

补肾调经方对小鼠体外培养卵泡卵母细胞 BMPR II /ALK6-Smads 表达的影响

孙晓换¹ 范丽洁¹ 李 丽¹ 魏学聪¹ 刘亚华¹ 耿丹丹¹ 谷向向¹ 杜惠兰^{1,2}

摘要 **目的** 观察补肾调经方对小鼠体外培养窦前卵泡成活数及卵母细胞骨形成蛋白 II 型受体 (bone morphogenetic protein receptor II, BMPR II)/激活素受体样激酶 6-Smads (activin receptor-like kinase 6-drosophila mothers against decapentaplegic proteins, ALK6-Smads) 信号通路的影响,探讨其提高体外生长卵泡卵母细胞质量的作用机制。**方法** 65 只 12 日龄健康雌性昆明小鼠,采用机械法分离其窦前卵泡,分别以正常大鼠血清、高、中、低剂量补肾调经方大鼠含药血清、高剂量补肾调经方大鼠含药血清 + K02288 孵育,分为对照组、补肾高、中、低剂量组 (即补肾组)、抑制剂组,普通法体外培养。培养第 6 天比较补肾组与对照组窦前卵泡成活数,实时荧光定量 PCR 法检测卵母细胞中 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达;细胞免疫荧光法检测上述指标和磷酸化的 Smad1/5/8 (phospho-Smad1/5/8, p-Smad1/5/8) 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,补肾高剂量组窦前卵泡成活数增加,补肾各剂量组 BMPR II、ALK6、Smad5、Smad8 mRNA 表达水平升高,上述指标及 p-Smad1/5/8 蛋白表达水平升高,补肾高、中剂量组 Smad1 mRNA 及其蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。与补肾高剂量组比较,抑制剂组 p-Smad1/5/8 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾调经方能增加体外培养窦前卵泡成活数,提高卵母细胞质量,其作用机制可能与调控卵母细胞中 BMPR II /ALK6-Smads 信号通路有关。

关键词 补肾调经方;窦前卵泡;卵母细胞;骨形成蛋白 II 型受体;激活素受体样激酶 6;信号通路

Bushen Tiaojing Recipe Regulated Expressions of BMPR II /ALK6-Smads in Mouse Oocytes Culture *in vitro* SUN Xiao-huan¹, FAN Li-jie¹, LI Li¹, WEI Xue-cong¹, LIU Ya-hua¹, GENG Dan-dan¹, GU Xiang-xiang¹, and DU Hui-lan^{1,2} 1 Graduate School, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017); 2 Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center of Integrated Chinese and Western Medicine on Reproductive Disease, Shijiazhuang (050091)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Bushen Tiaojing Recipe (BTR) on the counts of survival preantral follicles and the bone morphogenetic protein receptor II (BMPR II)/activin receptor-like kinase 6-drosophila mothers against decapentaplegic proteins (ALK6-Smads) signal pathway in oocytes cultured *in vitro*, and to study its mechanism for improving the quality of oocytes. **Methods** Preantral follicles were mechanically isolated from 65 female 12-day old healthy Kunming mice, which were inoculated by normal rats' serum (as the control group), high, medium, low dose BTR containing serums (as Shen-supplementing groups), high dose BTR containing serum + K02288 (as the inhibitor group), respectively. All were cultured by common method *in vitro*. On the 6th day the counts of survival preantral follicles were compared between each Shen-supplementing group and the control group respectively. mRNA expressions of BMPR II, ALK6, Smad1, Smad5, and Smad8 were detected by Real-time fluorescence quantitative PCR. The protein expressions of indices mentioned above and phospho-Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) were detected by cellular immunofluorescence test. **Results** Compared with the control

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 81173294)

作者单位:1.河北医科大学研究生学院 (石家庄 050017); 2.河北中医学院中西医结合学院 中西医结合生殖疾病协同创新中心 (石家庄 050091)

