

补肾安胎方及其不同组分对胚泡着床障碍小鼠雌、孕激素及其受体的影响

张明敏¹ 何新芳² 张锦金²

摘要 **目的** 比较补肾安胎方、补肾方及活血方对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜容受性的影响及其机制。**方法** 采用吲哚美辛诱导小鼠胚泡着床障碍模型,从妊娠第 1 天起分别予补肾安胎方、补肾方、活血方治疗。于妊娠第 5、6 天处死小鼠,留取血清及子宫标本。采用放射免疫法检测血清雌激素(E_2)和孕激素(P)的含量;采用免疫组织化学方法检测子宫雌、孕激素受体(ER、PR)的表达。**结果** 补肾安胎方可以提高妊娠第 6 天血清 P 及 E_2 水平,并且促进着床位点 ER 及 PR 的表达。而补肾方和活血方虽有轻度促进 ER、PR 表达作用,但其治疗作用弱于补肾安胎方。**结论** 将补肾法和活血法结合起来的补肾安胎方可以通过对 E_2 、P、ER、PR 的影响,从更大程度上改善着床障碍小鼠子宫内膜容受性,促进胚泡着床。

关键词 补肾;活血;雌激素;孕激素;雌激素受体;孕激素受体;子宫内膜容受性

Effect of Bushen Antai Recipe and Its Various Compositions on Endometrial Sexual Hormones and Receptors in Mice with Blastocyst Implantation Dysfunction ZHANG Ming-min, HE Xin-fang, and ZHANG Jin-jin
Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)

ABSTRACT **Objective** To compare the effects and mechanisms of Bushen Antai Recipe (BAR) and its different compositions, Bushen Recipe (BSR, the Shen-nourishing part) and Huoxue Recipe (HXR, the blood-activating part) on the endometrial receptivity in mice with blastocyst implantation dysfunction (BID). **Methods** Model mice of BID induced by indomethacin were treated respectively with BAR, BSR and HXR from the first day of pregnancy, and killed on day 5 or 6. Samples of their serum and uterine were collected for detecting serum estradiol (E_2), progesterone (P) contents using radioimmunoassay; and endometrial expression levels of their receptors, ER and PR, using immunohistochemistry. **Results** Serum levels of E_2 and P, and endometrial expression of ER and PR increased significantly on day 6 in mice after treated by BAR, but in those treated by BSR and HXR, the improvements were significantly lesser. **Conclusion** BAR, by combined application of both Shen-nourishing and blood-activating methods, could impact E_2 , P, ER and PR to improve the endometrial receptivity to a higher extent in BID mice so as to promote embryo implantation.

KEYWORDS nourishing Shen; activating blood; estradiol; progesterone; estradiol receptor; progesterone receptor; endometrial receptivity

胚泡着床直接关系到自然孕育的成功与否,也是现代辅助生殖技术治疗过程中影响治疗成功率的瓶颈,对着床机制的研究以及着力于胚泡移植着床率的提高方法是医务工作者普遍关注的问题。研究发现,控制性超排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)明显干扰了子宫内膜腺上皮雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的正常表达,使内膜腺上皮细胞

ER、PR 的阳性细胞表达率下降,影响了子宫内膜腺泡的正常发育,致内膜发育延迟,也影响子宫内膜发育的成熟度^[1]。众所周知,在胚泡着床过程中,雌、孕激素是调节子宫内膜发育的最基本因素,它们通过各自的细胞内受体作用于内膜组织,启动子宫内膜和胚胎之间一系列的功能的、形态的变化,这一过程是有大量的细胞因子参与的分子事件。基于前期的工作基础,我们对具有改善胚泡着床障碍小鼠孕育成功率的补肾安胎方及其不同构成组分进行比较性研究,观察补肾安胎方、补肾组分、活血组分对着床障碍小鼠雌、孕激素及其受体的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 300873347)

作者单位:1. 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);2. 华中科技大学同济医学院 2006 级硕士研究生

通讯作者:张明敏, Tel: 027-8366337, E-mail: mmzhang@tjh.tjmu.edu.cn

材料与方法

1 动物 选用健康清洁级昆明小白鼠,由湖北省卫生防疫站提供,雌性未交配过,雄性小鼠证明有生育能力。鼠龄 10~14 周,体重 30~35 g,置于室温 18~24℃,相对湿度 70%~85% 的动物房内,雌雄分笼饲养,给予 12 h 光照,12 h 暗室,自由饮水摄食。

