

二补助育汤对胚胎着床障碍小鼠子宫 内膜容受性的影响

江 媚¹ 刘雁峰² 王铁枫² 石 玥²

(1 北京市鼓楼中医院, 北京, 100009; 2 北京中医药大学东直门医院, 北京, 100700)

摘要 目的:探讨补肾活血中药方二补助育汤对胚胎着床障碍小鼠子宫内膜容受性的影响。方法:制备小鼠胚胎着床障碍模型,研究其子宫内膜 SCFmRNA、HOXA-10 mRNA、LIF、ER、PR、整合素($\alpha\text{v}\beta 3$)表达的改变。结果:GnRHa + HMG + HCG 超促排方案能降低子宫内膜容受性,而二补助育汤能够调控小鼠子宫内膜调控链间的相关调控因子的表达,从而改善子宫内膜容受性。结论:二补助育汤改善子宫内膜容受性的作用是肯定的,并且其作用途径是多靶点、多环节的。

关键词 二补助育汤;体外授精-胚胎移植;子宫内膜容受性;干细胞因子;同源盒基因

Effect of Erbu Zhuyu Decoction on Endometrium Receptivity of Rats Model with Embryo Implantation Dysfunction

Jiang Mei¹, Liu Yanfeng², Wang Tiefeng², Shi Yue²

(1 Beijing Drum Tower Hospital of TCM, Beijing 100009, China; 2 Dongzhimen Hospital of Beijing

University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Erbuzhuyu Decoction on endometrium receptivity of rats model with embryo implantation dysfunction. **Methods:** Rats model with embryo implantation dysfunction was prepared for the study on expression changes of endometrial SCFmRNA, HOXA-10 mRNA, LIF, ER, PR and $\alpha\text{v}\beta 3$. **Results:** GnRHa + , HMG + , HCG scheme may reduce the endometrium receptivity, and Erbu Zhuyu Decoction may regulate regulate the expression of relevant regulating factors in networks of rat endometrial microenvironment to improve endometrium receptivity. **Conclusion:** Erbu Zhuyu Decoction is bound to have the effect on endometrium receptivity and its activity pathway is multi-targeted and multi-linked.

Key Words Erbuzhuyu Decoction; IVF-ET; Endometrium receptivity; SCF; HOXA-10

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.043

子宫内膜容受性是影响胚胎种植率的关键因素之一,所以它越来越受到重视。中医药调节子宫内膜容受性具有明显的优势,但是其作用机制尚不明确。胚胎着床是胚胎植入子宫内膜的复杂生理过程,通过一系列过程完成胚胎与子宫内膜的对话,此过程受诸多因素调节。我们在中医理论基础和临床研究基础上,采用 GnRHa + HMG + HCG 超促排方案制备动物模型,应用免疫组化法、Real-time PCR 等方法和技术,利用所建立的动物模型,研究二补助育汤调控子宫容受性的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用清洁级昆明雌性小鼠 60 只,8~12 周龄,体重 24~30 g。由北京维通利华实验技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2012-

0001。

1.2 实验药物 二补助育汤:补骨脂、骨碎补、桑寄生、川断、川牛膝、巴戟天、制首乌、郁金、鸡血藤、葛根、升麻、颗粒制剂购自北京中医药大学附属东直门医院门诊药房;达菲林(GnRHa)(规格 0.1 mg),IP-SEN PHARMA BIOTECH 制药,进口药品 H20080638,购自东直门医院药房;补佳乐(戊酸雌二醇)(规格 1 mg/片)DELPHARM Lille S. A. S. 制药,进口药品 H20080108,购自东直门医院药房;阿司匹林肠溶片(规格 100 mg/片)拜耳制药,进口药品 H20090078,购自东直门医院门诊药房。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 实验动物共分为 7 组,分别为:空白组、模型组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药

基金项目:2012 国家自然科学基金项目(编号:81273789)——二补助育汤调节子宫内膜容受性的效应机制及其与 SCFmRNA 表达相关性研究;2014 国家自然科学基金项目(编号:81473721)——基于 NK/M-CSF/NO 通路的二补助育汤调节子宫内膜容受性效应机制相关性研究

作者简介:江媚(1986.07—)女,博士,医师,研究方向:中医药治疗女性不孕症、内分泌疾病等,E-mail:18001337209@163.com

通信作者:刘雁峰(1963.04—)女,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药治疗女性不孕症、内分泌疾病等,E-mail:liyua8888@sina.com

