

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.18.018

益肾疏肝方对胚胎着床障碍小鼠子宫基质金属蛋白酶的影响

庄梦斐, 袁雪菲, 曹 阳, 张婷婷*

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海市虹口区甘河路 110 号, 200437)

摘要 目的 探讨益肾疏肝方促进胚胎着床的可能作用机制。方法 雌、雄 ICR 小鼠按照 3 : 1 的比例合笼饲养, 次日清晨 8: 00 检查雌鼠阴道栓, 以见栓当日作为妊娠第 1 天。将见栓小鼠 50 只随机分为正常对照组、模型组、黄体酮组和中药低、高剂量组, 每组 10 只。除正常对照组外其余各组小鼠妊娠第 4 天颈背部皮下注射米非司酮溶液 (0.03 mg/kg) 建立胚胎着床障碍模型。从妊娠第 1 天开始, 模型组、正常对照组每日给予生理盐水 0.2 ml/只灌胃, 黄体酮组给予黄体酮溶液 (浓度 2 mg/ml) 每日皮下注射 20 μ l/只, 中药低、高剂量组每日分别给予 3.9 g/ml、15.6 g/ml 的益肾疏肝方灌胃 0.2 ml/只, 连续给药 7 天。妊娠第 8 天处死小鼠, 记录孕鼠数和着床总胚泡数, 计算着床率和平均着床胚泡数; 取下子宫, 免疫组化法和 Western blot 法对子宫中 MMP-2 和 MMP-9 表达和蛋白含量进行检测。结果 与正常对照组比较, 模型组孕鼠数明显减少, 着床率显著降低, 平均着床胚泡数明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药低、高剂量组和黄体酮组的平均着床胚泡数增高 ($P < 0.05$)。中药高剂量组、黄体酮组子宫中 MMP-2 的表达和蛋白含量较模型组显著升高 ($P < 0.05$); 中药低、高剂量组和黄体酮组子宫中 MMP-9 的表达和蛋白含量明显高于模型组 ($P < 0.05$)。结论 益肾疏肝方可以增加胚胎着床障碍小鼠的平均着床胚泡数, 提高受孕率, 可能与上调子宫中 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关。

关键词 胚胎着床障碍; 益肾疏肝方; 基质金属蛋白酶

近年来, 不孕症的发病率呈明显上升趋势, 严重影响人类的生殖健康。以体外受精 - 胚胎移植 (IVF - ET) 为代表的辅助生殖技术为不孕妇女带来希望, 但其孕育成功率始终徘徊在 25% ~ 35%, 胚胎着床障碍是导致成功率低的主要原因^[1]。因此, 改善胚胎着床障碍对治疗不孕症和提高辅助生殖技术的成功率有着重要的意义。基质金属蛋白酶 (MMPs) 作为对细胞外基质降解起主要作用的锌依赖蛋白水解酶, 是着床前胚胎发出的一种信号分子, 可以调节细胞外基质的动态平衡, 促进胚胎进入内膜并完成着床, 其中 MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族中参与胚胎着床过程的重要成员^[2]。目前, 中医药疗法已渗透到现代辅助生殖技术治疗不孕症的各个环节, 可改善子宫内膜容受性、促进胚胎着床、提高妊娠率等^[3]。此外, 有研究显示不

孕症患者的抑郁状态和焦虑程度较高^[4-5]。中医学认为, “肝肾同源”, 两者在生理上相互滋生, 病理上相互影响, 临床中运用补肾与疏肝相结合的方法治疗不孕症取得了良好疗效^[6-7]。本研究通过观察益肾疏肝方对胚胎着床障碍模型小鼠着床率以及子宫 MMPs 表达的影响, 初步探讨益肾疏肝方促进胚胎着床的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康未交配的 ICR 雌性小鼠 60 只, 8 周龄, 体重 24 ~ 28 g, 同种清洁级健康雄性小鼠 20 只, 体重 30 ~ 35 g, 均由上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司提供, 实验动物合格证号: SYXK (沪) 2014 - 0027, 雌雄分笼饲养, 自由取水, 室温 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (50 $\pm$ 10) %, 光照明暗各 12 h, 适应性饲养 3 天。

