

# 健胎液对米非司酮处理的小鼠子宫 雌孕激素受体基因表达的影响

刘艳娟 黄光英 杨明炜 龚 萍 陆付耳

**摘要** 目的 探讨健胎液改善着床障碍小鼠子宫内膜容受性的分子机制。方法 利用米非司酮诱导胚泡着床障碍小鼠模型,予健胎液进行干预(中药组),于妊娠第 8 天处死小鼠,采用蛋白印迹(Western blot)逆转录聚合酶链式反应(semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)检测子宫雌、孕激素受体(estrogen receptor, ER; progesterone receptor, PR)蛋白及其基因表达。结果 中药组 ER、PR 蛋白及基因表达均较模型组显著提高( $P < 0.05$ ),与正常组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。结论 健胎液通过调节胚泡着床障碍小鼠子宫组织 ER、PR 蛋白及基因的表达,促进子宫内膜发育,改善胚泡着床。

**关键词** 健胎液 雌激素受体 孕激素受体 基因表达

**Effect of Jiantai Liquid on Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in Uterus of Mice with Embryo Implantation Dysfunction Induced by Mifepristone** LIU Yan-juan, HUANG Guang-ying, YANG Ming-wei, et al *Institute of Integrated Traditional Chinese & Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan (430030)*

**Objective** To explore the molecular mechanism of Jiantai Liquid (JTL) in improving endometrial receptivity of mice with embryo implantation dysfunction (EID). **Methods** Mice model of EID induced by mifepristone were intervened with JTL (Twig of Chinese Taxillus, Red Sage root, Chinese Angelica, Milkvetch root, Chuanxiong rhizome), and sacrificed on day 8 of pregnancy. The endometrial estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) protein and their gene expressions were assessed by Western blot and semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Levels of ER and PR protein and their gene expressions in the JTL treated group were significantly higher than those in the model group respectively (all  $P < 0.05$ ), and showed insignificant difference from those in the normal control group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** JTL could promote the development of endometrium and improve the embryo implantation by way of regulating the levels of ER and PR protein and gene expression in mice with EID.

**Key words** Jiantai Liquid; estrogen receptor; progesterone receptor; gene expression

健胎液由桑寄生、丹参、当归、黄芪、川芎组成,具有温补肝肾、益气活血之功效。前期研究表明,健胎液能促进米非司酮诱导的胚泡着床障碍小鼠子宫内膜的发育,改善子宫内膜容受性,提高胚泡着床障碍小鼠的胚泡着床率<sup>[1,2]</sup>。本实验拟通过观察健胎液对小鼠子宫雌激素受体(estrogen receptor, ER)孕激素受体(progesterone receptor, PR)表达的影响,从基因水平探讨健胎液改善米非司酮处理的小鼠子宫内膜容受性的作用环节及机理。

## 材料与方 法

1 实验动物 清洁级性成熟、雌性未孕昆明种小鼠,体重(32±4)g,雄性小鼠(40±4)g,由湖北省卫生防疫站实验动物中心提供(湖北省实验动物合格证号:医动字第 19-082 号)。

2 实验药物 健胎液(由同济医院中西医结合研究所中药制剂室提供):桑寄生 18g 黄芪 14g 丹参 9g 当归 9g 川芎 9g,采用水煎醇沉工艺制成 144% 无菌剂,分装于无菌小瓶中, -20℃ 冰箱保存。米非司酮片(RU486,北京第三制药厂生产)研碎后溶解于丙二醇(国产分析纯试剂)中,配制成 0.8mg/ml 米非司酮溶液。

3 实验试剂 ER 多克隆抗体、PR 多克隆抗体

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30171193)

作者单位 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合科

(武汉 430030)

