

二至天葵方对小鼠卵细胞质量影响的实验研究

连 方¹ 孙振高¹ 张建伟² 张 宁² 刘延荷¹ 穆 琳² 张 鹏²

摘要 目的 观察二至天葵方在体外受精-胚胎移植过程中对卵细胞质量的影响。方法 将 80 只小鼠随机分为 4 组:结合组(给二至天葵方加入绝经期促性腺激素(HMG))、中药组(给二至天葵方)、激素组(给 HMG)、对照组(给生理盐水),并进行排卵和卵裂试验,观察中药对卵细胞质量的影响。结果 结合组与激素组在促排卵数量上差异无显著性,但在卵细胞形态学评分及受精率、卵裂率中比较差异均有显著性($P < 0.05$),以结合组为优。结论 二至天葵方可与西药发挥协同作用,并能提高卵细胞质量。

关键词 二至天葵方;体外受精-胚胎移植;卵细胞质量

Experimental Study on Effect of Erzhi Tiangui Recipe on Quality of Oocyte in Mice LIAN Fang, SUN Zhen-gao, ZHANG Jian-wei, et al *The Reproductive and Hereditary Center of the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan (250011)*

Objective To observe the effect of Erzhi Tiangui recipe (ETR) on quality of oocyte in the process of external fertilization and embryo-transplantation. **Methods** Eighty mice were randomly divided into 4 groups, Group A treated with ETR plus human menopausal gonadotropin (HMG), Group B with ETR, Group C with HMG and Group D with normal saline. Ovulation test and cleavage test were conducted to observe the effect of treatment on quality of oocytes. **Results** The difference on ovulation number between Group A and C was insignificant, but the difference in comparison between the two groups was significant in aspects of oocyte morphological scoring, fertilization rate and cleavage rate ($P < 0.05$). **Conclusion** ETR could play its effect synergistically with Western medicine, and raise the quality of oocytes.

Key words Erzhi Tiangui recipe; external fertilization and embryo-transplantation; quality of oocyte

不孕症是严重影响育龄夫妇双方身心健康的世界性问题,国内研究中药诱导排卵治疗不孕症,主要集中于临床研究方面,以动物实验阐明其作用的报道不多。本研究采用现代生殖医学的观察指标,将中医药与现代辅助生殖技术相结合,对二至天葵方在促卵细胞发育、受精及卵裂过程中的作用加以分析,探讨其在改善卵细胞质量中的作用机理,为本中药方在辅助生殖技术中的应用提供依据,从一个侧面反应中医调经种子理论在辅助生殖技术中的指导价值,进而为试管婴儿领域开拓新思路、新途径。

材料与方

1 动物 健康昆明种小鼠,8~9 周龄,体重(35 ± 5)g,山东大学医学院动物中心提供,雌性在本室

饲养 1 周后用于实验。根据小鼠阴道涂片动情周期的表现^[1],选用动情间期小鼠 80 只和有性交经验的雄性小鼠 40 只。

2 药物和试剂 二至天葵方由女贞子、旱莲草、枸杞子、菟丝子、当归、白芍、川芎、熟地黄、制香附、炙甘草等组成。人绝经期促性腺激素(human menopausal gonadotropin, HMG, 中国丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司生产,批号 0203234),人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG, 上海生物化学制药厂生产,批号 0012201),0~3 天胚胎培养液(P-1, medium with gentamicin),血清替代品(synthetic serum substitute, SSS)。

3 分组与给药情况 将 80 只雌性小鼠随机分为 4 组,即结合组、中药组、激素组和对照组,每组 20 只,每笼 4 只小鼠,雌雄分笼饲养,自由进食和饮水,饲养室的温度保持在(20 ± 1)℃,相对湿度约 50%,自动控制光照 12h,黑暗 12h,每日 18:00 灌胃给药。结合组、中药组给二至天葵方,激素组和对照组给等量生理盐水,中药剂量按成人每日服用量(即每日 1 剂两煎共

基金项目 国家自然科学基金资助课题(No. 90209058)

作者单位:1. 山东中医药大学附属医院(济南 250011);2. 山东中医药大学

通讯作者 连 方;Tel 0531-2611558;E-mail: flian@chinaivf.com

万方数据

300ml (含生药 136g) 计算^[2], 以人的标准体重 60kg 换算成 35g 体重小鼠的每日 8 倍量, 即每只雌性小鼠每日服用中药 1.4ml (雄性小鼠不服药), 连续给药 11 天, 最后一次给药后, 结合组与激素组同时腹腔注射 HMG 12U, 中药组、对照组注射等量生理盐水 48h 后 80 只小鼠同时腹腔注射 HCG 12U, 并进行胚胎体外培养 (按体外授精-胚胎移植技术要求进行操作)。

4 排卵试验 注射 HCG 次日上午 10:00, 4 组中每组分别随机取 10 只小鼠脱颈处死, 解剖取出输卵管, 在体视镜下用 1ml 注射针划破输卵管壶腹部, 收集被黏液团和颗粒细胞包裹的卵子, 观察正常和异常卵子数目。

