

大鼠薄型子宫内膜模型的建立和鉴定

高红, 赵静, 李艳萍*

(中南大学湘雅医院妇产科生殖医学中心, 中国湖南长沙410008)

摘要: 为探索宫腔注入无水乙醇建立薄型子宫内膜模型的可行性, 将25只大鼠分3组: 对照组(宫腔注入生理盐水), 5分钟组(宫腔注入无水乙醇并贮留5 min), 10分钟组(宫腔注入无水乙醇并贮留10 min), 经测量子宫内膜变薄者为造模组, 5分钟组有14个子宫内膜变薄, 10分钟组无一例纳入造模组。免疫组织化学检测角蛋白、波形蛋白、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、雌激素受体 α (estrogen related receptor alpha, ER α)的表达。结果发现5分钟组造模组与对照组单位内膜面积中角蛋白面积、单位间质面积中波形蛋白面积和子宫内膜中VEGF平均光密度差异有统计学意义($P < 0.05$), 造模组与对照组子宫内膜ER α 组织学积分无差异($P > 0.05$)。表明宫腔注入无水乙醇并贮留5 min可以成功建立薄型子宫内膜模型, 成功率为70%。

关键词: 薄型子宫内膜; 无水乙醇; 大鼠模型; 再生长受限

中图分类号: R71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)05-0426-06

Establishment and Identification of Rat Thin Endometrium Model

GAO Hong, ZHAO Jing, LI Yan-ping*

(Reproductive Medical Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

Abstract: To explore a novel method to establish a thin endometrium by injecting ethanol into the uterine cavity of rat. Twenty-five female SD rats were divided into three groups: control group (physiological saline were injected into cavities and kept for 5 min), 5 minutes group (95% ethanol was injected and kept for 5 min) and 10 minutes group (95% ethanol was injected and kept for 10 min). The endometria which were thinner than that of the control group would be taken as a new group-model group, the others were control group. Observe endometrial morphology by hematoxylin-eosin staining (HE) and analyze the growth of the epithelial and stroma cells, VEGF and ER α expression by immunohistochemical staining method. Fourteen uterine endometria thinned in 5 minutes group and the endometrial layers even all uterine layers of 16 uteri were necrosed in 10 minutes group. All endometria were characterized by poor regrowth in model group. Compared with control group, the cytokeratin and the vimentin area per unit endometrium area was less ($P < 0.05$); VEGF expressed lower in endometrium ($P < 0.05$); the expression of ER α was the same ($P > 0.05$) between two groups. A rat model of thin endometrium was successfully established when 95% ethyl alcohol was kept in uterine cavities for 5 min, and the success rate was 70%.

Key words: thin endometrium; ethyl alcohol; rat model; poor regrowth

(Life Science Research, 2011, 15(5): 426~431)

各种原因导致的薄型子宫内膜是生殖医生临床上经常遇到的难题, 其治疗目的就是要促进子宫内膜再生、修复, 增加子宫内膜厚度, 但目前药

物治疗方法效果较差。这促使我们探索新的有效方法, 如进行干细胞动员或干细胞移植等, 那么建立一种薄型内膜的动物模型显得尤为重要。目

收稿日期: 2011-09-09; 修回日期: 2011-10-19

作者简介: 高红 (1984-), 女, 山东阳谷人, 硕士研究生, 主要从事生殖医学研究, 现工作于厦门大学附属第一医院; * 通讯作者: 李艳萍(1962-), 女, 湖南长沙人, 中南大学湘雅医院教授, 博士, 主要从事辅助生殖研究, Tel: 0731-89753282, E-mail: lisayanping@sina.com.

前国内外有氟化物、电磁波、光动力对大鼠子宫内膜损伤和热对小鼠子宫内膜损伤的报道^[1-4],但由于损伤过度或不足而未形成薄型内膜.临床上我们常常利用无水乙醇的脱水和蛋白质变性作用损伤异位子宫内膜来治疗子宫内膜异位囊肿.在此,我们首次尝试以无水乙醇作为损伤内膜的介质,建立大鼠薄型内膜模型,并鉴定模型是否成立.

