

桂枝茯苓丸调节PI3K/Akt/mTOR通路对PCOS-IR大鼠 排卵障碍的影响

刘敏¹, 朱鸿秋^{2*}, 李印¹, 朱影¹, 胡小丹¹

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学医学与生命科学学院, 成都 610041)

[摘要] 目的:探讨桂枝茯苓丸对来曲唑联合高脂乳剂导致的多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗(PCOS-IR)大鼠排卵障碍的影响。方法:将72只雌性SD大鼠随机分为空白组、模型组、二甲双胍组和桂枝茯苓丸低、中、高剂量组,每组12只。除空白组外,其余大鼠每日予来曲唑 $0.001\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 结合高脂乳剂 $15\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续灌胃30 d建立PCOS-IR大鼠模型。桂枝茯苓丸低、中、高剂量组每日分别灌服桂枝茯苓丸混悬液 $0.31, 0.62, 1.24\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,二甲双胍组每日灌服二甲双胍混悬液 $0.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,空白组和模型组每日灌服 $12\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 生理盐水,共干预30 d。苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢组织病理形态学变化;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清促卵泡生成素(FSH),促黄体生成素(LH),睾酮(T),空腹胰岛素(FINS)水平,计算LH/FSH,胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)值;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢组织中磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路相关分子及自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1),自噬相关基因5(Atg5),微管相关蛋白轻链3(LC3) II蛋白表达水平;免疫组化(IHC)检测Beclin-1, LC3 II蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组大鼠卵巢中各级卵泡、卵泡颗粒细胞层厚度也减少,黄体数量明显减少,而卵巢白膜厚度增加,闭锁卵泡及囊状扩张卵泡数量明显增多;血清T, LH, LH/FSH, FINS, HOMA-IR显著升高($P<0.01$);卵巢组织中磷酸化(p)-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$);自噬相关蛋白LC3 II与Beclin-1的相对表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组及二甲双胍组囊状扩张卵泡数、闭锁卵泡数减少,卵泡颗粒细胞层厚度增加,可见到各级卵泡分布及较多黄体;桂枝茯苓丸低、中、高剂量组血清T, LH, LH/FSH, FINS, HOMA-IR明显降低($P<0.05, P<0.01$),二甲双胍组血清FINS, HOMA-IR显著降低($P<0.01$);各给药组p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);桂枝茯苓丸中、高剂量组LC3 II, Atg5与Beclin-1蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。结论:桂枝茯苓丸可激活颗粒细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路,抑制颗粒细胞过度自噬,改善卵巢功能及胰岛素抵抗,恢复排卵,并且以高剂量效果更佳。

[关键词] 桂枝茯苓丸; 多囊卵巢综合征; 排卵障碍; 胰岛素抵抗; 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路; 自噬

[中图分类号] R2-0; R289; R272.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)06-0007-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210536

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210108.1554.004.html>

[网络出版日期] 2021-1-11 16:26

Effect of Guizhi Fulingwan on Ovulation Dysfunction in PCOS-IR Rats by Regulating PI3K/Akt/mTOR Pathway

LIU Min¹, ZHU Hong-qiu^{2*}, LI Yin¹, ZHU Ying¹, HU Xiao-dan¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. College of Medicine and Life Sciences, Chengdu University of TCM, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Guizhi Fulingwan on ovulation dysfunction in rats

[收稿日期] 20200924(025)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873335);四川省科技厅面上项目(2020YJ0376);成都中医药大学科技发展基金医院专项重点项目(2017-EL-13)

[第一作者] 刘敏,在读硕士,从事中医药防治不孕症的实验研究, E-mail: 739879384@qq.com

[通信作者] *朱鸿秋,博士,研究员,从事中医药防治不孕症的实验研究, E-mail: zhuhongqiu@cdutcm.edu.cn

with polycystic ovary syndrome with insulin resistance (PCOS-IR) induced by letrozole combined with high fat emulsion. **Method:** A total of 72 female SD rats were randomly divided into control group, model group, metformin group and Guizhi Fulingwan low, medium and high dose groups, with 12 rats in each group. Except for control group, rats were given letrozole $0.001\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ combined with high-fat emulsion $15\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 21 consecutive days to establish model of PCOS-IR. Guizhi Fulingwan low, medium and high-dose groups were administrated with Guizhi Fulingwan 0.31, 0.62, $1.24\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectively, metformin group was administrated with metformin $0.27\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, control group and model group were administrated with $12\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ of normal saline daily for 30 days. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe ovarian tissue pathology morphology, and enzyme-linked immunoassay method (ELISA) was used to detect serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T), fasting insulin (FINS) level, and LH/FSH and insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated. Western blot was used to detect the expression levels of autophagy key molecular Atg6 yeast homologue (Beclin-1), autophagy related gene 5 (Atg5), microtubule associated protein light chain 3 (LC3) II proteins in the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/rapamycin target protein (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway and autophagy related indicators in rat ovarian tissue. Beclin-1 and LC3 II protein expressions were detected by immunohistochemistry (IHC). **Result:** Compared with control group, the thickness of follicles and follicular granulosa cells in the ovary of the model group also decreased, and the number of corpus luteum significantly decreased, while the white membrane thickness of the ovary increased, and the number of atresia follicles and cystic dilatation follicles increased significantly. Serum T, LH, LH/FSH, FINS, FINS, HOMA-IR were significantly increased ($P<0.01$). Phosphorylated (p)-PI3K, p-Akt, and p-mTOR proteins in ovarian tissue were all decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The relative expression levels of autophagy-related protein LC3 II and Beclin-1 were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with model group, the number of follicles in the low, medium and high dose Guizhi Fulingwan group and the metformin group decreased, the number of follicles in atresia and atresia increased, and the follicular granulosa cell layer thickness increased. Serum T, LH, LH/FSH, FINS and HOMA-IR of Guizhi Fulingwan group were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and serum FINS and HOMA-IR of metformin group were significantly decreased ($P<0.01$). The expressions of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR proteins were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression levels of LC3 II, Atg5 and Beclin-1 in the medium and high dose groups were significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion:** Guizhi Fulingwan can activate the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway of granular cells, inhibit excessive autophagy of granular cells, improve ovarian function and insulin resistance, and restore ovulation, and the effect is better with high dose.

