

原花青素 B2 介导 LKB1/AMPK 轴调控糖酵解代谢途径治疗肥胖型多囊卵巢综合征

刘恒炼, 冯倩, 乔世聪, 张艳, 夏敏*

重庆市中医院 妇科, 重庆 400021

摘要: 目的 探究原花青素 B2 (procyanidins B2, PCB2) 治疗肥胖型多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 的作用机制。方法 建立肥胖型 PCOS 大鼠模型, 使用不同剂量的 PCB2 治疗肥胖型 PCOS 大鼠。苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察卵巢组织形态; 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测激素水平、乳酸、丙酮酸水平以及腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 含量; 免疫组化法检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1) 和腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 的蛋白表达; 蛋白质免疫印迹 (Western blotting, WB) 检测凋亡标志物、糖酵解关键限速酶以及 LKB1/AMPK 通路相关蛋白的表达。结果 与对照组比较, 模型组卵泡闭锁, 囊性卵泡数量增加, 颗粒细胞层减薄, 黄体减少; 卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、雌二醇 (estradiol, E2) 降低 ($P < 0.01$), 黄体生成素 (luteinising hormone, LH)、睾酮 (testosterone, T)、LH/FSH 值升高 ($P < 0.01$); 乳酸 (lactic acid, LD)、ATP 含量降低 ($P < 0.001$)、丙酮酸升高 ($P < 0.001$); PCNA、AMPK、LKB1 表达下调 ($P < 0.01$), Caspase-3 表达上调 ($P < 0.01$); B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 蛋白表达增加 ($P < 0.01$), 糖酵解关键限速酶乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 和肌肉丙酮酸激酶同工酶 2 (pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2) 以及 LKB1、AMPK α 、磷酸化-AMPK α (phosphorylated-AMPK α , p-AMPK α) 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各剂量 PCB2 均逆转了以上变化 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 缓解了 PCOS。结论 PCB2 可能通过 LKB1/AMPK 轴调控糖酵解代谢途径治疗肥胖型 PCOS。

关键词: 原花青素 B2; 肥胖型多囊卵巢综合征; 糖酵解; LKB1/AMPK 轴; 能量代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0536-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.017

Procyanidins B2-mediated LKB1/AMPK axis in regulating glycolytic metabolic pathways in treatment of obese polycystic ovary syndrome

LIU Henglian, FENG Qian, QIAO Shicong, ZHANG Yan, XIA Min

Department of Gynecology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China

Abstract: Objective To investigate the specific mechanism of procyanidins B2 (PCB2) in treating obesity-related polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** An obesity-induced PCOS rat model was established and treated with different doses of PCB2. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphology of the ovarian tissue, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect hormone level, lactic acid and pyruvic acid levels and adenosine triphosphate (ATP) content, immunohistochemistry (IHC) was used to detect proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3), liver kinase B1 (LKB1) and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) protein expression and Western blotting (WB) was used to detect apoptotic markers, key rate-limiting enzymes of glucose metabolism, and LKB1/AMPK pathway-related proteins. **Results** Compared with the control group, the model group showed increased follicular atresia, increased cystic follicles,

收稿日期: 2024-10-27

基金项目: 2022 年重庆市科研机构绩效激励引导专项项目 (jxyn2022-6); 重庆市科卫联合中医药科研项目 (2023MXSM161); 中医“肾”藏象理论诊疗实践多学科交叉创新团队 [渝中医 (2022) 33 号]; 传承创新中心学科分层分类建设-中医妇科学 (培育) [(2024) 48 号]; 第七批全国老中医药专家学术经验传承项目 [国中医药人教函 (2022) 76 号]

作者简介: 刘恒炼, 副主任中医师, 硕士研究生, 从事生殖内分泌疾病研究。E-mail: 87482526@qq.com

*通信作者: 夏敏, 主任中医师, 硕士生导师, 博士后联合导师, 从事妇科疾病研究。E-mail: 491405096@qq.com

thinner granular cell layers, and fewer corpora lutea, decreased follicle-stimulating hormone (FSH) and estradiol (E2) ($P < 0.01$), increased luteinising hormone (LH), testosterone (T), and increased LH/FSH ($P < 0.01$), decreased lactic acid (LD) and adenosine triphosphate (ATP) ($P < 0.001$), increased pyruvic acid ($P < 0.001$), downregulated PCNA, AMPK, and LKB1 expression ($P < 0.01$), and upregulated Caspase-3 expression ($P < 0.01$), decreased B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression ($P < 0.01$) and increased Bcl-2-associated X protein (Bax) expression ($P < 0.01$), significantly decreased lactate dehydrogenase (LDHA) and pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2), and LKB1, AMPK α , and phosphorylated-AMPK α (p-AMPK α) protein expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, all doses of PCB2 reversed these changes and alleviated the severity of PCOS ($P < 0.05, 0.01, 0.001$).

Conclusion PCB2 may treat obesity-related PCOS by regulating the glycolytic metabolic pathway through the LKB1/AMPK axis.

Key words: procyanidins B2; obesity-related polycystic ovary syndrome; glycolysis; LKB1/AMPK axis; energy metabolism

