

橙皮素干预 TGF- β /Smads 通路改善来曲唑诱导 PCOS 大鼠卵巢纤维化发生

李子熔^{1,2,3}, 吴昱臻¹, 黄琴⁴, 顾佳倩¹, 欧丹¹, 谢津津¹, 宋家乐^{5,6,7,8*}, 宋慕波⁸

(1. 桂林医科大学公共卫生学院, 广西桂林 541199) (2. 广州医科大学公共卫生学院, 广东广州 511436) (3. 广州市疾病预防控制中心, 广东广州 511430) (4. 桂林医科大学第一临床医学院, 广西桂林 541199) (5. 桂林医科大学检验与生物技术学院, 广西桂林 541199) (6. 广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室, 广西桂林 541199) (7. 广西高校医药生物技术与转化医学重点实验室, 广西桂林 541199) (8. 广西康养食品科学与技术重点实验室(贺州学院), 广西贺州 542899)

摘要: 多囊卵巢综合征(Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS)是一种常见影响育龄妇女生殖健康的内分泌疾病。目前临床常用二甲双胍(Metformin, Met)等药物治疗,但存在一定副作用。橙皮素(Hesperetin, HSP)作为一种天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎等活性,但其对PCOS卵巢纤维化的改善作用及机制尚不清楚。为了探讨HSP对来曲唑诱导的PCOS大鼠卵巢纤维化的改善作用及其对TGF- β /Smads通路的介导机制。本实验经干预后检测大鼠体重、动情周期、卵巢病理(HE、Masson染色)、性激素、血脂、氧化应激指标及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);qRT-PCR和Western Blot法检测卵巢抗氧化基因mRNA表达及TGF- β /Smads通路蛋白表达。结果显示,HSP干预显著降低大鼠体重($P<0.05$),恢复动情周期,改善卵巢多囊样改变;低、高剂量HSP干预均降低血清T水平(15.70%、32.92%)、LH/FSH比值(69.45%、77.05%)、升高E2水平(1.32、1.28倍)、改善血脂紊乱和胰岛素抵抗(HOMA-IR, 39.14%、42.97%);改善大鼠氧化应激情况。同时,HSP抑制TGF- β /Smads通路激活,下调 α -SMA和CTGF表达,减轻卵巢纤维化。这为HSP作为PCOS潜在治疗剂提供了理论基础。

关键词: 橙皮素; 多囊卵巢综合征; TGF- β /Smads通路; 氧化应激

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0818

Hesperetin Ameliorates Letrozole-induced Ovarian Fibrosis in PCOS rats via Regulating the TGF- β /Smads Signaling Pathway

LI Zirong^{1,2,3}, WU Yuzhen¹, HUANG Qin⁴, GU Jiaqian¹, OU Dan¹, XIE Jinjin¹, SONG Jiale^{4,5,6,7,8*}, SONG Mubo⁸

(1.School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541199, China) (2.School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China) (3.Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China) (4.The First School of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China) (5.School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541199, China) (6.Guangxi Key Laboratory of Environmental Exposomics and Life-Cycle Health, Guilin 541199, China) (7.Guangxi Universities Key Laboratory of Medical Pharmaceutical Biotechnology and Translational Medicine, Guilin 541199, China) (8.Guangxi Key Laboratory of Health-Care Food Science and Technology (Hezhou University), Hezhou 542899, China)

Abstract: Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is a common gynecological endocrine disorder that severely affects the reproductive health of women of reproductive age. Metformin (Met) is currently widely used in clinical practice; however, its application is still limited by certain side effects. Hesperetin (HSP), a natural flavonoid compound, exhibits antioxidative and anti-inflammatory properties, but its effects on

收稿日期: 2026-05-27; 修回日期: 2026-09-06; 接受日期: 2026-09-07

基金项目: 中央引导地方科技发展基金(桂科 ZY22096025); 国家级大学创新创业训练计划(202310601044; 202510601032); 广西八桂青年拔尖人才培养项目(GCHH〔2024〕55); 桂林市科技计划项目(20220139-8-2; 20230127-2; 0230135-4-1); 广西康养食品科学与技术重点实验室开放课题(GXKYSYS202202); 桂林医科大学黄大年式教师团队建设经费(10224101k)

作者简介: 李子熔(2002-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物化合物与炎症疾病防治, E-mail: 15340631319@163.com; 共同第一作者: 吴昱臻(2003-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物化合物与炎症疾病防治, E-mail: 2770644924@qq.com

通讯作者: 宋家乐(1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 临床营养干预与慢性疾病防治, E-mail: songjiale@glmc.edu.cn

ovarian fibrosis in PCOS and the underlying mechanisms remain unclear. This study aimed to investigate the therapeutic effects of HSP on ovarian fibrosis in letrozole-induced PCOS rats and to elucidate its regulatory mechanism involving the TGF- β /Smads signaling pathway. After intervention, body weight, estrous cycle, ovarian histopathological changes (HE and Masson staining), sex hormone levels, lipid profiles, oxidative stress indicators, and insulin resistance index (HOMA-IR) were evaluated. In addition, qRT-PCR and Western blot analyses were performed to assess mRNA expression of antioxidant-related genes and protein expression of the TGF- β /Smads signaling pathway. The results showed that HSP significantly reduced body weight in rats ($P < 0.05$), restored estrous cyclicity, and improved polycystic ovarian morphological changes. Both low- and high-dose HSP treatments decreased serum testosterone (T) levels (15.70% and 32.92%, respectively) and LH/FSH ratios (69.45% and 77.05%, respectively), while increasing estradiol (E2) levels (1.32-fold and 1.28-fold, respectively). HSP also improved dyslipidemia and insulin resistance, as evidenced by reduced HOMA-IR (39.14% and 42.97%, respectively), and alleviated oxidative stress. Mechanistically, HSP inhibited abnormal activation of the TGF- β /Smads signaling pathway and downregulated the expression of α -SMA and CTGF, thereby attenuating ovarian fibrosis. These findings suggest that HSP may exert therapeutic effects against PCOS-associated ovarian fibrosis by modulating the TGF- β /Smads pathway, providing a theoretical basis for its potential as a therapeutic agent.

Key words: hesperetin; polycystic ovarian syndrome; TGF- β /Smads pathway; oxidative stress

多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS) 是一种常见的妇科内分泌疾病, 是导致育龄期妇女无排卵性不孕症的重要原因之一。PCOS 的全球发病率为 6%~10%^[1], 中国的发病率为 5.6%^[2]。其主要临床症状表现为胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR)、肥胖和代谢紊乱, 伴有高雄激素血症、卵巢功能障碍和多囊卵巢形态^[3]。目前研究普遍认为, 在 PCOS 发生发展中起核心作用的是下丘脑-垂体-卵巢轴 (Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis, HPOA) 的功能紊乱^[4,5]。其中促性腺激素释放激素 (GnRH) 脉冲频率异常升高可导致黄体生成素 (Luteinizing Hormone, LH) 分泌相对增加, 以及卵泡刺激素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH) 分泌不足, 从而促进卵巢雄激素过量生成并抑制卵泡正常发育^[6]。而过量的雄激素产生会刺激卵巢间质细胞分泌生长转化因子 β 1 (Transforming Growth Factor- β , TGF- β), 诱导 Smad2、Smad3 持续磷酸化^[7]。

当前的 PCOS 临床治疗方案一般从调节月经周期、降低雄激素水平、增强胰岛素敏感性三方面入手, 病情较重者可进一步采取手术或辅助生殖技术干预。相较于其他方案, 西药治疗可明显提升排卵率, 但部分患者依旧会出现流产、妊娠率下降等不良结局^[8]。二甲双胍 (Metformin, Met) 是临床应用成熟的胰岛素增敏药物, 已有研究证明, 可安全有效地改善 PCOS 患者的内分泌、代谢及生殖功能异常, 广泛用于 PCOS 伴 IR 的临床治疗^[9]。但长期使用 Met 可能引发恶心, 呕吐, 腹痛, 腹泻并造成乳酸中毒以及肝肾功能损害等副作用^[10]。

