

·方法学研究·

肾虚型大鼠子宫内膜容受性及内膜形态结构的实验研究

曹 蕾¹, 罗颂平¹, 欧汝强², 赵 颖¹(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广东省计划生育研究所, 广东 广州 510600)

摘要: **目的** 建立肾虚型子宫内膜容受障碍大鼠模型, 探讨子宫内膜容受性与自然流产的相关性。**方法** 以羟基脲建立肾虚型子宫内膜容受障碍大鼠模型, 比较模型组与正常对照组大鼠动情期内膜腺体腺腔个数、面积, 腺上皮超微结构, 血清雌二醇(E₂)、黄体酮(P)含量。于模型大鼠妊娠第 11 天, 比较模型妊娠组与正常妊娠组大鼠胚胎数及胚胎吸收率, 血清 E₂、P 含量。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠内膜腺上皮表面微绒毛分布稀疏, 腺上皮细胞内可见较多空泡化线粒体, 内质网数量较少, 核糖体减少、散在。与正常妊娠组大鼠比较, 模型妊娠组大鼠有胚胎数减少、胚胎吸收率增加的趋势, 但差异无统计学意义。**结论** 羟基脲可复制子宫内膜容受障碍大鼠模型, 该模型可用于因子宫内膜容受性不良导致的不孕、自然流产的相关研究。

关键词: 肾虚; 子宫内膜容受性; 自然流产; 动物模型

中图分类号: R711.6; R714.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0593-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.017

Research of Endometrial Receptivity and Endometrial Morphological Structure of Kidney Deficiency Rats

CAO lei¹, LUO Songping¹, OU Ruqiang², ZHAO Ying¹(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangdong Provincial Institute of Family Planning, Guangzhou 510600 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish kidney deficiency rat model of deficient endometrial receptivity, and to investigate the relationship between endometrial receptivity and spontaneous abortion. **Methods** We established the kidney deficiency rat model of deficient endometrial receptivity by hydroxyl urea. During the experiment, we compared the number of glands and glandular cavity, the area of glandular cavity, and ultrastructure of glandular epithelium of the endometrium as well as serum estrogen(E₂) and progesterone(P) contents of model rats and normal rats in oestrus. On pregnant day 11 for the model rats, fetus number, fetal resorption rate, and serum E₂ and P contents were compared with those in the normal rats. **Results** Compared with the normal rats, the distribution of microvilli on glandular epithelium of model rats was sparse, and the mitochondria became vacuolization, the number of endoplasmic reticula and ribosomes was decreased in epithelia cells. The fetus number became less and fetal resorption rate of model pregnant rats was higher than those of normal pregnant rats, but there were no statistical differences between the two groups. **Conclusion** Hydroxyl urea could be used to establish kidney deficiency rat model of deficient endometrial receptivity, and the model can be expected for the usage in the study of infertility or spontaneous disorder induced by deficient endometrial receptivity.

Keywords: Kidney deficiency; Endometrial receptivity; Spontaneous abortion; Animal models

收稿日期: 2013-03-08

作者简介: 曹蕾, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 中医药防治自然流产的相关研究。Email: leilei32@msn.com。通讯作者: 罗颂平, 广东省珠江学者特聘教授, 研究方向: 生殖障碍与生殖健康的中医药研究。Email: songpingluo@hotmail.com。

基金项目: 广东省教育厅普通高校“中医女性生殖调节与安全性研究”重点实验室开放基金项目(ZF201115)。

子宫内膜容受性是指子宫内膜允许胚泡着床的能力,是特定时期的一种状态,这一时期指“种植窗”期,普遍认为是排卵后的6~10 d。期间子宫内膜在雌、孕激素作用下发生一系列与胚泡发育同步的、有利于胚泡着床的形态结构变化,对胚泡具有容受性,能使胚泡顺利着床。良好的子宫内膜容受性是胚泡成功着床所必需的,也是成功妊娠的重要环节。羟基脲是临床用抗肿瘤药物,周莉等^[1-2]研究发现羟基脲对雄性 Wistar 大鼠有生殖毒性,可造成与其配对的性成熟的健康未染毒雌鼠受孕率降低、着床前丢失率升高、活胎率降低。中医学认为“肾主生殖”,故本研究利用羟基脲建立肾虚型子宫内膜容受障碍大鼠模型,观察子宫内膜容受性与自然流产的相关性。

