

甘草次酸、水飞蓟宾对体外培养的胰岛素抵抗猪卵巢颗粒细胞的影响

李威, 季小彬, 丛晶, 吴效科

黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科, 哈尔滨 150040

摘要 多囊卵巢综合征(PCOS)患者往往伴有卵巢细胞的胰岛素抵抗及激素水平的异常,胰岛素增敏剂能够缓解PCOS患者的症状。本研究利用地塞米松诱导的猪体外卵巢颗粒细胞胰岛素抵抗,探讨中药单体甘草次酸及水飞蓟宾作为胰岛素增敏剂对胰岛素抵抗卵巢颗粒细胞异常激素分泌的改善情况,从而阐明中药单体的疗效机制,进而扩大中药单体的临床应用。结果表明,地塞米松作用后,体外培养的猪卵巢颗粒细胞分泌睾酮(T)增加,同时伴有17 α 羟化酶(*CYP17*)mRNA表达量的上调,AMPK(一磷酸腺苷活化蛋白激酶)mRNA表达降低,芳香化酶(*P450arom*)变化不明显。甘草次酸和水飞蓟宾都能够通过提高AMPK mRNA的表达水平,降低胰岛素抵抗颗粒细胞的雄激素分泌能力及*CYP17* mRNA的表达水平。结果显示,中药甘草次酸和水飞蓟宾显著抑制了胰岛素抵抗细胞过高的雄激素分泌能力。卵巢细胞AMPK途径的激活可能是中药胰岛素增敏剂治疗PCOS高雄激素血症的途径之一。

关键词 颗粒细胞;胰岛素抵抗;甘草次酸;水飞蓟宾

中图分类号 R339.2

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.19.010

Effect of Glycyrrhetic Acid and Silibinin on Porcine Ovary Granulosa Cell Insulin Resistance

LI Wei, JI Xiaobin, CONG Jing, WU Xiaoke

Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract Ovarian cell Insulin Resistance (IR) and abnormal homogenesis is one of the characteristics of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and could be remedied by the insulin sensitive agent. To investigate herbal medicine as insulin sensitive agents to improve IR ovarian granulosa cell in vitro and clarify the mechanism of herbal medicine on IR, glycyrrhetic acid and silibinin were used to treat dexamethasone (DEX) induced IR porcine ovary granulosa cells. After DEX treatment, the medium testosterone level increased, while the *CYP17* mRNA expression increased and the AMP-activated protein kinase activity (*AMPK*), which is a protein that switches on ATP-producing catabolic pathways and switches off ATP-consuming anabolic processes based on energy status, mRNA expression decreased in vitro IR porcine ovarian theca cell. The results also show that compared to dexamethasone induced IR group, by adding glycyrrhetic acid and silibinin, testosterone production is reduced and mRNA expression of *AMPK* is increased. In summary, glycyrrhetic acid and silibinin significantly reverse hyperandrogen (testosterone) status and improve the sensitivity of energy balance by promoting the expression of *AMPK*. Chinese medicine glycyrrhetic acid and silibinin could reduce the hyperandrogenism of *in vitro* IR granulosa cell via increasing *AMPK* mRNA expression.

Keywords granulosa cell; IR; glycyrrhetic acid; silibinin

收稿日期:2011-03-28;修回日期:2011-05-18

基金项目:国家公益性行业(中医药管理局2008中医药行业)专项(200807021);黑龙江省杰出青年基金项目(2008-18);黑龙江省博士后科研启动金项目(LBH-Q09009)。

作者简介:李威,博士研究生,研究方向为生殖内分泌代谢,电子信箱:liweiarthas@163.com;季小彬(共同第一作者),硕士研究生,研究方向为妇产科疾病的中药治疗,电子信箱:xiaobin02@yahoo.com;吴效科(通信作者),主任医师,研究方向为多囊卵巢综合征的中西医结合治疗,电子信箱:xiaokewu2002@vip.sina.com。



0 引言

多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS) 是绝经前妇女最常见的内分泌紊乱性疾病, 高雄激素血症是其特征之一^[1]。有研究表明, 胰岛素抵抗与 PCOS 高雄激素血症密切相关, 减轻胰岛素抵抗能够在一定程度上恢复 PCOS 患者的生殖机能^[2]。

