基于网络药理学及动物实验探讨补肾活血方治疗多囊卵巢综合征的作用机制

蒋晓梅，　李贺月，　益敏辉，　唐　虹，　郝小白，　华　宇，　李林霞*
（上海中医药大学附属第七人民医院妇产科，上海 200137）

摘要：目的　基于网络药理学及动物实验探讨补肾活血方治疗多囊卵巢综合征（PCOS）的作用机制。**方法**　通过 TCMSP、GeneCards、OMIM、CTD 数据库获取疾病靶点，构建 PPI 网络、“药材-成分-靶点”网络，对关键靶点进行 GO、KEGG 分析，并对关键活性成分与靶点进行分子对接。通过动物实验验证补肾活血方对多囊卵巢综合征的作用靶点。**结果**　网络药理学表明，补肾活血方的关键成分为槲皮素、山柰酚、谷甾醇、异补骨脂查耳酮、阿魏酸，治疗多囊卵巢综合征的关键靶点为 EGFR、SRC、JUN，主要通过 PI3K/Akt、MAPK、Rap1、Ras、Ca^{2+}等信号通路发挥作用。动物实验表明，与模型组比较，补肾活血方能降低胰岛素水平，增加各级卵泡数和黄体数，降低 LH、T 水平，升高 E_2、FSH 水平，改善卵巢组织病理形态，颗粒细胞层数变多且规则排列，升高卵巢组织 PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达。**结论**　补肾活血方具有多成分、多靶点、多途径特性，可能通过 PI3K/Akt 信号通路改善胰岛素抵抗治疗多囊卵巢综合征。

关键词：补肾活血方；多囊卵巢综合征；胰岛素抵抗；PI3K/Akt 信号通路；网络药理学；动物实验
中图分类号：R285.5；R966　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1001-1528(2024)07-2415-08
doi：10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.049

多囊卵巢综合征（polyeystic ovary syndrome，PCOS）是一种复杂的代谢紊乱性疾病，表现为月经周期紊乱、排卵障碍、高雄激素等，引起女性不孕[1]，甚至严重影响患者的生活质量[2]，导致心血管疾病、2 型糖尿病、子宫内膜癌等疾病发生率升高[3]。近年来，PCOS 发病率高升，流行病学调查显示我国为 5%～10%[4]，目前本病尚无有效治愈方案，临床治疗以对症及健康管理为主[5]。胰岛素抵抗是该病的一个重要影响因素，患者机体雄激素水平增高会阻碍卵泡中颗粒细胞的增殖，导致卵泡发育受阻，影响排卵，并可影响卵母细胞质量，使受精率下降，亦有可能影响子宫内膜的微环境，影响妊娠进程，发生着床后早期自然流产风险、妊娠期相关并发症多于正常女性[6]。

网络药理学凭借“成分-靶点-通路-疾病”网络系统，探索药物治疗疾病的潜在作用机理[7]。本研究通过预测补肾活血方活性成分，挖掘疾病相关靶蛋白，构建活性成分-PCOS 靶标-KEGG 通路网络关系图，并对预测靶点进行动物实验验证，为后续临床研究该方治疗多囊卵巢综合征提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　网络药理学分析

1.1.1　活性成分筛选　通过 TCMSP 数据库检索补肾活血方活性成分，以口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、药物相似性（drug likeness，DL）≥0.18 为条件结合相关文献，筛选出活性成分较高的化合物，获得其作用靶蛋白。

1.1.2　PCOS 靶点筛选　通过 GeneCards（https：//www.genecards.org/）、OMIM（https：//omim.org/）、CTD（http：//ctdbase.org/）数据库，以关键词“polycystic ovary syndrome”检索疾病相关基因，将预测靶基因合并后作为疾病相关基因数据。

1.1.3　PPI 网络构建　将共同靶点数据集导入 Cytoscape 软件，使用 BisoGenet 插件构建 PPI 网络，寻找蛋白-蛋白互作关系，筛选得到关键靶点。

1.1.4　“药材-成分-靶点”网络构建及可视化分析　运用 Cytoscape 软件构建“药材-成分-靶点”网络并进行可视化分析，网络中各节点代表活性成分和关键靶点基因，边连接着活性成分与关键靶点基因。

1.1.5　GO、KEGG 富集分析　采用 Rx64 4.0.3 软件对关键靶点进行 GO、KEGG 分析，分别绘制排名前 10 位的 GO 功能及前 30 位的 KEGG 通路气泡图，Cytoscape 3.7.0 软件

收稿日期：2024-01-24
基金项目：上海市卫生健康委科研项目（202140279）；上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划（PWRq2022-49）；上海中医药大学附属第七人民医院“名中医继承人”人才培养计划（JCR2022-02）
作者简介：蒋晓梅（1989—），女，硕士，主治医师，从事中医妇科研究。Tel：（021）58670561—6326，E-mail：jiangxiaomei90@126.com
*　**通信作者：**李林霞（1970—），女，主任医师，硕士生导师，从事妇产科研究。Tel：15316954076，E-mail：243286825@qq.com

构建靶点-通路网络。

1.1.6　分子对接　在 RCSB（https：//www1. rcsb. org/）下载靶点 EGFR（6DUK）、SRC（4U5J）、JUN（4IZY）、STAT3（6NUQ）、ESR1（1A52）结构。通过 Discovery Studio 软件进行受体预处理（如去除水分子、金属离子等），Libdock 模块进行对接，再选取最优构象进行分子对接，并进行可视化分析。

