

引用:唐雨,张家乐,吴星霏,谢秉恒,吴刘俊,申艳朵,张明昊,马丽亚.龙胆泻肝汤改善多囊卵巢综合征作用机制的网络药理学分析及实验验证[J].中医导报,2025,31(8):5-11.

实验

龙胆泻肝汤改善多囊卵巢综合征作用机制的网络药理学分析及实验验证*

唐雨¹,张家乐²,吴星霏²,谢秉恒²,吴刘俊²,申艳朵²,张明昊³,马丽亚⁴

(1.河南中医药大学第二临床医学院,河南 郑州 450046;

2.河南中医药大学第五临床医学院,河南 郑州 450046;

3.河南中医药大学医学院,河南 郑州 450046;

4.河南中医药大学教务部,河南 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨龙胆泻肝汤改善多囊卵巢综合征(PCOS)的分子机制。方法:(1)网络药理学。通过数据库得到龙胆泻肝汤组方中药作用靶点和PCOS疾病靶点,取交集。运用Cytoscape 3.6.1构建互作网络。通过David数据库富集分析,并进行分子对接验证。(2)实验验证。建立来曲唑诱导的PCOS大鼠模型,将造模成功大鼠随机分组,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清性激素水平,计算卵巢系数。采用苏木素-伊红HE染色观察卵巢形态学改变,运用免疫组织化学(IHC)染色法检测关键蛋白表达。结果:(1)网络药理学分析共得到龙胆泻肝汤活性成分123个,筛选出龙胆泻肝汤改善PCOS的潜在作用靶点192个,4个关键活性成分(山柰酚、汉黄芩素、槲皮素、木犀草素),3个核心靶点(TP53、TNF- α 、IL-6),分子对接显示关键活性成分与核心靶点之间具有较强的结合力;GO功能富集分析得到774个功能条目,KEGG通路富集分析得到158个通路。(2)实验结果显示,与空白组(KB组)比较,模型组(MX组)大鼠血清E₂、FSH水平降低($P<0.05$),T、GnRH、LH蛋白表达升高($P<0.05$),卵巢系数升高($P<0.05$),卵巢组织中囊性卵泡增多,卵泡颗粒细胞层数减少,TP53蛋白表达降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-6蛋白表达升高($P<0.05$);与MX组比较,各给药干预组大鼠血清E₂、FSH蛋白表达升高($P<0.05$),T、GnRH、LH蛋白表达降低($P<0.05$),卵巢系数降低($P<0.05$),卵巢组织囊性病变更明显减轻,卵巢中TP53蛋白表达升高($P<0.05$),TNF- α 、IL-6蛋白表达降低($P<0.05$)。结论:龙胆泻肝汤可有效改善PCOS大鼠内分泌紊乱及卵巢组织病理状态,其作用可能是通过上调TP53蛋白表达、下调TNF- α 、IL-6蛋白表达实现的。

[关键词] 多囊卵巢综合征;龙胆泻肝汤;网络药理学;实验验证;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)08-0005-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.002

Mechanism and Experimental Verification of Longdan Xiegan Decoction (龙胆泻肝汤) in Treatment of Polycystic Ovary Syndrome Based on Network Pharmacology Analysis and Experiment

TANG Yu¹, ZHANG Jiale², WU Xingfei², XIE Bingheng², WU LiuJun², SHEN Yanduo²,
ZHANG Minghao³, MA Liya⁴

(1.Second Clinical School of He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China;

2.Fifth Clinical School of He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China; 3.School of Medicine of He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China 4.Academic Affairs

Department of He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China)

[Abstract] Objective: To explore the molecular mechanism underlying the improvement of polycystic ovary syndrome (PCOS) by Longdan Xiegan decoction. Methods: (1) Network Pharmacology. The target points of the traditional Chinese medicine ingredients in Longdan Xiegan decoction and those of PCOS were obtained from databases, and their intersection was determined. The interaction network was constructed using Cytoscape 3.6.1. Enrichment analysis was conducted via the David database and verified through molecular docking.

*基金项目:河南省重点研发与推广(科技攻关)项目(222102310139);河南省科技发展计划自然科学基金(面上项目)(242300420168);河南省中医药科学研究专项课题(2023ZYZD09);河南省中医药科学研究专项课题重点课题(20-21ZY1053)
通信作者:马丽亚,女,副教授,研究方向为中医妇科学

(2) Experimental Verification. A PCOS animal model induced by letrozole was established. The successfully modeled rats were randomly grouped. The serum sex hormone levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the ovarian coefficient was calculated. Hematoxylin-eosin staining (HE) was employed to observe the morphological changes of the ovaries, and the expression of key proteins was detected by immunohistochemistry (IHC) staining. Results: (1) Through network pharmacology analysis, 123 active components of Longdan Xiegan decoction were identified, and 192 potential target points for improving PCOS were screened out. There were 4 key active components, including kaempferol, wogonin, quercetin, and luteolin. There were 3 core target points, including TP53, TNF α , and IL6. Molecular docking indicated a strong binding force between them. Gene ontology (GO) functional analysis yielded 774 functional items and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis yielded 158 pathways. (2) The experimental results revealed that compared with the normal group (KB group), the serum E₂ and FSH levels in the model group (MX group) decreased ($P < 0.05$), while the T, GnRH, and LH levels increased ($P < 0.05$), and that the ovarian coefficient increased ($P < 0.05$). There was an increase in cystic follicles in the ovarian tissue, a reduction in the number of granulosa cell layers, a decrease in the TP53 level ($P < 0.05$), and an increase in the TNF- α and IL-6 levels in MX group ($P < 0.05$). Compared with the MX group, the serum E₂ and FSH levels of the rats increased in each drug intervention group ($P < 0.05$), while the T, GnRH, and LH levels decreased ($P < 0.05$). The ovarian coefficient decreased ($P < 0.05$), and the cystic lesions in the ovarian tissue were significantly alleviated in each drug intervention group. The TP53 level in the ovary increased ($P < 0.05$), while the TNF- α and IL-6 levels decreased in each drug intervention group ($P < 0.05$). Conclusion: Longdan Xiegan decoction can effectively improve the endocrine disorder and pathological state of the ovarian tissue in PCOS rats, and its effect may be achieved by up-regulating the TP53 level and down-regulating the TNF- α and IL-6 levels.

