

本文引用: 王 婕, 刘志成, 张彩凤, 郝 焱, 游 卉, 尤昭玲, 王慧颖, 金 波. 丹参酮 II A 对玻璃化冷冻小鼠卵母细胞保护机制的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(1): 42-50.

## 丹参酮 II A 对玻璃化冷冻小鼠卵母细胞保护机制的研究

王 婕<sup>1</sup>, 刘志成<sup>2</sup>, 张彩凤<sup>1</sup>, 郝 焱<sup>3</sup>, 游 卉<sup>4</sup>, 尤昭玲<sup>4</sup>, 王慧颖<sup>1</sup>, 金 波<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学深圳医院(龙岗)妇科, 广东 深圳 518000; 2. 银丰低温医学科技有限公司, 山东 济南 250000;  
3. 山东银丰生命科学研究院, 山东 济南 250000; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410208

**[摘要]** **目的** 探讨丹参酮 II A 对小鼠卵母细胞玻璃化冷冻的保护机制。**方法** 选取 4-8 周龄 SPF 级 ICR 雌性小鼠腹腔注射 5 IU 孕马血清促性腺激素(PMSG), 48 h 后从卵巢中收集形态正常的未成熟(GV 期)卵母细胞。将 GV 期卵母细胞分为对照组及丹参酮 II A 组进行 16~18 h 过夜培养到 M II 阶段, 形态正常的 M II 卵母细胞进行体外受精, 观察其各组的受精、卵裂和囊胚形成情况。通过免疫荧光技术检测 M II 卵母细胞对照组及丹参酮 II A 组中细胞膜水通道蛋白 3(AQP3)的蛋白表达水平。将 GV 期卵母细胞分为对照组(未冷冻)、丹参酮 II A 组(未冷冻)、对照组(玻璃化冷冻)、丹参酮 II A 组(玻璃化冷冻)进行培养至成熟卵母细胞, 观察分析四组卵母细胞的受精率、卵裂率、囊胚形成率。采用低温显微镜观察丹参酮 II A 在 M II 卵母细胞冷冻保存过程中对其细胞内冰晶形成的影响。**结果** 与对照组相比, 丹参酮 II A 组卵母细胞成熟率、受精率、卵裂率和囊胚形成率均提高( $P<0.05$ ), 其中添加 0.5  $\mu\text{g/mL}$  丹参酮 II A 组的囊胚率最高。丹参酮 II A 组中 AQP3 的蛋白表达水平明显高于对照组( $P<0.000 1$ )。与对照组(未冷冻)相比, 丹参酮 II A 组(未冷冻)的受精率、卵裂率、囊胚形成率均提高( $P<0.05$ )。与对照组(玻璃化冷冻)相比, 丹参酮 II A 组(玻璃化冷冻)的受精率、卵裂率、囊胚形成率均提高( $P<0.05$ )。在丹参酮 II A 组, 细胞内冰晶形成的温度更低及温度域的分布更集中, 且低温冰晶形成概率更少。**结论** 丹参酮 II A 通过上调卵母细胞细胞膜上 AQP3 的表达, 并降低冷冻保存过程中细胞内冰晶形成的温度, 进而提高玻璃化冷冻卵母细胞的成活率及后续发育潜能。

**[关键词]** 卵母细胞; 玻璃化冷冻; 丹参酮 II A; 水通道蛋白 3; 细胞内冰晶; 渗透性

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.01.006

## Protective mechanism of Tanshinone II A in vitrified mouse oocytes

WANG Jie<sup>1</sup>, LIU Zhicheng<sup>2</sup>, ZHANG Caifeng<sup>1</sup>, HAO Yan<sup>3</sup>, YOU Hui<sup>4</sup>, YOU Zhaoling<sup>4</sup>,

WANG Huiying<sup>1</sup>, JIN Bo<sup>1\*</sup>

1. Department of Gynaecology, Shenzhen Hospital (Longgang), Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 2. Yin Feng Cryomedicine Technology Co., Ltd, Jinan, Shandong 250000, China; 3. Shandong Yin Feng Life Science Research Institute, Jinan, Shandong 250000, China; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective mechanism of Tanshinone II A against vitrification-induced injury in mouse oocytes. **Methods** Female ICR mice aged 4-8 weeks (SPF grade) were intraperitoneally injected with 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). After 48 hours, morphologically normal immature oocytes at the germinal vesicle (GV) stage were collected from the ovaries. The GV-stage oocytes were divided into control group and Tanshinone II A group and cultured overnight for 16-18 hours to reach the metaphase II (M II) stage. Morphologically normal M II oocytes were then subjected to in vitro fertilization, and

**[收稿日期]** 2025-11-04

**[基金项目]** 育龙计划-三龙人才项目(2022-BUCMSZYLR05); 深圳市龙岗区科技创新专项(LGWJ2024-37); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目(SZZYSM202311019); 北京中医药大学深圳医院(龙岗)联合银丰低温医学科技有限公司合作课题(KJK-HX-2023-001); 国家中医药管理局“尤昭玲全国名中医传承工作室”建设项目(国中医药办人教函[2022]5号)。

**[通信作者]** \* 金 波, 男, 博士, 副教授, E-mail: jinboknox@163.com。

fertilization, cleavage, and blastocyst formation were observed in each group. The protein expression level of aquaporin 3 (AQP3) on the cell membrane was detected in MII oocytes from the control group and the Tanshinone II A group using immunofluorescence technique. In another experiment, GV-stage oocytes were divided into four groups for culture until maturation: a control group (non-vitrified), a Tanshinone II A group (non-vitrified), a control group (vitrified), and a Tanshinone II A group (vitrified). Fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst formation rate were observed and analyzed in the four groups. A cryomicroscope was employed to observe the effect of Tanshinone II A on intracellular ice formation (IIF) during the cryopreservation of MII oocytes. **Results** Compared with the control group, the Tanshinone II A group showed increased rates of oocyte maturation, fertilization, cleavage, and blastocyst formation ( $P<0.05$ ), with the highest blastocyst rate observed when treated with  $0.5 \mu\text{g/mL}$  Tanshinone II A. The protein expression level of AQP3 was significantly higher in the Tanshinone II A group than in the control group ( $P<0.0001$ ). Compared with the control group(non-vitrified), the Tanshinone II A group (non-vitrified) showed significantly higher fertilization, cleavage, and blastocyst formation rates ( $P<0.05$ ). Similarly, compared with the control group (vitrified), the Tanshinone II A group (vitrified) also exhibited significantly increased fertilization, cleavage, and blastocyst formation rates ( $P<0.05$ ). Additionally, IIF occurred at a lower temperature with a more concentrated temperature range, resulting in a lower probability of ice formation during cooling. **Conclusion** Tanshinone II A improves the survival rate and developmental potential of vitrified oocytes by upregulating the expression of AQP3 on the oocyte membrane and reducing the temperature of IIF during cryopreservation.

