

右归配方颗粒对肾阳虚型体外受精-胚胎移植患者 卵巢颗粒细胞基因表达谱的影响

连 方¹ 李 芸² 孙振高¹ 吴海萃¹

摘要 **目的** 从基因组学角度探讨温肾阳中药对肾阳虚型体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)患者卵巢颗粒细胞基因表达谱的影响。**方法** 72 例行 IVF 治疗的肾阳虚患者按照随机数字表法分为治疗组(36 例)和对照组(36 例),治疗组服用右归配方颗粒联合促性腺激素(gonadotropin, Gn),对照组服用安慰剂联合 Gn,两组均在 IVF 治疗前连续用药 3 个周期。两组采用超排卵长方案治疗后,行穿刺取卵术。利用基因高通量测序技术对两组患者卵巢颗粒细胞基因表达谱进行分析,研究两组患者基因表达谱的差异,并对差异基因行基因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析。**结果** 通过对两组患者卵巢颗粒细胞基因表达谱的分析,共筛选到 391 个差异表达基因,其中上调基因 238 个,下调基因 153 个。差异表达基因参与的富集的分子功能是:与细胞增殖、凋亡有关的细胞周期调节蛋白,蛋白质泛素化,微管、微丝等细胞骨架的构建,线粒体及能量相关功能的因子,激素合成调节因子等;参与的通路是能量代谢通路和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路。**结论** 两组患者卵巢颗粒细胞基因表达谱存在明显差异,差异表达基因所涉及的生物学过程与肾阳虚导致的生殖细胞增殖、凋亡紊乱,线粒体产生能量过程受阻等有相关性。

关键词 温肾阳;右归配方颗粒;肾阳虚型;基因组学;体外受精-胚胎移植

Effect of Yougui Formula Granule on Ovarian Granulosa Cells Gene Expression Profiles in IVF Patients of Shen Yang Deficiency Syndrome LIAN Fang¹, LI Yun², SUN Zhen-gao¹, and WU Hai-cui¹ 1 Integrative Medicine Research Centre of Reproduction and Heredity, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014), China; 2 First Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Yougui Formula Granule (YFG) on ovarian granulosa cells gene expression profiles in *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) patients of Shen yang deficiency syndrome (SYDS) from the viewpoint of genomics. **Methods** Totally 72 infertility patients undergoing IVF-ET were randomly assigned to the treatment group and the control group according to random digit table, 36 in each group. Patients in the treatment group took YFG combined gonadotropin (Gn), while those in the control group took placebos combined Gn. All medication lasted for 3 menstrual cycles before IVF. With high-throughput gene sequencing technology, gene expression profiles of ovarian granulosa cells in the two groups were analyzed to explore the difference by gene ontology (GO) enrichment analysis and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis. **Results** Ovarian granulosa cell gene expression profiles from the follicular fluid showed, when compared with the control group, 391 differential genes were found in the syndrome-control group, 153 down-regulated and 238 up-regulated. Enrichment of differentially expressed cellular location and molecular function of genes involved cell proliferation and apoptosis associated cyclin, protein ubiquitination, construction of microtubules and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(N0.81273790)

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 250014); 2.山东中医药大学第一临床学院(济南 250355)

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

DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1306

microfilament, mitochondrial function and energy-related factors, regulatory factors for hormone synthesis. Participated pathways involved energy metabolism pathway and transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathway. Conclusions There existed significant difference in gene expression profiles of ovarian granulosa cells between the treatment group and the control group. Differentially expressed genes involved in biological processes correlates with Shen yang deficiency induced proliferation of germ cells, confused apoptosis, and hindered process during which mitochondria produced energy.

