

化痰通脉饮对多囊卵巢综合征大鼠的改善作用机制研究[△]

姚新亚^{1,2*},林寒梅^{2#},逯克娜²,甘子晴²,郭华²,李文意³,李健玲²,金奇霖²(1.广西中医药大学第一临床医学院,南宁 530200;2.广西中医药大学第一附属医院妇科,南宁 530023;3.广西中医药大学附属国际壮医医院妇科,南宁 530201)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)23-2918-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.23.06



摘要 目的 基于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路调控自噬途径,探讨化痰通脉饮对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠的改善作用机制。**方法** 将40只大鼠随机分为空白组(纯净水)、模型组(纯净水)、中药组[化痰通脉饮,24 g/(kg·d)]和化学药组[二甲双胍,0.16 g/(kg·d)],每组10只。除空白组外,其余各组均采用灌胃1 mg/kg来曲唑混悬液联合高脂饲料喂养的方法建立PCOS大鼠模型。造模成功后,分别灌胃给药或水,每天1次,连续42 d。末次给药后,观察大鼠卵巢组织的病理形态学与超微结构变化;检测大鼠血清中促卵泡素(FSH)、睾酮(T)、雌二醇(E₂)、促黄体素(LH)水平并计算LH/FSH比值;检测大鼠卵巢组织中Beclin-1(Beclin-1)、p62、微管相关蛋白1轻链3(LC3)的mRNA表达水平以及PI3K/AKT/mTOR通路和自噬相关蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织病理损伤和超微结构改变明显,可见胞内大量自噬小体;血清中T、LH水平和LH/FSH比值,卵巢组织中Beclin-1、LC3 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);血清中E₂、FSH水平,卵巢组织中p62 mRNA及其蛋白表达水平和PI3K、AKT、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,给药组大鼠卵巢组织的病理损伤明显减轻,自噬小体数量减少,上述指标的表达水平均被显著逆转($P<0.05$)。**结论** 化痰通脉饮可通过激活PI3K/AKT/mTOR通路,抑制卵巢颗粒细胞自噬,调节性激素分泌,减轻卵巢组织的病理损伤,促进卵泡正常发育,从而发挥对PCOS大鼠的改善作用。

关键词 化痰通脉饮;多囊卵巢综合征;PI3K/AKT/mTOR通路;自噬;颗粒细胞

Study on the improvement mechanism of Huatan tongmai decoction on rats with polycystic ovary syndrome
YAO Xinya^{1,2}, LIN Hanmei², LU Kena², GAN Ziqing², GUO Hua², LI Wenyi³, LI Jianling², JIN Qilin²(1. The First Clinical School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Dept. of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 3. Dept. of Gynecology, International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530201, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the improvement mechanism of Huatan tongmai decoction on rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) by regulating autophagy through phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)/protein kinase B(AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **METHODS** A total of 40 rats were randomly divided into blank group (purified water), model group (purified water), traditional Chinese medicine group [Huatan tongmai decoction, 24 g/(kg·d)] and chemical drug group [metformin, 0.16 g/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except for blank group, other groups were given a combination of high-fat diet and intragastric administration of 1 mg/kg letrozole suspension to establish PCOS rat model. After modeling, they were given relevant medicine or water intragastrically, once a day, for 42 consecutive days. After the last administration, the pathological and ultrastructural changes of ovarian tissue were observed. The levels of follicle stimulating hormone (FSH), testosterone (T), estradiol (E₂), luteinizing hormone (LH) in serum were detected, and the LH/FSH ratio was calculated. mRNA expressions of Beclin-1, p62 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in ovarian tissue were detected. The expressions of related proteins of PI3K/AKT/mTOR pathway and autophagy in rat ovarian tissues were also detected. **RESULTS** Compared with blank group, the pathological damage and ultrastructural changes of the ovarian tissue in the model group rats were obvious, and a large number of autophagosomes could be seen in cells. The levels of T and LH and the LH/FSH ratio in serum, as well as mRNA and protein expressions of Beclin-1 and LC3, were increased significantly ($P<0.05$), while the levels of E₂ and FSH in serum, as well as mRNA and protein expressions of p62 and the phosphorylation levels of PI3K, AKT and mTOR proteins in ovarian tissue, were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, the pathological damage of ovarian tissue in the administration groups was significantly reduced, the number of autophagosomes was smaller, and the expression levels of the above indicators were significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Huatan tongmai

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82360950);广西壮族自治区研究生教育创新计划项目(No.YCBZ2024147)

***第一作者** 博士研究生。研究方向:中医药防治妇科生殖内分泌疾病及不孕不育。E-mail:1464975201@qq.com

#通信作者 主任医师,博士生导师。研究方向:中医药防治妇科生殖内分泌疾病及不孕不育。E-mail:Linhm0806@163.com

decocotion can inhibit autophagy in ovarian granular cells by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway, regulate the secretion of sex hormones, alleviate pathological damage in ovarian tissues, and promote normal follicular development, thereby exerting an ameliorative effect on PCOS rats.

