

· 实验研究 ·

羟基 γ -异山椒素抑制人体卵巢颗粒细胞雌激素生物合成的机制研究张 健¹, 史小可², 陈 重³, 肖雯婧³, 李玉博⁴, 张再媛¹, 曹东怡², 王 飞², 呼永河³

(1 西南交通大学医学院, 成都 610031; 2 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041;

3 西部战区总医院, 成都 610083; 4 西南医科大学, 泸州 646000)

[摘要] **目的:**探讨羟基 γ -异山椒素抑制人体卵巢颗粒细胞雌激素合成的相关机制。**方法:**利用 CCK-8 检测 4 种山椒素对人卵巢颗粒细胞系(KGN 细胞株)增殖的影响; Elisa 法检测 4 种山椒素对 KGN 细胞雌二醇合成的影响; RT-qPCR 检测 KGN 细胞芳香化酶基因; Western blot 法检测芳香化酶蛋白及相关通路蛋白。**结果:**羟基 γ -异山椒素抑制雌二醇生物合成效果最佳[半抑制浓度(IC_{50}) = (16.63 \pm 0.39) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], 并且在该浓度下对 KGN 细胞的增殖无明显抑制作用。在羟基 γ -异山椒素干预后, 芳香化酶基因和蛋白表达水平显著下降($P < 0.05$), 且芳香化酶的活性未受到明显影响; 同时, 羟基 γ -异山椒素能显著降低 P-CERB, P-AKT, P-p38 蛋白的表达($P < 0.05$)。**结论:**羟基 γ -异山椒素可能通过抑制 p38/MAPK 和 PI3K/AKT 通路的激活, 降低 CREB 的磷酸化, 抑制芳香化酶转录, 最终抑制 KGN 细胞雌激素生物合成。

[关键词] 雌激素; 花椒; 羟基 γ -异山椒素; 芳香化酶; 卵巢颗粒细胞**[中图分类号]** R965.1; R975.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)07-0735-07

Mechanism of hydroxy- γ -isosanshool on the inhibition of estrogen biosynthesis in human ovarian granulosa cells

ZHANG Jian¹, SHI Xiao-ke², CHEN Zhong³, XIAO Wen-jing³, LI Yu-bo⁴, ZHANG Zai-yuan¹,
CAO Dong-yi², WANG Fei², HU Yong-he³

(1 College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2 Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 3 The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China; 4 Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of inhibitory effect of hydroxy- γ -isosanshool on estrogen synthesis in human ovarian granulosa cells. **Methods:** The effects of four kinds of sanshool on the proliferation of human ovarian granulosa cell line (KGN cell line) were detected by CCK-8. The effects of four kinds of sanshool on estradiol synthesis in KGN cells were detected by Elisa. Aromatase gene in KGN cells was detected by RT-qPCR, and aromatase protein and related pathway proteins were detected by Western Blot. **Results:** Hydroxy- γ -isosanshool had the strongest inhibitory effect on estradiol biosynthesis [$IC_{50} = (16.63 \pm 0.39) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], while had no significant inhibitory effect on the proliferation of KGN cells at the same concentration. The expression levels of aromatase gene and protein decreased significantly after the intervention of hydroxy- γ -isosanshool ($P < 0.05$), and the activity of aromatase was not significantly affected. Hydroxy- γ -isosanshool significantly reduced the protein expressions of P-CERB, P-AKT and P-p38 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Hydroxy- γ -isosanshool may inhibit aromatase transcription and estrogen biosynthesis in KGN cells by inhibiting the activation of p38/MAPK and PI3K/AKT pathways and reducing the level of CREB phosphorylation, inhibit aromatase transcription, and ultimately inhibit

[基金项目] 四川省科技厅重点研发资助项目(2019YFS0542, 2018SZ0033, 2020YFS0122); 四川省卫健委重点资助项目(19ZDXM0016)**[作者简介]** 张健, 男, 硕士, 主要从事药理学研究。E-mail: 1352917317@qq.com。**[通讯作者]** 呼永河, 男, 教授, 主要从事中医内科学研究。E-mail: huyonghe@126.vip.com。

the estrogen biosynthesis of KGN cells.

