

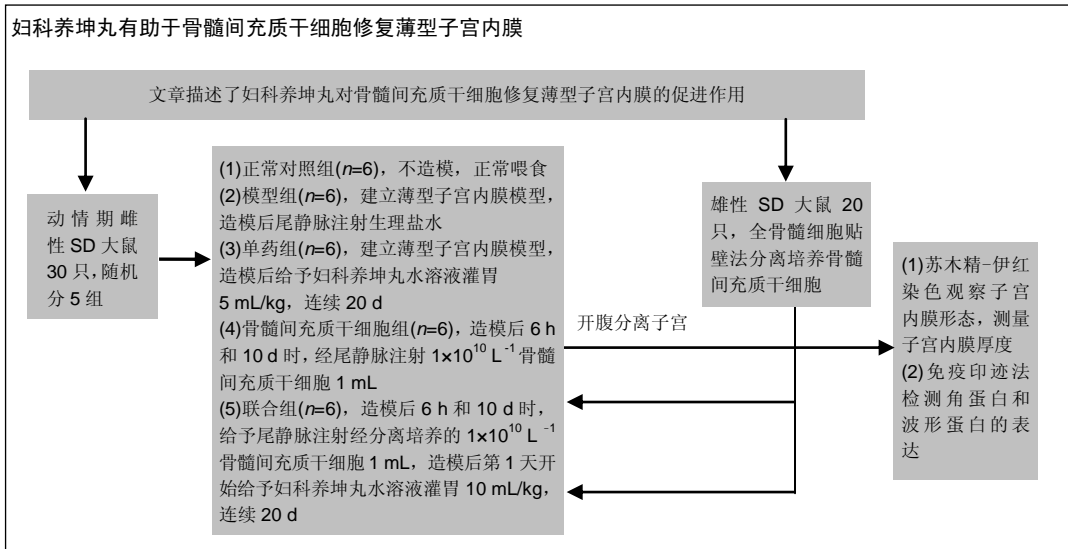
妇科养坤丸与骨髓间充质干细胞移植修复薄型子宫内膜

韩冉¹, 戴宁², 林韵³, 林彤³(北京中医药大学东方医院, ¹检验科, ³妇科, 北京市 100078; ²北京中医药大学基础医学院, 北京市 100029)

引用本文: 韩冉, 戴宁, 林韵, 林彤. 妇科养坤丸与骨髓间充质干细胞移植修复薄型子宫内膜[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):65-69.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.012 ORCID: 0000-0003-3855-6111(林彤)

文章快速阅读:



韩冉, 男, 2009年北京中医药大学毕业, 硕士, 主管技师。

通讯作者: 林彤, 副主任医师, 北京中医药大学东方医院妇科, 北京市 100078

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)01-00065-05

稿件接受: 2015-11-23

http://www.crter.org

文题释义:

骨髓间充质干细胞: 间充质干细胞最初在骨髓中发现, 具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点。在体内或体外特定的诱导条件下, 可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能, 可作为理想的种子细胞用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复。

薄型子宫内膜: 是指子宫内膜厚度低于能够获得妊娠的阈值, 其涉及宫腔操作和感染史、内分泌、年龄、药物等因素, 病理生理特征为腺上皮生长缓慢、子宫动脉血流阻力高、血管发育不良及血管内皮生长因子低表达。目前尚无统一诊断标准, 多数学者认为, 在辅助生殖技术中应用人绒毛膜促性腺激素或给予黄体支持当天, 超声下子宫内膜厚度 < 7 mm 或 8 mm 即可认为是薄型子宫内膜。

