

从雄激素受体及其活化因子角度探讨多囊饮对多囊卵巢模型大鼠卵泡发育及子宫内膜容受性的影响

郑冬雪¹ 刘军莲² 马 兰¹ 刘咏梅¹ 刘新敏¹

(1.中国中医科学院广安门医院,北京 100053;2.中国航天员科研训练中心,北京 100094)

摘 要 目的:探讨多囊饮对雄激素致不孕多囊卵巢(PCO)模型大鼠卵泡发育、子宫内膜容受性的影响及其作用机制。方法:取225只雌性成年SD大鼠随机分为造模组180只与正常组45只,造模组大鼠采用一次性皮下注射丙酸睾酮注射液法建立PCO大鼠模型,正常组注射等量溶剂中性茶油。造模成功后将造模组大鼠随机分为模型组、阳性药物组(枸橼酸氯米芬片每日100 mg/kg)、多囊饮大剂量组(多囊饮每日68.66 g/kg)、多囊饮小剂量组(多囊饮每日34.33 g/kg),每组45只。多囊饮各剂量组每日分别按规定剂量灌胃,连续给药10 d;阳性药物组参照人的用药方法,每个动情周期灌胃给药2 d,余3 d予等体积生理盐水,共给药2个动情周期;模型组和正常组每日予等体积生理盐水灌胃,连续10 d。于开始给药或生理盐水后的第11天各组随机取15只大鼠腹股沟静脉丛采血,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清睾酮(T)、卵泡刺激素(FSH);取子宫内膜组织,反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测雄激素受体(AR)及辅助活化因子雄激素受体相关蛋白70(ARA70)、可溶性受体1型(SCR1)、SRC羧基末端激酶结合蛋白(CBP) mRNA表达。余大鼠按雌雄比例4:1合笼,次晨检查阴栓,发现阴栓则记为D1,此后依天数类推。将各组大鼠按照发现阴栓后的天数分为D5(子宫内膜植入窗期)、D10、D16共3小组,每小组10只,分别于D5、D10、D16断颈处死,取子宫,观察各时期各组大鼠妊娠鼠数、胚胎着床数量或胎儿数,计算妊娠率。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清T水平显著升高($P<0.01$),FSH水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清T水平均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),多囊饮大剂量组血清FSH水平显著升高($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠子宫内膜组织AR、CBP基因表达显著升高($P<0.05$);与模型组比较,阳性药物组、多囊饮大剂量组大鼠子宫内膜组织AR、ARA70、CBP、SCR1基因表达水平及多囊饮小剂量组子宫内膜组织CBP基因表达水平均显著降低($P<0.01$, $P<0.05$)。与阳性药物组比较,多囊饮各剂量组大鼠子宫内膜组织上述基因表达水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。多囊饮大剂量组大鼠子宫内膜组织ARA70基因表达水平显著低于小剂量组($P<0.05$)。D5各组大鼠子宫均未发现着床胚胎。D10、D16模型组大鼠妊娠率显著低于正常组($P<0.01$),各给药组大鼠妊娠率与模型组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);D10阳性药物组和多囊饮大剂量组着床胚胎数略多于模型组,D16多囊饮大剂量组胎儿数略多于模型组、阳性药物组和多囊饮小剂量组。结论:多囊饮可能通过调节雄激素致不孕PCO模型大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,从而调节激素水平、改善雄激素-雄激素受体相关基因表达,作用于子宫内膜,达到促进卵泡发育、提高子宫内膜容受性的效果,进而促使机体恢复排卵并提高受孕几率。

关键词 多囊卵巢综合征;多囊饮;雄激素受体;雄激素受体辅助活化因子;卵泡发育;子宫内膜容受性

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81072839)

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期女性常见的生殖内分泌-代谢紊乱性疾病,临床表现涉及多毛、痤疮、脱发、肥胖等诸多方面,具有高度异质性^[1],育龄早期多并发不良妊娠结局如妊娠糖尿病、糖耐量降低、高脂血症等,远期则表现为子宫内膜癌、2型糖尿病、心血管疾病、代谢综合征等代谢异常相关疾病的患病风险增加^[1]。PCOS引起的稀发排卵、闭经、不孕是患者就诊的主要原因,因此提高排卵率和受孕率是治疗PCOS不孕

