

促排汤对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的影响

田立霞¹, 姜丹¹, 杨瑾¹, 周梦云¹, 刘慧聪¹, 黄小燕², 顾祖曦², 徐莲薇¹,
李佶¹

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200043; 2. 上海中医药大学动物实验中心, 上海 201203)

摘要: 目的 探讨促排汤对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的影响。方法 40只Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组、促排汤组, 分别给予羧甲基纤维素钠、格华止、促排汤灌胃, 检测大鼠体质量、空腹血糖、胰岛素等, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), 免疫组化测定卵巢组织炎症因子IL-6、TNF- α 以及IRS-2表达, RT-PCR及Western blot检测卵巢组织OX-LDLR1、TLR4表达。结果 促排汤和阳性对照组周期恢复率高于模型组($P<0.05$); 阳性对照组、促排汤组的HOMA-IR值低于模型组($P<0.01$), 促排汤组HOMA-IR值高于阳性对照组($P<0.05$); 模型组IL-6、TNF- α 水平高于正常组($P<0.01$); 促排汤组与阳性对照组炎性因子IL-6、TNF- α 水平低于模型组($P<0.01$); 模型组IRS-2水平低于正常组($P<0.01$), 促排汤组和阳性对照组IRS-2均高于模型组($P<0.01$); 模型组OX-LDLR1、TLR4表达增高, 促排汤组和阳性对照组表达降低较模型组($P<0.01$)。结论 促排汤能够改善胰岛素抵抗型PCOS大鼠的胰岛素抵抗, 同时胰岛素抵抗型PCOS模型大鼠炎性因子存在增加趋势, 其机制可能与改善炎症微环境有关。

关键词: 促排汤; 多囊卵巢综合征; 炎症因子; 胰岛素抵抗; 复方制剂

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)06-1627-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.046

多囊卵巢综合征(Poly cystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期女性最常见的内分泌疾病, 临床表现高度异质, 是以生殖障碍、内分泌异常、代谢紊乱和精神问题为特征的一组临床综合征^[1]。其发病率为5%~11%之间^[2]。多项研究提示卵巢分泌雄激素过多和机体存在胰岛素抵抗是PCOS病理生理变化的关键环节^[3-4]; 相关研究也发现多囊卵巢综合征存在慢性炎症, 并且胰岛素抵抗和慢性炎症的有着密切的关系^[5-6], 慢性炎症如何影响着胰岛素抵抗, 其机制研究可能对PCOS的治疗有着一定的意义。在治疗上, 各种西医的治疗方法均不能有效的改善PCOS, 因此研究中医药治疗PCOS变得尤为重要。促排汤是孙卓君教授的经验方, 在先前的临床研究中, 治疗效果较满意^[7]。该实验以胰岛素抵抗PCOS大鼠模型为研究对象, 观察促排汤对模型大鼠胰岛素抵抗以及炎症微环境的调控作用, 为促排汤的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物 脱氢表雄酮(DHEA)(批号BCSW201708)购于西安韵禾生物科技有限公司; 注射用大豆油(批号20170803)购于浙江田雨山药用油有限公司; 羧甲基纤维素钠(批号2017080250)购于上海万照精化工有限公司; 格华止(二甲双胍片, 850 mg, 批号

AAR3600, 中美上海施贵宝制药有限公司)。促排汤(肉苁蓉12 g、三棱9 g、柴胡9 g、菟丝子12 g、山茱萸9 g、当归10 g、熟地黄10 g、覆盆子12 g), 为上海中医药大学附属龙华医院新绿药免煎剂型。

PCR试剂盒(OX-LDL、TLR-4 mRNA)购于上海思兆生物科技有限公司; ELISA试剂盒(IL-6、TNF- α 、IRS-2、胰岛素)购自上海奥威生物科技有限公司; RIPA裂解液(WB0101和WB0102)、BCA蛋白定量试剂盒(WB0123和WB2123)、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒(WB0130)、5×SDS蛋白上样缓冲液(WB0133)、ECL超敏发光试剂盒(WB0164)、电泳液(WB0132)、转膜液(WB0154)、一抗稀释液(WB0158)、二抗稀释液(WB0159)、封闭液(WB0161)TBE、6×Loading buffer购于上海威奥生物科技有限公司; Trizol、随机引物、RNA酶抑制剂及First Strand cDNA synthesis Kit购于美国英杰生物技术有限公司; QuantityNova SYBR Green PCR Kit购于湖南凯杰科技有限公司。

