

灰树花多糖对多囊卵巢综合征大鼠症状的改善作用

种超杰¹, 吴亚琪¹, 董哲文^{1,2}, 李婉莹^{3,4}, 钟淑媚³, 王子娴³, 周燕园^{1,5*}, 宋家乐^{3,6,7*}

(1. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541199) (2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳 110016)

(3. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541199) (4. 柳州市人民医院临床营养科, 广西柳州 545026)

(5. 广西糖尿病系统医学重点实验室, 广西桂林 541199) (6. 广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室, 广西桂林 541101) (7. 桂林理工大学国家母婴乳品健康工程技术研究中心南亚分中心, 广西桂林 541004)

摘要: 该研究主要探究灰树花多糖 (GFPS) 对来曲唑诱导多囊卵巢综合征大鼠 (PCOS) 症状的改善作用。采用来曲唑 (1 mg/kg) 建立 PCOS 模型, 巴氏染色检测大鼠动情周期, HE 染色观察大鼠卵巢形态学变化, 酶联免疫吸附法检测大鼠血清促卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E2)、睾酮 (T)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 水平。qRT-PCR 法检测卵巢组织中 *Sod1*、*Sod2*、*Cat*、*Gpx3* 的 mRNA 表达。GFPS 减少了 PCOS 大鼠的囊状卵泡数量、增加了黄体颗粒细胞数量, 并显著改善血清性激素水平 (至 T: 68.02 nmol/L; LH: 83.22 ng/L; FSH: 89.31 IU/L; E2: 90.19 ng/L)、脂质水平 (至 TG: 0.98 mmol/L; TC: 0.36 mmol/L; LDL-C: 0.18 mmol/L) 以及氧化应激水平 (至 MDA: 1.42 nmol/mL 和 SOD: 1.49 U/mL)。此外, GFPS 还能上调 PCOS 大鼠卵巢中抗氧化基因酶 *Sod1* (3.86 倍)、*Sod2* (3.16 倍)、*Cat* (1.57 倍) 和 *Gpx3* (2.75 倍) 的表达。研究表明, GFPS 能够通过调节性激素水平、脂质水平和氧化应激水平, 改善卵泡发育, 是一种具有潜在 PCOS 治疗效果的天然多糖。

关键词: 多囊卵巢综合征; 灰树花多糖; 来曲唑; 脂质水平; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2023)08-10-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1178

Ameliorating Effects of *Grifola frondosa* Polysaccharides on Symptoms of Polycystic Ovary Syndrome in Rats

CHONG Chaojie¹, WU Yaqi¹, DONG Zhewen^{1,2}, LI Wanying^{3,4}, ZHONG Shumei³, WANG Zixian³,
ZHOU Yanyuan^{1,5*}, SONG Jiale^{3,6,7*}

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China) (2. School of Pharmacy, Shenyang

Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China) (3. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin

541199, China) (4. Department of Clinical Nutrition, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, China) (5. Guangxi Key

Laboratory of Diabetic Systems Medicine, Guilin 541199, China) (6. Guangxi Key Laboratory of Environmental

Exposomics and Entire Lifecycle Health, Guilin 541101, China) (7. South Asia Branch of National Engineering Research

Center of Dairy Health for Maternal and Child Health, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: The effects of *Grifola frondosa* polysaccharides (GFPS) on symptoms of letrozole-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats were investigated. GFPS significantly improved the symptoms of PCOS rats, including the number of antral follicles, the number of corpus luteum granulosa cells, and the levels of sex hormones in serum (T: 68.02 nmol/L; LH: 83.22 ng/L; FSH: 89.31 IU/L; E2: 90.19 ng/L), lipid levels (TG: 0.98 mmol/L; TC: 0.36 mmol/L; LDL-C: 0.18 mmol/L) and oxidative stress levels (MDA: 1.42 nmol/mL and SOD: 1.49 U/mL). In addition, GFPS could up-regulate the expression of antioxidant genes *Sod1* (3.86 fold), *Sod2* (3.16 fold), *Cat* (1.57 fold) and *Gpx3* (2.75 fold) in the ovaries of PCOS rats. The results showed that GFPS could improve follicle development by regulating sex hormone levels, lipid levels and oxidative stress levels, and is a natural polysaccharide with potential therapeutic effects on PCOS.

种超杰, 吴亚琪, 董哲文, 等. 灰树花多糖对多囊卵巢综合征大鼠症状的改善作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 10-20

CHONG Chaojie, WU Yaqi, DONG Zhewen, et al. Ameliorating effects of *Grifola frondosa* polysaccharides on symptoms of polycystic ovary syndrome in rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 10-20

收稿日期: 2022-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81860767); 中央财政引导地方科技发展基金 (GKZY22096025); 广西自然科学基金项目 (2022GXNSFAA035603; 2018GXNSFAA281104; 2016GXNSFBA380172); 人社部“高层次留学人才回国资助计划”(人社厅函[2019]160号); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助 (桂教人[2018]18号); 广西医疗卫生重点培育学科建设项目 (桂卫科教发[2022]4号)

作者简介: 种超杰 (1997-), 女, 在读硕士, 研究方向: 天然产物与药物分析学, E-mail: 2655863759@qq.com

通讯作者: 周燕园 (1978-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然药物质量控制及药理活性, E-mail: zyy@glmc.edu.cn; 共同通讯作者: 宋家乐 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 临床营养与免疫代谢性疾病的分子防治机制, E-mail: songjiale@glmc.edu.cn

female rats were investigated. The PCOS model was established using letrozole (1 mg/kg), while the estrous cycle of rats was detected by the Papanicolaou staining assay. Morphological changes in the rat ovaries were observed with HE staining, while the serum levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), testosterone (T), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The mRNA expression of *Sod1*, *Sod2*, *Cat*, and *Gpx3* in the ovarian tissue was detected by qRT-PCR. GFPS reduced the number of cystic follicles and increased the number of corpus luteum and granulosa cells. GFPS significantly improved serum sex hormone levels in these rats to T: 68.02 nmol/L, LH: 83.22 ng/L, FSH: 89.31 IU/L, and E2: 90.19 ng/L; lipid levels to TG: 0.98 mmol/L, TC: 0.36 mmol/L, and LDL-C: 0.18 mmol/L; and oxidative stress levels to MDA: 1.42 nmol/mL and SOD: 1.49 U/mL. In addition, GFPS increased the expression levels of antioxidant genetic enzymes *Sod1* (3.86-fold), *Sod2* (3.16-fold), *Cat* (1.57-fold), and *Gpx3* (2.75-fold) in the ovaries of PCOS rats. The results show that the natural polysaccharide GFPS can improve follicular development by regulating sex hormone levels, lipid levels, and oxidative stress levels, with potential therapeutic effects on PCOS.