通讯作者:杜惠兰, Tel:13931150880, E-mail:duhuilan@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1241

group, the quantity of survival preantral follicles increased in the high dose BTR containing serum group; mRNA expressions of BMPR II, ALK6, Smad5, and Smad8 were elevated, protein expressions of indices mentioned above and p-Smad1/5/8 were increased in the 3 Shen-supplementing groups ($P < 0.05$); mRNA and protein expressions of Smad1 were increased in high and medium dose BTR containing serum groups ($P < 0.05$). Compared with the high dose BTR containing serum group, protein expressions of Smad1/5/8 were reduced in the inhibitor group ($P < 0.05$). Conclusion BTR could elevate the quantity of survival preantral follicles cultured *in vitro* and improve the quality of oocytes, which might be possibly associated to regulating the BMPR II/ALK6-Smads signal pathway in oocytes.

KEYWORDS Bushen Tiaojing Recipe; preantral follicle; oocyte; bone morphogenetic protein receptor II; activin receptor-like kinase 6; signal pathway

不孕症是世界性的医学和社会学问题,目前,我国女性不孕症的发病率为 10% ~ 15%,且逐年上升,其中卵巢因素占 25% ~ 35%^[1]。体外受精—胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)是目前治疗不孕症的主要手段之一,开发和利用窦前卵泡,通过体外培养技术获取大量成熟并具有受精能力的优质卵母细胞,推动该技术继续发展是目前的研究热点。研究发现,卵泡液中较高的骨形成蛋白 15 (bone morphogenetic protein, BMP-15) 表达与较高的卵母细胞质量密切相关^[2],而 BMP-15 发挥信号转导作用需要结合特异性膜受体骨形成蛋白 II 型受体 (bone morphogenetic protein receptor II, BMPR II) 和激活素受体样激酶 6 (activin receptor-like kinase 6, ALK6),引起下游 Smads 活化,以调节靶基因转录。

中医学认为,肾藏精,为生殖之本,在维持女性妊娠生理方面具有重要的作用。临床上运用补肾法治疗不孕症疗效显著^[3]。补肾调经方由养精种玉汤与五子衍宗丸加减化裁而成,可作为补肾法的代表方剂。课题组前期研究证实,补肾调经方能调节促性腺激素预处理小鼠的卵巢功能^[4],改善雄激素致排卵障碍模型大鼠卵巢形态^[5],并通过上调 IVF-ET 患者颗粒细胞和控制性超促排卵小鼠卵母细胞 BMP-15 表达改善卵母细胞质量^[6,7]。而补肾调经方是否通过调控体外生长卵泡卵母细胞中膜受体介导的 Smads 信号通路,提高卵母细胞质量及其具体机制目前尚不明确。本研究通过观察补肾调经方对小鼠体外培养窦前卵泡成活数及卵母细胞 BMPR II/ALK6-Smads 信号通路的影响,旨在为补肾中药促进体外卵泡发育,提高卵母细胞质量,提供实验基础。

材料与方

1 动物 65 只清洁级健康雌性昆明小鼠(动物合格证编号:1507110),12 日龄;12 只清洁级健康雌性

SD 大鼠,6 周龄(动物合格证编号:1504103),均购自河北省实验动物中心,室温 20 ℃,相对湿度 50%,光照 12 h,黑暗 12 h。动物均自由进食饮水。

2 药物 补肾调经方由熟地黄 20 g 当归 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 白芍 9 g 肉苁蓉 10 g 丹参 10 g 组成,药材均购自石家庄乐仁堂药房,经河北中医学院中药系鉴定为正品。青链霉素(批号:1445472,以色列 Bioind 公司);重组人促卵泡激素(recombinant human follicular stimulating hormone, rFSH,批号:BA017828)、重组人促黄体激素(recombinant human luteinizing hormone, rLH,批号:AU004513)均由德国 Merck Serono 公司生产。

