

丹莪妇康煎膏提高子宫内膜异位症体外受精 - 胚胎移植患者卵细胞质量及 GDF-9 表达的研究

连 方¹ 李晓娜²

摘要 **目的** 研究丹莪妇康煎膏提高子宫内膜异位症体外受精 - 胚胎移植(IVF-ET)患者周期卵细胞质量和胚胎质量的作用机理。**方法** 将 70 例腹腔镜确诊子宫内膜异位症行 IVF-ET 的患者随机分为两组, 治疗组(35 例)为丹莪妇康煎膏加控制性超促排卵组, 对照组(35 例)为安慰剂加控制性超促排卵组, 另取 35 例因男方因素行卵细胞浆内单精子注射(ICSI-ET)者设为正常对照组。应用 Western blot 法测定取卵日成熟卵泡液颗粒细胞中生长分化因子-9(GDF-9)的含量; RT-PCR 法检测颗粒细胞中 GDF-9 mRNA 的表达; 并比较各组的获卵数、卵裂率、受精率、优质胚胎率及妊娠率等。**结果** 颗粒细胞中 GDF-9 mRNA 的表达, 治疗组显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与正常对照组比较差异无统计学意义。颗粒细胞中 GDF-9 的表达治疗组高于对照组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 与正常对照组比较差异亦无统计学意义。卵裂率治疗组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。受精率、优质胚胎率治疗组均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与正常对照组比较差异无统计学意义。**结论** 丹莪妇康煎膏有提高子宫内膜异位症 IVF-ET 患者卵细胞和胚胎质量的作用, 其作用机制可能与调控颗粒细胞 GDF-9 mRNA 水平有关。

关键词 丹莪妇康煎膏; 体外受精 - 胚胎移植; 生长分化因子-9; 颗粒细胞

Dan'e Fukang Soft Extract Improved the Oocyte Quality and GDF-9 Expressions of Endometriosis Patients: an Experimental Study LIAN Fang¹ and LI Xiao-na² 1 Center for Integrative Medicine Reproduction and Genetics Center, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011), China; 2 Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250014), China

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of Dan'e Fukang Soft Extract (DFSE) on improving oocyte and embryo qualities in endometriosis patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET). **Methods** Totally 70 patients with endometriosis confirmed by laparoscope were randomly assigned to two groups, the treated group and the control group, 35 cases in each group. Patients in the treated group were treated with DFSE + controlled ovarian hypostimulation (COH), while those in the control group were treated with DFSE placebo + COH. Besides, recruited were another 35 subjects undergoing intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer (ICSI-ET) as a normal control group. The content of growth differentiation factor 9 (GDF-9) in the granulocytes of the mature follicular fluid on the oocyte retrieval day was determined by Western blot. The mRNA expression of GDF-9 was detected by RT-PCR. The oocyte retrieval number, the cleavage rate, the fertilization rate, the high-quality embryo rate, and the pregnancy rate were compared. **Results** The mRNA expression of GDF-9 in the granulocytes was significantly higher in the treated group than in the control group, showing statistical difference ($P < 0.05$), but with no statistical difference when compared with that of the normal control group. There was no statistical difference in the cleavage rate between the two groups ($P > 0.05$). The fertilization rate and the high-quality embryo rate were higher in the treated group than in the control group, showing statistical difference ($P < 0.05$), but with no statistical difference when compared with that of the normal control group.

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心(济南 250011); 2. 山东中医药大学 2006 级中医七年制班(济南 250014)

通讯作者: 连 方, Tel: 13706403122, E-mail: f_lian@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.09.1179

Conclusions DFSE could improve the oocyte and embryo qualities of endometriosis patients undergoing IVF-ET. Its mechanism might be associated with regulating the GDF-9 mRNA level of granulocytes.

