

• 实验研究 •

二至天葵颗粒和右归丸对肾虚小鼠卵细胞
Snrpn 和 Peg1/Mest 甲基化状态的影响连 方^{1*} 王瑞霞² 王利红¹ 孙振高¹ 石 垒¹ 吴海萃²

(1. 山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心, 山东省济南市文化西路 42 号, 250011;

2. 山东中医药大学第一临床医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072836); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金

资助项目(20093731110006); 山东省自然科学基金(专项)资助项目(2009ZRB14306)

* 通讯作者: f_ljian@163.com, (0531)82611558

[摘要] 目的 探讨二至天葵颗粒和右归丸改善体外受精—胚胎移植结局的疗效机制。方法 将 175 只雌性小鼠随机分为正常组(生理盐水 0.5 ml 灌胃)、肾阴虚模型组(甲状腺片按 300 mg/kg 灌胃, 连用 10 天)、肾阴虚治疗组(造模同时每天予二至天葵颗粒 0.5 ml 灌胃)、肾阳虚模型组(氢化可的松注射液按 25 mg/kg 肌肉注射, 连用 10 天)、肾阳虚治疗组(造模同时每天予右归丸 0.5 ml 灌胃), 每组 35 只。实验至第 11 天进行超排卵, 每组 30 只小鼠取卵, 观察卵细胞印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 甲基化状态, 另 5 只雌鼠和 5 只雄鼠合笼后取受精卵, 观察受精卵数目、卵裂率、成胚率。结果 正常组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因完全甲基化; 肾阴虚、肾阳虚模型组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因发生了明显的去甲基化; 肾阴虚、肾阳虚治疗组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因的去甲基化状态得到了部分纠正。肾阴虚、肾阳虚模型组受精卵数目、卵裂率、囊胚形成率明显低于正常组($P < 0.05$), 肾阴虚、肾阳虚治疗组受精卵数目、卵裂率、囊胚形成率均高于相应的模型组($P < 0.05$)。结论 肾虚可致卵细胞印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 发生异常去甲基化, 二至天葵颗粒和右归丸可防止印迹丢失的发生, 改善肾虚小鼠的卵裂率、囊胚形成率, 从而发挥补肾治疗不孕症作用。

[关键词] 二至天葵颗粒; 右归丸; 卵细胞; DNA 甲基化; Snrpn; Peg1/Mest

Effect of Erzhi Tiangui Granules and Yougui Pill on Methylation Status of Snrpn and Peg1/Mest in Ovum of Mice with Kidney Deficiency
LIAN Fang¹, WANG Ruixia², WANG Lihong¹, SUN Zhengao¹, SHI Lei¹, WU Haicui²

(1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province 250011;

2. First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the efficacy mechanism of Erzhi Tiangui Granules (Double Supreme Tiangui Granules) and Yougui Pill (Right-Restoring Pill) for in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). **Methods** Totally 175 female mice were randomized into the normal group (gavage with 0.5 ml normal saline), kidney yin deficiency model group (gavage with 300 mg/kg Thyroid Tablets for 10 days), kidney yin deficiency treatment group (gavage with 0.5 ml Erzhi Tiangui Granules while modeling), kidney yang deficiency model group (intramuscular injection of 25 mg/kg Hydrocortisone Injection) and kidney yang deficiency treatment group (gavage with 0.5 ml Yougui Pill while modeling), with 35 in each. Superovulation was conducted on the 11th day of experiment. Oocyte retrieval was conducted on 30 mice in each group and the methylation status of Snrpn and Peg1/Mest in ovum was observed. Another 5 female mice in each group were caged together with 5 male mice and the zygotes were taken to observe the numbers, cleavage rate and embryo formation rate. **Results** The Snrpn and Peg1/Mest genes were fully methylated in the normal group. The Snrpn and Peg1/Mest genes were obviously demethylated in the kidney yin deficiency and kidney yang deficiency model groups. The methylation of Snrpn and Peg1/Mest genes was partially corrected in the kidney yin deficiency and kidney yang deficiency treatment groups. Comparing with the normal group, the numbers, cleavage rate and embryo formation rate of zygotes in the kidney yin deficiency and kidney yang deficiency model groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the numbers, cleavage rate and embryo formation rate of zygotes in the kidney yin deficiency and kidney yang deficiency treatment groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Kidney deficiency can cause the abnormal demethylation of Snrpn and Peg1/Mest. Erzhi Tiangui Granules and Yougui Pill can prevent loss of imprinting, improve the cleavage rate and embryo formation rate, and treat infertility by supplementing the kidney.

