

# 罗氏内异方对子宫内膜异位症模型大鼠内膜容受性的影响

李莉<sup>1</sup>, 张丽美<sup>2</sup>, 黄洁明<sup>1</sup>, 史云<sup>1</sup>, 李安<sup>1</sup>, 曾丽<sup>3</sup> 指导: 罗颂平

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学 2011 级硕士研究生, 广东 广州 510405

3. 广州中医药大学 2012 级硕士研究生, 广东 广州 510405

**[摘要]** 目的: 探讨罗氏内异方对子宫内膜异位症模型大鼠在位内膜容受性的影响。方法: 随机将 SPF 级 SD 大鼠 40 只分成内异方组 15 只、模型组 15 只、空白组 10 只, 除空白组外, 各组大鼠均采用自体移植法行子宫内膜异位症造模, 3 周成模后, 分别予罗氏内异方、灭菌注射用水灌胃 8 周。停药后, 于妊娠第 4 天取各组大鼠右侧子宫电镜下观察内膜胞饮突、放射免疫法检测血清中雌二醇 ( $E_2$ )、孕酮 (P) 的表达情况。结果: 模型组的成熟期胞饮突构成比较空白组及内异方组少, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ); 内异方组与空白组比较, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。胞饮突的发育情况与血清孕激素水平有显著相关性 ( $\gamma = 0.646$ ,  $P < 0.01$ ), 呈正相关。胞饮突的发育与血清雌孕激素比值有相关性 ( $\gamma = -0.336$ ,  $P = 0.048$ ), 呈负相关。结论: 子宫内膜异位症大鼠在位内膜容受性降低, 罗氏内异方可能通过提高大鼠血清中孕激素水平及调节  $E_2/P$  比值来促进内膜胞饮突发育, 以提高着床窗口期内膜容受性。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; 内膜容受性; 胞饮突; 罗氏内异方; 孕激素

**[中图分类号]** R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 08-0182-03

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.083

子宫内膜容受性降低可能是导致内异症患者低种植率的主要因素。良好的内膜容受态的建立能促进胚胎与内膜的相互作用, 利于胚胎着床。罗氏内异方是根据本院妇科专家罗元恺教授验方研制而成, 其不仅对内异症治疗和复发有较好的疗效, 且可提高内异症不孕患者受孕率, 本研究主要探讨罗氏内异方对子宫内膜异位症模型大鼠在位内膜容受性作用机制和靶点, 现报道如下。

## 1 材料与方

**1.1 动物及分组** 广州中医药大学实验动物中心 SPF 级成熟雌性 60 日龄 SD 大鼠共 40 只[动物许可证: SCXK(粤)2013-0020]及成熟雄性 SD 大鼠 15 只[动物许可证: SCXK(粤)2013-0020], 质量均在 180~220 g, 于 SPF 动物房饲养, 室温为 24℃, 12 h 明暗交替, 自由摄取食物和水。随机将大鼠分为 3 组, 分别为内异方组、模型组、空白组, 其中内异方组和模型组各 15 只, 空白组 10 只。除空白组外, 其余各组均采用自体移植法行子宫内膜异位症造模, 3 周后检测, 模型组成功第 2 天开始喂药, 根据《实验动物学》, 每 200 g 大鼠药物剂量是 60 kg 成人药物剂量的 0.018 倍, 从而得到大鼠等效剂量为 1.23 g/kg。空白组和模型组采用同样方法给予等体积的灭菌注射用水灌胃。连续 8 周。停药后第 2 天起每天阴道涂片, 于动情期将雌雄大鼠按 1:1 合笼, 第 2 天若发现无阴

栓则行阴道涂片观察有无精子, 若发现有阴栓或涂片有精子则计为妊娠第 1 天, 于第 4 天将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔内麻醉后, 开腹, 行腹主动脉抽血通过 RIA 法检测血清中雌孕激素水平, 取右侧子宫近卵巢端纵行剖开在扫描电镜观察子宫内膜胞饮突表达, 大鼠颈椎脱臼处死。

**1.2 主要试剂与仪器** 雌二醇( $E_2$ )、孕酮(P)试剂盒由北京北方生物技术研究所提供, 批号: 20140120; 戊酸雌二醇(补佳乐)由法国杜芬药厂 DELPHARM LueS.A.S. 生产, 批号: 016A2; 罗氏内异方由广州市康源药业有限公司生产, 批号: 121202; 10%水合氯醛由广东药学院附属第一医院生产, 批号: 20130712; LEO-1430VP 型扫描电镜由德国里奥公司生产; 1512 型切片机由德国莱卡公司生产; SN-695B 型放免  $\gamma$  测量仪由上海原子核所日环仪器一厂; BK-DM500 型数码生物显微镜由重庆奥特公司生产。

