

基于AMH/AMHR II信号通路探讨消囊调经汤治疗PCOS-IR模型大鼠的作用机制

周艳艳^{1,2}, 袁俊俊², 黄旭博², 刘沛沛², 吴梦瑶², 董亚娜^{3*}

(1. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450002;

2. 河南中医药大学, 郑州 450046; 3. 黄河科技学院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 基于抗苗勒氏管激素(AMH)/抗苗勒氏管激素 II 型受体(AMHR II)信号通路, 探讨消囊调经汤改善多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗(PCOS-IR)模型大鼠的作用机制。方法: 48只成年雌性SD大鼠随机分为空白组、模型组、消囊调经汤组(11.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)、达英-35组(0.21 g·kg⁻¹·d⁻¹), 除空白组外各组大鼠通过高脂高糖饮食联合来曲唑构建PCOS-IR模型, 给药组灌胃给予相应剂量药物15 d, 每给药4 d间隔1 d, 空白组及模型组灌胃给予等体积生理盐水。治疗期间每天记录大鼠动情周期, 治疗结束后记录体质量、Lee's指数, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定AMH、促黄体生成素(LH)、LH/卵泡刺激素(FSH)、睾酮(T)、雌二醇(E₂)水平, 血糖仪检测空腹血糖(FPG), 放射免疫分析法(RIA)检测空腹胰岛素(FINS)水平, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、胰岛素敏感性指数(QUICKI), 全自动生化检测测定甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平, 苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢组织形态学变化, 免疫组织化学法(IHC)检测卵巢组织内AMHR II、骨形态发生蛋白-15(BMP-15)、Smad5蛋白水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析AMHR II、BMP-15、Smad5蛋白表达水平。结果: 与空白组大鼠比较, 模型组大鼠阴道脱落细胞可见大量白细胞, 以动情间期为主; 体质量、Lee's指数、糖脂代谢指标(FPG、FINS、HOMA-IR、TG、TC)、AMH及性激素(LH、LH/FSH、T)水平显著上升($P < 0.01$), QUICKI及E₂水平显著下降($P < 0.01$); 卵巢表面囊性突起较多、湿重较大, 卵巢组织有较多闭锁状、囊性扩张性卵泡, 颗粒细胞层厚度减少, 不见卵母细胞; 卵巢组织中AMHR II蛋白表达水平显著上升($P < 0.01$), BMP-15、Smad5蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$)。与模型组大鼠比较, 消囊调经汤组大鼠阴道脱落细胞于治疗第5~6天起见角化细胞, 逐渐出现稳定的动情周期; 体质量、Lee's指数、糖脂代谢指标(FPG、FINS、HOMA-IR、TG、TC)、AMH及性激素(LH、LH/FSH、T)水平明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), QUICKI及E₂水平显著升高($P < 0.01$); 卵巢表面较光滑、湿重较轻, 卵巢组织可见卵母细胞及成熟卵泡, 颗粒细胞层厚度增加, 形态完整; 卵巢组织中BMP-15、Smad5蛋白表达水平显著上升($P < 0.01$), AMHR II蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$)。结论: 消囊调经汤可能通过下调AMH/AMHR II的同时介导PCOS-IR大鼠卵巢组织中BMP-15、Smad5上调, 从而改善大鼠卵巢功能、性激素及糖脂代谢水平。

[关键词] 多囊卵巢综合征(PCOS); 胰岛素抵抗(IR); 消囊调经汤; 抗苗勒氏管激素(AMH)/抗苗勒氏管激素 II 型受体(AMHR II)信号通路; 糖脂代谢; 骨形态发生蛋白-15(BMP-15); Smad5

[中图分类号] R22; R28; R96; R588 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)09-0137-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230568

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230110.1000.001.html>

[网络出版日期] 2023-01-11 09:38:24

Exploration of Mechanism of Xiaonang Tiaojing Decoction in Treating PCOS-IR Model Rats Based on AMH/AMHR II Signaling Pathway

ZHOU Yanyan^{1,2}, YUAN Junjun², HUANG Xubo², LIU Peipei², WU Mengyao², DONG Yana^{3*}

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine/The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Huanghe Science and Technology University, Zhengzhou 450000, China)

[收稿日期] 2022-11-03

[基金项目] 河南省科技攻关项目(212102311138)

