

逍遥丸对人卵巢壁颗粒细胞 ALK5/Smads 通路的影响

梁莹¹ 赵胜男¹ 常秀峰² 杜惠兰^{1*}

(1. 河北医科大学中西医结合学院, 河北省石家庄市新石南路 326 号, 050091;

2. 白求恩国际和平医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173294)

* 通讯作者: duhuilan@163.com, 13931150880

[摘要] 目的 研究逍遥丸治疗不孕症的可能作用机制。方法 60 例接受体外受精—胚胎移植(IVF-ET)治疗的不孕症患者中肝郁证者 21 例(治疗组), 其余 39 例患者为对照组。对照组采用西医常规方案促排卵, 治疗组在对照组的基础上口服逍遥丸, 每次 20 丸, 早晚分服。测定两组患者成熟卵泡壁颗粒细胞激活素受体激酶 5 (ALK5)、Smad2、Smad3 和 Smad4 mRNA 和蛋白的表达。结果 治疗组颗粒细胞 ALK5 和 Smad2 mRNA 及蛋白的表达显著高于对照组($P < 0.05$); Smad3、Smad4 mRNA 和蛋白的表达两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 逍遥丸治疗不孕症的机制可能与上调壁颗粒细胞受体 ALK5 和 Smad2 mRNA 及蛋白, 调节 ALK5/Smads 信号通路而达到促进卵泡发育目的, 调节卵巢功能。

[关键词] 逍遥丸; 不孕症; 卵巢; 壁颗粒细胞; 激活素受体激酶 5; 信号通路

Effect of Xiaoyao Pill on the ALK5/Smads Pathway of Granulosa Cells in Wall of Ovarian Follicle

LIANG Ying¹, ZHAO Shengnan¹, CHANG Xiufeng², DU Huilan¹

(1. Integrative Medicine College of Hebei Medical University, Hebei Province 050091; 2. Bethune International Peace Hospital)

ABSTRACT **Objective** To research the possible mechanism of Xiaoyao Pill (Free Wanderer Pill) for infertility. **Methods** Sixty cases of infertility undergoing in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) were grouped into the treatment group (21 cases, with liver depression pattern) and control group (39 cases). Both groups were induced ovulation with routine western medicine and the treatment group was added with Xiaoyao Pill orally, 20 pills once, in the morning and evening. The expressions of activin receptor-like kinase 5 (ALK5), Smad2, Smad3 and Smad4 proteins, ALK5 mRNA, Smad2 mRNA, Smad3 mRNA and Smad4 mRNA of granulosa cells in wall of ovarian follicle in both groups were detected. **Results** The expressions of ALK5 protein, Smad2 protein, ALK5 mRNA and Smad2 mRNA were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between groups in the expressions of Smad3 protein, Smad4 protein, Smad3 mRNA and Smad4 mRNA ($P > 0.05$). **Conclusion** The possible mechanism of Xiaoyao Pill for infertility is up-regulating the expressions of ALK5 protein, Smad2 protein, ALK5 mRNA and Smad2 mRNA and regulating ALK5/Smads signaling pathway to promote the follicular development and regulate ovarian function.

Keywords Xiaoyao Pill; infertility; ovarian; granulosa cells in wall of ovarian follicle; activin receptor-like kinase 5; signaling pathway

近年来不孕症发病率逐渐增加, 不孕症患者的心理状况逐渐受到关注^[1-2]。不孕症以兼夹证多见, 其中肝郁证比例为最高^[3]。近年来临床实践发现, 疏肝中药对治疗不孕症疗效确切^[4-7]。逍遥丸为疏肝解郁代表方, 具有疏肝解郁健脾、养血活血调经、调和气血、调畅冲任二脉的作用。人颗粒细胞上生长分化因子-9 (GDF-9) 表达与卵母细胞质量相关^[8]。GDF-9 需要结合特异受体才能发挥信号转导作用, 激活素受体激酶 5 (ALK5) 是 GDF-9 的转化生长因子- β (TGF- β) I 型受体, 下游结合 Smad2 和 Smad3, 并与 Smad4 结合转移进入细胞核, 调节

靶基因的转录^[9]。本研究探讨逍遥丸对人卵巢颗粒细胞上 GDF-9/Smads 信号通路的影响, 旨在为疏肝中药治疗不孕症提供实验基础。

1 临床资料

1.1 诊断及辨证标准

西医诊断标准参照《妇产科学》^[10]中不孕症的诊断标准。肝郁证辨证标准参考《中医临床诊疗术语·证候部分》^[11]及《中医妇科学》^[12]拟定: ①经期先后不定; ②经行不畅, 量少色暗; ③经前乳房胀痛; ④经行腹痛; ⑤精神抑郁或烦躁易怒; ⑥舌质正常或黯红, 脉弦。以上 6 项具备 3 项即可诊断。

