

· 基础研究 ·

补肾调经方和逍遥丸对体外培养小鼠卵泡中
ADAM8 及 ADAMTS-1 影响的比较刘亚华¹ 段彦苍^{1,2} 李 丽¹ 贺 明² 范丽洁^{1,2} 梁 潇^{1,2} 杜惠兰^{1,2}

摘要 **目的** 探讨补肾调经方和逍遥丸对体外培养小鼠卵泡中去整合素-金属蛋白酶 8 (ADAM8) 和 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (ADAMTS-1) 表达的影响。**方法** 机械法分离昆明乳鼠窦前卵泡, 随机分为空白组、正常组、补肾组、疏肝组, 空白组不加血清, 正常组加入正常大鼠血清, 体外培养 12 天; 补肾组加入补肾调经 II 号方高剂量大鼠含药血清, 疏肝组加入逍遥丸高剂量大鼠含药血清体外培养 11 天。11 天时补肾组和疏肝组分别改为补肾调经 III 号方高剂量和逍遥丸低剂量大鼠含药血清体外培养 1 天。培养 12 天加入人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 后 0、8、12、16 h 采用 RT-PCR 法检测各组卵泡和卵丘卵母细胞复合体 (COCs) 中 ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达, 细胞免疫荧光染色法比较各组 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达。**结果** 加入 hCG 后 0、8、12、16 h, 各组 ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 及蛋白的表达逐渐升高, 各时间点空白组与正常组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与本组 0、8 h 比较, 补肾组 12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与本组 0 h 比较, 疏肝组 8 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 及蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与空白组和正常组比较, 补肾组与疏肝组 8、12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 及蛋白表达升高, 8 h 疏肝组高于补肾组, 12 h 补肾组高于疏肝组 (均 $P<0.05$)。补肾组 ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 及蛋白的表达高峰高于疏肝组 ($P<0.05$)。**结论** 补肾调经方和逍遥丸均可通过增强 ADAM8 和 ADAMTS-1 的蛋白溶解作用, 使卵泡壁破裂而诱发排卵, 补肾法诱发排卵的作用优于疏肝法。

关键词 补肾调经方; 逍遥丸; 去整合素-金属蛋白酶 8; I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶

Comparison of Effects of Bushen Tiaojing Formula and Xiaoyao Pills on Expression of ADAM8 and ADAMTS-1 in Vitro Cultured Follicles of Mice LIU Ya-hua¹, DUAN Yan-cang^{1,2}, LI Li¹, HE Ming², FAN Li-jie^{1,2}, LIANG Xiao^{1,2}, and DU Hui-lan^{1,2} ¹ Faculty of Integrative Medicine Gynecology, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang (050200); ² Collaborative Innovation Center of Integrative Medicine on Reproductive Disease, Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-kidney Patterns, Shijiazhuang (050200)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Bushen Tiaojing Formula (BSTJF) and Xiaoyao Pills (XYP) on the expression of a disintegrin and metalloprotease 8 (ADAM8) and a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-1 (ADAMTS-1) in vitro cultured follicles of mice. **Methods** The preantral follicles of healthy Kunming female mice were separated by microdissection, which were divided into 4 groups: blank group, normal group, BSTJF group, XYP group randomly. The preantral follicles were inoculated by culture medium without medicated serum (blank group), normal rats' serum (normal group), high dose BSTJF II (Bushen group) or high dose XYP containing serums (XYP group) for 12 days. BSTJF group and XYP group were changed to high

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173294, No. 81774359, No. 81303002, No. 81973893)

作者单位: 1. 河北中医学院中西医结合学院妇科教研室 (石家庄 050200); 2. 河北省中西医结合生殖疾病协同创新中心, 河北省中西医结合肝病证研究重点实验室 (石家庄 050200)

