

杨璐瑜, 林安盈, 杨正望, 等. 健脾化痰方通过调控 FOXO1/PDK4 信号通路干预 PCOS-IR 大鼠脂代谢的作用机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 451-460.

YANG L Y, LIN A Y, YANG Z W, et al. Effects of Jianpi Huatan Fang on lipid metabolism and FOXO1/PDK4 expression in the ovary in rats with polycystic ovary syndrome and insulin resistance [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 451-460.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.04.005

健脾化痰方通过调控 FOXO1/PDK4 信号通路干预 PCOS-IR 大鼠脂代谢的作用机制研究

杨璐瑜¹, 林安盈², 杨正望¹, 李岚³, 余曦明^{2*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410021; 2. 湖南中医药大学,
长沙 410208; 3. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005)

【摘要】 目的 探讨健脾化痰方对多囊卵巢综合征合并胰岛素抵抗 (PCOS-IR) 大鼠脂代谢及叉头盒转录因子-1 (FOXO1)/丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4) 信号通路的影响。**方法** 40 只雌性 SD 大鼠随机分为空白对照组 10 只和造模组 30 只。采用高脂饮食 (8 周) 联合来曲唑 (第 4 ~ 8 周加入) 建立 PCOS-IR 大鼠模型。完成造模后, 将造模组大鼠随机分为模型对照组、健脾化痰方组、二甲双胍组, 药物干预 4 周。观察各组一般情况, 测定中医证候评分, 计算体重变化; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察卵巢组织病理学改变; 血液生化仪测定空腹血糖 (FBG) 和血脂四项; 酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定性激素如卵泡刺激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、睾酮 (T)、雌激素 (E₂)、胰岛素 (FINS) 水平; 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 法及实时荧光定量 PCR 法测定卵巢 FOXO1、PDK4 表达的变化。**结果** 与空白对照组相比, 模型对照组出现脾虚痰湿症状, 体重明显增加, 血清 LH、T、LH/FSH 升高, E₂、FSH 降低, 卵巢多囊性改变明显, 糖脂代谢调控失常 ($P < 0.01$)。与模型对照组相比, 健脾化痰方组与二甲双胍组大鼠体重增速放缓, 卵泡发育情况见好, 血清 LH、T、LH/FSH、FBG、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C 降低, E₂、FSH 升高, 卵巢 FOXO1、PDK4 mRNA 及蛋白表达下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 可升高血清 HDL-C 含量, 但是组间差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 健脾化痰方能有效调节性激素分泌, 改善 PCOS-IR 大鼠卵巢生殖功能, 调节糖脂代谢, 其机制可能是通过抑制 FOXO1/PDK4 通路发挥作用。

【关键词】 多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 脂代谢; FOXO1; PDK4; 健脾化痰方

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 04-0451-10

Effects of Jianpi Huatan Fang on lipid metabolism and FOXO1/PDK4 expression in the ovary in rats with polycystic ovary syndrome and insulin resistance

YANG Luyu¹, LIN Anying², YANG Zhengwang¹, LI Lan³, YU Ximing^{2*}

(1. the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410021, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. the Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China)

Corresponding author: YU Ximing. E-mail: 63175725@qq.com

【基金项目】 湖南省自然科学基金青年项目 (2022JJ40317), 湖南中医药大学中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金 (21PTKF1011)。

Funded by the Hunan Natural Science Foundation Youth Program (2022JJ40317), Open Fund for the Cultivation Base of State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Powder and Innovative Drugs Jointly Built by Hunan University of Chinese Medicine (21PTKF011).

【作者简介】 杨璐瑜, 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治女性生殖内分泌疾病。Email: 1207931566@qq.com

【通信作者】 余曦明, 女, 高级实验师, 硕士, 研究方向: 中医药防治女性生殖内分泌疾病。Email: 63175725@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of Jianpi Huatan Fang on lipid metabolism and expression levels of FOXO1 and PDK4 in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) and insulin resistance (IR). **Methods** Forty female rats were divided randomly into a blank control group ($n = 10$) and a model group ($n = 30$). A PCOS-IR rat model was established using a high-fat diet (8 weeks) combined with letrozole (added at weeks 4 ~ 8). Thirty successfully modeled rats were then divided randomly into a model control group, a Jianpi Huatan Fang group (11.07 g/kg), and a metformin group (0.2 g/kg) ($n = 10$ rats per group). Drug intervention was given for 4 weeks. The general status, Traditional Chinese medicine syndrome score, and weight changes were observed in each group. Histopathological changes in the ovary were detected by hematoxylin and eosin staining. Fasting blood glucose and blood lipids were measured using a blood biochemical analyzer. Levels of sex hormones including follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T), estradiol (E_2), and insulin were determined by enzyme linked immunosorbent assay and changes in the expression of FOXO1 and PDK4 in the ovaries were determined by Western Blot and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Results** Rats in the model control group exhibited symptoms of spleen deficiency and phlegm-dampness and showed significant weight gain, sex hormone disorders, polycystic ovarian changes, and dysregulation of glucose and lipid metabolism, compared with rats in the blank control group ($P < 0.01$). In addition, weight increase was slower in rats in the Jianpi Huatan Fang group and the metformin group compared with that in the model control group, and follicle development was improved. Serum LH, T, LH/FSH, fasting blood glucose, insulin, homeostatic model assessment for IR, cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein cholesterol decreased, estradiol and FSH increased, and ovarian FOXO1 and PDK4 mRNA and protein expression levels were down regulated in the Jianpi Huatan Fang group compared with the findings in the model control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Serum high-density lipoprotein cholesterol content was also increased, but the difference was not significant ($P > 0.05$). **Conclusions** Jianpi Huatan Fang can effectively regulate sex hormone secretion, improve ovarian reproductive function, and regulate glucose and lipid metabolism in obese PCOS-IR rats, possibly via inhibiting the FOXO1/PDK4 pathway.

