

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.10.018

实验研究

健胎液对胚胎着床障碍小鼠子宫炎性细胞因子表达的影响

龚 萍, 黄光英*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 430030)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973833, 81202826)

摘要 **目的** 探讨中药健胎液对子宫内膜着床微环境改善的可能分子机制。**方法** 90 只受孕小鼠随机分为正常组、模型组、中药组各 30 只, 模型组和中药组采用吲哚美辛皮下注射建立胚胎着床障碍小鼠模型。中药组从妊娠第 1 天开始用健胎液 (144% 无菌煎剂) 灌胃, 每天每只 0.5 ml; 模型组和正常组每天用等量生理盐水灌胃。在妊娠第 5 天检测各组小鼠 (每组 10 只) 子宫内膜白介素-1 β (IL-1 β)、白介素 1 受体 I 型 (IL-1R I)、白介素-6 (IL-6)、白血病抑制因子 (LIF)、集落刺激因子-1 (CSF-1) mRNA 水平, 妊娠第 8 天检查各组小鼠 (每组 20 只) 子宫内胚胎发育情况, 记录胚胎着床率和着床位点数。**结果** 中药组和模型组的胚胎着床率、着床位点数同正常组比较显著降低 ($P < 0.01$), 中药组胚胎着床率、着床位点数同模型组比较明显升高 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 含量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 中药健胎液通过降低胚胎着床障碍小鼠子宫内膜 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 细胞因子的基因表达, 改善子宫内膜微环境, 促进着床。

关键词 健胎液; 子宫内膜; 胚胎着床; 炎性细胞因子

胚胎着床过程的调节十分复杂, 多种因素和机制参与并影响子宫内膜的着床微环境, 特别是激素、细胞因子的平衡对子宫内膜容受性影响很大^[1], 这些细胞因子在胚胎着床中保持稳定水平在胚胎着床中具有重要意义。前期研究结果显示, 健胎液用于因不孕症而欲进行试管婴儿或配子移植术患者, 能显著改善胚胎植入后的孕育成功率^[2], 本实验以吲哚美辛所致的胚胎着床障碍为模型, 观察健胎液在胚胎着床中对白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素 1 受体 I 型 (IL-1R I)、白细胞介素-6 (IL-6)、白血病抑制因子 (LIF)、集落刺激因子-1 (CSF-1) 的影响, 探讨其对子宫内膜着床微环境改善的分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级未交配昆明小鼠 110 只, 雌性, 8 ~ 12

周龄, 体重 30 ~ 35 g; 成年雄性昆明小鼠 20 只, 体重 35 ~ 45 g。均由湖北省卫生防疫站提供, 实验动物合格证号: 医动字第 19-082 号。

1.2 药物及试剂

吲哚美辛肠溶片 (批号: A060802), 由山西云鹏制药有限公司生产, 先将吲哚美辛肠溶片在研钵中碾细后、再用麻油充分搅拌溶解使吲哚美辛含量为 1 mg/ml。健胎液由华中科技大学同济医学院中西医结合研究所中药制剂室提供, 桑寄生、黄芪、当归、川芎、丹参按 3 : 1 : 1 : 1 : 2 比例制成 144% 无菌煎剂, 4℃ 保存。

Trizol 试剂: GibcoBRL 公司, 批号 15596026; 脱氧核糖核酸 (dNTP): Invitrogen 公司, 批号 1298490; 随机引物 Olig (dT)₁₅: Promega 公司, 批号 C110A 9362612; 逆转录酶 (m-MLV): Promega 公司, 批号 M5108; 核糖核酸酶抑制剂 (Rnasin): Ambion 公司, 批号 R00949。IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 及 β -action 引物由上

* 通讯作者: gyhuang@tjh.tjmu.edu.cn, (027) 83663275

表 1 引物序列

类别	上游序列	下游序列	扩增片段
IL-1 β	5'-ATGGCAACTGTTCTCTGAA3'	5'-GTACAAAGCTCATGGAGA3'	493bp
IL-1R I	5'-CTGCTGTCGCTGGAGATTGA3'	5'-AGCCACATTCCTACCAACA3'	522bp
IL-6	5'-CTCTGCAAGAGACTTCCATCC3'	5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCC3'	542bp
LIF	5'-GAGCAGACAGACAGGTAGCA3'	5'-TCCAGAGCCATTCACTTCAT3'	671bp
CSF-1	5'-GCATAGAGGACGCAGGCACT3'	5'-CTGGCTCCTGGTGTCTTCA3'	474bp
β -actin	5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAG3'	5'-TCTTCATGGTGTCTAGGAGCA3'	623bp

