

更年期汤含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

曹俊岩¹, 张帆^{2*}, 曾莉², 罗德毅², 张丽²

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550001

2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550001

摘要: **目的** 研究更年期汤对围绝经期模型大鼠颗粒细胞磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) /哺乳动物雷帕霉素蛋白 (mTOR) 信号通路的影响。**方法** 10~14 月龄雌性 SD 大鼠 150 只, 筛选出围绝经期模型大鼠, 随机分为模型组、替勃龙组 (0.22 mg/kg) 和更年期汤低、中、高剂量 (1.0、2.0、4.0 g/kg) 组, 连续 ig 给药 15 d, 1 次/d, 第 15 天后采血, 制备大鼠含药血清; 3~4 月龄雌性 SD 大鼠 120 只, 筛选出动情前期老鼠, 剔出卵巢行体外颗粒细胞原代培养, 分别用各组含药血清培养液培养颗粒细胞, 72~120 h 后用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测颗粒细胞中 PI3K、Akt、mTOR、生长分化因子 9 (GDF9)、翼状螺旋转录因子 2 (FOXL2) mRNA 表达水平; Western blotting 法检测 PI3K、Akt、mTOR、GDF9、FOXL2 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 替勃龙组和更年期汤各剂量组卵巢颗粒细胞中 PI3K、mTOR mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), Akt mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), GDF9、FOXL2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 更年期汤含药血清在临床剂量上可提高卵巢颗粒细胞 PI3K、mTOR 的表达, 抑制 Akt 及其下游的 GDF9、FOXL2 表达, 从而推测更年期汤可调节卵泡的生长发育, 抑制卵泡闭锁、改善卵巢功能。

关键词: PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 颗粒细胞; 更年期汤; 围绝经期; 生长分化因子 9; 翼状螺旋转录因子 2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)08-2200-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.029

Effect of drug-containing serum of Gengnian Decoction on signal pathway of PI3K/Akt/mTOR in oval cells of rats

CAO Jun-yan¹, ZHANG Fan², ZENG Li², LUO De-yi², ZHANG Li²

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

2. Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

Abstract: **Objective** To study the effect of Gengnian Decoction on rat granulocyte in the signal pathway of PI3K/Akt/mTOR of perimenopausal model. **Methods** A total of 150 female SD rats aged from 10 to 14 months were screened out of the perimenopausal model rats and randomly divided into five groups: model group, tibolone group and Gengnian Decoction low, medium and high dose groups, continuous stomach ig administration for 15 d, once daily. The blood was collected to prepare the rat serum containing drugs 15 d later; A total of 120 female SD rats aged from 3 to 4 months were screened for pro-estrus mice, and ovarian granulosa cells were cultured *in vitro*; Granular cells were cultured with drug-containing serum of each group. After 72—120 h, mRNA and protein expression of PI3K, Akt, mTOR, GDF9, and FOXL2 levels were detected by qRT-PCR, and Western blotting, respectively. **Results** Compared with the model group, the mRNA and protein expression levels of PI3K and mTOR in ovarian granulosa cells of tibolone group and dose decoction groups were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), while the expression levels of Akt mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), the mRNA and protein expression levels of GDF9 and Foxl2 were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Gengnian Decoction serum can increase the expression of PI3K and mTOR in ovarian granulosa cells and inhibit the expression of Akt and its downstream GDF9 and Foxl2, so it was predicted that Gengnian Decoction can regulate the growth and development of ovarian follicles, inhibit follicles latching, and improve ovarian function.

Key words: PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; granulosa cells; Gengnian Decoction; peri-menopause; GDF9; FOXL2

收稿日期: 2019-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的补肾温阳祛风散寒法对肾虚模型大鼠卵巢功能的保护机制研究 (81560786); 贵州省科技基金: 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的补肾温阳祛风散寒法对肾虚模型大鼠卵巢功能的保护机制研究 (黔科合 LH 字 [2015] 7225 号)

作者简介: 曹俊岩 (1978—), 女, 山西文水人, 副教授, 博士, 研究方向为中医药调节女性生殖轴及妇科痛证研究。E-mail: 517261913@qq.com

