

· 临床论著 ·

补肾调经方对 IVF-ET 患者卵母细胞质量及
卵泡液生殖激素的影响梁莹¹ 杜惠兰² 常秀峰³ 赵胜男² 雷灵梅¹

摘要 目的 研究补肾调经方对体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)患者卵母细胞质量及与卵泡液生殖激素及颗粒细胞骨形态发生蛋白-15(bone morphogenetic protein-15, BMP-15)表达的影响。方法 将60例符合纳入标准的接受IVF-ET治疗的不孕症患者,按照治疗顺序分为中药联合控制性超排卵组(治疗组,20例)和单纯控制性超排卵组(对照组,40例)。比较两组年龄、不孕年限、基础促卵泡刺激素(basal follicle-stimulating hormone, bFSH)水平、促性腺激素(gonadotropins, Gn)使用天数及使用量、皮下注射重组人绒毛膜促性腺激素(HCG)日血清中雌二醇(estradiol, E₂)、孕酮(progesterone, P)、促黄体生成素(luteotropic hormone, LH)水平、获卵数、受精率、胚胎数、优质胚胎率和临床妊娠率。应用化学发光法检测卵泡液生殖激素FSH、LH、E₂、P、睾酮(testosterone, T)浓度。应用实时荧光定量PCR(real-time PCR)法和蛋白质印迹法(Western blot)测定成熟卵泡颗粒细胞BMP-15 mRNA和蛋白定量的表达。结果 60例患者妊娠32例,总妊娠率为53.3%。其中对照组40例,妊娠19例,妊娠率47.5%;治疗组20例,妊娠13例,妊娠率65.0%,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗组Gn用量低于对照组,优质胚胎率高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而HCG注射日血清E₂、LH、P浓度,获卵数和受精率两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,治疗组卵泡液FSH浓度均降低,LH浓度增高,妊娠患者卵泡液LH浓度亦明显高于未妊娠患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而卵泡液E₂、T、P浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗组颗粒细胞上BMP-15 mRNA和蛋白定量的表达较对照组均增高,妊娠患者亦高于未妊娠患者($P < 0.05$)。结论 在IVF-ET过程中,补肾调经方可以提高卵母细胞质量,增加卵泡对外源性促性腺激素的敏感性。补肾调经方的这一作用与颗粒细胞上BMP-15 mRNA和蛋白定量的表达变化及卵泡液中FSH和LH的浓度变化有关。

关键词 补肾调经方;卵母细胞质量;促卵泡生成素;促黄体生成素;骨形态发生蛋白-15

Effect of Bushen Tiaojing Recipe on the Quality of the Oocytes and Reproductive Hormones in the Follicular Fluid in IVF-ET Patients LIANG Ying¹, DU Hui-lan², CHANG Xiu-feng³, ZHAO Sheng-nan², and LEI Ling-mei¹ 1 Reproductive Center, Forth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang (050011), China; 2 Faculty of Integrative Medicine Gynecology, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center for Integrative Medicine Reproductive Disease, Shijiazhuang (050091), China; 3 Center for Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang (050082), China

ABSTRACT Objective To explore the effect of Bushen Tiaojing Recipe (BTR) on the quality of oocytes, reproductive hormones, and the expression of bone morphogenetic protein-15 (BMP15) of *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) patients. Methods Sixty infertility patients who prepared for IVF-ET were assigned to two groups according to the treatment order, the treatment group [20 cases,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173294)

作者单位:1. 河北省石家庄市第四医院生殖中心(石家庄 050011); 2. 河北中医学院中西医结合妇科教研室中西医结合生殖疾病协同创新中心(石家庄 050091); 3. 白求恩国际和平医院妇产科生殖医学中心(石家庄 050082)

