茯苓酸改善多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的作用及机制研究Δ

唐　虹[1,2*]，李林霞[2]，华　宇[2]，蒋晓梅[2]，章仕雯[1]，付金荣[1#]（1.上海中医药大学附属龙华医院妇科，上海 200032；2.上海中医药大学附属第七人民医院妇产科，上海　200137）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）01-0057-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.01.10

摘　要　目的　研究茯苓酸对多囊卵巢综合征（PCOS）大鼠胰岛素抵抗的改善作用及机制。**方法**　将126只雌性大鼠按随机数字表法分为空白组、PCOS组、茯苓酸低剂量组（8.33 mg/kg）、茯苓酸高剂量组（33.32 mg/kg）、炔雌醇环丙孕酮组（阳性对照组，0.34 mg/kg）、重组大鼠高迁移率族蛋白B1蛋白（rHMGB1）组（8 μg/kg）和茯苓酸高剂量+rHMGB1组（33.32 mg/kg茯苓酸+8 μg/kg rHMGB1），每组18只。除空白组外，其余各组大鼠均通过灌胃来曲唑混悬液的方式构建PCOS模型。建模成功后，每天给药1次，持续4周。给药结束后，检测大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数（HOMA-IR），检测大鼠血清中促卵泡素（FSH）、促黄体生成素（LH）、睾酮（T）水平及卵巢组织中白细胞介素1β（IL-1β）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平，计算大鼠卵巢系数，观察大鼠卵巢组织病理变化，检测大鼠卵巢组织中HMGB1、晚期糖基化终产物受体（RAGE）、磷酸化核因子κB p65（p-NF-κB p65）蛋白表达情况。**结果**　与空白组比较，PCOS组大鼠卵巢组织病理损伤严重，空腹血糖、空腹胰岛素水平、HOMA-IR、卵巢系数升高，血清中LH和T水平升高、FSH水平降低，卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平及HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量升高，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组大鼠卵巢组织病理损伤减轻，空腹血糖、空腹胰岛素水平、HOMA-IR、卵巢系数降低，血清中LH和T水平降低、FSH水平升高，卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平及HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量降低，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；rHMGB1组大鼠对应指标的变化趋势与上述给药组相反（$P<0.05$）。与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠的上述指标变化均被显著逆转（$P<0.05$）。**结论**　茯苓酸可能通过抑制HMGB1/RAGE信号通路改善PCOS大鼠胰岛素抵抗并抑制其炎症反应。

关键词　茯苓酸；多囊卵巢综合征；高迁移率族蛋白B1/晚期糖基化终产物受体通路；胰岛素抵抗；炎症反应

Improvement effects of poria acid on insulin resistance in rats with polycystic ovary syndrome and its mechanism

TANG Hong[1,2], LI Linxia[2], HUA Yu[2], JIANG Xiaomei[2], ZHANG Shiwen[1], FU Jinrong[1] (1. Dept. of Gynecology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Dept. of Obstetrics and Gynecology, the Seventh People's Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the improvement effects of poria acid on insulin resistance in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) and its mechanism. **METHODS** One hundred and twenty-six female rats were randomly separated into blank group, PCOS group, poria acid low-dose group (8.33 mg/kg), pachymic acid high-dose group (33.32 mg/kg), ethinylestradiol cyproterone group (positive control group, 0.34 mg/kg), recombinant rat high mobility group protein B1 protein (rHMGB1) group (8 μg/kg), and poria acid high dose+rHMGB1 group (33.32 mg/kg poria acid+8 μg/kg rHMGB1), with 18 rats in each group. Except for the blank group, the rats in all other groups were given Letrozole suspension intragastrically to construct the PCOS model. After successful modeling, administration was performed once a day for 4 weeks. After medication, the fasting blood glucose and fasting insulin levels, and insulin resistance index (HOMA-IR) were measured in rats; the levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testosterone (T) in rat serum, and the levels of interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in ovarian tissue were detected; ovarian coefficients of rats were calculated; the pathological changes of ovarian tissue were observed; the expressions of HMGB1, receptor for advanced glycosylation end product (RAGE) and phosphorylated nuclear factor κB p65 (p-NF-κB p65) proteins were determined in ovarian tissue of rats. **RESULTS** Compared with the blank group, the pathological injury of ovarian tissue of rats in the PCOS group

