

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.06.012

实验研究

基于 Kisspeptin/GPR54 系统探讨七子益肾理冲汤对多囊卵巢综合征模型大鼠卵泡发育的影响

付学美¹, 孙天琳², 史梅莹³, 陆义芹¹, 汤玲[✉]

1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700; 2. 北京市第一中西医结合医院; 3. 中国中医科学院望京医院

[摘要] **目的** 探讨七子益肾理冲汤对多囊卵巢综合征 (PCOS) 卵泡发育的影响及可能作用机制。**方法** 将 17 只动情规律雌性 SD 大鼠随机分为空白组 5 只、模型组 6 只、七子益肾理冲汤组 6 只。模型组及七子益肾理冲汤组大鼠每日予来曲唑-羧甲基纤维素混悬液 1 mg/(kg·d) 连续灌胃 21 天构建 PCOS 大鼠模型。第 22 天开始, 七子益肾理冲汤组以七子益肾理冲汤 34.02 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 剂, 空白组、模型组以 10 ml/(kg·d) 无菌饮用水灌胃。15 天后比较各组大鼠体质量、卵巢系数, 体视显微镜观察各组大鼠卵巢外观, HE 染色观察各组大鼠卵巢组织形态学改变, 放射免疫法检测各组大鼠血清激素卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E₂)、睾酮 (T)、孕激素 (P) 水平、抗苗勒管激素 (AMH)、抑制素 B (INHB) 水平, Western blot 法检测下丘脑及卵巢 Kisspeptin (Kp)、G 蛋白偶联受体 54 (GPR54)、细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 蛋白表达水平。**结果** 各组大鼠的体质量、卵巢系数比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白组比较, 模型组大鼠卵巢外观较苍白, 囊状扩张卵泡及闭锁卵泡增加, 卵泡颗粒细胞层变薄; 血清 FSH、LH、AMH 水平, 下丘脑及卵巢 Kp、GPR54、ERK1/2 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 血清 E₂、P 水平显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 七子益肾理冲汤组大鼠卵巢外观较红润, 囊状扩张卵泡减少, 卵泡颗粒细胞层增加, 出现近成熟卵泡, 可见少量黄体; 大鼠血清 FSH、LH、AMH 水平, 下丘脑、卵巢 Kp、GPR54 蛋白表达显著下降, 下丘脑 ERK1/2 蛋白表达显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 七子益肾理冲汤可以改善 PCOS 模型大鼠卵泡发育, 其机制可能是通过激活 Kp/GPR54 系统, 调节下游 ERK 信号通路, 进而调控下丘脑-垂体-卵巢轴, 改善激素水平, 发挥调节卵巢功能、促进卵泡发育的作用。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 卵泡发育; 七子益肾理冲汤; Kisspeptin; G 蛋白偶联受体 54; 性激素

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是常见的女性生殖内分泌疾病, 影响并危害育龄期女性的身心健康。研究显示, PCOS 的发病率逐年上升, 育龄期女性 PCOS 的患病率为 5%~10%, 且 PCOS 易影响育龄期女性的排卵功能而致不孕^[1]。PCOS 具有发病多因性、临床表现多态性的特点, 其发病机制尚未完全清楚, 目前研究主要集中于下丘脑-垂体-卵巢 (HPO) 轴紊乱、高雄激素血症、胰岛素抵抗、低度慢性炎症等方面^[2]。研

究发现, Kisspeptin (Kp) 是调控女性生殖内分泌的关键性信号因子, 可作用于 HPO 轴的上游, 在调节卵泡发育及排卵的过程中发挥重要作用^[3]。Kp 是一种由 KISS1 基因编码的神经肽类物质, 通过与 G 蛋白偶联受体 54 (GPR54) 结合, 诱导促性腺激素释放激素 (GnRH) 脉冲释放, 调节 HPO 轴, 调控黄体生成素 (LH) 及卵泡刺激素 (FSH) 分泌, 影响生殖内分泌功能^[4]。

七子益肾理冲汤是国医大师肖承棕临床经验方, 具有益肾养肝、调理冲脉的功效^[5]。前期临床研究表明, 七子益肾理冲汤能够降低卵巢储备功能低下 (DOR) 患者的 FSH、LH 水平, 升高雌二醇

基金项目: 中国民族医药学会科研项目 (2021Z2228-340104); 名医传承、薪火“3+3 工程” (JB049)

