

· 临床 ·

## 启宫丸对痰湿证PCOS不孕患者卵子质量和胚胎发育潜能的影响

潘静<sup>1</sup>, 刘鹏飞<sup>2</sup>, 刘金星<sup>2</sup>, 于潇<sup>2\*</sup>, 张建伟<sup>2\*</sup>

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014;

2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

**[摘要]** 目的: 观察启宫丸对痰湿证多囊卵巢综合征(PCOS)不孕患者卵泡颗粒细胞(GCs)中增殖与凋亡相关因子程序性细胞死亡蛋白4(PDCD4)和增殖细胞核抗原(PCNA)表达的调控, 探讨启宫丸对卵子质量和胚胎发育潜能的影响。方法: 选取行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的痰湿证PCOS患者66例, 按照随机数字表法分为观察组(启宫丸+西药)和对照组(西药), 每组33例, 均行拮抗剂方案促排卵。观察组于IVF前1周期始在服用西药的基础上联合启宫丸进行治疗, 对照组则不予中药干预。观察两组患者痰湿证候改善、促性腺激素(Gn)使用天数和用量、注射人绒毛促性腺激素(HCG)日血清黄体生成素(LH)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕酮(P)水平、双原核(2PN)受精率和优质胚胎率。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GCs中PDCD4和PCNA的表达。结果: 与本组治疗前比较, 两组患者痰湿证候评分均显著降低( $P<0.01$ ); 与对照组治疗后比较, 观察组痰湿证候评分降低更明显, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。与对照组比较, 观察组HCG日血清LH、E<sub>2</sub>和P水平均升高, 但只有E<sub>2</sub>水平差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 观察组2PN受精率[82.25%(556/676)/69.92%(365/522),  $\chi^2=25.172, P<0.01$ ]和优质胚胎率[44.19%(190/430)/34.23%(102/298),  $\chi^2=7.266, P<0.01$ ]均显著升高, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ ); 观察组卵巢GCs中PDCD4 mRNA和蛋白表达量均下调, PCNA mRNA和蛋白表达量均上调, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: 启宫丸可能通过下调PDCD4的表达和上调PCNA的表达来干预卵泡发育过程, 调节激素水平, 改善痰湿证PCOS患者证候表现, 抑制GCs凋亡并促进生长, 以改善卵子质量和胚胎发育潜能。

**[关键词]** 启宫丸; 多囊卵巢综合征; 颗粒细胞; 卵子质量; 胚胎发育潜能

**[中图分类号]** R242; R2-031; R287; R271.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0152-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20231591

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230210.1334.009.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-10 14:48:30

### Effect of Qigongwan on Quality of Oocytes and Embryonic Development Potential in Patients with PCOS Infertility with Phlegm-dampness Syndrome

PAN Jing<sup>1</sup>, LIU Pengfei<sup>2</sup>, LIU Jinxing<sup>2</sup>, YU Xiao<sup>2\*</sup>, ZHANG Jianwei<sup>2\*</sup>

(1. The First Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the regulation of Qigongwan on the expression of proliferation and apoptosis-related factors programmed cell death 4 (PDCD4) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in ovarian granulosa cells (GCs) in patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS) infertility with phlegm-dampness syndrome, and to explore the effect of Qigongwan on the quality of oocytes and embryonic

**[收稿日期]** 2022-10-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82104917); 山东省自然科学基金项目(ZR2020MH363)

**[第一作者]** 潘静, 在读博士, 从事月经病与不孕症的中医药研究, E-mail: 2233697678@qq.com

**[通信作者]** \* 于潇, 博士, 从事月经病、不孕症、盆腔炎症性疾病后遗症等的中医药治疗研究, E-mail: xiao675364548@163.com;

\* 张建伟, 教授, 博士生导师, 主任医师, 从事中医药在生殖医学中的应用及月经病的中医药研究, E-mail: zhangjianwei1970@sina.com

