

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.21.013

实验研究

补肾健脾方对自然衰老小鼠生殖能力及体外受精中卵子质量的影响

沈明洁, 齐聪*

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海市浦东新区张衡路 528 号, 201203)

摘要 目的 观察补肾健脾方对自然衰老小鼠卵巢功能的影响及可能作用机制。方法 将 48 只 9 月龄 C57BL/6J 雌性小鼠(自然衰老模型)随机分为模型组、阳性对照组和补肾健脾方高、低剂量组, 每组 12 只, 另选 2~3 月龄小鼠 12 只作为青年组。补肾健脾方低、高剂量组分别给予补肾健脾方 0.51、2.55 g/(kg·d)灌胃, 阳性对照组给予脱氢表雄酮片 1.25 mg/(kg·d)灌胃, 青年组及模型组给予 0.2 ml 蒸馏水灌胃, 各组共灌胃 3 个月。比较各组小鼠发情周期、产仔数量, 体外受精的获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数及囊胚数, 检测卵巢中新生儿卵巢同源盒基因(Nobox)蛋白及 mRNA 表达情况。结果 与青年组比较, 模型组小鼠完整发情周期次数、发情前期及发情期占周期比例及产仔数减少, 获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数及囊胚数亦减少, 卵巢中 Nobox 蛋白及 mRNA 表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 补肾健脾方高剂量组小鼠在体外受精过程中获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数、囊胚数均高于模型组, 并且卵巢中 Nobox 蛋白及 mRNA 表达升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 补肾健脾方有助于改善自然衰老小鼠生殖能力及卵子质量, 其作用机制可能与增加小鼠卵巢内 Nobox 转录因子表达有关。

关键词 自然衰老; 补肾健脾方; 生殖能力; 体外受精; 卵子质量; 新生儿卵巢同源盒基因

随着我国的经济的发展, 职业妇女的增多, 我国女性的生育年龄不断推迟, 大龄有生育需求的女性数量进一步增加。由于女性生殖能力在 35 岁后快速下降^[1], 1/3 的 35~39 岁女性会经历生育困难, 而 40~44 岁女性生育能力明显受损^[2]。虽然体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)为代表的辅助生殖技术已成为目前治疗不孕症有效的方法, 但是求助于 IVF-ET 的大龄女性仍不得不面对卵子质量下降并导致移植率及妊娠率较青年女性显著下降的局面^[3]。我们前期应用补肾健脾方治疗大龄卵巢功能下降患者取得良好临床疗效^[4]。本研究探讨补肾健脾方对于自然衰老小鼠模型生殖能力及卵子质量的影响及可能作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金(81403424); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(ZY3-CCCX-3-3007, ZY3-RCYP-2-2009); 上海市科学技术委员会科研计划(14ZR1442100)

* 通讯作者: qicongxq@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 48 只, 9 月龄, 体重(22.95 ± 0.58) g; SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 12 只, 2~3 月龄, 体重(15.97 ± 0.68) g; 雄性 ICR 小鼠 10 只, 6~8 周龄, 体重(27.57 ± 0.85) g, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SYXK(京)2003-0012。

1.2 实验药物

补肾健脾方组成: 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, 免煎颗粒为江阴天江药业有限公司产品(批号: 1702667), 制备成 4 g/ml 浓度溶液, 分装后 4℃ 冰箱保存备用。脱氢表雄酮片(DHEA, 美国 GNC 公司, 批号: 3406EN6436)。

1.3 实验试剂与仪器

注射用血促性腺激素(PMSG, 批号:

