

调经助孕胶囊对着床障碍小鼠胚泡着床位点数和雌、孕激素及其受体的影响^Δ

王瑞杰^{1*}, 李 晖², 孙 红³, 褚玉霞³(1.河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450002; 2.河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院生殖医学科, 郑州 450002; 3.河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院妇产科, 郑州 450002)

中图分类号 R915 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2629-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.12

摘 要 目的:研究调经助孕胶囊对着床障碍小鼠胚泡着床位点数和雌、孕激素及其受体(ER、PR)的影响。方法:将48只妊娠小鼠随机分为正常对照组(生理盐水)、病理模型组(生理盐水)与调经助孕胶囊组(24 g/kg),每组16只,ig给药,每天1次,连续3 d。第4天上午9:00,除正常对照组小鼠外,剩余小鼠均sc米非司酮溶液0.1 ml复制着床障碍模型。第5天处死小鼠,观察各组小鼠胚泡着床位点数;放射免疫法测定血清雌二醇(E₂)、孕酮(P)水平;免疫组化法测定子宫内膜ER、PR蛋白表达水平。结果:妊娠第5天,病理模型组小鼠胚泡着床位点数显著少于正常对照组,血清E₂、P水平与子宫内膜ER、PR蛋白表达水平均显著低于正常对照组($P<0.05$);调经助孕胶囊组小鼠胚泡着床位点数显著多于病理模型组,血清E₂、P水平与子宫内膜ER、PR水平均显著高于病理模型组($P<0.05$)。结论:调经助孕胶囊可显著提高小鼠血清E₂、P水平和ER、PR水平,增加胚泡着床位点数。
关键词 调经助孕胶囊;着床障碍;胚泡着床位点数;雌二醇;孕酮;雌、孕激素;小鼠

Effects of Tiaojing Zhuyun Capsules on the Number of Blastocyst Implantation Sites, Estrogen/Progestogen and Their Receptors in Mice with Implantation Dysfunction

WANG Ruijie¹, LI Hui², SUN Hong³, CHU Yuxia³(1.Second Clinical Medical College, Henan University of TCM, Zhengzhou 450002, China; 2.Dept. of Reproductive Medicine, Henan Province Hospital of TCM/The Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450002, China; 3.Dept. of Gynecology and Obstetrics Henan Province Hospital of TCM/The Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Tiaojing zhuyun capsules on the number of blastocyst implantation, estrogen, progestogen and their receptors (ER, PR) in mice with implantation dysfunction. METHODS: 48 pregnant mice were randomly divided into normal control group (normal saline), pathological model group (normal saline) and Tiaojing zhuyun capsules group (24 g/kg), with 16 mice in each group. They were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 3 d. On the 4th day, those mice were given mifepristone 0.1 ml subcutaneously to induce implantation dysfunction model except for normal control group. On the 5th day, the mice were sacrificed. The number of blastocyst implantation sites was observed. The serum levels of estradiol (E₂) and progesterone (P) were determined by radioimmunoassay, and the expression of ER and PR protein were determined by immunohistochemistry. RESULTS: On the 5th day of pregnancy, the number of embryo implantation sites, serum levels of E₂ and P and the protein expression of ER and PR in pathological model group were significantly lower than in normal control group ($P<0.05$); the number of embryo implantation sites, levels of E₂ and P, the protein expression of ER and PR in Tiaojing zhuyun capsules group were significantly higher than in pathological model group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Tiaojing zhuyun capsules can effectively improve the serum levels of E₂ and P, the protein expression of ER and PR, and increase the number of blastocyst implantation sites in mice.

KEYWORDS Tiaojing zhuyun capsules; Implantation dysfunction; Number of blastocyst implantation sites; Estradiol; Progesterone; Estrogen/Progestin; Mice

[13] Nagaoka K, Matoba T, Mao Y, *et al.* A new therapeutic modality for acute myocardial infarction: nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin induces cardioprotection from ischemia-reperfusion injury via activation of PI3K/Akt pathway and anti-inflammation in a rat model[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e132 451.

Δ 基金项目:国家中医药管理局全国名老中医专家传承工作室建设项目;河南省教育厅科学技术研究重点项目(No.13A360579);河南中医学院博士科研基金项目(No.BSJJ2012-21)

* 讲师,博士。研究方向:生殖内分泌、不孕不育。电话:0371-60908726。E-mail:wangruijie021@163.com

[14] Zhou M, Ren H, Han J, *et al.* Protective effects of kaempferol against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart via antioxidant activity and inhibition of glycogen synthase kinase-3 β[J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2015, 481 405(1):1.

