

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.04.012

实验研究

两固汤加减对促排卵模型小鼠种植窗期
子宫内膜容受性的影响

图1 请扫描二维码获取

林佳静¹, 曾定元², 刘丽¹, 李晶晶¹✉

1. 广西医科大学第四附属医院, 广西壮族自治区柳州市鱼峰区柳石路1号, 545005; 2. 广西柳州市妇幼保健院

摘要 目的 探讨两固汤加减对促排卵模型小鼠种植窗期子宫内膜容受性的影响及可能作用机制。方法 144 只雌性 ICR 小鼠随机分为自然周期组、促排卵组、黄体酮组、两固汤加减组, 每组 36 只。促排卵组依据体重给予生理盐水 0.2 ml/10 g 灌胃, 黄体酮组给予黄体酮 0.4 mg/10 g 灌胃, 两固汤加减组给予两固汤加减 0.3 mg/10 g 灌胃, 每日 1 次, 连续 15 天。连续灌胃的后 9 天, 促排卵组、黄体酮组、两固汤加减组雌鼠采用孕马血清 + 醋酸曲普瑞林注射液法建立促排卵小鼠模型, 自然周期组雌鼠腹腔注射等体积生理盐水。最后一次注射后各组小鼠雌雄 2:1 合笼。合笼第 2 天早上观察雌鼠阴栓情况、胚胎着床数, 观察种植窗期孕鼠子宫内膜组织学变化特点, 测量子宫内膜螺旋动脉数量。分别于交配日后第 2、3、4、5、6、7 日处死小鼠各 6 只, 检测小鼠子宫内膜巨噬细胞炎症蛋白 1 β (MIP1 β)、CD244、子宫自然杀伤细胞 (uNK) 蛋白表达。结果 与自然周期组比较, 促排卵组交配日后第 2 天胚胎着床数显著减少, 交配日后第 4 天子宫内膜螺旋动脉数量减少 ($P < 0.05$)。与促排卵组比较, 黄体酮组及两固汤加减组小鼠胚胎着床数、子宫内膜螺旋动脉数数量增加 ($P < 0.05$)。第 4、5 天, 促排卵组 CD244、uNK 蛋白表达较自然周期组降低, 而黄体酮组和两固汤加减组较促排卵组升高, 且两固汤加减组在第 4 天高于黄体酮组和自然周期组 ($P < 0.05$)。结论 两固汤加减可改善促排卵模型小鼠种植窗期子宫内膜容受性, 促进胚胎着床, 其机制可能通过纠正子宫内膜 uNK、CD244 蛋白表达时序紊乱有关。

关键词 两固汤; 促排卵; 子宫内膜容受性; 黄体酮; 子宫内膜螺旋动脉; 子宫自然杀伤细胞

子宫内膜对胚胎的接受特性即子宫内膜容受性, 是妊娠建立的关键因素。在黄体期特定时间内子宫内膜组织在雌激素、孕激素的作用下发生动态改变, 发育为具有良好接受胚胎的容受能力, 此时期称为“种植窗”^[1]。子宫内膜容受性不良对胚胎着床不利, 临床表现为反复胚胎种植失败如不孕、生化妊娠等, 也是制约辅助生殖技术发展的瓶颈, 目前现代医学尚无统一治疗方案, 且存在诸多使用局限^[2-3]。中医学认为, “肾藏精, 主生殖” “脾为气血生化之源”^[4]。如果肾精亏损, 脾虚气血生化乏源, 精血不足, 则影响子宫摄精容物的功能。临床上我们应用首都国医名师郭志强经验方两固

汤^[5-6]加减, 取得了一定的疗效。本研究从子宫内膜局部微环境的角度, 探讨两固汤加减对子宫内膜容受性的影响及可能作用机制, 以期为辅助生殖医疗提高临床妊娠率提供有效方法。本研究经广西医科大学第四附属医院伦理委员会批准, 编号 k2013101。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性 ICR 小鼠 144 只, 8~10 周龄, 未孕, 体重 (20 ± 2) g; SPF 级雄性 ICR 小鼠 72 只, 8~12 周龄, 体重 (30 ± 2) g, 均由北京维通利华实验动物研究所提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0016。小鼠饲养在 SPF 级屏障环境动物实验室内, 温度为 (23 ± 3) °C, 湿度为 (55.5 ± 10) %。

