金匮肾气丸对多囊卵巢综合征模型大鼠的改善作用及机制研究Δ

马丽亚[1*]，杜婧雯[2]，张　童[2]，俎兆轩[2]，郭　申[2]，赵　绅[2]，张明昊[2#]（1.河南中医药大学教务处，郑州　450008；2.河南中医药大学医学院，郑州　450046）

中图分类号　R965；R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）23-2869-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.10

摘　要　目的　探讨金匮肾气丸对多囊卵巢综合征（PCOS）模型大鼠的改善作用及机制。**方法**　将40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、炔雌醇环丙孕酮片（简称“达英-35”）+二甲双胍组（达英-35 0.2 mg/kg+二甲双胍230 mg/kg，阳性对照）和金匮肾气丸低、中、高剂量组（0.5、1.0、2.0 g/kg），每组10只。另取10只未造模大鼠作为正常组。各组大鼠灌胃相应药物，每天1次，连续30 d。末次灌胃24 h后，检测大鼠血清中血糖、胰岛素、雌二醇（E_2）、睾酮（T）、促性腺激素释放激素（GnRH）、促卵泡素（FSH）和促黄体生成素（LH）水平，并计算胰岛素抵抗指数；计算大鼠卵巢系数；观察大鼠卵巢组织的病理形态学变化；检测大鼠卵巢组织中肝激酶B1（LKB1）、腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）蛋白和mRNA的表达水平。**结果**　与正常组比较，模型组大鼠血糖、胰岛素水平，胰岛素抵抗指数，血清中T、GnRH、LH水平，卵巢系数均显著升高（$P<0.05$），血清中E_2、FSH水平及卵巢组织中LKB1、AMPK蛋白和mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）；卵巢皮质胶原化，闭锁卵泡和无卵丘的囊性卵泡数量增多，可见卵泡囊性病变。与模型组比较，金匮肾气丸各剂量组大鼠上述大部分指标水平均显著逆转（$P<0.05$）；金匮肾气丸中、高剂量组大鼠卵巢组织内各级卵泡数量增多，未见卵泡囊性病变。**结论**　金匮肾气丸对PCOS模型大鼠性激素水平异常、胰岛素抵抗及卵巢囊性改变均有较好的改善作用，其作用机制可能与上调LKB1/AMPK信号通路活性有关。

关键词　金匮肾气丸；多囊卵巢综合征；胰岛素抵抗；LKB1/AMPK信号通路；大鼠

Study on improvement effects of Jinkui shenqi pills on polycystic ovary syndrome model rats and the mechanism

MA Liya[1], DU Jingwen[2], ZHANG Tong[2], ZU Zhaoxuan[2], GUO Shen[2], ZHAO Shen[2], ZHANG Minghao[2]（1. Office of Educational Administration, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. School of Medical Science, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the improvement effects of Jinkui shenqi pills on polycystic ovary syndrome (PCOS) model rats and the mechanism. **METHODS** Totally 40 rats were given letrozole suspension instragastrically (1 mg/kg, once a day, for consecutive 21 d) to induce PCOS model. Model rats were divided into model group, ethinylestradiol and cyproterone acetate tablets (short for diane-35)+metformin group (diane-35 0.2 mg/kg + metformin 230 mg/kg, as positive control), Jinkui shenqi pills low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.5, 1.0, 2.0 g/kg), with 10 rats in each group. Other 10 healthy rats were included in normal group. Each group was given the corresponding drugs, once a day, for consecutive 30 d. Twelve hours after the last administration, serum levels of blood glucose, insulin, estrogen (E_2), testosterone (T), gonadotropin-releasing hormone (GnRH), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured. The insulin resistance indexes were calculated, and the ovary coefficients of rats were calculated. The pathological changes of ovary were observed. The protein and mRNA expressions of liver kinase B1 (LKB1) and AMP-activated protein kinase (AMPK) in ovary tissue were detected. **RESULTS** Compared with normal group, the levels of blood glucose, insulin, insulin resistance index, serum levels of T, GnRH and LH and ovarian indexes were significantly increased ($P<0.05$), while serum levels of E_2 and FSH as well as protein and mRNA expressions of LKB1 and AMPK in ovary tissue were decreased significantly ($P<0.05$); collagenization of ovarian cortex, increased number of atresia follicles and cystic follicles without cumulus, and follicular cystic lesions could be seen. Compared with model group, most of above indexes of Jinkui shenqi pills groups were reversed significantly ($P<0.05$); the number of follicle at each level was increased and no follicular cystic lesion was found in Jinkui shenqi pills medium-dose and high-dose groups. **CONCLUSIONS** Jinkui shenqi pills can significantly improve the abnormal level of sex hormones, insulin resistance and ovarian cystic changes, the mechanism of which may be related to up-regulating the activation of LKB1/AMPK signaling pathway.