Keywords Erzhi Tiangui Granules; Yougui Pill; ovum; DNA methylation; Snrpn; Peg1/Mest

随着现代辅助生殖技术的发展与应用,“肾主生殖”的科学内涵得到不断地丰富,卵细胞、精子、子宫内膜等与“肾主生殖”所指的先天之精有诸多相合之处^[1]。表观遗传学是研究不涉及 DNA 序列改变的基因表达和调控的学科,表观遗传修饰在人类生殖的卵细胞、精子发生、受精、胚胎发育等过程中起着重要作用。长期临床实践证明,补肾能提高卵细胞质量、胚胎发育潜能及辅助生殖技术的成功率^[2-4]。本研究通过观察二至天葵颗粒和右归丸对肾虚小鼠卵细胞印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 甲基化状态,探讨补肾中药改善体外受精—胚胎移植(IVF)结局的表观遗传学疗效机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康清洁级昆明种小鼠 175 只,雌性,8~9 周龄,体重(35±5)g;另选择有性交经验的雄性小鼠 25 只,8~9 周龄,体重(45±5)g,以上小鼠均由山东大学医学院动物中心提供,实验动物合格证号:SCX 鲁 20090001。

1.2 实验药物

二至天葵颗粒,由菟丝子、女贞子、墨旱莲、枸杞子、熟地黄、当归、川芎、白芍、制香附、炙甘草组成,每袋 3g,由山东中医药大学附属医院制剂室提供(批号 FZ032-03)。右归丸,每粒 0.18g,每瓶 250 粒,河南省宛西制药股份有限公司生产(批号 100307)。运用人与动物的体表面积计算法换算^[5],取 3g 二至天葵颗粒稀释入 15ml 蒸馏水中;取 1.8g 右归丸稀释入 5.6ml 蒸馏水中。人绝经期尿促性腺激素(HMG,批号 090202B)、人绒毛膜促性腺激素(HCG,批号 090415B),均为中国丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司生产。氢化可的松注射液:每支 25mg,天津金耀氨基酸有限公司生产(批号 0912101)。甲状腺片:每片 40mg,山东省莱阳生物化学制药厂生产(批号 090525)。

1.3 主要实验试剂和仪器

微量 DNA 提取试剂盒(Fermentas 公司产品,批号 D3096-01),DNA 甲基化修饰试剂盒(美国 Epigentek 公司产品,批号 P1001),DNA 内切酶 BstUI(批号 ER0121)、BstBI(批号 ER0158)均为 Fermentas 公司产品,ModifiedHTFMedium(mHTF, HumanTubalFluidHEPESBuffered,批号 A123A)、0.3%透明质酸酶(批号 A301A)、P-I(Medium with Gentamiein)均为美国 Irvine 公司产品。

体视镜(德国,Leica,GZ6),倒置显微镜(Olympus,CK40-32ph),图像分析仪(Leica,QWinV3 图像分析系统),照像显微镜(Leica,DM4000B),PTC-150 型 PCR 扩增仪(美国 MJResearch 公司)。

1.4 动物分组、造模和给药

按随机数字表法将小鼠分为正常组、肾阴虚模型组、肾阴虚治疗组、肾阳虚模型组、肾阳虚治疗组,每组 35 只。参考文献[6-7]建立动物模型,肾阴虚模型:甲状腺片按 300mg/kg 剂量灌胃,连用 10 天;肾阳虚模型:氢化可的松注射液按 25mg/kg 剂量大腿外侧轮流肌肉注射,连用 10 天。肾阴虚治疗组:造模同时每天予配制的二至天葵颗粒溶液 0.5ml 灌胃。肾阳虚治疗组:造模同时每天予配制的右归丸溶液 0.5ml 灌胃。正常组:予 0.5ml 的生理盐水灌胃。各组经上处理 10 天后,按照文献[8]进行超排卵,即实验至第 11 天,每只小鼠注射 HMG 12IU,48h 后注射 HCG 12IU。

