

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.24.016

补肾化痰方对肥胖型多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢组织 NLRP3 / ASC2 / Caspase - 1 炎症小体信号通路的影响

熊倩¹, 徐晓娟^{*}, 黄映红², 姚知林¹, 田雪梅¹, 陈美佳¹

1. 成都中医药大学临床医学院, 四川省成都市金牛区十二桥路 37 号, 610075; 2. 成都中医药大学基础医学院

摘要 目的 探讨补肾化痰方治疗肥胖型多囊卵巢综合征 (PCOS) 的可能作用机制。方法 采用来曲唑联合高脂乳剂制备肥胖型 PCOS 模型, 并将造模成功的 99 只 SD 大鼠随机分为模型组 19 只, 二甲双胍组及补肾化痰方低、中、高剂量组各 20 只, 另设空白组 23 只。补肾化痰方低、中、高剂量组分别给予补肾化痰方 16.65、41.63、83.25 g/(kg·d) 灌胃, 二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片 300 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组和空白组给予 5 ml/kg 蒸馏水灌胃, 各组均每日 1 次, 共灌胃 21 天。观察各组大鼠卵巢组织病理情况, ELISA 法检测血清睾酮 (T) 及游离脂肪酸 (FFAs), Western blotting 法检测卵巢组织 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 2 (ASC2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 蛋白表达水平, 免疫组化染色法检测卵巢组织白细胞介素 1 受体 (IL-1R)、核因子 κ B (NF- κ B) 阳性产物。结果 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢内基本未见优势卵泡生长, 血清 T、FFAs, 卵巢组织 IL-1R、NF- κ B 平均光密度及 Caspase-1、NLRP3、ASC2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾化痰方高、中剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢可见明显的黄体或生长卵泡, 卵巢组织 NLRP3、Caspase-1、ASC2 蛋白表达显著下调; 二甲双胍组、补肾化痰方高剂量组血清 T、FFAs 含量显著降低, IL-1R、NF- κ B 平均光密度显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肾化痰方各剂量组及二甲双胍组 Caspase-1、NLRP3、ASC2 蛋白表达及 IL-1R、NF- κ B 平均光密度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 补肾化痰方可能通过抑制卵巢组织 NLRP3 / ASC2 / Caspase-1 炎症小体信号通路治疗肥胖型 PCOS, 且对该通路的调节未见明显量效关系。

关键词 多囊卵巢综合征; 肥胖; 补肾化痰方; 炎症小体; NLRP3 / ASC2 / Caspase-1 信号通路

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见于育龄期妇女的内分泌疾病, 是引起不排卵性不孕的主要原因, 育龄期女性患病率为 4% ~ 19%, 其中伴发肥胖者占总患病人数的 30% ~ 60%^[1-2]。研究发现, PCOS 女性广泛存在慢性低度炎症, 其卵巢白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18) 等炎症因子水平普遍高于健康女性, 且肥胖等因素能加重这种炎症状态^[3-4]。慢性低度炎症状态是卵巢功能损伤的病理环节之一, 能进一步加重患者临床症状^[5]。炎症小体是病原体刺激巨噬细胞产生的一种大分子复合物, 与感染、损伤、急性或慢性炎症相关^[6]。研究发现, NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体在 PCOS 大

鼠卵巢炎症发生的过程中被激活^[7], 而脂肪组织 (尤其是内脏脂肪) 释放的炎性刺激因子可以激活局部组织的免疫细胞, 产生 NLRP3 炎症小体^[8]。中医学认为, 肥胖型 PCOS 以肾虚为本、痰湿为标^[9], 因此, 临床以补肾化痰为法组方治疗肥胖型 PCOS 疗效显著^[10-11]。本课题组前期成功构建以肾虚痰湿为主要特征的肥胖型 PCOS 大鼠模型^[12], 本实验通过复制该模型, 探讨 NLRP3 炎症小体信号通路的激活与肥胖型 PCOS 发生发展的关系, 阐明补肾化痰方调控该通路改善肥胖型 PCOS 大鼠慢性低度炎症的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雌性大鼠 123 只, 7 ~ 8 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK【川】2015-030。饲养

基金项目: 成都市科技局科学技术惠民项目 (2016-HM01-00286-SF)

