

· 临床论著 ·

养精种玉汤对原因不明不孕症患者子宫内膜胰岛素样生长因子-Ⅱ及其受体表达的影响^{*}

吴瑞瑾 周馥贞

内容提要 目的:探讨养精种玉汤对原因不明不孕症患者黄体中期子宫内膜胰岛素样生长因子-Ⅱ(IGF-Ⅱ)及其受体表达的影响及与子宫内膜接受性的关系。方法:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,对22例原因不明不孕症患者服用养精种玉汤前后黄体中期子宫内膜行IGF-Ⅱ及IGF-Ⅱ型受体mRNA检测。结果:治疗前黄体中期子宫内膜IGF-ⅡmRNA表达水平(灰度比值)为 0.794 ± 0.453 ,显著低于治疗后同期水平(1.202 ± 0.551 , $P < 0.01$);治疗前IGF-Ⅱ型受体mRNA表达水平(灰度比值)为 0.725 ± 0.354 ,显著低于治疗后的表达水平(1.045 ± 0.581 , $P < 0.05$)。相关分析显示治疗前后IGF-ⅡmRNA与IGF-Ⅱ型受体mRNA表达呈正相关。结论:养精种玉汤能促进黄体中期子宫内膜IGF-Ⅱ及其受体的基因表达,促进子宫内膜分化,提高子宫内膜对胚胎种植在接受性。

关键词 养精种玉汤 子宫内膜 胰岛素样生长因子 受体 胚胎植入

Effect of Yangjing Zhongyu Decoction on Expression of Insulin-like Growth Factor Ⅱ and Its Receptor in Endometrium of Women with Unexplained Infertility WU Rui-jin, ZHOU Fu-zhen *Women's Hospital, Medical School of Zhejiang University, Hangzhou (310006)*

Objective: To investigate the effect of Yangjing Zhongyu Decoction (YJZYD) on expression of insulin-like growth factor Ⅱ (IGF-Ⅱ) and its receptor Ⅱ (IGF-ⅡR) in endometrium of women with unexplained infertility, and the relationship of which with the receptibility of endometrium to ovum implantation. **Methods:** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was used to detect quantitatively the expression of IGF-Ⅱ and IGF-ⅡR in 22 women with unexplained infertility before and after YJZYD treatment during mid-luteal phase. **Results:** The levels of IGF-Ⅱ and IGF-ⅡR before treatment were 0.794 ± 0.453 and 0.725 ± 0.354 (in grey level, the same below) respectively, which were significantly increased in the same phase after treatment, reaching 1.202 ± 0.551 and 1.045 ± 0.581 respectively ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). Correlation analysis showed the level of IGF-Ⅱ mRNA was positively correlated with the level of IGF-ⅡR mRNA either before or after treatment. **Conclusion:** YJZYD could enhance the expression of IGF-Ⅱ and IGF-ⅡR in the endometrium during mid-luteal phase, promote the differentiation of endometrium and increase its reception to ovum implantation.

Key words Yangjing Zhongyu Decoction, endometrium, insulin-like growth factor, receptor, ovum implantation

生殖过程的机理及调节极其复杂,不仅受神经内分泌系统的影响,而且还受到生长因子、细胞因子及药物的调控。近年来的研究发现人类子宫存在完整的胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)系统,其中IGF-Ⅱ主要在黄体期表达,其在胚胎着床中

的重要性倍受关注。原因不明不孕症占不孕者的10%~20%,中西医结合治疗疗效良好,但作用机理不详。本研究旨在探讨养精种玉汤加减对辨证属肝肾不调的原因不明不孕症患者治疗前后子宫内膜IGF-Ⅱ及其IGF-Ⅱ型受体mRNA的表达和对子宫内膜胚胎着床接受性的影响及可能的作用机理。

^{*} 浙江省中医药科研基金项目(No. 2000C44)

浙江大学医学院附属妇产科医院(杭州 310006)