development potential. **Method:** Sixty-six patients with PCOS with phlegm-dampness syndrome who underwent *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) were randomly selected and divided into an observation group (Qigongwan + western medicine) and a control group (western medicine), with 33 patients in each group. Antagonist regimen was used to promote ovulation in the two groups. The observation group was given Qigongwan one cycle before IVF based on the treatment of conventional western medicine, while the control group was not given Chinese medicine. The improvement of phlegm and dampness syndrome, the dosage and the number of days of using gonadotropins (Gn), the levels of luteinizing hormone (LH), estradiol ( $E_2$ ), and progesterone (P) on the day of human chorionic gonadotropin (HCG) injection, the 2PN fertilization rate, and the high-quality embryo rate of patients in the two groups were compared. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot technology were used to detect the expression of PCNA and PDCD4 in GCs. **Result:** As compared with groups before treatment, the score of phlegm-dampness syndrome in both groups was significantly lower ( $P<0.01$ ). The score of phlegm and dampness syndrome in the observation group was significantly lower than that of the control group ( $P<0.01$ ). As compared with the control group, the levels of LH,  $E_2$ , and P in the observation group was higher, but only the difference in the level of  $E_2$  was statistically significant ( $P<0.01$ ). The 2PN fertilization rate [82.25% (556/676) vs 69.92% (365/522),  $\chi^2=25.172$ ,  $P<0.01$ ] and high-quality embryo rate [44.19% (190/430) vs 34.23% (102/298),  $\chi^2=7.266$ ,  $P<0.01$ ] in the observation group were significantly higher than that of the control group ( $P<0.01$ ). As compared with the control group, the mRNA and protein expression of PDCD4 in ovarian GCs was down-regulated in the observation group and that of PCNA was up-regulated ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** By down-regulating the expression of PDCD4 and up-regulating the expression of PCNA, Qigongwan may interfere with follicle development, adjust hormone levels, improve the symptomatic manifestations of patients with PCOS with phlegm-dampness syndrome, inhibit the apoptosis of GCs, and promote growth, thus improving the quality of oocytes and embryonic development potential.

**[Keywords]** Qigongwan; polycystic ovarian syndrome; granulosa cells; quality of oocytes; embryonic development potential

我国由多囊卵巢综合征(PCOS)引起的排卵障碍性不孕高达70%左右<sup>[1]</sup>。PCOS不孕的致病原因复杂多样,临床治疗难愈,一线或二线促排卵治疗效果不佳时,可行体外受精-胚胎移植(IVF-ET),但着床率、临床妊娠率和活产率较低<sup>[2]</sup>,这可能与PCOS患者卵泡发育迟缓,卵子质量下降有关。痰湿证为PCOS的主要证候<sup>[3]</sup>,在PCOS诸证中约占33%<sup>[4]</sup>。启宫丸记载于《医方集解》,主治子宫脂满不能孕育者,临床治疗和改善痰湿证PCOS不孕有独特的作用。启宫丸联合IVF-ET可促进卵泡生长发育及排出,提高受孕率,临床结局满意<sup>[5-6]</sup>,故有必要进一步探讨启宫丸在IVF-ET中的疗效机制及作用靶点。PCOS不孕患者卵泡颗粒细胞(GCs)中程序性细胞死亡蛋白4(PDCD4)和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达维持着GCs增殖与凋亡的动态平衡,共同调控卵泡的生长周期,进一步影响卵子质量和胚胎发育潜能。启宫丸治疗痰湿证PCOS不孕的临床研究已有不少报道,但对卵巢GCs中PDCD4

和PCNA表达的研究尚属空白。因此,本文将启宫丸及行IVF-ET的痰湿证PCOS不孕患者卵巢GCs中PDCD4、PCNA的表达与卵子质量和胚胎发育潜能相结合,探究启宫丸治疗痰湿证PCOS不孕的微观机制,以期更好地指导临床,为生殖健康的基因靶向治疗提供新思路。

## 1 资料

**1.1 一般资料** 研究所纳入的66例患者均为2019年11月至2021年1月在山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心门诊行IVF-ET助孕的痰湿证PCOS患者,按照随机数字表法分为观察组和对照组。本研究已在中国临床试验注册中心注册,注册号为ChiCTR2000038697,并通过山东中医药大学附属医院生殖医学伦理委员会批准(伦理审批号为KY19-06-11)。研究中由于患者取消周期出现病例脱落,最终统计计数为观察组31例,对照组30例。记录并比较两组患者年龄、不孕年限、身体质量指数(BMI)、血清抗缪勒管激素

(AMH)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕酮(P)、睾酮(T)、催乳素(PRL)、痰湿证

候评分等基线资料,差异无统计学意义,基线数据具有可比性。见表1-表3。

表1 两组患者年龄、不孕年限、BMI和血清AMH的比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of age, infertility, BMI and serum AMH between two groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	年龄/岁	不孕年限/年	BMI/kg·m <sup>-2</sup>	AMH/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
观察组	31	30.45±2.63	3.45±1.86	27.18±2.89	8.84±2.58
对照组	30	30.43±2.71	4.23±2.08	28.64±3.41	9.20±3.11

表2 两组患者血清基础内分泌水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of serum basic endocrine levels between two groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	FSH/IU·L <sup>-1</sup>	LH/IU·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	P/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	T/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PRL/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
观察组	31	7.13±1.54	10.48±6.93	61.78±59.90	0.53±0.39	0.67±0.34	15.10±1.33
对照组	30	6.61±1.73	7.92±4.13	57.16±42.43	0.42±0.36	0.68±0.44	14.78±1.52

