

补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSH/cAMP-PKA 通路的影响

宋翠森¹ 杨宏敏² 陆君² 周楠² 路帅² 段彦苍²
马惠荣² 徐华洲¹ 杜惠兰²

摘要 **目的** 通过补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞卵泡刺激素/环磷酸腺苷-蛋白激酶 A (follicle stimulating hormone/cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A, FSH/cAMP-PKA) 通路的影响,探讨补肾调经方改善卵巢内分泌功能可能的分子机制。**方法** 收集行体外受精-胚胎移植 (*In vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 患者卵泡液,提取颗粒细胞进行原代细胞培养 24 h,以低、中、高剂量补肾调经方人、大鼠含药血清以及正常人、大鼠血清分别与体外培养的人卵巢颗粒细胞共同孵育 48 h,分为补肾调经方低、中、高剂量组以及对照组。采用放射免疫方法测定培养液中雌二醇 (estrogen, E_2)、孕酮 (progesterone, P)、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的水平,采用蛋白印迹法和 Real-time PCR 分别检测卵泡刺激素受体 (follicle stimulating hormone receptor, FSHR) 蛋白和 FSHR、P450 芳香化酶 (P450 aromatase, P450arom) mRNA 在颗粒细胞的表达。**结果** 人含药血清组:与对照组比较,补肾调经方中、高剂量组培养液中 E_2 、cAMP 水平均明显升高 ($P < 0.05$),补肾强经方中剂量组 P 明显降低 ($P < 0.01$);补肾调经方中、高剂量组卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白及其 mRNA 表达均明显增高 ($P < 0.01$), P450 芳香化酶 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。大鼠含药血清组:与对照组比较,补肾调经方中、高剂量组 E_2 均升高 ($P < 0.01$), cAMP 明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),补肾调经方中剂量组 P 明显降低 ($P < 0.01$);补肾调经方中、高剂量组人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白及其 mRNA 表达均增高 ($P < 0.01$), P450 芳香化酶 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 补肾调经方可能通过调节卵巢颗粒细胞 FSH/cAMP-PKA 通路的主要效应分子 FSHR、cAMP、P450arom、 E_2 ,促进卵巢颗粒细胞的内分泌功能。

关键词 补肾调经方;颗粒细胞;卵泡刺激素;环磷酸腺苷-蛋白激酶 A 通路;雌二醇

Effect of Bushen Tiaojing Recipe Containing Serum on FSH/cAMP-PKA Pathway in *in vitro* Cultured Human Ovarian Granular Cells SONG Cui-miao¹, YANG Hong-min², LU Jun², ZHOU Nan², LU Shuai², DUAN Yan-cang², MA Hui-rong², XU Hua-zhou¹, and DU Hui-lan² 1Department of Physiology, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang (050091), China; 2 Department of Integrative Medical Obstetrics and Gynecology, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang (050091), China

ABSTRACT **Objective** To explore the potential molecular mechanisms for Bushen Tiaojing Recipe (BTR) improving the endocrine function of ovarian granular cells by observing the effect of BTR containing serum on follicle stimulating hormone/cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A (FSH/cAMP-PKA) pathway in *in vitro* cultured human ovarian granular cells. **Methods** The primary ovarian granular cells collected from *in vitro* fertilization-embryo transfer patients were cultured for 24 h. The human and rat serum containing different concentrations of BTR (low, medium, high dose), and their normal serums were co-incubated with ovarian granular cells for 48 h respectively, and then they were divided into the low, medium, high dose BTR groups and the control group. The levels of estradiol (E_2), pro-

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 30772818)

作者单位:1.河北中医学院生理学教研室 (石家庄 050091); 2.河北中医学院中西医结合妇产科学教研室,中西医结合生殖疾病协同创新中心 (石家庄 050091)

