补肾强身片对多囊卵巢综合征模型大鼠的干预作用及机制研究Δ

张明昊[1*]，高一盈[1]，董文霞[1]，薛鹏坤[1]，马伟洋[1]，张大伟[2]，马丽亚[3#]（1.河南中医药大学医学院，郑州 450046；2.河南中医药大学第三附属医院妇产科，郑州 450008；3.河南中医药大学临床技能实训中心，郑州 450046）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2022）21-2632-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.13

摘 要 目的 研究补肾强身片对多囊卵巢综合征（PCOS）模型大鼠的干预作用及机制。**方法** 将50只大鼠灌胃来曲唑混悬液（1 mg/kg，每天1次，连续21 d）复制PCOS模型。将造模成功的大鼠分为模型组、阳性对照组（炔雌醇环丙孕酮片0.2 mg/kg+盐酸二甲双胍片230 mg/kg）和补肾强身片低、中、高剂量组（189、378、756 mg/kg），每组10只。另取10只未造模大鼠作为正常组。各组大鼠给予相应药物干预，每天1次，连续30 d。末次给药24 h后，检测大鼠血清中雌二醇（E_2）、睾酮（T）、促性腺激素释放激素（GnRH）、促卵泡激素（FSH）和促黄体生成素（LH）水平，计算大鼠卵巢系数，观察大鼠卵巢组织病理形态学变化，检测大鼠卵巢组织中磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）、磷酸化蛋白激酶B（p-Akt）、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（p-mTOR）和葡萄糖转运蛋白4（GLUT4）的表达水平以及PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA表达水平。**结果** 与正常组比较，模型组大鼠卵巢系数、卵巢囊性病变评分均显著增加（$P<0.05$），血清中T、GnRH、LH水平均显著升高（$P<0.05$），血清中FSH、E_2水平和卵巢组织中PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4蛋白表达水平及PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$），卵巢组织中闭锁卵泡及无卵丘的囊性卵泡数量增多，卵泡颗粒细胞层数减少。与模型组比较，补肾强身片中、高剂量组大鼠上述指标水平均显著逆转（$P<0.05$），低剂量组上述大部分指标水平显著逆转（$P<0.05$），卵巢组织病变均不同程度改善。**结论** 补肾强身片可调节PCOS模型大鼠性激素分泌水平，改善卵巢囊性病变，其作用机制可能与上调PI3K/Akt/mTOR、PI3K/Akt/GLUT4两条信号通路有关。

关键词 补肾强身片；多囊卵巢综合征；PI3K/Akt/mTOR信号通路；PI3K/Akt/GLUT4信号通路

Study on intervention effect of Bushen qiangshen tablet on polycystic ovary syndrome model rats and its mechanism

ZHANG Minghao[1], GAO Yiying[1], DONG Wenxia[1], XUE Pengkun[1], MA Weiyang[1], ZHANG Dawei[2], MA Liya[3]（1. Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Dept. of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. Clinical Skills Training Center, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China）

ABSTRACT OBJECTIVE To study the intervention effect of Bushen qiangshen tablet on polycystic ovary syndrome (PCOS) model rats and its mechanism. **METHODS** Totally 50 rats were given letrozole suspension (1 mg/kg, once a day, for consecutive 21 d) instragastrically to induce PCOS model. Model rars were randomly divided into model group, positive control group (Ethinylestradiol and cyproterone acetate tables 0.2 mg/kg+Metformin hydrochloride tables 230 mg/kg), Bushen qiangshen tablet low-dose, medium-dose and high-dose groups (189, 378, 756 mg/kg), with 10 rats in each group. Another 10 healthy rats were included in normal group. Each group was given the corresponding drugs, once a day, for consecutive 30 d. Twenty-four hours after the last administration, serum levels of estrogen (E_2), testosterone (T), gonadotropin-releasing hormone (GnRH), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured. The ovary index was calculated, and pathological changes of ovary were observed. The protein expressions of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) and glucose transporter 4 (GLUT4) in ovary were detected, and mRNA expressions of PI3K, Akt, mTOR and GLUT4 in ovary were detected. **RESULTS** Compared with normal group, ovarian index and ovarian cystic disease score were significantly increased in model group ($P<0.05$), and serum levels of T, GnRH and LH were significantly increased ($P<0.05$); serum levels of FSH and E_2, protein expressions of PI3K, p-Akt, p-mTOR and GLUT4, and mRNA expression of PI3K, AKT, mTOR and GLUT4 in ovarian tissue were all significantly decreased in the model group ($P<0.05$); in ovarian tissue, the number of atresia follicles and non-cumulus cystic follicles increased, and the number of granulosa cell layers decreased. Compared with model group, above indexes of Bushen qiangshen tablet medium-dose and high-dose groups were reversed significantly ($P<0.05$), and most above indexes of low-dose group were