表3 两组患者治疗前痰湿证候评分比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of score of phlegm and dampness syndrome before treatment between two groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	治疗前痰湿证候评分/分
观察组	31	23.84±1.80
对照组	30	23.93±1.86

## 1.2 诊断标准

**1.2.1 不孕症的诊断标准** 参照第9版《妇产科学》<sup>[7]</sup>,女性无避孕性生活至少12个月而未孕称为不孕症。既往无妊娠史,未避孕而从未妊娠者为原发不孕;既往有妊娠史,后未避孕连续12个月未孕者为继发不孕。

**1.2.2 PCOS的诊断标准** 参照2018年中华医学会制定的《多囊卵巢综合征中国诊疗指南》,月经稀发或闭经或不规则子宫出血为必须条件,再符合下列2项中的1项:①高雄激素临床表现或高雄激素血症;②超声下表现为多囊卵巢(PCOM)。必须逐一排除其他可能引起高雄激素和排卵异常的疾病。

**1.2.3 痰湿证不孕的辨证标准** 参照2012年中华中医药学会制订的《中医妇科常见病诊疗指南》及《中医妇科学》<sup>[8]</sup>拟订。主证为婚久不孕;月经后期,量少、色淡、质黏稠,甚则闭经;形体肥胖。次证为带下量多,色白质黏;胸闷泛恶;倦怠乏力;大便溏薄。舌脉为舌淡胖或有齿印,苔白腻;脉滑或沉滑。以上主证必须完备,加上2~3项次证,结合舌脉,即可诊断。

**1.3 纳入标准** 年龄25~35岁的已婚妇女;符合以上诊断标准;符合IVF适应证;男方精液检查大致正常;签署知情同意书。

**1.4 排除标准** 宫腔环境不利于妊娠者;入组前

3个月曾用激素类药物者;泌尿生殖系统急性感染及性传播疾病者。

**1.5 脱落标准** 因各种原因未遵医嘱完成治疗者,收集到的卵巢GCs未达到实验要求者。

## 2 方法

**2.1 治疗方案** 观察组和对照组患者均采用促性腺激素释放激素(GnRH)拮抗剂方案进行控制性卵巢刺激,并于IVF前一个月经周期第5天开始口服达英-35(拜耳医药保健有限公司,批准文号H20170209),每日1片,连服21 d。两组患者均于撤退性出血的第2天开始,依自身情况给予重组人促卵泡激素注射液(果纳芬,德国默克雪兰诺有限公司,批准文号BA059826)150~300 U皮下注射或联合适量人绝经促性腺激素(乐宝得,丽珠集团丽珠制药厂,批准文号200704)肌肉注射进行控制性超促排卵(COH)。观察血清LH、E<sub>2</sub>、P水平及B超监测卵泡发育情况,在果纳芬用药第6天开始给予0.25 mg注射用醋酸西曲瑞克(思则凯,德国默克雪兰诺有限公司,批准文号P00501C)皮下注射至注射人绒毛促性腺激素(HCG)日。当超声检查示2~3个主导卵泡平均直径≥18 mm,平均每成熟卵泡E<sub>2</sub>水平为200~300 ng·L<sup>-1</sup>时,予HCG 10 000 U肌肉注射扳机,36 h后取卵。

观察组口服达英-35同时服用启宫丸免煎配方颗粒,每日1剂,早晚餐后温水冲服,连续服用至IVF周期HCG日。启宫丸组成为川芎9 g、白术12 g、制半夏9 g、香附12 g、茯苓15 g、神曲9 g、橘红12 g、甘草6 g,研究中的方剂采用江阴天江药业有限公司生产的中药免煎配方颗粒(批准文号为91320000703519845Q)。

**2.2 取卵、体外受精及培养** 扳机后36 h在B超

引导下经阴道卵巢穿刺取卵术,卵子取出洗涤后放入CO<sub>2</sub>培养箱中培养。取卵4~6 h后与经密度梯度离心后的新鲜精液行体外受精,18~22 h观察原核及第二极体排出情况,判断受精与否。继续体外培养,D3观察胚胎发育情况。