Key words: polycystic ovary syndrome; *Grifola frondosa* polysaccharide; letrozole; lipid levels; oxidative stress

多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS) 是育龄妇女期最常见的内分泌性疾病。据统计, 全世界育龄期妇女 PCOS 的发病率高达 5%~10%^[1]。在中国, 19~45 岁的汉族女性人群中 PCOS 的发病率为 5.6%^[2]。临床上, PCOS 的主要特征为高雄激素血症, 排卵功能障碍, 以及超声下卵巢呈现多囊形态^[3]。肥胖 (尤其是腹部肥胖)、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、心血管疾病均与 PCOS 的发生有较强的相关性^[4]。研究表明, PCOS 患者体内存在异常的氧化应激水平, 而这一生理事件被认为是促进 PCOS 病理发展的潜在诱因之一^[5]。

二甲双胍 (Metformin, Met) 是一种噻唑烷二酮衍生物, 是临床 PCOS 治疗的常用药物之一。Met 可以提高 PCOS 患者对胰岛素的敏感性, 改善卵巢排卵功能^[6]、抑制卵巢雄激素的合成^[7], 但长期服用 Met 会造成恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道反应以及乳酸中毒和肝肾损害^[8]等不良反应。

灰树花 (*Grifola frondosa*), 又称为“舞茸”, 属于担子菌纲, 多孔菌目, 多孔菌科, 树花属, 是一种我国传统食药两用真菌^[9]。目前, 对灰树花有效成分的研究主要集中于其多糖成分。已有的研究报道指出, 灰树花多糖 (*Grifola frondosa* Polysaccharide, GFPS) 具有降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、抗氧化、免疫调节和调节肠道菌群等多方面的活性^[10]。GFPS 不仅可以改善高脂饲料 (45%脂肪供能) 诱发高脂血症大鼠的脂代谢紊乱^[11], 还可以降低高脂肪与高胆固醇混合饮食仓鼠血清中甘油三酯 (Triglyceride, TG)、总胆固醇 (Total Cholesterol, TC)、谷胱甘肽水平, 并升高过氧化氢酶水平^[12]。本文拟采用来曲唑建立 PCOS 大鼠模型, 通过观察 GFPS 对 PCOS 大鼠动情周期、性激素水平、脂质代谢及氧化应激水平的改善作用, 为 GFPS 用于临床治疗 PCOS 药物的开发提

供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

GFPS 多糖购自西安瑞迪生物科技有限公司 (主要由葡萄糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖组成, 其摩尔比依次为 3.30:0.12:0.038:0.030:0.018:0.008:0.011); 来曲唑 (Letrozole, B25470) 购自上海源叶生物科技有限公司; Met (M2009) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 羧甲基纤维素 (Carboxymethyl Cellulose, CMC, S14015) 购自西陇科学股份有限公司; 巴氏染液 (G1612) 购自北京索莱宝科技有限公司; 苏木素-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色试剂盒 (C01055) 和 cDNA 逆转录试剂盒 (D7178M) 购自上海碧云天生物技术有限公司; Trazol 试剂 (DP424) 和 SuperReal 荧光定量试剂盒 (FP205-2) 购自北京天根生化科技有限公司; 雌二醇 (Estradiol, E2, MM-0575R1)、睾酮 (Testosterone, T, MM-0577R1)、黄体生成素 (Luteinizing Hormone, LH, MM-0624R1)、卵泡刺激素 (Follicle Stimulating Hormone, FSH, MM-70867R1) ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司; TC (A111-1-1)、TG (A110-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low-Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C, A113-1-1) 和高密度脂蛋白胆固醇 (High-Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C, A112-1-1) 试剂盒购自江苏爱迪生生物科技有限公司; 丙二醛 (Malonaldehyde, MDA, A003-1-2)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD, A001-3-2) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

Allegra 64R 高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 有限公司; Eppendorf 5424R 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Leica DM4B 显微镜, 德国徕卡仪器有限公司; ELx808 酶标仪, 美国 BioTek 公司; KZ-II 高速组织研磨仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司; ProFlex 梯度 PCR 仪和 Quant Studio™ 6 Flex PCR 仪, 美国 Thermo Fisher 科技公司。

1.3 实验动物

总 6 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 32 只 (190~220 g) 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 (生产许可证号 SYXK (桂) 2019-0004)。所有大鼠饲养于桂林医学院公共卫生学院 SPF 级动物房 (单位许可证号: SKY (桂) 2020-0005), 标准光照/黑暗 (12 h/12 h) 循环条件下饲养, 自由采食并提供清洁饮水。

1.4 实验方法

1.4.1 造模与分组

将大鼠随机分为正常组 ($n=8$)、PCOS 组 ($n=8$)、Met 组 ($n=8$)、GFPS 组 ($n=8$)。正常组每日灌胃生理盐水, PCOS 组每日灌胃 1 wt% CMC 混悬液 (含来曲唑 1 mg/kg), Met 组每日分别灌胃 1 wt% CMC 混悬液 (含来曲唑 1 mg/kg) 和 Met (265 mg/(kg d))^[13,14], GFPS 组每日分别灌胃 1 wt% CMC 混悬液 (含来曲唑 1 mg/kg) 和 GFPS (600 mg/(kg d))^[15], 每只大鼠每日灌胃 1 mL, 连续灌胃 21 d 后取材用于后续实验。本动物实验方案已通过桂林医学院动物伦理委员会审查批 (GLMC201813009)。

1.4.2 实验动物动情周期的观察

以阴道上皮细胞分类染色法观察实验动物的动情周期^[13,14]。无菌棉签沾取少量生理盐水于大鼠阴道内壁顺时针旋转, 将采集的细胞均匀涂抹于载玻片上晾干, 95vol% 乙醇固定 30 min。根据染色试剂盒说明书操作进行巴氏染色观察与记录。

1.4.3 大鼠脏器质量测定和卵巢组织形态学观察

实验结束后, CO₂ 麻醉处死大鼠, 腹主动脉取血。使用高速冷冻离心机在 4 °C 和 3 000 r/min 条件下离心 10 min 制备血清。冰上快速分离卵巢、子宫和内脏脂肪 (腹部脂肪、肾周脂肪、子宫周脂肪), 并算内脏脂肪相对质量。一侧卵巢经 10% (V/V) 福尔马林溶液固定行石蜡包埋切片 (4 μm) 并进行 HE 染色, 显微镜下观察各组大鼠卵巢组织病理学变化。

$$A = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——内脏脂肪相对质量;

m_1 ——内脏脂肪质量, g;

m_0 ——大鼠体质量, g。

1.4.4 血清生化指标的检测

取 1.4.3 中制备的血清, 按照对应 ELISA 试剂盒说明操作, 检测大鼠血清中 FSH、LH、E₂、T 水平, 并计算 LH/FSH 比值; 检测血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C、MDA 及 SOD 水平。

1.4.5 qRT-PCR 技术检测 PCOS 大鼠卵巢组织中抗氧化基因酶的 mRNA 表达

卵巢组织 (20 mg) 用生理盐水清洗血污后, Trazol 试剂提取总 RNA。定量 RNA 纯度后使用 SYBR Green 定量聚合酶链式反应试剂盒检测抗氧化基因酶 *Sod1* (5'-3': CGGATAAGAGAGGATGTT, 3'-5': TAGTACGGCCAATGATGGAATG), *Sod2* (5'-3': AGCGTGACTTTGGGTCTTT, 3'-5': AGCGACCTTGCTCCTATTG), *Cat* (5'-3': CAGAGGAAAGCGGTCAAGAA, 3'-5': CATTCTTAGGCTTCTGGGAGTT) 和 *Gpx3* (5'-3': GACATCCGCTGGAACCTTTGA, 3'-5': CCATCTTGACGTTGCTGACT) 的表达水平, 以 *Gapdh* (5'-3': GACATGCCGCTGGAGAAAC, 3'-5': AGCCCAGGATGCCCTTTAGT) 为内参。在总反应体系加入 cDNA 模板 (1 μL), 2×superReall PeMiK Pus (10 μL), 50×ROX Rltene Dye (0.4 μL), 上、下游引物各 0.6 μL, 最后添加无酶水 (7.4 μL) 至总体积 20 μL, PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。每个反应设置 3 个重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算样品中各基因的相对表达量^[16]。

