

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.19.008  
文章编号: 1005-8982 (2022) 19-0044-07

实验研究·论著

## 自拟补肾祛瘀方对多囊卵巢综合征 模型大鼠的作用及机制研究\*

牛永莉<sup>1</sup>, 王艳<sup>1</sup>, 孔丽<sup>1</sup>, 谢广妹<sup>2</sup>

(1. 酒泉市人民医院 生殖医学科, 甘肃 酒泉 735000; 2. 甘肃省妇幼保健院 生殖中心,  
甘肃 兰州 730050)

**摘要:** **目的** 探究自拟补肾祛瘀方治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的疗效及机制。**方法** 选取SD雌性大鼠, 复制PCOS模型后随机分为对照组、模型组、西药组及联合组。对照组和模型组根据大鼠体重给予1 mL/(kg·d)氯化钠溶液灌胃, 联合组每天根据体重给予补肾祛瘀汤剂11 g/kg和4.5 mg/kg二甲双胍灌胃, 西药组仅给予4.5 mg/kg二甲双胍灌胃。药物干预后分别采用Western blotting、qRT-PCR、免疫组织化学法检测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、核因子 $\text{I}\kappa\text{B}$ ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ )的蛋白、mRNA及阳性表达。比较各组大鼠的体重及血清睾酮(T)、促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)水平。**结果** 各组大鼠药物干预前的体重比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 各组大鼠药物干预28 d后的体重比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 进一步两两比较, 模型组的体重高于另外3组( $P<0.05$ ), 西药组高于联合组和对照组( $P<0.05$ ), 联合组高于对照组( $P<0.05$ )。各组大鼠血清T、FSH、LH水平比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 进一步两两比较, 模型组血清T、FSH、LH水平高于另外3组( $P<0.05$ ), 西药组高于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组高于对照组( $P<0.05$ )。各组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 进一步两两比较, 模型组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白相对表达量高于另外3组,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白相对表达量低于另外3组( $P<0.05$ ); 西药组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白相对表达量高于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组高于对照组( $P<0.05$ ); 西药组大鼠卵巢组织 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白相对表达量低于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组低于对照组( $P<0.05$ )。各组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 进一步两两比较, 模型组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量高于另外3组,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mRNA相对表达量低于另外3组( $P<0.05$ ); 西药组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B mRNA相对表达量高于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组高于对照组( $P<0.05$ ); 西药组大鼠卵巢组织 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  mRNA相对表达量低于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组低于对照组( $P<0.05$ )。各组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的OD值比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 进一步两两比较, 模型组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B的OD值高于另外3组,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的OD值低于另外3组( $P<0.05$ ); 西药组大鼠卵巢组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B的OD值高于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组高于对照组( $P<0.05$ ); 西药组大鼠卵巢组织 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的OD值低于联合组与对照组( $P<0.05$ ), 联合组低于对照组( $P<0.05$ )。**结论** 自拟补肾祛瘀方治疗PCOS可通过影响TNF- $\alpha$ 调控的NF- $\kappa$ B/ $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 信号通路促进LH、FSH、T的恢复。

**关键词:** 多囊卵巢综合征; 模型大鼠; 自拟补肾祛瘀方; 疗效; 机制

**中图分类号:** R711.6

**文献标识码:** A

## Efficacy and mechanism analysis of self-made Bushen Quyu decoction in treatment of polycystic ovary syndrome model rats\*

收稿日期: 2022-03-31

\* 基金项目: 甘肃省自然科学基金(No:17JR5RA028)

[通信作者] 谢广妹, E-mail: guangmeig@163.com

Yong-li Niu<sup>1</sup>, Yan Wang<sup>1</sup>, Li Kong<sup>1</sup>, Guang-mei Xie<sup>2</sup>