甘草是一味治疗糖尿病的传统中药, 宋代《太平圣惠方》中就有记载甘草治疗消渴的方剂^[3]。甘草中的有效成分甘草次酸能够增强胰岛素的敏感性, 并且可以降低 PCOS 患者的睾酮水平^[4]。水飞蓟宾是一种护肝、抗肿瘤药物, 主要是通过抑制增殖途径而起作用。近年的研究发现, 水飞蓟宾具有缓解胰岛素抵抗的作用^[5]。高雄激素是造成 PCOS 患者不孕的主要原因之一。因推测胰岛素抵抗卵巢细胞的雄激素合成能力可能发生改变, 改善胰岛素抵抗可能有利于减低卵巢合成雄激素的能力, 因此, 本研究采用中药单体甘草次酸及水飞蓟宾作为胰岛素增敏剂观察它们在体外对猪卵巢颗粒细胞甾体激素合成和 AMPK mRNA 表达的影响, 以期阐明中药单体的疗效机制进而扩大中药单体的临床应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

屠宰场新鲜雌性成熟家猪卵巢, 4h 内用保温瓶带回实验室。

1.1.2 试剂

DMEM/F12 培养基 (Hyclone 公司), 胎牛血清 (FCS) (Biosource 公司), Forskolin (Sigma 公司), RT-PCR 所需试剂 (Invitrogen 公司), 引物芳香化酶 (*P450arom*)、17 α 羟化酶 (*CYP17*)、磷酸腺苷活化蛋白激酶 (*AMPK*)、 β 肌动蛋白 (*β -actin*, 上海生工生物有限公司), 放射免疫试剂盒 (北京福瑞生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组

从屠宰场取猪卵巢放入加有双抗, 保温在 37℃ 的生理盐水中, 4h 内带回实验室。生理盐水冲洗后, 用 1mL 注射器刺破卵泡吸出卵泡液。将含有颗粒细胞的卵泡以 1500r/min 离心 10min, 离心后吸掉上清液。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将沉淀重悬, 反复离心 3 次后, 计数细胞数目, 以 10⁶/mL 的细胞浓度接入培养瓶中。然后加入培养基 (DMEM-F12, 胎牛血清 10%), 5% CO₂、95% 空气、饱和湿度, 37℃ 培养箱培养 72h。

1.2.2 分组干预

待细胞贴满瓶底后, 随机分为 4 组, 分别为空白组 (C)、抵抗组 (M)、甘草次酸组 (G)、水飞蓟宾组 (S)。各组重新加入含 0.1% DMSO 的培养液 (DMEM-F12, 胎牛血清 10%)。除对照组外, 其余 3 组都加入终浓度为 1 μ mol/L 的地塞米松 (DEX)。甘草次酸组、水飞蓟宾组分别加入相应药物终浓度为

20 μ mol/L, 继续培养 48h。

1.2.3 细胞上清液甾体激素的测定

培养结束后, 收集细胞上清液, 用化学发光法测定甾体激素睾酮 (T)、孕酮 (P) 和雌二醇 (E2) 浓度。

1.2.4 细胞分子水平的检测

引物设计参照 genebank 提供的引物序列, 应用 prime5.5 设计引物, 由上海生工生物有限公司合成, 引物序列见表 1。参考常规 RT-PCR 步骤反转录并扩增后, 琼脂糖凝胶电泳^[6]。利用凝聚成像系统扫描、拍照。应用图像分析软件获取条带平均密度和面积数据, 通过测得的目的基因的密度 $\times$ 面积/(同组 *β -actin* 的密度 $\times$ 面积), 计算出目的基因的相对表达量 (GSR), 计算 mRNA 相对表达量 (灰度比)。

表 1 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of genes

基因名称	引物序列	退火温度/℃
AMPK	GCA TCG GCA CAT TCC GAG ACT T	55.3
	CGT GGG GCT GGC AGG AAA GG	
CYP17	TGC TTA TTA AGA AGG GCA AGG ACT T	57.2
	TGT TGG ACG CGA TGT CTA GAG T	
P450arom	GGC TCG CAT ACA CTA CTT CC	58
	AAC TCC CTT CCC TGC TCA AA	
β -actin	ATG GTG GGT ATG GGT CAG AA	55
	ATG TCG TCC CAG TTG GTG AT	

1.2.5 统计学分析

各实验独立重复 3 次, 所有数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 系统软件, 对数据进行 *t* 检验, *P* < 0.05 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 地塞米松对卵巢颗粒细胞甾体激素合成的影响

细胞培养结束后, 收集细胞上清液并测定细胞上清液中甾体激素的浓度。结果显示, 与空白组相比, 抵抗组细胞睾酮水平明显升高, 加入药物 (甘草次酸、水飞蓟宾) 干预后, 睾酮水平明显降低 (*P* < 0.05), 孕酮, 雌二醇变化不明显 (图 1)。