通讯作者 刘艳娟, Tel: 027-83663379, E-mail: tjyjliu@hotmail.com

为美国 Santa Cruze 公司产品,SP 免疫组化试剂盒、ECL 试剂盒、Trizol RNA 抽提试剂、逆转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶及反应缓冲液、Mo-MLV 逆转录酶及反应缓冲液、dNTPs、Oligo dT<sub>15</sub>、RNasin 酶抑制剂为 MBI 公司产品。ER、PR 及 β-actin 引物由上海生工生物技术公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	引物序列	扩增片段长度
ER	上游 5'-TGTACCTGCCTAGCAACAGT-3'	423bp
	下游 5'-GCCACGTATCTAAGTCACCT-3'	
PR	上游 5'-CAGGAATCCACAACCACAAG-3'	176bp
	下游 5'-TCGTATGCTGGAGACCTAAG-3'	
β-actin	上游 5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'	623bp
	下游 5'-TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA-3'	

4 实验仪器 紫外分光光度计,多用电泳仪,PCR 仪,图像分析及分析软件。

5 动物分组及处理 将雌、雄小鼠分笼适应性饲养 3 天后,于每日 17:00 以雌雄 2:1 的比例合笼,次日 8:00 检查雌鼠阴道后再分笼,发现阴栓计为妊娠第 1 天。将受孕鼠随机分为正常组、模型组和中药组,每组各 6 只。于妊娠第 4 天皮下注射 RU486,每只 0.1ml 建立胚着床障碍模型。正常组不予任何处理,中药组自妊娠第 1 天起每天以 24g/kg 体重中药灌胃,模型组每天以等体积生理盐水灌胃,于妊娠第 8 天处死所有小鼠,迅速剖腹,取出子宫,记录着床成功的孕鼠数,检测子宫组织 ER、PR 蛋白含量及其 mRNA 的表达(一侧子宫角用于 Western blot 分析,另一侧子宫角用于 RT-PCR 分析)。

6 子宫组织 ER、PR 蛋白含量检测 采用 Western blot 法。将子宫组织用细胞裂解液(每毫升裂解液中含 50mmol/L Tris(pH 7.4),1 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl,1 μg/ml PMSF,10 μg/ml 抑肽酶,1 μg/ml 亮氨酸)裂解细胞<sup>[3]</sup>,离心后取上清,用 Lowry 法测定蛋白浓度。各取 50μg 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,浸入封闭液(10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150mmol/L NaCl,0.05% Tween-20)过夜,再分别进行抗原抗体反应。用 ECL 显色后,利用 VDS 图像分析系统扫描定量,得出光密度值,计算每克子宫组织蛋白的相对含量。

7 子宫组织 ERmRNA、PRmRNA 含量检测 采用 RT-PCR 法。用一步法抽提总 RNA<sup>[4]</sup>,在核酸分析仪上检测 RNA 的含量和纯度,并计算 A260/A280 的比值,比值为 1.9~2.0。按照逆转录试剂盒提供的实验步骤进行逆转录反应。取 1 μl cDNA 依次加入 10× buffer、2mmol/L dNTP、10 μmol/L Primer 各 2μl,

10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2μl, Taq 酶 1U,补水至总体积 20μl,分别进入 PCR 循环。ER 循环条件:95℃ 变性 1 min、53℃ 退火 30s、72℃ 延伸 1 min;PR 和 β-actin 的循环条件:95℃ 变性 1 min、51℃ 退火 30s、72℃ 延伸 1 min。共进行 38 个循环,循环终末 72℃ 10min 终止反应。

取 PCR 产物 8μl,用 2.5% 琼脂糖凝胶进行 DNA 电泳,电泳条带结果用 VDS 图像分析系统分析。以 ER 或 PR 的吸光度与 β-actin 吸光度的比值,表示 ER mRNA 或 PR mRNA 的表达水平。

8 统计学方法 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,经 SPSS 11.0 软件处理,组间比较采用 F 检验和 q 检验。

