

加味芍药甘草汤对多囊卵巢综合征模型大鼠的干预作用

程瑶^{1,2}, 邵云云², 常壮鹏^{1,2}, 樊磊^{1,2}, 刘俊瑾², 侯锐钢^{2*}

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030000; 2. 山西医科大学第二医院, 太原 030000)

[摘要] **目的:**探究加味芍药甘草汤对多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠的干预作用及机制。**方法:**SD雌性大鼠随机分为正常组,模型组,加味芍药甘草汤低、中、高剂量(12.5,25.0,50.0 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,达英-35组(0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组6只。除正常组给予蒸馏水外,其余各组利用来曲唑(0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃给药21 d制备PCOS大鼠模型,造模后加味芍药甘草汤及达英-35组分别以相应剂量灌胃给药2周,正常组及模型组灌胃给予等体积的蒸馏水。采用阴道涂片观察动情周期;卵巢组织切片观察形态变化;酶联免疫吸附法(ELISA)检测甾类激素(睾酮,雌二醇,孕酮,促黄体生成素)水平;并用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定大鼠卵巢组织中水通道蛋白-9(aquaporin-9, AQP-9)的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠动情周期发生紊乱;体质量与卵巢质量明显增加;卵巢组织中存在大量初级囊性扩张卵泡,颗粒细胞疏松,成熟卵泡内未见卵母细胞,放射冠消失;血清睾酮和促黄体生成素的水平均显著升高($P < 0.05$),而雌二醇和孕酮水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组大鼠比较,加味芍药甘草汤可以剂量依赖性地减轻体质量和卵巢质量,降低血清中雄激素和促黄体生成素水平,提高血清中雌激素及孕激素水平,并且与卵巢中AQP-9的表达呈相关性。**结论:**加味芍药甘草汤可能通过增加卵巢颗粒细胞中AQP-9表达干预PCOS大鼠卵巢多囊样变和高雄激素血症。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 加味芍药甘草汤; 水通道蛋白-9; 高雄激素血症

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R271.1;R271.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0139-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180681

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0916.032.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:16

Intervention Effect of Modified Shaoyao Gancaotang on Polycystic Ovary Syndrome in Rats

CHENG Yao^{1,2}, SHAO Yun-yun², CHANG Zhuang-peng^{1,2}, FAN Lei^{1,2}, LIU Jun-jin², HOU Rui-gang^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China;

2. Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention effect and the underlying mechanism of modified Shaoyao Gancaotang on polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. **Method:** SD female rats were randomly divided into normal group, model group, low, middle and high-dose modified Shaoyao Gancaotang groups (12.5, 25.0, 50.0 g·kg⁻¹·d⁻¹) and Diane-35 group (0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹), with 6 rats in each group. The rats in normal group received distilled water, while all of the other rats were treated with letrozole (0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹) for 21 days to induce the PCOS model. Diane-35 and different concentrations of modified Shaoyao Gancaotang were given by gavage for two weeks after modeling, and the equal volume of distilled water was given by gavage to normal group and model group. After treatment with drugs, the estrus cycle was determined by vaginal smears, the morphological changes were inspected by ovarian biopsy, the serum hormone level was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expression of aquaporin-9 (AQP-9) was detected by Western blot technique.

[收稿日期] 20170918(005)

[基金项目] 山西省中药现代化关键技术研究振兴专项(2014ZD0102); 山西省重点研发计划(指南)项目(201603D321035)

[第一作者] 程瑶,在读硕士,从事药效学及药代动力学研究,Tel:0351-3365405, E-mail: chengyao20170101@163.com

[通信作者] *侯锐钢,主任药师,从事药效学及药代动力学研究,Tel: 0351-3365405, E-mail: houruigang9966@163.com

Result: Model group showed an irregular estrous cycle with increased body weight and ovarian weight; the ovaries showed plenty of cystic dilating follicles as well as fewer granulosa cells, without oocyte and corona radiating in the follicles; the serum levels of androgen and luteinizing hormone of PCOS rats were significantly increased ($P < 0.05$), whereas the levels of estrogen and progesterone were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, modified Shaoyao Gancaotang groups showed decreased body weight and ovarian weight in a dose-dependent manner; serum levels of androgen and luteinizing hormone reduced, whereas the serum levels of estrogen and progesterone were increased. Moreover, modified Shaoyao Gancaotang was associated with AQP-9 expression in ovaries. **Conclusion:** Modified Shaoyao Gancaotang could intervene polycystic ovaries and hyperandrogenism in PCOS rats, and the underlying mechanism may be correlated with the up-regulation of AQP-9 expression in granulosa cells.