Δ**基金项目**　全国中医学术流派传承工作室第二轮建设项目（No.国中医药人教函〔2019〕62号）；上海市浦东新区科技发展基金事业单位民生科研专项（医疗卫生项目）（No.PKJ2022-Y09）；上海市第七人民医院“名中医继承人”人才培养计划项目（No.JCR2021-02）

*第一作者　主治医师，博士研究生。研究方向：中西医结合治疗女性月经不调、不孕症、多囊卵巢综合征、痛经等。E-mail：elaine_tanghong@sina.com

#通信作者　主任医师，博士。研究方向：中西医结合治疗妇科疑难疾病、多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症、慢性盆腔炎、不孕症、痛经等。E-mail：fujinrong2006@sina.com

was serious, the levels of fasting blood glucose and fasting insulin, HOMA-IR and ovarian coefficient were increased, the levels of serum LH and T were increased, while the levels of FSH were decreased; the levels of IL-1β and TNF-α, the expressions of HMGB1, RAGE and p-NF-κB p65 protein in ovarian tissue were increased, with statistical significance ($P<0.05$). Compared with the PCOS group, pathological damage of ovarian tissue was reduced in poria acid low-dose and high-dose groups and ethinylestradiol cyproterone group, and fasting blood glucose, fasting insulin levels, HOMA-IR and ovarian coefficient were decreased; serum LH and T levels were decreased, while FSH levels were increased; the levels of IL-1β and TNF-α and the expressions of HMGB1, RAGE and p-NF-κB p65 protein in ovarian tissue were decreased, with statistical significance ($P<0.05$). The trend of corresponding indexes in rHMGB1 group was opposite to the above ($P<0.05$). Compared with poria acid high-dose group, the changes of the above indexes were reversed significantly in poria acid high-dose+rHMGB1 group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Poria acid may improve insulin resistance and inhibit inflammatory reaction in PCOS rats by inhibiting HMGB1/RAGE pathway.

KEYWORDS poria acid; polycystic ovary syndrome; HMGB1/RAGE pathway; insulin resistance; inflammation response

多囊卵巢综合征（polycystic ovary syndrome，PCOS）是一种内分泌综合征，其特征是持续无排卵、高雄激素血症或胰岛素抵抗，同时也是育龄妇女不孕的最常见原因[1]。目前，PCOS的一些不良症状可以通过口服避孕药、糖皮质激素、二甲双胍等来改善[2]。然而，长期采用上述药物治疗可能会导致胃肠道不适、腹泻和其他严重的副作用，从而对患者的生活产生不利影响[3]。因此，迫切需要开发新的药物来治疗PCOS。

茯苓酸是从多孔菌科真菌茯苓*Poria cocos*（Schw.）Wolf的菌核中分离出的一种重要的生物活性萜类化合物，具有抗炎、抗高血糖、抗菌和抗病毒等活性[4]。已有研究报道，茯苓酸可以改善PCOS小鼠的内分泌环境和卵母细胞质量[5]。但茯苓酸对PCOS大鼠胰岛素抵抗的影响鲜有报道。相关研究显示，高迁移率族蛋白B1（high-mobility group box 1，HMGB1）/晚期糖基化终产物受体（receptor for advanced glycation end products，RAGE）信号通路中的HMGB1、RAGE蛋白表达上调与肥胖糖尿病人群胰岛素抵抗呈显著正相关性[6]，但茯苓酸能否通过调节HMGB1/RAGE信号通路影响PCOS大鼠胰岛素抵抗尚不明确。因此，本研究主要探究茯苓酸对PCOS大鼠胰岛素抵抗的影响，并基于HMGB1/RAGE信号通路探讨其潜在作用机制，旨在为该药的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

CR2032型血糖仪购自杭州微策生物技术股份有限公司；iMark型酶标仪、Gel Doc XR型凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司；TY15型电子天平购自北京海富达科技有限公司；BX53型光学显微镜购自日本Olympus公司；DYCZ40D型电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 主要药品与试剂