* 通讯作者: 847956379@qq.com, 13980971928

于成都中医药大学针灸实验室, 自由饮水摄食, 室温 22 ~ 25 °C, 相对湿度约为 70%, 每天光照 10 h。

1.2 药物

补肾化痰方组成: 菟丝子 30 g, 覆盆子 30 g, 桑椹 30 g, 补骨脂 10 g, 鹿角霜 10 g, 紫河车 10 g, 茯苓 20 g, 陈皮 15 g, 车前子 15 g, 肉苁蓉 15 g, 由成都中医药大学药学院药剂实验室统一制备成含生药浓度为 20、10、5 g/ml 的高、中、低剂量的储存液, 临用时稀释。来曲唑原药粉 (批号: 11209-51-5, 江苏恒瑞医药股份有限公司), 按照每日 1 mg/kg 的剂量混入高脂乳剂 (猪油与胆固醇, 批号: MB6750, 大连美仑生物技术有限公司) 混悬液中。盐酸二甲双胍片 (批号: 14030657, 中美上海施贵宝制药有限公司), 溶于 1% 羧甲基纤维素 (批号: MB1731, 大连美仑生物技术有限公司) 溶液中, 制备成含生药浓度 60 g/L 的储存液, 临用时稀释。

1.3 主要试剂与仪器

大鼠睾酮 (T) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (批号: ZC-36635), 上海茁彩生物科技有限公司; 大鼠游离脂肪酸 (FFAs) ELISA 试剂盒 (批号: XL-ER1158), 英国 Abcam 公司; 兔抗鼠含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 2 (ASC2) 抗体 (批号: AB47092)、兔抗鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 抗体 (批号: AB1872)、兔抗鼠 NLRP3 抗体 (批号: ab214185), Abcam 公司; 白细胞介素 1 受体 (IL-1R) 兔多克隆抗体 (批号: bs-2216R)、核因子 κ B (NF- κ B) 兔多克隆抗体 (批号: bs-7343R), 北京博奥森生物技术有限公司; 多聚甲醛固定液 (批号: 20160512), 国药集团化学试剂有限公司; 苏木素染液 (批号: LM10N13), 北京百灵威科技有限公司; 伊红染液 (批号: GL01-GMPC), 东京化成工业株式会社; 浓缩型 DAB 试剂盒 (批号: K135925C), 北京中杉金桥生物有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: KGP903), 南京凯基生物公司; 水合氯醛 (批号: MB4202), 大连美仑生物技术有限公司。

数码三目摄像显微系统 (型号: BA200Digital), 克奥迪实业集团有限公司; 光学显微镜 (型号: XSP-4C), 上海光密仪器有限公司; 全自动组织脱水机 (型号: TSJ-II), 常州市中威电子仪器有限公司; 高速低温离心机 (型号: TGL-16G-A), 上海安亭科学仪器厂; 凝胶图像分析成像系统 (型号: Image Lab), 美国 Bio-Rad 公

司; 图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0, 美国 Media Cybernetics 公司。

1.4 肥胖型 PCOS 大鼠模型制备

将 123 只 SD 大鼠分笼适应性喂养 10 天, 连续 10 天进行阴道脱落细胞涂片, 123 只大鼠连续两次动情周期正常, 即采用随机数字表法分为空白组 23 只和造模组 100 只。各组大鼠均喂饲普通饲料, 正常饮水。造模组参照文献 [12] 建立肥胖型 PCOS 大鼠模型, 每天上午 9 时给予来曲唑原药粉 1 mg/kg 及高脂乳剂 15 ml/kg 制成的混悬液灌胃, 连续 28 天。造模 18 天时开始连续 10 天进行阴道脱落细胞涂片, 筛选出连续两次动情周期紊乱且体重质量增长率高于造模前体重质量 20% 的大鼠。

1.5 动物分组及给药

造模过程中死亡 1 只大鼠, 余 99 只大鼠造模成功。将造模成功的 99 只大鼠按照随机数字表法分为模型组 19 只, 二甲双胍组及补肾化痰方高、中、低剂量组各 20 只。

