

枸橼酸氯米芬对雌性 SD 大鼠子宫内膜厚度及雌激素受体表达的影响

唐莉¹⁾, 王伟律¹⁾, 夏雪山²⁾, 冯悦²⁾, 谷海¹⁾

(1) 云南省第一人民医院生殖遗传一科, 云南昆明 650032; 2) 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨枸橼酸氯米芬 (clomiphene citrate, CC) 对雌性 SD 大鼠子宫内膜雌激素受体表达的影响. **方法** 选择 42 只 200~250 g 雌性大鼠进行枸橼酸氯米芬 (CC), 灌胃给药 6 d (1 mg/kg), 对照组 (30 只) 用等量生理盐水给药, 采用免疫印迹法 (Western blot) 检测 2 组大鼠子宫内膜雌激素受体 (ESR) 的表达. **结果** 与对照组相比, CC 组雌性 SD 大鼠子宫内膜厚度于 CC 给药后 D5~D6 显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CC 组 D5 子宫内膜 ESR 的表达也显著低于对照组 ($P < 0.05$). **结论** CC 给药后对雌性 SD 大鼠子宫内膜厚度以及子宫内膜 ESR1 的表达量均受到显著抑制.

[关键词] 枸橼酸氯米芬; 子宫内膜; 雌激素受体

[中图分类号] R711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 12-0010-03

The Effects of Clomiphene Citrate on Endometrial Thickness and the Expression of Estradiol Receptor in Female Rats

TANG Li¹⁾, WANG Wei-yu¹⁾, XIA Xue-shan²⁾, FENG Yue²⁾, GU Hai¹⁾

(1) Dept. of Reproductive and Genetic, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 2) The Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of clomiphene citrate (CC) on endometrial estradiol receptor (ESR) expression of Sprague-Dawley female rats. **Methods** 42 female rats, 200-250g, as the experimental group were intragastric administrated with CC (1 mg/Kg) and the 30 rats in control group were treated with the same count of physiological saline. Both of the two groups were treated for 6 days. All the endometrial slices were stained with hematoxylin and eosin, and the endometrial thickness was measured based on histology every day after CC administration. Then ESR of both groups was detected by Western Blotting. **Results** The endometrial thickness was significantly declined for D5-D6 days after CC treatment ($P < 0.05$). The ESR expression level was also significantly declined in CC group when compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The endometrial thickness and ESR expression level were both significantly declined after CC treatment.

[Key words] Clomiphene citrate; Endometrium; Estradiol receptor

枸橼酸氯米芬 (clomiphene citrate, CC) 作为一线促排卵药物广泛应用于不孕症的治疗已有 50 a 历史, 尽管 CC 存在抗雌激素作用, 导致了排卵率高和妊娠率低等缺点, 但是其具有用法简单、价格低廉、不需要注射及卵巢过度刺激综合症 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) 发生率极低等优点, 目前仍然是临床促排卵的一线治疗药物^[1]. 研究表明, CC 对子宫内膜显示的抗 E₂ 效应可抑制了

子宫内膜细胞的增殖过程, 是导致其低临床妊娠率和高流产率的因素之一^[2]. 但是尽管近年来不断有不同研究结果的报道, 然而, CC 用药后对子宫内膜的影响及具体机制仍不清楚. 本研究对雌性 SD 大鼠应用 CC 治疗后, 观察大鼠子宫内膜厚度的变化, 并对大鼠子宫内膜上的雌激素受体表达水平进行了检测, 现将结果报告如下.

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FZ284)

[作者简介] 唐莉 (1971~), 女, 湖北荆门市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事生殖医学临床工作.

1 材料与方法

1.1 研究对象

本实验所用的雌性 SD 大鼠购自昆明医科大学实验动物中心, 选取体重为 200 ~ 250 g 活泼正常的雌性 SD 大鼠为研究对象, 大鼠随机分配饲养于昆明理工大学医学院实验动物中心标准动物房中, 恒温 25℃, 每天光照 12 h. 饲养至少 3 ~ 4 周, 饲养期间每天进行大鼠阴道细胞图片, 观察大鼠的发情周期, 周期正常、未发现其他异常者纳入实验. 将大鼠随机分为 2 组, 枸橼酸氯米芬 (CC) 给药组 (42 只) 和生理盐水空白对照组 (30 只), 对大鼠进行灌胃给药 CC (1 mg/kg), 对照组灌给同样剂量的生理盐水. 在灌药后 D1、D2、D3、D4、D5 和 D6 将大鼠处死, 取其子宫组织切片进行 HE 染色, 观察子宫内膜的厚度变化, 同时检测大鼠子宫内膜 ESR 受体表达情况.

1.2 研究方法

1.2.1 HE 染色法 大鼠给药后每天断颈处死. 管状子宫组织, 放入 4% 甲醛溶液中固定. 常规梯度乙醇脱水、石蜡包埋, 连续切片 5 μm, 烤片、脱蜡, 苏木素染色, 乙醇水化, 封片, 显微镜下观察子宫内膜厚度. 用 Image Pro plus 6.0 (IPP6.0) 软件处理照片, 测量出子宫内膜的厚度. 血球计数板上每小格长 0.25 μm, 据此测量子宫内膜的厚度.

