

基于微生物组学研究枸杞叶对来曲唑诱导PCOS小鼠的干预作用

张莘悦¹, 陆 聪¹, 郑慧丽¹, 宿树兰^{1*}, 朱 悦¹, 郭 盛¹, 钱大玮¹,
康宏杰², 段金厥^{1*}

(1. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 宁夏枸杞创新中心, 宁夏 银川 750002)

摘要: 本研究旨在探讨枸杞叶对来曲唑诱导的多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 小鼠的干预作用及其机制。采用来曲唑联合高脂饮食制备PCOS模型, 造模成功后将40只小鼠随机分为PCOS组、阳性药二甲双胍组、枸杞叶低剂量组和枸杞叶高剂量组, 灌胃给予相应药物, 持续29天。实验结束摘眼球取血并收集卵巢组织, 检测各组小鼠卵巢质量、空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS)、睾酮 (T)、抗苗勒管激素 (AMH)、促黄体生成素 (LH)、促卵泡刺激素 (FSH)、雌二醇 (E₂)水平。采用苏木精-伊红染色观察卵巢组织形态, 并计数卵母细胞、囊性卵泡和黄体。采集小鼠盲肠内容物进行肠道菌群组成和差异菌群等分析。动物实验过程经南京中医药大学动物伦理委员会审核通过。结果显示, PCOS小鼠动情周期紊乱。与PCOS组相比, 枸杞叶组能明显减轻小鼠卵巢损伤, 减少囊状扩张卵泡数, 使动情周期正常化。经枸杞叶干预后的FBG、FINS、T、AMH、LH、FSH、LH/FSH水平显著降低 ($P < 0.05$), 而E₂水平显著升高 ($P < 0.001$)。此外, 枸杞叶能调节PCOS小鼠肠道菌群多样性紊乱, 提高拟杆菌门丰度, 降低厚壁菌门、回肠杆菌属、罗姆布茨菌属、类杆菌属的丰度。综上, 枸杞叶可通过改善胰岛素抵抗、调节生殖激素紊乱及肠道菌群失调而发挥对PCOS小鼠的治疗作用, 为枸杞叶的合理利用及开发提供了科学依据和有益参考。

关键词: 多囊卵巢综合征; 枸杞叶; 胰岛素抵抗; 肠道菌群; 干预作用

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2030-11

The intervention effect of *Lycium barbarum* leaves on letrozole-induced PCOS mice based on microbiome

ZHANG Xin-yue¹, LU Cong¹, ZHENG Hui-li¹, SU Shu-lan^{1*}, ZHU Yue¹, GUO Sheng¹,
QIAN Da-wei¹, KANG Hong-jie², DUAN Jin-ao^{1*}

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Ningxia Innovation Center of Goji R & D, Yinchuan 750002, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the intervention effect and mechanism of *Lycium barbarum* leaves on letrozole-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) mice. The PCOS model was prepared by letrozole combined with high-fat diet. After successful modeling, 40 mice were randomly divided into PCOS

收稿日期: 2023-12-26; 修回日期: 2024-02-26.

基金项目: 宁夏重点研发计划重点项目 (2022BBF02004, 2022BFH02008).

*通讯作者 Tel: 13809043258, E-mail: sushulan@njucm.edu.cn;

Tel: 86-25-85811291, E-mail: dja@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1449

group, positive drug metformin group, low-dose *Lycium barbarum* leaves group, and high-dose *Lycium barbarum* leaves group. The corresponding drugs were given by gavage for 29 days. At the end of the experiment, the eyeballs were removed for blood collection and ovarian tissue was collected. The ovarian mass, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), testosterone (T), anti-Mullerian hormone (AMH), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), and estradiol (E_2) levels were measured in each group. The morphology of ovarian tissue was observed by hematoxylin-eosin staining, and the oocytes, cystic follicles and corpus luteum were counted. Cecal contents of mice were collected for analysis of intestinal flora composition and differential flora. The animal experiment process was approved by the Animal Ethics Committee of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. The results showed that the estrous cycle of PCOS mice was disordered. Compared with the PCOS group, the *Lycium barbarum* leaves group can significantly reduce the ovarian damage of mice, reduce the number of cystic dilated follicles, and normalize the estrous cycle. After the intervention of *Lycium barbarum* leaves, the levels of FBG, FINS, T, AMH, LH, FSH and LH/FSH were significantly decreased ($P < 0.05$), while the level of E_2 was significantly increased ($P < 0.001$). In addition, *Lycium barbarum* leaves can regulate the disorder of intestinal flora diversity in PCOS mice, increase the abundance of Bacteroidetes, and reduce the abundance of Firmicutes, *Ileibacterium*, *Romboutsia* and *Faecalibaculum*. In summary, *Lycium barbarum* leaves can play a therapeutic role in PCOS mice by improving insulin resistance, regulating reproductive hormone disorders and gut microbiota imbalance. It provides scientific basis and useful reference for the rational utilization and development of *Lycium barbarum* leaves.

Key words: polycystic ovary syndrome; *lycium barbarum* leaves; insulin resistance; gut microbiota; intervention

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种复杂的妇科内分泌和代谢疾病, 在女性青春期、育龄期和围绝经期较为常见, 是指患者伴有肥胖、多毛、痤疮, 雄激素水平升高和月经紊乱的现象^[1], 不受控制的PCOS会导致2型糖尿病、心血管疾病、妊娠期糖尿病和子宫内膜癌等患病风险增加^[2], 严重影响人类健康和生活质量。根据社会人口指数, 全球范围内的育龄妇女 (15~49岁) PCOS年龄标准化发病率和伤残调整生命年在持续上升^[3]。PCOS患者表现出高雄激素血症、高胰岛素血症和持续性无排卵或月经稀发, 病因复杂, 对症治疗是其主要的治疗方案, 虽然部分药物 (复方口服避孕药、雄激素受体拮抗剂、二甲双胍、克罗米芬等) 已用于PCOS的临床治疗^[4], 但因药物疗效有限, 患者往往需要同时服用几种药物, 依从性差。因此, 需要开发更便宜、更有效、更安全的药物。中医药因其活性成分多、不良反应少, 越来越受到人们的重视。

枸杞叶 (俗称天精草) 为茄科枸杞属植物宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 或枸杞 (*Lycium chinense* Mill.) 的嫩茎叶, 具有滋补肝肾、补虚益精、清热明目的功效^[5]。在我国应用历史悠久, 自古便作为药食两用品种。现代研究发现, 枸杞叶富含黄酮、酚酸^[6]、多糖^[7]和甜菜碱等多类型资源性化学成分。现代药理学研究表明, 枸杞叶具有抗氧化、降血糖、降血脂、免疫保护、抗菌等多种生物学活性^[7-9], 对糖尿病及其并发症的治疗效果较好^[8,10,11], 《小品方》中以枸杞枝叶为君药

