

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.18.008  
文章编号: 1005-8982 (2021) 18-0039-05

实验研究·论著

## 低分子肝素对子宫内膜容受性的作用及其机制研究

牛凯迪, 王春雪, 于月新

(中国医科大学北部战区总医院 生殖医学中心, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** **目的** 研究低分子肝素(LMWH)影响子宫内膜容受性的作用机制。**方法** 随机将C57BL/6小鼠分为对照组、造模组、LMWH低剂量造模组和LMWH高剂量造模组。妊娠第5天统计胚胎数量, HE染色对比各组子宫内膜腺体及血管情况, qRT-PCR检测血小板内皮细胞黏附因子1(PECAM1)、同源框基因A10(HOXA10)、WNT7A和 $\beta$ -catenin的mRNA水平。**结果** LMWH低剂量造模组和LMWH高剂量造模组胚胎数量较造模组增加( $P < 0.05$ ), LMWH高剂量造模组最高。LMWH高剂量造模组胚胎数量较对照组增加( $P < 0.05$ )。LMWH低剂量造模组和LMWH高剂量造模组腺体、血管数量较造模组增加( $P < 0.05$ ), 而LMWH造模组与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。LMWH低剂量造模组和LMWH高剂量造模组HOXA10、PECAM1、Wnt7A、 $\beta$ -catenin mRNA相对表达量较造模组增加( $P < 0.05$ )。**结论** LMWH通过Wnt通路提高子宫内膜容受性, 其作用机制可能与PECAM1相关。

**关键词:** 子宫内膜; 肝素, 低分子量; 不育

**中图分类号:** R339.2; R711.6

**文献标识码:** A

## Effect of low molecular weight heparin on endometrial receptivity and its mechanism

Kai-di Niu, Chun-xue Wang, Yue-xin Yu

(Center for Reproductive Medicine, General Hospital of Northern Theater Command,  
China Medical University, Shenyang, Liaoning 110016, China)

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of low molecular weight heparin (LMWH) on endometrial receptivity. **Methods** The blastocyst implantation failure model was established via mifepristone, and C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, low-dose LMWH model group and high-dose LMWH model group. The number of embryos on the fifth day of gestation was counted. HE staining was used to compare endometrial glands and blood vessels in each group, and qRT-PCR was applied to detect mRNA levels of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1), homeobox A10 (HOXA10), Wnt family member 7A (WNT7A) and beta-catenin. **Results** Compared with the model group, the number of embryos was increased in the low-dose LMWH model group and high-dose LMWH model group and was even greater in the high-dose LMWH model group ( $P < 0.05$ ). Besides, the number of embryos in the high-dose LMWH model group was also greater than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The number of endometrial glands and blood vessels in the low-dose LMWH model group and high-dose LMWH model group was greater than that in the model group ( $P < 0.05$ ), but was not different compared with that in the control group ( $P > 0.05$ ). In addition, mRNA expression levels of PECAM1, HOXA10, WNT7A and beta-catenin in the low-dose LMWH model group and high-dose LMWH model group were

收稿日期: 2021-03-27

[通信作者] 于月新, E-mail: yuyuexinpingan@163.com; Tel: 024-28853470

higher compared with the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LMWH improves endometrial receptivity through WNT pathway, and its mechanism may be related to PECAM1.