KEYWORDS warming Shen yang; Yougui Formula Granule; Shen Yang ceficiency syndrome; genomics; *in vitro* fertilization-embryo transfer

近年来,随着妊娠年龄的延后,环境污染的加重,人类的生殖健康面临威胁。如何促进人类生殖健康,随着现代辅助生殖技术的发展与应用,“肾主生殖”的科学内涵得到不断地丰富。然而,目前大多数研究仍停留在临床验证和简单的实验研究阶段,对其所包含的科学内涵,仍缺乏全面而又深入地探讨。本研究以现代辅助生殖技术与肾阳虚证相结合,应用基因高通量测序技术,以期从基因水平探讨“温肾阳促生殖”的作用靶点。

资料与方法

1 诊断标准 西医诊断标准参照全国高等学校教材《妇产科学》^[1]中关于不孕症诊断标准;输卵管阻塞诊断标准参考中国中西医结合学会妇产科专业委员会 1990 年第三届学术会议修订的“女性不孕症的诊疗标准”。^[2]

2 中医辨证分型标准 参考《中医妇科学》中关于肾阳虚型不孕症的证候标准^[3]。主症:不孕、腰膝酸痛、腹冷肢寒、腰背发冷;次症:月经后推或停闭不行、色暗淡、头目眩晕、精神萎靡、性欲淡漠、小便频数或失禁、舌淡、苔白滑、脉沉细而迟或沉迟无力。以上主症必须具备,次症具备 1~2 项即可以诊断。

3 纳入标准 符合西医输卵管阻塞性不孕症分型标准;符合中医肾阳虚证不孕症辨证的诊断标准;年龄在 25~40 岁的已婚女性;男方精液常规基本正常;夫妇双方签署知情同意书;生殖相关内分泌水平均符合降调标准。

4 排除标准 近 3 个月内曾应用激素类药物者;子宫不具备妊娠功能或严重的躯体疾病不能承受妊娠者;患有严重的精神类疾患、泌尿生殖系统的急性感染者和性传播疾病者;患有《母婴保健法》规定的不宜生育且目前无法行种植前基因诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 的遗传性疾病者;具有吸毒等严重的不良嗜好者;曾接触致畸量的射线、毒物、药品并目前处于作用期者。

5 一般资料 选择 2012 年-2013 年就诊于山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心门诊, 预行 IVF 的 72 例患者,按随机数字表法分为治疗组 36 例 (右归配方颗粒联合 Gn 用药,36 个周期) 和对照组 36 例 (安慰剂联合 Gn 用药,36 个周期)。两组年龄、病程、病史、治疗前肾虚证候积分比较 (表 1), 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。此方案经本院生殖医学伦理委员会研究同意。

表 1 两组一般资料比较

组别	例数	年龄 (岁, $\bar{X}\pm s$)	病程 (年, $\bar{X}\pm s$)	原发性不孕 [例(%)]	继发性不孕 [例(%)]	证候积分 (分, $\bar{X}\pm s$)
治疗	36	33.56 $\pm$ 3.39	4.52 $\pm$ 1.88	22(61.11)	14(38.89)	18.36 $\pm$ 1.28
对照	36	33.42 $\pm$ 3.17	4.55 $\pm$ 1.73	18(50.00)	18(50.00)	18.28 $\pm$ 1.33

6 治疗方法 治疗组和对照组给予常规 IVF-ET 前预处理 (进行必要的术前检查、避孕), 分别在 IVF 治疗前用药 3 个周期, 治疗组予右归配方颗粒, 对照组予安慰剂, 两组每周周期分别自月经第 5 天开始用药, 每日 1 剂, 每次 200 mL, 连服 20 天为 1 个疗程, 治疗 3 个疗程。右归配方颗粒药物组成为附子 6 g 肉桂 6 g 阿胶 12 g 熟地黄 30 g 山茱萸 12 g 枸杞子 30 g 山药 30 g 菟丝子 30 g 杜仲 10 g 当归 10 g。安慰剂的剂量、剂型均与右归配方颗粒相同, 主要由糊精组成。右归配方颗粒与安慰剂均由山东中医药大学附属医院制剂室提供。