1.2.2 免疫印迹法 (Western blotting) 给药完成 2 组大鼠子宫内膜提取总蛋白, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转 F 膜 40C 封闭过夜; PBS 洗膜后加入 ESR1 一抗 (兔抗鼠) Stathmin (购自美国 Santa Cruz Bio 公司), 1:5 000 稀释, β-actin 抗体 (兔抗鼠) (santa cruz biotechnology, USA), 1:5 000 稀释, 孵育 1 h, 再次 PBS 洗膜后加 1:10 000 稀释的二抗 (羊抗兔 IgG, 购自浙江联科生物技术有限公司), 室温作用 45 min. 显色后红外线下显影观察. 以 β-actin 作为内参对照. 采用 Quantity One v 4.6.2 软件分析各个条带的灰度值, 以对内参蛋白 β-actin 的比值代表目的蛋白的相对表达水平. 每组实验重复 3 次取平均值.

1.3 统计学方法

采用 SPSS 软件软件包 *t* 检验对数据进行分析, 数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 CC 对大鼠子宫内膜厚度的影响

HE 染色图均在 4 × 10 倍显微镜下观察, 结果发现, CC 给药 D1 ~ D4 大鼠内膜厚度与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但是 CC 给药 D5 和 D6 大鼠的子宫内膜厚度较对照组相比显著下降 ($P < 0.05$), 见图 1. 采用 Image Pro Plus 软件对大鼠子宫内膜的厚度进行了测量并做曲线分析, 见图 2.

2.2 CC 对大鼠子宫内膜雌激素受体 (ESR) 表达的影响

CC 给药后 D1 ~ D4 大鼠子宫内膜上 ESR 的相对表达与对照组相比没有显著差异, 但是 D5 和 D6 d CC 给药组大鼠子宫内膜上 ESR 的表达较对照组相比显著下降 ($P < 0.05$), 见图 3.

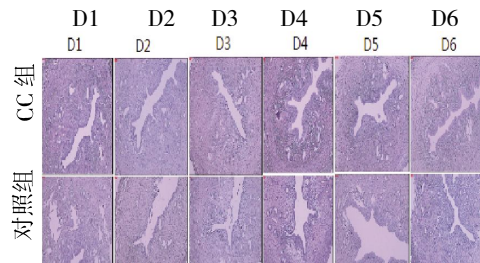


图 1 CC 给药不同时间大鼠子宫内膜 HE 染色图
Fig. 1 HE staining of the endometrium of rats in different times after CC administration

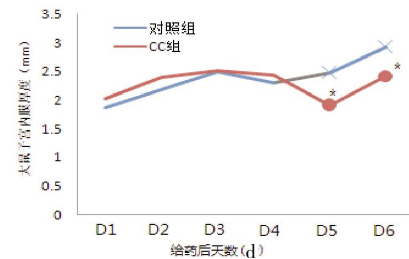


图 2 CC 给药不同时间大鼠子宫内膜厚度的变化
Fig. 2 Changes of the thickness of endometrium in different times after CC administration
与对照组比较, * $P < 0.05$.

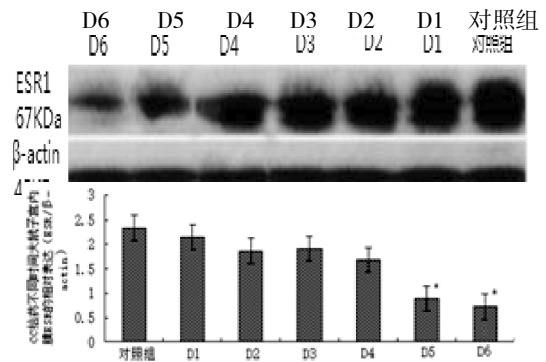


图 3 CC 给药不同时间大鼠子宫内膜上 ESR 的表达 (D: 给药天数)
Fig. 3 The expression of ESR in the endometrium of rats in different times after CC administration. (D: days of delivery)
与对照组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

CC 为三苯乙烯类衍生物外消旋混合物。它有较强的抗雌激素 (E2) 作用和弱的雌激素活性, 促排卵率可达 70%~90%, 它作用于靶细胞的雌激素受体, 产生弱雌激素及强抗雌激素作用, 并能抑制雌激素受体的补充。在下丘脑部位, 由于氯米芬与雌激素受体结合, 儿茶酚胺能的神经元不能察觉内源性雌激素水平, 解除雌激素对下丘脑的负反馈作用。下丘脑释放促性腺激素释放激素, 刺激垂体分泌促性腺激素, 使卵泡发育成熟、排卵形成黄体, 而氯米芬本身并不直接刺激排卵, 也无黄体化、雄性化和抗雄性化作用^[3]。传统观点认为, CC 能与子宫内膜上的雌激素受体结合, 产生抗雌激素作用从而影响了子宫内膜的生长, 厚度变薄, 引起内膜容受性下降, 从而降低 CC 促排后的临床妊娠率^[4]。