1.4.6 数据处理与统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析, 所有实验数据以结果以均值 (Means) ±标准偏差 (SD) 表示。数据统计方法使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行两两比较, 组间比较采用最小显著性差异法 (Least Significant Difference, LSD) 进行显著性差异检验, 方差不齐采用 Tamhane T2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。Graphpad Prism9 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 GFPS 对 PCOS 大鼠动情周期的影响

雌性 SD 大鼠的动情周期一般为 4~5 天^[17], 其阴

道上皮细胞的类型可分为存在大量椭圆形有核上皮细胞的动情前期,存在大多数不规则角化上皮细胞的动情期,存在不规则角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞的动情后期和以白细胞为主的动情间期等4个典型阶段^[18]。在用来曲唑诱导的PCOS大鼠经典模型中,可以观察到模型大鼠伴有激素水平的异常及动情周期紊乱等与人PCOS类似的临床症状^[19]。

如图1a所示,在整个实验期间正常组大鼠呈现规律的动情周期,而PCOS大鼠的动情周期多处于后期和间期,出现典型动情周期紊乱情况(图1b~e)。本次研究中所观察到的PCOS大鼠动情周期长时间处于间期的现象与Wang等^[20]所报道的PCOS大鼠动情周期紊乱较为一致。GFPS和Met分别处理后,PCOS大鼠动情周期逐渐趋于正常,提示GFPS能够有效改

善PCOS大鼠所出现的动情周期紊乱。PCOS大鼠动情周期紊乱的原因与下丘脑-垂体-性腺轴(Hypothalamic-Pituitary-Ovarianaxis, HPOA)的失衡相关,HPOA的失衡,抑制卵巢E2、FSH水平的产生,导致PCOS大鼠失去规律的动情周期,影响卵泡发育的成熟^[21]。GFPS通过改善PCOS大鼠的性激素水平有效的改善了PCOS大鼠动情周期紊乱。Li等^[22]的研究表明从灰树花子实体提取的多糖主要单糖组成为葡萄糖(Glc)、少量的甘露糖(Man)和半乳糖(Gal),三者间的摩尔比为15.2:2.8:1.0,这与本次实验中我们所使用GFPS的单糖构成较为接近。此外,传统药食两用植物石斛多糖(主要单糖构成为Glc、Man和Gal,其中Glc占比66.2%)也能够纠正来曲唑诱导的PCOS大鼠紊乱的动情周期^[23]。

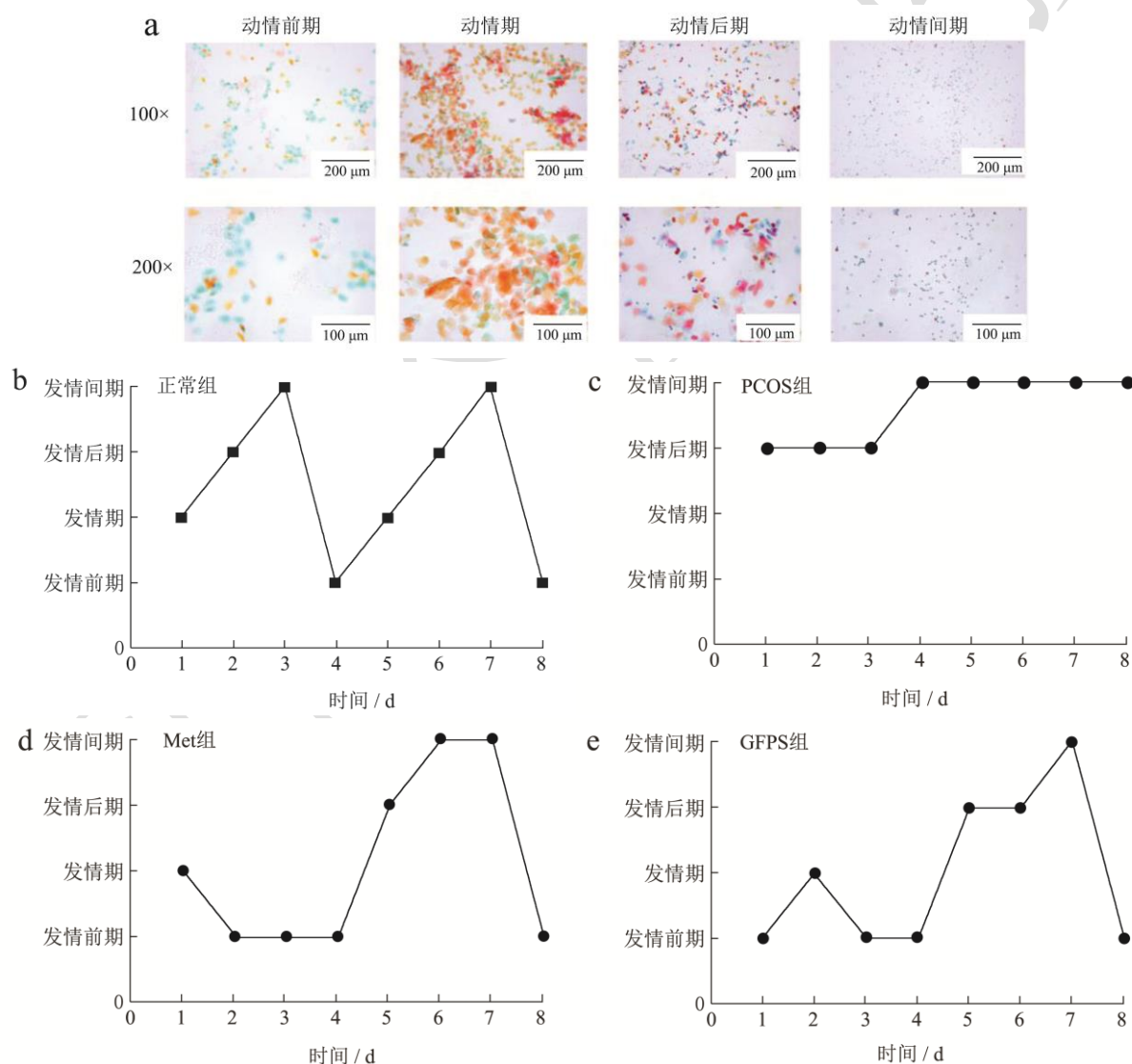


图1 GFPS对PCOS大鼠阴道上皮细胞(a)及动情周期(b~e)的影响

Fig.1 Effect of GFPS on vaginal epithelial cells (a) and estrous cycle (b~e) in PCOS rats

