

补肾活血汤对小鼠体外受精及其早期胚胎发育的影响^{*}

杨桂云¹ 王佩娟¹ 贾晓斌¹ 顾奎兴² 曹步凯³ 王晓丽³ 纪孝萍³

内容提要 目的 探讨补肾活血汤对女性生殖活动的影响,揭示其治疗不孕的作用机理。方法 以补肾活血汤的兔含药血清作为培养基添加剂,分别与未交配小鼠的精、卵及交配后雌鼠体内回收的 2 细胞期胚胎共同体外培养,观察小鼠体外受精及早期胚胎体外发育的变化。结果 含药血清加入培养能显著提高小鼠的体外受精率($P < 0.01$),并可促进其后的各期胚胎发育,尤其对 4 细胞及 8 细胞期胚胎的发育有显著促进作用($P < 0.05$);对小鼠体内 2 细胞期胚胎的体外 4 细胞发育率无明显影响,而对其 8 细胞期胚、桑椹胚、囊胚、孵化胚的各期发育率均有明显促进作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 补肾活血汤具有提高卵子受精率和促进早期胚胎发育的作用。

关键词 补肾活血汤 含药血清 体外受精 早期胚胎发育

Effect of Bushen Huoxue Decoction on in vitro Fertilization and Early Embryonic Development in Mice YANG Gui-yun, WANG Pei-juan, JIA Xiao-bin, et al *Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanjing (210028)*

Objective: To explore the effect of Bushen Huoxue decoction (BSHX) on female reproduction and elucidate its therapeutic mechanism to infertility. **Methods:** The BSHX medicated serum of rabbit, as a supplement, was co-cultured with the sperm and ovum of non-copulated mice, and the 2-cell embryos of copulated female mice separately, to observe the changes of in vitro fertilization rate (IVF) and early embryogenesis rate. **Results:** By co-cultured with BSHX medicated serum, IVF rate was increased obviously ($P < 0.01$), and the follow-up early embryogenesis rate at various period was promoted, particularly that of the 4-cell and 8-cell embryos ($P < 0.05$). No influence on developmental rate of in vitro 4-cell embryos obtained from the in vivo 2-cell embryos. But the development of the 8-cell embryos, morula, blastula and hatching were promoted significantly. **Conclusion:** BSHX could raise the fertilization rate and promote the early embryonic development.

Key words Bushen Huoxue decoction, medicated serum, in vitro fertilization rate, early embryogenesis

中医药治疗女性不孕症有着良好的临床疗效,并已为世人所公认,但目前对其作用机理尚缺乏深入地研究,特别是中医药在人类生殖活动中受孕的早期阶段,即受精及早期胚胎发育阶段所起的作用更是知之甚少。我们在多年临床实践中,根据中医学肾主生殖的理论,采用补肾为主,活血调经为辅的方法,治疗女性功能失调性不孕取得较好的疗效,并在此基础上总结出治疗女性不孕的经验方——补肾活血汤。为探明该方在女性生殖活动中所起的作用,进而揭示中医药治疗不孕的作用机理,为临床治疗提供科学依据,我们采用了血清药理学及细胞、胚胎培养的实验方法,以补

肾活血汤对小鼠体外受精及早期胚胎发育过程的影响进行了研究。

材料与方法

1 实验动物 新西兰健康成年雌兔,体重(2.9±0.5)kg,由江苏省农业科学院畜牧兽医研究所实验动物室提供。雌性昆明种小鼠,4~5 周龄,体重 20~22g;雄性昆明种小鼠,8~10 周龄,体重 30~35g,均由南京医科大学实验动物中心提供,常规饲养 1 周后用于实验。

2 药物及药物血清的制备 孕马血清(PMSG)由宁波第二激素厂提供;绒毛膜促性腺激素(hCG)由南京动物激素厂与上海生化制药厂共同提供。体外受精实验采用含 0.3% BSA 的 MEM(minimum essential medium,由美国 GIBCO 公司提供)作为基础培养液,

^{*} 国家中医药管理局重点资助项目(No. 95B038)

1. 江苏省中西医结合医院(南京 210028); 2. 江苏省肿瘤防治研究所; 3. 江苏省农业科学院胚胎工程研究室

早期胚胎培养采用 M16(由美国 Sigma 公司提供)为基础培养液。补肾活血汤由菟丝子、紫河车、当归、川芎、淮山药、柴胡等药组成。分别经乙醇回流提取及水煎煮浓缩后合并提取液为含生药量为 2.37g/ml 的中药浸膏,供动物给药制备含药血清,按成人量的 5 倍量,即补肾活血汤浸膏每天 6.5g/kg,每天 2 次给雌兔灌服,连续 3 天,于末次灌药后 1、3h 分别心脏采血,无菌分离血清,-20℃ 保存,实验前经 56℃、30min 灭活后使用。并以灌药前血清作为正常血清组。

