

- 细胞自噬治疗 RSV 诱发哮喘小鼠[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 9-18.
- [10] KOSKELA H O, NURMI H M, BIRRING S S. Utility of cough provocation tests in chronic cough and respiratory diseases: a comprehensive review and introduction of new reference ranges for the capsaicin test[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2021, 13(6): 833-849.
- [11] 仇志锴, 王春莲, 尤士军, 等. 麻杏石甘汤合过敏煎加味对咳嗽变异性哮喘患儿症状改善及诱导痰炎性因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(8): 214-219.
- [12] 秦中银, 陈盼碧, 唐徐韵, 等. 针刺调节丝裂原活化蛋白激酶通路影响哮喘大鼠肺组织嗜酸性粒细胞凋亡的机制研究[J]. 针刺研究, 2022, 47(8): 690-695.
- [13] LU X, LI R, YAN X. Airway hyperresponsiveness development and the toxicity of PM2.5[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(6): 6374-6391.
- [14] CHEN F J, HUANG X Y, LIN G P, et al. Validity of fractional exhaled nitric oxide and small airway function indices in diagnosis of cough-variant asthma [J]. J Asthma, 2018, 55(7): 750-755.
- [15] LADDHA A P, KULKARNI Y A. VEGF and FGF-2: promising targets for the treatment of respiratory disorders [J]. Respir Med, 2019, 156(1): 33-46.
- [16] FERREIRA T P T, GUIMARÃES F V, SÁ Y A P J, et al. Annexin- A1- derived peptide Ac2- 26 suppresses allergic airway inflammation and remodelling in mice[J]. Cells, 2022, 11(5): 1-13.
- [17] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, et al. A panoramic review of IL-6: structure, pathophysiological roles and inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(5): 1-49.
- [18] BUTTURINI E, CARCERERI DE PRATI A, et al. Redox regulation of STAT1 and STAT3 signaling [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7034.
- [19] ZHU H, JI W. Dihydroartemisinin ameliorated ovalbumin-induced asthma in mice via regulation of MiR-183C [J]. Med Sci Monit, 2019, 25(1): 3804-3814.
- [20] PAVÓN-ROMERO G F, SERRANO-PÉREZ N H, GARCÍA-SÁNCHEZ L, et al. Neuroimmune pathophysiology in asthma [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9(1): 1-21.
- [21] KENYON N J, MORRISSEY B M, SCHIVO M, et al. Occupational asthma [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2012, 43 (1/2): 3-13.
- [22] O'BYRNE P M, GAUVREAU G M, BRANNAN J D. Provoked models of asthma: what have we learnt? [J]. Clin Exp Allergy, 2009, 39(2): 181-192.

【责任编辑：侯丽颖】

经后增殖方含药血清对超排卵大鼠卵巢颗粒细胞 GDF9 表达及凋亡的调控机制

杨贞¹, 陈小燕², 江少如¹, 叶淑珠¹, 方晓宏¹, 邓伟民³, 郭新宇²

(1. 揭阳市人民医院, 广东揭阳 522000; 2. 南部战区总医院, 广东广州 510010;
3. 前海人寿广州总医院, 广东广州 511325)

摘要:【目的】观察益气活血法经后增殖方含药血清对超排卵大鼠卵巢颗粒细胞生长分化因子9(GDF9)表达及凋亡的调控机制。【方法】制备超排卵大鼠血清(空白血清)和经后增殖方灌胃的超排卵大鼠血清(含药血清)。建立控制性超排卵(COH)大鼠模型, 收集卵巢颗粒细胞。实验分为5组: 空白血清组, 含药血清组, 含药血清+SB203580 [p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)抑制剂]组, 含药血清+PDTC [核转录因子κB(NF-κB)抑制剂]组, 含药血清+SB203580+PDTC组。采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测p38MAPK、酪蛋白激酶2(CK2)、核转录因子κB抑制因子α(IκBα)、NF-κB、GDF9 mRNA表达水平, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测GDF9蛋白表达水平, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测卵巢颗粒细胞凋亡。【结果】经后增殖方含药血清降低COH大鼠卵巢颗粒细胞的p38MAPK和NF-κB mRNA表达, 升高CK2和IκBα mRNA表达, 提高GDF9 mRNA和蛋白的表达水平, 降低卵巢颗粒细胞的凋亡率。单独添加p38MAPK抑制剂SB203580与单独添加NF-κB抑制剂PDTC均能促进GDF9 mRNA和蛋白表达、降低卵巢颗粒细胞凋亡率。【结论】益气

