

桂枝茯苓丸对痰湿型多囊卵巢综合征模型大鼠的改善作用及机制研究^Δ

余璟玮^{1,2*}, 钟晓莹³, 曾 蕾³, 郑泳霞^{1#}(1.广州市番禺区何贤纪念医院中医妇科, 广州 511400; 2.广州中医药大学科技产业园, 广州 510445; 3.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0039-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.08

摘要 目的:研究桂枝茯苓丸对痰湿型多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠的改善作用及可能机制。方法:将50只动情周期规律的雌性SD大鼠随机分为空白对照组($n=10$)和造模组($n=40$)。造模组大鼠采用灌胃来曲唑[1 mg/(kg·d), 连续21 d]的方法建立痰湿型PCOS模型。将造模成功的40只大鼠再随机分为模型组、二甲双胍组[阳性对照, 0.135 g/(kg·d)]和桂枝茯苓丸低、高剂量组[4.49、17.96 g/(kg·d)], 每组10只。各药物组大鼠均灌胃给药, 每天1次, 连续给药30 d; 空白对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。末次给药结束后, 采用口服葡萄糖耐量实验检测大鼠灌胃葡萄糖溶液0、30、60、120 min后的血糖水平; 采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中促卵泡生成激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、睾酮(T)水平; 称定大鼠体质量和子宫、双侧卵巢、性腺旁脂肪的质量; 采用苏木精-伊红染色法观察大鼠卵巢组织的形态学变化; 分别采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法和Western blotting法检测大鼠卵巢组织中芳香化酶(CYP19a1)和子宫组织中葡萄糖转运蛋白4(Glut4)的mRNA及蛋白表达水平。结果:与空白对照组比较, 模型组大鼠灌胃葡萄糖溶液30、60、120 min后的血糖水平以及血清中LH、 E_2 、T水平均显著升高($P<0.05$); 体质量和子宫、双侧卵巢、性腺旁脂肪的质量均显著增加($P<0.05$); 卵泡膜细胞体积明显增大、呈圆球形; 卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠上述指标水平均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠卵泡膜细胞层厚度和卵泡膜细胞体积也有一定改善。结论:桂枝茯苓丸能够上调卵巢组织中CYP19a1基因及子宫组织中Glut4基因的表达, 从而改善痰湿型PCOS模型大鼠糖代谢异常、减轻胰岛素抵抗、下调血清雌激素水平、减轻卵巢多囊样改变程度, 最终起到治疗PCOS的作用。

关键词 桂枝茯苓丸; 痰湿型多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 芳香化酶; 葡萄糖转运蛋白4

- [16] ZAREI-KHEIRABADI M, MIRSADEGHI S, VACCARO AR, et al. Protocol for purification and culture of astrocytes: useful not only in 2 days postnatal but also in adult rat brain[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(3):1783-1794.
- [17] 王宁生, 杨奎, 雷燕, 等. 关于血清药理学若干思考[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5):264-266.
- [18] 陈延之. 小品方[M]. 高文铸, 辑校. 北京: 中国中医药出版社, 1995:60.
- [19] 汪昂. 医方集解[M]. 方向明, 注释. 北京: 中国中医药出版社, 2018:301.
- [20] DRENT M, COBBEN NA, HENDERSON RF, et al. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation[J]. Eur Respir J, 1996, 9(8):1736-1742.
- [21] YANG JP, QI JC, XIU BX, et al. Reactive oxygen species play a biphasic role in brain ischemia[J]. J Invest Surg, 2019, 32(2):97-102.
- [22] HUANG HF, GUO F, CAO YZ, et al. Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (MnSOD) mimics: antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(10):811-818.
- [23] XIANG J, ZHANG JS, CAI XF, et al. Bilobalide protects astrocytes from oxygen and glucose deprivation-induced oxidative injury by upregulating manganese superoxide dismutase[J]. Phytother Res, 2019, 33(9):2329-2336.
- [24] XIANG J, ZHU W, YANG F, et al. Melatonin-induced ApoE expression in mouse astrocytes protects endothelial cells from OGD-R induced injuries[J]. Transl Psychiatry, 2020. DOI:10.1038/s41398-020-00864-9.
- [25] KIM GW, KONDO T, NOSHIITA N, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals[J]. Stroke, 2002, 33(3):809-815.
- [26] LIU P, ZHAO H, WANG R, et al. MicroRNA-424 protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in mice by suppressing oxidative stress[J]. Stroke, 2015, 46(2):513-519.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81804135)

* 副主任中医师, 博士研究生。研究方向:中西医结合防治妇科疾病。E-mail: yjwfon@163.com

通信作者: 主任中医师, 博士。研究方向: 生殖健康与生殖障碍的中医药研究。E-mail: 9L701@163.com

(收稿日期:2020-09-02 修回日期:2020-12-10)
(编辑:罗 瑞)

Study on Improvement Effects and Mechanism of Guizhi Fuling Pills on Phlegm-dampness Type PCOS Model Rats

