· 基础研究 ·

补肾调经方改善体外培养小鼠卵母细胞核质成熟同步提高卵母细胞质量的机制研究

吕金梦　耿静然　于志芳　杜惠兰

摘要　目的　探讨补肾调经方改善体外培养小鼠卵母细胞核质成熟同步提高卵母细胞质量的作用机制。**方法**　日龄 10 天的雌性 ICR 小鼠 200 只，随机分为补肾组（60 只）、血清对照组（60 只）和空白对照组（80 只）。分别处死小鼠分离窦前卵泡，加入补肾调经方大鼠含药血清、正常大鼠血清和不加大鼠血清进行细胞培养，结束培养后分别收集 M Ⅱ期卵母细胞计算卵母细胞第一极体排出率、活细胞荧光探针观察线粒体分布、实时荧光定量 PCR 检测卵母细胞线粒体 DNA 拷贝数（mtDNA）、解偶联蛋白（UCP2）和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 -1α（PGC-1α）mRNA 表达；收集卵丘颗粒细胞实时荧光定量 PCR 检测促凋亡基因 Bax、抗凋亡基因 Bcl-2 以及缝隙连接蛋白 Cx43、Cx37 mRNA 表达。**结果**　与空白对照组和血清对照组比较，补肾组卵母细胞第一极体排出率升高（$P<0.05$），线粒体均匀分布于细胞质中，mtDNA、PGC-1α、UCP2 mRNA 表达升高（$P<0.05$），与空白对照组比较，血清对照组 Cx37 mRNA 表达升高（$P<0.05$），补肾组 Cx43、Bcl-2、Bcl-2/Bax mRNA 表达升高（$P<0.05$）；与血清对照组比较，补肾组 Cx37 mRNA 表达降低（$P<0.05$），Cx43、Bcl-2、Bcl-2/Bax mRNA 表达升高（$P<0.05$）。**结论**　补肾调经方可促进体外培养小鼠卵母细胞核质成熟同步，提高卵母细胞质量，其机制可能与减少颗粒细胞凋亡、改善线粒体功能有关。

关键词　补肾调经方；卵母细胞；体外成熟培养；核质成熟同步；缝隙连接蛋白；

Mechanism Study of Bushen Tiaojing Decotion to Improve the Quality of Mouse Oocytes by Improving the Synchronizing of Nucleocytoplasmic Maturation *in Vitro*

LYU Jin-meng，GENG Jing-ran，YU Zhi-fang，and DU Hui-lan　*Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-Kidney Patterns*，*Institute of Integrative Medicine*，*College of Integrative Medicine*，*Hebei University of Chinese Medicine*，*Shijiazhuang*（*050200*）

ABSTRACT　Objective　To explore the mechanism of Bushen Tiaojing Decotion to improve the quality of mouse oocytes by improving the synchronizing of nucleocytoplasmic maturation *in vitro*. **Methods**　Two hundred of female ICR mice，aged 10 days，were randomly divided into Shen-tonifying group（BS group，60 mice），serum control group（60 mice）and blank control group（80 mice）. The mice were sacrificed to separate preantral follicles，and the cells were cultured with Bushen Tiaojing Decotion rat serum，normal rat serum or without rat serum. After culturing，M Ⅱ oocytes were collected to calculate the first polar body excretion rate. Fluorescent probes for living-cell was used to observe the mitochondrial distribution. The mRNA expressions of mtDNA，uncoupling protein 2（UCP2）and peroxisome proliferator ctivated receptor γ coactivator-1α（PGC-1α）in oocytes were measured by real-time PCR assay；following collection of the cumulus granulosa cells，the mRNA expressions of pro-apoptotic gene Bax，anti-apoptotic gene Bcl-2，and connexin connexin43（Cx43），Cx37 were also assessed by real-time PCR. **Results**　Compared with the blank control group and the serum control group，the first polar body excretion rate of oocytes in the BS group increased（$P<0.05$），the mitochondria were evenly distributed in the cytoplasm，and the mRNA

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.81774359）
作者单位：河北中医学院中西医结合学院，中西医结合研究所，河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室（石家庄 050200）
通讯作者：杜惠兰，Tel：0311-89926716，E-mail：duhuilan@163.com
DOI：10. 7661/j. cjim. 20220629. 081

