

基于NLRP3炎症通路探讨健脾益肾化浊方对多囊卵巢综合征大鼠卵巢功能的影响

陈苗¹, 杜小利^{2*}, 冯亚宏³, 张晓静³, 罗嘉琦¹, 王静¹, 南楠¹, 刘文钊¹, 邢莎莎²,
田瑞莹², 杨丽², 孙苗², 何瑞², 陈冬梅², 马会明^{2*}

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学宁夏区域高发病中西医结合防治研究重点实验室, 生育力保持教育部重点实验室, 实验动物中心, 总医院宁夏干细胞与再生医学重点实验室, 银川 750004; 3. 宁夏中医医院暨中医研究院, 银川 750004)

[摘要] 目的:探究健脾益肾化浊方(JPYSHZ)改善多囊卵巢综合征(PCOS)卵巢功能的作用机制。方法:将70只SD雌性大鼠随机分为6组,空白组和模型组各15只,二甲双胍组(0.1 g·kg⁻¹)、JPYSHZ低、中、高剂量组(1.275、2.55、5.10 g·kg⁻¹)组各10只。空白组给予生理盐水(10 mL·kg⁻¹)灌胃和普通饲料喂养,其余各组均采用来曲唑(1 mg·kg⁻¹)灌胃联合高脂饲料喂养21 d构建PCOS模型,造模结束后,空白组和模型组给与等体积生理盐水灌胃,各药物组给予相应剂量的药物灌胃,共30 d。比较造模前与造模后大鼠体质量和空腹血糖(FPG)变化;苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠卵巢组织形态学改变;酶联免疫吸附测定法(ELISA)监测大鼠血清促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、睾酮(T)、抗苗勒管激素(AMH)和雌二醇(E₂)水平,并计算LH/FSH;免疫组化法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢组织中核苷结合寡聚化域蛋白样受体3(NALP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)、核转录因子-κB(NF-κB)、白细胞介素(IL)-1β、IL-18和IL-6蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组大鼠卵巢中可见较多囊性扩张的大卵泡,未见优势卵泡、卵泡颗粒层减少且排列松散,黄体数量明显减少;血清T、LH、AMH和LH/FSH明显升高(P<0.05, P<0.01),FSH和E₂明显降低(P<0.05, P<0.01);卵巢组织中NALP3、ASC、Caspase-1、NF-κB、IL-1β、IL-18和IL-6蛋白相对表达量均明显升高(P<0.05, P<0.01)。与模型组比较,JPYSHZ各剂量组和二甲双胍组卵巢组织中可见各级生长卵泡和黄体,囊性扩张卵泡减少,卵泡颗粒层厚度增加,可见成熟卵泡,卵母细胞局部形态完整;血清T、LH、AMH和LH/FSH明显降低(P<0.05, P<0.01),E₂和FSH明显升高(P<0.05);卵巢组织中NALP3、ASC、Caspase-1、NF-κB、IL-1β、IL-18和IL-6蛋白相对表达量明显下降(P<0.05, P<0.01)。结论:JPYSHZ可通过抑制NLRP3炎症小体激活,减少卵巢组织中各炎症因子释放,调节内分泌水平,有效减轻PCOS炎症状态,发挥改善卵巢功能作用。

[关键词] 健脾益肾化浊方; 多囊卵巢综合征; 核苷结合寡聚化域蛋白样受体3(NALP3); 大鼠

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R271.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0061-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221942

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220803.1742.003.html>

[网络出版日期] 2022-08-04 13:12

Effect of Jianpi Yishen Huazhuo Prescription on Ovarian Function in Rats with Polycystic Ovary Syndrome Based on NLRP3 Inflammatory Pathway

CHEN Miao¹, DU Xiaoli^{2*}, FENG Yahong³, ZHANG Xiaojing³, LUO Jiaqi¹, WANG Jing¹, NAN Nan¹,
LIU Wenzhao¹, XING Shasha², TIAN Ruiying², YANG Li², SUN Miao², HE Rui²,
CHEN Dongmei², MA Huiming^{2*}

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

[收稿日期] 2022-05-04

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目(2020AAC03430, 2022AAC03216);国家自然科学基金项目(81660813);宁夏科技领军人才项目(2020GKLRX11);宁夏药物研发创新团队项目(NXKJT2019012)

[第一作者] 陈苗,在读硕士,从事中医药防治妇科疾病的研究,E-mail:CM_110326@163.com

[通信作者] *杜小利,硕士,教授,从事中医药治疗女性内分泌疾病的研究,E-mail:dxl_515@163.com;

*马会明,博士,副教授,从事生殖损伤和康复治疗的研究,E-mail:mhm289@nxmu.edu.cn

2. Ningxia Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Experimental Animal Center of Ningxia Medical University, Ningxia Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine of General Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;
3. Ningxia Chinese Medicine Research Center, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Jianpi Yishen Huazhuo prescription in the improvement of ovarian function in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Method:** Seventy female SD rats in SPF grade were randomly divided into 6 groups, 15 in the blank group and 15 in the model group, 10 in the metformin group ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and 10 in the low ($1.275 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), medium ($2.55 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and high-dose ($5.10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) Jianpi Yishen Huazhuo prescription groups. The blank group was given normal saline ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) by gavage and ordinary feed, and the other groups were given letrozole ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) by gavage combined with high-fat feed for 21 days to induce the model of PCOS. After modeling, the blank group and model group were given equal volume normal saline by gavage, and each drug group was given the corresponding dose of the drug by gavage for 30 days. The changes in body mass and fasting blood glucose (FPG) of rats before and after modeling were compared. Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the morphological change in the ovaries of rats in each group. The serum levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T), anti-Mullerian hormone (AMH), and estradiol (E_2) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the LH/FSH ratio was calculated. Immunohistochemical staining (IHC) and Western blot were used to detect the protein expression levels of nucleoside binding oligomerization domain protein like receptor 3 (NALP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cysteine protease-1 (Caspase-1), nuclear transcription factor- κB (NF- κB), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18), and interleukin-6 (IL-6) in the rat ovaries. **Result:** As compared with the blank group, large follicles with polycystic expansion were found in the ovaries of the model group, no dominant follicles were found, the granular layer of follicles decreased and arranged loosely, and the number of corpus luteum decreased significantly. Serum T, LH, AMH and LH/FSH increased in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), while FSH and E_2 decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The relative protein expression levels of NALP3, ASC, Caspase-1, NF- κB , IL-1 β , IL-18, and IL-6 increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in the ovaries of the model group. Compared with the model group, the low, medium, and high-dose Jianpi Yishen Huazhuo prescription groups and the metformin group showed growing follicles and corpus luteum at all levels, the number of cystic expanding follicles decreased, the thickness of follicular granular layer increased, the number of follicular fluid increased, mature follicles were visible, and the local morphology of oocytes was complete. Serum T, LH, AMH, and LH/FSH in these groups decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while E_2 and FSH increased ($P<0.05$). The relative protein expressions of NALP3, ASC, Caspase-1, NF- κB , IL-1 β , IL-18, and IL-6 in the ovaries of these groups decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). There was no significant difference among the treatment groups. **Conclusion:** By inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome, Jianpi Yishen Huazhuo prescription reduces the release of NALP3, ASC, Caspase-1, NF- κB , IL-18, IL-1 β , and IL-6 inflammatory factors in ovarian tissues, regulates endocrine level, and effectively reduces PCOS inflammatory status, so as to play a role in improving ovarian function.