KEYWORDS Dan'e Fukang Soft Extract; *in vitro* fertilization-embryo transfer; growth differentiation factor 9; granular cell

卵母细胞质量是影响体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的重要因素之一,卵母细胞通过分泌卵母细胞分泌因子(oocyte-secreted factors, OSFs)调节卵泡细胞的功能,并在卵子生成、排卵以及受精的调节中起到关键作用。生长分化因子-9(GDF-9)是重要的 OSFs 之一,亦是转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员之一,是转化生长因子(transforming growth factor, TGF)超家族成员,有研究认为卵泡液中高水平的 GDF-9 与高质量的卵子和胚胎相关^[1,2]。本研究以 GDF-9 为切入点,通过运用 Western blot、RT-PCR 两种方法,探讨丹莪妇康煎膏提高子宫内膜异位症 IVF-ET 患者周期卵细胞质量和胚胎质量的作用机理。

资料与方法

1 诊断标准 参照《子宫内膜异位症的诊断与治疗规范》^[3],并结合腹腔镜进行诊断。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合本病诊断标准,行 IVF-ET 的患者,年龄 23~35 岁;知情同意者。排除标准:原发性痛经,盆腔炎,陈旧性宫外孕,子宫腺肌病、子宫肌瘤或其他生殖系统肿瘤,阑尾炎,未按时服药,近 3 个月接受激素类药物治疗,严重心脑血管疾病及肝肾功能不全,精神疾病,同时接受多项其他治疗及对本药物过敏者。

3 一般资料 70 例均为 2012 年 1 月—2013 年 1 月在山东中医药大学附属医院生殖中心就诊的腹腔镜确诊为子宫内膜异位症行 IVF-ET 的患者,按随机数字表法分为治疗组(丹莪妇康煎膏加控制性超排卵组)和对照组(安慰剂加控制性超排卵组)。其中治疗组 35 例,24~33 岁,平均 (28.20 ± 2.86) 岁;对照组 35 例,23~34 岁,平均 (28.13 ± 2.77) 岁;另取 35 例因男方因素行卵细胞浆内单精子注射(ICSI-ET)的患者设为正常对照组,年龄 22~33 岁,平均 (27.89 ± 2.36) 岁。3 组患者年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 治疗方法 3 组患者均采用超排卵长方案:促性腺激素释放激素激动剂/基因重组卵泡刺激素/人绝经后促性腺激素/人绒毛膜促性腺激素(GnRHa/FSH-r/HMG/HCG)方案。即入选患者于 IVF/ICSI-ET 治疗前一月经周期的黄体期(月经周期 21 天左右)给予醋

酸曲普瑞林(达菲林,法国 IPSEN 公司,3.75 mg/支,批号:U056)1.0 mg 肌肉注射。自月经周期第 3 天开始每天根据患者基础内分泌,肌肉注射重组人促卵泡激素(果纳芬,75 IU/支,默克雪兰诺公司,批号:V14137058)150~300 IU。用药期间 B 超监测卵泡发育情况并测血清黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、孕激素(P),根据患者卵泡发育情况及时调整药物的剂量,当两侧卵巢至少有 3 个卵泡直径 ≥ 18 mm 时停药,给予 HCG(5000 U/支,默克雪兰诺公司,批号:V14135808)10 000 U 肌肉注射,34~36 h 后在阴道超声引导下穿刺取卵术。其中治疗组在启动周期前 3 个月服用丹莪妇康煎膏治疗 3 个月(药物组成:紫丹参、莪术、竹叶、柴胡、三七、赤芍、当归、三棱、香附、延胡索、甘草,由昆明滇虹药业有限公司生产),口服,每次 10 g,2 次/天,经前 15 天开始服药,连服 15 天为 1 个疗程,第 2 疗程下个周期开始。对照组在启动周期前 3 个月服用安慰剂治疗 3 个月,方法同前。