***通信作者** 张帆 (1960—), 女, 主任医师, 学士, 博士生导师, 研究方向为中西医结合女性生殖内分泌疾病的基础和临床研究。

随着人口老龄化问题的日趋严重, 绝经综合征患病人数呈逐年增长趋势^[1]。中医药对该病的治疗有独特的疗效。前期研究^[2-10]发现更年汤能改善肾阳虚型及阴阳两虚型绝经前后诸症的临床症状。实验研究发现该方可以提高大鼠肾阳虚型围绝经期大鼠模型的骨密度, 对卵巢功能也具有一定的保护和改善作用。本实验在前期工作的基础上以调控细胞的生长、增殖、凋亡等过程的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路为切入点, 研究更年汤对模型大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的调控机制, 进一步阐明该方对促卵泡发育、抑制卵泡闭锁和扩张及对改善卵巢功能的影响, 以期解决中药调控及延缓卵巢功能衰退的关键问题。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠, 10~14 月龄 [150 只, 体质量 (300±50) g]、3~4 月龄 [120 只, 体质量 (200±50) g]^[11], 由中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (军) 2012-0011。在贵州中医药大学实验动物中心分笼适应性喂养 1 周, 喂养期间明暗周期为光照、无光照各 12 h, 自由饮水摄食, 室温控制在 22~25 °C, 湿度 70%。

1.2 药品

更年汤: 仙茅、仙灵脾、巴戟天、女贞子、墨旱莲、桑寄生、熟地、淮山、枣皮各 12 g, 当归 10 g, 桂枝、独活、防风各 9 g, 炙甘草 6 g, 细辛 3 g。上述处方中药均由贵州中医药大学第二附属医院住院部中药房提供, 按照所需浓度煎制而成, 保存于 4 °C 冰箱备用。药材经贵州中医药大学第二附属医院药学部韩云霞主任鉴定符合《中国药典》2015 年版标准。替勃龙 (2.5 mg/片, 批号 H20130027, N. V. Organon 公司)。0.9%氯化钠注射液, 贵州科伦药业有限公司。

1.3 试剂与仪器

HE 染色试剂盒、BCA 浓度测定试剂盒均购自 Solarbio 公司; 磷酸缓冲液 (PBS)、胎牛血清、青-链霉素均购自 Biological Industries 公司; 磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、哺乳动物雷帕霉素蛋白 (mTOR)、生长分化因子 9 (GDF9) 抗体均购自 Abcam 公司; DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司); 二抗、RNA 提取试剂盒购自 Bioworld 公司; 转录试剂盒 (TaKaRa 公司); 卵泡刺激素受体 (FSHR) 抗体 (上海英潍贸易有限公司); 翼状螺

转转录因子 2 (FOXL2) 抗体 (Proteintech 公司)。

Lab-Tell 腔室载玻片、II 级 A2 型生物安全柜、高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); IX71 倒置荧光显微镜、BX-53 生物显微镜 (奥林巴斯有限公司); CFX96 96 孔快速 PCR 仪、荧光定量 PCR 仪 (伯乐生命医学产品有限公司); LED2500 解剖显微镜 (Leica 公司); 3131 细胞培养箱 (Thermo 公司); ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 完全培养基配制

2.1.1 含胎牛血清完全培养基 根据前期预试验结果, 按照 20%胎牛血清+79% DMEM/F12 培养基+1%青-链霉素配制。

2.1.2 含药血清完全培养基 根据前期预试验及参照文献方法^[12-13], 按照 10%含药血清+89% DMEM/F12 培养基+1%青链霉素配制。

2.2 模型制备

大鼠阴道脱落细胞涂片观察筛选出动情周期紊乱, 主要表现为动情后期和动情期的延长^[2], 即为绝经期模型大鼠。

2.3 分组与给药

将绝经期模型大鼠随机分为 5 组, 每组 30 只, 分别为模型组, 更年汤低、中、高剂量组和阳性药替勃龙组。

各组大鼠于每日 18:00 时 ig 给药, 给药剂量按人体与鼠体表面积换算^[14], 换算后更年汤低、中、高剂量组给药剂量分别为 1.0、2.0、4.0 g/kg (以生药量计), 替勃龙组为 0.22 mg/kg。模型组大鼠 ig 给予 10 mL/kg 生理盐水。1 次/d, 连续给药 15 d。

