

祛瘀化痰方联合促排卵方案对多囊卵巢综合征患者胰岛素信号通路相关蛋白的影响

张淑梅 韩玉芳

(青海大学附属医院产科, 西宁, 814000)

摘要 目的:探讨祛瘀化痰方联合促排卵方案对多囊卵巢综合征(PCOS)患者胰岛素信号通路相关蛋白的影响。方法:选取2016年4月至2018年4月青海大学附属医院收治的PCOS患者100例,按照随机数字表法随机分为对照组和观察组,每组50例,对照组行氯米芬(CC)+人绝经期促性腺激素(hMG)促排卵方案治疗,观察组在对照组治疗的基础上联合中药祛瘀化痰方治疗,比较2组患者临床疗效、中医证候积分及胰岛素信号通路相关蛋白的表达。结果:治疗后,观察组治疗总有效率较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$);2组中医证候积分与治疗前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与治疗前比较,治疗后2组中医证候积分明显降低,对照组高于观察组,差异有统计学意义($P < 0.05$);2组治疗后的AKT蛋白表达比治疗前均有明显升高,且观察组上述指标改善情况较对照组明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);2组治疗后的P-INSR、INSR、P-IRS、IRS、P-PI3K、PI3K、P-AKT、P-ERK1、ERK1、P-ERK2、ERK2蛋白表达比治疗前均有明显下降,且观察组上述指标改善较对照组明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:对PCOS患者实施祛瘀化痰方剂联合西药治疗效果显著,能有效减轻患者临床症状,调控机体胰岛素信号通路相关蛋白的表达。

关键词 多囊卵巢综合征;祛瘀化痰方;胰岛素信号通路相关蛋白

Effects of Quyu Huatan Decoction Combined with Ovulation Promotion Scheme on Proteins Related to Insulin Signaling Pathway in Patients with Polycystic Ovarian Syndrome

Zhang Shumei, Han Yufang

(Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Quyu Huatan Decoction combined with ovulation promotion scheme on proteins related to insulin signaling pathway in patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods:** A total of 100 PCOS patients in Affiliated Hospital of Qinghai University from April 2016 to April 2018 were divided into two groups (control group and observation group) by random number table, with 50 cases in each group. The control group was given clomiphene citrate (CC) and human menopausal gonadotropin (hMG) ovulation promotion scheme, while the observation group was treated with Quyu Huatan Decoction based on the same treatment of the control group. The clinical efficacy, symptom scores of Tradition Chinese Medicine (TCM), expression of proteins related to insulin signaling pathway were compared between the two groups. **Results:** After treatment, the total effective rate of the observation group was higher than that of the control group ($P < 0.05$). The TCM symptom scores of two groups were compared with those before treatment, and there was no statistical difference ($P > 0.05$). Compared with before treatment, the TCM symptom scores of two groups decreased after treatment, and the score of control group was higher than that of the observation group ($P < 0.05$). After treatment, the AKT protein expression levels of two groups increased compared with those before treatment, and the improvement of AKT protein expression in the observation group was better than that in the control group ($P < 0.05$). After treatment, the P-INSR, INSR, P-IRS, IRS, P-PI3K, PI3K, P-AKT, P-ERK1, ERK1, P-ERK2, ERK2 protein expression levels in two groups decreased compared with those before treatment, and the improvement of above-mentioned indexes in the observation group was better than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Quyu Huatan Decoction combined with western medicine in treatment of PCOS is effective, which can improve clinical symptoms and regulate the expression of proteins related to insulin signaling pathway.

Key Words Polycystic ovarian syndrome; Quyu Huatan Decoction; Proteins related to insulin signaling pathway

中图分类号: R289.5; R271 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.012

多囊卵巢综合征(Polycystic Ovary Syndrome, PCOS)导致的代谢综合征以及心血管疾病日益受到临床关注,高脂血症、胰岛素抵抗等高危因素的存在,导致PCOS的发病率不断上升^[1]。采用药物改