基金项目: 国家自然科学基金 (81303137); 广西自然科学基金 (2012GXNSFBA053126)

✉ 通讯作者: 7407lijingjing@163.com

1.2 药物

两固汤加减由菟丝子 15 g、覆盆子 10 g、枸杞子 15 g、淫羊藿 10 g、党参 15 g、黄精 15 g、熟地黄 15 g、山药 15 g、巴戟天 10 g、补骨脂 15 g、续断 15 g、当归 15 g 组成, 中药饮片购于北京同仁堂医药有限公司。以上生药加 10 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 合并煎液, 过滤, 放置 24 h, 浓缩至药物浓度为 1.25 g/ml, 4℃ 冰箱保存, 依据药物与人体间等效剂量换算公式^[1] 计算小鼠给药量为 0.3 mg/10 g。黄体酮胶囊, 浙江仙琚制药股份有限公司生产, 50 mg/粒, 批号: 150722, 生理盐水配成浓度为 2 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂及仪器

巨噬细胞炎症蛋白 1 β (MIP1 β) 抗体 (批号 I1311)、CD244 抗体 (批号 I1108)、子宫自然杀伤细胞 (uNK) 抗体 (批号 I1196), Santa cruz 公司; 孕马血清 (PMSG, 宁波三生药业有限公司, 批号 C150801); 醋酸曲普瑞林注射液 (GnRHa, 成都天台山制药有限公司, 批号 170802-234); 注射用绒促性素 (HCG, 丽珠集团丽珠制药厂, 批号 170907-1); 牛血清白蛋白 V (Solarbio 公司, 批号 A8020); 无水乙醇 (批号 20151106)、二甲苯 (批号 20150326)、双氧水 (批号 20151115)、生理盐水 (批号 20160203)、苏木素染液 (批号 20141016)、伊红染液 (批号 20140326), 均为国药集团化学试剂有限公司产品; 乙酸 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 G1512005); EDTA 抗原修复液 (批号 20150908)、双氧水 (批号 20151115)、PBS (批号 20150908)、DAB 显色剂 (批号 20150908)、中性树胶封片剂 (批号 20151112), 均为北京中科万邦生物科技有限公司产品。

脱水机 (型号 JT-42S)、包埋机 (型号 JB-P7), 均为武汉俊杰电子有限公司产品; 病理切片机 (德国徕卡, 型号 RM2235); 组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, 型号 KD-P); 烤片机 (常州国华电器有限公司, 型号 DB-B2); 烤箱 [邦西仪器科技(上海)有限公司, 型号 101-1BS]; 倒置显微镜 (型号 IKON CI-S)、成像系统 (型号 NIKON DS-U3), 均为日本尼康公司产品。

1.4 造模方法^[2]

雌鼠阴道涂片为动情后期时给予腹腔内注射 GnRHa 2 μ g/100 g, 每日 1 次, 连续 9 天, 第 9 天同时给予腹腔内注射 PMSG 40 IU/100 g, 48 h 后腹腔内注射给予 HCG 100 IU/100 g。注射 HCG 后阴

道脱落细胞涂片, 可以见到大量无核角化细胞, 为促排卵小鼠模型造模成功^[3]。

1.5 动物分组及干预方法

给所有雌鼠编号为 1—144 号, 按阿拉伯数字顺序组成 4 列、36 行的拉丁方阵, 编码在同一列的雌鼠分在同一组。自然周期组、促排卵组、黄体酮组、两固汤加减组各 36 只雌鼠。自然周期组、促排卵组小鼠给予生理盐水 0.2 ml/10 g 灌胃, 黄体酮组给予黄体酮 0.4 mg/10 g 灌胃, 两固汤加减组给予两固汤加减 0.3 mg/10 g 灌胃, 每日 1 次, 连续 15 天。连续灌胃的后 9 天, 促排卵组、黄体酮组、两固汤加减组雌鼠建立促排卵小鼠模型, 自然周期组雌鼠腹腔注射等体积生理盐水。最后一次注射后各组小鼠雌雄 2:1 合笼。合笼第 2 天早上观察雌鼠阴栓情况, 有阴栓者为受孕。分别于交配日后第 2、3、4、5、6、7 天处死雌鼠各 6 只。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 小鼠阴栓数、胚胎着床数 交配日后第 2 天早晨 8:00 检测小鼠阴道栓, 记录阴栓数。处死小鼠后迅速取出子宫角并剖开, 记录着床胚胎数。