✉ 通讯作者: tangling73@126.com

(E_2) 水平^[6]。实验研究表明, 本方能够显著改善 DOR 大鼠抗苗勒氏管激素 (AMH)、卵巢指数、卵巢组织学形态, 降低卵巢颗粒细胞凋亡率^[7-8]。肖承棕教授认为 DOR 与 PCOS 两者病机有相通之处, 均以肾虚不足, 冲任失调为基本病机, 基于异病同治原则, PCOS 患者也可用益肾理冲之法调经助孕。基于此, 本实验旨在以 PCOS 大鼠为研究对象, 以 Kp/GPR54 系统调控 PCOS 卵泡发育为研究方向, 探讨七子益肾理冲汤改善卵泡发育的可能作用机制。本研究通过北京中医药大学动物实验伦理委员会的伦理审查 (批件号: 2021-104-R)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级雌性 SD 大鼠 18 只, 6 周龄, (170±10) g, 购自北京维通利华实验动物技术公司, 实验动物使用许可证号: SCXK (京) 2020-0013。饲养于北京中医药大学屏障级动物实验室, 温度 (22±2) °C, 湿度为 40%~60%, 12 h 周期性光照环境, 普通饲料喂养, 实验期间所有大鼠自由摄食和饮水。适应性喂养 3 天, 观察 2 个动情周期, 典型动情周期分为动情前期、动情期、动情后期、动情间期, 根据阴道脱落细胞涂片变化, 筛选出 17 只动情规律大鼠。

1.2 药品、主要试剂及仪器

七子益肾理冲汤由女贞子 15 g、菟丝子 15 g、枸杞子 15 g、沙苑子 15 g、香附 12 g、覆盆子 15 g、桑椹 15 g、桑寄生 15 g、续断 15 g、巴戟天 15 g、黄芪 15 g 组成, 颗粒剂由北京中医药大学东直门医院中药房提供, 购自北京康仁堂药业有限公司, 将七子益肾理冲汤颗粒剂溶于无菌饮用水中, 制备成含生药 3.402 g/ml 的溶液。来曲唑片 (伊美舒) 购于浙江海正药业股份有限公司, 规格为 2.5 mg/片, 批号: 22111181。1% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 溶液购于上海源叶生物科技有限公司, 批号: J14HR10490A。来曲唑-羧甲基纤维素 (CMC) 混悬液制备: 将来曲唑药片碾碎, 溶解于 1% CMC 溶液中, 浓度为 0.1 mg/ml。

放射免疫试剂盒: FSH、LH、 E_2 、孕酮 (P)、睾酮 (T) 试剂盒 (货号: 202204), AMH 试剂盒 (货号: 202202), 抑制素 B (INHB) 试剂盒 (货号: 202203), 均购自天津市协和医药科技集团有限公司; Kp 抗体 (美国 Affinity 公司, 货号: DF7133); GPR54 抗体 (北京 Bioass 公司, 货号:

BS-2501RDF7133); 细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 抗体 (美国 Abcam 公司, 货号: ab17942); 苏木素-伊红 (HE) 染液 (珠海贝索生物技术有限公司, 批号: C220201); BCA 蛋白定量试剂盒 (康为世纪生物科技股份有限公司, 批号: 02912E); 10% 水合氯醛溶液 (货号: ST1002), 4% 多聚甲醛固定液 (深圳希景生物科技有限公司, 货号: ST1127), 深圳希景生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂混合物 (瑞士 Roche 公司, 货号: 04693116001); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 货号: ISEQ00010)

精密电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司, 型号: BS-124S]; 正置光学显微镜 (日本 NIKON 公司, 型号: ECLIPSE 80i); 体视显微镜 (型号: M60)、自动脱水机 (型号: ASP300S)、包埋机 (型号: EG1160), 德国 Leica 公司; 低速离心机 (安徽中科中佳有限公司, 型号: SC-3612); 高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 型号: TGL-20M); 轮转式病理切片机 [赛默飞世尔仪器 (上海) 有限公司, 型号: HM 325]; 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: PowerPac HC Power Supply)。