中国中西医结合杂志

expressions of mtDNA，PGC-1α，UCP2 increased（$P<0.05$）. Compared with the blank control group，the expressions of Cx37 mRNA reduced in the serum control group（$P<0.05$），and the mRNA expression of Cx43，Bcl-2，and Bcl-2/Bax ratio in the cumulus granulosa cells of the BS group increased（$P<0.05$）. Compared with the serum control group，the mRNA expression of Cx37 decreased（$P<0.05$）；and the mRNA expression of Cx43，Bcl-2，and Bcl-2/Bax ratio in the BS group increased（$P<0.05$）. **Conclusion** Bushen Tiaojing Decotion could promote oocyte quality of mouse oocytes by improving the synchronizing of nucleocytoplasmic maturation in vitro，which may be associated with the decrease of apoptosis in the granulosa cell，and improvement of mitochondrial function.

KEYWORDS Bushen Tiaojing Decotion；oocyte；*in vitro* maturation；synchronization of nucleocytoplasmic；connexin

卵母细胞体外成熟培养（*in vitro* maturation，IVM）作为体外受精 - 胚胎移植（*in vitro* fertilization and embryo transfer，IVF-ET）的新兴衍生技术之一日存在着细胞质发育滞后于细胞核的问题，而卵母细胞核与质的同步成熟对卵母细胞的后续发育能力至关重要[1，2]。有研究表明，线粒体 DNA 拷贝数（mtDNA）可以作为评价卵母细胞胞质成熟的方法[3，4]；解偶联蛋白（uncoupling protein 2，UCP2）[5]和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 -1α（peroxisome proliferator ctivated receptor γ coactivator-1α，PGC-1α）可对线粒体起到保护作用、促进线粒体的氧化表达，提高线粒体的氧化功能，故可用 mtDNA、UCP2 和 PGC-1α 来评价线粒体数量及功能[6-8]。缝隙连接蛋白 43（connexin，Cx43）与缝隙连接蛋白 37（connexin，Cx37）的降低会影响卵母细胞与周围卵丘颗粒细胞之间的物质交换，使卵母细胞不能恢复减数分裂，从而降低卵母细胞的质量[9]；凋亡相关基因 B 淋巴细胞瘤 -2（B cell leukemia/lymphoma 2，Bcl-2）和 Bcl-2 相关 x 蛋白（Bcl-2 associated X，Bax）作为凋亡相关基因，两类基因间表达的比例和功能平衡状态决定了卵丘颗粒细胞的凋亡与否[10-12]，故可通过检测缝隙连接蛋白与凋亡相关基因来评价卵母细胞的质量。

补肾调经方可以提高 IVF-ET 患者卵母细胞质量，提高体外培养小鼠卵泡发育过程中卵母细胞的质量、增加小鼠卵母细胞数量、提高优质卵泡率和囊胚质量[13-16]。因此，本研究旨在观察补肾调经方对 IVM 过程中卵母细胞线粒体及缝隙连接蛋白的影响，探究补肾调经方改善体外培养小鼠卵母细胞核质成熟同步，提高卵母细胞质量的作用机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级雌性 ICR 小鼠 200 只，10 日龄，（5 ± 1）g；雌性 SD 大鼠 40 只，7~8 周龄，（200 ± 10）g，均购于北京维通利华实验动物有限公司，合格证号：SCXK（京）2016-0006。本实验经河北中医学院动物伦理委员会审查批准，审查批号：DWLL2019015。

2 实验药物 补肾调经方：熟地黄 20 g 山药 12 g 山萸肉 15 g 紫河车 10 g 当归 9 g 白芍 9 g 枸杞子 12 g 女贞子 9 g 菟丝子 12 g 覆盆子 10 g 香附 6 g 肉苁蓉 10 g 丹参 10 g 淫羊藿 10 g。中药一次性购自石家庄乐仁堂药店，将补肾调经方中药放入药锅，加干净的冷水浸泡药物 30 min，加水量以淹没过药面 3 cm 左右。武火煮沸药液后改为文火煎煮 30 min，滤出药液；药渣加水至没过药面 1 cm 左右，继续武火煎煮至沸腾后改为文火煎煮 20 min，合并两次药液并将每剂中药浓缩至 33.33 mL，置于 4 ℃冰箱保存备用。。

