

MAPK 信号通路介导养精种玉汤有效部位调节猪卵巢颗粒细胞雄激素水平的作用机制

叶丹凤¹ 马红霞^{2,3} 吴婉婷¹ 赖毛华^{2,3} 刘 华^{2,3} 郑艳华³ 马婉莹¹

摘要 **目的** 通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路探讨养精种玉汤正丁醇(ZDC)及乙酸乙酯(YSYZ)提取物降低猪卵巢颗粒细胞雄激素水平的作用机制。**方法** 分离并培养猪卵巢颗粒细胞,将细胞按不同浓度的 MAPK 抑制剂 PD98059 孵育,分为 0(空白对照)、1、3、10、25 $\mu\text{mol/L}$ 共 5 组,培养 24 h 后,采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测 17 α -羟化酶/C17,20-裂解酶(cytochrome P450c17a, CYP17) mRNA 表达水平,应用放射免疫测定法(RIA)检测细胞上清液雄激素(睾酮)含量,筛选最佳的 PD98059 作用浓度;采用 10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 干预卵巢颗粒细胞 24 h 后,将细胞培养液更换成含或不含有不同浓度(0、1、5、25、50 mg/mL)的养精种玉汤有效成分提取物 ZDC 及 YSYZ 干预不同的时间(3、6、18、24 h)后,采用 Western blot 法检测各组磷酸化的细胞外信号调节激酶(p-ERK1/2)、c-Fos 及 CYP17 蛋白表达水平,RIA 法检测细胞上清液睾酮含量。**结果** 10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 可明显降低猪卵巢颗粒细胞 p-ERK1/2 蛋白表达,增加 CYP17 mRNA 表达,并可增加细胞上清液睾酮含量($P < 0.05$)。当养精种玉汤 ZDC、YSYZ 提取物浓度为 25 ng/mL、作用时间为 6 h 时,可增加猪卵巢颗粒细胞 p-ERK1/2、c-Fos 蛋白水平并降低 CYP17 蛋白的表达,降低细胞上清液睾酮含量($P < 0.05$)。**结论** 养精种玉汤有效成分通过增加 MAPK 的活性从而降低猪卵巢颗粒细胞的雄激素生成。

关键词 养精种玉汤;雄激素;猪卵巢颗粒细胞;丝裂原活化蛋白激酶

Effective Ingredients of Yangjing Zhongyu Decoction Regulated Androgen Biosyntheses by Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Porcine Granulosa Cells YE Dan-feng¹, MA Hong-xia^{2,3}, WU Wan-ting¹, LAI Mao-hua^{2,3}, LIU Hua^{2,3}, ZHENG Yan-hua³, and MA Wan-ying¹ 1 Guangzhou Medical University, Guangzhou (510120); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou (510120); 3 Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou (510120)

ABSTRACT **Objective** To study the molecular mechanism of Yangjing Zhongyu Decoction (YZD) n-butanol extracts (ZDC) and ethyl acetate extracts (YSYZ) in reducing androgen in porcine granulosa cells by mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Methods** Porcine granulosa cells were isolated and cultured. They were inoculated by MAPK inhibitor PD98059 at different concentrations, and then they were divided into the blank control group (0), 1, 3, 10, and 25 $\mu\text{mol/L}$ groups. After 24-h culture the cytochrome P450c17a (CYP17) mRNA expression level was detected using Real-time fluorescent quantitative PCR. Contents of androgen (testosterone) in the supernate were detected using RIA and optimal PD98059 concentration screened. After intervened by 10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 for 24 h, the culture solution was intervened by effective ingredients of with or without YZD or YSYZ at various concentrations (0, 1, 5, 25, 50 mg/mL) at various time points (3, 6, 18, 24 h). Expression levels of p-ERK1/2, c-Fos and CYP17 were detected by Western blot. Testosterone content in the supernate was determined by radioimmunoassay (RIA). **Results** Ten $\mu\text{mol/L}$ PD98059 could obviously decrease p-ERK1/2 protein expression and increase CYP17 mRNA expression, and elevate testosterone content in the supernate ($P < 0.05$). ZDC and YSYZ at 25 ng/mL could increase

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273786)

作者单位:1.广州医科大学研究生院(广州 510120); 2.广州医科大学附属第一医院中医科(广州 510120); 3.广州医科大学中西医结合研究所(广州 510120)

通讯作者:马红霞, Tel: 020-83062042, E-mail: doctorhongxia@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.07.0847

p-ERK1/2 protein expression and c-Fos levels, and reduce CYP17 protein expression, and lower testosterone content in the supernate after 6-h intervention ($P < 0.01$). Conclusion Effective ingredients of YZD could reduce androgen production in porcine granulosa cells through increasing activities of MAPK.

