

《素问·灵兰秘典论》曰：“膀胱者，州都之官，津液藏焉，气化则能出矣”，大肠主津，小肠主液。偏实4个脏腑均与“水湿”相关，岭南地卑雾瘴，且长期炎热，故易出现水湿阻滞化热之实证。综上，笔者发现岭南健康人群虚证经络存在较高比例，其临床指导意义及针刺干预对经络虚实状态的调整效果，有待今后验证。

参 考 文 献

[1] 张燎. 经络检测仪测量不同人群的穴位电阻差异性分析. 广州: 广州中医药大学, 2011

- [2] 朱亮, 骆文斌, 吴承玉. TDS中医经络检测仪的原理与功用. 中医学报, 2011, 26(4): 502-503
- [3] 徐逸哲. E测定(人体手耳皮肤电阻抗测定)诊断恶性肿瘤的研究. 北京: 北京中医药大学, 2007
- [4] 蔺彩娟. 110例患者体质评估与经络检测特点及其与健康状态的关系. 山西中医, 2015, 31(1): 25-27
- [5] 叶沐镛. 利用经络检测仪探讨抑郁症与十二经络的相关性. 中医中药, 2013, 11(17): 704-705
- [6] 周小军, 田道法. 鼻咽癌高危人群体质调查研究. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(8): 51-54

(收稿日期: 2016年12月6日)

· 论 著 ·

左归丸含药血清对小鼠早期胚胎体外发育的影响

洪洁薇¹, 郝璐¹, 贾功雪², 王颖莉³, 许凯霞³, 冯前进³, 陈仲汉⁴, 朱士恩⁵, 牛欣¹, 牛婷立⁶

(¹北京中医药大学, 北京 100029; ²中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; ³山西中医学院, 太原 030619; ⁴杭州市第三人民医院, 杭州 310000; ⁵中国农业大学, 北京 100193; ⁶北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

摘要: 目的: 研究高糖环境下滋阴补肾方药左归丸对小鼠胚胎体外发育的影响。方法: 体外培养小鼠胚胎, 用高浓度葡萄糖抑制胚胎发育, 加左归丸含药血清干预胚胎体外发育过程, 用囊胚率, 2-细胞率和囊胚细胞计数来评估胚胎发育的情况。结果: 高糖环境抑制胚胎发育, 选择40mmol/L为高葡萄糖抑制胚胎发育的浓度, 与正常组比较, 囊胚率下降 ($P < 0.05$), 用左归丸含药血清干预高糖抑制组, 囊胚率升高 ($P < 0.05$)。从囊胚细胞计数来看, 高糖环境减少囊胚细胞数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 左归丸含药血清进一步减少囊胚细胞数, 但能有效提高囊胚率。结论: 高糖抑制胚胎发育, 左归丸含药血清可以提高高糖干预下受抑制的胚胎发育率, 促进胚胎发育。

关键词: 早期胚胎; 体外发育; 高糖; 左归丸; 含药血清

基金资助: 北京中医药大学在读研究生项目 (No.2016-JYB-XS009), 国家国际科技合作专项项目 (No.2012DFA31330), 山西省应用基础研究项目 (No.201601D021166), 国家自然科学基金面上项目 (No.81473553, No.81573880)

Effects of Zuogui Pill serum on early embryo development *in vitro* in mice

HONG Jie-wei¹, HAO Lu¹, JIA Gong-xue², WANG Ying-li³, XU Kai-xia³, FENG Qian-jin³, CHEN Zhong-han⁴, ZHU Shi-en⁵, NIU Xin¹, NIU Ting-li⁶

通讯作者: 牛欣, 北京市朝阳区北三环东路11号北京中医药大学基础医学院, 邮编: 100029, 电话: 010-64286956

E-mail: niux1@vip.sina.com

牛婷立, 北京市丰台区方庄芳星园一区6号北京中医药大学东方医院, 邮编: 100078, 电话: 010-67689642, E-mail: zeromaggie@sina.cn