KEYWORDS Huatan tongmai decoction; polycystic ovary syndrome; PI3K/AKT/mTOR pathway; autophagy; granular cells

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)以卵泡微环境失衡为核心特征,主要表现为窦前-窦卵泡过度阻滞、无周期性排卵等,可引发生殖-代谢双重障碍^[1]。临床队列研究显示,PCOS合并胰岛素抵抗者发生子宫内膜癌的风险较普通女性提高了2.7~4.3倍;在无排卵性不孕人群中,PCOS患病率已达50%~70%,且仍呈上升态势^[2]。在病因学层面,PCOS 被归为“多因素疑难病”,且现有证据指出其发病原因可能与颗粒细胞(granular cells, GCs)凋亡-自噬稳态破坏有关^[3]。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 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)通路作为GCs自噬的上游枢纽,兼具调控炎症和细胞增殖、存活的多效功能;该通路被过度激活后可通过抑制mTOR表达、加剧自噬应激,参与PCOS卵泡发育异常的分子病理过程^[4]。

化痰通脉饮是广西中医药大学第一附属医院林寒梅教授汲取首届国医大师、广西中医药大学教授班秀文先生的大量医案及学术经验后提炼而来。该方以“治经先治血,理血不忘瘀”为理,药取丹参、半夏、鸡血藤、苍术、白术、茯苓、陈皮、当归、川芎、香附、桃仁、瓦楞子、泽兰,共奏健脾化痰、活血化瘀之功。本课题组前期临床研究表明,该方联合二甲双胍使用可有效调节PCOS患者在月经周期、性激素水平等方面的诸多问题,显示出一定的中医药治疗优势^[5]。此外,本课题组前期基础研究发现,该方可通过回调PCOS异常病理进程中的过度炎症反应来减轻血管内皮损伤^[6]。基于此,本研究以PCOS模型大鼠为研究对象,探讨该方是否可作用于PI3K/AKT/mTOR通路进而调控自噬,阐明化痰通脉饮治疗PCOS的作用机制,为丰富中药复方对PCOS的治疗依据提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有: BX43型光学显微镜、 BX51型荧光显微镜(日本Olympus公司), TL-650Y型超声波细胞破碎仪(江苏天翔仪器有限公司), DS-11型核酸蛋白定量仪(美国DeNovix公司), CFX ConnectTM型荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司), RM2135型切片机(德国Leica公司), Multiskan MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司), H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

1.2 主要药品与试剂

化痰通脉饮组方饮片(半夏15 g、陈皮6 g、白术15 g、茯苓20 g、当归10 g、鸡血藤20 g、桃仁10 g、丹参15 g、泽兰15 g、川芎10 g、瓦楞子10 g、香附15 g、苍术15 g),加入6倍量蒸馏水浸泡2 h,采用文火分别煎煮2次,合并2次滤液并浓缩至含生药量为4.8 g/mL的药液,即得。

由广西中医药大学第一附属医院一次性购入,经该院药学部主任中药师田元春鉴定均为真品;盐酸二甲双胍片(批号1207097,规格0.5 g/片)购自中美上海施贵宝制药有限公司;来曲唑片(批号H19991001,规格2.5 mg/片)购自江苏恒瑞医药股份有限公司;羧甲基纤维素钠(批号F20070608)购自国药集团化学试剂有限公司;促卵泡素(follicle stimulating hormone, FSH)、睾酮(testosterone, T)、雌二醇(estrogen, E₂)、促黄体素(luteinizing hormone, LH)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号分别为JL13251、JL12462、JL11525、JL11706)均购自上海江莱生物科技有限公司;苏木素(批号710051)购自珠海贝索生物技术有限公司;伊红(批号880920)购自北京化学工业集团有限责任公司;兔荧光二抗(批号ZLI-9556)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Monzol升级款RNA提取试剂(批号140713)购自莫纳(苏州)生物科技有限公司;兔抗微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体、兔抗PI3K抗体、兔抗磷酸化PI3K(p-PI3K)抗体、兔抗AKT抗体、兔抗p62抗体(批号分别为ab192890、ab191606、ab138364、ab8805、ab109012)均购自英国Abcam公司;兔抗磷酸化AKT(p-AKT)抗体、兔抗mTOR抗体、兔抗磷酸化mTOR(p-mTOR)抗体、兔抗贝氯素1(Beclin-1)抗体(批号分别为4060S、2983S、5536S、3738S)均购自美国CST公司;兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号10494-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、DAPI染色液(批号分别为BA1054、AR1177)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为40只SPF级雌性SD大鼠,鼠龄为6周,体重为200~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004。大鼠购入后分笼饲养,饲养环境温度为20~25 °C,每日8:00至22:00光照,相对湿度为35%~45%。本研究中全部实验均得到广西中医药大学实验动物福利伦理委员会的批准(批准编号为DW20240603-175)。

