

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.03.011

实验研究

寿胎丸加味方对多囊卵巢综合征高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠炎症反应和子宫内膜容受性相关因子表达的影响

郭婷婷¹, 蒋蒙¹, 杨怀影¹, 吉翔¹, 张跃辉²✉

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路 24 号, 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院

[摘要] **目的** 从炎症反应和子宫内膜容受性探讨寿胎丸加味方治疗多囊卵巢综合征高雄激素-胰岛素抵抗流产的可能作用机制。**方法** 将动情周期规律且处于动情前期的 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只与 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 于每日 18:00 按 2:1 比例合笼, 次日 8:00 雌鼠阴道涂片镜下观察到大量精子且见阴道栓视为妊娠第 0.5 天, 共获得 30 只孕鼠。在妊娠第 0.5 天将孕鼠随机分为正常组、模型组、寿胎丸加味方组, 每组 10 只。自妊娠第 0.5 天至第 13.5 天, 寿胎丸加味方组予寿胎丸加味方药液 26.6 g/(kg·d) 灌胃, 每天 2 次, 连续 14 天; 正常组和模型组同时予生理盐水 4 ml/只灌胃。除正常组外, 其余两组孕鼠自妊娠第 7.5 天至第 13.5 天联合应用双氢睾酮 (DHT) 和胰岛素 (INS) 腹腔注射连续 7 天, 建立多囊卵巢综合征高雄激素-胰岛素抵抗流产大鼠模型。妊娠第 13.5 天对孕鼠进行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT), 检测 0、30、60、90、120 min 时血糖水平; 妊娠第 14.5 天取材, ELISA 法检测孕鼠血清中孕酮 (P₄)、雌二醇 (E₂)、空腹胰岛素 (FINS)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 水平, 并计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); 观察孕鼠胚胎着床情况, 计算流产率、平均活胎数; HE 染色观察子宫组织病理形态; qRT-PCR 法检测孕鼠子宫组织中 *Il-6*、*Tnf-α*、白血病抑制因子 (*Lif*)、同源框基因 10 (*Hoxa10*)、催乳素家族 8 亚家族 a 成员 2 (*Prl8a2*)、胰岛素样生长因子结合蛋白 1 (*Igfbp1*) mRNA 表达。**结果** 与正常组比较, 模型组孕鼠在 0、30、60、90、120 min 时血糖均升高, 流产率及 HOMA-IR 升高, 平均活胎数减少, 血清中 P₄、E₂ 水平降低, IL-6、TNF-α、FINS 水平升高, 子宫组织中 *Il-6*、*Tnf-α* mRNA 表达升高, *Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2* mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 子宫颜色暗红, 可见宫腔内有多处明显瘀血, 胚胎数量减少且发育不良, 胎盘出血坏死增多, 吸收胚胎和血胚较多; 病理形态示子宫蜕膜层存在血栓, 蜕膜细胞形态不清晰, 排列疏松, 分布散乱, 细胞浆呈水肿变性, 细胞核固缩甚至消失, 大量炎症细胞浸润。与模型组比较, 寿胎丸加味方组孕鼠在 0、30、60、90、120 min 时血糖均降低, 流产率及 HOMA-IR 降低, 平均活胎数增多, 血清中 P₄、E₂ 水平升高, IL-6、TNF-α、FINS 水平降低, 子宫组织中 *Il-6*、*Tnf-α* mRNA 表达降低, *Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2* mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 子宫、胚胎情况以及子宫组织病理形态均有明显改善。**结论** 寿胎丸加味方可降低多囊卵巢综合征高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠流产率, 其机制可能与抑制炎症反应而提高子宫内膜容受性和恢复子宫内膜蜕膜化缺陷有关。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 高雄激素血症; 胰岛素抵抗; 流产; 寿胎丸; 炎症因子; 子宫内膜容受性

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种多因素、复杂的妇科疾病, 在育龄

期女性中其发生率约为 8%~13%^[1]。PCOS 常伴高雄激素血症和胰岛素抵抗, 同时有月经稀发、肥胖、痤疮、多毛等临床表现, 妊娠期间发生流产和产科并发症的风险增高^[2]。在所有流产妇女中, PCOS 导致的流产达 30%~50%^[3]。中医药治疗流产具有独特优势, 其中张锡纯补肾安胎法代表方剂寿

基金项目: 国家自然科学基金 (82074259, 82374286); 黑龙江省青年岐黄学者培养项目 (黑中医药教函[2023]36 号); 黑龙江中医药大学“优秀青年学术带头人”科研项目

✉ 通讯作者: chizishui-04@163.com

胎丸疗效显著^[4]。国家名老中医王秀霞根据多年临证经验,认为PCOS伴有高雄激素-胰岛素抵抗的患者多有肾虚兼痰湿阻滞的病机特点,提出治以补肾益气、燥湿化痰、固冲安胎为法,拟定寿胎丸加味方^[5-6]。前期研究^[7]显示,寿胎丸加味方对PCOS早期先兆流产患者的疗效较好,有助于缓解临床症状,改善激素水平,同时安全性高,能使患者获得更好的妊娠结局。