1.2 纳入标准

符合上述诊断标准者;年龄 <40 岁;基础促卵泡生成素(BFSH) <10 mIU/ml;经医院伦理委员会批准,签署知情同意书。

1.3 排除标准

子宫不具备妊娠功能或严重躯体疾病不能承受妊娠;患有严重的精神疾患、泌尿生殖系统感染、性传播疾病者;有吸毒等严重不良嗜好,接触致畸量的射线、毒物并处于作用期不能接受体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗者;子宫内异位症患者。

1.4 一般资料

收集2010年9月至2011年7月在石家庄市妇产医院生殖医学中心接受IVF-ET治疗的60例不孕症患者。符合肝郁证辨证标准者21例为治疗组,其余39例患者为对照组。对照组年龄23~39岁,平均 (29.66 ± 4.13) 岁;不孕时间1~10年,平均 (4.8 ± 1.3) 年。治疗组年龄22~38岁,平均 (31.33 ± 2.61) 岁;不孕时间1~10年,平均 (4.4 ± 1.1) 年。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

2 方法

2.1 治疗方法

对照组采用西医常规方案促排卵,即月经的黄体中期或第21天给予注射用醋酸曲普瑞林(0.1 mg/支,法国博福-益普生制药有限公司,批号D22863)0.1 mg 每日皮下注射,至少14天。达到将调节标准,即子宫内膜 ≤ 5 mm,血清雌二醇(E_2) <50 pg/ml后,每日皮下注射重组人促卵泡激素注射液(75 IU/支,瑞士默克雪兰诺制药厂,批号AU002290)250~300 IU/d, B超及血清黄体生成素(LH)、 E_2 、孕酮(P)监测卵泡发育情况,当至少3个卵泡直径达到或超过18 mm时停药,给予重组人绒促性素注射液($250 \mu\text{g}$ /支,瑞士默克雪兰诺制药厂,批号DA009256) $250 \mu\text{g}$ 皮下注射诱导卵泡成熟,36~38 h经阴道超声引导下穿刺取卵。

治疗组在对照组的基础上自给予注射用醋酸曲普瑞林日开始口服逍遥丸(宛西制药股份有限公司,200丸/瓶,批号090513),每次20丸,早晚分服,至皮下注射重组人绒促性素注射液日停药。

2.2 观察指标及方法

皮下注射重组人绒促性素注射液36 h后在阴道B超指引下穿刺取卵术,留取优势卵泡的卵泡液,1500 r/min 离心10 min,留取沉淀。将沉淀物中加

入PBS至5 ml。取15 ml离心管,加入人淋巴细胞分离液5 ml,将混悬液缓慢加入淋巴细胞分离液的液面上,1200 r/min 离心20 min,吸取在两液面之间的颗粒细胞层加PBS,3000 r/min 离心5 min,下层即为壁颗粒细胞。治疗组18例、对照组36例吸尽PBS后,加入2 ml Trizol液完全裂解后置于 -80°C 冻存用于实时荧光定量PCR;另外治疗组3例、对照组3例按照细胞免疫荧光化学方法涂片。

2.2.1 卵泡壁颗粒细胞 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 mRNA 的表达 采用实时荧光定量PCR的方法。采用Trizol(Invotrigen公司,美国)一步法提取颗粒细胞总RNA,2%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。各组取 $2 \mu\text{g}$ 总RNA进行反转录,反应条件为 25°C 10 min, 42°C 50 min, 85°C 5 min。然后分别以人GAPDH、ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 的特异性引物进行PCR反应。所用引物序列利用GenBank数据库中提供的基因序列,经GenBank BLAST进行同源性检测,用DNAMAN version 6.0软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成。应用ABI 7300型实时荧光定量PCR仪来进行扩增,反应参数为: 95°C 预变性5 min,然后 95°C 15 s, 58°C 20 s, 72°C 27 s 反应40个循环,在每个循环的第27 s探测各孔的荧光量;溶解曲线阶段,变性 95°C 15 s,退火 $60 \sim 64^\circ\text{C}$ 30 s,最后 72°C 延伸30 s。ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 的mRNA表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 来表示,其值为以Smad1、Smad5、Smad8 和 Smad4 的mRNA表达量与GAPDH表达量的比值,再将对照组某某的量设为1,其余样本的数值与其相除,得到相对定量值。每个目的基因测定重复3次。

2.2.2 卵泡壁颗粒细胞 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 蛋白的表达 采用细胞免疫荧光化学法。将分离好的壁颗粒细胞加入PBS制成细胞悬混液,调整密度后,在涂布有多聚赖氨酸的玻璃片上涂片,待干片后,4%多聚甲醛固定15 min,1% Triton X-100处理15 min,10%山羊血清室温封闭15 min,分别加入兔抗ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 多克隆抗体(1:50), 37°C 孵育30 min。经PBS充分漂洗后,加入1:100稀释的TRITC标记的羊抗兔二抗, 37°C 孵育30 min,PBS清洗5 min $\times 3$ 次,80%甘油封片。激光共聚焦显微镜SP-5(Leica,德国)下观察并计算荧光值。