B140601)、注射用绒毛膜促性腺激素 (HCG, 批号: B140703), 宁波三生药业有限公司; 人输卵管液 (美国 Millipore 公司, 货号: 2506627); 胚胎培养液 (美国 Millipore 公司, 货号: 50206-2); 10% 血清替代品 (Irvine Scientific 公司, 货号: 99193150602); Triton-X100 (美国 Bio-Rad 公司, 货号: 161-0407); Trizol (Thermo Fisher 公司, 货号: 132906); 微管染色抗体 (一抗): 抗小鼠 α -tubulin 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司, 货号: 22142); BMP 15 抗体 (美国 Thermofisher 公司, 货号: PA5-34401); GDF9 抗体 (美国 biorbyt 公司, 货号: orb13991); Nobox (E-43) 抗体 (美国 Santa-cruz 公司, 货号: Sc-432002); Cy3 结合的兔抗小鼠 IgG (二抗, 货号: C2306)、FITC 结合的山羊抗小鼠 IgG (二抗, 货号: F7367)、DAPI 荧光染色剂 (货号: F6057), 美国 Sigma 公司; PCR 逆转录试剂盒 (Bio-Rad 公司, 货号: 170-8891); 荧光定量 PCR 试剂盒 (Bio-Rad 公司, 货号: 170-8893)。

微量分光光度仪 (DeNovix 公司, 型号: DS-11); 实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 型号: 7500 型); 体式显微镜 (Leica 公司, 型号: TL3000); 激光共聚焦显微镜 (Zeiss 公司, 型号: LSM710); 荧光显微镜 (Olympus 公司, 型号: CKX41-A32FL/PH)。

1.4 动物分组及用药

12 只 2~3 月龄小鼠设为青年组, 48 只 9 月龄小鼠为自然衰老小鼠。2~3 月龄 C57BL/6J 小鼠的单次产仔数为 6~7 只, 其 7~9 月龄时产仔数量明显减少, 12 月龄时则不再产仔^[5], 13~14 月龄时可生长发育卵泡基本耗竭^[6], 所以选择 9 月龄小鼠为自然衰老模型。将 9 月龄小鼠编号后依据随机数字表法分为模型组、阳性对照组及补肾健脾方低、高剂量组, 每组 12 只。适应性喂养 1 个月后补肾健脾方低、高剂量组自 10 月龄起分别给予补肾健脾方 0.51、2.55 g/(kg·d) 灌胃, 阳性对照组给予 DHEA 1.25 mg/(kg·d) 灌胃 (按与人体表面积比等效剂量^[7]), 青年组及模型组给予 0.2 ml 蒸馏水灌胃。各组共灌胃 3 个月。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 发情周期 各组采用随机数字表法选择 4 只小鼠, 参考文献 [8] 方法, 以阴道涂片为主, 结合外阴部观察, 鉴定发情周期。雌性小鼠发情周期一般为 4~5 天, 发情周期可分为发情前期 (卵

泡发育)、发情期 (排卵期)、发情后期 (黄体形成)、发情间期。记录各组灌胃 3 个月后小鼠 16 天中出现发情周期的次数。

1.5.2 产仔数量 小鼠灌胃 3 个月后, 各组根据随机数字表选择 4 只小鼠, 与同批次购入的 6~8 周龄 ICR 雄性小鼠, 每笼按雌雄比例 2:1 交配, 观察 40 天内产仔数量。

1.5.3 卵子的获得 各组剩余 8 只小鼠参考文献 [9] 方法于灌胃 3 个月后 (青年组于月龄 2~3 月末) 16:00 注射 PMSG 10 IU, 48h 后注射 HCG 10 IU, 在注射 HCG 12~14h 后脱臼处死小鼠, 快速剖腹, 剪下两侧输卵管, 置于预温好的人输卵管液中。在解剖镜下, 用 1 ml 的针头剖开输卵管壶腹部, 用巴氏管将卵丘复合物移出, 置于 0.3 mg/ml 的透明质酸酶中吹打消化 5 min, 将消化好的单个卵母细胞转移至干净的人输卵管液中洗净后, 转入已经过 4h 以上平衡的胚胎培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 的胚胎培养箱中培养, 体式显微镜下观察获卵数、成熟卵子数。

1.5.4 体外受精及胚胎培养 参考文献 [9] 方法, 脱臼处死雄性鼠龄 8 周的 ICR 小鼠, 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。转移精子至含有 10% 血清替代品的人输卵管液中上游 1.5 h。将上游好的精子以 1×10^6 个/ml 加入处理好的卵母细胞中 (每 200 μ l 的精子中加入 50 个卵母细胞), 置于 37℃、5% CO₂ 的胚胎培养箱中。6h 后观察受精情况, 并记录受精卵数。将出现两原核的受精卵置于胚胎培养液中, 继续培养至囊胚阶段。每隔 24h 观察一次胚胎发育情况, 并记录卵裂数及囊胚数。