高剂量组、西药组 1(补佳乐组)、西药组 2(阿司匹林组)。

1.3.2 动物模型的建立 造模方法:模型组、西药组 1、西药组 2、中药低、中、高剂量组,观察小鼠阴道涂片,从动情日开始,于每日 9 时腹腔内注射达菲林(GnRHa)40IU/100 g 体重,连续 9 d,至第 9 天联合腹腔注射人绝经期促性腺激素(HMG)1U/100 g 体重促排卵,48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)10IU/100 g 体重,从而造成胚泡着床障碍模型。

1.3.3 给药方法 本研究采用中药颗粒剂二补助育汤干涉治疗,同时以西药补佳乐及阿司匹林作为对照。方法:于造模同时,空白组和模型组每日灌服 0.9% 氯化钠溶液 0.2 mL,中药低、中、高剂量组每日分别按 0.213 g/20 g 体重、0.427 g/20 g 体重、0.853 g/20 g 体重的浓度灌服二补助育汤,西药组 1 每日灌服补佳乐 0.006 mg/20 g 体重,西药组 2 每日灌服阿司匹林 0.225 mg/20 g 体重,连续 10 d。于动物实验第 11 天,断颈处死小鼠,无菌条件下取子宫,将其中一角子宫纵向剖开,迅速放入液氮中,然后于 -80 ℃ 冰箱保存;另外一角子宫纵向剖开,立即放在 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片备用。

1.4 指标检测 1)实时聚合酶链反应:采用实时聚合酶链反应(Real-time PCR)技术对比检测不同剂量二补助育汤、补佳乐、阿司匹林作用下子宫内膜干细胞因子(SCFmRNA)及同源盒基因(HOXA-10 mRNA)表达的改变。2)免疫组化:采用免疫组化法对比检测不同剂量二补助育汤、补佳乐、阿司匹林作用下小鼠子宫内膜白血病抑制因子(LIF)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、整合素(αvβ3)表达的改变。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,定义 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。各组间比较采用方差分析或非参数检验,具有显著性后,再采用 LSD 法或 SNK 法进行多重比较。

2 结果

2.1 各组小鼠子宫内膜 SCFmRNA 表达情况 空白组小鼠子宫内膜 SCFmRNA 的表达明显高于模型组;西药各组及中药各治疗组小鼠子宫内膜 SCFmRNA 表达明显高于模型组($P < 0.05$);中药低剂量组明显低于中药高、中剂量组子宫内膜 SCFmRNA 的表达($P < 0.05$),但中药中剂量与高剂量组子宫内膜 SCFmRNA 的表达无统计学意义($P > 0.05$);阿司匹林组子宫内膜 SCFmRNA 表达明显低于中药各剂

量组($P < 0.05$),补佳乐组子宫内膜 SCFmRNA 表达明显低于中药高、中剂量组($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组小鼠子宫内膜 HOXA-10 mRNA 表达情况 空白组小鼠子宫内膜 HOXA-10 mRNA 的表达明显高于模型组;西药各组及中药中、低剂量组小鼠子宫内膜 HOXA-10 mRNA 表达明显高于模型组($P < 0.05$);阿司匹林组及补佳乐组小鼠子宫内膜 HOXA-10 mRNA 表达明显低于中药中、低剂量组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠子宫内膜 SCFmRNA 及 HOXA-10 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	标本量	SCFmRNA	HOXA-10 mRNA
空白组	8	1.02 ± 0.20 *	0.84 ± 0.26 *
模型组	9	0.68 ± 0.13 [△]	0.53 ± 0.09 [△]
中药高剂量组	9	1.45 ± 0.11 *▲□	0.57 ± 0.1
中药中剂量组	9	1.46 ± 0.09 *▲□	1.31 ± 0.44 *▲□
中药低剂量组	7	0.99 ± 0.15 *□	1.55 ± 0.23 *▲□
西药 1(补佳乐)组	9	0.94 ± 0.10 *	0.90 ± 0.53 *
西药 2(阿司匹林)组	9	0.80 ± 0.10 *	1.00 ± 0.14 *