[Key words] Guizhi Fulingwan; polycystic ovary syndrome; ovulation dysfunction; insulin resistance; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/rapamycin target protein (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway; autophagy

多囊卵巢综合征(PCOS)是育龄期女性常见的生殖内分泌代谢性疾病,主要表现为雄激素增多、排卵障碍和卵巢多囊样改变^[1],常伴有胰岛素抵抗(IR)或代偿性高胰岛素血症、肥胖、脂质代谢紊乱和低度慢性炎症,是导致育龄期妇女月经紊乱和不孕常见原因之一^[2-3]。据流行病学调查发现,育龄期妇女发病率为6%~20%^[1],中国PCOS发病率为5.6%^[4],约50%~70%的PCOS患者伴有IR^[5],约70%的排卵障碍性不孕归因于此病^[6]。西医治疗PCOS排卵障碍不良反应明显且难以避免,患者满

意度低。因此,寻求更加有效、安全的治疗势在必行。

中医从“痰瘀胞宫”认识PCOS,总结出PCOS主要病机为“痰瘀互结、滞碍冲任”^[7]。桂枝茯苓丸作为东汉张仲景治疗妇科病的经典名方,由桂枝、茯苓、白芍、牡丹皮、桃仁组成,具有化痰利水、活血化瘀之功。该方可能通过有效降低PCOS大鼠空腹血糖、空腹胰岛素及雄激素值,纠正低脂联素血症的途径来改善胰岛素抵抗及脂代谢异常^[8];缩短月经周期、恢复排卵,提高妊娠率^[9];一项中药复方治疗

PCOS的研究表明,补肾健脾、养血通利药物可通过抑制颗粒细胞过度自噬,从而改善PCOS患者卵巢功能状态^[10]。磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路是调控细胞自噬的重要信号通路。研究表明,卵巢颗粒细胞通过PI3K/Akt途径,自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1)抗体/B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)途径等经典信号通路介导的自噬发生与卵泡发育和闭锁有密切的关系,同时介导颗粒胞自噬的相关受体在卵泡的发育与闭锁过程中也发挥了重要的作用^[11]。为进一步揭示桂枝茯苓丸治疗PCOS-IR排卵障碍的机制,故本研究观察该方对PI3K/Akt/mTOR信号通路与自噬相关分子的调控关系,为PCOS-IR的防治提供更多的科学证据。

1 材料

1.1 动物 雌性SD大鼠84只,7~8周龄,体质量180~200 g,合格证号SCXK(川)2015-030,购自成都达硕生物科技有限公司,饲养于成都中医药大学附属医院实验室,动物使用许可证号SYXK(川)2004-179。控制室内温度(22±2)℃,相对湿度(55±5)%。每日12 h光照,12 h避光条件下循环饲养,标准饲料和饮用水自由获取。本实验得到成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理编号SYXK2018-0126)。

1.2 药物与试剂 桂枝茯苓丸由桂枝、茯苓、牡丹皮、白芍、桃仁5味中药组成,为成药丸剂,购自成都九芝堂金鼎药业有限公司,批号190202,药液配置方法:将桂枝茯苓丸研磨为粉末,加入生理盐水,统一制备为含生药质量浓度为31,62,124 g·L⁻¹的混悬液,放于4℃冰箱储存,使用时用玻璃棒搅匀;二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号H20023370);来曲唑(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号190316);胆固醇(北京鸿润宝顺科技有限公司,批号170810);羧甲基纤维素钠(美国Sigma公司,批号C835846);磷酸化(p)-PI3K抗体,兔单抗Akt,兔单抗p-Akt,兔单抗p-mTOR,Beclin-1抗体,自噬相关基因5(Atg5)抗体(美国CST公司,批号分别为4228,4691,4060,5536,3495,12994);PI3K抗体,mTOR抗体,自噬相关蛋白轻链3(LC3)II抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab191606,ab2732,ab48394,ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗(成都正能生物公司,批号511103);促卵泡生成素(FSH),促黄体生成素(LH),空腹胰岛素(FINS),