[**Key words**] polycystic ovary syndrome; modified Shaoyao Gancaotang; aquaporin-9; hyperandrogenism

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是育龄期妇女常见的内分泌疾病之一, 临床上主要表现为无排卵, 卵巢多囊样和高雄激素血症^[1-2]。近年来, PCOS 发病率逐年上升, 但其确切的发病机制尚不清楚。有研究认为, 高雄激素血症与 PCOS 患者的疾病进程及并发症的发生密切相关^[3]。临床治疗 PCOS 多以降低雄激素水平 (如达英-35, 螺内酯等) 为主, 效果显著, 但存在一定的毒副作用^[4-5], 中医药治疗 PCOS 疗效肯定且副作用小^[6-7]。复方芍药甘草汤首次记载于张仲景的《伤寒论》, 由芍药和甘草 2 味草药组成, 主要用于治疗腹痛, 肌肉痉挛及痛经。甘草的主要成分甘草次酸与甘草酸均可降低卵巢及血清中雄激素水平, 与芍药合用可以降低血清中睾酮的水平^[8]。动物研究再一次证实芍药与甘草合用可以直接增加卵巢芳香酶的活性, 使睾酮分泌减少, 从而明显地降低血清游离睾酮和总睾酮的水平^[9-10]。中医学认为肾虚血瘀对 PCOS 的发病有重要影响^[11]。泽兰是常用的活血祛瘀药, 具有通顺血脉, 行水消肿的功效, 可以通过改善血瘀症状、促进血液流动治疗闭经、痛经及月经紊乱性疾病^[12-13]。加味芍药甘草汤是在芍药甘草汤的基础上加入泽兰, 本课题组前期研究表明, 加味芍药甘草汤可以降低多囊卵巢大鼠血清中睾酮及瘦素水平^[14]。据此, 本实验采用加味芍药甘草汤干预 PCOS 模型大鼠, 探究其对 PCOS 的作用及机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 6 周龄 SD 大鼠, 体质量 (150 ± 20) g, 购于中国食品药品检定研究所实验动物中心, 动物合格证号 SCXK(京)2014-0013, SPF 级环境饲养。本实验经过了山西医科大学第二医院实验动物伦理委员会审查批准 (批准号 2015KS001)。

1.2 药物 加味芍药甘草汤组成为芍药、甘草、泽兰, 购于山西医科大学第二医院中药房, 由山西医科大学第二医院药学部张京平副主任中药师鉴定为正品。芍药-甘草-泽兰 (1:1:1) 共计 2.52 kg, 加 8 倍量水浸泡 1 h, 煎煮 2 次 (每次 45 min), 合并 2 次滤液, 经旋转蒸发仪浓缩至含生药 4.24 g·mL⁻¹, 即得到加味芍药甘草汤。加味芍药甘草汤中剂量按照临床试验中人体剂量折算后为 25.0 g·kg⁻¹·d⁻¹, 低、中、高剂量的比例为 0.5:1:2。阳性药物为达英-35 (0.001 g·kg⁻¹·d⁻¹)。