1.2 仪器 末梢血糖仪(德国拜耳公司); 小型垂直电泳槽(165-8001)、小型Trans-Blot转印槽(170-3930, 美国Bio-Rad公司); 组织匀浆器(TL-2010S, 上海净信实业发展有限公司); 超声波细胞破碎仪(JY88-II, 宁波新芝生

收稿日期: 2020-07-02

基金项目: 国家中医药管理局第四批全国中医(西学中)优秀人才研修项目(人事[008]); 上海中医药三年行动计划项目[ZY(2018-2020)-ccccx-2002-05, ZY(2018-2020)-ccccx-2002-09]; 上海中医药大学预算内项目(2016YSN36)

作者简介: 田立霞(1977—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合妇科学。Tel: 18918795698, E-mail: 274719830@qq.com

物科技股份有限公司); 台式高速冷冻离心机 (Fresco21, 美国 Thermo 公司) 高速台式离心机 (TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂); 隔水式电热恒温培养箱 (GHP-9080, 上海一恒科技有限公司); 脱色摇床 (TS-1, 海门其林贝尔仪器制造有限公司); 全波长酶标仪 (MutiskanTM GO, 美国 Thermo 公司); 凝胶成像系统 (GIS-1600, 上海天能科技有限公司); 梯度 PCR 仪 (Veriti DX, 美国 Life 公司); 生物安全柜 (BHC-1300, 苏州净化设备有限公司)。

1.3 动物 实验用鼠为 SPF 级雌性 wistar 大鼠, 21 日龄, 购买于上海市西普尔必凯实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2013-0016], 由上海中医药大学实验动物中心饲养, 饲料由该中心提供。大鼠自由摄食和饮水, 25 ℃ 恒温, 50% 相对湿度, 清洁级饲养, 12 h 光照 (6: 00 至 18: 00) 和 12 h 黑暗 (18: 00 至 6: 00) 周期交替进行。

1.4 分组与给药 按丁风娟等^[8] 脱氢表雄酮造模法^[9], 分组当日给予病理模型组大鼠每日颈背部皮下注射溶于注射用大豆油的脱氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone, DHEA) 溶液 60 mg/kg, 而对照组大鼠给予同容量注射用大豆油, 注射颈背部皮下。用药 20 d 后, 采用甲蓝染色法, 观察大鼠阴道脱落细胞学变化情况。阴道脱落上皮细胞呈角化状态, 持续 10 d, 提示为诱导成功的 PCOS 模型大鼠。禁食 12 h, 眼眶取血测空腹血糖、胰岛素及雄激素, 测定 HOMA 值。把造模成功的大鼠, 依随机数目法, 分到促排汤组、阳性对照组和模型组, 每组各 10 只。促排汤组每日给予 100 mg/kg 灌胃, 阳性对照组每日给予格华止溶液 100 mg/kg 灌胃, 模型组和正常组均每日给予 1% 羟甲基纤维素钠溶液灌胃。连续灌胃 28 d 后, 禁食禁水 12 h, 成功麻醉大鼠后, 从腹主动脉采血, 以 2 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -20 ℃ 保存备用。采血后断颈处死大鼠, 把一侧卵巢用 10% 福尔马林溶液固定, 另一侧于液氮冷冻, -80 ℃ 保存备用。

1.5 观察指标

1.5.1 HOMA-IR 大鼠禁食 12 h 后称定质量, 采目内眦取血法测定血糖 (fasting blood glucose, FPG) 水平和 ELISA 法测定胰岛素 (FINS) 水平。采用稳态模型胰岛素抵抗 (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) 评估胰岛素抵抗程度, 计算公式为 $HOMA-IR = FINS (\text{mIU/L}) \times FPG (\text{mmol/L}) / 22.5^{[10]}$ 。药物干预结束后, 复测以上指标。

1.5.2 各组大鼠卵巢组织形态改变 通过苏木精-伊红染色 (Hematoxylin-eosin staining, HE) 观察大鼠卵巢组织形态学的改变, 10% 福尔马林液固定后的卵巢组织流水冲洗 30 min, 放入 50%~90% 乙醇各 1 h 脱水处理, 再放入二甲苯中透明, 随放入石蜡中包埋, 标记好存放待用, 将包埋好的蜡块切片, 厚度约 5 μm, 二甲苯脱蜡, 酒精脱水, 先后放于苏木精溶液、伊红染色液中染色, 晾干, 封片。