注:与模型组比较 * $P < 0.05$,与空白组比较 [△] $P < 0.05$,与西药 1 组比较 ▲ $P < 0.05$,与西药 2 组比较 □ $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠子宫内膜整合素 αvβ3 表达情况 空白组小鼠子宫内膜整合素 αvβ3 的表达明显高于模型组;中药各剂量组小鼠子宫内膜整合素 αvβ3 表达明显高于模型组($P < 0.05$);补佳乐组及阿司匹林组子宫内膜整合素 αvβ3 表达明显低于中药各剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 各组小鼠子宫内膜 LIF 表达情况 空白组小鼠子宫内膜 LIF 的表达明显高于模型组;中药中、低剂量组及补佳乐组小鼠子宫内膜 LIF 表达明显高于模型组($P < 0.05$);补佳乐组子宫内膜 LIF 的表达明显低于中药低剂量组($P < 0.05$),阿司匹林组子宫内膜 LIF 的表达明显低于中药中、低剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠子宫内膜整合素 αvβ3 及 LIF 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	标本量	αvβ3	LIF
空白组	8	0.17 ± 0.02 *	0.17 ± 0.06 *
模型组	9	0.09 ± 0.03 [△]	0.09 ± 0.01 [△]
中药高剂量组	9	0.22 ± 0.06 *▲□	0.14 ± 0.05
中药中剂量组	9	0.18 ± 0.02 *▲□	0.18 ± 0.08 *□
中药低剂量组	7	0.22 ± 0.08 *▲□	0.34 ± 0.09 *▲□
西药 1(补佳乐)组	9	0.13 ± 0.06	0.16 ± 0.08 *
西药 2(阿司匹林)组	9	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.03

注:与模型组比较 * $P < 0.05$,与空白组比较 [△] $P < 0.05$,与西药 1 组比较 ▲ $P < 0.05$,与西药 2 组比较 □ $P < 0.05$ 。

2.5 各组小鼠子宫内膜 ER 表达情况 空白组小鼠子宫内膜 ER 的表达明显高于模型组;中药中、低

剂量组小鼠子宫内膜 ER 表达明显高于模型组 ($P < 0.05$);阿司匹林组及补佳乐组子宫内膜 ER 表达明显低于中药中、低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.6 各组小鼠子宫内膜 PR 表达情况 空白组小鼠子宫内膜 PR 的表达明显高于模型组;中药各剂量组小鼠子宫内膜 PR 表达明显高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠子宫内膜 ER 及 PR 表达情况($\bar{x} \pm s$)			
组别	标本量	ER	PR
空白组	8	0.16 ± 0.06 *	0.2 ± 0.14 *
模型组	9	0.08 ± 0.01 Δ	0.1 ± 0.04 Δ
中药高剂量组	9	0.14 ± 0.05	0.2 ± 0.08 *
中药中剂量组	9	0.22 ± 0.08 * $\blacktriangle$ $\square$	0.2 ± 0.06 *
中药低剂量组	7	0.26 ± 0.12 * $\blacktriangle$ $\square$	0.27 ± 0.13 *
西药 1(补佳乐)组	9	0.13 ± 0.05	0.2 ± 0.11
西药 2(阿司匹林)组	9	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.07

注:与模型组比较 * $P < 0.05$,与空白组比较 $\Delta P < 0.05$,与西药 1 组比较 $\blacktriangle P < 0.05$,与西药 2 组比较 $\square P < 0.05$ 。

3 讨论

IVF-ET 的最终妊娠率与子宫内膜容受性密切相关,而子宫内膜容受性受多个调控因子的调节。其中,整合素 $\alpha v \beta 3$ 是重要的细胞黏附因子,其在胚胎植入过程中介导胚胎与子宫内膜的对话,其可能参与胚胎植入的黏附过程,被认为是子宫内膜容受性的标记分子之一^[1-2];张炜等^[3]证实了 LIF 在小鼠孕期的表达明显高于非孕期 ($P < 0.05$);潘一红等^[4]发现子宫内膜异位症(EMS)患者种植窗期的子宫内膜、取卵日卵泡液中 LIF 表达均下降,可能与 EMS 导致不孕有相关性。这些都表明 LIF 与子宫内膜容受性关系密切,并且是预测子宫内膜容受性的金标准;ER、PR 与子宫内膜容受性的关系基本明确,雌、孕激素可通过 ER、PR 对子宫内膜进行调节,在月经周期的第 19 天,子宫内膜腺上皮的 ER、PR 突然消失,并且其降调与胞饮突同时发生^[5-7]。适当浓度的孕酮水平和子宫内膜 PR 的表达,是子宫内膜蜕膜化的必备条件。