**2.3 颗粒细胞的提取** 收集取卵日捡卵后淡黄色卵泡液至50 mL离心管中,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径10 cm,下同)。无菌巴氏吸管吸取沉淀物上的细胞层于15 mL的离心管中,加入磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液2 mL,轻柔吹打混匀2 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min。轻柔吸取中间细胞层于含PBS缓冲液4 mL的15 mL离心管中,混匀形成混悬液,缓缓加入到人淋巴细胞分离液2 mL液面上,使其形成清晰的分界面,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min。取中间云雾状颗粒层于PBS缓冲液3 mL中,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min。弃上清,白色沉淀物即为卵巢GCs,标注基本信息后,-80 °C冻存备用。

**2.4 观察指标** 证候改善程度采用自拟痰湿证PCOS量化评分表,统计研究中两组患者治疗前后痰湿证候评分,比较两组患者促性腺激素(Gn)使用天数和用量、HCG日血清LH、E<sub>2</sub>、P水平、双原核(2PN)受精率和优质胚胎率。2PN受精率=2PN受精数/获卵数×100%,2PN受精是指体外受精18~22 h后见双原核和第二极体排出。优质胚胎率=优质胚胎数/可用胚胎数×100%。可用胚胎数为可移植胚胎总数,胚胎质量按照Peter标准<sup>[9]</sup>,根据取卵后第3天(D3天)胚胎形态进行评估分级,I级胚胎为优质胚胎。

**2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测**

**2.5.1 材料与试剂** TRIzol(美国Ambion公司,货号15596-026),HiScript II Q RT SuperMix for Real-time PCR、SYBR Green Master Mix(南京Vazyme公司,货号分别为R223-01、Q111-02),Taq Plus DNA Polymerase、DL 2000 DNA Marker(南京Tiangen公司,货号分别为ET105-01、MD114-02),磷酸盐缓冲液(PBS,美国HyClone公司,货号SH30256.01B),ECL(武汉聚能译通生物,货号K-12043-D10),苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA蛋白定量检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为ST505、P0009),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗、HRP标记的山羊抗小鼠二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为SA00001-2、SA00001-1),十二烷基硫酸钠(SDS)loading buffer、Tris、甘氨酸

(北京Solarbio科技有限公司,货号分别为S8010、T8060、G8200),TBST缓冲液(武汉Boster公司,货号AR0195-10),蛋白预染marker Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein ladder、Membrane nuclear and cytoplasmic protein Extraction Kit(美国Thermo Scientific公司,货号均为26616)。

**2.5.2 仪器** INCI153med型CO<sub>2</sub>培养箱(德国Memmert公司),EDC-810型PCR仪(东胜创新生物科技有限公司),Nano-100型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司),QuantStudio 6型Real-time PCR仪(美国ABI公司),PP1152型电泳仪、MP-8001型电泳槽(CAVOY公司),EPS600C型电转仪、VE-186型电转槽(上海TANON公司),ChemiDoc™ XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),PerkinElmer型全功能微孔板检测仪(美国PerkinElmer公司)。

**2.5.3 Real-time PCR检测两组患者卵巢GCs中PDCD4和PCNA的基因相对表达水平** 取颗粒细胞,使用Trizol法提取总RNA,运用超微量核酸蛋白测定仪检测RNA纯度(吸光度A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>值为1.8~2.1的细胞RNA纯度较高)并定量,根据反转录试剂盒去除DNA反应,并进行反转录,设定条件为50 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 10 min冷却保存,后用Real-time PCR进行检测,设置PCR反应条件为95 °C,预变性10 min,95 °C变性15 s,60 °C退火60 s,40个循环,以cDNA为模板,扩增目的基因。观察PCR产物的溶解曲线是否符合标准,利用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算各个样本的mRNA相对表达量,P<0.05认为差异有统计学意义。Real-time PCR以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表4。

表4 引物序列

Table 4 Primer sequences

名称	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	115
	下游 TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT	
PCNA	上游 AGGCACTCAAGGACCTCATC	250
	下游 GCCAAGGTATCCGCGTTATC	
PDCD4	上游 CATTGGAGGGGAAGGCTAGT	250
	下游 GCCTGCACACAATCTACGT	

**2.5.4 Western blot检测两组患者卵巢GCs中PDCD4和PCNA的蛋白相对表达水平** 取颗粒细胞用RIPA裂解液提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度

后变性,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,转膜后5%BSA封闭,加一抗[PDCD4(1:1000)、PCNA(1:5000)、GAPDH(1:2000)]4℃孵育过夜、PBST摇床漂洗40min、二抗(1:5000)常温摇床孵育40min、PBST摇床漂洗40min,ECL化学发光显影,用Image J软件进行光密度分析,以样品蛋白的灰度值与对应的内参蛋白GAPDH的灰度值比值作为该样品中目的蛋白的相对表达量。