通讯作者:杜惠兰, Tel: 0311-86265087, E-mail: duhuilan@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.03.0317

gesterone (P), and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the culture medium were measured by radioimmunoassay. The protein expression of FSHR in ovarian granular cells was detected by Western Blot. The mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and P450 aromatase (P450arom) in ovarian granular cells were detected by Real-time PCR. Results In human BTR containing serum groups: Compared with control group, the levels of E_2 and cAMP in the culture medium were higher (both $P < 0.05$) in the medium and high dose BTR groups; the levels of P in the culture medium decreased in the medium dose BTR group ($P < 0.01$). The protein and mRNA expression of FSHR in ovarian granular cells increased (all $P < 0.01$), the mRNA expressions of P450arom in ovarian granular cells were higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the medium and high dose BTR groups. In rat BTR containing serum groups: Compared with the control group, the levels of E_2 in the culture medium were higher (all $P < 0.01$), cAMP in the culture medium were higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the medium and high dose BTR group; the levels of P in the culture medium decreased in the medium dose BTR group ($P < 0.01$). The protein and mRNA expression of FSHR in ovarian granular cells were higher (all $P < 0.01$), the mRNA expression of P450arom in ovarian granular cells increased in the medium and high dose BTR groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion BTR could possibly improve the endocrine function of ovarian granular cells by regulating main effector molecules FSHR, cAMP, P450arom, and E_2 in FSH/cAMP-PKA pathway of ovarian granular cells.

KEYWORDS Bushen Tiaojing Recipe; granular cell; follicle stimulating hormone; cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A pathway; estradiol

前期研究证实,补肾调经方治疗排卵障碍及生殖内分泌紊乱疾病取得了较好的疗效,并通过调节下丘脑-垂体-卵巢轴、改善卵巢功能而发挥调经种子的作用^[1-4]。在卵泡的发育、排卵、性激素的合成过程中,卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)发挥重要作用。FSH 通过颗粒细胞环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)-蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 即 cAMP-PKA 信号转导通路诱导雌激素生成^[5],而卵巢局部的雌激素对维持卵泡发育、成熟卵子的质量发挥重要的作用^[6,7]。那么,补肾调经法是否通过影响卵巢颗粒细胞 FSH 的 cAMP-PKA 信号转导通路发挥调节卵巢功能的作用及其机制值得进一步研究。本实验通过补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSH/cAMP-PKA 通路中已明确的主要效应分子卵泡刺激素受体(follicle stimulating hormone receptor, FSHR)、cAMP、P450 芳香化酶(P450 aromatase, P450arom)、雌二醇(estrogen, E_2)的影响,探讨补肾调经方改善卵巢颗粒细胞内分泌功能的分子机制。

材料与方法

1 动物 健康 Wistar 雌性大鼠 16 只,6 周龄,体重 160~170 g,清洁级。由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号:810164。

2 药物 补肾调经方组成:熟地黄 20 g 当归

9 g 山药 12 g 山萸肉 15 g 枸杞子 12 g 女贞子 9 g 淫羊藿 10 g 紫河车 10 g 覆盆子 10 g 菟丝子 12 g 香附 6 g 红花 9 g 白芍 9 g。购自河北省石家庄乐仁堂,采用自动煎药机统一煎制 300 mL。

3 试剂及仪器 试剂:RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司),逆转录酶(M-MLV)、核糖核酸酶抑制剂(RNasin)、随机引物、琼脂糖、Taq DNA 聚合酶、dNTP(均为美国 Promega 公司产品),HRP 标记二抗(北京博奥森生物技术有限公司),RNA 提取试剂 Trizol Reagent(Invitrogen 公司),FSHR 抗体(美国 Santa Cruz 公司), E_2 、P 放免试剂盒(批号分别为:RG60905, RG50905, 天津九鼎医学生物工程有限公司),cAMP 放免试剂盒(北京普尔伟业生物技术有限公司,批号:20090525)。仪器:756 型紫外分光光度计:上海,ABI 7300 Real-Time PCR System:美国 PE 公司,RS-28 高速低温离心机:德国贺利氏公司,超低温冰箱:德国贺利氏公司,UV 凝胶扫描系统:美国 UVP 公司,微量移液器:德国 Gilson, DYZ-22A 型双恒定时电泳仪:北京市六一仪器厂, DYY-III 桥式电泳仪:北京市六一仪器厂, CO₂ 培养箱 300/3000:美国 Revco, 倒置相差显微镜 IX-70:日本 Olympus 公司。

