

基于线粒体功能揭示《黄帝内经》“七七”理论内涵及 高龄IVF-ET患者的中药干预机制

贾志诚¹, 郭颖^{1,2*}, 赖昊¹, 连方², 高海霞², 李永谦³

(1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011;
3. 山东中医药大学中医学院, 济南 250014)

[摘要] 目的:研究不同年龄阶段女性卵巢颗粒细胞线粒体功能的变化及补肾中药二至天癸方对高龄妇女体外受精-胚胎移植技术(IVF-ET)结局的影响,从而验证《黄帝内经》“七七”理论的科学内涵。方法:收集山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心行辅助生殖技术的不孕症患者150例,按照《黄帝内经》“七七”理论分为三七、四七组(30例),五七组(60例)和六七组(60例),五七组和六七组采用随机数字+信封法分为对照组和中药组各30例,中药组自促排卵周期启动日给予二至天癸方至扳机日。观察各组之间的IVF结局,使用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定各组卵巢颗粒细胞中线粒体融合蛋白1(Mfn1)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)、线粒体分裂蛋白1(Drp1)的含量。结果:与三七、四七组比较,五七对照组和六七对照组患者获卵数、双原核(2PN)数、可用胚胎数、优质胚胎数、临床妊娠率和活产率均明显下降($P<0.05$),六七对照组鲜胚移植率明显下降($P<0.05$)。与五七对照组比较,六七对照组患者获卵数、2PN数、可用胚胎数、优质胚胎数和临床妊娠率均明显下降($P<0.05$)。与五七对照组比较,五七中药组患者获卵数、2PN数、可用胚胎数明显升高($P<0.05$);与六七对照组比较,六七中药组患者获卵数明显升高($P<0.05$)。与三七、四七组比较,五七和六七对照组患者卵巢颗粒细胞中Mfn1和Mfn2蛋白表达明显降低,Drp1蛋白表达升高($P<0.05$);与五七对照组比较,六七对照组患者卵巢颗粒细胞中Mfn1和Mfn2蛋白表达明显降低,Drp1蛋白表达升高($P<0.05$)。与五七对照组比较,五七中药组患者卵巢颗粒细胞中Mfn2蛋白表达升高,Drp1蛋白表达降低($P<0.05$);与六七对照组比较,六七中药组患者卵巢颗粒细胞中Mfn1和Mfn2蛋白表达升高,Drp1蛋白表达降低($P<0.05$)。结论:随着年龄的增长,女性在“五七”后IVF结局预后变差,卵巢颗粒细胞中线粒体融合能力下降,而裂变增多,从线粒体功能验证了《黄帝内经》“七七”理论的内涵。二至天癸方可以调节高龄女性的卵巢颗粒细胞线粒体功能,提高Mfn1、Mfn2表达水平,促进线粒体融合,抑制Drp1而减少线粒体分裂,缓解年龄带来的卵巢功能减退,提高卵母细胞发育潜能,改善高龄女性的IVF结局,但对于“六七”之年的超高龄女性临床效果欠佳。

[关键词] 线粒体; “七七”理论; 高龄女性; 体外受精-胚胎移植; 卵巢功能减退; 补肾中药; 二至天癸方

[中图分类号] R242;R2-031;R287;R271.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0128-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231690

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230421.1101.004.html>

[网络出版日期] 2023-04-21 16:06:23

Mitochondrial Function Reveals Connotation of "Seven-Seven" Theory of Huangdi's Internal Classic and Mechanism of Herbal Intervention for Elderly Women Undergoing IVF-ET

JIA Zhicheng¹, GUO Ying^{1,2*}, LAI Hao¹, LIAN Fang², GAO Haixia², LI Yongqian³

(1. *The First Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China*; 2. *Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China*;
3. *College of TCM, Shandong University of TCM, Jinan 250014, China*)

[收稿日期] 2023-01-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81804130);山东省“泰山青年学者”计划项目(tsqn202211353);济南市科技计划项目(202225005)