(¹Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ²Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; ³Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China; ⁴Hangzhou 3rd People's Hospital, Hangzhou 310000, China; ⁵China Agricultural University, Beijing 100193, China; ⁶East Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract: Objective: To study the effects of glucose and Zuogui Pill serum on the *in vitro* development of mouse embryos in high glucose. Methods: Embryos were cultured *in vitro* and the embryonic development was inhibited by high level of glucose. Zuogui Pill serum was used to increase the development of embryos. The blastocyst rate, 2-cell rate and blastocyst nucleus count were used to evaluate the embryonic development. Results: High level of glucose inhibited the embryonic development, and 40mmol/L was selected as the concentration of high glucose to inhibit the embryo development. Compared with the control group, the blastocyst rate of high glucose was decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, blastocyst rate of Zuogui Pill serum was increased ($P<0.05$). From the blastocyst nucleus counting, the high glucose environment reduced the number of blastocyst cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Zuogui Pill serum further reduced the number of blastocysts, but it could improve the rate of blastocyst. Conclusion: High level of glucose reduces the development of embryo while Zuogui Pill serum promotes the blastocyst rate, and promote embryonic development.

Key words: Early embryos; Culture *in vitro*; High glucose; Zuogui Pill; Serum

Funding: Beijing University of Chinese Medicine Graduate Program (No.2016-JYB-XS009), National Special Project of International Cooperation in Science and Technology (No.2012DFA31330), Shanxi Applied Basic Research Project (No.201601D021166), General Program of National Natural Science Foundation of China (No.81473553, No.81573880)

左归丸出自明代张景岳所著《景岳全书》，补先天元阴，主治真阴肾水不足……或腰酸腿软，凡精髓内亏，津液枯涸等证。中医藏象理论认为，肾为先天之本，主藏精，主生殖。研究表明，左归丸体内喂食和左归丸含药血清体外应用培养小鼠胚胎，均能促进酒精抑制下的胚胎发育^[1]。小鼠未成熟卵母细胞的体外成熟效率也会受到左归丸含药血清的显著影响^[2]。此外，左归丸含药血清还能促进受精卵着床相关基因的表达，提高胚胎种植率，从而实现对不孕症的治疗^[3]。糖代谢异常(糖尿病、糖耐量减低)的母亲不易受孕，胚胎质量较正常人低。本研究期望用滋阴补肾的方法，补“先天”益“后天”，探究滋阴补肾方药对受高糖抑制的小鼠早期胚胎发育的恢复作用。

材料与方方法

1. 动物 本实验所用实验动物为6-7周龄的ICR小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)，其中雌性80只，雄性15只，购入后在控温(20-27℃)、控光(光照14h/d, 06:00-20:00)的环境下自由采食和饮水，适应性饲养1周。

2. 药物 左归丸含药血清，由山西中医学院提供，制作方法参考文献[4]。

3. 试剂与仪器 如无特殊说明，所有化学药品均采购自Sigma公司(St. Louis, MO, USA)；PMSG和HCG购于宁波市激素制品有限公司；透明质酸酶、M2操作液、KSOM培养液、DAPI染色液、超净工作台(Nu-301-330E, 英国NUVNR公司)，体视显微镜(261, 日本Olympus公司)，荧光显微镜(BX60,

日本Olympus公司)，CO₂培养箱(3110, 美国Forma公司)。

4. 受精卵的收集和体外培养 腹腔注射PMSG和HCG超数排卵并与性成熟同系小鼠交配，有栓雌鼠于受精后10h引颈处死，摘除输卵管壶腹部置于M2操作液中，显微镜下用注射器针头将输卵管透明膨大处撕破，将游离出来的受精卵在透明质酸酶中脱去颗粒细胞，清洗后放入培养液滴中，于37℃、5%CO₂饱和湿度的CO₂培养箱中培养。24h后统计2-细胞率，96h后统计囊胚率和囊胚细胞数。

5. 干预方法 实验一：将葡萄糖含量逐渐加到80mmol/L，分成5组：正常组(2.81mmol/L)，20mmol/L组，40mmol/L组，60mmol/L组，80mmol/L组。将1次实验收集的所有受精卵随机分入各组。观察含有不同浓度葡萄糖的培养液对小鼠胚胎早期发育的作用。实验二：基于实验一，筛选出高糖抑制胚胎发育模型的最适葡萄糖浓度，加入5%左归丸含药血清干预^[1]。将1次实验收集的所有受精卵用移卵针随机分入4组：正常组，高糖抑制组，高糖抑制+空白血清组，高糖抑制+左归丸含药血清组。观察左归丸含药血清对小鼠胚胎早期发育的影响。