4 含药血清的制备

4.1 人补肾调经方含药血清的制备 选取年龄 20~30 周岁,符合中医辨证肾虚证^[8]、因排卵障碍不

孕就诊于河北中医学院门诊部的女性患者 4 例。B 超监测未见成熟卵泡,并排除卵巢、子宫器质性疾病,双侧输卵管造影通畅,近 3 个月未服用激素。口服补肾调经方 300 mL,分早、晚服用,连续用药 3 天,第 4 天清晨空腹服用全天剂量 300 mL 药物(服药前禁食 12 h),于末次服药 1 h 后静脉取血 5 mL,室温静置 2 h,离心,取上清,56 ℃ 水浴 30 min 灭活补体,0.22 μm 无菌过滤器过滤除菌、分装,制备人补肾调经方含药血清。

4.2 健康人血清的制备 选取年龄 27 周岁,身体健康,月经规律,B 超监测有成熟卵泡,且无卵巢、子宫器质性疾病的女性志愿者 1 名,清晨空腹静脉采血 5 mL,同上制备健康人血清。

4.3 大鼠补肾调经方含药血清的制备 取 16 只 Wistar 健康雌性大鼠,根据大鼠体重按随机数字表法随机分为 4 组。将自动煎药机统一煎制的补肾调经方水煎剂浓缩至生药 1.4 g/mL。补肾调经方低、中、高剂量组大鼠每日灌服浓缩补肾调经方 1、2、3 mL/100 g 体重(60 kg 成人 体重服用补肾调经方 143 g 生药,即生药 0.24 g/100 g 人体重,100 g 大鼠 体重服用浓缩补肾调经方 1 mL,即生药 1.4 g/100 g 大鼠 体重,相当于成人剂量的 6 倍),对照组大鼠每日灌服蒸馏水 2 mL/100 g 体重;每日分 2 次给药,连续给药 4 天。各组均于末次给药后 1 h 大鼠股动脉采血。同上制备低、中、高剂量补肾调经方大鼠含药血清及正常大鼠血清。以上血清均 -20 ℃ 保存备用。

5 观察指标及检测方法

5.1 卵巢颗粒细胞的采集 2009 年 6 月—11 月在河北医科大学第二医院生殖医学科因双侧输卵管阻塞或男性不育行体外受精-胚胎移植(*In vitro fertilization-embryo transfer*, IVF-ET)的不孕症患者 28 例(均知情同意),年龄 23~37 周岁(平均 26.46±4.79),基础体温呈双相型,血清催乳素在正常范围,受试前 3 个月内均未服用激素类药物,月经周期第 3 天测定血清 FSH(5~10 IU/L)。所有患者均采用 GnRH-a/Gonal-F/HMG/HCG 长周期降调节方案超促排卵,即于前 1 个月经周期黄体中期开始皮下注射 GnRH-a(0.1 mg/支,法国,达菲林, Diphereline, Beaufour Ipsen, 批号: V003) 0.1 mg/天,于月经第 3~7 天,达到降调节标准后(血 FSH、LH 均 < 5 MIU/mL, E_2 < 50 pg/mL),开始每日注射基因重组 FSH(75 IU/支,果纳芬 Gonal-F, Merck Serono, 批号: V16B2209) 150~300 IU,以刺激卵泡发育。用药期间 B 超监测卵泡发育情况、血清 E_2 和黄体生成素

(luteinizing hormone, LH) 水平,根据患者卵泡发育情况及时调整药物剂量,促排卵后期可酌情改用 HMG 2~3 天,当两侧卵巢至少有 3 个卵泡直径 ≥ 18 mm 时停药,肌肉注射人绒毛促性腺激素(HCG, 250 μg/支, Merck Serono, 批号: V14B8209) 250 μg, 34~36 h 后在阴道 B 超引导下行穿刺取卵,收集卵泡液。

5.2 卵巢颗粒细胞的分离、培养、分组及给药 将含有颗粒细胞(GC)的卵泡液,离心(1 500 r/min, 10 min),弃上清液,沉淀 GC,用 1640 培养基洗涤后,经密度梯度为 0.5 Percoll 悬液离心(1 500 r/min, 15 min)分离除去红细胞。加入 0.25% 的胰蛋白酶,37 ℃ 消化 5~10 min 左右,加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养液终止消化。PBS 冲洗,离心。用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养液将 GC 浓度调整为 2×10^5 /mL 的单细胞悬液,将细胞悬液与 0.4% 台盼蓝溶液以 9:1 混匀,3 min 内细胞计数显示细胞存活率 85%~90%。将单细胞悬液放入 24 孔的培养板,每孔 1 mL,在 5% CO₂、37 ℃ 孵育箱中培养 24 h 后贴壁,更换新鲜的培养基。以低剂量(6%)、中剂量(12%)、高剂量(18%)补肾调经方人含药血清、正常人血清以及低、中、高剂量肾调经方大鼠含药血清、正常大鼠血清分别与培养的卵巢颗粒细胞共同孵育 48 h(以上操作至少重复 3 次,每次每种浓度重复 5 个培养孔),分为补肾调经方低、中、高剂量组和对照组。收集 GC,取上清液(培养液),置 -20 ℃ 保存待测。

