

· 临床论著 ·

右归胶囊通过 JAK2/STAT3 通路改善高龄体外受精 - 胚胎移植女性卵细胞质量

连 方¹ 宋诗艳²

摘要 **目的** 探讨右归胶囊通过干预调节络氨酸激酶 2/信号传导及转录激活因子 3 (JAK2/STAT3) 通路中关键因子 JAK2、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 及与通路相关的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平对高龄肾阳虚体外受精 - 胚胎移植 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 患者卵细胞质量的影响。**方法** 64 例高龄肾阳虚 IVF-ET 女性分为治疗组 (右归胶囊 + 西药) 和安慰剂组 (安慰剂 + 西药), 每组 32 例。另选非肾阳虚 IVF-ET (男方因素) 高龄女性 32 例为对照组。观察前两组肾阳虚证候积分变化和各组促性腺激素 (Gn) 天数及用量、绒毛促性腺激素 (HCG) 日血雌二醇 (E_2)、黄体生成素 (LH)、孕酮 (P) 水平、获卵数、优卵率、受精率、获胚数、临床妊娠率; 检测 JAK2/STAT3 通路中关键因子 JAK2、Cyclin D1 蛋白表达及与通路相关的 SOD 水平。**结果** 与本组治疗前比较, 治疗组 HCG 日证候积分降低 ($P < 0.01$), 且较安慰剂组积分低更明显 ($P < 0.01$)。与安慰剂组比较, 治疗组和对照组 Gn 天数及用量减少 ($P < 0.01$), HCG 日 E_2 水平、获卵数、获胚数、优卵率、受精率、临床妊娠率均增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), SOD 水平、JAK2、CyclinD1 蛋白相对表达量亦升高 ($P < 0.05$)。**结论** 右归胶囊可能是通过 JAK2/STAT3 通路上调 SOD、JAK2、Cyclin D1 水平表达, 从而改善肾阳虚症状, 提高高龄肾阳虚 IVF-ET 患者的卵细胞质量, 有助于改善 IVF 结局。

关键词 高龄女性; 补肾中药; 卵细胞质量; 络氨酸激酶 2; JAK2/STAT3 通路; 细胞周期蛋白 D1; 超氧化物歧化酶

Yougui Capsule Improved Follicular Quality of Elderly Women undergoing IVF- ET through JAK2/STAT3 Pathway LIAN Fang¹ and SONG Shi-yan² 1 Reproduction and Genetic Center for Integrative Traditional and Western Medicine Research, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014); 2 First Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355)

ABSTRACT **Objective** To explore the effects of Yougui Capsule on the quality of oocytes in elderly patients with Shen-yang deficiency syndrome undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) by regulating the level of key factors (including JAK2, Cyclin D1 and SOD) in JAK2/STAT3 pathway. **Methods** Totally 64 IVF- ET elderly patients with Shen-yang deficiency were assigned to the treatment group (Yougui Capsule + Western medicine) and the placebo group (placebos + Western medicine), 32 cases in each group. Another 32 healthy elderly women (non-Shen-yang deficiency but male factor) were enrolled as the control group. The change of Shen-yang deficiency syndrome scores was observed in the treatment and placebo group before and after treatment, the amount and days of using gonadotropin (Gn), the estradiol (E_2), luteinizing hormone (LH) and progesterone (P) level on the day of human chorionic gonadotropin (HCG) injection, the number of retrieved oocytes and embryo, high quality oocytes rate, the fertilization and clinical pregnancy rate were also observed and calculated. JAK2/Cyclin D1 protein expression and the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81273790)

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心 (济南 250011); 2. 山东中医药大学第一临床医学院 (济南 250011)