PCOS患者流产的关键原因是卵巢和/或子宫功能障碍,其中子宫内膜功能障碍可能与蜕膜化缺陷、子宫内膜容受性低下、激素水平异常等有关^[8-9],而蜕膜化缺陷可能导致胎儿发育受损和妊娠失败^[10]。前期研究^[11]表明,高雄激素血症和胰岛素抵抗可激活核因子 κ B(NF- κ B)信号通路,导致炎症相关基因异常表达而引发炎症反应,进而造成子宫内膜功能障碍,是导致PCOS患者流产的主要因素之一。NF- κ B信号通路激活后,可诱导白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症因子过度表达^[12],而IL-6、TNF- α 为PCOS患者慢性炎症状态下的标志性细胞因子^[13]。因此,本研究通过观察寿胎丸加味方对PCOS高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠炎症反应和子宫内膜容受性相关因子表达的影响,探讨该方治疗PCOS患者流产的可能作用机制,为其临床应用提供实验依据。本研究已通过黑龙江省医院医学伦理委员会审批,批件号:伦科审(2021)089号。

1 材料与方法

1.1 动物

选取SPF级雌性SD大鼠30只,7~8周龄,体质量200~220 g;生殖能力正常的SPF级雄性SD大鼠15只,9~10周龄,体质量250~300 g,均由哈尔滨医科大学附属第二医院提供,实验动物生产许可证号:SCXK(黑)2024-002。所有大鼠饲养于黑龙江中医药大学附属第一医院中药药理(妇科)SPF级动物实验室,温度20~24℃,湿度55%~65%,通风及光照良好,12 h明暗交替循环,大鼠自由进食和饮水。

1.2 药物

寿胎丸加味方组成:菟丝子50 g,桑寄生20 g,续断20 g,杜仲20 g,阿胶珠(烊化)10 g,麦冬15 g,苍术20 g,桔梗15 g,党参20 g,黄芪30 g,山萸肉15 g,山药20 g。水煎制剂由黑龙江中医药大学附属第一医院煎药室提供,煎煮浓缩至终浓度

为1.66 g/ml,4℃保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

双氢睾酮(DHT,批号:D-5027)、二乙基焦碳酸酯(DEPC,货号:SM-V900882),Sigma-Aldrich公司;胰岛素(INS,批号:LVG4P48),丹麦诺和诺德公司;孕酮(P₄,货号:ml002894)、雌二醇(E₂,货号:ml002871)、INS(货号:YJ302840)、IL-6(货号:YJ102828)、TNF- α (货号:YJ002859)ELISA试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;4%多聚甲醛(货号:BL539A),Biosharp公司;苏木素染色液(货号:C0107)、伊红染色液(货号:C0109),碧云天生物技术有限公司;RNAiso Plus(货号:9109)、TB Green Premix Ex Taq II(货号:RR820A)、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号:RR047A),宝日医生生物技术(北京)有限公司。

全自动生物组织脱水机(型号:KD-TS3A)、生物组织冷冻包埋机(型号:KD-BMIII、BLIII),科迪仪器设备有限公司;半自动轮转式切片机(型号:HistoCore MULTICUT),Leica公司;显微镜(型号:BX53),Olympus公司;酶标仪(型号:Infinite M200 Pro),TECAN公司;离心机(型号:75007201),Thermofisher公司;实时荧光定量PCR仪(型号:CFX96),Bio-Rad公司;梯度PCR基因扩增仪(型号:3BT9610),SelectCycler II公司;超微量分光光度计(型号:K5600),北京凯奥科技发展有限公司。

1.4 动物分组及造模方法

将雌性大鼠适应性喂养1周后,连续观察两个动情周期,再于每日18:00将动情周期规律且处于动情前期的雌性大鼠与雄性大鼠按2:1比例合笼,次日8:00对雌鼠进行阴道涂片,镜下观察到大量精子且见阴道栓视为妊娠第0.5天,共获得30只孕鼠。应用随机数字表法分为正常组、模型组、寿胎丸加味方组,每组10只。造模方法根据课题组前期研究^[14-15]结果,联合应用DHT和INS腹腔注射连续7天,建立PCOS高雄激素-胰岛素抵抗流产大鼠模型。除正常组外,其余两组孕鼠自妊娠第7.5天至第13.5天,将DHT溶于芝麻油中配制成终浓度为0.01 mg/ μ l的溶液,并于每日8:00按1.66 mg/(kg·d)腹腔注射1次,诱导高雄激素血症^[16];同时腹腔注射INS 6.0 IU/d,于每日8:00和18:00各注射1次、每次3 IU,诱导胰岛素抵抗^[17]。造模孕鼠出现雄激素水平升高和胰岛素抵

抗等代谢和内分泌紊乱现象，以及流产率较正常孕鼠增加，差异有统计学意义即表明造模成功^[14-15]。正常组孕鼠同时时间分别于每日 8：00 腹腔注射等体积芝麻油，于每日 8：00 和 18：00 腹腔注射等体积生理盐水各 1 次。

1.5 给药方法

孕鼠妊娠第 0.5 天至第 13.5 天，按《药理实验方法学》^[18]中人和大鼠体表面积折算系数换算，大鼠等效剂量是人（标准成人体重 60 kg）的 6.3 倍，故寿胎丸加味方组予寿胎丸加味方药液 26.6 g/(kg·d) 灌胃，每日早、晚各 1 次，连续 14 天；正常组和模型组每只孕鼠同时予 4 ml 生理盐水灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 口服葡萄糖耐量试验（OGTT） 妊娠第 13.5 天早晨，对空腹孕鼠称重并记录；用温水和酒精分别擦拭鼠尾，使鼠尾充血，选用 7 号或 8 号针头刺入鼠尾静脉，拔出针头时即有血滴出，检测空腹血糖（FBG）水平；再以葡萄糖溶液按 2 g/kg 灌胃后开始计时，分别检测 0、30、60、90、120 min 的血糖浓度。