[第一作者] 周艳艳, 博士, 主任中医师, 从事中医药防治女性生殖内分泌疾病研究, E-mail: zyy19760803@126.com

[通信作者] * 董亚娜, 硕士, 讲师, 副主任中医师, 从事中医妇科血瘀症研究, E-mail: 125616570@qq.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Xiaonang Tiaojing decoction (XNTJD) in improving polycystic ovary syndrome with insulin resistance (PCOS-IR) model rats based on anti-Müllerian hormone (AMH)/AMH type II receptor (AMHR II) signaling pathway. **Method:** Forty-eight adult female SD rats were randomly divided into the blank group, model group, XNTJD group ($11.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Diane-35 group ($0.21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), PCOS-IR model was established by high-fat and high-sugar diet combined with letrozole in rats of all groups except the blank group, rats in the administration groups were given the corresponding dose of drugs by gavage for 15 days with an interval of 1 d every 4 d, normal saline of the same volume was given to the blank group and the model group. Estrous cycle was recorded daily during treatment. At the end of treatment, body weight and Lee's index were recorded, AMH, luteinizing hormone (LH), LH/follicle stimulating hormone (FSH), testosterone (T) and estradiol (E_2) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fasting plasma glucose (FPG) was measured by glucometer, fasting insulin (FINS) level was measured by radioimmunoassay (RIA), and the insulin resistance index (HOMA-IR) and insulin sensitivity index (QUICKI) were calculated, triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels were measured by automatic biochemical analyzer, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of the ovary, the levels of AMHR II, bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and Smad5 in ovarian tissues were detected by immunohistochemistry (IHC), Western blot was used to analyze the protein expression levels of AMHR II, BMP-15 and Smad5. **Result:** Compared with the blank group, a large number of leukocytes were observed in the vaginal exfoliated cells of rats in the model group, mainly in diestrus, the levels of body weight, Lee's index, glucose-lipid metabolism indexes (FPG, FINS, HOMA-IR, TG, TC), AMH and sex hormones (LH, LH/FSH, T) were significantly increased ($P < 0.01$), and QUICKI and E_2 levels were significantly decreased ($P < 0.01$), there were more cystic bulges on the ovarian surface, more wet weight, more atretic and cystic dilated follicles in the ovarian tissues, and the thickness of granulosa cell layer was reduced without oocytes, the expression level of AMHR II protein in ovarian tissues was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression levels of BMP-15 and Smad5 proteins were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the exfoliated cells in the vagina of rats treated with XNTJD group showed keratinocytes from the 5th to 6th day of treatment, and a stable estrous cycle gradually appeared, body weight, Lee's index, glucose-lipid metabolism indexes (FPG, FINS, HOMA-IR, TG, TC), AMH and sex hormones (LH, LH/FSH, T) levels were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), QUICKI and E_2 levels were significantly increased ($P < 0.01$), ovarian surface was smoother and lighter in wet weight, oocytes and mature follicles were observed in ovarian tissues, the thickness of granulosa cell layer increased and the morphology was intact, the expression levels of BMP-15 and Smad5 proteins were significantly increased ($P < 0.01$) and the expression level of AMHR II protein was significantly decreased ($P < 0.01$) in ovarian tissues. **Conclusion:** XNTJD may mediate the up-regulation of BMP-15 and Smad5 in ovarian tissues of PCOS-IR rats by down-regulating AMH/AMHR II, thereby improving ovarian function, sex hormones and glucose-lipid metabolism levels in PCOS-IR rats.

[Keywords] polycystic ovary syndrome (PCOS); insulin resistance (IR); Xiaonang Tiaojing decoction; anti-Müllerian hormone (AMH)/AMH type II receptor (AMHR II) signaling pathway; glucose-lipid metabolism; bone morphogenetic protein-15 (BMP-15); Smad5

多囊卵巢综合征(PCOS)是妇科常见的生殖内分泌疾病,主要临床表现为性腺功能紊乱、高胰岛素血症及血脂代谢异常。胰岛素抵抗(IR)是导致PCOS代谢异常及生殖障碍的核心重要机制之一,约75%的PCOS患者有胰岛素敏感性受损^[1]。高胰岛素血症的发展过程中代偿性分泌过多的

胰岛素,促进PCOS患者雄激素分泌增加、卵泡发育受阻及代谢紊乱^[2]。目前,现代医学治疗PCOS作用靶点较为单一,虽可改善患者性激素水平并提升促排卵效果^[3],但对于PCOS-IR的临床疗效有限。因此,积极开展中医药治疗PCOS-IR的研究具有重要意义。抗苗勒氏管激素(AMH)和骨形态发生蛋

白-15(BMP-15)是转化生长因子- β (TGF- β)超家族成员,被认为是卵母细胞质量和胚胎发育的重要指标,参与女性体内激素水平变化。据报道,AMH通过与其II型受体(AMHR II)结合,BMP-15通过正向调控丝氨酸/苏氨酸激酶2(Akt2),可共同激活Smad5磷酸化,进而发挥调节细胞增殖/分化、卵泡存活/闭锁和卵母细胞成熟的作用^[4-6]。此外,Smad5可通过控制Akt2表达和磷酸化来调节机体骨骼肌中的葡萄糖摄取,参与调节胰岛素信号^[7]。综上所述,AMH、AMHR II、BMP-15、Smad5在调控女性卵巢功能、激素水平及胰岛素等方面至关重要。

笔者以化痰降气、祛瘀通经为基本治法,选择葛根汤为基础方进行加减,拟定消囊调经汤。现代药理学研究发现,葛根汤可调节女性雌激素、改善子宫动脉血流情况^[8]。前期临床实验证实,消囊调经汤在改善PCOS患者卵巢储备功能及卵泡发育总有效率达94.29%,可有效降低PCOS患者血清雄激素水平、控制促黄体生成素(LH)/卵泡刺激素(FSH)、降低胰岛素样生长因子-1(IGF-1)水平^[9-11]。基于此,本研究以AMH/AMHR II信号通路为切入点,从功能及分子生物学角度分析消囊调经汤改善PCOS-IR大鼠卵巢功能及糖脂代谢异常的作用机制,以期为中医药治疗PCOS-IR的研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 成年雌性SPF级SD大鼠48只,体质量180~200 g,由郑州市实验动物饲养场提供,合格证号SCXK(豫)2019-0002,实验过程中饲养于河南省中医院SPF级动物实验中心,许可证号SYXK(豫)2016-0009,按实验室动物喂养标准要求常规饲养。本研究所涉及的动物实验经河南省中医院医学伦理委员会审核批准,伦理批号PZ-HNSZYY-2020-017。

1.2 药物与试剂 消囊调经汤由葛根20 g、桃仁10 g、当归10 g、桑白皮10 g、黄芩10 g、郁金10 g、鹿角霜10 g、茜草10 g、川芎6 g、清半夏6 g、石菖蒲6 g、麻黄6 g组成,饮片分别购自四川新荷花中药饮片有限公司、安徽普仁中药饮片有限公司,经河南省中医院黄小敏副主任药师鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)相关要求。按处方比例称取各饮片共114 g,混匀,第1次加8倍量水浸泡30 min,煎煮30 min,收集药液,第2次加6倍量水继续煎煮30 min,一煎与二煎药液合并,用4~6层纱布过滤,收集滤液,水浴浓缩至320 mL(生药质量浓度0.356 g·mL⁻¹),4℃保存备用。炔雌醇环丙孕酮

