

# 四物汤含药血清对多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞自噬的影响<sup>△</sup>

邵艳社<sup>1\*</sup>, 许雪梅<sup>1</sup>, 杨宝芹<sup>1</sup>, 李会娟<sup>2</sup>, 姬霞<sup>1#</sup> (1. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院妇产科, 郑州 450011; 2. 河南中医药大学第一附属医院生殖科, 郑州 450003)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)02-0185-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.02.09



**摘要** 目的 探讨四物汤含药血清对多囊卵巢综合征(PCOS)卵巢颗粒细胞自噬的影响及潜在机制。方法 取3月龄雌性SD大鼠,分别以生理盐水和不同剂量四物汤灌胃,制备空白血清和不同浓度[0.52、1.04、2.08 g/(kg·d)]四物汤含药血清。筛选四物汤含药血清干预浓度后,将人卵巢颗粒细胞KGN分为对照组(细胞不进行任何处理)、脱氢表雄酮(DHEA)组(以50 μmol/L的DHEA处理细胞48 h)、空白血清组(以50 μmol/L的DHEA处理细胞48 h后,再用10%空白血清处理72 h)、中浓度四物汤含药血清组(以50 μmol/L的DHEA处理细胞48 h后,再用10%中浓度四物汤含药血清处理72 h),观察各组细胞中的自噬体数量以及通路相关蛋白[果糖-1,6-二磷酸酶1(FBP1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化mTOR(p-mTOR)、自噬相关蛋白[p62、微管相关蛋白1轻链3(LC3)]和FBP1 mRNA的表达水平。将(转染)细胞分为四物汤组(以50 μmol/L的DHEA处理细胞48 h后,再用10%中浓度四物汤含药血清处理72 h)、四物汤+si-NC组(以50 μmol/L的DHEA处理阴性对照小干扰RNA转染细胞48 h后,再用10%中浓度四物汤含药血清处理72 h)、四物汤+si-FBP1组(以50 μmol/L的DHEA处理FBP1小干扰RNA转染细胞48 h后,再用10%中浓度四物汤含药血清处理72 h),考察敲低FBP1对四物汤上述作用的影响。**结果** 与对照组比较,DHEA组细胞的自噬体数量明显增加,LC3-II/LC3-I、p-mTOR/mTOR、FBP1蛋白及mRNA的表达水平均显著升高,p62蛋白的表达水平显著降低( $P<0.05$ )。与DHEA组和空白血清组比较,中浓度四物汤含药血清组细胞的自噬体数量明显减少,LC3-II/LC3-I显著降低,p-mTOR/mTOR和p62蛋白、FBP1蛋白及mRNA的表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。敲低FBP1后,与四物汤+si-NC组比较,四物汤+si-FBP1组细胞的存活率、p62蛋白的表达水平、FBP1蛋白及mRNA的表达水平、p-mTOR/mTOR均显著降低,LC3-II/LC3-I显著升高( $P<0.05$ )。**结论** 四物汤可通过上调KGN细胞中FBP1蛋白及mRNA的表达来促进mTOR蛋白的磷酸化,从而抑制其自噬。

**关键词** 四物汤;含药血清;多囊卵巢综合征;卵巢颗粒细胞;FBP1/mTOR信号通路

## Effects of medicated serum of Siwutang on autophagy of ovarian granulosa cells in polycystic ovarian syndrome

SHAO Yanshe<sup>1</sup>, XU Xuemei<sup>1</sup>, YANG Baoqin<sup>1</sup>, LI Huijuan<sup>2</sup>, JI Xia<sup>1</sup> (1. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine/the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450011, China; 2. Dept. of Reproduction, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the effects of medicated serum of Siwutang on autophagy of ovarian granulosa cells (KGN cells) in polycystic ovarian syndrome (PCOS) and its underlying mechanism. **METHODS** Blank serum and different-concentration medicated serum of Siwutang were prepared by intragastric administration of normal saline and different doses of Siwutang [0.52, 1.04, 2.08 g/(kg·d)] in 3-month-old female SD rats. After screening the intervention concentration of Siwutang medicated serum, KGN cells were divided into control group (without any treatment), dehydroepiandrosterone (DHEA) group (treated with 50 μmol/L DHEA for 48 h), blank serum group (treated with 50 μmol/L DHEA for 48 h and with 10% blank serum for 72 h) and medium-concentration of Siwutang medicated serum group (treated with 50 μmol/L DHEA for 48 h and with 10% medium-concentration Siwutang medicated serum for 72 h). The number of autophagosomes was observed in each group, and

protein expressions of pathway-related proteins [fructose-1, 6-bisphosphatase 1 (FBP1), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR)], autophagy-related proteins [p62, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)] and mRNA expression of FBP1 were also detected. The (transfected) cells were further divided into Siwutang group (treated with 10% medium dose of Siwutang