[Key words] estrogen; zanthoxylum bungeanum; hydroxy- γ -isosanshool; aromatase; ovarian granulosa cells

雌激素主要是卵巢和胎盘分泌的类固醇激素,它在女性各个年龄阶段发挥着重要作用。其在体内有着广泛的生理作用,调节着生殖、心血管、骨骼、内分泌、神经系统等生理和病理过程^[1]。育龄妇女的雌激素主要来源于卵巢颗粒细胞,卵巢雌激素分泌紊乱更容易诱发女性雌激素依赖性疾病和生育问题。芳香化酶属于细胞色素 P450 家族,由 *CYP19* 基因编码,是雌激素合成过程中的关键限速酶^[2],它的表达受到组织特异性启动子的调控^[3]。芳香化酶是一个重要的药物设计靶标,其抑制剂受到广泛研究,如来曲唑、依西美坦已成为多种疾病一线临床药物^[4-5]。芳香化酶抑制剂 (aromatase inhibitors, AIs) 通过抑制芳香化酶活性,减少睾酮和雄烯二酮向雌激素的转化,降低雌激素的合成。但其选择性较差具有全身性的雌激素抑制作用,会造成较严重的不良反应,如肌肉骨骼症状、潮热和失眠等^[6]。因此,需要去寻找不良反应更小、靶向性更高的新型芳香化酶抑制剂。

花椒在中国有着悠久的食用和药用历史,可用于抗菌杀虫、止痒止痛、治疗妇科疾病(月经不通、阴道炎、盆腔炎)等^[7-8]。山椒素属于花椒中的酰胺类物质^[9],作为花椒中主要的生物活性成分之一,花椒妇科药用价值可能和山椒素密切相关。现代医学研究表明山椒素具有抗炎镇痛、降血糖、麻醉、抗氧化、改善脂质代谢等多种药理活性^[10-11],具有很好的药用潜力。因此,本研究拟观察花椒中的 4 种山椒素(羟基 α -山椒素、羟基 β -山椒素、羟基 γ -山椒素、羟基 γ -异山椒素)对人体卵巢颗粒细胞系(KGN 细胞株)雌激素的影响以及与芳香化酶的关系。

材料与方 法

1 试剂

睾酮、来曲唑(Let, Sigma-Aldrich 公司);羟基 α -山椒素、羟基 β -山椒素、羟基 γ -山椒素,羟基 γ -异山椒素(上海源叶公司,批号: M15N10D102950, M07A11D110696, M26M10D83026, M28J11D116774, 纯度 $\geq 98\%$);佛司可林(forsklin, FSK, Beyotime 公司);二甲基亚砷(DMSO, Solarbio 公司);DMEM/F-12 培养基、DMEM 高糖培养基、10% 青链霉素液

(Hyclone 公司);胎牛血清(Gibco 公司);雌二醇试剂盒(江苏泽成公司);增强型 CCK-8 试剂盒(Beyotime 公司);放射免疫沉淀试验(RIPA)弱细胞裂解液(北京全式金公司);特超敏 ECL 化学发光试剂盒[Aromatase Antibody(Abcam)公司];Vinculin 抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Proteintech 公司);Phospho-环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB, Ser133)抗体, CREB(48H2)抗体, phospho-p38 抗体, p38 抗体, phospho-AKT 抗体, AKT 抗体(CST 公司);全封闭法实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒(北京全式金生物公司)。

2 细胞

人卵巢颗粒细胞系(KGN 细胞株);HEK-293A 芳香化酶过表达细胞(HEK-293A aro)。所用细胞由中国科学院成都生物研究所实验室提供与构建。

3 主要仪器

酶标仪;细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司);超净工作台(苏州苏洁净化设备公司);半自动化学发光免疫分析仪(Bio-Ekon 生物技术公司);Quant LAS 500 凝胶成像仪;PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司)。

4 细胞培养

KGN 株所用培养基为 DMEM/F-12 (10% 的胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、0.1 mg·mL⁻¹链霉素), HEK-293A aro 细胞培养于 DMEM-高糖 (10% 的胎牛血清、200 μ g·mL⁻¹的 G418、100 U·mL⁻¹青霉素、0.1 mg·mL⁻¹链霉素)的培养基中,二者置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中培养。

