

补肾活血方对肾虚血瘀型复发性流产小鼠胚胎植入及子宫免疫微环境的影响

韩永梅, 卫爱武*

(河南中医药大学, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 观察补肾活血方辅助常规西药对肾虚血瘀型复发性流产小鼠胚胎植入及子宫免疫微环境的影响。**方法** 肾虚血瘀型复发性流产雌性 CBA/J 小鼠分为模型组(生理盐水)、西药组(3.6 g/kg 地屈孕酮)、高剂量组(200 g/kg 补肾活血汤)、低剂量组(100 g/kg 补肾活血汤)、联合组(200 g/kg 补肾活血汤+3.6 g/kg 地屈孕酮),另设正常组(生理盐水),孕 1~14 d 连续给药。比较各组胚胎丢失率、子宫组织病理学改变、免疫微环境改变及蜕膜组织肿瘤坏死因子受体 I 型(TNFR1)、Fas 相关死亡域蛋白(FADD)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-8(caspase8) mRNA 和蛋白表达。**结果** 与模型组比较,各给药组胚胎丢失率均降低,且联合组<西药组<高剂量组<低剂量组($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组子宫组织 γ 干扰素(IFN- γ)/白细胞介素-4(IL-4)、CD4⁺/CD8⁺均降低,且联合组<西药组和高剂量组<低剂量组($P<0.05$),西药组和高剂量组比较无差异($P>0.05$)。与模型组比较,各给药组蜕膜组织中 TNFR1、FADD、caspase8 mRNA 和蛋白表达均降低且联合组最低,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达升高且联合组最高($P<0.05$)。**结论** 补肾活血方辅助常规西药可有效改善肾虚血瘀型复发性流产小鼠子宫免疫微环境,促进胚胎植入,其机制可能与调节 TNFR1 信号通路有关。

关键词: 补肾活血方;复发性流产;肾虚血瘀型;胚胎植入;子宫免疫微环境

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0937-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.046

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续发生至少 2 次妊娠不足 20 周胎儿丢失的病理现象,属于育龄期女性常见病和疑难病^[1]。研究显示,胎盘植入的局部微环境异常改变是导致胎儿丢失的主要原因,胎盘植入过程与胚胎、子宫内膜等多因素相关,其中免疫微环境调节至关重要^[2]。中医学在治疗复发性流产方面具有独特优势,现代中医学通过聚类分析发现,肾虚血瘀是临床复发性流产患者最为常见的证型,认为肾虚冲任不固为本,瘀血阻滞胞宫为标^[3]。补肾活血方是根据复发性流产病机及辨证论治原则,该方由中医经典补肾安胎方药寿胎丸《医学衷中参西录》及养血活血安胎方药芎归汤《景岳全书·妇人规》配伍而成,具有补肾活血之功效^[4]。为观察补肾活血方对常规西药对肾虚血瘀型复发性流产的辅助效果,本研究通过建立肾虚血瘀型复发性流产小鼠模型,分析其对胚胎种植及子宫免疫微环境的影响及机制,为临床复发性流产的治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雌性 CBA/J 小鼠 72 只,雄性 DBA/2 小鼠 30 只, BALB/c 小鼠 6 只,均为 8 周龄,体质量 18~22 g,购自北京科宇动物养殖中心,动物生产许可证号

SCXK(京)2018-0010。

1.2 药物 菟丝子 12 g,川续断、桑寄生、阿胶、川芎各 6 g,当归 9 g,药材均购自上海市同仁堂药业股份有限公司。除阿胶外,其余药材加水浸泡 30 min,武火煎煮 30 min,取药液 200 mL 过滤,再次加水文火煎煮 30 min,取药液 200 mL 过滤;两次药液合并煎煮,阿胶烊化混入药液,制成含生药 1 g/mL 浓煎液,4 ℃ 保存备用。地屈孕酮片(荷兰 Abbott Biologicals B. V. 公司,国药准字 H20170221,规格 10 mg)。

1.3 试剂 小鼠 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号 C12592、C3021,美国 Cygnus 公司);大鼠抗小鼠 CD4⁺、CD8⁺单抗(批号 PAB16751、PAB16420,美国 AbD Serotec 公司);逆转录试剂盒(批号 RR047 A,日本 TaKaRa 公司);实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒(批号 WE0129-DBI,北京百奥莱博科技有限公司);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量分析试剂盒(批号 QPBCA-1KT,美国 Thermo 公司);大鼠抗小鼠肿瘤坏死因