5 观察指标及方法

5.1 颗粒细胞收集 经阴道超声引导下用 17G 穿刺针(Wallace)负压(100 mmHg)抽吸卵泡,留取每侧卵巢直径 ≥ 18 mm 的主导卵泡的卵泡液。将卵泡液置于尖底离心管中离心(1 500 r/min,5 min),除去上清液,沉淀中加入磷酸缓冲液(PBS)至 5 mL 混匀,另一离心管中加入人淋巴细胞分离液 5 mL,将颗粒细胞和 PBS 混悬液缓慢加入淋巴细胞分离液的液面上离心(1 200 r/min,20 min),在两液面之间有一层白色细胞层,即为去除红细胞后的颗粒细胞,吸取此颗粒细胞层加 PBS 离心,然后转入 15 mL 尖头无菌离心管中,常温条件下 3 000 r/min,离心 5 min,用移液器枪头(规格 1 mL)轻轻将上清液吸干净,然后投入液氮快速冷冻至少 5 min,然后转入 -80 ℃冰箱长期冻存待测。

5.2 Western blot 法测定颗粒细胞 GDF-9 表达 取颗粒细胞 1.5 μ L,用细胞裂解液裂解,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,将分离到的蛋白条带转移至 PVDF 膜上,转移后的 PVDF 膜放入 GDF-9(1:1000;Santa Cruz)工作液中,4℃反应过夜,TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,与二抗孵育 1 h 洗膜。采用底物化学发光 ECL 显色,用

β-actin 作为内参,采用美国 UVP 分析仪器,对胶片进行扫描,系统自动生成灰度值,行数据统计分析处理,将目的条带与内参照的光密度比值作为蛋白相对量。

5.3 RT-PCR 测定颗粒细胞 GDF-9 mRNA 表达 GDF-9 引物合成:上游引物序列:TCTATCTGTTGGGCGAGGTG;下游引物序列:TGAAGGAGGCTGGTCACATC,产物长度 459 bp。内参 GAPDH 引物,上游引物序列:ACCACAGTCCATGCCATCAC;下游引物序列:TCCACCACCCTGTTGCTG,产物长度 452 bp。以上引物由上海生物有限公司合成。在超净工作台内加入 500 μL GIT,吹打混匀;加入 50 μL 2 mol/L NaACO,摇匀;加入 100 μL 水平平衡酚,摇匀;加入 100 μL 氯仿,摇匀;冰浴,3 min;取上清,加等量异丙醇,摇匀;-20 ℃冻存 2 h;去上清,加入 100 μL GIT,轻吹打 10 下;加入 100 μL 异丙醇,摇匀;-20 ℃冻存,1 h;离心:3 000 r/min,3 min;去上清,加 DEPC 水配置的 75% 乙醇;离心:3 000 r/min,3 min;轻弃乙醇,待挥发干后加入 DEPC 水溶解 RNA;加入 Oligo dT 1 μL;加入 RNA 产物 10 μL;放入 PCR 仪,RT1,5 min;冰浴 3 min;加入 5 × buffer 4 μL、dNTP 2 μL、Rasin 1 μL、M-MLV 1 μL;放入 PCR 仪,RT3,1 h;取出 RT 产物,置于冰盒上;加入 MIX 5 μL、RT 产物 3 μL、DEPC 水 10 μL;放入 PCR 仪,PCR1:5 min;加 Tag 酶 2 μL;放入 PCR 仪,PCR:2 h。电泳:75 V,35 min;取出胶,小心铺在凝胶图像分析仪上,进行检测分析。

5.4 记录相关临床数据 促性腺激素(Gn)用药量、用药天数、获卵数、受精率、卵裂率、优质胚胎率及妊娠率。

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用率表示,采用 *t* 检验及 χ^2 检验等进行统计学处理,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 Gn 用量、获卵数及妊娠率比较(表 1) 治疗组 Gn 用量少于对照组,但差异无统计学意义(*P* > 0.05),多于正常对照组,差异亦无统计学意义(*P* > 0.05);治疗组获卵数大于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),与正常对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。治疗组妊娠率显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),与正常对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 各组 Gn 用量、获卵数及妊娠率比较

