

# 胞饮突在肾虚 - 内膜容受障碍大鼠子宫内膜的表达变化

曹蕾<sup>1</sup>, 王颖<sup>2</sup>, 罗颂平<sup>1</sup>, 郜洁<sup>1</sup>, 赵颖<sup>1</sup>

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 南阳市中医院, 河南 南阳 473000

**[摘要]** 目的: 建立肾虚-内膜容受障碍病证结合大鼠模型, 动态观察胞饮突在大鼠不同生理阶段的表达。方法: 雌性 SD 大鼠随机分为模型组和正常对照组, 每组 40 只。以羟基脲造肾虚证大鼠模型, 比较模型大鼠和正常大鼠各动情周期及妊娠第 1~4 天内膜胞饮突表达及妊娠第 1~4 天雌孕激素水平。结果: 正常对照组大鼠在动情期已经可以见到较明显的胞饮突样结构, 未妊娠大鼠动情后期的胞饮突形态较动情期萎缩, 有消退迹象, 静止期大鼠胞饮突完全消退; 妊娠大鼠妊娠第 1 天即可见到胞饮突表达, 从胞饮突的数量、形态、分布上来看, 均较动情期成熟, 妊娠第 2 天胞饮突表达达到顶峰状态, 即为成熟胞饮突, 妊娠第 3 天开始, 胞饮突即成将消退状态。模型组大鼠相同生理周期胞饮突表达量较正常对照组明显减少, 形态亦欠饱满, 且其出现及消退的时间均较正常对照组大鼠滞后。胞饮突表达最丰富为妊娠第 2 天, 随后即成消退状态。妊娠后, 与模型组比较, 妊娠第 1 天和妊娠第 3 天, 正常对照组的血清 P 含量明显较高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 大鼠胚胎着床期可能为妊娠第 2 天; 内膜胞饮突表达不良是肾虚证在子宫内膜局部的微观表现。

**[关键词]** 胞饮突; 子宫内膜容受性; 雌二醇 ( $E_2$ ); 孕酮 (P); 动物模型; 大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 04-0008-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.04.003

## Changes of Expression of Pinopodes in endometrium of Rats with Kidney Deficiency Syndrome-Endometrial Receptivity Disorder

CAO Lei, WANG Ying, LUO Songping, GAO Jie, ZHAO Ying

**Abstract:** Objective: To establish the rats model of combination of disease and syndrome of kidney deficiency type-endometrial receptivity disorder, and to observe the expression of pinopodes in rats at different physiological stages dynamically. Methods: Divided female SD rats into the model group and the normal control group randomly, 40 rats in each group. Established the model of kidney deficiency with hydroxyurea. Compared the expression of pinopodes in each estrous cycle and from the first day to the forth day during pregnancy as well as the level of estrogen and progesterone from the first day to the forth day during pregnancy in rats in the model group and the normal control group. Results: In the normal control group, obvious structures of pinopodes in rats could be seen in estrus. Comparing with those in estrus, the shapes of pinopodes in non-pregnant rats in metestrus were shrunk, and had signs of extinction; in resting stage, pinopodes in rats were totally regressed. In the normal control group, on the first day of pregnancy, the expression of pinopodes could be observed, being maturer than that in the estrus in terms of number, shape and distribution; on the second day of pregnancy, the expression of pinopodes reached its peak, i.e. mature pinopodes; from the third day of pregnancy, pinopodes were regressed. In the model group, the levels of expression of pinopodes in the rats at the same physiological stage were obviously decreased when compared with those in the normal control group, the shape being not plump, and its appearance time and regression time being both delayed. The expression level of pinopodes became the highest when on the second day, and then it began to regress. After pregnancy, comparing with that in the model group, on the first day and the third day, the content of serum progesterone (P) in the normal control group was evidently higher ( $P < 0.05$ ). Conclusion: The embryo implantation stage in rats may be on the second day of pregnancy. The poor expression of pinopodes is the partial microcosmic manifestation of kidney deficiency syndrome in endometrium.

