滋肾育胎丸对复发性流产小鼠调节因子表达的影响

储继军， 王瑞雪， 余欣慧， 刘会会， 李伟莉*， 韩燕全
（安徽中医药大学第一附属医院，安徽 合肥 230031）

摘要：目的 观察滋肾育胎丸（菟丝子、人参、续断，等）对复发性流产（RSA）小鼠的大鼠肉瘤蛋白（RAS）、血管内皮细胞生长因子（VEGF）、血管内皮细胞生长因子受体 2（VEGFR-2）、可溶性血管内皮生长因子受体-1（sVEGFR-1）、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）等因子的调节作用，探讨其作用机制。**方法** 分别选取 CBA/J 雌性小鼠和 DBA/2 雄性小鼠，CBA/J 雌性小鼠与 BALB/c 雄性小鼠，按雌雄 2∶1 比例合笼交配，以检出阴栓者计为妊娠第 0 天，分别建立得到 RSA 模型和正常妊娠模型 CBA × BALB/c 小鼠；取造模成功的 CBA/J × DBA/2 小鼠 30 只，随机分为模型对照组、滋肾育胎丸组和黄体酮胶囊组，10 只 CBA × BALB/c 小鼠作为正常妊娠对照组。各给药组连续给药 15 d 后，检测并计算各组小鼠子宫胚胎丢失率，HE 染色观察小鼠蜕膜组织病理变化，免疫组化和 real-time PCR 分别检测 RAS、VEGF、VEGFR-2、sVEGFR-1、MAPK 的蛋白和 mRNA 表达。**结果** 滋肾育胎丸能够显著降低 RSA 小鼠的胚胎丢失率，改善 RSA 小鼠蜕膜组织的病理改变，能够通过降低 RAS、VEGF、VEGFR-2 的水平和提高 sVEGFR-1 的表达，调节小鼠蜕膜组织的血管生成及重铸。**结论** 滋肾育胎丸能够通过调节 RAS、VEGF、VEGFR-2 及 sVEGFR-1 等因子的表达，改善 RSA 小鼠胚胎丢失率和蜕膜血管新生。

关键词：滋肾育胎丸；复发性流产；RAS 蛋白；血管内皮生长因子
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2018)04-0777-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.003

Effects of Zishen Yutai Pills on the expressions of regulatory factors in recurrent spontaneous abortion mice

CHU Ji-jun, WANG Rui-xue, YU Xin-hui, LIU Hui-hui, LI Wei-li*, HAN Yan-quan
(*The First Hospital Affiliated to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China*)

ABSTRACT: AIM To observe the effect of Zishen Yutai Pills (*Cuscutae Semen*, *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Dipsaci Radix*, *etc.*) on RAS, VEGF, VEGFR-2, sVEGFR-1 and MAPK in recurrent miscarriage mice, and to explore its mechanism. **METHODS** CBA/J female mice + DBA/2 male mice, and CBA/J female mice + BALB/c male mice were mated by 2 females and 1 male in cage to establish the RSA model and the normal pregnancy CBA × BALB/c mouse model respectively. Since the zeroth day of pregnancy, a total of 24 CBA/J × DBA/2 mice were randomly divided into model control group, Zishen Yutai Pills group and progesterone capsule group, and 10 CBA × BALB/c mice were used as normal pregnancy control group. Mice of all groups after the respective 15-day intervention had their rate of uterine embryo loss measured and calculated. Their pathological changes of decidual tissue were determined by HE staining, their RAS, VEGF, VEGFR-2, sVEGFR-1, MAPK protein and mRNA expressions were detected by immunohistochemistry and real-time PCR. **RESULTS** Zishen Yutai Pills significantly reduced the rate of embryo loss and improved pathological changes of decidual tissue in RSA mice through regulating mouse decidual tissue angiogenesis and recasting, as revealed by the lowered levels of RAS, VEGF, VEGFR-

收稿日期：2017-12-27
基金项目：罗元恺滋肾育胎丸中青年科研基金项目（140206）
作者简介：储继军（1977—），男，博士，副主任医师，研究方向为中医药防治自然流产、不孕不育症等。Tel：13305694773，E-mail：280711035@qq.com
*通信作者：李伟莉（1958—），女，教授，主任医师，硕士生导师，研究方向为中医药防治自然流产、不孕不育症等。Tel：13075596906，E-mail：liweiliah@163.com

2 and MAPK, and increased expression of sVEGFR-1. **CONCLUSION** Zishen Yutai Pills can lower the rate of embryo loss and improve decidual angiogenesis in RSA mice through altering the expression of RAS, VEGF, VEGFR-2, sVEGFR-1 and MAPK.

