

健胎液对小鼠着床期子宫内膜孕激素受体及 mRNA 的影响

刘艳娟* 黄光英* 杨明炜* 龚 萍* 陆付耳*

摘要 目的:研究健胎液对胚泡着床障碍小鼠着床期孕激素受体(PR)的影响。方法:将受孕小鼠随机分为正常组、模型组和中药组,采用米非司酮诱导小鼠胚泡着床障碍,予健胎液进行干预,于妊娠第8天处死小鼠,观察子宫内膜形态学变化,采用免疫组化技术检测子宫PR的表达,Western印迹和RT-PCR技术检测子宫PR及PR mRNA表达。结果:模型组子宫内膜发育不良,中药组子宫内膜的发育与正常组相似;中药组子宫内膜腺体、间质PR表达范围和强度均较模型组显著增高($P < 0.05$),与正常组无显著性差异($P > 0.05$);中药组PR蛋白及基因表达均较模型组显著提高($P < 0.05$),与正常组无显著性差异($P > 0.05$)。结论:健胎液通过调节胚泡着床障碍小鼠子宫PR及mRNA的表达,促进子宫内膜发育,改善胚泡着床。

主题词 子宫内膜/药物作用 孕激素类/血液 @ 健胎液

Effects of Jiantai Liquid on Progesterone Receptor(PR) and PRmRNA in the Endometrium of Mice at Nidation Stage

Liu Yanjuan, Huang Guangying, Yang Mingwei, et al.

(Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

Objective: To study on effect of Jiantai Liquid on progesterone receptor(PR) in the uterus at the nidation stage in the mouse with disturbance of blastocyst nidation. **Methods:** The gestational mice were randomly divided into a normal group, a model group and a Chinese drug group. Mifepristone was used for inducing disturbance of blastocyst nidation in the mice, which were interfered with Jiantai Liquid. At the eighth week of pregnancy, the mice were killed and morphological changes of the endometrium were observed, and PR expression in the uterus was detected with immunohistochemical method and PR and PRmRNA expressions were detected with Western blot and RT-PCR methods. **Results:** The endometrium showed maldevelopment in the model group and normal development in the Chinese drug group, similar to the normal group; the gland, the PR expression range and intensity of PR expression in the interstitial substance in the Chinese drug group increased as compared with the model group ($P < 0.05$), and with no significant difference as compared with the normal group ($P > 0.05$); expressions of PR protein and gene in the Chinese drug group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$), with no significant difference as compared with the normal group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Jiantai Liquid can promote development of the endometrium and improves blastocyst nidation via regulating expressions of PR and PRmRNA in the uterus in the mice with disturbance of blastocyst nidation.

Key Words Endometrium/drug action; Progesterones/blood; @Jiantai Liquid

孕激素通过与孕激素受体(PR)结合,促使子宫内膜向分泌期分化,使着床期子宫内膜具有最大程度的容受胚泡的能力,直接或间接地维持胚泡的生命力。若子宫内膜容受性受损害,可导致胚泡着床障碍或失败,这是导致不孕的重要机制之一。健胎液由桑寄生、丹参、当归、黄芪、川芎组成,能促进子宫内膜发育,改善子宫内膜容受性,提高米非司酮诱导的胚泡着床障碍小鼠的着床率^[1];健胎液配合体外受精-胚泡移植术治疗不孕症,可提高胚泡移植的成功率^[2]。本研究拟通过观察健胎液对胚泡着床障碍小鼠着床期孕激素受体及mRNA的影响,探讨其改善子宫内膜容受性的作用机制。

基金项目:国家自然科学基金资助(30171193)

* 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合科,湖北省武汉市解放大道1095号(430030)

收稿日期:2004-05-08;修回日期:2004-07-14

1 材料

1.1 动物:清洁级性成熟雌性未孕昆明种小鼠,体重(32 ± 4)g,雄性小鼠(40 ± 4)g,由湖北省卫生防疫站实验动物中心提供(湖北省实验动物合格证号:医动字第19-082号)。

1.2 药物:健胎液由同济医院中西医结合研究所中药制剂室提供,组成:桑寄生18g,黄芪14g,丹参9g,当归9g,川芎9g。采用水煎醇沉工艺制成144%无菌煎剂,分装于无菌小瓶中。米非司酮片(北京第三制药厂生产)研碎后溶解于丙二醇(国产分析纯试剂)中,配制成0.8mg/ml的米非司酮溶液。

1.3 试剂:孕酮放射免疫试剂盒:天津德普公司产品;PR兔IgG多克隆抗体:Santa Cruze公司产品;SP免疫组化试剂盒、Trizol RNA抽提试剂、逆转录试剂盒、TaqDNA聚合酶及反应缓冲液、Mo-MLV逆转录酶及

反应缓冲液、dNTPs、Oligo dT₁₅、RNasin 酶抑制剂为 MBI 公司产品。PR、 β -actin 引物由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列如下:PR(上游:5'-CAGGAATCCACAACCACAAG-3',下游:5'-TCGTATGCTGGAGACCTAAG-3',176bp), β -actin(上游:5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3',下游:5'-TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA-3',623bp)。