5.3 培养液中 E_2 、P、cAMP 的测定 采用放射免疫方法。

5.4 卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白的测定 采用蛋白印迹法。取大约 10^6 颗粒细胞加 1 mL 提取液匀浆提取,4 ℃,离心(12 000 r/min 离心 5 min),取上清,加入等体积 2×SDS 上样缓冲液,100 ℃ 中煮沸 5 min。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样等量总蛋白。利用水浴式电印迹法将蛋白转移至膜上。室温振荡,封闭膜 2 h 后,加入 1:250(封闭液稀释)的第一抗体稀释液,室温缓慢摇动 2 h,用 PBS-Tween 洗膜 3 次后,再加入 1:5 000(封闭液稀释)的 HRP 标记的第二抗体稀释液,室温振荡 1 h, PBS-Tween 充分洗膜后,将膜浸入 DAB 显色液中,室温充分显色后,立即用蒸馏水洗膜,然后将膜转入 PBS 中观察、照相。采用 Quantity One 软件分析数据,获得各电泳条带的平均光密度值,以 FSHR 与 β-actin 的灰度比值表示 FSHR 的相对表达含量。

5.5 卵巢颗粒细胞 FSHR、P450 芳香化酶 mRNA

NA 的测定 采用 Real-time PCR 方法。

5.5.1 引物的设计 目的基因引物由上海生物工程公司合成,表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列	产物长度
FSHR	上游: 5'-CCTGGTCTCTTTGCTGGCAT-3'	110 bp
	下游: 5'-GAATCTCTGTGCACCTTGCTCTC-3'	
P450arom	上游: 5'-CTGGACACCTCTAACACGCT-3'	224 bp
	下游: 5'-CTCTTCTGTGGAAATCCTGCG-3'	
GAPDH	上游: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	135 bp
	下游: 5'-GCTTCACCACCTTCTTGTATGTC-3'	

5.5.2 RNA 提取 将培养的颗粒细胞 50 mg 参考说明书采用 Trizol 一步法提取总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。

5.5.3 Real-time PCR 以总 RNA 为模板,以 Oligo(dT) 16 为引物,按照 M-MLV 说明书反转录合成 cDNA, -20 ℃ 保存。PCR 热循环参数:96 ℃ 4 min,然后三步反应:94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃, 30 s,进行 40 个循环,于每个循环的第 3 步 72 ℃, 30 s 收集荧光信号。

5.5.4 Real-time PCR 结果分析 扩增完毕后,进入结果分析界面,以 GAPDH 为内参照基因,与对照组相比,得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值),将 RQ 值用于统计分析。

6 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 人卵巢颗粒细胞体外培养的生长情况 分离的人卵巢颗粒细胞于 24 h 内贴壁生长良好,倒置显微镜下可见颗粒细胞呈星形或椭圆形生长,细胞与细胞间有延长的伪足(丝状突起)相互连接,细胞核大而圆,胞浆饱满,富含颗粒。

2 补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞 E_2 、P、cAMP 的影响

2.1 人含药血清各组卵巢颗粒细胞培养液中 E_2 、P 及 cAMP 水平的比较(表 2) 与对照组比较,补肾调经方低、中、高剂量组培养液中 E_2 水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);补肾调经方中剂量组培养液中 P 明显降低($P < 0.01$);中、高剂量组培养中 cAMP 均明显升高($P < 0.01$)。