[Keywords] Jianpi Yishen Huazhuo prescription; polycystic ovary syndrome; nucleoside binding oligomerization domain protein like receptor 3 (NLRP3); rats

多囊卵巢综合征(PCOS)是育龄期女性常见的一种生殖代谢功能异常性疾病,常以月经不调、排

卵障碍、高雄激素为主要临床表现^[1]。多伴有胰岛素抵抗(IR)或代偿性高胰岛素血症、肥胖、代谢异

常和慢性低度炎症^[2]。若不及时治疗,远期会引发心脑血管疾病、糖尿病以及妇科相关恶性肿瘤等,严重影响患者的生命安全和生活质量^[3]。PCOS的发病原因复杂,发病机制尚存在争议。慢性低度炎症作为近些年的研究热点之一,其在PCOS中的重要作用已得到广泛认可,PCOS患者处于慢性低度炎症是卵巢损伤的主要原因之一,且已证实炎症可加重PCOS的病理特征促进PCOS的发生、发展^[4-5]。研究发现PCOS大鼠卵巢出现炎症反应时可激活炎症复合体中NOD样受体蛋白3(NLRP3),进而启动核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,促使炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 和IL-18的合成和分泌,这也是PCOS患者体内炎症因子水平显著高于正常女性的原因之一^[6-8]。

中医多从“脾肾两虚、痰瘀阻络”的理论探讨PCOS,以“健脾益肾化痰、祛湿逐瘀助运”之法整体辨证施治,在改善生殖功能和内分泌方面具有一定的优势和潜力^[9]。本课题所用健脾益肾化浊方沿袭传统名方二仙汤和苍附导痰丸、四君子汤衍化而来,全方具有“健脾益肾、化浊助运”之功,课题组前期经过临床60例疗效研究已证实该方在改善PCOS内分泌和卵巢功能方面疗效显著^[10]。但其发挥作用的机制尚不明确,因此本研究成功构建以痰湿为主要特征的PCOS大鼠模型,通过NLRP3炎症通路相关蛋白及其下游炎症因子的表达探讨健脾益肾化浊方治疗PCOS的作用机制,为健脾益肾化浊方临床治疗PCOS提供新的思路和理论依据。

1 材料

1.1 动物 8周龄SPF级SD雌性大鼠70只,体重200~220 g,由宁夏医科大学实验动物中心饲养管理,合格证号SCXK(宁)2015-0001。本实验经宁夏医科大学实验动物伦理委员会和宁夏回族自治区中医医院暨中医研究院伦理同意,遵循《实验动物管理条例》。

1.2 药物 健脾益肾化浊方由黄芪30 g、党参15 g、茯苓15 g、白术15 g、淫羊藿10 g、仙茅10 g、菟丝子15 g、桑寄生15 g、陈皮12 g、苍术15 g、荷叶12 g、香附12 g组成,购自宁夏中医医院暨中医研究院,经宁夏医科大学药学院赵建军教授鉴定质量合格。高脂饲料(美国Research Diets公司,批号D12492);普通饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司,批号21080114);来曲唑片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号H19991001);盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号

H20023370)。

1.3 试剂 全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20211018);一抗NALP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)、白细胞介素-18(IL-18)、白细胞介素-6(IL-6)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京博奥森生物有限公司,批号分别为bs-10021R、bs-6741R、bs-6368R、bs-0529R、bs-4539R、bs-0061R);核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体(美国CST公司,批号D14E12);白细胞介素-1 β (IL-1 β)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号BA2782);超敏发光液、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京兰博利德公司,批号分别为1060051911、G0100);二抗羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)、羊抗兔IgG-HRP(北京兰博利德生物技术有限公司,批号分别为S0100、S0101);Harris苏木素染色液(北京博奥拓达科技有限公司,批号180301);伊红染液(北京索莱宝科技有限公司,批号G1100);血清促卵泡生成素(FSH)、促黄体生成素(LH)、睾酮(T)、抗苗勒管激素(AMH)、雌二醇(E₂)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL13251、JL11706、JL11473、JL12462、JL11525)。