## 结 果

1 健胎液对米非司酮处理的小鼠子宫组织 ER、PR 蛋白表达的影响 膜显色后分别出现单一清晰的条带,分子量分别为 67KD、81KD,表明子宫组织中有 ER 及 PR 蛋白表达。ER、PR 蛋白在小鼠子宫的定性表达结果见图 1、2。模型组 ER、PR 蛋白含量均显著低于正常组和中药组( $P < 0.05$ ),而中药组的 ER、PR 蛋白含量与正常组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 健胎液对米非司酮处理的小鼠子宫组织 ER、PR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	着床鼠/受孕鼠数	ER(光密度)	PR(光密度)
正常	6	6/6	17.98 ± 0.36 <sup>△</sup>	29.11 ± 0.43 <sup>△</sup>
模型	6	1/6	15.91 ± 0.43*	26.57 ± 0.50*
中药	6	4/6	17.62 ± 0.19 <sup>△</sup>	28.74 ± 0.17 <sup>△</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

2 健胎液对米非司酮处理小鼠子宫组织 ER mRNA、PR mRNA 表达的影响 经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,ER mRNA、PR mRNA、β-actin mRNA 的扩增产物和理论长度一致,ER mRNA、PR mRNA 在小鼠子宫组织表达的定性分析见图 3、4。中药组子宫 ER mRNA、PR mRNA 的表达较模型组显著增高( $P < 0.05$ ),与正常组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ),而模型组子宫 ER mRNA、PR mRNA 的表达较正常组、中药组的表达均显著降低( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 健胎液对米非司酮处理的小鼠子宫组织 ER mRNA、PR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	着床鼠/受孕鼠数	ER/β-actin	PR/β-actin
正常	6	6/6	1.117 ± 0.038 <sup>△</sup>	1.243 ± 0.005 <sup>△</sup>
模型	6	1/6	0.873 ± 0.010*	0.773 ± 0.028*
中药	6	4/6	1.078 ± 0.050 <sup>△</sup>	1.151 ± 0.102 <sup>△</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$



图 1 ER 在小鼠子宫组织的表达  
注:1 为正常组;2 为模型组;3 为中药组;图 2 同



图 2 PR 在小鼠子宫组织的表达

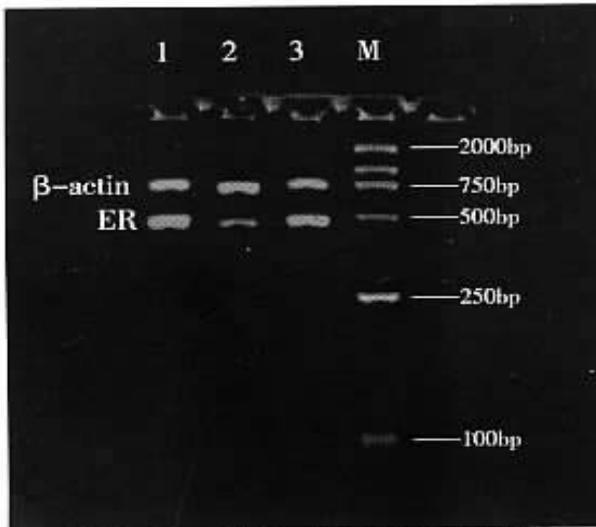


图 3 ER mRNA 在小鼠子宫组织的表达  
注:1 为正常组;2 为模型组;3 为中药组; M 为 DNA marker;图 4 同



图 4 PR mRNA 在小鼠子宫组织的表达

万方数据

## 讨 论

1 健胎液上调米非司酮处理的小鼠子宫 ER、PR 蛋白及其 mRNA 的表达 雌激素、孕激素作用于子宫内膜,促进着床期子宫内膜发育至可容受状态,ER、PR 是雌、孕激素发挥生物效应的介导者,任何影响 ER、PR 及其基因表达的因素都可影响雌、孕激素的作用,从而影响子宫内膜发育及其容受性<sup>[5]</sup>。本研究采用的 Western blot 及 RT-PCR 法为半定量检测,可反映 ER、PR 蛋白及 mRNA 表达相对含量的变化。研究结果表明:模型组子宫 ER、PR 基因表达显著降低,蛋白合成减少,从而使其介导的雌、孕激素的作用减弱,子宫内膜发育被抑制;而经中药治疗后,子宫 ER、PR 基因表达显著升高,蛋白合成增多,则其介导的雌、孕激素的作用增强,刺激子宫内膜发育,使之呈可容受状态而促进着床。说明健胎液可通过改变 ER、PR 蛋白及其 mRNA 的表达改善米非司酮处理的小鼠子宫内膜容受性,有利于着床。