组别	例数	Gn 用量 (IU, $\bar{x} \pm s$)	获卵数 (个, $\bar{x} \pm s$)	妊娠率 (%)
治疗	35	1 315.5 ± 350.4	16.20 ± 5.60 *	65.7 *
对照	35	1 385.0 ± 300.0	10.70 ± 6.08	49.1
正常对照	35	1 244.5 ± 279.1	17.30 ± 4.98	68.9

注:与对照组比较,**P* < 0.05

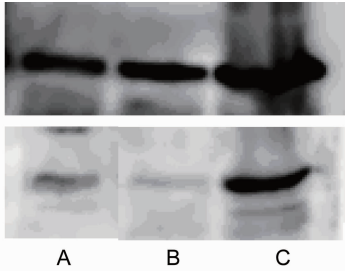
2 各组受精率、卵裂率及优质胚胎率比较 治疗组受精率、卵裂率及优质胚胎率分别为 74.5%、93.7% 及 64.1%,对照组分别为 64.1%、91.5% 及 53.2%,正常对照组分别为 77.1%、95.6% 及 69.3%。治疗组卵裂率与对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。受精率、优质胚胎率均高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);治疗组受精率、卵裂率及优质胚胎率均低于正常对照组,但差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

3 各组卵泡液颗粒细胞 GDF-9 表达比较(表 2,图 1) 治疗组卵泡液 GDF-9 水平高于对照组,但差异无统计学意义(*P* > 0.05),与正常对照组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 2 各组卵泡液颗粒细胞 GDF-9 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GDF-9
治疗	35	0.37 ± 0.25 *
对照	35	0.29 ± 0.18 *
正常对照	35	0.71 ± 0.20

注:与正常对照组比较,**P* < 0.05



注:A 为治疗组,B 为对照组,C 为正常对照组;图 2 同

图 1 各组卵泡液颗粒细胞 GDF-9 表达 (Western blot 电泳图)

4 各组卵泡液颗粒细胞 GDF-9 mRNA 表达比较(表 3,图 2) 治疗组卵泡液 GDF-9 mRNA 水平显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),与正常对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 3 各组卵泡液颗粒细胞 GDF-9 mRNA 结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GDF-9 mRNA
治疗	35	0.85 ± 0.12 *
对照	35	0.34 ± 0.11 ^Δ
正常对照	35	0.90 ± 0.08

注:与对照组比较,**P* < 0.05;与正常对照组比较,^Δ*P* < 0.05

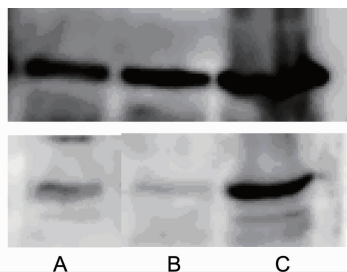


图2 各组卵泡液颗粒细胞 GDF-9 mRNA 表达 (RT-PCR 电泳图)

讨 论

卵子质量是决定胚胎发育的重要因素之一。有关研究表明, 卵母细胞通过分泌 OSFs 在卵泡细胞的功能中处于中心调节地位, 在卵泡生成和自身发育中发挥关键作用^[5]。GDF-9 是最重要的 OSFs 之一, 研究表明, GDF-9 主要表达于卵母细胞, 与垂体卵巢激素相互调节, 在卵泡的发育、成熟、排卵及受精过程中均起到重要作用^[6]。GDF-9 基因缺陷的鼠和羊由于发育初期的卵泡生产受阻均表现为不孕^[7]。Huang HY^[2] 等研究了颗粒细胞中 GDF-9 水平与卵子质量和胚胎发育的关系, 认为高水平 GDF-9 与卵子质量及胚胎质量相关, GDF-9 水平可以作为预测卵子质量和胚胎发育潜能的指标。