2.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 两组患者颗粒细胞 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 mRNA 比较

表 1 示, 治疗组 ALK5 mRNA 和 Smad2 mRNA 表达高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组患者 Smad3 mRNA 和 Smad4 mRNA 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 两组患者颗粒细胞 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALK5 mRNA	Smad2 mRNA	Smad3 mRNA	Smad4 mRNA
治疗组	18	2.03 $\pm$ 1.41	2.04 $\pm$ 1.41	0.75 $\pm$ 0.51	0.90 $\pm$ 0.27
对照组	36	1.04 $\pm$ 0.96*	1.04 $\pm$ 0.94*	0.68 $\pm$ 0.54	0.87 $\pm$ 0.72

注: 与治疗组比较, * $P < 0.05$

3.2 两组患者颗粒细胞 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 蛋白表达的比较

激光共聚焦在荧光显微镜下可观察到特异性的点状荧光分布, ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 蛋白在壁颗粒细胞上都有表达。ALK5 主要在细胞膜表达, Smad2 的表达在细胞膜和细胞浆, Smad3 和 Smad4 表达在细胞膜和细胞浆上。表 2 示, 治疗组 ALK5 蛋白荧光值和 Smad2 蛋白荧光值高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Smad3 蛋白荧光值和 Smad4 蛋白荧光值两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 两组患者颗粒细胞 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 蛋白荧光值表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALK5 蛋白 荧光值	Smad2 蛋白 荧光值	Smad3 蛋白 荧光值	Smad4 蛋白 荧光值
治疗组	3	21.21 $\pm$ 1.28	64.51 $\pm$ 2.67	47.78 $\pm$ 4.44	37.62 $\pm$ 6.72
对照组	3	13.44 $\pm$ 1.97*	14.13 $\pm$ 2.12**	50.63 $\pm$ 5.60	40.35 $\pm$ 4.50

注: 与治疗组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

中医认为“女子以肝为先天”, 肝主疏泄, 通过调冲任进而调节女性的生殖功能; 同时肝藏血, 具有贮藏血液和调节血量功能, 对女子的月经及胎产亦有重要作用。逍遥丸出自宋代《太平惠民和剂局方》, 由柴胡、当归、茯苓、白术、甘草等组成, 为疏肝解郁的代表方剂。本方用柴胡疏肝解郁, 以使肝气条达, 肝经及冲任二脉气血调畅, 为君药。白芍养血

敛阴柔肝, 当归补血调经, 活血止痛, 二药合用既养肝体助肝用, 又兼制柴胡疏泄太过, 为臣药。白术、茯苓、甘草健脾益气, 使运化有权, 营血生化有源以助肝用, 同时又达到扶土抑木的功效; 生姜温胃和中, 薄荷少许, 助柴胡疏肝而散郁热, 共为佐药。甘草又兼调和药性。诸药相合, 疏肝解郁, 养血活血, 可复肝用, 养肝体; 佐以健脾, 使气血调匀, 冲任二脉通畅, 达到经调子嗣的效果。

既往研究证明, ALK5 在卵泡发育各期的人颗粒细胞上都有表达^[13]。同时敲除颗粒细胞 Smad2 和 Smad3 的小鼠会表现为体型小、卵泡发育受阻、黄素化卵泡、卵丘功能缺陷^[14]。卵巢中条件性敲除 Smad4 基因的小鼠表现为类固醇激素产生、排卵、卵丘细胞的功能缺陷, 最终发展为卵巢功能早衰^[15]。因此, ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 在卵泡发育和卵母细胞成熟过程中起重要作用。本研究发现, 在人卵巢壁颗粒细胞上, 两组 ALK5、Smad2、Smad3 和 Smad4 mRNA 及蛋白均有一定量的表达。治疗组 ALK5 mRNA 及蛋白表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 提示口服逍遥丸可以上调颗粒细胞上膜受体的表达, 增强 GDF-9 促进颗粒细胞增殖的作用, 从而达到促进卵泡的生长和卵母细胞成熟的作用; 治疗组 Smad2 mRNA 及蛋白表达亦高于对照组 ($P < 0.01$), 提示口服逍遥丸可以促进颗粒细胞内信号因子的表达, 从而增强 GDF-9 信号通路促进颗粒细胞增殖的作用, 促进卵泡的生长和卵母细胞成熟。另外, ALK5/Smads 也是 TGF- β 因子在卵巢内的主要信号通路, TGF- β 可提高鼠颗粒细胞对低剂量卵泡刺激素 (FSH) 刺激的敏感性从而促进颗粒细胞增殖^[16]。提示口服逍遥丸可以增强 TGF- β 促进颗粒细胞增殖的作用。本研究结果显示, 口服逍遥丸可以上调颗粒细胞膜受体 ALK5 的表达, 并且可以增强 Smad2 信号分子的表达, 通过这一途径, 促进颗粒细胞的增殖, 而卵巢颗粒细胞增殖是卵泡发育和成熟过程的重要环节, 颗粒细胞提供卵母细胞发育所需要的物理支持及微环境^[17]。因此提示口服逍遥丸通过对卵巢颗粒细胞上关键的信号通路调节而达到促进卵泡发育, 调节卵巢功能, 达到治疗不孕症的目的。

