

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.17.011

寿胎丸加味方对多囊卵巢综合征高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠子宫内膜内质网应激和蜕膜化的影响

郭婷婷¹, 蒋蒙¹, 韩静², 郭肖竹³, 张跃辉³✉

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江省哈尔滨市香坊区和平路 24 号, 150040; 2. 黑龙江省中医药科学院; 3. 黑龙江中医药大学附属第一医院

[摘要] **目的** 探讨寿胎丸加味方治疗多囊卵巢综合征(PCOS)高雄激素-胰岛素抵抗流产的可能作用机制。**方法** 将动情周期规律且处于动情前期的 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只与 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 于每日 18:00 按 2:1 比例合笼, 次日 8:00 雌鼠阴道涂片镜下观察到大量精子且见阴道栓视为妊娠第 0.5 天, 共获得 30 只孕鼠。在妊娠第 0.5 天将孕鼠随机分为正常组、模型组、寿胎丸加味方组, 每组 10 只。自妊娠第 0.5 天至第 13.5 天, 寿胎丸加味方组予寿胎丸加味方药液 26.6 g/(kg·d) 灌胃, 每天 2 次, 连续 14 天; 正常组和模型组同时予等体积生理盐水灌胃。除正常组外, 其余两组孕鼠自妊娠第 7.5 天至第 13.5 天联合应用双氢睾酮和胰岛素腹腔注射, 建立 PCOS 高雄-胰岛素抵抗流产大鼠模型。所有孕鼠于妊娠第 0.5、3.5、6.5、9.5、12.5、14.5 天测定体质量; 于妊娠第 14.5 天取材, 观察胚胎情况, 计算胚胎丢失率、平均着床数及平均活胎数; 透射电镜观察子宫蜕膜超微结构变化; Western Blot 法检测子宫蜕膜组织中蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α) 蛋白水平; qRT-PCR 法检测子宫蜕膜组织中内质网应激相关因子 *Perk*、*Eif2 α* 、线粒体融合蛋白 2 (*Mfn2*)、葡萄糖调节蛋白 78 (*Grp78*) 和蜕膜化相关因子 Wnt 家族成员 4 蛋白 (*Wnt4*)、含 FXYD 域离子运输调控因子 2 (*Fxyd2*)、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 G 成员 1 (*Serping1*)、分泌型磷蛋白 1 (*Spp1*)、谷胱甘肽过氧化物酶 3 (*Gpx3*)、金属硫蛋白 1G (*Mt1g*) mRNA 表达情况。**结果** 与正常组比较, 模型组孕鼠在妊娠第 9.5、12.5、14.5 天体质量减少, 胚胎丢失率升高, 平均着床数及平均活胎数降低, 子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白及 mRNA 表达升高, *Grp78*、*Fxyd2*、*Spp1* mRNA 表达升高, *Mfn2*、*Wnt4*、*Serping1*、*Gpx3*、*Mt1g* mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 子宫蜕膜超微结构显示细胞损伤明显, 线粒体明显肿胀、膜局部隆起, 内质网数量较多且明显扩张、脱颗粒。与模型组比较, 寿胎丸加味方组孕鼠在妊娠第 9.5、12.5、14.5 天体质量增加, 胚胎丢失率降低, 平均活胎数升高, 子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白及 mRNA 表达降低, *Grp78*、*Fxyd2*、*Spp1* mRNA 表达降低, *Mfn2*、*Wnt4*、*Serping1*、*Gpx3* mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 子宫蜕膜细胞轻度损伤, 线粒体数量较多、轻度固缩、膜完整, 内质网数量减少、扩张、局部脱颗粒。**结论** 寿胎丸加味方可能通过抑制 PERK/eIF2 α 信号通路而改善子宫内膜内质网应激和蜕膜化受损, 从而降低 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠的胚胎丢失率, 防止流产发生。**[关键词]** 多囊卵巢综合征; 高雄激素血症; 胰岛素抵抗; 流产; 内质网应激; 蜕膜化; 蛋白激酶 R 样内质网激酶; 真核翻译起始因子 2 α ; 寿胎丸加味方

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 并发的妊娠期流产在育龄期女性流产中较常见, 多伴有高雄激素血症和胰岛素抵抗^[1]。

PCOS 导致的流产临床常见阴道出血、腰酸、腹痛、胎动下坠等症状, 可归属于中医学“胎漏”“胎动不安”范畴。寿胎丸加味方是全国名老中医王秀霞结合多年临床经验, 以《医学衷中参西录》中寿胎丸为基础化裁而成, 具有补肾固冲安胎、燥湿化痰之效。寿胎丸加味方常用于治疗肾虚兼痰湿阻滞导

基金项目: 国家自然科学基金(82374286); 黑龙江省中医药创新团队及人才支持计划项目

✉ 通讯作者: chizishui-04@163.com

致的 PCOS 流产患者,可显著改善 PCOS 临床症状,并可使患者获得更好的妊娠结局^[2]。前期实验研究^[3]表明,该方可降低 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠流产率,其机制可能与抑制炎症反应而提高子宫内膜容受性和恢复子宫内膜蜕膜化缺陷有关。

现代研究显示,内质网应激(ERS)在 PCOS 的生理及病理中起到重要作用^[4],PCOS 模型大鼠子宫平滑肌细胞存在 ERS 现象^[5]。本团队前期研究^[6-7]发现,PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗会导致妊娠大鼠子宫内膜蜕膜化受损。蜕膜化受损则会引发子宫内膜细胞氧化应激,从而诱导 ERS,导致胚胎着床失败,出现早期妊娠丢失^[8]。另有研究^[9]表明,蛋白激酶 R 样内质网激酶/真核翻译起始因子 2 α (PERK/eIF2 α)信号通路在细胞 ERS 中发挥着至关重要的作用。本研究基于 PERK/eIF2 α 信号通路,拟从子宫内膜 ERS 和蜕膜化角度,进一步探讨寿胎丸加味方治疗 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产的可能作用机制,为其临床应用提供实验依据。本研究已通过黑龙江中医药大学动物伦理研究委员会审批(批件号:2024060301)。

