

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.09.014

补肾助孕方对黄体功能不全模型大鼠垂体 PKC/MAPK/ERK 信号通路及黄体功能的影响

曹珍珍, 周惠芳✉



南京中医药大学, 江苏省南京市仙林大学城仙林大道 138 号, 210046

摘要 目的 探讨补肾助孕方治疗黄体功能不全 (LPD) 的可能作用机制。方法 40 只雌性育龄 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、补肾助孕方组、H-7 组、H-7 + 补肾助孕方组, 每组 8 只。除正常组外, 其余各组大鼠均给予米非司酮混悬液建立 LPD 模型。补肾助孕方组 (2.4 g/100 g 灌胃)、H-7 组 (0.005 mg/只腹腔注射)、H-7 + 补肾助孕方组 (给药同补肾助孕方组和 H-7 组) 均于第 4 个性周期 (D13) 开始, 于 D13、D17 的 16:00, 及 D14、D18 的 8:00 给药, 模型组、正常组均于以上给药时间点灌胃 (1.2 ml/100 g) 和腹腔注射 (20 μ l/只) 生理盐水。末次给药 6 h 后, 用 ELISA 法检测血清促黄体生成素 (LH)、促卵泡生成素 (FSH) 含量, 并计算 FSH/LH 值; HE 法观察卵巢组织病理及卵泡、黄体数; Western blot 法检测垂体组织蛋白激酶 C (PKC)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白酶 (p-p38MAPK)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK1/2) 蛋白水平。结果 与正常组比较, 模型组和 H-7 + 补肾助孕方组大鼠卵巢组织闭锁卵泡增多, 黄体细胞发育不良, 血清 LH 含量升高 ($P < 0.05$), 卵巢组织卵泡数及黄体数, 血清 FSH 含量及 FSH/LH 值, 垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$); 与模型组和 H-7 + 补肾助孕方组比较, 补肾助孕方组大鼠卵巢内闭锁卵泡减少, 黄体细胞发育有所改善, 血清 LH 含量降低 ($P < 0.05$), 卵巢组织卵泡数及黄体数, 血清 FSH 含量及 FSH/LH 值, 垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。结论 补肾助孕方可激活垂体组织 PKC/MAPK/ERK 通路, 促进血清 FSH 分泌, 从而改善黄体功能。

关键词 黄体功能不全; 补肾助孕方; 蛋白激酶 C; 丝裂原活化蛋白激酶; 胞外信号调节激酶

黄体功能不全 (luteal phase defect, LPD) 指女性排卵后黄体发育不全而引起孕酮分泌减少、月经失调和生育功能缺陷等综合征, 严重影响女性的生理、心理健康^[1-2]。近来研究^[3-4]发现, LPD 与下丘脑-垂体-卵巢轴激素分泌功能异常有关。蛋白激酶 C/丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶 (PKC/MAPK/ERK) 信号通路参与调节垂体促性腺激素分泌, 且与生殖轴整体功能的调节关系密切^[5]。补肾助孕方为课题组在国医大师夏桂成治疗不孕中医经验方的基础上逐步筛选凝练而来, 对因 LPD 引起的不孕、月经失调、习惯性流产等疾病有较好的疗效^[6-7]。前期研究^[8]发现, 补肾助孕方可影响垂体 PKC/MAPK 信号通路, 调节垂体及

生殖轴功能, 促进性腺激素的分泌。但中医药治疗 LPD 有多靶点多途径优势, 补肾助孕方对垂体 PKC/MAPK 通路的调节作用有待进一步验证。因此, 本研究建立 LPD 大鼠模型, 并给予 PKC/MAPK 抑制剂干预, 以期阐明补肾助孕方治疗 LPD 的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级同遗传背景 SPF 级 SD 雌性大鼠 50 只, 体质量 (200 $\pm$ 10) g, 8 周龄, 购自南京中医药大学实验动物中心, 实验动物合格证编号 11400700099114, 使用许可证号: SYXK (京) 2012-0001。分笼饲养于南京中医药大学实验动物中心, 饲养条件: 光照和黑暗各 12 h 交替进行, 自由饮食、饮水, 温度 22 ~ 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40% ~ 70%, 噪声低于 80 分贝, 保持动物房环境及鼠笼

