

· 药理 ·

解郁化痰法对多囊卵巢综合征大鼠肝脏组织 IRS-1 及 IRS-2 表达的影响

王维斌¹, 黄娜², 张萍¹, 俞洁^{1*}

(1. 福建中医药大学, 福州 350122; 2. 丽水市第二人民医院, 浙江 丽水 323000)

[摘要] **目的:** 观察二陈汤、柴胡疏肝散、二陈汤+柴胡疏肝散及二甲双胍对多囊卵巢综合征(PCOS)模型大鼠的肝脏组织胰岛素受体底物-1(IRS-1)、胰岛素受体底物-2(IRS-2)mRNA 和蛋白表达的影响, 探讨解郁化痰法改善多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的生物学机制。**方法:** 通过颈背部皮下注射脱氢表雄酮(DHEA)复制多囊卵巢综合征模型大鼠。将造模成功大鼠分为模型组、二陈汤组(9.135 g·kg⁻¹), 柴胡疏肝散组(6.615 g·kg⁻¹), 二陈汤+柴胡疏肝散组(合方组, 9.135 g·kg⁻¹+6.615 g·kg⁻¹), 二甲双胍组(0.158 mg·kg⁻¹), 并以正常组作为对照。给予相应药物灌胃, 每日1次, 连续4周。于末次给药后, 麻醉处死, 分离大鼠卵巢、肝脏组织, 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组大鼠血清睾酮(T), 雌二醇(E₂)激素水平, 苏木素-伊红(HE)染色检测各组大鼠卵巢组织病理学变化, 采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠肝脏组织的 IRS-1、IRS-2 mRNA 及蛋白表达水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠血清 T 水平显著上升, E₂ 水平显著下降(P<0.01), 卵巢组织病理可见大量囊状扩张卵泡, 颗粒细胞层较薄, 黄体少见, 肝脏组织 IRS-1、IRS-2 mRNA 及蛋白水平显著下降(P<0.01); 与模型组比较, 各给药组血清 T 水平显著下降, E₂ 水平显著上升(P<0.01), 卵巢组织病理可见囊状扩张卵泡数目减少, 颗粒细胞层增厚, 可见各级卵泡, 二陈汤组 IRS-1、IRS-2 mRNA 及蛋白表达明显上升(P<0.05, P<0.01); 柴胡疏肝散组 IRS-1 mRNA 及蛋白表达显著上升(P<0.01), IRS-2 mRNA 及蛋白表达有上升趋势; 合方组 IRS-1 mRNA 及蛋白表达和 IRS-2 mRNA 表达明显上升(P<0.05), IRS-2 mRNA 有上升趋势; 二甲双胍组 IRS-1 蛋白和 IRS-2 mRNA 和蛋白表达显著上调(P<0.01), IRS-1 mRNA 有上升趋势。**结论:** 二陈汤改善 PCOS 模型大鼠的胰岛素抵抗效果较柴胡疏肝散更为显著, 其机制可能与调控胰岛素信号转导通路的关键信号分子 IRS-1、IRS-2 mRNA 和蛋白表达水平有关。

[关键词] 二陈汤; 柴胡疏肝散; 多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 胰岛素信号通路

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0045-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200236

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191009.0944.004.html>

[网络出版时间] 2019-10-09 09:57

Effect of Method of Relieving Depression and Resolving Phlegm on Expression of IRS-1 and IRS-2 in Liver Tissues of Rats with Polycystic Ovary Syndrome

WANG Wei-bin¹, HUANG Na², ZHANG Ping¹, YU Jie^{1*}

(1. Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. Lishui Second People's Hospital, Lishui 323000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Erchentang, Chaihu Shugansan, Erchentang + Chaihu Shugansan and metformin on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) mRNA and protein expression in liver tissues of model rats with polycystic ovary syndrome (PCOS), and to explore the biological mechanism of relieving depression and resolving phlegm to improve insulin resistance of polycystic ovary syndrome. **Method:** A model of polycystic ovary syndrome was replicated in rats by subcutaneous

[收稿日期] 20190402(020)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603540)