临 床 资 料

选取本院 2000 年 10 月~2001 年 10 月收治的原因不明的不孕症患者 22 例,年龄(28.24 ± 2.31)岁;不孕时间 3~7 年;其中原发性不孕 13 例,继发性不孕 9 例;月经周期为(28 ± 3)天;基础体温呈双相型或 B 超连续监测有正常排卵,子宫输卵管碘油造影示双侧输卵管通畅,血卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、孕酮(P)、睾酮、泌乳素测定值均正常;腹腔镜检查盆腔无粘连,子宫、输卵管外观正常、通畅。男方精液检查正常,夫妇抗精子抗体阴性。患者至少在 3 个月内未服用性激素类药物。

方 法

1 治疗方法 22 例患者在每月月经干净后服用养精种玉汤加减治疗,每日 1 剂,水煎,分 2 次服,服用 7~10 剂为 1 个疗程,连续 3 个疗程。养精种玉汤由熟地 12g、当归 10g、白芍 10g、山萸肉 10g 组成^[1]。肝肾阴虚、腰酸乏力者(11 例),加杜仲 10g、续断 10g,以补肝肾、固腰补冲任;胸胁胀满、肝气郁积兼七情所伤者(4 例),加香附 10g、郁金 6g,以疏肝理气解郁;气滞血瘀、血行不畅者(7 例),加川芎 6g,以养血活血行气,通达气血^[2]。服药期间自测基础体温或排卵试纸预测,测尿 LH 峰值,以监测排卵。

2 测定指标和方法

2.1 标本采集 以未服药的自然周期作为自身对照周期,分别在用药前和用药 3 个疗程后基础体温上升 6~10 天采集标本(黄体中期)。用小号刮匙刮取子宫前后壁内膜各一条,即刻放入液氮中,贮藏于 -80°C 超低温冰箱保存待测。同时将刮出的内膜取少量送病理检查,证实为分泌中期内膜,无黄体功能不全(LPD)。

2.2 总 RNA 的提取、鉴定 每例患者取 100mg 内膜组织置于玻璃匀浆器中,采用 Trizol 一步法提取总 RNA。将 RNA 行甲醛变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,紫外观察仪下观察,见 18S、28S 和 5S 亚单位 3 个条带。提取的 RNA 样品在波长 260nm 和 280nm 处的吸光度(A)比值(A_{260}/A_{280})保持在 1.7~2.0 之间,根据 A 值计算总 RNA 浓度。

2.3 引物及试剂 根据文献^[3]设计 IGF-Ⅱ 基因引物互补脱氧核糖核酸(cDNA)序列。上游:5'-TGCG-GCAGTTTTGCTCACTTCCGATTGCTGG3',下游:5'-AGTCGATGCTGGTGCTTCTCACCTTCTTGCC3',扩增 IGF-Ⅱ 基因片段长度为 538bp。由于 β -肌动蛋白

(β -actin)在所有组织中均呈高水平恒定表达,不易受其他因素影响,故以其为内对照,以矫正加样误差。 β -actin 基因引物 cDNA 序列参照文献^[3],上游引物:5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC3',下游引物:5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAAT-GAGCTGCG3'。扩增的基因片段为 838bp。IGF-Ⅱ 型受体基因引物据基因库设计,上游:5'-CAAGTAC-TACCTTCAAGACGGCGATCTC3',下游:5'-GTAG-GACACGTTGGAAGTTCTCTCTACAG3'。扩增的基因片段为 415bp。所用引物均由上海生工生物公司合成。Trizol 试剂、RNA 酶抑制剂、M-MIV 逆转录酶及 Taq DNA 聚合酶均购自上海生工生物公司。

2.4 IGF-Ⅱ 及 IGF-Ⅱ 型受体 mRNA 的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) RNA 模板量为 10 μg ,采用随机引物法将 RNA 逆转录为 cDNA,采用单管法在 PTC-200PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增。取 2 μl 逆转录产物作模板,反应体系 50 μl ,每管加入 10mmol/L IGF-Ⅱ (或 IGF-Ⅱ 型受体)上下游引物各 1 μl , 10mmol/L β -actin 上下游引物各 1 μl , 10 倍 PCR 缓冲液 5 μl , 15mol/L 氯化镁 4 μl , Taq 酶 0.4 μl ,加水至 50 μl 。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 变性 1min, IGF-Ⅱ 56 $^\circ\text{C}$ (IGF-Ⅱ 型受体 57 $^\circ\text{C}$) 退火 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1min, 35 个循环的 PCR 扩增。