黄酮类化合物是一类广泛富集于水果、蔬菜和谷物内的天然化合物, 具有多种对人体健康有益的功能活性, 迄今为止已经鉴定出超 6 000 种该类化合物的具体结构^[11,12]。其中, 花青素、黄烷-3-醇、黄酮醇、黄酮、黄烷酮和异黄酮六类为常见的膳食黄酮^[13]。橙皮素 (Hesperetin, HSP) 为芸香科 (*Citrus Aurantium* L.) 植物果实中含有的一种天然黄酮类化合物^[14], 具有抗癌^[15]、抗阿尔茨海默病^[16]及抗糖尿病^[17]等多种功效。近年来研究逐渐认识到 PCOS 不仅是功能性内分泌紊乱疾病, 同时也伴随卵巢组织的进行性结构重塑。其中卵巢间质纤维化被认为是导致卵泡发育受阻及卵巢储备功能下降的重要病理基础^[18-20]。TGF- β /Smads 通路是调控组织纤维化形成的关键轴, 其中 Smad2/3 磷酸化激活及 Smad7 负反馈抑制失衡被认为是纤维化进展的重要分子机制^[21]。然而, 目前关于 HSP 改善 PCOS 的作用大多集中于代谢调节及抗氧化应激层面, 对于其是否能够通过调控卵巢纤维化过程, 尤其是影响 TGF- β /Smads 信号通路动态平衡的作用尚缺乏系统性证据^[22]。基于此, 本研究采用来曲唑诱导 PCOS 大鼠模型, 系统评价 HSP 对卵巢功能、糖脂代谢及氧化应激状态的影响, 并重点从卵巢纤维化角度出发, 深入探讨其对 TGF- β /Smads 信号通路关键分子的调控作用, 以期 HSP 干预 PCOS 提供新的病理机制依据与实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

25 只 5 周龄 SPF 级健康雌性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司 (生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0004), 饲养于桂林医科大学公共卫生学院 SPF 级动物房 (单位许可证号: SYXK (桂) 2020-0005);

HSP (H811043)、羧甲基纤维素钠 (Sodium Carboxymethyl Cellulose, CMC, C6332), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 来曲唑 (B25470), 上海源叶生物科技有限公司; Met (B25331), 上海源叶生物科技有限公司;

雌二醇 (Estradiol, E2, MM-0575R1)、睾酮 (Testosterone, T, MM-0577R1)、LH (MM-0624R1)、FSH (MM-70867R1)、胰岛素 (Insulin, INS, MM-0587R1) ELISA 试剂盒, 江苏酶免实业有限公司。

总胆固醇 (Total Cholesterol, TC, A111-1-1)、甘油三酯 (Triglyceride, TG, A110-1-1)、高密度脂蛋白 (High-Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C, A112-1-1) 试剂盒, 江苏科特生物科技有限公司。

超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、丙二醛 (Malonic Dialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、总抗氧化能力 (Total Antioxidant Capacity, T-AOC) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; SYBR Green 定量 PCR 试剂盒, 北京天根生化科技有限公司。

BCA 蛋白测定试剂盒 (P0012)、蛋白上样缓冲液 (P0286)、TGF- β 1 (AF0297)、结缔组织生长因子 (Connective Tissue Growth Factor, CTGF, AF6582)、 α -平滑肌肌动蛋白 (Alpha-Smooth Muscle Actin, α -SMA, GB11044)、Smad4 (AF1291)、Smad3 (AF1501)、p-Smad3 (AF1759)、Smad2 (AF1300)、p-Smad2 (AF2545) 和 GAPDH (AF1186) 抗体, 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

FA2004 电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 5424R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Varioskan LUX 多功能酶标仪, 美国 Thermo Scientific 公司; DM4B 显微镜, 德国 Leica 仪器有限公司; SCG-W2000 PLUS 化学发光成像分析系统, 武汉塞维尔生物科技有限公司; KZ-III 高速组织研磨仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司; QuantStudioTM 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实验分组及干预方案

所有大鼠经 7 d 的适应性喂养后, 随机分为 5 组: 空白对照组 (Control)、PCOS 模型组、阳性对照组 (PCOS+Met)、低剂量橙皮素干预组 (PCOS+HSPL) 和高剂量橙皮素干预组 (PCOS+HSPH), 每组 5 只。所有动物均采用灌胃方式给药。Control 组给予等体积生理盐水; PCOS 模型组给予来曲唑 (Letrozole, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 溶解于 1% CMC)^[23]; PCOS+Met 组同时给予来曲唑 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 Met ($265 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[24]; PCOS+HSP 低、高剂量组在给予来曲唑 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的同时, 分别给予 HSP ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 该剂量相关研究文献为小鼠灌胃条件下安全有效的干预剂量, 可观察到抗氧化、抗纤维化的梯度效应^[25], 连续干预 28 d。实验期间每 3 d 记录一次大鼠体质量和血糖。桂林医科大学动物伦理委员会已通过本研究实验方案的审核批准, 伦理批准号: GLMU-IACUC-202610058。

1.4 大鼠动情周期观察

参考闫传智等^[26]的方法, 从给药第 18 d 起, 于每天晚上八点进行持续 10 d 的阴道涂片, 采用巴氏染色法观察大鼠动情周期变化。依据阴道脱落细胞涂片区分大鼠的发情周期: 动情前期以绿色扁平上皮细胞为主, 动情期多见黄色角化细胞, 动情间期三种细胞均等分布, 动情后期涂片主要为蓝色白细胞。

1.5 血清的采集及处理

肌肉注射舒泰 50 (Zoletil 50) 溶液 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠, 经腹主静脉穿刺采集静脉全血 10 ml, 置于离心管中, 室温静置 30 min 后, 4°C , $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 20 min, 收集上清液, -80°C 保藏。

1.6 组织形态学和病理学观察

冰生理盐水清洗左侧卵巢, 10% 甲醛固定后制片 ($4 \mu\text{m}$)。组织标本后续进行 HE 和 Masson 染色分析, 记录图像。

1.7 血糖水平与糖耐量检测

造模 28 d 后, 大鼠禁食 12 h。尾尖采血, 血糖仪测定空腹血糖 (Fasting Blood Glucose, FBG) 水平。按体质

量给予葡萄糖溶液（2 g kg⁻¹）灌胃，进行口服葡萄糖耐量试验（Oral Glucose Tolerance Test, OGTT）。在灌胃后的 0、30、60、90 和 120 min 测定血糖值，计算口服葡萄糖耐量试验曲线下面积（Area Under the Curve of Oral Glucose Tolerance Test, OGTT-AUC₀₋₁₂₀），具体计算公式如（1）。

$$\text{OGTT-AUC}_{0-120} = 15G_0 + 30G_{30} + 45G_{60} + 30G_{120}$$

(1)

1.8 血清、血脂生化指标的检测

采用 ELISA 法测量血清中 FSH、E2、LH、T 及空腹 INS 水平。HOMA-IR 参考黄秋萍等^[27]文献采用稳态模型公式（2）。ELISA 法检测血清中 TC、TG、HDL-C、MDA、SOD、CAT 和 T-AOC 的水平。

$$P = \frac{F_1 \times F_2}{22.5}$$

(2)