1.2 药物

益肾疏肝方组成: 女贞子 15 g, 生地黄 15 g,

基金项目: 国家中医药管理局重点专科 (zk0901fk012); 上海市卫生局课题 (ZYSNXd - CC - HPGC - JD - 009)

* 通讯作者: tingting185@aliyun.com, 13671600698

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

茯苓 15 g, 黄精 15 g, 当归 15 g, 川芎 6 g, 巴戟天 15 g, 淫羊藿 15 g, 荆芥 9 g, 香附 9 g, 合欢皮 15 g, 郁金 5 g, 将免煎颗粒 (江阴天江药业有限公司, 批号 1401043) 制备成浓度为 3.9 g/ml、15.6 g/ml (相当于成人的等效剂量和 4 倍剂量) 的溶液。米非司酮片由北京紫竹药业有限公司提供, 25 mg/片, 批号 43110605。黄体酮注射液由上海通用药业股份有限公司提供, 1 ml/支, 批号 43110605。

1.3 主要试剂及仪器

氯化钠注射液由安徽双鹤药业有限责任公司生产, 批号 130818905; 丙二醇溶液 (上海生工生物, 批号 SJ0802S2013J); 玉米油 (上海融氏企业有限公司, 批号 00328241)。MMP-2 一抗 (货号 ab110186)、MMP-9 一抗 (货号 ab137867) 均购自 Abcam 公司, GAPDH 一抗 (货号 5174) 购自 Cell Signaling Technology 公司。DAB 显色剂购自 Vector Laboratories INC 公司, 批号 SK-4800; 苏木素溶液由上海虹桥乐翔医用试剂技术有限公司提供, 批号 130703; 高灵敏度化学发光检测 (ECL) 试剂盒由北京康为世纪生物科技有限公司提供, 批号 1712L。光学显微镜 (Leica 公司, 型号 DM750); 数码凝胶图像处理系统 (Tanon GIS System 公司, 型号 Tanon 4100)。

1.4 动物模型的建立

雌、雄小鼠第 1 天 17:00 按照 3:1 的比例合笼饲养, 次日清晨 8:00 检查雌鼠阴道栓, 以见栓当日作为妊娠第 1 天。将米非司酮片剂研碎, 溶于丙二醇溶液中, 制成 0.8 mg/ml 的米非司酮溶液。见栓小鼠妊娠第 4 天, 颈背部皮下注射米非司酮溶液 (0.03 mg/kg) 建立胚胎着床障碍模型^[8-9], 正常对照组皮下注射等量丙二醇溶液。

1.5 动物分组及给药

将见栓小鼠 50 只按照随机数字表分为模型组、黄体酮组、中药低剂量组、中药高剂量组和正常对照组, 每组 10 只。除正常对照组外其余各组建立胚胎着床障碍模型。同时从妊娠第 1 天开始, 模型组、正常对照组每日给予生理盐水 0.2 ml/只灌胃, 黄体酮组将黄体酮溶液用玉米油稀释成 2 mg/ml, 每日皮下注射 20 μ l/只, 中药低、高剂量组每日分别给予 3.9 g/ml、15.6 g/ml 的益肾疏肝方灌胃 0.2 ml/只, 连续给药 7 天。

1.6 观察指标及方法

妊娠第 8 天, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取出子宫组织, 记录胚泡数, 部分组织置于 4% 多聚甲醛固

定液中, 待行组织学观察, 部分组织放入液氮 -80℃ 冻存, 待行 Western blot 蛋白定量检测。

1.6.1 着床率和平均着床胚泡数 记录孕鼠数和着床总胚泡数, 着床率 = 孕鼠数/受试动物数 $\times$ 100%, 平均着床胚泡数 = 着床总胚泡数/孕鼠数。