注: 绿色为扁平上皮细胞; 橙红色为角化上皮细胞; 蓝色为白细胞。

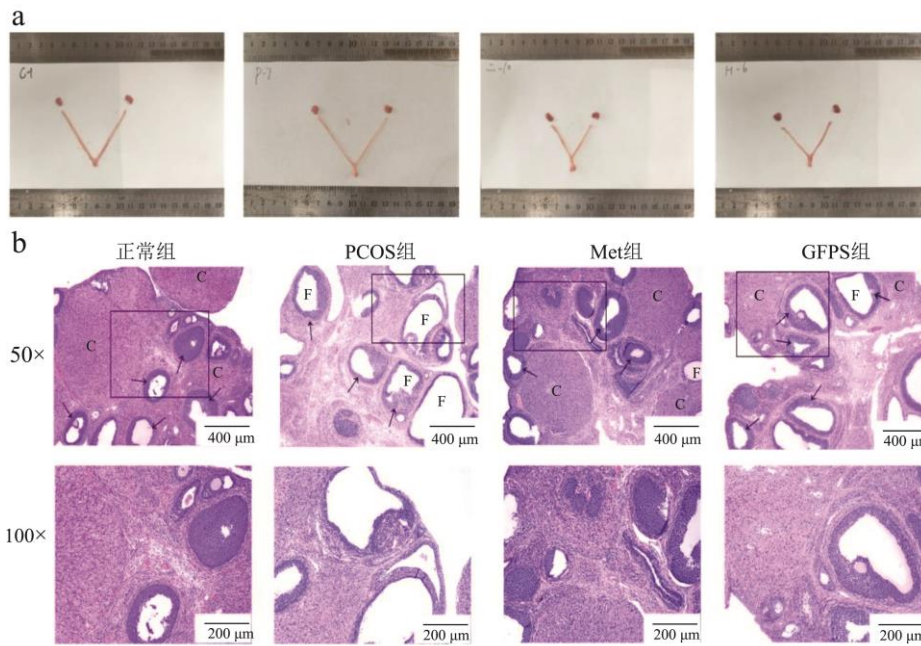


图 2 GFPS 对 PCOS 大鼠子宫和卵巢形态 (a) 及卵巢病理学变化 (b) 的影响

Fig.2 Effect of GFPS on uterine and ovarian morphology (a) and ovarian pathological changes (b) in PCOS rats

注: C 表示黄体, F 表示囊泡, “→”表示颗粒细胞层。

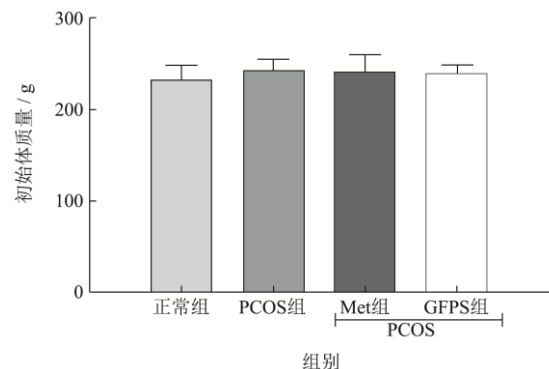
2.2 GFPS 对 PCOS 大鼠子宫、卵巢形态和卵巢病理学变化的影响

PCOS 患者因体内存在过高的雄激素水平, 造成卵巢形态异常^[24], 同时引发子宫炎症和血管分布异常等病理现象^[25]。与正常组相比, PCOS 大鼠卵巢组织和子宫普遍苍白、供血减少, 卵巢包膜增厚且体积增大这一结果与我们前期研究一致^[13,14]。GFPS 和 Met 分别干预后上述症状明显改善(图 2a)。HE 染色结果显示, 正常组大鼠卵巢中可见多个黄体和不同阶段发育的卵泡, 少见囊性扩张的卵泡(图 2b)。与正常组相比, PCOS 大鼠多个卵泡呈囊性扩张, 黄体明显减少、颗粒细胞层变薄, 提示无排卵, 这与 Rajan 等^[26]所报道的对卵巢的研究结果一致。经 GFPS 和 Met 分别干预后, PCOS 大鼠卵巢组织内囊泡减少, 黄体增多、颗粒细胞层增厚, 部分可恢复至正常卵泡形态。研究显示铁皮石斛多糖也可减少 PCOS 大鼠囊性卵泡、增加黄体数量, 增厚卵巢颗粒层^[27], 而石斛多糖主要由 Glc 和 Man 构成^[28]。这一研究也佐证了富含 Glc 的 GFPS 能显著改善 PCOS 大鼠的卵巢病理症状。

2.3 GFPS 对 PCOS 大鼠体重、内脏脂肪及脂质水平的影响

PCOS 患者多伴有肥胖, 这不仅会加重 IR 和代偿

性高胰岛素血症, 增加脂肪的生成, 同时肥胖使卵泡膜细胞对黄体生成素的刺激敏感, 造成高雄激素血症^[29,30], 这些都会阻碍 PCOS 患者卵泡发育^[31]。内脏脂肪的堆积与代谢综合征、2 型糖尿病和心血管疾病的发生相关, 它是反映疾病严重程度的指标^[32,33]。本研究对比各组大鼠体质量和内脏脂肪相对质量发现(图 3), 各组大鼠初始体重无显著性差异, 至 21 d 实验结束时, PCOS 大鼠体重和内脏脂肪相对质量较正常组显著升高了 21.79% 和 62.22% ($P < 0.01$)。Met 组大鼠体重和脂肪相对质量较 PCOS 组分别下降了 12.20% 和 23.67% ($P < 0.01$), GFPS 组大鼠的体重和脂肪相对质量较 PCOS 组分别下降了 9.20% 和 24.08% ($P < 0.01$)。研究发现, 主要构成为 Glc 的乌龙茶多糖^[34], 能显著降低高脂饮食大鼠体重并减少其内脏脂肪堆积^[35]。铁皮石斛多糖也能降低高脂饮食所造成的小鼠内脏脂肪组织中的炎症水平^[36], 这有力的佐证了 GFPS 对 PCOS 大鼠体重和内脏脂肪具有改善作用。



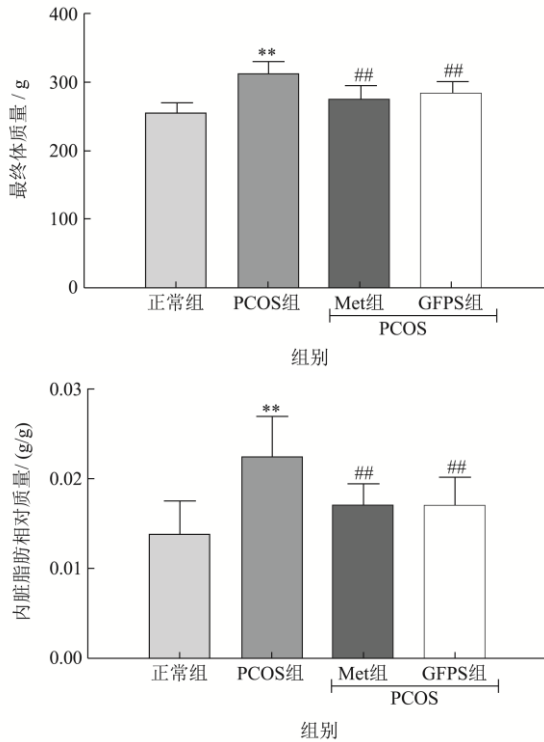


图3 GFPS对PCOS大鼠体重及内脏脂肪相对质量的影响
Fig.3 Effect of GFPS on body weight and relative mass of visceral fat in PCOS rats

