

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.20.013

基于 Wnt 通路探讨温阳化浊方含药血清对 Ishikawa 和 JAr 细胞胚胎种植模型的影响

冯伟华, 赵晓丽, 陈明丽, 江楠, 戎蓓蕾, 夏天✉

天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区李七庄昌凌路 88 号, 300193

[摘要] **目的** 探讨温阳化浊方促进胚胎种植的可能作用机制。**方法** 将 20 只大鼠随机分为温阳化浊方组和空白组, 每组 10 只。温阳化浊方组大鼠给予温阳化浊方药液 21.05 g/kg 连续灌胃 7 天, 空白组不予灌胃, 制备温阳化浊方含药血清和空白血清。体外培养 THP-1 单核细胞, 佛波酯 (PMA) 诱导分化成巨噬细胞, 再用 20 ng/ml 脂多糖 (LPS) 和 20 ng/ml γ 干扰素 (IFN- γ) 诱导巨噬细胞 M1 极化。M1 型巨噬细胞分别加入 2%、4%、8%、10%、15%、20% 的温阳化浊方含药血清和空白血清培养, 采用 CCK8 法检测细胞存活率, 选取最大无毒剂量的温阳化浊方含药血清进行后续实验。M1 型巨噬细胞分为: 模型 1 组、温阳化浊方含药血清 1 组、空白血清 1 组, 在诱导 M1 极化后, 温阳化浊方含药血清 1 组给予筛选浓度的温阳化浊方含药血清, 空白血清 1 组给予同浓度的空白血清, 各组均干预 24 h 和 48 h, Real-time PCR 法检测 M1 型巨噬细胞标志物肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和 M2 型巨噬细胞标志物趋化因子配体 18 (CCL-18)、甘露糖受体 C 型 1 (MRC-1) mRNA 表达。采用 Transwell 体系共培养 M1 型巨噬细胞、Ishikawa 细胞和 JAr 细胞, 建立体外胚胎种植模型。将胚胎种植模型细胞分为: 非容受态组 (只包含 Ishikawa 细胞)、容受态组 (包含 Ishikawa 细胞和 JAr 细胞)、模型 2 组 (M1 型巨噬细胞与 Ishikawa 细胞、JAr 细胞共培养)、温阳化浊方含药血清 2 组和空白血清 2 组。温阳化浊方含药血清 2 组和空白血清 2 组在 M1 型巨噬细胞与 Ishikawa 细胞共培养的同时, 分别给予筛选浓度的温阳化浊方含药血清和空白血清干预 48 h, 再与 JAr 细胞共培养。Real-time PCR 方法检测 Wnt 通路相关因子 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -连环蛋白 (β -catenin) 和子宫内膜容受性标志分子整合素 α V (ITG α V)、整合素 β 3 (ITG β 3)、整合素 β 5 (ITG β 5)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、L-选择素 (L-selectin) 的 mRNA 表达; 免疫荧光法检测 Wnt 通路下游分子原癌基因 (C-Jun)、间质上皮转换因子 (Met)、淋巴细胞增强结合因子 1 (LEF1) 的表达; 因非容受态组无 JAr 细胞黏附, 观察其余各组的 JAr 细胞黏附率。**结果** 根据细胞存活率结果, 选择 10% 温阳化浊方含药血清进行后续实验。干预 48 h 时, 与模型 1 组比较, 温阳化浊方含药血清 1 组 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达显著降低, CCL-18 和 MRC-1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), 空白血清 1 组 TNF- α mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与温阳化浊方含药血清 1 组比较, 空白血清 1 组 CCL-18 和 MRC-1 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$)。与非容受态组比较, 容受态组细胞中 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin、ITG α V、ITG β 3、ITG β 5、E-cadherin、L-selectin mRNA 及 C-Jun 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与容受态组比较, 模型 2 组 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin、ITG α V、ITG β 3、ITG β 5、E-cadherin、L-selectin mRNA 及 C-Jun 蛋白表达, JAr 细胞的黏附率显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型 2 组比较, 温阳化浊方含药血清 2 组 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin、ITG α V、ITG β 3、ITG β 5 mRNA 及 C-Jun 蛋白表达, JAr 细胞的黏附率均显著升高 ($P < 0.01$), 空白血清 2 组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 温阳化浊方含药血清通过抑制 M1 型巨噬细胞极化, 上调 Wnt 通路, 提高子宫内膜容受性, 从而促进慢性子宫内膜炎的胚胎种植。

[关键词] 慢性子宫内膜炎; 胚胎种植; 温阳化浊方; 子宫内膜容受性; 巨噬细胞; 极化; Wnt 通路

基金项目: 国家自然科学基金 (81774351)

✉ 通讯作者: xiatian76@163.com, 15822238896

慢性子宫内膜炎 (chronic endometritis, CE) 是子宫黏膜的持续性炎症, 常由病原微生物感染引起, 可导致不孕症、复发性流产、反复种植失败等, 是造成女性生殖力下降的重要因素^[1-2]。巨噬细胞是子宫内膜数量最多的抗原提呈细胞, 在病原微生物感染时, 革兰阴性菌的脂多糖 (LPS) 和炎症因子诱导巨噬细胞向经典活化的 M1 表型极化, 产生白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等促炎因子, 造成子宫内膜的慢性炎症反应^[3]。研究^[4-5]发现, CE 患者子宫内膜 M1 型巨噬细胞增多, 促炎因子表达增加, 可能是 CE 患者发生反复种植失败的重要因素之一。巨噬细胞可以表达多种 Wnt 配体, 尤其是在炎症环境下, 参与 Wnt 通路的激活^[6], 且 Wnt 通路在胚胎种植过程中具有重要的调节作用^[7]。本团队认为 CE 导致反复种植失败的中医主要病机为脾肾阳虚、湿浊瘀结, 并据此创制了温阳化浊方^[8]。前期研究发现, 温阳化浊方能显著提高反复种植失败患者的临床妊娠率和持续妊娠率^[9]。因此, 本实验通过体外培养 Ishikawa 细胞和 JAr 细胞, 建立胚胎种植细胞模型, 从巨噬细胞极化和 Wnt 通路探讨温阳化浊方促进胚胎种植的可能分子机制。本实验经南开医院动物伦理委员会批准 (批件号: NKYY-DWLL-2020-171)。

1 材料

1.1 动物及细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量 220 ~ 260 g, 8 ~ 10 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK(京)2016-0006。

