

基于蛋白质组学探讨关黄母颗粒对更年期小鼠卵巢功能的改善作用

韩瑜婷， 刘星童， 黄瑞麒， 张艺佳， 邢 玉*， 刘艳霞*
(北京中医药大学东方医院，北京 100078)

摘要：目的 探讨关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功能的作用机制。方法 将小鼠随机分为空白组、模型组、补佳乐组（0.13 mg/kg）及关黄母低、中、高剂量组（1.755、3.51、7.02 g/kg）。除空白组外，其余各组小鼠采用腹腔注射 4-VCD 构建更年期模型，分别灌胃相应药物，每天 1 次，持续 21 d。观察小鼠一般状况及体质量，HE 染色观察卵巢组织病理形态，ELISA 法检测血清性激素（E₂、FSH、LH）水平，DIA 定量蛋白质组学技术筛选差异表达蛋白（DEPs），RT-qPCR 法检测核心基因 mRNA 表达，Western blot 检测核心蛋白表达。结果 与模型组比较，关黄母颗粒能够减轻更年期小鼠卵巢组织病理损伤，增加卵泡数量，促进卵泡发育；关黄母中、高剂量组小鼠血清 E₂ 水平升高（ $P<0.05$ ），FSH、LH 水平降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。蛋白质组学共筛选出 908 个 DEPs，结合 GO、KEGG、Reactome 富集分析发现，关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功能的作用主要涉及免疫相关反应、人乳头瘤病毒感染、NOD 样受体信号通路、PI3K-Akt 信号通路、内体 Toll 样受体的运输与加工等途径；蛋白功能互作分析表明 Pik3cd、Casp1、Tlr7、Ctss 为核心蛋白。关黄母颗粒给药后 Pik3cd、Casp1、Tlr7、Ctss mRNA 及蛋白表达升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。结论 Pik3cd、Casp1、Tlr7 及 Ctss 是关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功能的关键蛋白，关黄母颗粒可能通过调控 PI3K/Akt、NLRP3/Casp1、Tlr7/NF- κ B 等信号通路，介导免疫与炎症相关反应，减轻更年期小鼠卵巢功能损伤。
关键词：关黄母颗粒；更年期综合征；蛋白质组学；Pik3cd；Casp1；Tlr7；Ctss
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2026)08-2757-09
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.08.036

更年期综合征（perimenopausal syndrome, PMS）是指女性绝经前后因性激素水平波动或减少引起的一系列躯体及精神心理症状^[1]。临床表现包括月经失调、潮热汗出、烦躁易怒、失眠健忘、神疲乏力、腰膝酸痛、手足心热、性欲减退或阴道干涩等^[2]。女性绝经前后雌激素（estradiol, E₂）水平降低，促卵泡激素（follicle-stimulating hormone, FSH）与促黄体生成素（luteinizing hormone, LH）水平升高^[3]，E₂ 长期缺乏会增加代谢性疾病的风险，并伴随情绪波动，严重时影响患者正常生活^[4]。目前，激素替代疗法因接受度有限、禁忌症明确，且漏服易导致治疗效果不理想，使用率有限^[5]。因此，寻找接受度更高、普适性更强、安全性更可靠的治疗方案显得尤为重要。

关黄母颗粒由古方《丹溪心法》中“大补阴丸”化裁而成，在原方熟地、龟甲胶、盐关黄柏、盐知母基础之上，创新性地加入白芍，以达补益肝

肾、滋阴降火的功效，临床用于肝肾阴虚型 PMS。既往研究证实，关黄母颗粒具有改善睡眠状况、提高生活质量、纠正内分泌紊乱的临床疗效^[6]，并基于质谱分析、网络药理学与分子对接技术，鉴定出关黄母颗粒的有效成分、入脑组织成分^[7-8]及可能作用靶点^[9-10]。为进一步深化研究内容，本研究将评价关黄母颗粒对更年期小鼠卵巢功能的影响，并基于 DIA 定量蛋白质组学技术探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 7~8 周龄 SPF 级 ICR 小鼠，雌性，体质量（28±2）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK（京）2016-0011]，饲养于北京中医药大学和平街校区动物中心屏障系统 [实验动物使用许可证号 SYXK（京）2020-0033]，环境温度 22~26 ℃，相对湿度 45%~55%，自由进食饮水，适应性饲养

收稿日期：2025-11-07
基金项目：国家自然科学基金项目（81904241）；北京市丰台区卫生健康系统科研项目（2025-016）；北京中医药大学东方医院横向课题（HX202412）
作者简介：韩瑜婷（1998—），女，博士在读，从事中医治疗妇科生殖内分泌疾病的研究。E-mail: hanyuting0319@163.com
*通信作者：邢 玉（1987—），女，博士，副主任医师，从事妇科生殖内分泌疾病的研究。Email: xingyu465@162.com
刘艳霞（1970—），女，教授，从事妇科生殖内分泌疾病的研究。E-mail: lyx7028@sina.com

5 d后开始正式实验。本实验经北京中医药大学动物实验伦理委员会批准（伦理号 BUCM-2024101009-4071）。

1.2 试剂与药物 关黄母颗粒（安徽太阳升药业有限公司，国药准字 Z20180001，批号 04240420）；补佳乐（德国拜耳集团，1 mg，批号 64011107）。4-VCD（上海蓝木化工有限公司，批号 E002402）；玉米油（上海源叶生物科技有限公司，批号 S50856）；小鼠雌二醇、卵泡刺激素、促黄体生成素 ELISA 检测试剂盒（上海江莱生物科技有限公司，批号 JL11790/96T、JL10239/96T、JL10432/96T）；苏木精-伊红染色试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，批号 C0105S）；HRP-山羊抗小鼠二抗、HRP-兔抗大鼠 IgG、HRP-山羊抗兔 IgG（上海赛尔维医疗科技有限公司，批号 C030205、C030226、C030212）；GAPDH、Tlr7 抗体（江苏亲科生物研究中心有限公司，批号 AF7021、DF6173-50）；Pik3cd、Casp1、Ctss 抗体（苏州博奥龙科技有限公司，批号 BD-PE2467、RM8397、BD-PN2060）。