[第一作者] 贾志诚, 硕士, 从事中医药在辅助生殖领域的研究, E-mail: doctorjzc@163.com

[通信作者] * 郭颖, 博士, 副主任医师, 从事中医药在辅助生殖领域的研究, E-mail: 71000916@sduetcm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To study the changes of mitochondrial function of ovarian granulosa cells in women of different ages and the effect of Erzhi-Tiangui prescription on *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) outcomes for elderly women, so as to verify the connotation of the "Seven-Seven" theory in the *Huangdi's Internal Classic* (《黄帝内经》). **Method:** A total of 150 infertility patients undergoing IVF-ET at the Reproductive and Genetic Center of Integrative Medicine, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine were recruited and assigned into "Three-Seven/Four-Seven (30 cases), Five-Seven (60 cases), and Six-Seven (60 cases) groups according to the "Seven-Seven" theory. The Five-Seven and Six-Seven groups were further assigned into control and Chinese medicine subgroups using the random number plus envelope method, and the Chinese medicine group was administrated with Erzhi Tiangui prescription from the start day of controlled ovulation stimulation cycle to the trigger day. The IVF outcome was observed, and Western blot was employed to determine the levels of mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2), and dynamin-related protein 1 (Drp1) in the ovarian granulosa cells. **Result:** Compared with the Three-Seven/Four-Seven group, the control subgroups of the Five-Seven and Six-Seven groups showed decreased retrieved oocytes, two pronuclear (2PN) embryos, available embryos, high-quality embryos, clinical pregnancy rate, and live birth rate ($P<0.05$). Moreover, the control subgroup of the Six-Seven group showed decreased fresh embryo transfer rate ($P<0.05$). Compared with the control subgroup of the Five-Seven group, that of the Six-Seven group showed reduced retrieved oocytes, 2PN embryos, available embryos, high-quality embryos, and clinical pregnancy rate ($P<0.05$). The Chinese medicine subgroup had more retrieved oocytes, 2PN oocytes, and available embryos than the control subgroup in the Five-Seven groups ($P<0.05$). The Chinese medicine subgroup had more retrieved oocytes, than the control subgroup in the Six-Seven groups ($P<0.05$). The control subgroup of the Six-Seven group showed lower expression levels of Mfn1 and Mfn2 and higher level of Drp1 than the control subgroup of the Five-Seven group ($P<0.05$), which indicated that the levels of Mfn1 and Mfn2 in ovarian granulosa cells were down-regulated while the expression of Drp1 was up-regulated with aging ($P<0.05$). The Chinese medicine subgroup had higher Mfn2 level and lower Drp1 level than the control subgroup in the Five-Seven group ($P<0.05$), and the Chinese medicine subgroup had higher Mfn1 and Mfn2 levels and lower Drp1 level than then control subgroup in the Six-Seven group ($P<0.05$). **Conclusions:** The prognosis of IVF in women after "Five-Seven" became worse with aging, and the mitochondria in ovarian granulosa cells showed decreased fusion ability and increased fission, which verified the connotation of the "Seven-Seven" theory from the mitochondrial function. Erzhi Tiangui prescription can regulate the mitochondrial function of ovarian granulosa cells in elderly women, up-regulate the expression levels of Mfn1 and Mfn2 to promote mitochondrial fusion, and down-regulate the expression of Drp1 to reduce mitochondrial fission, thus alleviating the ovarian hypofunction caused by aging, improve the development potential of oocytes, and improve the IVF outcomes of elderly women. However, this prescription has limited efficacy for the elderly women in the age range of "Six-Seven".

[Keywords] mitochondria; "Seven-Seven" theory; elder women; *in vitro* fertilization - embryo transfer; Ovarian hypofunction; kidney-tonifying herbs; Erzhi Tiangui prescription

随着婚育年龄的不断推后和三孩政策的颁布,我国高龄孕妇随之增多^[1]。随着女性年龄的增长,生殖能力减退体现在多个方面,包括卵巢功能减退、胚胎发育不良、非整倍体风险升高和不良妊娠结局等,其中卵巢功能减退是高龄女性生殖能力减退的主要原因之一^[2]。即使体外受精-胚胎移植技术(IVF-ET)很大程度上解决了高龄不孕不育患者

的配子问题,但在延缓年龄相关的卵巢功能减退方面未取得明显进展,进一步补充女性生殖衰老的相关研究十分有必要^[3]。

《黄帝内经·上古天真论》提出“七七”理论,认为女子以“七”为律,细分了年龄与女性生殖功能的关系,奠定了女性生殖衰老的中医理论基础^[4]。线粒体是卵母细胞中数量最多的细胞器,在女性生殖

