

六味地黄丸通过抑制 TGF- β 1/SMAD 信号通路对多囊卵巢综合征大鼠内分泌代谢的影响

闫雪¹, 马书鸽², 雷琼³, 何田田^{2*}

1. 海口市妇幼保健院 中医科, 海南 海口 570203

2. 广东省妇幼保健院 中医科, 广东 广州 511442

3. 广东省妇幼保健院 妇产科, 广东 广州 511442

摘要: 目的 建立多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠模型,探究六味地黄丸是否通过转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/SMAD信号通路对PCOS大鼠内分泌代谢产生影响。方法 将60只SD雌性大鼠随机分为对照组、模型组、二甲双胍(阳性药,50 mg·kg⁻¹)组、六味地黄丸(50 mg·kg⁻¹)组、六味地黄丸(50 mg·kg⁻¹)+SRI-011381(TGF- β 1/SMAD通路激活剂,100 ng·kg⁻¹)组,除对照组外,其余各组每天ig 1 mg·kg⁻¹来曲唑(溶于0.5%羧甲基纤维素钠),并喂食高脂饲料,连续15 d,构建PCOS大鼠模型;对照组每日ig等体积0.5%羧甲基纤维素钠,并喂食普通饲料。造模完成后,各组ig给药,对照组、模型组分别ig等体积0.9%氯化钠溶液,连续10 d。苏木精-伊红(HE)染色法检测各组大鼠卵巢、子宫的病理变化情况;采用酶联免疫试剂盒(ELISA)法检测各组大鼠血清睾酮(T)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)水平;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测各组卵巢组织中TGF- β 1、SMAD2、SMAD3 mRNA的表达水平,采用Western blotting法检测各组卵巢组织中TGF- β 1、SMAD2、SMAD3蛋白表达水平。结果 对照组大鼠卵巢及子宫结构完整;与对照组相比,模型组大鼠子宫腔缩小,卵巢多囊化严重,血清T、FSH、LH水平均显著提高,TGF- β 1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,阳性药物二甲双胍及六味地黄丸处理后,大鼠卵巢多囊化明显缓解,子宫腔扩张,血清T、FSH、LH水平均显著降低,TGF- β 1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),且两组以上指标表达无显著差异;与六味地黄丸组相比,六味地黄丸+SRI-011381组大鼠卵巢多囊化加重,血清T、FSH、LH水平均显著升高,TGF- β 1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。结论 六味地黄丸可有效抑制TGF- β 1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白的表达,缓解卵巢多囊化、子宫腔扩张,调节内分泌代谢,从而改善PCOS病情。

关键词: 多囊卵巢综合征; 六味地黄丸; 转化生长因子 β 1; SMAD; 内分泌代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)12-2494-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.013

Effects of Liuwei Dihuang Pills on endocrine metabolism in rats with polycystic ovary syndrome by inhibiting TGF- β 1/SMAD signal pathway

YAN Xue¹, MA Shuge², LEI Qiong³, HE Tiantian²

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Haikou Maternal and Child Health Hospital, Haikou 570203, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 511442, China

3. Department of Gynecology and Obstetrics, Guangdong Maternal and Child Health Hospital, Guangzhou 511442, China

Abstract: Objective To establish a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS), to explore whether Liuwei Dihuang Pill (LDP) affects endocrine metabolism in PCOS rats by regulating TGF- β 1/SMAD signaling pathway. **Methods** Sixty SD female rats were randomly divided into control group, model group, metformin (positive drug, 50 mg·kg⁻¹) group, LDP (50 mg·kg⁻¹) group, LDP (50 mg·kg⁻¹)+SRI-011381 (TGF- β 1/SMAD pathway activator, 100 ng·kg⁻¹) group. Except the control group, the other groups were ig with 1 mg·kg⁻¹ letrozole (dissolved in 0.5% sodium carboxymethyl cellulose) and fed high-fat diet every day for 15 days to establish PCOS rat model. The control group was ig 0.5% sodium carboxymethyl cellulose daily and fed ordinary diet. After

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20201032)