1.5.5 卵母细胞免疫荧光染色 透明质酸酶消化卵母细胞周围的颗粒细胞后, 4% 多聚甲醛溶液中固定。再以 Triton-X100 透膜后, α -tubulin 抗体 (1:200) 室温孵育。染色体的分布采用分子探针进行复染约 10 min 后, 转移至 DPBS 中洗净, 封片。激光共聚焦显微镜观察并获得图像。

1.5.6 卵巢中新生儿卵巢同源盒基因 (Nobox) 蛋白表达 脱臼处死小鼠后, 迅速完整切下卵巢, 4% 多聚甲醛溶液中固定。包埋切片后抗原暴露, 4℃孵育一抗过夜后, 采用免疫荧光染色, 荧光标记的二抗孵育 1~2h, DAPI 染色后封片。Nobox 蛋白 Cy3 显色, 呈红色荧光。在荧光显微镜下观察并获得图像, Image J 32.0 软件系统对图像进行分析, 采用积分光密度值 (IOD 值) 进行定量分析。

1.5.7 卵巢中 Nobox mRNA 表达 采用 Real time-PCR 法检测, 卵巢组织匀浆后分别加入 Trizol 提取 RNA, 对各组样本的总 RNA 进行定量和纯度检测后在按逆转录试剂盒推荐逆转录反应体系依次在 PCR 反应管中加入逆转录相应试剂, 进行逆转录反应获得 cDNA。将获得的 cDNA 按一定比例稀释后加入 SYBR Green Mix 试剂。将 PCR plate 放入定量 PCR 仪中, 根据试剂盒要求启动 PCR 程序。

1.6 统计学方法

应用 Graph-Pad Prism 5.0 统计软件, 结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Student *t*-test 进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 16 天中出现发情周期次数及各期所占比例比较

青年组小鼠基本均具有完整 4~5 天的发情周期, 在为期 16 天的观察中, 4 只青年小鼠共出现 12 次完整的发情周期, 每只小鼠平均出现 3 次发情周期; 模型组小鼠出现完整发情周期次数均显著下降, 4 只小鼠 16 天内仅有 1 只小鼠出现 1 次完整发情周期; 阳性对照组和补肾健脾方高剂量组 4 只小鼠 16 天内均累计出现完整发情周期 3 次; 补肾健脾方低剂量组 4 只小鼠 16 天内仅有 1 只小鼠出现 1 次完整发情周期。表 1 示, 与青年组比较, 其余各组发情前期、发情期所占比例明显降低, 发情后期/间期所占比例明显升高 ($P < 0.05$)。模型组、阳性对照组和补肾健脾方高、低剂量组各期所占比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠 40 天内产仔数量比较

表 2 示, 与青年组比较, 其余各组小鼠产仔数量明显降低 ($P < 0.05$)。模型组、阳性对照组和补肾健脾方高、低剂量组小鼠产仔数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组小鼠获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数及囊胚数比较

表 3 示, 与青年组比较, 其余各组小鼠获卵

表 2 各组小鼠 40 天内产仔数量比较 (只, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	产仔数量
青年组	4	7.75 $\pm$ 0.48
模型组	4	0.50 $\pm$ 0.29*
阳性对照组	4	0.50 $\pm$ 0.29*
补肾健脾方高剂量组	4	1.50 $\pm$ 0.65*
补肾健脾方低剂量组	4	0.25 $\pm$ 0.25*

注: 与青年组比较, * $P < 0.05$

数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数及囊胚数均显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾健脾方高剂量组小鼠获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数及囊胚数均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而补肾健脾方低剂量组和阳性对照组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与补肾健脾方高剂量组比较, 阳性对照组和补肾健脾方低剂量组小鼠获卵数、成熟卵子数、受精卵数及囊胚数量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而卵裂数三组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组小鼠卵母细胞免疫荧光染色结果