海生工生物技术公司合成, 引物序列见表 1。

1.3 主要仪器

电泳仪 (BDF-1600 型) 及电泳槽 (DYY-III33A 型): 北京六一仪器厂; 手提式紫外灯 (WD-9403E 型): 上海精科实业有限公司; 台式高速离心机 (HC-16): Sigma 公司; 蛋白核酸分析仪 (UV1101 型) 及 PCR 仪 (PTC-150HB 型): Eppendorf 公司; 凝胶成像系统: Beckman 公司。

1.4 造模方法

胚胎着床障碍模型参考吴云霞等^[9]报道, 成熟昆明小鼠按雌雄比例 2:1 合笼交配, 次日检查阴栓, 以发现阴栓作为妊娠第 1 天, 孕鼠 (90 只) 根据受孕先后顺序按随机数字表法分为正常组、模型组和中药组, 每组 30 只。正常组不给药, 模型组、中药组在妊娠第 3 天、第 4 天每天 9:00、17:00 两次皮下注射 4.4 mg/kg 吲哚美辛。中药组从妊娠第 1 天开始每天用健胎液灌胃, 每天每只 0.5 ml, 模型组和正常组每天用等量生理盐水灌胃。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 的检测 在妊娠第 5 天上午颈椎脱臼处死正常组、模型组和中药组小鼠各 10 只, 用刀背刮取小鼠子宫, -70℃ 保存备用。采用一步法抽提总 RNA, 在核酸分析仪上检测 RNA 的含量和纯度。按照逆转录试剂盒提供的实验步骤进行逆转录反应。取 PCR 产物 8 μ l 进行 DNA 电泳, 电泳条带结果用 VDS 图像分析系统分析。以 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 的吸光度与 β -actin 吸光度的比值, 表示 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 的表达水平。

1.5.2 胚胎着床率和着床位点数 妊娠第 8 天上

午颈椎脱臼处死正常组、模型组和中药组所有余下小鼠, 检查子宫内胚胎发育情况, 记录胚胎着床数和着床位点数。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间构成比用 χ^2 检验, 组间均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠胚胎着床率和着床位点数比较

表 2 示, 中药组和模型组的胚胎着床率、着床位点数同正常组比较显著降低 ($P < 0.01$), 中药组胚胎着床率、着床位点数同模型组比较明显升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠胚胎着床率和着床位点数比较

组别	鼠数	胚胎着床成立数 (只)	着床率 (%)	着床位点数 ($\bar{x} \pm s$, 个)
正常组	20	18	90	12.00 $\pm$ 4.32
中药组	20	7	35	3.35 $\pm$ 4.79 ^{*Δ}
模型组	20	1	5	0.30 $\pm$ 1.34 [*]

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

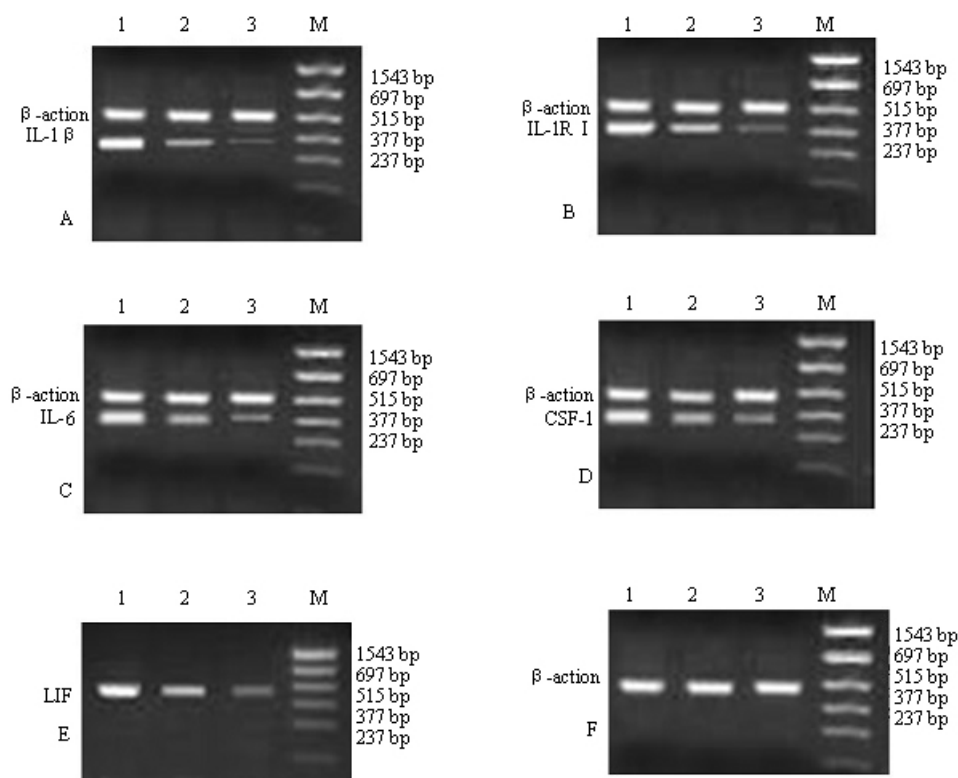
2.2 各组小鼠 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 水平比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 中药组 IL-1 β 、IL-1R I、LIF、CSF-1 mRNA 水平亦均较正常组升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药组 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、CSF-1、LIF mRNA 电泳图见图 1, LIF 电泳图条带与 β -action 比较接近, 所以分开跑胶, 故为两张图。