式中：
P——胰岛素抵抗指数 HOMA-IR；
F₁——空腹血糖 FBG，mmol L⁻¹；
F₂——空腹胰岛素水平 INS，mU L⁻¹。

1.9 实时荧光定量 PCR 法检测抗氧化酶的 mRNA 表达

参照课题组前期方法^[24]，RT-qPCR 法分析目标基因（*Gpx3*、*Gsta4*、*Cat*、*Prdx3*、*Gsr* 和 *Mgst1*，引物序列详见表 1，GAPDH 水平用于内参标准化，基于 2^{-ΔΔCt} 方法将其进行相对定量处理。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers used for quantitative real-time PCR		
Gene name	Primer sequence (5'-3')	Primer sequence (3'-5')
<i>Cat</i>	CAGAGGAAAGCGGTCAAGAA	CATTCTTAGGCTTCTGGGAGTT
<i>Gpx3</i>	GACATCCGCTGGAACCTTGA	CCATCTTGACGTTGCTGACT
<i>Prdx3</i>	GGATTCCCACCTTCAGTCATCTT	AGTCTCGGGATATCTGCTTAGT
<i>Mgst1</i>	CCACCTGAACGACCTTGAAA	CTGAAGTGAATGAGGGCTGTAG
<i>Gsta4</i>	GCTGGAGTGGAGTTTGAAGA	GTCAGTAGCATCCCGTCTATTT
<i>Gsr</i>	ACCACGAGGAAGACGAAATG	ATCTCATCGCAGCCAATCC
<i>Gapdh</i>	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

1.10 组织蛋白提取与蛋白印迹分析

取卵巢组织 40 mg，加入 250 μL 组织蛋白裂解液，采用 KZ-III 高速组织研磨仪充分研磨。经 12 000 r min⁻¹ 离心 5 min 后，取样品上清液。用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品经 6%或 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE）分离后，电转至聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene Fluoride, PVDF）膜。5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后，用 TBST 洗膜 3 次（每次 10 min）。随后加入一抗，4 ℃摇床孵育过夜（转速 60 r min⁻¹）。一抗稀释比例为：TGF-β1（1:1 000）、CTGF（1:500）、p-Smad2（1:1 000）、Smad2（1:1 000）、p-Smad3（1:1 000）、Smad3（1:1 000）、Smad4（1:1 000）、Smad7（1:500）、α-SMA（1:1 000）、GAPDH（1:1 000）。TBST 洗膜 3 次（每次 10 min，120 r min⁻¹）后，加入相应二抗（1:7 000），室温孵育 1 h（60 r min⁻¹）。TBST 再次洗膜 3 次（每次 10 min，120 r min⁻¹）后，使用化学发光成像分析系统曝光。以 GAPDH 作为内参蛋白，采用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度值进行定量分析。

1.11 数据分析

采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析；蛋白表达条带的灰度值采用 ImageJ 软件进行检测分析；实验结果图采用 GraphPad Prism 9.5 软件绘制。所有数据均以平均数±标准误（Mean±SD）表示。针对每组 n=5 小样本实验设计，采用单因素方差分析（One-way ANOVA）进行多组间比较；统计检验严格执行正态性、方差齐性双重检验，

符合方差齐性者采用 LSD 检验，方差不齐采用 Tamhane’s T2 非保守两两比较，规避小样本方差偏差；非正态分布数据采用非参数秩和检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。图表中不同符号表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 HSP 干预对 PCOS 大鼠动情周期的影响

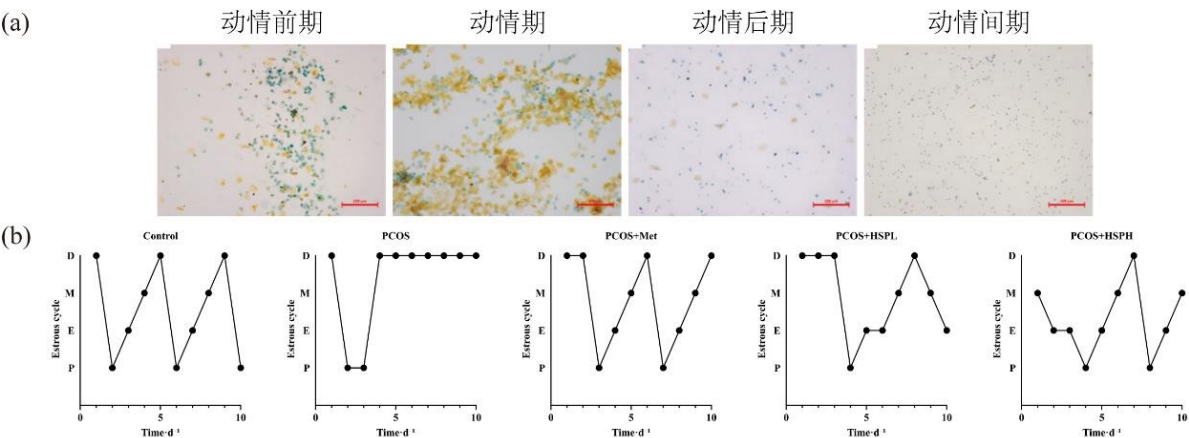


图 1 橙皮素干预对 PCOS 大鼠动情周期的影响

Fig.1 Effects of HSP intervention on the estrous cycle in PCOS rats

注：(a) 巴氏染色法观察各组大鼠动情周期细胞特征 ($\times 100$)、(b) 不同实验组大鼠动情时间占比。P：动情前期 (proestrus)；E：动情期 (estrus)；M：动情后期 (metestrus)；D：动情间期 (diestrus)。

如图 1a 所示，大鼠动情前期涂片可见大量有核上皮细胞，少量无核角化上皮细胞和白细胞；动情期涂片可见大量形似落叶状的无核角化上皮细胞，少量有核上皮细胞和白细胞；动情后期涂片可见无核角化上皮细胞、有核上皮细胞及白细胞；动情间期涂片以大量呈点状分布的白细胞为主，同时存在少量无核角化上皮细胞和有核上皮细胞。动情间期占比是评价卵巢功能紊乱的核心指标，动情间期异常升高提示动情周期阻滞；如图 1b 所示，与正常对照组相比，PCOS 模型组大鼠动情间期 (D) 时间占比升高，动情后期 (M)、动情期 (E)、动情前期 (P) 时间占比减少，存在严重的动情周期停滞。与 PCOS 模型组相比，Met 组、HSP 组大鼠动情间期时间占比降低，动情期、动情前期时间占比升高。

2.2 HSP 干预对 PCOS 大鼠卵巢形态的影响

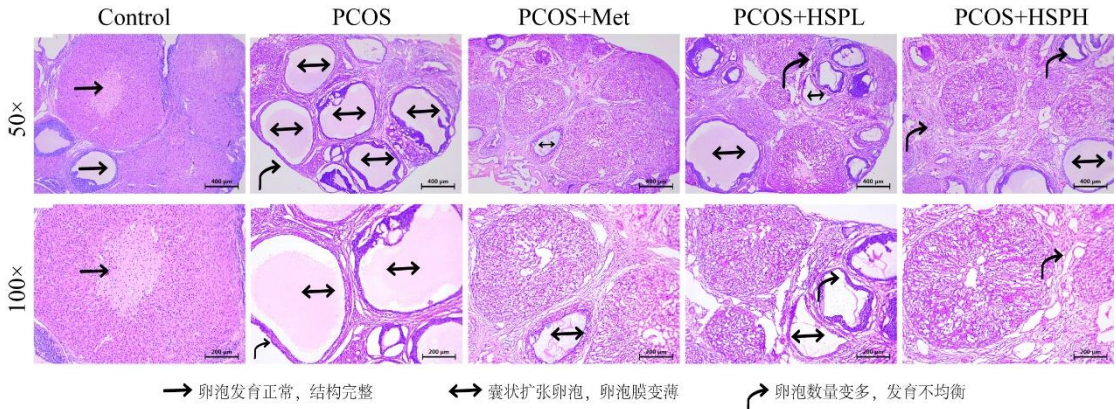


图 2 橙皮素干预对 PCOS 大鼠卵巢形态的影响 (HE 染色)

