

- methylation levels of targeted genes and albuminuria in patients with early diabetic kidney disease [J]. *Renal Failure*, 2017, 39(1): 597-601.
- [17] Sha J, Sui B, Su X, et al. Alteration of oxidative stress and inflammatory cytokines induces apoptosis in diabetic nephropathy [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7715-7723.
- [18] Civantos E, Bosch E, Ramirez E, et al. Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2017, 10(6): 207-222.
- [19] Bao L, Li J, Zha D, et al. Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 54(1): 245-253.
- [20] Al-Waili N, Al-Waili H, Al-Waili T, et al. Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials [J]. *Redox Rep*, 2017, 22(3): 99-118.
- [21] Cui W, Min X, Xu X, et al. Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 3797802.
- [22] Sun W, Liu X, Zhang H, et al. Epigallocatechin gallate upregulates NRF2 to prevent diabetic nephropathy via disabling KEAP1 [J]. *Free Radical Bio Med*, 2017, 108(7): 840-857.
- [23] Cai H, Liu F, Zuo P, et al. Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes [J]. *Med Chem*, 2015, 11(4): 383-390.
- [24] Sun Q, Meng Q, Jiang Y, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 against intestinal ischemia-reperfusion induced acute renal injury in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80859.
- [25] Mittal R, Kumar A, Singh D P, et al. Ameliorative potential of rutin in combination with nimesulide in STZ model of diabetic neuropathy: targeting Nrf2/HO-1/NF- $\kappa$ B and COX signalling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 26(3): 755-768.
- [26] 余丹. 二甲双胍对糖尿病肾病的保护作用及其抗氧化应激机制 [J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(4): 862-867.

## 丹参酮IIA对反复流产小鼠模型蜕膜组织、胎盘膜联蛋白A5表达的影响

段志颖<sup>1</sup>, 童星丽<sup>2</sup>, 黄紫微<sup>1</sup>, 谈勇<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏南京 210029; 2. 南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

**摘要:** 目的 探讨丹参酮IIA对反复流产小鼠模型子宫蜕膜组织、胎盘膜联蛋白A5 (AnxA5) 的影响。方法 DBA/2与CBA/J交配为RSA小鼠, 随机分为模型组, 低、中、高剂量组(丹参酮IIA), 西药组(阿司匹林), 中西药结合组(丹参酮低剂量+阿司匹林), 每组8只; BALB/c与CBA/J交配为正常妊娠小鼠, 作为正常组, 共10只。正常组、模型组小鼠给予同体积含0.4%二甲亚砷、1%羧甲基纤维素的蒸馏水灌胃, 其余组给予同体积对应药物灌胃, 14d后取材, 统计小鼠胚胎丢失率, ELISA检测血清雌二醇(E2)、凝血酶原(PT)、孕酮(P)水平, Western blot、免疫组织化学(IHC)检测膜联蛋白A5 (AnxA5)表达。结果 与正常组比较, 模型组胚胎丢失率升高 ( $P < 0.01$ ), 蜕膜组织、胎盘组织中AnxA5表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 治疗组胚胎丢失率降低 ( $P < 0.05$ ), 蜕膜组织、胎盘组织中AnxA5表达升高 ( $P < 0.05$ )。结论 丹参酮IIA能上调反复流产小鼠子宫蜕膜、胎盘组织中AnxA5表达, 改善子宫、胎盘血供情况, 降低胚胎丢失率。

**关键词:** 丹参酮IIA; 反复流产; 蜕膜组织; 胎盘; 膜联蛋白A5

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)11-3182-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.048

收稿日期: 2020-05-20

基金项目: 江苏省创新课题科研计划 (KYCX19\_1206); 江苏省中医院院级课题 (K2018y69)

作者简介: 段志颖 (1992—), 女, 硕士生, 从事不孕症等相关研究。E-mail: duanzhiyingnjucm@163.com

\*通信作者: 谈勇 (1956—), 女, 教授, 主任中医师, 从事不孕症、辅助生殖技术等相关研究。E-mail: xijun1025@163.com

反复流产即复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指同一性伴侣情况下连续发生3次或3次以上的自然流产, 但大多数专家认为因连续发生2次流产的患者再次发生流产的风险与3次者相近, 也应重视并予以评估<sup>[1]</sup>。RSA相当于祖国医学的“堕胎”、“滑胎”, 其病因复杂多样且缺乏特异性临床表现, 是妇科临床常见的不良妊娠现象, 也属于临床治疗的疑难病之一。

