

# 补肾助孕汤对小鼠生殖能力影响的实验研究

李小妮 李雅璇 周吉海 谭季春

**摘要 目的** 探讨中药补肾助孕汤对小鼠生殖能力的影响。**方法** 60 只昆明雌性小鼠随机分为实验组与对照组。实验组每天 2 次经鼠胃管灌注补肾助孕汤,对照组同时给予生理盐水灌胃,分别于给药 10、20 天处死小鼠,每次每组 15 只,放射免疫法检测血清雌二醇和孕酮水平;HE 染色,行子宫、卵巢组织形态学观察;免疫组化法测定子宫内膜白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和降钙素(calcitonin, CT)表达。**结果** 给药 10、20 天,实验组小鼠子宫、卵巢重量,血清雌二醇、孕酮水平以及子宫内膜 LIF、EGF、CT 表达均较对照组同期增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且以给药 20 天作用为优( $P < 0.05$ )。组织学检查显示,实验组小鼠卵巢各级卵泡数目增加,子宫内膜腺体数目增多,子宫内膜增生,复层排列,基质细胞增多,以给药 20 天最明显。**结论** 补肾助孕汤可以促进小鼠生殖器官的发育,促进雌二醇、孕酮分泌及卵泡生长;增加子宫内膜的容受性,从而增强其生殖能力。

**关键词** 补肾助孕汤;生殖能力;白血病抑制因子;表皮生长因子;降钙素

Effects of Bushen Zhuyun Decoction on the Reproductive Capacity of Mice: an Experimental Research LI Xiao-ni, LI Ya-xuan, ZHOU Ji-hai, and TAN Ji-chun Centre for Auxiliary Human Reproduction, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang (110004), China

**ABSTRACT Objective** To study the effects of Bushen Zhuyun Decoction (BZD) on the reproductive capacity of mice. **Methods** Totally 60 female Kunming mice were randomly divided into the experimental group and the control group. BZD was perfused by gastric tube to mice in the experimental group, twice daily. Meanwhile, mice in the control group were administered with normal saline by gastrogavage. Mice were sacrificed on the 10th day and the 20th day of medication respectively, 15 mice each time in each group. The serum levels of estradiol and progesterone were detected by radioimmunoassay. The morphological changes of uterus and ovary were observed using HE staining. The expressions of leukaemia inhibitory factor (LIF), epidermal growth factor (EGF), and calcitonin (CT) were determined using immunohistochemical assay. **Results** Compared with the control group at the same time point, the weights of uterus and ovary increased, the serum levels of estradiol and progesterone increased, the expressions of LIF, CT, and EGF increased in the experimental group on the 10th day and the 20th day of medication ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Better results were shown on the 20th day of medication ( $P < 0.05$ ). Histological results showed increased ovarian follicle numbers, increased endometrial gland numbers, endometrial hyperplasia (stratiform arranged), and increased stromal cells in the experimental group, especially on the 20th day of medication. **Conclusion** BZD could improve the reproductive capacity by advancing the development of generative organs, promoting the secretion of estradiol and progesterone and the follicular growth, and increasing the receptivity of endometrium.

**KEYWORDS** Bushen Zhuyun Decoction; reproductive capacity; leukaemia inhibitory factor; epidermal growth factor; calcitonin

尽管体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-

embryo transfer, IVF-ET)技术及超排卵药物有了长足进步,但其胚胎种植率仍未令人满意,影响种植的关键为胚胎质量和子宫内膜容受性。如何改善子宫内膜容受性,提高种植率是目前需要解决的问题<sup>[1]</sup>。已有研究发现,白血病抑制因子(leukaemia inhibitory

基金项目:辽宁省科学技术基金资助项目(No. 2012225014)

作者单位:中国医科大学附属盛京医院辅助生殖中心(沈阳 110004)

通讯作者:谭季春, Tel: 18940251868, E-mail: tjczjh@163.com

factor, LIF)<sup>[2-4]</sup>、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)<sup>[4-6]</sup>、降钙素(calcitonin, CT)<sup>[7,8]</sup>等细胞因子在子宫内膜容受性或胚胎种植的窗口期起至关重要的作用,而传统中医药在不孕症治疗方面曾起到重大的作用。本研究依据中医“肾藏精,主生殖”和“调经种子”理论,通过动物实验探讨《中医妇科学》<sup>[9]</sup>所载方剂补肾助孕汤对小鼠生殖能力的影响,为临床应用提供理论依据。