1 材料与方法

1.1 动物

选取 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只,7~8 周龄,体质量 200~220 g;生殖能力正常的 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只,9~10 周龄,体质量 280~300 g。大鼠均由哈尔滨医科大学实验动物学部提供,实验动物生产许可证号:SCXK(黑)2019-001,实验动物使用许可证号:SYXK(黑)2022-004。所有大鼠饲养于黑龙江中医药大学中药药理(妇科)SPF 级动物实验室,温度(22 $\pm$ 2)℃,湿度(50 $\pm$ 10)%,12 h 明暗交替循环,自由进食和饮水。

1.2 药物

寿胎丸加味方组成:菟丝子 50 g,桑寄生 20 g,续断 20 g,杜仲 20 g,阿胶珠 10 g,麦冬 15 g,苍术 20 g,桔梗 15 g,党参 20 g,黄芪 30 g,山萸肉 15 g,山药 20 g。药物购自黑龙江中医药大学附属第一医院,煎煮浓缩至终浓度为 1.66 g/ml,4℃保存备用。双氢睾酮(DHT,批号:D-5027),Sigma-Aldrich 公司;胰岛素(INS,规格:400 IU/支,货号:LVG4P48),丹麦诺和诺德公司。

1.3 主要试剂与仪器

PERK 抗体(货号:AF5304)、eIF2 α 抗体(货

号:AF6087),Affinity 公司; β -actin 抗体(货号:A5441),Sigma-Aldrich 公司;羊抗兔 IgG-HRP(货号:BL003A)、羊抗小鼠 IgG-HRP(货号:BL001A)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:BL521A),Biosharp 公司;高效 RIPA 裂解液(货号:R0010),索莱宝生物科技有限公司;ECL 发光液(货号:MA0186-1),美仑生物技术有限公司;RNAiso Plus(货号:9109)、TB Green Premix Ex Taq II(货号:RR820A)、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号:RR047A),宝日医生物技术(北京)有限公司;水合氯醛(货号:20201009),天津永晟精细化工有限公司。

梯度 PCR 基因扩增仪(型号:3BT9610),Select Bioproducts 公司;超微量分光光度计(型号:K5600),北京凯奥科技发展有限公司;透射电子显微镜(型号:HT7800/HT7700),日本 HITACHI 公司;电泳仪(型号:1658040)、凝胶成像仪(型号:1708265)、实时荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96),Bio-Rad 公司。

1.4 动物分组及造模方法

将所有雌性大鼠适应性喂养 1 周后,阴道涂片连续观察两个动情周期,选取动情周期规律且处于动情前期的雌性大鼠,于每日 18:00 将其与生育能力正常的雄性大鼠以 2:1 比例合笼过夜,次日 8:00 对雌性大鼠进行阴道涂片,镜下观察到大量精子且见阴道栓视为妊娠第 0.5 天,共获得 30 只孕鼠。采用随机数字表法将孕鼠分为正常组、模型组、寿胎丸加味方组,每组 10 只。除正常组外,其余两组孕鼠参考前期研究^[3,10]构建 PCOS 高雄-胰岛素抵抗流产大鼠模型:自妊娠第 7.5 天至第 13.5 天,将 DHT 溶于芝麻油中配制终浓度为 0.01 mg/ μ l 的溶液,于每日 8:00 按 1.66 mg/(kg $\cdot$ d)腹腔注射 1 次,诱导高雄激素血症;同时腹腔注射 INS 6 IU/d,于每日 8:00 和 18:00 各注射 1 次、每次 3 IU,诱导胰岛素抵抗。造模孕鼠出现雄激素水平升高和胰岛素抵抗等代谢和内分泌紊乱现象,以及流产率较正常孕鼠增加,差异有统计学意义,表明造模成功^[3,10]。正常组孕鼠同时间分别于每日 8:00 腹腔注射等体积芝麻油,于每日 8:00 和 18:00 腹腔注射等体积生理盐水各 1 次。

1.5 给药方法

孕鼠妊娠第 0.5 天至第 13.5 天,按《药理实验方法学》^[11]中人和大鼠体表面积折算系数换算,大鼠等效剂量是人(60 kg)的 6.3 倍,故寿胎丸加味

方组予寿胎丸加味方药液 26.6 g/ (kg·d) 灌胃，每日早、晚各 1 次，连续 14 天；正常组和模型组每只孕鼠同时给予等体积生理盐水灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 测定孕鼠体质量 所有孕鼠于妊娠第 0.5、3.5、6.5、9.5、12.5、14.5 天添加饲料前测定体质量并记录。

1.6.2 观察孕鼠子宫及胚胎情况 各组孕鼠于妊娠第 14.5 天 8:00 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 0.3 ml/100 g，麻醉后进行剖腹，迅速剥离子宫和胚胎，观察子宫整体形态、胚胎数目、胚胎外观以及有无瘀血等，判断正常胚胎与丢失胚胎并记录数目，计算胚胎丢失率、平均着床数及平均活胎数。子宫饱满，血运良好，胚胎剥离后形态完整、大小一致且无瘀血，为正常胚胎；子宫内有明显瘀血，血运欠佳，与正常胚胎比较外观严重出血或坏死、胚胎较小，为血胚；子宫内仅可见着床痕迹而无胚胎，则为吸收胚胎。丢失胚胎包括血胚和吸收胚胎，胚胎丢失率=丢失胚胎数/（丢失胚胎数+正常胚胎数）×100%。