补肾化痰方低、中、高剂量组分别给予补肾化痰方 16.65、41.63、83.25 g/(kg · d) 灌胃, 其中低剂量为大鼠与 70 kg 成人的等效剂量, 中、高剂量分别为等效剂量的 2.5、5 倍; 二甲双胍组给予盐酸二甲双胍片 300 mg/(kg · d) 灌胃, 相当于大鼠与 70 kg 成人等效剂量的 2.5 倍; 模型组和空白组给予等体积蒸馏水灌胃。各组灌胃体积均为 5 ml/kg, 每日 1 次, 7 天为 1 个周期, 两个周期之间停药 1 天, 共 3 个周期。

1.6 观察指标及方法

实验完成后每组均按照随机数字表法抽取 10 只大鼠检测血清 T、FFAs 浓度。从每组被选中的 10 只大鼠中再次按照随机数字表法各选取 6 只大鼠, 摘取同侧卵巢进行卵巢病理学检测和 NLRP3、ASC2、Caspase-1、IL-1R、NF- κ B 检测。

1.6.1 ELISA 法检测血清 T、FFAs 含量 各组大鼠均以 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 注射麻醉处死, 采心尖血后于 4 °C 冰上静置 20 min, 常温以 3500 r/min 离心 15 min, 离心半径 15 cm。检测各组大鼠血清 T、FFAs 含量。

1.6.2 卵巢组织病理情况 麻醉后断颈处死大鼠, 剖腹, 摘取大鼠的同侧卵巢, 剥离卵巢组织周围的脂肪垫和其他组织, 4% 多聚甲醛固定 48 h, 逐级酒精脱水, 二甲苯透明、浸蜡, 石蜡包埋, 制备厚度 4 ~ 6 μ m 的病理切片进行 HE 染色, 采用数码三目摄像显微系统对切片进行图像采集, 每张切片先

于 40 倍下观察全部组织及大体病变, 选择要观察的区域采集 100 倍图片, 观察具体病变。

1.6.3 免疫组化法检测卵巢组织 IL-1R、NF- κ B 阳性产物 摘取大鼠的同侧卵巢, 剥离卵巢组织周围的脂肪垫和其他组织, 4% 多聚甲醛固定, 固定组织经全自动脱水机脱水, 包埋, 切片后进行如下操作: 将脱蜡后的切片放入染色缸, PBS 洗 3 次, 将切片浸入 0.01 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中加热煮沸后, PBS 洗 2 次; 滴加山羊血清封闭液, 滴加一抗 IL-1R 兔多克隆抗体、NF- κ B 兔多克隆抗体, 滴加生物素化二抗, PBS 水洗 3 次; 使用 DAB 显色试剂盒显色; 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。光镜下观察组织切片。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的光密度和面积, 并计算每张图像的平均光密度, 使用 3 张图像的平均光密度再计算平均数, 得出每例样本的平均光密度。

1.6.4 Western blotting 法检测卵巢组织 NLRP3、ASC2、Caspase-1 蛋白表达 麻醉处死大鼠后剖腹, 摘取大鼠的同侧卵巢, 剥离卵巢组织周围的脂肪垫和其他组织, 液氮冻存大鼠卵巢组织样本。取液氮冻存大鼠卵巢组织样本, 于 37℃ 水浴中解冻后用灭菌后的小剪刀剪碎, 置碎冰上裂解 10 min; 收集裂解液, 低温 4℃ 以 12000 r/min 离心 10 min, 离心半径 15 cm, 取上清液, BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度, Western blotting 法检测 NLRP3、ASC2、Caspase-1 蛋白表达。一抗稀释浓度: ASC2 1 : 1000, Caspase-1 1 : 200, NLRP3 1 : 1000; 二抗稀释浓度: 1 : 5000。扫描 PVDF 膜上各条带, 用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析, 结果以目的蛋白相对表达量表示。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白积分光密度值 (IOD) / 内参积分光密度值 (IOD)。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较方差齐者采用 LSD 检验, 方差不齐者采用 Tamhane's T^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢组织病理结果

图 1 示, 空白组卵巢组织可见明显的黄体及优势卵泡; 模型组卵巢组织内间质细胞和纤维细胞增

生, 见多个小卵泡且不见优势卵泡生长; 二甲双胍组及补肾化痰方高、中剂量组均可见明显的黄体或生长卵泡; 补肾化痰方低剂量组卵巢内不见优势卵泡生长, 卵巢内纤维组织、间质细胞增生。