[Keywords] polycystic ovary; Longdan Xiegan decoction; network pharmacology; experimental verification; rat

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)涉及多个系统,如生殖、内分泌、代谢等。中医学多将其归属于“癥瘕”“月经过少”“闭经”“月经后期”等范畴^[1]。中医学认为肝、脾、肾功能失调,冲任督三脉不利为本病发病之本。有研究^[2]认为PCOS的发病本质为肾虚,但单纯肾虚证者较少,多兼肺虚、脾虚、肝旺、血瘀、痰凝等证。现代妇女面临多方压力,情志抑郁,气郁化火,肝郁下克脾土,脾失运化,则湿热内生,亦致胆气不利、胆汁壅积,化为湿热。湿热上扰则口干口苦、烦躁易怒;湿热下注则带下量多色黄;湿热熏蒸皮肤则痤疮溢脂;胞宫湿热蕴结则气血失和,血海不宁,月经失常,甚则闭经不孕^[3]。龙胆泻肝汤主要治疗肝经湿热,在多本古代中医典籍中均有记载^[4]。课题组认为其“清泻肝胆实火、清利肝胆湿热”符合中医对PCOS的治疗理念,故选用龙胆泻肝汤治疗PCOS。本研究首先通过网络药理学与分子对接技术筛选龙胆泻肝汤改善PCOS的有效成分及核心作用靶点,再以动物实验验证龙胆泻肝汤对PCOS的药效及作用机制,旨在为该方临床治疗PCOS提供实验依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 SPF级雌性SD大鼠63只,8周龄,体质量(200±20)g,购于郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号:SCXK(豫)2023-0002。动物实验经河南中医药大学伦理委员会批准,批件编号:DWLL202301016。实验动物饲养于河南中医药大学医学动物实验室。

1.2 药物与试剂 龙胆草、栀子、地黄、泽泻、车前子、牡丹皮各15g,黄芩、柴胡、当归各10g,夏枯草20g,购于封丘县福兴中药材金银花有限公司,经河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为正品。药物共煎煮3次,混合后浓缩至1.26 g/mL;

炔雌醇环丙孕酮片(商品名:达英-35,德国Bayer公司,批号:240430k);来曲唑(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:KTOKJ4J);促性腺激素释放激素(GnRH)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:JN5509)、卵泡刺激素(FSH)ELISA试剂盒(批号:JN3236)、促黄体生成素(LH)ELISA试剂盒(批号:JN5162)、大鼠雌二醇(E₂)ELISA试剂盒(批号:JN341)、睾酮(T)ELISA试剂盒(批号:JN5622)均购自上海纪宁生物科研有限公司;兔抗大鼠TP53抗体(批号:GB115747-100)、兔抗大鼠TNF- α 抗体(批号:GB115726-100)、兔抗大鼠IL-6抗体(批号:GB11117-100)、免疫组化专用山羊抗兔二抗(批号:G1213-100UL)、DAB显色试剂盒(批号:G1212-200T)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 高速低温离心机(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:SLX-1024F);光学显微镜(上海无陌光学仪器有限公司,型号:CX23);组织包埋机(湖北贝诺医疗科技有限公司,型号:YD-6D);酶标仪(美国Bio-Rad公司,型号:MR-96TB);电子分析天平(北京塞多利斯天平有限公司,型号:BS110S)。

1.4 龙胆泻肝汤改善PCOS的网络药理学预测

1.4.1 龙胆泻肝汤活性成分筛选 利用TCMSP数据库检索龙胆草、栀子、泽泻、当归、地黄、黄芩、柴胡、牡丹皮、夏枯草、车前子化学成分,以类药性(drug likeness, DL)≥0.18,口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%筛选,并根据文献进行补充。

1.4.2 龙胆泻肝汤作用靶点预测 将“1.4.1”项化学成分导入PubChem数据库,获得分子结构,后导入Swiss Target Prediction数据库,物种限定为“Homo sapiens”,筛选Probability>

0.1的化学成分。

1.4.3 PCOS疾病靶点预测 以“Polycystic ovary syndrome”为关键词,利用OMIM数据库、GeneCard数据库、TTD数据库获取Score值大于中位数的相关作用靶标,去除重复项。

1.4.4 龙胆泻肝汤改善PCOS的潜在作用靶点获取 将“1.4.2”项下作用靶点与“1.4.3”项下疾病相关靶点通过Venny2.1平台取交集,并绘制韦恩图。

1.4.5 PPI网络构建 将“1.4.4”项下靶点导入String数据库,绘制PPI网络图;筛选Medium-confidence ≥ 0.4 ,并通过Cytoscape 3.6.1软件可视化,以度(Degree)值筛选关键活性成分作用靶点。