KEYWORDS　Jinkui shenqi pills; polycystic ovary syndrome; insulin resistance; LKB1/AMPK signaling pathway; rats

Δ **基金项目**　河南省重点研发与推广（科技攻关）项目（No. 222102310139）

＊**第一作者**　副教授，硕士生导师。研究方向：中医妇科学。电话：0371-86550201。E-mail：mary868@163.com

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

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）是以月经失调、慢性无排卵、雄激素升高及卵巢多囊样改变为主要表现的一种妇科疾病，常伴发生殖功能障碍、胰岛素抵抗等代谢异常症状，亦可增加心血管疾病、子宫内膜癌的患病风险[1]。目前，西医治疗多以激素替代、调经及促排卵为主，患者妊娠率低，且可出现子宫异常出血、胃肠道不适、肝功能损害及肥胖等多种副作用[2—3]。中医将PCOS归为“不孕症”“闭经”“月经过少”“月经后期”“癥瘕”范畴，认为其病机是肾虚，继发肝瘀、脾虚、痰饮、水湿互结[4—5]，故应从补益脾肾入手进行治疗[6]。金匮肾气丸始载于《金匮要略》，乃“千古补肾之组方”，其对妇科疾病的治疗论述最早见于《妇人杂病脉证并治第二十二》，具有温补肾阳、化气行水的功效，且已有治疗PCOS的临床报道[7]，但此方面实验研究较少，作用机制亦不明确。目前，相关研究发现，金匮肾气丸可改善糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗[8]，其中肝激酶B1（liver kinase B1，LKB1）/腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）信号通路与胰岛素抵抗密切相关[9]，但是金匮肾气丸是否可通过LKB1/AMPK信号通路改善POCS尚不明确。基于此，本研究选择炔雌醇环丙孕酮片（商品名为达英-35，以下简称“达英-35”）联合二甲双胍为阳性对照药物[9—10]，探讨金匮肾气丸对胰岛素抵抗、性激素水平、卵巢病理形态变化及LKB1/AMPK信号通路的影响，以期为金匮肾气丸治疗PCOS提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有BS110S型电子天平（北京塞多利斯天平公司）、MR-96TB型酶标仪[骋克仪器（上海）有限公司]、RM2235石蜡切片机（德国Leica公司）、D3024R型台式高速冷冻型微量离心机[大龙兴创实验仪器（北京）股份有限公司]、CX23型光学显微镜（日本Olympus公司）、Stepone plus型荧光定量PCR仪（美国ABI公司）。

1.2 主要药品与试剂

金匮肾气丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂（批号19032632，规格0.2 g/粒）；达英-35购自德国拜耳医药保健有限公司（批号KT062FL2，规格0.2 mg/片）；盐酸二甲双胍片购自上海寿如松药业泌阳制药有限公司（批号20031702，规格0.25 g/片）；来曲唑购自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）购自国药集团化学试剂有限公司（批号20160704）；苏木素染色液、伊红染色液均购自福州飞净生物科技有限公司（批号分别为190805、20211009）；葡萄糖、胰岛素、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）的酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒均购自南京建成生物工程研究所（批号分别为F006-1-1、H203-1-2、H102-1、H090-1-2、H297、H101-1-2、H206-1-2）；兔SP试剂盒、DAB显色试剂盒购自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LKB1抗体、兔抗大鼠AMPK抗体、TriQuick总RNA提取试剂、cDNA合成试剂盒均购自武汉赛维尔生物科技有限公司（批号分别为GB111236、GB111919、R1100、G3330）。