1 材料与方法

1.1 实验动物来源

性成熟未交配雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 25 只,重 220~250 g,鼠龄 10 周左右,由中南大学实验动物中心提供.实验动物根据宫腔注射药物不同随机分为两组:对照组 5 只(10 个子宫)和实验组 20 只(40 个子宫).实验组根据 95%无水乙醇宫腔滞留时间不同分为:5 分钟组和 10 分钟组,各 10 只大鼠(20 个子宫).造模经过两个动情周期后,若实验组子宫内膜厚度与对照组相比无变化或者子宫内膜层完全坏死,则造模失败;若子宫内膜变薄,则定义为造模组.

1.2 主要试剂

95%无水乙醇;苏木素和伊红染液;一抗(Pan-cytokeratin: sc-15367, 美国 Santa Cruz 公司; ER α : sc-543, 美国 Santa Cruz 公司; Monoclonal anti-vimentin: V-6630, 美国 Sigma 公司; VEGF antibody: ab1316, 英国 Abcam 公司);兔二步法免疫组化试剂盒和小鼠超敏二步法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物公司);DAB.

1.3 动物模型的建立

每日上午 8:00 做大鼠阴道涂片检查,确定动情周期.取动情期大鼠,麻醉、固定、备皮、常规消毒,从尿道口上端约 3 cm 处正中纵向切开皮肤约 2~3 cm,逐层分离进入腹腔,在膀胱后方找到子宫,呈“V”型,在其下端汇合处用血管夹夹住.用无齿镊将一侧子宫拉直,子宫周围垫有无菌纱布.在宫角下 0.5 cm 处以 1 mL 针管沿子宫长轴进入宫腔,注入液体,见子宫膨隆且针孔处无明显液体流出(注入液体约 0.3 mL),即停止注药,保持针头在宫腔内,为保证宫腔的充盈状态,2 min 后再次缓慢注药,如此重复,使液体在宫腔滞留一定时间.对照组宫腔注入生理盐水共约 0.5 mL,滞留 5 min,实验组宫腔注入 95%无水乙醇,分别滞留 5 min(用量约 0.5 mL)和 10 min(用量约 0.8 mL),取出针头.另一侧子宫操作如上.反复冲洗

腹腔,用棉垫将冲洗液吸干,恢复子宫解剖位置,逐层关腹.术后连续观察 3 个动情周期,择第 3 个动情周期的动情期,开腹取子宫,观察子宫大体标本,并纵行剖开部分子宫暴露宫腔观察,后浸入 10%福尔马林中固定待查.

1.4 动物模型的鉴定

1.4.1 形态学观察

常规 HE 染色后,在光镜下观察 HE 染色后子宫各层厚度变化、腺体和血管分布情况、腔上皮或者腺上皮细胞形态学变化.采用 Leica qwin plus 图像处理软件测量子宫内膜厚度.

1.4.2 上皮细胞和间质中细胞生长情况

角蛋白属于结构蛋白并特异性表达于上皮细胞,呈网状分布整个胞质中,因此单位内膜面积中角蛋白的面积变化可以表示上皮细胞面积的变化,从而反映上皮细胞生长情况;同样,单位间质面积中波形蛋白的面积也可以反映间质中细胞(基质细胞和少量内皮细胞)的生长情况.角蛋白、波形蛋白的免疫组织化学染色分别按照兔二步法免疫组化试剂盒和小鼠超敏二步法免疫组化试剂盒说明进行.

1.4.3 VEGF 表达

VEGF 的免疫组织化学染色按照小鼠超敏二步法免疫组化试剂盒说明进行.其半定量采用平均光密度法:平均光密度(AOD average optical density)=IOD (integrated optical density) 累积光密度/area.

1.4.4 ER α 表达

ER α 免疫组织化学染色分别按照兔二步法免疫组化试剂盒说明进行,半定量分析采用组织化学评分(H-score)法.即以胞核或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性,每张切片在细胞密集区选择 5 个高倍镜视野($\times 400$),每个视野计数 100 个细胞.计算公式为: $H\text{-score} = \sum P_i (i+1)$. P_i 代表同一着色程度的细胞占的比例,范围 0~100%, i 代表着色强度,1 为纠正系数.按镜下着色深浅分为 0~3 分:0 分为未见棕黄色颗粒;1 分为出现较浅的棕黄色颗粒;2 分为棕黄色颗粒清晰;3 分为有明显的棕黄色颗粒.