1.4.6 “中药-活性成分-关键靶点”网络构建 将组方活性成分信息与潜在作用靶点信息导入Cytoscape 3.6.1,构建网络图。

1.4.7 GO功能及KEGG通路富集分析 将“1.4.4”项下靶点导入David数据库分析。使用微生信在线平台可视化。筛选出PPI度值排序靠前且位于相关信号通路的蛋白作为核心靶点。

1.4.8 分子对接 将核心靶点作为受体,根据“中药-活性成分-关键靶点”网络,由核心靶点回推到中药成分,确定配体。从PDB数据库中下载得到核心靶点蛋白的三维结构PDB文件,从TCMSP数据库下载组方活性成分mol2文件,利用AutoDock Tools1.5.7软件分子对接,以结合能 < -5 cal/mol作为结合能强的标准,根据对接分值选取结合能量最低组,利用Pymol对结果进行可视化分析。

1.5 龙胆泻肝汤改善PCOS的动物实验验证

1.5.1 模型构建、动物分组与给药 取大鼠53只,灌胃来曲唑混悬液(1 mg/kg),1次/d,连续28 d,从第14天始持续检测阴道涂片,第29天随机取3只大鼠腹腔注射氨基甲酸酯(1 g/kg)麻醉,剖取卵巢进行组织病理学检测^[9]。若光镜观察下,大鼠阴道脱落细胞涂片持续出现阴道上皮细胞角化,且卵巢组织观察到显著的病理改变,提示PCOS造模成功^[6]。将造模成功大鼠随机分为模型组(MX组)、达英-35组(DY组)、龙胆泻肝汤低剂量组(LD-D组)、龙胆泻肝汤中剂量组(LD-Z组)、龙胆泻肝汤高剂量组(LD-G组),另取10只未造模大鼠作为空白组(KB组)。KB组和MX组给予等容积蒸馏水。LD-D组、LD-Z组、LD-G组分别给予6.3 g/kg、12.6 g/kg、25.2 g/kg的龙胆泻肝汤药液灌胃,达英-35的大鼠灌胃剂量为0.2 mg/kg(根据人和大鼠换算公式推得),1次/d,连续28 d。

1.5.2 取材及处理 末次给药24 h后,称质量,麻醉后腹主动脉采集血液样本,离心取上清,储存于 -80 °C冰箱中备用。解剖获得双侧卵巢,生理盐水冲洗去除表面残留物,滤纸吸尽表面液体,称重后一分为二,一份用福尔马林固定,另一份液氮速冻后于 -80 °C下储存。

1.5.3 大鼠血清中 E_2 、T、GnRH、FSH、LH水平检测 取“1.5.2”项下各组大鼠血清样品,严格按照试剂盒说明书方法操作。

1.5.4 大鼠卵巢系数计算 根据公式(卵巢系数=卵巢质量/体质量)计算卵巢系数。

1.5.5 大鼠卵巢组织病理形态学观察 取“1.5.2”项下固定于福尔马林的卵巢组织,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片,切片后二甲苯脱蜡,取部分切片HE染色,染色完成后以梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,于光学显微镜下观察。

1.5.6 大鼠卵巢组织中TP53、TNF- α 、IL-6蛋白水平检测 采用免疫组化法检测卵巢组织蛋白表达,取“1.5.5”项制备的石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,8 min柠檬酸盐缓冲液热抗原修复。待自然冷却至室温,使用0.5% TritonX-100增强膜通透性,分别滴加TP53、TNF- α 和IL-6一抗(稀释比均为1:1000),4 °C孵育过夜。次日37 °C复温30 min,随后滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗,孵育20 min。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行3次漂洗后,采用DAB试剂进行显色,10 min后终止显色反应。采用苏木素进行复染,时间为3 min,之后使用盐酸乙醇进行分化,再经流水返蓝处理,按照常规步骤进行脱水、透明处理,最后使用中性树胶封片。于400倍光学显微镜下随机选取3个非重叠视野。以胞质或胞核出现淡黄至棕黄色颗粒沉积作为阳性判定标准。以积分光密度(IOD)值作为蛋白表达定量指标,使用Image-Pro Plus 6.0软件测定。

1.6 统计学方法 所有数据采用SPSS 24.0统计软件分析,计量资料均采用($\bar{x} \pm s$)表示,若数据服从正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用Dunnett's检验;不服从正态分布的多组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 龙胆泻肝汤改善PCOS的网络药理学预测结果

2.1.1 龙胆泻肝汤作用靶点筛选 经筛选后得到龙胆泻肝汤活性成分123个。将123个活性成分导入DrugBank数据库进行靶点预测,经去重后共得到靶点254个。

2.1.2 龙胆泻肝汤-PCOS靶点筛选结果 从GeneCard数据库、OMIM数据库、TTD数据库中搜索靶点并合并去重后得PCOS相关靶点共4 498个。254个龙胆泻肝汤潜在靶点与4 498个PCOS相关靶点交集,筛选出共同靶点192个。(见图1)

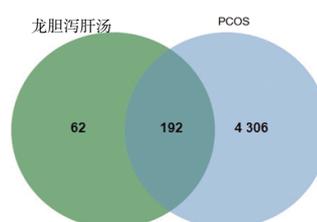


图1 龙胆泻肝汤干预PCOS靶点韦恩图

2.1.3 PPI网络分析结果 将“2.1.2”项下靶点导入String数据库,得到PPI网络图。PPI网络共包含191个节点,通过1 783条边连接,节点的平均度数为48.3,平均局部聚集系数为0.646。将PPI网络图导入Cytoscape3.9,以Degree值排序,得大于Degree平均值的靶点共83个。以83个核心靶点为基础构建“中药-活性成分-关键靶点”网络图。(见图2~5)