1.2　动物实验

1.2.1　动物　雌性 SD 大鼠 48 只，6 周龄，体质量 180～220 g，由上海睿太莫斯生物科技有限公司提供［实验动物生产许可证号 SYXK（沪）2021-0007］，饲养环境为温度（25±4）℃，相对湿度 60%～70%，自由摄食饮水，适应性喂养 1 周后开始实验。研究经实验动物伦理委员会审批［伦理号 202210（11）］。

1.2.2　补肾活血方制备　组方药材（熟地黄 15 g、黄芪 15 g、女贞子 6 g、麦冬 6 g、白芍 6 g、党参 9 g、香附 9 g、菟丝子 6 g、当归 9 g、补骨脂 9 g、丹参 9 g、甘草 3 g）均购自上海中医药大学第七人民医院中药房，常规煎煮后浓缩至 4 g/mL，消毒灭菌，4 ℃保存。按人临床所用剂量与大鼠给药剂量进行换算，确定为 10.71 g/kg[8]。

1.2.3　试剂　大鼠胰岛素（INS）ELISA 试剂盒（上海信裕生物科技有限公司，批号 XY-96871）；大鼠雌二醇（E_2）、促黄体生成激素（LH）、促卵泡激素（FSH）、睾酮（T）ELISA 试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号 E-OSEL-R0001、E-EL-R0026c、E-EL-R0391c、EOSEL-R0003）。二甲双胍（北京索莱宝科技有限公司，批号 D9351）。GAPDH 抗体、PI3K 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，批号 60009-1-AP、20584-1-AP）；羊抗兔 HRP 标记二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司，AB-2301）；p-Akt 抗体、Akt 抗体（美国 CST 公司，批号 4060、9272）。

1.2.4　模型建立　将大鼠随机分为正常组、模型组、二甲双胍组及补肾活血方低、中、高剂量组，每组 8 只，除正常组外其余各组建立多囊卵巢综合征胰岛素抵抗（PCOS-IR）模型[9]。大鼠颈背部皮下注射溶于芝麻油的脱氢表雄酮（DHEA）溶液 0.2 mL（0.6 mg/kg），正常组大鼠颈背部皮下注射注射用芝麻油 0.2 mL，连续20 d，通过亚甲蓝染色观察阴道脱落细胞学变化，若卵巢表面苍白，包膜增厚明显，体积增大，光镜下可见较多闭锁卵泡，囊泡扩张增加，颗粒细胞层减少，黄体数量减少，说明造模成功。

1.2.5　给药　补肾活血方低、中、高剂量组分别灌胃给予 1.071、2.142、4.284 g/mL 药液，二甲双胍组灌胃给予 100 mg/kg 二甲双胍，模型组和正常组灌胃给予生理盐水，每天 1 次，连续 30 d。末次给药后大鼠禁食 12 h，检测空腹血糖水平。

1.2.6　取材　大鼠麻醉后腹主动脉取血，4 ℃、4 000 r/min离心 15 min，取上清，血清于−80 ℃保存。再处死大鼠，摘取双侧卵巢，右侧固定于 4% 多聚甲醛，左侧于−80 ℃保存。

1.2.7　FINS、性激素水平检测　取于−80 ℃保存的大鼠血清，严格按照试剂盒说明书检测 LH、T、FSH、E_2、FINS 水平。

1.2.8　卵巢组织病理学观察　大鼠卵巢组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后石蜡包埋，制备病理切片，行常规 HE 染色，于显微镜下观察病理变化及卵泡发育情况，并统计原始卵泡数、初级卵泡数、次级卵泡数、成熟卵泡数。

1.2.9　Western blot 法检测大鼠卵巢组织 Akt、PI3K 蛋白表达　取适量大鼠卵巢组织，加入 RIPA 裂解液提取总蛋白，采用 BCA 法进行蛋白定量，加入蛋白上样缓冲液后水浴加热 5 min 进行变性。各组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，湿法转膜，封闭后加入 Akt、p-Akt、PI3K、GAPDH 一抗，4 ℃孵育过夜，次日洗膜后加入羊抗小鼠 HRP 标记二抗孵育，洗膜后 ECL 发光液显影，曝光。通过 Image J 软件分析条带积分光密度，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白相对表达。

1.2.10　统计学分析　通过 SPSS 22.0 软件进行处理，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，而不符合正态分布的或方差不齐者采用非参数秩和检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　活性成分靶点及 PCOS 疾病靶点蛋白网络　筛选得到补肾活血方靶点 361 个，PCOS 相关靶点 4 924 个，两者交集靶点 150 个，见图 1。补肾活血方治疗 PCOS 的 PPI 网络中得到相关靶点 5 051 个，靶点之间的相互关系共有 178 635 条。以介数中心度（betweenness centrality）≥0.04、接近中心度（closeness centrality）≥0.406 为条件，筛选得靶点 90 个，靶点之间相互关系 1 346 条，以 degree≥273 为条件，再筛选得靶点 30 个，靶点之间相互关系 113 条，见图 2。排名前十的关键靶点见图 3，为 EGFR、SRC、JUN 等。

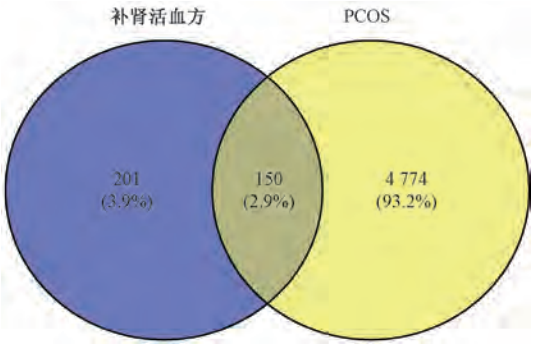


图 1　补肾活血方-PCOS 靶点交集韦恩图

2.2　“药材-成分-靶点”网络　通过查询数据库结合相关文献，共获得补肾活血方 74 种成分，Cytoscape 软件构建“药材-成分-靶点”可视化网络（图 4），发现关键成分为槲皮素、山柰酚、谷甾醇、异补骨脂查耳酮、阿魏酸等。

