

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.35.004

经后增殖方含药血清对超排卵大鼠卵巢 COCs 及 CCs 中 GDF9 与 Bim 表达的影响*

杨 贞^{1,2}, 郭新宇^{1△}, 刘佳子³, 邓伟民¹, 张金玉¹

(1. 广州军区广州总医院生殖医学中心, 广州 510010; 2. 广州中医药大学研究生院, 广州 510405; 3. 汕头大学医学院附属第一医院康复科, 广东汕头 515041)

[摘要] **目的** 观察经后增殖方含药血清对超排卵大鼠卵巢的卵丘-卵母细胞复合体(COCs)及卵丘细胞(CCs)中生长分化因子9(GDF9)及 Bim 表达的影响,探讨其治疗效果及作用机制。**方法** 制备大鼠超排卵卵巢模型,收集 COCs 和 CCs,分别与雌性 SD 超排卵大鼠空白血清和经后增殖方药物血清在体外共同培养,各分3组:空白血清组(空白组)、含药血清组(对照组)、含药血清+GDF9 受体阻断剂组(实验组),共6组。24 h 后收集 COCs 和 CCs,实时荧光定量 PCR 检测 GDF9 和 Bim mRNA 表达水平,蛋白质印迹法检测 GDF9 蛋白表达水平。**结果** (1)对照组 COCs 中 GDF9 mRNA 表达水平明显高于空白组和实验组($P < 0.05$);对照组和实验组 COCs 中 Bim mRNA 表达水平均明显低于空白组($P < 0.05$);对照组 COCs 中 GDF9 蛋白表达水平明显高于空白组($P < 0.05$),亦高于实验组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)CCs 中 GDF9 mRNA 表达水平在3组间的差异性比较结果与 COCs 中一致;对照组和实验组 CCs 中 Bim mRNA 表达水平均明显低于空白组($P < 0.05$);对照组 CCs 中 Bim mRNA 表达水平明显低于实验组($P < 0.05$);对照组 CCs 中 GDF9 蛋白表达水平明显高于空白组和实验组($P < 0.05$)。(3)对照组 COCs 中 GDF9 mRNA 表达水平明显高于 CCs 中($P < 0.05$),其余组内 COCs 和 CCs 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 经后增殖方含药血清能提高 COCs 和 CCs 中 GDF9 的表达水平,维持 COCs 和 CCs 中 Bim 的低水平表达,抑制细胞凋亡,促进卵泡发育;COCs 较剔除卵母细胞的 CCs 更有利于 GDF9 mRNA 的表达。

[关键词] 经后增殖方;超排卵;卵丘-卵母细胞复合体;卵丘细胞;生长分化因子9;Bim**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)35-4908-04

Effect of serum containing Jinghou Zengzhi Recipe on expression of GDF9 and Bim in ovarian COCs and CCs in controlled ovarian hyperstimulation rats*