睾酮(T)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为m1002872,m1002880,m1302840,m1002868);苏木素-伊红(HE)染色液,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120,P1200)。

1.3 仪器 MP-8001型双垂直电泳槽(北京凯元信瑞仪器有限公司);VE586型转移槽(上海天能公司);JY300C型电泳仪(美国Wealtec公司);SpectraMax190型全波长酶标仪(美国Molecular Devices公司);JJ-12J型脱水机(武汉俊杰电子有限公司);HD-310A/HD-310B型生物组织自动包埋机(湖北慧达仪器有限公司);S7220型石蜡切片机(沈阳恒松科技有限公司);BX53M型正置金相显微镜(日本Olympus公司);One touch型血糖仪(美国LifeScan公司)。

2 方法

2.1 动物分组及干预方法 大鼠适应性喂养2~3 d后,每天行阴道细胞涂片观察,将动情周期规律的大鼠纳入实验,按照随机数字表法分为空白组、模型组、二甲双胍组和桂枝茯苓丸低、中、高剂量组,每组12只。采用来曲唑联合高脂乳剂法构建PCOS-IR模型^[12],空白组每日灌胃12 mL·kg⁻¹生理盐水,其余大鼠灌胃来曲唑溶液0.001 g·kg⁻¹结合高脂乳剂10 mL·kg⁻¹连续30 d。从第21天开始,每日涂片,观察动情周期,当模型组大鼠50%动情周期紊乱时,视为造模成功^[12]。桂枝茯苓丸低、中、高剂量组和二甲双胍组在开始造模时同时干预治疗,连续30 d。桂枝茯苓丸低、中、高剂量组每日分别予0.31,0.62,1.24 g·kg⁻¹桂枝茯苓丸混悬液灌服,其中中剂量为人临床等效剂量,按照实验动物研究等效剂量的计算方法,以成人(体质量按60 kg计算)临床应用量的20倍确定大鼠给药的等效剂量^[13],即0.62 g·kg⁻¹,低剂量为等效剂量的0.5倍,高剂量为等效剂量的2倍。二甲双胍组每日灌服二甲双胍溶液0.27 g·kg⁻¹,空白组和模型组每日灌服12 mL·kg⁻¹生理盐水。剔除死亡大鼠,实验结束时空白组剩余7只大鼠,模型组剩余10只,桂枝茯苓丸低剂量组剩余8只,桂枝茯苓丸中剂量组剩余9只,桂枝茯苓丸高剂量组剩余10只,二甲双胍组剩余7只。

2.2 观察指标及方法 给药结束后,禁食12 h,次日8:00取血,室温放置30 min后,4℃,2 000 r·min⁻¹离心10 min,取上层血清,置于-80℃冰箱保存;取大鼠双侧卵巢,右侧卵巢置于4%多聚甲醛内固定24 h,常规脱水、石蜡包埋,制成3 μm的卵巢组织切

片,60℃烤片,4℃保存;左侧卵巢组织置于冷冻管,用液氮迅速冷冻,放入-80℃冰箱保存。

2.2.1 HE染色观察卵巢组织形态学及计数各类卵泡 取2.2项下制备的卵巢组织切片,HE染色,乙醇脱水,最后中性树胶封片。切片在全景扫描仪中观察、采集图像,并于100倍镜下观察统计成熟卵泡、囊性卵泡和黄体的数目。

2.2.2 ELISA检测血清T,FSH,LH,FINS水平 取2.2项下制备的血清,37℃恒温水浴解冻,用血糖仪测定空腹血糖(FPG)水平,用放射免疫分析仪测定血清FSH,T,LH和FINS水平,按照试剂盒说明书操作,采用酶标仪在450nm波长处测定各孔的吸光度A。计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), $HOMA-IR = FPG (mmol \cdot L^{-1}) \times FINS (mU \cdot L^{-1}) / 22.5$ 。

2.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织中PI3K,Akt,mTOR蛋白及其磷酸化水平和Beclin-1,Atg5,LC3 II蛋白表达 取卵巢组织1g,用液氮研磨,加入RIPA裂解液,振荡混匀,超声破碎细胞。在4℃,12 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清保存备用。用BCA蛋白定量试剂盒定量,再取适量蛋白加5×Loading buffer沸水加热10 min,上样。SDS-PAGE电泳,并转移到PVDF膜上,用适量TBST洗膜5 min,置膜于适量封闭缓冲液中,37℃封闭1 h,适量TBST洗3次,每次3 min。加入稀释的相应一抗(PI3K 1:1 000,p-PI3K 1:1 000,Akt 1:1 000,p-Akt 1:1 000,mTOR 1:1 000,p-mTOR 1:1 000,Beclin-1 1:1 000,Atg5 1:1 000,LC3 II 1:1 000),4℃孵育过夜。次日适量TBST洗3次,每次5 min。加入二抗(1:1 000),室温孵育1 h。再用适量TBST洗5次,每次5 min,适量TBS洗1次。显影,曝光。检测各蛋白条带灰度值,并使用Image J软件进行定量分析。

