

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.20.016

种子育麟散对超促排卵模型大鼠子宫内膜整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、HOXA10 表达的影响

许浩¹, 丁渊^{2*}

(杭州市第一人民医院/南京医科大学附属杭州医院, 浙江省杭州市浣纱路 261 号, 310006)

摘要 目的 探讨种子育麟散治疗不孕症的可能作用机制。方法 选取 30 只 SD 雌性大鼠随机分为空白对照组、模型组、中药组, 每组 10 只。模型组和中药组通过腹腔内注射丙氨瑞林、尿促性腺激素、注射用绒毛膜促性腺激素建立控制性超促排卵模型大鼠。造模开始的同时中药组给予种子育麟散 7.2 g/(kg·d) 灌胃, 模型组、空白对照组给予等量生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 每次 2 ml, 连续 9 天。于孕 5 天后分别采用免疫组化法、Western blot 法检测大鼠子宫内膜整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、同源框 (HOX) A10 蛋白表达, RT-PCR 法检测 HOXA10、整合素 $\alpha_v\beta_3$ mRNA 表达。结果 与空白对照组比较, 模型组子宫内膜整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、HOXA10 蛋白及 HOXA10、整合素 $\alpha_v\beta_3$ mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组子宫内膜整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、HOXA10 蛋白及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、HOXA10 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。结论 种子育麟散能够提高大鼠子宫内膜整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、HOXA10 蛋白及 mRNA 的表达, 从而改善妊娠结局, 可能是其治疗不孕症的机制之一。

关键词 不孕症; 种子育麟散; 控制性超促排卵; 子宫内膜容受性; 整合素; 同源框

以体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 为代表的现代辅助生殖技术为不孕症的治疗提供了新的方法。IVF-ET 超排卵阶段, 大剂量外源性促性腺激素影响了着床相关因子的表达, 降低了子宫内膜容受性及胚胎着床率^[1]。研究发现, 很多中药能够改善子宫内膜微环境, 上调子宫内膜容受性, 从而提高妊娠率, 降低流产率^[2-3]。研究还发现, 同源框 (homeobox, HOX) 低表达的子宫内膜其整合素的表达也降低, 整合素和同源框表达的缺失或减弱均会导致子宫内膜容受性的降低^[4], 其中研究最多的是整合素 $\alpha_v\beta_3$ 及 HOXA10。本课题采用的种子育麟散是根据古方毓麟珠化裁而来, 毓麟珠出自《景岳全书》, 主治妇人气血俱虚、经脉不调所致不孕, 改进后的种子育麟散临床观察发现在 IVF-ET 术前可以提高胚胎存活率。本课题通过免疫组化法、western blot 法、RT-PCR 法检测整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、HOXA10 蛋白及 mRNA 的表达, 观察种子育麟散对控制性超促排卵模型大鼠子宫内膜容受性的相关性作用机制。

基金项目: 浙江省中医药科技计划 (2015ZA126)

* 通讯作者: mtowen@163.com, 13857158822

1 材料

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 30 只, 雄性 SD 大鼠 15 只, 清洁级, 8 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2015-0016。

1.2 药物

种子育麟散组成: 党参 15 g, 黄芪 15 g, 白术 10 g, 白芍 10 g, 当归 10 g, 熟地黄 10 g, 菟丝子 15 g, 杜仲 10 g, 桑寄生 15 g, 续断 15 g, 阿胶 10 g, 制备成含生药 0.6 g/ml 溶液; 注射用丙氨瑞林 (GnRHa, 批号: 1005265, 马鞍山丰原制药有限公司生产); 注射用尿促性腺激素 (HMG, 批号: 1007234)、注射用绒毛膜促性腺激素 (HCG, 批号: 1006137) 均购于中国丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司。

1.3 主要试剂与仪器

Trizol 试剂盒 (批号: 123801), 美国 Invitrogen 公司; 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗体 (批号: 36922h61), 美国 Affibotech 公司; 兔 SP 检测试剂盒 (货号: SP-9001)、DAB 试剂盒 (批号: ZLI9018), 均购