片(达英-35,拜耳医药保健有限公司,批号KTOCCAS2,每片含醋酸环丙孕酮2 mg和炔雌醇0.035 mg),来曲唑片(浙江海正药业股份有限公司,批号H20133109),羧甲基纤维素钠(CMC-Na,北京索莱宝科技有限公司,批号C8621-25),AMH、LH、FSH、睾酮(T)、雌二醇(E₂)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为E-EL-R3022-J、E-EL-R0026c、E-EL-R0391c、E-EL-R0091c、E-EL-R0021c),胰岛素(INS)ELISA试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司,批号R1113G086),血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A110-2-1、A111-2-1),兔源AMHR II一抗、兔源BMP-15一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗、小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为PB1037、A10842、BA1054、BM0627、AR1180-100),兔源Smad5一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号12167-1-AP),二氨基联苯胺(DAB)底物显色试剂盒(江苏世泰实验器材有限公司,批号2005289),磷酸盐缓冲液(PBS,武汉百仟度生物科技有限公司,批号B0002),蛋白定量法(BCA)测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号P0010),增强型化学发光试剂(ECL,北京普利莱基因技术有限公司,批号P1050),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(德国默克集团,批号IPVH00010)。**1.3 仪器** BT25S型1/1万电子精密天平(德国赛多利斯公司),JW-3022HR型离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司),BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社),CX7型全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司),ACCU-CHEK® Guide Me型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司),DYY-7C型电泳仪电源、DYCZ-24DN型垂直电泳槽、DYCZ-40型电转仪(北京六一生物科技有限公司),LP115型pH计(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),multiskan MK3型酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司),ICV-450型电热恒温培养箱(日本亚速旺商贸有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组 参考高脂高糖饮食联合来曲唑药物干预构建PCOS-IR雌性大鼠病理模型的方法^[12],大鼠高脂高糖饮食饲养(普通无菌饲料70%,猪油10%,蔗糖10%,奶粉5%,鸡蛋5%+5%葡萄糖溶液)4周后开始造模,每日灌胃来曲唑混悬液(来曲唑1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,混悬于10 g·L⁻¹ CMC-Na

中),连续造模22 d。第12天起取大鼠阴道脱落细胞,连续观察10 d,阴道涂片以大量白细胞为主判断为失去动情周期,连续发生2次以上表示PCOS造模成功^[13]。选取造模成功的PCOS-IR大鼠36只随机分为模型组、消囊调经汤组、达英-35组,另取12只正常大鼠为空白组。

2.2 动物给药 前期预实验结果显示,消囊调经汤中剂量组(临床等效剂量)效果较优,因此确定消囊调经汤组大鼠按此剂量灌胃给药,临床等效剂量参照《药理实验方法学》^[14]中人和动物间体表面积折算的等效剂量比值,按成人每天114 g为1个处方量,计算公式为 $114 \text{ g}/(60 \text{ kg}) \times 6 = 11.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,达英-35组大鼠灌胃给予 $0.21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的达英-35混悬液^[15],空白组、模型组大鼠分别给予同体积生理盐水灌胃。每4 d为1个治疗周期,间隔1 d为休息期,共治疗3个周期,共15 d,期间常规喂养。

2.3 阴道细胞学检查^[16] 于治疗第1天起,每日定时收集各组大鼠阴道脱落细胞进行阴道涂片观察,用10%甲醛固定,光学显微镜下连续观察15 d并记录细胞变化。大鼠动情周期判断标准为动情间期以大量白细胞为主,动情前期以规则的有核上皮细胞为主,动情期以无核角化细胞为主,动情后期以分布比例相当的有核上皮细胞、白细胞及无核角化细胞为主。

2.4 肥胖评估、糖脂代谢分析及激素检测 治疗结束,称量各组大鼠体质量及体长并记录数据,计算Lee's指数, Lee's指数=(体质量 $\times 1000$)^{1/3}/体长。于造模结束后,禁食12 h,断尾取血,使用血糖仪测定空腹血糖(FPG),放射免疫分析法(RIA)测定血清空腹胰岛素(FINS),胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)计算公式为 $\text{HOMA-IR} = \text{FPG} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{FINS} (\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}) / 22.5$, HOMA-IR比正常同龄雌性未孕大鼠升高,进一步确定PCOS-IR造模成功^[17]。计算定量胰岛素敏感性指数(QUICKI)= $1/(\log \text{FPG} + \log \text{FINS})$,用以评估胰岛素抵抗稳态性。使用全自动生化分析仪检测血清TG、TC等脂代谢指标。各组大鼠麻醉后,腹主动脉取血,按照ELISA检测试剂盒说明书操作,使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度A,检测血清AMH、LH、LH/FSH、T、E₂水平。

2.5 卵巢组织学分析 取大鼠新鲜卵巢组织,将其周围脂肪剥离,精确称量卵巢湿重并拍照。用4%多聚甲醛固定,进行石蜡包埋、切片、染色,切片厚度4 μm , HE染色后在光学显微镜下观察卵巢组织病理变化^[18]。

2.6 免疫组织化学法(IHC)检测卵巢组织

AMHR II、BMP-15、Smad5蛋白表达 将4%多聚甲醛固定的大鼠卵巢组织以石蜡包埋切片,参照IHC染色方法观察分析AMHR II、BMP-15、Smad5蛋白表达情况。加入AMHR II、BMP-15、Smad5一抗(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入HRP标记的二抗(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育50 min, DAB显色, PBS清洗,封片,置于显微镜下观察,采用Images-pro Plus 6.0计算机图像分析系统对结果进行分析。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织AMHR II、BMP-15、Smad5蛋白水平 取新鲜卵巢组织剪碎、研磨,加入200 μL 去污剂裂解液,匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径10 cm),取上清液, BCA检测蛋白浓度。电泳、转膜、脱脂后分别加入AMHR II、BMP-15、Smad5、 β -actin一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST充分漂洗PVDF膜后加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育2 h, TBST充分洗涤, ECL试剂显色曝光,用凝胶图象处理系统分析目标条带的灰度值。

