

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.09.015

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

高 星¹, 杜惠兰^{1,2*}, 田茜华¹, 班光国¹, 贾云波¹, 孙晓换¹, 谷向向¹

(1. 河北医科大学研究生学院, 河北省石家庄市中山路 326 号, 050017; 2. 河北中医学院)

摘要 目的 观察补肾法、疏肝法对超促排卵大鼠妊娠结局的影响及可能作用机制。方法 将 80 只动情周期正常的雌鼠随机分为正常组、模型组、补肾组、疏肝组各 20 只。除正常组外, 各组大鼠建立控制性超促排卵模型。造模第 1 天始补肾组给予补肾调经方混悬液(浓度 2.78 g/ml), 疏肝组给予逍遥丸混悬液(浓度 0.162 g/ml), 均 1 ml/(200 g·d) 灌胃, 模型组及正常组给予同等剂量蒸馏水灌胃, 连续 11 天。比较各组大鼠血清雌二醇(E₂)、孕酮(P)含量及子宫内膜雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)水平, HE 染色测量子宫内膜厚度并观察子宫内膜形态, 观察大鼠内膜腔突表达, 检测子宫内膜血管内皮生长因子(VEGF)蛋白及其 mRNA 表达, 统计各组大鼠妊娠数、胚胎着床数。结果 与正常组比较, 模型组大鼠妊娠数、胚胎着床数减少, 血清 P 含量及子宫内膜 ER、PR 蛋白表达, VEGF 蛋白及其 mRNA 表达, 子宫内膜厚度及螺旋动脉数量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 补肾组、疏肝组大鼠妊娠数及胚胎着床数增加, 血清 P 含量及子宫内膜 ER、PR 蛋白表达, VEGF 蛋白及其 mRNA 表达, 子宫内膜厚度及螺旋动脉数量升高($P < 0.05$), 而补肾组和疏肝组大鼠组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 补肾法、疏肝法均能够增加超促排卵大鼠妊娠率及胚胎着床数, 其作用机制可能与调节性激素水平及雌、孕激素受体, 改善大鼠子宫内膜组织形态及血管生成有关。

关键词 补肾; 疏肝; 补肾调经方; 逍遥丸; 性激素; 子宫内膜; 血管内皮生长因子

子宫内膜容受性是指子宫内膜在空间上以及限定的时间内(种植窗期)允许囊胚黏附、穿透, 胚泡着床的状态。种植窗期通常在排卵后 6~8 天, 或受精后 5~7 天。研究发现, 着床失败的原因中 2/3 在于内膜容受不良, 子宫内膜容受性已成为影响胚胎着床成功的关键因素^[1]。血管生成是胚胎着床的关键步骤, 丰富的子宫内膜血管生成与血流灌注为种植窗期内膜提供必要的物质基础。血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子, 在人类正常子宫内膜的生理性血管生成中具有重要的作用^[2]。本课题组前期研究发现补肾法、疏肝法能够增加子宫内膜厚度, 改善临床妊娠结局^[3-4]。因此, 本研究拟以补肾调经方为补肾法的代表方, 以逍遥散作为疏肝法的代表方, 进一步探

讨两法对超促排卵大鼠妊娠结局、激素受体、血管生成的影响, 以期为临床应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 80 只, 清洁级, 8 周龄, 体重(200 ± 20) g; 雄性 SD 大鼠 40 只, 清洁级, 12 周龄, 体重(300 ± 24) g。实验动物许可证号: SCXK(冀)2013-1-003, 均购自河北医科大学实验动物中心。

1.2 药物

补肾调经方(熟地黄 20 g、当归 9 g、白芍 9 g、山药 12 g、山萸肉 15 g、枸杞子 12 g、女贞子 9 g、淫羊藿 10 g、紫河车 10 g、覆盆子 10 g、菟丝子 12 g、香附 6 g 等)、逍遥丸(河南省宛西制药股份有限公司, 批号: 130710)均购自石家庄乐仁堂药房, 经过河北医科大学中药系制成混悬液, 补肾

基金项目: 国家自然科学基金(81473719)