6. 胚胎质量评价 倒置显微镜体外动态观测小鼠胚胎早期发育情况，拍照做形态学观察，统计卵裂率、囊胚率、DAPI荧光染色法统计囊胚数，观察高糖抑制与左归丸含药血清处理对小鼠早期胚胎体外发育的影响。

7. 统计学方法 数据分析用prism 6.01软件，计量

资料组间比较用t检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 葡萄糖对体外胚胎发育情况的影响 见表1。与正常组比较, 40mmol/L组、60mmol/L组和80mmol/L组囊胚率明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 20mmol/L组、40mmol/L组、60mmol/L组和80mmol/L组囊胚细胞数明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表1 高糖对小鼠胚胎体外发育的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	2-细胞率 (%)	囊胚率 (%)	囊胚细胞数
正常组	0.85 ± 0.18	0.74 ± 0.16	44.79 ± 12.33
20mmol/L组	0.84 ± 0.14	0.67 ± 0.19	41.55 ± 12.63*
40mmol/L组	0.80 ± 0.13	0.53 ± 0.26*	40.11 ± 13.41*
60mmol/L组	0.72 ± 0.22	0.32 ± 0.23**	29.98 ± 14.36**
80mmol/L组	0.81 ± 0.14	0.04 ± 0.08**	34.89 ± 8.68*

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2. 各组胚胎2-细胞形态学观察 见图1。图1为光镜下受精后38h的正常2-细胞和高糖培养液培养的2-细胞图。2-细胞率与受精有着密切关系, 光镜下并没有观察到高糖影响下的胚胎出现异常。

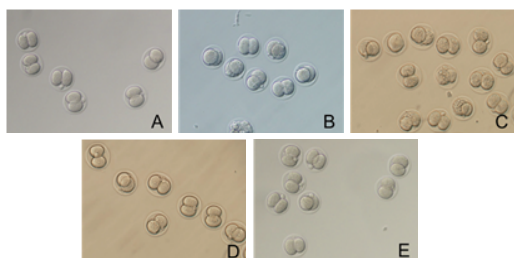


图1 光镜下受精后38h 2-细胞图 (×40倍)

注: A. 正常组; B. 20mmol/L组; C. 40mmol/L组; D. 60mmol/L组; E. 80mmol/L组。

3. 各组胚胎囊胚形态学观察 见图2。图2为光镜下受精后110h正常囊胚和高糖培养液培养的囊胚图。正常培养液中囊胚率在70%以上, 20mmol/L组与正常组相似, 在形态上无明显区别; 60mmol/L组的囊胚率显著下降 ($P < 0.01$), 且囊胚腔较小; 80mmol/L

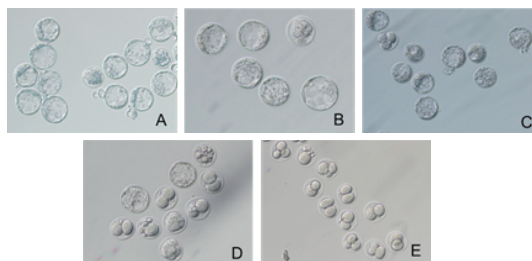


图2 光镜下受精后110h囊胚图

注: A. 正常组 (×40); B. 20mmol/L组 (×40); C. 40mmol/L组 (×40); D. 60mmol/L组 (×40); E. 80mmol/L组 (×20)。

L组几乎未见囊胚, 胚胎从2-细胞到4-细胞不等, 大多数胚胎被阻滞在2-细胞时期。

4. 左归丸含药血清对高糖40mmol/L负荷下小鼠胚胎发育率的影响 见表2。囊胚率: 与高糖抑制组比较, 高糖抑制+空白血清组无统计学差异, 高糖抑制+左归丸含药血清组有显著性差异 ($P < 0.05$), 排除了空白血清的干扰。2-细胞率: 各组间无显著性差异。