<sup>△</sup>基金项目 河南省中医药科学研究专项课题(No.20-21ZY2071, No.2024ZY2073);河南省中医药青苗人才培养项目(No.豫中医[2021]16号)

\*第一作者 主治医师。研究方向:中西医结合治疗妇科内分泌疾病。E-mail:15936217905@163.com

#通信作者 主任医师。研究方向:生殖内分泌和妇科肿瘤。E-mail:jixia\_dt@163.com

medicated serum for 72 h after 48 h intervention with 50  $\mu\text{mol/L}$  DHEA), Siwutang+si-NC group [negative control small interfering RNA (siRNA) transfected cells treated with 50  $\mu\text{mol/L}$  DHEA for 48 h, and then with 10% medium-concentration of Siwutang medicated serum for 72 h] and Siwutang+si-FBP1 group (FBP1 siRNA transfected cells treated with 50  $\mu\text{mol/L}$  DHEA for 48 h, and then with 10% medium-concentration Siwutang medicated serum for 72 h). The effects of knocking down FBP1 on the above-mentioned effects of Siwutang were detected. **RESULTS** Compared with control group, DHEA group exhibited an increase in the number of autophagosomes, an elevated LC3- II/LC3- I and p-mTOR/mTOR, as well as increases in protein and mRNA expressions of FBP1, and decreased protein expression of p62 ( $P<0.05$ ). Compared to both DHEA group and blank serum group, the medium-concentration of Siwutang medicated serum group showed a decrease in the number of autophagosomes, a decrease in LC3- II/LC3- I, and increases in p-mTOR/mTOR, protein expression of p62, protein and mRNA expressions of FBP1 ( $P<0.05$ ). After knocking down FBP1, compared with Siwutang+si-NC group, Siwutang+si-FBP1 group showed a significant decrease in cell viability, protein expression of p62, protein and mRNA expressions of FBP1 as well as p-mTOR/mTOR, and an increase in LC3- II/LC3- I ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Siwutang can promote the phosphorylation of mTOR protein by up-regulating the protein and mRNA expressions of FBP1 in KGN cells, thus inhibiting autophagy of KGN cells.

**KEYWORDS** Siwutang; medicated serum; polycystic ovarian syndrome; ovarian granulosa cells; FBP1/mTOR signaling pathway

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是育龄期女性最常见的生殖内分泌疾病之一,是导致女性无排卵性不孕的最常见原因,以高胰岛素血症、高雄激素血症、卵巢多囊样改变、月经不调等为主要症状<sup>[1]</sup>。PCOS 是高血压、2型糖尿病、妊娠期糖尿病、心血管疾病及子宫内膜癌等疾病的重要危险因素<sup>[2]</sup>。研究指出,卵泡发育异常是 PCOS 的主要特征,而卵泡内卵巢颗粒细胞的增殖、分化及自噬在卵泡生长发育过程中发挥着十分重要的作用<sup>[3]</sup>。其中,卵巢颗粒细胞在卵泡发育不同阶段出现的过度自噬均会导致卵母细胞质量下降,从而导致排卵障碍和性激素合成失调,最终诱发 PCOS<sup>[4]</sup>。

