蒲公英提取物对卵巢颗粒细胞增殖及激素受体表达的影响

王彤1，薛冰2，邵辉3，王树玉1，白莉3，阴赧宏1，赵焕英2，戚永超1，崔乐乐1，何欣1，马延敏1

1中国北京首都医科大学附属北京妇产医院生殖医学科100026
2中国北京首都医科大学核设施中心100069
3日本兵库县神户市中央区御幸通4丁目2-15株式会社德润英医院
王彤与薛冰对本研究做出了同等贡献。

摘要

背景：在当今社会，与年龄相关的不孕不育已经成为一个社会问题。卵巢低反应（poor ovarian response，POR）女性的体外受精（*in vitro* fertilization，IVF）成功率非常低。蒲公英提取物T-1（Dandelion extract T-1，DE-T1）是蒲公英（*Taraxacum officinale*）叶和茎提取物的有效成分，是一些POR患者使用的药物之一，但其分子机制尚不清楚。

方法：IVF后，提取60例患者的卵巢颗粒细胞（ovarian granulosa cell，GC），分为卵巢正常反应（normal ovarian response，NOR）组和POR组。用DE-T1以剂量和时间依赖的方式培养颗粒细胞，通过CCK-8法测定颗粒细胞的增殖，并通过定量聚合酶链反应测定胰岛素样生长因子1受体（insulin-like growth factor 1 receptor，IGF-1R）、促黄体激素受体（luteotropic hormone receptor，LHR）、卵泡刺激素受体（follicle-stimulating hormone receptor，FSHR）、LHR和CYP19A1（芳香化酶）的mRNA水平。采用酶联免疫吸附法测定孕酮和雌二醇（estradiol，E2）的浓度。

结果：细胞活力随着DE-T1浓度的逐渐增加而逐渐增加。与对照组（无DE-T1）相比，添加DE-T1后FSHR、LHR、IGF-1R和CYP19A1的mRNA表达上调，尤其是2.5% DE-T1组（P<0.01）。在含2.5% DE-T1的POR组中，TGF-1R的表达上调约25倍（24.97±4.02倍）。E2和孕酮水平随着DE-TI浓度的增加而增加。NOR组与POR组E2和孕酮分泌存在极显著差异（P<0.01）。

结论：DE-T1可能通过促进GC增殖和上调GC受体表达促进甾体激素合成，从而改善卵巢内分泌功能。

关键词：蒲公英提取物；卵泡刺激素受体；人颗粒细胞；胰岛素样生长因子1受体；增殖；甾类激素产生

在当今社会，与年龄相关的不孕不育已经成为一个社会问题。大约10%的女性在32岁之前经历卵泡加速丢失。[1]尽管人们已经使用了各种策略来改善卵巢反应，但针对低反应者的最佳方法仍然存在争议，许多中国人已开始寻求体外受精（*in vitro* fertilization，IVF）失败后的中医辅助治疗。蒲公英提取物T-1（Dandelion extract T-1，DE-T1）就是此类药物之一。

DE-T1是从蒲公英（*Taraxacum officinale*）叶和茎中提取的有效成分，在妇产科广泛用作抗炎和抗病毒治疗。[2] 动物研究表明，500μg/ml的DE-T1可以显著增加小鼠垂体LH和卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone receptor，FSH）的释放量（分泌量增加70%-90%）。

通讯地址：马延敏，中国北京首都医科大学附属北京妇产医院生殖医学科100026
电子邮箱：minyanma@163.com

这是一本开放获取期刊，文章是根据知识共享署名-非商业性使用-相同方式共享4.0协议的条款转载的，只要给予适当的信用，并且新创作是根据相同的条款获得许可的，该协议允许其他人对作品进行非商业性的重新组合、调整和构建。

再版请联系：reprints@medknow.com

© 2018 中华医学杂志：Wolters Kluwer-Medknow出品

收稿日期：2018年11月2日 **编辑：**Li-Shao Guo
本文引用方式：Wang T, Xue B, Shao H, Wang SY, Bai L, Yin CH, Zhao HY, Qi YC, Cui LL, He X, Ma YM. Effect of Dandelion Extracts on the Proliferation of Ovarian Granulosa Cells and Expression of Hormone Receptors. Chin Med J 2018;131:1694-701

DE-T1可显著上调小鼠子宫雌激素受体和卵巢FSH受体的表达，并增加雌二醇（estradiol，E2）的分泌。

我们假设草药产品DE-T1的治疗效果可能与对生殖激素水平的影响、其受体表达或颗粒细胞（granulosa cell，GC）活力有关。本研究旨在通过体外实验验证这三个考虑因素。

方法

参与者

不孕患者行IVF取卵后抽取壁层颗粒细胞。只有在收到每个患者签署的知情同意书后才收集和处理细胞，以便使用本来会被丢弃的细胞。本研究获得了我国地方机构审查委员会的批准。根据患者的卵巢反应将患者的细胞分为两组：卵巢正常反应（normal ovarian response，NOR）组和卵巢低反应（poor ovarian response，POR）组。低反应组患者基础血清FSH水平>10 U/L，窦卵泡计数<5个。我们排除了与多囊卵巢综合征或子宫内膜异位症等可能影响颗粒细胞质量的疾病相关的不孕症患者。所有患者均采用促性腺激素释放激素激动剂方案治疗；当主导卵泡直径达到18~20 mm，且超声检查至少有3个16 mm卵泡时，予以人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，hCG；6500 U，美国雪兰诺公司）。36 h后在经阴道超声引导下行取卵术，仅收集成熟卵母细胞。