衰老中的作用已被证实,线粒体对卵母细胞、胚胎的发育起着决定性作用^[5]。线粒体的动态融合和分裂是维持线粒体稳态的重要环节,与线粒体融合相关的蛋白主要有线粒体融合蛋白1(Mfn1)、线粒体融合蛋白2(Mfn2),与分裂相关的主要有线粒体分裂蛋白1(Drp1),其在线粒体裂变、修复和受损线粒体的清除中发挥重要作用^[6]。本研究从线粒体途径揭示“七七”理论的科学内涵,证实“七七”理论的临床价值,并研究补肾中药从线粒体途径延缓高龄女性卵巢功能减退的机制,为缓解高龄女性卵巢储备功能减退和改善IVF及临床妊娠结局提供诊疗思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将2020年1月至2020年12月在山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中

心接受IVF/卵胞浆内单精子注射(ICSI)治疗的150例不孕症患者,采用随机数字+信封法分为5组,即三七、四七组(21~34岁,30例),五七对照组(35~41岁,30例),五七中药组(35~41岁,30例),六七对照组(42~48岁,30例),六七中药组(42~48岁,30例)。五七和六七中药组与其对照组一般资料差异无统计学意义,资料具有可比性,见表1。本研究是临床探索性研究,未进行临床样本量的计算。实验所用的卵巢颗粒细胞标本取自自行IVF-ET女性取卵日的成熟卵泡,患者签署相关的知情同意书。卵巢颗粒细胞的研究得到了山东中医药大学生殖伦理委员会的批准(批号SDTCM/E1912-01),本次临床试验已通过中国临床试验注册中心的批准(注册号ChiCTR1900028526)。

表1 各组患者一般资料比较($\bar{x}\pm s, n=30$)

Table 1 Comparison of general information of patients in each group ($\bar{x}\pm s, n=30$)

组别	年龄/岁	基础卵泡刺激素(FSH)/U·L ⁻¹	体质量指数/kg·m ⁻²	窦卵泡/个
三七、四七组	30.00±3.73	6.44±1.44	24.17±2.30	13.80±0.89
五七对照组	38.70±2.09 ¹⁾	8.51±1.11 ¹⁾	23.85±2.39	8.87±0.68 ¹⁾
五七中药组	38.37±2.09 ¹⁾	8.31±1.05 ¹⁾	23.31±2.14	8.40±1.22 ¹⁾
六七对照组	44.82±2.04 ^{1,2)}	10.77±0.79 ^{1,2)}	23.28±2.82	6.50±1.07 ^{1,2)}
六七中药组	44.72±1.98 ^{1,2)}	10.45±0.89 ^{1,2)}	23.71±2.51	6.34±0.81 ^{1,2)}

注:与三七、四七组比较¹⁾ $P<0.05$;与五七对照组比较²⁾ $P<0.05$;与六七对照组比较³⁾ $P<0.05$ (表2-表4同)

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 不孕症诊断标准为夫妻双方正常性生活不避孕1年及以上未孕^[7]。

1.2.2 中医诊断及辨证标准 不孕证肾气虚辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[8]和《中医虚证辨证参考标准》^[9]制订。主证为腰脊酸痛(外伤性除外),脘酸膝软或足跟痛,耳鸣或耳聋,发脱或齿摇,尿后有余沥或失禁,性功能减退,不孕、不育,月经量少、色淡;兼证为神疲乏力,少气或懒言,自汗,舌胖或有齿印,脉虚无力(弱、软、濡)。以上主证具备3项,兼证具备1~2项即可诊断。

1.3 纳入标准 ①年龄21~48岁,计划进行IVF-ET的女性;②符合因输卵管因素行IVF-ET或因男方因素导致不孕的患者;③既往月经周期规律;④知晓风险并签署知情同意书。

1.4 排除标准 ①多囊卵巢综合征患者,符合中华医学会妇产科学分会对多囊卵巢综合征的诊断标准^[10];②卵巢早衰患者,符合卵巢早衰的临床表现和诊断标准^[11];③移植3个周期(包括新鲜胚胎移植和冻融胚胎移植),4个及以上优质胚胎,未获得

妊娠的患者^[12];④体质量指数 $>28\text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$;⑤需行胚胎植入前遗传学诊断患者;⑥合并有全身严重疾病、生理和心理疾病、甲状腺和肾上腺功能异常者。

1.5 脱落、剔除标准 ①取卵当天卵泡提前逃逸、未能取卵或尽管取到卵泡,显微镜下观察到未成熟的卵子;②未按计划接受治疗的患者;③因个人原因中途退出;④发生严重不良反应者。