茯苓酸对照品（纯度≥98%，批号20221103）购自成都瑞芬思生物科技有限公司；来曲唑片（规格2.5 mg，国药准字H19991001，批号20221008）购自江苏恒瑞医药股份有限公司；炔雌醇环丙孕酮片（规格为醋酸环丙孕酮2 mg和炔雌醇0.035 mg，批号20220916）购自拜耳医药保健有限公司；大鼠促卵泡素（follicle-stimulating hormone，FSH）、促黄体生成素（luteinizing hormone，LH）、睾酮（testosterone，T）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒（批号分别为20221203、20220926、20220817、20220829、20221023）均购自上海心语生物科技有限公司；HMGB1激活剂重组大鼠HMGB1蛋白（recombinant rat HMGB1 protein，rHMGB1）和兔源HMGB1、RAGE、核因子κB p65（nuclear factor kappa-B p65，NF-κB p65）、磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）一抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗（货号分别为ab215008、ab18256、ab216329、ab16502、ab239882、ab8245、ab6721）均购自英国Abcam公司；羧甲基纤维素钠（批号20221022）购自湖北裕盈生物科技有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雌性SD大鼠，共126只，3周龄，体重50～60 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司，实验动物生产许可证号为SCXK-（沪）2022-0007。所有动物购入后均饲养于上海中医药大学动物管理中心，实验动物使用许可证号为SYXK-（沪）2020-0009。本研究中的动物实验均获得了上海市第七人民医院伦理委员会的批准（批件号：2023-AR-010）。

2 方法

2.1 动物分组及处理

按照随机数字表法将126只大鼠随机分为空白组、PCOS组、茯苓酸低剂量组、茯苓酸高剂量组、炔雌醇环丙孕酮组（阳性对照组）、rHMGB1组、茯苓酸高剂量+rHMGB1组，每组18只。除空白组外，其余各组大鼠均需通过灌胃来曲唑混悬液的方式构建PCOS模型，具体

建模方法如下：连续21 d每天灌胃1次来曲唑混悬液（来曲唑溶于1%羧甲基纤维素钠溶液），灌胃剂量为1 mg/kg，灌胃体积为10 mL/kg[7]。空白组大鼠连续21 d按10 mL/kg的体积灌胃1%羧甲基纤维素钠溶液。造模第16天时进行阴道涂片检测，若观察到阴道上皮细胞持续角化，即为模型构建成功[7]。建模成功后，茯苓酸低、高剂量组大鼠分别灌胃8.33、33.32 mg/kg茯苓酸[8]，炔雌醇环丙孕酮组大鼠灌胃0.34 mg/kg炔雌醇环丙孕酮[9]，且均需尾静脉注射等体积的生理盐水；rHMGB1组大鼠尾静脉注射8 μg/kg rHMGB1[10]且还需灌胃等体积的生理盐水；茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠灌胃33.32 mg/kg茯苓酸且还需尾静脉注射8 μg/kg rHMGB1；空白组、PCOS组大鼠均需尾静脉注射且灌胃等体积的生理盐水。每天给药1次，持续4周。

2.2 标本收集及处理

末次给药24 h后，麻醉大鼠，收集大鼠空腹8 h的腹主动脉血，经离心（3 000 r/min，10 min）得血清，保存于－80 ℃冰箱中备用。取血完成后，在每组18只大鼠中随机选取6只，称定体重，然后处死大鼠，收集其卵巢，用滤纸吸去卵巢表面液体后称量卵巢质量，用于卵巢系数的计算。将各组剩余的12只大鼠处死，收集卵巢组织，分为两部分（每部分包含6只大鼠的卵巢组织），一部分组织固定于4%多聚甲醛中用于HE染色，另一部分组织冻存于－80 ℃冰箱中用于ELISA和Western blot检测。

2.3 大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数的检测

取“2.2”项下血清，用血糖仪检测大鼠空腹血糖；采用ELISA法检测大鼠空腹胰岛素水平，并计算胰岛素抵抗指数（insulin resistance index，HOMA-IR）：HOMA-IR＝空腹血糖水平×空腹胰岛素水平/22.5。

2.4 大鼠血清中FSH、LH、T水平的检测

取“2.2”项下血清，严格按照相应ELISA试剂盒说明书操作，检测大鼠血清中FSH、LH、T水平。

2.5 大鼠卵巢系数的检测

统计各组大鼠体重及卵巢质量，并计算卵巢系数，通过卵巢系数来评估卵巢病变程度。卵巢系数＝卵巢质量（g）/体重（g）。

2.6 大鼠卵巢组织病理变化观察

将“2.2”项下在4%多聚甲醛中固定24 h的卵巢组织取出，经常规脱水、石蜡包埋后制成4 μm厚的切片，常规HE染色，然后用光学显微镜观察卵巢组织病理变化。

2.7 大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平的检测

取“2.2”项下冻存于－80 ℃冰箱中的卵巢组织，匀浆后严格按照相应ELISA试剂盒说明书方法操作，检测大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平。

