

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

何珊珊^{1,2}, 马思琪³, 赵锡曼^{1,2}, 郜艳翠^{1,2}, 孙 婷^{1,2}, 曲银娥^{1,2*}

(1. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 063210; 2. 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 河北 唐山 063210; 3. 唐山市妇幼保健院, 河北 唐山 063014)

摘要: **目的** 探讨四君子颗粒联合阿司匹林对多囊卵巢综合征 (PCOS) 大鼠炎症的影响。**方法** 通过开放药物数据库和疾病数据平台收集四君子颗粒与阿司匹林 (ASA) 的活性成分及治疗 PCOS 的潜在作用靶点, STING 平台构建蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并进行 GO 功能、KEGG 通路富集分析。构建 PCOS 大鼠模型, 随机分为模型组、阿司匹林组、四君子颗粒组、联合用药组, 各组给予相应剂量药物, 持续 21 d, 记录大鼠动情周期, HE 染色观察卵巢组织病理形态学变化, ELISA 法检测血清睾酮 (T)、黄体生成素 (LH)、卵泡刺激素 (FSH) 水平, Western blot 法检测卵巢组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4 蛋白表达。另外, 给予 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 和激动剂佛波酯, 检测 p-p65/p65、p-I κ B α /I κ B α 变化。**结果** 获得潜在靶点蛋白 177 个, 主要涉及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-4。与对照组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱, 卵巢呈多囊样改变, 血清 T、LH 水平及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 蛋白表达升高 ($P<0.05$), FSH 水平及 IL-4 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠动情周期紊乱、卵巢多囊改善, 血清 T、LH 水平及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 蛋白表达降低 ($P<0.05$), FSH 水平及 IL-4 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 以联合用药组更明显 ($P<0.05$), 联合用药组 p-p65/p65、p-I κ B α /I κ B α 降低 ($P<0.05$)。**结论** 四君子颗粒联合阿司匹林具有多成分、多靶点的作用特点, 可改善 PCOS 大鼠慢性炎症, 能通过抑制炎症相关通路激活发挥治疗作用。

关键词: 四君子颗粒; 阿司匹林; 多囊卵巢综合征 (PCOS); 炎症; NF- κ B 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(2025)10-3451-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.042

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 属于发病率较高的生殖内分泌疾病, 临床表现以高雄激素血症、胰岛素抵抗和排卵障碍为主^[1], 患者血清睾酮 (testosterone, T)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 和卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 水平紊乱, 通常还会出现肥胖、脱发等内分泌代谢异常相关症状^[2]。PCOS 起病隐匿, 其发病机制可能与机体代谢紊乱和慢性炎症有关, 受表观遗传学与多种环境因素影响^[3], 临床上尚无系统的治疗药物, 大多采取长期口服避孕药、促排卵药物联合运动、饮食控制等方法^[4], 但存在服药周期长、成本较高的问题, 效果因人而异, 患者往往难以坚持按要求用药。四君子汤具有补气、泻热功效, 在脾胃气虚证的治疗及相关研究中应用较多^[5], 其主要成分在卵巢癌、肝癌及各类慢性炎症性疾病的治疗中都能发挥较好作用^[6-8], 课题组前期研究表明, 它可改善 PCOS 模型大鼠炎症。另外, 阿司匹林是非甾体类抗炎药物, 可较好地抑制机体炎症反应^[9]。本研究首先通过网络药理学预测四君子颗粒与阿司匹林治疗 PCOS 的潜在靶点, 再通过动物实验

分析两者联合应用的作用机制, 以期对相关治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物 42 只 3 周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠, 体质量 50~60 g, 由北京华阜康生物科技有限公司繁育 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008], 饲养于华北理工大学实验动物中心 [实验动物使用合格证号 SYXK (冀) 2020-007], 每笼 5 只, 环境温度 23.0~25.0 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~60%, 自由摄食饮水, 适应性喂养 7 d 后进行干预。本研究通过华北理工大学医学伦理委员会审查 (伦理审批编号 SQ2022098)。

1.2 试剂与药物 来曲唑 (批准文号 H20213680, 2.5 mg, 宝丰县珍景康医药有限公司); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 货号 101, 金平力宏生物科技开发有限责任公司); 阿司匹林肠溶胶囊 [批准文号 H19990212, 0.1 g/粒, 永信药品工业 (昆山) 股份有限公司]; 四君子颗粒 (批准文号 Z42021381, 每袋 15 mg, 李时珍医药集团有限公司)。BAY11-7082 母液、PMA 母液 (货号 10010266-10、27785-5, 德国 Cayman 公司); 超快 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒

收稿日期: 2025-04-02
基金项目: 河北省引进留学人员项目 (201860)
作者简介: 何珊珊 (2000—), 女, 硕士生, 研究方向为多囊卵巢综合征。Tel: 18772121962
* 通信作者: 曲银娥 (1967—), 女, 博士, 教授, 研究方向为免疫与妇科肿瘤。Tel: 13932554503

(货号 ZD304C, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司); 吉姆萨试剂 (货号 BA-4219, 珠海贝索生物技术有限公司); 大鼠 TNF- α 、IL-4、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、IkB α 、p-IkB α 抗体 [货号 WL01581、WL05916、WL00891、WL02841、WL01273b、WL02169、WL01936、WL02495, 万类生物科技 (上海) 有限公司]; 大鼠 β -Actin 抗体 (货号 AC004, 武汉爱博泰克生物科技有限公司); LH、FSH、T ELISA 试剂盒 (货号 500720、500710、501740, 德国 Cayman 公司); ECL 显色试剂盒、山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液 (货号 AC0453、S1001、S1002、RW0001, 河北瑞帕特生物科技有限公司)。

