

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.15.012

实验研究

补肾调经方对重复控制性卵巢刺激模型小鼠
囊胚细胞凋亡及内质网应激的影响熊文艳¹, 史蓓蓓¹, 申路路¹, 杜惠兰^{1,2}✉

1. 河北中医药大学中西医结合学院, 河北省石家庄市桥西区新石南路326号, 050200; 2. 河北省中西医结合生殖疾病协同创新中心

[摘要] 目的 探讨补肾调经方对重复控制性卵巢刺激(COS)早期胚胎质量的影响及其可能作用机制。方法 150只ICR雌性小鼠随机分为正常组、模型组、抑制剂组和补肾调经方低、高剂量组,每组30只。正常组、抑制剂组和模型组小鼠每日以蒸馏水0.25 ml灌胃,补肾调经方低、高剂量组分别给予补肾调经方25.6、51.2 g/(kg·d)灌胃,均每日灌胃1次,持续13天为1个周期。正常组小鼠于灌胃第11天腹腔注射生理盐水0.1 ml,其余4组小鼠建立COS模型,抑制剂组在造模前1 h注射内质网应激抑制剂4-苯基丁酸0.2 ml。各组灌胃及腹腔注射连续3个周期,每个周期间隔4天。各组小鼠均于第3次腹腔注射后立即与同品系雄鼠以2:1的比例合笼,次日8:00检查阴栓,见栓或阴道涂片见精子者记为妊娠。于妊娠第4天下午处死小鼠,倒置显微镜下获取囊胚,观察囊胚形态并记录总囊胚数、优质囊胚数,计算优质囊胚率;Tunel法检测囊胚细胞凋亡情况,计算细胞凋亡率;免疫荧光法及RT-qPCR法分别检测内质网分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶12(Caspase-12)蛋白荧光信号强度及其mRNA表达。结果 正常组囊胚形态规整,形态发育好,碎片率少;模型组囊胚发育较差,细胞形态不规则,碎片率高,有部分停滞;抑制剂组及补肾调经方高、低剂量组可见细胞形态发育较好,形态较规则,碎片率较少。与正常组比较,模型组优质囊胚率降低,囊胚细胞凋亡率升高,囊胚中GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax蛋白荧光信号强度及其mRNA表达升高,Bcl-2蛋白荧光信号强度及其mRNA降低($P<0.01$)。与模型组比较,抑制剂组及补肾调经方高、低剂量组优质囊胚率升高,囊胚细胞凋亡率降低,囊胚中GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax蛋白荧光信号强度及其mRNA表达降低,Bcl-2蛋白荧光信号强度及其mRNA表达升高($P<0.01$)。与抑制剂组比较,补肾调经方高剂量组GRP78、CHOP、Caspase-12、Bax蛋白荧光信号强度及其mRNA表达升高,补肾调经方低剂量组Caspase-12、Caspase-3、Bax蛋白荧光信号强度及其mRNA表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 补肾调经方可能通过改善内质网应激,抑制重复控制性卵巢刺激导致的囊胚细胞凋亡,以发挥提高早期胚胎质量的作用。

[关键词] 不孕症;重复控制性卵巢刺激;囊胚;内质网应激;细胞凋亡;补肾调经方

不孕症是指育龄期女性在至少有一年规律性生活且未采取避孕手段的条件下而未临床妊娠,属于妇科常见的疑难杂症之一^[1]。体外受精-胚胎移植技术(invitro fertilization embryo transfer, IVF-ET)作为当前辅助生殖技术最主要且有效的手段之一,可明显提高不孕不育症患者的妊娠率,但临床中小

于35岁的患者,每个IVF-ET周期后仅有约33.1%的活产率,所以重复控制性卵巢刺激(repeated controlled ovarian stimulation, COS)是IVF-ET中必不可少的环节^[2]。解决COS引起的卵母细胞、胚胎质量下降和卵巢损伤是提高临床妊娠率的关键^[3-4]。

中医药在解决IVF-ET内膜容受性的问题上有着独特认识 and 治疗方法^[5],且疗效肯定^[6]。补肾调

基金项目:国家自然科学基金(82074486)

✉ 通讯作者:duhuilan@163.com

经方是由五子衍宗丸和养精种玉汤加减而成,具有补肾气、益精血之功。课题组前期研究证明,补肾调经方可提高 COS 患者的胚胎质量及临床妊娠率,改善妊娠结局^[7-8]。现代研究显示,在卵母细胞成熟和植入前胚胎发育过程中,内质网参与提供广泛的蛋白质合成、折叠、成熟,然而未折叠或错误折叠的蛋白质也可以通过激活内质网相关降解的蛋白酶体清除^[9]。抑制内质网应激可改善卵母细胞成熟和早期胚胎发育^[10-11],表明内质网应激/稳态可能是卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中的重要机制。本研究拟观察补肾调经方对 COS 模型小鼠囊胚细胞内质网应激及凋亡途径的影响,进一步探讨补肾调经方提高早期胚胎质量的可能机制。本实验经河北中医药大学伦理委员会审查批准,批件编号为 DWLL2020032。

