以及细胞中Bcl-2和Caspase-3蛋白表达水平　与对照组（凋亡率：17.24%±5.64%，Bcl-2：0.23±0.18，Capase-3：0.43±0.18）比较，RESV组高龄女性颗粒细胞凋亡率（6.60%±4.28%）降低（$P<0.05$），颗粒细胞中Bcl-2蛋白表达水平（0.42±0.23）升高（$P<0.05$），颗粒细胞中Caspase-3蛋白表达水平（0.22±0.13）降低（$P<0.05$）；EX527组颗粒细胞凋亡率（36.38%±9.03%）升高（$P<0.05$），颗粒细胞中Bcl-2蛋白表达水平（0.12±0.06）降低（$P<0.05$），Caspase-3蛋白表达水平（0.80±0.33）升高（$P<0.05$）。见图1。

3　讨　论

卵巢衰老是指卵巢功能随着年龄的增长而下降，其特点是卵巢内卵泡数量和质量逐渐下降。卵泡微环境中的颗粒细胞位于卵母细胞周围区域，颗粒细胞作为卵巢的重要组成部分，在卵泡发育中发挥关键作用，参与卵母细胞生长、成熟和微环境维持的调控，颗粒细胞凋亡是卵泡闭锁的重要原因[3-4]。颗粒细胞是卵泡中主要的功能细胞，分泌雌二醇和孕酮以及细胞因子，以自分泌和旁分泌的方式影响卵泡的生长、发育及成熟[5]。SIRT1在颗粒细胞凋亡中发挥重要作用[6]。

本研究结果显示：高龄女性卵巢颗粒细胞中SIRT1表达水平降低。ZHAO等[7]发现：接受IVF/卵胞质内单精子注射（in tracytoplasmic sperm injection，ICSI）的患者中，随着年龄增加，卵泡液和颗粒细胞中SIRT1 mRNA及蛋白表达水平降低。SIRT1可能参与卵巢衰老过程，提示SIRT1可能是改善高龄患者卵巢功能的潜在靶点。ILJAS等[8]证实：老年雌性小鼠卵母细胞中SIRT1减少会影响卵母细胞的发育能力，导致小鼠生育能力加速下

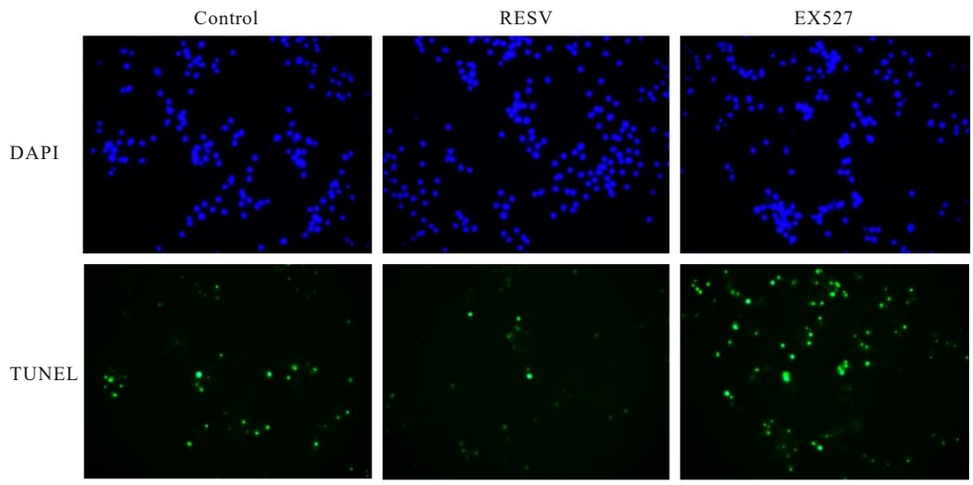


图 1 TUNEL 法检测各组高龄女性颗粒细胞的凋亡情况（×100）

Fig. 1 Appotosis of granulosa cells in various groups detected by TUNEL method(×100)

