

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.01.011

人参皂苷 Rh₂ 在卵巢颗粒细胞炎症反应中的作用及作用机制网络药理学与分子生物学研究*

王文芳,海鑫[△]

(哈尔滨医科大学附属第一医院,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 探讨西洋参中人参皂苷 Rh₂(简称 Rh₂) 在脂多糖(LPS)致人卵巢颗粒细胞瘤细胞系 KGN 细胞炎症反应中的作用及作用机制。方法 通过网络药理学方法筛选西洋参治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的潜在活性成分及靶点。以 200 ng/mL LPS 作用 KGN 细胞 6 h 诱导炎症反应,采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定 KGN 细胞中炎症因子白细胞介素 1β(IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的水平,采用 2',7'-二氯双荧光素双乙酸酯(DCFH-DA)染色法测定活性氧(ROS)的水平;40 μmol/L Rh₂ 作用 KGN 细胞 24 h 后,采用免疫印迹(Western blot)法测定哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在 LPS 诱导的 KGN 细胞中的表达水平。结果 网络药理学分析结果显示,共筛选出西洋参的主要化学成分 11 个、潜在靶点 144 个、治疗 PCOS 的靶点 13 个,其中 Rh₂ 与下游靶基因 mTOR 是西洋参抗 PCOS 的关键活性成分及潜在作用靶点。分子生物学研究结果显示,Rh₂ 能抑制 LPS 导致的 KGN 细胞中 ROS 和 mTOR 表达水平的升高,下调 IL-1β 和 TNF-α 的表达;低表达(50 nmol/L)mTOR 能促进 Rh₂ 缓解 LPS 导致的 KGN 细胞炎症反应,过表达(3 μg) mTOR 能逆转此现象。结论 Rh₂ 通过调控 mTOR 的表达水平参与 LPS 导致的卵巢颗粒细胞炎症反应。

关键词:多囊卵巢综合征;卵巢颗粒细胞;人参皂苷 Rh₂;西洋参;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;炎症反应;网络药理学;分子生物学

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2023)01-0046-06

Role and Mechanism of Ginsenoside Rh₂ in the Inflammatory Response of Ovarian Granulosa Cells Based on Network Pharmacology and Molecular Biology

WANG Wenfang, HAI Xin

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China 150086)

Abstract: Objective To investigate the role and mechanism of ginsenoside Rh₂ (hereinafter referred to as Rh₂) in the inflammatory response of human ovarian granulosa tumor cell line KGN induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The potential active components and targets of Panacis Quinquefolii Radix in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) were screened based on the network pharmacology. The KGN cells were treated with 200 ng/mL LPS for 6 h to induce the inflammatory response. The levels of inflammatory factors including interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the KGN cells were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The reactive oxygen species (ROS) level in the KGN cells was detected by the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining method. After the KGN cells were treated with 40 μmol/L Rh₂ for 24 h, the expression level of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the KGN cells induced by LPS was detected by the Western blot. **Results** The results of network pharmacology showed that 11 main chemical components, 144 potential targets and 13 targets in the treatment of PCOS in Panacis Quinquefolii Radix were screened out. Among them, Rh₂ and the downstream target gene mTOR were the key active component and potential target of Panacis Quinquefolii Radix in the treatment of PCOS. The results of molecular biology showed that Rh₂ could inhibit the high expression of ROS and mTOR and downregulate the expression of IL-1β and TNF-α in the KGN cells induced by LPS. Low expression of mTOR (50 nmol/L) could promote Rh₂ to alleviate the inflammatory response of KGN cells induced by LPS, while overexpression of mTOR (3 μg) could reverse this phenomenon. **Conclusion** Rh₂ participates in the inflammatory response of ovarian granulosa cells induced by LPS by regulating the expression of mTOR.

Key words: polycystic ovary syndrome; ovarian granulosa cell; ginsenoside Rh₂; Panacis Quinquefolii Radix; mammalian target of rapamycin; inflammatory response; network pharmacology; molecular biology

多囊卵巢综合征(PCOS)是一种以多囊卵巢、高雄激素血症和无排卵为特征的复杂生殖内分泌疾病,是造成女性不孕的重要原因之一,育龄妇女发病率为6%~10%^[1]。病理生理学因素包括下丘脑-垂体-卵巢轴紊乱、内分泌及遗传因素等^[2-4]。越来越多的证据表明,慢性轻度炎症在PCOS的发展中起着至关重要的