1 材料与方法

1.1 动物 雌性 SD 大鼠 40 只,8~10 周龄,体质量 200~250 g;雄性 SD 大鼠 20 只,8~10 周龄,体质量 300~350 g,均为 SPF 级,购自广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物及试剂 羟基脲,齐鲁制药有限公司,批号:906019LC;雌二醇(E_2)免疫反应试剂盒(批号:172078-01)、黄体酮(P)免疫反应试剂盒(批号:171485-01),德国罗氏诊断有限公司。

1.3 仪器 AIA-1800 全自动免疫分析仪,日本东曹株式会社;CX21BIM-SET 生物显微镜,日本奥林巴斯公司;H-600 透射电子显微镜,日本日立公司。

1.4 羟基脲诱导的肾虚大鼠对子宫内膜容受性的影响

1.4.1 分组及模型复制 取雌性 SD 大鼠 20 只,按体质量随机分为模型组和正常对照组。每天上午 9 时大鼠阴道涂片,见阴道分泌物中有大量白细胞,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;见阴道分泌物中角化上皮细胞呈落叶堆积状,为发情期。自动情周期第 1 天起,模型组大鼠每天予以羟基脲 450 mg·kg⁻¹;正常对照组大鼠给予以等量生理盐水,持续灌胃给药 8 d。

于停药后第 1 个动情周期发情期,10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,用毛细玻璃管自眼睛内眦采静脉血,处死大鼠,分离子宫。

1.4.2 观察指标

(1)血清 E_2 、P 含量测定 将 3 mL 静脉血置干燥试管中,离心分离血清。化学发光法测血清中 E_2 、P 的含量。

(2)子宫内膜腺腔面积、超微结构的观察 取两组大鼠离体子宫右侧段放入 4%多聚甲醛固定液中固定,取中部 1/3 石蜡包埋,做横断面切片,HE 染色,进行体视学分析,计数单位截面上内膜腺体腺腔个数,测量腺腔总面积。40 倍光镜下标记有完整腺上皮细胞包绕的腺腔,并计数,分别测量其腺腔面积后相加,作为该截面上腺腔总面积(μm^2)。

各组均随机抽取 1 只大鼠,分离子宫,将离体子宫左侧段中部 1/3 放入电镜固定液中固定,包埋、切片处理后,透射电镜扫描,观察子宫内膜的超微结构。

1.5 羟基脲诱导的肾虚大鼠对妊娠结局的影响 分组及模型复制方法同 1.4.1 项下。造模后于大鼠发情期将其与雄性 SD 大鼠按 2:1 合笼交配,自合笼之日起,每天上午 9 时观察阴栓,同时进行阴道分泌物涂片。如见阴栓或阴道涂片内见精子,即确定为妊娠第 0 天。自妊娠第 1 天起两组孕鼠均给予生理盐水 4 mL·kg⁻¹ 灌胃,每天 1 次,共 10 d。于妊娠的第 11 天,10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,用毛细玻璃管自眼睛内眦采静脉血,处死孕鼠,分离妊娠大鼠子宫,测定血清 E_2 、P 的含量,方法同 1.4.2 项下;计数吸收胚胎数和存活胚胎数。胚胎吸收率(R)按以下公式计算: $R = \text{Re} / (\text{Re} + \text{F}) \times 100\%$ (Re 为被吸收胚胎数;F 为存活胚胎数)^[3]。

1.6 统计学处理方法 采用 SPSS10.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 两组大鼠血清 E_2 、P 含量比较 与正常对照组比较,模型组大鼠血清 E_2 含量、 E_2 /P 比值均有升高的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 两组大鼠血清 E_2 、P 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 The comparison of the content of E_2 and P in rat blood between two groups

