

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.19.011

实验研究

化瘀消癥颗粒对低氧状态下滋养细胞增殖、黏附与自噬的影响

袁烁¹, 张家旗², 王宣尹², 邓高丕¹✉

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市机场路 16 号, 510405; 2. 广州中医药大学第一临床医学院

[摘要] **目的** 探讨化瘀消癥颗粒治疗输卵管妊娠的可能作用机制。**方法** 人源妊娠滋养细胞系 HTR-8/SVneo 细胞消化计数后接种至 96 孔板, 分别设空白组、低氧组和化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组, 每组 3 个复孔。低氧组和化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组每孔加入含 400 $\mu\text{mol/L}$ 二氯化钴 (CoCl_2) 0.1 ml 作用 24 h 建立低氧模型。造模后化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组在培养液中分别加入 20 mg/ml 化瘀消癥颗粒母液 50、100、150 μl 分别作用 24 h、48 h、72 h 后, 采用 CCK8 法筛选后续实验药物干预时间。采用同上分组及干预方法, 根据 CCK8 检测结果确定作用时间, 采用细胞划痕实验观察各组细胞迁移情况并计算细胞迁移率, 采用 Western-blot 法检测细胞缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin) 与自噬标志蛋白 (Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 3 蛋白 II (LC3-II) 表达。**结果** 根据 CCK8 法检测结果确定作用时间为 48 h 继续后续实验。与空白组比较, 低氧组细胞迁移率升高, HIF-1 α 、N-cadherin、Beclin-1、LC3-II 蛋白相对表达量均升高, E-cadherin 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。与低氧组比较, 化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组细胞迁移率降低, HIF-1 α 、N-cadherin、Beclin-1、LC3-II 蛋白相对表达量降低, 且呈浓度依赖性 ($P<0.05$); 化瘀消癥颗粒高、低剂量组 E-cadherin 蛋白相对表达量升高, 且化瘀消癥颗粒高剂量组升高更显著 ($P<0.05$)。**结论** 化瘀消癥颗粒可能通过抑制低氧所导致的滋养细胞的增殖、黏附、自噬活性, 而发挥治疗输卵管妊娠的作用, 以高剂量效果更佳。

[关键词] 输卵管妊娠; 低氧; 化瘀消癥颗粒; 细胞增殖; 黏附; 自噬

输卵管妊娠是指受精卵在输卵管着床并发育的一种非正常妊娠, 是异位妊娠最常见的类型, 输卵管妊娠破裂所导致的盆腔内出血是妇产科的危急重症之一。由于输卵管管腔内的结构不能形成完整的蜕膜, 不同于子宫内膜, 胚胎异位着床相较于宫内妊娠处于更加低氧的状态^[1]。低氧水平是调节滋养层移行和侵袭的关键因素, 低氧状态可诱导缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 激活, 进而促进滋养层细胞迁移和侵袭^[2]。化瘀消癥颗粒是经过多年临床研究筛选出来的治疗输卵管妊娠的经验方, 有化瘀消癥、活血杀胚功效, 类方已收入《中医妇科学》^[3]

及《输卵管妊娠中西医结合诊疗指南》^[4], 且目前已作为广州中医药大学第一附属医院治疗输卵管妊娠的院内制剂应用于临床^[5]。前期研究^[6]发现, 化瘀消癥颗粒可能通过调节整合素/黏附斑激酶 (FAK) 通路抑制滋养细胞侵袭和迁移。本研究旨在观察化瘀消癥颗粒对低氧状态下滋养细胞的增殖、黏附与自噬的活跃程度的影响, 以探讨其治疗输卵管妊娠的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人源妊娠滋养细胞系 HTR-8/SVneo 细胞 (美国 ATCC 细胞库, 货号: CRL-3271)。

1.2 药物

化瘀消癥颗粒 (广州中医药大学第一附属医院院内制剂, 批准文号: 粤药制字 Z20170001, 批

基金项目: 国家自然科学基金 (81804134); 广东省自然科学基金 (2018A030313469); 2019 年广东省名中医传承工作室建设项目 (粤中医办函[2019]5 号)