*基金项目:黑龙江省自然科学基金优秀青年项目[YQ2019H016]。

第一作者:王文芳,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物生物学,(电子信箱)wwfang1982@163.com。

[△]通信作者:海鑫,女,博士研究生,主任药师,研究方向为药物分析、医院药学,(电子信箱)hai_xin@163.com。

作用。尤其是促炎细胞因子表达失调与PCOS相关病因学存在密切联系^[5],主要表现为血清中C反应蛋白(CRP)、白细胞介素6(IL6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和C-C基序趋化因子配体2(CCL2)等的高表达^[6-8]。研究表明,抑制卵巢局部及全身的炎性反应可减轻卵巢炎性反应,从而抑制PCOS模型小鼠的卵巢功能障碍^[9-11]。故探讨炎性反应在PCOS中潜在的作用机制对了解PCOS的发病机制具有重要意义。研究表明,西洋参具有清除自由基及抗氧化作用,在抗肿瘤、降糖、降血压、止吐、保护神经等方面具有良好的功效^[12];能调节前列腺素生物合成,降低前列腺素 E_2 (PGE $_2$)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)等的高激素水平,使雌二醇(E_2)分泌接近正常水平,防止卵巢衰老^[13];可通过调节血清激素水平和改变卵巢组织中卵巢早衰(POF)相关基因的表达水平,有效预防POF,缓解相关症状^[14]。人参皂苷Rh $_2$ (简称Rh $_2$)是西洋参的重要活性成分,具有提高免疫力、增强记忆力、抗抑郁和保护心血管等药理作用^[15]。同时,Rh $_2$ 在抗氧化及抗肿瘤活性中起着重要作用^[16]。如Rh $_2$ 通过调节信号转导及转录激活因子3(STAT3)/miR-214信号通路减轻溃疡性结肠炎^[17];通过激活调节哮喘模型小鼠核因子- κ B(NF- κ B),减轻过敏性气道炎症^[18]。但Rh $_2$ 在PCOS中尤其是在内毒素诱导的颗粒细胞验证中的作用及潜在作用机制尚未明确。本研究中基于网络药理学及分子生物学方法探讨了西洋参中主要活性成分Rh $_2$ 在致卵巢颗粒细胞炎性反应中的作用及作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:H-YGD型倒置荧光显微镜(中国凤凰光学有限公司);硝酸纤维素膜(美国PALL公司)。

试剂:人参皂苷Rh $_2$ (分析标准品,阿拉丁试剂<上海>有限公司,40 μ mol/L);DMEM高糖培养基、胎牛血清、5%脱脂牛奶(美国Gibco公司);脂多糖(LPS,质量浓度为1 μ g/mL),2',7'-二氯双氢荧光素双乙酸酯(DCFH-DA)染色液,均购自美国西格玛公司;1%青-链霉素,辣根过氧化物酶(HRP),与HRP结合的山羊抗兔抗体(编号为GB23303,1:3 000),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶,均购自上海碧云天生物技术有限公司;哺乳动物雷帕素靶蛋白(mTOR,广州锐博生物技术有限公司);抗 β -actin(美国Abclonal公司,编号为AC004,1:25 000);抗mTOR(英国Abcam公司,编号为ab109268,1:1 000);白细胞介素1 β (IL-1 β)试剂盒、TNF- α 试剂盒(南京建成科技有限公司)。

细胞:KGN细胞(人卵巢颗粒细胞瘤细胞系,北纳生物技术有限公司)。

1.2 方法

西洋参活性成分及潜在靶点筛选:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)搜索西洋参已知化学成分,根据口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 且类药性(DL) ≥ 0.18 进行筛选,并在TCMSP中预测、提取西洋参有效成分的作用蛋白靶点,将筛选出的蛋白靶点名导入蛋白质数据库(UniProt, <https://www.uniprot.org/>),物种设置为人类,将作用人类蛋白名称转换成标准基因名。

PCOS疾病相关靶点筛选:通过人类基因信息数据库(Genecards, <https://www.genecards.org>)及孟德尔遗传数据库(DMIM, <https://www.omim.org/>)筛选与PCOS相关的疾病基因靶点,剔除重复靶点,设置关联分数 ≥ 10 ,结果导出为Excel文件。

治疗PCOS活性成分筛选:将西洋参活性成分与PCOS疾病靶点导入,取交集数据库(Venn, <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)进行对比匹配处理,共同靶点即为西洋参治疗PCOS的关键靶点,反向筛选出治疗PCOS的潜在活性成分。