急需解决的关键问题^[1]。克罗米芬、来曲唑是常用的促排卵药物,但二者均存在受孕率低、流产率高的缺点^[2-3]。

多囊饮是名老中医李光荣的经验方,前期研究表明该方能降低肾虚肝郁型PCOS患者血清睾酮(T)、黄体生成素(LH)水平,促进患者恢复自主月经、排卵和受孕,提高妊娠成功率^[4]。动物实验表明,该方能降低多囊卵巢(PCO)模型大鼠血清T、LH、胰岛素(INS)水平^[5]。本实验在前期研究的基础上,

通过注射丙酸睾酮建立PCO大鼠模型,研究多囊饮对PCO模型大鼠血清激素、子宫内膜组织雄激素受体(AR)及辅助活化因子、妊娠率及胚胎着床情况的影响,探讨多囊饮改善雄激素致不孕PCO模型大鼠卵泡发育及子宫内膜容受性的作用机制,为临床应用提供依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 清洁级7日龄雌性SD大鼠225只,体质量180~200 g,购于北京维通利华实验技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2006-0009。大鼠使用消毒饲料喂养于中国中医科学院广安门医院动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2009-0034。

1.2 药品与试剂 多囊饮浸膏(主要组成药物:柴胡10 g、白芍12 g、龙胆草6 g、泽兰12 g、菟丝子30 g、淫羊藿30 g)由中国中医科学院广安门医院中药新药制剂研发中心按流程煎制、浓缩,制成浸膏(每克浸膏含生药量1.73 g),4℃条件下保存备用。丙酸睾酮注射液(25 mg/mL,批号:100602),上海通用药业股份有限公司;枸橼酸氯米芬片(50 mg/片,批号:D0703),高特制药有限公司;Fermentas K1622 RT逆转录试剂盒(批号:00044977),MBI公司;SYBR Green PCR Master Mix试剂盒(批号:1108401),美国应用生物公司;Bradford蛋白浓度测定试剂(批号:PA102),北京天根生化科技有限公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、过硫酸铵(APS),美国Amersco公司,批号分别为7626、0172;甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS),美国Sigma公司,批号分别为034H1130、013K0003、49H0881;三氨基甲烷、丙烯酰胺、甘氨酸,美国Novon公司,批号分别为1582943、1259344、1346281。

1.3 主要仪器 7900HT型荧光定量PCR仪,美国应用生物公司;Thermo NanoDrop 2000分光光度计,基因有限公司;高速冷冻离心机,HITACHI公司;光学显微镜,日本OLYMPUS公司;JY99-ⅢB型超声波细胞破碎仪,宁波新芝科器研究所;5415R型高速离心机,德国Eppendorf公司;Lambdal P40紫外可见分光光度计,美国PE公司;Mini-ROTEAN3电泳系统与Mini Trans-Blot转移系统,美国Bio-Rad公司;TS-1型脱色摇床,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司。

2 实验方法

2.1 分组与造模 所有大鼠予普通食水适应性喂养2 d后,随机分为造模组180只,正常组45只。造模组大鼠参照文献[6]制作雄激素致不孕PCO大鼠

模型,于颈背部一次性皮下注射丙酸睾酮注射液1.25 mg/只,正常组同时注射同等剂量的溶剂中性茶油。造模组大鼠待70日龄阴道开口后,连续观察阴道上皮细胞涂片两个性周期(每个性周期5 d,共10 d),阴道上皮细胞持续角化,提示造模成功。

2.2 给药 造模成功后,将造模组大鼠随机分为模型组、阳性药物组(枸橼酸氯米芬片每日100 mg/kg)、多囊饮大剂量组(多囊饮每日68.66 g/kg)、多囊饮小剂量组(多囊饮每日34.33 g/kg)。多囊饮各剂量组每日分别按规定剂量灌胃,连续给药10 d;阳性药物组参照人的用药方法,每个动情周期灌胃给药2 d,余3 d予等体积生理盐水,共给药2个动情周期;模型组和正常组以等体积的生理盐水灌胃,连续10 d。

