

补肾化痰方对多囊卵巢综合征胰岛素抵抗 Akt 通路调控的实验研究

洪艳丽 吴 飞

摘要 **目的** 探讨补肾化痰方对多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)模型大鼠卵巢内胰岛素信号传导分子的调控。**方法** Wistar 雌鼠 50 只,随机分为溶媒对照组、模型组、中药低剂量组(5.406 g/kg)、中药中剂量组(10.812 g/kg)、中药高剂量组(21.624 g/kg),每组 10 只。测定大鼠空腹血糖及胰岛素水平,计算稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);RT-PCR 技术检测糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、葡萄糖转运蛋白 4(GLUT-4)、胰岛素受体底物-1(IRS-1)以及过氧化物酶增殖体激活受体 γ (PPAR- γ)表达,Western blot 法检测卵巢内胰岛素信号传导分子蛋白激酶 B(Akt)表达。**结果** 与溶媒对照组比较,模型组 HOMA-IR 及 PPAR- γ mRNA 表达明显升高,卵巢 GSK-3 β 、GLUT-4、IRS-1 mRNA 表达及 Akt、p-Akt 蛋白表达均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,中药高剂量组 HOMA-IR 明显降低,GSK-3 β 、GLUT-4、IRS-1 mRNA 表达及 Akt 蛋白表达均显著升高,p-Akt 蛋白表达尤为显著,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);中药低、中剂量组 GSK-3 β 、GLUT-4 mRNA 显著升高,PPAR- γ mRNA 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药低剂量组 p-Akt 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PCOS 模型鼠存在胰岛素抵抗,并存在卵巢组织信号通路传导异常。补肾化痰方能够改善 PCOS 大鼠胰岛素抵抗,与胰岛素信号传导分子蛋白表达的调控有关。

关键词 多囊卵巢综合征;补肾化痰方;蛋白激酶 B 通路;胰岛素抵抗

Effect of Bushen Huatan Recipe on the Akt Signal Pathway in Polycystic Ovarian Syndrome Model Rats with Insulin Resistance: an Experimental Research HONG Yan-li and WU Fei Department of Gynecology, First clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210046), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Bushen Huatan Recipe (BHR) on the Akt signal pathway in polycystic ovarian syndrome (PCOS) model rats with insulin resistance (IR). **Methods** Fifty Wistar female PCOS rats were randomly and equally divided into 5 groups, i.e., the control group, the model group, the low dose BHR group (5.406 g/kg), the medium dose BHR group (10.812 g/kg), and the high dose BHR group (21.624 g/kg), 10 in each group. Levels of fasting blood glucose (FBG) and insulin were detected to calculate homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). The expression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), glycogen synthetase kinase-3 β (GSK-3 β), glucose transporter 4 (GLUT-4), and peroxisome proliferator activated receptor (PPAR- γ) mRNA were detected by RT-PCR. The expression of insulin signal transduction molecular kinase B (Akt) was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, HOMA-IR and the mRNA expression of PPAR- γ mRNA significantly increased, the mRNA expression of GSK-3 β , GLUT-4, and IRS-1, protein expression of Akt and p-Akt significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, HOMA-IR significantly decreased, the mRNA expression of GSK-3 β , GLUT-4, IRS-1, and Akt protein significantly increased in the high dose BHR group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mRNA expression of p-Akt protein increased more obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$). mRNA expression of GSK-3 β and GLUT-4 significantly increased ($P < 0.05$), while the mRNA expression of PPAR- γ significantly decreased in the low

基金项目:南京中医药大学青年自然科学基金项目(No. 12XZR12)

作者单位:南京中医药大学第一临床医学院妇科(南京 210046)

通讯作者:洪艳丽, Tel: 025-85811147, E-mail: njutcmhongli@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.02.0230

and middle BHR groups ($P < 0.05$). The expression of p-Akt significantly increased in the low dose BHR group ($P < 0.05$). **Conclusions** IR and abnormal insulin signal pathway existed in PCOS model rats. BHR could improve IR of PCOS rats, which was correlated with regulating protein expression of insulin signal transduction molecules.