5 卵裂试验 注射 HCG 同时, 将每组剩余 10 只小鼠按雌:雄 = 1:1 比例分别合笼饲养 40h 后同上法处死小鼠, 解剖取出输卵管, 1ml 注射针冲洗一端, 使受精卵从另一端流出, 收集受精卵于含 P-1 液的 4 孔培养皿中, 并在 5% CO₂ 培养箱中培养, 定时 (24、48、72、96、120h) 观察受精卵的发育情况 (包括受精、卵裂情况)。正常情况下 2 细胞期鼠胚培养 24h 后即发育到 8 细胞期, 培养 48h 后到桑椹胚期, 72h 后到囊胚期, 到 96h 后开始有鼠胚孵出。在计算鼠胚孵出率时, 以培养 120h 的鼠胚为准。

6 统计学方法 由 PEMS (Ver 2.0) 华西医科大学卫生统计教研室提供, 统计软件处理, 采用 *t* 检验和 χ^2 检验。

结 果

1 各组小鼠卵泡计数和排卵数情况 见表 1。结合组与激素组两组排卵数比较差异无显著性, 但二者与中药组和对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。提示二至天癸方不减少超排卵方案中卵细胞的数目。

表 1 各组小鼠卵泡计数和排卵数比较

组别	鼠数	卵细胞计数 (个)	排卵数 (个, $\bar{x} \pm s$)
结合	10	384	38.40 ± 26.91 * [△]
中药	10	101	10.10 ± 5.32
激素	10	379	37.90 ± 27.18 * [△]
对照	10	89	8.90 ± 5.20

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与中药组比较, [△] $P < 0.05$

2 各组小鼠卵细胞质量的观察结果 见表 2。在排卵数目检查的同时, 对卵细胞形态进行评价, 异常, 包括卵胞浆不饱满, 颗粒细胞分布不均匀等。结果显示, 激素在增加卵细胞的同时, 异常卵细胞亦明显增加, 而配合二至天癸方能在不减少卵细胞数目的前提

下, 有效提高卵细胞的质量, 但两种异常卵细胞之间比较差异无显著性。

表 2 各组小鼠卵细胞形态比较 [个 (%)]

组别	卵细胞数 (个)	卵胞浆		颗粒细胞	
		饱满	固缩	松散	致密
结合	384	278 (72.4) * [△]	106 (27.6)	281 (73.2) * [△]	103 (26.8)
中药	101	79 (78.2) * [△]	22 (21.8)	80 (79.2) * [△]	21 (20.8)
激素	379	219 (57.8)	160 (42.2)	206 (54.4)	173 (45.6)
对照	89	53 (59.6)	36 (40.4)	53 (59.6)	36 (40.4)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与激素组比较, [△] $P < 0.05$

3 各组小鼠卵裂和受精卵情况的观察结果 见表 3、表 4。培养 24h 后, 结合组有 187 个卵细胞发育至 8 细胞期, 激素组有 109 个卵细胞发育至 8 细胞期, 两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。培养 72h 后, 结合组的鼠胚大都已发育至囊胚期, 而激素组的鼠胚则显示出发育迟缓, 部分仍停留在 2 细胞期, 其中有的细胞大小均匀, 形状规则, 透明带完整, 胞质均匀清晰, 没有颗粒现象, 表明鼠胚虽然停止发育但并未退化死亡; 有的细胞大小明显不均匀, 细胞皱缩, 形状不规则, 胞质有明显颗粒现象, 表现细胞已出现退化融解。培养到 72h 时, 结合组有 155 个鼠胚发育至囊胚期, 激素组只有 66 个鼠胚发育至囊胚期, 两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。结合组囊胚内细胞团清晰, 细胞数目较多, 滋养层细胞饱满, 激素组鼠胚内细胞团细胞数目较少, 滋养层细胞散在, 结构松散。培养 96h, 结合组有 87 个鼠胚孵出, 激素组有 27 个孵出, 两组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。在不同时间对受精卵的发育情况进行评价的结果显示, 早期鼠胚发育的进程中, HMG 有增加卵细胞数目的作用, 但卵的受精率和胚胎卵裂能力均较低, 异常和终止发育的卵裂球增加, 而配合二至天癸方, 则卵的受精率及胚胎卵裂能力无明显降低, 异常卵裂球亦少于激素组。

表 3 各组小鼠不同培养时间卵裂球观察结果比较 [个 (%)]

组别	受精卵数	8 细胞期/24h	桑椹胚/48h	囊胚期/72h	囊胚孵出/120h
结合	201	187 (93.0) * [△]	169 (84.1) * [△]	155 (77.1) * [△]	87 (43.3) * [△]
中药	49	45 (91.8) * [△]	41 (83.7) * [△]	36 (73.5) * [△]	20 (40.8) * [△]
激素	132	109 (82.6)	87 (65.9)	66 (50.0)	27 (20.5)
对照	41	33 (80.5)	30 (73.2)	23 (56.1)	11 (26.8)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与激素组比较, [△] $P < 0.05$

