

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.23.015

逍遥丸含药血清对体外生长小鼠腔前卵泡 卵母细胞中 Smads 表达的影响

孙晓换, 刘亚华, 魏学聪, 李丽, 范丽洁, 谷向向, 耿丹丹, 杜惠兰*

(河北医科大学, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017)

摘要 目的 探讨逍遥丸提高体外卵母细胞质量的可能作用机制。方法 分离 58 只昆明小鼠腔前卵泡, 分别以 10% 正常大鼠血清, 10% 逍遥丸低、中、高剂量大鼠含药血清, 10% 逍遥丸高剂量大鼠含药血清 + 10 μ mol/L K02288 孵育, 设为对照组, 疏肝低、中、高剂量组, 抑制剂组, 培养 6 天。实时荧光定量 PCR 法检测卵母细胞中 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达, 细胞免疫荧光检测 Smad1、Smad5、Smad8 和磷酸化的 Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) 蛋白表达。结果 疏肝高剂量组 Smad1 mRNA 和蛋白高于对照组 ($P < 0.05$); 疏肝各剂量组 Smad5、Smad8 mRNA 和蛋白及 p-Smad1/5/8 蛋白均高于对照组 ($P < 0.05$), 其中疏肝高、中剂量组 Smad5 mRNA 和蛋白比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 均高于低剂量组 ($P < 0.05$), Smad8 mRNA 和蛋白及 p-Smad1/5/8 蛋白以疏肝高剂量组最高 ($P < 0.05$); 抑制剂组 p-Smad1/5/8 蛋白低于疏肝高剂量组 ($P < 0.05$)。结论 逍遥丸提高体外卵母细胞质量的作用可能与上调卵母细胞中 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 和蛋白及 p-Smad1/5/8 蛋白表达有关, 以高剂量组效果更佳。

关键词 逍遥丸; 腔前卵泡; 卵母细胞; Smads; 抑制剂

中医学认为, 肝藏血, 主疏泄, 司周身气机。女子以血为本, 经、孕、产、乳皆以血为物质基础。肝之藏血、疏泄功能正常, 则气血调和, 天癸泌至有节, 冲任血海盈亏有序, 经调而子嗣。课题组前期研究发现, 逍遥丸可调节促性腺激素预处理小鼠卵巢功能^[1], 修复雄激素致排卵障碍模型大鼠腺垂体、卵巢结构^[2], 并通过上调体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 患者颗粒细胞和超促排卵小鼠卵母细胞中骨形态发生蛋白 (BMP) 15 表达提高卵母细胞质量, 增加 IVF-ET 患者优质胚胎率和超促排卵小鼠优质卵泡率^[3-4]。BMP15 在卵巢内的作用主要通过 BMP-Smads 信号转导通路实现, 其中腔前卵泡卵母细胞 Smads (Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8) 是 BMP15 的下游信号分子。本研究通过观察逍遥丸含药血清对体外培养小鼠腔前卵泡卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 的影响, 以期阐释逍遥丸提高卵母细胞质量的可能作用机理。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雌性昆明小鼠 58 只, 12 日龄, 体重 (8.5 ± 1.0) g; 清洁级雌性 SD 大鼠 12 只, 6 周龄, 体重 (155 ± 10) g。实验动物合格证编号分别为: 1507045, 1504103, 均购自河北省实验动物中心。

1.2 药物

逍遥丸 (批号: 141101, 河南宛西制药股份有限公司)。分别将 24、48、72 丸逍遥丸溶于蒸馏水中定容至 100 ml, 制成低、中、高剂量混悬液, 浓度分别为 0.09、0.18、0.27 g/ml, 4℃ 保存。