✉ 通讯作者: denggaopi@126.com, (020)36591369

号: 20190801), 组成比例为丹参: 赤芍: 桃仁: 紫草: 天花粉=1: 1: 1: 1: 1.333, 以上五味加水煎煮3次, 每次加8倍量水, 合并煎液, 滤过, 滤液减压浓缩至相对密度1.25~1.35 (60℃), 真空干燥, 粉碎后混匀制粒, 分装为7 g/袋 (相当于生药14 g)。用天平称取化瘀消癥颗粒0.12 g于6 ml 8%胎牛血清中, 0.22 μm 一次性针头过滤器过滤除菌, 配制浓度为20 mg/ml (相当于生药40 mg/ml) 的母液, 分装冻存于-20℃冰箱。

1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司, 批号 21870076); 南美胎牛血清 (Procell 公司, 批号 201909); 胰酶 (广州晶欣生物科技有限公司, 批号 1904190202); ECL 试剂盒 (Thermo 公司, 批号 00713462); CCK8 试剂盒 (日本同仁化学研究所, 批号 CK04); 3 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 批号 5174s)、一抗上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin, 批号 8834s)、一抗神经钙黏蛋白 (N-cadherin, 批号 13116s), CST 公司; 一抗 HIF-1α (Abcam 公司, 批号 ab51608); 一抗自噬标志蛋白 (Beclin-1, 批号 11306-1-AP)、一抗微管相关蛋白轻链 3 蛋白 II (LC3-II, 批号 14600-1-AP), Proteintech 公司; 兔二抗 (批号 125946)、鼠二抗 (批号 126848), Jackson 公司; 二氯化钴 (CoCl₂, Sigma 公司, 批号 232696)。

CO₂ 培养箱 (NBS 公司, 型号 CO48R-230); 超净工作台 (东莞美维净化设备有限公司, 型号 LAD-LCJT-1B); 细胞计数仪 (美国 Cellometer 公司, 型号 T4-203-0498); 常温离心机 (型号 SC-3610)、高速冷冻离心机 (型号 HC-2062), 科大创新股份有限公司中佳分公司; 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司, 型号 534138); 凝胶成像系统 (型号 Gel Doc XR+), 电泳仪 (型号 1645050)、转膜仪 (型号 1704150), 美国 Bio-Rad 公司; FC 型酶标仪 (美国 Thermo 公司, 型号 Multiskan FC)。

1.4 细胞培养

选取生长状态良好的 HTR-8/SVneo 细胞, 待细胞融合度达 80%~90% 时进行细胞传代, PBS 清洗细胞, 轻轻地摇晃后弃 PBS, 加入含 EDTA 的 0.25% 胰酶, 显微镜下观察细胞变圆、透亮, 加入完全培养基终止消化, 反复吹打, 将细胞悬液离心、重悬, 调整细胞浓度并计数, 每隔 24~48 h 更换培养基。

1.5 实验分组及干预方法

取对数生长期的 HTR-8/SVneo 细胞消化计数后接种至 96 孔板 (1×10⁴/孔), 实验分为空白组、低氧组和化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组, 每组 3 个复孔。待细胞贴壁 24 h 后, 空白组继续加入培养基培养, 低氧组和化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组每孔加入含 400 μmol/L 的 CoCl₂ 0.1 ml 作用 24 h 造成低氧环境^[7]。根据预实验结果, 化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组分别在培养液中加入 20 mg/ml 化瘀消癥颗粒母液 50、100、150 μl, 使化瘀消癥颗粒低、中、高剂量组化瘀消癥颗粒浓度分别为 1、2、3 mg/ml, 空白组和低氧组正常培养。

1.6 CCK8 法检测各组不同时间点滋养细胞增殖情况

分别作用 24 h、48 h、72 h 后, 每孔加入 10 μl CCK8, 用 FC 型酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度 (OD) 值。实验重复 3 次, 细胞增殖率= [(药物组 OD 值-低氧组 OD 值)/(空白组 OD 值-低氧组 OD 值)] ×100%。

1.7 细胞划痕实验检测细胞迁移情况

取对数生长期的细胞消化计数后接种至 6 孔板 (5×10⁵/孔), 每组 3 个复孔, 待各组细胞融合度约达 90%, 用无菌移液枪头垂直用力划痕, PBS 洗去划下细胞, 再根据实验分组 (同 1.5) 进行低氧造模、给药。显微镜下拍照各组细胞 0 h 与根据 1.6 确定的药物干预时间干预后的细胞迁移情况, 计算各组干预后的细胞迁移率。细胞迁移率= (0 h 划痕面积-干预后划痕面积)/0 h 划痕面积×100%。