1.4 仪器 JXFSTPRP-CL型全自动冷冻研磨仪、Mini-PROTEAN Tetra型电泳装置、Universal Hood II型化学发光仪(美国Bio-Rad公司);Epoch型全波长酶标仪(美国BioTek公司);Centrifuge 5417R型高速低温离心机(德国Eppendorf公司);KD-BM II型石蜡包埋机(中国KEDEE公司);RM2235型切片机(德国Leica公司);BX41型普通光学显微镜、BX51型正置荧光显微镜(日本Olympus公司);GA-7型血糖仪(中国Sinocare公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组 大鼠适应性喂养1周,筛选出动情周期正常的70只纳入实验。随机分为空白组和模型组各15只、二甲双胍组、健脾益肾化浊方低、中、高剂量组各10只。除空白组外,其余各组均给予高脂饲料喂养联合来曲唑1 mg·kg⁻¹·d⁻¹溶于1%羧甲基纤维素钠(1% CMC-Na)灌胃构建PCOS模型^[11];空白组给予10 mL·kg⁻¹·d⁻¹生理盐水灌胃加普通饲料喂养,连续21 d。造模期间,测量大鼠造模前与造模后大鼠体质量和空腹血糖。造模结束后,从空白组和模型组各随机抽取5只取材,通过大鼠体质量、空腹血糖(FPG)、血清激素水平和卵巢组织苏木素-伊红(HE)染色验证模型。实验中因造模灌

胃不适死亡7只, 剩余空白组8只、其余各组均9只。

2.2 给药 健脾益肾化浊方使用颗粒剂, 与饮片等量换算后颗粒剂25.5 g为成人一剂的用量。参照《药理实验方法学》^[12]中人体表面积法换算, 大鼠低、中、高剂量组分别为1.275、2.55、5.10 g·kg⁻¹·d⁻¹, 将健脾益肾化浊方颗粒剂研磨后用蒸馏水溶解, 分别配制成质量浓度为0.19、0.38、0.76 g·mL⁻¹的溶液灌胃。二甲双胍组给予盐酸二甲双胍0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹溶于1% CMC-Na中灌胃; 空白组和模型组每日给予等体积生理盐水灌胃, 连续治疗30 d。

2.3 检测指标及方法 尾静脉采血测量大鼠FPG, 治疗结束后, 所有大鼠禁食12 h, 2%戊巴比妥钠(0.04 g·kg⁻¹)腹腔注射, 麻醉后心脏采血, 4℃、3 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm, 下同)后取上清, 用于ELISA检测。取双侧卵巢, 一侧卵巢放入液氮中冷冻后置于低温冰箱, 用于蛋白免疫印迹法(Western blot)检测; 一侧卵巢于4%多聚甲醛中固定24 h, 脱水后进行石蜡包埋, 用于HE染色和免疫组化(IHC)实验。

2.3.1 HE染色 观察各组大鼠卵巢组织形态学变化 卵巢组织切片, 于温箱中烘烤2 h, 二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、进行HE染色、中性树胶封片、晾干后在白光显微镜下观察各组卵巢组织形态并采集相应图像。

2.3.2 ELISA检测 各组大鼠血清FSH、LH、T、AMH和E₂水平 按照ELISA检测试剂盒说明书操作步骤, 使用酶标仪设置波长在450 nm处测量各孔吸光度A, 标准曲线下计算各样品含量。

2.3.3 免疫组化(IHC)检测 卵巢中炎症相关蛋白NALP3、ASC、Caspase-1、NF-κB、IL-1β、IL-18、IL-6的阳性表达 卵巢组织石蜡切片、烘烤、二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水和枸橼酸微波修复、山羊血清封闭, NALP3、ASC、Caspase-1、NF-κB、IL-1β、IL-18和

IL-6(1:250)4℃孵育过夜, 二氨基联苯胺(DAB)显色后, 磷酸盐缓冲液(PBS)中止、苏木素复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片, 在光学显微镜下观察并采集图像。

2.3.4 Western blot检测 大鼠卵巢组织中NALP3、ASC、Caspase-1、NF-κB、IL-1β、IL-18和IL-6蛋白相对表达 将卵巢组织剪碎、研磨、裂解后, 于4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min, 取上清, 蛋白定量(BCA)试剂盒在酶标仪波长562 nm下测蛋白浓度。SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、TBST洗3次, 内参β-actin和GAPDH(1:6 000), 滴加一抗(NALP3、ASC、Caspase-1、NF-κB、IL-1β、IL-18和IL-6 1:1 000), 4℃孵育过夜、复温、TBST洗3次, 二抗羊抗小鼠IgG-HRP和羊抗兔IgG-HRP(1:1万)室温孵育1 h、TBST洗3次、ECL化学发光, 并用Image J软件对各条带进行灰度值分析。

2.4 统计学方法 运用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较数据服从正态分布且方差齐者采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用t检验。以P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 来曲唑联合高脂饲料构建PCOS大鼠模型鉴定 通过大鼠体质量、空腹血糖、卵巢组织形态学改变以及血清激素水平进行模型鉴定。结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠体质量和空腹血糖明显升高; 卵巢呈多囊样改变; 血清激素LH、LH/FSH、T和AMH显著升高, FSH和E₂明显降低, 与PCOS典型表现一致, 提示造模成功。

3.1.1 造模前后体质量和空腹血糖变化 与空白组比较, 模型组大鼠在给予来曲唑联合高脂饲料造模后体质量和空腹血糖均显著升高(P<0.01)。见表1。

表1 来曲唑联合高脂饲料对大鼠体质量及空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of letrozole combined with high fat diet on body mass and fasting blood glucose of rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

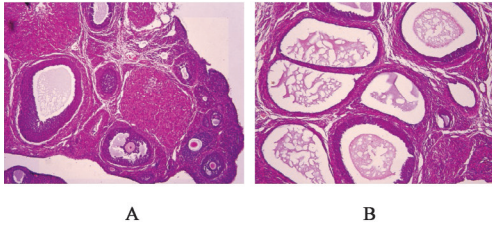
组别	体质量/g			FPG/mmol·L ⁻¹		
	造模前	造模后	增加量	造模前	造模后	增加量
空白组	246.38±13.41	282.65±14.14	36.29±5.38	3.371±0.170	3.386±0.168	0.343±0.151
模型组	261.96±19.02	347.37±22.86	79.99±25.43 ¹⁾	3.714±0.177	7.786±0.628	4.400±0.550 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾P<0.01