[**Keywords**] oocyte; vitrification; Tanshinone II A; AQP3; intracellular ice crystals; permeability

据 2021 年国家统计局的数据报道,我国育龄夫妇不孕不育率已上升至  $12\% \sim 18\%$ <sup>[1]</sup>。不孕不育已成为继肿瘤、心脑血管疾病之后的第三大严重影响人类健康的疾病,且育龄夫妇的生育能力呈逐年下降趋势<sup>[2-3]</sup>。此外,对于因恶性肿瘤等需手术或放化疗而导致卵巢功能丧失的女性,或在接受体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)周期中伴侣取精失败的女性,生育力保存是重要的策略之一<sup>[4]</sup>。女性生育力保存主要包括卵母细胞冷冻、胚胎冷冻及卵巢组织冷冻等<sup>[5]</sup>。

卵母细胞在玻璃化冷冻过程中,虽然避免了细胞外冰晶的形成,但是卵母细胞细胞膜以及内部诸如线粒体的双层膜结构对水和低温保护剂的渗透性较弱,卵母细胞在冷冻保存过程中易受到细胞内冰晶形成(intracellular ice formation, IIF)的损伤,从而降低其成活率及后续发育潜能<sup>[6]</sup>。另外,细胞膜上的水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是生物膜中与流体运动相关的主要通道蛋白,AQPs 广泛存在于原核生物和真核生物中,负责跨膜运输水、小分子溶质<sup>[7]</sup>。迄今为止已经发现 13 种水通道蛋白亚型(AQP0~AQP12)。大部分 AQPs 亚型是选择性水通道,而 AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10 是非选择性水通道,不仅能运输水分子,还能转运甘油、尿素等小分子非电解质<sup>[8-10]</sup>。GARCÍA 等发现冷冻保护剂通过上调小鼠卵母细胞 AQP7 的表达,促进冷冻保存过程中的水分运输并减少卵母细胞与冷冻保护剂溶液达到渗透平衡的时间<sup>[11]</sup>。PRIETO 等<sup>[12]</sup>发现在猪精子细胞中,AQP3 和 AQP7 参与精子细胞对小分子溶质的

通透性,AQP3 和 AQP7 的表达水平与精子细胞在冷冻保存中的存活率呈正相关。团队前期在小鼠及大动物模型(猪和牛)的卵母细胞和胚胎的研究中发现,在小鼠模型中,AQP3 充当水和甘油等小分子物质的渗透通道,AQP3 是细胞膜上水和低温保护剂进出的重要通道<sup>[13-15]</sup>,通过注射 AQP3 的 cRNA 到小鼠卵母细胞中表达 AQP3 后,能提高卵母细胞细胞膜的渗透性和卵母细胞复温后的成活率<sup>[13]</sup>。在牛的桑葚胚中有大量的 AQP3 表达,显著增加了胚胎对冷冻保护剂的渗透系数和冷冻胚胎解冻后的成活率<sup>[14]</sup>。上述研究表明,AQPs 在成功保存卵母细胞方面扮演重要角色,揭示了 AQPs 在卵母细胞和胚胎冷冻保存中维持渗透平衡的重要性。因此,提高卵母细胞细胞膜对低温保护剂及水分的渗透性可能是提高卵母细胞冷冻保存成活率及发育潜能的关键。

丹参酮 II A 是丹参的主要活性成分,是从丹参中提取的一种脂溶性化合物<sup>[16]</sup>。前期研究发现,在卵母细胞培养过程中,在培养液中添加丹参酮可以提高卵母细胞的细胞膜渗透性<sup>[17]</sup>。另有研究表明,丹参酮 II A 增加了人羊膜上皮 WISH 细胞对水的通透性<sup>[18]</sup>。结合前期对细胞膜渗透特性和 AQP3 的相关研究,推测丹参酮 II A 可能上调卵母细胞细胞膜 AQP3 的表达。本研究试图通过对小鼠卵母细胞玻璃化冷冻模型的研究,观察丹参酮 II A 对卵母细胞细胞膜 AQP3 表达和定位的影响,并通过 Linkam 低温显微镜系统解析丹参酮 II A 在小鼠卵母细胞保存中对 IIF 形成的影响,揭示丹参酮 II A 对小鼠卵母细胞玻璃化冷冻的保护机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

ICR 雌性小鼠, 4~8 周龄, 平均体质量 35 g 左右, 购自广东维通利华实验动物技术有限公司[动物合格证号: SCXK(粤)2022-0063]。购回后置于恒温 24~26 °C、湿度为 50%~70%、14 h 光照/10 h 无光照条件下饲养一周后用于实验。本研究经北京中医药大学深圳医院(龙岗)伦理委员会批准(伦理件批号: SZLDH2021LSYA-143)。

### 1.2 主要试剂

孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)(批号: 110204564)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)(批号: 110251282)均购自宁波第二激素厂; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(批号: A8020)、石蜡油(批号: M8040)购自北京 Solarbio 公司; 透明质酸酶(批号: H3506)、IVM 培养液(TCM-199, 批号: 12340030)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; M16 培养液(批号: M7292)、丹参酮 II A(批号: T4952-25MG)、葡萄糖(批号: D9434-250G)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号: 67-68-5)、乙二醇(ethylene glycol, EG)(批号: 102466)、聚蔗糖(批号: F2878-50G)以及蔗糖(批号: V900116-500G)均购自美国 Sigma 公司; AQP3(批号: AF5222)抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司; Snomax(购自美国 York Snow Inc 公司, 批号: Pseudomonas Syringae 31A); 免疫荧光检测试剂盒(批号: P0186)购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 主要仪器

体外受精超净工作台(丹麦 IVFtech 公司, 型号: 180 Sterile); 体视显微镜(日本 Olympus 公司, 型号: SZX16); 低温显微成像系统(英国 Linkam 公司, 型号: FDSC196); 二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号: BB150); 光学显微镜(德国 Leica 公司, 型号: DM4000B-LED); 激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司, 型号: A1R HD25)。

