

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.18.005

坤泰胶囊对小鼠子宫内膜容受性影响的研究*

王慧,李玉洁[△],陈帆,南燕

(新乡医学院第三附属医院妇产科,河南新乡 453003)

[摘要] **目的** 通过比较溶血磷脂酸受体-3(LPAR3)在小鼠胚胎着床期子宫内膜的表达,了解坤泰胶囊对小鼠子宫内膜容受性的影响。**方法** 将90只6~8周龄的昆明雌鼠分为3组[A组:控制性超促排卵(COH);B组:坤泰+COH;C组:生理盐水对照],每组30只,检查合笈次日晨阴栓,于第1~6天每天每组处死5只雌鼠,测定血清中雌二醇(E2)、孕酮(P)水平,以及腺体数和 LPAR3 免疫组化光密度值(IOD)。**结果** A、B组血清 E2、P 水平均高于同期 C 组($P<0.05$);HE 染色, A 组较 B、C 组腺体数明显减少($P<0.05$)。A 组第 3 天 LPAR3 的 IOD 值高于 B、C 组($P<0.05$),而 A 组第 4 天 IOD 值明显小于 B、C 组($P<0.05$),B 组较 C 组略高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 坤泰胶囊可能通过改善 COH 小鼠 LPAR3 正常时空表达,起到改善子宫内膜容受性的作用。

[关键词] 坤泰胶囊;子宫内膜容受性;控制性超促排卵;溶血磷脂酸受体-3

[中图分类号] R715.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)18-2464-03

Study on effect of Kuntai Capsule on mice endometrial receptivity*

Wang Hui, Li Yujie[△], Chen Fan, Nan Yan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

[Abstract] **Objective** To understand the effect of Kuntai Capsule on mice endometrial receptivity by comparing the lysophospholipids acid receptor-3(LPAR3) expression in endometrium during mouse embryos implantation period. **Methods** Ninety 6-8 week old Kunming female mice were randomly divided to three groups: the group A[controlled ovarian hyperstimulation (COH)], B (COH+Kuntai Capsule) and C(normal saline control), 30 cases in each group. The vaginal plug was performed on the next day after mating. Five mice in each group were daily killed on 1-6 d. The serum estradiol(E2) and progesterone(P) levels were detected. The glands number and the immunohistochemical integrated optical density(IOD) were also determined. **Results** The levels of serum E2 and P in the group A and B were higher than those in the group C at the same period($P<0.05$); in the HE staining, the glands number in the group A was significantly decreased compared with the group B and C($P<0.05$). The IOD value of LPAR3 on 3 d in the group A was significantly lower than that in the group B and C($P<0.05$), while the group B was slightly higher than the group C without statistical difference($P>0.05$). **Conclusion** Kuntai Capsule may play the role for improving the endometrial receptivity by improving the normal space-time expression of LPAR3.

[Key words] Kuntai Capsule; endometrial receptivity; controlled ovarian hyperstimulation; lysophosphatidic acid receptors 3

随着医学技术的发展,辅助生殖技术在卵子的获取、受精卵的培养、胚胎移植等方面取得很大的进步,为广大的不孕症患者带来希望;但是胚胎的着床率较前并未出现明显改善^[1],严重影响了妊娠结局,为此子宫内膜容受性即子宫内膜对胚胎的接受能力就成为当今生殖医学界研究的热点问题^[2]。本实验建立了控制性超促排卵(controlled ovarian hyperstimulation, COH)小鼠模型,观察坤泰胶囊对小鼠子宫内膜容受性的影响,并了解溶血磷脂酸受体-3(lysophosphatidic acid receptors 3, LPAR3)在小鼠子宫内膜上的表达特点,对坤泰胶囊作用机制及胚胎着床影响的机制进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 材料 清洁级昆明雌鼠 90 只,6~8 周龄,24~34 g;雄鼠 45 只,8~10 周龄,28~37 g,由新乡医学院实验动物中心提供。雌雄分笼饲养,自由取食水,室温 22~25℃。