KEY WORDS: Zishen Yutai Pills; recurrent spontaneous abortion; RAS protein; vascular endothelial growth factor

复发性流产（recurrent spontaneous abortion，RSA）是指堕胎、小产连续发生 3 次或 3 次以上的自然流产，中医统称其为滑胎，具有屡孕屡堕的特点，是妊娠期最常见的并发症之一[1]。连续自然流产 1、2、3 次后，再次妊娠流产的风险分别达到 13%、37%、84%，RSA 对患者身心健康和家庭社会稳定造成严重的影响，一直是妇产科研究的重大课题，也是临床治疗的难题之一[2]。

在妊娠过程中，影响胎盘正常生长发育的关键因素为胎盘的血液供应、血管的新生、通透性的改变。对于胚胎的生长发育及妊娠的顺利进行，其重要影响因素为胎儿和胎盘的生长发育、子宫蜕膜血管的发育状态及功能水平，母体和胎儿之间气体和营养物质的交换、胎儿所产生代谢物的排泄也都需要发育健全的胎盘血管网[3]。由此可知，血管网络的健康发育在胎盘正常的血液循环及胚胎发育过程发挥着极其重要的作用，因此，从血管生成调节平衡的相关因子表达角度来进行中药治疗 RSA 作用机制的探讨具有一定的可行性。本研究从血管生成调节相关的因子 RAS、VEGF、VEGF-R2、sVEGF-R1、MAPK 蛋白和 mRNA 表达角度出发，探讨滋肾育胎丸治疗实验性复发性流产的作用机制，以期能为该中药作用机制的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 *材料* 滋肾育胎丸（广州白云山中一中药厂生产，国药准字 Z44020008。药物组成：菟丝子、人参、续断、桑寄生、巴戟天、鹿角霜、阿胶、党参、白术、砂仁、熟地黄、首乌、艾叶、枸杞子、杜仲）。其他实验试剂见表 1。

表 1 实验主要药物、试剂盒和抗体

Tab. 1 Main drugs, kits and antibodies of the experiment

名称	生产厂家	批号
黄体酮胶囊(50 mg/粒)	浙江仙琚制药股份有限公司	国药准字 H20041902
逆转录试剂盒	Therm 公司	00221108
RAS 蛋白抗体	Bioworld 公司	CJ36131
血管内皮细胞生长因子(VEGF)抗体	Santa Cruz 公司	E8562
血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR-2)抗体	Cell Signaling Technology 公司	49474
可溶性血管内皮生长因子受体-1 (sVEGFR-1)抗体	Bioworld 公司	CJ36131
丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)抗体	Cell Signaling Technology 公司	CST 4370S
VEGF、VEGFR-2、sVEGFR-1 检测试剂盒	北京中杉公司	-

1.2 *实验动物和模型建立* 分别取雄性 DBA/2 小鼠 20 只、BALB/c 小鼠 5 只、清洁级雌性 CBA/J 小鼠 50 只，鼠龄 6～7 周，体质量 18～22 g（所有动物均购自北京华阜康生物科技股份有限公司，动物生产许可证号为 SCXK［京］2014-0004）。小鼠在相对恒定温度和相对湿度（25～27 ℃、40%～50%）条件下，按照清洁级标准进行饲养。小鼠适应性饲养 1 周后，观察无异常表现者即可入组进行实验研究。分别取雌性 CBA/J 小鼠 + 雄性 DBA/2 小鼠、雌性 CBA/J 小鼠 + BALB/c 雄性小鼠，雌雄小鼠按照 2∶1 比例促其交配，分别建立 CBA/J × DBA/2 RSA 模型及 CBA/J × BALB/c 正常妊娠模型，各妊娠小鼠受孕标准以检出阴栓第 0 天计。以 CBA × BALB/c 正常妊娠模型小鼠作为正常对照组，取造模成功的 CBA/J × DBA/2 RSA 模型小鼠 24 只，随机平均分为 3 组：模型对照组、滋肾育胎丸组和阳性对照组（黄体酮胶囊）。

