

助孕汤对育龄期妇女子宫内膜容受性的影响

丁彩飞 郑若姮 张永华 杨欣 孙中明 杜静

(浙江省中西医结合医院生殖医学科, 杭州市环城东路 208 号, 310003)

[摘要] **目的** 观察助孕汤对育龄期妇女子宫内膜容受性的影响。**方法** 将育龄期妇女 90 例, 随机分为自然周期组、西药组(克罗米芬+绒毛膜促性腺激素)、中药组(助孕汤)和中西药结合组。随访 3 个月, 统计妊娠率, 超声观察子宫内膜厚度和类型, 逆转录 PCR 和免疫组化分别检测子宫内膜雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、整合素 β mRNA 和蛋白水平。**结果** 与自然周期组比较, 中西药结合组、中药组妊娠率有所上升, 而西药组有所下降, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与自然周期组和中西药结合组比较, 子宫内膜厚度、ER、PR mRNA 和蛋白水平在西药组显著下降而在中药组则显著上升($P < 0.05$)。**结论** 助孕汤可能通过调节子宫内膜厚度、增加子宫内膜 ER、PR、整合素 β mRNA 和蛋白水平来改善妊娠率, 并能拮抗克罗米芬降低子宫内膜容受性的副作用。**[关键词]** 助孕汤; 子宫内膜容受性; 雌激素受体; 孕激素受体; 整合素 β

Effect of Zhuyun Decoction on the Endometrial Receptivity of Women of Childbearing Age

DING Caifei, ZHENG Ruoheng, ZHANG Yonghua, et al.

(Zhejiang Province Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Hangzhou 310003)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Zhuyun Decoction (Decoction to promote conception) on the endometrial receptivity of women of childbearing age. **Methods** Totally 90 women of childbearing age were randomized into 4 groups: normal period group (control), western drug group (clomiphene + human chorionic gonadotrophin), integrated Chinese and western medicine group, traditional Chinese medicine group (Zhuyun Decoction). After the 3-month follow-up, the pregnancy rate was recorded, the thickness and type of endometrium was measured by ultrasound examination, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), integrin β mRNA and protein levels were determined by reverse transcription PCR and immunohistochemistry method respectively. **Results** Compared with the normal period group, the pregnancy rate of the integrated Chinese and western medicine group and traditional Chinese medicine group was increased while that of the western drug group decreased, without significant difference. Compared with the normal period group and integrated Chinese and western medicine group, the thickness of endometrium and ER, PR, β mRNA and protein levels in the western drug group significantly decreased while those of the traditional Chinese medicine group significantly increased. **Conclusion** Zhuyun Decoction can promote the pregnancy rate by increasing the thickness of endometrium and ER, PR, β mRNA and protein levels, and antagonize the endometrium impairment caused by clomiphene as well.

Key Words Zhuyun Decoction (Decoction to promote conception); Endometrial receptivity; Estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR), Integrin β

不孕症的发病率已占育龄妇女的 15%, 成为仅次于心血管疾病和肿瘤的第三大疾病^[1]。随着人工助孕技术(IVF-ET)的发展, 临床上已经能应用促排卵药物取得较多的卵泡发育和较高的排卵率, 但促排卵后的妊娠率较低(20%~30%)仍是未能解决的问题。一方面, 这与促排卵后卵细胞的质量密切相关; 另一方面, 胚着床障碍起到主导作用, 而子宫内膜容受性差又是后者的主要原因之一^[2]。因此, 改善子宫内膜容受性, 提高着床率是提高人工助孕技术成功率的关键。

助孕汤系全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师鲍严钟所创制的有效复方。我们在临床中观察

发现, 助孕汤单独应用或配合克罗米芬可以显著改善卵泡发育, 诱导排卵, 提高着床率, 但机理不明。为探讨助孕汤对胚着床的影响, 本研究通过观察并比较患者的子宫内膜厚度、大体形态、雌孕激素受体和整合素 β 表达的变化, 进一步研究助孕汤对育龄期妇女子宫内膜容受性的影响, 以探讨其分子作用机制。

