

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.11.021

补肾健脾方改善自然衰老小鼠卵巢反应性的实验研究

沈明洁, 齐 聪

上海中医药大学附属曙光医院妇科(上海 201203)

【摘要】 目的 观察补肾健脾方对自然衰老小鼠卵巢反应性及卵巢储备的影响。**方法** 将 48 只 10 月龄 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为老年对照组、补肾健脾方组、DHEA 组, 给予相应处理; 并以 2~3 月龄小鼠为青年对照组。观察各组干预前后血清抗苗勒管激素 (AMH) 水平, 获取卵数、MII 卵子数、受精卵数、受精率及各级卵泡计数变化情况。**结果** ①补肾健脾方组小鼠血清 AMH 水平较老年对照组和 DHEA 组均升高 ($P < 0.05$); ②补肾健脾方组小鼠在体外受精过程中获卵数、MII 卵子数、受精卵数及受精率均明显高于较老年对照组和 DHEA 组 ($P < 0.05$); ③补肾健脾方组小鼠成熟卵泡数较老年对照组和 DHEA 组均显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾健脾方可改善衰老小鼠的卵巢低反应性和提高卵巢动态储备。

【关键词】 补肾健脾方; 卵巢反应性; 卵巢储备; 体外受精

Experimental research on Bushen Jianpi Formula in improving the ovarian response in naturally aged mice

SHEN Ming-jie, QI Cong

Department of Gynaecology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

Abstract: Objective To observe the effect of Bushen Jianpi Formula on the ovarian response and reserve in naturally aged mice. **Methods** Forty-eight female C57BL/6J mice that 10 months old were randomly divided into the model group, Bushen Jianpi Formula (BSJP) group and dehydroepiandrosterone (DHEA) group, and given the corresponding treatments. Meanwhile, young female C57BL/6J mice that 2-3 months old were set as the control group. Before and after intervention, the serum level of anti mullerian hormone (AMH), the changes of oocyte number, MII oocyte number, fertilized oocyte number, fertilization rate and ovarian follicle count were observed and compared. **Results** ①The serum AMH level in the BSJP group was higher than that in the model group and DHEA group ($P < 0.05$); ②In vitro fertilization, the oocyte number, MII oocyte number, fertilized oocyte number, fertilization rate of the BSJP group were significantly higher than those of the model group and DHEA group ($P < 0.05$); ③The number of mature follicle of the BSJP group was significantly increased compared with the model group and DHEA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Bushen Jianpi Formula can improve the ovarian reserve and response in naturally aged mice.

Keywords: Bushen Jianpi Formula; ovarian response; ovarian reserve; fertilization in vitro

卵巢低反应 (poor ovary response, POR) 即在实施体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 的药物超排卵过程中, 以卵巢对促性腺激素 (gonadotropin, Gn) 的刺激反应不良、Gn 用量多、发育的卵泡少为特征。近年来, 我国二胎政策的开放,

越来越多的大龄甚至高龄女性求助于辅助生殖技术。而卵巢储备 (ovarian reserve) 随着女性年龄的增长显著下降, 40 岁女性仅保留 3% 的卵巢储备^[1]。年龄是导致 POR 发生的主要原因, 高龄女性 (大于 40 岁) 是 POR 人群的主要组成部分, 与之伴随的是高龄女性极低的妊娠率与活产率^[2-3]。目前虽然有大量的方案应用于 POR 患者, 但是其成功率均非常有限。寻找一种有效可靠的治疗方法, 探索改善大龄女性卵巢储备及卵巢反应性, 对于提高大龄女性的生育能力有着不可估量的意义。本实验在齐聪教授所研制的补肾健脾方应用于临床 POR 患者取得良好疗效的基础上, 进一步研究该方对于自然衰老小鼠模型卵巢反应性及卵巢储备的影响。

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (81403424); 上海市自然科学基金项目 (14ZR1442100); 上海市卫生局青年科研基金项目 (20134Y24)