细胞纯化和培养

分离卵母细胞后，从残留的卵泡吸出物中收集壁层颗粒细胞，并用磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）洗涤三次。为了减少女性之间的差异，根据当天的取卵次数，尽可能将同一组中3至5名患者的颗粒细胞合并在一起。将细胞以2000 rpm离心10 min，并使用40%/80%Percoll梯度（西格玛-奥德里奇公司，美国密苏里州圣路易斯）从血细胞中分离。将沉淀用PBS重悬，并再次以1000rpm离心10 min。然后，除去PBS，并用1ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/Fl2)（英杰公司，美国加利福尼亚州卡尔斯巴德）重新悬浮细胞。使用血细胞计数器对纯化的细胞进行计数，并在接种前使用台盼蓝（BD Biosciences，美国加利福尼亚州圣何塞）测定细胞活力。

实验方案

将细胞接种于24孔板（100000个活细胞/孔）中，并用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM/F12进行培养。细胞在37.5℃、5%二氧化碳和20%氧气的湿润环境中培养。24 h后，将培养基更换为含有不同浓度蒲公英提取物DE-T1（健康促进研究所，日本大阪）的新鲜培养基，根据梯度（v/v）进行选择。根据细胞的可获得性，实验重复2次或3次。

增殖实验

壁层颗粒细胞以每孔1.5×10^{4}个细胞的密度于96孔板中培养。培养24 h后，用不同浓度的蒲公英提取物处理3个复孔。然后，细胞培养48~72 h。接着，将培养基更换为含有10 μl的Cell Counting Kit-8（CCK-8）试剂的新鲜培养基，并将平板于37.5℃下孵育4 h。测定各孔在240 nm处的吸光度。

RNA分离和实时聚合酶链反应

按照厂商说明书，使用Quick-RNA MicroPrep Kit（西格玛-奥德里奇公司，美国密苏里州圣路易斯）从颗粒细胞中提取总RNA。使用NanoDrop 2000C分光光度计（赛默飞，美国马塞诸塞州沃尔瑟姆）测定mRNA浓度。取等份1 ml RNA，使用High Capacity cDNA反转录试剂盒（赛默飞）按照厂商说明书进行反转录。使用荧光SYBR Green PCR预混液（赛默飞）对PCR产物进行定量。加入目的基因（胰岛素样生长因子1受体（insulin-like growth factor 1 receptor，IGF-1R）、FSHR、促黄体激素受体（luteotropic hormone receptor，LHR）和CYP19A1）的特异性引物，以终体积为10 ml进行PCR步骤操作。每个样品以β-actin作为内参（归一化）基因。

引物根据NCBI通过BLAST搜索GenBank数据库生成，并且都是在内含子-外显子之间跨越，以避免基因组DNA污染。它们是FSHR：正向引物5'-CTTCTGACCTCCCGAGGAAT-3'，反向引物5'-GGTCCCCAAATCCTGAAAAT-3'；LHCGR：正向引物5'-CCCTGAGCCCTGCAACT-3'，反向引物5'-TTGACAGGGAGGTAGGCAAG-3'；CYP19A1：正向引物5'-GAGAATTCATGCGAGTCTGGA-3'，反向引物5'-GCCGAATCGAGAGCTGTAAT-3'。

使用StepOnePlus 实时荧光定量PCR系统（应用生物系统公司，美国加利福尼亚州福斯特城）进行扩增和检测。扩增程序为：95℃ 10 min，1个循环；95℃ 10 s，60℃ 50 s，40个循环。每个反应取等份1 ml cDNA，反应总体积为10 ml。所有样本均重复三次。

所有分析基因均采用相同的实时定量PCR程序。以β-actin为管家基因，采用比较Ct法对mRNA水平进行相对定量。采用公式ΔΔCt法获得基因相对表达量数据（对照组）。结果表示为相对于没有DE-T1的实验对照的倍数变化。

激素水平测定

按照厂商说明书，使用酶联免疫吸附测定试剂盒（Cayman Chemical公司，美国密歇根州安阿伯）测量培养基中的E2和孕酮浓度各两次。E2和孕酮的检测灵敏度分别为15 pg/ml和10 pg/ml。孕酮的批内变异系数（coefficient of variation，CV）和批间变异系数分别为7.3%和7.7%，E2的批内CV为14.3。

统计分析

每个实验至少重复3次，数据以平均值±标准差（standard deviation，SD）表示。所有统计分析均采用SPSS（SPSS公司，美国伊里诺伊州芝加哥）软件进行。组间均数的统计学比较采用t检验进行，多重比较采用单因素方差分析（analysis of variance，ANOVA）。$P < 0.05$视为差异有统计学意义。