1.3 分组、造模及给药

将动情周期规律的 17 只大鼠依据随机数字表法分为空白组 5 只、模型组 6 只、七子益肾理冲汤组 6 只。模型组及七子益肾理冲汤组参照文献 [9] 采用芳香化酶抑制剂来曲唑法制备 PCOS 疾病模型, 大鼠每日予来曲唑-CMC 混悬液 1 mg/ (kg·d) 连续灌胃 21 天, 空白组大鼠予 10 ml/ (kg·d) 无菌饮用水灌胃。灌胃第 12~21 天每日 8:00 进行大鼠阴道脱落细胞涂片, 显微镜下观察动情周期以评估造模是否成功。以动情周期紊乱或持续处于动情间期提示无排卵, 初判 PCOS 模型建立成功^[10]。

实验第 22 天开始, 七子益肾理冲汤组大鼠予七子益肾理冲汤 34.02 g/ (kg·d) 灌胃, 灌胃剂量按照人与大鼠等效剂量换算^[11]。空白组及模型组大鼠予 10 ml/ (kg·d) 无菌饮用水灌胃, 各组连续灌胃 15 天。模型组 1 只大鼠由于灌胃操作不当而死亡。

1.4 取材

于末次灌胃给药当日晚 8:00 开始禁食不禁水, 次日晨 8:00 大鼠称重后用 10% 水合氯醛溶液 (3 ml/kg) 进行腹腔注射麻醉, 固定大鼠于仰卧位, 沿腹部正中中线剪开, 暴露腹腔各脏器及血管, 腹主动脉采血 4 ml。充分游离卵巢周边脂肪组织及卵巢

包膜，完整剥离双侧卵巢，于冰袋上迅速取出下丘脑，将一侧卵巢与下丘脑置于冻存管，迅速投入液氮中冷冻保存备用，将另一侧卵巢置于4%多聚甲醛固定液中固定备用。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠体质量、卵巢系数 称取并记录各组大鼠体质量，用精密电子天平称取双侧卵巢湿重，并计算卵巢系数。卵巢系数=双侧卵巢湿重之和(mg)/体质量(g)×100%。

1.5.2 卵巢外观及卵巢组织形态学 体视显微镜下拍照记录卵巢外观，4%多聚甲醛溶液中固定卵巢24 h后，放入自动脱水机中进行脱水、透明及浸蜡，常规石蜡包埋，选取卵巢最大切面，切成厚4 μm的薄片，脱蜡后进行HE染色，中性塑胶封片。显微镜下记录卵巢组织形态，观察各级卵泡发育及黄体情况。

1.5.3 放射免疫法检测大鼠血清激素水平 腹主动脉采血4 ml，经3000 r/min室温离心15 min(离心半径40 cm)后，收集血清，置于EP管中，-20℃冰箱保存。用放射免疫法测定大鼠血清FSH、LH、E₂、T、P、AMH、INHB水平，具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5.4 Western blot 法检测下丘脑及卵巢组织Kp、GPR54、ERK1/2蛋白表达水平 采用随机数字表法每组选取3只大鼠，将下丘脑及卵巢组织分别加入RIPA裂解液进行裂解，加入蛋白酶抑制剂混合液，转移至离心管中4℃、12 000 r/min离心15 min(离心半径15 cm)，取上清进行蛋白定量。按照BCA蛋白定量试剂盒使用说明操作，测定蛋白浓度，30 μg/孔上样，电泳分离，0.45 μm孔径PVDF膜湿转法转膜，一抗孵育浓度分别为：Kp(1:500)、GPR54(1:500)、ERK1/2(1:1000)，山羊抗兔二抗浓度为1:10 000孵育1 h，曝光显影。以β-actin单抗检测作为内参对照，将曝光显影后的底片扫描，并用IPP6软件对图像进行灰度分析。

1.6 统计学方法

采用SPSS 25.0统计软件，计量资料均符合正态分布且方差齐，以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、卵巢系数比较

表1示，各组大鼠的体质量、卵巢系数比较，

差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠体质量及卵巢系数比较

Table 1 Comparison of body weight and ovarian coefficient of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	卵巢系数/%
空白组	5	346.02±17.12	0.74±0.16
模型组	5	380.30±35.30	0.83±0.44
七子益肾理冲汤组	6	370.84±47.96	0.78±0.94

2.2 各组大鼠卵巢外观及卵巢组织形态学表现

空白组大鼠体视显微镜下可见卵巢组织外观色泽红润，卵泡生长形态规则，表面可见黄体；模型组大鼠卵巢表面皱缩，色泽较苍白，卵泡生长形态欠规则；与模型组比较，七子益肾理冲汤组大鼠卵巢组织外观色泽较红润，偶见黄体。