基金项目: 国家自然科学基金 (81774354, 81473713); 江苏省中医药局科技项目 (ZD201702)

✉ 通讯作者: Zhouhuifang2011301@163.com

清洁、透气。

1.2 主要药品、试剂及仪器

补肾助孕方组成：鹿角胶 10 g，菟丝子 15 g，醋柴胡 6 g，麸炒白芍 10 g，山萸肉 10 g，山药 15 g，丹参 10 g，饮片购自南京中医药大学百草堂，传统水煎法煎药，并浓缩成含生药浓度为 2.4 g/ml 的浓缩液。米非司酮片（批号：060702，上海新华制药有限公司，25 mg/片），用生理盐水配制浓度为 1 mg/ml 的混悬液。

PKC 抑制剂（H-7，批号：16891，美国 Sigma 公司）；HE 染色试剂盒（批号：20150823，上海生物公司）；ELISA 试剂盒：促卵泡生成素（FSH，批号 AK0015N）、促黄体生成素（LH，批号 OV18008），武汉伊莱瑞特生物科技有限公司；PKC 抗体（批号：ab181558）、磷酸化细胞外信号调节激酶（p-ERK1/2）抗体（批号：ab200807）、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白酶（p-p38MAPK）抗体（批号：ab45381），美国 Abcam 公司；二喹喏甲酸（BCA）蛋白定量试剂盒（批号 MK164230，美国 Thermo Scientific 公司）。

手动轮转式切片机（型号 RM2125RTS，德国 Leica 公司）；光学显微镜（型号 BX50，日本 Olympus 公司）；电泳仪（型号 1659001u）、半干转膜仪（型号 Trans-Blot SD）、凝胶成像仪（型号 ChemiDOCTMMP），美国 Bio-Rad 公司；高速低温离心机（型号 5427R，德国 Eppendorf 公司）。

1.3 模型建立、分组及给药

参照文献 [9-10] 构建大鼠 LPD 模型。50 只雌性 SD 大鼠实验前适应性喂养 1 周，并于每日 8:00、16:00 抓取大鼠进行阴道脱落细胞涂片，筛选出动情周期 SD 大鼠 40 只为实验大鼠。采用随机数字表法分为正常组、模型组、补肾助孕方组、H-7 组、H-7 + 补肾助孕方组，每组 8 只。发现动情期（排卵后黄体早期）记为第一天（D1），除正常组外，其余各组分别于 D1、D5、D9 给予浓度为 1 mg/ml 的米非司酮混悬液 1 ml/100 g 灌胃，每天 1 次，D9 末次给药 6 h 后，立即取腹主动脉血 1 ml，检测血清 LH、FSH 含量，并计算 FSH/LH 值，若 FSH/LH < 1 为造模成功 [11]，各组大鼠均造模成功。并从第 4 个动情周期（D13）开始，于 D13、D17 的 16:00，及 D14、D18 的 8:00 给药。补肾助孕方用生理盐水配置成含生药为 2 g/ml 的浓缩液，补肾助孕方组按 1.2 ml/100 g 即 2.4 g/100 g 的剂量灌胃给药；H-7 用生理盐水配置成浓

度为 0.25 mg/ml 的溶液，H-7 组按每只 0.005 mg 的剂量经腹腔注射给药；H-7 + 补肾助孕方组给予 H-7 溶液和补肾助孕方浓缩液，剂量和给药方式同上；模型组、正常组均于以上给药时间点灌胃（1.2 ml/100 g）和腹腔注射（0.0005 mg/只）生理盐水。

1.4 标本采集

各组大鼠于末次给药禁食禁水 6 h 后，用 10% 水合氯醛按 1 ml/100 g 剂量腹腔注射麻醉后处死，腹主动脉采血 1 ml，室温放置 2 h 后，于 4℃、3000 r/min 离心 15 min，离心半径 8 cm，取上清液于 -20℃ 冰箱保存备用。立即解剖大鼠，取垂体和卵巢组织，垂体组织于液氮速冻后，迅速置于 -80℃ 冰箱保存，卵巢组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。

