

· 基础研究 ·

苈根合剂对高龄先兆流产患者滋养细胞增殖的影响

林淑霞¹ 陈锦红² 徐慧娴¹ 赵成云¹ 李甲楠¹ 朱红梅¹ 吴湏婷² 王 玲²

摘要 **目的** 探讨苈根合剂对高龄先兆流产患者滋养细胞增殖的影响及其作用机制。**方法** 提取原代人早孕滋养细胞,制备动物含药血清干预细胞。将 SD 雌性大鼠根据信封法分成正常对照组、阳性对照组、中药低、中、高剂量组,每组 10 只。正常对照组给予生理盐水,阳性对照组给予地屈孕酮药液(3 mg/mL)灌胃,中药组则分别给予不同浓度的苈根合剂药液(0.55、1.1、2.2 g/mL)制备含药血清。采用信封法将细胞随机分成 5 组,分别为空白血清组(Control)、地屈孕酮血清组(DQYT)和低、中、高剂量苈根合剂血清组(ZGP-L、ZGP-M、ZGP-H)。每组设 5 个复孔均加入 100 μ L 对应含药血清培养基。采用 CCK-8 计数法、台盼蓝染色法、流式细胞术及酶联免疫吸附检测法(ELISA 法)分别测定滋养细胞增殖活力、生长曲线、细胞凋亡及血清激素孕酮(P)、雌二醇(E_2)、人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)的水平。**结果** 与 Control、DQYT 组比较,苈根合剂含药血清组滋养细胞增殖活力增强,生长周期延长,凋亡进程减缓($P<0.05$)。早期滋养细胞生长对剂量依赖性较大,浓度越高,细胞增殖、侵袭和分化活力越强,早期干预中以中、高浓度苈根合剂作用明显($P<0.05$),干预晚期时低浓度苈根合剂含药血清对滋养细胞作用较于稳定($P<0.05$)。与 Control 组比较,DQYT、ZGP-M 组 E_2 、P、 β -HCG 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$),ZGP-L 组 β -HCG 水平升高($P<0.01$),ZGP-H 组 P、 β -HCG 水平升高($P<0.05$)。与 DQYT 组比较,ZGP-L 组 E_2 水平降低($P<0.05$),ZGP-M 组 E_2 、P 水平升高, β -HCG 水平降低($P<0.05$),ZGP-H 组 β -HCG 水平亦降低($P<0.05$)。与 ZGP-L 组比较,ZGP-M、ZGP-H 组 E_2 、P 水平升高, β -HCG 水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。同时 ZGP-H 组 E_2 水平低于 ZGP-M 组($P<0.05$)。**结论** 苈根合剂能促进滋养细胞增殖,侵袭分化能力增强,延缓细胞凋亡进程。同时以自分泌或旁分泌的方式调节血清激素表达,使 E_2 、P、 β -HCG 激素分泌水平提高,改善高龄妊娠母胎内环境从而维持妊娠。

关键词 滋养细胞;苈根合剂;增殖;高龄先兆流产;中药复方

Effect of Zhugen Prescription on the Proliferation of Trophoblasts in Advanced Pregnant Women with Threatened Abortion

LIN Shu-xia¹, CHEN Jin-hong², XU Hui-xian¹, ZHAO Cheng-yun¹, LI Jia-nan¹, ZHU Hong-mei¹, WU Yun-ting², and WANG Ling² ¹ Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen (361102); ² Gynecology Outpatient Department of Xiamen Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen (361009)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism of Zhugen Prescription on the proliferation of trophoblast cells in advanced pregnant women with threatened abortion. **Methods** The primary human trophoblasts were extracted from advanced pregnant women, and prepared animal drug-containing serum to interfere with this cells. According to envelope method, female SD rats were divided into normal control group, positive control group, ZGP low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 10 rats in each group. The normal control group was given normal saline, the positive control groups was given Dydrogesterone (3 mg/mL) by intragastric administration, and the ZGP groups was given different concentrations of Zhugen Prescription (0.55, 1.1, 2.2 g/mL). The cells were randomly divided into 5 groups by envelope method, which were blank

基金项目: 厦门卫健委重大疾病攻关项目(No.3502Z20179048)