3 小鼠精、卵及 2 细胞期胚胎的采集 给每只雌鼠腹腔注射 PMSG 5~10IU,48h 后再注射 hCG 5~10IU,造成超排卵刺激。于注射 hCG 13~14h 后以颈椎脱臼法处死小鼠,从输卵管壶腹部采取未受精成熟卵,处死雄鼠,从副睾管采取精子,并孵育 1~1.5h。取雌鼠按上法行超排卵刺激后,于注射 hCG 当晚使与同种雄鼠按 1:1 比例合笼,次日晨检查雌鼠确认有阴栓者于 hCG 注射后 38~40h 处死,从输卵管内收集 2 细胞期胚胎。

4 小鼠体外受精、早期胚胎的体外培养及分组 体外受精及早期胚胎的培养均采用微滴培养法(50μl/滴)均在 37℃、5%CO₂ 孵育箱中培养 120h,于倒置显微镜下动态观察卵子受精和早期胚胎的发育情况。实验分组:空白组(I 组):为基础培养液;模型组(II 组):基础培养液中含 2%浓度的子宫内膜异位症不孕患者腹腔液(以下简称腹腔液);正常血清组(III 组):基础培养液中含 2%浓度的腹腔液及 10%浓度的兔灌药前血清;1h 药物血清组(IV 组):基础培养液中含 2%浓度的腹腔液及 10%浓度的兔末次灌药后 1h 所采血清;3h 药物血清组(V 组):基础培养液中含 2%浓度的腹腔液及 10%浓度的兔末次灌药后 3h 所采血清。

4.1 体外受精与体外受精卵发育 将采集的卵母细胞与调整浓度后的获能精子悬液[(1.0~1.5)×10²/μl]分别加入各组培养液中混合培养,以精卵混合 24h 后已分裂为 2 细胞期胚以上的数目计算其受精率,受精卵经清洗后转入 M16 液中继续培养,每隔 24h 观察 1 次,分别计算其 4 细胞期胚、8 细胞期胚、桑椹胚及囊胚的发育情况。

4.2 小鼠体内 2 细胞期胚胎体外发育 将采集的小鼠体内 2 细胞期胚胎分别置于各组培养液中培养,每隔 24h 观察 1 次,分别计算其 4 细胞期胚、8 细胞期胚、桑椹胚、囊胚、孵化胚的发育情况。

5 统计学方法 采用 χ^2 检验。

结 果

1 补肾活血汤对小鼠体外受精的影响 各组小

鼠体外受精率依次是:I 组为 53.8%(64/119 只),II 组为 29.5%(38/129 只),III 组为 32.6%(46/141 只),IV 组为 60.3%(85/141 只),V 组为 60.2%(74/123 只),IV、V 组与 III 组的体外受精率之间差异有显著性($P<0.01$)。说明补肾活血汤有显著提高小鼠体外受精的作用。

2 各组体外受精卵发育情况 见表 1。体外受精卵在继续培养过程中,其 4 细胞期、8 细胞期胚发育率与 I 组比较,II、III 组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 III 组比较,IV、V 组则明显增高,但以 V 组为显著($P<0.05$)。桑椹胚、囊胚发育率:与 III 组比较,IV、V 组胚发育有所增加,但差异无显著性。说明经补肾活血汤作用过的体外受精卵其后的各期胚发育率亦得到明显提高。

表 1 各组体外受精卵的发育情况 [个(%)]

组别	n	4 细胞	8 细胞	桑椹胚	囊胚
I	64	24(37.5)	12(18.8)	2(3.1)	0
II	38	7(18.4)**	0**	0	0
III	46	8(17.4)**	2(4.3)*	1(2.2)	0
IV	85	28(32.9)	10(11.8)	3(3.5)	1(1.2)
V	74	28(37.8) [△]	14(18.9) [△]	9(12.2)	3(4.1)

注:与 I 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 III 组比较,[△] $P<0.05$

3 补肾活血汤对小鼠体内 2 细胞期胚胎体外发育的影响 见表 2。小鼠 2 细胞期胚胎体外培养过程中,其 4 细胞期胚胎发育率各组间均未见明显差异;8 细胞期胚、桑椹胚、囊胚、孵化胚的发育率 IV、V 组均明显高于 III 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表明药物血清能明显促进小鼠体内 2 细胞期胚胎的体外发育。

表 2 各组体内 2 细胞期胚胎体外发育情况 [个(%)]

组别	n	4 细胞	8 细胞	桑椹胚	囊胚	孵化胚
II	88	60(68.2)	25(28.4)	6(6.8)	1(1.1)	0
III	96	75(78.1)	33(34.4)	12(12.5)	3(3.1)	0
IV	103	83(80.6)	53(51.5)*	25(24.3)*	11(10.7)*	6(5.8)*
V	96	83(86.5)	57(59.4)**	32(33.3)**	18(18.8)**	9(9.4)**

注:与 III 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

讨 论

中医学认为,肾为先天之本,主生殖、藏精。《素问·奇病论》曰:“胞脉者,系于肾”。肾与冲任二脉经气相通,胞宫的生理活动与肾气盛衰息息相关,只有当肾气旺盛,精血充沛,任通冲盛,月事如期,两精相搏,方能成孕。《妇科要旨·种子》又曰:“种子之法,即在于调经之中”。在补肾基础上予以活血调经,使患者建立起正常的月经周期,又为受孕创造条件。基于这一理论,我们自拟补肾活血汤为基本方,治疗女性功能性不孕取得了满意的临床疗效^{〔1〕}。而现代中药药理研究亦提示,补肾中药具有类似内分泌激素样作用,能够增强垂

