DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.06.025

归肾丸化裁通过调控TLR4/NF-κB信号通路改善PCOS大鼠炎症反应的研究

张晓芳,沈颖,叶利群
(浙江中医药大学附属宁波市中医院,浙江 宁波 315010)

摘要:目的 探究归肾丸化裁通过调控Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)/核因子κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)信号通路对多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)大鼠模型的治疗效果,特别是其对卵巢功能、血清激素水平及炎症因子表达的影响。方法 选取动情周期正常的8周龄SPF级雌性SD大鼠40只,随机分为4组(n=10),分别为正常组、模型组、归肾丸化裁组、阳性药组(二甲双胍)。除正常组外,其余各组通过连续21 d给予来曲唑灌胃建立PCOS模型。归肾丸化裁组与阳性药组分别接受相应药物治疗21 d。实验结束后,通过检测大鼠动情周期、卵巢指数、血清性激素水平、血清炎症因子水平、卵巢组织炎症相关基因mRNA水平及蛋白表达情况,评估归肾丸化裁的疗效。结果 正常组大鼠动情周期为3~5 d/次;造模21 d后,其余各组动情周期紊乱,平均5~8 d/次,多数处于动情间期或前期,甚至未见完整动情周期,表明大鼠卵巢受损。经过3周的灌胃治疗后,阳性药组及归肾丸化裁组动情周期恢复。与正常组相比,模型组大鼠卵巢指数显著增加(P<0.01),与模型组相比,归肾丸化裁组和阳性药组大鼠卵巢指数显著下降(P<0.01),接近正常组水平。模型组大鼠卵巢组织呈多囊性改变,黄体减少或消失,而归肾丸化裁组和阳性药组大鼠卵巢组织中囊性卵泡和闭锁性卵泡减少,颗粒细胞层结构趋向正常。模型组睾酮(testosterone,T)和促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)水平显著升高(P<0.01,P<0.05),促卵泡激素(follicle-stimulating hormone,FSH)水平显著下降(P<0.05),而归肾丸化裁组和阳性药组能显著降低T和LH水平(P<0.05),归肾丸化裁组和阳性药组还能显著升高FSH水平(P<0.05)。与正常组相比,模型组血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和白细胞介素-1β(interleukin-1 beta,IL-1β)水平显著升高(P<0.001)。与模型组相比,归肾丸化裁组和阳性药组均能显著降低PCOS大鼠血清中TNF-α、IL-6和IL-1β水平(P<0.01和P<0.05)。与正常组相比,模型组卵巢组织中IL-6、IL-1β、TNF-α和TLR4 mRNA水平显著升高(P<0.05,P<0.01),归肾丸化裁组与模型组相比IL-6、IL-1β和TLR4 mRNA水平显著下降(P<0.05),TNF-α mRNA水平有降低趋势(P=0.188)。与正常组相比,模型组卵巢组织中TLR4蛋白表达显著升高(P<0.05),NF-κB p65和核因子κB抑制蛋白α(Inhibitor of NF-κB alpha,IκBα)磷酸化水平显著升高(P<0.05),与模型组相比,归肾丸化裁组TLR4蛋白水平显著下降(P<0.05),NF-κB p65和IκBα磷酸化水平显著下降(P<0.05)。结论 归肾丸化裁可能通过抑制TLR4/NF-κB信号通路的激活,减少炎症因子的产生,进而改善PCOS大鼠的生殖功能障碍和卵巢炎症状态,为临床治疗PCOS提供了新的思路和理论依据。

关键词:归肾丸化裁;多囊卵巢综合征;大鼠模型;TLR4/NF-κB信号通路;血清激素;炎症因子
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)06-0140-08

Effect of Modified Guishen Wan(归肾丸化裁) on Improving Inflammatory Reaction in PCOS Rats by Regulating TLR4/NF-κB Signal Pathway

ZHANG Xiaofang,SHEN Ying,YE Liqun
(Ningbo Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University,Ningbo 315010,Zhejiang,China)

Abstract:*Objective* To research the therapeutic effects of Modified Guishen Wan(归肾丸化裁) on rat model of polycystic ovary syndrome(PCOS) by regulating Toll-like receptor 4(TLR4)/nuclear factor-κB(NF-κB) signaling pathway,particularly its impact on ovarian function,serum hormone levels and inflammatory factor expression. *Method* Forty 8-week-old SPF female SD rats with normal estrous cycle were randomly divided into four groups(n=10):normal group, model group,Modified Guishen Wan group and positive drug group(metformin). Except for the normal group,the other groups were administered letrozole via gavage for 21 consecutive days to establish the PCOS model. The Modified Guishen Wan group and the positive drug group received the corresponding treatments for 21 days. After the experiment,the estrous cycle,ovarian index,serum sex hormone levels,serum inflammatory factor levels,the mRNA levels of inflammation-related genes in ovarian tissue and protein expression were detected to evaluate the efficacy of the Modified Guishen Wan. *Result* The estrous cycle of the normal group was 3-5 days/cycle. After 21 days of modeling,the estrous cycles of the other groups became disordered,with an average of 5-8

基金项目:国家中医药管理局科技司-浙江省中医药管理局共建科技计划项目(GZY-ZJ-KJ-23090);浙江省中医药科技计划项目(2016ZB112);宁波市科技重点研发计划"揭榜挂帅"项目(2023Z206);宁波市自然科学基金项目(2023J240)
作者简介:张晓芳(1981-),女,河南平顶山人,副主任中医师,硕士,研究方向:中医药治疗妇科常见病。
通讯作者:叶利群(1973-),女,浙江宁波人,主任医师,硕士,研究方向:中医药治疗妇科常见病。E-mail:yeliqunnb@sina.com。