1 材料与方法

1.1 动物

选取健康 SPF 级雌性 ICR 小鼠 150 只,4~5 周龄,平均体质量(25±3)g;同品系雄性小鼠 120 只,8~10 周龄,平均体质量(28±3)g。实验动物均来源于斯贝福生物技术股份有限公司,实验动物许可证号为 SYXK(辽)2020-0001。实验小鼠均于河北中医药大学实验动物中心屏障环境内饲养,温度 20~26℃,相对湿度 40%~50%,12 h 明暗交替周期,动物可自由获得食物及饮用水。

1.2 药物

补肾调经方组成:熟地黄 20 g,菟丝子 12 g,紫河车 10 g,山萸肉 15 g,淫羊藿 10 g,枸杞子 12 g,当归 9 g,山药 12 g,白芍 9 g,香附 6 g,覆盆子 10 g,女贞子 9 g。中药饮片均采购自石家庄市乐仁堂制药有限责任公司。常规水煎浓缩、离心,制备成高剂量浓度含生药 5.4 g/ml、低剂量浓度含生药 2.7 g/ml 的水煎液,于 4℃密封保存。

1.3 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素(PMSG,1000 IU/支,批号:110204564),杭州动物药品厂;人绒毛膜促性腺激素(hCG,1000 IU/支,批号:110251282),宁波第二激素厂;4-苯基丁酸(4-PBA,5 g/支,批号:HY-A0281),MedChemExpress 公司;葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 抗体(批号:ab2168)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 抗体(批号:ab196495),Abcam 公司;Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(批号:WL01637)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

(Caspase-3) 抗体(批号:WL01992)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)抗体(批号:WL00880),万类生物科技公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12(Caspase-12)抗体(批号:YT0654),Immunoway 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,批号:S2110),Solarbio 公司;曲拉通 X-100(Triton X-100,批号:GC204003),Servicebio 公司;PicoPure RNA 分离试剂盒(批号:KIT0204),Applied Biosystems 公司;Tunel 凋亡检测试剂盒(批号:KTB1970),亚科因生物科技有限公司;逆转录试剂盒(批号:E047-01A),苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;2×SYBR Green qPCR Master Mix(批号:G3321-01),武汉塞维尔生物科技有限公司。

Nikon SMZ18 型体视显微镜,日本 Nikon 公司;BX51T-PHD-J11 型倒置显微镜,日本 Olympus 公司;7500 Fast 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 Thermo Scientific 公司;EVOS FL Auto 型全自动活细胞显微成像分析系统,美国 Thermo Fisher 公司。

1.4 分组及干预方法

雌性 ICR 小鼠经过 7 天的适应性喂养后,于每日 10:00 通过阴道细胞学观察小鼠的动情周期,连续观察 1 周。随后采用随机数字表法将小鼠分为正常组、模型组、抑制剂组、补肾调经方高剂量组和补肾调经方低剂量组,每组 30 只。正常组、抑制剂组和模型组小鼠每日 9:00 以蒸馏水 0.25 ml 灌胃。参照《动物与人之间剂量转换的简单实践指南》^[12],得出补肾调经方低剂量组给药 25.6 g/(kg·d),补肾调经方高剂量组给药 51.2 g/(kg·d),低、高剂量分别相当于临床给药剂量的 10、20 倍。各组均每日灌胃 1 次,持续 13 天为 1 个周期。

正常组小鼠于灌胃第 11 天 16:00 腹腔注射生理盐水 0.1 ml,其余 4 组小鼠同时间参考文献^[13]造模方法进行造模。腹腔注射 PMSG 10 IU,48 h 后腹腔注射 hCG 10 IU,抑制剂组于每次注射 PMSG 及 hCG 前 1 h 注射内质网应激抑制剂 4-PBA 0.2 ml。各组灌胃及腹腔注射连续 3 个周期,每个周期间隔 4 天。各组小鼠均于第 3 次腹腔注射 hCG 后立即与同品系雄鼠以 2:1 的比例合笼。第 2 天 8:00 检查阴栓,见栓或阴道涂片见精子者标记为妊娠。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 获取囊胚并观察囊胚形态 妊娠小鼠在第 3 次腹腔注射 hCG 后 96 h 被处死,迅速取出子宫及附件,使用 1 ml 注射器在体视显微镜下划开双侧子

宫角，吸取 PBS 从子宫中冲出囊胚，重复冲洗 3 次。在倒置显微镜下观察并收集囊胚，同时进行显微镜拍照记录，观察囊胚形态。

1.5.2 优质囊胚计数 采用随机数字表法每组选取 10 只小鼠，记录总囊胚数。采用 Gardner 评分系统^[14]，将囊胚按照其腔的扩张程度分为 6 期：1 期囊胚是指早期有腔室囊胚 / 囊腔 < 1/2 的胚胎总体积；2 期囊胚是指 1/2 的胚胎总体积 ≤ 囊胚腔；3 期囊胚是指完全扩张的囊胚，其腔完全占据整个胚胎的空间；4 期囊胚是指其腔体积较完全扩张时更大，透明带变薄；5 期囊胚是指滋养层细胞开始从透明带中逸出；6 期囊胚是指孵出的囊胚，其完全从透明带中孵出。对处于 3~6 期的囊胚结合内细胞团 (ICM) 和滋养层细胞 (TE) 进行质量分级。根据 ICM/TE 发育情况将囊胚分为 A、B、C 三级^[14]：A 级表示细胞数目多且结构紧密；B 级表示细胞数目较少且分布较松散；C 级表示细胞数目极少甚至难以辨认，结构非常松散。评分 A 或 B 级为优质囊胚，并进行计数。计算优质囊胚率 = 优质囊胚数 / 总囊胚数 × 100%。