2.8 大鼠卵巢组织中HMGB1/RAGE信号通路相关蛋白表达量的检测

采用Western blot法检测。取冻存于－80 ℃冰箱中的卵巢组织，用RIPA裂解缓冲液裂解并提取组织中总蛋白，用BCA法对蛋白质定量，然后将蛋白进行高温变性。取30 μg变性蛋白，经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（电压100 V，电泳时间1 h）分离，然后以湿转法转移（电流200 mA，转膜时间2 h）至聚偏氟乙烯膜上，以5%脱脂牛奶封闭1 h；将膜与一抗HMGB1（稀释比例1∶3 000）、RAGE（稀释比例1∶4 000）、p-NF-κB p65（稀释比例1∶5 000）、NF-κB p65（稀释比例1∶5 000）、GAPDH（稀释比例1∶5 000）在4 ℃下孵育过夜，再与二抗（稀释比例1∶3 000）在常温下共同孵育1 h。加入ECL试剂观察蛋白印迹，利用Image J软件评估蛋白灰度值。以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）灰度值的比值作为目的蛋白表达量，其中p-NF-κB p65蛋白表达量用p-NF-κB p65与NF-κB p65的灰度值比值确定。

2.9 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析，符合正态分布且方差齐性的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，进一步两组间的比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 茯苓酸对大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR的影响

与空白组比较，PCOS组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR显著降低（$P<0.05$），而rHMGB1组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR显著升高（$P<0.05$）；与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR比较（$\bar{x}\pm s$，$n=18$）

组别	空腹血糖/（mmol/L）	空腹胰岛素/（mU/L）	HOMA-IR
空白组	5.12±0.22	70.36±2.96	16.01±0.07
PCOS组	7.95±0.31[a]	126.68±5.77[a]	44.76±1.98[a]
茯苓酸低剂量组	7.04±0.32[b]	109.84±3.69[b]	34.37±1.67[b]
茯苓酸高剂量组	5.59±0.23[b]	87.86±2.76[b]	21.83±1.05[b]
炔雌醇环丙孕酮组	5.61±0.24[b]	87.91±2.81[b]	21.92±1.08[b]
rHMGB1组	8.43±0.30[b]	145.52±5.06[b]	54.52±2.36[b]
茯苓酸高剂量+rHMGB1组	6.43±0.29[c]	95.57±3.15[c]	27.31±1.28[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与茯苓酸高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2 茯苓酸对大鼠血清中FSH、LH、T水平的影响

与空白组比较，PCOS组大鼠血清中FSH水平显著降低（$P<0.05$），LH、T水平显著升高（$P<0.05$）。与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组

大鼠血清中FSH水平显著升高（$P<0.05$），LH、T水平显著降低（$P<0.05$）；而rHMGB1组大鼠血清中FSH水平显著降低（$P<0.05$），LH、T水平显著升高（$P<0.05$）。与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠血清中FSH水平显著降低（$P<0.05$），LH、T水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

表2　各组大鼠血清中FSH、LH、T水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=18$）

组别	FSH/（mU/mL）	LH/（mU/mL）	T/（nmol/L）
空白组	73.35±3.67	59.26±2.33	1.12±0.08
PCOS组	28.85±1.28[a]	81.15±3.67[a]	2.35±0.11[a]
茯苓酸低剂量组	36.69±1.71[b]	72.23±2.85[b]	2.01±0.09[b]
茯苓酸高剂量组	62.24±2.85[b]	64.45±2.93[b]	1.42±0.12[b]
炔雌醇环丙孕酮组	62.56±2.91[b]	64.76±2.94[b]	1.43±0.09[b]
rHMGB1组	21.22±1.32[b]	87.86±3.25[b]	2.67±0.13[b]
茯苓酸高剂量+rHMGB1组	41.15±2.03[c]	70.06±3.01[c]	1.86±0.07[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与茯苓酸高剂量组比较，$P<0.05$。