days/cycle, mostly in the interphase or prophase, and some lacked a complete estrous cycle, indicating ovarian damage. After 3 weeks of gavage treatment, the estrous cycles of the positive group and the Modified Guishen Wan group recovered. Compared with that of the normal group, the ovarian index of the model group significantly increased ($P<0.01$). Compared with that of the model group, the ovarian index of the rats of the Modified Guishen Wan group and the positive drug group significantly decreased ($P<0.01$), approaching the normal group levels. The ovarian tissue of the model group showed multiple cystic changes, with reduced or absent corpora lutea. In contrast, the Modified Guishen Wan group and the positive drug group had fewer cystic and atretic follicles, and the granulosa cell layer structure tended to be normal. The levels of testosterone (T) and luteinizing hormone (LH) in the model group were significantly higher ($P<0.01$, $P<0.05$), while follicle-stimulating hormone (FSH) levels were significantly lower ($P<0.05$). The Modified Guishen Wan group and the positive drug group could significantly reduce the levels of T and LH ($P<0.05$), and the Modified Guishen Wan group and the positive drug group could also significantly increase the FSH levels ($P<0.05$). Compared with those of the normal group, the serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1β (IL-1β) in the model group were significantly elevated ($P<0.001$). Compared with the model group, both the Modified Guishen Wan and the positive drug could significantly reduce the serum levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in PCOS rats ($P<0.01$ and $P<0.05$). Compared with those of the normal group, the mRNA levels of IL-6, IL-1β, TNF-α and TLR4 in the ovarian tissue of the model group were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The Modified Guishen Wan group had significantly lower levels of IL-6, IL-1β and TLR4 mRNA compared to the model group ($P<0.05$), with a trend toward lower TNF-α mRNA levels ($P=0.188$). Compared with the normal group, the protein expression of TLR4 in the ovarian tissue of the model group was significantly increased ($P<0.05$), and the phosphorylation levels of NF-κB p65 and IκBα were significantly elevated ($P<0.05$). The Modified Guishen Wan group had significantly lower TLR4 protein levels ($P<0.05$) and significantly reduced phosphorylation levels of NF-κB p65 and IκBα ($P<0.05$). *Conclusion* The Modified Guishen Wan may improve reproductive dysfunction and ovarian inflammation in PCOS rats by inhibiting the activation of the TLR4/NF-κB signaling pathway and reducing the production of inflammatory factors, providing new insights and theoretical basis for the clinical treatment of PCOS.

Keywords: Modified Guishen Wan (归肾丸化裁); polycystic ovary syndrome; rat model; TLR4/NF-κB signal path; serum hormones; inflammatory factors

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种常见的内分泌代谢疾病,其特征包括雄激素过多和持续无排卵或稀发排卵[1-3]。PCOS的临床表现多样化,影响着5%~20%的育龄期女性,并且与多种代谢性疾病如2型糖尿病、心血管疾病以及子宫内膜癌等有着密切的关联[4-5]。尽管现代医学已采用多种药物治疗PCOS,如二甲双胍和口服避孕药等,但这些治疗方法往往仅能缓解症状,难以根治,且长期使用可能带来不良反应[6-8]。因此,寻找更为安全有效的治疗方法成为了迫切的需求。

近年来,中医药在PCOS的治疗方面展现出独特的优势。其中,归肾丸化裁因其在改善卵巢功能和恢复排卵方面的良好效果而备受关注[9]。研究显示,归肾丸化裁不仅可以降低PCOS患者的炎症因子水平,改善月经周期,而且还能显著调节血清激素水平,显示出其在调节慢性低度炎症方面的潜力[10]。慢性低度炎症被认为是PCOS发病机制中的一个重要环节。研究显示,PCOS患者体内普遍存在炎症标志物水平的升高,如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin-1 beta, IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)等[11]。这些炎症因子不仅影响卵巢功能,还与胰岛素抵抗、雄激素水平异常和排卵障碍等病理过程紧密相关。本研究旨在通过动物模型实验,深入探讨归肾丸化裁如何通过调控Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)炎症信号通路来改善PCOS大鼠的卵巢功能、血清激素水平以及炎症因子表达,以期为该中药方剂在PCOS治疗中的应用提供科学依据和支持[12]。

1 资料与方法

1.1 实验动物

选用8周龄SPF级雌性SD大鼠45只,体质量250~300 g,由浙江维通利华实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(浙)2019-0001,室内保持22~25 ℃,湿度40%~60%,12 h/12 h照明/黑暗条件,自由摄入普通维持饲料和饮水,进入实验开始前先适应性饲养1周。本研究实验方案经浙江药科职业大学实验动物伦理委员会审核批准(伦理批号:ZYLL202302001),实验过程符合动物福利及伦理相关规定。

1.2 主要试剂及仪器

大鼠TNF-α、IL-6、IL-1β、睾酮(testosterone, T)、促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH) ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司),TLR4抗体、NF-κB p65抗体、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Proteintech公司),p-NF-κB p65抗体、核因子κB抑制蛋白α(Inhibitor of NF-κB alpha, IκBα)抗体、p-IκBα抗体(江苏佰嘉生物科技有限公司),超敏ECL化学发光试剂盒(苏州新赛美生物科技有限公司),SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(苏州新赛美生物科技有限公司),BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京Bioshap),PCR High Cycle 480(瑞士罗氏公司),多功能酶标仪(美国赛默飞世尔公司),Westen蛋白电泳设备(美国伯乐公司),台式高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司),超灵敏多功能成像仪(美国丹纳赫集团)。

1.3 实验用药

归肾丸化裁药物组成:熟地黄15 g,淫羊藿12 g,菟丝子15 g,山茱萸10 g,枸杞子15 g,山药15 g,茯苓12 g,炒杜仲15 g,柴胡6 g,当归10 g,丹参15 g,炒白芍15 g。以上方药均由宁波市中医院中药房统一制备包装。医院煎药室根据相关要求煎煮中药,旋转蒸发仪浓缩,浓缩为生药含量2 g/mL。

来曲唑(货号:S25071,规格:100 mg/片)购自上海源叶生物科技有限公司,二甲双胍(规格:0.5 g/片)购自德国默克

公司。

1.4 实验动物造模、分组与给药

通过进行大鼠阴道脱落细胞涂片、染色,以观察大鼠动情周期的改变,选取动情周期正常的大鼠进行实验。将动情周期正常的40只大鼠按随机原则分为4个组别,10只/组,分别为正常组、模型组、归肾丸化裁组、阳性药组。模型组、归肾丸化裁组、阳性药组均通过灌胃给予来曲唑(1 mg·kg^{-1}·d^{-1}),连续灌胃21 d,从第16日开始进行阴道涂片检查,观察阴道涂片,记录大鼠的发情周期,若阴道涂片连续出现角质化细胞,说明动情周期紊乱,提示造模成功。