(1. Department of Reproductive Medicine, Jiuquan City People's Hospital, Jiuquan, Gansu 735000, China; 2. Reproductive Center, Gansu Provincial Maternity and Child-Care Hospital, Lanzhou, Gansu 730050, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect and mechanism of self-made Bushen Quyu Decoction in treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** Six-week-old SPF SD female rats were selected and randomly divided into control group, model group, western medicine group, and combination group after letrozole modeling. After drug intervention, Western blotting, RT-PCR, and immunohistochemistry were used to detect the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), and nuclear factor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ). The body weight and serum testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) were compared in each group before and after treatment. **Results** Before treatment, the differences in body weight of the rats in each group were tested by one-way ANOVA, and the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). After treatment, the differences in the body weight of the rats in each group were statistically significant by one-way ANOVA test ( $P < 0.05$ ). Further pairwise comparisons showed that the body weight of the model group after treatment was higher than that of the other three groups ( $P < 0.05$ ), the body weight of the group was higher than that of the combined group and the control group ( $P < 0.05$ ), and the body weight of the combined group was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The differences between groups in abdominal aortic blood T, FSH and LH of rats in each group were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Further pairwise comparison showed that T, FSH and LH in the model group were higher than those in the other three groups ( $P < 0.05$ ); at the same time, the western medicine group was higher than the combination group and the control group ( $P < 0.05$ ), and the combination group was higher than the control group ( $P < 0.05$ ). The differences in the protein expression, mRNA expression, and OD value of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and I $\kappa$ B $\alpha$  in ovarian tissue of each group were statistically significant by one-way ANOVA test ( $P < 0.05$ ). Further pairwise comparison showed that the expression of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B protein, mRNA expression, and OD value in the ovarian tissue of the model group were higher than those of the other three groups, while the protein expression, mRNA expression and OD value of I $\kappa$ B $\alpha$  were lower than those of the other three groups ( $P < 0.05$ ); TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B protein expression, mRNA expression, and OD value in the ovarian tissue of the western medicine group were higher than those of the combination group and the control group ( $P < 0.05$ ), and these of the combination group was higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ); the expression of I $\kappa$ B $\alpha$  protein, mRNA expression, and OD in ovarian tissue of the western medicine group were lower than those of the combination group and the control group ( $P < 0.05$ ), and these of the combination group was lower than those of the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The self-made Bushen Huayu Decoction for PCOS can promote the recovery of LH, FSH and T by regulating TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  signaling pathway.

**Keywords:** polycystic ovary syndrome; model rats; self-made prescription for nourishing kidney and removing blood stasis; curative effect; mechanism

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 为育龄女性常见病, 发病率约 8%<sup>[1]</sup>。PCOS 是一种生殖功能障碍与糖代谢异常并存的内分泌紊乱综合征, 目前认为与雄激素及促黄体生成素异常、胰岛素抵抗等多种因素有关<sup>[2]</sup>。PCOS 属中医“闭经”“不孕”范畴, 以肾功能失调为本, 痰浊、血瘀为标, 中医治疗宜补肾为主, 祛瘀为辅<sup>[3]</sup>。以往研究表明<sup>[4]</sup>, 中医治疗 PCOS 费用低廉、不良反应少且无绝对用药禁忌, 在 PCOS 的临床治疗中受到重视。研究认为<sup>[5]</sup>, PCOS 的发生与肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 介导的核因子  $\kappa$ B (nuclear

factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)/核因子 I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ ) 信号通路激活有关。其中, NF- $\kappa$ B 有多项调控功能, 调控 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  信号通路可成为 PCOS 防治的新靶点, 但目前相关的研究较少。本研究采用自拟补肾祛瘀方治疗 PCOS 并分析其对 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  信号通路的影响, 以期明确其治疗 PCOS 的可能作用机制, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 80 只 SPF 级 SD 雌性大鼠, 6 周

龄, 体重(180±10)g由中国科学院上海药物研究所提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2020-0005]。喂养条件: 温度 20℃、湿度 50%, 每日喂新鲜水及饲料。

**1.1.2 实验试剂和药物** TNF- $\alpha$  抗体、NF- $\kappa$ B (P65) 抗体及 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体(英国 Abcam 公司), 鼠抗人  $\beta$ -actin(生工生物工程上海股份有限公司), 羊抗鼠二抗、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), SYBP<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup>(日本 TaKaRa 公司), PCR 引物(宝生物工程大连有限公司), TRIzol(美国英杰生命技术有限公司), TBST 试剂(上海科拉曼试剂有限公司)。补肾化痰方(酒泉市人民医院中医药剂室配置), 达英-35(拜耳医药保健有限公司), 来曲唑(大连美仑生物技术有限公司), 羧甲基纤维素钠、水合氯醛、0.9% 氯化钠溶液(北京博尔迈生物技术有限公司)。