2.3　GO、KEGG 富集分析　GO 功能富集分析得到 1 764 条生物过程（BP），主要涉及脂质代谢过程的调控、肽基酪氨酸磷酸化等；90 个细胞组分（CC），主要涉及突触前

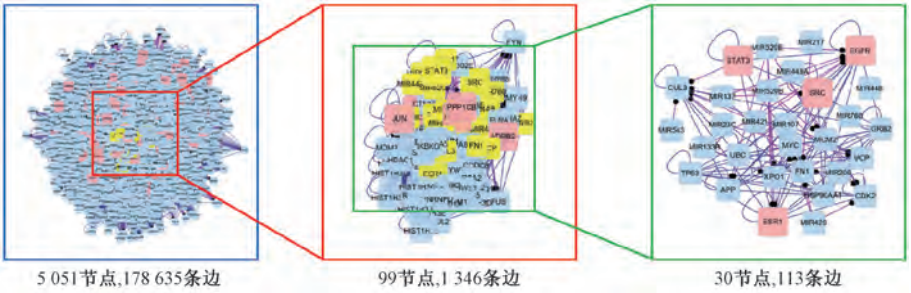


图 2　PPI 网络

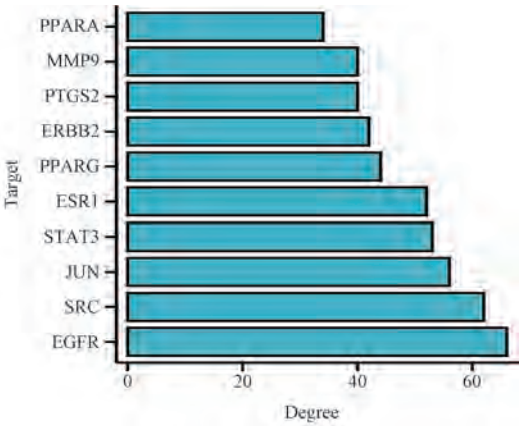


图 3　关键靶点（排名前十）

膜的组成部分、固有成分等；213 个分子功能（MF），主要涉及核受体活性、配体激活转录因子活性等，见图 5。KEGG 通路富集分析共得到 108 条通路，主要有 PI3K-Akt、MAPK、Rap1、Ras、Ca^{2+} 等信号通路，此外与 PCOS 密切相关的通路还有脂质与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、雌激素信号通路、类固醇激素生物合成、卵巢类固醇生成等，见图 6。

将关键靶点与通路联合以构建“靶点-通路”网络，除“2.1”项下关键靶点外，IGF1R、ERBB2、INSR 等靶点在补肾活血方整合多靶点、多通路治疗 PCOS 中也起到重要作用，见图 7。

2.4　分子对接验证　槲皮素、谷甾醇与关键靶点的亲和力最好，其中谷甾醇与 EGFR、JUN、STAT3 的结合能力最

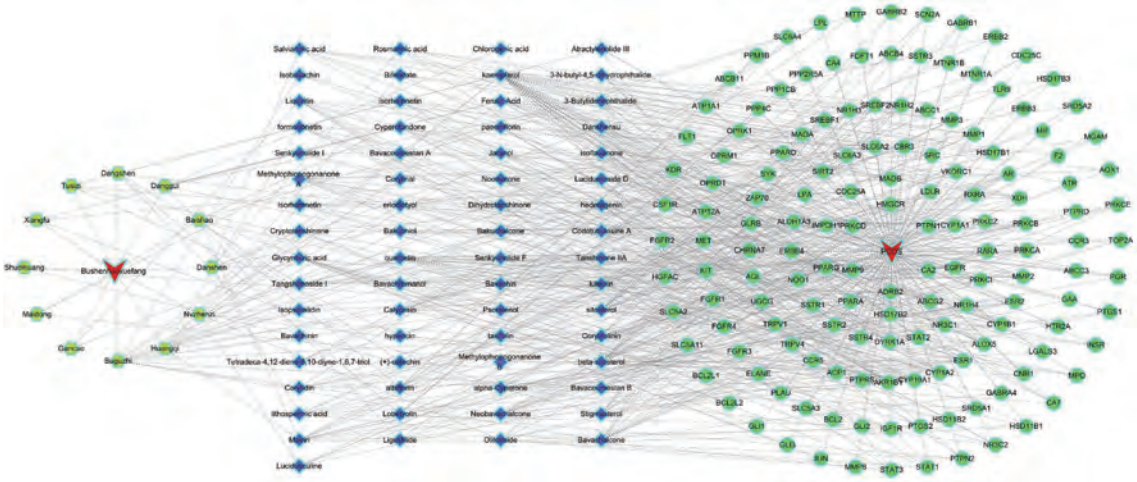


图 4　“药材-成分-靶点”网络

好，LibDock 分别为 123.614、105.134、70.333；槲皮素在 SRC、ESR1 靶标的疏水口袋中结合较好，LibDock 为 112.095、107.667，见图 8。对接可视化结果见图 9。

2.5　补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠空腹血糖、FINS 水平的影响　与正常组比较，模型组大鼠空腹血糖、FINS 水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，补肾活血方中、高剂量组和二甲双胍组大鼠 FINS 水平降低（$P<0.01$），补肾活血方中、高剂量组及二甲双胍组大鼠空腹血糖水平降低（$P<0.05$，$P<0.01$），见图 10。