人外周血 THP-1 单核细胞株、人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株, 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心; 人胎盘绒毛癌 JAr 细胞株, 购自中国科学院细胞库。THP-1 单核细胞培养条件: 90% 的 RPMI 1640 培养基, 10% 的胎牛血清, 1% 双抗, 0.05 mmol/L 的 β -巯基乙醇; Ishikawa 细胞培养条件: 90% DMEM 高糖培养基, 10% 胎牛血清, 1% 双抗; JAr 细胞培养条件: 90% 的 RPMI 1640 培养基, 10% 胎牛血清, 1% 双抗。均在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 药物及试剂

温阳化浊方组成: 黄芪 20 g, 菟丝子 30 g, 鹿角霜 (先煎) 20 g, 巴戟天 10 g, 肉苁蓉 10 g, 茯苓 15 g, 麸炒白术 10 g, 炒薏苡仁 20 g, 苍术 5 g,

藿香 10 g, 黄柏 5 g, 车前子 (包煎) 20 g, 陈皮 10 g, 荷梗 10 g, 由天津中医药大学第一附属医院药剂科提供。煎制方法: 加入蒸馏水 1365 ml, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 倒出药液, 再加入蒸馏水 585 ml, 煎煮 30 min, 将两次的药液混合, 浓缩至浓度为 4.23 g/ml 的药液。

胎牛血清 (FBS)、Trypsin-EDTA (0.25%)、RPMI 1640 培养基、DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司, 货号分别为 10270106、25200056、8119493、C11995500BT); THP-1 完全培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号 CM0233); 青链霉素混合液、 β -巯基乙醇、Hoechst 33258 染色液、甲基纤维素、CCK8 试剂盒、高效 RIPA 裂解液、TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂、Triton X-100 (北京索莱宝科技有限公司, 货号分别为 P1400、M8210、C0021、M8070、CA1210-500、R0010、R1100、T8200); 佛波酯 (PMA)、LPS (美国 Sigma 公司, 货号分别为 P8139、L4391); γ 干扰素 (IFN- γ , 美国 PeproTech 公司, 货号 300-02-20); 4% 多聚甲醛固定液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 P0099); 活细胞示踪探针-绿色、活细胞示踪探针-红色 (上海懋康生物科技有限公司, 货号分别为 MX4107-100 μ g、MX4109-100 μ g); Primer-ScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis kit、TB Green[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (日本 Takara 公司, 货号分别为 6210A、RR420A); 牛血清白蛋白 (BSA, Roche 公司, 货号 BL5138); 抗 CD14 抗体 (IH5D8) (美国 Abcam, 货号 ab181470); 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 多克隆抗体 (Proteintech 中国公司, 货号 18985-1-AP); Alexa Fluor 488 标记的驴抗兔二抗 IgG、Alexa Fluor 647 标记的羊抗小鼠二抗 IgG (北京博奥森生物技术有限公司, 货号分别为 bs-0295D-AF488、bs-0296G-AF647); 原癌基因 (C-Jun) 抗体、淋巴细胞增强结合因子 1 (LEF1) 抗体、间质上皮转换因子 (Met) 抗体 (美国 CST 公司, 货号分别为 9165、2230、8198)。

1.3 主要仪器

Vioskan LUX 多功能酶标仪、ProFlexTM 梯度 PCR 仪 (美国赛默飞世尔科技公司); DM6000 B 正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); AE31 倒置荧光显微镜、BX43 生物显微镜 (日本 Olympus 公司); LightCycler[®] 96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

采用随机数字表法将 20 只大鼠分为温阳化浊方组和空白组, 每组 10 只。根据人与大鼠的等效剂量^[10], 温阳化浊方组大鼠每次给予温阳化浊方 21.05 g/kg 灌胃, 每日 2 次, 每次 1 ml, 连续灌胃 7 天, 末次给药 1 h 后腹主动脉取血。空白组不予灌胃, 直接腹主动脉取血。室温静置 2 h, 3000 r/min、4℃离心 15 min, 离心半径为 12 cm, 取上清, 0.22 μm 滤膜过滤灭菌, 56℃灭活 30 min, -40℃冰箱保存备用。

2.2 诱导巨噬细胞 M1 极化

THP-1 为单核细胞, 在 THP-1 完全培养基中加入 16.2 μmol/L 的 PMA, 使其终浓度为 150 nmol/L, 37℃孵育过夜, 诱导 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞。之后接种于 6 孔板, 更换新鲜培养基, 每孔 3 ml 培养基中分别加入 LPS 和 IFN-γ, 浓度均为 20 μg/ml, 剂量均为 3 μl, 使其终浓度均为 20 ng/ml, 37℃孵育 24 h, 诱导巨噬细胞向 M1 型极化。免疫荧光法检测 M1 型巨噬细胞: 将经 LPS 和 IFN-γ 诱导的 M1 型巨噬细胞制备细胞爬片, 经 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.5% Triton X-100 通透 15 min, 5% BSA-PBS 室温封闭 1 h, 一抗 (CD14 1:300, iNOS 1:250) 4℃孵育过夜, 二抗 (羊抗小鼠二抗 IgG 1:300, 驴抗兔二抗 IgG 1:300) 37℃避光孵育 1 h, Hoechst 33258 避光复染 5 min, 抗荧光猝灭封片, 于正置荧光显微镜下观察。

2.3 含药血清浓度的筛选

CCK8 法检测细胞活性, 将 M1 型巨噬细胞接种于 96 孔板, 分别设置空白孔, 对照孔, 2%、4%、8%、10%、15%、20% 的温阳化浊方含药血清孔和相同浓度的空白血清孔, 37℃培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, 用完全培养基洗涤两次, 每孔加入 100 μl 新鲜培养基, 再依次加入 10 μl 的 CCK8 溶液, 37℃培养 2 h, 采用酶标仪 450 nm 检测吸光度 OD 值。细胞存活率 = (加药孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) × 100%, 其中加药孔中含 CCK8 溶液、M1 型巨噬细胞、培养基和不同浓度的温阳化浊含药血清或空白血清; 空白孔中含 CCK8 溶液和培养基; 对照孔中含 CCK8 溶液、M1 型巨噬细胞和培养基。每组 6 个样本, 实验重复 3 次。选择最大无毒剂量的温阳化浊含药血清和同浓度空白血清进行后续实验。