**Keywords:** endometrium; low molecular weight heparin; infertility

良好的子宫内膜容受性有利于胚胎植入, 而 Wnt 通路在子宫内膜容受性中起关键作用<sup>[1]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 为经典的 Wnt 信号通路, 异常的  $\beta$  连环蛋白表达将损害胚胎黏附和子宫内膜蜕膜化<sup>[2]</sup>。蜕膜化主要由孕激素引起, 是子宫内膜基质细胞向蜕膜细胞转化和子宫内膜血管床改变的过程。当这些变化不足时, 胚泡无法嵌入, 导致早期妊娠失败<sup>[3]</sup>。妊娠期间, 蜕膜细胞产生对胚胎发育至关重要的激素和细胞因子, 分泌控制滋养层浸润的因子<sup>[2]</sup>。有学者发现低分子肝素 (LMWH) 促进绒毛外滋养层细胞的分化和侵袭<sup>[4]</sup>。LMWH 调控白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 诱导的胚胎干细胞中白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-11 (IL-11)、白血病抑制因子的产生<sup>[5]</sup>, 调节趋化因子<sup>[6]</sup>并增加胰岛素样生长因子和泌乳素<sup>[7]</sup>, 其对细胞因子的调节超出抗凝作用。临床 LMWH 常经验性用药, 但其对子宫内膜容受性影响的相关机制尚不清楚。本研究拟通过米非司酮复制胚泡植入障碍模型, 进一步探究 LMWH 对小鼠子宫内膜容受性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

试剂: Trizol™ Reagent (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒 (上海近岸蛋白科技有限公司)。仪器: 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, 美国 Applied Biosystems 公司), 荧光倒置显微镜 (DM4000B, 德国 Leica 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物和分组** 48 只 C57BL/6 雌鼠和 16 只 C57BL/6 雄鼠[实验动物生产许可证: SCXK (辽) 2015-0001, 实验动物使用许可证: SYXK (军) 2012-0003]饲养于平均湿度 ( $55 \pm 10$ ) %、平均温度 ( $22 \pm 2$ ) °C 和明暗 (12 h/12 h) 控制的房间内, 可自由进食和饮水。适应性饲喂 1 周后, 随机将雌鼠分为对照组、造模组、LMWH 低剂量造模组和 LMWH 高剂量造模组。本实验获得中国医科大学北部战区总医院伦理委员会的批准 (No: 2019004)。

**1.2.2 模型复制** 将 25 mg 米非司酮片剂溶于 31 ml

乙二醇中配成 0.8g/L 米非司酮溶液。于妊娠第 4 天上午 9:00 皮下注射米非司酮溶液 0.1 ml。

**1.2.3 处理方法** 每日行脱落细胞学检查, 若为发情前期或发情期, 于当晚 5 点合笼, 第 2 天观察到阴道栓或涂片发现精子, 记为妊娠第 1 天。自该日起, 对照组、造模组每日皮下注射生理盐水, LMWH 低剂量造模组、LMWH 高剂量造模组分别皮下注射 100 IU/kg、150 IU/kg 的 LMWH, 持续至妊娠第 4 天。妊娠第 5 天上午行脊椎脱臼法处死小鼠。取出子宫内膜, 统计胚胎数量。将子宫分成两段, 一段液氮速冻后, 立即放入 -80°C 冰箱, 另一段放入 4% 的多聚甲醛内避光待检。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 子宫内膜组织学检测** 经垂直包埋, 石蜡切片, 苏木素-伊红染色法染色、脱水、透明、中性树脂胶封片。光镜下观察子宫内膜厚度和子宫内膜形态变化, 并进行组间比较。

**1.3.2 qRT-PCR** 将子宫组织剪碎, 按照试剂盒说明提取 RNA。逆转录后进行 qRT-PCR, 扩增条件: 95°C 预变性 1 min, 95°C 变性 20 s, 60°C 退火 1 min, 共 40 个循环。每孔加样 3 份, 重复 3 次。检测每组血小板内皮细胞黏附因子 1 (PECAM1)、同源框基因 A10 (HOXA10)、Wnt7A 和  $\beta$ -catenin 的 mRNA 水平。相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。见表 1。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 进一步的两两比较用 LSD- $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LMWH 对小鼠胚胎着床数量的影响

造模组子宫比对照组瘦、短, LMWH 低剂量造模组和 LMWH 高剂量造模组子宫明显较肥厚 (见图 1)。各组胚胎数量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), LMWH 低剂量造模组和 LMWH 高剂量造模组较造模组增加 ( $P < 0.05$ ),

