

加剧、多伴咽痒等风邪特点,所以亦有人根据其发病特点从“哮喘”论治。临床所见,本病多由风邪诱发,治不得法,或强止其咳,或闭门留痰,往往造成咳嗽迁延难愈。考虑到患儿稚阴稚阳之体,我们主张CVA的用药宜温润平和,重在理肺止咳,复其肃降,略兼疏散风邪,因而采用止嗽散化裁,创制小儿止咳颗粒,由百部、紫菀、款冬花、桔梗、荆芥、牛蒡子、枳壳、陈皮、茯苓、麦芽、甘草等药组成。经本科临床应用多年,疗效显著。

本研究结果提示:哮喘大鼠的血清与肺组织中存在高水平的MMP-9与TIMP-1,小儿止咳颗粒干预可下调其表达,而且其作用强度与剂量呈正相关。在肺组织形态学方面,病理模型组气道壁明显增厚,肺泡间隔不均匀增厚、增宽,气管黏膜皱壁增多,肺泡壁明显增厚、充血,气管及血管周围可见灶状炎性细胞浸润,表现为轻-中度肺气肿,毛细血管及细支气管周边可见较多胶原纤维沉积。而小儿止咳颗粒干预后上述病理表现得到改善,高剂量的小儿止咳颗粒疗效优于地塞米松。通过本研究发现,小儿止咳颗粒可通过下调MMP-9与TIMP-1的表达,减少ECM在气道的沉积,改善气道炎症,从而逆转气道重塑,达到治疗哮喘的目的,为小儿止咳颗粒治疗CVA提供了科学的实验依据,有利于更进一步临床推广应用。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2009版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(6):

407-413.

- [2] Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(1): 627-635.
- [3] Takemura M, Niimi A, Matsumoto H, et al. Clinical, physiological and anti-inflammatory effect of montelukast in patients with cough variant asthma[J]. Respiration, 2012, 83(4): 308-315.
- [4] Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma[J]. Immunity, 2009, 31(3): 438-449.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2008)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177-185.
- [6] Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma[J]. Curr Opin Pulm Med, 2003, 9(1): 28-33.
- [7] 何承辉, 邢建国, 康小龙, 等. 香青兰总黄酮对哮喘大鼠肺组织基质金属蛋白酶及其抑制剂的影响[J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(8): 686-688.
- [8] 田金娜, 李建保, 刘小凡. 丹龙定喘汤对哮喘小鼠气道重塑及MMP-9, TIMP-1的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 164-166.

(责任编辑: 骆欢欢, 郑锋玲)

安坤种子丸对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜雌孕激素受体表达的影响

田莉¹, 王磊¹, 杜敏¹, 胡树名²

1. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 观察安坤种子丸对胚泡着床障碍小鼠雌、孕激素受体表达的影响, 探讨其对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜容受性的影响及作用机制。方法: 筛选有规律动情周期的雌性小鼠, 随机分为正常组、模型组和中药组, 每组25只。用安坤种子丸先期对中药组小鼠进行灌胃, 雌、雄合笼后观察雌鼠阴栓情况, 之后各组选取有阴栓者20只并计为妊娠第1天(D1), 雄鼠及其余雌鼠剔除。妊娠第4天对中药组和模型组注射米非司酮进行干预, 制成胚泡着床障碍模型; 于妊娠第5、6天处死小鼠, 留取子宫标本。检测子宫雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的表达; 同时统计分析各组间妊娠率、平均着床胚泡数及胚泡着床率等指标的变化。结果: 安坤种子丸可以提高胚泡着床障碍小鼠子宫内膜ER、PR的表达, 妊娠率、平均着床胚泡数及胚泡着床率等指标虽低于正常组($P < 0.05$), 但显著高于模型组($P < 0.01$)。结论: 安坤种子丸可以提高雌鼠子宫内膜上ER、PR的水平, 一定程

[收稿日期] 2016-02-05

[基金项目] 甘肃省自然科学基金课题(1308RJZA126)

[作者简介] 田莉(1981-), 女, 主治医师, 研究方向: 中医妇科病的治疗。

度上改善着床障碍小鼠子宫内膜容受性, 促进胚泡着床。

[关键词] 安坤种子丸; 雌激素受体 (ER); 孕激素受体 (PR); 子宫内膜容受性; 胚泡着床

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2016) 07-0286-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.07.122