1.5 标本收集

注射 HCG 13h 后,每组脱颈处死 30 只小鼠,剖腹取出输卵管,在体视镜下用 TB 针划破输卵管壶腹部,收集被黏液团和颗粒细胞包裹的卵子;选取 MII 期卵细胞放入含 0.3%透明质酸酶的 mHTF 培养液中 3~5min 除去卵丘细胞,接着用 mHTF 洗卵,防止被体细胞污染,获得脱颗粒后的卵母细胞。注射 HCG 同时,将每组另 5 只雌鼠和雄鼠 1:1 比例合笼饲养,次日 8 时观察阴道栓,见阴道栓日为孕 1 天,40h 后同上法处死小鼠,解剖取出输卵管,TB 针冲洗一端,使受精卵从另一端流出,收集受精卵于含 P-1 液的四孔培养皿中,观察受精卵卵裂及囊胚形成情况,计算卵裂率和囊胚形成率。

1.6 卵细胞印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 的甲基化测定

1.6.1 DNA 提取和重亚硫酸盐处理 使用微量 DNA 回收试剂盒提取卵子 DNA。每组回收两批独立收集卵子(400~500 卵子/批)DNA。使用 DNA 甲基化修饰试剂盒进行 DNA 的修饰处理。

1.6.2 小鼠卵细胞 DNA-PCR 扩增 Snrpn 和 Peg1/Mest 甲基化位点上下游引物序列参考文献[9],由上海博尚生物科技公司合成。Snrpn: Outside forward: ATGTAATATGATATAGATT-TAGAAATTAG, Inside forward: AATTTGTGT-GATGTTTGTAATTATTTGG, Outside reverse: AATAAACCCAAATCTAAAATATTTTAATC,

Inside reverse: ATAAAATACACTTTTCACTAC-TAAAATCC; Peg1/Mest: Outside forward: GATTTGGGATATAAAAGGTTAATGAG, Inside forward: TTTTAGATTTTGAGGGTTT-TAGGTTG, Outside reverse: TCATTAAAAACA-CAAACCTCCTTTAC, Inside reverse: AATC-CCTTAAAAATCATCTTTTCACAC。

为获得 PCR 产物和避免 PCR 扩增的随机性,使用 $2\mu\text{l}$ 生理盐水处理之后的 DNA 作模板同时进行两个独立的巢式 PCR。每个巢式 PCR 中,第一次扩增的体积是 $25\mu\text{l}$,取其 $6\mu\text{l}$ 作为第二轮扩增的模板,第二次扩增的体积是 $50\mu\text{l}$ 。参照 PCR 检测试剂盒使用说明书进行操作。

1.6.3 PCR 限制性内切酶分析 每个处理中一半 PCR 产物用于酶切分析。用内切酶 BstUI 切 Snrpn 基因,识别位点:5-C GC G-3,3-G CG C-5,酶切产物大小:268+2+150bp;用内切酶 BstBI 切 Peg1/Mest 基因,识别位点:5-T TC GAA-3,3-AAG CT

T-5,酶切产物大小 172+93+135+163bp。

1.6.4 电泳 反应结束后取产物 $5\mu\text{l}$ 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭 EB 染色,100V 电压电泳 25 min,在紫外光下自显影,经计算机扫描成像来判定结果。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,进行 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验,当 $T<5$ 时,采用 Fisher 精确检验。

2 结果

2.1 各组小鼠卵细胞印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 甲基化的比较

各组小鼠卵细胞均有 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因表达,结果见图 1、图 3;酶切后各组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因的甲基化状态,结果见图 2、图 4。正常组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因完全甲基化;肾阴虚模型组、肾阳虚模型组小鼠卵