1.6.2 免疫组化法检测 MMP-2 和 MMP-9 表达 取小鼠子宫组织常规石蜡包埋, 连续切片, 厚度为 5 μ m。采用 SABC 法, 实验步骤严格按照试剂盒说明书要求进行, MMP-2 一抗按 1:100 稀释, MMP-9 一抗按 1:200 稀释, DAB 显色, 光学显微镜下观察 MMP-2 和 MMP-9 的表达情况, 以切片组织或细胞中呈现出棕黄色即为阳性信号, 计算累计光密度 (IOD) 值。

1.6.3 Western blot 法检测 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 将子宫组织剪成细小的碎片, 每 10 mg 组织加入 100 μ l 裂解液 (裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂), 充分匀浆, 4℃、12000 r/min 离心 20 min, 取上清液加入 buffer 缓冲液, 沸水浴中加热 5 min。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移蛋白至 NC 膜, 6% 脱脂奶粉封闭后, 加入 MMP-2、MMP-9 和内参 GAPDH 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 4 遍, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 37℃ 与膜孵育 1h, TBST 洗膜后, 加入 ECL 发光液, 显影, 定影, 数码凝胶图像处理系统分析条带光密度值, 以目的条带与 GAPDH 条带的光密度值的比值作为衡量参数, 分析 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布和方差齐性的数据采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-t 检验; 不符合正态分布和 (或) 方差齐性的数据采用 Kruskal-Wallis H 检验分析, 组间两两比较用 Wilcoxon 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠着床率和平均着床胚泡数比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 模型组孕鼠数明显减少, 着床率显著降低, 平均着床胚泡数明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药低、高剂量组和黄体酮组的平均着床胚泡数增高 ($P < 0.05$), 但中药低、高剂量组的平均着床胚泡数仍低于正常对照组, 并且中药低剂量组明显低于黄体酮组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠着床率和平均着床胚泡数比较

组别	鼠数	孕鼠数 (只)	着床率 (%)	平均着床胚泡数 (个, $\bar{x} \pm s$)
正常对照组	10	9	90	12.50 $\pm$ 1.29
模型组	10	4	40	4.58 $\pm$ 1.54*
黄体酮组	10	7	70	10.26 $\pm$ 1.96 Δ
中药低剂量组	10	6	60	7.33 $\pm$ 2.13* Δ
中药高剂量组	10	6	60	9.16 $\pm$ 2.44* Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与黄体酮组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组小鼠子宫 MMP-2 和 MMP-9 表达免疫组化检测结果比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠子宫 MMP-2、MMP-9 表达降低 ($P < 0.05$); 而中药高剂量组和黄体酮组 MMP-2 的表达较模型组升高 ($P < 0.05$)。中药低、高剂量组和黄体酮组 MMP-9 表达亦较模型组明显升高 ($P < 0.05$); 而中药低、高剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠子宫 MMP-2 和 MMP-9 表达免疫组化检测结果比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	孕鼠数	MMP-2	MMP-9
正常对照组	9	378.51 $\pm$ 8.43	398.35 $\pm$ 10.18
模型组	4	315.56 $\pm$ 4.18*	275.51 $\pm$ 9.26*
黄体酮组	7	355.38 $\pm$ 20.03 Δ	346.57 $\pm$ 10.54* Δ
中药低剂量组	6	328.09 $\pm$ 14.43*	330.14 $\pm$ 6.40* Δ
中药高剂量组	6	352.14 $\pm$ 18.08 Δ	345.96 $\pm$ 26.91* Δ

注: MMP-2, 基质金属蛋白酶 2; MMP-9, 基质金属蛋白酶 9; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组小鼠子宫 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 Western blot 法检测结果比较