表2 左归丸含药血清对高糖40mmol/L负荷下小鼠胚胎发育率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, %)

组别	2-细胞率	囊胚率
正常组	0.62 ± 0.12	0.65 ± 0.18**
高糖抑制组	0.67 ± 0.16	0.38 ± 0.16
高糖抑制+空白血清组	0.75 ± 0.16	0.52 ± 0.20
高糖抑制+左归丸含药血清组	0.57 ± 0.27	0.64 ± 0.25*

注: 与高糖抑制组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下表同。

5. 左归丸含药血清对囊胚细胞数的影响 见表3, 图3。各组囊胚用DAPI染色后荧光拍照, 做囊胚细胞计数。与高糖抑制组比较, 高糖抑制+左归丸含药血清组囊胚细胞数降低 ($P < 0.01$)。

表3 左归丸含药血清对40mmol/L高糖负荷下囊胚细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, %)

组别	囊胚细胞数
正常组	43.77 ± 13.11*
高糖抑制组	40.11 ± 13.41
高糖抑制+左归丸含药血清组	28.97 ± 11.12**

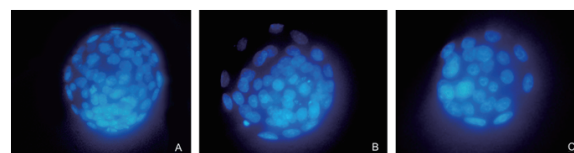


图3 受精后110h囊胚DAPI染色荧光图 (×100)

注: A. 正常组; B. 高糖抑制组; C. 高糖抑制+左归丸含药血清组。

讨论

小鼠超数排卵、受精卵收集培养、囊胚收样观察的时间点是固定的。从形态上观察, 囊胚率随着葡萄糖浓度的增高而降低, 自40mmol/L高糖浓度始, 囊胚形态发生明显改变, 囊胚内细胞团厚而紧密, 囊胚腔小, 腔液少。说明随着糖浓度增高, 早期囊胚数量占总囊胚数 (包括早期囊胚, 扩张囊胚和孵化囊胚) 的比例增高。经观察, 当糖浓度上升到80mmol/L, 囊胚形成被完全抑制。令人费解的是, 高糖对卵裂率并没有影响, 可能是体内自然受精的胚胎没有2-细胞阻滞的问题, 有着更好的抵御恶劣环

境的能力^[5-8]。

本研究选用40mmol/L作为葡萄糖抑制浓度,从囊胚率来看,左归丸含药血清能有效地促进胚胎发育,并且能排除空白血清的影响。尽管高糖作用下的胚胎与正常胚胎相比,早期囊胚比例增加,也能提示胚胎能一定程度的抵抗高糖环境的影响。从高糖抑制胚胎发育的情况来看,囊胚细胞核数量随着糖浓度的增高而减少,但我们却得到了这样的结果:与高糖抑制组相比,囊胚发育率更高的左归丸含药血清组的囊胚细胞核数量反而较少。笔者推测,这种现象可能与早期囊胚所占比例过大有关。

将不孕和2型糖尿病母亲的代谢问题联系起来,是因为胰岛素抵抗是其可能存在的共同机制。最新的研究表明,与排卵障碍和输卵管阻塞有关的不孕和2型糖尿病有着密切的联系^[9]。患有2型糖尿病或糖耐量减低的妇女不易怀孕,胚胎质量差。研究证明,多种表观遗传性的因素在这种代谢疾病的发生发展中产生作用,影响胚胎发育^[10]。

中医理论认为,先天之精是人从胎儿到完整个体最基本的物质,内生脏腑与脏腑外应的皮、肉、脉、筋、骨等本于先天精气。《灵枢·经脉》记载:“人始生,先成精,精成而脑髓生,骨为干,脉为营,筋为刚,肉为墙,皮肤坚而毛发长,谷入于胃,脉道以通,血气乃行”。《黄帝内经灵枢集注·卷二·经脉第十》记载:“皮肤脉肉筋骨,乃五脏之外合,本于先天之精气也。谷入于胃,脉道以通,血气乃行,言荣卫气血,生于后天水谷之精也”。因此,先天之精的盛衰影响子代的先天禀赋与生长发育。先天之精是由父母的生殖之精转化而来,先天禀赋不足直接影响胚胎发育。