1.6.2 ELISA 法检测血清中 P₄、E₂、空腹胰岛素（FINS）、IL-6、TNF-α 水平 在妊娠第 13.5 天晚上对各组孕鼠禁食，于妊娠第 14.5 天早晨腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 0.3 ml/100 g 麻醉孕鼠后剖腹，心脏采血，4℃、3000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm），分离血清后冻存于 -80℃ 冰箱。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测孕鼠血清中 P₄、E₂、FINS、IL-6、TNF-α 水平，并计算胰岛素抵抗指数（HOMA-IR），即 HOMA-IR=FBG×FINS/22.5。

1.6.3 观察孕鼠胚胎情况并计算流产率和平均活胎数 心脏采血完成后迅速剥离孕鼠子宫和胚胎，观察并记录每侧子宫颜色、形态及胚胎数目。通过观察子宫整体形态，评估胚胎着床情况，记录胚胎着床数量和胚胎吸收情况，拍照留存，计算流产率和平均活胎数。子宫饱满，血运良好，胚胎剥离后形态完整、大小一致且无瘀血，则为正常胚胎；子宫内有明显瘀血，血运欠佳，与正常胚胎比较，外观严重出血或坏死，胚胎较小则为血胚；子宫内仅可见着床痕迹而无胚胎，则为吸收胚胎。丢失胚胎包括血胚和吸收胚胎。流产率（%）=丢失胚胎数量/（丢失胚胎数量+正常胚胎数量）×100。

1.6.4 HE 染色观察子宫组织病理形态 将部分未剥离胚胎和胎盘的完整子宫组织用 4% 多聚甲醛固定，再脱水、包埋，制成 4 μm 的石蜡切片，烤片、

脱蜡水化，苏木素染色 10 min，自来水冲洗，伊红染色 3 min，脱水、透明，树胶封片并覆盖玻片保存，显微镜下观察子宫组织病理形态并拍照。

1.6.5 qRT-PCR 法检测子宫组织中 *Il-6*、*Tnf-α*、白血病抑制因子（*Lif*）、同源框基因 10（*Hoxa10*）、催乳素家族 8 亚家族 a 成员 2（*Prl8a2*）、胰岛素样生长因子结合蛋白 1（*Igfbp1*）mRNA 表达 剩余子宫组织提取 RNA，进行 cDNA 反转录后，将其置入实时荧光定量 PCR 仪 37℃、15 min，再调整为 85℃、5 s，最后降至 4℃ 结束。测定 cDNA 浓度，常温下配置反应体系，反应程序为 95℃，30 s、95℃，5 s、55℃，30 s、4℃，+∞。内参基因为 *Gapdh*，通过 2^{-ΔΔCT} 方法分析基因相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成，引物信息见表 1。

表 1 孕鼠子宫组织中 *Il-6*、*Tnf-α*、*Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2*、*Igfbp1* qRT-PCR 法引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR of *Il-6*, *Tnf-α*, *Lif*, *Hoxa10*, *Prl8a2*, and *Igfbp1* in uterine tissue of pregnant rats

引物名称	引物序列	产物长度
<i>Gapdh</i>	上游 TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	121 bp
	下游 GGTAAACCAGGCCTCCGATAC	
<i>Il-6</i>	上游 GCCTTCTTGGGACTGATGTT	95 bp
	下游 GGTCTGTTGCGGTGCTATC	
<i>Tnf-α</i>	上游 ACCACGCTCTTCTGTCTACT	115 bp
	上游 ATGATCTGAGTGTGAGGGTCT	
<i>Lif</i>	上游 CGCCCAACATGACGGATTTC	226 bp
	下游 TTGTTGCACAGACGGCAAAG	
<i>Hoxa10</i>	上游 TCCGAAAACAGTAAAGCCTCTC	127 bp
	下游 GCGTCTGCTGCTTCGTGTA	
<i>Prl8a2</i>	上游 GTAACACTGGTTGCACGCAT	102 bp
	下游 TTCAGGTCCATGAAGTGTTGG	
<i>Igfbp1</i>	上游 TGTACTAGAACCTGCCGCAC	126 bp
	下游 AGCAGCTGTTCTCTCTCAT	

注：*Il-6*，白细胞介素 6；*Tnf-α*，肿瘤坏死因子 α；*Lif*，白血病抑制因子；*Hoxa10*，同源框基因 10；*Prl8a2*，催乳素家族 8 亚家族 a 成员 2；*Igfbp1*，胰岛素样生长因子结合蛋白 1。