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，大鼠自由饮水采食。本实验获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准，批准号为DWLL202201010。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

取雌性SD大鼠50只，适应性饲养1周后，随机选取10只为正常组，其余大鼠按1 mg/kg灌胃来曲唑混悬液，每天1次，连续21 d，以复制PCOS模型。造模第16天开始进行阴道涂片检测，当显微镜下可见阴道上皮细胞持续角化，则表明造模成功[10]。将造模成功的大鼠随机分为模型组、达英-35+二甲双胍组（达英-35 0.2 mg/kg+二甲双胍230 mg/kg，两药剂量均为临床等效剂量）和金匮肾气丸低、中、高剂量组（0.5、1.0、2.0 g/kg，中剂量为临床等效剂量），每组10只。正常组和模型组大鼠灌胃等体积0.1% CMC-Na溶液，各给药组灌胃相应药物，每天1次，连续30 d。

2.2 取材及处理

各组大鼠末次灌胃24 h后，称质量，腹腔注射1 g/kg氨基甲酸乙酯麻醉，腹主动脉取血，以3 000 r/min离心10 min，取上清液于－80 ℃下保存备用。取血完成后，处死大鼠，剖取卵巢，去除周围组织，生理盐水洗涤，观察卵巢外观形态，滤纸吸尽脏器表面液体后用电子天平称质量，然后将卵巢组织一分为二，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 大鼠血清中血糖等指标水平检测及胰岛素抵抗指数计算

取“2.2”项下血清样品，按照试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪检测血糖、胰岛素、E_2、T、GnRH、FSH、LH水平；并计算胰岛素抵抗指数，胰岛素抵抗指数＝空腹血糖×空腹胰岛素/22.5。

2.4 大鼠卵巢系数的计算

记录各组大鼠卵巢质量与体质量，并计算卵巢系数，卵巢系数＝卵巢质量/体质量。

2.5 大鼠卵巢组织病理形态学观察

取“2.2”项下用4%多聚甲醛固定的卵巢组织，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片（4 μm）后制作

病理切片。取部分切片再经二甲苯脱蜡、苏木素-伊红染色、梯度乙醇脱水后，以中性树胶封片，于光学显微镜下观察各组大鼠卵巢组织的病理形态学变化并拍照。

2.6 大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK蛋白表达水平的检测

采用免疫组织化学法进行检测。取“2.5”项下制备的组织切片经脱蜡、水化后，H_2O_2封闭，清洗，柠檬酸盐缓冲液热修复，滴加山羊血清封闭液，室温孵育；倾去液体，分别滴加LKB1（稀释度为1∶2 000）、AMPK（稀释度为1∶1 000）抗体，4 ℃孵育过夜；滴加二抗，37 ℃孵育20 min，以DAB显色，经自来水冲洗后，再以苏木素复染1～2 min；以盐酸乙醇进行分化，经自来水冲洗、脱水、透明、封片后，于光学显微镜下观察。采用Image-Pro Plus 6.0软件检测每个视野中阳性染色区域的积分光密度（integrated optical density，IOD）值，IOD值越大，表示蛋白表达水平越高。

2.7 大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK mRNA表达水平的检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。取“2.2”项下各组大鼠卵巢组织适量进行匀浆，以Trizol试剂提取总RNA，再经逆转录合成cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增，分析各产物扩增曲线，以GAPDH为内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算目的基因mRNA的表达水平。PCR引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
LKB1	上游引物：GCCTTGCACCCTTTCGCT	248
	下游引物：AGTGGTGGAGCGCAGTCA	
AMPK	上游引物：CACTGGATGCACTCAACACAAC	153
	下游引物：TCACTACCTTCCATTCAAAGTCC	
GAPDH	上游引物：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游引物：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.8 统计学方法