Δ **基金项目** 河南省科技发展计划项目（No.222102310139）；河南中医药大学科研苗圃工程项目（No.MP2020-98）

＊**第一作者** 高级实验师，硕士。研究方向：基础药理学。E-mail：zhangminghao@hactcm.edu.cn

通信作者 副教授，硕士。研究方向：中医妇科学。电话：0371-86550201。E-mail：mary868@163.com

reversed significantly ($P<0.05$), the pathological changes of ovarian tissue were improved to varying degrees. **CONCLUSIONS** Bushen qiangshen tablet can regulate the secretion of sex hormones in PCOS model rats and improve ovarian cystic lesions. Its mechanism may be related to the upregulation of PI3K/Akt/mTOR and PI3K/Akt/GLUT4 signaling pathways.

KEYWORDS Bushen qiangshen tablet; polycystic ovary syndrome; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; PI3K/Akt/GLUT4 signaling pathway

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）属妇科内分泌疾病范畴，常见于青春期和育龄期女性，主要临床症状为月经失调、慢性无排卵、雄激素水平升高及卵巢多囊样改变，并伴随生殖功能障碍、胰岛素抵抗（insulin resistance，IR）等代谢异常症状[1]。目前西医治疗PCOS多以激素替代、调经及促排卵为主，但患者妊娠率低，且存在子宫异常出血、胃肠道不适、肝功能损害等多种副反应[2－3]。中医古籍尚无PCOS记载，根据临床表现可将其归为“不孕症”“闭经”“月经过少”“月经后期”“癥瘕”范畴，其发病以肾虚为本，继发肝瘀、脾虚、痰饮、水湿互结，终成PCOS[4－5]。故中医治疗PCOS多从补益脾肾入手，进而补肾助阳、温通胞络、滋阴填精，疗效明显[6]。

补肾强身片是由淫羊藿、菟丝子、金樱子、女贞子和狗脊（烫）5味中药加工而成的中药成方制剂，收录于《卫生部药品标准中药成方制剂》（第十五册），具有补肾强身的功效。方中淫羊藿、菟丝子均可治疗PCOS，且作用机制与磷脂酰肌醇3激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路相关[7－8]。该通路的下游信号蛋白有哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）和葡萄糖转运蛋白4（glucose transporter 4，GLUT4），可以分别调控细胞自噬和胰岛素抵抗，进而影响卵泡发育和卵巢多囊性改变[9]，且临床研究中也证实了PCOS患者存在PI3K、Akt水平降低的情况[10]。基于此，笔者建立PCOS模型大鼠模型，观察补肾强身片对大鼠激素水平及卵巢病理变化的影响，并基于PI3K/Akt/mTOR和PI3K/Akt/GLUT4信号通路探讨补肾强身片的作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有BSA124S-CW型电子天平（德国Sartorius公司），SpectraMax iD3型酶标仪[美谷分子仪器（上海）有限公司]，RM2235型石蜡切片机（德国Leica公司），L720R-3型冷冻离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司），YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机（金华市科迪仪器设备有限公司），CX23型光学显微镜（日本Olympus公司），StepOne™型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有补肾强身片[景忠山国药（唐山）有限公司，批号200502，规格0.28 g/片]，炔雌醇环丙孕酮片（拜耳医药保健有限公司，批号KT062FL2，规格0.2 mg/片），盐酸二甲双胍片（上海寿如松药业泌阳制药有限公司，批号20031702，规格0.25 g/片），来曲唑（上海麦克林生化科技有限公司，批号C12785740），羧甲基纤维素钠（CMC-Na，国药集团化学试剂有限公司，批号20160704），氨基甲酸乙酯（天津市光复科技发展有限公司，批号20210902），苏木素染色液、伊红染色液（福州飞净生物科技有限公司，批号分别为190805、20211009），雌二醇（estrogen，E_2）、睾酮（testosterone，T）、促性腺激素释放激素（gonadotropin-releasing hormone，GnRH）、促卵泡素（follicle stimulating hormone，FSH）、促黄体生成素（luteinizing hormone，LH）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为H102-1、H090-1-2、H297、H101-1-2、H206-1-2），兔SP试剂盒、DAB显色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号分别为SP-9001、ZLI-9018），兔抗大鼠磷酸化Akt（p-Akt）、磷酸化mTOR（p-mTOR）抗体（北京博奥森生物技术有限公司，批号分别为bs-6417R、bs-5331R），兔抗大鼠PI3K抗体、兔抗大鼠GLUT4抗体、总RNA提取试剂、cDNA合成试剂盒、实时荧光定量PCR扩增试剂（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号分别为GN11769、GB11244、R1100、G3330、G3320）。PCR引物根据GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）已发表的大鼠*PI3K*、*Akt*、*mTOR*、*GLUT4*、*GAPDH*基因序列设计（引物序列及扩增产物长度见表1），并由武汉塞维尔生物科技有限公司合成。