1.6.3 透射电镜观察子宫蜕膜超微结构 各组孕鼠剖腹后取出子宫蜕膜组织，部分固定用于透射电镜观察，剩余部分液氮速冻后转移至-80℃冰箱保存，用于 Western Blot 和 qRT-PCR 检测。将子宫蜕膜组织置于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4）配制的 1% 钨酸中避光室温固定 2 h。随后予 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次，每次 15 min。然后室温脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片、染色，透射电镜下观察子宫蜕膜超微结构变化，并采集图像。

1.6.4 Western Blot 法检测子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2α 蛋白水平 各组采用随机数字表法选取 3 只孕鼠冻存的子宫蜕膜组织 100 mg，加入 RIPA 裂解液，置于冰上裂解，匀浆后提取组织总蛋白上清液，采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液，蛋白变性，SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别滴加一抗 PERK、eIF2α（稀释浓度均为 1:2000），4℃孵育过夜。1×TBST 洗涤 5 次，加入相应二抗（稀释浓度为 1:20 000），室温孵育 1 h。1×TBST 洗涤 5 次，ECL 发光液显色，胶片曝光条带。使用 Image J 1.8.0 软件分析蛋白条带灰度值，以 β-actin 为内参，以目的蛋白与内参灰度值的比值表示目的蛋白水平。

1.6.5 qRT-PCR 法检测子宫蜕膜组织中 ERS 相关因子和蜕膜化相关因子 mRNA 表达 各组取子宫蜕膜组织提取 RNA 后，进行 cDNA 反转录，将其置入实时荧光定量 PCR 仪测定 cDNA 浓度，常温下配置反应体系，内参基因为 *Gapdh*，通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析基因相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成，详见表 1。ERS 相关因子包括 *Perk*、*Eif2α*、线粒体融合蛋白 2 (*Mfn2*)、葡萄糖调节蛋白 78 (*Grp78*)，蜕膜化相关因子包括 Wnt 家族成员 4 蛋白 (*Wnt4*)、含 FXYD 域离子运输调控因子 2 (*Fxyd2*)、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 G 成员 1 (*Serping1*)、分泌型磷蛋白 1 (*Spp1*)、谷胱甘肽过氧化物酶 3 (*Gpx3*)、金属硫蛋白 1G (*Mt1g*)。

表 1 孕鼠子宫蜕膜组织中内质网应激相关因子和蜕膜化相关因子的引物序列

Table 1 Primer sequences for endoplasmic reticulum stress-related factors and decidualization-related factors in the decidual tissue of pregnant mice

引物名称	引物序列	产物长度 /bp
<i>Gapdh</i>	上游 TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	121
	下游 GGTAACCAGGCGTCCGATAC	
<i>Perk</i>	上游 AGGCGGCTTTGGCGTTGTCT	159
	下游 TACCTCACGATGCCTGGGTGCT	
<i>Eif2α</i>	上游 GCCCAAAGTGGTTACAGATACA	122
	下游 CTTCAGCTTTGGCTTCCATTTC	
<i>Mfn2</i>	上游 GGGACAAAGTTCTGCCATCT	126
	下游 CGGTCTTGACACTCTTCTTCTC	
<i>Grp78</i>	上游 CTATTCCTGCGTCGGTGATTTC	99
	下游 TCAGGAGTGAAGGCCACATA	
<i>Wnt4</i>	上游 ATGGCGTAGCCTTCTCACAG	187
	下游 GCTCGCCAGCATGTCTTTAC	
<i>Fxyd2</i>	上游 CGAGTATGACTATGAAACCGTCC	96
	下游 CGGAATCTTTTGCTGAGGAGAA	
<i>Serping1</i>	上游 CGGAGAACACCAACCACAAG	180
	下游 TGCTACTCAACATGGGCACT	
<i>Spp1</i>	上游 CTGAAGCCTGACCCATCTCA	143
	下游 TCGTCGTCATCATCGTCCAT	
<i>Gpx3</i>	上游 CATTGGGCGTGTCATTCTG	169
	下游 TTCTGCTCTTTCTCCCCGTT	
<i>Mt1g</i>	上游 ACCTCTGCAAGAAGAGCTG	91
	下游 ACTTGTCGAGGCACCTTT	

注：*Perk*，蛋白激酶 R 样内质网激酶；*Eif2α*，真核翻译起始因子 2α；*Mfn2*，线粒体融合蛋白 2；*Grp78*，葡萄糖调节蛋白 78；*Wnt4*，Wnt 家族成员 4 蛋白；*Fxyd2*，含 FXYD 域离子运输调控因子 2；*Serping1*，丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 G 成员 1；*Spp1*，分泌型磷蛋白 1；*Gpx3*，谷胱甘肽过氧化物酶 3；*Mt1g*，金属硫蛋白 1G。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 Tukey 检验或 Dunnett 检验。计数资料以频数、百分率表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕鼠妊娠不同时间体质量比较

表 2 示，与正常组比较，模型组孕鼠在妊娠第 9.5、12.5、14.5 天体质量减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，寿胎丸加味方组孕鼠在妊娠第 9.5、12.5、14.5 天体质量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 各组孕鼠子宫形态、胚胎丢失率、平均着床数及平均活胎数比较

图 1 示，正常组孕鼠子宫形态完整，饱满如串珠，颜色鲜红，血运丰富且无瘀血，胚胎数量较多，发育良好，胚胎大小基本一致。模型组孕鼠子宫形态不规则，宫腔内有多处明显瘀血，胚胎数量明显减少且大小不一，发育不良，血运欠佳，吸收胚胎较多；与模型组比较，寿胎丸加味方组孕鼠子宫形态有明显改善，较为饱满，整体呈鲜红色，瘀血情况有所改善，胚胎数量明显增多，有少量血