收稿日期: 2023-10-21

作者简介: 杨贞(1988-), 女, 博士, 主治医师; E-mail: 894317845@qq.com

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(编号: 2020A1515011175); 广东省中医药局科研基金资助项目(编号: 20201412)

血法经后增殖方含药血清可促进超排卵大鼠卵巢颗粒细胞GDF9表达,抑制卵巢颗粒细胞凋亡,其机制可能与调控p38MAPK和NF- κ B双信号通路基因表达有关。

关键词: 益气血法; 经后增殖方; 控制性超排卵(COH); 凋亡; 生长分化因子9(GDF9); p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK); 核转录因子 κ B(NF- κ B); 颗粒细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2024)03-0735-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2024.03.031

Regulatory Mechanism of Drug-Containing Serum of *Jinghou Zengzhi* Prescription on GDF9 Expression and Apoptosis of Ovarian Granulosa Cells in Rats with Controlled Ovarian Hyperstimulation

YANG Zhen¹, CHEN Xiao-Yan², JIANG Shao-Ru¹, YE Shu-Zhu¹,
FANG Xiao-Hong¹, DENG Wei-Min³, GUO Xin-Yu²

(1. Jieyang People's Hospital, Jieyang 522000 Guangdong, China; 2. General Hospital of the Southern Theater Command, Guangzhou 510010 Guangdong, China; 3. Foresea Life Insurance Guangzhou General Hospital, Guangzhou 511325 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the regulatory mechanism of drug-containing serum of *Jinghou Zengzhi* Prescription based on *qi* and blood replenishing method on the expression of growth and differentiation factor 9 (GDF9) and apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with controlled ovarian hyperstimulation (COH). **Methods** Serum of COH rats (blank serum) and serum of COH rats gavaged by the *Jinghou Zengzhi* Prescription were prepared. A COH rat model was established and ovarian granulosa cells were collected. The experiment was divided into 5 groups: blank serum group, drug-containing serum group, drug-containing serum + SB203580 [p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) inhibitor] group, drug-containing serum + PDTC [nuclear transcription factor κ B (NF- κ B) inhibitor] group, drug-containing serum + SB203580 + PDTC group. The mRNA expression levels of p38MAPK, casein kinase 2 (CK2), nuclear transcription factor κ B inhibitor α (I κ B α), NF- κ B and GDF9 were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and GDF9 protein expression level was detected by Western Blot, and ovarian granulosa cell apoptosis was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). **Results** The drug-containing serum of *Jinghou Zengzhi* Prescription decreased the mRNA expressions of p38MAPK and NF- κ B, elevated the mRNA expressions of CK2 and I κ B α , increased the mRNA and protein expression levels of GDF9, and decreased the apoptosis rate of ovarian granulosa cells in COH rats. The addition of p38MAPK inhibitor SB203580 alone and the addition of NF- κ B inhibitor PDTC alone both promoted the mRNA and protein expressions of GDF9 and reduced the apoptosis rate of granulosa cells. **Conclusion** The drug-containing serum of *Jinghou Zengzhi* Prescription based on *qi* and blood replenishing method can promote the expression of GDF9 and inhibit the apoptosis of ovarian granulosa cells in rats with COH, and its mechanism may be related to the regulation of the expression of genes of the dual signaling pathways of p38MAPK and NF- κ B.