通讯作者:杜惠兰, Tel: 0311-83932133, E-mail: duhuilan@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.08.0911

treated with BTR + controlled ovarian hyperstimulation (COH)] and the control group (treated with COH alone, 40 cases). Age, the time limit for infertility, basal follicle-stimulating hormone (bFSH) concentration, usage days and the dosage of gonadotropins (Gn), serum levels of estradiol (E_2), luteotropic hormone (LH), and progesterone (P) on the HCG injection day, the number of retrieved oocytes, the fertilization rate, the number of embryos, the high quality embryo rate, and the clinical pregnancy rate were compared. Concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH), LH, E_2 , testosterone (T), and P in the follicular fluid were detected via chemiluminescence microparticle immunoassay. The mRNA and protein expression of BMP-15 in mature granulosa cells was detected by real-time fluorescent PCR and Western blot. Results Thirty-two patients were pregnant and the total pregnancy rate was 53.3%. Of them, 19 were pregnant and the total pregnancy rate was 47.5% in the control group, while 20 were pregnant and the total pregnancy rate was 65.0% in the treatment group. But there was no statistical difference between the two groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the Gn dosage was lower and the high quality embryo rate was higher in the treatment group, showing statistical difference ($P < 0.05$). There was no statistical difference in serum concentrations of E_2 , LH, or P on the HCG injection day, the number of retrieved oocytes, or the fertilization rate ($P > 0.05$). Compared with the control group, FSH concentrations in the follicular fluid were significantly lower and LH concentrations were significantly higher in the treatment group ($P < 0.05$). The LH concentrations in the follicular fluid were significantly higher in pregnant patients than non-pregnant patients, showing statistical difference ($P < 0.05$). There was no statistical difference in E_2 , T, or P concentrations ($P > 0.05$). The mRNA and protein expression of BMP-15 in granulosa cells was higher in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$). It was also higher in pregnant patients than non-pregnant patients, showing statistical difference ($P < 0.05$). Conclusion During the IVF-ET process, BTR could elevate the quality of oocytes, and increase the sensitivity of ovarian follicles to exogenous Gn, which was correlated with the mRNA and protein expression of BMP-15 in granulosa cells, and changing concentrations of FSH and LH.

KEYWORDS Bushen Tiaojing Recipe; oocyte quality; follicle-stimulating hormone; luteotropic hormone; bone morphogenetic protein - 15

补肾法是临床上中医治疗月经病、不孕症的常用治法。《傅青主女科》提出肾主生殖,“经水出诸肾”。肾气旺盛,肾精充实,气血调和,任通冲盛,则经调子嗣。卵母细胞质量研究在体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)技术工作中具有重要的临床意义^[1,2]。提高卵母细胞质量和胚胎质量对提高 IVF 妊娠率和孕育健康子代具有重大意义^[3]。有报道中药可以提高卵母细胞质量和提高卵巢储备功能^[4-6]。课题组的前期研究也发现补肾法具有调节卵巢功能的作用^[7]。

骨形态发生蛋白-15 (bone morphogenetic protein-15, BMP-15) 是卵母细胞分泌因子 (oocyte secreted factors, OSFs) 之一,在卵巢内广泛表达,由卵母细胞分泌,调节自身的成熟,并影响周围颗粒细胞、卵泡膜细胞和间质细胞的功能^[8-10]。因此本研究通过观察补肾调经方对 IVF-ET 患者卵母细胞质量和妊娠结局的影响来探讨补肾法对 IVF-ET 患者卵巢颗粒细胞 BMP-15 表达的影响。

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证标准

1.1 不孕症诊断标准 参照《妇产科学》^[11] 中不孕症的诊断标准。

1.2 肾虚证诊断标准 参考《中华人民共和国国家标准·中医临床诊疗术语·证候部分》^[12] 及《中医妇科学》^[13] 制定:(1)经量少或质稀;(2)腰酸或痛;(3)脘酸膝软或足跟痛;(4)头晕耳鸣;(5)性欲淡漠;(6)两尺脉沉迟。以上 6 项具备 ≥ 3 项即可诊断。

2 纳入标准 (1)符合西医不孕症和中医肾虚证诊断标准;(2)同意接受 IVF-ET 助孕治疗;(3)年龄 < 38 岁;(4)基础促卵泡刺激素 (bFSH) < 10 mIU/mL;(5)经医院伦理委员会批准,签署知情同意书。