3 主要试剂与仪器 Mito-Tracker Red CMXRos（上海碧云天生物技术有限公司，货号：C1035）；Total RNA KitII RNA 提取试剂盒（广州飞扬生物工程有限公司公司，货号：R6934-01）；RNeasy Micro Kit 微量 RNA 提取试剂盒（上海博冠生物技术有限公司公司，货号：74004）；逆转录试剂盒（莫纳生物科技有限公司，货号：MR05101）；扩增试剂盒（莫纳生物科技有限公司，货号：MQ00401）；引物由上海生物工程股份有限公司合成。

实时荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo Scientific 公司，型号：7500 Fast）；分光光度计（美国 Thermo Scientific 公司，型号：NanoDrop 2000）；倒置显微镜（日本 Olympus 公司，型号 BX51T-PHD-J11）；EVOS FL Auto 台式细胞培养室（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，型号 AMAFD1000）。

4 实验方法及检测指标

4.1 含药大鼠血清制备 40 只 SD 大鼠自由饮水、摄食 1 周后，根据 SPSS 26.0 软件生成的随机数字表随机分为补肾组和正常组，每组 20 只，补肾组每次灌胃 1 mL/（100 g · d）补肾调经方中药（含生药 5.4 g/mL），正常组灌胃同剂量的蒸馏水，2 次 / 日，

中国中西医结合杂志

连续 3 天，第 4 天禁食 12 h 后一次性灌服全天剂量，1 h 后采用吸入麻醉法麻醉各组动物，股动脉采血后处死动物，分离血清，过滤后存放于 -80 ℃冰箱用于细胞培养。

4.2　小鼠分组及窦前卵泡的获取与培养　将 200 只 ICR 小鼠根据 SPSS 26.0 软件生成的随机数字表随机分为补肾组（60 只）、血清对照组（80 只）和空白对照组（80 只），采用颈椎脱臼法处死，迅速分离卵巢，在倒置显微镜下使用 1 mL 无菌注射器针挑破卵巢，剥离窦前卵泡并转移到分别含有补肾中药大鼠血清、正常大鼠血清以及不含大鼠血清的培养液中培养，隔天更换培养液，至第 12 天。

4.3　小鼠卵母细胞与卵丘颗粒细胞的收集　培养至第 12 天，加入人绒毛膜促性腺素（human chorionic gonadotrophin，HCG）与表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF），16 h 后加入透明质酸酶消化掉颗粒细胞，分别收集第 2 次减数分裂中期（M Ⅱ）期卵母细胞和卵丘颗粒细胞，检查并记录卵母细胞总数以及排出第一极体的卵母细胞个数，用于实时荧光定量 PCR 的卵母细胞和卵丘颗粒细胞分别收集到 1.5 mL 无菌无酶 EP 管中，离心（3 000 r/min，4℃，5 min），保存到 -80℃；用于观察线粒体分布的卵母细胞直接转移至含有培养液的新培养皿中。

4.4　荧光探针法观察卵母细胞中线粒体分布　将各组小鼠培养至 M Ⅱ期的卵母细胞置于新的培养皿中，将 Mito-Tracker Red CMXRos 粉末加入 470 μL 的无水 DMSO，充分溶解后，得到浓度为 200 μmol/L 的 Mito-Tracker Red CMXRos 储存液，取少量按照 1∶1 000 的比例稀释，吸取 1 μL 加入上述培养皿中，混匀，37 ℃避光孵育 30 min，PBS 洗涤 3 次后于 EVOS FL Auto 台式细胞培养室下观察其分布。参照 Torner H 等 [17] 标准将线粒体分布分为方式分为两类：均质型线粒体分布，即荧光均匀分布于胞质各部，无明显聚集现象；非均质分布，即荧光呈聚集分布或成簇分布于细胞胞质内或细胞周边。