5 山椒素对 KGN 细胞增殖的影响

为了研究 4 种山椒素对细胞活力的影响,本实验分别用 1, 10, 50 μ mol·L⁻¹浓度的 4 种山椒素处理 KGN 细胞,每组设置 3 个复孔,培养过夜后,移除旧培养基,加入含有 10% CCK-8 试剂的新鲜培养基 100 μ L,于细胞培养箱中继续孵育 1~4 h,然后用酶标仪检测波长在 450 nm 处的吸光度。

6 山椒素对 KGN 细胞雌激素合成的影响

取对数生长期的 KGN 细胞,接种于 24 孔板,培养过夜后,吸掉旧培养基,加入新的无血清培养基,分别加 1, 10, 50 μ mol·L⁻¹浓度的 4 种山椒素,以及

10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FSK 和 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的来曲唑作为对照,继续培养 24 h 后,将培养基更换为新的无血清培养基,每孔分别加入终浓度为 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的睾酮,继续培养 24 h,收集上清液和裂解液保存,然后用磁微粒分离化学发光法测定上清中雌二醇的含量,利用 BCA 法对裂解液进行蛋白定量。相对雌二醇含量 = 雌激素含量/蛋白浓度。

7 Western blot 法检测 KGN 细胞芳香化酶和蛋白激酶信号的表达

取对数生长期的 KGN 细胞接种于 6 孔板,培养过夜后加入不同浓度的羟基 γ -异山椒素 (5, 15, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),并设置空白对照组 DMSO 和对照组 FSK,处理 24 h 后,加入 RIPA 细胞裂解液,高速离心后收集上清液,BCA 定量蛋白浓度。使用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,然后将蛋白转到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,将条带与 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 在室温下封闭 1.5 h 来阻断非特异性结合位点,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下一抗孵育过夜。用 TBST 将膜洗净并于二抗室温孵育 1.5 h 后滴加特超敏 ECL 化学发光试剂,接着进行全自动凝胶成像仪成像,使用 Image J 对灰度值进行定量。用浓度为 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 羟基 γ -异山椒素处理 KGN 细胞,1, 3, 6, 12, 24 h 后提取蛋白,采用上述同样的方法检测相关蛋白表达量。

8 RT-qPCR 检测芳香化酶 mRNA 的表达

取对数生长期的 KGN 细胞接种于 6 孔板,培养过夜后加入不同浓度的羟基 γ -异山椒素 (5, 15, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的含药培养基,并设置对照组。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。取 2 μg 总 RNA 以 oligo (dT) 18 作为引物,用 M-MLV 逆转录酶进行 cDNA 的合成。然后使用 SYBR Green I 进行 RT-qPCR。设定 PCR 反应程序:程序一:95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s;程序二:95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s,进行 40 个循环;程序三:72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s。使用 GAPDH 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 分析芳香化酶基因表达水平。检测中使用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

名称	序列
芳香化酶	5'-ATCCTCAATACCAGGTCCTGGC-3' (sense) and 5'-AGAGATCCAGACTCGCATGAATTCT-3' (antisense)
GAPDH	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' (sense) and 5'-GCTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA-3' (antisense)

9 数据分析

使用 SPSS 和 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析,实验数据的差异性分析使用 t 检验及 one-way ANOVA 方法,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,当 $P < 0.05$ 时认为有显著性差异,具有统计学意义。

结 果

1 4 种山椒素对 KGN 细胞活性的影响

本研究分别用 1, 10, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度 4 种山椒素处理 KGN 细胞 24 h 后,用 CCK-8 试剂盒检测山椒素对细胞增殖的影响。如图 1 所示,药物浓度在 1 ~ 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内对细胞的增殖没有显著影响。

