

引用:周黎阳,陈萍,丁春丽.基于PI3K-Akt-mTOR及PI3K-Akt-GLUT4信号通路探讨芪苓温肾消囊方治疗多囊卵巢综合征大鼠的作用机制[J].中医药导报,2025,31(9):61-67.

基于PI3K-Akt-mTOR及PI3K-Akt-GLUT4 信号通路探讨芪苓温肾消囊方治疗 多囊卵巢综合征大鼠的作用机制*

周黎阳¹,陈 萍²,丁春丽²

(1.河南中医药大学第一临床医学院,河南 郑州 450046;

2.河南中医药大学第一附属医院,河南 郑州 450099)

[摘要] 目的:基于磷酸肌醇3-激酶(PI3K)-蛋白激酶B(Akt)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及PI3K-Akt-葡萄糖转运蛋白4(GLUT4)信号通路探讨芪苓温肾消囊方治疗多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠的作用机制。方法:从65只雌性SD大鼠中随机选10只作为对照组,正常饲料喂养,剩余55只大鼠以来曲唑联合高脂饲料诱导建立PCOS大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、二甲双胍组(0.1 g/kg)、芪苓温肾低剂量组(1.8 g/kg)、芪苓温肾中剂量组(3.6 g/kg)、芪苓温肾高剂量组(7.2 g/kg),每组10只。对照组和模型组大鼠予生理盐水灌胃,其余各组给予对应药物,1次/d,连续21 d。记录各组大鼠体质量。HE染色观察卵巢形态学变化;血糖仪检测空腹血糖(FBG)水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清卵泡刺激激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌激素(E₂)、总睾酮(T)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、空腹胰岛素(FINS)含量,计算稳态模型评估胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);Real-time PCR法检测卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA表达水平;Western blotting法检测卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白表达水平。结果:对照组大鼠卵巢组织结构基本正常;与对照组比较,模型组大鼠卵巢组织呈多囊样改变;与模型组比较,芪苓温肾低剂量组、芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织多囊样改变均改善。模型组大鼠体质量、TG、TC、T、LH、FBG、FINS及HOMA-IR均高于对照组($P<0.05$),FSH及E₂水平均低于对照组($P<0.05$);芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠体质量、TG、TC、T、LH、FBG、FINS及HOMA-IR均低于模型组($P<0.05$),FSH及E₂水平均高于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量均低于对照组($P<0.05$);芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量均高于模型组($P<0.05$)。模型组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量均低于对照组($P<0.05$);芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量均高于模型组($P<0.05$)。结论:芪苓温肾消囊方能改善来曲唑联合高脂饲料诱导的PCOS大鼠糖脂代谢、内分泌及卵巢形态学,抑制胰岛素抵抗,其机制可能与激活PI3K-Akt-mTOR及PI3K-Akt-GLUT4信号通路相关。

[关键词] 多囊卵巢综合征;芪苓温肾消囊方;PI3K-Akt-mTOR信号通路;PI3K-Akt-GLUT4信号通路;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)09-0061-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.09.010

To Explore the Mechanism of Qiling Wenshen Xiaonang Prescription (芪苓温肾消囊方) in Treating Polycystic Ovary Syndrome Rats Based on PI3K-Akt-mTOR and PI3K-Akt-GLUT4 Signaling Pathway

ZHOU Liyang¹, CHEN Ping², DING Chunli²

*基金项目:河南省自然科学基金项目(232300421305);国家中医药管理局科技项目(GZY-KJS-2022-041-1);河南中医药大学第一附属医院博士科研启动基金项目(2021BSJJ020)