妊娠期间, 胎盘的血液供应影响着胎儿的正常生长发育。妊娠期高凝状态会改变子宫胎盘部位血流状态, 使之血液供应下降, 致使胚胎或胎儿缺血缺氧, 最终导致胚胎或胎儿的发育不良而流产<sup>[2-3]</sup>。Motha等<sup>[4]</sup>提出反复妊娠丢失与血栓性疾病或凝血功能紊乱有关。也有研究表明, 临床上采取常规保胎方案联合活血化瘀可以提高其临床疗效<sup>[5-6]</sup>。膜联蛋白V即Annexin V (胎盘抗凝蛋白I或血管抗凝剂, Annexin A5/AnxA5) 存在胎盘和血管内皮等组织中, 它具有强大的抗凝血性能, 这是由于它对阴离子磷脂具有很高的亲和力, 并有能力从磷脂中取代凝血因子<sup>[7-8]</sup>。AnxA5表达也与子痫前期和胎儿生长受限相关, 其中AnxA5主要是能够与这些促凝表面的结合而维持血流, 并通过维持胎盘的血液来提高胎儿的存活能力<sup>[9]</sup>。Ueki等<sup>[10]</sup>提出母亲AnxA5在怀孕期间充当抗血栓形成剂, 并指出母体的AnxA5缺失时会丢失胎儿。本文旨在探讨AnxA5与RSA的相关性和丹参酮IIA对RSA小鼠的影响, 以期对相关研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

1.1 动物 雌性CBA/J小鼠55只、雄性DBA/2小鼠15只、雄性BALB/c小鼠5只, 均为6~8周龄, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(沪)2018-0006, 动物合格证号分别为20130016009951、20180006001844, 自由饮水摄食, 饲养在南京中医药大实验动物中心, 温度(22±2)℃, 相对湿度50%~70%, 昼夜各12h。

1.2 试剂和仪器 丹参酮IIA对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司, 纯度99.13%, 批号568-72-9)。阿司匹林(江苏省中医院, 批号HI3023635); 戊巴比妥钠(美国Sigma公司, 批号U48297)。二甲基亚砜(德国BioFROXX公司, 批号67.68.5); 羟甲基纤维素钠(上海麦克林生化科技有限公司, 批号9085-26-1); 多聚甲醛(成都中科唯实仪器有限责任公司, 批号Q/C5411196-9); 凝血酶原(progesterone, PT)、雌激素(estradiol, E2)、孕激素(prothrombin, P)酶联免疫分析试剂盒(北京安迪华泰科技有限公司, 规格96T, 批号分别为AD3424Mo、AD3212Mo、AD1795Mo); 兔抗AnxA5抗体(美国Signalway Antibody公司, 批号31009); 抗β-actin抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号bs-0061R); 辣根过氧化物酶(horseradish Peroxidase, HRP)标记的二抗(美国Cell Signaling Technology公司, 批号7074P2); Western blot试剂(上海碧云天生物技术有限公司, 批号P0012A); JB-

P5石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司), RM2016病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

1.3 模型建立 参照文献[11], 采用CBA/J雌鼠与DBA/2雄鼠交配组合, 作为RSA模型, 操作方法是采取动情前期或动情期的CBA/J, 分别与DBA/2、BALB/c合笼交配, 检出阴栓者或阴道涂片见精子者为妊娠。

1.4 分组及给药 小鼠适应性喂养1周, 其间进行阴道脱落细胞涂片, 确认雌性小鼠周期变化规律, 选取动情前期及动情期的雌性CBA/J, 分别与雄性DBA/2、BALB/c合笼交配, 建立RSA模型50只、正常妊娠模型10只, 检出阴栓者及阴道涂片见精子者为妊娠第0.5天<sup>[12]</sup>, 开始用药。