第一作者: 闫雪(1986—), 硕士, 主治医师, 研究方向为妇科肿瘤、不孕症。E-mail: xckttcc@163.com

*通信作者: 何田田(1986—), 硕士, 副主任医师, 研究方向为中医妇科。E-mail: sybilaoao@163.com

modeling, each group was given the drug, and the control group and model group were given the same volume 0.9% sodium chloride solution intragastrically, respectively, for consecutive 10 days. Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to detect the pathological changes of the ovaries and uterus of rats in each group, enzyme-linked immunoassay kit (ELISA) method was used to detect levels of serum testosterone (T), luteinizing hormone (LH), and follicle stimulating hormone (FSH) of rats in each group, fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of *TGF-β1*, *SMAD2*, and *SMAD3* mRNA in the ovarian tissues of each group, Western blotting was used to detect the expression levels of TGF-β1, SMAD2, and SMAD3 proteins in ovarian tissues of each group. **Results** The structures of the ovary and uterus in the control group were complete. Compared with the control group, the uterine cavity of the model group was reduced, the ovarian polycysticosis was serious, the levels of serum T, FSH, and LH were significantly higher, and the expression levels of TGF-β1, SMAD2, SMAD3 mRNA and protein were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with model group, after treatment with the metformin and LDP, the rat ovarian polycysticosis was significantly relieved, the uterine cavity was dilated, the levels of serum T, FSH, and LH were significantly reduced, and the expression levels of TGF-β1, SMAD2, SMAD3 mRNA and protein were significantly reduced ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the expression of indicators between the two groups. Compared with the medication group, the polycysticosis of the ovaries in the rats in the medication + SRI-011381 group increased significantly, the levels of serum T, FSH, and LH were significantly increased, and the expression levels of TGF-β1, SMAD2, SMAD3 mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** LDP can effectively inhibit the expression of TGF-β1, SMAD2, SMAD3 mRNA and protein, relieve ovarian polycysticosis and uterine cavity dilatation, regulate endocrine metabolism, and improve the condition of PCOS.

Key words: polycystic ovary syndrome; Liuwei Dihuang Pill; transforming growth factor β1; SMAD; endocrine metabolism

多囊卵巢综合征(PCOS)是一种常见的生殖内分泌代谢性疾病,在育龄期妇女中最为常见,常常会造成代谢功能紊乱,引发内分泌代谢失调,影响患者的生理健康,严重时伴随其它高危型并发症的发生^[1-2]。PCOS发病因素多种多样,临床表现呈多态性,因此其发病机制尚未完全明确。目前仅通过药物缓解和减轻相关症状,新的治疗方法还有待探索^[3-4]。转化生长因子β1(TGF-β1)被证实在PCOS患者血清中高表达,成熟的TGF-β1与TGF-βR2形成四聚体,使TGF-βR1磷酸化,活化的TGF-βR1磷酸化SMAD2/SMAD3,参与调控PCOS疾病^[5-7]。

近年来,利用中药治疗PCOS的研究逐渐增多,已被证实具有多种优势,可多途径、多靶点作用于疾病^[8-9]。六味地黄丸作为常见中成药,有降低血糖、调节内分泌代谢等多种功效,已被用于PCOS的治疗,但其作用机制尚未明确^[10-11]。六味地黄丸已证实可参与调控TGF-β1/SMAD通路^[12],但能否通过调控TGF-β1/SMAD信号通路改善PCOS大鼠内分泌代谢,从而缓解PCOS病情尚无定论。本实验探究六味地黄丸对PCOS大鼠TGF-β1/SMAD信号通路及内分泌代谢的影响。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

六味地黄丸(批号18110401,规格9 g×10丸)购于北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂;来曲唑片(批号22003161,规格2.5 mg×10片)购于江苏恒瑞医药股份有限公司;二甲双胍片(批号

02000913,规格0.5 g×20片)购于中美上海施贵宝制药有限公司;TGF-β1/SMAD通路激活剂(SRI-011381,货号M05956)购于北京百奥莱博科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号BC-DL-001)购于南京生航生物技术有限公司;大鼠血清睾酮(T)定量检测试剂盒(货号2400012)购于博奥赛斯(天津)生物科技有限公司;卵泡刺激素(FSH)酶联免疫(ELISA)试剂盒(货号JL45058)购于上海江莱生物技术有限公司;黄体生成素(LH)ELISA试剂盒(货号SP12626)购于武汉赛培生物科技有限公司;TGF-β1抗体(货号ab179695)、SMAD2抗体(货号ab280888)、SMAD3抗体(货号ab208182)、GAPDH抗体(货号ab8245)购于Abcam公司。