[第一作者] 王维斌, 在读硕士, 从事内分泌及代谢疾病的中医证研究, E-mail: 515048049@qq.com

[通信作者] * 俞洁, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事内分泌及代谢疾病的中医证研究, E-mail: 415538196@qq.com

injection of dehydroepiandrosterone (DHEA) under the neck and back. The control group was the normal group, The model rats were divided into model group, Erchentang group ($9.135 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Chaihu Shugansan group ($6.615 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Erchentang + Chaihu Shugansan group (Hefang group, $9.135 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} + 6.615 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and metformin group ($0.158 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The corresponding drugs were given by intragastric administration once a day for 4 weeks. The ovarian and liver tissues of rats were isolated, and serum testosterone (T) and estradiol (E_2) hormone levels in each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the histopathological changes of ovary in each group were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining, IRS-1 and IRS-2 mRNA and protein expression levels in rat liver tissues were detected by quantitative real-time fluorescence PCR (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with normal group, the serum T and E_2 level of model group were significantly decreased ($P < 0.01$), the histology of ovary showed a large number of saccate dilated follicles, thin granular cell layer and rare corpus luteum, IRS-1, IRS-2 mRNA and protein levels in liver tissues decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, the serum T and E_2 level of each group significantly decreased ($P < 0.01$), histopathology of ovarian tissue showed that the number of saccular dilated follicles decreased, and the granulosa cell layer thickened, showing follicles of all levels, IRS-1, IRS-2 mRNA and protein expression were significantly increased in Erchentang group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), IRS-1 mRNA and protein expression were significantly increased in Chaihu Shugansan group ($P < 0.01$), IRS-2 mRNA and protein expression were on the rise, IRS-1 mRNA and protein expression and IRS-2 mRNA expression were significantly increased in the Hefang group ($P < 0.05$), while IRS-2 mRNA was on the rise, IRS-1 protein and IRS-2 mRNA and protein expression were significantly increased in metformin group ($P < 0.01$), while IRS-1 mRNA showed an upward trend. **Conclusion:** Erchentang improved the insulin resistance of PCOS model rats more significantly than Chaihu Shugansan, and its mechanism may be related to IRS-1, IRS-2 mRNA and protein expression levels of key signaling molecules regulating insulin signal transduction pathway.

[**Key words**] Erchentang; Chaihu Shugansan; polycystic ovarian syndrome; insulin resistance; insulin signaling pathway

多囊卵巢综合征(PCOS)是育龄期女性常见的内分泌紊乱综合征,以长期持续无排卵、不孕、高雄激素血症(HA)和胰岛素抵抗(IR)为主要特征,在女性中发病率约为5%~10%^[1]。近年来临床研究调查显示,约有50%~70%的PCOS患者伴有IR^[2],IR在PCOS的发病机制中发挥着重要作用。IR是PCOS的生殖功能障碍及糖代谢异常的主要病理基础,其导致的代偿性的高胰岛素血症容易破坏卵巢功能,加重PCOS的不孕、闭经等症状,甚至远期还会并发糖尿病、冠心病、高血压等疾病,因此,改善IR对于治疗PCOS尤为重要。现代研究显示,胰岛素后受体信号转导通路障碍是促使PCOS发生IR的主要原因^[3-5],也是当前的研究热点之一。目前临床上常用胰岛素增敏剂二甲双胍等治疗PCOS的IR,但西药的不良反应较大,长期治疗不能为患者所接受^[6]。近年来中医药防治PCOS已经取得了良好的疗效,中医药具有多靶点、多环节、多途径的特点,可以同时调节PCOS患者内分泌与代谢紊乱,且相对安全^[7-9]。由于PCOS患者多存在有肝郁痰阻

的临床表现^[10],研究表明运用解郁化痰法治疗PCOS具有显著疗效^[11]。然而,目前解郁化痰法治疗PCOS的具体作用机制尚不明确。二陈汤源于《太平惠民和剂局方》,是化痰的基础方剂,柴胡疏肝散出自《医学统旨》,为疏肝解郁之代表方剂,二方均分别为临床上用于化痰及疏肝的基础方,临床上常在此二方的基础上进行加减用药治疗,并且疗效显著^[12-14]。故本研究以此二方为主,通过单独使用二陈汤、柴胡疏肝散及二方联合运用,从胰岛素信号转导通路探究中医药解郁化痰法治疗PCOS-IR的作用靶点,为中医药防治PCOS-IR提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 56只21日龄SPF级雌性SD大鼠,体质量(50 ± 10)g,由上海斯莱克动物有限责任公司提供,许可证号SYXK(闽)2014-0001。饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级屏障系统,饲养环境恒温恒湿,温度(20 ± 2)℃,湿度40%~60%,12h周期性光照环境,普通饲料喂养。除实验期外

