

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.03.018

论著·基础

黄连素通过重塑肠道菌群和调节 PI3K/AKT 信号通路改善多囊卵巢综合征小鼠的作用机制研究

杨宇琦, 吴丽娜, 孙克, 邢伟园, 侯越, 张丽文



基金项目: 上海市卫生健康委员会科研课题(20204Y0392); 上海市闵行区自然科学研究课题(2023MHZ040)

作者单位: 201100 上海, 复旦大学附属上海市第五人民医院妇产科

通信作者: 张丽文, E-mail: 18918177819@163.com

【摘要】目的 探究黄连素(BBR)对多囊卵巢综合征(PCOS)小鼠肠道菌群的调节作用及其治疗机制。**方法** 于2021年6月—2022年6月在复旦大学附属上海市第五人民医院实验动物中心进行实验。清洁级健康雌性C57BL/6J小鼠24只,随机选取6只作为正常对照组,其余18只应用来曲唑灌胃制备PCOS模型。造模成功后,将造模小鼠随机分为模型(PCOS)组、阳性药达英-35($0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组和BBR($100\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组,每组6只,给予相应药物治疗14 d。收集小鼠结肠内粪便,采用16S rDNA测序检测肠道菌群;称小鼠体质量,观察小鼠阴道脱落细胞形态学改变;检测血清性激素和胰岛素水平;HE染色观察卵巢病理结构;免疫组化检测小鼠结肠Claudin-1、Occludin表达;Western-blot检测卵巢组织PI3K/AKT通路相关蛋白表达。**结果** 16S rDNA测序结果显示,PCOS组肠道菌群多样性较正常对照组发生变化。在属水平,与正常对照组比较,PCOS组布劳特氏菌属、韦永氏球菌属、孪生球菌属和梭形杆菌属等有害菌属丰度增加;BBR治疗后小鼠肠道菌群紊乱状态得到改善,乳酸菌属等有益菌属丰度增加。与正常对照组比较,PCOS组小鼠雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)和胰岛素敏感系数(ISI)水平降低($t/P=2.847/0.017, 3.079/0.012, 3.541/0.005$),体质量和睾酮(T)、黄体生成素(LH)、LH/FSH、空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)水平升高($t/P=4.782/0.013, 4.626/0.001, 5.703/<0.001, 2.578/0.028, 4.156/0.002, 3.255/0.009, 7.439/<0.001$),动情周期紊乱,光镜下卵巢结构符合PCOS病理特征,Claudin-1、Occludin、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达下降($t/P=3.806/0.003, 3.795/0.004, 13.474/<0.001, 17.285/<0.001$)。与PCOS组比较,达英-35组 E_2 、FSH和ISI水平升高($t/P=2.389/0.038, 3.354/0.007, 3.198/0.010$),体质量和T、LH、LH/FSH、FINS、HOMA-IR水平降低($t/P=3.133/0.011, 3.416/0.007, 4.596/0.001, 2.327/0.042, 2.908/0.016, 6.096/<0.001$),动情周期和卵巢结构得到改善,Claudin-1、Occludin、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达升高($t/P=2.390/0.038, 2.247/0.048, 7.323/<0.001, 7.564/<0.001$);BBR组ISI水平升高($t/P=3.198/0.010$),体质量和T、LH、LH/FSH、FPG、FINS、HOMA-IR水平明显降低($t/P=3.668/0.004, 4.602/0.001, 6.101/<0.001, 2.535/0.030, 5.950/<0.001, 2.914/0.015, 7.630/<0.001$),动情周期和卵巢结构得到改善,Claudin-1、Occludin、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达升高($t/P=3.799/0.003, 3.185/0.010, 7.473/<0.001, 8.187/<0.001$)。**结论** 来曲唑诱导的PCOS小鼠存在菌群失调,BBR通过调节肠道菌群分布可能有助于激活PI3K/AKT通路,改善肠道屏障功能,达到治疗PCOS的目的。

【关键词】 多囊卵巢综合征; 黄连素; 肠道菌群; PI3K/AKT信号通路; 小鼠**【中图分类号】** R711.75 **【文献标识码】** A

Mechanism of action of flavopiridol to improve polycystic ovary syndrome by remodeling intestinal flora and regulating PI3K/AKT signaling pathway Yang Yuqi, Wu Lina, Sun Ke, Xing Weiyuan, Hou Yue, Zhang Liwen. Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 201100, China

Funding program: Scientific Research Project of Shanghai Municipal Health and Wellness Commission (20204Y0392); Natural Science Research Project of Minhang District, Shanghai (2023MHZ040)

Corresponding author: Zhang Liwen, E-mail: 18918177819@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of BBR on the intestinal flora of mice with polycystic ovary syndrome (PCOS) and its therapeutic mechanism. **Methods** In June 2021–June 2022, experiments were carried out in the Experimental Animal Center of Shanghai Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University, 24 clean-grade healthy fe-

