

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2022.05.005

# 针刺对胚胎着床障碍大鼠子宫 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞的影响

高伟娜<sup>1</sup> 董浩旭<sup>2</sup> 唐 潇<sup>3</sup> 黄光英<sup>2△</sup>

<sup>1</sup> 郑州大学第一附属医院产科, 郑州 450052

<sup>2</sup> 华中科技大学同济医学院附属同济医院中医科, 武汉 430030

<sup>3</sup> 恩施自治州市中心医院妇产科, 湖北恩施 445000

**摘要** **目的** 观察针刺对胚胎着床障碍大鼠子宫 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞的影响。**方法** 将 48 只妊娠大鼠随机分为正常组(N)、模型组(M)、针刺组(A)和黄体酮组(P)。其中 M、A 和 P 组于妊娠第 1 天(D1)给予米非司酮-麻油溶液造模, N 组作为对照仅给予等量麻油溶液。同时, A 组用自制布袋固定并于 D1 开始每天针刺三阴交、后三里, N 组和 M 组仅固定, P 组则肌肉注射黄体酮, 直至处死。于 D8、D10 分别收集各组子宫样本, 采用免疫组织化学法、Western blot 和 Real-time PCR 等方法测定子宫 CD68 的表达。**结果** 与 N 组相比, M 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 蛋白和 mRNA 的表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 M 组相比, A 组和 P 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 蛋白的表达明显增高 ( $P < 0.05$ ); 与 M 组相比, A 组大鼠 D8 和 P 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 mRNA 的表达明显增高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 针刺可能通过调节大鼠子宫 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞的表达而改善胚胎着床障碍, 从而促进胚胎着床。

**关键词** 针刺; 胚胎着床障碍; 子宫; CD68

**中图分类号** R2-031 **文献标志码** A

## Effect of Acupuncture on Uterine CD68<sup>+</sup> Macrophages in Rats with Embryo Implantation Disorder

GAO Weina<sup>1</sup>, DONG Haoxu<sup>2</sup>, TANG Xiao<sup>3</sup>, HUANG Guangying<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

<sup>2</sup> Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

<sup>3</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, China

**Abstract** **Objective** To observe the effect of acupuncture on uterine CD68<sup>+</sup> macrophages in rats with embryo implantation disorder. **Methods** Forty-eight pregnant rats were randomly divided into normal group(N), model group(M), acupuncture group(A) and progesterone group(P). Pregnant mice in groups M, A and P were given mifepristone-sesame oil solution on the first day of pregnancy(D1), and group N was only given equal amount of sesame oil solution as control. At the same time, group A was fixed with a homemade cloth bag and acupuncture at Sanyinjiao and Housanli every day. Group N and M were only fixed, and group P was injected intramuscularly with progesterone until sacrificed. Uterine samples were collected at D8 and D10, and uterine CD68 expression was determined by immunohistochemistry, Western blot and Real-time PCR. **Results** Compared with group N, the expressions of CD68 protein and mRNA in group M were significantly decreased in uterus on D8 and D10 ( $P < 0.05$ ). Compared with group M, the expression of CD68 protein in group A and P were significantly increased on D8 and

△通信作者, Corresponding author, E-mail: gyhuang@tjh.tjmu.edu.cn

D10( $P < 0.05$ ). Compared with group M, the expression of uterine CD68 mRNA in group A(D8) and group P(D8 and D10) were significantly increased( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Acupuncture may improve embryo implantation dysfunction by regulating the expression of CD68<sup>+</sup> macrophages in rat uterus, thereby facilitating embryo implantation.