4.5　实时荧光定量 PCR 检测卵母细胞中 mtDNA、PGC-1α、UCP2 以及卵丘颗粒细胞中 Bax、Bcl-2、Cx43、Cx37 mRNA 表达　按照微量 RNA 提取试剂盒说明书提取卵母细胞中的总 RNA，按照普通 RNA 提取试剂盒说明书提取颗粒细胞中的总 RNA，分别测定样品浓度及纯度，按照逆转录试剂盒说明书去除基因组 DNA 及逆转录。获得的 cDNA 于 7500 Fast PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 反应，PCR 热循环参数为 95 ℃，10 min 进行预变性，然后进行 40 个循环反应：95 ℃，10 s，60 ℃，30 s，95 ℃，15 s。扩增完毕后，对 CT 值进行数据处理，以 β-actin 为内参照基因，设置空白对照组的第 1 号样品为标准 1，按照公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算得到目的基表达的相对定量值（RQ 值），将 RQ 值用于统计分析。具体引物序列见表 1。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	序列	扩增片段（bp）
UCP2	S：5'-TCCCAATGTTGCCCGTAATG-3'	286
	A：3'-AGGCATGAACCCCTTGTAGAA-5'	
PGC-1α	S：5'-GTCGTGTTCCCGATCACCATAT-3'	230
	A：3'-CTTTGCGGTATTCATCCCTCTT-5'	
mtDNA	F：5'-ACGAAATCAACAACCCCGTATTAA-3'	169
	R：3'-CTCGGTTATCAACTTCTAGCAGTC-5'	
Cx43	F：5'-TGAAAGAGAGGTGCCCAGACA-3'	243
	R：3'-CGTGAGAGATGGGGAAGGACT-5'	
Cx37	S：5'-CTTCATGCTGGTGGTAGGAGTCA-3'	105
	A：3'-TGGTCCCTTCGTGCCTTTATC-5'	
Bax	S：5'-TGGTTGCCCTCTTCTACTTTGA-3'	100
	A：3'-AAGTCCAGTGTCCAGCCCAT-5'	
Bcl-2	S：5'-TGACTTCTCTCGTCGCTACCGT-3'	112
	A：3'-CCTGAAGAGTTCCTCCACCACC-5'	
β-actin	S：5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3'	287
	A：3'-GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC-5'	

5　统计学方法　所有数据均应用 SPPS 26.0 软件包进行分析处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，原始数据先进行正态性分布检验，多组间的均数比较采用单因素方差（*One-way ANOVA*）分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

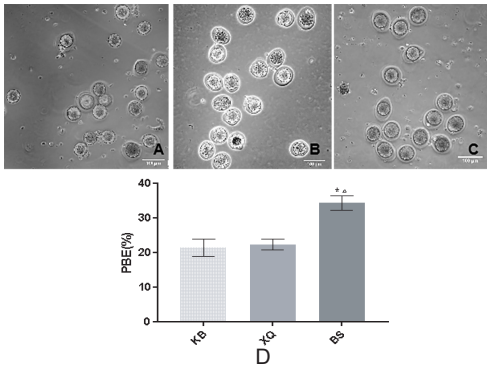
结　　果

1　各组卵母细胞第一极体排出率比较（图 1）　培养 12 天后，用透明质酸酶消化颗粒细胞后发现，补肾组卵母细胞第一极体排出率较空白对照组和血清对照组均有显著升高（$P<0.05$），空白对照组和血清对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2　各组卵母细胞中线粒体的分布比较（图 2）　Mito-Tracker Red 染色线粒体结果显示，补肾组卵母细胞线粒体呈均质分布，空白对照组与血清对照组均为不均质分布。

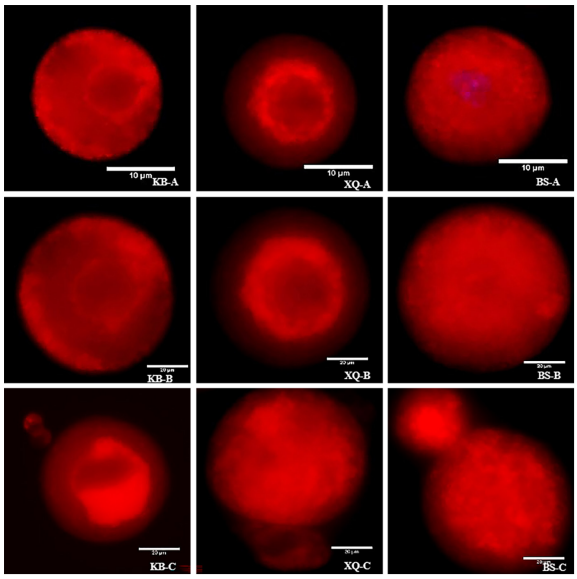
3　各组卵母细胞中 mtDNA、PGC-1α、UCP2 mRNA 比较（表 2）　与空白对照组比较，血清对照组 mtDNA、PGC-1α、UCP2 mRNA 的表达差异无统计学意义（$P>0.05$）；与空白对照组及血清对照组比较，补肾组 mtDNA、PGC-1α、UCP2 mRNA 表