1.3 仪器 Orbitrap Astral 质谱仪、Vanquish Neo 超高效液相色谱系统、 μ PAC Neo 高通量色谱柱（美国赛默飞世尔科技公司）。

2 方法

2.1 造模分组与给药 从 36 只动情周期正常的 ICR 小鼠中随机选择 6 只小鼠作为空白组，腹腔注射玉米油；其余 30 只小鼠腹腔注射 4-VCD（160 mg/kg，溶于玉米油中）溶液，连续 20 d。末次给药结束 25 d 后，连续观察小鼠阴道脱落细胞涂片 10 d，直至出现小鼠动情周期紊乱，即造模成功^[11]。将造模成功的小鼠随机分为模型组、补佳乐组及关黄母颗粒低、中、高剂量组。根据临床剂量换算，补佳乐组以 0.13 mg/kg 灌胃；关黄母中剂量组参考临床常规用量（成人剂量 27 g/d），并以临床常规用量 0.5、2 倍定为关黄母低、高剂量组灌胃剂量，换算后关黄母低、中、高剂量组给药质量分别为 1.755、3.51、7.02 g/kg。各药物均溶于小鼠饮用水中，连续 21 d，每天 1 次。空白组小鼠每天灌胃等量饮用水。

2.2 一般情况与体质量观察 观察各组小鼠一般情况，并比较给药前后小鼠体质量变化。

2.3 标本采集 末次给药当晚，各组小鼠禁食、水 12 h，异氟烷吸入麻醉后摘眼球取血，静置 30 min，3 500 r/min 离心 10 min，取上层血清。脱

颈处死小鼠，迅速分离小鼠双侧卵巢，使用预冷的 PBS 缓冲液冲洗干净后，一侧卵巢置于 4% 多聚甲醛中固定，另一侧卵巢置于液氮中速冻并保存于 -80 ℃ 冰箱。

2.4 卵巢组织病理学观察 取出于多聚甲醛中固定的卵巢组织，制备石蜡切片，经苏木精-伊红染色后于数字病理切片系统 10 倍物镜下扫描拍照，拍照后使用 Caseviewer 软件以 100 μ m 为标尺放大观察卵巢组织病理形态及卵泡发育情况，并截取关键病理改变区域。

2.5 血清性激素水平检测 严格按照 ELISA 试剂盒说明操作，采用 ELISA Calc 软件进行数据分析，分别检测小鼠血清 E₂、FSH、LH 水平。

2.6 卵巢组织蛋白质组学检测

2.6.1 样品制备 从空白组、模型组及关黄母颗粒高剂量组各随机选取 3 个卵巢组织样本液氮研磨，分别加入适量 SDT 裂解液，沸水浴 3 min，超声破碎 2 min，4 ℃、16 000 $\times$ g 离心 20 min，取上清，使用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白定量后每例样本各取 15 μ g 蛋白质样品按 5 : 1 比例加入 5 $\times$ 上样缓冲液，沸水浴 5 min，进行 8% ~ 16% SDS-PAGE 凝胶电泳。另取适量蛋白进行 FASP 酶解，加 DTT 至 100 mmol/L，沸水浴 5 min，冷却至室温；加 200 μ L UA buffer（8 mol/L Urea，150 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0）混匀，12 000 $\times$ g 离心 15 min，重复 2 次后弃滤液；加 100 μ L IAA（50 mmol/L IAA 溶于 UA），600 r/min 振荡 1 min，避光室温 30 min，12 000 $\times$ g 离心 10 min。加 100 μ L UA buffer，12 000 $\times$ g 离心 10 min，重复 2 次。加 100 μ L NH₄HCO₃ buffer，14 000 $\times$ g 离心 10 min，重复 2 次。加入 40 μ L Trypsin buffer（6 μ g Trypsin 溶于 40 μ L NH₄HCO₃ buffer），600 r/min 振荡 1 min，37 ℃ 下反应 16 ~ 18 h。换新收集管，12 000 $\times$ g 离心 10 min，收集滤液，加入适量 0.1% TFA 溶液，酶解后的肽段使用 C₁₈ Cartridge 脱盐，真空冻干。酶解后的肽段干燥后用 0.1% FA 复溶，肽段浓度测定，以备液相色谱质谱分析。

2.6.2 质谱数据采集 每例样本取适量肽段，使用 Vanquish Neo UHPLC 系统进行色谱分离。色谱柱为 μ PAC Neo High Throughput 分析柱，流动相 0.1% 甲酸（A）-80% 乙腈（含 0.1% 甲酸）（B），梯度洗脱（0 ~ 8 min，4% ~ 99% B），分离后的肽段在 Orbitrap Astral 质谱仪上进行 DIA 质谱分析。

2.6.3 质谱数据检索与分析 通过软件 DIA-NN

合并所有质谱数据。将所有样本的数据同时导入并进行数据库与定量分析，所用数据库为 uniprotkb-Mus musculus (Mouse) [10090] -87491-20241204.fast，来源于网址 <https://www.uniprot.org/taxonomy/10090>。