1.3 主要试剂及仪器

α -改良伊格尔培养基 (α -MEM, 批号: 8114083), 美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清 (FBS, 批号: 1520002), 以色列 Bioind 公司; 胰岛素-转铁蛋白-硒 (ITS, 批号: SLBL0388V), 美国 Sigma 公司; 青霉素-链霉素 (批号: 1445472), 以色列 Bioind 公司; 重组人促卵泡激素 (rhFSH, 批号: BA017828), 德国 Merck Serono 公司; 重组人促黄体激素 (rhLH, 批号: AU004513), 德国 Merck Serono 公司; 胶原酶 NB4 (批号: 060684), 德国

基金项目: 国家自然科学基金 (81173294)

* 通讯作者: duhuilan@163.com, 13931150880

Serva 公司; 透明质酸酶 (批号: H8030), 北京索莱宝生物科技有限公司; K02288 (批号: 16678), 美国 Cayman 公司; Trizol (货号: 15596-026), 美国 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录试剂盒 (货号: A3500), 美国 Promega 公司; SYBR Green I 荧光定量 PCR 仪 (货号: K0251), 加拿大 Fementas 公司; Smad1 一抗 (货号: DF6243), Smad5 一抗 (货号: AF5119), Smad8 一抗 (货号: AF5114), 均为美国 Affinity 公司产品; p-Smad1/5/8 一抗 (货号: 13820), 美国 CST 公司; 荧光二抗 (批号: 117979), 北京中杉金桥生物技术有限公司。ND2000 型紫外分光光度计, 美国 Thermo 公司; 7300 型荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; RS-28 型低温离心机, 德国贺利氏公司; UVP 凝胶扫描仪, 美国 UVP 公司; EZ4 体视显微镜, 德国 Leica 公司; BX51T-PHD-J11 倒置显微镜, IX71 荧光倒置显微镜, 均为日本 Olympus 公司产品。

2 方法

2.1 含药血清的制备

12 只雌性 SD 大鼠采用随机数字表法分为逍遥丸低、中、高剂量组和空白对照组, 每组 3 只。自由饮水和进食, 动物室温度约 20℃, 相对湿度约 50%。逍遥丸低、中、高剂量组和空白对照组每日 8:00、14:00 分别灌服浓度为 0.09、0.18、0.27 g/ml 逍遥丸混悬液 (分别相当于成人剂量的 6、12、18 倍) 和蒸馏水 1 ml/ (100 g · d), 连续 3 天, 第 4 日禁食 12 h 后一次性灌服全天剂量, 1 h 后行股动脉采血。37℃ 水浴 15 min, 常温下 3000 r/min 离心 15 min, 取上清, 56℃ 水浴 30 min, 0.22 μm 无菌滤器过滤除菌、分装, 获得逍遥丸低、中、高剂量大鼠含药血清和正常大鼠血清, -20℃ 保存备用。

2.2 腔前卵泡分离及分组培养

参照文献 [7] 中机械显微分离法分离小鼠腔前卵泡。无菌条件下颈椎脱臼法分批处死 58 只昆明小鼠, 于肾囊处取其双侧卵巢, 含青霉素 200 IU/ml、链霉素 200 μg/ml 的生理盐水清洗 2 或 3 次, 转移至超净工作台, 将卵巢置于卵泡分离液中 (α-MEM + 10% FBS + 100 IU/ml 青霉素 + 100 μg/ml 链霉素), 40 倍体视显微镜下用 25G 针头进行卵泡分离, 操作时动作尽量精细迅速。腔前卵泡选择标准: 1) 直径 80 ~ 120 μm; 2) 卵泡中

央有一圆形卵母细胞; 3) 颗粒细胞 2 ~ 4 层, 包绕于卵母细胞周围; 4) 卵泡壁和基底膜完整清晰, 无明显因操作造成的卵泡损伤。在 35 mm 培养皿中加入 1 ml 培养液 (α-MEM + 10% FBS + ITS + 100 mIU/ml rFSH + 10 mIU/ml rLH + 100 IU/ml 青霉素 + 100 μg/ml 链霉素), 每个培养皿移入 100 个腔前卵泡, 37℃、5% CO₂、100% 湿度的三气培养箱中培养。24 h 后卵泡贴壁, 分别加入 10% 正常大鼠血清, 10% 逍遥丸低、中、高剂量大鼠含药血清, 10% 逍遥丸高剂量大鼠含药血清 + 10 μmol/L K02288 (K02288 于收集卵母细胞前 2 h 加入), 设为对照组, 疏肝低、中、高剂量组及抑制剂组 (以上操作重复 3 次, 抑制剂组每次 1 个培养皿, 其余各组每次 3 个培养皿)。培养 6 天, 隔天换液 1/2。