**2.6 统计方法** 统计分析采用SPSS 26.0进行计算。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并对正态性分布及方差齐性进行检验,符合正态性分布且方差齐的数据,采用配对样本 $T$ 检验进行同组别治疗前后差异的比较,采用独立样本 $T$ 检验进行不同组别的组间比较。若数据不服从正态性分布,和(或)方差不齐则采用Wilcoxon Mann-Whitney  $U$ 秩和检验,并用中位数(四分位数间距)描述;计数资料以率描述,采用四格表 $\chi^2$ 检验进行比较,所有统计检验均用双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 两组患者治疗前后痰湿证候评分的比较** 对观察组和对照组治疗前后痰湿证后评分进行配对 $T$ 检验统计学分析,结果显示,与本组治疗前比较,两组患者治疗后痰湿证候评分均显著降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。对观察组和对照组治疗后痰湿证候评分进行独立样本 $T$ 检验统计学分析,结果显示,与对照组治疗后比较,观察组患者痰湿证后评分显著降低,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见表5。

表5 两组患者治疗前后痰湿证候评分比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 5 Comparison of phlegm-dampness syndrome scores before and after treatment between two groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	治疗前	治疗后
观察组	31	23.84±1.80	18.87±2.33 <sup>1,2)</sup>
对照组	30	23.93±1.86	23.77±1.60

注:与本组治疗前比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与对照组治疗后比较<sup>2)</sup> $P<0.01$

**3.2 两组患者Gn天数和Gn用量比较** 对观察组和对照组的Gn天数和Gn用量进行秩和检验统计学分析,结果显示,两组患者Gn天数和Gn用量差异均无统计学意义。见表6。

**3.3 两组患者HCG日血清LH、E<sub>2</sub>、P水平比较** 对观察组和对照组的HCG日血清LH、E<sub>2</sub>、P水平进行 $T$ 检验统计学分析,结果显示,与对照组比较,HCG

表6 两组患者Gn天数和Gn用量比较[M(Q)]

Table 6 Comparison of Gn days and Gn dosage between two groups of patients [M(Q)]

组别	例数	Gn天数/d	Gn用量/U
观察组	31	10.0(2.0)	1900.00(750.00)
对照组	30	10.0(2.5)	2075.00(1171.88)

日两组患者血清LH水平和P水平差异均无统计学意义;观察组HCG日血清E<sub>2</sub>水平显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见表7。

表7 两组患者HCG日血清LH、E<sub>2</sub>、P水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 7 Comparison of serum LH, E<sub>2</sub> and P levels on HCG day between two groups of patients ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	LH/U·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	P/μg·L <sup>-1</sup>
观察组	31	2.55±1.88	4114.87±846.00	1.39±1.00
对照组	30	2.32±0.92	3426.69±957.11	1.32±0.96

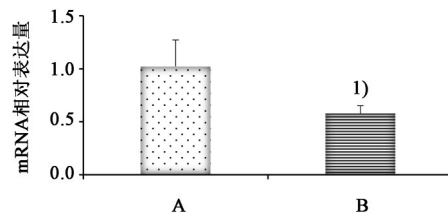
**3.4 两组患者2PN受精率和优质胚胎率比较** 对观察组和对照组的2PN受精率和优质胚胎率进行 $\chi^2$ 检验统计学分析,结果显示,与对照组比较,观察组2PN受精率( $\chi^2=25.172, P<0.01$ )和优质胚胎率( $\chi^2=7.266, P<0.01$ )显著升高,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见表8。

表8 两组患者2PN受精率和优质胚胎率比较

Table 8 Comparison of 2PN fertilization rate and high-quality embryo rate between two groups of patients %

组别	例数	2PN受精率	优质胚胎率
观察组	31	82.25(556/676)	44.19(190/430)
对照组	30	69.92(365/522)	34.23(102/298)

**3.5 两组患者卵巢GCs中PDCD4和PCNA mRNA相对表达水平比较** 研究结果显示与对照组比较,观察组患者卵巢GCs中PDCD4 mRNA表达水平下调,PCNA基因表达水平上调,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见图1和图2。



注:A.对照组;B.观察组;与对照组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ (图2-图4同)

图1 两组患者卵巢GCs中PDCD4 mRNA相对表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 1 Comparison of relative expression level of PDCD4 mRNA in ovarian GCS between two groups of patients ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

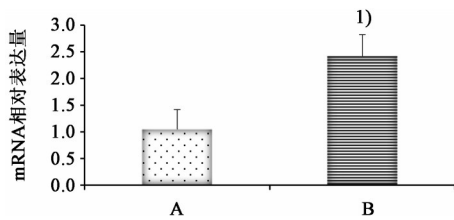


图2 两组患者卵巢GCs中PCNA mRNA相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Comparison of relative expression level of PCNA mRNA in ovarian GCS between two groups of patients ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