1.8 Western-blot 法检测细胞 HIF-1α、E-cadherin、N-cadherin、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达

取对数生长期的细胞消化计数后接种至 6 孔板 (1×10⁵/孔), 实验分组及干预同 1.5, 加药后培养 48 h, 上样, SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜 (湿转)、封闭, 加入一抗 (1: 1000), 4℃孵育过夜, 加入二抗 (1: 1000), 配制 ECL 化学发光底物与膜共孵育 1 h, 洗膜, 化学发光, 凝胶成像显影, 分析蛋白条带灰度值, 计算 HIF-1α、E-cadherin、N-cadherin、Beclin-1、LC3-II 蛋白相对表达量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理和分析, 本研究计量资料均符合正态分布且方差齐, 以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间细胞增殖率比较

表 1 示, 与空白组同时间比较, 低氧组各时间点细胞增殖率升高, 且随着时间的延长细胞增殖率逐步升高 ($P<0.05$); 与低氧组同时间比较, 化疗消癌颗粒低、中、高剂量组各时间点细胞增殖率均降低 ($P<0.05$); 与化疗消癌颗粒高剂量组同时间比较, 化疗消癌颗粒低、中剂量组各时间点细胞增殖率升高 ($P<0.05$); 与化疗消癌颗粒中剂量组同时间比较, 化疗消癌颗粒低剂量组各时间点细胞增殖率升高 ($P<0.05$)。化疗消癌颗粒各剂量组细胞 48 h、72 h 时细胞增殖率均较前一时间点升高 ($P<0.05$)。根据 CCK8 结果, 细胞既要有增殖趋势, 但细胞增殖程度不能过于明显, 故选择 48 h 为后续实验的干预时间。

2.2 各组干预 48 h 后细胞迁移率比较

表 2 示, 与空白组比较, 低氧组细胞迁移率升高 ($P<0.05$); 与低氧组比较, 化疗消癌颗粒低、中、高剂量组细胞迁移率降低 ($P<0.05$); 与化疗消癌颗粒高剂量组比较, 化疗消癌颗粒低、中剂量组细胞迁移率升高 ($P<0.05$); 与化疗消癌颗粒中剂量组比较, 化疗消癌颗粒低剂量组细胞迁移率升高 ($P<0.05$)。

表 2 各组干预 48 h 后滋养细胞迁移率比较 (%) ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	迁移率
空白组	3	76.58±4.53
低氧组	3	89.37±4.70 ^{a)}
化疗消癌颗粒低剂量组	3	51.36±5.29 ^{b) c) d)}
化疗消癌颗粒中剂量组	3	45.49±3.91 ^{b) c)}
化疗消癌颗粒高剂量组	3	30.64±6.45 ^{b)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与低氧组比较, $P<0.05$; c) 与化疗消癌颗粒高剂量组比较, $P<0.05$; d) 与化疗消癌颗粒中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组 HIF-1 α 、E-cadherin、N-cadherin、Beclin-1、LC3- II 蛋白表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 低氧组 HIF-1 α 、N-cadherin、Beclin-1、LC3- II 蛋白相对表达量均升高, E-cadherin 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。与低氧组比较, 化疗消癌颗粒低、中、高剂量组细胞 HIF-1 α 、N-cadherin、Beclin-1、LC3- II 蛋白相对表达量均降低 ($P<0.05$), 且化疗消癌颗粒高剂量组低于化疗消癌颗粒低、中剂量组, 化疗消癌颗粒中剂量组低于化疗消癌颗粒低剂量组 ($P<0.05$); 化疗消癌颗粒中剂量组 E-cadherin 蛋白相对表达量降低, 而化疗消癌颗粒低、高剂量组升高, 且化疗消癌颗粒高剂量组升高更显著 ($P<0.05$)。各组滋养细胞 HIF-1 α 、E-cadherin、N-cadherin、Beclin-1、LC3- II 蛋白电泳图见图 1。

表 1 各组不同时间滋养细胞增殖率比较 (%) ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	24 h	48 h	72 h
空白组	3	0.457±0.025	0.510±0.012 ^{d)}	0.585±0.017 ^{d)}
低氧组	3	0.624±0.013 ^{a)}	0.716±0.035 ^{a) c)}	0.821±0.022 ^{a) c)}
化疗消癌颗粒低剂量组	3	0.405±0.020 ^{b) c) d)}	0.352±0.028 ^{b) c) d) e)}	0.297±0.018 ^{b) c) d) e)}
化疗消癌颗粒中剂量组	3	0.356±0.021 ^{b) c)}	0.300±0.013 ^{b) c) e)}	0.235±0.015 ^{b) c) e)}
化疗消癌颗粒高剂量组	3	0.307±0.017 ^{b)}	0.255±0.009 ^{b) e)}	0.185±0.009 ^{b) e)}