摘要

背景: 已有研究发现骨髓抑制后女性患者的子宫内膜中检测到来源骨髓供体的内膜细胞。

目的: 探讨妇科养坤丸对骨髓间充质干细胞治疗薄型子宫内膜的促进作用。

方法: 取处于动情期的雌性大鼠 30 只随机分为正常对照组、模型组、单药组、骨髓间充质干细胞组、联合组, 每组 6 只, 除正常对照组外, 其余各组大鼠建立薄型子宫内膜模型。正常对照组正常喂食, 模型组尾静脉注射生理盐水, 骨髓间充质干细胞组造模后 6 h 和 10 d 经尾静脉注射异体骨髓间充质干细胞 1 mL, 单药组造模后连续 20 d 灌胃妇科养坤丸水溶液 5 mL/kg, 联合组造模后 6 h 和 10 d 尾静脉注射骨髓间充质干细胞 1 mL 以及连续 20 d 灌胃妇科养坤丸水溶液 10 mL/kg。造模后第 21 天苏木精-伊红染色观察子宫内膜组织形态变化, 测量子宫内膜厚度, 免疫印迹法检测子宫内膜角蛋白与波形蛋白的表达。

结果与结论: ①与模型组相比, 骨髓间充质干细胞组、单药组和联合组的子宫内膜均有不同程度增厚, 其中联合组最接近正常对照组。②正常对照组的角蛋白和波形蛋白表达最强, 模型组的表达最低, 单药组、骨髓间充质干细胞组和联合组依次升高 ($P < 0.05$)。③结果表明骨髓间充质干细胞移植于薄型子宫内膜大鼠体内可修复子宫内膜组织, 妇科养坤丸能够显著促进骨髓间充质干细胞对子宫内膜的修复作用。

关键词:

干细胞; 移植; 妇科养坤丸; 骨髓间充质干细胞; 薄型子宫内膜; 全骨髓贴壁法; 子宫厚度; 角蛋白; 波形蛋白

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 子宫内膜; 角蛋白类; 波形蛋白; 组织工程

基金资助:

北京科技发展基金(JJ2013-58)

Han Ran¹, Dai Ning², Lin Yun³, Lin Tong³ (¹Department of Laboratory Medicine, ³Department of Gynecology, East Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; ²Basic Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Han Ran, Master, Technician in charge, Department of Laboratory Medicine, East Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Corresponding author: Lin Tong, Associate chief physician, Department of Gynecology, East Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Endometrium; Keratins; Vimentin; Tissue Engineering

Funding: the Scientific Development Fund of Beijing, No. JJ2013-58

Therapeutic effect of *Fukeyangkun* pills and bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on thin endometrium

Abstract

BACKGROUND: Studies have found that endometrial cells from bone marrow donors can be detected in the endometrium of female patients after bone marrow suppression.

OBJECTIVE: To investigate the effect of *Fukeyangkun* pills combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation in the treatment of thin endometrium.

METHODS: Thirty female rats at rutting period were randomized into control, model, *Fukeyangkun* pills, cell transplantation and combined group ($n=6$ per group). Rat models of thin endometrium were made in the latter five groups. Rats in the six groups were respectively subjected to routine feeding, tail vein injection of normal saline, tail vein injection of bone marrow mesenchymal stem cells (1 mL) at 6 hours and 10 days after modeling, intragastric administration of 5 mL/kg *Fukeyangkun* pill solution for continuous 20 days, or tail vein injection of bone marrow mesenchymal stem cells (1 mL) at 6 hours and 10 days after modeling plus intragastric administration of 10 mL/kg *Fukeyangkun* pill solution for continuous 20 days. At 21 days after modeling, hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes of the endometrial tissues and measure the endometrium thickness. The expression of cytokeratin and vimentin was determined by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, the endometrium thickness and the expression of cytokeratin and vimentin ($P < 0.05$) were increased successively in the *Fukeyangkun* pills group, cell transplantation group, and combined group to different extents. Of these groups, the endometrium thickness and the expression of cytokeratin and vimentin in the combined group were the most close to normal levels. Our data demonstrate that bone marrow mesenchymal stem cell transplantation can induce regeneration of the endometrial cells and repair endometrial tissue. Furthermore, treatment of *Fukeyangkun* pills obviously augments the repair effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on thin endometrium.

Cite this article: Han R, Dai N, Lin Y, Lin T. Therapeutic effect of *Fukeyangkun* pills and bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on thin endometrium. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):65-69.