1.2 主要仪器

7500荧光定量PCR仪(ABI公司);HE-120凝胶成像系统(上海生工生物有限公司)。

1.3 实验动物

清洁级SD雌性大鼠60只,体质量(200±10)g,6~7周龄,购于河北省实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(冀)2018-004。本实验经海口市妇幼保健院的动物伦理委员会批准(批准文号H20200645)。

2 方法

2.1 动物模型的构建

清洁级SD雌性大鼠随机分为对照组、模型组、二甲双胍(50 mg·kg⁻¹)组、六味地黄丸(50 mg·kg⁻¹,剂量通过预试验确定,是临床常用剂量的等效剂量)组、六味地黄

丸($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)+SRI-011381 ($100\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组12只。除对照组外,其余各组每天ig $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 来曲唑(溶于0.5%羧甲基纤维素钠),并喂食高脂饲料,连续15 d,构建PCOS大鼠模型^[13];对照组每日ig等体积0.5%羧甲基纤维素钠,并喂食普通饲料。造模完成后,各组ig给药,对照组、模型组分别ig等体积0.9%氯化钠溶液,连续10 d。

2.2 大鼠内分泌代谢指标检测

末次干预后,各组大鼠禁食12 h,麻醉大鼠,解剖腹部,分离脂肪暴露主动脉,经腹部主动脉穿刺抽血5 mL, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,采用ELISA试剂盒,严格按照试剂盒说明书检测T、LH、FSH水平。

2.3 大鼠子宫及卵巢组织病理学变化观察

抽取血液后,解剖取出各组大鼠子宫及卵巢,

子宫及左侧卵巢切下置于4%多聚甲醛中固定,右侧卵巢取出液氮处理,研磨至粉,冻存备用。子宫及左侧卵巢固定24 h后,不同浓度乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋制作切片,切片厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。切片脱蜡至水,苏木精染液染色3 min,清水冲洗干净,直至返蓝,0.5%伊红染液染色3 min,清水冲洗干净,不同浓度乙醇梯度脱水,二甲苯透明后中性树脂封片,置于显微镜下观察染色结果。

2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

取出预先冻存备用的卵巢组织粉末少许,Trizol法提取RNA,加入无酶水溶解,定量后反转录,上机检测TGF- $\beta 1$ 、SMAD2、SMAD3 mRNA的表达水平。mRNA引物由Primer 5.0软件设计,合成于北京擎科生物技术有限公司。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
β -actin	CCACCATGTACCCAGGCATT	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
TGF- $\beta 1$	TGGCGTTACCTTGGAACC	GGTGTGAGCCCTTTCCAG
SMAD2	CCACTACCAGAGGGTGGAGA	CCTGCTGGGAAATTTGTGT
SMAD3	GAGACATTCCACGCTTCACA	GCTGCATTCCGGTTAACATT

2.5 Western blotting实验

取出预先冻存备用的卵巢组织粉末少许,加入组织裂解液0.5 mL,充分震荡混匀,加入1 mL蛋白提取液,低温静置5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,收集上清液体,敞口干燥15 min,加入上样缓冲液充分混合,加热10 min,倒入10% SDS-PAGE凝胶板的孔道中进行凝胶电泳实验,之后取出凝胶,将蛋白电泳产物转印至膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h,加入一抗(GAPDH、TGF- $\beta 1$ 、SMAD2、SMAD3抗体,1:1 500), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST清洗3次,每次5 min,加入二抗(1:1 000),常温孵育40 min, TBST清洗3次,每次5 min。将发光液ECL混合倒于膜上,室温下浸泡1 min,用吸水纸吸去多余液体,置于Syngene光密度扫描系统上进行条带灰度分析。

2.6 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较均采用SPSS 25.0软件中的单因素方差分析(one-way ANOVA),进一步两两比较采用SNK- q 检验。

3 结果

3.1 六味地黄丸对PCOS大鼠内分泌代谢的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清T、FSH、LH水平均显著提高($P<0.05$);与模型组相比,二甲双胍

组、六味地黄丸组大鼠血清T、FSH、LH水平均显著降低($P<0.05$);与六味地黄丸组相比,六味地黄丸+SRI-011381组大鼠血清T、FSH、LH水平均显著提高($P<0.05$);二甲双胍组与六味地黄丸组之间大鼠血清T、FSH、LH水平无显著性差异,结果见表2。