其中, CBA/J×BALB/c孕鼠作为正常组( $n=10$ ), CBA/J×DBA/2孕鼠RSA模型( $n=50$ )按妊娠顺序随机分为模型组、西药组(阿司匹林)、中西药结合组(丹参酮IIA低剂量+阿司匹林)及低剂量组、中剂量组、高剂量组(丹参酮IIA)。阿司匹林剂量根据成人70kg临床用药剂量75mg/d, 按动物体表面积换算; 丹参酮IIA参考文献[13], 低、中、高剂量组给药剂量分别为12.5、25、50mg/kg。因丹参酮IIA不易溶解, 故用含0.4%二甲亚砜、1%羟甲基纤维素钠的蒸馏水配制, 并置于超声仪中助溶, 而正常组、模型组给予相同体积分含0.4%二甲亚砜、1%羟甲基纤维素钠的蒸馏水, 灌胃量均为0.01mL/g, 自妊娠第0.5天开始灌胃, 每天1次, 连续14d<sup>[12]</sup>。

1.5 标本制备 末次灌胃后小鼠禁食24h后, 给予1.5%戊巴比妥钠麻醉, 眼眶采血, 在室温下静置30min后离心, 收集上清, 颈椎脱臼处死, 剖腹分离妊娠子宫, 从子宫角处钝性剖开子宫壁, 将胚胎从着床部位剥离, 眼科剪分离着床部位的蜕膜组织, 预冷的PBS缓冲液或生理盐水充分冲洗, 滤纸吸净, 迅速置于液氮罐或4%多聚甲醛中固定保存。

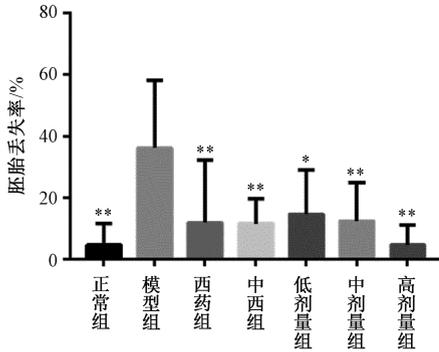
1.6 免疫组化 4%多聚甲醛固定小鼠子宫蜕膜、胎盘组织, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 进行抗原修复, 给予一抗AnxA5(1:200)、二抗(HRP标记)覆盖, 玻片洗涤后滴加显色液, 控制显色时间, 显色后冲洗, Harris苏木素复染后再冲洗, 脱水晾干, 封片, 在显微镜下进行图像采集, 每组选取6张切片, 每张随机观察3个视野, 采用Image-Pro Plus软件分析。

1.7 Western blot检测 提取冻存的小鼠子宫蜕膜组织、胎盘标本, 蛋白定量变性后, 10%SDS-PAGE凝胶电泳1.2h, 半干转30min, 在室温下封闭1h, 4℃下孵育一抗(β-actin 1:1000、Anxa5 1:1000)过夜, 洗膜, 室温孵育二抗(1:2000)1h, 曝光, 采用Image J软件测定目的条带OD值, 以β-actin为内参, 目的条带OD值/β-actin OD值为目的蛋白表达量。

1.8 统计学分析 通过GraphPad Prism 7、SPSS 25软件进行处理, 数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胚胎丢失率 参考文献 [12-14] 计算丢失率, 结果如图1所示, 可知正常组胚胎丢失率较低, 在10%以下, 而模型组接近40%, 高于正常组 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 给药组胚胎丢失率降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 以高剂量组最明显。



注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠胚胎丢失率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

2.2 小鼠血清指标 由表1可见, 正常组、模型组小鼠血

清PT、E2、P水平比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 给药组小鼠血清PT水平降低 ( $P < 0.05$ )。

表1 各组小鼠血清PT、E2、P水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	PT	E2	P
正常组	21.64±0.82*	61.67±1.46*	1626.4±41.4*
模型组	28.78±1.45	48.10±4.46	1382.1±32.7
西药组	23.60±0.61*	51.65±1.39	1431.8±40.9
中西药结合组	22.11±0.87*	53.30±2.83	1451.8±62.2
低剂量组	24.10±1.04*	48.18±2.27	1410.8±44.1
中剂量组	23.28±2.06*	50.06±2.98	1440.2±49.2
高剂量组	22.73±0.89*	52.86±5.06	1458.8±48.4