2.7 RT-qPCR 法检测卵巢组织 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、*Ctss* mRNA 表达 使用 TRIzol 提取样本总 RNA，使用核酸浓度测定仪测定 RNA 浓度和纯度，使用 ExonScript RT SuperMix with dsDNase 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系总体积为 20 μ L，包含 1 μ g 总 RNA、4 μ L 5 $\times$ 缓冲液、3 μ L 逆转录酶混合物。反应条件为 25 $^{\circ}$ C 孵育 10 min，55 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 进行逆转录反应，在 85 $^{\circ}$ C 下加热 5 min 使酶失活。合成的 cDNA 用保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。在 LongGene Q2000B 荧光定量 PCR 仪上进行 qPCR 反应。总反应体积为 20 μ L，包含 1 μ L cDNA 模板、10 μ L 2 $\times$ qPCR mix、正反向引物各 0.4 μ L（终浓度 0.2 μ mol/L）。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，58 $^{\circ}$ C 退火 20 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s，40 个循环。扩增结束后进行熔解曲线分析，95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，以 0.15 $^{\circ}$ C/s 速率从 60 $^{\circ}$ C 升温至 95 $^{\circ}$ C，连续采集荧光信号。每个样品设置 3 个技术重复。以 *GAPDH* 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物由北京百奥思科生物医学技术有限公司设计合成，序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
<i>GAPDH</i>	正向 CTCCTGAGCGCAAGTACTCT	91
	反向 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
<i>Pik3cd</i>	正向 ACCATCAGTGGCTCTGCGGTTT	150
	反向 GTGGTCTTCTGGGAACCTACCT	
<i>Casp1</i>	正向 GGCACATTTCCAGGACTGACTG	125
	反向 GCAAGACGTGTACGAGTG GTTG	
<i>Tlr7</i>	正向 GTGATGCTGTGTGTTTGTCTGG	100
	反向 CCTTTGTGTGCTCTGGACCTA	
<i>Ctss</i>	正向 GCATAGAGGCAGACGCTTCCTA	138
	反向 CCACTGCTTCTTTCAAGGCATC	

2.8 Western blot 法检测卵巢组织 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、*Ctss* 蛋白表达 提取各卵巢组织样本总蛋白，BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定，上样、SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、1 $\times$ TBST 清洗 3 次，滴加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，次日复温后清洗 3 次，用 3%脱脂奶粉的 1 $\times$ TBST 稀释二抗，室温下孵育 1 h

再次清洗 3 次，滴加 ECL 发光液曝光，并置于化学发光成像仪中成像，采用 Image J 软件分析条带灰度值，计算各蛋白相对表达量。

2.9 统计学分析 使用 SPSS 26.0 和 GraphPad 10.6 软件进行数据分析及绘图，计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，使用 Shapiro-Wilk 正态性检验确定样本分布，符合正态分布且方差齐性的样本，2 组间比较采用独立样本 *t* 检验；方差不齐的样本，2 组间比较采用校正后的 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 关黄母颗粒对更年期小鼠一般情况及体质量的影响 与空白组比较，模型组小鼠饮食减少，躁动不安，易激惹，抓取时弓背回身明显，毛发无光泽、脱落明显；与模型组比较，各给药组小鼠在情绪及活动性方面有明显改善。与空白组比较，其余各组小鼠体质量均减轻 (*P*<0.05，*P*<0.01)；与模型组比较，各给药组小鼠体质量变化无明显变化 (*P*>0.05)，见表 2。

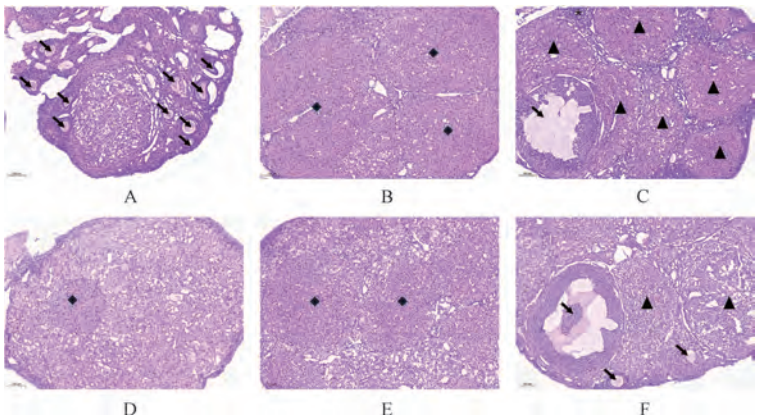
表 2 各组小鼠体质量比较 (g, $\bar{x}\pm s$, *n*=6)

组别	造模前	造模后	给药后
空白组	29.30 $\pm$ 0.85	33.30 $\pm$ 1.24	34.80 $\pm$ 1.34
模型组	29.10 $\pm$ 1.25	33.70 $\pm$ 1.30	30.10 $\pm$ 1.12**
补佳乐组	28.70 $\pm$ 1.15	33.20 $\pm$ 1.23	31.50 $\pm$ 1.67**
关黄母低剂量组	29.00 $\pm$ 1.11	33.40 $\pm$ 1.13	30.20 $\pm$ 1.46*
关黄母中剂量组	28.70 $\pm$ 1.05	33.70 $\pm$ 1.63	30.80 $\pm$ 1.20*
关黄母高剂量组	28.90 $\pm$ 0.80	32.70 $\pm$ 1.18	30.20 $\pm$ 1.57*