male C57BL/6J mice, 6 mice were randomly selected as the normal control group, and the remaining 18 mice were used to prepare the PCOS model by letrozole gavage. After successful modeling, the modeled mice were randomly divided into the model (PCOS) group, the positive drug daunin-35 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group and the BBR ($100 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) groups, 6 mice in each group, were given the corresponding drugs for 14 d. Feces were collected from the colon of the mice, and 16S rDNA sequencing was used to detect intestinal flora; mice were weighed, and morphological changes of vaginal exfoliated cells were observed; serum sex hormone and insulin levels were detected; HE staining was used to observe the pathological structure of the ovary; immunohistochemistry was used to detect the expression of Claudin-1 and Occludin in the colon of mice; and Western-blot was used to detect the expression of proteins related to the PI3K/AKT pathway in the ovary tissues. **Results** The 16S rDNA sequencing showed that the diversity of intestinal flora in the PCOS group was changed compared with that in the normal control group. At the genus level, the abundance of harmful bacteria such as Blautia, Fusobacterium spp., Coccidioides immitis, Coccidioides twins and Clostridium spp. was increased in the PCOS group compared with the normal control group, while the disordered state of the intestinal flora of the mice was improved by BBR, and the abundance of beneficial bacteria, such as Lactobacillus spp., was increased. Compared with the normal control group, mice in the PCOS group had reduced levels of estradiol (E2), follicle-stimulating hormone (FSH), and insulin sensitivity index (ISI) ($t/P = 2.847/0.017, 3.079/0.012, 3.541/0.005$), body mass and testosterone (T), luteinizing hormone (LH), LH/FSH, fasting glucose (FPG), fasting insulin (FINS), and insulin resistance index (HOMA-IR) levels were elevated ($t/P = 4.782/0.013, 4.626/0.001, 5.703/ <0.001, \text{ and } 2.578/0.028, 4.156/0.002, 3.255/0.009, 7.439/ <0.001$), disturbances in the motility cycle, light microscopic ovarian structures consistent with PCOS pathology, and decreased expression of Claudin-1, Occludin, p-PI3K/PI3K, and p-AKT/AKT ($t/P = 3.806/0.003, 3.795/0.004, 13.474/ <0.001, 17.285/ <0.001$). Compared with the PCOS group, E2, FSH, and ISI levels were elevated ($t/P = 2.389/0.038, 3.354/0.007, 3.198/0.010$), and body mass and T, LH, LH/FSH, FINS, and HOMA-IR levels were decreased in the darbepoetin-35 group ($t/P = 3.133/0.011, 3.416/0.007, 4.596/0.001, 2.327/0.042, 2.908/0.016, 6.096/ <0.001$), improved motility cycle and ovarian structure, Claudin-1, Occludin, p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT expression was elevated ($t/P = 2.390/0.038, 2.247/0.048, 7.323/ <0.001, 7.564/ <0.001$); BBR group ISI levels were elevated ($t/P = 3.198/0.010$), and body mass and T, LH, LH/FSH, FPG, FINS, HOMA-IR levels were decreased ($t/P = 3.668/0.004, 4.602/0.001, 6.101/ <0.001, 2.535/0.030, 5.950/ <0.001, 2.914/0.015, 7.630/ <0.001$), improved motility cycle and ovarian structure, improved levels of Claudin-1, Occludin, p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT expression was elevated ($t/P = 3.799/0.003, 3.185/0.010, 7.473/ <0.001, 8.187/ <0.001$). **Conclusion** Letrozole-induced PCOS mice have dysbiosis, BBR may help to activate the PI3K/AKT pathway and improve the intestinal barrier function by regulating the distribution of intestinal flora to achieve the therapeutic purpose of PCOS.

【Key words】 Polycystic ovary syndrome; Flavopiridol; Intestinal flora; PI3K/AKT signaling pathway; Mice

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是女性最常见的生殖内分泌疾病,也是育龄期女性不孕的重要原因^[1]。PCOS 发病机制较为复杂,其治疗方法具有局限性。因此,寻找有效的治疗药物至关重要。黄连素 (berberine, BBR) 是一种天然异喹啉生物碱,具有降糖、降脂和抗炎等有益作用。据报道, BBR 对 PCOS 显示出良好的临床疗效^[2],但其具体机制尚未可知。研究表明,肠道菌群及其代谢产物失调与 PCOS 的生殖和代谢表型存在联系^[3-4],靶向调节肠道菌群可改善 PCOS^[5-6]。由于 BBR 吸收率低,其分解代谢主要集中在胃肠道,可能有效调节肠道菌群和肠道黏膜屏障^[7]。因此,本研究采用来曲唑诱导的 PCOS 小鼠模型,利用 16S rDNA 基因测序技术,研究 BBR 对 PCOS 肠道菌群的调节作用及可能机制,报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 (1) 动物: 清洁级健康雌性 C57BL/6J 小鼠 24 只, 6 ~ 8 周龄, 体质量 15 ~ 20 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 合格证号: SCXK (京) 2020-0004。饲养在特定的无菌条件下, 标准温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 45% ~ 70%, 光暗周期 12/12 h, 并给予自由饮水和标准饮食。屏障环境适应 1 周后进行后续实验。(2) 试剂: 来曲唑 (货号 H199991001) 购自江苏恒瑞医药公司; 达英-35 (货号 j20140114) 购自德国拜耳公司; 黄连素 (批号 B21449) 购自上海源叶生物公司; 睾酮 (T, 货号 H090-1-1)、雌二醇 (E₂, 货号 H102-1-1) 和促黄体生成素 (LH, 货号 H206-1-2) 购自南京建成公司; 空腹胰岛素 (FINS, 货号 ml060484) 和卵泡刺激素 (FSH, 货号 ml059034) ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物公司; HE 检测试剂盒 (货号 G1003) 购自武汉塞维尔生物公司; 抗 Occludin (GB111401)、Claudin-1 (GB14066) 抗体购自美

国 Servicebio 公司; 抗 PI3K (4255S) 和 PI3K-p85 (4292S) 抗体购自美国 CST 公司; 抗 AKT (ab8805) 和 AKT-pT30 磷酸化抗体 (ab32445) 购自美国 Abcam 公司。(3) 仪器设备: 离心机 (AXTGL16M) 购自江苏恒诺仪器制造有限公司; 切片机 (RM2235) 和石蜡包埋机 (G1150H) 购自德国徕卡公司; I-Sanger 生信云平台 (<https://www.i-sanger.com/>)。