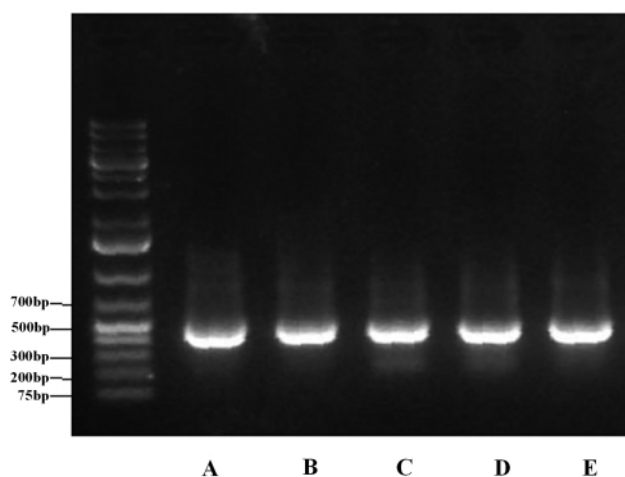


图 1 酶切前各组小鼠卵母细胞 Snrpn DNA

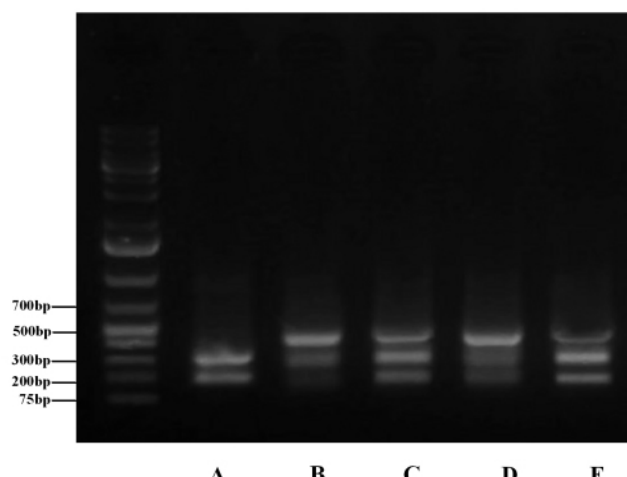


图 2 酶切后各组小鼠卵母细胞 Snrpn DNA

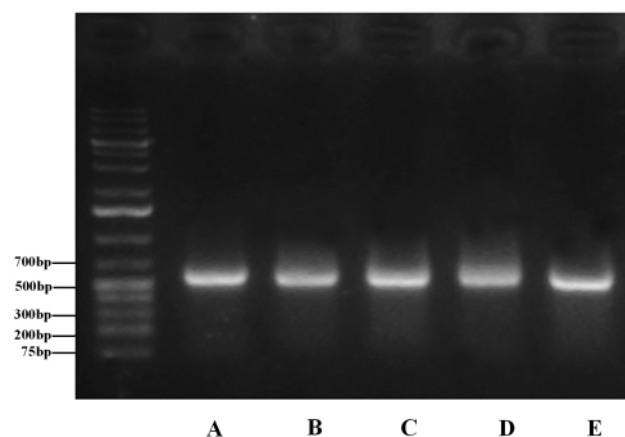


图 3 酶切前各组小鼠卵母细胞 Peg1/Mest DNA

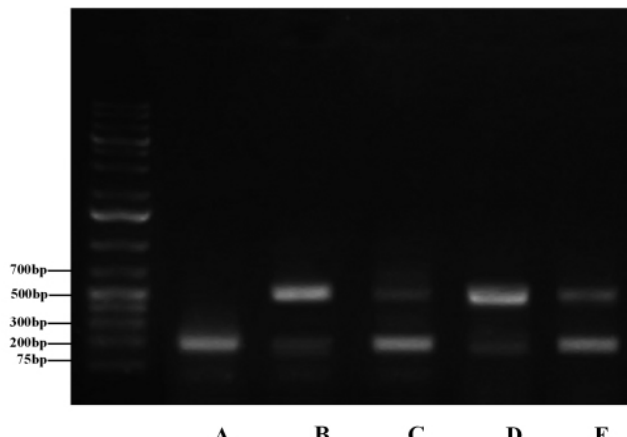


图 4 酶切后各组小鼠卵母细胞 Peg1/Mest DNA

注:图 1—4 中 A 为正常组,B 为肾阴虚模型组,C 为肾阴虚治疗组,D 为肾阳虚模型组,E 为肾阳虚治疗组

细胞 Snrpn 基因发生了明显的去甲基化;肾阴虚治疗组、肾阳虚治疗组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因的去甲基化状态得到了纠正。表明肾虚可导致小鼠卵细胞母本印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 的 DMR 发生去甲基化,而二至天葵颗粒和右归丸可纠正该基因异常去甲基化。