1.3 仪器 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 石蜡半自动切片机 (德国 Leica 公司); BX63 显微镜扫描系统 (日本 Olympus 公司); 凝胶成像分析系统、电泳仪、半干转印槽、垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); 全自动生化分析仪 240 (深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 有效成分及相关靶点筛选 从中药系统药理学平台 TC MSP 中收集四君子颗粒化学成分, 以药物相似性 (DL) ≥ 0.18 和口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 为标准, 收集活性物质, 同时获取其作用靶点, 使用 UniProt 数据库将所得靶点转化为标准基因名称。以 “Aspirin” 为关键词, 在 PubChem 数据库中获取阿司匹林药物的 SMILE 结构, 然后在 SwissTargetPrediction 平台预测疾病靶点, 选择 probability>0 者。同时, 使用 TTD、DrugBank 数据库, 以 “Aspirin” 为关键词收集靶点信息, UniProt 数据库将所得靶点转化为标准基因名称。再将 2 种药物的靶点取交集后去除重复项, 得到联合用药靶点。

2.1.2 PCOS 相关靶点筛选 将 “polycystic ovary syndrome” 设定为检索词, 分别在 DrugBank、OMIM、NCBI、GeneCards 数据库中筛选 PCOS 相关靶点。

2.1.3 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点筛选 将 “2.1.1” “2.1.2” 项下相关靶点基因与 PCOS 靶点基因导入 Venny 软件, 筛选出共同靶点基因并绘图。

2.1.4 GO 功能、KEGG 富集分析 应用 DAVID 数据库对相关的交集基因进行分析, 计算 P 值, 错误发现率 (FDR) 校正, $P \leq 0.05$ 为具有显著差异, 绘制关系图。将 PDB-T2DM 交集靶点输入 DAVID 数据库, 限定 “H. sapiens”, P 值由小到大排序, 对排名前十的条目进行 GO 功能分析, 排名前三十的通路进行 KEGG 富集分析。再将目的基因导入微生信网站, 进行可视化处理。

2.2 动物实验

2.2.1 造模 42 只大鼠以随机数字表法分为对照组 (6 只) 和实验组 (36 只), 实验组灌胃给予来曲唑的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 (1 mg/kg), 高脂饲料喂养; 对照组灌胃给予等体积溶剂, 普通饲料喂养, 连续 28 d。当大鼠无

规律动情周期、卵巢呈多囊样改变时, 为造模成功^[7]。

2.2.2 分组与给药 造模成功后将大鼠分为模型组、阿司匹林组、四君子颗粒组、联合用药组、BAY 组和佛波酯组, 每组 6 只, 阿司匹林组灌胃 0.1 mg/kg 阿司匹林; 四君子颗粒组灌胃 10.5 g/kg 四君子颗粒; 联合用药组灌胃 0.1 mg/kg 阿司匹林+10.5 g/kg 四君子颗粒; BAY 组灌胃等体积溶剂, 并于治疗第 7 天开始每天腹腔注射 1 mg/kg BAY11-7082; 佛波酯组灌胃 0.1 mg/kg 阿司匹林+10.5 g/kg 四君子颗粒, 并于治疗第 7 天开始每天腹腔注射 200 μ g/kg PMA; 模型组与对照组灌胃等体积溶剂, 持续 21 d, 其中对照组、模型组、阿司匹林组、四君子颗粒组与联合用药组观察联合用药的治疗效果, 对照组、模型组、联合用药组、BAY 组与佛波酯组探讨联合用药的作用机制。治疗结束后, 各组大鼠于取材前一天晚上 8 点开始停止进食饮水, 次日上午 8 点经异氟烷麻醉后眼内眦取血, 2 000 r/min 离心 15 min, 取血清, 置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。再取两侧卵巢, 左侧置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 右侧置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。

2.2.3 体质量测定 每天上午 8 点测定大鼠体质量, 观察药物干预前后其变化。

2.2.4 吉姆萨染色观察阴道细胞 从造模第 21 天和给药第 14 天起, 每天上午 9 点制备大鼠阴道涂片, 连续 8 d (分别至造模结束和给药结束), 使用吉姆萨染色剂染色 10 min, 流水冲洗去除多余染液, 玻片干燥后在显微镜下观察并拍照, 分析动情周期。

2.2.5 卵巢指数测定 剥取大鼠双侧卵巢, 称定质量, 计算卵巢指数, 公式为卵巢指数=双侧卵巢湿重/处死前所测大鼠体质量。

2.2.6 HE 染色观察卵巢组织病理形态 取 4% 多聚甲醛溶液中固定的大鼠卵巢组织, 连续制备 4~5 μ m 切片, 苏木精、伊红染色, 在显微镜下观察并拍照。

2.2.7 ELISA 法检测血清性激素水平 取大鼠血清适量, 按试剂盒说明书检测 T、LH、FSH 水平, 计算 LH/FSH 值。

2.2.8 Western blot 法检测炎症因子及 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达 取-80 $^{\circ}$ C 保存的大鼠卵巢组织适量, 充分匀浆后低温离心提取总蛋白, Nanodrop2000 超微量分光光度计检测浓度, 按照每孔 75 μ g 的标准量上样。电泳分离后, 将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液封闭, 加入一抗 TNF- α 、IL-4、NF- κ B p65、LaminA/C、p-NF- κ B p65 (1 : 2 000), IL-1 β 、IL-6 (1 : 1 000), IkB α 、p-IkB α (1 : 500), β -actin (1 : 100 000), 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h, TBST 清洗 PVDF 膜, 加入相应二抗 (1 : 5 000), 待孵育结束后再次洗膜, 进行 ECL 显影, 采用凝胶成像系统检测条带, 以 β -Actin 为内参蛋白, Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量。