1.2 PCOS 模型构建及分组处理 2021 年 6 月—2022 年 6 月在复旦大学附属上海市第五人民医院实验动物中心进行实验。采用随机数字表法将 24 只雌鼠分为正常对照组、模型 (PCOS) 组、阳性药达英-35 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组和 BBR ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组, 每组 6 只。除正常对照组外, 其余小鼠均予以来曲唑 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 溶于 1% 羧甲基纤维素) 灌胃诱导 PCOS 模型, 连续 21 d, 正常对照组给予等容积 0.9% 氯化钠溶液。以第 1 次给来曲唑为第 1 天计算, 第 8 天开始连续每日取小鼠阴道上皮细胞涂片观察脱落细胞改变, 分析动情周期变化, 以阴道上皮细胞持续角化者为造模成功。造模成功后, 第 22 天开始给予相应剂量药物连续灌胃治疗 14 d, 正常对照组和 PCOS 组给予等容积 0.9% 氯化钠溶液。实验期间, 每周监测小鼠体重。实验结束后, 禁食 10 h 后过量麻醉处死, 收集血清、双侧卵巢和结肠作进一步分析。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 16S rDNA 基因测序检测各组小鼠肠道菌群变化: 实验结束后, 收集各组小鼠粪便样本, 按照文献 [8] 报道方法, 从小鼠粪便样本中提取微生物基因组 DNA。PCR 扩增方法如下: 98°C 2 min, 随后在 98°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s 下循环 25 次, 最后在 72°C 延伸 5 min。使用正向引物 338 F ($5' \text{-ACTCTACGG-GAGGCAGCA-3}$) 和反向引物 806 R ($5' \text{-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3}$) 在 72°C 下进行最终延长 5 min, 制备文库 (连接接头和指示剂) 和纯化。微生物组生物学信息学采用 QIIME2 2019.4 进行, 并根据官方教程 (<https://docs.qiime2.org/2019.4/tutorials/>) 进行轻微修改。基于操作分类单元 (OTU) 注释, 结合门、纲、目、科、属等分类水平, 生成相对丰度谱。采用 Pearson 相关系数矩阵进行 UPGMA 聚类, 并在 R 统计软件包中开发自定义脚本生成热图, 对差异较大的每个类群或 OTU 进行评价。

1.3.2 血清激素水平测定: 各组小鼠末次给药后, 于眼眶后静脉丛采血 0.5 ~ 1.0 ml, 室温静置 2 h 后, 4°C 离心收集上层血清。利用酶联免疫吸附法并按照试剂盒说明书检测血清激素水平: T、 E_2 、FSH、LH 和 FINS。

1.3.3 胰岛素代谢相关指标测定: 上述血液以 Hitachi-7600 自动生化分析仪测量空腹血糖 (FPG); 分别根据公式 $[\text{FINS} (\mu\text{IU/ml}) \times \text{FPG} (\text{mmol/L}) / 22.5]$ 和 $1 / [\text{FPG} (\text{mmol/L}) \times \text{FINS} (\mu\text{IU/ml})]$ 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 和胰岛素敏感系数 (ISI)。

1.3.4 HE 染色检测小鼠卵巢病理结构: 取各组小鼠卵巢组织, 4°C 下以 4% 多聚甲醛固定 48 h, 常规石蜡包埋, 切片厚 $5 \mu\text{m}$ 。利用 HE 染色试剂盒, 并按照说明书步骤行 HE 染色。光镜下评估创面组织形态学变化。

1.3.5 结肠 Occludin、Claudin-1 表达: 将结肠组织切片放入 65°C 烤箱烘烤 30 min 后, 二甲苯脱蜡, 酒精梯度复水。在 0.01 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中煮沸 20 min, 抗原修复。3% H_2O_2 封闭切片 5 min 后, 室温下山羊血清封闭 15 min, 分别用紧密连接蛋白 Occludin 和 Claudin-1 的特异性一抗 (1:200) 4°C 下孵育过夜; 次日, 用生物素标记的山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶在室温下各孵育 15 min。3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色 5 min, 苏木精复染。使用光学显微镜获得图像, 阳性结果呈棕褐色, 并进行蛋白定量分析。

1.3.6 Western-blot 检测小鼠卵巢组织 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达: 各组小鼠卵巢组织在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中进行裂解, 并利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。20 μg 卵巢蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 并在 100 V 下转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上 60 ~ 80 min。非特异性结合点在室温下用 5% 脱脂牛奶在三相缓冲盐水 (TBS-T) 中阻断 1 h 后, 用 PI3K (1:500)、p-PI3K (1:300)、AKT (1:500)、p-AKT (1:300) 和 β -actin (1:5000) 的一抗孵育 PVDF 膜。次日, 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:5000) 作为二抗, 以 β -actin 为内参, 采用 Image J 软件进行定量分析。

1.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0 绘图并利用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析并进行 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肠道菌群丰度和多样性比较

2.1.1 OUT 分析及物种组成分析: 正常对照组、PCOS 组、达英-35 组和 BBR 组特有的 OTU 数分别为 9 499 (25.04%)、6 534 (17.32%)、7 089 (18.79%) 和 7 212 (19.11%)。根据 OUT 聚类的结果, 可获得 4 组小鼠

在门、纲、目、科、属、种水平的丰度信息,见表 1。

表 1 4 组小鼠肠道各级微生物分类群的数量

Tab. 1 Number of microbial taxa at all levels of the intestinal tract of mice in the 4 groups

组别	门	纲	目	科	属	种
正常对照组	50	87	102	174	215	99
PCOS 组	48	87	97	169	219	106
达英-35 组	44	80	91	179	214	104
BBR 组	45	82	97	179	233	109