表 3 示, 模型组子宫 MMP-2 和 MMP-9 蛋白含量较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$)。中药高剂量组、黄体酮组子宫 MMP-2 蛋白较模型组明显升高, 但仍低于正常对照组 ($P < 0.05$)。中药低、高剂量组和黄体酮组子宫 MMP-9 蛋白含量较模型组亦明显升高 ($P < 0.05$); 而中药低、高剂量组和黄体酮组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠子宫 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 Western blot 法检测结果比较 (GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	孕鼠数	MMP-2	MMP-9
正常对照组	9	0.63 $\pm$ 0.05	0.69 $\pm$ 0.23
模型组	4	0.27 $\pm$ 0.14*	0.17 $\pm$ 0.05*
黄体酮组	7	0.45 $\pm$ 0.03* Δ	0.59 $\pm$ 0.16 Δ
中药低剂量组	6	0.33 $\pm$ 0.05*	0.40 $\pm$ 0.13 Δ
中药高剂量组	6	0.46 $\pm$ 0.10* Δ	0.53 $\pm$ 0.18 Δ

注: MMP-2, 基质金属蛋白酶 2; MMP-9, 基质金属蛋白酶 9; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

胚胎着床是妊娠的关键环节, 其过程包括定位、黏附和侵入, 从而实现胚胎和母体在结构和功能上的联系。胚胎着床的过程涉及多个基因、生物分子、细胞因子以及多个信号转导通路的参与和调控。在胚胎着床过程中, 胚胎滋养层细胞以及子宫内膜间质细胞分泌 MMPs, 降解子宫内膜的细胞外基质, 参与子宫内膜蜕膜化过程中的基质改建、内膜血管的形成, 从而有利于胚胎的成功着床^[1]。

研究表明, 在小鼠的胚胎植入阶段, 滋养层细胞分泌的主要 MMPs 是 MMP-2 和 MMP-9^[1]。MMP-2 是植入胚胎前细胞滋养层分泌的最主要的蛋白酶, 辅助胚胎浸润有助于胚胎植入, MMP-2 和 MMP-9 在增殖晚期及排卵后的子宫内膜中丰富表达, MMP-9 是分泌期子宫内膜较特异性表达的一种蛋白酶, 是 ECM 降解的主要调节因子^[2]。本研究结果显示, 胚胎着床障碍模型小鼠子宫中 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平显著低于正常受孕小鼠, 提示 MMP-2、MMP-9 在胚胎着床过程中起重要作用, 二者的低表达可能导致子宫内膜容受性下降, 使胚胎不能顺利着床。

《傅青主女科》曰“胞脉系于肾。”《景岳全书·妇人规》曰“妇人肾以系胞。”肾气旺盛, 任通冲盛, 两精相搏, 才能受孕。肾主冲任, 人体脏腑经络之间有着不可分割的联系, 因此不孕症临床常见证候有肾虚、肝郁、痰湿、血瘀、湿热、血虚等, 但总以肾虚为主。随着现代生活节奏加快、生活方式改变, 情志因素在不孕症的发生中占有越来越重要的地位, 叶天士在《临证指南医案》中提出“女子以肝为先天”, 指出肝在女性生殖中的重要地位。《妇人规·子嗣类》曰“孕育由于气血, 气血由于情怀, 情怀不畅, 则冲任不充, 冲任不充则胎孕不受”。因此, 我们采用益肾填精、疏肝理气的方法治疗不孕症。益肾疏肝方中女贞子、生地黄、巴戟天、淫羊藿滋补肝肾、益精填髓, 香附、合欢皮、郁金疏肝解郁、理气行气, 茯苓健脾渗湿, 黄精补气养阴、健脾益肾, 川芎活血行气, 全方阴阳平补, 共奏益肾疏肝、填精助孕之功。

实验结果表明, 中药高剂量组小鼠的平均着床胚泡数增加, 着床率升高, 子宫中 MMP-2、MMP-9 的表达水平显著增高, 说明益肾疏肝方可以增强胚胎着床障碍小鼠子宫 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 改善子宫内膜容受性, 促进滋养细胞对子宫内膜的侵入, 使子宫内膜更适合胚胎的植入, 促进胚胎进

