DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.10.016

苍附导痰汤通过IRS1/GLUT4通路改善胰岛素抵抗-多囊卵巢综合征大鼠卵巢功能的作用机制

俞桥[1],孟宇豪[2],张玮珩[2],赵宾宾[2],王朝阳[2],吕银娟[2]
(1.解放军中部战区总医院,湖北 武汉 430064;2.湖北中医药大学基础医学院,湖北 武汉 430065)

摘要:目的 观察苍附导痰汤对胰岛素抵抗-多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome-Insulin resistance,PCOS-IR)大鼠胰岛素受体底物-1(Insulin receptor substrate-1,IRS-1)和葡萄糖转运蛋白4(Glucose transporter type 4,GLUT4)信号通路的影响。方法 将60只SPF级雌性SD大鼠,随机分为空白组,模型组,苍附导痰汤高、低剂量组,二甲双胍组,每组12只。除空白组外,其他各组采用皮下注射脱氢表雄酮(Dehydroisoandrosterone,DHEA)联合高脂饲料喂养构建大鼠PCOS-IR模型,空白组注射等容积的生理盐水,连续20 d。造模完成后,灌胃给予各组大鼠相应药物,给药剂量分别为二甲双胍(0.265 g·kg^{-1})、苍附导痰汤(10.82、21.64 g·kg^{-1}),连续给药28 d,记录大鼠体质量变化,末次给药后取材。采用血糖仪行腹腔葡萄糖耐量试验(Intraperitoneal glucose tolerance test,IPGTT),计算胰岛素抵抗指数(Homeostatic model assessment of insulin resistance,HOMA-IR)及血糖曲线面积(Area under the curve,GAUC);采用苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin staining,HE)染色卵巢组织,光镜下观察大鼠卵巢,统计初级卵泡数、次级卵泡数、成熟卵泡数;酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked immunosorbent assay,ELISA)测定各组大鼠血清黄体生成素(Luteinizing hormone,LH)、促卵泡激素(Follicle-stimulating hormone,FSH)、睾酮(Testosterone,T)、雌二醇(Estradiol,E2)、抗缪勒管激素(Anti-Müllerianhormone,AMH)、胰岛素(Insulin,INS)水平;蛋白免疫印迹法检测大鼠卵巢组织中IRS1、磷脂酰肌醇3激酶(Phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase,PI3K)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Serine/Threonine kinase Proteins,AKT)、GLUT4的蛋白表达。结果 与空白组比较,模型组大鼠体质量、IPGTT、HOMA-IR和GAUC水平均显著性升高,LH/FSH、T、E2、INS水平显著升高,原始卵泡数明显减少,成熟卵泡数显著增多,卵巢组织中IRS1蛋白表达水平显著升高,PI3K、AKT、GLUT4蛋白表达水平显著降低($P<0.05$、$P<0.01$);与模型组比较,苍附导痰汤高剂量组、二甲双胍组大鼠体质量、IPGTT、HOMA-IR和GAUC水平均显著下降($P<0.05$、$P<0.01$),苍附导痰汤高剂量组大鼠原始卵泡数明显增多、成熟卵泡数明显减少,二甲双胍组、苍附导痰汤高剂量组大鼠血清E2、T、LH/FSH水平显著降低,卵巢组织中IRS1蛋白表达水平显著升高,PI3K、AKT、GLUT4蛋白表达水平显著降低($P<0.05$,$P<0.01$);与二甲双胍组比较,苍附导痰汤高剂量组IPGTT、HOMA-IR和GAUC水平明显降低,苍附导痰汤高剂量组T、LH/FSH水平显著降低,卵巢组织中PI3K、AKT、GLUT4蛋白表达明显升高($P<0.05$,$P<0.01$),且苍附导痰汤高剂量组更加接近于空白组。结论 苍附导痰汤能明显改善PCOS-IR大鼠卵巢功能,其机制可能与抑制IRS1/PI3K/AKT/GLUT4信号通路相关。

关键词:苍附导痰汤;胰岛素抵抗-多囊卵巢综合征;卵泡数量;胰岛素受体底物-1/葡萄糖转运蛋白4型信号通路
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)10-0076-09

Mechanism of Cangfu Daotan Decoction(苍附导痰汤) in Improving Ovarian Function in PCOS-IR Rats through IRS1/GLUT4 Pathway

YU Qiao[1],MENG Yuhao[2],ZHANG Weiheng[2],ZHAO Binbin[2],WANG Chaoyang[2],LYU Yinjuan[2]
(1. General Hospital of Central Theater Command of PLA,Wuhan 430064,Hubei,China;
2. College of Basic Medical Sciences,Hubei University of Chinese Medicine,Wuhan 430065,Hubei,China)

Abstract:*Objective* To observe the effect of Cangfu Daotan Decoction(苍附导痰汤) on the insulin receptor substrate-1(IRS-1) and glucose transporter type 4(GLUT4) signaling pathways in rats with polycystic ovary syndrome-insulin resistance(PCOS-IR). *Methods* Sixty SPF-grade female SD rats were randomly divided into blank group,model group,Cangfu Daotan Decoction high-dose group,Cangfu Daotan Decoction low-dose group and metformin group,with 12 rats in each group. Except for the blank group,the other groups were induced PCOS-IR mdoel by subcutaneous injection of dehydroepiandrosterone

基金项目:国家重点研发计划项目(2023YFC3503102);国家自然科学基金面上项目(82374317)
作者简介:俞桥(1980-),男,浙江绍兴人,主治医师,硕士,研究方向:中西医结合治疗慢性病。
通讯作者:吕银娟(1977-),女,河北赵县人,副教授、副主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:方剂配伍及其应用、中医药防治生殖疾病。E-mail:1053825845@qq.com。

(DHEA) combined with a high-fat diet for 20 days, while the blank group was injected with an equal volume of physiological saline. After the model was established, the rats in each group were administered the respective drugs by gavage for 28 days: metformin (0.265 g·kg^{-1}) and Cangfu Daotan Decoction (10.82, 21.64 g·kg^{-1}). The changes in body weight were recorded, and the samples were collected after the last administration. The intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed using a blood glucose meter to calculate the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and the area under the glucose curve (GAUC). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe ovarian tissue under a light microscope and to count the numbers of primary follicles, secondary follicles and mature follicles. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure serum levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), testosterone (T), estradiol (E2) and insulin (INS). The protein expression levels of IRS1, phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase (PI3K), serine/threonine kinase proteins (AKT) and GLUT4 in ovarian tissue were detected by Western blot. *Results* Compared with the blank group, the model group had significantly higher body weight and levels of IPGTT, HOMA-IR and GAUC, significantly lower serum AMH levels, significantly higher levels of LH, FSH, T, E2 and INS, significantly fewer primary follicles, significantly more mature follicles, significantly higher IRS1 protein expression in ovarian tissue, and significantly lower protein expression levels of PI3K, AKT and GLUT4 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the Cangfu Daotan Decoction high-dose group and metformin group showed significantly lower body weight and levels of IPGTT, HOMA-IR and GAUC. The Cangfu Daotan Decoction high-dose group had significantly more primary follicles and significantly fewer mature follicles, while the metformin group and Cangfu Daotan Decoction high-dose group had significantly lower serum levels of E2, LH/FSH and T, significantly higher IRS1 protein expression in ovarian tissue, and significantly lower protein expression levels of PI3K, AKT and GLUT4 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the metformin group, the Cangfu Daotan Decoction high-dose group showed significantly lower levels of IPGTT, HOMA-IR and GAUC, significantly lower levels of LH/FSH and T, and significantly higher protein expression levels of PI3K, AKT and GLUT4 in ovarian tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). The result in the Cangfu Daotan Decoction high-dose group was closer to that in the blank group. *Conclusion* Cangfu Daotan Decoction significantly improves ovarian function in PCOS-IR rats, and its mechanism may be related to the inhibition of the IRS1/PI3K/AKT/GLUT4 signaling pathway.