2.1.2 α 多样性分析: 正常对照组、PCOS 组、达英-35 组和 BBR 组小鼠肠道菌群的 Simpson 指数分别为 0.986 2、0.472 3、0.887 6 和 0.978 4, Shannon 指数分别为 9.089 2、3.234 1、8.672 8 和 8.423 6, 4 组间 Simpson 和 Shannon 指数比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.1.3 β 多样性分析: 剔除远离总体的部分样本后, 非加权主坐标分析 (PCoA) 结果表明, 4 组肠道菌群组成有明显差异。Axis 1 和 Axis 2 轴对结果的解释度分别为 7.3% 和 5.5%, 见图 1。

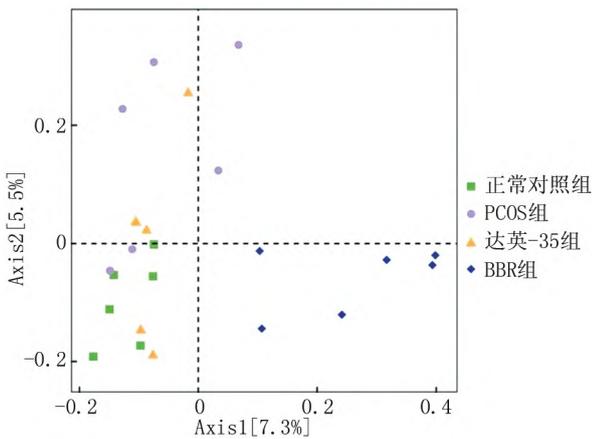


图 1 4 组小鼠 PCoA 分析结果

Fig. 1 Results of PCoA analysis in the 4 group of mice

2.1.4 物种差异分析:

2.1.4.1 门水平菌群丰度比较 4 组小鼠肠道门水平菌群丰度比较(前 20 位), 菌群组成以厚壁杆菌门和拟杆菌门为主。正常对照组、PCOS 组、达英-35 组和 BBR 组厚壁杆菌门占比分别为 (72.54 ± 2.36)%、(72.58 ± 2.28)%、(76.81 ± 3.23)% 和 (74.23 ± 2.98)% , 拟杆菌门占比分别为 (25.87 ± 1.67)%、(27.13 ± 1.89)%、(21.67 ± 1.62)% 和 (24.13 ± 1.87)%。4 组间厚壁杆菌门和拟杆菌门丰度比较差异

无统计学意义 ($F/P = 0.173 / 0.894, 0.241 / 0.812$)。

2.1.4.2 属水平菌群丰度比较 在属水平上, 与正常对照组比较, PCOS 组小鼠中布劳特氏菌属 (Blautia)、韦永氏球菌属 (Veillonella)、孪生球菌属 (Gemella) 和梭形杆菌属 (Fusobacterium) 的丰度增加, 颤螺旋菌属 (Helicobacter)、粪球菌属 (Coprococcus) 和瘤胃球菌属 (Ruminococcus) 的丰度减少 (P 均 < 0.05); 与 PCOS 组比较, BBR 组普氏菌属 (Prevotell)、韦永氏球菌属 (Veillonella)、孪生球菌属 (Gemella) 和梭形杆菌属 (Fusobacterium) 的丰度降低, 而布劳特氏菌属 (Blautia)、颤螺旋菌属 (Helicobacter)、瘤胃球菌属 (Ruminococcus)、乳酸菌属 (Lactobacillus)、粪球菌属 (Coprococcus)、副杆菌属 (Parabacteroides)、粪杆菌属 (Faecalibacterium)、罗氏菌属 (Roseburia)、酪酸菌属 (Butyrivibrio)、链球菌属 (Streptococcus) 和帕拉普氏菌属 (Paraprevotella) 等有益菌属的丰度均增加 (P 均 < 0.05)。前 15 位有丰度差异的属水平菌群见图 2。

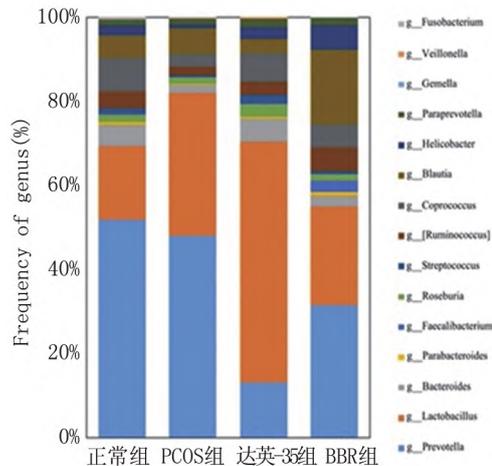


图 2 4 组小鼠属水平肠道菌群丰度比较

Fig. 2 Comparison of gut flora abundance at genus level in 4 groups of mice

2.2 各组小鼠体质量比较 正常对照组、PCOS 组、达英-35 组和 BBR 组小鼠末次给药时体质量分别为 (16.23 ± 0.87) g、(22.76 ± 3.23) g、(18.45 ± 0.96) g 和 (17.88 ± 0.43) g。与正常对照组小鼠比较, PCOS 组小鼠体质量增加 ($t/P = 4.782 / 0.013$); 与 PCOS 组比较, 达英-35 组和 BBR 组小鼠体质量明显降低 ($t/P = 3.133 / 0.011, 3.668 / 0.004$)。

2.3 各组小鼠发情周期比较 小鼠月经周期呈现动情前期 (P)、动情期 (E)、动情间期 (M) 和动情后期 (D), 4 ~ 5 d 为 1 个性周期且规律出现; 阴道涂片细胞