0 引言 Introduction

子宫内膜在卵巢性激素的调控下, 内膜厚度、形态和生殖内分泌功能均呈周期性变化。在每次月经周期中, 子宫内膜只有一段时间能够接受胚胎的种植, 有学者认为, 在体外受精-胚胎移植周期或胚胎解冻及移植周期中子宫内膜厚度应在8 mm是获得成功妊娠的“阈厚度”, 而内膜厚度小于6 mm, 则妊娠率显著下降^[1-3]。厚度小于“阈厚度”的子宫内膜统称为薄型子宫内膜^[4-5], 临床特征主要是个体月经周期正常, 但月经量过少。多种因素导致薄型子宫内膜, 主要包括过度刮宫或子宫内膜结核等因素, 使子宫内膜基底层损伤, 内膜难以再生, 胚胎着床失败, 严重影响女性的生育能力^[6-9]。

临床上对薄型子宫内膜的治疗方案尚无统一标准。通常采用大剂量雌激素治疗为主, 加以其他辅助性治疗药物, 但效果并不理想。Shen等^[10]研究发现黄体中期子宫内膜厚度小于6 mm的患者于月经周期第3天开始连续口服戊酸雌二醇(16 mg/d)9 d, 患者的胚胎移植率及妊娠成功率均显著增加。Satirapod等^[11]采用枸橼酸氯米芬治疗后出现的薄型子宫内膜患者给予戊酸雌二醇治疗后, 子宫内膜厚度可增加至(10.5±0.4) mm。还有报道指出子宫内膜生长不良患者给予枸橼酸西地那非, 70%的患者子宫内膜厚度达到9 mm, 胚胎着床率和妊娠率均显著增加^[12]。国内学者发现中医药治疗薄型子宫内膜具有显著疗效, 逍遥丸和六味地黄丸等均能改善子宫内膜血液循环, 促进子宫内膜发育, 从而提高妊娠率^[13]。

实验建立雌性大鼠薄型子宫内膜模型, 给予大鼠骨髓间充质干细胞和妇科养坤丸进行治疗, 观察妇科养坤丸是否有助于骨髓间充质干细胞修复薄型子宫内膜, 为妇科养坤丸用于薄型子宫内膜的临床应用增加实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2012年6月至2014年12月在北京中医药大学基础医学院完成。

1.3 材料 Sprague-Dawley(SD)健康大鼠, 雄性20只, 未交配雌性30只, SPF级别, 6-8周龄, 体质量220-250 g, 购自山东大学实验动物中心。正常饮食, 温度(22±2)℃, 湿度(55±5)%。DMEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国Gibco公司, 妇科养坤丸购自吉林双士药业有限公司, 青霉素购自华北制药有限公司。Cytokeratin、vimentin和GAPDH购自美国Santa Cruz 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养 将20只雄性大鼠颈椎脱臼法处死, 剪开下肢皮肤, 于无菌条件下取双侧股骨, 剔除肌肉和筋膜, 置于无血清的DMEM培养皿中; 剪断股骨一端, 用5 mL注射器预先吸取DMEM培养基, 插入股骨一端, 冲出骨髓, 重复多次直至骨头发白, 将冲出液吹打成悬液, 置于离心管中, 2 000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 用含胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞, 计数。以 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度将细胞接种于培养瓶中, 置于37℃,

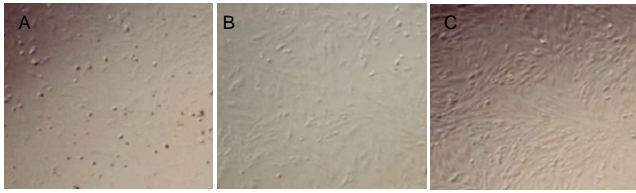


图1 SD大鼠骨髓间充质干细胞的形态(x200)

Figure 1 The morphology of bone marrow mesenchymal stem cells in Sprague-Dawley rats (x200)

图注: 图中A为培养24 h后细胞呈圆形, 附着于瓶底; B为培养3 d后, 细胞逐渐增多, 呈圆形、短梭形; C为培养7 d后细胞呈长梭性, 集落式生长。

表1 各组大鼠子宫内膜厚度的比较

($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of rat endometrial thickness among different groups

组别	n	子宫内膜厚度(μm)
正常对照组	6	362.42 \pm 11.43
模型组	6	201.32 \pm 14.38 ^a
单药组	6	243.17 \pm 12.42 ^{ab}
骨髓间充质干细胞组	6	301.75 \pm 11.57 ^{ab}
联合组	6	335.12 \pm 12.21 ^{ab}