YU Jingwei^{1, 2}, ZHONG Xiaoying³, ZENG Lei³, ZHENG Yongxia¹ (1. Dept. of TCM Gynecology, He Xian Memorial Hospital of Panyu District of Guangzhou, Guangzhou 511400, China; 2. Science and Technology Industrial Park of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510445; 3. First College of Clinical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect and mechanism of Guizhi fuling pill (GZFLP) on rats with phlegm-dampness type polycystic ovary syndrome(PCOS).METHODS: Totally fifty female SD rats with regular estrous cycle were randomly divided into blank control group ($n=10$) and model group ($n=40$). The model group received letrozole intragastrically [1 mg/(kg·d), for 21 d] to induce phlegm-damp PCOS rat model. Forty model rats were randomly divided into model group, metformin group [positive control, 0.135 g/(kg·d)] and GZFLP low-dose, high-dose groups [4.49, 17.96 g/(kg·d)], with 10 rats in each group. Each medicine group was given intragastric administration, once a day, for 30 consecutive days. Blank control and model group were given intragastric administration of equal volume normal saline. After last medication, oral glucose tolerance test (OGTT) was used to detect the level of blood glucose in rats at 0, 30, 60 and 120 min. ELISA assay was used to detect the levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E_2) and testosterone (T); body weight, the weight of uterus, bilateral ovaries and paragonadal fat were weighed. HE staining was used to observe morphological changes of ovarian tissue sections. RT-PCR method and Western blotting assay were used to detect mRNA and protein expression of CYP19a1 in ovary and Glut4 in uterine. RESULTS: Compared with blank control group, the levels of blood glucose 30, 60, 120 min after intragastric administration of glucose solution as well as serum levels of LH, E_2 and T were increased significantly in model group ($P<0.05$); the body weight, the weight of uterus, bilateral ovaries and paragonadal fat were increased significantly ($P<0.05$); the volume of theca cells increased significantly and showed spherical shape; the mRNA and protein expression of CYP19a1 in ovarian tissue and Glut4 in uterine tissue were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, above indexes of administration groups were improved significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); the thickness of theca cell layer and the volume of theca cells in GZFLP low-dose and high-dose groups were also improved. CONCLUSIONS: GZFLP can up-regulate the expression of CYP19a1 in ovary and Glut4 in uterus, so as to improve the abnormal glucose metabolism in phlegm-dampness type PCOS model rats, reduce insulin resistance, lower serum estrogen levels, and reduce the degree of polycystic changes in ovary, thereby playing a role in the treatment of PCOS.

KEYWORDS Guizhi fuling pills; Phlegm-dampness type polycystic ovarian syndrome; Insulin resistance; Aromatase; Glucose transporter 4

多囊卵巢综合征 (Polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见的内分泌紊乱综合征, 好发于青春期及育龄期妇女, 以卵巢功能障碍和代谢异常为特征, 多伴有持续性排卵障碍、高雄激素血症、高胰岛素血症、肥胖和卵巢多囊样改变等表现^[1-2]。已有研究证实, 芳香化酶 (CYP19a1)、葡萄糖转运蛋白 4 (Glut4)、亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 等基因的表达变化与 PCOS 的发病有一定的相关性^[3-5]。PCOS 的总体发病率为 8% ~ 13%^[6], 是导致无排卵性不孕最常见的原因^[7], 并能显著增加 2 型糖尿病、心脑血管疾病、卵巢癌等远期并发症的风险^[8-9]。现代中医研究认为, 痰湿是 PCOS 的主要病因之一^[10-11], 与非痰湿证患者相比, 痰湿证患者肥胖的发生率更高, 且胰岛素抵抗、糖脂代谢异常的程度较重, 呈正相关关系^[12-13]。因此, PCOS 临床治疗多以改善胰岛素抵抗、调节内分泌代谢水平等为原则^[14-15]。

桂枝茯苓丸是源自《金匱要略》的经典名方, 由桂枝、茯苓、芍药、桃仁、牡丹皮组成, 广泛用于妇产科等疾病的治疗。临床报道显示, 桂枝茯苓丸有活血化瘀、消癥散积之功效, 能够增加胰岛素敏感性、减轻炎症反应及氧化应激反应、改善胰岛素抵抗、降低体内胰岛素与

雄激素水平, 从而有效改善卵巢功能、提高妊娠成功率, 对 PCOS 预后具有积极作用^[16-17]。但是, 目前并未有将桂枝茯苓丸与中医痰湿型 PCOS 证候联系在一起的研究。鉴于此, 本课题组以动物实验为基础, 从血清甾体激素水平、卵巢形态学变化、卵巢组织中 CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的 mRNA 及蛋白表达等角度, 探讨桂枝茯苓丸对痰湿型 PCOS 大鼠的改善作用及可能机制, 为桂枝茯苓丸的临床推广应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

XMark 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); PIDRed 96 型聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪 (德国 Biometra 公司); RM2245 型冰冻切片仪 (北京世贤远东科学仪器有限公司); EG1150 型包埋机、SM2000R 型石蜡滑动式切片仪 (德国 Leica 公司); BX-2 型生物显微镜 (日本 Olympus 公司); Quintix 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); CF10 型全自动分析仪 (武汉明德生物有限公司); ZF-208 型凝胶成像系统 (上海恒勤仪器设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