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ 。

2.3 小鼠子宫蜕膜组织、胎盘AnxA5表达 如图2、表2所示, 与正常组比较, 模型组小鼠AnxA5表达降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 给药组AnxA5表达有不同程度的提高 ( $P > 0.05$ )。如表3、图3所示, 与模型组比较, 给药组(除低剂量组外)小鼠子宫蜕膜组织AnxA5表达升高 ( $P < 0.05$ ), 中西药结合组、高剂量组小鼠胎盘组织其表达升高 ( $P < 0.05$ )。

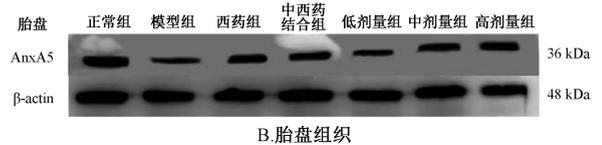
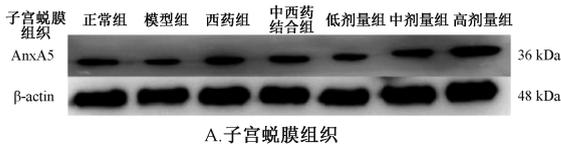


图2 各组小鼠子宫蜕膜组织、胎盘AnxA5表达(I)

表2 各组小鼠子宫蜕膜组织、胎盘AnxA5表达的OD值(I,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	子宫蜕膜组织	胎盘组织
正常组	0.986±0.365*	0.986±0.365*
模型组	0.446±0.086	0.446±0.086
西药组	0.751±0.285	0.751±0.285
中西药结合组	0.822±0.323	0.822±0.323
低剂量组	0.630±0.240	0.630±0.240
中剂量组	0.739±0.249	0.739±0.249
高剂量组	0.849±0.379	0.849±0.379

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ 。

表3 各组小鼠子宫蜕膜组织、胎盘Anxa5表达的OD值(II,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	子宫蜕膜组织	胎盘组织
正常组	0.0185±0.0020*	0.0229±0.0016*
模型组	0.0070±0.0009	0.0082±0.0030
西药组	0.0150±0.0026*	0.0136±0.0057
中西药结合组	0.0156±0.0019*	0.0208±0.0020*
低剂量组	0.0115±0.0069	0.0136±0.0039
中剂量组	0.0162±0.0043*	0.0104±0.0019
高剂量组	0.0180±0.0029*	0.0182±0.0008*

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

丹参素有“功同四物”之称, 具有活血祛瘀等功效, 宋代陈自明的《妇人大全良方》中曾指出其能破宿血, 生

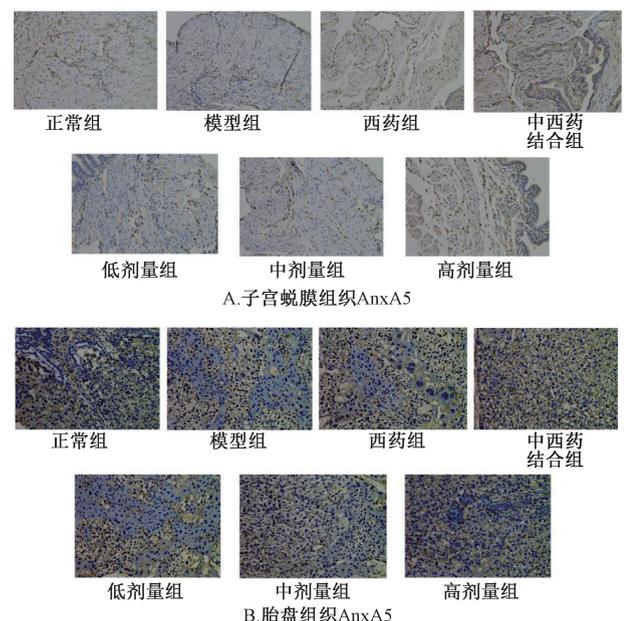


图3 各组小鼠子宫蜕膜组织、胎盘AnxA5表达(II) (×200)

新血, 安生胎, 治疗产前胎动不安。丹参具有促进纤溶、降低血小板粘附及聚集等功能<sup>[15-16]</sup>。随着对丹参药理作用的不断研究, 丹参提取物丹参酮IIA的作用也有了深层次的发现, 研究表明丹参酮IIA改善血液循环抗凝、抗血小板聚集、改善血液流变学特性及改善微循环等多种药理