2.6　补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠血清性激素水平的影响　与正常组比较，模型组大鼠 FSH、E_2 水平降低（$P<0.01$），LH、T 水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，补肾活血方中、高剂量组和二甲双胍组大鼠 FSH、E_2 水平（$P<0.01$），LH、T 水平降低（$P<0.01$），补肾活血方低剂量组 T 水平降低（$P<0.01$），见图 11。

2.7　补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠卵泡发育情况的影响　与正常组比较，模型组大鼠卵巢初级卵泡数、次级卵泡数、成熟卵泡数及黄体数减少；与模型组比较，各给药组各级卵泡数及黄体数增加，见图 12。

正常组大鼠卵巢组织可见黄体及不同发育阶段的卵泡，

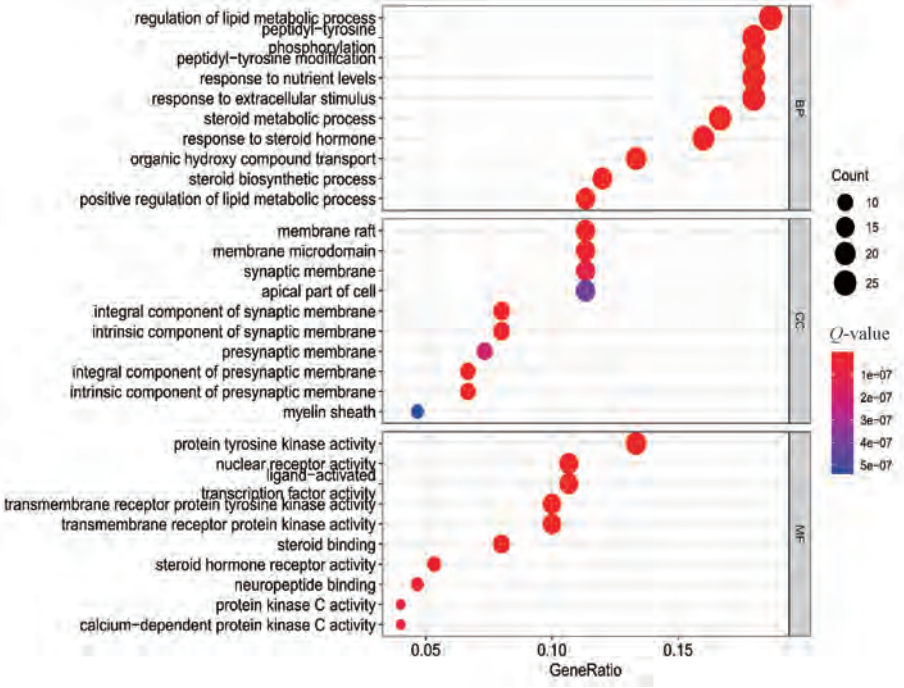


图 5　GO 富集分析

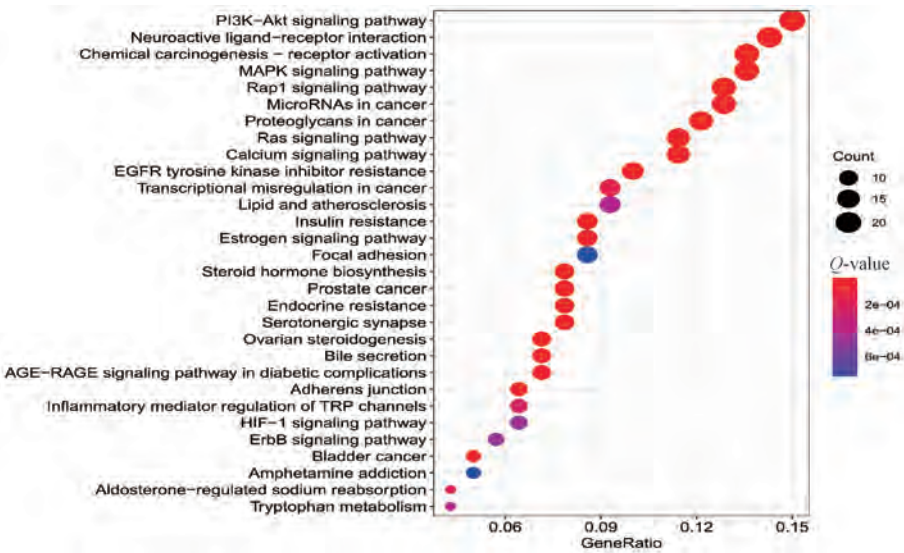


图 6　KEGG 富集分析

卵泡腔内可见卵丘及放射冠等结构，颗粒细胞形态完整、排列整齐，大多为 4~8 层；模型组大鼠卵巢组织皮质内少见各级发育期卵泡及黄体，卵泡多呈囊性扩张，卵泡内卵母细胞或放射冠消失，颗粒细胞仅有 1~2 层；补肾活血方各剂量组大鼠卵巢组织中可见各级卵泡及较多黄体，卵泡内颗粒细胞层数增加至 3~7 层；二甲双胍组大鼠卵巢组织可见各级卵泡及较多黄体，卵泡内颗粒细胞层数增加至 3~7 层，见图 13。