表 3 各组小鼠 IL-1 β 、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	IL-1R I	IL-6	CSF-1	LIF
正常组	10	0.3415 $\pm$ 0.0284	0.3811 $\pm$ 0.0434	0.6162 $\pm$ 0.0356	0.4721 $\pm$ 0.0467	0.3817 $\pm$ 0.0384
中药组	10	0.5561 $\pm$ 0.0397 ^{*$\Delta\Delta$}	0.6061 $\pm$ 0.0517 ^{*$\Delta\Delta$}	0.6213 $\pm$ 0.0452 ^{$\Delta\Delta$}	0.5618 $\pm$ 0.0497 ^{*$\Delta\Delta$}	0.4916 $\pm$ 0.0464 ^{*Δ}
模型组	10	0.9118 $\pm$ 0.0452 ^{**}	0.9323 $\pm$ 0.0606 ^{**}	1.0541 $\pm$ 0.0632 ^{**}	1.017 $\pm$ 0.0734 ^{**}	0.7815 $\pm$ 0.0652 ^{**}

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



注: 1: 正常组; 2: 中药组; 3: 模型组; M: Marker

图1 各组小鼠 IL-1β、IL-1R I、IL-6、CSF-1、LIF mRNA 电泳图

3 讨论

胚泡着床过程中子宫内膜会出现一个短暂的“植入窗”，此时，子宫内膜发生复杂而精细的生理变化，形成适合胚泡植入的良好子宫内膜微环境，使子宫内膜具有一定的“容受性”而接纳胚泡，在此过程中子宫内膜的炎症反应在胚泡植入中起重要作用^[4]。子宫内膜与胚泡达到同步分化状态接受胚泡植入，主要由卵巢甾体激素调节，而甾体激素的活性由细胞因子介导，这些细胞因子的局部合成又受甾体激素直接或间接调节，其中 IL-1、IL-6、LIF、CSF-1 这些炎症因子被认为是着床中起重要作用，研究显示在着床前后 IL-1、IL-6、LIF、CSF-1 在子宫内膜的表达具有高度时空特异性，提示这几种细胞因子的协调表达可能在着床发生中起重要作用^[5]。

前列腺素在着床中起重要作用，它使局部血管扩张、启动着床，前列腺素抑制剂吲哚美辛抑制子宫内膜血管通透性，既往研究发现吲哚美辛模型组小鼠子宫内膜血管稀少^[6]，说明吲哚美辛对血管扩张产生强烈的抑制作用。本实验发现模型组孕鼠子宫内膜 IL-1β、IL-1R I、IL-6、CSF-1、LIF mRNA 表达较正常组显著升高。IL-1、IL-6、LIF、

CSF-1 的升高可以在局部促进炎症反应，既往研究也发现模型组子宫内膜出现明显的炎症浸润^[4]。炎症细胞的大量渗出改变了子宫内膜环境，不断渗出的淋巴细胞有分泌作用，并通过自溶释放细胞内容物，使宫腔液酸碱度下降影响 DNA 的代谢。因此，围着床期子宫内膜 IL-1、IL-6、LIF、CSF-1 的过高表达是有害的。