3.2 六味地黄丸对PCOS大鼠子宫及卵巢组织病理变化的影响

显微镜下观察发现,对照组大鼠子宫组织及卵巢结构完好,腔上皮细胞及腺上皮细胞排列整齐,腺体及血管清晰分布,卵巢内卵母细胞、卵泡清晰可见,且排列整齐;模型组子宫体积缩小,腔上皮细胞及腺上皮细胞排列混乱呈扁平状,肌层厚度增加,卵巢内多囊状扩张明显,卵巢内仅有少量卵母细胞,出现多个闭锁卵泡排列;二甲双胍组及六味地黄丸组子宫腔明显扩张,腔上皮细胞及腺上皮细胞排列较为整齐,腺体和血管数目增多,卵巢内多囊状扩张得到缓解,卵母细胞数量增多,细胞与细胞间排列紧密;六味地黄丸+SRI-011381组子宫腔有一定程度扩张,但不如六味地黄丸组明显,腺体和血管数目较多,卵巢内卵母细胞数量缓慢增长,仍有少量闭锁卵泡,见图1、2。

表2 各组PCOS大鼠血清T、FSH、LH水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)Table 2 Comparison of serum T, FSH and LH levels of PCOS rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	T/(ng·mL ⁻¹)	FSH/(mU·mL ⁻¹)	LH/(mU·mL ⁻¹)
对照	—	0.23±0.08	3.25±0.37	2.73±0.26
模型	—	2.78±0.27*	6.56±0.58*	13.74±2.38*
二甲双胍	50	0.53±0.16 [#]	4.23±0.31 [#]	6.02±1.23 [#]
六味地黄丸	50	0.48±0.18 [#]	4.18±0.23 [#]	5.12±0.78 [#]
六味地黄丸+SRI-011381	50+100 ng·kg ⁻¹	1.86±0.35 ^{#△}	5.71±0.27 ^{#△}	8.34±0.62 ^{#△}

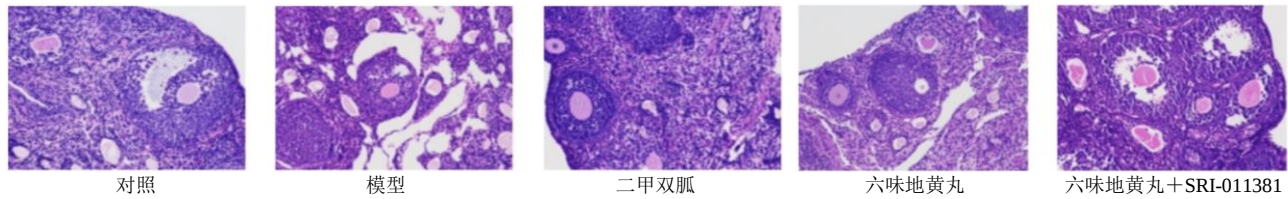
与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与六味地黄丸组比较: [△] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs LDP group

图1 HE染色观察PCOS大鼠卵巢组织病理变化(×40)

Fig. 1 Pathological changes of ovarian tissues of PCOS rats observed by HE staining (×40)

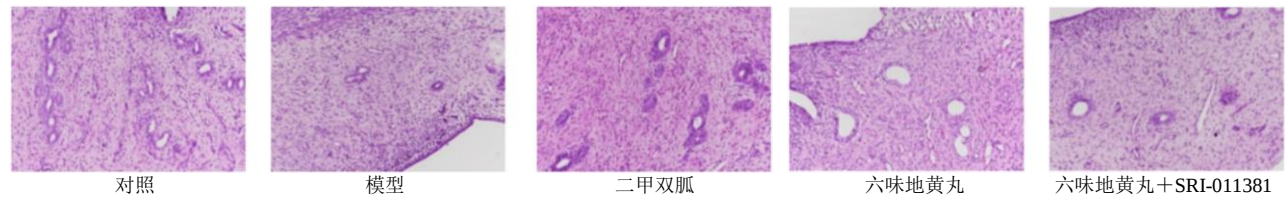


图2 HE染色观察PCOS大鼠子宫组织病理变化(×200)

Fig. 2 Pathological changes of uterus tissue of PCOS rats observed by HE staining (×200)

3.3 六味地黄丸对PCOS大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA表达的影响

模型组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA表达显著高于对照组($P<0.05$);二甲双胍组、六味地黄丸组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA表达显著低于模型组($P<0.05$);六味地黄丸+SRI-011381组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA表达显著高于六味地黄丸组($P<0.05$);二甲双胍组与六味地黄丸组比较大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA表达无显著差异,见表3。