* 通讯作者: duhuilan@163.com, (0311) 89926291

调经方浓度 2.78 g/ml, 逍遥丸浓度 0.162 g/ml, 放置于 4℃ 冰箱中密闭保存。注射用醋酸曲普瑞林 (GnRHa): 法国益普生生物制药公司, 批号: F02463; 注射用尿促性腺激素 (HMG): 丽珠集团丽珠制药厂, 批号: 130810; 注射用绒毛膜促性腺激素 (HCG): 丽珠集团丽珠制药厂, 批号: 130111。

1.3 主要试剂与仪器

血清雌二醇 (E_2 , 批号: RG61402)、孕酮 (P, 批号: RG51402) 放射免疫分析试剂盒均购自天津九鼎医学生物工程有限公司; 子宫内膜雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc (批号分别为 sc-542、sc-538); VEGF 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc (批号: sc-7269)。RS-28 高速低温离心机: 德国贺利氏公司; FJ-2021 γ -放射免疫计数器: 西安二六二厂; RM2135 石蜡切片机: 德国莱卡公司; Odyssey 红外荧光扫描成像系统: 美国 LI-COR 公司; PE9600 型 PCR 扩增仪: 美国 PE 公司; S-3500N 扫描电子显微镜: 日本日立公司; 756MC 型紫外分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; IB-3 型离子镀金仪: 日本 Eiko 公司。

1.4 分组及造模方法

将饲养 2 周后动情周期正常的雌性大鼠 80 只, 按随机数字表法分为正常组、模型组、补肾组、疏肝组, 每组 20 只。每日上午 9:00 取阴道分泌物做涂片行脱落细胞学检查, 确定大鼠的动情周期。采用文献 [5-6] 造模方法建立控制性超促排卵模型, 模型组、补肾组、疏肝组大鼠于动情后期每日上午 9:00 腹腔内注射 GnRHa 1.8 μ g/200 g, 连续 9 天。至第 9 天同时注射 HMG 70 IU/200 g, 48 h 后注射 HCG 180 IU/200 g, 正常组同时给予等体积 0.9% 生理盐水腹腔注射。注射 HCG (正常组注射生理盐水) 晚 10:00 以雌雄大鼠 2:1 比例合笼, 次日晨 6:00 观察阴栓及阴道涂片。在动情后期连续注射 GnRHa 5 天后, 阴道脱落细胞涂片见周期变化不明显, 呈现出动情间期的表现, 镜下可见大量白细胞。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, 即为造模成功。补肾组、疏肝组分别于注射 GnRHa 之日起用补肾调经方、逍遥丸混悬液 1 ml/(200 g·d) 灌胃, 模型组及正常组用同等剂量蒸馏水灌胃, 连续 11 天。

1.5 观察指标及方法

各组大鼠分别于孕 5 天断头处死 10 只, 取室温静置 2 h 后 3000 r/min, 离心 10 min, 取上清制备血清, -20℃ 冰箱保存待测; 留取子宫称重后取一侧子宫 1/2 迅速放入 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片, 用于 HE 及免疫组织化学检测; 余 1/2 置于 2.5% 戊二醛中固定行电子显微镜检测; 另一侧子宫迅速置于液氮中 10 min 后转入 -80℃ 低温冰箱用于 Western blot 及 RT-PCR 检测。

1.5.1 血清 E_2 、P 含量 采用放射免疫分析法检测, 严格按说明书操作。

1.5.2 免疫组织化学法检测子宫内膜 ER、PR、VEGF 蛋白表达 采用同济医科大学千屏影像工程公司 HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图文分析系统分析 ER、PR、VEGF 蛋白表达的平均光密度值, 每一切片测量 5 个视野进行统计。

1.5.3 子宫内膜厚度及组织形态学分析 常规 HE 染色, 采用病理图文分析系统, 测量子宫内膜厚度并进行组织形态学观察, 包括子宫内膜成熟度、螺旋动脉数量。

1.5.4 子宫内膜胞饮突的表达 取新鲜子宫组织, 置于蜡片上, 用眼科剪将子宫剪开暴露内膜面, 取 3~5 mm³ 组织大小, 将所取组织在生理盐水中反复抽提 30 下, 重复 3 次, 以彻底清除表面的黏液、组织液、血液及细胞碎片等附着物, 充分暴露样品表面, 置于 2.5% 戊二醛中固定, 检测时将样本用 PBS 彻底清洗, 系列乙醇脱水, 系列叔丁醇干燥后放入冰箱固化。抽气干燥 10 min, 粘贴样本, 用离子镀金仪喷金镀膜, 行扫描电子显微镜 (SEM) 观察。