胚。表 3 示，与正常组比较，模型组孕鼠胚胎丢失率升高，平均着床数、平均活胎数降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，寿胎丸加味方组孕鼠胚胎丢失率降低，平均活胎数升高 ($P<0.05$)，平均着床数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组孕鼠胚胎丢失率、平均着床数及平均活胎数比较

Table 3 Comparison of embryo loss rate, average number of implantations, and average number of live fetuses among pregnant rats in each group				
组别	鼠数	胚胎丢失率/%	平均着床数 /个, $\bar{x}\pm s$	平均活胎数 /个, $\bar{x}\pm s$
正常组	10	1.67	14.20±1.46	13.50±1.56
模型组	10	31.80 ^{a)}	9.10±2.02 ^{a)}	6.20±1.32 ^{a)}
寿胎丸加味组	10	15.38 ^{b)}	11.20±1.92	9.60±1.35 ^{b)}

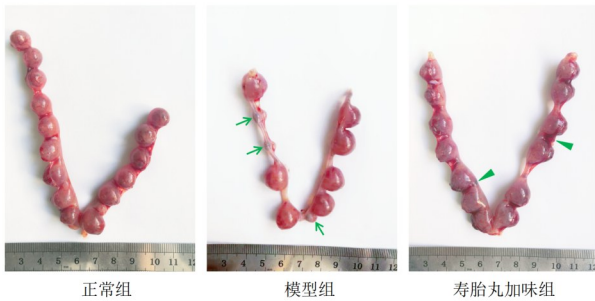
注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组孕鼠子宫蜕膜超微结构比较

图 2 示，正常组孕鼠可见子宫蜕膜细胞膜完整，线粒体和内质网数量丰富，大多结构正常，基质均匀，嵴平行排列。模型组可见子宫蜕膜细胞损伤明显，线粒体明显肿胀，膜局部隆起，基质局部稀疏、溶解，嵴断裂、减少；内质网数量较多且明显扩张，脱颗粒，部分膜破损、空泡变性，分布线粒体周围。寿胎丸加味方组可见子宫蜕膜细胞轻度损伤，细胞器数量丰富，局部聚集；线粒体数量较多，轻度固缩，膜完整，基质浓缩，电子密度高，嵴扩张；粗面内质网数量明显减少、扩张，局部脱颗粒。

2.4 各组孕鼠子宫蜕膜组织中 ERS 相关因子和蜕膜化相关因子 mRNA 表达比较

表 4、表 5 示，与正常组比较，模型组孕鼠子宫蜕膜组织中 ERS 相关因子 *Perk*、*Eif2 α* 、*Grp78* mRNA 表达升高，*Mfn2* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；蜕膜化相关因子 *Wnt4*、*Serping1*、*Gpx3*、*Mt1g* mRNA 表达降低，*Fxyd2*、*Spp1* mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，寿胎丸加味方组孕鼠子宫蜕膜组织中 ERS 相关因子 *Perk*、*Eif2 α* 、*Grp78* mRNA 表达降低，*Mfn2* mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；蜕膜化相关因子 *Wnt4*、*Serping1*、



注：绿色箭头代表吸收胚胎，绿色三角代表血胚。

图 1 各组孕鼠妊娠第 14.5 天子宫形态图

Figure 1 Uterine morphology of pregnant rats in each group on day 14.5 of pregnancy

表 2 各组孕鼠妊娠不同时间体质量比较

Table 2 Comparison of body weights of pregnant rats in each group at different stages of pregnancy (g, $\bar{x}\pm s$)							
组别	鼠数	妊娠第 0.5 天	妊娠第 3.5 天	妊娠第 6.5 天	妊娠第 9.5 天	妊娠第 12.5 天	妊娠第 14.5 天
正常组	10	242.72±28.04	262.32±21.17	278.33±12.45	298.93±21.72	308.62±21.46	305.30±22.46
模型组	10	247.56±18.21	263.37±12.62	271.28±14.82	283.91±12.06 ^{a)}	289.25±23.23 ^{b)}	288.50±21.35 ^{a)}
寿胎丸加味方组	10	245.83±21.47	266.62±15.73	275.42±23.30	294.90±16.34 ^{c)}	303.48±24.26 ^{d)}	302.50±19.18 ^{c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

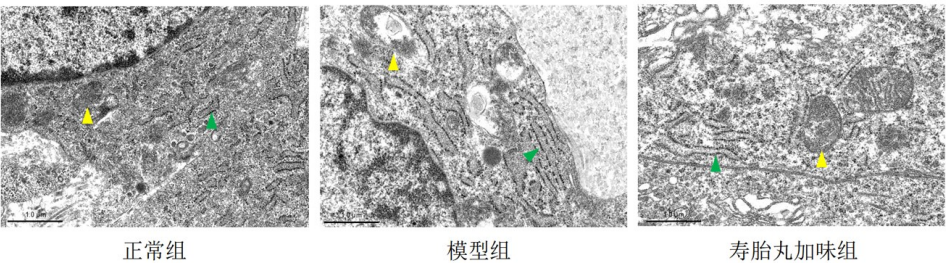


图2 各组孕鼠透射电镜下子宫蜕膜超微结构比较 (×10 000)

Figure 2 Comparison of ultrastructures of uterine decidua under transmission electron microscope among pregnant rats in each group (×10 000)