自由饮食、饮水。本实验所有相关动物实验操作均按照动物伦理审查标准严格进行。

1.2 药物及试剂 二陈汤组成根据《太平惠民和剂局方》二陈汤的原方,处方:陈皮 15 g,姜半夏 15 g,茯苓 9 g,炙甘草 4.5 g。柴胡疏肝散组成根据《景岳全书》柴胡疏肝散的原方,处方:北柴胡 6 g,白芍 4.5 g,枳壳 4.5 g,川芎 4.5 g,醋炒陈皮 6 g,香附 4.5 g,炙甘草 1.5 g。二陈汤 + 柴胡疏肝散组(合方组)为前述两方合用。上述中药干预采用浓缩液,由福建中医药大学附属第三医院药剂科制备,严格按照 2015 年版《中国药典》鉴定规范,4 ℃ 条件下保存备用。二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,0.5 g/片,批号 H20023370);脱氢表雄酮(DHEA,上海麦克林生化科技有限公司,批号 C10098326);注射用大豆油剂(江西益普生药业有限公司,500 g/瓶,批号 20160602);大鼠睾酮(T),雌二醇(E₂)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号均为 1901R);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20180727);逆转录试剂盒,SYBR 试剂盒(日本 TAKARA 公司,批号分别为 AI21033A, AI12394A);兔抗胰岛素受体底物(IRS)-1 一抗,兔抗 IRS-2 一抗,兔抗 β-肌动蛋白(β-actin)一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab52167, ab134101, ab8227);羊抗兔二抗(英国 MDL 公司,批号 MD2141);PCR 引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
β-actin	上游 5'-CTCTGTGTGGATTGGTGGCT-3'	136
	下游 5'-AGCTCAGTAACAGTCCGCCT-3'	
IRS-1	上游 5'-CTGCACTCACCTAGACCCA-3'	143
	下游 5'-TGACTCCGAAATTCACGCCG-3'	
IRS-2	上游 5'-GCATGTTCCAACCAACGCT-3'	197
	下游 5'-GAGTGTACTCCATCAGCCCG-3'	

1.3 仪器 Premium U570 型超低温冰箱,5424R 型微型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);EG1150H 型生物组织包埋机,Histocore Pearl 型全封闭组织脱水机,RM2245 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);SHP-250 型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);QuantStudio6 Flex 型实时荧光定量 PCR

(Real-time PCR) 仪(美国 Applied Biosystems 公司);Nandrop2000 型超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);170-4070 型转膜仪,170-3940 型半干转印槽,170-3930 型垂直电泳系统,Chemi Dox™ XRS + 型化学发光凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模 参照张晓薇等^[15]的改良法,选取 56 只 21 日龄 SPF 级 SD 雌性大鼠,适应性喂养 2 d 后,按体质量随机分为模型组(44 只)和正常组(12 只),模型组于颈背部皮下注射 DHEA 60 mg·kg⁻¹ 及注射用大豆油剂 0.2 mL,连续 20 d。正常组于颈背部皮下注射大豆油剂 0.2 mL,连续 20 d。于造模第 10 天后,行 2 个性周期(10 d)的大鼠阴道脱落细胞涂片,观察大鼠动情周期的变化,并定期观察体质量和摄食情况。于造模结束后,从正常组、模型组各取出 4 只,麻醉处死,分离卵巢组织,用 4% 多聚甲醛固定后,行 HE 染色观察卵巢组织病理学变化,以判定模型建立是否成功。

2.2 模型评价 造模第 10 天开始观察大鼠阴道脱落细胞变化情况,连续观察 2 个性周期。正常组阴道涂片按照动情间期、动情前期、动情期、动情后期规律进行;模型组阴道涂片则以黏液和白细胞为主,动情间期延长,失去规律动情周期。于造模结束后,从正常组及模型组各取出 4 只处死,取卵巢组织,行 HE 染色观察卵巢形态学变化,正常组镜下可见各级卵泡,成熟卵泡结构完整,有卵丘、卵细胞及放射冠,卵巢颗粒细胞层多为 8~9 层;模型组镜下可见卵巢呈多囊样变,无成熟卵泡,无卵母细胞及卵丘,卵巢颗粒细胞层多为 1~3 层,且排列稀疏,少见黄体,证明 PCOS 模型建立成功。