图1示，空白组大鼠卵巢皮质部可见处于不同发育阶段的各级卵泡，颗粒细胞多为6~8层，结构完整，排列致密有序；模型组卵巢可见多个闭锁卵泡，呈明显囊性扩张，出现数量较多、体积较大的空囊腔，颗粒细胞层明显变薄，排列稀松无序，未见成熟卵泡；与模型组相比，七子益肾理冲汤组大鼠卵巢组织形态改善，囊性扩张卵泡数量减少，颗粒细胞层增加，出现近成熟卵泡，有卵母细胞、卵丘、放射冠等结构，可见黄体。

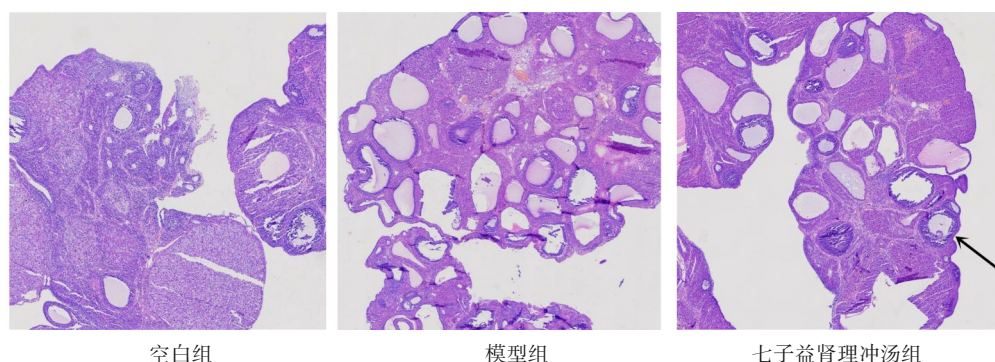
2.3 各组大鼠血清激素水平比较

表2示，与空白组比较，模型组大鼠血清FSH、LH、AMH水平显著升高，E₂、P水平显著降低($P<0.01$)，T、INHB水平差异无统计学意义($P>0.05$)；与模型组比较，七子益肾理冲汤组大鼠FSH、LH、AMH水平显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，E₂、P、T、INHB水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠下丘脑及卵巢Kp、GPR54、ERK1/2蛋白表达比较

表3、图2示，与空白组比较，模型组大鼠下丘脑Kp、GPR54、ERK1/2蛋白表达均显著升高($P<0.01$)；与模型组比较，七子益肾理冲汤组下丘脑Kp、GPR54、ERK1/2蛋白表达均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表4、图3示，与空白组比较，模型组大鼠卵巢Kp、GPR54、ERK1/2蛋白表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，七子益肾理冲汤组Kp、GPR54表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，而ERK1/2蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。



注：黑色箭头指向为近成熟卵泡，可见卵母细胞、卵丘、放射冠等结构。

图1 各组大鼠卵巢组织形态学结果 (HE 染色, ×40)

Figure 1 Histomorphological changes in the rat ovaries of three groups (HE, ×40)

表2 各组大鼠血清 FSH、LH、T、E₂、P、AMH、INHB 水平比较

Table 2 Comparison of serum FSH, LH, T, E₂, P, AMH, and INHB levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FSH/mIU·ml ⁻¹	LH/mIU·ml ⁻¹	T/ng·ml ⁻¹	E ₂ /pg·ml ⁻¹
空白组	5	7.07±1.00	8.91±0.81	14.67±1.91	62.46±6.21
模型组	5	10.67±0.75 ^{a)}	13.26±1.10 ^{a)}	14.35±1.53	47.97±6.61 ^{a)}
七子益肾理冲汤组	6	6.29±0.56 ^{b)}	10.35±0.47 ^{b)}	13.68±1.06	52.56±6.61
组别	鼠数	P/ng·ml ⁻¹	AMH/ng·ml ⁻¹	INHB/pg·ml ⁻¹	
空白组	5	23.62±1.72	1.64±0.87	10.52±0.95	
模型组	5	15.78±1.89 ^{a)}	2.28±0.31 ^{a)}	15.32±3.98	
七子益肾理冲汤组	6	17.81±2.37	1.87±0.29 ^{c)}	11.33±0.98	