以上结果表明，补肾活血方能改善 PCOS-IR 大鼠卵巢组织病理形态，增加各级卵泡数及黄体数，促进卵泡发育。

2.8　*补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠卵巢组织 PI3K、Akt 蛋白表达的影响*　与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织 PI3K 蛋白表达、p-Akt/Akt 比值降低（$P<0.01$）；与模型组比较，补肾活血方中、高剂量组及二甲双胍组大鼠卵巢组织 PI3K 蛋白表达、p-Akt/Akt 比值升高（$P<0.01$），见图 14。以上结果表明，补肾活血方可能通过 PI3K/Akt 信号通路改善胰岛素抵抗治疗多囊卵巢综合征。

3　讨论

中医认为，多囊卵巢综合征（PCOS）属于“闭经”“不孕”“月经后期”范畴。目前，中医对 PCOS 的治疗越来越趋于系统化和成熟化，有着多靶点、多环节、多途径等优势，以补肾、健脾、清肝等为主，佐以燥湿除痰、活血化瘀调经等[8]。课题组前期发现，全国名老中医戴德英教授的临床经验方——补肾活血方对多囊卵巢综合征颇有

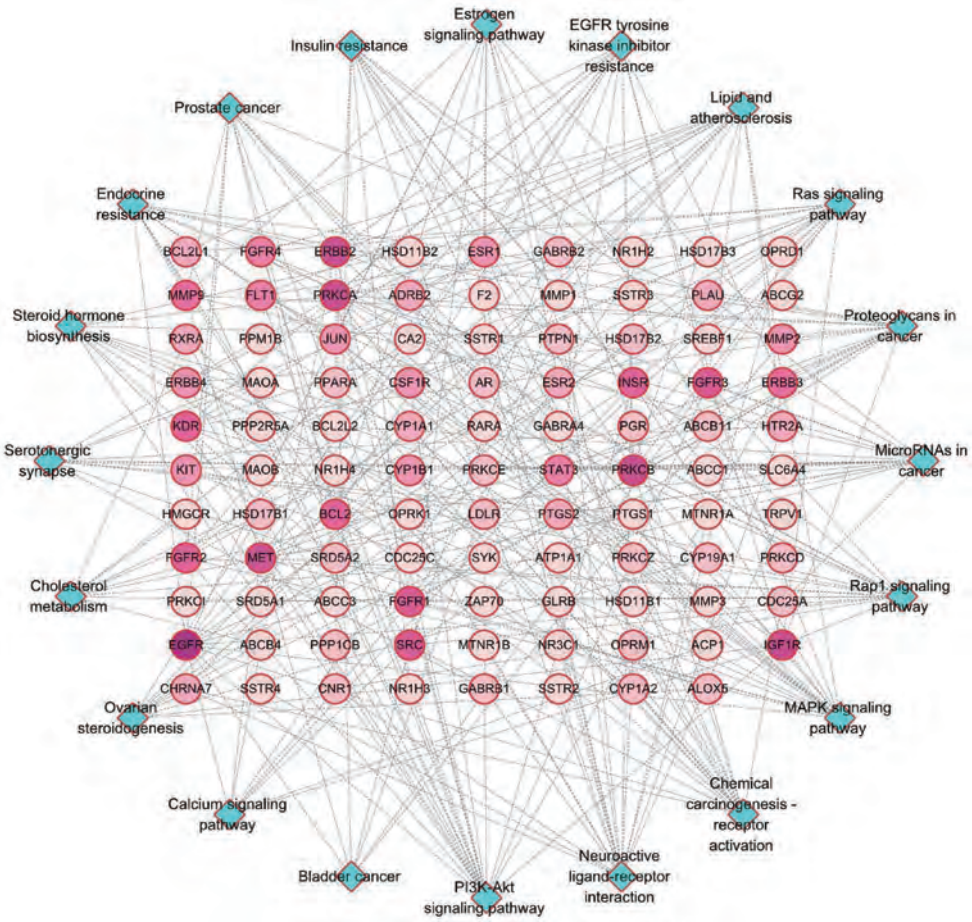


图 7　靶点-通路网络

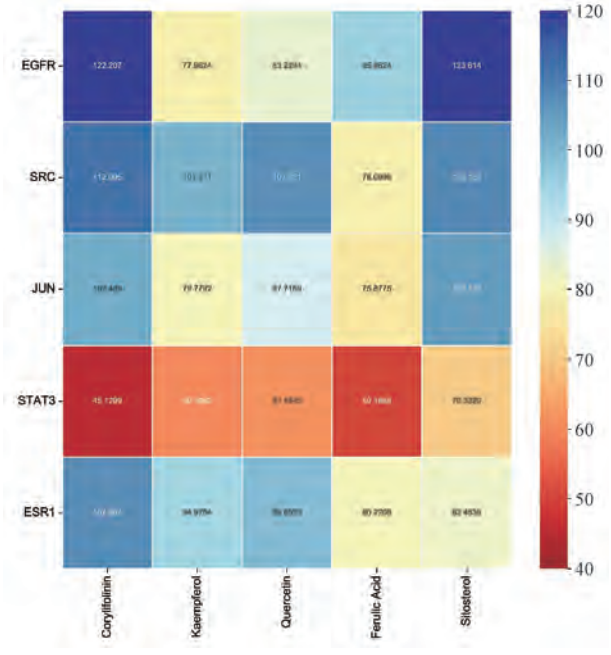
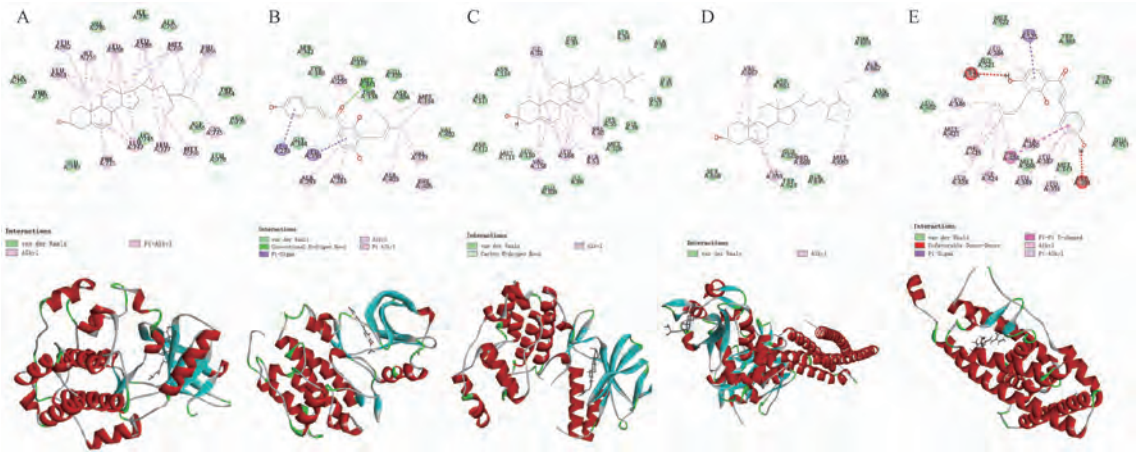