1 临床资料

选择 2004 年 12 月~2007 年 6 月因男性不育欲行人工授精而就诊于本院生殖中心的妇女 90 例, 年龄 24~36 岁, 不育史 1.5~6 年, 其中原发不育 63 例, 继发不育 27 例。纳入标准: ① 40 岁以下育龄妇女, 婚后有正常性生活, 未避孕同居 1 年未能受孕, 或曾有妊娠史而又 1 年未能再孕, 经检查诊断为男方不育而行人工授精者; ② 月经周期正常, 基础体温双相; ③ 基础内分泌

正常;④近 3 个月未服用激素治疗;⑤B 超检查示子宫、卵巢无器质性病变;⑥经输卵管造影证实双侧输卵管通畅;⑦排除免疫性不孕。入选病例双盲随机分为 4 组:自然周期组 30 例,西药组 20 例,中西药结合组 20 例,中药组 20 例。各组间年龄、身高、体重差异无统计学意义($P>0.05$)。

本研究经过本院医学伦理委员会批准。

2 方法

2.1 治疗方法

西药组给予克罗米芬(上海衡山药业有限公司生产,批号 A 0101)(CC)+绒毛膜促性腺激素(HCG):月经周期第 5 天起口服 CC^{100mg},共 5 天,当优势卵泡直径 $\geq 1.8\text{cm}$ 时,肌肉注射 HCG^{10000U}。中西药结合组给予克罗米芬+绒毛膜促性腺激素+助孕汤:月经周期第 5 天起西药同上组,加服助孕汤(组成:当归、黄芪、鹿角片、淫羊藿、巴戟天、葫芦巴、补骨脂、菟丝子、丹参等,由浙江中医学院提供道地药材,最终制成含 2g/ml 助孕汤提取液),每次 50ml,每日 2 次口服,至排卵后 10 天。中药组给予助孕汤:月经周期第 5 天起,服助孕汤,服法同上。自然周期组不给任何药物。因本实验中取子宫内膜是有创性检查,所以各组均为 1 个疗程(即 1 个月经周期)。

2.2 检查方法及观察指标

2.2.1 观察子宫内膜厚度、形态 自排卵日算起第 7 天,采用东芝 SAL-77A 型阴道超声(TVS),探头频率为 5.0MHz,距宫底 2.0cm 测量冠状面子宫内膜厚度(前后壁内膜与子宫肌层交界处强回声内膜厚度)。子宫内膜形态按 Gonon 等的标准^[3]分为 A 型:典型三线型或多层子宫内膜,外层和中央为强回声线,外层和宫腔中线之间为低回声区或暗区;B 型:均一的中等回声型,宫腔强回声中线断续不清;C 型:均质型回声,无宫腔中线回声。

2.2.2 逆转录 PCR 检测子宫内膜雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、整合素 β mRNA 水平 自排卵日算起第 7 天,采用 Trizol 法提取子宫内膜总 mRNA,在核酸分析仪上检测 RNA 的含量并常规行琼脂糖电泳检测 RNA 是否降解。按照逆转录试剂盒提供的实验步骤反转录 mRNA 成 cDNA。Trizol RNA 抽提试剂、逆转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶及缓冲液、MLV 逆转录酶及缓冲液、dNTPs、OligodT₁₈、RNase 抑制剂等均购自大连宝生物工程有限公司。PCR 引物使用 prierpremier 5.0 软件设计后由上海英骏生物技术有限公司合成序列如下 (a) ER:上游: 5'-ATGGAGTCTCGCTCTCTGACGC-3';下游: 5'-GCTGTTCTTCTTAGACGCTTTGA-3' (326bp);

(b) PR:上游: 5'-TTCCAAATGAAAGCCAAGCC-3';下游: 5'-AAGTTGATAGAAACGCTGTGAGC-3' (635bp); (c); 整合素 β :上游: 5'-GCAAGATCACGGGCAAGTAC-3';下游: 5'-AGGACCACCAGGATGTCAGG-3' (550bp)。用 VDS 图像分析系统分析,以 ER、PR、整合素 β 的吸光度与 β actin(看家基因,PCR 常规引物扩增)吸光度的比值,表示相应物质 mRNA 的表达水平。