2 方法

2.1 化痰通脉饮的制备

取化痰通脉饮的组方饮片(半夏15 g、陈皮6 g、白术15 g、茯苓20 g、当归10 g、鸡血藤20 g、桃仁10 g、丹参15 g、泽兰15 g、川芎10 g、瓦楞子10 g、香附15 g、苍术15 g),加入6倍量蒸馏水浸泡2 h,采用文火分别煎煮2次,合并2次滤液并浓缩至含生药量为4.8 g/mL的药液,即得。

2.2 分组、造模与给药

将40只大鼠随机分为空白组、模型组、中药组和化学药组,每组10只。空白组大鼠以普通饲料喂养,其余各组大鼠通过灌胃1 mg/kg来曲唑混悬液联合高脂饲料喂养建立PCOS模型,连续21 d后进行阴道涂片检测,若镜下可见造模大鼠卵巢组织上皮细胞持续角化、卵泡GCs层数明显减少、卵细胞放射冠消失或改变,则表明大鼠出现动情周期紊乱,提示造模成功^[7]。造模成功后,中药组、化学药组大鼠分别灌胃化痰通脉饮[24 g/(kg·d)^[6]]、二甲双胍溶液[0.16 g/(kg·d),溶剂为1%羧甲基纤维素钠溶液^[5]],空白组和模型组大鼠按10 mL/(kg·d)灌胃纯净水,每天1次,连续42 d。

2.3 标本采集及处理

末次给药24 h后,按0.04 g/kg的剂量腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉大鼠;取大鼠股动脉血4 mL,于4 °C下静置3 h后离心10 min(离心半径为10 cm,转速为3 500 r/min),存取上层血清,用于ELISA检测。

取血后将大鼠处死,分离其双侧卵巢,反复冲洗后去除卵巢血管、表面膜等组织后得到卵巢组织。每组取4只大鼠的卵巢组织分别固定于4%多聚甲醛、戊二醛固定液中,每组剩余6只大鼠的卵巢组织保存于-80 °C冰箱中,用于后续检测。

2.4 大鼠卵巢组织病理形态学观察

取“2.3”项下用4%多聚甲醛固定的卵巢组织,依次经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明及石蜡包埋后,制备石蜡切片(厚5 μm),最后进行苏木素-伊红(HE)染色,采用光学显微镜进行病理形态学观察。

2.5 大鼠卵巢组织超微结构观察

取“2.3”项下用戊二醛固定的大鼠卵巢组织,用1%四氧化锇后固定,经丙酮梯度脱水及环氧树脂包埋后,制备成厚度约60 nm的超薄切片。切片依次经醋酸铀染色10 min、柠檬酸铅染色2 min后,采用透射电子显微镜进行图像采集和观察。

2.6 大鼠血清性激素水平检测

取“2.3”项下血清,分别按照相应ELISA试剂盒说明书步骤操作,采用酶标仪检测血清中T、E₂、LH、FSH水平并计算LH/FSH比值。

2.7 大鼠卵巢组织中Beclin-1、p62蛋白表达检测

采用免疫荧光法检测。取“2.4”项下切片(每组取3个样本),放入3%柠檬酸修复液中高压修复10 min,再加入3%双氧水作用20 min,然后在室温下以5%牛血清白蛋白孵育30 min;分别滴加一抗(Beclin-1的稀释比例为1:150,p62的稀释比例为1:100)工作液,在4 °C下孵育过夜;滴加荧光二抗(稀释比例为1:150),在37 °C下孵育30 min;滴加DAPI染色液,室温孵育10 min,封片后通过荧光显微镜观察。Beclin-1、p62蛋白的阳性表达呈红色荧光,采用Image J软件对阳性表达蛋白的荧光强度进行分析。