## 2 方法

### 2.1 小鼠卵母细胞的获取

GV 期卵母细胞: 4~8 周龄 SPF 级 ICR 雌性小鼠腹腔注射 PMSG 后, 48 h 后处死小鼠。回收卵巢组织放入表面皿中的 PB1 溶液中, 用针头刺破卵巢中的卵泡, 释放 GV 期卵母细胞。

### 2.2 试验分组及处理

形态正常的 GV 期卵母细胞随机分为对照组和

实验组, 对照组仅使用 IVM 培养液培养; 实验组在 IVM 培养液中添加不同浓度的丹参酮 II A (0.1、0.5、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 两组中 GV 期卵母细胞经过 16~18 h 培养至 M II 期卵母细胞。选择丹参酮 II A 最佳浓度用于后续实验。

在玻璃化冷冻相关实验中, 将试验分为 4 组, 对照组(未冷冻)、丹参酮 II A 组(未冷冻)、对照组(玻璃化冷冻)、丹参酮 II A 组(玻璃化冷冻)。对照组(未冷冻)、对照组(玻璃化冷冻)是将 GV 期卵母细胞单独使用 IVM 培养液经过 16 h 培养至 M II 期卵母细胞; 丹参酮 II A 组(未冷冻)、丹参酮 II A 组(玻璃化冷冻)是将 GV 期卵母细胞使用添加丹参酮 II A 的 IVM 培养液中经过 16 h 培养至 M II 期卵母细胞。

### 2.3 玻璃化冷冻与解冻

溶液配制: 以 PB1(改良磷酸缓冲生理盐水)<sup>[18]</sup>为基础溶液, 平衡液 ED10/10 包含 10%(V/V)的 EG 和 10%(V/V)DMSO, 玻璃化冷冻液 EDF520/20 包含 20%(V/V)的 EG、20%(V/V)DMSO、18%(W/V) Ficoll 和 0.3 mol/L 蔗糖, 解冻液分别为 0.5、1.0 mol/L 蔗糖。

玻璃化冷冻: 室温保持 25 °C, 使用 35 mm 培养皿作为冷冻的操作皿。将 5 个 M II 期卵母细胞从培养液中逐步转移至 3 个 50  $\mu\text{L}$  的 ED10/10 平衡液液滴中连续处理, 总平衡时间为 2 min。随后转移到 50  $\mu\text{L}$  的 EDF520/20 玻璃化溶液中处理 1 min, 随后将处理后的 5 个 M II 期卵母细胞转移到冷冻载杆上。将样本连同载杆快速放入液氮中冷冻保存。

解冻处理: 室温保持 25 °C, 分别准备含有 200  $\mu\text{L}$  的 1.0 mol/L 蔗糖溶液、0.5 mol/L 蔗糖溶液以及 IVM 培养液的培养皿各一个, 同时准备一个含有 50  $\mu\text{L}$  的 IVM 培养液的培养皿。所有培养皿均须在实验前置于培养箱中平衡 12 h。将含有 M II 期卵母细胞的载杆自液氮罐中取出, 先将含有卵母细胞的载杆放入 200  $\mu\text{L}$  的 1.0 mol/L 蔗糖溶液中, 保持 1 min; 然后转移到 200  $\mu\text{L}$  的 0.5 mol/L 蔗糖溶液中, 保持 5 min; 然后将卵母细胞转移到 200  $\mu\text{L}$  的 IVM 培养液中保持 5 min; 最终移入事先平衡好的 50  $\mu\text{L}$  的 IVM 培养液中培养。在培养箱中培养 1.5~2 h 后, 评估 M II 期卵母细胞的形态成功率, 形态正常的 M II 期卵母细胞用于后续实验。

### 2.4 Linkam 低温系统的样本准备

实验中, 将 M II 卵母细胞从 PB1 液滴转移到 1 mL

含有1.0 mol/L EG和10 mg/L Snomax的溶液,平衡15 min。Snomax作为植冰剂添加到溶液中,降低在冷冻降温过程中溶液的过冷化。平衡后,用微量枪头把1.5  $\mu$ L液滴放置在Linkam系统50  $\mu$ m厚石英槽中心,然后将卵母细胞以最小体积移液到该液滴中并盖好盖玻片。接着将石英槽插入Linkam冷冻台中,开始按照设定的程序运行,并通过显微镜系统观察卵母细胞的变化。

### 2.5 小鼠卵母细胞的体外受精

将覆盖有石蜡油的受精微滴(50  $\mu$ L)置于培养箱中平衡12 h。实验组添加不同浓度的丹参酮II A (0.1、0.5、1.0  $\mu$ g/mL)和对照组的M II期卵母细胞用受精液洗3次,每个受精微滴中移入5枚M II期卵母细胞。取ICR雄鼠附睾精子放入300  $\mu$ L受精液中在培养箱获能2 h。随后,每个受精微滴中加10  $\mu$ L获能的精液(精子密度 $5 \times 10^6$ 个/mL),精卵共孵育6 h后,受精结束,将受精卵移至M16培养液培养皿中,继续进行培养并观察。

### 2.6 小鼠卵母细胞免疫荧光染色

通过免疫荧光技术,检测AQP3在小鼠卵母细胞膜上的表达和定位。将收集到的M II期卵母细胞随机分组为对照组:将GV期卵母细胞单独使用IVM培养液经过16 h培养至M II期卵母细胞;丹参酮II A组:将GV期卵母细胞使用添加丹参酮II A (0.5  $\mu$ g/mL)的IVM培养液中经过16 h培养至M II期卵母细胞。卵母细胞用4%多聚甲醛溶液中固定,选用含有2% BSA的PBS洗涤3次,室温封闭0.5~1 h后,AQP3抗体(1:200)4  $^{\circ}$ C孵育过夜。0.1% Tween20进行清洗,荧光二抗室温孵育1 h,0.1% Tween20进行清洗,使用DAPI试剂进行染核10 min后,转移至DPBS中洗净,用防荧光淬灭剂封片。用倒置荧光显微镜观察并获得图像进行分析。并通过ImageJ软件定量分析AQP3的表达。通过丹参酮II A和对照组卵母细胞膜上的AQP3表达的荧光强度,探测丹参酮II A对小鼠卵母细胞膜AQP3表达的影响。

### 2.7 玻璃化冷冻小鼠卵母细胞的体外受精

将试验分为4组,对照组(未冷冻)、丹参酮II A组(未冷冻)、对照组(玻璃化冷冻)、丹参酮II A组(玻璃化冷冻)。对照组(未冷冻)是将GV期卵母细胞单独使用IVM培养液经过16 h培养至M II期卵母细胞;丹参酮II A组(未冷冻)是将GV期卵母细胞在添加丹参酮II A (0.5  $\mu$ g/mL)的IVM培养液中培养16 h至M II期卵母细胞;对照组(玻璃化冷冻)是将GV期卵母细胞单独使用IVM培养液经过16 h