2.4 更年汤含药血清制备与灭活

给药第 15 天, 大鼠禁食 12 h 后 ig 给药, 1 h 后^[15]各组大鼠 ip 10%水合氯醛 0.04 mL/10 g^[16]麻醉, 双侧股动脉采血。收集血清, 37 °C 水浴 15 min^[17]灭活补体后, 0.22 μm 微孔滤器滤过除菌, 分装于 1.5 mL EP 管内, 冻存于-80 °C 冷藏箱备用。

2.5 大鼠卵巢颗粒细胞分离与原代培养

通过阴道脱落细胞观察, 筛选处于动情前期 3~4 月 SD 雌性大鼠, 经脱颈椎处死后, 迅速放入盛有乙醇的玻璃烧杯浸泡 10 min 后放入超净工作台, 无菌条件下取出大鼠双侧卵巢; 放入含有双抗的预冷 PBS 液的培养皿中; 反复冲洗 3 次, 以去除

血块及卵巢周围脂肪组织；在解剖显微镜下，用眼科剪剪去卵巢组织上包膜及周围脂肪，将卵巢放入盛有 DMEM/F12 培养液中。

解剖显微镜下，使用 1 mL 注射器刺破卵巢表面饱满的卵泡，使颗粒细胞充分释放入培养基中，用细胞筛滤过卵巢收集卵泡液及颗粒细胞，滤过后组织加入 2 倍体积的 0.25% 胰酶，在二氧化碳培养箱中消化 35 min，细胞筛滤过后，将液体吸到无菌离心管中；2 500 r/min 离心 10 min，倒掉上清液，在离心管中加入 3~5 mL 培养基(79%DMEM/F12+1% 双抗+20%胎牛血清)，反复吹打抽吸(动作轻柔，避免产生气泡损伤细胞)，制备成细胞悬液，将悬浮细胞液吸入 20 cm² 培养瓶中，放入 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 备用。

2.6 大鼠卵巢颗粒细胞鉴定

取贴壁生长旺盛 72 h 后的颗粒细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化后 1 500 r/min 离心 10 min，弃上清，收集颗粒细胞，加入完全培养基后混悬直接计数，调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL 种植于 Lab-Tell 腔室载玻片，放入培养箱继续培养。当细胞生长至 70% 时取出玻片，进行 FSHR 特异性染色，鉴定卵巢颗粒细胞。

2.7 细胞分组与及相应含药血清培养

将培养 48 h 贴壁生长的颗粒细胞在各自培养瓶(20 cm²) 上标记更年汤高、中、低剂量组和替勃龙组、模型组，倒掉培养基，加入 PBS 冲洗 2 次，1 次 30 s，吸出 PBS 缓冲液，待细胞长满达瓶 80% 以上，分别加入提前配好的更年汤高、中、低剂量组和替勃龙组、模型组含药血清(79%DMEM/F12+1% 双抗+20%血清)，放置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 收集检测。

2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR、GDF9、FOX L2 mRNA 表达

收集含药血清培养后的颗粒细胞，严格按照超纯 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，测定总 RNA 量，逆转录成 cDNA，配制 qRT-PCR 反应体系，引物系列见表 1。以逆转录成 cDNA 为模板，置于 PCR 仪上进行 qRT-PCR 反应，反应程序为预变性 95 ℃、5 min，变性 95 ℃、5 s，退火/延伸 60 ℃、30 s，40 个循环，熔解曲线阶段 95 ℃、10 s，60 ℃、30 s，97 ℃、1 s，冷却 37 ℃、30 s，采用 2^{-ΔΔC_t} 测定 mRNA 相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers of qRT-PCR