Fig.2 Effects of HSP intervention on ovarian morphology in PCOS rats

注：比例尺=200 μm ，放大比例尺=400 μm 。

如图 2 所示，Control 组卵巢皮质较厚，可见不同发育阶段的卵泡和黄体，颗粒细胞排列紧密。PCOS 模型组卵巢呈多囊样改变，出现较多囊性扩张的卵泡和闭锁卵泡，颗粒细胞层变薄，黄体数量减少。经 Met 和 HSP 干预

后, 卵巢多囊样改变明显改善, 颗粒细胞层增厚, 黄体数量增加。

2.3 HSP 干预对 PCOS 大鼠性激素水平的影响

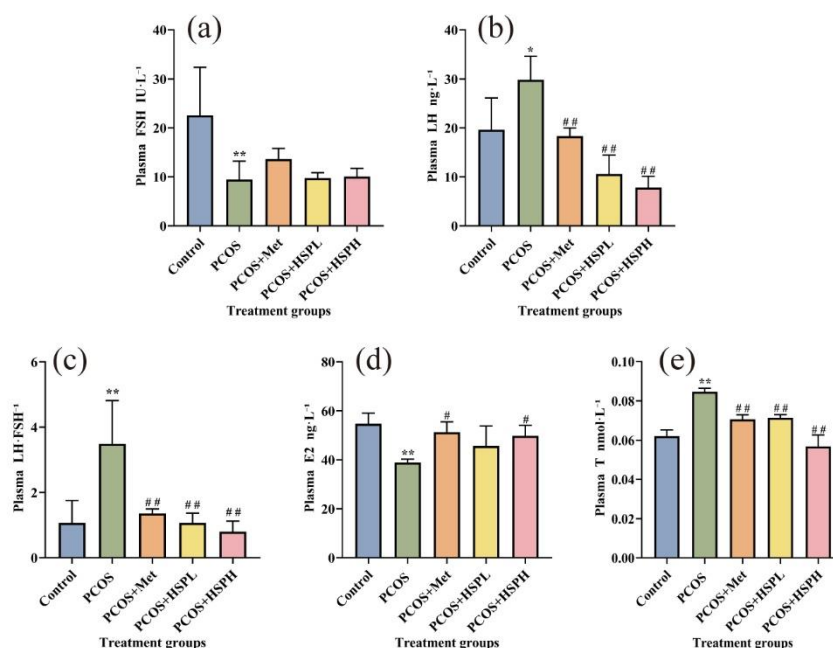


图3 橙皮素干预对 PCOS 大鼠性激素水平影响

Fig.3 Effects of HSP intervention on sex hormone levels in PCOS rats

注: (a) FSH 水平、(b) LH 水平、(c) LH/FSH 比值、(d) E2 水平、(e) T 水平。与 Control 组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。与 PCOS 组相比 # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。下同。

如图3所示,与Control组相比,PCOS模型组大鼠血清T水平升高1.37倍,LH/FSH比值升高3.87倍($P<0.01$),LH水平升高1.52倍($P<0.05$),E2和FSH水平分别降低28.89%和58.18%($P<0.01$)。在PCOS的发展中,下丘脑GnRH神经元的过度活跃起着至关重要的作用^[28]。PCOS患者因存在异常升高水平的雄激素使GnRH对负反馈抑制不敏感,导致脉冲频率持续增加,从而增加LH产生,限制FSH的生成^[24]。LH的过高水平产生,则会进一步刺激卵泡膜细胞合成过多的雄激素^[29]。随后,高水平的雄激素产生,则导致GnRH释放频率异常,进一步导致垂体产生更多的LH^[24],引发了性激素紊乱的恶性循环。此外,GnRH还影响FSH的分泌,从而影响了卵泡的正常生长以及E2合成^[30],本研究结果与上述结论类似。与PCOS组相比,PCOS+Met组T、LH/FSH比值和LH水平显著降低($P<0.01$),E2水平显著升高($P<0.05$);PCOS+HSPL组T、LH/FSH比值和LH水平显著降低($P<0.01$);PCOS+HSPH组T、LH/FSH比值和LH水平显著降低($P<0.01$),E2水平显著升高($P<0.05$)。以上结果表明,HSP可有效改善PCOS大鼠性激素紊乱,且高剂量效果优于低剂量。而性激素的恢复可以促进不同发育阶段的卵泡形成多个黄体,从而恢复卵巢的组织学形态^[24]。

2.4 HSP 干预对 PCOS 大鼠体质量、血脂的影响

研究表明,PCOS患者因脂质代谢失衡会发生肥胖^[24]。约50%~80%的PCOS患者会出现合并肥胖所导致患者生殖功能异常,30%~35%患者出现糖耐量受损的情况^[31]。在28d实验过程中,各组大鼠初始体质量无明显差异(图4a),PCOS模型组大鼠体质量随时间持续增加,表现出明显的体质量增长趋势。与PCOS模型组相比,Met组及HSP干预组均可不同程度减缓体质量增长速度,其中高剂量HSP作用更为明显。与Control组大鼠相比,PCOS组大鼠体质量显著升高($P<0.01$)。与PCOS组相比,Met组体质量显著降低($P<0.01$),HSPL和HSPH处理则使PCOS大鼠的体质量显著($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。如图4c所示,与Control组相比,PCOS组大鼠TC、TG水平升高,HDL-C水平降低;与PCOS组相比,PCOS+Met组使TC、TG水平下降,HDL-C水平升高,PCOS+HSPL组使TC、TG水平下降,HDL-C水平升高,PCOS+HSPH组TC、TG水平显著降低($P<0.05$),HDL-C水平升高。