学分析发现,正常对照组小鼠月经周期正常,PCOS 组小鼠 D 期延长,提示无排卵;达英-35 组和 BBR 组小鼠发情周期在治疗后逐渐恢复规律,见图 3。

2.4 各组小鼠血清性激素水平比较 与正常对照组比较,PCOS 组小鼠血清 T、LH 和 LH/FSH 水平升高, E₂ 和 FSH 水平降低($t/P=4.626/0.001, 5.703/ <0.001, 2.578/0.028, 2.847/0.017, 3.079/0.012$)。与 PCOS 组比较,达英-35 组小鼠血清 T、LH 和 LH/FSH 水平降低, E₂ 和 FSH 水平升高 ($t/P=3.416/0.007, 4.596/0.001, 2.327/0.042, 2.389/0.038, 3.354/0.007$), BBR 组血清 T、LH 和 LH/FSH 水平亦降低 ($t/P=4.602/0.001, 6.101/ <0.001, 2.535/0.030$),但 PCOS 组和 BBR 组 E₂ 和 FSH 水平比较差异无统计学意义 ($t/P=1.031/0.327, 1.623/0.136$),见表 2。

2.5 各组小鼠胰岛素代谢相关指标水平比较 与正常对照组比较,PCOS 组小鼠 FPG、FINS 和 HOMA-IR 水平升高,ISI 降低 ($t/P=4.156/0.002, 3.255/0.009, 7.439/ <0.001, 3.541/0.005$);与 PCOS 组比较, BBR 组 FPG、FINS 和 HOMA-IR 水平明显下调,ISI 上调 ($t/P=5.950/ <0.001, 2.914/0.015, 7.630/ <0.001, 3.198/0.010$);达英-35 组和 PCOS 组比较, FINS 和 HOMA-IR 水平亦降低,ISI 升高 ($t/P=2.908/0.016, 6.096/ <0.001, 3.194/0.010$),而 FPG 差异无统计学

意义($t/P=0.906/0.386$),见表 3。

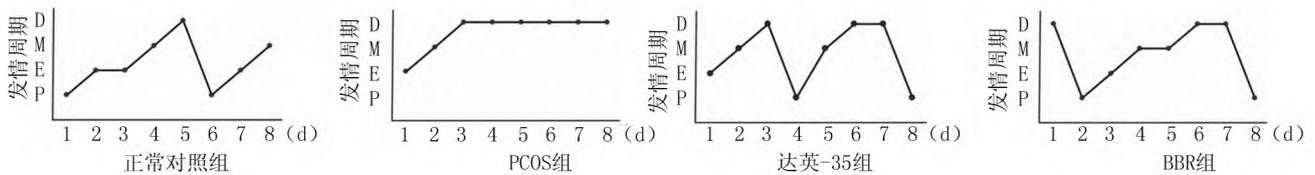
表 3 各组小鼠胰岛素代谢水平比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of insulin metabolism levels in mice in each group of mice

组别	FPG (mmol/L)	FINS (μ IU/ml)	ISI	HOMA-IR
正常对照组	3.31 \pm 0.89	6.03 \pm 0.94	0.056 \pm 0.021	0.76 \pm 0.19
PCOS 组	5.18 \pm 0.65 ^a	8.45 \pm 1.56 ^a	0.024 \pm 0.007 ^a	1.62 \pm 0.21 ^a
达英-35 组	4.81 \pm 0.76	6.17 \pm 1.12 ^b	0.041 \pm 0.011 ^b	1.03 \pm 0.11 ^b
BBR 组	3.42 \pm 0.32 ^b	6.13 \pm 1.17 ^b	0.048 \pm 0.017 ^b	0.92 \pm 0.08 ^b
F 值	23.754	13.578	10.707	70.346
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 PCOS 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.6 各组小鼠卵巢组织病理形态比较 HE 染色结果显示,与正常对照组比较,PCOS 组小鼠的卵巢形态发生了改变,卵巢皮质增厚,结构不均匀,无黄体或黄体数量极少,囊性卵泡体积增大,卵巢呈典型的多囊性改变,原始卵泡和初级卵泡数量明显减少。与 PCOS 组比较,达英-35 组镜下可见卵巢皮质层略有变薄,黄体数量增多,卵泡体积变小; BBR 组小鼠卵巢皮质层显著变薄,黄体数量明显增多,卵泡形态完整,排列整齐,见图 4。



注: P. 动情前期; E. 动情期; M. 动情间期; D. 动情后期。

图 3 各组小鼠发情周期比较

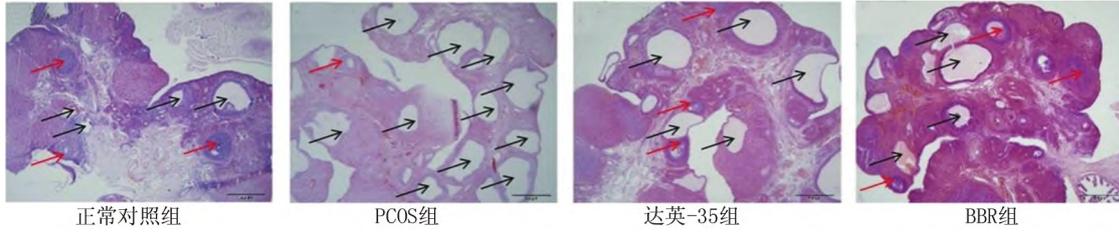
Fig.3 Comparison of estrous cycle of mice in each group

表 2 各组小鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of serum sex hormone levels in mice in each group of mice