**1.1.3 实验仪器** 台式高速离心机(美国 Sigma 公司), 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司), 实时荧光定量 PCR 仪、PCR 扩增仪、恒温箱(美国 Thermo 公司), 显微镜(日本奥林巴斯株式会社), 酶标仪(美国 Benchmark 公司), 血糖仪(德国罗氏诊断有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 模型复制** 80 只大鼠随机分为对照组 20 只、模型复制组 60 只。采用来曲唑法复制模型: 来曲唑灌胃 1 mg/(kg·d), 连续 28 d, 模型复制组给予高脂高糖饲料和 9% 葡萄糖水。模型复制成功后分为模型组、西药组及联合组, 每组 20 只。

**1.2.2 药物干预** 对照组和模型组根据大鼠体重给予 1 mL/(kg·d) 氯化钠溶液灌胃, 参考《中药药理研究方法学》<sup>[6]</sup> 换算用药剂量。自拟补肾祛痰方组成: 女贞子、墨旱莲各 15 g, 菟丝子、山茱萸、丹参、川芎、赤芍、桃仁、红花各 10 g, 由医院中医药剂室加水煎煮成汤剂, 汤剂终浓度为 1 g/mL。联合组每天根据体重给予补肾祛痰汤剂 11 g/kg 和 4.5 mg/kg 二甲双胍灌胃, 西药组仅给予 4.5 mg/kg 二甲双胍灌胃, 联合组与西药组均灌胃 28 d。

**1.2.3 大鼠体重检测** 药物干预前及药物干预 28 d 后称量各组大鼠体重, 比较药物干预前后大鼠体重变化。

**1.2.4 大鼠性激素水平检测** 大鼠于 16 周龄、动情间期当晚 20 点开始禁食, 至次日早晨 8 点空腹取腹

主动脉血 5~8 mL, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 置入 -20℃ 冰箱冷冻保存待测。参照放射免疫法试剂盒说明书测定睾酮(T)、促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)的水平。抽血称重后采用脊椎脱臼法处死所有大鼠, 取大鼠卵巢组织待测。

**1.2.5 Western blotting 检测大鼠卵巢组织中 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量** 剪碎 30 mg 卵巢组织, 加 1 mL PBS, 10 000 r/min、4℃ 下离心 1 min, 洗净组织上的血污及黏液等。加 300  $\mu$ L 蛋白裂解液, 研磨后置于冰上 20 min 至细胞裂解。12 000 r/min、4℃ 下离心 15 min, 得上清液即为全蛋白提取液, 置于 -80℃ 冷冻保存备用。提取蛋白液, 电泳、转膜、封闭, 取出 PVDF 膜放入 TBST 中漂洗 3 次, 分别加入 TNF- $\alpha$  抗体、NF- $\kappa$ B (P65) 抗体、I $\kappa$ B $\alpha$  抗体及鼠抗人  $\beta$ -actin, 震荡过夜。取出膜, 放入 TBST 中漂洗 3 次后置于二抗中震荡 2 h。放入 TBST 中漂洗 3 次, 滴加显色液, 紧密结合膜蛋白面与胶片, 强曝光 5 min 左右, 用 Image Quant 350 成像系统扫描并保存图像, 分析 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量。

**1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测大鼠卵巢组织中 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 相对表达量** 洗净研钵等器皿, 用双蒸水和焦碳酸二乙酯水分别冲洗, 于 180℃ 下烘烤 4 h 去除 RNA 酶。切取 50~100 mg 组织在研钵中研磨成粉, 将粉末移至无 RNA 酶的 EP 管中, 加 1 mL TRIzol 后混匀。静置 5 min 后加入氯仿 200  $\mu$ L, 震荡 15 s 混匀, 静置 5 min, 4℃ 下离心 15 min。待 EP 管中液体分层后, 用 100  $\mu$ L 移液枪将上层液体吸到新的无 RNA 酶的 EP 管中, 并加入等体积异丙醇, 混匀后静置 10 min 并再次离心 10 min。EP 管底部白色物质即为 RNA, 倒掉管中液体后加入 1 mL 75% 乙醇, 颠倒 EP 管数次, 离心 5 min。倒掉上清液, 用移液枪吸净管底液体, 静置 5 min 干燥。加入 30~50  $\mu$ L DEPC 水并用移液枪吹打使 RNA 充分溶解。取 2  $\mu$ L 总 RNA, 凝胶电泳检测完整性。各组大鼠总 RNA 的电泳图中可见明显 2 个条带, 根据迁移率分别是 18 S 和 28 S, 且电泳图中无明显杂带和向前拖尾的现象, 说明 RNA 提取成功, 完整性较高, 纯度满足后续 PCR 扩增要求。参照 TaKaRa 试剂盒说明书配制逆转录体系 20  $\mu$ L (5  $\times$  PrimeScript<sup>™</sup> Buffer 4  $\mu$ L、Total RNA 4  $\mu$ L、RNase Free dH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L), 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 30 min 获取 cDNA。qRT-PCR 反应条

件:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,95℃退火 5 s,60℃延伸 30 s,40个循环,循环结束后95℃延伸 15 s。引物序列:①TNF- $\alpha$ :正向 5'-TCTCTTCAAGGGACAA GGCT-3',反向 5'-TCCTGGTATGAAATGGCAAA-3',引物长度 78 bp;②NF- $\kappa$ B:正向 5'-GCCTCATCCAC ATGAACTTG-3',反向 5'-CGCTTCTTCACACACTGG AT-3',引物长度 120 bp;③I $\kappa$ B $\alpha$ :正向 5'-CTGTACG CCCCAGCATCT-3',反向 5'-GCACCCAAAGTCACCAA G-3',引物长度 144 bp;④ $\beta$ -actin:正向 5'-CGGTCA GGTCATCACTATCG-3',反向 5'-TTCCATACCCAGGA AGGAAG-3',引物长度 79 bp。以 $\beta$ -actin为内参,计算各组 $\Delta\Delta Ct$ , $\Delta Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因}$ , $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{实验组}-\Delta Ct_{对照组}$ 。目的基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

**1.2.7 免疫组织化学检测大鼠卵巢组织中 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白阳性表达** 卵巢组织常规固定、石蜡包埋、切片(厚度 4  $\mu$ m),脱蜡止水,5%的牛血清白蛋白封闭 10 min。滴加一抗后 4℃下过夜;滴加二抗后 37℃下孵育 20 min。苏木精复染 2 min,脱水后常规透明、封片,显微镜下拍照,取 5 个不同高倍镜视野,IPP 6.0 软件分析图像,记录阳性细胞平均光密度(OD)值,取 3 次平均值作为最终结果,OD 值越高表示阳性表达率越高。阳性判定:TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  以细胞核中可见棕黄或棕褐色颗粒为阳性表达。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,比较采用方差分析,进一步两两比较采取 LSD- $t$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠药物干预前后体重比较

各组大鼠药物干预前体重比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各组大鼠药物干预 28 d 后体重比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );进一步两两比较,模型组的体重高于另外 3 组( $P<0.05$ ),西药组高于联合组和对照组( $P<0.05$ ),联合组高于对照组( $P<0.05$ )。见表 1。

### 2.2 各组大鼠血清性激素水平比较

各组大鼠血清 T、FSH、LH 水平比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ );进一步两两比较,模型组血清

表 1 各组大鼠药物干预前及药物干预 28 d 后的体重比较  
( $n=20$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	药物干预前	药物干预 28 d 后
对照组	190.54 $\pm$ 8.11	210.78 $\pm$ 10.33 <sup>①②</sup>
模型组	189.18 $\pm$ 9.13	231.16 $\pm$ 15.17
西药组	188.69 $\pm$ 10.14	225.65 $\pm$ 13.02 <sup>①</sup>
联合组	190.88 $\pm$ 10.52	219.32 $\pm$ 11.62 <sup>①②③</sup>
F 值	0.245	5.150
P 值	0.865	0.003

注:①与模型组比较, $P<0.05$ ;②与西药组比较, $P<0.05$ ;③与对照组比较, $P<0.05$ 。

T、FSH、LH 水平高于另外 3 组( $P<0.05$ ),西药组高于联合组与对照组( $P<0.05$ ),联合组高于对照组( $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠血清性激素水平比较 ( $n=20$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	T/(ng/dL)	FSH/(mIU/mL)	LH/(mIU/mL)
对照组	11.91 $\pm$ 2.26 <sup>①②</sup>	9.94 $\pm$ 2.82 <sup>①②</sup>	34.51 $\pm$ 6.78 <sup>①②</sup>
模型组	17.5 $\pm$ 5.76	14.79 $\pm$ 4.63	47.15 $\pm$ 11.63
西药组	15.87 $\pm$ 4.98 <sup>①</sup>	13.08 $\pm$ 3.99 <sup>①</sup>	43.12 $\pm$ 10.97 <sup>①</sup>
联合组	13.66 $\pm$ 4.21 <sup>①②③</sup>	11.71 $\pm$ 3.41 <sup>①②③</sup>	39.22 $\pm$ 7.56 <sup>①②③</sup>
F 值	5.999	6.343	6.512
P 值	0.001	0.001	0.001