善内分泌与代谢紊乱成为关键, 临床治疗 PCOS 大多采用降低雄激素、促排卵以及降低胰岛素等治疗^[2]。其中促排卵方案, 有氯米芬 (Clomiphene Citrate, CC)、人绝经期促性腺激素 (Human Menopausal Gonadotropin, hMG) 等。但由于药物治疗会产生一系列肠胃不良、卵巢过度刺激等不良反应, 使得临床治疗受到一定的限制^[3]。中医认为痰湿内盛是 PCOS 的主要病因, 肾虚为本, 痰湿痰血为标, 以祛痰湿、化瘀血为主要原则, 祛瘀化痰方剂可以有效改善 PCOS 患者糖、脂代谢紊乱及胰岛素敏感性。本研究对祛瘀化痰方联合促排卵方案对 PCOS 患者胰岛素信号通路相关蛋白的影响进行分析, 进一步探讨中西医结合治疗 PCOS 的机制。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 4 月至 2018 年 4 月我院收治 PCOS 患者 100 例, 按照随机数字表法分对照组和观察组, 每组 50 例。观察组年龄 22 ~ 45 岁, 平均年龄 (36.62 ± 8.47) 岁; 病程 2 ~ 8 年, 平均病程 (4.62 ± 2.42) 年; 体重指数 16.4 ~ 23.6 kg/m², 平均体重指数 (21.02 ± 0.61) kg/m²。对照组年龄 20 ~ 40 岁, 平均年龄 (35.43 ± 9.07) 岁; 病程 1 ~ 8 年, 平均病程 (4.36 ± 2.12) 年; 体重指数 16.2 ~ 23.8 kg/m², 平均体重指数 (21.06 ± 0.64) kg/m²。2 组一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医学伦理委员会批准, 患者及其家属均同意参加本研究, 并自愿签署知情书。

1.2 诊断标准

1.1.1 西医诊断标准 1) 无排卵或排卵稀少; 2) 生化 (和) 临床表现为高雄激素血症; 3) 超声检查显示卵巢体积 > 10 mL, 存在 > 12 个直径为 2 ~ 9 mm 的卵泡^[4]。符合上述 2 条标准, 并排除先天性肾上腺皮质增生、库欣综合征等高雄激素疾病即可诊断为 PCOS。

1.1.2 中医诊断标准 1) 主症: 闭经; 月经不调; 婚久不孕; 痤疮; 2) 次症: 烦躁易怒; 乳房胀痛; 胸肋胀满; 精神抑郁; 喜叹息; 暖气; 少腹胀痛; 3) 舌脉: 脉弦或涩; 舌红苔薄白。具备上述全部主症或 1 项主症和全部次症, 参考舌脉即可诊断^[5]。

1.3 纳入标准 患者年龄 20 ~ 45 岁; 患者意识清楚, 无智力与表达障碍; 所有 PCOS 患者均经临床病理确诊; 输卵管造影以及腹腔镜检查确保输卵管通畅。

1.4 排除标准 年龄在 20 岁以下或 40 岁以上者; 合并盆腔粘连、子宫肌瘤以及近期使用促排卵药物

患者; 有自身免疫性疾病患者; 有严重的肝肾功能不全及消化道疾病者; 对中药或者其他研究药物禁忌或者过敏者。

1.5 治疗方法 对照组于患者月经周期或者黄体酮撤退性出血第 5 天开始, 口服 CC (通化仁民药业股份有限公司, 国药准字 H22022100), 规格: 50 mg, 50 mg/d。用药 5 d 后, 第 10 天开始肌肉注射 hMG (烟台北方制药有限公司, 国药准字 H20033108), 75 IU/d, 每周递增量 37.5 IU/d。根据患者卵泡的发育情况来决定 hMG 用药的时间与剂量。观察组在对照组的基础上联用祛瘀化痰方剂进行治疗, 患者于月经周期第 5 天或者黄体酮撤退性出血第 5 天开始。方剂如下: 淫羊藿、菟丝子、枸杞、苍术、陈皮、赤芍、丹参各 20 g, 巴戟天、山茱萸、茯苓、当归各 15 g, 法半夏 10 g, 随证加减。上述药物聚齐浸泡 30 min, 用 500 mL 水煎取, 取汤汁 200 mL, 2 次/d, 早晚分服, 1 剂/d, 经期停用。服药期间禁止服用研究外的其他药物, 禁酒禁烟, 严禁生冷、辛辣等刺激性食物, 2 组患者用药为 6 个月经周期。