HOXA-10 属于腹部 B 组 HOX 基因,能参与女性生殖系统的发育以及正常子宫内膜形态的建立,并对子宫内膜的增殖与分化、子宫内膜容受性的建立、胚胎植入的黏附、子宫内膜的蜕膜化发挥至关重要的作用,所以 HOXA-10 是子宫内膜容受性建立的必备因子^[8-9];SCF 与 IVF-ET 的妊娠结局关系密切,研究发现^[10-12], SCF 可能是中医药调节子宫内膜容受性的新靶点。另外,雌、孕激素可能通过 ER 和 PR 来调节其下游的 HOXA-10 的表达,而 HOXA-10

又可能调节下游的 COX2、EP3 以及 EP 等 PG 信号系统使子宫内膜进入着床窗口期,从而利于胚胎的着床。

东直门医院肖承棕教授经过长期临床经验总结发现接受 IVF-ET 失败的患者主要病机是肾气不足,胞脉不畅,其独创的二补助育汤能使子宫内膜环境与卵泡发育同步,从而利于胚胎的着床及发育^[13]。我们前期临床观察发现其有显著的临床疗效,现在通过实验研究得出结论:补肾气,通胞脉中药能显著提高子宫内膜 ER、PR、LIF、 $\alpha v \beta 3$ 的表达,此四者是子宫内膜容受性建立的标志物,提示二补助育汤改善子宫内膜容受性的作用是肯定的;另外,其能提高子宫内膜 SCFmRNA 及 HOXA-10 mRNA 的表达,提示二补助育汤可能是通过调控子宫内膜 SCF 及 HOXA-10 的表达来改善子宫内膜容受性,从而使卵泡发育与子宫内膜同步,利于胚泡着床。综上,我们推测这些调控因子相互作用形成调节子宫内膜容受性的调控网络,而补肾气,通胞脉中药通过多方面、多通路作用于子宫内膜,从而改善子宫内膜微环境、调节子宫内膜容受性,而其具体作用机制是多层次、多靶点的。

研究过程中我们采用了长方案(GnRHa + HMG + HCG 方案)制备动物模型,但是未建立肾虚血瘀证动物模型,下一步将深入对病证结合动物模型的研究;另外,该方案制备的动物模型不能进行胚泡着床计数,希望在下一步的研究中改进。

参考文献

[1]隋晓倩,于德钦,张冬梅.子宫内膜容受性各相关标志物研究进展[J].生殖与避孕,2015,35(3):185-190.

[2]王公道,韩旭,黄梦琪,等.子宫内膜容受性标志物的研究进展[J].东南大学学报:医学版,2015,34(2):332-336.

[3]张炜,周剑萍,刘银坤,等.白血病抑制因子在小鼠围着床期子宫内膜的表达[J].生殖医学杂志,2000,9(2):100-103.

[4]潘一红,陶德友,牛志宏,等.子宫内膜异位症患者体外受精治疗周期子宫内膜及卵泡液中 LIF 表达与妊娠结局的相关性研究[J].中国妇幼保健,2010,25(21):3025-3028.

[5]王公道,韩旭,黄梦琪,等.子宫内膜容受性标志物的研究进展[J].东南大学学报:医学版,2015,34(2):332-336.

[6]仇燕,郝天羽,刘海萍.种植窗期子宫内膜厚度、类型和宫腔冲洗液中 LIF 水平与 IVF-ET 妊娠结局的关系[J].山东医药,2014,54(24):4-6,9.

[7]林娜,马艳萍,武泽,等.超排卵周期中高雌、孕激素水平对床期子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 、骨桥蛋白表达及子宫内膜容受性的影响[J].中国妇幼保健,2015,30(9):1438-1442.

可减少气管支气管周围及肺泡炎性细胞浸润。根据气管支气管组织病理评分结果分析发现补中柴前连梅煎在改善支气管扩张模型大鼠的柱状纤毛上皮、腺体细胞、管腔内分泌物、炎性细胞浸润个单项病理评分方面没有表现出明显的差异,而在病理评分总分方面表现出与空白组无统计学意义。说明补中柴前连梅煎的治疗支气管扩张症模型大鼠的作用为整体作用。从病理方面证明中医药治疗支气管扩张症的作用为整体调理作用。根据肺脏组织病理评分结果分析发现补中柴前连梅煎可明显改善支气管扩张症模型大鼠细支气管支气管周围炎性浸润、血管周围炎性浸润及间质性肺炎,这可能与补中柴前连梅煎中柴胡、前胡搜风下气,祛肝胆风痰,乌梅、黄连收泄,黄芩清肺泻热,鱼腥草清热解毒有关。