通讯作者: 连 方, Tel: 0531-68617800, E-mail: f_lian@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180122.039

level of SOD associated with the JAK2/STAT3 pathway were measured in each group. Results Compared with before treatment, the syndrome scores on the day of HCG injection were significantly lower in the treatment group ($P < 0.01$), and it was much lower than the placebo group ($P < 0.01$). Compared with the placebo group, the amount and days of using Gn were significantly reduced ($P < 0.01$), the level of E_2 on the day of HCG, the number of retrieved oocytes and embryos, the high quality oocytes rate, the fertilization and clinical pregnancy rate were significantly higher($P < 0.05$), JAK2/Cyclin D1 protein expression and SOD level associated with the JAK2/STAT3 pathway were all increased in the treatment group and the control group. Conclusion For the elderly IVF- ET patients with Shen-yang deficiency, Yougui Capsule could improve their clinical syndrome and oocytes quality by up-regulating JAK2, Cyclin D1, SOD expression in JAK2/STAT3 pathway, thus improving the outcomes of IVF- ET.

KEYWORDS elderly women; Chinese drug for invigorating Shen; oocytes quality; Janus Kinase 2; JAK2/STAT3 pathway; Cyclin D1; superoxide dismutase

随着经济、文明的双发展,很多女性选择先立业后成家,导致婚育年龄推迟。女子自“五七”始生殖力逐渐降低,突出表现在卵细胞质量上的降低,最终导致不孕。前期研究证明补肾中药可改善机体肾虚症状,提高卵子质量^[1]。近些年已明确验证络氨酸激酶 2/信号传导及转录激活因子 3 (Janus Kinase2/Signal transducers and activators of transcription3, JAK2/STAT3) 通路参与调节氧化应激和卵巢颗粒细胞增殖^[2]。本研究旨在监测卵巢颗粒细胞 JAK2/STAT3 通路上关键因子 JAK2、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 及与通路相关的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平的表达,完善补肾中药通过抗氧化应激促进颗粒细胞增殖从而提高卵细胞质量和改善体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 结局理论。

资料与方法

- 1 诊断标准
- 1.1 西医不孕症诊断标准 不孕症参照文献[3];不孕症输卵管因素诊断标准参考中国中西医结合学会妇产科专业委员会第三届学术会议——子宫内膜异位症/妊娠高血压综合征及女性不孕症的中西医结合诊疗标准^[4];年龄 >35 岁的女性称为高龄女性。
- 1.2 中医肾虚不孕症辨证标准 参照参考文献[5],由两位副主任医师对入选受试者进行独立辨证,两次辨证相吻合者随即入选。

- 2 纳入标准 (1)符合西医输卵管因素或男方因素所致不孕症的诊断标准;(2)符合中医肾虚型不孕症的诊断标准;(3)年龄 35 ~ 42 岁已婚女性;(4)基础内分泌值未见明显异常者;(5)签署知情同意书。
- 3 排除标准 (1)《母婴保健法》中不建议受孕者;(2)对实验药物过敏者;(3)合并其他系统重大疾病者;(4)严重精神障碍者;(5)吸毒病史者;(6)近 3 个月经周期应用激素或其他不利于妊娠且处在作用期物品者;(7)智力低下,无法沟通者。
- 4 一般资料 2014 年 7 月—2015 年 12 月就诊于山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心高龄不孕女性 96 例,其中高龄肾虚 IVF-ET 患者 64 例,按照随机数字表法分为治疗组(右归胶囊 + 西药),安慰剂组(安慰剂 + 西药),每组 32 例。最终治疗组入组分析 31 例,对照组 29 例,另选高龄非肾虚 IVF-ET(男方因素)患者 32 名作为对照组。各组年龄、病程、不孕类型、基础卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteotropic hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E_2), 肾虚证候积分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。此研究经山东中医药大学附属医院生殖伦理委员会批准(伦理号: 201407002S)。
- 5 治疗方法 各组均使用拮抗剂方案,月经周期第 3 天测血 FSH、LH、 E_2 和阴道 B 超结果,皮下注射重组人促卵泡激素注射液 (rFSH, 规格:75 IU/支,瑞士雪兰诺公司,批准文号:S2013005575)或(和)人绝