组别	$E_2/\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$P/\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$	E_2/P
模型组	49.30 ± 28.64	82.07 ± 18.44	0.61 ± 0.33
正常对照组	42.25 ± 20.31	82.43 ± 19.59	0.52 ± 0.20

2.2 羟基脲对大鼠子宫内膜容受性的影响

2.2.1 两组大鼠腺体数量、腺体总面积比较 与正常对照组比较,模型组子宫单位截面上腺体个数有减少的趋势,腺体总面积有减小的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2 和图 1。

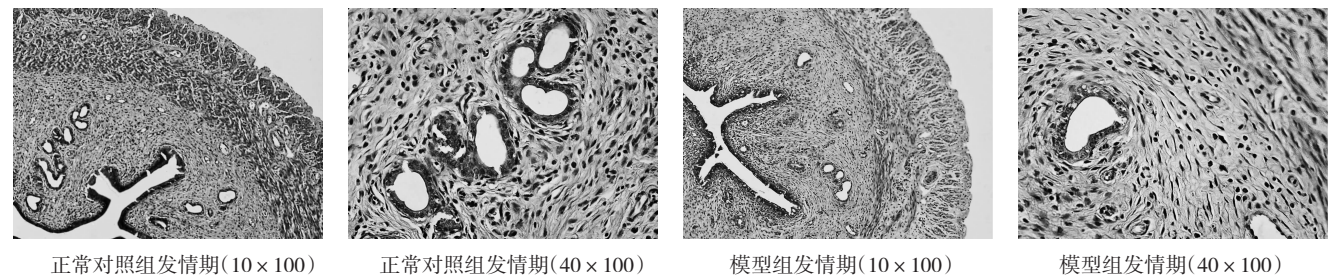


图 1 羟基脲对大鼠子宫内膜腺体及间质组织病理学的影响(HE 染色)

Figure 1 Effect of hydroxyl urea on Endometrial glands and interstitial(HE staining)

表 2 两组大鼠子宫单位截面上腺体数、腺体总面积比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 The comparison of the quantity of glands and area of lumen between two growps

组别	腺体数 / 个	腺体总面积 / $\times 10^4 \mu\text{m}^2$
模型组	17.20 ± 8.78	2.04 ± 1.39
正常对照组	21.64 ± 15.03	2.76 ± 2.36

2.2.2 两组大鼠子宫内膜超微结构比较 模型组内膜

腺上皮表面微绒毛分布稀疏(图 2A), 腺上皮细胞内见较多空泡化线粒体(图 2B), 内质网数量较少, 内质网上可见少许核糖体附着(图 2C)。正常对照组内膜腺上皮表面微绒毛分布密集(图 2D), 腺上皮内可见脂滴, 脂滴周边可见线粒体、粗面内质网, 个别线粒体内可见小空泡, 内质网表面见核糖体附着(图 2E)。

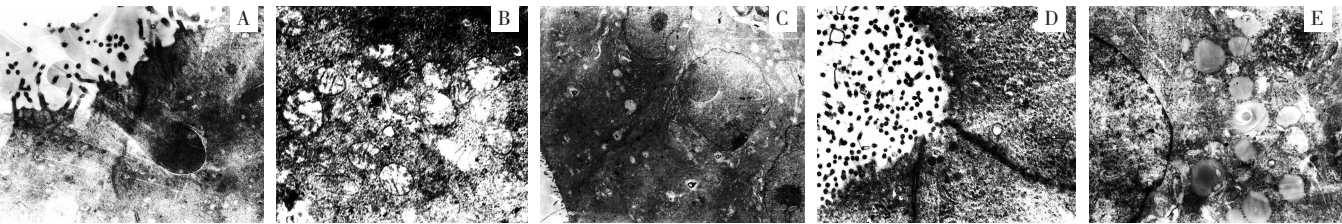


图 2 羟基脲对子宫内膜超微结构的影响(A~C. 模型组; D、E. 正常对照组)