3.6 两组患者卵巢GCs中PDCD4和PCNA蛋白相对表达水平比较 与对照组治疗后比较,观察组较PDCD4蛋白表达水平明显下调,PCNA蛋白表达水平明显上调,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图3和图4。

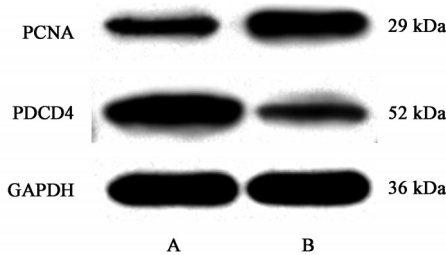


图3 两组患者卵巢GCs中PDCD4和PCNA蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PDCD4 and PCNA protein expression in ovarian GCs of two groups of patients

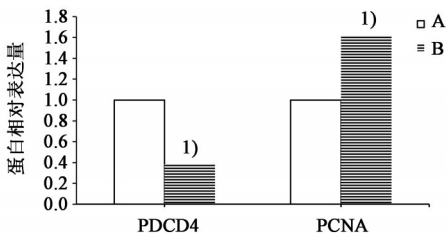


图4 两组患者卵巢GCs中PDCD4和PCNA蛋白相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Comparison of protein expression of PDCD4 and PCNA in ovarian GCs between two groups of patients ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

#### 4 讨论

启宫丸方记载于《医方集解》,主治妇人痰盛,子宫脂满,不能孕育。方中半夏、橘红、白术燥湿祛痰;香附、神曲理气消滞;川芎散郁和血;茯苓、甘草祛湿和中。陈修园于《女科要旨》中阐明启宫丸为二陈汤的化裁,“身体过于肥盛,脂满子宫而不纳精,前人有启宫丸一方颇超然……究竟是二陈汤加苍术、川芎、六神曲、香附之类”<sup>[10]</sup>。“二陈汤,一身之痰都治管”<sup>[11]</sup>,痰壅胞宫亦不例外。凡妇人肥而不孕,痰盛为主,故以半夏、橘红为君,加用气

血药,共奏除湿祛痰之效,如此才可通壅滞,启闭塞。全方燥湿化痰以治标,运脾培冲以固本,理气活血,启宫助孕,临床多用治痰湿证PCOS不孕。

痰湿证PCOS患者多以脾虚为本,痰湿为标,已有大量实验证明健脾化痰类中药可能通过调控卵巢GCs增殖与凋亡治疗PCOS<sup>[12-13]</sup>。本研究临床数据结果显示,观察组治疗前后痰湿证候评分差异有统计学意义,并且观察组治疗后痰湿证候评分较对照组明显降低,差异有统计学意义,提示健脾燥湿化痰,行气活血通滞之启宫丸可以显著改善痰湿证PCOS不孕患者的证候表现。观察组与对照组Gn天数相似,Gn用量有减少,但差异均没有统计学意义。这与赵帅等<sup>[14]</sup>应用燥湿化痰中药干预行IVF-ET的PCOS患者的研究结果相似。观察组HCG日血清E<sub>2</sub>水平高于对照组,差异有统计学意义。HCG日血清E<sub>2</sub>水平可以在一定程度上反应卵子质量,在合理范围内,E<sub>2</sub>水平高体现了卵巢对COH反应较好,有较多高质量的成熟卵泡,有利于提高胚胎发育潜能<sup>[15]</sup>。观察组2PN受精率为82.25%与对照组69.92%相比,差异有统计学意义。观察组优质胚胎率为44.19%与对照组34.23%相比,差异有统计学意义。观察组2PN受精率和优质胚胎率的明显升高,提示启宫丸可能通过祛湿化痰为卵子的发育创造良好的基础环境,提高痰湿证PCOS不孕患者卵细胞质量和胚胎发育潜能,进而改善IVF-ET临床结局。

卵巢GCs作为卵泡中数量最多的体细胞,是卵巢的主要功能细胞,参与卵泡的募集、选择及卵子的排出,影响类固醇激素的生成。GCs正常增殖分化与适时凋亡是卵泡发育成熟的前提。女性卵巢中每月有多个卵泡发育,但一般只有一个优势卵泡可达完全成熟,其余卵泡发育到一定程度通过GCs凋亡机制实现闭锁。GCs的凋亡是诱导卵泡闭锁的直接因素之一<sup>[16]</sup>。已有研究表明,卵巢GCs凋亡率过高会影响卵母细胞的成熟,促使PCOS的发生<sup>[17]</sup>。PCOS患者卵巢GCs中促凋亡B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)表达上调,而抑凋亡基因Bcl-2表达下调,促进了疾病的发生发展<sup>[18]</sup>。动物实验证实,增加PCOS大鼠卵巢GCs中Bcl-2的表达及降低Bax的表达,能抑制GCs凋亡,促进PCOS大鼠排卵<sup>[19]</sup>。因此,GCs中凋亡相关因子的异常表达会干预细胞的正常生长周期,导致卵泡发育异常,出现排卵障碍,进而引发PCOS。