2 药物及主要试剂 补肾安胎方由菟丝子、桑寄生、续断、黄芪、当归、丹参等按一定比例制成含生药量 1.45 g/mL 的无菌煎剂;补肾方由菟丝子、桑寄生、续断等按一定比例制成含生药量 1.45 g/mL 的无菌煎剂;活血方由黄芪、当归、丹参等按一定比例制成含生药量 1.45 g/mL 的无菌煎剂。3 种中药无菌煎剂均密封,置于 4℃ 冰箱内保存。吡啶美辛肠溶片由山西云鹏制药有限公司生产,比色法测吡啶美辛肠溶片中吡啶美辛含量为 0.3694 mg/mL,先将吡啶美辛肠溶片在碾钵中碾碎,再用麻油充分搅拌溶解使吡啶美辛浓度为 1 mg/mL。依文思蓝(凌飞科技有限公司生产)溶液配制:称取 0.05 g 依文思蓝粉末溶于 10 mL 双蒸水配成浓度为 0.5% 的溶液。雌、孕激素放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司;ER、PR、兔 IgG 多克隆抗体为 Santa Cruze 公司产品;过氧化物酶标记的链霉卵白素免疫组化法染色(SP 法)免疫组化试剂盒为 MBI 公司产品;多聚甲醛为北京化学试剂公司产品;苏木素-伊红(HE)染色试剂购自北京中山公司;中性树胶由中国上海标本模型厂生产。

3 实验方法

3.1 分组 将小鼠适应性喂养 3 天后,按雌雄 2:1 或 1:1 的比例于每天下午 4:30~5:00 之间合笼,次日清晨 7:00~7:30 间检查小鼠阴道,发现阴栓者记为怀孕第 1 天(即 PD1)。将孕鼠随机分为正常组、模型组、补肾安胎组、补肾组和活血组。

3.2 处理 从妊娠第 1 天开始,每天上午 8:00~9:00 间正常组和模型组小鼠以 0.3 mL 生理盐水灌胃,补肾安胎组小鼠以 0.3 mL 补肾安胎方灌胃,补肾组小鼠以 0.3 mL 补肾方灌胃,活血组以 0.3 mL 活血方灌胃。于妊娠第 3 和 4 天,除正常组外,其余 4 组分别于上午 8:00~9:00,下午 4:00~5:00 间皮下注射吡啶美辛油剂 0.12 mL。

3.3 标本收集 分别于妊娠第 5、6 天小鼠尾静脉注射 0.2 mL 0.5% 依文思蓝,5 min 后摘眼球取血(大约 1.5 mL)置于 2 mL EP 管中,颈椎脱臼处死小鼠,立即开腹取子宫。各组小鼠全血在 37℃ 孵育箱中静置 15~30 min 后,置于 4℃ 离心机中 4 000 r/min 离心 15 min,取上清置于 -70℃ 冰箱中保存。血清收齐

后送同济医院放射科进行放射免疫检测。子宫用生理盐水冲洗干净置于 4% 多聚甲醛中固定,24 h 后选取含有胚泡/胚胎的子宫组织,送同济医院病理科按纵横两个方向包埋于石蜡之中。

3.4 血清雌激素(E_2)、孕激素(P)含量及 ER、PR 的检测 采用放射免疫的方法检测妊娠第 5、6 天小鼠血清 E_2 、P 含量。雌、孕激素受体的检测用免疫组织化学 SP 法,片中胞核染成棕黄色为阳性细胞标志,选取同批染色切片,每张切片在光镜下随机取 5 个不同视野,以切片染色的背景作对照,经 HPIAS1000 病理图文分析系统(同济医学院千屏音像公司)分析,测定阳性信号得分积分吸光度值。

4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计分析软件,用方差分析方法进行分析。

结果

1 各组小鼠妊娠第 5、6 天血清 E_2 水平比较(表 1) 第 5、6 天血清 E_2 水平模型组明显低于正常组($P < 0.01$);第 6 天补肾安胎组明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2 各组小鼠妊娠 5、6 天血清 P 水平比较(表 1) 第 5、6 天血清 P 水平模型组明显低于正常组($P < 0.01$),第 6 天补肾安胎组高于模型组($P < 0.01$),而活血组低于补肾安胎组($P < 0.01$)。