Yang Zhen^{1,2}, Guo Xinyu^{1△}, Liu Jiazi³, Deng Weimin¹, Zhang Jinyu¹

(1. Reproductive Medicine Center, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 2. Graduate School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 3. Department of Rehabilitation, First Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of serum containing Jinghou Zengzhi Recipe (JHZZ) on the expression of growth differentiation factor 9 (GDF9) and Bim in cumulus-oocyte complexes (COCs) and cumulus cells (CCs) of controlled ovarian hyperstimulation (COH) rats, and to investigate its curative effect and mechanism. **Methods** The rat COH ovarian model was prepared for collecting COCs and CCs, which were respectively co-cultured in vitro with the blank serum of female COH SD rat and serum containing JHZZ, and the each group was divided into 3 subgroups: the blank serum group (blank group), serum containing JHZZ group (control group) and serum containing JHZZ plus GDF9 receptor blocker group (experimental group), total 6 subgroups. COCs and CCs were collected after 24 h. The expression levels of GDF9 and Bim mRNA were detected by real-time quantitative PCR. The GDF9 protein expression levels were detected by Western blot. **Results** (1) The expression level of GDF9 mRNA in control group COCs was obviously higher than that in the control group and experiment group COCs ($P < 0.05$); the Bim mRNA expression level in COCs of control group and experiment group was significantly lower than that in COCs of blank group ($P < 0.05$); the GDF9 protein expression level in the control group COCs was significantly higher than that in the blank group COCs ($P < 0.05$), and also higher than that in the experiment group COCs, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). (2) The comparison results of GDF9 mRNA expression level in CCs among 3 groups were consistent with those in COCs; the Bim mRNA expression level in CCs of control group and experimental group was significantly lower than that in the blank group ($P < 0.05$); the Bim mRNA expression level in the control group CCs was significantly lower than that in the experimental group CCs ($P < 0.05$); the GDF9 protein expression level in the control group CCs was significantly higher than that in the blank group and experimental group CCs ($P < 0.05$). (3) The GDF9 mRNA expression level in the control group COCs was significantly higher than that in CCs ($P < 0.05$), and the other inter-group comparisons between COCs and CCs had no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Serum containing JHZZ can increase the GDF9 expression level in COCs and CCs, maintain the low expression of Bim in COCs and CCs, inhibit the ovarian cells apoptosis and promote the follicular development; COCs is more conducive to the expression of GDF9 mRNA compared with CCs eliminating oocyte.

[Key words] Jinghou Zengzhi Recipe; superovulation; cumulus-oocyte complexes; cumulus cells; growth differentiation factor 9; Bim

控制性超排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)是体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)周期中的重要环节,常用方案为先使用促性腺激素释放激素激动剂进行垂体降调节,然后用促性腺激素刺激卵巢,使多个卵泡同时发育,从而同时获取多个卵子进行体外受精,有别于自然周期的单卵排卵。已有研究证实超排卵可能损伤卵细胞染色体的结构和功能,影响胚胎的基因表达,从而降低胚胎的着床潜能^[1],导致胚胎着床率和妊娠率显著下降^[2]。中医药介入 IVF-ET 周期收效显著,本课题组前期研究证实益气血补肝肾中药能提高胚胎移植成功率和妊娠率^[3]。本研究提取 COH 大鼠卵巢中卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)和卵丘细胞(cumulus cells, CCs),加入经后增殖方含药血清进行体外培养,检测 COCs 和 CCs 中生长分化因子 9(growth differentiation factor 9, GDF9)和 Bim 的表达水平,探讨益气血中药对提高 IVF-ET 周期卵质量的效果及可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 无特定病原体(SPF)级 SD 雌性大鼠 42 只,鼠龄 6~8 周,体质量 180~220 g,由广州军区广州总医院动物实验中心提供(合格证号:44007200031374,44002100009700)。适应性饲养 1 周后进入实验阶段,自然光照,自由饮水和摄食,以阴道脱落细胞涂片检查动情周期。

1.1.2 实验药品 醋酸曲普瑞林(GnRHa, 瑞士辉凌公司,商品名:名达必佳,批号:K18565B);孕马血清促性腺激素(PMSG, 美国 Sigma 公司,批号:SLBP4544V);人绒毛膜促性腺激素(HCG, 丽珠药业有限公司,批号:160201);经后增殖方(颗粒剂,每袋 10 g,广东一方制药有限公司,批号:Q1511004),每袋相当于生药:党参 15 g,白术 12 g,茯苓 12 g,甘草 6 g,熟地黄 12 g,白芍 12 g,当归 6 g,川芎 6 g,菟丝子 15 g,鹿角霜 20 g,杜仲 15 g,山萸肉 10 g,川椒 3 g。

1.1.3 主要仪器与试剂 反转录试剂盒(德国 DBI 公司,批号:DBI-2220),荧光定量 PCR 检测试剂盒(美国 Genecopoeia 公司,批号:AOPR-1200),二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(杭州弗德生物,批号:FD2001),山羊抗大鼠 GDF-9 抗体(美国 Santa 公司,批号:sc-12244),小鼠抗大鼠 β -actin 抗体(北京博奥森,批号:Bsm-33036M),荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号:7500)。