收稿日期:2021-02-23

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2018ZY2064,2019JDZX080)

作者简介:韩永梅(1971—),女,硕士,副教授,从事生殖医学研究。E-mail: er211420@163.com

*通信作者:卫爱武(1965—),女,博士,教授,主任医师,从事生殖医学研究。Tel: 13733838297, E-mail: 15290826589@163.com

子受体1型 (tumor necrosis factor receptor type I, TNFR1)、Fas 相关死亡域蛋白 (Fas-related death domain protein, FADD)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B lymphocyte tumor-2 gene, Bcl-2)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-8 (containing aspartate proteolytic enzyme-8, caspase8) 一抗 (批号 ab231925、ab119059、ab218123、ab25901, 英国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记 IgG 二抗 (批号 23-72101, 武汉艾迪抗生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组和模型制备 72 只雌性 CBA/J 小鼠按照体质量随机分组法分为正常组、模型组、西药组、高剂量组、低剂量组和联合组, 每组 12 只。除正常组外, 其余各组制备肾虚血瘀型复发性流产小鼠模型^[5], 灌胃 0.2 mL 羧基豚, 同时皮下注射 12 μ L 肾上腺素, 连续 1 周; 正常组小鼠灌胃 0.2 mL 超纯水, 皮下注射 12 μ L 生理盐水, 连续 1 周。1 周后正常组雌鼠与 BALB/C 雄鼠按 2:1 比例合笼饲养, 其余各组雌鼠与 DBA/2 雄鼠按 2:1 比例合笼饲养 1~2 d, 合笼次日清晨检出阴栓或阴道分泌物将其涂片见精子则记为孕 1 d。

2.2 给药方法 按照人与小鼠间的等效剂量换算^[6], 小鼠灌胃地屈孕酮临床等效剂量为 3.6 g/kg, 补肾活血汤剂量临床等效剂量为 100 g/kg。自孕 1 d 开始, 西药组灌胃 36 μ g/10 g 地屈孕酮片水溶剂, 高、低剂量组灌胃 200、100 g/kg 补肾活血汤, 联合组同时灌胃 200 g/kg 补肾活血汤和 3.6 g/kg 地屈孕酮片水溶剂, 正常组和模型组灌胃等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 14 d。

2.3 胚胎丢失率计算 孕 15 d 后处死各组小鼠, 剖腹取子宫组织, 统计丢失胚胎数和正常胚胎数, 正常胚胎呈大小均一的串珠状, 胚胎中间见红色条索状胎盘, 丢失胚胎呈黑色或紫褐色, 大小不均一, 部分胚胎萎缩。计算胚胎丢失率为丢失胚胎数占总胚胎数的比例。

2.4 组织取材 冰上纵向剖开子宫组织, 剥离胚胎后, 取部分子宫组织, 称定质量后剪碎, 按照 1:9 比例加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 立即匀浆, 4 $^{\circ}$ C 预冷离心机, 12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 10 cm), 取匀浆上清液, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。取部分子宫组织, 置于 40% 中性甲醛中固定 48 h 备用。剥离蜕膜组织, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.5 子宫组织病理学 取 40% 中性甲醛中固定的子宫组织, 常规石蜡包埋, 制作厚度为 4 μ m 的连续切片, 每只小鼠取 5 张切片, 切片经脱蜡, 酒精水化后进行常规苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 封片剂封片, 光学显微镜下观察并拍摄图片。

2.6 子宫组织中 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞检测 每只小鼠取 5 张切片, 脱蜡至水, 3% H₂O₂ 室温孵育 7 min, PBS 洗涤, 96 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 滴加山羊血清, 室温孵育 30 min, 滴加大鼠抗小鼠 CD4⁺、CD8⁺ 单抗 (PBS 代替一抗为阴性

对照), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 滴加生物素标记兔抗大鼠 IgG 单抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 25 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 滴加辣根或氧化物酶标记亲和素, 37 $^{\circ}$ C 孵育 25 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 流水终止。脱水、透明后中性树胶封片, 光学显微镜下观察并拍摄图片, 棕色或棕褐色染色为阳性细胞, 每张切片取 5 个随机视野, 计数 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞数, 取平均值。