降。GUO 等[9]证实：卵巢早衰小鼠的卵巢组织中 SIRT1 表达量降低。YANG 等[10]发现：SIRT1 保护化疗诱导的卵巢早衰小鼠的卵巢颗粒细胞，防止卵巢损伤，同时减少氧化损伤和炎症。LI 等[11]发现：激活 SIRT1 可抑制 DNA 损伤和细胞凋亡，从而逆转衰老卵母细胞质量下降。

RESV 的抗衰老机制与其在哺乳动物繁殖中的抗凋亡和抗氧化特性有关。RESV 通过 SIRT1 调节细胞增殖、凋亡和分泌活性来控制颗粒细胞的功能。RESV 可以通过其抗氧化和抗凋亡功能来提高卵母细胞的质量[12]。

本研究结果显示：RESV 能够促进高龄女性卵巢颗粒细胞中 SIRT1 的表达。WU 等[13]发现：RESV 通过抑制氧化应激和激活 SIRT1 来改善老年大鼠的卵巢功能，RESV 能显著提高老年大鼠卵巢的 SIRT1 蛋白表达水平，降低 Caspase-3 蛋白水平，明显增加卵巢储备，增加原始和初级卵泡的数量，降低卵巢的氧化损伤，延缓卵巢衰老。ZHU 等[14]证实：RESV 可能通过激活 SIRT1 以减少炎症和内质网应激，并最终延缓短命鱼的卵巢衰老。随着年龄的增长，SIRT1 表达水平降低。GUO 等[9]发现：在小鼠腹腔注射 SIRT1 拮抗剂 EX527 可降低卵巢功能，导致卵巢早衰，SIRT1 激动剂 RESV 可促进卵巢早衰小鼠卵巢功能的恢复，缓解卵巢早衰症状。SZYMANSKA 等[15]证实：在人颗粒-黄体细胞中，SIRT1 激活剂 RESV 呈时间-剂量依赖性增强 SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平，而 SIRT1 抑制剂 EX527 可抑制 SIRT1 蛋白表达。NIE 等[16]发现：RESV 通过增加 IVF 助孕女性颗粒细胞中 SIRT1 表达，从而减少颗粒细胞的氧化损伤。

本研究结果显示：RESV 通过促进 SIRT1 表达增加高龄女性颗粒细胞中类固醇激素合成酶的表达，从而促进颗粒细胞合成雌二醇。GUO 等[9]证实：人黄素化颗粒细胞中敲除 *SIRT1* 基因后，参与雌激素合成的相关基因如 *CYP19A1* 和 *CYP17A1* 和 *STAR* 以及一些功能受体表达水平降低，表明 *SIRT1* 可能参与人黄素化颗粒细胞中雌激素合成的调节和受体表达。采用慢病毒敲除 *SIRT1* 基因后，人黄素化颗粒细胞中雌激素的合成和分泌明显降低。SZYMANSKA 等[15]证实：RESV 通过抵抗氧化功能障碍，保护大鼠卵巢黄素化颗粒细胞，提高细胞活力，刺激黄体酮和雌二醇的分泌，并抵抗细胞凋亡。HU 等[17]发现：RESV 的 β-环糊精复合物能够维持卵巢颗粒细胞功能，抑制小鼠卵巢早衰。采用 β-环糊精复合物处理甲发性卵巢功能不全（premature ovarian insufficiency，POI）小鼠后，血液中雌激素水平明显恢复。SONG 等[18]发现：RESV 促进人颗粒细胞中 StAR 的表达和孕酮的产生。JIANG 等[19]发现：RESV 可促进牦牛颗粒细胞的增殖、抗氧化特性和黄体酮的产生。RESV 通过上调 *Bcl-2* 和 *SIRT1* 基因，下调 *Caspase-3* 和 *P53* 基因表达，提高细胞活力和增殖活性，抑制颗粒细胞凋亡，促进黄体酮分泌和 P4 合成相关基因的表达。LI 等[20]证实：褪黑素通过 SIRT1/STAR 通路改善颗粒细胞的线粒体功能障碍和类固醇紊乱。CAI 等[21]发现：大鼠卵巢颗粒细胞分泌雌激素功能受到 SIRT1 调节。