1.5.3 Tunel 法检测囊胚细胞凋亡情况 各组剩余小鼠均收集囊胚，每组选取囊胚 6 个置于 PBS 中清洗，3% Triton X-100 (PBS 配置) 通透 10 min，PBS 清洗后，在平衡缓冲液中孵育 1 h，再次 PBS 清洗，用 DAPI 封片，通过全自动活细胞显微成像分析系统观察，利用 Image J 29.0 软件统计细胞数，计算囊胚细胞凋亡率 = 凋亡囊胚细胞数 / 囊胚细胞总数 × 100%。

1.5.4 免疫荧光法检测 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白水平情况 在倒置显微镜下收集每组囊胚 10 个，随后用 PBS 反复清洗，清洗干净后将其置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min。接着在 1% Triton X-100 (由 PBS 配置) 中通透 15 min，用 PBS 清洗 3 次。用 10% 山羊血清封闭样本，于 37 °C 孵育 10 min。将细胞转移至一抗中，在 4 °C 下孵育过夜，一抗包括 GRP78 (1 : 300)、CHOP (1 : 100)、Caspase-12 (1 : 300)、Caspase-3 (1 : 300)、Bcl-2 (1 : 300)、Bax (1 : 100)。次日，在室温下平衡 1 h 后用 PBS 清洗，然后将荧光二抗 (1 : 300) 在 37 °C 避光条件下孵育 1 h。清洗后将细胞置于载玻片上，用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片。待细胞核染色完全后，在由 EVOS FL Auto 型全自动

活细胞显微成像分析系统下进行观察。最后，使用 Image J 29.0 软件分析荧光信号强度。

1.5.5 RT-qPCR 法检测囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA 表达 每组选取 40 枚囊胚，按照 PicoPure RNA 分离试剂盒说明书的步骤提取总 RNA，并测定 RNA 纯度。将其逆转录成 cDNA 后，短期保存在 -20 °C，长期保存在 -80 °C。根据 2×SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒的说明书，以 GAPDH 为内参，加入 PCR 扩增反应体系，设定 PCR 反应程序。获取各目的基因的 CT 值后进行分析。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成，引物序列见表 1。

表 1 小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax 引物序列

Table 1 Primer sequence of GRP78, CHOP, Caspase-12, Caspase-3, Bcl-2, and Bax in blastocysts of mice

基因	引物序列	平均长度/bp
GAPDH	上游: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	
GRP78	上游: TGTGTGTGAGACCAGAACCG	222
	下游: TAGTGGTCCCCAAGTCGAT	
CHOP	上游: CCAGGAAACGAAGAGGAAGAAT	206
	下游: CACTGACCACTCTGTTTCCGTTT	
Caspase-12	上游: ATATTTCTTGAAGGTAGGCAAGAC	125
	下游: CTCAAATGAGTGTTGAACCTTTTCG	
Caspase-3	上游: AGCACCTGGTTACTATTCTGCAG	191
	下游: GGATCTGTTTCTTTGCCGTGGA	
Bcl-2	上游: TGACTTCTCTCGTCGCTACCGT	112
	下游: CCTGAAGAGTTCCTCCACCACC	
Bax	上游: GCCTTTTGTCTACAGGGTTTCAT	151
	下游: TATTGCTGTCCAGTTCATCTCCA	

注: GRP78, 葡萄糖调节蛋白 78; CHOP, C/EBP 同源蛋白; Caspase-12, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12; Caspase-3, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; Bcl-2, B 细胞淋巴瘤 2; Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白。

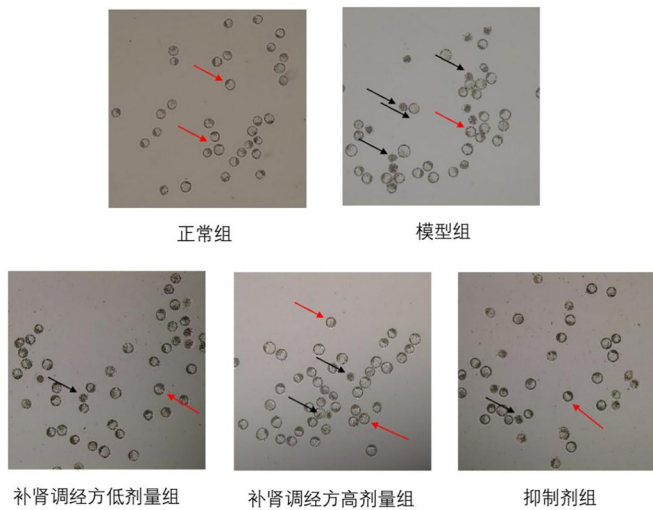
1.6 统计学方法

采用 SPSS 29.0 和 GraphPad Prism 10.0 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述，若方差齐，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用 LSD 检验；方差不齐时选择 Kruskal-Wallis 检验，两两比较用 Bonferroni 法。计数资料用例 (%) 表示，多组间比较使用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的囊胚形态比较

图 1 示, 正常组囊胚形态规则, 形态发育好, 碎片率少; 模型组囊胚发育较差, 细胞形态不规则, 碎片率高, 有部分停滞; 抑制剂组及补肾调经方高、低剂量组细胞形态发育较好, 形态较规则, 碎片率较少。