3.1.2 HE染色 观察卵巢组织形态学变化 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织内可见多个囊状扩大卵泡, 颗粒层减少, 黄体数量明显减少, 未见优势

卵泡, 间质细胞增生明显; 与模型组比较, 空白组大鼠卵巢组织内可见各级卵泡, 初级卵泡和次级卵泡较多, 卵母细胞结构完整, 颗粒细胞层排列紧密, 可

见多个黄体,发育良好。见图1。



注:A.空白组;B.模型组

图1 来曲唑联合高脂饲料对大鼠卵巢组织形态学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of letrozole combined with high fat diet on ovarian histomorphology in rats (HE,×100)

3.1.3 ELISA 检测血清激素 LH、FSH、LH/FSH、T、E₂和 AMH 水平 与空白组比较,模型组大鼠血清 LH、LH/FSH、T 和 AMH 水平明显升高($P<0.05$),

FSH 和 E₂水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

3.2 健脾益肾化浊方对 PCOS 大鼠的治疗效果评价及作用机制

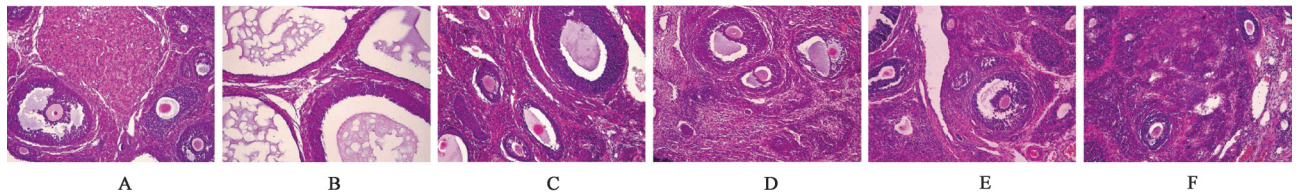
3.2.1 对 PCOS 大鼠卵巢组织形态学的影响 各组大鼠卵巢组织 HE 染色结果示,空白组大鼠卵巢组织内可见各个发育阶段的卵泡,可见形态正常的成熟卵泡以及黄体,颗粒细胞排列紧密呈多层,发育良好;与空白组比较,模型组卵巢组织内可见大量囊状扩张卵泡和闭锁卵泡,颗粒细胞层减少,排列松散且不规则,间质细胞增生和纤维化,黄体数量明显减少,未见优势卵泡;与模型组比较,二甲双胍组及健脾益肾化浊方低、中、高剂量组大鼠卵巢内囊性扩张卵泡减少,卵泡颗粒细胞增厚,排列整齐,黄体数量增加,卵泡液增加,可见各个发育阶段的卵泡。见图2。

表2 来曲唑联合高脂饲料对大鼠血清 LH、FSH、LH/FSH、T、AMH 和 E₂ 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of letrozole combined with high fat diet on serum LH, FSH, LH/FSH, T, AMH and E₂ in rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LH/U·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/FSH	T/ng·L ⁻¹	AMH/ng·L ⁻¹	E ₂ /pmol·L ⁻¹
空白组	23.76±2.91	8.62±0.23	2.75±0.29	145.90±17.32	1 991.00±114.50	56.17±5.50
模型组	47.68±2.00 ¹⁾	5.48±0.02 ²⁾	8.70±0.36 ¹⁾	252.70±17.96 ¹⁾	3 180.00±150.90 ¹⁾	24.12±5.32 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$



注:A.空白组;B.模型组;C.二甲双胍组;D.健脾益肾化浊方低剂量组;E.健脾益肾化浊方中剂量组;F.健脾益肾化浊方高剂量组(图3-图6同)

图2 健脾益肾化浊方对各组大鼠卵巢组织形态学的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on ovarian histomorphology in rats (HE,×200)

3.2.2 对 PCOS 大鼠血清 LH、FSH、LH/FSH、T、E₂和 AMH 的影响 与空白组比较,PCOS 模型组大鼠血清 LH、LH/FSH、T、AMH 明显升高($P<0.05, P<0.01$),FSH 和 E₂明显下降($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,健脾益肾化浊方各剂量组及二甲双胍组大鼠血清 LH、LH/FSH、T 和 AMH 明显降低($P<0.05, P<0.01$),FSH 和 E₂明显升高($P<0.05$),各治疗组间比较差异无统计学意义;其中健脾益肾化浊方低剂量治疗组血清 T、FSH 与 PCOS 模型组比较差异无统计学意义。见表3和表4。

在卵母细胞、颗粒细胞和黄体中有表达;IL-1 β 、IL-6 在颗粒细胞、黄体 and 间质中有表达;NALP3、ASC、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 均在健脾益肾化浊方高剂量组中表达不明显。见图3和图4。

3.2.3 对 PCOS 大鼠卵巢组织 NALP3、ASC、NF- κ B、Caspase-1、IL-18、IL-1 β 和 IL-6 蛋白的影响 IHC 结果显示,NALP3、ASC、NF- κ B 在黄体、卵泡液、颗粒细胞及间质中均有表达;Caspase-1、IL-18

3.2.4 对 PCOS 大鼠卵巢组织 NALP3、ASC、NF- κ B 蛋白表达的影响 与空白组比较,PCOS 模型组 NALP3 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,除健脾益肾化浊方低剂量治疗组差异无统计学意义外,其余各治疗组 NALP3 蛋白相对表达量均明显降低($P<0.05, P<0.01$),其中健脾益肾化浊方高剂量下调最为显著($P<0.01$);与空白组比较,模型组 Caspase-1、NF- κ B 蛋白相对表达量均明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,健脾益肾化浊方各剂量组和二甲双胍组 Caspase-1、NF- κ B 蛋白相对

表3 健脾益肾化浊方对PCOS大鼠血清LH、FSH、LH/FSH水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on serum LH, FSH and LH/FSH level in PCOS rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/FSH
空白组	8		27.72±3.83	8.34±0.09	3.33±0.45
模型组	9		44.38±1.90 ¹⁾	5.63±0.01 ²⁾	7.89±0.34 ²⁾
二甲双胍组	9	0.1	35.43±0.79 ³⁾	8.33±0.50 ³⁾	4.26±0.30 ³⁾
健脾益肾化浊方低剂量组	9	1.275	37.66±3.85 ³⁾	7.50±1.73	5.11±0.64 ³⁾
健脾益肾化浊方中剂量组	9	2.55	34.41±5.03 ³⁾	8.05±0.20 ³⁾	4.28±0.67 ³⁾
健脾益肾化浊方高剂量组	9	5.10	29.65±4.78 ³⁾	8.24±0.89 ³⁾	3.67±0.97 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表4-表6同)