组别	n	T (μ g/L)	E ₂ (pmol/L)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	LH/FSH
正常对照组	6	5.06 \pm 1.65	157.32 \pm 26.68	5.54 \pm 1.78	6.89 \pm 0.76	1.24 \pm 0.32
PCOS 组	6	10.78 \pm 2.54 ^a	116.12 \pm 23.34 ^a	2.67 \pm 1.43 ^a	9.87 \pm 1.03 ^a	2.69 \pm 1.34 ^a
达英-35 组	6	6.13 \pm 2.16 ^b	147.32 \pm 21.88 ^b	5.42 \pm 1.41 ^b	7.34 \pm 0.87 ^b	1.35 \pm 0.44 ^b
BBR 组	6	4.43 \pm 2.23 ^b	132.23 \pm 30.34	3.92 \pm 1.23	6.43 \pm 0.92 ^b	1.24 \pm 0.41 ^b
F 值		4.384	6.146	9.036	30.494	10.214
P 值		0.016	0.004	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 PCOS 组比较,^b $P < 0.05$ 。



注: 黑色箭头所示为卵泡, 红色箭头所示为黄体。

图 4 各组小鼠卵巢组织病理形态比较(HE 染色, ×100)

Fig. 4 Comparison of histopathologic morphology of mouse ovary in each group (HE staining, ×100)

2.7 各组小鼠结肠组织 Claudin-1 和 Occludin 表达水平比较 免疫组化结果显示, 与正常对照组比较, PCOS组小鼠结肠组织 Claudin-1 和 Occludin 蛋白水平下降 ($t/P = 3.806/0.003, 3.795/0.004$); 与 PCOS 组比较, 达英-35 组和 BBR 组小鼠结肠组织 Claudin-1 和 Occludin 表达均升高 ($t/P = 2.390/0.038, 2.247/0.048; 3.799/0.003, 3.185/0.010$), 见表 4。

表 4 各组小鼠结肠组织 Claudin-1、Occludin 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of the expression levels of Claudin-1 and Occludin in the colonic tissues of mice in each group

组别	n	Claudin-1	Occludin
正常对照组	6	23.67 ± 6.83	14.23 ± 2.56
PCOS 组	6	12.16 ± 2.87 ^a	9.13 ± 2.07 ^a
达英-35 组	6	19.86 ± 7.35 ^b	12.79 ± 3.41 ^b
BBR 组	6	22.91 ± 6.31 ^b	13.89 ± 3.02 ^b
F 值		7.915	6.576
P 值		0.001	0.002

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PCOS 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.8 各组小鼠卵巢组织 PI3K/AKT 相关蛋白表达比较 与正常对照组比较, PCOS 组小鼠卵巢组织 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值降低 ($t/P = 13.474 / < 0.001, 17.285 / < 0.001$); 与 PCOS 组比较, 达英-35 组和 BBR 组小鼠卵巢组织 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值升高 ($t/P = 7.323 / < 0.001, 7.564 / < 0.001; 7.473 / < 0.001, 8.187 / < 0.001$), 见表 5。

3 讨论

PCOS 是育龄妇女常见的内分泌紊乱性疾病, 患者面临排卵障碍引起的不孕症等疾病的更高风险^[1]。目前西医治疗 PCOS 的药物长期使用效果不佳, 甚至会产生诸多不良反应。开发既能有效治疗 PCOS 且不良反应小的药物, 并探索其作用机制, 已成为当今 PCOS 研究的重要方向和热点。

表 5 各组小鼠结肠组织 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of the expression of PI3K/AKT pathway-related proteins in the colon tissues of mice in each group

组别	n	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
正常对照组	6	0.98 ± 0.03	1.04 ± 0.05
PCOS 组	6	0.51 ± 0.08 ^a	0.66 ± 0.02 ^a
达英-35 组	6	0.87 ± 0.09 ^b	0.77 ± 0.03 ^b
BBR 组	6	0.93 ± 0.11 ^b	0.84 ± 0.05 ^b
F 值		78.810	162.017
P 值		< 0.001	< 0.001

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PCOS 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

根据 PCOS 临床及病理特征, Kafali 等^[9] 首创的利用非甾体类芳香化酶抑制剂来曲唑构建雌鼠 PCOS 模型, 是目前公认的、较为全面的、能够反映 PCOS 临床患者内分泌状态和卵巢病理改变的良好动物模型, 表现出无排卵、性激素紊乱、体质量增加和胰岛素抵抗 (IR) 等一系列代谢特征。高雄激素血症是 PCOS 的重要病理特征之一, T 水平受 P450 芳香化酶的影响, 较高雄激素可引起 PCOS 卵泡发育异常, 卵泡壁无法破裂, 导致卵泡闭锁和排卵障碍^[10]。此外, 高雄激素血症会诱导前卵泡堆积, FSH 减少和功能下降。依赖 FSH 的 P450 芳香化酶合成受到抑制, 卵巢 T 向 E₂ 的转化减慢, 导致高 T 低 E₂。同时, 高 LH/FSH 比率被认为是 PCOS 的诊断标志, 提高 FSH 水平可促进卵泡生长^[11]。因此, 本研究利用来曲唑诱导 PCOS 小鼠模型, 结果发现, PCOS 小鼠表现出体质量逐渐下降, 性激素代谢紊乱, 卵巢呈典型的多囊性改变, 提示模型构建成功。

BBR 是中草药黄连、黄柏和小檗皮的主要活性成分, 已被用于治疗腹泻、代谢紊乱和不孕症。最近证据表明 BBR 有望治疗 PCOS, Mishra 等^[12] 研究发现, BBR 对临床症状、激素水平和血脂参数方面的调节作用比二甲双胍更有效, 可有效降低 PCOS 患者的心血管疾