通讯作者: 杜惠兰, Tel: 0311-89926717, E-mail: duhuilan@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20211220.403

dose BSTJF III and low dose XYP serum respectively in 11st day. The follicles and excreted cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected after the hCG was added after 0, 8, 12, 16 h in 12nd day. RT-PCR and immunofluorescence staining were used to detect the mRNA and protein expression of ADAM8, ADAMTS-1 in follicles and COCs respectively. **Result** After the hCG was added, the mRNA and protein expression of ADAM8, ADAMTS-1 increased gradually in each group. There was no significant difference between blank and normal group at each time point ($P>0.05$). Compared with the same group at 0 and 8 h, mRNA and protein expressions of ADAM8 and ADAMTS-1 were increased at 12 and 16 h in BSTJF group ($P<0.05$). Compared with the same group at 0 h, the expressions of ADAM8 and ADAMTS-1 mRNA and protein were increased at 8 h in XYP group ($P<0.05$). Compared with the blank and normal group, the expression of ADAM8, ADAMTS-1 increased in the treatment groups at 8, 12 and 16 h. Compared with the BSTJF group, the expression of ADAM8, ADAMTS-1 in XYP group was higher at 8 h ($P<0.05$) and lower at 12 h ($P<0.05$). There was no significant difference between the BSTJF group and the XYP group at 16h ($P>0.05$). The mRNA and protein expression peak of ADAM8, ADAMTS-1 in BSTJF group was higher than that in XYP group. **Conclusions** Both BSTJF and XYP can enhance the proteolysis of ADAM8 and ADAMTS-1 to rupture the wall of follicle and induce ovulation. BSTJF is better than XYP in promoting ovulation.

KEYWORDS Bushen Tiaojing Formula; Xiaoyao Pills; a disintegrin and metalloprotease 8; a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-1

《素问·六节脏象论》^[1]云：“肾者主蛰，封藏之本，精之处也”，生殖之精藏于肾，肾藏精，精化气，肾气和肾精充盛为女子月经产生和孕育胎儿的主导。肝藏血，主疏泄，是调节女性生殖的主要枢纽。“女子以肝为先天”，女子经、孕、产、乳的生理特点均以血为体、以血为用，与肝关系密切。肾、肝与女子生殖功能密切相关，临床上常用补肾法、疏肝法治疗不孕症、月经不调等排卵障碍性疾病，疗效显著^[2-4]。排卵过程中，去整合素-金属蛋白酶 8 (a disintegrin and metalloprotease 8, ADAM8)、I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (adisintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-1, ADAMTS-1) 的蛋白溶解作用对卵泡壁破裂、卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 成功排出至关重要^[5,6]。本研究观察补肾调经方、逍遥丸对体外培养小鼠卵泡中 ADAM8、ADAMTS-1 表达的影响。

材料与方法

1 实验动物 出生 12 天健康雌性昆明乳鼠 128 只，6 周龄健康雌性 SD 大鼠 40 只，购自河北实验动物中心，动物合格证号：1608097，1610063。本研究严格遵循《赫尔辛基宣言》基本原则。本研究通过河北中医学院动物实验伦理审核 (No. DWLL2016002)。

2 药物 补肾调经 II 号方药物组成：熟地黄 15 g 山茱萸 15 g 枸杞子 12 g 女贞子 9 g

当归 9 g 白芍 9 g 山药 9 g 紫河车 3 g。补肾调经 III 号方药物组成：紫石英 10 g 仙茅 12 g 淫羊藿 12 g 肉苁蓉 10 g 熟地黄 15 g 菟丝子 12 g 覆盆子 10 g 丹参 10 g 枳壳 10 g 当归 9 g。饮片购自石家庄乐仁堂。水煎浓缩至含生药 1.54 g/mL，分装置 4℃ 冰箱中备用。逍遥丸 (河南宛西制药股份有限公司，批号：20160410)，药物组成：柴胡、当归、白芍、炒白术、茯苓、炙甘草、薄荷、生姜。将浓缩丸溶于蒸馏水中，制成混悬液，含生药 0.09 g/mL，分装置 4℃ 冰箱中备用。