**Key words** acupuncture; embryo implantation disorder; uterus; CD68

巨噬细胞是由单核细胞分化产生的白细胞,几乎存在于人体的所有组织中。它们参与人体多种生理和病理过程,表现出吞噬作用、参与先天性或适应性免疫、促炎(M1)和抗炎(M2)等多种作用,具体取决于各组织的微环境<sup>[1]</sup>。在母胎着床微环境中,子宫内膜巨噬细胞是胚胎着床环节的重要参与者之一,对成功妊娠起着至关重要的作用。母胎界面数量最多的免疫细胞是自然杀伤细胞,占总免疫细胞的 50%~60%;其次为子宫内膜巨噬细胞,占 20%~30%<sup>[2]</sup>。除了在蜕膜中作为主要抗原呈递细胞的作用外,巨噬细胞还积极参与妊娠早期的滋养层侵袭、组织和血管重塑等过程,并在妊娠的不同阶段表现出不同的表型和极性<sup>[3]</sup>。子宫内膜巨噬细胞的数量或功能异常可能导致各种病理性妊娠的发生,如先兆子痫、复发性自然流产、不孕、宫内生长受限和早产等。课题组前期研究发现,针刺具有调节胚胎着床障碍模型动物母胎界面趋化因子 CCR2<sup>[4]</sup>、CXCL8<sup>[5]</sup>和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞<sup>[6]</sup> 等的的作用,表现出通过调节 Th1/Th2 细胞因子网络<sup>[7]</sup> 发挥促进胚胎着床的疗效。鉴于子宫内膜巨噬细胞是母胎界面第二大免疫细胞群体,本研究聚焦子宫内膜巨噬细胞,旨在研究针刺是否可通过调节巨噬细胞表达发挥促进胚胎着床的作用,现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与分组

未经孕产的雌性 Wistar 成年大鼠(SPF 级,10~12 周,220 g~230 g)和生育能力正常的成年雄性 Wistar 大鼠(SPF 级,250 g~300 g)购买于湖北省疾病预防控制中心。所有实验动物均饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心屏障系统中。经适应性喂养 1 周后,采用阴道涂片的方法观察并记录雌性大鼠动情周期,动情周期正常者纳入后续实验。随后,动情期的雌性大鼠与雄性大鼠以 2:1 的比例于 6 pm 进行合笼,并以次日 8 am 时行大鼠阴道涂片发现有大量精子者作为妊娠标准,并记录为妊娠第 1 天(D1)。妊娠大鼠被随机分为正常组(N)、模型组(M)、针刺组(A)和黄体酮组(P),每组 12 只。

### 1.2 试剂与仪器

主要的试剂:小鼠抗大鼠单克隆抗体 CD68 购于英国 AbD serotec 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG、兔抗大鼠  $\beta$ -actin 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L)和 DAB 显色试剂盒购于中国北京中杉金桥生物技术有限公司;Cocktail 蛋白酶抑制剂购于瑞士 Roche 公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒购于中国碧云天生物科技公司;Trizol RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 SYBR 荧光定量试剂盒来源于中国 Takara 公司;NC 膜来自德国 Pierce 公司。

实验药品:米非司酮片(湖北葛店人福药业有限责任公司,国药准字 H20083780)、黄体酮注射液(浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字 H33020828)由华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部提供。

主要设备:PCR 仪(Eppendorf Company,德国);荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,美国);核酸蛋白质分析仪(DU730,BeckmanCoulter,美国);全能酶标仪(BioTek Synergy2, Vermont,美国)和尼康显微成像系统(TE2000-U 日本)。

### 1.3 造模与干预措施

在超净工作台中将米非司酮片研末后用麻油溶解,配制成 2 mg/mL 的米非司酮-麻油溶液,分装后于 4℃ 冰箱备用。M 组、A 组和 P 组孕鼠于 D1 9 am 于头颈部皮下注射米非司酮-麻油溶液(5 mg/kg)造模。N 组孕鼠则给予等量的纯麻油溶液于同一时间进行注射。

针刺操作:A 组从 D1 直至处死当日,每日 3 pm 用自制布袋固定后,使用规格 0.30 mm × 13 mm(华佗牌,苏州医疗用品厂有限公司)针灸针刺大鼠双侧后三阴和三阴交,使用手动针刺刺激,每 5 min 行针 1 次,共留针 25 min,穴位的定位和进针深度参考前期的研究<sup>[4-7]</sup>;同时 M 组和 N 组大鼠仅固定不予针刺;P 组大鼠则每日肌肉注射黄体酮(40 mg/kg)。