1.5.3 各组大鼠卵巢组织的炎性因子、受体底物水平 把

包埋处理的卵巢组织进行切片, 通过免疫组织化学法检测胰岛素抵抗大鼠卵巢组织的炎性因子白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor alpha, TNF-α)、胰岛素受体底物-2 (Insulin receptor substrate-2, IRS-2) 水平。

把组织切片放入 59 ℃ 恒温箱中烘烤 1 h 后, 分别置于二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III 溶液中各 10 min, 放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、无水乙醇 III 各浸泡 10 min, 后蒸馏水浸泡冲洗 15 min, 进行脱蜡和水化; 用 3% H₂O₂ 200 mL 浸泡 10 min 灭活, 再用流水冲洗约 10 min; 稀释 1 倍的修复液微波炉高火预热 2 min 中, 加入组织片, 加满修复液, 微波炉高火修复 10 min, 冷却后进行第 2 次高火修复 12 min, 冷却至室温后倒去修复液, PBS 洗涤 2 次, 各 15 min, 滴加 5% BSA 封闭液, 室温放置 35 min, 配制一抗, 去除多余液体 (不洗), 滴加适量的一抗, 4 ℃ 过夜; 第二天取出组织片, PBS 冲洗 4 次, 每次 15 min, 擦去表明液体, 滴加二抗, 37 ℃ 下放置 35 min, 组织切片再用 PBS 洗涤 4 次, 各 15 min, 显色, 观察。依据试剂盒说明配制显色液, 显色完流水冲洗十余分钟, 进行复染, 滴加苏木素染液, 浸染 2 min, 冲洗 10 min, 观察颜色, 脱水, 在 1 缸无水乙醇中涮一下, 2 缸无水酒精及 3 缸二甲苯中各方 3 min, 封片, 加 1 d 封片塑胶, 盖片。通过医学图像定量分析软件分析, 显微镜物镜选 ×40 (目镜 ×10), 去除免疫组化中的紫蓝色背景, 有效阴性区用蓝色表示, 有效阳性区用红色表示。

1.5.4 大鼠卵巢组织 Ox-LDL、TLR-4 mRNA 表达 应用 RT-PCR 法, 具体引物序列 (逆转录酶和引物) 见表 1。绿豆大小的卵巢组织匀浆, 加入 1 mL Trizol 提取总 RNA, 依照试剂盒说明配成 20 μL 逆转录反应体系, 打匀后 25 ℃, 5 min, 42 ℃ 下扩增 60 min; 70 ℃ 下变性处理 5 min; 高速 (>5 000×g) 离心 5 s, -20 ℃ 保存, 把 11 μL 聚合酶链反应体系在 95 ℃ 下变性 2 min, 95 ℃ 下变性 5 s, 60 ℃ 下延伸 30 s, 变性, 退火, 延伸重复 45 个循环, 60 ℃ 下延伸 5 min, 4 ℃ 结束反应。取出 5 μL 产物, 在 2% 的琼脂糖凝胶上给予 80 V 电压下电泳 30 min, 借助凝胶电泳成像系统拍照, 取得条带密度值和面积等数据, 通过与内标基因 (GAPDH) 扩增产物的灰度比来体现各基因转录表达水平。

表 1 引物序列

名称	扩增长度/bp	序列 (5'-3')
GAPDH	129	正向 TGCCACTCAGAACACTGTGG 反向 TTCAAGCTCTGGGATGACCTT
TLR-4	164	正向 CAGGAATTAGGCTCATGAA 反向 TCCATGACAGAACCGTCAAA
Ox-LDL	159	正向 CTGTGACTCTGGCCATCCTT 反向 CTGCTTTCTCTGGGCTGAC