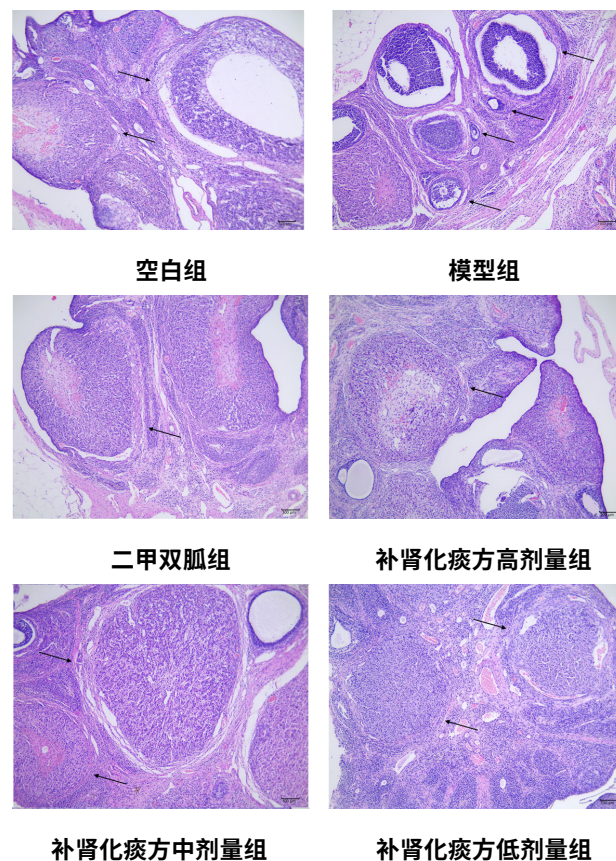


图 1 各组大鼠卵巢组织 HE 染色结果 ($\times 100$)

2.2 各组大鼠血清 T、FFAs 含量比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 T、FFAs 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组、补肾化痰方高剂量组血清 T、FFAs 含量显著降低 ($P < 0.05$); 与补肾化痰方高剂量组比较, 补肾化痰方低剂量组 T、FFAs 含量显著升高 ($P < 0.05$), 补肾化痰方中剂量组和二甲双胍组 T、FFAs 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与补

表 1 各组大鼠血清 T、FFAs 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T (pg/ml)	FFAs (nmol/ml)
空白组	10	36.113 $\pm$ 6.823	115.911 $\pm$ 14.940
模型组	10	49.099 $\pm$ 10.392*	145.407 $\pm$ 17.180*
补肾化痰方高剂量组	10	41.153 $\pm$ 7.266 Δ	126.099 $\pm$ 18.753 Δ
补肾化痰方中剂量组	10	46.861 $\pm$ 8.513	139.928 $\pm$ 27.134
补肾化痰方低剂量组	10	48.906 $\pm$ 6.503 Δ	146.136 $\pm$ 17.353 Δ
二甲双胍组	10	40.132 $\pm$ 9.453 Δ #	125.543 $\pm$ 18.729 Δ #

注: T, 睾酮; FFAs, 游离脂肪酸; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与补肾化痰方高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与补肾化痰方低剂量组比较, # $P < 0.05$

肾化痰方中剂量组比较, 补肾化痰方低剂量组和二甲双胍组 T、FFAs 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与补肾化痰方低剂量组比较, 二甲双胍组 T、FFAs 含量降低 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠卵巢组织 IL-1R、NF- κ B 表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 IL-1R、NF- κ B 平均光密度显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组及补肾化痰方高、中、低剂量组 IL-1R 平均光密度显著降低, 补肾化痰方高剂量组和二甲双胍组 NF- κ B 平均光密度显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肾化痰方高、中、低剂量组及二甲双胍组 IL-1R 和 NF- κ B 平均光密度比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠卵巢组织 IL-1R、NF- κ B 表达比较 (平均光密度, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1R	NF- κ B
空白组	6	0.3369 $\pm$ 0.0091	0.3364 $\pm$ 0.0128
模型组	6	0.3773 $\pm$ 0.0143 **	0.3517 $\pm$ 0.0087 *
补肾化痰方高剂量组	6	0.3556 $\pm$ 0.0119 $\Delta\Delta$	0.3348 $\pm$ 0.0091 Δ
补肾化痰方中剂量组	6	0.3571 $\pm$ 0.0179 Δ	0.3408 $\pm$ 0.0121
补肾化痰方低剂量组	6	0.3580 $\pm$ 0.0100 Δ	0.3418 $\pm$ 0.0198
二甲双胍组	6	0.3487 $\pm$ 0.0129 $\Delta\Delta$	0.3365 $\pm$ 0.0086 Δ