Keywords: Cangfu Daotan Decoction (苍附导痰汤); insulin resistance-polycystic ovary syndrome; follicle count; insulin receptor substrate-1/glucose transporter type 4 signaling pathway

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期妇女最常见的内分泌疾病之一,病因不明确,诱发女性月经不调、不孕、糖脂代谢异常及心血管疾病等远期并发症[1-2]。PCOS 的发病率呈逐年增长趋势,我国育龄期妇女中患病率为 4.5%~10.2%[3]。本病的病因复杂,胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)诱发代谢失常被认为是 PCOS 发病的病理机制之一[4]。胰岛素与其受体结合并促进胰岛素受体底物-1(Insulin receptor substrate-1, IRS1)的酪氨酸磷酸化,从而激活磷脂酰肌醇 3 激酶(Phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K)丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Serine/Threonine kinase proteins, AKT)信号传导并增强葡萄糖转运蛋白 4 型(Glucose transporter type4, GLUT4)易位和细胞内葡萄糖摄取,对于机体血糖平衡的维持至关重要,是 PCOS 潜在的治疗靶点之一[5]。

苍附导痰汤出自《叶天士女科诊治秘方》,具有开痰散结,行气解郁之功效,是现代治疗 PCOS 的基础中药复方,临床研究发现其可降低痰湿型单纯性肥胖症伴血脂异常患者具有减轻体质量、减小腰围、调节血脂代谢、缓解胰岛素抵抗,治疗 PCOS 痰湿型效果显著[6-7]。但其是否通过靶向 GLUT4 发挥作用尚不清楚,故在前期研究基础上,本实验通过观察苍附导痰汤对 PCOS 模型大鼠卵巢组织 GLUT4 介导的葡萄糖代谢的影响,进一步探索苍附导痰汤的治疗 PCOS 的机制。

1 实验材料

1.1 *实验动物* 6~8 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,体质量 180~220 g,购买于三峡大学动物实验中心,合格证号 SCXK(鄂)2017-0012,饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室,使用许可证编号 SCXK(鄂)2023-0067。温度(23±2)℃,湿度 40%~60%,光照时间每天 7:00—19:00,常规饲料喂养,自由摄食饮水 7 d。本实验通过湖北中医药大学动物伦理审批,伦理审查批号:HUCMS202202023。

1.2 *药品及主要试剂* 苍附导痰汤(苍术 20 g,醋香附 20 g,炒枳壳 12 g,陈皮 9 g,茯苓 15 g,胆南星 6 g,生甘草 6 g,白鲜皮 15 g),由广州一方制药有限公司提供配方颗粒按比例配制而成(各单味药物批号分别为 202209003, 202210011, 202209014, 202209002, 202210013, 202210012, 202207003, 202207011);根据大鼠与成人的体表面积换算公式,以成人推荐用量的 6.3 倍为临床等效剂量,即苍附导痰汤低剂量=103 g/60 kg×6.3=10.82 g·kg^{-1},设定为低剂量组。苍附导痰汤高剂量组的给药剂量为低剂量组的 2 倍(10.82×2=21.64 g·kg^{-1})。用蒸馏水配制成生药含量为 2 g·mL^{-1}浓度的中药悬液,4 ℃保存备用。盐酸二甲双胍片(0.5 g/片,中美上海施贵宝制药有限公司,批号 H20023370);刘 A、刘 B 染色剂(贝索生物科技有限公司,批号:BA4000、BA4007);染色 RIPA 裂解液、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、蛋白还原型上样缓冲液(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号:G2002、G2007、G2026、G2075);ECL 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号 PE0010);苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-Eosin staining, HE)染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,G1120);大鼠睾酮激素(Testosterone, T)酶联免疫吸附法(Enzyme-Linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、大鼠促黄体生成激素(Luteinizing hormone, LH) ELISA 试剂盒、大鼠抗缪勒管激素

(Anti-Müllerianhormone,AMH)定量ELISA试剂盒、大鼠雌二醇(Estradiol,E2)ELISA试剂盒、大鼠促卵泡生成激素(Follicle-stimulating hormone,FSH)ELISA试剂盒、大鼠胰岛素(Insulin,INS)ELISA试剂盒(华美生物,货号CSB-E05100r、CSB-E12654r、CSB-E11162r、CSB-E05110r、CSB-E06869r、CSB-E05070r);鼠单克隆抗GAPDH蛋白抗体(美国Abcam公司,货号ab8245);兔多抗IRS1抗体(英国abcam公司,批号ab5599);兔AKT抗体(CST,批号#4691);PI3K抗体(Affinity,批号AF3241)。

1.3 主要仪器 E100型显微镜(日本尼康公司);CR21G高速离心机(日本日立公司);GA-3型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司);分光光度计(上海舜宇恒科学仪器有限公司);KZ-Ⅲ-F型高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);DYCZ-40型电转仪(北京六一仪器厂);Multiskan FC型酶标仪(上海赛默飞世尔科技有限公司);RM2016病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);JB-P5包埋机(武汉俊杰电子有限公司);NikonDS-U3成像系统(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 大鼠PCOS-IR造模方法 模型组大鼠,高脂饲料[8]喂养,并于颈背部皮下注射脱氢表雄酮(Dehydroisoandrosterone,DHEA)6 mg/100 g +0.2 mL注射用油剂[9],连续20 d;空白组大鼠,普通饲料喂养,于颈背部皮下注射0.2 mL注射用油剂,给予连续20 d。皮下注射时,严格按照无菌消毒操作。造模最后5 d,观察大鼠阴道上皮细胞周期变化;造模结束后,行腹腔葡萄糖耐量试验(Intraperitoneal glucose tolerance test,IPGTT),随机选取1只大鼠取双侧卵巢,HE染色后光镜下观察判定卵巢各级卵泡数量。大鼠动情周期紊乱,卵巢多囊样改变,IPGTT结果升高则判定为胰岛素抵抗-多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome-Insulin resistance,PCOS-IR)造模成功[10]。

2.2 分组及干预方法 造模成功后将大鼠分为:空白组、模型组、苍附导痰汤高、低剂量组、二甲双胍组,每组大鼠各12只。二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片灌胃(0.265 g·kg^{-1})[17];苍附导痰汤低、高剂量组分别给予苍附导痰汤10.82、21.64 g·kg^{-1}灌胃;空白组、模型组每日给予等量生理盐水灌胃。1次/d,连续治疗28 d。