KEYWORDS Yangjing Zhongyu Decoction; androgen; porcine granulosa cell; mitogen-activated protein kinase

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 又称 Stein-Leventhal 综合征, 在 1935 年由 Stein-Leventhal 提出, 是一组表现为肥胖、不孕、闭经、多毛、双侧卵巢呈多囊样改变的综合征。PCOS 的主要病理生理改变为体内雄激素增多。由于雄激素的来源复杂, PCOS 患者抗雄激素的治疗也是多方面的。如口服避孕药、雄激素受体拮抗剂、 5α -还原酶抑制剂等。但这些药物本身存在一些不良反应, 如长期口服避孕药可能导致血脂异常、糖耐量异常、胰岛素抵抗、血栓形成以及停药后复发等^[1, 2]。中药复方具有多效应及不良反应小的特点, 对于复杂的病症可经多途径、多环节、多靶点进行调节。

养精种玉汤出自《傅青主女科》, 用于补肾养血, 为调经种子的有效方剂。本课题组前期研究表明, 养精种玉汤能降低 PCOS 大鼠模型血清睾酮 (testosterone, T) 及相应底物 17α -羟孕酮浓度水平, 升高血清雌二醇 (E_2) 水平, 并促进卵巢颗粒细胞增殖分化相关基因的表达, 其主要有效部位是正丁醇 (ZDC) 和 YSYZ 提取物^[3, 4]。本研究从雄激素生成关键酶 17α -羟化酶/C17, 20-裂解酶 (CYP17) 的基因表达及其调控因子 c-Fos 与主要信号转导途径—丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 探讨养精种玉汤主要有效部位 ZDC 及 YSYZ 提取物降低猪卵巢颗粒细胞雄激素合成的机制。

材料与方法

1 动物 4~6 月龄大白猪, 猪卵巢在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温条件下 1 小时内从当地的屠宰场带回实验室, 猪卵巢颗粒细胞从猪卵巢中提取。

2 药物与试剂 养精种玉汤组成: 大熟地 30 g 当归 15 g 白芍 15 g 山萸肉 15 g。采用 ZDC 和 YSYZ 提取有效部位, 样品浓度为 1 g/mL (即每毫升含 1 g 生药), 由广东药学院制备, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存。使用前先室温自然解冻, 3 000 r/min 以上转速离心 15 min, 取上清液, 再用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。青链霉素混合液 (双抗, 100 $\times$, 青霉素含量为 10 000 U/mL, 链霉素含量为 10 mg/mL) 由 Solarbio 公司提供 (批号: P1400-100); MAPK 抑制剂

PD98059 购自 Selleck Chemicals (批号: S1177); 培养基 DME/F12 (批号: SR30003.KT) 和胎牛血清购自 Hyclone 公司 (批号: SH30084.03); 兔抗 P44/42 MAPK (ERK1/2) [phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (extracellular regulated protein kinases)] 购自 Cell Signaling Technology (批号: 9101S); 兔抗人 c-Fos (FBJ osteosarcoma oncogene) 购自美国 Santa Cruz 公司 (批号: SC-1616); 兔多克隆抗体 CYP17 购自英国 BIOBYT 公司 (批号: orb5948); 兔抗 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 购自 ABCam (ab78336); Western blot 所需试剂购自上海碧云天生物技术有限公司。山羊抗兔 IgG 二抗, HRP 辣根过氧化物酶标记购自 EarthOx 公司 (批号: E030120)。

3 猪卵巢颗粒细胞的分离与培养 取新鲜的猪卵巢, 置于含高浓度双抗 (每 500 mL 生理盐水含 5 mL 的青链霉素混合液) 生理盐水中, 用含有 1% 双抗的 PBS (NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, KH_2PO_4 2 mmol/L, pH 7.2~7.4) 反复冲洗 3 遍, 放入含有少量培养基的培养皿中, 选取未成熟的、直径小或中等大小的卵泡 (2~4 mm), 1 mL 注射器刺破并吸出卵泡液, 加入含有 2 mL 生理盐水的离心管 (15 mL) 中, 以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。采用培养基 (DMEM/F12, 10% FBS) 洗涤细胞 1 次, 离心去上清。获得的细胞即为较纯的颗粒细胞^[5, 6]。将上述方法获得的颗粒细胞悬浮于 10% FBS 的培养基中, 反复吹打, 使之分散。以 $1 \times 10^6/\text{L}$ 的细胞浓度接种于 6 孔板后, 将细胞放入 5% CO_2 、95% 空气、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养。