综上所述,通过补中柴前连梅煎干预支气管扩张症模型大鼠的反应性效应及组织病理学变化,从整体及器官组织层面探讨了补中柴前连梅煎治疗支气管扩张症中铜绿假单胞菌感染的作用机制。认为补中柴前连梅煎可明显改善支气管扩张症模型大鼠细支气管支气管周围炎性浸润、血管周围炎性浸润及间质性肺炎,其对气管支气管组织病理学改善主要表现为整体调理作用。下一步需从分子生物学方面进一步研究补中柴前连梅煎对支气管扩张症中铜绿假单胞菌群体感应系统的影响机制。

参考文献

- [1] 成人支气管扩张症诊治专家共识编写组. 成人支气管扩张症诊治专家共识(2012版)[J/CD]. 中华危重症医学杂志:电子版, 2012,5(5):315-328.
- [2] Lee YT, Chen SC, Chan KC, et al. Impact of infectious etiology on the outcome of Taiwanese patients hospitalized with community-acquired

pneumonia[J]. J Infect Dev Ctries, 2013,7(2):116-124.

- [3] Jacobsen JN, Andersen AS, Krogfelt KA. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on cellular wound healing responses in vitro[J]. Scand J Infect Dis, 2012,44(8):615-619.
- [4] 宋秀杰,路聪哲,方庭正,等. 老年支气管扩张合并急性感染的病原菌及其耐药性研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012,17(8):914-918.
- [5] 万毅刚,曹世宏,毕建军,等. 大鼠支气管扩张症模型研制[J]. 上海实验动物科学, 2000,20(2):65-68.
- [6] 高青. 实验动物病理标本的标准化取材和量化诊断方法[J]. 中国比较医学杂志, 2004,14(3):4.
- [7] 岳盈盈,李鹏,李志会,等. 呼吸道合胞病毒感染兔呼吸系统组织病理学的改变和相关指数评分标准的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2010,20(6):21-25,后插4.
- [8] Martin RJ, Chu HW, Honour JM. Airway inflammation and bronchial hypersensitivity after mycoplasma pneumoniae infection in a murine model[J]. J Am J Respir Cell Mol Biol, 2001,24(5):577.
- [9] McArthur-Vaughan K, Gershwin LJ. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection[J]. J Med Primatol, 2002,31(2):61-67.
- [10] 焦秋粉,樊茂蓉,张燕萍. 张燕萍教授治疗支气管扩张经验总结[J]. 世界中医药, 2014,9(5):598-600.
- [11] 樊长征,张文江,张燕萍,等. 千金苇茎汤对支气管扩张症中铜绿假单胞菌群体感应系统影响的可行性[J]. 光明中医, 2016,31(2):279-280.
- [12] 段琦梅,梁宗锁,杨东风,等. 黄芪、党参乙醇提取物抗菌活性研究[J]. 中成药, 2012,34(11):2220-2222.
- [13] 胡小鹰,陈建伟,陈汝炎,等. 明党参水提液及结晶Ⅵ的镇咳祛痰平喘作用[J]. 南京中医药大学学报, 1995,6(11):28-30.
- [14] 王志洁,黄铁牛,刘焱文,等. 黄芪多种成分抗人疱疹病毒的初步实验研究[J]. 中国现代应用药理学, 2002,19(5):356-359.
- [15] 段琦梅,梁宗锁,杨东风,等. 黄芪、党参乙醇提取物抗菌活性研究[J]. 中成药, 2012,34(11):2220-2222.

(2016-02-29 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第2369页)

- [8] 李丽娜. HOXA 10 在子宫内膜异位症不孕患者血清中的表达及意义[J]. 吉林医学, 2014,35(1):15-17.
- [9] 符免艾,黄林,洗梅兰,等. HOXA10 启动子区基因多态性与子宫内膜容受性的相关性研究[J]. 海南医学, 2015,26(15):2221-2223.
- [10] 陈世荣,胡志华,冯智君. SCF/C-Kit 在子宫腺肌瘤和子宫内膜异位症患者在位和异位内膜中的表达和意义[J]. 中华临床医

师杂志:电子版, 2015,9(8):1331-1334.

- [11] 孙旸,梁婧,兰晓霞,等. 改善子宫内膜发育不良的药物治疗[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2015,34(3):251-254.
- [12] 陈婕,谈勇. 干细胞因子在女性生殖系统疾病诊疗中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2015,32(19):3254-3255.
- [13] 江媚,刘雁峰,吕艳莹. 浅谈肖承棕教授中药治疗子宫内膜容受性低之经验[J]. 环球中医药, 2013,6(1):22-24.

(2015-12-21 收稿 责任编辑:张文婷)