2.2 各组小鼠受精卵数目、卵裂率、囊胚形成率比较

表 1 示,各组受精卵数目、卵裂率、囊胚形成率比较,肾阴虚模型组、肾阳虚模型组明显低于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),肾阴虚治疗组、肾阳虚治疗组与正常组相似,差异无统计学意义($P>0.05$);肾阴虚治疗组明显高于肾阴虚模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),肾阳虚治疗组明显高于肾阳虚模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠受精卵数目、卵裂率及囊胚形成率比较

组别	鼠数	受精卵数目 (个, $\bar{x} \pm s$)	卵裂率 (%)	囊胚形成率 (%)
正常组	5	33.80 $\pm$ 3.92	93.20	43.56
肾阴虚模型组	5	27.80 $\pm$ 3.11*	82.71*	23.76*
肾阴虚治疗组	5	33.00 $\pm$ 3.81#	89.56#	39.82#
肾阳虚模型组	5	27.80 $\pm$ 3.90*	85.72*	24.56*
肾阳虚治疗组	5	32.80 $\pm$ 3.83#	90.12#	40.53#

注:与正常组比较,* $P<0.05$,与相应模型组比较,# $P<0.05$

3 讨论

卵泡的发育、成熟除受促性腺激素、卵巢局部细胞因子的调节,还要经历复杂的表观遗传修饰。目前在人类卵母细胞和早期胚胎各阶段,印迹基因表达尚无一个明确的图谱,对印迹基因的消除和建立的精确时间及其调控机制还未完全清楚。但已证实,卵细胞和植入前胚胎为印迹基因的甲基化印迹建立、去除、重新建立和维持的关键窗口期^[10]。这是一个动态的过程,在每个生殖周期都必须保持精确。此时期受外界因素干扰将可能影响胚胎发育,导致疾病发生。

研究显示,Snrpn、Znf127 和 Ndn 等基因的印迹在原始卵泡到初级卵泡阶段就建立,而 Peg3、Igf2R 和 p57 等基因的印迹在次级卵泡阶段才建立,还有更晚阶段建立的印迹:早期窦卵泡阶段建立的 Mest 和窦卵泡阶段才建立的 Impact 基因,而 Peg1 直到卵母细胞完全成熟后才快速完成新发甲基化^[11]。Lucifero 等^[8]发现在注射 HCG 之后的 20h,小鼠的卵子已经获得了完全的甲基化印迹。由此可知,排卵前卵泡中的成熟卵母细胞已完全完

成印迹模式,此阶段干扰印迹建立会改变印迹基因的表达模式,影响卵细胞质量、受精卵、胚胎的发育甚至导致出生后子代的表型异常。

Snrpn 是一个母本印迹基因,卵母细胞中该基因的甲基化状态与卵细胞发育、老化及质量有关。该基因的印迹功能紊乱可引起胚胎发育异常,包括流产、畸形、胚胎死亡、生长迟缓、精神行为异常、神经系统的发育异常等^[12]。Peg1/Mest 也是一个母本印迹基因,该基因在卵细胞上的母本表达会导致胚胎的生长阻碍^[13]。Snrpn、Peg1/Mest 基因表达的研究对卵子成熟、胚胎发育和人类相关印迹疾病发生的分子机制有着十分重要意义。

“肾主生殖”是《黄帝内经》对人体生殖功能的高度概括。二至天葵颗粒中女贞子、菟丝子滋补肝肾益精,阴阳并补,共为君药;墨旱莲、枸杞子、熟地黄滋补肝肾、填精养血,协助君药共奏清补肾阴之功,共为臣药;白芍、当归、川芎、制香附养血疏肝,调达冲任,精血互化,以佐君药滋补肾阴之功,共为佐药;炙甘草补脾益气,调和诸药为使药。诸药共用使肾中阴阳平秘,经候自调,则胎孕可成。二至天葵颗粒可通过改善卵细胞质量而提高临床妊娠率^[14]。