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种以高雄激素血症^[1]、卵巢多囊样改变及持续无排卵^[2]等为临床特征的内分泌代谢性疾病, 发病率高达 10%~13%^[3], 常伴有肥胖、胰岛素抵抗和血脂异常等临床指征, 其发生机制与机体代谢紊乱密切相关^[4]。根据 PCOS 患者的身体质量指数 (body mass index, BMI) 指数, 通常将多囊卵巢综合征分为“肥胖型”和“非肥胖型”2 类^[5]。PCOS 患者通常存在糖脂代谢紊乱的问题, 而肥胖型 PCOS 患者患糖尿病、高脂血、冠心病及脑血管疾病的风险更高^[6]。目前, PCOS 的临床治疗主要是通过促进排卵, 减少雄激素生成和改善胰岛素抵抗的药物以及妇科手术^[7]。然而, 大多数临床治疗不能有效减轻 PCOS 的症状。越来越多的证据表明, 传统中药在动物模型和临床研究中 PCOS 的治疗具有很大的疗效^[8]。原花青素 B2 (procyanidins B2, PCB2) 是原花青素 (procyanidins, PC) 的 B 型二聚体, 已被证明比其他 PC 具有更强的抗氧化和抗炎作用^[9]。本研究建立肥胖型 PCOS 大鼠动物模型, 探究原花青素 B2 对肥胖型 PCOS 的治疗作用与机制。PC 是一种具有抗氧化、抗炎和抗衰老活性的多酚化合物^[10], 因其在酸性介质中加热产生花青素而得名^[11], 广泛存在于植物和水果中, 如葡萄籽、法国海岸松树皮和黑枸杞等^[12]。研究表明, PC 可通过调节血清激素水平和抑制氧化应激来改善 PCOS 大鼠卵巢纤维化^[8], 还可改善 PCOS 大鼠性激素水平、减轻病理改变、抑制颗粒细胞自噬^[13]。PCB2 属于 PC 的低聚体^[14], 其对颗粒细胞的氧化损伤具有保护作用^[15], 能够提高卵母细胞成熟率并减少氧化应激水平^[16]。然而, PCB2 是否具有治疗 PCOS 的作用尚未报道。肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1) 是一种多功能激酶, 参与调节癌症控制、细胞能量稳态以及血管生成^[1], 可直接磷酸化并激活下游代谢和能量感受器腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-

monophosphate-activated protein kinase, AMPK), 调控合成代谢过程, 降低腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 的消耗^[17], 同时促进催化氧化过程 (如脂肪酸氧化、糖酵解等) 以生成更多的 ATP, 缓解应激, 维持机体的正常代谢^[18]。AMPK 作为真核细胞能量调节器, 在细胞能量生成、自噬等多种过程中发挥重要作用。LKB1/AMPK 通路与胰岛素抵抗密切相关, 胰岛素抵抗又是 PCOS 的主要症状之一^[19]。研究表明, 采用补肾化痰方治疗肾虚血瘀型 PCOS 患者, 可降低血清 AMPK、LKB1 的 mRNA 水平^[20]。据此, 推测 PCB2 对肥胖型 PCOS 的治疗作用可能与 LKB1/AMPK 有关。

本研究通过建立肥胖型 PCOS 大鼠模型, 探究 PCB2 对肥胖型 PCOS 氧化应激以及糖酵解途径的作用, 有助于理解 PCB2 治疗肥胖型 PCOS 的作用机制, 为 PCB2 的开发、应用以及延缓肥胖型 PCOS 发病进展提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 180~200 g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK (川) 2020-0030。动物饲养于重庆市中医院动物房, 实验动物使用许可证号 SYXK (渝) 2020-0001, 饲养于温度 20~26 °C、相对湿度 40%~60%、12 h 光照循环的环境下。本研究动物实验经重庆市中医院实验动物福利伦理委员批准 (伦理号 2023-DWSY-LHL)。

1.2 药品与试剂

PCB2 (批号 M4518-01, 质量分数 99.26%) 购自上海奥默生物技术有限公司; 脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA, 批号 252805-10GM) 购自美国 millipore 公司; 细胞裂解液 (批号 A106241120) 购自北京兰杰柯科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 24098351) 购自上

海碧云天生物技术有限公司；伊红染液（批号 YE2080）购自合肥博美生物科技有限责任公司；二氨基联苯胺（diaminobenzidine, DAB）试剂盒（批号 248070922）购自北京中杉金桥生物有限公司；AMPK（批号 10929-2-AP）、LKB1（批号 29323-1-AP）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号 26593-1-AP）抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司；Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2-associated X protein, Bax, 批号 A19684）、 β -肌动蛋白（beta-actin, β -actin, 批号 3600002125）抗体均购自爱博泰克生物技术有限公司；乳酸脱氢酶 A（lactate dehydrogenase A, LDHA, 批号 DF6280）、AMPK α （批号 11c4512）、磷酸化-AMPK α （phosphorylated-AMPK α , p-AMPK α , 批号 49t6850）、肌肉丙酮酸激酶同工酶 2（pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2, 批号 AF5234）抗体购自美国 affbiotech 公司；苏木素染液（批号 CR2406041）购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen, PCNA, 批号 AC240722069）、HRP 标记山羊抗兔二抗（批号 AC2412043172）购自武汉赛维尔生物技术有限公司；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-aspartate protease-3, Caspase-3, 批号 ab32351）抗体购自英国 abcam 公司；卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone, FSH）、雌二醇（estradiol, E2）、黄体生成素（luteinising hormone, LH）、睾酮（testosterone, T）ELISA 试剂盒（批号 0240718、20240823、20240816、20240803）购自上海茁彩生物科技有限公司；总蛋白（total protein, TP）、乳酸（lactic acid, LD）、丙酮酸测定试剂盒、ATP 含量测定试剂盒（批号 20240708、20240813、20240806、20240802）均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

SpectraMAX Plus384 型酶标仪（美谷分子仪器有限公司）；徕卡-2016 型转轮式切片机（德国徕卡公司）；JT-12S 型自动脱水机（武汉俊杰电子有限公司）；BMJ-A 型组织包埋机（常州郊区中威电子仪器厂）；PHY-III 型病理组织漂烘仪（常州市中威电子仪器有限公司）；BA210 型 Digital 数码三目摄像显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司）。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

大鼠适应性喂养 5 d 后，按照随机数字表将大

鼠分为对照组、模型组、二甲双胍（0.23 g/kg）组及 PCB2 低、中、高（10、20、40 mg/kg）剂量组，每组 6 只。造模前连续 4 d 进行阴道涂片观察大鼠的动情周期变化，除对照组外，其余各组大鼠 sc 0.1 mL DHEA（0.6 mg/kg）芝麻油溶液，1 次/d，联合高脂饲料喂养 30 d；对照组大鼠 sc 等体积芝麻油，并给予常规维持饲料喂养 30 d。于第 26~30 天连续进行阴道涂片，以阴道上皮细胞持续性角化、排卵周期紊乱及体质量显著增加（ $P < 0.01$ ）为肥胖型 PCOS 造模成功标准。造模结束后，各给药组大鼠 ig 相应药物，对照、模型组大鼠 ig 等体积生理盐水，1 次/d，连续 15 d。

