

补肾助孕方对黄体功能不全模型大鼠卵巢内质网应激的调节

史露露¹, 周惠芳^{1,2*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046;
2. 南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨补肾助孕方对米非司酮诱导的黄体功能不全(LPD)模型大鼠卵巢内质网应激(ERS)的调控机制。方法:使用随机数表法将50只SD大鼠分为空白组,模型组,地屈孕酮(0.02 g·kg⁻¹)组,补肾助孕方低(0.08 g·kg⁻¹)、高剂量(0.24 g·kg⁻¹)组。使用蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠卵巢免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP),蛋白激酶R样内质网激酶(PERK),肌醇必需酶-1(IRE-1),活性转录因子6(ATF6),C/EBP同源蛋白(CHOP)蛋白和mRNA表达水平,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血清孕酮(P)和雌二醇(E₂)水平。结果:与空白组比较,模型组BIP,PERK,CHOP蛋白表达显著升高($P<0.01$),PERK及CHOP mRNA表达明显下降($P<0.05$);而IRE-1,ATF6蛋白表达,IRE-1,BIP,ATF6 mRNA表达,血清E₂,P水平差异无统计学意义。与模型组比较,地屈孕酮组CHOP蛋白表达显著降低($P<0.01$),而PERK,IRE-1,BIP,ATF6蛋白表达,PERK,IRE-1,BIP,ATF6,CHOP mRNA表达及血清E₂,P水平差异无统计学意义;补肾助孕方低剂量组CHOP蛋白表达显著降低($P<0.01$),CHOP mRNA表达水平明显升高($P<0.05$),而PERK,IRE-1,BIP,ATF6蛋白和mRNA表达及血清E₂,P水平差异无统计学意义;补肾助孕方高剂量组PERK,BIP,CHOP蛋白表达显著降低($P<0.01$),CHOP mRNA表达水平显著升高($P<0.01$),而IRE-1和ATF6蛋白表达,PERK,IRE-1,BIP,ATF6 mRNA表达及血清E₂,P水平差异无统计学意义。结论:补肾助孕方可以改善黄体功能不全,其机制可能与缓解内质网应激作用有关。

[关键词] 内质网应激(ERS); 卵巢; 补肾助孕方; 黄体功能不全(LPD)

[中图分类号] R2-0;R285.5;R588;R711.75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)16-0084-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211692

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210622.1714.001.html>

[网络出版日期] 2021-06-23 9:10

Regulation of Bushen Zhuyun Prescription on Ovarian Endoplasmic Reticulum Stress in Rats with Luteal Phase Defect

SHI Lu-lu¹, ZHOU Hui-fang^{1,2*}

(1. *The First Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;*
2. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of China Medicine, Nanjing 210029, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory mechanism of Bushen Zhuyun prescription (BSZYP) on endoplasmic reticulum stress (ERS) in rats with luteal phase defect (LPD) induced by mifepristone. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, a positive control group (dydrogesterone, 0.02 g·kg⁻¹), and low-(0.08 g·kg⁻¹) and high-dose (0.24 g·kg⁻¹) BSZYP groups. Western blot and Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the mRNA and protein expression levels of immunoglobulin binding protein (BIP), protein kinase

[收稿日期] 20210218(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973898,81774354);江苏省中医药局重大项目(ZD201702);江苏省中医药领军人才项目(SLJ0202)

[第一作者] 史露露,硕士,从事不孕症的临床及基础研究,E-mail:648818013@qq.com

[通信作者] *周惠芳,博士,教授,博士生导师,从事不孕症的临床及基础研究,E-mail:zhouhuifang2011301@163.com

R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 (IRE-1), activating transcription factor 6 (ATF6), and C/EBP homologous protein (CHOP). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum progesterone (P) and estradiol (E_2) levels. **Result:** Compared with the blank group, the model group showed the elevated protein expression of BIP, PERK, and CHOP ($P<0.01$) and the dwindled mRNA expression of PERK and CHOP ($P<0.05$), while no significant difference was observed in the protein expression of IRE-1 and ATF6, mRNA expression of IRE-1, BIP, and ATF6, and serum E_2 and P levels. Compared with the model group, the positive control group displayed diminished protein expression of CHOP ($P<0.01$), while no significant difference was observed in the protein expression of PERK, IRE-1, BIP, and ATF6, mRNA expression of PERK, IRE-1, BIP, ATF6, and CHOP, and serum levels of E_2 and P. The protein expression of CHOP decreased ($P<0.01$) and the mRNA expression of CHOP increased ($P<0.05$) in the low-dose BSZYP group, while no significant difference was observed in the mRNA and protein expression of PERK, IRE-1, BIP, and ATF6, and serum E_2 and P levels. In the high-dose BSZYP group, the protein expression of PERK, BIP, and CHOP was down-regulated ($P<0.01$), and the mRNA expression of CHOP was up-regulated ($P<0.01$), while no significant difference was observed in the protein expression of IRE-1 and ATF6, mRNA expression of PERK, IRE-1, BIP, and ATF6, and serum E_2 and P levels. **Conclusion:** BSZYP can treat LPD by relieving ERS.