1.5.5 卵巢组织 OX-LDL、TLR-4 蛋白表达 采用 Western blot 法。提取标本卵巢组织蛋白质, 应用 BCA 蛋白浓度测

定试剂盒来测定蛋白浓度，标本进行 TEMED 凝胶电泳，转模，封闭，加入一抗 OX-LDLR1 (1:400)、TLR4 (1:800) 和 GAPDH (1:2000)，在 4℃ 条件下孵育过夜。处理后的标本洗涤后再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (Jackson 1:2000) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠二抗 (1:2000) 混合后，在室温下孵育 2 h，充分洗涤，化学发光，显影，定影，蒸馏水冲洗终止反应。内参选用 GAPDH，结果利用凝胶图像处理系统分析。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行分析，结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，2 组间比较采用双侧 t 检验 (two-tailed student's t test)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况 DHEA 溶液连续皮下注射 20 d 后，观察大鼠落细胞的形态学变化及 HOMA-IR 值，其中 30 只大鼠造模成功。把 30 只模型大鼠按随机数目表法随机分为模型组、促排汤组以及阳性对照组，各 10 只，另外 10 只有规律性周期的大鼠作为正常对照组，继续后续实验。给药 28 d 后，性周期恢复情况为模型组中 1 只，促排汤组中 6 只，阳性对照组中 7 只。

2.2 不同组别大鼠卵巢形态学表现 正常组大鼠卵巢镜下可见各级卵泡及黄体多枚，优势卵泡的颗粒细胞层厚约 8~9 层；模型组卵巢镜下见囊性扩张的卵泡，囊内无卵母细胞及放射冠，卵泡内仅 3~4 层颗粒细胞，黄体减少；促排汤组和阳性对照组镜下卵巢组织可见各期别卵泡及黄体数目增多，卵泡内的颗粒细胞层数约 3~7 层。具体见图 1。

2.3 不同组别大鼠胰岛素抵抗指数的变化 与正常组比较，模型组大鼠 HOMA-IR 值增高 ($P < 0.01$)；促排汤组、阳性对照组大鼠 HOMA-IR 值低于模型组 ($P < 0.01$)；促排

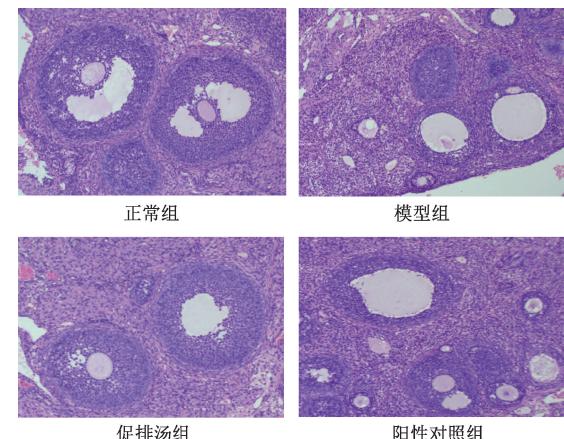


图 1 各组大鼠卵巢形态学 (HE, $\times 40$)

汤组大鼠 HOMA-IR 值高于阳性对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠胰岛素抵抗 HOMA-IR 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	HOMA-IR/[(mmol·mIU)·L ⁻²]
正常组	1.694 2±0.223 8
模型组	4.633 0±0.532 0 ^{△△}
促排汤组	2.506 7±0.564 3 ^{** ☆}
二甲双胍组	2.103 2±0.313 1 ^{**}

注：与正常组比较，^{△△} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ ；促排汤与二甲双胍组比较，[☆] $P < 0.05$ 。

2.4 促排汤对 IL-6、TNF- α 的影响以及 IRS-2 磷酸化表达的影响 模型组卵巢组织中 IL-6、TNF- α 的阳性表达较正常组增高 ($P < 0.01$)；促排汤组及阳性对照组卵巢组织中 IL-6、TNF- α 阳性表达皆低于模型组 ($P < 0.01$)；模型组 IRS-2 磷酸化阳性表达较正常组降低 ($P < 0.01$)；而促排汤组和阳性对照组 IRS-2 磷酸化阳性表达均高于模型组 ($P < 0.01$)。具体见图 2、表 3。