1.2 方 法

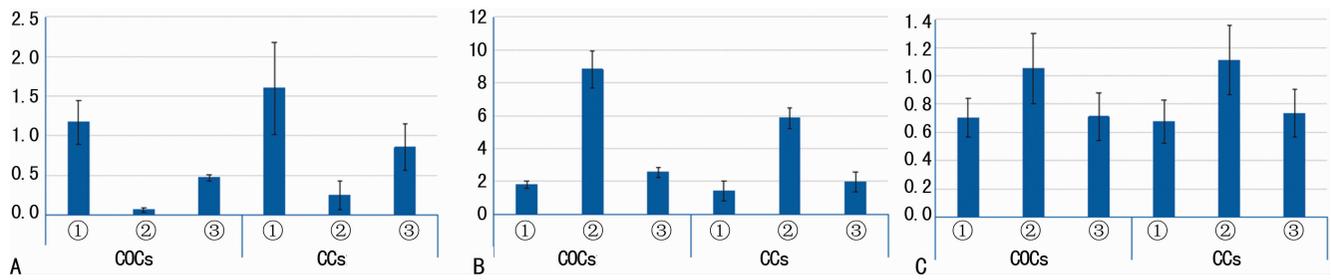
1.2.1 含药血清的制备及灭活 12 只雌性大鼠连续观察 2 个动情周期均正常,随机分为含药血清组和空白血清组,每组 6 只。阴道涂片为动情后期(动情周期第 3 天),两组大鼠均于每日上午 9 时腹腔注射 GnRHa 2.0 μ g/100 g,连续 7 d,第 7 天同时注射 PMSG 40 IU/100 g,48 h 后注射 HCG 100 IU/100 g。从第 1 天注射 GnRHa 开始,同时含药血清组大鼠每日上午 9 时给予经后增殖方 4.5 g/kg(相当于 3 倍临床等效剂量),空白血清组大鼠给予等体积生理盐水灌胃,每日 1 次,至注射 HCG 日,共 9 d。第 9 天灌胃及注射 HCG 后 1.5 h,腹腔注射 10% 水合氯醛 4.0 mL/kg,深入麻醉大鼠后腹主动脉取血。将各组血液置于 4 $^{\circ}$ C 放置 2 h,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,56 $^{\circ}$ C 30 min 灭活,用 0.22 μ m 微孔过滤器过滤除菌,同组血清混匀分装,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 COCs 和 CCs 的制备 30 只雌性大鼠连续观察 2 个动情周期均正常。阴道涂片为动情后期(动情周期第 3 天),于每日上午 9 时腹腔注射 GnRHa 2.0 μ g/100 g,连续 7 d,第 7 天同时注射 PMSG 40 IU/100 g,48 h 后注射 HCG 100 IU/100 g,2 h 后颈椎脱臼处死,无菌条件下快速取出小鼠双侧卵巢,37 $^{\circ}$ C 5% 二氧化碳(CO₂)过夜预热的 M199 培养液中洗 3 次,37 $^{\circ}$ C 恒温板上,立体显微镜下,10 mL 注射器吸取大卵泡中的 COCs,选取形态良好的 COCs。(1)取一半 COCs 置于 M199 培养液(美国 Hyclone 公司)中,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱暂存备用。(2)另一半 COCs 置于 0.1% 透明质酸酶(美国 Sigma 公司)中,用一次性注射针头刺破卵泡,使 CCs 释放入培养液中,并轻轻吹打,使其分散成单个细胞,加入 M199 培养液终止消化,200 目一次性细胞筛过滤。将含 CCs 的培养液收集在离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,培养液洗 2 次后,加一定量的培养液重悬细胞,台盼蓝染色,血细胞计数板计数活细胞数,细胞存活数大于 85%,M199 培养液将 CCs 悬液调整为 1×10^6 cells/mL 的单细胞悬液备用。

