水木涤浊饮治疗多囊卵巢综合征作用机制

周武柳[1],胡馨一[2],吴斐华[1],金晶[3]

(1.中国药科大学,江苏 南京 211198;2.南京医科大学,江苏 南京 211100;3.南京中医药大学附属医院,江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究水木涤浊饮(SMDZ)对脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone,DHEA)诱导小鼠多囊卵巢综合征(PCOS)的治疗作用及其潜在机制。**方法** 将50只SPF级雌性C57BL/6小鼠随机分为正常对照组、模型组、水木涤浊饮低、高剂量组和单纯给药组。连续21 d皮下注射DHEA建立PCOS模型,再灌胃水木涤浊饮21 d后检测小鼠动情周期、卵泡种类和激素水平,通过网络药理学筛选作用靶点,构建PCOS细胞模型验证靶点。**结果** 与模型组相比,水木涤浊饮高剂量组可纠正动情周期紊乱、卵泡发育异常、激素水平异常(均$P<0.05$)。经网络药理学分析和细胞实验验证,水木涤浊饮可增强P53通路中MDM2、CCND1、BCL2L1蛋白表达,从而抑制CASP8、CASP9、CDKN1A表达水平(均$P<0.05$),逆转颗粒细胞凋亡。**结论** 水木涤浊饮通过调控p53信号通路逆转颗粒细胞凋亡,改善PCOS。

关键词:多囊卵巢综合征;水木涤浊饮;网络药理学

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-5375(2026)09-0967-08

doi:10.13506/j.cnki.jpr.2026.09.002

The mechanism of action of Shuimudizhuo Decoction in the treatment of polycystic ovary syndrome

ZHOU Wuliu[1],HU Xinyi[2],WU Feihua[1],JIN Jing[3]

(*1.China Pharmaceutical University,Nanjing 211198,China;2.Nanjing Medical University,Nanjing 211100,China;3.Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine,Nanjing 210029,China*)

Abstract:Objective To investigate the therapeutic effect of Shuimudizhuo Decoction on dehydroepiandrosterone (DHEA) -induced polycystic ovary syndrome(PCOS) mice and its potential mechanism.**Methods** Fifty SPF-grade female C57BL/6 mice were randomly divided into a blank control group,a model group,low-dose and high-dose groups of Shuimudizhuo Decoction,and drug-only group.The PCOS model was established by subcutaneous injection of DHEA for 21 days.After 21 days of gavage of Shuimudizhuo Decoction,the estrous cycle,types of follicles,ovarian histology and hormone levels of mice were analyzed.Target screening was performed through network pharmacology and verified in vitro.**Results** Compared with the model group,the high-dose group of Shuimudizhuo Decoction could correct estrous cycle disorders,abnormal follicular development,and abnormal hormone levels(all $P<0.05$).Through network pharmacological analysis and in vitro experiments,it has been verified that Shuimudizhuo Decoction may reverse granulosa cell apoptosis by enhancing the expression of MDM2,CCND1,BCL2L1 proteins,inhibiting the expression of CASP8,CASP9,and CDKN1A proteins(all $P<0.05$).**Conclusion** Shuimudizhuo Decoction reverses granulosa cell apoptosis and improves PCOS by regulating the p53 signaling pathway.

Key words: Polycystic ovary syndrome;Shuimudizhuo Decoction;Network pharmacology

---

基金项目:中华中医药学会青年培英计划项目(No.202403-002);江苏省高层次人才培养计划("333"工程);江苏省中医院高峰学术人才培养项目(No.k2026yrc57)

作者简介:周武柳,女,硕士生,研究方向:中药药理,E-mail:zhouzhouya088@163.com

通信作者:吴斐华,女,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药药理,E-mail:fhwu2000@cpu.edu.cn;金晶,女,博士,副主任中医师,研究方向:妇科临床、教学和科研,E-mail:jingjing@njucm.edu.cn

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)是一种常见的育龄期女性生殖内分泌代谢疾病[1],全球发病率约为 6%~20%[2],且呈年轻化趋势。其主要病理特征为慢性无排卵或少排卵、高雄激素血症、胰岛素抵抗及卵巢多囊样改变。目前西医治疗以抗雄激素、促排卵及调整月经周期为主[3],但长期疗效欠佳且不良反应较多[4]。中医药在降低雄激素水平、恢复月经周期、减轻胰岛素抵抗及辅助体质量控制等方面疗效显著,不良反应较少[5],具有多靶点综合调节的优势,常用于 PCOS 的治疗。

基于中医辨证论治原则,临床治疗 PCOS 常采用补肾、疏肝、健脾、化痰、活血等治法,如二仙汤[6]、逍遥散[7]等中药以温肾益精、疏肝调经已被广泛应用,具有良好的临床效果。水木涤浊饮(SMDZ)由决明子、枸杞子、山药、泽泻、荷叶、茯苓、山茱萸、柴胡、山楂等九味药构成,其方由经典名方六味地黄丸加减所得。现代研究表明,决明子可降血脂、抗氧化、抗糖尿病及并发症[8];枸杞子的主要活性成分枸杞多糖具抗衰老和生殖保护作用,可改善卵巢功能[9];山药与泽泻温肾滋阴,清热解毒;荷叶、山楂、茯苓、山茱萸等具有降低血脂,抗动脉粥样硬化,改善胰岛素抵抗等作用,临床上常被用于减肥、治疗高脂血症等[10];柴胡则抗炎抗抑郁,对肝脏有良好保护作用[11]。综上,水木涤浊饮以补肾清肝为基础,调节下丘脑-垂体-卵巢轴,改善卵巢功能。

本研究以脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone,DHEA)诱导小鼠 PCOS,测量小鼠动情周期、激素变化和组织病理学来评价 SMDZ 对 PCOS 的治疗作用,并应用网络药理学的方法,阐述 SMDZ 治疗 PCOS 的可能机制,以期为后续 SMDZ 的临床应用及机制研究提供新的思路。