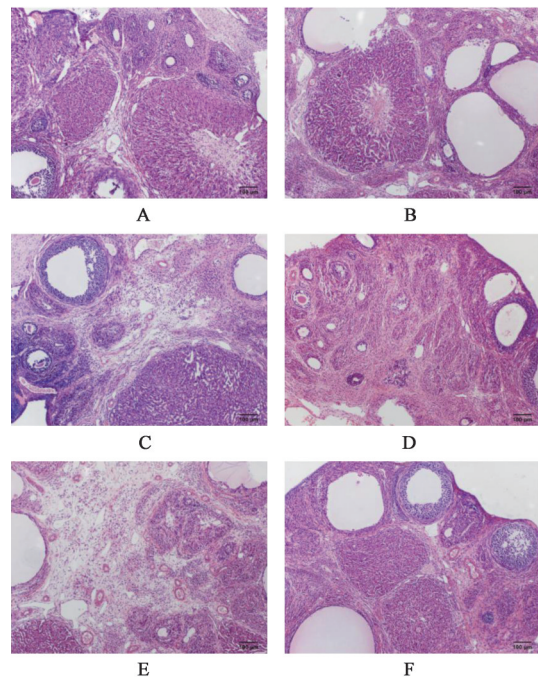
2.2.4 免疫组化检测卵巢组织中自噬相关蛋白Beclin-1,LC3 II的表达 样品固定在4%多聚甲醛中石蜡包埋,切片厚4 μm,68℃下烘烤2 h,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水。切片在室温下3%过氧化氢中避光孵育10 min,5%山羊血清孵育样本15 min,4℃条件下抗体(Beclin-1 1:100,LC3 II 1:100)孵育过夜。次日37℃条件下孵育二抗(1:100)40 min。滴加三抗(1:100),37℃孵育40 min。后二氨基联苯胺染色10 min,苏木素复染1 min,自来水冲洗返蓝15 min,梯度乙醇脱水,干燥,二甲苯中变透明,中性胶封片,风干,显微镜下读片。

2.3 统计学方法 运用SPSS 20.0软件进行数据分

析,服从正态分布且方差齐性的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,并使用最小显著性差异法(LSD)-*t*进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对PCOS-IR大鼠卵巢组织病理形态变化的影响 空白组大鼠卵巢组织内卵泡种类丰富,原始卵泡、初级卵泡及次级卵泡较多,反映出卵泡生长发育良好;同时,亦可见体积较大且卵泡液较多的成熟卵泡,卵泡颗粒细胞层次及黄体亦数目较多,发育良好。与空白组比较,模型组的大鼠卵巢内囊状卵泡和闭锁卵泡数增加,各级卵泡、黄体数目及卵泡颗粒细胞层厚度明显减少,而卵巢白膜厚度明显增加,提示PCOS造模成功。与模型组比较,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢内的囊状扩张卵泡数、闭锁卵泡数明显减少,黄体数及卵泡颗粒细胞层厚度增加,可见成熟卵泡。见图1。



A.空白组;B.模型组;C.桂枝茯苓丸低剂量组;D.桂枝茯苓丸中剂量组;E.桂枝茯苓丸高剂量组;F.二甲双胍组(图2~5同)

图1 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠卵巢组织病理变化的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Guizhi Fulingwan on pathological changes of ovarian tissue of PCOS-IR rats (HE, ×100)

3.2 对PCOS-IR大鼠卵巢卵泡及黄体数目的影响

与空白组比较,模型组大鼠囊状卵泡数显著增加($P < 0.01$),成熟卵泡及黄体数目明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸低、中、高剂量

组及二甲双胍组囊状卵泡数目均明显减少($P<0.05$, $P<0.01$), 桂枝茯苓丸中、高剂量组及二甲双胍组成

熟卵泡及黄体数目均显著增多($P<0.01$), 差异有统计学意义。见表1。

表1 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠卵巢卵泡及黄体数目的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of Guizhi Fulingwan on number of ovarian follicles and corpus luteum in PCOS-IR rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	成熟卵泡数目	囊状卵泡数目	黄体数目
空白	7		6.70±2.54	5.10±1.79	8.70±2.21
模型	10		3.00±1.94 ¹⁾	13.10±2.28 ²⁾	4.00±1.70 ²⁾
桂枝茯苓丸	8	0.31	5.20±2.44	9.40±2.68 ³⁾	5.20±1.40
	9	0.62	10.40±2.31 ^{4,6)}	8.80±2.49 ⁴⁾	9.40±2.95 ^{4,6)}
	10	1.24	13.80±3.12 ^{4,6)}	8.20±2.97 ⁴⁾	11.80±2.35 ^{4,6)}
二甲双胍	7	0.27	11.60±2.59 ^{4,6)}	9.50±2.01 ³⁾	9.60±1.27 ^{4,6)}

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⁾ $P<0.01$;与桂枝茯苓丸低剂量组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表2,4同)。

3.3 对PCOS-IR大鼠血清T, FSH, LH, LH/FSH, FINS水平及胰岛抵抗的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清T, LH, LH/FSH, FINS, HOMA-IR显著升高($P<0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸各剂量组大鼠血清T, LH, LH/FSH, FINS, HOMA-IR明显降