Effect of Ankun Zhongzi Wan on the Expression of Estrogen and Endometrium Progesterone Receptor of Rats with Rmbryo Implantation Dysfunction

TIAN Li, WANG Lei, DU Min, HU Shuming

Abstract: Objective: To observe the effect of Ankun Zhongzi wan on the expression of estrogen and endometrium progesterone receptor of rats with rmbryo implantation dysfunction, and to discuss its mechanism on endometrial receptivity of rats. Methods: Selected female rats with regular estrous cycle and divided into normal group, model group and Chinese medicine (CM) group, 25 cases in each group. Gavages by Ankun Zhongzi wan was given to rats in CM group beforehand. Observed vaginal pessary of female rats after female and male rats were mated. On the pregnancy 1st day, intervention of injecting mifepristone was given to CM group and model group to make model of rmbryo implantation dysfunction, then rats were killed and uterine specimen was prepared on the pregnancy 5th and 6th day. Detected expressions of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), analyzed the change of pregnancy rates, number of blastocyst implantation, implantation rate and other indexes among all groups. Results: The expression of endometrium ER and PR of rats in Ankun Zhongzi wan group was improved, while indexes such as pregnancy rates, number of blastocyst implantation, implantation rate were lower than those in normal group ($P < 0.05$), and were all higher than those in model group ($P < 0.01$). Conclusion: Ankun Zhongzi wan can increase levels of endometrium ER and PR, improve endometrial receptivity of rats with implantation dysfunction on some degree, promote embryo implantation.

Keywords: Ankun Zhongzi wan; Estrogen Receptor (ER); Progesterone Receptor (PR); Endometrial receptivity; Embryo implantation

不孕症系指婚后同居, 有正常性生活且未采取避孕措施, 持续 1 年而未妊娠者, 是妇科的常见病之一, 虽对女性身体健康不造成影响, 但给女性及家庭生活带来精神方面的负担。随着社会的进步, 女性生活方式发生改变, 不孕症的发病率呈上升趋势。影响女性不孕的因素有多方面, 其中, 胚泡着床障碍是不孕症的重要原因之一, 胚泡着床成功与否, 与子宫内膜容受性, 即指子宫内膜对胚胎的接受能力密切相关^[1]。卵巢甾体激素及其受体对子宫内膜容受性(胚泡着床)具有重要作用。雌激素 (estrogen, E), 孕激素 (progesterone, P) 分别通过与各自受体即雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 结合使子宫内膜发生蜕膜化改变, 促进子宫内膜容受性的建立, 以利于胚泡植入。

笔者所在的甘肃省中医院生产的中药制剂“安坤种子丸”在临床已应用多年, 前期已行临床观察和相关的动物实验, 结果表明有促卵泡发育和促排卵的作用。本次实验通过检测安坤种子丸对胚泡着床障碍小鼠 ER、PR 表达的影响, 探讨该药促进胚泡着床的作用机制。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 安坤种子丸: 0.1 g/粒, 由甘肃省中医院

中成药提供, 20140721; 米非司酮片剂, 由北京第三制药厂生产, 批号: 国药准字 H20000648; 依文思蓝, 凌飞科技有限公司生产, 批号: LA06039; 抗-雌激素受体 (ANTI-ER), 北京中杉金桥, 批号: KB1737; 抗-孕激素受体 (ANTI-PR), 北京中杉金桥, 批号: RG4506; 即用型 SABC (过氧化物酶) 免疫组化试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司生产, 批号: 08122CJ; 多聚甲醛, 北京化学试剂公司产品, 批号: J30525-89-4; 生理盐水, 由四川科伦药业股份有限公司生产, 批号: A040806-18; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂, 购自北京中杉金桥, 批号: 10427352。

1.2 实验仪器 γ -全自动免疫计数器, 由中科大中佳公司生产, 型号 GC-1200; 生物显微镜, 日本奥林巴斯, 型号 BX71; 电子分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司, 型号 BSA124S-CW; 相机, 日本尼康, 型号 D7000; 移液器, 德国 eppendorf, 型号 research plus; 切片机, 德国徕卡, 型号 LeicaRM2235。