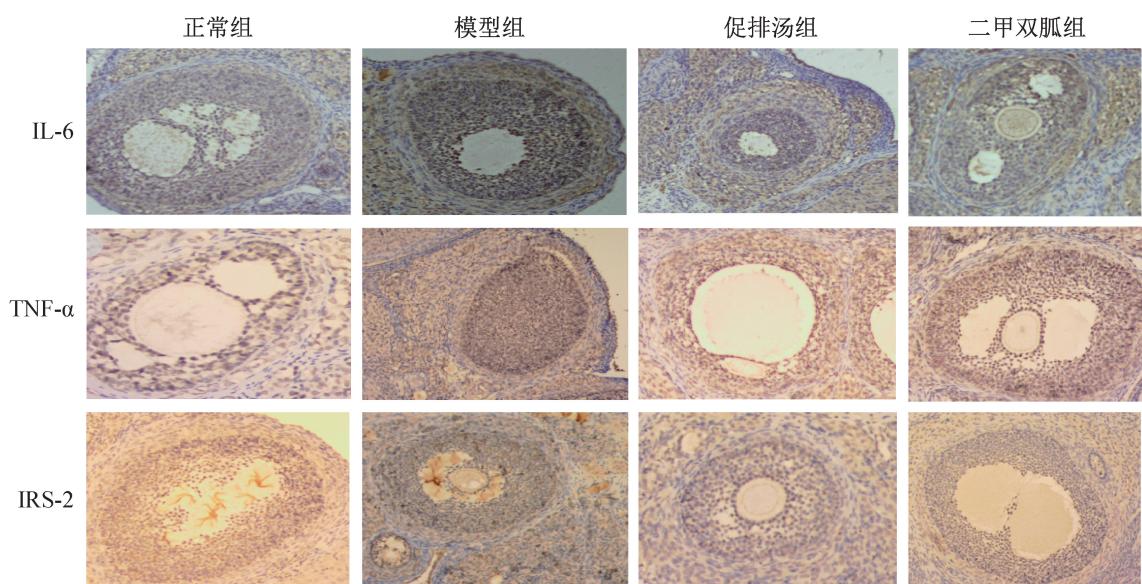


图 2 各组大鼠免疫组化图 ($\times 40$)

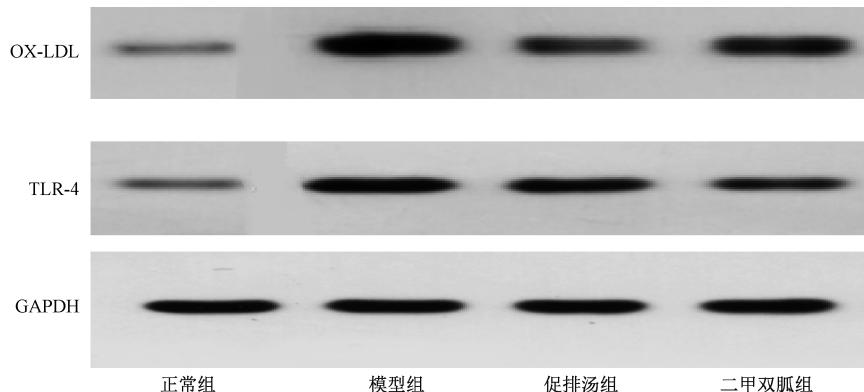
表3 各组大鼠卵巢组织 IL-6、TNF- α 、IRS-2 表达 ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	IL-6	TNF- α	IRS-2
正常组	0.433 0±0.123 3	0.504 6±0.065 5	2.336 1±0.789 0
模型组	0.760 5±0.134 8 ^{△△}	3.163 2±0.039 8 ^{△△}	0.584 5±0.492 0 ^{△△}
促排汤组	0.122 3±0.087 7 ^{**} [☆]	0.547 7±0.057 8 ^{**} [☆]	0.928 5±0.387 0 ^{**}
二甲双胍组	0.448 7±0.123 0 ^{**}	1.010 7±0.076 5 ^{**}	1.110 7±0.532 2 ^{**}