[Keywords] endoplasmic reticulum stress (ERS); ovary; Bushen Zhuyun prescription; luteal phase defect (LPD)

不孕症是指女性有正常性生活,未避孕1年而未孕的病症。据统计,世界上约有10%的育龄期夫妇经历过一种或多种形式的不孕^[1]。黄体功能不全(LPD)是导致不孕症的重要原因,临床上约有3.5%~10%的不孕症,35%的早期妊娠流产和4%的习惯性流产是由LPD导致^[2]。LPD致病因素及发病机制仍不清楚,现代医学治疗LPD主要为激素替代及促排卵,存在高促排卵率及低妊娠率等不足^[3-4]。而中医药在治疗不孕症上有独特优势^[5-6],补肾助孕方是国医大师夏桂成经验方总结而来,对肾阳不足夹有肝郁的黄体功能不全患者有确切临床疗效^[7]。课题组前期研究已证实补肾助孕方可以缓解LPD大鼠卵巢氧化应激,降低卵巢凋亡水平,从而改善黄体功能不全^[8]。氧化应激与内质网应激(ERS)密切相关,氧化应激可以通过激活ERS信号通路,减少类固醇生成酶,减少卵巢内黄体数量,诱发黄体细胞凋亡,从而降低孕酮生成水平,造成LPD^[9-11]。为进一步明确补肾助孕方对黄体功能不全作用机制。本文通过体外实验,观察补肾助孕方对LPD大鼠卵巢ERS的影响,进一步阐述补肾助孕方治疗LPD性不孕症的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 12周龄SPF级雌性大鼠50只,体重(220~240)g,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,许可证号为SYXK(苏)2017-0001,本实验设

计已通过南京中医药大学动物伦理审核,批准号201805A015。

1.2 药物 米非司酮(上海华联制药有限公司,规格25 mg/片,批号C019160102);地屈孕酮(荷兰苏威制药有限公司,规格10 mg/片,批号347870)。将上述2种药物研磨并分别配置为质量浓度1, 0.2 g·L⁻¹的混悬液;补肾助孕方由鹿角片10 g,菟丝子15 g,山茱萸10 g,炒白芍10 g,淮山药15 g,醋柴胡6 g等8味中药组成,于南京中医药大学百草堂统一购买,经南京中医药大学中药鉴定教研室刘圣金副教授鉴定为正品,均符合2015年版《中华人民共和国药典》相关要求。用8倍量水浸泡药物30 min,其中鹿角片单独浸泡,先武火煮开鹿角片,再文火煎煮30 min,再倒入其他7味中药武火煮至沸腾,后继续文火煮30 min,过滤;第2煎加入6倍量水武火煮开,再文火煎煮30 min,过滤;最后加4倍量水煎30 min(沸后),再次滤过残渣。用旋转蒸发器将3次所得药液浓缩至含生药量为0.8, 2.4 g·mL⁻¹的补肾助孕方溶液,4℃保存备用,给药前复温至27℃左右。

1.3 试剂 免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP),肌醇必需酶-1(IRE-1),活性转录因子6(ATF6)兔多克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR3297867-1, GR3304926-1, GR3299831-1);蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)兔多克隆抗体(美国Cell Signaling

Technology 公司, 批号 11); C/EBP 同源蛋白 (CHOP), β -微管蛋白(β -tubulin)兔多克隆抗体(武汉 Proteintech 公司, 批号分别为 00049764, 10068-I-AP); 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗(美国 Affinity 公司, 批号 27K4786); BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司, 批号 #RK242682); Total RNA Isolation Kit 组织总 RNA 提取试剂盒, Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号分别为 RC101-01 50rxn, 7E491E0); 大鼠孕酮(P)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒, 大鼠雌二醇(E_2) ELISA 试剂盒(上海西塘生物科技有限公司, 批号分别为 2101261, 2004251)。