1.3 试剂 曲唑片 (2.5 mg/片, 诺华制药, 批号 S0124); 达英-35 (每片含醋酸环丙孕酮 2 mg 和炔雌醇 0.035 mg, 拜耳医药保健有限公司, 批号 264F); PIPA 裂解缓冲液 (上海碧云天生物科技有限公司, 批号 P0013B); PMSF (Solarbio 公司, 批号 P8340); 聚偏乙烯 (PVDF) 膜 (EMD Millipore 公司, 货号 00117694PU); 大鼠促黄体生成素、雌二醇、睾酮、孕酮酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (USCN 公司, 批号分别为 CEA441Ra, CEA461Ge, CEA458Ge, CEA459Ge); BCA 蛋白质定量试剂盒 (博士德生物工程有限公司, 批号 11D18B46); anti-水通道蛋白-9 (AQP-9) 一抗 (美国 Abcam 公司, 批号 ab15129); 辣根酶标记羊源抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 ZB2301); 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 多克隆 IgG 抗体 (杭州贤至生物科技有限公司, 批号 AB-P-R001); Marker (Thermo 公司, 批号 00301719); ECL 超敏发光液 (Solarbio 公司, 批号 PE0010); 姬姆萨染液 (Solarbio 公司, 批号 G1010)。

1.4 仪器 SQP 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); AxioLab. A1 型光学显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); DY89-II 型电动匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有

限公司);DYY-7C型蛋白印迹电泳仪,转膜仪,WD-9405B型水平脱色摇床(北京市六一仪器厂);D-37520 Osterode型高速冷冻离心机(德国 Biofuge 公司);HH.S21-6型电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);FluorChem HD2型凝胶成像分析系统(美国 Protein Simple 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及给药 大鼠适应性喂养1周后,随机分为正常组(6只)与来曲唑组(36只),来曲唑组大鼠灌胃给予来曲唑溶液($0.001\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)制备PCOS大鼠模型;正常组大鼠灌胃给予生理盐水作为对照。每周称量体质量1次,共5周。造模开始后,每天对大鼠进行阴道涂片,姬姆萨染液染色后观察大鼠动情周期的变化,动情周期紊乱(如动情周期延长、缩短、持续动情周期等)即表示大鼠模型制备成功^[15]。将造模成功的大鼠随机分为5组,即模型组,加味芍药甘草汤低、中、高剂量组,达英-35组。每组6只。每日给药1次,连续2周。加味芍药甘草汤低、中、高剂量组分别灌胃给予加味芍药甘草汤 $12.5, 25.0, 50.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,正常组和模型组大鼠均灌胃给予相应体积的蒸馏水。

2.2 观察动情周期 给予来曲唑造模期间每天进行阴道涂片,用浸泡在0.9%氯化钠注射液中的无菌棉签在阴道侧壁上1/3处轻刮黏液及细胞,将其薄而均匀地涂在载玻片上,置无水乙醇中固定3 min并用姬姆萨染液染色,光镜观察细胞。

2.3 卵巢组织标本制备与观察 取大鼠卵巢组织,用精密天平称重,卵巢置于4%甲醛溶液中固定,使用95%,90%,70%乙醇溶液进行脱水,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察卵巢组织形态变化。

2.4 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清激素水平 末次给予加味芍药甘草汤后24 h后,水合氯醛麻醉动物,腹主动脉取血5 mL,4℃条件下离心10 min, $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,后取血清,按照ELISA试剂盒说明书步骤进行操作,检测血清中激素(睾酮、雌二醇、孕酮、促黄体生成素)水平。

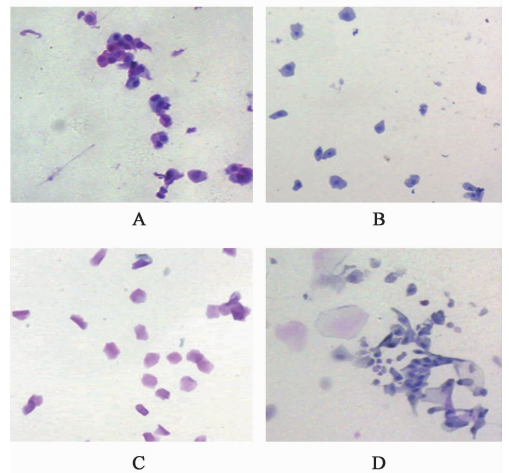
2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织中AQP-9蛋白表达 称取大鼠卵巢组织40 mg,加入RIPA裂解液0.4 mL提取总蛋白,BCA法测定蛋白质含量。配制分离胶(10%)和浓缩胶(5%),上样后电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭30 min。将PVDF膜与一抗(1:800)4℃孵育过夜,二抗(1:2 000)室温孵育1 h,加ECL发光液,曝光,扫描