1.5.5 Western blot 法检测子宫内膜 VEGF 蛋白表达 200 mg 子宫组织加入 1 ml 裂解液提取匀浆, 4℃、12000 r/min 离心 5 min, 取上清, 分装超低温保存。适当稀释提取上清液, 考马斯亮蓝测定提取液的蛋白浓度, 确保每个蛋白样品的上样量一致。取含等量蛋白的样品加等量的 2× 上样缓冲液混匀, 100℃、5 min, -20℃ 保存。配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 每孔加样品 20 μ l, 90V 恒压, 电泳 1.5 h。20V 恒压转膜 30 min, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 兔抗大鼠 VEGF (一抗)、以 1:200 比例溶于 T-TBS, 4℃ 冰箱孵育过夜。加二抗 (1:10000), 室温震荡封闭 1 h, TBS 漂洗。Odyssey 红外荧光扫描成像系统检测抗体特异性结合条带, 显影, 以 GAPDH 为内参, 进行半定量分析。

1.5.6 RT-PCR 法检测子宫内膜 VEGF mRNA 表达

Trizol 一步法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度。总 RNA 2 μg 加入 RT 反应体系 (含 AMV Buffer, dNTPs, Oligo dT Primer, AMV, Rnase Inhibitor 等) 管中, 并用 DEPC 处理水补足到 50 μl 反应液体积, 震荡混匀后短暂离心, 加少许矿物油于 PCR 扩增仪 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min (cDNA 合成), 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (逆转录酶失活), 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。引物根据基因序列, 参照 MEDLINE, 由 Invitrogen 公司合成。引物序列及扩增条件: VEGF 上游: 5'-CACCATGCCAAGTGCTGAAG-3', 下游: 5'-GCTTGTACATCTGCAAGTACG-3', 扩增片段为 459 bp; GAPDH 上游: 5'-CCTCCTGAAGT-GAGGCAGTTT-3', 下游: 5'-ATTGTCTCTTTAGG-GATCCAGGC-3', 扩增片段为 611 bp。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; (94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s) 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取每个标本的扩增产物 6 μl 于 1% 的含 GV 核酸染料的琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA Marker (DL2000) 作为标准片段标记, 电泳后于紫外透射仪观察, 并用数码相机照相, 输入微机应用 Quantity One 凝胶图象分析软件 (Bio-Rad 公司, 版本 V4.62) 对目的电泳条带进行分析, 以相应的内参电泳条带作为参照, 结果以两者积分吸光度的比值表示。

1.5.7 大鼠妊娠数与胚胎着床数 发现阴栓或精子记为孕第 1 天, 各组余下 10 天大鼠于孕后 10 天处死, 观察胚胎着床情况, 计录各组着床胚胎数。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据进行正态性及

方差齐性检验, 符合正态分布且方差齐性者比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 SNK 法 Q 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠妊娠数与胚胎着床数比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠妊娠数、胚胎着床数减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 补肾组、疏肝组大鼠妊娠数及胚胎着床数增加 ($P < 0.05$), 补肾组和疏肝组大鼠妊娠数及胚胎着床数组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠妊娠数及胚胎着床数比较

组别	鼠数	妊娠数 [只 (%)]	胚胎着床数 (个, $\bar{x} \pm s$)
正常组	10	9 (90)	14.3 $\pm$ 1.768
模型组	10	3 (30)	9.6 $\pm$ 1.582*
补肾组	10	6 (60)	13.1 $\pm$ 1.361 Δ
疏肝组	10	5 (50)	12.4 $\pm$ 1.649 Δ

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

2.2 各组大鼠血清 E_2 、P 含量及子宫内膜 ER、PR 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组血清 P 水平, 子宫内膜 ER、PR 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾组、疏肝组 P 水平, 子宫内膜 ER、PR 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$); 而补肾组与疏肝组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组 E_2 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠子宫内膜厚度及组织形态比较