2 健胎液直接调节米非司酮处理的小鼠 ER、PR 蛋白及其 mRNA 的表达 血雌、孕激素的分泌水平可影响子宫内膜 ER、PR 蛋白及 mRNA 的表达。雌激素水平升高时,ER、PR 蛋白合成及 mRNA 表达增加;当孕激素水平升高时,ER、PR 蛋白合成及 mRNA 表达下降,这属于机体维持雌、孕激素生理作用相对稳定的自身调节机制<sup>[6]</sup>。前期实验结果显示,经米非司酮处理后,小鼠的着床率和平均着床胚胎数均显著降低,虽然血清、子宫组织中雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)、孕酮(progesterone, P)含量均无显著性改变<sup>[1]</sup>,但其子宫局部 ER、PR 蛋白及其 mRNA 表达减少,而健胎液能上调胚胎着床障碍小鼠子宫 ER、PR 蛋白及其 mRNA 的表达,说明健胎液并非通过调节 E<sub>2</sub>、P 的分泌间接调节 ER、PR 的表达,而是直接调节子宫局部 ER、PR 的表达。

3 健胎液对米非司酮处理的小鼠子宫 ER、PR 蛋白及其 mRNA 的调节可能是其改善子宫内膜容受性的机理之一 子宫内膜在雌、孕激素的作用下,发生一系列有利于胚胎着床的变化,其正常发育为胚胎着床提供良好的着床微环境,若子宫内膜发育不良,与胚胎的发育失去同步性,则导致胚胎着床障碍。根据中医辨证,绝大多数不孕症患者属肾虚而胎元不固,故拟补肾益气之方填补肾精,稍伍养血活血之品,则可改善子宫内膜的发育。临床研究证实,该方配合 IVF-ET 能显著提高不孕症患者的临床妊娠率<sup>[7]</sup>。动物实验亦显示,该方能促进子宫内膜发育,改善子宫内膜容受

性 提高胚泡着床障碍小鼠的着床率<sup>[2]</sup>。本研究结果进一步表明 :对 ER、PR 基因及蛋白表达的调节作用可能是健胎液改善胚泡着床障碍小鼠子宫内膜受性的机理之一。

### 参 考 文 献

- 1 刘艳娟,黄光英,陆付耳,等.小鼠胚泡着床障碍模型的建立.中国药理学通报 2003 ;19(11):1315—1318.  
Liu YJ, Huang GY, Lu FE, et al. Establishment of mice model with embryo implantation dysfunction. Chin Pharmacol Bull 2003 ;19(11):1315—1318.
- 2 刘艳娟,黄光英,陆付耳,等.健胎液对胚泡着床障碍小鼠胚泡着床作用的研究.上海中医药杂志 2004 ;38(4):46—48.  
Liu YJ, Huang GY, Lu FE, et al. Effects of Jiantai Ye on embryo implantation in implantation dysfunction mice. Shanghai J Tradit Chin Med 2004 ;38(4):46—48.
- 3 Tan J, Paria BC, Dey SK, et al. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine

preparation for implantation and decidualization in the mouse. Endocrinol 1999 ;140(11):5310—5321.

- 4 Chinczyski P, Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987 ;162(1):156—159.
- 5 Garcia E, Bouchard P, Brux J, et al. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. J Clin Endocrinol Metab 1988 ;67:80—87.
- 6 Lessey BA, Allen PK, Deborah AM, et al. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1988 ;67:334—340.
- 7 张明敏,黄光英,陆付耳,等.补肾益气活血汤对多次助孕技术失败患者结局的影响.微循环学杂志 2002 ;12(2):10—13.  
Zhang MM, Huang GY, Lu FE, et al. Influence of Bushen Huoxue Decoction on patients under many failures in assisted reproductive technology. J Microcirc 2002 ;12(2):10—13.