中国中西医结合杂志



注：A 为空白对照组；B 为血清对照组；C 为补肾组；D 为第一极体排出率；与空白对照组比较，*P<0.05；与血清对照组比较，△P<0.05；A、B、C 标尺 =100μm；KB 为空白对照组；XQ 为血清对照组；BS 为补肾组

图 1　各组小鼠卵母细胞 PB 排出率情况



注：KB 为空白对照组；XQ 为血清对照组；BS 为补肾组；KB、XQ 为不均匀分布，BS 为均匀分布；A：x20，标尺 =10μm；B、C：×40，标尺 =20μm

图 2　各组小鼠卵母细胞线粒体荧光染色结果

表 2　各组小鼠卵母细胞中 mtDNA、PGC-1α、UCP2 的 mRNA 表达（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	mtDNA	UCP2	PGC-1α
空白对照	3	1.13 ± 0.56	1.10 ± 0.19	1.11 ± 0.10
血清对照	3	1.26 ± 0.57	1.22 ± 0.65	1.39 ± 0.33
补肾		3.34 ± 0.77*△	2.46 ± 0.37*△	3.13 ± 0.61*△
F 值		11.263	8.618	21.910
P 值		0.009	0.017	0.002

注：与空白对照组比较，*P<0.05；与血清对照组比较，△P<0.05

达均升高（P<0.05）。

4　各组颗粒细胞中 Cx37、Cx43、Bax、Bcl-2、Bcl-2/Bax 的 mRNA 比较（表 3）　与空白对照组比较，血清对照组 Cx37 mRNA 表达升高（P<0.05）；Cx43、Bax、Bcl-2、Bcl-2/Bax 的 mRNA 表达差异均无统计学意义（P>0.05）；与空白对照组比较，补肾组 Cx37、Bax 的 mRNA 表达差异无统计学意义（P>0.05），Cx43、Bcl-2、Bcl-2/Bax mRNA 表达升高（P<0.05）；与血清对照组比较，补肾组 Cx37 的 mRNA 表达降低（P<0.05），Cx43、Bcl-2、Bcl-2/Bax mRNA 表达升高（P<0.05），Bax mRNA 表达差异无统计学意义（P>0.05）。

讨　论

卵母细胞成熟过程主要分为细胞核成熟与细胞质成熟两个部分，细胞核成熟标志即第一极体的排出[18]；而细胞质成熟的表现比较复杂，涉及一系列 mRNA、蛋白质以及各种细胞器的形态和位置的变化，目前尚无统一的评价标准，有研究显示，可以通过观察线粒体的动态变化和 mtDNA 拷贝数的变化作为评价细胞质的成熟指标之一[19]。在体内成熟的卵母细胞在 GV 期线粒体分布在皮质区和核周区，而在 M Ⅱ期卵母细胞中，线粒体分布在胞质中央区域，且大多聚集在纺锤体的周围，成熟卵母细胞的 mtDNA 拷贝数也明显高于未成熟者[19]。UCP2 主要位于线粒体内膜上，通过负反馈机制控制细胞内活性氧水平，参与颗粒细胞抗凋亡和对卵母细胞氧化应激的保护作用[20]。PGC-1α 是人体内一种重要的核转录辅助激活因子，其转录共刺激作用可以激活大量涉及线粒体呼吸和线粒体成分的转录因子，调节线粒体生物发生，用以评价线粒体功能[21]。