注：FSH，卵泡刺激素；LH，黄体生成素；T，睾酮；E₂，雌二醇；P，孕酮；AMH，抗苗勒氏管激素；INHB，抑制素B。

a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠下丘脑 Kp、GPR54、ERK1/2

蛋白表达比较

Table 3 Comparison of Kp, GPR54 and ERK1/2 expression in hypothalamus in each group (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Kp	GPR54	ERK1/2
空白组	3	0.13±0.01	0.14±0.48	0.26±0.35
模型组	3	0.32±0.40 ^{a)}	0.44±0.14 ^{a)}	0.68±0.45 ^{a)}
七子益肾理冲汤组	3	0.20±0.28 ^{b)}	0.28±0.99 ^{c)}	0.42±0.40 ^{b)}

注：Kp, Kisspeptin; GPR54, G 蛋白耦联受体 54; ERK1/2, 细胞外信号调节激酶 1/2。

a) 与空白组相比， $P < 0.01$ ；b) 与模型组相比， $P < 0.01$ ；c) 与模型组相比， $P < 0.05$ 。

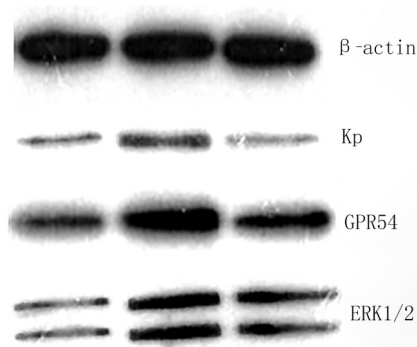
表4 各组大鼠卵巢 Kp、GPR54、ERK1/2 的蛋白表达比较

Table 4 Comparison of Kp, GPR54, and ERK1/2 expression in ovary in each group (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Kp	GPR54	ERK1/2
空白组	3	0.23±0.12	0.26±0.09	0.30±0.06
模型组	3	0.57±0.10 ^{a)}	1.06±0.10 ^{a)}	0.99±0.20 ^{b)}
七子益肾理冲汤组	3	0.36±0.04 ^{c)}	0.60±0.10 ^{d)}	0.59±0.38

注：Kp, Kisspeptin; GPR54, G 蛋白耦联受体 54; ERK1/2, 细胞外信号调节激酶 1/2。

a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与空白组比较， $P < 0.05$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；d) 与模型组比较， $P < 0.01$ 。



空白组 模型组 七子益肾理冲汤组

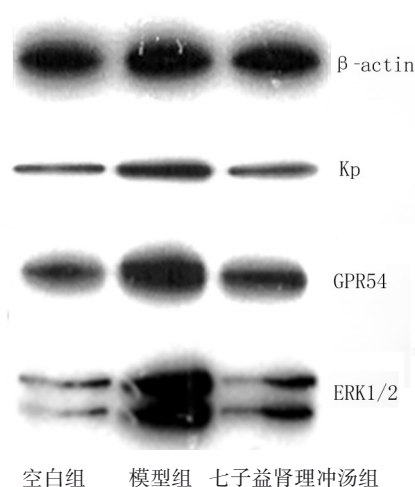
注：Kp, Kisspeptin; GPR54, G 蛋白耦联受体 54; ERK1/2, 细胞外信号调节激酶 1/2。

图2 各组大鼠下丘脑 Kp、GPR54、ERK1/2 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of Kp, GPR54, and ERK1/2 in the hypothalamus of rats in each group

3 讨论

《傅青主女科》云：“经水出诸肾”“经本于肾”，《医学正传》载：“月经全借肾水施化”。肖承棕教授根据多年临床经验认为，PCOS 卵泡发育障碍病机当以肾虚为本。肾气充盛、肾精滋长是卵泡发育的基础，冲任气血和畅是排卵的条件，肾之阴



注：Kp, Kisspeptin; GPR54, G 蛋白耦联受体 54; ERK1/2, 细胞外信号调节激酶 1/2。

图 3 各组大鼠卵巢 Kp、GPR54、ERK1/2 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of Kp, GPR54, and ERK1/2 in ovary of rats in each group