结果

参与者

前瞻性纳入了60例年龄小于38岁的女性（30例诊断为POR，30例诊断为NOR，符合研究的纳入标准）。表1总结了两组（NOR组和POR组）的患者特征。两组之间的年龄和体重指数的平均值没有显著性差异。然而，两组在第三个周期日的窦卵泡计数和FSH水平以及注射hCG当天的血清E2等方面存在显著性差异。此外，两组取卵数存在显著性差异（$P<0.001$）。

卵巢正常反应组颗粒细胞体外形态学观察

在倒置相差显微镜下，刚接种时GCs呈球形，8 h后开始贴壁。24 h贴壁率达到70%，培养2 d后贴壁率达到90%。细胞形态不规则，细胞呈星形或纺锤形。细胞之间通过细胞间延伸的伪足相互连接。细胞核大而圆，细胞质饱满，透明度高。细胞呈簇状生长。对于按均匀细胞密度铺板的颗粒细胞，在预培养24小时后，根据梯度浓度加入DE-T1。48 h时，DE-T1处理组颗粒细胞的增殖和伸展程度明显高于对照组【图1】。

蒲公英提取物T-1对人颗粒细胞体外增殖的影响

不同浓度蒲公英提取物T-1对体外培养颗粒细胞活力的影响

颗粒细胞用不同浓度的DE-T1培养48小时后，用CCK-8法检测细胞活力。结果显示，对于NOR组颗粒细胞，在一定浓度范围内，随着DE-T1浓度的递增，细胞活力逐渐增强，提示DE-T1可促进GCs增殖，且这种作用呈剂量依赖性正相关。细胞与DE-T1孵育48 h后，增殖活性高于对照组，不同浓度差异有统计学意义（$P < 0.05$）。1.25%组（$P=0.003$）、2.5%组（$P=0.007$）和5%组（$P=0.001$）的增殖活性显著高于对照组【$P<0.01$；图2】。

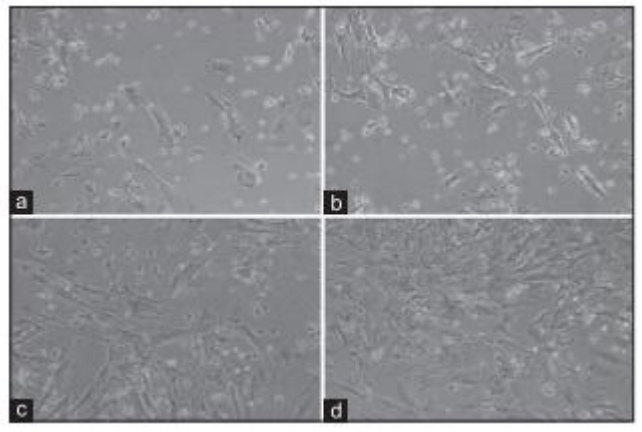


图1：卵巢正常反应组体外培养48 h的卵巢颗粒细胞显微图像（200倍）。(a) 对照组（无DE-T1）；(b) 1% DE-T1组；(c) 5% DE-T1组；(d) 10% DE-T1组。DE-T1：蒲公英提取物T-1。

表1：NOR组与POR组的特征比较

变量	NOR组 (n = 30)	POR组 (n = 30)	t	p
年龄（岁）	31.73± 3.93	33.36± 3.68	1.659	0.102
BMI (kg/m^2)	22.83± 2.03	23.49± 2.37	1.144	0.257
AFC	11.10± 2.69	4.43± 1.33	- 1 2.579	<0.01
bFSH (mU/ml)	6.35± 1.82	11.9 2± 5. 1 7	5.552	<0.01
取卵数	9.93± 2.32	3.43± 0.93	- 12.898	<0.01
雌二醇峰值(pg /ml)	2490.19± 550.53	1179.92± 294.55	- 11.494	<0.01

数据以均值SD表示。BMI：体重指数；AFC：窦卵泡计数；bFSH：基础卵泡刺激素；NOR：卵巢正常反应（bFSH < 10 mU/ml或AFC = 5-15）；POR：卵巢低反应（bFSH > 10 mU/ml或AFC<5）；SD：标准差

体外添加蒲公英提取物T-1培养不同天数后的低反应患者颗粒细胞变化

低反应患者颗粒细胞与DE-T1体外培养1d、2d后，颗粒细胞显示出随时间缓慢增殖的趋势。然后，它们逐渐衰老，细胞活力逐渐下降。与对照组相比，DE-T1添加组颗粒细胞的衰老死亡和增殖能力的下降显著延缓。培养1d（P = 0.014）、培养2d（P = 0.005）与培养3d（P = 0.002）有显著性差异【P < 0.01；图3】。

蒲公英提取物T-1对颗粒细胞卵泡刺激素受体、促黄体生成素受体、胰岛素样生长因子1受体和CYP19A1 mRNA表达的影响

卵巢正常反应组

添加DE-T1后，NOR组颗粒细胞的FSHR、LHR、IGF-1R和CYP19A1的mRNA表达与对照组相比呈增加趋势。1.25% DE-T1浓度组FSHR的mRNA表达水平高于对照组（P = 0.017）。2.5% DE-T1组与对照组（P < 0．01）相比，FSHR（P = 0.009）、IGF-lR（P = 0.003）、CYP19A1（P = 0.001）的mRNA表达水平有显著性差异。5% DE-T1组颗粒细胞中IGF-1R（P = 0.004）和CYP19A1（P = 0.003）的mRNA表达水平显著高于对照组【P < 0.01；图4a和4b】。