2.2 关键分子 mRNA 表达水平变化

RT-PCR 方法检测培养细胞的 *CYP17*、*P450arom* 及 *AMPK* mRNA 的转录变化。结果表明, 抵抗组与空白组相比, *CYP17* mRNA 的表达显著上升, 而 *AMPK* mRNA 的表达却有所降低, 两种中药的干预组能够降低抵抗组异常升高的 *CYP17* mRNA 表达水平, 并且与抵抗组相比能够提高 *AMPK* mRNA 的表达。*P450arom* mRNA 的变化在所有分组中变化不明显 (图 2)。

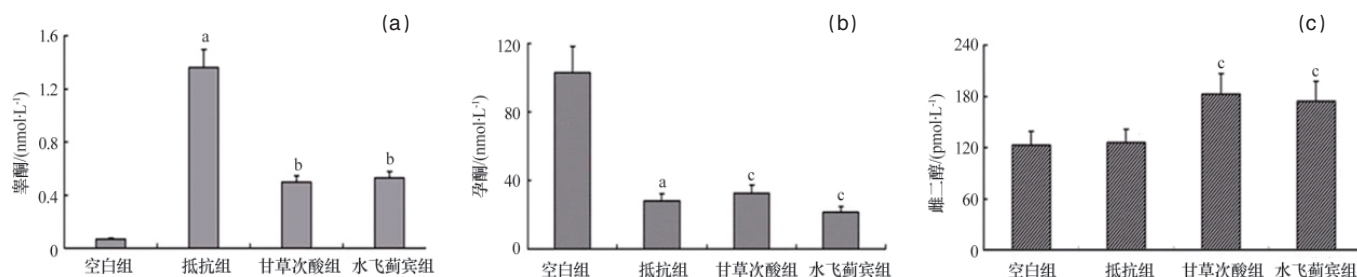


图1 各组中培养液甾体激素水平

Fig. 1 Steroidal hormone level of medium in different groups

注: a, 与空白组相比 $P<0.05$; b, 与抵抗组相比 $P<0.05$; c, 与抵抗组相比 $P>0.05$ 。

Notes: a, compared with control group, $P<0.05$; b, compared with DEX treated group, $P<0.05$; c, compared with DEX treated group, $P>0.05$.

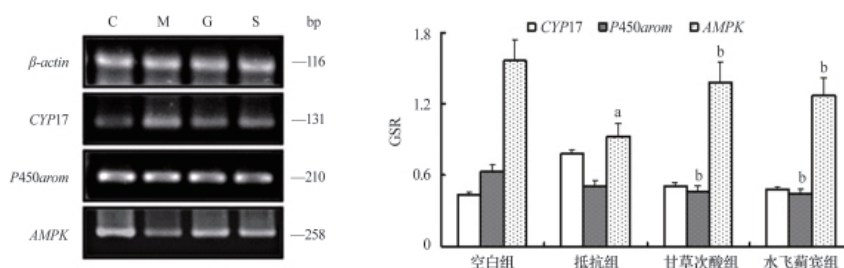


图2 各组不同基因 mRNA 表达情况

Fig. 2 mRNA expression of genes in different groups

注: a, 与空白组相比 $P<0.05$; b, 与抵抗组相比, $P<0.05$ 。

Notes: a, compared with control group, $P<0.05$; b, compared with DEX treated group, $P<0.05$.

3 讨论

3.1 卵巢局部胰岛素抵抗与 PCOS

PCOS 临床表现为胰岛素抵抗、生殖内分泌异常及高雄激素血症。很多研究表明,高雄激素血症与胰岛素抵抗密切相关^[7]。例如,胰岛素增敏剂:二甲双胍等,能够在一定程度上缓解 PCOS 的症状,并降低血清雄激素水平^[8],说明胰岛素抵抗影响生殖内分泌代谢。但无论是 1 型或 2 型糖尿病的女性患者都没有表现为明显的生殖机能障碍,显示经典靶器官(骨骼肌、脂肪)的胰岛素抵抗不是生殖机能障碍的原因。而在 PCOS 患者,胰岛素抵抗的发生局限于卵巢器官而非全身,那么卵巢胰岛素抵抗对于全身的糖代谢影响就很小。这可能就是糖尿病妇女并不伴有生殖障碍而某些 PCOS 患者全身胰岛素抵抗现象不明显的原因^[9]。然而,卵巢又是女性的重要生殖内分泌器官,其糖代谢水平的改变很可能使其功能发生变化,女性体内的雄激素主要来源于肾上腺及卵巢^[10],PCOS 的诊断是在排除肾上腺皮质功能亢进因素后作出的,这意味着卵巢来源的雄激素可能是 PCOS 患者高雄激素血症的主要原因。本研究结果表明,在体外诱导胰岛素抵抗后,卵巢颗粒细胞合成雄激素的能力和水平都有上升的趋势,并且这些效果都能够被有胰岛素增敏效应的中药(甘草次酸和水飞蓟宾)所抑制。这些结果表明,改善卵巢局部的胰岛素抵抗有利于缓解 PCOS 的高雄激素血症。