2.2.9 统计学分析 通过 Graphpad Prism 8 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有

统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 药物-活性成分-共同靶点 满足筛选标准（OB≥30%，DL≥0.18）后检索 TCMSP 数据库，合并去重，得到 252 个药物靶点。从 GeneCards 数据库中共获得 6 507 个疾病相关靶点，OMIM 数据库中共获得 189 个，NCBI 数据库中共获得 493 个，DrugBank 数据库中共获得 37 个。去除重复目标后，收集到 6 577 个疾病相关靶点，将其与四君子颗粒和阿司匹林靶点取交集，最终获得 190 个共同靶点，见图 1。

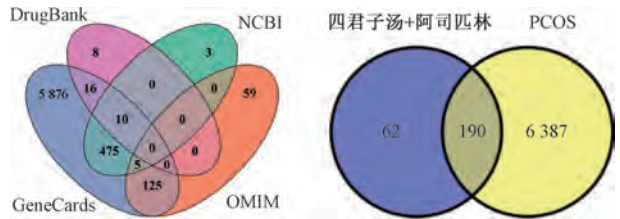


图 1 四君子颗粒-阿司匹林-PCOS 交集靶点韦恩图

3.1.2 交集靶点 PPI 网络 将 190 个交集靶点转移至 STRING 平台进行 PPI 网络构建，并在 Cytoscape 3.7.0 软件中进行可视化，结果有 154 个节点和 583 条边。其中，IL-6、TNF 等在 PPI 网络中起着重要的联系作用，可能是重要的潜在靶点，见图 2。

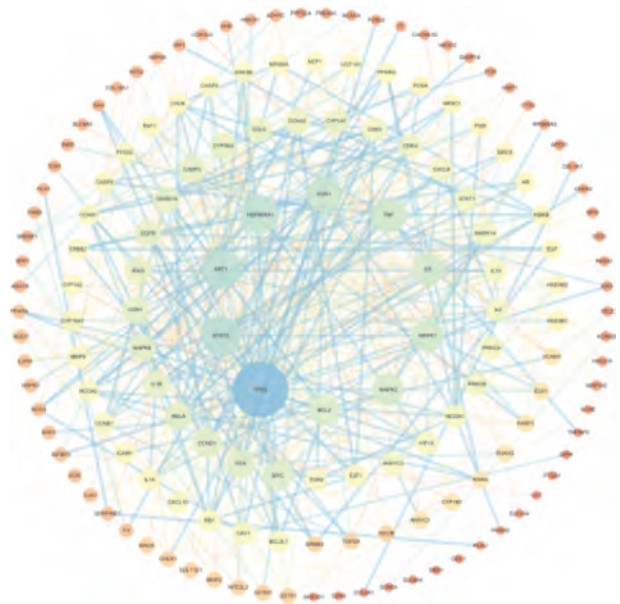


图 2 交集靶点 PPI 网络图

3.1.3 核心靶点筛选 在交集靶点 PPI 网络的基础上，根据网络拓扑中心性、数据包括度中心性、接近性中心性和介数中心性，以 3 个参数均大于中心值为标准，得到 10 个核心靶点（10 个点，32 条边），见表 1、图 3。

3.1.4 GO 功能、KEGG 通路富集分析 GO 功能富集分析涵盖生物过程（BP）、分子功能（MF）和细胞成分（CC）3 个方面，共得到 216 个条目（ $P<0.05$ ），其中 BP 条目

表 1 PPI 网络关键靶点

名称	Degree 值	名称	Degree 值
TP53	48	TNF	24
STAT3	30	MAPK1	22
AKT1	30	IL6	22
HSP90AA1	28	MAPK3	21
ESR1	25	BCL2	19



图 3 核心靶点图

151 个，CC 条目 13 个，MF 条目 52 个，并且 BP 中有大量与 NF- κ B RELA（P65）通路相关的条目。KEGG 分析共获得 132 条通路（ $P<0.05$ ），包括大量与炎症相关的通路，如 IL-17、TNF、PI3K-Akt 通路等，涉及到的相关炎症因子包括 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4 等，见图 4。

3.2 动物实验

3.2.1 联合用药对 PCOS 大鼠体质量的影响 造模前，各组大鼠体质量比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；造模结束时，与对照组比较，模型组大鼠体质量升高（ $P<0.05$ ）；给药结束时，与模型组比较，各给药组大鼠体质量降低（ $P<0.05$ ），以联合用药组更明显（ $P<0.05$ ），见表 2。

3.2.2 联合用药对 PCOS 大鼠动情周期的影响 动情前期（P）以有核上皮细胞为主，动情期（E）以角化的上皮细胞为主，动情后期（M）以有核上皮细胞、角化上皮细胞及少量白细胞为主，动情间期（D）以白细胞为主，有少量有核上皮细胞及角化上皮细胞^[10]。对照组动情周期规律；与对照组比较，模型组动情周期紊乱，动情间期延长（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，各给药组动情周期紊乱有所改善，动情间期缩短（ $P<0.05$ ），以联合用药组更明显（ $P<0.05$ ），见图 5~8。