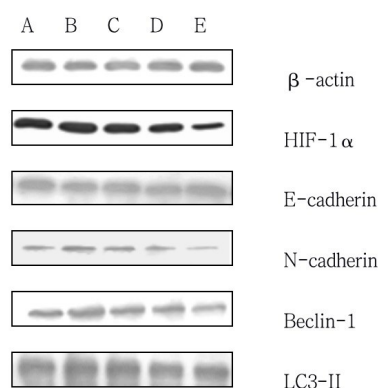
注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; b) 与低氧组同时间比较, $P<0.05$; c) 与化疗消癌颗粒高剂量组同时间比较, $P<0.05$; d) 与化疗消癌颗粒中剂量组同时间比较, $P<0.05$; e) 与本组前一时间点比较, $P<0.05$ 。

表 3 各组滋养细胞 HIF-1 α 、E-cadherin、N-cadherin、Beclin-1、LC3- II 蛋白相对表达量比较 (β -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	HIF-1 α	E-cadherin	N-cadherin	Beclin-1	LC3- II
空白组	3	2.248±0.004	1.284±0.004	0.379±0.003	0.734±0.001	1.798±0.020
低氧组	3	2.412±0.000 ^{a)}	1.220±0.002 ^{a)}	0.502±0.001 ^{a)}	1.021±0.002 ^{a)}	2.048±0.010 ^{a)}
化疗消癌颗粒低剂量组	3	2.108±0.002 ^{b) c) d)}	1.367±0.005 ^{b) c) d)}	0.393±0.002 ^{b) c) d)}	0.788±0.003 ^{b) c) d)}	1.846±0.011 ^{b) c) d)}
化疗消癌颗粒中剂量组	3	1.599±0.001 ^{b) c)}	1.196±0.001 ^{b) c)}	0.242±0.001 ^{b) c)}	0.661±0.000 ^{b) c)}	1.410±0.004 ^{b) c)}
化疗消癌颗粒高剂量组	3	0.943±0.001 ^{b)}	1.439±0.006 ^{b)}	0.096±0.002 ^{b)}	0.433±0.000 ^{b)}	1.265±0.005 ^{b)}

注: HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; E-cadherin, 上皮细胞钙黏蛋白; N-cadherin, 神经钙黏蛋白; Beclin-1, 自噬标志蛋白; LC3- II, 微管相关蛋白轻链 3 蛋白 II。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与低氧组比较, $P<0.05$; c) 与化疗消癌颗粒高剂量组比较, $P<0.05$; d) 与化疗消癌颗粒中剂量组比较, $P<0.05$ 。



注: A, 空白组; B, 低氧组; C, 化癥消癥颗粒低剂量组; D, 化癥消癥颗粒中剂量组; E, 化癥消癥颗粒高剂量组。

β-actin, β 肌动蛋白; HIF-1α, 缺氧诱导因子 1α; E-cadherin, 上皮细胞钙黏蛋白; N-cadherin, 神经钙黏蛋白; Beclin-1, 自噬标志蛋白; LC3-II, 微管相关蛋白轻链 3 蛋白 II。

图 1 各组滋养细胞 HIF-1α、E-cadherin、N-cadherin、Beclin-1、LC3-II 蛋白电泳图

3 讨论

输卵管妊娠是发生在早孕阶段的妊娠相关疾病。正常妊娠期间, 滋养细胞一直处于氧环境动态变化的过程中, 妊娠早期胚胎处于局部生理性低氧环境^[8]。低氧是细胞事件的关键调节因子, 最终可引起滋养细胞的氧化应激反应^[9]。在低氧浓度下许多细胞会失去存活能力, 而滋养细胞却能在低氧浓度下形成一个严格的时空控制, 形成多因素调节事件以保证妊娠阶段的维系^[8]。相较于宫内妊娠, 输卵管管腔的低氧状态更为明显^[1], 着床部位严重缺氧, 可能是促使滋养细胞的生物活性增强进而导致着床部位受侵袭而破裂, 出现腹腔内出血等危急重症的原因之一^[10]。