2.5 PCR 产物测定 取 10 μl PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外观测仪下摄像,凝胶图像分析系统(CCD)扫描各电泳带的灰度值,计算 IGF-Ⅱ 与 β -actin 的灰度值的比值,即为子宫内膜 IGF-Ⅱ mRNA 的表达水平,计算 IGF-Ⅱ 型受体与 β -actin 的灰度值的比值,即为子宫内膜 IGF-Ⅱ 型受体 mRNA 的表达水平。

3 统计学方法 采用配对 t 检验,直线回归与相关法 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1 22 例患者治疗前后子宫内膜 IGF-Ⅱ mRNA 表达的变化(即 RT-PCR 扩增 IGF-Ⅱ mRNA 的琼脂糖电泳结果)见图 1。治疗后(5~8 泳道)538bp 的 IGF-Ⅱ mRNA 条带较治疗前(1~4 泳道)条带亮,而治疗前后 838bp 的 β -actin mRNA 条带亮度无明显差异。计算 IGF-Ⅱ mRNA 与 β -actin mRNA 的灰度值的比值,治疗前黄体中期子宫内膜 IGF-Ⅱ mRNA 的表达灰度比值为 0.794 ± 0.453 ,治疗后表达灰度比值为 1.202 ± 0.551 ,治疗前后比较差异有显著性($P < 0.01$)。

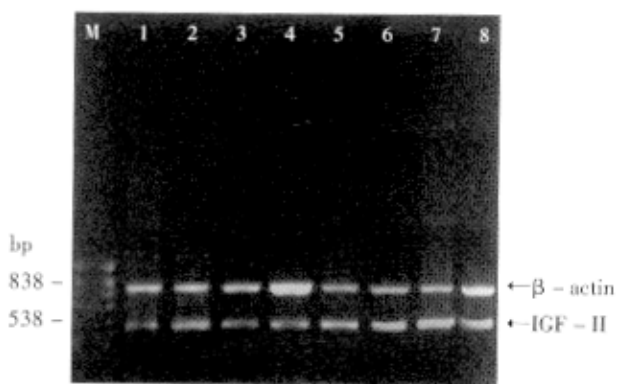


图1 养精种玉汤治疗前后子宫内膜 IGF-II mRNA RT-PCR 扩增图谱

注 M 为 DNA 相对分子质量 ;1~4 为治疗前 5~8 为治疗后

2 22 例患者治疗前后子宫内膜 IGF-II 型受体 mRNA 表达的变化(即 RT-PCR 扩增 IGF-II 型受体 mRNA 的琼脂糖电泳结果) 见图 2。治疗后(5~8 泳道)415bp 的 IGF-II 型受体 mRNA 条带较治疗前(1~4 泳道)条带亮,而治疗前后 838bp 的 β -actin mRNA 条带亮度无明显差异。计算 IGF-II 型受体 mRNA 与 β -actin mRNA 的灰度值的比值,治疗前黄体中期子宫内膜 IGF-II 型受体 mRNA 的表达灰度比值为 0.725 ± 0.354 ,治疗后的表达灰度比值为 1.045 ± 0.581 ,治疗前后比较差异有显著性($P < 0.05$)。