3.3　茯苓酸对大鼠卵巢系数的影响

与空白组[$(6.12\pm0.27)\times10^{-4}$ g/g，$n=6$]比较，PCOS组大鼠卵巢系数[$(8.26\pm0.29)\times10^{-4}$ g/g，$n=6$]显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组大鼠卵巢系数[分别为$(7.83\pm0.19)\times10^{-4}$、$(6.56\pm0.21)\times10^{-4}$、$(6.58\pm0.22)\times10^{-4}$ g/g，$n=6$]显著降低（$P<0.05$），而rHMGB1组大鼠卵巢系数[$(8.64\pm0.23)\times10^{-4}$ g/g，$n=6$]显著升高（$P<0.05$）；与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠卵巢系数[$(7.37\pm0.21)\times10^{-4}$ g/g，$n=6$]显著升高（$P<0.05$）。

3.4　茯苓酸对大鼠卵巢组织病理变化的影响

空白组大鼠卵巢组织结构完整，卵泡发育良好，无囊性卵泡生成；PCOS组大鼠卵巢组织结构紊乱，可见大量囊性卵泡生成；与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组大鼠卵巢组织病理损伤有所改善，而rHMGB1组大鼠卵巢组织病理损伤加剧；与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠卵巢组织病理损伤严重。结果见图1。

3.5　茯苓酸对大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平的影响

与空白组比较，PCOS组大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平显著降低（$P<0.05$），而rHMGB1组大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平显著升高（$P<0.05$）；与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

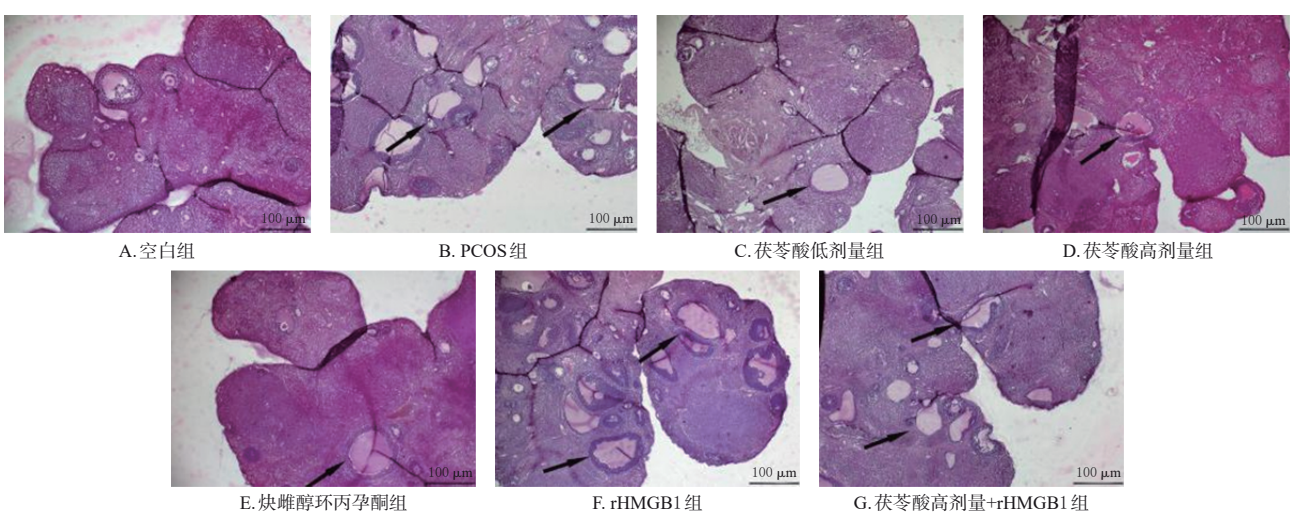
表3　各组大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，pg/mg）

组别	IL-1β	TNF-α
空白组	15.52±0.68	121.13±6.15
PCOS组	62.26±2.31[a]	236.68±10.44[a]
茯苓酸低剂量组	51.52±2.08[b]	199.92±8.65[b]
茯苓酸高剂量组	28.23±1.15[b]	141.52±6.34[b]
炔雌醇环丙孕酮组	28.34±1.23[b]	140.68±6.16[b]
rHMGB1组	73.36±3.11[b]	265.52±11.58[b]
茯苓酸高剂量+rHMGB1组	46.67±2.18[c]	182.25±7.35[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与茯苓酸高剂量组比较，$P<0.05$。

3.6　茯苓酸对大鼠卵巢组织中HMGB1/RAGE信号通路相关蛋白表达的影响

与空白组比较，PCOS组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量显著升高（$P<0.05$）；与PCOS组比较，茯苓酸低、高剂量组和炔雌醇环丙孕酮组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量显著降低（$P<0.05$），而rHMGB1组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量显著升高（$P<0.05$）；与茯苓酸高剂量组比较，茯苓酸高剂量+rHMGB1组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、表4。