1.2 方法 将 90 只雌鼠分为 A、B、C 3 组($n=30$),B 组给予坤泰胶囊(贵阳新天药业股份有限公司提供),A、C 组给予相

同剂量生理盐水,均灌胃 1 个月,每只每天剂量为 0.7 mL。将坤泰胶囊溶于生理盐水浓度为 50 mg/mL,灌胃剂量根据许文生氏公式和 Meeh-Rubner 氏公式,按中国妇女的平均身高 158.6 cm,体质量 53.6 kg,本次实验雌鼠的平均体质量 27.5 g 计算,小鼠的每日灌药量约为 1.2 mg/g。3 组小鼠灌胃 20 d 后,于小鼠发情后期,A、B 两组均于上午 9:00 腹腔注射促性腺激素释放激素拮抗剂(GnRHa)1.5 μg/100 g,连续 9 d,第 9 天加注孕马血清促性腺激素(PMSG)10 IU/只,48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)10 IU/只,C 组同时注射同等剂量的生理盐水。HCG 注射日晚 A、B、C 3 组雌:雄比 2:1 合笼,次日晨 7:00~8:00 时检查阴栓,并记为第 1 天,依次为第 2、3、4、5、6 天,每天每组平均颈椎脱臼处死 5 只雌鼠,心脏取血行雌二醇(E2)、孕酮(P)测定,解剖取其子宫组织,放置 4% 的多聚甲醛中固定待行 HE 染色和免疫组化检测 LPAR3 表达的光密度值(IOD)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分

* 基金项目:2012 年河南省高等学校骨干教师资助项目(2012GGJS-135)。 作者简介:王慧(1987-),住院医师,硕士研究生,主要从事子 宫内膜容受性研究。△ 通讯作者,E-mail:645482554@qq.com。

析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 检验标准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组小鼠第 1~6 天 E2、P 水平比较 A、B 组 E2、P 水平均高于同期 C 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); B 组 E2、P 水平高于 A 组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1、表 2。

2.2 3 组小鼠第 4 天子宫内膜 HE 染色比较 A、B、C 组腺体数分别为 (12.6±3.36)、(19.8±1.92)、(17.0±2.45) 个, B 组腺体数高于 A、C 组, 与 A 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 与 C 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。镜下观 A

组腺体发育差, 腺腔小, 间质致密, 血管较少; B 组腺体发育好, 腺腔大, 间质疏松, 血管多; C、B 组镜下比较无明显差别。图 1~3。

2.3 3 组小鼠 LPAR3 表达的 IOD 比较 LPAR3 在 3 组小鼠的第 1~6 天出现规律性表达, A 组峰值出现在第 3 天, B、C 组峰值均出现在第 4 天, 且 A 组第 3 天的 IOD 值高于 B、C 组 ($P<0.05$); B、C 组第 4 天的 IOD 值高于 A 组 ($P<0.05$); B 组第 4、5 天的 IOD 值略高于 C 组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。三组峰值可见免疫组化图 4~6。

表 1 3 组小鼠第 1~6 天 E2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

| 组别 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| A 组 | 15.42±1.24 ^a | 17.52±1.40 ^a | 26.98±2.32 ^a | 29.74±2.27 ^a | 33.73±3.15 ^a | 39.05±1.00 ^a |
| B 组 | 15.48±1.57 ^a | 17.93±1.19 ^a | 27.71±2.60 ^a | 30.17±1.21 ^a | 33.94±3.30 ^a | 39.97±0.97 ^a |
| C 组 | 6.74±0.89 | 9.81±0.91 | 12.56±1.76 | 19.75±1.76 | 20.05±2.05 | 24.05±3.16 |