入内膜并完成着床, 提高妊娠率, 为益肾疏肝方治疗不孕症以及中医药联合辅助生殖技术提高不孕患者的孕育成功率提供了科学依据。

参考文献

- [1] Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential [J]. *Hear Res*, 2002, 165(1-2): 1-9.
- [2] Nissi R, Talvensaari-Mattila A, Kotila V, et al. Cicularizing matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013, 11: 2. doi: 10.1186/1477-7827-11-2.
- [3] 罗颂平. 中医妇科学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 228.
- [4] 马申. 不孕症妇女心理状态分析 [J]. *上海预防医学*, 2006, 18(5): 241-242.
- [5] 谭丽, 张婷婷, 王姿雅, 等. Beck 抑郁自评问卷在不孕症患者中的应用 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(4): 542-545.
- [6] 杨潭芬. 益肾疏肝方治疗排卵障碍性不孕症 40 例 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(10): 924.
- [7] 井庆彦, 张国骏. 张国骏教授补肾疏肝治疗不孕症随诊体会 [J]. *中医学报*, 2010, 25(1): 53-54.
- [8] 刘艳娟, 黄光英, 陆付耳, 等. 小鼠胚泡着床障碍模型的建立 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(11): 1315-1318.
- [9] 白玉涛, 张玉玲, 代娟, 等. ICR 小鼠着床障碍模型的建立 [J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43(3): 63-67.
- [10] Huang SC, Sheu BC, Chang WC, et al. Extracellular matrix proteases-cytokine regulation role in cancer and pregnancy [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14: 1571-1588.
- [11] Zhao YF, Xiao AZ, Cao XM, et al. Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(2): 149-158.
- [12] Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, et al. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(Suppl 2): 812-819.

Effects of *Yishen Shugan Fang* (益肾疏肝方) on Matrix Metalloproteinases in Mice with Embryo Implantation Obstacle

ZHUAN Mengfei, YUAN Xuefei, CAO Yang, ZHANG Tingting

(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Yishen Shugan Fang* (YSSGF) in promoting the embryo implantation. **Methods** Female and male ICR mice (in proportion of 3: 1) were fed in the same cage. At 8: 00 of the next morning, vaginal plug of the female mice were checked, and the day was regarded as the first day of pregnancy when saw the plug. Then 50 mice with plug were randomly divided into normal control group, model group, progesterone group, and the TCM low and high dose groups, with ten in each group. Except the normal control group, the other four groups were given subcutaneous injection with mifepristone solution (0.03 mg/kg) into neck and back to establish a model of obstacle of embryo implantation on the fourth day of pregnancy. Starting from the first day of pregnancy, the model group and the normal control group were given by gavage with 0.2 ml of normal saline every day, the progesterone group was given subcutaneous injection with progesterone solution 20 μ l (2 mg/ml) every day, the TCM low and high dose groups were given by gavage with 3.9 g/ml and 15.6 g/ml of YSSGF 0.2 ml, respectively every day, all for seven days. On the eighth day of pregnancy, the mice were sacrificed, and the number of pregnant mice and total blastocyst with implantation were recorded to calculate implantation rate and average number of blastocyst with implantation. The uteri were also removed to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 and protein content by the immunohistochemical method and the Western blot method. **Results** Compared with the normal control group, the number of pregnant mice, the implantation rate and the average number of blastocyst with implantation decreased significantly in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the average number of blastocyst with implantation increased significantly in the TCM low and high dose groups and the progesterone group ($P < 0.05$), the expression of MMP-2 and protein content in uterus increased significantly in the TCM high dose group and the progesterone group ($P < 0.05$), and the expression of MMP-9 and protein content in uterus were significantly higher in the TCM low and high dose groups and the progesterone group ($P < 0.05$). **Conclusion** YSSGF may increase the average number of blastocyst with implantation of mice with obstacle of embryo implantation and improve the conception rate, and the underline mechanism may be related to increase the expression of MMP-2 and MMP-9 in uterus.

Keywords obstacle of embryo implantation; *Yishen Shugan Fang* (益肾疏肝方); matrix metalloproteinases

(收稿日期: 2015-02-05; 修回日期: 2015-03-10)

编辑: 邓 媛