1.4 仪器 Infinite M200 PRO 型微孔板检测仪(瑞士 Tecan 公司); MM400 型混合球磨仪(德国 Retsch 公司); Power Pac Basic 型电泳仪, Trans-blot-SD 型半干转膜仪, Chemi-Doc MP 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); Quant Studio 7 Flex 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo 公司); MB100-4P 型恒温震荡仪, 5430 型微孔板专用离心机, SNAP2.0 型抗体孵育器(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 分组 将 SD 大鼠适应性喂养 3 d, 后于每日 09:00, 15:00 进行大鼠阴道涂片, 观察, 记录, 连续观察 2~3 个动情周期, 了解大鼠动情周期的变化, 并选出 50 只动情周期约为 4 d 的大鼠, 利用随机数表法将大鼠分为空白组, 模型组, 地屈孕酮组, 补肾助孕方低剂量组及补肾助孕方高剂量组, 每组各 10 只。

2.2 给药 每日 08:00 对各组大鼠进行阴道涂片, 确认 SD 大鼠进入动情周期后 2 h 内; 空白组灌服生理盐水($0.1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 其他组均给予米非司酮($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌服; 于下午 15:00 空白组与模型组灌服生理盐水, 其他组灌服相应药物: 地屈孕酮($0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 补肾助孕方低剂量组($0.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 补肾助孕方高剂量组($0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)药物灌胃, 于第 2 日上午 9:00 各组继续灌服相应药物, 其中空白组与模型组以生理盐水灌胃, 此为第 1 个动情周期。第 2 周期同一周期, 第 3 周期开始, 第 1 日早上 8:00 确认进入动情周期后, 各组均不给予米非司酮, 以生理盐水代替, 下午 15:00 各组灌服相应的药物(空白与模型灌服生理盐水)。实验中给药量均按《人和动物间体表面积折算的等效剂量比值表》换算得

出, 其中补肾助孕方高剂量为人体用量 3 倍。造模给药参考前期课题组给药方案^[12]。

2.3 标本取材方法 于末次给药结束后当天 16:00 处死 LPD 大鼠, 各组大鼠予 10% 水合氯醛溶液 $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉, 腹主动脉采血后断颈处死, 立即取出卵巢, 用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液漂洗, 置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备测, 处死前所取血样静置 2 h 后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 离心 15 min (离心半径 13.5 cm), 取血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备测。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠卵巢 PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP 蛋白表达水平 取一定的组织加入 RIPA 裂解液并置球磨仪中研磨, 后于冰上裂解 30 min; 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各组蛋白浓度, 将各组蛋白质量浓度定为 $5.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各组取蛋白样品溶液 $4 \mu\text{L}$ 进行蛋白电泳, 其中积成胶体积分数为 5%, 电压为 80 V, 时间为 30 min; 分离胶质量浓度为 8%, 电压为 110 V, 时间为 30 min。用湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 湿转仪设置为 90 min, 250 mA。转膜结束后, 使用 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)洗膜 3 次, 每次 10 min。用 5% BSA 溶液室温封闭 1 h, 再次使用 TBST 溶液洗膜 3 次。后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷库孵育相应一抗 BIP (1:1 000), PERK (1:1 000), IRE-1 (1:1 000), ATF6 (1:500), CHOP (1:500) 过夜, 结束后用 TBST 溶液洗膜 3 次, 后室温下孵育二抗 (1:5 000) 1 h, 再次使用 TBST 溶液清洗 3 次。最后将浸泡过曝光液的条带放入多功能蛋白印迹成像系统进行曝光, 以 Image Lab, Photo Shop 等软件处理图片。

2.5 Real-time PCR 法检测大鼠卵巢 PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP mRNA 表达水平 使用诺唯赞 Total RNA Isolation Kit 组织总 RNA 提取试剂盒提取大鼠卵巢组织总 RNA, 并测定各样品浓度及纯度, 使用 c-DNA 逆转录试剂盒逆转录为 c-DNA, 放入 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备测。于 PubMed 基因库中检索大鼠 PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP mRNA 引物序列, 由生物工程(上海)股份有限公司设计与合成引物, 见表 1。其中甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 使用 Quant Studio 6 & 7 PCR System 进行扩增, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 30 s, 40 个循环。以上步骤均严格按照说明书进行操作, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理反应数据。