1.4.5 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件及 Excel 软件处理.计量资料结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验. P 值为双侧概率,检验水准 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 大鼠子宫造模术后的结果统计

造模术后经过两个动情周期, 5 分钟组中(表 1), 1 只大鼠死亡, 4 个子宫的内膜厚度恢复至正常, 造模失败. 14 个子宫的内膜变薄 (表 2), 我们把内膜变薄的 14 个子宫归为造模组. 10 分钟组中, 大鼠子宫内膜层甚至子宫全层坏死, 造模失败(表 1).

表 1 3 组大鼠子宫造模术后结果比较
Table 1 Comparison of the results after modeling among three groups

Results	Control group	5 min group	10 min group
Rats	5	10	10
Dead rats	0	1	2
All rats' uteri	0	18	16
Normal uteri	10	4	0
Uteri with thin endometrium	0	14	0
Uteri with all layers necrosed	0	0	9
Uteri with endometria necrosed	0	0	7
Uteri with intrauterine adhesions	0	0	0
Abdominal adhesions	Mild	Moderate	Serious

表 2 造模组和对照组大鼠子宫内膜厚度比较
Table 2 Comparison of the endometrium thickness between the two groups

Groups	No.of uteri	endometrium thickness/ μm
Model group	14	234.6 \pm 48.1
Control group	10	764.1 \pm 100.2

注: 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$).

Notes: There is significant difference between two groups($P < 0.01$).

2.2 在体和离体子宫大体标本观察

大鼠为双子宫双宫颈, 呈“V”型. 注入 95% 无水乙醇后子宫颜色变白, 质地变硬, 未注药侧子宫呈深粉红色, 有弹性 (图 1A). 两个动情周期后, 取出子宫观察: 对照组子宫形态规则, 粗细均匀; 造膜组子宫颜色稍黄, 形态欠规则, 粗细不等, 穿刺位置稍膨大(图 1B); 10 分钟组子宫形态不规则, 粗细明显不等, 有的部位膨大如袋状, 表面可见出血坏死区域 (图 1C). 沿纵轴将子宫剖开观察, 对照组子宫壁厚, 宫腔平整, 皱壁明显可见 (图 1D); 造模组子宫壁较薄且不均匀, 宫腔凹凸不平, 未见明显皱壁 (图 1E). 10 分钟组子宫壁更薄, 宫腔光滑, 并可见出血坏死区域(图 1F).