注: IL-1R, 白细胞介素 1 受体; NF- κ B, 核因子 κ B; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

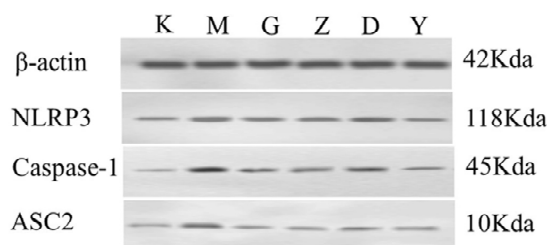
2.4 各组大鼠卵巢组织 NLRP3、Caspase-1、ASC2 蛋白表达比较

图 2、表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠卵巢组织 Caspase-1、NLRP3、ASC2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二甲双胍组及补肾化痰方高、中剂量组卵巢组织 Caspase-1、NLRP3、ASC2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肾化痰方各剂量组及二甲双胍组 Caspase-1、NLRP3、ASC2 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠卵巢组织 NLRP3、Caspase-1、ASC2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NLRP3	Caspase-1	ASC2
空白组	6	0.9400 $\pm$ 0.2573	0.8455 $\pm$ 0.2395	0.9984 $\pm$ 0.1774
模型组	6	1.7076 $\pm$ 0.4438 *	1.8509 $\pm$ 0.3177 *	2.0682 $\pm$ 1.0967 *
补肾化痰方高剂量组	6	1.3014 $\pm$ 0.1908 Δ	1.2483 $\pm$ 0.4044 Δ	1.3360 $\pm$ 0.3067 Δ
补肾化痰方中剂量组	6	1.2953 $\pm$ 0.2341 Δ	1.3760 $\pm$ 0.4737 Δ	1.3267 $\pm$ 0.3706 Δ
补肾化痰方低剂量组	6	1.5092 $\pm$ 0.3529	1.4710 $\pm$ 0.3561	1.7649 $\pm$ 0.5763
二甲双胍组	6	1.0862 $\pm$ 0.0707 $\Delta\Delta$	1.0254 $\pm$ 0.4543 $\Delta\Delta$	1.4827 $\pm$ 0.5988 $\Delta\Delta$

注: NLRP3, NOD 样受体蛋白 3; Caspase-1, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; ASC2, 含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 2; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注: NLRP3, NOD 样受体蛋白 3; Caspase-1, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; ASC2, 含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 2; K, 空白组; M, 模型组; G, 补肾化痰方高剂量组; Z, 补肾化痰方中剂量组; D, 补肾化痰方低剂量组; Y, 二甲双胍组

图 2 各组大鼠卵巢组织 NLRP3、Caspase-1、ASC2 蛋白电泳图

3 讨论

PCOS 属于中医学“闭经”“不孕”等范畴。中医学认为, 肥胖型 PCOS 以肾虚为本、痰湿为标, 治当补肾化痰^[9]。肾为先天之本, 肾精肾气亏虚, 天癸生化乏源则月事不能应时而下, 最终不能排卵发为不孕。《格致余论》曰“肥人多痰。”肥胖型 PCOS 患者痰湿内蕴, 使卵巢包膜增厚, 卵泡不能顺利排出。补肾化痰方由五子衍宗丸和苍附导痰汤加减而成, 方中菟丝子、补骨脂、桑椹、覆盆子、紫河车、肉苁蓉温肾益精, 滋养肝肾精血; 车前子、茯苓、陈皮化痰燥湿, 健脾利水, 全方动静结合, 补而不滞。研究发现, 五子衍宗丸中的补肾类中药能通过调整下丘脑、垂体而对卵巢发挥作用, 从而提高雌激素水平、促进卵泡发育^[13]; 苍附导痰丸可改善痰湿内阻型 PCOS 患者卵泡发育及卵巢动脉血流情况^[14], 并能降低肥胖 PCOS 患者血清炎症因子水平^[15]。