1.6 治疗方法 对照组患者采用促性腺激素释放激素拮抗剂方案(GnRH-ant方案)。月经第2~3天开始使用重组人卵泡刺激素(rhFSH,果纳芬,德国默克雪兰诺公司,450 U/支,批号S20160040)促卵泡生长,在促排卵过程中根据卵泡大小、血清雌二醇、黄体生成素水平调整rhFSH和添加拮抗剂GnRH-ant(思则凯,注射用醋酸西曲瑞克,德国默克雪兰诺公司,0.25 mg/支,批号H20140476)的剂量。当至少2个优势卵泡 $\geq 18\text{ mm}$ 时,停用GnRH-ant和rhFSH,肌注人绒毛膜促性腺激素(HCG,丽珠集团丽珠制药厂,2 000 U/支,批号H44020673)扳机促进卵子成熟,hCG注射36 h后穿刺取卵。

中药组在对照组的基础上,于促排卵周期启动

日始给予二至天癸方,3包/次,2次/d,口服,用药至HCG扳机日。二至天癸方药物组成为女贞子、旱莲草、枸杞子、菟丝子、熟地黄、当归、白芍、川芎、制香附、炙甘草,颗粒剂由山东中医药大学附属医院药物制剂室批量制作[院内批号(01)FZ032-03-1]。

1.7 观察指标

1.7.1 各组IVF结局比较 获卵数,穿刺取卵术后所获得的卵母细胞总数。双原核(2PN)受精卵数,正常受精的卵母细胞个数。可用/优质胚胎数,I级和II级称为优质胚胎,I~III级为可用胚胎^[13]。周期取消率,周期取消率=取消周期/总周期数×100%。鲜胚移植率,鲜胚移植率=新鲜胚胎移植周期/总周期数×100%。临床妊娠,移植后经阴道B超下见孕囊即判定为临床妊娠^[14]。临床妊娠率,临床妊娠率=临床妊娠人数/鲜胚移植人数×100%。活产,至少1个有呼吸和心跳的婴儿,无论胎龄如何。活产率,活产率=活产数/鲜胚移植人数×100%。

1.7.2 卵巢颗粒细胞的收集与线粒体功能测定

当患者主导卵泡直径在18~20 mm时,且激素水平到达标准时,肌肉注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)诱导排卵,36 h左右行经阴道B超下穿刺取卵术,将取到的卵泡连同卵泡液一起放置SMZ1270型显微镜(日本尼康株式会社,×400)下观察。卵母细胞取出后剩余的卵泡液即为所得,并尽快进行颗粒细胞的提取,-80 °C冻存待用。待收集足够样本行蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢颗粒细胞中Mfn1、Mfn2和Drp1的蛋白表达。Mfn1、Mfn2和Drp1抗体(美国CST公司,批号分别为#14739、#9482、#8570),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号10494),羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Abcam公司,批号ab150077),一抗、二抗稀释液(中国Beyotime公司,批号分别为P0023A、P0023D)。取低温冻存的各组颗粒细胞,加入裂解液200~300 μL,高速研磨机研磨后4 °C,12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径30cm),用吸管吸取上清,BCA法测定蛋白浓度。上样、电泳(PowerPac Basic型电泳仪,美国BIO-RAD公司)后转膜(Tanon EPS600型转膜仪,上海天能公司),加5%脱脂奶粉封闭,分别加入和Mfn1、Mfn2、Drp1和GAPDH一抗(1:10 000),4 °C过夜,洗涤后加入二抗(1:10 000),37 °C恒温孵育,PBST摇床漂洗40 min显影。使用Image J软件分析目标条带和内参蛋白灰度值的比值作为目标蛋白相对表达水平。

1.7.3 各组患者不良事件发生率比较 观察患者治疗期间的不良反应状况。

1.8 统计学方法 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布时,组间比较采用独立样本 t 检验,组内比较则采用成对样本 t 检验;若不符合正态分布,组间比较用独立样本秩和检验,组内比较用配对样本秩和检验;计数资料以频数(%)的形式报告,采用卡方检验;数据采用SPSS 24.0统计分析,并采用Image J图像采集分析系统计算Western blot灰度值;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年龄阶段女性IVF结局比较 与三七、四七组比较,五七对照组和六七对照组患者获卵数、2PN数、可用胚胎数、优质胚胎数、临床妊娠率和产活率均明显下降($P<0.05$),六七对照组鲜胚移植率明显下降($P<0.05$)。对五七对照组比较,六七对照组患者患者获卵数、2PN数、可用胚胎数、优质胚胎数和临床妊娠率均明显下降($P<0.05$)。见表2。