3 试剂及仪器 α 改良伊格尔培养基(α modified eagle medium, α -MEM,批号:8114083,美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,批号:120310,美国 GIBCO 公司);胰岛素-转铁蛋白-硒(insulin-transferrin-selenium, ITS,批号:SLBL0388V,美国 Sigma 公司);胶原酶 NB4(批号:17454,德国 Serva 公司);透明质酸酶(批号:H8030,北京索莱宝生物科技有限公司);K02288(批号:16678,美国 Cayman 公司);Trizol(货号:15596-026,美国 Invitrogen 公司);M-MLV 反转录试剂盒(货号:A3500,美国 Promega 公司);SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒(货号:K0251,加拿大 Fementas 公司);BMPR II 一抗(货号:DF7448)、ALK6 一抗(货号:DF6748)、Smad1 一抗(货号:DF6243)、Smad5 一抗(货号:AF5119)及 Smad8 一抗(货号:AF5114)均为美国 Affinity 公司产品;p-Smad1/5/8(批号:13820,美国 CST 公司);荧光二抗(批号:117979,北京中杉金桥生物技术有限公司)。ND2000 型紫外分光光度计,美国 Thermo 公司;ABI

7300 型荧光定量 PCR System, 美国 ABI 公司; RS-28 型低温离心机, 德国贺利氏公司; UVP 凝胶扫描仪, 美国 UVP 公司; Leica EZ4 体视显微镜, 德国徕卡公司; BX51T-PHD-J11 倒置显微镜, IX71 荧光倒置显微镜, 均为日本 Olympus。

4 动物分组及含药血清制备 将 12 只雌性 SD 大鼠按体重分为 4 组, 即补肾高、中、低剂量组和对照组, 每组 3 只。每日 8:00、14:00 分别灌服补肾调经方混悬液 4.62、3.08、1.54 g/mL 和蒸馏水(分别相当于成人剂量的 18、12、6 倍), 1 mL/(100 g·d), 连续 3 天, 第 4 天禁食 12 h 后一次性灌服全天剂量, 1 h 后股动脉采血。37℃ 水浴 15 min 后常温下离心(3 000 r/min, 15 min), 取上清, 56℃ 水浴 30 min 灭活补体, 0.22 μm 无菌滤器过滤除菌, 获得高、中、低剂量补肾调经方大鼠含药血清和正常大鼠血清, -20℃ 保存备用。

5 窦前卵泡分离及培养 参照参考文献[8], 机械法分离小鼠窦前卵泡。将小鼠在无菌条件下颈椎脱臼处死, 于肾囊处取出双侧卵巢, 用含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 μg/mL 的生理盐水清洗 1~2 次, 转移至超净工作台, 在卵泡分离液(α-MEM + 10% FBS + 100 IU/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素), 40 倍体视显微镜下用连接于 1 mL 注射器的 25 G 针头分离, 操作时动作尽量精细。选择窦前卵泡的标准: 直径为 80~120 μm, 中央有一圆形卵母细胞, 颗粒细胞透明, 卵泡壁和基底膜清晰完整。用外径略大于卵泡直径的吸管将卵泡移入装有 2 mL 预先平衡过夜细胞培养液的 35 mm 培养皿中(α-MEM + 10% FBS + 1% ITS + 100 mIU/mL rFSH + 10 mIU/mL rLH + 100 IU/mL 青霉素 + 100 μg/mL 链霉素), 三气培养箱(37℃、5% CO₂、100% 湿度)培养。

6 实验分组及样本收集 24 h 后卵泡贴壁, 分别加入 10% 正常大鼠血清, 10% 高、中、低剂量补肾调经方大鼠含药血清、10% 高剂量补肾调经方大鼠含药血清 + 10 μmol/L K02288, 分为对照组、补肾高、中、低剂量组(即补肾组)及抑制剂组。普通法群体培养, 隔天换液 1/2。体外培养 6 天后, 依次用 0.25% 胶原酶 NB4 和 0.1% 透明质酸酶 37℃ 消化窦前卵泡 5~10 min, 其中抑制剂组予 10 μmol/L ALK6 受体抑制剂 K02288 孵育 2 h 后再行消化, 得到卵母细胞。将收集的卵母细胞一部分置于液氮中保存, 用于实时荧光定量 PCR; 另一部分迅速用 4% 多聚甲醛固定, 用于细胞免疫荧光(immunofluorescence, IF)。