根据分组不同对各组大鼠采用不同干预方案进行处理,归肾丸化裁组以33 g/kg的剂量给与大鼠归肾丸化裁水煎液灌胃治疗,每次0.3 mL。阳性药组采用二甲双胍(100 mg·kg^{-1}·d^{-1})水溶液灌胃,模型组和正常组予以等量生理盐水灌胃,每日上、下午各灌1次,连续21 d。

1.5 取材方法

各组大鼠在最后一次给药后禁食12 h,采用0.3%戊巴比妥钠溶液通过腹腔注射的方式进行麻醉,将大鼠置于仰卧位置后予以固定。接着,通过腹主动脉采血并处死大鼠,采集的血液立即注入到无抗凝剂的生化(红色)采血管中。大鼠血液标本静置2 h,低温高速离心机离心3000 r/min,取上清,将得到的血清样本储存在-80 ℃冰箱中以备后续检测。之后在大鼠腹腔V形剪开,取出双侧卵巢组织,并清除其表面附着的输卵管及脂肪组织。对取出的卵巢组织进行称重。最终,将左侧卵巢置于4%多聚甲醛溶液中进行固定,而右侧卵巢则冷冻保存在液氮中以备后续分析。

1.6 观察指标

1.6.1 观察并记录卵巢的形态学变化 根据大鼠体质量和卵巢质量计算卵巢的相对质量(脏器指数)(mg/100 g)=卵巢质量/(体质量×10^{-2})。采用HE染色法分析卵巢组织形态,步骤如下:①取出卵巢组织后,立即将其置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h;②经过标准的脱水过程后,进行石蜡包埋;③制备的切片厚度设定为5 μm,使用二甲苯去除切片中的石蜡,持续10 min;④通过100%乙醇两次脱蜡,每次5 min,之后用蒸馏水洗涤;⑤使用苏木精水溶液进行染色,持续5 min;⑥经过1%醋酸水溶液处理10 s,随后使用0.5%氨水处理10 s以优化染色;⑦使用流动的自来水冲洗5 min,再用蒸馏水清洗1 min;⑧在70%和90%的乙醇中分别脱水10 min;⑨使用乙醇伊红染色液进行染色,持续3 min;⑩染色后的切片需经过纯乙醇脱水5 min,再通过二甲苯使之透明10 min;⑪使用中性树胶封固切片。

1.6.2 ELISA法检测大鼠的血清T、FSH、LH、TNF-α、IL-6、IL-1β水平 具体步骤:①取大鼠血清。②根据ELISA试剂盒说明书的要求,分别设立标准孔、测试孔和对照孔。在每个孔中准确添加预设体积的标准物质或待测血清样本。③依次向各孔中加入特定量的标记抗体,然后按照指示加入底物进行显色反应。完成显色反应后,立即加入终止液以停止反应。④利用酶联免疫吸附测定仪在450 nm波长下测量各孔的光密度值(OD值)。依据标准物质的浓度与其相应的OD值绘制出一条标准曲线,并确定一个标准方程。通过将测试孔的OD值代入此方程中,可计算出大鼠血清中T、FSH、LH、TNF-α、IL-6和IL-1β的具体浓度。

1.6.3 qRT-PCR检测大鼠卵巢组织中炎症因子和炎症通路相关指标的mRNA的表达量 利用Primer Premier 5.0软件,设计相关基因引物。采用Trizol法提取卵巢组织总RNA,随后用1%琼脂糖凝胶电泳分析总RNA纯度和浓度;以65 ℃,5 min,37 ℃ 40 min,70 ℃ 10 min的反应条件进行RNA反转录;随后采用荧光定量PCR仪对各样品目的基因进行RT-PCR检测,并采用SYBR PCR Mixture进行扩增;采用$2^{-\Delta\Delta ct}$法对RT-PCR每个样品目的基因的Ct值进行相对定量分析。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

基因	引物序列(5′-3′)	扩增长度/(bp)
β-actin	Forward CATTGCTGACAGGATG	140
	Reverse GCTGATCCACATCTGCTGG	
TNF-α	Forward GAGCAGGAATGAGAAGAGG	18
	Reverse GATGTGGAACTGGCAGAG	
IL-1β	Forward AATCTCACAGCAGCATCTC	66
	Reverse TTCTCCACAGCCACAATG	
TLR4	Forward ATTGTATCGCCTTCTTAGCA	146
	Reverse CTTCTTGTTCTTCCTCTGATG	
IL-6	Forward TAAGCCTCCGACTTGTGA	137
	Reverse TCCATCCAGTTGCCTTCT	

1.6.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢组织的TLR4、NF-κB p65、p-NF-κBp65、IκBα和p-IκBα蛋白水平的变化 将各组大鼠的卵巢组织经PBS洗涤后,使用液氮加入RIPA裂解液将适量卵巢组织研磨,对组织进行裂解。在4 ℃,14 000 g离心15 min后,收集上清液,并通过BCA试剂盒测定蛋白质浓度。提取的等量蛋白质(50 μg)通过10% SDS-PAGE分离,将蛋白质转移至PVDF膜后放入封闭缓冲液(5%脱脂牛奶)中封闭。封闭后将膜放入TLR4、NF-κBp65、p-NF-κBp65、IκBα、p-IκBα和β-actin一抗(1∶1000)中,孵育2 h,1×TBS-T洗膜3次(8 min/次),加入对应二抗,孵育2 h,1×TBS-T洗膜3次(8 min/次)。应用凝胶成像系统扫描图像,用目的条带除以内参条带峰面积值的比值作为目的蛋白的相对表达量,目的蛋白相对表达量=目的条带灰度值/同一样本内参灰度值,再应用Tanon GIS进行灰度分析。

1.7 统计学分析

本研究所有数据资料采用SPSS 25.0软件进行处理分析,所有数据资料均为计量资料,采用$\bar{x}\pm s$的形式予以表示。数据比较上,多组间数据均采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行;符合正态分布且方差一致的两组数据采用最小显著性差异法(LSD)进行比较;符合正态分布但方差不一致的两组数据采用Tukey's Multiple Comparison Test法进行检验。$P<0.05$代表数据间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组对PCOS大鼠动情周期的影响

在整个实验过程中,正常组大鼠动情周期为3~5 d/次;造模21 d后,除正常组外,其余各组动情周期均出现紊乱,并且出现不同程度的延长,平均5~8 d/次,多数处于动情间期或前期,甚至未见完整的动情周期,这表明大鼠卵巢受损,其功能受到抑制。经过3周的灌胃治疗后,阳性药组及归肾丸化裁组动情周期恢复。大鼠动情周期各时期阴道脱落细胞涂片见插页XXⅦ图1。