Figure 2 Effect of hydroxyl urea on ultrastructure of endometrium

2.3 两组妊娠大鼠胚胎吸收率比较 与正常妊娠组比较, 模型妊娠组存活胚胎数减少, 而胚胎吸收率上升, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 两组妊娠大鼠胚胎吸收率比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 The comparison of absorption rate of the embryo between two pregant rat growps

组别	胚胎数 / 个	胚胎吸收率 / %
模型妊娠组	9.50 ± 5.32	19.63 ± 26.04
正常妊娠组	12.63 ± 3.02	11.05 ± 21.30

2.4 两组妊娠大鼠血清 E₂、P 含量比较 与正常妊娠组比较, 模型妊娠组大鼠血清 E₂ 含量有上升的趋势, 而 P 含量有下降的趋势, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表 4。

3 讨论

3.1 从肾虚论子宫内膜容受障碍 肾、天癸、冲任与女性月经、孕育的生理功能关系密切, 其中以肾为主

表 4 两组妊娠大鼠血清 E₂、P 含量比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 The comparison of the content of E₂ and P in blood between two pregnant rat growps

组别	E ₂ /pmol·L ⁻¹	P/nmol·L ⁻¹
模型妊娠组	45.10 ± 10.33	302.09 ± 102.66
正常妊娠组	39.86 ± 16.88	374.40 ± 115.43

导和根本。罗元恺教授首先提出了肾 - 天癸 - 冲任 - 子宫生殖轴的概念。肾 - 天癸 - 冲任 - 子宫相互调节, 并在全身脏腑、经络、气血的协调作用下, 维持女性正常的生理功能, 是女性生殖功能与性周期调节的核心。肾气充盛, 肾藏精功能正常, 则子宫得肾中精气充养, 才能正常发挥其生理功能, 定期、适时藏泻。子宫内膜容受性是子宫内膜在“种植窗”期的一种状态, 是子宫在特定时期所具有的一种功能, 主要表现为允许囊胚黏附、穿透、植入的一种能力, 受内膜下螺旋动脉血流灌注、内分泌、免疫因子等多方面因素的影响。从中医学角度, 子宫发挥其正常生理功

能, 肾藏精功能正常是前提。肾气充盛, 气血充足, 机体功能调节有度, 才能对子宫滋养、调节, 子宫才能发挥其正常的孕育功能; 反之, 则可妨碍子宫正常功能, 影响其对囊胚的接受及胚胎日后的生长发育。

3.2 肾虚内膜容受障碍大鼠模型的建立 目前, 用于子宫内膜容受性研究的动物模型较少, 刘艳娟^[6]、宋殿荣^[9]等报道用米非司酮建立胚泡着床障碍 SD 大鼠模型, 该模型能较好地模拟临床黄体功能不足致生殖障碍患者, 但与不明原因自然流产或不孕的患者则有明显差异。羟基脲是抗肿瘤药物, 其作用机理是抑制核苷酸还原酶, 从而抑制 DNA 合成, 改变脂肪、蛋白质的代谢, 产生一系列虚损症状, 如毛发干枯、活动迟缓、大便稀烂等。周莉等^[11-2]研究发现羟基脲对雄性 Wistar 大鼠有生殖毒性, 当给药剂量达 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 大鼠开始出现体质量减轻; 给药剂量达 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 可造成与其配对的性成熟的健康雌鼠受孕率降低、着床前丢失率升高、活胎率降低 ($P < 0.05$)。因此, 羟基脲能较好的模拟肾虚生殖障碍病证。我们在既往研究^[4-5]也发现, 随着羟基脲给药剂量增加、时间延长, 成年雌性 SD 大鼠会逐渐出现大鼠动情周期不规则, 卵巢次级、成熟卵泡数目减少, 妊娠胚胎数减少。羟基脲致肾虚型流产大鼠自然流产率为 58.33 %^[9]。通过预实验筛选, 本研究以羟基脲 $450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \times 8 \text{ d}$ 作为大鼠模型的复制剂量。此剂量下可复制肾虚轻证模型, 大鼠排卵尚未完全被抑制, 动情周期还有规律, 可以用于探讨子宫内膜容受障碍及形态结构变化对妊娠结局的影响及其机理。