1　试剂与材料

1.1　药物试剂与仪器　决明子、枸杞子、山药、泽泻、荷叶、茯苓、山茱萸、柴胡、山楂等 9 味药购于江苏省中医院;脱氢表雄酮(阿拉丁公司,批号:D106380);双氢睾酮(DHT,Sigma 公司,批号:A8380);胰岛素(INS,批号:AF02579-A)、雌二醇(E2,批号:AF02566-A)、睾酮(T,批号:AF02569-A)、孕酮(P,批号:AF02568-A)、黄体生成素(LH,批号:AF02582-A)、促卵泡生成素(FSH,批号:AF02555-A) ELISA 试剂盒均购自湖南艾方生物有限公司);4%多聚甲醛通用型组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:G1101-3ML);MDM2 抗体(Abclonal 公司,批号:A13327);Caspase-8 抗体(批号:ab25901)、Caspase-9 抗体(批号:ab32539)购自 Abcam 公司;β-actin 抗体(Affinity Biosciences 公司,批号:T0022);CDKN1A 抗体(批号:37543T)、CCND1 抗体(批号:2978T)购自 CST 公司;山羊抗鼠 IgG 二抗(批号:BL001A)、山羊抗兔 IgG 二抗(批号:BL003A)购自北京兰杰柯科技有限公司;Bradford 蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:W042-1-1);HyClone DME/F-12 1∶1(1X)培养基(思拓凡生物科技有限公司,批号:SH30023.01);MTT 试剂(南京翼飞雪生物科技有限公司,批号:YM0001-250);基恩士显微镜 BZ-X800 系列(基恩士中国有限公司);Cytation 5 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);天能 5200 化学发光成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.2　实验动物　无特定病原体雌性 C57BL/6 小鼠(3 周,18~20 g)、清洁级健康雌性 SD 大鼠(7~8 周,200~220 g),购自南京医科大学医药实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2021-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2020-0022。所有动物饲养于南京医科大学实验动物中心,严格遵守实验动物的饲养规定,可自由饮食和进水。本研究通过南京市医科大学伦理委员会审查批准,批准号为 2211015。实验动物中心温度保持在 20~26 ℃,相对湿度保持在 30%~70%,12 h 明暗交替光照,适应培养 1 周后开始进行实验。

2　方法

2.1　供试液的制备　水木涤浊饮供试液溶液:按既定比例称取决明子、枸杞子、山药、泽泻、荷叶、山楂、茯苓、山茱萸、柴胡(共计 127 g),加入 10 倍体积双蒸水冷浸 30 min,加热至沸腾后文火煎煮 60 min,纱布过滤收集药液;药渣加入 8 倍体积双蒸水,再次沸腾后文火煎煮 30 min,过滤合并两次药液,减压浓缩至 420 mL,分装后-20 ℃冷冻保存,使用前室温复溶并涡旋混匀。DHEA 供试液溶液:精密称取 DHEA 粉末,用 0.01 mL 无水乙醇溶解,再加入 0.09 mL 芝麻油为溶剂稀释至 40 $mg\cdot kg^{-1}$给药浓度(每只小鼠皮下注射 0.1 mL),涡旋混匀至溶液澄清无沉淀现配现用。

2.2　模型的建立　雌性 C57BL/6 小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只。各组分别为:①正常对照组;②模型组;③水木涤浊饮低剂量组;④水木涤浊饮高剂量组;⑤单纯给药组。正常对照组与单纯给药组接受生理盐水,其他组所有动物均接受皮下注射 60 $mg\cdot kg^{-1}$的 DHEA,持续 21 d 以诱导 PCOS 模型。从第 22 天至第 42 天,正常对照组与模型组灌胃给予生理盐水,水木涤

浊饮组灌胃给药不同剂量[生药剂量:4.5、15.0 g·(kg·d)$^{-1}$],单纯给药组给予水木涤浊饮高剂量。

2.3 体重和动情周期测定 研究过程中,C57BL/6小鼠每周称重1次,持续42 d。参照文献[12]方法:采用阴道上皮细胞涂片法检测,每天固定时间以0.9%生理盐水轻柔冲洗小鼠阴道,取阴道脱落细胞涂片,95%乙醇固定、甲苯胺蓝染色后,光学显微镜下依据有核上皮细胞、角化细胞及白细胞的组成比例判定小鼠动情周期。动情周期阶段,依据小鼠阴道脱落细胞的类型,分别鉴定为:动情前期(P)、动情期(E)、动情后期(M)、动情间期(D)。

2.4 卵巢组织学 检测卵巢组织学以评估小鼠卵泡发育。取小鼠卵巢4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片(5 μm),苏木精和伊红染色。为了确定每个卵巢中的卵泡数量,我们遵循了早期研究的程序[13],在每6个切片中计算原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、窦卵泡、闭锁卵泡、黄体和总卵泡,间隔30 μm,然后将总和乘以6。只有当卵泡中含有带有可见细胞核的卵母细胞时才进行计数,以确保计数中没有重复。我们通过应用先前研究中详细介绍的形态学标准来确定卵泡分期[14-15]。

2.5 血清激素检测 测定小鼠血清胰岛素水平以评估胰岛素抵抗。实验终点将所有实验小鼠麻醉后摘取眼球取血,血液室温静置30 min,4 ℃、3 000 r·min^{-1}离心15 min,取上层血清,分装50 μL至无菌1.5 mL EP管中,其余放-80 ℃冻存备用。采集50 μL血清样本,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)按标准化流程检测与卵泡发育有关的血清激素水平如雌二醇(E2)、睾酮(T)、孕酮(P)、黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)水平,以探讨水木涤浊饮改善多囊卵巢综合征卵泡发育的潜在作用。