1.5 HE 染色观察卵巢组织病理形态

取卵巢组织，常规透明、浸蜡、包埋后，切成厚度为 5 μm 的切片。按 HE 试剂盒说明书进行染色，置于显微镜下观察组织形态，并计数卵巢中卵泡数及黄体数。

1.6 血清 LH、FSH 含量测定

血清标本 4℃ 冰箱解冻后，按 ELISA 试剂盒说明书方法，分别检测血清 LH、FSH 含量，并计算 FSH/LH 值。

1.7 Western blot 法检测垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平

垂体组织于 4℃ 冰箱中解冻后，取垂体前叶组织 0.5 g，加入 5 ml 含苯甲基磺酰氟（PMSF）的组织细胞裂解液（RIPA）裂解后，于 4℃、12000 r/min 离心 30 min，离心半径 8 cm，取上清液，用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度后，取 50 μg 蛋白上样，进行电泳和转膜反应，TBST 溶液清洗后，加入 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h，TBST 溶液清洗 3 次后，加入一抗（稀释倍数均为 1:1000），4℃ 摇床室温孵育过夜，TBST 振洗后加入 HRP 羊抗兔二抗（稀释倍数 1:2000），37℃ 摇床室温孵育 1 h，TBST 清洗 3 次后，采用增强化学发光法显色，以凝胶成像仪观察条带并拍照，并以 Image-J v1.8.0 软件分析各组蛋白相对表达。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较进行单因素方差分析，进一步两组间比较用 LSD-t 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢组织病理形态结果

正常组大鼠卵巢可观察到各级发育良好的卵泡及黄体。与正常组相比,模型组和 H-7 + 补肾助孕方组大鼠卵巢组织闭锁卵泡增多,卵泡形态结构不良,黄体细胞发育不良,体积小,颗粒细胞层减少。与模型组和 H-7 + 补肾助孕方组相比,补肾助孕方组大鼠卵巢内闭锁卵泡减少,黄体细胞发育有所改善,黄体细胞体积增大,颗粒细胞层增多;H-7 组大鼠卵巢组织内闭锁卵泡增多、黄体细胞减少、颗粒细胞层减少病理现象严重。H-7 + 补肾助孕方组与模型组大鼠卵巢组织形态差异不大(见图 1,彩图请扫描二维码获取)。

2.2 各组大鼠卵巢组织中卵泡及黄体数目比较

表 1 示,与正常组比较,模型组、H-7 + 补肾助孕方组大鼠卵巢组织内卵泡数及黄体数明显减少

表 1 各组大鼠卵巢组织中卵泡及黄体数目比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	卵泡数	黄体数
正常组	8	33.56 $\pm$ 3.25	26.42 $\pm$ 3.17
模型组	8	22.86 $\pm$ 2.93 ^{a)}	15.75 $\pm$ 2.72 ^{a)}
H-7 + 补肾助孕方组	8	22.35 $\pm$ 2.76 ^{a)}	15.53 $\pm$ 2.96 ^{a) b)}
补肾助孕方组	8	29.26 $\pm$ 2.82 ^{b) c)}	22.11 $\pm$ 2.86 ^{b) c)}
H-7 组	8	18.22 $\pm$ 2.65 ^{a) b) c) d)}	12.26 $\pm$ 2.65 ^{a) b) c) d)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与 H-7 + 补肾助孕方组比较, $P < 0.05$; d) 与补肾助孕方组比较, $P < 0.05$ 。