[Keywords] polycystic ovary syndrome; insulin resistance; lipid metabolism; FOXO1; PDK4; Jianpi Huatan Fang
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 作为一类常见且难以治愈的妇科疾病, 对全球 8% ~ 13% 的育龄期女性造成了负面影响^[1], 与生殖内分泌异常及代谢紊乱相关, 临床表现主要包括月经异常及排卵异常、高雄激素表现、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 等代谢异常。IR 是该病的核心发病机制。研究认为脂代谢异常既是胰岛素抵抗的结果, 也是胰岛素抵抗的重要致病因素^[2]。在我国, 约 70% 的 PCOS 患者存在脂代谢异常^[3]。胰岛素抵抗与脂代谢异常也是引起许多难治性慢性疾病的重要因素, 如肥胖症、糖调节受损及 2 型糖尿病、非酒精性脂肪性肝病、冠心病等, 严重影响 PCOS 患者的远期生活质量。叉头盒转录因子-1 (FOXO1) 是近年 PCOS 研究中的新靶点, 通过对自身蛋白质和 mRNA 的修饰参与控制介导代谢调节的下游基因的转录, 与糖脂代谢、IR 密切相关^[4-5]。丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4) 是 FOXO1 的主要下游靶基因, 参与调控线粒体能量, 也在胰岛素抵抗及脂代谢中起到了重要作用^[6-8]。

健脾化痰方是杨正望教授临床经验方, 临床上针对脾虚痰湿型 PCOS 临床疗效显著, 可以改善脂

代谢紊乱、胰岛素抵抗等症状, 对调整内分泌及预防远期并发症有积极意义^[9-10]。但目前多为临床报道, 因此, 本研究构建 PCOS-IR 大鼠模型, 深入探究本方对 PCOS-IR 大鼠糖脂代谢的影响, 以及研究其是否与 FOXO1/PDK4 通路相关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 21 日龄 SPF 级雌性 SD 健康大鼠, 体重 47 ~ 59 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK (湘) 2019 - 0004】, 动物合格证号 430727221100204748。可自由获得标准饮用水和相应颗粒饲料, 12 h 光/暗循环, 室温 20 ~ 26 °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 环境安静, 通风干燥, 饲养于湖南中医药大学动物实验中心【SYXK (湘) 2019-0009】。大鼠分笼饲养, 每笼饲养 3 只。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批 (LL2022020801)。

1.1.2 药物

健脾化痰方由茯苓 15 g、黄芪 15 g、浙贝 10 g、柴胡 10 g、当归 10 g、苍术 10 g、陈皮 10 g、法半夏

10 g、石菖蒲 10 g、枳壳 10 g、黄连 5 g、川芎 5 g、甘草 3 g 组成(购自湖南中医药大学第一附属医院急诊颗粒中药房);盐酸二甲双胍片(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:国药准字 H20054790,规格:每片 0.5 g);来曲唑片(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:H19991001,规格:每片 2.5 mg)。

1.1.3 主要试剂与仪器

FSH、LH、T、胰岛素、脂联素酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(分别购自江苏酶免实业有限公司及江苏菲亚生物科技有限公司,批号分别为:FY3441-B、FY3676-B、FY3452-B、2205R42、2205R36,中国);FOXO1 抗体、PDK4 抗体(购自 Bioswamp,批号分别为:PAB40781、PAB31474,中国);FOXO1 和 PDK4 的上下游引物,购自北京擎科生物科技有限公司。

Rayto RT-6100 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,中国);Chemray240 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司,中国);PIKOREAL96 荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific,美国)。

1.2 方法

1.2.1 构建 PCOS-IR 动物模型

将 40 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 10 只和造模组 30 只。造模持续 8 周;造模组大鼠持续喂食高脂饲料(购自北京科澳协力饲料有限公司,组成百分比为:脂肪 45%、碳水化合物 35%、蛋白质 20%),第 4 周开始增加来曲唑溶液(1 mg/kg)灌胃;空白对照组大鼠持续喂食普通饲料,第 4 周开始增加 0.5%羧甲基纤维素钠溶液灌胃。灌胃时给予体积为 10 mL/(kg·d)。

1.2.2 分组及给药

将造模成功的 30 只 PCOS-IR 大鼠再次随机分组,分为模型对照组、健脾化痰方组、二甲双胍组,每组 10 只。给药组灌胃相应药物,灌胃时给予体积为 10 mL/(kg·d),给药剂量均按体表面积换算:二甲双胍折合大鼠用药剂量为 0.2 g/kg,溶液调配至 20 g/L;健脾化痰方折合大鼠用药剂量为 11.07 g/kg,溶液调配至含生药 1.11 g/mL;空白对照组和模型对照组灌胃等体积的蒸馏水,连续 4 周。

1.2.3 脾虚痰湿证证候评估

造模及治疗期间,观察各组小鼠精神状态、活动状况、体型、毛发、粪便等项目,进行中医证候评

估。脾虚从精神状态(良好、倦怠、朦胧欲睡、多怒撕咬)、活动(自如、蜷缩、畏寒喜暖、拱背发抖)、呼吸(平顺、气喘、喘急、呼吸微弱)、皮毛(光滑、无光泽、竖毛蓬松、枯黄稀少)、大便质地(正常、偏湿、湿烂、黏液便)及有无异味(无异味、淡臭、臭、恶臭)分项计算积分^[11-13],评价脾虚的严重程度,其中各项正常为 1 分,根据严重程度逐分递增,最终得分 ≤ 6 分为无脾虚,7 ~ 12 分为轻度脾虚,13 ~ 18 分为典型脾虚,19 ~ 24 分为重度脾虚;根据形体肥胖、血脂水平升高评估痰湿证。

1.2.4 样本采集

造模及治疗期间,每周定时检测 2 次大鼠体重。各组大鼠末次给药后,20:00 开始禁食不禁水。次日 8:00 称取体重后,先取尾尖血检测各组大鼠的空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG),再进行腹腔注射麻醉,确定深度麻醉后,腹主动脉取血 4 ~ 5 mL,静置 1 h 后离心 15 min(3000 r/min),取上层血清保存于 -80 °C 冰箱备用。分离两侧卵巢组织,分别放入 4%多聚甲醛中固定及液氮中速冻保存备用。