表 2 人含药血清各组卵巢颗粒细胞培养液中 E_2 、P 及 cAMP 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (pg/mL)	P(ng/mL)	cAMP(pmol/mL)
A	5	44.05 ± 9.75	12.90 ± 4.14	0.60 ± 0.13
B	5	59.49 ± 11.81 *	10.26 ± 2.00	1.01 ± 0.37
C	5	76.43 ± 13.02 **	6.72 ± 3.31 **	1.85 ± 0.38 **
D	5	96.88 ± 13.18 **	11.51 ± 4.04	1.52 ± 0.39 **

注:A 为对照组;B 为补肾调经方低剂量组;C 为补肾调经方中剂量组;D 为补肾调经方高剂量组;与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;下表同

2.2 大鼠含药血清各组卵巢颗粒细胞培养液中 E_2 、P、cAMP 水平的比较(表 3) 与对照组比较,补肾调经方中、高剂量组 E_2 升高(均 $P < 0.01$);补肾调经方中剂量组 P 明显降低($P < 0.01$);补肾调经方中、高剂量组 cAMP 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 大鼠含药血清各组卵巢颗粒细胞培养液中 E_2 、P 及 cAMP 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (pg/mL)	P(ng/mL)	cAMP(pmol/mL)
A	5	34.27 ± 6.94	5.32 ± 1.78	1.70 ± 1.29
B	5	45.17 ± 7.86	4.44 ± 1.73	2.28 ± 1.53
C	5	85.82 ± 11.07 **	2.67 ± 1.60 **	3.22 ± 0.81 *
D	5	87.68 ± 14.02 **	4.26 ± 1.66	3.59 ± 1.92 **

3 补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达的影响

3.1 人含药血清各组体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达的比较(图 1、2) 与对照组比较,补肾调经方低、中、高剂量组人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达明显增高,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

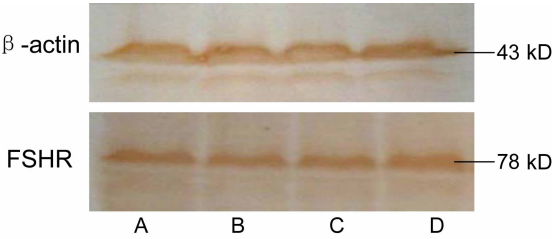
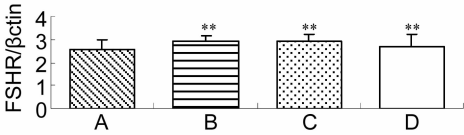


图 1 人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白印迹电泳图



注:A 为对照组;B 为补肾调经方低剂量组;C 为补肾调经方中剂量组;D 为补肾调经方高剂量组;与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;图 4、5、6 同

图 2 人含药血清各组人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达

3.2 大鼠含药血清各组体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达的比较(图 3、4) 与对照组比较,补肾调经方低、中、高剂量组人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

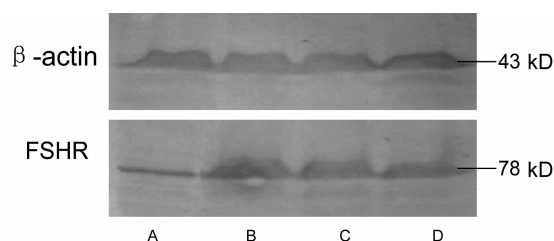


图 3 人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白印迹电泳图

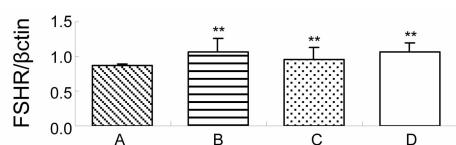
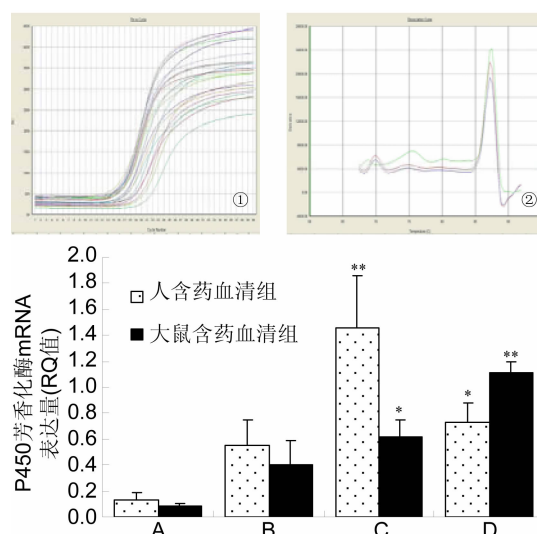