7 观察指标及检测方法

7.1 成活卵泡计数 体外培养 6 天, 倒置显微

镜下计数成活卵泡数量。判定标准: 卵泡清晰完整, 卵母细胞形态正常, 被颗粒细胞包围, 即认为成活; 反之, 卵泡轮廓不规则, 基底膜模糊或缺失, 颗粒细胞松散或游离到卵泡外, 卵泡内出现黑色坏死区, 卵母细胞逸出、变形或崩解等为退化现象。

7.2 卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达水平检测 采用实时荧光定量 PCR 的方法。Trizol 一步法提取卵母细胞总 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 纯度和浓度。各组取 2 μg 总 RNA 反转录于 PCR 仪上, 反应条件为 42℃ 50 min, 95℃ 5 min, 灭活反转录酶。然后分别以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8 的特异性引物进行 PCR 反应。应用 ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 仪进行 40 个循环反应, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 于每个循环的第 3 个步骤收集荧光信号, 扩增完毕进入结果分析界面, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为公式, 得到目的基因表达的相对定量值(relative quantification, RQ), 每个目的基因测定重复 3 次, 进行统计分析。

7.3 卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达水平检测 采用细胞免疫荧光法。将得到的卵母细胞重悬后, 在涂布有多聚赖氨酸的玻片上涂片, 自然风干后, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% TritonX-100 处理 20 min, 10% 山羊血清室温封闭 20 min, 分别滴加 BMPR II (1:60)、ALK6 (1:50)、Smad1 (1:80)、Smad5 (1:80)、Smad8 (1:100)、p-Smad1/5/8 (1:50) 一抗, 湿盒中 4℃ 过夜, 次日室温静置 20 min, 加入 1:40 稀释的 FITC 标记的荧光二抗孵育 1.5 h, DAPI 染液孵育 10 min, 进行细胞核染色, 含抗荧光淬灭剂的封片液封片。采用美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图象分析管理系统计算积分光密度(integral optical density, IOD)值, 每个玻片测量 5 个视野用于统计分析。

8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组窦前成活卵泡数比较(表 1) 与对照组比较, 补肾高剂量组窦前卵泡成活数升高($P < 0.05$)。

表 1 各组窦前成活卵泡数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	卵巢数	卵泡总数 (个)	成活卵泡总数 (个)	成活卵泡数 (个)
对照	10	400	316	31.60 ± 2.56
补肾高剂量	10	400	387	38.70 ± 1.35 *
中剂量	10	400	321	32.10 ± 2.81
低剂量	10	400	317	31.70 ± 2.41

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

2 各组卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5 及 Smad8 mRNA 表达水平比较(表 2) 与对照组比较, 补肾各剂量组 BMPR II、ALK6、Smad5、Smad8 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), 补肾高、中剂量组 Smad1 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。

3 各组卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达水平比较(图 1、表 3、4) 荧光显微镜下可观察到特异性绿色

荧光分布, BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 在各组卵母细胞中均有表达。与对照组比较, 补肾各剂量组 BMPR II、ALK6、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 补肾高、中剂量组 Smad1 蛋白表达升高($P < 0.05$)。与补肾高剂量组比较, 抑制剂组 p-Smad1/5/8 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

表 4 各组卵母细胞 p-Smad1/5/8 蛋白表达比较 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