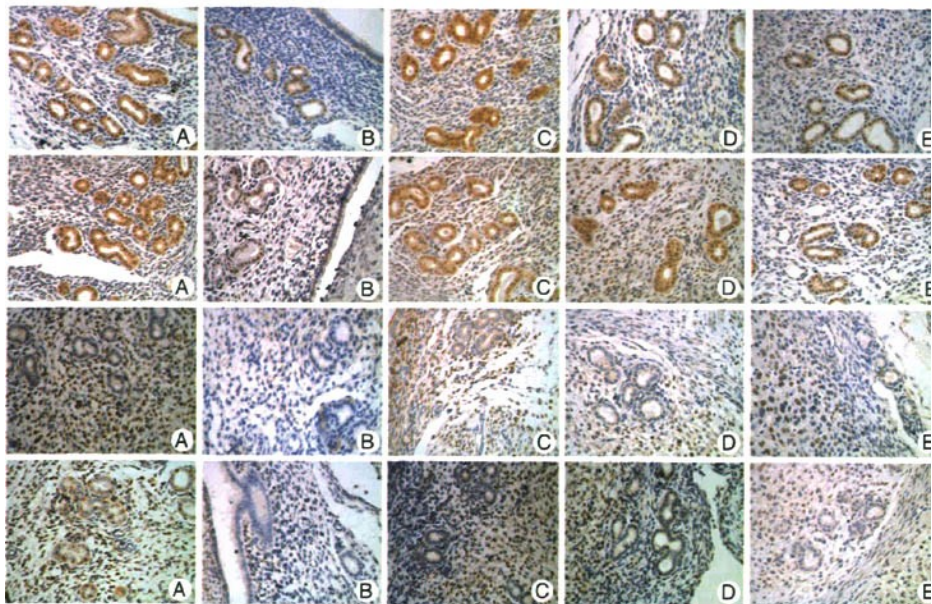
表 1 各组小鼠血清 E_2 及 P 水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2		P	
		第 5 天	第 6 天	第 5 天	第 6 天
正常	12	7.75 ± 4.85	6.00 ± 1.81	126.15 ± 63.56	123.74 ± 77.22
模型	13	1.32 ± 0.79*	2.07 ± 0.77*	50.17 ± 31.58*	35.01 ± 8.50*
补肾安胎	10	3.14 ± 1.05	3.78 ± 1.63 [△]	83.84 ± 55.76	105.12 ± 73.24 ^{△△}
补肾	11	2.11 ± 1.68	3.56 ± 1.07	55.33 ± 35.62	44.44 ± 28.88
活血	10	2.17 ± 1.49	2.46 ± 1.72	66.86 ± 45.65	35.23 ± 9.80 [▲]

注:与正常组同期比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与补肾安胎组同期比较,[▲] $P < 0.01$;表 2 同

3 各组小鼠妊娠第 5、6 天子宫内膜 ER 的免疫组织化学切片观察(图 1、2) ER 阳性者表达于上皮或间质细胞核中,少量弥散于胞浆,呈棕黄色。正常组和补肾安胎组腺体丰富,ER 在腺体和间质细胞核中强烈表达,补肾组和活血组腺体较丰富,但较正常组和补肾安胎组少,ER 在腺体和间质中的表达较弱。模型组腺体减少,ER 表达明显减弱。

4 各组小鼠妊娠第 5、6 天子宫内膜 PR 的免疫组织化学切片观察(图 3、4) PR 阳性者主要表达于间质细胞核中,这与 Garcia E 等^[2]的研究相吻合,Garcia E 等研究表明在内膜腺体内,P 通过下调雌激素受体并且接着通过使孕激素受体在腺体内消失来对抗雌激素的增殖效应。正常组、补肾安胎组在间质细胞核



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为补肾安胎组; D 为补肾组; E 为活血组

图 1 为小鼠妊娠第 5 天子宫内膜 ER 表达; 图 2 为小鼠妊娠第 6 天子宫内膜 ER 表达; 图 3 为小鼠妊娠第 5 天子宫内膜 PR 表达; 图 4 为小鼠妊娠第 6 天子宫内膜 PR 表达 (免疫组化染色, $\times 400$)