2.7 子宫组织中 IFN- γ 、IL-4 水平检测 取子宫组织匀浆上清液, 采用 ELISA 法^[7] 检测 IFN- γ 、IL-4 水平, 按照试剂盒说明书操作, 检测 570 nm 波长处吸光度值, 根据吸光度-浓度标准曲线计算待测样本水平。

2.8 蜕膜组织中 TNFR1、FADD、Bcl-2、caspase8 mRNA 检测 取蜕膜组织, Trizol 法^[8] 提取总 RNA, 酶标仪检测 260 nm 和 280 nm 波长处吸光度 (absorbance, A) 值, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.6~1.8 之间为合格, 计算 RNA 纯度。将 RNA 逆转录获得互补链 cDNA, SYBR Green 荧光定量试剂盒进行 RT-qPCR, 25 μ L 反应体系为 SYBR Premix Ex Taq 13.5 μ L, 10 μ mol/L 正反向引物各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L; 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 90 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 重复 40 个循环; 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法^[9] 计算目的基因相对内参 β 肌动蛋白 (β -actin) 表达量, 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
TNFR1	正向 5'-TGCATGCTGATGCTGAC-3' 反向 5'-GCCCTGATGCTGACTCA-3'
FADD	正向 5'-ATGATGCTGGATCGAATCG-3' 反向 5'-GCTAGTGATGTCGTAGCTC-3'
Bcl-2	正向 5'-CTGATAGCTGTGACTGCCG-3' 反向 5'-GAATTGGCTGATGCTGTGTC-3'
caspase8	正向 5'-ACTGATGTGCTGATGCTG-3' 反向 5'-GCCTGATGCTGTAGCTAC-3'
β -actin	正向 5'-ACGTGATGCTGATGTGGTCG-3' 反向 5'-GCTGTAGCCTGATGCTGCTC-3'

2.9 蜕膜组织中 TNFR1、FADD、Bcl-2、caspase8 蛋白表达检测 取蜕膜组织, 于液氮中研磨后转至离心管, 加入 0.5 mL 细胞裂解液于冰上裂解 25 min, 沸水浴 10 min 变性, 12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 10 cm), 取上清进行 BCA 蛋白总量检测。取 40 μ g 蛋白与等量 Loading buffer 混匀, 进行 SDS-PAGE, 电压 80 V 至指示剂进入分离胶, 120 V 电泳至结束, 电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 封闭液室温封闭 2 h, Tris 盐酸吐温缓冲液 (Tris-HCl tween hydrochloride buffer, TBST) 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入一抗 TNFR1 (1:200), FADD (1:300), Bcl-2 (1:300), caspase8 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入相应的稀释二抗 (1:2 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入电化学

发光法显影、定影,凝胶成像系统扫描拍照,Image J 图像分析软件分析条带灰度值,目的蛋白与内参 β -actin 灰度值的比值表示蛋白相对表达量。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理,经正态性检验,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

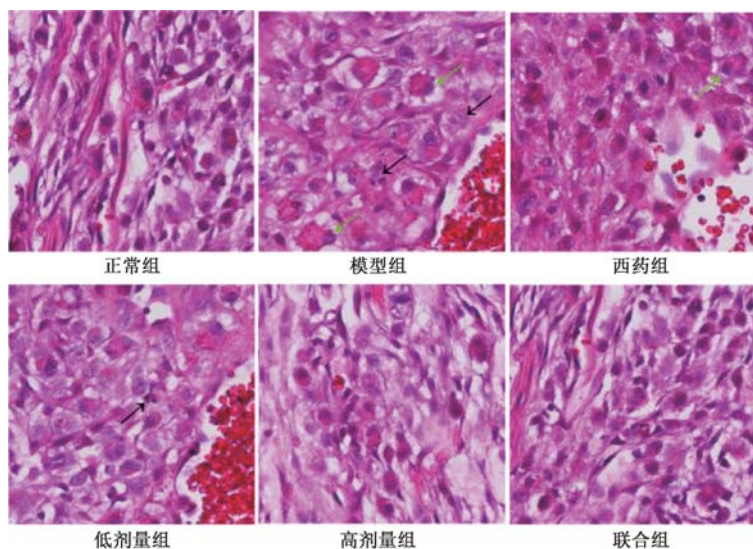
3.1 补肾活血方对小鼠胚胎丢失率的影响 正常组、西药组、高剂量组和联合组均造模成功(妊娠 10 只),模型组和低剂量组造模成功 9 只。如表 2 所示,与正常组比较,模型组小鼠胚胎丢失率升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组胚胎丢失率均降低($P < 0.05$),并且联合组<西药组<高剂量组<低剂量组。