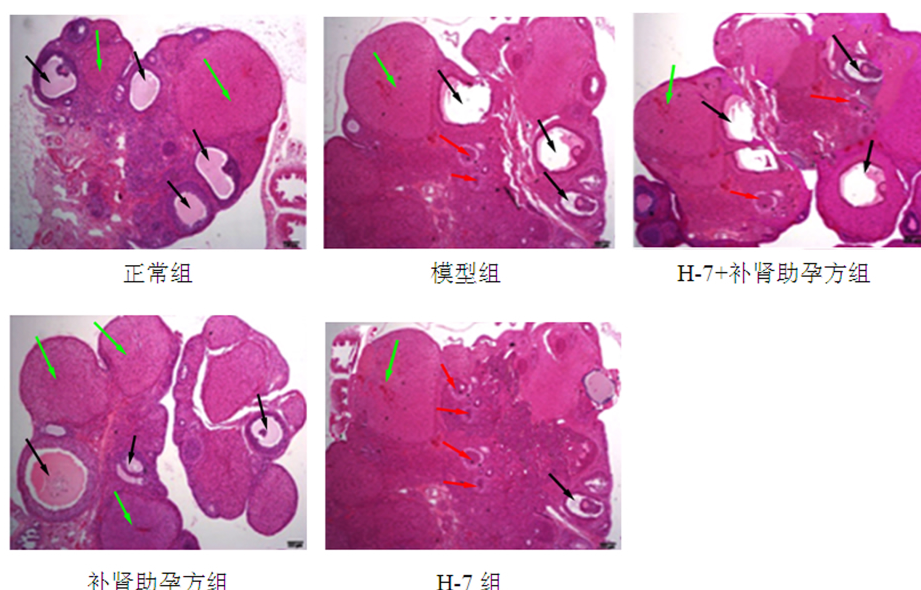
($P < 0.05$); 与模型组和 H-7 + 补肾助孕方组比较,补肾助孕方组大鼠卵巢组织内卵泡数及黄体数增多($P < 0.05$),H-7 组大鼠卵巢组织内卵泡数及黄体数减少($P < 0.05$)。模型组与 H-7 + 补肾助孕方组比较,卵泡数及黄体数差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清 LH、FSH 含量及 FSH/LH 值比较

表 2 示,与正常组比较,模型组和 H-7 + 补肾助孕方组大鼠血清 LH 含量升高,FSH 含量及 FSH/LH 值降低($P < 0.05$);与模型组和 H-7 + 补肾助孕方组比较,补肾助孕方组大鼠血清 LH 含量降低,FSH 含量及 FSH/LH 值升高($P < 0.05$),H-7 组大鼠血清 LH 含量升高($P < 0.05$),FSH 含量及 FSH/LH 值降低($P < 0.05$);模型组与 H-7 + 补肾助孕方组比较,LH、FSH 含量及 FSH/LH 值差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平比较

表 3、图 2 示,与正常组比较,模型组和 H-7 + 补肾助孕方组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平降低($P < 0.05$);与模型组和 H-7 + 补肾助孕方组比较,补肾助孕方组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平升高,H-7 组大鼠 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平降低($P < 0.05$);模型组与 H-7 + 补肾助孕方组比较,各指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: 黑色箭头为卵泡; 绿色箭头为黄体; 红色箭头为闭锁卵泡。

图 1 各组大鼠卵巢组织病理形态 ($\times 200$, HE 染色)

表 2 各组大鼠血清 LH、FSH 含量及 FSH/LH 值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	FSH/LH
正常组	8	8.91 ± 0.23	10.78 ± 0.46	1.21 ± 0.10
模型组	8	9.97 ± 0.32 ^{a)}	8.12 ± 0.39 ^{a)}	0.91 ± 0.09 ^{a)}
H-7 + 补肾助孕方组	8	9.88 ± 0.29 ^{a)}	8.01 ± 0.36 ^{a)}	0.91 ± 0.11 ^{a)}
补肾助孕方组	8	9.09 ± 0.33 ^{b) c)}	10.69 ± 0.33 ^{b) c)}	1.16 ± 0.10 ^{b) c)}
H-7 组	8	10.33 ± 0.25 ^{a) b) c) d)}	6.03 ± 0.41 ^{a) b) c) d)}	0.72 ± 0.11 ^{a) b) c) d)}

注: LH, 促黄体生成素; FSH, 促卵泡生成素。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与 H-7 + 补肾助孕方组比较, $P < 0.05$; d) 与补肾助孕方组比较, $P < 0.05$ 。

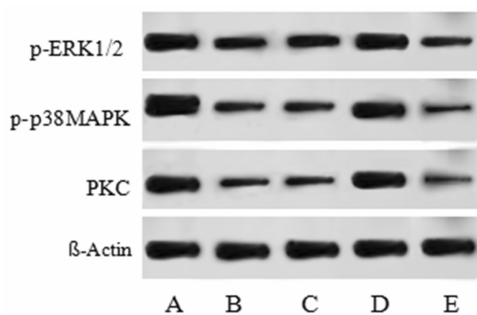
表 3 各组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平比较