3 主要试剂及仪器 α -改良伊格尔 (α modified eagle's medium, α -MEM) 培养基 (美国 Gibco 公司，批号：8116196)；FBS (美国 Gibco 公司，批号：1640958)；重组人促卵泡激素 (recombinant human follicle stimulating hormone, rhFSH, 德国 Merck Serono 公司，批号：AUO16217)；重组人促黄体激素 (recombinant human luteinizing hormone, rhLH, 德国 Merck Serono 公司，批号：AUO12487)；胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS, 美国 Sigma 公司，批号：1711871)；Total RNA Kit II (美国 Omega 公司，批号：00R6934010000126P079)；Hiscript II Q Select RT super Mix (美国 Vazyme 公司，批号：7E070F6)；Ace Q q PCR SYBR Green Master Mix (美国 Vazyme 公司，批号：7E041C6)；ADAM8 一抗 (美国 Biorbyt 公司，批号：orb389340)；ADAMTS-1 一抗 (美国 proteintech 公司，批号：

20960-1-AP); 荧光二抗 (美国 proteintech 公司, 货号: SA00003-2)。紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司): ND2000 型; RT-PCR System (美国 Life 公司): 7500 Fast 型; CTS SP8 激光共聚焦显微镜系统 (德国 Leica 公司)。

4 大鼠含药血清制备 6 周龄健康 SD 雌性大鼠饲养于清洁级动物房, 自由进食水, 按照随机数字表法随机分为正常组、补肾调经 II 号方高剂量组、补肾调经 III 号方高剂量组、逍遥丸高剂量组、逍遥丸低剂量组。补肾调经 II 号方高剂量组、补肾调经 III 号方高剂量组、逍遥丸高剂量组、逍遥丸低剂量组分别灌服补肾调经方和逍遥丸 (高剂量组 3 mL/100 g 体重、低剂量组 1 mL/100 g 体重), 正常组每日灌服等体积生理盐水; 每天 8:00、17:00 分 2 次给药, 连续 4 天。末次给药后 1 h 大鼠股动脉采血。室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 经 56 °C 水浴 30 min 灭活补体后, 0.22 μm 无菌滤器过滤, 分装 -80 °C 保存。

5 小鼠卵泡的体外培养 颈椎脱臼处死昆明乳鼠, 酒精消毒, 取双侧卵巢, 用含青、链霉素各 200 IU/mL、200 μg/mL 的生理盐水清洗 1~2 次, 置卵泡分离液 (α-MEM、10% FBS、100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 中, 25 G 针头在 40 倍体视显微镜下分离。窦前卵泡选择标准: 直径 80~120 μm, 圆形卵母细胞居于中央, 颗粒细胞透明, 卵泡壁和基底膜清晰完整。将分离的窦前卵泡随机分为空白组、正常组、补肾组、疏肝组, 置于装有培养液 (α-MEM、10% FBS、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、100 mIU/mL rhFSH、10 mIU/mL rhLH 和 1% ITS) 的 35 mm 培养皿中, 培养 24 h 后细胞贴壁。补肾组和疏肝组分别加入补肾调经 II 号方高剂量和逍遥丸高剂量大鼠含药血清, 正常组加正常大鼠血清, 空白对照组不加血清, 培养 12 天, 隔天换液。11 天补肾组和疏肝组分别改为补肾调经 III 号方高剂量和逍遥丸低剂量大鼠含药血清。12 天在培养液中加入 2.5 IU/mL hCG、5 ng/mL 表皮生长因子, 加入 hCG 后 0、8、12、16 h 后收集卵泡和排出的 COCs, 置于液氮保存备用 (用于 RT-PCR)。取培养皿中玻片上的卵泡或排出的 COCs, 自然风干, 置 4% 多聚甲醛中固定。

6 RT-PCR 法检测 ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 的表达 根据 Gene Bank 所发布的基因序列应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 经 Gene Bank BLAST 同源性检测, 由上海生工生物工程有限公司合