作者单位: 1. 厦门大学医学院中医系(厦门 361102); 2. 厦门市中医院妇科门诊部(厦门 361009)。

通讯作者: 朱红梅, Tel: 0592-2183069, E-mail: z5913778@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20221124.246

serum group (Control), dydrogesterone serum group (DQYT) and low, medium and high dose Zhugen Prescription serum group (ZGP-L, ZGP-M and ZGP-H). In each group, 5 multiple Wells were added with 100 μ L corresponding drug-containing serum medium. CCK-8 counting, Trypan blue staining, flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to determine the proliferation activity, growth curve, cell apoptosis and serum secretion levels of hormones E_2 , P and β -HCG. **Results** Compared with Control and DQYT group, the proliferation activity of trophoblast cells in ZGP groups was increased, the growth cycle was prolonged, and the apoptosis process was slowed down ($P < 0.05$). The growth of trophoblasts in the early stage was more dose-dependent, and the higher the concentration, the stronger the activity of cell proliferation, invasion and differentiation. In the early intervention, the effect of medium and high concentration of Zhugen Prescription was obvious ($P < 0.05$). In the late stage, the drug-containing serum of low concentration of Zhugen Prescription had a stable effect on trophoblasts ($P < 0.05$). Compared with the Control group, the levels of E_2 , P and β -HCG significantly increased in DQYT and ZGP-M groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the level of β -HCG increased in ZGP-L group ($P < 0.01$). The levels of P and β -HCG in ZGP-H group increased ($P < 0.05$). Compared with DQYT group, the level of E_2 decreased in ZGP-L group ($P < 0.05$), the levels of E_2 and P increased, and the level of β -HCG decreased in ZGP-M group ($P < 0.05$), and the level of β -HCG also decreased in ZGP-H group ($P < 0.05$). Compared with ZGP-L group, the levels of E_2 and P increased, and the level of β -HCG decreased in ZGP-M and ZGP-H groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, the level of E_2 in ZGP-H group was lower than that in ZGP-M group ($P < 0.05$). **Conclusions** Zhugen Prescription can promote the proliferation of trophoblasts, enhance the ability of invasion and differentiation, and delay the process of apoptosis. At the same time, the expression of serum hormone was regulated by autocrine or paracrine, which increased the secretion level of E_2 , P and β -HCG, and improved the internal environment of the mother and fetus in the advanced pregnancy so as to maintain the pregnancy.

KEYWORDS trophoblast; Zhugen Prescription; proliferation; threatened abortion in the advanced age; Chinese herbal compound

医学上普遍以孕妇在妊娠年龄高于 35 岁所发生先兆流产 (threatened abortion, TA) 为高龄先兆流产^[1]。当前越来越多的女性将重心投入到教育与事业发展,从而推迟婚育年龄,使妊娠妇女的年龄结构发生变化^[2]。且随着“三孩”政策的推行和医学科学上辅助生殖技术的进步^[3],为高龄女性带来更多的生育机会,高龄孕妇呈现逐步增多的趋势。一般先兆流产临床发生率为 15%~20%^[4],是常见的临床病证,随着高龄孕妇的攀升,与其相关的高龄妊娠疾病也引起了医学工作者的重视。研究表明,高龄女性有低妊娠率、高流产率等问题^[5],因此开展高龄先兆流产的研究具有重要意义。高龄先兆流产患者与多种因素导致的母胎内环境失衡密切相关^[6]。滋养细胞是具有肿瘤侵袭浸润和分化功能的一种上皮细胞,受精卵着床后胚泡产生的具有特异生物学特性的细胞,其正常的增殖侵袭功能可以促进胚胎生长和胎盘发育,同时通过自分泌和旁分泌方式参与内分泌平衡环节的调控来维持妊娠^[7],因此滋养细胞增殖与侵袭活动与母胎微环境稳态调节密不可分。但具体发病机制并未完全明确,仍需进一步研究。因此,探究苈根合剂对滋养细

胞增殖活动的影响在早期妊娠中调控母胎界面的作用机制,对早期防治高龄先兆流产具有重要临床意义。

材料与方 法

1 动物 8 周龄 SPF 级 SD 雌性健康大鼠 60 只,体重 (220 \pm 20) g,购自上海斯莱克动物实验公司,许可证号 SCXK (沪) 2017-0005。动物饲养于 SPF 级环境,室温 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 55% \pm 15%,动物随机分笼饲养,每笼 5 只,昼夜 12 h 交替饲养,适应性饲养 7 天,自由饮食,本实验通过厦门大学实验动物中心福利与伦理委员会审查 (No. 20190020),实验操作遵循实验动物伦理委员会管理进行。

2 药物 苈根合剂 (Zhugen Prescription, ZGP) 组方:白芍 10 g (批号:190200079)、酒续断 10 g (批号:190104591)、黄芩片 10 g (批号:190402181)、桑寄生 15 g (批号:190201111)、莲 子 10 g (批号:190250451)、苈麻根 15 g (批号:1812230392)、黑豆 30 g (批号:180925)、阿胶 5 g (批号:1712022),均由厦门市中医院药房供应。达芙通地屈孕酮片 (10 mg/片,批号:358187),