2.2 样本采集

观察各组大鼠的生长状况，造模期间每隔 4 d 称量 1 次体质量，末次给药后称定大鼠体质量，禁水禁食 12 h 后，ip 2%戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉采血，4 °C、4 000 r/min 离心，收集上层血清，-80 °C 保存备用。采血后迅速将大鼠处死，剖取卵巢和子宫组织，并称定质量，计算卵巢、子宫指数。将左侧卵巢置于-80 °C 保存、右侧卵巢浸于 4%多聚甲醛中固定 48 h。

卵巢指数 = 卵巢湿质量/体质量

子宫指数 = 子宫湿质量/体质量

2.3 HE 染色观察卵巢组织形态

卵巢组织固定后，进行石蜡包埋处理，待石蜡完全凝固，制成厚度为 4~5 μ m 的切片，进行脱蜡复水后，采用 HE 染液对卵巢切片组织染色，置于光学显微镜下观察卵巢组织的病理形态变化并拍照。

2.4 ELISA 检测大鼠血清和卵巢组织中激素水平

依据试剂盒说明书检测 FSH、E2、LH、T 水平，并计算 LH/FSH 值。

2.5 免疫组织化学法检测相关蛋白表达

卵巢组织固定后，进行脱水、包埋、切片，经干燥、脱蜡、脱水、漂洗后，加柠檬酸缓冲液提取抗原，用质量分数 3%的 H₂O₂ 浸泡 10 min，PBS 洗涤 3 次，分别滴加一抗（PCNA, 1 : 400; Caspase-3, 1 : 100; AMPK, 1 : 200; LKB1, 1 : 100）4 °C 孵育过夜，PBS 洗涤 3 次，加入二抗（1 : 100）室温孵育 5 min，DAB 显色苏木精染液复染，质量分数 1%的盐酸乙醇溶液分化 3 s，清水冲洗，氨水返蓝，冲洗后进行封片，拍照。用 Image-Pro Plus 6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照

片阳性的统一标准,以吸光度(A)值表示蛋白表达水平。

2.6 ELISA 检测卵巢组织乳酸、丙酮酸、ATP 含量

依据 ELISA 试剂盒说明书,分别检测各组大鼠卵巢组织中丙酮酸、乳酸和 ATP 含量。

2.7 Western blotting 法检测相关蛋白表达

取各组大鼠卵巢组织样本,加入 RIPA 裂解液研磨,离心后取上清,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,5%的脱脂奶粉封闭,分别滴加一抗(LDHA, 1:2 000; LKB1, 1:1 000; PKM2, 1:2 000; AMPK α , 1:2 000; p-AMPK α , 1:2 000; Bax, 1:2 000; Bcl-2, 1:2 000; β -actin, 1:50 000), 4 °C 孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,采用 ECL 化学发光试剂盒显影,凝胶成像系统拍照,Image-J 软件分析目的蛋白条带。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 One-Way ANOVA 检验,方差齐则采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验。

3 结果

3.1 动情周期观察

造模前进行 4 d 的阴道涂片,3 只大鼠动情周期紊乱,淘汰,用 3 只备用鼠替换。造模期间,进行 2 次连续 5 d 的阴道涂片,第 1 次于造模后第 2 天开始,除对照组外,其余组大鼠大部分出现动情周期紊乱;第 2 次于造模结束前 5 d 开始,除对照

组外,其余组大鼠均出现动情周期紊乱。造模前和造模后阴道涂片典型涂片见图 1。

3.2 对肥胖型 PCOS 大鼠体质量和子宫质量的影响

如图 2-A 所示,造模结束(第 30 天)后,与对照组比较,模型组大鼠体质量显著增加($P < 0.01$),认为肥胖型 PCOS 大鼠模型造模成功;如图 2-B 所示,治疗结束(第 57 天)后,与对照组比较,模型组大鼠体质量和子宫质量显著升高($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,各治疗组大鼠体质量显著性降低($P < 0.01$),PCB2 高剂量组和二甲双胍组大鼠子宫质量显著性降低($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组大鼠左侧卵巢与右侧卵巢在各组间均无显著性差异。如图 2-C 所示,卵巢指数在各组间均无显著性差异。与对照组比较,模型组子宫指数显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组子宫指数显著降低($P < 0.05$),其余组无显著差异。

3.3 对肥胖型 PCOS 大鼠血清以及卵巢组织中激素含量的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 FSH、E2 含量显著降低($P < 0.01$),LH、T 含量以及 LH/FSH 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,PCB2 高、中剂量组和二甲双胍组大鼠血清中 FSH 含量显著升高($P < 0.01$),PCB2 低剂量组大鼠血清中 FSH 含量显著升高($P < 0.05$),PCB2 高、中剂量组和二甲双胍组大鼠血清中 E2 含量显著升高($P < 0.01$)、LH、T 含量显著降低($P < 0.01$),PCB2 低剂量组大鼠血清中 E2 含量显著升高($P < 0.05$),LH、T 含量显著降低($P < 0.05$)。如表 2 所示,与