青年组小鼠卵母细胞纺锤体位于靠近极体的皮质区, 呈现形态规则的纺锤状, 形态一致均匀, 可见 DAPI 染色的染色体排列于中期板内, 与两侧对称分布的纺锤体相连接。模型组小鼠纺锤体崩解, 未位于极体附近的皮质区, 散在于整个卵母细胞内, 形态明显异常; 虽然 DAPI 染色仍可发现染色体, 但是染色体排列紊乱, 形态明显异常, 荧光着色明显减弱, 且未位于中期板内与纺锤体相连。阳性对照组小鼠卵母细胞内纺锤体形态较青年组异常, 呈拉伸纺锤状, 形态不均匀, 仍可见散在簇状 DAPI 染色染色体, 与纺锤体相连, 形态不规则, 荧光着色较青年组未明显减弱。补肾健脾方高剂量组小鼠卵母细胞纺锤体形态尚均一, 呈纺锤状, 位于极体附近的皮质区, 纺锤体结构较青年组小鼠卵母细胞纺锤体明显疏松, 也可见染色体位于中期板内, 与纺锤体相连, 但是染色体 DAPI 染色荧光强度较青年组明显减弱。补肾健脾方低剂量组小鼠卵母细胞纺锤体呈折叠状, 形态不均, 明显异常,

表 1 各组小鼠 16 天中发情周期所占比例比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	发情前期	发情期	发情后期/间期
青年组	4	18.75 $\pm$ 0.00	23.44 $\pm$ 1.56	60.94 $\pm$ 1.563
模型组	4	3.13 $\pm$ 1.80*	3.13 $\pm$ 1.80*	93.75 $\pm$ 2.552*
阳性对照组	4	4.69 $\pm$ 1.56*	4.69 $\pm$ 1.56*	90.63 $\pm$ 3.125*
补肾健脾方高剂量组	4	7.81 $\pm$ 1.56*	7.81 $\pm$ 2.99*	84.38 $\pm$ 3.125*
补肾健脾方低剂量组	4	3.13 $\pm$ 1.80*	3.13 $\pm$ 1.80*	93.75 $\pm$ 2.552*

注: 与青年组比较, * $P < 0.05$

表 3 各组小鼠获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数及囊胚数比较 (个/只, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	获卵数	成熟卵子数	受精卵数	卵裂数	囊胚数
青年组	8	13.50 ± 1.24	11.13 ± 1.23	10.50 ± 1.07	9.75 ± 0.96	6.75 ± 0.73
模型组	8	1.13 ± 0.40 [*]	0.63 ± 0.32 [*]	0.38 ± 0.18 [*]	0.13 ± 0.13 [*]	0 [*]
阳性对照组	8	1.25 ± 0.45 ^{*▲▲}	0.63 ± 0.26 ^{*▲▲}	0.50 ± 0.27 ^{*▲}	0.38 ± 0.18 [*]	0.13 ± 0.13 ^{*▲}
补肾健脾方高剂量组	8	4.00 ± 0.46 ^{*△△}	2.63 ± 0.57 ^{*△△}	2.00 ± 0.54 ^{*△}	1.00 ± 0.38 ^{*△}	0.75 ± 0.25 ^{*△△}
补肾健脾方低剂量组	8	1.75 ± 0.49 ^{*▲}	0.88 ± 0.30 ^{*▲}	0.38 ± 0.18 ^{*▲}	0.25 ± 0.16 [*]	0 ^{*▲▲}

注: 与青年组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\triangle P < 0.01$; 与补肾健脾方高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

表 4 各组小鼠卵巢中 Nobox 蛋白及 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Nobox 蛋白 ($\times 10^4$, IOD 值)	Nobox mRNA
青年组	6.88 ± 1.18 (4)	0.58 ± 0.15 (5)
模型组	0.74 ± 0.06 ^{**} (4)	0.05 ± 0.02 ^{**} (5)
阳性对照组	1.03 ± 0.13 ^{**} (4)	0.23 ± 0.17 (5)
补肾健脾方高剂量组	2.98 ± 0.87 ^{*△} (4)	1.24 ± 0.41 [△] (5)
补肾健脾方低剂量组	1.28 ± 0.20 ^{*△} (4)	0.52 ± 0.22 (5)