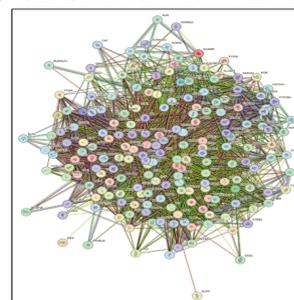


图2 PPI网络图

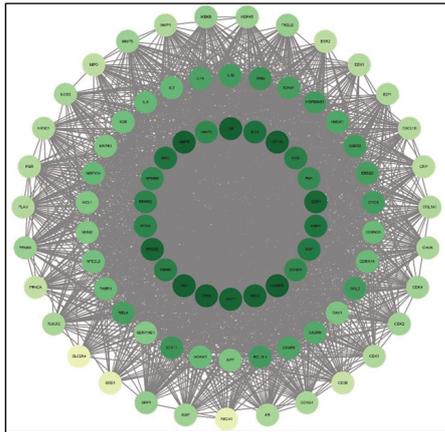


图3 关键靶点 PPI 网络图

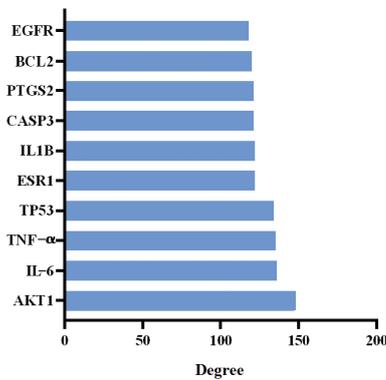
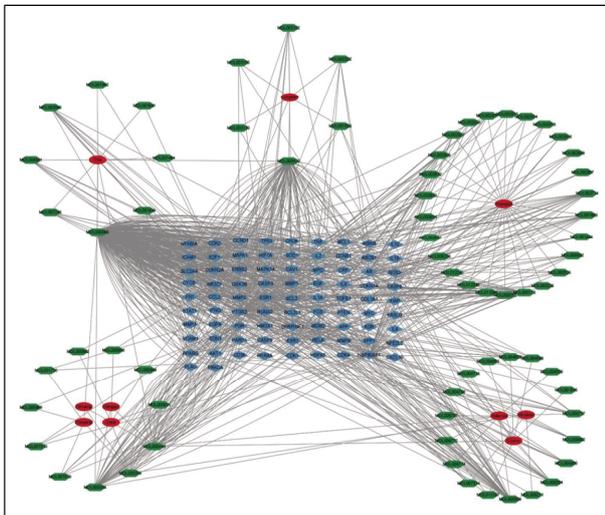


图4 排名前10位的关键靶点度值排序

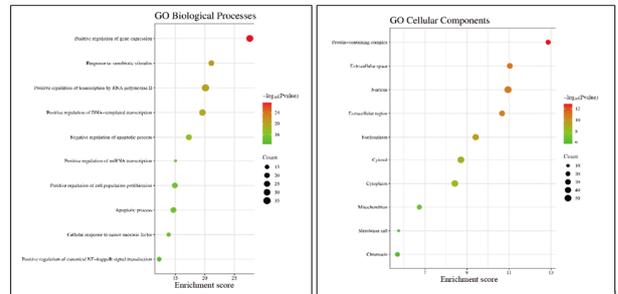


注:椭圆形代表中药,六边形代表主要活性成分,四边形代表关键靶点。

图5 中药-活性成分-关键靶点网络图

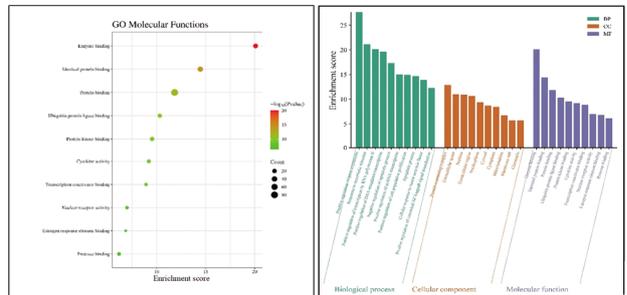
2.1.4 GO功能富集和KEGG通路富集分析结果 将“2.1.3”项下交集靶点导入David数据库分析,筛选出满足 $P \leq 0.05$ 的GO功能条目774个、KEGG信号通路158个。(见图6~7)GO功能富集分析结果显示生物过程(BP)涉及基因表达的正向调控、对外源性刺激的反应、RNA聚合酶II对转录的正向调控等;细胞组分(CC)涉及蛋白质复合物、细胞外空间、细胞核等;分子功能(MF)涉及酶结合、相同的蛋白质结合、蛋白质结合等。KEGG功能富集分析结果显示癌症的途径、脂质与动脉粥样

硬化、前列腺癌等通路参与其中。根据以上网络药理学结果预测,结合以往研究文献[7],推测龙胆泻肝汤可能通过脂质与动脉粥样硬化途径干预多囊卵巢综合征,筛选出与通路相关且度值排名靠前的蛋白靶点,推测涉及的核心靶点为肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、细胞肿瘤抗原P53蛋白(TP53)。