[作者简介] 沈明洁, 女, 博士生, 主治医师, 讲师, 主要从事中西医结合不孕不育临床研究工作

[通讯作者] 齐聪, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师。

E-mail: qicongxqz@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 实验动物 C57BL/6J 雌性小鼠,SPF 级,9 月龄,共 48 只,购于北京维通利华实验动物有限公司(动物批号:11400700072908);购入动物后适应性喂养 1 周后,连续 2 周做阴道涂片,动情周期紊乱或消失,10 月龄时纳入实验。青年 C57BL/6J 雌性小鼠 SPF 级,共 15 只,购于北京维通利华实验动物有限公司(动物批号:11400700081339);购入动物后喂养至 2~3 月龄纳入实验。

1.2 主要试药 ①补肾健脾方:黄精 15 g,党参 15 g,白术 9 g,白芍 10 g,黄芪 15 g,女贞子 9 g,菟丝子 10 g,肉苁蓉 12 g,巴戟天 9 g,当归 9 g,炙甘草 6 g;均为免煎颗粒剂,购于我院中药房,华润三九医药股份有限公司生产。按比例溶解于纯水后浓缩成 4 g/ml 生药浓度,分装后 4℃ 冰箱保存,备用。小鼠灌胃按与人体表面积比等效剂量换算: $2.55\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。②脱氢表雄酮^[4](dehydroepiandrosterone,DHEA)购于美国 GNC 公司,根据成人口服剂量(75 mg/d),溶解于蒸馏水后小鼠灌胃按与人体表面积比等效剂量换算: $1.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。③试剂:AMH Elisa kit(usbiological, 23452,USA)。

1.3 分组和用药 将自然衰老 48 只 C57BL/6J 小鼠随机分为补肾健脾方组(老年小鼠,18 只)、DHEA 组(老年小鼠,15 只)、老年对照组(老年小鼠,15 只),另取青年小鼠(2~3 月龄)15 只作为青年对照组。补肾健脾方组自 10 月龄起每日灌胃补肾健脾方(0.3 ml/d),DHEA 组自 10 月龄起每日灌胃 DHEA(0.3 ml/d)。老年对照组给予等量生理盐水灌胃。共灌胃 3 个月。除青年对照组外,其余组均饲养至 12 月龄末。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 血清 AMH 值 小鼠血清抗苗勒管激素(anti miillerian hormone,AMH)水平采用 ELISA 法检测,选用小鼠 AMH Elisa kit 试剂盒(usbiological,23452,USA),试剂盒敏感度为 0.05 ng/ml,标准曲线范围 0.1~40 ng/ml。

1.4.2 卵巢反应性的评价指标

1.4.2.1 卵子的获取及受精 各组小鼠均于月龄 12 月末(青年对照组于月龄 2~3 月)随机选择 6 只于 16:00 注射妊马血清促性腺激素(PMSG)10 IU,48 h 后注射 HCG 10 IU。在注射 HCG 16 h 后脱臼处死小鼠,快速剖腹,剪下两侧输卵管,置于预温好的 HTF (Embry Max HTF, Millipore, USA) 中。在解剖镜下,用 1 ml 的针头剖开输卵管壶腹部,使卵丘复合物流出。用巴氏管将卵丘复合物移出,转移至干净的 HTF 中洗净后受精,转入已经过 4 h 以上平衡的 KMOS (Millipore, USA) 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 的胚胎

培养箱中培养。观察镜下获卵数、MII 卵子数、受精卵数等。

1.4.2.2 体外受精及胚胎培养 脱臼处死雄性鼠龄 12 周的 ICR 小鼠 1 只,快速剖腹,分离附睾尾,采用 1 ml 针头挤压附睾尾,使精子排出。转移精子在 HTF 中上游 1.5 h。将上游好的精子(1×10^6)/ml 加入处理好的卵丘复合物中,置于 37℃、5% CO₂ 的胚胎培养箱中。6 h 后观察受精情况,并记录受精卵数。

