

引用 赵千影,汪栋材,吴海滨,林基伟,宋晓容.菟丝子总黄酮对PCOS大鼠血清甲状腺激素、排卵障碍的影响及机制研究[J].中医药导报.2022,28(5):30-34,46.

菟丝子总黄酮对PCOS大鼠血清甲状腺激素、排卵障碍的影响及机制研究*

赵千影,汪栋材,吴海滨,林基伟,宋晓容
(深圳市中医院,广东 深圳 518000)

[摘要] 目的 观察菟丝子总黄酮对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠血清甲状腺激素及排卵障碍的影响,并探索可能机制。方法 取45只SD大鼠,随机选取10只设为对照组,剩余大鼠建立PCOS模型,采用随机数字表法将31只造模成功大鼠分为PCOS组(11只)、干预组(10只)、联合组(10只)。联合组大鼠灌胃菟丝子总黄酮(200 mg/kg),尾静脉注射丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)通路激动剂表皮生长因子(EGF)(10 μg/kg);干预组大鼠灌胃菟丝子总黄酮(200 mg/kg),尾静脉注射等量PBS;对照组、PCOS组大鼠灌胃等体积生理盐水,尾静脉注射等量PBS,1次/d,持续21 d。检测血清促甲状腺激素(TSH)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT₃)、游离甲状腺素(FT₄)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促卵泡生长激素(FSH)、黄体生成激素(LH)、雌二醇(E₂)水平;检测血清空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);HE染色观察排卵情况;Western blotting法检测卵巢组织p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达量。结果 与PCOS组比较,干预组大鼠血清TSH、LH、FINS、HOMA-IR水平、囊性扩张卵泡率、卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2降低,FT₃、FT₄、T₃、T₄、FSH、E₂水平及排卵率升高,平均排卵数增加(P<0.05);与干预组比较,联合组血清TSH、LH、FINS、HOMA-IR水平、囊性扩张卵泡率、卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2升高,FT₃、FT₄、T₃、T₄、FSH、E₂水平、排卵率降低,平均排卵数减少(P<0.05)。结论 菟丝子总黄酮可改善PCOS大鼠甲状腺激素、性激素水平,降低胰岛素抵抗,促进排卵。其作用机制可能与抑制MAPK/ERK通路有关。

[关键词] 多囊卵巢综合征 菟丝子总黄酮 甲状腺激素 排卵障碍 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2022)05-0030-05

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2022.05.007

Effects of Total Flavonoids of Tusizi(Cuscutae Semen) on Serum Thyroid Hormone and Ovulation Disorder in PCOS Rats and Its Mechanism

ZHAO Qian-ying, WANG Dong-cai, WU Hai-bin, LIN Ji-wei, SONG Xiao-rong

(Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518000, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of total flavonoids of Tusizi (Cuscutae Semen) on serum thyroid hormones and ovulation disorders in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS), and explore possible mechanisms. Methods: Totally ten of the 45 SD rats were randomly selected 10 as the control group, and the remaining rats were establish the PCOS model. Totally 31 successfully rats were divided into PCOS group (n=11), intervention group (n=10) and combination group (n=10) by random number table method. Rats in the combination group were given total flavonoids of Tusizi (200 mg/kg) by gavage, and injected mitogen activated protein kinase (MAPK) / extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway agonist epidermal growth factor (EGF) (10 μg/kg) into the tail vein. Rats in the intervention group were given otal flavonoids of Tusizi (200 mg/kg) by gavage, and the same amount of PBS was injected into the tail vein. Rats in the control group and PCOS group were intragastrically administered with an equal volume of normal saline, and an equal volume of PBS was injected into the tail

*基金项目 深圳市卫生健康委员会医防融合中医药组项目(深卫健体改〔2019〕25号) 深圳市卫计委重点学科建设项目(SZXJ2018007); 广东省中医药局科研课题(20211325)