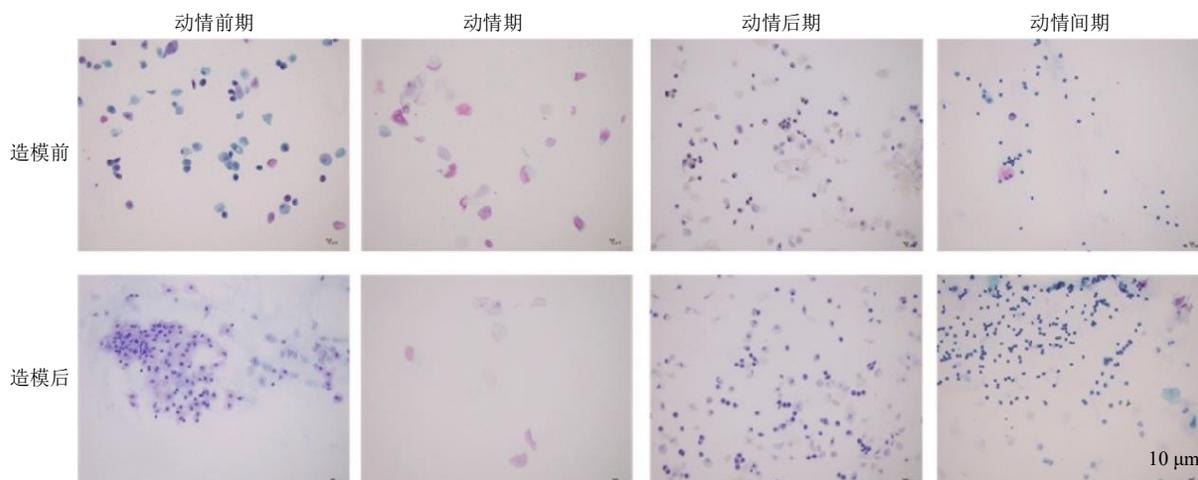
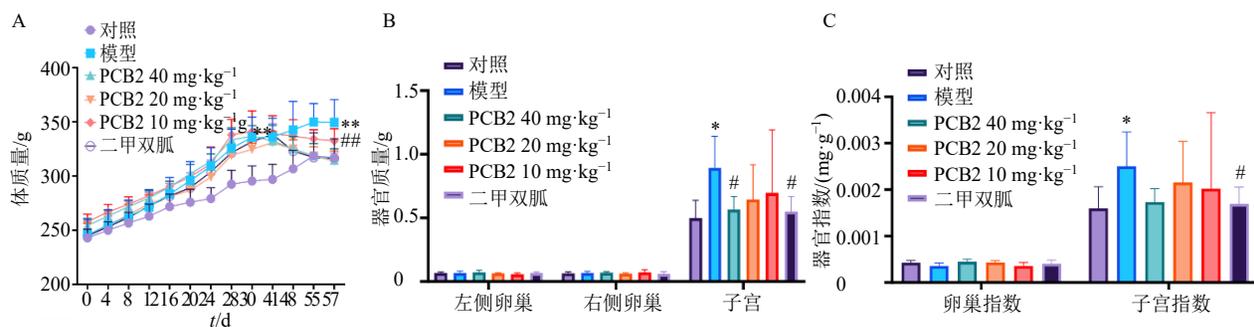


图 1 造模前后大鼠阴道涂片 ($\times 400$; $n = 6$)

Fig. 1 Vaginal smears of rats before and after modeling ($\times 400$; $n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图2 各组大鼠体重 (A)、卵巢及子宫质量 (B)、卵巢指数及子宫指数 (C) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Body weight (A), ovaries and uterus weight (B) and ovaries and uterus index (C) of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表1 各组血清中 FSH、LH、E2、T 以及 LH/FSH 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Contents of FSH, LH, E2, T and LH/FSH in serum of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	E2/(pmol·L ⁻¹)	T/(pg·mL ⁻¹)	LH/FSH
对照	—	1.920 ± 0.220	4.065 ± 0.531	8.727 ± 1.274	20.790 ± 1.650	2.129 ± 0.263
模型	—	0.933 ± 0.265**	7.528 ± 1.095**	5.045 ± 1.257**	37.342 ± 4.249**	8.303 ± 1.093**
PCB2	40	1.670 ± 0.219##	4.968 ± 0.659##	7.908 ± 0.953##	25.173 ± 3.400##	2.995 ± 0.379##
	20	1.526 ± 0.286##	5.885 ± 0.805##	7.356 ± 0.993##	29.840 ± 2.685##	3.980 ± 0.922##
	10	1.335 ± 0.261#	6.415 ± 0.617#	6.676 ± 1.343#	31.139 ± 4.583#	4.940 ± 0.996##
二甲双胍	230	1.620 ± 0.096##	5.182 ± 0.930##	8.196 ± 1.091##	26.538 ± 5.972##	3.215 ± 0.646##

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下表同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below tables.

表2 各组卵巢组织中 FSH、LH、E2、T 以及 LH/FSH 的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Contents of FSH, LH, E2, T and LH/FSH in ovaries of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)	E2/(pmol·L ⁻¹)	T/(pg·mL ⁻¹)	LH/FSH
对照	—	2.633 ± 0.240	5.499 ± 0.912	13.778 ± 1.519	24.331 ± 3.542	2.128 ± 0.547
模型	—	1.357 ± 0.354**	9.665 ± 1.234**	5.419 ± 0.838**	49.136 ± 6.629##	7.415 ± 1.491**
PCB2	40	2.272 ± 0.270##	6.868 ± 0.718##	12.353 ± 0.957##	31.656 ± 3.961##	3.075 ± 0.607##
	20	1.948 ± 0.227##	7.478 ± 0.873#	9.625 ± 0.845##	37.426 ± 2.328##	3.861 ± 0.459##
	10	1.773 ± 0.272#	8.250 ± 1.132##	7.114 ± 0.700#	42.053 ± 4.001#	4.739 ± 0.936##
二甲双胍	230	2.195 ± 0.121##	6.904 ± 0.850##	12.049 ± 0.958##	33.872 ± 3.285##	3.142 ± 0.311

对照组比较, 模型组大鼠卵巢组织中 FSH、E2 含量显著降低 ($P < 0.01$), LH、T 含量以及 LH/FSH 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, PCB2 高、中剂量组与二甲双胍组大鼠卵巢组织中 FSH、E2 含量显著升高 ($P < 0.01$), LH、LH/FSH 降低 ($P < 0.01$), PCB2 低剂量组大鼠卵巢组织中 FSH、E2 含量显著升高 ($P < 0.05$), LH、LH/FSH 降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