表 1 各组患者一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	病程(年)	原发/继发	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	E_2 (pg/mL)	证候积分(分)
治疗	31	37.42 ± 2.35	3.74 ± 2.71	13/18	10.34 ± 1.61	5.41 ± 1.06	45.23 ± 8.68	23.42 ± 3.22
安慰剂	29	37.76 ± 2.12	4.14 ± 3.07	15/14	9.99 ± 1.32	5.18 ± 1.04	45.52 ± 9.56	23.72 ± 2.43
对照	30	37.57 ± 2.06	4.07 ± 2.21	14/16	10.18 ± 1.28	5.31 ± 1.25	46.73 ± 9.88	—

经期促性腺激素(human menopausal gonadotropin, HMG),规格:75 IU/支,丽珠集团丽珠制药厂,按照卵泡大小、激素水平及时改变药物及药量。当卵泡直径 ≥ 14 mm时,连续每天皮下注射注射用醋酸西曲瑞克(GnRH-ant,规格:0.25 μ g/支,瑞士雪兰诺公司)0.25 μ g至HCG日。

治疗组于月经周期第3天予右归胶囊(由炮附子、肉桂、鹿角胶、熟地黄、酒萸肉、枸杞子、山药、菟丝子、盐杜仲、当归组成,规格:0.45 g/粒,江西银涛药业有限公司提供,批号:Z20030134)口服,4粒/次,每日3次,口服,至扳机日,同时予安慰剂组及对照组等量安慰剂。B超示子宫内膜三线征,卵泡直径 ≥ 18 mm时,肌肉注射注射用绒促性素(human chorionic gonadotropin, HCG),规格:2 000 IU/支,丽珠集团丽珠制药厂,6 000~10 000 IU,34~36 h后行经阴道超声引导下穿刺取卵术。

6 观察指标及方法 取卵后收集卵泡液,以提取颗粒细胞;行IVF,并观察受精情况,体外培养3天后行ET,术后予适量黄体酮和(或)HCG进行黄体支持。

6.1 临床观察指标检测 包括肾虚证候评分、促性腺激素(Gn)天数及用量、HCG日血 E_2 、LH、P水平、获卵数、优卵率、受精率、获胚数和临床妊娠率指标的检测。

6.2 SOD水平检测 采用化学发光法测定SOD水平。

6.3 JAK2、CyclinD1蛋白水平检测 采用蛋白质印迹法(Western blot)测定。1.5 mL EP管装400 μ L细胞裂解液裂解PBA清洗后的颗粒细胞,1 200 r/min $\times$ 20 min,吸取上清液于新的1.5 mL冰浴EP管中。应用Thermo BCA蛋白浓度测定试剂盒,配制Reagent A与Reagent B=50:1的混合蛋白定量液。将双蒸水20 μ L、蛋白样品5 μ L和蛋白定量液200 μ L依次加入96孔板中,37℃孵育30 min。570 nm测量波长,450 nm校正波长测量蛋白反应液吸光度。用标准公式换算成浓度后予PBA将每个样品调整为等体积等浓度,加入6 $\times$ SDS Loading Buffer,100℃加热5 min,制成蛋白样品。取出凝胶置于1 $\times$ 转膜液中。准备两块稍大于凝胶的滤纸浸泡于1 $\times$ 转膜液。另准备一块稍大于滤纸的PVDF膜置甲醇2 min。转膜装置顺序是滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸。350 mA恒流,接通电源,转膜70 min。将PVDF膜置于1% BSA封闭液中,摇床上室温封闭2 h。根据marker将PVDF膜切成大小合适的目的条带,适量

的封闭液与相应抗体配比成一抗工作液,将条带置于一抗孵育盒中,摇床4℃过夜。次日用1 $\times$ TBST于摇床中清洗,10 min/次 $\times$ 3次。适量的二抗工作液(封闭液:二抗=50 000:1)覆盖条带,于二抗孵育盒中摇床上室温1 h。后用1 $\times$ TBST于摇床中清洗,10 min/次 $\times$ 3次。将条带置于200 μ L ECL底物发光工作液(A液:B液=1:1)中曝光,Image J软件分析蛋白和内参(β -actin)的灰度值,并计算两者的比值,该比值可反应蛋白表达水平。即蛋白相对表达量=蛋白灰度值/ β -actin灰度值 $\times$ 100%。