2.6 空腹血糖检测及空腹血清采集 小鼠给药结束后禁食12 h,不禁水,用剪刀剪去小鼠尾尖1~2 mm,轻压尾巴并弃去第一滴血,取第二滴尾尖血测空腹血糖浓度。通过尾尖收集空腹血清,分离血清保存于-80 ℃。

2.7 网络药理学分析 通过TCMSP(https://tcmspw.com/)平台获取药物有效成分,HERB(https://herb.ac.cn)平台作补充。并通过TCMSP平台获取对应靶点,结合SwissTargetPrediction平台作为补充。输入关键词搜索"决明子""枸杞子""山药""泽泻""荷叶""山楂""茯苓""山茱萸""柴胡",在TCMSP平台分析有效成分与靶点的筛选条件为OB≥30%且DL≥0.18,参考中药网络药理学研究常用阈值[16]。通过UniProt数据库(https://www.uniprot.org/)将靶点名称进行规范。于GeneCards(https://www.genecards.org/)和DisGeNET(http://www.disgenet.org)数据库,输入关键词搜索"多囊卵巢综合征",进行疾病靶点的获取。将水木涤浊饮靶点与多囊卵巢综合征获取的靶点取交集,利用Venny 2.1.0(https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)进行可视化。交集靶点输入STRING在线数据库(https://cn.string-db.org),物种选择"*Homo sapiens*"。获得蛋白质互作网络关系数据,导入Cytoscape软件中建立蛋白互作网络图。为进一步分析水木涤浊饮治疗多囊卵巢综合征的分子机制,将交集基因导入DAVID(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp),进行基因本体论(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。利用微生信平台(http://www.bioinformatics.com.cn)进行数据可视化。为清晰得到中药、活性成分、关键靶点之间的关系,我们使用Cytoscacpe软件构建"中药-成分-关键靶点"网络图。

2.8 细胞实验

2.8.1 含药鼠血清的制备 8只SD大鼠适应性饲养1周,随机分为2组:空白对照组、水木涤浊饮组,每组4只。水木涤浊饮组给予每只大鼠生药剂量15.0 g·(kg·d)$^{-1}$,空白对照组给予等量生理盐水。每天2次,连续灌胃14 d,各组于末次给药1 h后,腹腔麻醉后腹主动脉取血,静置,离心分离含药血清,分装后保存-20 ℃备用。使用时用培养基混合后并通过0.22 μm过滤器过滤。

2.8.2 细胞造模 为了诱导离体PCOS模型,以浓度为500 μmol·L^{-1}的DHT处理KGN细胞48 h[17-18];根据血清药理学,采用含药血清治疗PCOS。同步给予0.5%、1%、2%、4%的含药鼠血清处理48 h,MTT法检测细胞存活率。

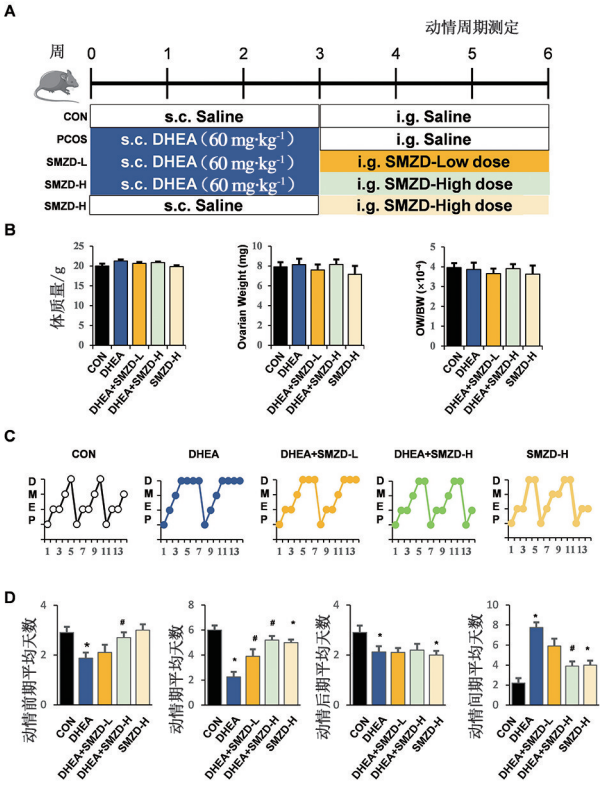
2.9 Western blotting检测 将KGN细胞采用PBS清洗,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA溶液,置于冰上充分研磨,冰上裂解30 min,离心后收集上清液,提取细胞中的总蛋白,用Bradford蛋白定量法测定蛋白浓度,每孔加25 μg总蛋白,通过SDS-PAGE分离,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)转膜,5%脱脂牛奶室温下封闭,添加一抗过夜,次日孵育二抗,电化学发光(electro-chemi-luminescence,ECL)法对蛋白条带进行显影,Image J软件进行图片分析。

2.10 分子对接 核心蛋白的晶体结构从RCSB蛋白数据库(PDB)下载。未查询到的蛋白结构运用Alphafold3预测。通过Pymol对目标蛋白晶体结构移除水分子及原配体分子,随后导入AutoDock Tools 1.5.7进行加氢化、电荷计算和合并非极性氢原子。导入化合物的SDF文件,运行AutoDock Vina与靶点蛋白进行对接,选择亲和力高、结合能低的构象作为最终对接结果。最后,使用Pymol对结果进行可视化。

2.11 数据统计分析 每组数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。两组比较采用 Student′s-t 检验,多组比较采用单因素方差分析和 Kruskal-Wallis 检验,$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 SMDZ 纠正 PCOS 小鼠动情周期紊乱 与正常对照组相比,DHEA 处理小鼠的体质量、卵巢重量和卵巢重量与体质量之比没有变化($P>0.05$,见图 1B),SMDZ 治疗对其几乎没有影响($P>0.05$)。与正常对照组相比,DHEA 处理小鼠动情前期(P)、动情期(E)、动情后期(M)缩短,动情间期(D)延长($P<0.05$,见图 1C)。DHEA 处理小鼠连续 3 周后,给予 SMDZ 可纠正小鼠 PCOS 的动情周期紊乱,使动情周期各个阶段趋近正常水平,高剂量组水木涤浊饮处理小鼠动情期(E)延长,动情间期(D)缩短($P<0.05$)。