注: 与青年组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; () 内为鼠数

DAPI 染色染色体未位于中期板内, 排列紊乱, 荧光着色明显减弱, 未与纺锤体相连。

2.5 各组小鼠卵巢中 Nobox 蛋白及 mRNA 表达比较

表 4 示, 与青年组比较, 其余各组 Nobox 蛋白均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 仅模型组 Nobox mRNA 明显降低 ($P < 0.01$), 而阳性对照组和补肾健脾方高、低剂量组 Nobox mRNA 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 补肾健脾方高、低剂量组 Nobox 蛋白表达明显升高, 补肾健脾方高剂量组 Nobox mRNA 表达亦明显升高 ($P < 0.05$), 阳性对照组 Nobox 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

人类的生育能力随着年龄的增长而逐步下降, 其根本原因是卵巢功能的下降, 即卵子数量的减少与质量的同步衰退, 30 岁时女性仅保留 12% 的卵子, 而 40 岁时降至 3%^[8]。年龄不仅影响卵子的数量, 而且对卵子的质量也产生严重影响^[10]。大龄女性在 IVF 促排卵中出现获卵数下降的同时伴随着受精率的下降, 尤其是大于 40 岁的女性, IVF 的受精率出现急剧下滑^[11]。有研究认为, 脱氢表雄酮可提高卵巢储备功能从而改善女性 IVF 的妊娠结局^[12], 故辅助生殖临床多应用脱氢表雄酮于卵巢储备下降的女性, 但是对于其临床疗效, 尤其是对于雄激素水平正常的女性, 仍存在一定争议^[13-14]。

《素问·上古天真论》中记载女子“五七”之时, 阳明脉衰, 面始焦, 发始堕。我们认为, 大龄

女性随着年龄的增长, 肾气本已渐亏, 加之外有六淫饮食之邪, 内有郁怒积劳之因, 导致脾胃功能大伤, 卵巢功能下降, 卵子质量下滑, 经血源泉日涸。脾胃为后天之本, 气血生化之源, 脾气旺盛, 才能周身气血充足, 向卵巢输注水谷精微, 滋养卵泡的发育。以脾胃运化的水谷精微及气血为营养基础, 卵泡才能在肾气及天癸的作用下正常发育成长, 脾旺气血充盛亦可补充大龄女性随着年龄的增长而不断损耗的肾气。补肾健脾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, 为滋肾补精血之要药, 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。

本研究结果发现, 自然衰老小鼠生殖能力较青年小鼠明显降低, 但补肾健脾方高剂量组小鼠在 16 天内出现完整发情周期的次数较模型组增多, 虽然补肾健脾方高剂量组小鼠发情前期与发情期的比例及产仔数量有升高的趋势, 但与模型组比较差异无统计学意义, 可能与样本量较小有关, 提示补肾健脾方能在一定程度上改善自然衰老小鼠的生殖功能。卵子免疫荧光染色观察也发现补肾健脾方高剂量组小鼠较模型组、阳性对照组小鼠卵母细胞纺锤体形态均一, 结构较为正常, 染色体 DAPI 染色虽然较青年组小鼠仍有明显减弱, 但未出现其他自然衰老小鼠卵母细胞染色体紊乱崩解的现象, 提示补肾健脾方有助于改善自然衰老小鼠的卵子质量。

同时,补肾健脾方高剂量组小鼠获卵数、成熟卵子数、受精卵数、卵裂数、囊胚数均较模型组增多,且获卵数、成熟卵子数、受精卵数及囊胚数均较阳性对照组和补肾健脾方低剂量组增多,提示补肾健脾方高剂量可明显提高体外受精情况。