(收稿 2004-03-08 修回 2004-06-20)

## SARS 患者舌苔与 T 细胞亚群的相关性研究

陈文强<sup>1</sup> 李宗信<sup>1</sup> 黄小波<sup>1</sup> 李 斌<sup>1</sup> 孙淑玲<sup>1</sup> 王明越<sup>1</sup> 刘桂兰<sup>1</sup> 王 芬<sup>2</sup> 刘金星<sup>3</sup>

为了深入探讨 SARS 患者的舌苔与 T 细胞亚群的关系,我们对 99 例 SARS 患者的舌苔和 T 细胞亚群进行了检测,兹报告结果如下。

### 资料与方法

1 观察对象 选择 2003 年 5 月 8 日—2003 年 6 月 27 日在首都医科大学宣武医院住院的 SARS 患者,共计 99 例舌苔进行拍照分析,男 43 例,女 56 例,年龄 7~71 岁,平均(35.39 ± 14.38)岁。

2 诊断标准 SARS 患者的诊断标准参照卫生部中国疾病预防控制中心公布的《非典型肺炎病例的临床诊断标准(试行)》。舌苔的诊断标准参照《中医诊断学》第 5 版相关内容制定。其中,本文中出现的薄白苔为具有舌淡苔薄白表现的病理性薄白苔。

舌苔拍照采用 Canon Power Shot A70 型防水数码相机,图像为 2048×1536 像素,由副主任医师以上专家深入隔离病房,近距离接触 SARS 患者,直接观察舌质、舌苔并用数码相机拍摄舌象照片作综合分析判断。T 细胞亚群 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>、CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 测定采用流式细胞仪。所得数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行二元变量相关分析。

### 结 果

基金项目:国家中医药管理局资助项目(国中医药科非典专项 12 号)北京市中医管理局资助项目(京中科 SARS-04)

作者单位:1. 首都医科大学宣武医院中医科(北京 100053) 2. 北京中医药大学附属东方医院肿瘤科 3. 山东中医药大学附属医院

1 不同舌苔的 T 细胞亚群测定例数 在测定 T 细胞亚群的患者中,白苔 52 例(30.59%),黄苔 21 例(12.35%),厚苔 27 例(15.88%),薄苔 48 例(28.24%),润苔 70 例(41.18%),燥苔 5 例(2.94%),腐腻苔 48 例(28.24%),剥落苔 15 例(8.82%)。

2 舌苔与 T 细胞亚群的相关性 见表 1。SARS 患者白苔与 CD<sub>3</sub> 呈负相关,舌苔厚薄与 CD<sub>3</sub>、CD<sub>8</sub>、CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 均呈正相关,腐腻苔与 CD<sub>3</sub> 呈负相关。SARS 患者 CD<sub>3</sub> 降低时多见薄苔,白苔或腐腻苔,CD<sub>8</sub> 和 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 降低时,多见薄苔。

表 1 SARS 患者舌苔与 T 细胞亚群的相关性 (r 值)

T 细胞亚群	白苔	黄苔	薄苔	润燥	腐腻	剥落
CD <sub>3</sub>	-0.193 *	0.110	0.212 *	0.010	-0.270 *	0.017
CD <sub>4</sub>	-0.168	0.126	0.059	-0.087	-0.125	-0.070
CD <sub>8</sub>	0.054	-0.088	0.257 *	-0.111	-0.008	0.120
CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub>	0.081	-0.016	0.236 *	0.057	-0.089	-0.015

注:\*P<0.01

讨 论 SARS 病毒的靶器官为肺和免疫系统。SARS 患者的病理改变是弥漫性肺泡损伤,尸检和病理学研究表明,SARS 患者的淋巴细胞,特别是 T 细胞亚群计数低,且重型患者较普通型患者下降更显著,提示 SARS 患者细胞免疫损伤可能是本病发生的重要机制之一。

从我们此次的临床观察结果可以看出,CD<sub>3</sub> 和 CD<sub>8</sub> 降低的患者,多见有薄白苔和腐腻苔。由此可见 SARS 患者的舌苔可以比较直观地反映出 T 细胞亚群的某些变化,显示了中医舌诊所具有的独特优势与潜力。

(收稿 2003-10-23 修回 2004-02-20)