四物汤始载于《仙授理伤续断秘方》,以熟地黄、当归、川芎、白芍 4 味药材熬制而成,是中医补血、养血的经典方。四物汤作为“妇科第一方”,可刺激卵泡发育、减少卵泡闭锁,在治疗 PCOS 方面独具优势<sup>[5]</sup>,但其作用机制尚不明确。本课题组前期网络药理学初筛发现,FBP1 是四物汤的潜在靶基因;同时,全基因组关联分析发现,FBP1 是 PCOS 易感基因之一<sup>[6]</sup>。Liu 等<sup>[7]</sup>研究表明,果糖-1,6-二磷酸酶 1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1, FBP1) 在以高雄激素培养的小鼠卵巢颗粒细胞中表达异常,提示 FBP1 蛋白可能参与了 PCOS 的发生发展过程。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是参与自噬负向调控的主要因子<sup>[8]</sup>。mTOR 可通过影响细胞自噬、氧化应激、炎症反应、线粒体功能、葡萄糖摄取等途径来影响卵泡的发育和成熟,进而调控 PCOS 进程<sup>[9]</sup>。研究发现,FBP1 可通过调控 mTOR 而抑制前列腺癌细胞自噬<sup>[10]</sup>。基于此,本研究从 FBP1/mTOR 信号通

路出发,初步探讨四物汤含药血清对卵巢颗粒细胞自噬的影响,以期阐明该方治疗 PCOS 的机制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 JY300HC 型通用型电泳仪 (北京君意华鑫科技有限公司)、MK3 型酶标仪和 LS-C0150 型  $\text{CO}_2$  细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、FluorChem FC3 型化学发光凝胶成像系统 (美国 ProteinSimple 公司)、MyGo Pro 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (英国 IT-IS 公司)、Axio Observer 3 型倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司) 等。

### 1.2 主要药品与试剂

熟地黄、当归、白芍、川芎配方颗粒 [批号分别为 2105012W、2201005C、2104012W、2109027C,规格分别为每袋装 3 g (相当于饮片 10 g)、2 g (相当于饮片 3 g)、1 g (相当于饮片 10 g)、1 g (相当于饮片 3 g)],均购自河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院;胎牛血清和 DMEM/F12 培养基 (批号分别为 SH30070.01、SH30023.02) 均购自美国 Hyclone 公司;脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA; 批号 252805) 购自美国 Sigma 公司;兔微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、p62、FBP1、mTOR、磷酸化 mTOR (phosphorylated mTOR, p-mTOR)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗 (批号分别为 ab63817、ab109012、ab109732、ab134903、ab109268、ab8245、ab6721) 均购自英国 Abcam 公司;RIPA 细胞裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒 (批号分别为 P0013J、P0010) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)-LC3

质粒、FBP1小干扰RNA及其阴性对照小干扰RNA(批号分别为91822、91889、91890)均购自上海吉玛制药技术有限公司;TurboFect转染试剂和RNA反转录试剂盒(批号分别为R0531、K1691)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

### 1.3 动物

3月龄SPF级雌性SD大鼠40只,体重(290±50)g,用于含药血清的制备。大鼠由河南省实验动物中心提供,动物生产许可证号为SCXK(豫)2020-0001。所有动物均饲养于温度(23±1)°C、相对湿度(50±5)%、每12h明暗循环的环境下,自由摄食、饮水。本动物实验方案经河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院实验动物福利伦理委员会批准(批准文号PZ-HNSZYY-2022-070)。

### 1.4 细胞

人卵巢颗粒细胞KGN(批号CL-0603)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 四物汤颗粒药液制备

按相关文献<sup>[1]</sup>的组方配比制备四物汤颗粒药液:取熟地黄、当归、白芍、川芎配方颗粒,按饮片质量15:10:10:6混合,溶于生理盐水中,制成相应浓度的四物汤颗粒药液,备用。

### 2.2 空白血清和含药血清制备

所有雌性SD大鼠适应性喂养3d后,随机分为空白血清组和低、中、高剂量四物汤含药血清组,每组10只。四物汤颗粒成人用量为5g/d,按成人60kg换算得日剂量,为0.0833g/(kg·d);再进一步换算得大鼠给药低剂量,为0.52g/(kg·d)<sup>[2]</sup>。空白血清组大鼠灌胃等体积生理盐水,低、中、高剂量四物汤含药血清组大鼠分别灌胃四物汤颗粒0.52、1.04、2.08g/(kg·d),每天灌胃2次,持续3d。末次灌胃后3h,各组大鼠经腹腔麻醉并于腹主动脉取血;血样于4°C下静置1h,再以3000r/min离心10min,收集上层血清,过滤;血清于56°C下灭活30min,即得空白血清和低、中、高浓度四物汤含药血清,于-20°C保存,备用。