注:与正常组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$;与PCOS组比较, # $P<0.05$, ### $P<0.01$; Met组与GFPS组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$,下同。

进一步检测大鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C的水平发现(图4),PCOS大鼠血清TC、TG、LDL-C水平较正常组分别升高了2.48倍、1.87倍和4.97倍($P<0.01$),HDL-C下降了50.00%($P<0.01$)。Met组大鼠血清中TG、LDL-C降低了33.94%、36.81%($P<0.01$),HDL-C升高了2.04倍($P<0.01$);GFPS组大鼠血清中TC、TG、LDL-C分别降低了82.46%、66.94%、83.71%($P<0.01$)。这与Pan等^[37]所研究GFPS降低高糖高脂饲料饮食大鼠血清中TC、TG、LDL-C水平降低的研究结果一致。但值得注意的是,我们的研究结果显示GFPS对PCOS大鼠血清HDL-C水平无显著改善作用($P>0.05$),且Guo等^[38]研究结果也提示GFPS对糖尿病小鼠血清中HDL-C水平无显著性影响。这表明GFPS通过降低PCOS大鼠血清中TC、TG和LDL-C的水平从而发挥调节脂质代谢紊乱的作用。

2.4 GFPS对PCOS大鼠性激素水平的影响

性激素紊乱作为PCOS患者的典型症状其具体的机制可能与HPOA轴失衡和芳香化酶功能失调有关。正常生理情况下,促性腺激素释放激素刺激垂体前叶分泌LH和FSH。下丘脑的促性腺激素释放激素脉冲频率增加会刺激LH的合成,导致LH/FSH比率升高^[39]。

LH进一步刺激卵泡膜细胞合成雄烯二酮,FSH通过芳香化酶活性影响雄烯二酮向雌二醇的转化,而来曲唑抑制了芳香化酶活性,导致卵巢中雄激素升高,雌激素下降^[40]。卵巢激素水平的紊乱会导致排卵障碍,进一步引发月经生理周期的紊乱并造成不孕症^[41]。

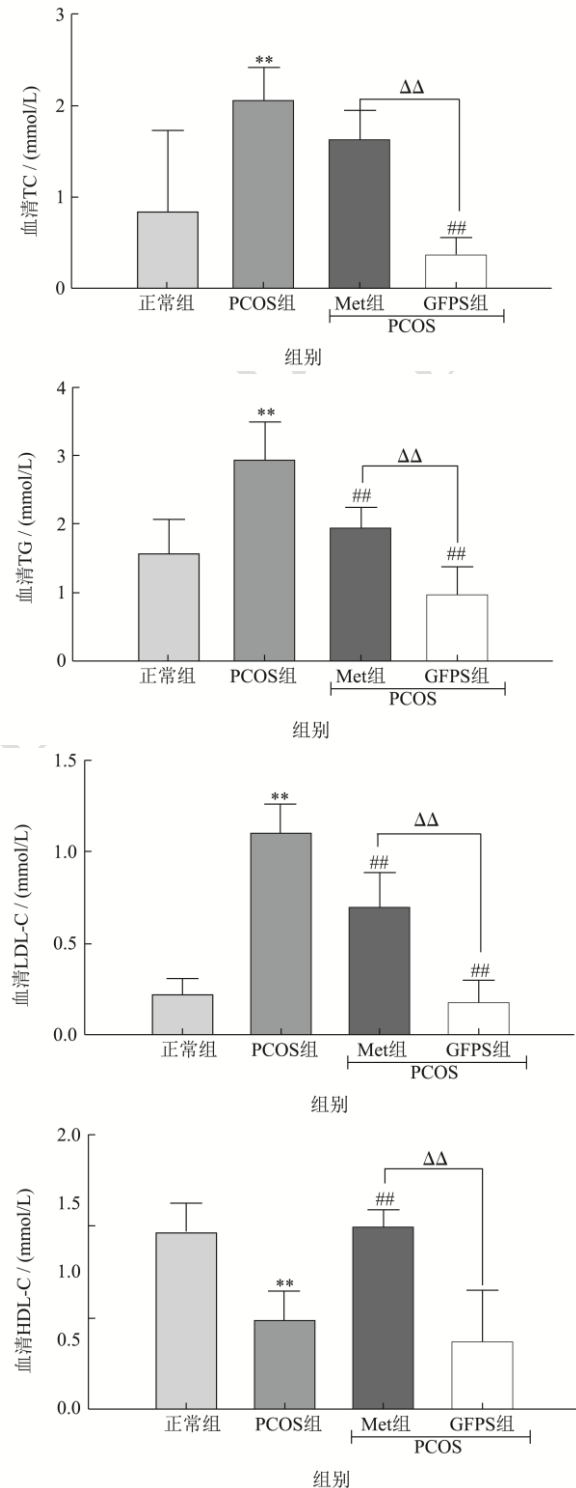


图4 GFPS对PCOS大鼠血清中(TC, TG, LDL-C和HDL-C)水平的影响

Fig.4 Effect of GFPS on serum levels of (TC, TG, LDL-C and HDL-C) in PCOS rats

如图 5 示, PCOS 大鼠血清中激素 T、LH 和 LH/FSH 比值较正常组升高了 20.59%、23.56% 和 69.39% ($P < 0.01$), E2 和 FSH 水平则分别下降了 26.25%、37.18% ($P < 0.01$), 这些激素水平的变化与 Ndeingang 等^[42]采用相同造模方法的 PCOS 大鼠 T、LH 水平升高、E2 降低的研究结果一致。相比 PCOS 模型组, Met 组大鼠的 T、LH 水平下降了 17.69% 和 22.87%, E2 升高了 31.30% ($P < 0.01$); GFPS 组大鼠血清 T、LH 及 LH/FSH 比值分别下降 20.48%、14.57% 和 23.63% ($P < 0.01$), E2 和 FSH 水平则分别升高 50.23% 和 15.00% ($P < 0.05$)。此外, 药食同源类石斛多糖、黄芪多糖也降低了 PCOS 大鼠血清 T 水平、升高了 PCOS 大鼠血清 E2 水平^[24,43], 而多项关于黄芪多糖的结构研究表明其主要由 Glc 构成^[44], 这为 GFPS 能够改善 PCOS 大鼠异常的性激素水平提供了有力支撑。