注:与正常组比较, ^{△△} P<0.01;与模型组比较, ^{**} P<0.01;促排汤与二甲双胍组比较, [☆] P<0.05。

2.5 促排汤对 OX-LDL、TLR-4 蛋白及 mRNA 表达的影响

模型组大鼠 OX-LDL、TLR-4 mRNA 表达高于正常组 (P<0.01); 促排汤组与二甲双胍组大鼠 OX-LDL、TLR-4 mRNA

**图3 各组大鼠卵巢 OX-LDL、TLR-4 蛋白表达**

3 讨论

3.1 PCOS 胰岛素抵抗与 PCOS 慢性炎症 多囊卵巢综合征主要病理生理的特点是卵巢雄激素功能异常, 导致高雄激素血症, 出现了多毛, 少或无排卵, 以及多囊卵巢等临床特征^[11], 胰岛素抵抗亦是多囊卵巢综合征的主要特征之一^[12]。在性激素生物合成途径中, DHEA 通过Δ5 途径促进睾酮的合成, 外源性给予 DHEA 可以造成雄烯二酮水平增高, 从而导致睾酮及雌酮水平升高, 引起卵泡发育停滞, 产生排卵障碍, 提示 DHEA 升高可能是导致 PCOS 的一个主要原因^[13], 并且是胰岛素抵抗型 PCOS 制备的理想模型^[9]。在该动物实验研究中, 用 DHEA 造模成功后, 大鼠的胰岛素释放实验、HOMA-IR 与正常组大鼠比较, 明显增高; 大鼠卵巢的组织切片提示卵泡停止发育; 上述结果提示高雄激素可导致幼鼠发育成多囊卵巢大鼠, 并存在胰岛素抵抗状态, DHEA 注射法是制备胰岛素抵抗 PCOS 模型的有效方法之一。PCOS 胰岛素抵抗的发生机制主要有受体前缺陷、受体缺陷以及受体后缺陷, 因此 PCOS 的发病机制之一是胰岛素受体传导缺陷^[14]。模型大鼠的免疫组化结果提示, PCOS 大鼠的 IRS-2 磷酸化表达降低, 表明 PCOS 胰岛素抵抗模型在胰岛素底物方面存在的异常。

近期的多项研究提示, PCOS 存在低度慢性炎症, 这种炎症可能与机体的胰岛素抵抗相关^[15]。与免疫和炎症相关的 TLRs 样受体是 TLR-4, 当 TLR-4 受体与配体结合后, 激活一系列炎症反应, 产生 IL-6、TNF- α 等炎性因子, 导致了机体的微环境处于慢性炎症状态^[16-17], OX-LDL 是 TLR-

表达水平低于模型组 (P<0.01), 见表 4。OX-LDL、TLR-4 蛋白表达模型组最高, 促排汤组大鼠与阳性对照组均有下降, 见图 3。

表4 各组大鼠卵巢 OX-LDL、TLR-4 mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$, n=4)

组别	X-LDL	TLR-4
正常组	1.000 0±0	1.000 0±0
模型组	10.056 7±0.143 9 ^{△△}	10.540 0±0.100 3 ^{△△}
促排汤组	7.506 7±0.187 6 ^{**}	5.055 0±0.163 3 ^{**}
二甲双胍组	3.083 33±0.300 6 ^{**}	8.506 7±0.400 6 ^{**}

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

4 的内源性配体^[17]。有关研究证实 PCOS 患者在糖代谢过程中, 己糖支路活跃, 导致机体氧化应激的激活, OX-LDL 水平升高^[18]。该研究数据提示, 胰岛素抵抗大鼠的卵巢组织 TNF- α 及 IL-6 明显增加, TLR-4 及 OX-LDL 基因及蛋白表达水平增高, 提示多囊卵巢存在低度炎症反应。其机制可能是 PCOS 患者因为糖的异常代谢, 使得 OX-LDL 水平增高, 激活细胞 Toll 样受体, 导致炎症反应激活, 引起 IL-6、TNF- α 等炎性因子增加; 另外卵巢组织中 IRS-2 水平下降, 导致胰岛素信号传导受限, 而此时炎症反应活跃, 炎症信号通路与胰岛素信号通路之间可能有交叉影响, 进而导致胰岛素信号传导能力下降。

3.2 促排汤对 PCOS 胰岛素抵抗的治疗作用 近年来研究认为多囊卵巢综合征的病机与肾、肝、脾三脏功能失调及痰湿、血瘀密切相关^[19], 孙卓君教授的促排汤, 君药为菟丝子和肉苁蓉, 两药相须为用, 共补肾阳。柴胡、红花、三棱作为臣, 疏肝理气、破血活血, 佐以滋肾填精养血的当归、熟地黄、山茱萸, 全方即补益肾精, 又能补肾阴阳, 达到温补而不燥, 补而不峻, 达到“阴阳调和”, 以促排卵^[20]。既往的临床研究显示, 促排汤能较好的改善 PCOS 排卵情况, 改善糖代谢异常^[19]。本实验研究提示, 给予 PCOS 胰岛素抵抗模型大鼠促排汤中药灌胃治疗后, IL-6、TNF- α 等炎性因子较模型组明显下降 (P<0.05), 另外 TLR-4、OX-LDL 基因及蛋白与模型组比较均有降低 (P<0.05), 提示促排汤可能通过抑制 TLR-4 以及 OX-LDL 的表达, 降低炎症反应。