图 8　关键成分与靶点 Libdock Score 热图

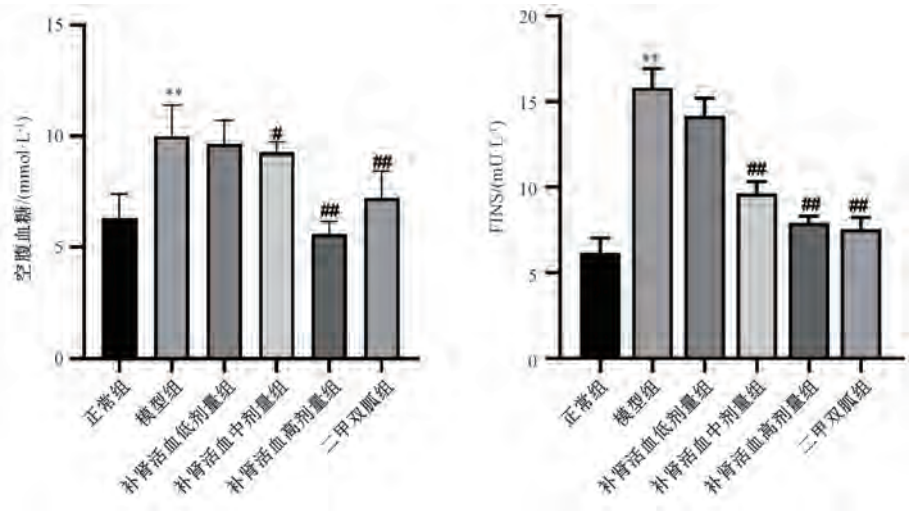
效果，补肾活血方中熟地黄、黄芪两者配伍为君，起补肾益气之效；党参、补骨脂、女贞子、菟丝子四药配伍为臣，增强补益肝肾之效；白芍、麦冬、香附、丹参、当归、共为佐药，补血活血使整个方中补而不腻；甘草为使，调和诸药，全方共奏补肾活血之效。

本研究借助网络药理学揭示补肾活血方治疗 PCOS 的作用机制，通过数据库挖掘筛选出 74 种活性成分，如槲皮素、山柰酚等，可能通过参与胰岛素抵抗、炎性微环境、雄激素水平等发挥治疗作用[9]，其中槲皮素在 PI3K-Akt 通路中扮演重要的角色[10]；山柰酚具有抗氧化、抗炎等作用，能促进葡萄糖代谢，抑制肝糖异生[11]。PI3K/Akt 信号通路是胰岛素抵抗发生的经典通路，其下游蛋白结构和功能改变，会引起细胞代谢异常、通路转导障碍，导致葡萄糖吸收障碍，最终致使 IR 发生[12]；PI3K 由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成，该基因表达异常会引起代谢紊乱[13]；Akt 是 PI3K 信号通路下游的重要靶蛋白，目前发现 Akt2 亚型主要调节机体内分泌降血糖[14]，当机体发生 IR 时，PI3K/Akt 信号通路被抑制，葡萄糖摄入减少，引起血糖升高[15]，进一步引起下丘脑-垂体-卵巢轴功能失衡，刺激过渡分泌 LH 和过量 T，干扰卵泡正常发育，卵泡闭锁，无法出现优势卵泡[16]，它不仅参与胰岛素代谢，还参与卵泡的生长发育，其异常会阻碍卵泡生长，引起 PCOS[17-18]。补肾活血方能调节内分泌激素水平，维持卵巢功能，促进卵泡发育，调节卵巢颗粒细胞数量，通过激活 PI3K/Akt 信号通路改善卵巢储备功能，可见该信号通路表达异常是引