哺乳动物体内成熟的卵母细胞受到众多细胞因子调控，阻滞在第一次减数分裂前期的双线期，抑制了细胞核的成熟，至月经 / 动情周期时才能恢复减数分裂，保证了核质成熟的同步性[22]。卵母细胞发育所需营养物质以及调控信号等都需要通过卵母细胞与周围的卵丘颗粒细胞之间形成的缝隙连接来实现，缝隙连接的主要成分是缝隙连接蛋白，而缝隙连接蛋白又有很多种类，其中 Cx43 与 Cx37 是卵母细胞和卵丘细胞之间缝隙连接通讯最为密切的两个相关蛋白[23]。有研究检测到在体内发育各阶段的卵泡颗粒细胞内都有 Cx43 的表达，而 Cx37 在卵母细胞和颗粒细胞内均能检测，且在整个动情周期中，动情前期表达最为丰富[24]。Ackert CL 等[25]发现，在 Cx43 基因剔除的小鼠卵巢中，卵泡仅发育至初级卵泡阶段，卵母细胞和颗粒细胞都出现不同程度的空泡化，透明带发育不良，卵母细胞不能恢复减数分裂。Simon AM 等[26]发现，Cx37 基因剔除的小鼠卵母细胞与颗粒细胞之

中国中西医结合杂志

表 3　各组小鼠颗粒细胞中 Cx37、Cx43、Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达　（$\bar{x} \pm s$）

组别	*n*	Cx37	Cx43	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
空白对照	3	1.21 ± 0.29	0.68 ± 0.28	1.01 ± 0.43	0.96 ± 0.08	1.06 ± 0.40
血清对照	3	5.78 ± 1.85*	0.94 ± 0.40	0.62 ± 0.05	0.89 ± 0.42	1.48 ± 0.82
补肾		2.84 ± 1.33△	2.96 ± 0.25*△	1.00 ± 0.18	2.71 ± 0.16*△	2.78 ± 0.52*△
F 值		9.153	45.959	2.009	45.402	6.535
P 值		0.015	0.000	0.215	0.000	0.031

注：与空白对照组比较，*P<0.05；与血清对照组比较，△P<0.05

间的缝隙连接缺失，卵泡发育在腔前阶段之前一直都是正常的，但到了腔前阶段之后，卵泡形成了未成熟黄体，并且应用促性腺激素也不能诱发卵泡成熟并排卵。Bcl-2 与 Bax 作为细胞凋亡相关基因，Bcl-2 可抑制细胞凋亡，Bax 可促进细胞凋亡，当 Bcl-2 大于 Bax 时细胞趋于存活，Bax 大于 Bcl-2 时则细胞趋于凋亡，故可通过检测其比值评估卵丘颗粒细胞的凋亡情况。

中医学理论认为“肾藏精，主生殖”，而卵母细胞作为先天之精，只有肾中精气充沛，气血充足，才能有优质的卵母细胞。有研究表明，中药在改善卵母细胞质量方面，主要以补肾为主，补肾法在实验和临床方面主要通过卵母细胞的各个通路调控相关 mRNA 和蛋白的表达或者调控颗粒细胞相关因子及改善线粒体功能等进而影响卵母细胞 [27]。前期实验研究显示补肾调经方可以诱发小鼠排卵、提高优质卵泡率，改善卵母细胞质量，促进患者颗粒细胞增殖，提高临床 IVF-ET 妊娠率 [28-31]。补肾调经方是杜惠兰教授的经验方，由养精种玉汤和五子衍宗丸加减化裁而来，方中熟地补血滋阴，益精填髓，调补冲任，为君药。菟丝子温肾填精，紫河车大补元气，共助君药滋补肾阴，旨在阳中求阴，使“阴得阳升而泉源不竭”；枸杞子、女贞子、覆盆子、山药、山萸肉、淫羊藿滋补肝肾，填精养血；当归、白芍养血调经，调补冲任，紫河车为血肉有情之品共为臣药，佐丹参、香附理气活血，交通阴阳。诸药合用，共奏填精养血、调补冲任、平衡肾中阴阳之功，故将补肾调经方作为补肾法的代表方。

