

临床研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.01.009

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

梁莹¹, 杜惠兰^{2*}, 赵胜男², 常秀峰³

(1. 石家庄市第四医院生殖医学中心, 河北省石家庄市中山路 206 号, 050011; 2. 河北中医学院中西医结合妇科教研室, 中西医结合生殖疾病协同创新中心; 3. 白求恩国际和平医院妇产科生殖医学中心)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173294)

摘要 目的 观察体外受精—胚胎移植术 (IVF-ET) 分别联合补肾调经方、逍遥散方治疗不孕症的临床疗效及可能机制。方法 40 例不孕症患者辨证分为补肾组、疏肝组各 20 例, 另设单纯控制性超排卵 20 例为对照组。各组均接受 IVF-ET 治疗, 补肾组同时服用补肾调经方, 疏肝组同时服用逍遥散方。治疗后检测各组患者卵巢颗粒细胞中活化素受体样激酶 5 (ALK5) mRNA 的表达, 观察患者获卵数、受精率、优质胚胎率和临床妊娠率。结果 对照组优质胚胎率、临床妊娠率分别为 29.3%、45.0%, 补肾组分别为 50.3%、65.0%, 疏肝组分别为 50.6%、60.0%, 补肾组、疏肝组优质胚胎率均高于对照组 ($P < 0.05$), 各组临床妊娠率以及获卵数、受精率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。补肾组、疏肝组 ALK5 mRNA 表达均高于对照组 ($P < 0.05$)。结论 补肾调经方、逍遥散方均可以上调不孕症患者颗粒细胞膜受体 ALK5 mRNA 的表达, 促进颗粒细胞的增殖, 从而调节卵巢功能而治疗不孕症。

关键词 不孕症; 体外受精—胚胎移植术; 补肾调经方; 逍遥散方; 活化素受体样激酶 5

卵泡发育过程是一个精细的调节过程, 卵母细胞及颗粒细胞在内分泌、旁分泌的调节作用下完成卵泡发育、成熟、排卵及卵母细胞的发育成熟过程。前期研究发现, 补肾法、疏肝法可以提高接受体外受精—胚胎移植 (IVF-ET) 患者的卵母细胞质量以及改善妊娠结局, 并且这一作用与上调颗粒细胞生长分化因子-9 (GDF9) 表达有关^[1-2]。活化素受体样激酶 5 (ALK5) 可以在卵泡发育的不同时期通过表达量的不同调节配体对下游信号因子的作用^[3]。本研究以补肾调经方为补肾法的代表方、逍遥散方为疏肝法的代表方, 观察两方对颗粒细胞上 ALK5 mRNA 表达的影响, 为补肾法和疏肝法调节卵巢功能、治疗不孕症提供实验依据。

1 临床资料

1.1 一般资料

收集 2010 年 9 月至 2011 年 7 月在石家庄市第四医院生殖医学中心和白求恩国际和平医院妇产科

生殖医学中心接受 IVF-ET 治疗的不孕症患者共 60 例。其中符合肾虚证诊断标准的 20 例患者为补肾组, 符合肝郁证诊断标准的 20 例患者为疏肝组; 单纯控制性超排卵 20 例患者为对照组。补肾组年龄 21~38 岁, 平均 (31.33 ± 2.61) 岁; 不孕年限 1~10 年, 平均 (4.59 ± 1.48) 年。疏肝组年龄 21~38 岁, 平均 (32.56 ± 3.15) 岁; 不孕年限 1~9 年, 平均 (4.19 ± 1.41) 年。对照组年龄 22~39 岁, 平均 (30.56 ± 2.97) 岁; 不孕年限 2~10 年, 平均 (4.72 ± 1.82) 年。各组患者一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。该研究经石家庄市妇产医院伦理委员会和白求恩国际和平医院伦理委员会批准, 伦理审查批号: 2009 年第 1 号。