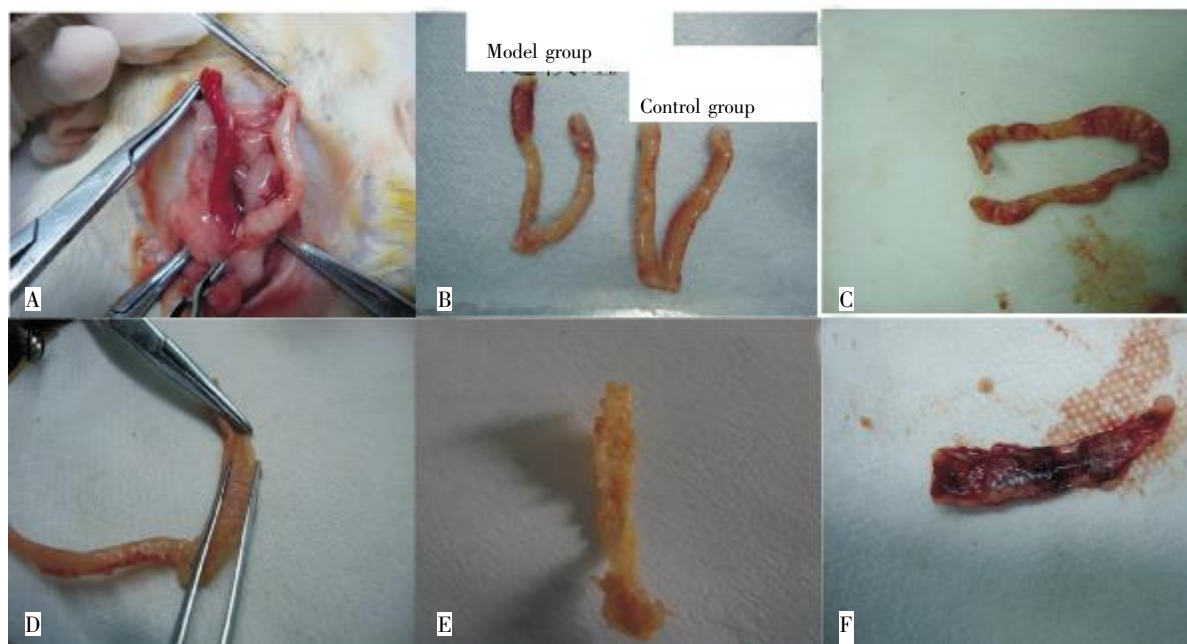


图 1 三组大鼠子宫在体和离体大体标本

(A) 左侧子宫注入 95% 无水乙醇; (B) 造模两个动情周期后, 两组子宫大体标本; (C) 造模两个动情周期后 10 分钟组子宫的大体标本; (D) 造模两个动情周期后对照组子宫的纵向剖面; (E) 造模两个动情周期后造模组子宫的纵向剖面; (F) 造模两个动情周期后 10 分钟组子宫的纵向剖面.

Fig.1 Specimen morphology *in vivo* and *ex vivo*

(A) The left uterus was injected with 95% ethanol; (B) The morphology of the specimen *ex vivo* two estrous cycles after modeling; (C) The morphology of specimen in 10 min group two estrous cycles after modeling; (D) Longitudinal profile of uteri in control group two estrous cycles after modeling; (E) Longitudinal profile of uteri in model group two estrous cycles after modeling; (F) Longitudinal profile of uteri in 10 min group.

2.3 大鼠子宫内膜 HE 染色结果观察

与对照组(图 2A、C) 相比,造模组子宫壁全层均变薄,子宫内膜层(↓)较肌层(↓)更明显,且未见明显波浪形;腺体(#)稀疏,部分腺腔膨大成囊状,腺上皮(↑)及内膜表面上皮呈低柱、立方甚至扁平状;间质中部分区域轻度水肿;子宫内中

大部分区域血管(↑)稀疏,部分区域血管密集并可见管腔膨大(图 2B、D)。10 分钟组子宫内膜层大部分为无细胞结构区域,仅存少数细胞结构轮廓,浅肌层甚至子宫全层坏死,部分深肌层血管扩张,内可见血栓形成(☆)(图 2E、F)。

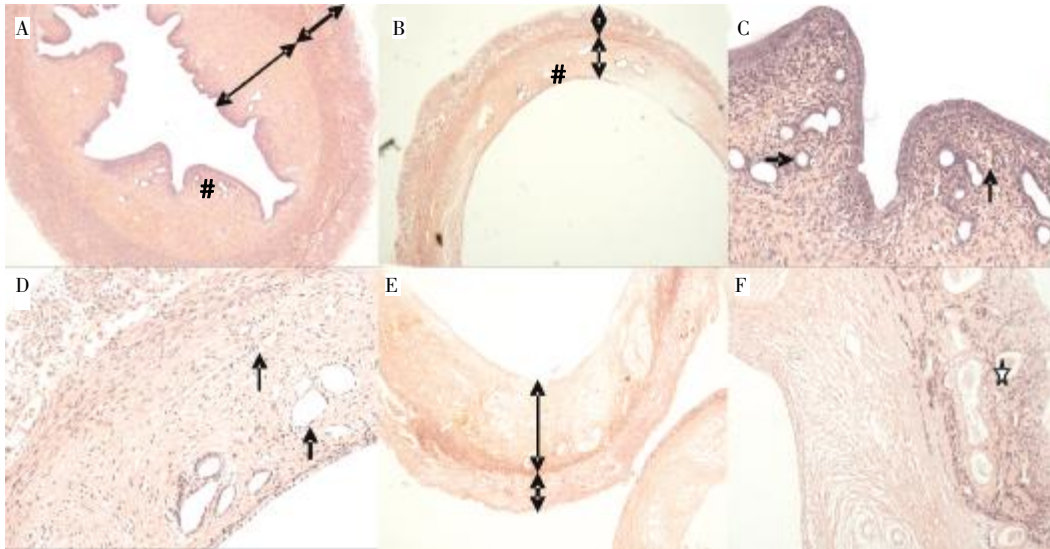


图 2 3 组大鼠子宫组织 HE 染色光镜观察

(A) 对照组宫内膜和肌层的 HE 染色后的形态学观察(x50); (B) 模型组宫内膜和肌层的 HE 染色后的形态学观察(x50); (C) 对照组子宫内膜 HE 染色后的形态学观察(x200); (D) 造模组子宫内膜 HE 染色后的形态学观察(x200); (E) 10 分钟组光镜下子宫内膜和肌层 HE 染色后的形态学观察(x50); (F) 10 分钟组光镜下子宫内膜和肌层 HE 染色后的形态学观察(x200)。其中,“↓”代表子宫内膜层;“↑”代表肌层;“#”代表腺体;“↑”代表腺上皮细胞;“↑”代表血管;“☆”代表血栓。