## 材料与方法

1 动物 清洁级昆明雌性小鼠 60 只,由中国医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(辽)2010-0009,8~12 周龄,体重 25~30 g,未交配。饲养:室温 21~22 ℃,湿度 67%~75%,光照明暗时间比为 14 h/10 h,能自由获取食物和水。

2 药物及制备 补肾助孕汤方剂组成:紫石英、川芎、川椒、川牛膝、续断、当归、赤芍、白芍、淫羊藿、菟丝子、枸杞子、香附、桂心、丹皮。全部中药购于天益堂大药房,经辽宁省中医药大学药学院中药鉴定教研室鉴定。按常规煎药法制备,并将所得药液过滤,含生药 267 mg/mL,相当于 60 kg 成人用药等效剂量,存于 4 ℃ 冰箱待用。

3 试剂及仪器 兔抗人 LIF(BA1239)、EGF、CT 单克隆抗体,生物标记素标记的羊抗兔 IgG(武汉博士德),即用型 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒(武汉博士德);血清雌二醇、孕酮放射免疫检测试剂盒购于美国 DPC 公司。光学显微镜,日本 NIKON;美国 DPC GAMBYT10 探头  $\gamma$  计数器;岛津 UV-2600 型紫外可见分光光度计;Bio Teck 全自动酶标仪;MISA300 多媒体图像分析系统。

4 分组及给药 采用完全随机分组方法,将小鼠分为实验组(30 只)和对照组(30 只),实验组进一步分为实验 1 组(给药 10 天,15 只)和实验 2 组(给药 20 天,15 只)。以生药剂量比根据文献[10]折算,依照成人单位体重生药量求得小鼠单位体重用药剂量后,再扩大 10 倍给药,亦即 2.67 g/(kg·d),实验组小鼠每天 2 次(6:00 和 18:00)经鼠胃管灌注;对照组常规饲养,每日于同一时间给予同体积生理盐水灌胃。

5 标本采集 分别于给药 10、20 天后断颈处死实验组和对照组小鼠,每组每次 15 只。实验组和对照组均心脏取血;横向剪开腹壁,找到子宫及卵巢,观察并记录对照组及实验组子宫、卵巢形态,并称量,所取组织用 4% 多聚甲醛固定,准备组织学检查和免疫

组化检查。

6 血清雌二醇和孕酮测定 采用放射免疫法检测小鼠血清雌二醇和孕酮含量。分离血清,采用 GAMBYT10 探头  $\gamma$  计数器放免测定小鼠雌二醇及孕酮水平。

7 子宫、卵巢组织 HE 染色 石蜡包埋所取组织后,切片至 4  $\mu$ m 厚度,再经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,苏木素染色 8 min;之后水洗、盐酸乙醇化,再经伊红染色 1 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,最后以中性树脂封片。

8 免疫组化法测定子宫内膜 LIF、EGF 和 CT 表达

8.1 操作步骤 切片常规脱水,蒸馏水 10 min 室温洗 3 次后,浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液,加热至沸腾,间隔 5 min,再浸入枸橼酸盐缓冲液内;冷却后,以 0.1 mol/L PBS 洗涤 2 次,加抗原修复液 I 室温 10 min,0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,滴山羊血清封闭室温 40 min。之后将切片分别滴加兔抗人 LIF、EGF、CT 单克隆抗体,4 ℃ 过夜,0.1 mol/L PBS 洗涤 2 min 3 次,滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG,37 ℃ 30 min,0.1 mol/L PBS 洗涤 2 min 3 次。滴加试剂 SABC,37 ℃ 20 min,0.1 mol/L PBS 洗涤 5 min 4 次,应用 DAB 显色试剂盒,室温显色。洗涤,苏木素轻度染色 30 s,水洗、酒精梯度脱水、透明、中性树脂封闭,显微镜观察拍照,并以 PBS 代替一抗和二抗作为空白对照。

8.2 结果判定 染色结束或在阴性对照无特异性着色情况下对切片进行判读,阳性细胞必须符合下列要求:(1)棕黄色颗粒为特异染色。镜下组织细胞结构清楚,阳性颗粒定位好,染色明显高于背景。(2)通过 MISA300 多媒体图像分析系统进行分析:每张切片用显微镜摄像头(200 $\times$ )随机选取 5 个区域,将图像输入计算机,以阳性细胞灰度值代表染色强度,以任意单位 U 表示,反映 CT、EGF、LIF 的含量。