卵巢低反应组

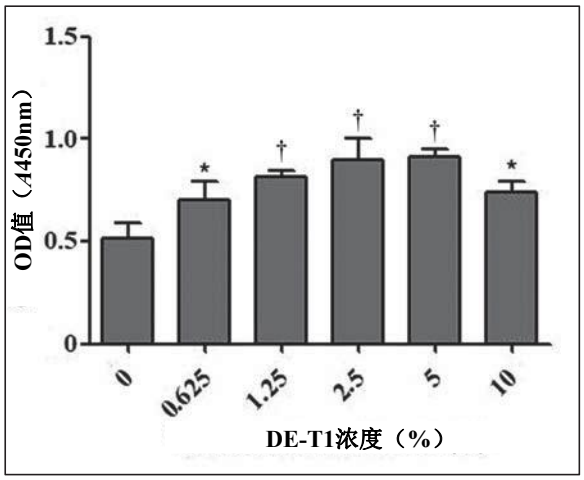
添加DE-T1后，POR组GC的FSHR、LHR、IGF-lR和CYP19A1的mRNA表达水平相比对照组呈增加趋势。2.5%剂量组FSHR（P = 0.001）、IGF-1R（P = 0.001）和CYP19A1（P = 0.001）的mRNA表达水平与对照组（P < 0.01）相比差异极显著，2.5%剂量组与NOR组之间并无差异。1.25 %剂量组CYP19A1（P = 0.011）的mRNA表达水平显著高于对照组（P < 0.05）。5%剂量组LHR（P = 0.014）和IGF-1R（P = 0.003）的mRNA表达水平与对照组【P < 0.01；图4c和4d】相比有显著性差异。

2.5%蒲公英提取物T-1对卵巢正常反应和卵巢低反应的差异

在不同DE-T1浓度下，NOR组和POR组颗粒细胞的基因表达存在差异。在2.5% DE-T1浓度下，POR组LHR上调4.78±0.50倍，显著高于NOR组（3.58±0.12倍，P < 0.05)。POR组的IGF-1R在（24.97±4.02）较NOR组（3.29 ± 0.51；P < 0.01）显著上调，POR组的CYP19A1（1.49 0.12)较NOR组（1.06±0.09，P < 0.01）显著上调且差异极显著。NOR组FSHR表达上调，且显著高于POR组【P < 0.05；图5】。

蒲公英提取物T-1对颗粒细胞孕酮分泌的影响

在NOR组颗粒细胞培养基中，孕酮水平随着DE-T1浓度的增加而增加。当DE-T1浓度达到5%时，孕酮（P = 0.021）分泌量差异有统计学意义。当DE-T1浓度为2.5%（P = 0.027）和5 %【P = 0.002；图6a和6b】时，POR组孕酮分泌量差异有统计学意义。



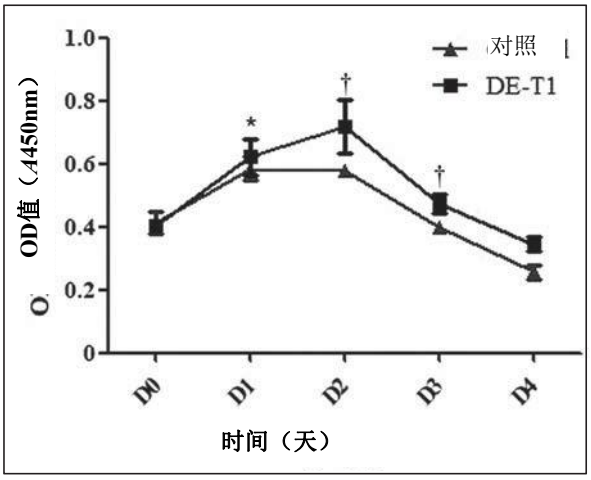


图2：卵巢正常反应组的卵巢颗粒细胞用蒲公英以剂量递增（0.625%~10%）方式培养48 h后，用CCK-8法检测细胞活力的变化。数据以平均值±SD表示，与无DE-T1的对照组相比。*P < 0.05，†P < 0.01。CCK-8：Cell Counting Kit-8；DE-T1：蒲公英提取物T-1。SD：标准差。

图3：用5%蒲公英培养的卵巢低反应组卵巢颗粒细胞随时间增加（1-4d）的变化，每天用CCK - 8法检测细胞活力。数据以平均值±SD表示，与无DE-T1的对照组相比。*P < 0.05，†P < 0.01。CCK-8：Cell Counting Kit-8；DE-T1：蒲公英提取物T-1。SD：标准差。