PCOS-西洋参-活性成分-靶点网络构建:将西洋参活性成分、PCOS疾病靶点导入Cytoscape 3.9.1软件,构建疾病-药物-活性成分-靶点基因可视化网络,网络中节点(Node)代表疾病、药物、靶点、活性成分,边用来连接疾病与靶点、靶点与活性成分、活性成分与药物。

蛋白互作(PPI)网络构建:将西洋参治疗PCOS的关键靶点输入蛋白质-蛋白质相互作用数据库(String, <https://string-db.org/>),物种设置为人类,可信度设置为中等可信,隐藏未连接的节点,其他参数保持数据库系统推荐设置,进行PPI分析,获取PPI网络。

细胞培养及转染:取KGN细胞,进行短串联重复序列(STR)分析以确保细胞真实性,培养于添加10%胎牛血清及1%青链霉素的DMEM高糖培养基,置温度为37 $^{\circ}$ C的CO $_2$ 孵箱中。为了保持细胞独特的功能特性,仅使用第4~9代的KGN细胞作为实验对象。参考文献[19-20],取LPS(质量浓度为1 μ g/mL)稀释为质量浓度为200 ng/mL,作用KGN细胞6 h以激活炎性反应。将不同表达的mTOR的质粒分别转染到KGN细胞中作用72 h,进行后续实验。

免疫印迹(Western blot)法^[21]分析:使用12% SDS-PAGE凝胶分离蛋白质样品,转移到硝酸纤维素膜上,用5%脱脂牛奶在室温下封膜2 h,并在4 $^{\circ}$ C温度下用抗 β -actin和抗mTOR过夜孵育过夜。硝酸纤维素膜在磷酸盐吐温缓冲液(PBST)中洗涤3次,与HRP结合的山羊抗兔抗体孵育。使用Image J软件对图像进行定量分

析,计算显影正常蛋白与 β -actin的灰度值比率,以确定某些蛋白质的改变。

酶联免疫吸附(ELISA)试验:KGN细胞以 4×10^4 的细胞密度接种于24孔培养板中,每孔1 mL DMEM/F12,不含红色苯酚和炭化处理的10%胎牛血清。经LPS或Rh₂作用后,按IL-1 β 和TNF- α 试剂盒中所述方法进行检测。

DCFH-DA染色:KGN细胞用DCFH-DA染色,用Rh₂与LPS单独或共同处理细胞,检测正常组(正常KGN细胞)、LPS组(诱导炎症反应后的KGN细胞)、Rh₂组(诱导炎症反应用药Rh₂ 24 h的KGN细胞)细胞中的ROS含量的变化,以分析Rh₂及LPS对KGN细胞中活性氧(ROS)的影响。按文献[22-23]的操作进行处理,使用荧光显微镜选取随机5个区域分析图像。

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 t 检验,3组及以上的比较采用单因素方差分析中的Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

西洋参活性成分及靶点:共筛选出西洋参的主要化学成分11个(表1),预测到潜在靶点144个,通过Uniprot数据库标准基因名转换后得到680个作用人类的基因靶点。通过Genecards和OMIM数据库共检索到与PCOS相关的基因358个,其中与西洋参有效成分靶点匹配映射得到西洋参治疗PCOS的靶点共13个,分别为mTOR, AKT3, ESR1及胆碱能毒蕈碱受体3(CHRM3)、胃蛋白酶原1/胃蛋白酶原2(PGR)、类固醇5 α 还原酶1(SRD5A1)、类固醇5 α 还原酶2(SRD5A2)、细胞色素P450 19A1(CYP19A1)、细胞色素P450 2C19(CYP2C19)、UDP葡萄糖醛酸转移酶2家族多肽B7(UGT2B7)、细胞色素P450 2C9(CYP2C9)、雄激素受体(AR)、性激素结合球蛋白(SHBG)。

PCOS-西洋参-活性成分-靶点网络构建:将西洋参活性成分及疾病相关靶点导入Cytoscape 3.9.1软件构建PCOS-西洋参-活性成分-靶点可视化网络。剔除天然产物分离过程中的“垃圾成分”后,共包含7个化学成分和13个靶点,主要活性成分为MOL000358(β -谷甾醇)、MOL005344(Rh₂)、MOL008173(胡萝卜苷)等,详见图1。