基因名称	引物序列 (5'→3')
Akt	正向: CACTGTGTTGGCGTACAGGT
	反向: TCATCACCATTGGCAATGAG
PI3K	正向: CATCACTTCCTCCTGCTCTAT
	反向: CAGTTGTTGGCAATCTTCTTC
mTOR	正向: CGCTGTCACTCCCTTTATCG
	反向: ATGCTCAAACACCTCCACC
FOX L2	正向: CGTGAGAGTGTCTAACGGGAG
	反向: TCGCTTCTTCCATATCTCGGC
GDF9	正向: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC
	反向: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

2.9 Western blotting 检测大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR、GDF9、FOX L2 蛋白表达

收集含药血清培养后的颗粒细胞，加入蛋白裂解液裂解，收集上清液，采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量检测。取 50 ug 蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳，分离蛋白，转印于醋酸纤维素膜上，加入 PI3K、Akt、mTOR (1:1 000) 和 GDF9、FOX L2 (1:2 000) 一抗摇床上室温孵育过夜，TBST 摇床上洗涤。放入稀释的二抗(1:5 000)溶液中，置于摇床上孵育 1.5 h，TBST 漂洗。用 ECL 显影，放入 Bio-Rad 的 CD Touch 凝胶成像仪中进行电化学发光显影。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布，组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析，方差齐性时，组间比较采用 LSD，方差不齐时采用 Tamhane's 检验。若不服从正态分布，采用 Wilcoxon 秩和检验。

3 结果

3.1 细胞鉴定结果

刚分离出的颗粒细胞呈圆形小颗粒样(图 1, 0 h)；培养 24 h 后颗粒细胞呈单层贴壁生长，并长出突触；48 h 贴壁细胞逐渐增多，细胞突触相互衔接，细胞浆内含颗粒；72~96 h 后，细胞核大而圆，呈长梭状，聚集生长。

3.2 更年汤对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达的影响

与模型组比较，替勃龙组和更年汤各剂量组卵巢颗粒细胞中 PI3K、mTOR mRNA 表达水平均显著升

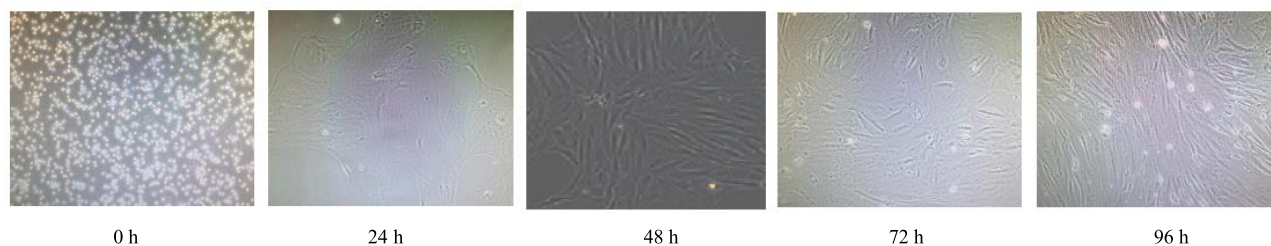


图 1 卵巢颗粒细胞形态 (×40)

Fig. 1 Morphology of ovarian granulosa cells (×40)

高 ($P<0.01$), Akt mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$), 更年汤中剂量组、替勃龙组与更年汤低剂量组、高剂量组两两比较差异显著 ($P<0.01$), 更年汤中剂量组与替勃龙组无明显差异, 更年汤低剂量组与高剂量组无差异。见表 2。

3.3 更年汤对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达的影响

与模型组比较, 替勃龙组和更年汤低、中、高剂量组卵巢颗粒细胞中 PI3K、mTOR 蛋白表达水平

均升高 ($P<0.05$ 、 0.01), Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 其中更年汤中剂量组、替勃龙组与更年汤低剂量组、高剂量组两两比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 更年汤中剂量组与替勃龙组间无明显差异, 更年汤低剂量组与高剂量组无差异。见图 2 和表 3。