2.6 ELISA 检测大鼠血清 P, E_2 激素水平表达 按大鼠 P, E_2 ELISA 试剂盒说明书将大鼠血清样本及实验组分室温平衡 30 min 后震荡混匀备用, 并配置

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PERK	上游 ATAGAATGCTGCGTTGCGAGGAC	306
	下游 GCCGATAAGGTTACGATGCTGTGG	
IRE-1	上游 TGGACGGACAGAATACACCA	134
	下游 TGGACACAAAGTGGGACATC	
BIP	上游 CGGAGGAGGAGGACAAGAAGGAG	212
	下游 CGGGTTGGACGTGAGTTGGTTC	
CHOP	上游 TGCCTTTCGCCTTGGAGACAGTG	220
	下游 GGGCTTTGGGAGGTGCTTGTG	
ATF6	上游 AAGTGAAGAACCATTACTTTATATC	157
	下游 TTTCTGCTGGCTATTTGT	
GAPDH	上游 TGCTGAGTATGTCGTGGAG	203
	下游 GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT	

洗液。将样品及对照品加入96孔板中,充分混匀再加入标记物50 μL,充分混匀后37 °C温育60 min,弃液体并洗涤5次后控干水分。加入显色液避光静置15 min后加入中止液,使用多功能酶标仪系统检测并采集数据。

2.7 统计学方法 本研究均采用 GraphPad Prism8.0 软件进行统计分析。采用单因素方差(ANOVA)分析,利用 TuKey 检验进行组间两两比较,数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠卵巢 BIP, PERK, IRE-1, ATF6, CHOP 蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠

BIP, PERK, CHOP 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), IRE-1 与 ATF6 蛋白表达有所升高但差异无统计学意义。与模型组比较,地屈孕酮组 CHOP 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), BIP, PERK, IRE-1, ATF6 蛋白表达有所下降,但差异无统计学意义;补肾助孕方低剂量组 CHOP 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), BIP, PERK, IRE-1, ATF6 蛋白表达有所下降,但差异无统计学意义;补肾助孕方高剂量组 PERK, BIP, CHOP 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), IRE-1 与 ATF6 蛋白表达有所下降,但差异无统计学意义。见图1,表2。

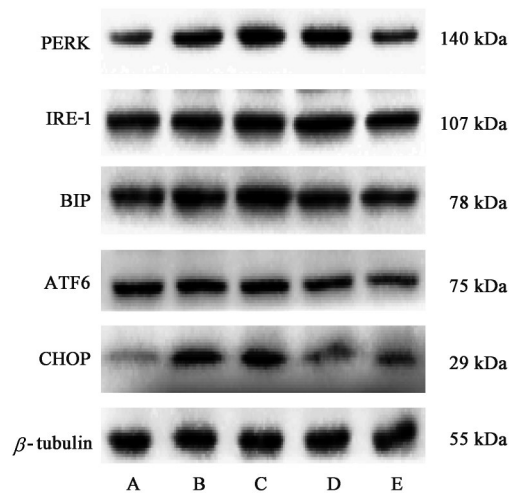


图1 各组大鼠卵巢组织 PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP protein expression in ovarian tissue of rats in each group

表2 补肾助孕方对各组大鼠卵巢组织 BIP, PERK, IRE-1, ATF6, CHOP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Bushen Zhuyun prescription on protein expression of BIP, PERK, IRE-1, ATF6, CHOP in ovarian tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BIP/ β -tubulin	PERK/ β -tubulin	IRE-1/ β -tubulin	ATF6/ β -tubulin	CHOP/ β -tubulin
空白		0.88±0.22	0.73±0.04	0.76±0.23	0.88±0.21	0.85±0.13
模型		1.30±0.01 ¹⁾	1.01±0.09 ¹⁾	0.79±0.09	1.02±0.22	1.68±1.44 ¹⁾
地屈孕酮	0.02	1.16±0.06	0.98±0.04	0.78±0.32	0.82±0.25	0.88±0.12 ²⁾
补肾助孕方	0.08	1.12±0.10	0.92±0.13	0.71±0.28	0.79±0.27	0.68±0.12 ²⁾
	0.24	0.66±0.05 ²⁾	0.77±0.09 ²⁾	0.60±0.21	0.81±0.09	0.39±0.15 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对大鼠卵巢 PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP mRNA 表达水平的影响 与空白组比较,模型组 PERK 及 CHOP mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), IRE-1, BIP, ATF6 mRNA 表达水平差异无统计学意义。与模型组比较,地屈孕酮组 PERK, IRE-1, BIP, ATF6, CHOP mRNA 表达水平差异无统计学意义;补肾助孕方低剂量组 CHOP mRNA 表达