2.3 大鼠体质量记录 隔日上午9:00—9:30称量大鼠体质量,并记录。

2.4 大鼠动情周期变化 每日8:00于光学显微镜下行阴道脱落细胞学检测,间隔12、24 h观察1次。大鼠阴道涂片制作:无菌棉签,用生理盐水润湿,轻轻在大鼠阴道内侧壁旋转1圈后取出,将棉签上携带的脱落细胞及分泌物均匀涂抹于载玻片上,采用刘氏染色法,分别滴刘A、刘B染色剂染色,在光学显微镜下观察大鼠阴道上皮细胞形态,确定大鼠动情周期变化。大鼠动情周期持续时间约为4~5 d,分为动情前期、动情期、动情后期、动情间期。各期特点,动情前期:全部为有核上皮细胞,偶见少量角化细胞,持续17~21 h;动情期:全部为无核角化细胞或伴见有少量上皮细胞,持续9~15 h;动情后期:白细胞、角化细胞、有核上皮细胞均可见,持续10~14 h;动情间期:见大量白细胞、少量上皮细胞和黏液,持续60~70 h。统计每组动情期低于12 h为动情周期缩短,动情前期超过24 h为动物前期延长,有上述变化为动情周期紊乱。统计方法:紊乱只数(动情前期延长只数)/每组总只数×100%[11]。

2.5 葡萄糖代谢评估 采用IPGTT、胰岛素抵抗指数(Homeostatic model assessment of insulin resistance,HOMA-IR)及血糖曲线面积(Area under the curve,GAUC)评估葡萄糖代谢。禁食不禁水12 h,次日行IPGTT,眶静脉取血0.5 mL,检测空腹血糖(Fasting blood glucose,FBG)及空腹胰岛素(Fasting serum lisulin,FINS);腹腔注射50%葡萄糖注射液,按体质量给药(2 g·kg^{-1}),120 min后另一侧眶静脉取血0.5 mL,检测餐后120 min血糖和餐后120 min胰岛素,并且计算HOMA-IR及GAUC。计算公式如下,HOMA-IR=FBG(mmol/L)×FINS(mU/L)/22.5;GAUC=(FBG+PBG60′)/2+(PBG60′+PBG120′)/2。

2.6 ELISA测定大鼠血清LH、FSH、T、E2、AMH、INS水平 3%戊巴比妥钠腹腔注射(30 g·kg^{-1}),腹主动脉取血,3000 r/min离心20 min(4 ℃),取上层血清,-80 ℃冰箱保存备用。采用ELISA试剂盒,检测各项指标,严格按照各试剂盒说明书使用。

2.7 HE染色观察大鼠卵巢各级卵泡发育情况 4%多聚甲醛固定巢组织72 h后,脱水、包埋,4 μm切片,脱蜡,HE染色,光镜下观察大鼠卵巢组织病理变化及卵泡发育情况,并对各组大鼠右侧卵巢组织初级卵泡数、次级卵泡数、成熟卵泡进行计数。

2.8 Western Blot方法检测各组大鼠卵巢组织IRS1、PI3K、AKT、GLUT4蛋白水平 取卵巢组织,加入RIPA裂解液提取组织蛋白质,BCA法测定蛋白浓度,将蛋白溶液按照4∶1的比例加入还原型蛋白上样缓冲液,沸水浴变性15 min,-80 ℃冰箱保存备用;SDS-PAGE电泳、转膜、封闭;加入IRS1(1∶1000)、AKT(1∶1000)、GLUT4(1∶1000)、PI3K(1∶1000)、β-actin(1∶5000)一抗,4 ℃孵育摇床过夜;TBST洗涤后,加入辣根过氧化酶标记的山羊抗兔(1∶5000)二抗孵育,TBST洗涤,ECL发光液显影、定影。利用Image J软件分析计算积分光密度,与内参β-actin条带灰度值的比值进行比较。

2.9 统计学方法 SPSS 23.0进行统计学分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布和方差齐性则用单因素方差分析比较,不符合正态分布或者方差不齐采用秩和检验比较,$P<0.05$为有统计学意义。

3 结果

3.1 对PCOS-IR大鼠体质量的影响 造模后,与空白组比较,经过造模后的4组大鼠体质量显著升高($P<0.01$);经过治疗给药后,与模型组比较,苍术导痰汤高、低剂量组及二甲双胍组大鼠体质量下降($P<0.05$)。见插页Ⅷ图1。

3.2 对PCOS-IR大鼠动情周期的影响 与空白组比较,模型组大鼠的正常动情周期率减少、动情间期延长率升高;与模型组比较,苍术导痰汤高剂量组、二甲双胍组大鼠正常动情周期率升高、延长率降低;与二甲双胍组比较,苍术导痰汤高剂量组动情周期正常率升高、延长率降低。见插页Ⅷ图2。

3.3 对PCOS-IR大鼠FBG、餐后2 h血糖(postprandial blood glucose,PBG)水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠FBG、PBG30′、PBG60′、PBG90′、PBG120′水平均显著升高($P<$

0.01)。与模型组比较,苍术导痰汤高剂量组 FBG、PBG30′、PBG60′、PBG90′、PBG120′水平显著降低($P<0.01$);苍术导痰汤低剂量组 FBG、PBG30′、PBG90′水平降低($P<0.05$),PBG60′、PBG120′水平显著降低($P<0.01$);二甲双胍组 FBG 水平降低($P<0.05$),PBG30′、PBG60′、PBG90′、PBG120′水平显著降低($P<0.01$)。与二甲双胍组比较,苍术导痰汤高剂量组 PBG120′水平显著降低($P<0.01$),FBG、PBG30′、PBG60′、PBG90′水平降低($P<0.05$)。见插页Ⅸ图3。

3.4 对 PCOS-IR 大鼠 HOMA-IR、GAUC 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠 FINS、餐后 2 h INS、HOMA-IR 和 GAUC 水平均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和苍术导痰汤低、高剂量组大鼠 FINS、餐后 2 h INS、HOMA-IR 和 GAUC 水平显著下降($P<0.01$);与二甲双胍组比较,苍术导痰汤高剂量组大鼠 HOMA-IR 水平显著降低($P<0.01$),餐后 2 h INS、FINS、GAUC 水平降低($P<0.05$)。见插页Ⅸ图4。

