

补肾益气活血汤对小鼠血清雌、孕激素浓度 及其受体表达的影响^{*}

吴云霞 黄光英

(华中科技大学同济医学院药学院生药系 武汉 430030 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所)

摘要 目的: 探讨中药补肾益气活血汤促进着床的机理。方法: 在以吲哚美辛建立小鼠着床障碍模型的基础上, 将动物分为正常组, 吲哚美辛组, 中药组和黄体酮组, 用放射免疫、免疫组织化学及 Western-blot 方法检测各组小鼠妊娠 d5(围着床期)血清 E₂、P₄ 浓度及子宫内膜 ER、PR 表达。结果: 补肾益气活血汤对 E₂、P₄ 水平无明显影响, 对 PR 表达也无明显影响, 但有轻度促进 ER α 表达作用, 此外, 实验发现治疗对照组注射黄体酮虽然使 P₄ 水平升高, 但 ER α 、PR 表达却都有不同程度下降。结论: 提示中药补肾益气活血汤可能主要通过雌激素样活性加强 E₂ 与其受体作用而有利于发动蜕膜化从而促进着床, 黄体酮辅助生殖治疗失败可能与孕酮一定程度上抑制 ER α 和 PR 表达有关。

关键词: 补肾益气活血汤; 雌激素; 孕激素

Clinical Significance of High Frequency Ultrasound in Detection of Thyroid Nodule Calcification

XU Shao-fen, ZENG Gong-jun

Function Examination Department, the First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China

ABSTRACT Objective: To investigate the clinical significance of thyroid calcification in the differential diagnosis of thyroid carcinoma. **Methods:** The clinical data of 77 patients (male: 20, female: 57) with thyroid nodules, who were confirmed by preoperative ultrasonic examination and postoperative pathological results, were retrospectively analysed. **Results:** Among the patients, there were 20 with benign nodules, 56 with malignant tumor, and 1 with precancerous lesion. In this study, calcification rates in benign and malignant diseases were 10% and 14.28% respectively, with significant difference. **Conclusion:** According to the size of thyroid nodule calcification, whether malignant disease or not can be diagnosed, so if micro-calcification in thyroid nodules is detected by preoperative ultrasound, malignant tumor of thyroid should be highly doubted and paid more attention to, especially for the young or patients with single nodule.

Key words: Thyroid Nodules; Calcification; High Frequency Ultrasound

卵巢甾体激素对哺乳动物的胚泡着床具有启动作用, 在植入前促进胚泡发育并调节子宫内膜细胞向有益于胚泡植入的方向分化。研究发现来自卵泡期的雌激素调节子宫内膜上皮细胞增殖, 围着床期来自新形成的黄体生成的孕激素启动基质细胞增殖, 使子宫内膜增殖活动从上皮细胞转向基质, 而黄体生成的雌激素使内膜上皮细胞停止增殖呈分化状态, 同时加强基质细胞的增殖, 使胚泡附着点处的基质细胞广泛增殖并分化成蜕膜细胞。雌激素 (estrogen, E₂), 孕激素 (progesterone, P₄) 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^[1]。前期实验已经证实补肾益气活血汤能明显提高着床障碍鼠着床率^[2,3], 本实验旨在通过检测小鼠妊娠 d5(围着床期)血清 E₂、P₄ 浓度及子宫内膜 ER、PR 表达, 以探讨该方促进着床的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用清洁级昆明小鼠, 年龄 8~12W, 体重 20~25g, 未交配, 由湖北省卫生防疫站提供。置于室温 18~22℃, 相对湿度 70~85% 的动物房内, 雌雄分笼饲养, 自由摄食, 饮水, 10h 光照。

1.2 实验用药与主要试剂

吲哚美辛肠溶片, 25mg×100 片, 批号: 冀卫药准字 (1996) 第 040137 号, 中国河北邯郸溢荣制药有限公司生产。黄体酮针剂 5mg/ml 支, 苏卫药准字 (1983) 第 310701 号, 哈药集团第二制药有限公司生产。补肾益气活血汤由同济医学院中西医结合研究所中药制剂室提供, 由续断、桑寄生、黄芪、当归、丹参等按一定比例制成 3.75mg/ml 无菌煎剂, 密封, 4℃ 保存。^[125I]-E₂、^[125I]-P₄ 放免检测 (radioactive immunology assay, RIA) 试剂盒购自北京北方生物工程有限公司, ER α 、PR 兔抗小鼠多克隆抗体及化学发光试剂购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG 和 SP 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司, 总蛋白质定量试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司), 多聚甲醛, 氯化钠, 去氧胆酸钠等常

* 基金项目: 国家高等学校博士学科点专项科研基金资助 (NO: 20020487058)