表 1 qRT-PCR引物序列

基因	引物库ID	引物序列	引物长度/bp
GAPDH	6679937a1	正向: 5'-AGGTCGCTGTGAACGGATTG-3'	21
		反向: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	23
HOXA10	6680243a1	正向: 5'-CCTGCCGCGAACTCCTTTT-3	19
		反向: 5'-GGCGCTTCATTACGCTTGC-3	19
PECAM1	26332198a1	正向: 5'-ACGCTGGTCTCTATGCAAG-3'	20
		反向: 5'-TCAGTTGCTGCCCATTCATCA-3'	21
Wnt7a	29144994a1	正向: 5'-CCTGTGTCGCTTGTCTCC-3'	20
		反向: 5'-GGCGGGCAATCCACATAG-3'	19
$\beta$ -catenin	6671684a1	正向: 5'-ATGGAGCCGACAGAAAAGC-3'	20
		反向: 5'-CTTGCCACTCAGGGAAGGA-3'	19

LMWH 高剂量造模组最高; LMWH 高剂量造模组较对照组增加 ( $P < 0.05$ )。见表 2 和图 2。



图 1 子宫图

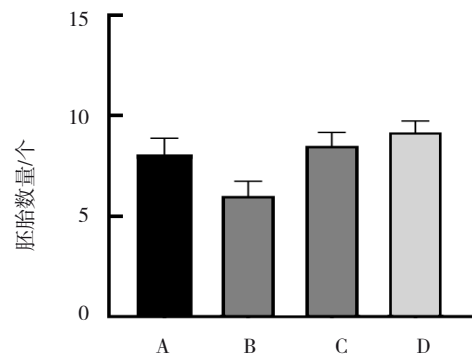
### 2.2 子宫内膜 HE 染色

造模组子宫内膜厚度薄, 间质致密; LMWH 低剂量造模组和 LMWH 高剂量造模组子宫内膜增厚, 子宫腺弯曲, 腺腔扩大, 螺旋动脉更长、更弯曲, 间质呈生理性水肿, 局部内膜疏松, LMWH 高剂量造模组尤为明显。各组腺体数量、血管数量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), LMWH 低剂量造模组和 LMWH 高剂量造模组较造模组增加 ( $P < 0.05$ ), 而 LMWH 造模组与对

表 2 每组胚胎、腺体及血管数量比较 ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	胚胎数量	腺体数量	血管数量
对照组	8.08 ± 0.79	18.93 ± 3.75	16.27 ± 2.24
造模组	6.00 ± 0.74	13.33 ± 4.38	11.87 ± 3.58
LMWH 低剂量造模组	8.50 ± 0.67 <sup>①</sup>	17.39 ± 3.86 <sup>①</sup>	16.58 ± 3.81 <sup>①</sup>
LMWH 高剂量造模组	9.17 ± 0.58 <sup>①②</sup>	20.83 ± 2.82 <sup>①</sup>	16.84 ± 2.52 <sup>①</sup>
F 值	45.685	8.692	6.897
P 值	0.000	0.000	0.001

注: ①与造模组比较,  $P < 0.05$ ; ②与对照组比较,  $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B: 造模组; C: LMWH 低剂量造模组; D: LMWH 高剂量造模组。

图 2 各组胚胎数量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2 和图 3。

### 2.3 各组 HOXA10、PECAM1、Wnt7A、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较

各组 HOXA10、PECAM1、Wnt7A、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), LMWH 低剂量造模组和 LMWH

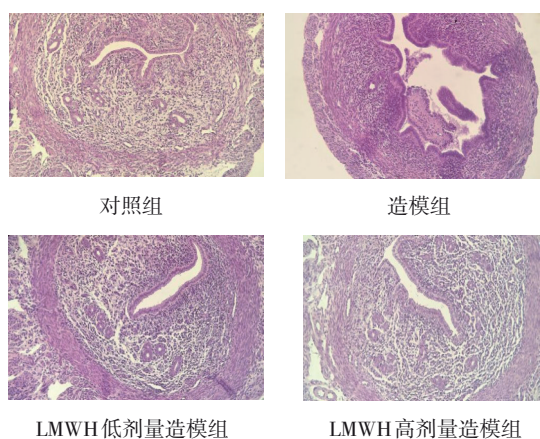


图3 HE染色图 (×200)