9 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件包,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组小鼠子宫和卵巢重量比较(表 1) 实验 1 组和实验 2 组小鼠子宫和卵巢重量较对照组同期明显增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且实验 2 组优于实验 1 组( $P < 0.05$ )。

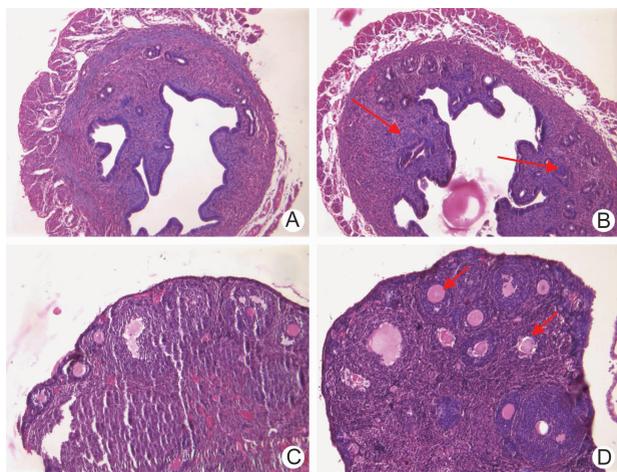
表 1 各组小鼠子宫、卵巢重量及性激素水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	给药时间	子宫(g)	卵巢(g)	雌二醇(ng/mL)	孕酮(ng/mL)
对照	15	10 天	0.30 ± 0.09	0.051 ± 0.018	83.8 ± 17.3	1.3 ± 1.8
实验 1	15	10 天	0.45 ± 0.14 *	0.062 ± 0.021 *	99.2 ± 31.4 *	3.4 ± 1.9 **
对照	15	20 天	0.31 ± 0.06	0.049 ± 0.009	85.1 ± 20.7	1.7 ± 1.5
实验 2	15	20 天	0.53 ± 0.12 **△	0.076 ± 0.034 **△	109.2 ± 20.9 **△	3.7 ± 2.1 **△

注:与对照组同期比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与实验 1 组比较, △P < 0.05; 表 2 同

2 各组小鼠性激素水平比较(表 1) 实验 1 组和实验 2 组小鼠血清雌二醇和孕酮水平均明显高于对照组同期, 差异有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01), 且实验 2 组优于实验 1 组(P < 0.05)。

3 各组小鼠子宫和卵巢形态学比较(图 1) 实验组小鼠子宫内膜腺体数目增加, 局部腺体增大, 腺腔扩大, 腺体上皮细胞核数目增加, 子宫内膜增生, 复层排列, 间质细胞增多; 对照组小鼠子宫内膜腺体和间质细胞清晰, 子宫内膜完整。实验 1 组及实验 2 组小鼠卵巢增大, 初级卵泡、次级卵泡数均增多, 间质细胞轻度黄素化, 以实验 2 组最为明显; 对照组小鼠卵巢初级卵泡、次级卵泡清晰, 未见黄素化现象。



注:A 为对照组 20 天小鼠子宫; B 为实验 2 组小鼠子宫, 箭头所示为子宫内膜; C 为对照组 20 天小鼠卵巢; D 为实验 2 组小鼠卵巢, 箭头所示为各级卵泡