4 PD98059 有效浓度筛选 参照文献 [7], 通过 PD98059 作用颗粒细胞, 检测 CYP17 mRNA 以筛选 PD98059 最佳浓度。上述方法培养的卵巢颗粒细胞按照含有不同浓度的 PD98059 分为 0 (空白对照)、1、3、10、25 $\mu\text{mol/L}$ 组, 共 5 组。各组培养 24 h 后, 提取细胞 RNA, 采用 Real-time PCR 法检测 CYP17 mRNA 的表达。用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 并按反转录试剂盒说明进行反转录。在 ABI 7900 荧光定量 PCR 系统中对 CYP17 的水平进行检测, 以 β -

actin 为对照。CYP17 上游引物:5'-TGTCGTCGT-CAATCTGTGGG-3', 下游引物:5'-GGGTGGAGT-CAGGAGGTACT-3', 引物长度 147 bp。内参 β -actin 上游引物:5'-TCTACACCGCTACCAAGTTCG-3', 下游引物:5'-TCGATGGGGTACTTGAGGGT-3', 引物长度 132 bp。q RT-PCR 循环参数:(1) 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环;(2) 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环;(3) 溶解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。CYP17 mRNA 表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示, 其值为以 CYP17 mRNA 表达量与 β -actin 表达量的比值, 再将对照组的量设为 1, 其余样本的数值与其相除, 得到相对定量值。每个目的基因重复测定 3 次。

5 T 含量测定 将培养细胞分为两组, 实验组 (PD 组) 为最佳浓度的 PD98059 干预卵巢颗粒细胞 24 h, 对照组为无药物干预组。收集各组的细胞上清液, 并保存于 -20 °C 冰箱中。采用 RIA 法检测细胞上清液的 T 含量。每组重复测定 3 次。

6 养精种玉汤有效成分 ZDC 和 YSYZ 最佳作用浓度及作用时间的探索

6.1 最佳作用浓度的探索 将细胞分为两大组, 第 1 组为 ZDC 干预组, 第 2 组为 YSYZ 干预组。根据含或不含有有效成分 (ZDC 或 YSYZ) 及干预浓度, 各组再分为 6 个小组: 分别为 (PD-ZDC-) 组、(PD + ZDC-) 组、(PD + ZDC1) 组、(PD + ZDC5) 组、(PD + ZDC25) 组及 (PD + ZDC50) 组; 或 (PD - YSYZ-) 组、(PD + YSYZ-) 组、(PD + YSYZ 1) 组、(PD + YSYZ 5) 组、(PD + YSYZ 25) 组及 (PD + YSYZ 50) 组。第 1 小组不进行任何药物干预。其余 5 组为上述实验筛选出的最佳浓度 (10 μ mol/L) 的 PD98059 干预 24 h 后, 换成含有不同浓度 (0、1、5、25、50 mg/mL) 的 ZDC 或 YSYZ 培养基中干预 24 h。收集各组细胞上清液, 采用 Western blot 检测各组 p-ERK1/2 蛋白水平。每组实验重复 3 次。筛选 ZDC 及 YSYZ 的最佳作用浓度。

6.2 最佳作用时间的探索 将上述 ZDC 干预组和 YSYZ 干预组分别分为 8 个小组。各组卵巢颗粒细胞经 10 μ mol/L PD98059 干预 24 h 后, 更换成含有或不含有 6.1 实验筛选出的最佳浓度的 ZDC 或 YSYZ 分别干预不同时间 (3、6、18、24 h)。其分组为 (PD + ZDC 3 h-) 组、(PD + ZDC 3 h+) 组、(PD + ZDC 6 h-) 组、(PD + ZDC 6 h+) 组、(PD + ZDC 18 h-) 组、(PD + ZDC 18 h+) 组、(PD + ZDC 24 h-) 组及 (PD + ZDC 24 h+) 组; 或 (PD + YSYZ 3 h-) 组、(PD + YSYZ 3 h+) 组、(PD + YSYZ 6 h-) 组、

(PD + YSYZ 6 h+) 组、(PD + YSYZ 18 h-) 组、(PD + YSYZ 18 h+) 组、(PD + YSYZ 24 h-) 组、(PD + YSYZ 24 h+) 组。收集各组细胞上清液, 采用 Western blot 法检测各组 p-ERK1/2 蛋白表达。每组实验重复 3 次。筛选 ZDC 及 YSYZ 的最佳作用时间。

7 实验分组 将培养的猪卵巢颗粒细胞分为 ZDC 及 YSYZ 干预组。各组在 10 μ mol/L PD98059 干预 24 h 后, 更换成含有或不含有最佳浓度的养精种玉汤有效成分提取物后干预最佳作用时间。收集各组蛋白质及细胞上清液。采用 RIA 检测细胞上清液的睾酮含量。每组实验重复 3 次。