通信作者:陈萍,女,主任医师,研究方向为中西医结合治疗妇科疾病

(1.The First Clinical Medical College of He'nan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China; 2.The First Affiliated Hospital of He'nan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450099, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Qiling Wenshen Xiaonang prescription (芪苓温肾消囊方) in treating polycystic ovary syndrome (PCOS) based on the expression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) - protein kinase B (Akt) -mammalian target of rapamycin (mTOR) and PI3K-Akt-glucose transporter type4 (GLUT4) signaling pathway. Methods: Among 65 female SD rats, 10 rats were randomly selected as the control group and fed with normal diet. The remaining 55 rats were used to establish the PCOS model by letrozole combined with high-fat diet. The successful model rats were randomly divided into model group, metformin group (0.1 g/kg), Qiling Wenshen low-dose group (1.8 g/kg), Qiling Wenshen medium-dose group (3.6 g/kg), and Qiling Wenshen high-dose group (7.2 g/kg), with 10 rats in each group. The rats in the control group and the model group were given normal saline by gavage, and the other groups were given corresponding drugs once a day for 21 consecutive days. The body weight of rats in each group was recorded. HE staining was used to observe ovarian morphological changes. Fasting blood glucose (FBG) was measured with a blood glucose meter. The levels of serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estrogen (E₂), total testosterone (T), triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and fasting insulin (FINS) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. Real-time PCR was used to detect the expression of PI3K mRNA, Akt mRNA, mTOR mRNA and GLUT4 mRNA in ovarian tissue. Western blotting was used to detect the expression levels of PI3K, Akt, mTOR and GLUT4 proteins in ovarian tissues. Results: The ovarian tissue structure was basically normal in control group. Compared with the control group, the ovarian tissue of the model group showed polycystic changes. Compared with the model group, the polycystic changes of ovarian tissue were improved in the Qiling Wenshen low-dose group, Qiling Wenshen medium-dose group, Qiling Wenshen high-dose group and metformin group. The model group showed higher body weight, TG, TC, T, LH, FBG, FINS and HOMA-IR than control group ($P<0.05$), while lower levels of FSH and E₂ than control group ($P<0.05$). Qiling Wenshen medium-dose group, Qiling Wenshen high-dose group and metformin group showed lower body weight, TG, TC, T, LH, FBG, FINS and HOMA-IR than model group ($P<0.05$), while higher levels of FSH and E₂ than model group ($P<0.05$). The model group showed lower relative expression levels of PI3K mRNA, Akt mRNA, mTOR mRNA and GLUT4 mRNA in ovarian tissue than control group ($P<0.05$). The Qiling Wenshen medium-dose group, Qiling Wenshen high-dose group and metformin group showed higher relative expression of PI3K mRNA, Akt mRNA, mTOR mRNA and GLUT4 mRNA than model group ($P<0.05$). The model group showed lower relative expression levels of PI3K, Akt, mTOR and GLUT4 protein in ovarian tissue than control group ($P<0.05$). The Qiling Wenshen medium-dose group, Qiling Wenshen high-dose group and metformin group showed higher relative expression of PI3K, Akt, mTOR and GLUT4 protein in ovarian tissue than model group ($P<0.05$). Conclusion: Qiling Wenshen Xiaonang prescription can improve glucose and lipid metabolism, endocrine and ovarian morphology and inhibit insulin resistance in PCOS rats induced by letrozole and high-fat diet, which may be related to the activation of PI3K-Akt-mTOR and PI3K-Akt-GLUT4 signaling pathways.

[Keywords] polycystic ovary syndrome; Qiling Wenshen Xiaonang prescription; PI3K-Akt-mTOR signaling pathway; PI3K-Akt-GLUT4 signaling pathway; rat

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期女性常见的生殖内分泌及代谢紊乱性疾病,常见特征为胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、高雄激素血症、糖脂代谢异常、卵巢多囊样改变、排卵障碍、不孕等^[1]。PCOS全球发病率为4%~20%,中国发病率已由5.6%逐年上升至10.01%,且发病

群体逐渐趋于年轻化^[2]。PCOS病因及遗传背景复杂,发病机制至今不明。当前治疗PCOS的药物主要为达英-35、来曲唑、克罗米芬、二甲双胍等药物。上述药物属于避孕药、排卵诱导剂及胰岛素增敏剂,都是针对PCOS的某一种症状。目前尚无完全根治PCOS的综合药物。因此,寻找有效且全面治疗PCOS的

药物是亟须解决的医学问题^[3-5]。

中医学并无PCOS之名,当代学者根据临床症状将其归于“不孕”“肥胖”“消渴”等范畴。中医主要从肾、脾、肝三脏以及气滞、血瘀、痰湿辨证论治PCOS。肾虚痰湿证在PCOS患者中最为常见^[6-7]。黑龙江省名中医侯丽辉教授认为PCOS的中医病机为“痰湿壅滞胞宫,肾虚失养”,故创立芪苓温肾消囊方治疗PCOS。芪苓温肾消囊方可化痰祛湿,温肾消囊。前期研究已证实芪苓温肾消囊方可降低PCOS患者的高雄激素血症,调节脂质代谢,纠正胰岛素抵抗,调节生殖内分泌水平,促进月经恢复及排卵恢复^[7-8],但其作用机制尚不明确。网络药理学研究发现,磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B (protein kinase B, Akt)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及PI3K-Akt-葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter type4, GLUT4)可能是芪苓温肾消囊方治疗PCOS发挥作用的信号通路^[9]。基于此,本研究通过构建PCOS大鼠模型,从整体、分子、基因水平探讨芪苓温肾消囊方对PCOS的治疗作用及其对PI3K-Akt-mTOR、PI3K-Akt-GLUT4信号通路的影响,以期为PCOS提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 65只SPF级SD雌性大鼠,体质量(200.26±20.43)g,8周龄,购自河南德润康生物科技有限公司。动物生产许可证号:(鲁)2022-0008;动物质量合格证号:430727281106404748。大鼠分笼饲养于河南省中医药研究院实验室,饲养室光线12 h明暗交替,室温为21~24 ℃,相对湿度为45%~60%。本实验获得河南省中医药研究院伦理委员会批准(HNTCMDW-20230716)。