1.3 实验动物 SPF 清洁级昆明种小鼠, 性成熟期, 未交配, 体重 25~30 g, 自由饮水饮食, 室温 22~25℃, 每天光照 10 h, 黑暗 14 h。由甘肃中医学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(甘)2014-0001。

2 实验方法

2.1 分组、造模及给药 将雌性小鼠 80 余只及雄性小鼠 40 只分笼饲养,观察其动情周期。筛选有规律动情周期的雌性小鼠,随机分为 3 组,即正常组、模型组和中药组,每组 25 只。中药组每天上午 9:00 灌胃安坤种子丸 1.0 g/kg(临床日用量的 10 倍),其余 2 组灌服等容量蒸馏水,连续 2 个动情周期。第 3 个动情周期开始,各组按雌雄比为 2:1 合笼,第二天早晨分组检查雌性小鼠阴道,查看有无阴栓。之后各组选取有阴栓者 20 只并计为妊娠第 1 天(D1),雄鼠及其余雌鼠剔除。从 D1 开始,各组仍旧每天给药或给水 1 次。参考文献[2]的造模方法,于小鼠妊娠第 4 天上午 9:00,在中药组和模型组小鼠颈背部皮下注射米非司酮溶液 0.1 mL(0.8 mg/mL),制成胚泡着床障碍模型;正常组颈背部皮下注射等量生理盐水。

2.2 判断模型成功的标准 模型组及中药组平均着床胚泡数低于正常组,即可视为造模成功^[2]。

2.3 标本收集 分别于妊娠第 5、6 天采用颈椎脱臼法处死小鼠,立即开腹取子宫和卵巢,并剥离周围组织。卵巢组织用 4% 多聚甲醛溶液固定,连续切片,HE 染色,记录黄体数目。参照 Myers 等计数法^[3],统计双角子宫的着床胚泡数。用生理盐水漂洗子宫,左右角分开,一半子宫用 4% 多聚甲醛固定 12 h,石蜡包埋,制备切片并检测雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)。

2.4 妊娠率、平均着床胚泡数和着床率计算 于妊娠第 5、6 天采用颈椎脱臼法处死小鼠,立即开腹取出子宫,子宫内壁上蓝染的串珠状膨隆即为胚泡着床,计数双角子宫的着床胚泡数;每个卵巢从中线最大面开始连续切片 5 张,每张间隔 250 μm ,光学显微镜下观察并记录黄体数目。每只小鼠黄体数为双侧卵巢切片中黄体数相加之和。并分组计算其妊娠率、平均着床胚泡数及着床率^[4]。妊娠率=妊娠小鼠数/总雌鼠数 \times 100%;平均着床胚泡数=总着床胚泡数/妊娠小鼠数;胚泡着床率=着床胚泡数/黄体数 \times 100%。

2.5 子宫内膜 ER、PR 蛋白的检测 用免疫组织化学 SP 法制备切片,片中胞核染成棕黄色为阳性细胞标志,选取同批次切片,每张切片随机取 5 个不同高倍视野,以切片染色的背景作对照,经 HP IAS1000 病理图文分析系统分析,测定阳性信号的积分吸光度值,比较各组间着色差异。

2.6 统计学方法 记录数据,采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示,采用多组间多重比较的统计学方法,两组间比较采用 *t* 检验,率的比较采用卡方检验。

3 实验结果

3.1 妊娠率、胚泡着床率和平均着床胚泡数比较 见表 1 和表 2。与正常组比较,模型组妊娠率、胚泡着床率及平均着床胚泡数均显著减少,差异均有统计学意义($P<0.01$),提示造模成功;中药组与正常组比较,妊娠率、胚泡着床率及平均着床

胚泡数均减少,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,中药组妊娠率、胚泡着床率及平均着床胚泡数均明显增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 各组小鼠妊娠率和着床率比较

组别	样本数(只)	妊娠率(%)	胚泡着床率(%)
正常组	20	100(20/20)	88.98 \pm 3.96
模型组	20	35(7/20) ^①	28.01 \pm 2.89 ^①
中药组	20	75(15/20) ^{②③}	67.21 \pm 3.79 ^{②③}