病风险。动物实验研究亦显示, BBR 可通过抑制炎症反应和细胞凋亡对 PCOS 大鼠发挥保护作用, 促进 PCOS 大鼠排卵, 改善其代谢紊乱和子宫内膜容受性^[13]。本研究评估了 BBR 对 PCOS 小鼠生殖和代谢特征的影响, 发现 BBR 不仅能显著缓解卵巢结构和功能障碍, 还能通过调节血清性激素和胰岛素代谢发挥保护作用, 这与以往的文献结果相一致^[13], 表明 BBR 可能在 PCOS 的治疗中发挥重要作用, 但其调节血清激素水平和代谢异常的机制仍不清楚。

近年来大量研究表明, 肠道菌群在人类多种疾病的发生、发展中发挥重要作用, 提出了通过干预肠道菌群以防治疾病新的临床策略。由于 PCOS 患者高水平的循环胰岛素刺激卵巢细胞产生过量雄激素已得到体内和体外研究的支持, 一种关于 PCOS 发展的微生物学假说认为, 肠道菌群失调可促进卵巢产生雄激素, 引发慢性炎症反应和 IR 干扰卵泡正常发育^[14]。多个临床研究发现, 与正常者比较, PCOS 女性肠道菌群 α 多样性降低, 而且 PCOS 高雄激素血症与肠道菌群 α 多样性呈负相关^[15]。Li 等^[16]将 PCOS 小鼠粪便菌群移植到无菌小鼠中, 发现肠道菌群与其宿主的性激素水平、发情周期和卵巢形态变化密切相关。因此, 通过对肠道菌群的检测和靶向治疗, 可能对 PCOS 的预测和疗效有一定的指导意义。本研究通过 16S rDNA 基因测序发现, PCOS 小鼠肠道菌群发生了整体改变, 且 BBR 治疗可显著改善 PCOS 小鼠肠道菌群 α 和 β 多样性。啮齿类动物和人类的肠道菌群门水平十分相似, 均以厚壁菌门和拟杆菌门为主(约占 80%)^[17], 与本结果类似。Torres 等^[18]发现, 来曲唑诱导小鼠肠道菌群中多类菌属平均相对丰度发生显著变化, 而 BBR 治疗可使这些菌属丰度降低。这些结果提示, PCOS 小鼠存在肠道菌群失调, 而 BBR 治疗可能通过调整小鼠肠道菌群组成和结构影响激素水平, 从而改善 PCOS。

肠道屏障功能受损往往是 PCOS 发病机制中一个重要的加重因素^[19], 上调肠黏膜中 Claudin-1 和 Occludin 的表达可减少肠黏膜损伤, 为预防肠屏障功能障碍提供了新的方向。本研究发现, BBR 干预后, 结肠组织中 Claudin-1 和 Occludin 的表达明显增加, 粪球菌属、颤螺旋菌属和罗氏菌属丰度上调。研究发现这些细菌可通过抑制 TLR-NF- κ B 通路减轻炎症反应, 有助于调节肠道平衡, 维持肠道屏障功能, 促进受损组织的修复和再生^[20]。此外, 补充 BBR 后, 链球菌、布劳特氏菌和乳酸菌等产生短链脂肪酸(SCFA) 的菌属有所增加, 可为上皮细胞提供能量, 增加紧密连接蛋白表

达, 促进有益菌生长^[7]。研究表明, 罗氏菌属和颤螺旋菌属可参与产生丁酸盐和丁酸盐样物质, 以保护肠道屏障功能的完整性^[21]。这些结果提示, BBR 通过影响肠道菌群的组成或产生 SCFA、丁酸盐和丁酸盐样物质来改善肠道屏障功能。

IR 是 PCOS 的典型特征, 其中经典的 PI3K/AKT 信号通路通过促进葡萄糖转运并抑制糖元合成来调节代谢。Alaaeldin 等^[22]通过建立 IR 体外模型证实, IR 与 PI3K/AKT 信号通路有关, 胰岛素受体激活后, 诱导胰岛素受体底物(IRS) 磷酸化, 与 PI3K 蛋白结合, 调节细胞的葡萄糖摄入量。与此结果一致, BBR 治疗后, PCOS 小鼠血清 FPG、FINS 和 HOMA-IR 水平显著下降, 卵巢组织 PI3K/AKT 通路磷酸化明显增多。此外, PI3K/AKT 在维持肠道屏障功能方面发挥着重要作用, 如在缺氧时调节 Occludin 和 Claudin-1 的表达, 以及刺激肠道干细胞在肠道中的扩增^[23]。因此, 经 BBR 干预后, Claudin-1 和 Occludin 显著下调, PCOS 的病理状态得到改善。

综上所述, BBR 可能通过调节肠道菌群并激活 PI3K/AKT 信号通路, 降低 PCOS 小鼠体质量和胰岛素抵抗, 改善激素水平, 减轻卵巢功能障碍, 增强肠道通透性和肠道屏障功能。然而, BBR 如何影响 PCOS 小鼠肠道菌群的确切机制还需要进一步研究。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

杨宇琦: 设计研究方案, 实施研究过程, 论文撰写; 吴丽娜: 提出研究方向, 论文审核; 孙克: 实施研究过程, 资料搜集整理; 邢伟国: 进行统计学分析; 侯越: 实施研究过程, 数据收集、分析整理; 张丽文: 实施研究过程, 论文修改