2 方法

2.1 动物分组及处理:将雌、雄小鼠分笼适应性饲养 3 天后,于每日 17:00 以雌雄 2:1 的比例合笼,次日 8:00 检查雌鼠阴道后再分笼,发现阴栓记为妊娠第 1 天。将孕鼠随机分为正常组、模型组和中药组,每组 6 只。于妊娠第 4 天皮下注射米非司酮,每只 0.08mg,建立胚泡着床障碍模型^[3],正常组不予任何处理,中药组自妊娠第 1 天始每鼠每天灌胃健胎液 24g/kg,模型组每天以等体积生理盐水灌胃,于妊娠第 8 天 9:00,用颈椎脱臼法处死小鼠,迅速剖腹,取出子宫。

2.2 观察指标及检测方法

2.2.1 子宫内膜的组织形态:取一部分子宫标本用 100ml/L 甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,制作组织切片,光镜观察子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞的变化。

2.2.2 子宫内膜 PR 的表达:将一部分子宫标本制作石蜡切片,采用过氧化物酶标记的链霉卵白素免疫组化法(SP 法)染色,检测子宫内膜 PR 的表达。按照试剂提供的实验步骤进行操作。免疫组化分析结果判断:PR 的阳性表达为细胞质呈棕黄色,主要位于子宫内膜腺体、间质细胞内。选用同批染色切片,每张切片在光镜下($\times 40$)随机取 5 个不同的视野,以每张切片染色的背景作对照,经 HPIAS-1000 病理图文分析系统(同济医学院千屏音像公司提供)分析,分别测定并计算子宫内膜腺体、间质的阳性信号所占的各自面积比和平均光度,表示阳性信号的表达范围和表达强度。以 PBS 代替 I 抗做阴性对照。

2.2.3 子宫组织 PR 蛋白的含量:将子宫组织用细胞裂解液(每毫升裂解液中含 50mM Tris,pH 7.4,1mM EDTA,150mM NaCl,1 μ g/ml PMSF,10 μ g/ml 抑肽酶,1 μ g/ml 亮氨酸)裂解细胞^[4],离心后取上清,用 Lowry 法测定蛋白浓度。各取 50 μ g 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,浸入封闭液(10mM Tris-HCl,pH 8.0,150mM NaCl,0.05%Tween-20)过夜,再分别进行抗原抗体反应。用 ECL 显色后,利用 VDS 图像分析系统扫描定量,得出光密度值,计算每克子宫组织的相对含量。

2.2.4 子宫组织 PR mRNA 的表达:采用一步法抽提总 RNA^[5],在核酸分析仪上检测 RNA 的含量和纯度,并计算 A₂₆₀/A₂₈₀的比值,比值为 1.8~2.0。按照逆转录试剂盒提供的实验步骤进行逆转录反应。取 1 μ l cDNA 依次加入 10 $\times$ buffer、2M dNTP、10 μ M Primer 2 μ l,10mM MgCl₂ 1.2 μ l,Taq 酶 1U,补水至总体积 20 μ l,分别进入 PCR 循环。PR 和 β -肌动蛋白(β -actin)的循环条件:95 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟、51 $^{\circ}$ C 退火 30、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟,共进行 38 个循环,循环结束 72 $^{\circ}$ C 10 分钟终止反应。取 PCR 产物 8 μ l,用 2.5%琼脂糖凝胶进行 DNA 电泳,电泳条带结果用 VDS 图像分析系统分析。以 PR 的吸光度与 β -actin 吸光度的比值表示 PR mRNA 的表达水平。

2.3 统计学方法:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SPSS 11.0 软件处理,组间比较采用 *F* 检验和 *q* 检验。

3 结果

3.1 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜组织结构的影响:正常组子宫内膜呈现早期妊娠的内膜变化,可见大片蜕膜组织:蜕膜样细胞逐渐增大,变为蜕膜细胞,可见腺体的顶部,分泌不明显。模型组未见早期妊娠的内膜改变,与正常组相比,表现为子宫内膜发育不良,可见两种形态的内膜:其一,间质水肿,但腺腔扩大,腺上皮细胞成单层立方上皮,核有假复层,显示间质已呈分泌期样改变而腺体仍呈增生期样改变,表明子宫内膜腺体与间质发育不同步,发育受阻。其二,腺腔稍扩大,弯曲,腺上皮细胞呈单层立方上皮,而间质细胞致密,显示子宫内膜腺体与间质发育均衡同步,呈增生期样改变,由于取材时为着床期,子宫内膜发育应处于分泌期,表明此时模型组子宫内膜发育与取材时相不同步,子宫内膜发育滞后。中药组子宫内膜多数呈现早期妊娠的内膜变化,也有部分子宫内膜呈晚分泌期的变化,但腺体和间质发育均衡同步,表现为间质细胞分化为蜕膜样细胞,间质水肿。