妊娠后第 1 天进行灌胃给药，正常组和模型对照组给予等容量蒸馏水，阳性对照组给药剂量为 156 mg/(kg·d)，滋肾育胎丸组给药剂量为 11.7 g/(kg·d)，后两组给药剂量均相当于临床成人等效剂量的 6 倍。药物用蒸馏水溶解、稀释后，按每 10 g 小鼠 0.2 mL 体积灌胃给药，每天 1 次，连续给药 15 d。

2 指标观察

2.1 *胚胎丢失率观察* 给药周期结束后，采用断

头法处死各组实验小鼠，立即解剖腹腔，分离子宫，仔细观察各小鼠的胚胎形态、颜色、大小等，并记录总胚胎和胚胎丢失数。按照公式计算胚胎丢失率。

胚胎丢失率（embryo loss rate，ELR）计算公式为 ELR = 丢失胚胎数/（丢失胚胎数 + 存活胚胎数）。正常对照组小鼠的胚胎呈淡红色、粗大、串珠状，子宫内未见明显痕血；复发性流产（RSA）小鼠的胚胎颜色较深，呈黑褐色，部分小鼠子宫呈现竹节样改变，子宫内痕血分布明显，部分 RSA 小鼠胚胎完全消失。

2.2 蜕膜组织病理形态学观察 末次给药后，以颈椎脱臼法处死小鼠，迅速解剖，分离蜕膜组织，用生理盐水漂洗除去血迹后，置于 10% 甲醛溶液中固定，石蜡包埋，再经过切片、HE 染色等过程，制成小鼠蜕膜组织病理片，并于显微镜下观察其血管病理学改变。

2.3 蜕膜组织中 RAS、VEGF、VEGF-R2、sVEGF-R1、MAPK 的免疫组织化学检测 取包埋好的石蜡切片 2 μm，常规脱蜡水化，灭活内源性酶，热修复抗原。分别加 1∶100 稀释的兔抗 RAS、VEGF、VEGF-R2、sVEGF-R1、MAPK 抗体，4 ℃过夜，生物素标记抗兔 IgG（1∶1 000），室温孵育 2 h。洗涤后，加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作液孵育（37 ℃、30 min），DAB 显色，封片，显微镜观察。在每张切片中随机选取 5 个视野，以细胞胞浆或胞质、胞核中存在黄色或棕褐色颗粒为阳性反应，用 BA200 Digital 数码三目摄像显微摄像系统进行图像采集，每张切片选择 3 个区域，运用 200 倍采集图像，再采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的光密度（IOD）和面积，计算平均光密度值（MD）。

2.4 RT-qPCR 检测 *RAS*、*VEGF*、*VEGF-R2*、*sVEGF-R1*、*MAPK* mRNA 表达 取各组小鼠的蜕膜组织各 100 mg，按照 Trizol 试剂说明书抽提绒毛组织总 RNA，紫外分光光度计测定其浓度和纯度，将鉴定合格的 RNA 进行逆转录。real-time PCR 反应体系为 SYBR green mix 12.5 μL，上下游引物各 1 μL，cDNA 2 μL Rnase-free，水 8.5 μL；反应条件为 95 ℃ 3 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，循环 40 次，65 ~ 95 ℃下检测溶解曲线。序列见表 2。