A.SMDZ 治疗 DHEA 诱导的 PCOS 小鼠;B.体质量、卵巢重量与卵巢指数;C、D.动情周期平均天数

图 1 SMDZ 纠正 PCOS 动情周期紊乱($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

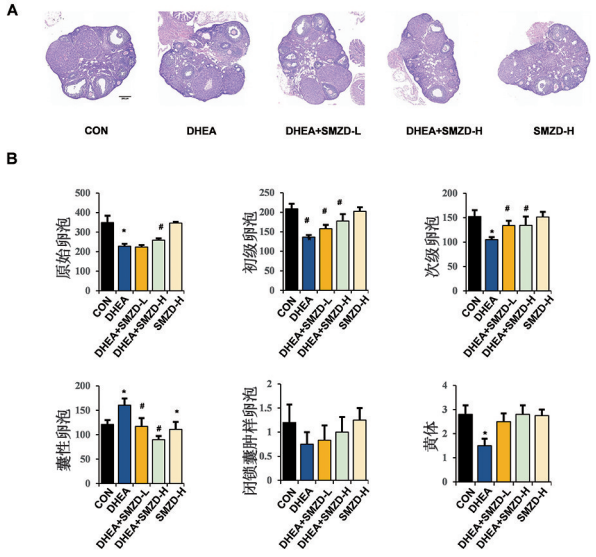
注:与正常对照组相比,$^{*}P<0.05$;与 PCOS 模型组对比,$^{\#}P<0.05$。

A.SMDZ in the treatment of DHEA-induced PCOS mice; B.Body weight, ovarian weight and ovarian index; C, D. Average number of days in the estrous cycle

Fig.1 SMDZ corrects estrous cycle disorders in PCOS($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

Note: Compared with control group, $^{*}P<0.05$; Compared with PCOS model group, $^{\#}P<0.05$.

3.2 SMDZ 纠正 PCOS 小鼠卵泡发育异常 选取处于动情间期小鼠的卵巢进行 H&E 染色。组织病理学观察显示,正常对照组小鼠卵巢形态正常,有不同发育阶段的卵泡和黄体,DHEA 处理的小鼠的卵巢皮质增厚、结构不均匀、黄体很少或没有、囊性卵泡被多层颗粒细胞或卵泡膜细胞覆盖、许多囊性卵囊增大,卵巢显示典型的多囊变化,原始卵泡和主要卵泡的数量减少。SMDZ 给药处理的小鼠的卵巢症状明显改善(见图 2A)。统计小鼠不同类型卵泡数据。DHEA 处理小鼠的原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、黄体数量低于正常对照组($P<0.05$,见图 2B),SMDZ 给药处理,PCOS 小鼠的生长卵泡(原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡)数量增加,囊性卵泡减少,黄体数量增加($P<0.05$,见图 2B)。单独给予水木涤浊饮对于小鼠卵巢没有影响($P>0.05$,见图 2B)。



A.卵巢 HE 染色;B.原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、囊性卵泡、闭锁囊肿样卵泡、黄体的平均数目

图 2 SMDZ 纠正 PCOS 卵泡发育异常($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

注:与正常对照组相比,$^{*}P<0.05$;与 PCOS 模型组对比,$^{\#}P<0.05$。

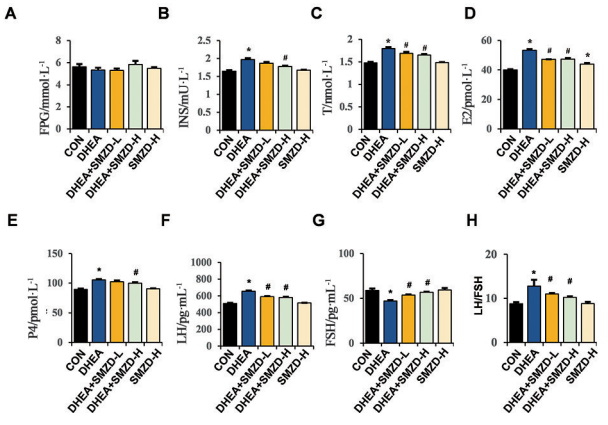
A. Ovarian HE staining; B. Mean numbers of primordial follicles, primary follicles, secondary follicles, cystic follicles, atretic cyst-like follicles, and corpora lutea

Fig.2 SMDZ ameliorates abnormal follicular development in PCOS($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

Note: Compared with control group, $^{*}P<0.05$; Compared with PCOS model group, $^{\#}P<0.05$.

3.3 SMDZ 纠正 PCOS 小鼠激素水平异常 DHEA 处理的小鼠血清胰岛素(INS)($P<0.05$,见图 3B)、睾酮(T)($P<0.05$,见图 3C)、雌二醇(E2)($P<0.05$,见图 3D)、孕酮(P4)($P<0.05$,见图 3E)、促黄体生成素(LH)($P<0.05$,见图 3F)增加。血清促卵泡素(FSH)水平降低($P<0.05$,见图 3G)。DHEA 处理小鼠的 LH 与 FSH 之比升高($P<0.05$,见图 3H)。高剂量 SMDZ 治疗后小鼠血清胰岛素

(INS)(P<0.05)、睾酮(T)、雌二醇(E2)、孕酮(P4)降低,血清促卵泡素(FSH)水平升高(P<0.05),血清促黄体生成素(LH)水平降低,导致 LH/FSH 比值降低(P<0.05)。结果表明,DHEA 诱导的小鼠 PCOS 模型中,下丘脑-垂体-卵巢轴的激素均处于紊乱状态,SMDZ 能够有效改善 PCOS 小鼠激素水平异常。