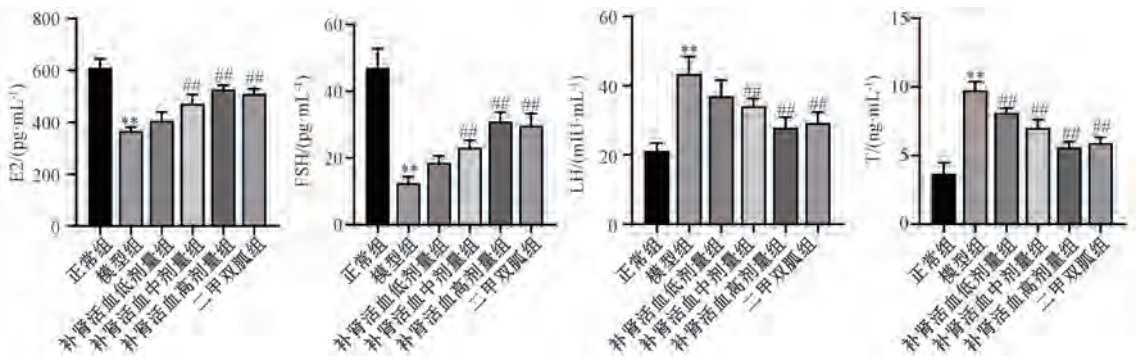
注：A 为 EGFR 与谷甾醇对接，B 为 SRC 与异补骨脂查耳酮对接，C 为 JUN 与谷甾醇对接，D 为 STAT3 与谷甾醇对接，E 为 ESR1 与异补骨脂查耳酮对接。

图 9　分子对接可视化图



注：与正常组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$。

图 10　补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠空腹血糖、FINS 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）



注：与正常组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，## $P<0.01$。

图 11　补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠血清性激素水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

起 IR 的重要机制之一，同时也影响着卵巢的正常功能[19]。祁珍珍[20]发现，补肾药配伍活血药可改善糖脂代谢水平，通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻 PCOS-IR。陶冲等[21]发现，补肾活血方各剂量组能提高 PCOS-IR 大鼠性激素水平，改善胰岛素抵抗，减轻糖代谢障碍，升高血清 FSH、E_2 水平，降低 LH、T、AMH 水平。

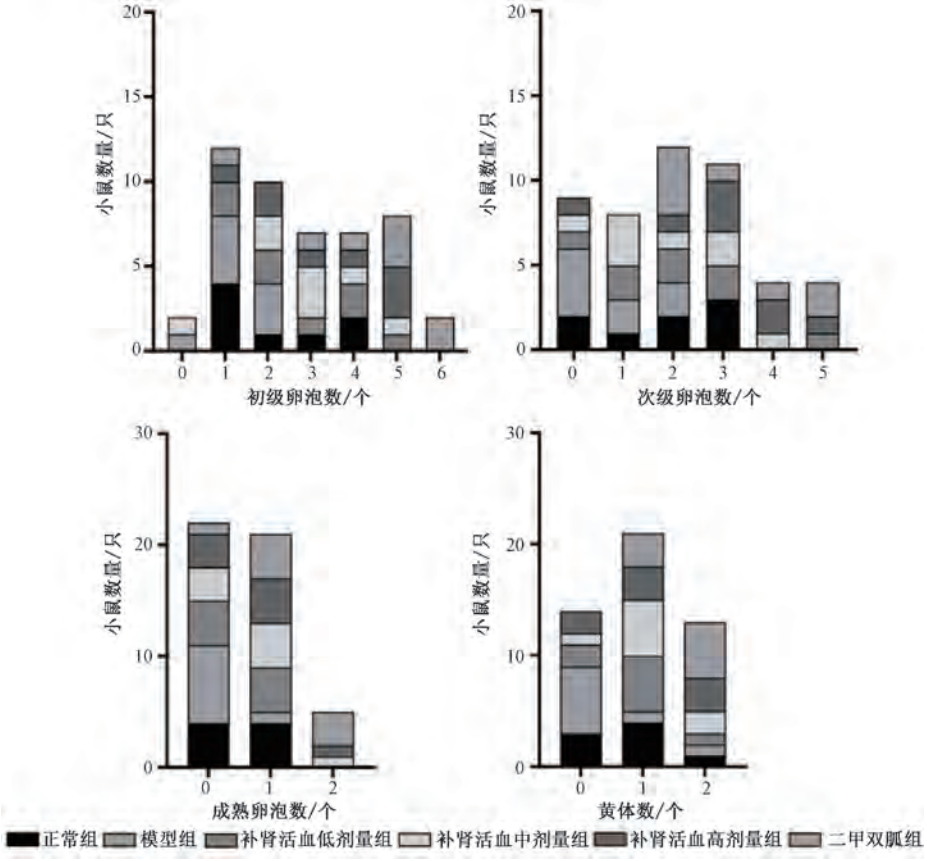


图 12　各组大鼠卵巢组织初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡、黄体个数（$n=8$）

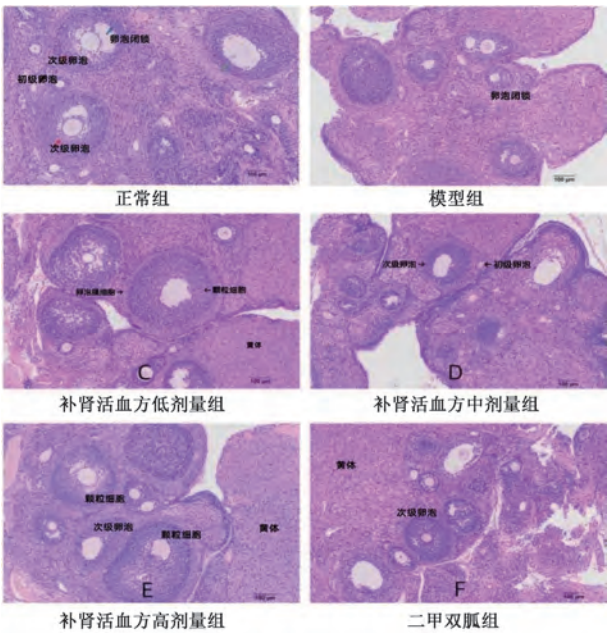
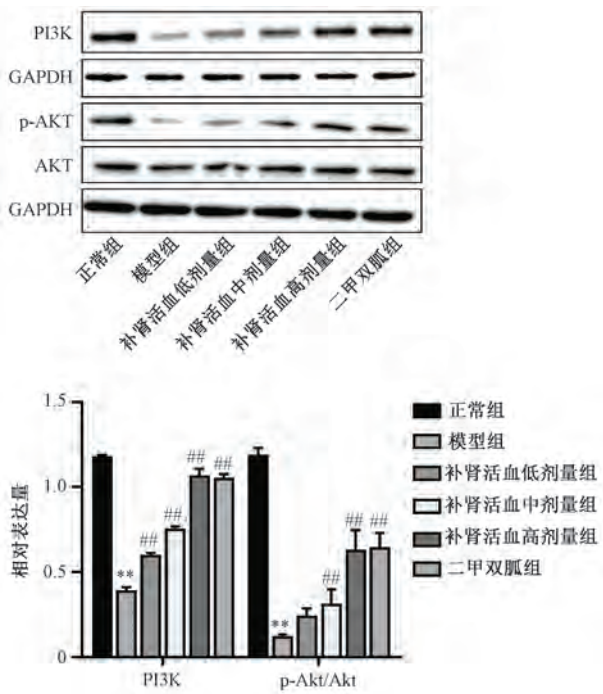