的“枸杞汤”主治“内消”^[12], 课题组前期研究也表明, 枸杞叶对糖尿病大鼠的血糖、血脂水平有明显的调节作用^[8]。PCOS的代谢特征如胰岛素抵抗和高胰岛素血症与糖尿病相似, 近50%~60%的PCOS患者存在胰岛素抵抗。有研究证实, 地骨皮 (枸杞根皮) 提取液可以调节PCOS大鼠的糖脂代谢紊乱, 改善胰岛素抵抗, 降低血清激素水平, 改善卵巢功能, 在一定程度上具有恢复排卵的作用^[13]。基于以上背景, 本研究旨在评价枸杞叶对PCOS的干预作用。

肠道菌群在控制宿主生殖和代谢方面发挥着重要作用。研究表明, 肠道微生物可能通过影响代谢间接调节生殖轴, 或通过对类固醇激素的再激活促进肝肠循环, 促进雌激素反应的增殖, 从而对生殖产生直接影响^[14]。临床研究显示, PCOS患者的肠道菌群存在失调, 表现为粪杆菌属、双歧杆菌属和布劳特氏菌属的丰度降低, 副拟杆菌属和梭菌属的丰度增加^[15]。研究发现, 在来曲唑诱导的PCOS大鼠体内, 肠道微生物群的物种多样性和丰富度降低, 乳杆菌属数量显著增加, 异源芽孢杆菌属和拟杆菌属数量显著减少^[16], 这表明肠道菌群紊乱与PCOS的发生和发展有关。因此, 本研究采用来曲唑联合高脂饮食制备PCOS模型, 考察枸杞叶对PCOS小鼠生殖代谢紊乱的改善作用, 采用16S rDNA高通量测序法阐明枸杞叶对PCOS小鼠盲肠内容物中肠道菌群的调控作用, 并与生化指标进行相关性分析, 从而揭示枸杞叶治疗PCOS的作用机制, 为临床应用提供研究基础。

材料与方法

药物与试剂 枸杞叶(批号2205195)购于宁夏明德中药饮片公司,经南京中医药大学段金廛教授鉴定为宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的嫩茎叶;新绿原酸(批号906-33-2)、隐绿原酸(批号905-99-7)购于武汉天植生物技术有限公司;绿原酸(批号110753-202119)、芦丁(批号100080-202012)购于中国食品药品检定研究院;盐酸二甲双胍(MET,批号ACH0111)购于默克制药有限公司;来曲唑(批号C11830352)购于上海麦克林公司;羧甲基纤维素钠(CMC-Na,批号J14HS173796)购于上海源叶公司;瑞氏染色液(批号C0315)购于上海碧云天生物技术有限公司;60% kcal脂肪热量高脂鼠粮(批号HF60)、10% kcal脂肪热量低脂鼠粮(批号LF10C)购于戴茨生物科技(无锡)有限公司;促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、促卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、睾酮(testosterone, T)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、抗苗勒管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)、雌二醇(estradiol, E₂)试剂盒均购于湖南艾方生物科技有限公司。

仪器 LEICA DFC 7000T 体视荧光显微镜(德国Leica公司);三诺安稳+血糖仪(批号2K01B200724,三诺生物传感公司);电子计量秤(永康市华鹰衡器公司);ML105电子天平(上海梅特勒-托利多公司);大龙D3024R高速冷冻离心机(北京大龙兴创公司);Enspire多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司)。

供试药物的制备与成分分析 将0.5 kg枸杞叶与蒸馏水按1:10(g:mL)的比例混合,水蒸气蒸馏法提取(2次,每次60 min),合并滤液后用旋转蒸发器浓缩至浓度约1.0 g·mL⁻¹(生药量)。冷冻干燥后得药粉196.16 g,计算得率为39.23%。按《宁夏中药饮片炮制规范》^[5]人用剂量15 g·d⁻¹,根据体表面积换算得到枸杞叶低、高剂量分别为880、1 760 mg·kg⁻¹·d⁻¹。取枸杞叶水提取物采用75%甲醇溶解后离心(3 500 r·min⁻¹, 15 min),取上清液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得枸杞叶供试品溶液。采用高效液相色谱仪对上述供试品溶液进行成分分析。高效液相色谱检测条件:采用GL Sciences Inertsil ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 3.5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~18 min, 5%~12% A; 18~38 min, 12%~16% A; 38~39 min, 16%~21% A; 39~44 min: 21%~22% A; 44~46 min, 22%~100% A),流速1 mL·min⁻¹,进样量10 μL,柱温25 °C,检测波长340 nm。

实验动物 SPF级C57BL/6J雌性小鼠,体重14~17 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK

(沪)2022-0004],动物饲养在南京中医药大学实验动物中心的屏障环境,温度为(22±2) °C,相对湿度为(55±10)%,交替光照12 h,小鼠自由吃喝。本实验经南京中医药大学动物伦理委员会审核通过,伦理申请号:202302A062。

动物造模及给药 适应性喂养1周后,按体重分层分组法将小鼠随机分为空白组(CON, n=10)和PCOS组(n=40)。将来曲唑溶于0.3% CMC-Na的溶液中,PCOS组每日灌胃给予1 mg·kg⁻¹来曲唑溶液,并饲喂高脂饲料。空白组灌胃给予等量药物溶媒,并饲喂低脂饲料。造模第21天起对小鼠进行阴道涂片采集,监测各组小鼠的动情周期变化,连续11天。以动情周期紊乱表示小鼠PCOS模型制备成功,将成功造模的40只小鼠根据体重随机分为PCOS组(n=10),二甲双胍组(MET, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹, n=10)、枸杞叶低剂量组(GQY-L, 880 mg·kg⁻¹·d⁻¹, n=10)、枸杞叶高剂量组(GQY-H, 1 760 mg·kg⁻¹·d⁻¹, n=10)。每天给予相应药物灌胃1次,灌胃体积为10 mL·kg⁻¹,除空白组灌胃给予0.3% CMC-Na溶液外,其余各组灌胃给予1 mg·kg⁻¹来曲唑溶液继续造模。给药第18天起对小鼠进行阴道涂片采集,观察动情周期是否恢复,连续11天。

阴道涂片的采集 小鼠的动情周期一般为4~5天,每天同一时间采用生理盐水冲洗法对小鼠进行阴道涂片采集,使用移液枪吸取生理盐水,插入小鼠阴道后吹打2~3次后吸出液体,滴至载玻片,于室温下风干后,用瑞氏染液染色10 min。在荧光显微镜下检查涂片中的细胞。根据小鼠阴道涂片的细胞变化特点来划分动情周期的各阶段:动情前期可见大量有核上皮细胞;动情期可见大量不规则角化上皮细胞;动情后期可见角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞,且比例相当;动情间期可见大量白细胞及少量有核上皮细胞黏液^[17]。

血清和组织样本的采集与处理 药物干预持续29天,每4天对小鼠进行一次体重的测量。末次给药后,将小鼠禁食不禁水12 h,尾尖取血测定空腹血糖值(FBG),麻醉后摘眼球取血,室温保存小鼠全血2 h后,3 000 r·min⁻¹离心15 min后取上清,于-80 °C冰箱保存。取冷冻血清样本,采用ELISA试剂盒按说明书测定T、AMH、LH、FSH、E₂、FINS水平,采用稳态模型计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR):FBG(mmol·L⁻¹)×FINS(mIU·L⁻¹)/22.5。摘取两侧卵巢,称重后将左侧卵巢固定在4%多聚甲醛中,用于组织学分析,脱水、包埋、切片、组织病理学检查染色。切片显微图像在Panorama DESK/MIDI/250/1000扫描仪(3DHISTECH,记录)下观察,并统计卵母细胞、囊性卵泡和黄体数量。