GO-BP分析

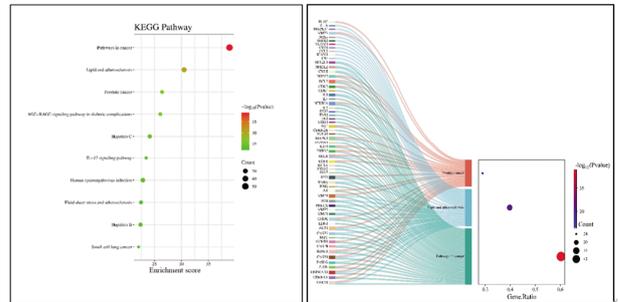
GO-CC分析



GO-MF分析

GO富集分析

图6 龙胆泻肝汤干预PCOS的GO富集分析图



KEGG通路分析

KEGG通路(前三名)靶点分析

图7 龙胆泻肝汤干预PCOS的KEGG富集分析图

2.1.5 分子对接验证结果 以龙胆草成分山柰酚、黄芩成分汉黄芩素、栀子成分槲皮素、夏枯草成分木犀草素与TNF- α 、IL-6、TP53三个靶点分子对接,结合能均小于-5 kJ/mol,表明龙胆草成分山柰酚、黄芩成分汉黄芩素、栀子成分槲皮素、夏枯草成分木犀草素与TNF- α 、IL-6、TP53结合稳定。(见图8~9)

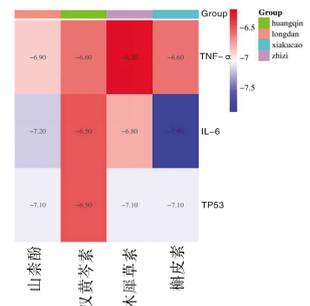
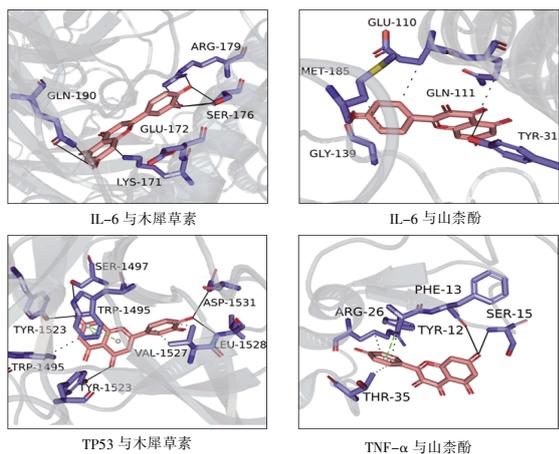


图8 分子对接结合能热图



注:黑色实线代表Hydrogen Bonds;黑色虚线代表Hydrophobic Interactions;绿色虚线代表 π -Stacking。

图9 部分龙胆泻肝汤关键活性成分与核心靶点的分子对接模拟图

2.2 龙胆泻肝汤改善PCOS大鼠的动物实验验证结果

2.2.1 大鼠血清中 E_2 、T、GnRH、FSH、LH水平检测结果 与KB组比较, MX组大鼠血清 E_2 、FSH水平降低 ($P<0.05$), 血清T、GnRH、LH水平升高 ($P<0.05$); 与MX组比较, DY组、LD-Z组、LD-G组大鼠血清 E_2 升高 ($P<0.05$); 与MX组比较, DY组、LD-D组、LD-Z组、LD-G组大鼠血清FSH水平升高 ($P<0.05$), T、GnRH、LH水平降低 ($P<0.05$)。(见表1)

表1 龙胆泻肝汤对PCOS大鼠血清中 E_2 、T、GnRH、FSH及LH水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	E_2 (ng/L)	T(nmol/L)	GnRH(ng/L)	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)
KB组	10	228.9±4.8	32.1±0.9	572.2±13.3	10.7±0.4	16.8±0.1
MX组	10	203.6±3.1 ^a	42.6±0.9 ^a	702.9±10.7 ^a	6.6±0.3 ^a	20.5±0.4 ^a
DY组	10	223.3±2.1 ^b	34.3±1.2 ^b	605.3±10.9 ^b	8.9±0.1 ^b	17.5±0.4 ^b
LD-D组	10	206.9±2.0	39.6±1.1 ^b	662.8±10.4 ^b	8.2±0.1 ^b	19.4±0.2 ^b
LD-Z组	10	214.7±3.1 ^b	36.5±1.2 ^b	626.3±5.4 ^b	7.7±0.2 ^b	18.9±0.3 ^b
LD-G组	10	220.0±3.0 ^b	35.9±0.9 ^b	614.5±6.5 ^b	8.2±0.2 ^b	18.2±0.1 ^b

注:与KB组比较,^a $P<0.05$;与MX组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2.2 大鼠卵巢外观形态观察 KB组大鼠的卵巢体积较小, 色淡红, 表面凹凸不平, 可观察到不规则的结节状卵泡结构; MX组大鼠的卵巢体积增大、颜色加深, 且表面可见大小不一、内部充盈液体的小囊状结构; 与MX组比较, DY组、LD-D组、LD-Z组、LD-G组大鼠的卵巢外观病理改变均不同程度改善。(见图10)

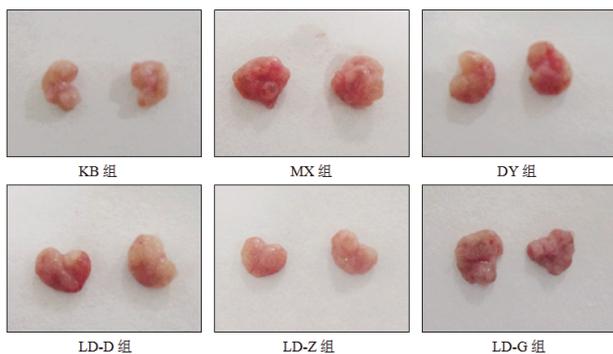


图10 各组大鼠卵巢外观形态图

2.2.3 大鼠卵巢系数计算结果 与KB组比较, MX组大鼠卵巢质量、卵巢系数升高 ($P<0.05$), 体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与MX组比较, DY组、LD-Z组、LD-G组大鼠卵巢质量升高 ($P<0.05$); 与MX组比较, DY组、LD-Z组、LD-G组大鼠卵巢系数升高 ($P<0.05$)。(见表3)