PPI网络构建:将PCOS及人参皂苷Rh₂导入String数据库构建PPI网络,包含13个节点、71条边,平均连接度值为10.93,详见图2。利用Cytoscape3.9.1软件插件中Degree算法确定度值(Degree),并以度值排名前6的蛋白为Hub蛋白,其中ESR1, CYP19A1, SRD5A1, SRD5A2, AR, PGR, mTOR, AKT3 8个蛋白的

表1 西洋参治疗PCOS的潜在活性成分

Tab. 1 Potential active components of Panacis Quinquefolii Radix in the treatment of PCOS

TSCMP 编号	活性成分	口服生物利用度(%)	CaCo-2细胞渗透性	血脑屏障通透性	类药性
MOL011434	polyacetylene PQ-2	36.74	-0.27	-1.14	0.20
MOL011435	PQ-2	36.74	-0.35	-1.10	0.19
MOL011455	20-hexadecanoylingenol	32.70	-0.24	-0.38	0.65
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	1.32	0.99	0.75
MOL005344	人参皂苷 Rh ₂	36.32	-0.51	-1.38	0.56
MOL006774	stigmast-7-enol	37.42	1.39	1.04	0.75
MOL006980	甾甾碱	64.04	1.22	0.57	0.38
MOL011394	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hydroxymethyl)-6-[[[(3S,5R,8R,9R,10R,12R,13R,14R,17S)-12-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-17-[(2S)-6-methyl-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]]-2,3,5,6,7,9,11,12,13,15,16,17-dodecahydro-1H-c	36.43	-1.76	-2.64	0.25
MOL011442	(8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-1,2,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta [a]phenanthren-7-one	43.87	1.55	1.23	0.75
MOL008173	胡萝卜苷	36.91	1.33	0.85	0.75
MOL008397	曼陀罗灵	50.37	0.61	0.06	0.77

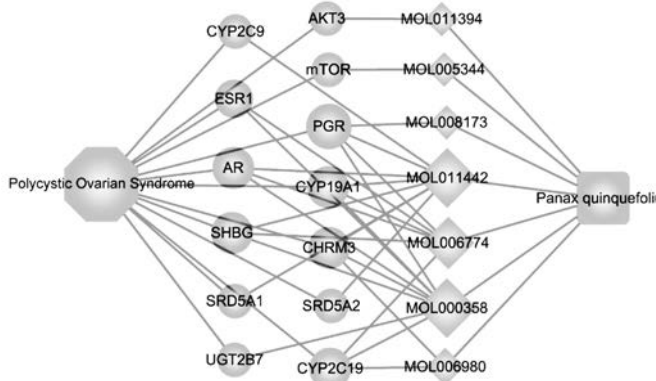


图1 PCOS-西洋参-活性成分-靶点网络

Fig. 1 Network of PCOS-Panax Quinquefolii Radix-active components-targets

度值分别为23,20,14,14,14,13,11,7,均大于平均值。

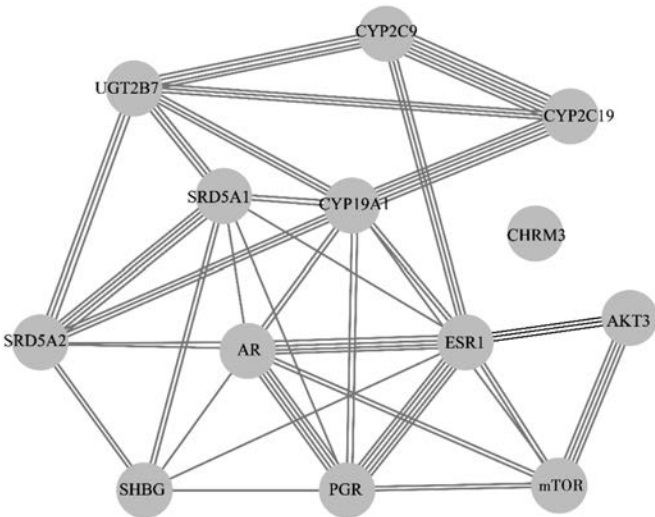


图2 人参皂苷Rh₂治疗PCOS的蛋白互作网络

Fig. 2 Protein-Protein interaction network of ginsenoside Rh₂ in the treatment of PCOS

2.2 分子生物学方法分析

Rh₂对ROS表达水平的影响:结果显示,与正常组比较,LPS组KGN细胞中ROS的表达水平显著升高($P < 0.05$);与LPS组比较,Rh₂组KGN细胞中ROS的表达水平显著降低($P < 0.05$),表明Rh₂能抑制由LPS导致的炎症反应KGN细胞中ROS水平的升高。详见图3。