桂枝茯苓丸 (明致集团万荣药业有限公司, 批号:

A14000011996,规格:2.2 g/丸);二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:B14202013163,规格:0.5 g/片);来曲唑片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:A14202157792,规格:2.5 mg/片);羧甲基纤维素(CMC,江苏奥福生物科技有限公司,批号:H19991223);羊抗大鼠CYP19a1单克隆抗体、羊抗大鼠Glut4单克隆抗体、羊抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗大鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗、血糖测试纸以及大鼠促卵泡生成激素(FSH)、大鼠黄体生成素(LH)、大鼠睾酮(T)、大鼠雌二醇(E₂)酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:22944764、20441354、22142129、23865472、23841657、23461810、23667503、23579014、23248655);Trizol试剂、ECL化学发光试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(美国Peprotech公司,批号:021468、022324、002344、224677);反转录试剂盒(日本Takara公司,批号:191334CC);实时荧光定量-PCR试剂盒(美国AB-Clonal公司,批号:A4376);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

55只成年SD大鼠,SPF级,10周龄,雌性,体质量200~220 g,由广州中医药大学实验动物中心提供[动物生产合格证编号:SCXK(粤)2018-0034]。动物房温度为(22±2)℃、相对湿度为50%。本研究获得广州中医药大学动物伦理委员会的批准。

2 方法

2.1 造模

将55只大鼠先适应性饲养3 d,期间喂以颗粒饲料、自由饮水,并每日清晨行阴道分泌物涂片检查,选取动情周期规律的大鼠共50只进入正式实验。在50只入组大鼠中随机抽取10只作为空白对照组($n=10$),另外40只作为造模组($n=40$)。造模组大鼠采用灌胃来曲唑[1 mg/(kg·d),以10 g/L CMC溶液制备药液]连续21 d来诱导建立痰湿型PCOS模型,空白对照组同法大鼠灌胃等量10 g/L CMC溶液,灌胃体积均为4 mL/(kg·d)^[18]。于造模第21天时,检查大鼠阴道分泌物涂片,若持续出现角化细胞、失去动情周期,则视为造模成功^[19]。

2.2 分组与给药

将造模成功的40只大鼠采用随机数字表法随机分为模型组、二甲双胍组[阳性对照,0.135 g/(kg·d),相当于成人临床剂量]^[20]和桂枝茯苓丸低、高剂量组[4.49、17.96 g/(kg·d),分别相当于成人剂量的1、4倍]^[19],每组10只。造模成功后的第2天各药物组大鼠开始灌胃给药(药物以生理盐水配制成相应药液),每天1次,连续给药30 d;空白对照组和模型组大鼠同法灌胃等体积生理盐水。

2.3 口服葡萄糖耐量实验

末次给药结束后,各组大鼠禁食不禁水12 h,然后

按2 g/kg(以葡萄糖量计)灌胃50%葡萄糖溶液。分别在灌胃前(0 min)和灌胃后30、60、120 min时,于大鼠尾静脉取血,采用GOP-POD终点法^[21]在全自动分析仪中测定大鼠的血糖水平。

2.4 大鼠体质量和血清中甾体激素水平检测

口服葡萄糖耐量实验结束24 h后,对所有大鼠禁食不禁水12 h,次日清晨测定其体质量,然后腹腔注射10%水合氯醛将其麻醉,自眼眶后静脉丛取血。将血样以2 000 r/min离心10 min,分离血清,采用ELISA法检测血清中FSH、LH、E₂、T水平,具体操作严格按照相应试剂盒说明书进行。

2.5 大鼠脏器质量测定和卵巢组织形态学观察

取血后,将大鼠以颈椎脱臼处死,剖腹取出并分离子宫、双侧卵巢、性腺旁脂肪,清洗后称定质量并记录。取一半卵巢组织,用10%中性福尔马林固定液固定、石蜡包埋,常规进行组织连续切片(厚度10 μm),再脱蜡、水化后,行常规苏木精-伊红(HE)染色,以中性树脂封片,在显微镜下观察大鼠卵巢组织的形态学变化。余下的组织置于-80℃冰箱中保存,待测。

2.6 大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA表达水平检测

采用RT-PCR法进行检测。分别称取大鼠卵巢组织和子宫组织各约100 mg,剪碎后,采用Trizol法提取组织总RNA,并逆转录获得cDNA。经鉴定后,以cDNA为模板进行RT-PCR扩增。反应体系(共20 μL):SYBR荧光染料10 μL,上、下游引物各2 μL,cDNA模板4 μL,无核酸酶水2 μL。反应条件:94℃变性1 min,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,重复45个循环。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法分析大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA表达水平。引物序列及产物长度见表1。