^a: $P<0.05$, 与同期 C 组比较。

表 2 3 组小鼠第 1~6 天 P 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

| 组别 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 |
|-----|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| A 组 | 1.84±0.23 ^a | 4.08±0.42 ^a | 19.57±3.36 ^a | 33.04±3.91 ^a | 41.76±5.29 ^a | 43.85±6.51 ^a |
| B 组 | 1.85±0.22 ^a | 4.34±0.48 ^a | 20.35±3.09 ^a | 35.05±3.70 ^a | 43.71±3.77 ^a | 47.80±3.37 ^a |
| C 组 | 0.87±0.15 | 2.08±0.15 | 7.26±0.76 | 9.44±1.06 | 16.23±2.61 | 20.16±2.70 |

^a: $P<0.05$, 与同期 C 组比较。

表 3 3 组小鼠 LPAR3 的 IOD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 |
|-----|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------|
| A 组 | 0.119±0.008 | 0.208±0.023 | 0.293±0.019 | 0.207±0.022 | 0.127±0.014 | 0.119±0.011 |
| B 组 | 0.118±0.011 | 0.125±0.014 | 0.255±0.014 ^a | 0.330±0.026 ^a | 0.125±0.013 | 0.114±0.014 |
| C 组 | 0.114±0.011 | 0.120±0.013 | 0.253±0.032 ^a | 0.311±0.019 ^a | 0.122±0.013 | 0.115±0.010 |

^a: $P<0.05$, 与同期 A 组比较。

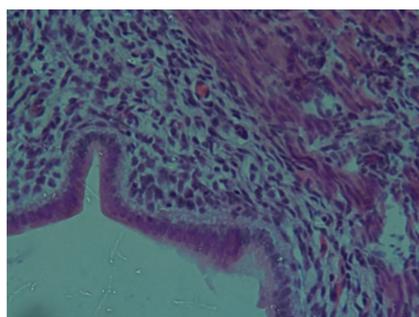


图 1 A 组第 4 天 HE 染色 (×400)

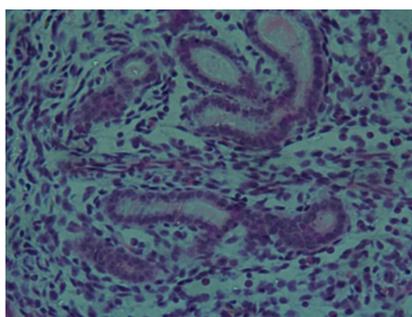


图 2 B 组第 4 天 HE 染色 (×400)

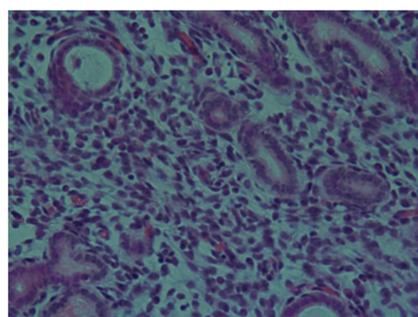


图 3 C 组第 4 天 HE 染色 (×400)

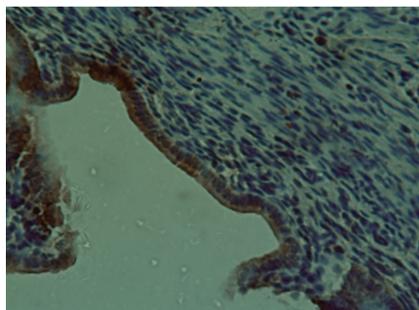


图 4 A 组第 3 天 LPAR3 的表达 (×400)

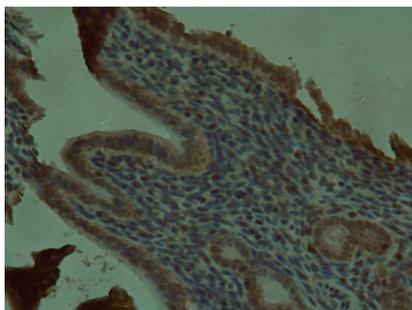


图 5 B 组第 4 天 LPAR3 的表达 (×400)