KEYWORDS polycystic ovarian syndrome; Bushen Huatan Recipe; Akt signal pathway; insulin resistance

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是育龄期妇女常见的一种生殖功能障碍与糖代谢异常并存的内分泌紊乱综合征。临床以高雄激素、持续无排卵及多囊卵巢为特征,病理生理涉及范围广泛^[1]。其代谢异常主要表现为肥胖、糖耐量减低和血脂代谢异常等,胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是其关键发病机制^[2]。自 1980 年 Burghen 首次提出 IR 参与 PCOS 的发病以来,大量研究证实 IR 与 PCOS 之间存在密切关系,胰岛素信号传导途径中的任何一个环节受损均可导致 IR 的发生^[3-5]。多年来,关于 PCOS 的研究一直是妇产科及生殖领域的焦点,采用的西药多为人工合成制剂,不良反应大。中药资源丰富,其多系统调理、多靶点作用及中医的辨证论治、整体观念使其在治疗 PCOS 方面存在着优势^[3]。从 PCOS 临床和基础研究文献不难看出^[6,7],肾虚是 PCOS 排卵障碍的基础,肾中阴阳失衡,气化失司,天癸的产生与泌至失调,变生痰浊之证,以致包膜变厚、排卵不利,而 PCOS 的 IR 则是在痰浊不化的基础上形成的。补肾化痰方是临床经验方,前期临床研究取得较满意效果。本实验通过建立 PCOS 大鼠模型,观察补肾化痰方对模型鼠卵巢内胰岛素信号传导分子的调控作用,为补肾化痰方的临床应用提供现代科学理论依据。

材料与方

1 动物与分组 选用体重 45 ~ 60 g、21 日龄的未成年 Wistar 雌鼠 (清洁级) 50 只,由南京中医药大学实验动物中心提供,许可证号: SCXK (沪) 2007 - 0005。饲养于标准实验环境中,饮水及食物自由摄取。采用随机数字表法将大鼠分 5 组:溶媒对照组,模型组,中药低、中、高浓度组,每组 10 只。

2 仪器、试剂与药物 超速低温离心机 (美国 Beckman COULTER), 超低温冰箱 (美国 Thermo 702), 自动生化分析仪 (日本 HITACHI 7060), EPS-300 电泳仪 (上海天能科技有限公司), 普通光学显微镜 (日本 Olympus CK-Z), 752 紫外可见分光光度计 (上海菁华科技仪器有限公司), 核酸蛋白分析仪 (德国 Ep-

pendorf BioPhotometer)。脱氢表雄酮 (DHEA) 购自西安高远生化有限公司,纯度为国产分析纯 99.16 %,批号 H20090125。注射用茶油购自广州汉方现代中药研究开发有限公司,批号 20090213。ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司;逆转录酶和引物购自美国 Promega 公司,PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。补肾化痰方药由 (仙灵脾 10 g 仙茅 10 g 苍术 10 g 半夏 10 g 陈皮 10 g 九节菖蒲 10 g 香附 10 g 川芎 10 g 泽泻 10 g 鹿角霜 10 g 胆南星 10 g 砂仁 5 g 等) 组成,由江苏省中医院煎药室加工制成含生药 1 g/mL 的溶液,按照“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算,给药剂量根据临床等效剂量的 1/2 倍、1 倍及 2 倍设立低 (5.406 g/kg)、中 (10.812 g/kg)、高浓度 (21.624 g/kg)。

3 模型制备 按 Lee MT 等^[8]方法,SD 雌性大鼠 21 日龄开始溶媒对照组每日皮下注射茶油 0.2 mL,连续注射 20 日;其余各组每日皮下注射 DHEA 6 mg/100 g 体重加 0.2 mL 茶油混合剂,均连续注射 20 日。注射完成后,取阴道涂片连续观察 11 日,以阴道涂片连续出现角化细胞判定为造模成功。