两组患者均采用超排卵方案:促性腺激素释放激素激动剂/基因重组卵泡刺激素/注射用尿促性素/注射用绒毛膜促性腺激素 (GnRH-a/FSH-r/HMG/HCG) 方案。即入选患者于 IVF 治疗前 1 个月经周期的黄体期 (MC21 天左右) 给予达菲林 (法国 IPSEN 公司, 3.75 mg/支, 产品批号: U056) 0.9~1.2 mg 肌肉注射;自月经周期第 3 天开始每天根据患者不同情况皮下注射果纳芬 (75 IU/支, 瑞士 Serono 公司, 批号: Y14A6694) 150~300 IU, 用药期间 B 超监测卵泡发育情况并测血清雌二醇 (E_2)、孕酮 (P)、促黄体生成素 (LH), 根据患者卵泡发育情况及时调整药物的剂量,

当两侧卵巢至少有 3 个卵泡直径 ≥ 18 mm 时给予注射用绒毛膜促性腺激素(5 000IU/支,珠海丽珠集团丽宝生物化学制药公司,批号: 090515B)10 000 IU 肌肉注射, 34 ~ 36 h 后在阴道超声引导下穿刺取卵术。

7 观察指标与方法

7.1 颗粒细胞收集 经阴道超声引导下用 17G 穿刺针(Wallace)负压(100 mmHg)抽吸卵泡,留取每侧卵巢直径 18 ~ 20 mm 的主导卵泡的卵泡液。利用磷酸缓冲液(PBS)和淋巴细胞分离液提取卵泡液中的颗粒细胞,然后转入 -80°C 冰箱冻存待测。

7.2 RNA 的提取及样本检测 实验用 Trizol (Invitrogen)对样本进行总 RNA 的提取。通过 Agilent nanochip 分析仪完成此过程。样本选择标准: RIN 值 >7.0 。

7.3 文库构建及高通量测序 将通过质量检测的样本进行文库构建,此过程由 Illumina 公司提供的 protocol 实现。建构好的文库,利用 Hiseq2000 (Illumina)进行 $1 \times 100\text{bp}$ 的测序。

8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,两组资料组间比较采用 t 检验;计数资料采用构成百分比描述,两组分类资料采用 χ^2 检验,当 $T < 5$ 时,采用 Fisher 精确检验;多分类有序变量采用秩和检验;所有的统计检验均采用双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 脱落情况 治疗组脱落 3 例,对照组脱落 3 例,因为提取颗粒细胞中 RNA 浓度过低,不符合实验预期效果。

2 差异基因的筛选(图 1) 实验原始数据筛选的标准是阈值为 2,即 $P < 0.05$, $\text{FDR} < 0.05$, fold-change 值高于阈值的基因则被视为差异表达基因。根据 fold-change > 2 或 < 0.5 ,进行两组间上调或下调基因的筛选。经过筛选,两组的差异表达基因有 391 个,其中表达上调的基因有 238 个,表达下调的基因有 153 个。黑色的点为两组间 mRNA 差异无统计学意义($P > 0.05$);红色的点为两组间 mRNA 差异有统计学意义($P < 0.05$),图中散点的分散程度越大,说明两组的 mRNA 差异越大。

3 两组基因表达热图(图 2) 热图说明用温肾阳中药干预后两组基因表达有差异。图中颜色越浅为表达量越低,颜色越深为表达量越高,如图所示基因表达信号分为两类,此结果与入组患者分为治疗组和对照组相符。