表1 引物序列及扩增产物片段长度

基因	引物序列（5′→3′）	扩增产物片段长度/bp
PI3K	上游引物：AGAGCTTGGAGGACGATGACG	174
	下游引物：TGGACTGGGCTATCTCACTTCG	
Akt	上游引物：CTGGAGGACAACGACTATGGC	215
	下游引物：AGCCTCTGTGTAGGGTCCTTCTT	
mTOR	上游引物：ACCCTCCATCCACCTCATCAG	218
	下游引物：CCTGGTCATTCAGAGCCACAAA	
GLUT4	上游引物：CCTTCTTTGAGATTGGTCCTGG	160
	下游引物：CCCATAGCATCCGCAACATAC	
GAPDH	上游引物：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游引物：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

1.3 动物

本研究所用动物为健康SD雌性大鼠，8周龄，体质量180～200 g，购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场，动物生产许可证号为SCXK（豫）2019-0002。所有大鼠分笼饲养于河南中医药大学医学机能实验室，室温为20～22 ℃，相对湿度为55%～60%，正常光照，期间大鼠

均自由饮水采食。本实验获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号DWLL202201010），实验过程及动物处置严格遵守“3R”原则。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

取大鼠50只，适应性饲养1周后，按1 mg/kg灌胃来曲唑混悬液造模，每天1次，连续21 d，造模第16天开始进行阴道涂片检测，当光镜下可见阴道上皮细胞持续角化则表明造模成功[11]。将造模成功的50只大鼠按体质量随机分为模型组、阳性对照组（炔雌醇环丙孕酮片0.2 mg/kg+盐酸二甲双胍片230 mg/kg，剂量均为临床等效剂量）和补肾强身片低、中、高剂量组（189、378、756 mg/kg，中剂量为临床等效剂量），每组10只。另取10只未造模大鼠作为正常组。上述各药物均以0.1% CMC-Na制成混悬液后进行灌胃给药，灌胃体积为10 mL/kg，正常组大鼠灌胃等体积0.1% CMC-Na溶液，每天给药1次，连续30 d。

2.2 取材及处理

末次灌胃24 h后，各组大鼠称体质量后腹腔注射1 g/kg氨基甲酸乙酯麻醉，腹主动脉取血，血样以3 000 r/min离心10 min，取上层血清于－80 ℃下保存。取血后，将大鼠处死，剖取卵巢，去除周围组织，以生理盐水洗涤后观察卵巢外观形态；以滤纸吸尽卵巢表面液体后称质量，然后将卵巢一分为二，其中一份用4%多聚甲醛固定，另一份用液氮速冻后于－80 ℃下储存。

2.3 大鼠血清中E_2、T、GnRH、FSH、LH水平的检测

取“2.2”项下各组大鼠的血清样品，室温融化，按照试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度，并根据标准曲线计算大鼠血清中E_2、T、GnRH、FSH、LH水平。

2.4 大鼠卵巢系数的计算

统计各组大鼠卵巢质量与体质量，计算卵巢系数（卵巢系数＝卵巢质量/体质量），以此来评价卵巢的病变程度。

2.5 大鼠卵巢组织病理形态学观察

取“2.2”项下固定于4%多聚甲醛的卵巢组织，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片（4 μm）后，以二甲苯脱蜡；取部分切片（其余部分用于免疫组织化学染色），经苏木素-伊红（HE）染色后，以梯度乙醇脱水、中性树胶封片，然后于光学显微镜下观察卵巢组织的病理形态学变化，并根据卵巢囊性病变进行评分：正常记0分；闭锁及无卵丘的囊性卵泡占卵泡总量的百分比≤25%记1分；闭锁及无卵丘的囊性卵泡占卵泡总量的百分比在＞25%～＜50%之间记2分；闭锁及无卵丘的囊性卵泡占卵泡总量的百分比在50%～＜75%之间记3分；闭锁及无卵丘的囊性卵泡占卵泡总量的百分比≥75%记4分[12]。