表 4 各组小鼠受精卵情况比较 [个 (%)]

组别	卵子数	受精卵细胞数	正常卵裂球	异常卵裂球
结合	378	201 (53.2) *	173 (85.6) *	29 (14.4)
中药	91	49 (53.9) *	42 (85.7) *	7 (14.3)
激素	381	133 (34.7)	90 (68.2)	42 (31.8)
对照	83	41 (49.4)	30 (73.2)	11 (26.8)

注: 对激素组比较, * $P < 0.05$

讨 论

“肾气盛、天癸至”在中医学理论中描述的是肾气、

天葵在女性生长、发育、生殖过程中的重要作用。肾藏精,主生殖,肾精与天葵是促进生殖的精微物质,可以说是促使卵细胞发育的源泉。肾中阴阳动态平衡遭到破坏,阴精失于润泽,阳气不能施化,天葵艰于泌至,冲任之气行涩,均可致不孕。肾气充盛,封藏有权,天葵产生至成熟,通达冲任,使任通冲盛,聚阴血以注于胞宫,周而复始,以至行经孕育。因此肾气不足可成为卵细胞发育障碍的基础病机,补肾益天葵,养血调冲任对生殖功能有明显的促进作用已成为共识。

1978 年第一例试管婴儿的诞生后,随着体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术的推广和应用,使用药物超排卵已是不可缺少的环节之一。但在临床应用中仍有一些不足之处,如价格昂贵,妊娠率偏低,原因之一可能为 HMG 对卵子质量、生殖内分泌激素及子宫内膜容受性的某些不良影响,尤其是可使子宫内膜发育延迟或提早成熟,改变内膜与囊胚发育的同步性^[3],流产的发生率较自然妊娠高^[4];我们对行 IVF-ET 的患者在超排卵的过程中,配合二至天葵方可与西药发挥协同作用,在不减少临床促排卵疗效的前提下,提高卵细胞质量,进而提高受精率、卵裂率和妊娠率^[5],其作用机理与促卵细胞发育、改善生殖内分泌环境、调整免疫功能及提高子宫内膜容受性的中药整体调节作用有关。目前体外培养条件仍达不到体内生理状态下受精和胚胎发育的条件。昆明种小鼠是我国目前使用广泛的一种远交品系小鼠,其早期胚胎在体外培养中表现出严重的 2 细胞期阻滞现象^[6],我们的研究发现,激素组鼠胚在培养过程中,有 14.4% 停滞在 2 细胞期而不再向前发展,加服二至天葵方的小鼠有 93.0% 的 2 细胞鼠胚向前发育,说明二至天葵方有促使早期胚胎细胞发育的作用。早期鼠胚的生命活动主要表现为细胞的分化和增殖,本研究结果显示,服用二至天葵方可促进早期胚胎的分化和发育。

将中医药理论应用于试管婴儿技术领域虽然已有报道^[7],但对其机理的认识仍处于起步阶段。笔者认为中西医结合能够互相取长补短,发挥中药整体调节之优势,在提高西药疗效的同时,并可消除或降低西药

毒副反应,使用药量减少,费用降低,而且可改善患者免疫功能,不易产生耐药性等,但联合用药对卵细胞成熟因子基因表达的影响需做进一步的研究。

参 考 文 献

- 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1991:440—442.
Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of pharmacological experiment. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991:440—442.
- 李桂娴,张亚滨,史小林,等. 中草药促排卵汤对小鼠胚泡数量的影响. 首都医学院学报 1994,15(3):194—195.
Li GX, Zhang YB, Shi XL, et al. Effect of Cupailuan decoction on the number of rat's blastocyst. J Capital Coll Med Sci 1994,15(3):194—195.
- Janson KAM, Turker KE. Follicle stimulation for IVF: should GnRH agonists be our first choice? Toward reproductive certainty, fertility & genetics beyond 1999. The Parthenon Publishing Group, New York and London, 1999, 27:186—194.
- Brestow RE, Karlan BY. Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. Fertil Steril 1996, 66:499—507.
- 连方,张建伟,张宁,等. 中西医结合疗法在试管婴儿技术中的应用. 山东中医药大学学报 2002, 26(3):182—183.
Lian F, Zhang JW, Zhang N, et al. Application of Chinese integrative medicine in IVF-ET. J Shandong Univ Chin Med 2002, 26(3):182—183.
- 李逸平,左嘉客. 哺乳类早期鼠胚发育阻滞的形成与突破. 细胞生物学杂志 1992, 14(1):135—138.
Li YP, Zuo JK. Formation and breakthrough of rat's early blastocyst's developmental retardation. J Mag Cell Biol 1992; 14(1):135—138.
- 连方,张宁,张建伟,等. 中药配合体外受精及胚胎移植治疗不孕症 2 例. 中国中西医结合杂志 2002, 26(3):627—628.
Lian F, Zhang N, Zhang JW, et al. Two infertility cases treated by herbs and IVF-ET. Chin J Integr Tradit West Med 2002, 26(3):627—628.

(收稿 2003-06-30 修回 2004-03-20)