### 1.4 取材

分别于 D8 和 D10 处死各组大鼠,收集子宫标本,每个处死时间节点每组大鼠各 6 只。取材时,使用

1%的戊巴比妥钠对实验动物进行麻醉,剖腹后暴露子宫,观察胚泡着床情况。其中,取 1/3 的着床点子宫组织,使用 4%多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋并切片用于后续实验。剩余的子宫组织使用锡箔纸包裹后立即置于-80℃冰箱冷冻保存。

### 1.5 观察指标与检测方法

#### 1.5.1 免疫组织化学法观察各组大鼠子宫巨噬细胞的分布

首先,将 5 μm 的石蜡切片置于 60℃烤箱中烤片 1 h。然后,经二甲苯脱蜡和梯度酒精水化后,用 PBS 漂洗,并将切片置于枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中微波修复 15 min(98℃)。随后,用 3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温下封闭过氧化氢酶 10 min。漂洗切片后,用 5% BSA 室温下封闭 20 min。随后,孵育一抗(CD68 1:100),4℃过夜。第 2 天漂洗切片后,孵育 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L)二抗,37℃孵育 30 min。漂洗切片后,经 DAB 显色、苏木精染核、氨水返蓝、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片等步骤后,使用显微成像系统进行拍照。

#### 1.5.2 Western-blot 法检测各组大鼠子宫 CD68 的蛋白表达

首先,沿子宫系膜对侧将子宫沿长轴剪开,并在解剖显微镜下将胎儿剔除,收集着床点子宫组织。随后将这些组织剪碎,置于预冷的 RIPA 裂解液中在冰上研磨成匀浆状,并静置 30 min。然后,在 4℃条件下,12000 g 离心 20 min。最后,收集其上清并分装放于-80℃冰箱中,用于后续实验。

Western-blot 具体步骤:组织样本的蛋白浓度用 BCA 试剂盒定量,并使用酶标仪进行分析;样本加入上样缓冲液,98℃煮沸 10 min;样本加入 12% SDS-PAGE 中电泳;电泳后将分离的蛋白转移至 NC 膜上;用 5%的脱脂牛奶室温下封闭 2 h 后,一抗孵育 4℃过夜(β-actin 1:200;CD68 1:500);漂洗后,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:20000),于室温下孵育 1 h;根据说明书进行 ECL 曝光;扫描胶片,用 Quantity One 软件分析获得积分光密度值。

#### 1.5.3 Real-time PCR 法检测各组大鼠子宫 CD68 的 mRNA 表达

首先,将剪碎的着床点子宫组织置于预冷的 Trizol 中按说明书的步骤提取 RNA。随后,取 2 μL RNA 用核酸蛋白质分析仪测定其浓度和纯度。随后,用 Prime Script RT Re-agent Kit 将其逆转录成 cDNA,反应条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s。然后,在 20 μL 体系下进行扩增[10 μL SYBR Premix Ex Taq

(2×),2 μL cDNA 样品,10 μM 的引物各 0.4 μL,0.4 μL ROX Reference Dye(50×),6.8 μL 无菌 DECP 水]。反应条件为:第一步 95℃ 30 s,1 个循环;第二步 95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环;第三步 95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,1 个循环。其中,每个样本做 2 个复孔,β-actin 作为内参。最后,通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各组样本中 CD68 的相对 RNA 含量。所用引物序列见表 1。

表 1 CD68 和 β-actin 的引物序列

基因	引物 (5'-3')	序列
β-actin	Forward	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	Reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
CD68	Forward	CGCCAGTGACCAATCTCTC
	Reverse	GGGTAACGCAGAAGGCAAT

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析处理,所有实验数据均为连续数据,符合正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析进行统计处理。如果数据满足方差齐性条件,选择 LSD 检验;如果不满足,则选择 Dunnett's T3 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠子宫内皮巨噬细胞分布