2.2 中药组与对照组IVF结局比较 与五七对照组比较,五七中药组患者获卵数、2PN数、可用胚胎数明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);优质胚胎数、鲜胚移植率、临床妊娠率、活产率有升高趋势,但差异无统计学意义。与六七对照组比较,六七中药组患者获卵数明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);2PN数、可用胚胎数、优质胚胎数、鲜胚移植率、临床妊娠率、活产率有升高趋势,周期取消率有降低趋势,但差异无统计学意义。见表2。

2.3 不同年龄阶段女性卵巢颗粒细胞线粒体功能蛋白表达水平比较 与三七、四七组比较,五七对照组和六七对照组患者卵巢颗粒细胞中Mfn1和Mfn2蛋白表达降低,Drp1蛋白表达升高($P<0.05$)。与五七对照组比较,六七对照组患者卵巢颗粒细胞中Mfn1和Mfn2蛋白表达降低,Drp1蛋白表达升高($P<0.05$)。见表3和图1。

2.4 中药组与对照组卵巢颗粒细胞线粒体功能蛋白表达水平比较 与五七对照组比较,五七中药组Mfn2蛋白表达升高,Drp1蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与六七对照组比较,六七中药组Mfn1和Mfn2蛋白表达升高,Drp1蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表4和图2。

2.5 不良事件发生情况 所有患者治疗期间均无不良反应发生。

3 讨论

年龄是影响女性生育的独立危险因素之一,

表2 中药组与对照组IVF结局的比较 (n=30)

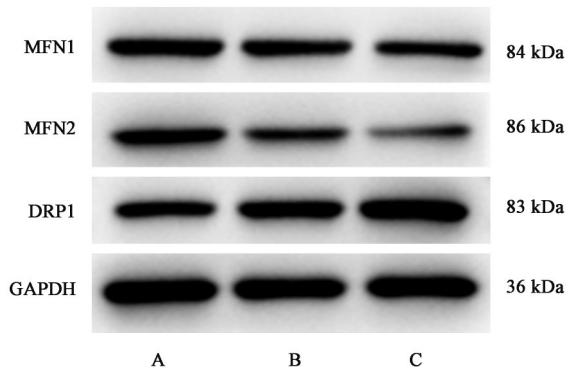
Table 2 Comparison of IVF outcome between Chinese herbal group and control group (n=30)

组别	获卵数($\bar{x}\pm s$)/个	2PN数($\bar{x}\pm s$)/个	可用胚胎数($\bar{x}\pm s$)/个	优质胚胎数($\bar{x}\pm s$)/个
三七、四七组	13.9±1.19	12.7±1.82	10.5±2.37	5.83±2.56
五七对照组	7.57±0.5 ¹⁾	6.27±1.95 ¹⁾	4.73±1.66 ¹⁾	2.87±1.46 ¹⁾
五七中药组	8.83±1.23 ²⁾	7.47±1.57 ²⁾	5.7±1.66 ²⁾	3.60±1.48
六七对照组	4.29±0.81 ^{1,2)}	3.79±0.92 ^{1,2)}	2.25±1.08 ^{1,2)}	1.07±1.09 ^{1,2)}
六七中药组	5.03±1.02 ³⁾	4.10±1.57	2.66±1.20	1.34±1.17
组别	周期取消率/%	鲜胚移植率/%	临床妊娠率/%	活产率/%
三七、四七组	0	83.33(25/30)	84.00(21/25)	72.00(18/25)
五七对照组	0	66.67(20/30)	55.00(11/20) ¹⁾	35.00(7/20) ¹⁾
五七中药组	0	73.33(22/30)	59.09(13/22)	40.90(9/22)
六七对照组	6.70(2/30)	53.37(15/28) ¹⁾	20.00(3/15) ^{1,2)}	13.33%(2/15) ¹⁾
六七中药组	3.33(1/30)	55.17(16/29)	31.25(5/16)	18.75(3/16)