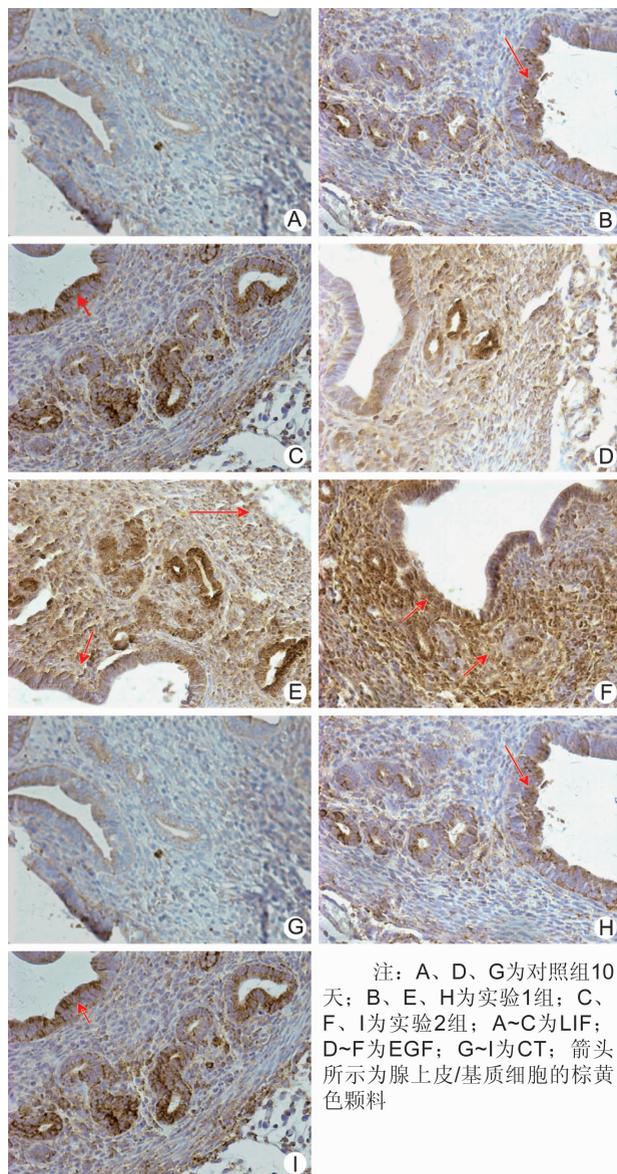
图 1 对照组与实验 2 组小鼠子宫内膜及卵巢组织形态学改变 (HE, ×100)

4 各组小鼠子宫内膜 LIF、EGF 和 CT 表达比较(表 2, 图 2) 在小鼠子宫内膜中 LIF、EGF 表达于腺上皮细胞及基质细胞浆中, 呈棕黄色颗粒, LIF 表达以腺上皮细胞为主。实验 1、2 组小鼠腺上皮细胞及基质细胞浆中 LIF、EGF 表达较对照组同期明显增强(P < 0.01, P < 0.05), 且实验 2 组优于实验 1 组(P < 0.05)。在小鼠子宫内膜中 CT 表达于腺上皮细胞浆中, 呈棕黄色颗粒。实验 1、2 组小鼠 CT 表达较对照组同期增强, 差异有统计学意义(P < 0.01), 且实

验 2 组优于实验 1 组(P < 0.05)。

表 2 各组小鼠子宫内膜 LIF、EGF 和 CT 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	给药时间	LIF	EGF	CT
对照	15	10 天	138.07 ± 6.27	145.82 ± 10.85	136.32 ± 6.37
实验 1	15	10 天	144.64 ± 3.20 **	157.36 ± 16.24 *	142.87 ± 3.20 **
对照	15	20 天	139.17 ± 6.23	145.88 ± 10.35	137.02 ± 6.17
实验 2	15	20 天	155.53 ± 3.11 **△	176.12 ± 15.93 **△	150.02 ± 8.21 **△



注: A、D、G 为对照组 10 天; B、E、H 为实验 1 组; C、F、I 为实验 2 组; A~I 为 LIF; D~F 为 EGF; G~I 为 CT; 箭头所示为腺上皮/基质细胞的棕黄色颗粒

图 2 各组小鼠子宫内膜 LIF、EGF 及 CT 表达情况 (免疫组化染色, ×200)

## 讨 论

根据中医“肾藏精,主生殖”和“调经种子”等理论,采用补肾助孕汤其宗旨系在于“补肾、活血、化瘀及调经”。方中重用紫石英,《本草便读》云,紫石英温营血而润养,可通奇脉,镇冲气之上升,故本方用其温肾暖宫。现代认为,紫石英主要化学成分是氟化钙( $\text{CaF}_2$ ),有兴奋卵巢分泌功能<sup>[11]</sup>,而且紫石英具有雌激素样作用,并可升高雌激素水平,使育龄妇女基础体温由单相型转变为双相型<sup>[12,13]</sup>。此外,药理研究证实,当归对子宫有双向调节作用,可调整子宫收缩节律,加速子宫的血液循环,确保子宫的供血供氧;当归还可以使体内前列腺素维持正常水平。香附对子宫有抑制其收缩、缓解其痉挛的作用。川芎、桂心、丹皮可改善微循环,川芎还可提高机体的耐缺氧能力<sup>[14]</sup>。