Keywords: *qi* and blood replenishing method; *Jinghou Zengzhi* Prescription; controlled ovarian hyperstimulation (COH); apoptosis; growth differentiation factor 9 (GDF9); p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK); nuclear transcription factor κ B (NF- κ B); granulosa cells

本课题组前期通过临床研究证实, 益气血法能提高不孕患者体外受精-胚胎移植(IVF-ET)周期

中胚胎移植成功率和妊娠率^[1-2]。但益气血法具体作用机制尚不完全清楚。颗粒细胞, 作为卵泡中

数量最多的一种细胞,能通过合成和表达多种激素、生长因子及相关受体,调节卵母细胞及卵泡的发育^[3];而颗粒细胞凋亡则可影响该过程,促使卵泡闭锁^[4]。作为IVF-ET周期中的关键环节,控制性超排卵(COH)的应用,能使一个月经周期中卵巢有多个卵泡同时发育。但有研究证实,在COH中所使用的促性腺激素释放激素激动剂(GnRHa)、促性腺激素(Gn)等,可破坏卵细胞中遗传物质的稳定性,影响核质成熟的同步性,从而抑制卵细胞的发育,降低胚胎质量及妊娠率^[5-6]。因此,如何提高卵细胞及胚胎质量一直是生殖医学领域的研究热点之一。基于此,本研究拟通过细胞实验探讨益气血法经后增殖方含药血清对超排卵大鼠卵巢颗粒细胞的调控机制,以期进一步完善益气血法应用于IVF-ET的理论依据,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 动物 SPF级雌性SD大鼠27只,鼠龄6~8周,体质量180~220 g,购自南方医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2021-0041,饲养于中国科学院广州生物医药与健康研究院,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2018-0131。动物实验方案已获得揭阳市人民医院伦理委员会批准,批准编号:201903。实验遵照《关于善待实验动物的指导性意见》(国科发财字[2006]398号)。自然光照,大鼠自由饮水和摄食,适应性饲养1周后开始实验,以阴道脱落细胞涂片检查动情周期。

1.2 药物 经后增殖方(组成:党参15 g、白术12 g、茯苓12 g、甘草6 g、熟地黄12 g、白芍12 g、当归6 g、川芎6 g、菟丝子15 g、鹿角霜20 g、杜仲15 g、山萸肉10 g、川椒3 g),颗粒剂,10 g/袋,由广东一方制药有限公司制备,由南部战区总医院提供,批号:J2001003);醋酸曲普瑞林(GnRHa,瑞士辉凌公司生产,批号:S11775A);孕马血清促性腺激素(PMSG,北京索莱宝公司生产,批号:601Q021);人绒毛膜促性腺激素(HCG,丽珠药业,批号:201202)。

1.3 试剂与仪器 M199培养液(美国Hyclone公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)抑制剂SB203580(美国MCE

公司,货号:HY-10256);核转录因子kappaB(NF- κ B)抑制剂PDTIC(美国MCE公司,货号:HY-18738);逆转录试剂盒(美国Thermo公司);荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测试剂盒(美国Genecopoeia公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的GAPDH优质内参(上海康成生物公司);兔多克隆生长分化因子9(GDF9)抗体(英国Abcam公司);山羊抗兔IgG(H+L)二抗(美国Southern Biotech公司);二喹啉甲酸(BCA)法蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物公司);脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒(美国Promega公司)。7500荧光定量PCR仪(美国ABI公司);multiscan MK3酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);VE180垂直电泳槽、VE186转移电泳槽(上海天能公司);BG-Power 600i型电泳仪(北京百晶生物公司);CKX41倒置光学显微镜(日本Olympus公司);DMI6000B倒置荧光显微镜(德国Leica公司)。