图片进行保存。使用Image J软件计算灰度值。

2.6 统计学分析 采用统计学软件SPSS 22.0进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数比较采用ANOVA分析,组间比较采用t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动情周期 改变规律的动情周期(4~5 d/周期)是正常卵巢功能的主要指标。来曲唑组动情周期规律的大鼠数量减少至16.7%,仅选用动情周期紊乱的大鼠作为PCOS大鼠。加味芍药甘草汤干预后,PCOS大鼠动情周期逐渐规律。见图1。



A. 动情间期;B. 动情前期;C. 动情期;D. 动情后期

图1 加味芍药甘草汤对PCOS大鼠动情周期变化的影响(姬姆萨,×100)

Fig. 1 Effect of modified Shaoyao Gancaotang on estrous cycle in PCOS rats (Giemsa, ×100)

3.2 加味芍药甘草汤对PCOS大鼠体质量及卵巢质量的影响 与正常大鼠比较,模型组大鼠的体质量和卵巢质量显著增加($P < 0.05$)。加味芍药甘草汤干预后,体质量和卵巢质量明显减轻($P < 0.05$),并存在剂量依赖性。见表1。

3.3 加味芍药甘草汤对PCOS大鼠卵巢组织结构的影响 模型组大鼠的卵巢组织中存在大量初级囊性扩张卵泡、颗粒细胞疏松且层数减少、成熟卵泡内未见卵母细胞、放射冠消失。加味芍药甘草汤干预后,初级囊性扩张卵泡显著减少、颗粒细胞数目显著增加,并呈现剂量依赖性。见图2。

3.4 加味芍药甘草汤对PCOS大鼠血清激素水平的影响 与正常组大鼠比较,模型组大鼠的血清睾酮和促黄体生成素的水平均显著升高($P < 0.05$),而雌二醇和孕酮水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组大鼠比较,高剂量加味芍药甘草汤可以降低血清睾酮和

表 1 加味芍药甘草汤对 PCOS 大鼠体质量及卵巢质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of modified Shaoyao Gancaotang on body weight and ovarian weight in PCOS rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	模型制备前 体质量	模型制备完成后 体质量	给药后体质量		卵巢质量
				第 7 天	第 14 天	
正常	-	183.67 ± 13.02	247.67 ± 14.73	261.00 ± 17.57	277.00 ± 25.35	0.07 ± 0.00
模型	-	179.00 ± 4.55	301.00 ± 18.67 ¹⁾	324.00 ± 18.38 ¹⁾	363.00 ± 27.65 ¹⁾	0.11 ± 0.01 ¹⁾
加味芍药甘草汤	12.5	182.00 ± 2.45	302.00 ± 16.39 ¹⁾	318.67 ± 16.44	359.00 ± 11.05	0.09 ± 0.00 ²⁾
	25.0	181.33 ± 4.19	305.00 ± 6.16 ¹⁾	300.33 ± 16.34	345.33 ± 8.99	0.09 ± 0.00 ²⁾
	50.0	184.00 ± 5.35	306.67 ± 15.86 ¹⁾	264.67 ± 9.46 ²⁾	289.00 ± 2.94 ²⁾	0.07 ± 0.00 ²⁾
达英-35	0.001	180.00 ± 3.27	306.33 ± 7.41 ¹⁾	268.33 ± 2.49 ²⁾	295.00 ± 8.83 ²⁾	0.07 ± 0.00 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05(表 2,3 同)。

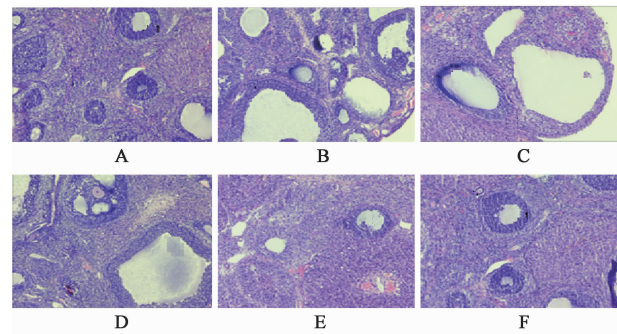


图 2 加味芍药甘草汤对 PCOS 大鼠卵巢组织结构的影响(HE, ×100)
A. 正常组; B. 模型组; C. 加味芍药甘草汤低剂量组; D. 加味芍药甘草汤中剂量组; E. 加味芍药甘草汤高剂量组; F. 达英-35 组(图 3 同)