1.6.2 种植窗期小鼠子宫内膜形态学 交配日后第 4 天为种植窗期^[4], 剪开腹腔, 取出子宫, HE 染色法检测。石蜡切片烘箱中 65℃ 烤 1 h, 常规二甲苯脱蜡至水后, 流水冲洗 10 min, 苏木精染色 20 min, 流水充分冲洗, 5% 乙酸分化 1 min, 流水冲洗, 伊红染色 5 min, 流水冲洗 10 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯 1 min, 自然晾干后中性树胶封片。使用显微镜病理图文分析系统, 观察种植窗期小鼠子宫内膜组织学变化特点, 记录子宫内膜螺旋动脉数量。

1.6.3 小鼠子宫内膜 uNK、MIP1 β 、CD244 蛋白表达 采用免疫组化法检测, 于交配日后第 2、3、4、5、6、7 天各检测 1 次。取石蜡切片厚度为 4 μ m, 65℃ 烤箱 1 h, 脱蜡至水后进行抗原修复, 灭活内源性过氧化物酶, 阻断非特异性反应, 滴加适当比例用抗体稀释液稀释的一抗 (uNK 1:500, MIP1 β 1:200, CD244 1:500), 4℃ 过夜。取出孵育盒, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 滴加相应二抗 (浓度均为 1:1000) 进 37℃ 温箱 30 min, PBS 充分冲洗, DAB 显色剂显色, 光镜下观察, 蒸馏水充分冲洗, 苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明后, 中性树胶封片。使用显微镜成像系统以及 Meta morph/Cool snapfx/AX70 图像分析软件对 uNK、MIP1 β 、CD244 免疫组织化学染色切片进行

拍照及分析。每张切片在高倍视野下 ($\times 200$) 的子宫内膜层随机选取 3 个视野, 测量其灰度值, 取平均值。同时镜下 ($\times 200$) 观察种植窗期 (交配日后第 4 天) 各组小鼠子宫内膜 uNK、MIP1 β 、CD244 蛋白表达情况。

1.7 统计学方法

运用 SPSS 24.0 统计软件处理数据, 计量数据符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 S-N-K 法; 计数资料用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠交配日后第 2 天阴栓数及胚胎着床数比较

表 1 示, 各组小鼠阴栓数比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 7.90, P = 0.141$), 胚胎着床数比较差异有统计学意义 ($F = 13.08, P < 0.001$)。促排卵组胚胎着床数显著少于其余各组 ($P < 0.05$)。自然周期组、黄体酮组及两固汤加减组胚胎着床数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠交配日后第 2 天阴栓数及胚胎着床数比较

组别	鼠数	阴栓数/个	胚胎着床数/个, $\bar{x} \pm s$
自然周期组	6	5	11.50 $\pm$ 1.05 ^{a)}
促排卵组	6	3	6.83 $\pm$ 1.94
黄体酮组	6	6	11.17 $\pm$ 1.72 ^{a)}
两固汤加减组	6	6	11.83 $\pm$ 1.94 ^{a)}

注: a) 与促排卵组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠交配日后第 4 天子官内膜形态学比较

表 2 示, 交配日后第 4 天各组小鼠子宫螺旋动脉数量差异有统计学意义 ($F = 6.13, P = 0.004$)。促排卵组小鼠子宫螺旋动脉数量较自然周期组减少, 两固汤加减组、黄体酮组小鼠子宫螺旋动脉数量较促排卵组增加 ($P < 0.05$)。两固汤加减组、黄体酮组小鼠子宫螺旋动脉数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠交配日后第 4 天子官内膜螺旋动脉数量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	子宫螺旋动脉数量
自然周期组	6	19.67 $\pm$ 2.25 ^{a)}
促排卵组	6	13.81 $\pm$ 2.93
黄体酮组	6	19.73 $\pm$ 3.44 ^{a)}
两固汤加减组	6	19.87 $\pm$ 3.06 ^{a)}

注: a) 与促排卵组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠不同时间子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达比较