2.8 统计学分析 采用SPSS 25.0软件,数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时采用Dunnett's T3检验。数据不符合正态分布时采用非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

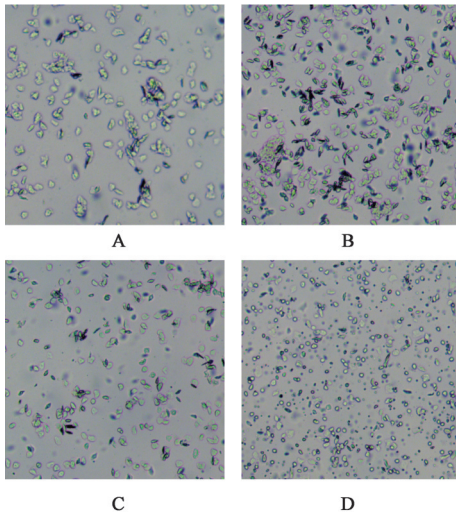
3 结果

3.1 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠动情周期的影响

观察大鼠阴道脱落细胞变化,空白组大鼠4~5 d出现1次大量无核无规则的角化细胞;模型组大鼠长期可见大量小而圆的白细胞,动情周期紊乱,表明PCOS造模成功。消囊调经汤组大鼠于治疗第5~6天起阴道脱落细胞出现角化细胞,达英-35组大鼠于治疗第6~7天起逐渐出现角化细胞,治疗结束后2组大鼠动情周期稳定且规律。见图1。

3.2 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠Lee's指数及糖脂代谢的影响

治疗结束后,与空白组比较,模型组大鼠体质量及Lee's指数均显著上升($P < 0.01$);与模型组比较,消囊调经汤组、达英-35组大鼠体质量及Lee's指数显著下降($P < 0.01$),见表1。与空白组比较,模型组大鼠血清中FPG、FINS、HOMA-IR、TC、TG水平显著升高($P < 0.01$), QUICKI显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,消囊调经汤组、达英-35组大鼠血清FPG、FINS、HOMA-IR、TC水平明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), QUICKI显著上升($P < 0.01$),消囊调经汤组TG水平明显下降($P < 0.05$),达英-35组TG较模型组有所下降,但差异无统计学意义,见表2。



注:A.动情前期;B.动情期;C.动情后期;D.动情间期
图1 大鼠阴道脱落细胞变化(倒置显微镜,×10)

Fig. 1 Microscopic changes of vaginal exfoliated cells in rats (inverted microscope, ×10)

表2 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠糖脂代谢指标的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Xiaonang Tiaoqing decoction on glycolipid metabolism indexes in PCOS-IR rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | FPG/mmol·L ⁻¹ | FINS/mU·L ⁻¹ | HOMA-IR | QUICKI | TC/mmol·L ⁻¹ | TG/mmol·L ⁻¹ |
|--------|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 5.03±0.62 | 43.45±1.82 | 9.67±1.47 | 0.42±0.13 | 1.24±0.15 | 0.96±0.25 |
| 模型组 | | 15.75±2.51 ²⁾ | 81.50±3.92 ²⁾ | 57.41±11.69 ²⁾ | 0.32±0.01 ²⁾ | 1.84±0.27 ²⁾ | 1.28±0.21 ²⁾ |
| 消囊调经汤组 | 11.4 | 7.27±1.17 ³⁾ | 55.44±3.48 ⁴⁾ | 18.04±4.03 ⁴⁾ | 0.38±0.01 ⁴⁾ | 1.59±0.23 ³⁾ | 1.09±0.23 ³⁾ |
| 达英-35组 | 0.21 | 8.23±1.19 ³⁾ | 59.45±3.45 ⁴⁾ | 21.90±4.38 ⁴⁾ | 0.37±0.01 ⁴⁾ | 1.61±0.21 ³⁾ | 1.12±0.25 |

表3 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠血清中AMH及性激素水平的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Xiaonang Tiaoqing decoction on serum levels of AMH and sex hormones in PCOS-IR rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | AMH/pmol·L ⁻¹ | LH/IU·L ⁻¹ | FSH/IU·L ⁻¹ | LH/FSH | T/nmol·L ⁻¹ | E ₂ /pmol·L ⁻¹ |
|--------|--|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 空白组 | | 412.43±60.03 | 3.10±0.41 | 1.53±0.21 | 2.04±0.36 | 0.32±0.03 | 9.78±1.54 |
| 模型组 | | 1 189.06±68.31 ²⁾ | 10.99±0.80 ²⁾ | 1.87±0.37 ¹⁾ | 6.08±1.26 ²⁾ | 2.97±0.39 ²⁾ | 6.37±1.89 ²⁾ |
| 消囊调经汤组 | 11.4 | 455.83±56.53 ⁴⁾ | 4.53±0.80 ⁴⁾ | 1.81±0.18 | 2.53±0.58 ⁴⁾ | 1.17±0.13 ⁴⁾ | 9.92±2.31 ⁴⁾ |
| 达英-35组 | 0.21 | 518.00±48.57 ⁴⁾ | 4.65±0.64 ⁴⁾ | 1.92±0.29 | 2.46±0.47 ⁴⁾ | 0.86±0.04 ⁴⁾ | 10.18±1.61 ⁴⁾ |