7 统计学方法 应用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 描述,同组治疗前后或两组间比较用 t 检验;各组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用LSD检验。计数资料用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病例完成情况 治疗组脱落1例,完成31例,安慰剂组脱落3例,完成29例,对照组脱落2例,完成30例。

2 两组治疗前后肾虚证候积分比较(表2) 与本组治疗前比较,治疗组治疗后肾虚证候积分降低($P<0.01$);与安慰剂组比较,治疗组治疗后肾虚证候积分降低更明显低($P<0.01$)。

表2 两组治疗前后肾虚证候积分比较(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	肾虚证候积分
治疗	31	治疗前	23.42 $\pm$ 3.22
		治疗后	19.74 $\pm$ 3.09 ^{*Δ}
安慰剂	29	治疗前	23.72 $\pm$ 2.43
		治疗后	23.34 $\pm$ 2.16

注:与本组治疗前比较,* $P<0.01$;与安慰剂组比较, $\Delta P<0.01$

3 各组Gn天数及用量、HCG日 E_2 、LH、P水平、获卵数、获胚数、优卵率、受精率、临床妊娠率比较(表3) 与安慰剂组比较,治疗组及对照组的Gn天数及用量减少($P<0.01$),HCG日 E_2 水平、获卵数、获胚数、优卵率、受精率、临床妊娠率均增高($P<0.05$, $P<0.01$)。

4 各组SOD水平比较(表4) 与安慰剂组比较,治疗组和对照组SOD水平升高($P<0.05$)。

5 各组JAK2、CyclinD1蛋白相对表达量比较(表5,图1) 与安慰剂组比较,治疗组和对照组JAK2、CyclinD1蛋白相对表达量均升高($P<0.05$)。

讨 论

中医学“七七”理论中讲到“五七,阳明脉衰,面始

表 3 各组 Gn 天数及用量、HCG 日 E₂、LH、P 水平、获卵数、获胚数、优卵率、受精率、临床妊娠率比较

组别	例数	Gn 天数(天, $\bar{x} \pm s$)	Gn 用量(IU, $\bar{x} \pm s$)	E ₂ (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)	LH(mIU/mL, $\bar{x} \pm s$)	P(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)
安慰剂	29	11.34 ± 1.54	3 304.34 ± 823.21	1 687.90 ± 893.88	3.78 ± 2.47	1.22 ± 0.44
治疗	31	10.26 ± 1.32 **	2 548.94 ± 728.77 **	2 633.48 ± 793.13 **	3.80 ± 2.76	1.03 ± 0.45
对照	30	10.07 ± 1.34 **	2 651.73 ± 823.55 **	2 696.00 ± 771.47 **	3.97 ± 2.86	1.17 ± 0.47

组别	例数	获卵数(枚, $\bar{x} \pm s$)	获胚数(枚, $\bar{x} \pm s$)	优卵数[例(%)]	受精数[例(%)]	临床妊娠数[例(%)]
安慰剂	29	6.21 ± 3.96	2.28 ± 1.22	111(61.67)	99(55)	6(20.69)
治疗	31	8.00 ± 3.54 *	3.68 ± 1.92 *	194(78.23) *	175(70.56) *	14(45.16) *
对照	30	8.33 ± 2.55 *	3.97 ± 1.94 *	203(81.20) *	191(76.40) *	15(50.00) *

注:与安慰剂组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

表 4 各组 SOD 水平比较 (10³NU/gprot, $\bar{x} \pm s$)