2.6 大鼠卵巢组织中PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA表达水平的检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。取卵巢组织100 mg，加入TriQuick试剂1 mL充分研磨匀浆后提取总RNA，并检测总RNA浓度及纯度。取总RNA适量，在20 μL反应体系内合成cDNA，再以2 μL cDNA为模板，加入靶基因上下游引物，于15 μL反应体系内进行PCR扩增。反应结束后，根据扩增曲线及溶解曲线判断PCR反应特异性。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA的表达水平。

2.7 大鼠卵巢组织中PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4蛋白表达水平的检测

采用免疫组织化学染色法进行检测。取“2.5”项下各组大鼠剩余的切片，经二甲苯脱蜡、水化后，用柠檬酸盐缓冲液热修复8 min；待切片温度降至室温后，以H_2O_2孵育10 min，PBS浸洗3次，每次3 min；以山羊血清孵育30 min，然后滴加PI3K（稀释度为1∶1 000）、p-Akt（稀释度为1∶100）、p-mTOR（稀释度为1∶100）、GLUT4（稀释度为1∶400）抗体，4 ℃孵育过夜。次日将切片于37 ℃复温30 min，滴加二抗孵育20 min，PBS浸洗3次，每次3 min；以DAB显色10 min，自来水冲洗终止显色；再以苏木素复染切片3 min，经盐酸乙醇分化后，以自来水冲洗，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后，采用显微镜进行观察。每张切片在显微镜下随机选取1个视野，以棕黄色为阳性染色，采用Image-Pro Plus 6.0软件测定每个视野中阳性染色区域的积分光密度（integrated optical density，IOD）值，以表示各蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

数据采用SPSS 26.0软件进行统计分析，计量资料均采用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间方差齐时两两比较采用LSD-t检验，方差不齐时采用Dunnett’s检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠卵巢外观形态的观察结果

正常组大鼠卵巢外观形态正常，呈淡粉色，表面有不规则结节状卵泡；模型组大鼠卵巢稍增大，颜色稍苍白，表面布满小囊，结节状卵泡减少；阳性对照组和补肾强身片各剂量组大鼠卵巢病变情况相对模型组较轻。

3.2 大鼠卵巢系数的计算结果

与正常组比较，模型组大鼠卵巢系数显著增加（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和补肾强肾片各剂量组大鼠卵巢系数显著减小（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　各组大鼠卵巢系数和卵巢囊性病变评分的计算结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	卵巢系数（$\times10^{-4}$）	卵巢囊性病变评分/分
正常组	6.68±0.44	0
模型组	7.73±0.43[a]	3.67±0.52[a]
阳性对照组	5.16±0.54[b]	1.33±0.52[b]
补肾强身片低剂量组	5.58±0.60[b]	1.67±0.82[b]
补肾强身片中剂量组	6.01±0.73[b]	1.50±0.55[b]
补肾强身片高剂量组	5.73±0.93[b]	1.33±0.52[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.3　大鼠血清中 E_2、T、GnRH、FSH、LH 水平的测定结果

与正常组比较，模型组大鼠血清中 E_2、FSH 水平均显著降低（$P<0.05$），T、GnRH、LH 水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和补肾强身片各剂量组大鼠血清中 T、GnRH、LH 水平均显著降低（$P<0.05$），E_2（补肾强身片低剂量组除外）、FSH 水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

表3　各组大鼠血清中 E_2、T、GnRH、FSH、LH 水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	E_2/(pmol/L)	T/(nmol/L)	GnRH/(mIU/mL)	FSH/(mIU/mL)	LH/(mIU/mL)
正常组	49.49±11.59	1.29±0.42	42.27±5.33	62.72±12.07	64.16±3.75
模型组	28.81±10.11[a]	1.95±0.23[a]	56.82±7.37[a]	23.33±5.42[a]	75.78±11.80[a]
阳性对照组	57.32±17.71[b]	1.23±0.42[b]	36.64±9.66[b]	76.38±13.77[b]	51.60±5.04[b]
补肾强身片低剂量组	31.47±7.00	1.09±0.40[b]	37.05±4.41[b]	59.83±6.50[b]	57.25±4.57[b]
补肾强身片中剂量组	53.90±13.98[b]	1.09±0.43[b]	46.70±5.78[b]	62.41±13.43[b]	48.91±6.41[b]
补肾强身片高剂量组	49.92±19.09[b]	1.07±0.33[b]	38.48±4.86[b]	66.70±7.72[b]	47.33±7.91[b]