2.4 Real-time PCR 法检测 M1 型巨噬细胞 TNF-α、IL-1β 和 M2 型巨噬细胞趋化因子配体 18 (CCL-18)、甘露糖受体 C 型 1 (MRC-1) 表达

实验分为 3 个组。1) 模型 1 组: M1 型巨噬细胞; 2) 温阳化浊方含药血清 1 组; 3) 空白血清 1 组。THP-1 单核细胞接种于 6 孔板, 每孔 2×10^5 个, 各组细胞均经 PMA 诱导为巨噬细胞, 再加入 3 μl 20 μg/ml 的 LPS 和 3 μl 20 μg/ml 的 IFN-γ 诱导 M1 型巨噬细胞极化; 温阳化浊含药血清 1 组和空白血清 1 组, 同时分别加入筛选出的最大无毒剂量的温阳化浊方含药血清和空白含药血清, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养, 每组 3 个样本, 每个样本 3 个复孔。各组均孵育 24 h 和 48 h 两个时间点检测。培养结束后, 弃去培养基, 加入 1 ml TriQuick RNA 提取试剂, 提取总 RNA, 合成 cDNA, 检测 M1 型巨噬细胞标志物 TNF-α、IL-1β 和 M2 型巨噬细胞标志物 CCL-18、MRC-1 的表达。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列如下: β-actin 上游引物 5'-TGGAACGGTGAAGGTG-ACAG-3', 下游引物 5'-CGCATCTCATATTTGGAATGACT-3' (长度 120 bp); TNF-α 上游引物 5'-CCCCAGGGA-CCTCTCTCTAA-3', 下游引物 5'-CTCAGCTTGA-GGGTTTGCTAC-3' (长度 109 bp); IL-1β 上游引物 5'-AGCCATGGCAGAAGTACCTG-3', 下游引物 5'-CCTGGAAGGAGCACTTCATCT-3' (长度 116 bp); CCL-18 上游引物 5'-TGCTCCTGT-GCACAAGTT-GGTA-3', 下游引物 5'-CCGGCCTCT-CTTGTTA-GGA-3' (长度 150 bp); MRC-1 上游引物 5'-TTCC-TTTGGACGGATGGACG-3', 下游引物 5'-GTCAA-GGAAGGGTCCGATCG-3' (长度 206 bp)。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示目的基因相对于内参 β-actin 的表达水平。

2.5 温阳化浊方含药血清对体外胚胎种植 Wnt 通路的影响

2.5.1 建立体外胚胎种植模型 JAr 细胞为贴壁细胞, 首先使用 0.25% Trypsin-EDTA 消化成单个细胞, 将 1×10^6 个细胞种植在超低黏附 6 孔板中培养, 在完全培养基中加入 3 mg/ml 的甲基纤维素, 37℃培养过夜。收集 JAr 细胞球, 室温 1000 r/min 离心 3 min, 离心半径 8.6 cm, 弃上清, 用 1 ml 的 JAr 全培重悬, 过 70 μm 细胞滤网, 得到直径小于 70 μm 的 JAr 细胞球。采用 Transwell 共培养 M1 型巨噬细胞和子宫内膜上皮 Ishikawa 细胞, 温阳化浊方含药血清干预 48 h。Transwell 共培养结束后, 去除上层小室, 在下层加入 JAr 细胞球, 更换为 JAr 培养基,

与 Ishikawa 细胞共培养 1.5 h, 模拟体外胚胎种植^[11-13]。

2.5.2 实验组和干预方法 分为5个组: 1) 非容受态组: 只包含 Ishikawa 细胞, 此时无滋养层 JAr 细胞球植入, 代表非容受态的子宫内膜; 2) 容受态组: 包含 Ishikawa 细胞和 JAr 细胞, 代表容受状态的子宫内膜; 3) 模型 2 组: Ishikawa 细胞与 M1 型巨噬细胞共同孵育 48 h, 再与 JAr 细胞球共培养; 4) 温阳化浊方含药血清 2 组: 在 Ishikawa 细胞与 M1 型巨噬细胞共培养体系中, 同时加入筛选出的最大无毒剂量的温阳化浊方含药血清, 共同孵育 48 h, 再加入 JAr 细胞球; 5) 空白血清 2 组: 在 Ishikawa 细胞与 M1 型巨噬细胞共培养体系中, 加入同浓度空白血清孵育 48 h, 再加入 JAr 细胞球。

2.5.3 观察指标及方法 1) Real-time PCR 法检测 Wnt 通路相关因子 mRNA 表达, 包括 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin。细胞共培养 1.5 h 后, 弃掉培养基, 用 PBS 洗一次, 去除未黏附的 JAr 细胞, 提取总 RNA。反应条件同 2.4。每组 4 个样本, 实验重复 3 次。引物序列如下: β -actin 上游引物 5'-TGGAACGGTGAAGGTGACAG-3', 下游引物 5'-CGCATCTCATATTTGGAATGACT-3' (长度 120 bp); Wnt4 上游引物 5'-GTGACGCAAGG-GACTCGG-3', 下游引物 5'-CGCACATCCACAAAC-GACTG-3' (长度 215 bp); Wnt6 上游引物 5'-CAG-CCCCTTGCTTATGGACC-3', 下游引物 5'-CGTCTC-CCGAATGTCCTGTT-3' (长度 226 bp); Wnt7b 上游引物 5'-GGACGCTCGGGAGATCAAG-3', 下游引物 5'-ATCCGGTCCTCTAGAACCTTCC-3' (长度 87 bp); Wnt11 上游引物 5'-TATCCGGCCTGTGAAGGACT-3', 下游引物 5'-TTGTTGCACTGCCTGTCTTG-3' (长度 111 bp); β -catenin 上游引物 5'-TCTAGGAATGAA-GGTGTGGCG-3', 下游引物 5'-TCCAAGATCAGCA-GTCTCATTC-3' (长度 156 bp)。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示目的基因相对于内参 β -actin 的表达水平。

2) 免疫荧光方法检测 Wnt 通路下游 C-Jun、Met、LEF1 活性。细胞共培养 1.5 h 后, 弃掉培养基, 用 PBS 洗 1 次, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 细胞免疫荧光实验步骤同 2.2。一抗 (C-Jun 1: 400, Met 1: 300, LEF1 1: 200), 二抗 (IgG 1: 300)。每组 6 个样本, 实验重复 3 次。结果用 C-Jun 细胞阳性率、Met 和 LEF1 荧光强度表示。