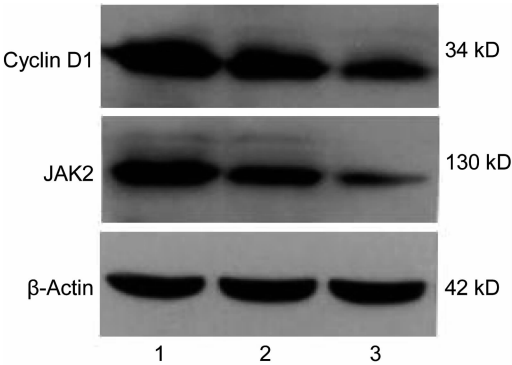
组别	例数	SOD
安慰剂	29	3.006 ± 0.507
治疗	31	3.361 ± 0.571 *
对照	30	3.284 ± 0.497 *

注:与安慰剂组比较,**P* < 0.05

表 5 各组 JAK2、Cyclin D1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	JAK2	CyclinD1
安慰剂	29	0.502 4 ± 0.034 2	0.696 5 ± 0.040 8
治疗	31	0.524 3 ± 0.042 2 *	0.725 8 ± 0.045 7 *
对照	30	0.529 6 ± 0.045 0 *	0.721 8 ± 0.038 5 *

注:与安慰剂组比较,**P* < 0.05



注:1 为对照组;2 为治疗组;3 为安慰剂组

图 1 JAK2/Cyclin D1 蛋白表达图

焦,发始堕”。即生理状态下,女子自五七始,阳明脉气渐衰,肾阳开始衰少,生殖功能的开始衰退,机体呈现“肾阳易虚”的生理状态。肾主生殖,卵巢归属胞脉,而“胞脉系于肾”,故卵巢的藏泻受肾的调节。若肾阳虚衰,推动无力,温煦乏源,卵巢只藏不泻,藏泻失司,影响其成熟和排出,故可导致卵子质量低下和(或)滞留于卵巢,出现不排卵、卵泡黄素化或卵巢囊肿等现象。

颗粒细胞是卵巢内的主要功能细胞,其合成和分泌卵巢性激素,促进卵子的生长、发育及排出。机体活性氧类(ROS)导致女性卵母细胞质量的下降可能是

高龄女性发生不孕和 IVF-ET 妊娠结局差的重要原因之一^[6,7]。ROS 是通路的重要组成部分之一,有研究证实其可激活 JAK/STAT 信号转导通路^[8,9],调控卵巢颗粒细胞增殖^[2]。SOD 是颗粒细胞产生的可以保卫卵细胞免受氧化应激损害的金属酶抗氧化剂^[10],能够反映机体氧化和抗氧化水平及氧化应激状态,其能够清扫氧自由基,从而保卫卵细胞遭遇氧化应激伤害^[11]。临床研究证实 JAK2/STAT3 通路的活化可缓解细胞氧化应激状态,促进其增殖。有资料显示 JAK2/STAT3 通路被激活后可提高 SOD 活性以对抗生物膜膜脂质过氧化损伤^[12]。王超君等^[2]研究发现 JAK2/STAT3 通路参与调节氧化应激和卵巢颗粒细胞增殖。

本研究中,与本组治疗前比较,治疗组 HCG 日证候积分降低(*P* < 0.01),且较安慰剂积分低更明显(*P* < 0.01),说明右归胶囊可显著改善肾阳虚患者的肾阳虚症状。E₂的高低预示卵子质量的好坏。治疗组 HCG 日 E₂较高(*P* < 0.05),因此可推测右归胶囊能够提高卵细胞质量。治疗组 SOD 水平升高(*P* < 0.05),表明颗粒细胞氧化应激程度较安慰剂组低。JAK2、CyclinD1 蛋白相对表达量亦升高(*P* < 0.05),说明颗粒细胞的增殖较安慰剂组明显。治疗组的获卵数、获胚数、优卵率、受精率、临床妊娠率均增高(*P* < 0.05),表明右归胶囊通过提高卵子质量最终改善 IVF-ET 结局。