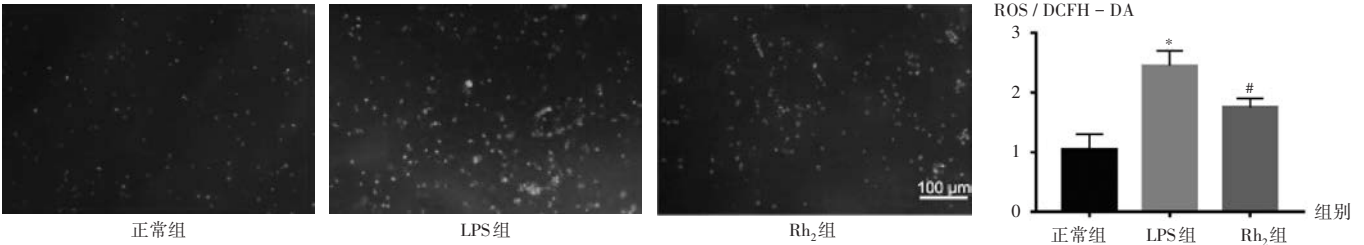
Rh₂对IL-1 β ,TNF- α ,mTOR表达水平的影响:ELISA实验结果显示,与正常组比较,LPS组KGN细胞中IL-1 β 和TNF- α 的表达水平均显著升高($P < 0.05$);

与LPS组比较,Rh₂组KGN细胞中IL-1 β 和TNF- α 的表达水平均显著降低($P < 0.05$),表明Rh₂(40 $\mu\text{mol/L}$, 24 h)能抑制由LPS导致的炎症反应KGN细胞中IL-1 β 和TNF- α 表达水平升高。详见图4 A和图4 B。Western bolt实验结果显示,与正常组比较,LPS组KGN细胞中mTOR的表达水平显著升高($P < 0.05$);与LPS组比较,Rh₂组KGN细胞中mTOR的表达水平显著降低($P < 0.05$),表明Rh₂能抑制LPS导致的炎症反应KGN细胞中mTOR蛋白表达水平的升高。详见图4 C和图4 D。

不同表达水平mTOR对IL-1 β 和TNF- α 表达水平的影响:通过细胞转染技术将表达不同水平的mTOR质粒转染到KGN细胞中,采用Western blot法检测KGN细胞中mTOR的蛋白表达水平。结果显示,低表达(50 nmol/L)mTOR能下调KGN细胞中mTOR蛋白表达,过表达(3 μg)mTOR能上调KGN细胞中mTOR蛋白表达,详见图5 A。通过ELISA试剂盒检测不同表达水平的mTOR对Rh₂保护LPS刺激后KGN细胞中TNF- α 和IL-1 β 的水平。结果显示,与Rh₂组比较,低表达mTOR能明显促进Rh₂对LPS诱导的KGN细胞损伤的保护作用,过表达mTOR能加重KGN细胞的炎症反应,详见图5 B至图5 D。

3 讨论

PCOS患者多伴随慢性炎症,临床表现为外周血白细胞计数及中性粒细胞计数均增加,同时血清中CRP,

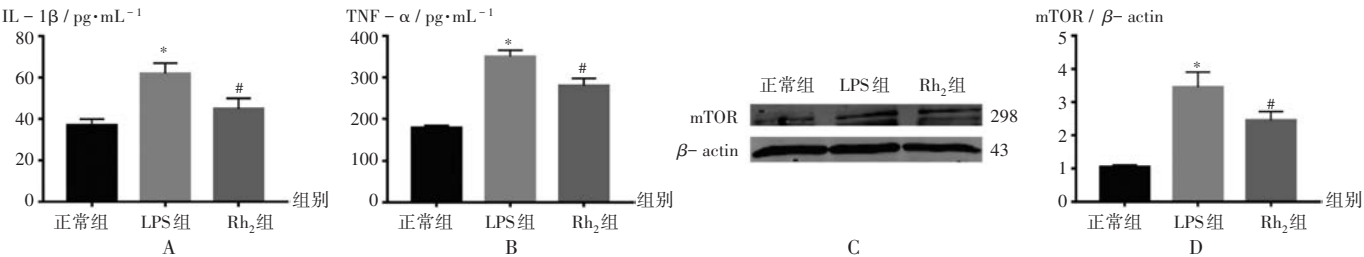


注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与LPS组比较,# $P < 0.05$ 。图4和图5同。

图3 人参皂苷Rh₂对LPS诱导炎症反应KGN细胞中ROS水平的影响($n = 3$)

Note: Compared with those in the normal group, * $P < 0.05$; Compared with those in the LPS group, # $P < 0.05$ (for Fig. 3-5).