注：与空白组比较，* *P*<0.05，** *P*<0.01。

3.2 关黄母颗粒对更年期小鼠卵巢组织病理学形态的影响 如图 1 所示，空白组可见各级卵泡及黄体；模型组卵巢结构紊乱，组织偏实性，未见各级成熟卵泡或黄体；补佳乐组卵巢结构较模型组明显改善，可见少量卵泡及黄体，黄体边界清晰；关黄母低、中剂量组卵巢组织结构紊乱同模型组，大部分卵巢组织被纤维结缔组织替代，皮质变薄，其内可见逐渐向白体转化的无功能性黄体，边界不清；关黄母高剂量组可见少量卵泡及黄体，但黄体边界不及补佳乐组清晰。

3.3 关黄母颗粒对更年期小鼠血清 E₂、FSH、LH 水平的影响 如表 3 所示，与空白组比较，模型组小鼠血清 E₂ 水平降低 (*P*<0.01)，血清 FSH、LH 水平升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，补佳乐组和关黄母中、高剂量组小鼠血清 E₂ 水平升高 (*P*<0.05，*P*<0.01)，血清 FSH、LH 水平降低 (*P*<0.05，*P*<0.01)。



注：↘为各级卵泡，▲为黄体，◆为无功能性黄体。A 为空白组，B 为模型组，C 为补佳乐组，D~F 分别为关黄母低、中、高剂量组。

图 1 各组小鼠卵巢组织病理形态

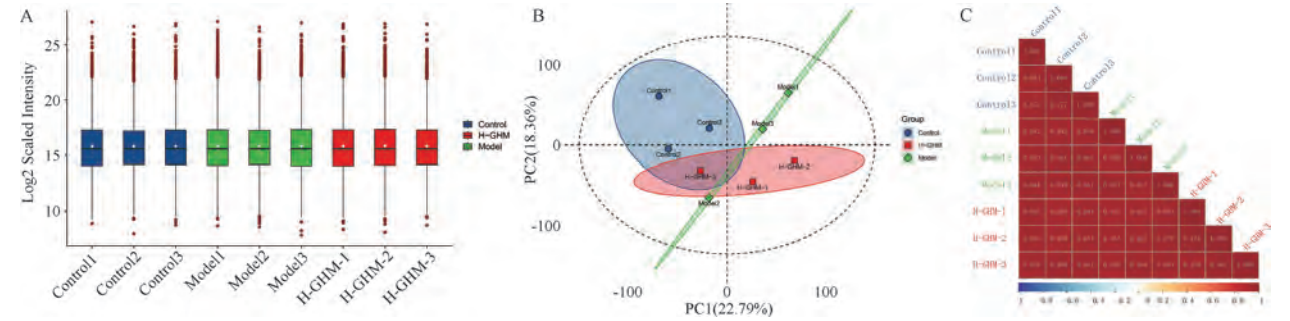
表 3 各组小鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	E ₂ /(pg·mL ⁻¹)	FSH/(mIU·mL ⁻¹)	LH/(mIU·mL ⁻¹)
空白组	19.85±2.15	14.61±0.96	11.49±0.91
模型组	16.39±0.75**	20.21±1.98**	16.03±0.64**
补佳乐组	21.29±2.40##	14.68±1.93##	12.43±1.98##
关黄母低剂量组	16.89±1.52	18.34±1.68	15.29±2.03
关黄母中剂量组	17.64±0.84#	17.65±1.90#	13.90±1.32##
关黄母高剂量组	18.63±2.01#	16.52±1.72##	13.16±1.78##

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

3.4 关黄母颗粒对更年期小鼠卵巢 DIA 蛋白质组学的影响 结合血清性激素水平及卵巢组织病理学形态结果，关黄母颗粒具有改善更年期小鼠卵巢功能的作用，且高剂量组效果最佳。因此，选择空白组、模型组、关黄母高剂量组进行蛋白质组学研究，以筛选差异表达蛋白（differentially expressed proteins, DEPs）。

3.4.1 数据质控 如图 2A 所示，9 例样本中位数接近同一水平线，表明数据质量及重复性良好；如图 2B 所示，3 组样本之间区分度良好，且 9 例样本均在置信区间内；如图 2C 所示，每 2 例样本间相关性系数绝对值均接近于 1，表明样本相关性良好。