1.2.3 COCs 和 CCs 的培养 将 COCs 和 CCs 分别随机种入已用 0.05% L-多聚赖氨酸涂布的 6 孔培养板中,COCs 和 CCs 各随机分为 3 组,每组 3 个复孔,加入大鼠血清及青链霉素双抗(美国 Gibco 公司),形成含 10% 大鼠血清[各组分别加入空白血清(空白组),含药血清(对照组),含药血清+GDF9 受体阻断剂(实验组,GDF9 受体阻断剂为美国 R&D 公司产品)],1% 双抗的 M199 培养液。培养 24 h 后,收集各组细胞待测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测 GDF9 mRNA 和 Bim mRNA 的表达 实时荧光定量 PCR 操作按试剂盒说明书进行。GDF9 上游引物序列:5'-GCA GAT TCC TGT TGG GGG TT-3',下游引物序列:5'-TAC AGG CAA CAG CAA GGA CC-3',扩增长度 100 bp;Bim 上游引物序列:5'-AGA GAT ACG GAT CGC ACA GG-3',下游引物序列:5'-GTC TTC CGC CTC TCG GTA AT-3',扩增长度 100 bp;内参 β -actin 上游引物序列:5'-AGT TCA ACG GCA CAG TCA AG-3',下游引物序列:5'-TAC TCA GCA CCA GCA TCA CC-3',扩增长度 118 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 35 s,退火、变性、延伸,40 个循环。根据各组样品的 Ct 值(Ct 值为荧光信号达到设定阈值时所经过的循环数),以 β -actin 进行参照,折算出各样品起始模板数的相对数量关系。计算公式:目的基因的相对量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示, $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{待测样品目的基因}) - Ct(\text{待测样品内参基因})] - [Ct(\text{对照组样品目的基因}) - Ct(\text{对照组样品内参基因})]$ 。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测 GDF9 蛋白的表达 提取大鼠 COCs 和 CCs 总蛋白液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白水平后,各组样品分别取 60 μ g 蛋白,加适量 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液,沸水浴 5 min,配置 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,上样,浓缩胶电压 75 V,分离胶电压 120 V,电泳至溴酚蓝刚跑出即终止电泳,将蛋白质转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。将转好的膜于室温下脱色摇床上用 5% 脱脂奶粉(含 0.5% TBST)封闭 1 h。加入用 TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶稀释的一抗(山羊抗大鼠 GDF-9 抗体 1:500,小鼠抗大鼠 β -actin 抗体 1:2 000),4 $^{\circ}$ C 过夜;用 TBST 在室温下洗 3 次,每次 5 min;加入



A: Bim mRNA; B: GDF9 mRNA; C: GDF9 蛋白; ①: 空白组; ②: 对照组; ③: 实验组

图 1 COCs 和 CCs 中 Bim mRNA、GDF9 mRNA 和 GDF9 蛋白相对表达水平

表 1 COCs 和 CCs 中 Bim mRNA、GDF9 mRNA 及 GDF9 蛋白相对表达水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞	Bim mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值)	GDF9 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值)	GDF9 蛋白
空白组	COCs	1.168 ± 0.276	1.818 ± 0.207	0.703 ± 0.136
	CCs	1.599 ± 0.580	1.414 ± 0.599	0.673 ± 0.153
对照组	COCs	0.064 ± 0.027*	8.811 ± 1.138* [△]	1.050 ± 0.248*
	CCs	0.250 ± 0.181 ^{#▽}	5.859 ± 0.629 ^{#▽▲}	1.110 ± 0.245 ^{#▽}
实验组	COCs	0.471 ± 0.039*	2.565 ± 0.297	0.710 ± 0.168
	CCs	0.852 ± 0.293 [#]	1.968 ± 0.608	0.733 ± 0.169

*: $P < 0.05$, 与空白组 COCs 比较; #: $P < 0.05$, 与空白组 CCs 比较; Δ : $P < 0.05$, 与实验组 COCs 组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与实验组 CCs 比较; \blacktriangle : $P < 0.05$, 与同组 COCs 比较

用 TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶稀释的二抗 [辣根过氧化物酶 (HRP)-兔抗山羊 IgG 抗体 1:1000, HRP-山羊抗小鼠 IgG 抗体 1:5000], 室温下孵育 30 min 后, 用 TBST 室温下洗 3 次, 每次 5 min。采用电化学发光 (ECL) 法显影曝光。X 线片曝光显影。采用 Image J 软件处理系统分析目标带的吸光度值 (A 值)。以 GDF9/ β -actin 的相对 A 值表示结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 方差齐性检验采用 Levene 法, 组间两两比较采用 LSD 法, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