表1 引物序列及产物长度

基因名称	引物序列	产物长度, bp
CYP19a1	上游:5'-GGGAAAAATCCGCACACAC-3'	138
	下游:5'-AGTTTGCTGCCGAATCGAGA-3'	
Glut4	上游:5'-AGGCACCTCACTACCCITTT-3'	106
	下游:5'-TTTCCTTCCCAACCATTTGAG-3'	
GAPDH	上游:5'-GGGAGCCAAAAGGGTCATCA-3'	78
	下游:5'-CCACCTGGTGCTCAGTGTAG-3'	

2.7 大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的蛋白表达水平检测

采用Western blotting法进行检测。分别取大鼠卵巢组织和子宫组织适量,加入裂解液使其充分裂解,然后以12 000 r/min离心15 min,取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸5 min变性后,取30 μg进行SDS-PAGE,然后以恒流(100 mA,2 h)电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上;用5%脱脂奶粉于室温封闭1 h后,加入CYP19a1、Glut4、GAPDH一抗(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜3次,加入二抗(稀释

度为1:200),室温孵育1h;采用ECL化学试剂盒显色后,在凝胶成像系统中成像。采用ImageJ V 1.8.0.112图像分析软件进行分析,以目标蛋白条带与内参GAPDH蛋白条带的灰度值之比表示目标蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠灌胃葡萄糖不同时段的血糖水平检测结果

在灌胃葡萄糖溶液前(0 min时),各组大鼠之间血糖水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在灌胃葡萄糖溶液30、60、120 min时,与空白对照组比较,模型组大鼠血糖水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,二甲双胍组和桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠血糖水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与二甲双胍组比较,桂枝茯苓丸高剂量组大鼠的血糖水平在灌胃葡萄糖溶液120 min时显著降低($P < 0.05$)。与桂枝茯苓丸低剂量组比较,桂枝茯苓丸高剂量组大鼠的血糖水平在各个时段差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠灌胃葡萄糖溶液不同时段的血糖水平检测结果见表2。

表2 各组大鼠灌胃葡萄糖溶液不同时段的血糖水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Blood glucose in rats of each group after intra-gastric administration of glucose at different time points($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	0 min	30 min	60 min	120 min
空白对照组	4.61 ± 0.23	7.02 ± 0.33	6.05 ± 0.24	4.48 ± 0.32
模型组	4.63 ± 0.19	8.89 ± 0.14 [*]	7.62 ± 0.14 [*]	5.74 ± 0.22 [*]
二甲双胍组	4.58 ± 0.14	7.50 ± 0.15 ^{##}	6.53 ± 0.24 ^{##}	4.79 ± 0.36 ^{##}
桂枝茯苓丸低剂量组	4.32 ± 0.13	7.82 ± 0.22 [#]	6.95 ± 0.25 [#]	5.13 ± 0.34 [#]
桂枝茯苓丸高剂量组	4.55 ± 0.16	7.34 ± 0.13 ^{##}	6.49 ± 0.26 ^{##}	4.46 ± 0.31 ^{###}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与二甲双胍组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; vs. metformin group, ^Δ $P < 0.05$

3.2 大鼠血清中甾体激素水平检测结果

各组大鼠血清中FSH水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与空白对照组比较,模型组大鼠血清中LH、E₂、T水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组和桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠血清中LH、E₂、T水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且各药物组之间上述指标水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中FSH、LH、E₂、T水平检测结果见表3。

3.3 大鼠体质量和脏器质量的检测结果

与空白对照组比较,模型组大鼠的体质量以及子宫、性腺旁脂肪质量均显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较,二甲双胍组和桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠的体质量以及子宫、性腺旁脂肪质量均显著降低($P < 0.05$),

表3 各组大鼠血清中FSH、LH、E₂、T水平检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

Tab 3 Serum levels of FSH, LH, E₂ and T in rats of each group($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

组别	FSH	LH	E ₂	T
空白对照组	3.62 ± 0.34	3.13 ± 0.11	1.27 ± 0.25	2.38 ± 0.14
模型组	3.74 ± 0.28	3.79 ± 0.14 [*]	1.74 ± 0.19 [*]	2.95 ± 0.12 [*]
二甲双胍组	3.67 ± 0.25	3.37 ± 0.15 ^{##}	1.40 ± 0.18 ^{##}	2.41 ± 0.16 ^{##}
桂枝茯苓丸低剂量组	3.73 ± 0.22	3.51 ± 0.22 [#]	1.55 ± 0.23 [#]	2.74 ± 0.13 [#]
桂枝茯苓丸高剂量组	3.65 ± 0.27	3.24 ± 0.16 ^{##}	1.37 ± 0.22 ^{##}	2.38 ± 0.11 ^{##}