表 2 引物序列

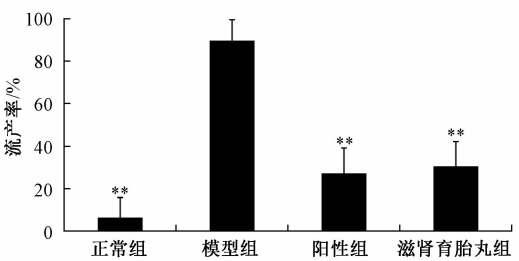
Tab. 2 Primer sequences

基因	正向引物(5′→3′)	反向引物(5′→3′)	长度/bp
β-actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTC	150
RAS	CCCATCTATGAGGGTTACGC	CCCTCCCCAGTTCTCATGTA	90
VEGF	CTCTCTCCCAGATCGGTGAC	CAAAGGAATGTGTGGTGGGG	103
VEGF-R2	ACAGTTCCCAGAGTGGTTGG	GTCACTGACAGAGGCGTAGA	129
sVEGF-R1	CAGACAATTCTGCAGCACCT	TCCTTCGAGGTGGATTTAGG	96
MAPK	CTGGAATGGAAGGGCTATGA	CAGGATGAGTAGGGAGAGC	90

2.5 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，统计学处理采用 SPSS 22.0 软件，组间数据比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 胚胎丢失率 如图 1 所示，正常组胚胎丢失率在 10% 以下，胚胎丢失率较低；与正常组相比，模型组胚胎丢失率显著增高（$P < 0.01$），接近 90%；经滋肾育胎丸及黄体酮治疗后，滋肾育胎丸组和阳性组的胚胎丢失率与模型组比较大幅降低，并与模型组的差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。

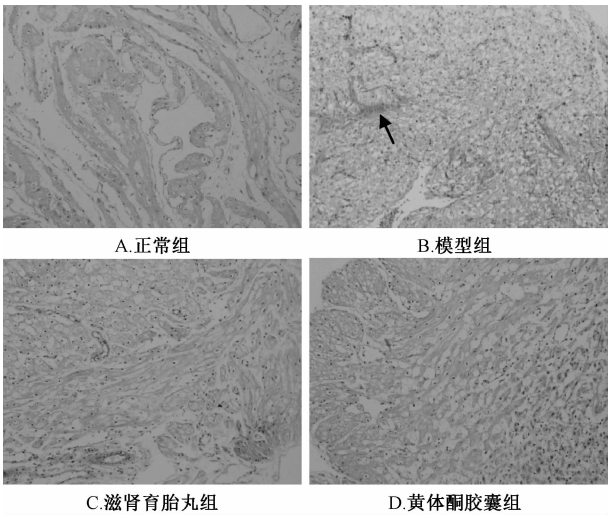


注：与模型组比较，$^{**}P < 0.01$

图 1 小鼠胚胎丢失率的比较

Fig. 1 Comparison of mouse embryo loss rates

3.2 RSA 小鼠蜕膜组织血管形态学观察 结果见图 2。与 CBA × BALB/c 正常妊娠小鼠比较，模型组 RSA 小鼠绒毛形态变化明显，外形不规则且呈现大小不一的状态；细胞形态异常，排列紊乱，炎性细胞和凋亡细胞散布明显，由于细胞核的固缩，染色明显，纤维状变性普遍存在于间充质及基质中，间质血管、细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞数量明显减少。此外，蜕膜组织形态变化也十分明显，其上皮细胞排列不规则，且呈不完整状，腺体呈褶皱及萎缩形态，血管内可见明显瘀血。经过滋肾育胎丸或黄体酮胶囊给药干预后，RSA 小鼠蜕膜组织血管形态学有向正常状态回归的趋势。