1.4 COH模型及含药血清的制备 将12只雌性大鼠随机分为2组:COH组、COH+中药组。COH模型的建立:阴道涂片为动情周期第3天时,COH组、COH+中药组的大鼠于每日上午9时腹腔注射GnRHa 20 μ g/kg,给药浓度为20 μ g/mL,连续7 d。第7天同时注射PMSG 400 IU/kg,给药浓度为400 IU/mL,48 h后注射HCG 1 IU/g,给药浓度为1 000 IU/mL。解剖可见大鼠双侧卵巢有多个优势卵泡,则判断造模成功。中药灌胃:COH造模第1天起,COH+中药组大鼠每日上午9时分别给予经后增殖方4.5 g/kg(相当于3倍临床等效剂量)^[7]灌胃,给药浓度0.33 g/mL,连续9 d;COH组大鼠给予等体积生理盐水灌胃。采血:造模第9天,麻醉大鼠后腹主动脉取血,离心取上清液,56 $^{\circ}$ C灭活,同组血清混匀分装,-80 $^{\circ}$ C保存,备用。

1.5 颗粒细胞的制备 15只雌性大鼠连续观察2个动情周期均正常。建立COH模型,在注射HCG后1.5 h颈椎脱臼处死。无菌条件下快速取出大鼠双侧卵巢,置入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂过夜预热的M199培养液中,转移至解剖显微镜下37 $^{\circ}$ C恒温板上,M199培养液中洗3次。解剖显微镜下,用镊子轻轻撕开形态明显的卵泡的卵泡膜,使卵泡内的颗粒细胞释放到培养液中。加入0.1%透明质酸酶消化液,置于CO₂孵箱中,5 min后取出,用移液器轻轻吹打使其分散为单个细胞,加入10%胎

牛血清培养液以中和透明质酸酶的作用从而中止消化。经一次性的200目细胞筛过滤后,以1 000 r/min(离心半径16 cm)离心5 min,弃去培养液。M199培养液洗2次,再次加入适量的M199培养液重悬颗粒细胞,移液器轻柔抽吸使颗粒细胞重悬。用台盼蓝染色并计数,细胞存活率>85%,再加入含M199培养液调至 1×10^6 个/mL。

1.6 颗粒细胞的培养 将颗粒细胞随机种入事先用0.05% L-多聚赖氨酸均匀涂抹过的6孔板中,随机分为5组:空白血清组、含药血清组、含药血清+SB203580组、含药血清+PDTC组、含药血清+SB203580+PDTC组。每孔2.5 mL,包含M199培养液89%体积,青-链霉素双抗1%体积,大鼠血清10%体积[上述各组分别对应加入空白血清(COH组大鼠血清)、含药血清(COH+中药组大鼠血清)、含药血清+p38MAPK抑制剂SB203580(按说明书1:1 000稀释度,即浓度10 μ mol/mL,SB203580试剂浓度10 mol/L,添加体积2.5 μ L)、含药血清+NF- κ B抑制剂PDTC(按说明书1:1 000稀释度,即浓度10 μ mol/mL,PDTC试剂浓度10 mmol/mL,添加体积2.5 μ L)、含药血清+SB203580+PDTC(添加浓度及体积同上)],于CO₂孵箱中继续培养24 h后,收集颗粒细胞用于后续检测。

1.7 qRT-PCR法检测卵巢颗粒细胞中p38MAPK、酪蛋白激酶2(CK2)、核因子 κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、NF- κ B、GDF9 mRNA的表达 按qPCR试剂盒说明书进行操作。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列见表1。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C、10 min预变性;95 $^{\circ}$ C、10 s退火,55 $^{\circ}$ C、20 s变性,72 $^{\circ}$ C、35 s延伸,40个循环。循环结束后从55 $^{\circ}$ C升高到95 $^{\circ}$ C获取溶解曲线。以GAPDH进行参照,应用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算p38MAPK、CK2、I κ B α 、NF- κ B、GDF9 mRNA的相对表达量。

1.8 Western Blot法检测颗粒细胞中GDF9蛋白的表达 提取颗粒细胞总蛋白,用二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒测定蛋白水平后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),蛋白质聚偏氟乙烯(PVDF)膜上转膜,添加兔多克隆GDF9一抗(1:5 000稀释度)及山羊抗兔IgG(H+L)二抗(1:20 000稀释度),添加发光液,显影,ImageJ软件处理系统分析目的蛋白及内参GAPDH灰度值。