[15] Wang Y, Zhang ZZ, Wu Y, *et al.* Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(10):861.

(收稿日期:2016-01-15 修回日期:2016-05-16)
(编辑:邹丽娟)

胚泡着床成功与否在很大程度上直接影响其孕育情况,而胚泡着床与孕卵、内膜之间的调节性密切相关,其中内膜容受性直接决定胚泡着床是否成功。雌激素与孕激素作为促进子宫内膜发育的重要组成部分,通过各自细胞内受体作用于内膜组织,促使子宫内膜、胚胎发生变化。研究表明,着床障碍的发生与子宫内膜组织雌、孕激素受体(ER、PR)的异常表达有关,ER、PR阳性细胞的低表达可造成子宫内膜胞饮小泡发育不良,不利于内膜发育,最终导致子宫内膜发育不成熟而发生胚泡着床障碍^[1]。相关研究表明,补肾、活血方能有效提高胚泡着床障碍小鼠的胚胎着床率,但其作用的具体机制目前尚无定论^[2-3]。

调经助孕胶囊由我国著名中医妇科专家、著名老中医褚玉霞教授研制而成,由丹参、仙灵脾、紫河车、枸杞、熟地黄等成分组成。制备时取适当比例生药,以水为提取溶剂,每次加水8倍量,每次煎煮1 h,共煎煮3次,最终制作成胶囊。调经助孕胶囊服用方便、给药剂量少、生物利用度高,具有滋肾补肾、理气活血、调经助孕之功效。近年来,调经助孕方在排卵障碍、多囊卵巢综合征等妇科疾病中应用较多,多集中在疗效观察方面^[4];但其对着床障碍小鼠相关指标,特别是对ER、PR的影响尚未明确。因此,在本研究中笔者观察了调经助孕胶囊对着床障碍小鼠胚泡着床位点数和雌、孕激素及ER、PR的影响。

1 材料

1.1 仪器

CHK显微镜(日本Olympus Chk公司);Enviro-Genie恒温孵育箱(北京创美伟业科技有限公司);TD6M离心机(盐城凯特实验仪器设备有限公司);RM2135切片机、LEICA EG1140生物组织包埋机(德国徕卡公司)。

1.2 药品与试剂

调经助孕胶囊(河南省中医学院第二附属医院制剂室,批号:20151125;加水后调制成药液,每1 ml含生药1 g);米非司酮片[北京紫竹药业有限公司,批号:110423,规格:10 mg/片;加入丙二醇(湖北星河化工有限公司提供,纯度:99%)中配制质量浓度为0.8 mg/ml的米非司酮溶液];雌二醇(E₂)、孕酮(P)放射免疫试剂盒(北京北方生物工程有限公司,批号:061220、061221);ER、PR兔抗小鼠多克隆抗体试剂盒(美国Santa Cruze公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康昆明小鼠,96只,♀,体质量18~22 g,鼠龄5~6周,合格证号:SCXK(黑)2008-004;健康昆明小鼠,48只,♂,体质量25~35 g,鼠龄5~6周,合格证号:SCXK(黑)2008-001。动物均由黑龙江中医药大学动物实验中心提供。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

雌雄小鼠分笼适应性饲养3 d后,于每日17:00以雌雄比例2:1合笼,于次日8:00检查雌鼠阴道后分笼,发现阴栓记为妊娠第1 d。将孕鼠随机分为正常对照组(生理盐水)、病理模型组(生理盐水)与调经助孕胶囊组(24 g/kg,相当于成人每千克剂量的20倍,按照体表面积换算),每组16只,ig给药,每天1次,连续3 d。第4天上午9:00,除正常对照组小鼠外,剩余小鼠均sc米非司酮溶液0.1 ml复制着床障碍模型。每天记录各组小鼠的体质量,并于镜下观察小鼠阴道分泌物情况,若