表4 各组孕鼠子宫蜕膜组织中内质网应激相关因子 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of mRNA expressions of endoplasmic reticulum stress-related factors in uterine decidual tissues of pregnant rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>Perk</i>	<i>Eif2α</i>	<i>Mfn2</i>	<i>Grp78</i>
正常组	10	1.00±0.11	1.00±0.03	1.00±0.07	1.00±0.09
模型组	10	4.86±0.85 ^{a)}	3.21±0.82 ^{a)}	0.28±0.08 ^{a)}	5.41±1.10 ^{a)}
寿胎丸加味方组	10	2.92±0.58 ^{b)}	1.57±0.31 ^{c)}	0.94±0.12 ^{c)}	2.81±0.83 ^{c)}

注: *Perk*, 蛋白激酶 R 样内质网激酶; *Eif2 α* , 真核翻译起始因子 2 α ; *Mfn2*, 线粒体融合蛋白 2; *Grp78*, 葡萄糖调节蛋白 78。

a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

表5 各组孕鼠子宫蜕膜组织中蜕膜化相关因子 mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of mRNA expressions of decidualization-related factors in uterine decidual tissues of pregnant rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>Wnt4</i>	<i>Fxyd2</i>	<i>Serp1g1</i>	<i>Spp1</i>	<i>Gpx3</i>	<i>Mt1g</i>
正常组	10	1.00±0.02	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.04	1.00±0.02	1.00±0.04
模型组	10	0.30±0.05 ^{a)}	4.62±0.67 ^{b)}	0.59±0.27 ^{a)}	2.45±0.35 ^{b)}	0.26±0.02 ^{a)}	0.16±0.05 ^{b)}
寿胎丸加味方组	10	0.95±0.13 ^{c)}	2.83±0.53 ^{c)}	0.84±0.13 ^{c)}	1.73±0.19 ^{d)}	1.05±0.34 ^{c)}	0.37±0.11

注: *Wnt4*, Wnt 家族成员 4 蛋白; *Fxyd2*, 含 FXYD 域离子运输调控因子 2; *Serp1g1*, 丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 G 成员 1; *Spp1*, 分泌型磷蛋白 1; *Gpx3*, 谷胱甘肽过氧化物酶 3; *Mt1g*, 金属硫蛋白 1G。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.05$; d) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

Gpx3 mRNA 表达升高, *Fxyd2*、*Spp1* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组孕鼠子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白水平比较

表6示, 与正常组比较, 模型组孕鼠子宫蜕膜

表6 各组孕鼠子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白水平比较

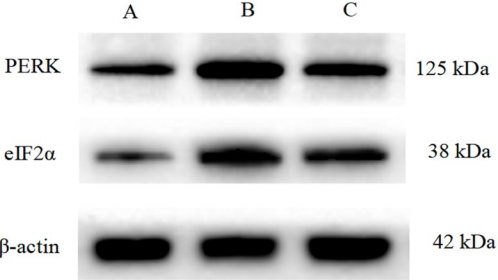
Table 6 Comparison of PERK and eIF2 α protein levels in uterine decidual tissues of pregnant rats in each group ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PERK	eIF2 α
正常组	3	0.76±0.02	0.44±0.05
模型组	3	1.28±0.13 ^{a)}	0.95±0.07 ^{a)}
寿胎丸加味方组	3	0.80±0.06 ^{b)}	0.71±0.04 ^{b)}

注: PERK, 蛋白激酶 R 样内质网激酶; eIF2 α , 真核翻译起始因子 2 α 。

a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

组织中 PERK、eIF2 α 蛋白水平升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 寿胎丸加味方组孕鼠子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白水平降低 ($P < 0.01$)。各组孕鼠子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白电泳图见图 3。



注: A, 正常组; B, 模型组; C, 寿胎丸加味方组; PERK, 蛋白激酶 R 样内质网激酶; eIF2 α , 真核翻译起始因子 2 α 。

图3 各组孕鼠子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoretograms of PERK and eIF2 α proteins in uterine decidual tissues of pregnant rats in each group

3 讨论

本研究采用 DHT 和 INS 联合给药的方法建立 PCOS 高雄-胰岛素抵抗流产大鼠模型, 经前期研究^[3, 10]证实该造模方法成熟有效, DHT 能够模拟 PCOS 患者的高雄激素状态, INS 会诱导大鼠出现胰岛素抵抗、胰岛素敏感性下降等糖代谢异常。本研究结果显示, 模型组孕鼠子宫内胚胎数量明显减少且发育不良、胎盘出血坏死增多、吸收胚胎较多, 胚胎丢失率高于正常组, 平均着床数、平均活胎数低于正常组, 表明造模成功。此外, 模型组孕鼠在妊娠第 9.5、12.5、14.5 天体质量明显减少, 提示代谢异常对大鼠体质量造成了影响。

寿胎丸是补肾安胎的经典方剂, 主治肾虚所致的胎漏、胎动不安。现代研究显示, 寿胎丸在治疗流产方面临床疗效显著^[12], 在小鼠促排卵周期应用寿胎丸有利于提高子宫内膜容受性和妊娠率^[13]。王秀霞根据多年临床经验, 认为 PCOS 伴有高雄激素及胰岛素抵抗的患者多有肾虚兼痰湿阻滞的特点, 肾虚气化无力, 致水湿内停, 聚而生痰, 痰湿阻滞胞宫胞脉, 气血不能下注冲任, 胎元失养, 加之肾虚致精血乏源, 不能濡养胎元, 胎元不固, 则出现流产。据此, 临证主张治以补肾益气、燥湿化痰、固冲安胎为法, 拟定寿胎丸加味方, 即在寿胎丸基础上加杜仲、山药、山萸肉增强补肾固冲安胎之功, 苍术、桔梗燥湿化痰, 麦冬滋阴养血, 党参和黄芪补脾益气, 助气血生化有源。前期研究^[3]证实, 寿胎丸加味方能通过抑制炎症反应来恢复 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠子宫内膜蜕膜化缺陷。