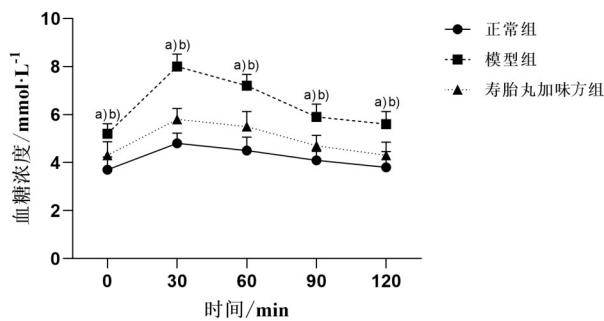
1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较，方差齐者采用 LSD 检验，方差不齐者采用 Tukey 检验或 Dunnett 检验。计数资料以频数、百分率表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕鼠 OGTT 结果比较

图 1 示, 正常组、模型组与寿胎丸加味方组孕鼠均在 30 min 时血糖达到峰值。模型组在 0、30、60、90、120 min 时血糖均高于正常组 ($P<0.05$)。寿胎丸加味方组在 0、30、60、90、120 min 时血糖均低于模型组 ($P<0.05$)。



注: a) 与正常组同时间比较, $P<0.05$; b) 与寿胎丸加味方组同时间比较, $P<0.05$ 。

图 1 各组孕鼠口服葡萄糖耐量试验(OGTT)血糖浓度比较
Figure 1 Comparison of blood glucose concentrations in OGTT among pregnant rats in each group

2.2 各组孕鼠血清中 FINS 水平及 HOMA-IR 比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组血清中 FINS 水平及 HOMA-IR 升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 寿胎丸加味方组血清中 FINS 水平及 HOMA-IR 降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组孕鼠血清中 FINS 水平及 HOMA-IR 比较

Table 2 Comparison of serum FINS levels and HOMA-IR index among pregnant rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	FINS/mU·L ⁻¹	HOMA-IR
正常组	10	6.95±1.50	1.22±0.06
模型组	10	12.41±1.94 ^{a)}	2.75±0.41 ^{a)}
寿胎丸加味方组	10	8.73±1.75 ^{b)}	1.55±0.86 ^{c)}

注: FINS, 空腹胰岛素; HOMA-IR, 胰岛素抵抗指数。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

表 4 各组孕鼠血清中 P₄、E₂、IL-6、TNF-α 水平比较

Table 4 Comparison of serum levels of P₄, E₂, IL-6 and TNF-α among pregnant rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	P ₄ /ng·ml ⁻¹	E ₂ /pmol·L ⁻¹	IL-6/pg·ml ⁻¹	TNF-α/pg·ml ⁻¹
正常组	10	2.48±0.25	8.83±0.77	5.73±1.04	213.45±23.34
模型组	10	1.84±0.36 ^{a)}	5.93±0.89 ^{b)}	19.67±3.37 ^{b)}	307.43±19.29 ^{b)}
寿胎丸加味方组	10	2.63±0.17 ^{d)}	8.02±0.65 ^{d)}	8.41±1.53 ^{d)}	256.24±8.62 ^{c)}

注: P₄, 孕酮; E₂, 雌二醇; IL-6, 白细胞介素 6; TNF-α, 肿瘤坏死因子 α。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与正常组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组孕鼠子宫形态及流产率、平均活胎数比较

图 2 示, 正常组孕鼠子宫形态饱满, 形如串珠, 颜色鲜红, 血运丰富且无瘀血, 胚胎数量较多, 胚胎大小一致。与正常组比较, 模型组子宫颜色暗红, 可见宫腔内有多处明显瘀血, 胚胎数量减少且大小不一致, 胚胎发育不良, 胎盘出血坏死增多, 吸收胚胎和血胚较多。与模型组比较, 寿胎丸加味方组子宫形态有明显改善, 较为饱满, 整体呈鲜红色, 血运丰富且无明显瘀血, 有少量吸收胚胎, 无血胚存在。表 3 示, 与正常组比较, 模型组流产率升高, 平均活胎数减少 ($P<0.01$)。与模型组比较, 寿胎丸加味方组流产率降低, 平均活胎数增多 ($P<0.01$)。



注: 黑色箭头代表血胚, 黑色三角代表吸收胚胎。

图 2 各组孕鼠妊娠第 14.5 天子宫形态图

Figure 2 Uterine morphology of pregnant rats on day 14.5 of pregnancy in each group

表 3 各组孕鼠流产率和平均活胎数比较

Table 3 Comparison of miscarriage rate and average number of live fetuses among pregnant rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	流产率/%	平均活胎数/个
正常组	10	1.36	11.70±1.06
模型组	10	34.27 ^{a)}	4.40±1.21 ^{a)}
寿胎丸加味方组	10	13.52 ^{b)}	9.36±2.91 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组孕鼠血清中 P₄、E₂、IL-6、TNF-α 水平比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组血清中 P₄、E₂ 水平降低, IL-6、TNF-α 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<$

0.01)。与模型组比较,寿胎丸加味方组血清中 P_4 、 E_2 水平升高,IL-6、TNF- α 水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 各组孕鼠子宫组织 HE 染色病理形态比较

图3示,正常组孕鼠子宫蜕膜层细胞排列紧密且规则,分布均匀,细胞形态清晰,细胞核多为圆形。与正常组比较,模型组子宫蜕膜层存在血栓,蜕膜细胞形态不清晰,排列疏松,分布散乱,细胞浆呈水肿变性,细胞核固缩甚至消失,大量炎症细胞浸润。与模型组比较,寿胎丸加味方组子宫蜕膜层存在少量血栓,蜕膜细胞排列较紧密,分布较均匀,细胞形态较清晰,细胞核较明显,偶有细胞边界模糊不清、细胞核坏死消失、细胞浆呈水肿变性。