表3 各组PCOS大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA表达量的比较($\bar{x}\pm s, n=12$)Table 3 Comparison of mRNA expressions of TGF-β1, SMAD2 and SMAD3 in ovary of PCOS rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF-β1/β-actin	SMAD2/β-actin	SMAD3/β-actin
对照	—	1.00±0.22	1.00±0.18	1.00±0.17
模型	—	2.94±0.28*	3.25±0.25*	4.37±0.36*
二甲双胍	50	1.34±0.41 [#]	1.31±0.08 [#]	1.68±0.24 [#]
六味地黄丸	50	1.38±0.37 [#]	1.26±0.14 [#]	1.74±0.48 [#]
六味地黄丸+SRI-011381	50+100 ng·kg ⁻¹	2.37±0.11 ^{#△}	2.73±0.26 ^{#△}	3.36±0.33 ^{#△}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与六味地黄丸组比较: [△] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs LDP group

3.4 六味地黄丸对PCOS大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白表达的影响

模型组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白表达量显著高于对照组($P<0.05$);二甲双胍组、六味地黄丸组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白表达量显著低于模型组($P<0.05$);六味地黄丸+SRI-011381组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白表达量显著高于六味地黄丸组($P<0.05$);二甲双胍组与六味地黄丸组比较大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白表达量无显著性差异。结果见图3、表4。

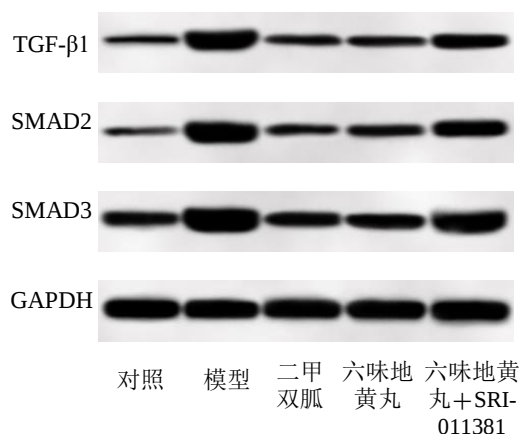


图3 各组PCOS大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白表达情况

Fig. 3 Protein expressions of TGF-β1, SMAD2 and SMAD3 in ovary of PCOS rats in each group

4 讨论

PCOS作为常见的代谢异常类疾病,往往会造成代谢功能紊乱,严重影响内分泌系统的正常功能^[14]。本研究通过检测大鼠血清T、LH、FSH含量判断内分泌功能情况,发现模型组大鼠血清中T、FSH、LH水平均显著提高,说明模型组大鼠内分泌功能紊乱,模型构建成功。有文献指出^[15],六味地黄丸可应用于PCOS的治疗,但其作用机制和作用途径尚未明确。另有研究发现^[16],六味地黄丸可通过改善内分泌功能缓解围绝经期综合征等代谢异常类疾病,推测六味地黄丸可能通过缓解PCOS患者的内分泌功能,改善PCOS病情。二甲双胍已被证实对PCOS具有很好的疗效,可以有效缓解病状,因此本实验选用二甲双胍作为阳性对照,实验用药

表4 各组PCOS大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Expression of TGF-β1, SMAD2 and SMAD3 proteins in ovary of PCOS rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF-β1/GAPDH	SMAD2/GAPDH	SMAD3/GAPDH
对照	—	0.23±0.06	0.21±0.04	0.57±0.18
模型	—	1.27±0.17*	1.53±0.16*	1.69±0.15*
二甲双胍	50	0.42±0.21 [#]	0.39±0.25 [#]	0.67±0.17 [#]
六味地黄丸	50	0.47±0.16 [#]	0.45±0.14 [#]	0.75±0.21 [#]
六味地黄丸+SRI-011381	50+100 ng·kg ⁻¹	0.79±0.21 ^{#△}	0.86±0.23 ^{#△}	1.13±0.17 ^{#△}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与六味地黄丸组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs LDP group

剂量参考文献中常用剂量^[17]。本研究发现,使用二甲双胍和六味地黄丸分别处理后,PCOS大鼠血清T、FSH、LH水平均显著降低,表明六味地黄丸同治疗PCOS的常规药物一样,可有效改善内分泌功能。