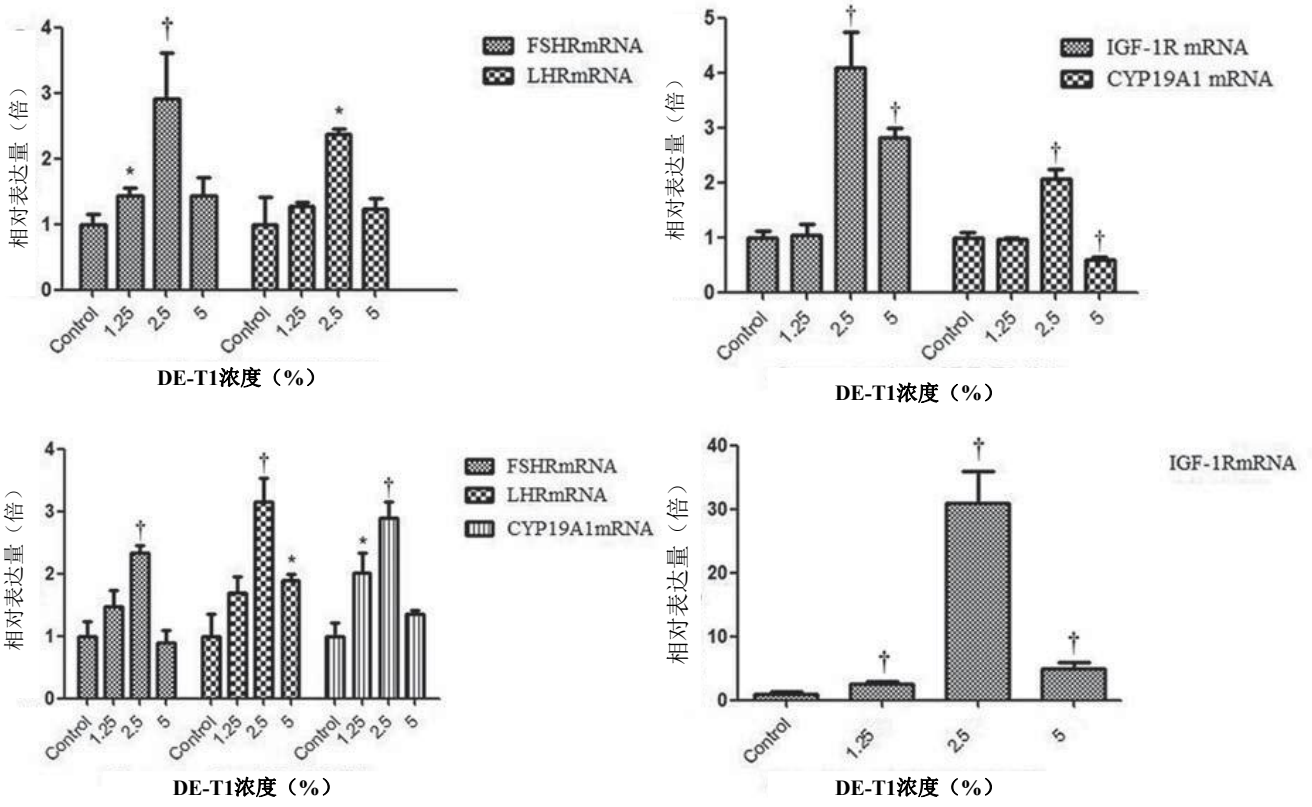


图4：蒲公英给药对 (a) FSHR和LHR mRNA水平的影响；(b) 对NOR组卵巢颗粒细胞IGF-1R、CYP19A1（芳香化酶）的影响。蒲公英给药对 (c) FSHR、LHR和CYP19A1（芳香化酶）mRNA水平的影响；(d) 对POR组颗粒细胞中IGF-1R的影响，用提取的RNA，并以β-actin为内参，进行RT-PCR检测颗粒细胞中IGF-1R的mRNA水平。测得的蒲公英水平以百分数表示。数据以平均值±SD表示，与无DE-T1的对照组相比。*P < 0.05，P < 0.01。FSHR：卵泡刺激素受体；LHR：促黄体生成素受体；GCs：颗粒细胞；NOR：卵巢正常反应；POR：卵巢低反应；RT-PCR：实时聚合酶链反应；SD：标准差。

蒲公英提取物T-1对颗粒细胞雌二醇分泌的影响

在NOR组颗粒细胞培养基中，E2随着DE-T1浓度的增加而增加。当DE-T1剂量为2.5%（P = 0.016）和5%（P = 0.003）时，E2分泌量差异有统计学意义。在POR组中，当DE-T1剂量为2.5%（P = 0.004）和5%（P = 0.002）时，颗粒细胞【P < 0.01；图6c、6d】的E2分泌量有显著性差异。

讨论

颗粒细胞是卵巢的主要功能细胞，这些细胞的增殖和分化可以作为卵泡发育的标志。Nakahara等[3]的研究表明，与卵巢功能正常的女性相比，卵巢储备功能下降的患者颗粒细胞增殖减慢，凋亡加速。在卵巢功能正常的女性中，FSHR信号通路与FSH调控基因*PPAP/CYP19A1*之间存在正相关关系，而在POR患者中，这种相关性受到干扰甚至阻断。[4] 颗粒细胞凋亡是窦卵泡闭锁的标志。人们认为颗粒细胞凋亡在促排卵周期中发挥重要作用，并对该周期的临床妊娠率产生不利影响。