3.4 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠卵泡发育的影响

空白组、模型组、消囊调经汤组、达英-35组大鼠卵巢平均湿重分别为(0.10±0.01)、(0.20±0.01)、(0.15±0.01)、(0.14±0.01)g。模型组大鼠卵巢表面色泽苍白、囊性突起较多;镜下观察卵巢HE染色切片发现,有较多数量的囊性扩张卵泡和闭锁状卵泡,卵泡内颗粒细胞层数减少甚至消失,未见卵母细胞,符合多囊样(PCO)卵巢。与模型组比较,其他3组大鼠卵巢色泽较红润、表面较光滑;镜下观察卵巢HE染色切片,空白组大鼠成熟卵泡内可见卵母细胞及放射冠,颗粒细胞排列整齐,层数达8~9层,黄体数量多;消囊调经汤组大鼠卵巢颗粒细胞层数次之且可见成熟的卵泡、卵母细胞。见图2和图3。

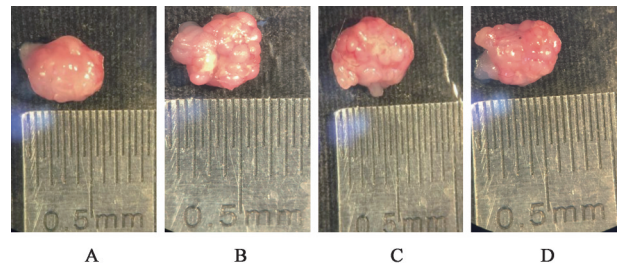
表1 消囊调经汤对大鼠体质量和Lee's指数的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effect of Xiaonang Tiaoqing decoction on Body weight and Lee's index of rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | 体质量/g | Lee's指数 |
|--------|--|----------------------------|--------------------------|
| 空白组 | | 390.00±6.51 | 24.29±0.34 |
| 模型组 | | 410.00±6.69 ²⁾ | 26.15±0.33 ²⁾ |
| 消囊调经汤组 | 11.4 | 389.00±11.60 ⁴⁾ | 24.61±0.33 ⁴⁾ |
| 达英-35组 | 0.21 | 390.00±12.34 ⁴⁾ | 24.84±0.19 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2-表4同)

3.3 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠血清中AMH及性激素水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清AMH、LH、LH/FSH、T水平显著上升(P<0.01),E₂水平显著下降(P<0.01);与模型组比较,消囊调经汤组、达英-35组大鼠血清AMH、LH、LH/FSH、T水平显著下降,E₂水平显著上升(P<0.01),见表3。



注:A.空白组;B.模型组;C.消囊调经汤组;D.达英-35组(图3-图7同)

图2 消囊调经汤对大鼠卵巢外观的影响

Fig. 2 Effect of Xiaonang Tiaoqing decoction on ovarian appearance of rats

3.5 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠卵巢组织中AMHR II、BMP-15、Smad5蛋白表达水平的影响 IHC

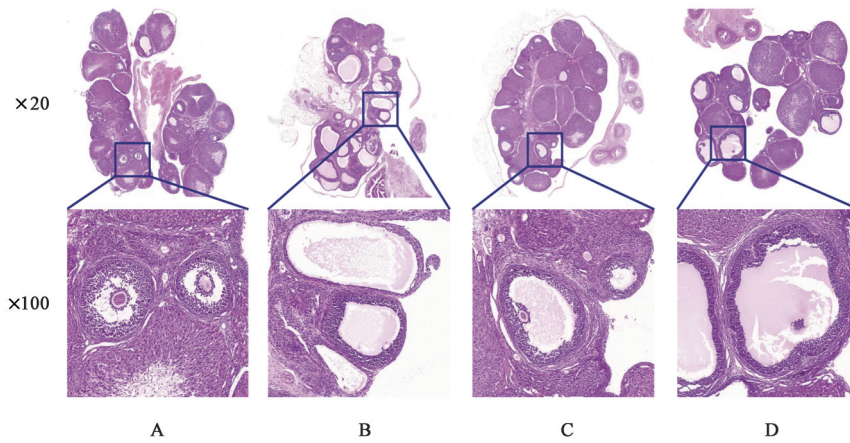


图3 消囊调经汤对大鼠卵巢组织病理的影响(HE)

Fig. 3 Effect of Xiaonang Tiaojing decoction on histopathology of rat ovaries (HE)

结果显示,与空白组比较,模型组卵巢组织AMHR II抗体阳性表达最强,BMP-15、Smad5抗体阳性表达不明显;与模型组比较,消囊调经汤组和

达英-35组卵巢组织中BMP-15、Smad5抗体阳性表达较强,AMHR II抗体阳性表达较不明显。见图4-图6。

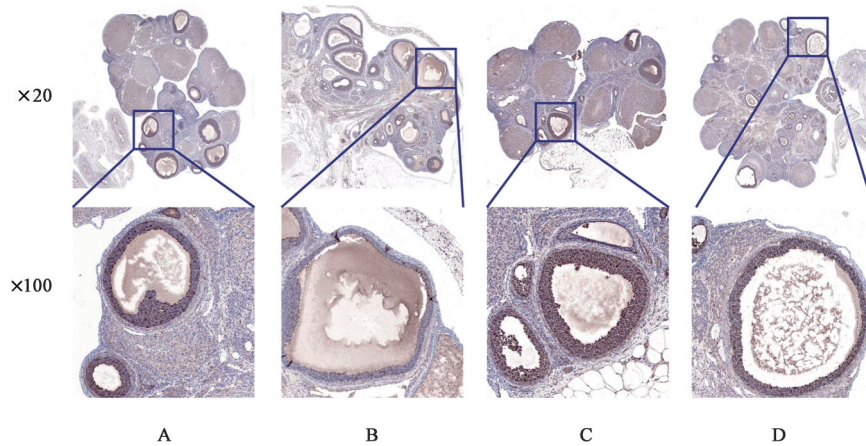


图4 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠卵巢组织AMHR II蛋白表达水平的影响(IHC)

Fig. 4 Effect of Xiaonang Tiaojing decoction on AMHR II protein expression level in ovarian tissues of PCOS-IR rats (IHC)