3.5 对 PCOS-IR 大鼠卵巢各级卵泡数量的影响 空白组大鼠卵巢结构正常、形态完整,颗粒细胞排列紧密,可见原始卵泡和多个黄体;模型组大鼠卵巢呈多囊样改变,卵泡体积增大,卵巢颗粒细胞结构松散;二甲双胍组大鼠卵巢卵泡数量较模型组减少,卵泡体积减小;苍术导痰汤低剂量组大鼠卵巢形态结构与二甲双胍组相似;苍术导痰汤高剂量组大鼠卵巢颗粒细胞较为紧密,卵泡数量明显减少,有黄体形成。见插页Ⅹ图5。与空白组比较,模型组大鼠成熟卵泡数明显减少、初级卵泡、次级卵泡明显增多($P<0.01$);与模型组比较,苍术导痰汤高剂量组初级卵泡、次级卵泡明显减少、成熟卵泡明显增多($P<0.01$),苍术导痰汤低剂量组初级卵泡明显减少($P<0.05$),二甲双胍组初级卵泡、次级卵泡减少、成熟卵泡增多($P<0.05$);与二甲双胍组比较,苍术导痰汤高剂量组初级卵泡明显减少、成熟卵泡明显增多($P<0.01$),次级卵泡减少($P<0.05$)。见插页Ⅹ图6。

3.6 对 PCOS-IR 大鼠血清 T、E2、LH/FSH 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 E2、T、LH/FSH 水平均明显升高($P<0.01$);与模型组比较,苍术导痰汤高剂量组大鼠血清 E2、T、LH/FSH 水平显著降低($P<0.01$),苍术导痰汤低剂量组大鼠血清 E2、T、LH/FSH 水平降低($P<0.05$),二甲双胍组大鼠血清 E2、LH/FSH 水平降低($P<0.05$);与二甲双胍组比较,苍术导痰汤高剂量组大鼠血清 E2、T、LH/FSH 水平降低($P<0.05$)。见插页Ⅹ图7。

3.7 对 PCOS-IR 大鼠卵巢组织中 IRS1、PI3K、AKT、GLUT4 蛋白水平的影响 与空白组比较,模型组 IRS1、PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,苍附导痰汤高剂量组 IRS1、PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白表达显著升高($P<0.01$);苍附导痰汤低剂量组 IRS1、PI3K 蛋白表达升高($P<0.05$)、AKT 蛋白表达显著升高($P<0.01$);二甲双胍组 IRS1 表达升高($P<0.05$),PI3K、AKT 和 GLUT4 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与二甲双胍组比较,苍附导痰汤高剂量组 IRS1、GLUT4 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见插页Ⅺ图8。

4 讨论

PCOS 作为现代临床的难治病、多发病,对育龄女性生殖功能、糖代谢功能造成严重危害,我国发病率为 4.5% ~ 10.2%,其中诱发 IR 的患者高达 85%[12]。目前临床治疗,激素、二甲双胍类药物仍是 PCOS-IR 的首选,但此类药物均存在治愈率较低,肠胃不良反应及肝肾代谢负担、治疗依从性差等问题[13]。因此,探索 PCOS-IR 的治疗新靶点,成为了扭转当前疗效不佳现状的突破口。胰岛素抵抗是 PCOS-IR 的重要病理基础,从胰岛素信号通路切入,可能是寻找行之有效的替代药物的着力点。

PCOS-IR 属于中医学“月经后期”“闭经”“不孕”“癥瘕”等范畴。本病属本虚标实、虚实夹杂,病程缠绵反复,主要病机包括“湿”“痰”“瘀”,涉及肝、脾、肾三脏[14],因此疏肝理脾、清泄郁热是其治疗的关键。苍附导痰汤方中香附疏肝理气和血,苍术燥湿兼有健脾,陈皮、枳壳调理气机、调和脾胃,半夏、胆南星燥湿化痰,茯苓、炙甘草补气兼有祛痰之功。该方具有行气祛痰的功效,可用于痰湿体质,偏于肥胖,表现为白带增多、白浊稠厚、四肢乏力、食欲不佳等,以及痰湿内蕴导致的月经停闭[15-16]。现代药理学研究表明,香附的化学成分主要包括黄酮、生物碱、糖、甾醇等类成分。其中,黄酮类化合物能通过 PI3K/AKT 信号通路治疗多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗模型大鼠[17-18],苍术-香附可能通过 PI3K/AKT 信号通路,从而实现通过调节代谢、抑制炎症因子、促进卵泡发育及排卵、减少雄激素生成等起到多靶点、多途径治疗 PCOS 的作用[19]。提示苍附导痰汤方发挥调节代谢、促进卵泡发育及排卵作用具有一定物质基础。本研究结果显示,苍附导痰汤能改善血清 T、E2、LH/FSH 水平,调节 PCOS-IR 大鼠卵巢各级卵泡数量。

目前,许多研究者认为,雄激素增高是 PCOS 的关键原因,而雄激素可以刺激内脏脂肪的分解,促进胰岛 β 细胞释放胰岛素并在体内诱导 IR[20-21]。IR 促进活化的胰岛素受体快速内化为胞质溶胶,阻断胰岛素信号传导,加重疾病发展[22]。本研究结果显示,苍附导痰汤能够显著改善 PCOS-IR 大鼠体质量,降低 IPGTT、HOMA-IR 以及 GAUC 水平,通过多成分、多靶点调节 PCOS-IR 模型大鼠糖脂代谢稳态,符合中医基础理论,丰富了现代药理学研究结果。

既往研究还发现,IR 合并 PCOS 患者子宫内膜中 GLUT4 和胰岛素后受体信号转导分子的表达降低[23-25]。PCOS 女性在脂肪组织中表现出 IR 升高,这与全身 IR 密切相关[26]。下调炎症环境中胰岛素信号通路中 IRS-1/GLUT4 基因表达,在改善 PCOS-IR 大鼠卵巢功能方面发挥作用[27]。同样,本研究发现 PCOS 大鼠的 GLUT4 显著降低,并且 IR 也发生。PI3K/AKT 是细胞中一条与磷脂酰肌醇有关的经典信号通路,在胰岛素的刺激以及细胞生存当中发挥着重要作用[28]。PI3K/AKT 信号通路不仅参与了胰岛素代谢调控,还参与卵泡的分化与生长,该信号通路异常,可影响卵泡生长和卵母细胞质量,引起 PCOS,导致卵巢早衰和不孕[29-30]。GLUT4 为 PI3K/AKT 中下游基因,承担了全身约 50% ~ 80% 的葡萄糖的转运。PI3K/AKT 信号通路被激活后,GULT4 即从胞内转导胞膜,摄取葡萄糖;当机体发生 IR 时,PI3K/AKT 信号通路被抑制,传递给 GLUT4 的信号减弱,导致葡萄糖摄取减少,引起血糖升高[31]。本实验结果显示,模型组大鼠卵巢组织 PI3K、AKT、GLUT4 蛋白表达均较空白组降低,苍附导痰汤或二甲双胍治

疗后,大鼠卵巢组织中 PI3K、AKT、GLUT4 蛋白表达均不同程度改善,证实 PI3K/AKT 信号通路参与 PCOS－IR 病理过程。

综上所述,苍附导痰汤可以显著改善 PCOS－IR 大鼠血清 AMH、LH/FSH、T、E2、INS、IPGTT 水平和多囊样卵巢改变,其机制可能是通过调节 IRS1/PI3K/AKT/GLUT4 通路来干预 PCOS－IR 大鼠糖脂代谢及生殖内分泌功能。研究尚有不足之处,未明确苍附导痰汤的主要成分分析,没有体现传统中药具有多通路、多成分、多靶点的特点。

参考文献

[1] 贾凡,赵红玉,郑冬雪,等. 半夏泻心汤加减治疗多囊卵巢综合征及胰岛素抵抗"异病同治"的网络药理学分析及实验验证[J]. 环球中医药,2022,15(5):764－774.