Fig.2 The observation of rats' endometrial morphology after HE Staining under microscopy in the three groups

(A) The morphology of endometrial and muscular layers by HE staining in the control group (x50); (B) The morphology of endometrial and muscular layers by HE staining in the model group(x50); (C) The morphology of endometrial and muscular layers by HE staining in the control group(x200); (D) The morphology of endometrial and muscular layers by HE staining in the model group (x200); (E) The morphology of endometrial and muscular layers by HE staining in the 10 minutes group (x50); (F) The morphology of endometrial and muscular layers by HE staining in the 10 min group(x200 times). “↓” endometrial layer; “↑” muscular layer; “#” glands; “↑” luminal epithelium; “↑” vessels; “☆” thrombosis.

2.4 上皮细胞和间质中细胞再生情况

角蛋白和波形蛋白分别表达于子宫内膜上皮细胞的胞浆和间质中细胞(基质细胞和少量的血管内皮细胞)胞浆中。造模组单位内膜面积中角蛋白面积和单位间质面积中波形蛋白面积均小于对照组,差异有统计学意义, $P < 0.05$ (表 3)。

表 3 两组大鼠单位内膜面积中角蛋白面积和单位间质面积中波形蛋白面积比较

Table 3 Comparison of the cytokeratin area and vimentin area between the two groups

Groups	No.of uteri	Cytokeratin area/(%)	Vimentin area /((%)
Model group	14	11.46±2.40	8.30±2.84
Control group	10	17.82±2.28	13.62±3.18

注: 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

Notes: There is significant difference between two groups($P < 0.05$).

2.5 VEGF 和 ERα 表达情况

VEGF 主要表达于子宫内膜上皮细胞胞浆中, ERα 主要表达于子宫内膜上皮细胞的胞核和胞浆中, 胞核表达多于胞浆。造模组子宫内膜 VEGF 平均光密度低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 ERα 组织学积分(H-score)稍低于对照组, 差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 4)。

3 讨论

本实验中所选择的动物是 SD 大鼠。在预实验中, 我们曾选用过 C57 小鼠, 由于其具有嗜酒精性, 95%、85%、75%无水乙醇约 0.1 mL 注入子宫后, 小鼠全部死亡, 考虑继续降低酒精浓度则可能达不到损伤效果, 且小鼠个体小, 子宫较小, 无

表 4 两组大鼠子宫内膜 VEGF 平均光密度和 ER α 组织学积分比较

Table 4 Comparison of the expression of AOD of VEGF and H-score of ER α between the two groups

Groups	No.of uteri	AOD of VEGF	H-score of ER α
Model group	14	0.033 \pm 0.005 3	3.12 \pm 0.07
Control group	10	0.054 \pm 0.008 4	3.20 \pm 0.12
P		<0.05	>0.05

注: $P < 0.05$, 有统计学差异.

Notes: There is significant difference when $P < 0.05$.

水乙醇的用量难以控制, 遂我们将实验动物改为 SD 大鼠.