3.2.3 联合用药对 PCOS 大鼠卵巢外观及卵巢指数的影响 对照组卵巢色泽红润，整体轮廓清晰，剥离时无脂肪组织粘连，表面可见卵泡；模型组卵巢体积增大、表面皱缩且边界不清，色泽苍白，剥离时卵巢表面较多脂肪组织粘连；各给药组卵巢体积缩小，色泽由苍白转为红润，剥离时脂肪组织粘连较少，以联合用药组改善效果最好，见图 9。

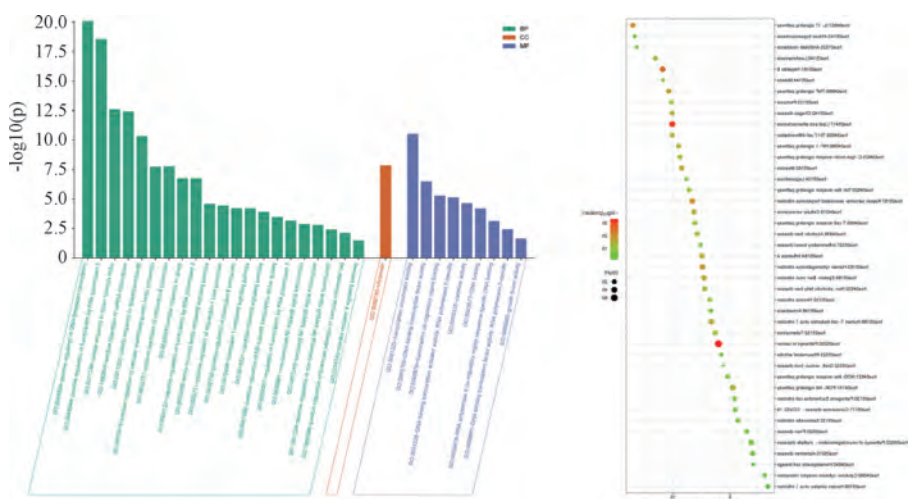
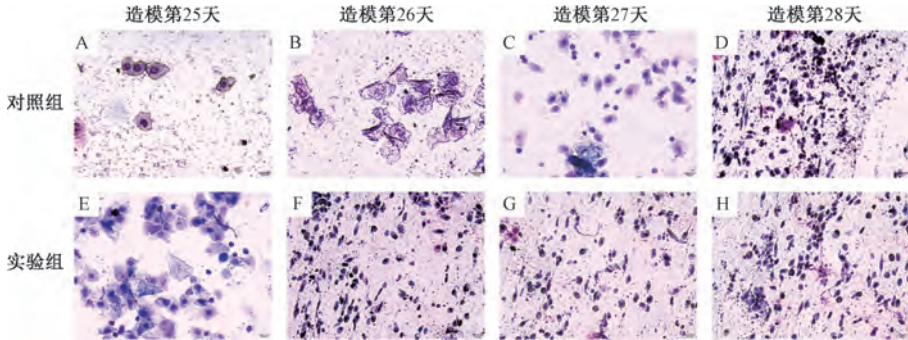


图 4 GO 功能、KEGG 通路富集分析图

表 2 各组大鼠体质量比较 (g, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

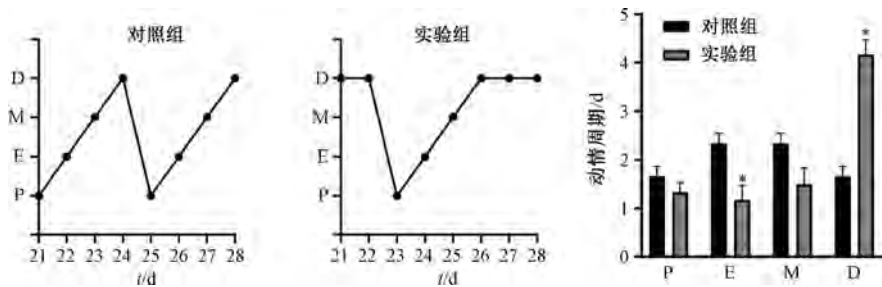
组别	造模前(第 1 天)	造模后(第 28 天)	治疗后(第 49 天)
对照组	52.85±2.40	181.35±7.73	245.67±5.81
模型组	53.04±2.05	235.96±6.77 [*]	293.82±7.66 [*]
阿司匹林组	54.08±3.58	232.95±6.54	275.56±6.43 [#]
四君子颗粒组	53.16±2.97	233.33±8.44	278.62±7.80 [#]
联合用药组	54.55±3.19	235.23±7.59	260.65±7.17 ^{#△▲}

注: 与对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$; 与阿司匹林组比较, [△] $P<0.05$; 与四君子颗粒组比较, [▲] $P<0.05$ 。



注: A 表示动情前期, B 表示动情期, C、E 表示动情后期, D、F、G、H 表示动情间期。

图 5 各组大鼠阴道涂片 (I) (吉姆萨染色, $\times 400$)