购自荷兰 Solvay Pharmaceuticals B.V 公司。

3 试剂与仪器 主要试剂: 南美胎牛血清 (FSP500)、IV 型胶原酶 (C-17104019)、Dnase- I 粉末 (C-MB3069)、0.25% EDTA-Trypsin (F-25200072)、苏木素 - 伊红试剂盒 (MB9898-3)、台盼蓝粉末 (T5-8070) 与 CCK-8 试剂 (C-MA0218) 购自美仑生物, Cytokeratin 7 抗体 (17513-1-AP)、Vimentin 抗体 (10366-1-AP) 购自 Proteintech 公司, 人绒毛膜促性腺激素 (chorionic gonadotropin, β -HCG)、雌二醇 (estradiol, E_2)、孕酮 (progesterone, P) ELISA 试剂盒 (0791H1、0777H1、51338H1) 购自酶免公司。主要仪器: CO₂ 恒温培养箱、酶标仪 (TECAN)、台式离心机 (湖南湘仪)、流式细胞仪 (美国 Backman)、全自动组织脱水机 (德国 Leica) 等。

4 样本收集 实验组样本选取 2019 年 4-12 月在厦门市中医院妇产科门诊接收的自愿终止妊娠的高龄早孕妇女 20 例。中、西医诊断标准参照相关教材内容^[8, 9] 评定, 纳入及排除标准: 孕妇年龄 35~45 岁之间, 孕 6~10 周, 术前伴有阴道有少量出血或腹痛腰酸等先兆流产征象且持续时间不超过 2 天, 妊娠反应仍为阳性, 排除其他致病因素, 经妇科检查、B 超检查示宫内妊娠且胎囊大小与停经天数相符, 临床证型诊断为肾虚血热证型先兆流产。选避孕失败而自愿终止妊娠的正常组织作为样本对照组。伦理审查申请表、临床研究方案、知情同意书等均通过厦门市中医院伦理委员会审查 (No. 20170728)。

5 实验方法

5.1 含药血清制备 制备地屈孕酮药液 (3 mg/mL 剂量)、低、中、高浓度苕根合剂药液 (0.55、1.1、2.2 g/mL)。SD 雌性大鼠根据信封法分成正常对照组、阳性对照组、中药低、中、高剂量组, 每组 10 只。正常对照组给予生理盐水, 阳性对照组给予地屈孕酮药液灌胃, 中药组则分别给予不同浓度的苕根合剂药液, 早晚 2 次, 连续灌药 5 天, 第 6 天末次给药 1 h 后取动物全血, 离心收集上清, 56 °C 水浴灭活补体, 经 0.22 μ m 滤器过滤, 获得空白血清、地屈孕酮血清及不同浓度苕根合剂血清, 根据细胞干预需要, 配制 20% 含药血清培养液, 分别为空白血清培养液、地屈孕酮血清培养液和低、中、高剂量苕根合剂血清培养液, 4 °C 冰箱封存备用。

5.2 标本收集及处理 收集无菌新鲜刮宫组织置于装有冰培养基的样本瓶中, PBS 缓冲液反复清洗 3 次。绒毛组织用于提取原代滋养细胞, 蜕膜组织置于多聚甲醛中固定标本, 石蜡包埋组织, 切厚度为

表 1 免疫组化染色定量评分

内容	计分 (分)	蛋白染色情况
蛋白染色程度	1	不着色
	2	着浅棕色
	3	着棕色, 核蓝色
	4	着棕褐色或深棕黄色, 核深蓝色
阳性蛋白数量	1	少于视野范围内细胞数的 5%
	2	视野范围内细胞数的 5%~25%
	3	视野范围内细胞数的 26%~50%
	4	超过视野范围内细胞数的 50%

注: 免疫组化评分为阳性染色程度评分与阳性蛋白数量评分之积^[10]

5 μ m 的切片, 行苏木精 - 伊红染色 (HE 染色) 和免疫组化染色 (IHC 染色), 步骤参照相关试剂盒说明。镜下观察细胞角蛋白 7 (cytokeratin 7, CK-7) 和波形蛋白 (Vimentin) 的表达情况, 根据免疫组化染色定量评分标准进行评价, 评分标准见表 1。