**Keywords:** Pinopodes; Endometrial receptivity; Estradiol ( $E_2$ ); Progesterone (P); Animal model; Rats

**[收稿日期]** 2016-10-15

**[基金项目]** 广东省科技计划项目 (2013B021800224)

**[作者简介]** 曹蕾 (1982-), 女, 副主任中医师, 研究方向: 中医药防治生殖障碍性疾病。

**[通讯作者]** 罗颂平, E-mail: songpingluo@hotmail.com。

目前,晚婚晚育已然成为育龄人群的发展趋势,而生活节奏的加快、生活作息的不规律,以致现阶段生育力总体呈现出下降的趋势,女性生殖障碍性疾病也日益增多。影响生育能力的因素有很多,良好的子宫内膜容受性作为成功妊娠的先决条件之一而被学者们关注和重视。有效改善患者子宫内膜容受性,对于提高妊娠成功率,减轻复发性流产、不孕患者心理和经济负担有着重要的现实意义。由于对子宫内膜容受性的许多临床研究的开展仍受到临床伦理学的限制,因此,我们从中医学“肾主生殖”的角度,在以往羟基脲致肾虚系列大鼠模型的基础上,建立了起模拟临床病证病理变化的肾虚—内膜容受障碍大鼠模型,现阶段先观察子宫内膜容受性形态学指标“胞饮突”在该模型上的表达及雌孕激素的变化。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级SD大鼠,雌性,80只,体质量约180~220g;雄性,40只,体质量约300~340g,均由广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-0020,实验动物质量合格证号分别为No:0099255和No:0102570。饲养于广州中医药大学第一附属医院SPF级实验中心。动物实验已通过动物伦理委员会的审批。

**1.2 实验药物及试剂** 羟基脲片,国药准字,齐鲁制药有限公司,片剂,500mg/片,批准文号:国药准字H37021289。生理盐水,四川科伦药业股份有限公司,批号:T1109309。雌二醇放射免疫分析药盒,购自北京北方生物技术研究所,试剂批号:20121120。孕酮放射免疫分析药盒,购自北京北方生物技术研究所,试剂批号:20121120。

**1.3 实验器材** JJ3000动物电子称,G&G公司产品;奥林巴斯CX21BIM-SET生物显微镜;BS224S电子天平(1/万),德国SARTORIUS产品;HW524型电热恒温水浴锅,上海一恒科技有限公司产品;LD5-2A离心机,北京医用离心机厂产品;DHG-9203型电热恒温干燥鼓风干燥箱,上海精密实验设备厂产品;LEO-1430VP扫描电子显微镜。

**1.4 实验方法** 将雌鼠随机分为A、B两组,其中A组为模型组,B组为正常对照组,每组40只。所有大鼠每天上午9时开始阴道涂片,见阴道涂片中有大量白细胞,或夹少许有核扁平上皮细胞,无角化细胞,为静止期,确定为大鼠动情周期第1天。自动情周期第1天开始,造模组大鼠按羟基脲450mg/kg灌胃,正常对照组大鼠按生理盐水10mL/kg灌胃,两组均连续灌胃8天。两组大鼠均于停药当天随机分为两小组,分别为A1、A2、B1、B2组,每组20只。其中A1、B1组为非孕组,A2、B2组为受孕组。

非孕组大鼠分别于静止期、动情前期、动情期、动情后期随机取5只,以10%水合氯醛腹腔内麻醉后,剖腹取子宫,扫描电镜观察内膜胞饮突表达。大鼠颈椎脱臼处死。

受孕组大鼠与雄鼠2:1合笼,每天早晨9时雌鼠阴道涂

片,发现大量精子或阴栓则记为妊娠第0天。合笼开始同时,A2组大鼠继续按羟基脲450mg/kg灌胃造模以维持大鼠肾虚证状态,B2组大鼠按生理盐水10mL/kg灌胃,均每天1次,直至妊娠第0天停药。分别于妊娠第1~4天,各组孕鼠每天随机取5只,以10%水合氯醛腹腔内麻醉后,眼眶静脉丛取血,剖腹取妊娠子宫,扫描电镜观察内膜胞饮突表达。孕鼠颈椎脱臼处死,收集大鼠静脉血离心后,以放免法测血清E<sub>2</sub>、P含量。