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rh₂ on the ROS level in the KGN cells with inflammatory response induced by LPS ($n = 3$)

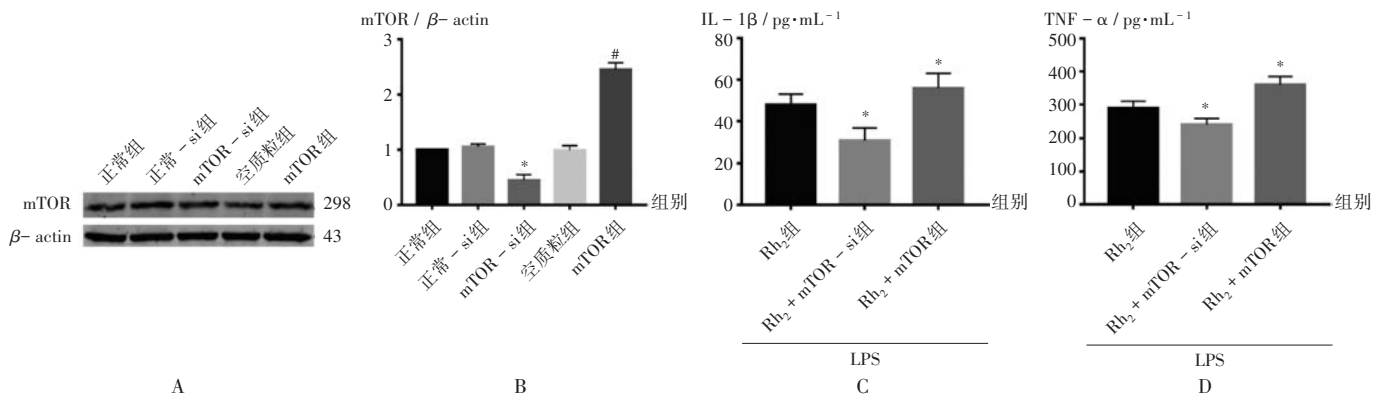


A. 对IL-1 β 水平的影响 B. 对TNF- α 水平的影响 C,D. 对mTOR水平的影响

图4 人参皂苷Rh₂对LPS诱导炎症反应KGN细胞中IL-1 β ,TNF- α ,mTOR水平的影响($n = 3$)

A. Effect on the IL-1 β level B. Effect on the TNF- α level C,D. Effects on the mTOR level

Fig. 4 Effects of ginsenoside Rh₂ on the IL-1 β ,TNF- α and mTOR levels in the KGN cells with inflammatory response induced by LPS ($n = 3$)



A, B. 不同表达 mTOR 质粒转染后正常 KGN 细胞中 mTOR 的表达 C, D. 对 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平的影响

图5 不同表达水平 mTOR 对 KGN 细胞中 IL-1 β , TNF- α , mTOR 表达水平的影响 ($n = 3$)

A, B. Expression of mTOR in normal KGN cells after the transfection of mTOR plasmids with different expression levels C, D. Effects on the expression levels of TNF- α and IL-1 β

Fig. 5 Effects of mTOR with different expression levels on the expression levels of IL-1 β , TNF- α and mTOR in KGN cells ($n = 3$)

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 等炎症因子的水平均升高^[24-25]。而炎症因子水平升高,胰岛素受体酪氨酸激酶的活性会受到抑制,这可能是导致代谢性疾病发生的重要原因之一^[6,26]。故本研究中使用 LPS 刺激 KGN 细胞模拟体内 PCOS 的过程,进而研究慢性炎症与 PCOS 间的作用及潜在作用机制。本研究结果显示,相较于对照组, LPS 组中 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平均升高,而 Rh₂ 能逆转此水平的升高,表明 Rh₂ 对 LPS 导致的炎症颗粒细胞有很好的保护作用。