作用<sup>[17-21]</sup>。

膜联蛋白 A5 是属于参与细胞转运的一种蛋白质家族, 主要为各组织提供营养, 且具有抗血栓形成、抗凋亡和抗炎的特性<sup>[8, 22]</sup>。AnxA5 在妊娠时期胎盘滋养细胞和血管内皮细胞表达丰富, 可与胎盘绒毛细胞膜表面的磷脂相结合, 形成一道保护屏障使凝血因子复合物合成受阻, 从而起到抗凝效果而维持正常妊娠<sup>[23-24]</sup>。当这种屏障被破坏或 AnxA5 表达减少, 就可能会发生流产。反复流产与胎盘和子宫蜕膜上的 AnxA5 表达有关, 表达较低或其抗凝血或结合活性受阻, 均可导致自然妊娠丢失<sup>[25]</sup>。此外, AnxA5 高表达可维持血液流动性, 可能在预防血小板活化异常中起作用, 子宫或胎盘 AnxA5 表达可以预防血栓形成, 从而维持整个妊娠时期<sup>[25-26]</sup>。

本实验结果表明, 与正常组比较, 模型组胚胎丢失率及血清 PT 水平上升, 但各个干预组胚胎丢失率及 PT 水平均有不同程度的改善; 模型组小鼠子宫蜕膜、胎盘组织 AnxA5 较低, 而各个干预组小鼠子宫蜕膜、胎盘组织 AnxA5 均有不同程度的提升。可见丹参酮 II A 可能通过提高子宫蜕膜组织或胎盘组织中 AnxA5 表达从而维护其所形成的保护性屏障, 起到抗凝维持妊娠的作用。母体妊娠子宫、胎盘 AnxA5 的存在, 使胎盘血栓形成的风险和胎儿丢失风险降低, 从而改善妊娠结局。同时丹参酮 II A 还可以通过降低妊娠小鼠血清凝血酶原的水平, 从而抑制血小板聚集, 改善血凝状态, 改善小鼠妊娠结局。

综上所述, 丹参酮 II A 可能通过降低血清凝血酶原, 增加子宫、胎盘 AnxA5 表达, 改善孕鼠高凝状态, 从而降低胚胎丢失率。但其更多潜在的药理作用及作用机制有待进一步研究, 可从细胞生物学等角度更深入的研究来解释丹参酮 II A 在反复流产的应用原理。

#### 参考文献:

[1] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

[2] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(1): 3-9.

[3] Huchon C, Deffieux X, Beucher G, et al. Pregnancy loss: french clinical practice guidelines [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016, 201: 18-26.

[4] Motha M B C, Paliwadana T S, Perry D J. Recurrent pregnancy loss and thrombophilia[J]. *Ceylon Med J*, 2014, 59(1): 1-3.

[5] 舒宏广, 付志红, 吴飞华. 活血化瘀法治疗先兆流产文献的 Meta 分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(1): 85-87.

[6] 骆春. 化瘀止血、补肾健脾法治疗胎漏和胎动不安体会[J]. 中医杂志, 2017, 58(2): 164-166.

[7] Kennedy J R. Attenuating a sickle cell crisis with annexin V[J]. *Med Hypotheses*, 2015, 84(5): 434-436.

[8] Zhang X, Huo L, Jin H, et al. Anti-cancer activity of annexin V in murine melanoma model by suppressing tumor angiogenesis

[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 42602-42612.

[9] Sifakis S, Soufla G, Koukoura O, et al. Decreased annexin A5 mRNA placental expression in pregnancies complicated by fetal growth restriction[J]. *Thromb Res*, 2010, 125(4): 326-331.

[10] Ueki H, Mizushima T, Laoharatchathathanin T, et al. Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of placental platelet thrombosis and foetal loss[J]. *Sci Rep*, 2012, 2(1): 9-24.

[11] Chung Y, Kim H, Im E, et al. Th 17 cells and nesfatin-1 are associated with spontaneous abortion in the CBA/j × DBA/2 mouse model[J]. *Dev Reprod*, 2015, 19(4): 243-252.

[12] 罗英姣. 寿胎丸对 RSA 模型小鼠子宫蜕膜组织 vimentin 及  $\beta$ -actin 表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.