图 2 加味芍药甘草汤对 PCOS 大鼠卵巢组织结构的影响(HE, ×100)
Fig. 2 Effect of modified Shaoyao Gancaotang on morphological changes in ovary tissue of PCOS rats (HE, ×100)

表 2 加味芍药甘草汤对 PCOS 大鼠血清激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of modified Shaoyao Gancaotang on serum levels of hormones in PCOS rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	睾酮/ng·L ⁻¹	雌二醇/ng·L ⁻¹	孕酮/ng·L ⁻¹	促黄体生成素/U·L ⁻¹
正常	-	349.11 ± 21.33	44.90 ± 1.58	23.45 ± 0.98	0.61 ± 0.04
模型	-	517.34 ± 25.16 ¹⁾	25.59 ± 1.73 ¹⁾	17.89 ± 1.44 ¹⁾	0.85 ± 0.03 ¹⁾
加味芍药甘草汤	12.5	432.88 ± 63.07	28.35 ± 3.52	18.23 ± 1.76	0.78 ± 0.05
	25.0	392.34 ± 52.86 ²⁾	31.17 ± 5.61	19.37 ± 2.17	0.67 ± 0.03 ²⁾
	50.0	382.68 ± 17.56 ²⁾	39.36 ± 0.98 ²⁾	20.65 ± 1.13	0.61 ± 0.03 ²⁾
达英-35	0.001	292.74 ± 46.61 ²⁾	42.67 ± 0.89 ²⁾	21.56 ± 0.65 ²⁾	0.63 ± 0.04 ²⁾

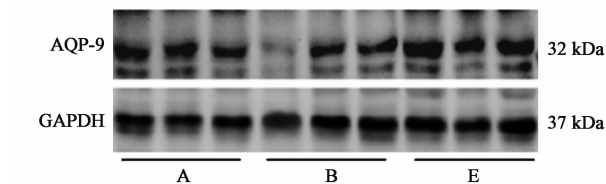


图 3 PCOS 大鼠卵巢组织中 AQP-9 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of AQP-9 expression in ovary tissue of PCOS rats

促黄体生成素的水平,提高雌二醇的水平。此外,加味芍药甘草汤剂量组大鼠血清孕酮的水平呈现剂量依赖性增加,但差异无统计学意义。见表 2。

3.5 高剂量加味芍药甘草汤对 PCOS 大鼠 AQP-9 表达的影响 模型组大鼠卵巢中 AQP-9 蛋白表达与正常组大鼠比较显著降低 ($P < 0.05$);与模型组大鼠比较,高剂量加味芍药甘草汤可显著增加卵巢中 AQP-9 蛋白表达 ($P < 0.05$)。见图 3,表 3。

4 讨论

PCOS 是育龄期妇女常见的内分泌和代谢异常引起的疾病,病因复杂。临床上中医药治疗 PCOS 比西医疗效稳定且副作用小。中医认为 PCOS 的

表 3 高剂量加味芍药甘草汤对 PCOS 大鼠卵巢组织中 AQP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of high-dose modified Shaoyao Gancaotang on AQP-9 expression in ovary tissue of PCOS rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP-9/GAPDH
正常	-	0.66 ± 0.06
模型	-	0.39 ± 0.06 ¹⁾
加味芍药甘草汤	50.0	0.80 ± 0.01 ²⁾

病理病因主要是由于肝、肾、脾三脏功能失调所致的

气血津液运行失常,进而气滞血瘀,痰湿内停,“痰

夹瘀血,遂成窠囊”(《丹溪心法》)。加味芍药甘草汤既有芍药养血敛阴、活血化瘀的作用,又有泽兰入厥阴经、活血通经、行水消肿之功效,辅以甘草调补血气、调和诸药,甚合 PCOS 除湿化痰化瘀的病机。

