

对肾阳虚小鼠肾上腺皮质功能低下状况改善明显,温补肾阳作用最佳。该结果与古文献中记载的肾气丸衍化方作用相一致,在众多肾气丸衍化方中,肉桂及附子的剂量均较原方剂量有所增加,以便更好地发挥其温补肾阳之功。考虑剂量及配比发生改变的可能原因:①温补肾阳作用目的的强化。自晋至宋时期对肾气丸的衍化来看,该方已逐渐从补肾气衍变为温补肾阳的方剂。明代开始,众医家逐渐将金贵肾气丸奉为温补肾阳之代表方。普通高等教育中医药类规划教材五版及六版教材均将该方列入补阳药类,作用为“补肾助阳”,主治“肾阳不足证”。正所谓“量随证变,效由量生”,因此,该方的剂量及配比发生一定变化是合理的。②药材质量的变化。药材质量好坏是产生临床疗效的关键所在,但随着生态环境的改变,或者炮制方法的不同,药材质量也在不断发生变化,为达到良好的治疗效果,组方药物剂量发生改变,而不是固守原方剂量。③剂型的改变。《金匱要略》中记载肾气丸用法为“上为细末,炼蜜为丸,如梧桐子大,酒下为十五丸,日再服”,现多用汤剂

入药。剂型上的改变,对组方中有效成分的溶出产生一定影响,如作为肉桂的主要有效成分桂皮醛,因其具有挥发性,因而随着药物的不断加热煎煮,其含量将会受到影响,其药理作用同时发生改变,故对临床疗效亦产生一定影响。故此,为达到良好的临床治疗功效,将肾气丸剂量及配比进行优化是必要的。

[参考文献]

- [1] 高洁,李政木,黎同明,等.从拆方肾气丸对肾阳虚模型大鼠 HPA 轴的影响初探“阴中求阳”配伍机理[J].四川中医,2007,25(7):15-17.
- [2] 陈奇.中药药理学[M].北京:人民卫生出版社,1993:33.
- [3] 沈自尹.中医虚证辨证参考标准[J].中西医结合杂志,1986(2):117.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

安坤种子丸对胚胎着床障碍小鼠血清雌、孕激素的影响

胡树名¹,王磊²,田莉²,杜敏²

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

[摘要] 目的:观察安坤种子丸对胚胎着床障碍小鼠血清雌、孕激素影响,探讨其对胚胎着床障碍小鼠子宫内膜容受性的影响及其机制。方法:将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。先用安坤种子丸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小鼠颈背部皮下注射米非司酮,制成胚胎着床障碍模型;于妊娠第 5、6 天处死小鼠,留取血清标本。采用放射免疫法检测血清雌激素(E₂)和孕激素(P)的含量;同时制备 HE 切片以观察各组小鼠子宫内膜形态结构的变化,分析并统计观察各组平均着床胚泡数的变化。结果:安坤种子丸可以提高胚胎着床障碍小鼠血清 E₂、P 水平,中药组平均着床胚泡数虽低于正常组,但显著高于模型组,差异均有统计学意义(P<0.01)。结论:安坤种子丸可以通过提高雌鼠血清 E₂、P 水平,一定程度上改善着床障碍小鼠子宫内膜容受性,促进胚胎着床。

[关键词] 子宫内膜容受性;胚胎着床;雌激素;孕激素;安坤种子丸;动物实验;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2016)08-0296-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.08.131

不孕症是妇科的常见病之一,近年来,不孕症的发病率显著上升,这不仅成为一个严重的医学问题,更是当今社会关注的焦点问题。虽然人类辅助生殖技术(assisted reproductive techniques, ART)迅速发展,日渐成熟,但尚存在着低种植率

及低妊娠率的问题。影响妊娠率的因素,除了胚胎的质量外,子宫内膜容受性(endometrial receptivity, ER)也起着至关重要的作用。子宫内膜容受性是指子宫内膜处于一种允许囊胚定位、黏附、侵入,并使子宫内膜间质发生改变,促进胚胎着床

[收稿日期] 2016-02-28

[基金项目] 甘肃省自然科学基金课题(1308RJZA126)