A.空腹血糖;B.胰岛素;C~G.血清睾酮、雌二醇、孕酮、促黄体生成素、促卵泡激素;H.促黄体生成素与促卵泡激素比值

图 3 SMDZ 纠正 PCOS 激素水平异常($\bar{x}\pm s$,n=10)

注:与正常对照组相比,$^{*}P$<0.05;与 PCOS 模型组对比,$^{\#}P$<0.05。

A. Fasting blood glucose; B. Insulin; C ~ G. Serum testosterone, estradiol, progesterone, luteinizing hormone, follicle - stimulating hormone; H. Ratio of luteinizing hormone to follicle-stimulating hormone

Fig.3 SMDZ ameliorates abnormal hormone levels in PCOS($\bar{x}\pm s$,n=10)

Note: Compared with control group, $^{*}P$<0.05; Compared with PCOS model group, $^{\#}P$<0.05.

3.4 网络药理学分析 SMDZ 治疗 PCOS 作用靶点

在 SMDZ 中筛选出发挥药理作用的 138 种活性成分,共得到 374 个靶点。检索并筛选出 2 506 个 PCOS 靶点。对 SMDZ 作用靶点和 PCOS 靶点取交集,获得 136 个重叠靶点,将 136 个 SMDZ 治疗 PCOS 的靶点输入 STRING 数据库中进行分析,以获得蛋白互相作用的数据导入 Cytoscape 软件制为 PPI 网络图。其中,节点代表不同的靶点,连线代表它们之间的相互作用。剔除游离靶点,在图 4B 中有 135 个节点,1 137 条边。使用 DAVID 数据库(http://davidbioinformatics.nih.gov)对 136 个潜在靶基因进行 GO 和 KEGG 分析。KEGG 富集结果(见图 4C)的前 20 通过 P<0.05 进行筛选,相关通路主要包括 p53 信号通路等。GO 分析的生物学过程(BP),细胞组成(CC),分子功能(MF)的前 20 通过 P<0.05 进行筛选,如图 4D 所示,生物过程主要包括 MAPK 级联的正调控、凋亡过程的负调控和细胞增殖的正调控。细胞组成包括质膜、大分子复合物和细胞质。分子功能包括蛋白激酶活性、酶结合和蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性。GO 和 KEGG 中与 PCOS 颗粒细胞凋亡相关通路中包含的基因是我们选择重点关注的基因。我们将其挑选出进行分析选取排名前 10 的基因,它们可能是 SMDZ 治疗 PCOS 的关键靶点(见图 4E)。找到关键靶点对应的化合物,绘制药物-成分-关键靶点网络图(见图 4F)。

3.5 SMDZ 靶点验证

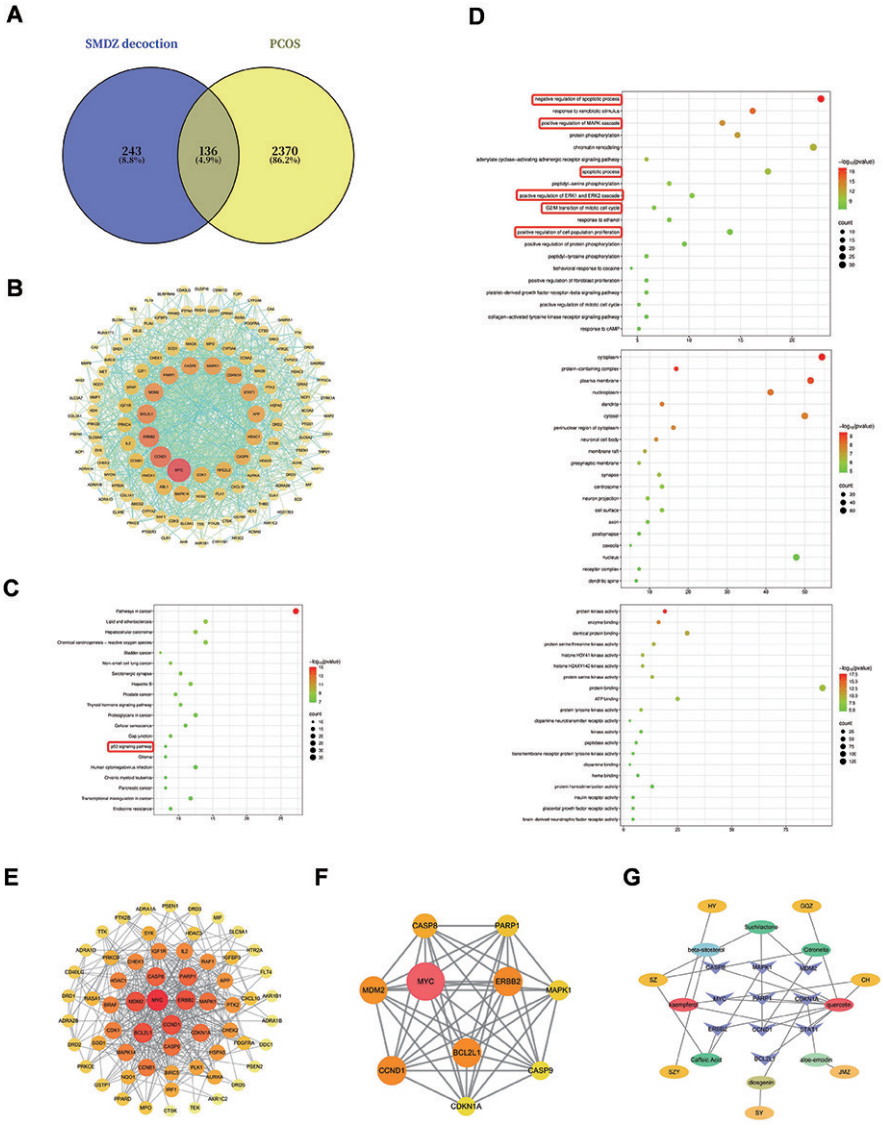
如图 5 所示,我们采用双氢睾酮(DHT)处理颗粒细胞系 KGN,模拟 PCOS 中颗粒细胞内环境。经过不同浓度含药血清治疗,发现 4%含药血清可以对抗 DHT 诱导的 KGN 细胞死亡(P<0.01,见图 5A)。为了检测 SMDZ 是否通过 p53 信号通路改善 PCOS。我们检测了 GO、KEGG 颗粒细胞凋亡相关包含基因 TOP10 中 p53 信号通路包含的靶点。与正常对照组相比,PCOS 组 KGN 细胞 MDM2、CCND1、BCL2L1 蛋白表达降低(P<0.05),CASP8、CASP9、CDKN1A 蛋白表达升高(P<0.05);与模型组相比,4% 含药血清组明显增强 MDM2、CCND1、BCL2L1 蛋白表达,抑制 CASP8、CASP9、CDKN1A 蛋白表达(P<0.05,见图 5B)。由此绘制 SMDZ 治疗 PCOS 的机制图(见图 6)。