在造模过程中, 我们首先探索形成薄型内膜所需的无水乙醇剂量及作用时间. Hsieh^[9]和 Noma^[6]等多位学者发现对于子宫内膜异位囊肿患者, 穿刺抽出内容物后, 相对于 95% 无水乙醇灌注囊腔 0~10 min, 95% 无水乙醇囊腔贮留 ≥ 10 min 时囊肿复发率明显降低. 国内多位研究者^[7, 8]分别报道宫腔内注入 95% 无水乙醇 5~10 mL, 重复 2~3 次, 共保留 15~30 min, 可以治疗功能失调性子宫出血、子宫内膜增殖症等因素引起的子宫内膜异常出血. 多数患者出血停止, 月经恢复, 少数患者闭经. 由于种属差异, 大鼠子宫较人类小, 子宫内膜也较薄, 考虑减少 95% 无水乙醇的时间和用量. 本实验中, 贮留 5 min 的大鼠大部分子宫内膜变薄; 贮留 10 min 的大鼠子宫内膜甚至全层出血坏死. 这说明子宫内膜损伤程度与 95% 无水乙醇作用时间和用量有关. 可以根据本实验的结果适当调整 95% 无水乙醇的作用时间和剂量, 使模型制作成功率更高. 其次, 临床上清宫术后常常引起宫腔粘连, 而本实验中未见明显宫腔粘连形成, 分析原因, 可能是动情期大鼠宫腔存在分泌液, 加上宫腔内注入的无水乙醇, 宫腔变大; 受无水乙醇细胞脱水、蛋白质凝固作用而坏死的子宫内膜像是形成一层保护膜, 使创面相互接触减少; 大鼠动情周期较短, 仅 4~5 d, 内膜修复及时, 进一步减少粘连的发生. 最后, 手术操作时注意避免无水乙醇溢出流入腹腔, 否则可导致: 大网膜及腹腔脏器严重粘连; 无水乙醇损伤卵巢, 引起卵巢分泌性激素减少, 不再支持内膜生长, 使薄型内膜形成原因不明; 上述情况均可导致大鼠不孕, 不利于后续研究的分析.

本实验在造模经过两个动情周期后, 镜下观察处于动情期的造模组大鼠子宫内膜厚度明显小于对照组, 符合子宫内膜薄的特点^[9, 10]. Yoel. Shu-

faro^[11] 提出刮宫术对于子宫内膜损伤程度可能从形成薄且无反应的内膜到 Asherman 综合征不等. 而在 Asherman 综合症中, 子宫内膜的特点为生长受限. 本实验中, 子宫壁全层明显变薄, 子宫内膜层较肌层更明显, 且未见明显波浪形; 腺体稀疏, 部分腺腔膨大成囊状, 腺上皮及内膜表面上皮呈低柱、立方甚至扁平状. 血管减少, 部分管腔膨大. 这些病理学表现均符合内膜生长受限的特点^[12].

本实验中, 造模组单位内膜面积中角蛋白面积和单位间质面积中波形蛋白面积均小于对照组, 提示造模组子宫内膜上皮细胞、间质中的细胞再生生长受限, 与 Miwa 等^[13]提出黄体中期薄型子宫内膜中腺上皮细胞生长受限结论一致. 子宫内膜组织的再生、修复主要包括子宫内膜上皮细胞、间质中的细胞(包括基质细胞和少量的内皮细胞)再生、修复. 早在 1978 年就有学者^[14]提出子宫内膜的修复是通过子宫内膜干细胞介导的. 造模组形成薄型内膜, 可能与残存的子宫内膜干细胞不能完全修复子宫内膜有关. 本实验中, 造模组 VEGF 表达量低于对照组, 这与 Miwa^[13]和周晓曦^[15]的结论一致. VEGF 是一种极强的血管生成促进因子, 而血管生成主要的意义是促进子宫内膜增殖和修复. 薄型内膜的产生可能是由 VEGF 不足引起. 本实验发现 ER α 在造模组大鼠子宫内膜中表达稍低, 但差异无统计学意义. 这与 Ohno^[16]、Kim^[17]等大部分研究一致, 但袁瑞^[18]研究显示薄型内膜中 ER α 表达降低. ER α 是子宫中占优势的 ER 亚型, 在介导雌激素对子宫内膜的生长、增殖作用中起主导作用. ER α 在薄型内膜中的表达降低的结论在传统理论上是行得通的, 而本实验和大部分研究发现 ER α 在薄型内膜中的表达与正常内膜无差异, 其原因不明, 具体机制仍需我们进一步研究.

因此, 造模组大鼠子宫内膜生长受限的形态学特点、上皮细胞、间质中细胞生长受限的特点和 VEGF 表达量降低均可以推断薄型内膜大鼠模型成功建立, 为后续的干细胞宫腔移植方面的实验性治疗研究奠定实验动物基础.