表3 不同年龄阶段女性卵巢颗粒细胞Mfn1、Mfn2、Drp1蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of expression level of Mfn1, Mfn2 and Drp1 proteins in ovarian granulosa cells of women at different ages ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Mfn1/GAPDH	Mfn2/GAPDH	Drp1/GAPDH
三七、四七组	1.07±0.02	1.16±0.05	0.81±0.07
五七对照组	0.97±0.05 ¹⁾	0.99±0.04 ¹⁾	1.02±0.02 ¹⁾
六七对照组	0.95±0.05 ^{1,2)}	0.84±0.09 ^{1,2)}	1.18±0.08 ^{1,2)}



注:A.三七、四七组;B.五七对照组;C.六七对照组

图1 不同年龄阶段女性卵巢颗粒细胞Mfn1、Mfn2、Drp1的蛋白表达电泳

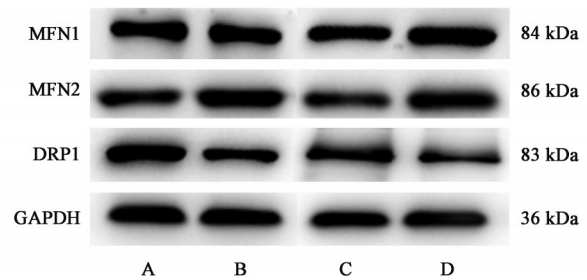
Fig. 1 Electrophoresis of Mfn1, Mfn2 and Drp1 in ovarian granulosa cells of women of different ages

35岁以上的女性被定义为高龄产妇^[15]。卵巢衰老与其他身体机能衰老的巨大时间差,以及对于辅助生殖技术的盲目自信,导致高龄女性往往意识不到自己面临的生殖困境,延缓高龄不孕女性卵巢储备功能减退和改善高龄不孕女性的IVF结局成为目前生殖医学领域研究的重点^[16]。高龄不孕在中医学中无专有名词,散见于“闭经”“不孕症”“经断前后

表4 中药组与对照组卵巢颗粒细胞Mfn1、Mfn2、Drp1蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of Mfn1, Mfn2 and Drp1 protein expression levels in ovarian granulosa cells between Chinese herbal group and control group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Mfn1/GAPDH	Mfn2/GAPDH	Drp1/GAPDH
五七对照组	1.05±0.12	0.88±0.05	1.13±0.1
五七中药组	0.96±0.12	1.12±0.06 ²⁾	0.87±0.1 ²⁾
六七对照组	0.91±0.06	0.92±0.06	1.13±0.09
六七中药组	1.10±0.07 ³⁾	1.09±0.07 ³⁾	0.86±0.08 ³⁾



注:A.五七对照组;B.五七中药组;C.六七对照组;D.六七中药组

图2 中药组和对照组卵巢颗粒细胞Mfn1、Mfn2、Drp1的蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Mfn1, Mfn2 and Drp1 in granulosa cells of ovary between Chinese herbal group and control group

诸证”等疾病文献中^[17]。《黄帝内经·上古天真论》“女子七岁肾气盛,齿更发长。二七而天癸至……五七阳明脉衰,面始焦,发始堕。六七……七七任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也”阐述了女性生长、生殖、衰老的规律^[18]。女性在“二七”天癸至,故能有子,在“四七”肾气达盛极,生殖能力在最佳年龄;“三七”“四七”作为女性育龄

期,其自身的肾气充盛足以充养身形,孕育胎儿,能发挥其正常的生殖生理活动,不需加以补肾中药调理补肾。女性在“五七”,肾气由盛转衰,天癸乏源,肾气由盛转衰,生殖能力每况日下,则需要用补肾中药加以调理,这与现代医学定义的“女性超过35岁属于“高龄产妇”不谋而合。“七七”理论构建了以肾为主导的女性生殖体系,是临床论治高龄女性不孕的基础^[19]。

二至天癸方是全国名中医连方教授的经验方,也是其学术思想与临床经验的结晶,应用于临床二十余载。二至天癸方在经典名方二至丸和四物汤的基础上组方,方中菟丝子、枸杞子合二至丸为君,可补肝肾益精髓;四物汤为臣涵养肝体而调冲任,佐以香附养血调冲、疏肝理气,诸药合用,补肾阴滋肝血,进而改善女性妊娠结局^[20]。网络药理学的研究表明,二至天癸方调治女性不孕症具有多途径、多成分、多靶点的作用机制^[21]。