**1.5 统计学方法** 应用SPSS17.0软件进行统计分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据经过方差分析和T检验进行统计分析。用方差分析时先做方差齐性检验,方差齐选用LSD法进行组间比较,方差不齐选用秩和检验。

## 2 结果

**2.1 未妊娠大鼠各动情周期子宫内膜的观察** ①静止期:模型组大鼠静止期子宫内膜表面可见少量蘑菇样凸起结构,微绒毛仍多数呈融合状态,分布不均匀(见图1)。正常大鼠微绒毛覆盖子宫内膜表面,分布均匀(见图2)。

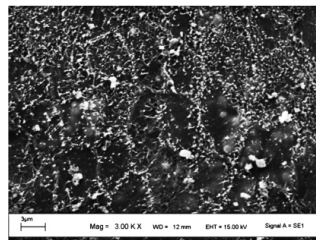


图1 模型组

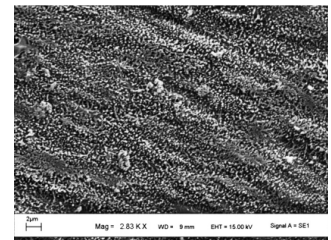


图2 正常对照组

②动情前期:模型组大鼠子宫内膜表面覆盖微绒毛,但微绒毛短小,部分微绒毛顶端有变光滑的趋势(见图3)。正常对照组大鼠子宫内膜表面出现丰富、密集的微绒毛,呈团簇样隆起似蘑菇状凸起样结构(见图4)。

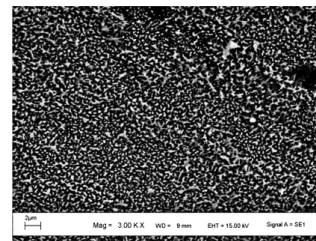


图3 模型组

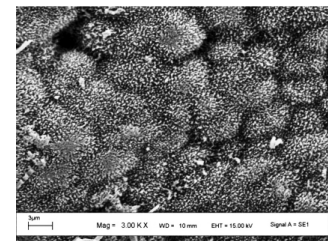


图4 正常对照组

③动情期:模型组大鼠子宫内膜表面可见较丰富的微绒毛,局部呈团簇样隆起似蘑菇状凸起样结构(见图5)。正常对照组大鼠子宫内膜表面见较多蘑菇状隆起,大小较一致,分布较均匀,仍可见少量微绒毛结构(见图6)。

④动情后期:模型组大鼠子宫内膜表面见较多短小、融合的微绒毛(见图7)。正常对照组大鼠子宫内膜表面仍见少量蘑菇状隆起,但体积较前缩小,数量减少,微绒毛短小,分布较均匀(见图8)。

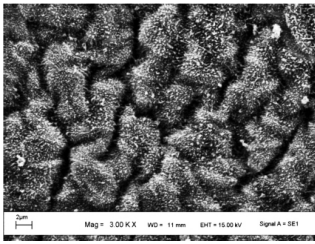


图5 模型组

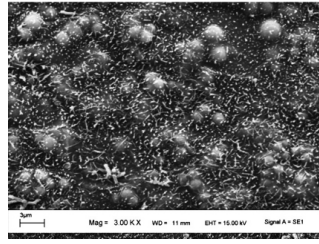


图6 正常对照组

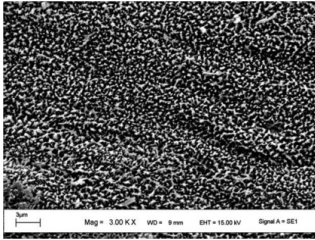


图7 模型组

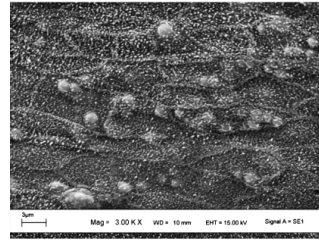


图8 正常对照组

2.2 妊娠大鼠子宫内膜胞饮突的发育及表达情况 ①妊娠第1天：模型组大鼠妊娠子宫内膜表面覆盖着短小的微绒毛，分布较为分散，并见少量蘑菇状隆起，大小不一(见图9)。正常对照组大鼠妊娠子宫内膜表面覆盖着丰富微绒毛，可见密集分布的蘑菇样隆起，且大小较为一致(见图10)。