3) Real-time PCR 法检测子宫内膜容受性标志分子整合素 αV (ITG αV)、整合素 $\beta 3$ (ITG $\beta 3$)、

整合素 $\beta 5$ (ITG $\beta 5$)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、L-选择素 (L-selectin) mRNA 表达。细胞共培养 1.5 h 后, 弃掉培养基, 用 PBS 洗一次, 去除未黏附的 JAr 细胞, 提取总 RNA。反应条件同 2.4, 每组 4 个样本, 实验重复 3 次。引物序列如下: β -actin 上游引物 5'-TGGAACGGTGAAGGTGACAG-3', 下游引物 5'-CGCATCTCATATTTGGAATGACT-3' (长度 120 bp); ITG αV 上游引物 5'-AGATATT-CACACTTTGGGTTGTGG-3', 下游引物 5'-GGTAA-CCAATGTGGAGTTGGTG-3' (长度 244 bp); ITG $\beta 3$ 上游引物 5'-CCGGCTACTACTGCAACTGT-3', 下游引物 5'-CCTTGCCAGTGTCTTAAGCTCT-3' (长度 291 bp); ITG $\beta 5$ 上游引物 5'-GAGTGCTGCGGG-ACGGAT-3', 下游引物 5'-TGCATATGTTGAGACC-TGCCAG-3' (长度 268 bp); E-cadherin 上游引物 5'-CGGAGAAGAGGACCAGGACTT-3', 下游引物 5'-AAGATACCGGGGACACTCA-3' (长度 115 bp); L-selection 上游引物 5'-GATGCAGGCAAATGGAA-CGA-3', 下游引物 5'-GGCTGGCAAGAAGCTGTG-TA-3' (长度 74 bp)。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示目的基因相对于内参 β -actin 的表达水平。

2.6 温阳化浊方含药血清对胚胎种植的影响

细胞分为 4 个组: 1) 容受态组: 包含 Ishikawa 细胞和 JAr 细胞球; 2) 模型 2 组: 包含 Ishikawa 细胞、JAr 细胞和 M1 型巨噬细胞; 3) 温阳化浊方含药血清 2 组: 包含 Ishikawa 细胞、JAr 细胞和 M1 型巨噬细胞, 以及温阳化浊方含药血清 (每孔 3 ml 培养基中加入 300 μ l 温阳化浊含药血清); 4) 空白血清 2 组: 包含 Ishikawa 细胞、JAr 细胞和 M1 型巨噬细胞, 以及空白血清 (每孔 3 ml 培养基中加入 300 μ l 空白血清)。

M1 型巨噬细胞与 Ishikawa 细胞及相应含药血清共培养 48 h 后, 弃去上层小室, 加入 2 μ mol/L 的活细胞示踪探针-绿色, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min。JAr 细胞球离心后, 用 10 μ mol/L 的活细胞示踪探针-红色重悬, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。染色结束后, 去除染色液, 加 PBS 反复洗 3 次。JAr 细胞球与 Ishikawa 细胞共培养 1.5 h。倒置荧光显微镜下观察, Image J 1.8.0 软件分析 10 个视野下 JAr 细胞球数量, 此为 JAr 细胞球总量。之后弃掉培养基, PBS 洗 1 次, 去除未黏附的 JAr 细胞球, 再于倒置荧光显微镜下观察黏附的 JAr 细胞数量, 计算黏附率: 细胞黏附率=黏附的细胞数量/细胞总数量 $\times$ 100%。每组 6 个样本, 实验重复 3 次。

2.7 统计学方法

采用 R 软件（版本 3.6.1）进行统计分析。本研究数据均满足正态分布用 ($\bar{x}\pm s$) 表示, CCK8 实验两组比较采用 *t* 检验, 其余实验多组比较采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐采用 Turkey 检验, 若方差不齐用 Dunn's 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 LPS+LFN- γ 诱导巨噬细胞 M1 极化结果

使用 M0 型巨噬细胞标志物 CD14（红色荧光）和 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS（绿色荧光）共同标记, 免疫荧光结果见图 1。极化前 M0 型巨噬细胞高表达 CD14, 而其 iNOS 表达量很低; 经 LPS+IFN- γ 诱导 M1 型巨噬细胞极化后, 高表达 CD14, 并且 iNOS 阳性细胞明显增加, 提示此时巨噬细胞表型为 M1 型。

3.2 温阳化浊方含药血清干预浓度筛选结果

表 1 示, 与空白血清组比较, 温阳化浊方含药血清 2%、4%、8%、10% 浓度 M1 型巨噬细胞存活率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而温阳化浊方含药血清浓度增加到 15% 和 20% 时, 细胞活性受到明显抑制, 与空白血清组比较细胞存活率显著降

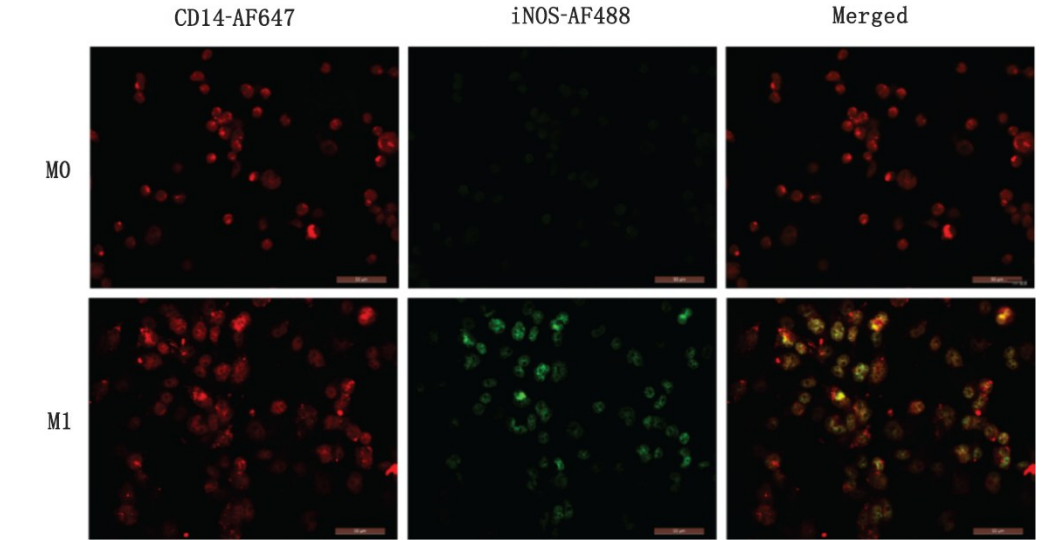
低 ($P<0.01$)。因此, 本研究选择最大无毒剂量 10% 温阳化浊方含药血清进行后续实验。

3.3 各组 M1 型巨噬细胞标志物 TNF- α 、IL-1 β 和 M2 巨噬细胞标志物 CCL-18、MRC-1 mRNA 表达比较

表 2 示, 与本组 24 h 比较, 48 h 时温阳化浊方含药血清 1 组 IL-1 β mRNA 表达显著降低, CCL-18、MRC-1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$), 模型 1 组和空白血清 1 组 TNF- α 、IL-1 β 、CCL-18、MRC-1 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。干预 24 h, 各组间 TNF- α 、IL-1 β 、CCL-18、MRC-1 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。干预 48 h, 与模型 1 组比较, 温阳化浊方含药血清 1 组 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达显著降低, CCL-18 和 MRC-1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$), 空白血清 1 组 TNF- α mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$)。与温阳化浊方含药血清 1 组同时时间比较, 空白血清 1 组 48 h 时 CCL-18 和 MRC-1 mRNA 表达均显著降低 ($P<0.01$)。