PDCD4作为凋亡相关基因在卵巢GCs中表达

上调<sup>[20-22]</sup>,会导致卵泡闭锁<sup>[23]</sup>,而卵泡异常闭锁是导致PCOS的独立危险因素之一。研究表明,环状RNA(cirRNA)-126靶向微RNA(miR)-21-PDCD4轴可抑制GCs增殖并促进凋亡<sup>[24]</sup>;miR-155可以通过负调节PCOS患者PDCD4 KGN细胞通路,加强GCs增殖迁移和入侵<sup>[25]</sup>;外泌体miR-323-3p通过靶向PCOS卵巢GCs中PDCD4,促进GCs的增殖并抑制其凋亡<sup>[26]</sup>。因此,探究卵巢GCs中PDCD4的表达与PCOS发病的关系,可为改善PCOS病理状态提供新的分子靶点。

卵巢GCs异常增殖与PCOS的发病亦有密切关系<sup>[27]</sup>。PCNA为检测细胞增殖活性最常用的标记物,在卵巢GCs中表达下调会使卵泡生长停滞,导致排卵障碍<sup>[28-29]</sup>。miRNA-21-3p可以调节GCs中PCNA的表达,抑制GCs的增殖<sup>[30]</sup>。动物实验证明,PCNA在PCOS大鼠卵巢细胞中表达下调,与GCs增殖减少相关<sup>[31]</sup>。因此,观察PCNA在卵巢GCs中的表达可知卵泡发育状态,对预判PCOS的发生发展有重要作用。

卵巢GCs的异常增殖与凋亡会引起PCOS,但诱导调控GCs生长状态的确切分子机制仍不明晰,PDCD4和PCNA是反映卵巢GCs状态的良好指标,在PCOS病情进展中起关键作用。本研究实验结果显示,启宫丸联合西药治疗痰湿证PCOS不孕患者后,观察组较对照组卵巢GCs中PDCD4基因及蛋白相对表达水平下调,PCNA相对表达上调,差异均具有统计学意义。提示启宫丸可能通过增强GCs中增殖相关基因PCNA的表达水平,并抑制凋亡相关基因PDCD4的表达水平,调节GCs的发育状态,促进卵泡生长发育成熟及排出,为卵母细胞提供充分的营养,提高卵子质量及胚胎发育潜能。

启宫丸健脾燥湿化痰,行气活血通滞,能改善行IVF-ET的痰湿证PCOS患者的证候表现,提高2PN受精率和优质胚胎率,其作用机制可能是通过调控靶向信号蛋白PDCD4和PCNA干预GCs分裂进程和分化方向,促进卵泡生长成熟,改善排卵障碍,提高卵子质量,进而利于胚胎发育,可获得良好的临床结局。本研究基于痰湿证PCOS不孕患者卵巢GCs,探讨了启宫丸对PDCD4和PCNA表达的影响,为评价卵子质量,预测胚胎发育提供了新方向。但病例收集时间短,样本量较少,资料统计可能会出现偏倚,今后可继续探究调控卵巢GCs中PDCD4和PCNA表达的完整信号通路,从基因组学角度进行多中心的队列研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] ORTIZ-FLORES A E, LUQUE-RAMÍREZ M, ESCOBAR-MORREALE H F. Polycystic ovary syndrome in adult women[J]. Med Clin (Barc), 2019, 152(11):450-457.
- [2] LI X, DING W, LIU J Y, et al. Effects of dyslipidemia on IVF/ICSI pregnancy outcome in patients with polycystic ovary syndrome[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2018, 53(6):402-408.
- [3] 张莉莉,赵红玉,王超颖,等. 基于“因子分析”探讨多囊卵巢综合征(排卵障碍)的证候要素分布[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(7):1211-1214.
- [4] 李丹妮. 不同BMI多囊卵巢综合征患者内分泌代谢特征及中医证候分布研究[D]. 天津:天津中医药大学, 2020.
- [5] 吕文君. 启宫丸加减治疗多囊卵巢综合征的疗效[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2019, 6(21):110, 116.
- [6] 陈姗姗,张宁. 启宫丸在痰湿型多囊卵巢综合征患者行IVF-ET中的应用价值[J]. 中医药通报, 2017, 16(5):28-29, 14.
- [7] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社, 2018:361.
- [8] 谈勇. 中医妇科学[M]. 4版. 北京:中国中医药出版社, 2016:250-251.
- [9] Brinsden P R. A Textbook of *in vitro* fertilization and assisted reproduction [M]. New York: The Parthenon Publishing Group Inc, 1999.
- [10] 陈修园. 女科要旨[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1982:74.
- [11] 朱震亨. 丹溪心法[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:57-60.
- [12] 张萍,王维斌,邵岩飞,等. 二陈汤对多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织Bcl-2及Bax蛋白表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(11):941-950.
- [13] 崔文娜. 苍附导痰汤对痰湿型PCOS患者卵巢颗粒细胞脂联素受体基因的表达及妊娠结局的影响[D]. 济南:山东中医药大学, 2019.
- [14] 赵帅,连方,吴海萃. 苍附导痰颗粒对痰湿证多囊卵巢综合征患者卵巢颗粒细胞基因表达干预的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(2):177-183.
- [15] KYROU D, POPOVIC-TODOROVIC B, FATEMI H M, et al. Does the estradiol level on the day of human chorionic gonadotrophin administration have an impact on pregnancy rates in patients treated with rec-FSH/GnRH antagonist? [J]. Hum Reprod, 2009, 24(11):