成: GAPDH: F: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', R: 3'-GCTTCACCACCTTCTTGATGTC-5', 引物大小为 198 bp; ADAM8: F: 5'-AGCTAAGAACAGGCC TCCAG-3', R: 3'-TGGTGGGAGGATCAGGTCTA-5', 引物大小为 179 bp; ADAMTS-1: F: 5'-GGCAAACG AGTCCGCTAC-3', R: 3'-CCCCTCTTCAATCA CCCAC-5', 引物大小为 189 bp。使用 Total RNA Kit II 试剂盒提取细胞总 RNA。紫外分光光度计测 RNA 纯度和浓度, 按照 Hiscript II Q Select RT super Mix 试剂盒操作进行反转录。PCR 热循环参数为 95 °C, 5 min 预变性, 95 °C 10 min; 60 °C 30 s, 共 40 个循环。扩增完毕后, 根据 CT 数据处理方法, 以 GAPDH 为内参照基因, 设置空白对照组的第 1 号样品为标准 1, 按照公式: 相对定量值 (RQ) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得到目的基因表达 RQ 值, 将 RQ 值用于统计分析。

7 免疫荧光法检测 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白的表达 将 4% 多聚甲醛中固定 30 min 的细胞爬片取出, 1% Triton X-100 PBS 孵育 15 min, 加 10% 正常山羊血清, 37 °C 封闭 10 min。加兔抗鼠单克隆抗体 (1:200 稀释), 4 °C 孵育过夜。充分洗涤后, 加羊抗兔 FITC 荧光标记二抗 (1:50), 室温避光 30 min。DAPI 染核。荧光显微镜下观察、拍照。

8 统计学方法 应用 SPSS 21.0 软件包进行统计处理。数值变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 做组间均数的比较时, 若满足正态性及方差齐性, 用单因素方差分析检验; 否则采用 Dunnett' T3 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

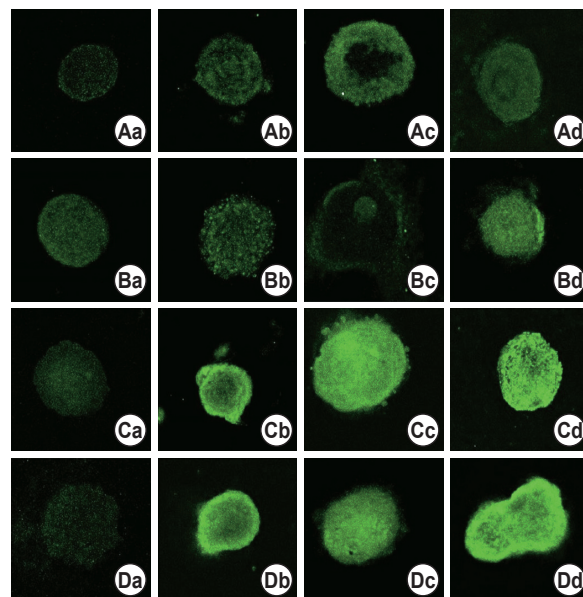
结 果

1 各组不同时间点 ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达比较 (表 1、2) 各组 ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达逐渐增高。与本组 0、8 h 比较, 补肾组 12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达升高 (P<0.05)。与本组 0 h 比较, 疏肝组 8 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达升高 (P<0.05), 与本组 8 h 比较, 12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达有升高趋势, 但差异无统计学意义 (P>0.05)。补肾组 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达峰值高于疏肝组。空白组与正常组比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。与正常组比较, 补肾组与疏肝组 8、12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 mRNA 表达升高 (P<0.05), 8 h 时疏肝组高于补肾组 (P<0.05), 12 h 补肾组高于疏肝组 (P<0.05)。