低($P<0.05$, $P<0.01$), 二甲双胍组血清FINS, HOMA-IR明显降低($P<0.05$), T, LH, LH/FSH, FSH差异无统计学意义;与桂枝茯苓丸低剂量组比较,桂枝茯苓丸高剂量组HOMA-IR明显降低($P<0.05$)。见表2。

表2 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠血清T, FSH, LH, LH/FSH, FINS水平及HOMA-IR的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Guizhi Fulingwan on serum T, FSH, LH, LH/FSH, FINS, FINS and HOMA-IR in PCOS-IR rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	T/ng·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	LH/U·L ⁻¹	LH/FSH	FINS/mU·L ⁻¹	HOMA-IR
空白	7		165.56±28.65	22.27±5.84	31.78±6.14	1.42±0.32	25.70±5.60	5.37±0.69
模型	10		306.46±69.41 ²⁾	26.19±3.38	54.78±10.53 ²⁾	2.19±0.48 ²⁾	48.03±7.34 ²⁾	14.41±2.11 ²⁾
桂枝茯苓丸	8	0.31	227.43±40.72 ⁴⁾	30.71±8.19	38.12±2.83 ⁴⁾	1.32±0.35 ⁴⁾	32.71±6.19 ⁴⁾	9.21±1.56 ⁴⁾
	9	0.62	220.34±45.52 ³⁾	28.51±4.22	42.33±6.41 ³⁾	1.50±0.24 ⁴⁾	29.92±7.15 ⁴⁾	7.74±1.21 ⁴⁾
	10	1.24	218.54±54.58 ³⁾	30.31±4.89	42.54±4.14 ³⁾	1.43±0.25 ⁴⁾	31.81±4.09 ⁴⁾	6.91±1.04 ^{4,5)}
二甲双胍	7	0.27	185.54±27.38	28.44±9.59	50.66±12.89	1.85±0.41	31.93±6.80 ⁴⁾	8.01±1.44 ⁴⁾

3.4 对PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞PI3K, Akt, mTOR蛋白及其磷酸化水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组及二甲双胍组p-Akt, p-mTOR蛋白表达量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), 桂枝茯苓丸中、高剂量组及二甲双胍组p-PI3K蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与桂枝茯苓丸低剂量组比较,桂枝茯苓丸中、高剂量组中p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与桂枝茯苓丸中剂量组比较,桂枝茯苓丸高剂量组mTOR蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图2,表3。

3.5 对PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞Beclin-1, Atg5, LC3 II蛋白表达的影响 免疫组化结果显示,与空白组比较,模型组中大鼠卵巢组织中自噬相关蛋白Beclin-1, LC3 II呈现高表达现象;与模型组比较,桂

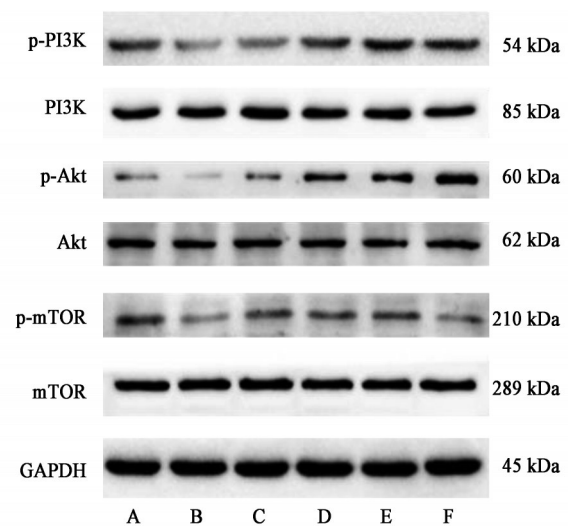


图2 PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR and mTOR protein expression of ovarian granulosa cells in PCOS-IR rats

表3 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞中p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Guizhi Fulingwan on p-PI3K, p-Akt and p-mTOR protein expression of ovarian granulosa cells in PCOS-IR rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH	p-mTOR/GAPDH
空白	7		0.452±0.050	0.272±0.047	0.366±0.049
模型	10		0.188±0.064 ¹⁾	0.109±0.056 ¹⁾	0.110±0.016 ²⁾
桂枝茯苓丸	8	0.31	0.240±0.072	0.320±0.044 ³⁾	0.414±0.051 ⁴⁾
	9	0.62	0.543±0.117 ^{4,5)}	0.579±0.045 ^{4,6)}	0.637±0.043 ^{4,6)}
	10	1.24	0.758±0.094 ^{4,6)}	0.716±0.033 ^{4,6)}	0.784±0.062 ^{4,6,7)}
二甲双胍	7	0.27	0.628±0.079 ^{4,6)}	0.733±0.108 ^{4,6)}	0.599±0.037 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;与桂枝茯苓丸低剂量组比较⁵⁾P<0.05,⁶⁾P<0.01;与桂枝茯苓丸中剂量组比较⁷⁾P<0.05,⁸⁾P<0.01。