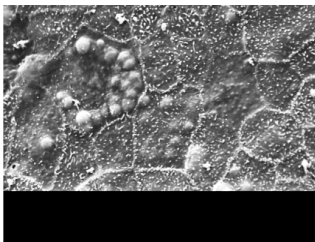


图9 模型组

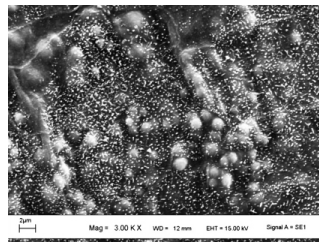


图10 正常对照组

②妊娠第2天：模型组大鼠妊娠子宫内膜表面覆盖着短小的微绒毛，数量较前日增加，可见较多蘑菇样隆起(见图11)。正常对照组大鼠妊娠子宫内膜表面见大量蘑菇样隆起密集分布，大小较为一致，形态较为饱满，微绒毛数量较前日减少(见图12)。

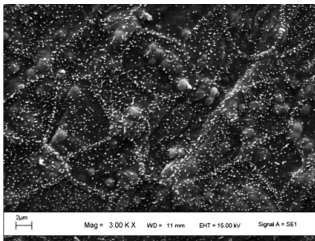


图11 模型组

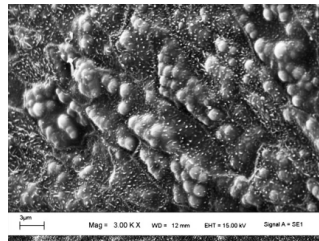


图12 正常对照组

③妊娠第3天：模型组大鼠妊娠子宫内膜表面覆盖着密集、短粗微绒毛，未见蘑菇样隆起结构(见图13)。正常对照组大鼠妊娠子宫内膜表面仍见散在分布的蘑菇样隆起结构，数量

较前明显减少，形态不饱满(见图14)。

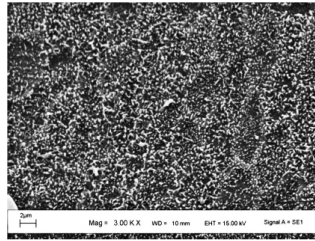


图13 模型组

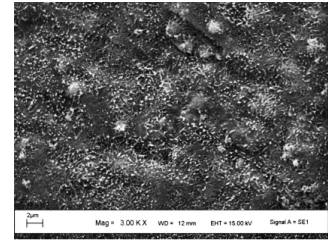


图14 正常对照组

④妊娠第4天：模型组大鼠妊娠子宫内膜表面覆盖着较为密集的微绒毛(见图15)。正常对照组大鼠妊娠子宫内膜表面仍个别散在的蘑菇状隆起，微绒毛较前稍增加(见图16)。

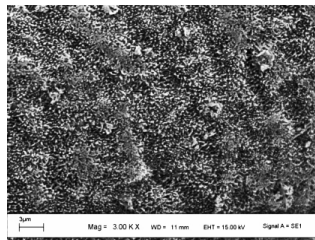


图15 模型组

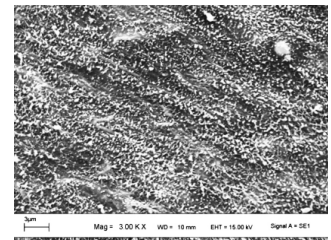


图16 正常对照组

2.3 妊娠大鼠各时间点外周血清 E<sub>2</sub>、P 含量比较 见表1~4。与A2组比较，妊娠第1天和妊娠第3天，B2组的血清P含量明显较高，差异均有统计学意义(P<0.05)。