[2] 赵博,张意,王淼,等. 中医药治疗 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(19):2162－2166.

[3] 徐智睿. PCOS 患者血脂、激素、糖耐量和胰岛素抵抗指数及其与 BMI、GAUC 的相关性分析[J]. 标记免疫分析与临床,2018,25(6):804－807.

[4] ARNOLD S E, ARVANITAKIS Z, MACAULEY－RAMBACH S L, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums[J]. Nat Rev Neurol,2018,14(3):168－181.

[5] MU J, YU P, LI Q. microRNA－103 contributes to progression of polycystic ovary syndrome through modulating the IRS1/PI3K/AKT signal axis[J]. Arch Med Res,2021,52(5):494－504.

[6] 王静芳. 苍附导痰汤联合二甲双胍治疗多囊卵巢综合征痰湿型对胰岛素抵抗及糖脂代谢的影响[J]. 实用中医药杂志,2023,39(5):902－904.

[7] 杨昕宇,杨华,唐红,等. 加味苍附导痰汤治疗痰湿型单纯性肥胖症伴血脂异常的临床效果[J]. 中国医药导报,2023,20(12):151－155.

[8] 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.

[9] 刘思雪,刘宏民,黄芳. 2 种多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的比较研究[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(11):1371－1374,1384.

[10] 王丽珍,祝鸿发,朱妹妹,等. 两种 PCOS 伴胰岛素抵抗大鼠动物模型构建与评价[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(10):139－143.

[11] 范雅祺,郑燕鹏,周子婷,等. 雷公藤建立卵巢早衰大鼠模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报,2023,31(3):355－364.

[12] AMISI C A, CICCOZZI M, POZZILLI P. Wrist circumference: a new marker for insulin resistance in African women with polycystic ovary syndrome[J]. World J Diabetes,2020,11(2):42－51.

[13] 陈佩佩,毛萍,蔡三金,等. 中医药治疗多囊卵巢综合征并胰岛素抵抗的特征评价及疗效分析[J]. 中医药临床杂志,2022,34(6):1086－1092.

[14] 王佳宁,王昕,陈旭. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗中西医研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2024,26(3):184－188.

[15] 曹晓春,仲英华. 苍附导痰汤对多囊卵巢综合征患者性激素水平及卵巢体积的影响[J]. 新中医,2022,54(23):48－51.

[16] 堵吉. 苍附导痰汤化裁治疗痰湿型月经后期 42 例观察[J]. 中国实用医药,2023,18(5):142－144.

[17] 毕晓英,许珂,赵艳晓,等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 通路研究杜仲总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平及卵巢组织自噬的影响[J]. 中药药理与临床,2022,38(1):82－86.

[18] 纪淑玲,卢素杰,郑露,等. 苍术－香附治疗多囊卵巢综合征的网络药理学机制研究[J]. 中医临床研究,2022,14(32):109－114.

[19] ZHANG Y, HU M, JIA W, et al. Hyperandrogenism and insulin resistance modulate gravid uterine and placental ferroptosis in PCOS－like rats[J]. J Endocrinol,2020,246(3):247－263.

[20] DIAMANTI－KANDARAKIS E, DUNAIF A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications[J]. Endocr Rev,2012,33(6):981－1030.

[21] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. Physiol Rev,2018,98(4):2133－2223.

[22] GHOSHAL K, LI X, PENG D, et al. EET analog treatment improves insulin signaling in a genetic mouse model of insulin resistance[J]. Diabetes,2021: db210298.

[23] NEISY A, ZAL F, SEGHATOLESLAM A, et al. Amelioration by quercetin of insulin resistance and uterine *GLUT*4 and ERα gene expression in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Reprod Fertil Dev,2019,31(2):315.

[24] CHEN Y H, HENEIDI S, LEE J M, et al. miRNA－93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance[J]. Diabetes,2013,62(7):2278－2286.

[25] EZEH U, CHEN I Y, CHEN Y H, et al. Adipocyte insulin resistance in PCOS: relationship with GLUT－4 expression and whole－body glucose disposal and β－cell function[J]. J Clin Endocrinol Metab,2020,105(7):e2408－e2420.

[26] LIU S W, ZHANG Y, YANG F, et al. Modified Cangfu Daotan decoction ameliorates polycystic ovary syndrome with insulin resistance *via* NF－κB/LCN－2 signaling pathway in inflammatory microenvironment[J]. Front Endocrinol,2022,13:975724.

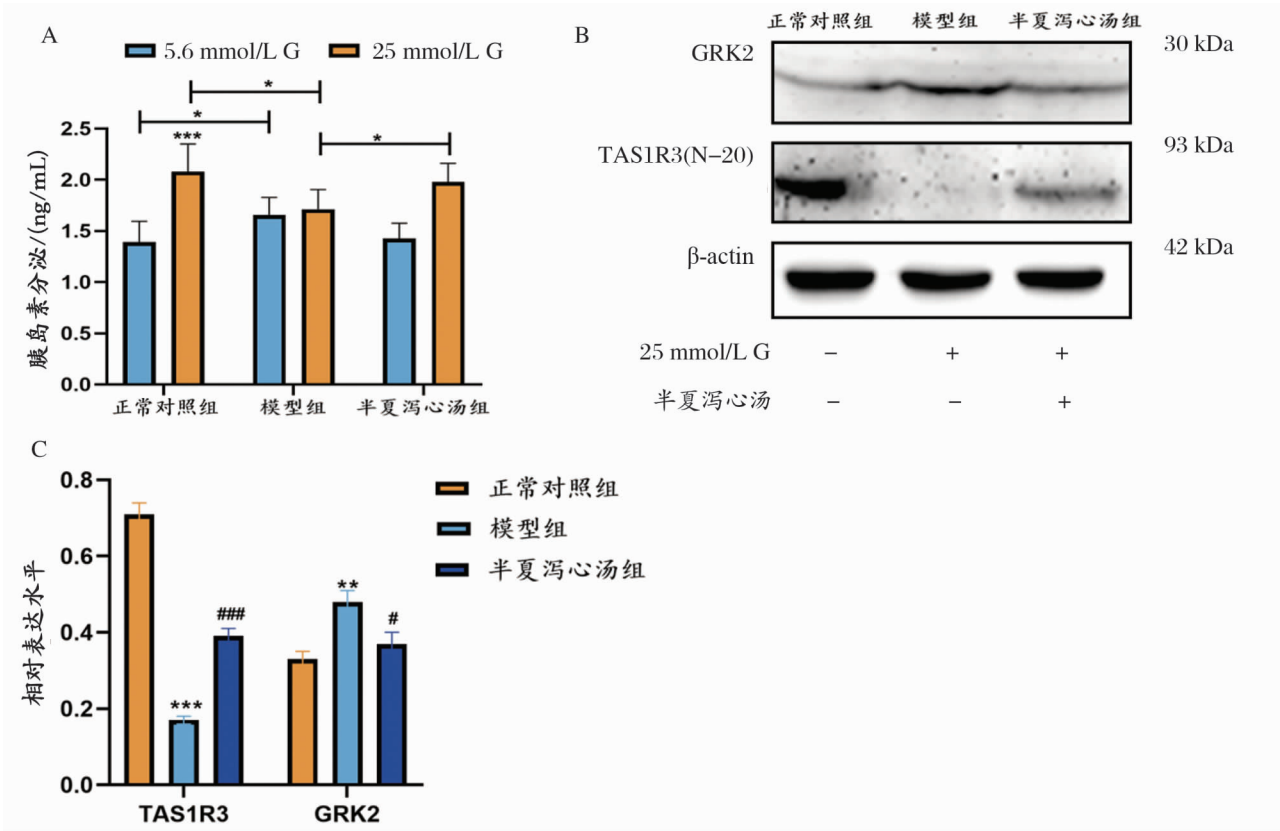
[27] ZHANG N, LIU X Y, ZHUANG L L, et al. Berberine decreases insulin resistance in a PCOS rats by improving GLUT4: Dual regulation of the PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. Regul Toxicol Pharmacol,2020,110:104544.