中均有较强表达; 补肾组和活血组 PR 在间质中表达稍强; 模型组表达最少。

5 各组小鼠妊娠第 5、6 天 ER 蛋白表达结果 (表 2) 妊娠第 5 天模型组 ER 蛋白表达显著低于正常组, 补肾安胎组显著高于模型组; 而补肾组、活血组与模型组相当, 且低于补肾安胎组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。妊娠第 6 天模型组显著低于正常组, 与模型组比较, 补肾组、活血组及补肾安胎组 ER 表达均增高, 以补肾安胎组最为显著; 与补肾安胎组比较, 补肾组、活血组则减低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠子宫内膜 ER 及 PR 积分
吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER		PR	
		第 5 天	第 6 天	第 5 天	第 6 天
正常	12	12.66 $\pm$ 3.64	14.15 $\pm$ 3.49	8.73 $\pm$ 0.94	9.11 $\pm$ 1.88
模型	13	5.27 $\pm$ 2.10*	3.75 $\pm$ 1.75*	2.77 $\pm$ 0.86*	2.88 $\pm$ 0.97*
补肾安胎	10	11.63 $\pm$ 3.75 $\Delta\Delta$	12.82 $\pm$ 3.72 $\Delta\Delta$	8.05 $\pm$ 1.23 $\Delta\Delta$	8.27 $\pm$ 1.21 $\Delta\Delta$
补肾	11	6.74 $\pm$ 1.95 Δ	6.30 $\pm$ 1.49 $\Delta\Delta$	5.87 $\pm$ 1.49 $\Delta\Delta\Delta$	6.15 $\pm$ 0.89 $\Delta\Delta\Delta$
活血	10	5.94 $\pm$ 1.71 Δ	6.13 $\pm$ 1.04 $\Delta\Delta$	6.24 $\pm$ 1.13 $\Delta\Delta\Delta$	6.07 $\pm$ 0.70 $\Delta\Delta\Delta$

6 各组小鼠妊娠第 5、6 天 PR 蛋白表达结果 (表 2) 妊娠第 5 和 6 天, 模型组 PR 含量较正常组显著降低, 补肾组、活血组和补肾安胎组高于模型组 ($P < 0.01$), 但补肾组、活血组 PR 含量低于补肾安胎组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

讨 论

在体外受精 - 胚胎移植中, 为了获取多个优质卵

泡, 大多使用促排卵治疗, 这种治疗干扰了内源性垂体激素对子宫内膜的生理调节作用, 使子宫内膜不同于自然周期^[3]。其中最主要是使雌、孕激素水平失衡, 导致内膜结构的改变和细胞因子网络平衡的破坏, 干扰种植窗子宫内膜的形态、功能, 进而影响子宫内膜的容受性, 最终影响胚胎的着床, 降低妊娠率^[4]。补肾安胎方是以补肾活血为理论依据提炼出的经验方, 在临床运用和前期实验研究中均证明其能提高着床率和孕育成功率^[5-7]。本研究则通过用补肾安胎方及其补肾和活血组分对着床障碍小鼠进行治疗, 比较补肾安胎方、补肾方、活血方对胚泡着床障碍小鼠 E_2 、P、ER 和 PR 的影响及其机制, 并且为超促排卵中着床率低的现状提供解决依据。

在种植窗内, 子宫内膜的形态、显微结构及生化等方面要发生一系列的变化以适应胚胎着床^[8]。雌激素促使子宫内膜上皮细胞肥大和增殖; 孕激素将雌激素准备过的子宫内膜转化为分泌组织, 并且为胚胎黏附提供一个适宜的环境^[9]。雌、孕激素又通过各自的受体作用于子宫内膜, 使内膜腺体和间质细胞水肿, 血管扩展, 为胚胎着床提供物质基础。排卵期过高和过低的雌激素水平均不利于胚胎着床。适量的孕激素水平有利于妊娠, 孕激素水平过低, 提示卵泡未成熟; 孕激素水平过高, 则可使内膜着床期提前, 内膜与胚胎发育不同步, 影响受精卵的着床。在小鼠妊娠早期, 血清

E_2 水平于第 1~4 天增加,第 5 天达峰值,随后下降。 P 水平第 1~5 天逐渐上升,第 5 天达峰值,第 6~8 天下降。故本实验选择检测小鼠妊娠第 5、6 天血清 E_2 、 P 水平以及子宫内膜 ER、PR 蛋白的表达来进行研究。