($/\beta$ -Actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PKC	p-p38MAPK	p-ERK1/2
正常组	8	1.06 ± 0.12	1.12 ± 0.16	1.11 ± 0.14
模型组	8	0.56 ± 0.08 ^{a)}	0.63 ± 0.13 ^{a)}	0.63 ± 0.12 ^{a)}
H-7 + 补肾助孕方组	8	0.59 ± 0.09 ^{a)}	0.66 ± 0.15 ^{a)}	0.65 ± 0.13 ^{a)}
补肾助孕方组	8	1.01 ± 0.11 ^{b) c)}	1.09 ± 0.13 ^{b) c)}	0.99 ± 0.13 ^{b) c)}
H-7 组	8	0.21 ± 0.07 ^{a) b) c) d)}	0.22 ± 0.14 ^{a) b) c) d)}	0.20 ± 0.11 ^{a) b) c) d)}

注: PKC, 蛋白激酶 C; p-p38MAPK, 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; p-ERK1/2, 磷酸化的细胞外信号调节激酶。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与 H-7 + 补肾助孕方组比较, $P < 0.05$; d) 与补肾助孕方组比较, $P < 0.05$ 。



注: PKC, 蛋白激酶 C; p-p38MAPK, 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; p-ERK1/2, 磷酸化细胞外信号调节激酶; A, 正常组; B, 模型组; C, H-7 + 补肾助孕方组; D, 补肾助孕方组; E, H-7 组。

图 2 各组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白电泳图

3 讨论

卵泡发育不良、黄体细胞过早退化或功能不足、孕激素分泌不足、卵泡期 FSH、FSH/LH 值降低, 雌激素、孕激素不平衡等激素变化异常是引起 LPD 的主要原因^[4,12]。米非司酮可导致垂体分泌 LH 增多、FSH 减少, 使 FSH/LH 值降低, 促进黄体细胞萎缩、卵泡发育异常, 从而导致黄体功能异常^[13-14]。本研究采用米非司酮构建大鼠 LPD 模型, 发现与正常组大鼠相比, 模型组大鼠卵巢内闭锁卵泡数量增多、黄体数量、颗粒细胞层次减少, 血清 FSH、FSH/LH 值降低, 表明模型组卵泡发育异常, 黄体萎缩及功能异常, 提示造模成功。

中医学将 LPD 归属于“不孕”“无子”“胎

漏”“胎动不安”“滑胎”“月经不调”等范畴, 且认为由肾虚导致的“肾气-天癸-冲任-胞宫”生殖轴功能紊乱是导致 LPD 发病的重要原因^[15-16], 而以补肾为主导, 调节天癸冲任气血, 维持生殖轴功能的正常, 可达到治疗 LPD 的目的^[12]。补肾助孕方中君药鹿角胶可补肾助阳, 臣药菟丝子可平调肾中阴阳; 山药、炒白芍、山萸肉可滋补肾阴, 佐药醋柴胡可疏肝调经, 丹参可活血调经, 方中诸药可调畅心肝气机、安定魂魄而调控心脑-肾-子宫生殖轴, 从而达到调经和助孕的目的^[14]。研究^[17]发现, 补肾助孕方对 LPD 有较好治疗效果, 可降低 LPD 大鼠卵巢组织氧化应激反应和组织细胞凋亡, 并可通过升高血清催乳素、雌二醇、孕激素等水平而改善 LPD 大鼠黄体功能, 提高子宫内膜容受性。本研究发现, 与模型组相比, 补肾助孕方大鼠卵巢内闭锁卵泡减少、黄体细胞体积增大、颗粒细胞层增多, 血清 FSH 含量、FSH/LH 值升高, 表明补肾助孕方可改善卵泡发育功能, 缓解黄体萎缩及功能异常。

PKC/MAPK 通路为垂体促性腺激素细胞信号转导途径之一, PKC 可介导 MAPK 发生级联反应, 激活 ERK 信号通路, 调控细胞转录因子及垂体促性腺激素受体表达, 影响垂体分泌 FSH 和 LH, FSH/LH 值过低可导致黄体提前萎缩, 影响卵泡正常发育^[18-19]。研究^[20-21]发现, 干预垂体促性腺激素细胞 PKC/MAPK 通路表达, 可对垂体 FSH 和 LH 基因表达和分泌水平产生影响。本研究发现,