3.2 胰岛素抵抗卵巢可能发生功能转化

卵巢是女性甾体类激素的主要分泌器官,性激素的合成主要是由卵泡内部的颗粒细胞、卵泡膜细胞完成。一般认为,卵巢雄激素以孕酮为底物在卵泡膜细胞中合成,主要受黄体生成激素(LH)调节;雌激素以睾酮为底物,主要在颗粒细胞当中合成,主要受卵泡生成激素(FSH)调节^[11]。正常的卵巢组织中,CYP17 存在于卵泡膜细胞和黄素化的卵泡膜细胞中,P450arom 主要存在于颗粒细胞中,这也与相应的细胞功能相对应^[12]。但在卵巢细胞发生胰岛素抵抗后,这些细胞的生殖内分泌特性则可能发生改变。

已有研究表明,在体外培养的颗粒细胞中使用 MAPK 特异性抑制剂(PD98059)抑制 MAPK 通路后,CYP17 基因的转录水平上升了近 11 倍,雄烯二酮的表达量上升了 13 倍,同时伴有 c-fos 基因表达的抑制^[12]。c-fos 是一种催化转录因子,能够负向调节 CYP17 的表达水平。在正常颗粒细胞中 c-fos 呈高表达状态,而在卵泡膜细胞中则几乎检测不到^[12]。卵巢中不同细胞类型中 c-fos 表达的差异可能是造成细胞内分泌功能差异的原因。尽管在本实验中没有检测 c-fos 的表达变化情况,但在胰岛素抵抗后,猪卵巢颗粒细胞的睾酮分泌能力及分泌水平都有较大水平的提升,这说明胰岛素信号通路受损后卵巢细胞的生殖内分泌功能发生改变,原本以合成雌激素为主要功能的颗粒细胞可能向着合成雄激素的方向转化。虽

然这一结论还有待进一步研究证实,但现有的证据已经表明,增强胰岛素敏感性可以改善卵巢的激素合成^[13-14]。

3.3 甘草次酸、水飞蓟宾治疗胰岛素抵抗的可能作用通路

甘草中的甘草次酸成分在临床上常用于抗炎、镇痛、抗过敏、抗溃疡等诸多方面。近来新发现它还具有降血脂、护肝、降低睾酮等作用。甘草次酸能够改善 PCOS 患者体内紊乱的 11β -羟基类固醇脱氢酶 1。甘草次酸能够增加胰岛素敏感性、降低血糖、降低睾酮水平^[15-16]。水飞蓟宾对于多种 P450 细胞色素系列酶具有作用。此外,水飞蓟宾可以增加代谢综合征患者的葡萄糖代谢率水平,改善胰岛素抵抗^[17]。虽然这两种药物在中医临床治疗中被广泛使用,但其作用的分子机制还不是十分明确。

本实验的结果显示,在胰岛素抵抗的卵巢颗粒细胞中 AMPK mRNA 表达降低,两种中药单体都能够使 AMPK mRNA 的表达上升。AMPK 能抑制其下游 β -羟- β -甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA reductase)的调控^[18],而 HMG-CoA 是限速的胆固醇生物合成途径酶,起维持胆固醇动态平衡的关键作用,而胆固醇是激素合成和代谢的最原始阶段,两种药物单体可能通过这一途径降低了胰岛素抵抗细胞的甾体激素合成能力。AMPK 被称为“细胞能量调节器”,是调节代谢和能量的需要,AMPK 能够调节条下游的信号通路参与多种细胞信号传导过程^[19-20]。研究表明,AMPK 参与调解能量代谢、糖脂代谢、激素合成代谢等多个生理过程。另有研究表明,牛颗粒细胞经过 AMPK 的特异性激动剂刺激后合成雌激素和孕激素的能力下降,表明 AMPK 能够制约激素方面的合成或代谢^[21]。