阳转化协调是成熟卵泡排出的关键。若肾虚天癸乏源，冲任血海失充，肾阴肾阳转化失常，其中任一环节失常都会导致卵泡发育不良或排卵障碍。因此，肖承棕教授在临床上多以益肾理冲为法，以七子益肾理冲汤为底方临证加减。方中女贞子、枸杞子、沙苑子、桑椹、菟丝子归肝肾经为主，补益肾气、滋肾养阴；巴戟天激发肾气，鼓动肾阳；桑寄生、续断补肝肾而不滞，补中寓通；香附疏肝柔肝；黄芪补中益气，先后天相互滋养。全方用药平和，气血同补，阴阳互滋，共奏益肾养肝、调理冲脉之效^[5]。

PCOS 是临床中无排卵性不孕的最常见病因^[12]，约占 70%~80%^[13]。研究表明，PCOS 发病机制与大脑 GnRH 神经元网络功能障碍有关^[14]。在 PCOS 患者中，GnRH 的脉冲频率及 LH 对 GnRH 的应答升高可导致 LH/FSH 值升高，造成 HPO 轴紊乱，导致卵泡发育调控的异常^[15]。GnRH 神经元过度活跃可诱发 LH 脉冲释放频率增加，驱动下游雄激素合成增加，引起卵泡凋亡和闭锁，导致排卵障碍是 PCOS 的重要发病机制^[16]。Kp/GPR54 系统是调控 GnRH 神经元活性的重要元件之一，Kp 是一种由黑色素瘤细胞抑制基因 KISS1 编码的肽类物质，与其受体 GPR54 结合后可以激活磷脂酶 C (PLC)，PLC 水解磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP2) 产生两个第二信使：三磷酸肌醇 (IP3) 和二酰甘油 (DAG)，IP3 刺激触发内质网钙外流，增加胞内钙浓度，DAG 激活蛋白激酶 C (PKC) 促使 ERK1/2 的磷酸化，

完成细胞间信号传导^[17]。Kp/GPR54 系统诱发下丘脑神经元释放 GnRH，刺激垂体分泌 LH、FSH 和下游性腺类固醇激素的释放，参与青春期启动、性成熟、卵泡发育及排卵等女性生殖内分泌过程^[18-19]。研究显示，PCOS 的发病机制可能与 Kp 的异常表达密切相关^[20]。有大型荟萃分析^[21]发现，PCOS 患者的血清 Kp、LH、T 和 AMH 水平明显高于非 PCOS 患者。另有研究^[22]发现，下丘脑 Kisspeptin/神经肽 B/强啡肽 (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin, KNDy) 神经元的过度激活可能是 PCOS 女性 LH 分泌过多的根本因素。因此，通过上游调控 Kp 表达，抑制 GnRH 神经元过度活跃，调节 HPO 轴促性腺激素释放，改善神经内分泌网络，可能是 PCOS 的有效治疗方向。

本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠动情周期紊乱，血清 AMH 水平升高，大鼠卵巢组织形态可见囊状扩张卵泡，卵泡颗粒细胞层明显变薄，符合 PCOS 内分泌特征及病理表现，表明 PCOS 造模成功。本研究中各组大鼠体质量及卵巢系数差异无统计学意义，考虑可能与样本量小有关，有待扩大样本量进一步研究。临床研究^[23-24]发现，PCOS 患者血清 LH、AMH、INHB 水平多明显高于健康群体。本实验中，与模型组相比，七子益肾理冲汤组血清 FSH、LH、AMH 均较模型组显著下降，提示七子益肾理冲汤能改善 PCOS 激素水平，而 T、INHB 未表现出明显差异，可能与不同动情周期干扰及 INHB 对于 PCOS 预测价值相对较低^[25]有关。经七子益肾理冲汤干预后，大鼠卵巢表面可见少量黄体，表明有排卵的发生，卵巢组织形态学见囊状扩张卵泡及闭锁卵泡减少，颗粒细胞层增加，近成熟卵泡出现，表明七子益肾理冲汤能改善 PCOS 卵泡发育，与前期实验研究结果^[7]相符。与空白组相比，模型组大鼠血清 LH 及下丘脑 Kp、GPR54 蛋白表达明显升高，并且其信号通路相关指标 ERK1/2 亦有相应改变，表明 PCOS 大鼠确实存在 LH 与 Kp/GPR54 系统的异常关联。而经过七子益肾理冲汤干预后，大鼠下丘脑、卵巢 Kp 及 GPR54 水平均不同程度下降，提示调控 Kp/GPR54 表达可能是改善 PCOS 卵泡发育的有效途径之一。