本研究结果发现, 模型组大鼠动情周期紊乱, 卵巢 HE 病理切片见多个小卵泡且不见优势卵泡, 呈明显多囊样变, 且血清 T、FFAs 相较空白组显著上升, 以上改变与肥胖型 PCOS 的临床表现有较

高的拟合度,提示模型复制成功。补肾化痰方能改善模型大鼠卵泡发育,降低血清 T 水平纠正高雄激素状态,同时还能减少血清 FFAs 的释放。且补肾化痰方高、低剂量组血清 T、FFAs 改善差异有统计学意义,提示补肾化痰方对肥胖 PCOS 脂质代谢和高雄激素状态的改善作用可能存在量效关系。本实验所用阳性药物二甲双胍被证明能纠正 PCOS 慢性低度炎症状态^[14],但由于其较重的胃肠道反应(如恶心、呕吐)、减少维生素 B₁₂ 的吸收、乳酸酸中毒等不良反应^[17]限制了该药物在临床上的使用。另有研究^[18-20]发现,补肾化痰方不仅能改善肥胖型 PCOS 模型大鼠胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱,还能促进卵巢颗粒细胞增殖、改善子宫内膜容受性。因此,相比单纯二甲双胍治疗,补肾化痰方具有更大的治疗优势。

NLRP3 炎症小体是一种与慢性低度炎症反应相关的大分子复合物,受体蛋白 NLRP3、凋亡相关点样蛋白(ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 1 的酶原(pro-Caspase-1)均为该复合物的组成部分^[21]。研究^[22]发现,NLRP3 炎症小体活化的启动阶段与应激、损伤等危险信号被模式识别受体识别后介导 NF- κ B 向核内转位有关。NF- κ B 是细胞中参与细胞炎症及免疫应答的重要转录调节因子,应激、代谢产物、炎症介质、细菌等均可以引起 NF- κ B 的活化^[23]。研究^[24]发现,小鼠巨噬细胞内 NLRP3 mRNA 和蛋白表达的上调依赖于 NF- κ B 的活化。IL-1R 是一类重要的病原模式识别受体,能识别病原体、应激、损伤等危险信号,是启动炎症反应的关键分子^[25],可以作为 NLRP3 炎症小体的启动信号促进 NF- κ B 向核内转位。当 NLRP3 受内源性危险信号如异常增高的血糖、血游离脂肪酸的刺激而被活化时,其 PYD 结构域暴露,从而募集 ASC 和 pro-Caspase-1,形成炎症小体复合物。复合物中的衔接蛋白 ASC 通过 PYRIN 和 CARD 结构域连接受体蛋白和 pro-Caspase-1,使 pro-Caspase-1 切割为有活性的 Caspase-1,进而促使 pro-IL-1 和 pro-IL-18 转化为成熟的 IL-1、IL-18^[26],使 IL-1 和 IL-18 的合成和分泌增加,从而介导炎症反应的发生。因此,慢性低度炎症的发生发展与 NLRP3/ASC2/Caspase-1 信号通路的激活密切相关。本研究结果显示,模型组大鼠 NLRP3、ASC2、Caspase-1 蛋白相对表达量较空白组上升,表明肥胖型 PCOS 雌鼠卵巢中 NLRP3 炎症小体发生了过度活化,其活化

的启动因素可能与 IL-1R 通过识别危险信号介导 NF- κ B 核转位相关。补肾化痰方能降低卵巢组织中 IL-1R、NF- κ B 的相对表达,抑制 NLRP3/ASC2/Caspase-1 通路的活化和转导,以上改变可能是补肾化痰方改善肥胖型 PCOS 雌鼠卵巢慢性低度炎症的机制。值得注意的是,补肾化痰方的作用与已经研究证实的腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活剂二甲双胍对 NLRP2 炎症小体通路的调节趋势^[27]一致。

综上所述,补肾化痰方可改善肥胖型 PCOS 模型大鼠卵巢慢性低度炎症状态,其机制可能与抑制 NLRP3/ASC2/Caspase-1 炎症信号通路的活性有关。虽然本次实验证明补肾化痰方高剂量组与中、低剂量组相比干预效果更佳,但未能明确各剂量调控该通路的量效关系,其最佳安全有效剂量还需后期实验进一步探讨。