表 2 各组胚胎丢失率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	胚胎丢失率
正常组	10	6.45 $\pm$ 2.63
模型组	9	38.06 $\pm$ 3.11 [#]
西药组	10	16.20 $\pm$ 3.04 [*]
高剂量组	10	19.36 $\pm$ 2.91 ^{* §}
低剂量组	9	24.84 $\pm$ 2.85 ^{* § △}
联合组	10	10.55 $\pm$ 2.87 ^{* § △ ▲}

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与西药组比较,[§] $P < 0.05$;与高剂量组比较,[△] $P < 0.05$;与低剂量组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

3.2 补肾活血方对小鼠子宫组织病理学改变的影响 如图 1 所示,正常组小鼠子宫组织细胞无明显异常,细胞核深染清晰;模型组小鼠子宫组织细胞核染色较浅,呈现边聚、碎裂情况;各给药组细胞核边聚和碎裂现象减少,结构清晰,其中联合组改善最为明显。



注:黑色箭头指示细胞核碎裂,绿色箭头指示细胞核边聚。

图 1 各组小鼠子宫组织病理学(HE, ×400)

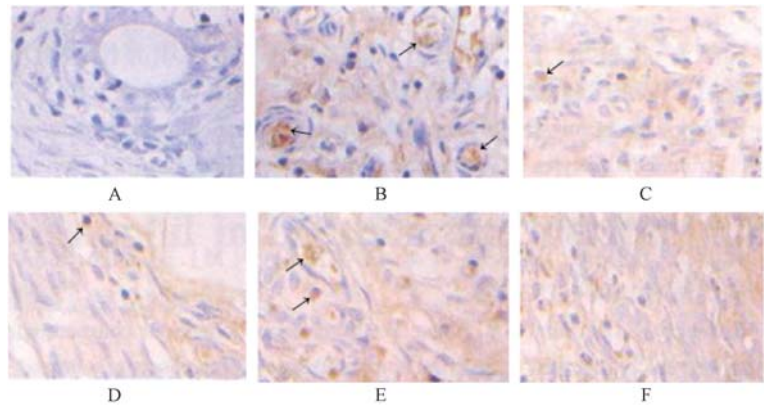
3.3 补肾活血方对小鼠子宫组织免疫微环境的影响 如表 3、图 2~3 所示,与正常组比较,模型组小鼠子宫组织 IFN- γ 、CD4⁺、IFN- γ /IL-4、CD4⁺/CD8⁺水平均升高($P < 0.05$),IL-4、CD8⁺水平均降低($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠子宫组织 IFN- γ 、CD4⁺、IFN- γ /IL-4、CD4⁺/CD8⁺水平均降低($P < 0.05$),并且联合组<西药组和高剂量组<

低剂量组;与模型组比较,各给药组小鼠子宫组织 IL-4、CD8⁺水平均升高($P < 0.05$),并且联合组>西药组和高剂量组>低剂量组;西药组和高剂量组比较,小鼠子宫组织 IFN- γ 、IL-4、CD4⁺、CD8⁺、IFN- γ /IL-4、CD4⁺/CD8⁺水平无明显变化($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠子宫组织中 IFN- γ /IL-4、CD4⁺/CD8⁺水平($\bar{x} \pm s$)