就方剂整体而言,国内的研究已经证明,补肾助孕汤可明显提高不孕妇女血浆中黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的含量<sup>[9]</sup>,而 FSH 不仅能刺激卵泡生长发育,在少量 LH 参与下,还可使发育的卵巢分泌雌激素。与本研究观察到的卵巢重量增加以及雌二醇、孕酮含量增加的结果相吻合。

尚有研究显示,中药补肾方剂可以从促进子宫内膜腺体和间质发育同步,促进卵巢黄体细胞的增生和改善黄体细胞的发育,提高黄体功能<sup>[15]</sup>。吴云霞等<sup>[16]</sup>对小鼠子宫内膜容受性进行研究,发现中药补肾益气活血汤通过其雌激素样活性,加强雌激素与其受体相互作用,使子宫内膜蜕膜化来促进着床。陈秋梅等<sup>[17]</sup>对排卵障碍性患者应用调经孕育方药治疗,经治疗后刮取子宫内膜进行组织学观察发现,调经孕育方药可明显改善子宫内膜容受性,促进内膜组织增殖和分泌。丁彩飞等<sup>[18]</sup>运用助孕汤补肾温阳、养血活血,增加 IVF-ET 患者因克罗米芬引起的抗雌激素作用的内膜厚度,促进子宫内膜血流状况,从而提高妊娠率。夏誉薇等<sup>[19]</sup>研究发现女贞孕育汤可养血补肾,使子宫内膜增殖,且雌、孕激素受体、EGF 受体等的表达明显增强。而本研究也发现补肾助孕汤可以促进子宫和卵巢的发育,促进子宫内膜腺体的发育,增加各级卵泡数目。

探讨补肾助孕汤与 LIF、EGF 及 CT 这一类细胞因子的关系,是本研究的亮点之一。近来发现, LIF 在不明原因所致的不孕症妇女中起关键作用, Mariee N 等<sup>[20]</sup>发现 IVF 反复失败的妇女子宫内膜腺上皮 LIF 表达水平较正常妇女低, Aghajanova L 等<sup>[21]</sup>也发现不明原因不孕妇女的 LIF 通路受阻。关于 CT<sup>[22]</sup>,主

要由甲状腺滤泡旁 C 细胞合成并分泌,是两端高度保守单链多肽激素,由 32 个氨基酸组成的,其生物活性区集中在第 3-6 位氨基酸序列中,而 Palomba S 等<sup>[23]</sup>的研究提示,CT 可能通过自分泌或旁分泌方式促进细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流,降低宫腔  $\text{Ca}^{2+}$  水平,而增加间质细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,并通过钙调蛋白,促进子宫内膜间质细胞从  $G_1$  期进入 S 期,从而促进蜕膜的生长分化;体外培养时加入  $\text{Ca}^{2+}$ ,能促进上皮细胞间紧密连接的形成,反之,则松持。Li HY 等<sup>[24]</sup>研究着床期子宫内膜上皮细胞向滋养层细胞发生过程时发现,CT 是通过钙离子和蛋白激酶 C 达到促进此过程的作用的。

Zamah AM 等<sup>[25]</sup>在研究 LH 激发的排卵过程中 EGF 样生长因子的作用时,认为人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)敏感的患者成熟卵泡液中含大量 EGF 样生长因子的双调蛋白。而在 LH 高峰前和体外颗粒细胞培养应用 HCG 之前均检测不到这类双调蛋白,说明 EGF 样生长因子需要促性腺激素的刺激。受激素刺激的卵泡液可以使卵丘膨大、卵泡成熟。应用免疫耗竭卵泡液中的 EGF 样生长因子将无法使卵丘膨大、卵泡成熟。不成熟的卵泡液和发育成畸形胚胎的卵泡液中 EGF 样生长因子远远少于正常成熟卵泡液。由此推论,EGF 样生长因子对卵细胞成熟,甚至排卵起重要作用。本研究发现补肾助孕汤可以明显增加 EGF 在小鼠子宫内膜的表达,且发现补肾助孕汤可以增加卵巢重量,卵巢各级卵泡增多,雌二醇和孕酮也有提高,提示补肾助孕汤可以促进卵泡的发育和激素分泌。

本研究结果证实,补肾助孕汤可促进小鼠生殖系统的发育及雌二醇、孕酮的分泌,增加 LIF、EGF、CT 在子宫内膜的表达,且与用药时间有相关性;从组织学、细胞学角度探讨了补肾调经中药对靶器官的作用,证明补肾助孕汤可以提高子宫内膜的容受性,有利于胚胎着床和发育。为补肾助孕汤用于改善子宫内膜容受性的临床治疗提供了实验依据。