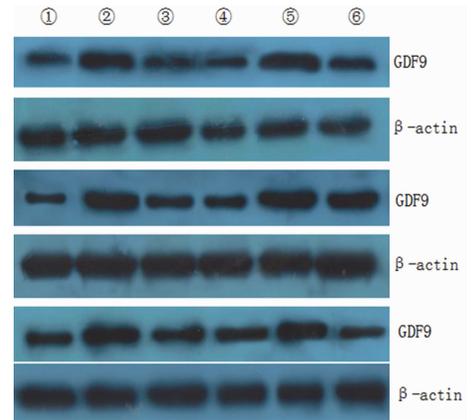
2 结果

2.1 COCs 和 CCs 中 Bim mRNA 相对表达水平 溶解曲线均呈单峰分布, 无基因组 DNA 的非特异扩增。(1) COCs 中: 对照组和实验组 Bim mRNA 相对表达水平均明显低于空白组 ($P < 0.05$), 对照组 Bim mRNA 相对表达水平低于实验组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); (2) CCs 中: 对照组和实验组 Bim mRNA 相对表达水平均明显低于空白组 ($P < 0.05$), 对照组 Bim mRNA 相对表达水平明显低于实验组 ($P < 0.05$); (3) 各组 COCs 中 Bim mRNA 相对表达水平均低于相对应各组 CCs 中 Bim mRNA 相对表达水平, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1A、表 1。

2.2 COCs 和 CCs 中 GDF9 mRNA 相对表达水平 溶解曲线均呈单峰分布, 无基因组 DNA 的非特异扩增。(1) COCs 中: 对照组 GDF9 mRNA 相对表达水平明显高于空白组和实验组 ($P < 0.05$); (2) CCs 中: 对照组 GDF9 mRNA 相对表达水平明显高于空白组和实验组 ($P < 0.05$); (3) 各组 COCs 中 GDF9 mRNA 相对表达水平均高于相对应各组 CCs 中, 其中对照组 COCs 和 CCs 中 GDF9 mRNA 相对表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白组、实验组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1B、表 1。

2.3 COCs 和 CCs 中 GDF9 蛋白相对表达水平比较 (1)

COCs 中: 对照组 GDF9 蛋白相对表达水平明显高于空白组 ($P < 0.05$), 亦高于实验组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); (2) CCs 中: 对照组 GDF9 蛋白相对表达水平明显高于空白组和实验组 ($P < 0.05$); (3) 各组 COCs 中 GDF9 蛋白相对表达水平与相对应各组 CCs 中比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1C、图 2、表 1。



①: 空白组 CCs; ②: 对照组 CCs; ③: 实验组 CCs; ④: 空白组 COCs; ⑤: 对照组 COCs; ⑥: 实验组 COCs

图 2 COCs 和 CCs 中 GDF9 蛋白表达电泳图

3 讨论

COCs 是哺乳动物卵巢的基本功能单位, 包括一个卵母细胞和围绕其周围的 CCs。CCs 与卵母细胞关系密切, CCs 直接影响卵母细胞的发育、成熟, 进而影响胚胎的质量, 而卵母细胞也可以通过分泌卵细胞分泌因子 (oocyte secreted factors, OSFs) 来调节 CCs 的生长分化, 在卵母细胞的成熟过程中, 二者相互影响, 缺一不可^[4]。近年来通过卵母细胞与颗粒细胞重建卵泡的研究提示, 卵母细胞在调控卵泡发育中起主导作用, OSFs 通过旁分泌作用促进卵泡的形成, 卵丘扩张及某些代谢过程, 同时 OSFs 被证实具有维持 CCs 低凋亡率的作用, 而