注：Control 为空白组，Model 为模型组，H-GHM 为关黄母高剂量组。A 为样本表达分布箱式图，B 为 PCA 得分图，C 为样本相关性图。

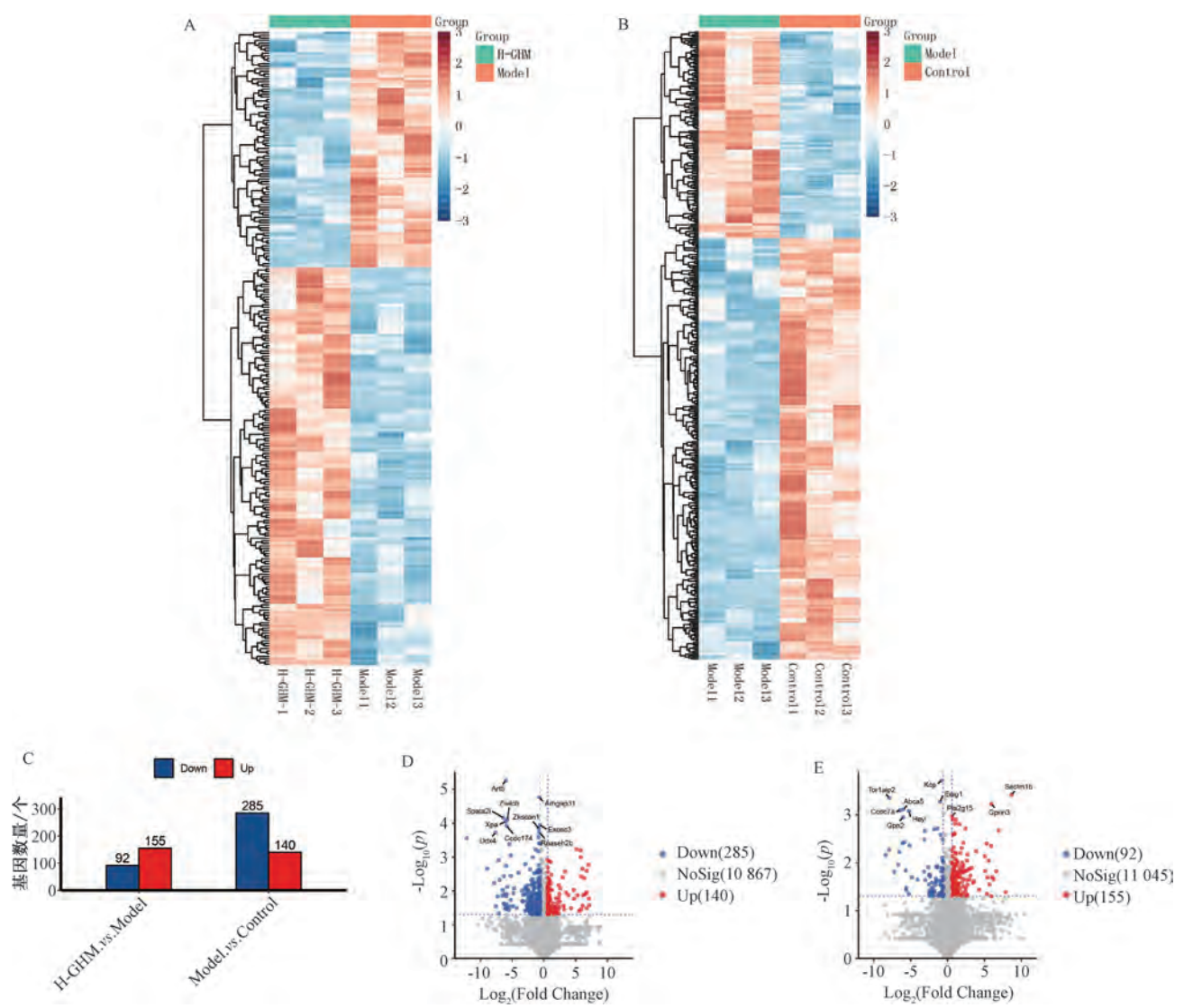
图 2 数据质控

3.4.2 DEPs 鉴定筛选 如图 3A~3B 所示，空白组和模型组样本、模型组和关黄母高剂量组样本在聚类中明显分开。从 9 例小鼠卵巢样本中共鉴定出 119 453 种肽段、11 292 种蛋白，3 组间 DEPs 共 908 种（以 $P<0.05$ 且 $FC\geq 1.5$ 或 $\leq 1/1.5$ 为筛选条件）。与空白组比较，模型组发现 155 个蛋白表达上调，92 个蛋白表达下调；与模型组比较，关

黄母高剂量组发现 140 个蛋白表达上调，285 个蛋白表达下调，见图 3C~3E。

3.4.3 差异蛋白功能分析

3.4.3.1 GO 功能富集分析 对关黄母高剂量组和模型组 DEPs 进行 GO 功能富集分析，并从生物过程（biological process, BP）、细胞组分（cellular component, CC）、分子功能（molecular function,



注：Control 为空白组，Model 为模型组，H-GHM 为关黄母高剂量组。A~B 分别为 3 组间两两比较聚类热图，C 为 3 组间两两比较差异蛋白数量柱状图，D~E 分别为 3 组间两两比较火山图。