[28] FENG J, GAO Q, LIU Q, et al. Integrated strategy of differentially expressed genes associated with ulcerative colitis[J]. Mol Med Rep,2017,16(5):7479－7489.

[29] LIU J, WU D C, QU L H, et al. The role of mTOR in ovarian Neoplasms, polycystic ovary syndrome, and ovarian aging[J]. Clin Anat,2018,31(6):891－898.

[30] YARIBEYGI H, FARROKHI F R, BUTLER A E, et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms[J]. J Cell Physiol,2019,234(6):8152－8161.

[31] ZHANG X, XUE X C, WANG Y, et al. Celastrol reverses palmitic acid－induced insulin resistance in HepG2 cells *via* restoring the miR－223 and GLUT4 pathway[J]. Can J Diabetes,2019,43(3):165－172.

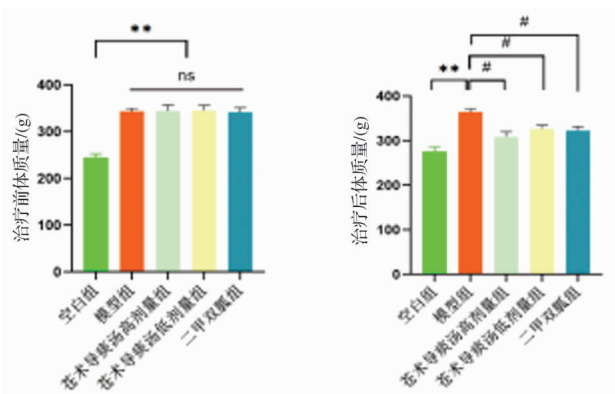


注：＊与正常对照组比较，$P<0.05$；＊＊与正常对照组比较，$P<0.01$；＊＊＊与正常对照组比较，$P<0.001$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；###与模型组比较，$P<0.001$。

图 8　半夏泻心汤对高糖诱导的 INS－1β 细胞胰岛素分泌、甜味受体及 GRK2 表达的影响

苍附导痰汤通过 IRS1/GLUT4 通路改善 PCOS－IR 大鼠卵巢功能的作用机制

（正文见 76－80 页）



注：＊＊与空白组比较，$P<0.01$；#与模型组比较，$P<0.05$。

图 1　苍术导痰汤对 PCOS－IR 大鼠体质量变化的影响（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

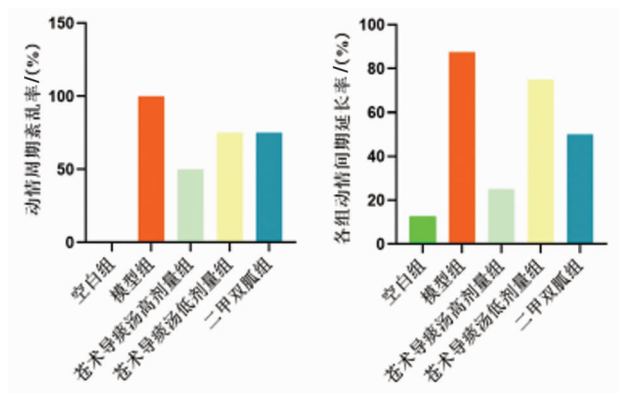
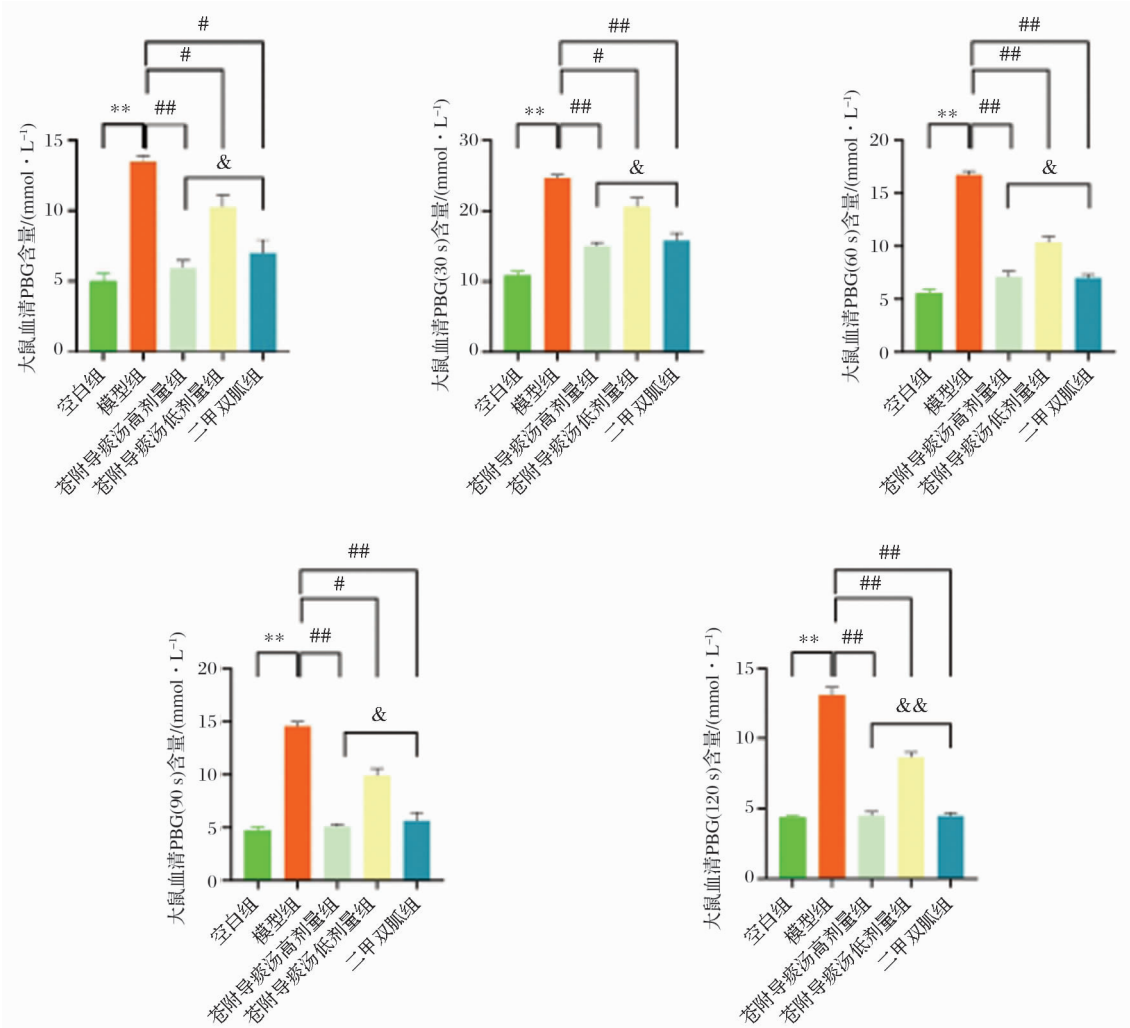
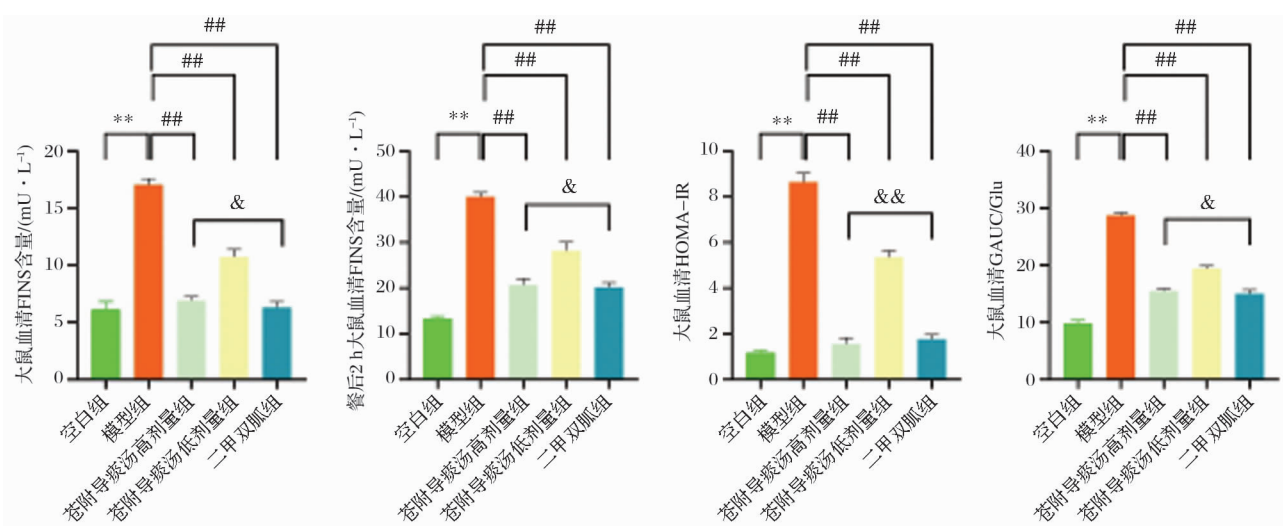