通信作者 汪栋材, E-mail: 4mpse@163.com

vein. Once a day for 21 days. The levels of serum thyroid-stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (FT₃), free thyroxine (FT₄), triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and estradiol (E₂) were detected. Serum fasting serum insulin (FINS) and homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) were measured. Ovulation was observed by HE staining. The protein expressions of p38 MAPK, p-p38 MAPK, ERK1/2 and p-ERK1/2 in ovarian tissues were detected by Western blotting. Results: Compared with the PCOS group, the level of serum TSH, LH, FINS, HOMA-IR, the cystic dilated follicle rate, and ovarian tissue p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-ERK1/2 /ERK1/2 of the intervention group were decreased, of which the level of FT₃, FT₄, T₃, T₄, FSH, E₂ and ovulation rate increased, and the average number of ovulation were increased ($P<0.05$). Compared with the intervention group, the level of serum TSH, LH, FINS, HOMA-IR, cystic dilated follicle rate, and ovarian tissue p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-ERK1/2/ERK1/2 of the intervention group were increased, of which the level of FT₃, FT₄, T₃, T₄, FSH, E₂, and ovulation rate decreased, the average number of ovulation were decreased ($P<0.05$). Conclusion: The total flavonoids of Tusizi can improve the levels of thyroid hormone and sex hormone, reduce insulin resistance and promote ovulation in PCOS rats. Its mechanism may be related to the inhibition of MAPK/ERK pathway.

[Keywords] polycystic ovarian syndrome; total flavonoids of Tusizi; thyroid hormones; ovulation disorders; rat

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是临床常见的内分泌紊乱疾病, 多发于育龄期及青春期女性^[1]。流行病学调查显示, 我国PCOS发病率为5%~10%, 且呈上升趋势。PCOS可在早期影响患者生殖及内分泌系统, 造成其不孕, 后期则易诱发高胰岛素血症、子宫内膜癌、糖尿病、心脑血管疾病等并发症^[2]。口服避孕药是目前临床治疗PCOS的首选方法, 可调节月经周期、增加排卵, 以恢复生育能力, 但对部分患者效果并不理想, 且易加重胰岛素抵抗^[3]。菟丝子总黄酮是中药菟丝子的主要活性成分之一, 具有抗癌、抗氧化、提升免疫力、保肝、调节生殖系统功能等多种药理活性^[4]。有研究^[5]表明, 菟丝子总黄酮可增加卵巢质量及卵泡数量、提高雌激素水平、提升卵巢功能, 从而对卵巢早衰大鼠产生治疗作用, 但关于其对PCOS甲状腺功能的影响及排卵障碍的治疗作用研究尚少, 且缺乏对应的机制研究。本研究通过建立PCOS大鼠模型, 观察菟丝子总黄酮对PCOS大鼠的治疗作用, 并探讨其相关机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 7周龄雌性SPF级SD大鼠45只, 体质量 (170±10) g, 健康状况良好, 购自北京科宇动物养殖中心, 生产许可证号 SCXK (京) 2018-0010。饲养于清洁、通风环境, 温度23℃左右, 湿度60%左右, 明暗周期12 h/12 h循环。本研究过程中处理动物时均符合2006年中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》, 并经本院实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 菟丝子总黄酮 (陕西昂威生物医药科技有限公司, 批号 20090912); 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /细胞外信号调节激酶 (extra-cellular signal-regulated kinase, ERK) 通路激动剂表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (北京华越洋生物科技有限公司, 批号 22253-63-8) 脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) (上海沪震实业有限公司, 批号 DK0124) 促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 放射免疫试剂盒 (批号 E-EL-R0976)、游离三碘甲腺原氨酸 (free triiodothyronine, FT₃) 放射免疫试剂盒 (批号 E-EL-0079)、游离甲状腺素 (free thyroxine, FT₄) 放射免疫试剂盒 (批号 E-EL-0122) 均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 三碘甲腺原氨酸 (triiodothyronine, T₃) 放射免疫试剂盒 (批号 SP12617)、甲状腺素 (thyroxine, T₄) 放射免疫试剂盒 (批号 SP12618)、促卵泡生长激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 微粒子酶免疫试剂盒 (批号 SP12603)、黄体生成激素 (luteinizing hormone, LH) 微粒子酶免疫试剂盒 (批号 SP12626)、雌二醇 (estradiol, E₂) 微粒子酶免疫试剂盒 (批号 SP12610) 均购自武汉赛培生物科技有限公司; 空腹胰岛素 (fasting serum insulin, FINS) 放射免疫试剂盒 (中国台湾Abnova公司, 批号 KA3811)、兔抗大鼠 p38 MAPK一抗 (批号 ab221012)、兔抗大鼠 p-p38 MAPK一抗 (批号 ab284564)、兔抗大鼠 ERK1/2一抗 (批号 ab176640)、兔抗大鼠 p-ERK1/2一抗 (批号 ab126445) 均购自美国Abcam公司。

1.3 主要仪器 CX33显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); AIA-1800全自动荧光磁微粒酶免疫分析仪 (日本东曹株式会社); Gel SMART凝胶成像仪 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]。