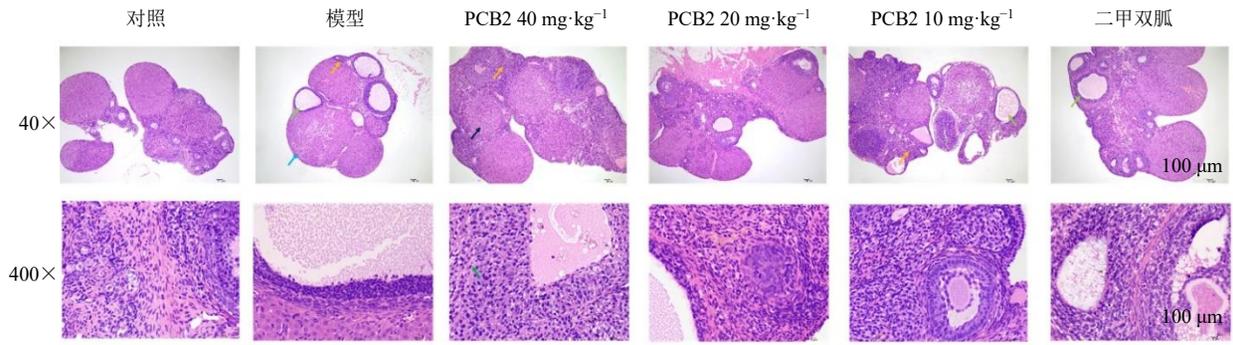
3.4 对肥胖型 PCOS 大鼠卵巢病变程度的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠卵巢组织中可见较多不同发育阶段的卵泡细胞, 卵泡结构正常, 颗粒细胞层较厚, 排列紧致; 模型组大鼠卵巢组织中卵泡闭锁, 囊肿性卵泡数量增加, 颗粒细胞层减薄, 排

列松散, 黄体减少或消失; 各剂量原花青素 B2 和二甲双胍组卵巢病变程度缓解。

3.5 对肥胖型 PCOS 大鼠卵巢组织细胞增殖、凋亡的影响

如图 4-A 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠卵巢组织 PCNA 阳性表达量显著降低 ($P < 0.01$), Caspase-3 阳性表达量升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, PCB2 高、中剂量组和二甲双胍组大鼠卵巢组织 PCNA 阳性表达显著升高 ($P < 0.01$), Caspase-3 阳性表达显著降低 ($P < 0.01$)。PCB2 低剂量组大鼠卵巢组织 PCNA 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$), Caspase-3 阳性表达无显著性变化。如图 4-B 所示,

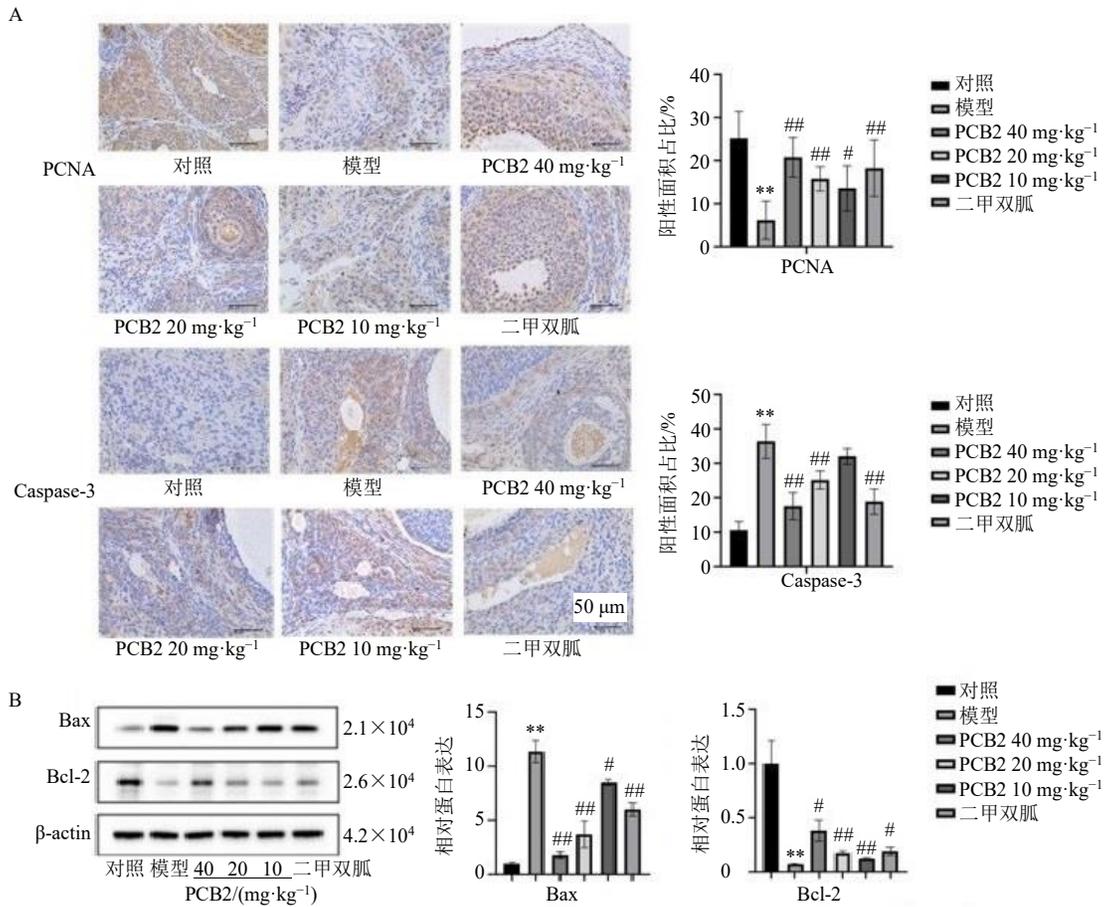


黄色箭头代表卵泡数量减少；浅绿色箭头代表卵泡数量增加；深绿色代表中性粒细胞增加；蓝色箭头代表黄体变性和坏死增加；黑色箭头代表黄体数量增加。

Yellow arrows represents a decrease in the number of follicles; light green arrows represents an increase in the number of follicles; dark green arrows represents an increase in neutrophils; blue arrows represents an increase in luteal degeneration and necrosis; black arrow represents an increase in the number of corpora lutea.

图3 各组大鼠卵巢组织形态变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Changes in the morphology of rat ovarian tissue in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-各组大鼠卵巢组织中 PCNA 和 Caspase-3 的表达；B-各组大鼠卵巢组织中 Bax 和 Bcl-2 的蛋白条带及蛋白表达水平。

A-expression of PCNA and Caspase-3 in ovarian tissues of rats in each group; B-protein bands and protein expression levels of Bax and Bcl-2 in ovarian tissues of rats in each group.