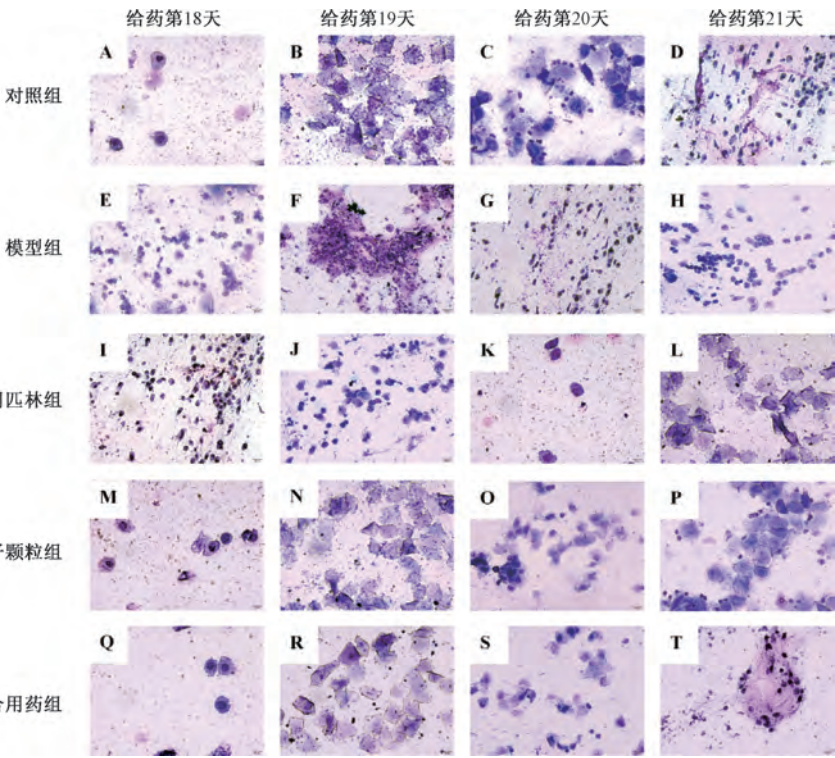


注: P 为动情前期, E 为动情期, M 为动情后期, D 为动情间期。与对照组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

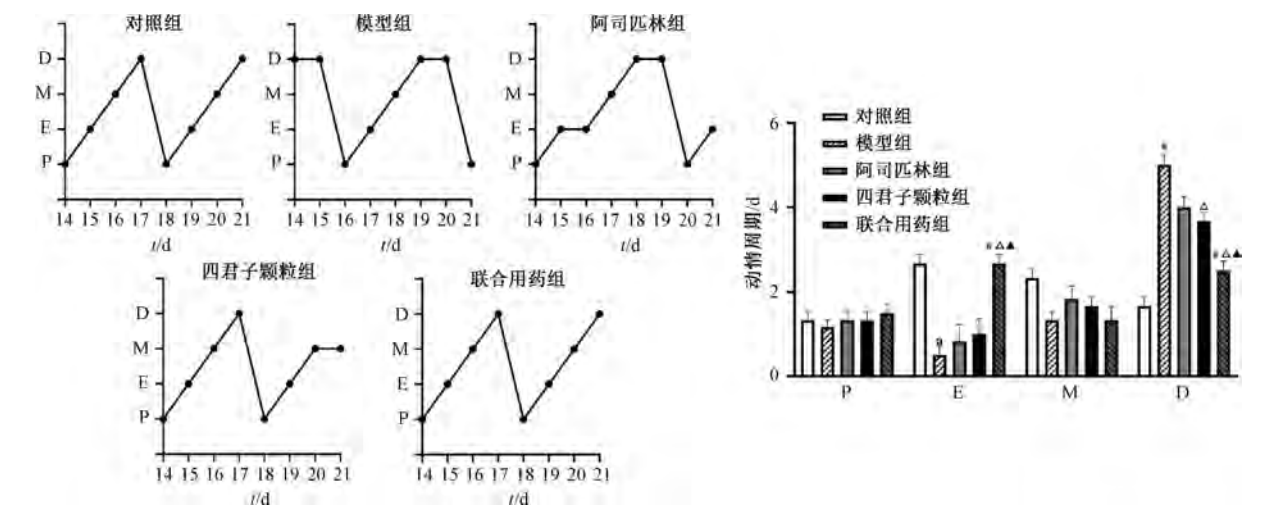
图 6 各组大鼠造模第 21~28 天动情周期变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

与对照组比较, 模型组大鼠卵巢指数升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组卵巢指数降低 ($P<0.05$), 以联合用药组卵巢指数降低更明显 ($P<0.05$); 各单独用药组组间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

3.2.4 联合用药对 PCOS 大鼠卵巢组织病理形态的影响 对照组大鼠卵巢组织存在多个各阶段的卵泡和黄体, 颗粒细胞层较厚且排列紧密; 与对照组比较, 模型组大鼠卵巢组织各阶段卵泡及黄体数量减少 ($P<0.05$), 颗粒细



注：A、H、K、Q、M 表示动情前期，B、L、N、R 表示动情期，C、E、O、P、S 表示动情后期，D、F、G、I、J、T 表示动情间期。
图 7 各组大鼠阴道涂片（Ⅱ）（吉姆萨染色，×400）



注：P 为动情前期，E 为动情期，M 为动情后期，D 为动情间期。与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与阿司匹林组比较， $\Delta P<0.05$ ；与四君子颗粒组比较， $\blacktriangle P<0.05$ 。