本研究结果显示：RESV 通过促进 SIRT1 表

达，从而上调Bcl-2蛋白表达水平，下调Caspase-3蛋白表达水平，抑制颗粒细胞凋亡。研究[22]显示：RESV增加IVF助孕患者卵巢颗粒细胞中抑制凋亡蛋白水平，降低Caspase-3蛋白水平。CAI等[21]发现：RESV通过SIRT1减少氧化应激导致的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡。SEVGIN等[23]发现：RESV治疗可导致SIRT1过表达，并通过激活SIRT1/Bcl-2通路改善大鼠卵巢早衰。LIANG等[24]证实：接受IVF治疗的不孕症患者中，RESV通过抑制颗粒细胞凋亡来改善卵巢状态；RESV处理后，颗粒细胞凋亡率降低，Caspase-9蛋白表达水平降低，Bcl-2蛋白表达水平升高。JOO等[25]发现：SIRT1可抑制COV434颗粒细胞凋亡。YU等[26]发现：抑制SIRT1表达会促进鸡颗粒细胞凋亡；增加*SIRT1* mRNA表达后，Bcl-2蛋白表达水平升高，Caspase-3蛋白表达水平降低，从而抑制鸡的颗粒细胞凋亡。XU等[27]证实：SIRT1能够抑制牛卵巢颗粒细胞凋亡。SIRT1抑制剂EX527处理后Caspase-3蛋白表达水平升高，Bcl-2蛋白表达水平降低，细胞凋亡率升高。PARK等[28]发现：氧化应激会抑制SIRT1表达，促进p53蛋白表达，导致颗粒细胞凋亡。GUO等[9]证实：在小鼠模型中，氧化应激的增加可抑制SRIT1表达，诱导人黄素化颗粒细胞凋亡。

综上所述，高龄女性卵巢颗粒细胞中SIRT1表达降低。RESV通过促进高龄女性颗粒细胞中SIRT1表达，进而抑制颗粒细胞凋亡，增加颗粒细胞类固醇激素合成酶表达，促进颗粒细胞合成雌二醇。因此，RESV可能有利于改善高龄女性卵巢颗粒细胞功能，从而提高卵母细胞质量和生育力。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

柯慧参与选题、研究方案制定、数据统计学分析和论文撰写，颜礼征参与实验操作、数据采集及文献收集，张宇、毛记龙和姚宇飞参与论文审校。

[参考文献]

[1] OH W Y, SHAHIDI F. Antioxidant activity of resveratrol ester derivatives in food and biological model systems[J]. Food Chem, 2018, 261: 267-273.

[2] SHI J, YOSHINO O, OSUGA Y, et al. Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells[J]. Fertil Steril, 2010, 93(4): 1273-1279.

[3] SU Y Q, SUGIURA K, EPPIG J J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism[J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(1): 32-42.

[4] ALMEIDA C P, FERREIRA M C F, SILVEIRA C O, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells-a review[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(10): 1276-1281.

[5] RIMON-DAHARI N, YERUSHALMI-HEINEMANN L, ALYAGOR L, et al. Ovarian folliculogenesis[M]. Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. Cham: Springer International Publishing, 2016: 167-190.

[6] PARK S A, JOO N R, PARK J H, et al. Role of the SIRT1/p53 regulatory axis in oxidative stress-mediated granulosa cell apoptosis[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 20.

[7] ZHAO J Y, NIE Z Y, KONG X L, et al. Study on the relationship between SIRT1 and oxidative stress in aged patients undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfer cycles[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2023, 52(1): 102516.

[8] ILJAS J D, WEI Z, HOMER H A. Sirt1 sustains female fertility by slowing age-related decline in oocyte quality required for post-fertilization embryo development[J]. Aging Cell, 2020, 19(9): e13204.

[9] GUO L, LIU X C, CHEN H, et al. Decrease in ovarian reserve through the inhibition of SIRT1-mediated oxidative phosphorylation[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(5): 2335-2347.