注:①与模型组比较, $P<0.05$ ;②与西药组比较, $P<0.05$ ;③与对照组比较, $P<0.05$ 。

### 2.3 各组大鼠 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白相对表达量比较

各组大鼠卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。进一步两两比较,模型组大鼠卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量高于另外 3 组, I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量低于另外 3 组( $P<0.05$ );西药组大鼠卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达量高于联合组与对照组( $P<0.05$ ),同时联合组高于对照组( $P<0.05$ );西药组大鼠卵巢组织 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白相对表达量低于联合组与对照组( $P<0.05$ ),同时联合组低于对照组( $P<0.05$ )。见图 1 和表 3。

### 2.4 各组大鼠 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$ mRNA 相对表达量的比较

各组大鼠卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。进一步两两比较,模型组大鼠卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量高于另外 3 组,



图 1 各组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB、IκBα 蛋白的表达

表 3 各组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB、IκBα 蛋白相对表达量的比较 (n=20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α 蛋白 相对表达量	NF-κB 蛋白 相对表达量	IκBα 蛋白 相对表达量
对照组	0.38 ± 0.07 <sup>①②</sup>	0.53 ± 0.18 <sup>①②</sup>	0.71 ± 0.22 <sup>①②</sup>
模型组	1.45 ± 0.21	0.81 ± 0.26	0.46 ± 0.12
西药组	1.13 ± 0.19 <sup>①</sup>	0.73 ± 0.24 <sup>①</sup>	0.55 ± 0.16 <sup>①</sup>
联合组	0.67 ± 0.14 <sup>①②③</sup>	0.64 ± 0.20 <sup>①②③</sup>	0.61 ± 0.20 <sup>①②③</sup>
F 值	6.416	5.867	6.495
P 值	0.001	0.001	0.001

注：①与模型组比较,  $P < 0.05$ ；②与西药组比较,  $P < 0.05$ ；③与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

IκBα mRNA 相对表达量低于另外 3 组 ( $P < 0.05$ )；西药组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB mRNA 相对表达量高于联合组与对照组 ( $P < 0.05$ )，联合组高于对照组 ( $P < 0.05$ )；西药组大鼠卵巢组织 IκBα mRNA 相对表达量低于联合组与对照组 ( $P < 0.05$ )，联合组低于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

### 2.5 各组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB、IκBα 的 OD 值比较

各组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB、IκBα 的 OD 值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两

表 4 各组大鼠 TNF-α、NF-κB、IκBα mRNA 相对表达量比较 (n=20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α mRNA	NF-κB mRNA	IκBα mRNA
对照组	0.67 ± 0.21 <sup>①②</sup>	0.53 ± 0.18 <sup>①②</sup>	0.58 ± 0.20 <sup>①②</sup>
模型组	1.01 ± 0.34	0.83 ± 0.24	0.39 ± 0.11
西药组	0.90 ± 0.29 <sup>①</sup>	0.72 ± 0.20 <sup>①</sup>	0.44 ± 0.13 <sup>①</sup>
联合组	0.76 ± 0.24 <sup>①②③</sup>	0.61 ± 0.19 <sup>①②③</sup>	0.52 ± 0.15 <sup>①②③</sup>
F 值	5.990	6.498	6.750
P 值	0.001	0.001	0.001

注：①与模型组比较,  $P < 0.05$ ；②与西药组比较,  $P < 0.05$ ；③与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

两比较, 模型组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB 的 OD 值高于另外 3 组, IκBα 的 OD 值低于另外 3 组 ( $P < 0.05$ )；西药组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB 的 OD 值高于联合组与对照组 ( $P < 0.05$ )，联合组高于对照组 ( $P < 0.05$ )；西药组大鼠卵巢组织 IκBα 的 OD 值低于联合组与对照组 ( $P < 0.05$ )，联合组低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (见表 5)。各组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB、IκBα 阳性表达见图 3 ~ 5。