**1.3 动物模型的制备** 参照文献<sup>[1]</sup>方法改良如下: 术前予灌服戊酸雌二醇, 每天 0.02 mg/kg, 连续 5 天, 在无菌条件下, 以浓度为 100 mg/L 的水合氯醛麻醉, 按大鼠体重予 3 mL/kg 行腹腔内注射。备皮、消毒, 取尿道口上方 1 cm, 下腹正中长约 1.5 cm 的纵行切口, 逐层开腹; 查看“Y”型子宫是否完整。挑出左侧子宫, 用 1# 丝线结扎左侧子宫长约 2 cm 的子宫系膜血管, 再自左输卵管子宫端, 结扎长约 1.5 cm 的左侧

**[收稿日期]** 2014-03-30

**[基金项目]** 广东省科技厅科技计划项目 (编号: 83018)

**[作者简介]** 李莉 (1972-), 女, 副教授, 研究方向: 中医妇科。

子宫组织两端，切断，置于生理盐水中。纵行剖开离体子宫段，用0/5肠线以内膜面贴于种植部位四角缝合于右前腹壁腹膜处。术后第1天肌注青霉素16万U/kg，每天1次，连续5天；术后第4天灌服戊酸雌二醇每天0.02 mg/kg，连续5天。于造模常规饲养3周后，内异方组及模型组均再次剖腹观察移植物生长情况并取移植物体积的一半行病理切片组织学检查，证实移植物异位生长。

**1.4 电镜胞饮突检测法** 胞饮突分为发育、成熟和衰退3个阶段，发育期的胞饮突微绒毛细长，浓密直立，其顶部膜状突起逐渐形成，并发展到整个细胞的顶部，继而微绒毛变短、变少，相互融合；成熟期的胞饮突微绒毛完全消失，表面光滑，膜状突起变大，高于纤毛细胞，如蘑菇状；衰退期的胞饮突膜状突起萎缩，表面重新出现微绒毛。分泌期内膜表现为：内膜表面开始隆起，微绒毛长而密。胞饮突数量统计：胞饮突面积占内膜表面的20%~50%则为中等，>50%则为丰富，<20%则为少量。将胞饮突的发育阶段评分为-1~2分：分泌期为0分，发育期为1分，成熟期为2分，衰退期为-1分。取新鲜子宫组织1 cm，用眼科剪纵行剪开，平铺在培养皿中用磷酸缓冲液把子宫内腔清洗干净后，放入2.5%的戊二醛缓冲液中固定3 h。用磷酸缓冲液把戊二醛清洗干净。置入1%的锇酸固定液中做后固定1 h。梯度酒精脱水。放入临界点干燥仪中干燥。干燥后把样品装在样品台上，经真空镀膜仪镀膜后，放入扫描电镜中观察拍照。由广州中医药大学电镜室操作检测。

**1.5 雌孕激素检测** E<sub>2</sub>及P的检测采用放射免疫法，由广州中医药大学核医学教研室操作检测。

**1.6 统计学方法** 用SPSS13.0统计软件包进行数据的统计分析。

**2 结果**

**2.1 各组动物造模情况** 实验共造模30只大鼠，内异方组术中、术后48 h内各死亡1只，术后模型检测时有1只病理提

示异位病灶呈萎缩样生长，未见内膜生长，造模失败。模型组术后48 h内死亡1只，模型检测时1只病理提示为脓肿，予以剔除。空白组大鼠无死亡。

**2.2 各组电镜胞饮突分期情况比较** 见表1、图1。模型组的成熟期胞饮突构成比较空白组及内异方组少，差异有显著性意义( $P < 0.05$ )；内异方组与空白组比较，差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。空白组占70%的大鼠在位内膜均表现为成熟期胞饮突，电镜下表现为内膜表面出现丰富的形如蘑菇样突起，均匀分布，大小适中，细胞界限清楚，表面光滑。其中有2例大鼠在位内膜表现为发育期胞饮突，电镜下见蘑菇状隆起的表面可见大量微绒毛，浓密直立而且细长，顶端尚未分化。有1例内膜电镜下表现为子宫内膜光滑，皱褶较多，可见大量腺体开口，腺体周围见大量分泌物。该组未见胞饮突提前衰退的大鼠，说明组内大部分内膜发育同步。模型组大鼠在位内膜主要表现为分泌期内膜和发育期胞饮突，成熟胞饮突表达少，仅占组内的15.38%，且电镜下该组成熟胞饮突表现为少量突起，大小不一，参差不齐，分布不均，发育不同步，有的则刚突出于内膜表面，细胞界限不清，不光滑，有微绒毛。内异方组大鼠内膜特点与空白组大鼠内膜特点相似，其中6例大鼠在位内膜电镜下显示有成熟期胞饮突，表现为丰富均匀的蘑菇状突起，表面光滑，界限清晰，突起十分明显。另有1例内膜出现衰退期现象，表现为表面突起逐渐变小消失，丰富的微绒毛重新出现，覆盖在整个内膜表面，部分区域尚有残存退化不全的胞饮突，表面已皱缩。