表4 健脾益肾化浊方对PCOS大鼠血清T、AMH、E₂水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on serum T, AMH and E₂ level in PCOS rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	T/ng·L ⁻¹	AMH/ng·L ⁻¹	E ₂ /pmol·L ⁻¹
空白组	8		143.80±17.78	1 972.53±467.30	50.10±3.77
模型组	9		246.60±18.70 ¹⁾	3 428.59±311.50 ¹⁾	27.99±4.47 ¹⁾
二甲双胍组	9	0.1	127.00±6.47 ⁴⁾	2 257.01±425.40 ³⁾	40.87±9.63 ³⁾
健脾益肾化浊方低剂量组	9	1.275	200.30±36.76	2 792.72±498.00 ³⁾	34.85±8.94 ³⁾
健脾益肾化浊方中剂量组	9	2.55	175.90±13.18 ³⁾	2 922.23±355.40 ³⁾	41.36±1.75 ³⁾
健脾益肾化浊方高剂量组	9	5.10	172.60±36.14 ³⁾	2 515.16±448.10 ³⁾	36.11±4.12 ³⁾

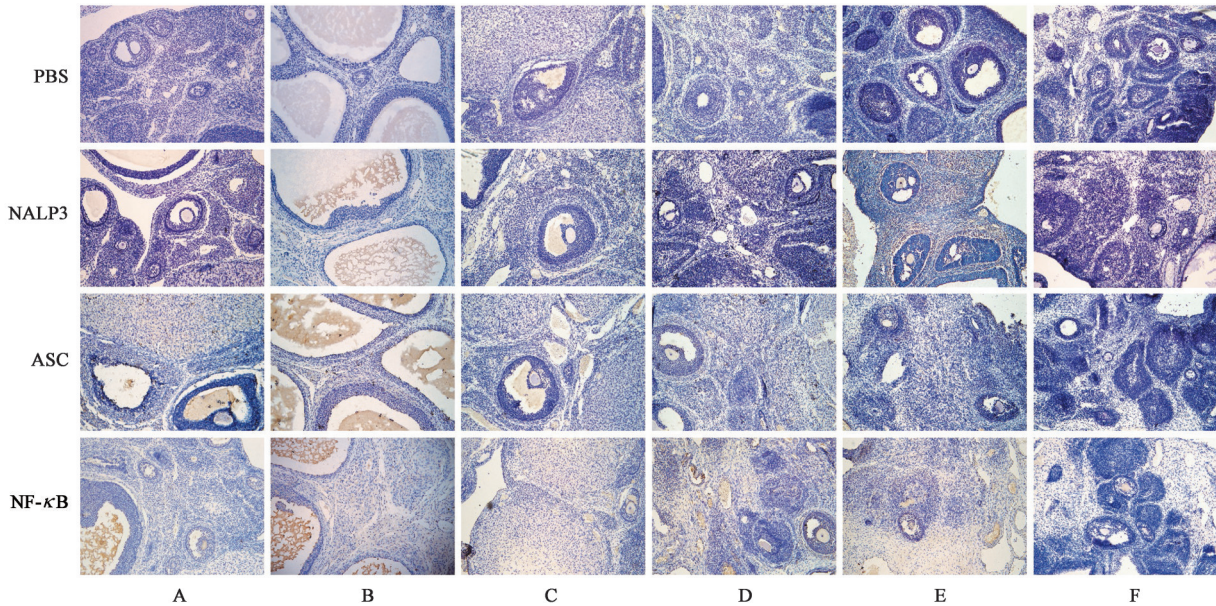


图3 健脾益肾化浊方对PCOS大鼠卵巢组织NALP3、ASC、NF-κB蛋白表达的影响(IHC,×200)

Fig. 3 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on NALP3, ASC and NF-κB expression in ovarian tissues of PCOS rats (IHC, ×200)

表达量均明显降低($P<0.05, P<0.01$),且健脾益肾化浊方中剂量组下调尤为显著($P<0.01$);各治疗组间差异无统计学意义。见表5、图5。

3.2.5 对PCOS大鼠卵巢组织IL-6、IL-18、ASC和IL-1β蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织中IL-6、IL-18、ASC和IL-1β蛋白相对表达

量均明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,健脾益肾化浊方各剂量组和二甲双胍组IL-6、IL-18和ASC蛋白相对表达量均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),其中健脾益肾化浊方低剂量组下调程度尤为显著($P<0.01$),IL-6和IL-18在健脾益肾化浊方高剂量组降低程度较为显著,差异有统计