1.2 药物与试剂 芪苓温肾消囊方组成:黄芪15 g,淫羊藿12 g,茯苓9 g,苍术12 g,丹参15 g。黄芪(批号:2408012)、淫羊藿(批号:240707)、茯苓(批号:2409016)、苍术(批号:2408014)、丹参(批号:2407010)中药饮片均购自安徽普仁中药饮片有限公司,经河南中医药大学第一附属医院主任中药师董申鉴定为正品。河南中医药大学第一附属医院提供并负责煎煮浓缩中药液。

盐酸二甲双胍片(默克制药有限公司,批号:H20227043);来曲唑(浙江海正药业股份有限公司,批号:H20133109);羧甲基纤维素钠(澳美生物科技有限公司,批号:9004324);黄体生成素(luteinizing, LH)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:SP13577)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)ELISA试剂盒(批号:SP13464)、甘油三酯(triglyceride, TG)ELISA试剂盒(批号:SP12560)、总胆固醇(total cholesterol, TC)ELISA试剂盒(批号:SP12535)、雌激素(estrogen, E₂)ELISA试剂盒(批号:SP13503)、睾酮(total testosterone, T)ELISA试剂盒(批号:SP12645)、胰岛素ELISA试剂盒(批号:SP13565)均购自武汉赛培生物科技有限公司;兔抗大鼠PI3K抗体(批号:K23092)、兔抗大鼠Akt抗体(批号:YT636)、兔抗大鼠mTOR抗体(批号:Z21264)、兔抗大鼠GLUT4抗体(批号:ZN0602)均购自北京百奥莱博科技有限公司;全蛋白提取试剂盒(批号:E-BC-E002)、BCA蛋白浓度检测试剂盒(批号:E-BC-K318-M)

均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;ECL超敏发光液(美国Biogen公司,批号:HY-K1005);苏木素染色液(批号:BL700A-1)、伊红染液(批号:BL700A-2)均购自中国Biosharp公司;戊巴比妥钠(北京智杰方远科技有限公司,批号:P11011);HRP标记羊抗鼠抗体IgG(批号:A0218)、HRP标记羊抗兔IgG(批号:A0236)、一抗稀释液(批号:P0023A)、二抗稀释液(批号:P0023D)、GAPDH抗体(批号:AG019)均购自上海碧云天生物技术有限公司;荧光定量PCR试剂盒(福州飞净生物科技有限公司,批号:PH0120);普通饲料(20%蛋白、70%碳水化合物、10%脂肪,批号:STHF37)、高脂饲料(20%蛋白、2%胆固醇、30%碳水化合物、48%脂肪,批号:XTHF45)均购自郑州市金水区嘉年华实验室用材料经营部。

1.3 主要仪器 高速匀浆机(北京中瑞祥科技有限公司,型号:ZRX-24210);电热恒温培养箱(重庆松朗电子仪器有限公司,型号:MJX-50);-80 ℃超低温冰箱(中科西冷公司,型号:DL-178-86);光谱仪(武汉曲尺技术有限公司,型号:6362D);血糖仪(广东爱奥乐医疗器械有限公司,型号:G-425-2);超净工作台(深圳益洁净化有限公司,型号:YUIE-1950);酶标仪(美国Bio Tek公司,型号:Epoch);电泳仪(美国Bio-rad公司,型号:Power HC);荧光定量PCR仪(上海闪谱生物科技有限公司,型号:1800);切片扫描仪(日本滨松光子学株式会社,型号:NanoZoomer S60);光学显微镜(Nikon公司,型号:ECLIPSE E100)。

1.4 造模与分组 65只SD大鼠适应性饲养1周后,随机选取10只作为对照组,其余55只参照文献方法^[10-12]进行造模。将来曲唑溶解于1%的羧甲基纤维素钠中,大鼠灌胃来曲唑,1 mg/kg,1次/d,持续21 d。对照组大鼠予普通饲料喂养21 d,造模大鼠予高脂饲料喂养21 d。第22~25天(大鼠1个动情周期为4 d)继续将棉拭子湿润生理盐水后取大鼠(对照组除外)阴道上皮,涂片后于显微镜下观察。其中51只大鼠阴道上皮持续角化、失去动情周期,且大鼠体质量比对照组平均体质量增加15%,胰岛素抵抗指数比对照组均数增加1.96个标准差,视为造模成功。用随机标号法将成功造模的51只大鼠分为模型组、二甲双胍组、芪苓温肾低剂量组、芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组,每组10只。剩余1只大鼠单笼饲养,不纳入实验。

1.5 给药 根据体表面积计算二甲双胍组和芪苓温肾中剂量组大鼠给药剂量,并按1:2:4比例设置芪苓温肾消囊方低、中、高剂量。二甲双胍组大鼠予二甲双胍灌胃,0.1 g/kg;芪苓温肾低、中、高剂量组大鼠分别予低剂量(1.8 g/kg)、中剂量(3.6 g/kg)、高剂量(7.2 g/kg)芪苓温肾消囊方溶液灌胃;对照组、模型组大鼠予0.9%氯化钠溶液灌胃。各组均每日20:00:00灌胃,连续21 d。