3.2 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜 PR 表达的影响:PR 免疫反应为棕黄色颗粒,主要位于细胞核内。各组子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞的细胞核内均可见棕黄色颗粒,阴性对照片细胞核内未见棕黄色颗粒。表 1 示,中药组腺体、间质 PR 阳性信号的表达范围和表达强度均显著高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与正常组差异无显著性($P > 0.05$),而模型组 PR 阳性信号的表达范围和表达强度均显著低于正常组。

3.3 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫组织 PR 蛋白表达的影响:膜显色后出现单一清晰的条带,分子量为

表1 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜PR表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	腺体		间质	
		平均光度	面积比	平均光度	面积比
正常组	6	0.364±0.103	0.057±0.019	0.377±0.071	0.173±0.053
模型组	6	0.351±0.079*	0.037±0.017*	0.347±0.067**	0.143±0.055*
中药组	6	0.357±0.067 Δ	0.054±0.017 Δ	0.366±0.079 $\Delta\Delta$	0.171±0.044 Δ

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表2 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫组织PR蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PR光密度
正常组	6	29.11±0.43
模型组	6	26.57±0.50*
中药组	6	28.74±0.17 Δ

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表3 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫组织PR mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PR/ β -actin
正常组	6	1.243±0.005
模型组	6	0.773±0.028*
中药组	6	1.151±0.102 Δ

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

81KD,表明子宫组织中有PR表达。表2示,模型组PR蛋白含量显著低于正常组和中药组($P < 0.01$),而中药组的PR蛋白含量与正常组差异无显著性($P > 0.05$)。

3.4 健胎液对胚泡着床障碍小鼠子宫组织PR mRNA表达的影响:经2%琼脂糖凝胶电泳分析,PR mRNA、 β -actin mRNA的扩增产物和理论长度一致。表3示,中药组子宫PR mRNA的表达较模型组显著增高($P < 0.01$),与正常组差异无显著性($P > 0.05$),而模型组子宫PR mRNA的表达较正常组、中药组的表达均有显著降低($P < 0.01$)。

4 讨论

PR是一种核受体,多分布于子宫内膜和肌层中,在腺上皮细胞和内膜间质细胞核内表达。PR浓度在月经周期中呈周期性变化,在增生晚期最高,分泌晚期最低,翻译PR的mRNA在月经的不同阶段无明显差异,提示PR的调控可能不仅发生在转录水平,也可发生在转录后水平^[6]。利用基因敲除技术,发现PR在胚泡着床过程中起着重要作用。PR敲除小鼠子宫内膜间质细胞不能蜕膜化,胚泡着床障碍;若将野生型小鼠的胚泡移入PR敲除假孕鼠的子宫,胚泡也不能着床^[7]。PR可通过影响降钙素、双调蛋白等着床必须因子的分泌而影响胚泡着床^[8]。临床研究发现,子宫内膜PR低下必然导致子宫内膜发育不良,从而抑制胚泡

着床,发生不孕^[9]。进一步研究显示,孕激素通过与胞质中PR结合转运到细胞核,使之DNA、mRNA发生变化,蛋白质合成增加,最终引起内膜一系列形态结构变化,诱导细胞因子、生长因子适时分泌,使着床期子宫内膜呈现最大限度的可容受性,接纳胚泡着床。本研究所见,模型组子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞中PR含量降低,内膜不能及时对孕激素的变化做出相应的反应,导致子宫内膜发育滞后,继而影响子宫内膜对胚泡的容受性,使胚泡难以着床,与临床所见一致。

近年来,人工助孕技术作为治疗不孕症的最新技术有了迅猛发展,但子宫内膜容受性差制约了人工助孕技术的进一步发展。将中医药与人工助孕技术相结合治疗不孕症,中医药从宏观上协调机体内分泌环境,改善子宫内膜容受性,西医助孕技术直接从微观治疗,两者相得益彰,各展所长,为不孕症的治疗开辟了新途径^[10],是目前研究的新方向,具有显著的优势。

参考文献

- 刘艳娟,黄光英,陆付耳,等.健胎液对胚泡着床障碍小鼠胚泡着床作用的研究.上海中医药杂志,2004,38(4):46~48.
- 张明敏,黄光英,陆付耳,等.补肾益气活血汤对多次助孕技术失败患者结局的影响.微循环学杂志,2002,12(2):10~13.
- 刘艳娟,黄光英,陆付耳,等.小鼠胚泡着床障碍模型的建立.中国药理学通报,2003,19(11):1315~1318.
- Tan J, Paria BC, Dey SK, et al. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. Endocrinology, 1999,140(11):5310~5321.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987,162(1):156~159.
- 李美芝.妇科内分泌学.北京:人民军医出版社,2001:307~308.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, et al. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. Mol Cell Endocrinol, 2001,179(1~2):97~103.
- 霍立军,杨增明.孕酮调节的胚胎着床相关分子及其作用.中华妇产科杂志,2002,37(8):505~507.
- 戴林,沈沈,虞有智,等.不孕患者子宫内膜孕激素受体研究.中华病理学杂志,2000,29(3):184~186.
- 陈丽霞,徐发彬.中西医结合在试管婴儿技术中的优势.中医杂志,2003,44(12):948.