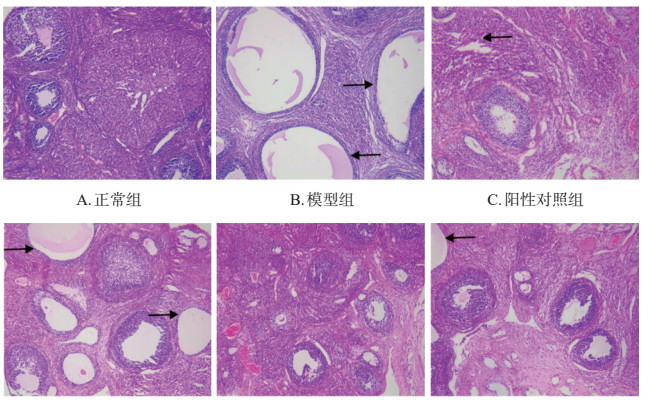
a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.4　大鼠卵巢组织病理形态学观察结果

HE 染色结果显示，正常组大鼠卵巢组织结构完整，原始卵泡、生长卵泡与成熟卵泡数量较多、发育良好，存在正常的黄体和白体；模型组大鼠卵巢皮质胶原化，闭锁卵泡及无卵丘的囊性卵泡数量增多，卵泡颗粒细胞层数减少；阳性对照组大鼠卵巢组织结构完整，原始卵泡、生长卵泡与成熟卵泡形态较为完整，放射冠清晰，无囊性改变，卵泡颗粒细胞层数明显增加，存在少量黄体和白体；补肾强身片低剂量组大鼠卵巢组织中可见较多的闭锁卵泡和无卵丘囊性卵泡，卵泡颗粒细胞层数减少；补肾强身片中、高剂量组大鼠卵巢组织中含有原始卵泡、生长卵泡与成熟卵泡，卵泡颗粒细胞层数增加，放射冠清晰，存在少量黄体和白体，未见卵泡囊性改变。卵巢囊性病变评分结果显示，与正常组比较，模型组大鼠卵巢囊性病变评分显著增加（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和补肾强身片各剂量组大鼠卵巢囊性病变评分均显著降低（$P<0.05$）。结果见图1、表2。

3.5　大鼠卵巢组织中 PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA 表达水平的测定结果

与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织中 PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA 表达水平均显著降低（$P<0.05$）。



→：囊性卵泡

图1　各组大鼠卵巢组织的病理形态学观察结果（HE 染色，×100）

与模型组比较，阳性对照组和补肾强身片各剂量组大鼠卵巢组织中 PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA 表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　各组大鼠卵巢组织中 PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA 表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	PI3K mRNA	Akt mRNA	mTOR mRNA	GLUT4 mRNA
正常组	1.12±0.09	1.09±0.06	1.07±0.09	1.13±0.08
模型组	0.96±0.06[a]	0.61±0.11[a]	0.56±0.07[a]	0.77±0.09[a]
阳性对照组	5.49±0.25[b]	1.69±0.10[b]	2.27±0.25[b]	2.32±0.40[b]
补肾强身片低剂量组	3.37±0.20[b]	1.20±0.16[b]	1.14±0.09[b]	1.05±0.11[b]
补肾强身片中剂量组	3.99±0.38[b]	1.18±0.06[b]	1.50±0.11[b]	1.43±0.14[b]
补肾强身片高剂量组	4.83±0.60[b]	1.30±0.10[b]	2.27±0.25[b]	1.91±0.22[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

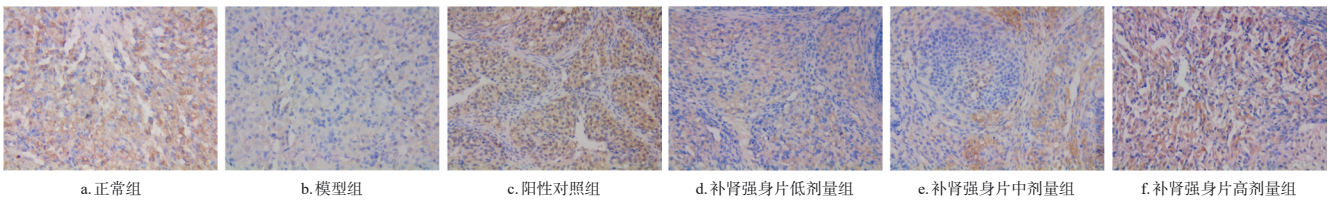
3.6　大鼠卵巢组织中 PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4 蛋白表达水平的测定结果

正常组大鼠卵巢组织中有大量 PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4 蛋白表达。与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织中有少量 PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4 蛋白表达，阳性表达 IOD 值均显著减小（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和补肾强身片中、高剂量组大鼠卵巢组织中有大量 PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4 蛋白表达，阳性表达 IOD 值均显著增加（$P<0.05$）；补肾强身片低剂量组大鼠卵巢组织中有大量 PI3K、p-mTOR 蛋白表达，阳性表达 IOD 值显著增加（$P<0.05$）。结果见表5、图2。