2.3 取材 于开始灌胃给药或生理盐水后的第11天,各组随机取15只大鼠,腹股沟静脉丛取血,分离血清后-80℃冰箱保存。随后处死大鼠,取出子宫组织,去除周围脂层,-80℃冰箱保存。剩余大鼠按雌雄比例4:1合笼,次晨检查阴栓,发现阴栓记为D1,此后依天数类推。将每组大鼠再进一步分为D5(子宫内膜植入窗期)、D10、D16共3个小组,分别于D5、D10、D16断颈处死,打开腹腔,取双角子宫。

2.4 检测指标

2.4.1 血清T、卵泡刺激素(FSH)水平 按照说明书采用酶免法分别测定各组15只大鼠血清T、FSH含量。

2.4.2 子宫内膜组织AR及辅助活化因子雄激素受体相关蛋白70(ARA70)、SRC羧基末端激酶结合蛋白(CBP)、可溶性补体受体1型(SCR1)mRNA表达 采用RT-PCR检测。使用trizol法提取总RNA,检测其纯度和浓度,逆转录cDNA后扩增,扩增反应为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸35 s,共40个循环;72℃延伸8 min。实验中同步进行内对照GAPDH的定量检测,以目的基因与GAPDH荧光阈值(Ct)之间比作为目的基因的相对表达量。以GAPDH为内参基因,相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,计算mRNA的相对表达量。

2.4.3 各组大鼠D5、D10、D16妊娠、胚胎情况 于不同时期取各组大鼠子宫,记录妊娠大鼠数量、着床胚胎数量或胎儿数。

2.5 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本t检验;不符合正态分布的计量资料用中位数(四分位数)[M(Q25, Q75)]描述,组间比较用非参数检验。计数资料用例(%)表示,组间比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠血清T、FSH水平比较 与正常组比较,模型组大鼠血清T水平显著升高($P<0.01$),FSH水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清T水平均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),多囊饮大剂量组血清FSH水平显著升高($P<0.05$)。与阳性药物组比较,多囊饮大、小剂量组大鼠血清T水平均有降低趋势,FSH水平有升高趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$);多囊饮大、小剂量组组间比较,血清FSH、T水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

3.2 各组大鼠子宫内膜组织AR基因及辅助活化因子ARA70、CBP、SCR1 mRNA表达比较 与正常组比较,模型组大鼠子宫内膜组织AR、CBP基因表达显著升高($P<0.05$),ARA70、SCR1基因表达有升高趋势;与模型组比较,阳性药物组、多囊饮大剂量组大鼠子宫内膜组织AR、ARA70、CBP、SCR1基因表达均显著降低($P<0.01$),多囊饮小剂量组大鼠子宫内膜组织CBP基因表达显著降低($P<0.05$);与阳性药物组比较,多囊饮各剂量组大鼠子宫内膜组织上述基因表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);多囊饮大剂量组ARA70基因表达显著低于多囊饮小剂量组($P<0.05$)。见表2。

3.3 各组大鼠各时期妊娠、胚胎情况比较 结果见表3。D5各组大鼠均未见胚胎着床。与正常组比较,模型组大鼠D10、D16妊娠率显著降低($P<0.01$);各给药组大鼠D10、D16妊娠率与模型组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);D10阳性药物组和多囊饮大剂量组着床胚胎数略多于模型组,且多囊饮大剂量组胚胎大小均匀;D16多囊饮大剂量组胎儿数量略多于模型组、阳性药物组和多囊饮小剂量组。

4 讨论

4.1 多囊饮立法、组方与用药特色 多囊饮由我国著名中医妇科专家李光荣教授创立,具有补肾调肝、健脾活血、调经助孕的作用,主治肾虚肝郁型PCOS。

方中柴胡味苦、辛,性微寒,归肝、胆经,具有和解少阳、疏肝解郁的作用,可疏肝理气开郁结,引诸药入肝经,又能升发阳气,俾春气生而万物化育;白芍味苦、酸,性微寒,归肝、脾经,具有养血敛阴、平抑肝阳的作用。二者为君药,共奏调肝解郁、滋阴养血之效。龙胆草清肝火,除肝湿,利肝经,使方药补而不过滋腻,且引肝火下行而不上扰髓海;菟丝子味辛、甘,性平,归肾、肝、脾经,有养肝、补肾、益精的作用;淫羊藿味辛、甘,性温,归肾、肝经,可补肾壮阳;泽兰味苦,性微温,归肝、脾经,可活血、行水、化瘀。诸药合用,补肾调肝、健脾活血、调经助孕。