数据采用SPSS 26.0软件进行统计分析，计量资料均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者组间两两比较采用LSD-t检验，方差不齐者采用Dunnett's t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠血清中血糖、胰岛素水平及胰岛素抵抗指数的检测结果

与正常组比较，模型组大鼠血糖、胰岛素水平及胰岛素抵抗指数均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，达英-35+二甲双胍组和金匮肾气丸各剂量组大鼠上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.2 大鼠血清中E_2、T、GnRH、FSH、LH水平的检测结果

与正常组比较，模型组大鼠血清中T、GnRH和LH水平均显著升高（$P<0.05$），E_2和FSH水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，达英-35+二甲双胍组和金匮肾气丸各剂量组大鼠血清中GnRH、LH水平均显著降低（$P<0.05$），FSH水平均显著升高（$P<0.05$）；达英-35+二甲双胍组和金匮肾气丸中剂量组大鼠血清中E_2水平均显著升高（$P<0.05$），T水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

表2 各组大鼠血清中血糖、胰岛素水平及胰岛素抵抗指数检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	血糖/（mmol/L）	胰岛素/（mU/L）	胰岛素抵抗指数
正常组	5.68±0.12	9.06±0.08	2.29±0.07
模型组	10.46±0.10[a]	32.52±1.23[a]	15.11±0.56[a]
达英-35+二甲双胍组	6.21±0.09[b]	9.81±0.13[b]	2.70±0.06[b]
金匮肾气丸低剂量组	8.80±0.14[b]	20.32±0.65[b]	7.95±0.37[b]
金匮肾气丸中剂量组	7.53±0.05[b]	16.62±0.96[b]	5.56±0.34[b]
金匮肾气丸高剂量组	6.70±0.13[b]	12.97±0.88[b]	3.86±0.24[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

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

组别	E_2/（pmol/L）	T/（nmol/L）	GnRH/（mIU/mL）	FSH/（mIU/mL）	LH/（mIU/mL）
正常组	45.24±13.58	1.15±0.18	35.09±3.77	63.63±12.10	54.81±2.73
模型组	24.44±9.35[a]	1.70±0.21[a]	49.66±6.12[a]	22.38±3.52[a]	65.67±10.52[a]
达英-35+二甲双胍组	52.37±11.66[b]	1.16±0.31[b]	31.19±7.20[b]	66.55±11.76[b]	49.39±4.77[b]
金匮肾气丸低剂量组	33.26±15.78	1.44±0.40	30.62±4.61[b]	59.96±3.01[b]	56.46±7.35[b]
金匮肾气丸中剂量组	44.61±14.04[b]	1.03±0.61[b]	33.94±7.66[b]	65.93±7.50[b]	53.01±7.08[b]
金匮肾气丸高剂量组	31.76±11.01	1.50±0.47	38.19±8.24[b]	64.67±9.44[b]	51.35±6.86[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.3 大鼠卵巢系数的检测结果

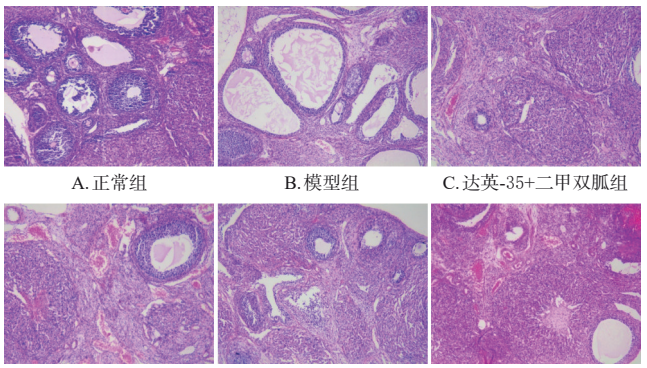
与正常组[$(5.69\pm0.40)\times10^{-4}$]比较，模型组大鼠卵巢系数[$(6.36\pm0.67)\times10^{-4}$]显著增加（$P<0.05$）；与模型组比较，达英-35+二甲双胍组和金匮肾气丸各剂量组大鼠卵巢系数[分别为$(4.51\pm0.52)\times10^{-4}$、$(5.55\pm0.45)\times10^{-4}$、$(4.69\pm0.72)\times10^{-4}$、$(5.03\pm0.45)\times10^{-4}$]均显著降低（$P<0.05$）。