2.2 各组对PCOS大鼠卵巢指数的影响

与正常组相比,模型组大鼠卵巢指数明显增加($P<0.01$)。与模型组相比,归肾丸化裁组和阳性药组大鼠卵巢指数显著下降($P<0.01$),与正常组比较差异无统计学意义。见表2。

表2 各组对PCOS大鼠卵巢指数的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:%

组别	n	卵巢指数
正常组	10	0.038 8 ± 0.004
模型组	10	0.048 2 ± 0.003**
归肾丸化裁组	10	0.038 6 ± 0.004##
阳性药组	10	0.039 0 ± 0.007##

注:**与正常组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$。

2.3 各组对大鼠卵巢组织病理形态学的影响

HE染色结果显示,正常组大鼠卵巢组织的颗粒细胞层结构正常,可见黄体和不同发育阶段的卵泡;模型组大鼠卵巢组织呈多囊性改变,黄体数量减少或消失,出现大量充液性大囊性卵泡和闭锁性卵泡,颗粒细胞层排列紊乱且层数减少;归肾丸化裁组和阳性药组大鼠卵巢组织中囊性卵泡和闭锁性卵泡变少,颗粒细胞层结构趋向正常。见插页XXⅦ图2。

2.4 各组对PCOS大鼠血清性激素水平的影响

与正常组相比,模型组T和LH水平呈现出明显的升高,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$),模型组FSH水平显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,归肾丸化裁组和阳性药组均能降低PCOS大鼠T和LH水平,差异有统计学意义($P<0.05$);归肾丸化裁组和阳性药组均能升高PCOS大鼠FSH水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3。

2.5 各组对PCOS大鼠血清炎症因子的影响

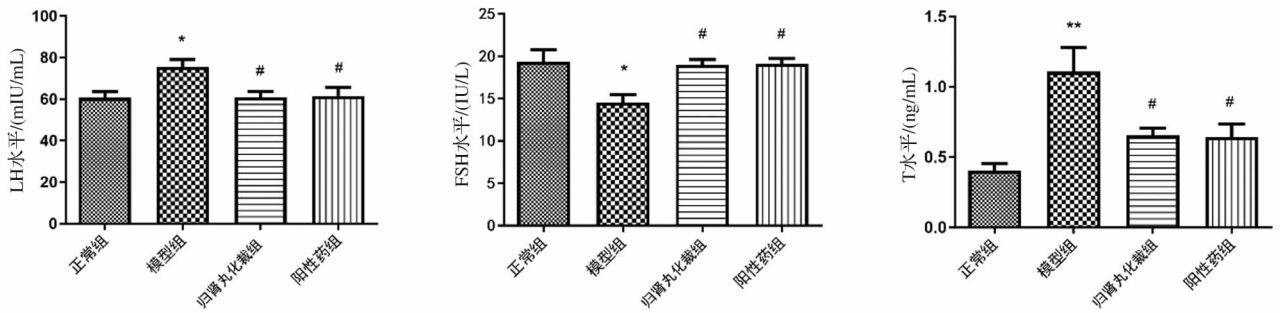
与正常组相比,模型组血清TNF-α、IL-6和IL-1β水平显著升高($P<0.001$)。与模型组相比,归肾丸化裁组和阳性药组均能显著降低PCOS大鼠血清中TNF-α、IL-6和IL-1β水平($P<0.01$和$P<0.05$)。见图4。

2.6 各组对PCOS大鼠卵巢组织中炎症因子mRNA水平的影响

与正常组相比,模型组卵巢组织中IL-6、IL-1β和TNF-α mRNA水平显著升高($P<0.01$),与模型组相比,归肾丸化裁组IL-6、IL-1β mRNA水平显著下降($P<0.05$),TNF-α mRNA水平有降低趋势,但差异无统计学意义($P=0.188$)。见图5。

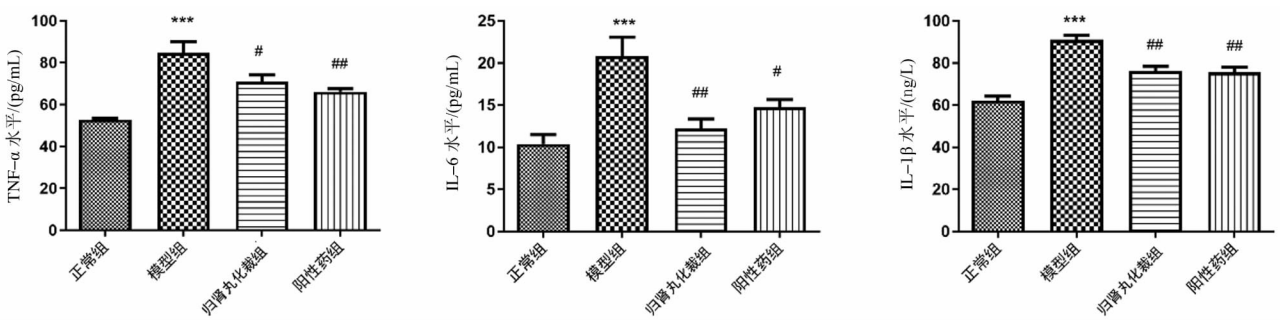
2.7 各组对PCOS大鼠卵巢组织中TLR4 mRNA水平的影响

与正常组相比,模型组卵巢组织中TLR4 mRNA水平显著



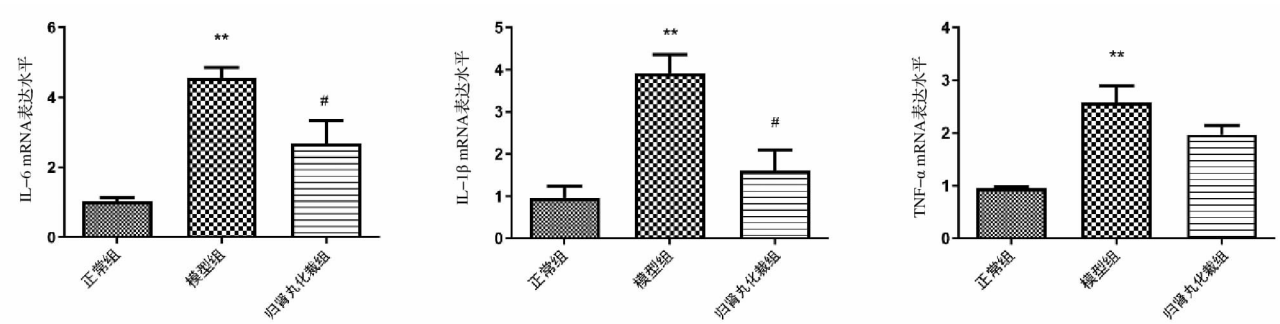
注:*与正常组比较,$P<0.05$;**与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$。