泽兰可以药食两用,经常食用具有减肥的作用^[16]。有研究表明,芍药苷可以促进离体脂肪组织分解,此外,白芍水煎剂能抑制去卵巢肥胖大鼠的体质量^[17]。本实验结果显示加味芍药甘草汤干预后,可以剂量依赖性地减轻 PCOS 大鼠的体质量及卵巢质量。据文献报道,轻微减重(初始体质量的 5% 左右)可以促进 PCOS 女性的自发排卵,增加怀孕概率,同时可以改善高雄激素症状以及血脂水平^[18],据此推测加味芍药甘草汤可以通过减重改善 PCOS 大鼠症状。

甾体激素(如雄激素,雌激素,孕激素,促黄体生成素等)对卵巢的生殖功能具有重要作用。本研究结果表明加味芍药甘草汤可以抑制 PCOS 大鼠血清睾酮和促黄体生成素的水平,提高雌二醇及孕酮的水平,并且呈现出剂量依赖性。在一定程度上说明加味芍药甘草汤可以重新平衡血清中甾体激素的水平。垂体分泌的黄体生成素,卵巢分泌的雌激素、孕激素等甾体激素水平受到多种因子(如肾素、瘦素等)的调节,这些因子主要通过下丘脑-垂体-卵巢轴等发挥作用,机体下丘脑-垂体-卵巢轴中任何环节调节功能失调都会使甾体激素水平紊乱^[19]。因此加味芍药甘草汤可能通过启动下丘脑-垂体-卵巢轴,调整了 PCOS 大鼠的内分泌失衡状态,起到改善 PCOS 症状的作用,但其确切机制仍有待进一步验证。

早期卵泡的生长由雄激素与雄激素受体结合后进行调节^[20]。卵巢局部雄激素升高可以促进小卵泡的生成,但是会减少优势卵泡的数量,形成闭锁,导致无排卵。促黄体生成素可以影响卵泡发育以及卵母细胞质量,过高的促黄体生成素可使卵泡膜细胞分泌雄激素增加,导致颗粒细胞凋亡^[21]。实验结果表明,加味芍药甘草汤可以改善 PCOS 大鼠卵巢形态,使初级囊性扩张卵泡显著减少,颗粒细胞明显增加,由此本课题组推测加味芍药甘草汤通过改善 PCOS 大鼠的高雄激素血症,从根本上纠正卵巢激素失调,从而促进卵泡的正常发育,调节动情周期。

AQP-9 是水通道蛋白的一种亚型,为窦腔扩张输送大量的水分子,进而促进窦状卵泡的成熟^[22]。多项免疫组化的结果证实,在 PCOS 患者以及大鼠卵泡的颗粒细胞上的细胞膜与细胞质中有 AQP-9

的表达^[23-25]。在 PCOS 患者体内,高雄激素可以通过 PI3K 通路抑制颗粒细胞中 AQP-9 的表达,使颗粒细胞功能受损,阻碍卵泡的发育^[24]。实验结果显示与正常大鼠比较,PCOS 大鼠卵巢内 AQP-9 蛋白的表达明显下降,但经加味芍药甘草汤干预后,表达显著增加。由此推测,AQP-9 可能在 PCOS 发病机制中起重要作用,或许可以成为诊断 PCOS 的指标之一。

综上所述,笔者推测在来曲唑诱导的大鼠 PCOS 模型中,加味芍药甘草汤可以通过增加 AQP-9 的表达,继而重新平衡血清中甾体激素水平,从而调节动情周期,改善卵巢多囊样变。可见,加味芍药甘草汤有望开发成为治疗 PCOS 的新型药物。本研究为临床上使用加味芍药甘草汤治疗 PCOS 提供了实验性依据。

[参考文献]