4.2 多囊饮可降低雄激素致不孕PCO模型大鼠血清T水平、升高血清FSH水平 过多的雄激素在卵巢中能抑制卵泡发育,引起卵泡闭锁,阻碍优势卵泡的形成和排卵,还能导致卵细胞质量下降^[7-8];同时会使得子宫内膜腺上皮AR表达增高,造成子宫内膜容受性下降、受精率及受孕率降低^[8-9]。降低血清T水平

表1 各组大鼠血清T、FSH水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g/kg)	T/(ng/mL)	FSH/(mIU/mL)
正常组	13	-	1.28±0.39	1.71±0.59
模型组	15	-	2.10±0.68 ^{△△}	1.22±0.55 [△]
阳性药物组	14	0.1	1.74±0.38 [▲]	1.49±0.62
多囊饮小剂量组	15	34.33	1.69±0.48 [▲]	1.57±0.26
多囊饮大剂量组	15	68.66	1.61±0.42 ^{▲▲}	1.81±0.57 [▲]

注:与正常组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。正常组、阳性药物组分别有2只、1只大鼠血清未检测出数据。

表2 各组大鼠子宫内膜组织AR基因及辅助活化因子ARA70、CBP、SCR1 mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g/kg)	AR	ARA70	CBP	SCR1
正常组	9	-	0.65±0.31	1.13±0.48	0.36±0.25	0.93±0.90
模型组	10	-	1.64±1.04 [△]	2.59±2.58	1.91±3.48 [△]	1.62±0.77
阳性药物组	10	0.1	0.29±0.14 ^{▲▲}	0.58±0.27 ^{▲▲}	0.08±0.07 ^{▲▲}	0.36±0.33 ^{▲▲}
多囊饮小剂量组	9	34.33	0.67±0.78	1.32±1.51	0.41±0.59 [▲]	0.85±0.86
多囊饮大剂量组	10	68.66	0.22±0.14 ^{▲▲}	0.36±0.30 ^{▲▲}	0.11±0.15 ^{▲▲}	0.26±0.30 ^{▲▲}

注:与正常组比较,△ $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与多囊饮小剂量组比较,* $P<0.05$ 。表格中动物数为各组实际检测出指标数据的动物只数,各组均有部分大鼠指标数据未检出。

表3 各组大鼠D5、D10、D16妊娠及胚胎情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	剂量/(g/kg)	D5妊娠大鼠/只	D10			D16		
				妊娠大鼠/只	妊娠率/%	着床胚胎/只	妊娠大鼠/只	妊娠率/%	胎儿数/只
正常组	10	-	0	5	50.0	62	9	90.0	106
模型组	10	-	0	1	10.0 ^{△△}	9	0	0 ^{△△}	0
阳性药物组	10	0.1	0	1	10.0	11	0	0	0
多囊饮小剂量组	10	34.33	0	0	0	0	1	10.0	2
多囊饮大剂量组	10	68.66	0	1	10.0	10	1	10.0	4

注:与正常组比较,△△ $P<0.01$ 。

有利于促使卵巢恢复排卵,提升卵细胞质量及子宫内膜容受性。

研究表明,若FSH水平较低,则不能充分将雄激素芳香化为雌激素,卵泡局部雄激素较多,雌激素较少,以致卵泡不能发育成熟,呈长期无排卵状态。PCOS患者卵泡募集数量较多,卵泡的选择及优势化停止,多个发育不全的小卵泡停留在各阶段或提前闭锁,形成多囊性卵巢的形态,闭锁的卵泡形成间质组织的一部分,使卵巢间质变形增生,成为PCOS的特征之一^[10-11]。故提高FSH水平可以在一定程度上改善卵泡的发育情况。

本实验结果显示,多囊饮能够有效降低雄激素致不孕PCO模型大鼠血清T水平,提高FSH水平,说明多囊饮具有调节下丘脑-垂体-卵巢轴的作用,从而可改善排卵情况。

4.3 多囊饮改善子宫内膜容受性 PCOS不孕表现为低受孕率和高流产率,其原因为卵泡发育障碍所导致的无排卵和子宫内膜容受性降低,二者均与雄激素增高有关。雄激素通过与雄激素受体特异性结合而发挥生物学效应,雄激素受体辅助活化因子如SCR、ARA、CBP等可通过蛋白之间的相互作用降低雄激素受体活化对雄激素浓度的要求,在一定程度上有提高雄激素活性的作用。