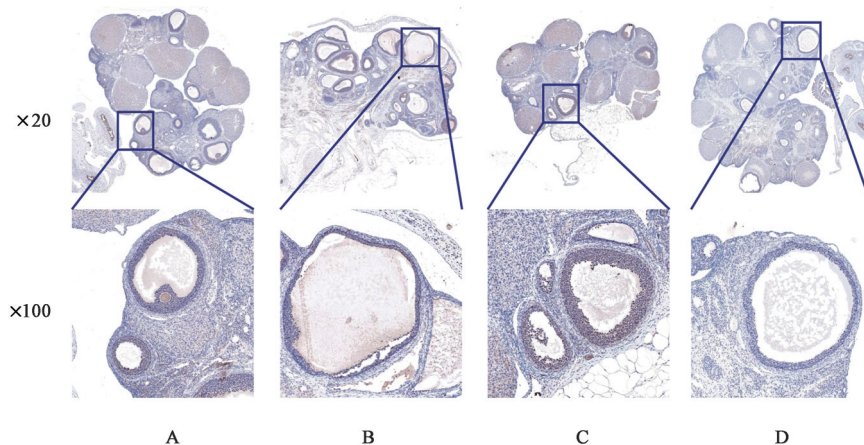


图5 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠卵巢组织BMP-15蛋白表达水平的影响(IHC)

Fig. 5 Effect of Xiaonang Tiaojing decoction on BMP-15 protein expression level in ovarian tissues of PCOS-IR rats (IHC)

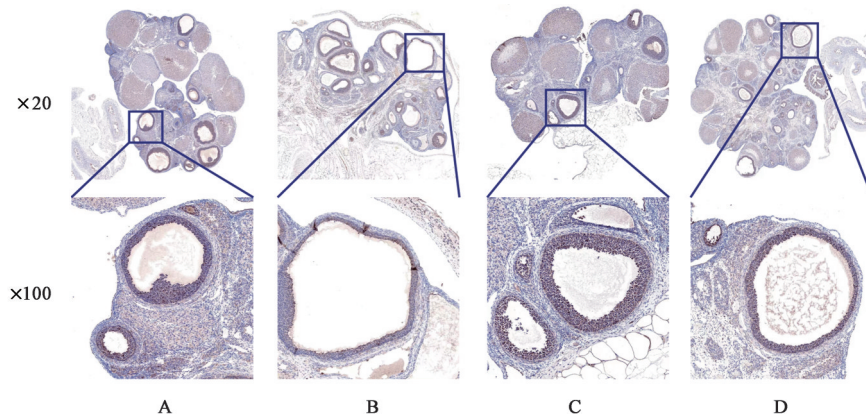


图6 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠卵巢组织Smad5蛋白表达水平的影响(IHC)

Fig. 6 Effect of Xiaonang Tiaojing decoction on Smad5 protein expression level in ovarian tissues of PCOS-IR rats (IHC)

Western blot结果显示,与空白组比较,模型组卵巢组织中AMHR II蛋白表达量显著上升,BMP-15、Smad5蛋白表达量显著下降($P<0.01$);与模型组比较,

消囊调经汤组、达英-35组大鼠卵巢组织BMP-15、Smad5蛋白表达量显著上升,AMHR II蛋白表达量显著下降($P<0.01$)。见表4和图7。

表4 消囊调经汤对PCOS-IR大鼠卵巢组织中AMHR II、BMP-15、Smad5蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Xiaonang Tiaojing decoction on protein expression levels of AMHR II, BMP-15 and Smad5 in ovarian tissues of PCOS-IR rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/ $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ | AMHR II/ β -actin | BMP-15/ β -actin | Smad5/ β -actin |
|--------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组 | | 227.00±39.67 | 323.00±36.21 | 561.00±25.39 |
| 模型组 | | 639.00±61.60 ²⁾ | 118.00±22.20 ²⁾ | 170.00±24.59 ²⁾ |
| 消囊调经汤组 | 11.4 | 352.00±36.58 ⁴⁾ | 256.00±25.44 ⁴⁾ | 451.00±36.22 ⁴⁾ |
| 达英-35组 | 0.21 | 350.00±46.83 ⁴⁾ | 272.00±47.65 ⁴⁾ | 411.00±45.29 ⁴⁾ |

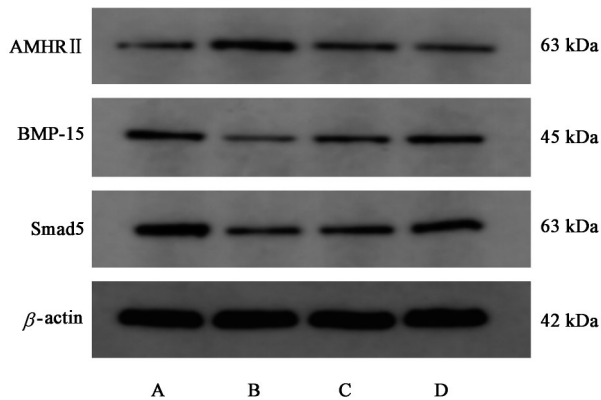


图7 大鼠卵巢组织AMHR II、BMP-15和Smad5蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoretic of AMHR II, BMP-15 and Smad5 protein expression in rat ovarian tissues

4 讨论

PCOS是一种内分泌系统异质性疾病,对生理和代谢系统产生普遍有害的影响。在PCOS女性中,50%~80%为肥胖女性,其中30%~35%糖耐量受损,8%~10%被发现患有糖尿病或有糖尿病家族史^[19]。近年来,关于PCOS-IR的研究趋于热潮,IR是PCOS患者内分泌异常特征之一,作为众多代谢