1.2.5 卵巢组织病理学观察

卵巢组织固定 24 h,依次进行脱水、浸蜡,制成厚为 4 μm 的组织薄片,烘干后进行苏木素-伊红(HE)染色处理,光镜下观察卵巢组织形态变化。

1.2.6 血脂检测

在全自动生化分析仪中设置相应参数,上样后自动检测大鼠血清中的甘油三酯(triglycerides, TG)、胆固醇(cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平。

1.2.7 血清性激素及胰岛素检测

取保存的血清,ELISA 法检测卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)、雌激素(estradiol, E_2)、胰岛素(insulin, FINS)水平,并通过稳态胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)评估胰岛素抵抗程度。 $\text{HOMA-IR} = \text{FBG}(\text{mmol/L}) \times \text{FINS}(\text{mIU/L})/22.5$ 。

1.2.8 Western Blot 法检测 FOXO1 和 PDK4 蛋白的表达

取 0.02 g 卵巢组织放入预冷离心管中,分 2 次加入 200 μL 裂解液,塑料棒研磨后室温孵育 1 ~

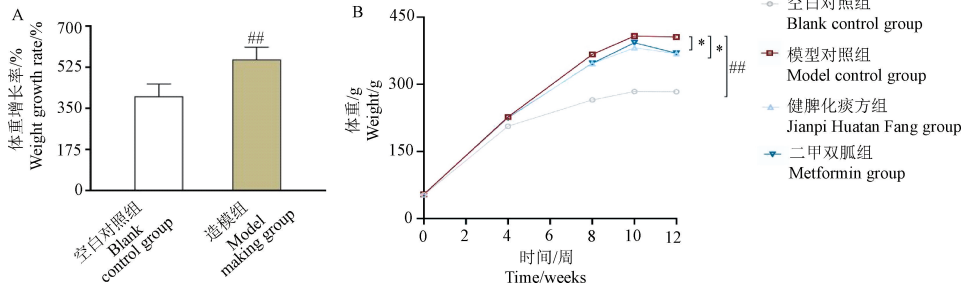
2 min,以 14 000 ~ 16 000 r/min 离心 1 ~ 2 min,收集上清。根据 BCA 法测定蛋白量。备制胶架,实时配制分离胶,灌入玻璃板间隙,再缓慢加注异丙酮压平。待分离胶凝固后倒掉异丙酮。最后加入现配浓缩胶,插上梳子,等待凝固。将凝固好的胶固定在电泳槽中,拔出梳子,上样。上样结束后加盖开始电泳。电泳完成后剪切所需分离胶部分,制作三明治夹层:中心为分离胶及上层的 NC 膜(0.45 μm),依次为润湿的白色滤纸、黑色纤维垫,最外层下为黑色负极板、上为透明正极板。转膜夹固定后放入干转仪中进行转膜。转膜成功后封闭、孵抗体。最后往膜上均匀加入显影剂,放入显影机中进行发光成像。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 法检测 FOXO1 和 PDK4 mRNA 的表达

取 0.02 g 卵巢组织,加入 1 mL 总 RNA 抽提试剂研磨匀浆,经过室温裂解、离心沉淀,提取样本总 DNA,在 260 ~ 280 nm 处测其吸光度值,并计算其浓度与纯度。以组织总 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。取 cDNA 2 μL ,加入上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,ddH₂O 11 μL ,2 $\times$ SYB GREEN PCR Master Mix 15 μL ,共 30 μL ,进入扩增程序,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min 后,以 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 为 1 次,循环 40 次。以 GAPDH 为内参,分析 FOXO1 及 PDK4 的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 FOXO1 和 PDK4 引物序列

Table 1 Primers sequence for FOXO1 and PDK4			
引物名称 Primers	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	长度/bp Length/bp
FOXO1	CGCGTCTCTGCTACTCTCTG	GTGCTCGAGTTGGACTGGT	163
PDK4	TCCCGTCTCTACGCCAAGTA	GGCATCTGTCCCATAGCCTG	72
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGCTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	252



注:A:来曲唑联合高脂饲料喂养对体重的影响;B:健脾化痰方对体重的影响;与空白对照组相比,## $P < 0.01$;与模型对照组相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 来曲唑联合高脂饲料和健脾化痰方对体重的影响

Note. A. Effect of letrozole combined with high fat feed on body weight. B. Effect of Jianpi Huatan Fang on body weight. Compared with the blank control group, ## $P < 0.01$. Compared with the model control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of Letrozole combined with high fat feed and Jianpi Huatan Fang on body weight

1.3 统计学分析

实验所得数据均采用 SPSS 25.0 统计软件进行整理和分析。计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组资料经过正态分布检测,多组组间比较采用单因素方差分析,方差若齐采用 LSD 检验。若 $P < 0.05$ 表示组间差异具有显著性。

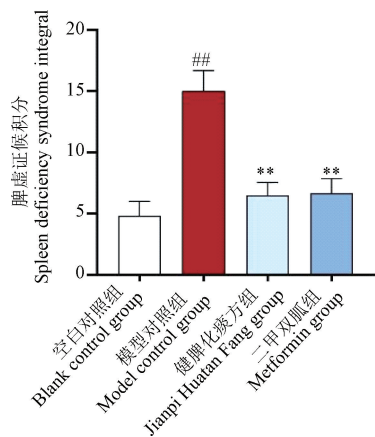
2 结果

2.1 各组大鼠体重的变化情况

造模期间,造模组体重增长率明显高于空白对照组($P < 0.01$)。药物干预结束后,与空白对照组相比,其余 3 组大鼠体重仍具有显著性差异($P < 0.01$);但与模型对照组相比,两个给药组大鼠的体重得到控制($P < 0.05$),其中健脾化痰方组改善更为明显(见图 1)。