表 3 示, 各组内不同时间点整体比较: 自然周期组各时间点小鼠子宫内膜 MIP1 β 蛋白表达差异无统计学意义 ($F = 0.17, P = 0.967$), CD244、uNK 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 5.78, P = 0.006$; $F = 4.94, P = 0.011$)。促排卵组小鼠各时间点子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达差异均无统计学意义 ($F = 0.41, P = 0.834$; $F = 0.78, P = 0.580$; $F = 1.72, P = 0.205$)。黄体酮组各时间点子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达差异均无统计学意义 ($F = 1.92, P = 0.164$; $F = 2.89, P = 0.061$; $F = 1.72, P = 0.204$)。两固汤加减组各时间点小鼠子宫内膜 MIP1 β 蛋白表达差异无统计学意义 ($F = 3.08, P = 0.051$), CD244、uNK 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 9.69, P = 0.001$; $F = 17.86, P < 0.001$)。各组本组内不同时间点两两比较: 与本组第 4 天比较, 自然周期组第 2、3、6、7 天 CD244 蛋白表达降低, 第 2、7 天 uNK 蛋白表达亦降低 ($P < 0.05$); 促排卵组第 7 天 CD244 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 两固汤加减组第 2、3、5、6、7 天 CD244、uNK 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。各组内其余各时间点两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

同一时间各组间整体比较: 第 2 天各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达差异均无统计学意义 ($F = 0.69, P = 0.582$; $F = 1.53, P = 0.279$; $F = 1.54, P = 0.278$)。第 3 天各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 蛋白表达差异无统计学意义 ($F = 1.50, P = 0.287$), CD244、uNK 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 9.57, P = 0.005$; $F = 18.40, P = 0.001$)。第 4 天各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 蛋白表达差异无统计学意义 ($F = 3.79, P = 0.059$), uNK、CD244 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 4.84, P = 0.033$; $F = 12.83, P = 0.002$)。第 5 天各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 7.56, P = 0.01$; $F = 8.66, P = 0.007$; $F = 10.28, P = 0.004$)。第 6 天各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 、CD244 蛋白表达差异无统计学意义 ($F = 0.57, P = 0.651$; $F = 2.04, P = 0.187$), uNK 蛋白表达差异有统计学意义 ($F = 9.90, P = 0.005$)。第 7 天各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达差异无统计学意义 ($F = 2.25, P = 0.160$; $F = 3.76, P = 0.060$; $F =$

表 3 各组小鼠不同时间子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	MIP1 β	CD244	uNK
自然周期组	第 2 天	6	0.09 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.11 $\pm$ 0.02 ^{a)}
	第 3 天	6	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.12 $\pm$ 0.01
	第 4 天	6	0.09 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02
	第 5 天	6	0.09 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.02
	第 6 天	6	0.09 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.12 $\pm$ 0.01
	第 7 天	6	0.09 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.10 $\pm$ 0.03 ^{a)}
促排卵组	第 2 天	6	0.10 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02
	第 3 天	6	0.09 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.01 ^{b)}
	第 4 天	6	0.09 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.12 $\pm$ 0.03 ^{b)}
	第 5 天	6	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.11 $\pm$ 0.01 ^{b)}
	第 6 天	6	0.08 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02
	第 7 天	6	0.09 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.11 $\pm$ 0.01
黄体酮组	第 2 天	6	0.09 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02
	第 3 天	6	0.11 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.15 $\pm$ 0.01 ^{b) c)}
	第 4 天	6	0.10 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.06 ^{c)}	0.18 $\pm$ 0.02 ^{c)}
	第 5 天	6	0.12 $\pm$ 0.03 ^{c)}	0.12 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.16 $\pm$ 0.03 ^{c)}
	第 6 天	6	0.10 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02
	第 7 天	6	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03
两固汤加减组	第 2 天	6	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.14 $\pm$ 0.01 ^{a)}
	第 3 天	6	0.11 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01 ^{a) c)}	0.17 $\pm$ 0.01 ^{a) b) c)}
	第 4 天	6	0.12 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.23 $\pm$ 0.02 ^{b) c) d)}
	第 5 天	6	0.12 $\pm$ 0.01 ^{c)}	0.14 $\pm$ 0.02 ^{a) c)}	0.19 $\pm$ 0.01 ^{a) b) c)}
	第 6 天	6	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.18 $\pm$ 0.01 ^{a) b) c) d)}
	第 7 天	6	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.12 $\pm$ 0.03 ^{a)}