16S rDNA 测序分析 取各组小鼠新鲜的盲肠内容物进行肠道菌群测序, 进行微生物群落总基因组DNA提取和16S rDNA基因V3~V4高变区的扩增。使用Illumina的MiSeq PE300平台进行测序。利用UPARSE软件按照97%相似性阈值对质量控制剪接后的序列进行OTU (operational taxonomic units) 聚类操作, 消除嵌合现象。利用mothur软件计算Alpha多样性。基于Bray Curtis距离进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA), 检测样品间微生物群落结构的相似性或差异性。对不同组样本进行线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA), 识别在属水平分类上存在显著差异物种。应用R语言工具对生化指标与肠道菌群之间的Spearman相关系数进行评价。利用PICRUST2软件对16S rDNA测序数据进行功能预测分析。

统计学分析 采用GraphPad Prism 8软件进行统

计分析, 组间比较采用单因素方差分析和Kruskal-Wallis检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结果

1 供试药物成分分析

采用标准曲线法对枸杞叶水提取物中4个有效成分进行含量分析, 即3个酚酸类成分 (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)、1个黄酮类成分 (芦丁), 结果显示枸杞叶水提取物中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和芦丁的含量分别为0.63%、0.56%、0.58%和2.75%。

2 枸杞叶对PCOS小鼠体重、卵巢重量及动情周期的影响

与空白组比较, PCOS组及给药组小鼠的体重有明显增长 (图1A); 与PCOS组比较, GQY-L组小鼠末次给药体重较PCOS组有所下降 ($P < 0.05$, 图1B)。同时, PCOS组小鼠卵巢质量较空白组小鼠明显增加

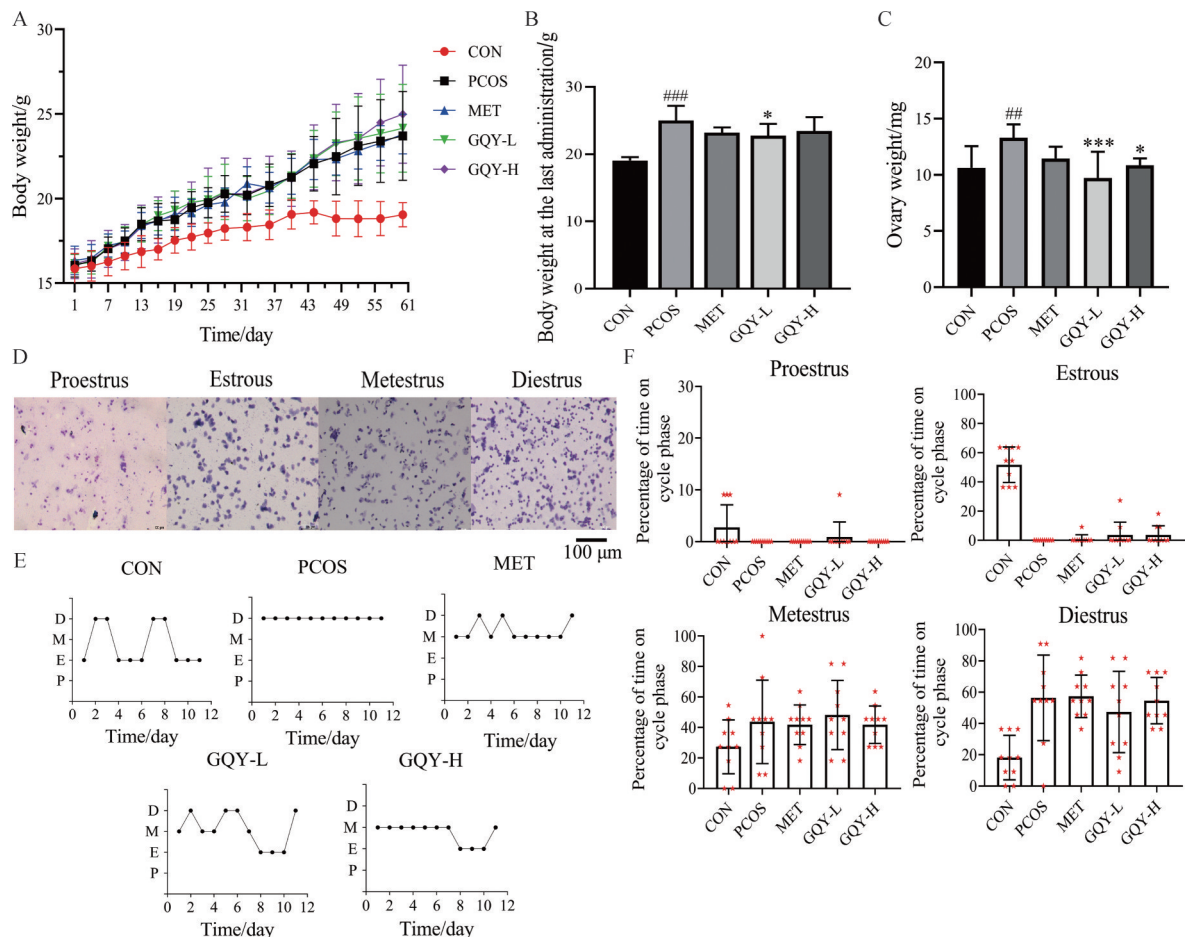


Figure 1 The effects of administration on body weight (A), body weight at the last administration (B), and ovarian weight (C). $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.01$, $^{####}P < 0.001$ vs CON group; $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ vs PCOS group; D: Wright staining of vaginal smears ($\times 100$, scale bar = 100 μm); E: Changes in the estrous cycle of representative mice in each group for 11 consecutive days; F: The relative time span of each stage in the estrous cycle ($n = 10$). CON: Blank group; PCOS: Polycystic ovary syndrome; MET: Metformin group ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); GQY-L: Low dose group of *Lycium barbarum* leaves ($880 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); GQY-H: High dose group of *Lycium barbarum* leaves ($1\,760 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); P: Proestrus; E: Estrous; M: Metestrus; D: Diestrus

($P < 0.01$), 经枸杞叶干预后有效减轻了PCOS增加的卵巢质量 ($P < 0.05$, 图1C)。通过阴道涂片测定小鼠动情周期的各个阶段 (图1D), 空白组小鼠有正常的动情周期 (图1E), 而经来曲唑造模和高脂饮食饲喂后, PCOS小鼠经历了更长的动情后期和动情间期、更短的动情前期和动情期 (图1F), 给予枸杞叶治疗后, 一定程度上改善了PCOS所致的动情周期紊乱。