### 2.3 药物干预浓度筛选

取KGN细胞,接种于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中,于37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下培养。待细胞生长至对数期后,以2×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板中,并分为对照组(不进行任何处理)、DHEA组(以50μmol/L的DHEA处理48h,以构建PCOS细胞模型<sup>[3]</sup>)、空白血清组(以50μmol/L的DHEA处理48h后,再用10%空白血清处理72h)和低、中、高浓度四物汤含药血清组(以50μmol/L的DHEA处理48h后,分别再用10%低、中、高

浓度四物汤含药血清处理72h<sup>[4]</sup>),并设置不含细胞、不含药物的调零组,每组设置6个复孔。每孔加入CCK-8溶液10μL,反应2h,使用酶标仪于450nm波长下检测各孔的吸光度(A)值并按下式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组A值-调零组A值)/(对照组A值-调零组A值)×100%。根据检测结果筛选后续实验含药血清的干预浓度。

### 2.4 细胞中自噬体数量检测

取KGN细胞,按2×10<sup>5</sup>个/孔接种于24孔板中,于37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育24h,待细胞融合至70%时进行GFP-LC3质粒转染(将GFP-LC3质粒0.5μg与无血清DMEM/F12培养基100μL混合,随后加入TurboFect转染试剂2μL混匀,转染48h),若荧光显微镜下可见细胞发出明显的绿色荧光即为转染成功。取转染后的细胞,分为对照组、DHEA组、空白血清组、中浓度四物汤含药血清组(四物汤含药血清干预浓度根据“2.3”项下结果设置),各组细胞均按“2.3”项下方法处理,每组设置6个复孔。取各组细胞,用4%多聚甲醛溶液于室温下固定20min,再加入0.02%Triton X-100试剂于室温下孵育5min,用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后,使用荧光显微镜观察细胞中的自噬体(GFP-LC3绿色荧光斑点)并记录其数量。

### 2.5 细胞中自噬相关蛋白、mTOR蛋白、FBP1蛋白及mRNA表达检测

采用Western blot法检测相关蛋白表达。取对数生长期的KGN细胞,按5×10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔板中,按“2.4”项下方法分组、处理。收集各组细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度后加热变性。取变性蛋白30μg进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到硝酸纤维素膜上,用5%脱脂奶粉于室温下孵育2h;洗膜后,加入自噬相关蛋白一抗(LC3、p62,稀释比例分别为1:900、1:800)、通路相关蛋白一抗(FBP1、mTOR、p-mTOR,稀释比例分别为1:700、1:700、1:1000)、内参蛋白一抗(GAPDH,稀释比例为1:1000),于4°C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:2000),于37°C下孵育1h;洗膜后,加入发光试剂,并置于化学发光凝胶成像分析系统下显影曝光。使用Image Lab软件分析各蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白的条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,再以LC3-II与LC3-I的表达水平比值(LC3-II/LC3-I)表示自噬活性,以p-mTOR与mTOR的表达水平比值(p-mTOR/mTOR)表示mTOR蛋白的磷酸化水平。结果以对照组为参照进行归一化处理。

采用实时荧光定量PCR法检测FBP1 mRNA表达。取对数生长期的KGN细胞,按5×10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔



板中,按“2.4”项下方法分组、处理。收集细胞,经 Trizol 试剂裂解后,提取总 RNA,经纯度、含量检测后,将其反转录合成 cDNA,再以此 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , PCR 正/反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 8  $\mu\text{L}$ , 共 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s, 共循环 40 次。以 GAPDH 为内参,用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 FBP1 mRNA 的表达水平。PCR 引物由北京擎科生物科技有限公司设计、合成。FBP1 正向引物序列为 5'-CTCTATGGCATTGCTGGTTCTA-3', 反向引物序列为 5'-CGTGGCAAAGGATGACTTTAAC-3', 扩增产物长度为 108 bp; GAPDH 正向引物序列为 5'-TACTAGCGGTTTACGGGCG-3', 反向引物序列为 5'-ATTGGGCTCTTCCACACAGG-3', 扩增产物长度为 166 bp。结果以对照组为参照进行归一化处理。