1.6 取材 所有大鼠末次给药后,第2天08:00:00称体质量,血糖仪检测血糖,腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,腹主动脉取血,血液采集后立刻取大鼠双侧卵巢,去除表面脂肪后,随机分为2份样本,一份放入超低温冰箱,另一份放入4%多聚甲醛内进行保存。

1.7 观察指标

1.7.1 大鼠体质量 每周的周三、周六08:00:00—09:00:00称

量大鼠体质量。

1.7.2 卵巢形态 将卵巢进行固定、脱水、包埋,切片厚度为5 μm,脱蜡后行HE染色,于光镜下观察卵巢组织形态并进行图像采集。

1.7.3 血清FSH、LH、E₂、T、TG、TC、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平及空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)水平 按照ELISA试剂盒说明书操作,测定大鼠血清中FSH、LH、E₂、T、TG、TC、FINS水平,酶标仪测量各孔在450 nm处吸光度值,并计算各样品含量。采用血糖仪检测FBG,并计算稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance,HOMA-IR)。HOMA-IR=FBG×FINS/22.5。

1.7.4 卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA表达 采用Real-time PCR检测卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA表达水平。取适量清洗后的卵巢组织并加入TRIzol试剂提取RNA,于冰上反转录为cDNA,将GAPDH作为内参进行扩增,扩增条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性3 s,60 °C退火30 s,共进行40个循环。通过2^{-ΔΔCt}法分析各组大鼠PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量。引物序列见表1,由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。

表1 引物序列

目的基因	引物(5'→3')	扩增产物片段长度/bp
PI3K	上游引物:ACAGCTTGGAGCGACGTGACG 下游引物:TGGACTGGCTATCTCACTTCG	174
Akt	上游引物:CGACGTAGCCATTGTGAAGGAG 下游引物:ATTGTGCCACTGAGAAGTGTG	173
mTOR	上游引物:CTCTGACTACAGCACCACTGAAATG 下游引物:CAGGGACTTGAAGATGAAGGTGAT	169
GLUT4	上游引物:GCTGAAGGATGAGAACGGAAGT 下游引物:ACTAACGACCCGAGACCAACG	255
GAPDH	上游引物:CTGGAGAACCTGCCAAGTATG 下游引物:GGTGGAGAACATGGACTTGCT	138

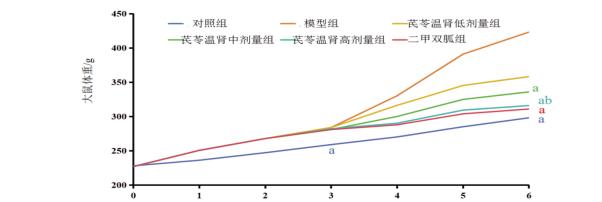
1.7.5 卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白表达 采用Western blotting法检测大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白表达水平。大鼠卵巢称质量,切块后匀浆,加入10倍质量的RIPA裂解液,置于冰上2 h保证其充分裂解,4 °C 15 000 r/min(离心半径为10 cm)离心10 min。BCA法检测上清液中蛋白浓度,将样品与SDS-PAGE蛋白上样缓冲液按1:1的体积比混合均匀,10% SDS-PAGE分离蛋白样品后,转至PVDF薄膜上,严格按照说明书加入一抗、二抗,经TBST洗涤3次后,添加ECL试剂显影并拍照,用AIWBwellTM软件分析图像。GAPDH为内参。

1.8 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行数据统计,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料符合正态分布且方差齐,采用ANOVA进行多组间比较,两组间比较采用LSD法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠体质量比较 造模前,各组大鼠体质量呈生理性上升趋势。造模后,各组大鼠体质量呈上升趋势,模型组大鼠体质量高于对照组($P<0.05$);芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠体质量均低于模型组($P<0.05$);芪苓温肾高剂量组大鼠体质量与二甲双胍组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图1)

2.2 大鼠卵巢组织形态 对照组大鼠卵巢组织结构基本正常,各期卵泡均可见,黄体数量多且发育良好,颗粒细胞紧密、规则且整齐;模型组大鼠卵巢组织内闭锁卵泡数明显增加,多囊样,较少成熟卵泡及黄体,颗粒细胞层排列稀疏;芪苓温肾低剂量组、芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织内可见成熟卵泡,闭锁卵泡及囊性卵泡数均减少,颗粒细胞层数增加,且芪苓温肾消囊方作用呈剂量依赖性。(见图2)



注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与二甲双胍组比较,^b $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠体质量比较 ($n=10$)

2.3 各组大鼠血清性激素水平比较 模型组大鼠血清FSH、E₂水平低于对照组,血清LH、T水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);芪苓温肾低剂量组大鼠血清FSH、E₂、LH、T水平与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠血清FSH、E₂水平均高于模型组($P<0.05$),血清LH、T水平均低于模型组($P<0.05$);二甲双胍组大鼠血清FSH、E₂水平高于芪苓温肾中剂量组,血清LH、T水平低于芪苓温肾中剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见图3)