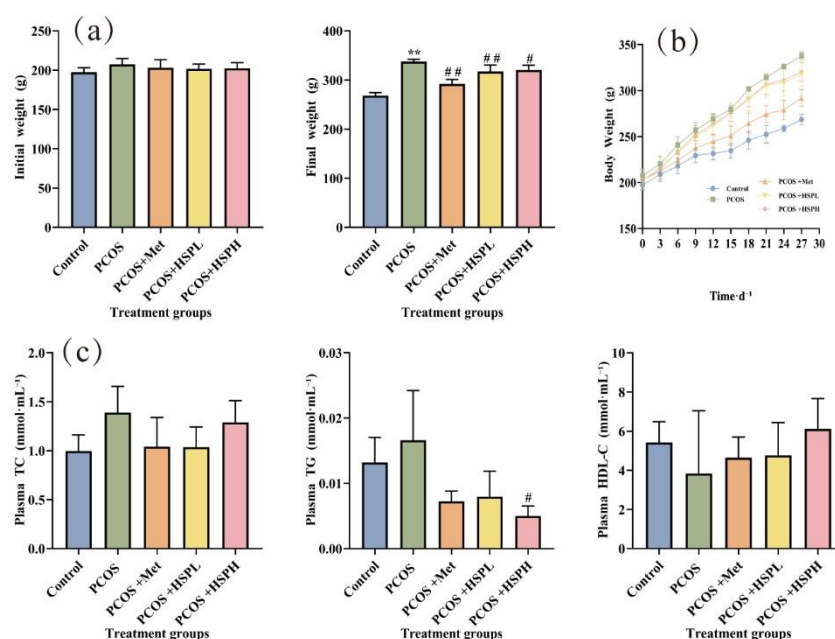


图4 橙皮素干预对PCOS大鼠体质量和血脂水平的影响

Fig.4 Effects of HSP intervention on body weight and lipid profiles in PCOS rats

注：(a) 大鼠开始造模体质量、大鼠造模结束体质量、(b) 大鼠造模 28 d 体质量变化、(c) HSP 干预对 PCOS 大鼠血脂代谢水平的影响。

2.5 HSP 干预对 PCOS 大鼠胰岛素及血糖水平的影响

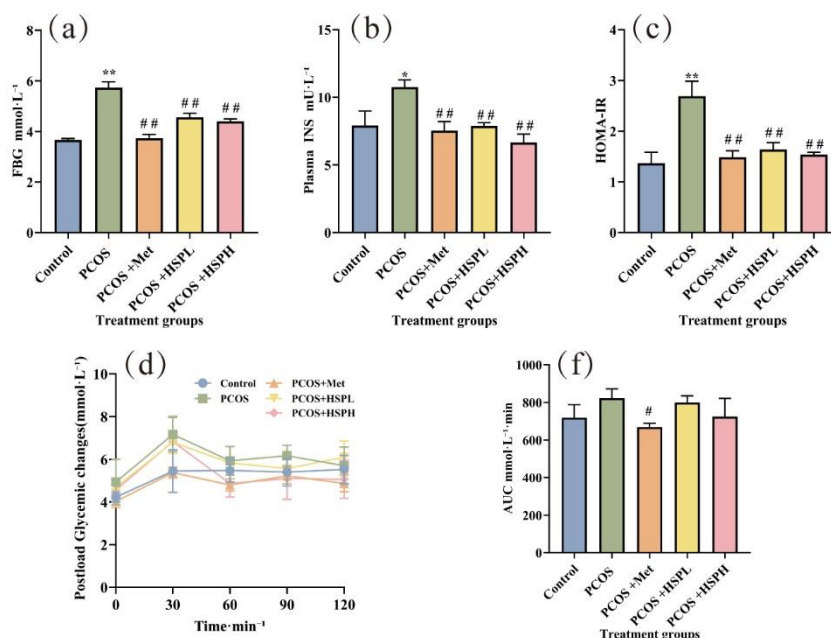


图5 HSP 干预对 PCOS 大鼠血糖、血清胰岛素水平及胰岛素抵抗的影响

Fig.5 Effects of HSP intervention on blood glucose, serum insulin levels, and insulin resistance in PCOS rats

注：(a) FBG 水平、(b) INS 水平、(c) HOMA-IR 水平、(d) 葡萄糖负荷后 0-120 min 血糖动态变化曲线 (OGTT)、(e) OGTT-AUC 定量分析。

胰岛素是参与糖代谢的重要激素之一，其敏感性与葡萄糖的正常摄取和代谢密切相关^[32]。IR 被认为是胰岛素介导的组织（主要是肝脏、脂肪和肌肉）调节葡萄糖代谢的缺陷，脂肪组织可能通过释放脂质及其他促进胰岛素抵抗的循环因子，从而推动 IR 的发生与发展^[33]。如图 5 所示，与 Control 组比，PCOS 组 FBG、HOMA-IR ($P < 0.01$)、

INS ($P<0.05$) 显著升高。与 PCOS 组比, PCOS+Met 组 FBG、HOMA-IR、INS 显著降低 ($P<0.01$); PCOS+HSPL 组 FBG、HOMA-IR、INS 显著降低 ($P<0.01$); PCOS+HSPH 组 FBG、HOMA-IR、INS 显著降低 ($P<0.01$)。OGTT 结果显示, PCOS 组各时间点血糖水平均高于 Control 组, 且血糖峰值升高, 下降速度减缓。分别给予 Met、HSP 干预后, 各组血糖峰值水平均有降低 (图 5d)。AUC 结果显示, 与 Control 组相比, PCOS 组 AUC 水平升高; 与 PCOS 组相比, PCOS+Met 组 AUC 水平显著降低 ($P<0.05$), 而 HSP 的干预虽使 AUC 水平降低, 但差异未达到显著水平 (图 5f)。结果显示, Met 和 HSP 的干预能够改善 PCOS 大鼠的糖耐量异常, 但 HSP 整体效果弱于 Met。以上结果提示, HSP 可有效改善 PCOS 大鼠的 IR 的现象。Kong 等^[34]发现 HSP 可以通过抑制巨噬细胞浸润到白色脂肪组织并防止其炎症转化, 从而提升脂肪组织胰岛素敏感性。

2.6 HSP 干预对 PCOS 大鼠血清抗氧化酶以及对 PCOS 大鼠卵巢组织中抗氧化酶表达水平的影响

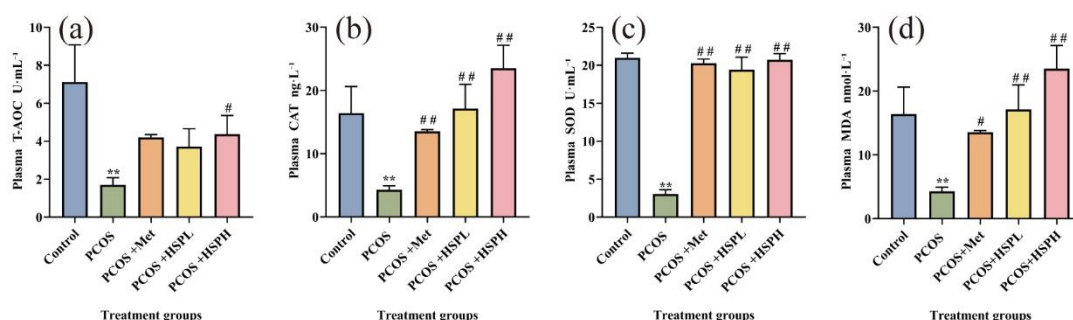


图 6 橙皮素干预对 PCOS 大鼠血清氧化应激指标水平的影响

Fig.6 Effects of HSP intervention on serum levels of oxidative stress-related factors in PCOS rats

注: (a) T-AOC 水平、(b) CAT 水平、(c) SOD 水平、(d) MDA 水平。

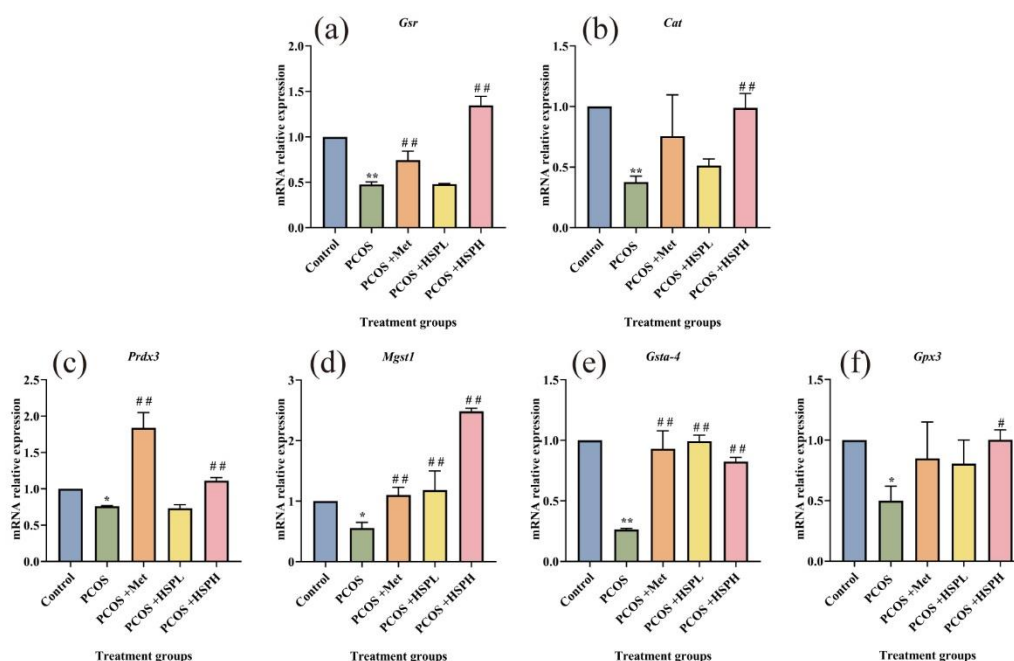


图 7 橙皮素干预对 PCOS 大鼠卵巢组织抗氧化酶 mRNA 表达水平的影响

Fig.7 Effects of HSP intervention on the mRNA expression levels of antioxidant enzymes in ovarian tissues of PCOS rats

注: (a) *Gsr* 水平、(b) *Cat* 水平、(c) *Prdx3* 水平、(d) *Mgst1* 水平、(e) *Gsta4* 水平、(f) *Gpx3* 水平。