图 8 各组大鼠给药第 14~21 天动情周期变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

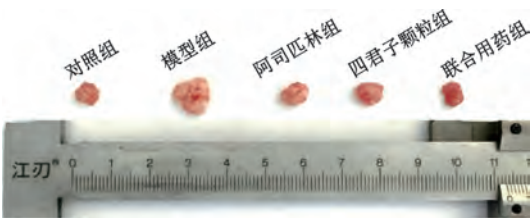


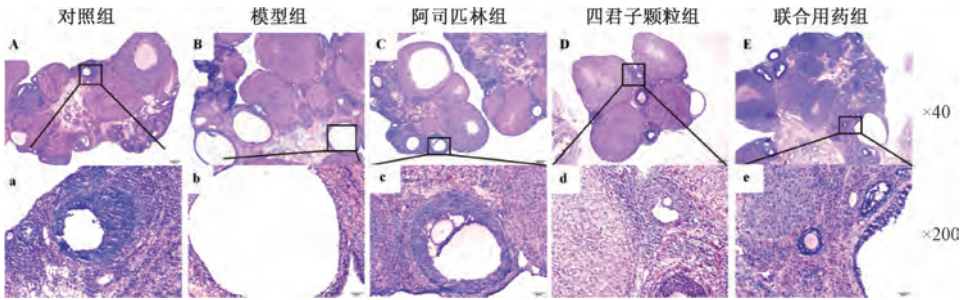
图 9 各组大鼠卵巢外观

表 3 各组大鼠卵巢指数比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	卵巢指数/(mg·g ⁻¹)
对照组	35.11±3.31
模型组	60.41±6.23 [*]
阿司匹林组	51.64±4.70 [#]
四君子颗粒组	37.43±4.61 [#]
联合用药组	47.70±4.04 ^{#△▲}

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与阿司匹林组比较， $\Delta P<0.05$ ；与四君子颗粒组比较， $\blacktriangle P<0.05$ 。

胞层较稀薄且排列紊乱，囊状卵泡数量增加 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠卵巢组织各阶段卵泡及黄体数量增加 ($P<0.05$)，囊状卵泡数量减少 ($P<0.05$)，以联合用药组各阶段卵泡数量增多、囊状卵泡数量减少更明显 ($P<0.05$)，见图 10、表 4。



注：a 为成熟卵泡，b 为囊状卵泡，c~e 为次级卵泡。
图 10 各组大鼠卵巢组织病理形态（HE 染色）

表 4 各组大鼠各级卵泡、黄体数量比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	初级卵泡/个	次级卵泡/个	成熟卵泡/个	囊状卵泡/个	黄体/个
对照组	11.17±1.17	9.33±1.21	7.50±1.05	1.33±0.52	5.67±1.21
模型组	5.50±0.55 [*]	3.83±0.75 [*]	2.67±0.52 [*]	11.83±1.17 [*]	0.83±0.41 [*]
阿司匹林组	7.67±0.82 [#]	6.33±0.53 [#]	5.00±0.89 [#]	6.17±0.75 [#]	2.33±0.52 [#]
四君子颗粒组	8.16±0.75 [#]	7.17±0.98 [#]	5.17±1.17 [#]	6.17±0.98 ^{#△}	2.67±0.50 [#]
联合用药组	10.17±0.41 ^{#△▲}	8.50±0.55 ^{#△}	7.50±0.55 ^{#△▲}	3.67±0.82 ^{#△}	4.16±0.75 ^{#△▲}

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与阿司匹林组比较，[△] $P<0.05$ ；与四君子颗粒组比较，[▲] $P<0.05$ 。

3.2.5 联合用药对 PCOS 大鼠血清性激素水平的影响 与对照组比较，模型组大鼠血清 T、LH 水平与 LH/FSH 比值升高 ($P<0.05$)，FSH 水平降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清 T、LH 水平与 LH/FSH 比值降低 ($P<0.05$)，FSH 水平升高 ($P<0.05$)，以联合用药组效果更好 ($P<0.05$)，见表 5。

表 5 各组大鼠血清 T、LH、FSH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	T/(ng·mL ⁻¹)	LH/(IU·L ⁻¹)	FSH/(IU·L ⁻¹)	LH/FSH
对照组	3.50±0.33	2.80±0.37	3.83±0.20	0.74±0.12
模型组	8.06±0.44 [*]	7.93±0.61 [*]	2.34±0.22 [*]	3.43±0.54 [*]
阿司匹林组	6.63±0.44 [#]	4.96±0.42 [#]	3.06±0.14 [#]	1.62±0.16 [#]
四君子颗粒组	6.48±0.36 [#]	4.63±0.36 [#]	3.36±0.20 [#]	1.38±0.16 [#]
联合用药组	4.56±0.39 ^{#△▲}	3.62±0.32 ^{#△▲}	3.89±0.28 ^{#△▲}	0.93±0.10 ^{#△▲}

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与阿司匹林组比较，[△] $P<0.05$ ；与四君子颗粒组比较，[▲] $P<0.05$ 。

3.2.6 联合用药对 PCOS 大鼠炎症因子相关蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，抗炎因子 IL-4 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠卵巢组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，IL-4 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，以联合用药组效果更好 ($P<0.05$)，见图 11、表 6。