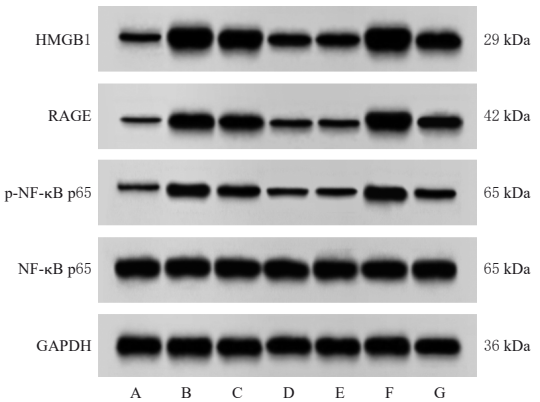


A.空白组　B. PCOS组　C.茯苓酸低剂量组　D.茯苓酸高剂量组

E.炔雌醇环丙孕酮组　F. rHMGB1组　G.茯苓酸高剂量+rHMGB1组

↑：囊性卵泡。

图1　各组大鼠卵巢组织病理损伤情况（HE染色）



A：空白组；B：PCOS组；C：茯苓酸低剂量组；D：茯苓酸高剂量组；E：炔雌醇环丙孕酮组；F：rHMGB1组；G：茯苓酸高剂量+rHMGB1组。

图2　各组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65、NF-κB p65蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	HMGB1/GAPDH	RAGE/GAPDH	p-NF-κB p65/NF-κB p65
空白组	0.45±0.03	0.21±0.02	0.15±0.01
PCOS组	1.78±0.14[a]	1.05±0.08[a]	0.72±0.06[a]
茯苓酸低剂量组	1.45±0.12[b]	0.86±0.07[b]	0.59±0.04[b]
茯苓酸高剂量组	0.64±0.05[b]	0.40±0.03[b]	0.28±0.02[b]
炔雌醇环丙孕酮组	0.62±0.06[b]	0.41±0.04[b]	0.29±0.02[b]
rHMGB1组	2.02±0.18[b]	1.36±0.11[b]	0.89±0.07[b]
茯苓酸高剂量+rHMGB1组	1.18±0.15[c]	0.72±0.06[c]	0.46±0.04[c]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与PCOS组比较，$P<0.05$；c：与茯苓酸高剂量组比较，$P<0.05$。

4　讨论

PCOS是一种复杂的疾病，具有多种因素和多种临床表现，严重影响女性健康。胰岛素抵抗是PCOS的一个主要特征，主要表现为个体对外源性或内源性胰岛素的敏感性降低，导致机体无法使用胰岛素来调节血糖，使血糖始终处于高水平[11]。高雄激素血症是PCOS的另一个核心组成部分，可通过测量T水平来评估[12]。据报道，PCOS患者通常表现为LH水平升高、FSH水平下降，高水平的LH会促使卵泡膜细胞合成大量T，而低水平的FSH则会抑制卵巢颗粒细胞中芳香化酶的活性，导致T向雌激素转化的过程受阻，最后使卵巢内处于高雄激素环境，这一环境会使卵泡排出受阻，进而形成卵巢多囊性改变[13]。本研究通过灌胃来曲唑混悬液的方法建立PCOS大鼠模型，结果显示，与空白组比较，PCOS组大鼠空腹血糖、空腹胰岛素水平及HOMA-IR升高，FSH水平降低，LH、T水平升高，表明PCOS大鼠存在胰岛素抵抗和高雄激素血症。此外，PCOS与慢性低度炎症有关[14]。因此，本研究检测了PCOS大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平和卵巢系数及卵巢组织病理变化。结果显示，与空白组比较，PCOS大鼠卵巢组织中IL-1β、TNF-α水平及卵巢系数升高，卵巢组织病理损伤严重，表明PCOS大鼠存在炎症反应且卵巢组织存在病理学改变。因此，改善胰岛素抵抗及降低炎症反应可能是治疗PCOS的有效途径之一。