[作者简介] 胡树名(1972-),男,讲师,研究方向:病理学与病理生理学。

的状态^[1],是胚泡成功着床的关键因素。故胚泡着床障碍是导致不孕症及影响 ART 成功率的重要原因之一。卵巢甾体激素对子宫内膜容受性具有重要作用。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,促进子宫内膜容受性的建立,以利于胚泡植入。

甘肃省中医院自制中药制剂“安坤种子丸”系妇科临床经验方,临床疗效显著,前期临床及动物实验研究表明该方促进卵泡发育和促排卵的作用确切。本次实验通过检测安坤种子丸对胚泡着床障碍小鼠血清雌、孕激素的影响,探讨该药促进胚泡着床的作用机制。

1 实验材料

1.1 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。

1.2 药物与试剂 安坤种子丸:0.1 g/粒,由甘肃省中医院中成药房提供,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。雌二醇(E₂)放免测定药盒、孕酮(P)放免测定药盒,由天津九鼎生物工程公司生产,批号:RG3505。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:08122 CJ。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。

1.3 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 Leica RM2235。

2 实验方法

2.1 分组、造模及给药 将雌性小鼠 80 只及雄性小鼠约 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 2:1 合笼,次日早晨分组检查雌性小鼠阴道,查看是否有阴栓。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,各组仍照前每天给药或给水 1 次。参考文献[2]的造模方法,于小鼠妊娠第 4 天上午 9:00,中药组、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)1 次,制成胚泡着床障碍模型;正常组颈背皮下注射生理盐水。

2.2 判断模型成功标准 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 天小鼠尾静脉注射 0.2 mL 0.5% 依文思蓝,5 min 后摘眼球取血(大约 1.5 mL)置于 2 mL EP 管中,用于检测雌孕激素;颈椎脱臼处死小鼠,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。

2.4 平均着床胚泡数的计算 分别于妊娠第 5、6 天小鼠尾静脉注射 0.2 mL 0.5% 依文思蓝,颈椎脱臼处死小鼠,立即开腹取出子宫,子宫内蓝染的串珠状膨隆即为胚泡着床,同时参照 Myers 等计数法^[3],统计双角子宫的着床胚泡数,并分组计算平均着床胚泡数^[4]。平均着床胚泡数=总着床胚泡数/妊娠小鼠数。

2.5 子宫内膜的形态结构观察 取各组胚泡着床部位子宫,每个卵巢从中线最大面开始连续切片 5 张,每张间隔 250 μm,光学显微镜下观察组织形态学变化。制备 HE 切片,观察子宫内膜的发育情况及腺上皮细胞、间质细胞的变化。

2.6 血清 E₂、P 含量的检测 将所取血液静置 2 小时,离心(3000 r/min, 4℃)8 min,分离血清,放射免疫法检测 E₂、P 的含量。

2.7 统计学方法 记录数据,采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用组间多重比较的统计学方法,组间比较采用 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 各组小鼠平均着床胚泡数的比较 见表 1。与正常组比较,模型组和中药组平均着床胚泡数显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示造模成功;与模型组比较,中药组平均着床胚泡数均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

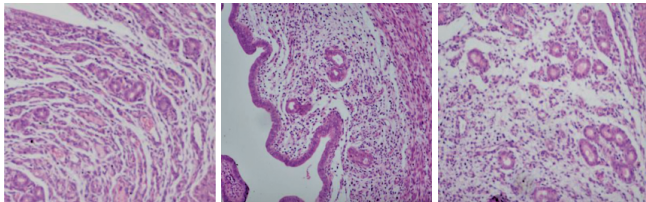
表 1 各组小鼠平均着床胚泡数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(只)	平均着床胚泡数
正常组	20	14.45±2.29
模型组	20	6.02±1.18 ^①
中药组	20	10.01±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 子宫内膜的形态结构观察 见图 1。正常组:子宫内膜形态结构表现为子宫内膜增厚,呈蜕膜化;光镜下:子宫内膜腺体较多,腔大,呈弯曲形,腺腔内可见分泌物;腺上皮细胞呈高柱状,可见核下空泡和顶浆分泌,核分裂象多见;间质水肿、疏松,有散在胶原纤维,见大片蜕膜组织,蜕膜细胞散在分布,形态不规则,核大淡染,核膜清晰,核仁明显,核分裂象多见,血管迂曲,扩张,充血明显。模型组:与正常组比较,子宫内膜发育有较大变化,主要表现为子宫内膜发育不