8 卵巢颗粒细胞 p-ERK1/2、c-Fos 及 CYP17 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。将 6 孔板中的细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍后加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (PMSF), 冰上孵育 30 min, 收集细胞裂解产物。4 °C 14 000 $\times g$ 离心 5 min, 将上清移至另一预冷的 1.5 mL EP 管中, BCA 法测定蛋白质浓度, 并分装。蛋白质与 2 $\times$ Loading buffer 混合。沸水煮 5 min, 置冰上 2 min。取 30 μ g 蛋白上样, 10% SDS-PAGE 在 80 mV, 100 min 下进行电泳。并于 4 °C 冷库, 300 mA, 1.5 h 条件下转膜。PVDF 膜用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液) 室温孵育 1 h, 倒去封闭液, 加入一抗 4 °C 孵育过夜。TBST (Tris-Buffered Saline and Tween 20) 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。膜稍干后加入化学发光试剂孵育 1 min。于暗室曝光。曝光时间 5 s ~ 30 min。以 GAPDH 为内参。其中兔抗 p-ERK1/2 稀释比例为 1:1 000, 兔抗 c-Fos 为 1:400, 兔抗 CYP17 为 1:800, 兔抗 GAPDH 为 1:1 000, 山羊抗兔 IgG 二抗比例为 1:5 000。采用 Image J 对 Western blot 图片进行灰度分析, 计算目的基因/内参基因灰度值比值。

9 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 卵巢颗粒细胞培养 (图 1) 卵巢颗粒细胞呈单层贴壁性生长, 培养 24 h 后细胞开始贴壁、增殖。倒置显微镜下观察可见, 细胞核大、胞浆饱满、颗粒丰富均匀、透光好。细胞生长呈星形或梭形, 细胞与细胞间有延长的伪足相互连接。

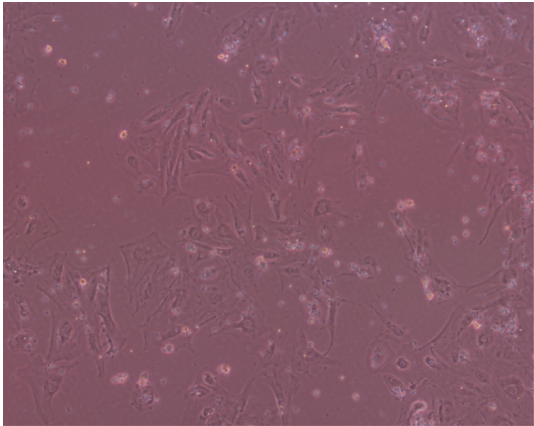


图1 培养 24 h 贴壁生长的卵巢颗粒细胞
(倒置显微镜, ×20)

2 不同浓度的 PD98059 作用下各组 CYP17 mRNA 表达水平比较(表 1) 与空白对照组比较,各组 CYP17 mRNA 表达均增加 ($P < 0.05$), 且当 PD98059 浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时, CYP17 mRNA 的表达增加 10 倍左右, 故后续实验 PD98059 均采用此浓度。

表 1 不同浓度的 PD98059 作用下各组 CYP17 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	CYP17 mRNA
空白对照	3	1
PD98059 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$	3	$6.64 \pm 1.05^*$
5 $\mu\text{mol/L}$	3	$4.54 \pm 1.11^*$
10 $\mu\text{mol/L}$	3	$10.02 \pm 1.30^*$
25 $\mu\text{mol/L}$	3	$5.18 \pm 1.53^*$

注:与空白对照组, * $P < 0.05$; *n* 为实验重复次数;下表同

3 对照组与 PD 组 T 含量比较 对照组 T 含量为 (0.04 ± 0.02) ng/mL, PD 组 T 含量为 (0.18 ± 0.02) ng/mL, PD 组较对照组明显升高 ($P < 0.05$)。

4 不同浓度的 ZDC 和 YSYZ 提取物干预后各组卵巢颗粒细胞 p-ERK1/2 蛋白水平比较

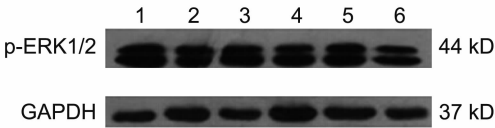
4.1 不同浓度的 ZDC 提取物与 PD98059 共孵育后各组 p-ERK1/2 蛋白水平比较 (表 2, 图 2) 与 (PD-ZDC-) 组比较, (PD + ZDC-) 组 p-ERK1/2 表达减少 ($P < 0.05$)。与 (PD + ZDC-) 组比较, (PD + ZDC25) 组 p-ERK1/2 表达增加, 且增加最明显 ($P < 0.01$)。因而后续 ZDC 的浓度选取 25 mg/mL 。