表 3 示, 模型组大鼠子宫内膜厚度、螺旋动脉数量较正常组显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);

表 2 各组大鼠血清 E_2 、P 含量及子宫内膜 ER、PR 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	E_2 (pg/ml)	P (ng/ml)	ER (平均光密度值)	PR (平均光密度值)
正常组	10	33.146 $\pm$ 7.019	32.645 $\pm$ 8.437	0.333 $\pm$ 0.090	0.334 $\pm$ 0.084
模型组	10	36.507 $\pm$ 9.960	24.728 $\pm$ 6.122**	0.248 $\pm$ 0.052*	0.223 $\pm$ 0.039**
补肾组	10	32.444 $\pm$ 8.296	30.931 $\pm$ 6.589 Δ	0.314 $\pm$ 0.076 Δ	0.329 $\pm$ 0.064 Δ
疏肝组	10	30.785 $\pm$ 7.578	29.153 $\pm$ 7.565 Δ	0.306 $\pm$ 0.054 Δ	0.314 $\pm$ 0.049 Δ

注: E_2 , 雌二醇; P, 孕酮; ER, 雌激素受体; PR, 孕激素受体; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组大鼠子宫内膜厚度及组织形态学比较

组别	鼠数	内膜厚度 (μm , $\bar{x} \pm s$)	螺旋动脉数量 (个, $\bar{x} \pm s$)	子宫内膜成熟度 [个 (%)]		
				发育成熟	发育延迟	发育不同步
正常组	10	559.29 $\pm$ 122.02	21.43 $\pm$ 2.483	8 (80)	1 (10)	1 (10)
模型组	10	324.67 $\pm$ 121.12*	13.98 $\pm$ 1.760**	2 (20)	3 (30)	5 (50)
补肾组	10	532.60 $\pm$ 89.24 Δ	19.31 $\pm$ 2.019 Δ	7 (70)	2 (20)	1 (10)
疏肝组	10	510.23 $\pm$ 159.95 Δ	18.49 $\pm$ 1.874 Δ	6 (60)	2 (20)	2 (20)

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

与模型组比较, 补肾组、疏肝组大鼠子宫内膜厚度、螺旋动脉数量显著升高 ($P < 0.05$), 补肾组、疏肝组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组与正常组、补肾组、疏肝组比较, 子宫内膜成熟度低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 补肾组与疏肝组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠子宫内膜胞饮突表达比较

正常组大鼠子宫内膜表面均匀分布着大量边界清楚的膜状突起, 分布均匀呈蘑菇状, 为完全发育的胞饮突; 模型组子宫内膜胞饮突数量较正常组减少, 表面皱缩凹陷, 呈现出退化表现; 补肾组、疏肝组大鼠内膜表面胞饮突数量较模型组增多, 表面饱满, 分布相对均匀。

2.5 各组大鼠子宫内膜 VEGF 蛋白表达比较

免疫组织化学法显示: VEGF 表达主要定位于子宫内膜腺上皮细胞、间质细胞以及血管内皮细胞的胞浆中, 呈棕黄色颗粒。表 4 示, 模型组大鼠子宫上皮细胞、间质细胞 VEGF 蛋白表达明显低于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 补肾组、疏肝组子宫上皮细胞、间质细胞 VEGF 蛋白表达较模型组明显增高 ($P < 0.05$)。Western blot 法检测结果: 模型组大鼠子宫 VEGF 蛋白表达较正常组明显减低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 补肾组、疏肝组 VEGF 蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$), 补肾组、疏肝组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠子宫内膜 VEGF 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF 平均光密度值		VEGF/ β -actin
		上皮细胞	间质细胞	
正常组	10	0.265 $\pm$ 0.074	0.384 $\pm$ 0.083	0.627 $\pm$ 0.037
模型组	10	0.147 $\pm$ 0.038*	0.163 $\pm$ 0.049**	0.337 $\pm$ 0.019*
补肾组	10	0.244 $\pm$ 0.068 Δ	0.346 $\pm$ 0.081 Δ	0.543 $\pm$ 0.045 Δ
疏肝组	10	0.235 $\pm$ 0.082 Δ	0.337 $\pm$ 0.082 Δ	0.533 $\pm$ 0.126 Δ