2 各组不同时间点 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白的表达比较 (表 3、4, 图 1、2) 补肾组于 0、8、12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达逐渐增高, 与 0、8 h 比较, 12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。疏肝组 0、8、12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达逐渐增高, 与 0 h 比较, 8、12、16 h 时 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达均增强 ($P<0.05$); 与 8 h 比较, 12、16 h ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。补肾组 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达高峰值高于疏肝组 ($P>0.05$)。空白组与正常组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白组和正常组比较, 8、12、16 h 时, 补肾组与疏肝组 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 8 h 时疏肝组高于补肾组 ($P<0.05$), 12 h 时补肾组高于疏肝组 ($P<0.05$)。

讨 论

排卵需要蛋白酶的溶解作用来促进卵母细胞从卵泡中释放^[7,8]。ADAMTS-1 在排卵过程中裂解 COCs 基质多功能蛋白聚糖, 破坏 COCs 基质的结构完整性而促进排卵^[9]。ADAMTS1 受 PR 的调节, PRKO 小鼠出现排卵障碍且卵巢无 ADAMTS-1 的表达^[10]; ADAMTS-1 敲除小鼠生育力低, 促性腺激素刺激 ADAMTS-1 敲除的小鼠后, 平均只排 12 个卵, 与同



注: FITC 绿色荧光标记 ADAM8 蛋白; A 为空白组, B 为正常组, C 为补肾组, D 为疏肝组; a 为加入 hCG 后 0 h, b 为加入 hCG 后 8 h, c 为加入 hCG 后 12 h, d 为加入 hCG 后 16 h

图 1 免疫荧光法检测体外培养卵泡或排出的 COCs 中 ADAM8 的表达 (IF, $\times 400$)

窝杂合子小鼠相比, 排卵数显著减少, 且影响体内受精^[11]; 这可能与蛋白水解酶重塑缺失、COCs 内的基质蛋白破裂减少有关^[12,13]。多囊卵巢综合征患者颗粒细胞中 ADAMTS-1 mRNA 及其蛋白的表达较

表 1 各组不同时间点 ADAM8 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 h	8 h	12 h	16 h
空白	6	1.003 $\pm$ 0.136	1.361 $\pm$ 0.127	1.695 $\pm$ 0.354	1.577 $\pm$ 0.194
正常	6	0.996 $\pm$ 0.091	1.115 $\pm$ 0.269	1.858 $\pm$ 0.247	1.512 $\pm$ 0.471
补肾	6	0.767 $\pm$ 0.039	1.807 $\pm$ 0.596 [▲]	3.261 $\pm$ 0.295 ^{*△▲}	3.233 $\pm$ 0.112 ^{*△▲}
疏肝	6	0.867 $\pm$ 0.108	2.355 $\pm$ 0.144 ^{*▲○}	2.655 $\pm$ 0.350 ^{*▲○}	2.890 $\pm$ 0.611 ^{*▲}

注: 与本组 0 h 比较, $^*P<0.05$; 与本组 8 h 比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与正常组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与补肾组比较, $^{\circ}P<0.05$; 表 2~4 同