1.4.2.3 卵巢切片及各级卵泡计数 各组随机选择 6 只小鼠脱臼处死,快速剖腹后取出卵巢,固定于 10% 中性缓冲福尔马林固定液 12 h。随后包裹于石蜡中,并以 4 μm 的厚度连续快速切片,HE 染色后在放大 200 倍的倒置显微镜下对每五张切片中第五张进行全切片原始卵泡及初级卵泡计数,由不同的两个实验人员计数对照。通过该方法计算整个卵巢中各级卵泡的数目^[5-6]。原始卵泡:含有一个完整的卵母细胞,可见细胞核,且被单层梭型颗粒细胞包围(如果卵泡含有的单层颗粒细胞中既有梭型细胞,又有立方型细胞,此类卵泡仍被定义为原始卵泡);初级卵泡:含有一个完整且增大的卵母细胞,可见细胞核,且被单层立方型的颗粒细胞包围;次级卵泡:有超过一层的颗粒细胞,但无可见的窦腔;窦卵泡或成熟卵泡:含有数个卵泡液形成的小窦腔,或含有单个大窦腔的卵泡。如果观察到卵泡在早期发育阶段即退化(变形或浓缩)或破碎,即便 HE 染色后仍可观察到,则定义为闭锁卵泡。

1.5 统计学方法 观察数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。所有检验均采用双侧检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 AMH 水平比较 补肾健脾方组小鼠血清 AMH 水平高于老年对照组和 DHEA 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。青年对照组小鼠血清 AMH 水平高于各老年组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠血清 AMH 水平比较($\bar{x}\pm s$,ng/ml)

组别	n	AMH	F	P
补肾健脾方	6	4.69±1.52	19.707	<0.001
DHEA	6	2.25±0.28**		
老年对照	6	3.05±0.75**		
青年对照	6	6.14±0.47*		

注:与补肾健脾方组比较,* $P<0.05$;与青年对照组比较,# $P<0.05$

2.2 IVF 结果比较 补肾健脾方组小鼠在 IVF 过程中获卵数、MII 卵数、受精卵数及受精率较老年对照组和 DHEA 组小鼠增多,且存在统计学差异($P<0.05$)。青

年对照组小鼠在获卵数、MII 卵数、受精卵数较其余各组均显著增多,存在统计学差异($P<0.05$);青年对照组小鼠受精率较老年对照组和 DHEA 组小鼠显著增高

表 2 各组小鼠 IVF 结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	获卵数(个)	MIⅡ 卵数(个)	受精卵数(个)	受精率(%)
补肾健脾方	6	4.50±1.05	3.33±1.03	2.50±1.38	72±27
DHEA	6	1.17±1.17* [#]	0.67±0.82* [#]	0.33±0.52* [#]	25±42* [#]
老年对照	6	0.83±0.98* [#]	0.50±0.84* [#]	0.33±0.52* [#]	25±42* [#]
青年对照	6	12.00±2.45*	9.67±2.58*	9.33±2.42*	97±5
<i>F</i>		68.475	48.419	52.550	7.192
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	0.002

注:与补肾健脾方组比较,* $P<0.05$;与青年对照组比较,[#] $P<0.05$

2.3 卵泡计数比较 补肾健脾方组小鼠成熟卵泡数量较老年对照组和 DHEA 组增多,闭锁卵泡数量较老年对照组明显减少,均有统计学差异($P<0.05$);次级卵泡及窦卵泡数量均有明显增多趋势,但无统计学差异($P>0.05$)。青年对照组各级卵泡较补肾健脾方组及老年对照组明显增多,均有统计学差异($P<0.05$),

表 3 各组卵泡计数结果比较($\bar{x}\pm s$,个)

组别	<i>n</i>	原始卵泡	初级卵泡	次级卵泡	窦卵泡	成熟卵泡	闭锁卵泡
补肾健脾方	6	13.33±9.93	8.67±7.97	13.67±8.24	18.17±2.32	6.00±3.22	0.83±1.17
DHEA	6	11.50±3.15 [#]	15.17±4.71*	10.33±3.27 [#]	8.00±2.83 [#]	0.33±0.52* [#]	0.33±0.52 [#]
老年对照	6	7.83±5.74 [#]	10.83±2.48 [#]	6.00±2.97 [#]	7.33±2.80 [#]	1.67±2.25* [#]	3.83±2.14* [#]
青年对照	6	23.00±6.13*	19.50±4.23*	29.67±10.52*	63.67±20.13*	9.33±2.80*	0.50±0.84
<i>F</i>		5.613	5.050	12.915	40.177	17.250	9.493
<i>P</i>		0.006	0.009	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与补肾健脾方组比较,* $P<0.05$;与青年对照组比较,[#] $P<0.05$