4.2 不同浓度的 YSYZ 提取物与 PD98059 共孵育后各组 p-ERK1/2 蛋白水平比较(表 3, 图 3) 与 (PD - YSYZ -) 组比较, (PD + YSYZ-) 组 p-ERK1/2 表达减少 ($P < 0.05$)。与 (PD + YSYZ -) 组比较, (PD + YSYZ25) 组 p-ERK1/2 表达增加最明显 ($P < 0.01$)。

表 2 不同浓度的 ZDC 与 PD98059 共孵育后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	p-ERK1/2 蛋白
PD - ZDC -	3	1.35 ± 0.35
PD + ZDC -	3	$0.54 \pm 0.11^*$
PD + ZDC1	3	0.81 ± 0.06
PD + ZDC5	3	0.69 ± 0.25
PD + ZDC25	3	$1.10 \pm 0.13^\Delta$
PD + ZDC50	3	0.83 ± 0.15

注:与 (PD-ZDC-) 组比较, * $P < 0.05$; 与 (PD + ZDC-) 组比较, $^\Delta P < 0.01$



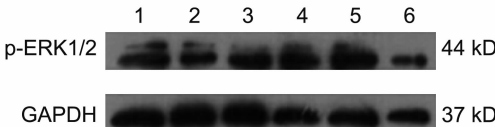
注:1 为 (PD - ZDC -) 组; 2 为 (PD + ZDC -) 组; 3 为 (PD + ZDC1) 组; 4 为 (PD + ZDC5) 组; 5 为 (PD + ZDC25) 组; 6 为 (PD + ZDC50) 组

图 2 不同浓度的 ZDC 与 PD98059 共孵育后各组 p-ERK1/2 蛋白表达

表 3 不同浓度的 YSYZ 与 PD98059 共孵育后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	p-ERK1/2 蛋白
PD - YSYZ -	3	1.14 ± 0.26
PD + YSYZ -	3	$0.30 \pm 0.29^*$
PD + YSYZ1	3	0.72 ± 0.12
PD + YSYZ5	3	$1.29 \pm 0.60^\Delta$
PD + YSYZ25	3	$1.35 \pm 0.29^\Delta$
PD + YSYZ50	3	0.80 ± 0.13

注:与 (PD - YSYZ -) 组比较, * $P < 0.05$; 与 (PD + YSYZ-) 比较, $^\Delta P < 0.01$



注:1 为 (PD - YSYZ -) 组; 2 为 (PD + YSYZ -) 组; 3 为 (PD + YSYZ1) 组; 4 为 (PD + YSYZ5) 组; 5 为 (PD + YSYZ25) 组; 6 为 (PD + YSYZ50) 组

图 3 不同浓度的 YSYZ 与 PD98059 共孵育后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白表达水平

故后续 YSYZ 的浓度选取 25 mg/mL 。

5 养精种玉汤有效部位与 PD98059 共孵育不同时间后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白水平比较

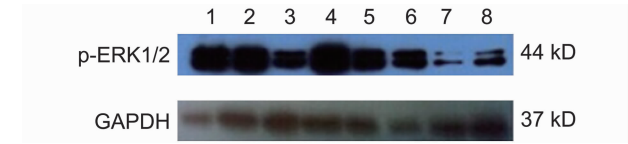
5.1 ZDC 与 PD98059 共孵育不同时间后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白水平比较(表 4, 图 4) (PD + ZDC 6 h +) 组与 (PD + ZDC 6 h -) 组、(PD + ZDC 18 h +) 组与 (PD + ZDC 18 h -) 组比较, 前者 p-ERK1/2 表达水平均高于后者 ($P < 0.05$)。 (PD +

ZDC 6 h +) 组较 (PD + ZDC 6 h -) 组 p-ERK1/2 表达增加约 1.7 倍。

表 4 ZDC 与 PD98059 共孵育不同时间后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-ERK1/2 蛋白
PD + ZDC 3 h -	3	1.05 ± 0.20
PD + ZDC 3 h +	3	1.24 ± 0.25
PD + ZDC 6 h -	3	0.80 ± 0.39
PD + ZDC 6 h +	3	1.37 ± 0.19*
PD + ZDC 18 h -	3	0.71 ± 0.11
PD + ZDC 18 h +	3	1.12 ± 0.05 ^Δ
PD + ZDC 24 h -	3	0.53 ± 0.15
PD + ZDC 24 h +	3	0.88 ± 0.42