参考文献

- [1] YILMAZ B, VELLANKI P, ATA B, et al. Metabolic syndrome, hypertension, and hyperlipidemia in mothers, fathers, sisters, and brothers of women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Fertil Steril, 2018, 109(2): 356-364.
- [2] 乔杰,李蓉,李莉,等.多囊卵巢综合征流行病学研究[J].中国实用妇科与产科杂志,2013,29(11): 849-852.
- [3] KELLY CC, LYALL H, PETRIE JR, et al. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(6): 2453-2455.
- [4] SHORAKAE S, TEEDE H, DE COURTEN B, et al. The emerging role of chronic low-grade inflammation in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome [J]. Semin Reprod Med, 2015, 33(4): 257-269.
- [5] 林姿均,陶弢,刘伟.慢性低度炎症对多囊卵巢综合征病理生理影响的研究进展[J].上海交通大学学报(医学版),2013,33(12): 1667-1672.
- [6] MARTINON F, BURNS K, TSCHOP PJ. The inflammatory: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL- β [J]. Mol Cell, 2002, 10(2): 417-446.
- [7] 王凡. HIF-1 信号通路在卵巢综合征中的作用及其调控机制 [J]. 福州: 福建师范大学, 2017.
- [8] 林娜,瞿佳. NLRP3 炎症体与代谢综合征的关系 [J]. 药学研究, 2017, 36(12): 733-735.
- [9] 王颖,侯丽辉. 肥胖型多囊卵巢综合征与痰湿因素关系中医浅析 [J]. 天津中医药, 2010, 27(2): 130-132.
- [10] 万庆芝,张晓甦,陆瑾. 补肾化痰调周法联合穴位埋线

- 治疗肥胖型多囊卵巢综合征 48 例临床观察 [J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(10): 794-797.
- [1] 李宛静, 徐晓娟, 夏宛廷, 等. 补肾化痰方调控肥胖型 PCOS-IR 的临床疗效分析 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2200-2203.
- [2] 徐晓娟, 黄映红, 姚莉娟, 等. 来曲唑和脱氢表雄酮建立肾虚痰湿特征信息肥胖 PCOS 大鼠动物模型的对比研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(5): 511-514, 529.
- [3] 王学华, 史同霞. 五子衍宗丸的药理研究及临床应用进展 [J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2018, 27(2): 54-57.
- [4] 徐丹, 谢波, 徐莉, 等. 苍附导痰丸加减治疗痰湿内阻型多囊卵巢综合征不孕的临床研究 [J]. 四川中医, 2015, 33(7): 92-94.
- [5] 薛国凤. 健脾化痰中药联合健康指导对肥胖型 PCOS 患者慢性炎症因子的影响 [J]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [6] 邹琳, 韦冰, 庞小艳, 等. 吡格列酮和二甲双胍在多囊卵巢综合征雌鼠血浆中促炎因子与抑炎因子失衡中的作用 [J]. 广东医学, 2014, 35(14): 2145-2147.
- [7] OKAYASU S, KITAICHI K, HORI A, et al. The evaluation of risk factors associated with adverse drug reactions by metformin in type 2 diabetes mellitus [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(6): 933-937.
- [8] 黄映红, 徐晓娟, 邓蒂斯, 等. 补肾化痰法对肥胖型 PCOS 雌鼠 AdipoR1、AMPK 的影响及其调控胰岛素抵抗的作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(7): 1533-1537.
- [9] 邓蒂斯, 徐晓娟, 黄映红, 等. 补肾化痰方经 APN 信号通路对肥胖 PCOS 大鼠 GC 增殖的调控研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(9): 1968-1971, 2017.
- [10] 田雪梅, 黄映红, 徐晓娟, 等. 补肾化痰法经 VEGF/Akt 通路调控肥胖型多囊卵巢综合征雌鼠子宫内膜的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 169-172, 267-269.
- [11] KAHLENBERG JM, KANG I. Clinicopathologic significance of inflammasome activation in autoimmune diseases [J]. Arthritis Rheumatol, 2020, 72(3): 386-395.
- [12] MANGAN MSJ, OLHAVA EJ, ROUSH WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606.
- [13] 孙婷, 陈泉, 肖继, 等. NF- κ B 亚基泛素化研究进展 [J]. 生理科学进展, 2018, 49(3): 217-221.
- [14] 乔羽. TLR 诱导 NF- κ B 活化上调 NLRP3 表达的机制研究 [J]. 济南: 山东大学, 2012.
- [15] HEGUY A, BALDARI CT, MACCHIA G, et al. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction [J]. Biol Chem, 1992, 267(4): 2605-2609.
- [16] HANEKLAUS M, O'NEILL LA, COLL RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments [J]. Curr Opin Immunol, 2013, 25(1): 40-45.
- [17] WANG F, WANG SB, ZHANG ZH, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in the ovaries during the development and treatment of polycystic ovary syndrome [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(5): 5022-5030.