1.6 观察指标 1) 中医证候积分: 根据《中药新药临床研究指导原则》脏腑诸证考察与分析制定的评价标准^[6], 根据患者主症及次症的症状评分, 将闭经、月经不调、婚久不孕、痤疮等主症, 按其严重程度分为无、轻、中、重 4 个等级, 相应得分为 0 分、2 分、4 分、6 分。将烦躁易怒、乳房胀痛、胸肋胀满、精神抑郁、喜叹息、暖气、少腹胀痛等次症按严重程度分为无、轻、中、重 4 个等级, 相应得分为 0 分、1 分、2 分、3 分, 舌脉不计分。中医证候总积分越高, 提示患者临床症状越严重。2) 观察血清胰岛素信号通路相关蛋白表达: 治疗前、治疗 6 个月经周期后空腹抽取患者的静脉血 8 mL 于真空采血管中。采用蛋白印迹法检测 2 组患者胰岛素信号通路相关蛋白的表达。步骤如下: 3 000 r/min, 离心 20 min 后分离血清, 收集样本细胞, 加入适当裂解液后消化洗涤, 低温离心。纯乙醇洗涤沉淀后用移液器吸取离心管中液体, 室温下干燥沉淀。每 1×10^6 个细胞中加入 150 μ L 蛋白溶解缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 金属浴 8 min, 室温下静置溶解沉淀 60 min, 离心去除不溶物。采用考马斯亮蓝法对蛋白质的含量进行测定。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) 胶制备完成后进行蛋白质变性及电泳。即: 取出提取的样品总蛋白, 插入冰中使其融化, 尽量减少蛋白质的降解。蛋白质凝胶电泳上样缓冲液与相应体积的样品总蛋

白轻轻混匀,95 ℃变性 10 min,立即插入冰中备用。凝胶孔中轻轻加入样品,使得样品通过分离胶与浓缩胶,当染料到达分离胶适当位置时,结束电泳。蛋白凝胶转膜及检测:凝胶电泳结束后,采用转移电泳方式将凝胶上分离到的蛋白条带转印至固相支持物上,采用半干转的转膜方式以及聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene Fluoride, PVDF)作为固相支持物,应用一抗和二抗对其孵育及检测。

1.7 疗效判定标准 根据 2 组患者月经、性激素以及卵巢恢复情况评估 2 组临床疗效:痊愈:月经周期、质、色、量恢复正常,卵巢多个不成熟卵泡情况消失,卵巢大小和性激素水平恢复正常;显效:与治疗前比较,月经周期、质、色、量有明显改善,卵巢中不成熟卵泡数量明显减小,卵巢体积明显缩小,性激素水平趋于正常;有效:月经周期、质、色、量较治疗前有所改善,临床症状有所改善;无效:与治疗前比较,患者病情无明显变化。有效率=(痊愈例数+显效例数+有效例数)/总例数×100%。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件处理数据,计数资料以百分数和例数表示,组间比较用 χ^2 检验;计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床疗效比较 治疗后,观察组治疗有效率较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 2 组中医证候积分比较 治疗前,2 组中医证候积分差异无统计学意义($P > 0.05$);与治疗前比较,治疗后 2 组中医证候积分明显降低,对照组高于观察组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 2 组临床疗效比较

组别	痊愈 (例)	显效 (例)	有效 (例)	无效 (例)	治疗有效 [例(%)]
对照组($n=50$)	19	11	7	13	37(74.00)
观察组($n=50$)	23	14	10	3	47(94.00)
χ^2					7.441
P					0.006

表 2 2 组中医证候积分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	治疗前	治疗后	t	P
对照组($n=50$)	32.10±0.84	12.63±1.03	103.584	0.000
观察组($n=50$)	32.36±0.89	8.23±0.99	128.170	0.000
t	1.502	21.359		
P	0.136	0.000		

2.3 2 组胰岛素信号通路相关蛋白表达比较 与治疗前比较,2 组治疗后 AKT 蛋白表达均明显升高,且观察组上述指标改善情况较对照组佳,差异有统计学意义($P < 0.05$);2 组治疗后的 P-INSR、INSR、P-IRS、IRS、P-PI3K、PI3K、P-AKT、P-ERK1、ERK1、P-ERK2、ERK2 蛋白表达比治疗前均有明显下降,且观察组上述指标改善情况较对照组佳,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