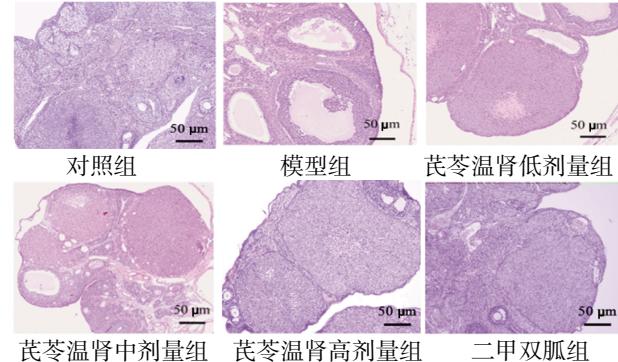
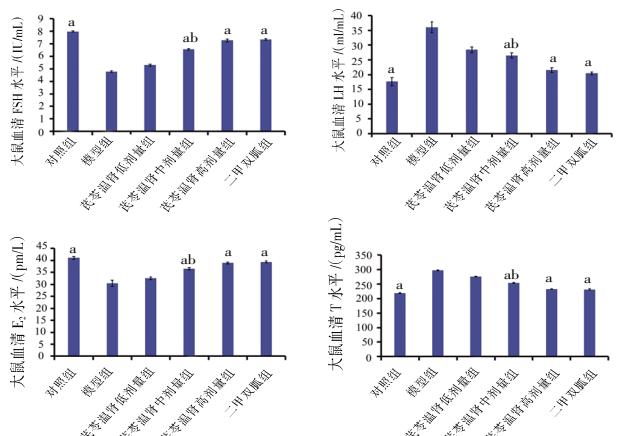


图2 大鼠卵巢组织形态 (HE, $\times 100$)

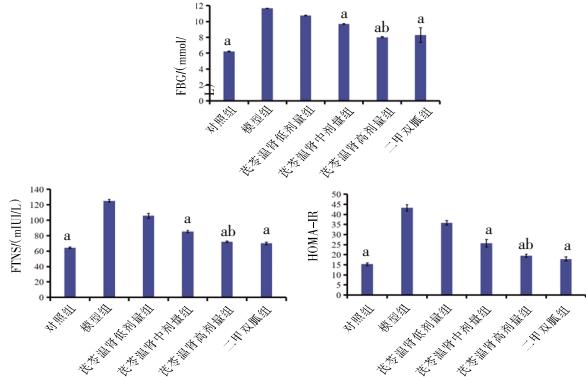
2.4 各组大鼠血清性激素水平比较 模型组大鼠血清FSH、E₂水平低于对照组,血清LH、T水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);芪苓温肾低剂量组大鼠血清FSH、E₂、LH、T水平与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠血清FSH、E₂水平均高于模型组($P<0.05$),血清LH、T水平均低于模型组($P<0.05$);二甲双胍组大鼠血清FSH、E₂水平高于芪苓温肾中剂量组,血清LH、T水平低于芪苓温肾中剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见图3)



注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与二甲双胍组比较,^b $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

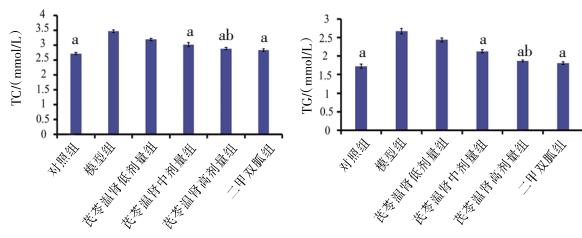
2.4 各组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR比较 模型组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR均高于对照组($P<0.05$)；芪苓温肾低剂量组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR与模型组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)；芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR均低于模型组($P<0.05$)；芪苓温肾高剂量组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR与二甲双胍组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图4)



注：与模型组比较，^a $P<0.05$ ；与二甲双胍组比较，^b $P>0.05$ 。

图4 各组大鼠FBG、FINS及HOMA-IR比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

2.5 各组大鼠血脂水平比较 模型组大鼠TC、TG水平高于对照组($P<0.05$)；芪苓温肾低剂量组大鼠TC、TG水平与模型组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠TC、TG水平均低于模型组($P<0.05$)；芪苓温肾高剂量组大鼠TC、TG水平与二甲双胍组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图5)



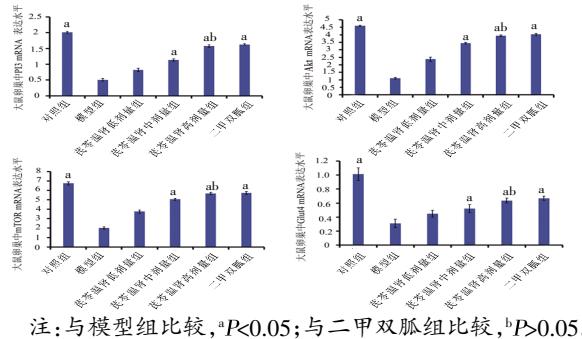
注：与模型组比较，^a $P<0.05$ ；与二甲双胍组比较，^b $P>0.05$ 。