年龄引起的女性生育能力的下降在25岁时为4.5%,在35岁时为12%,在41岁时为50%,在50岁时几乎为100%^[22]。研究结果表明,从三七、四七组到五七组、六七组,各年龄组之间在获卵数、2PN数、可用胚胎数、优质胚胎数和临床妊娠率和活产率方面下降,这印证了“七七”理论的临床指导价值。在本研究中,五七中药组在获卵数、2PN数、可用胚胎数方面优于五七对照组,六七中药组仅在获卵数方面有所改善。尽管研究中剔除了卵巢储备功能减退的患者,但“六七”组属于超高龄产妇(>40岁),临床妊娠结局预后极差,即使是接受了辅助生殖技术或中医药等补充替代医学的治疗,其IVF结局及临床妊娠结局也难以改善^[23]。中药组对高龄产妇(>35岁)的临床妊娠率、活产率均没有明显改善,一方面可能是由于患者中药的服用周期仅仅在促排卵期间,确定临床妊娠后一般不再复诊,此后诸多混杂因素影响了活产率,如患者的社会经济状况、一般健康参数和产科护理等,另一方面是受到样本量的限制,尽管课题组采用了Fisher's精确检验来评估临床妊娠率与活产率的差异,但“单中心”“小样本”等仍然限制了结果的可靠性。

线粒体是颗粒细胞和卵母细胞内含量最丰富的细胞器,若线粒体功能下降则会影响卵母细胞质量,进而影响妊娠结局。现代药理学研究表明,线粒体稳态是补肾中药调控卵巢功能减退类疾病的重要靶点^[24]。Mfn1是卵母细胞与颗粒细胞间通讯的重要因子^[25],卵母细胞中Mfn1的靶向缺失导致

卵母细胞和颗粒细胞之间的黏附和间隙连接被破坏,抑制颗粒细胞增殖进而导致卵泡加速耗竭^[26]。Mfn2与线粒体损伤和卵巢组织凋亡的关系已被证实^[27],Mfn2的低表达会降低小鼠的囊胚形成率,并导致腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)和线粒体DNA(mtDNA)水平及线粒体膜电位的下降^[28]。Drp1通过多个细胞器的动态重排来维持卵母细胞质量^[29],Drp1过表达诱导线粒体碎裂并减少线粒体膜电位,Drp1的减少能增强粒体自噬,有利于维持线粒体稳态^[30]。女性随着年龄的增长,机体的抗氧化能力逐渐降低,卵母细胞线粒体长期暴露在活性氧堆积的环境中,线粒体出现基因突变、功能异常的可能性会增加。本研究中,随着年龄的增长,卵巢颗粒细胞中Mfn1和Mfn2蛋白水平降低,而Drp1蛋白表达升高,线粒体Mfn1、Mfn2的降低与Drp1的升高是线粒体稳态失衡的表现,与女性在“五七”后,肾气由盛转衰,生殖能力下降相一致;“六七”后,阳气衰于上,进而阳损及阴,十二经脉俱虚,肾气进一步衰退,Mfn1、Mfn2的降低与Drp1的升高较“五七”之年更为显著。这印证了线粒体是年龄相关卵巢功能减退的重要机制之一,丰富和发展了《黄帝内经》“七七”理论。与本组对照组比较,五七中药组、六七中药组的Mfn2蛋白表达升高,Drp1蛋白表达降低,六七中药组Mfn1蛋白表达升高,提示补肾中药二至天癸可能通过调节卵巢颗粒细胞的线粒体功能,促进线粒体的融合,减少线粒体的裂变,进而调控线粒体稳态来改善卵母细胞质量及胚胎的发育潜能。

综上所述,本文从线粒体途径丰富和发展了《黄帝内经》“七七”理论的内涵,并验证了补肾中药对于高龄IVF患者的临床疗效。由于各种条件限制,本研究未能从体内外试验进行验证,后续研究中可进一步予以完善,并开展大样本、多中心的临床试验,为缓解年龄相关的卵巢功能减退和改善高龄女性IVF和妊娠结局提供中医药临床用药思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] JING W, LIU J, MA Q, et al. Fertility intentions to have a second or third child under China's three-child policy: A national cross-sectional study [J]. Hum Reprod, 2022, 37(8): 1907-1918.
- [2] 蒋励,陈耀龙,罗旭飞,等. 中国高龄不孕女性辅助生殖临床实践指南[J]. 中国循证医学杂志, 2019, 19(3): 253-270.
- [3] UBALDI F M, CIMADOMO D, VAIARELLI A, et al.