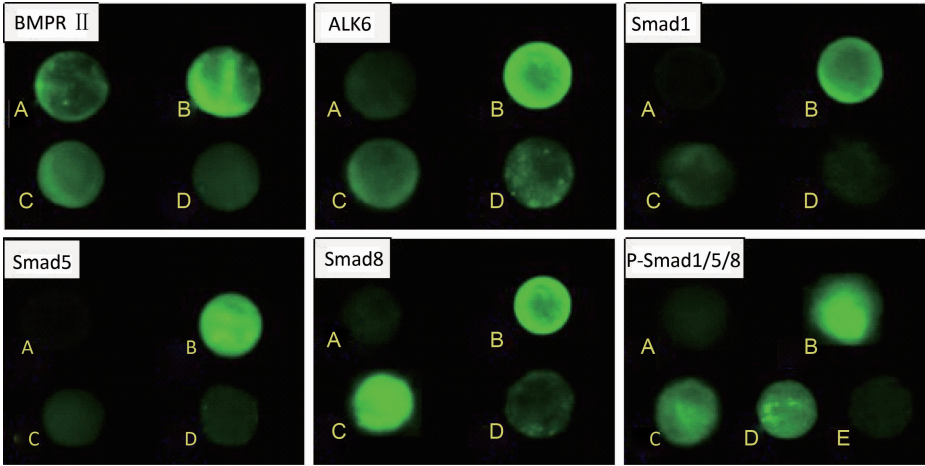
组别	卵巢数	p-Smad1/5/8
对照	3	109.20 ± 9.96
补肾高剂量	3	330.23 ± 16.10 *
中剂量	3	197.50 ± 12.40 *
低剂量	3	161.23 ± 9.44 *
抑制剂	3	131.23 ± 7.71 Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与补肾高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5 及 Smad8 mRNA 表达水平比较 (RQ 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	卵巢数	BMPR II	ALK6	Smad1	Smad5	Smad8
对照	10	1.239 ± 0.117	1.253 ± 0.134	1.293 ± 0.216	1.170 ± 0.459	1.280 ± 0.472
补肾高剂量	10	3.466 ± 0.402 *	5.165 ± 0.200 *	4.114 ± 0.544 *	4.409 ± 0.276 *	4.775 ± 0.080 *
中剂量	10	2.364 ± 0.206 *	3.755 ± 0.168 *	2.917 ± 0.434 *	3.188 ± 0.126 *	4.514 ± 0.247 *
低剂量	10	1.695 ± 0.109 *	2.073 ± 0.230 *	1.930 ± 0.235	1.900 ± 0.100 *	2.310 ± 0.358 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$



注:A 为对照组;B 为补肾高剂量组;C 为补肾中剂量组;D 为补肾低剂量组;E 为抑制剂组

图 1 各组卵母细胞 BMPR II/ALK6-Smads 蛋白表达比较 (IF, $\times 400$)

表 3 各组卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5 及 Smad8 蛋白表达水平比较 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	卵巢数	BMPR II	ALK6	Smad1	Smad5	Smad8
对照	18	147.57 ± 2.67	112.53 ± 8.66	106.30 ± 4.07	96.27 ± 7.24	106.53 ± 9.11
补肾高剂量	18	250.93 ± 10.64 *	368.87 ± 16.94 *	211.07 ± 4.26 *	271.17 ± 5.18 *	236.10 ± 11.47 *
中剂量	18	219.30 ± 10.02 *	215.93 ± 9.81 *	189.23 ± 10.85 *	201.23 ± 6.50 *	225.87 ± 8.78 *
低剂量	18	186.47 ± 6.55 *	174.43 ± 5.99 *	116.20 ± 2.30	128.33 ± 2.31 *	164.67 ± 2.58 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

