

左归丸促进小鼠未成熟卵母细胞体外核成熟的实验研究*

孙晓峰¹ 罗 令² 孙启春³ 高玉强³ 贺又舜¹ 陈北阳¹ 吴 霞¹

(1 湖南中医药大学 湖南 长沙 410007; 2 湖南省长沙市第八医院 湖南 长沙 410000;

3 山东省枣庄市市立医院 山东 枣庄 277100)

摘要 目的:研究左归丸对小鼠未成熟卵母细胞体外核成熟的影响。**方法:**制备左归丸含药血清,将生发泡(germinal vesicle, GV)期卵母细胞分别在不同采血时间获取的左归丸含药血清培养液中进行体外培养,观察左归丸含药血清对生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)和第一极体(the first polar body, PB1)排出的时效关系。**结果:**药物血清组卵母细胞 GVBD 的发生率高于正常血清组 and 对照组,于培养后 4h 差异最显著($P < 0.01$);药物血清组卵母细胞 PB1 的发生率高于正常血清组 and 对照组,于培养后 18h 差异最显著($P < 0.01$)。**结论:**2~2.5h 左归丸含药血清对未成熟卵母细胞体外核成熟具有明显促进作用。

关键词:左归丸;血清;卵母细胞;生发泡破裂;第一极体

中图分类号:Q95-3 R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-444-04

Experimental Study of Zuogui Pills in Stimulation of Mouse Immature Oocytes Nuclear Maturation in Vitro*

SUN Xiao-feng¹, LUO Ling², SUN Qi-chun³, GAO Yu-qiang³, HE You-shun¹, CHEN Bei-yang¹, WU Xia¹

(1 Hunan University of TCM, Changsha Hunan 410007 China;

2 Changsha Eighth Hospital, Changsha Hunan 410000 China;

3 Zaozhuang Municipal Hospital of Shandong, Zaozhuang Shandong 277100 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Zuoguiwan in vitro on nuclear maturation of immature mouse oocytes. **Methods:** The serum containing Zuoguiwan were prepared. The immature oocytes were isolated from the ovaries of the mouse. The GV oocytes were cultured in the culture media supplemented with Zuoguiwan serum with different blood sampling time, respectively. The rates of GVBD and PB1 extrusion were detected. **Results:** There was higher GVBD in several Zuoguiwan serum groups than that in the controls and normal serum group. And the difference was the most notable at 4th hours. There was higher PB1 in Several Zuoguiwan serum groups than that in the controls and normal serum group. And the difference was the most notable at 18th hours. **Conclusion:** 2~2.5h Zuoguiwan serum improved in vitro nuclear maturation of immature mouse oocytes significantly.

Key words: Zuoguiwan; Serum; Oocyte; Germinal vesicle breakdown; Polar body

Chinese Library Classification: Q95-3 R285 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-444-04

前言

正常的卵巢功能是生殖健康的基础。女性一生中仅有 400~500 个卵泡能够发育成熟并排卵,有的女性一生中能发育成熟的卵泡却远远少于 400 个,面对社会、家庭等各方面压力,推迟生育计划的女性越来越多,由于卵巢功能低下导致的女性不孕呈上升趋势,生殖能力的保护显得越发重要^[1]。中医学认为肾为先天之本,主藏精,主生殖,与下丘脑-垂体-卵巢轴功能关系密切。左归丸是补肾的经典方剂,该方从补肾养精、滋阴养血入手,在妇科临床上用于治疗不孕、卵巢早衰等病症,具有改善卵巢轴的作用^[2]。本课题组通过前期的动物体内实验研究发现左归丸可下调促卵泡凋亡基因的表达,增强卵巢储备,对增龄小鼠卵巢具有明显保护作用(待发表)。本研究以小鼠生发泡(germinal vesicle, GV)期末成熟裸卵(denuded oocytes, DOs)为研究对象,将 GV 期 DOs 在左归丸含药血清的培养系

统中进行体外培养,观察左归丸含药血清对生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)和第一极体(the first polar body, PB1)排出的时效关系,探讨左归丸对卵母细胞核成熟的作用。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

左归丸方由熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶等组成。孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)购自宁波市三生药业有限公司;人输卵管液(Human tubal fluid, HTF, Quinn 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, sigma 公司);胚胎培养专用石蜡油(sigma, M8410)。