图3 各组对PCOS大鼠血清性激素的影响



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

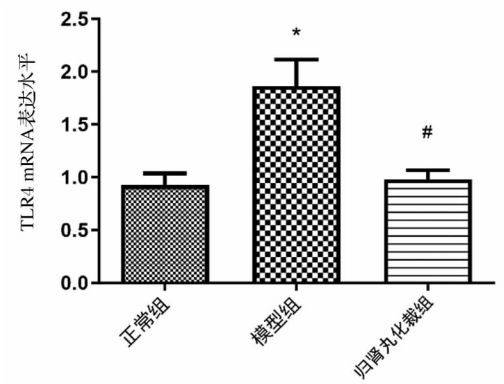
图4 各组对PCOS大鼠血清炎症因子的影响



注:**与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$。

图5 各组对PCOS大鼠卵巢组织炎症因子mRNA水平的影响

升高($P<0.05$),与模型组相比,归肾丸化裁组 TLR4 mRNA 水平显著下降($P<0.05$)。见图 6。



注:* 与正常组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$。

图 6 各组对 PCOS 大鼠卵巢组织 TLR4 mRNA 水平的影响

2.8 Western blot 检测归肾丸化裁对 PCOS 大鼠卵巢组织中 TLR4、NF-κBp65、p-NF-κBp65、IκBα 和 p-IκBα 蛋白水平的变化

与正常组相比,模型组卵巢组织中 TLR4 蛋白表达显著升高($P<0.05$),NF-κBp65 和 IκBα 磷酸化水平显著升高($P<0.05$),与模型组相比,归肾丸化裁组 TLR4 蛋白水平显著下降($P<0.05$);NF-κBp65 和 IκBα 磷酸化水平显著下降($P<0.05$)。见图 7。

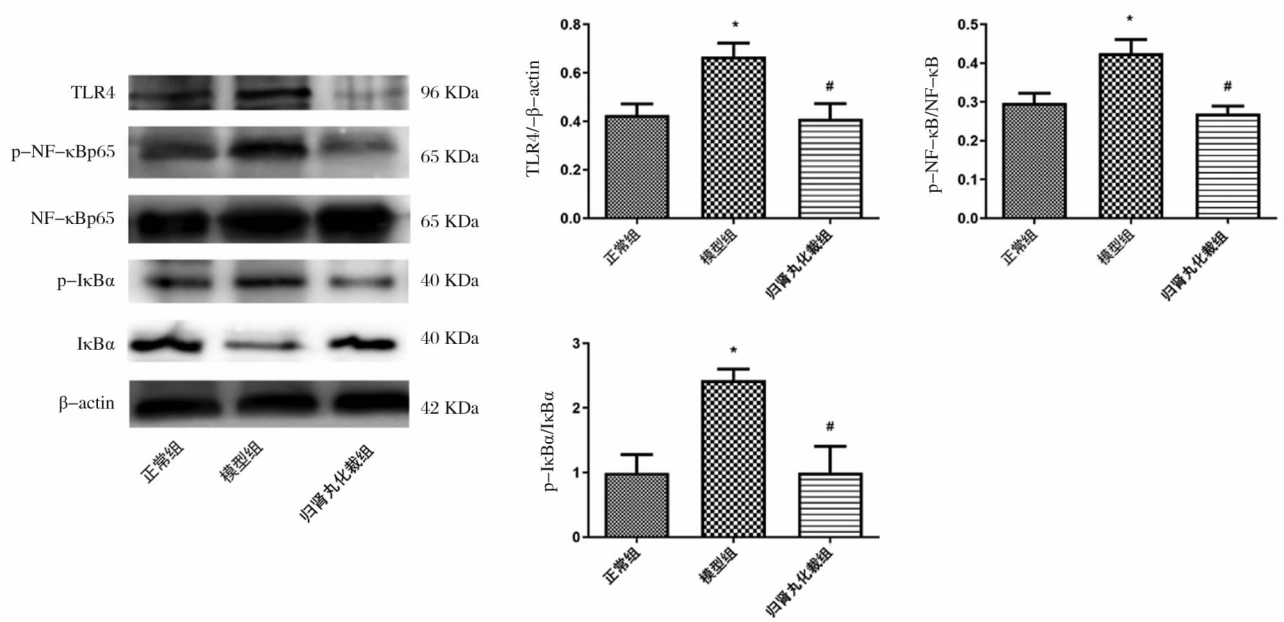
3 讨论

PCOS 是一种涉及内分泌及代谢异常的常见妇科疾病,主要特征有卵巢多囊改变、雄激素水平升高和周期性排卵问题。此外,PCOS 还与一系列代谢并发症相关,比如 2 型糖尿病和心血管疾病[13]。近年来的研究表明,PCOS 的发病机制与多种因素有关,包括遗传、环境、生活方式等。其中,慢性低度炎症在 PCOS 的发病过程中起着重要作用。炎症反应不仅影响卵巢的功能,还可能导致胰岛素抵抗和代谢紊乱[14]。TLR4/NF-κB 信号通路在 PCOS 的炎症反应中扮演关键角色。TLR4 是识别多种病原体相关分子模式的模式识别受体,激活后可使 IκBα 磷酸化降解,诱导 NF-κB 的核转位,从而促进炎症因子如 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的产生。这些炎症因子的过度表达会进一步加剧卵巢组织的炎症状态,影响卵泡的正常发育和激素的平衡[15]。