[13] Ueng Y, Kuo Y, Wang S, et al. Induction of CYP1A by a diterpene quinone tanshinone II A isolated from a medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* in C57BL/6J but not in DBA/2J mice [J]. *Life Sci*, 2004, 74(7): 885-896.

[14] 赵爱民, 林其德, 鲍世民, 等. 自然流产小鼠模型的胚胎丢失率[J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(4): 220-221.

[15] 冯彦. 丹参的现代药理研究及临床应用[J]. 中医临床研究, 2017, 9(30): 46-47.

[16] 马莹慧, 王艺璇, 刘雪, 等. 丹参药理活性研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2019, 40(6): 440-442.

[17] Dong K, Xu W, Yang J, et al. Neuroprotective effects of tanshinone II A on permanent focal cerebral ischemia in mice [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(5): 608-613.

[18] Gao S, Liu Z, Li H, et al. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II A [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(1): 3-10.

[19] Liu J, Lee T, Miedzyblocki M, et al. Effects of tanshinone II A a major component of *Salvia miltiorrhiza*, on platelet aggregation in healthy newborn piglets [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 44-49.

[20] Maione F, Cantone V, Chini M G, et al. Molecular mechanism of tanshinone II A and cryptotanshinone in platelet anti-aggregating effects: an integrated study of pharmacology and computational analysis[J]. *Fitoterapia*, 2015, 100: 174-178.

[21] Maione F, De Feo V, Caiazzo E, et al. Tanshinone II A, a major component of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, inhibits platelet activation via ERK-2 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1236-1242.

[22] Ewing M M, de Vries M R, Nordzell M, et al. Annexin A5 therapy attenuates vascular inflammation and remodeling and improves endothelial function in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 95-101.

[23] Kuypers F A, Larkin S K, Emeis J J, et al. Interaction of an annexin V homodimer (Diannexin) with phosphatidylserine on cell surfaces and consequent antithrombotic activity[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3): 478-486.

[24] 方小桂, 时雪飞, 童芳芳. 膜联蛋白 A5 水平检测在妊娠中期胎儿宫内生长受限诊断中的应用研究[J]. 中国当代医药, 2014, 21(33): 31-32; 35.

[25] Ormaghi S, Vergani P, Urban G, et al. Immunohistochemical

expression of annexin A5 in preeclamptic placentas [J].  
*Placenta*, 2010, 32(3): 264-268.

A5 and annexin A2 levels as biomarkers for pre-eclampsia: a  
pilot study[J]. *Pregnancy Hypertens*, 2017, 8: 65-69.

[26] Abd E M, Azzam H, Othman M, et al. Assessment of annexin

## 葛根汤通过下调 THRB 表达逆转 COC1/DDP 细胞顺铂耐药

赵丽杰, 杨传军, 陈蓓蓓, 马庆良\*

(上海中医药大学附属曙光医院妇产科, 上海 201210)

**摘要:** 目的 研究葛根汤对 THRB 表达的影响, 探究该方逆转人卵巢癌细胞株 COC1/DDP 顺铂耐药的机制。方法 采用血清药理学方法制备含药血清, MTT 比色法筛选剂量。不同浓度顺铂联合含药血清处理 COC1、COC1/DDP 细胞后, 计算 IC<sub>50</sub>、耐药指数, 将 COC1/DDP 细胞随机分为对照组、DDP 组及葛根汤低、中、高剂量组, 对应药物干预 48 h 后, 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测 *THRB* mRNA 转录水平, Western blot 检测 THRB、MRD-1、P-gp 蛋白表达。结果 适宜剂量为 10% 低剂量含药血清作用 48 h。低剂量葛根汤含药血清联合作用能逆转 COC1/DDP 细胞肿瘤耐药, 降低 COC1/DDP 细胞对顺铂的耐药指数。在 COC1 细胞株中, *THRB* mRNA 为低水平转录表达; 在耐药 COC1/DDP 细胞中, *THRB* mRNA 均为高水平转录。葛根汤干预后, COC1/DDP 细胞内高水平转录的 *THRB* mRNA 转录下调, THRB 蛋白表达降低, 葛根汤低、中、高剂量组 THRB mRNA 及蛋白表达与 DDP 组比较均降低 ( $P < 0.05$ )。葛根汤作用于卵巢癌 COC1/DDP 细胞 48 h 后, MRD-1、P-gp 耐药相关蛋白表达降低, 并呈一定的剂量依赖性, 葛根汤剂量越高, 肿瘤细胞的耐药相关蛋白表达降低程度越明显 ( $P < 0.05$ )。结论 葛根汤能有效增加人卵巢癌细胞株 COC1/DDP 对顺铂的敏感性, 其机制可能与降低 THRB 基因转录和蛋白表达有关。