自北京中杉金桥公司; RIPA 裂解液 (批号: C1053)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: P1511)、ECL 化学发光试剂盒 (批号: P1030), 均购于普利莱基因技术有限公司; RR047A 试剂盒 (批号: AK3702)、RR420A 试剂盒 (批号: AKA3301), 均购自 Takara 公司。

Step one plus PCR 仪 (美国应用生物系统公司), 多功能真彩色细胞图象分析管理系统 Image-Pro Plus (美国 Media Cybernetics 公司), Fluor Chem HD2 化学发光凝胶成像系统 (美国 Protein Simple 公司), TE214S 电子天平 (德国 Sartorius 公司), DK600 电热恒温水浴槽 (上海医用恒温设备厂), MDF-C8V (N) 低温冰箱 (日本 SANYO 公司), ELX800 全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), Mini-PROTEAN4 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

30 只雌性 SD 大鼠采用随机数字表法分为模型组、中药组、空白对照组, 每组 10 只。模型组、中药组参考文献 [5], 于大鼠动情后期每日上午 9:00 定时腹腔内注射丙氨瑞林 $2.7 \mu\text{g}/200 \text{ g}$, 连续 9 天, 至第 9 天同时注射 HMG $4.1 \text{ IU}/200 \text{ g}$, 48 h 后注射 HCG $180 \text{ IU}/200 \text{ g}$ 。造模评价: 在连续注射丙氨瑞林 9 天后, 阴道脱落细胞涂片见周期变化消失, 注射 HMG 和 HCG 后阴道分泌物明显增多, 且阴道脱落细胞涂片见有大量的无核角化细胞, 即为模型建立成功。中药组同时予种子育麟散溶液 $7.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 给药剂量按 70 kg 成人表面积折算 [6]。空白对照组、模型组予等量生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 每次 2 ml, 连续 9 天。然后按雌雄 2:1 合笼, 次日阴道涂片发现精子或阴栓者记为孕 1 天。

2.2 观察指标和方法

参考文献 [5], 于孕 5 天处死大鼠, 每组各 10 只, 同时剖取并分离大鼠子宫, 在一侧子宫体部取材 2 份, 每份约 10 mg, 一份用 4% 多聚甲醛固定, 常规制备石蜡切片 ($6 \mu\text{m}$); 另一份置液氮中, 以备蛋白质提取。

2.2.1 免疫组织化学法检测整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 蛋白表达 常规脱蜡入水, 0.4% 胃酶消化暴露抗原, 0.3% H_2O_2 -甲醇室温孵育 30 min, 去除内源性过氧化物酶, 滴加整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 抗体 (1:100 稀释), 4°C 孵育 18 h, 阴性对照以 0.01 mol/L PBS 缓冲液

代替一抗孵育, SABC 复合物于 37°C 处理 1 h, $\text{DAB}-\text{H}_2\text{O}_2$ 室温下显色, 在阴性对照无特异性着色的情况下, 出现棕黄色颗粒为阳性染色。整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 半定量分析采用多功能真彩色细胞图象分析管理系统 Image-Pro Plus, 每张切片测定 10 个区域阳性细胞的平均光密度 (IOD), 即为整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 蛋白的表达量。整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 蛋白的表达以胞核黄染或出现黄至棕黑色颗粒为阳性, (-) 为无染色; (+) 为淡黄色; (++) 为黄色; (+++) 为深棕色。

2.2.2 Western blot 法检测 HOXA10 蛋白表达 常规抽提蛋白, 用 BCA 法进行定量。取 $45 \mu\text{g}$ 蛋白样品溶解于 $4 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液, 行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。最后将蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上。羊抗鼠 HOXA10 多克隆抗体浓度为 1:150, 羊抗鼠 β -actin 单克隆抗体浓度为 1:500, 与蛋白条带 4°C 孵育过夜。室温下孵育 1 h 后, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗羊二抗, 按 1:5000 稀释。最后加入显色底物, 覆盖在膜表面 1~2 min 后, 用保鲜膜把膜包起来, 放入夹板中, 在暗室中曝光显影。Fluor Chem HD2 化学发光凝胶成像系统分析灰度值, 结果以 HOXA10 灰度值/ β -actin 灰度值表示。