2.3 观察指标及方法

体外培养第 6 天依次用 0.25% 胶原酶 NB4 和 0.1% 透明质酸酶 37℃ 消化腔前卵泡 5 ~ 10 min, PBS 反复冲洗后得到卵母细胞。

2.3.1 卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达 采用实时荧光定量 PCR 法。对照组及疏肝低、中、高剂量组分别取 300 个卵母细胞, Trizol 一步法提取总 RNA, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计鉴定 RNA 纯度和浓度后反转录于 PCR 仪上, 42℃ 50 min (cDNA 合成), 95℃ 5 min (反转录酶灭活)。然后分别以 GAPDH、Smad1、Smad5、Smad8 的特异性引物进行 PCR 反应。引物设计应用 Primer Premier 5.0 软件, 根据 Gene Bank 所发布的基因序列进行, 经 Gene Bank BLAST 同源性检测, 由上海生工生物工程有限公司合成, 具体引物序列如下 (5'至 3'): GAPDH: 上游: TGAACGGGAAGCTCACTGG, 下游: GCT-TCACCACCTTCTTGATGTC; Smad1: 上游: TGCT-TACCTGCCTCCTGAA, 下游: CAACTGCCTGAA-CATCTCCTCT; Smad5: 上游: CCTCCAGTATT-AGTGCCTCGT, 下游: GGAAAGAATCGGGAAACG; Smad8: 上游: AGAGACTTTCCAGGCGTCT, 下游: ACACCCTTTCCAATGTGCC。ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 仪 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 进行 40 个循环反应, 并于每个循环的第三个步骤收集荧光信号, 扩增结束, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为公式, 得到各目的基因表达的相对定量值, 每个目的基因重复测定 3 次, 进行统计分析。

2.3.2 卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达 采用细胞免疫荧光法。抑制剂组取 100 个卵母细胞,其余各组分别取 400 个卵母细胞,涂布于多聚赖氨酸处理的玻片表面(每片 25 个),自然风干,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.3% TritonX-100 处理 20 min,10% 正常山羊血清室温封闭 20 min。抑制剂组滴加 p-Smad1/5/8 (1:50) 一抗,其余各组 300 个卵母细胞分别滴加 Smad1 (1:80)、Smad5 (1:80)、Smad8 (1:100),100 个卵母细胞滴加 p-Smad1/5/8 (1:50) 一抗,每组每种抗体 4 个玻片,湿盒中 4℃ 孵育 24 h,室温静置 20 min,滴加 FITC 标记的荧光二抗 (1:40),湿盒中孵育 1.5 h,DAPI 染液处理 10 min,进行细胞核染色,含抗荧光淬灭剂的封片液封片。同时做去一抗、二抗的阴性对照。荧光显微镜下观察照相,采用美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图象分析管理系统计算平均光密度值 (MOD),每个玻片测量 5 个视野用于统计分析。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件包进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较用单因素方差分析,均数间两两比较采用 SNK 法 Q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达比较

表 1 示,与对照组比较,疏肝高剂量组 Smad1 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$),疏肝低、中剂量组

Smad1 mRNA 表达无明显变化 ($P > 0.05$);疏肝低、中、高剂量组 Smad5、Smad8 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$)。疏肝各剂量组组间比较,疏肝高剂量组 Smad1 mRNA 表达明显高于疏肝低、中剂量组 ($P < 0.05$),疏肝低、中剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);疏肝高、中剂量组 Smad5 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),均高于疏肝低剂量组 ($P < 0.05$);Smad8 mRNA 以疏肝高剂量组最高,中剂量组次之,低剂量组最低,呈剂量依赖性,组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.2 各组卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达比较