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

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

且各药物组之间上述指标水平差异无统计意义($P > 0.05$)。各组大鼠体质量以及卵巢、子宫、性腺旁脂肪质量检测结果见表4。

表4 各组大鼠体质量以及卵巢、子宫、性腺旁脂肪质量检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 4 Body weight and the weight of uterus, ovaries and paragonadal fat in rats of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体质量,kg	卵巢,g	子宫,g	性腺旁脂肪,g
空白对照组	0.28 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.33 ± 0.12	2.24 ± 0.73
模型组	0.44 ± 0.05 [*]	0.19 ± 0.04 [*]	0.48 ± 0.23 [*]	3.67 ± 0.46 [*]
二甲双胍组	0.35 ± 0.03 [#]	0.13 ± 0.03 [#]	0.34 ± 0.22 [#]	3.23 ± 0.47 [#]
桂枝茯苓丸低剂量组	0.36 ± 0.01 [#]	0.15 ± 0.03 [#]	0.39 ± 0.25 [#]	3.28 ± 0.51 [#]
桂枝茯苓丸高剂量组	0.33 ± 0.02 [#]	0.12 ± 0.02 [#]	0.35 ± 0.16 [#]	3.14 ± 0.62 [#]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.4 大鼠卵巢组织形态学观察结果

空白对照组大鼠卵泡膜细胞层无增厚,卵泡膜细胞体积较小、呈梭形;模型组和二甲双胍组大鼠卵泡膜细胞层均明显增厚,卵泡膜细胞体积明显增大、呈圆球形;桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠的卵泡膜细胞层亦有所增厚,但与模型组、二甲双胍组相比较薄,卵泡膜细胞体积也介于空白对照组和模型组、二甲双胍组之间。各组大鼠卵巢组织HE染色结果见图1。

3.5 大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA表达水平检测结果

与空白对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且各药物组之间上述指标水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA表达水平检测结果见表5。

3.6 大鼠卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的蛋白表达水平检测结果

与空白对照组比较,模型组大鼠卵巢组织中

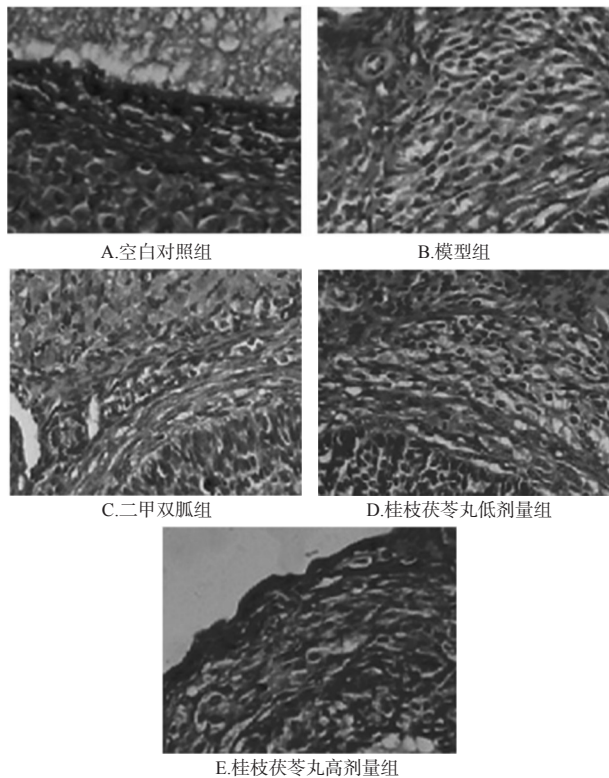


图1 各组大鼠卵巢组织显微图(HE染色, ×200)

Fig 1 Micrograph of ovarian tissue of rats in each group(HE staining, ×200)

表5 各组大鼠卵巢组织中 CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的 mRNA 表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 mRNA expressions of CYP19a1 in ovary and Glut4 in uterus of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	CYP19a1	Glut4
空白对照组	1.01 ± 0.03	1.03 ± 0.12
模型组	0.42 ± 0.02*	0.87 ± 0.13*
二甲双胍组	0.74 ± 0.03**	1.16 ± 0.15**
桂枝茯苓丸低剂量组	0.61 ± 0.01*	0.94 ± 0.20*
桂枝茯苓丸高剂量组	0.90 ± 0.02**	1.21 ± 0.16**

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 桂枝茯苓丸低、高剂量组和二甲双胍组大鼠卵巢组织中 CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且桂枝茯苓丸的作用具有量效关系($P < 0.05$)。与桂枝茯苓丸低剂量组比较, 二甲双胍组和桂枝茯苓丸高剂量组上述指标水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠卵巢组织中 CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的蛋白表达电泳图见图2, 蛋白表达水平检测结果见表6。

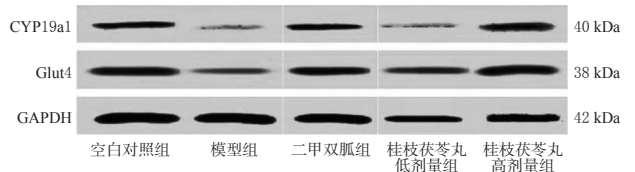


图2 各组大鼠卵巢组织中 CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of CYP19a1 in ovarian tissue and Glut4 in uterine tissue of rats in each group