2.2.3 RT-PCR 法检测 HOXA10、整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ mRNA 表达 取约 100 mg 子宫组织于冰浴匀浆器中, 冰上迅速研磨成匀浆液, 加入 1 ml Trizol 剧烈震荡, 室温放置 5 min, 加入 0.2 ml 的氯仿, 盖好后漩涡剧烈震荡 15 s, 室温放置 2~3 min, 然后 4°C 、12000 r/min 离心 15 min。离心后分成 3 层, 最上面是无色的水相。RNA 只存在于水相中, 将上层水相转移到另一干净的 EP 管中, 加入等体积的异丙醇, -20°C 静置 30 min。然后 4°C 、12000 r/min 离心 15 min, 去上清, 加入 1 ml 75% 乙醇, 洗涤 RNA 沉淀, 振荡器混匀, 4°C 、7500 r/min 离心 5 min, 去上清, 置真空或空气中 5~10 min, 干燥 RNA 沉淀。注意不能将 RNA 沉淀完全干燥, 这样会极大地降低它的溶解度。根据沉淀的量加入适量的 DEPC 水溶解 RNA, 在假设扩增效率相同的条件下, 取 RNA 表达量平均值, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件分析数据, 统计数据描述采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数之间的比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白表达水平比较

中药组子宫内膜腺上皮表达呈强阳性, 以 (++) ~ (+++) 为主, 主要表达于细胞膜上及胞浆, 内膜间质中也有表达, 强度以 (++) 为主。空白对照组腺上皮表达呈阳性, 以 (++) 为主, 主要表达于胞膜及胞浆, 内膜间质中同样也有表达, 以 (++) 为主。模型组子宫内膜腺上皮及内膜间质细胞表达明显较前两组弱, 以 (+) 为主, 表达部位、范围与前两组基本相似。表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组子宫内膜 $\alpha v\beta 3$ 蛋白相对表达量明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组子宫内膜 $\alpha v\beta 3$ 蛋白相对表达量明显增加, 且明显高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 、HOXA10 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白 (IOD)	HOXA10 蛋白 (β -actin)
空白对照组	10	0.439 $\pm$ 0.0354	0.515 $\pm$ 0.0340
模型组	10	0.272 $\pm$ 0.0345*	0.355 $\pm$ 0.0369*
中药组	10	0.517 $\pm$ 0.0337* Δ	0.598 $\pm$ 0.0371* Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3.2 各组大鼠子宫内膜 HOXA10 蛋白表达水平比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组子宫内膜 HOXA10 蛋白相对表达量明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组子宫内膜 HOXA10 蛋白相对表达量明显增加, 且明显高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

3.3 各组大鼠子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 、HOXA10 mRNA 表达水平比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组子宫内膜 HOXA10、整合素 $\alpha v\beta 3$ mRNA 相对表达量明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组子宫内膜 HOXA10、整合素 $\alpha v\beta 3$ mRNA 相对表达量明显增加, 且显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠子宫内膜 $\alpha v\beta 3$ 、HOXA10 mRNA 表达水平比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	整合素 $\alpha v\beta 3$	HOXA10
空白对照组	10	0.439 $\pm$ 0.0354	0.515 $\pm$ 0.0340
模型组	10	0.272 $\pm$ 0.0345*	0.355 $\pm$ 0.0369*
中药组	10	0.517 $\pm$ 0.0337* Δ	0.598 $\pm$ 0.0371* Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