1.4 造模与分组 35只大鼠建立PCOS模型。大鼠适应性饲养3 d后, 颈背部皮下注射0.2 mL DHEA大豆油混合液 (剂量: DHEA 60 mg/100 g体质量), 1次/d, 持续20 d, 每日早上观察阴道涂片, 若连续两个动情周期上皮细胞均未角化, 则表明动情周期紊乱, PCOS模型构建成功^[6]。PCOS模型复制成功31只, 采用随机数字表法分为PCOS组 (11只)、干预组 (10只)、联合组 (10只) 另取10只正常大鼠注射0.2 mL大豆油, 其余方法相同, 设为对照组。

1.5 实验给药 确认建模成功次日, 联合组大鼠灌胃菟丝子

总黄酮生理盐水悬浊液 (200 mg/kg)^[7], 2 h后尾静脉注射EGF PBS溶液 (10 μg/kg)^[8]; 干预组大鼠灌胃菟丝子总黄酮生理盐水悬浊液 (200 mg/kg), 2 h后尾静脉注射等量PBS; 对照组、PCOS组大鼠灌胃等体积生理盐水, 2 h后尾静脉注射等量PBS, 1次/d, 持续21 d。

1.6 观察指标 末次干预后, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 4℃下3 000 r/min离心10 min (离心半径8 cm), 将获取血清分成两份, 4℃冰箱保存, 分别用于甲状腺激素检测及血糖指标检测; 采血后颈椎脱臼处死大鼠, 开腹取双侧卵巢, 切取部分卵巢组织, 一半固定于4%多聚甲醛24 h, 脱水、透明、浸蜡、包埋, 切为4 μm连续病理切片, 用于HE染色, 另一半投入液氮中保存, 用于蛋白检测。

1.6.1 血清甲状腺激素水平 取4℃保存血清, 采用放射免疫分析法检测血清TSH、FT₃、FT₄、T₃、T₄水平, 根据试剂盒说明书设计实验步骤, 计算血清TSH、FT₃、FT₄、T₃、T₄水平。

1.6.2 血清性激素水平 取4℃保存血清, 采用微粒子酶免疫分析法及全自动荧光磁微粒酶免疫分析仪检测FSH、LH、E₂水平。

1.6.3 血清FINS、HOMA-IR 取4℃保存血清, 经血糖仪检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、放射免疫试剂盒检测FINS, 计算胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-IR)。HOMA-IR=FBG×FINS/22.5。

1.6.4 HE染色观察卵巢组织病理学改变及排卵情况 取卵巢组织切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 移入苏木精溶液浸泡8 min, 自来水冲洗, 盐酸酒精分化液分化, 自来水冲洗, 促蓝液反蓝, 移入伊红溶液染色2 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 滴加中性树脂封片, 光镜下观察卵巢组织病理变化, 记录排卵数、囊样扩张卵泡数。排卵率=有排卵大鼠数/该组大鼠数×100%。平均排卵数=黄体总数/该组大鼠数×100%。囊性扩张卵泡率=囊样扩张卵泡总数/该组大鼠数×100%。

1.6.5 Western blotting法检测卵巢组织p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白相对表达量 取液氮中保存的卵巢组织, 剪碎并充分研磨, 匀浆后加入RIPA液裂解细胞, 移至离心管内, 低温离心机9 000 r/min离心15 min (离心半径10 cm), 经BCA试剂盒定量蛋白。取40 μg蛋白样本, 以1:4的体积比混合上样缓冲液, 80 V电压下行凝胶电泳分离, 湿法转至硝酸纤维素膜, 5%脱脂牛奶封闭2 h, TBST清洗, 混合作液浓度1:500的兔抗大鼠p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2一抗, 4℃摇床孵育过夜, TBST清洗, 加入二抗

(1:2 000) 混匀, 室温孵育40 min, ECL发光, 暗盒显影, 采用凝胶成像分析仪分析蛋白条带灰度值, p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白相对表达量分别为p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白条带灰度值与内参GAPDH条带灰度值的比值。计算p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2。

1.7 统计学方法 通过SPSS 23.0进行统计学分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本资料比较用单因素方差分析, 以LSD-t行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血清甲状腺激素指标比较 与对照组比较, PCOS组大鼠血清TSH水平明显升高 ($P < 0.05$), FT₃、FT₄、T₃、T₄水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与PCOS组比较, 干预组大鼠血清TSH水平明显降低 ($P < 0.05$), FT₃、FT₄、T₃、T₄水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与干预组比较, 联合组大鼠血清TSH水平明显升高 ($P < 0.05$), FT₃、FT₄、T₃、T₄水平均明显降低 ($P < 0.05$)。(见表1)