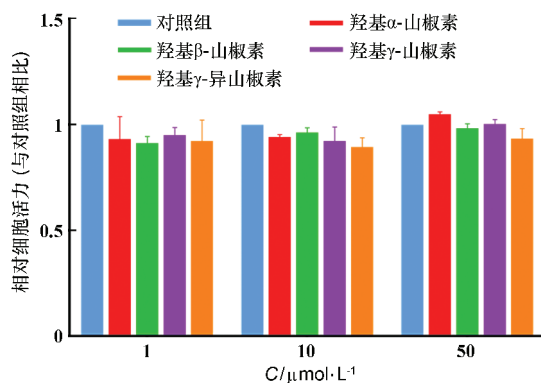
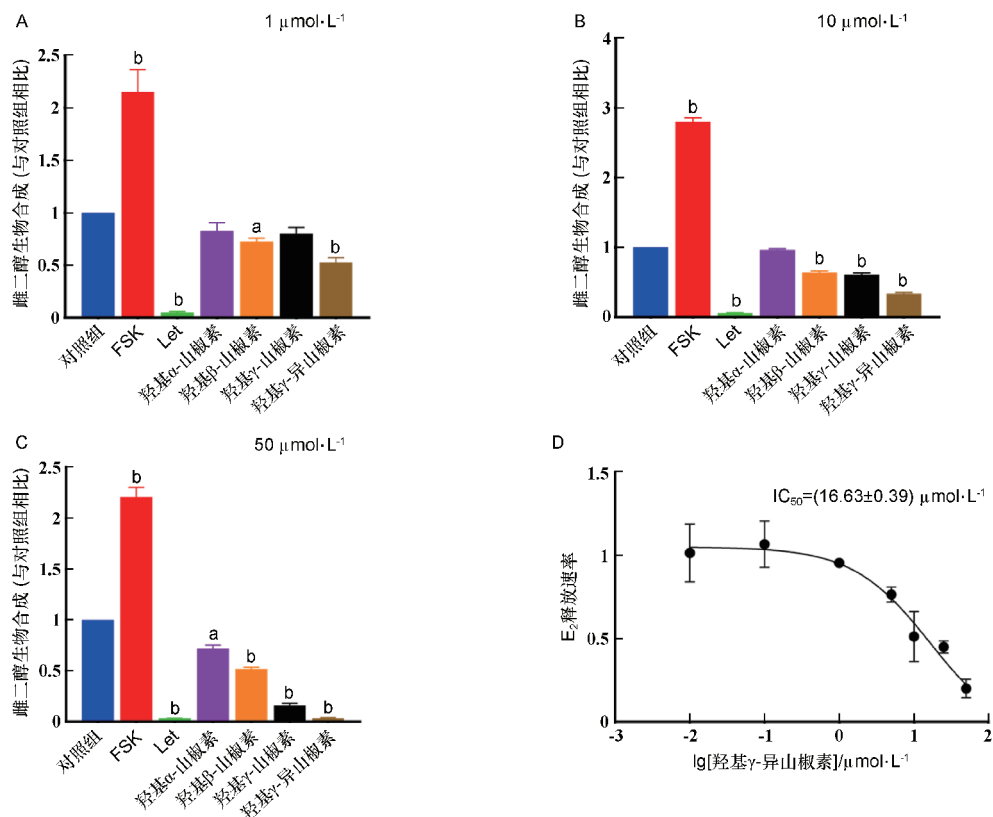


图 1 相对细胞活力检测结果

2 4 种山椒素对 KGN 细胞雌激素合成的影响

本研究检测了不同浓度的 4 种山椒素对 KGN 细胞雌激素合成的影响。同时设置了 FSK 组和来曲唑组作为对照 (FSK 可以促进 KGN 细胞雌激素的合成,来曲唑可以抑制 KGN 细胞雌激素的合成)。如图 2A 所示,在 4 种山椒素的浓度为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比羟基 γ -异山椒素显著抑制 KGN 细胞雌二醇合成 ($P < 0.0001$)。当达到 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时,羟基 γ -异山椒素对雌激素合成的抑制显著高于对照组和另外 3 种山椒素。如图 2C,在给药 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时,羟基 γ -异山椒素对雌激素合成抑制效果明显优于羟基 α -山椒素和羟基 β -山椒素。本研究进一步用不同浓度的羟基 γ -异山椒素处理 KGN 细胞后,检测细胞雌二醇的表达水平 (磁微粒分离化学发光法)。结果如图 2D 显示,羟基 γ -异山椒素对 KGN 细胞雌二醇的产生有抑制作用,且随药物浓度的增加而增强, IC_{50} 为 (16.63 \pm 0.39) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