培养至M II期卵母细胞,再经过玻璃化冷冻与解冻处理;丹参酮II A组(玻璃化冷冻)是将GV期卵母细胞在添加丹参酮II A的IVM培养液中经过16 h培养至M II期卵母细胞,再经过玻璃化冷冻与解冻处理。对4组M II期卵母细胞进行体外受精,培养后评估4组卵母细胞的受精率、卵裂率、囊胚形成率。

### 2.8 小鼠卵母细胞程序化降温及复温

使用液氮(liquid nitrogen, LN<sub>2</sub>)蒸汽进行降温和借助电阻器进行升温,Linkam低温平台及其相关控制硬件和Pax-it软件,完成对样品进行一系列温度的梯度变化,其中可以设定降温速率、目标温度、维持温度和复温速率等。本实验使用的温度梯度变化如表1所示。操作步骤如下:卵母细胞快速降温至-5.0  $^{\circ}$ C,然后缓慢降至-8.0  $^{\circ}$ C(程序1和2);随后升温(程序3)至-3.2  $^{\circ}$ C,此时刚好达到溶液的熔点,大部分(但不是全部)外部冰融化。程序3的目的为细胞外部液体、外部冰晶以及细胞中的过冷水提供平衡时间,使其在重新降温冷冻开始前达到近似平衡状态。如果省略程序3,则观察到细胞内冰晶的温度会高出约20  $^{\circ}$ C<sup>[20]</sup>。在程序3完成后保持10 s后,程序4进行再降温冷冻。细胞内冰晶在程序4期间形成,表现为细胞突然出现变黑的现象。详见表1。

表1 卵母细胞降温及复温的程序( $\bar{x} \pm s, n$ )

Table 1 Procedures of oocyte cooling and rewarming ( $\bar{x} \pm s, n$ )

程序	速率/( $^{\circ}$ C/min)	最终温度/ $^{\circ}$ C	保持时间/s	说明
1	-20	-5	0	降温
2	-2	-8	0	降温;细胞外冰晶形成
3	+2	-3.2	10	复温
4	-20	-70	0	降温;细胞内冰晶形成
5	+20	+20	60	复温

注:降温用负速率表示;复温用正速率表示。

### 2.9 统计学分析

使用SPSS 27.0进行数据的统计学分析。计数资料用“%”表示,使用 $\chi^2$ 检验进行分析。计量资料进行正态性检验,符合正态分布者以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间比较采用One-Way ANOVA方差分析,组间比较采用SNK检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 丹参酮II A对小鼠卵母细胞成熟率、受精率、卵裂率及囊胚形成率的影响

与对照组相比,添加丹参酮II A组中3个浓度梯度共培养的卵母细胞从GV期到M II期的成熟

表 2 对照组及丹参酮 II A 组中卵母细胞的成熟率、受精率、卵裂率、囊胚率的变化( $\bar{x}\pm s, n=3$ )**Table 2** Maturation rate, fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst rate in control group and Tanshinone II A group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	卵母细胞数/个	成熟率/%	受精率/%	卵裂率/%	囊胚率/%
对照组	102	88.65±0.85	80.21±0.22	72.52±1.13	68.57±0.87
丹参酮 II A 组 (0.1 μg/mL)	106	89.55±1.36	87.76±1.16*	85.58±0.55*	71.01±0.69*
丹参酮 II A 组 (0.5 μg/mL)	104	90.08±0.89	89.29±0.15*#	87.85±0.32*#	75.31±0.36*#
丹参酮 II A 组 (1.0 μg/mL)	102	88.61±0.94	85.84±0.54* <sup>△</sup>	84.11±0.21* <sup>△</sup>	70.94±0.30* <sup>△</sup>

注:括号中示阳性数/总数;与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与丹参酮 II A 组(0.1 μg/mL)相比,# $P<0.05$ ;与丹参酮 II A 组(0.5 μg/mL)相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

率、受精率、卵裂率、囊胚形成率均有提高。与对照组相比,丹参酮 II A 组的成熟率差异无统计学意义( $P>0.05$ ),受精率、卵裂率和囊胚率差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。与 0.1 μg/mL 和 1 μg/mL 丹参酮 II A 组相比,0.5 μg/mL 丹参酮 II A 组的受精率、卵裂率和囊胚率明显升高( $P<0.05$ ),且 0.5 μg/mL 丹参酮 II A 组卵母细胞形态学图谱与对照组的一样显示正常形态,见图 1。故采用添加浓度为 0.5 μg/mL 的丹参酮 II A 进行后续实验。

### 3.2 丹参酮 II A 对小鼠卵母细胞膜 AQP3 表达的影响

在丹参酮 II A 组中 AQP3 的蛋白表达水平高于对照组( $P<0.001$ )。详见图 2。

### 3.3 丹参酮 II A 对玻璃化冷冻卵母细胞受精率、卵裂率、囊胚形成率的影响

与对照组(未冷冻)相比,丹参酮 II A 组(未冷冻)卵母细胞的受精率、卵裂率、囊胚形成率均提高

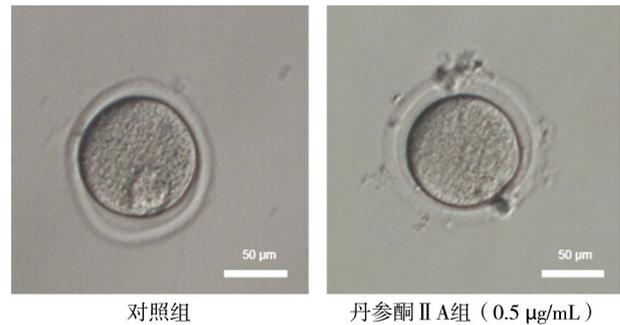


图 1 卵母细胞的形态(标尺=50 μm)