PCOS 患者卵巢组织中活性氧 (Intracellular Reactive Oxygen Species, ROS) 的过度蓄积及代谢紊乱所产生的大量自由基会打破机体抗氧化系统的平衡, 共同驱动氧化应激水平的升高^[32], 最终引发过氧化应激损伤^[35-38]。此外, PCOS 患者常伴随雄激素过量、IR 及肥胖等典型病理特征, 这些因素均可独立或协同激活氧化应激通路, 形成恶性循环, 加速疾病进展^[39]。研究证实, HSP 通过激活 Nrf2 通路来减轻多种细胞类型及组织中的氧化应激损伤, 发挥保护功能^[40-42]。如图 6 所示, 与 Control 组相比, PCOS 组中 T-AOC、CAT 和 SOD 水平显著下降 ($P<0.01$),

MDA 水平升高 ($P<0.01$)；与 PCOS 组相比，PCOS+Met 组 T-AOC、SOD 水平显著升 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)，MDA 水平显著下降 ($P<0.01$)，CAT 水平无统计学意义；PCOS+HSPL 组 T-AOC、SOD 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)，MDA 和 CAT 水平无统计学意义；PCOS+HSPH 组 T-AOC、SOD 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$)，MDA 水平下降 ($P<0.01$)，CAT 水平无统计学意义。

进一步检测 PCOS 大鼠卵巢组织中抗氧化酶的表达水平（图 7）可知，与 Control 组比，PCOS 组 *Gsr*、*Cat*、*Mgst1*、*Prdx3*、*Gsta4* 和 *Gpx3* 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。与 PCOS 组比，PCOS+Met 组 *Prdx3*、*Mgst1*、*Gsta4* 和 *Gsr* 的 mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$)；PCOS+HSPL 组 *Mgst1* 和 *Gsta4* 的 mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$)，*Gsr*、*Cat*、*Gpx3* 和 *Prdx3* 的 mRNA 表达水平在 PCOS+HSPL 组无统计学差异。PCOS+HSPH 组 *Cat*、*Prdx3*、*Mgst1*、*Gsta4*、*Gsr* 和 *Gpx3* 的 mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。HSP 干预后 PCOS 大鼠卵巢中的氧化应激状态得到明显改善，其体内抗氧化酶活性也获得了一定程度的增强。

2.7 HSP 干预对 PCOS 大鼠卵巢纤维化的发生以及对 PCOS 大鼠卵巢纤维化相关蛋白表达的影响

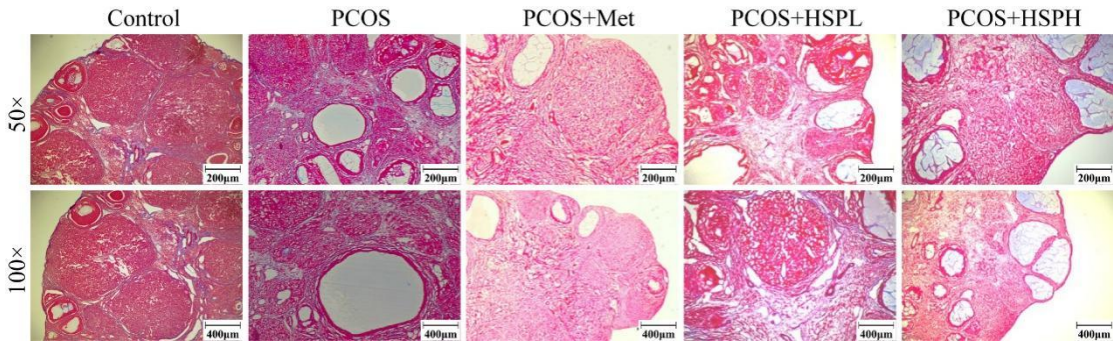


图 8 橙皮素干预后 PCOS 大鼠卵巢组织的 Masson 染色结果

Fig.8 Effects of HSP intervention on histological changes in ovarian tissues of PCOS rats

注：比例尺=200 µm，放大比例尺=400 µm。

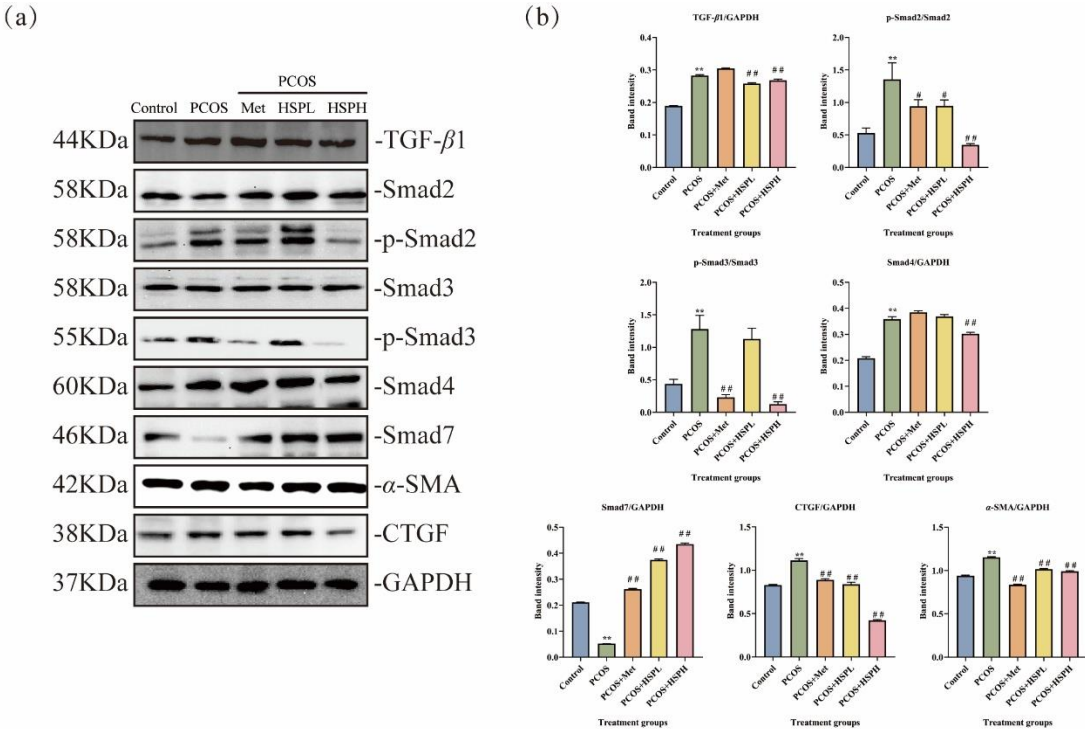


图 9 橙皮素干预对 PCOS 大鼠卵巢中纤维化相关蛋白表达的影响

Fig.9 Effects of HSP intervention on the expression of fibrosis-related proteins in ovarian tissues of PCOS rats