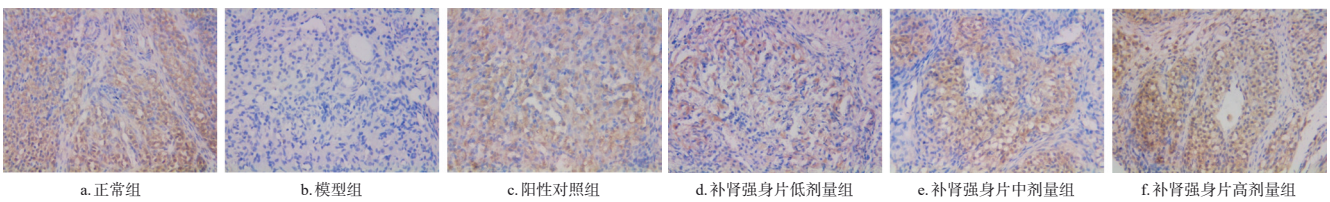
表5　各组大鼠卵巢组织中 PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4 蛋白 IOD 值的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	PI3K（$\times10^3$）	p-Akt（$\times10^3$）	p-mTOR（$\times10^3$）	GLUT4（$\times10^3$）
正常组	294.97±38.57	286.26±40.73	372.93±41.91	358.86±53.51
模型组	147.58±14.76[a]	61.98±10.38[a]	227.08±39.89[a]	117.88±26.29[a]
阳性对照组	428.77±51.68[b]	377.09±60.99[b]	528.46±63.27[b]	412.80±66.11[b]
补肾强身片低剂量组	199.65±21.49[b]	110.94±11.24	292.43±39.13[b]	167.71±44.24
补肾强身片中剂量组	264.28±40.17[b]	268.90±58.06[b]	387.59±40.32[b]	339.99±55.07[b]
补肾强身片高剂量组	335.23±16.50[b]	342.81±44.54[b]	414.98±33.39[b]	402.23±64.04[b]

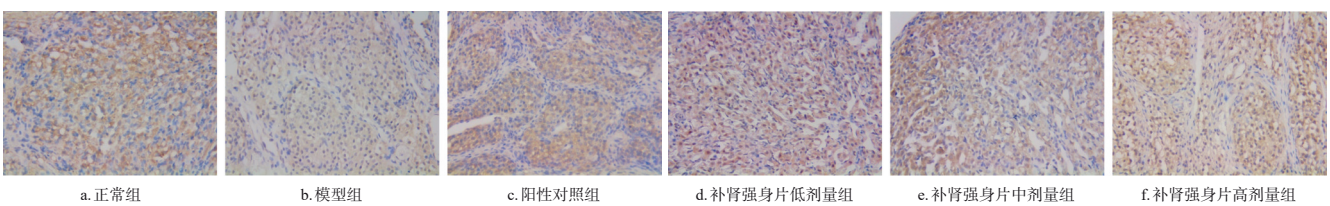
a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$



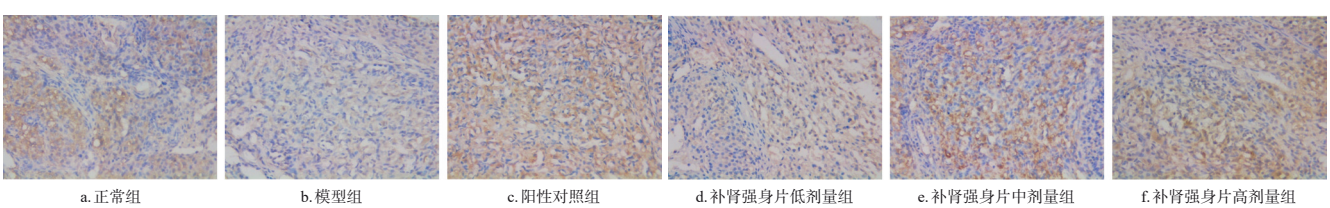
A. PI3K蛋白



B. p-Akt蛋白



C. p-mTOR蛋白



D. GLUT4蛋白

图2　各组大鼠卵巢组织中PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4蛋白表达的免疫组织化学染色图（×400）