**Fig.1** Morphology of oocytes from control group and Tanshinone II A group

( $P<0.05$ )。与对照组(玻璃化冷冻)相比,丹参酮 II A 组(玻璃化冷冻)的受精率、卵裂率、囊胚形成率均升高( $P<0.05$ )。详见表 3。

### 3.4 添加丹参酮 II A 对 IIF 的影响

M II 卵母细胞在 Linkam 系统中完成降温 and 复温的过程,在程序 1 和 2 中,细胞无明显收缩,仅因

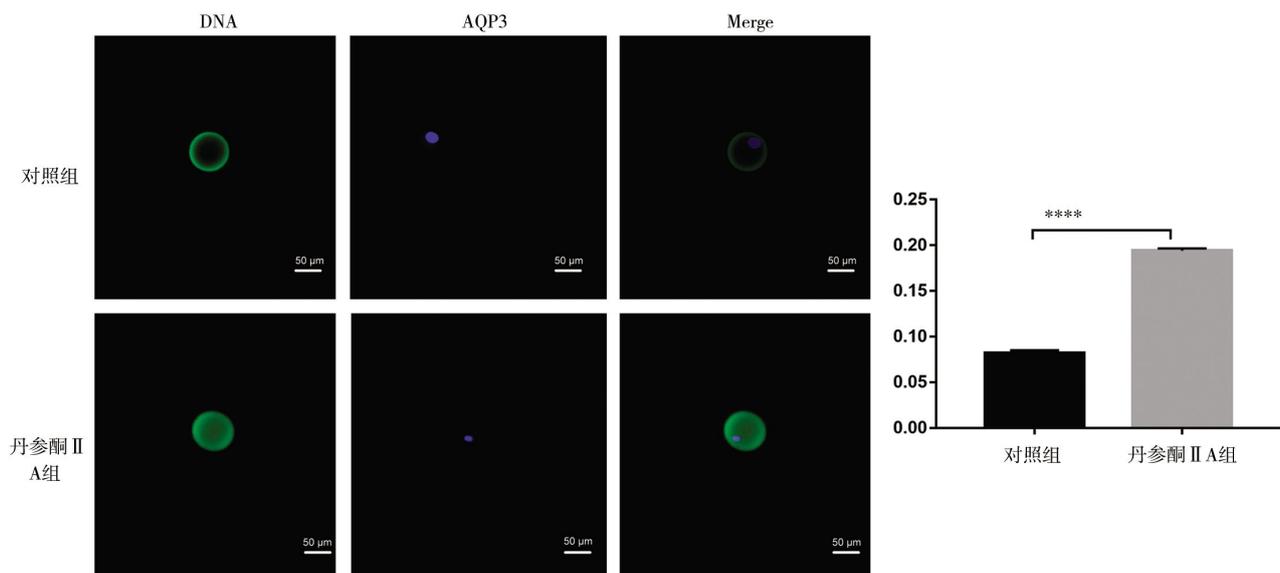


图 2 AQP3 在卵母细胞的表达和定位

**Fig.2** Expression and localization of AQP3 in oocytes from control group and Tanshinone II A group

注:A. AQP3 在对照组及丹参酮 II A 组的荧光共定位图像及复合图像,标尺=50 μm;B. AQP3 在卵母细胞中的荧光定量分析图。

\*\*\*\* $P<0.0001$ 。

表3 丹参酮II A对玻璃化冷冻卵母细胞受精率、卵裂率、囊胚形成率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )**Table 3** Effects of Tanshinone II A on fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst formation rate of vitrified oocytes ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	卵母细胞数/个	受精率/%	卵裂率/%	囊胚率/%
对照组(未冷冻)	102	80.21±0.22	72.52±1.13	68.57±0.87
丹参酮II A组(未冷冻)	104	89.29±0.15*	87.85±0.32*	75.31±0.36*
对照组(玻璃化冷冻)	102	41.03±0.64	39.46±1.27	23.45±0.24
丹参酮II A组(玻璃化冷冻)	103	58.32±0.57 <sup>#</sup>	52.37±0.69 <sup>#</sup>	37.86±0.17 <sup>#</sup>

注:与对照组(未冷冻)相比,\* $P<0.05$ ;与对照组(玻璃化冷冻)相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

细胞外诱发冰晶过程中引起轻微不规则的收缩变形。在程序3~5中,对照组在-8.52℃时细胞外冰晶形成,随着温度的不断降低,在-36.72℃时可见卵母细胞突然变黑并随即迅速扩展至整个卵母细胞,意味着卵母细胞内部形成冰晶。丹参酮II A组在-9.28℃时细胞外冰晶形成,随着温度的不断降低,在-39.96℃时卵母细胞变黑,细胞内冰晶形成。详见图3。

卵母细胞在降温过程中,实时记录IIF和细胞外冰晶形成(extracellular ice formation, EIF)的温度,细胞内部突然变黑意味着IIF的形成。本实验中两组均无高温冰晶形成;对照组IIF的温度为(-33.61±7.21)℃,丹参酮II A组IIF的温度为(-39.39±4.60)℃。

丹参酮II A组卵母细胞IIF的温度明显低于对照组( $P<0.001$ )。详见表4。

对照组卵母细胞细胞内IIF的温度域分布-37.68~-23.26℃,丹参酮II A组细胞内IIF的温度域分布为-44.12~-34.93℃,丹参酮II A组冰晶温度域的分布更集中。详见图4。

#### 4 讨论

卵母细胞表面积/体积的比率小,细胞膜对低温保护剂及水渗透慢,细胞膜AQPs表达量低<sup>[21-23]</sup>,这些低温生物学特性使得卵母细胞在冷冻保存与复温过程中容易受到细胞内冰晶的伤害,例如引起纺锤体、线粒体以及细胞骨架的损伤,并可能进一步对极