良；光镜下：腺体小而少，分泌不足，腺腔轻度扩张，呈圆形或椭圆形，腺上皮呈单层立方或矮柱状；间质疏松、水肿，相对致密，间质内血窦少，血管扩张不明显，间质细胞增多，排列紧密，有蜕膜样变；部分子宫内可见腺体与间质发育不同步，间质已呈分泌期样改变而腺体发育仍处于增生期。中药组：与正常组相似，明显好于模型组。光镜下：子宫内膜增厚，间质疏松，见大片蜕膜组织，蜕膜细胞较多，散在分布，血管迂曲，扩张，充血明显。内膜腺体较多，腺腔内可见分泌物，腺上皮细胞高柱状，核分裂象多见。



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

图 1 各组小鼠子宫内膜 HE 切片

3.3 各组小鼠血清 E_2 、P 含量的比较 见表 2。与正常组比较，模型组血清 E_2 、P 含量的差异无显著性($P>0.05$)；中药组雌鼠血清 E_2 、P 含量明显高于正常组和模型组，差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 E_2 、P 含量比较

组别	样本数(只)	E_2 (pg/mL)	P(ng/mL)
正常组	20	34.54 ± 5.63	34.33 ± 3.02
模型组	20	33.34 ± 4.69	31.91 ± 3.58
中药组	20	45.53 ± 5.23^{①②}	44.90 ± 5.16^{①②}

与正常组比较，① $P<0.01$ ；与模型组比较，② $P<0.01$

4 讨论

在胚胎着床过程中，子宫内膜容受性起着关键作用^[4]。子宫内膜容受性受性激素的调控，雌激素可以使内膜增生变厚，然后在孕激素作用下，增生期子宫内膜转化为分泌组织(分泌期)，此时内膜腺体和间质细胞水肿，血管扩张，为胚胎着床准备物质基础。在小鼠妊娠过程中，胚胎于妊娠第 5 天着床，同时血清雌、孕激素也均于第 5 天到达峰值^[5]。故本实验选择小鼠妊娠第 4 天开始予以米非司酮造成胚胎着床障碍模型，于妊娠第 5、6 天检测血清 E_2 、P 水平进行研究。本实验中模型组及中药组平均着床胚泡数均低于正常组(表明造模成功)，但模型组血清雌、孕激素水平与正常组比较没有明显差异，而中药组明显高于模型组和正常组；卵巢及子宫内膜形态结构变化，正常组明显优于模型组，中药组虽不及正常组，但却明显优于模型组，说明安坤种子丸能提高雌、孕激素水平，故中药组平均着床胚泡数虽受米非司酮的影响低于正常组，却明显高于模型组。

中医理论认为，肾为先天之本，藏精，主生殖。肾气盛为生殖根本，精、血、气为孕育的物质基础。清代名医傅青主在《傅青主女科·女科上卷·种子》曰：“精满则子宫易于摄精，血足则子宫易于容物，皆有子之道也。”故在不孕证治疗上当以补肾调精、调理气血为主。补肾调经中药可明显促进子宫内膜分泌功能、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方向发展，为妊娠提供组织形态学基础^[6]，从而达到改善子宫内膜容受性的作用。同时用中药促排卵，排卵与子宫内膜的发育同步，着床那天子宫内膜容受性达到最高水平^[7]。

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，本方重用菟丝子、淫羊藿、枸杞以滋养肾之阴阳，当归意在调经活血，有改善子宫内膜微循环的作用，“种子必先调经，血足则子宫易于容物”，与现代医学促进子宫内膜容受性相契合。本方滋阴而不腻、温阳而不燥，药性平和，宜于久服。

综上所述，并结合前期临床及动物实验研究，安坤种子丸治疗不孕症，除了促卵泡发育和促排卵的作用之外，同时提高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雌、孕激素水平，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] 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.
- [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] 刘丽, 胡喜姣, 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.
- [7] 王冰洁, 黄海红. 补肾养血中药对无排卵性不孕的治疗作用及机理探讨[J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(3): 189-191.

(责任编辑：冯天保，郑锋玲)