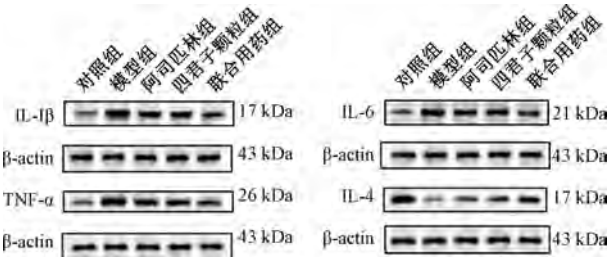


图 11 各组大鼠卵巢组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-4 蛋白条带

3.2.7 联合用药对 PCOS 大鼠卵巢组织 NF- κ B 磷酸化的抑制作用 与对照组比较，模型组大鼠卵巢组织胞浆 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达及核内 p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，BAY 组、联合用药组大鼠卵巢组织胞浆 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达及核内 p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与联合用药组比较，佛波酯组大鼠卵巢组织胞浆 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达及核内 p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，见图 12、表 7。

表 6 各组大鼠卵巢组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-4 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-4
对照组	0.48±0.09	0.52±0.03	0.45±0.04	1.07±0.03
模型组	1.14±0.09 [*]	1.17±0.03 [*]	1.15±0.04 [*]	0.40±0.04 [*]
阿司匹林组	0.75±0.11 [#]	0.89±0.05 [#]	0.90±0.03 [#]	0.53±0.05 [#]
四君子颗粒组	0.70±0.10 [#]	0.91±0.07 [#]	0.82±0.04 [#]	0.57±0.05 ^{#△}
联合用药组	0.60±0.10 ^{#△▲}	0.72±0.06 ^{#△▲}	0.70±0.05 ^{#△▲}	0.76±0.02 ^{#△▲}

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与阿司匹林组比较，[△] $P<0.05$ ；与四君子颗粒组比较，[▲] $P<0.05$ 。

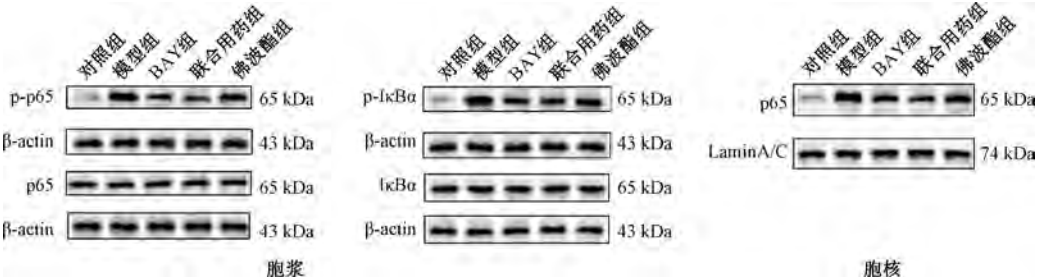


图 12 各组大鼠卵巢组织 p65、IκBα、p-p65、p-IκBα 蛋白条带

表 7 各组大鼠卵巢组织 p65、IκBα、p-p65、p-IκBα 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	p-p65/p65	p-IκBα/IκBα	p65/LaminA/C
对照组	0.36±0.05	0.21±0.04	0.27±0.03
模型组	1.27±0.07 [*]	1.05±0.03 [*]	1.04±0.03
BAY 组	0.82±0.11 [#]	0.70±0.05 [#]	0.75±0.04
联合用药组	0.71±0.08 ^{#△}	0.67±0.03 ^{#△}	0.59±0.04
佛波酯组	1.03±0.10 [▲]	0.79±0.06 [▲]	0.94±0.03

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与 BAY 组比较，[△] $P<0.05$ ；与联合用药组比较，[▲] $P<0.05$ 。

4 讨论

PCOS 的发病与机体的炎症状态密切相关，有研究指出，机体慢性炎症反应诱导卵巢组织氧化应激和组织纤维化，阻碍了卵泡发育，损害生殖功能^[11-12]。因此，调节机体异常的炎症反应，改善慢性炎症状态，对延缓和治疗 PCOS 具有重大意义。

本研究运用网络药理学筛选出四君子颗粒与阿司匹林的 190 个作用靶点，在两者联合治疗 PCOS 的核心靶点相互作用网络中，共有 154 个潜在靶点和 583 条相互作用关系，其中 IL-6、TNF、NF-κB RELA (p65) 等参与的最普遍，表明以上因子可能是四君子颗粒联合阿司匹林治疗 PCOS 的核心靶点。再对核心靶点的功能和通路进行富集分析，其涉及的生物学功能主要和细胞因子、转录因子活性等有关，发挥作用的信号通路主要是炎症相关通路。

研究发现，IL-1β 可抑制促卵泡生成素受体 (FSHR) 和黄体生成素受体 (LHR) 的功能，从而抑制卵泡成熟和排卵^[13-14]。NF-κB 信号通路是机体调节炎症反应的经典通路，TNF-α 作为该通路的上游炎症因子，表达异常增加往往与通路的过度激活有关^[15-16]。TNF-α 介导的 NF-κB 通路激活后，NIK 作为非经典 NF-κB 信号通路的关键组成部分会在 TNF-α 诱导下稳定积累，激活下游的非经典 NF-κB 信号通路，引起机体的炎症反应^[17-18]。IL-6 是 NF-κB 信号通路下游的炎症因子之一，进一步促进机体炎症因子的聚集，