3 讨论

近年来,由于我国女性婚育年龄的延后,求助于辅助生殖技术女性的平均年龄不断升高,二胎政策的全面开放,进一步加剧这一现象。人类的生育能力随着年龄的增长而逐步下降,卵巢储备(即卵巢中原始卵泡数量)的急剧减少,IVF-ET 中卵巢反应性显著下降,最终导致 IVF-ET 结局失败是大龄女性不得不面临的困境。目前,大多数学者倾向于人类出生后的卵子资源是有限的,无法再生^[7],并随着年龄增加而逐渐耗竭。这意味着,大龄女性无法补充原始卵泡的数量,卵巢储备下降是不可逆的。而与之平行的,是在 IVF-ET 中更为关键的小窦卵泡数量及卵子质量的下降,与排卵密切相关的重要动态卵巢储备^[2]。虽然卵巢储备从本质上是无法再生的,但是提高卵泡发育的效率,提高小窦卵泡的数量及卵子的质量,对于大龄女性而言并非是不可能的。

齐聪教授结合传统中医理论及现代生殖医学知识,认为大龄女性卵巢低反应的主要病机在于“脾肾亏

($P<0.05$),但较补肾健脾方组虽有增高,但无统计学差异($P>0.05$)。见表 2。

青年对照组闭锁卵泡数较老年对照明显减少,有统计学差异($P<0.05$),但与补肾健脾方组及 DHEA 组比较无统计学差异($P>0.05$)。DHEA 组初级卵泡数较补肾健脾方组增多,有统计学差异($P<0.05$)。见表 3。

虚”^[8],研制补肾健脾方并应用于临床获得肯定疗效。方中菟丝子填补肾精,善补肾中阴阳,温而不燥,补而不滞;肉苁蓉补肾阳、益精血,肝肾足则精血盛,精血盛则多子;女贞子滋肾益阴,巴戟天温肾助阳。四药水火既济,强肾益精。黄精平补气血而润,黄芪、党参、白术益气健脾,以资气血生化之源。白芍酸甘敛阴而柔肝,得当归相助,养血调冲。全方共奏补肾健脾、调冲养卵之效。

AMH 由发育中的窦前卵泡及小窦卵泡颗粒细胞所分泌,是目前临床用于评价卵巢储备及 IVF 中卵巢反应性的重要且敏感的指标^[9]。小鼠的卵泡计数可以从本质上评价卵巢的储备功能及卵泡发育的情况。对于临床的辅助生殖技术而言,卵巢储备功能(原始卵泡的数量)固然非常重要,但是动态卵巢储备(次级卵泡及窦卵泡)更是直接影响 IVF 结局的关键因素。本研究应用自然衰老小鼠为研究模型,通过对小鼠血清 AMH 水平、IVF 结果及卵泡计数等指标的观察,评价补肾健脾方对衰老小鼠卵巢反应性及卵巢储备的影响。研究发现,补肾健脾方组小鼠血清 AMH 水平较老年对

照组及 DHEA 组显著升高,原始卵泡和初级卵泡数量较老年对照组并无明显增加,次级卵泡及窦卵泡数量较老年对照组有明显增加趋势,其原因可能与样本量较小、且青年对照组与其余三组老年组小鼠的卵泡数量差异较大,导致方差不齐,而未出现统计学差异,但是其次级卵泡及窦卵泡的增长趋势是明确的。补肾健脾方组小鼠的成熟卵泡的数量较老年对照组及 DHEA 组显著增加。根据血清 AMH 水平及卵泡计数结果,本研究提示中药补肾健脾方可有效改善自然衰老小鼠的动态卵巢储备(次级卵泡及窦卵泡),在衰老小鼠卵巢储备下降的基础上,提高卵泡发育效率,获得更多可能排卵的成熟卵子。我们同时发现,补肾健脾方组小鼠的 IVF 结果要明显优于老年对照组及 DHEA 组,其获卵数、MII 卵数、受精卵数及受精率均显著增加。提示中药补肾健脾方在提高自然衰老小鼠卵巢动态储备的基础上,可提高小鼠 IVF 中卵巢的反应性及卵子的质量,获得更加理想的 IVF 结果。