1.2 仪器

35mm 玻璃培养皿;体视显微镜;倒置显微镜;CO₂ 培养箱;超净工作台;灭菌手术器械(眼科剪、眼科镊、钟表镊);1ml 无

* 基金项目:湖南省教育厅资助项目(2009C727);湖南省科技厅博士后专项(2009RS3018)

作者简介:孙晓峰,女,博士,讲师,从事组胚学教研工作;研究方向:生殖内分泌

E-mail: sxf9@eyou.com

(收稿日期:2010-11-06 接受日期:2010-11-30)

菌注射器;玻璃吸卵管;滤器(0.22 μ m和0.8 μ m)。

1.3 动物

健康雌性 ICR 小鼠,6~8 周龄,体重 25~27g;性成熟健康雌性 SD 大鼠,体重 250~270g。均由湖南中医药大学实验动物中心提供,在本实验室饲养 1 周后用于实验。

1.4 含药血清制备

左归丸方药水煎浓缩成 2.15g/ml 的中药浸膏,根据成人与大鼠体表面积,换算成大鼠的用量,按照临床等效剂量的 5 倍给大鼠灌服,即按照 47.25g/(kg·d),每天分两次给大鼠灌服,连续 3d,于末次灌药后 1、1.5、2、2.5、3h 分别乙醚麻醉后腹主动脉采血,静置 30min,离心后,无菌分离血清,-20℃保存,实验前 56℃ 30min 灭活,0.22 μ m 滤器过滤后使用。并以未灌药大鼠血清作为正常血清组^[3]。

1.5 GV 期 DOs 的收集

小鼠腹腔注射 PMSG 10IU/只后 48h,脱颈处死小鼠,取双侧卵巢,见卵巢增大,表面见有许多大小不等的卵泡突出于卵巢表面,在体视显微镜下用 1ml 无菌注射器针头和钟表镊尽量去除卵巢周围的脂肪和结缔组织,放至无血清的 HTF 液中快速洗 3 遍,扎刺半透明卵泡,轻轻挤压,释放卵丘-卵母细胞复合物(cumulus-oocyte complex, COCs),轻轻吹打颗粒细胞使其散开,卵母细胞裸露,继续扎刺卵巢,释放卵母细胞,吸卵管吸取 GV 期 DOs 并移至平衡好的微滴中。

1.6 分组培养

未成熟卵母细胞采用微滴培养法,35mm 培养皿内制备 10 个微滴,10 μ l/滴,每 10ml 放置 10 个卵母细胞,覆盖胚胎培养专用石蜡油,培养前一天放至 CO₂ 培养箱中平衡过夜。以 HTF 液作为基础培养液,DOs 分为 7 组进行培养。对照组:基础培养液+10%胎牛血清;正常血清组:基础培养液+10%未灌药大鼠血清;1h 左归丸含药血清组:基础培养液+10% 1h 左归丸含药血清;1.5h 左归丸含药血清组:基础培养液+10% 1.5h 左归丸含药血清;2h 左归丸含药血清组:基础培养液+10% 2h 左归丸含药血清;2.5h 左归丸含药血清组:基础培养液+10% 2.5h 左归丸含药血清;3h 左归丸含药血清组:基础培养液+10% 3h 左归丸含药血清。在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 20h,观察不同时间卵母细胞的核成熟。

1.7 观察指标

本实验以 GVBD 作为减数分裂启动的标志,PB1 作为第一次减数分裂完成、卵母细胞核成熟的标志。分别在培养后的 2、4、6h 在倒置显微镜下观察 GV 期卵母细胞 GVBD 的情况,计算 GVBD 率;分别在培养后的 14、16、18、20h 观察 PB1 的排出,计算 PB1 排出率。本研究共重复 5 次实验,结果取 5 次实验的均值。