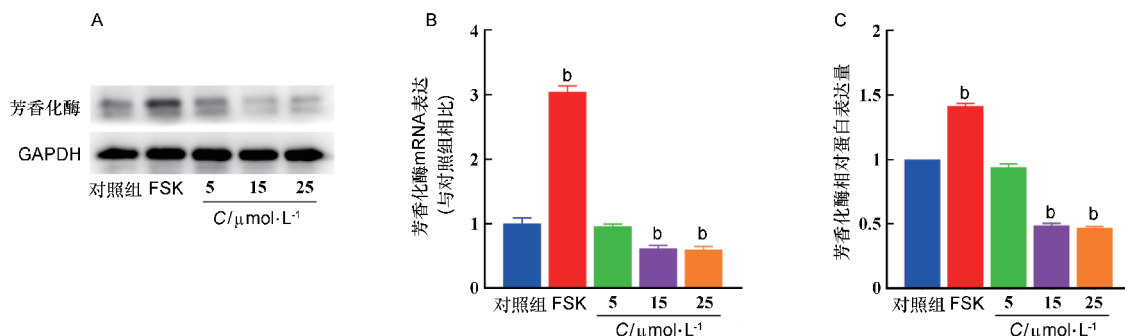
A: 浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 4 种山椒素对雌二醇合成的影响; B: 浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 4 种山椒素对雌二醇合成的影响; C: 浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 4 种山椒素对雌二醇合成的影响; D: 羟基 γ -异山椒素抑制 KGN 细胞雌激素合成的浓度反应曲线; 与对照组相比, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.0001$

图 2 4 种不同浓度的山椒素对 KGN 细胞雌激素合成的影响 ($n = 3$)

3 羟基 γ -异山椒素降低 KGN 细胞芳香化酶表达

KGN 细胞中雌激素的合成是由芳香化酶调控。因此, 本研究用不同浓度的羟基 γ -异山椒素处理 KGN 细胞后, Western blot 法检测芳香化酶蛋白的表达。本研究发现当给药浓度为 15 和 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与对照组相比, 羟基 γ -异山椒素对芳香化酶蛋白的表达有显著抑制 ($P < 0.0001$), 接着用同样的

药物、同样的方法处理 KGN 细胞, 提取总 RNA 后进行 RT-qPCR 来检测芳香化酶基因的表达。结果见图 3B, 芳香化酶基因的表达趋势和其蛋白表达趋势一样, 与对照组相比, 15 和 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的羟基 γ -异山椒素显著降低芳香化酶基因的表达 ($P < 0.0001$)。这说明羟基 γ -异山椒素通过减少芳香化酶基因的表达, 进而抑制其蛋白的表达。



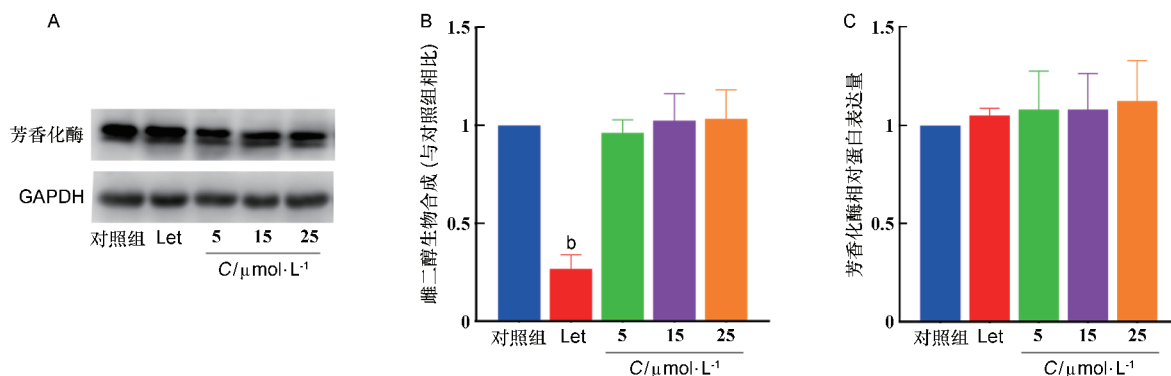
A: Western blot 法检测芳香化酶的表达; B: RT-qPCR 检测 KGN 细胞芳香化酶 mRNA 的表达定量结果; C: 芳香化酶蛋白定量结果; 与对照组相比, b: $P < 0.0001$