桂枝茯苓丸低、中、高剂量组及二甲双胍组 Beclin-1, LC3 II 蛋白表达量均表现出不同程度的降低。见图 3, 4。Western blot 结果显示,与空白组比较,模型组 LC3 II 与 Beclin-1 蛋白表达均明显升高(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组自噬相关蛋白 Beclin-1, Atg5 与 LC3 II 的蛋白表达量呈现降低趋势,其中高剂量组降低最显著(P<0.01)。鉴于免疫组化的结果,桂枝茯苓丸组与二甲双胍组结果趋势一致,故 Western blot 未做二甲双胍组 Beclin-1, Atg5, LC3 II 蛋白表达实验。见图 5, 表 4。

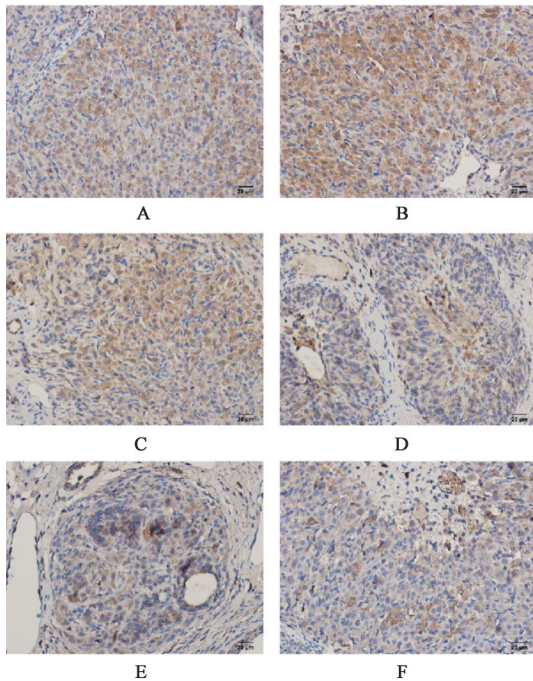


图3 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞Beclin-1表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of Guizhi Fulingwan on Beclin-1 protein expression of ovarian granulosa cells in PCOS-IR rats (IHC, ×200)

4 讨论

PCOS作为一种排卵障碍与代谢紊乱并见的生

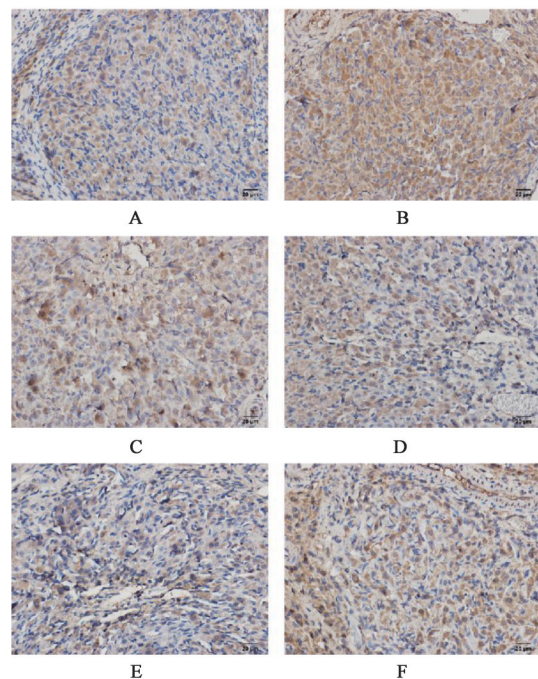


图4 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞LC3 II表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of Guizhi Fulingwan on LC3 II protein expression of ovarian granulosa cells in PCOS-IR rats (IHC, ×200)

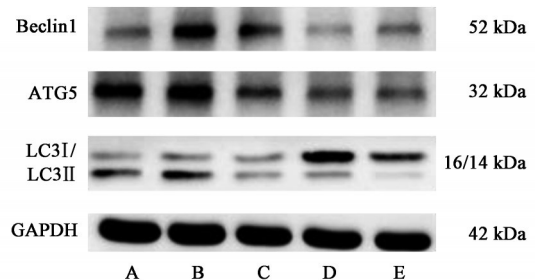


图5 各组大鼠卵巢颗粒细胞Beclin-1, Atg5, LC3 II 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of Beclin-1, Atg5, LC3 II protein expression of ovarian granulosa cells in rats of each group

殖内分泌疾病,在育龄期妇女中发病率高,其病因与发病机制仍未完全阐明,是妇科内分泌领域研究难点。目前,现代医学促排卵治疗存在一定副作用

表4 桂枝茯苓丸对PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞Beclin-1, Atg5, LC3 II蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Guizhi Fulingwan on Beclin-1, Atg5 and LC3 II protein expression of ovarian granulosa cells in PCOS-IR rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Beclin-1/GAPDH	Atg5/GAPDH	LC3 II/GAPDH
空白	7		0.340±0.047	0.796±0.105	0.481±0.070
模型	10		0.714±0.053 ²⁾	0.921±0.051	0.668±0.054 ¹⁾
桂枝茯苓丸	8	0.31	0.627±0.052	0.713±0.053	0.265±0.070 ⁴⁾
	9	0.62	0.328±0.041 ^{4,6)}	0.526±0.046 ⁴⁾	0.225±0.037 ⁴⁾
	10	1.24	0.347±0.068 ^{4,6)}	0.356±0.100 ^{4,6)}	0.128±0.034 ⁴⁾