表1 妊娠第1天血清 E<sub>2</sub>、P 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	E <sub>2</sub> (pmol/L)	P(nmol/L)	E <sub>2</sub> /P
A2组	5	6.40± 2.59	25.79± 6.60	0.27± 0.16
B2组	5	6.81± 2.29	44.58± 14.44 <sup>①</sup>	0.18± 0.10

与A2组比较，<sup>①</sup>P<0.05

表2 妊娠第2天血清 E<sub>2</sub>、P 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	E <sub>2</sub> (pmol/L)	P(nmol/L)	E <sub>2</sub> /P
A2组	5	5.20± 1.19	35.83± 13.55	0.16± 0.07
B2组	5	6.40± 1.73	54.13± 15.13	0.12± 0.02

表3 妊娠第3天血清 E<sub>2</sub>、P 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	E <sub>2</sub> (pmol/L)	P(nmol/L)	E <sub>2</sub> /P
A2组	5	6.00± 1.33	37.38± 24.78	0.23± 0.16
B2组	5	6.86± 2.40	69.10± 16.13 <sup>①</sup>	0.10± 0.03

与A2组比较，<sup>①</sup>P<0.05

表4 妊娠第4天血清 E<sub>2</sub>、P 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	E <sub>2</sub> (pmol/L)	P(nmol/L)	E <sub>2</sub> /P
A2组	5	5.95± 3.32	57.15± 42.33	0.12± 0.06
B2组	5	7.26± 2.51	71.48± 26.19	0.11± 0.04

3 讨论

3.1 胞饮突与子宫内膜容受性 子宫内膜容受性，是指子宫

内膜对胚胎的接受能力,正常状态的子宫内膜仅在一个极短的时间窗内允许胚泡植入,即种植窗期。目前认为种植窗期胞饮突的形成是评价子宫内膜容受性最好的形态学指标。研究表明,胞饮突缺乏的患者,胚胎植入后着床反复失败,胞饮突越丰富的患者妊娠率越高<sup>[1]</sup>。

3.2 肾虚大鼠子宫内膜胞饮突的表达及激素的调控作用  
1958 年 Nilsson 首次在鼠子宫标本的扫描电镜下观察到胞饮突,他发现,大鼠子宫内膜上皮细胞表面的微绒毛在着床期消失并取而代之一种形态较大的、光滑的突起<sup>[2]</sup>。1973 年,Enders 和 Nelson 发现内膜上皮细胞可以摄取注入鼠宫腔内的示踪剂,据此,猜测这种结构具有胞饮作用,从而命名为 pinopod(胞饮突)<sup>[3]</sup>。此后,研究发现人的子宫内膜上也存在胞饮突<sup>[4]</sup>。

为了进一步探究胞饮突的变化规律,我们动态观察了胞饮突在大鼠子宫内膜不同生理阶段中的表达。对于正常对照组大鼠,如图 2、4、6、8、10、12、14、16,大鼠在动情期已经可以见到较明显的胞饮突样结构,未妊娠大鼠动情后期的胞饮突形态较动情期萎缩,有消退迹象,静止期大鼠胞饮突完全消退;妊娠大鼠妊娠第 1 天即可见到胞饮突表达,从胞饮突的数量、形态、分布上来看,均较动情期成熟,妊娠第 2 天胞饮突表达达到顶峰状态,即为成熟胞饮突,妊娠第 3 天开始,胞饮突即成即将消退状态。对于模型组大鼠,如图 1、3、5、7、9、11、13、15,相同生理周期的模型大鼠胞饮突表达量较正常大鼠明显减少,形态亦欠饱满,且其出现及消退的时间均较正常大鼠滞后,如其在静止期仍能见到消退中的胞饮突表达迹象,也就是说,模型组大鼠胞饮突的表达与生理周期不同步,滞后于生理周期。