1.9 TUNEL法检测卵巢颗粒细胞凋亡率 TUNEL

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	扩增长度/bp
GAPDH	上游: GCAAGGATACTGAGAGCAAGAG	98
	下游: GGATGGAATTGTGAGGGAGATG	
p38MAPK	上游: CCAGCTAAGAAAAGCTGCAAAC	101
	下游: GGCTGTCTAATGACCCTATT	
CK2	上游: CCGCGGACATAAAGATGAGTAG	98
	下游: GTCTTCATCCACCTCACAGAAG	
I κ B α	上游: CCTTCCTCAACTCCAGAACAA	105
	下游: GATCACAGCCAGCTTTCAGA	
NF- κ B	上游: CATGCGTTTCCGTTACAAGTG	111
	下游: CCCGTGTAGCCATTGATCTT	
GDF9	上游: GTTCTCTCTGATAGCGGAAGTG	127
	下游: GGTGACTTCTGCTGGGTTTA	

检测操作按试剂盒说明书进行,荧光镜下观察,每张封片随机挑选5个200倍视野拍照,用ImageJ软件处理系统分析颗粒细胞凋亡率。

1.10 统计方法 采用SPSS 26.0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。方差齐性检验采用Levene法,多组间比较采用单因素方差分析。组间两两比较采用LSD检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠卵巢颗粒细胞p38MAPK、CK2、I κ B α 、NF- κ B的mRNA表达比较 含药血清组的p38MAPK表达水平显著低于空白血清组($P < 0.05$);含药血清组NF- κ B mRNA表达水平低于空白血清组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);含药血清组I κ B α 、CK2 mRNA表达水平均显著高于空白血清组(均 $P < 0.05$)。见表2。

2.2 各组大鼠卵巢颗粒细胞GDF9 mRNA和蛋白表达比较 各组GDF9 mRNA的表达水平:含药血清组>空白血清组>含药血清+PDTC组>含药血清+SB203580组>含药血清+SB203580+PDTC组。其中:含药血清+SB203580组和含药血清+PDTC组比较,空白血清组和含药血清+PDTC组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);其余各组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组GDF9蛋白的表达水平:含药血清组>含药血清+PDTC组>含药血清+SB203580组>空白血清组>含药血清+

表2 两组大鼠卵巢颗粒细胞p38MAPK、CK2、IκBα、NF-κB mRNA相对表达水平比较

Table 2 Comparison of mRNA relative expressions of p38MAPK, CK2, IκBα and NF-κB in ovarian granulosa cells between the two groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	复孔数/个	p38MAPK	CK2	IκBα	NF-κB
空白血清组	3	1.000 ± 0.053	1.003 ± 0.101	1.000 ± 0.035	1.003 ± 0.140
含药血清组	3	0.777 ± 0.075 ^①	1.993 ± 0.369 ^①	1.920 ± 0.266 ^①	0.817 ± 0.031
<i>t</i> 值		4.212	-4.482	-5.934	2.249
<i>P</i> 值		0.014	0.011	0.004	0.088

注: ① $P < 0.05$, 与空白血清组比较

SB203580+PDTC组。其中: 含药血清+SB203580组与含药血清+PDTC组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 其余各组间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表3、图1。

2.3 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率比较 TUNEL染色后, 荧光镜下细胞核呈现蓝色荧光的为正常细胞, 呈现绿色荧光的为凋亡细胞。空白血清组呈现绿色荧光的细胞多, 中药血清组呈现绿色荧

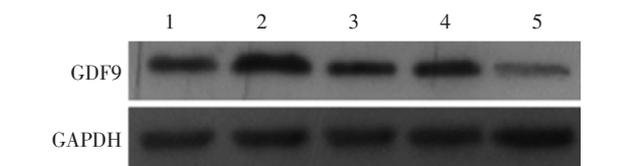
光的细胞少, 加入抑制剂后呈现绿色荧光的细胞不同程度增多。各组卵巢颗粒细胞凋亡率: 含药血清组 < 含药血清+PDTC组 < 含药血清+SB203580组 < 含药血清+SB203580+PDTC组 < 空白血清组。其中: 含药血清+SB203580组和含药血清+PDTC组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 其余各组间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表4、图2。