4 给药方法 造模结束次日开始给药,方案为:溶媒对照组与模型组,灌服生理盐水,1 mL/100 g,1 次/日,连续 30 日。中药组分别灌服低、中、高浓度补肾化痰方,1 次/日,连续 30 日。

5 标本采集与储存 大鼠灌胃 30 天后,禁食水 12 h,用戊巴比妥腹腔麻醉,于腹主动脉采血,以 3 000 r/min,离心 15 min,分离血清, - 20 °C 保存,备用。随后大鼠断颈处死,一侧卵巢置入多聚甲醛中固定,另一侧液氮冷冻, - 70 °C 保存。

6 观察指标及方法

6.1 HOMA-IR 血清标本采集后,采用放免法测定空腹葡萄糖 (FBG) 及胰岛素 (FINS),由南京中医药大学附属江苏省中医院检验科检测。计算稳态模型胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR), 计算公式: $HOMA-IR = FBG (mmol/L) \times FINS (mIU/L) / 22.5$ 。

6.2 卵巢相关信号分子 mRNA 表达 应用 RT-PCR 法检测卵巢组织糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT-4)、胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 以及过氧化物酶增殖体激活受体 γ (PPAR- γ) mRNA 表达,具体引物序列见表 1。组织匀浆,加入 1 mL Trizol,提取总 RNA 按照试剂盒说明在 20 μ L 体系下完成逆转录。逆转录反应体系为 20 μ L,42℃ 下扩增 60 min,95℃ 下变性 5 min,4℃ 保存。聚合酶链反应体系为 25 μ L,95℃ 下预变性 5 min,94℃ 下变性 30 s,72℃ 下延伸 30 s;重复变性、退火、延伸 35 个循环;72℃ 下充分延伸 7 min,结束温度为 4℃。取 5 μ L 产物,80 V 下经 2% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min,利用凝胶电泳成像系统拍照,获得条带密度值和面积数据,利用与内标基因 (GAPDH) 扩增产物的灰度比反映各基因转录表达水平。

表 1 RT-PCR 引物

基因名	引物序列	长度 (bp)
GSK-3 β	S: 5'-3' TCCTTATCCCTCCTCAGC	119
	A: 5'-3' TTGGTCTGTCCACGGTCT	
GLUT-44	S: 5'-3' TACTCAGGGCTAACATCAGG	231
	A: 5'-3' AGGACAGAAGGGCAACAG	
PPAR- γ	S: 5'-3' ACCACTCCCATTCTCTTT	264
	A: 5'-3' CACAGACTCGGCACTCG	
IRS-1	S: 5'-3' CCTGGAGTATTATGAGAACGAG	742
	A: 5'-3' GCTGGCGGAGGATTGT	
GAPDH	S: 5'-3' TCAACGGCAGTCAAGG	470
	A: 5'-3' ACCAGTGGATGTCAGGGAT	

6.3 卵巢组织 Akt 及 p-Akt 蛋白表达 采用 Western blot 法检测卵巢组织蛋白激酶 B (Akt) 及 p-Akt 蛋白表达。标本采集冻存后,提取卵巢组织蛋白质,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,加入一抗兔抗大鼠 p-Akt 多克隆抗体孵育,4℃ 静置过夜。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的半抗兔二抗,孵育,充分洗涤,化学发光,显影,定影,蒸馏水冲洗终止。以 GAPDH 为内参,凝胶图像处理系统分析结果。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用秩和检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 比较 (表 2) 与溶媒对照组比较,模型组 FINS、HOMA-IR 明

显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而 FBG 则无明显变化 ($P > 0.05$)。与模型组比较,中药中剂量组 FINS 显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);中药高剂量组 FINS、HOMA-IR 明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	HOMA-IR
溶媒对照	10	4.82 $\pm$ 0.21	4.12 $\pm$ 0.44	0.88 $\pm$ 0.13
模型	10	5.67 $\pm$ 0.67	6.57 $\pm$ 0.21*	1.74 $\pm$ 0.25*
中药低剂量	10	5.27 $\pm$ 0.45	6.03 $\pm$ 0.25	1.41 $\pm$ 0.06
中剂量	10	5.23 $\pm$ 0.55	5.27 $\pm$ 0.31 $^{\Delta}$	1.23 $\pm$ 0.19
高剂量	10	5.07 $\pm$ 0.25	4.37 $\pm$ 0.57 $^{\Delta}$	0.99 $\pm$ 0.18 $^{\Delta}$