文献指出,PCOS患者主要表现为子宫缩小,卵巢增大,卵泡密集成多囊状,从而影响内分泌功能正常,因此子宫及卵巢的结构形态变化是判别PCOS病情的重要病理学依据^[18]。通过对不同组大鼠进行染色观察发现,对照组大鼠具有完整的子宫及卵巢结构,而模型组子宫体积缩小,且卵巢内多囊状扩张明显,这与文献中报道一致,进一步验证了模型有效性。二甲双胍组及六味地黄丸组大鼠的子宫腔扩张明显,卵巢多囊化明显缓解,说明六味地黄丸可以有效缓解PCOS症状,而子宫及卵巢作为内分泌功能发挥作用的重要器官,也进一步验证了六味地黄丸对大鼠内分泌功能的改善作用,但其作用机制仍待进一步阐释。

有文献指出^[19-20],TGF-β1作为卵巢局部产生的重要的生物活性因子,在卵巢多囊化过程中发挥重

要的作用,卵巢间质纤维化引起的PCOS病情加重也与TGF-β1的高表达有关。TGF-β1受体的下游信号转导因子SMAD在卵巢多囊化过程中发挥重要的作用,其中SMAD2和SMAD3是TGF-β1下游最重要的信号因子,两者具有高同源性的同时,在TGF-β1通路发挥不同的作用^[21]。本研究发现,模型组大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白的表达量显著高于对照组,而阳性药物二甲双胍及六味地黄丸组TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白的表达量显著降低,且阳性药物与六味地黄丸之间无显著差异,说明六味地黄丸可以有效作用,且效果近似于常规药物,很可能在TGF-β1/SMAD信号通路中发挥重要的调节作用。为进一步探究六味地黄丸是否通过参与调控TGF-β1/SMAD信号通路发挥对PCOS的疗效,本实验在用药的同时,利用通路激活剂激活相关通路,发现与六味地黄丸组相比,六味地黄丸+SRI-011381组的大鼠卵巢TGF-β1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白的表达量均显著升高,同时大鼠血清T、FSH、LH水