2.8 大鼠卵巢组织中Beclin-1、p62、LC3 mRNA表达检测

采用qRT-PCR法检测。取“2.3”项下冻存的卵巢组织(每组取3个样本),加入0.5 mL Monzol升级款RNA提取试剂充分研磨裂解,提取组织中总RNA并将其反转录合成cDNA。以cDNA为模板,加入上、下游引物,按程序(95 °C预变性30 s;95 °C变性10 s,60 °C退火/延伸30 s,共40个循环)进行PCR扩增,根据扩增曲线和溶解曲线完成qRT-PCR检测。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算Beclin-1、p62、LC3 mRNA的表达水平。引物序列由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
GAPDH	正向:ACAGCAACAGGGTGGTGGAC 反向:TTTGAGGGTCAGCGAACCTT	155
Beclin-1	正向:TTGCCGTGTTACTGTTCT 反向:AATCTTGCCCTTCCTCCAC	165
p62	正向:TCCCTGTCAAGCAGTATCC 反向:TCCTCCTGGCTTGTCTC	145
LC3	正向:ATAGAGCGATAACAAGGGTG 反向:AGGAAGAAGGCTTGGTTA	140

2.9 大鼠卵巢组织中PI3K/AKT/mTOR通路及自噬相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.3”项下冻存的卵巢组织(每组取3个样本),加入裂解液后冷冻研磨,离心(温度4 °C,转速12 000 r/min,半径10 cm)15 min后取上清液。根据BCA试剂盒说明书对上清液中总蛋白进行定量,加入5×上样缓冲液煮10 min,冷却保存。取变性后蛋白上样进行电泳[浓缩胶的电压为80 V,电泳时间为30 min;分离胶的电压为120 V,电泳时间为60 min(其中LC3蛋白的电压为110 V,电泳时间为70 min)]、转膜[电流为350 mA,转膜时间为40 min(其中LC3蛋白的转膜电流为200 mA,转膜时间为60 min)]、室温封闭1 h(LC3蛋白室温封闭2 h)后,加入一抗PI3K、p-PI3K、AKT、mTOR、p-mTOR、Beclin-1、p62、LC3(稀释比例均为1:1 000)以及p-AKT(稀释比例为1:2 000)和GAPDH(稀释比例为1:5 000),4 °C孵育过夜;以TBST洗膜3次后加二抗(稀释比例为1:10 000),室温孵育1 h;又以TBST洗膜3次后加入ECL显影。使用Image J软件分析各蛋白条带的灰度值,以p-PI3K与PI3K、p-AKT与AKT、p-mTOR与mTOR条带的灰度值比值分别表示PI3K、AKT和mTOR蛋白的磷酸化水平,以Beclin-1、p62与内参蛋白(GAPDH)条带的灰度值比值表示Beclin-1、p62蛋白的表达水平,以LC3-II与LC3-I条带的灰度值比值表示LC3蛋白的表达水平。

2.10 统计学方法

采用SPSS 26.0统计学软件进行数据处理与分析。本研究中所有计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时组间两两比较采用LSD检验,方差不齐时组间两两比较采用Games-Howell检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 化痰通脉饮对PCOS大鼠卵巢组织病理形态学的影响

空白组大鼠卵泡结构完整,GCs层数较为丰富,透明带完好,黄体细胞数量充足且发育良好。与空白组比较,模型组大鼠的GCs层数显著减少,并出现明显的脱落现象;卵泡直径显著增大,卵细胞的放射冠消失,黄体细胞数量也随之减少。与模型组比较,各给药组大鼠的GCs层数显著增加,卵泡直径有所减小,未观察到卵细胞的放射冠,黄体细胞数量有所增加。结果见图1。

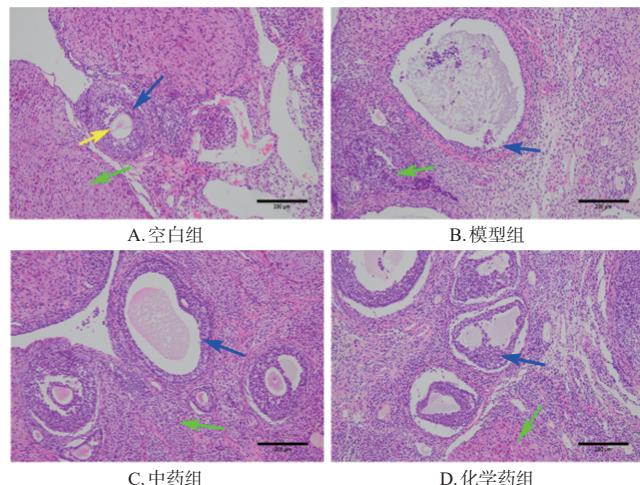


图1 各组大鼠卵巢组织HE染色图(标尺:200 μm)