3.4 更年汤对大鼠卵巢颗粒细胞 GDF9、FOXL2 mRNA 表达的影响

与模型组比较, 替勃龙组和更年汤各剂量组卵巢颗粒细胞中 GDF9、FOXL2 mRNA 表达水平均显

表 2 更年汤对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Gengnian Decoction on mRNA expression of PI3K, AKT and mTOR in rat ovarian granulosa cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		PI3K	Akt	mTOR
模型	—	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
替勃龙	0.000 22	1.521±0.176**	0.589±0.049**	1.334±0.103**
更年汤	1.0	1.179±0.104***	0.870±0.136***	1.139±0.101***
	2.0	1.544±0.036***☆	0.613±0.106***☆	1.420±0.138***☆
	4.0	1.261±0.030***△△	0.814±0.137***△△	1.212±0.106***△△

与模型组比较: ** $P<0.01$; 与替勃龙组比较: *** $P<0.01$; 与更年汤 1.0 g·kg⁻¹ 组比较: ☆ $P<0.01$; 与更年汤 2.0 g·kg⁻¹ 组比较: △△ $P<0.01$, 表 4 同

** $P<0.01$ vs model group; *** $P<0.01$ vs tibolone group; ☆ $P<0.01$ vs Gengnian Decoction 1.0 g·kg⁻¹ group; △△ $P<0.01$ vs Gengnian Decoction 2.0 g·kg⁻¹ group, same as table 4

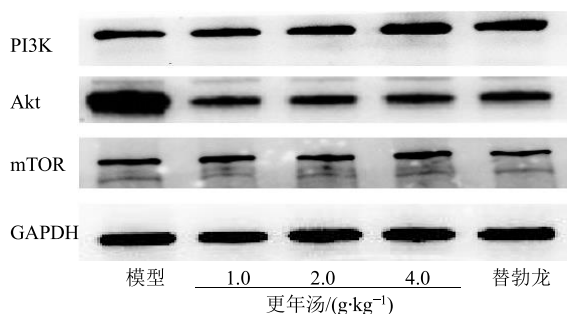


图 2 更年汤对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Gengnian Decoction on expression of PI3K, Akt and mTOR protein in rat ovarian granulosa cells

著降低 ($P<0.01$), 更年汤中剂量组、替勃龙组与更年汤低、高剂量组两两比较差异显著 ($P<0.01$), 但更年汤低、高剂量组比较差异不显著, 替勃龙组与更年汤中剂量组比较差异不显著, 见表 4。

3.5 更年汤对大鼠卵巢颗粒细胞 GDF9、FOXL2 蛋白表达的影响

与模型组比较, 更年汤各剂量组及替勃龙组卵巢颗粒细胞中 GDF9、FOXL2 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$), 更年汤中剂量组、替勃龙组与更年汤低、高剂量组两两比较差异显著 ($P<0.01$), 但更年汤低、高剂量组比较差异不显著, 替勃龙组与更年汤中剂量组比较差异不显著, 见图 3 和表 4。

表 3 更年期汤对大鼠卵巢颗粒细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Effect of Gengnian Decoction on expression of PI3K, Akt and mTOR protein in rat ovarian granulosa cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		PI3K	Akt	mTOR
模型	—	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
替勃龙	0.000 22	2.325±0.151**	0.305±0.191**	2.098±0.024**
更年期汤	1.0	1.242±0.091***	0.813±0.138***	1.348±0.101***
	2.0	2.351±0.157***☆	0.379±0.202***☆	2.118±0.202***☆
	4.0	1.253±0.065***△△	0.789±0.190***△△	1.801±0.124***△△

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与替勃龙组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与更年期汤 1.0 g·kg⁻¹ 组比较: ☆ $P < 0.01$; 与更年期汤 2.0 g·kg⁻¹ 组比较: △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs tibolone group; ☆ $P < 0.01$ vs Gengnian Decoction 1.0 g·kg⁻¹ group; △△ $P < 0.01$ vs Gengnian Decoction 2.0 g·kg⁻¹ group

表 4 更年期汤对大鼠卵巢颗粒细胞 GDF9、FOXL2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Effect of Gengnian Decoction on mRNA and protein expression of GDF9 and FOXL2 in rat ovarian granulosa cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		蛋白相对表达量	
		GDF9	FOXL2	GDF9	FOXL2
对照	—	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
替勃龙	0.000 22	0.384±0.137**	0.341±0.314**	0.216±0.108**	0.325±0.193**
更年期汤	1.0	0.898±0.231***	0.891±0.040***	0.883±0.045***	0.874±0.115***
	2.0	0.418±0.114***☆	0.446±0.258***☆	0.266±0.106***☆	0.401±0.145***☆
	4.0	0.824±0.208***△△	0.794±0.190***△△	0.843±0.074***△△	0.823±0.156***△△