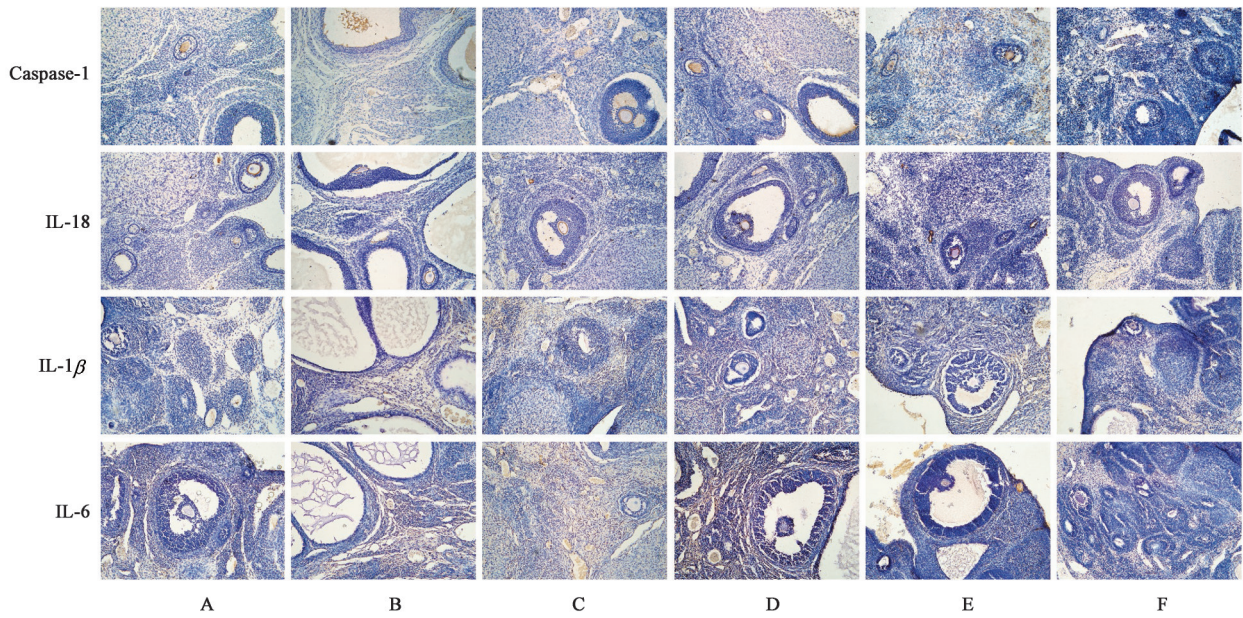


图4 健脾益肾化浊方对PCOS大鼠卵巢组织Caspase-1、IL-18、IL-1 β 和IL-6表达的影响(IHC, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on Caspase-1, IL-18, IL-1 β and IL-6 expression in ovarian tissues of PCOS rats (IHC, $\times 200$)

表5 健脾益肾化浊方对PCOS大鼠卵巢组织NALP3、Caspase-1、NF- κ B蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on protein expression of NALP3, Caspase-1 and NF- κ B in ovarian tissues of PCOS rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	NALP3/GAPDH	Caspase-1/GAPDH	NF- κ B/GAPDH
空白组		0.603 \pm 0.081	0.561 \pm 0.057	0.179 \pm 0.077
模型组		0.825 \pm 0.047 ¹⁾	0.872 \pm 0.064 ¹⁾	0.958 \pm 0.057 ²⁾
二甲双胍组	0.1	0.703 \pm 0.082 ³⁾	0.379 \pm 0.017 ³⁾	0.420 \pm 0.068 ³⁾
健脾益肾化浊方低剂量组	1.275	0.932 \pm 0.052	0.470 \pm 0.040 ³⁾	0.579 \pm 0.159 ³⁾
健脾益肾化浊方中剂量组	2.55	0.684 \pm 0.030 ³⁾	0.290 \pm 0.138 ⁴⁾	0.463 \pm 0.160 ⁴⁾
健脾益肾化浊方高剂量组	5.10	0.346 \pm 0.107 ⁴⁾	0.455 \pm 0.251 ³⁾	0.638 \pm 0.228 ³⁾

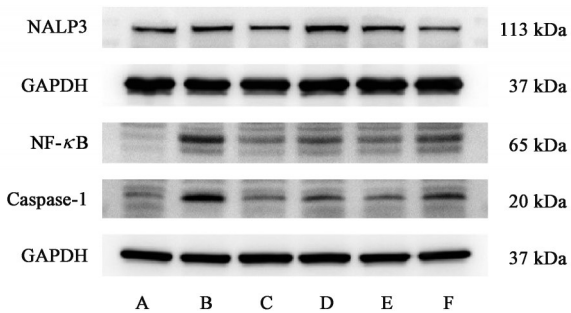


图5 各组大鼠卵巢组织NALP3、Caspase-1、NF- κ B蛋白电泳表达

Fig. 5 Electrophoresis of NALP3, Caspase-1 and NF- κ B protein expression in ovarian tissue of rats in each group

学意义($P < 0.01$),各治疗组间差异无统计学意义;健脾益肾化浊方中、高剂量组IL-1 β 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$),而二甲双胍组与健脾益肾化浊方低剂治疗组表现不明显,差异无统计学意义。见图6、表6。

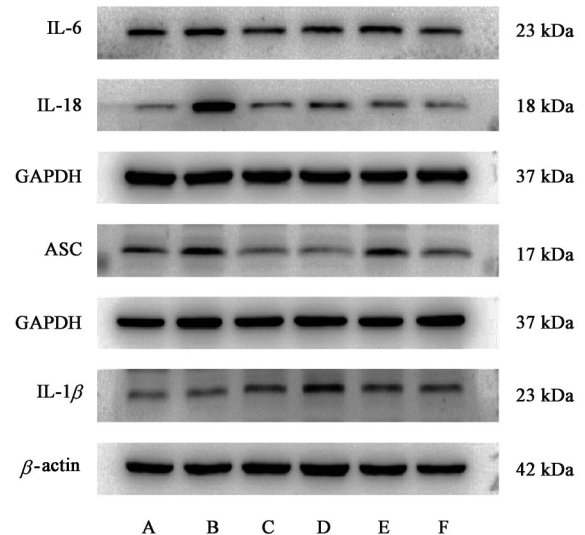


图6 各组大鼠卵巢组织IL-6、IL-18、ASC和IL-1 β 蛋白电泳表达

Fig. 6 Electrophoresis of IL-6, IL-18, ASC and IL-1 β protein expression in ovarian tissue of rats in each group

表6 健脾益肾化浊方对PCOS大鼠卵巢组织IL-6、IL-18、ASC和IL-1 β 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Jianpi Yishen Huazhuo prescription on protein expression of IL-6, IL-18, ASC and IL-1 β in ovarian of PCOS rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/GAPDH	IL-18/GAPDH	ASC/GAPDH	IL-1 β / β -actin
空白组		0.691 \pm 0.110	0.330 \pm 0.209	0.735 \pm 0.159	0.567 \pm 0.028
模型组		0.820 \pm 0.029 ¹⁾	0.859 \pm 0.088 ²⁾	0.884 \pm 0.177 ¹⁾	0.767 \pm 0.033 ¹⁾
二甲双胍组	0.1	0.611 \pm 0.103 ³⁾	0.340 \pm 0.127 ⁴⁾	0.484 \pm 0.021 ³⁾	0.853 \pm 0.138
健脾益肾化浊方低剂量组	1.275	0.706 \pm 0.158	0.486 \pm 0.094 ³⁾	0.451 \pm 0.097 ⁴⁾	0.842 \pm 0.148
健脾益肾化浊方中剂量组	2.55	0.852 \pm 0.143	0.450 \pm 0.179 ³⁾	0.711 \pm 0.085	0.573 \pm 0.293 ³⁾
健脾益肾化浊方高剂量组	5.10	0.499 \pm 0.074 ⁴⁾	0.402 \pm 0.128 ⁴⁾	0.580 \pm 0.237 ³⁾	0.515 \pm 0.342 ³⁾