3 枸杞叶对PCOS小鼠血清生化指标及卵巢结构的影响

如图2所示, 与空白组比较, PCOS组小鼠FBG、FINS、HOMA-IR、T、AMH、LH、FSH、LH/FSH水平显著升高 ($P < 0.01$), E_2 水平显著降低 ($P < 0.001$); 与PCOS组比较, 枸杞叶给药组小鼠血清中FBG、FINS、HOMA-IR、T、AMH、LH、FSH、LH/FSH水平显著降低 ($P < 0.05$), 而 E_2 水平显著升高 ($P < 0.001$)。光学显微镜下苏木精-伊红染色结果显示 (图3A), 空白组小鼠卵巢组织结构正常, 可见多个黄体 and 卵母细胞, 颗粒细胞层数较多, 排列整齐。PCOS组小鼠卵巢囊性卵泡较多, 且卵泡内颗粒细胞层变薄或消失, 囊性扩张严重, 未见黄体 and 卵母细胞。经枸杞叶或二甲双胍治疗

后, 小鼠受损的卵巢组织结构部分恢复, 卵母细胞出现, 颗粒细胞层数增多, 囊性扩张得到改善, 囊性卵泡数减少 (图3B)。

4 维恩图分析

5组样本中共检测到1 683个OTU, 其中空白组952个OTU, PCOS组665个OTU, MET组566个OTU, GQY-L组797个OTU, GQY-H组881个OTU (图4A)。通过Venn图分析各组在OTU水平上组成的相似性及重叠情况, 结果表明枸杞叶治疗后的OTU数量增多, 有正常化的趋势。

5 多样性分析

当稀释曲线趋向平坦时, 说明测序数据量渐进合理, 测序量足够覆盖样本中的大部分微生物 (图4B)。空白组盲肠内容物样本中代表肠道菌群丰富度的Sobs、Ace、Chao指数, 以及代表多样性的Shannon指数均显著高于PCOS组 ($P < 0.01$), 经药物治疗后均有显著回调趋势 (图4D), 提示枸杞叶能够改善PCOS小鼠肠道微生物区的多样性及丰富度。PCoA图表明空白组与PCOS组距离较远, 枸杞叶干预后距离向空白组靠近, 说明枸杞叶对PCOS小鼠肠道微生物的组成具

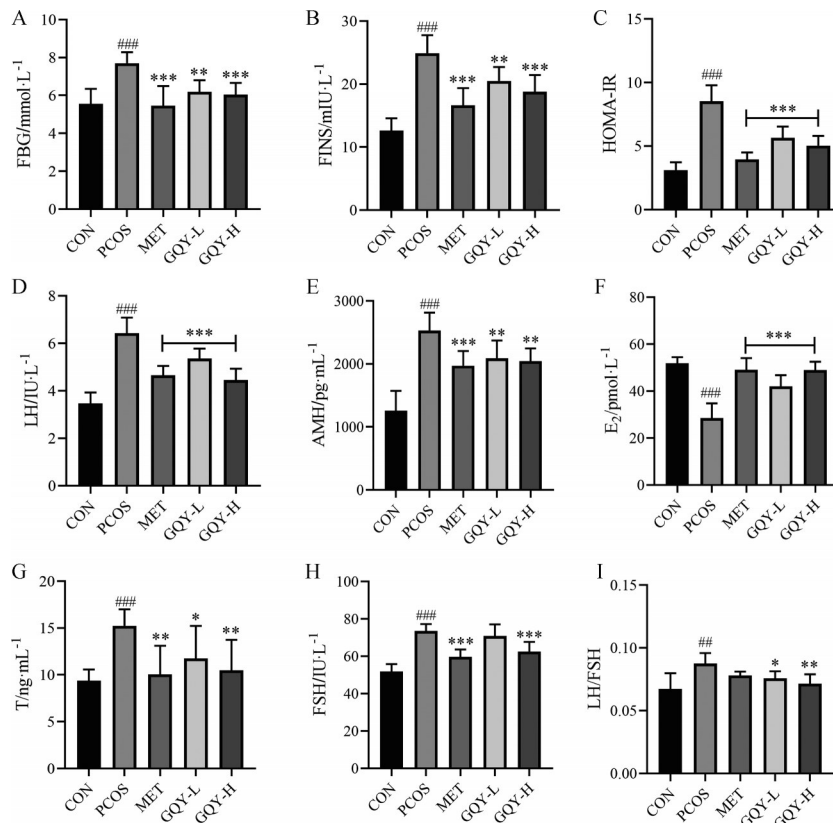


Figure 2 Effects of GQY treatment on FBG (A), FINS (B), HOMA-IR (C), LH (D), AMH (E), E_2 (F), T (G), FSH (H), LH/FSH (I). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.01$, $^{####}P < 0.001$ vs CON group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs PCOS group. GQY: *Lycium barbarum* leaves; FBG: Fasting blood glucose; FINS: Fasting insulin; HOMA-IR: Insulin resistance index; T: Testosterone; AMH: Anti-Mullerian hormone; LH: Luteinizing hormone; FSH: Follicle stimulating hormone; E_2 : Estradiol

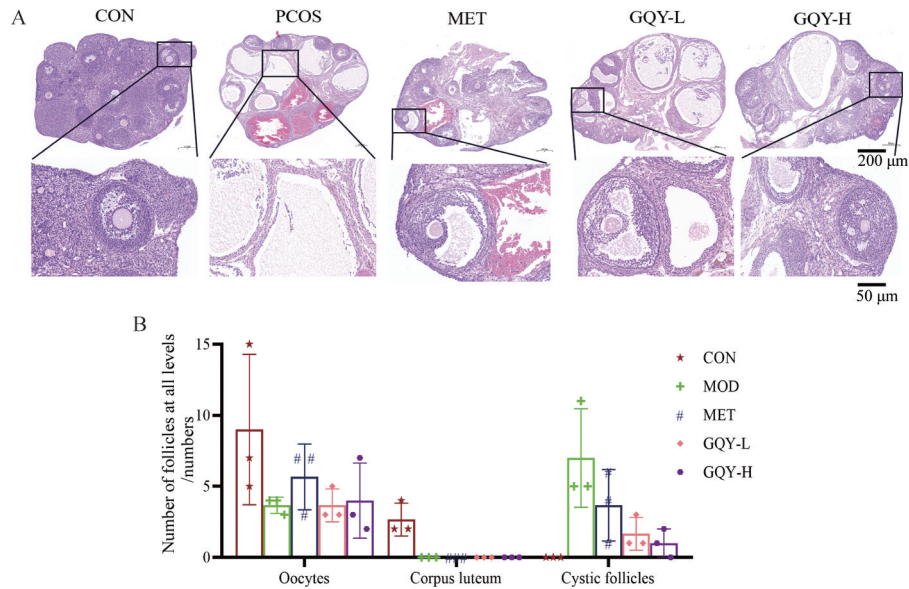


Figure 3 Effect of GQY on ovarian structure. A: Hematoxylin-eosin staining of ovaries ($\times 50$, scale bar = 200 μm ; $\times 200$, scale bar = 50 μm); B: The number of oocytes, cystic follicles and corpus luteum in each group ($n = 3$)