卵母细胞质量是影响人类生殖能力、胚胎发育和辅助生殖技术治疗结局的关键因素之一。中医学认为,“肾藏精,主生殖”、“经水出诸肾”。《素问·上古天真论》曰:“女子七岁,肾气盛,齿更发长,二七而天癸至,任脉通,太冲脉盛,月事以时下,故有子……”,人类卵细胞的生成、发育、成熟与肾精充盛密切相关,肾阴滋养卵泡能促进卵泡发育,而卵母细胞的生长、成熟与卵泡发育相伴进行,因此理论上讲,补肾填精可以促进卵泡发育,提高卵母细胞质量,从而发挥调经种子的作用。有研究报道,补肾中药具有改善卵子和胚胎质量、提高卵巢储备功能,提高 IVF-ET 患者临床妊娠率的作用^[9,10]。

影响卵母细胞质量的因素是多方面的。研究表明,卵母细胞在卵泡发育过程中处于主导地位,其可通过卵母细胞分泌因子(oocyte secreted factors, OSFs)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^[11]。BMP-15 是重要的 OSFs 之一,主要在卵母细胞中特异性表达^[12],调节早期卵泡发育^[13]。在体外培养的卵泡膜细胞中可显著抑制黄体激素合成,增加卵泡膜细胞数量,促进细胞增殖^[14]。BMP15 下游主要的信号转导通路是 BMPR II/ALK 6-Smads 信号通路。BMPR II 和 ALK6 分别是 BMP-15 的 II 型受体和 I 型受体^[15,16], Smad1、Smad5、Smad8 是 BMP-15 受体作用的直接底物,是将配体与受体作用的信号由细胞质传导至细胞核的中介分子,属于受体调节型 Smad(receptor regulate Smad, R-Smad), p-Smad1/5/8 是 Smad1、Smad5、Smad8 的活化状态。BMP-15 的具体信号转导通路如下:首先与细胞膜上的 II 型受体 BMPR II 结合,BMPR II 发生自身磷酸化之后募集其 I 型受体 ALK6,活化的 ALK6 与其下游信号分子 Smad1、Smad5、Smad8 暂时结合,并将其磷酸化,p-Smad1/5/8 构象发生变化从 ALK6 上解离下来,与 Smad4 结合形成异多聚体,进入核内与特异的 DNA 识别位点或调节转录的某些蛋白作用调控表达。研究显示,BMPR II 和 ALK6 在卵泡发育各个阶段持续表达^[17],ALK6 突变与 Booroola 绵羊多胎表型完全一致,卵巢中条件性敲除 Smad1/5/8 基因的小鼠会表现出类固醇激素产生减少、排卵功能障碍和不育^[18],且卵母细胞内的 FSH 可以上调 Smad1/5/8 的磷酸化水平^[19]。因此,可以认为 BMPR II/ALK6-Smads 信号通路与卵泡发育和卵母细胞质量密切相关。

补肾调经方是导师杜惠兰教授治疗肾虚型不孕症的经典方。方中熟地黄滋阴补血、填髓益精,为君药。枸杞子、山萸肉入冲任,滋肝肾之阴;山药、女贞子、肉苁蓉助君药滋肾益精;紫河车、覆盆子、淫羊藿、菟丝子温肾填精,于滋阴药中配以补阳药,旨在阳中求阴,使“阴得阳升而泉源不竭”,共为臣药。丹参、当归、白芍活血养血,调冲任;香附为气病之主司,调经理血,交通阴阳,共为佐药。纵观全方,滋肾阴、温肾阳、填精血、调冲任,以达补肾调经之功,发挥促进卵泡发育的作用。