西医认为,PCOS 的发病机制为下丘脑-垂体-卵巢轴调节功能失常,目前临床并无好的治疗方式^[7]。中医文献记载中并无 PCOS 的病名,按照患者临床表现以及病情演化规律,可将其归属于“经量过少”“闭经”“月经后期”“不孕症”等范畴。此证多由肝气郁滞、脏腑功能失常、冲任二脉受损、气血失调、血海蓄溢失常等因素引起^[8]。PCOS 证候虚实夹杂,血痰、痰湿都为脏腑阴阳失衡的产物。经血是基本物

表 3 2 组胰岛素信号通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

项目	治疗前		t	P	治疗后		t	P
	对照组($n=50$)	观察组($n=50$)			对照组($n=50$)	观察组($n=50$)		
P-INSR	0.496±0.123	0.513±0.146	0.630	0.530	0.234±0.102	0.098±0.095*	6.899	0.000
INSR	1.091±0.260	1.168±0.255	1.495	0.138	0.806±0.321	0.656±0.246*	2.623	0.010
P-IRS	0.470±0.151	0.448±0.125	0.830	0.409	0.255±0.112	0.086±0.066*	9.192	0.000
IRS	1.114±0.211	1.180±0.268	1.368	0.174	0.866±0.123	0.619±0.239*	6.498	0.000
P-PI3K	0.488±0.125	0.446±0.089	0.092	0.927	0.248±0.039	0.087±0.052	17.514	0.000
PI3K	1.129±0.243	1.196±0.197	1.515	0.133	0.846±0.022	0.647±0.036*	33.352	0.000
P-*KT	0.430±0.120	0.423±0.111	0.303	0.763	0.265±0.102	0.096±0.099*	8.407	0.000
AKT	1.025±0.223	0.965±0.243	1.286	0.201	1.296±0.201	1.436±0.263*	2.991	0.004
P-ERK1	0.364±0.095	0.393±0.101	1.479	0.142	0.233±0.023	0.087±0.036*	24.166	0.000
ERK1	1.068±0.173	1.094±0.173	0.751	0.454	0.888±0.156	0.642±0.046*	10.695	0.000
P-ERK2	0.395±0.073	0.398±0.118	0.153	0.879	0.269±0.059	0.082±0.033*	19.560	0.000
ERK2	0.970±0.141	0.962±0.212	0.222	0.825	0.721±0.152	0.506±0.133*	7.527	0.000

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$

质,气血生化之源为脏腑,肝为藏血之脏,调节月经,主疏泄,喜条达而恶抑郁。血脉不通、气血不和,卵子顺利排出受阻,经水不调,不能成孕^[9-10]。PCOS治疗的主要目的为调节内分泌。

祛瘀化痰方剂主要由淫羊藿、菟丝子、枸杞、苍术、陈皮、赤芍、丹参、巴戟天、山茱萸、茯苓、当归、法半夏等中药组成^[11]。方中淫羊藿补肾壮阳,增加心脑血管血流量,促进造血功能、免疫功能及骨代谢,具有抗衰老、抗肿瘤等功效。丹参活血化痰,对于经闭经痛具有良好功效。菟丝子、枸杞、巴戟天、山茱萸补易阴阳,当归、赤芍补血活血。法半夏降逆止呕,燥湿化痰。茯苓利水消肿、渗湿、健脾、宁心^[12-13]。苍术、陈皮燥湿健脾,理气化痰。中药合用,补肾、祛痰、化痰^[14]。本研究结果显示,治疗后对照组治疗有效率低于观察组,观察组的中医证候积分低于对照组。与常规西药治疗比较,对PCOS患者行祛瘀化痰方剂联合西药治疗能够有效减轻患者临床症状,提高临床疗效。

机体内的胰岛素通过与细胞表面的受体结合作用于细胞,胰岛素与配体结合后,INSR特定的酪氨酸残基自体磷酸化,开始信号转导^[15]。IRS分子在胰岛素信号通路中属于介导者,而PI3K是一类特异催化磷脂酰肌醇的激酶^[16-17]。AKT是-PI3K下游的直接靶蛋白,磷酸化后,进一步激活或抑制其下游靶蛋白^[18]。ERK属于MAPK的一员,被激活的ERK可以调控下游相关基因的转录表达,参与促细胞分裂信号的转导通路,进一步引起细胞增殖,传递以及调控胰岛素信号^[19-20]。本研究显示,2组治疗后的AKT蛋白表达比治疗前均有明显升高,P-INSR、INSR、P-IRS、IRS、P-PI3K、PI3K、P-AKT、P-ERK1、ERK1、P-ERK2、ERK2蛋白表达比治疗前均有明显下降,且观察组改善比对照组佳。说明采用祛瘀化痰方剂治疗PCOS患者能够有效调控胰岛素信号通路相关蛋白表达。由此可见,祛瘀化痰方剂联合西药是治疗PCOS患者的良方。本研究因研究时间和经费的限制,仍存在一定的不足之处,如纳入样本量较小,未对患者长期随访观察,未分析2组用药安全性,未对患者磷酸化以及信号转导通路机制等进行研究,故后期仍需加大样本量进行多中心的深入研究。