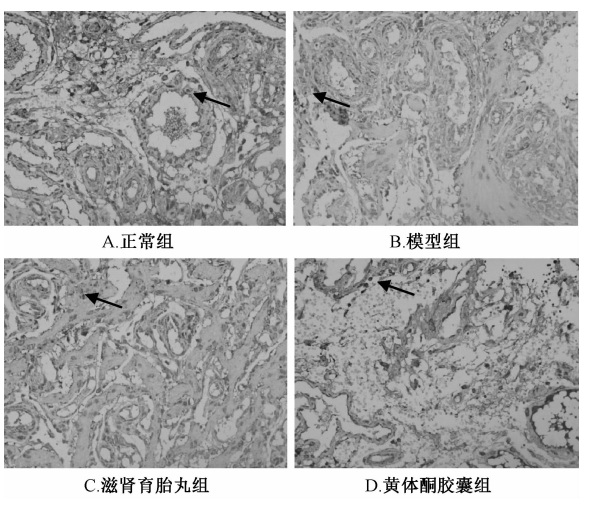


注：箭头所示为蜕膜组织血管

图 2 小鼠蜕膜组织（HE 染色，×200）

Fig. 2 Decidual tissue of mice（HE staining，×200）

3.3 蜕膜组织中 RAS、VEGF、VEGFR-2、sVEGFR-1 和 MAPK 蛋白的分布及表达 如图 3～5 显示，VEGF 蛋白普遍存在于蜕膜细胞、腺上皮细胞及血管内皮细胞胞浆，而细胞核内分布较少，未见明显染色；蜕膜细胞分布较多，染色明显；在蜕膜组织的大部分蜕膜细胞及少数腺上皮细胞的胞核和胞浆内也可见 VEGFR-2 的阳性表达；RAS、sVEGFR-1 和 MAPK 则在血管内皮细胞中表达丰富。相比于 CBA×BALB/c 正常妊娠，模型组 RSA 小鼠的 RAS、VEGF、VEGFR-2 和 MAPK 的表达明显降低（$P<0.05$），而 sVEGFR-1 的表达高于正常组（$P<0.01$）；经滋肾育胎丸和黄体酮治疗后，除滋肾育胎丸组 MAPK、黄体酮 sVEGFR-1 蛋白外，其他指标与模型组比较均具有显著性差异（$P<0.05$，$P<0.01$）；RAS、VEGF、VEGFR-2、MAPK 和 sVEGFR-1 表达的平均光密度值见表 3。

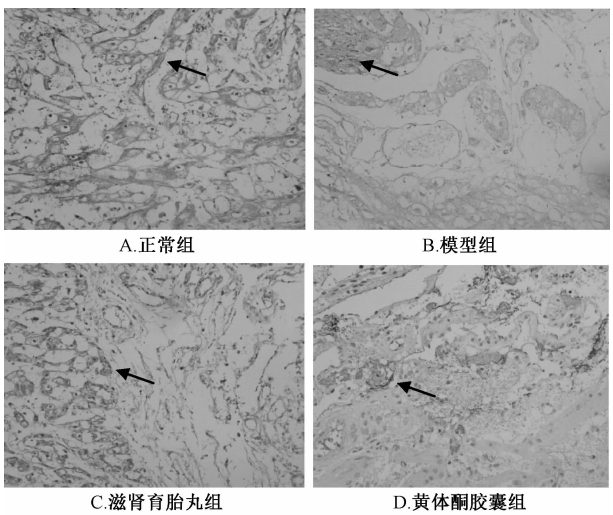


注：箭头所示棕黄色为 RAS 蛋白

图 3 小鼠蜕膜组织 RAS 表达

Fig. 3 Expressions of RAS in decidual tissue of mice

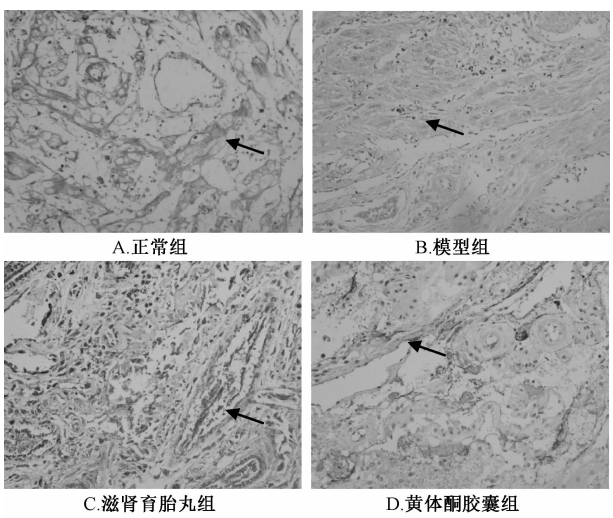
3.4 蜕膜组织中 RAS、VEGF、VEGFR-2、sVEGFR-1 和 MAPK mRNA 的表达 如表 4 所示，与正常组比较，模型组中 RAS、VEGF、VEGFR-2 和 MAPK mRNA 表达均明显降低，sVEGFR-1 mRNA 表达明显升高；经过滋肾育胎丸及黄体酮治疗后，给药组和阳性药组中 RAS、VEGF、VEGFR-2 和 MAPK mRNA 表达较模型组均有显著提升，而 sVEGFR-1 mRNA 表达明显下降，与模型组比较，差异具有统计学意义（$P<0.01$），见图 6～7。