表注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

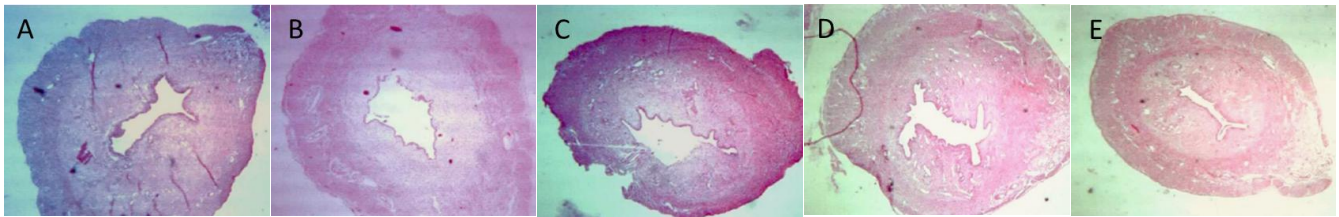


图2 各组大鼠子宫内膜苏木精-伊红染色(x200)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of the rat endometrium in each group (x200)

图注: 图中A为正常对照组, 子宫内膜结构完整呈波浪形, 腺上皮和腔上皮细胞完整, 呈立方状; B为模型组, 子宫壁全层变薄, 子宫内膜最显著, 腺上皮和腔上皮细胞呈扁平状; C为单药组, 子宫壁全层变薄, 腺上皮和腔上皮细胞呈扁平状; D为骨髓间充质干细胞组, 腺上皮及腔上皮细胞呈低柱状, 子宫内膜薄, 表面无明显波浪形; E为联合组, 大部分可见完整结构, 厚度均匀一致, 内膜表面呈波浪形。

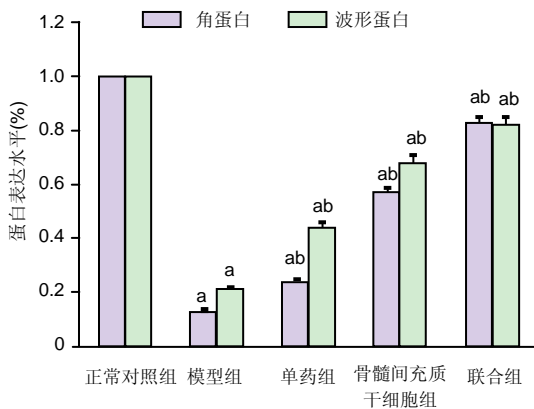


图3 各组大鼠子宫内膜角蛋白、波形蛋白的表达水平

Figure 3 The protein expression of cytokeratin and vimentin in each group

图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。

体积分数为5%CO₂恒温细胞培养箱中培养。20 h后更换新培养基, 以后每2 d或3 d换液1次。待细胞铺满瓶底约90%时, 加入胰酶进行消化传代。

1.4.2 建立大鼠薄型子宫内膜模型 取处于动情期的雌性大鼠30只随机分为正常对照组、模型组、单药组、骨髓间充质干细胞组、联合组, 每组6只, 除正常对照组外, 其余各组大鼠造模。腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg), 待角膜反射及翻正反射消失后于尿道口上约2 cm处做长2.0-2.5 cm的纵向切口, 逐层分离, 暴露子宫, 用2个血管夹分别轻轻夹住一侧子宫的近端和远端, 无齿镊把子宫拉直, 盐水纱布保护周围组织。注射器针头从子宫远端缓缓

注入无水乙醇, 保持宫腔处于充盈状态, 5 min后缓缓取出针头, 松开血管夹, 另一侧同样处理。用生理盐水冲洗腹腔, 无菌纱布吸干, 恢复子宫正常位置, 逐层关腹。大鼠苏醒前注意保温, 术后给予青霉素腹腔注射3 d(10 \times 10⁴ U), 预防感染。