图 4 大鼠含药血清各组人卵巢颗粒细胞 FSHR 蛋白表达

4 补肾调经方含药血清对体外培养的人卵巢颗粒细胞 FSHR、P450 芳香化酶 mRNA 表达的影响(图 5、6) Real-time PCR 实验中扩增曲线图:横坐标为扩增循环数,纵坐标为荧光强度,每个循环进行一次荧光信号收集。荧光扩增曲线分成 3 个阶段,即荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段和平台期。荧光背景信号阶段即到达荧光阈值(CT 值)之前的阶



注:1 人卵巢颗粒细胞 P450 芳香化酶 mRNA 的扩增曲线图;2 为人卵巢颗粒细胞 P450 芳香化酶 mRNA 的融解曲线图

图 6 人卵巢颗粒细胞 P450 芳香化酶 mRNA 表达

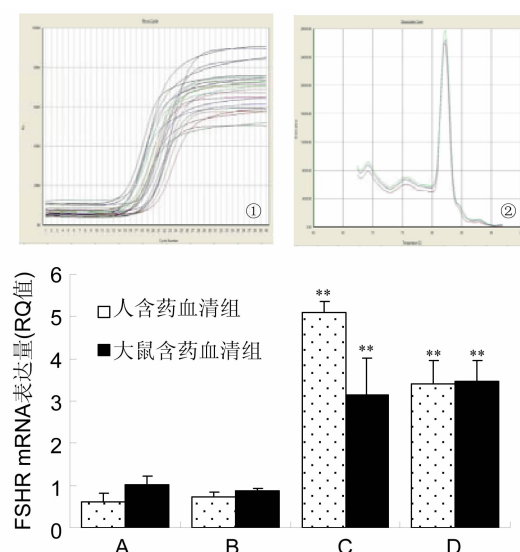
段。模板 DNA 量越多,荧光达到荧光阈值的循环数越少,即 CT 值越小。融解曲线图:单一峰,无非特异性荧光,定量准确;若出现杂峰,则为其他产物出现非特异性荧光,定量不准确。

4.1 人含药血清各组人卵巢颗粒细胞 FSHR、P450 芳香化酶 mRNA 表达的比较(图 5、6) 与对照组比较,补肾调经方中、高剂量组人卵巢颗粒细胞 FSHRmRNA 表达均明显升高($P < 0.01$);P450 芳香化酶 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4.2 大鼠含药血清各组人卵巢颗粒细胞 FSHR、P450 芳香化酶 mRNA 表达的比较(图 5、6) 与对照组比较,补肾调经方中、高剂量组卵巢颗粒细胞 FSHRmRNA 表达均明显增强($P < 0.01$);P450 芳香化酶 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

离体卵巢颗粒细胞是研究卵巢局部功能一个极好的切入点,而且原代细胞培养的优势在于能最大限度的保持细胞的原始特性。为了更好的验证中药的作用,选用了补肾调经方人含药血清及大鼠含药血清。有学者认为,考虑实验体系中被培养细胞的血清耐受性,含药血清的添加量不超过 20% 为宜^[9],冯伟^[10]认为高浓度血清中的细胞因子等血清固有成分含量过高,易掩盖药效,刘平等^[11]认为培养液中的血清浓度,以 10% 较为合适。因此本实验人含药血清设计为 6%、12%、18% 3 个剂量,以探讨补肾调经方含药血