与正常组比较,① $P<0.01$,② $P<0.05$;与模型组比较,③ $P<0.01$

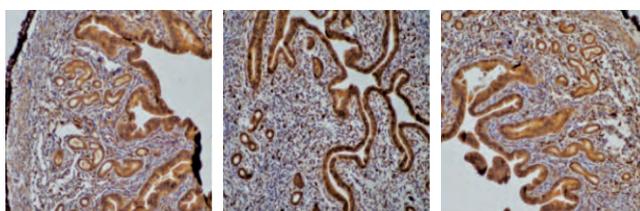
表 2 平均着床胚泡数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(只)	平均着床胚泡数
正常组	20	14.45 \pm 2.29
模型组	20	6.02 \pm 1.18 ^①
中药组	20	10.01 \pm 2.56 ^{②③}

与正常组比较,① $P<0.01$,② $P<0.05$;与模型组比较,③ $P<0.01$

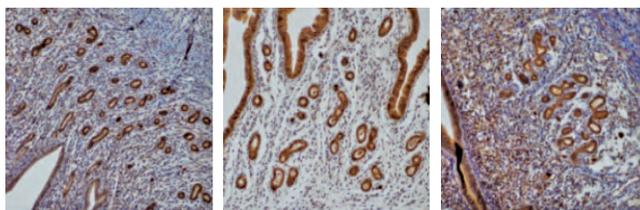
3.2 各组小鼠子宫内膜 ER、PR 免疫组化切片观察 见图 1 和图 2。ER 阳性者呈棕黄色,主要表达于子宫内膜上皮及间质细胞核中,少量散布于胞浆,正常组和中药组腺体丰富,ER 在腺体和间质细胞核中强烈表达;模型组腺体减少,ER 在腺体及间质中的表达较弱。

PR 阳性者为棕黄色颗粒,主要表达于上皮及间质细胞核中,正常组与中药组在细胞核中均有较强表达;模型组则表达较少。



A. 正常组 (100 \times) B. 模型组 (100 \times) C. 中药组 (100 \times)

图 1 各组小鼠子宫内膜 ER 免疫组化图片



A. 正常组 (100 \times) B. 模型组 (100 \times) C. 中药组 (100 \times)

图 2 各组小鼠子宫内膜 PR 免疫组化图片

3.3 各组小鼠子宫内膜 ER、PR 蛋白表达结果比较 见表 3。与正常组比较,模型组 ER 蛋白和 PR 蛋白表达显著降低,差

均有统计学意义($P<0.01$)。中药组与正常组比较, ER 蛋白和 PR 蛋白稍微降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与模型组比较, ER 蛋白和 PR 蛋白显著升高, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

表3 各组小鼠子宫内膜 ER、PR 积分吸光度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(只)	ER	PR
正常组	20	13.64±3.63	9.13±1.02
模型组	20	4.31±2.39 ^①	2.91±0.78 ^①
中药组	20	10.55±5.23 ^{②③}	8.73±1.16 ^{②③}

与正常组比较, ① $P<0.01$, ② $P<0.05$; 与模型组比较, ③ $P<0.01$

4 讨论

不孕症的病因具有多样性, 而胚泡着床障碍是其中之一, 在胚胎着床过程中, 子宫内膜容受性起着关键性作用^[6]。子宫内膜的发育必需与卵泡发育、排卵同步, 才具有接受胚胎植入的能力^[6], 故子宫内膜的发育与子宫内膜的容受性息息相关。子宫内膜容受性建立的机制极其复杂, 不仅受子宫内膜和胚胎分泌的细胞因子、黏附分子调节, 而且也受到卵巢性激素的影响。卵巢分泌的 E、P 是女性生殖系统中最重要的激素, 而 E、P 发挥作用首先必须与相应的 ER 和 PR 结合。虽然血液中 E、P 含量正常, 但由于靶细胞缺乏受体或受体异常, 激素仍不能发挥生理效应而导致一些妇科疾病^[7], 由此可见, ER、PR 的缺乏和异常可间接影响到胚泡着床。本次实验选择小鼠妊娠第 4 天开始, 予以米非司酮制造胚泡着床障碍模型, 其原理为米非司酮是一种孕激素受体拮抗剂, 能竞争性的与 PR 结合, 阻断 P 在靶器官发挥生理效应, 能从影响卵巢功能、输卵管形态和运动及抑制子宫内膜的发育等多个途径干扰着床^[8]。实验中对中药组小鼠予安坤种子丸进行干预治疗, 通过对各组小鼠妊娠第 5、6 天子宫内膜上 ER、PR 蛋白的表达和着床率、妊娠率进行观察研究, 发现模型组及中药组平均着床胚泡数均低于正常组(造模成功); 模型组 ER、PR 表达明显低于正常组, 而中药组虽仍低于正常组, 但却明显高于模型组, 卵巢及子宫内膜形态结构亦存在相同规律。说明安坤种子丸能适度提高 ER、PR 表达水平, 具有对抗米非司酮的作用。因而, 中药组妊娠率、胚泡着床率及平均着床胚泡数虽受米非司酮的影响而低于正常组, 却明显高于模型组。