3.6 SMDZ 治疗 PCOS 靶点的分子对接

SMDZ 中核心靶点 MDM2、CCND1、CDKN1A、CASP8、CASP9、BCL2L1 对应的核心有效成分主要包括芦荟大黄素、β-谷甾醇、香茅醛、薯蓣皂苷元、槲皮素、苏齐内酯等。核心靶点与有效成分之间的结合能大多低于-5 kcal·mol^{-1}(见图 7),表明核心靶点与化合物之间具有较强的结合力。部分结果可视化展示如图 8。

4 讨论

多囊卵巢综合征(PCOS)归属中医“不孕”“月经后期”范畴,核心病机为肝肾阴虚、水不涵木、肝郁气滞,兼夹痰浊瘀阻。肾阴亏虚则冲任失养、经血乏源;肝失濡养、疏泄失常则胞宫藏泻失司,发为月经紊乱、排卵障碍[19-20];肝肾失调则脾失健运、痰浊脂浊内生,与本病以胰岛素抵抗为核心的代谢紊乱高度契合[21-22],最终累及心-肝肾-胞宫轴,与患者生殖障碍、代谢异常、情志失调的临床特征完全相符[19-20]。水木涤浊饮以“滋水涵木、肝肾同调”为治则,由《医宗己任编·四明心法》滋肾清肝饮化裁而来,配伍紧扣 PCOS 核心病机。方中枸杞子、决明子为君,滋肾清肝,直击“水不涵木”病本;臣以山药益肾健脾,兼顾先后天之本;佐以山萸肉、茯苓、泽泻等固摄精血、化浊降脂,兼顾痰浊瘀阻之标;使以柴胡疏肝引经。全方补肝肾、疏肝郁、涤痰浊,标本兼顾,与 PCOS 核心病机高度契合,为本方治疗 PCOS 奠定了中医理论基础。



A.SMDZ 治疗 PCOS 靶点 Venn 图;B.SMDZ 治疗 PCOS 靶点 PPI 网络;C～D.KEGG 和 GO 富集分析;E.通路靶点 PPI 网络;F.核心靶点 PPI 网络;G.药物-化合物-核心靶点网络图

图 4　网络药理学分析 SMDZ 治疗 PCOS 作用靶点

A.Venn diagram of targets of SMDZ in the treatment of PCOS;B.PPI network of targets of SMDZ in the treatment of PCOS;C～D.KEGG and GO enrichment analysis;E.PPI network of pathway targets;F.PPI network of core targets;G.Drug-compound-core target network diagram

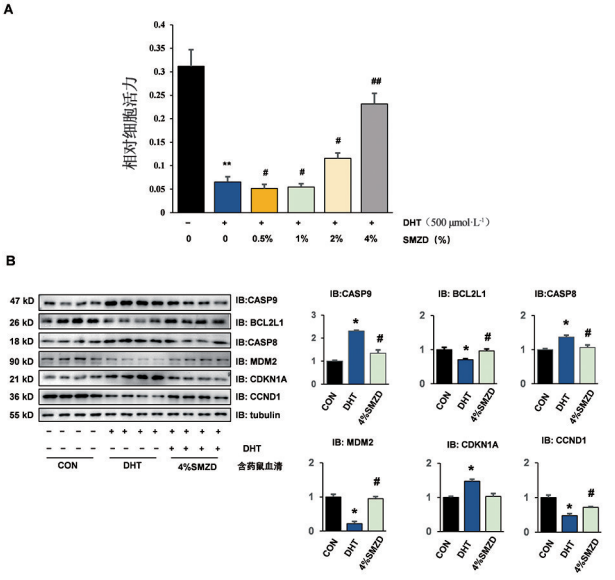
Fig.4　Network pharmacology analysis of the action targets of SMDZ in the treatment of PCOS

经过网络药理学分析,我们确定了 SMDZ 的 138 种可能的活性成分。相关靶点的 GO 分析结果表明,SMDZ 调节 ERK1 和 ERK2 级联、有丝分裂细胞周期的 G_2/M 转变、细胞增殖、细胞凋亡过程、MAPK 级联。KEGG 分析表明,SMDZ 调控 p53 信号通路。这些通路均与细胞生存相关,颗粒细胞凋亡引发的卵泡异常发育是 PCOS 主要的病理机制[23-24],据此推测,SMDZ 主要的靶点在于卵巢颗粒细胞。我们研究结果证实 SMDZ 通过上调 MDM2、CCND1、BCL2L1 和下调 CASP8、CASP9、CDKN1A 逆转颗粒细胞凋亡,改善 PCOS。

p53 通路通过增强颗粒细胞的凋亡加剧 PCOS 的发生发展[25]。MDM2 作为 p53 的 E3 泛素连接酶,诱导 p53 泛素化加速其降解[26]。BCL2L1 是 Bcl-2 家族的抗凋亡成员,活化的 p53 通过其 DNA 结合结构域与线粒体上 BCL2L1 的 BH4 结构域直接结合,抑制 Bcl-xL 的抗凋亡作用,释放并激活促凋亡蛋白 BAX/BAK,导致线粒体外膜通透化,促进凋亡[27]。BCL2L1 在 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞中常表现为被抑制[28];CDKN1A 是 p53 下游靶基因,介导细胞周期阻滞[29],CCND1 是细胞从 G_1 期向 S 期转换的关键[30]。