图5 各组大鼠血脂水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

2.6 各组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量比较 模型组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量低于对照组($P<0.05$)；芪苓温肾低剂量组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量与模型组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；芪苓温肾中剂量组、芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量均高于模型组($P<0.05$)；芪苓温肾高剂量组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量与二甲双胍组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图6)

2.7 各组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量比较 模型组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量低于对照组($P<0.05$)；芪苓温肾低剂量组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量与模型组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；芪苓温肾中剂量组、

芪苓温肾高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量均高于模型组($P<0.05$)；芪苓温肾高剂量组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量与二甲双胍组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图7~8)



注：与模型组比较，^a $P<0.05$ ；与二甲双胍组比较，^b $P>0.05$ 。

图6 各组大鼠卵巢组织PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA及GLUT4 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

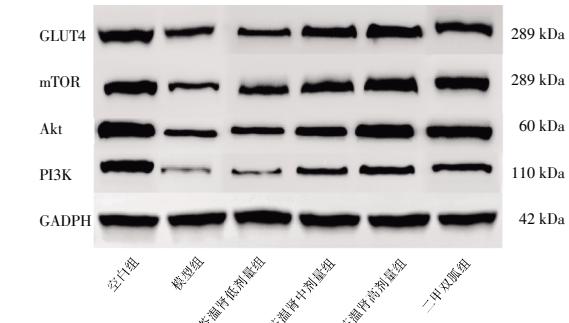
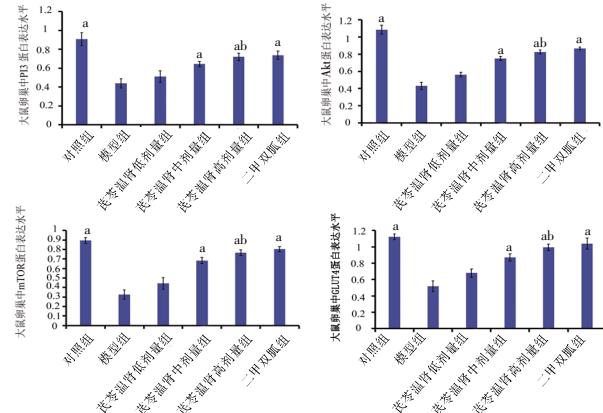


图7 各组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白表达Western blotting图



注：与模型组比较，^a $P<0.05$ ；与二甲双胍组比较，^b $P>0.05$ 。

图8 各组大鼠卵巢组织PI3K、Akt、mTOR及GLUT4蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3 讨论

肾为先天之本，主藏精、生长发育、生殖。若肾阳不足，气血津液失于温煦，则聚而成痰、成湿^[13]。痰湿为妇科疾病的重要病理因素。朱丹溪云：“若是肥盛妇人……经水不调，不能成孕，谓之躯脂满溢，闭塞子宫。”《女科切要》言：“肥白妇人，经闭而不通者，必是痰湿与脂膜壅塞之故也。”痰湿壅滞胞宫、胞脉，阻滞冲任，致胞宫不能摄精成孕。冲任失调则月事不以时下，故痰湿为女性不孕、月经失调的重要病因，肾虚则为内

因。研究表明,痰湿证为PCOS合并糖脂代谢异常的主要证型,约占63.7%。痰湿既为PCOS的重要病理因素,亦为其主要病理产物^[14-16]。《素问·经脉别论篇》曰:“饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱,水精四布,五经并行。”水液经口入胃,经肺、脾、肾、三焦之气化作用化为精微以滋养全身。代谢废物经皮肤汗液或尿液排泄。此为人体推陈纳新,维持水液平衡之过程。先天之本肾虚致机体气化、推动水液运行无力。痰湿日久积于人体各处,阻滞经络,阻碍气机,使脏腑功能失调。水谷入多出少,代谢废物积滞于内不得出,亦生痰湿。周而复始,如环无端,机体推陈纳新减缓,日久则形体肥胖。水液代谢失常,滋养机体减少,则呈多饮、多食之状,即为消渴^[17-19]。

芪苓温肾消囊方中黄芪益气健脾以杜生痰之源,为君药;淫羊藿甘温补肾,温先天之肾阳,为臣药;茯苓利水渗湿、苍术燥湿健脾,促水液代谢,共为佐药;丹参温经活血以通脉,为使药。本方药简力专,标本兼治。全方共奏化痰祛湿、温肾消囊之功。刘冷等^[20]研究表明,黄芪甲苷可减轻肥胖PCOS大鼠卵巢多囊样改变,并拮抗其IR状态。徐彩生等^[21]研究表明,淫羊藿总黄酮能明显下调大鼠血清T、LH含量,改善高雄激素血症,提高卵巢功能。李美玲^[22]研究表明,淫羊藿苷可显著促进人体卵巢颗粒细胞增殖,促进卵巢颗粒细胞分泌E₂,具有雌激素样作用。裴莉昕等^[23]表明淫羊藿木兰花碱可提高IR大鼠对葡萄糖的吸收利用,从而改善IR,并可抑制脂多糖诱导的炎症。郑彩云^[24]研究表明,茯苓多糖具有降低糖尿病模型大鼠血糖、抗脂质过氧化、减肥及降血脂的作用,且效果与浓度呈正相关。张叶苗^[25]研究表明,茯苓多糖可促进高IR的Hep G₂细胞消耗葡萄糖,且具有剂量依赖性。王梦羽等^[26]研究表明,苍术酮能抑制脂肪累积,具有较好的降脂作用。何洪静等^[27]研究表明,丹参可明显改善微血管痉挛及血液流态,改善微循环障碍,防止血栓形成,治疗月经不调。综上,芪苓温肾消囊方中药物成分与血糖、血脂、性激素及卵巢颗粒细胞具有相关性。