用,多呈现高排低孕现象^[14],患者满意度较低。而中医药辨证治疗PCOS疗效确切同时副作用相对较小,具有优势^[15-16]。我国古籍尚无PCOS病名记载,据其临床表现可归属于中医“月经过少”“月经后期”“闭经”“不孕”等范畴。关于该病病因病机,医籍认为和痰湿、瘀血密切相关。《丹溪心法·痰饮》中提出“痰挟瘀血,遂成窠囊”,首次明确指出“窠囊”的基本病机为痰瘀互结,可存在于人体的各个部位,病势迁延难治^[17]。《寓意草》云:“至于窠囊之痰,如蜂子之穴于房中,如莲子之嵌于蓬内,生长则易,剥落则难。”^[18]对于窠囊的具体形态进行了描述,符合PCOS患者卵巢的形态学特征。现代医家也认为应从“痰瘀阻滞胞宫”认识PCOS,国医大师刘敏如更是建议将PCOS更名为“胞中脂膜壅塞诸症”^[19],以体现中医治疗特色。本研究基于中医传统窠囊理论认识,总结出PCOS主要病机为“痰瘀互结、滞碍冲任”,提化痰祛瘀的治疗大法。桂枝茯苓丸出自《金匱要略·妇人妊娠病脉证并治》,方中桂枝温阳化气以助血行,茯苓健脾而化痰湿,白芍敛肝血而扶脾,牡丹皮清血热以化瘀,桃仁活血化瘀以消癥块,诸药相合共奏化痰利水、活血化瘀之效。

稀发排卵或无排卵,高雄激素血症,IR是PCOS的主要临床表现。本研究大鼠卵巢组织病理结果显示,PCOS模型组主要以囊状卵泡为主,颗粒细胞层数减少,各级卵泡及黄体数目也明显少于空白组;血清T, LH, FINS水平及HOMA-IR显著升高,从病理及内分泌角度证明PCOS-IR模型构建成功。给予桂枝茯苓丸干预后,结果表明桂枝茯苓丸中、高剂量组中各级卵泡及黄体数目增多,颗粒细胞层数增加且排列整齐,囊状卵泡数目明显减少;血清T, LH, FINS水平及HOMA-IR显著降低,以桂枝茯苓丸高剂量组效果更为突出,说明高剂量的桂枝茯苓丸能够促进卵泡生长、发育,改善性激素水平及胰岛抵抗情况,恢复卵巢排卵功能。

自噬是一种细胞内的降解途径,正常水平的自

噬可以清除细胞内的有害物质和受损细胞器,维持细胞的正常功能;可受诸多因素影响,对机体正常生理功能的调节起到至关重要的作用。自噬不足和自噬过度都可导致机体内环境紊乱。研究表明,PCOS模型大鼠卵巢颗粒细胞自噬率明显高于对照组^[20]。Beclin-1是哺乳动物中最早发现的一个自噬相关蛋白,主要通过和PI3K形成复合体来调控其他自噬蛋白定位到自噬前体的结构中,而调节自噬活性,其表达强度与自噬活性密切相关。后续研究证实,PCOS患者卵巢组织观察到活跃的自噬现象,Beclin-1, LC3及LC3 II/LC3 I作为自噬的核心调节因子在PCOS卵巢颗粒细胞中升高^[21]。PI3K/Akt/mTOR信号通路是调控自噬的重要通路,与细胞自噬性死亡相关^[22],上调PI3K, Akt, mTOR磷酸化水平可抑制细胞自噬^[23]。在营养丰富的生理情况下,胰岛素与颗粒细胞膜上的胰岛素受体特异性结合,胰岛素受体自身磷酸化,并募集一个胰岛素受体底物蛋白(IRS)与PI3K结合,使其激活并产生磷酸肌醇3-磷酸(PIP3),Akt在PIP3作用下聚集于细胞膜,进而被重组人丙酮酸脱氢酶激酶同工酶1(PDK-1)磷酸化后激活,活化的Akt通过磷酸化TSC1/TSC2二聚体,使Rheb与三磷酸尿苷水解酶(GTP)结合,促进mTOR的累积与活化,致使自噬相关蛋白13(Atg13)高度磷酸化,降低其与失调51样激酶(ULK)的结合力,阻止ULK, Atg13和支架蛋白FIP200结合成为自噬启动复合体,从而抑制自噬的发生^[24]。然而,PCOS患者机体胰岛素受体自身磷酸化下降,致使PI3K/Akt/mTOR信号通路转导功能下降,Atg13, ULK去磷酸化,ULK酶活性增高,ULK, Atg13和FIP200复合体大量合成,导致细胞发生过度自噬^[25]。本研究发现模型组大鼠卵巢颗粒细胞中PI3K, Akt, mTOR蛋白及其磷酸化水平明显降低,表明其卵巢组织PI3K/Akt/mTOR信号通路失调。与模型组比较,桂枝茯苓丸中、高剂量组及二甲双胍组可显著增高p-PI3K, p-Akt和p-mTOR蛋白