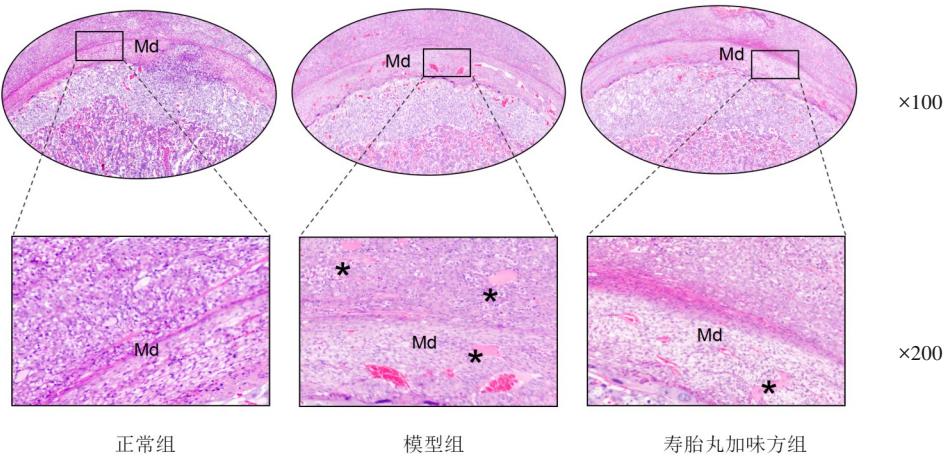
2.6 各组孕鼠子宫组织中 *Il-6*、*Tnf- α* 、*Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2*、*Igfbp1* mRNA 表达比较

表5示,与正常组比较,模型组子宫组织中*Il-6*、*Tnf- α* mRNA 表达升高,*Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2* mRNA 表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,寿胎丸加味方组子宫组织中*Il-6*、*Tnf- α* mRNA 表达

降低,*Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2* mRNA 表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组*Igfbp1* mRNA 表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

根据PCOS流产阴道出血、腹痛、腰酸、胎动下坠等临床症状,可将其归属中医学“堕胎”“胎漏”“胎动不安”范畴,临床以脾肾两虚、气血虚弱、肾虚血热、肾虚血瘀证多见^[19]。肾藏精,主生殖,女子正常的经、孕、产、乳功能均依靠肾气肾精,肾之精气化生天癸,天癸至,任通冲盛,故月经能够正常来潮和孕育胎儿。胎孕既成,仍靠肾气维系,同时肾所藏之精化血以养胎元,肾虚则胎元失养,导致流产发生。痰湿阻滞是PCOS的主要病机之一。肾主水,若肾气亏虚,气化无力易致水湿内停,日久而生痰湿,阻遏胞宫气机,致经血运行不畅,冲任失调,胞宫胞脉阻滞;若肾阳不足,不能温煦脾土,或素体脾虚,或过食肥甘厚味而伤脾,则脾虚水湿运化失常,聚生痰湿,壅塞胞宫胞脉,发为PCOS^[20]。PCOS患者妊娠后气血下注冲



注: Md代表子宫蜕膜层; *代表子宫蜕膜层存在血栓。

图3 各组孕鼠子宫组织病理形态结果 (HE 染色)

Figure 3 Pathological morphology of uterine tissue in pregnant rats in each group (HE staining)

表5 各组孕鼠子宫组织中 *Il-6*、*Tnf- α* 、*Lif*、*Hoxa10*、*Prl8a2*、*Igfbp1* mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of mRNA expressions of <i>Il-6</i> , <i>Tnf-α</i> , <i>Lif</i> , <i>Hoxa10</i> , <i>Prl8a2</i> and <i>Igfbp1</i> in uterus tissue of pregnant rats in each group ($\bar{x}\pm s$)							
组别	鼠数	<i>Il-6</i>	<i>Tnf-α</i>	<i>Lif</i>	<i>Hoxa10</i>	<i>Prl8a2</i>	<i>Igfbp1</i>
正常组	10	1.00±0.03	1.00±0.06	1.00±0.12	1.00±0.10	1.00±0.14	1.00±0.09
模型组	10	2.63±0.17 ^{a)}	1.95±0.22 ^{a)}	0.48±0.07 ^{a)}	0.58±0.03 ^{b)}	0.32±1.56 ^{a)}	1.13±0.06
寿胎丸加味方组	10	1.51±0.15 ^{c)}	1.37±0.13 ^{c)}	0.74±0.04 ^{d)}	1.08±0.49 ^{c)}	0.87±0.94 ^{d)}	1.04±0.17

注: *Il-6*, 白细胞介素6; *Tnf- α* , 肿瘤坏死因子 α ; *Lif*, 白血病抑制因子; *Hoxa10*, 同源框基因10; *Prl8a2*, 催乳素家族8亚家族a成员2; *Igfbp1*, 胰岛素样生长因子结合蛋白1。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与正常组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

任, 则胎元得养, 若痰湿阻滞胞宫胞脉, 加之肾虚致精血乏源, 冲任不足, 则胎元不得滋养而不固, 而出现流产。综上, 认为肾虚兼痰湿阻滞是 PCOS 流产患者的主要病机。