图 3 羟基 γ -异山椒素对 KGN 细胞芳香化酶表达的影响 ($n = 3$)

4 羟基 γ -异山椒素对芳香化酶活性无影响

为了进一步验证羟基 γ -异山椒素通过抑制芳香化酶对雌激素生物合成的抑制作用,将不表达芳香化酶的 HEK293A 细胞转染芳香化酶表达载体,接着用不同浓度的羟基 γ -异山椒素处理 HEK-293A aro 细胞(芳香化酶过表达)24 h,然后加入睾酮(芳香化酶反应底物)培养 24 h,最后检测芳香化酶蛋白的表达水平和雌二醇的生成量。来曲唑作为第 3 代非甾体类芳香化酶抑制剂通过与内源性底物竞争芳香化酶的活性位点,可逆性地抑制酶的活性^[12]。由图 4B 所示,来曲唑显著降低雌二醇的含量,但羟基

γ -异山椒素对雌二醇合成的影响与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。本研究进一步检测了 HEK-293A aro 细胞芳香化酶的表达。如图 4A 所示,与对照组相比,羟基 γ -异山椒素组芳香化酶蛋白的表达在统计学上没有显著性差异。羟基 γ -异山椒素没有影响 HEK-293A aro 细胞芳香化酶的表达,也没有影响其雌二醇的合成,因此羟基 γ -异山椒素不会抑制芳香化酶的活性。另外,羟基 γ -异山椒素可以减少 KGN 细胞芳香化酶的表达。因此,本研究推测在 KGN 细胞中,羟基 γ -异山椒素可能通过影响某些蛋白信号通路来调控芳香化酶的表达。



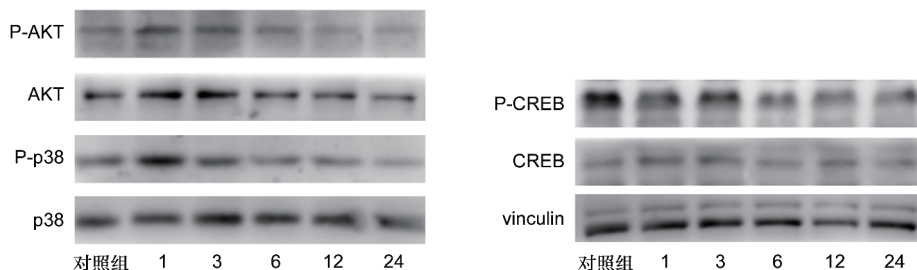
A: Western blot 法检测 HEK-293A aro 细胞芳香化酶的表达和芳香化酶蛋白定量结果;B: ELISA 法检测 HEK-293A aro 细胞雌二醇的合成定量结果;与对照组相比, b: $P < 0.0001$