2.2 各组大鼠一般情况与脾虚证候积分情况

空白对照组精神状态好,毛发光亮柔顺,体形正常,大便质可成形;模型对照组大鼠精神尚可,容易激惹,体形肥胖,后期进食量减少、体重增速放缓,被毛油腻,大便稀软,垫料潮湿,与空白对照组相比,脾虚证候积分显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组相比,健脾化痰方组、二甲双胍组精神活动明显好转,体重减轻,大便溏症状缓解,垫料轻度潮湿,证候积分明显下降($P < 0.01$)(见图 2)。



注:与模型对照组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)
图 2 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠脾虚证候积分的影响
Note. Compared with the model control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Effect of Jianpi Huatan Fang on the spleen deficiency syndrome integral in PCOS-IR rat

2.3 各组大鼠卵巢组织病理形态学表现

空白对照组大鼠卵巢组织可见体积大、形态圆、结构完整的成熟卵泡,颗粒细胞层厚实紧密,有较多发育良好的黄体;模型对照组大鼠卵巢组织中卵泡发育差,形态不规则,有较多小卵泡、闭锁卵泡,颗粒细胞层松散、脱落,黄体数量少;二甲双胍组卵巢组织与模型对照组相比,闭锁卵泡数目减

少,卵泡体积增大、形态稍圆,透明带完整,颗粒细胞层厚度增加,可见成熟黄体;健脾化痰方较二甲双胍组略差(见图 3)。

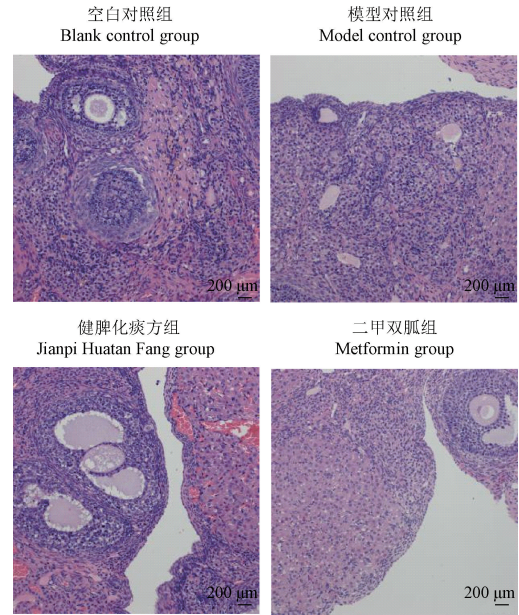


图 3 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠卵巢组织病理形态的影响
Figure 3 Effect of Jianpi Huatan Fang on the pathological morphology of ovarian tissue in PCOS-IR rat

2.4 各组大鼠性激素水平情况

由图 4 知,与空白对照组相比,模型对照组大鼠

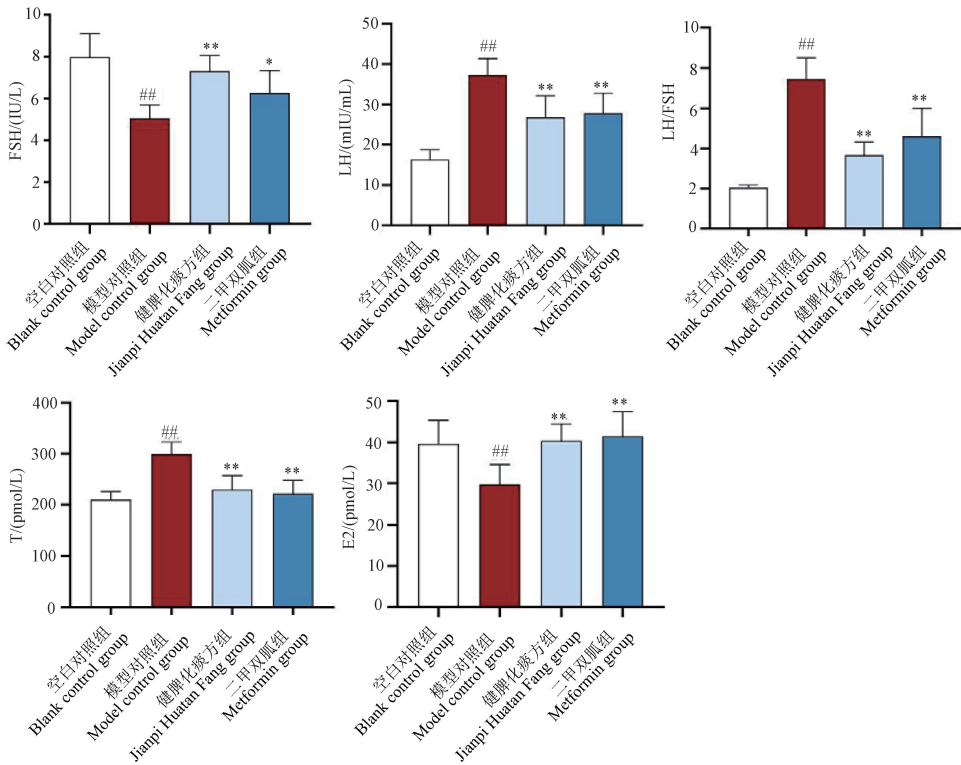


图 4 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠性激素水平的影响($n = 6$)

Figure 4 Effect of Jianpi Huatan Fang on sexual hormone levels in PCOS-IR rats ($n = 6$)

性激素水平趋向 PCOS 改变,血清 LH、T 水平及 LH/FSH 比值显著升高($P < 0.01$),FSH、E2 分泌显著减少($P < 0.01$)。与模型对照组相比,在给药干预后,二甲双胍组及健脾化痰方组大鼠的 LH、T 水平及 LH/FSH 比值明显降低($P < 0.01$),E2 分泌明显增多、FSH 升高($P < 0.01, P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠胰岛素抵抗情况

由图 5 知,与空白对照组相比,模型对照组大鼠出现糖代谢紊乱,FBG、FINS 水平和 HOMA-IR 显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组相比,给药组大鼠的 FBG、FINS 水平和 HOMA-IR 都有不同程度的下降($P < 0.05, P < 0.01$)。