5.3 细胞提取与培养 滋养细胞提取参照文献步骤^[11] 并改进方法, 剪碎绒毛组织成糊状, 抽吸至 50 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 3 min, 收集沉淀物。加入 2 倍体积 IV 型胶原酶配制液, 置 37 °C 恒温箱消化 1 h 后, 加入 Dnase- I 酶配制液, 常温消化 0.5 h 后摇荡混匀, 过滤筛器过滤全细胞, 将滤液移至含 percoll 梯度液离心管中, 1 000 r/min 离心 3 min。吸去上清液, 加入 3 倍体积红细胞裂解液反应 15 min, 离心收集细胞。加入完全培养基, 吹悬成单细胞悬液并种入培养皿, 摇匀。待细胞贴壁后即弃去悬液, 更换新鲜培养基培养, 细胞传代培养至第三代进行药物血清干预实验。

5.4 CCK-8 增殖实验 常规方法收集细胞, 调整细胞密度约 5×10^5 个 /mL, 采用信封法将细胞随机分成 5 组, 分别为空白血清组 (Control)、地屈孕酮血清组 (DQYT) 和低、中、高剂量苕根合剂血清组 (ZGP-L、ZGP-M、ZGP-H)。每组设 5 个复孔, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 每孔均加入 100 μ L 对应含药血清培养基, 分别干预 24、48、72、96 h, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L 避光温育 1 h, 酶标仪 450 nm 波长处检测各组滋养细胞吸光度。

5.5 绘制细胞生长曲线 同上进行细胞分组, 每组设 3 个复孔, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 每孔均加入 100 μ L 对应含药血清培养基, 分别干预 24、48、72、96 h, 收集不同干预时间的滋养细胞, 镜下进行台盼蓝染色计数并绘制生长曲线。

5.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集细胞, 调整细胞浓度为每 1 mL 含 5×10^5 个细胞, 接种于

6 孔板, 含药血清干预 72 h 后, 400 μL 结合缓冲液悬浮细胞, 加入 Annexin V-FITC、PI 各 10 μL , 混匀, 避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 步骤参照试剂说明书。

5.7 血清激素测定 滋养细胞培养 72 h 后, 收集含药血清培养液, ELISA 法检测培养液中 P、 E_2 、 $\beta\text{-HCG}$ 表达情况, 比较滋养细胞在不同血清培养液中的表达差异。

6 统计学方法 采用 SPSS 22 软件包进行数据统计及分析, 计量资料分析前进行正态性检验及方差齐性检验, 组间比较采用两独立样本 t 检验和秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 实验结果作图采用 Graph Pad Prism 8.02 软件进行。

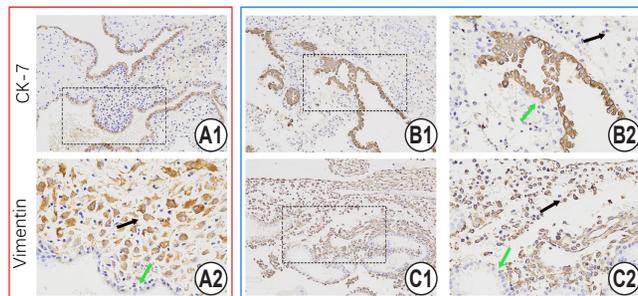
结 果

1 病理结果比较

1.1 HE 染色结果比较 (图 1) 对照组形态如图所示, 绒毛区滋养细胞形态正常, 数量多且体积小, 细胞排列紧密、规则, 细胞及组织形态正常, 间质偶见炎性细胞浸润。与对照组相比, 高龄先兆流产患者滋养层间隙变薄变窄, 绒毛稀疏碎裂明显, 广泛可见滋养细胞变性甚至坏死, 胞质淡染、疏松膨胀或呈空泡状, 细胞嗜酸性增强, 绒毛区可见嗜酸性团块。蜕膜区细胞肿胀, 胞质疏松淡染, 蜕膜区及滋养层均可见大量炎性细胞浸润, 细胞排列不规则, 组织形态变差。

1.2 IHC 结果比较 (图 2、表 2) 与对照组比较, 流产组绒毛层 CK-7 阳性蛋白表达率降低, 阳性细胞数量减少, Vimentin 阴性表达也有降低, 可见绒毛组织中滋养细胞降低, 且在蜕膜组织中 Vimentin

阳性蛋白表达比例较大程度降低, 可见蜕膜细胞数量减少 ($P < 0.05$)。细胞组化形态学观察可知, Vimentin 阳性表达降低, CK-7 阳性表达降低, 滋养细胞与蜕膜细胞都可见变性或坏死, 细胞膨胀和空泡样改变, 胞核皱缩不见深染反应, 组织结构破碎和形态变差, 滋养细胞和蜕膜细胞数量降低。