4　讨论

PCOS是目前造成育龄期女性不孕的主要病因之一，其动物模型可由类固醇、胰岛素联合人绒毛膜促性腺激素诱导或转基因等多种方式构建，其中以雄激素、芳香化酶抑制剂诱导的PCOS模型应用较为广泛。来曲唑是一种人工合成的苄三唑类衍生物，可以通过抑制芳香化酶活性而下调雄激素向雌激素的转化，致使卵巢内源性雄激素水平持续升高，进而造成机体性周期紊乱、卵巢排卵障碍及多囊性改变[13]。本研究采用来曲唑诱导构建了大鼠PCOS模型，结果发现，模型大鼠血清中E_2、FSH水平降低，T、GnRH、LH水平升高，卵巢稍增大且出现多囊性改变，表明造模成功。

西医治疗PCOS以激素替代、调经及促排卵为主，可改善PCOS症状，但难以达到根治目的。中医理论认为，PCOS与肾虚、脾虚、肝郁、痰湿和血瘀有关[4,14]。补肾强身片是补肾强身的中药成方制剂，以淫羊藿为君药，补肾壮阳，大补元阳；以菟丝子为臣药，补益肝肾，固精安胎；以狗脊、女贞子为佐药，补肾滋阴，补气疏肝；金樱子可固精明目；诸药合用，既补肾阳，又滋肾阴，共达“阴阳双补”之效[15]。由于雄激素水平较高和IR是PCOS的两个典型特征，因此，临床上常采用炔雌醇环丙孕酮片联合盐酸二甲双胍片治疗PCOS[16]。基于此，本研究选择炔雌醇环丙孕酮片+盐酸二甲双胍片作为阳性对照药。本研究发现，经补肾强身片干预后，PCOS模型大鼠卵巢组织中各级卵泡数量增加，囊性卵泡数量减少，卵泡颗粒细胞层数增加，卵巢系数减小，这表明补肾强身片对PCOS模型大鼠具有较好的改善作用。

GnRH由下丘脑分泌，可与下丘脑和腺垂体的GnRH受体（GnRH receptor，GnRH-R）结合后作用于垂体前叶促性腺激素细胞，进而调控LH和FSH的分泌过程[17]。LH和FSH均由垂体前叶促性腺激素细胞分泌，与卵巢颗粒细胞分泌的E_2协同作用于卵巢，调控雌、孕激素的分泌[18]。PCOS患者长期大量分泌GnRH，使GnRH-R低表达且敏感性下降，并升高LH水平，降低FSH水平；而高水平的LH可刺激卵泡膜细胞合成大量T，低水平的FSH则可降低卵巢颗粒细胞中芳香化酶的活性，使T向雌激素的转化进程受阻，从而导致卵泡发育障碍，进而形成卵巢多囊性病变[19]。此外，卵巢颗粒细胞分泌E_2水平下降也是加剧卵泡闭锁与排卵障碍的主要原因[20]。本研究发现，经补肾强身片干预后，PCOS

模型大鼠血清中E_2、FSH水平升高，T、GnRH、LH水平降低，表明补肾强身片可以通过调控性激素分泌水平干预PCOS。

PI3K由1个催化亚基p110和1个调节亚基p85组成，其中p85含有SH2和SH3两个结构域，可与靶蛋白结合；当PI3K接收酪氨酸激酶和G蛋白偶联受体的信号后，其p85调节亚基可向质膜富集并与p110亚基结合，进而将底物磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸磷酸化为磷脂酰肌醇-3，4，5-三磷酸（phosphatidyli-nositol-3，4，5-triphosphate，PIP3）[21]。在3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1的参与下，PIP3与Akt结合并磷酸化Akt蛋白上的苏氨酸位点（Thr308）和丝氨酸位点（Ser473），从而激活Akt[11]。活化的p-Akt可以解除结节性硬化症相关基因1（tuberous sclerosis complex 1，TSC1）和TSC2对脑组织富含的Ras同源物的抑制作用，从而激活mTOR[21]。mTOR是PI3K/Akt信号通路下游的重要因子之一，活化的p-mTOR可促使4E结合蛋白1与翻译起始因子解离以及核糖体S6蛋白激酶的磷酸化，从而调节下丘脑-垂体-性腺轴，进而调控雌激素分泌与卵泡生长发育[22]。临床研究也证实，PCOS患者卵巢组织中PI3K、Akt、mTOR蛋白表达降低[23]，由此推测卵巢多囊性改变和卵泡发育障碍均与PI3K/Akt/mTOR信号通路的下调有关。GLUT4是一种类胰岛素敏感型葡萄糖转运载体，与IR的发生密切相关。在正常生理状态下，胰岛素可与靶器官表面的胰岛素受体α亚基结合，激活酪氨酸蛋白激酶，进而磷酸化胰岛素受体底物1（insulin receptor substrate-1，IRS-1）和IRS-2；磷酸化后的IRS-1可与PI3K的p85亚基结合，从而活化PI3K、磷酸化Akt，进而诱导GLUT4表达，当PI3K、Akt蛋白水平降低时，GLUT4表达降低，从而阻碍葡萄糖由细胞外转运至细胞内，导致IR[24]。卵巢局部IR可以通过多种途径影响下丘脑-垂体-性腺轴，使卵巢局部保持高雄激素水平环境，阻碍卵泡成熟，最终导致卵巢多囊性改变[24]。本研究发现，经补肾强身片干预后，PCOS模型大鼠卵巢组织中PI3K、p-Akt、p-mTOR、GLUT4蛋白表达水平及PI3K、Akt、mTOR、GLUT4 mRNA表达水平均升高，提示补肾强身片可通过上调PI3K/Akt/mTOR、PI3K/Akt/GLUT4两条信号通路来干预PCOS。