健胎液以补肾、益气、活血立方，方中桑寄生补益肝肾，黄芪补气，当归补血调经，川芎养血活血、通达气血，丹参活血化瘀。本实验发现，中药组小鼠胚胎着床率、着床点数虽然低于正常组，但比吲哚美辛引起的胚胎着床障碍模型组明显升高，说明该中药能促进胚胎着床。同时中药组 IL-1β、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 的表达虽明显低于模型组，但除 IL-6 mRNA 水平与正常组无差异外，IL-1β、IL-1R I、LIF、CSF-1 mRNA 仍未达到正常水平。说明 IL-1β、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 mRNA 过高表达打破了子宫内膜着床微环境，破坏了子宫内膜容受性，不利于着床。中药健胎液降低了子宫内膜 IL-1β、IL-1R I、IL-6、LIF、CSF-1 表达，说明该方有改善炎症反应的作用。综上，中药健胎液可能通过改善着床局部的炎症反应而改善着床局部微环境从而促进胚胎着床。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 张明敏, 黄光英, 陆付耳. 补肾益气活血汤对多次助孕技术失败患者结局的影响 [J]. 微循环学杂志, 2002, 12 (2): 10-13.
- [3] 吴云霞, 黄光英, 龚萍. 吲哚美辛致小鼠胚泡着床障碍模型的建立 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21 (3): 373-375.
- [4] Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome [J]. Reproduction, 2012, 144 (6): 661-668.
- [5] Seo H, Choi Y, Shim J, et al. Regulatory mechanism for expression of IL1B receptors in the uterine endometrium and effects of IL1B on prostaglandin synthetic enzymes during the implantation period in pigs [J]. Biol Reprod, 2012, 87 (2): 31.
- [6] 龚萍, 黄光英, 刘艳娟. 健胎液改善胚泡着床障碍模型小鼠实验研究 [J]. 山东中医杂志, 2005, 24 (12): 739-741.

Effects of *Jiantai Liquid* on the Expressions of Uterine Inflammatory Cytokines in Mice With Embryo Implantation Dysfunction

GONG Ping, HUANG Guangying

(Tongji Hospital, Tongji Medical College Huazhong University of Science & Technology, Hubei Province 430030)

ABSTRACT Objective To study the possible molecular mechanism of *Jiantai Liquid* in improving the implantation environment in the endometrium. **Methods** Totally 90 pregnant mice were randomized into the normal group, model group and *Jiantai Liquid* group, with 30 in each. The embryo implantation dysfunctional (EID) models were established with indomethacin in the model group and *Jiantai Liquid* group. The *Jiantai Liquid* group was gavaged with *Jiantai Liquid* from the 1st day of pregnancy. The model group and normal group were gavaged with the same amount of normal saline. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-1 receptor type I (IL-1RI), IL-6, leukemia inhibitory factor (LIF) and colony stimulating factor-1 (CSF-1) mRNA were detected on the 5th day of pregnancy. The embryonic development was observed, and the numbers and site numbers of embryo implantation were recorded on the 8th day of pregnancy. **Results** Comparing with the normal group, the numbers and site numbers of embryo implantation were significantly decreased in the *Jiantai Liquid* group and model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the numbers and site numbers of embryo implantation were significantly increased in the *Jiantai Liquid* group ($P < 0.05$). Comparing with the normal group, the contents of IL-1 β , IL-1RI, IL-6, LIF and CSF-1 mRNA were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the contents of IL-1 β , IL-1RI, IL-6, LIF and CSF-1 mRNA were significantly decreased in the *Jiantai Liquid* group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Jiantai Liquid* can improve endometrial microenvironment and promote implantation by deregulating the expressions of IL-1 β , IL-1RI, IL-6, LIF and CSF-1 mRNA.

Keywords *Jiantai Liquid*; endometrial; embryo implantation; inflammatory cytokines

(收稿日期: 2013-08-12; 修回日期: 2014-01-02)

[编辑: 邓媛]

《世界睡眠医学杂志》征稿

《世界睡眠医学杂志》(ISSN 2095-7130、CN 10-1207/R)是由世界中医药学会联合会主办的睡眠医学专业学术期刊,《世界睡眠医学杂志》的办刊宗旨是发展传统与现代睡眠医学,促进睡眠医学领域国内外信息交流和传播,为宣传和普及科学睡眠知识提供平台,为医学科研和临床应用服务。《世界睡眠医学杂志》刊登睡眠医学的基础研究、临床研究的新成果、新经验、新技术和新动态,重视所刊出内容的科学性、先进性、实用性和可读性。

稿件要求:文稿应具有创新性、科学性、实用性。论著类稿件一般不超过5000字,并附400字左右中、英文摘要;讲座、综述、会议纪要、临床病理(例)讨论类文稿字数可视情况而定。对重大研究成果,将采用“快速通道”快速发表。《世界睡眠医学杂志》编辑部地址:北京市西城区马连道南街6号,邮政编码:100055,电话:(010)83114725;投稿网址: <http://www.sjsmyxzz.com>; E-mail: sjsmyx@126.com。