注: A 为正常组织切片; B、C 为流产组织切片; 2 为 1 图中方框放大区域, 1 的放大倍数为 200, 2 的放大倍数为 400; 绿色箭头为绒毛组织及滋养细胞, 黑色箭头为蜕膜组织及蜕膜细胞

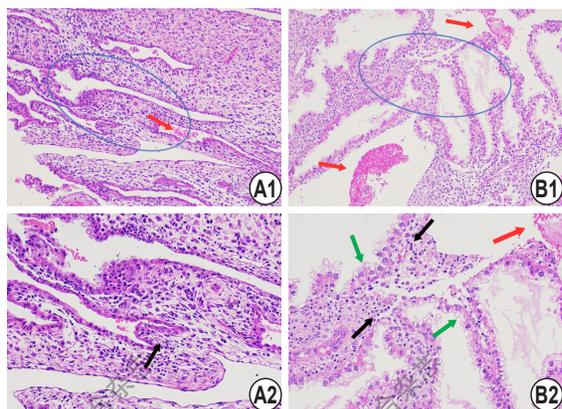
图 2 人刮宫组织 IHC 染色图

表 2 两组刮宫组织 CK-7 和 Vimentin 蛋白免疫组化染色

评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	CK-7 评分	Vimentin 评分
对照	9	7.33 ± 1.00	8.67 ± 2.65
流产	9	5.00 ± 1.50	6.00 ± 1.73
P 值		0.0013	0.0223

2 各组 CCK-8 增殖结果比较 (表 3) 与 Control 组比较, DQYT 组干预 48 h 细胞吸光度减少, 细胞浓度降低, 而干预 96 h 时升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ZGP-L 组干预 96 h、ZGP-M 组干预 24、96 h 以及 ZGP-H 组干预 24 h 时细胞吸光度升高, 细胞浓度增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 DQYT 组比较, ZGP-L 组干预 96 h、ZGP-M 组干预 48 h 时细胞吸光度升高, 细胞浓度增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 ZGP-L 组比较, ZGP-M 组干预 48 h 时细胞吸光度升高, 细胞浓度增加 ($P < 0.01$), 而 ZGP-H 组干预 96 h 时则降低 ($P < 0.01$)。

3 生长曲线变化结果比较 (图 3) 与本组 24 h 时期比较, 可见各组细胞在 48、72、96 h 时, 可见所有组别滋养细胞活力增强 ($P < 0.01$)。与 Control 组比较, ZGP-L、ZGP-M 组在含药血清培养与培养周期两种因素存在强线性相关性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), DQYT 组在 24 h 时期活力低于各组, 较 Control 组有统计学意义 ($P < 0.05$); ZGP-H 组活力趋势相比则变化不明显, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。经台盼蓝染色计数结果显示, 随着培养时间延长, 滋养细



注: A 为正常组织切片; B 为流产组织切片; 2 为 1 图中虚框放大区域, 1 的放大倍数为 100, 2 的放大倍数为 200; 红色箭头为嗜酸性团块, 绿色箭头为细胞变性或坏死, 黑色箭头为炎性细胞浸润

图 1 人刮宫组织 HE 染色图

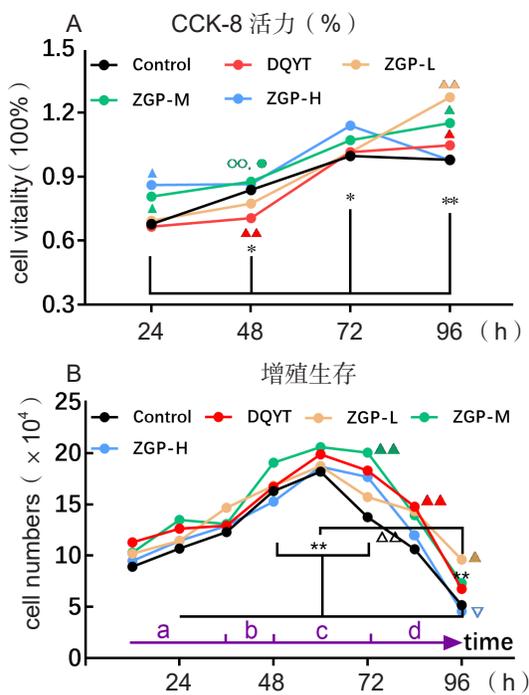
表 3 不同时间段含药血清对人绒毛滋养细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	5	0.677 ± 0.036	0.837 ± 0.043	0.996 ± 0.034	0.978 ± 0.034
DQYT	5	0.666 ± 0.028	0.706 ± 0.049**	1.015 ± 0.032 [○]	1.046 ± 0.034* [○]
ZGP-L	5	0.693 ± 0.042	0.773 ± 0.095	1.014 ± 0.075 [○]	1.271 ± 0.079** [△] [○]
ZGP-M	5	0.807 ± 0.060*	0.876 ± 0.044 ^{△△} [▲]	1.071 ± 0.057 [○]	1.150 ± 0.094* [○]
ZGP-H	5	0.845 ± 0.069*	0.864 ± 0.082	1.139 ± 0.093 [○]	0.917 ± 0.115 [▲]