注: 红色箭头指示为优质囊胚; 黑色箭头指示为劣质胚胎。

图 1 各组小鼠囊胚形态图 (×100)

Figure 1 Morphology of blastocysts in each group of mice (×100)

2.2 各组小鼠总囊胚数、优质囊胚数、优质囊胚率比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组优质囊胚率降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补肾调经方高、低剂量组及抑制剂组优质囊胚率升高 ($P<0.01$); 补肾调经方高、低剂量组间比较, 优质囊胚率差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与抑制剂组比较, 补肾调经方高、低剂量组优质囊胚率降低 ($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠总囊胚数、优质囊胚数、优质囊胚率比较

Table 2 Comparison of of total number of blastocysts, number of good quality blastocysts and rate of good quality blastocysts in each group of mice

组别	鼠数	总囊胚数/个	优质囊胚数/个	优质囊胚率/%
正常组	10	102	96	94.12
模型组	10	278	204	73.38 ^{a)}
补肾调经方低剂量组	10	235	198	84.26 ^{b) c)}
补肾调经方高剂量组	10	224	187	83.48 ^{b) c)}
抑制剂组	10	263	229	87.07 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与抑制剂组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组小鼠囊胚细胞凋亡率比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组囊胚细胞凋亡率升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补肾调经方高、低剂量组和抑制剂组囊胚细胞凋亡率降低 ($P<0.01$); 与抑制剂组比较, 补肾调经方高、低剂量组囊胚细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)。

表 3 各组小鼠囊胚细胞凋亡率比较

Table 3 Comparison of apoptosis rate of blastocyst cells of mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	囊胚数	囊胚细胞凋亡率
正常组	6	0.67±1.03
模型组	6	7.83±5.91 ^{a)}
补肾调经方低剂量组	6	3.67±4.23 ^{b) c)}
补肾调经方高剂量组	6	3.83±2.32 ^{b) c)}
抑制剂组	6	2.50±2.81 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与抑制剂组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白荧光信号强度比较

免疫荧光染色显示, CHOP、Bcl-2 蛋白表达在细胞核内, 其余指标蛋白均表达在细胞质内。表 4 示, 与正常组比较, 模型组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax 蛋白荧光信号强度升高, 而 Bcl-2 蛋白荧光信号强度降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 补肾调经方高、低剂量和抑制剂组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax 蛋白荧光信号强度降低, Bcl-2 蛋白荧光信号强度升高 ($P<0.01$)。与抑制剂组比较, 补肾调经方高、低剂量组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax 蛋白荧光信号强度升高, Bcl-2 蛋白荧光信号强度降低 ($P<0.01$)。各组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白免疫荧光图见图 2。

2.5 各组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA 表达比较

表 5 示, 与正常组比较, 模型组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax mRNA 表达升高, 而 Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 补肾调经方高、低剂量组和抑制剂组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax mRNA 表达降低, Bcl-2 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与抑制剂组比较, 补肾调经方低剂量组 Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA 表达升高, 补肾调经方高剂量组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Bax mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

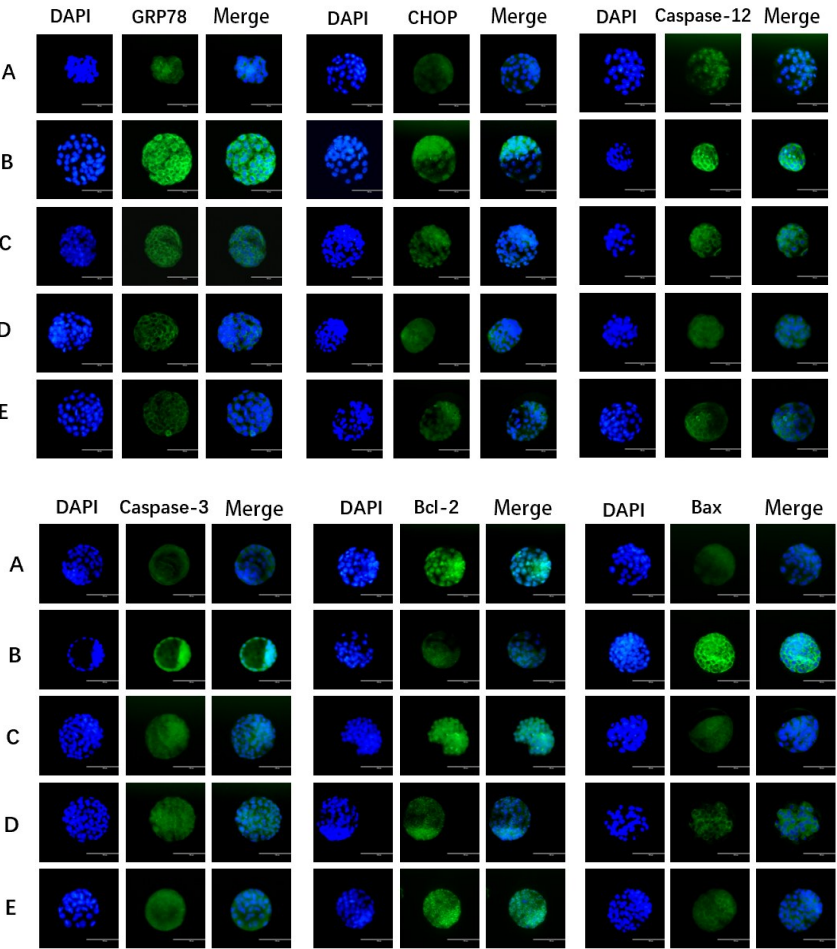
表 4 各组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白荧光信号强度比较