本研究结果显示，与空白对照组和血清对照组比较，补肾组卵母细胞第一极体排出率显著升高、线粒体分布均匀，表明补肾法不仅促进了卵母细胞核的成熟，同时也使细胞质达到成熟状态，能够反映补肾法促进体外培养小鼠卵母细胞核质成熟同步，提高卵母细胞质量。实时荧光定量 PCR 显示，补肾组卵母细胞 mtDNA、UCP2 以及 PGC-1α mRNA 水平显著高于空白对照组和血清对照组，表明补肾法可提高 mtDNA、UCP2 以及 PGC-1α mRNA 表达，提示补肾法可增加卵母细胞线粒体的数量，改善线粒体功能；补肾组卵丘颗粒细胞 Cx43、Bcl-2/Bax mRNA 水平显著高于空白对照组和血清对照组，提示补肾法可减少卵丘颗粒细胞的凋亡，增加缝隙连接蛋白的数量；而 Cx37 的 mRNA 水平，补肾组较空白对照组无明显差异，较血清对照组显著下降，因 Cx37 在动情前期表达最为丰富 [24]，故推测其表达可能受到体外培养环境的影响，具体机制还需进一步研究。综合上述研究结果笔者推测，补肾调经方可促进小鼠卵母细胞体外培养核质成熟同步，提高卵母细胞质量，其机制有两个方面：一方面可能直接通过增加线粒体数量及改善线粒体功能促进卵母细胞质的成熟；另一方面可能间接通过抑制卵丘颗粒细胞凋亡，从而加强卵丘颗粒细胞与卵母细胞之间的信息交流，延长卵母细胞停滞在第一次减数分裂前期的时间，留与细胞质充分的时间成熟。目前有研究显示可以通过黄体生成素（luteinizing hormone，LH）延缓生发泡破裂和促进细胞质成熟或者通过卵母细胞成熟抑制剂延缓生发泡破裂来促使核质成熟同步 [32-35]，而中医药是否可以促进核质成熟同步提高卵母细胞质量还缺少相关研究，本研究采用补肾调经方不仅促进了卵母细胞体外培养核质成熟同步，而且提高了卵母细胞第一极体排出率，进一步提高了卵母细胞质量，丰富了中医学“肾主生殖”的理论内涵，从一个侧面反应中医补肾法在辅助生殖技术中的指导价值。然而，本实验并未对增加线粒体数量、促进线粒体功能以及抑制卵丘颗粒细胞凋亡的具体机制进行探究，为后续更深入的研究奠定了基础。

利益冲突：无利益冲突。

参 考 文 献

［1］ Lu C，Zhang Y，Zheng X，et al. Current perspectives on in vitro maturation and its effects on oocyte genetic and epigenetic profiles[J].Sci China Life Sci，2018，61（6）：633–643.

［2］ Petersen CG，Vagnini LD，Mauri AL，et al. Evaluation of zona pellucida birefringence intensity during *in vitro* maturation of oocytes from stimulated cycles[J]. Reprod Biol Endocrinol，2011，9（1）：53.