右归丸是温补肾阳代表方,功效为温补肾阳,填精益髓。临床上妇科常用于治疗不孕症、闭经等病症辨证属肾阳虚精血亏虚者,该方可上调肾阳虚模型大鼠卵巢卵泡细胞 Bcl-2、Caspase-3、Bax 表达,发挥抑制凋亡的作用^[15]。本研究结果发现,各组小鼠成熟卵细胞均有 Snrpn、Peg1/Mest 基因表达;正常组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因完全甲基化;肾阴虚模型组、肾阳虚模型组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因发生了明显甲基化;使用二至天葵颗粒、右归丸治疗的肾阴虚、肾阳虚治疗组小鼠卵细胞 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因去甲基化状态得到了一定的纠正。各组受精卵数目、卵裂率、囊胚形成率比较,肾阴虚模型组、肾阳虚模型组明显低于正常组($P<0.05$),肾阴虚治疗组、肾阳虚治疗组与正常组相似($P>0.05$);各治疗组均高于相应的模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示肾虚可导致小鼠卵细胞印迹基因 Snrpn 和 Peg1/Mest 基因发生去甲基化,这种异常的去甲基化可能是肾虚不孕症的发病机制之一;二至天葵颗粒、右归丸可在一定程度上纠正该基因的异常去甲基化,改善肾虚小鼠受精卵卵裂率、囊胚形成率,推测纠正 DNA 异常去甲基化是补肾治疗不孕症的作用机制之一。

参考文献

- [1]王瑞霞,连方,孙振高.从现代生殖医学角度探讨“肾藏精主生殖”理论[J].辽宁中医杂志,2010,37(9):1672-1674.
- [2]连方,孙振高,穆琳,等.二至天葵颗粒提高卵细胞质量与小鼠卵巢内 IGF-1RmRNA 表达量关系的研究[J].中国中西医结合杂志,2006,26(5):431-434.
- [3]连方,贺瑞燕,李婷婷.二至天葵颗粒对黄体功能不健性不孕症患者子宫内膜受容性的影响[J].中医杂志,2009,50(11):988-990.
- [4]张建伟,连方,孙振高,等.中药二至天葵颗粒对控制性超排卵周期卵泡液 IL-1 β 、IL-6 以及对胚胎质量的影响[J].生殖与避孕,2007,27(11):714-717.
- [5]苗明三.实验动物和动物实验技术[M].北京:中国中医药出版社,2003:143-144.
- [6]蒋时红.安神益智胶囊对阴虚模型小鼠的益智作用[J].中国中医药信息杂志,1997,4(7):37-38.
- [7]张伟荣,陈小野.中医实验学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2004:166-168.
- [8]沈宗姬,徐文新,华月琴,等.体外受精-胚胎移植模型的建立[J].苏州医学院学报,2000,20(9):811-812.
- [9]Lueifero D, Mertineit C, Clarke HJ, et al. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells[J]. Genomic, 2002, 79(4):530-538.
- [10]Santos F, Hendrich B, Reik W, et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the mouse embryo[J]. Dev Bio, 2002, 241(1):172-182.
- [11]Lucifero D, Chaillat JR, Trasler JM, et al. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology[J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(1):3-18.
- [12]Li S, Klein ES, Russo AF, et al. Isolation of cDNA clones encoding small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins with different tissue specificities[J]. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86(24):9778-9782.
- [13]Lefebvre L, Viville S, Barton SC, et al. Genomic structure and parent-of-origin-specific methylation of Peg1[J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(11):1907-1915.
- [14]连方,孙振高,张建伟,等.二至天葵方对小鼠卵细胞质量的影响的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2004,24(7):625-627.
- [15]徐晓娟,金沈锐,秦旭华,等.右归丸对肾虚大鼠卵巢细胞 Caspase-3、TNF α 、Bcl-2、Bax 表达的影响[J].中医基础医学杂志,2005,11(7):503-505.

(收稿日期:2013-02-28;修回日期:2013-05-28)

[编辑:邓 媛]

东华原医疗——

浓缩收膏包装机组 膏方生产全自动



东华原医疗
DONGHUAYUAN MEDICAL

提供从中药材到膏滋包装成品多种“一站式”解决方案



北京东华原医疗设备有限公司 www.donghuayuan.com 400-888-0258 800-810-0359