1.2 西医诊断标准及中医辨证标准

西医诊断标准参照《妇产科学》^[4]不孕症诊断标准。

中医辨证标准参照《中医临床诊疗术语·证候部分》^[5]及《中医妇科学》^[6]制定。肾虚证: ①月经

* 通讯作者: duhuilan@163.com, (0311) 83809066

量少或质稀; ②腰酸或痛; ③胫酸膝软或足跟痛; ④头晕耳鸣; ⑤性欲淡漠; ⑥两尺脉沉迟。以上 6 项具备 3 项以上即可诊断。肝郁证: ①经期先后不定; ②经行不畅, 量少色黯; ③经前乳房胀痛; ④经行腹痛; ⑤精神抑郁或烦躁易怒; ⑥舌质正常或黯红, 脉弦。以上 6 项具备 3 项以上即可诊断。

1.3 纳入标准

符合西医诊断标准; 治疗组符合中医辨证标准; 年龄 < 40 岁; 基础促卵泡生成素 (BFSH) < 10 mIU/ml; 患者签署知情同意书。

1.4 排除标准

子宫不具备妊娠功能或严重躯体疾病不能承受妊娠者; 患有严重的精神疾患、泌尿生殖系统感染、性传播疾病者; 有吸毒等严重不良嗜好者; 接触致畸量的射线、毒物并处于作用期不能接受 IVF-ET 治疗者; 子宫内异位症患者。

2 方法

2.1 治疗方法

各组患者均采用常规的促性腺激素释放激素激动剂 (GnRHa) 长方案促排卵, 即月经周期的黄体中期或者第 21 天每日皮下注射 GnRHa (醋酸曲普瑞林注射剂, 法国博福益普生集团, 0.1 mg/支, 批号 D22863) 0.1 mg, 至少 14 天。达到调节标准即子宫内膜 ≤ 5 mm、血清雌二醇 (E_2) < 50 pg/ml 后, 每日注射重组人卵泡刺激素 (FSH, 果那芬注射剂, 75 IU/支, 德国默克雪兰诺公司, 批号 AU002290) 250 ~ 300 IU/天, B 超及血清促黄体生成素 (LH)、 E_2 、孕酮 (P) 监测卵泡发育情况, 当较多卵泡直径 ≥ 18 mm 时停药, 皮下注射重组人绒毛膜促性腺激素 (HCG, 艾泽注射剂, 德国默克雪兰诺公司, 250 g/支, 批号 DA009256) 250 g 诱导卵泡成熟, 36 ~ 38 h 后经阴道超声引导下穿刺取卵。补肾组同时服用补肾调经方, 处方: 熟地黄 20 g, 当归 9 g, 白芍 9 g, 山药 12 g, 山萸肉 15 g, 枸杞子 12 g, 女贞子 9 g, 淫羊藿 10 g, 紫河车 10 g, 覆盆子 10 g, 菟丝子 12 g, 香附 6 g。疏肝组同时服用逍遥散方, 处方: 北柴胡 10 g, 当归 10 g, 茯苓 10 g, 白芍 10 g, 白术 10 g, 甘草 5 g, 生姜 5 g, 薄荷 5 g。两组均每日 1 剂, 早晚分服, 至 HCG 注射日停药。

2.2 观察指标和方法

2.2.1 标本的采集 取卵后留取优势卵泡的卵泡液, 离心 (500 r/min, 10 min), 在沉淀物中加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 至 5 ml。取 15 ml 离心管,

加入人淋巴细胞分离液 5 ml, 将混悬液缓慢加入淋巴细胞分离液的液面上, 离心 (1200 r/min, 20 min), 吸取在两液面之间的颗粒细胞层加 PBS 离心 (3000 r/min, 5 min), 吸尽 PBS, 下层即为壁颗粒细胞。部分加入 2 ml 总 RNA 抽提试剂 Trizol 液 (Invitrogen 公司, 批号 46532), 完全裂解后置于 -80°C 冻存, 用于实时荧光定量 PCR。