3.4 大鼠卵巢组织病理形态学的观察结果

正常组大鼠卵巢组织结构完整，各级卵泡数量较多、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，卵泡颗粒细胞层厚度减小，可见卵泡囊性病变；达英-35+二甲双胍组大鼠卵巢组织结构基本完整，各级卵泡形态完好，未见卵泡囊性改变，卵泡颗粒细胞层厚度增加，存在少量黄体和白体；金匮肾气丸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，卵泡颗粒细胞层厚度减小；金匮肾气丸中、高剂量组大鼠卵巢组织内各级卵泡数量增多，卵泡颗粒细胞层厚度增加，放射冠清晰，存在少量黄体和白体，未见卵泡囊性病变。结果见图1。

3.5 大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK蛋白表达水平的检测结果

正常组大鼠卵巢组织中有大量LKB1、AMPK蛋白表达。与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织中有少量LKB1、AMPK蛋白表达，其阳性表达IOD值均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，达英-35+二甲双胍组和金匮

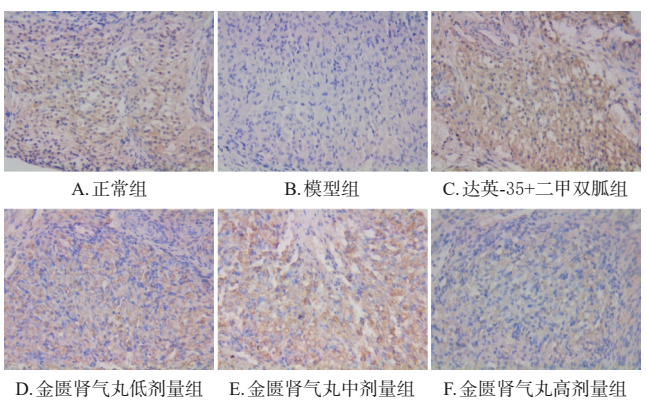


A. 正常组　B. 模型组　C. 达英-35+二甲双胍组

D. 金匮肾气丸低剂量组　E. 金匮肾气丸中剂量组　F. 金匮肾气丸高剂量组

图1　各组大鼠卵巢组织的病理形态学显微图（HE染色，×100）

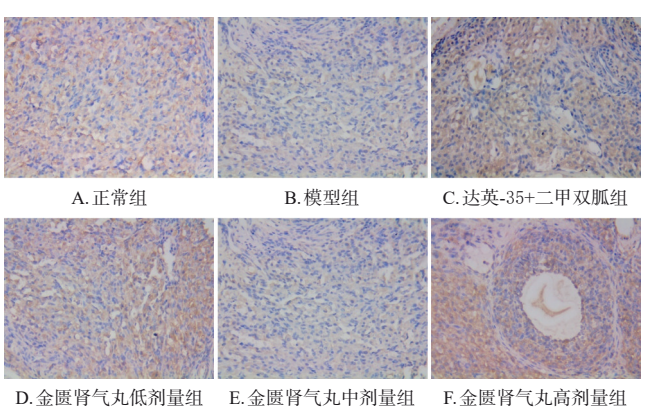
肾气丸各剂量组大鼠卵巢组织中有大量LKB1、AMPK蛋白表达，其阳性表达IOD值均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、图3和表4。