茯苓酸是一种来自茯苓的羊毛脂型三萜类化合物，具有多种药理作用，如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、降血糖和镇静[15]。据报道，茯苓酸可缓解PCOS小鼠的胰岛素抵抗[8]，可抑制脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的炎症反应[16]。以上研究表明，茯苓酸具有改善胰岛素抵抗及抑制炎症反应的作用。由于炔雌醇环丙孕酮对PCOS所致的雄激素高等症状具有一定的改善作用，因此本研究以其为阳性对照药物。本研究亦证实，茯苓酸和炔雌醇环丙孕酮均可改善PCOS大鼠胰岛素抵抗及降低炎症反应，且茯苓酸剂量越高，效果越显著。这提示茯苓酸可能成为治疗PCOS的潜在有效药物之一。

HMGB1是一种典型的损伤相关分子模式蛋白，主要通过与RAGE的受体结合进一步激活NF-κB蛋白，而NF-κB蛋白通过翻译后修饰（磷酸化）进一步活化NF-κB信号通路并引起炎症级联反应[17]。据报道，沉默*HMGB1*基因可提高滋养层细胞对胰岛素的敏感性，并减少促炎因子的分泌[18]；抑制HMGB1/RAGE信号通路可缓解大鼠急性胰腺炎的进展[19]；抑制NF-κB信号通路可改善糖尿病大鼠胰岛素抵抗[20]。本研究显示，与PCOS组比较，rHMGB1组大鼠卵巢组织中HMGB1、RAGE、p-NF-κB p65蛋白表达量升高，大鼠胰岛素抵抗及炎症反应增强，且rHMGB1为HMGB1激活剂，表明HMGB1/RAGE信号通路确实参与了PCOS大鼠胰岛素抵抗和炎症反应过程。此外，本研究还发现，茯苓酸可改善PCOS大鼠胰岛素抵抗并抑制炎症反应，且茯苓酸剂量越高，其效果越显著。笔者推测茯苓酸可能通过抑制HMGB1/RAGE信号通路，进而改善PCOS大鼠的胰岛素抵抗并抑制其炎症反应。为了验证该推测，本研究在高剂量茯苓酸作用的基础上再加上HMGB1激活剂rHMGB1来干预PCOS大鼠，结果显示，rHMGB1减弱了高剂量茯苓酸对PCOS大鼠胰岛素抵抗的改善作用以及对炎症反应的抑制作用，证实了上述推测。

综上所述，茯苓酸可能通过抑制HMGB1/RAGE信号通路来改善PCOS大鼠胰岛素抵抗并抑制其炎症反应。但茯苓酸对PCOS的治疗作用可能还涉及其他机制，这将是本研究后续研究的重要方向之一。

参考文献

[1] YU J，DING C F，HUA Z J，et al. Protective effects of berberine in a rat model of polycystic ovary syndrome mediated via the PI3K/AKT pathway[J]. J Obstet And Gynaecol，2021，47(5)：1789-1803.

[2] RAMEZANI TEHRANI F，AMIRI M. Polycystic ovary syndrome in adolescents：challenges in diagnosis and treatment[J]. Int J Endocrinol Metab，2019，17(3)：1-9.

[3] SHEN H R，XU X，LI X L. Berberine exerts a protective effect on rats with polycystic ovary syndrome by inhibiting the inflammatory response and cell apoptosis[J].

Reprod Biol Endocrinol，2021，19(1)：3-13.

[4] WEI C Y，WANG H Z，SUN X，et al. Pharmacological profiles and therapeutic applications of pachymic acid (review)[J]. Exp Ther Med，2022，24(3)：547.

[5] FU X P，XU L，FU B B，et al. Pachymic acid protects oocyte by improving the ovarian microenvironment in polycystic ovary syndrome mice[J]. Biol Reprod，2020，103(5)：1085-1098.

[6] SUBRAMANIANS，PALLATIP K，SHARMAP，et al. Significant association of TREM-1 with HMGB1，TLRs and RAGE in the pathogenesis of insulin resistance in obese diabetic populations[J]. Am J Transl Res，2017，9(7)：3224-3244.

[7] 马丽亚，杜婧雯，张童，等. 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[J]. 中国药房，2022，33(23)：2869-2873.
MA L Y，DU J W，ZHANG T，et al. Study on improvement effects of Jinkui shenqi pills on polycystic ovary syndrome model rats and the mechanism[J]. China Pharm，2022，33(23)：2869-2873.

[8] 符贤佩. 茯苓酸改善PCOS小鼠卵母细胞损伤的作用研究[D]. 厦门：厦门大学，2018.
FU X P. Research on the protective effect of pachymic acid against the impaired oocyte quality in PCOS mouse [D]. Xiamen：Xiamen University，2018.