与正常组大鼠相比,模型组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平降低,提示 LPD 大鼠 PKC/MAPK/ERK 通路被抑制;而与 LPD 大鼠相比,补肾助孕方组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平升高,表明补肾助孕方可能通过激活 PKC/MAPK/ERK 通路发挥改善黄体萎缩及功能异常的作用,与前期研究^[8]一致。为验证补肾助孕方对 PKC/MAPK/ERK 通路的调控作用,本研究给予 LPD 大鼠 PKC 抑制剂 H-7 进行干预,结果发现,与模型组大鼠相比,H-7 组大鼠垂体组织 PKC、p-p38MAPK、p-ERK1/2 蛋白水平降低,卵巢内闭锁卵泡增多、黄体细胞减少、颗粒细胞层次减少,血清 FSH、FSH/LH 值降低,表明抑制了 PKC/MAPK/ERK 通路激活,可加重黄体功能损伤和卵泡发育异常。而 H-7 + 补肾助孕方组大鼠上述指标与模型组无差异,提示 H-7 可逆转补肾助孕方对 LPD 大鼠黄体功能的改善作用,进一步表明补肾助孕方可能通过激活 PKC/MAPK/ERK 通路实现对 LPD 大鼠黄体功能的改善作用。

综上所述,补肾助孕方可激活垂体组织 PKC/MAPK/ERK 通路,促进血清 FSH、FSH/LH 分泌,改善 LPD 大鼠黄体功能异常,为临床治疗 LPD 提供一定参考。但 LPD 病理机制复杂,中医药治疗 LPD 具有多靶点、多途径作用,补肾助孕方还可能通过其他途径治疗 LPD,有待后续深入研究。

参考文献

- [1] GRIESINGER G, MELDRUM D. Introduction: management of the luteal phase in assisted reproductive technology [J]. Fertil Steril, 2018, 109(5): 747-748.
- [2] KOLTUN KJ, DE SOUZA MJ, SCHEID JL, et al. Energy availability is associated with luteinizing hormone pulse frequency and induction of luteal phase defects [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(1): 185-193.
- [3] KOC O, OZDEMIRICI S, ACET M, et al. Nuclear factor- κ B expression in the endometrium of normal and overweight women with polycystic ovary syndrome [J]. J Obstet Gynaecol, 2017, 37(7): 924-930.
- [4] 谈静. 黄体功能不全中西医研究概况 [J]. 河南中医, 2013, 33(3): 398-401.
- [5] 张晓娜, 杨镒峰, 常彤, 等. 雌激素、雄激素在卵泡发育中的作用及应用 [J]. 特产研究, 2017, 39(3): 50-54.
- [6] 刘贝, 周惠芳, 周伯如, 等. 补肾助孕方对大鼠垂体细胞促性腺激素的调节 [J]. 医学研究生学报, 2018, 31(7): 703-708.
- [7] 石明晴, 周惠芳, 徐晓飞, 等. 基于卵巢 Kisspeptin/GPR54 系统的补肾助孕方干预黄体功能不全大鼠生殖功能的机制研究 [J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(10): 721-722.
- [8] 周伯如, 周惠芳, 刘贝, 等. 补肾助孕方对 LPD 模型大鼠垂体 GnRH 受体信号转导系统的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(6): 554-559.
- [9] SÁNCHEZ-CRIADO JE, BELLIDO C, GALIOT F, et al. A possible dual mechanism of the anovulatory action of antiprogesterone RU486 in the rat [J]. Biol Reprod, 1990, 42(5-6): 877-886.
- [10] 刘昱磊, 罗颂平, 梁国珍, 等. 助孕 3 号方及拆方防治肾虚黄体抑制动物流产模型的实验研究 [J]. 生殖与避孕, 2003, 23(1): 17-21.
- [11] 尤俊文. 实用中医妇科诊治精要 [M]. 北京: 中国纺织出版社, 2019: 51-52.
- [12] 童云, 周惠芳. 中医辨证治疗黄体功能不全不孕症研究进展 [J]. 中医学报, 2013, 28(8): 1197-1198.
- [13] KIM SK, SHIN SJ, YOO Y, et al. Oral toxicity of isotretinoin, misoprostol, methotrexate, mifepristone and levonorgestrel as pregnancy category X medications in female mice [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 853-859.
- [14] WU S, CHEN Y, FAJOBI T, et al. Conditional knockout of the androgen receptor in gonadotropes reveals crucial roles for androgen in gonadotropin synthesis and surge in female mice [J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(10): 1670-1681.
- [15] 李文文, 王艳, 任志红, 等. 中医治疗黄体功能不全研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2015, 31(9): 883-885.
- [16] 杨丽洁, 苗润青, 兰颖, 等. 基于“阴中求阳”理论浅析“调冲任”、“固肾元”针灸法在黄体功能不全治疗中的临床应用 [J]. 成都中医药大学学报, 2019, 42(3): 15-17.
- [17] 袁艺祯, 周惠芳, 蒋小飞, 等. 补肾助孕方对 LPD 模型大鼠卵巢 SOD-2、GPX-1、P53 表达水平的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1814-1816.
- [18] LEI Z, WANG J, SUN W, et al. PKC δ reveals a tumor promoter function by promoting cell proliferation and migration in somatotropinomas [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(1): 208-215.
- [19] LU M, WANG Y, ZHAN X, et al. The MAPK pathway-based drug therapeutic targets in pituitary adenomas [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 330. doi: 10.3389/fendo.2019.00330.
- [20] 王新, 刘金玲, 赖小平, 等. 大鼠 GnRH 细胞内 PKC 的改变对 LH 分泌的影响 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(29): 42-45.
- [21] 周伯如, 戴佳轩, 杨丽娟, 等. 补肾助孕方对黄体功能不全大鼠促性腺激素及其关键调控因子的影响 [J]. 医学研究生学报, 2016, 29(11): 1153-1157.