有研究认为,小鼠的胚泡着床期出现在妊娠第 4~5 天,持续约 24 小时<sup>[5]</sup>,故很多学者对大鼠或小鼠内膜胞饮突的观察时间都选择在妊娠第 4~5 天。就本实验来说,大鼠的胚胎种植窗期可能为妊娠第 2 天,但与其他文献报道妊娠第 4~5 天见到成熟胞饮突并不一致。由于本次实验动物数量有限,故仍需进一步扩大样本量对实验结果进行验证。

胞饮突的生长发育需要依靠体内孕激素的变化,血清孕激素水平增加是胞饮突发育的必要条件。虽然胞饮突的发育主要依赖孕激素,但基础雌激素水平亦是胞饮突发育所必需。孕酮和雌激素需要通过相互协调、平衡来实现对子宫内膜的控制,使内膜和胚泡发育的同步化。本课题组比较了肾虚大鼠和正常大鼠妊娠后 1~4 天的雌、孕激素水平,如表 1-4 所示,肾虚大鼠妊娠后孕激素水平明显低于正常妊娠大鼠, $E_2/P$  比值较正常大鼠有增加趋势(但未见统计学差异),两组大鼠内分泌的差异与内膜胞饮突表达的差异表现尚一致。

3.3 肾虚与子宫内膜容受障碍 肾藏精,主生殖,中医学认为肾虚是生殖障碍的重要因素之一。正常妊娠中都以肾气充盈、脏腑功能发挥正常为先决条件,这是从宏观而言,但我们

在日常的临床工作中发现,有不少患者,平素并无典型的肾虚症状表现,月经也规律,但长时间不孕或反复自然流产,那么辨证肾虚的具体客观依据何在?胞宫作为女性经、孕、胎、产的执行脏器,其功能的正常发挥,需要肾藏精功能的正常。我们前期的动物实验发现,羟基脲致肾虚大鼠存在子宫内膜腺上皮细胞线粒体、核糖体功能减退,细胞表面微绒毛数量减少,腺上皮细胞分泌功能与信号传导功能减退,内膜白血病抑制因子含量减少<sup>[6-7]</sup>。此次实验发现肾虚大鼠胞饮突形成不良,内膜反应与生理周期不同步,妊娠后孕激素分泌水平降低,这些都可以认为是子宫内膜容受性受损,内膜容受障碍,这些都是肾虚证的微观表现。因此我们认为,子宫内膜容受障碍可以看成肾虚证中的轻证,这种状态下机体全身总体状态尚未有明显的肾虚证迹象,排卵功能尚未受到抑制,仅表现为子宫内膜局部、微观功能障碍,从而影响正常妊娠。故该模型一定程度上能够实现模拟临床肾虚-内膜容受障碍状态,可以用于子宫内膜容受性相关实验研究。

#### [参考文献]

- [1] Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, et al. Surface morphology of the human endometrium: Basic and clinical aspects [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 900: 316-324.
- [2] Nilsson O. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influence. 3. Late effect of estrogen administered to spayed animals [J]. *J Ultrastruct Res*, 1958, 2(2): 185-199.
- [3] Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat [J]. *Am J Anat*, 1973, 138(3): 277-299.
- [4] Parr MB, Parr EL. Relationship of apical domes in the rabbit uterine epithelium during the peri-implantation period to endocytosis, apocrine secretion and fixation [J]. *J Reprod Fertil*, 1982, 66(2): 739-744.
- [5] Basu R, Gundlach T, Tasker M. Mifepristone and misoprostol for medical termination of pregnancy: the effectiveness of a flexible regimen [J]. *J Fam Plann Reprod Health Care*, 2003, 29(3): 139-141.
- [6] 曹蕾, 罗颂平, 欧汝强. 肾虚大鼠子宫内膜容受障碍免疫学机制的研究 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(4): 265-269.
- [7] 曹蕾, 罗颂平, 欧汝强, 等. 肾虚型大鼠子宫内膜容受性及内膜形态结构的实验研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(6): 593-596.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)