分泌物显著增多则需光学镜下涂片观察,发现无核角化细胞大量存在则判断为建模成功。

2.2 胚泡着床位点数的观察

妊娠第5天,各组小鼠iv伊文思蓝溶液0.2 ml,观察10 min,见小鼠口周、眼球部位呈蓝色时处死小鼠。开腹,取子宫(有蓝染点子宫取蓝染点处,若无则取对应部位),甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋、切片,光镜下观察。被伊文思蓝染为深蓝色部位为胚泡着床位点,计算胚泡着床位点个数。

2.3 血清E₂、P及子宫内膜ER、PR水平检测

所有小鼠于处死时取全血于孵育箱中静置15~30 min,以离心半径2.0 cm、4 000 r/min离心15 min,取上层血清保存在-70℃冰箱中。标本收集后通过放射免疫法测定小鼠血清中E₂、P水平,通过免疫组织化学(SP法)测定小鼠子宫内膜ER、PR水平,均严格按照相关试剂盒说明书操作。片中胞核染色至棕黄色提示为阳性细胞。对同色切片于光镜下观察,随机选择5个不同视野,以切片染色背景为对照,测定积分吸光度值。

2.4 统计学方法

应用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用*t*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 建模结果

48只小鼠镜下显示其阴道分泌物明显增多,且经光学镜涂片显示无核角化细胞大量存在,48只小鼠均建模成功。

3.2 各组小鼠胚泡着床位点观察结果

妊娠第5天,病理模型组小鼠胚泡着床位点个数显著少于正常对照组;调经助孕胶囊组小鼠胚泡着床位点个数显著多于病理模型组,以上差异均有统计学意义(*P*<0.05),详见表1。

表1 各组小鼠胚泡着床位点比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the number of blastocyst implantation sites among those groups($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	着床位点数
正常对照组	16	14.48 ± 2.01
病理模型组	16	7.32 ± 1.50*
调经助孕胶囊组	16	12.03 ± 2.00 [#]

注:与正常对照组比较,**P*<0.05;与病理模型组比较,[#]*P*<0.05

Note: vs. normal control group, **P*<0.05; vs. pathological model group, [#]*P*<0.05

3.3 各组小鼠血清中E₂、P水平检测结果

妊娠第5天,病理模型组小鼠血清E₂、P水平均显著低于正常对照组;调经助孕胶囊组小鼠血清E₂、P水平均显著高于病理模型组,以上差异均有统计学意义(*P*<0.05),详见表2。

表2 各组小鼠血清中E₂、P水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Tab 2 Comparison of serum levels of E₂ and P among those groups($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	<i>n</i>	E ₂	P
正常对照组	16	7.76 ± 4.84	126.16 ± 63.55
病理模型组	16	1.33 ± 0.80*	50.18 ± 31.57*
调经助孕胶囊组	16	4.67 ± 1.25 [#]	102.15 ± 45.74 [#]

注:与正常对照组比较,**P*<0.05;与病理模型组比较,[#]*P*<0.05

Note: vs. normal control group, **P*<0.05; vs. pathological model group, [#]*P*<0.05

3.4 各组小鼠子宫内膜ER、PR水平检测结果

妊娠第5天,病理模型组小鼠子宫内膜ER、PR水平均显著低于正常对照组;调经助孕胶囊组小鼠子宫内膜ER、PR水平均显著高于病理模型组,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表3。

表3 各组小鼠子宫内膜ER、PR蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of protein expression of ER and PR among those groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER	PR
正常对照组	16	12.67 ± 3.65	8.74 ± 0.95
病理模型组	16	5.26 ± 2.11*	2.76 ± 0.84*
调经助孕胶囊组	16	11.62 ± 3.74#	8.07 ± 1.22#

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与病理模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. pathological model group, # $P < 0.05$

3 讨论

相关研究结果显示,促排卵治疗会影响内源性甾体激素调节子宫内膜的功能,干扰子宫内膜自然周期,这与雌、孕激素水平失衡密切相关。雌、孕激素水平失衡可破坏子宫内膜结构与细胞因子网络平衡,对种植窗子宫内膜功能、形态造成干扰,导致子宫内膜容受性异常,最终导致胚泡着床障碍,不利于妊娠^[9]。本研究选择米非司酮建模,该药物与PR结合强度大,能有效降低孕激素水平,影响子宫内膜正常功能与受精卵着床过程。通常情况下小鼠妊娠第4天时正常发育的胚泡便移行至于宫腔,妊娠第4天傍晚胚泡便会着床,因此妊娠第4天上午9:00注射米非司酮溶液可有效排除该药物对受精卵自身发育、输卵管运动的影响引发的着床障碍,同时可造成子宫内膜容受性下降,复制着床障碍模型^[9]。