PCOS、胰岛素抵抗、糖尿病及肥胖等疾病状态下存在明显 ERS 反应, 其病理机制为未折叠蛋白反应 (UPR) 信号传导异常^[4, 14]。有研究表明, 诱导妊娠期小鼠子宫肌细胞 ERS 可导致早产发生^[15-16], 而参与 ERS 的信号通路炎症反应的发生及血管生成有关, 这两个过程在子宫内膜蜕膜化过程中都起着关键作用, 可能会导致胚胎丢失等妊娠并发症^[17-18]。本团队前期研究^[6]亦证实, PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗会通过影响妊娠大鼠子宫内膜中蜕膜化相关基因的表达而损害蜕膜化过程, 导致胚胎丢失。综上, PCOS 流产与 ERS 及子宫内膜蜕膜化存在相关性, 蜕膜化过程受损会诱导子宫蜕膜 ERS 反应发生, 从而导致流产。

内质网是各种膜蛋白和分泌蛋白合成以及折

叠、组装、修饰等过程的重要场所^[19]。UPR 能够调节未折叠或错误折叠蛋白质积累所引起的 ERS 状态, 当内质网功能受到干扰而导致蛋白质正确折叠受阻时, UPR 会被激活, 以恢复内质网稳态^[20]。PERK/eIF2 α 信号通路是 ERS 的重要通路, PERK 是 ERS 的关键传感器, 亦是组成 UPR 的跨膜蛋白之一^[21]。蛋白质错误折叠会激活 PERK, UPR 可通过抑制 PERK 和 eIF2 α 而降低内质网蛋白合成并恢复内质网功能^[20]。GRP78 作为 UPR 促生存因子, 可促进蛋白质适当折叠, 维持蛋白质处于折叠状态, 阻止蛋白质中间体在内质网中聚集, 是 ERS 发生的标志物^[22]。Mfn2 作为 PERK 的上游激活因子, 在内质网中大量存在, 可与 PERK 相互作用, Mfn2 缺失后细胞会表现出 PERK 的持续激活状态, 引发 ERS^[23]。蜕膜化相关因子包括 *Wnt4*、*Serping1*、*Gpx3*、*Mt1g*、*Fxyd2*、*Spp1*, 其中 *Wnt4* 在正常蜕膜化、着床和妊娠中具有重要作用^[24], 敲除 *Wnt4* 基因的小鼠表现为蜕膜化缺陷, 胚胎着床失败^[25]。*Fxyd2* 是 Na⁺-K⁺-ATP 酶 (钠钾泵) 的调节亚基, 可调节蜕膜细胞渗透压, 蜕膜化启动后, *Fxyd2* 在子宫内膜间质细胞中表达上调^[26]。*Serping1* 在蜕膜化异常的子宫内膜基质细胞中表达下降^[27]。*Spp1* 是促进子宫-胎儿相互作用的关键调控因子, 腺上皮细胞分泌的 *Spp1* 在整个妊娠期均表达, 是子宫内膜容受性和蜕膜化的代表性基因^[28]。*Gpx3* 是抗氧化酶的重要成员, 用于减少活性氧和维持氧平衡, 诱导 *Gpx3* 基因可恢复受损的蜕膜化过程^[29]。*Mt1g* 对血管内皮生长因子具有刺激作用, 该基因与子宫形态改变和子宫蜕膜化有关^[30]。

本研究结果显示, 模型组孕鼠子宫蜕膜组织中 PERK、eIF2 α 蛋白及 mRNA 表达、*Grp78* mRNA 表达均较正常组升高, 而 *Mfn2* mRNA 表达降低, 提示 PCOS 孕鼠子宫内膜中 PERK/eIF2 α 信号通路被激活, 引发了 ERS。蜕膜化相关因子结果显示, 模型组孕鼠 *Wnt4*、*Serping1*、*Gpx3*、*Mt1g* mRNA 表达较正常组降低, 提示 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗会导致孕鼠子宫蜕膜化受损, 加剧 ERS, 从而造成胚胎丢失, 与前期研究^[6]一致。模型组孕鼠的 *Fxyd2*、*Spp1* mRNA 表达升高, 这可能是由于在生理条件或 PCOS 等疾病状态下子宫内膜蜕膜化过程的起始和维持存在差异造成的。透射电镜结果显示, 模型组孕鼠子宫蜕膜细胞器损伤明显, 如线粒体明显肿胀、膜局部隆起、嵴断裂, 内质网数量较多且明显扩张、脱颗粒, 部分膜破损且空泡变性。以上结果

表明, PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗会激活 PERK/eIF2 α 信号通路, 导致子宫蜕膜发生 ERS, 从而出现子宫蜕膜细胞明显损伤, 内质网亦损伤。

经寿胎丸加味方干预后, 孕鼠胚胎丢失率明显降低、平均活胎数升高, 与前期研究结果^[2]一致; 同时孕鼠子宫蜕膜组织中 ERS 相关因子 PERK、eIF2 α 蛋白及 mRNA 表达降低, *Grp78* mRNA 表达降低, *Mfn2* mRNA 表达升高, 蜕膜化相关因子 *Wnt4*、*Serping1*、*Gpx3* mRNA 表达升高; 此外, 孕鼠子宫蜕膜细胞超微结构明显改善, 细胞轻度损伤, 细胞器数量丰富, 线粒体数量较多, 粗面内质网数量明显减少。上述结果表明, 寿胎丸加味方对 PCOS 流产有效, 其可改善 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠子宫蜕膜细胞和内质网形态受损, 作用机制可能是通过激活 UPR, 从而抑制 PERK/eIF2 α 信号通路, 同时上调蜕膜化相关因子表达, 调节子宫内膜 ERS 状态, 恢复内质网稳态和子宫内膜的正常功能, 从而维持正常妊娠。