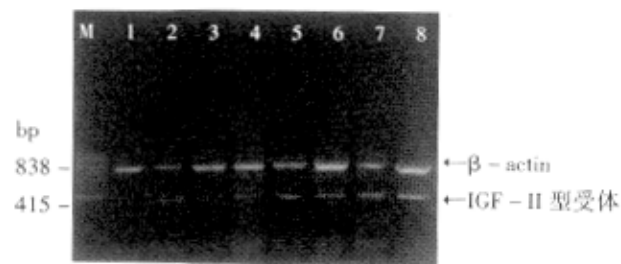


图2 养精种玉汤治疗前后子宫内膜 IGF-II 型受体 mRNA RT-PCR 扩增图谱

注 M 为 DNA 相对分子质量 ;1~4 为治疗前 5~8 为治疗后

3 子宫内膜 IGF-II mRNA 与 IGF-II 型受体 mRNA 的相关性 相关分析显示,治疗前后 IGF-II mRNA 与 IGF-II 型受体 mRNA 呈正相关性, $R_1 = 0.757$, $P < 0.005$; $R_2 = 0.862$, $P < 0.001$,其散点图示各点呈直线回归。

4 受孕情况 经养精种玉汤治疗 3 个疗程后 22 例患者中有 6 例自然妊娠,其中 1 例已足月分娩,其余 5 例继续妊娠;4 例以人绝经后促性腺激素(HMG)超促排卵后经丈夫精子人工受精助孕而妊娠,其中 1 例双胎妊娠,已剖宫分娩,其余 3 例继续妊娠。服药后出

生的 3 名新生儿未见畸形。

讨 论

《女科·受妊》说,胚胎上系于心包而下系于命门,心者阳也,系命门者通于肾,肾者阴也,阴阳协和,始能变化生人。而肝为藏血之脏,有疏泄、喜条达而恶抑郁。肾主闭藏,肝肾协调始得经血条达是为孕育之根本。因此肝气疏泄,肾气充盈在治疗不孕症中具有重要作用。子宫是孕育胚胎的器官,子宫内膜对胚胎着床的接受性是决定能否受孕的关键因素之一,各种与生殖有关的物质诸如性激素、细胞因子、生长因子、免疫调节物、各种药物等作用于子宫使内膜发育分化而适于胚胎着床。养精种玉汤之疏肝、补肾的结果必然最终作用于辨证属肝肾不调不孕妇女的子宫内膜,改善其接受性而达到受孕目的。

人类子宫内膜在排卵后第 6~10 天,即正常月经周期的第 20~24 天表现出最大的胚泡种植接受性。IGF 系统在子宫内膜存在,IGF-II 主要在黄体期子宫内膜表达,IGF-II 型受体与 IGF-II 具有高亲和力,可协助溶酶体酶运转,调节 IGF-II 的功能,直接影响子宫内膜的发育分化⁽⁴⁾。IGF-II 及 IGF-II 型受体 mRNA 在分泌中期子宫内膜间质细胞大量表达,提示其在间质细胞蜕膜化过程中的作用⁽⁵⁾。子宫内膜分化可能是 P 调节 IGF-II 介导的⁽³⁾。子宫内膜存在功能信号途径,IGF-II 与 IGF-II 型受体结合后经此途径刺激上皮细胞 DNA 合成及有丝分裂,并呈剂量依赖性⁽⁶⁾。有研究发现滋养层固定的绒毛柱体上 IGF-II mRNA 呈梯度形式高表达,侵入最前端浓度最高,提示 IGF-II 在滋养层侵入中的作用^(7,8)。因此目前认为 IGF-II 是与胚泡着床过程有关的生长因子。我们先前的免疫组化研究已发现,养精种玉汤治疗后原因不明不孕症患者黄体中期子宫内膜间质细胞 IGF-II 表达呈强阳性,治疗前则为弱阳性(待发表)。

本研究结果发现 22 例原因不明不孕症患者在养精种玉汤治疗后,黄体中期子宫内膜 IGF-II 及 IGF-II 型受体基因的表达显著高于治疗前的表达,IGF-II mRNA 与 IGF-II 型受体 mRNA 呈正相关性,可能是养精种玉汤方药中熟地滋肾益精以生血,当归、白芍养肝和血,山萸肉滋养肝肾,共奏养血滋肾之功,使精血充、冲任滋而能助孕。加減杜仲、续断以补肝益肾、固腰补冲任,香附、郁金以疏肝理气解郁,川芎养血活血行气,通达气血,从而协调刺激子宫内膜 IGF-II 基因表达,促进 IGF-II 介导的子宫内膜分化。IGF-II 通过与高亲和力的 IGF-II 型受体结合而实现其生物学功