注：（a）Western blot 代表性条带；（b）灰度值定量分析。

CTGF 和 TGF- β 1 的异常高表达,是诱发大鼠卵巢组织纤维化发生的重要因子^[43]。TGF- β 1 通过激活 Smad2 和 Smad3 蛋白促进纤维化的发生,而 Smad7 则通过拮抗 TGF- β 1 活性,减缓纤维化的发生^[24]。磷酸化的 Smad2 和 Smad3 与 Smad4 产生三聚体复合物,形成的 TGF- β 1/Smads 复合物进一步转入细胞核,促进 CTGF 和 α -SMA 的基因转录^[19]。 α -SMA 是肌成纤维细胞的标志物,是纤维化发展的关键部分,也是组织成纤维化发生的重要指标之一^[44]。而 CTGF 参与介导了 TGF- β 1 的促纤维化效应,如增加 ECM 的合成和积累^[45]。我们观察发现,与 Control 组相比,PCOS 组卵巢纤维化程度明显增加(图 8)。与 PCOS 组相比,PCOS+Met 组和 PCOS+HSP 组卵巢纤维化程度明显降低。进一步检测卵巢纤维化相关蛋白表达发现(图 9),与 Control 组比,PCOS 组 α -SMA 和 CTGF 水平显著升高($P<0.01$)。与 PCOS 组相比,PCOS+Met 组 α -SMA 和 CTGF 水平显著降低($P<0.01$),TGF- β 1 水平无显著性差异;PCOS+HSPL 组 TGF- β 1、 α -SMA 和 CTGF 水平显著降低($P<0.01$);PCOS+HSPH 组 TGF- β 1、 α -SMA 和 CTGF 水平显著降低($P<0.01$)。此外,如图 9 所示,与 Control 组相比,PCOS 组中 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 和 Smad4 水平显著升高了,Smad7 显著降低($P<0.01$)。与 PCOS 组相比,PCOS+Met 组 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 显著降低($P<0.01$),Smad7 水平显著升高($P<0.01$),Smad4 无显著性差异;PCOS+HSPL 组 p-Smad2/Smad2 显著降低($P<0.01$),Smad7 显著升高($P<0.01$),Smad4 和 p-Smad3/Smad3 无显著性差异;PCOS+HSPH 组 p-Smad2/Smad2, p-Smad3/Smad3, Smad4 和 Smad4 显著降低($P<0.01$),Smad7 水平显著升高($P<0.01$)。经 HSP 与 Met 干预后,PCOS 大鼠卵巢组织内 TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3、Smad4、CTGF 和 α -SMA 水平均显著下调,同时 Smad7 表达水平显著升高,提示二者可通过抑制 TGF- β 1/Smads 信号通路过度激活,减轻卵巢组织纤维化损伤。本研究 WB 与 Masson 染色结果证实,HSP 可以通过抑制 TGF- β 1/Smads 信号通路过度激活,减轻卵巢组织纤维化损伤,并体现出一定的剂量依赖性。这种通路改变规律与 Zhou 等^[24]来曲唑 PCOS 多糖干预模型研究结论保持一致,证实 TGF- β /Smads 通路是多囊卵巢纤维化的核心靶点。实验结果显示,Met 在 TGF- β 1/Smads 信号通路的抑制作用弱于 HSP,说明 HSP 具备 Met 不具备的卵巢局部靶向优势。现有研究报道,抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)、白藜芦醇均可通过清除 ROS 间接抑制 TGF- β /Smads 通路活化,发挥抗纤维化作用^[46]。NAC 主要作为 ROS 直接清除剂,以抗氧化应激为主,对 TGF- β /Smads 通路转录水平的直接调控作用有限;白藜芦醇可同时激活 SIRT1、Nrf2,抑制 TGF- β /Smads 信号,但其在 PCOS 模型中改善高雄激素、恢复卵巢周期的效果有限,且存在体内生物利用度偏低的短板^[47]。对比来看,HSP 作为柑橘来源黄酮,除具备抗氧化属性外,本研究结果提示其可同时下调 TGF- β 1 蛋白表达,抑制 Smad2/3 磷酸化并上调负向调控蛋白 Smad7,实现对 TGF- β /Smads 通路的多重调控,同时可改善 PCOS 大鼠高雄激素血症、恢复动情周期,兼顾生殖内分泌调节与抗卵巢纤维化双重效应,体现出 HSP 的独特优势。本研究主要聚焦 TGF- β /Smads 通路,尚未对 Nrf2、AMPK、PI3K/Akt 开展蛋白水平验证,因此推测 HSP 存在多通路交叉调控网络,后续可设置通路干预实验进一步解析 HSP 调控 TGF- β /Smads 的上游分子。结合本研究对于 PCOS 性激素、氧化应激相关结果进一步分析,一方面,HSP 可以通过修复 HPOA 轴,抑制雄激素的过量产生来抑制卵巢间质细胞分泌 TGF- β 1,进一步抑制 Smad2、Smad3 的持续磷酸化;另一方面,HSP 可以通过清除卵巢中蓄积的 ROS,减弱纤维化通路激活。本研究解释了 HSP 多靶点改善 PCOS 生殖、代谢、卵巢结构损伤的分子逻辑,弥补现有天然黄酮干预 PCOS 研究的不足。

3 结论

本研究发现,HSP 可多靶点改善来曲唑诱导 PCOS 大鼠多项病理表型,改善 PCOS 大鼠的卵巢组织形态、性激素稳态、糖脂代谢紊乱及氧化应激状态。在分子机制层面,HSP 一方面改善卵巢组织内的氧化应激环境,降低 ROS 积累,削弱 TGF- β 1 活性;另一方面调控 Smad2/3 磷酸化并促进 Smad7 的表达,恢复 Smads 信号通路的抑制反馈,阻断纤维化基因转录激活,通过“氧化应激-TGF- β /Smads 信号轴-纤维化”调控机制协同改善 PCOS 卵巢结构性损伤,抑制卵巢纤维化,缓解 PCOS 相关症状。其中,高剂量 HSP 在改善部分内分泌指标方面甚至优于 Met,而在胰岛素抵抗及代谢相关指标方面则与 Met 表现出一定差异。Met 对卵巢局部微环境及纤维化通路的直接调控作用相对有限。相比之下,HSP 作为天然黄酮类化合物,除具备一定改善代谢紊乱的作用外,还可抑制 TGF- β /Smads 信号通路、减轻氧化应激,干预卵巢纤维化进程,体现多靶点药理特征,在 PCOS 综合管理中具备潜在应用价值。HSP 与 Met 可能通过不同通路参与 PCOS 病理调控,HSP 可作为 Met 的补充干预手段,在改善内分泌紊乱及卵巢局部病理改变方面发挥协同作用,而非完全替代现有标准治疗。上述发现为

HSP 治疗 PCOS 的临床研究奠定了基础。此外, 本实验每组动物样本量为 5 只, 属于探索性动物实验设计, 样本量偏小, 一定程度上会降低实验结果的稳健性与可重复性, 后续验证实验应适当扩大生物学样本量, 进一步确认 HSP 的效应, 并且本研究相关验证局限于动物模型体系, 所得实验结论能为临床转化提供前期依据, 但 HSP 应用于人体的安全剂量范围、最佳给药浓度以及长期干预的作用仍有待后续临床试验系统探究。