平均显著升高,且卵巢多囊化更加明显。这进一步验证了六味地黄丸通过抑制TGF- β 1/SMAD信号通路影响激素分泌,从而改善PCOS大鼠的内分泌代谢功能。

本研究结果表明,六味地黄丸可通过调节TGF- β 1/SMAD信号通路,抑制TGF- β 1、SMAD2、SMAD3 mRNA及蛋白的表达,从而降低大鼠血清T、FSH、LH水平,改善内分泌代谢功能,同时消除卵巢内多囊状扩张及卵泡,缓解PCOS相关症状,最终有效治疗和改善PCOS。六味地黄丸对于PCOS有很好的疗效,因此有很大的应用空间,TGF- β 1/SMAD信号通路可作为六味地黄丸作用的靶点之一,可对其深层次的内在联系进行进一步的探究。但六味地黄丸是否还通过调节其他通路参与调控PCOS,仍有待进一步的实验加以探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang S, Tu H Y, Yao J, et al. Combined use of Diane-35 and metformin improves the ovulation in the PCOS rat model possibly via regulating glycolysis pathway [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2020, 18(1): 58.
- [2] Zeng B, Lai Z W, Sun L J, et al. Structural and functional profiles of the gut microbial community in polycystic ovary syndrome with insulin resistance (IR-PCOS): A pilot study [J]. Res Microbiol, 2019, 170(1): 43-52.
- [3] Tan I F, Lim A J R, Indran I R, et al. Reproductive outcomes of women with polycystic ovarian syndrome following *in-vitro* fertilization—A meta-analysis and systematic review [J]. FandR, 2019, 1(4): 193-201.
- [4] Brenjian S, Moini A, Yamini N, et al. Resveratrol treatment in patients with polycystic ovary syndrome decreased pro-inflammatory and endoplasmic reticulum stress markers [J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 83(1): e13186.
- [5] Takahashi N, Harada M, Hirota Y, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress in granulosa cells from patients with polycystic ovary syndrome contributes to ovarian fibrosis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10824.
- [6] Massagué J. TGF β signalling in context [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(10): 616-630.
- [7] Zhou Y Y, Lan H, Dong Z W, et al. Rhamnocitrin attenuates ovarian fibrosis in rats with letrozole-induced experimental polycystic ovary syndrome [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 5558599.
- [8] Wei B, Zhang Y, Zhao N N, et al. Systematic review and meta-analysis of tanshinone capsule in the treatment of polycystic ovary syndrome [J]. Med Plant, 2020, 11(2): 8-12.
- [9] 周笑梦, 李雪莲. 中药提取物改善多囊卵巢综合征中胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2018, 45(3): 287-290, 305.
Zhou X M, Li X L. Research progress in improvement of polycystic ovary syndrome with insulin resistance by traditional Chinese herb extracts [J]. J Int Obstet Gynecol, 2018, 45(3): 287-290, 305.
- [10] 张旭宾, 林秀峰, 杜静, 等. 六味地黄丸联合达英-35对多囊卵巢综合征胰岛素抵抗患者干预的临床研究 [J]. 临床医学, 2011, 31(8): 114-116.
Zhang X B, Lin X F, Du J, et al. Clinical study on the intervention of Liuwei Dihuang Pill combined with Diane-35 in patients with polycystic ovarian syndrome with insulin resistance [J]. Clin Med, 2011, 31(8): 114-116.
- [11] 狄丹华, 杨准叶. 紫河车合六味地黄丸治疗青春期多囊卵巢综合征30例临床观察 [J]. 中国医药指南, 2019, 17(22): 189-190.
Di D H, Yang Z Y. Clinical observation on 30 cases of puberty polycystic ovary syndrome treated with Ziheche and Liuwei Dihuang Pills [J]. Guide China Med, 2019, 17(22): 189-190.
- [12] 李志杰, 张悦, 陆海英, 等. 六味地黄丸对糖尿病肾病大鼠肾组织TGF- β 1-smad通路的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8): 1811-1814.
Li Z J, Zhang Y, Lu H Y, et al. Effect of Liuwei Dihuang Pill on TGF- β 1-smad pathway in diabetic nephropathy rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(8): 1811-1814.
- [13] 丁晨晨, 鲁琳琳, 董婷婷, 等. 吡格列酮对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(16): 2224-2226.
Ding C C, Lu L L, Dong T T, et al. Effect of pioglitazone on insulin resistance in rats with polycystic ovary syndrome [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(16): 2224-2226.
- [14] Emidio G D, Placidi M, Rea F, et al. Methylglyoxal-dependent glycation stress and deregulation of SIRT1 functional network in the ovary of PCOS mice [J]. Cells, 2020, 9(1): E209.
- [15] 徐钦臣. 六味地黄丸加味联合腹腔镜治疗多囊卵巢综合征的临床疗效分析 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(22): 93-94.
Xu Q C. An analysis of treating polycystic ovary syndrome with Liuwei Dihuang Wan plus laparoscopic [J]. Clin J Chin Med, 2016, 8(22): 93-94.
- [16] 钟冬芳. 六味地黄丸联合加味逍遥丸治疗围绝经期综

- 合征临床研究 [J]. 新中医, 2019, 51(6): 79-83.
- Zhong D F. Clinical study of Liuwei Dihuang pills combined with modified Xiaoyao pills for perimenopausal syndrome [J]. J New Chin Med, 2019, 51(6): 79-83.
- [17] El Sharkwy I, Sharaf El-Din M. L-Carnitine plus metformin in clomiphene-resistant obese PCOS women, reproductive and metabolic effects: A randomized clinical trial [J]. Gynecol Endocrinol, 2019, 35(8): 701-705.
- [18] de Leo V, Musacchio M C, Cappelli V, et al. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: An update [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2016, 14(1): 38.
- [19] D Prabhu Y, Bhati M, Vellingiri B, et al. The effect of γ -linolenic acid on polycystic ovary syndrome associated focal segmental glomerulosclerosis via TGF- β pathway [J]. Life Sci, 2021, 276: 119456.
- [20] 何婧妍, 方兰兰, 孙莹璞. 转化生长因子 β 超家族在多囊卵巢综合征中的表达和作用特点 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(5): 423-428.
- He J Y, Fang L L, Sun Y P. Roles of TGF- β superfamily in pathophysiological mechanism of polycystic ovary syndrome [J]. J Int Reproductive Heal Plan, 2016, 35(5): 423-428.
- [21] Zhou Y Y, Lan H, Dong Z W, et al. Dietary proanthocyanidins alleviated ovarian fibrosis in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats [J]. J Food Biochem, 2021, 45(5): e13723.

[责任编辑 兰新新]