表2 龙胆泻肝汤对PCOS大鼠体质量、卵巢、卵巢系数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量/g	卵巢/mg	卵巢系数/(mg/g)
KB组	10	209.3±12.6	77.2±3.9	0.37±0.02
MX组	10	213.3±37.3	140.2±35.0 ^a	0.66±0.12 ^a
DY组	10	216.8±32.8	92.6±14.1 ^b	0.43±0.02 ^b
LD-D组	10	245.5±1.9	123.0±9.2	0.53±0.02 ^b
LD-Z组	10	211.2±17.1	99.1±6.2 ^b	0.47±0.01 ^b
LD-G组	10	238.2±21.9	101.5±8.5 ^b	0.42±0.02 ^b

注:与KB组比较,^a $P<0.05$;与MX组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2.4 大鼠卵巢组织病理学观察结果 KB组大鼠卵巢组织结构保持完整, 各阶段卵泡发育状况良好, 未观察到囊性卵泡。与KB组比较, MX组大鼠卵巢皮质呈现胶原化现象, 卵泡颗粒细胞层数减少, 卵泡出现囊性改变。与MX组比较, DY组、LD-D组、LD-Z组、LD-G组大鼠卵巢组织均表现出不同程度的改善。(见图11)

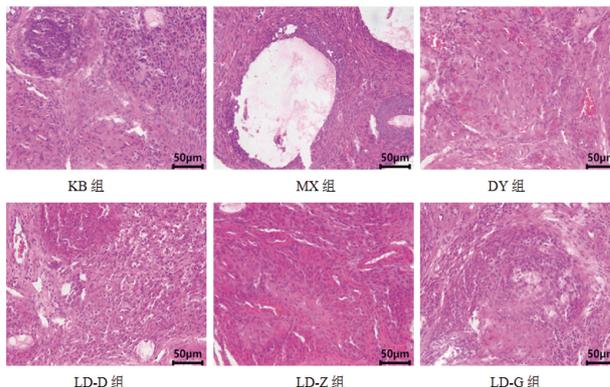


图11 各组大鼠病理形态图 (HE, ×400)

2.2.5 大鼠卵巢组织TP53、TNF- α 、IL6蛋白表达结果 与KB组比较, MX组大鼠卵巢组织TP53水平降低 ($P<0.05$), TNF- α 、IL-6水平升高 ($P<0.05$); 与MX组比较, DY组、LD-Z组、LD-G组大鼠卵巢组织TP53水平升高 ($P<0.05$), TNF- α 、IL6水平均降低 ($P<0.05$)。(见图12~14、表3)

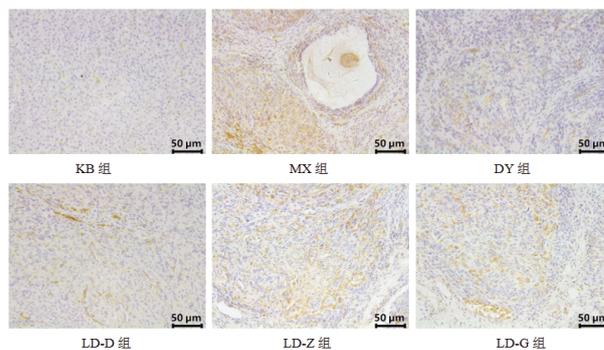


图12 龙胆泻肝汤对PCOS大鼠卵巢组织IL-6蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

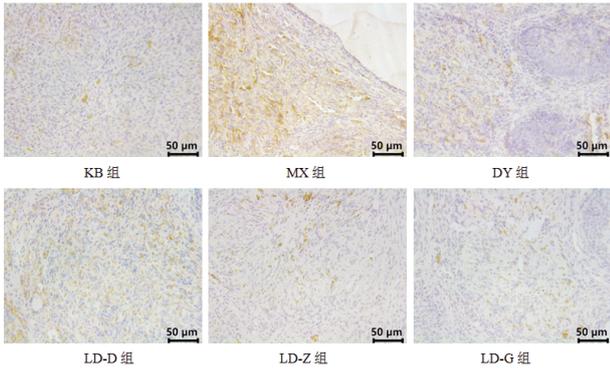


图 13 龙胆泻肝汤对 PCOS 大鼠卵巢组织 TNF-α 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

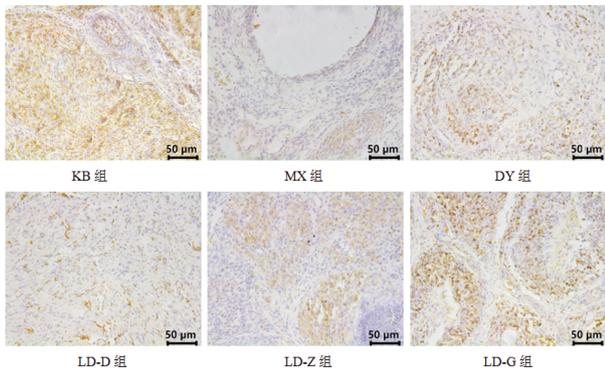


图 14 龙胆泻肝汤对 PCOS 大鼠卵巢组织 TP53 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