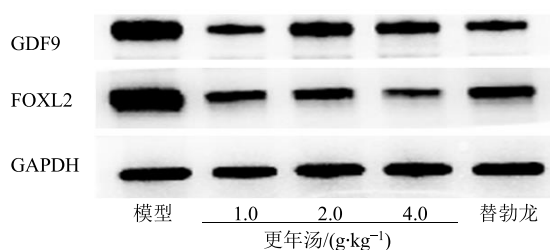


图 3 更年期汤对大鼠卵巢颗粒细胞 GDF9、FOXL2 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Gengnian Decoction on protein expression of GDF9 and FOXL2 in rat ovarian granulosa cells

4 讨论

中医学认为肾虚是衰老的主要原因, 补肾滋阴壮阳是治疗围绝经期综合征的根本方法。肾阳虚衰时, 虚寒内生使阳气不达于外, 从而使机体功能失衡, 表现出一系列内寒症状。阳气不足, 肾气的产生、气化、运动失常, 可影响全身气机, 气机不畅则使全身经脉气血受阻, 肾阳虚衰, 虚寒闭络, 经络受寒阻滞, 运化不畅, 阳气运行受阻而不固于外, 加之贵州地处高原寒湿地域, 外寒易侵, 故有内寒与外寒共见之症。故认为肾阳虚及肾阴阳两虚型绝

经前后诸症的基本病因是肾虚是本, 经络闭阻为标, 根据病因提出“补肾温阳, 祛风散寒、通络共用”的治疗理念, 从而创立自拟方更年期汤用于临床。本方可温补肾阳、滋养肾阴, 又可祛散风寒、疏通经络、调畅气机, 从而能明显改善绝经前后肾阳虚及肾阴阳两虚所导致的经行量多, 经色暗淡, 精神萎靡, 腰背冷痛, 小便清长等内寒及外寒诸症。并且在前期研究中取得较为满意的疗效^[2-3]。前期研究发现更年期汤能提高大鼠血清中的雌二醇 (E₂) 水平, 加强卵巢对下丘脑的正负反馈作用, 从而对大鼠血清中的黄体生成素 (LH)、卵泡刺激素 (FSH)、促性腺激素释放激素 (GnRH) 水平进行干预^[4]。改善肾阳虚型及阴阳两虚型绝经前后诸症的临床症状^[3,5-7]。并通过实验研究, 更年期汤可以提高大鼠模型的骨密度^[8]; 能调节肾阳虚型围绝经期大鼠模型的激素水平, 降低大鼠卵巢组织颗粒细胞中 Bax 及其受体的阳性表达, 最终能抑制模型大鼠卵巢组织中颗粒细胞的凋亡^[9]; 能促进卵泡发育, 抑制卵泡闭锁和扩张, 上调卵巢颗粒细胞抑制凋亡因子 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达水平, 抑制促凋亡因子

bax mRNA 和蛋白的表达^[10]。以上研究表明更年汤对肾阳虚型围绝经期模型大鼠的卵巢功能具有一定的保护和改善作用。

更年汤由二仙汤、二至丸及独活寄生汤化裁而成, 包含仙茅、仙灵脾、巴戟天、女贞子、墨旱莲、桑寄生、熟地、淮山、枣皮各 12 g, 当归 10 g, 桂枝、防风、独活各 9 g, 炙甘草 6 g、细辛 3 g, 共计 15 味药物, 功效为补肾温阳、祛散风寒。方中仙茅、熟地为君药, 补肾精、温肾阳。臣药仙灵脾及巴戟天温肾壮阳、祛风湿、强筋骨。臣药淮山、当归、枣皮、女贞子、墨旱莲、桑寄生可补肾阳、填精髓、强筋骨。佐用细辛、防风、独活, 加以桂枝共同驱散内外寒邪。以甘草为使, 调和诸药, 补益脾气。据研究表明, 二仙汤可抑制大鼠卵巢组织上颗粒细胞凋亡, 改善卵巢功能^[18]。另外二仙汤可调控 SD 大鼠血清生长因子-1(IGF-1)mRNA 水平的表达^[19]。而独活寄生汤可调控软骨细胞的增殖及分化^[20]。所以加入祛风散寒新意的更年汤既能滋补肾阳, 又能驱散外寒, 故能兼取内寒外寒共见之症, 能调节全身气机, 改善肾阳虚型及阴阳两虚型绝经前后诸症^[10]。