作者简介: 吴云霞, 女, 30 岁, 博士, 讲师, 研究方向: 中西医结合妇科 Tel: 13317185799, E-mail: wyx7419@yahoo.com.cn

通讯作者: 黄光英, 女, 60 岁, 博士, 教授, 研究方向: 中西医结合妇科

(收稿日期 2006-02-06 接受日期: 2006-03-12)

用化学试剂(北京化学试剂公司)。

1.3 实验仪器

普通显微镜 (OLYMPUS CHK, Japan), 切片机 (LEICA RM2135, Germany), 生物组织自动脱水机(LEICA, IP1020, Germany), 生物组织包埋机(LEICA, EG1140, Germany), 垂直电泳仪, 转移电泳仪(BIO- RAD 公司)。

1.4 实验方法

将小鼠喂养至体重(30±2)g., 按雌雄比例 1~ 3 1 合笼, 次日晨 7:00~ 8:00 检查雌鼠阴道, 发现阴栓者计为妊娠第 1 天(d1), 将发现阴栓小鼠随机分为正常组, 吡啶美辛组, 补肾益气活血汤组(中药组)和黄体酮组, 每组 10 只。除正常组妊娠 d3、d4 每天两次注射溶剂外, 其余各组在妊娠 d3、d4 每天 9:00 和 16:00 每次于颈背部皮下注射 0.13ml 吡啶美辛溶液造成着床障碍模型^[2], 自妊娠 d1 开始, 吡啶美辛组与正常组每天上午灌服自来水 0.2ml, 中药组灌服中药 0.2 ml, 黄体酮组隔日肌注黄体酮 0.02ml, 根据人与小鼠药量换算公式, 中药量相当于 50kg 体重的人每天 2 剂, 黄体酮用量相当于 50kg 人每次 40mg, 隔日肌注。小鼠于妊娠 d5 上午 9:00, 各组动物摘眼球取血, 室温静置, 待凝固后分离出血清, 放入- 20℃冰箱待测。取血后断颈处死小鼠, 剖腹取子宫内膜组织用生理盐水洗净, 一小块置于 4% 多聚甲醛中固定约 12 小时后石蜡包埋, 切片, 剩下子宫组织于- 71℃冰箱中保存。

1.4.1 放射免疫法检测 E2、P4 浓度:测定操作程序按说明书, 批内和批间差异 E2 分别为 6.8% 和 11.7%, P4 分别为 7.9% 和 13.1%, 对 E2 非特异性结合率 2.80%, 特异性结合率 72.04%, 对 P4 非特异性结合率 3.14%, 特异性结合率 76.63%。

1.4.2 ERα、PR 蛋白检测: Western- blot 方法每组取约 0.5 g 内膜组织加入 1.5ml 改良的 RIPA 裂解液(Tris- HCL50mmol/L, pH7.5; NaCL150mmol/L; NP- 40 1%; 去氧胆酸钠 0.5%; SDS0.1%; EDTA0.5mmol/L; PMSF1mmol/L; Leupeptin2ug/ml) 冰浴条件下进行组织匀浆; 4℃ 10000g 离心 10 分钟, 弃除沉淀, 用 Lowry

改良方法由 Bio- Rad 公司提供试剂盒进行蛋白定量。ERα、PR 蛋白的检测取 15ug 总蛋白, 分别加入上样缓冲液, 94℃ 10 分钟后进行 SDS- PAGE 电泳, 转膜, 抗 ERα 及抗 PR 兔抗鼠多克隆抗体分别按照 1:600 及 1:500 稀释, 羊抗兔二抗均采用 1:750 稀释, 利用 ECL 进行显色, 结果进行光密度扫描分析。同时使用 SP 法定位检测 ERα、PR 蛋白表达。

1.5 统计学处理

运用 SPSS11.0 软件, 各组间比较用 t 检验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 血清 E2、P4 浓度比较(如表 1)

血清 E2 浓度比较, 吡啶美辛组 E2 的水平较正常组明显降低($P < 0.05$), 而中药组和黄体酮组与吡啶美辛组相比差别无显著性意义($P > 0.05$)。正常组, 中药组, 吡啶美辛组间 P4 水平比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 而黄体酮 P4 水平较各组明显升高($P < 0.01$)。