1.8 统计学处理

结果以($\bar{x} \pm S$)表示,采用 spss13.0 统计软件进行显著性检验。

2 结果

2.1 成功获取 GV 期卵母细胞

GV 期卵母细胞形态特征为卵母细胞中看到明显的细胞核(生发泡),核膜轮廓清楚,核仁明显,未见极体,即为 GV 期卵母细胞(见图 1)。

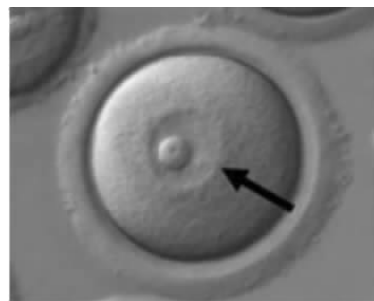


图 1 刚分离的未成熟 GV 期卵母细胞,(↑为细胞核),× 400

Fig.1 immature GV oocyte,(↑showing nucleus), × 400

2.2 左归丸对小鼠卵母细胞 GVBD 率(GVBD%)的影响

GVBD 的形态学特征为卵母细胞中生发泡(GV)消失,但未见第一极体释放(见图 2)。经体外培养后,各组及各时间段的卵母细胞 GVBD 排出率如表 1 所示,药物血清组卵母细胞 GVBD 的发生率高于正常血清组 and 对照组,2~2.5h 左归丸含药血清组培养后 4h 有极显著差异($P < 0.01$),1.5h 左归丸含药血清组培养后 4h 有显著性差异。



图 2 体外培养发生 GVBD 的卵母细胞,× 400

Fig.2 GVBD oocyte, × 400

2.3 左归丸对小鼠卵母细胞 PB1 率(PB1%)的影响

PB1 排出的形态学特征为卵母细胞内未见 GV,PB1 释放到卵周隙内(见图 3)。各组及各时间段的 PB1 的释放率如表 2 所示,药物血清组卵母细胞 PB1 的发生率高于正常血清组 and 对照组,2~2.5h 左归丸含药血清组培养后 4h 有极显著差异($P < 0.01$),1.5h 左归丸含药血清组培养后 4h 有显著性差异。

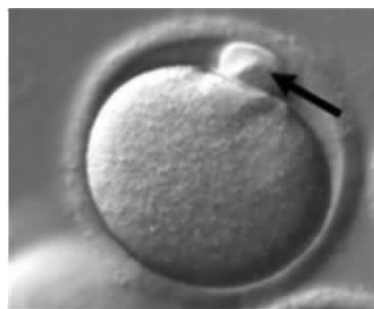


图 3 体外培养至 MII 卵母细胞,PB1 已释放(↑为第一极体),× 400

Fig.3 MII oocyte and released PB1,(↑showing PB1), × 400

3 讨论

卵母细胞的成熟是卵泡发育成熟的核心,卵泡是否继续发育在于卵母细胞是否能恢复减数分裂^[4-6]。已知哺乳动物卵母细

胞的成熟包括核成熟和胞质成熟。处于减数分裂第一次分裂前期(prophase I,PI)的卵母细胞浆内通常会看到GV。如果该卵母细胞恢复成熟分裂,GV就会破裂(GV break down,GVBD),卵母细胞进入第一次减数分裂中期(metaphase I,MI),MI期是一个过渡期,此时既观察不到GV,也没有PB1。此后卵母细胞进一步成熟就会进入减数分裂第二次分裂中期 (metaphase II, MII),释放出PB1,此时认为卵母细胞核已经达到成熟,并停留在此阶段等待受精^[7-10]。

表 1 实验小鼠卵母细胞体外培养 GVBD 的发生率($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The percentage of oocytes reached GVBD in the female mouse ($\bar{x} \pm s$)

Group	GV oocyte	Culture time and GVBD		
		2h(%)	4h(%)	6h(%)
Control group	139.20± 6.90	14.10± 1.61	68.30± 4.80	70.20± 4.86
Normal group	135.51± 5.13	15.21± 1.82	69.32± 5.10	73.36± 5.14
1h Zuoguiwan group	126.30± 7.10	15.80± 1.74	73.22± 4.61	74.10± 4.80
1.5h Zuoguiwan group	128.90± 4.92	15.90± 1.85	80.15± 5.12★※	82.27± 5.16
2h Zuoguiwan group	156.10± 5.10	17.30± 1.912	86.68± 4.10★★※※	86.70± 4.10
2.5h Zuoguiwan group	148.20± 6.20	17.40± 1.96	88.50± 4.30★★※※	88.90± 4.32
3h Zuoguiwan group	151.40± 5.22	17.20± 1.80	73.80± 4.69	74.00± 4.71

注:与对照组相比,★★为 P<0.01,★为 P<0.05;与空白组相比,※※为 P<0.01,※为 P<0.05
Note: Compared to the control group, ★★denote P<0.01, ★denote P<0.05; Compared to the black group, ※※denote P<0.01, ※denote P<0.05