注:1 为人卵巢颗粒细胞 FSHRmRNA 的扩增曲线图;2 为人卵巢颗粒细胞 FSHRmRNA 的融解曲线图

图 5 人卵巢颗粒细胞 FSHRmRNA 的表达

清对体外培养的人卵巢颗粒 FSH/cAMP-PKA 通路的影响。

FSH 通过颗粒细胞 cAMP-PKA 信号转导通路,活化 P450 芳香化酶系统,诱导雌激素生成。FSH 是卵巢功能重要的内分泌调节激素,直接参与促进卵泡发育、排卵、黄体生成及甾体激素的合成^[12]。FSH 必须与分布于颗粒细胞的特异性 FSHR 结合方能发挥其生理功能。研究表明,优势卵泡具有的一个明显优势就是存在较多的 FSHR,从而使颗粒细胞对 FSH 的敏感性比其他尚未成熟卵泡的颗粒细胞高 4 倍。颗粒细胞 FSHR 属于 G 蛋白耦联受体超家族,与 FSH 结合后可顺序激活刺激性 G 蛋白以及腺苷酸环化酶(AC),后者使 ATP 转化为 cAMP,而 cAMP 作为第二信使激活 PKA,使 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,并促进 PKA 下游区信号级联放大。磷酸化的 CREB 与 P450 芳香化酶启动子 II 的 cAMP 的反应元件(CRE)结合,刺激 P450 芳香化酶转录^[13,14]。P450 芳香化酶是卵巢颗粒细胞上催化雄激素转化为雌激素的限速酶,将睾酮转化为雌二醇,进入血液循环和卵泡液中,P450 芳香化酶表达水平与活性直接决定了卵巢组织中雌激素的水平^[15]。

雌激素协同 FSH 使颗粒细胞增生,内膜细胞分化,卵泡液形成,卵泡腔扩大,从而使卵泡生长和发育。雌激素在决定优势卵泡的形成过程中起决定性作用。有实验证实^[7],闭锁卵泡中雌激素的合成减少,与之相对应的芳香化酶 mRNA 表达水平下降,且这一变化在卵泡闭锁的形态特征出现前即可被观察到。此结果反证了卵巢局部的雌激素对维持卵泡发育的重要性。雌激素是卵母细胞自分泌、旁分泌的调节因素,并直接影响成熟卵子的质量^[6]。

补肾调经方由养精种玉汤合五子衍宗丸加减化裁而成。方中熟地滋补肝肾,填精养血而为君药。枸杞子、山萸肉、紫河车助君药滋肾益精,补养冲任;覆盆子、淫羊藿、山药温肾益气,“阳中求阴”;当归、白芍养血调经,共为臣药。稍佐香附、红花理气活血,交通阴阳。诸药合用,滋肾阴、温肾阳、填精血、调冲任,平衡肾中阴阳,以达补肾调经、经调子嗣之功,发挥调节卵巢功能的作用。

本实验结果显示,补肾调经方人、大鼠含药血清可使颗粒细胞培养液中 E₂、cAMP 水平升高,上调颗粒细胞 FSHR 蛋白及其 mRNA、P450 芳香化酶 mRNA 的表达。推测补肾调经方可能通过增加颗粒细胞 FSHR 蛋白及其 mRNA 的表达,提高颗粒细胞对 FSH 的敏感性,FSH 通过颗粒细胞 cAMP-PKA 信号

转导通路,激活 AC,使 cAMP 含量升高,进而激活 PKA,从而调节下游靶基因 P450 芳香化酶转录,活化的 P450 芳香化酶将睾酮转化为 E₂。由此可见,补肾调经方含药血清可能通过调节卵巢颗粒细胞 FSH/cAMP-PKA 通路中已明确的主要效应分子 FSHR、cAMP、P450 芳香化酶,促进了卵巢颗粒细胞的内分泌功能,使培养液中 E₂ 升高。且现代药理研究证实,补肾调经方中熟地黄、菟丝子、肉苁蓉、紫河车均有雌激素样作用^[16-19],女贞子可使兔卵巢分泌雌激素升高^[20],而卵巢局部更多的雌激素有助于卵泡生长和发育,延缓卵泡的闭锁,并对成熟卵子的质量发挥重要的作用。

本研究还发现,补肾调经方人、大鼠中剂量含药血清降低卵巢颗粒细胞培养液中 P 水平,这与谷长任等^[21]观察到的养精种玉汤醇提取液的体外作用以及李沛森^[22]观察到补肾调冲含药血清使离体大鼠卵巢颗粒细胞分泌 P 降低的结果相同。据推测,排卵前 P 分泌被抑制可能对于防止 LH 峰前的 P 水平过早升高和卵泡过早黄素化、卵泡闭锁及未破裂卵泡黄素化综合征的发生有重要生理意义^[23]。

(致谢:河北医科大学第二医院生殖医学科的徐素欣主任和曹金凤、赵志明老师在收集病例标本方面给予的帮助和支持!)