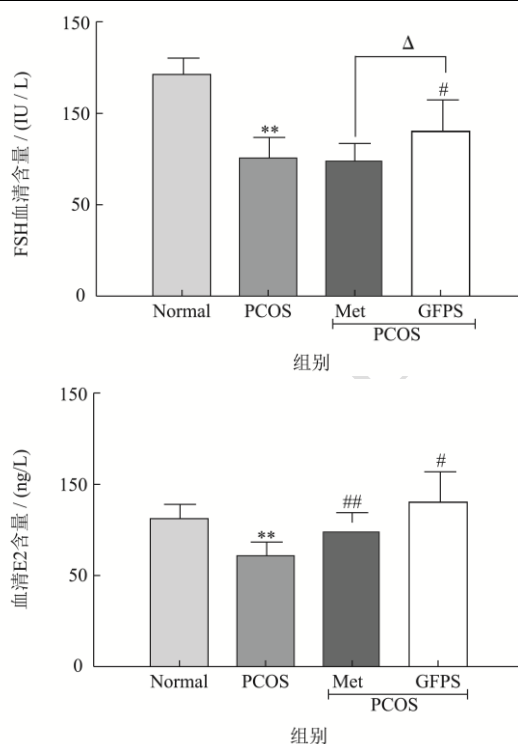
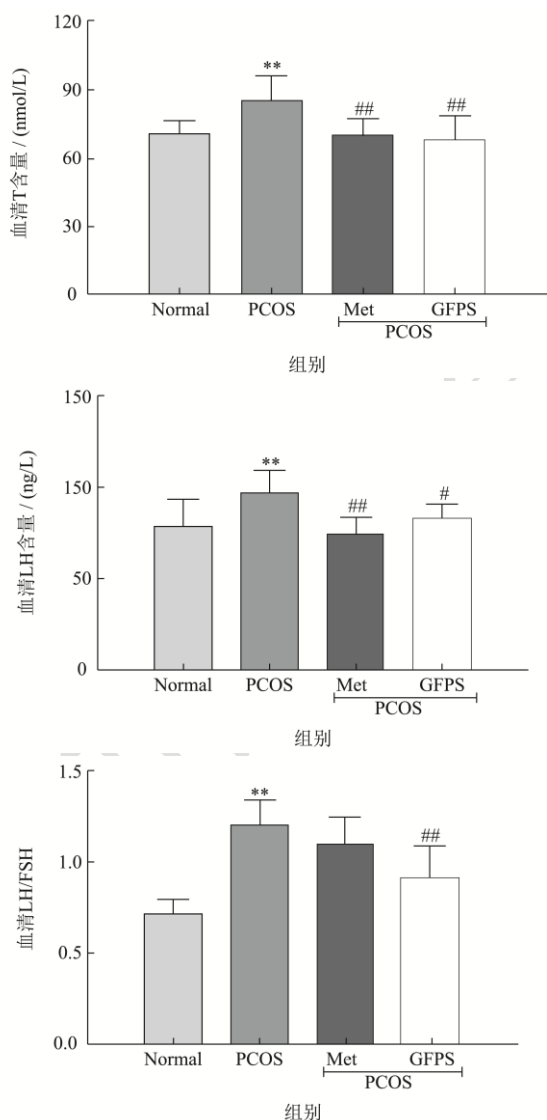


图 5 GFPS 对 PCOS 大鼠血清激素 (T、LH、FSH 和 E2) 及 LH/FSH 比值的影响

Fig.5 Effect of GFPS on serum hormones (T, LH, FSH and E2) and LH/FSH ratio in PCOS rats

2.5 GFPS 对 PCOS 大鼠血清中 MDA 及 SOD

水平的影 响

氧化应激在 PCOS 发病机制中发挥着关键作用^[45]。MDA、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶等是评估氧化应激损伤重要的生物标志物^[46], PCOS 患者中的高雄激素血症、肥胖、胰岛素抵抗会引起卵巢中氧化应激水平的异常^[47], 主要表现为抗氧化酶水平下降, MDA 水平升高^[48]。本研究中, PCOS 组大鼠血清中 MDA 水平较正常组升高了 2.57 倍, 血清中 SOD 水平较正常组降低了 5.85% ($P < 0.05$, 图 6)。这与 Haslan 等^[49]所报告的来曲唑诱导 PCOS 大鼠血清中 MDA 及 SOD 水平变化趋势较为一致。而 GFPS 和 Met 干预后, MDA 水平较 PCOS 组分别降低了 43.52% 和 38.87% ($P < 0.01$), SOD 水平分别升高了 9.90% 和 6.10% ($P < 0.01$)。Kou 等^[50]发现 GFPS 能降低糖尿病大鼠血清中 MDA, 升高 SOD 水平, 从而改善氧化应激水平。上述结果支持了 GFPS 能够改善 PCOS 大鼠血清中氧化应激水平这一结论。

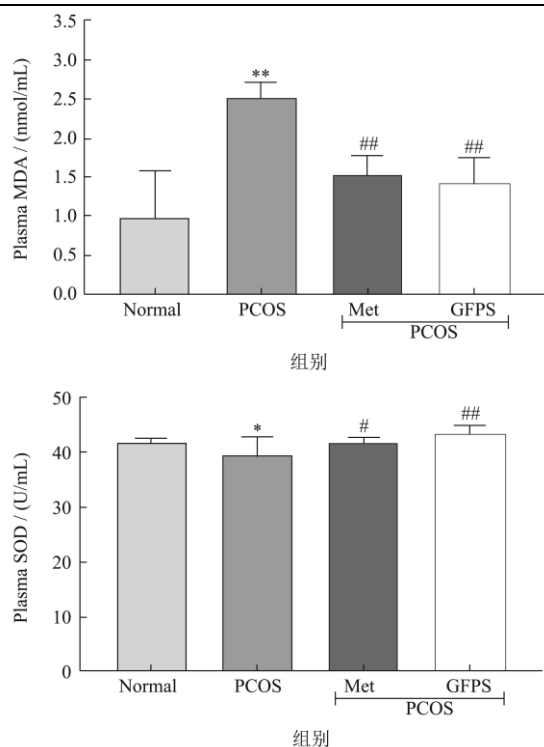


图6 GFPS对PCOS大鼠血清中MDA与SOD水平的影响

Fig.6 Effect of GFPS on the serum levels of MDA and SOD in PCOS rats

2.6 GFPS对PCOS大鼠卵巢组织中抗氧化酶(Sod1、Sod2、Cat和Gpx3)表达的影响

研究显示PCOS患者血清中SOD、GPx、CAT等抗氧化酶水平是显著下降的^[51]。多糖具有提高抗氧化酶活性、消除自由基、抑制脂质过氧化的作用，可以减少组织或器官中氧化应激损伤^[52,53]。为了进一步探索GFPS对PCOS大鼠氧化应激的影响，我们检测了PCOS大鼠卵巢组织中Sod1、Sod2、Cat和Gpx3抗氧化基因酶的mRNA表达。如图7所示，PCOS组织中Sod1和Cat的mRNA表达水平较正常组降低了26.91%、35.06% ($P < 0.05$)，Sod2、Gpx3的mRNA表达水平较正常组降低了72.09%、72.72% ($P < 0.01$)。Met干预后的PCOS大鼠卵巢组织中Sod1、Cat、Gpx3的mRNA表达水平较PCOS组显著提高3.90、1.93、3.19倍 ($P < 0.01$)，Sod2的mRNA表达水平提高了63.90% ($P < 0.05$)。GFPS组大鼠卵巢组织中Sod1、Sod2、Gpx3的mRNA表达水平分别较PCOS组提高了3.86、3.16和2.75倍 ($P < 0.01$)，Cat的mRNA表达水平提高了1.57倍 ($P < 0.05$)。研究提示经酶解处理提取的灰树花多糖具有 α 糖苷键构型，主要单糖由Man、Glc和Gal构成，摩尔比为1.00:16.36:5.25，其