类疾病的“危险信号”,IR会导致诸如血脂异常、2型糖尿病、代谢综合征等疾病的发生^[20]。目前,现代医学对PCOS-IR的治疗较为单一,虽然能有效控制血糖、降低IR,但停药后易复发,不良反应明显,临床满意度较低。中医学在PCOS疾病中应用广泛,在辨证治疗PCOS及其并发症等方面具有明显优势^[21-22]。中医学认为PCOS多与“痰”“瘀”相关,笔者既往观察300例PCOS患者发现,气滞痰瘀型占71.1%、气滞型占81.7%、痰湿型占68.3%、血瘀型占63.3%等,其病因以气滞、痰湿、瘀血为主^[23]。同时结合多年临床经验发现,患有PCOS的女性在面临应激反应时易出现急躁、易怒、抑郁等情志,加之平素饮食失节,脾失运化,气机出入失序,易形成痰湿体质,因而体型愈加肥胖。早期研究指出,肥胖是促使发生IR的关键因素^[24],中医称肥胖为“无形之痰”异常积聚,而痰湿之邪其性为阴,且重浊黏滞,若情志异常,气滞与痰湿互结,滞于脉中,影响胞宫胞脉血液运行,久之形成湿瘀同病,加重津液输布异常,进而阻碍气血运行,致PCOS患者糖脂代谢发生紊乱,成为PCOS诸多并发症之肇始,故本病

从气滞、痰湿、瘀血3个方面探讨其治疗具有临床意义。笔者运用《伤寒论》葛根汤治疗PCOS, 临证发现可有效促进PCOS患者卵泡发育, 降低其血清IGF-1水平^[25], 进而在此基础上拟定消囊调经汤治疗本病。方中君药葛根, 具升发胃阳、解经气壅遏之功; 清半夏、石菖蒲、桑白皮俱为臣药, 起清肺降气、化痰祛瘀之效; 佐药桃仁、川芎、茜草、当归可行气活血, 使调经养血之力倍增, 郁金、黄芩、麻黄、鹿角霜行血化瘀、清热利湿, 多种药材合用共奏“化痰降气、祛瘀通经”之效。

目前, 通过高脂高糖持续诱导的方式构建PCOS-IR大鼠模型, 常用于研究中医药治疗PCOS-IR的评判疗效及作用机制中^[26-27]。本研究以PCOS-IR模型大鼠为研究对象, 与空白组比较, 模型组大鼠阴道脱落细胞可见大量白细胞、动情周期紊乱, 体质量、Lee's指数、糖脂代谢相关指标(FPG、FINS、HOMA-IR、TG、TC)、AMH及性激素水平(LH、LH/FSH、T)显著上升, E₂水平、QUICKI显著下降, 卵巢组织表面苍白、囊性突起较多、湿重较大, HE染色结果呈现卵泡呈闭锁状、囊性扩张状, 卵泡内颗粒细胞层数减少甚至消失, 不见卵母细胞的PCO状, 主要表现为肥胖、激素及代谢紊乱、动情失调、卵巢功能受损等特征。在消囊调经汤灌胃治疗后, 与模型组大鼠比较, 消囊调经汤组大鼠于治疗第5~6天起阴道脱落细胞出现角化细胞, 治疗周期结束后, 体质量、Lee's指数、AMH及性激素水平(LH、LH/FSH、T)、糖脂代谢指标(FPG、FINS、HOMA-IR、TG、TC)明显下降, E₂水平、QUICKI显著上升, 卵巢组织表面较红润、呈现光滑状、湿重减轻, HE染色结果显示其形态完整、卵巢颗粒细胞层次多, 可见卵母细胞和成熟卵泡。研究表明, 在长期高脂高糖饮食的持续刺激下, 过多的体脂量, 尤其是Lee's指数较正常雌性大鼠明显升高时, IR程度足以使PCOS大鼠代谢异常的风险增加, 同时紊乱动情, 导致卵泡发育异常。而消囊调经汤能够改善PCOS-IR大鼠性激素水平及糖脂代谢情况, 促进卵泡生长、发育, 恢复动情周期及卵巢功能。

AMH是一种分泌型糖蛋白激素, 是女性卵泡发育的负调节剂, 其信号通路的失调导致女性不育的主要原因为PCOS。在AMH的分子机制研究中, AMH与AMHR II的特异性结合可激活BMP-Smad信号传导^[28], 进而激活受体特异性募集和Smad1、Smad5和(或)Smad8磷酸化, 最终控制调节胚胎发育、组织形态发生等基因表达^[29]。ANHÊ等^[7]研究

表明, Smad5通过BMP/Smad信号通路, 直接与Akt2启动子结合并正向调节Akt2, 进而调节L6肌管中的葡萄糖摄取, 是治疗2型糖尿病的潜在靶点, 因此在调节胚胎发育和胰岛素信号中, Smad5具有重要作用。此外, BMP-15作为PCOS女性卵巢功能的潜在标志物之一, 已被证明可激活Smad1/5/8信号通路, 用于调控女性卵泡生长^[30]。基于以上研究, AMH与AMHR II的特异性结合与BMP-15/Smad5存在密切关联, 在调节卵巢功能和胰岛素方面可能起着关键作用。本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织中AMHR II蛋白阳性表达异常升高, BMP-15、Smad5蛋白阳性表达不明显, 血清AMH显著上升; 与模型组比较, 消囊调经汤组大鼠卵巢组织中AMHR II蛋白阳性表达下调, BMP-15、Smad5蛋白阳性表达上调, 血清AMH水平显著下降。Western blot进一步检测发现, 消囊调经汤组大鼠卵巢组织BMP-15、Smad5蛋白表达量显著高于模型组, 而AMHR II蛋白表达量显著低于模型组。说明消囊调经汤治疗PCOS-IR的机制可能与下调AMH/AMHR II信号通路的过表达并上调BMP-15、Smad5表达有关。