2.3 分组及给药 将成模后的大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为模型组、二陈汤组、柴胡疏肝散组、合方组、二甲双胍组,并以正常组(8 只)作为对照。造模结束后开始灌胃给药,按照人与动物剂量比例换算,大鼠给药剂量为人剂量的 6 倍^[16-18],二陈汤组给予二陈汤 9.135 g·kg⁻¹;柴胡疏肝散组给予柴胡疏肝散 6.615 g·kg⁻¹;合方组给予二陈汤 + 柴胡疏肝散,二方剂量相加 9.135 g·kg⁻¹ + 6.615 g·kg⁻¹;二甲双胍组给予二甲双胍 0.158 mg·kg⁻¹,正常组及模型组予等体积灭菌饮用水,每天 1 次,分别连续干预 4 周。

2.4 标本取材及处理 于末次给药后,下午 8:00 开始禁食不禁水。次日称体质量后以 10% 水合氯

醛腹腔注射麻醉,腹主动脉采血,取卵巢、肝脏组织,用预冷的生理盐水洗去组织表面残血,将右侧卵巢组织置于 2 mL 冻存管内, -80 °C 保存备用,左侧卵巢组织置于 4% 多聚甲醛中固定,用于 HE 染色。将肝脏组织切成正方形小块,置于 2 mL 冻存管内, -80 °C 保存备用。

2.5 ELISA 检测大鼠血清中 T 和 E₂ 的含量 大鼠麻醉后腹主动脉取血于促凝管,静置 4 h, 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清。先加样品稀释液 40 μL,再加待测样品 10 μL,37 °C 孵育 30 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min。每个反应孔加酶标试剂 50 μL,37 °C 孵育 30 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min。每孔加显色剂 A 50 μL,再加显色剂 B 50 μL,轻轻震荡混匀,37 °C 避光显色 15 min。最后加终止液 50 μL,在酶标仪 450 nm 波长处检测各孔的吸光度 A。

2.6 HE 染色观察大鼠卵巢组织病理学变化 选取卵巢的最大平面进行石蜡包埋,蜡块分别以 4 μm 厚度进行连续切片,HE 染色并观察,具体染色时间为苏木素染色 5 min,伊红染色 30 s。

2.7 Real-time PCR 检测大鼠肝脏组织中 IRS-1 和 IRS-2 mRNA 表达 取肝脏组织进行匀浆,trizol 1 mL 提取肝脏组织总 RNA,用 RNA 紫外分光光度计检测肝脏总 RNA 浓度和纯度,取总 RNA 逆转录为 cDNA。预变性 95 °C 30 s;PCR 反应:95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 40 个循环。以 β-actin 为内参基因, 2^{-ΔΔC_t}法计算 mRNA 表达水平。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肝脏组织中 IRS-1 和 IRS-2 蛋白表达 提取肝脏组织中总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,根据蛋白浓度,调整上样量,以 40 μg/孔的蛋白量进行上样电泳,于湿转槽内将蛋白转印至 PVDF 膜,经 IRS-1, IRS-2 一抗 (1:1 500),β-actin 一抗 (1:5 000) 4 °C 孵育过夜,二抗 (1:2 000) 37 °C 孵育 1 h, ECL 发光,于凝胶成像分析系统中采集 PVDF 膜发光图像,并测定条带灰度值,以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值作为统计数据进行分析。

2.9 统计学方法 所得数据采用 SPSS 21.0 统计学软件分析,符合正态分布计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用 One-way ANOVA 进行统计分析,满足方差齐性检验时,采用 LSD 方法分析比较组间差异;方差不齐时,两两比较选择 Dunnett *T*₃ 方法;当不符合正态性检验时,采用非参数检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计

学意义。

3 结果

3.1 对大鼠体质量, T 及 E₂ 水平变化的影响 用药干预治疗后,各组大鼠体质量无明显差异。与正常组比较,模型组大鼠 T 水平显著上升, E₂ 水平显著下降 (*P* < 0.01);与模型组比较,各给药组 T 水平显著下降, E₂ 水平显著升高 (*P* < 0.01)。见表 2。