图4 原花青素 B2 对大鼠卵巢组织细胞增殖以及凋亡的影响 ($\times 400; \bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of procyanidins B2 on proliferation and apoptosis of ovarian tissue cells in rats ($\times 400; \bar{x} \pm s, n = 5$)

与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较,各剂量 PCB2 与二甲双胍组大鼠卵巢组织中 Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 对肥胖型 PCOS 大鼠卵巢组织糖酵解的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组卵巢中乳酸、ATP 含量显著降低 ($P < 0.001$),丙酮酸含量显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较,PCB2 高剂量组

和二甲双胍组卵巢中乳酸、ATP 含量显著升高 ($P < 0.001$),丙酮酸含量显著降低降低 ($P < 0.001$), PCB2 低剂量组卵巢中乳酸含量显著升高 ($P < 0.05$),丙酮酸、ATP 含量显著降低 ($P < 0.05$)。如图 6 所示,与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 LDHA、PKM2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,各剂量的 PCB2 和二甲双胍组的大鼠卵巢组织中 LDHA、PKM2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。

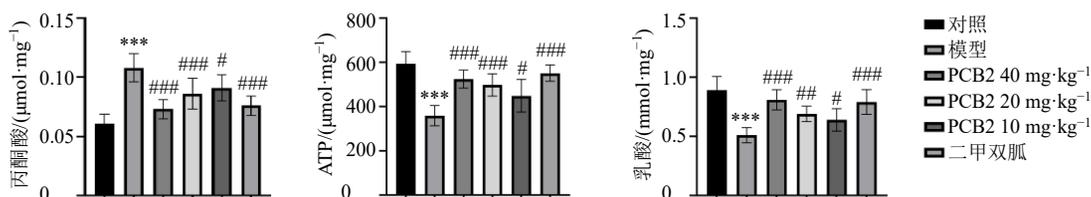


图 5 原花青素 B2 对肥胖型大鼠卵巢组织中丙酮酸、乳酸、ATP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of proanthocyanidin B2 on pyruvic acid, lactic acid and ATP in ovarian tissue of obese rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

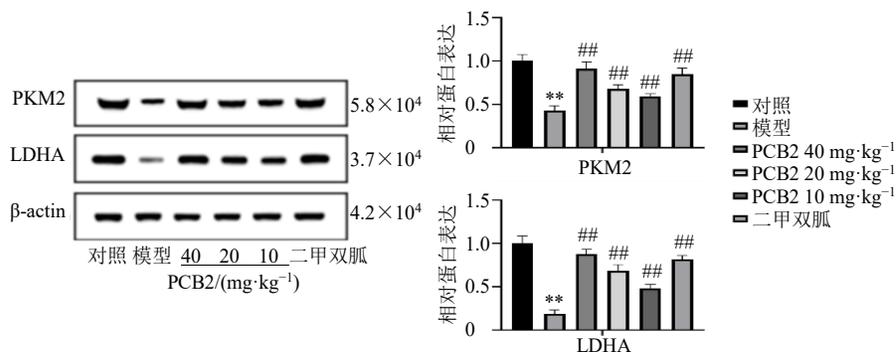


图 6 原花青素 B2 对糖酵解关键限速酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of proanthocyanidin B2 on key rate-limiting enzymes of glycolysis ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.7 对肥胖型 PCOS 大鼠卵巢组织中 LKB1/AMPK 信号通路的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织 AMPK、LKB1 阳性表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,PCB2 高、低剂量组以及二甲双胍组大鼠卵巢组织 AMPK 阳性表达显著升高 ($P < 0.01$), PCB2 中剂量组数据方差不齐,经 Tamhane's T2 test 检验无显著变化; 与模型组比较, PCB2 各剂量组和二甲双胍组大鼠卵巢组织 LKB1 阳性表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 8 所示,与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中 LKB1、AMPK α 、p-AMPK α 蛋白表达及 p-AMPK α /AMPK α 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, PCB2 各剂量组和二甲双胍组大鼠卵巢组织

中 LKB1、AMPK α 、p-AMPK α 蛋白表达及 p-AMPK α /AMPK α 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 参与卵泡成熟和激素分泌^[21]。卵泡相对封闭的低氧环境使得颗粒细胞糖酵解产物成为颗粒细胞和卵母细胞主要的能量物质来源^[22]。卵母细胞缺乏糖酵解限速酶,其对葡萄糖的利用能力低。颗粒细胞对葡萄糖的亲和力较强,能使葡萄糖转化为乳酸、丙酮酸等基质,并提供给卵母细胞,对卵母细胞的生长起支持、营养作用^[23]。研究发现,PCOS 小鼠卵巢中糖酵解关键限速酶 LDHA 和 PKM2 的表达较正常小鼠显著降低,乳酸生成减少,而提高 PCOS 患者卵泡液中乳酸的含量,可减少闭锁卵泡的发生^[24]。