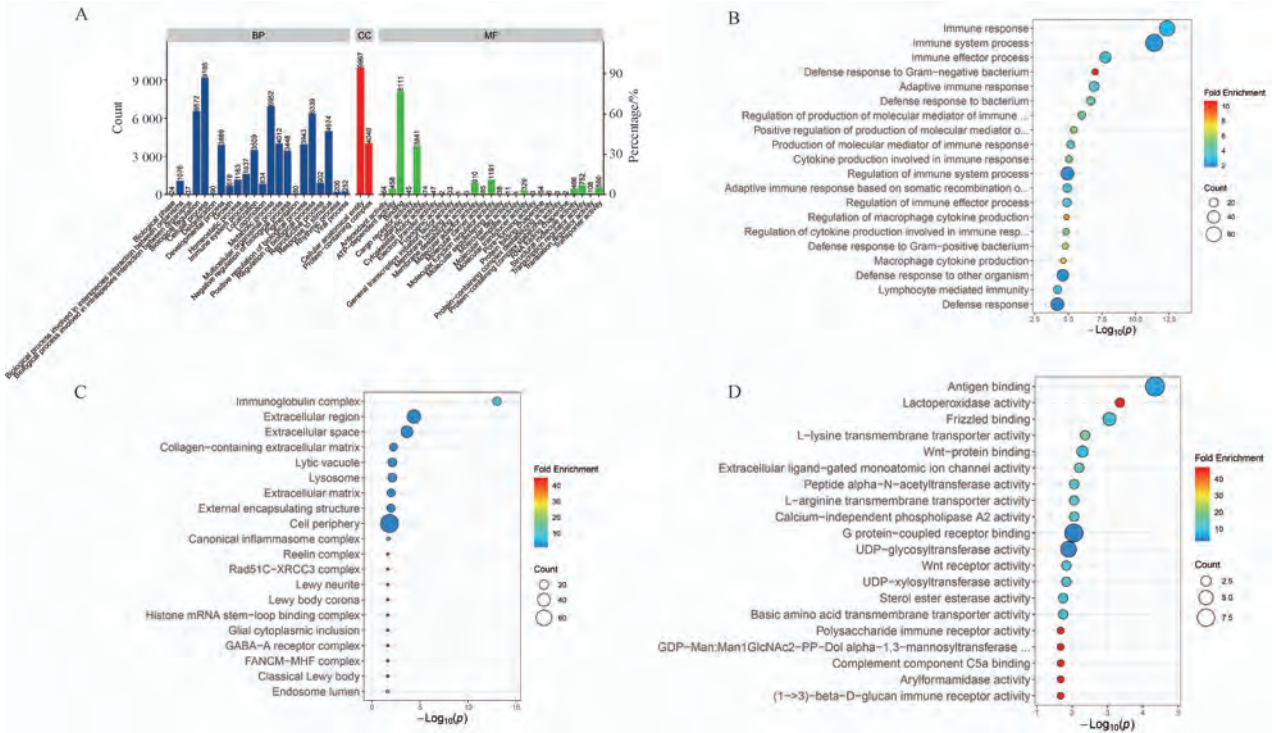
图 3 DEPs 鉴定筛选

MF) 3 个方面进行注释，共富集到 5 014 条 GO 条目，以 $P<0.05$ 作为显著性阈值对 GO 条目进行筛选，最终得到 453 条具有统计学意义的 GO 条目，其中包括 388 个 BP，30 个 CC，35 个 MF。BP 主要涉及免疫系统过程、免疫应答、细胞过程、免疫效应过程、代谢过程、免疫系统过程调控、刺激应答、适应性免疫应答、防御应答、抗其他生物体防御应答等；CC 主要涉及细胞解剖学实体、细胞质、免疫球蛋白复合体、胞内细胞器等；MF 主要涉及结合功能、催化活性、蛋白质结合、同源蛋白结合、抗原结合、水解酶活性等，见图 4A~4D。

3.4.3.2 KEGG 通路富集分析 对关黄母高剂量组和模型组 DEPs 进行 KEGG 通路注释与富集分析，结果显示，关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功

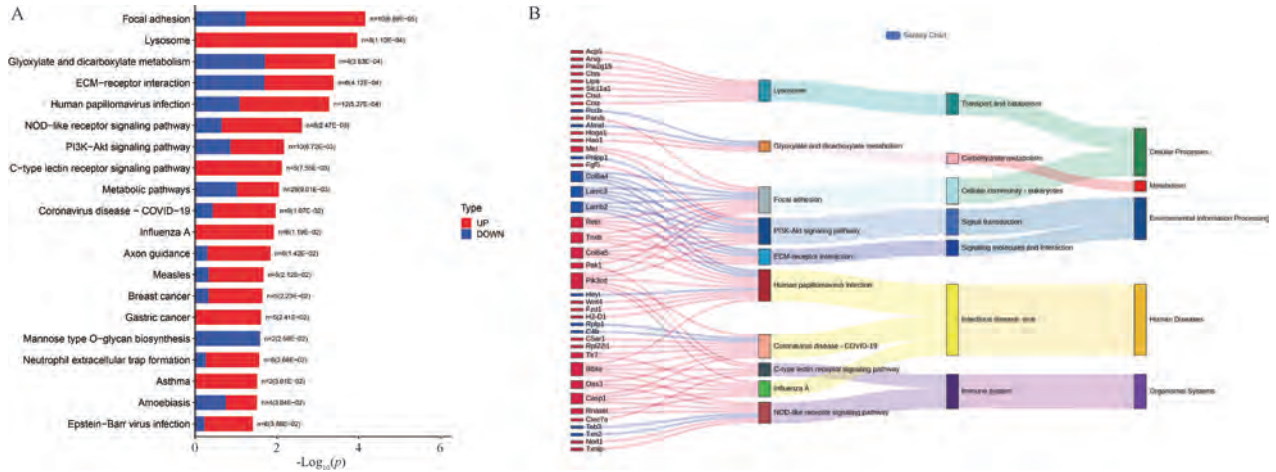
能的 DEPs 主要参与黏着斑、溶酶体、乙醛酸和二羧酸代谢、细胞外基质-受体相互作用、人乳头瘤病毒感染、冠状病毒病、C 型凝集素受体信号通路、NOD 样受体信号通路、PI3K-Akt 信号通路、中性粒细胞胞外诱捕网形成、Ras 信号通路、EB 病毒感染等，见图 5A。此外，本研究绘制 DEPs 与通路相关联的桑基图以展示蛋白与通路之间的关联性，见图 5B。

3.4.3.3 Reactome 通路分析 对关黄母高剂量组和模型组 DEPs 进行 Reactome 通路分析，结果显示，共富集到 422 条通路，以 $P\text{-value}<0.05$ 作为显著性阈值对 Reactome 通路进行筛选，最终得到 20 条具有统计学意义的 Reactome 通路，其中富集程度较高的通路分别是胶原蛋白形成、核苷酸结合



注：A 为关黄母高剂量组对比模型组 DEPs GO 功能蛋白数统计柱状图，B~D 分别为关黄母高剂量组对比模型组 DEPs BP、CC、MF term 富集气泡图。

图 4 GO 功能富集分析



注：A 为关黄母高剂量组对比模型组 DEPs KEGG 通路富集分析 bar 图，B 为关黄母高剂量组对比模型组差异蛋白与通路的关系桑基图。

图 5 KEGG 通路富集分析

域及富含亮氨酸重复序列受体信号通路、胶原纤维及其他多聚体结构的组装、NOD1/2 信号通路、内体 Toll 样受体的运输与加工、Toll 样受体级联反应、血管紧张素原代谢为血管紧张素、Toll 样受体 7/8 (Tlr7/8) 级联反应等，见图 6。