CCs 保持良好生物学活性是卵细胞质量的保证^[5-6]。

作为其中一种 OSFs, GDF9 是转化生长因子 β 超家族成员, 其表达可见于早期初级卵泡阶段, 对颗粒细胞的增殖、分化、排卵及黄素化起调控作用, 与卵泡的生长和发育关系密切, 是卵泡发育的重要因子, 并可能与胚胎发育有关, 卵泡液中的 GDF9 水平高低可以预测卵母细胞及胚胎质量^[7-10]。因此, 最近的一些研究已经把 GDF9 列为评价卵母细胞质量及其发育潜能的重要指标^[11-12]。颗粒细胞的凋亡促进卵泡闭锁, 使卵泡无法回到正常的发育轨道^[13]。目前已经阐明有两条凋亡信号传导途径: (1) 外源性死亡受体途径, 由 Fas/TNF2A 通路激发; (2) 内源性线粒体途径, 由 Bcl-2 基因家族激发^[14]。Bim 是 Bcl-2 家族中 BH3-only 亚家族的成员, 在机体多种组织包括生殖细胞中有不同程度的表达^[15], 在凋亡的启动和调节上具有重要的作用。不同的 Bim 异构体可通过直接激活 Bax 蛋白, 或通过抑制 Bcl-2 的抗凋亡活性间接激活 Bax/Bak 引起线粒体途径的细胞凋亡。因此其表达上调可促进细胞凋亡, 是一种重要的凋亡调节蛋白^[16]。因此, 本研究选取 GDF9 和 Bim 作为检测指标, 观察具有益气血作用的经后增殖方对卵泡发育的作用机制。

中医学的“肾气-天癸-冲任”生殖轴与西医学的“下丘脑-垂体-卵巢”性腺轴相对应。中医认为, 受孕的机理在于肾气充, 天癸至, 冲任调和, 精血津液充沛。不孕主要与肾气不足, 冲任气血亏虚有关。因此在治疗上通常以补肾、益气、养血为主。本研究所用经后增殖方由《太平惠民和剂局方》之八珍汤加减演化而来, 方中四君子汤(党参、白术、茯苓、甘草)健脾益气; 四物汤(熟地黄、当归、白芍、川芎)补血活血; 另加补肾精血之山萸肉, 阴阳并补之菟丝子, 两药同用有养精种子之效; 鹿角霜、杜仲、川椒温阳暖宫。全方使气血双补, 气生血长, 又得肾阳温煦, 胎孕易成。笔者早前的临床观察表明该方在卵泡期可能通过增强“下丘脑-垂体-卵巢”性腺轴的调理功能, 改善卵母细胞质量, 促进卵泡发育, 增强胚胎着床潜能, 提高胚胎的种植率^[3]。

本研究结果显示, 对照组 COCs 和 CCs 中 GDF9 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于空白组($P < 0.05$), 说明经后增殖方含药血清能显著提高 GDF9 mRNA 和蛋白的表达水平, 从而对抗细胞凋亡, 促进卵泡发育; 加入 GDF9 受体阻断剂能阻断含药血清对 GDF9 表达的影响($P < 0.05$)。而对照组 COCs 中 GDF9 mRNA 表达水平明显高于 CCs 中($P < 0.05$), 说明经后增殖方含药血清有助于卵母细胞和 CCs 之间的相互影响, 促进卵母细胞分泌 GDF9 mRNA, 二者相互依存, 相互促进。剔除了卵母细胞, GDF9 mRNA 的表达显著下降, CCs 的功能将受到明显影响。经后增殖方含药血清能明显抑制 COCs 和 CCs 中 Bim 基因的表达($P < 0.05$), 而在加入含药血清的同时加入了 GDF9 受体阻断剂, COCs 和 CCs 中 Bim 基因的表达水平仍然受到明显抑制($P < 0.05$), 说明 GDF9 受体阻断剂能特异性阻断 GDF9 受体的作用, 但对 Bim 并无直接影响, 因此经后增殖方含药血清仍能发挥对 Bim 表达的抑制作用。然而该水平仍高于未加入 GDF9 受体阻断剂的含药血清组($P < 0.05$), 说明加入 GDF9 受体阻断剂, GDF9 的表达明显降低, 能间接影响经后增殖方含药血清对 Bim 基因表达的抑制作用, 从而无法维持 Bim 表达的低水平。