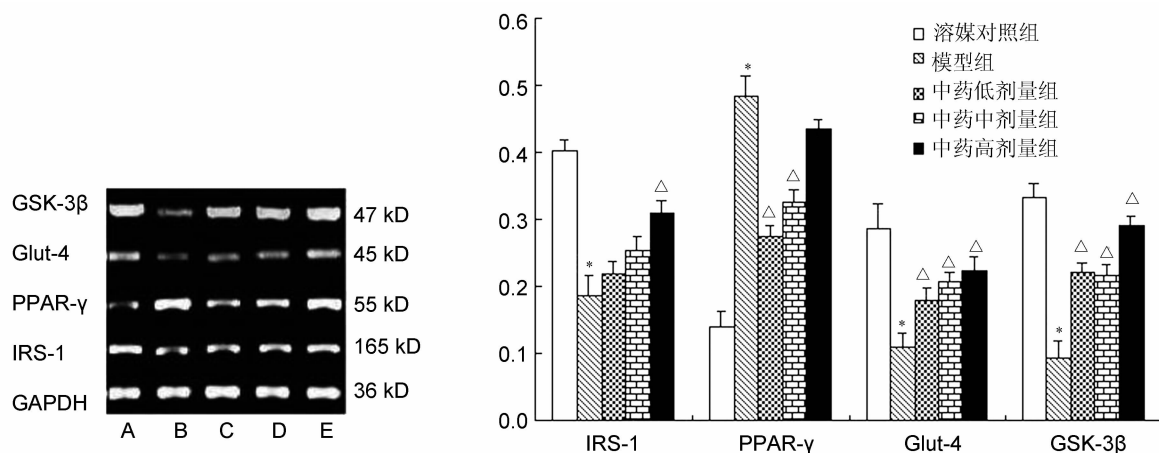
注:与溶媒对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

2 各组大鼠卵巢组织 GSK-3 β 、GLUT-4、IRS-1 及 PPAR- γ mRNA 表达比较 (图 1) 与溶媒对照组比较,模型组 GSK-3 β 、GLUT-4、IRS-1 mRNA 表达明显降低,PPAR- γ mRNA 表达显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较,中药低、中剂量组 GSK-3 β 、GLUT-4 mRNA 表达显著升高,PPAR- γ mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 IRS-1 mRNA 表达无明显变化 ($P > 0.05$);中药高剂量组 GSK-3 β 、GLUT-4、IRS-1 mRNA 表达均显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 PPAR- γ mRNA 则无明显变化 ($P > 0.05$)。

3 各组大鼠卵巢组织 Akt 及 p-Akt 蛋白表达比较 (图 2) 与溶媒对照组比较,模型组 Akt 及 p-Akt 蛋白表达均显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较,中药低、中、高剂量组 Akt 蛋白表达均显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);中药低、高剂量组 p-Akt 蛋白表达明显升高,高剂量组尤为显著,差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$),中药中剂量组无明显变化 ($P > 0.05$)。