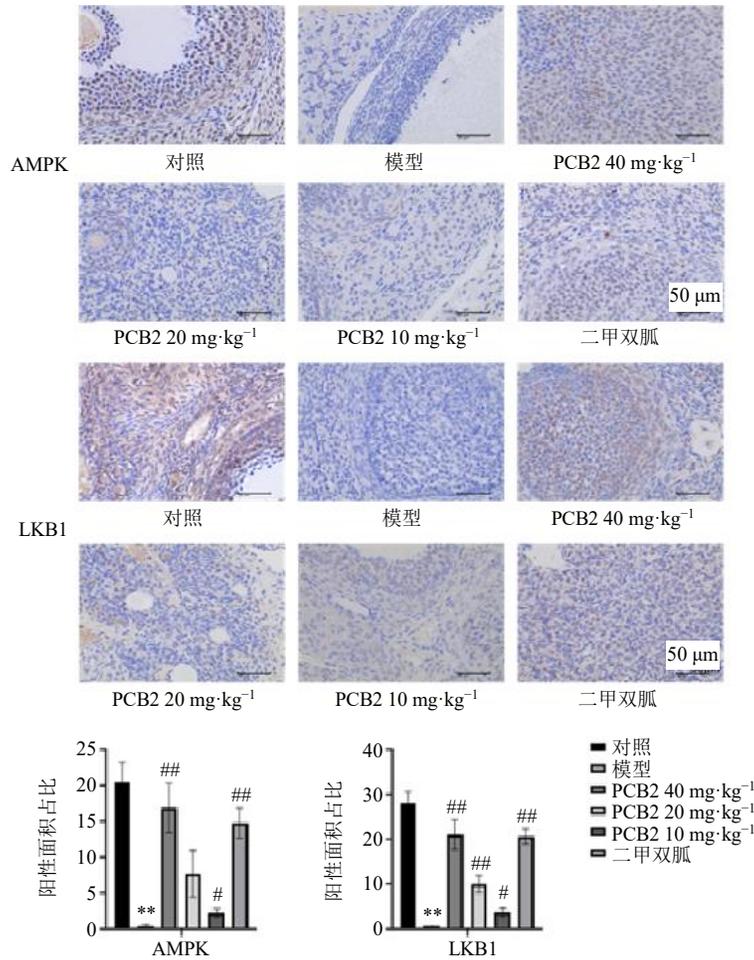


图7 原花青素 B2 对 LKB1 和 AMPK 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 7 Effect of proanthocyanidin B2 on LKB1 and AMPK ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

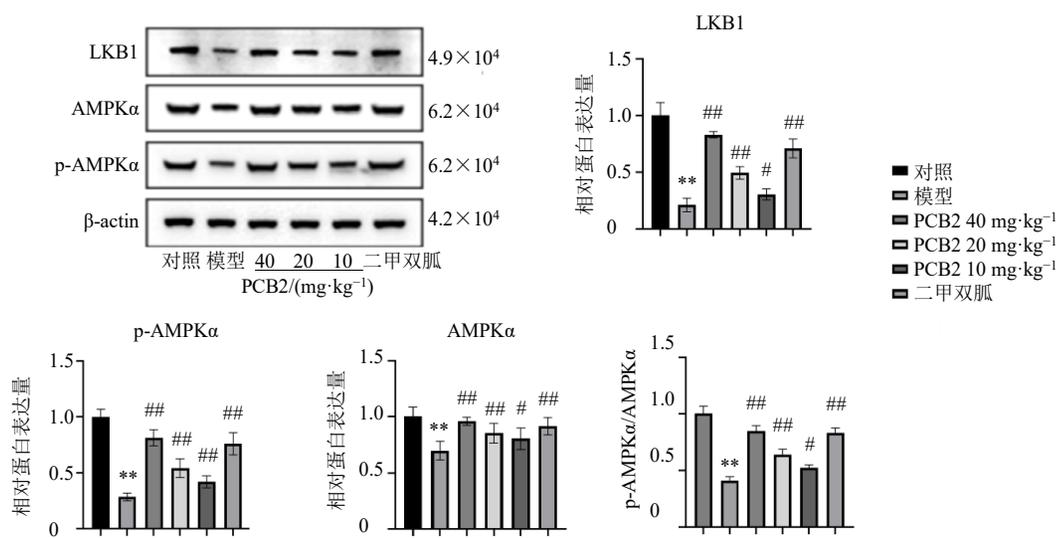


图8 原花青素 B2 对 LKB1/AMPK 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 8 Effect of proanthocyanidin B2 on LKB1/AMPK pathway proteins expression ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

研究发现,PCOS 患者的卵泡同正常组相比需要更多的乳酸来维持生长,这一过度需求进一步导致PCOS 的卵泡发育障碍。这也从能量代谢水平角度解释尽管PCOS 多卵泡发育,但由于颗粒细胞糖酵解抑制,乳酸成减少,颗粒细胞能量来源减少,最终导致颗粒细胞活力下降和凋亡,使卵泡异常闭锁,最终导致少排卵甚至无排卵,加快PCOS 发病进程^[25]。本研究结果表明,糖酵解限速酶表达下降,糖酵解代谢紊乱,卵泡囊肿数量增加,加入不同剂量的PCB2 以及二甲双胍处理后均不同程度的逆转了以上变化,表明PCB2 可能通过调节肥胖型PCOS 模型中糖酵解来改善卵泡发育的有效性。

T 是卵巢基质膜细胞产生的一种主要雄激素,患有PCOS 的女性通常有高血清睾酮水平和高雄激素症的临床表现^[26]。研究表明,肥胖的PCOS 患者会产生过量的LH,从而促进卵巢基质和滤泡膜细胞产生过量的雄激素^[27]。雌激素还起着负FSH 反馈机制的作用,降低FSH 水平,并增加LH/FSH 的值。当存在高水平的LH 时,卵巢被激活并产生雄激素,但低水平的FSH 会阻止卵泡生长,从而造成高雄激素血症和无排卵的恶性循环^[28]。患有实验性PCOS 的大鼠表现出高水平的内分泌相关参数,包括T、LH、LH/FSH^[29]。本研究结果表明,模型组血清和卵巢组织中FSH、E2 降低,LH、T 升高,LH/FSH 的值升高。各剂量PCB2 和二甲双胍组均不同程度逆转了这些变化。表明PCB2 能够调节肥胖型PCOS 大鼠的激素水平,进而改善卵巢功能、治疗PCOS。

LKB1/AMPK 活性拮抗合成代谢过程,如糖异生、脂肪生成、蛋白质合成和核苷酸合成,并刺激分解代谢过程,如自噬、糖酵解、柠檬酸循环和脂肪酸 β 氧化^[30]。研究表明,在肥胖型PCOS 模型组中观察到AMPK α 1, AMPK α 2 和LKB1 的蛋白质和mRNA 表达降低。同时观察到激素失调,包括T 和LH 的表达增加以及E2 的表达减少^[2]。本研究中,在肥胖型PCOS 模型组中观察到了与其一致的变化,但加入各剂量的PCB2 则逆转了以上变化,缓解了肥胖型PCOS 的发病进展。上述结果表明,PCB2 通过调控糖酵解以及激素水平来缓解肥胖型PCOS 大鼠的发病程度,其机制可能与LKB1/AMPK 有关。

综上,PCB2 可促进PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞的增殖,并抑制其凋亡,调控激素水平,改善卵泡

