

· 临床探讨 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.12.028

促排卵药物对小鼠子宫内膜容受性标志物表达的影响*

冼英杰,陈彩蓉,梁小青,周秀琴

(广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院生殖医学中心,广东清远 511500)

摘要:目的 比较应用促排卵药物雷洛昔芬(RAL)和克罗米芬(CC)对小鼠子宫内膜容受性(ER)的影响。方法 将48只健康昆明雌鼠,随机分为CC组、对照组(NC组)、RAL 180 mg组和RAL 240 mg组,用药后取子宫内膜采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测ER因子环氧合酶2(COX-2)和溶血磷脂酸受体3(LPAR3)蛋白的表达情况。结果 COX-2和LPAR3蛋白在CC组的表达水平显著低于其他3组($P < 0.05$),而NC组、RAL 180 mg组和RAL 240 mg组的COX-2和LPAR3表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 使用CC进行促排卵显著降低COX-2和LPAR3在小鼠子宫内膜的表达,而使用RAL则无显著影响。

关键词:雷洛昔芬; 克罗米芬; 环氧合酶2; 溶血磷脂酸受体3

中图分类号:R394

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1724-03

克罗米芬(CC)是治疗因排卵障碍而导致患者不孕的一线用药。该药促排卵作用较好,但缺点为出现宫颈黏液、子宫内膜薄及临床妊娠率较低等。而雷洛昔芬(RAL)是促排卵新药,研究资料显示其与CC有着相似的促排卵作用,但对子宫内膜的影响较小^[1]。

不孕症患者成功妊娠的标志性事件是胚胎着床,其有两个关键点:(1)胚胎发育潜力好;(2)子宫内膜具有良好的容受性。经研究证实,环氧合酶2(COX-2)与溶血磷脂酸受体3(LPAR3)是两个能准确预测子宫内膜容受性(ER)良好的参考指标^[2-3]。因此,本研究将选择小鼠作为模型研究,使用蛋白免疫印记法(Western blot法)检测小鼠COX-2和LPAR3蛋白的表达情况,探讨CC和不同浓度RAL对子宫内膜的影响,以期在RAL在临床促排卵治疗中提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 在广东省实验动物中心购买周龄为6~8周、体质量20~24 g的健康昆明雌鼠48只。每天早晨取雌鼠阴道分泌物涂玻片检查,普通光学显微镜下观察分泌物中脱落上皮细胞组织学变化,判断其是否具有正常的动情周期。选取连续2个及以上正常动情周期的雌鼠进入实验,随机分为对照组(NC组)、CC组、RAL 180 mg组和RAL 240 mg组,每组12只。

1.2 方 法

1.2.1 动物用药方法 确定雌鼠符合实验条件后,每天灌胃给药1次,连续2 d。CC(MEDOCHEMIE LTD, Cyprus)和RAL(礼来苏州制药有限公司)用药剂量根据换算公式计算得出^[4],剂量如下:NC组灌胃1 mL不含药物的生理盐水;CC组灌胃1 mL CC药物

溶液(浓度0.54 mg/mL);RAL 180 mg组灌胃1 mL RAL药物溶液(浓度0.97 mg/mL);RAL 240 mg组灌胃1 mL RAL药物溶液(浓度1.29 mg/mL)^[5]。

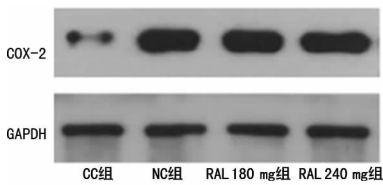
1.2.2 标本采集 48 h后雌鼠注射5 IU人绒毛膜促性腺激素(HCG)诱发排卵并与12只雄鼠合笼交配,次晨检查出现阴道栓确定为妊娠,4.5 d后采用乙醚麻醉雌鼠将其处死,取子宫内膜。

1.2.3 Western blot 采用Western blot检测COX-2和LPAR3蛋白在小鼠子宫内膜的表达。提取细胞,按一定比例加入蛋白裂解液制备总蛋白,使用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。按说明书配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,取30 g蛋白进行电泳,蛋白分离后350 mA转膜70 min,将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。将膜浸在封闭液中37℃封闭1 h;将膜取出直接放入一抗(1:1 000稀释)中,4℃摇床反应过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)洗膜,每次5 min,共4次;将膜转入二抗(1:30 000稀释)中,37℃反应1 h;PBS洗膜,每次5 min,共5次;用化学发光法(ECL)显影。

1.3 统计学处理 采用SPSS21.0软件对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

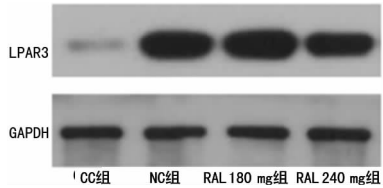
2 结 果

Western blot结果显示,各组小鼠子宫内膜上均有COX-2和LPAR3蛋白表达。COX-2和LPAR3蛋白在CC组的表达水平显著低于其他3组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而这两种蛋白在NC组、RAL 180 mg组和RAL 240 mg组的表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1、图2和表1。



注:GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 1 各组小鼠子宫内膜 COX-2 蛋白表达情况



注:GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 2 各组小鼠子宫内膜 LPAR3 蛋白表达情况

表 1 各组小鼠 COX-2 和 LPAR3 蛋白水平的比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | COX-2 | LPAR3 |
|--------------|----|--------------|--------------|
| CC 组 | 12 | 0.41 ± 0.02 | 0.23 ± 0.07 |
| NC 组 | 12 | 1.06 ± 0.16* | 1.45 ± 0.28* |
| RAL 180 mg 组 | 12 | 1.05 ± 0.05* | 1.62 ± 0.32* |
| RAL 240 mg 组 | 12 | 0.98 ± 0.12* | 1.47 ± 0.39* |
| F | | 91.02 | 49.35 |
| P | | <0.05 | <0.05 |

注:与 CC 组比较, * $P < 0.05$

3 讨 论

目前人类辅助生殖技术已较成熟,临床上应用促排卵药物已能获得数量合适及优秀质量的胚胎,但抱婴回家率却始终在 40% 左右,远没有达到人们的期望。其中因 ER 下降造成胚胎种植不成功的占 2/3^[6-7]。因此,近年来 ER 已成为生殖领域研究的焦点和难点之一。

ER 是指子宫内膜内环境接受胚胎植入的能力,即胚胎可以在雌激素和孕激素以及多种调控因子的作用下,通过诱导内膜间质生长实现黏附和在内膜的成功植入,最后实现胎儿发育的能力。在人类和动物体内拥有较多的调控因子可作为 ER 标记物对 ER 进行预测,其中,因子 COX-2 与 LPAR3 是目前较新且常用的两种^[2-3]。

COX-2 基因被认为是“快速反应基因”,其蛋白质位于内质网和核膜上,在细胞受到外部各种生物信号刺激的情况下能快速合成,参与多种生理和病理过程^[8]。COX-2 在维持女性生殖功能中发挥着巨大的作用,如卵巢排卵、精卵结合成为受精卵、受精卵分裂为早期胚胎并在输卵管中运输、囊胚在子宫腔植入、子宫蜕膜化以及妊娠支持等。同时,有学者研究证实,LPAR3 因子与雌性动物的生殖功能有密切的联系^[9]。郭燕红等^[10]在研究中发现,小鼠 LPAR3 因子

表达水平的变化与胞饮突的出现及消失相一致。提示 LPAR3 参与小鼠早期胚胎植入的过程,其正常表达与胚胎的顺利着床密切相关。YE 等^[11]利用基因敲除技术敲除雌性小鼠的 LPAR3 基因后,发现其 En 组织中的前列腺素 E2 (PGE2) 和前列环素 (PGI2) 的表达水平明显下调,内膜微环境及蜕膜化过程发生异常改变,从而导致小鼠早期胚胎植入时间延迟,胚胎着床失败。

本研究发现,对小鼠着床期两种不同剂量 RAL 组和 NC 组的 COX-2 和 LPAR3 蛋白的表达水平进行比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 CC 组 COX-2 和 LPAR3 的表达水平均明显低于其他 3 组 ($P < 0.05$)。结果提示,CC 促排卵并下调围着床期小鼠 LPAR3 的表达作用更为显著,而 RAL 促排卵对围着床期小鼠 LPAR3 的表达未造成不良影响。这些结果与文献^[12-13]的研究结果相一致。

综上所述,RAL 促排卵对小鼠 ER 标记物 LPAR3 和 COX-2 的表达无明显不良影响,明显优于 CC,表明该药物应用于促排卵治疗的同时并未降低 ER,提示 RAL 可能是一种具有潜力的新一代口服促排卵药物。

参考文献

- [1] 高善霞,刘玉才,伊西娟. 排卵颗粒联合克罗米芬治疗排卵障碍性不孕症的临床疗效[J]. 实用医学杂志,2014,30(22):3589-3592.
- [2] BLITEK A, MENDRZYCKA A U, BIEGANSKA M K, et al. Effect of steroids on basal and LH-stimulated prostaglandin F-2 alpha and E-2 release and cyclooxygenase-2 expression in cultured porcine endometrial stromal cells [J]. Reprod Biol, 2007, 7(1): 73-88.
- [3] DIAO H, LI R, EL ZOWALATY A E, et al. Deletion of lysophosphatidic acid receptor 3 (Lpar3) disrupts fine local balance of progesterone and estrogen signaling in mouse uterus during implantation [J]. Biol Reprod, 2015, 93(5): 123-128.
- [4] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [5] 洗英杰,陈彩蓉,梁小青,等. 两种口服促排卵药物对小鼠子宫内膜容受性影响的比较 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(24): 4053-4056.
- [6] SIMON C, MORENO C, REMOHI J, et al. Cytokines and embryo implantation [J]. J Reprod Immunol, 1998, 39(1/2): 117-131.
- [7] LEDEE-BATAILLE N, LAPREE-DELAGE G, TAUPIN J L, et al. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation [J]. Human Rep, 2002, 17(1): 213-218.
- [8] 汪燕,刘西茹,李尚为. COX-2 在女性生殖过程中的作用 [J]. 华西医学, 2005, 20(2): 393-395.