3.3 肾虚型大鼠子宫内膜容受性的改变 本实验采用透射电镜观察了大鼠动情期子宫内膜腺上皮超微结构, 结果表明, 与正常对照组大鼠比较, 羟基脲致肾虚大鼠子宫内膜表面微绒毛分布稀疏, 形态短小; 子宫内膜腺上皮细胞内可见明显增多的空泡样线粒体聚集, 粗面内质网上核糖体附着明显减少, 胞质内核糖体分布也较稀疏, 提示模型组大鼠内膜分泌反应不良、信号传导功能减退, 可能会进一步影响围着床期子宫内膜对孕卵的容受性。

雌、孕激素是评价内膜容受性的指标之一, 过高的雌激素不利于胚胎着床, 但过高的孕激素又会引起内膜与胚胎发育不同步, 而孕激素过低则提示卵泡发育不良。有研究认为适合的雌、孕激素比率直接影响

内膜胞饮突的表达^[7]。胞饮突为分泌中期内膜上皮细胞的分泌细胞, 是最重要的子宫内膜容受性形态学标志。本研究结果表明, 模型组大鼠 E_2 、 E_2/P 比值均较正常对照组大鼠有升高的趋势, 其变化趋势与临床研究结果^[8]相一致, 说明羟基脲可能使大鼠出现内分泌紊乱, 从而影响内膜容受性。

本研究结果显示, 与正常对照组比较, 模型组子宫单位截面上腺体个数减少, 腺体总面积减小; 妊娠胎数减少, 胚胎吸收率升高, 但差异均无统计学意义。这与各指标数据的个体差异较大有关, 同时, 羟基脲的时效性也是可能是原因之一, 即羟基脲停药至妊娠时间长短可能会影响妊娠结局。因此, 我们将在实验设计和实验条件控制方面作进一步优化和完善。

中医学认为, 肾为生殖之本, 肾气不足, 冲任失养, 功能紊乱, 则易出现动情周期波动、紊乱, 直接影响生殖功能。肾虚可出现全身或局部的虚损表现, 定位于胞宫, 则表现为孕育功能减退。本研究结果提示, 模型组大鼠子宫内膜线粒体、核糖体功能损伤、内膜分泌功能减退都是肾虚的表征, 因此, 本模型可用于不明原因生殖障碍子宫内膜容受性相关研究。

参考文献:

- [1] 周莉, 吴纯启, 廖明阳. 羟基脲对雄性大鼠的生殖毒性[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10 (12): 1330-1334.
- [2] 周莉, 吴纯启, 姜忠彩, 等. 羟基脲对大鼠生育能力的影响[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(3): 167-168.
- [3] 罗颂平, 梁国珍, 张玉珍, 等. 助孕 3 号方防治大鼠自然流产的机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7): 522-525.
- [4] 周英, 梁国珍, 罗颂平. 脾虚和肾虚雌性大鼠生育能力的实验观察[J]. 广州中医药大学学报, 1998, 15(3): 195-198.
- [5] 李淑云, 罗颂平. 补肾法对肾虚排卵抑制模型大鼠内分泌激素、脏器湿重及抑制素影响的研究[J]. 新中医, 2010, 42(2): 90-92.
- [6] 刘艳娟, 黄光英, 杨明伟, 等. 对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜容受性的研究[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(3): 144-148.
- [7] 魏丽坤, 张雷, 王嵩明. 子宫内膜容受性的评价及其改善措施[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(5): 298-302.
- [8] 曹蕾, 罗颂平, 欧汝强. 补肾健脾法对复发性流产患者子宫内膜容受性的干预作用[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 27(6): 562-565.
- [9] 宋殿荣, 刘亚琴, 张巍. 补肾活血方中药对妊娠大鼠子宫内膜容受性的影响[J]. 国际妇产科学杂志, 2009, 36(2): 161-166.

(编辑: 梁进权)