**关键词:** 葛根汤; 人卵巢癌细胞株 COC1/DDP; THRB; 顺铂; 耐药

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)11-3186-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.049

卵巢癌是妇科常见肿瘤, 死亡率为妇科恶性肿瘤第一位<sup>[1]</sup>。目前, 以铂类为基础的联合化疗是卵巢癌治疗的主要手段, 但较多卵巢癌患者会出现顺铂 (DDP) 耐药, 导致患者 5 年生存率低、预后不良<sup>[2]</sup>。因此, 寻找新型抗肿瘤药物以提高治疗卵巢癌的疗效至关重要。葛根汤出自《伤寒论》, 由葛根、麻黄、桂枝、生姜、甘草、芍药、大枣组成, 具有发汗解毒、升津舒筋的功效, 可以减轻化疗毒副作用、调节机体免疫。方中葛根有效成分葛根素是一种生物类黄酮化合物, 已有研究证实葛根素能够促进癌细胞凋亡、抑制癌细胞增殖和周期进展、发挥较好的抗肿瘤作用, 其在胃癌细胞中改善 DDP 耐药的作用已经得到证实<sup>[3]</sup>。卵巢癌 DDP 耐药的机制十分复杂, 随着分子生物学研究的不断深入, 越来越多的研究者开始从基因水平去探讨疾病的发生进展以及潜在的诊疗措施<sup>[4]</sup>。激素是机体组织生物功能重要的调节物质, 随着研究的深入, 研究者发现激素在肿瘤细胞的分裂、凋亡和迁移中扮演重要角色, 在多种恶性肿瘤细胞中激素及激素受体基因往往呈异常表达状态<sup>[5]</sup>。甲状腺激素 (TH) 及其受体 (TR) 可以影响

MAPK、PI3K 等通路起到抑制肿瘤细胞生长和转移的作用, 而甲状腺激素受体基因 (thyroid hormone receptor, *THRB*) 是一种激素受体相关基因, 与细胞的生长密切相关, 在细胞的增殖、分化、DNA 修复和周期转换中发挥重要的参与作用<sup>[6]</sup>。近年来研究报道显示, *THRB* 在卵巢癌耐药细胞中的呈异常高表达, 提示 *THRB* 的异常与卵巢癌的耐药密切相关<sup>[7]</sup>。目前关于葛根汤在卵巢癌中是否存在类似的生物作用及具体机制仍未明确。本研究以人上皮性卵巢癌耐药 COC1/DDP 细胞为模型探讨葛根汤对其增殖、凋亡的影响是否调控 *THRB* 基因的表达, 初步探讨 *THRB* 在其抗卵巢癌作用的可能机制。

### 1 材料与方 法

1.1 细胞 卵巢癌细胞株 COC1、顺铂耐药卵巢癌细胞株 COC1/DDP, 购自中国典型培养物保藏中心。

1.2 试剂、仪器与药物 葛根汤组方药材葛根 21 g、桂枝 9 g、芍药 9 g、生姜 9 g、甘草 6 g、大枣 12 枚、麻黄 9 g, 由上海曙光医院药剂科制剂中心 (中药制剂研究室) 一次性加工完成, 制成生药量 0.66 g/mL 的浓缩液, 在 4 °C 下

收稿日期: 2020-04-06

基金项目: 上海市嘉定区卫生和计划生育委员会科研课题计划 (2016-KY-11)

作者简介: 赵丽杰 (1974—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事妇产科研究。Tel: 13818784470, E-mail: erong86440@sina.com

\* 通信作者: 马庆良 (1959—), 男, 硕士, 教授, 主任医师, 从事妇产科研究。E-mail: 2906536100@qq.com