[9] TOKUMURA A, MIYAKE M, NISHIOKA Y, et al. Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of in vitro fertilization patients [J]. Biol Reprod, 1999, 61(1):195-199.

[10] 郭燕红, 张雷, 邵素霞. 雌、孕激素对 LPAR3 在小鼠子宫内膜围着床期的表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(2):178-182.

[11] YE X, HAMA K, CONTOS J J, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing[J]. Nature, 2005, 435(738):104-108.

[12] LESSEY B A, PALOMINO W A, APPARAO K B, et al. Estrogen receptor-alpha(ER- α) and defects in uterine receptivity in women[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4 (Suppl 1):S9-S18.

[13] CHEN C, YAN Q, LIU K, et al. Endometrial receptivity markers in mice stimulated with raloxifene versus clomiphene citrate and natural cycles[J]. Reprod Sci, 2016, 23 (6):748-755.

(收稿日期:2018-12-15 修回日期:2019-03-12)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.12.029

氧化石墨烯检测手足口病原体的可行性探讨*

王晓琴

(山西医科大学汾阳学院,山西汾阳 032200)

摘要:目的 通过氧化石墨烯(GO)检测体系和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法对手足口病两种常见病毒 CA16 和 EV71 进行检测,探讨 GO 检测体系对病毒快速检测在临床运用中的可行性。**方法** 采集确诊为手足口病患儿的粪便拭子、咽拭子和疱疹液标本共 228 例,运用 GO 检测体系和 RT-PCR 法对标本中的 CA16 和 EV71 进行检测。**结果** RT-PCR 检测结果显示,3 种标本病原体阳性检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=4.56, P>0.05$)。GO 检测结果显示,3 种标本病原体阳性检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.08, P>0.05$)。对于两种检测方法检测结果不同的标本,经基因测序后,排除了假阳性和假阴性,证明了 GO 检测体系的可行性。**结论** GO 检测法具有高灵敏度和 DNA 特异性结合的特点,有望成为实现简便、快速、准确、经济的病毒检测法且可以运用到临床中对 CA16 和 EV71 两种病毒进行检测。

关键词:氧化石墨烯; 逆转录-聚合酶链反应; 手足口病

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1726-04

手足口病(HFMD)是由 CA16 和 EV71 为主要病原体引起的传染性极强的全球性疾病,两种病原体引起的 HFMD 临床症状表现相似,但 EV71 引起的 HFMD 临床表现更重,EV71 容易引起如脑炎、脑膜炎等中枢神经系统的严重并发症,严重者甚至可危及生命^[1]。HFMD 属于自限性疾病,80% 的 HFMD 患儿无明显的症状或体征,但可作为传染源传播^[2]。2008 年 5 月,原卫生部发布通知,将 HFMD 列为丙类传染病^[3],据 ZHOU 等^[4]的报道, HFMD 发病率在传染病中位列第二,该病已成为导致患儿死亡的第 6 大原因,因此找到一种早期、快速、准确诊断 HFMD 的方法显得尤为重要。本文采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法和氧化石墨烯(GO)检测体系对 CA16 和 EV71 两种病毒进行快速检测,比较两种方法之间的优缺点,为 HFMD 的综合防治提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集确诊为 HFMD 患儿的粪便拭子、咽拭子和疱疹液标本共 228 例,其中粪便拭子 156 例,咽拭子 54 例,疱疹液 18 例。运用 GO 检测体系和 RT-PCR 法对标本中 CA16 和 EV71 两种病毒进行检

测。所有标本的检测都经过患儿家长的同意并签订同意书。

1.2 仪器与试剂 采用美国应用生物系统公司 7500 定量 PCR 仪;上海博讯实业有限公司 YXQ-30S2 型立式压力蒸汽灭菌锅;宁波新芝生物科技有限公司 JY92-IIN 超声波细胞粉碎机;上海光谱仪器有限公司 SP752 紫外分光光度计;美国 Covaris 生化公司 DNA 剪切仪;日本日立集团 F-2700 荧光分光光度计;北京六一生物科技有限公司 DYCP-31DN 电泳仪;DH-360 电热恒温水浴箱。病毒总 RNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);电泳缓冲液 TBE(北京索莱宝科技有限公司);DNA 标志物(大连宝生物科技有限公司);GO(山西大学郭玉晶教授制备且惠赠);阳性标本(山西省汾阳医院提供)。

1.3 方法 鉴于 HFMD 的传播途径包括消化道、呼吸道及密切接触传播,课题组分别采集了患儿的粪便拭子、咽拭子和疱疹液作阳性结果比较分析。

1.3.1 粪便拭子标本的采集 使用专用采样棉签,直接采集患儿粪便标本约 8 g,将棉签放入装有 3~5 mL 病毒保存液的无菌采样管中,于 4℃ 暂存,12 h 内

* 基金项目:山西省重点研发计划研发项目(201603D321094)。