表 2 各组方药对大鼠体质量, T 及 E₂ 水平变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effect of each treatment group on changes of body weight, T and E₂ levels in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体质量 /mg	T /mg·L ⁻¹	E ₂ /mg·L ⁻¹
正常	-	269.6 ± 24.6	0.31 ± 0.07	81.55 ± 5.38
模型	-	263.4 ± 13.7	2.50 ± 1.23 ²⁾	47.64 ± 6.53 ²⁾
二陈汤	9.135	272.6 ± 22.9	0.41 ± 0.12 ⁴⁾	74.51 ± 3.72 ⁴⁾
柴胡疏肝散	6.615	262.8 ± 22.9	0.56 ± 0.20 ⁴⁾	79.48 ± 13.16 ⁴⁾
合方	15.75	268.5 ± 18.8	0.45 ± 0.18 ⁴⁾	78.77 ± 9.23 ⁴⁾
二甲双胍	1.575 × 10 ⁻⁴	265.8 ± 14.6	0.43 ± 0.16 ⁴⁾	76.24 ± 5.94 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01 (表 3, 4 同)。

3.2 对大鼠卵巢组织病理学的影响 正常组大鼠卵巢组织镜下可见多个黄体及不同发育阶段的卵泡,颗粒细胞呈多层排列,多为 8 ~ 9 层,形态完整。模型组大鼠可见大量的囊状扩张卵泡,囊状卵泡内卵母细胞或放射冠消失,间质细胞增生,卵巢颗粒细胞层数减少,多为 2 ~ 3 层,排列疏松,各级卵泡数目较少。与模型组比较,各用药组可见囊状卵泡数量减少,卵泡颗粒细胞层较模型组增厚,多为 5 ~ 6 层,黄体数量增多,可见有卵丘的成熟卵泡及各级卵泡。见图 1。

3.3 对大鼠肝脏组织中 IRS-1 和 IRS-2 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中 IRS-1, IRS-2 mRNA 表达水平显著下降 (*P* < 0.01);与模型组比较,二陈汤组、柴胡疏肝散组及合方组 IRS-1 mRNA 表达水平明显上升 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),以二陈汤组上升最为明显;二陈汤组和二甲双胍组 IRS-2 mRNA 表达水平显著上升 (*P* < 0.01),柴胡疏肝散组及合方组 IRS-2 mRNA 无显著性差异。见表 3。

3.4 对大鼠肝脏组织 IRS-1 及 IRS-2 蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中 IRS-1, IRS-2 蛋白表达明显下降 (*P* < 0.05, *P* < 0.01);与模型组比较,二陈汤组、二甲双胍组及

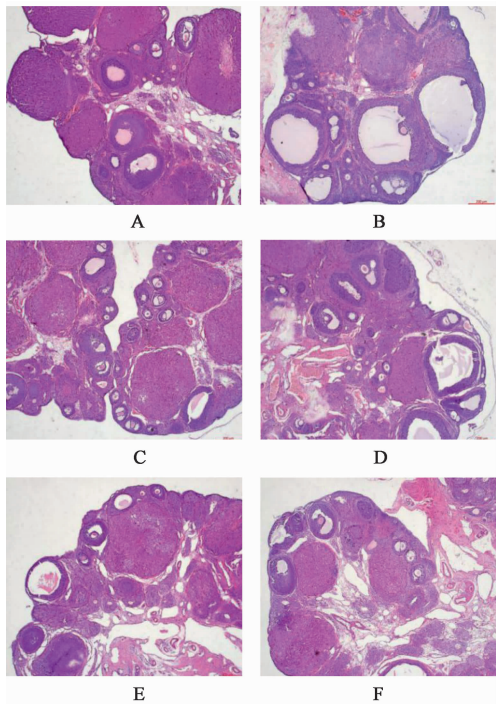


图 1 各组方药对大鼠卵巢组织病理学的影响 (HE, ×50)

Fig. 1 Effect of each treatment group on histopathology of ovary of rats (HE, ×50)

表 3 各组方药对大鼠肝脏组织 IRS-1, IRS-2 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of each treatment group on IRS-1 and IRS-2 mRNA expression in liver of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IRS-1	IRS-2
正常	-	1.059 ± 0.224	1.033 ± 0.284
模型	-	0.216 ± 0.059 ²⁾	0.384 ± 0.081 ²⁾
二陈汤	9.135	0.875 ± 0.173 ⁴⁾	1.193 ± 0.308 ⁴⁾
柴胡疏肝散	6.615	0.508 ± 0.137 ⁴⁾	0.841 ± 0.429
合方	15.75	0.552 ± 0.164 ³⁾	0.732 ± 0.438
二甲双胍	1.575 × 10 ⁻⁴	0.322 ± 0.087 ²⁾	2.042 ± 0.798 ⁴⁾