- Advanced maternal age in IVF: Still a challenge? The present and the future of its treatment [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 94.
- [4] 李今庸.《素问》“女子七七”、“男子八八”解[J]. *湖北中医杂志*, 1982(1):31.
- [5] CHIANG J L, SHUKLA P, PAGIDAS K, et al. Mitochondria in ovarian aging and reproductive longevity[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 63: 101168.
- [6] LIU J, WANG L, GE L, et al. Lanthanum decreased VAPB-PTPP51, BAP31-FIS1, and MFN2-MFN1 expression of mitochondria-associated membranes and induced abnormal autophagy in rat hippocampus [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 161: 112831.
- [7] VANDER BORGHT M, WYNS C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology [J]. *Clin Biochem*, 2018, 62: 2-10.
- [8] 郑筱萸. *中药新药临床研究指导原则*[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [9] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. *中西医结合杂志*, 1986(10): 598.
- [10] BRAAKHEKKE M, KAMPHUIS E I, DANCET E A, et al. Ongoing pregnancy qualifies best as the primary outcome measure of choice in trials in reproductive medicine: An opinion paper[J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(5): 1203-1204.
- [11] The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(6): 1270-1283.
- [12] 刘道英, 张建伟. 反复种植失败诊断标准的研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2019, 38(5): 397-400.
- [13] 徐苓, 宋亦军. 卵巢早衰的临床表现和诊断标准[J]. *实用妇产科杂志*, 2003, 19(4): 195-196.
- [14] 宋颖, 李蓉. 多囊卵巢综合征中国诊疗指南解读[J]. *实用妇产科杂志*, 2018, 34(10): 737-741.
- [15] No authors listed. Infertility workup for the women's health specialist: ACOG committee opinion, Number 781[J]. *Obstet Gynecol*, 2019, 133(6): e377-e384.
- [16] 陈瑛, 郁琦. 年龄与卵巢功能——对卵巢衰老的认识[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2017, 33(1): 68-70.
- [17] 连方. 不孕症中医文献的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2002.
- [18] 孙振高, 张兴兴, 宋景艳, 等. 基于卵泡液代谢组学的《黄帝内经》“七七理论”临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(10): 1168-1173.
- [19] 罗元恺. 肾气·天癸·冲任的探讨及其与妇科的关系[J]. *上海中医药杂志*, 1983(1): 11-13.
- [20] 王艺绚, 庞聪慧, 吴海萃, 等. 基于sPD-1和Th17/Treg相关细胞因子探讨二至天癸方辨治肾虚型反复种植失败的疗效和机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(7): 139-145.
- [21] 李然, 郭颖. 基于网络药理学及分子对接探讨二至天癸方治疗女性不孕症的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(1): 126-133.
- [22] EIJKEMANS M J, VAN POPPEL F, HABBEMA D F, et al. Too old to have children? Lessons from natural fertility populations [J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(6): 1304-1312.
- [23] 柴国路, 许培, 陈兢思, 等. 高龄产妇妊娠并发症及妊娠结局分析[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2019, 20(6): 506-509.
- [24] 史薇, 刘敏, 王智超, 等. 补肾养血活血类中药复方调控线粒体稳态治疗卵巢功能减退类疾病的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(1): 240-249.
- [25] ZHANG M, BENER M B, JIANG Z, et al. Mitofusin 1 is required for female fertility and to maintain ovarian follicular reserve [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 560.
- [26] CARVALHO K F, MACHADO T S, GARCIA B M, et al. Mitofusin 1 is required for oocyte growth and communication with follicular somatic cells [J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 7644-7660.
- [27] CHEN W, XU X, WANG L, et al. Low Expression of Mfn2 is associated with mitochondrial damage and apoptosis of ovarian tissues in the premature ovarian failure model [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136421.
- [28] ZHAO N, ZHANG Y, LIU Q, et al. Mfn2 affects embryo development via mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125680.
- [29] TILOKANI L, NAGASHIMA S, PAUPE V, et al. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms [J]. *Essays Biochem*, 2018, 62(3): 341-360.
- [30] KANDIMALLA R, MANCZAK M, PRADEPKIRAN J A, et al. A partial reduction of Drp1 improves cognitive behavior and enhances mitophagy, autophagy and dendritic spines in a transgenic Tau mouse model of Alzheimer disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2022, 31(11): 1788-1805.

[责任编辑 王鑫]