综上所述, 具有益气血作用的经后增殖方能通过促进 GDF9 的分泌, 维持超排卵大鼠 CCs 和卵母细胞的功能及其相

互之间的促进作用, 有利于卵泡的发育, 提高卵泡质量; GDF9 具有维持 CCs 中 Bim 低水平表达的作用。而经后增殖方提高 GDF9 表达水平的具体作用通路有待进一步研究。

参考文献

- [1] Meng QX, Gao HJ, Xu CM, et al. Reduced expression and function of aquaporin-3 in mouse metaphase-II oocytes induced by controlled ovarian hyperstimulation were associated with subsequent low fertilization rate[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 21(1/2/3): 123-128.
- [2] 李培旭, 李尚为, 彭芝兰, 等. 超排卵对小鼠胚胎着床潜能的影响[J]. *实用妇产科杂志*, 2007, 23(4): 232-234.
- [3] 邓伟民, 邵玉, 张金玉, 等. 中药益气血补肝肾法对辅助生育胚胎种植率的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2008, 25(2): 106-109.
- [4] Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(5): 2890-2894.
- [5] Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells[J]. *Development*, 2008, 135(1): 111-121.
- [6] Hussein TS, Froiland DA, Amato F, et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 22): 5257-5268.
- [7] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality[J]. *Hum Reprod Update*, 2008, 14(2): 159-177.
- [8] Regassa A, Rings F, Hoelker M, et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 57.
- [9] Assou S, Haouzi D, De Vos J, et al. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(8): 531-538.
- [10] Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice [J]. *Human Reproduction*, 2008, 23(1): 67-73.
- [11] Yang JL, Zhang CP, Li L, et al. Testosterone induces redistribution of forkhead Box-3a and Down-Regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(2): 774-782.
- [12] Sanchez F, Adriaenssens T, Romero S, et al. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro [J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(9): 539-550.
- [13] 金艳梅. 颗粒细胞对卵泡发育的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(8): 69-72.

氨基酸可被细胞利用。这种肽在细胞培养液促发下可自组装为纳米纤维凝胶,反应温和,条件简单,与其他材料相比具有明显优势,是构建神经组织工程较好的基质支架材料。

目前许多研究者通过改变氨基酸序列,设计出具有特定功能的肽链^[5],可模拟培养细胞所需要的生存环境,通过改变肽链的长短序列及带电性质,在 pH 7.35~7.45 发生自组装成多肽纳米凝胶结构,此纳米凝胶与细胞外基质相类似。由于多肽凝胶含水量较高且存在着间隙,为营养物质及细胞排泄物的运送提供了通道。多肽由天然的氨基酸合成,在体内不会进行排斥反应和炎性反应,凝胶在体内酶的作用下降解,给细胞提供生存养料。RGD 环肽序列为 C16H31OA3G4D2RGD,环肽具有的特性为:(1)C16H31O 序列提高对酸的敏感度,同时烷基尾可以调节纳米纤维之间的间隙^[6-7];(2)A3G4(AAAGGGG)与 C16H31O 烷基尾有协同作用^[8],同时能让活性 RGD 环表位暴露出来;(3)D2(DD)具有调节带电离子作用,当 RGD 环肽在自组装成凝胶时,凝胶的 pH 范围在 7.35~7.45 之间,正好适合细胞生长、增殖、分化^[8];(4)RGD 序列能促进细胞对凝胶的黏附、生长及分化^[1]。