注：箭头所示棕黄色为 VEGF 蛋白

图 4 小鼠蜕膜组织 VEGF 表达

Fig. 4 Expressions of VEGF in decidual tissue of mice



注：箭头所示棕黄色为 VEGFR2 蛋白

图 5 小鼠蜕膜组织 VEGFR2 表达

Fig. 5 Expressions of VEGFR2 in decidual tissue of mice

表 3 蜕膜组织中 RAS、VEGF、VEGFR-2、sVEGFR-1、MAPK 蛋白的 MD 值（$\bar{x} \pm s$，$n=6$）

Tab. 3 MD values of RAS, VEGF, VEGFR-2, sVEGFR-1 and MAPK proteins in decidual tissue（$\bar{x} \pm s$，$n=6$）

组别	RAS	VEGF	VEGFR-2	MAPK	sVEGFR-1
正常组	0.31 ± 0.06	0.38 ± 0.07	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.02
模型组	0.23 ± 0.03$^{\#}$	0.31 ± 0.04$^{\#}$	0.17 ± 0.01$^{\#}$	0.17 ± 0.01$^{\#}$	0.23 ± 0.03$^{\#\#}$
滋肾育胎丸组	0.28 ± 0.02*	0.38 ± 0.06*	0.19 ± 0.01**	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01*
黄体酮胶囊组	0.28 ± 0.03*	0.37 ± 0.05*	0.21 ± 0.03**	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.02

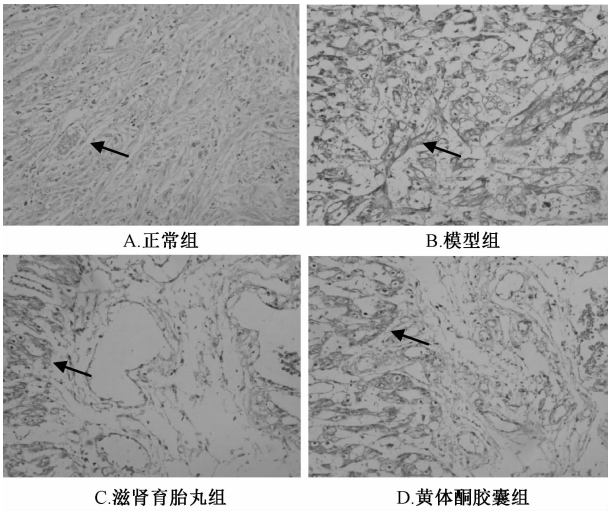
注：与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与正常组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

表 4 蜕膜组织 RAS、VEGF、VEGFR-2、sVEGF-R1、MAPK mRNA 的比较（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

Tab. 4 Comparison of RAS, VEGF, VEGFR-2, sVEGF-R1 and MAPK mRNA in decidual tissue（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别	RAS	VEGF	VEGFR-2	sVEGFR-1	MAPK
正常组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05
模型组	0.47 ± 0.02**	0.46 ± 0.02**	0.42 ± 0.01**	1.52 ± 0.14**	0.60 ± 0.06**
滋肾育胎丸组	0.73 ± 0.05$^{\#\#}$	0.74 ± 0.05$^{\#\#}$	0.75 ± 0.04$^{\#\#}$	1.25 ± 0.04$^{\#\#}$	0.75 ± 0.04$^{\#\#}$
黄体酮胶囊组	0.84 ± 0.05$^{\#\#}$	0.81 ± 0.06$^{\#\#}$	0.86 ± 0.05$^{\#\#}$	1.12 ± 0.09$^{\#\#}$	0.86 ± 0.05$^{\#\#}$