表1 各组电镜胞饮突分期情况比较 例(%)

组别	n	分泌期内膜	发育期胞饮突	成熟期胞饮突	衰退期胞饮突
内异方组	12	2(16.67)	3(25.00)	6(50.00)	1(8.33)
模型组	13	5(38.46)	5(38.46)	2(15.38)	1(7.70)
空白组	10	1(10.00)	2(20.00)	7(70.00)	0(0.00)

与模型组比较，① $P < 0.05$

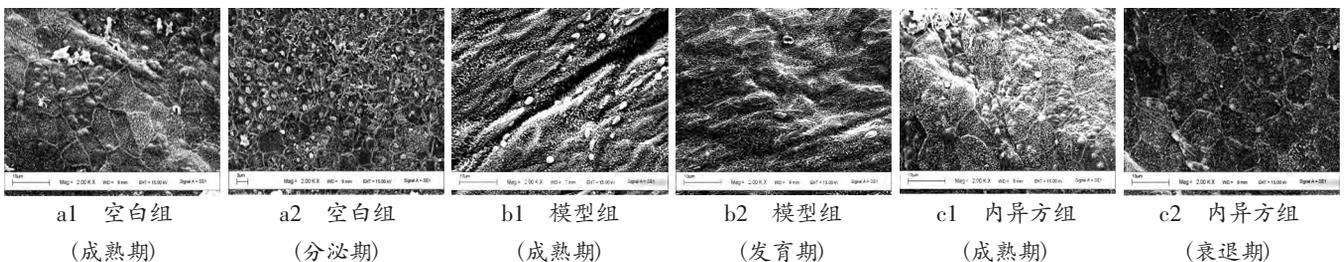


图1 各组大鼠子宫内腔胞饮突形态学改变(扫描电镜, ×1000)

**2.3 各组胞饮突发育情况与血清性孕激素相关性** 见图2、图3。结果显示：胞饮突的发育情况与血清孕激素水平有显著相关性( $\gamma = 0.646, P < 0.01$ )，呈正相关。胞饮突的发育与血清雌孕激素比值有相关性( $\gamma = -0.336, P = 0.048$ )，呈负相关。

**3 讨论**

罗氏内异方是已故妇科专家罗元恺教授经验方，该方以活血化瘀为基本治法，又具有行气止痛、软坚散结的功效。临床观察证实该药不仅对消除或抑制内异病灶及防止复发有良好的疗效，且无明显不良反应，还可提高该类患者受孕率及降低流