3.2 化痰通脉饮对PCOS大鼠卵巢组织超微结构的影响

空白组大鼠核周间隙结构正常,核膜完整、连续未见断裂,核仁边集;线粒体轻度水肿变性,嵴结构部分轻度溶解;未见自噬相关结构;可见大量脂滴结构。与空白组比较,模型组大鼠核周间隙局部轻度扩张且呈泡状向外膨出,局部核膜断裂,未见核仁;线粒体重度水肿变性,外膜部分断裂,嵴结构多数溶解;粗面内质网中度扩张,囊池结构广泛增宽、形态不规则;细胞内有大量次级溶酶体、自噬小体结构;可见较多的不饱和脂肪酸脂滴结构,中间电子密度最高的颗粒为脂褐素成分。与模型组比较,中药组大鼠核膜显著扩张,核周间隙明显增宽,多处核膜出现断裂,核仁增大或肥大;线粒体中度水肿变性,外膜部分断裂,嵴结构大部分溶解,且胞内可见大量滑面内质网呈囊泡状。化学药组大鼠表现为核周间隙局部轻度扩张且呈泡状向外膨出,局部核膜断裂,未见核仁;线粒体同样中度水肿变性,外膜部分断裂,嵴结构多数被溶解;粗面内质网表现出中度扩张,囊池结构广泛增宽且形态不规则,伴随部分脱颗粒。此外,各给药组大鼠GCs内均可观察到少量自噬小体结构,GCs之间存在大量脂滴结构。结果见图2。

3.3 化痰通脉饮对PCOS大鼠血清性激素水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠血清中T、LH水平及LH/FSH比值均显著升高($P<0.05$),E₂、FSH水平均显著

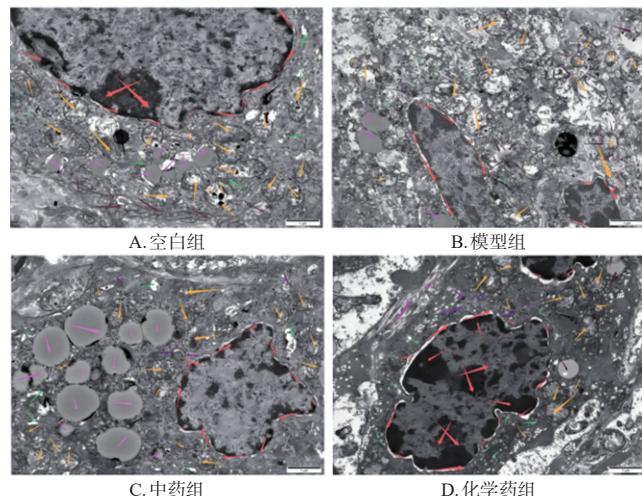


图2 各组大鼠卵巢组织透射电镜图(标尺:1 μm)
红色箭头:细胞核;黄色箭头:线粒体;绿色箭头:内质网;深紫色箭头:自噬相关结构;浅紫色箭头:脂滴结构。

图2 各组大鼠卵巢组织透射电镜图(标尺:1 μm)

降低($P<0.05$);与模型组比较,中药组和化学药组大鼠上述指标水平/比值均被显著逆转($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠血清性激素水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	T/(nmol/L)	E ₂ /(pmol/L)	FSH/(U/L)	LH/(ng/L)	LH/FSH
空白组	4.71±0.31	94.98±4.95	23.44±2.77	34.93±0.60	1.50±0.17
模型组	7.57±0.04 ^a	76.77±1.28 ^a	14.47±0.61 ^a	38.30±0.25 ^a	2.65±0.10 ^a
中药组	6.78±0.36 ^b	83.50±6.55 ^b	23.13±1.50 ^b	36.93±1.00 ^b	1.60±0.08 ^b
化学药组	6.73±0.22 ^b	84.14±3.48 ^b	23.26±0.97 ^b	36.35±0.46 ^b	1.56±0.05 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.4 化痰通脉饮对PCOS大鼠卵巢组织中Beclin-1、p62蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织中Beclin-1蛋白的荧光强度显著升高($P<0.05$),p62蛋白的荧光强度显著降低($P<0.05$);与模型组比较,中药组和化学药组大鼠卵巢组织中Beclin-1蛋白的荧光强度显著降低($P<0.05$),p62蛋白的荧光强度显著升高($P<0.05$)。结果见表3(免疫荧光染色图请扫描本文首页二维码进入“增强出版”页面查看附图1、附图2)。