3.4.3.4 蛋白功能互作网络分析 对关黄母高剂量组和模型组 DEPs 进行蛋白功能互作网络分析，在含富集通路信息的蛋白质与蛋白质相互作用网络中，以人乳头瘤病毒感染为关键通路，以 Pik3cd、

Casp1、Ikbke、Hspa1b、Tlr7、Btk、Met、Ctss、Pxdn 为关键蛋白，见图 7A。通过蛋白质与蛋白质相互作用网络分析发现，Casp1、Tlr7、Casp1、Hspa1b、Pxdn 为关键蛋白，见图 7B。通过查阅文献，最终选定 Pik3cd、Casp1、Tlr7、Ctss 为目标蛋白，并进一步验证。

3.5 关黄母颗粒对更年期小鼠卵巢组织 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、*Ctss* mRNA 表达的影响 与空白组比较，模型组小鼠卵巢组织 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、

表 5 各组小鼠卵巢组织 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、*Ctss* 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	<i>Pik3cd</i>	<i>Casp1</i>	<i>Tlr7</i>	<i>Ctss</i>
空白组	0.910±0.128	0.695±0.073	0.697±0.070	0.671±0.063
模型组	0.552±0.095 *	0.455±0.044 *	0.489±0.065 *	0.398±0.046 **
关黄母高剂量组	0.757±0.063 [#]	0.557±0.085 [#]	0.587±0.051 [#]	0.607±0.056 ^{##}

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

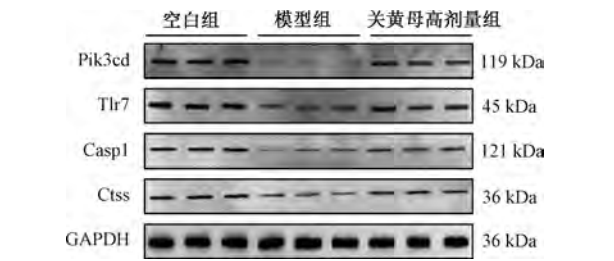


图 8 各组小鼠卵巢组织 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、*Ctss* 蛋白印迹图

4 讨论

本研究采用蛋白质组学技术探究关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功能的作用机制，3 组间共发现 908 个 DEPs。与模型组比较，关黄母高剂量组共发现上调蛋白 140 个，下调蛋白 285 个，经蛋白功能互作分析与文献筛选，共得到目标蛋白 4 个，并通过 RT-qPCR 及 Western blot 验证获得一致结果，初步证明 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7*、*Ctss* 可能为关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功能的作用靶点。

Pik3cd 编码 p110δ 的形成，是磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）的重要组成部分，参与调控 PI3K/Akt/mTOR 通路，与免疫反应密切相关^[12]。研究发现，*Pik3cd* 基因缺失雌鼠表现为生育力低下，各初级、次级卵泡数量减少而闭锁窦卵泡增多，且对外源性促性腺激素反应较弱，而正常小鼠颗粒细胞中，FSH 与 E₂ 能显著激活 PI3K/Akt 通路^[13]，一方面证实 *Pik3cd* 影响卵泡发育及卵巢功能，另一方面阐明 *Pik3cd* 是 PI3K/Akt 通路激活的关键蛋白。同时，*Pik3cd* 激活后，上调卵巢类固醇生成及相关基因的表达，从而诱导 F1 代雌鼠卵巢发育，提前启动青春期^[14]。此外，研究发现 *Pik3cd* 的表达在不同繁殖力绵羊品种间存在显著差异，提示其与生育力具有直接相关性^[15]。

Casp1 编码半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1（cysteine-dependent aspartate-directed protease-1, Caspase-1）的形成，后者是触发细胞焦亡与诱导强烈炎症因子的关键效应蛋白^[16]。通过体内外研究发现，抑制 NLRP3/*Casp1*/GSDMD 通路引起的

焦亡反应，能有效恢复自身免疫性早发性卵巢功能不全的卵巢功能^[17]。另有一项研究表明，经环磷酰胺诱导的卵巢损伤小鼠，其体内 *Casp1* mRNA 表达显著低于空白小鼠，提示 *Casp1* 与卵巢损伤具有相关性^[18]。

Tlr7 编码 Toll 样受体 7（Toll-like receptor 7, *Tlr7*）的形成，为 Toll 样受体（Toll-like receptors, TLR）的重要组成部分。TLR 是先天免疫的重要组成部分，被称为“第一道防线”^[19]。此前 TLR 在肿瘤进展中讨论较多^[20]，近年来，其对生殖功能影响的研究日趋深入。Wang 等^[21]在雌性绵羊生殖系统中发现，所有 TLR 均在输卵管、子宫和卵巢中表达，且高繁殖力组绵羊 *Tlr7* 表达最低，其大量表达于卵巢颗粒细胞的凋亡体周围，提示 *Tlr7* 可能在调节颗粒细胞凋亡中发挥重要作用，兼具免疫哨兵和生殖调控因子的双重角色，从而影响绵羊的繁殖能力。但目前以鼠作为对象的研究相对空白，未来可在此方面展开进一步探讨。