注:与 (PD + ZDC 6 h -) 比较, *P < 0.05; 与 (PD + ZDC 18 h -) 比较, ^ΔP < 0.05



注:1 为 (PD + ZDC 3 h -) 组;2 为 (PD + ZDC 3 h +) 组;3 为 (PD + ZDC 6 h -) 组;4 为 (PD + ZDC 6 h +) 组;5 为 (PD + ZDC 18 h -) 组;6 为 (PD + ZDC 18 h +) 组;7 为 (PD + ZDC 24 h -) 组;8 为 (PD + ZDC 24 h +) 组

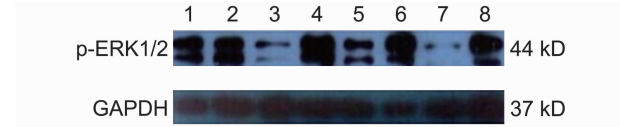
图 4 ZDC 与 PD98059 共孵育不同时间后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白表达

5.2 YSYZ 与 PD98059 共孵育不同时间后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白水平比较 (表 5, 图 5) (PD + YSYZ 6 h +) 组与 (PD + YSYZ 6 h -) 组、(PD + YSYZ 18 h +) 组与 (PD + YSYZ 18 h -) 组比较, 前者 p-ERK1/2 表达均高于后者 (P < 0.05)。(PD + YSYZ 6 h +) 组较 (PD + YSYZ 6 h -) 组 p-ERK1/2 表达增加约 2 倍。

表 5 YSYZ 与 PD98059 共孵育不同时间后各组细胞上清 p-ERK1/2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-ERK1/2 蛋白
PD + YSYZ 3 h -	3	0.95 ± 0.28
PD + YSYZ 3 h +	3	1.07 ± 0.44
PD + YSYZ 6 h -	3	0.40 ± 0.15
PD + YSYZ 6 h +	3	0.95 ± 0.52*
PD + YSYZ 18 h -	3	0.57 ± 0.10
PD + YSYZ 18 h +	3	1.03 ± 0.15 ^Δ
PD + YSYZ 24 h -	3	0.21 ± 0.21
PD + YSYZ 24 h +	3	0.55 ± 0.10

注:与 (PD + YSYZ 6 h -) 比较, *P < 0.05; 与 (PD + YSYZ 18 h -) 比较, ^ΔP < 0.05



注:1 为 (PD + YSYZ 3 h -) 组;2 为 (PD + YSYZ 3 h +) 组;3 为 (PD + YSYZ 6 h -) 组;4 为 (PD + YSYZ 6 h +) 组;5 为 (PD + YSYZ 18 h -) 组;6 为 (PD + YSYZ 18 h +) 组;7 为 (PD + YSYZ 24 h -) 组;8 为 (PD + YSYZ 24 h +) 组

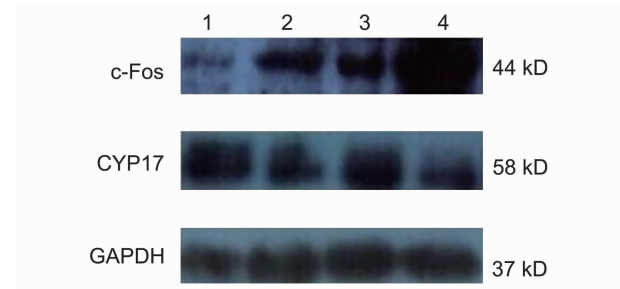
图 5 YSYZ 与 PD 共孵育不同时间后 p-ERK1/2 蛋白表达

6 各组卵巢颗粒细胞 c-Fos 及 CYP17 蛋白水平比较 (表 6, 图 6) 与 (PD + ZDC 6 h -) 组比较, (PD + ZDC 6 h +) 组 c-Fos 表达增加, CYP17 表达减少 (P < 0.05)。与 (PD + YSYZ 6 h -) 组比较, (PD + YSYZ 6 h +) 组 c-Fos 表达增加, CYP17 表达减少 (P < 0.05)。

表 6 各组卵巢颗粒细胞 c-Fos 及 CYP17 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	c-Fos 蛋白	CYP17 蛋白
PD + ZDC 6 h -	3	0.39 ± 0.07	1.84 ± 1.13
PD + ZDC 6 h +	3	1.05 ± 0.20*	0.67 ± 0.11 [▲]
PD + YSYZ 6 h -	3	0.74 ± 0.16	1.43 ± 0.16
PD + YSYZ 6 h +	3	2.04 ± 0.59 ^Δ	0.96 ± 0.11 [○]

注:与 (PD + ZDC 6 h -) c-Fos 蛋白比较, *P < 0.05; 与 (PD + YSYZ 6 h -) c-Fos 蛋白比较, ^ΔP < 0.05; 与 (PD + ZDC 6 h -) CYP17 蛋白比较, [▲]P < 0.05; 与 (PD + YSYZ 6 h -) CYP17 蛋白比较, [○]P < 0.05