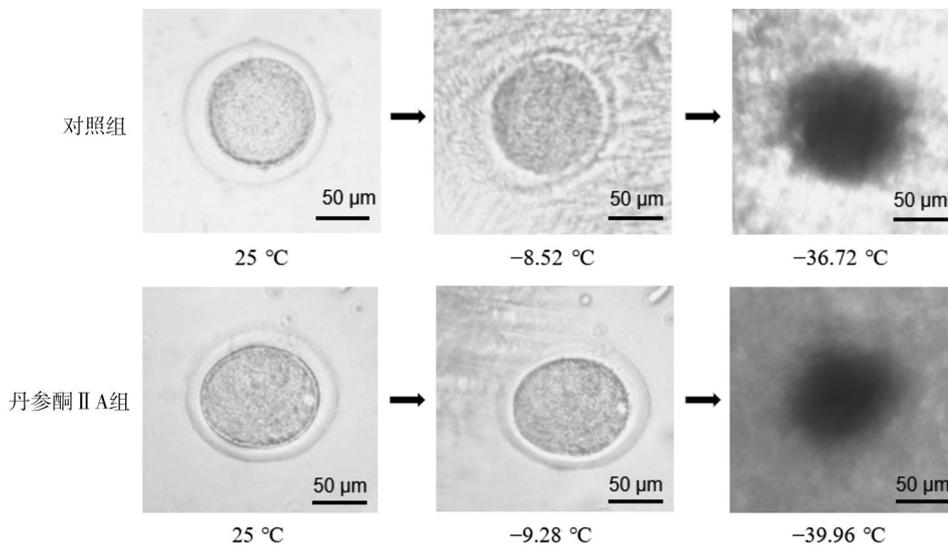


图3 卵母细胞细胞内冰晶形成

**Fig.3** IIF in oocytes表4 卵母细胞的IIF情况( $\bar{x}\pm s, n=3$ )**Table 4** IIF in oocytes ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	卵母细胞数/个	未结冰数/个	高温冰晶数/个	低温冰晶数/个	低温冰晶温度/℃	最低温度/℃	最高温度/℃
对照组	54	0	0	54	-33.61±7.21	-37.68	-23.26
丹参酮II A组	54	0	0	54	-39.39±4.60***	-44.12	-34.93

注:与对照组相比,\*\*\* $P<0.001$ 。

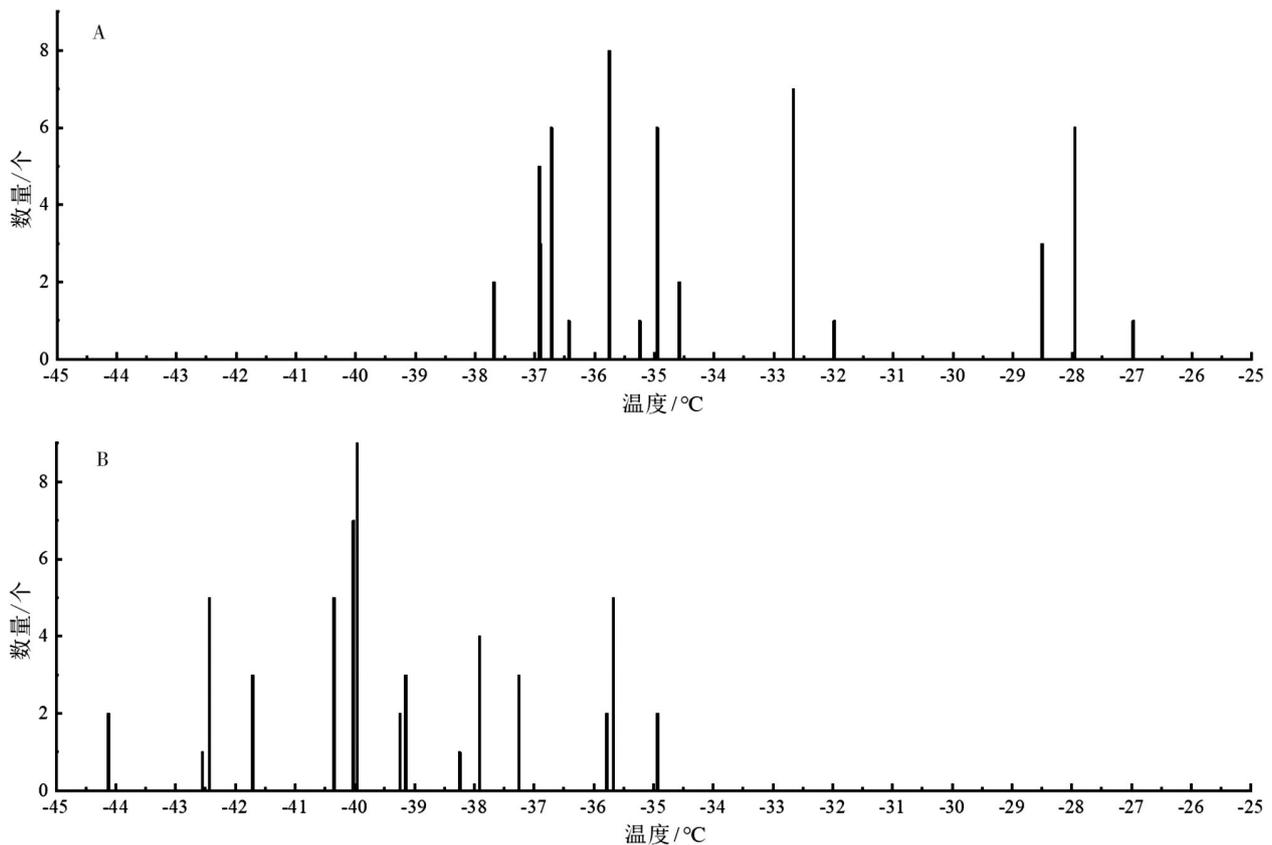


图 4 卵母细胞内 IIF 的温度分布图

Fig.4 Temperature distribution of IIF in oocytes

注:A.对照组,B.丹参酮 II A 组。

体挤压、原核迁移和细胞质分裂产生影响,降低其成活率及后续发育能力<sup>[24-25]</sup>,这使得成功冷冻保存卵母细胞相对于胚胎更困难。

研究发现,中药单体在卵母细胞培养及低温保存中发挥重要作用<sup>[26-28]</sup>。例如,黄芩苷可以通过降低活性氧水平提高猪卵母细胞的体外成熟率<sup>[29]</sup>。石斛碱通过调节氧化还原反应和抑制胚胎凋亡促进卵母细胞成熟和胚胎发育<sup>[30]</sup>。丹参具有祛瘀止痛、活血通络的功效<sup>[31-32]</sup>。丹参酮 II A 是丹参中的主要二萜成分奎宁色素,具有抗氧化、抗炎、改善微循环等作用,在生殖、内分泌、神经系统等方面有广泛应用<sup>[33-38]</sup>。研究发现,丹参酮 II A 可以增强老年小鼠的卵巢储备并减轻卵巢氧化应激<sup>[39]</sup>。杨芳等<sup>[40]</sup>发现,丹参酮 II A 可能通过降低氧化应激水平和炎症反应,从而减轻大鼠的生殖损伤。华莹<sup>[17]</sup>研究发现,丹参酮 II A 可增加人羊膜上皮 WISH 细胞对水的通透性。本研究旨在探索丹参酮 II A 在卵母细胞玻璃化冷冻保存中的作用及其机制,以小鼠卵母细胞作为研究模型,添加不同浓度丹参酮 II A 到细胞 IVM 培养基中进行共培养,评估其对 M II 期卵母细胞发育率、受精率、卵裂率、囊胚形成率的影响。结果表明,丹参酮 II A 对