综上所述, 寿胎丸加味方可以降低 PCOS 高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠胚胎丢失率, 其作用机制可能为抑制 PERK/eIF2 α 信号通路, 改善子宫内膜 ERS 和蜕膜化受损。需要注意的是, PCOS 导致流产的发病机制复杂, 本研究为 ERS 相关机制的初步探索, 未来将继续深入研究 PERK/eIF2 α 的下游通路以及与凋亡的关系, 为寿胎丸加味方临床应用提供更多实验支持。

参考文献

- [1]BAHRI KHOMAMI M, JOHAM AE, BOYLE JA, et al. Increased maternal pregnancy complications in polycystic ovary syndrome appear to be independent of obesity: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression [J]. *Obes Rev*, 2019, 20(5): 659-674.
- [2]韩晗, 张跃辉, 韩亚鹏, 等. 从铁死亡角度探讨寿胎丸加味方对 PCOS 早期先兆流产患者的疗效机制[J]. *中医药学报*, 2023, 51(10): 67-71.
- [3]郭婷婷, 蒋蒙, 杨怀影, 等. 寿胎丸加味方对多囊卵巢综合征高雄激素-胰岛素抵抗流产模型大鼠炎症反应和子宫内膜容受性相关因子表达的影响[J]. *中医杂志*, 2025, 66(3): 275-282.
- [4]ALEXANDRE-SANTOS B, MARTINS FFTR, DA SILVA GONÇALVES L, et al. Potential role of endoplasmic reticulum stress in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2022, 44(1): 105-112.
- [5]KARAGUL MI, YILDIRIM A, DEMIRAY ASOGLU Z, et al. Endoplasmic reticulum stress in myometrial smooth muscle cells and spontaneous contraction changes in the uterus of dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary syndrome rats [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2025, 83(1): 893-904.
- [6]HU M, ZHANG Y, GUO X, et al. Hyperandrogenism and insulin resistance induce gravid uterine defects in association with mitochondrial dysfunction and aberrant reactive oxygen species production [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(5): E794-E809.
- [7]ZHANG Y, HU M, YANG F, et al. Increased uterine androgen receptor protein abundance results in implantation and mitochondrial defects in pregnant rats with hyperandrogenism and insulin resistance [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 99(10): 1427-1446.
- [8]GAO HJ, ZHU YM, HE WH, et al. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(9): 9179-9186.
- [9]MAHDI AA, RIZVI SH, PARVEEN A. Role of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein responses in health and diseases [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2016, 31(2): 127-137.
- [10]ZHANG Y, ZHAO W, XU H, et al. Hyperandrogenism and insulin resistance-induced fetal loss: evidence for placental mitochondrial abnormalities and elevated reactive oxygen species production in pregnant rats that mimic the clinical features of polycystic ovary syndrome [J]. *J Physiol*, 2019, 597(15): 3927-3950.
- [11]魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [12]马珺卓, 靳梓琪, 王天一, 等. 寿胎丸治疗复发性流产研究进展 [J]. *河北中医*, 2023, 45(6): 1038-1043.
- [13]谭福红, 李楠, 张辉, 等. 寿胎丸对 GnRHa 控制性超排卵着床期小鼠子宫内膜形态及妊娠结局的影响 [J]. *实用妇科内分泌杂志(电子版)*, 2019, 6(6): 64-65, 73.
- [14]VILLALOBOS-LABRA R, SUBIABRE M, TOLEDO F, et al. Endoplasmic reticulum stress and development of insulin resistance in adipose, skeletal, liver, and foeto-placental tissue in diabetes [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 66: 49-61. doi: 10.1016/j.mam.2018.11.001.
- [15]KYATHANAHALLI C, ORGAN K, MORECI RS, et al. Uterine endoplasmic reticulum stress-unfolded protein response regulation of gestational length is caspase-3 and -7-dependent [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(45): 14090-14095.

- [16] SURESH A, SUBEDI K, KYATHANAHALLI C, et al. Uterine endoplasmic reticulum stress and its unfolded protein response may regulate caspase 3 activation in the pregnant mouse uterus [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9) : e75152.
- [17] SOCZEWSKI E, GRASSO E, GALLINO L, et al. Immunoregulation of the decidualization program: focus on the endoplasmic reticulum stress [J]. *Reproduction*, 2020, 159(4):R203–R211.
- [18] BINET F, SAPIEHA P. ER stress and angiogenesis [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4):560–575.
- [19] BRAAKMAN I, BULLEID NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 71–99. doi: 10.1146/annurev-biochem-062209-093836.
- [20] ALMANZA A, CARLESSO A, CHINTHA C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling: from basic mechanisms to clinical applications [J]. *FEBS J*, 2019, 286(2): 241–278.
- [21] SCHRÖDER M, KAUFMAN RJ. Divergent roles of IRE1 α and PERK in the unfolded protein response [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(1):5–36.
- [22] ZHU G, LEE AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(7):1413–1420.
- [23] CAO Y, CHEN Z, HU J, et al. Mfn2 regulates high glucose-induced MAMs dysfunction and apoptosis in podocytes via PERK pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:769213. doi:10.3389/fcell.2021.769213.
- [24] PITZER LM, MORONEY MR, NOKOFF NJ, et al. WNT4 balances development vs disease in gynecologic tissues and women's health [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(7):bqab093.
- [25] PELLEGRINO M, MAIORINO R, SCHONAUER S. WNT4 signaling in female gonadal development [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2010, 10(2):168–174.
- [26] FLOYD RV, WRAY S, QUENBY S, et al. Expression and distribution of Na, K-ATPase isoforms in the human uterus [J]. *Reprod Sci*, 2010, 17(4):366–376.
- [27] GURUNG S, GREENING DW, RAI A, et al. The proteomes of endometrial stromal cell-derived extracellular vesicles following a decidualizing stimulus define the cells' potential for decidualization success [J]. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(10):gaab057.
- [28] GIBSON DA, SIMITSIDELLIS I, COUSINS FL, et al. Intracrine androgens enhance decidualization and modulate expression of human endometrial receptivity genes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19970. doi:10.1038/srep19970.
- [29] YAO S, WEI W, CAO R, et al. Resveratrol alleviates zea-induced decidualization disturbance in human endometrial stromal cells [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 207:111511. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111511.
- [30] HU S, YAO G, WANG Y, et al. Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(12):E2744–E2753.