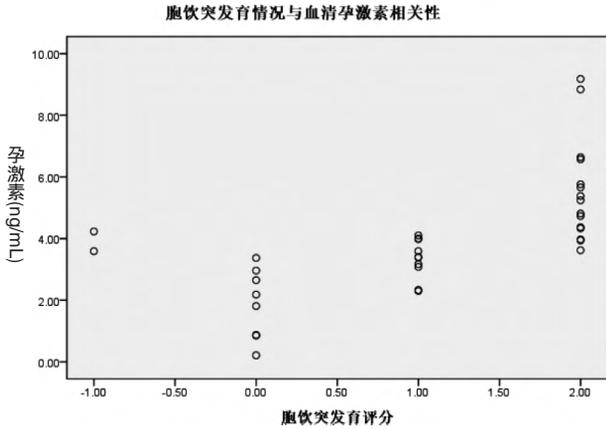


图2 内异方组胞饮突发育情况与血清孕激素相关性散点图

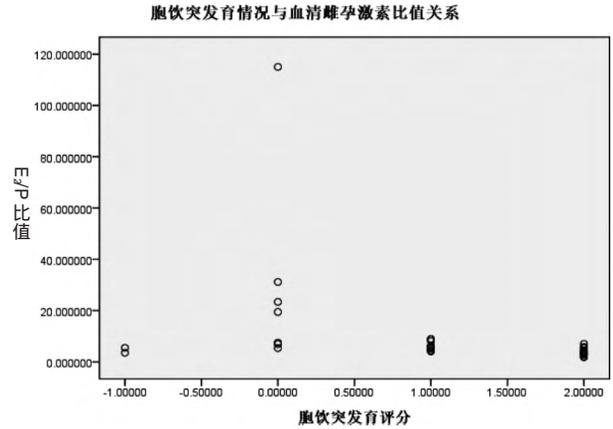


图3 内异方组胞饮突发育程度与血清雌孕激素比值相关性散点图

产率<sup>[2]</sup>。既往的学者已从免疫学、血液流变学、内分泌学及形态学等方面证实了其治疗子宫内膜异位症的疗效机制<sup>[3-5]</sup>。本研究在电镜下观察到经子宫内膜异位造模后的模型组大鼠在着床窗口期成熟期胞饮突表达不管是在数量上还是同期形态上均较差，通过罗氏内异方治疗后大鼠成熟期胞饮突表达水平与正常未造模者一致，提示子宫内膜异位症可导致大鼠在着床窗的容受性降低，罗氏内异方可改善内异症大鼠的胞饮突发育情况，使其内膜容受性提高并与正常大鼠一致。

子宫内膜胞饮突形成、退化与血清孕激素水平的变化一致，若在其发育期，孕激素受体表达降低，则可导致胞饮突缺乏。Develioglu OH等<sup>[6]</sup>认为，成熟期的胞饮突出现时段与外周孕激素浓度密切相关，平均孕激素浓度过高不会使胞饮突数量发生变化，反而会导致促排周期胞饮突提前出现，促使子宫内膜着床窗的偏移，最终导致胚胎和内膜发育的不同步，着床率降低。尽管胞饮突的发育严格依赖孕激素，但基础雌激素水平是必要的<sup>[7]</sup>。孕激素浓度过高会导致胞饮突提前出现，导致子宫内膜着床窗的移动，而雌激素则限制胞饮突的发育，因此适当的E<sub>2</sub>/P比值可能会使胞饮突适时出现并正常发育，目前有学者提出E<sub>2</sub>/P概念，认为两者适当的比值决定适宜的子宫内腔上皮表面糖基结合物比例，高E<sub>2</sub>/P比值使糖基结合物比例失调，影响胞饮突发育及胚胎种植<sup>[8]</sup>。

本研究将胞饮突各发育阶段评分，并与相对应大鼠血清性激素水平比较，发现血清孕激素水平与胞饮突的发育呈正相关，可见胞饮突发育与孕激素水平升高有关，成熟期胞饮突表达与血清孕激素高峰时间一致，提示成熟期胞饮突的表达可能受血清孕激素水平调控。本研究还发现，胞饮突的发育评分与E<sub>2</sub>/P比值呈负相关，提示过高的E<sub>2</sub>/P比值反而限制胞饮突的发育。

综上所述，胞饮突的发育与孕激素呈正相关，适当的E<sub>2</sub>/P比值可使成熟期胞饮突表达正常，子宫内膜异位症可致大鼠内膜成熟期胞饮突发育受限，罗氏内异方可能通过提高大鼠血清中孕

激素水平及调节E<sub>2</sub>/P比值来促进内膜胞饮突发育，以提高着床窗口期内膜容受性。

[参考文献]

- [1] 黄洁明, 罗颂平. 罗氏内异方对子宫内膜异位症局部雌激素合成影响的实验研究[J]. 新中医, 2012, 44(2): 101.
- [2] 李莉, 罗颂平, 黄洁明, 等. 罗氏内异方联合腹腔镜治疗子宫内膜异位症不孕的临床研究[J]. 邯郸医学高等专科学校学报, 2006, 4(19): 273.
- [3] 杨洪艳, 欧阳惠卿. 丹哪唑、罗氏内异方对实验性子宫内膜异位症大鼠血液流变性影响[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(2): 45.
- [4] 杨洪艳, 欧阳惠卿, 郑高飞, 等. 罗氏内异方对实验性子宫内膜异位症模型超微结构的影响[J]. 中医药研究, 2000, 16(4): 35.
- [5] 杨洪艳, 欧阳惠卿, 罗颂平, 等. 中药对实验性内异症血清内分泌激素及激素受体的影响[J]. 新中医, 2001, 33(6): 75.
- [6] Develioglu OH, Hsiu JG, Nikas G, et al. Endometrium estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors[J]. Fertil Steril, 2001, 76(4): 670.
- [7] Martel D, Monir M N, Roche D, et al. Hormonal Dependence of Pinopode Formation at the Uterine Luminal Surface[J]. Hum Reprid, 1991, 6(4): 597.
- [8] Levi AJ, DrewsMR, Bergh PA, et al. Controlled ovarian hyperstimulation doesnotadversely affectendometrial receptivity in vitro fertilization cycles[J]. Fertil Steril, 2001, 76(4): 670.

(责任编辑: 骆欢欢)