能。养精种玉汤治疗后 IGF-Ⅱ 型受体表达增高,直接或间接地促进子宫内膜腔上皮与间质细胞相互作用及 IGF-Ⅱ 生物学信息的传递,促进上皮细胞 DNA 合成及有丝分裂,两者结合共同调节间质细胞的蜕膜化,蛋白水解酶的激活,细胞外基质的降解及细胞滋养层的侵入,产生适合胚泡粘附和侵入的变化,从而提高子宫内膜的接受性,使得胚泡着床而受孕。推测养精种玉汤可能通过疏肝益肾的作用,上调卵巢某些基因的表达,从而促使黄体发育及 P 分泌增加,促进 IGF-Ⅱ 表达及子宫内膜蜕膜化,直接促进内膜的发育及内膜局部 IGF-Ⅱ 型受体、孕激素受体的表达,IGF-Ⅱ 通过自分泌和旁分泌机制促进内膜蜕膜化,通过疏肝补肾,调理整体及内膜、卵巢局部的内分泌环境,使患者恢复到正常生育妇女状态而受孕。

参 考 文 献

1. 何高明. 傅青主妇科校释. 太原: 山西人民出版社, 1984: 77—79.

2. 刘宏奇主编. 中医妇科学. 北京: 科学出版社, 2002: 32—35.

3. Wang HS, Wang TH, Soong YK. Elevation of insulin-like growth factor-binding protein-1 RNA expression following hormone replacement therapy. Hum Reprod 2000 ;15(1): 50—54.

4. Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. J Endocrinol 1999 ;161(1): 1—13.

5. Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, et al. Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1994 ;79(6): 1723—1734.

6. Badinga L, Song S, Simmen RC, et al. Complex mediation of uterine endometrial epithelial cell growth by insulin-like growth factor Ⅱ and insulin-like growth factor-binding protein-2. J Mol Endocrinol 1999 ;23(3): 277—285.

7. Giudice LC, Irwin JC. Roles of the insulin-like growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface. Semin Reprod Endocrinol 1999 ;17(1): 13—21.

8. Irwin JC, Suen LF, Faessen GH, et al. Insulin-like growth factor(IGF)-Ⅱ inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidual: trophoblast interface during human implantation. J Clin Endocrinol Metab 2001 ;86(5): 2060—2064.

(收稿 2001-12-31 修回 2002-03-25)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编	季钟朴									
总 编 辑	陈可冀									
副总编辑	沈自尹	肖培根	陈维养(常务)							
顾 问	吴咸中	辛育龄	关幼波	邓铁涛	尚天裕	王永炎	侯 灿			
编辑委员	马必生	王一涛	王书臣	王今达	王宁生	王 阶	王学美	王 佩	王宝恩	
	王硕仁	王雪苔	尹光耀	史大卓	史载祥	刘干中	刘建勋	刘耕陶	刘猷枋	
	危北海	匡调元	朱 兵	吕爱平	吕维柏	齐清会	孙 燕	李 恩	李乃卿	
	李大金	李玉光	李连达	李廷谦	李国贤	李国栋	李鸣真	李顺成	李恩宽	
	杨任民	杨秀伟	时毓民	陈士奎	陈小野	陈冬燕	陈香美	吴伟康	陆付耳	
	张大钊	张之南	张永祥	张伯礼	张国玺	张亭栋	张荣华	张家庆	张梓荆	
	林求诚	林志彬	林瑞超	郁仁存	周文泉	周 俊	周霭祥	金益强	赵伟康	
	唐由之	顾振纶	郭赛珊	徐治鸿	梁晓春	黄晓愚	曹小定	葛秦生	谢宗万	
	谢竹藩	董福慧	曾晓春	雷 燕	蔡定芳	裴正学	黎磊石	廖家桢	廖福龙	
		戴瑞鸿								