注:1 为 (PD + ZDC 6 h -) 组;2 为 (PD + ZDC 6 h +) 组;3 为 (PD + YSYZ 6 h -) 组;4 为 (PD + YSYZ 6 h +) 组

图 6 养精种玉汤有效成分提取物作用后 c-Fos 及 CYP17 蛋白表达电泳

7 养精种玉汤有效成分提取物作用 6 h 后各组颗粒细胞 T 水平比较 (表 7) 与 (PD + ZDC 6 h -) 组比较, (PD + ZDC 6 h +) 组细胞上清液 T 含量降低 (P < 0.05)。与 (PD + YSYZ 6 h -) 组比较, (PD + YSYZ 6 h +) 组细胞上清液中 T 含量降低 (P < 0.05)。

表 7 养精种玉汤有效成分提取物作用 6 h 后
颗粒细胞 T 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T (ng/mL)
PD + ZDC 6 h -	3	0.18 ± 0.02
PD + ZDC 6 h +	3	0.08 ± 0.02 *
PD + YSYZ 6 h -	3	0.17 ± 0.01
PD + YSYZ 6 h +	3	0.06 ± 0.043 [△]

注:与(PD + ZDC 6 h -)比较, * $P < 0.05$;与(PD + YSYZ 6 h -)比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

根据中医“肾藏精,主生殖”、“女子血海盈亏有期”及女性月经周期中阴阳消长转化规律,经后期予以滋肾养精血治疗以促进卵泡发育,养精种玉汤是滋肾养精血的代表方,是调经种子的有效方剂^[8,9]。有研究表明,养精种玉汤能增加颗粒细胞孕酮与雌二醇的分泌^[10,11],提高子宫内膜对胚胎种植的接受性^[12,13],有助于提高试管婴儿成功率^[14]。本课题组前期的研究表明养精种玉汤有效成分 YSYZ 和 ZDC 提取物可以促进雄激素向雌激素的转化,又可以降低雄激素的生成^[3,4]。本研究主要探讨养精种玉汤主要有效部位降低猪卵巢颗粒细胞雄激素生成的机制。

PCOS 为生育年龄女性常见疾病,PCOS 常表现为高胰岛素血症,雄激素增多等。其发病机制尚未阐明,但研究认为高雄激素血症在 PCOS 的发病机制中发挥着重要的作用。在卵巢和肾上腺,类固醇合成的核心途径涉及到细胞色素 P450 基因家族。P450c17 具有 17 α -羟化酶和 17,20 裂解酶活性,在肾上腺类固醇和性腺雄激素的合成中起到关键的限速作用。PCOS 妇女中分离出的膜细胞与正常膜细胞比较,毛猴素刺激的 CYP17 增加更加明显^[15]。PCOS 膜细胞长期培养后 CYP17 基因的转录及 P450c17-羟化酶/C17,20 裂解酶的活性增强,表明 PCOS 膜细胞中增加的 CYP17 导致生成雄激素的类固醇生成酶的升高^[16]。

CYP17 的调节涉及多种分子途径的相互作用。研究表明,在 LH 水平升高的典型 PCOS 中,升高的 LH 水平可能导致 17,20 裂解酶的增加^[17]。近年有研究认为 MAPK 途径也可能参与了类固醇的生成。MAPKs 是一种使信号从细胞质到细胞核的信号转导介质^[18]。本实验中,颗粒细胞在含有 MAPK 抑制剂 PD98059 的培养基中培养后,CYP17 mRNA 的表达升高,表明 MAPK 途径的抑制可增加 CYP17 mRNA 的活性。研究表明,PCOS 卵巢中分裂原活化抑制剂 (MEK) 1/2 和 ERK1/2 信号降低,并且降

低的 MEK 1/2 和 ERK1/2 的活性可导致 CYP17 基因表达的增加和雄激素合成增多^[19,20]。在本研究中,颗粒细胞在含有 MAPK 抑制剂 PD98059 的培养基中培养后,p-ERK1/2 蛋白减少,睾酮水平增高。以上表明猪卵巢颗粒细胞中雄激素的调控可能是通过 MAPK 途径来调控 CYP17 的表达,从而调节雄激素的生成。