- 2902-2909.
- [16] 张馨怡,谭季春. 多囊卵巢综合征中卵巢颗粒细胞的研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(1):134-136.
- [17] KWON C Y, CHO I H, PARK K S. Therapeutic effects and mechanisms of herbal medicines for treating polycystic ovary syndrome: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1192.
- [18] 吴坚,郑庚唐,张琳,等. 多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 Bcl-2、Bax、p53 的表达及其意义[J]. 新医学, 2019, 50(7):536-539.
- [19] 范从红,李根,廖晓燕,等. 二甲双胍对多囊卵巢综合征大鼠排卵及卵巢颗粒细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 和兔抗人单克隆抗体表达的影响[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(24):6277-6281.
- [20] QIU X, WEI Y, LIU C, et al. Hyperandrogen enhances apoptosis of human ovarian granulosa cells via up-regulation and demethylation of PDCD4[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(4):333-337.
- [21] DING L, GAO F, ZHANG M, et al. Higher PDCD4 expression is associated with obesity, insulin resistance, lipid metabolism disorders, and granulosa cell apoptosis in polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(5):1330-1337.
- [22] FU X, HE Y, WANG X, et al. MicroRNA-16 promotes ovarian granulosa cell proliferation and suppresses apoptosis through targeting PDCD4 in polycystic ovary syndrome[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(2):670-682.
- [23] 李红娟,唐小珂,王雅莉. 微RNA-21-5p 靶向 PDCD4 基因对多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(4):450-454.
- [24] LU J, XUE Y, WANG Y, et al. CiRS-126 inhibits proliferation of ovarian granulosa cells through targeting the miR-21-PDCD4-ROS axis in a polycystic ovarian syndrome model [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 381(1):189-201.
- [25] XIA H, ZHAO Y. miR-155 is high-expressed in polycystic ovarian syndrome and promotes cell proliferation and migration through targeting PDCD4 in KGN cells [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1):197-205.
- [26] ZHAO Y, TAO M, WEI M, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomal miR-323-3p promotes proliferation and inhibits apoptosis of cumulus cells in polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):3804-3813.
- [27] WEI D, XIE J, YIN B, et al. Significantly lengthened telomere in granulosa cells from women with polycystic ovarian syndrome (PCOS) [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34(7):861-866.
- [28] CHEN H, GUO J H, ZHANG X H, et al. Defective CFTR-regulated granulosa cell proliferation in polycystic ovarian syndrome [J]. *Reproduction*, 2015, 149(5):393-401.
- [29] ZHAO J, XU J, WANG W, et al. Corrigendum to "Long non-coding RNA LINC-01572: 28 inhibits granulosa cell growth via a decrease in p27 (Kip1) degradation in patients with polycystic ovary syndrome" [EBioMedicine 36 (2018) 526-538] [J]. *EBioMedicine*, 2018, 37:563.
- [30] 张国青. MiRNA-21-3p 在多囊卵巢综合征中的表达及其相关功能研究[D]. 长春:吉林大学, 2019.
- [31] MUSKHELISHVILI L, WINGARD S K, LATENDRESSE J R. Proliferating cell nuclear antigen-A marker for ovarian follicle counts [J]. *Toxicol Pathol*, 2005, 33(3):365-368.

[责任编辑 王鑫]