合方组 IRS-1, IRS-2 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 柴胡疏肝散组 IRS-1 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 4。

4 讨论

近年来,多囊卵巢综合征的患病率呈现逐年升高趋势,已成为危害育龄期妇女生活质量和心理健康的严重疾病之一。研究表明,IR 是 PCOS 的关键环节,在 PCOS 的发病中占据着重要的地位,是公认导致月经周期异常及不孕的关键原因^[19-23]。目前大多数学者认为 PCOS 发生 IR 的主要原因是由于

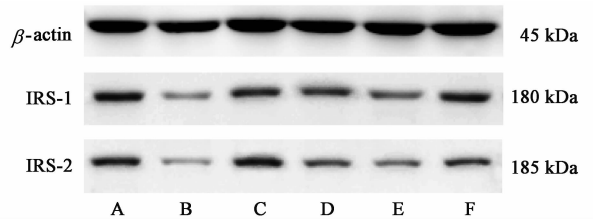


图 2 PCOS 大鼠肝脏组织 IRS-1, IRS-2 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of IRS-1 and IRS-2 protein expression in PCOS rats liver tissues

表 4 各组方药对大鼠肝脏组织 IRS-1, IRS-2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of each treatment group on expression levels of IRS-1, IRS-2 proteins in rats liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IRS-1/β-actin	IRS-2/β-actin
正常	-	0.383 ± 0.062	0.358 ± 0.150
模型	-	0.224 ± 0.066 ²⁾	0.161 ± 0.059 ¹⁾
二陈汤	9.135	0.499 ± 0.120 ⁴⁾	0.340 ± 0.142 ³⁾
柴胡疏肝散	6.615	0.380 ± 0.144 ³⁾	0.248 ± 0.095
合方	15.75	0.372 ± 0.062 ³⁾	0.361 ± 0.136 ³⁾
二甲双胍	1.575 × 10 ⁻⁴	0.450 ± 0.073 ⁴⁾	0.404 ± 0.035 ⁴⁾

胰岛素受体信号通路障碍所致^[24]。而胰岛素受体底物 (IRS) 作为调节胰岛素信号通路的关键信号分子,对于 IR 的发生和发展至关重要,其中 IRS-1 与 IRS-2 是调节胰岛素信号传导途径的主要船坞蛋白,其蛋白表达和酪氨酸磷酸化异常是发生 IR 的主要原因^[25]。

中医学认为 PCOS 的发病与肾、脾、肝三脏功能失调有关,由于先天肾气不足,后天脾失健运,肝气郁结,导致气机阻滞,痰湿内生,壅塞胞宫而发病^[26]。可见 PCOS 的病因病机是以肾虚为本,脾虚、肝郁、痰湿为标,虚实夹杂,本虚标实。因此,肝郁和痰湿是 PCOS 发病的基本病因病机之一,并且中医学认为,肝郁和痰湿也是引起 IR 发生的主要病理因素^[27-32]。

二陈汤源于《太平惠民和剂局方》,是化痰的基础方剂,方中姜半夏、陈皮、茯苓、炙甘草四药合用,共奏燥湿化痰,理气和中之功。柴胡疏肝散出自《医学统旨》,为疏肝理气之代表方剂,原方由陈皮、北柴胡、川芎、香附、枳壳、白芍、炙甘草等药组成,共奏疏肝理气、活血止痛之功。二者方药分别为治疗痰湿、肝郁的经典代表方剂。因此,本研究通过观察二陈汤、柴胡疏肝散、二陈汤 + 柴胡疏肝散及二甲双胍对 DHEA 复制的 PCOS 模型大鼠的肝脏组织 IRS-