2.2 各组大鼠血清性激素水平比较 与对照组比较, PCOS组大鼠血清LH水平明显升高 ($P < 0.05$), FSH、E₂水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与PCOS组比较, 干预组大鼠血清LH水平明显降低 ($P < 0.05$), FSH、E₂水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与干预组比较, 联合组大鼠血清LH水平明显升高 ($P < 0.05$), FSH、E₂水平均明显降低 ($P < 0.05$)。(见表2)

表2 各组大鼠血清性激素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	给药剂量		FSH (mIU/mL)	E ₂ (pg/mL)	LH (mIU/mL)
		菟丝子总黄酮 (mg/kg)	EGF (μg/kg)			
对照组	10	-	-	8.98 ± 2.14	24.15 ± 3.64	24.97 ± 4.05
PCOS组	11	-	-	5.39 ± 1.23 ^a	12.87 ± 1.99 ^a	47.96 ± 5.47 ^a
干预组	10	200	-	8.09 ± 2.05 ^b	19.30 ± 2.11 ^b	31.32 ± 4.90 ^b
联合组	10	200	10	6.54 ± 1.07 ^c	15.47 ± 1.63 ^c	39.70 ± 4.82 ^c
<i>F</i>				9.444	41.365	44.450
<i>P</i>				0.000	0.000	0.000

注 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与PCOS组比较, ^b $P < 0.05$; 与干预组比较, ^c $P < 0.05$

2.3 各组大鼠胰岛素抵抗指标比较 与对照组比较, PCOS组大鼠FINS、HOMA-IR水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与PCOS组比较, 干预组大鼠FINS、HOMA-IR水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与干预组比较, 联合组大鼠FINS、HOMA-IR水平均明显升高 ($P < 0.05$)。(见表3)

表1 各组大鼠血清甲状腺激素指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	给药剂量		TSH (mIU/L)	FT ₃ (ng/L)	FT ₄ (ng/L)	T ₃ (μg/L)	T ₄ (μg/L)
		菟丝子总黄酮 (mg/kg)	EGF (μg/kg)					
对照组	10	-	-	2.31 ± 0.57	2.69 ± 0.52	14.32 ± 2.68	1.50 ± 0.22	41.63 ± 7.41
PCOS组	11	-	-	4.69 ± 0.75 ^a	0.91 ± 0.14 ^a	5.03 ± 0.74 ^a	0.74 ± 0.09 ^a	23.65 ± 3.87 ^a
干预组	10	200	-	3.55 ± 0.62 ^b	1.93 ± 0.36 ^b	11.69 ± 2.52 ^b	1.31 ± 0.19 ^b	36.68 ± 4.15 ^b
联合组	10	200	10	4.03 ± 0.51 ^c	1.22 ± 0.19 ^c	7.98 ± 1.62 ^c	0.96 ± 0.11 ^c	29.97 ± 4.06 ^c
<i>F</i>				26.971	58.237	42.698	47.356	25.143
<i>P</i>				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与PCOS组比较, ^b $P < 0.05$; 与干预组比较, ^c $P < 0.05$

表 4 各组大鼠排卵情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

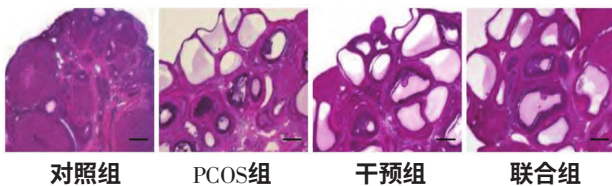
组别	动物数 (只)	给药剂量		排卵率	平均排卵数 (个)	囊性扩张卵泡率
		菟丝子总黄酮 (mg/kg)	EGF ($\mu\text{g/kg}$)			
对照组	10	-	-	100.00% (10/10)	12.70 $\pm$ 2.14	0.05% (3/60)
PCOS组	11	-	-	27.27% (3/11) ^a	1.73 $\pm$ 0.26 ^a	47.06% (80/170) ^a
干预组	10	200	-	80.00% (8/10) ^b	9.20 $\pm$ 1.13 ^b	17.86% (20/112) ^b
联合组	10	200	10	30.00% (3/10) ^c	4.40 $\pm$ 0.52 ^c	29.37% (42/143) ^c
χ^2/F				16.766	164.789	49.400
P				0.001	0.000	0.000