## 2.6 敲低 FBP1 对四物汤含药血清作用的影响检测

取 KGN 细胞,按  $2\times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h,待细胞融合至 80% 时进行细胞转染[取阴性对照小干扰 RNA 和 FBP1 小干扰 RNA 各 1  $\mu\text{g}$ , 分别与不含血清的 DMEM/F12 培养基(含 TurboFect 转染试剂 2.5  $\mu\text{L}$ ) 1 mL 混合,再与 KGN 细胞共同孵育 24 h,即得阴性对照小干扰 RNA 转染细胞和 FBP1 小干扰 RNA 转染细胞,Western blot 检测示二者 FBP1 蛋白表达水平分别较未转染细胞变化不大或显著降低,即为转染成功]。将 KGN 细胞和转染细胞分为四物汤组(以 50  $\mu\text{mol/L}$  的 DHEA 处理 KGN 细胞 48 h 后,再用 10% 中浓度四物汤含药血清处理 72 h)、四物汤+si-NC 组(以 50  $\mu\text{mol/L}$  的 DHEA 处理阴性对照小干扰 RNA 转染细胞 48 h 后,再用 10% 中浓度四物汤含药血清处理 72 h)、四物汤+si-FBP1 组(以 50  $\mu\text{mol/L}$  的 DHEA 处理 FBP1 小干扰 RNA 转染细胞 48 h 后,再用 10% 中浓度四物汤含药血清处理 72 h),每组设置 6 个复孔。取各组细胞,按“2.3”项下方法检测其存活率,按“2.5”项下方法检测 LC3- II/LC3- I、p-mTOR/mTOR 和 p62 蛋白、FBP1 蛋白及 mRNA 的表达水平。

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni 检测。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 四物汤含药血清干预浓度的筛选结果

与对照组(100%)比较,DHEA 组细胞的存活率[(35.4 $\pm$ 3.6)%]显著降低( $P<0.05$ )。与 DHEA 组和空白血清组[(34.8 $\pm$ 4.5)%]比较,低、中、高浓度四物汤含

药血清组细胞的存活率[(52.5 $\pm$ 6.7)%、(78.3 $\pm$ 7.8)%、(81.6 $\pm$ 6.9)%]均显著升高( $P<0.05$ )。其中,中浓度四物汤含药血清组细胞的存活率与高浓度四物汤含药血清组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),遂后续仅使用中浓度四物汤含药血清进行实验。

### 3.2 四物汤含药血清对 KGN 细胞自噬及相关蛋白表达的影响

与对照组比较,DHEA 组细胞中自噬体数量明显增多,LC3- II/LC3- I 显著升高,p62 蛋白的表达水平显著降低( $P<0.05$ )。与 DHEA 组和空白血清组比较,中浓度四物汤含药血清组细胞中自噬体数量明显减少,LC3- II/LC3- I 显著降低,p62 蛋白的表达水平显著升高( $P<0.05$ )。结果见图 1、图 2、表 1。