具有的三螺旋立体构型，会使抗氧化活性更高^[54]，这也提示了GFPS对PCOS大鼠机体的氧化应激状态具有改善作用。

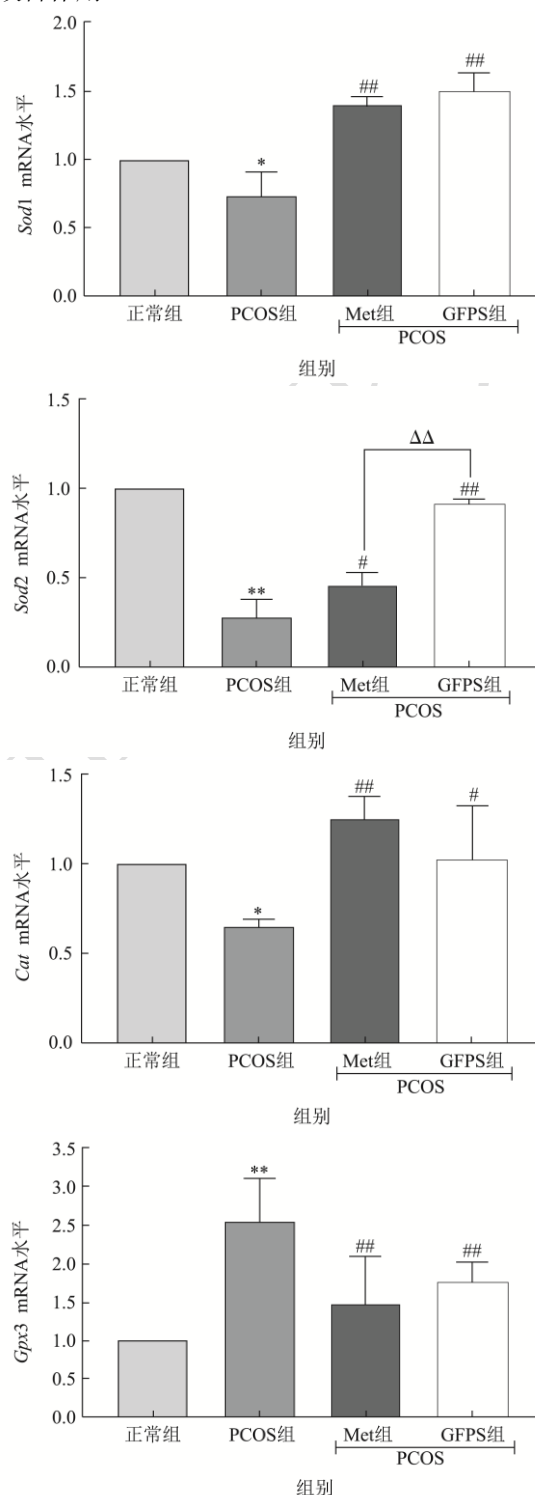


图7 GFPS对PCOS大鼠卵巢中抗氧化基因酶(Sod1、Sod2、Cat和Gpx3)mRNA水平的影响

Fig.7 Effect of GFPS on the mRNA levels of antioxidant gene enzymes (Sod1, Sod2, Cat and Gpx3) in the ovaries of PCOS rats

3 结论

本研究结果表明, GFPS 能够通过改善 PCOS 大鼠血清中性激素水平, 改善 PCOS 大鼠动情周期的紊乱并促进 PCOS 大鼠卵泡的成熟和发育。同时, GFPS 处理还能降低 PCOS 大鼠体重的增长, 减少其内脏脂肪相对质量, 改善 PCOS 大鼠血清脂质代谢水平。此外, GFPS 也通过上调 PCOS 大鼠卵巢组织中抗氧化基因酶 (*Sod1*、*Sod2*、*Cat* 和 *Gpx3*) 的基因表达水平来改善 PCOS 大鼠氧化应激状态 (即升高了血清中的 SOD 水平, 并降低了血清 MDA 水平)。上述结果充分证明了 GFPS 对 PCOS 大鼠的症状具有较好的改善效果, 具体的作用机制可能与其参与调控 PCOS 大鼠的脂质代谢以及参与对抗氧化应激所导致的机体损伤有一定的关系。本研究同时也为 GFPS 用于临床辅助治疗 PCOS 提供了较为有力的研究证据。

参考文献

- [1] Li D, Bai P, Wu J Y, et al. Effect of acupuncture on ovary morphology and function in DHEA-induced polycystic ovary syndrome model rats [J]. Chin J Integr Med, 2021, 27(3): 220-224.
- [2] Vatopoulou A, Tziomalos K. Management of obesity in adolescents with polycystic ovary syndrome [J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21(2): 207-211.
- [3] Anagnostis P, Tarlatzis B C, Kauffman R P. Polycystic ovarian syndrome (PCOS): Long-term metabolic consequences [J]. Metabolism, 2018, 86: 33-43.
- [4] Escobar-Morreale H F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(5): 270-284.
- [5] Shukla P, Mukherjee S. Mitochondrial dysfunction: an emerging link in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome [J]. Mitochondrion, 2020, 52: 24-39.
- [6] Peng F, Hu Y, Peng S, et al. Apigenin exerts protective effect and restores ovarian function in dehydroepiandrosterone induced polycystic ovary syndrome rats: a biochemical and histological analysis [J]. Ann Med, 2022, 54(1): 578-587.
- [7] Motta A B. Mechanisms involved in metformin action in the treatment of polycystic ovary syndrome [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(26): 3074-3077.
- [8] Kausar F, Rather M A, Bashir S M, et al. Ameliorative effects of *Cuscuta reflexa* and *Peucedanum grande* on letrozole induced polycystic ovary syndrome in wistar rats [J]. Redox Rep, 2021, 26(1): 94-104.
- [9] 张冰茹, 郭雨季, 刘维明, 等. 灰树花多糖的制备及药理活性的研究进展 [J]. 食药用菌, 2019, 27(2): 99-105.
- [10] Wu J Y, Siu K C, Geng P. Bioactive ingredients and medicinal values of *Grifola frondosa* (Maitake) [J]. Foods, 2021, 10(1): 95.
- [11] Chen Y, Liu Y, Sarker M M R, et al. Structural characterization and antidiabetic potential of a novel heteropolysaccharide from *Grifola frondosa* via IRS1/PI3K-JNK signaling pathways [J]. Carbohydr Polym, 2018, 198: 452-461.
- [12] Wu W T, Hsu T H, Chen W L, et al. Polysaccharides of *Grifola frondosa* ameliorate oxidative stress and hypercholesterolaemia in hamsters fed a high-fat, high-cholesterol diet [J]. J Pharm Pharmacol, 2022, 74(9): 1296-1306.
- [13] Zhou Y, Lan H, Dong Z, et al. Dietary proanthocyanidins alleviated ovarian fibrosis in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats [J]. J Food Biochem, 2021, 45(5): e13723.
- [14] Zhou Y, Lan H, Dong Z, et al. Rhamnocitrin attenuates ovarian fibrosis in rats with letrozole-induced experimental polycystic ovary syndrome [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 5558599.
- [15] Li Y, Sheng Y, Lu X, et al. Isolation and purification of acidic polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and evaluation of their lipid-lowering mechanism [J]. Int J BiolMacromol, 2020, 157: 276-287.
- [16] 彭淼, 毛曦, 彭勃, 等. 刺葡萄酒对高脂饮食大鼠的降血脂作用 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 8-15.
- [17] 安婧, 马瑞兰, 蒲育栋, 等. 芹菜对雌性小鼠动情周期的影响 [J]. 中国实用医药, 2008, 27: 62-64.
- [18] Kamal D A M, Ibrahim S F, Ugusman A, et al. Effects of kelulut honey on oestrus cycle regulation and histomorphological changes in letrozole-induced polycystic ovary syndrome rats: a preliminary study [J]. Life (Basel), 2022, 12(6): 890.
- [19] 胡颜霞, 张展, 贾莉婷. 来曲唑诱导多囊卵巢综合征大鼠模型的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(7): 957-959.
- [20] Wang C, Ding C, Hua Z, et al. Cangfudaotan decoction alleviates insulin resistance and improves follicular development in rats with polycystic ovary syndrome via IGF-1-PI3K/Akt-Bax/Bcl-2 pathway [J]. Mediators Inflamm, 2020, 24: 8865647.
- [21] Nath P P, Sarkar K, Mondal M, et al. Metanil yellow impairs the estrous cycle physiology and ovarian folliculogenesis in