2型糖尿病(包括糖代谢异常)的母亲,其先天之精不足不仅影响受孕还影响子代的禀赋与生长发育。研究人员正在试图解释葡萄糖是如何被运输到小鼠卵母细胞并影响卵母细胞质量的^[11]。但可以肯定的是,糖代谢异常的母亲生育能力下降,且高糖环境影响胚胎质量^[12-13]。本研究显示滋阴补肾方药左归丸能提高胚胎质量,激发胚胎发育潜能。血糖控制不佳的妇女往往遭受一系列的生殖问题,如流产、新生儿的发病率和病死率高,胎儿先天性畸形等,大大增加了胚胎的畸形和死亡风险^[14]。在卵子生发和受精过程中,胎儿暴露于异常的代谢环境,足够永久的影响其以后的发育状况。母体的高血糖影响胚胎的受精、着床,异常的宫内环境会影响胚胎的早期发育,是不好的“先天”。本课题组控制一个异常变量——葡萄糖,来研究高糖子宫内环境对胚胎发育的影响,

试图补“先天”,益“后天”,提高胚胎质量,降低胚胎异常的可能性。

本课题组试图探索一种方法,提高卵细胞质量及防止生育缺陷。是不是有这样一种可能性,应用中医中药“补肾”的方法,补“先天”不足,益“后天”质量。滋阴补肾方药左归丸能提高胚胎质量,激发胚胎发育潜能,成为中医理论“肾主藏精主生殖”的又一力证,可能提供预防糖尿病、IGT等困扰人类的诸多重大慢性疾病的新思路,为全人类的优生优育、生活质量的提高提供技术方法。

参 考 文 献

- [1] 冯前进,冯玛莉,王玉良,等.补肾方剂左归丸(汤)对小鼠早期胚胎发育的影响.中国中西医结合杂志,1996,16(11):673-675
- [2] 孙晓峰,罗令,孙启春,等.左归丸促进小鼠未成熟卵母细胞体外核成熟的实验研究.现代生物医学进展,2011,11(3):444-447
- [3] 梁丽梅,陆华,周天秀.左归丸含药血清对 $\alpha v \beta 3$ 、HLA-G、HOXA10、Fas/FasL、IDO在人早孕绒毛膜组织中表达的影响.国医国药,2015,26(5):1073-1076
- [4] 王颖莉,李亚妮,许凯霞,等.左归丸对大鼠血清代谢物质组影响的研究.实验方剂学杂志,2014,20(23):121-125
- [5] 贾青,高娟,杨博等.小鼠体外受精及其胚胎体外培养的比较研究.实验动物与比较医学,2008,28(5):304-308
- [6] 董彬.添加筛选的中药培养液对小鼠体外受精及胚胎发育的影响.咸阳:西北农林科技大学,2008
- [7] Lawitts J A,Biggers J D.Culture of preimplantation embryos. Methods Enzymol,1993(225):153-164
- [8] Erbach G T,Lawitts J A,Papaioannou V E,et al.Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. Biol Reprod,1994,50(5):1027-1033
- [9] Tobias D K,Gaskins A J,Missmer S A,et al.History of infertility and risk of type 2 diabetes mellitus:a prospective cohort study. Diabetologia,2015,58(4):707-715
- [10] Sterns J D,Smith C B,Steele J R,et al.Epigenetics and type II diabetes mellitus:underlying mechanisms of prenatal predisposition.Front Cell Dev Biol,2014(2):15
- [11] Wang Q,Chi M M,Schedl T,et al.An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes.Am J Physiol Endocrinol Metab,2012,302(12):1511-1518
- [12] Anifandis G M,Dafopoulos K,Messini C I,et al.Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome.Reprod Biol and Endocrinol,2010(8):91
- [13] Jungheim E S,Moley K H.Current knowledge of obesity's effects in the pre-and periconceptional periods, and avenues for future research.Am J Obstet Gynecol,2010,203(6):525-530
- [14] Gu L,Liu H,Gu X,et al.Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes.Cell Mol Life Sci,2015,72(2):251-271

(收稿日期:2016年8月13日)