注 与对照组比较,^a $P<0.05$ 与PCOS组比较,^b $P<0.05$ 与干预组比较,^c $P<0.05$ 表 3 各组大鼠胰岛素抵抗指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	给药剂量		FINS (mU/L)	HOMA-IR
		菟丝子总黄酮 (mg/kg)	EGF ($\mu\text{g/kg}$)		
对照组	10	-	-	10.30 $\pm$ 2.61	2.20 $\pm$ 0.35
PCOS组	11	-	-	18.96 $\pm$ 3.74 ^a	10.92 $\pm$ 1.32 ^a
干预组	10	200	-	13.75 $\pm$ 3.02 ^b	5.69 $\pm$ 0.97 ^b
联合组	10	200	10	16.83 $\pm$ 3.19 ^c	8.85 $\pm$ 1.11 ^c
F				14.555	145.995
P				0.000	0.000

注 与对照组比较,^a $P<0.05$ 与PCOS组比较,^b $P<0.05$ 与干预组比较,^c $P<0.05$

2.4 各组大鼠卵巢组织病理改变情况 对照组大鼠卵巢组织中可观察到处于不同发育阶段的卵泡,黄体数量较多,卵泡囊性扩张极少;PCOS组大鼠卵巢结构紊乱,可观察到较多卵泡囊性扩张,窦前卵泡、闭锁卵泡数量增加,发育期卵泡与黄体数量明显减少;与PCOS组比较,干预组、联合组大鼠卵巢结构有所改善,可观察到卵泡囊性扩张,以及一定数量的发育期卵泡及黄体,窦前卵泡、闭锁卵泡数量有所减少,其中干预组改善效果优于联合组。(见图1)

图 1 各组大鼠卵巢组织病理变化 (HE, $\times 50$, 标尺 100 μm)

2.5 各组大鼠排卵情况比较 与对照组比较,PCOS组大鼠排卵率明显降低 ($P<0.05$), 平均排卵数明显减少 ($P<0.05$), 囊性扩张卵泡率明显升高 ($P<0.05$); 与PCOS组比较,干预组大鼠排卵率明显升高 ($P<0.05$), 平均排卵数明显增加 ($P<0.05$), 囊性扩张卵泡率明显降低 ($P<0.05$); 与干预组比较,联合组大鼠排卵率明显降低 ($P<0.05$), 平均排卵数明显减少 ($P<0.05$), 囊性扩张卵泡率升高 ($P<0.05$)。(见表4)

2.6 各组大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2比较 与对照组比较,PCOS组大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2明显升高 ($P<0.05$); 与PCOS组比较,干预组大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2明显降低 ($P<0.05$); 与干预组比较,联合组大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2明显升高 ($P<0.05$)。(见表5、图2)

表 5 各组大鼠卵巢组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	给药剂量		p-p38 MAPK/p38 MAPK	p-ERK1/2/ERK1/2
		菟丝子总黄酮 (mg/kg)	EGF ($\mu\text{g/kg}$)		
对照组	10	-	-	0.12 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02
PCOS组	11	-	-	0.63 $\pm$ 0.07 ^a	0.72 $\pm$ 0.09 ^a
干预组	10	200	-	0.31 $\pm$ 0.04 ^b	0.43 $\pm$ 0.05 ^b
联合组	10	200	10	0.46 $\pm$ 0.05 ^c	0.61 $\pm$ 0.07 ^c
F				203.255	179.041
P				0.000	0.000

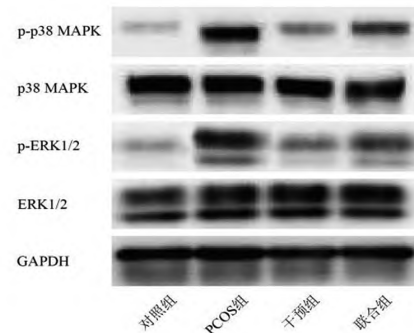
注 与对照组比较,^a $P<0.05$ 与PCOS组比较,^b $P<0.05$ 与干预组比较,^c $P<0.05$ 

图 2 各组大鼠卵巢组织 p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达 Western blotting 图

3 讨 论

PCOS是由下丘脑-垂体-卵巢轴代谢紊乱引起的非器质性疾病,临床表现为月经周期紊乱、排卵异常、胰岛素抵抗、高雄激素血症等,以双侧卵巢纤维化多囊性变,体积增大,膜下出现囊性扩张卵泡为主要病理改变^[9]。肥胖、月经周期延长、缺乏运动、不良饮食习惯、母亲孕期健康不佳等均是PCOS的危险因素,目前其发病机制尚未被完全阐明,多认为与胰岛素抵抗、下丘脑内分泌失调、甲状腺功能异常、遗传及环境因素等相关,其中胰岛素抵抗机制被更多学者认可^[10]。甲状腺激素可发挥胰岛素拮抗作用,其水平异常可影响促性腺激素活性,促使卵巢增大,加速PCOS发病,胰岛素抵抗加重可提升黄体生成素及雄激素水平,降低卵泡刺激素活性,从而减少排卵数量^[11-12]。因此,寻找调节甲状腺激素同时降低胰岛素抵抗的新型治疗手段,对于PCOS治疗具有积极意义。