近年来,中医药在治疗 PCOS 方面展现出了巨大的潜力,尤其是针对改善患者的生殖功能和调节激素水平等方面。虽然传统中医文献中没有直接提及多囊卵巢综合征,但基于其临床表现,可以将其归类于“月经过少”“月经延后”“闭经”和“不孕”等相关病证[16-18]。在中医学理论中,肾被认为是人体的先天之本,主管生殖功能。只有当肾气充足,精血旺盛,胞脉才能得到充分滋养,从而确保月经正常周期和生育能力。若肾气亏虚,精血不足,则会导致月经不调和不孕,因此肾虚是发生本病的基础病机[19-20]。同时,肝的疏泄、藏血等功能与月经的关系十分密切,随着生活方式的改变,现代女性承受的压力增大,容易发生情志抑郁,导致冲任不调,气血失和,引发面部痤疮、月经紊乱、不孕等问题。由此可见,肾虚肝郁为 PCOS 的核心病机。因此,治疗当以滋肾调肝为主,佐以活血[21-22]。

归肾丸出自《景岳全书》,主要用于治疗肾虚引起的腰膝酸软、头晕耳鸣、遗精早泄等症状,广泛应用于肾虚肝郁所致的各种妇科疾病的治疗。本研究使用的归肾丸化裁是在归肾丸的基础上进行调整而成[23-24]。该方中,菟丝子、淫羊藿和熟地黄作为君药,共同发挥滋阴补阳、养血填精的作用;臣药选用杜仲、山茱萸和枸杞子,以滋养肝肾、益精血;柴胡和白芍疏肝解郁,柔肝止痛,敛阴和营;茯苓和山药可强肾健脾、化解湿气,以防肝疾累及脾脏;佐以当归和丹参,活血调经,补而不滞[25]。整个方剂既能滋养肾脏又能调理肝脾,具有滋而不腻、温而不燥的特点,旨在滋养冲任二脉,促进气血旺盛,令月事周期有序而常[26-27]。

研究结果显示,归肾丸化裁能够显著改善 PCOS 大鼠的动情周期紊乱、降低卵巢指数、恢复卵巢结构。具体而言,经过 21 d 的来曲唑处理后,PCOS 模型组大鼠的动情周期明显紊乱,卵巢指数增加,且卵巢组织呈现多囊性改变。然而,经过



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

图 7 各组对 PCOS 大鼠卵巢组织炎症通路相关蛋白表达的影响

21 d的归肾丸化裁治疗后，大鼠的动情周期恢复正常，卵巢指数显著下降，卵巢组织中囊性卵泡和闭锁性卵泡减少，颗粒细胞层结构趋向正常。这表明归肾丸化裁能够有效改善PCOS大鼠的卵巢功能障碍，恢复正常的卵巢结构。

此外，归肾丸化裁还对PCOS大鼠的血清激素水平产生了显著影响。与模型组相比，归肾丸化裁组大鼠的血清T和LH水平显著降低，而促卵泡激素(FSH)水平显著升高。这说明归肾丸化裁可以通过调节下丘脑－垂体－卵巢轴的功能，改善PCOS大鼠的内分泌失调，从而促进正常的排卵周期。这种调节作用可能是通过归肾丸化裁中的多种中药成分协同作用，共同调节激素分泌和代谢，进而恢复卵巢的正常功能[28]。

最后，研究还发现归肾丸化裁具有显著的抗炎作用。归肾丸化裁能够显著降低PCOS大鼠血清和卵巢组织中的TNF－α、IL－6和IL－1β水平。进一步的分子生物学研究表明，归肾丸化裁可以显著降低卵巢组织中TLR4 mRNA和蛋白的表达水平，以及NF－κB p65和IκBα的磷酸化水平。这些结果提示，归肾丸化裁可能通过抑制TLR4/NF－κB信号通路的激活，减少炎症因子的产生，从而改善PCOS大鼠的卵巢炎症状态。这一机制的发现为理解归肾丸化裁的抗炎作用提供了新的视角，也为开发靶向TLR4/NF－κB信号通路的新型疗法提供了理论依据[29－30]。

综上所述，归肾丸化裁能够有效改善PCOS大鼠的卵巢形态异常，调节血清激素水平，并通过调控TLR4/NF－κB信号通路减轻卵巢组织内的炎症反应。这些发现为该中药配方作为潜在的PCOS治疗手段提供了实验依据。未来的研究可以进一步探索其作用的具体机制，并评估其在临床应用中的安全性和有效性。考虑到PCOS的复杂性和个体差异性，还需要更多的临床试验来验证这些发现，并确定最佳的治疗方案和剂量范围。此外，深入探讨中药配方中各个成分的具体作用机制将有助于更好地理解其整体疗效，为开发更为有效的治疗方法提供科学依据。