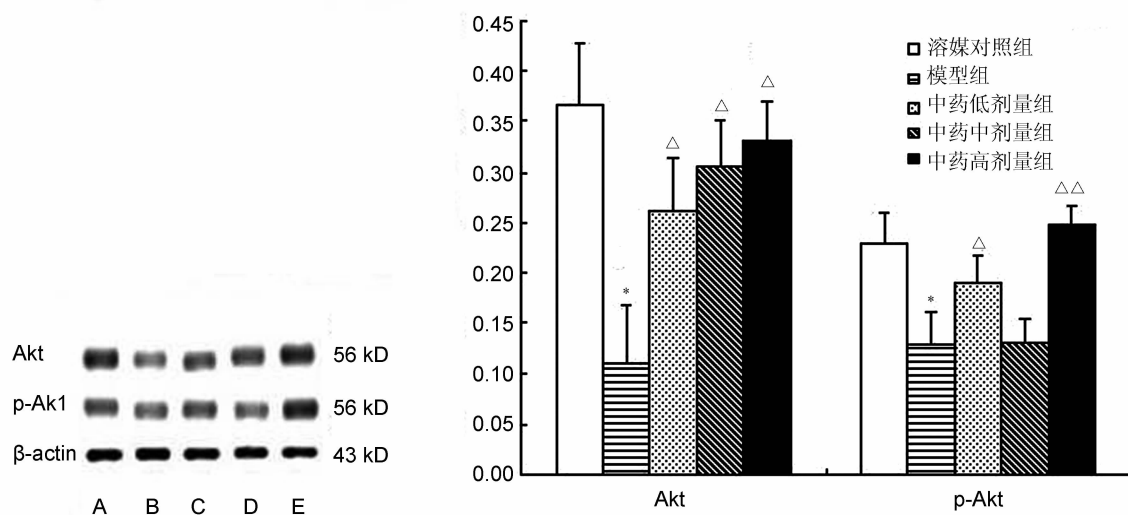
讨 论

中医学认为,PCOS 属肾虚痰阻证。肾虚,则经断无源;脾虚,则运化失职,“痰湿”壅阻胞宫,则表现为经少、闭经、不孕及排卵障碍等生殖方面的异常。大量研究表明,补肾化痰中药能够改善 PCOS 患者的高雄激素血症及 IR,能够逆转卵巢多囊样改变^[3]。方中仙灵脾、仙茅、鹿角霜补肾益气;苍术、半夏、陈皮、石菖蒲、泽泻、胆南星、砂仁健脾化痰,利水渗湿;香附、川芎活血化瘀,调经助孕。全方补肾健脾,化痰逐瘀通经。



注:A 为溶媒对照组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 各组大鼠 GSK-3 β 、GLUT-4、IRS-1、PPAR- γ mRNA 表达比较



注:A 为溶媒对照组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 2 各组大鼠卵巢组织 Akt 及 p-Akt 蛋白表达比较

胰岛素(INS)通过与靶细胞膜上的特异性受体结合发挥其生物学效应。当 INS 与受体结合后,激活酪氨酸蛋白激酶,进而催化酪氨酸残基发生磷酸化过程,磷酸化的 IRSs 能够结合并激活 Src 和胶原同源蛋白(Shc)等下游效应物,后者激活磷脂酰肌醇-3(PI-3),可使肌肉 GLUT-4 由细胞内的贮存室移位并融合到细胞膜上,使葡萄糖由细胞外向细胞内的跨膜运输完成^[9]。PI-3 激酶亦可激活 Akt,后者使 GSK-3 发生磷酸化而失活,进而使糖原合成酶激活促进糖原合成^[10,11]。近年来研究证实,PCOS 患者卵巢存在胰岛素受体(InsR)活性下降、IRS-1 表达及活性下降、PI-3K 活性下降、GLUT-4 表达下降等多处信号分子异

常,从而形成 IR,葡萄糖摄取率下降^[12,13]。

本实验结果发现,模型组大鼠存在 HOMA-IR 明显升高,卵巢组织 IRS-1 mRNA 表达降低,证实 PCOS 模型鼠存在胰岛素抵抗,卵巢局部的 IRS-1 蛋白水平的高低和功能的改变是胰岛素信号转导的基础^[14,15]。还有研究发现 PI-3K 下游信号分子 p-Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达下调,减弱了胰岛素信号的传递,引起卵巢 GLUT-4 蛋白表达的下调,影响葡萄糖的摄取利用,导致 IR 的发生^[5]。本实验发现经补肾化痰方处理后,HOMA-IR 明显降低,卵巢 IRS-1 mRNA 表达升高,GSK-3 β 、GLUT-4 mRNA 及 p-Akt 蛋白表达均显著上调,说明补肾化痰方能促进 IRS-1 磷酸