M II 期卵母细胞的发育率、受精率、卵裂率、囊胚形成率均有提高,这可能与丹参酮 II A 的抗氧化作用相关。通过细胞免疫荧光技术检测卵母细胞的 AQP3 表达,进一步研究发现,丹参酮 II A 组中卵母细胞 AQP3 的蛋白表达水平明显高于对照组。这表明,添加丹参酮 II A 可以上调卵母细胞 AQP3 的表达,从而提高卵母细胞对低温保护剂和水的渗透性,使冷冻保护剂快速进入细胞内,提高卵母细胞保存的成活率。这与张译文等<sup>[18]</sup>发现丹参注射液可以上调人羊膜上皮细胞 AQP3 的表达相一致。继续将 GV 期卵母细胞分为对照组(未冷冻)、丹参酮 II A 组(未冷冻)、对照组(玻璃化冷冻)、丹参酮 II A 组(玻璃化冷冻)进行培养至成熟卵母细胞,观察分析 4 组卵母细胞的受精率、卵裂率、囊胚形成率。与对照组(玻璃化冷冻)相比,添加丹参酮 II A 可以提高卵母细胞玻璃化冷冻后的受精率、卵裂率和囊胚形成率。

IIF 形成和细胞的冷冻速率相关<sup>[41-43]</sup>,细胞冷冻保存过程中,IIF 形成是影响细胞成活的致命因素<sup>[6]</sup>。前期研究发现,当降温速度为 20 °C/min 时,小鼠 1 细胞阶段胚胎在冷冻过程中,IIF 温度是 $(-42.9 \pm 0.4)$  °C,

桑葚胚的 IIF 温度是 $(-23.6 \pm 1.48)$  °C, 1 细胞阶段胚胎 IIF 温度域的分布与桑葚胚相比要宽得多<sup>[41]</sup>。人的卵母细胞和胚胎的 IIF 温度分别为 $-25.0$  °C和 $-20.4$  °C, 人卵母细胞的 IIF 温度更高一些<sup>[6]</sup>。从温度分布图可以看出, 人卵母细胞细胞内 IIF 的温度域宽且分散, 而胚胎细胞内 IIF 的温度域窄且集中<sup>[6]</sup>。实验中以小鼠卵母细胞通过  $20$  °C/min 的冷冻速率建立研究模型, 探索丹参酮 II A 的添加培养是否改变卵母细胞的 IIF 形成温度的模式。结果显示, 对照组 IIF 的温度为 $(-33.61 \pm 7.21)$  °C, 丹参酮 II A 组 IIF 的温度为 $(-39.39 \pm 4.60)$  °C, 差异具有统计学意义。本研究中, 丹参酮 II A 组 IIF 温度更低及温度域的分布更集中, 且低温冰晶形成概率更少。有研究发现, 丹参酮 II A 可以提高细胞膜的渗透性<sup>[17]</sup>, 结合本研究结果, 这意味着细胞膜渗透性改变可能影响细胞内冰晶形成的温度, 低温冰晶出现的温度越低, IIF 出现的可能性越小, 对细胞的损伤就越轻。因此, 本研究结果表明, 添加丹参酮 II A 降低了细胞内 IIF 温度。

在中医学理论中, “肾主生殖, 肾藏精”, 卵母细胞的发育与质量有赖于肾精肾气的充足<sup>[44]</sup>。肾气虚则气不行血, 形成“瘀血”阻塞胞宫胞络, 致使“胞络微循环”障碍<sup>[45]</sup>。此外, “肾主水”, 肾气虚则气化失司, 胞络水液输布不利, 也可致使“胞络微循环”障碍<sup>[46]</sup>。综上所述, 在卵母细胞冷冻保存过程中, 丹参酮 II A 可能通过祛瘀、活血通络改善卵母细胞所处的微观“胞络”环境, 减轻冷冻过程中的氧化应激反应。还可能通过活血通络改善“胞络微循环”, 改善卵母细胞膜的通透性, 从而提高卵母细胞对低温保护剂和水的渗透性, 让冷冻保护剂得以快速进入细胞内, 最终提高卵母细胞保存的成活率。

因此, 添加合适浓度的丹参酮 II A 到小鼠卵母细胞培养基中, 不仅可以改善小鼠卵母细胞的成熟与发育状况, 提高卵母细胞细胞膜的 AQP3 表达, 也可能改变卵母细胞在冷冻保存过程中细胞内冰晶形成的温度, 最终提高卵母细胞玻璃化成功率。后续将继续深入研究丹参酮 II A 作为冷冻保护剂的分子机制, 为低温保存技术的创新提供理论基础, 以期建立安全可靠的临床生育力保存技术方案。

## 参考文献

[1] 全紫薇, 刘晓曦. 健康中国背景下我国辅助生殖技术的发展与进步[J]. 医学研究杂志, 2022, 51(10): 6-8.  
[2] QIAO J, WANG Y Y, LI X H, et al. A Lancet Commission on 70 years of women's reproductive, maternal, newborn, child, and

adolescent health in China[J]. Lancet, 2021, 397(10293): 2497-2536.  
[3] ZHOU Z, ZHENG D, WU H, et al. Epidemiology of infertility in China: A population-based study[J]. BJOG: an International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2018, 125(4): 432-441.  
[4] WALKER Z, LANES A, GINSBURG E. Oocyte cryopreservation review: Outcomes of medical oocyte cryopreservation and planned oocyte cryopreservation[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2022, 20(1): 10.  
[5] HENRY L, LABIED S, JOUAN C, et al. Preservation of female fertility: The current therapeutic strategy[J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2022, 156(1): 3-9.  
[6] 苑凤, 张振强, 史艳彬, 等. 人卵母细胞和胚胎在低温保存过程中细胞内外冰晶形成规律的研究[J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(3): 273-278.  
[7] YING Y, YANG B X. Physiological functions of aquaporin-3 in mediating water and solutes[J]. Physiology, 2024, 39(S1): 1779.  
[8] ISHIBASHI K, MORISHITA Y, TANAKA Y. The evolutionary aspects of aquaporin family[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2017, 969: 35-50.  
[9] TARDELLI M, STULNIG T M. Aquaporin regulation in metabolic organs[J]. Vitamins and Hormones, 2020, 112: 71-93.  
[10] MARTINEZ N, DAMIANO A E. Aquaporins in fetal development[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2023, 1398: 251-266.  
[11] GARCÍA-MARTÍNEZ T, MARTÍNEZ-RODERO I, RONCERO-CAROL J, et al. The role of aquaporin 7 in the movement of water and cryoprotectants in bovine in vitro matured oocytes[J]. Animals, 2022, 12(4): 530.  
[12] PRIETO-MARTÍNEZ N, VILAGRAN I, MORATÓ R, et al. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures[J]. Andrology, 2017, 5(6): 1153-1164.  
[13] EDASHIGE K, OHTA S, TANAKA M, et al. The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae[J]. Biology of Reproduction, 2007, 77(2): 365-375.  
[14] JIN B, KAWAI Y, HARA T, et al. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos[J]. Biology of Reproduction, 2011, 85(4): 834-847.  
[15] EDASHIGE K. The movement of water and cryoprotectants across the plasma membrane of mammalian oocytes and embryos and its relevance to vitrification[J]. The Journal of Reproduction and Development, 2016, 62(4): 317-321.  
[16] WANG L L, FENG J, ZHAN D Q, et al. Protective effects of tanshinone II A on sepsis-induced multiple organ dysfunction: A literature review[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 43(5): 1040-1046.  
[17] 华莹. 丹参酮 II A 调节人羊膜上皮 WISH 细胞水通透性及其机制的研究[D]. 温州: 温州医科大学, 2015.  
[18] 张译文, 马小燕, 丁盛娣, 等. 复方丹参注射液对人羊膜上皮细胞水通道蛋白 3 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013,