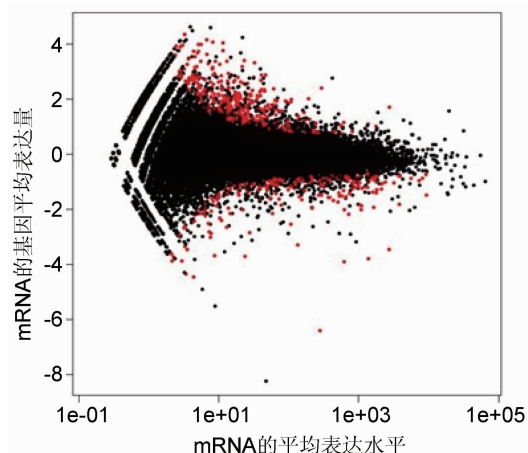
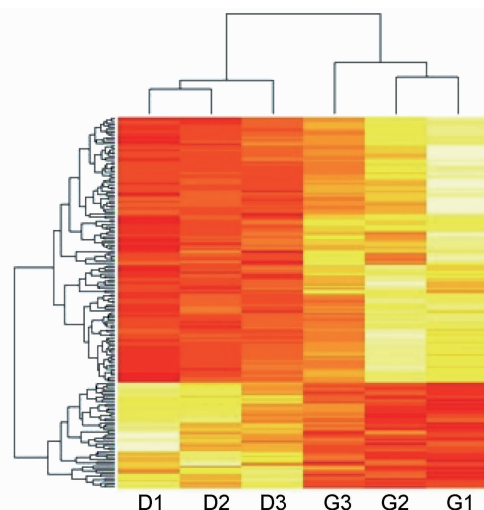


图 1 差异基因散点图



注: X 轴为分别划分为不同组别的各个样本; Y 轴为差异表达基因

图 2 两组基因表达信号热图

4 差异表达基因 GO 功能分析 根据实验筛选出两组的差异表达基因,其参与的富集的细胞位置和分子功能是:(1)细胞周期调节蛋白;(2)蛋白质泛素化;(3)微管、微丝等细胞骨架构建;(4)线粒体及能量相关功能的因子;(5)激素合成调节因子。

5 差异表达基因 KEGG 通路分析 差异表达基因参与的通路主要为:(1)葡萄糖、脂类、能量代谢;(2)TGF- β 信号传导通路。

讨 论

差异基因参与了机体多个生物学过程和通路,如 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、核受体激素(nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1, NR4A1)和脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, Fas)表达均上调,Bax 在 mRNA

和蛋白表达水平的升高与颗粒细胞死亡及卵泡闭锁存在持续关系。Sasson R 等^[4]发现在人类卵巢颗粒细胞的凋亡被皮质激素所抑制时,细胞内 Bax 的含量高达 3~7.6 倍,证明了 Bax 能抑制颗粒细胞凋亡,促进卵泡的生长和排卵。Liu LQ^[5]等发现 NR4A1 对猪的生殖功能具有调节作用;Park JI 等^[6]研究发现在大鼠排卵前卵泡颗粒细胞中应用 LH 能显著促进 NR4A1 的表达,进而影响排卵;董丽^[7]研究发现 NR4A1 可以参与调节颗粒细胞葡萄糖的利用及脂类物质的转运、氧化。Dharma SJ 等^[8]研究认为 Fas 抗原在卵母细胞、卵及某些颗粒细胞上有表达,而 Fas 配体在颗粒细胞上则强表达,该实验证明颗粒细胞上 Fas 配体的表达能诱导表达 Fas 的卵细胞发生凋亡。

肾为天癸之源,冲任之本,寓元阴元阳,是生精的基础,也是生长、生育、生殖的根本。王瑞霞等^[9]提出人体生殖能力由肾精、天癸所主导,胚胎质量及发育潜能由肾精决定。若肾阳亏虚,肾中阴阳失衡,卵泡发育迟缓,导致卵子及颗粒细胞“藏而不泄”;只有肾阳充盛,肾中阴阳平衡,天癸才能泌至,冲任两脉才能通盛,精气由此到达胞脉,卵巢得以蓄积人之元精,卵子适时而泄,颗粒细胞随之泻出,才能为精卵受精及胚胎的着床提供可能。