表6 各组大鼠卵巢组织中 CYP19a1 和子宫组织中 Glut4 的蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Protein expression of CYP19a1 in ovarian tissue and Glut4 in uterine tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	CYP19a1/GAPDH	Glut4/GAPDH
空白对照组	2.53 ± 0.35	4.67 ± 1.05
模型组	0.85 ± 1.24**	1.26 ± 1.23**
二甲双胍组	2.16 ± 2.08***	2.71 ± 1.24***
桂枝茯苓丸低剂量组	1.15 ± 1.65*	1.54 ± 1.72*
桂枝茯苓丸高剂量组	2.18 ± 1.77***	2.83 ± 1.56***

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型相比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与桂枝茯苓丸低剂量组比较, * $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; vs. GZFLP low-dose group, * $P < 0.05$

4 讨论

PCOS 作为妇科常见的内分泌紊乱综合征, 是复杂的多因素疾病, 与遗传基因、生活方式、心理因素等均有联系^[22]。根据 PCOS 的临床特征与表现, 该病属于祖国医学“闭经”“癥瘕”“不孕”等范畴, 与肾、肝、脾三脏相关。脾肾阳虚、温煦气化失常可致水液积聚而成痰湿之邪, 肝失疏泄无法通调水道则加剧痰湿阻塞胞宫, 形成癥瘕, 最终导致不孕^[23]。一般认为, 胰岛素抵抗是 PCOS 的核心病理、生理特征之一, 大约 50%~75% 的 PCOS 患者均患有不同程度的胰岛素抵抗^[24]。目前, 临床治疗 PCOS 主要使用降低雄激素水平、促排卵和胰岛素增敏剂等类型为主的药物^[25-26]。近年来, 中医药在 PCOS 治疗上的应用越来越受关注。研究证实, 桂枝茯苓丸对大鼠卵巢趋化因子——细胞因子诱导性中性白细胞趋化因子(CINC)的分泌有直接促进作用, 同时还能减轻卵巢多囊样改变、改善血流供应, 从而促进排卵、恢复卵巢功能, 对 PCOS 有一定的改善作用^[27]。

本研究采用灌胃来曲唑的方法进行痰湿型 PCOS 造模, 主要是基于芳香化酶是雄激素向雌激素转化的限速酶, 而来曲唑是一种芳香化酶抑制剂, 给药后可使体内雄激素水平升高, 并进展成为多囊卵巢^[28]。结果显示, 造模后, 大鼠卵巢形态学改变明显, 体质量以及卵巢、子宫、性旁腺脂肪质量均显著增加, 血清中甾体激素 LH、E₂、T 水平均显著降低, 这与痰湿型 PCOS 患者的实验室

检查结果相似^[29],因此可以认为来曲唑造模大鼠符合痰湿型PCOS的表现。二甲双胍作为临床上常用的胰岛素增敏剂,可抑制肝糖原异生和葡萄糖的输出,提高外周组织对胰岛素的敏感性,抑制胰岛素分泌,进而减轻胰岛素抵抗状态^[30]。因二甲双胍同时也是临床治疗PCOS的常用药物之一,故本研究以其为阳性对照药物。

由本研究结果可看出,桂枝茯苓丸与二甲双胍不仅能够明显降低痰湿型PCOS模型大鼠的体质量以及卵巢、子宫、性腺旁脂肪的质量,还能降低其血清中甾体激素(LH、E₂、T)水平以及糖耐量实验中各测试时段的血糖水平。这提示桂枝茯苓丸具有与二甲双胍相似的功效,即通过调节机体糖代谢水平,降低痰湿型PCOS模型大鼠体质量及性腺旁脂肪的质量,提高机体对胰岛素的敏感性,缓解高胰岛素血症;同时,可使甾体激素水平接近正常值,从而改善内分泌紊乱及代谢异常,最终达到恢复卵巢功能的作用^[16,31]。但本研究中各组大鼠血清中FSH水平差异均无统计学意义,这可能与造模方法相关,由于PCOS的发病过程受多种因素调控影响,故难以用一种特定的造模方法完全模拟临床上PCOS患者的发病过程和代谢水平的改变^[29],这也是本研究的不足之一。

在本研究中,与空白对照组比较,痰湿型PCOS模型大鼠的卵巢增大,卵巢内卵泡呈多囊样改变,卵泡膜细胞体积增大、细胞层增厚,病理表现与临床痰湿型PCOS患者相符^[29]。经药物干预后,桂枝茯苓丸组大鼠卵泡膜细胞层虽有增厚,但较模型组和二甲双胍组薄,卵泡膜细胞体积也介于空白对照组和模型组、二甲双胍组之间。以上结果说明,与二甲双胍比较,桂枝茯苓丸更能减轻大鼠卵巢多囊样改变的程度,加快其排卵功能的恢复,治疗痰湿型PCOS的效果更佳。