免疫组化结果显示:子宫内皮巨噬细胞在母胎界面分布较为广泛,主要在集中在子宫内皮腺上皮、腔上皮和螺旋动脉附近,其次在蜕膜区和子宫肌层。与 N 组相比,M 组大鼠子宫内皮巨噬细胞少量散在分布,且主要集中在子宫内皮腺上皮、腔上皮附近和子宫肌层;与 M 组相比,A 组和 P 组大鼠子宫内皮巨噬细胞数量较多,且分布广泛,除了子宫内皮腺上皮、腔上皮附近和子宫肌层分布外,在螺旋动脉和蜕膜区亦有较多分布。见图 1。

### 2.2 各组大鼠子宫 CD68 蛋白表达

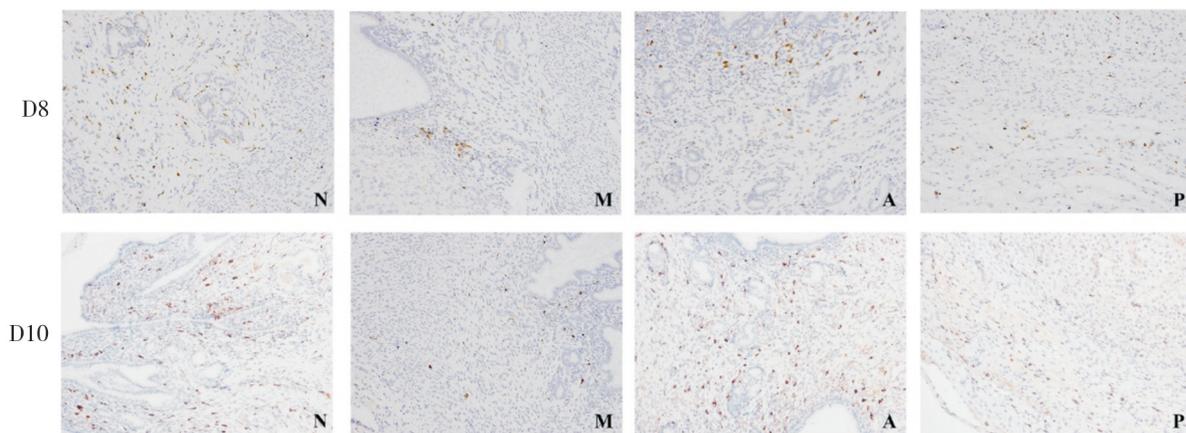
与 N 组相比,M 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 的蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。与 M 相比,A 组和 P 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 的蛋白表达均明显上升( $P < 0.05$ )。A 组和 P 组 CD68 的蛋白表达相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 各组大鼠子宫 CD68 mRNA 表达

与 N 组相比,M 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ )。与 M 组相比,A 组大鼠 D8、P 组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 mRNA 表达均明

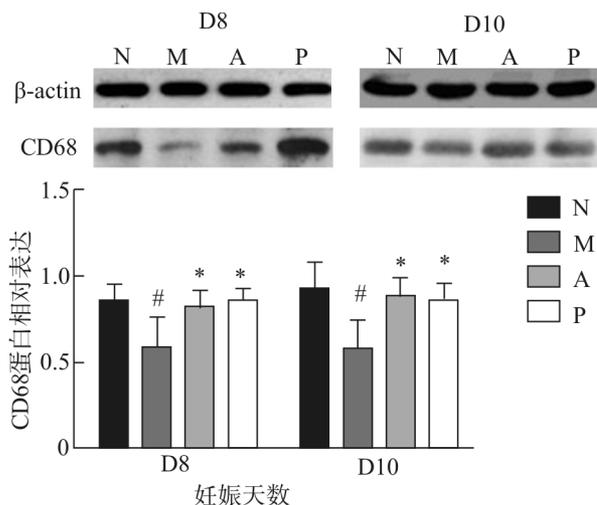
显上升( $P < 0.05$ );与 M 组相比,A 组大鼠 D10 子宫 CD68 mRNA 表达有上升趋势,但差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。A 组和 P 组之间 CD68 mRNA 表达比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3。