肾藏精,主生长发育和生殖,阳虚阴寒内盛,气血运行不畅,以人体的生长发育迟缓或早衰、卵巢藏泻功能失常、生殖机能障碍为主要病理变化。本研究结果提示颗粒细胞增殖代谢迟缓、凋亡加快,蛋白质降解过程受阻,颗粒细胞能量代谢障碍、激素合成能力下降等可能是肾阳虚导致生殖功能障碍的一个重要原因。治疗组运用温肾阳中药后颗粒细胞基因表达谱发生变化,通过对差异基因的 GO 功能和信号通路分析提示右归配方颗粒能提高颗粒细胞的增殖速度,抑制其凋亡,调节蛋白质降解、能量代谢、激素合成等过程,提示其与协调肾阳虚患者卵巢颗粒细胞代谢水平低下有关,但这些基因在卵泡发育过程中的协调作用还有待进一步研究。

右归配方颗粒用附子、肉桂、阿胶培补肾中元阳,熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药滋阴益肾,养肝补脾,填精补髓,枸杞子能改善神经内分泌的调节,具有诱发排卵作用,对女性不孕症有良好的治疗功能^[10]。菟丝子、杜仲、当归可使精血互化,菟丝子具有雌激素样作用^[11],菟丝子黄酮可下调心理应激大鼠下丘脑神经递质 β -EP,上调腺垂体 LH 水平^[12],当归有增加卵巢血流量,改善微循环的作用,有助于卵子的生成及排卵,丰富卵巢血供,改善生殖内分泌功能^[13]。本研究应用基因高通量测序技术,研究温肾阳中药是否对肾阳虚

型 IVF 患者卵巢颗粒细胞基因表达谱有影响。其中表达水平上调的基因占到 60.9%,这与应用右归配方颗粒之前肾虚以致卵巢的藏泻功能失调导致颗粒细胞增殖分化、蛋白质泛素化、能量代谢障碍等有关,深化了肾阳虚证基因调控机制的研究。

参 考 文 献

- [1] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:351-353.
- [2] 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[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(6): 376-378.
- [3] 马宝璋, 齐聪. 中医妇科学[M]. 第 9 版. 北京:中国中医药出版社, 2012:323-324.
- [4] Samson R, Tajima K, Amsterdam A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells [J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 802-811.
- [5] Liu LQ, Li FE, Deng CY, et al. Molecular cloning, tissue expression and association of porcine NR4A1 gene with reproductive traits[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(1): 103-114.
- [6] Park JI, Park HJ, Choi HS, et al. Gonadotropin regulation of NGFI-B messenger ribonucleic acid expression during ovarian follicle development in the rat [J]. Endocrinology, 2001, 142(7): 3051-3059.
- [7] 董丽. 孤儿核受体 NR4A1 对卵巢颗粒细胞糖和脂代谢调节作用的研究[D]. 南京:南京医科大学, 2011.
- [8] Dharma SJ, Kelkar RL, Nandedkar TD. Fas and Fas ligand protein and mRNA in normal and atretic mouse ovarian follicle[J]. Reproduction, 2003, 126(6): 783-789.
- [9] 王瑞霞, 连方, 孙振高. 从现代生殖医学角度探讨“肾藏精主生殖”理论[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(9): 1672-1674.
- [10] 施仁潮主编. 枸杞子[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 2002: 12-22.
- [11] 朱金凤, 余运初, 周楚华. 寿胎丸加味治疗先兆流产的临床观察及实验研究[J]. 中西医结合杂志, 1987, 7(7): 407-409.
- [12] 王建红, 王敏章, 欧阳栋, 等. 菟丝子黄酮对应激雌性大鼠下丘脑 β -EP 与腺垂体 FSH、LH 的影响[J]. 中药材, 2002, 25(12): 886-887.
- [13] 孔增科, 周海平, 付正良主编. 常用中药药理与临床应用[M]. 呼和浩特:内蒙古科学技术出版社, 2005:429.

(收稿:2014-04-05 修回:2014-08-25)