化,上调 PI-3K/ Akt 通路活性,促进卵巢对葡萄糖摄取,改善 IR。

PPAR 是一类核转录因子,属于核受体超家族成员,目前研究证实 PPAR- γ 不仅是噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)的功能性受体,也是调控多种脂肪细胞分泌的蛋白质因子基因的表达,同时可以调节胰岛素敏感性^[16]。本实验发现,PCOS 模型鼠卵巢中 PPAR- γ mRNA 表达明显高于对照组,提示 PPAR- γ 可能在 PCOS 形成中起调节作用,但 PPAR- γ 是如何影响卵巢局部胰岛素信号途径,有待进一步研究。

综上所述,PCOS 大鼠存在胰岛素抵抗,卵巢局部组织存在信号传导通路的异常。补肾化痰方能够改善胰岛素抵抗,可能与胰岛素信号传导分子蛋白表达的调控有关。

参 考 文 献

- [1] 伊西娟,田秀珠.多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜生存素 Ki-67 环氧化酶-2 的表达及二甲双胍对其影响的研究[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(4): 451-453.
- [2] 沈文娟,吴效科.卵巢胰岛素抵抗的生物学效应[J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(8): 569-572.
- [3] 梁晨,丛晶,常惠,等.补肾化痰复方对多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢内胰岛素信号传导分子的调控[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(12): 1639-1644.
- [4] Mukherjee S, Maitra A. Molecular & genetic factors contributing to insulin resistance in polycystic ovary syndrome[J]. Ind J Med Res, 2010, 131: 743-760.
- [5] Zhang HY, Zhang YF, Han YK, et al. Activation and significance of the PI3K/Akt pathway in endometrium with polycystic ovary syndrome patients[J]. China J Obstet Gynecol, 2012, 47(1): 19-23.
- [6] 王晓冰,侯丽辉,吴效科.痰浊与多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的关系研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(2): 122-124.
- [7] 王波,吴效科.多囊卵巢综合征痰湿证候与代谢综合征的关系[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(5): 457-460.
- [8] Lee MT, Anderson E, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone [J]. Anat Rec, 1991, 231(2): 185-192.
- [9] 谢铁男.多囊卵巢综合征子宫内膜胰岛素抵抗的分子机制[D]. 吉林:吉林大学, 2012.
- [10] Allemand MC, Irving BA, Asmann YW, et al. Effect of testosterone on insulin stimulated IRS1 Ser phosphorylation in primary rat myotubes - a potential model for PCOS-related insulin resistance [J]. PLoS One, 2009, 4(1): e4274-e4281.
- [11] 黄健康,李启富.胰岛素抵抗与多囊卵巢综合征[J]. 医学综述, 2005, 11(5): 389-391.
- [12] Fornes R, Ormazabad P, Rosas C, et al. Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia [J]. Mol Med, 2011, 16(3-4): 129-136.
- [13] 魏兆莲.二甲双胍对 PCOS 患者卵巢颗粒细胞胰岛素受体底物-1 及 P450 芳香化酶的作用[D]. 合肥:安徽医科大学, 2011.
- [14] Ruan Y, Ma J, Xie X, et al. Association of IRS-1 and IRS-2 genes polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis [J]. Endocr J, 2012, 59(7): 601-609.
- [15] Dasgupta S, Sirisha P, Neelaveni K, et al. Polymorphisms in the IRS-1 and PPAR-gamma genes and their association with polycystic ovary syndrome among South Indian women [J]. Gene, 2012, 503(1): 140-146.
- [16] Zhang H, Bi Y, Hu C, et al. Association between the Pro12Ala polymorphism of PPAR-gamma gene and the polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of case-control studies [J]. Gene, 2012, 503(1): 12-17.

(收稿:2013-03-01 修回:2013-11-24)