- [1] DU D F, LI X L, FANG F, et al. Expression of anti-mullerian hormone in letrozole rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30 (12):885-889.
- [2] SUN J, JIN C, WU H, et al. Effects of electroacupuncture on ovarian P450arom, P450c17alpha and mRNA expression induced by letrozole in PCOS rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e79382.
- [3] CHEN M J, CHOU C H, CHEN S U, et al. The effect of androgens on ovarian follicle maturation: Dihydrotestosterone suppress FSH-stimulated granulosa cell proliferation by upregulating PPARgamma-dependent PTEN expression [J]. *Sci Rep*, 2015, 5 (1):18319.
- [4] 王娜梅. 隐丹参酮对多囊卵巢综合征大鼠糖脂代谢及性激素的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(20): 3490-3493.
- [5] Goodman N F, Cobin R H, Futterweit W, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and Pcos Society Disease State Clinical Review: Guide to the Best Practices in the Evaluation and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome—Part 1 [J]. *Endocr Pract*, 2015, 21(11):1291-1300.
- [6] 罗雪. 中医药治疗多囊卵巢综合征的系统评价[D]. 广州:广州中医药大学, 2011.
- [7] 李娟, 马红霞, 宋金龙, 等. 多囊卵巢综合征脂代谢异常的国内外研究进展及中医药治疗优势探讨[J]. *世界中医药*, 2015, 10(7):1112-1116.
- [8] Takeuchi T. Effect of shakuyaku-kanzo-to, shakuyaku,

- kanzo, paeoniflorin, glycyrrhetic acid and glycyrrhizin on ovarian function in rats[J]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 1988, 64(11):1124-1139.
- [9] Armanini D, Castello R, Scaroni C, et al. Treatment of polycystic ovary syndrome with spironolactone plus licorice[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007, 131(1):61-67.
- [10] Takeuchi T, Nishii O, Okamura T, et al. Effect of traditional herbal medicine, shakuyaku-kanzo-to on total and free serum testosterone levels[J]. *Am J Chin Med*, 1989, 17(1/2):35-44.
- [11] 刘桢,梁瑞宁,李佩双. 多囊卵巢综合征代谢异常特点及中医认识[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(5):654-656.
- [12] CUI H Z, OH H C, LI X, et al. Ethanol extract of *Lycopus lucidus* elicits positive inotropic effect via activation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release in beating rabbit atria[J]. *J Med Food*, 2013, 16(7):633-640.
- [13] REN Q, DING L, SUN S S, et al. Chemical identification and quality evaluation of *Lycopus lucidus* Turcz by UHPLC-Q-TOF-MS and HPLC-MS/MS and hierarchical clustering analysis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(5):3867-3878.
- [14] 郝琦蓉,张引华. 多囊平胶囊治疗多囊卵巢综合征的实验研究[J]. *山西医科大学学报*, 2003, 34(5):447-450.
- [15] Rajan R K, Ss M, Balaji B. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1):242-251.
- [16] 辛卫云,苗明三. 泽兰的化学、药理及临床应用[J]. *中医学报*, 2015, 30(3):418-420.
- [17] 刘雨娟. 芍药苷对大鼠离体脂肪组织影响的实验研究[D]. 兰州:兰州大学, 2009.
- [18] Motta A B. The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(17):2482-2491.
- [19] 尹山兰. 多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞 PPAR γ 、P450arom 表达及与 IVF-ET 结局关系研究[D]. 郑州:郑州大学, 2013.
- [20] Gervasio C G, Bernuci M P, Silva-de-Sa M F, et al. The role of androgen hormones in early follicular development[J]. *ISRN Obstet Gynecol*, 2014, doi:10:1155/2014/8/18010.
- [21] Filicori M. Roles and novel regimens of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in ovulation induction[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(4):1437-1441.
- [22] HUANG H F, HE R H, SUN C C, et al. Function of aquaporins in female and male reproductive systems[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(6):785-795.
- [23] 陆秀娥,钱羽力,黄荷凤. 多囊卵巢综合征患者颗粒细胞 AQP9 的表达[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2007, 36(5):449-453.
- [24] QU F, WANG F F, LU X E, et al. Altered aquaporin expression in women with polycystic ovary syndrome: hyperandrogenism in follicular fluid inhibits aquaporin-9 in granulosa cells through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(6):1441-1450.
- [25] 李星,杨菁,尹太郎,等. 水通道蛋白 9 在多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞的表达[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(23):7807-7808.

[责任编辑 邹晓翠]