注: MIP1 β , 巨噬细胞炎症蛋白 1 β ; uNK, 子宫自然杀伤细胞。

a) 与本组第 4 天比较, $P < 0.05$; b) 与自然周期组同时时间比较, $P < 0.05$; c) 与促排卵组同时时间比较, $P < 0.05$; d) 与黄体酮组同时时间比较, $P < 0.05$ 。

1.42, $P = 0.306$)。同一时间各组间两两比较: 第 3 天, 与自然周期组比较, 促排卵组、黄体酮组和两固汤加减组 uNK 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与促排卵组比较, 黄体酮组和两固汤加减组 CD244、uNK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。第 4 天, 促排卵组 CD244、uNK 蛋白表达较自然周期组降低, 而黄体酮组和两固汤加减组较促排卵组升高, 且两固汤加减组 uNK 蛋白高于黄体酮组和自然周期组 ($P < 0.05$)。第 5 天, 促排卵组 CD244、uNK 蛋白表达较自然周期组降低, 而黄体酮组和两固汤加减组 MIP1 β 、CD244、uNK 蛋白表达较促排卵组升高, 且两固汤加减组 uNK 蛋白表达高于自然周期组 ($P < 0.05$)。第 6 天, 两固汤加减组 uNK 蛋白表达高于自然周期组、促排卵组和黄体酮组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠交配日后第 4 天子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 镜下表达情况

自然周期组 uNK 在血管内皮细胞、子宫内膜腺上皮细胞以及间质细胞的胞浆中均广泛表达; CD244 表达特点与 uNK 相似, 但稍弱; MIP1 β 主

要在子宫内膜腺上皮细胞胞浆中表达, 间质细胞以及血管内皮细胞的胞浆中有少许表达。促排卵组 uNK 在子宫内膜腺上皮细胞胞浆中表达稍减弱, 血管内皮细胞、间质细胞的胞浆中均表达减弱, 部分子宫内膜间质细胞胞浆中未表达; CD244 表达变化与 uNK 相似; 促排卵组 MIP1 β 表达与自然周期组类似, 变化不大。黄体酮组 uNK、CD244、MIP1 β 表达变化主要为子宫内膜间质细胞的胞浆中, 较促排卵组增强, 在子宫内膜腺上皮细胞胞浆中表达变化不大。两固汤加减组 uNK、CD244、MIP1 β 表达变化主要为子宫内膜腺上皮细胞胞浆, 均较促排卵组显著增强, 在间质中表达变化不大。各组小鼠交配日后第 4 天子宫内膜 MIP1 β 、CD244、uNK 镜下表达见图 1 (图片请扫描文中二维码获取)。

3 讨论

尽管生殖医学在最近几十年以来取得了很大的进展, 但胚胎植入失败率高的问题始终无法有效解决^[1], 子宫内膜容受性不良已被公认为胚胎着床失败的主要原因^[2]。种植窗期子宫内膜容受性不

良的女性可以表现为月经过少, 超声排卵期子宫内膜菲薄或内膜血流缺失, 也可仅为反复胚胎种植失败而无其他临床表现^[3]。不孕症女性在接受辅助生殖技术如体外受精-胚胎移植术时往往需要接受促排卵治疗。促排卵治疗的药物如克罗米芬等在促排卵同时, 也对子宫内膜有抑制作用^[4-15]。因此, 高效促排卵方案带来反应迟钝的子宫内膜和反复胚胎种植失败的问题仍然是辅助生殖领域的一个挑战。