3.4 各组细胞中 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin mRNA 表达比较

表 3 示, 与非容受态组比较, 容受态组 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin mRNA 表达显著



注: CD14-AF647, 红色荧光染料 Alexa Flour 647 标记 CD14 抗体; iNOS-AF488, 绿色荧光染料 Alexa Flour 488 标记的 iNOS 抗体; Merged, 两种荧光图片叠加。

图 1 脂多糖联合 γ 干扰素诱导巨噬细胞 M1 极化 (免疫荧光, $\times 400$)

表 1 不同浓度温阳化浊方含药血清组和空白血清组 M1 型巨噬细胞存活率比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	2	4	8	10	15	20
空白血清组	6	102.7 $\pm$ 3.5	103.9 $\pm$ 2.5	99.9 $\pm$ 1.8	101.5 $\pm$ 6.1	107.8 $\pm$ 2.3	111.3 $\pm$ 4.8
温阳化浊方含药血清组	6	109.7 $\pm$ 3.8	94.1 $\pm$ 2.3	103.4 $\pm$ 3.0	91.6 $\pm$ 4.9	70.6 $\pm$ 3.5 ^{a)}	61.6 $\pm$ 5.9 ^{a)}

注: a) 与同浓度空白血清组比较, $P<0.01$ 。

表2 各组 M1 型巨噬细胞不同时间标志物 TNF- α 、IL-1 β 和 M2 型巨噬细胞标志物 CCL-18、MRC-1 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	时间	样本数	TNF- α	IL-1 β	CCL-18	MRC-1
模型 1 组	24 h	3	1.02 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.04	1.02 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.01
	48 h	3	1.33 $\pm$ 0.20	1.48 $\pm$ 0.27	0.67 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.08
温阳化浊方含药血清 1 组	24 h	3	0.73 $\pm$ 0.20	1.08 $\pm$ 0.10	1.39 $\pm$ 0.21	1.29 $\pm$ 0.08
	48 h	3	0.41 $\pm$ 0.09 ^{b)}	0.33 $\pm$ 0.07 ^{a) b)}	27.51 $\pm$ 2.76 ^{a) b)}	3.73 $\pm$ 0.19 ^{a) b)}
空白血清 1 组	24 h	3	0.58 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.04	1.30 $\pm$ 0.09
	48 h	3	0.68 $\pm$ 0.10 ^{c)}	1.10 $\pm$ 0.15	0.41 $\pm$ 0.06 ^{d)}	1.55 $\pm$ 0.19 ^{d)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; CCL-18, 趋化因子配体 18; MRC-1, 甘露糖受体 C 型 1。

a) 与本组 24 h 比较, $P<0.01$; b) 与模型 1 组同时时间比较, $P<0.01$; c) 与模型 1 组同时时间比较, $P<0.05$; d) 与温阳化浊方含药血清 1 组同时时间比较, $P<0.01$ 。

升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与容受态组比较, 模型 2 组 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型 2 组比较, 温阳化浊方含药血清 2 组 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin mRNA 表达均显著升高 ($P<0.01$), 空白血清 2 组各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$); 温阳化浊方含药血清 2 组 β -catenin mRNA 表达显著高于容受态组 ($P<0.01$); 温阳化浊方含药血清 2 组和容受态组各指标表达均高于空白血清 2 组 ($P<0.01$)。

3.5 各组细胞中 C-Jun、Met、LEF1 蛋白表达比较

表 4 示, 与非容受态组比较, 容受态组 C-Jun 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$); 与容受态组比较, 模型 2 组 C-Jun 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 与模型 2 组比较, 温阳化浊方含药血清 2 组 C-Jun 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), 空白血清 2 组差异无

统计学意义 ($P>0.05$); 温阳化浊方含药血清 2 组 C-Jun 蛋白表达量显著高于空白血清 2 组 ($P<0.01$)。各组间 Met、LEF1 蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.6 各组细胞子宫内皮膜容受性标志分子 mRNA 表达比较

表 5 示, 容受态组子宫内皮膜 ITG α V、ITG β 3、ITG β 5、E-cadherin、L-selectin mRNA 表达较非容受态组显著升高 ($P<0.01$); 模型 2 组 ITG α V、ITG β 3、ITG β 5、E-cadherin、L-selectin mRNA 表达较容受态组显著降低 ($P<0.01$), 其中 L-selectin 降低尤为显著, 且低于非容受态组 ($P<0.05$); 与模型 2 组比较, 温阳化浊方含药血清 2 组 ITG α V、ITG β 3、ITG β 5 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$), 空白血清 2 组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与温阳化浊方含药血清 2 组比较, 空白血清 2

表3 各组细胞中 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	Wnt4	Wnt6	Wnt7b	Wnt11	β -catenin
非容受态组	4	1.01 $\pm$ 0.07	1.03 $\pm$ 0.14	1.02 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.12
容受态组	4	3.46 $\pm$ 0.19 ^{a)}	14.43 $\pm$ 1.47 ^{a)}	6.40 $\pm$ 0.23 ^{a)}	5.41 $\pm$ 0.28 ^{a)}	2.10 $\pm$ 0.22 ^{b)}
模型 2 组	4	1.53 $\pm$ 0.16 ^{c)}	4.92 $\pm$ 0.64 ^{c)}	3.52 $\pm$ 0.08 ^{c)}	1.08 $\pm$ 0.07 ^{c)}	1.01 $\pm$ 0.15 ^{d)}
温阳化浊方含药血清 2 组	4	3.27 $\pm$ 0.27 ^{e)}	17.14 $\pm$ 1.63 ^{e)}	6.10 $\pm$ 0.43 ^{e)}	4.72 $\pm$ 0.74 ^{e)}	3.49 $\pm$ 0.40 ^{e) f)}
空白血清 2 组	4	0.91 $\pm$ 0.11 ^{c) f)}	6.96 $\pm$ 0.68 ^{c) f)}	3.17 $\pm$ 0.52 ^{c) f)}	1.06 $\pm$ 0.10 ^{c) f)}	0.74 $\pm$ 0.04 ^{d) f)}

注: a) 与非容受态组比较, $P<0.01$; b) 与非容受态组比较, $P<0.05$; c) 与容受态组比较, $P<0.01$; d) 与容受态组比较, $P<0.05$; e) 与模型 2 组比较, $P<0.01$; f) 与温阳化浊方含药血清 2 组比较, $P<0.01$ 。