Effect of *Bushen Zhuyun Formula* (补肾助孕方) on PKC/MAPK/ERK Signaling Pathway and Luteal Function in Luteal Phase Defect Model Rats

CAO Zhenzhen, ZHOU Huifang

Nanjing University of Chinese medicine, Nanjing, 210046

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Bushen Zhuyun Formula* (BZF, 补肾助孕方) in treating luteal phase defect (LPD) . **Methods** A total of 40 female SD rats of childbearing age were randomly divided into normal group, model group, BZF group, H-7 group and H-7 plus BZF group, with eight rats in each group. Except for the normal group, rats were given mifepristone suspension to establish the LPD model. Starting from the fourth sexual cycle (Day 13) , BZF at a dose of 2.4 g/100 g was given by gavage in BZF group, while 0.005 mg H-7 was intraperitoneally injected into each rat in H-7 group at 16:00 on Day 13 and Day 17 and at 08:00 on Day 14 and Day 18; at the same time points, the rats in the H-7 plus BZF group were administered with same dose of drugs as the H-7 group and BZF group, and the rats in the model group and normal group were gavaged with 1.2 ml/100 g normal saline and intraperitoneally injected with 20 μ l normal saline per rat. At six hours after the last administration, the contents of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) , and FSH/LH was calculated; hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of ovarian tissue and the numbers of follicles and corpus luteum; the protein levels of pituitary tissue protein kinase C (PKC) , phosphorylated p38 mitogen activated protein kinases (p-p38MAPK) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) were detected by Western blotting. **Results** Compared to those in the normal group, the atresia follicle in the ovarian tissue increased in the model group and H-7 plus BZF group; there was dysplasia of corpus luteum; the content of serum LH increased ($P < 0.05$) ; the numbers of ovarian follicles and corpus luteum, the content of serum FSH and FSH/LH ratio, and the protein levels of PKC, p-p38MAPK and p-ERK1/2 in pituitary significantly increased ($P < 0.05$) . Compared to those in the model group and H-7 plus BZF group, the atresia follicle in the ovarian tissue, the luteal cell dysplasia, and the content of serum FSH of rats in BZF group significantly decreased ($P < 0.05$) ; the numbers of ovarian follicles and corpus luteum, the content of serum FSH and the ratio of FSH/LH, as well as the protein levels of PKC, p-p38MAPK and p-ERK1/2 in pituitary significantly increased ($P < 0.05$) . **Conclusion** BZF can activate PKC/MAPK/ERK pathway in pituitary and promote the secretions of serum FSH, thereby improving the luteal function of LPD rats.

Keywords luteal phase defect; *Bushen Zhuyun Formula* (补肾助孕方) ; protein kinase C; mitogen activated protein kinase; extracellular signal-regulated kinase

(收稿日期: 2020-06-12; 修回日期: 2020-10-12)

编辑: 王利芬