表 2、表 3 示,与对照组比较,疏肝高剂量组 Smad1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),疏肝低、中剂量组 Smad1 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$);疏肝低、中、高剂量组 Smad5、Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。疏肝各剂量组组间比较,疏肝高剂量组 Smad1 蛋白表达明显高于疏肝低、中剂量组 ($P < 0.05$),疏肝低、中剂量组差异无统计学意义 ($P > 0.05$);疏肝高、中剂量组 Smad5 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),均高于疏肝低剂量组 ($P < 0.05$);Smad8、p-Smad1/5/8 蛋白表达均以疏肝高剂量组最高,中剂量组次之,低剂量组最低,呈剂量依赖性,组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与疏肝高剂量组比较,抑制剂组 p-Smad1/5/8 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	卵母细胞数	Smad1	Smad5	Smad8
对照组	300	1.293 ± 0.216	1.170 ± 0.459	1.280 ± 0.472
疏肝低剂量组	300	1.373 ± 0.146	3.330 ± 0.623*	1.736 ± 0.097*
疏肝中剂量组	300	1.765 ± 0.539	4.140 ± 0.617*△	2.838 ± 0.245*△
疏肝高剂量组	300	4.402 ± 0.518*△▲	4.180 ± 0.386*△	3.742 ± 0.225*△▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与疏肝低剂量组比较,△ $P < 0.05$;与疏肝中剂量组比较,▲ $P < 0.05$

表 2 各组卵母细胞 Smad1、Smad5、Smad8 蛋白表达比较 (MOD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	卵母细胞数	Smad1	Smad5	Smad8
对照组	300	0.258 ± 0.043	0.249 ± 0.098	0.256 ± 0.094
疏肝低剂量组	300	0.275 ± 0.029	0.708 ± 0.133*	0.347 ± 0.020*
疏肝中剂量组	300	0.353 ± 0.108	0.881 ± 0.131*△	0.568 ± 0.049*△
疏肝高剂量组	300	0.880 ± 0.104*△▲	0.889 ± 0.082*△	0.748 ± 0.045*△▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与疏肝低剂量组比较,△ $P < 0.05$;与疏肝中剂量组比较,▲ $P < 0.05$

表 3 各组卵母细胞 p-Smad1/5/8 蛋白表达比较 (MOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	卵母细胞数	p-Smad1/5/8
对照组	100	0.232 ± 0.050
疏肝低剂量组	100	0.365 ± 0.051*
疏肝中剂量组	100	0.548 ± 0.024*△
疏肝高剂量组	100	0.809 ± 0.027*△▲
抑制剂组	100	0.164 ± 0.032#

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与疏肝低剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与疏肝中剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; 与疏肝高剂量组比较, # $P < 0.05$

4 讨论

卵母细胞质量受多种因素影响, 卵巢局部的多因子调节网络尤其是卵母细胞分泌因子 (oocyte-secreted factors, OSFs) 可改善卵母细胞生长的微环境, 是广大生殖医学研究者关注的焦点。其中 BMP15 是重要的 OSFs 之一, 在人类卵巢中特异性表达^[8], 可刺激颗粒细胞增殖、抑制卵泡黄素化、促进卵母细胞优质生长^[9]。Su 等^[10]观察到, 体外培养牛的卵母细胞过程中加入 BMP15, 可以显著提高发育到囊胚期的比例, 证实 BMP15 对卵泡微环境的调节可明显改善卵母细胞发育潜力。BMP15 的主要信号转导途径是 BMP-Smads 信号通路, 其中 Smad1、Smad5、Smad8 属于 R-Smads, 是 BMP15 受体作用的底物^[11-12], 能够将配体与受体作用的信号由细胞浆传递至细胞核, p-Smad1/5/8 是三者的活化状态。Smad1 表达升高可改善 IVF-ET 患者卵巢功能, 促进卵泡发育, 提高临床妊娠率^[13]。Smad1/5 空基因小鼠原始生殖干细胞发育异常, 而且条件性敲除 Smad1/5/8 会导致小鼠类固醇激素产生减少、排卵功能障碍^[14]。此外, Smads 分子受促卵泡生成激素 (FSH) 调控, 而 FSH 是调节卵泡发育的重要因子, FSH 可通过减少颗粒细胞抑制型 Smads 表达而上调 Smad8 水平, 且 FSH 可上调 Smad1/5/8 的磷酸化水平, 以增强 BMP 信号活性^[15]。可见, Smads 分子及其磷酸化程度与卵泡发育和卵母细胞质量密切相关。