表3 各组大鼠卵巢组织中Beclin-1、p62蛋白的荧光强度比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Beclin-1	p62
空白组	0.75±0.62	7.93±0.31
模型组	8.29±0.57 ^a	0.89±0.38 ^a
中药组	4.58±0.61 ^b	4.88±0.59 ^b
化学药组	5.14±1.20 ^b	4.85±1.89 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.5 化痰通脉饮对PCOS大鼠卵巢组织中Beclin-1、p62、LC3 mRNA表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织中Beclin-1、LC3 mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$),p62 mRNA表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,中药组和化学药组大鼠卵巢组织中上述指标水平均被显著逆转($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠卵巢组织中 Beclin-1、p62、LC3 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	Beclin-1	p62	LC3
空白组	1.42±0.18	1.31±0.25	1.58±0.09
模型组	3.42±0.23 ^a	0.10±0.04 ^a	3.81±0.87 ^a
中药组	1.64±0.08 ^b	0.64±0.03 ^b	2.05±0.43 ^b
化学药组	1.47±0.20 ^b	0.74±0.18 ^b	2.10±0.97 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$; b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.6 化痰通脉饮对PCOS大鼠卵巢组织中PI3K/AKT/mTOR通路及自噬相关蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠卵巢组织中PI3K、AKT、mTOR蛋白的磷酸化水平及p62蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$),Beclin-1、LC3蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠上述指标水平均被显著逆转($P<0.05$)。结果见图3、表5。

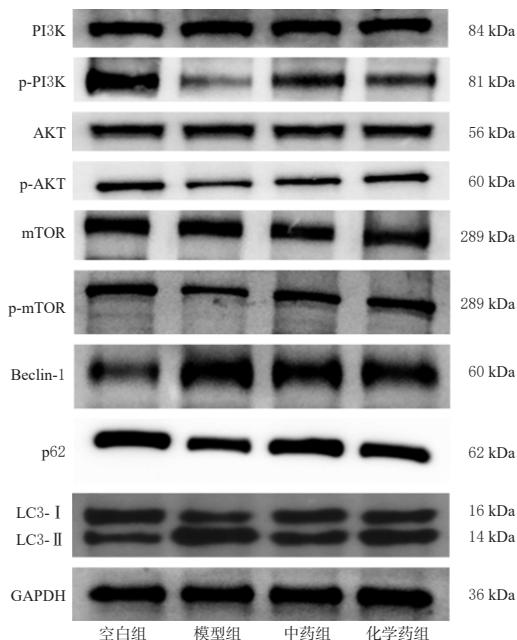


图3 各组大鼠卵巢组织中PI3K/AKT/mTOR通路及自噬相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠卵巢组织中PI3K/AKT/mTOR通路及自噬相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR	Beclin-1/GAPDH	p62/GAPDH	LC3-II/LC3-I
空白组	1.04±0.29	1.09±0.11	1.15±0.10	0.52±0.39	1.06±0.07	0.28±0.03
模型组	0.41±0.07 ^a	0.75±0.19 ^a	0.59±0.09 ^a	1.13±0.11 ^a	0.62±0.06 ^a	2.35±0.23 ^a
中药组	0.75±0.12 ^b	1.11±0.11 ^b	1.05±0.27 ^b	0.69±0.13 ^b	1.13±0.26 ^b	0.64±0.11 ^b
化学药组	0.73±0.06 ^b	1.00±0.08 ^b	1.14±0.12 ^b	0.63±0.17 ^b	0.99±0.10 ^b	1.29±0.12 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$; b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

PCOS是一种内分泌代谢性疾病,中医尚未有与之对应的病名,而是根据该病的临床表现将其归属于“不孕”“闭经”等范畴。国医大师班秀文教授以中医阴阳理论解析PCOS的病理病机后认为,维持机体内环境的功能属阳,而PCOS患者素体脾肾两虚,阳虚则不能制约属阴的物质,即产生痰浊、瘀血等病理产物,日久导致内环境失衡,即阴阳失衡,使机体处于病理状态^[8]。因此,其