A. 正常组　B. 模型组　C. 达英-35+二甲双胍组

D. 金匮肾气丸低剂量组　E. 金匮肾气丸中剂量组　F. 金匮肾气丸高剂量组

图2　各组大鼠卵巢组织中LKB1蛋白表达的免疫组织化学显微图（×400）



A. 正常组　B. 模型组　C. 达英-35+二甲双胍组

D. 金匮肾气丸低剂量组　E. 金匮肾气丸中剂量组　F. 金匮肾气丸高剂量组

图3　各组大鼠卵巢组织中AMPK蛋白表达的免疫组织化学显微图（×400）

3.6　大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK mRNA表达水平的检测结果

与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，达英-35+二甲双胍组和金匮肾气丸各剂量组大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表5。

表4　各组大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK蛋白的IOD值检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，$\times10^{-3}$）

组别	LKB1	AMPK
正常组	364.65±10.66	250.72±17.27
模型组	67.90±4.23[a]	132.32±25.84[a]
达英-35+二甲双胍组	211.39±49.04[b]	285.40±51.35[b]
金匮肾气丸低剂量组	146.72±34.26[b]	219.42±28.76[b]
金匮肾气丸中剂量组	215.31±26.14[b]	240.45±29.93[b]
金匮肾气丸高剂量组	160.03±25.67[b]	193.75±31.03[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

表5　各组大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK mRNA表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	LKB1 mRNA	AMPK mRNA
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.67±0.06[a]	0.59±0.09[a]
达英-35+二甲双胍组	1.78±0.27[b]	1.55±0.14[b]
金匮肾气丸低剂量组	1.44±0.33[b]	1.06±0.05[b]
金匮肾气丸中剂量组	1.65±0.29[b]	1.16±0.15[b]
金匮肾气丸高剂量组	1.31±0.28[b]	1.16±0.04[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

4　讨论

来曲唑可抑制卵巢中雄激素向雌激素的转化过程，从而造成机体性周期紊乱、卵巢排卵障碍及多囊性改变[11]。相关研究表明，由来曲唑诱导构建的PCOS模型与人体PCOS卵巢的病理学变化较为一致[12]。基于此，本研究采用来曲唑诱导构建大鼠PCOS模型，结果发现，PCOS模型大鼠血清中E_2、FSH水平显著降低，T、GnRH、LH水平显著升高，卵巢皮质胶原化，可见卵泡囊性改变，表明造模成功。

中医认为PCOS与肾虚、脾虚、肝郁和血瘀有关[13]，故补肾、健脾、调肝为中医治疗PCOS的主要思路。金匮肾气丸以六味地黄丸为基础，重用生地黄以滋阴补肾，附以附子、桂枝温补阳气，引火归原，以使肾阴、肾阳平衡，肾气充实，进而恢复月经；方中以山药、山茱萸为臣药，补益脾肾之气；佐以泽泻、茯苓健脾利水，牡丹皮清热消瘀，牛膝、车前子逐瘀通经；诸药合用，共达“脾肾同治，阴阳双补”之效[7]。达英-35为雌激素与孕激素合剂，对PCOS所致的月经失调、雄激素高等症状具有一定的治疗作用；二甲双胍为胰岛素增敏剂，可以改善胰岛素抵抗。本研究结果发现，金匮肾气丸可降低PCOS模型大鼠卵巢系数，增加各级卵泡数量，改善卵泡囊性病变。这表明金匮肾气丸对PCOS模型大鼠具有较好的改善作用。

GnRH是下丘脑-垂体-性腺（HPG）轴的主要调控因子，可与下丘脑和腺垂体的GnRH受体结合后调控LH和FSH的分泌过程[14]。LH、FSH、E_2和相应激素受体一起协同作用于卵巢，调控雌孕激素的分泌，进而影响雌性机体的动情周期、卵泡发育及排卵过程[15]。PCOS患者长期大量分泌GnRH，从而导致LH、FSH分泌失衡，即LH水平升高，FSH水平下降；LH水平升高进一步促进

卵泡膜细胞合成大量T，从而在卵巢内形成高雄激素环境，进而阻碍优势卵泡发育，形成PCOS[16-18]。PCOS患者卵巢通常可见颗粒细胞损伤，E_2分泌水平下降，这也是加剧卵泡闭锁与排卵障碍的主要原因[19]。本研究结果发现，金匮肾气丸可升高E_2、FSH水平，降低T、GnRH、LH水平。这表明金匮肾气丸可以通过调控激素分泌水平来改善PCOS。