- 33(1): 51–55.
- [19] WHITTINGHAM D G, LEIBO S P, MAZUR P. Survival of mouse embryos frozen to  $-196$  degrees and  $-269$  degrees C[J]. *Science*, 1972, 178(4059): 411–414.
- [20] MAZUR P, SEKI S, PINN I L, et al. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes[J]. *Cryobiology*, 2005, 51(1): 29–53.
- [21] RIBEIRO J C, CARRAGETA D F, BERNARDINO R L, et al. Aquaporins and animal gamete cryopreservation: Advances and future challenges[J]. *Animals*, 2022, 12(3): 359.
- [22] CASCIANI V, MONSEUR B, CIMADOMO D, et al. Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: Past achievements and current challenges[J]. *Fertility and Sterility*, 2023, 120(3): 506–520.
- [23] PETANO-DUQUE J M, CASTRO-VARGAS R E, CRUZ-MENDEZ J S, et al. Gene expression of aquaporins (AQPs) in cumulus oocytes complex and embryo of cattle[J]. *Animals*, 2023, 13(1): 98.
- [24] LIU Z, ZHENG X, WANG J J. Bioinspired ice-binding materials for tissue and organ cryopreservation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(13): 5685–5701.
- [25] CHEN J M, LIU X J, HU Y Y, et al. Cryopreservation of tissues and organs: Present, bottlenecks, and future[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1201794.
- [26] 杨璐恺, 蒋利刚, 崔妍婷, 等. 槲皮素在羊卵巢组织玻璃化冻存中的卵泡保护及抗氧化作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(9): 1–7.
- [27] 张 珣, 李 惠, 章宜芬, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路研究白藜芦醇在小鼠卵巢冷冻复苏中的保护作用及机制[J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40(5): 1221–1227.
- [28] JIANG C, WANG Z D, YUAN S Q, et al. Chinese herbal medicine for immune infertility: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine*, 2021, 100(5): e24248.
- [29] GUO Q, XUAN M F, LUO Z B, et al. Baicalin improves the in vitro developmental capacity of pig embryos by inhibiting apoptosis, regulating mitochondrial activity and activating sonic hedgehog signaling[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2019, 25(9): 538–549.
- [30] ZHAO Y H, E Z Q, JIAO A H, et al. Dendrobine enhances bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development and quality[J]. *Theriogenology*, 2023, 203: 53–60.
- [31] 宋 瑞, 刘永惠, 常 靖, 等. 全国名中医药专家刘永惠教授补肾化痰通络法应用与思考[J]. *陕西中医药大学学报*, 2025, 48(5): 58–62.
- [32] 马 涛, 李 银, 谢庆晟, 等. 丹参及其方剂配伍治疗股骨头坏死的研究进展[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*, 1–26[2025–12–03]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20252497>.
- [33] LU T C, WU Y H, CHEN W Y, et al. Targeting oxidative stress and endothelial dysfunction using tanshinone II A for the treatment of tissue inflammation and fibrosis[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022(1): 2811789.
- [34] FANG Z Y, ZHANG M, LIU J N, et al. Tanshinone II A: A review of its anticancer effects[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 11: 611087.
- [35] DING B, LIN C H, LIU Q, et al. Tanshinone II A attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 302.
- [36] SHERAWAT K, MEHAN S. Tanshinone–II A mediated neuroprotection by modulating neuronal pathways[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2023, 396(8): 1647–1667.
- [37] 吴小绸, 王慧颖, 王 婕, 等. 丹参酮 II A 对冷冻保存小鼠卵巢的保护机制[J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(29): 6198–6204.
- [38] 吴 琳. 三种抗氧化剂对猪精子保存效果的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [39] BAI L, HE G Z, GAO C H, et al. Tanshinone II A enhances the ovarian reserve and attenuates ovarian oxidative stress in aged mice[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8(4): 1617–1625.
- [40] 杨 芳, 高素文, 刘 旋, 等. 丹参酮 II A 通过调控 p38MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻糖尿病雄性大鼠生殖损伤实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2024, 53(5): 610–615.
- [41] JIN B, SEKI S, PAREDES E, et al. Intracellular ice formation in mouse zygotes and early morulae vs. cooling rate and temperature—experimental vs. Theory[J]. *Cryobiology*, 2016, 73(2): 181–186.
- [42] JIN B, MAZUR P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9271.
- [43] QIU J, MATSUKAWA K, KOSHIMOTO C, et al. Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages using low concentrations of cryoprotectants[J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2021, 67(2): 109–114.
- [44] 陈 莹, 李 红, 马 坤, 等. 鲜石斛联合促卵合剂治疗肾阴不足型卵泡发育不良不孕症临床研究[J]. *福建中医药*, 2021, 52(3): 7–9.
- [45] 张紫娟, 杨瑞恩, 游 卉, 等. 输卵管性不孕辅助生殖中西医结合全程干预的临床策略[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(9): 1607–1612.
- [46] 刘梦雪, 柳 颖, 彭小龙, 等. 刘未艾基于生殖“双环”网络理论针灸治疗输卵管功能障碍经验[J]. *中医药临床杂志*, 2025, 37(11): 2186–2190.

(本文编辑 苏 维)