综上所述，补肾强身片可调节PCOS模型大鼠性激素分泌水平，改善卵巢囊性病变，其作用机制可能与上调PI3K/Akt/mTOR、PI3K/Akt/GLUT4两条信号通路有关。

参考文献

[1] 高梦雅，洪艳丽，崔媚婷，等.补肾化痰方治疗多囊卵巢综合征的作用机制：基于网络药理学和分子对接方法[J].南方医科大学学报，2022，42(1)：1-12.

[2] 宋甜，付琳琳，王秋敏，等.脂肪酸转运蛋白1在多囊卵巢综合征患者颗粒细胞中的表达[J].山东大学学报（医学版），2022，60(2)：22-26.

[3] HOEGER K M，DOKRAS A，PILTONEN T. Update on PCOS：consequences，challenges，and guiding treatment [J]. J Clin Endocrinol Metab，2021，106(3)：e1071-e1083.

[4] 沈文娟，金宝，李浦媛，等.中医药治疗多囊卵巢综合征高雄激素血症研究进展[J].中国中医基础医学杂志，2021，27(4)：694-697.

[5] 吴登辉，韩延华，杨丽珍，等.从中医阴阳理论探讨多囊卵巢综合征与细胞自噬的相关性[J].中华中医药杂志，2021，36(8)：4526-4528.

[6] 钱丽旗，李素那，于洋，等.夏桂成治疗多囊卵巢综合征致不孕症经验[J].中医杂志，2020，61(20)：1775-1778.

[7] 林秀莲，宋粉云，李华，等.UPLC同时测定补肾强身片中6种化学成分的含量[J].中国实验方剂学杂志，2017，23(20)：56-60.

[8] 李康梅，戴明明，黎明星，等.基于网络药理学研究淫羊藿治疗多囊卵巢综合征的作用机制[J].中医药导报，2020，26(11)：101-105.

[9] 余璟玮，钟晓莹，曾蕾，等.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[J].中国药房，2021，32(1)：39-45.

[10] 张慧英，张艳芳，韩玉崑，等.多囊卵巢综合征患者子宫内膜组织中胰岛素PI3K/Akt信号通路的活化及其意义[J].中华妇产科杂志，2012，47(1)：19-23.

[11] 刘敏，朱鸿秋，李印，等.桂枝茯苓丸调节PI3K/Akt/mTOR通路对PCOS-IR大鼠排卵障碍的影响[J].中国实验方剂学杂志，2021，27(6)：7-14.

[12] 苗明三，彭孟凡，闫晓丽.菟丝子总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠模型的影响[J].中国实验方剂学杂志，2019，25(5)：143-150.

[13] 苗晋鑫，李秀敏，苗明三.多囊卵巢综合征动物模型数据挖掘及分析[J].中国比较医学杂志，2020，30(2)：135-140，146.

[14] 沈文娟，李欣，金宝，等.多囊卵巢综合征高雄激素血症中西医研究进展[J].辽宁中医杂志，2022，49(2)：209-213.

[15] 方慧祥，杨坤芬，冯玉茹.RP-HPLC法测定补肾强身片中金丝桃苷的含量[J].中国药房，2015，26(3)：413-415.

[16] 张彩宇，陶爱群，莫有珍.二甲双胍与炔雌醇环丙孕酮片联用对多囊卵巢综合征患者相关激素分泌水平的影响[J].中国现代医学杂志，2016，26(9)：85-88.

[17] SHIN J J，PARK K E，CHOI Y M，et al. Early gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in women with polycystic ovary syndrome：a preliminary randomized trial[J]. Clin Exp Reprod Med，2018，45(3)：135-142.

[18] LUQUE-RAMÍREZ M，ESCOBAR-MORREALE H F. Targets to treat androgen excess in polycystic ovary syndrome[J]. Expert Opin Ther Targets，2015，19(11)：1545-1560.

（下转第2653页）