Effect of *Bushen Huatan Formula* (补肾化痰方) on NLRP3 /ASC2/Caspase-1 Inflammasome Signal Pathway of Obese Polycystic Ovarian Syndrome Model Rats

XIONG Qian¹, XU Xiaojuan¹, HUANG Yinghong², YAO Zhilin¹, TIAN Xuemei¹, CHEN Meijia¹

1. Clinical Medicine School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075; 2. School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To study the mechanism of *Bushen Huatan Formula* (BHF, 补肾化痰方) on obese type polycystic ovarian syndrome (PCOS). **Methods** SD rats were treated with Letrozole combined high-fat and cholesterol to induce the obese PCOS rat models. A total of 99 successful modeling rats were divided into a model group (n=99), BHF high dose group (n=20), BHF middle dose group (n=20), BHF low dose group (n=20), and a metformin group (n=20). Another 23 rats were set as blank group. The BHF low, middle, high dose group was given 16.65, 41.63 and 83.25 g/(kg·d) by gastric perfusion, while the metformin group was given metformin 300 mg/(kg·d), and 5 ml/kg distilled water was given to the model group and the blank group. All groups were treated once a day for totally 21 days. HE staining of ovarian tissue, testosterone (T) and free fatty acids (FFAs) levels of serum were detected by ELISA. The protein relative expressions of NLRP3, apoptosis associated speck-like protein-2 containing a CARD (ASC2), cysteine-requiring aspartate protease-1 (Caspase-1) were detected by Western-blotting. The interleukin-1 receptor (IL-1R), nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein positive production were detected by immu-

nohistochemical method. **Results** Compared with the blank group, model group dominant follicle in the ovary had been absent, meanwhile, the serum T and FFAs in the model group increased significantly, average optical density of IL-1R, NF- κ B in ovarian tissue and expression of Caspase-1, NLRP3, ASC2 protein increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, expressions of NLRP3, Caspase-1, ASC2 and IL-1R in ovarian tissue of the BHF high and middle dose group as well as the metformin decreased significantly ($P < 0.05$). The level of serum T and FFAs in metformin group and BHF high dose group decreased, and the average optical density of IL-1R, NF- κ B significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no statistics difference in expression of Caspase-1, NLRP3, ASC2 protein average optical density of IL-1R, NF- κ B among different dose BHF group and metformin group ($P > 0.05$). **Conclusion** The *Bushen Huatan Formula* can improve obese PCOS by inhibiting the NLRP3/ASC2/Caspase-1 inflammasome signal pathway, and there is no obvious dose-effect relationship in the regulation of pathway.

Keywords polycystic ovarian syndrome; obese; *Bushen Huatan Formula* (补肾化痰方); inflammasome; NLRP3/ASC2/Caspase-1 signal pathway

(收稿日期: 2020-02-11; 修回日期: 2020-06-20)

编辑: 王利菊

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951 年 ~ 2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951 年 ~ 1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632 联系人: 杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951 年 ~ 1986 年光盘合订本每套(4 张光盘) 480 元

1987 年 ~ 1994 年光盘合订本每套(1 张光盘) 260 元

1995 年 ~ 2004 年光盘合订本每套(1 张光盘) 280 元

2005 年 ~ 2013 年光盘合订本每套(1 张光盘) 300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5-《中医杂志》(1987-1994)

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