寿胎丸是助孕安胎的有效方剂, 研究表明其可改善复发性流产模型小鼠母胎界面酸性微环境, 调节免疫应答活性, 促进胚胎植入, 降低胚胎丢失率^[21]; 还能够提高胚胎有氧糖酵解水平, 发挥保胎作用^[22]。寿胎丸加味方是在寿胎丸基础上加味而成, 具有补益肾气、燥湿化痰、固冲安胎的功效。方中菟丝子补肾益精、固摄冲任; 桑寄生、续断、杜仲补肝肾、强筋骨、固冲任、安胎元; 山萸肉温补肝肾; 阿胶珠、麦冬滋阴养血, 使冲任血旺; 苍术、桔梗燥湿化痰; 党参、黄芪、山药补脾益气, 助气血生化有源, 补后天而充养先天。前期研究^[23]显示, 寿胎丸加味方联合黄体酮治疗肾虚型早期先兆流产患者临床疗效显著, 可提高妊娠率和激素水平, 且在降低中医证候积分及改善临床症状方面具有优势。

高雄激素、胰岛素抵抗是 PCOS 两大内分泌特征, 本研究选择联合运用 DHT 和 INS 建立 PCOS 流产大鼠模型。前期实验研究^[14-15]已证实, DHT 诱导大鼠能够模拟 PCOS 患者的高雄激素状态, INS 可诱导大鼠出现包括外周血和子宫胰岛素抵抗在内的代谢紊乱。为避免由于受精或着床失败等原因引起的妊娠丢失, 将妊娠大鼠在妊娠第 7.5 天至第 13.5 天给予腹腔注射 DHT 和 INS, 这种建立动物模型的方式与 PCOS 患者有相似的病理特点, 同时存在妊娠丢失情况。有研究^[24]显示, PCOS、慢性炎症与流产之间有很强的相关性, 可能是通过激活 NF- κ B 信号通路导致的。课题组前期研究^[25]发现, PCOS 子宫内膜炎症反应与雄激素诱导的 Toll 样受体 4 (TLR4) /干扰素调节因子 7 (IRF-7) /NF- κ B 信号通路有关。PCOS 患者体内高水平的炎症因子, 如 IL-6、TNF- α 在子宫内膜中紊乱表达可能会影响子宫内膜的容受性、蜕膜化过程, 使子宫内膜发生功能障碍, 胚胎着床困难, 导致流产发生^[26]。此外, 高雄激素-胰岛素抵抗可引发全身慢性炎症状态, 炎症反应同时参与 PCOS 妊娠早期流产的发病机制, 炎症相关因子的表达在 PCOS 大鼠子宫中显著增强, 同时炎症反应可以影响子宫内膜容受性^[27]。本研究结果显示, 寿胎丸加味方能够降低 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠的流产率, 提高平均活胎数, 升高血清中 P₄、E₂ 水平, 降

低血清中 IL-6、TNF- α 水平和子宫组织中 IL-6、Tnf- α mRNA 表达, 提示该方对抑制炎症反应有一定作用, 可能通过抑制炎症反应来改善 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗状态, 提高子宫内膜容受性。另经寿胎丸加味方干预后, 孕鼠血清中 FINS 水平、HOMA-IR 降低, 结合 OGTT 结果说明寿胎丸加味方能够改善 DHT 和 INS 所导致的糖代谢异常, 能够提高胰岛素敏感性, 降低血糖水平。HE 染色结果可见寿胎丸加味方组孕鼠的子宫组织病理形态较模型组有明显改善, 提示该方对改善高雄激素-胰岛素抵抗所导致的子宫蜕膜层细胞受损具有一定作用, 能够改善 PCOS 孕鼠的子宫蜕膜层血栓情况以及子宫蜕膜层细胞形态。

Lif、Hoxa10、Prl8a2、Igfbp1 是与子宫内膜容受性、蜕膜化和胚胎植入相关的重要因子, 正常状态下在子宫及胚胎组织中高表达, 对胚胎发育起重要作用^[28]。Lif 可为建立良好子宫内膜容受性和胚胎着床作准备^[29-30]; Hoxa10 与子宫内膜容受性密切相关, 是建立子宫内膜容受性的关键因子^[31], 研究显示二者在 PCOS 孕鼠子宫内均表达降低^[32]。Prl8a2^[33]、Igfbp1^[34] 均是子宫内膜蜕膜化过程中的标志分子。本研究中, 寿胎丸加味方能够上调孕鼠与子宫内膜容受性有关的 Lif、Hoxa10 mRNA 表达以及子宫内膜蜕膜化有关的 Prl8a2 mRNA 表达, 提示其可能通过改善子宫内膜容受性, 恢复子宫内膜蜕膜化缺陷, 以维持蜕膜正常功能, 从而使胚胎成功植入, 降低流产率。

综上所述, 我们认为, 寿胎丸加味方治疗 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产的机制可能与调控炎症因子的表达, 抑制炎症反应, 从而提高子宫内膜容受性和恢复子宫蜕膜化缺陷有关。然而本研究仅进行了炎症相关因子的初步探讨, 寿胎丸加味方对 PCOS 流产炎症反应的作用机制仍需进一步研究。未来, 我们会通过体内外研究深入探索炎症反应及相关通路在 PCOS 流产发生发展过程中的分子机制以及寿胎丸加味方的调控作用, 为寿胎丸加味方治疗 PCOS 流产提供依据。