图 2　苍术导痰汤对 PCOS－IR 大鼠动情周期变化的影响（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）



注：＊＊$P<0.01$；#$P<0.05$；##$P<0.01$；&$P<0.05$；&&$P<0.01$。

图 3　苍术导痰汤对 PCOS－IR 大鼠 FBG、PBG 水平的影响（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）



注：＊＊$P<0.01$；#$P<0.05$；##$P<0.01$；&$P<0.05$；&&$P<0.01$。

图 4　苍术导痰汤对 PCOS－IR 大鼠 HOMA－IR、GAUC 水平的影响（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

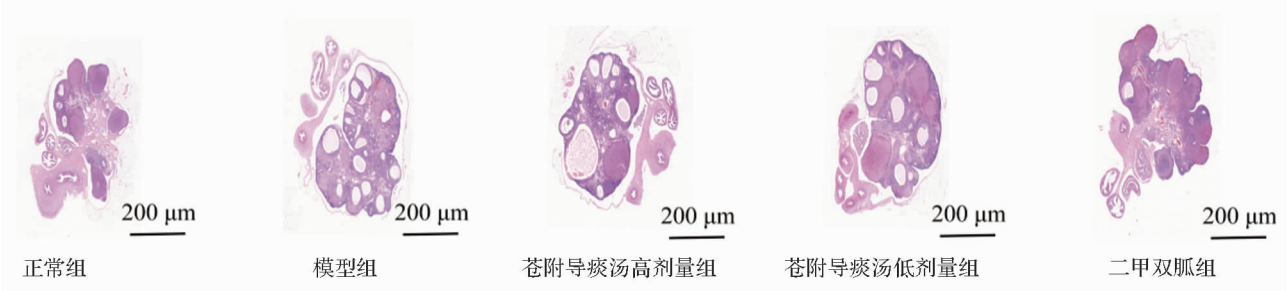
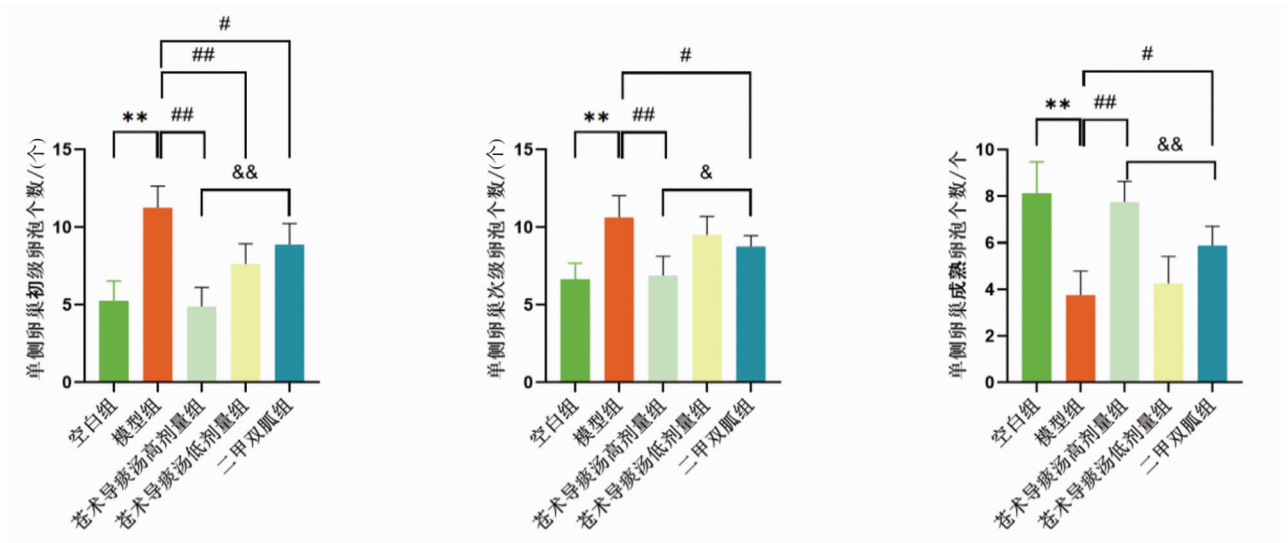
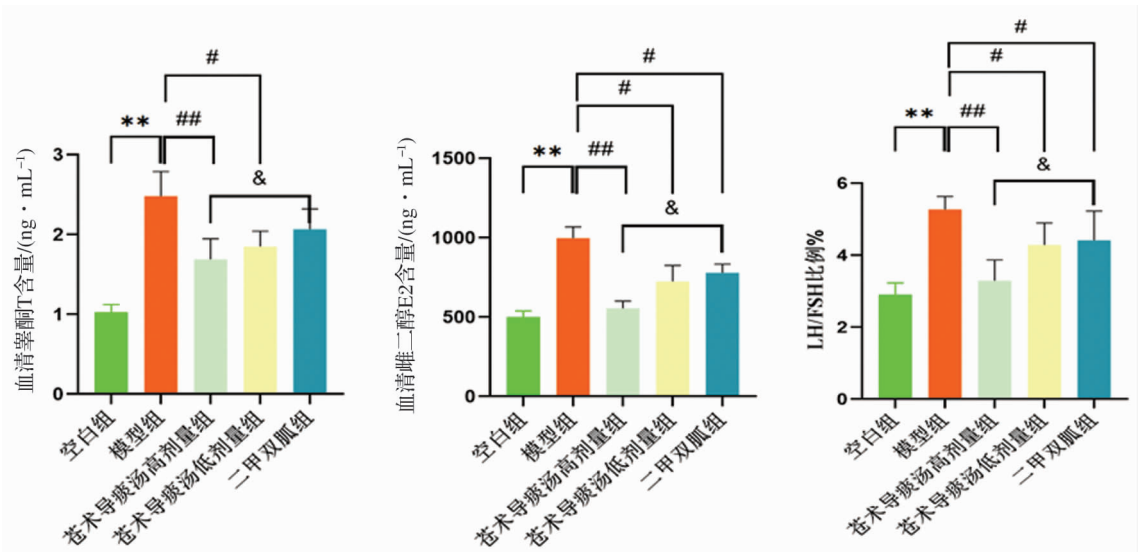