子宫内膜容受性不良在中医学属于“无子”“断绪”“续断”等范畴。临床以脾肾阳虚、精血亏损多见。《景岳全书·妇人规》中提到“女子以血为主, 血旺则经调而子嗣”“补脾胃以资血之源, 养肾气以安血之室”。中医理论认为, 脾、肾既是经血之源, 又是安胎养胎之本。除精血充旺之外, 受孕的条件还需要阳气充盛以助生发。种植窗处于女性黄体期, 经过排卵期的阴阳转化、重阴及阳, 黄体期为阳长之期, 阳气鼓动, 万物生发, 为受孕提供孕育胎儿的必要环境。但现代女性往往冬日保暖不够, 或夏日贪凉, 易损伤阳气, 导致机体阴阳失调; 加上既往多次宫腔手术操作史、情绪紧张、工作生活压力大等因素, 易致肾虚、脾虚、阴血耗损, 加重冲任、胞宫损伤。我们在种植窗期采用郭志强教授黄体期常用的经验方两固汤加减口服, 方中菟丝子、覆盆子、枸杞子三味药为平补阳气之品; 熟地黄、山药、黄精专于滋补脾肾之阴, 兼具补气补脾之效; 淫羊藿、补骨脂、巴戟天为温肾阳之药, 以助阳生的生长; 续断温补肝肾, 调理冲任; 当归补血活血, 黄芪健脾益气。诸药合用, 治以温补脾肾、养血固冲, 使阴阳调和、阴阳俱盛, 为孕卵种植做好充分准备。Linden 等^[6]系统综述认为, 黄体酮是黄体期支持最好的选择, 能有效改善胚胎种植率和妊娠率。孕激素在人类妊娠的建立过程中, 具有很强的免疫调节作用^[7]。因此, 本研究选用黄体酮为阳性对照组探讨两固汤加减在子宫内膜容受性建立中的作用及机制。本实验结果显示, 促排卵药物处理后, 小鼠子宫内膜螺旋动脉数、胚胎着床数均显著降低; 而黄体酮组和两固汤加减组小鼠子宫内膜螺旋动脉数、胚胎着床数与自然周期组相似, 均显著高于促排卵组; 且两固汤加减组在增加子宫内膜螺旋动脉数、胚胎着床数方面优于黄体酮。以上结果说明两固汤加减治疗可改善子宫内膜容受性, 促进胚胎着床。

妊娠过程类似于器官移植, 母体免疫细胞识别并耐受胚胎抗原, 源于单核细胞的白细胞、uNK 占分泌期子宫内膜细胞总数的 20% ~ 40%, 在子

宫内膜容受性建立过程中至关重要^[8]。在植入窗口期大量的 uNK 细胞聚集在胎盘部位的蜕膜处与侵入的滋养层细胞密切接触并分泌多种细胞因子影响滋养细胞的生长、受精卵的着床、胎盘血管的形成和调节胚胎生长发育, 为种植成功营造适宜的内膜微环境^[9]。uNK 在维持循环子宫内膜的稳态方面起着至关重要的作用^[9]。MIP1 β 在窗口期子宫内膜中的首要作用是趋化妊娠相关白细胞的迁移和活化, 其主要受体为趋化因子受体, 是 uNK 细胞非常重要的趋化剂和激活剂^[20]。另有研究^[21]发现, CD244 是一种跨膜蛋白, uNK 细胞上 CD244 分子与其配体的相互作用, 能抑制自然杀伤细胞的细胞毒作用和细胞因子干扰素- γ 的分泌。

本研究结果显示, 促排卵组小鼠子宫内膜在交配后 uNK、CD244 表达失去规律, 提示促排卵干预对子宫内膜容受性存在一定影响。各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 表达部位与 uNK、CD244 略有不同, 前者主要表达于子宫内膜腺上皮细胞胞浆中, 后者在血管内皮细胞、子宫内膜腺上皮细胞以及间质细胞的胞浆中均有表达。在不同时间点检测, 各组小鼠子宫内膜 MIP1 β 的表达无明显时间变化规律, uNK、CD244 表达有明显时间规律性且相似, 除促排卵组外, 均为交配后第 4 天水平达峰值, 再次证明种植窗期为交配日后第 4 天。与自然周期组比较, 促排卵组小鼠子宫内膜 uNK、CD244 表达在第 3、4、5 天有不同程度降低。而给予黄体酮和两固汤加减后, 在第 3、4、5 天小鼠子宫内膜 MIP1 β 、uNK、CD244 蛋白表达有不同程度升高, 且以两固汤加减组最为明显。说明两固汤加减及黄体酮均可恢复促排卵处理后小鼠子宫内膜 uNK、CD244 表达时序, 且两固汤加减在第 4、6 天改善 uNK 蛋白表达方面优于黄体酮。

综上所述, 两固汤加减可改善促排卵处理后小鼠胚胎着床, 其机制可能通过纠正子宫内膜 uNK、CD244 表达时序紊乱, 从而改善小鼠子宫内膜容受性。下一步我们将进行细胞实验验证以上结果, 并增加安全性及最佳有效剂量的研究。

参考文献

- [1] KARIZBODAGH MP, RASHIDI B, SAHEBKAR A, et al. Implantation window and angiogenesis [J]. J Cel Biochem, 2017, 118(12): 4141-4151.
- [2] 张新宇, 王丽娜, 李蓉, 等. 反复胚胎种植失败母体因素分析及治疗 [J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(9): 1098-1102.
- [3] SMITH MB, PAULSON RJ. Endometrial preparation for