PI3K为p110催化亚基及p85调节亚基所组成的胞内磷脂酰肌醇激酶,具有SH2结构域^[28]。Akt是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,哺乳动物中主要有Akt1、Akt2和Akt3三种亚型。Akt以非活性状态存在于细胞质基质中。PI3K催化底物PIP衍变成PIP2,再催化后者生成PIP3。这些第二信使,通过激活PDK-1磷酸化Akt结合位点上的Thr308和Ser473,使Akt由非活性状态转变至激活状态^[29-30]。PI3K/Akt通路为酶联受体介导的重要信号转导通路,可通过磷酸化Akt不同位点精准调控其下游靶蛋白,发挥不同的生物效应,主要包括调节氧化应激、炎症反应、能量代谢,调节细胞周期,促进细胞代谢、生长及增殖,以及抑制细胞凋亡等^[31-32]。mTOR与GLUT4是该通路的下游靶点,mTOR可影响卵泡的生长发育、性激素分泌、胰岛素敏感性及葡萄糖利用率^[33-34]。GLUT4被激活后,会促进卵泡生长与分化,增加卵母细胞质量,促进葡萄糖摄取^[35-36]。本研究表明,芪苓温肾消囊方能降低PCOS大鼠体质量及血清FBG、TG、TC水平,说明芪苓温肾消囊方能通过改善PCOS大鼠糖代谢、脂代谢

减轻体质量。芪苓温肾消囊方能降低PCOS大鼠FINS含量及HOMA-IR,说明芪苓温肾消囊方能抑制PCOS大鼠IR。芪苓温肾消囊方能降低PCOS大鼠T、LH水平,提高FSH、E₂水平,说明芪苓温肾消囊方能通过调节PCOS大鼠性激素紊乱改善卵巢组织多囊样形态。芪苓温肾消囊方能上调卵巢组织内PI3K mRNA、Akt mRNA、mTOR mRNA、GLUT4 mRNA 及 PI3K、Akt、mTOR、GLUT4蛋白表达水平,说明芪苓温肾消囊方可通过激活PI3K-Akt-mTOR及PI3K-Akt-GLUT4信号通路发挥作用。

综上所述,芪苓温肾消囊方能改善来曲唑联合高脂饲料诱导的PCOS大鼠糖脂代谢、内分泌及卵巢形态学,抑制IR,其机制可能与激活PI3K-Akt-mTOR及PI3K-Akt-GLUT4信号通路相关。