表 1 各组血清 E2、P4 浓度比较

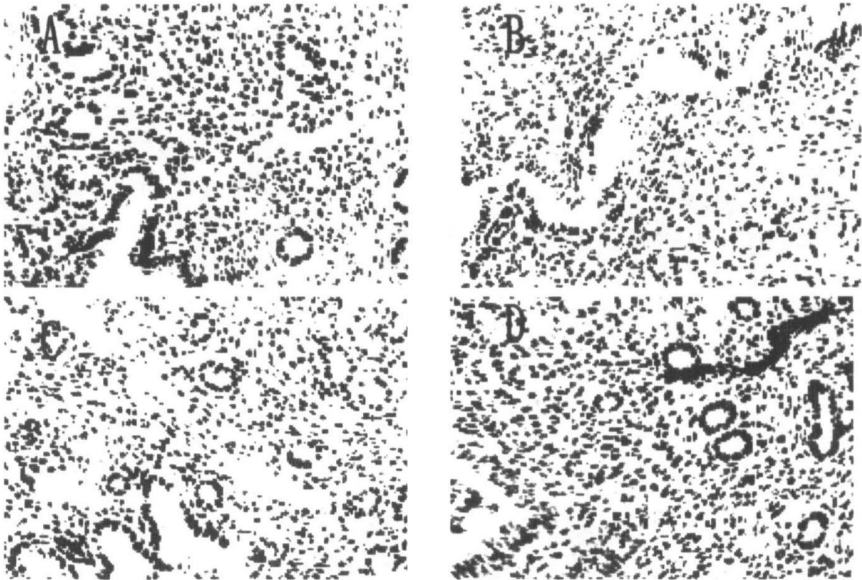
组别	E2(pg/ml) (n)	P4(ng/ml) (n)
正常组	39.49±14.27 (8)	1.49±0.58 (6)
吡啶美辛	27.94±7.00 (9)*	1.55±0.45 (7)
中药组	24.59±2.10 (9)*	1.30±0.54 (7)
黄体酮组	23.16±3.38 (9)*	4.12±1.77 (7)* * Δ# #

注: 与正常组比较* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$; 与吡啶美辛组比较 Δ $P < 0.05$; 与中药组比较# # $P < 0.01$ 。

2.2 小鼠妊娠 d5 子宫内膜 ERα 的免疫组织化学切片观察

ERα 阳性者表达于上皮或间质细胞核中, 少量弥散于胞浆, 呈棕黄色(图 1), 正常组(图 A)于上皮和间质细胞有较强表达, 吡啶美辛组(图 B)中药组(图 C)和黄体酮组(图 D)上皮和间质表达减弱。

图 1 小鼠妊娠 d5 子宫内膜 ERα 表达的免疫组织化学切片(× 200)



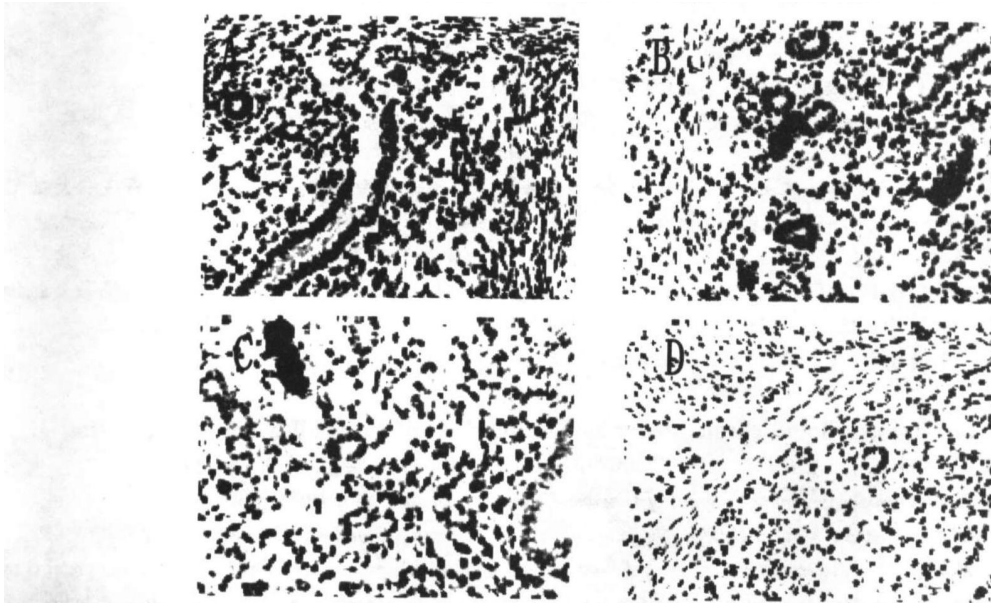
注:图 A, 正常组; B, 吡啶美辛组; C, 中药组; D, 黄体酮组

2.3 小鼠妊娠 d5 子宫内膜 PR 的免疫组织化学切片观察

PR 阳性者主要表达于间质细胞核中(图 2) 正常组(图

A), 吲哚美辛组(图 B) 和中药组(图 C) 在间质细胞有较强表达, 黄体酮组(图 D) 表达减弱。

图 2 小鼠妊娠 d5 子宫内膜 PR 表达的免疫组织化学切片($\times 200$)