逍遥丸源于逍遥散, 乃“女科圣药”。方中柴胡疏肝解郁, 条达肝气, 引诸药入肝经以调畅肝经和冲任气血, 为君药; 当归、白芍养血调经, 敛阴柔肝, 两药相合养肝体以助肝用, 并防柴胡疏泄太过, 为臣药; 白术、茯苓、炙甘草补气健脾和胃, 养肝阴使运化有权, 营血生化有源, 以增强当归、白芍的养血之效, 兼实土以抑木, 生姜温胃和中,

薄荷疏肝而散郁热, 共为佐药; 此外, 炙甘草调和药性, 缓急止痛, 兼为使药。诸药相合, 疏肝解郁、养血敛阴、健脾和营, 使肝用得复, 肝体得养, 脾运得健, 肝脾同调, 共奏促进卵泡正常发育以调经种子之功。

本研究发现, 逍遥丸含药血清能够上调体外培养腔前卵泡卵母细胞中 Smad1、Smad5、Smad8 mRNA 和蛋白表达, 增强 BMP-Smads 信号传导, 且存在一定的量效关系, 以高剂量效果显著。此外, 逍遥丸含药血清可以上调卵母细胞中 p-Smad1/5/8 蛋白表达, 以疏肝高剂量组最高, 呈剂量依赖性, 经 BMP-Smads 信号通路抑制剂 K02288 干预后, 其表达水平下降, 表明逍遥丸能够上调 Smad1、Smad5、Smad8 的磷酸化程度, 以增强信号传导, 且高剂量效果最优。另有研究发现, BMP15 可以通过上调 Smad1 表达, 使 R-Smads/Smad4 复合物增多, 进而增强对靶基因的转录调节, 如调节颗粒细胞增生以及 DNA 合成, 而颗粒细胞能够为卵母细胞发育提供微环境支持以促进卵母细胞优质生长^[16]。因此我们推测, 逍遥丸可能通过增加 Smad1、Smad5、Smad8 表达, 上调三者的磷酸化程度, 增强 BMP-Smads 信号传导, 放大 BMP15 的生物学效应, 改善卵泡生长的微环境, 从而促进卵泡体外发育, 提高卵母细胞质量, 且高剂量在各个环节作用显著, 但逍遥丸对非 Smads 通路 (如 PI3K、MAPK) 有无影响以及 Smads 信号传导过程中是否有负性调节蛋白 (如 Smad6、Smad7) 参与有待进一步研究。