中国中西医结合杂志

[3] 李希，王曦，周胜花，等 . 线粒体与卵母细胞成熟发育质量的关系研究进展 [J]. 山西农业科学，2021，49（1）：105–109，114.
[4] 牟天伊，王树玉，马延敏，等 . 线粒体 DNA 拷贝数与卵母细胞质量及胚胎发育相关性研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2020，34（12）：1287–1289.
[5] Mehlmann LM，Saeki Y，Tanaka S，et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes[J].Science，2004，306（5703）：1947–1950.
[6] 王慧婷，张岩晨，徐梦怡，等 . 能量代谢关键调控因子 PGC-1α 的研究进展 [J]. 生理学报，2020，72（6）：804–816.
[7] Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function [J]. Physiol Rev，2008，88（2）：611–638.
[8] Alaynick WA. Nuclear receptors，mitochondria and lipid metabolism [J]. Mitochondrion，2008，8（4）：329–337.
[9] 吕金梦，耿静然，杜惠兰 . 卵母细胞体内外核质成熟同步研究进展 [J]. 生理科学进展，2021，52（6）：471–474.
[10] 陈骢，郝健淇，彭皓宁，等 . BCL-2 家族凋亡调控作用及其介导的抗肿瘤药物治疗后耐药的研究进展 [J/OL]. 中国胸心血管外科临床杂志：1–10[2022-06-16].http：//kns.cnki.net/kcms/detail/51.1492.R.20210820.1006.010.html.
[11] 覃尚忠 . Bcl-2 家族蛋白质相互作用的机制和应用 [J]. 中国医药生物技术，2007，2（3）：218–221.
[12] 刘静，蒋常文 . X 连锁凋亡抑制蛋白 XIAP 肿瘤相关性研究现状 [J]. 医学综述，2009，15（19）：2954–2956.
[13] 刘孟瑞，于志芳，左茜茜，等 . 补肾调经方通过有氧糖酵解促进控制性超促排卵小鼠囊胚发育的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2022，42（5）：575-581.
[14] 梁莹，赵胜男，常秀峰，等 . 补肾调经方对人卵泡壁颗粒细胞 BMP/Smads 表达的影响 .[J]. 中国中西医结合杂志，2013，33（5）：606–610.
[15] 梁莹，杜惠兰，常秀峰，等 . 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 .[J]. 中国中西医结合杂志，2014，34（8）：911–916.
[16] 孙晓换，范丽洁，李丽，等 . 补肾调经方对小鼠体外培养卵泡卵母细胞 BMPRⅡ/ALK6-Smads 表达的影响 .[J]. 中国中西医结合杂志，2016，36（10）：1241–1246.
[17] Torner H，Brüssow KP，Alm H，et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation.[J]. Theriogenology，2004，61（9）：1675–89.
[18] 陈大元主编 . 受精生物学：受精机制与生殖工程 [M]. 北京：科学出版社，2000：146–163.
[19] 宣恒华，冯定庆，赵卫东 . 体外成熟的卵母细胞胞质成熟的评价指标 [J]. 生殖医学杂志，2012，21（4）：406–410.
[20] 付志红，朱文杰，李雪梅，等 . 解偶联蛋白 2 表达对颗粒细胞抗氧化应激的影响 [J]. 实用医学杂志，2007，23（13）：1957–1958.
[21] 范志鹏，李玲，赵慧佳，等 . PGC-1α 基因多态性与代谢性疾病的相关性 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2019，24（10）：1172–1180.
[22] 蔡姣，葛万文 . 卵母细胞第一次减数分裂的阻滞和恢复 [J]. 生命科学，2019，31（9）：921–930.
[23] 毛晓燕，丘瑾 . 人卵母细胞成熟过程中卵丘细胞与卵母细胞关系的研究进展 [J]. 同济大学学报（医学版），2018，39（5）：123–127.
[24] Carabatsos MJ，Sellitto C，Goodenough DA，et al. Oocyte–granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence[J]. Dev Biol，2000，226（2）：167–179.
[25] Ackert CL，Gittens JE，O'Brien MJ，et al. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse[J]. Dev Biol，2001，233（2）：258–270.
[26] Simon AM，Goodenough DA，En Li，et al. Female inferfility in mice lacking connexin37[J].Nature，1997，385（6616）：525–529.
[27] 刘卫丽，尹巧芝 . 中医药对卵母细胞质量调控的研究 [J]. 辽宁中医杂志，2020，47（9）：34–36.
[28] 宋翠淼，段彦苍，贺明，等 . 补肾调经方及逍遥丸对促性腺激素预处理小鼠排卵关键因子 HIF-1α 和 EDN2 的影响 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（4）：1714–1718.
[29] 孙晓换，范丽洁，李丽，等 . 补肾调经方对小鼠体外培养卵泡卵母细胞 BMPRⅡ/ALK6-Smads 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2016，36（10）：1241–1246.
[30] 梁莹，杜惠兰，赵胜男，等 . 体外受精—胚胎移植术联合补肾、疏肝对不孕症患者活化素受体样激酶 5 的影响 [J]. 中医杂志，2014，55（1）：34–37.
[31] 常秀峰，杜惠兰，高星，等 . 补肾调经方对输卵管性不孕症患者体外受精—胚胎移植超排卵周期 GDF-9 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2011，31（6）：780–783.
[32] 李凯，倪和民，赵雁伟，等 . 促黄体素对绵羊卵母细胞体外成熟核质同步化的影响 [J]. 中国农业科学，2009，42（10）：3633–3638.
[33] 潘瑞 . 山羊卵母细胞核质成熟同步化研究 [D]. 陕西：西北农林科技大学，2011.
[34] 张晋平 . 延缓生发泡破裂时间对猪卵母细胞体外成熟效果的影响 [D]. 重庆：西南大学，2007.
[35] 周洪彬 . 卵母细胞成熟抑制剂对猪卵母细胞成熟的影响 [D]. 重庆：西南大学，2006.

（收稿：2020–12–24　在线：2022–08–23）
责任编辑：汤　静

中国中西医结合杂志