本研究结果表明,雄激素致不孕PCO模型大鼠子宫内膜组织AR、CBP基因表达显著升高,表明丙酸睾酮注射造模的PCO大鼠具有子宫内膜局部雄激素受体及其活化因子异常。经过多囊饮治疗后,PCO模型大鼠子宫内膜组织AR、ARA70、CBP、SCR1基因表达水平有不同程度的降低,且对ARA70的改善多囊饮大剂量组显著优于小剂量组。对大鼠妊娠、胚胎情况的观察发现,给予多囊饮灌胃治疗后,雄激素致不孕PCO模型大鼠的妊娠率及胚胎、胎儿数较模型组有改善趋势,说明中药可增加PCO大鼠胚胎着床数量,提高妊娠率。上述结果说明多囊饮可能通过降低子宫内膜局部雄激素及雄激素受体的基因表达,从而改善子宫内膜容受性,且表现出一定的剂量依赖性。雄激素-雄激素受体途径是多囊饮发挥促进卵泡发育、改善子宫内膜容受性的作用途径之一。

综上所述,多囊饮能够对下丘脑-垂体-卵巢轴的功能进行调节,通过调节激素水平、改善雄激素-雄激素受体相关基因表达,达到促进卵泡发育、提高子宫内膜容受性的效果,进而促使机体恢复排卵并提高受孕几率。课题组拟进一步对多囊饮不同剂量的药物有效成分、治疗PCOS的作用机制、信号通路、靶点进行研究,以更严谨、科学地使用中药治疗疾病。

参考文献

- [1] ANGIN P, YOLDEMIR T, ATASAYAN K. Quality of life among infertile PCOS patients[J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 300 (2): 461.
- [2] 覃晓,黎枝,覃卫玲,等.不同促排卵方案对多囊卵巢综合征不孕症患者的治疗效果[J].生殖医学杂志, 2021, 30 (2): 175.
- [3] 张巧利,贾婵维,马延敏,等.克罗米芬与来曲唑临床促排卵应用的研究进展[J].现代妇产科进展, 2016, 25 (1): 65.
- [4] 刘新敏,李光荣.多囊饮治疗多囊卵巢综合征37例[J].中国中医药信息杂志, 2006, 13 (8): 49.
- [5] 刘新敏,李光荣,陈双厚,等.多囊饮对多囊卵巢模型大鼠的影响[J].中华中医药杂志, 2006, 21 (6): 371.
- [6] 俞瑾,杨淑萍,张月萍,等.雄激素致高胰岛素与高雄激素性无排卵大鼠模型[J].生殖医学杂志, 1993, 2 (4): 215.
- [7] 张阳阳,邹艳荣,王晟,等.基础雄激素及卵泡液雄激素水平与卵巢反应性及妊娠结局关系的探讨[J].现代妇产科进展, 2016, 25 (11): 842.
- [8] 张阳阳,徐阳.雄激素对卵泡发育的影响及其在辅助生殖技术中的应用[J].中国妇幼健康研究, 2017, 28 (2): 210.
- [9] 何倩,王永宏,周小青,等.补肾活络中药对雄激素致不孕大鼠卵泡数、子宫内膜面积和内分泌的影响[J].中国中医药信息杂志, 2007, 14 (8): 34.
- [10] 李文玲.PCOS不孕症患者胰岛素抵抗与血清LH、FSH、E2水平的相关性研究[J].临床医学, 2020, 40 (10): 43.
- [11] 何淑莹,申玉华,尤昭玲.多囊卵巢综合征LH及FSH的研究现状[J].中医药导报, 2005, 11 (8): 82.

第一作者:郑冬雪(1990—),女,医学硕士,主治医师,研究方向:多囊卵巢综合征的临床与实验研究。

通讯作者:刘新敏,医学博士,主任医师,博士研究生导师。beijingliuxm@163.com

修回日期: 2022-03-20

编辑:吴宁