4 讨论

中医学中无PCOS的记载,根据临床特征可归属为“闭经”“癥瘕”和“不孕”等范畴。《黄帝内经·素问·上古天真论》中载:“女子七岁,肾气盛,齿更发张;二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下,故有子……七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也”,强调了肾精在女性生长发育和生殖功能方面的重要作用。中医认为脾肾二脏在女性月经及生殖过程中起主导作用,是产生月经和维持正常月经周期的根本,也是决定女性生殖能力的根本。故诸多医家认为脾肾两虚是PCOS发生的关键,痰湿和瘀血为其主要致病因素^[13]。研究表明,在PCOS患者中脾虚痰湿证占比较高,多表现为肥胖,月经稀发,闭经,痤疮,腰膝酸软,神疲倦怠,少气懒言,舌淡苔白腻,脉沉滑等;而肥人多痰湿,痰湿者多脾虚,脾阳以肾阳为根,健脾首当益肾,因此健脾益肾、祛湿化痰助运为治疗PCOS的重要方法^[14-15]。

健脾益肾化浊方是由宁夏中医医院暨中医研究院妇科名家王淑斌主任医师根据多年临床经验,沿袭传统名方二仙汤和苍附导痰丸、四君子汤衍化而来。方中淫羊藿、仙茅、菟丝子、桑寄生补肾益精,调理冲任;黄芪、党参、茯苓、白术健脾燥湿,补益气血;陈皮、苍术、荷叶、香附理气燥湿化痰。全方基于“脾肾皆为生殖之本”的观点,从肾为先天生殖之本,脾为后天生殖之源的角度出发,立足于“脾肾两虚,瘀血痰浊”的病机,共奏“健脾益肾,化浊助运”之效。经典名方苍附导痰汤和二仙汤治疗PCOS的疗效确切,可调节患者内分泌指标及脂代谢物水平,抑制炎症发生,改善卵巢内环境,提高排卵率^[16-17]。临床研究亦证实^[10],健脾益肾化浊方可有效调节肥胖型PCOS内分泌系统,改善卵巢排卵功能,从而恢复月经生殖能力。

肥胖和IR是PCOS最常见的以慢性炎症为特

征的代谢状态,肥胖使体内脂肪过度堆积,促使脂肪组织中巨噬细胞分泌促炎因子,诱导卵巢发生炎症反应^[18-19]。而PCOS患者体内炎症因子又可诱导脂肪细胞增殖,导致游离脂肪酸释放,进而加重炎症反应^[20]。有文献报道^[21],合并IR的患者炎症因子水平显著升高,说明IR可以促进PCOS的炎症反应。机体炎症因子的上调,可直接损伤卵巢颗粒细胞导致卵泡发育停滞,也可刺激炎症信号通路,NLRP3炎症小体激活后,可在一定程度上促进卵巢组织纤维化,进而诱导排卵障碍,促进PCOS的发病进程^[1]。PCOS卵巢颗粒细胞焦亡、间质细胞纤维化和排卵障碍与NLRP3炎症小体介导的经典通路有关^[22]。NLRP3炎症小体是巨噬细胞受到病原体刺激后产生的大分子复合物,由NLRP3、ASC和胱天蛋白酶-1前体(pro Caspase-1)组成,Toll样受体(TLR)作为第一信号,激活NF- κ B,促进NLRP3的表达,进而转录合成炎症因子pro IL-1 β 和pro IL-18;在第二阶段,NLRP3受体接收到前一阶段的激活剂作为第二信号发生寡聚化,通过衔接蛋白ASC对pro Caspase-1进行招募,pro Caspase-1自身剪切产生具有活性的Caspase-1,处理第一阶段产生的pro IL-1 β 、pro IL-18,促进下游炎症因子IL-18、IL-1 β 的释放,引发卵巢炎症反应^[23-24]。IL-6升高是PCOS发生炎症的标志物之一,可激活炎症细胞释放更多炎症因子,导致卵巢组织炎症浸润,使PCOS患者卵巢处于持续慢性炎症状态^[25-26]。

来曲唑造模基础上联合高脂饲料喂养可成功构建具有显著PCOS-IR病理表现、内分泌异常、代谢紊乱特征的大鼠模型,与临床患者典型表现具有高度一致性^[27]。本研究结果发现,与空白组比较,模型组大鼠体质量和FPG在造模后显著升高;卵巢组织中各级生长卵泡和黄体数量均明显减少,卵巢组织内可见多个囊性扩张的卵泡,颗粒细胞层减少,卵巢呈多囊样改变;血清LH、LH/FSH、T、AMH

水平显著升高,FSH、 E_2 水平显著降低,表明PCOS造模成功。与模型组比较,健脾益肾化浊方干预后,大鼠卵巢组织内可见各级生长卵泡,颗粒细胞层增厚,黄体数量增加,可见优势卵泡;血清LH、LH/FSH、T和AMH水平显著降低,FSH和 E_2 水平显著升高。以上激素改变与文献报道PCOS患者激素水平结果一致^[28],证明健脾益肾化浊方可改善PCOS卵巢多囊样改变,调节体内激素水平,改善卵巢内环境。为进一步探讨其发挥作用的机制,结合NLRP3炎症通路与PCOS排卵障碍之间的联系,笔者检测了卵巢组织中NLRP3炎症通路相关蛋白的表达情况。研究发现,PCOS模型组中NALP3、ASC、Caspase-1、NF- κ B、IL-1 β 、IL-18和IL-6蛋白相对表达量均明显升高,表明PCOS卵巢组织中NLRP3炎症小体被激活,而在健脾益肾化浊方和二甲双胍治疗后均下降,可见健脾益肾化浊方可有效抑制PCOS卵巢组织内NLRP3炎症小体的激活及下游炎症因子的释放,进而降低PCOS大鼠卵巢组织的炎症反应。