参考文献

- [1] 宁波, 陈晨, 宋伟, 等. 原发性不孕症患者心理状态调查及分析[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(8): 657-658.
- [2] 闫凯麟, 邓中荣, 郭克锋. 女性不孕症患者的人格特征与

- 心理健康状况[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(1): 33-35.
- [3] 李灿东, 高碧珍, 黄熙理, 等. 不孕症肝郁病理与性腺轴功能变化的相关性研究[J]. 上海中医药大学学报, 2005, 19(3): 36-38.
- [4] 王海英. 疏肝种玉汤治疗排卵障碍性不孕症 43 例[J]. 陕西中医学院学报, 2010, 33(4): 57-58.
- [5] 刘国平, 陈鹏飞, 贺玉珍. 中医治疗排卵功能障碍性不孕 68 例临床观察[J]. 吉林医学, 2010, 31(9): 1125-1126.
- [6] 井庆彦, 张国骏. 张国骏教授补肾疏肝治疗不孕症随诊体会[J]. 中医学报, 2010, 25(1): 53-54.
- [7] 王迪华, 梁雪雯, 周红. 逍遥助卵煎对卵巢早衰患者血清性激素水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(33): 4687-4688.
- [8] Gode F, Gulekli B, Dogan E, et al. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality[J]. Fertil Steril, 2011, 95(7): 2274-2278.
- [9] Mazerbourg S, Klein C, Roh J, et al. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(3): 653-665.
- [10] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 351.
- [11] 国家技术监督局. 中医临床诊疗术语·证候部分[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 157.
- [12] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 324-329.
- [13] Oron G, Fisch B, Ao A, et al. Expression of growth-differentiating factor 9 and its type 1 receptor in human ovaries[J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(1): 109-117.
- [14] Li Q, Pangas SA, Jorgez CJ, et al. Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells in vivo[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(23): 7001-7011.
- [15] Pangas SA, Li X, Robertson EJ, et al. Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(6): 1406-1422.
- [16] Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle stimulation hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells[J]. Biol Reprod, 1999, 61(4): 1104-1109.
- [17] Ito M, Muraki M, Takahashi Y, et al. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility[J]. Fertil Steril, 2008, 90(4): 1026-1035.
- (收稿日期: 2012-11-26; 修回日期: 2013-01-15)
- [编辑: 邓 媛]

· 信息窗 ·

《中医杂志》22 篇优秀论文获得 “精品期刊顶尖论文平台——领跑者 5000”论文提名

“精品期刊顶尖论文平台——领跑者 5000”是在国家科技部立项支持下,由中国科学技术信息研究所构建的、集中展示我国精品期刊上发表的最高端学术研究成果的平台,旨在进一步提升“中国精品科技期刊”的品牌价值,巩固精品期刊学术影响力,促进学术交流和知识传播。平台将成为开展科技评价工作的有力工具,同时也是开展科研管理、科技政策以及相关研究的新途径。“领跑者 5000”项目为扩大我国精品科技期刊的显示度,提高优秀科技论文的国际影响力发挥了积极作用,并已经取得了一定的社会影响。在一些研究单位的科研绩效管理与评价工作中,已经开始尝试引入“领跑者 5000”项目的成果。“领跑者 5000”将与国际和国内重要检索系统连接,拟利用 WOK 国际检索系统平台,与 SCI 数据库在同一平台内实现文献链接和国际引文检索,在更大范围内向世界科技同行展示和推广我国最重要的科技成果。

国家科技部“中国精品科技期刊服务与保障系统”项目于 2008 年和 2011 年公布了两届“中国精品科技期刊”评选结果,《中医杂志》两次连续被评为“中国精品科技期刊”。本次以定量分析方法及同行评议方式,从 2007—2012 年在本刊发表的论文中共选出 22 篇优秀论文获得“精品期刊顶尖论文平台——领跑者 5000”提名。这 22 篇论文集中体现了本学科优秀作者的研究成果,定量分析显示已产生了很好的学术影响。借助“领跑者 5000”平台,这些优秀论文将在国内和国际学术界产生更加广泛的影响。(本刊编辑部)