3 排除标准 (1)子宫不具备妊娠功能或严重躯体疾病不能承受妊娠;(2)患有严重的精神疾患、泌尿生殖系统感染、性传播疾病、有吸毒等严重不良嗜好、接触致畸量的射线、毒物并处于作用期不能接受 IVF-ET 治

疗者;(3)子宫内膜异位症;(4)宫腔病变,包括子宫内膜息肉,宫腔粘连等其他包含子宫内膜因素的不孕;(5)发生受精失败(受精率<30%);(6)因卵巢过度刺激综合征等其他因素取消移植;(7)染色体异常。

4 一般资料 60 例均为 2010 年 9 月—2012 年 7 月于河北省石家庄市第四医院生殖中心和白求恩国际和平医院生殖中心接受 IVF-ET 治疗符合纳入标准的不孕症患者,按照治疗先后顺序分为对照组和治疗组。对照组 40 例,年龄 21~38 岁,平均(28.41±4.53)岁,不孕年限 1~10 年,平均(4.92±2.63)年,bFSH 3.21~8.12 mIU/mL,平均(5.90±3.51) mIU/mL。治疗组 20 例,年龄 21~38 岁,平均(30.43±3.81)岁,不孕年限 1~10 年,平均(5.51±3.81)年,bFSH 2.71~8.74 mIU/mL,平均(4.81±2.72) mIU/mL,两组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

5 治疗方法 两组患者均采用常规的促性腺激素释放激素激动剂(GnRHa)长方案促排卵,即月经周期的黄体中期或者第 21 天每日皮下注射 GnRHa(醋酸曲普瑞林,0.1 mg/支,法国博福-益普生集团,批号:D22863) 0.1 mg,至少 14 天。达到降调节标准即子宫内膜≤5 mm,血清雌二醇(E_2)<50 pg/mL 后,每日注射重组人 FSH(果那芬,75 IU/支,德国默克雪兰诺,批号:AU002290)250~300 IU/d, B 超及血清促黄体生成素(LH)、 E_2 、孕酮(P)监测卵泡发育情况,当较多卵泡直径达到或超过 18 mm 时停药,皮下注射重组人绒毛膜促性腺激素(HCG,艾泽,250 μg/支,默克雪兰诺,批号:DA009256)250 μg 诱导卵泡成熟,36~38 h 经阴道超声引导下穿刺取卵。

治疗组同时服用补肾调经方:熟地黄 20 g 当归 9 g 白芍 9 g 山药 12 g 山萸肉 15 g 枸杞子 12 g 女贞子 9 g 淫羊藿 10 g 紫河车 10 g 覆盆子 10 g 菟丝子 12 g 香附 6 g,水煎服,每天 1 剂,早、晚分服。至 HCG 注射日停服。

6 观察指标及方法

6.1 促性腺激素(Gn)使用天数及使用量

6.2 注射 HCG 日血清中 E_2 、P、LH 测定 采用化学发光法。

6.3 获卵数、受精率、卵裂率、胚胎数、优质胚胎率和临床妊娠率 获卵数:将取卵获得的卵泡液置于体视镜观察,挑取卵冠丘复合物,培养并且计数获卵数。所有卵母细胞按剥除卵丘细胞时的卵母细胞的成熟度分为 3 组:I 组,有第一极体,为 MⅡ期卵(成熟卵);Ⅱ组,无第一极体也无生发泡(GV+),为 MⅠ

期卵;Ⅲ组,有 GV,为 GV 期卵。

受精率:于受精后 16~18 h 仔细分开丘细胞、放射冠,观察胞浆和原核(Pronucleus, PN),正常受精卵有 2 个原核(2PN),2 个极体,卵母细胞的透明带完整、规则,胞浆清晰,均匀。未受精的卵母细胞无原核(0PN)。另外还包括 1PN 及 3PN 等,均为异常受精。观察并记录正常受精数。受精率(%)=受精卵子数/获卵数×100%。