因此，促进颗粒细胞增殖或减少其凋亡可能会改善促排卵结局。FSH（通过CAMP-ERK-1/2通路）促进颗粒细胞增殖[5]，并通过cAMP-PKA通路稳定颗粒细胞骨架，从而增加颗粒细胞数量。本研究表明，在一定浓度范围内，DE-T1可增强体外培养的颗粒细胞增殖活性，延缓这些细胞增殖活性的下降。我们推测DE-T1可能具有FSH样作用，并促进颗粒细胞的增殖。

颗粒细胞在人体内主要表达FSHR，FSHR的数量直接影响患者对促排卵药物的反应性。Doherty等[7]进行的研究证实，与NOR患者相比，POR患者颗粒细胞表面的FSHR表达降低。Hu等[8]也证实了FSHR在卵巢储备功能低下患者颗粒细胞表面的分布密度降低。临床实践上通过增加促性腺激素剂量可获得理想的取卵数，但效果并不理想。然而，有研究表明，POR患者卵泡液中的FSH水平高于NOR患者。[9] 有研究认为，大剂量促排卵药物的确可以增加卵泡局部雌激素的分泌，

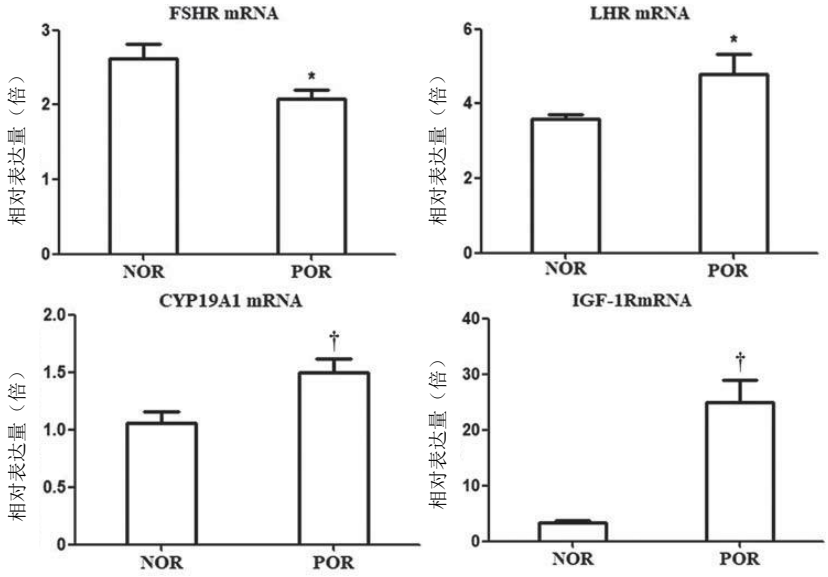


图5：2.5% DE-T1给药对卵巢颗粒细胞 (a) FSHR、(b) LHR、(c) CYP19A1（芳香化酶）和 (d) IGF-1R的mRNA水平的影响。NOR组和POR组的卵巢颗粒细胞之间的mRNA水平使用提取RNA通过qRT-PCR进行测定，并针对β- actin进行归一化。DE-T1水平以百分数表示。数据以平均值±SD表示，与无DE-T1的对照组相比。*P < 0.05，P < 0.01。DE-T1：蒲公英提取物T-1；FSHR：卵泡刺激素受体；LHR：促黄体生成素受体；NOR：卵巢正常反应；POR：卵巢低反应；qRT-PCR：实时定量聚合酶链式反应；SD：标准差。

但POR患者颗粒细胞表面的FSHR数量较少，导致结局不良。因此，研究认为提高FSHR在颗粒细胞表面的表达是提高卵巢对促排卵药物反应性、减少药物剂量、改善临床结局的重要途径。[10] 本研究表明，在NOR和POR组中，无论是否在颗粒细胞培养中引入DE-T1，FSHR的表达均显著增加。因此，NOR组FSHR的表达上调水平（2.61±0.20）略高于POR组（2.08±0.10），表明DE-T1可增强颗粒细胞上FSHR的表达，对卵巢正常反应和卵巢低反应的不孕患者均有效。我们推测，这是DE-T1辅助促排卵和提高临床卵巢反应性的重要机制。

芳香化酶是P450芳香化酶的关键酶相关基因，活化的颗粒细胞在P450芳香化酶的作用下合成E2。Samardzija等[11]研究发现，通过抑制小鼠颗粒细胞表面LHR和CYP19A1的表达，可以抑制颗粒细胞中E2的分泌，从而抑制小鼠的排卵。