发育状态,并改善卵巢能量代谢状态,一定程度上逆转糖酵解紊乱,且以上作用可能与LKB1/AMPK 有关。本研究为PCB2 治疗PCOS 的临床应用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu Y, Gao Y X, Huang Z F, *et al.* LKB1 suppresses androgen synthesis in a mouse model of hyperandrogenism via IGF-1 signaling [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(10): 1817-1825.
- [2] Zhou J, Yin P, Zhao Q Y, *et al.* Electroacupuncture improves follicular development and metabolism and regulates the expression of adiponectin, AMPK and ACC in an obese rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Acupunct Med*, 2023, 41(3): 151-162.
- [3] Gasieva D M, Sheremetyeva E V, Kalashnikova M F, *et al.* Polycystic ovary syndrome: New and promising treatment methods [J]. *Probl Endokrinol*, 2024, 70(4): 103-113.
- [4] Wang J, Wu D C, Guo H, *et al.* Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome [J]. *Life Sci*, 2019, 236: 116940.
- [5] 刘雨潇, 张蛟, 姜玥, 等. 中医药治疗非肥胖型多囊卵巢综合征的研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*: 2024, 51(11): 202-205.
- [6] 张宇, 蔡裕娴, 谭淑莹, 等. 肥胖型多囊卵巢综合征的中医研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2023, 37(10): 10-12.
- [7] Kim J J, Hwang K R, Choi Y M, *et al.* Complete phenotypic and metabolic profiles of a large consecutive cohort of untreated Korean women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(5): 1424-1430.
- [8] Valencia-Hernandez L J, Wong-Paz J E, Ascacio-Valdés J A, *et al.* Procyanidins: From agro-industrial waste to food as bioactive molecules [J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3152.
- [9] Ma L, Li C X, Lian S, *et al.* Procyanidin B2 alleviates liver injury caused by cold stimulation through Sonic hedgehog signalling and autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 8015-8027.
- [10] 李海超, 吕鹏, 陈飞儿, 等. 原青花素的抗肿瘤机制研究现状 [J]. *吉林医药学院学报*, 2017, 38(1): 64-66.
- [11] Chen J R, Zhong K X, Jing Y Q, *et al.* Procyanidin B2: A promising multi-functional food-derived pigment for human diseases [J]. *Food Chem*, 2023, 420: 136101.
- [12] Zhou Y Y, Lan H, Dong Z W, *et al.* Dietary proanthocyanidins alleviated ovarian fibrosis in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(5): e13723.
- [13] 李莹, 陈建玲, 吴佩蔚, 等. 基于P53/AMPK 通路车前

- 子醇提物对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞自噬的作用研究 [J]. 医学研究杂志, 2022, 51(7): 76-80.
- [14] 龙青焘, 王文静, 陈本莉, 等. 原花青素 B2 通过 miR-499-5p 促进骨骼肌慢肌纤维基因的表达 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2024, 50(3): 259-267.
- [15] 邢宝松, 张家庆, 任巧玲, 等. 原花青素 B2 对猪颗粒细胞氧化损伤的保护作用及机制研究 [J]. 河南农业科学, 2022, 51(1): 146-153.
- [16] 李厚儒. 原花青素 B2 对不同年龄绵羊卵母细胞体外成熟及胚胎发育的影响 [D]. 石河子: 石河子大学, 2023.
- [17] Jiang Z Z, Hu M W, Ma X S, *et al.* LKB1 acts as a critical gatekeeper of ovarian primordial follicle pool [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5738-5753.
- [18] Shackelford D B, Shaw R J. The LKB1-AMPK pathway: Metabolism and growth control in tumour suppression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 563-575.
- [19] 刘亚敏, 张明昊, 王瑾瑾, 等. 四物汤通过激活 LKB1/AMPK 通路对多囊卵巢综合征大鼠的改善作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(7): 895-903.
- [20] 张瑞瑞, 武权生, 潘文, 等. 补肾化痰方治疗肾虚血瘀型多囊卵巢综合征的临床疗效及对 AMPK、LKB1 mRNA 水平的影响 [J]. 中国民间疗法, 2023, 31(21): 61-64.
- [21] 黎婷. 卵母细胞与颗粒细胞的交互作用 [J]. 商丘师范学院学报, 2024, 40(3): 56-59.
- [22] Zhang Q, Ren J, Wang F F, *et al.* Mitochondrial and glucose metabolic dysfunctions in granulosa cells induce impaired oocytes of polycystic ovary syndrome through Sirtuin 3 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 1-16.
- [23] 赵阳朋, 李宝山, 程东凯. 颗粒细胞糖脂代谢对卵母细胞发育影响的研究进展 [J]. 妇儿健康导刊, 2024, 3(15): 22-26.
- [24] 黄兰娥. 罗汉果苷 V 调控糖酵解代谢改善 PCOS 大鼠卵泡发育的实验研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2022.
- [25] 曹建平, 张家宁, 单会荃, 等. 卵泡液外泌体 miRNA 对颗粒细胞糖酵解途径介导多囊卵巢综合征患者卵泡发育的影响及其作用机制 [J]. 中国生物制品学杂志, 2024, 37(2): 160-165.
- [26] Zhou W D, Lian Y K, Chen J H, *et al.* LncRNA PKD1P6 modulates ovarian granulosa cell survival of hyperandrogenic polycystic ovary syndrome by targeting miR-135b-5p and inhibiting ERK1/2 signaling [J]. *Heliyon*, 2024, 10(16): e36321.
- [27] Oróstica L, Rosas C, Plaza-Parrochia F, *et al.* Altered steroid metabolism and insulin signaling in PCOS endometria: Impact in tissue function [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(36): 5614-5624.
- [28] Cui W, Li J, Sun W, *et al.* Effect of electroacupuncture on oocyte quality and pregnancy for patients with PCOS undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfervitro fertilization and embryo transfer [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2011, 31(8): 687-691.
- [29] Cong P W, Shang B, Zhang L N, *et al.* New insights into the treatment of polycystic ovary syndrome: HKDC1 promotes the growth of ovarian granulocyte cells by regulating mitochondrial function and glycolysis [J]. *J Mol Histol*, 2024, 55(2): 187-199.
- [30] Trelford C B, Shepherd T G. LKB1 biology: Assessing the therapeutic relevancy of LKB1 inhibitors [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 310.

[责任编辑 罗 曦]