CYP19a1基因位于染色体15q21.2区段上,其编码产物芳香化酶P₄₅₀在雄激素代谢中发挥着重要作用,是催化雄激素转化为雌激素的关键酶^[32-33]。相关研究证实,CYP19a1基因突变、表达下调或芳香化酶的活性降低均可直接造成卵巢性的高雄激素血症和增加PCOS的发生风险。如Yu YY等^[34]观察到在PCOS患者卵巢组织中由于启动子高甲基化,CYP19a1的mRNA及其蛋白表达均受到抑制,从而引起雄激素过多和促性腺激素分泌异常,而这一过程在PCOS的发病中起关键作用;再如Wang H等^[35]进行病例对照研究时发现,CYP19a1基因中常见的遗传变异可预测PCOS发生的风险,如该基因的Arg(264)Cys变体会影响芳香化酶的活性,导致雄烯二酮向雌激素的转化增加,证明CYP19a1基因与PCOS的病理发展过程相关。本研究也发现,痰湿型PCOS模型大鼠卵巢组织中CYP19a1 mRNA和蛋白表达水平显著降低,灌胃桂枝茯苓丸后大鼠卵巢组织中CYP19a1 mRNA和蛋白表达水平又显著升高,说明桂枝茯苓丸可通过上调卵巢组织中CYP19a1基因的表达,增加其体内mRNA

和蛋白水平,从而促进激素转化、降低雄激素水平、调节激素紊乱,达到治疗痰湿型PCOS的目的。

Glut4被称为胰岛素敏感性转运蛋白,由SLC244基因编码,共含有509个氨基酸,可存在于子宫内中,是葡萄糖转运的主要载体,通过调控机体类固醇激素水平,从而影响子宫内中细胞的增殖、分化、分泌和凋亡^[36-37]。已有研究显示,肥胖型PCOS患者伴有显著的胰岛素抵抗水平升高及Glut4活性降低,胰岛素抵抗可导致Glut4葡萄糖信号的跨膜转运异常、局部细胞受损,进而导致子宫内中功能异常,并增加了胚胎着床失败和流产的风险^[5];而Glut4的功能障碍也会进一步加剧胰岛素抵抗,各种因素之间相互作用产生恶性循环,加速PCOS病情的发展^[38]。Sato K等^[39]发现,过高的T水平可通过骨骼肌中的丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)等途径影响Glut4蛋白正常的表达和转运,是PCOS发病的病理过程之一。在本研究中,与模型组比较,桂枝茯苓丸低、高剂量组大鼠子宫组织中Glut4 mRNA和蛋白表达水平显著升高,提示桂枝茯苓丸能通过上调Glut4 mRNA和蛋白的表达,进一步促进葡萄糖摄取、改善胰岛素抵抗,从而改善痰湿型PCOS机体子宫内中容受性,有利于恢复生殖功能和避免长期代谢综合征,达到治疗PCOS的目的。

综上所述,本研究初步证实了桂枝茯苓丸可能通过上调卵巢组织中CYP19a1和子宫组织中Glut4的mRNA及蛋白的表达,从而改善痰湿型PCOS模型大鼠的糖代谢异常、减轻胰岛素抵抗、下调血清雌激素水平、减轻卵巢多囊样改变程度,最终起到治疗PCOS的作用。但由于PCOS具有发病机制多样性、临床表现异质性和复杂性的特点,在一定程度上限制了本实验结果的准确性,故桂枝茯苓丸治疗PCOS的具体作用机制有待后续研究进一步验证和完善。

参考文献

- [1] TAN Q. Deciphering the DNA methylome of polycystic ovary syndrome[J]. Mol Diagn Ther, 2020, 24(3): 245-250.
- [2] 贾汝楠,刘玉兰.多囊卵巢综合征中西医研究进展[J].世界中医药,2020,15(12):1827-1831.
- [3] 甄鑫,颜桂军,孙海翔,等. CYP19A1基因多态性与多囊卵巢综合征的相关性研究[J].医学研究生学报,2014,27(6):596-599.
- [4] 冯婉琴,潘沅,张懿,等. MTHFR和MTRR基因多态性与多囊卵巢综合征的相关性研究[J].现代妇产科进展,2020,29(11):825-829.
- [5] 丛培玮,吴兆利,张丽娜,等.固本化痰法通过影响多囊卵巢综合征大鼠GLUT4/Akt表达调控胰岛素抵抗作用的机制研究[J].中华中医药学刊,2019,37(8):1872-1876、2052.
- [6] MORAN LJ, TASSONE EC, BOYLE J, et al. Evidence summaries and recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and manage-