参考文献

- [1] ZENG X, XIE YJ, LIU YT, et al. Polycystic ovarian syndrome: correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity[J]. Clin Chim Acta, 2020, 502: 214-221. doi: 10.1016/j.cca.2019.11.003.
- [2] BAHRI KHOMAMI M, JOHAM AE, BOYLE JA, et al. Increased maternal pregnancy complications in polycystic ovary syndrome appear to be independent of obesity: a

- systematic review, meta-analysis, and meta-regression [J]. *Obes Rev*, 2019, 20(5): 659–674.
- [3] LIM CC, MAHMOOD T. Obesity in pregnancy [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2015, 29(3): 309–319.
- [4] 何冬梅, 黄嘉敏, 庄佳玲, 等. 寿胎丸治疗先兆流产临床疗效的 Meta 分析 [J]. *中医研究*, 2019, 32(12): 60–63.
- [5] 石晶, 姚美玉. 王秀霞教授治疗多囊卵巢综合征经验介绍 [J]. *新中医*, 2008, 40(10): 6–7.
- [6] 张杨, 聂彦彦, 张跃辉, 等. 王秀霞教授分期论治多囊卵巢综合征经验举隅 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2019, 11(6): 6–7.
- [7] 韩晗, 张跃辉, 韩亚鹏, 等. 从铁死亡角度探讨寿胎丸加味方对 PCOS 早期先兆流产患者的疗效机制 [J]. *中医药学报*, 2023, 51(10): 67–71.
- [8] PALOMBA S, PILTONEN TT, GIUDICE LC. Endometrial function in women with polycystic ovary syndrome: a comprehensive review [J]. *Hum Reprod Update*, 2021, 27(3): 584–618.
- [9] NG SW, NORWITZ GA, PAVLICEV M, et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4092.
- [10] ASHARY N, TIWARI A, MODI D. Embryo implantation: war in times of love [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(2): 1188–1198.
- [11] HU M, ZHANG Y, GUO X, et al. Perturbed ovarian and uterine glucocorticoid receptor signaling accompanies the balanced regulation of mitochondrial function and NF κ B-mediated inflammation under conditions of hyperandrogenism and insulin resistance [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116681. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116681.
- [12] HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 86. doi: 10.1186/1476-4598-12-86.
- [13] ORÓSTICA L, ASTORGA I, PLAZA-PARROCHIA F, et al. Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2016, 40(11): 1715–1722.
- [14] HU M, ZHANG Y, GUO X, et al. Hyperandrogenism and insulin resistance induce gravid uterine defects in association with mitochondrial dysfunction and aberrant reactive oxygen species production [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(5): E794–E809.
- [15] ZHANG Y, ZHAO W, XU H, et al. Hyperandrogenism and insulin resistance-induced fetal loss: evidence for placental mitochondrial abnormalities and elevated reactive oxygen species production in pregnant rats that mimic the clinical features of polycystic ovary syndrome [J]. *J Physiol*, 2019, 597(15): 3927–3950.
- [16] FENG Y, SHAO R, WEIJDEGÅRD B, et al. Effects of androgen and leptin on behavioral and cellular responses in female rats [J]. *Horm Behav*, 2011, 60(4): 427–438.
- [17] ZHANG Y, SUN X, SUN X, et al. Molecular characterization of insulin resistance and glycolytic metabolism in the rat uterus [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30679. doi: 10.1038/srep30679.
- [18] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [19] 吕蓓丽, 王海燕, 张婷婷. 不同表型多囊卵巢综合征伴先兆流产相关中医证型及各自特性分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4376–4380.
- [20] 苟雅姣, 赵粉琴, 胡芝霞. 多囊卵巢综合征病因病机及治疗的研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(4): 11–13.
- [21] 吕竞芳, 蒋敏, 周真真, 等. 寿胎丸对复发性流产模型小鼠母胎界面乳酸含量及免疫相关因子表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(9): 934–942.
- [22] 梁潇, 唐思玲, 宋亚静, 等. 寿胎丸对复发性流产模型小鼠胚胎有氧糖酵解关键酶及相关蛋白表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(10): 1044–1050.
- [23] 毕红. 寿胎丸加味联合黄体酮治疗肾虚型早期先兆流产临床观察 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2023.
- [24] HU M, ZHANG Y, LU Y, et al. Regulatory mechanisms of HMGB1 and its receptors in polycystic ovary syndrome-driven gravid uterine inflammation [J]. *FEBS J*, 2023, 290(7): 1874–1906.
- [25] HU M, ZHANG Y, LI X, et al. TLR4-associated IRF-7 and NF κ B signaling act as a molecular link between androgen and metformin activities and cytokine synthesis in the PCOS endometrium [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(4): 1022–1040.
- [26] DÍAZ-GIMENO P, HORCAJADAS JA, MARTÍNEZ-CONEJERO JA, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(1): 50–60.
- [27] ZHANG Y, HU M, MENG F, et al. Metformin ameliorates uterine defects in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *EBioMedicine*, 2017, 18: 157–170. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.023.
- [28] ALTMÄE S, KOEL M, VÕSA U, et al. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10077.
- [29] SHOKRZADEH N, ALIVAND MR, ABEDELAHI A, et al. Calcitonin administration improves endometrial receptivity via regulation of LIF, Muc-1 and microRNA Let-7a in mice [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12989–13000.
- [30] HAJIPOUR H, SAMBRANI R, GHORBANI M, et al. Sildenafil citrate-loaded targeted nanostructured lipid