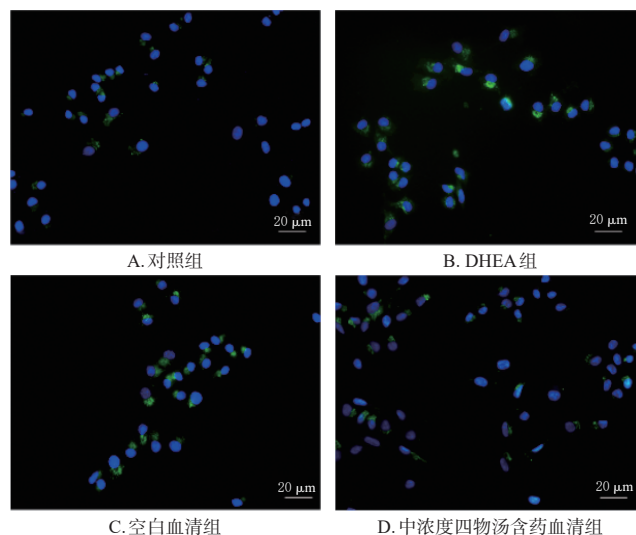


图 1 各组细胞中自噬体数量的显微图

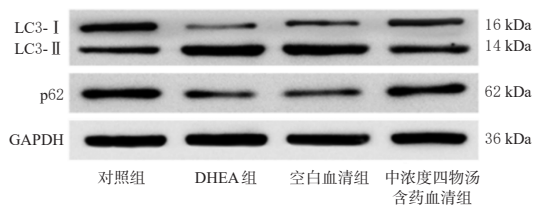


图 2 各组细胞中自噬相关蛋白表达的电泳图

表 1 各组细胞中自噬相关蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别          | LC3- II/LC3- I               | p62                           |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|
| 对照组         | 1.00 $\pm$ 0.07              | 1.00 $\pm$ 0.03               |
| DHEA 组      | 2.41 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup> | 0.39 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>  |
| 空白血清组       | 2.32 $\pm$ 0.17              | 0.41 $\pm$ 0.05               |
| 中浓度四物汤含药血清组 | 1.43 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup> | 0.78 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup> |

a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 DHEA 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与空白血清组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.3 四物汤含药血清对 KGN 细胞中通路相关蛋白、mRNA 表达的影响

与对照组比较,DHEA 组细胞中 p-mTOR/mTOR、FBP1 蛋白及 mRNA 的表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与 DHEA 组和空白血清组比较,中浓度四物汤含药血清

组细胞中p-mTOR/mTOR、FBP1蛋白及mRNA的表达水平亦显著升高( $P<0.05$ )。结果见图3、表2。

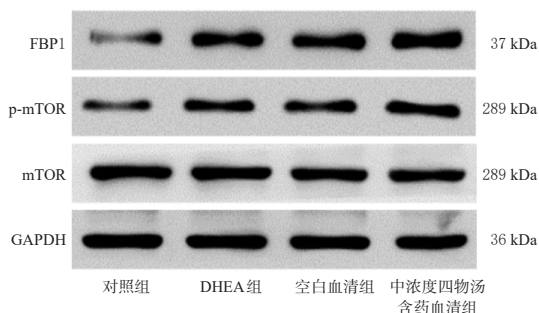


图3 各组细胞中FBP1/mTOR信号通路相关蛋白表达的电泳图( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

表2 各组细胞中p-mTOR/mTOR、FBP1蛋白及mRNA表达水平的比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别          | p-mTOR/mTOR            | FBP1蛋白                 | FBP1 mRNA              |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组         | 1.00±0.03              | 1.00±0.04              | 1.00±0.01              |
| DHEA组       | 2.34±0.12 <sup>a</sup> | 1.98±0.15 <sup>a</sup> | 4.53±0.21 <sup>a</sup> |
| 空白血清组       | 2.19±0.21              | 2.06±0.07              | 4.46±0.35              |
| 中浓度四物汤含药血清组 | 2.96±0.19 <sup>a</sup> | 3.24±0.18 <sup>a</sup> | 6.67±0.39 <sup>a</sup> |

a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与DHEA组比较,  $P<0.05$ ; c: 与空白血清组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.4 敲低FBP1对四物汤含药血清相关作用的影响

与四物汤组比较, 四物汤+si-NC组细胞的存活率、LC3-II/LC3-I、p-mTOR/mTOR、p62蛋白、FBP1蛋白及mRNA的表达差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与四物汤+si-NC组比较, 四物汤+si-FBP1组细胞的存活率、p62蛋白的表达水平、FBP1蛋白及mRNA的表达水平、p-mTOR/mTOR均显著降低, LC3-II/LC3-I显著升高( $P<0.05$ )。结果见图4、表3。