胚胎和优质胚胎率:从形态学角度将胚胎质量,分为 4 级。分级标准:1 级胚胎:胚胎卵裂球均匀规则,胞浆均质透明,胚胎无或仅有极少量碎片(<5%);2 级胚胎:卵裂球不甚均匀规则,胞浆折光性有轻微改变,卵裂球碎片占 10%~25%;3 级胚胎:胚胎卵裂球不均欠规则,卵裂球碎片占 25%~50%;4 级胚胎:胚胎卵裂球严重不均,形态不规则,卵裂球碎片>50%。胚胎质量≤2 级作为优质胚胎;若>2 级且≤3 级为可移植胚胎,4 级为弃胚。优质胚胎率(%)=优质胚胎数/胚胎数×100%。

临床妊娠:胚胎移植后 1 个月,在超声下可见到胎囊、胎芽及原始心管搏动,记为临床妊娠。临床妊娠率(%)=临床妊娠例数/移植胚胎的周期数×100%。

6.4 卵泡液 FSH、LH、 E_2 、P、睾酮(T)测定 采用化学发光法。

6.5 卵泡壁颗粒细胞 BMP-15 mRNA 的表达 采用实时荧光定量 PCR 的方法。采用 Trizol(In-votrigen 公司,美国)一步法提取颗粒细胞总 RNA,2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。各组取 2 μg 总 RNA 进行反转录,反应条件为 25℃ 10 min,42℃ 50 min,85℃ 5 min。然后分别以人 GAPDH、BMP-15 的特异性引物进行 PCR 反应。所用引物序列利用 GenBank 数据库中提供的基因序列,经 GenBank BLAST 进行同源性检测,用 DNAMAN version 6 软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成,其序列分别如下:GAPDH:上游:5'-TGAACGGGAAGCT-CACTGG-3',下游:5'-GCTTCACCACCTTCTT-GATGTC-3',引物长度:135 bp;BMP-15:上游:5'-CGCCATCATCTCCAACTAAC-3',下游:5'-TC-CAT CTCTTTCCAAGCGT-3',引物长度:143 bp。应用 ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 仪来进行扩增,反应参数为:95℃ 预变性 5 min,然后 95℃,15 s、58℃,20 s、72℃,27 s 反应 40 个循环,在每个循环的第 27 s 探测各孔的荧光量;溶解曲线阶段,变性 95℃ 15 s,退火 60~64℃ 30 s,最后 72℃ 延伸

30 s。BMP-15 mRNA 表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示,其值为以 BMP-15 mRNA 表达量与 GAPDH 表达量的比值,再将对照组某某的量设为 1,其余样本的数值与其相除,得到相对定量值。每个目的基因测定重复 3 次。

6.6 BMP-15 蛋白表达 采用 Western blot 方法测定。将提取的人颗粒细胞加入蛋白裂解液,冰浴 30 min,使细胞充分裂解。4 ℃,8 000 r/min 离心 10 min,收集上清,进行蛋白定量。各组取等量蛋白质,进行 10% SDS-PAGE 分离后,电转膜至 PDVF 膜上。依次与 BMP-15 抗体和 β -actin 抗体以及抗兔 IgG Antibody IRDye 800 和抗鼠 IgG Antibody IRDye700 二抗进行结合反应,用化学发光法检测抗原抗体结合条带。用数码成像分析系统软件对电泳条带进行密度扫描,以 β -actin 为内参照进行定量分析。

7 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 t 检验;计数资料用率表示,并采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 妊娠情况 60 例患者中妊娠 32 例,未妊娠 28 例,总妊娠率为 53.3%。对照组 40 例,妊娠 19 例,妊娠率 47.5%;治疗组 20 例,妊娠 13 例,妊娠率 65.0%,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 两组 Gn 用量及 HCG 注射日血清 E₂、LH、P 浓度比较(表 1) 与对照组比较,治疗组 Gn 用量低于对照组($P < 0.05$),而 HCG 注射日血清 E₂、LH、P 浓度两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 两组获卵数、受精率、优质胚胎率及临床妊娠率比较(表 2) 与对照组比较,治疗组获卵数和受精率差异无统计学意义($P > 0.05$)。但优质胚胎率高于对照组($P < 0.05$)。治疗组临床妊娠率有增高的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 两组卵泡液中 FSH、LH、E₂、T 及 P 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FSH 浓度(mIU/mL)	LH 浓度(mIU/mL)	E ₂ 浓度(pg/mL)	T 浓度(ng/mL)	P 浓度(ng/mL)
对照	40	6.80 ± 1.80	0.22 ± 0.10	1 079.31 ± 564.31	6.00 ± 0.32	25.03 ± 9.61
治疗	20	5.31 ± 1.00 *	0.31 ± 0.19 *	1 445.42 ± 707.40	7.21 ± 2.72	25.82 ± 2.51