2.2.3 免疫组化法测子宫内膜 ER、PR、整合素 β 蛋白水平 在排卵后 7~8 天用 Pipette 管吸取子宫内膜组织,常规石蜡包埋切片后采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法进行检测。单克隆鼠抗人 ER、PR 和整合素 β 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。根据试剂说明将 SP 染色切片置于 Olympus CHK 显微镜 400 倍下观察,选择 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,分别读出其中阴性(-)即细胞核内无棕色颗粒;弱阳性(+)即细胞核内有较浅的棕色颗粒;阳性(++)即细胞核内有棕色颗粒清晰;强阳性(+++)即细胞核内有明显棕色颗粒的细胞数。再用组织学积分 H-score 方法进行半定量分析(三位对标本分类未知的临床医生进行)。计算公式: $H\text{-score} = \sum p_i(i+1)$ 。其中 P_i 代表同一染色强度的阳性细胞数占待测细胞总数的百分比,即 $P_i = \text{阳性细胞数} / \text{待测细胞总数} \times 100\%$ 。i 为染色强度,用 1、2、3 分别代表(+)、(++)、(+++)。1 为纠正系数。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 进行统计分析,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较用方差检验,两组间比较用 t 检验;计数资料的组间比较采用卡方检验。

3 结果

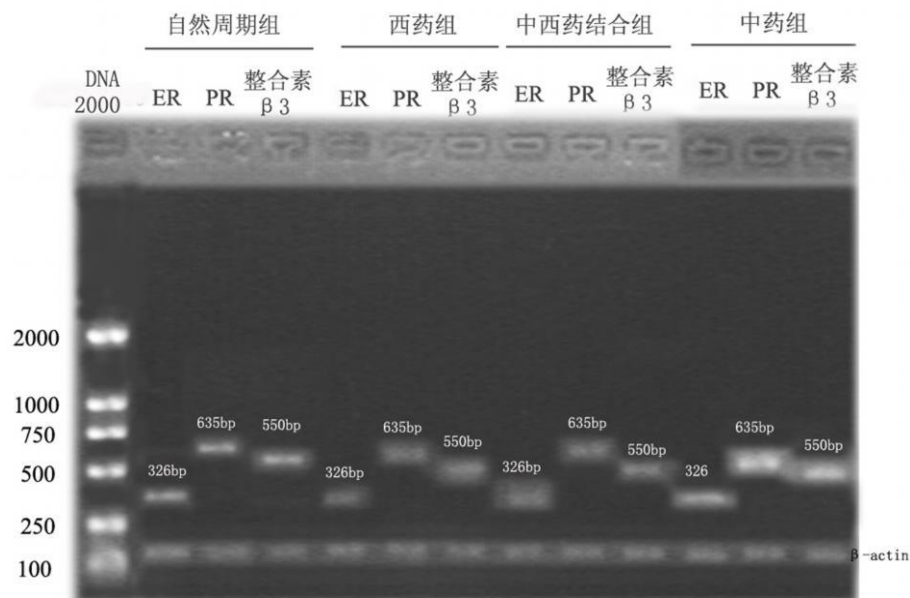
3.1 各组患者当月妊娠率和子宫内膜厚度、类型比较

表 1 4 组患者妊娠率和子宫内膜厚度、类型比较

组别	例数	妊娠数 [例(%)]	内膜厚度 ($\bar{x} \pm s$)	内膜类型(例)		
				A 型	B 型	C 型
自然周期组	30	3(10)	0.9 $\pm$ 0.21	21	8	1
西药组	20	1(5)	0.7 $\pm$ 0.19*	4	7	9
中西药结合组	20	4(20)	0.9 $\pm$ 0.17 Δ	6	11	3
中药组	20	3(15)	1.0 $\pm$ 0.14 Δ	15	5	0

注:与自然周期组比较,* $P<0.05$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$

表 1 示,与自然周期组比较,西药组患者的妊娠率下降最明显,而中西医结合组则升高幅度最大;同时,西药组患者的子宫内膜厚度比自然周期组也有显著性下降($P<0.05$),而中药组、中西医结合组与自然周期组比较差异无统计学意义,但比西药组有显著性升高



附图 各组ER、PR 及整合素 β mRNA 电泳图片

($P<0.05$)。此外,内膜类型除西药组以C型为主外,其他3组均以A、B型为主。

3.2 各患者子宫内膜ER、PR、整合素 β mRNA 水平比较

经1%琼脂糖凝胶电泳分析,ER mRNA、PR mRNA、整合素 β mRNA、 β actin mRNA 的扩增产物和理论长度一致。附图及表2示,与自然周期组比较,西药组患者子宫内膜ER、PR mRNA 水平显著下降($P<0.05$),而整合素 β mRNA 无明显差异;而中西药结合组与自然周期组比较差异无统计学意义,但比西药组有显著性升高($P<0.05$)。对中药组而言,其ER、PR 及整合素 β mRNA 水平比自然周期组亦有显著性增高($P<0.05$)。