Nutu M 等^[6]研究表明, CC 治疗后可抑制啮齿类动物的胚胎种植, 可能与 CC 治疗后导致的生殖系统异常有关。对家兔的实验研究表明, 排卵前后采用 CC 治疗可以降低胚胎种植率。由此推测, CC 可能通过某种不明机制影响了胚胎在子宫内膜的着床过程。关于氯米芬对子宫内膜受体的影响, 国内外学者作了很多研究, 但 CC 对子宫内膜雌激素受体 (ER) 的作用结论不一。Satirapod C 等^[5]给 24 名女性服用 CC 后, 发现服用 CC 后子宫内膜厚度较对照组变薄。Nutu M^[6]等研究发现, CC 能诱导子宫内膜细胞的凋亡增加, 导致子宫内膜细胞上 ESR1 的表达下降。Fritz MA^[7]研究表明 CC 周期增生晚期和分泌晚期子宫内膜细胞 ER 和 PR 含量均显著低于自然周期, CC 具有拮抗雌激素的作用, 能明显减少子宫内膜 ER 含量, 影响孕卵着床。Molina^[8]等报道, 在超促排卵周期氯米芬使分泌晚期内膜 ER 减少。Ohnoy^[9]等研究了用药氯米芬周期与自然周期比较, CC 治疗周期能使排卵前子宫内膜雌激素受体减少, 导致排卵率高而妊娠率低。然而, Kilic-Okman 等^[10]对成年雌性大鼠 CC 给药后 2 d 发现, CC 给药后大鼠的子宫内膜与给生理盐水组相比, CC 组大鼠子宫内膜却并没有明显变化。张四友等^[11]人对生育期女性给 CC 促排卵后发现, CC 给药后卵泡自发排卵率与自然周期组 (NC) 相比没有显著差异, 但是排卵前卵泡的直径要明显大于自然周期组; 在优势卵泡直径 2.0 cm 时, CC 组子宫内膜厚度 ≥ 8 mm 者和宫颈粘液 ≥ 9 分的周期比率均低于 NC 组 ($P < 0.01$); 而在排卵前

再作比较时则无统计学差异 ($P > 0.05$)。笔者的研究结果显示, 对生育周期正常的大鼠 CC 给药 5 d 后子宫内膜的厚度显著下降 ($P < 0.05$), ESR1 的表达也较对照组显著下调 ($P < 0.05$)。

CC 是一种临床最上常用的价廉促排卵药, 具有高促排卵率、低妊娠率的特点。CC 给药后对大鼠子宫内膜的厚度及内膜上 ESR 的表达下调导致子宫内膜发育不良, 可能是 CC 用药后妊娠率低下的主要原因, 但是具体机制尚需要进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] CHECK J H. The future trends of induction of ovulation [J]. *Minerva Endocrinol*, 2010, 35(4): 227-246.
- [2] HOMBURG R. Clomiphene citrate—end of an era A mini-review [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(8): 2 043-2 051.
- [3] GANESH A, GOSWAMI S K, CHATTOPADHYAY R, et al. Comparison of letrozole with continuous gonadotropins and clomiphene—gonadotropin combination for ovulation induction in 1387 PCOS women after clomiphene citrate failure: randomized prospective clinical trial [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2009, 26(1): 19-24.
- [4] VERBERG M F, MACKLON N S, NARGUND G, et al. Mild ovarian stimulation for IVF [J]. *Hum Reprod Update*, 2009, 15(1): 13-29.
- [5] SATIRAPOD C, WINGPRAWAT S, JULTANMAS R, et al. Effect of estradiol valerate on endometrium thickness during clomiphene citrate—stimulated ovulation [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2014, 40(1): 96-101.
- [6] NUTU M, FENG Y, EGECIOGLU E, et al. Stromal cell—specific apoptotic and anti—estrogenic mechanisms may explain uterine defects in humans after clomiphene citrate therapy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 203(1): 65e1-65e10.
- [7] Effect of clomiphene citrate treatment on endometrial estrogen and progesterone receptor induction in women. Fritz MA, Holmes RT, Keenan EJ [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 165(1): 177-185.
- [8] MOLINA R, CASTILA J A, VERGARA F, et al. Luteal cytoplasmic estradiol and progesterone receptors in human endometrium: in vitro fertilization and normal cycles [J]. *Fertil Steril*, 1989, 51(6): 976-979.
- [9] OHNO Y, FUJIMOTO Y. Endometrial oestrogen and progesterone receptors and their relationship to sonographic appearance of the endometrium [J]. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(5): 560-564.
- [10] KILIC—OKMAN T, KUCUK M, ALTANER S. Comparison of the effects of letrozole and clomiphene citrate on ovarian follicles, endometrium and hormone levels in the rat [J]. *Fertil Steril*, 2003, 80(6): 1 330-1 332.
- [11] 张四友, 郑家风. 氯米酚促排卵周期的特点和规律性再认识 [J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(6): 480-483.

(2015-09-09 收稿)