表4 各组细胞中 C-Jun、Met、LEF1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	C-Jun 阳性细胞表达率/%	Met 荧光强度	LEF1 荧光强度
非容受态组	6	14.32 $\pm$ 1.04	20.70 $\pm$ 1.50	18.75 $\pm$ 0.62
容受态组	6	54.86 $\pm$ 4.30 ^{a)}	19.09 $\pm$ 0.23	26.02 $\pm$ 2.37
模型 2 组	6	16.24 $\pm$ 2.51 ^{b)}	22.40 $\pm$ 1.54	18.83 $\pm$ 1.27
温阳化浊方含药血清 2 组	6	43.84 $\pm$ 3.72 ^{c)}	21.59 $\pm$ 1.41	26.27 $\pm$ 3.51
空白血清 2 组	6	16.26 $\pm$ 1.42 ^{d)}	20.57 $\pm$ 1.31	20.15 $\pm$ 0.85

注: C-Jun, 原癌基因; Met, 间质上皮转换因子; LEF1, 淋巴细胞增强结合因子 1。

a) 与非容受态组比较, $P<0.01$; b) 与容受态组比较, $P<0.01$; c) 与模型 2 组比较, $P<0.01$; d) 与温阳化浊方含药血清 2 组比较, $P<0.01$ 。

表 5 各组细胞子宫内膜容受性标志分子 mRNA 表达比较 (2^{-ΔΔCT}, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	ITGαV	ITGβ3	ITGβ5	E-cadherin	L-selectin
非容受态组	4	1.00±0.05	1.01±0.08	1.01±0.09	1.02±0.13	1.00±0.03
容受态组	4	4.32±0.39 ^{a)}	4.11±0.43 ^{a)}	3.17±0.20 ^{a)}	2.55±0.20 ^{a)}	2.28±0.25 ^{a)}
模型 2 组	4	1.76±0.33 ^{c)}	1.83±0.20 ^{c)}	1.26±0.22 ^{c)}	1.60±0.10 ^{c)}	0.41±0.08 ^{b) c)}
温阳化浊方含药血清 2 组	4	10.96±1.35 ^{a) c) d)}	5.51±1.30 ^{a) d)}	2.78±0.31 ^{a) d)}	2.16±0.07 ^{a)}	0.46±0.02 ^{c)}
空白血清 2 组	4	1.89±0.21 ^{e)}	1.68±0.11 ^{e)}	0.75±0.05 ^{c) e)}	1.41±0.10 ^{c) f)}	0.44±0.06 ^{c)}

注: ITGαV, 整合素 αV; ITGβ3, 整合素 β3; ITGβ5, 整合素 β5; E-cadherin, E-钙黏蛋白; L-selectin, L-选择素。
a) 与非容受态组比较, $P<0.01$; b) 与非容受态组比较, $P<0.05$; c) 与容受态组比较, $P<0.01$; d) 与模型 2 组比较, $P<0.01$; e) 与温阳化浊方含药血清 2 组比较, $P<0.01$; f) 与温阳化浊方含药血清 2 组比较, $P<0.05$ 。

组 ITGαV、ITGβ3、ITGβ5、E-cadherin mRNA 表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.7 各组 JAr 细胞黏附率比较

表 6 示, 与容受态组比较, 模型 2 组中 JAr 细胞的黏附率显著降低 ($P<0.01$); 与模型 2 组比较, 温阳化浊方含药血清 2 组中 JAr 细胞黏附率显著升高 ($P<0.01$), 空白血清 2 组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 温阳化浊方含药血清 2 组中 JAr 细胞黏附率较空白血清 2 组显著升高 ($P<0.01$)。

表 6 各组 JAr 细胞黏附率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	黏附率
容受态组	6	90.20±3.62
模型 2 组	6	57.26±3.32 ^{a)}
温阳化浊方含药血清 2 组	6	84.05±9.60 ^{b)}
空白血清 2 组	6	51.53±3.08 ^{c)}

注: a) 与容受态组比较, $P<0.01$; b) 与模型 2 组比较, $P<0.01$; c) 与温阳化浊方含药血清 2 组比较, $P<0.01$ 。

4 讨论

慢性子宫内膜炎常合并不孕症、反复种植失败等病症, 故属于中医学“不孕”“滑胎”“胎元不固”等范畴。主要病机为脾肾阳虚, 湿浊内蕴, 胞宫寒湿困阻, 瘀浊不化, 从而阻碍胚胎的种植。温阳化浊方中菟丝子、鹿角霜、肉苁蓉、巴戟天温阳化气, 补肾填精, 荣养胞宫; 黄芪、茯苓、白术健脾益气, 气行则血行, 血脉通畅, 胞宫得养; 苍术、车前子、陈皮、荷梗、藿香、薏苡仁理气化湿, 以助分化胞宫蓄积之湿浊瘀痰; 黄柏清热燥湿, 反佐诸药温燥之性。全方温肾健脾, 化湿蠲浊。前期临床研究^[9]发现, 温阳化浊方可显著改善子宫内膜容受性, 为胚胎提供良好的种植环境, 提高反复种植失败患者冻融胚胎移植的临床妊娠率和持续妊娠率。

巨噬细胞是子宫内膜数量最多的固有免疫细胞和抗原提呈细胞, 按功能表型可分为 M1 型和 M2

型。在炎症初始阶段, LPS、Th1 细胞因子 IFN-γ 诱导巨噬细胞向 M1 型极化, 分泌促炎因子如 IL-1β、TNF-α 等, 加重子宫内膜的慢性炎症; 在炎症修复阶段, Th2 细胞因子诱导巨噬细胞向替代性激活的 M2 型极化, 通过分泌转化生长因子 β (TGF-β)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和表皮生长因子 (EGF), 以抑制炎症的发生并促进组织再生^[14-15]。巨噬细胞 M1/M2 极化的平衡调控子宫内膜促炎/抑炎的稳态。本研究结果显示, LPS+IFN-γ 诱导的 M1 型巨噬细胞经温阳化浊含药血清干预 24 h 后, M1 型巨噬细胞标志物 TNF-α、IL-1β 和 M2 型巨噬细胞标志物 CCL-18、MRC-1 mRNA 的表达与模型 1 组比较无显著差异; 干预 48 h 后, 与模型 1 组比较, 温阳化浊含药血清 1 组 TNF-α 和 IL-1β mRNA 的表达显著减少, CCL-18 和 MRC-1 mRNA 的表达显著增加; 此外, 温阳化浊含药血清 1 组干预 48 h 后, IL-1β mRNA 表达较干预 24 h 时显著降低, CCL-18、MRC-1 mRNA 表达则显著升高, 均提示温阳化浊含药血清干预时间延长至 48 h 后, 能够有效抑制 M1 型巨噬细胞过度极化, 降低 M1/M2 巨噬细胞比例, 从而减轻子宫内膜的慢性炎症状态。