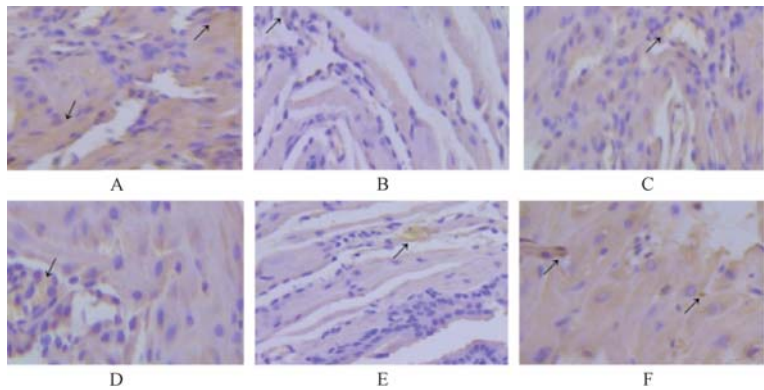
组别	动物数/只	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /IL-4	CD4 ⁺ /个	CD8 ⁺ /个	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常组	10	10.21 $\pm$ 2.37	28.26 $\pm$ 4.04	0.36 $\pm$ 0.05	4.95 $\pm$ 0.55	13.09 $\pm$ 0.95	0.38 $\pm$ 0.04
模型组	9	37.85 $\pm$ 3.59 [#]	9.67 $\pm$ 2.07 [#]	3.91 $\pm$ 0.08 [#]	28.36 $\pm$ 2.17 [#]	10.14 $\pm$ 1.12 [#]	2.80 $\pm$ 0.10 [#]
西药组	10	17.22 $\pm$ 2.82 [*]	28.50 $\pm$ 3.15 [*]	0.60 $\pm$ 0.06 [*]	9.71 $\pm$ 1.16 [*]	13.04 $\pm$ 1.10 [*]	0.74 $\pm$ 0.07 [*]
高剂量组	10	16.38 $\pm$ 2.70 [*]	27.95 $\pm$ 3.07 [*]	0.58 $\pm$ 0.06 [*]	9.30 $\pm$ 1.25 [*]	12.93 $\pm$ 1.21 [*]	0.72 $\pm$ 0.08 [*]
低剂量组	9	21.90 $\pm$ 3.05 ^{* § △}	18.24 $\pm$ 2.94 ^{* § △}	1.75 $\pm$ 0.07 ^{* § △}	14.23 $\pm$ 1.03 ^{* § △}	11.68 $\pm$ 1.04 ^{* § △}	1.22 $\pm$ 0.09 ^{* § △}
联合组	10	13.14 $\pm$ 2.64 ^{* § △ ▲}	34.52 $\pm$ 3.22 ^{* § △ ▲}	0.38 $\pm$ 0.04 ^{* § △ ▲}	5.22 $\pm$ 0.62 ^{* § △ ▲}	15.87 $\pm$ 1.27 ^{* § △ ▲}	0.33 $\pm$ 0.04 ^{* § △ ▲}

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与西药组比较,[§] $P < 0.05$;与高剂量组比较,[△] $P < 0.05$;与低剂量组比较,[▲] $P < 0.05$ 。



注：黑色箭头指示 CD4⁺T 淋巴细胞。

图 2 各组小鼠子宫组织 CD4⁺免疫组化染色图 (×400)



注：黑色箭头指示 CD8⁺T 淋巴细胞。

图 3 各组小鼠子宫组织 CD8⁺免疫组化染色图 (×400)

3.4 补肾活血方对小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*Bcl-2*、*caspase8* mRNA 表达的影响 如表 4 所示，与正常组比较，模型组小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*caspase8* mRNA 表达升高 ($P<0.05$)，*Bcl-2* mRNA 表达降低 ($P<0.05$)；与

模型组比较，各给药组小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*caspase8* mRNA 表达均降低 ($P<0.05$)，*Bcl-2* mRNA 表达升高 ($P<0.05$)，其中联合组 *TNFR1*、*FADD*、*caspase8* mRNA 表达最低，且 *Bcl-2* mRNA 表达最高。