综上所述,健脾益肾化浊方可通过抑制NLRP3炎症小体的激活,减少卵巢组织中NALP3、Caspase-1、NF- κ B、IL-18、IL-1 β 和IL-6炎症因子的释放,有效减轻PCOS炎症状态,改善卵巢功能,调节生殖内分泌水平,促进卵泡正常发育,从而发挥治疗作用。本研究从分子水平为健脾益肾化浊方治疗PCOS提供了有力的科学依据,同时也为中医药临床治疗PCOS提供了新的靶点。但其对PCOS患者糖脂代谢方面的影响还有待进一步探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 高晴,鱼文欢,何佳静,等. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3炎症小体在PCOS中的研究进展[J]. 生殖医学杂志,2022,31(3):420-424.

[2] 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.

[3] 刘志勤,刘黎敏,陈青青. 全程健康教育对多囊卵巢综合征患者自我管理能力及妊娠结局的影响[J]. 中国健康心理学杂志,2022,30(7):1003-1007.

[4] 张杏,连方. 炎症细胞因子白介素-6、肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β_1 在多囊卵巢综合征中作用机制及临床意义的研究进展[J]. 中国性科学,2022,31(1):47-50.

[5] 吕镁,徐泽均,孙任任,等. 高雄激素相关的慢性炎症

与多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2022,49(4):767-774.

[6] ROSTAMTABAR M, ESMAEILZADEH S, TOURANI M, et al. Pathophysiological roles of chronic low-grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(2):824-838.

[7] 冯晓玲,姜天悦,张杨. NLRP3炎症小体与妊娠相关疾病[J]. 华中科技大学学报:医学版,2021,50(4):528-532,554.

[8] HERMAN R, JENSTERLE M, JANEŽ A, et al. Genetic variability in antioxidative and inflammatory pathways modifies the risk for PCOS and influences metabolic profile of the syndrome[J]. Metabolites, 2020,10(11):439.

[9] 翟勇聪,刘景楠,韩涛. 中医治疗多囊卵巢综合征临床研究进展[J]. 甘肃科技,2021,37(23):129-133.

[10] 冯亚宏,张晓静,杜翠忠. 健脾益肾化浊方治疗肥胖型多囊卵巢综合征60例临床观察[J]. 母婴世界,2021,1:100.

[11] 徐海燕,杜青,徐琳本,等. 两种肥胖型多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的构建及评价[J]. 中国实验动物学报,2021,29(5):644-650.

[12] 李晓,胡亦明,韦春昕,等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨黑逍遥散对AD模型大鼠神经炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(11):33-41.

[13] 温利丹,赵双俏,冯磊,等. 从“脾肾两虚,痰瘀互结”论肥胖型多囊卵巢综合征的辨治[J]. 世界中西医结合杂志,2022,17(2):412-415.

[14] 孙畅,潘紫萌,李婧,等. 不同代谢状态和肥胖对多囊卵巢综合征患者性激素水平及中医体质、证型分布的影响[J]. 上海中医药杂志,2022,56(1):28-33.

[15] 丁彧涵,冉颖卓. 从虚、痰、瘀辨治肥胖型多囊卵巢综合征经验[J]. 中华中医药杂志,2020,35(9):4493-4495.

[16] 吴晓贞,何嘉仑,曾蕾,等. 基于TLR-4/NF- κ B信号通路探讨苍附导痰汤对痰湿型多囊卵巢综合征大鼠的治疗作用[J]. 中药新药与临床药理,2022,33(3):307-312.

[17] 王婧,李小花,方捷. 加味二仙汤联合二甲双胍对胰岛素抵抗型多囊卵巢综合征患者月经情况的影响[J]. 四川中医,2021,39(5):151-154.

[18] 孙博洋,韩世愈. 慢性低度炎症与多囊卵巢综合征关系的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2022,30(1):161-164.

[19] ENGIN A. The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation[J]. Adv Exp Med Biol, 2017,960:221-245.

- [20] ZHUANG Z, PAN X, ZHAO K, et al. The effect of interleukin-6 (IL-6), interleukin-11 (IL-11), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and Akt signaling on adipocyte proliferation in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 26(25):7218-7227.
- [21] POPOVIC M, SARTORIUS G, CHRIST-CRAIN M. Chronic low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome: Is there a (patho)-physiological role for interleukin-1? [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(4): 447-459.
- [22] WANG D, WENG Y, ZHANG Y, et al. Exposure to hyperandrogen drives ovarian dysfunction and fibrosis by activating the NLRP3 inflammasome in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141049.
- [23] HERMAN R, JENSTERLE M, JANEŽ A, et al. Genetic variability in antioxidative and inflammatory pathways modifies the risk for PCOS and influences metabolic profile of the syndrome [J]. *Metabolites*, 2020, 10(11):439.
- [24] 潘敏丹,孙忻. 多囊卵巢综合征的慢性炎症机制及其研究进展[J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30(8): 1118-1121.
- [25] 王维斌,黄娜,张萍,等. 解郁化痰法对多囊卵巢综合征大鼠肝脏组织 IRS-1及 IRS-2表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2):45-51.
- [26] 孙子懿,雷梦云,刘聪,等. 多囊卵巢综合征与单核细胞及炎性细胞因子的关系[J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47(12):1128-1132.
- [27] 王景尚,尹晓丹,何军琴,等. 来曲唑联合高糖高脂饮食构建多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型研究[J]. *首都医科大学学报*, 2021, 42(3):436-442.
- [28] KRISHNAN A, MUTHUSAMI S. Hormonal alterations in PCOS and its influence on bone metabolism [J]. *J Endocrinol*, 2017, 232(2): R99-R113.

[责任编辑 孙丛丛]