注: VEGF, 血管内皮生长因子; VEGF 平均光密度值是免疫组织化学法检测结果, VEGF/ β -actin 是 Western blot 法检测结果; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.6 各组大鼠子宫内膜 VEGF mRNA 表达比较

表 5 各组大鼠子宫内膜 VEGF mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF mRNA
正常组	10	0.307 $\pm$ 0.016
模型组	10	0.197 $\pm$ 0.012*
补肾组	10	0.279 $\pm$ 0.022 Δ
疏肝组	10	0.270 $\pm$ 0.029 Δ

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

表 5 示, 模型组大鼠子宫内膜 VEGF mRNA 表达较正常组明显减低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,

补肾组、疏肝组 VEGF mRNA 表达明显增高 ($P < 0.05$), 补肾组、疏肝组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

子宫内膜容受性是在着床期子宫内膜受激素、细胞因子、黏附因子以及糖蛋白等多种因素的调节发生的一系列变化, 以达到接受胚泡定位、附着、穿透的状态, 是保证成功妊娠的关键因素。雌激素、孕激素是胚泡植入过程中起主导作用的激素, 其通过与受体相结合形成稳定的激素-受体复合物而发挥生理效应, 二者通过彼此协调实现对子宫内膜的调控, 促进子宫内膜和胚泡发育的同步化^[7-8]。子宫内膜表达的 ER 和 PR 受月经周期的调控, ER 和 PR 数量的调节是控制和影响子宫内膜发展和功能的重要机制, 是胚胎着床的标记^[9]。雌激素可使内膜增厚, 且可促进 ER、PR 及其他因子的生成^[10]。分泌期孕酮的升高是触发着床始动的关键因素, 使子宫内膜在胚胎着床期呈现最大的容受性^[11]。胞饮突是子宫内膜种植窗开放时重要的形态学表现, 近年来已成为评价子宫内膜容受性的重要指标, 一般出现在自然月经周期的第 20~21 天, 与子宫内膜着床期一致, 其表达数量与胚胎种植率密切相关^[12]。不同的激素治疗及干预会提前或推迟胞饮突的形成^[13]。胞饮突的发育又依赖于体内性激素水平, 血清孕激素在胞饮突的发育过程中具有重要作用^[14]。VEGF 属于血小板源性因子家族, 其主要功能是参与血管内皮增殖, 改善血管通透性, 促进血管生成等。分泌期子宫内膜在一系列因子影响下, 膜基质细胞中 VEGF 表达增强, 增加子宫内膜容受性^[15-16]。体内雌激素、孕激素水平及其受体能够调控胞饮突及 VEGF 的表达, 在种植窗期共同为胚泡植入提供适宜的微环境。本研究结果发现, 控制性超促排卵大鼠 (模型组) 血清 P 水平及子宫内膜 ER、PR 表达下降, 子宫内膜厚度变薄, 胞饮突表达不良, 螺旋动脉数量减少, 子宫内膜 VEGF 表达量下降而致内膜容受性下降, 从而导致胚胎着床率及妊娠率降低。

中医学认为, “肾主生殖”; “女子以肝为先天”。补肾、疏肝是妇科常用治疗大法, 在不孕症治疗中效果显著^[17-19]。补肾调经方由养精种玉汤 (《傅青主女科》) 和五子衍宗丸 (《医学入门》) 加减化裁而成, 具有滋肾填精、调理冲任之功。方中熟地黄、枸杞子、山萸肉滋阴补肾填精; 覆盆