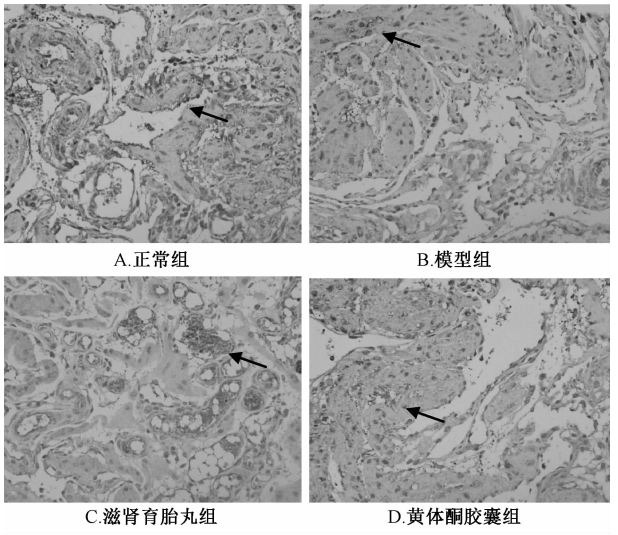
注：与模型组比较，$^{**}P<0.01$；与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$



注：箭头所示为 sVEGFR1 蛋白

图 6 小鼠蜕膜组织 sVEGFR1 表达

Fig. 6 Expressions of sVEGFR1 in decidua tissue of mice



注：箭头所示为 MAPK 蛋白

图 7 小鼠蜕膜组织 MAPK 表达

Fig. 7 Expressions of MAPK in decidual tissue of mice

4 讨论

RSA 是临床最常见的一种妊娠期并发症，随着环境和生活方式的变化，其发病率逐渐升高。目前研究认为，染色体、内分泌及免疫系统等因素都可以引起 RSA，但仍有大部分患者发病原因尚不清楚[4]。研究表明，胎盘生长发育进程中内皮细胞增殖、血管增生异常和胎儿血液供应的减少是导致胚胎发育停止及流产的重要原因[5]。VEGF 能够促进内皮细胞的分化与增殖，对血管的生成有重要作用[6-7]，同时对子宫内膜的血管生长状态有一定的调节作用，可以将 VEGF 的调节作用运用在胚胎植入的过程中，其表达的正常与否与流产的发生密切相关[8-10]。

胎盘中 VEGF 和 VEGFR 的表达存在于整个孕期过程中，且伴随着妊娠进行逐渐增强，表明在胎盘血管的生长发育和功能维持上两者均发挥重要作用[11]。Zammiti 等[12]实验发现，在小鼠胚胎受精卵的发育过程中若去除 VEGF 基因，则检测不到小鼠的胚胎血管，从而导致胚胎的发育停止和死亡，亦可表明在妊娠过程中，VEGF 的表达极其重要。VEGF 发挥促进新生血管的生成作用时，必须通过 VEGFR-2 受体的介导，将信号传递至下游的 RAS、MAPK 调节因子，发挥促进血管生成的作用，而 sVEGFR-1 为 VEGF 的可溶性受体，在胎盘的 VEGF 系统中起着一直调控的作用，能抑制并完全阻止其活性。因此，本研究选取 VEGFR-2 及 sVEGFR-1 两个 VEGF 受体指标，从正反两方面验证滋肾育胎丸治疗 RSA 的机制[13]。

RSA 在中医学的疾病范畴中归属“滑胎”、

“数堕胎”[14]，其中医病名最早见于隋代巢元方的《诸病源候论·妊娠数堕胎候》，云“血气虚损者，子脏为风冷所居，则血气不足……喜堕胎也，”提出了气血、肾气与胞胎的联系。滋肾育胎丸源自国内中医妇科著名专家罗元恺教授的“补肾固冲丸”，此方由菟丝子、人参、续断、桑寄生、巴戟天、鹿角霜、阿胶、党参、白术、砂仁、熟地黄、首乌、艾叶、枸杞子、杜仲共 15 味中药组成，主要有补肾健脾、益气培元、养血安胎之功效，用于脾肾两虚、冲任不固所致的滑胎，在临床上应用广泛[15-16]。