Table 4 Comparison of GRP78, CHOP, Caspase-12, Caspase-3, Bcl-2, and Bax protein levels in blastocysts of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	囊胚数	GRP78	CHOP	Caspase-12	Caspase-3	Bcl-2	Bax
正常组	10	1.00±0.25	1.00±0.47	1.00±0.02	1.00±0.44	1.00±0.26	1.00±0.43
模型组	10	3.52±0.45 ^{a)}	1.90±0.22 ^{a)}	3.90±0.46 ^{a)}	3.08±0.70 ^{a)}	0.33±0.53 ^{a)}	3.09±0.31 ^{a)}
补肾调经方低剂量组	10	1.42±0.20 ^{b) c)}	1.24±0.23 ^{b) c)}	1.43±0.33 ^{b) c)}	1.15±0.63 ^{b) c)}	0.81±0.39 ^{b) c)}	1.35±0.21 ^{b) c)}
补肾调经方高剂量组	10	1.38±0.43 ^{b) c)}	1.26±0.50 ^{b) c)}	1.41±0.11 ^{b) c)}	1.18±0.28 ^{b) c)}	0.83±0.25 ^{b) c)}	1.25±0.17 ^{b) c)}
抑制剂组	10	1.00±0.43 ^{b)}	1.04±0.16 ^{b)}	1.06±0.17 ^{b)}	1.07±0.31 ^{b)}	0.97±0.30 ^{b)}	1.00±0.40 ^{b)}

注：GRP78，葡萄糖调节蛋白 78；CHOP，C/EBP 同源蛋白；Caspase-12，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与抑制剂组比较， $P<0.01$ 。



注：GRP78，葡萄糖调节蛋白 78；CHOP，C/EBP 同源蛋白；Caspase-12，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白；A，正常组；B，模型组；C，补肾调经方低剂量组；D，补肾调经方高剂量组；E，抑制剂组。

图 2 各组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白免疫荧光图 (×400)

Figure 2 Immunofluorescence of GRP78, CHOP, Caspase-12, Caspase-3, Bcl-2, and Bax proteins in blastocysts of mice in each group (×400)

表 5 各组小鼠囊胚中 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of GRP78, CHOP, Caspase-12, Caspase-3, Bcl-2, and Bax mRNA expression in blastocysts of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	囊胚数	GRP78	CHOP	Caspase-12	Caspase-3	Bcl-2	Bax
正常组	40	1.00±0.05	1.00±0.01	1.00±0.05	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.02
模型组	40	4.56±0.14 ^{a)}	3.62±0.11 ^{a)}	3.90±0.07 ^{a)}	3.79±0.11 ^{a)}	0.16±0.02 ^{a)}	5.69±0.14 ^{a)}
补肾调经方低剂量组	40	1.43±0.12 ^{b)}	1.26±0.14 ^{b)}	1.77±0.21 ^{b) d)}	1.65±0.09 ^{b) d)}	2.51±0.42 ^{b) d)}	2.03±0.03 ^{b) d)}
补肾调经方高剂量组	40	1.70±0.12 ^{b) c)}	1.45±0.01 ^{b) c)}	1.47±0.02 ^{b) c)}	1.47±0.04 ^{b)}	1.96±0.12 ^{b)}	2.16±0.04 ^{b) d)}
抑制剂组	40	1.35±0.05 ^{b)}	1.15±0.02 ^{b)}	1.18±0.02 ^{b)}	1.34±0.04 ^{b)}	1.51±0.09 ^{b)}	1.24±0.01 ^{b)}

注：GRP78，葡萄糖调节蛋白 78；CHOP，C/EBP 同源蛋白；Caspase-12，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与抑制剂组比较， $P<0.05$ ；d) 与抑制剂组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

近年来，IVF-ET 为不孕症患者提供了有效的解决方案，但临床数据表明，IVF-ET 中首次成功妊娠率约为 30%^[15]，所以临床中多采用 COS 获得多个成熟卵子，以增加成功受孕率和获得可用于移植的优质胚胎的可能。国外研究发现，增加 COS 次数，患者会出现卵巢反应性降低的情况，表现为获卵数减少、活胚胎计数率及囊胚形成率下降^[16-17]。中医理论认为，在 COS 过程中，运用药物刺激促进卵泡发育和排卵，会过度消耗肾精，从而导致肾精与肾气的亏虚^[18]。在肾气盛、任通冲盛的条件下，男精女卵相合，方可媾成胎孕。基于肾主生殖理论，本团队运用补肾调经法治疗多种类型不孕症，在提高胚胎质量、改善妊娠结局方面均取得成效^[7-8]。补肾调经方中熟地黄具有滋肾水、封填骨髓、利血脉、补益真阴，为君药。紫河车、淫羊藿、菟丝子温肾补精，益气养血；山茱萸、女贞子、枸杞子滋养肝肾二阴；山药、覆盆子补肾涩精，固护正气，共为臣药。白芍、当归、香附养血活血，共为佐使。诸药合用，共奏补益肝肾气血、调理冲任之功。