表2 4组患者子宫内膜ER、PR、整合素 β mRNA 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	ER/ β actin	PR/ β actin	整合素 β / β actin
自然周期组	30	1.23 $\pm$ 0.02	1.33 $\pm$ 0.06	1.19 $\pm$ 0.04
西药组	20	0.92 $\pm$ 0.07*	0.89 $\pm$ 0.10*	1.12 $\pm$ 0.12
中西药结合组	20	1.19 $\pm$ 0.11 Δ	1.35 $\pm$ 0.08 Δ	1.21 $\pm$ 0.09
中药组	20	1.51 $\pm$ 0.09*	1.67 $\pm$ 0.12*	1.53 $\pm$ 0.13*

注:与自然周期组比较,* $P<0.05$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$

3.3 各组患者子宫内膜ER、PR、整合素 β 蛋白水平比较

ER、PR 及整合素 β 阳性效应产物呈棕黄色颗粒,前两者主要分布于腺体细胞核而整合素 β 则主要定位于腺体细胞膜和胞浆中。表3示,由H-score方法进行半定量分析可知:与自然周期组比较,西药组患者子宫内膜ER、PR 蛋白水平显著下降($P<0.05$),而整

合素 β 蛋白水平无明显差异;而中西药结合组与自然周期组比较差异无统计学意义,但比西药组有显著性升高($P<0.05$)。对中药组而言,其ER、PR 及整合素 β 蛋白水平比自然周期组亦有显著性增高($P<0.05$)。

表3 4组患者子宫内膜ER、PR、整合素 β 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	ER	PR	整合素 β
自然周期组	30	0.89 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.04	1.13 $\pm$ 0.11
西药组	20	0.67 $\pm$ 0.03*	0.59 $\pm$ 0.01*	1.09 $\pm$ 0.07
中西药结合组	20	0.91 $\pm$ 0.02 Δ	0.75 $\pm$ 0.03 Δ	1.15 $\pm$ 0.05
中药组	20	1.34 $\pm$ 0.08*	1.29 $\pm$ 0.08*	1.67 $\pm$ 0.19*

注:与自然周期组比较,* $P<0.05$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$

4 讨论

胚泡着床是其与子宫内膜相互作用的过程,而后者只有在特定的时期(即“种植窗”)内才允许胚泡着床,因而子宫内膜容受性是影响胚胎着床的主要因素之一^[4]。最近的研究还提示,子宫内膜雌孕激素受体及整合素 β 的表达也影响了子宫内膜容受性^[5]。当前对于排卵障碍性不孕不育,国内外较多采用克罗米芬及性激素治疗,但此类药物在受体水平上阻断了雌激素作用,导致子宫内膜DNA合成受阻,使得内膜发育迟缓,呈现高排卵率、低妊娠率的特点^[6,7]。本研究发现,使用西药组患者的妊娠率为5%,比自然周期组10%要低,而使用中西药结合组和中药组的妊娠率分别上升到20%和15%。由于样本量有限并且妊娠率的统计是在实验结束后3个月后进行,因而本次实验的妊娠率偏低且组间的差异只是一种趋势,在进行卡方检验时差异无统计学意义。此外,子宫内膜类型当呈现典型

“三线征”即 A 型时,其处在最佳的容受状态,而 B 型、C 型的子宫容受性则依次递减。结果表明,子宫内膜形态学的阳性结果从形态学的角度提示助孕汤能改善子宫内膜容受性,拮抗克罗米芬等促排卵药对子宫内膜造成的损害。