水平明显升高 ($P < 0.05$), PERK, IRE1, BIP, ATF6 mRNA 表达水平差异无统计学意义;补肾助孕方高剂量组 CHOP mRNA 显著升高 ($P < 0.01$), PERK, IRE1, BIP, ATF6 mRNA 表达水平差异无统计学意义。见表3。

3.3 对大鼠血清性激素 P 及 E₂ 水平的影响 血清 P, E₂ 表达水平,各组之间差异无统计学意义。见表4。

表3 补肾助孕方对各组大鼠卵巢组织BIP, PERK, IRE-1, ATF6, CHOP mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Bushen Zhuyun prescription on mRNA expression of BIP, PERK, IRE-1, ATF6, CHOP in ovarian tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BIP	PERK	IRE-1	ATF6	CHOP
空白		0.99±0.04	1.02±0.02	1.01±0.19	0.94±0.06	1.01±0.01
模型		0.82±0.04	0.64±0.02 ¹⁾	1.20±0.10	1.02±0.20	0.55±0.03 ¹⁾
地屈孕酮	0.02	0.93±0.18	0.72±0.05	1.21±0.05	1.13±0.09	0.74±0.06
补肾助孕方	0.08	0.93±0.35	0.96±0.22	1.09±0.12	0.90±0.15	0.98±0.15 ²⁾
	0.24	1.17±0.22	0.91±0.21	1.18±0.05	1.18±0.05	1.26±0.25 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01。

表4 补肾助孕方对各组大鼠血清P和E₂水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Bushen Zhuyun prescription on serum P and E₂ levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	P	E ₂
空白		37.3±0.51	136.3±15.56
模型		36.1±1.16	59.8±47.07
地屈孕酮	0.02	38.3±0.93	281.5±148.1
补肾助孕方	0.08	38.2±1.30	166.1±56.65
	0.24	38.6±0.84	179.4±92.51

4 讨论

中医学无LPD病名,根据其临床表现可将其归属于“月经失调”“不孕”“胎漏”“胎动不安”等病证。傅山有云“经水出诸肾”,故女子正常生理与肾密切相关。肾气盛,经血充盈,女子月经方能正常来潮,两精相搏,才能正常受孕^[13]。国医大师夏桂成总结多年临床经验,认为LPD主要病因病机为肾阳不足夹有肝郁,肾为一身之阳,若肾阳虚衰,冲任不足,则胞宫失于温煦,使宫寒不能摄精成孕;忧思恼怒,气郁血滞,经行不畅,则月经失调与不孕。补肾助孕方以鹿角片为君,补肾助阳,臣以山茱萸、淮山药、炒白芍、菟丝子滋补肾阴,佐使柴胡疏肝解郁,鼓舞阳气,全方于经前期使用,可以使“阳长至重”,调畅心肝气机,从而调节心(脑)-肾-子宫生殖轴,以助调经和助孕。

LPD的发病机制仍不明确,研究认为,下丘脑-垂体-卵巢-子宫轴任意一个环节功能紊乱均会导致LPD^[14],其中卵巢作为重要的下游器官,响应上游生殖轴,分泌性激素,并通过性激素正负反馈双向调节下丘脑及垂体的功能。内质网是真核细胞中重要的细胞器,具有蛋白质合成与脂质代谢等重要作用。在卵母细胞发育过程中内质网将累积的母体mRNA翻译成功能性的蛋白质^[15],且调节孕酮生成所需的类固醇合成酶^[16-17]。研究发现,ERS在

黄体期中期及后期被激活,诱导黄体的凋亡^[18-19],在生理情况下,内质网促凋亡因子CHOP表达量很低,当机体发生内质网应激时,ERS会激活IRE-1, ATF6, PERK 3条信号通路,其中CHOP主要为PERK下游效应分子,但研究表明ATF6, IRE-1均可诱导CHOP表达^[20]。