表 5 各组大鼠卵巢组织 TNF-α、NF-κB、IκBα 的 OD 值比较 (n=20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF-α	NF-κB	IκBα
对照组	0.40 ± 0.14 <sup>①②</sup>	0.49 ± 0.15 <sup>①②</sup>	0.78 ± 0.24 <sup>①②</sup>
模型组	0.76 ± 0.23	0.74 ± 0.23	0.44 ± 0.16
西药组	0.65 ± 0.21 <sup>①</sup>	0.66 ± 0.21 <sup>①</sup>	0.59 ± 0.17 <sup>①</sup>
联合组	0.52 ± 0.16 <sup>①②③</sup>	0.58 ± 0.17 <sup>①②③</sup>	0.67 ± 0.19 <sup>①②③</sup>
F 值	11.165	6.195	6.302
P 值	0.001	0.001	0.001

注：①与模型组比较,  $P < 0.05$ ；②与西药组比较,  $P < 0.05$ ；③与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

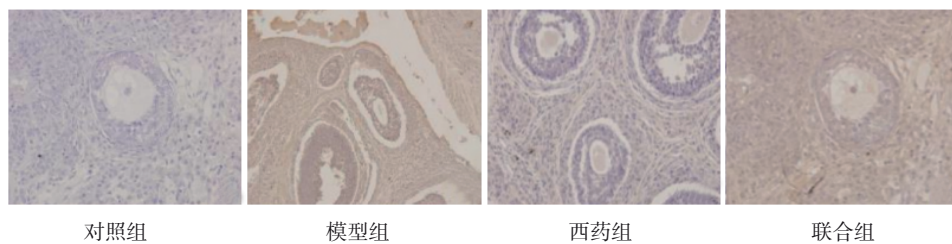


图 3 各组大鼠卵巢组织 TNF-α 蛋白阳性表达 (免疫组织化学 × 200)

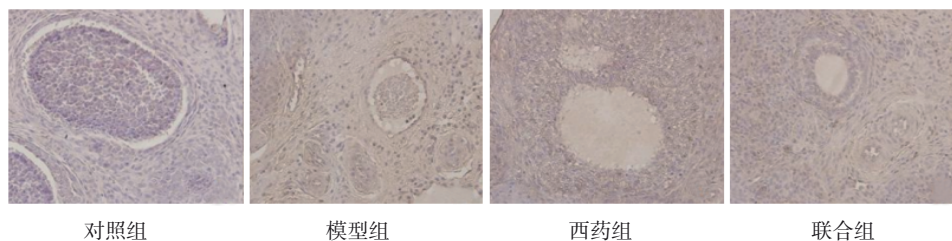


图 4 各组大鼠卵巢组织 NF-κB 蛋白阳性表达 (免疫组织化学 × 200)

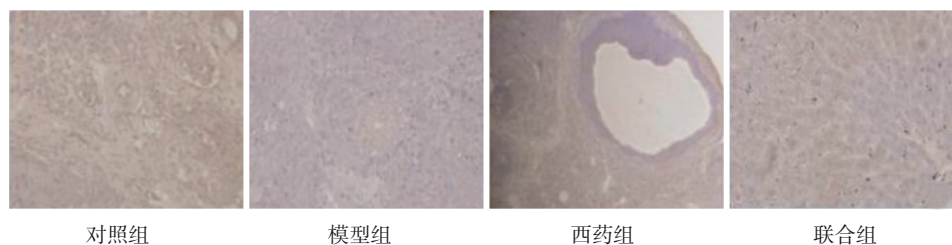


图5 各组大鼠卵巢组织 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白阳性表达 (免疫组织化学  $\times 200$ )

### 3 讨论

研究发现<sup>[7]</sup>, PCOS 易增加子宫内膜癌的发病风险, 积极治疗 PCOS 对女性月经失调、不孕症及各种远期并发症有较好的预防作用。由于对 PCOS 发病机制认识的局限性, 目前国内外尚无统一的规范治疗方案, 临床治疗多以促排卵等对症处理为主, 但存在停药复发或治疗无效等问题。西药基础上联合中医药治疗 PCOS 具有不良反应少, 且能有效改善患者症状, 受到临床欢迎。