胚胎质量评估是辅助生殖的关键环节，在临床中筛选出优质胚胎后进行移植可显著提高着床率、妊娠率和活产率等^[19]。卵裂期胚胎观察指标主要包括细胞数目、细胞形状和大小的均匀程度及碎片情况等^[20]。囊胚期胚胎除关注胚胎的整体形态外，还需观察囊胚腔的扩张程度，根据 Gardner 评分系统^[14]筛选优质胚胎，在移植中具有较高的成功率。既往研究已经证实，COS 可能使卵母细胞质量下降，导致受精后胚胎卵裂速度异常，卵裂球分裂不同步现象增多，出现卵裂速度减慢或加快的情況^[21]，受精卵能够成功发育到囊胚阶段的胚胎比

例下降，囊胚形成率显著降低^[22]。本研究结果显示，模型组获取囊胚总数较正常组增加，但其优质囊胚率显著下降，囊胚细胞形态不规则，碎片率高。但给予内质网抑制剂 4-PBA 或补肾调经方高、低剂量进行干预后，虽然囊胚总数与模型组比较差异无统计学意义，但优质囊胚率显著提高，囊胚形态基本正常，其中补肾调经方高、低剂量组优质囊胚率低于抑制剂组。由此可知，COS 可获得更多的囊胚，但其胚胎质量却显著下降，抑制内质网应激和补肾调经方干预后，改善了 COS 对胚胎造成的不良影响，且补肾调经方的可能作用机制是通过调控内质网应激而实现的。

细胞凋亡作为一种程序性细胞死亡方式，对胚胎的正常发育起着至关重要的作用^[23]。适量的细胞凋亡有助于清除胚胎中受损或异常的细胞，维持胚胎细胞群体的质量和平衡^[24]，但当细胞凋亡异常增加时，会导致胚胎细胞数量减少、发育阻滞甚至胚胎死亡，严重影响辅助生殖的成功率和妊娠结局^[25]。研究显示，内质网作为细胞凋亡的关键细胞器，其改变与体外胚胎细胞的自噬及凋亡息息相关^[26]。当内质网应激发生时，Caspase-12 活化从而激活包括 Caspase-3 在内的整个 Caspase 级联反应，引发细胞凋亡^[27]。CHOP 作为一种促凋亡转录因子，其表达上调后，通过多种机制促进细胞凋亡，CHOP 可以直接上调促凋亡蛋白 Bax 的表达，同时下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达，导致线粒体膜通透性增加，细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质中，激活 Caspase-9，进而激活 Caspase-3，引发细胞凋亡^[28]。GRP78 是内质网中重要分子伴侣，其表达水平与胚胎发育密切相关^[29]。在受精卵早期分裂阶段 GRP78 高表达，可识别并结合新合成的多肽链，帮助多肽链的正确折叠、组装和转运，防止蛋白质聚集和错误折叠，确保蛋白质在细胞内的正常加工和成熟，

为受精卵提供物质基础^[30]。另外, GRP78 作为内质网应激的关键调节因子, 能够通过激活未折叠蛋白反应来缓解内质网应激, 保护胚胎细胞免受内质网应激引起的损伤, 维持胚胎细胞的正常功能和存活^[31]。本研究结果发现, 模型组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax 蛋白水平及 mRNA 表达均升高, Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达降低, 囊胚细胞凋亡率升高, 提示囊胚细胞内质网应激的发生, 且促进了细胞凋亡。内质网抑制剂和补肾调经方低、高剂量干预后, 上述指标蛋白水平及 mRNA 表达均有不同程度改善, 但补肾调经方低、高剂量组 GRP78、CHOP、Caspase-12、Caspase-3、Bax 蛋白水平及 *Caspase-12*、*Bax* mRNA 表达改善效果不如抑制剂组, 这可能与中药复方可作用于多个靶点, 而抑制剂专一性更强有关; 或因药物口服吸收较差、首过效应显著, 而抑制剂通过注射给药直接达靶器官, 效果更佳, 具体原因需进一步研究。

综上所述, 补肾调经方可能通过减少内质网应激的发生, 从而降低早期胚胎细胞凋亡, 提高优质胚胎的数量。但目前关于囊胚中内质网应激的具体信号通路及分子调控机制尚未完全阐明, 未来需深入探究囊胚细胞内质网应激的调控机制, 进一步明确补肾调经方潜在的分子作用靶点与机制, 为其临床应用提供更坚实的实验依据。

参考文献

- [1] STARC A, TRAMPUŠ M, PAVAN JUKIĆ D, et al. Infertility and sexual dysfunctions: a systematic literature review [J]. *Acta Clin Croat*, 2019, 58(3): 508–515.
- [2] 中华医学会生殖医学分会. 中国高龄不孕女性辅助生殖临床实践指南 [J]. *中国循证医学杂志*, 2019, 19(3): 253–270.
- [3] LIU B, WANG JL, WANG XM, et al. Reparative effects of lycium barbarum polysaccharide on mouse ovarian injuries induced by repeated superovulation [J]. *Theriogenology*, 2020, 145: 115–125. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.048.
- [4] TANG SB, YANG LL, ZHANG TT, et al. Multiple superovulations alter histone modifications in mouse early embryos [J]. *Reproduction*, 2019, 157(6): 511–523.
- [5] 王策, 黎小斌. 中药分期治疗在体外受精-胚胎移植控制性超促排卵方案中的应用 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(2): 219–223.
- [6] 刘达, 陈慧心. 中医药改善 IVF-ET 患者子宫内膜容受性低下研究进展 [J]. *光明中医*, 2025, 40(2): 400–403.
- [7] 曹玉聪. 补肾法改善重复 COS 患者卵巢颗粒细胞氧化