表 2 实验小鼠卵母细胞体外培养 PB1 的释放率($\bar{x} \pm S$)
Table2 The percentage of oocytes reached PB1 in the female mouse ($\bar{x} \pm S$)

Group	GV oocyte	Culture time and PB1			
		14h(%)	16h(%)	18h(%)	20h(%)
Control group	139.20± 6.90	20.20± 1.90	26.10± 1.90	35.40± 2.30	37.60± 2.40
Normal group	135.51± 5.13	20.42± 1.63	26.20± 1.70	36.90± 2.20	37.60± 2.20
1h Zuoguiwan group	126.30± 7.10	21.65± 1.71	27.10± 1.82	38.10± 2.40	39.22± 2.46
1.5h Zuoguiwan group	128.90± 4.92	21.91± 1.74	27.10± 1.86	53.90± 2.14★※	54.26± 2.60
2h Zuoguiwan group	156.10± 5.10	23.14± 1.81	28.20± 1.82	65.60± 3.08★★※※	65.90± 3.15
2.5h Zuoguiwan group	148.20± 6.20	22.50± 1.80	28.50± 1.84	65.40± 2.89★★※※	65.50± 2.90
3h Zuoguiwan group	151.40± 5.22	21.80± 1.80	27.20± 2.50	43.88± 2.56	44.40± 3.10

注:与对照组相比,★★为 P<0.01,★为 P<0.05;与空白组相比,※※为 P<0.01,※为 P<0.05
Note: Compared to the control group, ★★denote P<0.01, ★denote P<0.05; Compared to the black group, ※※denote P<0.01, ※denote P<0.05

未成熟卵母细胞体外成熟(in vitro maturation,IVM)指获取未成熟卵母细胞进行体外培养至成熟的过程^[11,12]。该成熟的卵母细胞可以进行体外受精和胚胎移植(IVF-ET),最终获得妊娠^[13,14]。该项技术为排卵障碍性不孕症患者提供了新的治疗途径,临床应用前景十分广阔^[15,16],但是培养条件直接影响甚至调节卵母细胞的减数分裂,因而选择合理的适合未成熟卵母细胞成熟所必需的体外培养条件在IVM技术中至关重要^[17]。已有不少学者尝试在IVM基础培养基中添加多种生长因子促进IVM的成功,以求提高卵子的成熟质量^[18-20]。

中药含药血清药理研究方法是日本学者田代真一于1988年正式提出的,是指动物灌胃给予中药及制剂,经吸收入机体血液循环,在一定时间内采取血液,分离所得血清,必定含有一定的该药物成分,此时的血药浓度反映了机体的真实血药

浓度,以此血清加入到体外细胞培养体系,观察其药理作用的体外实验方法,同时也可分析测定血清中药物成分的含量^[9]。

现代药理研究认为左归丸能改善生殖内分泌、免疫功能,具有调节下丘脑-垂体-性腺轴作用。有报道,左归丸可以改善卵巢功能,延缓生殖轴的老年性变化^[2];左归丸可以改善小鼠卵巢免疫性炎症的损伤,从而保护卵巢功能^[21];左归丸可以改善卵细胞及胚卵发育阶段的微环境,包括促进输卵管上皮分泌而有利于胚胎的发育^[22]。本课题组通过前期的动物体内实验研究发现左归丸可下调促卵泡凋亡基因的表达,增强卵巢储备,对增龄小鼠卵巢具有明显保护作用(待发表),本研究采用血清药理学方法从体外途径探讨左归丸含药血清在IVM中对未成熟卵母细胞核成熟的作用,从而进一步探讨了左归丸对体外生殖的影响。

研究发现左归丸含药血清作为 IVM 培养基添加剂, 可以提高 GVBD 率和 PB1 率, 尤其以末次灌胃后 2~2.5h 药物血清效果最好, 左归丸具有促进未成熟卵母细胞体外核成熟的作用。不仅为有关卵子成熟机制的研究建立体外模式, 也为中药复方的药效学研究提供了依据。

参考文献(References)