本研究Western blot结果显示,模型组大鼠卵巢BIP, PERK, CHOP蛋白表达升高,地屈孕酮组、补肾助孕方低及高剂量组可以明显降低CHOP蛋白表达水平;其中补肾助孕方高剂量组并可降低BIP, PERK蛋白表达。Real-time PCR结果显示,模型组PERK, CHOP mRNA表达降低,其中补肾助孕方低、高剂量组CHOP mRNA表达升高,ELISA实验结果显示,模型组大鼠血清E₂, P含量各组比较无统计学差异,予补肾助孕方和地屈孕酮片干预后E₂, P含量也无统计学差异。蛋白与mRNA表达结果不一致,由于真核基因表达到目的蛋白调控,受基因转录、转录后加工、转录降解、翻译及翻译后加工修饰等多方面影响,基因表达调控与蛋白转录水平并不完全相同。其次,补肾助孕方高剂量组不仅可以下调CHOP蛋白表达,还可以下调PERK, BIP蛋白表达。由于补肾助孕方高剂量组中药剂量为正常人体用药的3倍,且下游凋亡分子CHOP蛋白的表达与中药低剂量组无明显差异,因此中药高剂量组PERK, BIP蛋白变化生物意义较小,无明显临床意义。

由于基因本身并不能直接影响机体生理病理活动,其主要通过翻译表达蛋白质,通过对蛋白水平的调控,影响机体生理病理活动。因此从蛋白表达水平上看,补肾助孕方可以通过缓解卵巢内质网应激,降低卵巢凋亡水平,从而达到治疗黄体功能不全的目的。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 冒韵东,刘嘉茵. 不孕症诊治临床路径[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2013,29(9):690-693.
- [2] 邱雅琳,刘音吟,周惠芳. 黄体功能不全性不孕症临床思路摘要[J]. 北京中医药,2019,38(7):665-667.
- [3] 杨碧蓉,周华. 寿胎丸加味联合黄体酮及低分子肝素治疗复发性流产的临床观察[J]. 世界中医药,2019,14(6):1502-1506.
- [4] 刘冬娥. 促排卵周期中的黄体支持[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2015,31(1):35-38.
- [5] 孙爱军,唐旭东,张巧利,等. 卵巢储备功能降低不孕症中西医结合治疗的理论与临床试验研究探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):148-157.
- [6] 李姣,林洁. 龙胆泻肝汤治疗湿热瘀结型盆腔炎性不孕的疗效及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(6):85-90.
- [7] 杨斌,周文清,陈莎,等. 补肾助孕方对肾虚薄型子宫内膜大鼠内膜容受性的影响及机制研究[J]. 世界中医药,2020,15(17):2565-2569.
- [8] 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.
- [9] LI L, ZHENG P, DEAN J. Maternal control of early mouse development[J]. Development, 2010, 137(6): 859-870.
- [10] TAKAHASHI N, HARADA M, HIROTA Y, et al. A potential role for endoplasmic reticulum stress in progesterone deficiency in obese women [J]. Endocrinology, 2017, 158(1): 84-97.
- [11] PARK H J, LEE D G, SEONG J B, et al. Peroxiredoxin I maintain luteal function by regulating unfolded protein response [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1):79.
- [12] 周伯如,戴佳轩,周惠芳,等. 排卵后给予米非司酮对雌性大鼠动情周期、黄体功能的影响及意义[J]. 山东医药,2017,57(44):32-35.
- [13] 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.
- [14] 王飞虹,谈勇. 黄体功能不全性不孕中西医治疗进展[J]. 吉林中医药,2015,35(3):319-324.
- [15] ESENCAN E, KALLEN A, ZHANG M, et al. Translational activation of maternally derived mRNAs in oocytes and early embryos and the role of embryonic poly(A) binding protein (EPAB)[J]. Biol Reprod, 2019, 100(5): 1147-1157.
- [16] PRASAD M, PAWLAK K J, BURAK W E, et al. Mitochondrial metabolic regulation by GRP78 [J]. Sci Adv, 2017, doi:10.1126/sciadv.1602038.
- [17] XIONG Y, CHEN H, LIN P, et al. ATF6 knockdown decreases apoptosis, arrests the S phase of the cell cycle, and increases steroid hormone production in mouse granulosa cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2017, 312: C341-C353.
- [18] PARK S J, KIM T S, PARK C K, et al. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6 in Leydig cells of the testis [J]. J Mol Endocrinol, 2013, 50(2): 151-166.
- [19] PARK H J, PARK S J, KOO D B, et al. Progesterone production is affected by unfolded protein response (UPR) signaling during the luteal phase in mice [J]. Life Sci, 2014, 113(1/2): 60-67.
- [20] 徐倩,许银丰,杨杰杰,等. 内质网应激与细胞自噬的关系[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(8): 1489-1500.

[责任编辑 王鑫]