综上所述,对PCOS患者实施祛瘀化痰方剂联合西药治疗效果良好,能有效减轻患者临床症状,调控机体胰岛素信号通路相关蛋白的表达,这为临床治疗PCOS提供了一定的参考价值。

参考文献

- [1] Swaroop A, Jaipuria AS, Gupta SK, et al. Efficacy of a Novel Fenugreek Seed Extract (*Trigonella foenum-graecum*, Furocyst) in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12 (10): 825-831.
- [2] Eek D, Paty J, Black P, et al. A Comprehensive Disease Model of Polycystic Ovary Syndrome (Pcos) [J]. *Value Health*, 2015, 18 (7): A722.
- [3] Morgante G, Cappelli V, Di SA, et al. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and hyperandrogenism: the role of a new natural association [J]. *Minerva Ginecol*, 2015, 67 (5): 457-463.
- [4] Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81 (1): 19-25.
- [5] 季绍良, 成肇智. 中医诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 136.
- [6] 梁茂新, 高天舒. 《中药新药临床研究指导原则》脏腑诸证考索与分析 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2008, 14 (5): 330-331, 342.
- [7] Sokhal D, Kraus C. Insulin Sensitizers for Treatment of Menstrual Irregularities Associated with PCOS [J]. *Am Fam Physician*, 2015, 92 (5): 390.
- [8] Gourgari E, Lodish M, Shamburek R, et al. Lipoprotein Particles in Adolescents and Young Women With PCOS Provide Insights Into Their Cardiovascular Risk [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100 (11): 4291-4298.
- [9] 蒋彦彤, 任青玲. 影响多囊卵巢综合征不孕症患者受孕结局的中医相关因素分析 [J]. *中医杂志*, 2018, 59 (2): 116-119.
- [10] 孙云. 抑亢汤治疗青春期多囊卵巢综合征的理论及临床探讨 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42 (1): 24-28.
- [11] 姬霞, 傅金英, 周艳艳, 等. 补肾化痰祛瘀中药对多囊卵巢模型大鼠胰岛素样生长因子-1及血清肿瘤坏死因子- α 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37 (16): 3927-3928.
- [12] 王渝蓉, 余晓霞. 化痰祛瘀汤对脑梗死患者的治疗效果及血液流变学、血流动力学的影响 [J]. *环球中医药*, 2016, 9 (7): 856-858.
- [13] 黄楚燕, 梁宏宇. 淫羊藿化学成分分离与鉴定 [J]. *世界中医药*, 2018, 13 (5): 1262-1265.
- [14] 肖连宇, 黎又乐, 刘倩, 等. 叶天士和薛生白治疗湿热性温病用药异同研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33 (1): 11-13.
- [15] 张飞翔. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗机制研究进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2018, 37 (2): 167-171.
- [16] 沈涌海, 施新颜, 邱媛, 等. 多囊卵巢综合征患者血清FAI与AMH、IR的相关性研究 [J]. *浙江预防医学*, 2018, 30 (5): 467-470.
- [17] 刘佳怡, 沈山梅, 王静, 等. 不同体质指数及临床表型的多囊卵巢综合征患者代谢特征研究 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10 (3): 209-215.
- [18] 樊磊, 常壮鹏, 程瑶, 等. 葡萄糖转运体4与多囊卵巢综合征相关性的研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38 (3): 334-337, 253.
- [19] 胡晶, 戴娜, 徐冰雁, 等. 益气解毒方通过MAPK/ERK信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (6): 1221-1227.
- [20] 黄俊, 杨婉, 金世云, 等. ERK信号蛋白在吗啡预处理减轻大鼠全心缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34 (2): 232-236.