参考文献

- 段彦苍, 杜惠兰, 贺明, 等. 补肾调经方、逍遥丸对促性腺激素预处理小鼠组织蛋白酶-L mRNA 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(1): 80-84.
- 徐丁洁, 洪丽文, 徐洪, 等. 补肾调经方、逍遥丸对雄激素致排卵障碍模型大鼠腺垂体、卵巢影响的比较研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(1): 87-90.
- 梁莹. 补肾法、疏肝法提高 IVF-ET 患者卵母细胞质量与颗粒细胞 BMPs 及其 Smads 信号通路的关系 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- 白静. 补肾法、疏肝法对小鼠卵母细胞 BMP-15 及其 Smads 信号通路影响的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- 梁莹, 杜惠兰, 赵胜男, 等. 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 [J]. 中医杂志, 2014, 55(1): 34-37.
- 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): 597-604.
- [7] 彭宇红, 庄广伦, 周灿权, 等. 体外培养小鼠卵母细胞及其生长分化因子-9 基因表达 [J]. 动物学研究, 2006, 27(5): 456-460.
- [8] OTSUKA F, YAO Z, LEE TH, et al. Bone morphogenetic protein 15 identification of target cells and biological functions [J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39523-39528.
- [9] SUGIURA K, SU YQ, DIAZ FJ, et al. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells [J]. Development, 2007, 134(14): 2593-2603.
- [10] SU J, WANG Y, ZHANG L, et al. Oocyte secreted factors in oocyte maturation media enhance subsequent development of bovine cloned embryos [J]. Mol Reprod Dev, 2014, 81(4): 341-349.
- [11] MIYAZAWA K, SHINOZAKI M, HARA T, et al. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signaling [J]. Genes Cells, 2002, 7(12): 1191-1204.
- [12] MOORE RK, OTSUKA F, SHIMASAKI S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 304-310.
- [13] 梁莹, 赵胜男, 常秀峰, 等. 补肾调经方对人卵泡壁颗粒细胞 BMP/Smads 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5): 606-610.
- [14] PANGAS SA, LI X, UMANS L, et al. Conditional deletion of Smad1 and Smad5 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(1): 248-257.
- [15] MIYOSHI T, OTSUKA F, INAGAKI K, et al. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production [J]. Endocrinology, 2007, 148(1): 337-345.
- [16] OTSUKA F, YAO Z, LEE T, et al. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions [J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39523-39528.

Impact of Serum Containing *Xiaoyao Pill* (逍遥丸) on Smads Expression in Oocyte of Mice's Preantral Follicle Growth in Vitro

SUN Xiaohuan, LIU Yahua, WEI Xuecong, LI Li, FAN Lijie, GU Xiangxiang, GENG Dandan, DU Huilan (Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050017)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xiaoyao Pill* in improving the quality of oocyte in vitro. **Methods** Preantral follicles of 56 Kunming mice were separated and divided into the control group, the dispersing the stagnated liver-energy low, medium and high dose groups and the inhibitor group. Preantral follicles in each group were incubated respectively with 10% serum of normal rats, 10% rats' serum containing low, medium and high dose *Xiaoyao Pill*, as well as 10% rats' serum containing high dose *Xiaoyao Pill* + 10 μ mol/L K02288, all for 6 days. The expressions of Smad1, Smad5 and Smad8 mRNA in oocyte were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) method. The expressions of Smad1, Smad5, Smad8, as well as phosphorylated Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) protein were detected by cellular immunofluorescence. **Results** Expressions of Smad1 mRNA and protein in the dispersing the stagnated liver-energy high dose group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). Expression of Smad5, Smad8 mRNA, protein and p-Smad1/5/8 protein in all dispersing the stagnated liver-energy groups were higher than those in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in expressions of Smad5 mRNA and protein between the dispersing the stagnated liver-energy high dose group and medium dose group ($P > 0.05$), which were both higher than those in the low dose group ($P < 0.05$). Expressions of Smad8 mRNA, protein and p-Smad1/5/8 protein were the highest in the dispersing the stagnated liver-energy high dose group ($P < 0.05$). p-Smad1/5/8 protein in the inhibitor group was lower than that in the dispersing the stagnated liver-energy high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Xiaoyao Pill* improving the quality of oocyte in vitro might be relate to up-regulating the expressions of Smad1, Smad5, Smad8 mRNA, protein and p-Smad1/5/8 protein. The effect in the high dose group is the best.

Keywords *Xiaoyao Pill*; preantral follicle; oocyte; Smads; inhibitor

(收稿日期: 2016-06-22; 修回日期: 2016-07-29)

编辑: 王利菊