- [1] 严杰, 乔杰. 生殖能力的保护和保存[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(10): 772-775
Yan Jie, Qiao jie. Fertility protection and preservation in female[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2010, 26(10): 772-775
- [2] 程彬彬, 朱玲, 李长征. 左归丸对雌性小鼠阴道模型生殖内分泌的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(13): 1362-1364
Cheng Bin-bin, Zhu ling, Li Chang-zheng, et al. Effect of Zuogui pill on reproductive endocrine of female Yin-deficiency mice[J]. Modern journal of integrated traditional chinese and western medicine, 2003, 12(13): 1362-1364
- [3] 陈奇. 中药药效研究思路与方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 30-34
Chen qi. Efficacy study on the traditional Chinese medicine [M], Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 30-34
- [4] Giovanni C, Raffaella S, Karla H, et al. Metaphase II karyoplast transfer from human in-vitro matured oocytes to enucleated mature oocytes[J]. Reproductive BioMedicine, 2009, 19(4): 514-520
- [5] Ekaterina V, Gary MW. The Regulation of Oocyte Maturation[J]. Developmental Biology, 2003, 58: 53-110
- [6] Lin YH, Huang JL. in Vitro Maturation of Human Oocytes [J]. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2006, 45(2): 95-99
- [7] Zbigniew P, Steffen H, Chizuko T. Oocyte nucleus controls progression through meiotic maturation [J]. Developmental Biology, 2005, 281(2): 184-195
- [8] Stephanie MN, Lynette G, Janis AGM, et al. Effects of in vitro maturation and age on oocyte quality in the rhesus macaque *Macaca mulatta* [J]. Fertility and Sterility, 2010, 93(5): 1591-1600
- [9] Steffen H, Chizuko T, Jacek ZK, et al. Germinal vesicle material drives meiotic cell cycle of mouse oocyte through the 3'UTR-dependent control of cyclin B1 synthesis [J]. Developmental Biology, 2006, 292(1): 46-54
- [10] Min KK, Yuda HF, Hyun JO, et al. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes[J]. Theriogenology, 2005, 63(5): 1342-1353
- [11] Curnow EC, Ryan JP, Douglas M, et al. Primate model of metaphase I oocyte in vitro maturation and the effects of a novel glutathione donor on maturation, fertilization, and blastocyst development [J]. Fertility and Sterility, 2010, 7, 1033-1038
- [12] Ali A, Benkhalifa M, Miron P. In-vitro maturation of oocytes: biological aspects[J]. Reproductive BioMedicine, 2006, 13(3): 437-446
- [13] Salhab M, Tosca L, Cabau C, et al. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion [J]. Theriogenology, 2011, 75(1): 90-104
- [14] Nagano M, Uchikura K, Takahashi Y, et al. Effect of duration of in vitro maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes[J]. Theriogenology, 2008, 69(2): 231-236
- [15] Benkhalifa M, Demirel A, Mé né zo Y, et al. Natural cycle IVF and oocyte in-vitro maturation in polycystic ovary syndrome: a collaborative prospective study [J]. Reproductive BioMedicine, 2009, 18(1): 29-36
- [16] Richard AA, Rosemary ALB, John G, et al. Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of human oocyte maturation and early embryo development [J]. Fertility and Sterility, 2010, 93(5): 1394-1406
- [17] Atsushi T, Motoi N, Shoichiro A, et al. Metaphase II karyoplast transfer from human in-vitro matured oocytes to enucleated mature oocytes[J]. Reproductive BioMedicine, 2009, 19(4), Pages 514-520
- [18] Hazout A, Junca AM, Mé né zo Y, et al. Effect of growth hormone on oocyte competence in patients with multiple IVF failures [J]. Reproductive BioMedicine, 2009, 18(5): 664-670
- [19] Christopikou D, Karamalegos C, Doriza S, et al. Spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro in two different culture media [J]. Reproductive BioMedicine, 2010, 20(5): 639-648
- [20] Barbara M, Eleonora I, Daniele Z, et al. Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. Theriogenology, 2005, 63(7): 2032-2039
- [21] 朱玲, 罗颂平, 许丽绵, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰 Fas、Fas-L 表达的影响[J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(1): 52-55
Zhu ling, Luo Song-ping, Xu Li-jin, et al. Effects of Zuogui pill on expression of Fas/FasL protein in ovaries of immune premature ovarian failure mice [J]. Journal of jiangxi university of traditional chinese medicine, 2008, 20(1): 52-55
- [22] 冯前进, 冯玛丽, 王玉良等. 补肾方剂左归丸对小鼠早期胚胎发育的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(11): 673-675
Feng Qian-jin, Feng ma-li, Wang Yu-liang, et al. Effect of Zuoguiwan on early embryonic development of mice [J]. Chinese journal of integrated traditional and western medicine, 1996, 16(11): 673-675