体及卵巢的反映性,调节下丘脑—垂体—卵巢轴功能^(2,3);而在补肾的基础上加活血药又可以改善患者的循环与微循环,增加卵巢血流量,诱发成熟卵泡排卵及促进黄体发育^(4,5)。因此,为进一步探明补肾活血汤是否对受精及早期胚胎发育过程产生影响?并且究竟是在哪一阶段发生影响?我们采用了血清药理学方法对此进行了实验研究。

为了更好地反映中药的作用,我们考虑首先利用目前国内外对子宫内膜异位症不孕患者腹腔内微环境因素的研究结果^(6~9),采用子宫内膜异位症不孕患者的腹腔液制造小鼠体外受精及早期胚胎发育抑制模型来观察补肾活血汤对小鼠体外受精及早期胚胎发育过程的作用。结果表明,补肾活血汤含药血清加入培养液后,能显著提高小鼠体外受精率,并对其后的体外受精卵的各期胚胎发育率亦有明显促进作用。在小鼠体内 2 细胞期胚胎的体外发育过程中,补肾活血汤对其 4 细胞期胚以后的各期胚胎发育均有明显促进作用。我们在实验中还观察到,末次灌药后 3h 所采含药血清与末次灌药后 1h 所采含药血清相比,其对小鼠体外受精及早期胚胎发育的促进作用更为显著,这有待于我们下一步对药物血清的最佳浓度进行更深入地探讨。

从本研究结果显示,补肾活血汤治疗女性不孕的作用机制可能与其在受孕的极初期阶段,即在受精及早期胚胎发育过程中起到促进作用有关。

参 考 文 献

1. 杨桂云,顾奎兴.补肾活血法治疗临床功能失调性不孕症 92 例.南京中医药大学学报 1998 ;14(3):183.
2. 归绥琪,余瑾,魏美娟,等.补肾中药对雄激素致不孕大鼠垂体、卵巢及肾上腺作用的实验研究.中国中西医结合杂志 1997 ;17(12):735—738.
3. 钟雪梅,周灵,杨家林,等.补经合剂促卵泡发育和排卵的实验研究.江苏中医 1998 ;19(3):45—46.
4. 赵瑞华,刘亚绵,杨林,等.补肾调经汤促排卵的临床研究.中国中西医结合杂志 1996 ;16(5):264—266.
5. 奚明.中医药改善黄体功能的临床研究进展.现代诊断与治疗 1995 ;(1):6—7.
6. 五味渊秀人,田府田きよ子,武谷雄二,等.子宫内膜症患者腹水のマウス体外受精に与える影响.日本受精着床学会杂志 1988 (5):134—136.
7. 郭宗明,武谷雄二,水野正彦.子宫内膜症の腹腔内貯留液の卵分割に及ぼす影响.エンドメトリオーズ研究会会志 1990 (11):174—177.
8. Morcos RN, Gibbons WE, Findley WE. Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos possible role in infertility associated with endometriosis. Fertil zsteril 1985 ;44(5):678—683.
9. 杨桂云,松浦训平,本田律生,等.マウスの体外受精および初期胚发育に及ぼすインターロイキンの作用.日本不妊学会杂志 1993 ;38(2):91—95.

(收稿 2000-04-24 修回 2001-03-23)

欢迎订阅《中国中西医结合杂志》

中文版《中国中西医结合杂志》1988~1995 年各年合订本每册 50.00 元;1996 年合订本每册 60.00 元;1997、1998 年合订本每册 70.00 元;1999 年合订本每册 80.00 元;2000 年合订本每册 90.00 元。1994~1996 年单行本(无 1995 年第 1、2 期)每本 3.90 元;1997 及 1998 年单行本每本 4.90 元;1999 年每本 5.90 元;2000 年每本 6.90 元。各年的基础理论特集:1986 年每本 2.90 元;1988 年特 1 集 3.60 元,特 2 集 4.50 元;1989 年每本 4.90 元;1990 年每本 6.50 元;1991 年每本 15.00 元;1993 年每本 18.00 元;1994 年每本 25.00 元;1995 年每本 36.00 元;1996 年每本 38.00 元;1997 年每本 40.00 元;1998 年每本 40.00 元;1999、2000 年及 2001 年每本 20.00 元;以上均另加 10% 邮资。2001 年每本 6.90 元(含邮资)。

英文版《中国中西医结合杂志》1995 年创刊(季刊,每季度末出刊),1995~2000 年每本 25.00 元,另加邮资 10%;2001 年每本 25.00 元(含邮资)。

欲购者请直接向本社邮购部汇款订购。本社地址:北京西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社邮购部(邮政编码:100091)。请在汇款附言内注明所要年、期及册数,并写清购刊者姓名、详细地址及邮政编码。