中医学认为, 输卵管妊娠的主要病机为冲任不畅、少腹血瘀^[3], 异位胎元阻滞于胞宫以外的胞脉或胞络部位, 与瘀血相搏, 阻于妇人少腹而为癥。胎元虽异位但亦不同于寻常之瘀, 胎元本有生长发育之象, 故治疗上需在活血化瘀基础上配伍散结、消癥、杀胚之品。化癥消癥颗粒中丹参活血祛瘀、止痛消癥, 赤芍行瘀止痛、活血消肿, 桃仁活血化瘀、润肠通便, 紫草、天花粉并用以杀胚。现代药理研究发现, 紫草素可抑制滋养细胞的增殖^[11], 天花粉蛋白通过作用于胎盘绒毛的合体滋养层细胞, 催化细胞内核糖体失活, 阻碍细胞内蛋白合成, 导致绒毛变性、坏死^[12]。本研究结果表明, 低氧状态下滋养细胞增殖率升高, 且表现为时间依赖性, 这与其他研究结果^[13]一致。低氧状态下化

癥消癥颗粒不同剂量对滋养细胞的增殖呈抑制状态, 表现为时间与浓度依赖性。同时, 低氧状态增加了滋养细胞的迁移率, 而化癥消癥颗粒可浓度依赖地逆转其迁移力, 继而可减轻对着床部位的侵蚀。

现代研究发现, HIF-1α 在不同的氧浓度下激活基因转录, 在妊娠早期表达升高, 对早期滋养层分化的生物学效应至关重要^[9]。本研究结果表明, 由 CoCl₂ 形成的化学低氧状态下, 滋养细胞中 HIF-1α 蛋白表达量增加, 证实本实验在 HTR-8/SVneo 细胞中诱导低氧模型是成功的。而化癥消癥颗粒各剂量组均可逆转滋养细胞由于低氧所引起的 HIF-1α 蛋白的上调, 且呈浓度依赖性, 说明化癥消癥颗粒可能通过改变 HIF-1α 所介导的下游效应而对滋养细胞活性产生影响。

钙黏蛋白 (cadherin) 是跨膜蛋白介导的钙依赖性细胞-细胞黏附, 钙黏蛋白将细胞外环境与细胞骨架相连接, 并通过其保守的胞浆结构域与连环蛋白、细胞因子相互作用, 参与细胞信号的传导^[14]。生理低氧环境有利于形成细胞滋养层外壳, 这层外壳与子宫内膜接触, 因上皮-间充质转化, 形成黏附而获得侵袭潜力^[15]。E-cadherin 与 N-cadherin 分别作为上皮与间充质黏附分子标志物, 其介导的滋养层-内皮细胞相互作用, 与细胞侵袭性及对母体螺旋动脉的网络形成有密切的关系^[16]。下调 E-cadherin 表达可促进滋养细胞的入侵与扩散^[17], 上调 N-cadherin 表达可作为滋养细胞侵袭力增强的途径之一^[18]。本研究结果表明, 低氧条件下可使 E-cadherin 表达下调而 N-cadherin 表达上调, 与本研究划痕实验的细胞迁移率结果相互印证; 而化癥消癥颗粒低、高剂量组可逆转 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达, 提示化癥消癥颗粒具有抑制滋养细胞侵袭力的作用。

自噬是一种降解过程, 是细胞对环境应激源作出的反应, 是对细胞内物质进行周转的重要过程。自噬在滋养层细胞的正常发育和功能中起着重要的作用, 在妊娠期受到精确的调控^[19], Beclin-1 与 LC3 均可在早孕期或孕晚期胎盘中被检测到, Beclin-1 参与自噬的早期阶段, 而 LC3 是最终自噬体形成的标志物^[20]。早孕期滋养细胞出现异常持续侵袭状态可能与缺氧相关, 持续缺氧状态诱导的自噬障碍可使 Beclin-1 蛋白表达升高, 继而导致胎盘滋养细胞的侵袭性增强^[21], 进而引发各类病理妊娠状态。本研究结果显示, 低氧状态下滋养细胞中的 Beclin-1、

LC3-II 蛋白表达升高, 而化瘀消癥颗粒各剂量组均可降低 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达, 且呈浓度依赖性, 阐明其可能通过干预自噬过程, 调整低氧所致的自噬失调而诱导的滋养细胞与异位着床部位的母胎串扰, 以维持细胞内稳态及功能。