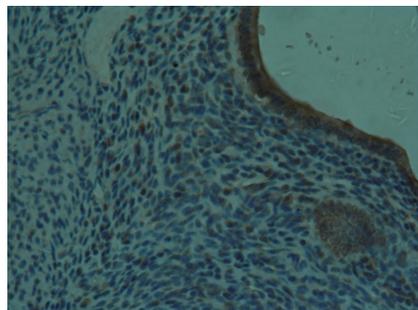


图 6 C 组第 4 天 LPAR3 的表达 (×400)

3 讨 论

通过提高子宫内腔容受性,从而提高辅助生殖技术的临床妊娠率是现在生殖医学界研究的热点问题,国内外学者通过大量研究以期解决超促排卵后导致的种植窗期子宫内腔容受性低下的问题,同时也是目前解决胚胎种植率低的切入点。

溶血磷脂酸(LPA)存在于机体的血清、眼房水、精浆等多种体液中,其受体有 4 种,分别是 LPAR1、LPAR2、LPAR3、LPAR4,其中 LPAR3 与雌性生殖系统关系密切。有研究发现,LPAR3 基因缺陷的雌性小鼠中 LPAR3 空间分布异常,并推测其表达异常可导致胚胎种植的延迟^[3]。本实验免疫组化提示,LPAR3 表达于子宫内膜上皮及腺上皮细胞质,且在子宫内膜上的表达具有规律性,3 组均出现峰值,A 组峰值出现在第 3 天,B、C 组出现第 4 天;B 组峰值高于 A 组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),这种规律性表达可能与生殖关系密切相关。

坤泰胶囊为纯中药制剂,由熟地黄、黄连、白芍、黄芩、茯苓、阿胶等六味中药组成,无雌激素,却有类雌激素作用。有研究证实,坤泰胶囊有雌激素样作用,并且能改善子宫内腔发育,有利于胚胎着床^[4];有研究证实,雌、孕激素在胚胎与子宫内腔对话建立关联之间起到重要的把控作用^[5]。通过本实验发现坤泰胶囊确实具有升高雌、孕激素的作用,但作用弱。陈蓉等^[6]研究的坤泰胶囊可以升高 E2,且不会造成子宫内腔过度增生。本实验显示,坤泰胶囊同时具有改善 COH 引起的子宫内腔腺体少且发育不良、间质致密等作用。付连芳^[7]研究 COH 药物具有影响小鼠子宫内腔容受性,导致临床妊娠率低;龚瑜等^[8]试图从子宫内腔厚度、血流指数等方面研究超促排卵对子宫内腔容受性的影响,发现超促排卵对内腔厚度与血流指数影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。由本实验可见 COH 可能是在异常升高雌、孕激素水平,影响内腔腺体发育等方面降低子宫内腔容受性的;而坤泰胶囊在一定程度上可通过改善子宫内腔腺体少、发育不良、疏松间质从而改善 COH 引起的子宫内腔容受性降低;这一结论与郑瑞君等^[9]研究的坤泰胶囊具有改善子宫内腔容受性的结论相同。南燕等^[10]研究发现,坤泰胶囊能改善子宫内腔容受性,有助于胚胎的着床;此外宋晖等^[11]研究发现,坤泰胶囊具有促排卵作用,但是不会造成子宫内腔过度增生,因此和促排卵药物联合应用可降低促排卵药物对子宫内腔的不良影响,从而达到改善子宫内腔容受性的作用。另外临床研究也证实,坤泰胶囊具有改善卵巢功能、调节雌激素水平、促进子宫内腔增生,利于胚胎着床^[12-13];还有研究显示,坤泰胶囊对更年期大鼠子宫具有营养作用^[14]。