本研究结果提示,中药补肾健脾方可有效改善自然衰老小鼠卵巢动态储备和 IVF 过程中卵巢的反应性,但是由于其样本量较小,其疗效的广泛性还有待进一步的大样本研究证实,其作用机制还有待进一步阐明。

(上接第 48 页)

近年来,大量研究结果表明,COX-2 蛋白过度表达与消化系统肿瘤的发生和发展密切相关,在胃正常黏膜中表达较低;在 CAG 伴 PLGC 中已经被激活,并且随着向癌变的发展,COX-2 蛋白表达逐渐增高^[7]。COX-2 蛋白过表达可能会加重组织损伤、降低机体免疫力及促进细胞癌变,与胃癌的发生关系密切,所以在 CAG 伴 PLGC 阶段,降低 COX-2 的表达可以为临床防治胃癌的发生和发展提供有效途径^[8]。本研究治疗 2 个疗程后,治疗组 COX-2 的表达较治疗前有显著降低,治疗前后差异显著($P < 0.05$),表明降低胃黏膜 COX-2 的表达可能是胃康宁组方治疗 CAG 伴 PLGC 的机制之一。

本研究结果表明,胃康宁治疗脾虚寒热瘀毒型慢性萎缩性胃炎伴胃癌前病变临床疗效满意,可显著改善患者临床症状,缓解胃黏膜炎症,逆转胃黏膜萎缩和肠上皮化生,降低胃黏膜 COX-2 蛋白表达,这对于预防胃癌的发生有一定的积极意义,值得临床应用。

参考文献:

- [1] Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause[J]. *PLoS One*, 2010,5(1):1-7.
- [2] Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences[J]. *Endocr Rev*, 2009,30(5):465-493.
- [3] Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility treatment when the prognosis is very poor or futile: a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2012,98(1):e6-e9.
- [4] Norbert Gleicher, Ann Kim, Andrea Weghofer, *et al.* Hypoandrogenism in association with diminished functional ovarian reserve[J]. *Human Reproduction*, 2013,28(4):1084-1091.
- [5] Flaws JA, Abbud R, MannRJ, *et al.* Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary[J]. *Biol Reprod*, 1997,57(5):1233-1237.
- [6] Liu M, Yin Y, Ye X, *et al.* Resveratrol protects against stage-associated infertility in mice[J]. *Human Reproduction*, 2013,28(3):707-717.
- [7] Hanna CB, Hennebold JD. Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? [J]. *Fertil. Steril*, 2014,101(1):20-30.
- [8] 朱辰隼, 齐聪. 补肾法治疗卵巢低反应的相关机制探讨[J]. *上海中医药大学学报*, 2015,29(2):87-89.
- [9] Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, *et al.* Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection[J]. *Mol Hum Reprod*, 2013,19(8):519-527.

编辑：肖元春

收稿日期:2016-06-14

参考文献:

- [1] Correa P, Haenszel W, Cuello C, *et al.* A model for gastric cancer epi-demiology[J]. Lancet,1975, 7924 (2):58-60.
- [2] Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade[J]. J Dig Dis,2012,13(1):2-9.
- [3] Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer[J]. IARC Sci Publ,2004,157(157):327-349.
- [4] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(2006,上海)[J]. 胃肠病学, 2006,11(11):674-684.
- [5] 郑筱蓓. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002.
- [6] 中华中医药学会脾胃病分会. 慢性萎缩性胃炎中医诊疗共识意见(2009,深圳)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2010, 18(5):345-349.
- [7] 张富花,周永宁,李高忠,等. 环氧合酶2和尿纤溶酶原激活物在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志,2008,88(46):3279-3282.
- [8] Forones NM, Kawamura KY, Segreto HR, *et al.* Expression of COX-2 in stomach carcinogenesis[J]. J Gastrointest Cancer,2008, 39(1-4):4-10.

编辑:张立艳

收稿日期:2016-06-19