表 4 各组小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*Bcl-2*、*caspase8* mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	<i>TNFR1</i>	<i>FADD</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>caspase8</i>
正常组	0.96±0.11	0.95±0.09	1.05±0.08	0.89±0.12
模型组	1.64±0.15 [#]	1.87±0.12 [#]	0.31±0.05 [#]	1.75±0.13 [#]
西药组	1.42±0.10 [*]	1.60±0.14 [*]	0.51±0.06 [*]	1.51±0.12 [*]
高剂量组	1.23±0.14 ^{*\$}	1.36±1.11 ^{*\$}	0.52±0.06 [*]	1.34±0.10 ^{*\$}
低剂量组	1.40±0.13 ^{*△}	1.59±0.13 ^{*△}	0.40±0.05 ^{*\$△}	1.50±0.12 ^{*△}
联合组	1.02±0.12 ^{*\$△▲}	1.10±0.10 ^{*\$△▲}	0.78±0.08 ^{*\$△▲}	1.18±0.10 ^{*\$△▲}

注：与正常组比较，[#] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ；与西药组比较，^{\$} $P<0.05$ ；与高剂量组比较，[△] $P<0.05$ ；与低剂量组比较，[▲] $P<0.05$ 。

3.5 补肾活血方对小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*Bcl-2*、*caspase8* 蛋白表达的影响 如图 4~5 所示，与正常组比较，模型组小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*caspase8* 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，*Bcl-2* 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*caspase8* 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)，*Bcl-2* 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，其中联合组小鼠蜕膜组织中 *TNFR1*、*FADD*、*caspase8* 蛋白表达最低，且 *Bcl-2* 蛋白表达最高 ($P<0.05$)。

4 讨论

复发性流产病因复杂，除遗传、解剖、内分泌等临床常见因素外，多数与免疫因素有关^[10-11]。母体免疫系统对胚胎抗原的保护性免疫耐受，是维持妊娠序贯正常进行的前提条件，子宫免疫微环境异常改变可导致胚胎植入异常，最终导致流产发生^[12]。临床常用地屈孕酮、黄体酮等药物治疗，但疗效仍不理想^[13]。本研究结果显示，补肾活血方辅助常规西药可有效改善肾虚血瘀型复发性流产小鼠子宫免疫微环境，促进胚胎植入，其机制可能与调节 *TNFR1* 信

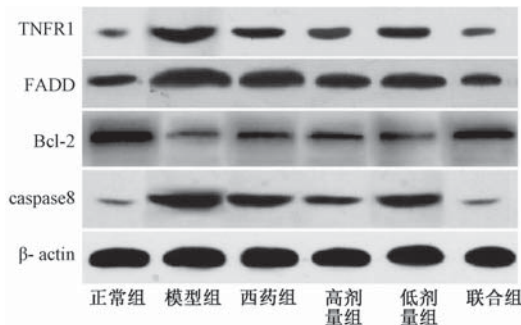
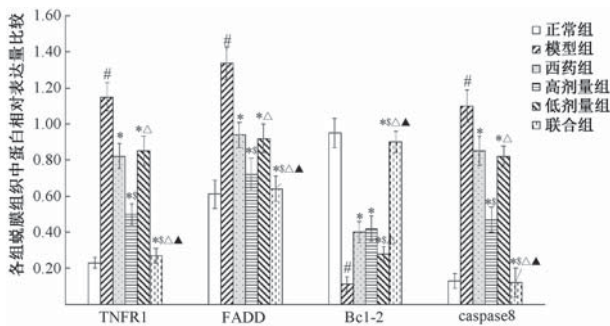


图4 各组小鼠蜕膜组织中TNFR1、FADD、Bcl-2、caspase8蛋白条带图



注：与正常组比较， $^{\#}P<0.05$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ ；与西药组比较， $^{\$}P<0.05$ ；与高剂量组比较， $^{\Delta}P<0.05$ ；与低剂量组比较， $^{\Delta}P<0.05$ 。