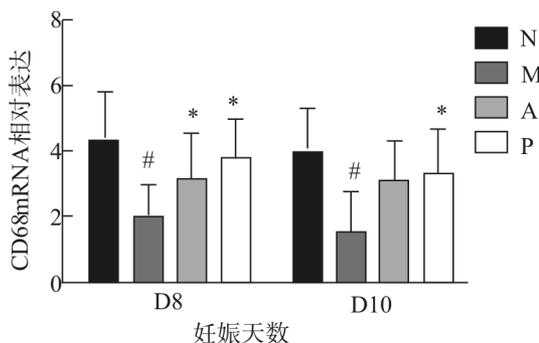
N:正常组;M:模型组;A:针刺组;P:黄体酮组;棕黄色为阳性表达( $\times 200$ )

图 1 各组大鼠 D8、D10 子宫 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞分布及表达



N:正常组;M:模型组;A:针刺组;P:黄体酮组;与 N 组比较<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 M 组比较<sup>\*</sup> $P < 0.05$

图 2 各组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 蛋白表达



N:正常组;M:模型组;A:针刺组;P:黄体酮组;与 N 组比较<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 M 组比较<sup>\*</sup> $P < 0.05$

图 3 各组大鼠 D8、D10 子宫 CD68 mRNA 表达

### 3 讨论

妊娠早期的蜕膜中有着大量白细胞,包括巨噬细胞、自然杀伤细胞、T 细胞和树突状细胞等,这些免疫细胞组成了复杂而精细的免疫调节网络,共同调节着母胎免疫耐受的过程,且在整个妊娠期呈现时空有序的动态变化。研究表明,子宫巨噬细胞在非妊娠子宫内膜中占一般白细胞抗原的 10%<sup>[8]</sup>,而在妊娠早期占蜕膜细胞的 20%~30%<sup>[2]</sup>。既往研究显示,子宫巨噬细胞遍布整个母胎界面,主要在子宫螺旋动脉附近<sup>[9-10]</sup>,并且在分娩时数量显著增加<sup>[11]</sup>。1 项关于胚胎着床和妊娠早期子宫内膜白细胞亚类的研究显示,恒河猴早期妊娠蜕膜中 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞的比率明显增加<sup>[12]</sup>;这与本研究结果相一致。在人孕早期,子宫巨噬细胞在母胎界面分布较为广泛,主要在集中在子宫内膜腺上皮、腔上皮和螺旋动脉附近,其次在蜕膜区和子宫肌层。

子宫巨噬细胞在母胎界面具有多重作用,具体表现在参与半异体胎儿的免疫耐受、滋养层入侵以及组织和血管重塑等过程<sup>[13]</sup>。此外,它具有可塑性,可通过改变其功能以响应组织中不断变化的微环境,从而广泛参与生理功能和疾病过程<sup>[3]</sup>。根据它们功能和产生细胞因子的不同,可分为经典激活(M1)和交替激活(M2)表型<sup>[14]</sup>。M1 型巨噬细胞由于干扰素- $\gamma$  诱导,其特点是主动产生炎性细胞因子、活性氮和氧中间体,并促进 Th1 反应。M1 型巨噬细胞本质上是促炎性的。相比之下,M2 型巨噬细胞被 IL-4 激活,并与

炎症消退和促进组织重塑和纤维化有关。巨噬细胞这种可塑性称为 M1/M2 极化。在母胎界面, M1/M2 巨噬细胞的数量和比例在整个妊娠期都会发生变化, 以保护胎儿免受母体免疫微环境的影响并建立母胎耐受。在围着床期, M1 型占主导地位, 之后过渡到 M1 型和 M2 型的混合型, 在此期间滋养细胞侵入基质并定居在子宫内膜; 这种混合型的主导地位持续至孕中期的早期阶段<sup>[1]</sup>。随后, 随着胎盘的建立, M2 表型占主导地位, 促使母胎免疫耐受。CD68 是溶酶体和内体膜上与吞噬活性相关的抗原<sup>[15]</sup>, 其表达被视为 M1 型巨噬细胞的标志<sup>[16]</sup>。本研究通过米非司酮诱导胚胎着床障碍, 发现着床障碍大鼠母胎界面 M1 型巨噬细胞的低表达, 这表明米非司酮可能抑制 M1 型巨噬细胞在母胎界面的表达, 而黄体酮和针刺可能通过逆转 M1 型巨噬细胞的低表达而改善胚胎着床障碍。