Ginther等[12]发现，在FSH/FSHR基因敲除和IGF-1基因敲除小鼠中，卵泡发育受阻于排卵前期。Dierich等[13]对IGF-1及其受体与胚胎质量之间的关系进行了研究。这些结果也表明IGF-1在高生长潜能胚胎中的表达水平较高。卵泡液中IGF-1浓度与卵母细胞质量呈正相关[13]，IGF-1的生物学功能是通过其与颗粒细胞表面的特异性IGF-1受体结合实现的。有研究表明，FSH可通过增加颗粒细胞表面IGF-1受体的数量，协同增加DNA和蛋白质的合成，从而促进卵子和颗粒细胞的成熟和分化。[14] 这也可以显著增加细胞卵裂，改善胚胎发育。研究还表明，IGF-1及其受体在颗粒细胞的增殖、分化和排卵功能中发挥重要作用，并与胚胎质量密切相关。

Stocco等[15]通过全基因组测序发现，FSH对颗粒细胞的调控作用近50%可归因于IGF-1R。IGF-1受体表达被抑制后，包括FSH介导的CYP19A1在内的部分基因表达降低。在FSH的介导下，虽然CYP19A1的表达上调了近20倍，但其中一半可以被AEW（IGF-1R抑制剂）抑制。本研究发现，与对照组相比，添加DE-T1后颗粒细胞中CYP19A1、IGF-lR和LHR的表达显著增加。因此，我们认为DE-T1可能上调颗粒细胞表面FSHR、LHR、IGF-lR等重要受体的mRNA表达。这可能会进一步增强这类激素在卵泡发育中的协同作用，并加强对下游靶基因P450芳香化酶转录的调控作用。因此，卵巢中会产生更多的雌激素，通过正反馈作用有助

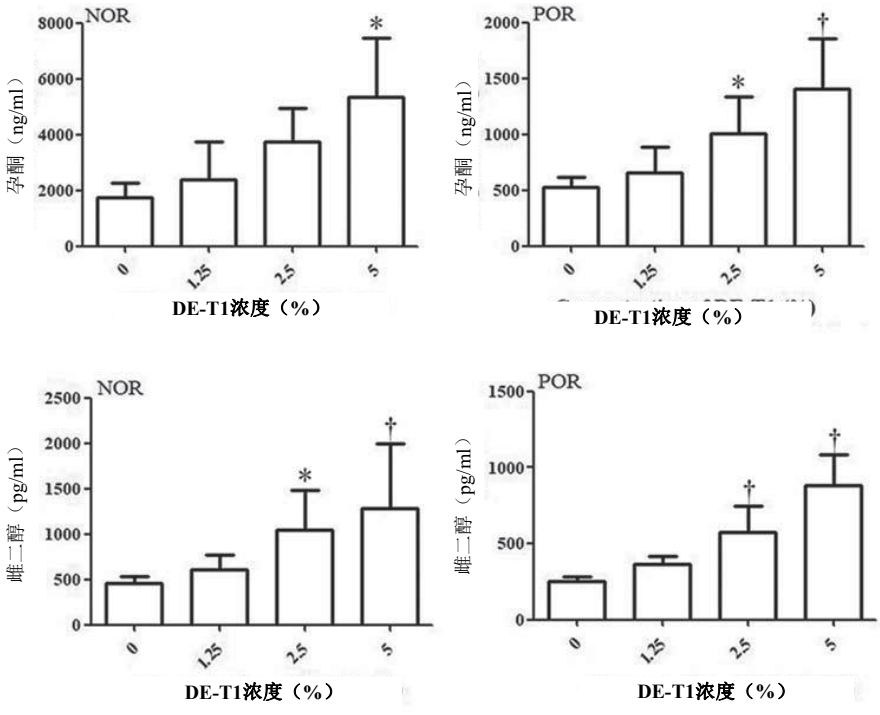


图6：(a) NOR组和 (b) POR组中ELISA法测定不同DE-T1浓度下的孕酮水平。(c) NOR组和 (d) POR组中ELISA法测定不同DE-T1浓度下的雌二醇水平。与不含DE-T1的对照组相比，数据显示为平均值±SD。*P < 0.05；P < 0.01。DE-T1：蒲公英提取物T-1；NOR：卵巢正常反应；POR：卵巢低反应；ELISA：酶联免疫吸附试验；SD：标准差。

于卵泡生长发育和排卵。我们发现，与NOR组相比，LHR、CYP19A1和IGF-1受体在POR组颗粒细胞中的表达对DE-T1更敏感，且IGF-1R在DE-T1组颗粒细胞中的表达量增加了近25倍。因此，我们推测IGF可能是DE-T1低反应患者敏感性的关键。PI3K/Akt/mTOR信号通路是经典的IGF-1R下游激活通路，DE-T1可能通过该通路激活颗粒细胞的分化。应该进行进一步深入的研究来阐明这些机制。

FSHR与细胞内信号转导途径的激活之间的相互作用导致颗粒细胞的增殖和分化。在FSH和协同激素的刺激下，颗粒细胞产生E2，其具有多效效应。它可以促进颗粒细胞的增殖，起到至关重要的作用，并与FSH协同发挥作用，促进FSHR和LHR的表达，从而增强芳香化酶的活性。本实验检测了颗粒细胞培养基中E2和孕酮激素水平，并发现DE-T1组颗粒细胞中E2和孕酮分泌量显著高于对照组。在相同药物浓度水平下，NOR组激素分泌量大于POR组。雌激素和孕酮是重要的女性生殖激素；由此推测，DE-T1可能通过促进颗粒细胞合成更多的类固醇激素来维持卵泡中卵母细胞的进一步发育和成熟，这可能有利于排卵后的早期胚胎发育。