信号通路激活可能参与 PCOS 炎症的发病机制^[27],而炎症因子的产生取决于炎症信号通路的激活。GUO 等^[28]的研究表明, PCOS 患者的 mTOR 活性高于健康受试者。而 mTOR 是与多种细胞炎症及增殖相关的重要因子之一,如在前列腺细胞和成纤维细胞中, mTOR 的异常表达与炎症信号通路密切相关^[29]。但目前尚无 Rh₂ 直接调控 mTOR 参与炎症导致 PCOS 的相关报道。网络药理学研究结果显示, mTOR 可能是 Rh₂ 抗 PCOS 的重要作用靶点之一。mTOR 是女性生殖的重要靶点,参与卵巢的各种过程,包括卵巢储备、卵泡发育、卵母细胞减数分裂成熟、卵巢老化、卵巢体细胞增殖和类固醇生成等^[30]。同时,卵母颗粒细胞中 mTOR 表达升高能激活原始卵泡,进而提升卵巢储备,产生保护能力^[31]。抑制 mTOR 会阻碍卵母细胞减数分裂成熟,这可能会限制 mTOR 抑制药物在生育相关疾病中的应用^[32]。临床前的实验研究表明,应用 mTOR 调节剂有可能改善与 POF 及 PCOS 和子宫内膜异位症相关的生育问题^[33]。上述研究均说明, mTOR 在卵巢功能中具有良好作用。mTOR 能作为一个关键因子参与体内 ROS 表达水平的变化^[34],如 ROS / mTOR 能参与红景天苷保护 LPS 对心肌细胞的损伤^[35]。分子生物学研究结果显示, Rh₂ 能逆转由 LPS 诱导的 KGN 细胞中 mTOR 的表达升高;此外,外

源性过表达 mTOR 能降低 Rh₂ 的保护能力,低表达 mTOR 能增加 Rh₂ 的保护能力。以上结果均说明, mTOR 可能是 Rh₂ 保护 LPS 诱导 KGN 细胞炎症反应的主要调节因子。

综上所述,本研究中基于网络药理学分析了西洋参抗 PCOS 的主要活性成分及潜在的作用靶点;结合分子生物学方法验证了 Rh₂ 能通过激活 ROS 而调控 KGN 细胞中 mTOR 的表达,抑制 LPS 诱导的炎症因子的表达而抑制炎症反应,起到抗炎作用,为 Rh₂ 成为 PCOS 的潜在治疗药物提供了更多实验室依据。

参考文献

- [1] HOEGER KM, DOKRAS A, PILTONEN T. Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2021, 106(3): e1071 - e1083.
- [2] KASHYAP S, RABBANI M, DE LIMA I, et al. HOPX Plays a Critical Role in Antiretroviral Drugs Induced Epigenetic Modification and Cardiac Hypertrophy [J]. Cells, 2021, 10(12): 3458.
- [3] ROSENFIELD RL, EHRMANN DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited [J]. Endocr Rev, 2016, 37(5): 467 - 520.
- [4] GOODARZI MO, DUMESIC DA, CHAZENBALK G, et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis [J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(4): 219 - 231.
- [5] REGIDOR PA, MUELLER A, SAILER M, et al. Chronic Inflammation in PCOS: The Potential Benefits of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) in the Improvement of the Resolutive Response [J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): 384.
- [6] BORTHAKUR A, D PRABHU P, VALSALA GOPALAKRISHNAN A. Role of IL-6 signalling in Polycystic Ovarian Syndrome associated inflammation [J]. J Reprod Immunol, 2020, 141: 103155.
- [7] ESCOBAR - MORREALE HF, LUQUE - RAMIREZ M, GON-