注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 DQYT 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 ZGP-L 组比较, $\Delta P < 0.01$;与本组 24 h 比较, $\circ P < 0.01$

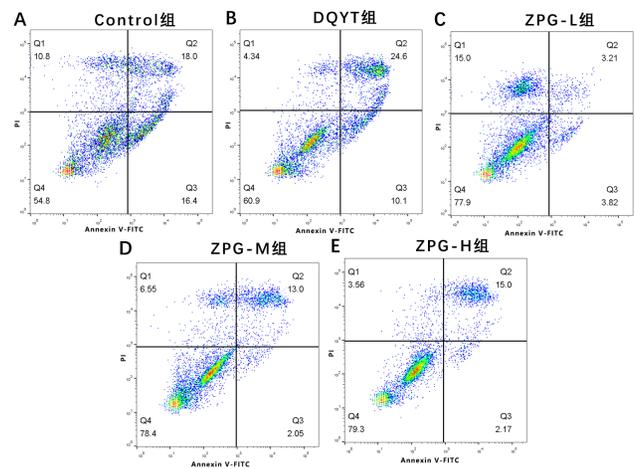
胞数量呈抛物线状发展,细胞增殖呈明显的生长凋亡变化趋势。与本组 24 h 比较,各组 36、48、72 h 时细胞增长数目增长 ($P < 0.01$),96 h 阶段细胞存活率开始降低 ($P < 0.05$)。与 Control 组比较,DQYT、ZGP-L 组和 ZGP-M 组细胞增殖数目较多且生长速度较快,其中 ZGP-M 组统计学差异最为显著,DQYT 组次之 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 ZGP-H 组整体较 Control 组增殖速度稍快,细胞数目略增,生长曲线相似,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),同时 ZGP-H 组较 ZGP-M 组各阶段的细胞总数低,细胞增殖速度较低,凋亡进程较早 ($P < 0.05$)。

细胞组凋亡率均降低,以 ZGP-L 组细胞凋亡率降低最明显 ($P < 0.05$),而 ZGP-M、ZGP-H 组凋亡率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注:a为调整期,b为对数期,c为稳定期,d为衰亡期;与 24 h 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 96 h 比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 Control 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 DQYT 组比较, $\circ P < 0.01$;与 ZGP-L 组比较, $\bullet P < 0.05$;与 ZGP-M 组比较, $\nabla P < 0.05$

图 3 含药血清对滋养细胞活力率及生长曲线的影响



注:象限分析:Q1 为坏死细胞比例;Q2 为晚期凋亡细胞比例;Q3 为早期凋亡细胞比例;Q4 为活细胞比例

图 4 含药血清培养 72 h 后对细胞凋亡的影响

表 4 各组滋养细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
Control	4	29.64 ± 4.425
DQYT	4	27.49 ± 8.539
ZGP-L	4	12.91 ± 7.877* [△]
ZGP-M	4	18.67 ± 4.510
ZGP-H	4	20.23 ± 4.844

注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$;与 DQYT 比较, $\Delta P < 0.05$

4 FITC-PI 细胞凋亡率比较 (图 4, 表 4) 与 Control、DQYT 组比较, 苕根合剂含药血清干预的

5 各组激素水平结果比较 (表 5) 与 Control 组比较,DQYT 及 ZGP-M 组 E_2 、P、 β -HCG 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),ZGP-L 组 E_2 、P 水平略增,但无统计学意义 ($P > 0.05$), β -HCG 水平有显著升高 ($P < 0.01$);ZGP-H 组 P、 β -HCG 水平升高 ($P < 0.05$)。与 DQYT 组比较,ZGP-L 组 E_2 水平降低 ($P < 0.05$),ZGP-M 组 E_2 、P 水平升高, β -HCG 水平降低 ($P < 0.05$),ZGP-H 组 β -HCG 水平亦降低 ($P < 0.05$)。与 ZGP-L 组比较,ZGP-M、ZGP-H 组 E_2 、P 水平升高, β -HCG 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时 ZGP-H