综上所述, 消囊调经汤可能通过下调AMH/AMHR II信号通路, 同时介导BMP-15、Smad5上调, 从而改善PCOS-IR大鼠动情周期、AMH、性激素变化及糖脂代谢指标失衡状态, 进而降低体质量及Lee's指数, 恢复已损伤的卵巢功能。本研究从功能及分子层面为消囊调经汤治疗PCOS-IR提供了有力的科学依据, 同时也为中医药临床治疗PCOS-IR提供了新的靶点。本研究仅初步观察了消囊调经汤对PCOS-IR大鼠AMH/AMHR II信号通路表达的影响, 后期将通过敲除基因, 阻断该信号通路以进一步验证研究结果。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TOSI F, BONORA E, MOGHETTI P. Insulin resistance in a large cohort of women with polycystic ovary syndrome: A comparison between euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp and surrogate indexes [J]. Hum Reprod, 2017, 32(12):2515-2521.
- [2] ZENG X, XIE Y J, LIU Y T, et al. Polycystic ovarian syndrome: Correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity [J]. Clin Chim Acta, 2020, 502:214-221.
- [3] WU H, RUAN X, JIN J, et al. Metabolic profile of

- Diane-35 versus Diane-35 plus metformin in Chinese PCOS women under standardized life-style changes [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(7): 548-551.
- [4] PELLATT L, RICE S, MASON H D. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: A mountain too high? [J]. *Reproduction*, 2010, 139(5): 825-833.
- [5] MEIRELES A J C, BILIBIO J P, LORENZZONI P L, et al. Association of FSHR, LH, LHR, BMP15, GDF9, AMH, and AMHR polymorphisms with poor ovarian response in patients undergoing in vitro fertilization [J]. *JBRA Assist Reprod*, 2021, 25(3): 439-446.
- [6] PRPA E, VASILAKI A, DAFPOULOS K, et al. Effect of anti-Müllerian hormone (AMH) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) on steroidogenesis in primary-cultured human luteinizing granulosa cells through Smad5 signalling [J]. *J Assist Reprod Genet*. 2015, 32(7): 1079-1088.
- [7] ANHÊ F F, LELLIS-SANTOS C, LEITE A R, et al. Smad5 regulates Akt2 expression and insulin-induced glucose uptake in L6 myotubes [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 319(1/2): 30-38.
- [8] 何贵艳, 段英丹, 洪方, 等. 葛根在葛根汤治疗原发性痛经中的作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(15): 3926-3933.
- [9] 李潇, 李秋芳, 周艳艳. 消囊调经汤对非肥胖型多囊卵巢综合征患者卵巢储备及卵泡发育的影响 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2018, 20(5): 710-715.
- [10] 周艳艳, 付佳琳, 刘阳阳, 等. 化痰降气法对肝郁气滞型非肥胖型PCOS卵巢储备及内分泌代谢的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(12): 1823-1826, 1832.
- [11] 李燕红, 郭梅珍, 袁俊俊, 等. 消囊调经汤联合屈螺酮炔雌醇片(II)治疗多囊卵巢综合征临床研究 [J]. *新中医*, 2022, 54(5): 135-139.
- [12] 王明星, 尹谦, 张晓丹, 等. 来曲唑联合高脂膳食诱导PCOS-IR大鼠模型复制时间及其内分泌、代谢改变的实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(1): 1-7.
- [13] XU J, DUN J, YANG J, et al. Letrozole rat model mimics human polycystic ovarian syndrome and changes in insulin signal pathways [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e923073.
- [14] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1124.
- [15] 李俊波, 邓芳, 李霄汉, 等. 龙胆泻肝汤对PCOS模型大鼠的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7): 121-126.
- [16] MARCONDES F K, BIANCHI F J, TANNO A P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations [J]. *Braz J Biol*, 2002, 62(4A): 609-614.
- [17] ZHU Y, LI Y, LIU M, et al. Guizhi Fuling Wan, Chinese herbal medicine, ameliorates insulin sensitivity in PCOS model rats with insulin resistance via remodeling intestinal homeostasis [J]. *Front Endocrinol(Lausanne)*, 2020, 11: 575.
- [18] FELDMAN A T, WOLFE D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1180: 31-43.
- [19] XU Y, QIAO J. Association of insulin resistance and elevated androgen levels with polycystic ovarian syndrome(PCOS): A review of literature [J]. *J Healthc Eng*, 2022, doi:10.1155/2022/9240569.
- [20] NADERPOOR N, SHORAKAE S, JOHAM A, et al. Obesity and polycystic ovary syndrome [J]. *Minerva Endocrinol*, 2015, 40(1): 37-51.
- [21] 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.
- [22] 陈苗, 杜小利, 冯亚宏, 等. 基于NLRP3炎症通路探讨健脾益肾化痰方对多囊卵巢综合征大鼠卵巢功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(20): 61-70.
- [23] 付佳琳, 周艳艳, 胡长容, 等. 300例非肥胖型PCOS患者中医证型分布研究 [J]. *国医论坛*, 2021, 36(5): 21-23.
- [24] BASTARD J P, MAACHI M, LAGATHU C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2006, 17(1): 4-12.
- [25] 付佳琳. 非肥胖型PCOS中医证候分析及降气化痰法对气滞痰瘀型患者的临床观察 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2020.
- [26] 尹谦, 王明星, 许昕. 益肾祛浊方对PCOS-IR模型大鼠IGF-1表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(11): 6805-6808.
- [27] 许金榜, 王小云, 纪峰, 等. 痰脂消汤调控PCOS-IR模型大鼠卵巢PI3K/Akt途径探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 156-160.
- [28] HOWARD J A, HART K N, THOMPSON T B. Molecular mechanisms of AMH signaling [J]. *Front Endocrinol(Lausanne)*, 2022, 13: 927824.
- [29] LAI L Y S, GRACIE N P, GOWRIPALAN A, et al. SMAD proteins: Mediators of diverse outcomes during infection [J]. *Eur J Cell Biol*, 2022, 101(2): 151204.
- [30] SHIMIZU K, NAKAMURA T, BAYASULA, et al. Molecular mechanism of FSHR expression induced by BMP15 in human granulosa cells [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(6): 1185-1194.

[责任编辑 李嘉麟]