表 2 各组不同时间点 ADAMTS-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

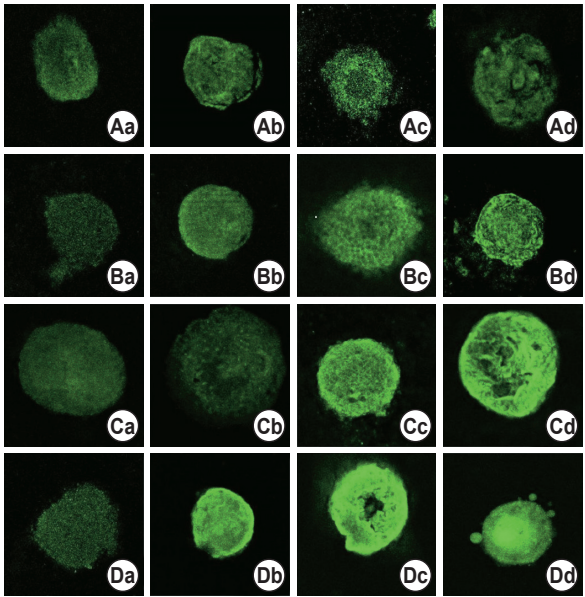
组别	n	0 h	8 h	12 h	16 h
空白	6	0.961 $\pm$ 0.370	1.305 $\pm$ 0.158	1.555 $\pm$ 0.175	1.618 $\pm$ 0.835
正常	6	0.927 $\pm$ 0.015	1.291 $\pm$ 0.220	1.795 $\pm$ 0.219	1.838 $\pm$ 0.164
补肾	6	0.960 $\pm$ 0.017	1.896 $\pm$ 0.489 [▲]	3.698 $\pm$ 0.107 ^{*△▲}	3.763 $\pm$ 0.188 ^{*△▲}
疏肝	6	0.963 $\pm$ 0.061	2.417 $\pm$ 0.594 ^{*▲○}	2.859 $\pm$ 0.501 ^{*▲○}	3.148 $\pm$ 0.268 ^{*▲}

表 3 免疫荧光法检测 ADAM8 蛋白含量表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 h	8 h	12 h	16 h
空白	6	3.158 $\pm$ 0.612	2.645 $\pm$ 0.158	3.494 $\pm$ 0.507	4.732 $\pm$ 0.803
正常	6	2.493 $\pm$ 0.245	2.006 $\pm$ 0.387	3.559 $\pm$ 0.301	2.636 $\pm$ 1.105
补肾	6	2.560 $\pm$ 0.623	3.821 $\pm$ 1.199 [▲]	9.344 $\pm$ 1.773 ^{*△▲}	7.483 $\pm$ 0.887 ^{*△▲}
疏肝	6	3.516 $\pm$ 0.438	7.880 $\pm$ 1.487 ^{*▲○}	7.155 $\pm$ 0.857 ^{*▲○}	6.182 $\pm$ 0.779 ^{*▲}

表 4 免疫荧光法检测 ADAMTS-1 蛋白含量表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 h	8 h	12 h	16 h
空白	6	4.501 ± 0.557	2.712 ± 0.750	3.278 ± 0.606	4.124 ± 1.541
正常	6	3.570 ± 0.243	1.649 ± 0.275	2.337 ± 1.365	3.872 ± 1.000
补肾	6	3.676 ± 0.145	1.931 ± 0.600 [▲]	5.603 ± 0.655 ^{*△▲}	7.640 ± 1.554 ^{*△▲}
疏肝	6	3.623 ± 0.895	4.448 ± 0.318 ^{*△○}	4.839 ± 0.324 ^{*△○}	5.946 ± 2.632 ^{*▲}



注: FITC 绿色荧光标记 ADAMTS-1 蛋白; A 为空白组, B 为正常组, C 为补肾组, D 为疏肝组; a 为加入 hCG 后 0 h, b 为加入 hCG 后 8 h, c 为加入 hCG 后 12 h, d 为加入 hCG 后 16 h

图 2 免疫荧光法检测体外培养卵泡或排出的 COCs 中 ADAMTS-1 的表达 (IF, ×400)

正常排卵女性亦显著降低^[14]。ADAMTS1 表达也与体外受精 (*in vitro fertilization*, IVF) 结果呈正相关, COCs 中 ADAMTS 表达与卵母细胞受精能力显著相关^[5]。ADAM 家族中另一种调节细胞基质的关键蛋白水解酶 ADAM8 也是 PR 下游靶基因, PR 敲除小鼠出现排卵障碍的同时 ADAM8 表达低于野生型小鼠^[15]。ADAM8 是排卵过程中重要的跨膜糖蛋白, 具有金属蛋白酶和解联蛋白域, 是连接蛋白水解的膜定位的前体, 通过激活信号分子、溶解 COCs 基质参与诱发排卵, ADAM8 mRNA 和蛋白在排卵前卵巢卵丘细胞和颗粒细胞中表达^[6,16,17]。故 ADAMTS-1 和 ADAM8 均为排卵所必须关键水解蛋白酶。