2.2.2 卵泡壁颗粒细胞 ALK5 mRNA 表达 采用实时荧光定量 PCR 方法。运用 Trizol 一步法提取颗粒细胞总核糖核酸 (RNA), 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。各组取 2 μg 总 RNA 进行反转录, 反应条件为 25°C 10 min, 42°C 50 min, 85°C 5 min。然后分别以人 GAPDH、ALK5 的特异性引物进行 PCR 反应。所用引物序列利用 GenBank 数据库中提供的基因序列, 经 GenBank BLAST 进行同源性检测, 用 DNAMAN version6 软件设计, 由上海生工生物工程有限公司合成。序列: GAPDH-上游: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', GAPDH-下游: 5'-GCTTCACCACCTTCTTGATGTC-3'; ALK5-上游: 5'-AAACTTGCTCTGTCCACGG-3', ALK5-下游: 5'-AATGGCTGGCTTTCCTTG-3'。应用 7300 型实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司) 进行扩增, 反应参数为: 95°C 预变性 5 min, 然后 95°C 15 s、 58°C 20 s、 72°C 27 s 反应 40 个循环, 在每个循环的第 27 s 探测各孔的荧光量; 溶解曲线阶段, 变性 95°C 15 s, 退火 $60 \sim 64^{\circ}\text{C}$ 30 s, 最后 72°C 延伸 30 s。ALK5 mRNA 表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示, 其值为 ALK5 mRNA 表达量与 GAPDH 表达量的比值, 再将对照组样品设为标准 1, 其余样本的数值与其相除, 得到相对定量值。每个目的基因测定重复 3 次。

2.2.3 临床疗效指标 治疗后观察获卵数、受精率、优质胚胎率和临床妊娠率。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验。计数资料采用卡方检验。

3 结果

3.1 各组患者治疗后获卵数、受精率、优质胚胎率和临床妊娠率比较

表 1 示, 治疗后各组患者获卵数和受精率比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 补肾组和疏肝组优质胚胎率均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 补肾组和疏肝组临床妊娠率与对照组比较有

表 1 各组不孕症患者临床疗效指标及 ALK5 mRNA 表达比较

组别	例数	获卵数 (个, $\bar{x} \pm s$)	受精率 [% (受精数/获卵数)]	优质胚胎率 [% (优质胚胎数/胚胎数)]	临床妊娠率 [% (例)]	ALK5 mRNA ($\bar{x} \pm s$)
对照组	20	12.5 $\pm$ 4.2	66.7 (142/213)	29.3 (39/133)	45.0 (9)	1.04 $\pm$ 0.67
补肾组	20	13.9 $\pm$ 5.7	70.4 (150/213)	50.3 (80/159)	65.0 (13)	2.32 $\pm$ 1.21*
疏肝组	20	14.6 $\pm$ 7.7	72.5 (161/222)	50.6 (82/162)	60.0 (12)	3.15 $\pm$ 1.41*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

增高趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 各组患者人卵巢壁颗粒细胞 ALK5 mRNA 表达比较

表 1 示,补肾组和疏肝组人卵巢壁颗粒细胞 ALK5 mRNA 的表达量均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。补肾组人卵巢壁颗粒细胞 ALK5 mRNA 的表达量与疏肝组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