有调节作用 (图4C)。

6 菌群群落组成分析

通过从门、属水平研究枸杞叶对肠道菌群组成的影响, 结果发现在门水平上, 厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobiota) 是 5 个组中的优势门 (图 5A)。与空白组相比, PCOS 组 Firmicutes 和 Actinobacteria 丰度升高, Verrucomicrobiota 丰度降低, 给予枸杞叶水提取物后具有不同程度

的回调趋势。在属水平上, 按所占比例依次为回肠杆菌属 (*Ileibacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、粪杆菌属 (*Faecalibaculum*) 等。空白组与 PCOS 组在属水平的构成上差异较大 (图 5B)。给药后小鼠肠道菌群组成不断向对照组靠近, 提示枸杞叶对来曲唑诱导的小鼠肠道菌群紊乱具有一定的调节作用。

7 差异菌的筛选和药物调节作用

通过 LEfSe 软件分析鉴定, 在属水平上差异显著

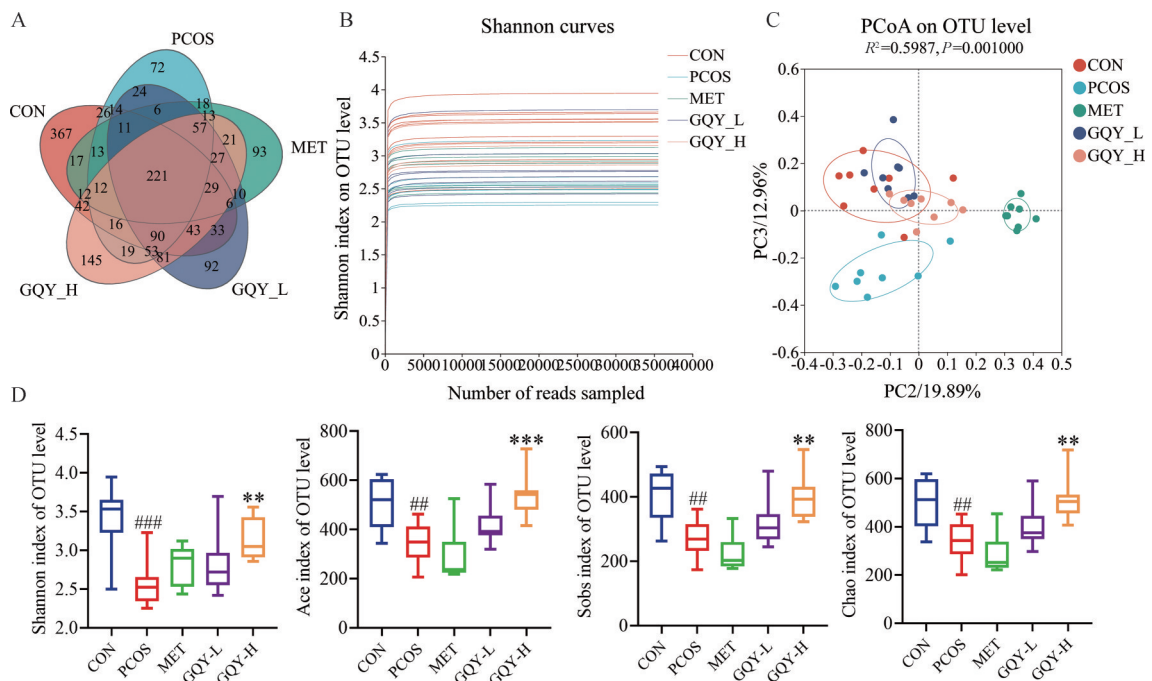


Figure 4 The effect of GQY on the diversity of gut microbiota in PCOS mice. A: Venn diagram of OTU; B: Shannon sparse curves analysis; C: PCoA analysis; D: α diversity index analysis (Shannon, Ace, Sobs, Chao index). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs CON group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PCOS group. OTU: Operational taxonomic units; PCoA: Principal co-ordinates analysis

的共62种(图5C),并对其进行统计分析,比较各组菌群的相对丰度。结果表明,与空白组相比,PCOS组在回肠杆菌属(*Ileibacterium*)、粪杆菌属(*Faecalibaculum*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)中丰度显著上升($P < 0.05$),在*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、未分类产粪甾烷真杆菌(*norank_f_Eubacterium_coprostanoligenes_group*)、*norank_f_Oscillospiraceae*和另枝菌属(*Alistipes*)中丰度显著下降($P < 0.05$)(图5D)。经枸杞叶处理后具有不同程度的回调效应,表现为能促进益生菌的生长,抑制有害菌的增殖,在一定程度上改善PCOS小鼠

体内肠道菌群紊乱的状态。

8 相关性分析和COG的功能预测

盲肠内容物中肠道菌群变化与临床生化指标之间的相关性结果表明(图6A),在门水平上,拟杆菌门(*Bacteroidota*)与FBG、T、FSH、INS、AMH、LH等异常代谢指标呈负相关,与E₂呈正相关。在属水平上,PCOS组富集的肠道菌如*Romboutsia*、*Clostridium_sensu_stricto_1*、*Ileibacterium*与血脂异常、性激素紊乱水平呈正相关,枸杞叶组富集的肠道菌如*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*norank_f_Eubacterium_coprostanoligenes_group*与生殖代谢异常指标呈负相关。