参考文献

[1] TEEDE H J, TAY C T, LAVEN J J E, et al. Recommendations from the 2023 international evidence－based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2023, 108(10): 2447－2469.
[2] 杨宏，张振，付旭锋. 来曲唑诱导大鼠多囊卵巢综合征模型的肠道菌群分析[J]. 中国实验动物学报，2024，32(5)：585－591.
[3] 刘雯星，陈怡，黄缨，等. 基于MAPK/ERK通路探讨益肾调经丸对大鼠多囊卵巢综合征的作用和机制研究[J]. 陕西中医，2024，45(1)：23－28.
[4] 高玲，龙宇航，黄荷凤. 多囊卵巢综合征加重心血管损伤新机制研究[J]. 中华内分泌代谢杂志，2024，40(4)：275－282.
[5] 廖鑫，黄琦，张琳，等. 多囊卵巢综合征与代谢异常[J]. 中华糖尿病杂志，2024，16(3)：371－376.
[6] 朱万龙，刘鑫，李梦雅，等. 降血糖药物治疗多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 医药导报，2022，41(8)：1157－1163.
[7] 黄进格，张健，项瑞君，等. 基于AGE－RAGE信号通路探讨坤泰胶囊治疗多囊卵巢综合征模型大鼠的作用机制[J]. 中国中药杂志，2024，49(4)：1082－1090.
[8] 宋小彪，金智生，陈彦旭，等. 2型糖尿病并发多囊卵巢综合征与肠道菌群相关性的研究进展[J]. 中国微生态学杂志，2023，35(6)：741－744.
[9] 陈旭，王昕. 中医滋阴潜阳法对多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠PI3K/Akt信号通路、性激素及胰岛素相关指标的影响[J]. 中华中医药学刊，2024，42(2)：23－28.
[10] 钱诚，叶利群. 滋肾调肝活血调周法对多囊卵巢综合征伴不孕患者卵巢血流动力学参数的影响[J]. 中国妇幼保健，2022，37(24)：4645－4649.
[11] 王阳，刘艳霞，佟庆，等. 基于TLR－4/NF－κB信号通路探讨归术益坤方联合粪菌移植对多囊卵巢综合征大鼠的治疗作用[J]. 世界中西医结合杂志，2023，18(5)：855－861.
[12] GUAN C, ZAHID S, MINHAS A S, et al. Polycystic ovary syndrome: a "risk－enhancing" factor for cardiovascular disease[J]. Fertil Steril, 2022, 117(5): 924－935.
[13] 吕桂娇，马铭泽，史丽萍，等. 基于数据可视化的中医药治疗青春期多囊卵巢综合征的症－证－方－药及中药药性网络研究[J]. 中医药导报，2023，29(6)：153－158.
[14] DI LORENZO M, CACCIAPUOTI N, LONARDO M S, et al. Pathophysiology and nutritional approaches in polycystic ovary syndrome (PCOS): a comprehensive review[J]. Curr Nutr Rep, 2023, 12(3): 527－544.
[15] 孙淼，祝鑫瑜，孟小钰，等. 基于LPS/TLR4/NF－κB信号通路探讨中药治疗多囊卵巢综合征慢性低度炎症研究进展[J]. 中华中医药学刊，2021，39(8)：128－132.
[16] 李玲，程玲，李林珏，等. 程玲运用中药治疗多囊卵巢综合征伴高雄激素血症诊疗思路[J]. 陕西中医，2023，44(2)：237－240，244.
[17] 曹琳果，李艳青，高蕊，等. 中医药干预多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 中国性科学，2023，32(11)：128－131.
[18] 鹿潇柳，相珊，连方. 中医药干预肠道菌群影响多囊卵巢综合征机制研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志，2024，44(4)：366－370.
[19] 于委，杜鑫. 基于月经周期的中药汤剂对多囊卵巢综合征患者性激素水平、妊娠结局的影响[J]. 陕西中医，2021，42(1)：29－32.
[20] 宁鹏，陈晓红，唐宏亮，等. 基于中医传承计算平台探析广西地区多囊卵巢综合征的证候特点及中医药治疗的组方规律[J]. 广西医学，2023，45(23)：2836－2841.
[21] 宁雪梅，李天梅，朱梓齐，等. 中医药治疗多囊卵巢综合征相关通路研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2024，26(7)：184－189.
[22] 陈秀榕，李康梅，刘倩菁，等. 多囊卵巢综合征伴自身免疫性甲状腺疾病的发病机制及中医药治疗的研究进展[J]. 西部中医药，2022，35(12)：159－162.
[23] 李荣秀. 滋肾调肝活血调周法对多囊卵巢综合征患者的临床疗效分析[J]. 系统医学，2021，6(3)：129－131.
[24] 李晓红，李芳，龙旭，等. 新加归肾丸联合雌二醇片/雌二醇地屈孕酮片对卵巢早衰患者卵巢功能、Kupperman评分的影响[J]. 中国性科学，2024，33(2)：152－156.
[25] 孟依临，郭霞珍，王彤. 补肾疏肝法治疗多囊卵巢综合征心得[J]. 国际中医中药杂志，2022，44(9)：1066－1068.
[26] 黎源，靳艳文，李健芳. 加味归肾丸联合耳穴压豆对卵巢储备功能减退合并不孕症患者的治疗效果[J]. 广西医学，2023，45(17)：2093－2096.
[27] 张玉洁，祁志荣，胡瑞雪. 疏肝补肾汤联合腹腔镜手术对难治性多囊卵巢综合征患者卵巢体积、血清HOXA10表达及妊娠率的影响[J]. 广州中医药大学学报，2024，41(5)：1195－1201.
[28] 马丽亚，杜婧雯，张童，等. 金匮肾气丸对多囊卵巢综合征模型大鼠的改善作用及机制研究[J]. 中国药房，2022，33(23)：2869－2873.
[29] 梁爽爽，朱莎，刘妮英，等. 加味芍药甘草汤基于Toll样受体4/核因子κB信号通路对多囊卵巢综合征大鼠妊娠结局及免疫机制的影响[J]. 河北中医，2024，46(3)：433－438.
[30] 王姚鳗，高磊，张跃辉. 基于数据挖掘探讨中药复方专利治疗多囊卵巢综合征的用药规律[J]. 国际中医中药杂志，2024，46(3)：377－382.