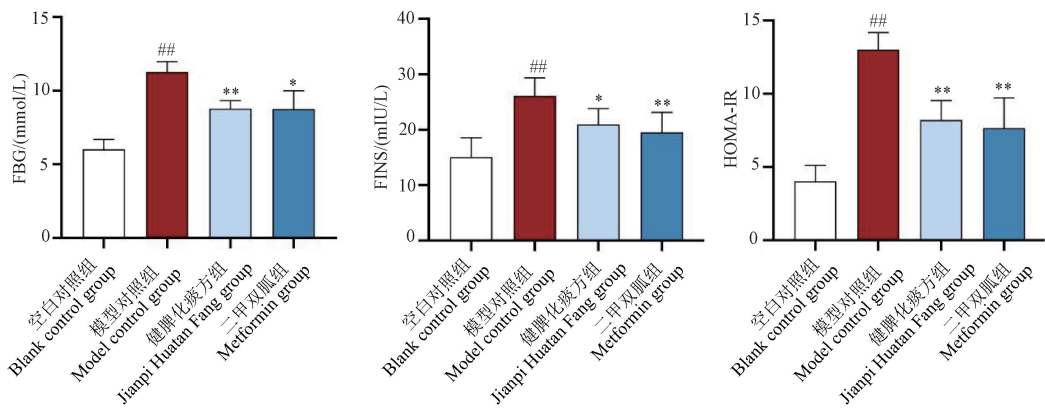


图 5 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠胰岛素抵抗的影响($n = 6$)

Figure 5 Effect of Jianpi Huatan Fang on insulin resistance in PCOS-IR rats($n = 6$)

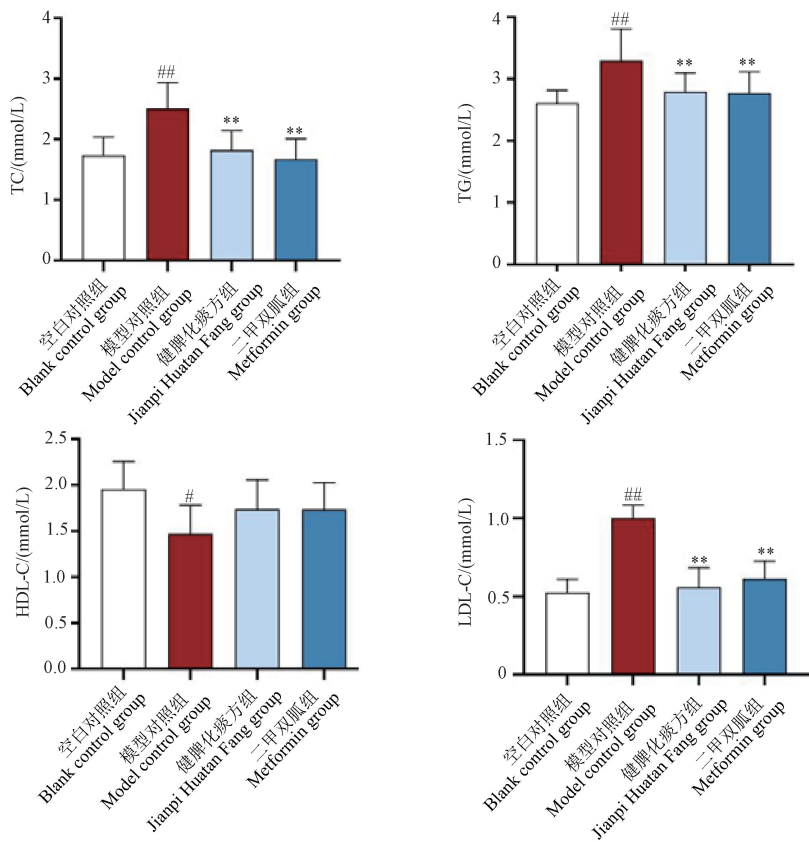


图 6 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠脂代谢的影响($n = 6$)

Note. Compared with the blank control group, $^{\#}P < 0.05$.

Figure 6 Effect of Jianpi Huatan Fang on lipid metabolism in PCOS-IR rats($n = 6$)

2.6 各组大鼠脂代谢情况

与空白对照组相比,模型对照组大鼠脂代谢紊乱,血清 TC、TG 及 LDL-C 水平显著升高,HDL-C 水平明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型对照组相比,两给药组可明显调控 TC、TG 及 LDL-C 水平($P < 0.01$),可升高 HDL-C 水平,但组间差别无统计学意义($P > 0.05$)(见图 6)。

2.7 各组大鼠 FOXO1 和 PDK4 蛋白表达情况

与空白对照组相比,模型对照组 FOXO1、PDK4

蛋白表达量显著上调($P < 0.01$);与模型对照组相比,两给药组 FOXO1、PDK4 蛋白表达量下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 7)。

2.8 各组大鼠 FOXO1 和 PDK4 mRNA 表达情况

与空白对照组相比,模型对照组 FOXO1、PDK4 mRNA 表达显著上调($P < 0.01$);与模型对照组相比,两给药组 FOXO1、PDK4 mRNA 表达明显下调($P < 0.01$)(见图 8)。