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

表 4 妊娠与未妊娠患者卵泡液中 FSH、LH、E₂、T 及 P 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	E ₂ (pg/mL)	T (ng/mL)	P (ng/mL)
妊娠	32	6.32 ± 2.31	0.30 ± 0.18 *	1 269.80 ± 710.30	6.20 ± 2.60	23.30 ± 12.60
未妊娠	28	7.24 ± 0.92	0.21 ± 0.11	888.80 ± 269.90	5.90 ± 1.20	26.80 ± 4.90

注:与未妊娠患者比较, * $P < 0.05$

表 1 两组 Gn 用量及 HCG 注射日血清 E₂、LH 及 P 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Gn 用量 (IU)	E ₂ (pg/mL)	LH (mIU/mL)	P (ng/mL)
对照	40	3 398.52 ± 1032.31	4 123.53 ± 2 103.51	0.91 ± 0.62	0.92 ± 0.70
治疗	20	2 768.51 ± 958.31 *	4 966.81 ± 1 955.82	0.81 ± 0.73	0.91 ± 0.61

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 两组获卵数、受精率、优质胚胎率及临床妊娠率比较

组别	例数	获卵数 (个, $\bar{x} \pm s$)	受精率 (%)	优质胚胎率 (%)	临床妊娠率 (%)
对照	40	12.92 ± 4.73	66.43(283/426)	35.71(100/280)	47.50(19/40)
治疗	20	14.63 ± 6.72	72.20(161/223)	53.13(85/160) *	65.00(13/20)

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

4 两组卵泡液中 FSH、LH、E₂、T 及 P 浓度比较(表 3) 与对照组比较,治疗组卵泡液 FSH 浓度降低, LH 浓度增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两组 E₂、T、P 浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 妊娠与未妊娠患者卵泡液中 FSH、LH、E₂、T 及 P 浓度比较(表 4) 与未妊娠患者进行比较,妊娠患者卵泡液 FSH、P 浓度下降, E₂、T 浓度升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);妊娠患者卵泡液 LH 浓度明显高于未妊娠患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

6 两组卵巢颗粒细胞上 BMP-15 mRNA 表达比较(表 5、6,图 1) 与对照组比较,治疗组 BMP-15 mRNA 的表达增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。妊娠患者 BMP-15 mRNA 表达高于未妊娠患者,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

7 两组卵巢颗粒细胞上 BMP-15 蛋白表达比较(表 5、6,图 2) 与对照组比较,治疗组 BMP-15 蛋白表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。妊娠患者 BMP-15 蛋白表达亦高于未妊娠患者,差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

表 5 两组卵巢颗粒细胞上 BMP-15 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

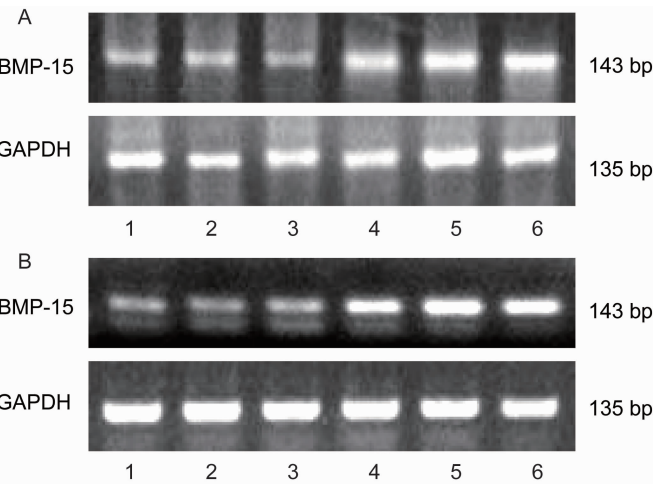
组别	例数	BMP-15 mRNA	BMP-15 蛋白
对照	40	1.91 ± 1.13	0.65 ± 0.41
治疗	20	4.03 ± 2.01 **	1.46 ± 0.08 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 6 妊娠与未妊娠患者颗粒细胞 BMP-15 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