- ment of polycystic ovary syndrome: lifestyle management[J]. *Obes Rev*, 2020. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.004.
- [7] 多囊卵巢综合征相关不孕治疗及生育保护共识专家组, 中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 多囊卵巢综合征相关不孕治疗及生育保护共识[J]. *生殖医学杂志*, 2020, 29(7): 843-851.
- [8] 陈京京, 常惠, 陈莹莹, 等. 多囊卵巢综合征合并心血管疾病预测标记物的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2019, 46(5): 545-548.
- [9] ANDERSEN M, GLINTBORG D. Diagnosis and follow-up of type 2 diabetes in women with PCOS: a role for OGTT?[J]. *Eur J Endocrinol*, 2018, 179(3): D1-D14.
- [10] 常久, 李晓君. 多囊卵巢综合征中医证型分布特点的现代文献研究[J]. *中国性科学*, 2014, 23(3): 60-63.
- [11] 唐培培, 谈勇. 多囊卵巢综合征证型及证候要素分布规律的文献研究[J]. *江苏中医药*, 2017, 49(1): 66-68.
- [12] 杨艳婷, 侯丽辉, 孙森, 等. 痰湿证多囊卵巢综合征不孕患者临床体征及生化指标的分析[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(15): 92-95.
- [13] 高金金, 侯丽辉, 李妍. 应用补肾化痰法治疗多囊卵巢综合征的研究进展[J]. *中医药信息*, 2016, 33(2): 112-114.
- [14] WIWEKO B, INDRA I, SUSANTO C, et al. The correlation between serum AMH and HOMA-IR among PCOS phenotypes[J]. *BMC Res Notes*, 2018. DOI: 10.1186/s13104-018-3207-y.
- [15] 陈欣欣, 施晓莎, 王婷, 等. 多囊卵巢综合征中西医结合治疗临床研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(2): 61-64.
- [16] 林菁, 徐滢, 张爱华, 等. 桂枝茯苓丸联合西药治疗多囊卵巢综合征的效果[J]. *中国卫生标准管理*, 2019, 10(23): 92-94.
- [17] 张丽芸, 殷文俏. 桂枝茯苓丸辅助治疗对PCOS伴胰岛素抵抗患者的影响[J]. *中药材*, 2016, 39(7): 1661-1663.
- [18] 亓妍妍, 孟欣, 张琳, 等. 多囊卵巢综合征模型的构建与分析[J]. *产业与科技论坛*, 2019, 18(1): 56-58.
- [19] 曾蕾, 赵红艳, 罗颂平. 改良PCOS-IR大鼠模型的设计与实验[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(12): 2341-2345.
- [20] 黄晓, 吉柳, 谢红梅, 等. 二甲双胍治疗多囊卵巢综合征研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(12): 1143-1145.
- [21] 徐晓娟, 黄映红, 姚莉娟, 等. 来曲唑和脱氢表雄酮建立肾虚痰湿特征信息肥胖PCOS大鼠动物模型的对比研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(5): 511-514, 529.
- [22] 杨琦, 邓玲. 多囊卵巢综合征的研究进展[J]. *江西医药*, 2020, 55(6): 790-792.
- [23] 李春瑶, 赵粉琴. 中医药论治多囊卵巢综合征研究进展[J]. *中医药学报*, 2020, 48(10): 79-82.
- [24] HACKBART KS, CUNHA PM, MEYER RK, et al. Effect of glucocorticoid-induced insulin resistance on follicle development and ovulation[J]. *Biol Reprod*, 2013. DOI: 10.1095/biolreprod.113.107862.
- [25] BEDNARSKA S, SIEJKA A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: what's new?[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(2): 359-367.
- [26] JIN P, XIE Y. Treatment strategies for women with polycystic ovary syndrome[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(4): 272-277.
- [27] 牛越贤治郎. 当归芍药散及桂枝茯苓丸对大鼠卵巢细胞培养系CINC分泌的影响[J]. *国外医学: 中医中药分册*, 2001, 23(4): 216-217.
- [28] 蔡云, 许昕. 来曲唑联合高脂饲料建立PCOS-IR大鼠模型实验研究[J]. *首都医科大学学报*, 2017, 38(2): 244-248.
- [29] 姚莉娟, 徐晓娟, 王婧婧, 等. 体现中医病因病机的多囊卵巢综合征动物模型评价及筛选[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2014, 16(10): 2137-2148.
- [30] WANG YW, HE SJ, FENG X, et al. Metformin: a review of its potential indications[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017. DOI: 10.2147/dddt.s141675.
- [31] 丁淑珍, 马斐飞. 桂枝茯苓丸对多囊卵巢综合征模型大鼠激素水平的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2013, 48(6): 408-409.
- [32] GARG D, MERHI Z. Relationship between advanced glycation end products and steroidogenesis in PCOS[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016. DOI: 10.1186/s12958-016-0205-6.
- [33] GU Y, XU W, ZHUANG B, et al. Role of A-kinase anchoring protein 95 in the regulation of cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1) in human ovarian granulosa cells[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(8): 1128-1136.
- [34] YU YY, SUN CX, LIU YK, et al. Promoter methylation of CYP19A1 gene in Chinese polycystic ovary syndrome patients[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2013, 76(4): 209-213.
- [35] WANG H, LI Q, WANG T, et al. A common polymorphism in the human aromatase gene alters the risk for polycystic ovary syndrome and modifies aromatase activity in vitro[J]. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17(6): 386-391.
- [36] FROLOVA AI, MOLEY KH. Glucose transporters in the uterus: an analysis of tissue distribution and proposed physiological roles[J]. *Reproduction*, 2011, 142(2): 211-220.
- [37] CRITCHLEY HO, SAUNDERS PT. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium[J]. *Reprod Sci*, 2009, 16(2): 191-199.
- [38] ESCOBAR-MORREALE HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(5): 270-284.
- [39] SATO K, IEMITSU M, AIZAWA K, et al. Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(5): E961-E968.

(收稿日期: 2020-04-14 修回日期: 2020-12-04)

(编辑: 林 静)