[10] YANG Y X, TANG X T, YAO T, et al. Metformin protects ovarian granulosa cells in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through AMPK/PPAR-γ/SIRT1 pathway[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 1447.

[11] LI C, ZHANG H, WU H, et al. Intermittent fasting reverses the declining quality of aged oocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 195: 74-88.

[12] PASQUARIELLO R, VERDILE N, BREVINI T A L, et al. The role of resveratrol in mammalian reproduction[J]. Molecules, 2020, 25(19): 4554.

[13] WU H F, XUE J C, DI H Q, et al. Resveratrol improves ovarian function in aged rat by inhibiting oxidative stress and activating the Sirt1[J]. Gen Physiol Biophys, 2022, 41(1): 53-61.

[14] ZHU H Y, LI X W, QIAO M X, et al. Resveratrol alleviates inflammation and ER stress through SIRT1/

NRF2 to delay ovarian aging in a short-lived fish[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2023, 78(4): 596-602.
[15] SZYMANSKA M, MANTHE S, SHRESTHA K, et al. The cAMP pathway promotes sirtuin-1 expression in human granulosa-lutein cells[J]. Reprod Biol, 2020, 20(3): 273-281.
[16] NIE Z Y, HUA R, ZHANG Y N, et al. Resveratrol protects human luteinised granulosa cells against hydrogen peroxide-induced oxidative injury through the Sirt1[J]. Reprod Fertil Dev, 2021, 33(16): 831-840.
[17] HU B B, ZHENG X S, ZHANG W. Resveratrol-βcd inhibited premature ovarian insufficiency progression by regulating granulosa cell autophagy[J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1): 18.
[18] SONG T L, CHEN J Y, YANG S Z, et al. Resveratrol stimulates StAR expression and progesterone production by GPER-mediated downregulation of Snail expression in human granulosa cells[J]. J Food Drug Anal, 2023, 31(2): 315-325.
[19] JIANG X D, MA Y, GONG S N, et al. Resveratrol promotes proliferation, antioxidant properties, and progesterone production in yak (bos grunniens) granulosa cells[J]. Animals, 2024, 14(2): 240.
[20] LI X W, YI B J, WANG Z Y, et al. The ROS/SIRT1/STAR axis as a target for melatonin ameliorating atrazine-induced mitochondrial dysfunction and steroid disorders in granulosa cells[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 269: 115780.
[21] CAI M H, WANG J, SUN H J, et al. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced injury of rat ovarian granulosa-lutein cells by resisting oxidative stress *via* the SIRT1/Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Curr Pharm Des, 2023, 29(12): 947-956.
[22] SAPULENI J, SZYMANSKA M, MEIDAN R N. Diverse actions of sirtuin-1 on ovulatory genes and cell death pathways in human granulosa cells[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2022, 20(1): 104.
[23] SEVGIN K, ERGUVEN P. SIRT1 overexpression by melatonin and resveratrol combined treatment attenuates premature ovarian failure through activation of SIRT1/FOXO3a/BCL2 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 696: 149506.
[24] LIANG Y, XU M L, GAO X, et al. Resveratrol improves ovarian state by inhibiting apoptosis of granulosa cells[J]. Gynecol Endocrinol, 2023, 39(1): 2181652.
[25] JOO N R, PARK S A, PARK J H, et al. TOPK inhibits TNF-α-induced granulosa cell apoptosis *via* regulation of SIRT1/p53[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 664: 128-135.
[26] YU C L, QIU M H, YIN H D, et al. miR-138-5p promotes chicken granulosa cell apoptosis *via* targeting *SIRT1*[J]. Anim Biotechnol, 2023, 34(7): 2449-2458.
[27] XU G Q, DONG Y, WANG Z, et al. Melatonin attenuates oxidative stress-induced apoptosis of bovine ovarian granulosa cells by promoting mitophagy *via* SIRT1/FoxO1 signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16): 12854.
[28] PARK J H, PARK S A, LEE Y J, et al. TOPK inhibition accelerates oxidative stress-induced granulosa cell apoptosis *via* the p53/SIRT1 axis[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(5): 1923-1937.