子宫内膜巨噬细胞 M1/M2 极化失衡是导致胚胎种植失败、流产、先兆子痫、早产等不良妊娠事件的重要因素^[16-18]。研究^[4]表明, 子宫内膜 M1 型巨噬细胞增多, 与 CE 患者发生反复种植失败相关。复发性流产患者子宫蜕膜组织中可见大量 M1 型巨噬细胞^[19]。巨噬细胞作为 Wnt 配体的重要来源, 参与 Wnt 通路的激活^[6], 巨噬细胞极化失衡可能影响 Wnt 通路活性, 进而导致胚胎种植失败。Wnt 通路在植入前囊胚的发育、囊胚激活以及囊胚在子宫内膜的黏附和植入等过程中都发挥着广泛的调节作用^[20]。Wnt4、Wnt5a、Wnt6 表达于子宫内膜基质细胞, Wnt7b、Wnt11、β-catenin 表达于腺上皮和基质细胞, 在胚胎种植窗期的表达显著增加^[21-22]。

C-Jun、Met、LEF1 是经典 Wnt/ β -catenin 通路的下游效应分子, C-Jun 表达于囊胚的滋养层, 能够促进滋养层细胞侵入到子宫内膜上皮^[23]。本研究结果表明, 与容受态组比较, 当模型 2 组子宫上皮 Ishikawa 细胞暴露于 M1 型巨噬细胞时, Met 和 LEF1 的表达差异无统计学意义, Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin 和 C-Jun 表达显著降低, 提示 Wnt 通路活性显著下调; 温阳化浊方含药血清干预可显著增加 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin、C-Jun 的表达水平, 对 Met 和 LEF1 的表达无显著影响, 提示温阳化浊方能够通过上调 Wnt4、Wnt6、Wnt7b、Wnt11、 β -catenin、C-Jun 的表达, 提高 Wnt 通路活性。

另有研究^[21]表明, Wnt 通路能够调节子宫内膜容受性, 在胚胎种植过程中发挥重要作用。在胚胎植入窗口期, 子宫内膜上皮细胞特异性表达黏附蛋白 ITG α V、ITG β 3、ITG β 5、E-cadherin、L-selectin 等, 调控子宫内膜呈现容受状态, 以接纳胚胎的植入^[24-25]。E-cadherin 是一种钙依赖性的细胞黏附分子, 在胚胎与子宫内膜上皮黏附阶段, 表达于囊胚的滋养外胚层, 有利于胚胎在子宫内膜上皮细胞的定位和黏附^[26]; L-selectin 表达于子宫内膜上皮细胞、腺上皮细胞和囊胚滋养层细胞, 能够促进胚胎的植入^[27]。本研究结果显示, 模型 2 组子宫内膜上皮 Ishikawa 细胞与 M1 型巨噬细胞共培养后, 与容受态组比较, ITG α V、ITG β 3、ITG β 5、E-cadherin、L-selectin 的表达显著降低, JAr 细胞黏附率显著降低; 温阳化浊方含药血清干预能显著升高上皮细胞 ITG α V、ITG β 3 和 ITG β 5 的表达, 提高滋养层 JAr 细胞的黏附率, 提示温阳化浊方通过上调 Wnt 通路活性, 提高子宫内膜容受性, 从而促进胚胎种植。

综上所述, 温阳化浊方能够有效提高慢性子宫内膜炎的胚胎种植率, 其机制可能与抑制 M1 型巨噬细胞极化, 增强 Wnt 通路活性, 提高子宫内膜容受性, 从而促进胚胎种植相关。但本研究仅涉及胚胎种植细胞实验, 影响因素较为单一, 不能够完全反映在整个机体环境下慢性子宫内膜炎对胚胎种植的影响, 后续需要进一步研究探讨。

参考文献

- [1] KIMURA F, TAKEBAYASHI A, ISHIDA M, et al. Review: chronic endometritis and its effect on reproduction [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2019, 45(5):951-960.
- [2] KITAYA K, TAKEUCHI T, MIZUTA S, et al. Endometritis: new time, new concepts [J]. Fertil Steril, 2018, 110(3):344-350.
- [3] SU Y, XIONG S, LAN H, et al. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory activities of liriorensinol B dimethyl ether through suppression of NF- κ B and MAPK signaling in in vitro and in vivo models [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 321-332. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.020.
- [4] LI Y, YU S, HUANG C, et al. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure [J]. Fertil Steril, 2020, 113(1):187-196.
- [5] WANG WJ, ZHANG H, CHEN ZQ, et al. Endometrial TGF- β , IL-10, IL-17 and autophagy are dysregulated in women with recurrent implantation failure with chronic endometritis [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17(1): 2.
- [6] SCHAALE K, NEUMANN J, SCHNEIDER D, et al. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses [J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(6-7): 553-559.
- [7] KALOĞLU C, BULUT HE, HAMUTOĞLU R, et al. Wingless ligands and beta-catenin expression in the rat endometrium: The role of Wnt3 and Wnt7a/beta-catenin pathway at the embryo-uterine interface [J]. Mol Reprod Dev, 2020, 87(11):1159-1172.
- [8] 李兆惠, 宫政, 夏天, 等. 温阳化浊法改善子宫内膜容受性体会 [J]. 中医杂志, 2020, 61(6):533-536.
- [9] 胡祖贤, 张巧, 宋佳怡, 等. 温阳化浊方对反复种植失败患者冻融胚胎移植周期妊娠结局的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(9):1038-1041.
- [10] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. FASEB J, 2008, 22(3): 659-661.
- [11] WEIMAR CH, POST UITERWEER ED, TEKLENBURG G, et al. In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions [J]. Reprod Biomed Online, 2013, 27(5):461-476.
- [12] KIM SE, LEE JE, HAN YH, et al. Decursinol from Angelica gigas Nakai enhances endometrial receptivity during implantation [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 36.
- [13] YUAN C, LI X, SONG H, et al. BMP7 coordinates endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation through the endoglin pathway in cell lines and a mouse model [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(4): 2547-2556.
- [14] MURRAY PJ. Macrophage polarization [J]. Annu Rev