- female rats [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(12): 2057-2067.
- [22] Li Q, Zhang F, Chen G, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. *Int J BiolMacromol*, 2018, 111: 1293-1303.
- [23] Zhang S, Tu H, Zhu J, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. polysaccharides improve follicular development in PCOS rats [J]. *Int J BiolMacromol*, 2020, 149: 826-834.
- [24] Candelaria N R, Padmanabhan A, Stossi F, et al. Vcam1 is induced in ovarian theca and stromal cells in a mouse model of androgen excess [J]. *Endocrinology*, 2019, 160(6): 1377-1393.
- [25] Hong G, Wu H, Ma S T, et al. Catechins from Oolong tea improve uterine defects by inhibiting STAT3 signaling in polycystic ovary syndrome mice [J]. *Chin Med*, 2020, 15(1): 125.
- [26] Rajan R K, M S S, Balaji B. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 242-251.
- [27] Feng X, Wang D, Hu L, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide ameliorates polycystic ovary syndrome via regulating butyrate dependent gut-brain-ovary axis mechanism [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 962775.
- [28] 刘伟帆,郭烁璇,林映好,等.石斛多糖的构效关系研究进展[J].现代食品科技,2021,37(1):308-338.
- [29] Nawrocka-Rutkowska J, Szydłowska I, Jakubowska K, et al. Assessment of the parameters of oxidative stress depending on the metabolic and anthropometric status indicators in women with pcos [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(2): 225.
- [30] Glueck C J, Goldenberg N. Characteristics of obesity in polycystic ovary syndrome: etiology, treatment, and genetics [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 108-120.
- [31] Zeng X, Xie Y J, Liu Y T, et al. Polycystic ovarian syndrome: correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502: 214-221.
- [32] Kałużna M, Człapka-Matysik M, Bykowska-Derda A, et al. Indirect predictors of visceral adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome: a comparison of methods [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2494.
- [33] Zheng S H, Li X L. Visceral adiposity index as a predictor of clinical severity and therapeutic outcome of PCOS [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(3): 177-183.
- [34] 杨江帆,郑德勇,叶乃兴,等.乌龙茶多糖的单糖组成及结构的研究[J].茶叶科学技术,2007,4:1-3.
- [35] Wu T, Xu J, Chen Y, et al. Oolong tea polysaccharide and polyphenols prevent obesity development in Sprague-Dawley rats [J]. *Food Nutr Res*, 2018, 62: 1599.
- [36] Qu J, Tan S, Xie X, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide attenuates insulin resistance and abnormal lipid metabolism in obese mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 659626.
- [37] Pan Y, Wan X, Zeng F, et al. Regulatory effect of *Grifola frondosa* extract rich in polysaccharides and organic acids on glycolipid metabolism and gut microbiota in rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 1030-1039.
- [38] Guo W L, Deng J C, Pan Y Y, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Grifola frondosa* polysaccharides and their relationships with the modulation of intestinal microflora in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *Int J BiolMacromol*, 2020, 153: 1231-1240.
- [39] Dulka E A, Moenter S M. Prepubertal development of gonadotropin-releasing hormone neuron activity is altered by sex, age, and prenatal androgen exposure [J]. *Endocrinology*, 2017, 158(11): 3943-3953.
- [40] Silva M S B, Campbell R E. Polycystic ovary syndrome and the neuroendocrine consequences of androgen excess [J]. *Compr Physiol*, 2022, 12(2): 3347-3369.
- [41] Abraham Gnanadass S, Divakar Prabhu Y, Valsala Gopalakrishnan A. Association of metabolic and inflammatory markers with polycystic ovarian syndrome (PCOS): An update [J]. *Arch GynecolObstet*, 2021, 303(3): 631-643.
- [42] Ndeingang E C, Defo Deeh P B, Watcho P, et al. *Phyllanthus muellerianus* (Euphorbiaceae) restores ovarian functions in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 2965821.
- [43] 张雅娟,桑敏,张洪秀,等.黄芪多糖对体外培养多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞雄激素分泌异常的影响[J].中国医师杂志,2011,12:1607-1610.
- [44] 张明宇,马悦,王知斌.黄芪多糖的分离纯化及结构鉴定研究进展[J].化学工程师,2021,35(12):47-50.
- [45] Wang Y, Li N, Zeng Z, et al. Humanin regulates oxidative stress in the ovaries of polycystic ovary syndrome patients via the Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(2): gaaa081.
- [46] Mohammadi M. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: a brief review [J]. *Int J Prev Med*, 2019, 10(10): 86.

- [47] Dubey P, Reddy S, Boyd S, et al. Effect of nutritional supplementation on oxidative stress and hormonal and lipid profiles in pcos-affected females [J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 2938.
- [48] Nawrocka-Rutkowska J, Szydłowska I, Jakubowska K, et al. Assessment of the parameters of oxidative stress depending on the metabolic and anthropometric status indicators in women with pcos [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(2): 225.
- [49] Haslan M A, Samsulrizal N, Hashim N, et al. Ficus deltoidea ameliorates biochemical, hormonal, and histomorphometric changes in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome rats [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 1-13.
- [50] Kou L, Du M, Liu P, et al. Anti-diabetic and anti-nephritic activities of *Grifola frondosa* mycelium polysaccharides in diet-streptozotocin-induced diabetic rats via modulation on oxidative stress [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 187(1): 310-322.
- [51] Uğan K, Demir H, Turan K, et al. Role of oxidative stress in obese and nonobese pcos patients [J]. *Int J ClinPract*, 2022, 2022: 4579831.
- [52] Mu S, Yang W, Huang G. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, 97(3): 628-632.
- [53] Liu Y, Sun Y, Huang G. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 780-786.
- [54] Ting Z, Yina F, Guanghua M, et al. Purification, characterization and antioxidant activities of enzymolysis polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. *Iran J Pharm Res*, 2017, 16(1): 347.