表 3 龙胆泻肝汤对 PCOS 大鼠卵巢组织 TP53、TNF-α、IL-6 IOD 值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TP53(IOD×10 ²)	TNF-α/(IOD×10 ²)	IL-6(IOD×10 ²)
KB组	10	273.9 ± 6.1	34.8 ± 4.0	53.4 ± 11.6
MX组	10	46.8 ± 11.4 ^a	152.4 ± 22.2 ^a	305.0 ± 33.0 ^a
DY组	10	281.52 ± 6.8 ^b	44.9 ± 11.1 ^b	76.5 ± 494.7 ^b
LD-D组	10	187.8 ± 9.4 ^b	87.5 ± 8.8 ^b	116.5 ± 69.9 ^b
LD-Z组	10	206.2 ± 24.7 ^b	55.2 ± 4.1 ^b	92.6 ± 72.6 ^b
LD-G组	10	232.7 ± 17.1 ^b	59.8 ± 4.5 ^b	111.6 ± 18.2 ^b

注:与KB组比较,^aP<0.05;与MX组比较,^bP<0.05。

3 讨论

PCOS的动物模型一般由雄激素、芳香化酶抑制剂等药物构建^[9]。来曲唑属于芳香化酶抑制剂的一种,可抑制卵巢中雄激素向雌激素转化,使雄激素水平升高,导致排卵异常及卵巢多囊性改变^[9]。本研究采用来曲唑造模,结果显示,模型大鼠卵巢体积增大且呈囊性改变,性激素紊乱,提示造模成功。

肝经湿热证存在于PCOS发生发展的各个阶段,且表现复杂。龙胆泻肝汤是治疗肝经湿热的经典方。方中龙胆草上清实火、下利湿热、清肝利胆、两擅其功,为君药。黄芩善清上中二焦湿热;栀子清泻肝胆实火,通利三焦,导热下行;夏枯草清肝泻火。三药共助君药清肝胆实火。泽泻利水渗湿;车前子利尿通淋,使湿热从下焦而去。两药共助君药清泻肝胆湿热^[10]。临床常用达英-35治疗PCOS,其含有炔雌醇、醋酸环丙孕酮成分,可有效抑制卵巢分泌雄激素,降低LH水平^[11]。因此本研究选择达英-35作为阳性对照药。经龙胆泻肝汤干预后,

PCOS大鼠卵巢囊性病变改善,颗粒细胞层数增加,表明龙胆泻肝汤对PCOS大鼠有较好的改善作用。

卵泡生长是一个复杂的过程,需要LH、FSH、T、E₂、AMH和其他可能因素的协调。GnRH来源于下丘脑,可调控LH和FSH的分泌^[12]。PCOS患者中枢神经系统异常,表现为下丘脑GnRH神经元脉冲式释放频率升高。这种长期、高频率的GnRH脉冲刺激作用,导致垂体GnRH受体数量减少、GnRH敏感性降低,引发LH和FSH的分泌调节机制紊乱,表现为垂体对GnRH的反应性增强,LH升高,FSH下降^[13]。高水平的LH促进卵泡膜细胞中雄激素合成,导致高雄激素血症和卵泡发育停滞,同时损害雌激素和FSH合成,抑制卵泡生长和排卵,最终导致卵巢多囊样改变^[14]。低水平的FSH使卵巢芳香化酶的活性下降,使T向E₂转化受阻,同时低水平的FSH会损伤卵巢颗粒细胞,使E₂分泌减少,导致卵巢内形成高T和低E₂的环境,从而影响卵泡的发育和排出^[15]。GnRH的搏动分泌模式受卵巢类固醇激素雌二醇和孕激素的反馈调节。与非PCOS患者女性相比,患有PCOS的女性雌激素减少且负反馈系统受损,需要更高剂量的外源性雌二醇和孕激素来减少升高的LH脉搏频率^[16],而低水平的E₂水平更无法抑制这一过程。本实验结果发现经龙胆泻肝汤干预后,PCOS大鼠血清E₂和FSH水平升高,T、GnRH和LH水平降低,表明龙胆泻肝汤可有效改善PCOS大鼠性激素分泌。

既往有动物研究^[9]指出,经龙胆泻肝汤治疗后,PCOS大鼠卵巢体积明显减小,LH、LH/FSH、T、泌乳素(PRL)、抗米勒管激素(AMH)、IL-2、IL-6、IL-10水平降低,提示龙胆泻肝汤可能通过降低雄激素水平、抑制炎症反应等治疗PCOS。此结果与临床研究^[7]的结果基本一致。本研究通过网络药理学研究了龙胆泻肝汤改善PCOS的分子机制,结果显示龙胆泻肝汤主要通过脂质与动脉粥样硬化途径干预多囊卵巢综合征,涉及的核心靶点为TNF-α、IL-6、TP53。PCOS患者普遍存在慢性低度炎症状态^[18],TNF-α、IL-6均为重要的炎症因子。TNF-α参与活性氧生成及多种转录通路的激活,可引发具有组织特异性的炎症反应。PCOS的发生和发展以胰岛素抵抗为核心。高浓度的TNF-α可通过丝氨酸磷酸化干扰胰岛素信号传导,诱导胰岛素抵抗^[19]。TNF-α可刺激核因子κB(NF-κB)与内源性雄激素受体(AR)启动子结合,增加内源性AR表达并参与PCOS卵巢细胞凋亡和无排卵。IL-6可上调卵巢组织中AR活性,间接增加雌激素活性,影响卵巢功能、排卵、受精等,并参与脂肪细胞增殖、胰岛素抵抗的调节^[20]。TP53是人体最重要的肿瘤抑癌基因。TP53在母体生殖中发挥作用,其变异相关的不孕症的可能机制可能是植入受损^[21]。白血病抑制因子(LIF)是一种对囊胚植入至关重要的分泌细胞因子。TP53的失活降低了子宫LIF的水平和功能,影响囊胚植入^[22]。这可能是PCOS影响生殖健康的原因。同时,高水平的TP53可使IL-6、TNF-α的水平下降,抑制炎症因子的释放^[23]。本研究结果显示,PCOS大鼠卵巢组织中TP53水平下降,TNF-α和IL-6水平均升高。在龙胆泻肝汤干预下,PCOS大鼠卵巢组织出现了TP53水平上调,TNF-α和IL-6水平下调的情况,推测该方可以通过升高卵巢组织TP53水平,降低卵巢组织TNF-α和IL-6水平来影响脂质