子宫内膜异位症是免疫性疾病, 激素依赖性疾病, 在组织学上是良性的, 但其生物学行为却和恶性肿瘤相似, 具有增生、浸润、扩散和远处转移的特点。由于子宫内膜周期性脱落, 中医学称为“离经之血”, 离经之血蓄积于下焦而致病, 瘀滞内停, 冲任失调, 不能摄精成孕而为不孕。故中医治疗原则是补肾调肝、活血化瘀、软坚散结。现代药理研究认为, 活血化瘀药可以调节人体的免疫机制, 调补肝肾药有类似内分泌激素的作用, 但却没有激素的不良反^[8]。子宫内膜异位症导致不孕的可能机制包括影响卵泡发育、排卵障碍、对早期胚胎发育的影响以及影响胚胎着床等。而卵母细胞的质量直接影响了卵泡的发育, 从而引起胚胎质量的下降, 进一步导致胚胎的着床率降低。接受 IVF 治疗的子宫内膜异位症性不孕妇女的颗粒细胞的凋亡率, 相比于输卵管、男性因素和不明原因不孕症患者显著增高^[9]。

丹莪妇康煎膏用丹参活血, 当归补血调血, 香附理气, 莪术、三七、三棱及延胡索活血化瘀, 改善盆腔血液循环; 甘草内含三萜皂苷黄酮, 具有补脾益气、免疫调节和广泛的激素样作用。有研究表明, 丹莪妇康胶囊能改善子宫内膜异位症大鼠异位内膜组织的免疫病理变化, 能降低异位内膜组织内 CD8⁺ T 细胞数和巨噬细胞

数^[10]。本研究结果表明, 予丹莪妇康煎膏治疗后, 子宫内膜异位症患者颗粒细胞 GDF-9 mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.05$), GDF-9 表达, 治疗组较对照组虽差异无统计学意义, 但经丹莪妇康煎膏治疗后, 表达仍有升高。综合研究结果提示, 丹莪妇康煎膏能够提高卵泡质量, 改善卵细胞和胚胎的发育潜能, 提高 IVF-ET 临床妊娠率, 其机理与通过调节 GDF-9 的表达有关。今后还需从卵细胞的旁分泌角度, 深入研究丹莪妇康煎膏治疗子宫内膜异位症性不孕患者的机理。

参 考 文 献

- [1] Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, et al. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(1): 316-321.
- [2] Huang HY, Wang HS, Chan HS, et al. Granulosa-lutein cell growth differentiation factor-9 (GDF-9) messenger RNA and protein expression in *in vitro* fertilization (IVF) cycles: relation to characteristics of ovulation induction and IVF[J]. Fertil Steril 2009, 91(4): 1583-1585.
- [3] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊断与治疗规范[J]. 中国妇产科杂志, 2007, 42(9): 645-648.
- [4] 罗元凯主编. 实用中医妇科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 278.
- [5] Li J, Qiao J. Regulation of growth differentiation factor-9 in follicle development[J]. J Int Reprod Health/Fam Plan, 2008, 27(2): 84-87.
- [6] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors DGF-9 and BMP-15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovisaries)[J]. Biol Reprod, 2004, 70(4): 900-909.
- [7] 李健, 乔杰. 生长分化因子-9 在卵泡发育中的调控作用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(2): 84-87.
- [8] 朱兰, 郎景和. 子宫内膜异位症的免疫研究进展[J]. 国外医学·妇产科学分册, 2002, 29(4): 282.
- [9] Toya M, Saito H, Ohta N, et al. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing *in vitro* fertilization and embryo transfer[J]. Fertil Steril, 2000(73): 344-350.
- [10] 孙玲, 钱忠义, 王燮, 等. 丹莪妇康胶囊对子宫内膜异位症模型大鼠异位内膜内免疫细胞的影响[J]. 生殖免疫学, 2008, 24(11): 1007-1010.

(收稿: 2013-06-07 修回: 2013-07-08)