图 5　苍附导痰汤对 PCOS－IR 大鼠卵巢组织病理学的影响（HE 染色，×100）



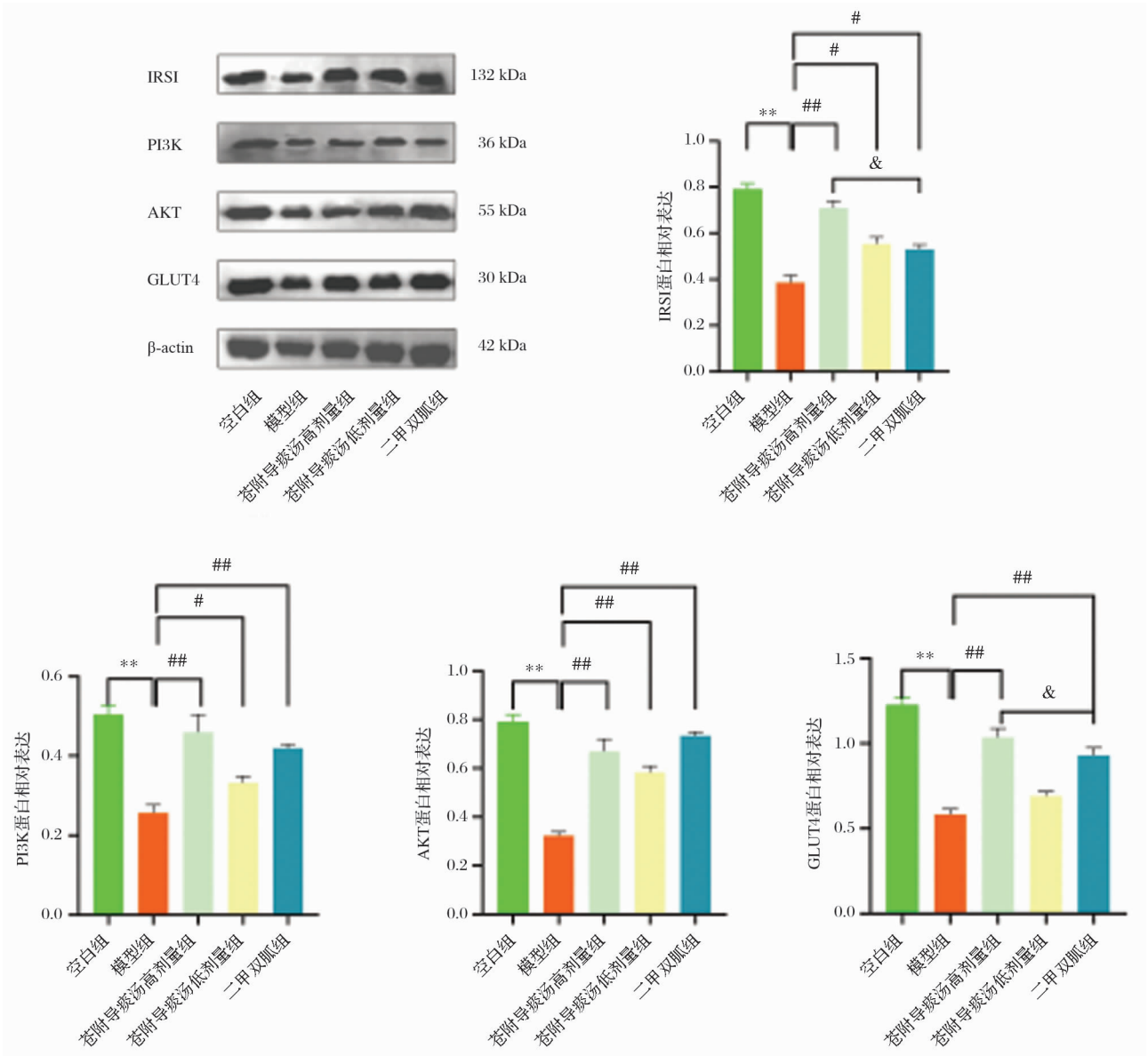
注：＊＊$P<0.01$；#$P<0.05$；##$P<0.01$；&$P<0.05$；&&$P<0.01$。

图 6　苍附导痰汤对各组大鼠右侧卵巢组织原始卵泡数、初级卵泡数、次级卵泡数、成熟卵泡计数的影响（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）



注：＊＊$P<0.01$；#$P<0.05$；##$P<0.01$；&$P<0.05$。

图 7　附导痰汤对 PCOS－IR 大鼠血清 T、E_2、LH/FSH 水平的影响（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）



注：＊＊$P<0.01$；#$P<0.05$；##$P<0.01$；&$P<0.05$。

图 8 附导痰汤对 PCOS－IR 大鼠卵巢组织 IRS1、PI3K、AKT、GLUT4 蛋白表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）