4 结论

本研究通过体外地塞米松诱导的胰岛素抵抗模型探讨中药胰岛素增敏剂甘草次酸、水飞蓟宾在改善 PCOS 患者高雄激素血症方面可能的机制。尽管胰岛素抵抗与 PCOS 的关系还有待进一步研究,但本研究结果表明,卵巢局部的胰岛素抵抗是造成 PCOS 患者卵巢内分泌异常的原因之一。随着中药作用机制的深入研究,中药治疗多囊卵巢综合征会有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Franks S, McCarthy M I, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: Involvement of genetic and environmental factors [J]. *Int J Androl*, 2006, 29(1): 278-285.
- [2] Giallauria F, Palomba S, Vigorito C, et al. Androgens in polycystic ovary syndrome: The role of exercise and diet [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(4): 306-315.
- [3] 张山广, 王金荣. 《太平圣惠方》消渴证方药分析[J]. 河南中医, 1994(4): 236-238.
Zhang Guangshan, Wang Jinrong. *Henan Traditional Chinese Medicine*, 1994(4): 236-238.
- [4] Armanini D, Castello R, Scaroni C, et al. Treatment of polycystic ovary syndrome with spironolactone plus licorice [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007, 131(1): 61-67.
- [5] McCarty M F. Potential utility of natural polyphenols for reversing fat-induced insulin resistance[J]. *Med Hypotheses*, 2005, 64(3): 628-635.
- [6] Qu J, Wang Y, Wu X, et al. Insulin resistance directly contributes to androgenic potential within ovarian theca cells [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(5 Suppl 1): 1990-1997.
- [7] Veldhuis J D, Zhang G, Garmey J C. Troglitazone, an insulin-sensitizing thiazolidinedione, represses combined stimulation by LH and insulin of de novo androgen biosynthesis by thecal cells in vitro [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3): 1129-1133.
- [8] Sangraula H, Paudel K R, Sharma M. Metformin and troglitazone in the treatment of female infertility associated with polycystic ovarian syndrome [J]. *JNMA J Nepal Med Assoc*, 2009, 48(176): 335-339.
- [9] Zhao L, Li W, Han F, et al. Berberine reduces insulin resistance induced by dexamethasone in theca cells in vitro [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(1): 461-463.
- [10] Markopoulos M C, Rizos D, Valsamakis et al. Hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome persists after menopause [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(3): 623-631.
- [11] Wu J, Tian Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro[J]. *Zygote*, 2007, 15(3): 233-240.
- [12] Patel S S, Beshay V E, Escobar J C, et al. Molecular mechanism for repression of 17 alpha-hydroxylase expression and androstenedione production in granulosa cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(12): 5163-5168.
- [13] Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, et al. Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(10): 4794-4801.
- [14] González C, Díaz F, Alonso A. Neuroprotective effects of estrogens: Cross-talk between estrogen and intracellular insulin signalling [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2008, 8(1): 65-67.
- [15] 王小英, 肖柳英, 潘竞璐, 等. 甘草对抗 D-半乳糖诱导大鼠糖尿病模型的实验研究[J]. 药物研究, 2007, 13(8): 8-10.
Wang Xiaoying, Xiao Liuying, Pan Jingqiang, et al. *China Pharmaceuticals*, 2007, 13(8): 8-10.
- [16] Armanini D, Mattarello M J, Fiore C, et al. Licorice reduces serum testosterone in healthy women[J]. *Steroids*, 2004, 69(11-12): 763-766.
- [17] 郎江明, 刘瑜, 魏爱生, 等. 水飞蓟宾对代谢综合征患者葡萄糖代谢率的影响[J]. 新中医, 2008, 12(17): 26-27.
Lang Jiangming, Liu Yu, Wei Aisheng, et al. *Journal of New Chinese Medicine*, 2008, 12(17): 26-27.
- [18] Trapani L, Violo F, Pallottini V. Hypercholesterolemia and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase regulation in aged female rats [J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(2): 119-128.
- [19] Dzamko N L, Steinberg G R. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism[J]. *Acta Physiol*, 2009, 196(1): 115-127.
- [20] Kola B, Boscaro M, Rutter G A, et al. Expanding role of AMPK in endocrinology[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(5): 205-215.
- [21] Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, et al. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: Possible involvement of adenosine 50 Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK)[J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 76(3): 368-378.

(责任编辑 吴晓丽)