与动脉粥样硬化途径,以实现改善PCOS作用。这一新的分子机制将为龙胆泻肝汤的进一步临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 谈勇.中医妇科学[M].4版.北京:中国中医药出版社,2016.
- [2] 彭霞,夏悦,谢佳妮,等.曹玲仙教授论治高雄激素血症型多囊卵巢综合征经验[J].河北中医,2022,44(5):713-716.
- [3] 肖淑兰,杜彦懿,王嘉玥.龙胆泻肝汤加减治疗肝经湿热型PCOS的疗效及对血清性激素、炎症因子的影响[J].中药材,2024,47(1):226-230.
- [4] 王建青.龙胆泻肝汤的渊源及临床运用概况[J].中医药通报,2020,19(1):41-43.
- [5] 张明昊,高一盈,董文霞,等.补肾强身片对多囊卵巢综合征模型大鼠的干预作用及机制研究[J].中国药房,2022,33(21):2632-2637,2653.
- [6] 刘亚敏,张明昊,王瑾瑾,等.四物汤通过激活LKB1/AMPK通路对多囊卵巢综合征大鼠的改善作用[J].中药新药与临床药理,2023,34(7):895-903.
- [7] 闵莉,章小燕,王素英,等.龙胆泻肝汤对胆囊胆固醇结石小鼠胆固醇代谢的影响[J].中华中医药杂志,2024,39(7):3410-3415.
- [8] 苗晋鑫,李秀敏,苗明三.多囊卵巢综合征动物模型数据挖掘及分析[J].中国比较医学杂志,2020,30(2):135-140,146.
- [9] 马丽亚,杜婧雯,张童,等.金匱肾气丸对多囊卵巢综合征模型大鼠的改善作用及机制研究[J].中国药房,2022,33(23):2869-2873.
- [10] 张明昊,薛鹏坤,赵盈盈,等.龙胆泻肝汤通过H1R/TRPV1、PAR-2/TRPV1和P38MAPK通路干预湿疹大鼠的作用机制研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2022,24(6):2331-2339.
- [11] 刘亚敏,董文霞,薛鹏坤,等.金匱肾气丸通过调控PI3K-AKT-mTOR及PI3K-AKT-GLUT4通路干预多囊卵巢综合征大鼠的作用机制研究[J].中药药理与临床,2023,39(1):1-7.
- [12] SHIN J, PARK K E, CHOI Y M, et al. Early gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in women with polycystic ovaries syndrome: A preliminary randomized trial[J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45(3): 135-142.
- [13] STENER-VICTORIN E, PADMANABHAN V, WALTERS K A, et al. Animal models to understand the etiology and pathophysiology of polycystic ovary syndrome [J]. Endocr Rev, 2020, 41(4): bnaa010.
- [14] LIAO B Y, QIAO J, PANG Y L. Central regulation of PCOS: Abnormal neuronal-reproductive-metabolic circuits in PCOS pathophysiology [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 667422.
- [15] 尹利军,王晓慧.雄激素及其受体在肥胖、肥胖相关疾病及糖脂代谢紊乱中的作用[J].生理学报,2018,70(3):319-328.
- [16] CHHABRA S, MCCARTNEY C R, YOO R Y, et al. Progesterone inhibition of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator: Evidence for varied effects in hyperandrogenemic adolescent girls [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(5): 2810-2815.
- [17] 李俊波,邓芳,李霄汉,等.龙胆泻肝汤对PCOS模型大鼠的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):121-126.
- [18] 唐雨,张大伟,马丽亚.体重指数与多囊卵巢综合征相关性的研究进展[J].江苏大学学报(医学版),2024,34(3):222-227.
- [19] AKASH M S H, REHMAN K, LIAQAT A. Tumor necrosis factor- α : Role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 105-110.
- [20] DABRAVOLSKI S A, NIKIFOROV N G, EID A H, et al. Mitochondrial dysfunction and chronic inflammation in polycystic ovary syndrome [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 3923.
- [21] PASKULIN DD, PAIXÃO-CÔRTEZ V R, HAINAUT P, et al. The TP53 fertility network [J]. Genet Mol Biol, 2012, 35(supp4): 939-946.
- [22] STEWART C L, KASPAR P, BRUNET L J, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor [J]. Nature, 1992, 359(6390): 76-79.
- [23] 孙丽莎,王虹,张娟,等.基于JAK/STAT信号通路探讨调控TP53对子宫内膜癌大鼠的干预效果[J].中国老年学杂志,2024,44(23):5781-5785.

(收稿日期:2025-02-14 编辑:罗英姣)