[9] 周知，涂志华，黎业娟，等. 川芎嗪对多囊卵巢综合征大鼠卵巢功能及PPAR-γ/NF-κB通路的影响[J]. 中成药，2023，45(1)：251-254.
ZHOU Z，TU Z H，LI Y J，et al. Effects of ligustrazine on ovarian function and PPAR-γ/NF-κB pathway in rats with polycystic ovary syndrome[J]. Chin Tradit Pat Med，2023，45(1)：251-254.

[10] ZHAI Y Y，ZHU Y L，LIU J Y，et al. Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein B1 group (HMGB1)/toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway[J]. Med Sci Monit，2020，26：e918617.

[11] TONG C，WU Y，ZHANG L L，et al. Insulin resistance，autophagy and apoptosis in patients with polycystic ovary syndrome：association with PI3K signaling pathway[J]. Front Endocrinol，2022，13：1091147.

[12] KARAKAS S E. New biomarkers for diagnosis and management of polycystic ovary syndrome[J]. Clin Chim Acta，2017，471：248-253.

[13] 刘亚敏，董文霞，薛鹏坤，等. 金匮肾气丸通过调控PI3K-AKT-mTOR及PI3K-AKT-GLUT4通路干预多囊卵巢综合征大鼠的作用机制研究[J]. 中药药理与临床，2023，39(1)：1-7.
LIU Y M，DONG W X，XUE P K，et al. Intervention effect of Jinkui shenqi wan on polycystic ovary syndrome in rats by regulating PI3K-AKT-mTOR and PI3K-AKT-GLUT4 pathways[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med，2023，39(1)：1-7.

[14] AKAN O Y，BILGIR O. The relation of dermcidin with insulin resistance and inflammation in women with polycystic ovary syndrome[J]. Rev Da Assoc Med Bras 1992，2022，68(6)：820-826.

[15] JIANG G P，LIAO Y J，HUANG L L，et al. Effects and molecular mechanism of pachymic acid on ferroptosis in renal ischemia reperfusion injury[J]. Mol Med Rep，2021，23(1)：63-72.

[16] 陈云，王婷婷，郝明明，等. 茯苓酸对LPS诱导的急性肺损伤小鼠的保护作用及机制[J]. 广东药科大学学报，2022，38(1)：83-89.
CHEN Y，WANG T T，HAO M M，et al. Protective effect and mechanism of pachymic acid on LPS-induced acute lung injury[J]. J Guangdong Pharm Univ，2022，38(1)：83-89.

[17] ZOU C C，LIU L，HUANG C Q，et al. Baiying qingmai formulation ameliorates thromboangiitis obliterans by inhibiting HMGB1/RAGE/NF-κB signaling pathways[J]. Front Pharmacol，2022，13：1018438.

[18] 高艳宇，林娟，王琼，等. 沉默HMGB1通过下调NF-κB信号来改善滋养细胞增殖侵袭及胰岛素抵抗和炎症反应[J]. 河北医学，2021，27(8)：1244-1250.
GAO Y Y，LIN J，WANG Q，et al. Silencing HMGB1 improves trophoblast cell proliferation invasion insulin resistance and inflammation by downregulating NF-κB signaling [J]. Hebei Med，2021，27(8)：1244-1250.

[19] 宋冰，辜吉秀，汪永锋，等. 大黄牡丹汤调控HMGB1/RAGE/NF-κB信号通路干预急性胰腺炎模型大鼠的机制[J]. 畜牧兽医学报，2021，52(11)：3260-3269.
SONG B，GU J X，WANG Y F，et al. Mechanism of Dahuang mudan decoction regulating HMGB1/RAGE/NF-κB signaling pathway in rats with acute pancreatitis[J]. Acta Vet Zootechnica Sin，2021，52(11)：3260-3269.

[20] 金笑呈. 加味清肺泻肝汤通过NF-κB信号通路对糖尿病胰岛素抵抗大鼠的影响[D]. 延吉：延边大学，2021.
JIN X C. The effect of modified Jiawei qingfei xiegan decoction on insulin resistance diabetic rats through NF-κB signaling pathway[D]. Yanji：Yanbian University，2021.

（收稿日期：2023-07-05　修回日期：2023-11-19）
（编辑：林　静）