参考文献

- [1] ZHANG X, MIAO H, ZHOU J, et al. Association between preconception anti-androgen therapy and pregnancy outcomes of patients with PCOS: A prospective cohort study [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1109861.
- [2] SHAN H, LUO R, GUO X, et al. Abnormal Endometrial Receptivity and Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 904942.
- [3] YANG J, CHEN C. Hormonal changes in PCOS [J]. *The Journal of Endocrinology*, 2024, 261(1): e230342.
- [4] LONARDO M S, CACCIAPUOTI N, GUIDA B, et al. Hypothalamic-Ovarian axis and Adiposity Relationship in Polycystic Ovary Syndrome: Physiopathology and Therapeutic Options for the Management of Metabolic and Inflammatory Aspects [J]. *Current Obesity Reports*, 2024, 13(1): 51-70.
- [5] ZUCHELO L T S, ALVES M S, BARACAT E C, et al. Menstrual pattern in polycystic ovary syndrome and hypothalamic-pituitary-ovarian axis immaturity in adolescents: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 2024, 40(1): 2360077.
- [6] GARG A, PATEL B, ABBARA A, et al. Treatments targeting neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Clinical Endocrinology*, 2022, 97(2): 156-164.
- [7] WANG D, WANG W, LIANG Q, et al. DHEA-induced ovarian hyperfibrosis is mediated by TGF- β signaling pathway [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2018, 11: 6.
- [8] CHEN X, TAO C, WANG J, et al. Meta-analysis of therapeutic efficacy and effects of integrated traditional Chinese and Western medicine on coagulation and fibrinolysis system in patients with threatened abortion and polycystic ovary syndrome [J]. *American Journal of Translational Research*, 2022, 14(5): 2768-2778.
- [9] SAADATI S, MASON T, GODINI R, et al. Metformin use in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): Opportunities, benefits, and clinical challenges [J]. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 2025, 27 Suppl 3(Suppl 3): 31-47.
- [10] JAHAN S, ABID A, KHALID S, et al. Therapeutic potentials of Quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using Letrozole induced rat model: a histological and a biochemical study [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2018, 11: 26.
- [11] CARDONA F, ANDRÉS-LACUEVA C, TULIPANI S, et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(8): 1415-1422.
- [12] SHEN N, WANG T, GAN Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity [J]. *Food Chemistry*, 2022, 383: 132531.
- [13] AL-KHAYRI J M, SAHANA G R, NAGELLA P, et al. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2901.
- [14] MUKUND V, MUKUND D, SHARMA V, et al. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer [J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017, 119: 13-22.
- [15] HASAN A K, BABAEI E, AL-KHAFI A S K. Hesperetin effect on MLH1 and MSH2 expression on breast cancer cells BT-549 [J]. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2023, 14(3): 241-247.
- [16] SHAFIEE L, PISHVA M S, HOSSEINZADEGSN R, et al. Hesperetin reduces neuronal death in an SHSY5Y Alzheimer's model by inhibiting inflammation and apoptosis and pyroptosis cell death pathways [J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 41901.
- [17] YANG H, WANG Y, XU S, et al. Hesperetin, a Promising Treatment Option for Diabetes and Related Complications: A Literature Review [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(28): 8582-8592.
- [18] EDEPLI B G, YABA A. Molecular mechanisms of ovarian fibrosis [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2025, 32(1): gaaf058.
- [19] WANG K, LI Y. Signaling pathways and targeted therapeutic strategies for polycystic ovary syndrome [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1191759.

- [20] WANG H, ZHOU H, LIU Z, et al. The stromal microenvironment of ovary: a novel area in polycystic ovary syndrome [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2026, 19(1): 207.
- [21] RIZK EL-ADWY N S, EL-ASHMAWY N E, AL-ASHMAWY G M, et al. Paraxanthine and azilsartan attenuate gentamicin-induced renal fibrosis via modulation of TGF- β 1/Smad3/7 signaling and miRNA-21/miRNA-200b expression [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2026, 24(1): 684.
- [22] XU J, XIE J, ZHANG M, et al. Pharmacological effects of Chinese herbal active compounds in the intervention of polycystic ovary syndrome: focusing on molecular mechanisms [J]. *All Life*, 2026, 19(1): 2612407.
- [23] 王娟,杨雯钦,刘进,等.脂联素通过上调 PPAR α /HOXA10 通路改善多囊卵巢综合征大鼠的子宫内膜容受性[J].*南方医科大学学报*,2024,44(2):298.
- [24] ZHOU Y Y, WU Y Q, CHONG C J, et al. Irpex lacteus polysaccharide exhibits therapeutic potential for ovarian fibrosis in PCOS rats via the TGF- β 1/smad pathway [J]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e18741.
- [25] NAJJAR KHALILABAD S, MIRZAEI A, ASKARI V R, et al. How hesperidin and Hesperetin, as promising food Supplements, combat cardiovascular diseases: A systematic review from bench to bed [J]. *Journal of Functional Foods*, 2024, 120: 106358.
- [26] 闫传智,宋子纯,徐婕,等.南山楂总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠的改善作用[J].*中成药*,2025,47(12):3934-3942.
- [27] 黄秋萍,谢晨阳,李新宇,等.L-茶氨酸改善来曲唑诱导的多囊卵巢综合征大鼠临床症状[J].*茶叶科学*,2021,41(6):831-842.
- [28] LIAO B, QIAO J, PANG Y. Central Regulation of PCOS: Abnormal Neuronal-Reproductive-Metabolic Circuits in PCOS Pathophysiology [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 667422.
- [29] RAZZAQ T, ARIF M, AHMAD S Z, et al. THE PATHOGENESIS OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME (PCOS): THE HYPOTHESIS OF FUNCTIONAL OVARIAN HYPERANDROGENISM REVISITED [J]. *Contemporary Journal of Social Science Review*, 2025, 3(1): 1808-1822.
- [30] FANIS P, NEOCLEOUS V, PAPAPETROU I, et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (GnRHR) and Hypogonadotropic Hypogonadism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15965.
- [31] GLUECK C J, GOLDENBERG N. Characteristics of obesity in polycystic ovary syndrome: Etiology, treatment, and genetics [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 108-120.
- [32] NORTON L, SHANNON C, GASTALDELLI A, et al. Insulin: The master regulator of glucose metabolism [J]. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2022, 129: 155142.
- [33] ZHAO H, ZHANG J, CHENG X, et al. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome across various tissues: an updated review of pathogenesis, evaluation, and treatment [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2023, 16(1): 9.
- [34] KONG R, WANG N, LUO H, et al. Hesperetin Mitigates Bile Duct Ligation-Induced Liver Fibrosis by Inhibiting Extracellular Matrix and Cell Apoptosis via the TGF- β 1/Smad Pathway [J]. *Current Molecular Medicine*, 2018, 18(1): 15-24.
- [35] NAWROCKA-RUTKOWSKA J, SZYDŁOWSKA I, JAKUBOWSKA K, et al. The Role of Oxidative Stress in the Risk of Cardiovascular Disease and Identification of Risk Factors Using AIP and Castelli Atherogenicity Indicators in Patients with PCOS [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1700.
- [36] SOLTANI M, MOGHIMIAN M, ABTAHI-EVARI S H, et al. he Effects of Clove Oil on The Biochemical and Histological Parameters, and Autophagy Markers in Polycystic Ovary Syndrome-Model Rats [J]. *International Journal of Fertility & Sterility*, 2023, 17(3): 187-194.
- [37] MOHAMMADI M. Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review [J]. *International Journal of Preventive Medicine*, 2019, 10: 86.
- [38] PEKER N, TURAN G, EGE S, et al. The effect of clomiphene citrate on oxidative stress parameters in polycystic ovarian syndrome [J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 2021, 41(1): 112-117.
- [39] LI R, LI Z, HUANG Y, et al. The effect of magnesium alone or its combination with other supplements on the markers of inflammation, OS and metabolism in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS): A systematic review [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 974042.
- [40] MUHAMMAD T, IKRAM M, ULLAH R, et al. RETRACTED: Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 648.
- [41] ZHU C, DONG Y, LIU H, et al. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1

- signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed Pharmacother.* [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 88: 124-133.
- [42] CHEN X, WEI W, LI Y, et al. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 308: 269-278.
- [43] MCILVENNA L C, PATTEN R K, MCAINCH A J, et al. Transforming Growth Factor Beta 1 Alters Glucose Uptake but Not Insulin Signalling in Human Primary Myotubes From Women With and Without Polycystic Ovary Syndrome [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 732338.
- [44] LIU Z Q, YAN C Z, ZHONG S M, et al. Dietary Anrodia cinnamomea Polysaccharide Intervention Modulates Clinical Symptoms by Regulating Ovarian Metabolites and Restructuring the Intestinal Microbiota in Rats with Letrozole-Induced PCOS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(50): 27884-27901.
- [45] MIAO Z L, GUO L, WANG Y X, et al. The intervention effect of Rosiglitazone in ovarian fibrosis of PCOS rats [J]. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2012, 25(1): 46-52.
- [46] CHANG H, SHI B, WANG Y, et al. Effect and mechanism of resveratrol against polycystic ovary syndrome: a review [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2025, 16: 1529231.
- [47] ASHRAFIZADEH M, NAJAFI M, OROUEI S, et al. Resveratrol Modulates Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling Pathway for Disease Therapy: A New Insight into Its Pharmacological Activities [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(8): 261.