对血清激素水平的检测发现,SMDZ 可降低

PCOS 小鼠中异常升高的胰岛素水平,说明 SMDZ 可改善胰岛素抵抗。后者是 PCOS 发生的重要诱因[31]。E2 是卵巢颗粒细胞以睾酮为原料合成的,它的异常升高可能是 DHEA 过度供给的结果。DHEA 作为雄激素前体直接激活卵巢类固醇合成通路,CYP11A1、3β-HSD 和 StAR 等类固醇生成酶的高表达促进 P4 合成[32]。E2 作为下丘脑 GPR54-Kisspeptin 系统具有正负反馈的调控作用,E2 水平异常直接扰乱下丘脑及其下游垂体功能,这解释了由垂体分泌的 LH、FSH 水平异常[33]。



A.SMDZ 纠正 PCOS 的药物浓度;B.Western blotting 法检测核心靶点蛋白表达

图 5　SMDZ 靶点验证

注:与正常对照组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$。

A. Drug concentration of SMDZ for correcting PCOS; B. Detection of core target protein expression by Western blotting

Fig.5　Validation of SMDZ targets

Note: Compared with control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; Compared with model group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

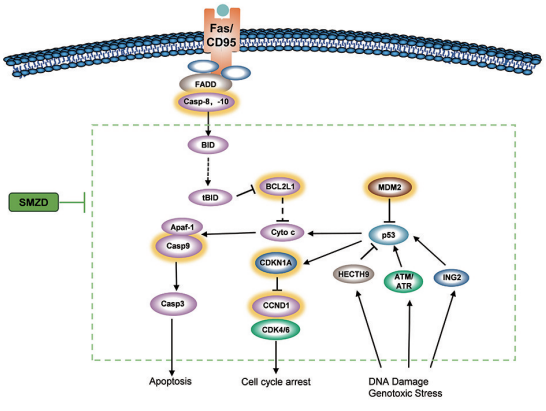


图 6　SMDZ 治疗 PCOS 的机制

Fig.6　Mechanism of SMDZ in the treatment of PCOS

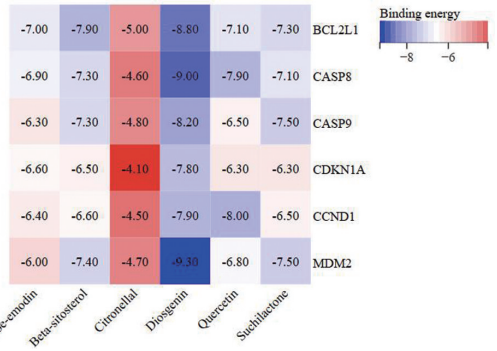
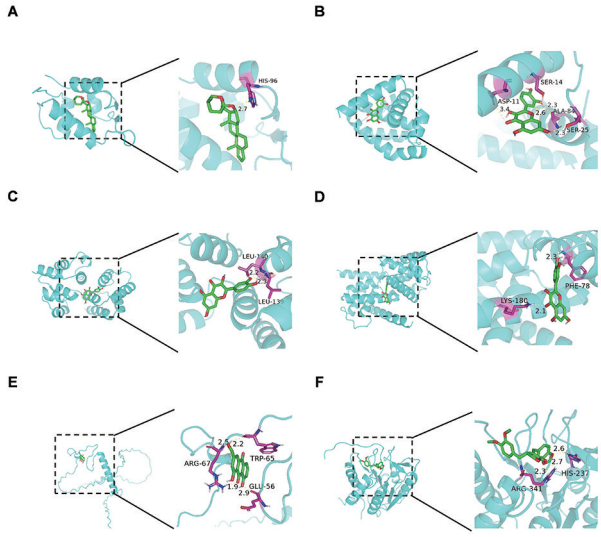


图 7　活性成分与核心靶点分子对接结果热图(kcal·mol^{-1})

Fig.7　Heatmap of molecular docking results between active components and core targets(kcal·mol^{-1})



A. MDM2-Diosgenin; B. BCL2L1-Quercetin; C. CASP8-Quercetin; D. CCND1-Quercetin; E. CDKN1A-Aloe-emodin; F. CASP9-Suchilactone

图 8　SMDZ 核心成分与核心靶点的分子对接示意图

A. MDM2-Diosgenin; B. BCL2L1-Quercetin; C. CASP8-Quercetin; D. CCND1-Quercetin; E. CDKN1A-Aloe-emodin; F. CASP9-Suchilactone

Fig.8　Schematic diagram of molecular docking between core components of SMDZ and core targets

综上所述,SMDZ 对 PCOS 具有明确的治疗效果,通过网络药理学、分子对接等方法进行靶标预测和作用通路分析,并进一步实验确证了核心靶点,为阐明 SMDZ 改善 PCOS 的具体机制提供了理论基础。

参考文献:

[1] Ndefo U A, Eaton A, Green M R. Polycystic ovary syndrome: a review of treatment options with a focus on pharmacological approaches[J]. P T, 2013, 38(6): 336-355.

[2] Teede H J, Tay C T, Laven J J E, et al. Recommendations from the 2023 international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2023, 108(10): 2447-2469.

[3] Huddleston H G, Dokras A. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome[J]. JAMA, 2022, 327(3): 274-275.