- carrier enhances receptivity potential of endometrial cells via LIF and VEGF upregulation[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2021, 394(11): 2323–2331.
- [31] TAYLOR HS. Role of HOXA genes in human implantation[J]. Hum Reprod Update, 2000, 6(1): 75–79.
- [32] HU M, ZHANG Y, MA S, et al. Suppression of uterine and placental ferroptosis by N-acetylcysteine in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. Mol Hum Reprod, 2021, 27(12): gaab067.
- [33] SIMMONS DG, RAWN S, DAVIES A, et al. Spatial and temporal expression of the 23 murine Prolactin/Placental Lactogen-related genes is not associated with their position in the locus[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 352. doi:10.1186/1471-2164-9-352.
- [34] GIBSON DA, SIMITSIDELLIS I, KELEPOURI O, et al. Dehydroepiandrosterone enhances decidualization in women of advanced reproductive age [J]. Fertil Steril, 2018, 109(4): 728–734.

Effect of *Modified Shoutai Pill* (寿胎丸加味方) on Inflammatory Reaction and Expression of Endometrial Receptivity-Related Factors in A Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome and Miscarriage with High Testosterone-Insulin Resistance

GUO Tingting¹, JIANG Meng¹, YANG Huaiying¹, JI Xiang¹, ZHANG Yuehui²

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040; 2. First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanisms of *Modified Shoutai Pill* (寿胎丸加味方, MSP) in treating polycystic ovary syndrome (PCOS) with hyperandrogenism, insulin resistance, and miscarriage, focusing on inflammatory response and endometrial receptivity. **Methods** Thirty female SPF-grade SD rats with regular estrous cycles and in proestrus, and 15 male SPF-grade SD rats were housed together in a 2 : 1 ratio at 18:00. At 8:00 next morning, rats showing abundant sperm and vaginal plugs were considered pregnant on the day 0.5. The 30 pregnant rats were randomly divided into three groups, normal group, model group, and MSP group, with 10 rats in each group. From day 0.5 to day 13.5 of pregnancy, the MSP group was given 26.6 g/(kg·d) of the MSP via gavage twice a day for 14 consecutive days. The normal group and the model group received 4 ml of normal saline daily. From day 7.5 to day 13.5 of pregnancy, the rats in the model group and MSP group were intraperitoneally injected with dihydrotestosterone (DHT) and insulin (INS) for 7 consecutive days to establish a PCOS model with hyperandrogenism, insulin resistance, and miscarriage. On day 13.5 of pregnancy, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed to measure blood glucose levels at 0, 30, 60, 90, and 120 minutes. On day 14.5, serum level of progesterone (P₄), estradiol (E₂), fasting insulin (FINS), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) were measured by ELISA. The insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. Embryo implantation, miscarriage rate, and average number of live fetuses were observed. Uterine tissue pathology was examined by HE staining, and mRNA expression of *Il-6*, *Tnf-α*, leukemia inhibitory factor (*Lif*), homeobox gene 10 (*Hoxa10*), prolactin family 8 subfamily A member 2 (*Prl8a2*), and insulin-like growth factor-binding protein 1 (*Igfbp1*) in the uterine tissue was detected by qRT-PCR. **Results** Compared with the normal group, the model group had significantly higher blood glucose level at 0, 30, 60, 90, and 120 minutes, increased miscarriage rate, elevated HOMA-IR, decreased average number of live fetuses, lower level of P₄ and E₂, higher level of IL-6, TNF-α, and FINS, and higher mRNA expression of *Il-6* and *Tnf-α* in the uterine tissue. The mRNA expression of *Lif*, *Hoxa10*, and *Prl8a2* was reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The uterus had a dark red color, visible areas of bleeding, fewer embryos with developmental abnormalities, and increased placental necrosis. Pathological examination revealed thrombus in the decidual layer, unclear decidual cell morphology, loose arrangement, scattered distribution, edema degeneration in the cytoplasm, and nuclear shrinkage or disappearance, with extensive infiltration of inflammatory cells. In contrast, compared with the model group, the MSP group showed significantly lower blood glucose level at 0, 30, 60, 90, and 120 min, reduced miscarriage rate, lower HOMA-IR, increased number of live fetuses, higher level of P₄ and E₂, and lower level of IL-6, TNF-α, and FINS. The mRNA expression of *Il-6* and *Tnf-α* in the uterine tissue was lower, while the expression of *Lif*, *Hoxa10*, and *Prl8a2* mRNA was higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was significant improvement in uterine and embryo conditions, as well as in uterine tissue pathology. **Conclusion** The MSP can reduce the miscarriage rate in a PCOS model with hyperandrogenism, insulin resistance, and miscarriage. Its mechanism may involve inhibiting inflammation, improving endometrial receptivity, and restoring the defects in endometrial decidualization.

Keywords polycystic ovary syndrome; hyperandrogenism; insulin resistance; miscarriage; *Modified Shoutai Pill* (寿胎丸加味方); inflammatory factors; endometrial receptivity

(收稿日期: 2024-07-03; 修回日期: 2024-11-18)

[编辑: 邓媛]