- third-party parenting and cryopreserved embryo transfer [J]. Fertil Steril, 2019, 111(4): 641–649.
- [4] 傅山. 傅青主女科 [M]. 上海: 人民出版社, 1978: 30.
- [5] 张帆, 王必勤, 韩琳, 等. 郭志强崇阳学术观点在妇科疾病中的应用 [J]. 中医杂志, 2019, 60(8): 644–647.
- [6] 郑婧, 邱慧芳, 丁霞, 等. 郭志强顾护阳气调经用药经验 [J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 201–203.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [8] RUAN HC, ZHU XM, LUO Q, et al. Ovarian stimulation with GnRH agonist, but not GnRH antagonist, partially restores the expression of endometrial integrin beta3 and leukemia-inhibitory factor and improves uterine receptivity in mice [J]. Hum Reprod, 2006, 21(10): 2521–2529.
- [9] 高星, 杜惠兰, 田茜华, 等. 补肾法、疏肝法对超促排卵大鼠子宫内膜组织形态及血管生成的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(9): 782–787.
- [10] DIETRICH JE, HIRAGI T. Stochastic patterning in the mouse preimplantation embryo [J]. Development, 2007, 134(23): 4219–4231.
- [11] CHA J, SUN X, DEY SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy [J]. Nat Med, 2012, 18(12): 1754–1767.
- [12] CAKMAK H, TAYLOR HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment [J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(2): 242–253.
- [13] 鲁秋丹, 林佳静, 金哲, 等. 月经过少与子宫内膜血流的相关性 [J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2): 152–153.
- [14] BAO SH, SHENG SL, PENG YF, et al. Effects of letrozole and clomiphene citrate on the expression of HOXA10 and integrin alpha v beta 3 in uterine epithelium of rats [J]. Fertil Steril, 2009, 91(1): 244–248.
- [15] Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG practice bulletin No. 194: polycystic ovary syndrome [J]. Obstet Gynecol, 2018, 131(6): e157–e171.
- [16] VAN DER LINDEN M, BUCKINGHAM K, FARQUHAR C, et al. Luteal phase support for assisted reproduction cycles [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 5(10): CD009154.
- [17] STRAUSS JF, BARBIERI RL. Yen & Jaffe's 生殖内分泌学 [M]. 7 版. 乔杰, 主译. 北京: 科学出版社, 2019: 216–218.
- [18] ANNE CROY B, VAN DEN HEUVEL MJ, BORZYCHOWSKI AM, et al. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones [J]. Immunol Rev, 2006, 214: 161–185. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00447.x.
- [19] BRIGHTON PJ, MARUYAMA Y, FISHWICK K, et al. Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium [J]. Elife, 2017, 6: e31274. doi: 10.7554/eLife.31274.
- [20] KITAYA K, NAKAYAMA T, OKUBO T, et al. Expression of macrophage inflammatory protein-1-beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(4): 1809–1814.
- [21] SZEKERES-BRTHO J. Regulation of NK cell cytotoxicity during pregnancy [J]. Reprod Biomed Online, 2008, 16(2): 211–217.

Effect of Modified *Lianggu Decoction* (两固汤加减) on Endometrial Receptivity during the Implantation Window of Ovulation Induction Model Mice

LIN Jiajing¹, ZENG Dingyuan², LIU Li¹, LI Jingjing¹

1. The Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, 545005; 2. Liuzhou Maternity and Child Healthcare Hospital

ABSTRACT Objective To explore the effect of Modified *Lianggu Decoction* (两固汤加减) on endometrial receptivity during the implantation window of ovulation induction model mice, and the underlying mechanism. **Methods** Totally 144 female ICR mice were randomly divided into natural cycle group, ovulation induction group, progesterone group, and Modified *Lianggu Decoction* group, with 36 mice in each group. Normal saline 0.2 ml/10 g (body weight), progesterone 0.4 mg/10 g, and Modified *Lianggu Decoction* 0.3 mg/10 g were administered by gavage, once daily, for 15 days in ovulation induction group, progesterone group and Modified *Lianggu Decoction* group, respectively. After nine days of gavage, pregnant mare serum and triptorelin acetate injections were used to establish a model of ovulation induction in female mice of ovulation induction group, progesterone group and Modified *Lianggu Decoction* group, while equal volume of normal saline was injected in natural cycle group. After last injection, female and male mice at a ratio of 2 : 1 were caged in each group. The vaginal plug, number of embryo implantation, histological changes of the endometrium during implantation window, and the number of spiral arteries in the endometrium were assessed on the next morning. Mice were sacrificed after mating day, with six mice per day since the 2nd day. The expression of macrophage inflammatory protein 1β (MIP1β), CD244, and uterine natural killer cell (uNK) protein were detected. **Results** The number of embryo implantation in ovulation induction group significantly decreased