中医学将PCOS归于“月经不调”“闭经”“不孕”等范畴,认为“冲任起于胞宫,隶属肝肾”。本病主要病机为禀赋不足、后

天失养、肾阳不足、肝气郁结、逆行犯脾,以致精血不足、血失流畅、任冲不通、天癸不至、胞宫虚寒、无血可下,子宫无法摄精成孕,终而发病。肾虚是其根本病因,故治疗应以补肾填精、活血化瘀为主^[13]。中药菟丝子又称豆寄生,是临床常用补肾药材,取自双子叶寄生植物菟丝子干燥成熟种子,性平,味辛、甘,归肝经、肾经、脾经,可补肾、固精、止泻、明目。唐代名家甄权言其可治虚冷,填精益髓,去腰疼膝冷。现代中医著作《山东中药》记载,菟丝子可治妇人习惯性流产^[14]。菟丝子总黄酮是菟丝子中黄酮类化合物的总称,作为一种植物雌激素,可在人体雌激素水平较低时表现类雌激素效应,在雌激素水平较高时表现抗雌激素效应,发挥其雌激素平衡作用^[15]。有学者^[16]认为,菟丝子总黄酮可修复子宫内双酚A诱导的小鼠后代卵巢功能障碍,提升促卵泡激素水平,促进排卵。本研究结果显示,与PCOS组比较,干预组大鼠血清TSH、LH、FINS、HOMA-IR水平及囊性扩张卵泡率明显降低,FT₃、FT₄、T₃、T₄、FSH、E₂水平及排卵率明显升高,平均排卵数明显增加,提示菟丝子总黄酮可改善PCOS大鼠甲状腺激素及性激素水平,降低胰岛素抵抗,促进排卵。

MAPK/ERK通路是胞外至胞核信息传递的重要通路之一,广泛参与细胞增殖、迁移、分化等过程。p38 MAPK、ERK是该通路重要调节因子,均属于MAPK家族。细胞外刺激激活p38 MAPK后,磷酸化的p38 MAPK可进入细胞核,激活下游酶蛋白引发酶促反应,激活ERK1/2,p-ERK1/2激活下游相关基因转录,降低胰岛素受体底物活性,从而增加胰岛素抵抗^[17-18]。YE H等^[19]研究认为,抑制MAPK/ERK通路可改善PCOS大鼠卵巢形态,提升促卵泡激素水平,减轻胰岛素抵抗。本研究结果显示,与对照组比较,PCOS组大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2均明显升高,干预组大鼠卵巢组织p-p38 MAPK/p38 MAPK、-ERK1/2/ERK1/2均明显降低,且联合组大鼠血清TSH、LH、FINS、HOMA-IR水平、囊性扩张卵泡率升高,FT₃、FT₄、T₃、T₄、FSH、E₂水平、排卵率均明显降低,平均排卵数减少,提示MAPK/ERK通路在PCOS中异常激活,菟丝子总黄酮可能通过调节该通路对PCOS产生治疗作用。

综上所述,菟丝子总黄酮可改善PCOS大鼠甲状腺激素及性激素水平,降低胰岛素抵抗,促进排卵。其作用机制可能与抑制MAPK/ERK通路有关。

参考文献

- [1] SALEHI R, MAZIER H L, NIVET A L, et al. Ovarian mitochondrial dynamics and cell fate regulation in an androgen-induced rat model of polycystic ovarian syndrome[J]. *Sci Rep*,2020,10(1):1021.
- [2] 马璠璇,管海云,王璐,等.多囊卵巢综合征患者颗粒细胞mTOR通路改变与生殖内分泌异常的相关性[J]. *中华生殖与避孕杂志*,2020,40(4):287-293.
- [3] IGNATOV A, ORTMANN O. Endocrine risk factors of endometrial cancer: Polycystic ovary syndrome, oral contraceptives, infertility, tamoxifen[J]. *Cancers*,2020,12(7):1766.