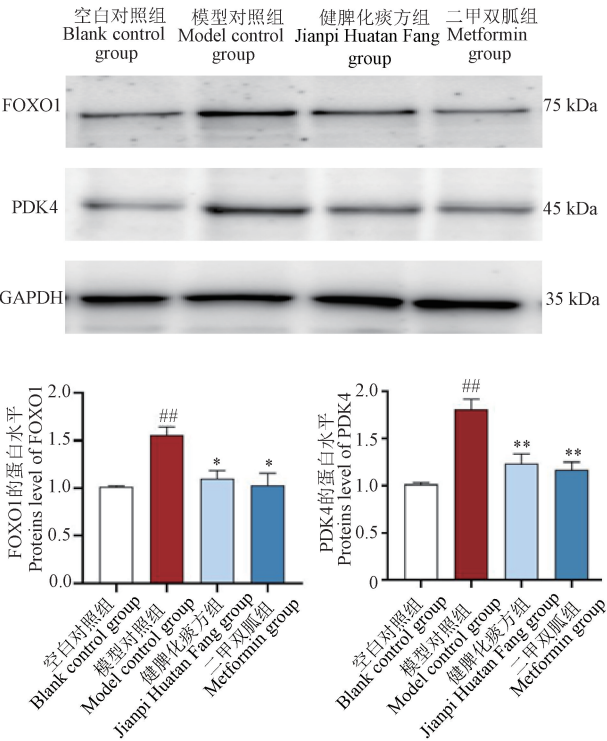


图 7 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠卵巢 FOXO1、PDK4 蛋白的影响

Figure 7 Effect of Jianpi Huatan Fang on FOXO1 and PDK4 protein expression in the ovaries of PCOS-IR rats

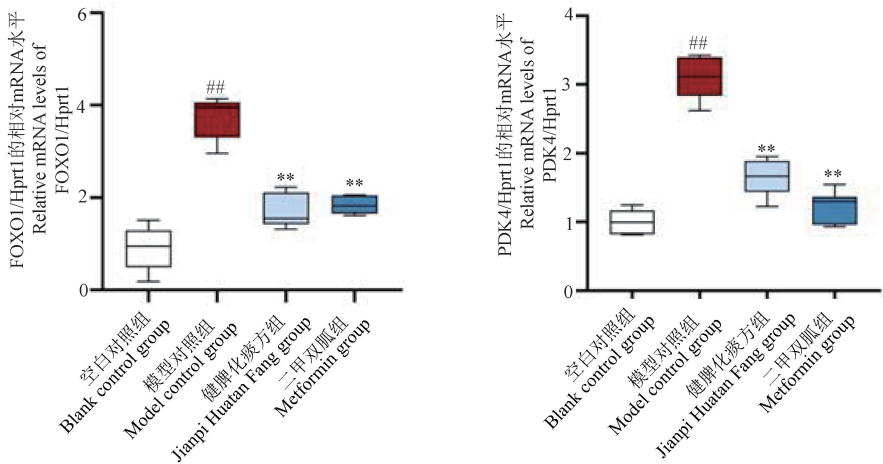


图 8 健脾化痰方对 PCOS-IR 大鼠卵巢 FOXO1、PDK4 mRNA 的影响

Figure 8 Effect of Jianpi Huatan Fang on FOXO1 and PDK4 mRNA in the ovaries of PCOS-IR rats

3 讨论

PCOS 作为青春期及育龄期女性最常见的内分泌疾病之一,涉及多系统紊乱。该病一般病程较长、病情复杂,对女性的生殖、代谢产生严重影响。

中医根据 PCOS 的临床表现及特征将其纳入“月经过少”“不孕”“月经后期”等,多为虚实夹杂、本虚标实之证。现代根据对 PCOS-IR 患者证型、体质等归类分析,PCOS-IR 患者确实多见痰湿体质、痰湿证型^[14-15]。PCOS 代谢异常表型患者临床多见形体肥胖、头晕胸闷、乏力、苔白腻等,且多高脂高糖饮食,与痰湿证是大致相符的。《丹溪心法》《医门法律》提到肥人多痰湿,且《内经》早有记载,肥胖与消渴等多种疾病相关,均由摄入过多导致。故 PCOS-IR 患者以痰湿为标。而此类妇人痰从何来,何以出现经迟涩少不孕等。程若水言:“妇人经水与乳,俱由脾胃所生。”《妇人大全良方·调经门》云:“脾胃久虚,以致气血俱衰,遂而月经不行。”《丹溪心法》谓:“经不行者非无血也,为痰碍所不化也。”《万氏妇人科》中也有类似表述:“肥人经水来少者,责其痰碍经隧也。”而痰湿乃“过食……油腻之物,有伤脾胃,遂致脾土虚湿,不能运化而成”。妇人素体脾虚或肥膏厚味碍脾困脾,影响脾正常机能的发挥,一则化源不足,二则不能运化水湿,聚而成痰化饮,阻滞冲任胞脉,故经候不能如期、经血乏源。清代《女科正宗》言及“……女经调,有子之道也”。受孕成功在于肾气、天癸、冲任、胞宫各个环节协调。历代医家如傅山、朱丹溪、吴谦均认为肥盛妇人不能成孕源于痰湿闭塞子宫。或后天虚弱不足以补充培育先天,肾气虚而不孕;或痰湿脂膜壅于冲任而胎孕难成;或幸而有孕,但“胎气系于脾,脾虚则蒂无所附……易落”。综上,PCOS-IR 患者以脾虚为本,痰湿为标。治痰当先复脾之健运,而痰可自化。

杨正望教授临床针对脾虚痰湿证 PCOS 患者自拟健脾化痰方以理血调经。方中茯苓主健脾补中,浙贝主化痰散结,标本共治,共为君药。黄芪助茯苓补气健脾、助肺行津,法夏、陈皮助浙贝燥湿行气,苍术燥湿健脾,共为臣药。痰湿困于脾胃,以石菖蒲力清中焦湿浊;阻滞气机,以柴胡、枳壳一升一降,畅中焦气机枢纽;碍于血行,以当归、川芎行气活血;恐内郁化火,佐少许黄连入中焦清热燥湿;甘草调和诸药;上药合用,标本兼顾,共奏健脾化痰除