表3 各组大鼠卵巢颗粒细胞GDF9 mRNA和蛋白相对表达水平

Table 3 Comparison of mRNA and protein relative expressions of GDF9 in ovarian granulosa cells among various groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	复孔数/个	GDF9 mRNA	GDF9蛋白
空白血清组	3	1.010 ± 0.168	0.666 ± 0.012
含药血清组	3	1.987 ± 0.304 ^①	0.991 ± 0.012 ^①
含药血清+SB203580组	3	0.573 ± 0.067 ^{①②}	0.690 ± 0.008 ^{①②}
含药血清+PDTC组	3	0.817 ± 0.126 ^②	0.693 ± 0.007 ^{①②}
含药血清+SB203580+PDTC组	3	0.257 ± 0.047 ^{①②③④}	0.333 ± 0.006 ^{①②③④}
<i>F</i> 值		45.031	1 789.369
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001

注: ① $P < 0.05$, 与空白血清组比较; ② $P < 0.05$, 与含药血清组比较; ③ $P < 0.05$, 与含药血清+SB203580组比较; ④ $P < 0.05$, 与含药血清+PDTC组比较



注: 1. 空白血清组; 2. 含药血清组; 3. 含药血清+SB203580组; 4. 含药血清+PDTC组; 5. 含药血清+SB203580+PDTC组

图1 各组大鼠卵巢颗粒细胞GDF9蛋白表达的Western Blot条带

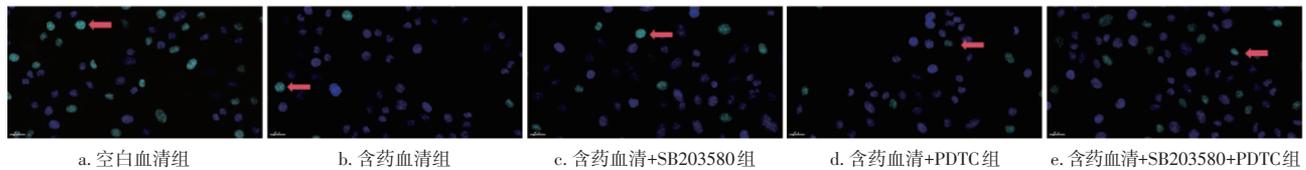
Figure 1 Western Blot bands of GDF9 protein expression in ovarian granulosa cells in each group of rats

表4 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率比较

Table 4 Comparison of the apoptosis index of ovarian granulosa cells among various groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	复孔数/个	凋亡率/%
空白血清组	5	42.818 ± 1.290
含药血清组	5	5.878 ± 0.823 ^①
含药血清+SB203580组	5	15.124 ± 0.328 ^{①②}
含药血清+PDTC组	5	14.156 ± 1.885 ^{①②}
含药血清+SB203580+PDTC组	5	23.842 ± 1.075 ^{①②③④}
<i>F</i> 值		691.419
<i>P</i> 值		< 0.001

注: ① $P < 0.05$, 与空白血清组比较; ② $P < 0.05$, 与含药血清组比较; ③ $P < 0.05$, 与含药血清+SB203580组比较; ④ $P < 0.05$, 与含药血清+PDTC组比较



注：红色箭头所指为呈现绿色荧光的凋亡细胞

图2 各组大鼠卵巢颗粒细胞凋亡比较(DAPI染色, ×200)

Figure 2 Comparison of ovarian granulosa cells apoptosis among various groups of rats (DAPI staining, ×200)