认为治疗PCOS应该健脾化痰、活血化瘀,并据此创立了能够祛瘀生新、维持内环境稳定的化痰通脉饮。

高雄激素血症不仅是导致女性无排卵的最常见原因之一,而且增加了PCOS患者内分泌紊乱的风险^[9]。PCOS患者内分泌失调,表现为窦前卵泡生长过多,且其体内增多的人类抗米勒管激素可降低卵泡对FSH的敏感性,使GCs的增殖速率降低、卵泡发育停滞^[10]。PCOS的诊断特征之一是T水平升高^[11]。研究发现,加剧卵泡闭锁与排卵障碍的另一个主要原因是GCs分泌的E₂减少^[12]。一项包含76例PCOS患者的横断面研究发现,PCOS组患者血清中LH水平、LH/FSH比值和游离T水平均显著高于正常组^[13]。本研究结果显示,化痰通脉饮能显著降低PCOS大鼠血清中T、LH水平和LH/FSH比值,升高血清中E₂、FSH水平,表明该方能够有效调控以上性激素分泌,改善PCOS大鼠内分泌紊乱。

GCs是卵巢组织的重要组成部分,在卵泡生长发育过程中发挥着至关重要的作用。GCs凋亡会导致卵巢激素合成减少,从而阻滞卵泡卵母细胞的生长发育,诱导卵母细胞凋亡;此外,自噬水平的稳态可维护卵泡正常生长发育,而过度自噬则可导致卵泡闭锁死亡^[14]。GCs的凋亡使得大多数卵泡停滞在窦状卵泡阶段不能继续发育,而PCOS患者GCs的凋亡发生率明显高于正常人群,这表明GCs的数量预示着卵泡发育的结局^[15]。此外,有研究发现患PCOS的人和大鼠的卵巢组织存在过度自噬情况,而GCs又是该自噬发生的主要场所^[16]。本研究中病理和电镜观察结果显示,PCOS大鼠GCs、卵细胞、黄体细胞数量等均明显减少,同时线粒体水肿变性严重,且存在大量溶酶体和自噬小体;给予化痰通脉饮干预后,PCOS大鼠上述情况明显逆转,表明该方涉及的效应表型可能与抑制线粒体过度自噬有关。

自噬过程可分为多个特定阶段,包括自噬小体、溶酶体的生成及自溶酶体内物质的降解。关键的自噬相关蛋白包括自噬相关蛋白7、UNC-51样激酶1、Beclin-1和LC3-I/II,其参与自噬启动过程并促进自溶酶体成熟^[17]。因LC3-II在细胞自噬中具有特异性,并且自噬程度与自噬体数量成正比,所以LC3-II水平或LC3-II/LC3-I比值是评估细胞自噬水平的金标准^[18]。Prasad等^[19]发现,LC3-II在PCOS小鼠的后代小鼠卵巢中的表达高于正常小鼠,且在GCs中尤其多。另有研究发现,自噬启动后,Beclin-1的表达水平与血清总T、LC3-II/LC3-I比值呈正相关;p62由于可随着降解底物被运送到溶酶体而一同降解,故其水平反而下降^[20]。本研究结果显示,模型组大鼠卵巢组织中Beclin-1蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值均较空白组大鼠显著升高,而p62蛋白表达水平较空白组显著降低;经化痰通脉饮干预后,PCOS大鼠卵巢组织中上述指标水平均被显著逆转。这提示该方能够抑制PCOS大鼠的过度自噬。

GCs通过连接蛋白、激素及卵巢特定细胞因子的相互作用,调节多条信号通路,以维持卵泡内自噬与凋亡

的平衡,确保卵巢的正常功能^[21]。mTOR作为PI3K/AKT通路下游核心效应因子,在促性腺激素分泌和调节卵泡生长方面均有重要作用^[22]。PI3K/AKT/mTOR通路可负向调节卵巢GCs的自噬,与卵泡发育和闭锁密切相关^[23]。研究表明,激活PCOS小鼠的PI3K/AKT/mTOR通路能够减少活性氧的产生,减少细胞凋亡、氧化应激和自噬,加速卵巢GCs的增殖^[24]。本研究结果显示,化痰通脉饮能够上调PI3K/AKT/mTOR通路中重要蛋白PI3K、AKT、mTOR的磷酸化水平,表明该方能够显著激活该通路。

综上所述,化痰通脉饮可通过激活PI3K/AKT/mTOR通路抑制PCOS大鼠卵巢GCs自噬,调节性激素分泌,减轻卵巢组织的病理损伤,促进卵泡正常发育,从而改善PCOS。然而,本研究存在一定局限性,如未通过基因沉默及加入抑制剂、激动剂等方式对该通路的重要基因进行反向验证,后续本课题组将设计相关实验对此进行深入研究。