本研究结果显示,造模后,模型小鼠血清 E_2 、 P 、ER 和 PR 水平均较正常小鼠低。运用中药治疗后,补肾安胎方、补肾方、活血方虽均未能明显提高着床障碍小鼠第 5 天血清 E_2 和 P 水平,但是在第 6 天补肾安胎方可以显著提高模型小鼠血清 E_2 和 P 水平。与此同时,补肾安胎方还能够显著提高模型小鼠妊娠第 5、6 天着床局部的 ER、PR 的表达;与补肾安胎方比较,补肾方、活血方虽可以提高模型小鼠第 6 天 ER 以及第 5、6 天 PR 水平,但是其改变程度均显著小于补肾安胎方。

已有大量实验证明,小鼠血清 E_2 和 P 的水平可以影响早期胚胎形成和着床。同时,在适量的雌、孕激素协同作用下可以调节着床窗胞饮突的表达、提高同源框基因 10、11 以及水通道蛋白等的水平。本研究中模型小鼠血清中 E_2 、 P 水平均较低,不利于着床。补肾安胎方可能是通过提高模型小鼠血清中 E_2 、 P 水平以及 ER、PR 的水平来改善子宫内膜容受性,促进胚胎着床的。着床窗内只有 E_2 、 P 、ER 和 PR 的水平提高到正常范围内,才可以很好地促进着床位点子宫内膜生长以及蜕膜化,促使胞饮突如期表达,导致胚胎与子宫内膜发育同步,并且使同源框基因以及水通道蛋白等水平上调,通过一系列的分子事件的发生促进着床。补肾安胎方对 E_2 及 ER 的调节可能主要是补肾中药的雌激素样和促性腺激素样作用的结果^[10,11]。然而,单独使用补肾方、活血方则均不能明显提高模型小鼠血清中 E_2 和 P 水平;这一结果表明补肾、活血存在协同作用。有意义的是,补肾方、活血方以及由此构成的补肾安胎方均可以提高模型小鼠着床局部 ER、PR 水平,但是补肾方、活血方单方的增长水平却远低于补肾安胎方。说明只有将补肾法和活血法结合起来,才可能更大程度地改善着床障碍小鼠血清中雌、孕激素及其受体的表达,更大程度地起到促进胚胎着床的作用。

参 考 文 献

- [1] 章汉旺,高娟. 控制性超排卵小鼠围着的床期子宫内膜容受性的研究[J]. 中国妇幼保健, 2005, 20(11): 1324-1326.
- [2] Garcia E, Bouchard P, De Brux J, et al. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 67(1): 80-87.
- [3] Thomas K, Thomson AJ, Wood SJ, et al. Endometrial integrin expression in women undergoing IVF and ICSI: a comparison of the two groups and fertile[J]. Hum Reprod, 2003, 18(2): 364-369.
- [4] Mirkin S, Nikas G, Hsimej G, et al. Gene expression profiles and end structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-simulated cycles[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(11): 5742-5752.
- [5] 张明敏,董莉萍,程亮亮. 补肾安胎方对胚泡着床障碍小鼠胚胎着床局部 COX-2 蛋白和 mRNA 表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(1): 58-61.
- [6] 张明敏,黄玉琴,程亮亮,等. 补肾安胎方对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜 HB-EGF 及其受体 EGFR 表达的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2008, 37(1): 85-88.
- [7] 张明敏,程亮亮,董莉萍. 补肾安胎方对胚泡着床障碍模型小鼠着床局部 PGI_2 及其核受体的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(3): 229-233.
- [8] Acosta AA, Elberger L, Borghi M, et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women[J]. Fertil Steril, 2000, 73(4): 788-798.
- [9] 杨增明,孙青原,夏国良. 生殖生物学[M]. 北京:科学出版社, 2005: 236-243.
- [10] 李淑萍,李玲. 补肾调冲法治疗卵巢功能失调性不孕的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(3): 33-34.
- [11] 秦达念,余白蓉,余运初. 菟丝子黄酮对实验动物及人绒毛组织生殖功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(6): 349-351.
- [12] Qin DN, She BR, She YC. Effects of flavonoids of *Semen Cuscutae* on reproductive function of animals[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2000, 11(6): 349-351.

(收稿:2009-01-15 修回:2009-11-16)