- [4] 郑义博,杨欣欣,包永睿,等.基于PI3K/PTEN/VEGF的菟丝子总黄酮抗肝癌作用机制研究[J]. *中国医院药学杂志*,2018,38(14):1462-1465.
- [5] 王永霞,马娜,钟兴明,等.菟丝子总黄酮对卵巢早衰大鼠卵巢功能的作用研究[J]. *医学综述*,2019,25(13):2695-2699.
- [6] 王娜梅.脱氢表雄酮诱导多囊卵巢综合征大鼠模型的表型研究[J]. *世界中西医结合杂志*,2015,10(11):1596-1599.
- [7] 苗明三,彭孟凡,闫晓丽,等.菟丝子总黄酮对来曲唑致多囊卵巢综合征大鼠模型的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2019,25(16):17-23.
- [8] LIU C H, HUA N, FU X, et al. Metformin regulates atrial SK2 and SK3 expression through inhibiting the PKC/ERK signaling pathway in type 2 diabetic rats[J]. *BMC Cardiovasc Disord*,2018,18(1):236.
- [9] QI X Y, YUN C Y, SUN L L, et al. Gut microbiota-bile acid-interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome[J]. *Nat Med*,2019,25(8):1225-1233.
- [10] ZHAO J, LIU S, WANG Y D, et al. Vitamin D improves in-vitro fertilization outcomes in infertile women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance[J]. *Minerva Med*,2019,110(3):199-208.
- [11] WDOVIK A, RACZKIEWICZ D, JANCZYK P, et al. Interactions of cortisol and prolactin with other selected menstrual cycle hormones affecting the chances of conception in infertile women[J]. *Int J Environ Res Public Health*,2020,17(20):7537.
- [12] 周彤艺,杨正望,周芳,等.健脾化痰方结合二甲双胍治疗脾虚痰湿证多囊卵巢综合征合并胰岛素抵抗的临床研究[J]. *中医药导报*,2021,27(11):95-99.
- [13] 周洁,王旭东,谈勇,等.补肾促排卵汤对多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢MMP-2、α-SMA的影响[J]. *中医药导报*,2020,26(15):44-48.
- [14] 山东卫生干部进修学院.山东中药[M].济南:山东人民出版社,1959:35-87.
- [15] WEI Y Y, HAN C, LI S Y, et al. Cuscuta chinensis flavonoids down-regulate the DNA methylation of the H19/Igf2 imprinted control region and estrogen receptor alpha promoter of the testis in bisphenol A exposed mouse offspring[J]. *Food Funct*,2020,11(1):787-798.
- [16] HAN C, WEI Y Y, GENG Y M, et al. Bisphenol A in utero exposure induces ovary dysfunction in mice offspring and the ameliorating effects of Cuscuta chinensis flavonoids[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*,2020,27(25):31357-31368.
- [17] XU B Y, TANG X D, CHEN J, et al. Rifampicin induces clathrin-dependent endocytosis and ubiquitin-proteasome degradation of MRP2 via oxidative stress-activated PKC-ERK/JNK/p38 and PI3K signaling pathways in HepG2 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, (下转第46页)

具有祛风散寒除湿的功效。乌头中的乌头碱具有显著抗炎、镇痛作用^[17-18]。肉桂亦为臣药,能够温中补肾、散寒止痛,《本草纲目》谓其能坚筋骨、通血脉、导百药。肉桂挥发油主要成分桂皮醛有明显的扩张皮肤血管作用,可增加体表血流,升高体表温度^[19]。木瓜为佐药,能舒筋活络、祛风除痹,是治疗筋脉拘急的要药。木瓜中的多糖能够抗炎、抗氧化^[20]。木鳖子亦为佐药,能消肿散结。木鳖子皂苷有抗炎作用^[21]。诸药共奏祛风除湿、活血通络止痛之功效。刮法是中医特色疗法之一,通过刮法的物理作用,温通局部腠理、脉络^[22],再加以膏药,增强药物吸收的同时,加强疗效。

本研究结果显示铁包金按摩膏联合刮法可以改善KOA模型兔膝关节炎症的症状,降低Lequesne MG、Mankin评分及软骨组织TNF- α 、IL-1 β 的水平,提高实验兔膝关节软骨组织中A20的表达,为铁包金按摩膏联合刮法治疗KOA提供了实验。其作用机制可能与抑制TNF- α 、IL-1 β 表达和促进A20蛋白表达有关。但铁包金按摩膏成分复杂,其有效成分及具体作用机制需进一步探索研究。