右归胶囊中,炮附子、肉桂、鹿角胶补肾助阳,温里祛寒,为君;熟地黄、酒萸肉、枸杞子、山药滋肾填精,养肝补脾,取自张景岳《景岳全书》“善补阳者,必于阴中求阳,则阳得阴助而生化无穷”之义,为臣;菟丝子、盐杜仲补肝肾,强腰膝,加用当归养血活血,共补肝肾之精血,为佐。诸药合用,温补肾阳,填精益髓,适用于不孕之肾阳虚证。动物实验结果提示右归胶囊可明显提高小鼠的体温和增加肾阳虚证小鼠负重游泳时间,从而达到补肾助阳的作用^[13]。赵敏等^[14]研究发现其可上调模型大鼠肾组织内 TLR4 蛋白和基因的表达,增强机体免疫功能,最终改善模型大鼠肾阳虚状态。崔妍等^[15]临床观察发现其在中医方面明显改善患者的

肾阳虚症状,从现代医学角度使基础体温高温相温度显著升高并延长,常被用于治疗肾阳虚型女性不孕症。

本研究表明右归胶囊可明显改善高龄肾阳虚 IVF-ET 女性肾虚状态,提高其获卵数、优卵率、受精率、获胚数、临床妊娠率,其可能是通过 JAK2/STAT3 通路上调 JAK2、Cyclin D1、SOD 水平表达,从而提高高龄肾阳虚不孕患者的卵细胞质量,最终改善 IVF-ET 结局。鉴于多种条件的限制,本研究样本量较少,若想进一步证实结论,需进行大样本临床研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 连方,田珊,张翔昱.二至调经颗粒对多囊卵巢综合征不孕患者卵泡质量的影响[J].中医杂志,2011,52(2):114-117.
- [2] 王超君,李冬华,邢燕,等.JAK2/STAT3 通路参与过氧化氢抑制小鼠原代颗粒细胞增殖的研究[J].生殖医学杂志,2015,24(4):316-321.
- [3] 谢幸,苟文丽主编.妇产科学[M].北京:人民卫生出版社,2014:369.
- [4] 中国中西医结合学会妇产科专业委员会第三届学术会议.子宫内膜异位症/妊娠高血压综合征及女性不孕症的中西医诊疗标准[J].中国中西医结合杂志,1991,11(6):376-378.
- [5] 马宝璋主编.中医妇科学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:224.
- [6] Benkhalifa M, Ferreira YJ, Chahine H, et al. Mitochondria: participation to infertility as source of energy and cause of senescence[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 55(1): 60-64.
- [7] Goncalves RLS, Rothschild DE, Quinlan CL, et

al. Sources of superoxide/H₂O₂ during mitochondrial proline oxidation[J]. Redox Biol, 2014, 2(1): 901-909.

- [8] Mazière C, Conte MA, Mazière JC. Activation of JAK2 by the oxidative stress generated with oxidized low-density lipoprotein[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(11): 1334-1340.
- [9] Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6Pt 1): C1640-C1652.
- [10] Li J, Foote RH, Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase[J]. Biol Reprod, 1993, 49(1): 33-37.
- [11] Zavodnik IB, Domanski AV, Lapshina EA, et al. Melatonin directly scavenges free radicals generated in red blood cells and a cell-free system: chemiluminescence measurements and theoretical calculations[J]. Life Sci, 2006, 79(4): 391-400.
- [12] 刘胜中,杨双强.TTX 通过 JAK2/STAT3 通路活化 SOD 减轻心肌细胞凋亡[J].重庆医科大学学报,2010,35(1):64-67.
- [13] 方铝,朱良辉,曾文丽.右归胶囊的补肾助阳作用研究[J].药品评价,2004,1(2):128-129.
- [14] 赵敏,周安方,徐安莉,等.右归胶囊对肾阳虚大鼠 TLR4 影响的实验研究[J].中华中医药学刊,2013,31(11):2550-2551,2602.
- [15] 崔妍,龚瑾.右归胶囊治疗肾阳虚型不孕症临床观察[J].山西中医,2013,29(9):19-20,22.

(收稿:2016-03-16 在线:2018-06-27)

责任编辑:白霞