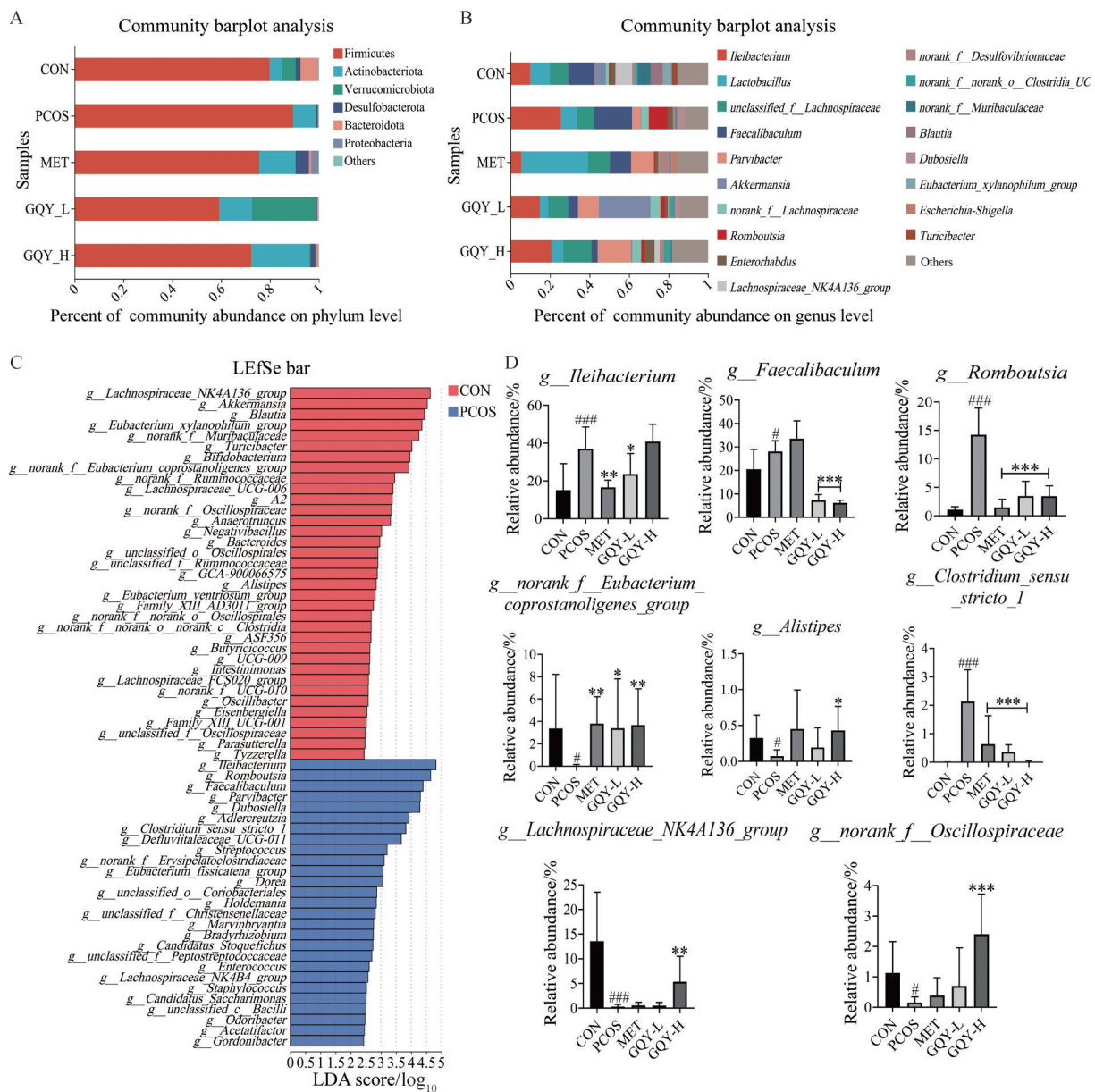


Figure 5 The differences in the community composition between the phylum levels (A) and the genus levels (B); C: LefSe hierarchical tree map of multistage species in cecal content; D: Average relative abundance of difference features flora of different groups in cecal content. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs CON group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PCOS group. LDA: Linear discriminant analysis

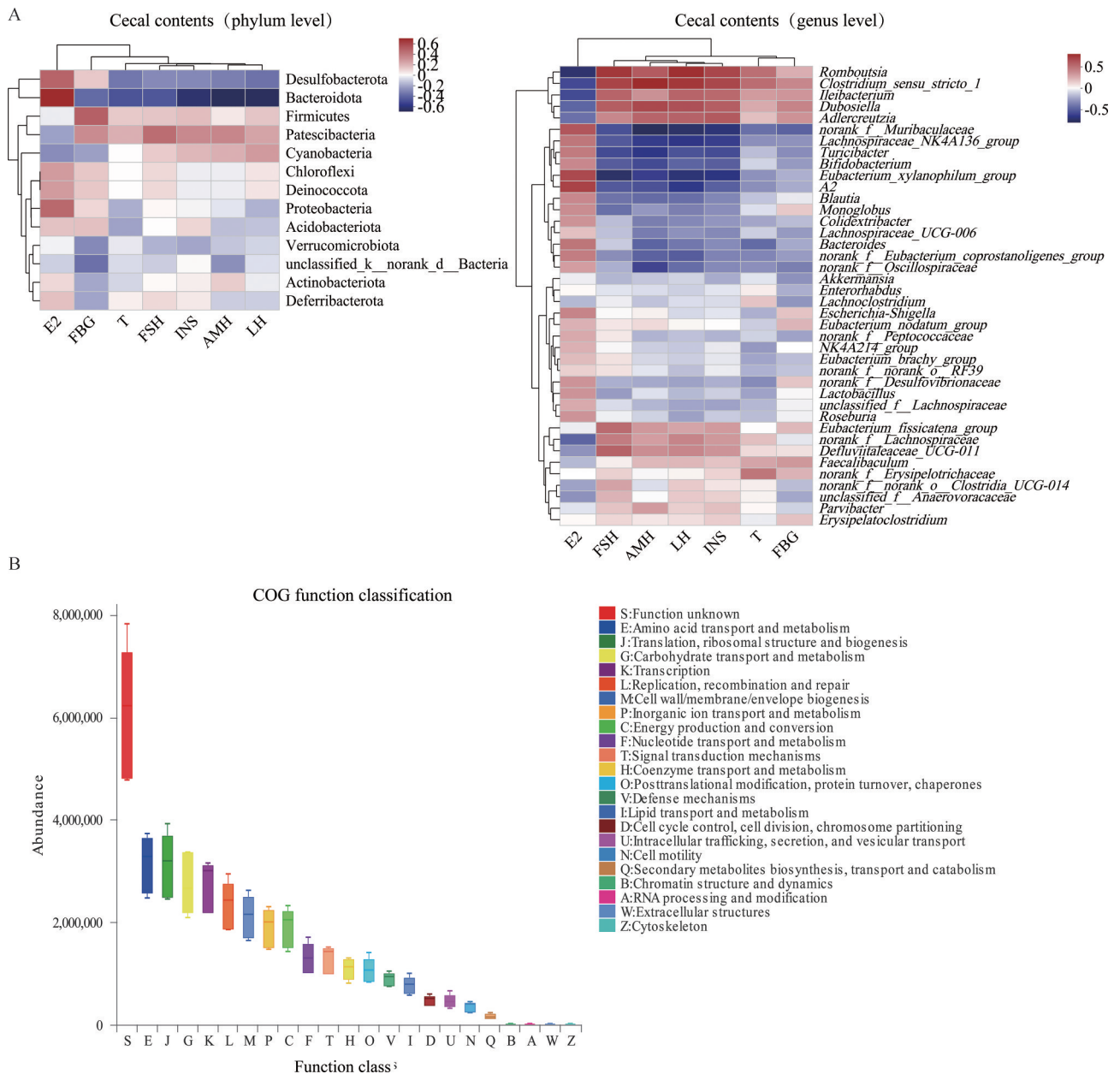


Figure 6 Heat map of correlation analysis between biochemical indexes and gut microbiota (A) and metabolic function prediction of community samples (B). COG: Cluster of orthologous groups

COG的功能分析表明,氨基酸转运和代谢、翻译及碳水化合物转运与代谢途径起主要作用(图6B)。结果提示,枸杞叶可影响肠道菌群组成结构,调节代谢,这可能是治疗PCOS的潜在机制,尚有待进一步验证研究。

讨论

多囊卵巢综合征是一种终生生殖、神经内分泌和代谢紊乱疾病,其模糊的诊断标准和极其复杂的表型^[18],使得这种具有高度异质性临床表现的综合征更具挑战性,治疗效果欠佳。目前,中医药是PCOS患者