子、菟丝子、淫羊藿补肾温阳；当归、白芍养血，调补冲任；紫河车为血肉有情之品，有补肾益精、益气养血功效。诸药共用，则精血得充，正如傅山所云“精满则子宫易于摄精，血足则子宫易于容物”。肾的生理功能正常，则所藏之精满溢，所化之血充足，胞宫得以濡养，则易于纳物，以使胚胎顺利着床。逍遥丸源于宋代《太平惠民和剂局方》，方中柴胡疏肝解郁、条达肝气；当归、白芍养血柔肝；白术、茯苓、甘草健脾益气。诸药合用，宣畅冲任二脉，使胞宫气机通畅，肝血充盈，达经调而子嗣之效。本研究结果显示，补肾调经方、逍遥丸均能增加血清 P 水平，提高子宫内膜厚度及其成熟度，改善胞饮突表达，增加螺旋动脉数量，上调子宫内膜 ER、PR 及 VEGF 表达，与模型组比较差异具有统计学意义，而补肾组、疏肝组间比较差异无统计学意义，证实两法均能通过调控雌激素、孕激素及其受体水平，改善子宫内膜组织形态，提高 VEGF 表达，从而发挥提高控制性超促排卵大鼠子宫内膜容受性、改善妊娠结局的作用。

参考文献

- [1] Heger A, Sator M, Pietrowski D. Endometrial receptivity and its predictive value for IVF/ICSI-outcome [J]. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2012, 72(8): 710-715.
- [2] 冯苗, 李素春, 潘萍, 等. 子宫内膜着床窗口期血管生成状态及胞饮突表达对胚胎着床的影响 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(7): 525-529.
- [3] Gao X, Chang X, Du H, et al. Effect of soothing liver therapy on oocyte quality and growth differentiation factor-9 in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(5): 597-602.
- [4] 杜惠兰, 闫华, 白凤楼, 等. 补肾调经系列方对功能失调性子宫出血患者生殖激素及子宫内膜激素受体的影响 [J]. 中医杂志, 2007, 48(11): 986-988.
- [5] 潘永苗, 石一复. GnRH-a 超排卵对小鼠子宫内膜形态学和雌、孕激素受体表达的影响 [J]. 生殖与避孕, 2002, 22(4): 195-198.
- [6] 章汉旺, 高娟. 控制性超排卵小鼠围床期子宫内膜容受性的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2005, 20(11): 1324-1326.
- [7] Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity [J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 530-535.
- [8] Groll JM, Usadi RS, Lessey BA, et al. Effects of variations in serum estradiol concentrations on secretory endometrial development and function in experimentally induced cycles in normal women [J]. Fertil Steril, 2009, 92(6): 2058-2061.
- [9] Huang R, Fang C, Xu S, et al. Premature progesterone rise negatively correlated with live birth rate in IVF cycles with GnRH agonist: an analysis of 2,566 cycles [J]. Fertil Steril, 2012, 98(3): 664-670.
- [10] Lee DK, Kurihara I, Jeong JW, et al. Suppression of ER-alpha activity by COUP-TFII is essential for successful implantation and decidualization [J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(5): 930-940.
- [11] 林晓梅, 严丽, 刘晓平. 定量分析雌孕激素对改善子宫内膜状态作用 [J]. 中国计划生育学杂志, 2000, 58(2): 57-61.
- [12] Xu B, Sun X, Li L, et al. Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin-β3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss [J]. Fertil Steril, 2012, 98(2): 389-395.
- [13] Rashidi B, Soleimani Rad JI, Roshangar L, et al. Evaluation of Pinopodes Expression on the Mouse Endometrium Immediately before Implantation by Treatment with HMG/HCG and Sildenafil Citrate Administration [J]. Iran J Basic Med Sci, 2012, 15(5): 1091-1096.
- [14] Rashidi B, Rad JS, Roshangar L, et al. Progesterone and ovarian stimulation control endometrial pinopode expression before implantation in mice [J]. Pathophysiology, 2012, 19(2): 131-135.
- [15] Rabbani ML, Rogers PA. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats [J]. Reproduction, 2001, 122(1): 85-90.
- [16] Boudjenah R, Molina-Gomes D, Torre A, et al. Associations between individual and combined polymorphisms of the TNF and VEGF genes and the embryo implantation rate in patients undergoing In vitro fertilization (IVF) programs [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108287.
- [17] 李小妮, 李雅璇, 周吉海, 等. 补肾助孕汤对小鼠生殖能力影响的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(3): 365-369.
- [18] Li HX, Guo XY, Xie Y, et al. Yiqixue buganshen recipe regulates the expression of integrin αvβ3 in the endometrium of controlled ovarian hyperstimulation mice [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(10): 755-760.
- [19] 梁莹, 杜惠兰, 赵胜男, 等. 体外受精-胚胎移植术联合补肾、疏肝对不孕症患者活化素受体样激酶 5 的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(1): 34-37.