#### 3.1 自拟补肾祛瘀方对 PCOS 大鼠性激素水平的影响

本研究通过来曲唑法复制大鼠 PCOS 模型。来曲唑可促进促性腺激素持续分泌, 刺激 LH、FSH 持续合成, 使 LH、FSH 无法达到排卵高峰, 诱发排卵功能障碍, 造成卵巢多囊样改变<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 药物干预后, 模型组大鼠体重增加最为显著, 高于另外 3 组; 西药组高于联合组和对照组, 联合组高于对照组。此外, 模型组血清 T、FSH、LH 高于对照组; 且与模型组相比, 血清 T、FSH、LH 明显降低, 其中联合组更低, 但仍高于对照组。这提示 PCOS 会造成血清 T、FSH、LH 水平的升高, 西药治疗可促进血清 T、FSH、LH 降低, 而联合自拟补肾祛瘀方治疗后, 血清 T、FSH、LH 会进一步降低。中医认为<sup>[9]</sup>, PCOS 病机主要为肾虚、瘀血阻致胞宫, 两者互为因果, 形成肾虚血瘀症, 补肾祛瘀是 PCOS 的主要治疗思路。本研究所用自拟补肾祛瘀方中, 菟丝子、山茱萸补肾益精为君药, 女贞子、墨旱莲共用为臣药, 可养肝肾、益精血; 丹参、赤芍、桃仁活血养血为佐药, 补益而不留瘀; 川芎、红花解郁通达、活血祛瘀, 为使药。诸药合用精充血足、气血畅通则经自调, 共奏补肾祛瘀、活血调经之功<sup>[10-11]</sup>。现代药理学研究表明<sup>[12-13]</sup>, 菟丝子可以 TNF- $\alpha$  为靶点调控 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, 抑制 PCOS 的炎症反应, 从而治

疗 PCOS; 墨旱莲具有抗炎、调节免疫等功效, 可通过对卵巢炎症的抑制作用改善卵巢功能<sup>[14-15]</sup>; 山茱萸的抗炎抑菌作用可有效改善 PCOS 大鼠的胰岛素抵抗, 从而减轻炎症及氧化应激, 降低血清 TNF- $\alpha$  水平, 促进卵巢功能的恢复<sup>[16]</sup>; 丹参可通过对外周血单个核细胞 NF- $\kappa$ B 活化及 TNF- $\alpha$  表达的影响来调控炎症反应, 且与 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  炎症反应通路之间存在量效时效关系<sup>[17-18]</sup>。上述研究提示自拟补肾祛瘀方可能是通过对 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  炎症通路的调控来改善卵巢循环与病理状态, 达到治疗目的。

#### 3.2 自拟补肾祛瘀方对 PCOS 大鼠 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 信号通路的调控作用

为探讨自拟补肾祛瘀方治疗 PCOS 的机制, 本研究检测大鼠卵巢组织的 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B $\alpha$  表达, 结果显示模型组大鼠卵巢组织的 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 蛋白表达, mRNA 表达, OD 值均高于对照组, I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达, mRNA 表达, OD 值均低于对照组。与模型组相比, 西药组和联合组卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 蛋白表达, mRNA 表达, OD 值均降低, 其中联合组更低, 但仍高于对照组; 与模型组相比, 西药组和联合组卵巢组织 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达, mRNA 表达, OD 值均升高, 其中联合组更高, 但仍低于对照组。上述结果表明自拟补肾祛瘀方治疗 PCOS 可上调卵巢组织 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 表达, 下调 I $\kappa$ B $\alpha$  表达, PCOS 发病与 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  信号通路有关。国外研究表明<sup>[19]</sup>, 细胞在正常生理情况下, NF- $\kappa$ B 与抑制蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  结合成无活性的三聚体并存在于细胞质中; TNF- $\alpha$  升高会刺激 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化后与 NF- $\kappa$ B 解离, 使 NF- $\kappa$ B 进入细胞核并转录, 诱发 PCOS<sup>[20]</sup>。也有研究发现<sup>[21]</sup>, 炎症因子 I $\kappa$ B $\alpha$  是 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  信号通路的关键下游因子, 抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  可阻断该通路, 改善 PCOS。自拟补肾祛瘀方可补益肝肾, 活血化瘀, 切中病机, 并通过影响 TNF- $\alpha$

调控的 I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路来改善卵巢功能, 且可对 TNF- $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 多个靶点进行干预, 最终促进性激素水平的恢复。本研究不足之处: PCOS 的发病过程复杂, 自拟补肾祛瘀方治疗 PCOS 可能不只对单一信号通路的调控发挥治疗作用, 其可能涉及的其他信号通路及靶点仍有待进一步探究。

综上所述, 自拟补肾祛瘀方治疗 PCOS 可有效促进 LH、FSH、T 等的恢复, 且这一作用考虑与 TNF- $\alpha$  介导的 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  信号通路的调控有关。