的主要治疗方法,其作用涉及多个途径和靶点。中医认为脾肾亏虚、肝气郁结是PCOS之本,痰血、痰湿是本病之标,随着时间的推移,湿、痰、瘀血等病理产物在体内积聚,如果不及时治愈,最终会阻塞冲任经和子宫,进而导致肾-天癸-冲任-胞宫轴功能失调,导致多囊卵巢综合征发生。故应以补肾、疏肝理气泻火、健脾化痰为治则,从多个方面改善PCOS症状与体征^[19]。

来曲唑是一种非甾体芳香酶抑制剂,限制雄激素向雌激素的转化,造成类固醇激素水平紊乱,导致持续无排卵及卵巢的多囊样改变,已被广泛应用于PCOS模型的制备^[20]。但来曲唑造模法存在糖脂代谢异常表

现不明显的弊端,如适度的体重增加和腹部肥胖、最低限度升高的空腹血糖和不可检测的胰岛素抵抗。而高脂饮食可诱导炎症反应,导致异常的葡萄糖和脂质代谢,复制出较稳定可靠的糖脂代谢异常模型^[21]。来曲唑联合高脂饮食诱导的PCOS小鼠模型可以表现出高雄激素血症、动情周期紊乱、卵巢多囊样变化和性激素紊乱等生殖特征,体重增加、空腹血糖水平升高、胰岛素抵抗和血脂异常等代谢特征^[19,22]。采用上述造模方法,更适合研究PCOS发病中生殖内分泌及糖脂代谢的异常,可用于研究PCOS的各种治疗方案。二甲双胍是一种胰岛素增敏剂,已被美国糖尿病协会推荐为治疗2型糖尿病和PCOS的一线药物。在PCOS研究中,二甲双胍被广泛用作阳性对照^[23]。二甲双胍可改善与生殖功能障碍相关的高雄激素血症和高胰岛素血症,并适用于诱导排卵^[24]。二甲双胍作为一种双胍类抗糖尿病药物,可修复肌细胞和骨骼肌的胰岛素信号转导,促进内脏脂肪中葡萄糖的吸收,抑制肝脏糖异生,降低血清胰岛素表达水平来改善胰岛素抵抗,同时其还具有明显的减重作用。二甲双胍还可通过减少卵巢产生雄激素、降低睾酮和雄烯二酮水平、增加肝脏中性激素结合球蛋白的产生和增加卵巢雌激素分泌来改善月经不规律、排卵频率和高雄激素血症等临床症状^[25]。

PCOS的病理机制与下丘脑-垂体-卵巢或肾上腺轴异常密切相关,促性腺激素释放激素(GnRH)的负反馈调节紊乱,导致LH/FSH比值相对升高。血清中过量的LH刺激卵巢内雄激素的产生,而相对不足的FSH则进一步损害卵泡发育,导致患者排卵困难^[26,27]。本文研究结果表明,经枸杞叶干预后,PCOS小鼠动情周期逐渐恢复,睾酮、LH/FSH水平降低,卵泡囊性扩张明显改善,卵巢内颗粒细胞层数增加,胰岛素抵抗得到了改善,降低了PCOS相关并发症的风险;二甲双胍也可显著降低空腹血糖及空腹胰岛素,从而改善胰岛素抵抗。然而,在恢复紊乱的动情周期,过量的LH/FSH水平方面,枸杞叶效果优于二甲双胍。综上看出,枸杞叶改善多囊卵巢综合征的症状表现具有较好的应用价值和临床意义。

近年来,肠道菌群被认为是影响健康和疾病的关键因素,为代谢性疾病的研究提供了新视角。肠道菌群失调与高雄激素血症、胰岛素抵抗^[28]和肥胖^[29]等疾病表型密切相关。PCOS患者肠道微生物多样性的减少可能是其肠道功能改变,加重PCOS及产生相关疾病的潜在机制。来曲唑可导致啮齿动物肠道微生物菌群结构改变,相比健康小鼠肠道菌群的多样性下降^[16],使用共居模式发现小鼠通过粪-口途径暴露于健

康的肠道微生物组,可以防止PCOS代谢和生殖表型的发展^[30],这表明肠道微生物组的失调可能在代谢紊乱的发展中发挥关键作用。采用16S rDNA高通量测序技术分析PCOS小鼠盲肠内容物样本中肠道菌群的变化,发现枸杞叶增加了小鼠肠道菌群的多样性及丰富度,物种组成有正常化的趋势。由于中药具有有效成分复杂、作用靶点及通路不清晰等特点,因此量效关系难以如西方医学那样易于判定。枸杞叶给药高、低剂量组虽然在药效指标和16S rDNA测序结果中没有显示出显著的剂量依赖性,但在激素水平及肠道菌群多样性调节方面存在一定的量效关系,GQY-H组回调趋势更为明显。

研究表明,大约80%的人类肠道细菌来自厚壁菌门和拟杆菌门。Firmicutes/Bacteroidetes (F/B)比值的异常被认为是肠道菌群发生紊乱的生物学标志^[28]。虽然门水平上各组的相对丰度差异无统计学意义,但枸杞叶能够下调Firmicutes丰度,上调Bacteroidetes丰度,降低了F/B比值,其肠道菌群组成有趋于正常。在给药组中富集的*Lachnospiraceae_NK4A136_group*菌属是一种公认的有益菌,能促进丁酸的生成,在维持小鼠肠道屏障的完整性方面发挥着至关重要的作用,并表现出显著的抗炎特性^[31]。研究表明,该菌属能通过增强线粒体功能改善胰岛素敏感性并增加能量消耗,还可抑制组蛋白脱乙酰基酶的表达和活性,并通过不同基因表达和激素调节途径激活肠道新生,从而预防代谢性内毒素血症^[32]。本研究发现,*Lachnospiraceae_NK4A136_group*与E₂水平呈正相关,与FSH、LH、AMH水平呈负相关,且该菌群丰度在GQY-H组中明显增加。有研究发现,PCOS小鼠的*Lachnospiraceae_NK4A136_group*菌群与LH、LH/FSH呈负相关^[33],这与本实验研究结果相一致。*Romboutsia*作为高脂饮食诱导肥胖个体代谢紊乱的菌群生物标志物,与体重和血清脂质呈正相关^[34]。*Romboutsia*在糖尿病^[35]和溃疡性结肠炎^[36]患者的肠道中相对丰度高于健康人,并与促炎因子呈正相关。这表明*Romboutsia*可能是一种潜在的致病菌,参与加重肝脂肪变性和破坏肠屏障。一旦肠道菌群平衡被扰乱,*Romboutsia*可通过肠道黏膜进入正常组织,进而导致不同疾病的发展。本研究发现,*Romboutsia*菌属在PCOS组中高度富集,且与血糖血脂代谢异常指标呈正相关,说明枸杞叶可以促进益生菌的生长,抑制有害菌的增殖,从而改善PCOS小鼠肠道微生物群的失调。