参考文献 (References):

- [1] GUNNEY M, ORAL B, KARAHAN N, *et al.* Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on fluoride-induced oxidative stress and apoptosis in rat endometrium[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 24(2): 86-91.
- [2] GUNEYA M, OZGUNERB F, ORAL B, *et al.* 900 MHz ra-

- diol frequency-induced histopathologic changes and oxidative stress in rat endometrium: protection by vitamins E and C[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2007, 23(7): 411-420.
- [3] KRZEMIEN A A, Van VUGT D A, POTTIER R H, *et al.* Evaluation of novel nonlaser light source for endometrial ablation using 5-aminolevulinic acid[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1999, 25(4): 315-322.
- [4] 吕一帆. 胚胎干细胞在内膜损伤小鼠宫腔内移植的实验研究[D]. 福州: 福建医科大学(Lü Yi-fan. Experimental studies on transplantation of mouse embryonic stem cell into uterine cavity of the ICR mouse with injured endometrium [D]. Fuzhou: Fujian Medical University), 2010.
- [5] HSIEH C L, SHIAU C S, LO L M, *et al.* Effectiveness of ultrasound-guided aspiration and sclerotherapy with 95% ethanol for treatment of recurrent ovarian endometriomas[J]. *Fertility and Sterility*, 2009, 91(6): 2709-2713.
- [6] NOMA J, YOSHIDA N. Efficacy of ethanol sclerotherapy for ovarian endometriomas[J]. *Gynecology and Obstetrics*, 2001, 72(1): 35-39.
- [7] 石洪柱, 石福宝, 王长庚, 等. 超声引导下宫腔内注入无水乙醇治疗子宫内膜增殖症[J]. 中国超声诊断杂志(SHI Hong-zhu, SHI Fu-bao, WANG Chang-geng, *et al.* The treatment of endometrial hyperplasia with ethanol injected into uterine cavity under the guidance of ultrasound[J]. *Chinese Journal of Ultrasound Diagnosis*), 2003, 4(3): 219-220.
- [8] 武传中, 王勇, 王其美, 等. 刮宫术后宫腔内注入无水乙醇治疗子宫异常出血 38 例报告[J]. 山东医药(WU Chuan-zhong, WANG Yong, WANG Qi-mei, *et al.* 38 cases report of treatment of abnormal bleeding with ethanol injected into the uterine cavity after uterine curettage[J]. *Shandong Medical Journal*), 2001, 41(22): 47-48.
- [9] Mc WILLIAMS G D, FRATTARELLI J L. Changes in measured endometrial thickness predict *in vitro* fertilization success[J]. *Fertility and Sterility*, 2007, 88(1): 74-81.
- [10] BASIR G S, O W S, SO W W, *et al.* Evaluation of cycle-to-cycle variation of endometrial responsiveness using transvaginal sonography in women undergoing assisted reproduction[J]. *Ultrasound Obstetrics and Gynecology*, 2002, 19(5): 484-489.
- [11] SHUFARO Y, SIMON A, LAUFER N, *et al.* Thin unresponsive endometrium—a possible complication of surgical curettage compromising ART outcome [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2008, 25(8): 421-425.
- [12] YU D, WONG Y M, CHEONG Y, *et al.* Asherman syndrome one century later [J]. *Fertility and Sterility*, 2008, 89(4): 759-779.
- [13] MIWA I, TAMURA H, TAKASAKI A, *et al.* Pathophysiologic features of “thin” endometrium[J]. *Fertility and Sterility*, 2009, 4(91): 998-1004.
- [14] PRIANISHNIKOV V A. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium[J]. *Contraception*, 1978, 18(3): 213-223.
- [15] 周晓曦, 姚珍薇. 原因不明月经过少子宫内中血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶-11 的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学 (ZHOU Xiao-xi, YAO Zhen-wei. The study of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases-11 in endometrium of hypomenorrhea[D]. Chongqing: Chongqing Medical University), 2007.
- [16] OHNO Y, HOSOKAWA K, TAMURA T, *et al.* Endometrial oestrogen and progesterone receptors and their relationship to sonographic endometrial appearance[J]. *Human Reproduction*, 1995, 10(3): 708-711.
- [17] KIM C H, CHAE H I, HUH J, *et al.* Relationship between endometrial oestrogen and progesterone receptors, and sonographic endometrial appearance in the preovulatory phase[J]. *Obstetrics and Gynaecology Research*, 2010, 26(2): 95-101.
- [18] 袁瑞, 乐爱文, 姚珍薇, 等. 原因不明月经过少患者子宫内膜雌激素受体 α 表达的研究[J]. 第三军医大学学报(YUAN Rui, LE Ai-wen, YAO Zhen-wei, *et al.* ER α gene expression in unknown aetiology hypomenorrhea[J]. *ACTA Academiae Medicinae Militaris Tertiae*), 2007, 29(22): 2185-2187.