Effect of Soothing Liver and Tonifying Kidney Method on Tissue Morphology and Angiogenesis of Endometrium in Superovulation Rats

GAO Xing¹, DU Huilan^{1,2}, TIAN Qianhua¹, BAN Guangguo¹, JIA Yunbo¹, SUN Xiaohuan¹, GU Xiangxiang¹

(1. Graduate College of Hebei Medical University, Hebei Province, 050017; 2. Hebei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect and possible mechanism of tonifying kidney and soothing liver on pregnancy outcome of superovulation rats. **Methods** Divide 80 female rats of normal estrous cycle into normal group (n = 20), model group (n = 20), tonifying kidney group (n = 20) and soothing liver group (n = 20) randomly. Except the normal group, the other 3 groups were built for controlled superovulation models. From the first day of modelling, tonifying kidney group was given suspension of *Bushen Tiaojing Fang* (补肾调经方, concentration of 2.78g/ml), soothing liver group was given suspension of *Xiaoyao Wan* (逍遥丸, concentration of 0.162 g/ml), both 1 ml/ (200 g · d) by gavage, and the model and normal group were given distilled water of same dose by gavage, for 11 days. Compare levels of estradiol (E₂), progesterone (P), endometrium estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). Measure endometrial thickness by HE staining. Observe endometrial morphology and the expression of endometrial pinopodes. Detect endometrial vascular endothelial growth factor (VEGF) protein and the expression of mRNA. Count the number of encyesis and embryos implantation of each group. **Results** Compared with normal group, the number of pregnancy and embryos implantation, level of P in serum, the expression of endometrial ER, PR, VEGF protein and mRNA, endometrial thickness and spiral artery all decreased (P < 0.05 or P < 0.01) in the model group. Compared with model group, the number of pregnancy and embryos implantation, level of P in serum, the expression of endometrial ER, PR, VEGF protein and mRNA, endometrial thickness and spiral artery increased in the tonifying kidney group and soothing liver groups (P < 0.05). The difference was not significant between tonifying kidney group and soothing liver group (P > 0.05). **Conclusion** Tonifying kidney and soothing liver could increase pregnancy rate and the number of embryos implantation of superovulation rats. The underlying mechanism may relate to regulating the sex hormone level, ER, PR and improving tissue morphology and angiogenesis in endometrium.

Keywords tonifying kidney; soothing liver; *Bushen Tiaojing Fang*; *Xiaoyao Wan*; sex hormone; endometrium; vascular endothelial growth factor

收稿日期: 2014 - 10 - 16; 修回日期: 2015 - 01 - 09

编辑: 邓 媛

2015 年 《中国中医基础医学杂志》 征订启事

《中国中医基础医学杂志》是由中国中医科学院中医基础理论研究所主办的学术性期刊,于 1995 年元月创刊。本刊为中文核心期刊、中国科技核心期刊,为中国科学引文数据库、中国学术期刊、中国生物学文摘和文献、中文科技期刊等数据库收录期刊。期刊网站: www.zyjc.ac.cn。

本刊设有理论探讨、中医方法学、实验研究、中医多学科研究、临床基础、针灸研究、方药研究、中医写作与翻译、临证验案等栏目,适于中医及中西医结合科研、教学、临床人员阅读。

本刊为月刊,大 16 开。国内刊号: CN11 - 3554/R ; 国际刊号: ISSN 1006 - 3250。每月 28 日出版。每册定价 10 元,全年定价 120 元。国外邮发代号为: M - 4690, 中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱) 订阅; 国内各地邮局均可订阅,国内邮发代号为: 80 - 330; 亦可向本刊编辑部汇款邮购。汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号,中国中医基础医学杂志社编辑部收,邮政编码: 100700,请在附言栏中写清欲购期刊年度、期号及册数。