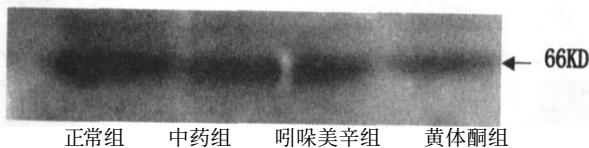


注: A, 正常组; B, 吲哚美辛组; C, 中药组; D 黄体酮组

2.4 ER α 的 Western- Blot 结果观察

Western- blot 印迹显示 ER α 为分子量约 66KD 的蛋白(如图 3), 子宫内膜 ER α 表达吲哚美辛组、中药组和黄体酮组较正常组降低, 中药组较吲哚美辛组升高, 黄体酮组较吲哚美辛组和中药组更低。

图 3 小鼠妊娠 d5 子宫内膜 Western- Blot 检测 PR 蛋白的表达



2.5 PR 的 Western- Blot 结果观察

Western- blot 印迹显示 PR 为分子量约 119KD 的蛋白(如图 4), 正常组、中药组、吲哚美辛组之间无明显差别, 黄体酮组较正常组、中药组、吲哚美辛组降低。

图 4 小鼠妊娠 d5 子宫内膜 Western- Blot 检测 PR 蛋白的表达



3 讨论

哺乳类动物的胚泡着床显然是受激素控制, 对大鼠和小鼠为诱导着床需要雌激素和孕激素的联合作用, 对人类着床则可发生在仅有孕酮条件下^[4]。在小鼠妊娠期间, 血清 E2 水平 d1~ d4 增加, d5 达峰值, 随后下降, 直到分娩前一天, E2 再次上升, 分娩后又下降。P4 水平 d1~ d5 逐渐上升, d5 达峰值, d6~ d8 下降, d9 继续增加直至分娩, 全子宫 ER、PR 水平与 E2、P4 同步, 其中 d4、d5 E2、P4 及其受体水平升高对于诱发促进蜕膜化中起着至关重要的作用, 而随后的下降可能是便于维持

子宫内膜一种“静态”的环境, 以利于胚泡植入^[5]。所以, 本实验选择观察小鼠妊娠 d5 血清 E2、P4 浓度和子宫内膜 ER、PR 表达来观察补肾益气活血中药促进着床机理。补肾益气活血汤是在补肾化瘀治法研究基础上提炼出的经验方, 在临床和实验研究中证明其能提高孕育成功率和着床率, 本实验结果显示该中药对 E2、P4 水平无明显影响, 对 PR 表达也无明显影响, 但有轻度促进 ER α 表达作用, 看来其发动蜕膜化和促进着床有可能是通过增强其受体作用而发挥的, 这与朱金凤^[6]等研究补肾中药通过雌激素样活性使子宫重量明显增加结论可以吻合。

实验中发现注射黄体酮虽然使 P4 水平升高, 但 ER α 、PR 表达却都有一定下降, 黄体酮能抑制 ER α 、PR 表达, 如此则黄体酮的作用可能因此而减弱或取消了, 这可能是某些患者用黄体酮治疗无效的原因。

总之, 实验结果表明中药补肾益气活血汤可能主要通过雌激素样活性从加强 E2 与其受体作用而有利于发动蜕膜化从而促进着床, 黄体酮辅助生殖治疗失败可能与孕酮一定程度上抑制 ER α 和 PR 表达有关。

参考文献

- [1] Jian Tan, SK Dey, SK Das. Differential uterine expression of ER and PR correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse[J]. Endocr, 1999, 140(11): 5310- 21
- [2] 吴云霞, 黄光英. 补肾益气活血方对吲哚美辛致胚泡着床障碍模型小鼠胚泡着床的影响[J]. 中国医学研究与临床, 2005, 4(3): 1- 4
- [3] 吴云霞, 黄光英, 龚萍, 等. 吲哚美辛致小鼠胚泡着床障碍模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 373- 375
- [4] 王一飞, 朱云凤. 着床与抗着床研究进展[J]. 生殖与避孕, 1999, 5(1): 1- 4
- [5] Dey SK, Adashi EY, Rock JA. Implantation reproductive endocrinology[J]. Reprod Endocr, 1996, 9(10): 421- 34
- [6] 朱金凤, 余运初, 周楚华. 寿胎丸加味治疗先兆流产的临床观察及实验研究[J]. 中西医结合杂志, 1987, 7(7): 407- 9