参考文献

- [1] 王斌,邢丹,董圣杰,等.中国膝关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J].中国循证医学杂志,2018,18(2):134-142.
- [2] 魏金荣,张惠萍,徐书英,等.刮痧疗法治疗膝关节骨性关节炎效果观察[J].中西医结合护理(中英文),2018,4(10):55-59.
- [3] 冯岚,唐华星,匡建军.铁包金药物刮痧在肩周炎应用中效果观察[J].湖南中医杂志,2016,32(7):130-132.
- [4] 李瑞良,蔡萍,戎宽,等.铁包金按摩膏药刮法治疗膝骨性关节炎30例临床观察[J].中医药导报,2018,24(20):85-87.
- [5] 李琳慧,熊俊,周志刚,等.兔膝关节炎模型的研究进展[J].江西中医药大学学报,2019,31(4):108-113.
- [6] LEQUESNE M G, SAMSON M. Indices of severity in osteoarthritis for weight bearing joints [J]. J Rheumatol Suppl,1991,27:16-18.
- [7] 王月,邹曜宇.实验动物的处死方法[J].现代农业科技,2010(12):284,286.
- [8] 尹万乐,马利阁,尤笑迎,等.膝骨性关节炎患者关节滑液白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 的表达及意义[J].中华实验外科杂志,2017,34(9):1593-1595.
- [9] OLAJIDE O A, BHATIA H S, DE OLIVEIRA A C P, et al. Inhibition of neuroinflammation in LPS-activated

microglia by cryptolepine[J]. Evid Based Complementary Altern Med,2013,2013:459723.

- [10] LU C, LI Y Q, HU S Y, et al. Scoparone prevents IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. Biomed Pharmacother,2018,106:1169-1174.
- [11] SCOTECCE M, CONDE J, ABELLA V, et al. Oleocanthal inhibits catabolic and inflammatory mediators in LPS-activated human primary osteoarthritis (OA) chondrocytes through MAPKs/NF- κ B pathways[J]. Cell Physiol Biochem, 2018,49(6):2414-2426.
- [12] 陈可添,黎力之,幸清风,等.锌指蛋白调控机体炎症信号通路的研究进展[J/OL].中国畜牧杂志:1-10[2022-03-08].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2083.S.20220104.1237.001.html>.
- [13] 李强,熊咏民.A20基因与NF- κ B信号通路的研究进展[J].国外医学(医学地理分册),2019,40(1):87-89.
- [14] 顾庚国,姜宏.WORMS评分中滑膜炎与膝骨性关节炎中医证型的关联性研究[J].中国骨伤,2019,32(12):1108-1111.
- [15] 王中陆,戎宽,蔡萍,等.铁包金按摩膏治疗类风湿性关节炎风寒湿阻证疗效观察[J].中医药临床杂志,2019,31(11):2156-2159.
- [16] 荆英珊,谢国勇,顾卫卫,等.铁包金的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2017,36(1):49-53,61.
- [17] 陈良妮,程雪梅,陈勇,等.川乌药理作用、毒性、质量控制方法研究进展[J].中成药,2021,43(3):722-729.
- [18] 荣宝山,黄凯丽,袁琳嫣,等.乌头类药材化学成分和药理作用研究进展[J].中国药事,2021,35(8):932-947.
- [19] 沈梦婷,白丹妮,王庆伟,等.肉桂及其活性成分抗炎作用机制的研究进展[J/OL].中草药:1-8[2022-03-08].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.r.20211228.1235.003.html>.
- [20] 代琪,余颖祺,叶俏波,等.中药木瓜和木瓜籽的化学成分及药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2021,17(8):219-223.
- [21] 赵芳惠,侯小涛,郝二伟,等.木鳖子化学成分、毒理与药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(3):222-235.
- [22] 周忠科.运用文献与激光散斑成像技术揭示刮痧法调节营卫的研究[D].成都:成都中医药大学,2014.

(收稿日期 2021-11-07 编辑 刘颖)

(上接第34页) 2020,41(1):36-64.

- [18] 刘亚华,韩煦,金黎懿,等.健脾清化方调控RasGRP1/P38 MAPK通路影响肠道通透性对高脂饮食诱导肥胖小鼠胰岛素抵抗的改善作用[J].中华中医药杂志,2021,36(5):2647-2651.

- [19] YE H, LIU X J, HUI Y, et al. Downregulation of microRNA-222 reduces insulin resistance in rats with PCOS by inhibiting activation of the MAPK/ERK pathway via pten[J]. Mol Ther Nucleic Acids,2020,22:733-741.

(收稿日期 2021-11-05 编辑 刘颖)