参考文献

- [1] QIN Y L, LI T, ZHAO H, et al. Integrated transcriptomic and epigenetic study of PCOS: impact of Map3k1 and Map1lc3a promoter methylation on autophagy[J]. Front Genet, 2021, 12:620241.
- [2] HATOUM S, AMIRI M, HOPKINS D, et al. Population-based vs. health system and insurer records: significant underdiagnosis of PCOS[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2025, 110(6):e1759-e1766.
- [3] RASHAD N M, EL-SHAL A S, ABDELAZIZ A M. Association between inflammatory biomarker serum procalcitonin and obesity in women with polycystic ovary syndrome [J]. J Reprod Immunol, 2013, 97(2):232-239.
- [4] GUO Z X, YU Q. Role of mTOR signaling in female reproduction[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10:692.
- [5] 林寒梅, 逮克娜, 赵柯杭, 等. 化痰通脉饮联合二甲双胍治疗肥胖型多囊卵巢综合征的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(7):1416-1418.
- [6] 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-κB信号串流的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24):140-145.
- [7] 刘敏, 朱鸿秋, 李印, 等. 桂枝茯苓丸调节PI3K/Akt/mTOR通路对PCOS-IR大鼠排卵障碍的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6):7-14.
- [8] 肖承悰, 吴熙. 中医妇科名家经验心悟[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:265-274.
- [9] LI X X, QI J, ZHU Q L, et al. The role of androgen in autophagy of granulosa cells from PCOS[J]. Gynecol Endocrinol, 2019, 35(8):669-672.
- [10] BHIDE P, KULKARNI A, DILGIL M, et al. Phenotypic variation in anti-Mullerian hormone (AMH) production per follicle in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and isolated polycystic ovarian morphology (PCOM): an observational cross-sectional study[J]. Gynecol Endocrinol, 2017, 33(10):801-806.
- [11] HALPIN K, PAPROCKI E, EICKHOFF P, et al. Selective venous sampling prompting unilateral oophorectomy in an adolescent with PCOS and markedly elevated testosterone [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2023, 36(2):103-106.
- [12] ZHANG C Y, MA J, WANG W S, et al. Lysyl oxidase blockade ameliorates anovulation in polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2018, 33(11):2096-2106.
- [13] FRANIK G, MAKSYM M, OWCZAREK A J, et al. Estradiol/testosterone and estradiol/androstenedione indexes and nutritional status in PCOS women: a pilot study[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2019, 242:166-169.
- [14] REGAN S L P, KNIGHT P G, YOVICH J L, et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle: a changing view [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9:61.
- [15] 章彩芳, 来玉芹, 凌沛, 等. 中药调控卵巢颗粒细胞自噬的研究进展[J]. 河北中医, 2023, 45(3):504-508, 513.
- [16] LI D, YOU Y, BI F F, et al. Autophagy is activated in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome[J]. Reproduction, 2018, 155(1):85-92.
- [17] HUANG Q, LI Y B, CHEN Z, et al. Bushenhuoluo decoction improves polycystic ovary syndrome by regulating exosomal miR-30a-5p/SOCS3/mTOR/NLRP3 signaling-mediated autophagy and pyroptosis[J]. J Ovarian Res, 2024, 17(1):29.
- [18] RUNWAL G, STAMATAKOU E, SIDDIQI F H, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells[J]. Sci Rep, 2019, 9:10147.
- [19] PRASAD S, TIWARI M, PANDEY A N, et al. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome[J]. J Biomed Sci, 2016, 23:36.
- [20] SONG X, SHEN Q Y, FAN L T, et al. Dehydroepiandrosterone-induced activation of mTORC1 and inhibition of autophagy contribute to skeletal muscle insulin resistance in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. Oncotarget, 2018, 9(15):11905-11921.
- [21] GAWRILUK T R, KO C, HONG X M, et al. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(40):E4194-E4203.
- [22] 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.
- [23] WANG C, LIAO H Y, LIU H P, et al. Relationship between autophagy and premature ovarian failure[J]. Reprod Contracept, 2016, 44(4):637-642.
- [24] WANG F H, YIN Y Y, NIE X W, et al. Protocatechuic acid alleviates polycystic ovary syndrome symptoms in mice by PI3K signaling in granulosa cells to relieve ROS pressure and apoptosis[J]. Gynecol Endocrinol, 2023, 39(1):2228917.

(收稿日期:2025-08-11 修回日期:2025-11-15)

(编辑:林 静)