颗粒细胞是卵巢卵泡内主要功能细胞, 因颗粒细胞的胞膜突起穿过透明带与卵子的胞膜形成缝隙连接, 从而为卵子的信息传递和营养提供了一条通道。PI3K/Akt/mTOR 是一条与细胞增殖、分化、密切相关的通路, 卵母细胞和颗粒细胞中均存在完整的 PI3K/Akt 信号系统, 共同协调, 调节卵泡的生长、发育、成熟和周期性的排卵, 参与细胞增殖、分化、迁移等的调节^[21-23]。FOXL2 是一种在眼睑、胚胎及成体卵巢颗粒细胞中特异性表达的转录因子, 在卵巢颗粒细胞的增殖和分化过程中发挥重要作用^[24]。GDF-9 是重要的卵母细胞源性生长因子, 在人类的卵母细胞及颗粒细胞中均有所表达, 而且随卵泡发育逐渐增加, 主要表达于卵母细胞, 可诱导始基卵泡募集、促进始基卵泡发育, 对卵泡的调节作用主要表现在对颗粒细胞的调节, 抑制生长卵泡中的颗粒细胞过早分化^[25]。有文献表明 PI3K/Akt 通过磷酸化激活 FOXL 家族的基因, 如 FOXL1^[26], 从而抑制颗粒细胞的凋亡。也有文献说明 FOXL2 是 Akt 的下游靶基因^[27]。例如在卵巢中 micro RNA-937 通过抑制 AKT 而抑制 FOXL2^[28]。因此研究了卵巢特异的转录因子 FOXL2 及其靶基因 GDF9^[29-30]。

本实验结果显示, 各组大鼠卵巢颗粒细胞中 PI3K、Akt、GDF9、FOXL2 mRNA 及蛋白表达量

相比较, 更年汤中剂量组、替勃龙组与更年汤低剂量组、高剂量组两两比较有差异, 更年汤中剂量组与替勃龙组无明显差异, 低剂量组与高剂量组无差异, 以中剂量值最接近于替勃龙组。中剂量对应为人临床用药剂量, 实验提示高剂量的疗效低于中剂量, 推测可能与药物的毒性有关, 还待进一步研究。可推测更年汤可能通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 上调信号分子 PI3K、mTOR 表达, 抑制信号分子 Akt 及 GDF9, FOXL2 因子表达, 参与调节卵泡的生长发育, 从而发挥抑制卵泡闭锁、改善卵巢功能, 从而延缓衰老及前驱症状。