不孕症主要与肾气不足、冲任气血失调密切相关, 其病因病机为肾虚、肝郁、血瘀、痰湿, 尤以肾虚为根本, 治疗大法为填精补肾, 调理冲任气血。种子育麟散方中熟地黄、菟丝子、杜仲、桑寄生、续断补肾填精, 调补冲任; 党参、黄芪、白术、当归、阿胶健脾, 培补气血, 补益胎元, 辅以白芍柔肝, 处方以填补先天之肾精为主, 补养后天之脾土为辅, 调理冲任气血。实验研究表明, 很多补肾中药能通过改善胚泡着床障碍小鼠子宫内膜容受性, 从而提高胚胎着床率和妊娠率^[1]。

HOXA10 是胚胎着床和子宫内膜蜕膜化必不可少的基因^[2], 参与雌性生殖系统的发育和正常子宫内膜形态的构建, 并在子宫内膜的增殖与分化、子宫内膜容受性的建立、胚胎的定位及黏附、子宫内膜的蜕膜化以及血管通透性的增强中发挥着重要作用^[3]。HOXA10 还是胞饮突形成的关键因素, 上皮细胞胞饮突的数量和成熟度与 HOXA10 的表达呈正相关^[4]。李红等^[5]研究发现, HOXA10 基因在胚胎着床过程中起某种作用, 着床期的低表达可能与着床障碍有关, 并在蜕膜化过程中起作用。动物实验表明, 正常小鼠胚胎不能在 HOXA10 基因缺失小鼠子宫着床, 阻断小鼠 HOXA10 的表达同样可以阻碍着床, 表明母体 HOXA10 的正常表达是胚胎着床所必需的^[6]。

整合素 $\alpha v\beta 3$ 属于黏合家族的一组细胞黏附分子, 参与细胞的生长、分化、活化和跨膜信号传导等。Lessey 等^[7]研究发现, 子宫内膜整合素特异性表达于子宫最大容受期, 整合素是更可靠的“植入窗口”开放标志。宋芳等^[8]在体外培养的人蜕膜细胞中分别加入整合素 αv 抗体, 与小鼠胚泡共培养, 观察整合素抗体对小鼠胚泡在体外培养的人蜕膜细胞上的黏附和铺展的影响, 得出整合素 αv 能够调节胚泡在人蜕膜细胞上的植入, 其中整合素 αv 可能与胚泡的黏附有关。张俊慧等^[9]检测妊娠小鼠子宫内膜及人分泌期子宫内膜和妊娠早期中整合素 $\beta 3$ 亚基的表达量, 发现整合蛋白 $\beta 3$ 亚基在子宫内膜中的特异性变化, 可能启动、促进胚胎的黏附和着床, 在着床过程中起重要作用。

本研究结果显示, 控制性超促排卵模型组子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 、HOXA10 蛋白及其 mRNA 表达均较正常对照组明显降低, 表明此时子宫内膜容受性低下, 而中药种子育麟散能够明显提高子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 、HOXA10 蛋白及其 mRNA 的表达,

提示中药种子育麟散能显著改善子宫内膜容受性。综上所述,控制性超促排卵患者的子宫内膜存在蛋白及 mRNA 表达异常,子宫内膜容受性下降,导致胚胎着床障碍而不孕,种子育麟散可能通过改善子宫内膜容受性,诱导整合素 $\alpha v \beta 3$ 、HOXA10 蛋白及其 mRNA 在窗口期的表达,从而改善妊娠结局。

参考文献

- [1] KYROU D, DEVROEY P. Does the estradiol level on the day of human chorionic gonadotrophin administration have an impact on pregnancy rates in patients treated with rec-FSH/GnRH agonist [J]. Hum Reprod, 2009, 24(11): 2902-2909.
- [2] 邓伟民, 邵玉, 张金玉, 等. 中药益气血补肝法对辅助生育胚胎种植率的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2008, 24(2): 106-109.
- [3] 曹蕾, 罗颂平, 欧汝强. 补肾健脾法对复发性流产患者子宫内膜容受性的干预作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(6): 562-565.
- [4] DAFTARY GS, TROY PJ, BAGOT CN, et al. Direct regulation of beta3-integrin subunit gene expression by HOXA10 in endometrial cells [J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(3): 571-579.
- [5] 肖彭莹. 护卵汤对 GnRHa 超促排卵大鼠子宫内膜容受性的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1535.
- [7] 黄冬梅, 黄光英, 陆付耳. 补肾益气血方中药对胚胎

着床障碍小鼠子宫内膜表面胞饮突表达的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(4): 230-233.