表 5 各组含药血清培养基 E₂、P、β-HCG 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E ₂ (pmol/L)	P (pmol/L)	β-HCG (IU/L)
Control	5	7.17 ± 1.21	790.83 ± 201.43	8.88 ± 0.83
DQYT	5	11.40 ± 0.54*	1 034.67 ± 137.13*	13.48 ± 1.50**
ZGP-L	5	7.51 ± 0.42 [△]	930.43 ± 234.99	14.31 ± 1.38**
ZGP-M	5	13.81 ± 1.25** ^{△△△}	1 181.17 ± 102.53** ^{△△△}	11.63 ± 1.24* ^{△△△}
ZGP-H	5	8.72 ± 0.49 ^{△○}	1 105.00 ± 235.46** [△]	12.09 ± 2.13* ^{△△}

注:与 Control 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DQYT 组比较,[△] $P < 0.05$;与 ZGP-L 组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与 ZGP-M 组比较,[○] $P < 0.05$

组 E₂ 水平低于 ZGP-M 组 ($P < 0.05$)。

讨 论

肾是孕育之根本,因而胎元不安,当有肾虚因素在其中^[12]。且妇人的体质特点为血不足,气有余^[13];高龄肾之癸水始不足,复因阳明脉衰少,阴血更显不足;加之不良的生活习惯和情绪亦易造成阴血的耗损。一旦妊娠,阴血下注养胎,机体处于阴血不足,阳气偏盛的特殊生理状态,便易因热扰胎动而出现流产先兆。正如《景岳全书》^[14]所言:“凡胎热者,血易动,血动者,胎不安。”故高龄先兆流产应重视肾虚血热这一重要的致病环节。苈根合剂是 20 世纪 60 年代闽南名医潘仲鹤的效验成方,沿用至 80 年代由闽南中医妇科名家吴网治先生整理、定型^[15],在治疗肾虚血热型先兆流产效果显著。本方乃张锡纯名方寿胎丸化裁而来,由苈麻根、酒续断、桑寄生、阿胶、白芍、莲子、黄芩、绿心乌豆组成。方中重用苈麻根为君药,取其性味甘寒擅于止血安胎、清热凉血之功。川断与桑寄生均主怀妊漏血不止之疾,入肝肾经,有补肾载胎之效。潘师认为绿心乌豆是本方用药特色之一,其在补肾安胎上效力尤强,有补肾益精血之功,且能健脾利湿、清热解毒,加上黄芩清热泻火,直折热邪,为安胎之圣药,共为臣药。莲子补后天以充养先天以安胎元,阿胶色黑味甘,可养血止血、滋补精血,配以白芍养血敛阴,共为佐药。诸药相合可以补肾凉血,养血止血以安胎,热清血止,胎元自固,达到固胎摄胎的效果。结合高龄先兆流产高发生率和多存在肾虚血热致病的现状,研究苈根合剂对高龄先兆流产患者滋养细胞增殖的影响就有重要意义。

滋养细胞高增殖和侵袭性是早期妊娠重要表现,研究表明其功能受限则会导致流产发生^[7]。高龄先兆流产患者的刮宫病理组织研究显示,胚胎组织结构变性,绒毛组织和蜕膜结构松散破碎,嗜酸性团块多,细胞胞质膨胀或者空泡样变,细胞间隙变窄,炎性粒细胞广布。滋养细胞变性坏死,细胞膨胀,排

列不规则化,且蜕膜组织中极少存在滋养细胞,说明滋养细胞增殖和侵袭功能受限。本研究中 CCK-8 检测细胞增殖活力和台盼蓝计数观察细胞生长曲线发现,苈根合剂增强细胞增殖活力,随着培养时间延长和浓度增加,中、高浓度苈根合剂在早期培养使细胞增殖、侵袭、分化等生物学特性增强作用明显优于地屈孕酮,晚期则以低剂量苈根合剂作用明显。FCM 流式检测显示,培养时间相同的苈根合剂细胞晚期凋亡比例少于地屈孕酮组,活细胞比例高于地屈孕酮组,表明苈根合剂能有效使细胞增殖,延缓细胞凋亡的进程,延长细胞生存周期,减少细胞凋亡,说明苈根合剂在促进滋养细胞增殖中发挥重要作用。