LKB1、AMPK均为真核细胞中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，广泛表达于各种组织中，当细胞内一磷酸腺苷（AMP）/三磷酸腺苷（ATP）比值升高时，AMP与AMPK-γ调节亚基结合，将LKB1磷酸化为p-LKB1，p-LKB1又会与AMPK-α亚基上的Thr172位点结合，将该位点磷酸化为p-AMPK，进而开启分解代谢途径以升高ATP水平，同时关闭合成代谢途径以降低ATP消耗，维持能量平衡[20-21]。有研究表明，LKB1/AMPK信号通路与胰岛素抵抗相关，且LKB1、AMPK蛋白表达水平降低是胰岛素抵抗发生的关键环节[22]，由此推测PCOS引起的胰岛素抵抗可能与下调LKB1/AMPK信号通路活性有关。本研究结果发现，PCOS模型大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK蛋白和mRNA的表达水平均显著降低，即LKB1/AMPK信号通路被抑制。经金匮肾气丸干预后，大鼠卵巢组织中LKB1、AMPK蛋白和mRNA的表达水平显著升高。这表明金匮肾气丸可通过上调LKB1/AMPK信号通路活性来改善PCOS。

综上所述，金匮肾气丸对PCOS模型大鼠性激素水平异常、胰岛素抵抗及卵巢囊性改变均有较好的改善作用，其作用机制可能与上调LKB1/AMPK信号通路活性有关。

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] 钟旭，曹睿，蒋洪梅，等. 金匮肾气丸对多囊卵巢综合征患者内分泌代谢的影响[J]. 世界中医药，2018，13(10)：2492-2495，2499.

[8] 刘仙菊，胡方林. 金匮肾气丸对2型糖尿病模型大鼠脂肪代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. 中医药导报，2011，17(11)：22-25.

[9] 黄苏萍，康文倩，刘永进，等. 丹瓜方对糖尿病大鼠肝脏LKB1、AMPK及SIRT1表达的影响[J]. 中华中医药杂志，2019，34(9)：4003-4007.

[10] 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.

[11] 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.

[12] MIMOUNI N E H，PAIVA I，BARBOTIN A L，et al. Polycystic ovary syndrome is transmitted via a transgenerational epigenetic process[J]. Cell Metab，2021，33(3)：513-530.

[13] 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.

[14] 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.

[15] VITEK W，HOEGER K，LEGRO R S. Treatment strategies for infertile women with polycystic ovary syndrome [J]. Minerva Ginecol，2016，68(4)：450-457.

[16] 尹利军，王晓慧. 雄激素及其受体在肥胖、肥胖相关疾病及糖脂代谢紊乱中的作用[J]. 生理学报，2018，70(3)：319-328.

[17] WALTERS K A. Role of androgens in normal and pathological ovarian function[J]. Reproduction，2015，149(4)：R193-R218.

[18] 苗明三，彭孟凡，闫晓丽，等. 菟丝子总黄酮对来曲唑致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(16)：17-23.

[19] ZHANG C Y，MA J，WANG W S，et al. Lysyl oxidase blockade ameliorates anovulation in polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod，2018，33(11)：2096-2106.

[20] 龙璐，王平芳. LKB1-AMPK信号通路与胰岛素抵抗[J]. 中国糖尿病杂志，2007，15(6)：382-384.

[21] 张明昊，张童，郭申，等. 复方丹参片通过LKB1-AMPK通路干预高脂血症大鼠的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理，2022，33(2)：158-164.

[22] 程媛，王佑民. 腺苷酸活化蛋白激酶与LKB1在肥胖大鼠脂肪组织中的表达及其对糖脂代谢的影响[J]. 蚌埠医学院学报，2011，36(12)：1296-1298.

（收稿日期：2022-05-05　修回日期：2022-10-22）

（编辑：唐晓莲）