Ctss 编码组织蛋白酶 S（cathepsins S, *Ctss*）的形成，属溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族，其功能主要是参与多种蛋白水解过程，包括细胞外基质的降解^[22]。研究证实 *Ctss* 是与卵丘扩增相关的基因^[23]，不同组织蛋白酶在小鼠卵巢中与动情周期呈现同步的周期性变化，且不同蛋白酶所表达分布的空间位置有所不同，其中 *Ctss* 主要表达在发育阶段颗粒细胞的外膜层及黄体中，提示特定组织蛋白酶在卵泡发育、生长和破裂过程中具有不同的功能^[24]。本研究发现，核心蛋白与免疫及炎症反应密切相关，同时这也与 GO 分析、KEGG 通路富集分析、Reactome 通路分析结果一致。

综上所述，本研究通过运用蛋白质组学、生物信息学分析技术发现 *Pik3cd*、*Casp1*、*Tlr7* 及 *Ctss* 为关黄母颗粒改善更年期小鼠卵巢功能的核心蛋白，关黄母颗粒可能通过调控 PI3K/Akt、NLRP3/*Casp1*、*Tlr7*/NF-κB 等通路，参与免疫系统过程、免疫应答、细胞过程、免疫效应过程、代谢过程、免疫系统过程调控等生物过程影响卵巢功能。本研

究通过检测目标靶点 mRNA 及蛋白表达，为其在 PMS 中的可能作用机制提供了初步验证。

参考文献：

[1] Harlow S D, Gass M, Hall J E, *et al.* Executive summary of the stages of reproductive aging workshop: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(4): 1159-1168.

[2] Chen W, Chen M, Tang H, *et al.* Advances in diagnosis and treatment of perimenopausal syndrome[J]. *Open Life Sci*, 2023, 18(1): 20220754.

[3] Erdélyi A, Pálfi E, Túú L, *et al.* The importance of nutrition in menopause and perimenopause—a review[J]. *Nutrients*, 2023, 16(1): 27.

[4] Crandall C J, Mehta J M, Manson J E. Management of menopausal symptoms: a review[J]. *JAMA*, 2023, 329(5): 405.

[5] 中华医学会妇产科学分会绝经学组. 中国绝经管理与绝经激素治疗指南 2023 版[J]. 中华妇产科杂志, 2023, 58(1): 4-21.

[6] 费 燕, 龚 玉, 陈 敏, 等. 关黄母颗粒治疗围绝经期综合征患者的临床疗效及对其内分泌紊乱、睡眠质量的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2024, 19(8): 1608-1613.

[7] 刘匡一, 张凌云, 杨秀婷, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定关黄母颗粒中 12 种成分的含量[J]. 中成药, 2024, 46(5): 1430-1434.

[8] 彭 秘, 张增珠, 李 刚, 等. 基于 UPLC-QTOF/MS 的关黄母颗粒主要化学成分及脑组织移行成分研究[J]. 中南药学, 2023, 21(2): 298-306.

[9] 宋 微, 郭 鑫, 巴音桑, 等. 基于网络药理学和分子对接的关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的作用机制研究[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(1): 48-57.

[10] 张凌云, 彭 秘, 熊国营. 基于网络药理学及分子对接探讨关黄母颗粒治疗更年期抑郁症的作用机制[J]. 药品评价, 2024, 21(5): 553-559.

[11] Cora M C, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse - review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears[J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(6): 776-793.

[12] Ding Z, Shao G, Li M. Targeting autophagy in premature ovarian failure: therapeutic strategies from molecular pathways to clinical applications[J]. *Life Sci*, 2025, 366-367: 123473.

[13] Li Q, He H, Zhang Y L, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase p110δ mediates estrogen- and FSH-stimulated ovarian follicle growth[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(9): 1468-1482.

[14] Gan H, Lan H, Hu Z, *et al.* Triclosan induces earlier puberty onset in female mice *via* interfering with L-type calcium channels and activating Pik3cd[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 269: 115772.

[15] He X, Wang W, Du X, *et al.* Association between single-nucleotide polymorphism in *Pik3cd* gene and litter size in small tail han sheep[J]. *Anim Biotechnol*, 2023, 34 (8): 3337-3342.

[16] Pranindya Sari A, Reviono, Susanto A D, *et al.* Can pyridoxine function as an anti-pyroptosis agent? A narrative review[J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(5): 2341-2349.

[17] Xie J, Yang Y, Zhuo A, *et al.* Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate NLRP3-related pyroptosis in autoimmune premature ovarian insufficiency *via* the NF-κB pathway[J]. *Reprod Biomed Online*, 2024, 48(6): 103814.

[18] Madden J A, Thomas P Q, Keating A F. Phosphoramidate mustard induces autophagy markers and mTOR inhibition prevents follicle loss due to phosphoramidate mustard exposure[J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 67: 65-78.

[19] Lam J H, Baumgarth N. Toll-like receptor mediated inflammation directs B cells towards protective antiviral extrafollicular responses[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3979.

[20] Kang Y, Flores L, Ngai H W, *et al.* Large, anionic liposomes enable targeted intraperitoneal delivery of a TLR 7/8 agonist to repolarize ovarian tumors ’ microenvironment[J]. *Bioconjug Chem*, 2021, 32(8): 1581-1592.

[21] Wang Z, Zheng J, Yang H, *et al.* Toll-like receptor expression patterns in the female reproductive tract of sheep[J]. *Animals*, 2025, 15(12): 1704.

[22] Smyth P, Sasiwachirangkul J, Williams R, *et al.* Cathepsin S (Ctss) activity in health and disease—a treasure trove of untapped clinical potential[J]. *Mol Aspects Med*, 2022, 88: 101106.

[23] Kowalczyk-Zieba I, Boruszewska D, Suwik K, *et al.* Iloprost affects *in vitro* maturation and developmental competence of bovine oocytes[J]. *Theriogenology*, 2020, 157: 286-296.

[24] Oksjoki S. Differential expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the mouse ovary[J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7 (1): 27-34.