湿、行气理血调经之功。

尽管目前 PCOS 的病因不明,但临床统计研究发现其常伴随 IR 及高脂血症等代谢异常。在疾病发生发展过程中脂代谢异常和 IR 亦会互相促进^[16]。高水平胰岛素促进甘油三酯合成又抑制脂肪动员,造成脂质堆积。经典的葡萄糖-脂肪酸循环假说的提出与验证表明胰岛素抵抗的葡萄糖代谢受损继发于脂代谢紊乱^[17]。同时研究发现,肥胖与脂代谢异常和 IR 均关系密切。AMISI^[18]认为 PCOS 患者 IR 的严重程度与肥胖有关,尤其是腹型肥胖。堆积的内脏脂肪可直接降低胰岛素敏感性,也可通过水解生成的游离脂肪酸促进胰岛素分泌,造成 IR^[19]。肥胖也是血脂异常的重要危险因素^[20]。实际上,肥胖加剧了所有代谢异常,如胰岛素抵抗、血脂异常、生殖功能障碍等。本研究结果显示,健脾化痰方能有效减缓 PCOS-IR 大鼠体重增长速度、明显降低 HOMA-IR、TG、LDL-C,但对于调控 HDL-C 水平略有欠缺。

FOXO1 是叉头转录因子家族中的成员,在各种哺乳动物组织细胞中广泛表达,参与多种病理生理过程,如 IR、协调脂肪细胞相关的基因表达与分化、脂肪转换及氧化应激等^[4,21]。在肝细胞中,靶向抑制 FOXO1 可以改善非酒精性脂肪性肝病小鼠的脂质积累^[22-23]。FOXO1 的激活将脂肪酸转移酶 CD36 募集到细胞质膜,并增加脂肪酸的摄取和氧化^[24]。过表达的 FOXO1 通过升高血糖水平、产生炎症因子(白介素-1 β 、白介素-6 等)来加速胰岛素抵抗的产生,同时通过调控固醇调节元件结合蛋白-1C (SREBP-1C)及载脂蛋白 C-III (ApoC-III)影响脂质水平^[25-27]。近期研究发现 FOXO1 还与下丘脑中的瘦素受体及胰岛素受体互相作用,增加食物摄入并导致肥胖,也有可能参与到下丘脑炎症中^[28]。PDK4 是催化丙酮酸生成乙酰辅酶 A 的关键,促进脂肪酸的合成^[29]。目前研究均认可抑制 PDK4 可缓解肝细胞内脂滴聚集及血清中血脂升高等情况^[30-31]。本研究结果显示,健脾化痰方能抑制卵巢组织中的 FOXO1 和 PDK4 的表达,提示其改善脂代谢的作用可能与 FOXO1/PDK4 信号通路相关。

综上所述,健脾化痰方治疗 PCOS-IR 的作用机制可能是通过抑制 PCOS-IR 大鼠卵巢组织中的 FOXO1/PDK4 信号通路,减轻胰岛素抵抗,改善脂代谢,调节性激素水平。本研究结果可为健脾化痰方治疗 PCOS-IR 提供科学依据,但由于 PCOS-IR 发

病机制复杂,而中药复方治疗疾病具有多途径、多靶点的特性,其背后所涉及的分子机制及治疗过程中的关键靶点还有待进一步深入研究。

参 考 文 献(References)

- [1] BAHRI KHOMAMI M, TEEDE H J, JOHAM A E, et al. Clinical management of pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: an expert opinion [J]. Clin Endocrinol, 2022, 97(2): 227-236.
- [2] 郭胜男,刘弘毅,吴深涛.“化浊解毒方”对二恶英暴露 2 型糖尿病大鼠脂代谢及胰岛素抵抗的影响 [J]. 江苏中医药, 2020, 52(6): 83-86.
GUO S N, LIU H Y, WU S T. Effects of “Hua Zhu Jie du” prescription on lipid metabolism and insulin resistance of dioxin-exposed type 2 diabetic rats [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2020, 52(6): 83-86.
- [3] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 多囊卵巢综合征诊治内分泌专家共识 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2018, 34(1): 1-7.
Endocrine Metabolism Branch of the Chinese Medical Association. Endocrine experts' consensus on diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2018, 34(1): 1-7.
- [4] PENG S, LI W, HOU N, et al. A review of FoxO1-regulated metabolic diseases and related drug discoveries [J]. Cells, 2020, 9(1): 184.
- [5] KIM-MULLER J Y, KIM Y J, FAN J, et al. FoxO1 deacetylation decreases fatty acid oxidation in β -cells and sustains insulin secretion in diabetes [J]. J Biol Chem, 2016, 291(19): 10162-10172.
- [6] ZHAO Y, TRAN M, WANG L, et al. PDK4-deficiency reprograms intrahepatic glucose and lipid metabolism to facilitate liver regeneration in mice [J]. Hepatol Commun, 2020, 4(4): 504-517.
- [7] OLANIYI K S, OLATUNJI L A. Oral ethinylestradiol-levonorgestrel attenuates cardiac glycogen and triglyceride accumulation in high fructose female rats by suppressing pyruvate dehydrogenase kinase-4 [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019, 392(1): 89-101.
- [8] JEON J H, THOUDAM T, CHOI E J, et al. Loss of metabolic flexibility as a result of overexpression of pyruvate dehydrogenase kinases in muscle, liver and the immune system: Therapeutic targets in metabolic diseases [J]. J Diabetes Investig, 2021, 12(1): 21-31.
- [9] 陈苇. 健脾化痰方对肥胖型 PCOS-IR 脾虚痰湿证患者脂代谢的影响 [D]. 湖南: 湖南中医药大学; 2021.
CHEN W. The Effect of Jianpi Huatan formula on lipid metabolism in obese PCOS-IR patients with spleen deficiency and phlegm dampness syndrome [D]. Hunan: Hunan University of Chinese Medicine; 2021.
- [10] 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.
- [11] ZHOU T Y, YANG Z W, ZHOU F, et al. Clinical study on Jianpi Huatan Decoction combined with metformin in treating polycystic ovary syndrome of spleen deficiency and phlegm-dampness syndrome with insulin resistance [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(11): 95-99.
- [12] 孙保国,项婷,李玉龙,等. 大小承气汤制作大鼠脾虚肝癌模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 20-25.
SUN B G, XIANG T, LI Y L, et al. Comparison of the rat models of liver cancer spleen deficiency established by Dachengqi and Xiaochengqi Decoctions [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(2): 20-25.
- [13] 游翕,张林,姚俊鹏,等. 肥胖中医证候动物模型研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(9): 3332-3338.
- [14] YOU X, ZHANG L, YAO J P, et al. Research progress on animal models of TCM syndromes of obesity [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(9): 3332-3338.
- [15] 蔡嘉洛,朱贻霖,李晓屏,等. 脾虚痰湿证糖尿病前期模型的建立和评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(11): 2646-2651.
CAI J L, ZHU Y L, LI X P, et al. Establishment and evaluation of Pre-diabetes model with spleen deficiency and Phlegm-damp syndrome [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2022, 39(11): 2646-2651.
- [16] 夏丹萍. 多囊卵巢综合征伴/不伴高胰岛素血症患者临床特征、中医体质分布及健康自我管理能力的对比研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2020.
- [17] XIA D P. Comparative study on clinical characteristics, TCM constitution distribution and healthy self-management ability of hyperinsulinemia and non-hyperinsulinemia patients with polycystic ovary syndrome [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [18] 王云强,王艳彬,刘晓杰,等. 多囊卵巢综合征患者中医证型分布与性激素及胰岛素抵抗水平间的关系分析 [J]. 四川中医, 2022, 40(5): 59-62.
- [19] WANG Y Q, WANG Y B, LIU X J, et al. Relationship of the distribution of traditional Chinese medicine syndromes with sex hormones and insulin resistance for patients with polycystic ovary syndrome [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2022, 40(5): 59-62.
- [20] WANDERLEY M D S, PEREIRA L C R, SANTOS C B, et al. Association between insulin resistance and cardiovascular risk factors in polycystic ovary syndrome patients [J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2018, 40(4): 188-195.
- [21] 杨燕,童南伟. 肥胖、脂代谢紊乱、胰岛素抵抗的相互关系 [J]. 药品评价, 2011, 8(9): 27-30.
- [22] YANG Y, TONG N W. Relationship between obesity, abnormal lipid metabolism and insulin resistance [J]. Drug Eval, 2011, 8(9): 27-30.
- [23] AMISI C A. Markers of insulin resistance in Polycystic ovary