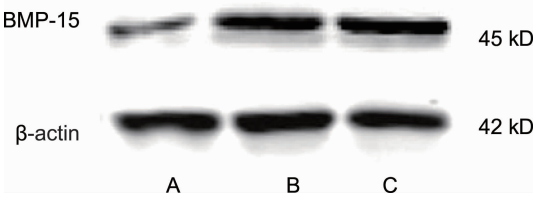
组别	例数	BMP-15 mRNA	BMP-15 蛋白
妊娠	32	2.82 ± 0.80 *	1.00 ± 0.03 **
未妊娠	28	1.12 ± 0.11	0.28 ± 0.06

注:与未妊娠患者比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$



注:A 为治疗组和对照组 BMP-15 mRNA 表达比较;其中 A1~3 为对照组;A4~6 为治疗组;B 为未妊娠患者和妊娠患者 BMP-15 mRNA 表达比较;B1~3 为未妊娠患者;B4~6 为妊娠患者

图 1 两组卵巢颗粒细胞上 BMP-15 mRNA 表达电泳图



注:A 为对照组中的未妊娠患者;B 为对照组中的妊娠患者;C 为治疗组

图 2 BMP-15 蛋白在颗粒细胞上的表达电泳图

讨论

中医学认为,肾藏精,主生殖,系胞胎,为冲任之本,元气之根。肾气旺盛,天癸始能泌至,促进冲任二脉通盛,生殖之精成熟,阴阳合,两精相搏,生命由是开始。

补肾调经方由养精种玉汤合五子衍宗丸加减而

来,是补肾法的代表方。方中熟地黄可补血滋阴、益精填髓为君药。山萸肉、山药、枸杞子、女贞子助熟地黄滋肾添精,补益真阴;淫羊藿、紫河车、覆盆子、菟丝子补肾助阳,共为臣药。当归、白芍养血活血,滋阴柔肝,香附行气开郁,助血运行,共为佐药。本方在滋补肾阴的基础上,加入温肾壮阳之品,共奏滋肾阴、温肾阳、填精血、调冲任之功,与养血调经之药合用,而达补肾调经促排卵之用。

临床上用来反映卵母细胞质量的重要标志是优质胚胎率和妊娠率。卵母细胞的质量影响生殖能力、胚胎质量及辅助生殖治疗结局的关键因素之一^[1-3]。目前临床上多是从受精率、卵裂率、优质胚胎形成率及第一极体形态、MII期卵母细胞分级等形态学方面来评定卵母细胞质量^[14]。本研究结果显示,治疗组优质胚胎率明显高于对照组,并且妊娠率有增高的趋势。提示补肾调经方有提高卵母细胞质量的作用。治疗组促性腺激素用量减低,卵泡液中的 FSH 浓度减低,提示补肾调经方有减少促性腺激素用量,提高卵泡对外源性促性腺激素敏感性的作用,这一作用是否与增加 FSH 受体(FSHR)的表达或增强 FSHR 后作用有关有待进一步研究。本研究中患者卵泡液 LH 浓度极低,明显低于血清中检测的 LH 浓度;而妊娠组卵泡液 LH 浓度高于未妊娠组,治疗组高于对照组,提示卵泡液中一定量的 LH 浓度对妊娠有促进作用,补肾调经方有利于维持一定浓度的 LH 水平,进而有利于妊娠。补肾调经方如何实现对 LH 浓度的调节有待进一步探讨。