本研究存在一定的局限性。所用的颗粒细胞来自接受IVF促排卵治疗的患者，且在IVF取卵后进行了黄体化处理，因此细胞的增殖能力相对较弱。与卵泡发育最相关的细胞应该是窦卵泡中的卵丘颗粒细胞，但在临床上很难获得。在前期动物实验的基础上，我们在黄体化颗粒细胞模型中检测DE-T1的作用。

目前，DE-T1作为一种中药制剂，在辅助促排卵或增强生殖激素受体表达方面的研究鲜有报道。与以往动物模型的DE-T1实验相比，本实验的重点是人卵巢颗粒细胞的体外原代培养，从而验证了探讨DE-T1的T1作用机制的药用价值。

综上所述，我们推测DE-T1能够促进颗粒细胞的增殖，从而增加颗粒细胞表面FSHR和IGF-1R mRNA的表达，增强颗粒细胞对促排卵激素及其协同激素的敏感性。同时我们认为DE-T1可以调控下游靶基因P450芳香化酶的转录，从而促进卵巢产生更多的雌激素，有助于卵泡的生长发育。DE-T1可能用于辅助临床促排卵治疗，减少促排卵药物的剂量，特别是针对促排卵药物有不良反应的女性改善卵巢功能。此外， DE-T1可用于获得理想的取卵数，改善IVF的临床结局。为了证实DE-T1在辅助生殖技术中的临床应用和价值，还需要额外的基础实验和临床应用证据。

财政支持和赞助

无。

利益冲突

不存在利益冲突。

参考文献

1. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of ' poor response'to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. Hum Reprod 2011;26:1616-24. doi: 10.1093/humr ep/der092
2. Zhi X, Honda K, Ozaki K, Misugi T, Sumi T, Tshiko 0, et al. Dandelion T-1 extract up-regulates reproductive hormone receptor expression in mice. Int J Mol Med 2007;20:287-92. doi: 10.3892/ I mm.20.3.287
3. Nakahara K, Saito H, Saito T, Tto M, Ohta N, Sakai N, et al. Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1997;67:302-8. doi: I0.1016 /SOO l5-0282(97)81915-2.
4. Gonlez-Fernandez R, P a 6, Hem dez J, Martin-Vasallo P, Palumbo A, Avila J, et al. Patients with endometriosis and patients with poor ovarian reserve have abnormal follicle-stimulating hormone receptor signaling pathways. Fertil Steril 2011;95:2373-8 doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.030.
5. Kayampilly PP, Menon KM. Follicle-stimulating hormone inh ts adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture hrough an Aki-dependent pathway. Endocrinology 2009;150:929-35 doi: 10.1210/en.2008-1032

6. Maizels ET, Cottom J, Jones JC, Hunzicker-Dunn M. Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. Endocrinology 1998;139:3353-6. doi: 10.1210/endo.139.7.6188.
7. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A novel mutation in the FSH receptor inh ting signal transduction and causing primary ovarian failure. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1151-5. doi: 10.1210/jcem.87.3.8319.
8. Hu Q, Hong L, Nie M, Wang Q, Fang Y, Dai Y, et al. The effect of dehydroepiandrosterone supplementation on ovarian response is associated with androgen receptor in diminished ovarian reserve women. J Ovarian Res 2017;10:32. doi: 10.1186/ sl3048-017-0326-3
9. Thiruppathi P, Shatavi S, Dias JA, Radwanska E, Luborsky JL Gonadotrophin receptor expression on human granulosa cells of low and nonnal responders to FSH. Mol Hum Reprod 2001;7:697-704. doi: 10.1093/mole hr/7.8.697
10. Cai J, Lou HY, Dong MY, Lu XE, Zhu YM, Gao HJ, et al. Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells Fertil Steril 2007;87:1350-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.034.
11. Samardzija D, Pogrmic-Ma c K, Fa S, Glisic B, Stanic B, Andric N, et al. Atrazine blocks ovulation via suppression of Lhr and Cypl9al mRNA and estradiol secretion in immature gonadotropin-treated rats. Reprod Toxicol 2016;6l:10-8. doi 10.1016/j.reprotox.2016.02.009.
12. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. Anim Reprod Sci 2008;105:417-23. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.007
13. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, F ia GM, Gansmuller A LeMeur M, et al. lmpamng folhcle-shmulatmg honnone (FSH} signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance . Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:13612-7. doi: 10.1073/pnas.95.23.13612.
14. Lamb JD, Zamah AM, Shen S, McCulloch C, Cedars Ml, Rosen MP, et al. Follicular fluid steroid honnone levels are associated with fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. Fert Steril 2010;94:952-7. doi: 10.1016 /j.fe rtnstert.2009.04.010.
15. Stocco C, Baumgarten SC, Annouti M, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia B, et al. Genome-wide interactions between FSH and insulin-like growth factors in the regulation of human granulosa cell differentiation. Hum Reprod 2017;32:905-14. doi: 10.1093/humrep/ dex002.