1, IRS-2 mRNA 和蛋白表达的影响, 探讨解郁化痰法治疗多囊卵巢综合征的生物学机制。

本实验研究结果显示, 模型组大鼠血清 T 水平显著上升, E₂ 水平明显下降, 卵巢组织病理可见大量囊状扩张卵泡, 颗粒细胞层较薄, 黄体少见, 表明 PCOS 模型建立成功。经过用药治疗后, 与模型组比较, 各组方药血清 T 水平明显下降, E₂ 水平明显升高, 卵巢组织病理可见囊状扩张卵泡数目减少, 颗粒细胞层增厚, 可见各级卵泡, 故实验结果表明, 在 PCOS 模型大鼠中存在有肝郁痰阻的病理基础。与正常组比较, 模型组大鼠的 IRS-1, IRS-2 mRNA 及蛋白表达显著下调, IRS-1 与 IRS-2 是调节胰岛素信号传导途径的主要蛋白, 其蛋白表达变化是发生 IR 的主要原因。本实验表明二陈汤和柴胡疏肝散均可上调 PCOS 模型大鼠的 IRS-1, IRS-2 mRNA 和蛋白表达水平, 并且通过实验结果对比发现, 二陈汤化痰法调控 PCOS 模型大鼠的 IRS-1, IRS-2 mRNA 和蛋白效果较柴胡疏肝散解郁法更为显著, 表明了痰是导致 PCOS 发生 IR 的主要病理因素。现代研究显示, 痰不仅是 PCOS 发病的关键病因病机, 也是 PCOS 发病过程中的病理产物^[33], 说明了痰在 PCOS 发病和后期症状表现中都占据着重要作用。临床调查研究发现, 有 50% ~ 70% 的 PCOS 患者伴有 IR, 其发生原因可能是与痰相关。化痰法能够通过调控 PCOS 模型大鼠肝脏组织的 IRS-1, IRS-2 mRNA 和蛋白表达水平, 从而影响 PCOS 胰岛素抵抗, 改善 PCOS 症状。现代研究也证实了胰岛素抵抗与痰密切相关^[34-35]。中医学认为, 胰岛素抵抗发生的机制是由于过食肥甘厚腻, 困遏脾土, 脾失健运, 不能为胃行其津液, 水谷不化, 湿浊内生, 气机阻滞, 水谷精微不能正常布散, 停滞体内而致。而解郁法也可改善 PCOS, 但其作用途径可能还通过其他方面实现, 有待于进一步深入研究。

综上所述, DHEA 诱导的 PCOS 模型大鼠中存在有肝郁痰阻的病理机制, 二陈汤化痰法改善 PCOS 的 IR 效果较柴胡疏肝散解郁法更为明显, 二陈汤能够通过上调 PCOS 模型大鼠的肝脏组织 IRS-1, IRS-2 mRNA 和蛋白表达水平, 改善 PCOS 模型大鼠的胰岛素抵抗, 故从以方测证的角度, 说明了痰证可能是导致 IR 发生的主要原因, 化痰法治疗 PCOS 模型大鼠的胰岛素抵抗可能是通过影响胰岛素信号通路的相关信号分子来发挥其作用。

[参考文献]

- [1] Moreira S, Soares E, Tomaz G, et al. Polycystic ovary syndrome: a psychosocial approach[J]. Acta Med Port, 2010, 23(2): 237.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Mukherjee S, Maitra A. Molecular & genetic factors contributing to insulin resistance in polycystic ovary syndrome[J]. Ind J Med Res, 2010, 131: 743-760.
- [5] ZHANG H Y, ZHANG Y F, HAN Y K, et al. Activation and significance of the PI3K/PKB pathway in endometrium with polycystic ovary syndrome patients[J]. China J Obstet Gynecol, 2012, 47(1): 19-23.
- [6] 董焱. 补肾健脾汤治疗多囊卵巢综合征临床观察[J]. 四川中医, 2016, 34(1): 88-89.
- [7] 张文权, 熊文琴. 二甲双胍对多囊卵巢综合征患者心血管疾病风险的影响[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(7): 1001-1002.
- [8] 李娟, 马红霞, 宋金龙, 等. 多囊卵巢综合征脂代谢异常的国内外研究进展及中医药治疗优势探讨[J]. 世界中医药, 2015, 10(7): 1112-1116.
- [9] 彭孟凡, 刘保松, 苗明三. 补肾法治疗多囊卵巢综合征的理论探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 204-209.
- [10] 黄金珠, 李蕴璐, 黄叶芳, 等. 215 例多囊卵巢综合征的中医临床证候分布规律研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7): 1711-1712.
- [11] 陈莉, 王赛莉, 张勤华. 加味导痰汤治疗肝郁痰湿型多囊卵巢综合征患者临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 971-974.
- [12] 王德军, 李路凯, 张辉. 加味二陈汤对肾虚痰湿型多囊卵巢综合征患者卵巢多囊样改变、内分泌及代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 190-195.
- [13] 谢文英, 季书, 尚立芝, 等. 二陈汤加味对 COPD 患者缺氧诱导因子-1 α 及沉默信息调节因子 1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 155-162.
- [14] 赵帅, 蔡海荣, 林黄果, 等. 柴胡疏肝散对代谢综合征肝气郁结证大鼠胰岛素抵抗及 GLUT-4 的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1567-1569.
- [15] 张晓薇, 邴健全, 曾爱群, 等. 脱氢表雄酮诱导多囊卵巢综合征动物模型的研究[J]. 广州医学院学报, 2000, 28(3): 14-18, 91.