- ZIALEZ F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(3): 1048 – 1058.
- [8] PILTONEN TT. Polycystic ovary syndrome: Endometrial markers[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016, 37: 66 – 79.
- [9] GIAMPAOLINO P, FORESTE V, DI FILIPPO C, et al. Microbiome and PCOS: State – of – Art and Future Aspects[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2048.
- [10] RYU Y, KIM SW, KIM YY, et al. Animal Models for Human Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Focused on the Use of Indirect Hormonal Perturbations: A Review of the Literature[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2720.
- [11] 郭 瑞. 苍附导痰汤加减治疗肥胖型多囊卵巢综合征临床研究[J]. *中国药业*, 2017, 26(9): 70 – 72.
- [12] 马 英, 孔 丽. 人参皂苷 Rg₃ 诱导小鼠肝癌细胞凋亡的作用研究[J]. *中国药业*, 2014, 23(24): 21 – 23.
- [13] ZHU L, LI J, XING NN, et al. American ginseng regulates gene expression to protect against premature ovarian failure in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 767124.
- [14] GE PL, XING NN, REN YH, et al. Preventive effect of American ginseng against premature ovarian failure in a rat model[J]. *Drug Dev Res*, 2014, 75(8): 521 – 528.
- [15] LI X, CHU SF, LIN MY, et al. Anticancer property of ginsenoside Rh₂ from ginseng[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 203: 112627.
- [16] LIU Y, YU ST, XING X, et al. Ginsenoside Rh₂ stimulates the production of mitochondrial reactive oxygen species and induces apoptosis of cervical cancer cells by inhibiting mitochondrial electron transfer chain complex [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(6): 873.
- [17] CHEN XQ, XU TT, LV XY, et al. Ginsenoside Rh₂ alleviates ulcerative colitis by regulating the STAT3 / miR – 214 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274: 113997.
- [18] LI LC, PIAO HM, ZHENG MY, et al. Ginsenoside Rh₂ attenuates allergic airway inflammation by modulating nuclear factor – κ B activation in a murine model of asthma[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 6946 – 6954.
- [19] YAN S, DING JJ, ZHANG Y, et al. C1QTNF6 participates in the pathogenesis of PCOS by affecting the inflammatory response of granulosa cells double dagger [J]. *Biol Reprod*, 2021, 105(2): 427 – 438.
- [20] ZHONG ZY, LIANG S, SANCHEZ – LOPEZ E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 198 – 203.
- [21] WANG DJ, WENG YJ, ZHANG YL, et al. Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 745: 141049.
- [22] ARANDA A, SEQUEDO L, TOLOSA L, et al. Dichloro – dihydro – fluorescein diacetate (DCFH – DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle – treated cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(2): 954 – 963.
- [23] TANG J, DIAO P, SHU XH, et al. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS – Induced RAW264. 7 Cells: *In Vitro* Assessment and a Theoretical Model[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 7039802.
- [24] RUDNICKA E, SUCHTA K, GRYMOWICZ M, et al. Chronic Low Grade Inflammation in Pathogenesis of PCOS [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3789.
- [25] 韩体微, 袁凤玲, 王艳鹏, 等. 地黄苦苣元对多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢功能的影响[J]. *中国药业*, 2021, 30(24): 50 – 54.
- [26] LIU YH, LIU H, LI ZJ, et al. The Release of Peripheral Immune Inflammatory Cytokines Promote an Inflammatory Cascade in PCOS Patients via Altering the Follicular Microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 685724.
- [27] XIONG HX, HU Q, JIANG Q. Protective effects of lidocaine on polycystic ovary syndrome through modulating ovarian granulosa cell physiology via PI3K / AKT / mTOR pathway [J]. *Cytotechnology*, 2022, 74(2): 283 – 292.
- [28] GUO ZX, YU Q. Role of mTOR Signaling in Female Reproduction[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 692.
- [29] DU HY, ZHANG X, ZENG YC, et al. A Novel Phytochemical, DIM, Inhibits Proliferation, Migration, Invasion and TNF – α Induced Inflammatory Cytokine Production of Synovial Fibroblasts From Rheumatoid Arthritis Patients by Targeting MAPK and AKT / mTOR Signal Pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1620.
- [30] LIU J, WU DC, QU LH, et al. The role of mTOR in ovarian Neoplasms, polycystic ovary syndrome, and ovarian aging[J]. *Clin Anat*, 2018, 31(6): 891 – 898.
- [31] YABA A, DEMIR N. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. *J Ovarian Res*, 2012, 5(1): 38.
- [32] GUO J, ZHANG T, GUO YS, et al. Oocyte stage – specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(23): e5326 – e5333.
- [33] ESTIENNE A, BONGRANI A, RAMÉ C, et al. Energy sensors and reproductive hypothalamo – pituitary ovarian axis (HPO) in female mammals: Role of mTOR (mammalian target of rapamycin), AMPK (AMP – activated protein kinase) and SIRT1 (Sirtuin 1)[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 521: 111113.
- [34] LIU XH, ZHAO PY, WANG XJ, et al. Celastrol mediates autophagy and apoptosis via the ROS / JNK and Akt / mTOR signaling pathways in glioma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 184.
- [35] CHEN L, LIU P, FENG X, et al. Salidroside suppressing LPS – induced myocardial injury by inhibiting ROS – mediated PI3K / Akt / mTOR pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12): 3178 – 3189.

(收稿日期: 2022 – 06 – 10; 修回日期: 2022 – 08 – 27)