图5 各组小鼠蜕膜组织中TNFR1、FADD、Bcl-2、caspase8蛋白表达柱状图

号通路有关。

本研究发现，补肾活血方联合西药可有效降低胚胎丢失率、子宫组织IFN- γ /IL-4、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 水平，提示补肾活血方辅助常规西药可有效促进肾虚血瘀型复发性流产小鼠胚胎植入，增强母体对胚胎的免疫耐受程度。《诸病源候论》提出本病为气血两虚、冲任不固、胎失营养所致，其中肾虚血瘀是导致滑胎的关键因素，其后在多种中医著作中均有提出^[14-15]。补肾活血方以补肾安胎经典方寿胎丸为主，配伍“治一切胎气不安”之养血活血安胎方芎归汤为辅。补肾活血方中菟丝子补肾益精，固摄冲任，重用为君；桑寄生、续断补益肝肾，养血安胎为臣；阿胶补血为佐；当归养血活血，川芎理气行滞为使，诸药合用共奏补肾活血、益气安胎之功效。冯晓玲等^[16]临床应用补肾活血方治疗复发性流产发现，中医症状明显改善，为妊娠提供良好母体内环境。Th1细胞属于攻击性细胞，可分泌IFN- γ ，诱导免疫排斥发生，IL-4由Th2细胞分泌，主要诱导免疫耐受^[17]。CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ T淋巴细胞亚群同样是调节机体免疫耐受的细胞群之一，前者具有细胞毒性作用，后者具有负性调节作用^[18]。补肾活血方中多种中草药活性成分联合地屈孕酮能够更好的调节子宫免疫微环境，降低流产风险。此外，本研究发现，补肾活血方联合西药可下调蜕膜组织中TNFR1、FADD、caspase8 mRNA和蛋白表达，上调

Bcl-2表达。TNFR1主要表达于蜕膜组织，FADD表达于滋养层，临床研究显示^[19]，复发性流产患者TNFR1和FADD表达均异常升高，可导致血管内皮损伤，致使胚胎失养而流产。TNFR1与肿瘤坏死因子结合后，前者发生多聚化反应从而激活caspase8，启动凋亡信号通路^[20]。Bcl-2是TNFR1信号通路下游的抗凋亡因子，其表达量升高可修复受损线粒体从而抑制细胞凋亡^[21]。本研究中补肾活血方可辅助地屈孕酮抑制TNFR1信号通路激活，从而改善胚胎植入局部环境稳定，促进胚胎植入。

参考文献：

- [1] Kliman H J, Frankfurter D. Clinical approach to recurrent implantation failure: evidence-based evaluation of the endometrium[J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(4): 618-628.
- [2] Turocy J M, Rackow B W. Uterine factor in recurrent pregnancy loss[J]. *Semin Perinatol*, 2019, 43(2): 74-79.
- [3] 曹天澈, 陆启滨, 许家莹. 从肾虚血瘀论治免疫性复发性流产[J]. *长春中医药大学学报*, 2020, 36(1): 49-51.
- [4] 冯晓玲, 张俐佳, 张杨, 等. 补肾活血方对不明原因复发性流产患者外周血中IL-1 β 、IL23表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(8): 1808-1810.
- [5] 武颖, 张莹, 辛明蔚, 等. 养血安胎方对肾虚血瘀型复发性流产小鼠胚胎植入及蛋白表达的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(10): 4552-4556.
- [6] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [7] 解晓莉, 徐正中, 孟闯, 等. 梅花鹿 γ 干扰素双单抗夹心ELISA方法的初步建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(12): 989-992.
- [8] Trakunram K, Champoochana N, Chaniad P, et al. MicroRNA isolation by Trizol-based method and its stability in stored serum and cDNA derivatives[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(6): 1641-1647.
- [9] 宋国华, 高继萍, 王春芳, 等. 相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析Caspase-3和Caspase-9在氟诱导大鼠肾脏中的表达[J]. *毒理学杂志*, 2014, 28(4): 274-278.
- [10] Liu X Y, Fan Q, Wang J, et al. Higher chromosomal abnormality rate in blastocysts from young patients with idiopathic recurrent pregnancy loss[J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(4): 853-864.
- [11] Qian J F, Zhang N, Lin J, et al. Distinct pattern of Th17/Treg cells in pregnant women with a history of unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(2): 157-167.
- [12] Li Y, Yu S, Huang C, et al. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure[J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(1): 187-196.
- [13] Ismail A M, Abbas A M, Ali M K, et al. Peri-conceptional progesterone treatment in women with unexplained recurrent