参考文献

- [1] XU Y L, QIAO J. Association of insulin resistance and elevated androgen levels with polycystic ovarian syndrome (PCOS): A review of literature[J]. J Healthc Eng, 2022, 2022:9240569.
- [2] SHRIVASTAVA S, CONIGLIARO R L. Polycystic ovarian syndrome[J]. Med Clin N Am, 2023, 107(2):227-234.
- [3] 贾金英,刘明珠,郭晓燕.化瘀消癥汤治疗多囊卵巢综合征高雄激素血症的前瞻性研究[J/OL].中华中医药学刊,1-9 [2024-12-10].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20241121.0959.022.html>.
- [4] ABDALLA M A, SHAH N, DESHMUKH H, et al. Impact of pharmacological interventions on biochemical hyperandrogenemia in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. Arch Gynecol Obstet, 2023, 307(5):1347-1376.
- [5] 沈文娟,金宝,李浦媛,等.中医药治疗多囊卵巢综合征高雄激素血症研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(4):694-697.
- [6] 陈冰冰,徐广立.基于五运六气及四时节律探讨多囊卵巢综合征患者发病规律[J].广州中医药大学学报,2024,41(11):2876-2882.
- [7] 孙艺玲,江玉敏,姜文娜,等.多囊卵巢综合征患者中医证型与生活方式的相关性研究[J].广州中医药大学学报,2024,41(11):2882-2890.
- [8] 刘婉君.经阴道超声评价芪苓温肾消囊方治疗多囊卵巢综合征的应用研究[D].沈阳:中国医科大学,2023.
- [9] 王云丹,张依倩,郝磊,等.芪苓温肾消囊方化学成分及其治疗多囊卵巢综合征的作用机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(8):183-193.
- [10] 蔡云,许昕.来曲唑联合高脂饲料建立PCOS-IR大鼠模型实验研究[J].首都医科大学学报,2017,38(2):244-248.
- [11] 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.
- [12] 林安盈,杨璐瑜,孔倩,等.健脾化痰方通过PI3K/AKT/mTOR和PI3K/AKT/GLUT4通路干预PCOS-IR大鼠的作用机制研究[J].时珍国医国药,2023,34(10):2362-2365.
- [13] 张荧,王甜甜,刘艳,等.补肾促排卵汤促进骨骼肌葡萄糖转运体GLUT4膜转位改善PCOS大鼠胰岛素抵抗的作用研究[J].中医药学报,2024,52(9):27-32.
- [14] 柯婷,肖洋,祁海燕,等.基于数据挖掘探讨肥胖型多囊卵巢综合征的中医用药规律[J].临床医学研究与实践,2023,8(29):117-120.
- [15] 徐梦,黄昱雯,秦文敏.奚嘉教授从“痰湿”论治多囊卵巢综合征排卵障碍性不孕经验[J].基层中医药,2023,2(10):18-22.
- [16] 王浩,程玲,丁永芬,等.中医中药治疗多囊卵巢综合征研究进展[J].吉林中医药,2018,38(12):1483-1487.
- [17] 叶宁,邱瑾,童奎骅.温肾化痰汤对肾虚痰湿型多囊卵巢综合征高雄激素血症的影响[J].浙江中医杂志,2018,53(3):186.
- [18] 伍嘉仪,张绚丽,曾美玲,等.痰湿型多囊卵巢综合征的中医证治研究进展[J].中国民间疗法,2024,32(20):104-109.
- [19] 柳美华,卢秉久,丛培玮,等.从痰湿探讨胰岛素抵抗致代谢相关脂肪性肝病合并多囊卵巢综合征的发病机理[J/OL].中华中医药学刊,1-12[2024-12-10].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20241121.1009.044.html>.
- [20] 刘冷,贺春花.黄芪甲苷对肥胖型多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗及MAPK/ERK通路的影响[J].中成药,2024,46(1):94-100.
- [21] 徐彩生,罗丽莉,曾如辉,等.淫羊藿总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平的影响[J].重庆医科大学学报,2013,38(2):147-150.
- [22] 李美玲.淫羊藿昔通过调节卵巢颗粒细胞增殖与分泌功能改善DOR患者IVF助孕结局的临床与机制研究[D].南京:南京中医药大学,2020.
- [23] 裴莉昕,陈琳,李诺,等.箭叶淫羊藿化学成分与药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2025,3(12):1-12.
- [24] 郑彩云.茯苓多糖抗糖尿病作用的实验研究[J].中国医疗前沿,2010,5(14):12-13.
- [25] 张叶苗.茯苓复合提取物对2型糖尿病大鼠血糖和血脂水平的影响[D].长春:吉林大学,2020.
- [26] 王梦羽,沈洁,刘杰,等.苍术酮对肥胖斑马鱼的降脂作用[J].中成药,2024,46(4):1360-1364.
- [27] 何洪静,李惠兰,张荣平,等.滇丹参、甘西鼠尾、褐毛甘西鼠尾水提取液对鼠血栓形成及微循环的影响[J].天然产物研究与开发,2003,15(2):144-151.
- [28] MADSEN R R, TOKER A. PI3K signaling through a biochemical systems lens[J]. J Biol Chem,2023,299(10):105224.
- [29] SUN Z C, JIANG Q W, GAO B, et al. AKT blocks SIK1-mediated repression of STAT3 to promote breast tumorigenesis[J]. Cancer Res,2023,83(8):1264-1279.
- [30] GUERAU-DE-ARELLANO M, PIEDRA-QUINTERO Z L, TSICHLIS P N. Akt isoforms in the immune system[J]. Front Immunol,2022,13:990874.
- [31] YU L, WEI J, LIU P D. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer[J]. Semin Cancer Biol,2022,85:69-94.
- [32] PENG Y, WANG Y Y, ZHOU C, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: Are we making headway?[J]. Front Oncol,2022,12:819128.
- [33] YANG M M, LU Y M, PIAO W L, et al. The translational regulation in mTOR pathway[J]. Biomolecules,2022,12(6):802.
- [34] DELEYTO-SELDAS N, EFEYAN A. The mTOR-autophagy axis and the control of metabolism[J]. Front Cell Dev Biol,2021,9:655731.
- [35] VAN GERWEN J, SHUN-SHION A S, FAZAKERLEY D J. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance[J]. Biochem Soc Trans,2023,51(3):1057-1069.
- [36] HERMAN R, KRAVOS N A, JENSTERLE M, et al. Metformin and insulin resistance: A review of the underlying mechanisms behind changes in GLUT4-mediated glucose transport[J]. Int J Mol Sci,2022,23(3):1264.

(收稿日期:2024-12-18 编辑:蒋凯彪)