小鼠等哺乳动物胚泡着床与激素水平密切相关,雌、孕激素联合作用可诱导小鼠胚泡着床,而人类胚泡着床仅受孕酮影响。小鼠血清E₂水平于妊娠第1~4天升高,第5天时达到峰值,随后开始逐渐降低直至分娩前1天,复于分娩期间升高、分娩后降低;而血清P水平于妊娠第1~5天逐渐升高,第5天时达到峰值,第6~7天降低,第8天起又逐渐升高直至分娩;子宫ER、PR水平与血清E₂、P水平相关^[7]。妊娠第4~5天血清E₂、P水平及ER、PR升高对蜕膜化起到重要作用,而后E₂、P水平降低可能与子宫内膜“静态”环境维持有关,可为胚泡植入创造良好的条件^[9]。因此,本研究在小鼠妊娠第5天时观察胚泡着床位点数和血清E₂、P水平及子宫内膜ER、PR水平。

调经助孕胶囊中既含有补肾中药成分,又含有活血调经成分,相关研究表明该药能显著提高无排卵性不孕患者血清E₂、P水平^[9],促进卵泡发育生长,提高妊娠成功率。本研究结果显示,调经助孕胶囊组小鼠血清E₂、P水平均显著高于病理模型组,表明该药可显著提高着床障碍小鼠血清E₂、P水平,增强雌、孕激素对子宫内膜的作用,促进着床期子宫内膜发育达到容受状态。雌激素主要促进子宫内膜上皮细胞增殖,其水平过高或过低均可影响胚胎着床;孕激素除可把雌激素干预

后的子宫内膜转化为分泌组织外,还可创造便利条件方便胚胎黏附,其水平过低表示卵泡发育不成熟,过高则会导致子宫内膜着床期提前,不利于受精卵着床^[10]。本研究结果显示,调经助孕胶囊组小鼠胚泡着床位点数显著多于病理模型组,子宫内膜ER、PR蛋白表达水平均显著高于病理模型组,这表明调经助孕胶囊可显著改善ER、PR的异常表达,促进子宫内膜发育成熟。

综上所述,调经助孕胶囊可显著提高小鼠血清E₂、P水平和子宫内膜ER、PR水平,增加胚泡着床位点数。但着床障碍小鼠子宫内膜容受性还受到很多因子的影响,如子宫内膜降钙素^[11]、血管内皮生长因子^[9]等。本研究未结合其他细胞因子对子宫内膜容受性的影响进行综合性评价,后续可进行这一方面的研究。

参考文献

- [1] 张明敏,何新芳,张锦金,等.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[J].中国中西医结合杂志,2010,30(3):291.
- [2] 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.
- [3] 屠庆年,何新芳,张明敏,等.补肾、活血组分及其复方制剂对着床障碍小鼠血管内皮生长因子的影响[J].中国妇幼保健,2011,26(8):1207.
- [4] 党慧敏,刘艳巧,刘润侠,等.调经助孕方联合来曲唑对多囊卵巢综合征不孕患者卵泡发育及卵巢、子宫血流动力学影响[J].中医药导报,2013,19(6):3.
- [5] 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.
- [6] 李银珠,王秋凤.参杞调经助孕丸的制备及治疗无排卵型不孕症的临床观察[J].中医学报,2013,28(7):1026.
- [7] 刘丽,侯洁,韩晓宇,等.保胎液对胚泡着床障碍小鼠雌孕激素的影响[J].吉林中医药,2012,32(3):274.
- [8] 杨增明,孙青原,夏国良.生殖生物学[M].北京:科学出版社,2005:236.
- [9] 褚玉霞,王瑞杰.二紫胶囊治疗无排卵型不孕症60例[J].中医研究,2006,1(12):27.
- [10] 肖新春,傅金英,胡心伟,等.经胶胶囊对动情后期高雌大鼠血清雌二醇、孕酮的影响[J].长春中医药大学学报,2013,29(4):567.
- [11] 刘丽,齐智慧,王贺,等.保胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜降钙素表达的影响[J].实用妇产科杂志,2013,29(8):634.

(收稿日期:2016-01-30 修回日期:2016-05-15)

(编辑:刘明伟)