图 13　各组大鼠卵巢组织 HE 染色（×100）



注：与正常组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

图 14　补肾活血方对 PCOS-IR 大鼠卵巢组织 PI3K、Akt 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

综上所述，补肾活血方能改善 PCOS 大鼠多囊样卵巢病变，调节体内激素水平稳定内环境，促进卵泡发育，可能通过调节 PI3K/Akt 通路干预 PCOS-IR 大鼠糖代谢及生殖内分泌功能，且高剂量效果与二甲双胍相近。但尚未明确补肾活血方发挥作用的主要成分和靶点，同时其活性成分及具体机制仍需进一步研究。

参考文献：

[1] Sadeghi H M, Adeli I, Calina D, *et al*. Polycystic ovary syndrome: A comprehensive review of pathogenesis, management, and drug repurposing[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 583.

[2] Szczuko M, Kikut J, Szczuko U, *et al*. Nutrition strategy and life style in polycystic ovary syndrome-narrative review[J]. *Nutrients*, 2021, 13(7): 2452.

[3] Rodriguez-Paris D, Remlinger-Molenda A, Kurzawa R, *et al*. Psychiatric disorders in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Psychiatr Pol*, 2019, 53(4): 955-966.

[4] Shang Y, Zhou H, Hu M, *et al*. Effect of diet on insulin resistance in polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(10): dgaa425.

[5] Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters K A, *et al*. Animal models to understand the etiology and pathophysiology of polycystic ovary syndrome[J]. *Endocr Rev*, 2020, 41(4): bnaa010.

[6] 袁莹莹，赵君利. 多囊卵巢综合征流行病学特点[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2019，35(3)：261-264.

[7] Sha T T, Wang X J, Cheng W W, *et al*. A meta-analysis of pregnancy-related outcomes and complications in women with polycystic ovary syndrome undergoing IVF[J]. *Reprod Biomed Online*, 2019, 39(2): 281-293.

[8] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，1993.

[9] 姜晓琳，谭 毅，张丽娜，等. 膈下逐瘀汤联合电针对多囊卵巢综合征胰岛素抵抗大鼠外周血炎症介质的影响[J]. 中国药物经济学，2021，16(9)：33-36.

[10] 姚运秀，潘春辉，王 晨，等. 网络药理学在中药复方的研究进展与应用策略[J]. 成都大学学报（自然科学版），2020，39(3)：257-263.

[11] 牛志宏，叶 瑶，夏 兰，等. PCOS 合并代谢综合征患者卵泡液激肽谱与卵子质量的关系[J]. 生殖医学杂志，2017，26(5)：409-414.

[12] Huang X, Liu G, Guo J, *et al*. The PI3K/Akt pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496.

[13] 陈 贵，夏稷子，史 娟，等. 地桃花化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中成药，2020，42(7)：1858-1864.

[14] Zhang N, Liu X Y, Zhuang L L, *et al*. Berberine decreases inaulin resistance in a PCOS rate by improving GLUT4: Dual regultion of the PI3K/Akt md MAPK pathways[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2020, 110: 104544.

[15] 张 珊，徐梦珠，郝 娟，等. 基于磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/葡萄糖转运蛋白 4 通路的中药治疗糖尿病新进展[J]. 基层中医药，2022，1(4)：82-88.

[16] Yaribeygi H, Farrokhi F R, Butler A E, *et al*. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8152-8161.

[17] Feng J, Gao Q, Liu Q, *et al*. Integrated strategy of differentially expressed genes associated with ulcerative colitis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7479-7489.

[18] Liu J, Wu D C, Qu L H, *et al*. The role of mTOR in ovarian Neoplasms, polycystic ovary syndrome, and ovarian aging[J]. *Clin Anat*, 2018, 31(6): 891-898.

[19] Roberts J A, Carpenter R M, Blythe S N, *et al*. FSH/AMH ratio and adipocyte size are linked to ovarian dysfunction[J]. *Endocr Res*, 2020, 45(3): 174-189.

[20] 祁珍珍. 覆盆子红花药对通过 PI3K/Akt 信号通路调节 PCOS-IR 大鼠性激素分泌及减轻胰岛素抵抗的作用机制研究[D]. 西宁：青海大学，2022.

[21] 陶 冲，林 莺，徐沙丽，等. 补肾活血方对多囊卵巢综合征-胰岛素抵抗模型大鼠性激素水平及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2022，29(12)：93-97.