补肾调经Ⅱ号方中熟地黄补阴血、益肾精, 为君药; 山茱萸、枸杞子、女贞子、紫河车滋肾阴, 阳中求阴, 为臣药; 山药、当归、白芍养血和血为佐药。全方共奏滋肾阴、填精血、调补冲任之功, 精充血以促卵泡发育。补肾调经Ⅲ号方中仙茅、淫羊藿温补肾

阳, 为君药, 紫石英、肉苁蓉、菟丝子、覆盆子助君药温肾阳、滋肾阴为臣药; 丹参、枳壳, 活血理气, 调理冲任气血为佐使药。诸药合用, 共奏温肾阳、调理冲任气血、助重阴转阳诱发排卵之效。经后期服用补肾调经Ⅱ号方滋阴养血, 氤氲期、经前期服用补肾调经Ⅲ号方温阳理气活血, 使阴升阳长, 阴平阳秘, 冲任气血调畅, 经候如常^[18-20]。本实验结果表明, 在小鼠卵泡体外培养的过程中, 序贯应用含有补肾调经Ⅱ、Ⅲ号方含药血清可使加入 hCG 后卵泡和 COCs 中 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白及 mRNA 的表达升高, 提示补肾调经方诱发排卵、促进卵母细胞逸出的作用可能与其使排卵时 ADAM8、ADAMTS-1 表达迅速达高峰, 从而裂解 COCs 基质多功能蛋白聚糖、破坏 COCs 基质结构的完整性、诱导卵泡排出有关。逍遥丸为疏肝理气、调经的代表方。方中柴胡疏肝解郁为君药, 白芍、当归养血调经、滋养肝阴为臣药, 白术、茯苓、甘草三药健脾益气, 煨姜温胃和中, 薄荷疏散透达肝经之郁滞共为佐药。诸药合用, 肝脾同调、气血兼顾、疏养并施、经调子嗣。课题组前期研究证实逍遥丸高、低剂量序贯使用, 高剂量疏肝养血, 促进卵泡发育成熟, 低剂量疏肝理气, 助其阴阳转化而排卵^[21]。本实验结果表明, 在小鼠卵泡体外培养的过程中, 序贯应用含有高剂量、低剂量逍遥丸含药血清的培养液进行培养, 可使加入 hCG 后 8、12、16 h, 卵泡和 COCs 中, ADAM8、ADAMTS-1 蛋白及 mRNA 的表达升高, 且 0 h 到 8 h 增速最快, 推测逍遥丸可快速上调排卵前卵泡中 ADAM8、ADAMTS-1 含量, 促使卵泡壁破裂达到诱发排卵、促进卵母细胞逸出的结局。

在不同时间点, 补肾调经方和逍遥丸调控 ADAM8、ADAMTS-1 的优势作用不同, 补肾组在加入 hCG 后 12 h 的排卵时发挥促进作用, 而疏肝组在加入 hCG 后 8 h 的排卵前迅速达到高水平并缓慢增高至排卵时。相比较而言, 补肾组小鼠卵泡和 COCs 中表达高峰高于疏肝组。究其原因可能为补肾调经方将补肾贯穿始终, 对卵泡的长养与促排作用不断蓄积, 于重阴转阳排卵之时促进作用达到高峰。逍遥丸