综上, 化瘀消癥颗粒可能通过逆转由于低氧所导致的滋养细胞增殖、黏附、自噬活性, 进而发挥治疗输卵管妊娠的作用。

参考文献

- [1] ZOU S, LI X, FENG Y, et al. Comparison of the diagnostic values of circulating steroid hormones, VEGF-A, PIGF, and ADAM12 in women with ectopic pregnancy [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 44. doi: 10.1186/1479-5876-11-44.
- [2] ZHAN Z, PENG YUN L, YAN W, et al. Hypoxia-induced expression of CXCR4 favors trophoblast cell migration and invasion via the activation of HIF-1 α [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3):1508-1516.
- [3] 罗颂平, 刘雁峰. 中医妇科学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 164-170.
- [4] 中国中西医结合学会妇产科专业委员会. 输卵管妊娠中西医结合诊疗指南[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(2):172-180.
- [5] 邱斌, 廖慧妍, 李安, 等. 化瘀消癥颗粒治疗早期输卵管妊娠的临床疗效观察[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(2):209-214.
- [6] 孙建华, 郅洁, 刘开飞, 等. 化瘀消癥颗粒对人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo 侵袭迁移的影响[J]. 中成药, 2019, 41(11):2761-2765.
- [7] CHENGJIN H, NAN S, PING X, et al. Hypoxia-induced downregulation of SRC-3 suppresses trophoblastic invasion and migration through inhibition of the AKT/mTOR pathway: implications for the pathogenesis of preeclampsia [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):10349.
- [8] WAKELAND AK, FRANCESCA S, MATTEO M, et al. Hypoxia directs human extravillous trophoblast differentiation in a hypoxia-inducible factor-dependent manner [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(4):767-780.
- [9] CHANGDAI G, SOHAE P, JIN S, et al. Altered expression of ADM and ADM2 by hypoxia regulates migration of trophoblast and HLA-G expression [J]. *Biol Reprod*, 2021, 104(1):159-169.
- [10] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 75.
- [11] WANG Y, ZHU F, ZHANG Y, et al. Shikonin suppresses trophoblast cell growth via regulation of GLI1, and p62 mediated caspase 8 activation [J]. *Reprod Toxicol*, 2020, 95:104-112. doi:10.1016/j.reprotox.2020.05.011.
- [12] APPEL S, ANKERNE J, APPEL J, et al. CNN3 regulates trophoblast invasion and is upregulated by hypoxia in BeWo cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e103216.
- [13] SENO K, TANIKAWA N, TAKAHASHI H, et al. Oxygen concentration modulates cellular senescence and autophagy in human trophoblast cells [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 79(6):e12826.
- [14] LI Y, LV Z, ZHANG S, et al. Genetic fate mapping of transient cell fate reveals N-Cadherin activity and function in tumor metastasis [J]. *Dev Cell*, 2020, 54(5):593-607.
- [15] BURTON GJ, CINDROVA-DAVIES T, YUNG HW, et al. Oxygen and development of the human placenta [J]. *Reproduction*, 2020, 161(1):F53-F65.
- [16] MULTHAUP A, HUPPERTZ B, GÖHNER C, et al. N-cadherin knockdown leads to disruption of trophoblastic and endothelial cell interaction in a 3D cell culture model: New insights in trophoblast invasion failure [J]. *Cell Adh Migr*, 2018, 12(3):259-270.
- [17] SONAM V, AMANDEEP KK, RAHUL PAL, et al. BST2 regulates interferon gamma-dependent decrease in invasion of HTR-8/SVneo cells via STAT1 and AKT signaling pathways and expression of E-cadherin [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):19951-19963.
- [18] YAN L, CHRISTIAN K, JUNG-CHIEN C, et al. Activin A, B, and AB increase human trophoblast cell invasion by up-regulating N-cadherin [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(11):e2216-e2225.
- [19] BASTIDA-RUIZ D, YART L, WUILLEMIN C, et al. The fine-tuning of endoplasmic reticulum stress response and autophagy activation during trophoblast syncytialization [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):651.
- [20] CHIFENTI B, LOCCI MT, LAZZEERI G, et al. Autophagy-related protein LC3 and Beclin-1 in the first trimester of pregnancy [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2013, 40(1):33-37.
- [21] LI M, WU X, AN P, et al. Effects of resveratrol on autophagy and the expression of inflammasomes in a placental trophoblast oxidative stress model [J]. *Life Sci*, 2020, 256:117890. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117890.

(下转第 1731 页)