1.4.3 实验给药 正常对照组正常喂食, 模型组造模后尾静脉注射生理盐水, 骨髓间充质干细胞组于造模后6 h和10 d时, 经尾静脉注射1 \times 10¹⁰ L⁻¹骨髓间充质干细胞1 mL; 单药组于造模后给予妇科养坤丸水溶液灌胃5 mL/kg, 连续20 d; 联合组于造模后6 h和10 d时, 给予尾静脉注射经分离培养的1 \times 10¹⁰ L⁻¹骨髓间充质干细胞1 mL, 并造模后第1天开始给予妇科养坤丸水溶液灌胃10 mL/kg, 连续20 d。

1.4.4 取材 脱臼处死大鼠, 开腹分离子宫, 一部分用40 g/L多聚甲醛固定, 一部分放在-80 °C液氮保存, 备用。

1.4.5 子宫内膜苏木精-伊红染色 取出40 g/L多聚甲醛固定的子宫, 用石蜡沿子宫长轴垂直包埋, 4 μm 厚度切片, 置于二甲苯 I、II 中各30 min, 置于梯度乙醇中各5 min, PBS冲洗, 置于苏木精染液中浸泡10 min, 洗去多余染液, 1%盐酸乙醇分色片刻, 直至显微镜下观察细胞核及细胞质清晰为止, 约10 s。流水冲洗15-30 min, 置于醇溶性伊红染液中染色20-30 s, 再次梯度乙醇脱水, 依次置于二甲苯 I、II 中5 min, 中性树胶封固, 显微镜下观察子宫内膜的形态。

1.4.6 子宫内膜厚度测量 光学显微镜低倍镜下观察, 采用leica Qwin Plus图像处理软件测量子宫内膜厚度(子宫内

膜肌层交接处至宫腔的垂直距离)。

1.4.7 免疫印迹法检测相关蛋白表达 取出液氮保存的子宫组织, 研磨, 加入预冷的裂解液于冰上反应30 min, 于4 °C, 10 000 r/min离心15 min, 取上清液进行蛋白定量, 上样, 10%聚丙烯酰胺进行SDS-PAGE电泳, 转移至硝酸纤维素膜上, 用含5%脱脂牛奶的TBS封闭液轻摇2 h, 加入相应一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗膜2次, 加入相应二抗室温孵育2 h, TBST洗膜3次, 进行化学发光反应, 显影, 应用胶片瞬变显示系统扫描胶片。

1.5 主要观察指标 骨髓间充质干细胞形态, 子宫内膜厚度, 子宫内膜角蛋白、波形蛋白表达。

1.6 统计学分析 数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 全部实验结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 t 检验对两样本均数间进行比较, 组间差异应用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的形态 接种24 h后可见部分细胞附着于瓶底生长, 接种3 d后, 贴壁细胞逐渐增多, 呈圆形, 短梭形。随时间增加, 梭形细胞呈集落式生长, 逐渐扩增, 铺满瓶底约90%后进行首次传代。传代后细胞的贴壁生长速度加快, 显微镜下观察呈长梭形或不规则形, 排列整齐或呈漩涡状、放射状, 见图1。

2.2 子宫内膜苏木精-伊红染色结果 正常对照组的子宫内膜结构完整, 呈波浪形, 腺上皮和腔上皮细胞完整, 呈立方状, 腺体和血管正常; 模型组子宫壁全层变薄, 子宫内膜层最显著, 腺上皮和腔上皮细胞呈扁平状, 腺体稀疏, 新生毛细血管数量增多明显, 子宫内膜不连续; 单药组子宫壁全层变薄, 腺上皮和腔上皮细胞呈扁平状, 腺体较少, 毛细血管增多明显, 子宫内膜薄, 不均匀一致, 无明显波浪形; 骨髓间充质干细胞组的子宫内膜结构完整程度少于正常对照组, 腺上皮及腔上皮细胞呈低柱状, 子宫内膜薄, 表面无明显波浪形, 腺体略少, 毛细血管增多; 联合组子宫内膜大部分可见完整结构, 厚度均匀一致, 内膜表面呈波浪形, 大部分腺上皮和腔上皮细胞完整, 成单层立方状, 排列整齐, 腺体略少, 毛细血管增多, 见图2。