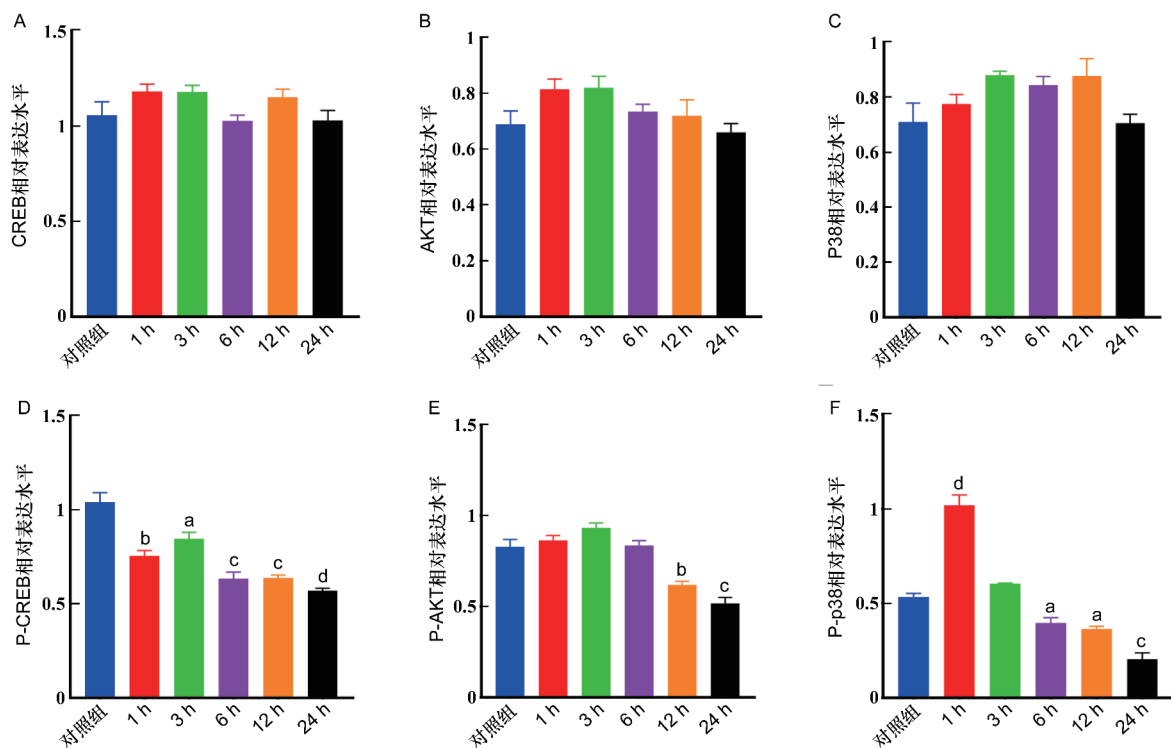
图 4 羟基 γ -异山椒素对 HEK-293A aro 细胞雌二醇和芳香化酶蛋白表达的影响 ($n = 3$)

5 羟基 γ -异山椒素对 KGN 细胞蛋白激酶信号的影响

本研究用羟基 γ -异山椒素分别处理细胞 1, 3, 6, 12, 24 h。然后进行蛋白提取,通过 Western blot 法检测蛋白表达。芳香化酶是调控雌激素的关键限速酶,CREB 是控制芳香化酶转录的关键转录因子^[13]。因此本研究首先检测了 CREB 及其磷酸化情况。如图 5D 所示,本研究发现羟基 γ -异山椒素在 1~24 h 内显著降低 KGN 细胞 p-CREB 的表达 ($P < 0.05$),但各个时间点 CREB 的表达水平相比于对照组没有统计学意义。KGN 细胞中,p38 丝裂

原活化蛋白激酶 (p38/MAPK) 和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路可以参与调控 CREB 的磷酸化,进而激活芳香化酶的转录。如图 5B 所示,不同时间点 AKT 的表达与对照组之间没有统计学差异,但用羟基 γ -异山椒素处理 12 和 24 h 后,KGN 细胞磷酸化-蛋白激酶 B (p-AKT) 的表达却显著低于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$),见图 5E。另外,羟基 γ -异山椒素处理后,各个时间点 p38 的表达与对照组相比也无统计学差异,药物处理 6, 12, 24 h 时, P-p38 的表达显著低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。





A: CREB 水平; B: AKT 水平; C: p38 水平; D: P-CREB 水平; E: P-AKT 水平; F: P-p38 水平; 与对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, d: $P < 0.0001$

图5 羟基 γ -异山椒素对 KGN 细胞蛋白激酶信号的影响 ($n = 3$)

讨 论

在本研究中,通过对 4 种山椒素筛选发现了羟基 γ -异山椒素抑制芳香化酶的潜力。经实验得羟基 γ -异山椒素抑制 KGN 细胞雌激素合成 IC_{50} 为 $(16.63 \pm 0.39) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此本研究设置了 5, 15, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 这 3 个剂量组进行后续实验。在卵巢中,卵泡膜细胞可以给颗粒细胞提供雌激素合成的反应底物-雄激素^[14]。体外进行实验时,KGN 细胞因缺乏 17 α -羟化酶,自身不能合成雄激素^[15],需要给予外源性雄激素。