除了上述的形态学指标,我们还从 mRNA 和蛋白水平揭示了子宫内膜 ER、PR、整合素 β 在其中的作用。雌孕激素的生理效应有赖于 ER、PR 的介导,因而后者表达失常均将导致着床失败^[8];既往研究显示,内膜异常组 ER 显著低于正常组,提示 ER 异常在影响子宫内膜容受性中的作用^[9]。我们的研究也证实,与自然周期组相比,助孕汤能显著增加 ER、PR mRNA 和蛋白的表达水平并且拮抗克罗米芬等促排卵药所导致的 ER、PR 表达下降。整合素 β 是一类细胞黏附分子,由 α β 两亚单位以非共价键形式连成异二聚体分子构成^[10]。它可作为子宫内膜容受性的标志分子,其表达受到激素、细胞因子、胚胎因素等多种信号的调节,并且通过识别配体发挥作用^[11]。本研究发现与自然周期组比较,西药组患者整合素 β mRNA 和蛋白水平无显著性降低,这与 Gonzalez 等观察到的克罗米芬对不明原因不孕患者种植窗口期的整合素 β 表达无影响相一致^[12]。但中药组患者整合素 β mRNA 和蛋白水平与自然周期组比较有显著性增高。ER、PR、整合素 β 的阳性结果提示助孕汤可能通过作用于这些分子,一方面拮抗克罗米芬等促排卵药导致子宫内膜容受性降低的副作用,另一方面自身就具有提高子宫内膜容受性进而增加妊娠率的作用。

助孕汤的主要作用是补肾温阳,养血活血。中医学认为肾主生殖,主藏精;肾精之血,冲任直接参与生育的生理活动,补肾养血药调节肾—天癸—冲任—胞宫轴。方中淫羊藿、葫芦巴温肾助阳,调节冲任,促进性腺功能,提高卵巢、子宫重量及垂体重量增加;鹿角片温阳暖宫,促使卵泡发育,改善黄体功能;何首乌、当归、熟地黄补肾养血,可抑制血管内血栓形成;丹参活血,具有使子宫内膜螺旋动脉变粗、变长、增加子宫内膜血流灌注量大,使得内膜增厚,为受精卵着床做好准备^[13]。

综上所述,本实验再次证实了克罗米芬能降低子宫内膜厚度、减少 ER、PR mRNA 和蛋白表达,从而损害妊娠期妇女子宫内膜容受性并影响妊娠。我们发现,助孕汤能拮抗上述作用,并且单独使用助孕汤能增加妊娠率,这可能与它能改善子宫内膜类型并增加子宫内膜 ER、PR、整合素 β mRNA 和蛋白表达相关。由于

克罗米芬具有显著的促排卵作用,我们建议在临床上将其与助孕汤合用,以助孕汤能改善子宫内膜容受性之长,补充克罗米芬降低子宫内膜容受性之短。我们的研究结果为中药与人工助孕技术相结合从而提高不孕症治疗成功率提供了实验依据,为中西医结合治疗不孕症提供了新方法。

参考文献

- [1] Al-Inany H. Female infertility [J]. Clin Evid, 2006, (15): 2465—2487.
- [2] Makker A, Singh MM. Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility [J]. Med Res Rev, 2006, 26(6): 699—746.
- [3] 周彬,王宾,孙付和,等. 坤宝颗粒改善子宫内膜容受性的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(21): 2886—2887.
- [4] Devroey P, Bourgain C, Macklon NS, et al. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and endometrial receptivity [J]. Trends Endocrinol Metab, 2004, 15(2): 84—90.
- [5] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 731—746.
- [6] Thompson LA, Barratt CL, Thornton SJ, et al. The effects of clomiphene citrate and cyclofenil on cervical mucus volume and receptivity over the periovulatory period [J]. Fertil Steril, 1993, 59(1): 125—129.
- [7] Nelson LM, Hershlag A, Kurl RS, et al. Clomiphene citrate directly impairs endometrial receptivity in the mouse [J]. Fertil Steril, 1990, 53(4): 727—731.
- [8] Garcia E, Bouchard P, De Brux J, et al. Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 67(1): 80—87.
- [9] Xu Miaohou, Zhan Zhenguo, Jiang Sen, et al. Endocrine difference between patients with luteal phase deficiency and inadequate endometrial response [J]. Clin J Obstet Gynecol, 1997, 32(3): 141—144.
- [10] Arnaout MA. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion [J]. Immunol Rev, 2002, 186: 125—140.
- [11] Leahy DJ. New light on the integrin switch [J]. Structure, 2002, 10(9): 1152—1154.
- [12] Gonzalez RR, Palomino A, Vantman D, et al. Abnormal pattern of integrin expression at the implantation window in endometrium from fertile women treated with clomiphene citrate and users of intrauterine device [J]. Early Pregnancy, 2001, 5(2): 132—143.