Nobox 是卵子来源的同源盒基因,目前研究认为 Nobox 对人类及小鼠的卵泡发育起到重要作用^[13]。有研究报道,Nobox 转录因子参与原始卵泡的激活,敲除 Nobox 基因的小鼠出现窦前卵泡的损失,原始卵泡向初级卵泡转化过程中止^[14]。本研究发现,补肾健脾方高剂量组小鼠卵巢中 Nobox mRNA 及蛋白水平均较模型组增高。由此,我们推测补肾健脾方改善自然衰老小鼠生殖能力及卵子质量的作用与其增加小鼠卵巢内 Nobox 转录因子在基因及蛋白层面上的表达密切相关。

参考文献

- [1] FADDY MJ, GOSDEN RG, GOUGEON A, et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause [J]. Hum Reprod, 1992, 7 (10): 1342-1346.
- [2] MENKEN J, TRUSSELL J, LARSEN U. Age and infertility [J]. Science, 1986, 233(4771): 1389-1394.
- [3] BROER SL, VAN DISSELDORP J, BROEZE KA, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach [J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(1): 26-36.
- [4] 沈明洁,齐聪,匡延平,等. 补肾健脾法治疗体外受精-胚胎移植中卵巢低反应临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(3): 62-64.
- [5] LIU M, YIN Y, YE X, et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice [J]. Hum Reprod, 2013, 28(3): 707-717.
- [6] GOSDEN RG, LAING SC, FELICIO LS, et al. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice [J]. Biol Reprod, 1983, 28(2): 255-260.
- [7] GLEICHER N, KIM A, WEGHOFFER A, et al. Hypoandrogenism in association with diminished functional ovarian reserve [J]. Hum Reprod, 2013, 28(4): 1084-1091.
- [8] WU S, CHEN Y, FAJOBI T, et al. Conditional knockout of the androgen receptor in gonadotropes reveals crucial roles for androgen in gonadotropin synthesis and surge in female mice [J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(10): 1670-1681.
- [9] WALLACE WH, KELSEY TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause [J]. PLoS One, 2010, 5(1): 1-7.
- [10] FARR SL, SCHIEVE LA, JAMIESON DJ. Pregnancy loss among pregnancies conceived through assisted reproductive technology, United States, 1999-2002 [J]. Am J Epidemiol, 2007, 165(12): 1380-1388.
- [11] TAN TY, LAU SK, LOH SF, et al. Female aging and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. [J]. Singapore Med J, 2014, 55(6): 305-309.
- [12] GLEICHER N, BARAD DH. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve (DOR) [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9: 67. doi: 10.1186/1477-7827-9-67.
- [13] YAKIN K, URMAN B. DHEA as a miracle drug in the treatment of poor responders; hype or hope? [J]. Hum Reprod, 2011, 26(8): 1941-1944.
- [14] HUGUES JN, MASSART P, CEDRIN-DURNERIN I. Assessment of theca cell function: a prerequisite to androgen or luteinizing hormone supplementation in poor responders [J]. Fertil Steril, 2013, 99(2): 333-336.
- [15] QIN Y, SHI Y, ZHAO Y, et al. Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. [J]. Fertil Steril, 2009, 91(4 Suppl): 1507-1509.
- [16] RAJKOVIC A, PANGAS SA, BALLOU D, et al. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression [J]. Science, 2004, 305(5687): 1157-1159.

Effect of *Bushen Jianpi Formula* (补肾健脾方) on Reproductive Ability and Egg Quality of In Vitro Fertilization of Natural Aging Mice

SHEN Mingjie, QI Cong

(Shuguang Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Bushen Jianpi Formula* (补肾健脾方) on ovarian function in natural aging mice and its possible mechanism. **Methods** Randomly divided 48 C57BL/6J female mice of 9 months old (natural aging models) into model group, positive control group, *Bushen Jianpi Formula* high and low dose group, with 12 mice in each group. Other 12 mice aged 2~3 months were selected as the youth group. The *Bushen Jianpi Formula* low and high dose group were given *Bushen Jianpi Formula* 0.51 and 2.55 g/(kg·d) by gavage