参考文献

- [1] 曹琳果, 李艳青, 高蕊, 等. 中医药干预多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 中国性科学, 2023, 32(11): 128-131. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2560.2010.12.017.
- [2] 刘亚江, 冯金华, 邹琼燕, 等. 不同浓度黄连素对乳腺癌 T47 D 细胞生物学特性的影响[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(9): 945-949. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.09.019.
- [3] 赵艳, 赵粉琴. 肠道菌群与多囊卵巢综合征相关性研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2023, 40(1): 95-100. DOI: 10.16841/j.issn1003-8450.2023.01.18.
- [4] 安洁, 周琴, 曹珍珍, 等. 多囊卵巢综合征患者与健康人群肠道菌群差异性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(7): 825-831. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.202107017.
- [5] 刘文琼, 左新. 中医药治疗多囊卵巢综合征实验研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(10): 248-252. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2023.10.065.
- [6] 周娟, 王杨, 严骅. 培补清利方对多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠肠道菌群作用的观察[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(2):

- 72-78. DOI: 10.16305/j.1007-4334.2023.2108156.
- [7] Zhu TW, Li XL. Berberine interacts with gut microbiota and its potential therapy for polycystic ovary syndrome [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2023, 50 (11): 835-843. DOI: 10.1111/1440-1681.13814.
- [8] Qi X, Yun C, Sun L, et al. Gut microbiota-bile acid-interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome [J]. Nat Med, 2019, 25 (8): 1225-1233. DOI: 10.1038/s41591-019-0509-0.
- [9] Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease [J]. Arch Med Res, 2004, 35 (2): 103-108. DOI: 10.1016/j.arcmed.2003.10.005.
- [10] Wu LM, Wang YX, Zhan Y, et al. Dulaglutide, a long-acting GLP-1 receptor agonist, can improve hyperandrogenemia and ovarian function in DHEA-induced PCOS rats [J]. Peptides, 2021, 145: 170624. DOI: 10.1016/j.peptides.2021.170624.
- [11] Xing C, Zhao H, Zhang J, et al. Effect of metformin versus metformin plus liraglutide on gonadal and metabolic profiles in overweight patients with polycystic ovary syndrome [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 17(13): 945609. DOI: 10.3389/fendo.2022.945609.
- [12] Mishra N, Verma R, Jadaun P. Study on the effect of berberine, myo-inositol, and metformin in women with polycystic ovary syndrome: A prospective randomised study [J]. Cureus, 2022, 14 (1): e21781. DOI: 10.7759/cureus.21781.
- [13] Wang Z, Nie K, Su H, et al. Berberine improves ovulation and endometrial receptivity in polycystic ovary syndrome [J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153654. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153654.
- [14] Zhang M, Hu R, Huang Y, et al. Present and future: Crosstalks between polycystic ovary syndrome and gut metabolites relating to gut microbiota [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 933110. DOI: 10.3389/fendo.2022.933110.
- [15] Suturina L, Belkova N, Igumnov I, et al. Polycystic ovary syndrome and gut microbiota: Phenotype matters [J]. Life (Basel), 2022, 13 (1): 7. DOI: 10.3390/life13010007.
- [16] Li T, Zhang T, Gao H, et al. Tempol ameliorates polycystic ovary syndrome through attenuating intestinal oxidative stress and modulating of gut microbiota composition-serum metabolites interaction [J]. Redox Biol, 2021, 41: 101886. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101886.
- [17] Perler BK, Friedman ES, Wu GD. The role of the gut microbiota in the relationship between diet and human health [J]. Annu Rev Physiol, 2023, 85: 449-468. DOI: 10.1146/annurev-physiol-031522-092054.
- [18] Torres PJ, Skarra DV, Ho BS, et al. Letrozole treatment of adult female mice results in a similar reproductive phenotype but distinct changes in metabolism and the gut microbiome compared to pubertal mice [J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 57. DOI: 10.1186/s12866-019-1425-7.
- [19] 姚尧. 小檗碱对多囊卵巢综合征的疗效及肠道功能的调节作用分析 [J]. 北方药学, 2019, 16 (3): 180-181. DOI: CNKI: SUN: BPHYX.0.2019-03-138.
- [20] Jian Y, Zhang D, Liu M, et al. The impact of gut microbiota on radiation-induced enteritis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 586392. DOI: 10.3389/fcimb.2021.586392.
- [21] Zhang J, Luo D, Lin Z, et al. Dysbiosis of gut microbiota in adult idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome [J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104359. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104359.
- [22] Alaaeldin R, Abdel-Rahman IAM, Hassan HA, et al. Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells via modulating IR/IRS1/PI3k/Akt/GSK3/FoxO1 pathway [J]. Molecules, 2021, 26 (24): 7629. DOI: 10.3390/molecules26247629.
- [23] Zhang B, Wei X, Ding M, et al. Daidzein protects Caco-2 cells against lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial barrier injury by suppressing PI3K/AKT and P38 pathways [J]. Molecules, 2022, 27 (24): 8928. DOI: 10.3390/molecules27248928.

(收稿日期: 2023 - 10 - 09)

作者 · 编者 · 读者

关于对冒用我刊名义进行非法征稿活动的郑重声明

近期发现网上有冒用我刊名义进行非法征稿活动的情况,我刊为此郑重声明如下:(1)疑难病杂志社地址设在石家庄,我社从未委托任何代理机构和个人开展组稿、征稿活动,任何打着我刊名义进行收稿活动的个人或机构均属非法。(2)根据原国家新闻出版广电总局的有关规定,一种期刊只能在其出版地设立一个编辑部,其他任何冒用本刊名义,在网上进行征稿及组稿的活动,均属非法行为。(3)作者来稿,请直接通过本刊投稿网址进行投稿,禁止发给个人,收稿后本刊将尽快给予处理,谨防上当受骗。

联系电话: 0311-85901735, 邮箱: ynbzz@163.com

投稿网址: <https://ynbz.cbpt.cnki.net>