本研究结果显示,体外培养第 6 日,与对照组比较,补肾高剂量组窦前卵泡成活数升高,提示补肾调经方可以促进体外培养卵泡发育,提高窦前卵泡成活数。实时荧光定量 PCR 结果显示,补肾调经方能够上调卵母细胞 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 水平,提示补肾调经方激活了体外培养窦前卵泡卵母细胞中 BMPR II/ALK6-Smads 信号通路。细胞免疫荧光结果显示,在体外培养第 6 日两组小鼠窦前卵泡卵母细胞上均有一定量的 BMPR II、ALK6、Smad1、Smad5、Smad8 和 p-Smad1/5/8 蛋白表达,加用补肾调经方,可以提高上述蛋白表达水平。进一步用 Smads 信号通路的抑制剂 K02288 进行干预,抑制剂组 p-Smad1/5/8 蛋白表达较补肾高剂量组降低,提示补肾调经方通过上调体外生长卵泡卵母细胞中 ALK6 对 Smad1、Smad5、Smad8 的磷酸化作用,增强了 BMPR II/ALK6-Smads 通路信号转导。据此笔者推测,补肾调经方能够提高体外培养小鼠窦前卵泡成活数,促进卵泡发育,提高卵母细胞质量,其作用的发挥可能是通过调控卵母细胞中 BMPR II/ALK6-Smads 信号通路实现的,但补肾调经方能否通过其他信号通路激活 Smads 表达从而提高体外培养卵泡卵母细胞质量以及信号转导过程中是否有负调因子(如 MAPK/ERK 通路)影响有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 崔艳艳,刘健.腹腔镜诊治输卵管因素为主的不孕症 31 例临床分析[J].中华全科医学,2013,11(7):1080.
- [2] 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.
- [3] 杨艳环.赵瑞华治疗不孕症的经验[J].中华中医药杂志,2011,26(7):1528-1530.
- [4] 段彦苍,杜惠兰,贺明,等.补肾调经方、逍遥丸对促性腺

- 激素预处理小鼠组织蛋白酶-L mRNA 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(1): 80-84.
- [5] 徐丁洁, 洪丽文, 徐洪, 等. 补肾调经方、逍遥丸对雄激素致排卵障碍模型大鼠腺垂体、卵巢影响的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(1): 87-90.
- [6] 梁莹. 补肾法、疏肝法提高 IVF-ET 患者卵母细胞质量与颗粒细胞 BMPs 及其 Smads 信号通路的关系[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [7] 白静. 补肾法、疏肝法对小鼠卵母细胞 BMP-15 及其 Smads 信号通路影响的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [8] Peng YH, Zhuang GL, Zhou CQ, et al. Growth differentiation factor-9 gene expression of mice oocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. Zoological Res, 2006, 27(5): 456-460.
- [9] 徐珉, 司徒仪, 李丽芸, 等. 中医补肾法对高龄不孕妇女的卵巢储备功能的调控[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(4): 267-270.
- [10] 连方, 赵斌, 吕雪梅, 等. 二至天葵方对体外受精-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.
- [11] 李爽, 柴淑娟, 夏天, 等. 生长分化因子-9 与卵泡发育和卵巢早衰[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29(2): 102-104.
- [12] Monti M, Redi C. Oogenesis specific genes (Nobox, Oct4, Bmp15, Gdf9, Oogenesin1 and Oogenesin2) are differentially expressed during natural and gonadotropin-induced mouse follicular development [J]. Mol Reprod Dev, 2009, 76(10): 994-1003.
- [13] Celestino JJ, Lima-Verde IB, Bruno JB, et al. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 338(1-2): 1-9.
- [14] Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypogonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) gene [J]. Am J Hum Genet, 2004, 75(1): 106-111.
- [15] McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor- β super-family in the intraovarian regulation of follicular development [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(2): 144-161.
- [16] Zhang Y, Zhang DY, Zhao YF, et al. Analysis and characterization of the functional TGF- β receptors required for BMP-6-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells [J]. BMB Rep, 2013, 46(2): 107-112.
- [17] Paulini F, Melo EO. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP-15 in follicular development and oogenesis [J]. Reprod Domest Anim, 2011, 46(2): 354-361.
- [18] Pangas SA, Li X, Umans L, et al. Conditional deletion of Smad1 and Smad5 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(1): 248-257.
- [19] Miyoshi T, Otsuka F, Inagaki K, et al. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone induced estrogen production [J]. Endocrinology, 2007, 148(1): 337-345.

(收稿: 2016-01-26 修回: 2016-05-20)