雌性小鼠 BMP-15 基因缺失,生育能力下降,其卵巢没有明显的改变,但卵巢的卵泡发育减少,并且透明带碎裂增加,排卵率下降,自然妊娠率降低^[15]。课题组的前期研究发现,卵泡液中 BMP-15 的表达与相应卵泡的优质卵母细胞和胚胎相关^[16]。BMP-15 和 FSH 具有相互作用。高浓度的 FSH 能显著降低 BMP-15 的表达^[17],BMP-15 可以抑制 FSHR 表达抑制 FSH 诱导的孕酮增加^[18]。此外实验证明发育潜能好的卵母细胞其卵泡液中含有较高水平的 BMP-15^[19]。本研究中,补肾药物组卵泡液中 FSH 浓度降低,颗粒细胞上 BMP-15 和 FSH 表达增加,提示补肾法通过对 BMP-15 和 FSH 的调节实现对卵母细胞发育的调节,从而影响卵母细胞的质量。

综上所述,本研究结果提示在 IVF-ET 过程中补肾法可以提高卵母细胞质量,增加卵泡对外源性促性腺激素的敏感性,其作用机制可能与补肾调经方上调颗粒细胞 BMP-15 表达及卵泡液中 FSH 和 LH 的浓度有关。

参 考 文 献

- [1] Gasperin BG, Ferreira R, Rovani MT, et al. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle[J]. Anim Reprod Sci, 2014, 144(3-4): 72-78.
- [2] Gode F, Gulekli B, Dogan E, et al. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality[J]. Fertil Steril, 2011, 95(7): 2274-2278.
- [3] Lian F, Li XN. Dan'e Fukang Soft Extract improved the oocyte quality and GDF-9 expressions of endometriosis patients: an experimental study[J]. Chin J Integr Med, 2013, 33(9): 1179-1182.
- [4] 连方, 赵斌, 吕雪梅, 等. 二至天癸方对体外受精-胚胎移植患者卵泡液代谢组学及 Ca^{2+} 浓度的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 22-25.
- [5] 连方, 滕依丽, 张建伟, 等. 二至天癸颗粒对体外受精-胚胎移植周期人卵泡液白血病抑制因子和卵细胞质量的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(11): 976-978.
- [6] 张建伟, 连方, 孙振高. 中药二至天癸颗粒对控制性超排卵周期卵泡液 IL-1 β 、IL-6 以及对胚胎质量的影响[J]. 生殖与避孕, 2007, 27(11): 714-716.
- [7] 杜惠兰, 段彦苍, 宋翠森. 补肾调经方对雄激素诱导无排卵大鼠血清生殖激素及子宫、卵巢性激素受体水平的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(4): 24-26.
- [8] Otsuka F, Yao Z, Lee TH, et al. Bone morphogenetic protein 15 identification of target cells and biological functions[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39523-39528.
- [9] Margulis S, Abir R, Felz C, et al. Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women[J]. Fertil Steril, 2009, 92(5): 1666-1673.
- [10] Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, et al. Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) genes in ovine oocytes and *in vitro*-produced preimplantation embryos[J]. Reprod Fertil Dev, 2008, 20(8): 908-915.
- [11] 乐杰. 妇产科学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 351.
- [12] 国家技术监督局. 中华人民共和国国家标准·中医临床诊疗术语·证候部分[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 157-160.
- [13] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 324-329.
- [14] Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors[J]. Reprod Fertil Dev, 2007, 19(1): 1-12.
- [15] Yan C, Wang P, DeMayo J, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. Mol Endocrinol, 2001, 15(6): 854-866.
- [16] 常秀峰. 补肾调经方对 IVF-ET 妊娠结局及颗粒细胞凋亡和 OSFs 的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2011.
- [17] Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, et al. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of the expression of oocyte and granulosa cell factors[J]. Endocrinology, 2005, 146(2): 941-949.
- [18] Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, et al. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression[J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11387-11392.
- [19] Wu YT, Tang L, Cai J, et al. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development[J]. Hum Reprod, 2007, 22(6): 1526-1531.

(收稿: 2013-10-09 修回: 2014-03-15)