3 讨论

中医药在体外受精-胚胎移植(IVF-ET)周期中的应用收效明显,已被越来越多的临床医生及患者所接受。中医对不孕的治疗多以益气血、补肝肾为主。本研究所用具有益气血作用的经后增殖方,是由经典方八珍汤(党参、白术、茯苓、甘草、熟地黄、当归、白芍、川芎)加山萸肉、菟丝子、鹿角霜、杜仲、川椒组成。全方补益气血、温肾助阳,契合了不孕症多肝肾气血亏虚的特点。本课题组前期临床研究发现,本方能提高人体内雌激素分泌的水平,促进卵泡发育,提高胚胎的着床潜能及种植率^[1-2]。本课题组开展的多项研究证实,益气血法能提高卵母细胞分泌GDF9的水平,并维持Bim低表达水平,促进颗粒细胞的增殖,抑制其凋亡,从而促进卵丘-卵母细胞复合体的发育,提高控制性超排卵(COH)卵泡和胚胎质量^[7-11]。因此,在前期的研究基础上,本研究进一步探讨益气血法在调节GDF9分泌及颗粒细胞凋亡过程中的作用机制。

p38MAPK/NF-κB通路在细胞生长发育及细胞凋亡过程中具有重要的调节作用^[12-13]。p38MAPK是丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族成员之一。有研究在DNA损伤细胞中发现,活化的p38MAPK能控制多种转录因子mRNA表达的活性,在细胞因子产生、遗传物质基因转录、基因翻译和细胞生长发育、细胞凋亡过程中均起到重要作用^[14-15]。在生殖系统中,睾丸和卵巢中主要有p38δ亚型的表达^[16]。NF-κB是重要的核转录调节因子,参与机体器官发育、组织损伤、免疫应答、细胞凋亡等多种生物学功能的调节^[17],在生殖方面,参与卵细胞生长及胚胎发育等过程中与凋亡相关基因的表达和调控^[18]。有研究在DNA损伤的细胞中发现,p38MAPK能激活CK2,使IκBα发生磷酸化反应,继而激活NF-κB^[14]。

GDF9是转化生长因子β(TGF-β)超家族成员,是卵母细胞分泌的生长因子。GDF9调控卵母细胞中颗粒细胞的增殖、分化,调节卵母细胞的发育、排卵及黄素化^[19-20],是卵泡生长发育的重要调节因子。有研究^[21]表明,多囊卵巢综合征患者卵巢腔前卵泡中GDF9的表达明显低于正常卵巢,可导致早期卵泡发育异常。而GDF9敲除的新生小鼠始基卵泡池规模几乎不受影响,但始基卵泡消耗快,基因组测序结果提示GDF9与早发性卵巢功能不全相关^[22]。

本研究结果显示,经后增殖方含药血清可提高COH大鼠卵巢颗粒细胞GDF9的表达,分别单独阻断p38MAPK和NF-κB通路均能减弱该作用,使GDF9的表达水平下降,而同时阻断p38MAPK和NF-κB通路使COH大鼠卵巢颗粒细胞GDF9的表达水平进一步下降,且远低于单独阻断p38MAPK或NF-κB通路。经后增殖方含药血清可抑制COH大鼠卵巢颗粒细胞的凋亡,p38MAPK或NF-κB通路的阻断能减弱该作用,使COH大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率增加,而同时阻断p38MAPK或NF-κB通路使COH大鼠卵巢颗粒细胞凋亡率进一步升高,且远高于单独阻断p38MAPK或NF-κB通路。提示益气血法调节GDF9分泌及颗粒细胞凋亡的机制可能与p38MAPK通路或/和NF-κB通路有关。

综上所述,益气血法经后增殖方对COH大鼠卵巢颗粒细胞GDF9表达的促进作用和对卵巢颗粒细胞凋亡的抑制作用,可能是与p38MAPK通路或/和NF-κB通路双信号通路基因表达有关。

参考文献:

- [1] 谭新, 赵彦鹏, 张金玉, 等. 益气血补肝肾中药对辅助生殖技术胚胎质量的影响[J]. 实用医学杂志, 2013(22): 3761-3763.
- [2] 邓伟民, 赵彦鹏, 葛明晓, 等. 益气血补肝肾中药对体外受精-胚胎移植临床结局的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,

- 2011, 13(6): 5-7.
- [3] 付靖波, 张红霞, 朱海英. 颗粒细胞凋亡调控机制及其在卵泡发育中的作用[J]. 中国临床医学, 2020, 27(5): 857-860.
- [4] LI W D, ZANG C J, YIN S, et al. Metformin protects against mouse oocyte apoptosis defects induced by arecoline [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(7): e12809.
- [5] LIÑÁN A, LAWRENZ B, EL KHATIB I, et al. Clinical reassessment of human embryo ploidy status between cleavage and blastocyst stage by next generation sequencing [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e201652.
- [6] 王晓雪, 刘晰梦, 方振宇, 等. 猪卵巢颗粒细胞和黄体细胞凋亡的调控机制研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(9): 93-97.
- [7] 杨贞. 益气血法通过调节GDF9分泌对大鼠超排卵卵丘细胞凋亡的影响及其作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [8] 杨贞, 郭新宇, 刘佳子, 等. 经后增殖方含药血清对超排卵大鼠卵巢COCs及CCs中GDF9与Bim表达的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(35): 4908-4911, 4916.
- [9] 杨贞, 郭新宇, 邓伟民, 等. 益气血法对超排卵大鼠卵巢颗粒细胞凋亡及Bim表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(10): 1593-1596.
- [10] 杨贞, 郭新宇, 李海霞, 等. 益气血法对超排卵小鼠卵巢颗粒细胞Bcl-2、Bax、Caspase3表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(13): 2105-2108.
- [11] 陈艳婷. 经后增殖方对超排卵大鼠卵巢颗粒细胞Fas通路的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [12] 沈稼轩, 宋渊, 张团庄, 等. 消肿止痛合剂对血管内皮细胞凋亡及p38MAPK-PPAR γ /NF- κ B信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(6): 1290-1293.
- [13] 高月彩, 王旭, 刘荣格, 等. 黄芪甲苷调控p38 MAPK/NF- κ B信号通路改善甲亢大鼠细胞凋亡的机制[J]. 河北医学, 2023, 29(5): 726-732.
- [14] CAI Q H, TANG Y, FAN S H, et al. In vivo effects of dexmedetomidine on immune function and tumor growth in rats with ovarian cancer through inhibiting the p38MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1830-1837.
- [15] JIN J, MA Y, TONG X, et al. Metformin inhibits testosterone-induced endoplasmic reticulum stress in ovarian granulosa cells via inactivation of p38MAPK [J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(5): 1145-1158.
- [16] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [17] JAYASOORIYA R G, MOON D O, PARK S R, et al. Combined treatment with verrucarin A and tumor necrosis factor- α sensitizes apoptosis by overexpression of nuclear factor- κ B-mediated Fas [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(2): 303-310.
- [18] ZHANG C, GONG P, YE Y, et al. NF- κ B-vimentin is involved in steroidogenesis stimulated by mono-butyl phthalate in primary cultured ovarian granulosa cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 45(Pt 1): 25-30.
- [19] CHEN H, LIU C, JIANG H, et al. Regulatory role of miRNA-375 in expression of BMP15/GDF9 receptors and its effect on proliferation and apoptosis of bovine cumulus cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(2): 439-450.
- [20] LI Y, LI R Q, OU S B, et al. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12: 81.
- [21] ROSETTI R, FERRARI I, BESTETTI I, et al. Fundamental role of BMP15 in human ovarian folliculogenesis revealed by null and missense mutations associated with primary ovarian insufficiency [J]. *Hum Mutat*, 2020, 41(5): 983-997.
- [22] NORLING A, HIRSCHBERG A L, RODRIGUEZ-WALLBERG K A, et al. Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high-resolution array comparative genomic hybridization platform [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(8): 1818-1827.

【责任编辑: 侯丽颖】