2.3 子宫内膜厚度的测量 各组大鼠子宫内膜厚度测量结果见表1。与正常对照组相比, 模型组的子宫内膜显著变薄($P < 0.05$); 与模型组相比, 骨髓间充质干细胞组、单药组和联合组子宫内膜的厚度显著增加($P < 0.05$), 其中, 联合组的子宫内膜厚度显著厚于单药组和骨髓间充质干细胞组($P < 0.05$)。

2.4 子宫内膜角蛋白、波形蛋白的表达 采用免疫印迹法检测各组大鼠子宫内膜角蛋白和波形蛋白的表达情况, 见图3。正常对照组角蛋白和波形蛋白表达最强, 模型组表达最低, 单药组、骨髓间充质干细胞组和联合组依次升高,

两两间差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

妇科养坤丸属于中药复方制剂, 主要含有熟地黄、甘草、地黄、川芎(酒制)、当归(酒蒸)、延胡索(醋制)、黄芩(酒制)、郁金、木香、杜仲(盐制)、香附(醋制)、白芍(酒炒)、蔓荆子(酒蒸)、砂仁等14味中药组方, 主治疏肝理气, 养血活血。临床上用于血虚肝郁所致的月经不调, 痛经, 经期头痛等症^[14]。

干细胞是一类具有自我更新、多向分化以及具有无限增殖潜能的未分化细胞^[15-18]。骨髓来源的间充质干细胞在临床前研究中应用甚广。骨髓中间充质干细胞的含量极低, 仅占有核细胞的0.001%-0.01%^[19-20]。骨髓间充质干细胞易于分离, 容易培养, 在短时间内可大量增殖; 再者, 骨髓间充质干细胞不存在免疫排斥反应与伦理问题, 因此, 在组织工程和基因治疗领域中具有广泛的应用前景^[21-22]。目前骨髓间充质干细胞移植主要用于神经系统疾病如脑梗死、心肌梗死、脊髓损伤等^[23], 亦可用于修复骨损伤、皮肤损伤等^[24-25]。国内有关骨髓间充质干细胞治疗子宫内膜损伤的报道极少。

Nagori等^[26]在2011年发现1例Asherman综合征患者, 通过宫腔移植自体骨髓干细胞联合雌激素替代治疗4个月后, 促进子宫内膜再生, 厚度达到7.1 mm, 最终成功妊娠, 提示自体骨髓干细胞对于子宫内膜再生具有良好的疗效。

临床上除了采用药物治疗薄型子宫内膜, 也有采用子宫内膜微创术, 利用机械性创伤刺激子宫内膜炎症反应和免疫反应, 通过分泌相应的细胞因子和生长因子等^[27], 参与血管的重塑和组织的形成, 促进子宫内膜螺旋小动脉生成和子宫内膜血管化, 使上皮和基质细胞增生^[28]。国内学者对29例顽固性子宫内膜过薄的不孕患者进行子宫-输卵管碘油造影, 发现其中22例患者排卵后的子宫内膜厚度大于8 mm, 治疗有效率达到75.86%^[29], 可能是由于造影剂中的碘对子宫局部具有杀菌、促进炎症吸收作用, 从而增加内膜厚度。

实验采用妇科养坤丸联合自体骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠薄型子宫内膜。苏木精-伊红染色结果显示自体骨髓间充质干细胞移植显著改善子宫内膜的结构, 妇科养坤丸联合骨髓间充质干细胞治疗效果最好, 子宫内膜的厚度显著高于其他处理组, 更接近正常对照组, 提示妇科养坤丸与骨髓间充质干细胞在治疗薄型子宫内膜时具有协同作用, 比单独采用其中一种方式的治疗效果要好。临床上主要以角蛋白和波形蛋白在子宫内膜上皮细胞和间质细胞中的表达来反应子宫内膜细胞的生长情况, 妇科养坤丸联合骨髓间充质干细胞治疗后, 免疫印迹法检测发现子宫内膜标志蛋白角蛋白和波形蛋白的表达显著增高。由于熟地与当归是妇科养坤丸的君药, 因此推测熟地与当归中的有效成分可能是主要发挥作用的物质。上述结果提示妇科养坤丸确实具有修复子宫内膜组织的功能, 其进一步机制将在未来的实验中继续进行探讨。