小鼠子宫内腔的种植窗为第 4~5 天晨,约 18 h^[15]。胞饮突为目前公认的子宫内腔容受性评价指标之一。郭燕红等^[16]研究小鼠在合笼第 4 天,出现完全发育的胞饮突,本实验的 B 组与 C 组的 LPAR3 峰值均出现在第 4 天;与胞饮突的发育一致,可见 LPAR3 与胚胎着床确实关系密切。坤泰胶囊在改善子宫内腔腺体数少、发育不良的同时,也改善了 LPAR3 总体表达量,为此可见 B 组第 4 天较其他两组腺体多、LPAR3 的 IOD 值较其他两组高,免疫组化与 HE 染色结果一致。为此,可推断,LPAR3 与胚胎着床关系密切,其可能通过黏附作用参与胚胎着床过程。郭燕红等^[16]研究表明,LPAR3 在子宫内腔着床期表达,对评价子宫内腔容受性有重要意义,可作为子宫内腔容受性的良好评价指标之一。A 组 LPAR3 峰值提前出现且较 B 组低,第 4 天腺体发育不良、间质致密、血管较少,可见 COH 可能导致胚胎种植窗提前,造成胚胎与子宫内腔发育不同步,而坤泰胶囊改善了 COH 小鼠内腔的 LPAR3 时空表

达,并增加了 LPAR3 的表达量,从而起到改善小鼠子宫内腔腺体发育,提高子宫内腔容受性的作用。

坤泰胶囊能促进子宫内腔发育,并能抵制促排卵药物引起的子宫内腔容受性降低,而此作用可能是通过改善 LPAR3 的正常时空表达及量的表达实现;但 LPAR3 如何承上启下发挥调节作用尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 魏丽坤,张雷,王嵩明. 子宫内腔容受性的评价及其改善措施[J]. 生殖与避孕,2008,28(5):298-303.
- [2] Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK. Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy[J]. Trends Endocrinol Metab,2002,13(4):144-150.
- [3] Ye X, Hama K, Contos JJ, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing[J]. Nature,2005,435(738):104-108.
- [4] 李存存,王晶晶,陈潮,等. 坤泰胶囊与激素替代疗法治疗更年期综合征有效性和安全性比较的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(9):1183-1190.
- [5] 张炜,周剑萍,刘银坤,吴欣等. 白血病抑制因子在小鼠围着床期子宫内腔的表达[J]. 生殖医学,2000,9(2):100-103.
- [6] 陈蓉,林守清,杨欣,等. 坤泰胶囊治疗妇女更年期综合征的临床研究[J]. 中国新药杂志,2005,14(12):1472-1476.
- [7] 付连芳. 控制性超排卵(COH)药物 GnRH α 对小鼠子宫内腔整合素 α v、 β 1 表达的影响[J]. 医学检验与临床,2006,17(6):33-34,40.
- [8] 龚瑜,岳天孚,白晓红,等. 超促排卵与胚胎着床前期子宫内腔容受性的关系[J]. 国际妇产科学杂志,2010,37(3):212-214,218,227.
- [9] 郑瑞君,张宸铭. 坤泰胶囊对原因不明性不孕症子宫内腔容受性的影响[J]. 中成药,2014,36(11):2261-2264.
- [10] 南燕,段子新,李玉洁等. 坤泰胶囊对不孕症患者子宫内腔容受性的影响[J]. 新乡医学院学报,2012,29(5):384-385.
- [11] 宋晖,韩星,田国华,等. 坤泰胶囊对多囊卵巢综合征促排卵临床疗效观察[J]. 中国妇幼保健,2012,27(32):5194-5196.
- [12] Trudel G. Sexuality and marital life: results of a survey [J]. J Sex Marital Ther,2002,28(3):229-249.
- [13] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal woman[J]. JAMA,2002,288(3):321-333.
- [14] 张绍芬,朱慧庭,刘畅,等. 坤泰胶囊对更年期大鼠卵巢功能及子宫内腔影响的实验研究[J]. 中华老年杂志,2004,23(9):648-651.
- [15] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models[J]. Nat Rev Genet,2006,7(3):185-199.
- [16] 郭燕红,张雷,邵素霞,等. 溶血磷脂酸受体 3 在小鼠胚胎围着床期子宫内腔的表达及意义[J]. 解剖学报,2009,40(1):141-145.