芳香化酶调控雌激素的合成,羟基 γ -异山椒素可能作用于芳香化酶,结果与前期猜想一致,羟基 γ -异山椒素可以显著抑制芳香化酶蛋白和基因的表达。在 HEK-293A aro 细胞(芳香化酶过表达)中用羟基 γ -异山椒素处理后,结果显示羟基 γ -异山椒素对雌激素的生物合成和芳香化酶的表达没有影响,这表明羟基 γ -异山椒素不是通过影响芳香化酶的活性来调控雌激素。芳香化酶的表达具有组织特异性,在不同的组织由不同的启动子进行调控(如 PI. 1-胎盘、PI. 4-皮肤、PI. 6-骨骼、Pif-大脑)^[16],在

KGN 细胞中,芳香化酶主要是由启动子 II 调节^[17]。p38/MAPK 或 PI3K/AKT 信号通路磷酸化后可以激活 CREB 以结合芳香化酶启动子 II 中的环磷酸腺苷(cAMP)反应元(CRE),并启动芳香化酶的转录^[18]。本研究发现羟基 γ -异山椒素能减少 KGN 细胞芳香化酶的表达和雌激素生物合成,并且以时间依赖性的方式显著降低 P-p38, P-AKT, P-CREB 的表达。

综上所述,羟基 γ -异山椒素可能通过抑制 p38/MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路的激活进而抑制 CREB 的磷酸化,降低芳香化酶的转录,最终减少雌激素的生物合成。

[参 考 文 献]

- [1] JIA M, DAHLMAN-WRIGHT K, GUSTAFSSON JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015, 29(4): 557-568.
- [2] HONG YY, LI HZ, YUAN YC, et al. Molecular characterization of aromatase[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155: 112-120.
- [3] LIU T, HUANG YF, LIN H. Estrogen disorders; interpreting the abnormal regulation of aromatase in granulosa cells (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(5): 73.
- [4] WAANBAH BD, JOSEPH T, REBEKAH G, et al. Letrozole as first-line drug for ovulation induction in treatment-naïve infertile polycystic ovarian syndrome women [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(10): 3583-3589.

- [5] SOBRAL AF, AMARAL C, CORREIA-DA-SILVA G, *et al.* Unravelling exemestane: from biology to clinical prospects[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 163: 1-11.
- [6] BELL SG, DALTON L, MCNEISH BL, *et al.* Aromatase inhibitor use, side effects and discontinuation rates in gynecologic oncology patients[J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 159(2): 509-514.
- [7] 凌智群, 程宝宏, 魏居国, 等. 花椒功效发展的历史沿革[J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(4): 49-50.
- [8] 凌智群, 魏居国, 程宝宏, 等. 花椒功效的初步考证[J]. 陕西中医学院学报, 2008, 31(4): 73-76.
- [9] 梁辉, 赵镭, 杨静, 等. 花椒化学成分及药理作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(1): 91-94.
- [10] 李焰梅, 郝丹, 蒋献. 山椒素药理学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(2): 172-175.
- [11] 牛博, 庞广昌, 鲁丁强. 花椒麻素的生物功能研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 248-253.
- [12] 江泽飞, 宋三泰, 孙燕. 乳腺癌内分泌治疗的基本原则和新动向: 2006年美国NCCN乳腺癌内分泌治疗指南解读[J]. 临床药物治疗杂志, 2006, 4(2): 21-25.
- [13] MICHAEL MD, MICHAEL LF, SIMPSON ER. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 134(2): 147-156.
- [14] 何琿, 姜冬梅, 康波, 等. 哺乳动物卵巢卵泡膜细胞功能的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(9): 1337-1341.
- [15] 鲁丹枫, BAHTIGUL JA, 张国林, 等. 采用磁微粒分离酶联免疫法构建基于KGN细胞的雌激素生物合成筛选模型[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 27-30, 67.
- [16] ZHAO H, ZHOU L, SHANGGUAN AJ, *et al.* Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer[J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 57(1): R19-R33.
- [17] LIU T, HUANG YF, LIN H. Estrogen disorders: interpreting the abnormal regulation of aromatase in granulosa cells (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(5): 73.
- [18] HUNZICKER-DUNN M, MAIZELS ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(9): 1351-1359.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-09-28