综上，七子益肾理冲汤可以改善 PCOS 大鼠卵泡发育，其机制可能与调控 Kp/GPR54 系统及信号通路上相关信号因子表达、影响 GnRH 神经元活跃水平、调节 HPO 轴、调控 FSH 和 LH 释放，从而改

善卵泡发育有关。但本研究受限于样本量较小、大鼠不同动情周期干扰、组间异质性较大等因素影响,部分数据未能显示出明显的统计学意义,有待进一步扩大样本量,完善实验方案以深入探讨。

参考文献

- [1]袁莹莹,赵君利.多囊卵巢综合征流行病学特点[J].中国实用妇科与产科杂志,2019,35(3):261-264.
- [2]张楚,董浩旭,宋琦璠,等.多囊卵巢综合征相关不孕症发病机制的研究进展[J].现代妇产科进展,2020,29(8):629-631.
- [3]刘现娜,张宁. Kisspeptin 调节肽参与多囊卵巢综合征的研究进展[J].安徽医药,2022,26(12):2341-2344.
- [4]韩昕宇,吴天强,冯晓玲. Kisspeptin 与妊娠及其相关疾病关系的研究进展[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2021,40(5):420-426.
- [5]肖承棕.肖承棕妇科集验真传[M].北京:中国医药科技出版社,2021:42-45.
- [6]吴丽婷.七子益肾理冲汤治疗肝肾阴虚型卵巢早衰临床疗效观察[D].北京:北京中医药大学,2017.
- [7]钱颖仪,刘雁峰.七子益肾理冲汤对DOR大鼠卵巢储备的影响[J].天津中医药,2018,35(6):450-453.
- [8]钱颖仪.七子益肾理冲汤对卵巢储备功能的影响及miR-29a的调控作用[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [9]KAFALI H, IRIADAM M, OZARDALI I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease[J]. Arch Med Res, 2004, 35(2): 103-108.
- [10]王洁,吴素慧,尚海霞.性成熟雌性SD大鼠动情周期的观察[J].当代医学,2013,19(28):25-26.
- [11]陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:33-34.
- [12]多囊卵巢综合征相关不孕治疗及生育保护共识专家组,中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组.多囊卵巢综合征相关不孕治疗及生育保护共识[J].生殖医学杂志,2020,29(7):843-851.
- [13]TATA B, MIMOUNI NEH, BARBOTIN AL, et al. Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood [J]. Nat Med, 2018, 24(6):834-846.
- [14]杜晓琴,刘美玉,尹菊.神经内分泌在多囊卵巢综合征发病机制中的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2020,47(5):503-507.
- [15]王凡,张正红,肖开转,等.下丘脑-垂体-肾上腺轴和下丘脑-垂体-卵巢轴在多囊卵巢综合征神经内分泌功能紊乱中的作用[J].中国医学科学院学报,2017,39(5):699-704.
- [16]SILVA MSB, DESROZIERS E, HESSLER S, et al. Activation of arcuate nucleus GABA neurons promotes luteinizing hormone secretion and reproductive dysfunction: implications for polycystic ovary syndrome [J]. EBioMedicine, 2019, 44: 582-596. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.065.
- [17]TREVISAN CM, MONTAGNA E, DE OLIVEIRA R, et al. Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction? [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(4):1259-1276.
- [18]HU KL, ZHAO H, CHANG HM, et al. Kisspeptin/Kisspeptin receptor system in the ovary [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 8:365. doi: 10.3389/fendo.2017.00365.
- [19]SKORUPSKAITE K, GEORGE JT, ANDERSON RA. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease [J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(4):485-500.
- [20]SZELIGA A, RUDNICKA E, MACIEJEWSKA-JESKE M, et al. Neuroendocrine determinants of polycystic ovary syndrome [J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(5):3089.
- [21]PÉREZ-LÓPEZ FR, ORNAT L, LÓPEZ-BAENA MT, et al. Circulating kisspeptin and anti-müllerian hormone levels, and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2021, 260:85-98. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.03.007.
- [22]ESPARZA LA, SCHAFER D, HO BS, et al. Hyperactive LH pulses and elevated kisspeptin and NKB gene expression in the arcuate nucleus of a PCOS mouse model [J]. Endocrinology, 2020, 161(4):bqaa018.
- [23]张蓓,魏薇,杨璨.AMH、DHEA-S、LH、FSH在多囊卵巢综合征患者血清中的表达及临床意义[J].贵州医药,2022,46(1):126-127.
- [24]秦薇,黄筱竑,黄惠莲,等.血清IGF-1、INHB、E2及VEGF水平与多囊卵巢综合征病情的相关性研究[J].浙江实用医学,2020,25(6):449-451.
- [25]唐蕾.抗苗勒管激素与抑制素B对多囊卵巢综合征的临床预测价值[J].中国社区医师,2019,35(5):69,73.