- [8] SZCZEPANSKA M, WIRSTLEIN P, LUCZAK M, et al. Expression of HOXA-10 and HOXA-11 in the endometria of women with idiopathic infertility [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(2): 111-118.
- [9] SMITH CC, TAYLOR HS. Xenoestrogen exposure eimprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development [J]. FASEB J, 2007, 21(1): 239-246.
- [10] TAYLOR HS, BAGOT CN, KLIMAN HJ. Maternal HOXA10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation [J]. Dev Dyn, 2001, 222(1): 538-544.
- [11] 李红, 陈士岭, 邢福祺. HOXA10 基因在子宫内膜组织中的表达及与不孕的关系 [J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(1): 30-33.
- [12] BAGOT CN, TROY PJ, TAYLOR HS, et al. Alteration of maternal HOXA10 expression by in vivo gene transfection affects implantation [J]. Gene Ther, 2000, 7(1): 1378-1384.
- [13] LESSEY BA, CASTELBAUM AJ, BUCK CA, et al. Further characterization of endometrial Integrins during the menstrual cycle and in pregnancy [J]. Fertil Steril, 1994, 62(3): 497-506.
- [14] 宋芳, 李英, 王光明, 等. 整合素 αv , $\alpha 4$ 在小鼠胚胎植入中的作用 [J]. 解剖学杂志, 2003, 26(4): 322-326.
- [15] 张俊慧, 伍俊萍, 刘银坤, 等. 子宫内膜整合素 $\beta 3$ 蛋白亚基在妊娠中的变化 [J]. 生殖与避孕, 2000, 20(3): 151-155.

Impact of Zhongzi Yulin Powder (种子育麟散) on Expressions of Endometrial Integrin $\alpha v \beta 3$ and Homeobox A10 (HOXA10) of Rat Model of Controlled Ovarian Hyperstimulation

XU Hao¹, DING Yuan²

(Hangzhou First People's Hospital / Hangzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Hangzhou, 310006)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Zhongzi Yulin Powder in treating infertility.

Methods Thirty female Sprague Dawley (SD) rats were randomized into a blank control group, a model group and a herb group, with 10 in each group. Rats in the model group and the herb group were given intraperitoneal injection of alarelin, urinary gonadotropin and chorionic gonadotropin to made controlled ovarian hyperstimulation model. At the same time of modeling, the herb group was given 7.2 g/(kg · d) of Zhongzi Yulin Powder by gavage, and the model group and the blank control group were given normal saline by gavage, 2 ml each time, once every day, for 9 days. After 5 days of pregnancy, expressions of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ and HOXA10 protein were detected by immunohistochemical method and western blot method. Reverse transcription polymerase chain reaction method (RT-PCR) was adopted to detect the expressions of HOXA10 and integrin $\alpha v \beta 3$ mRNA. **Results** Compared with those in the blank control group, the expressions of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ and HOXA10 protein, as well as HOXA10 protein and integrin $\alpha v \beta 3$ mRNA in the model group decreased ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the expressions of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ and HOXA10 protein, as well as HOXA10 protein and integrin $\alpha v \beta 3$ mRNA in the herb group increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Zhongzi Yulin Powder might improve the expressions of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ and HOXA10 protein and mRNA to improve pregnancy outcome, which might be one of the mechanisms in its treatment of infertility.

Keywords infertility; Zhongzi Yulin Powder; controlled superovulation; uterine receptivity; integrin; homeobox

(收稿日期: 2017-02-15; 修回日期: 2017-07-02)

编辑: 王利芬