中医理论认为“肾为天癸化生之源, 主生殖, 两精相搏, 合而成胎”, 《素问·上古天真论》曰: “女子七岁, 肾气盛, 齿更, 发长; 二七天癸至, 任脉通, 太冲脉盛, 月事以时下, 故有子……七七, 任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏无子也。”肾气的盛衰与天癸的分泌至衰竭密切相关。肾气充盛, 肾阴肾阳平衡, 天癸才能充盈, 冲任二脉才能通盛, 胞宫才能受孕育胎。现代研究发现, 补肾法能明显促进胚泡着床期子宫内膜的生长及子宫内膜腺体的发育, 促进卵巢黄体细胞的增生和改善黄体细胞的结构, 从而提高了子宫内膜的

容受性, 有利于胚胎着床和发育^[9]。补肾调经中药可明显促进子宫内膜的分泌功能、内膜腺体和间质的同步化、改善内膜局部微循环状态的作用, 使内膜组织形态向有利于植入的方向发展, 为妊娠提供组织形态学基础^[10], 从而达到改善子宫内膜容受性的作用。甘肃省中医院妇科多年临床经验方安坤种子丸方由菟丝子、枸杞子、淫羊藿、香附、白芍等中药组成, 其中菟丝子、枸杞子、淫羊藿意在补肾益精, 温阳化气, 以上 3 味药物合用具有阴阳并补之功效。该方重用菟丝子, 因其阴阳并补, 药性平和, 故为君药; 淫羊藿可温阳, 《本草纲目》谓其可用于“女子绝阴无子”; 方中枸杞子益肝肾明目, 功主补阴; 在补肾益精的基础上, 注重温阳化气, 并佐以香附疏肝理气, 气机舒畅, 则肾藏泻有度; 当归、白芍活血调经, 诸药合用, 共奏滋阴补肾、化瘀生精、温阳化气之功效。综上所述, 安坤种子丸结合前期临床及动物实验研究, 其治疗不孕症方面具有促卵泡发育和促排卵的作用, 同时还提高了子宫内膜对受孕卵的容受性, 其提高容受性的作用机理之一是通过提高 ER、PR 的表达水平, 促进子宫内膜发育而实现的。

[参考文献]

- [1] 魏丽坤, 张雷, 王蔼明. 子宫内膜容受性的形态学和分子生物学相关标志[J]. 生殖医学杂志, 2008, 17(1): 74-79.
- [2] 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.
- [3] Myers M, Britt KL, Wreford NG, et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary[J]. Reproduction, 2004, 127(5): 569-580.
- [4] 付正英, 卢建荣, 苏晓华. GnRH-a 控制性超促排卵(COH)对小鼠着床期 Hoxa-10 基因表达的影响[J]. 生殖与避孕, 2012, 32(7): 438-442.
- [5] 张明敏, 何新芳, 张锦金. 补肾安胎方及其不同组分对胚泡着床障碍小鼠雌、孕激素及其受体的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(3): 291-294.
- [6] Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy[J]. N Engl J Med, 1999, 340(23): 1796-1799.
- [7] 苏应宽, 徐增祥, 江森. 新编实用妇科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1995: 56.
- [8] 周惠芳, 蒋凤荣, 顿文亮. 补肾助孕方对大鼠胚泡着床期子宫内膜及卵巢形态学的影响[J]. 陕西中医, 2009, 30(1): 117-118.
- [9] 刘丽, 胡喜蛟, 吴春芳, 等. 中医药治疗胚泡着床障碍的研究进展[J]. 中医杂志, 2010, 51(2): 259-260.

(责任编辑: 骆欢欢, 郑锋玲)