本实验采用滋肾育胎丸治疗 RSA 小鼠，检测了药物干预前后的胚胎丢失率、蜕膜组织的 HE 染色变化和蜕膜组织细胞中 VEGF、VEGFR-2、sVEGFR-1、RAS 及 MAPK 的表达。结果发现，RSA 小鼠的胚胎丢失率相比正常小鼠明显提高，滋肾育胎丸能够显著降低 RSA 小鼠的胚胎丢失率，对胚胎发育及生长有明显的治疗作用；RSA 小鼠的蜕膜组织相比正常小鼠有着显著的病理变化，其蜕膜组织的血管形态学呈现异常的病理状态，而滋肾育胎丸能够显著改善其蜕膜组织血管形态学的病变，促进了血管的新生与重构，起到保护蜕膜组织治疗 RSA 的疗效。由此说明，滋肾育胎丸治疗 RSA 的机制与提高 VEGF/RAS/MAPK 通路的表达密切相关，能够提高 RSA 小鼠体内 VEGF、VEGFR-2 的水平，使促进血管生成的信号传递给 RAS 及 MAPK，作用于蜕膜组织的血管生成，从而达到治疗 RSA 的作用，这可能是滋肾育胎丸治疗 RSA 的初步机制，具体机制还需要进一步研究证实。

参考文献：

[1] 谢 幸，苟文丽. 妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2013：49.

[2] 许春艳，孙 晶. 泰山磐石散对复发性流产小鼠母胎界面 Th1/Th2 细胞因子及妊娠预后的影响[J]. 国际妇产科学杂志，2016，43(2)：214-216.

[3] 李本英，赵翠红，魏剑红，等. 不明原因复发性流产患者绒毛组织中 miR-210 表达及其与血管新生因子的关系[J]. 现代妇产科进展，2017，26(5)：353-356.

[4] 罗振宇，柴冬宁，李 萍，等. 复发性流产病因分析及免疫治疗[J]. 中国妇幼保健，2016，31(4)：782-784.

[5] Coulam C B，Jeyendran R S. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss[J]. *Am J Reprod Immunol*，2008，59(4)：301-305.

[6] 曹晓梅，李伟莉. 补肾安胎冲剂对复发性流产小鼠蜕膜组织 VEGF 及 VEGFR2 蛋白表达的影响[J]. 上海中医药大学学报，2016，30(1)：65-68.

[7] 赖火娣，赖丽辉. 血管内皮生长因子及可溶性受体与孕期复发性流产的相关性研究[J]. 临床医学，2016，36(7)：95-96.

[8] Zhu Y，Lu H，Huo Z，*et al*. MicroRNA-16 inhibits feto-maternal angiogenesis and causes recurrent spontaneous abortion by targeting vascular endothelial growth factor[J]. *Sci Rep*，2016，6：35536.

[9] Amirchaghmaghi E，Rezaei A，Moini A，*et al*. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Cell J*，2015，16(4)：538-545.

[10] Pereza N，Ostoji ć S，Smir či ć A，*et al*. The -2549 insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the *VEGFA* gene in couples with idiopathic recurrent spontaneous abortion[J]. *J Assist Reprod Genet*，2015，32(12)：1789-1794.

[11] Sun J K. Intravitreal anti-VEGF therapy with prompt or deferred laser compared with steroid with prompt laser and prompt laser alone for treatment of diabetic macular edema[J]. *Curr Diab Rep*，2011，11(4)：227-229.

[12] Zammiti W，Mtiraoui N，Kallel C，*et al*. A case-control study on the association of idiopathic recurrent pregnancy loss with autoantibodies anaginst beta-glycoportein I and annexin V[J]. *Reproduction*，2006，131(4)：817-822.

[13] 熊程俏，李伟莉. 反复自然流产小鼠蜕膜 VEGF、VEGFR2 的表达及中药干预研究[J]. 中医药临床杂志，2013，24(2)：625-626.

[14] 方 家. 滋肾育胎丸对先兆流产止血安胎作用的机理研究[D]. 广州：广州中医药大学，2014.

[15] 郑泳霞，赵 颖，罗颂平. 滋肾育胎丸治疗肾虚型月经过少的疗效观察[J]. 中药材，2015，38(1)：203-205.

[16] 闫晓彤，齐 聪. 滋肾育胎丸临床应用及作用机制研究进展[J]. 上海中医药杂志，2016，50(8)：98-100.