Effect of *Qizi Yishen Lichong Decoction* (七子益肾理冲汤) on Follicular Development of Polycystic Ovary Syndrome Model Rats based on Kisspeptin/GPR54 System

FU Xuemei¹, SUN Tianlin², SHI Meiyang³, LU Yiqin¹, TANG Ling¹

1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700; 2. Beijing First Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine; 3. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To explore the effect and the potential mechanism of *Qizi Yishen Lichong Decoction* (七子益肾理冲汤) on follicular development of polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** Seventeen female SD rats with regular estrus were randomly divided into blank group (n=5), model group (n=6) and *Qizi* group (n=6). Rats in the model group and *Qizi* group were given 1 mg/(kg·d) of letrozole-carboxymethylcellulose suspension by gavage for 21 days to establish the model of PCOS. Since the 22nd day, *Qizi* group was given 34.02 g/(kg·d) of *Qizi Yishen Lichong Decoction*, one dose daily, while the blank group and model group were given 10 ml/(kg·d) of sterile drinking water by gavage. After 15 days, the rat weight and ovarian coefficient were compared. The appearance of the ovaries was observed with a stereo microscope. Histomorphological Changes of ovary in all groups of rats were observed by HE staining. The levels of serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E₂), testosterone (T), progesterone (P), anti-Müllerian hormone (AMH), and inhibin B (INHB) were detected by radioimmunoassay. The expression levels of kisspeptin (Kp), G protein-coupled receptor 54 (GPR54) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in hypothalamus and ovary were detected by Western blot. **Results** There was no significant difference in weight and ovarian coefficient of rats between the groups ($P>0.05$). Compared to those in the blank group, the ovaries of rats in the model group were paler in appearance, with cystic dilatation, increased follicles and atretic follicles, and thinning follicular granulosa cell layer; the serum FSH, LH, AMH levels, as well as the expression of Kp, GPR54, and ERK1/2 in hypothalamus and ovary increased ($P<0.01$), while the serum E₂ and P levels decreased ($P<0.01$). Compared to those in the the model group, the ovarian surface of rats in the *Qizi* group was more ruddy in appearance, with decreased number of cystic follicles and increased follicular granulosa cell layer, and near-mature follicles were found with a small amount of corpus luteum; the serum FSH, LH and AMH levels, and the expression of Kp and GPR54 in the hypothalamus and ovary significantly decreased, as well as the ERK1/2 in the hypothalamus ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** *Qizi Yishen Lichong Decoction* can improve the follicular development of PCOS, and its mechanism may be related to the regulation of the downstream ERK signaling pathway by activating the Kp/GPR54 system, which further regulates the hypothalamus-pituitary-ovary axis and improves the sex hormones levels, playing the role in regulating ovarian function and promoting follicular development.

Keywords polycystic ovary syndrome; follicular development; *Qizi Yishen Lichong Decoction* (七子益肾理冲汤); Kisspeptin; G protein-coupled receptor 54; sex hormone

(收稿日期: 2022-05-30; 修回日期: 2023-01-05)

[编辑: 王利芬]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001年合订本每本100元, 2002、2003年合订本每本105元, 2004年合订本115元, 2005年合订本125元, 2007—2010年合订本, 每本140元。2011(缺5、6期)—2013年每册9.80元, 2014(缺21期)—2017年(缺3、5、15、18期)每册15元, 2018年(缺5、7、9期)每册20元, 2020年(缺7、8、9期)每册20元, 2021年每册20元。2011—2013年合订本, 每年4本, 全年280元, 2014—2017年合订本, 每年4本(缺2017年上半年合订本), 全年400元, 2018—2021年合订本, 每年4本, 全年600元。2022年合订本, 每年4本, 全年800元。《中医杂志》2006—2008年增刊每册40元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加3元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街16号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信(zyzgzzh)购买。邮编: 100700, 电话: (010)64089195。