[4] Barber T M,Franks S.Obesity and polycystic ovary syndrome[J].Clin Endocrinol(Oxf),2021,95(4):531-541.
[5] 沈文娟,金宝,李浦媛,等.中医药治疗多囊卵巢综合征高雄激素血症研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(4):694-697.
[6] 周绵莉,喻小兰,毛惠.二仙汤对卵巢早衰模型大鼠血清炎性因子、相关生长因子及性激素水平的影响[J].中华中医药学刊,2021,39(9):240-243.
[7] Zhou X,Ma Q,Yan Z,et al.Efficacy and safety of Chinese patent medicine Xiao Yao San in polycystic ovary syndrome:A systematic review and meta-analysis[J].J Ethnopharmacol,2023(313):116517.
[8] 董玉洁,蒋沅岐,刘毅,等.决明子的化学成分、药理作用及质量标志物预测分析[J].中草药,2021,52(9):2719-2732.
[9] Zheng H,Liang X,Zhou H,et al.Integrated gut microbiota and fecal metabolome analyses of the effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on D-galactose-induced premature ovarian insufficiency[J].Food Funct,2023,14(15):7209-7221.
[10] 冯恩敏,杨正望,林安盈,等.杨秉秀运用"角药"治疗多囊卵巢综合征经验[J].时珍国医国药,2021,32(4):975-977.
[11] Yang F,Dong X,Yin X,et al.*Radix Bupleuri*:A review of traditional uses,botany,phytochemistry,pharmacology,and toxicology[J].Biomed Res Int,2017(2017):7597596.
[12] Goldman J M,Murr A S,Cooper R L.The rodent estrous cycle:characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies[J].Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol,2007,80(2):84-97.
[13] Brown C,LaRocca J,Pietruska J,et al.Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKB alpha/Akt1[J].Biol Reprod,2010,82(2):246-256.
[14] Myers M,Britt K L,Wreford N G,et al.Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary[J].Reproduction,2004,127(5):569-580.
[15] Caldwell A S,Middleton L J,Jimenez M,et al.Characterization of reproductive,metabolic,and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models[J].Endocrinology,2014,155(8):3146-3159.
[16] 何珊珊,马思琪,赵锡曼,等.基于网络药理学和动物实验探讨四君子颗粒联合阿司匹林对多囊卵巢综合征大鼠炎症的影响[J].中成药,2025,47(10):3451-3458.
[17] Zheng X,Chen Z,Liang M,et al.Targeting UGT2B15 and NR1H4 interaction:a novel therapeutic strategy for polycystic ovary syndrome using naftopidil enantiomers[J].J Ovarian Res,2025,18(1):13.
[18] Liu Y,Zhang S,Chen L,et al.The molecular mechanism of miR-96-5p in the pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome[J].Transl Res,2022(256):1-13.
[19] Stener-Victorin E,Teede H,Norman R J,et al.Polycystic ovary syndrome[J].Nat Rev Dis Primers,2024,10(1):27.
[20] Dong J,Rees D A.Polycystic ovary syndrome:pathophysiology and therapeutic opportunities[J].BMJ Med,2023,2(1):e000548.
[21] Zhang Y,Chen Z J,Zhao H.Polycystic ovary syndrome:A metabolic disorder with therapeutic opportunities[J].Cell Metab,2025,37(10):1932-1949.
[22] Helvaci N,Yildiz B O.Polycystic ovary syndrome as a metabolic disease[J].Nat Rev Endocrinol,2025,21(4):230-244.
[23] Li T,Zhang T,Gao H,et al.Tempol ameliorates polycystic ovary syndrome through attenuating intestinal oxidative stress and modulating of gut microbiota composition-serum metabolites interaction[J].Redox Biol,2021(41):101886.
[24] Manabe N,Matsuda-Minehata F,Goto Y,et al.Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries[J].Reprod Domest Anim,2008,43(Suppl 2):268-272.
[25] Zanjirband M,Hodayi R,Safaeinejad Z,et al.Evaluation of the p53 pathway in polycystic ovarian syndrome pathogenesis and apoptosis enhancement in human granulosa cells through transcriptome data analysis[J].Sci Rep,2023,13(1):11648.
[26] Yang J,Jin A,Han J,et al.MDMX recruits UbcH5c to facilitate MDM2 E3 ligase activity and subsequent p53 degradation in vivo[J].Cancer Res,2021,81(4):898-909.
[27] Fuster J J,Sanz-González S M,Moll U M,et al.Classic and novel roles of p53:prospects for anticancer therapy[J].Trends Mol Med,2007,13(5):192-199.
[28] Ding Y,Jiang Z,Xia B,et al.Mitochondria-targeted antioxidant therapy for an animal model of PCOS-IR[J].Int J Mol Med,2019,43(1):316-324.
[29] Engeland K.Cell cycle regulation:p53-p21-RB signaling[J].Cell Death Differ,2022,29(5):946-960.
[30] Guardavaccaro D,Corrente G,Covone F,et al.Arrest of G_1-S progression by the p53-inducible gene *PC3* is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription[J].Mol Cell Biol,2000,20(5):1797-1815.
[31] Zhao H,Zhang J,Cheng X,et al.Insulin resistance in polycystic ovary syndrome across various tissues:an updated review of pathogenesis,evaluation,and treatment[J].J Ovarian Res,2023,16(1):9.
[32] Kyei G,Sobhani A,Nekonam S,et al.Assessing the effect of $MitoQ_{10}$ and Vitamin D3 on ovarian oxidative stress,steroidogenesis and histomorphology in DHEA induced PCOS mouse model[J].Heliyon,2020,6(7):e04279.
[33] Hu Q,Jin J,Zhou H,et al.Crocetin attenuates DHT-induced polycystic ovary syndrome in mice via revising kisspeptin neurons[J].Biomed Pharmacother,2018(107):1363-1369.

(收稿日期:2026-02-26)