- Physiol, 2017, 79:541-566. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
- [15]SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9):6425-6440.
- [16]YE HX, LIAO GN, DONG YJ, et al. miR-146a-5p enhances embryo survival in unexplained recurrent spontaneous abortion by promoting M2 polarization of decidual macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 108930. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108930.
- [17]LI M, PIAO LZ, CHEN CP, et al. Modulation of decidual macrophage polarization by macrophage colony-stimulating factor derived from first-trimester decidual cells: implication in preeclampsia[J]. Am J Pathol, 2016, 186(5):1258-1266.
- [18]XU Y, ROMERO R, MILLER D, et al. An M1-like macrophage polarization in decidual tissue during spontaneous preterm labor that is attenuated by rosiglitazone treatment[J]. J Immunol, 2016, 196(6):2476-2491.
- [19]TSAO FY, WU MY, CHANG YL, et al. M1 macrophages decrease in the decidua from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(3): 204-211.
- [20]TEPEKOY F, AKKOYUNLU G, DEMIR R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation [J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(3):337-346.
- [21]HAYASHI K, YOSHIOKA S, REARDON SN, et al. Wnt genes in the mouse uterus potential regulation of implantation[J]. Biol Reprod, 2011, 84(2): 308-319.
- [22]SONDEREGGER S, POLLHEIMER J, KNÖFLER M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation-review[J]. Placenta, 2010, 31(10): 839-847.
- [23]XAVIER F, LAGARRIGUE S, GUILLOMOT M, et al. Expression of c-fos and jun protooncogenes in ovine trophoblasts in relation to interferon-tau expression and early implantation process [J]. Mol Reprod Dev, 1997, 46(2): 127-137.
- [24]SINGH H, APLIN JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation [J]. J Anat, 2009, 215(1): 3-13.
- [25]FUKUDA MN, SUGIHARA K. Cell adhesion molecules in human embryo implantation [J]. Acta physiologica Sinica, 2012, 64(3):247-258.
- [26]PARIA BC, ZHAO X, DAS SK, et al. Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization[J]. Dev Biol, 1999, 208(2): 488-501.
- [27]GENBACEV OD, PRAKOBPHOL A, FOULK RA, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface[J]. Science, 2003, 299(5605): 405-408.

The Effect of *Wenyang Huazhuo Formula* (温阳化浊方)-containing Serum on Ishikawa and JAr Cell Embryo Implantation Model based on Wnt Pathway

FENG Weihua, ZHAO Xiaoli, CHEN Mingli, JIANG Nan, RONG Beilei, XIA Tian¹

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Wenyang Huazhuo Formula* (温阳化浊方, WHF) in promoting embryo implantation. **Methods** Twenty rats were randomly divided into WHF group and blank group, with 10 rats in each group. Rats in the WHF group were given 21.05 g/kg of WHF liquid by gavage for 7 days, while those in the blank group was not given intragastric administration, so as to prepare WHF-containing serum and blank serum. THP-1 monocytes were cultured in vitro and were differentiated into macrophages induced by phorbol ester (PMA). Furthermore, 20 ng·ml⁻¹ lipopolysaccharide (LPS) and 20 ng·ml⁻¹ gamma Interferon (IFN)- γ were used to induce M1 polarization of macrophages. M1 macrophages were cultured in the 2%, 4%, 8%, 10%, 15%, and 20% WHF-containing serum and blank serum. CCK8 method was used to detect cell viability, and WHF-containing serum having the nontoxic maximum content were selected for follow-up experiment. M1 macrophages were divided into three groups: model 1 group, WHF-containing serum 1 group, and blank serum 1 group. After M1 macrophages polarization, WHF-containing serum 1 group was given selected concentration of WHF-containing serum, while blank serum 1 group was given same concentration of blank serum for 24 and 48 hours. Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) was used to detect mRNA expression of M1 macrophage markers including tumor necrosis

factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) and M2 macrophage markers including chemokine ligand 18 (CCL-18) and mannose receptor type C-1 (MRC-1). Transwell system was used to co-culture M1 macrophages, Ishikawa cells and JAr cells to establish an in vitro embryo implantation model. These cells were divided into five groups: non-receptive group (only Ishikawa cells), receptive group (including Ishikawa cells and JAr cells), model 2 group (M1 macrophages co-cultured with Ishikawa cells and JAr cells), WHF-containing serum 2 group and blank serum 2 group. While M1 macrophages were co-cultured with Ishikawa cells, the latter two groups were administered with selected concentration of WHF-containing serum and blank serum respectively for 48 hours, and then were co-cultured with JAr cells. Real-time PCR was used to detect mRNA expression of Wnt pathway related factors including Wnt4, Wnt6, Wnt7b, Wnt11 and β -catenin and endometrial receptive markers including integrin α V (ITG α V), integrin β 3 (ITG β 3), integrin β 5 (ITG β 5), E-cadherin and L-selectin. Immunofluorescence assay was used to detect the expression of downstream molecules of Wnt pathway including proto-oncogene (C-Jun), mesenchymal transition factor (Met) and lymphocyte enhancer binding factor 1 (LEF1). JAr cell adhesion rate was measured in all the groups except for non-receptive group where there was no JAr cell spheroid adhesion. **Results** According to the results of cell viability, 10% WHF-containing serum was used for subsequent experiments. After 48 hours, compared to those in the model 1 group, the mRNA expression of TNF- α and IL-1 β were reduced significantly, while CCL-18 and MRC-1 mRNA expression increased in the WHF-containing serum 1 group ($P < 0.01$), and TNF- α mRNA expression significantly decreased in the blank serum 1 group ($P < 0.05$). The mRNA expression of CCL-18 and MRC-1 were significantly lower in the blank serum 1 group than the WHF-containing serum 1 group ($P < 0.01$). Compared to the non-receptive group, the receptive group had significantly increased mRNA expressions of Wnt4, Wnt6, Wnt7b, Wnt11, β -catenin, ITG α V, ITG β 3, ITG β 5, E-cadherin and L-selectin and protein expression of C-Jun ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the receptive group, the model 2 group had significantly decreased mRNA expressions of Wnt4, Wnt6, Wnt7b, Wnt11, β -catenin, ITG α V, ITG β 3, ITG β 5, E-cadherin and L-selectin, protein expression of C-Jun, and the adhesion rate of JAr cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model 2 group, the mRNA expressions of Wnt4, Wnt6, Wnt7b, Wnt11, β -catenin, ITG α V, ITG β 3 and ITG β 5, protein expression of C-Jun, and the adhesion rate of JAr cells increased significantly in the WHF-containing serum 2 group ($P < 0.01$), while there was no significant differences with blank serum 2 group ($P > 0.05$). **Conclusion** WHF-containing serum can inhibit the polarization of M1 macrophages, up-regulate Wnt pathway, and improve endometrial receptivity, thereby promoting embryo implantation in chronic endometritis.

Keywords chronic endometritis; embryo implantation; *Wenyang Huazhuo Formula* (温阳化浊方); endometrial receptivity; macrophages; polarization; Wnt pathway

(收稿日期: 2022-01-10; 修回日期: 2022-05-05)

[编辑: 王利芬]