- 应激和临床妊娠结局的研究 [D]. 石家庄: 河北中医药大学, 2021.
- [8] MA YC, HAO GM, ZHAO ZM, et al. Effects of Bushen-Tiaojing-Fang on the pregnancy outcomes of infertile patients with repeated controlled ovarian stimulation [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15233.
- [9] GUZEL E, ARLIER S, GUZELOGLU-KAYISLI O, et al. Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 792.
- [10] LIN T, LEE JE, OQANI RK, et al. Delayed blastocyst formation or an extra day culture increases apoptosis in pig blastocysts [J]. *Anim Reprod Sci*, 2017, 185: 128–139. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.012.
- [11] ZHANG JY, DIAO YF, KIM HR, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40433.
- [12] NAIR AB, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27–31.
- [13] VAN BLERKOM J, DAVIS P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(4): 757–764.
- [14] GARDNER DK, LANE M, STEVENS J, et al. Reprint of: blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer [J]. *Fertil Steril*, 2019, 112(4 Suppl1): e81–e84.
- [15] TOFTAGER M, BOGSTAD J, LØSSL K, et al. Cumulative live birth rates after one ART cycle including all subsequent frozen-thaw cycles in 1050 women: secondary outcome of an RCT comparing GnRH-antagonist and GnRH-agonist protocols [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(3): 556–567.
- [16] SERNA J, GARCÍA-VELASCO JA. Effect of repeated assisted reproduction techniques on the ovarian response [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2005, 17(3): 233–236.
- [17] YARKINER Z, BOYNUKALIN FK, COBAN Ö. Assessment of repetitive controlled ovarian stimulation (COS) cycles on oocyte donors: impact on oocyte quality and viable embryo yield [J]. *Reprod Sci*, 2024, 31(9): 2615–2624.
- [18] 郑霞, 陆华. 从不孕探讨“肾主生殖”理论的临床研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(12): 2676–2678.
- [19] GLUJOVSKY D, QUINTEIRO RETAMAR AM, ALVAREZ SEDO CR, et al. Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology [J].

- Cochrane Database Syst Rev, 2022, 5(5): Cd002118.
- [20]王慧, 刘帅, 梁云浩, 等. 不同质量卵裂期胚胎发育至囊胚能力的研究[J]. 广州医药, 2021, 52(1): 53-58.
- [21]赵颖, 章勤, 陈众芳, 等. 反复超促排卵对老龄模型小鼠生殖能力的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2022, 32(12): 1096-1100, 1105.
- [22]袁静. 辅助生殖助孕女性妊娠期合并SCH的影响因素及预测模型的构建[D]. 十堰:湖北医药学院, 2024.
- [23]栾静云, 徐鹏飞. 细胞程序性死亡与脊椎动物胚胎发育综述[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2023, 49(2): 213-228.
- [24]刘涛, 李向臣, 赵倩君, 等. 应激诱导对体外培养早期胚胎细胞凋亡的影响[J]. 生物技术通报, 2011, 27(3): 54-58.
- [25]HAOUZI D, HAMAMAH S. Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF) [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(15): 1905-1916.
- [26]TAN J, LIU Y, LI W, et al. Lumpy skin disease virus infection activates autophagy and endoplasmic reticulum stress-related cell apoptosis in primary bovine embryonic fibroblast cells [J]. Microorganisms, 2023, 11(8):1883.
- [27]吴瑜婷, 郑雨彤, 石惠萍, 等. 内质网应激诱导细胞类凋亡的机制研究进展[J]. 台州学院学报, 2024, 46(3): 63-71.
- [28]MARCINIAK SJ, CHAMBERS JE, RON D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(2): 115-140.
- [29]HEO G, LEE SH, KIM JD, et al. GRP78 acts as a cAMP/PKA signaling modulator through the MC4R pathway in porcine embryonic development [J]. FaseB J, 2023, 37(12): e23274.
- [30]AUDOUARD C, LE MASSON F, CHARRY C, et al. Oocyte-targeted deletion reveals that hsp90b1 is needed for the completion of first mitosis in mouse zygotes [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17109.
- [31]SHI SM, HU B, CHI ZC, et al. Role of MFN2 in bovine embryonic development and the mitigation of ER stress [J]. Anim Reprod Sci, 2025, 273: 107664. doi: 10.1016/j.anireprosci. 2024. 107664.