- miscarriage; a randomized double-blind placebo-controlled trial [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(3): 388-394.
- [14] 吴 花, 郝乐乐, 李伟莉, 等. 基于古今医案云平台分析中医药治疗免疫性复发性流产用药规律[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(6): 52-55.
- [15] 韩春艳, 孙自学, 宋艳丽. 补肾安胎饮对肾虚型不明原因复发性流产患者的临床疗效[J]. 中成药, 2019, 41(12): 3067-3071.
- [16] 冯晓玲, 赵小莹, 王 磊, 等. 治未病思想指导下针刺结合补肾活血法治疗复发性流产的临床观察[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2183-2187.
- [17] Azizi R, Ahmadi M, Danaii S, *et al.* Cyclosporine A improves pregnancy outcomes in women with recurrent pregnancy loss and elevated Th1/Th2 ratio[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 19039-19047.
- [18] Basimi P, Akbari Asbagh F, Yekaninejad MS, *et al.* Comparing the frequency of CD4⁺ T cells in recurrent spontaneous abortion women with and without anti-thyroid peroxidase (TPO) [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2020, 19(1): 65-73.
- [19] 杨俊英, 米亚英. 正常妊娠与自然流产小鼠模型蜕膜组织和血清中 TNFR1 的表达[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(5): 436-438.
- [20] Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and pregnancy: focus on biologics. An updated and comprehensive review [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017, 53(1): 40-53.
- [21] Jo E, Jang H J, Yang K E, *et al.* *Cordyceps militaris* induces apoptosis in ovarian cancer cells through TNF- α /TNFR1-mediated inhibition of NF- κ B phosphorylation [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 1.

四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖、凋亡及转移的作用

张 敏¹, 华 桦^{2*}, 曾安琪², 刘 俐², 刘 芳³, 赵军宁^{1,2}

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 四川省中医药科学院转化药理与临床应用研究所, 四川省中医药转化医学中心, 四川省道地药材系统开发工程技术研究中心, 四川省道地药材形成原理与品质评价工程研究中心, 中医药转化医学四川省重点实验室, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川成都 610041; 3. 四川大学, 四川 成都 610041)

摘要: **目的** 探讨四氢姜黄素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、凋亡及转移的作用。**方法** 采用 CCK8 和克隆形成试验测定四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖能力的影响, 流式细胞术检测四氢姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡的作用, 细胞划痕试验、Transwell 试验检测四氢姜黄素对 MCF-7 细胞转移、侵袭能力的影响, Western blot 法检测四氢姜黄素对 MCF-7 细胞凋亡 (Bcl-2、Bax)、转移相关蛋白 (MMP2、MMP9) 表达的调控作用。**结果** 四氢姜黄素对 MCF-7 细胞增殖具有一定的抑制作用, 可升高细胞凋亡率, 降低其转移能力。**结论** 四氢姜黄素作用机制可能是通过下调 Bcl-2/Bax 蛋白表达来诱导肿瘤细胞凋亡, 以及下调基质金属蛋白酶 2 和 9 (MMP2, MMP9) 表达来抑制细胞转移而实现的。

关键词: 四氢姜黄素; MCF-7 细胞; 增殖; 凋亡; 转移

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0942-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.047

乳腺癌是一种发生于乳腺上皮组织的恶性肿瘤, 其发病率逐年上升并愈发年轻化^[1-4]。乳房并非维持生命的重要器官, 但乳腺癌细胞易失去细胞间的黏附能力, 极易增殖扩散, 短时间内迅速转移、生长到其他器官如骨髓、淋巴等, 最后危及患者生命^[5-8]。姜黄素类为中药姜黄的主要有效成

分, 目前已有研究证实姜黄素能抑制膀胱癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤细胞的生长^[9-10]。四氢姜黄素 (tetrahydrocurcumin) 为姜黄素在体内的主要代谢产物, 具有抗肿瘤作用^[11-14], 但其作用机制尚不清楚。本研究探索了四氢姜黄素对 MCF-7 乳腺癌细胞增殖、凋亡、转移的作用及其机制, 为四氢姜

收稿日期: 2020-12-06

基金项目: 重大新药创制“科技重大专项项目 (2018ZX09201018-029); 四川省科技厅重点研发项目 (2018SZ0056); 四川省省级科研院所基本科研业务 (A-2019N-16, A-2019N-30)

作者简介: 张 敏 (1995—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 18745128367, E-mail: 1129703233@qq.com

***通信作者:** 华 桦 (1982—), 女, 副研究员, 研究方向为中药药理学。Tel: 86-28-85226120, E-mail: 905701276qq.com

网络出版日期: 2021-03-30

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210329.1706.004.html>