参考文献

- [1] 张 凡, 张广美. 女性绝经综合征的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2017, 30(8): 1131-1133.
- [2] 张 帆, 黄桂珍. 补肾温阳、祛风散寒法治疗肾阳虚型绝经前后诸症 38 例 [J]. 贵州医药, 2007, 31(8): 75.
- [3] 张 帆. 自拟更年汤治疗肾阳虚型绝经前后诸症 35 例临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(9): 1360-1362.
- [4] 张 帆, 侯 聪. 更年汤对围绝经期模型大鼠 E2、LH、FSH、GnRH 的干预作用研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(9): 1850-1854.
- [5] 张 帆, 黄桂珍. 补肾温阳祛风散寒法治疗肾阳虚型绝经前后诸症 38 例 [J]. 贵州医药, 2007, 31(8): 757.
- [6] 曾 灵, 张 帆. 张帆应用补肾祛风散寒通络法治疗绝经前后诸症体会 [J]. 北方药学, 2013, 10(2): 104-105.
- [7] 侯 聪, 张 帆. 张帆治疗肾阳虚型围绝经期综合征经验 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(8): 1054-1055.
- [8] 张 帆, 武创新. 更年汤对肾阳虚型围绝经期模型大鼠 IL-6 及骨密度影响的实验研究 [J]. 新中医, 2016, 48(2): 239-241.
- [9] 张 帆, 曾 灵. 更年汤对围绝经期模型大鼠雌激素受体及细胞凋亡相关因子的影响及作用机理研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(6): 1361-1363.
- [10] 张 帆, 武创新, 齐帅英, 等. 自拟更年汤对肾阳虚型围绝经期模型大鼠卵巢细胞凋亡相关因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(8): 799-802.
- [11] 刘晓宇, 王 娇, 钱 欣, 等. 围绝经期大鼠动情周期变化的研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(5): 358-360.
- [12] 何国珍, 岑妍慧, 杨美春, 等. 班氏促卵助孕煎剂含药血清对体外培养人卵巢颗粒细胞增殖的影响 [J]. 医药导报, 2013, 32(4): 424-427.
- [13] 刘慧萍, 陈明辉, 李 玲, 等. 补肾活血方含药血清对卵巢颗粒细胞 ActA/Smads 信号通路的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(12): 2857-2861.

- [14] 张 宏, 王旭昀, 刘美奇, 等. 中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(6): 623-625.
- [15] 邢作英, 王永霞, 曹英杰, 等. 血清药理学研究概要 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(1): 219-222.
- [16] 钟 渝, 孙丹宁. 不同麻醉方法对 SD 大鼠麻醉效果的比较 [J]. 西南国防医药, 2014, 24(11): 1161-1163.
- [17] 张 莹, 李玛琳, 罗 敏, 等. 制备 SD 大鼠云南白药含药血清的实验条件筛选 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(3): 61-62.
- [18] 刘永胜, 赵丽慧. 二仙汤的研究及临床应用 [J]. 光明中医, 2010, 25(4): 741-742.
- [19] 杨 颖, 陈明道, 等. 二仙汤及其药物血清对 GT1-7 细胞增殖及胰岛素生长因子-1mRNA 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 6(24): 232-233.
- [20] 石楸鸣. 独活寄生汤的药理作用及临床应用 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(6): 575-576.
- [21] 潘 晔, 殷 佳, 蔡雪朦, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨中医药治疗冠心病的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4100-4104.
- [22] Camillo P, Chiara P, Alessandra M. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer [J]. *Front Oncol*, 2014, 11(1): 1-11.
- [23] 李 爽, 柴淑娟, 夏 天, 等. 生长分化因子-9 与卵泡发育和卵巢早衰 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29(2): 102-104.
- [24] 刘丽旋, 杨碧敏, 张婷婷, 等. 淮山的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 包装与食品机械, 2015, 33(1): 46-50.
- [25] Yang P Y, Tang C C, Chang Y C, *et al.* Effects of tibolone on osteoarthritis in ovariectomized rats: Association with nociceptive pain behaviour [J]. *Euro J Pain*, 2014, 18(5): 680-690.
- [26] Elzaia M, Todeschini A L, Caburet S, *et al.* The genetic make-up of ovarian development and function: the focus on the transcription factor FOXL2 [J]. *Clin Genet*, 2017, 91(2): 173-182.
- [27] Campisi R, Marengo F D. Cardiovascular effects of tibolone: A selective tissue estrogenic activity regulator [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007, 25(2): 132-145.
- [28] Yu L, Chen J, Liu Y, *et al.* MicroRNA-107 inhibits cell proliferation and metastasis in gastric cancer cells by downregulating FOXL2 [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 21(1): 105-116.
- [29] McTavish K J, Nonis D, Hoang Y D, *et al.* Granulosa cell tumor mutant FOXL2 suppresses GDF-9 and activin A-induced follistatin transcription in primary granulosa cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 372(1): 57-64.
- [30] Nonis D, McTavish K J, Shimasaki S. Essential but differential role of FOXL2 in GDF-9 stimulation of follistatin transcription in co-operation with Smad in the human granulosa cell line [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 372(1/2): 42-48.