作者贡献: 实验设计为林彤, 实验实施为韩冉, 实验评估为林彤, 资料收集为林彤与戴宁。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经北京中医药大学东方医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 201206003。实验动物在麻醉下进行所有手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Zenke U, Chetkowski RJ. Transfer and uterine factors are the major recipient-related determinants of success with donor eggs. *Fertil Steril.* 2004;82(4):850-856.
- [2] Yaman C, Mayer R. Three-dimensional ultrasound as a predictor of pregnancy in patients undergoing ART. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2012;13(2):128-134.
- [3] Riad ON, Hak AA. Assessment of endometrial receptivity using Doppler ultrasonography in infertile women undergoing intrauterine insemination. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(1):70-73.
- [4] McWilliams GD, Frattarelli JL. Changes in measured endometrial thickness predict in vitro fertilization success. *Fertil Steril.* 2007;88(1):74-81.
- [5] Momeni M, Rahbar MH, Kovanci E. A meta-analysis of the relationship between endometrial thickness and outcome of in vitro fertilization cycles. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(3):130-137.
- [6] Shufaro Y, Simon A, Laufer N, et al. Thin unresponsive endometrium--a possible complication of surgical curettage compromising ART outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25(8):421-425.
- [7] Grow DR, Iromloo K. Oral contraceptives maintain a very thin endometrium before operative hysteroscopy. *Fertil Steril.* 2006;85(1):204-207.
- [8] Kumbak B, Erden HF, Tosun S, et al. Outcome of assisted reproduction treatment in patients with endometrial thickness less than 7 mm. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(1):79-84.
- [9] Kumbak B, Sahin L. Woman age and morphologic pattern should be taken into consideration while talking about "thin" endometrium. *Fertil Steril.* 2009;92(2):e38.
- [10] Shen MS, Wang CW, Chen CH, et al. New horizon on successful management for a woman with repeated implantation failure due to unresponsive thin endometrium: use of extended estrogen supplementation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(5):1092-1094.
- [11] Satirapod C, Wingprawat S, Jultanas R, et al. Effect of estradiol valerate on endometrium thickness during clomiphene citrate-stimulated ovulation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40(1):96-101.
- [12] Check JH, Graziano V, Lee G, et al. Neither sildenafil nor vaginal estradiol improves endometrial thickness in women with thin endometria after taking oral estradiol in graduating dosages. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2004;31(2):99-102.
- [13] 乐爱文, 申旋, 单莉莉, 等. 逍遥丸合六味地黄丸对原因不明月经少子宫内膜细胞ER、VEGF和KDR表达影响[J]. *生物学杂志*, 2012,29(3):48-50.
- [14] 赵磊, 张丽华. 中成药妇科养坤丸质量标准研究[J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2010,11(1):49-52.
- [15] Morelli SS, Yi P, Goldsmith LT. Endometrial stem cells and reproduction. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:851367.
- [16] Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000;287(5457):1427-1430.
- [17] Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(9):726-737.
- [18] Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287(5457):1433-1438.
- [19] Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006;27(2):208-219.
- [20] Xu RH, Chen X, Li DS, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol.* 2002;20(12):1261-1264.
- [21] 李鲁生, 张涵, 王成俊, 等. 骨髓间充质干细胞的分离方法和生物学特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010,14(10):1869-1873.
- [22] Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(6):827-842.
- [23] Moviglia GA, Fernandez Viña R, Brizuela JA, et al. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy.* 2006;8(3):202-209.
- [24] Fu X, Fang L, Li X, et al. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen.* 2006;14(3):325-335.
- [25] Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2005;112(8):1128-1135.
- [26] Nagori CB, Panchal SY, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(1):43-48.
- [27] Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2030-2036.
- [28] 王瑶, 冯云, 牛志宏, 等. 子宫内膜轻创对着床相关因子及IVF妊娠结局影响的研究[J]. *生殖与避孕*, 2007,27(7):454-462.
- [29] 朱小凤. 子宫输卵管造影治疗过薄型子宫内膜不孕29例临床分析[J]. *中国实用医药*, 2010,5(18):93-94.