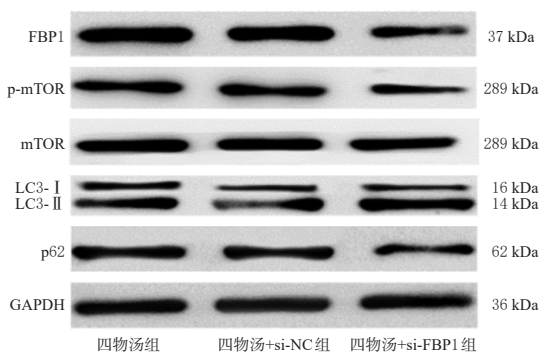


图4 各组细胞自噬和FBP1/mTOR信号通路相关蛋白表达的电泳图

表3 各组细胞存活率、自噬和FBP1/mTOR信号通路相关蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别           | 细胞存活率/%                 | LC3-II/LC3-I           | p62                    | p-mTOR/mTOR            | FBP1蛋白                 | FBP1 mRNA              |
|--------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 四物汤组         | 100.00±5.32             | 1.00±0.06              | 1.00±0.05              | 1.00±0.08              | 1.00±0.05              | 1.00±0.00              |
| 四物汤+si-NC组   | 97.60±6.13              | 0.97±0.05              | 0.97±0.08              | 1.05±0.10              | 0.96±0.07              | 1.07±0.08              |
| 四物汤+si-FBP1组 | 40.50±5.35 <sup>a</sup> | 1.87±0.12 <sup>a</sup> | 0.27±0.04 <sup>a</sup> | 0.43±0.07 <sup>a</sup> | 0.38±0.03 <sup>a</sup> | 0.11±0.02 <sup>a</sup> |

a: 与四物汤+si-NC组比较,  $P<0.05$ 。

## 4 讨论

PCOS患者的主要临床表现包括卵泡发育异常、排卵障碍及流产<sup>[1]</sup>。作为卵泡发育的标志, 卵巢颗粒细胞的生长分化是原始卵泡启动和生长的关键, 其能通过受体介导途径调控生长期卵泡的发育及卵泡闭锁, 从而在卵泡发育过程中发挥重要的调控作用<sup>[15]</sup>。长期的临床应用表明, 四物汤用于女性月经紊乱相关疾病的疗效确切<sup>[16]</sup>。现代中医学认为, PCOS属于“不孕”“闭经”范畴, 主要病机为痰湿瘀血。该方中, 君药熟地黄可补血滋阴, 臣药当归可补血行血, 佐药川芎可祛瘀止痛, 佐药白芍可养血调经, 契合PCOS上述病机。本研究使用不同剂量的四物汤灌胃大鼠, 制备了3种不同浓度的四物汤含药血清, CCK-8实验结果显示, 各浓度四物汤含药血清对KGN细胞的存活均有促进作用。

研究表明, PCOS模型动物/患者的卵巢颗粒细胞自噬会被异常激活<sup>[17]</sup>。过度自噬会引起细胞结构受损, 影响卵细胞正常发育, 从而导致排卵障碍和性激素合成失调<sup>[4]</sup>。因此, 通过改变卵巢颗粒细胞的自噬水平有望成为PCOS治疗的有效途径之一。根据报道, 四物汤活性成分豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇及山柰酚均可抑制细胞自噬<sup>[18-19]</sup>, 由此本课题组推测, 该方可能具有调控卵巢颗粒细胞自噬水平的作用。本研究结果显示, 四物汤含药血清可显著下调KGN细胞中自噬体数量和LC3-II/LC3-I, 上调p62蛋白的表达, 升高mTOR蛋白的磷酸化水平, 说明四物汤含药血清可抑制KGN细胞自噬。

学者发现, 在高雄激素培养的小鼠卵巢颗粒细胞及源自PCOS患者的诱导性多能干细胞中, FBP1蛋白的表达均明显升高<sup>[20-21]</sup>。本研究结果发现, 经DHEA处理后, KGN细胞中FBP1蛋白及mRNA的表达水平均显著升高, 与之前报道一致<sup>[7]</sup>; 经四物汤含药血清处理后, KGN细胞中FBP1蛋白及mRNA的表达水平进一步升高; 敲低FBP1后, 四物汤含药血清对KGN细胞存活率的促进作用和对自噬的抑制作用均被减弱, 说明FBP1在PCOS进展过程中具有保护作用, 高水平的FBP1可抑制卵巢颗粒细胞的自噬。

综上所述, 四物汤含药血清可通过上调KGN细胞中FBP1蛋白及mRNA的表达来促进mTOR蛋白的磷酸化, 从而抑制其自噬, 这可能是四物汤改善PCOS的潜在作用机制。

## 参考文献

- [1] WALKER K, DECHERNEY A H, SAUNDERS R. Menstrual dysfunction in PCOS[J]. Clin Obstet Gynecol, 2021, 64(1):119-125.
- [2] XU Y L, QIAO J. Association of insulin resistance and elevated androgen levels with polycystic ovarian syndrome