Effects of Modified *Shoutai Pill* (寿胎丸) on Endoplasmic Reticulum Stress and Decidualization in the Endometrium for Hyperandrogenism and Insulin Resistance-Induced Fetal Loss of Rats with Polycystic Ovary Syndrome

GUO Tingting¹, JIANG Meng¹, HAN Jing², GUO Xiaozhu³, ZHANG Yuehui³

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040; 2. Heilongjiang Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine; 3. The First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of the modified *Shoutai Pill* (寿胎丸) for polycystic ovary syndrome (PCOS) complicated by hyperandrogenism and insulin resistance-induced fetal loss. **Methods**

Thirty SPF-grade female SD rats with regular estrous cycles and in the proestrus phase were caged with 15 SPF-grade male SD rats at a ratio of 2:1 every day at 18:00. On the next day at 8:00, female rats were considered to be on day 0.5 of pregnancy when a large number of sperm and vaginal plugs were observed under a microscope in vaginal smears. A total of 30 pregnant rats were obtained. On day 0.5 of pregnancy, the pregnant rats were randomly divided into normal group, model group, and the modified *Shoutai Pill* group, with 10 rats in each group. From day 0.5 to day 13.5 of pregnancy, the *Shoutai Pill* group was given modified *Shoutai Pill* solution at a dose of 26.6 g/(kg·d) by gavage, twice a day, for 14 consecutive days. Meanwhile, the normal group and the model group were given an equal volume of normal saline by gavage. Except for the normal group, the pregnant rats were intraperitoneally injected with

dihydrotestosterone and insulin from day 7.5 to day 13.5 of pregnancy to establish a PCOS rat model with hyperandrogenism and insulin resistance-induced fetal loss. All pregnant rats were weighed on days 0.5, 3.5, 6.5, 9.5, 12.5, and 14.5 of pregnancy; samples were collected on day 14.5 of pregnancy to observe the embryo status, and the embryo loss rate, average number of implantations, and average number of live fetuses were calculated; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of uterine decidua; Western Blot was performed to detect the protein levels of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) in uterine decidual tissues; qRT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of endoplasmic reticulum stress-related factors (*Perk*, *Eif2 α* , mitofusin 2 [*Mfn2*], glucose-regulated protein 78 [*Grp78*]) and decidualization-related factors Wnt family member 4 [*Wnt4*], FXYD domain-containing ion transport regulator 2 [*Fxyd2*], serpin family G member 1 [*Serping1*], secreted phosphoprotein 1 [*Spp1*], glutathione peroxidase 3 [*Gpx3*], metallothionein 1G [*Mt1g*]) in uterine decidual tissues. **Results** Compared with the normal group, the pregnant rats in the model group showed reduced body weight on days 9.5, 12.5, and 14.5 of pregnancy, an increased embryo loss rate, and decreased average number of implantations and average number of live fetuses, increased PERK and eIF2 α protein and mRNA expressions in uterine decidual tissues, increased mRNA expressions of *Grp78*, *Fxyd2*, and *Spp1*, and reduced mRNA expressions of *Mfn2*, *Wnt4*, *Serping1*, *Gpx3*, and *Mt1g* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the ultrastructure of the uterine decidua showed obvious cellular damage, significant swelling of mitochondria, local bulging of membranes, as well as a relatively large number of endoplasmic reticula with obvious dilation and degranulation. Compared with the model group, the pregnant rats in *Shoutai Pill* group had increased body weight on days 9.5, 12.5, and 14.5 of pregnancy, a decreased embryo loss rate and an increased average number of live fetuses; decreased protein and mRNA expressions of PERK and eIF2 α in uterine decidual tissues, reduced mRNA expressions of *Grp78*, *Fxyd2*, and *Spp1*, and elevated mRNA expressions of *Mfn2*, *Wnt4*, *Serping1*, and *Gpx3* ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the uterine decidual cells showed mild damage, with a relatively large number of mitochondria, slightly pyknotic with intact membranes, but the number of endoplasmic reticula was reduced, with dilation and local degranulation. **Conclusion** The modified *Shoutai Pill* may improve endometrial endoplasmic reticulum stress and impaired decidualization by inhibiting the PERK/eIF2 α signaling pathway, thereby reducing the embryo loss rate and preventing abortion in rats with PCOS complicated by hyperandrogenism and insulin resistance-induced fetal loss.

Keywords polycystic ovary syndrome; hyperandrogenism; insulin resistance; abortion; endoplasmic reticulum stress; decidualization; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; eukaryotic translation initiation factor 2 α ; modified *Shoutai Pill* (寿胎丸)

(收稿日期: 2024-12-04; 修回日期: 2025-04-29)

[编辑: 姜 冰]