respectively, while the positive control group were given Dehydroepiandrosterone tablet 1.25 mg (kg · d) by gavage, and the youth group and model group were given 0.2 ml distilled water by gavage, all for 3 months. Compared estrous cycle, farrowing amount, numbers of retrieved oocytes in vitro fertilization, mature oocytes, fertilized eggs, cleavage number and number of blastocyst and measured expression of newborn ovary homeobox gene (Nobox) protein and mRNA in ovary of mice in different groups. **Results** Compared with the youth group, the whole estrous cycles times, proportion of proestrus and oestrus in whole cycle, farrowing amount decreased in the model group. The number of retrieved oocytes in vitro fertilization, mature oocytes, fertilized eggs, cleavage number and number of blastocyst were also reduced with reduction of the expression of Nobox protein and mRNA in ovary ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Meanwhile, the number of retrieved oocytes in vitro fertilization, mature oocytes, fertilized eggs, cleavage number and number of blastocyst in the *Bushen Jianpi Formula* high dose group were higher than that in the model group, and the expression of Nobox protein and mRNA in the ovary increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Bushen Jianpi Formula* could improve the reproductive ability and egg quality of natural aging mice, and its mechanism may be related to increasing Nobox transcription factor expression in the ovary of mice.

Keywords natural aging; *Bushen Jianpi Formula*; reproductive ability; in vitro fertilization; egg quality; neonatal ovary homologous box gene

(收稿日期: 2017-04-30; 修回日期: 2017-07-12)

编辑: 邓 媛

(上接第 1837 页)

Clinical Observation on *Fulyuning Keli* (复律宁颗粒) Combined with Western Medicine in Treating 40 Cases of Chronic Heart Failure Complicated with Arrhythmia of Both Qi and Yin Deficiency Type

WEI Na¹, QU Chang², TANG Nuo¹, CHEN Cheng³, TANG Jingyi¹, GAO Jimei⁴, WANG Youhua¹, LIN Zhongxiang¹, DENG Bing¹, SHEN Lin¹

(1. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai, 200032; 2. Dalian Women and Children Medical Centre; 3. Suzhou Hospital of Chinese Medicine; 4. Changxing Hospital of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To examine the effect and safety of *Fulyuning Keli* (复律宁颗粒) in treating heart failure complicated with arrhythmia of both Qi and Yin deficiency type. **Methods** Eighty heart failure complicated with arrhythmia patients of both Qi and Yin deficiency type were divided into treatment group and control group, 40 cases in each group. The control group was given western medicine standardized treatment of heart failure complicated with arrhythmia. In addition to the standardized treatment, the treatment group was given *Fulyuning Keli*. Both groups were treated for 4 weeks. Patients' cardiac functional grading, cardiac ultrasound indexes including ejection fraction (EF), stroke volume (SV) and left ventricular end diastolic dimension (LVEDD), brain natriuretic peptide (BNP), 6-min walking test, Chinese medicine syndrome score, as well as the scores of Minnesota life quality of heart failure questionnaire (MLHFQ), Hamilton anxiety scale (HAMA) and Hamilton depression scale (HAMD) before and after treatment were compared. Heart function efficacy and arrhythmia efficacy in both groups were evaluated.

Results After treatment, changes of heart function effect (total effective rate 80.00% in the treatment group, 55.00% in the control group) and arrhythmia effect (total effective rate 70.00% in the treatment group, 42.50% in the control group) was significantly different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treatment, Chinese medicine syndrome score, 6-min walking distance, as well as the scores of MLHFQ, HAMA and HAMD in both groups improved, and the treatment group was superior to the control group ($P < 0.01$). BNP level in both groups decreased after treatment ($P < 0.01$). The difference between both groups was not significant ($P > 0.05$). The difference of cardiac ultrasound indexes in both groups before and after treatment was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** In treating heart failure complicated with arrhythmia patients of both Qi and Yin deficiency type, *Fulyuning Keli* might improve heart function, reduce patients' premature attack and improve patients' clinical symptoms and life quality.

Keywords chronic heart failure; *Fulyuning Keli*; deficiency of both Qi and Yin; arrhythmia; quality of life; heart function

(收稿日期: 2017-05-02; 修回日期: 2017-06-12)

编辑: 叶 晨