on the 2nd day after the mating day, while the number of spiral arteries in the endometrium decreased on the 4th day compared to natural cycle group ($P < 0.05$). Compared to ovulation induction group, there were significantly larger numbers of embryo implantation and spiral arteries in the endometrium in progesterone group and Modified *Lianggu Decoction* group ($P < 0.05$). The expression of CD244 and uNK protein significantly decreased on the 4th and 5th day in ovulation induction group compared to the natural cycle group, and were elevated in progesterone group and Modified *Lianggu Decoction* group compared to the ovulation induction group ($P < 0.05$). Modified *Lianggu Decoction* group had the highest expression of CD244 and uNK protein on the 4th day compared to progesterone group and natural cycle group ($P < 0.05$). **Conclusion** Modified *Lianggu Decoction* may improve the endometrial receptivity during implantation window and promote embryo implantation of ovulation induction model rats, by regulating the disorder of uNK and CD244 protein expression.

Keywords modified *Lianggu Decoction* (两固汤加减); induction of ovulation; endometrial receptivity; progesterone; endometrial spiral artery; uterine natural killer cells

(收稿日期: 2020-03-13; 修回日期: 2020-05-21)

编辑: 邓 媛

读者·作者·编者

如何正确引用网络文献

正确引用的参考文献是学术论文的重要组成部分,除传统的印刷版文献外,参考文献还包括了大量的网络文献。常见的网络文献资源包括电子公告 (EB/OL)、电子图书 (M/OL)、电子期刊 (J/OL)、报纸 (N/OL)、数据库 (DB/OL)、专利文献 (P/OL) 等。根据《GB/T 7714—2015 信息与文献 参考文献著录规则》,不同文献类型有相应的著录格式。以下为电子资源著录格式。

著录格式

主要责任者. 题名: 其他题名信息 [文献类型标识/文献载体标识]. 出版地: 出版者, 出版年: 引文页码 (更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径. 数字对象唯一标识符.

著录格式示例

- [1] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知 [EB/OL]. (2020-03-03) [2020-03-17]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03-04/content_5486705.htm.
- [2] 仝小林, 李修洋, 赵林华, 等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的中医药防治策略 [J/OL]. 中医杂志. (2020-02-19) [2020-02-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200217.2034.006.html>.
- [3] 罗兰. “国医大师”王琦院士开的预防药方来了 [N/OL]. 长江日报. (2020-01-29) [2020-05-12]. <http://www.cjrbapp.cjn.cn/wuhan/p/154889.html>.

稿件中数字的用法

稿件中用于表示数量的数字一般应使用阿拉伯数字。在表示数值的范围时,可采用浪纹式连接号“~”或连接号“-”。前后两个数值的附加符号或计量单位相同时,在不造成歧义的情况下,前一个数值的附加符号或计量单位可省略。如果省略数值的附加符号或计量单位会造成歧义,则不应省略。如: 100~150 kg, 2 亿~3 亿 (不能写为 2~3 亿)、15%~30% (不写为 15~30%)、 $4.5 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^4$ (不能写为 $4.5 \sim 5.5 \times 10^4$)。

在某些特定情况下应使用汉字数字。干支纪年、农历月日、历史朝代纪年及其他传统上采用汉字形式的非公历纪年等,应采用汉字数字,如丙寅年三月十五日,正月初八,清咸丰十年九月二十日,日本庆应三年。数字连用表示的概数、含“几”的概数应采用汉字数字,如三四个月,四十五六岁,二十几,几万分之一。数字作为词素构成定型词、词组、惯用语、缩略语或具有修辞色彩的词句,应使用汉字,如一氧化碳,“十一五”规划,十二指肠等。

(本刊编辑部)