高剂量造模组较造模组增加 ( $P < 0.05$ )。结果表明, LMWH 可以改善子宫内膜情况, 提高胚胎植入, 作用机制与 Wnt 通路和 PECAM1、HOXA10 相关; LMWH 高剂量疗效更佳, 能更好地提高子宫内膜容受性。见表 3 和图 4。

表 3 各组 HOXA10、PECAM1、Wnt7A、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较 ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	HOXA10	PECAM1	Wnt7A	$\beta$ -catenin
对照组	1.01 ± 0.42	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.47	1.00 ± 0.58
造模组	0.28 ± 0.13	0.33 ± 0.16	0.28 ± 0.18	0.15 ± 0.07
LMWH 低剂量造模组	1.62 ± 0.89	1.62 ± 0.84	2.37 ± 0.90	1.24 ± 0.29
LMWH 高剂量造模组	2.08 ± 0.68	2.01 ± 0.72	4.11 ± 0.91	2.26 ± 0.52
F 值	10.150	9.652	36.350	3.734
P 值	0.000	0.000	0.000	0.028

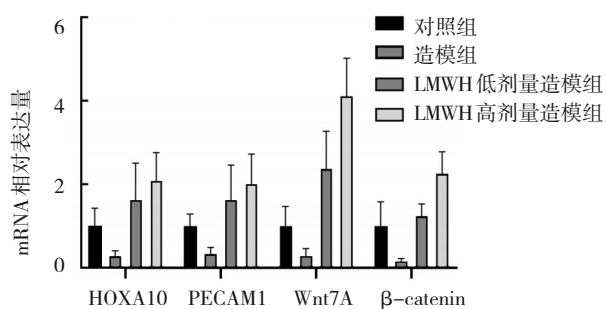


图4 各组 HOXA10、PECAM1、Wnt7A、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

HOXA10 作为子宫内膜容受性标志物, 在分泌中期达到峰值<sup>[8]</sup>, 这一时间与植入窗口期相同, 其含量增加提示子宫内膜容受性的提高。本研究发

现经过 LMWH 治疗后的小鼠, HOXA10 含量与造模组相比显著增加。提示 LMWH 存在提高子宫内膜容受性的作用, 且这一作用与用药剂量相关。

Wnts 是小鼠子宫形态发生和胚泡植入的重要调节因子<sup>[9]</sup>, 其失调会导致腺体形成、蜕膜化和生育能力的缺陷。本研究发现, 经 LMWH 低剂量治疗后, 胚胎植入数量高于造模组, HE 染色新生血管的数量也较多。从分子层面来说, 与造模组相比, 不同剂量 LMWH 造模组 Wnt7A mRNA 和  $\beta$ -catenin mRNA 含量都显著增加, LMWH 高剂量造模组效果优于 LMWH 低剂量造模组。以上结果表明, LMWH 可以明显改善胚胎植入失败子宫内膜容受性, 进而有利于胚胎植入。并且 LMWH 作用通路可能为 Wnt 通路。

胚胎和母体子宫内膜之间复杂的相互作用是着床过程的第一步, 类固醇激素在其中发挥作用。孕激素与 Wnt 通路相关, 可影响人子宫内膜上皮细胞中的 Wnt7A<sup>[10-11]</sup>。孕酮可在去卵巢小鼠体内诱导子宫内膜血管生成<sup>[12]</sup>, 血管生成和重塑过程为母胎界面提供充足的血液供应, 这对成功着床至关重要<sup>[13]</sup>。