#### 参 考 文 献 :

- [1] 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.
- [2] HU M, ZHANG Y H, LI X, et al. TLR4-associated IRF-7 and NF $\kappa$ B signaling act as a molecular link between androgen and metformin activities and cytokine synthesis in the PCOS endometrium[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2021, 106(4): 1022-1040.
- [3] COONEY L G, DOKRAS A. Depression and anxiety in polycystic ovary syndrome: etiology and treatment[J]. Curr Psychiatry Rep, 2017, 19(11): 83.
- [4] NANDI A, CHEN Z J, PATEL R, et al. Polycystic ovary syndrome[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014, 43(1): 123-147.
- [5] CONCHA C F, SIR P T, RECABARREN S E, et al. Epigenetics of polycystic ovary syndrome[J]. Rev Med Chil, 2017, 145(7): 907-915.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 54-56.
- [7] RYU Y, KIM S W, KIM Y Y, et al. Animal models for human polycystic ovary syndrome (PCOS) focused on the use of indirect hormonal perturbations: a review of the literature[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2720.
- [8] GANIE M A, VASUDEVAN V, WANI I A, et al. Epidemiology, pathogenesis, genetics & management of polycystic ovary syndrome in India[J]. Indian J Med Res, 2019, 150(4): 333-344.
- [9] STEPTO N K, HIAM D, GIBSON-HELM M, et al. Exercise and insulin resistance in PCOS: muscle insulin signalling and fibrosis[J]. Endocr Connect, 2020, 9(4): 346-359.
- [10] ROSENFELD R L. Current concepts of polycystic ovary syndrome pathogenesis[J]. Curr Opin Pediatr, 2020, 32(5): 698-706.
- [11] RAJSKA A, BUSZEWSKA-FORAJTA M, RACHOŃ D, et al. Metabolomic insight into polycystic ovary syndrome-an overview[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4853.
- [12] 王翠翠, 马晓欣. 基于网络药理学探讨当归-菟丝子治疗多囊卵巢综合征的作用靶标和信号通路[J]. 中国医科大学学报, 2021, 50(1): 51-56.
- [13] CABRERA-CRUZ H, ORÓSTICA L, PLAZA-PARROCHIA F, et al. The insulin-sensitizing mechanism of myo-inositol is associated with AMPK activation and GLUT-4 expression in human endometrial cells exposed to a PCOS environment[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 318(2): E237-E248.
- [14] JEANES Y M, REEVES S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges[J]. Nutr Res Rev, 2017, 30(1): 97-105.
- [15] WALTERS K A, GILCHRIST R B, LEDGER W L, et al. New perspectives on the pathogenesis of PCOS: neuroendocrine origins[J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(12): 841-852.
- [16] AFLATOUNIAN A, EDWARDS M C, RODRIGUEZ PARIS V, et al. Androgen signaling pathways driving reproductive and metabolic phenotypes in a PCOS mouse model[J]. J Endocrinol, 2020, 245(3): 381-395.
- [17] LEE C M. Laser-assisted hair removal for facial hirsutism in women: a review of evidence[J]. J Cosmet Laser Ther, 2018, 20(3): 140-144.
- [18] WALTERS K A, BERTOLDO M J, HANDELSMAN D J. Evidence from animal models on the pathogenesis of PCOS[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2018, 32(3): 271-281.
- [19] WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA A, KOWALCZYK K, TRYBEK P, et al. In search of new therapeutics-molecular aspects of the PCOS pathophysiology: genetics, hormones, metabolism and beyond[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7054.
- [20] RODRIGUEZ PARIS V, BERTOLDO M J. The mechanism of androgen actions in PCOS etiology[J]. Med Sci (Basel), 2019, 7(9): 89.
- [21] MOINI JAZANI A, NASIMI DOOST AZGOMI H, NASIMI DOOST AZGOMI A, et al. A comprehensive review of clinical studies with herbal medicine on polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Daru, 2019, 27(2): 863-877.

(张蕾 编辑)

**本文引用格式:** 牛永莉, 王艳, 孔丽, 等. 自拟补肾祛瘀方对多囊卵巢综合征模型大鼠的作用及机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(19): 44-50.

**Cite this article as:** NIU Y L, WANG Y, KONG L, et al. Efficacy and mechanism analysis of self-made Bushen Quyu decoction in treatment of polycystic ovary syndrome model rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(19): 44-50.