与西药相比, 针刺具有明显的整体调节优势; 同时在针刺的现代机制研究中, “免疫调节机制”被认为是其中十分重要的途径。课题组前期一系列研究表明, 针刺可通过调节 Treg 细胞的功能、Th1/Th2 比例和趋化因子 CXCL8 受体的表达提高胚泡着床障碍模型大鼠受孕率<sup>[4-7]</sup>; 提示针刺可能通过“调节母胎局部免疫”的途径促进胚胎着床。而本研究关注的子宫巨噬细胞是母胎界面另一重要免疫细胞, 本研究结果表明, 针刺可以改善胚胎着床障碍模型大鼠子宫着床位点巨噬细胞 CD68 的蛋白和 mRNA 表达, 从而表现出调节 M1/M2 极化的作用, 这可能是针刺改善胚胎着床障碍、促进着床的分子机制之一。

然而, 本研究也具有一定的局限性: 本研究只观察到针刺可以调节子宫巨噬细胞表达的现象, 而未进一步探讨针刺对巨噬细胞促炎(M1)和抗炎(M2)活性的影响。未来有待开展更多机制研究、深入揭示针刺如何通过免疫调节途径促进胚胎着床。

参 考 文 献

[1] Jena MK, Nayak N, Chen K, et al. Role of macrophages in pregnancy and related complications [J]. *Arch Immunol Ther Exp(Warsz)*, 2019, 67(5):295-309.

[2] Mor G, Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM. Macrophage-trophoblast interactions [J]. *Methods Mol Med*, 2006, 122:149-163.

[3] Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 76(3):509-513.

[4] 高伟娜, 唐潇, 芮月, 等. 针刺对胚胎着床障碍大鼠子宫内膜 CCR2 的影响 [J]. *中西医结合研究*, 2013, 5(4):

176-180.

[5] Gao WN, Yang W, Liu YF, et al. Effect of acupuncture on CXCL8 receptors in rats suffering from embryo implantation failure [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, 34(1):91-98.

[6] 高伟娜, 芮月, 王丽君, 等. 针刺对胚胎着床障碍大鼠 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(8):1464-1470.

[7] Gui J, Xiong F, Li J, et al. Effects of acupuncture on Th1, th2 cytokines in rats of implantation failure [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012:893023.

[8] Bonatz G, Hansmann ML, Buchholz F, et al. Macrophage- and lymphocyte-subtypes in the endometrium during different phases of the ovarian cycle [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 1992, 37(1):29-36.

[9] Melgert BN, Spaans F, Borghuis T, et al. Pregnancy and preeclampsia affect monocyte subsets in humans and rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e45229.

[10] Tessier DR, Raha S, Holloway AC, et al. Characterization of immune cells and cytokine localization in the rat uteroplacental unit mid-to late gestation [J]. *J Reprod Immunol*, 2015, 110:89-101.

[11] Hamilton S, Oomomian Y, Stephen G, et al. Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(2):39.

[12] Slukvin II, Breburda EE, Golos TG. Dynamic changes in primate endometrial leukocyte populations: differential distribution of macrophages and natural killer cells at the rhesus monkey implantation site and in early pregnancy [J]. *Placenta*, 2004, 25(4):297-307.

[13] Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1:119.

[14] Nakagawa M, Karim MR, Izawa T, et al. Immunophenotypic characterization of M1/M2 macrophages and lymphocytes in cisplatin-induced rat progressive renal fibrosis [J]. *Cells*, 2021, 10(2):257.

[15] Damoiseaux JG, Döpp EA, Calame W, et al. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1 [J]. *Immunology*, 1994, 83(1):140-147.

[16] Wijesundera KK, Izawa T, Murakami H, et al. M1-and M2-macrophage polarization in thioacetamide (TAA)-induced rat liver lesions; a possible analysis for hepato-pathology [J]. *Histol Histopathol*, 2014, 29(4):497-511.

(收稿日期:2022-06-12)