因此本课题组从 MAPK 途径来研究养精种玉汤有效成分降低雄激素的机制。笔者假设养精种玉汤有效成分可以通过活化 MAPK 途径来降低 CYP17 和雄激素的合成。当 MAPK 抑制剂浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,与对照组比较,CYP17 mRNA 表达增加最明显。因而本实验后续实验采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 干预颗粒细胞。结果表明,颗粒细胞经 10 $\mu\text{mol/L}$ MAPK 抑制剂 PD98059 处理后,再用 ZDC 或 YSYZ 提取物干预,当其浓度均为 25 mg/mL 时,p-ERK1/2 表达的增加相对于其他组最明显。当 ZDC 或 YSYZ 提取物作用于颗粒细胞的时间为 6 h 时,磷酸化 ERK1/2 表达的增加相对于其他组最明显。颗粒细胞在 10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 干预后,25 mg/mL 的 ZDC 或 YSYZ 提取物作用于细胞 6 h,CYP17 和睾酮的表达水平降低。

在人类卵巢膜细胞模型中,c-Fos 可能是抑制 CYP17 表达的一种因子。c-Fos 属于激活蛋白-1 家族的转录因子,c-Fos/c-jun 异源二聚体可以阻止 SF1 与 CYP17 基因启动子的结合。研究表明,MAPK 途径的阻断导致 CYP17 的增加可能涉及到 c-Fos^[7]。本研究结果表明,养精种玉汤 YSYZ 提取物和 ZDC 提取物均增加了颗粒细胞 c-Fos 基因的表达。

综上所述,本实验表明养精种玉汤 YSYZ 和 ZDC 提取物可能通过增加磷酸化 ERK 的活性而抑制 CYP17 和雄激素的生成,并且其对 CYP17 的抑制机制可能涉及 c-Fos 表达的增加。

参 考 文 献

- [1] Steven ST, Hartzema AG, Brophy JM, et al. Risk of venous thromboembolism in women with polycystic ovary syndrome: a population-based matched cohort analysis [J]. CAMJ, 2013, 185 (2): 115-120.
- [2] Baillargeon JP, McClish DK, Essah PA, et al. Association between the current use of low-dose oral contraceptives and cardiovascular arterial disease: a meta-analysis [J]. J Clin Endocrinol

- Metab, 2005, 90(7): 3863–3870.
- [3] 丁涛. 养精种玉汤促卵泡发育机制及其药效物质基础研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2012.
- [4] 马红霞, 谢军, 赖毛华, 等. 养精种玉汤对多囊卵巢综合征大鼠模型卵巢颗粒细胞分泌功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 54–57.
- [5] LaVoie HA, Garmey JC, Day RN, et al. Concerted regulation of low density lipoprotein receptor gene expression by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in porcine granulosa cells: promoter activation, messenger ribonucleic acid stability, and sterol feedback[J]. Endocrinology, 1999, 140(1): 178–186.
- [6] Aad PY, Voge JL, Santiago CA, et al. Real-time PCR quantification of pregnancy-associated plasma protein-A mRNA abundance in bovine granulosa and theca cells: effects of hormones *in vitro* [J]. Domest Anim Endocrinol, 2006, 31(4): 357–372.
- [7] Patel SS, Beshay VE, Escobar JC, et al. Molecular mechanism for repression of 17 α -hydroxylase expression and androstenedione production in granulosa cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(12): 5163–5168.
- [8] 马红霞, 赖毛华, 黄婉怡, 等. 中医药促卵泡发育成熟的研究思路[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(4): 8–10.
- [9] 包文斐. 浅析《傅青主女科》调经种子证治特色[J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(7): 484–485.
- [10] 张玮, 王京花, 程龙庆, 等. 养精种玉汤加减提取液对离体培养的兔卵巢颗粒细胞雌二醇生成的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, S1: 206–207.
- [11] 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.
- [12] 吴瑞瑾, 周馥贞. 养精种玉汤对原因不明不孕患者子宫内膜基质金属蛋白酶-9 表达及性激素调节的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(4): 294–298.
- [13] 吴瑞瑾, 周馥贞. 养精种玉汤对原因不明不孕症患者子宫内膜胰岛素样生长因子-Ⅱ及其受体表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(7): 490–493.
- [14] 姜萍, 傅萍. 傅萍运用养精种玉汤治疗试管婴儿术前临床经验[J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(3): 170–171.
- [15] Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, et al. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries [J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(6): 946–957.
- [16] Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, et al. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(12): 5925–5933.
- [17] Qin KN, Rosenfield RL. Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome [J]. Mol Cell Endocrinol, 1998, 145(1–2): 111–121.
- [18] Whitmarsh A, Davis R. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways [J]. J Mol Med, 1996, 74(10): 589–607.
- [19] Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Quinn PG, et al. Increased cytochrome P450 17 α -hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1 [J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(3): 588–605.
- [20] Nelson-DeGrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, et al. Alterations in mitogen-activated protein kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome [J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(2): 379–390.

(收稿: 2013–10–12 修回: 2015–03–22)