- [16] 黄成宝,张斐,陈丹,等. 二陈汤对高脂饮食与 AOM/DSS 诱导的肠道炎症痰证模型大鼠的血清及大肠组织 IL-1 β 、IL-6、CRP 的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5):1105-1107.
- [17] 李生强,李亚婵,梁文娜,等. 柴胡疏肝散对围绝经期综合征肝郁证大鼠模型海马 ERK1/2 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(10):3201-3204.
- [18] 黄娜. 柴胡疏肝散对 PCOS 大鼠的促排卵作用的实验研究[D]. 福州:福建中医药大学, 2018.
- [19] Saremi A, Schwenke D C, Buchanan T A, et al. Pioglitazone slows progression of atherosclerosis in prediabetes independent of changes in cardiovascular risk factors[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2):393-399.
- [20] Khan R A, Baig S G, Siddiq A. Comparative effects of metformin and pioglitazone on lipid profile of rabbits [J]. *Pakistan J Pharmaceutical Sci*, 2015, 28(2):553-555.
- [21] 黄品秀,韦继红. 瘦素与多囊卵巢综合征发病机制的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(8):153-155.
- [22] LIAN F, CHEN C, XIANG S. Improvement of the oocyte quality with electroacupuncture in infertility patients of kidney deficiency pattern [J]. *Chin Acupunct Moxib*, 2015, 35(2):109-113.
- [23] 李翌,华苓. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的新进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(4):358-363.
- [24] 林寒梅,班胜,黄巍,等. 化痰通脉饮对多囊卵巢综合征大鼠 IRS-1-PI3K/Akt 及 NF- κ B 信号串流的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24):140-145.
- [25] TANG C, MAN X, GUO Y, et al. IRS-2 partially compensates for the insulin signal defects in IRS-1^(-/-) mice mediated by miR-33[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(2):123-132.
- [26] 谢敏,李丹,赵爽. 多囊卵巢综合征的病因病机及治疗研究动态[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(1):145-148.
- [27] 李亚,李伟,王晶,等. 抑郁状态与 2 型糖尿病形成各阶段代谢指标的相关性分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(16):1697-1698.
- [28] Atlantis E, Browning C, Sims J, et al. Diabetes incidence associated with depression and antidepressants in the melbour-ne longitudinal studies on healthy ageing (MELSHA) [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2010, 25(7):688-696.
- [29] 金春兰,吴中朝,赵吉平. 从肝论治多囊卵巢综合征探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(6):1379-1381.
- [30] 桑霞,陶莉莉,张玉珍,等. 多囊卵巢综合征临床证型证候分布特点的初步研究[J]. 河南中医学院学报, 2008, 23(2):42-43, 45.
- [31] 刘靖芳,汤旭磊,成建国,等. 多囊卵巢综合征患者肥胖与糖代谢异常关系的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(18):73-76.
- [32] 王从容,刘亚兵,王敬泽,等. 饮食脂肪含量和耐力运动对肥胖鼠胰岛素受体酪氨酸蛋白激酶的影响[J]. 体育科学, 2000, 20(6):51-54.
- [33] 袁小琴,李玉玲. 多囊卵巢综合征中医证候的现代文献研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(5):39-40.
- [34] 刘花,黄兴,黄宇虹. 从痰论治胰岛素抵抗[J]. 西部中医药, 2016, 29(10):47-49.
- [35] 张冬玲. 从痰湿论治胰岛素抵抗[J]. 吉林中医药, 2013, 33(4):333-334.

[责任编辑 孙丛丛]