综上所述,枸杞叶通过改善胰岛素抵抗、减轻卵巢形态学损伤、调节血清激素水平及肠道菌群紊乱,从而在PCOS治疗中发挥作用。研究结果为枸杞叶治疗多

囊卵巢综合征的临床应用及开发利用提供了科学依据, 为阐明其调控肠道菌群的作用机制研究提供了指引。

作者贡献: 宿树兰和段金殿设计实验并提供资金; 张莘悦为本研究的主要完成人和论文撰写者; 陆聪和郑慧丽参与部分数据分析工作; 朱悦、郭盛、钱大玮和康宏杰提供实验技术支持。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Lian YK, Zhou WD. Advances in the research of exosome and exosomal non-coding RNA in the pathogenesis, diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2256-2263.
- [2] Cooney LG, Dokras A. Beyond fertility: polycystic ovary syndrome and long-term health [J]. Fertil Steril, 2018, 110: 794-809.
- [3] Liu J, Wu Q, Hao Y, et al. Measuring the global disease burden of polycystic ovary syndrome in 194 countries: global burden of disease study 2017 [J]. Hum Reprod, 2021, 36: 1108-1119.
- [4] Teede HJ, Tay CT, Laven J, et al. Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome [J]. Fertil Steril, 2023, 120: 767-793.
- [5] Ningxia Food and Drug Administration. Processing Specification of Ningxia Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces (宁夏中药饮片炮制规范) [M]. Yinchuan: Sunny Publishing House, 2017: 218-219.
- [6] Zhao XQ, Guo S, Yan H, et al. Analysis of phenolic acids and flavonoids in leaves of *Lycium barbarum* from different habitats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33: e4552.
- [7] Liu H, Fan Y, Wang W, et al. Polysaccharides from *Lycium barbarum* leaves: isolation, characterization and splenocyte proliferation activity [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51: 417-422.
- [8] Zhao XQ, Guo S, Lu YY, et al. *Lycium barbarum* L. leaves ameliorate type 2 diabetes in rats by modulating metabolic profiles and gut microbiota composition [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109559.
- [9] Niu Y, Liao J, Zhou H, et al. Flavonoids from *Lycium barbarum* leaves exhibit anti-aging effects through the redox-modulation [J]. Molecules, 2022, 27: 4952.
- [10] Olatunji OJ, Chen H, Zhou Y. *Lycium chinense* leaves extract ameliorates diabetic nephropathy by suppressing hyperglycemia mediated renal oxidative stress and inflammation [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 1145-1151.
- [11] Wen C, Liu C, Li Y, et al. Ameliorative potentials of the ethanolic extract from *Lycium chinense* leaf extract against diabetic cardiomyopathy. Insight into oxido-inflammatory and apoptosis modulation [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154: 113583.
- [12] Chen YZ. Classic Formulas (小品方) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1995: 64-69.
- [13] Zhang T, Guo JY. Effects of Lycii Cortex on express of PI3K/PKB in PCOS rats [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 2004-2008.
- [14] Pellock SJ, Redinbo MR. Glucuronides in the gut: sugar-driven symbioses between microbe and host [J]. Biol Chem, 2017, 292: 8569-8576.
- [15] Zhang JC, Sun ZH, Jiang SM, et al. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 regulates the secretion of sex hormones in polycystic ovary syndrome patients through the gut-brain axis [J]. mSystems, 2019, 4: e00017-19.
- [16] Gao Y, Mo SY, Cao HK, et al. The efficacy and mechanism of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels root aqueous extract based on RNA sequencing and 16S rDNA sequencing in alleviating polycystic ovary syndrome [J]. Phytomedicine, 2023, 120: 155013.
- [17] Zhou RQ. The Role of FHL2 in Follicular Growth and Ovulatory Obstacles of Polycystic Ovary Syndrome (FHL2在多囊卵巢综合征卵泡发育异常及排卵障碍中作用的机制研究) [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2020.
- [18] Wang Y, Xiao H, Liu Y, et al. Effects of Bu Shen Hua Zhuo formula on the LPS/TLR4 pathway and gut microbiota in rats with letrozole-induced polycystic ovary syndrome [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 891297.
- [19] Lu LJ, Zhang J, Jiang Y, et al. Mechanism of mitochondrial dysfunction in polycystic ovary syndrome and intervention progress of traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 49: 1-14.
- [20] Kauffman AS, Thackray VG, Ryan GE, et al. A novel letrozole model recapitulates both the reproductive and metabolic phenotypes of polycystic ovary syndrome in female mice [J]. Biol Reprod, 2015, 93: 69.
- [21] Begum N, Manipriya K, Veeresh B. Role of high-fat diet on letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 917: 174746.
- [22] Skarra DV, Hernández-Carretero A, Rivera AJ, et al. Hyperandrogenemia induced by letrozole treatment of pubertal female mice results in hyperinsulinemia prior to weight gain and insulin resistance [J]. Endocrinology, 2017, 158: 2988-3003.
- [23] Wang Z, Nie K, Su H, et al. Berberine improves ovulation and endometrial receptivity in polycystic ovary syndrome [J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153654.
- [24] Hu RA, Huang YJ, Geng YL, et al. Jiawei Buzhong Yiqi decoction ameliorates polycystic ovary syndrome via oocyte-granulosa cell communication [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 323: 117654.
- [25] Morley LC, Tang T, Yasmin E, et al. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for

- women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 11: CD003053.
- [26] Saadia Z. Follicle stimulating hormone (LH: FSH) ratio in polycystic ovary syndrome (PCOS)-obese vs. non-obese women [J]. *Med Arch*, 2020, 74: 289-293.
- [27] Wang R, Zhao Y, Fang X, et al. Effect of the ketogenic diet on gut microbiome composition and metabolomics in polycystic ovarian syndrome rats induced by letrozole and a high-fat diet [J]. *Nutrition*, 2023, 114: 112127.
- [28] Qin JJ, Li YR, Cai ZM, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490: 55-60.
- [29] Insenser M, Murri M, Del Campo R, et al. Gut microbiota and the polycystic ovary syndrome: influence of sex, sex hormones and obesity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103: 2552-2562.
- [30] Torres PJ, Ho BS, Arroyo P, et al. Exposure to a healthy gut microbiome protects against reproductive and metabolic dysregulation in a PCOS mouse model [J]. *Endocrinology*, 2019, 160: 1193-1204.
- [31] Li QM, Cui Y, Xu BC, et al. Main active components of Jiawei Gegen Qinlian decoction protects against ulcerative colitis under different dietary environments in a gut microbiota-dependent manner [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105694.
- [32] Dong WT, Zhao YY, Li XW, et al. Corn silk polysaccharides attenuate diabetic nephropathy through restoration of the gut microbial ecosystem and metabolic homeostasis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1232132.
- [33] Li RY, Hu R, Huang Y, et al. Astragalus polysaccharide alleviates polycystic ovary syndrome by reducing insulin resistance and oxidative stress and increasing the diversity of gut microbiota [J]. *Endocrine*, 2024, 83: 783-797.
- [34] Zeng Q, Li DF, He Y, et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 13424.
- [35] Liu J, Wang X, Li QY, et al. Fecal metabolomics combined with 16S rRNA gene sequencing to analyze the effect of Jiatai pill intervention in type 2 diabetes mellitus rats [J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1135343.
- [36] Zhong YB, Xiao QP, Huang JQ, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates ulcerative colitis in obese mice by regulating the gut microbiota-lipid metabolism-Th1/Th2/Th17 cells axis [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71: 20073-20091.