本研究通过用高效液相色谱仪和质谱仪进行纯化和分析,结果证明所合成的 RGD 环肽为所需的目的肽。用 0.1 mol/L NaOH 溶液、0.1 mol/L HCl 溶液及无菌双蒸水将多肽调整浓度为 10 mg/mL,此时的多肽溶液呈黏稠状态,加入等体积含 Ca²⁺ 等二价阳离子无酚红的 DMEM/F12,数秒钟后多肽成凝胶状态,小管瓶口倒置,凝胶紧贴瓶底,有较强的黏附力,经电子显微镜观察凝胶发现凝胶由直径 2~5 nm,长度 100~1 000 nm 的纳米纤维构成,纳米纤维相互交织成三维网络结构。此类凝胶含水量 95.0%,对细胞有良好的骨架支持作用;营养物质、氧气及细胞所需要的活性因子可通过凝胶间隙到达细胞内,细胞内排泄物可通过间隙排出凝胶外。本实验采用全骨髓细胞差异贴壁法获取大鼠骨髓间充质干细胞^[9],通过细胞形态学观察,流式细胞仪检测细胞表面抗原,培养 2 周后的细胞呈漩涡式、鱼状排列,细胞表面 CD29、CD90 高表达,而 CD34、CD45 不表达,验证所取的细胞为骨髓间充质干细胞。

BMSCs 有许多优点,包括来源丰富、高活性、低免疫原性、分化潜能和分泌养分,在移植研究中已得到广泛的应用^[10]。BMSCs 可以分泌多种趋化因子、免疫调节因子和生长因子,这些因子可以进一步聚集其他细胞(包括炎性细胞),调节免疫应答,参与组织修复,影响病理进展^[11]。因此,BMSCs 为组织工程修复神经损伤较理想的种子细胞。

RGD 环两性亲肽纳米凝胶与 BMSCs 混合形成三维细胞培养体系,凝胶的三维结构具有良好的骨架结构,为细胞的生长提供支持作用;同时 RGD 环活性表位促进细胞对凝胶的黏附、生长及分化。本研究 CCK-8 结果显示,在三维细胞培养体系中 BMSCs 增殖速度比在二维细胞培养体系中快。由钙黄绿素乙氧基甲酯和 PI 构成的 DEAD/LIVE 试剂可通过荧光显微镜显色,观察细胞在二维及三维细胞培养体系的活力和增殖情况,活细胞染成绿色,死细胞染成红色^[12]。本研究结果显

示,随着培养时间的增加,三维细胞培养体系中的活细胞数较二维细胞培养体系中多。

综上所述,RGD 环肽与 BMSCs 具有很好的细胞相容性,可为以后在仿生材料涉及的神经组织工程中进行转基因改造奠定基础。

参考文献

- [1] Breyman C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering[J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(2): 87-92.
 - [2] 元亮亮,梁鹏. 自组装多肽纳米纤维支架的结构特点及应用优势[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(29): 5379-5386.
 - [3] 陈睿,宋玉林,汪文玉,等. 大鼠骨髓间充质干细胞与树枝状两性亲肽自组装凝胶支架的生物相容性[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(6): 803-809.
 - [4] Yip PK, Malaspina A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return[J]. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 6.
 - [5] Ruan L, Zhang H, Luo H, et al. Designed amphiphilic peptide forms stable nanoweb, slowly releases encapsulated hydrophobic drug, and accelerates animal hemostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(13): 5105-5110.
 - [6] Sargeant TD, Guler MO, Oppenheimer SM, et al. Hybrid bone implants: self-assembly of peptide amphiphilic nanofibers within porous titanium[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(2): 161-171.
 - [7] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers[J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1684-1688.
 - [8] 宋玉林,郑启新,郑剑锋,等. 两性亲肽自组装凝胶与神经干细胞相容性研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2008, 4(4): 192-195.
 - [9] 李双月,戚媛,陈若琳,等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性及优势[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(10): 1484-1489.
 - [10] Hu J, Deng G, Tian Y, et al. An in vitro investigation into the role of bone marrow derived mesenchymal stem cells in the control of disc degeneration[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5701-5708.
 - [11] Han X, Yang Q, Lin L, et al. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(11): 1758-1768.
 - [12] 桑江玮,王素雅,张杰,等. 猪小肠黏膜下层细胞外基质促进肝细胞活力和功能基因表达的研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(5): 607-613.
- (收稿日期:2017-07-12 修回日期:2017-09-15)
- (上接第 4911 页)
- [14] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(11): 897-907.
 - [15] Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of bim in health and disease[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23058-23134.
 - [16] Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins[J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(5): 505-512.
- (收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-09-21)