归肾丸化裁通过调控 TLR4/NF－κB 信号通路改善 PCOS 大鼠炎症反应的研究

（正文见 140－145 页）

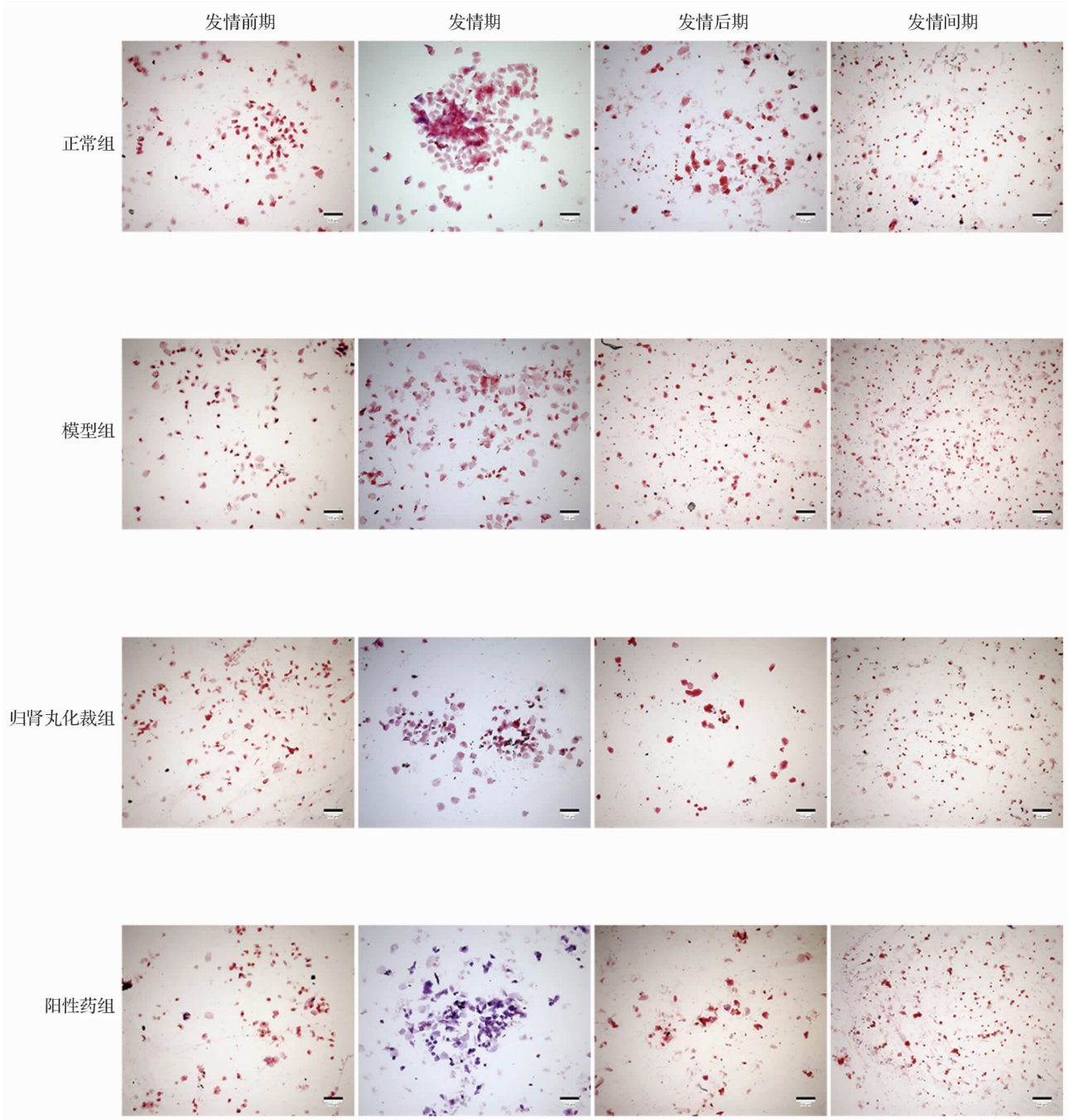


图 1　大鼠动情周期各时期阴道脱落细胞形态变化（HE，100 ×）

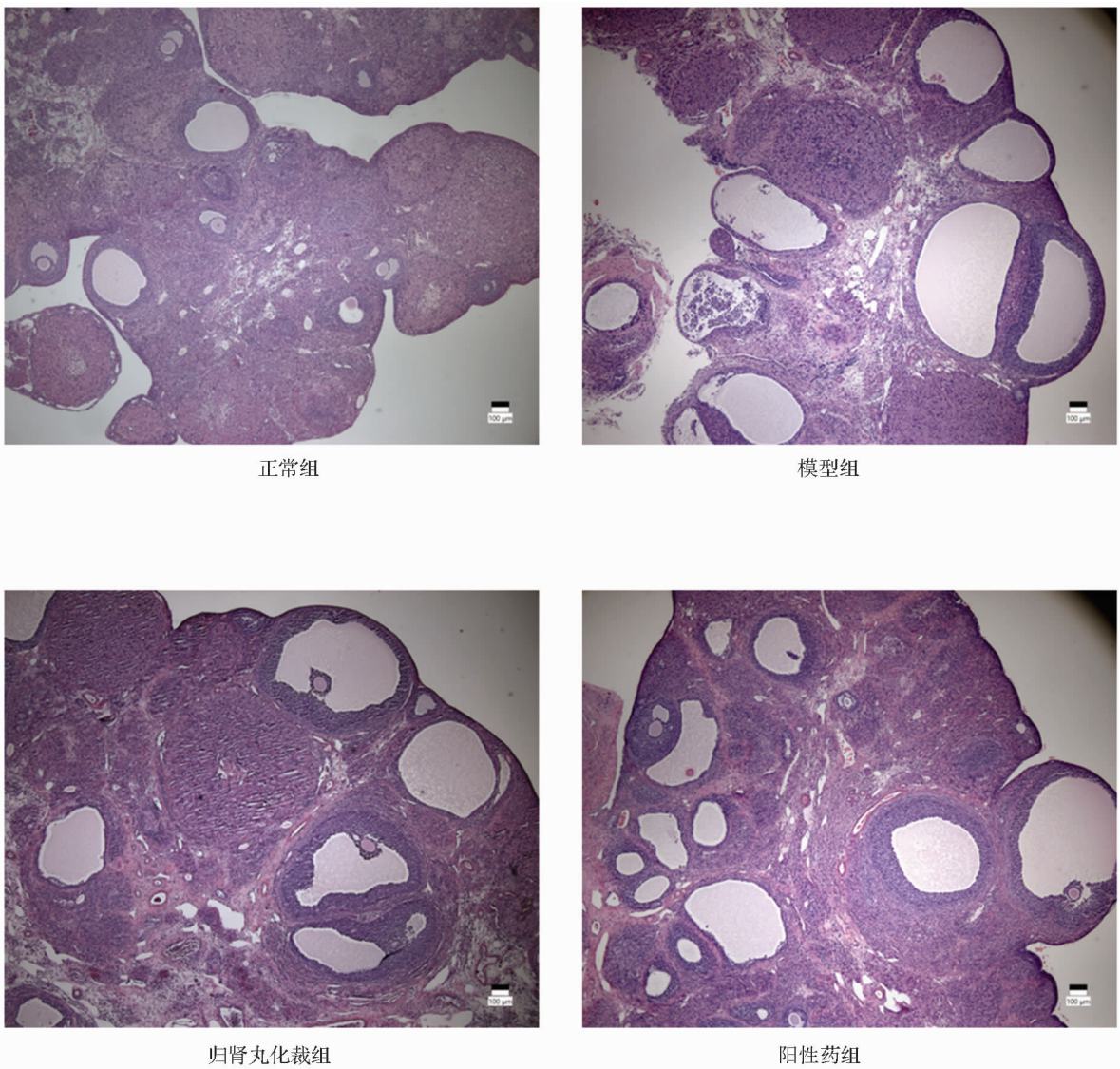


图2 各组PCOS大鼠卵巢病理形态的影响(HE,40×)