参 考 文 献

- [1] 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临床研究[J].中国中西医结合杂志,2003,23(3):180-183.
- [2] 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.
- [3] 常秀峰,杜惠兰,高星,等.补肾调经方对输卵管性不孕症患者体外受精-胚胎移植超排卵周期 GDF-9 的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(6):780-783.
- [4] 杜惠兰,段彦苍,宋翠森,等.补肾调经方对雄激素诱导无排卵大鼠血清生殖激素及子宫、卵巢性激素受体水平的影响[J].北京中医药大学学报,2004,27(4):24-26.
- [5] 陈悦群,黄荷凤.颗粒细胞增殖分化中卵泡刺激素的 cAMP-PKA 通路[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2011,30(1):65-67.
- [6] 李美芝,王嵩明,等.妇科内分泌学[M].北京:人民军医出版,2001:5,16,69-70,141,270.
- [7] Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles[J]. Clin Endocrinol Metab, 1997, 82(11):3748-3751.

- [8] 张玉珍主编. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 323.
- [9] 潘卫松, 刘美凤, 石钺, 等. 血清药理学、血清化学和中药药代动力学[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 4(3): 51-55.
- [10] 冯伟. MTT 法分析中药含药血清对体外软骨细胞增殖影响的研究[J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(1): 43-45.
- [11] 刘平, 王宁生, 雷燕, 等. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5): 263-266.
- [12] Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, et al. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(4): 1214-1218.
- [13] Gonzalez-Robayna LJ, Falender AE, Ochsner S, et al. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for a kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(8): 1283-1300.
- [14] 靳玉甫, 覃爱平. 卵巢颗粒细胞 P450 芳香化酶研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(6): 972-974.
- [15] Simpson ER, Clyne C, Rubin G, et al. Aromatase - a brief overview[J]. Annu Rev Physiol, 2002, 64: 93-127.
- [16] 郝庆秀, 王继峰, 牛建昭, 等. 熟地等 4 味中药的植物雌激素作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(5): 620-623.
- [17] 赵丕文, 王大伟, 牛建昭, 等. 红花等 10 种中药的植物雌激素活性研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 2(5): 436-439.
- [18] 王晓敏, 王建红, 邹志坚, 等. 菟丝子黄酮对去势雌性大鼠血脂和血管雌激素受体的影响[J]. 中成药, 2008, 30(2): 255-256.
- [19] 高学敏主编. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1719.
- [20] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 323.
- [21] 谷长任, 张玮, 周健秋, 等. 养精种玉汤对兔卵巢颗粒细胞孕酮生成的影响及机制[J]. 中医药学报, 2002, 30(3): 55-56.
- [22] 李沛森. 补肾调冲含药血清对离体大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能与结构的影响[D]. 天津: 天津中医学院, 2005.
- [23] 吕时铭, 吕红, 陈援越. 转化生长因子参与调节颗粒细胞雌孕激素的分泌[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(5): 278-281.

(收稿: 2013-02-23 修回: 2013-11-10)

第十八次全国儿科中西医结合学术会议征文通知

由中国中西医结合学会儿科专业委员会主办、贵州省人民医院承办的第十八次全国儿科中西医结合学术会议拟于 2014 年 8 月 15—17 日在贵州省贵阳市召开, 届时将邀请儿科全国知名专家进行专题报告, 并进行学术论文交流。现将征文要求通知如下:

征文内容 (1) 中西医结合及中医、西医儿科的临床论著、实验研究和专题综述; (2) 临床儿科疑难、重症、少见病例报道; (3) 中西医结合药理或诊断研究; (4) 儿科中西医结合理论及方法研究等。 (5) 对儿科中西医结合工作的建议等。

征文要求 (1) 尚未公开发表的学术论文, 具有科学性、先进性和实用性; (2) 稿件应为全文并附 400~800 字摘要, 摘要必须包括目的、方法、结果和结论四项要素; (3) 稿件中请注明作者单位、通信地址、邮政编码、电子邮箱及电话等联系信息; (4) 一律采用 Microsoft Word 文档投稿; (5) 稿件或意向参会者的信息, 请发至电子邮箱: cuiyuxia1969@163.com。 (6) 征文截止日期: 2014 年 6 月 30 日。

联系方式 联系人: 贵州省人民医院儿科 崔玉霞, 电话: 0851-5923907; 手机: 13985105620, 电子邮箱: cuiyuxia1969@163.com