PECAM1 作为新生血管的标志物, 负责囊胚植入过程中胎盘的血流<sup>[14]</sup>。本研究发现, 不同剂量 LMWH 造模组 PECAM1 较造模组显著增加, 说明 LMWH 可能通过增加血管生成促进胚胎植入。胎盘血管生成对于正常胎盘循环以及胎儿发育至关重要, 滋养层浸润不足将导致血管-胎盘功能不全<sup>[15]</sup>。体外细胞培养发现, LMWH 可以促进滋养细胞侵袭, 与本研究结果一致<sup>[16]</sup>。本研究仍有一定不足, 只证明了 LMWH、PECAM1 与 Wnt 有关, 未明确 LMWH 作用靶点是 PECAM1。母胎界面分子机制极为复杂, Wnt 可能不是 LMWH 唯一作用通路, 这些都值得进一步研究。

### 参 考 文 献 :

- [1] FREIS A, KELLER A, LUDWIG N, et al. Altered miRNA-profile dependent on ART outcome in early pregnancy targets Wnt-pathway[J]. Reproduction, 2017, 154(6): 799-805.
- [2] TEPEKOY F, AKKOYUNLU G, DEMIR R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(3): 337-346.
- [3] FULOP V, VERMES G, DEMETER J. The relationship between inflammatory and immunological processes during pregnancy.

- Practical aspects[J]. *Orv Hetil*, 2019, 160(32): 1247-1259.
- [4] BOLNICK A D, BOLNICK J M, KOHAN-GHADR H R, et al. Enhancement of trophoblast differentiation and survival by low molecular weight heparin requires heparin-binding EGF-like growth factor[J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(6): 1218-1229.
- [5] SPRATTE J, BORNKESSEL F, SCHUTZ F, et al. The presence of heparins during decidualization modulates the response of human endometrial stromal cells to IL-1beta in vitro[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(7): 949-957.
- [6] SPRATTE J, SCHONBORN M, TREDER N, et al. Heparin modulates chemokines in human endometrial stromal cells by interaction with tumor necrosis factor alpha and thrombin[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(5): 1363-1369.
- [7] FLUHR H, SPRATTE J, EHRHARDT J, et al. Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2581-2587.
- [8] WANG J X, HUANG C Y, JIANG R W, et al. Decreased endometrial IL-10 impairs endometrial receptivity by downregulating *hoxa10* expression in women with adenomyosis[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: DOI: 10.1155/2018/2549789.
- [9] INGARAMO P I, VARAYOUD J, MILESI M M, et al. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats[J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 73: 87-95.
- [10] FAN X, KRIEG S, HWANG J Y, et al. Dynamic regulation of Wnt7a expression in the primate endometrium: implications for postmenstrual regeneration and secretory transformation[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(3): 1063-1069.
- [11] HAYASHI K, YOSHIOKA S, REARDON S N, et al. Wnts in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(2): 308-319.
- [12] WALTER L M, ROGERS P A, GIRLING J E. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice[J]. *Reproduction*, 2005, 129(6): 765-777.
- [13] EL-AZZAMY H, DAMBAEVA S V, KATUKURUNDAGE D, et al. Dysregulated uterine natural killer cells and vascular remodeling in women with recurrent pregnancy losses[J/OL]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 80(4): e13024.
- [14] GUO F, SI C C, ZHOU M J, et al. Decreased PECAM1-mediated TGF-beta1 expression in the mid-secretory endometrium in women with recurrent implantation failure[J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(5): 832-843.
- [15] ALIJOTAS-REIG J, PALACIO-GARCIA C, FARRAN-CODINA I, et al. Circulating cell-derived microparticles in severe preeclampsia and in fetal growth restriction[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2012, 67(2): 140-151.
- [16] SHOMER E, KATZENELL S, ZIPORI Y, et al. Microvesicles of pregnant women receiving low molecular weight heparin improve trophoblast function[J]. *Thromb Res*, 2016, 137: 141-147.

(李科 编辑)

**本文引用格式:** 牛凯迪, 王春雪, 于月新. 低分子肝素对子宫内膜容受性的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(18): 39-43.

**Cite this article as:** NIU K D, WANG C X, YU Y X. Effect of low molecular weight heparin on endometrial receptivity and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(18): 39-43.