E₂、P、β-HCG 是临床观察妊娠状态的重要指标^[16],滋养细胞生物学特性与该类激素分泌紧密相关。β-HCG 是早期妊娠检测的特异性指标,能够直接反映胚胎状况,因此滋养细胞的增殖在促进分泌 β-HCG 具有反馈作用。在值达到高峰前能成倍增长,可以维持妊娠黄体功能和持续分泌类固醇激素,使 P、E₂ 分泌增加,对促进胚胎发育、胎盘生长直至替代黄体有重要意义^[17],P 在子宫内膜发育、胚胎着床和母胎界面构建上发挥重要影响^[18],这一点上 E₂ 与 P 作用类似,E₂ 在推动蜕膜化进程中可以起到打开植入窗口并且调节母胎免疫识别功能,维持较好的胚胎生长环境^[19]。本研究中 ELISA 法测定细胞含药血清培养液激素分泌水平,地屈孕酮和苈根合剂血清均有促进 E₂、P、β-HCG 分泌含量的作用,其中以中浓度苈根合剂作用最为突出,明显优于空白组和地屈孕酮。

总之,研究证明苈根合剂能促进滋养细胞增殖,增强细胞活力,延缓细胞凋亡进程。同时滋养细胞以自分泌或旁分泌方式提高 E₂、P、β-HCG 等分泌水平,通过促进细胞增殖可以参与调控母胎内环境稳态,因此苈根合剂可以有效治疗肾虚血热型先兆流产。

利益冲突：无。

参 考 文 献

- [1] Correa-De-Araujo R, Yoon S. Clinical outcomes in high-risk pregnancies due to advanced maternal age [J]. J Women's Health (Larchmt), 2021, 30 (2) : 160-167.
- [2] 赵梦晗. 我国妇女生育推迟与近期生育水平变化 [J]. 人口学刊, 2016, 38 (1) : 14-25.
- [3] 史心怡, 李成碑, 李文, 等. 三孩政策下女性不孕者辅助生殖技术接受度及影响因素的质性研究——以上海 G 医院为例 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(8) : 1300-1304.
- [4] Naert MN, Khadraoui H, Muniz Rodriguez A, et al. Association Between first-trimester subchorionic hematomas and pregnancy loss in Singleton pregnancies [J]. Obst Gynecol, 2019, 134 (2) : 276-281.
- [5] 李梅. 高龄女性的卵子和胚胎质量 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2017, 55 (1) : 16-21.
- [6] 王卫红. 250 例早期先兆流产中医药安胎患者母胎及子代的健康情况研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [7] Pang H, Lei D, Guo Y, et al. Three categories of similarities between the placenta and cancer that can aid cancer treatment: cells, the microenvironment, and metabolites [J]. Front Oncol, 2022, 12: 977618.
- [8] 谢幸主编. 妇产科学 [M]. 第 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 68-70.
- [9] 谈勇主编. 中医妇科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 154-160.
- [10] 郝冉, 施丽婕, 笪如桥, 等. 化瘀通阳方对溃疡性结肠炎大鼠巨噬细胞炎性蛋白 -2 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38 (1) : 60-65.
- [11] Kolokoltsova T, Saburina I, Zurina I, et al. Isolation and characterization of trophoblasts from enzymatic explants of human term placenta [J]. Human cell, 2017, 30 (4) : 249-257.
- [12] 隋·巢元方撰; 黄作阵点校. 诸病源候论 [M]. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 1997: 195-196.
- [13] 明·王元敬刻本. 旧题黄帝·灵枢经 [M]. 先秦: 明赵府居敬堂刊本, 万历十四年: 303.
- [14] 明·张景岳著. 张景岳医学全书 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 1354.
- [15] 吴网治, 陈明妙, 项新菊. 苧根合剂安胎 110 例 [J]. 福建中医药, 1986, 17 (3) : 17.
- [16] 黄琦, 黄秀敏, 马玉平. 血清孕酮和 β -hCG 在早期妊娠不同妊娠结局中的临床意义 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36 (31) : 4704-4706.
- [17] 黄春玉, 冯力民, 于文, 等. 动态监测血清孕酮及人绒毛膜促性腺激素对早期异常宫内妊娠的预后判定 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2014, 15 (5) : 413-416.
- [18] Abdulhussain G, Azizieh F, Makhseed MA, et al. Effects of progesterone, dydrogesterone and estrogen on the production of Th1/Th2/Th17 cytokines by lymphocytes from women with recurrent spontaneous miscarriage [J]. J Reprod Immunol, 2020, 140: 103132.
- [19] Li S, Zhao S, Luo J, et al. Estrogen induces indoleamine 2, 3-dioxygenase expression via suppressors of cytokine signaling 3 in the chorionic villi and decidua of women in early pregnancy [J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 83 (1) : e13197.

(收稿: 2021-04-02 在线: 2023-02-06)

责任编辑: 汤 静