中医学认为,肾藏精,主生殖,肾所藏先天之精包括生殖之精,故肾为先天之本。肾气旺盛,肾精充实,气血调和,任通冲盛,则经调子嗣。肝主藏血,司血海,主疏泄,是女性生殖调节的枢纽,血海蓄溢受肝所司,故叶天士在《临证指南医案》中提出“女子以肝为先天”。朱丹溪曰“气血冲和,百病不生,一有怫郁,诸病生焉。”肾、肝与女子生殖功能密切相关,而补肾、疏肝也成为治疗不孕症的常用治法^[7-9]。补肾调经方由养精种玉汤合五子衍宗丸加减化裁而成。《景岳全书》指出,肾为水火之宅,补肾贵在能平衡肾之阴阳,善补阴者必于阳中求阴。方中熟地黄滋补肝肾、填精养血,枸杞子、山萸肉滋肝肾之阴,淫羊藿、覆盆子、菟丝子补肾温阳,则阴得阳升而源泉不竭。妇女以血为要,当归、白芍养血调经,香附为气病之主司,是调经理血要药,紫河车为血肉有情之品,入冲任,滋先天,温肾阳。诸药合用,补肾填精,调补冲任,以达到经调子嗣的作用。逍遥散方为疏肝法的代表方剂,源于宋代《太平惠民和剂局方》,柴胡专入肝经而疏肝理气,使肝经、冲任气血调畅;当归、白芍养血调经,调补冲任,白术、茯苓健脾益气,助脾化气血以养肝阴而使肝气疏达,营血生化有源;薄荷疏肝解郁。诸药合用使肝气条达、肝血充盈、冲任二脉调畅,达经调子嗣、诱发排卵之效果。有研究表明,逍遥口服液有温和的雌激素样作用^[10]。前期研究证实,逍遥散方可使雄激素致无排卵大鼠卵巢颗粒细胞层次增加排列整齐,优势卵泡内见有卵母细胞^[11]。

本研究结果发现,补肾调经方和逍遥散方都有

提高 IVF-ET 患者优质胚胎数的作用,并有增加妊娠率的趋势,与课题组前期研究结果^[1-3]一致,证实补肾法和疏肝法有提高卵母细胞质量的作用。

ALK5 的主要配体是转化生长因子- β (TGF- β) 和 GDF-9,在卵巢内 ALK5 作为 GDF9 的受体发挥主要作用^[12]。ALK5 可以在卵泡发育的不同时期通过表达量的不同调节配体对下游信号因子的调节作用^[13]。ALK5 基因的敲除可以阻断配体的作用,如促使卵丘细胞扩展等^[14]。对由于基因突变而导致排卵增加的羊进行的基因分析时发现,虽然配体 GDF9 mRNA 表达不增加,但是 ALK5 mRNA 的增加可以增强配体的作用^[15]。ALK5 的基因表达也与卵母细胞质量有关,体外培养发现卵母细胞成熟率低下的卵冠丘复合物,ALK5 的基因表达也减少^[16-17]。由此可见细胞膜受体 ALK5 的表达在 TGF β 超家族信号通路中,对卵子的发育和成熟有重要的影响。

本研究结果显示,补肾调经方、逍遥散方均有上调细胞膜受体 ALK5 mRNA 表达的作用,补肾组和疏肝组卵巢壁颗粒细胞 ALK5 mRNA 的表达均比对照组增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此推测,补肾调经方及逍遥散方治疗不孕症的机理可能包括上调颗粒细胞膜受体 ALK5 的表达,增强上游 GDF9 及 TGF- β ,促进颗粒细胞细胞周期素蛋白等的合成而刺激颗粒细胞的增殖,从而达到促进卵泡发育及卵母细胞成熟的作用。

参考文献

- [1] 高星.疏肝法对输卵管性不孕患者 IVF-ET 周期妊娠结局及 OSFs 影响的研究 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2012.
- [2] 杨丽芸,杜惠兰,白静,等.补肾法、疏肝法对超促排卵小鼠卵母细胞数量及 GDF-9 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(7): 597-600, 604.
- [3] Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Mazerbourg S, et al. Adenoviral gene transfer allows Smad-responsive gene promoter analyses and delineation of type I receptor usage of transforming growth factor-beta family ligands in cultured human granulosa luteal cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(1): 271-278.
- [4] 乐杰.妇产科学 [M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,

2008; 351.