- (PCOS) : a review of literature[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022:9240569.
- [ 3 ] ZHENG Y X, MA L Z, LIU N, et al. Autophagy and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells during follicular development[J]. *Animals(Basel)*, 2019, 9(12):1111.
- [ 4 ] SAMARE-NAJAF M, NEISY A, SAMAREH A, et al. The constructive and destructive impact of autophagy on both genders' reproducibility, a comprehensive review[J]. *Autophagy*, 2023, 19(12):3033-3061.
- [ 5 ] ZHOU F R, SONG Y F, LIU X, et al. Si-wu-tang facilitates ovarian function through improving ovarian microenvironment and angiogenesis in a mouse model of premature ovarian failure[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280:114431.
- [ 6 ] ZHAO S G, TIAN Y, GAO X, et al. Family-based analysis of eight susceptibility loci in polycystic ovary syndrome[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12619.
- [ 7 ] LIU T, ZHAO H, WANG J F, et al. The role of fructose-1, 6-bisphosphatase 1 in abnormal development of ovarian follicles caused by high testosterone concentration[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5):6489-6498.
- [ 8 ] XU Z R, HAN X, OU D M, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2):575-587.
- [ 9 ] 马桦, 齐大河, 陈雯玥, 等. AMPK 及 mTOR 与多囊卵巢综合征的关系及中药干预研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(2):164-170.
- MA H, QI D H, CHEN W Y, et al. Chinese medicine regulates AMPK or mTOR to treat polycystic ovary syndrome: a review[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(2):164-170.
- [10] LI X R, ZHOU K Q, YIN Z, et al. Knockdown of FBP1 enhances radiosensitivity in prostate cancer cells by activating autophagy[J]. *Neoplasma*, 2020, 67(5):982-991.
- [11] 徐王彦君. 基于 UPLC-QTOF MS 技术的四物汤灌胃大鼠代谢组学初步研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2015.
- XU W Y J. Preliminary study on metabonomics in rats after oral administration of Si-wu-tang based on UPLC-QTOF MS[D]. Hefei:Anhui Medical University, 2015.
- [12] 陈梦, 石丹宁, 张则业, 等. 四物汤在大鼠脑和骨骼肌组织中发挥雌激素样效应的机制研究[J]. *中国医药*, 2021, 16(10):1580-1584.
- CHEN M, SHI D N, ZHANG Z Y, et al. Study on mechanism of Siwu decoction exerting estrogenic effects on rats brain and skeletal muscle tissues[J]. *China Med*, 2021, 16(10):1580-1584.
- [13] 谢芬芬. 褪黑素对青春期 DHEA 暴露致 PCOS 的保护机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2020.
- XIE F F. Protective mechanism of melatonin on PCOS induced by DHEA exposure in adolescence[D]. Hefei:Anhui Medical University, 2020.
- [14] 林陶秀, 张文娟, 张悦健, 等. 最佳中药含药血清浓度的筛选方法研究现状[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2):195-202.
- LIN T X, ZHANG W J, ZHANG Y J, et al. Screening methods for optimal serum concentration of Chinese medicine: a review[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(2):195-202.
- [15] ZHANG T J, BASANG W D, CHANG W H, et al. Dynamics of apoptosis-related gene expression during follicular development in yak[J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2021, 105(6):1002-1013.
- [16] HUANG G C, TSAI Y Z, LEE C J, et al. Elucidation of the effects of Si-wu tang on menstrual disorder patterns through activation of aromatase and antioxidation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:4761651.
- [17] KUMARIYA S, UBBA V, JHA R K, et al. Autophagy in ovary and polycystic ovary syndrome: role, dispute and future perspective[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10):2706-2733.
- [18] ZHAO H G, ZHANG X, WANG M, et al. Stigmasterol simultaneously induces apoptosis and protective autophagy by inhibiting Akt/mTOR pathway in gastric cancer cells[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:629008.
- [19] KIM M J, SONG Y R, KIM Y E, et al. Kaempferol stimulation of autophagy regulates the ferroptosis under the oxidative stress as mediated with AMP-activated protein kinase[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 208:630-642.
- [20] LI D, YOU Y, BI F F, et al. Autophagy is activated in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome[J]. *Reproduction*, 2018, 155(1):85-92.
- [21] MIN Z Y, GAO Q, ZHEN X M, et al. New insights into the genic and metabolic characteristics of induced pluripotent stem cells from polycystic ovary syndrome women[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):210.

(收稿日期:2024-07-23 修回日期:2024-12-25)

(编辑:邹丽娟)