- syndrome women; an update [J]. *World J Diabetes*, 2022, 13(3): 129–149.
- [19] 董梦姣, 张彬彬, 李程, 等. 多囊卵巢综合征患者肥胖指标对胰岛素抵抗的预测价值 [J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(8): 811–815.
- DONG M J, ZHANG S S, LI C, et al. Predictive value of obesity index for insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Chin J Difficult Complicat Cases*, 2021, 20(8): 811–815.
- [20] 范丹丹, 苏畅, 杜文雯, 等. 中国三省成年居民肥胖指标与高血压和血脂异常的关系 [J]. *卫生研究*, 2018, 47(6): 875–882.
- FAN D D, SU C, DU W W, et al. Association of obesity indexes with hypertension and dyslipidemia in Chinese adults [J]. *J Hyg Res*, 2018, 47(6): 875–882.
- [21] XING Y Q, LI A, YANG Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 124–131.
- [22] 全颖, 首第文, 程洁敏, 等. 靶向 FoxO1 通过调节脂质代谢影响非酒精性脂肪性肝病的初步机制研究 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2022, 27(11): 1376–1380, 1387.
- QUAN Y, SHOU D W, CHENG J M, et al. Effect of FoxO1 on lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mod Dig Interv*, 2022, 27(11): 1376–1380, 1387.
- [23] 项逸欣, 黄雅兰, 周敏, 等. 左归降糖清肝方通过调控 FoxO1/MTP/APOB 信号通路改善 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝糖脂代谢 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(16): 4438–4445.
- XIANG Y X, HUANG Y L, ZHOU M, et al. Zuogui Jiangtang Qinggan Formula improves glucolipid metabolism in type 2 diabetes mellitus complicated with non-alcoholic fatty liver disease by regulating FoxO1/MTP/APOB signaling pathway [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2023, 48(16): 4438–4445.
- [24] NAHLÉ Z, HSIEH M, PIETKA T, et al. CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR δ/β -mediated adaptation to metabolic stress [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(21): 14317–14326.
- [25] LI Y, MA Z, JIANG S, et al. A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases [J]. *Prog Lipid Res*, 2017, 66: 42–49.
- [26] 董书琴, 卢宇, 高菲, 等. FoxO1 在糖脂代谢机制中的研究进展 [J]. *大连医科大学学报*, 2021, 43(5): 445–450.
- DONG S Q, LU Y, GAO F, et al. Research progress of FoxO1 in the mechanisms of glucose and lipid metabolism [J]. *J Dalian Med Univ*, 2021, 43(5): 445–450.
- [27] NATHANAEL J, SUARDANA P, VIANNEY Y M, et al. The role of FoxO1 and its modulation with small molecules in the development of diabetes mellitus; a review [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2022, 99(2): 344–361.
- [28] 刘爽, 曲伸. Foxo1 在肥胖相关下丘脑炎症中的作用及其机制 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2022, 43(6): 867–874.
- LIU S, QU S. The role and mechanism of Foxo1 in obesity-related hypothalamus inflammation [J]. *J Tongji Univ (Med Sci)*, 2022, 43(6): 867–874.
- [29] 杨蕊, 朱奕, 王颖, 等. 丙酮酸脱氢酶激酶 PDK4 在临床中的研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(1): 101–105.
- YANG R, ZHU Y, WANG Y, et al. Research progress of pyruvate dehydrogenase kinase PDK4 in clinical practice [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2019, 39(1): 101–105.
- [30] 邓文艺. 丙酮酸脱氢酶激酶 4 介导 FXR 调节肝脂质代谢的机制研究 [D]. 衡阳: 南华大学; 2019.
- DENG W Y. Mechanism of pyruvate dehydrogenase kinase 4 mediated FXR regulation of hepatic lipid metabolism [D]. Hengyang: University of South China; 2019.
- [31] ZHANG M, ZHAO Y, LI Z, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 mediates lipogenesis and contributes to the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 582–586.

[收稿日期] 2023-08-13