表达量,且以桂枝茯苓丸高剂量组效果最为显著,揭示桂枝茯苓丸可有效激活卵巢组织内PI3K/Akt/mTOR信号通路。免疫组化结果显示Beclin-1,LC3 II作为自噬的核心调节因子在PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞中表达明显升高,表明自噬现象增强;与模型组相比,桂枝茯苓丸给药组LC3 II与Beclin-1的阳性表达显著降低,起到了对卵巢颗粒细胞的保护作用。同时Western blot结果也显示,模型组的Beclin-1,LC3 II的表达量显著高于空白组,桂枝茯苓丸中、高剂量组比模型组Beclin-1,Atg5与LC3 II的表达量显著降低,表明桂枝茯苓丸能够有效抑制PCOS-IR大鼠卵巢颗粒细胞的过度自噬现象。

综上所述,桂枝茯苓丸能够上调大鼠颗粒细胞内PI3K, Akt, mTOR蛋白及其磷酸化水平,有效激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,抑制颗粒细胞的过度自噬,有效地改善PCOS内分泌代谢,促进卵泡的正常生长、发育与成熟。该研究结果为桂枝茯苓丸治疗PCOS-IR排卵障碍提供科学依据,同时,拓宽了经方的运用范畴,但其治疗PCOS更具体的分子机制及作用靶点仍有待今后研究深入探讨。

[参考文献]

[1] ESCOBAR-MORREALE H F. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14 (5) : 270-284.

[2] CHEN Z, OU H, WU H, et al. Role of microRNA in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(8): 754-762.

[3] PATEL S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 182: 27-36.

[4] 乔杰, 齐新宇, 徐雅兰, 等. 关注影响女性健康的重要生殖内分泌疾病多囊卵巢综合征[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2020, 36(1): 1-9.

[5] 袁莹莹, 赵君利. 多囊卵巢综合征流行病学特点[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2019, 35(3): 261-264.

[6] BRASSARD M, AINMELK Y, BAILLARGEON J P. Basic infertility including polycystic ovary syndrome [J]. *Med Clin North Am*, 2008, 92(5): 1163-1192.

[7] 祁冰, 郝松莉, 吴效科, 等. 从“痰瘀胞宫”理论认识多囊卵巢综合征[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(4): 375-376.

[8] 赵秋生, 谭秀芬, 王南苏. 桂枝茯苓丸对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗及脂联素的影响[J]. *新中医*, 2012, 44(1): 116-117.

[9] 王南苏. 桂枝茯苓丸加减治疗多囊卵巢综合征的实

验研究及对痰瘀互结型临床疗效观察[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.

[10] 李燕. 化痰化瘀法调控多囊卵巢模型大鼠MMPs-TIMPs平衡表达的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.

[11] 王灿, 廖海燕, 刘慧萍, 等. 自噬机制与卵巢早衰的关系[J]. *生殖与避孕*, 2016, 44(16): 637.

[12] 徐晓娟, 姚莉娟, 王张, 等. 对模拟肾虚痰湿特征信息的改良型PCOS动物模型卵巢形态学变化研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2016, 39(2): 5-9.

[13] 袁盛榕. 药理学实习教程[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1994: 13.

[14] USADI R S, MERRIAM K S. On-label and off-label drug use in the treatment of female infertility [J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): 583-594.

[15] 楼雪莉, 陈瑜. 毓麟珠合桂枝茯苓丸加味治疗多囊卵巢综合征排卵障碍性不孕临床研究[J]. *新中医*, 2019, 51(11): 43-47.

[16] 赵淑云, 魏莹莹. 桂枝茯苓胶囊对多囊卵巢综合征合并胰岛素抵抗患者卵巢功能和临床症状的影响观察[J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2019, 6(23): 106, 165.

[17] 韩凤娟, 王东雪. 基于窠囊理论探讨多囊卵巢综合征[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(2): 487-489.

[18] 喻嘉言. 寓意草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 107.

[19] 邓福霞. 国医大师刘敏如教授学术思想与治疗不孕症的经验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.

[20] 佟庆, 金哲, 沈喜萍. 多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬率的相关研究[J]. *疑难病杂志*, 2011, 10(5): 364-365, 403.

[21] LI D, YOU Y, BI F F, et al. Autophagy is activated in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome [J]. *Reproduction*, 2018, 155(1): 85-92.

[22] 李宁, 张永兴. 中医治疗多囊卵巢综合征的概况[J]. *中国病案*, 2017, 18(3): 109-112.

[23] SONG J J, YAN M E, WU X K, et al. Progress of integrative Chinese and western medicine in treating polycystic ovarian syndrome caused infertility [J]. *Chin J Integr Med*, 2006, 12(4): 312-316.

[24] KIM J, KUNDU M, VIOLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141.

[25] LI T, MO H, CHEN W, et al. Role of the PI3K-Akt signaling pathway in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(5): 646-655.

[责任编辑 孙丛丛]