- [5] 国家技术监督局. 中医临床诊疗术语: 证候部分 [M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 157-160.
- [6] 张玉珍. 中医妇科学 [M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 324-329.
- [7] 刘国平, 陈鹏飞, 贺玉珍. 中医治疗排卵功能障碍性不孕 68 例临床观察 [J]. 吉林医学, 2010, 31 (9): 1225-1226.
- [8] 井庆彦, 张国骏. 张国骏教授补肾疏肝治疗不孕症随诊体会 [J]. 中医学报, 2010, 25 (1): 53-54.
- [9] 常秀峰, 高星, 张敏, 等. 补肾调经方在体外受精—胚胎移植助孕中的应用 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26 (5): 1123-1125.
- [10] 李飞. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 453.
- [11] 罗亚萍, 马惠荣, 杜惠兰, 等. 逍遥丸对雄激素致无排卵大鼠卵巢功能的影响 [J]. 河北中医药学报, 2009, 24 (3): 33-34.
- [12] Mazerbourg S, Hsueh AJ. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12 (4): 373-383.
- [13] Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, et al. Growth differentiation

factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9 [J]. Biol Reprod, 2008, 78 (2): 243-253.

- [14] Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, et al. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion [J]. Biol Reprod, 2007, 76 (5): 848-857.
- [15] Feary ES, Juengel JL, Smith P, et al. Patterns of expression of messenger RNAs encoding GDF9, BMP15, TGF- β 1, BMP1B, and BMP2 during follicular development and characterization of ovarian follicular populations in ewes carrying the Woodlands FecX2W mutation [J]. Biol Reprod, 2007, 77 (6): 990-998.
- [16] Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, et al. IVM and gene expression of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification [J]. Reprod Biomed Online, 2010, 20 (1): 26-34.
- [17] Kyasari OR, Valojerdi MR, Farrokhi A, et al. Expression of maturation genes and their receptors during in vitro maturation of sheep COCs in the presence and absence of somatic cells of cumulus origin [J]. Theriogenology, 2012, 77 (1): 12-20.

Effect of IVF-ET Combined With Kidney-Supplementing or Liver-Coursing Methods on the Expression of ALK5 in Patients With Female Infertility

LIANG Ying¹, DU Huilan², ZHAO Shengnan², CHANG Xiufeng³

(1. The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Hebei Province 050011; 2. Hebei College of Chinese Medicine; 3. Bethune International Peace Hospital)

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic effect of in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) combined with *Bushen Tiaojing Formula* (formula to supplement the kidney and regulate menstruation) or *Xiaoyao Powder* (Free Wanderer Powder) respectively on female infertility and its possible mechanism. **Methods** Forty cases of female infertility were divided into the kidney-supplementing group and liver-coursing group according to the pattern identification, with 20 in each. Twenty cases of controlled ovarian hyperstimulation were selected as the control group. All groups were given IVF-ET. The kidney-supplementing group and liver-coursing group were added with *Bushen Tiaojing Formula* or *Xiaoyao Powder* respectively. The expressions of activin receptor-like kinase 5 (ALK5) and ALK5 mRNA in the ovarian granulosa cells were detected after treatment. The number of oocytes retrieved, fertilization rate, good-quality embryo rate and clinical pregnancy rate were observed. **Results** The good-quality embryo rate in the control group, kidney-supplementing group and liver-coursing group was 29.3% , 50.3% and 50.6% respectively. The good-quality embryo rate in the kidney-supplementing group and liver-coursing group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The clinical pregnancy rate in the control group, kidney-supplementing group and liver-coursing group was 45.0% , 65.0% and 60.0% respectively, with no significant difference between groups ($P > 0.05$). There was no significant difference between groups in the number of oocytes retrieved and fertilization rate ($P > 0.05$). The expression of ALK5 mRNA in the kidney-supplementing group and liver-coursing group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Both *Bushen Tiaojing Formula* and *Xiaoyao Powder* can up-regulate the expression of ALK5 in granulosa cells of patients with female infertility, promote the proliferation of granulosa cells and regulate the ovarian function, especially *Xiaoyao Powder*. **Keywords** female infertility; in vitro fertilization-embryo transfer; *Bushen Tiaojing Formula*; *Xiaoyao Powder*; mural granulosa cell; activin receptor-like kinase 5

(收稿日期: 2013-08-28; 修回日期: 2013-10-15)

编辑: 王利芬