多囊卵巢综合征是伴随女性一生的内分泌失调性的慢性疾病，针对胰岛素抵抗的基本特征，根据不同时期的需求进行长期管理，是治疗的基本原则。该课题以多囊卵巢综合征胰岛素抵抗与微环境炎症的关系进行探讨。查阅相关文献，有关胰岛素抵抗的信号通路是一个交织的信号通路网。本研究结果提示促排卵可以治疗胰岛素抵抗，胰岛素抵抗与炎症微环境间存在相互关联，具体的信号通路可能与 TLR/NF-κB 信号通路有关，有待进一步的研究证明。

参考文献：

- [1] 钱易, 马翔. 多囊卵巢综合征诊断标准解读 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(3): 265-267.
- [2] 袁莹莹, 赵君利. 多囊卵巢综合征诊断及管理策略 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(3): 261-264.
- [3] Rosenfield R L, Ehrmann D A. The pathogenesis of Polycystic syndrome (PCOS): the Hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(7): 467-520.
- [4] Bednarska S, Siejka A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: what's new? [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(2): 359-367.
- [5] 王俊燕, 林金芳. 高雄激素血症诱发多囊卵巢综合征慢性轻度炎症的分子机制研究进展 [J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(8): 633-635.
- [6] Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh-Bardei L, et al. The effect of curcumin on TNF- α , IL-6 and CRP expression in a model of polycystic ovary syndrome as an inflammation state [J]. *J Reprod Infertil*, 2017, 18(4): 352-360.
- [7] 徐莲薇, 倪晓容, 孙卓君, 等. 补肾活血调周法治疗多囊卵巢综合征疗效观察 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(12): 37-39.
- [8] 丁风娟, 郝翠芳. 多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(3): 71-74.
- [9] 姚莉娟, 徐晓娟, 王婧婧, 等. 体现中医病因病机的多囊卵巢综合征动物模型评价及筛选 [J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2014, 16(10): 2137-2148.
- [10] Mehmet K, Selim K, Mustafa K, et al. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents [J]. *Pediatrics*, 2005, 115(4): 500-503.
- [11] Rosenfield R L, Mortensen M, Wroblewski K, et al. Determination of the source of androgen excess in functionally atypical polycystic ovary syndrome by a short dexamethasone androgen-suppression test and a low-dose ACTH test [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(11): 3138.
- [12] Greenwood E A, Pasch L A, Cedars M I, et al. Insulin resistance is associated with depression risk in polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(1): 27-34.
- [13] 杨正望, 尤昭玲, 冯光荣, 等. 多囊卵巢综合征动物模型的构建及中药干预机制述评 [J]. 湖南中医学院学报, 2006, 26(1): 56-58.
- [14] Celik O, Yesilada E, Hascalik S, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of insulin resistance in PCOS [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(4): 492-498.
- [15] 陈莉, 孙梦娇, 王芳. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗与慢性炎症的相关性研究进展 [J]. 中国计划生育杂志, 2018, 28(8): 750-753.
- [16] Bhaskar S, Shalini V, Helen A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF-κB signaling pathway [J]. *Immunobiology*, 2011, 216(3): 367-373.
- [17] Chávez-Sánchez L, Garza-Reyes M G, Espinosa-Luna J E, et al. The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to ox-LDL in humans [J]. *Human Immunology*, 2014, 75(4): 322-329.
- [18] Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) plasma levels and oxLDL to LDL ratio-Are they real oxidative stress markers in dialyzed patients? [J]. *Life Sciences*, 2013, 92(4-5): 253-258.
- [19] 徐莲薇, 倪晓容, 叶玉妹, 等. 补肾活血调周法治疗多囊卵巢综合征 78 例 [J]. 陕西中医, 2009, 30(3): 274-275.
- [20] 徐莲薇, 朱虹, 孙卓君, 等. 补肾活血调周法治疗不同证型多囊卵巢综合征 90 例 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(6): 88-91.