序贯用药, 经后期养血柔肝, 对卵泡以养为主, 氩氩期理气解郁, 对卵泡以促排为主, 而补肾调经方对卵泡养与行并施, 动静结合, 使卵子顺利排出, 故补肾调经方诱发卵泡破裂作用优于逍遥丸。综上, 补肾调经方和逍遥丸可以上调 ADAM8、ADAMTS-1 蛋白及 mRNA 的表达, 通过提高 ADAM8 的蛋白溶解作用, 诱发排卵。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 王庆其主编. 内经选读 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 53-55.
- [2] 张丽萍, 杨伍凤. 补肾法治排卵障碍性不孕症 22 例疗效观察 [J]. 新中医, 2001, 33 (12): 24-25.
- [3] 马月香. 从疏肝论治多囊卵巢综合征排卵障碍思路探讨 [J]. 山东中医药大学学报, 2010, 44 (5): 32-33.
- [4] 夏桂成, 谭勇. 中医药治疗排卵障碍性不孕症临床研究进展述评 [J]. 江苏中医药, 2019, 51 (9): 1-7.
- [5] Sibel O, Efser O, Avtekin T, et al. Role of versican and ADAMTS-1 in polycystic ovary syndrome [J]. Clin Res Pediatr Endocrin, 2017, 9 (1): 24-30.
- [6] Sriraman V, Eichenlaub-Ritter U, Bartsch JW, et al. Regulated expression of ADAM8 (a disintegrin and metalloprotease domain 8 in the mouse ovary: evidence for a regulatory role of luteinizing hormone, progesterone receptor, and epidermal growth factor-like growth factors [J]. Biol Reprod, 2008, 78 (6): 1038-1048.
- [7] Butler TA, Jr WJ. Gelatinases and endogenous inhibitors in the preovulatory rat ovary [J]. Ann N Y Acad Sci, 1994, 732 (1): 444-446.
- [8] Butler TA, Zhu C, Mueller RA, et al. Inhibition of ovulation in the perfused rat ovary by the synthetic collagenase inhibitor SC 44463 [J]. Biol Reprod, 1992, 44 (6): 1183-1188.
- [9] Fernandez MO, Sharma S, Kim S, et al. Obese neuronal PPAR γ knockout mice are leptin sensitive but show impaired glucose tolerance and fertility [J]. Endocrinology, 2017, 158 (1): 121-133.
- [10] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte secreted factors regulators of cumulus cell function and oocyte quality [J]. Hum Reprod Update, 2008, 14 (2): 159-177.
- [11] Mittaz L, Russell DL, Wilson T, et al. Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system [J]. Biol Reprod, 2004, 70 (4): 1096-10105.
- [12] Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, et al. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation [J]. Biol Chem, 2003, 278 (43): 42330-42339.
- [13] Robker RL, Russell DL, Espey LL, et al. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97 (9): 4689-4694.
- [14] Birendra M, Ji YP, Kalin W, et al. X-linked lymphocyte regulated gene 5c-like (Xlr5c-like) is a novel target of progesterone action in granulosa cells of periovulatory rat ovaries [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 9 (5): 226-238.
- [15] Yung Y, Maman E, Konopnicki S, et al. ADAMTS-1: a new human ovulatory gene and a cumulus marker for fertilization capacity [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 328 (1-2): 104-108.
- [16] Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, et al. ADAM family proteins in the immune system [J]. Immunol Today, 1999, 20 (6): 278-284.
- [17] Duffy DM, Ko C, Jo M, et al. Ovulation: parallels with inflammatory processes [J]. Endocr Rev, 2019, 40 (2): 369-416.
- [18] 杜惠兰, 闫华, 白凤楼, 等. 补肾调经系列方周期给药治疗功能失调性子宫出血的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23 (3): 178-181.
- [19] 杜惠兰, 闫华, 白凤楼, 等. 补肾调经系列方周期给药治疗功能失调性子宫出血 174 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2004, 45 (7): 517-519.
- [20] 杜惠兰, 闫华, 白凤楼, 等. 补肾调经系列方对功能失调性子宫出血患者生殖激素及子宫内膜激素受体的影响 [J]. 中医杂志, 2007, 48 (11): 986-988.
- [21] 段彦苍. 补肾法、疏肝法对促性腺激素预处理小鼠排卵机制影响的比较研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.

(收稿: 2019-09-03 在线: 2021-05-19)

责任编辑: 杨 静