Effects of *Bushen Tiaojing Formula* (补肾调经方) on Blastocyst Cell Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress in Repeated Controlled Ovarian Stimulation Model Mice

XIONG Wenyan¹, SHI Beibei¹, SHEN Lulu¹, DU Huilan^{1,2}

1. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050200;

2. Collaborative Innovation Center for Reproductive Diseases of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Hebei Province

ABSTRACT Objective To explore the effects of *Bushen Tiaojing Formula* (补肾调经方) on the quality of early embryos in repeated controlled ovarian stimulation (COS) and its possible mechanism. **Methods** A total of 150 ICR female mice were divided into a normal group, a model group, an inhibitor group, a low-dose and a high-dose *Bushen Tiaojing Formula* group. Mice in the normal group, inhibitor group and model group were gavaged with distilled water 0.25 ml a day, and mice in the low- and high-dose groups were given 25.6 and 51.2 g/(kg·d) of *Bushen Tiaojing Formula*, respectively. All groups were gavaged once a day for 13 days as a cycle. Mice in the normal group were injected intraperitoneally with 0.1 ml normal saline on the 11th day of gavage, while mice in the other four groups were used to establish COS models. The inhibitor group was injected with the endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-phenylbutyric acid 0.2 ml one hour before modelling. All groups were injected by gavage and intraperitoneal injection for 3 consecutive cycles, with an interval of 4 days between cycles. Immediately after the third intraperitoneal injection, mice were grouped with male mice of the same strain in a ratio of 2 : 1, and at 8AM of the second day, the mice were examined, and those with spermatozoa or spermatozoa in the vaginal smears were recorded as pregnant. The mice were executed in the afternoon of the 4th day of pregnancy, and the blastocysts were obtained under an inverted microscope. The morphology of the blastocysts was observed, and the total number of blastocysts and the number of high-quality blastocysts were recorded to calculate the rate of high-quality blastocysts; the apoptosis of blastocyst cells was detected by the Tunel method, and the apoptosis rate was calculated; the endoplasmic reticulum molecular chaperone protein glucose-regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), B-lymphoblastoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cystathionin 3 (Caspase-3) and cystathionin 12 (Caspase-12) protein levels and their mRNA expression were detected by immunofluorescent assay and RT-qPCR assay, respectively. **Results** In the normal group, blastocysts had regular morphology, good morphological development and low fragmen-

tation rate; in the model group, blastocysts were poorly developed, cell morphology was irregular, fragmentation rate was high, and there was some stagnation; in the inhibitor group and high-dose, low-dose *Bushen Tiaojing Formula* groups, cell morphology could be seen to be better developed, with regular morphology and less fragmentation rate. Compared with the normal group, the rate of high-quality blastocysts in the model group reduced, the rate of apoptosis of blastocyst cells increased, the levels of GRP78, CHOP, Caspase-12, Caspase-3, Bax protein and its mRNA expression in blastocysts increased, while the level of Bcl-2 protein and its mRNA reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the rate of high-quality blastocysts increased, the rate of apoptosis of blastocysts decreased, the levels of GRP78, CHOP, Caspase-12, Caspase-3, Bax protein and their mRNA expression decreased, and the levels of Bcl-2 protein and its mRNA expression increased in the blastocysts in the inhibitor group and the high-dose and low-dose *Bushen Tiaojing Formula* groups ($P < 0.01$). Compared with the inhibitor group, GRP78, CHOP, Caspase-12, Bax protein levels and their mRNA expressions increased in the high-dose *Bushen Tiaojing Formula* group, and Caspase-12, Caspase-3, Bax protein levels and their mRNA expressions increased in the low-dose formula group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Bushen Tiaojing Formula* can inhibit the apoptosis of blastocyst cells caused by repeated controlled ovarian stimulation by improving endoplasmic reticulum stress, which plays a role in improving the quality of early embryos.

Keywords infertility; repetitive controlled ovarian stimulation; blastocysts; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; *Bushen Tiaojing Formula* (补肾调经方)

(收稿日期: 2025-02-26; 修回日期: 2025-05-31)

[编辑: 邓 媛]

读者·作者·编者

《中医杂志》论文中关于伦理审查与利益冲突的规定

1 伦理审查

依据中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 2023 年公布的《涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法》，报告涉及人的生物医学研究时，需说明所采用的试验程序是否经过国家的或所在机构设立的伦理审查委员会的评估与批准，并注明批准文号。涉及人的生物医学研究包括以下活动：1) 采用现代物理学、化学、生物学、中医药学和心理学等方法对人的生理、心理行为、病理现象、疾病病因和发病机制，以及疾病的预防、诊断、治疗和康复进行研究的；2) 医学新技术或者医疗新产品在人体上进行试验研究的；3) 采用流行病学、社会学、心理学等方法收集、记录、使用、报告或者储存有关人的样本、医疗记录、行为等科学研究资料的活动。

如果所在机构没有正式的伦理委员会，作者需说明研究是否符合世界卫生组织《涉及人的生物医学研究国际伦理准则》和世界医学协会最新修订的《赫尔辛基宣言》的相关规定。临床研究报告应说明受试者保护情况。在没有获得知情同意的情况下，可辨认身份的信息，包括患者姓名和其首字母缩写，或住院号，都不应在书面描述、照片或遗传谱系中公开，以保护患者的隐私权。研究对象为实验动物时，应说明是否经过相关伦理委员会审查，并注明批准文号，或说明是否遵循了国家或机构的有关实验动物管理和使用的规定。

2 利益冲突

作者投稿时需告知与该研究有关的潜在利益冲突，说明可能导致其研究结果和论文撰写产生偏倚的经济关系和私人关系，并对所提供的利益冲突公开声明的真实性负责。同行审稿专家应向编辑部公开任何可能使其对稿件评价产生偏倚的利益冲突，必要时应主动回避对稿件的审阅。

(本刊编辑部)