## 参 考 文 献

- [1] 徐淑萍. 子宫内膜容受性浅析[J]. 医学理论与实践杂志, 2012, 25(1): 40-41.
- [2] Paiva P, Menkhorst E, Salamonsen L, et al. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(4): 319-328.
- [3] Hasegawa E, Ito H, Hasegawa F, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in the endometrium in abnormal uterine cavities during the im-

- plantation window[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(4): 953-958.
- [4] Leach RE, Jessmon P, Coutifaris C, et al. High throughput, cell type-specific analysis of key proteins in human endometrial biopsies of women from fertile and infertile couples [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(3): 814-828.
- [5] Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors[J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(1): 5-14.
- [6] Bukowska D, Kempisty B, Jackowska M, et al. Differential expression of epidermal growth factor and transforming growth factor beta isoforms in dog endometrium during different periods of the estrus cycle[J]. *Pol J Vet Sci*, 2011, 14(2): 259-264.
- [7] Dong YL, Reddy DM, Green KE, et al. Calcitonin gene-related peptide (CALCA) is a proangiogenic growth factor in the human placental development [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(5): 892-899.
- [8] Stavreus-Evers A, Ha C, Kallak T, et al. Low calcitonin receptor like receptor expression in endometrial vessels from women with unexplained infertility [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2011, 27(9): 655-660.
- [9] 金维新,李竹兰.中医妇科学[M].北京:科学出版社,1994:318.
- [10] 何丽清,傅延龄.《伤寒论》与《金匱要略》常用药物剂量比较与分析[J].*中医杂志*,2011,52(22):1954-1955.
- [11] 毕焕春.矿物中药与临床[M].北京:中国医药科技出版社,1992:67.
- [12] 单书健,陈子华.古今名医临证金鉴妇科卷[M].北京:中国中医药出版社,2000:288.
- [13] 李希心,苏明廉.当代中药临床应用[M].济南:济南出版社,1999:639-792.
- [14] 张恩虎.实用临床中药手册[M].北京:人民军医出版社,2001:146-175.
- [15] 周惠芳,蒋凤荣,顿文亮,等.补肾助孕方对大鼠胚胎着床期子宫内膜及卵巢形态学的影响[J].*陕西中医*,2009,30(1):117-118.
- [16] 吴云霞,黄光英.补肾益气活血汤对小鼠血清雌、孕激素浓度及其受体表达的影响[J].*现代生物医学进展*,2006,6(2):19-21.
- [17] 陈秋梅,张树成,贺彬,等.调经孕育方药对排卵障碍性不孕者子宫内膜感受态的影响——组织形态学分析[J].*中医药学刊*,2004,22(3):464-467.
- [18] 丁彩飞,郑若姮,杨欣,等.助孕汤对子宫内膜容受性形态学的影响[J].*浙江中西医结合杂志*,2008,18(2):84-85.
- [19] 夏誉薇,张树成,蔡连香.女贞孕育汤对不孕症子宫内膜组织形态、雌孕激素受体和血管生成因子表达的影响[J].*中国中医药信息杂志*,2004,11(1):26-28.
- [20] Mariee N, Li TC, Laird SM. Expression of leukemia inhibitory factor and interleukin 15 in endometrium of women with recurrent implantation failure after IVF; correlation with the number of endometrial natural killer cells [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(7): 1946-1954.
- [21] Aghajanova L, Altmäe S, Bjuresten K, et al. Disturbances in the LIF pathway in the endometrium among women with unexplained infertility [J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(6): 2602-2610.
- [22] Chesnut CH, Azria M, Silverman S, et al. Salmon calcitonin: a review of current and future therapeutic indications [J]. *April*, 2008, 19(4): 479-491.
- [23] Palomba S, Di Carlo C, Morelli M, et al. Effect of tibolone on breast symptoms resulting from postmenopausal hormone replacement therapy [J]. *Maturitas*, 2003, 45(4): 267-273.
- [24] Li HY, Shen JT, Chang SP, et al. Calcitonin promotes outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells: involvement of calcium mobilization and protein kinase C activation [J]. *Placenta*, 2008, 29(1): 20-29.
- [25] Zamah AM, Hsieh M, Chen J, et al. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(10): 2569-2578.

(收稿:2012-04-25 修回:2012-12-16)