诱导炎症反应^[19-20]。TNF-α、IL-1β、IL-6 生理功能广泛，被视为“黄金检测组合”，在多种疾病的诊断和治疗中都发挥关键作用^[21]。IL-4 作为一种抗炎因子，有助于机体调节免疫反应的平衡，减轻过度的炎症反应，是治疗慢性炎症的重要潜在靶点^[22-25]。本研究结果表明，四君子颗粒联合阿司匹林可减轻 PCOS 大鼠的炎症反应，改善动情周期紊乱和激素水平异常，下调促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 NF-κB 信号通路 p-p65、p-IκBα、核内 p65 蛋白表达，上调抗炎因子 IL-4 蛋白表达。

综上所述，四君子颗粒联合阿司匹林具有多靶点、多效应的优势，可减轻 PCOS 大鼠慢性炎症反应，改善动情周期紊乱，调节性激素水平，但两者在临床上的具体治疗周期与服药剂量仍需进一步验证。

参考文献：

[1] Scragg J, Hobson A, Willis L, *et al.* Effect of weight loss interventions on the symptomatic burden and biomarkers of polycystic ovary syndrome: A systematic review of randomized controlled trials[J]. *Ann Intern Med*, 2024, 177 (12): 1664-1674.

[2] Myers S H, Russo M, Dinicola S, *et al.* Questioning PCOS phenotypes for reclassification and tailored therapy[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(11): 694-703.

[3] Liu K L, He X, Huang J Y, *et al.* Short-chain fatty acid-butyric acid ameliorates granulosa cells inflammation through regulating METTL3-mediated N6-methyladenosine modification of FOSL2 in polycystic ovarian syndrome[J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1): 86.

[4] Zhao H, Xing C, Zhang J Q, *et al.* Comparative efficacy of oral insulin sensitizers metformin, thiazolidinediones, inositol, and berberine in improving endocrine and metabolic profiles in women with PCOS: a network meta-analysis [J]. *Reprod Health*, 2021, 18(1): 171.

[5]

何 牟, 李 静, 杨 骏, 等. 经典名方四君子汤的历史沿革与关键信息考证[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(4): 83-90.

[6]

严清霜, 汤万权, 常 森, 等. 四君子汤联合 rhG-CSF 对卵巢癌患者术后化疗导致白细胞降低的临床效果[J]. 实用癌症杂志, 2024, 39(4): 681-685.

[7]

肖 萌, 赵景涛, 王军徽, 等. 四君子汤治疗肝癌的临床研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2023, 37(6): 94-98.

[8]

袁红昌, 卢乙众. 基于网络药理学探讨四君子汤治疗克罗恩病的作用机制[J]. 新中医, 2022, 54(5): 14-22.

[9]

Bradley C S, Romero R. Larry J. Copeland, MD, *American Journal of Obstetrics & Gynecology Editor*[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2022, 226(5): 603-604.

[10]

Zhang Q, Ren J, Wang F F, *et al.* Chinese herbal medicine alleviates the pathogenesis of polycystic ovary syndrome by improving oxidative stress and glucose metabolism *via* mitochondrial Sirtuin 3 signaling[J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154556.

[11]

Antar S A, Ashour N A, Marawan M E, *et al.* Fibrosis: types, effects, markers, mechanisms for disease progression, and its relation with oxidative stress, immunity, and inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 4004.

[12]

Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, *et al.* Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease-novel insights into cellular communication circuits[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(4): 1136-1160.

[13]

He S J, Li H, Zhang Q J, *et al.* Berberine alleviates inflammation in polycystic ovary syndrome by inhibiting hyaluronan synthase 2 expression[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155456.

[14]

Chen Y, Luo X F, Li Y Z, *et al.* PTX3 impairs granulosa cell function by promoting the secretion of inflammatory cytokines in M1 macrophages *via* the JAK pathway[J]. *Steroids*, 2025, 214: 109541.

[15]

Zhao Y L, Shao C Y, Zhou H F, *et al.* Salvianolic acid B inhibits atherosclerosis and TNF- α -induced inflammation by regulating NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 155002.

[16]

Chen T L, Zhang X D, Zhu G L, *et al.* Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation *via* downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway *in vitro*[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(38): e22241.

[17]

Zhang K, Zhang M X, Meng X X, *et al.* Targeting GPR65 alleviates hepatic inflammation and fibrosis by suppressing the JNK and NF- κ B pathways[J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 56.

[18]

Chen M, Chen Z Y, Huang D, *et al.* Corrigendum to “Myricetin inhibits TNF- α -induced inflammation in A549 cells *via* the SIRT1/NF- κ B pathway” [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2021, 68: 102031.

[19]

Sun J, Zhou Y Q, Xu B Y, *et al.* STING/NF- κ B/IL-6-mediated inflammation in microglia contributes to spared nerve injury (SNI) -induced pain initiation[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2022, 17(3-4): 453-469.

[20]

Zheng Y, Li Y Q, Ran X W, *et al.* Mettl14 mediates the inflammatory response of macrophages in atherosclerosis through the NF- κ B/IL-6 signaling pathway[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(6): 311.

[21]

邓亚胜, 习兰花, 范燕萍, 等. 中药活性成分调节哮喘 Th1/Th2、Th17/Treg 免疫应答平衡的作用及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(4): 1000-1021.

[22]

Gao S S, Zhou J, Liu N, *et al.* Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 85: 131-139.

[23]

Cristofori F, Dargenio V N, Dargenio C, *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 578386.

[24]

Lee Y, Choi H K, N’deh K P U, *et al.* Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 411.

[25]

Sha W J, Zhao B, Wei H Z, *et al.* Astragalus polysaccharide ameliorates vascular endothelial dysfunction by stimulating macrophage M2 polarization *via* potentiating Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154667.