

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.10.013

寿胎丸对复发性流产模型小鼠胚胎有氧糖酵解关键酶及相关蛋白表达的影响

梁潇¹, 唐思玲¹, 宋亚静¹, 李丹丹¹, 段彦苍^{1,2}, 杜惠兰^{1,2}✉

1. 河北中医学院中西医结合学院, 河北省石家庄市桥西区新石南路326号, 050091; 2. 河北省中西医结合生殖疾病协同创新中心

[摘要] **目的** 探讨寿胎丸治疗复发性流产(RSA)的可能作用机制。**方法** 雌性CBA/J小鼠随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组和寿胎丸组, 每组14只。正常组雌性CBA/J小鼠与雄性BALB/c小鼠合笼交配; 其余3组为雌性CBA/J小鼠与雄性DBA/2小鼠合笼交配建立RSA小鼠模型。寿胎丸组雌鼠从合笼前14天到妊娠第6天或第14天给予寿胎丸1.66 g/(kg·d)灌胃; 地屈孕酮组妊娠第1天到妊娠第6天或第14天给予地屈孕酮片0.33 g/(kg·d)灌胃, 正常组和模型组雌鼠给予0.4 ml蒸馏水灌胃。各组在妊娠第6天时随机选取8只雌鼠取胚胎组织, 检测胚胎组织糖酵解关键酶己糖激酶2(HK2)、M2-型丙酮酸激酶(PKM2)、乳酸脱氢酶A(LDHA)mRNA和蛋白表达, 检测葡萄糖转运体1(GLUT1)、单羧酸转运体4(MCT4)和G蛋白偶联受体81(GPR81)蛋白表达水平。剩余6只雌鼠在妊娠第14天注射台盼蓝染色剂, 计算胚胎丢失率。**结果** 妊娠第14天, 正常组雌鼠胚胎丢失率为6.12%, 模型组小鼠胚胎丢失率为33.33%, 差异有统计学意义($P<0.05$); 地屈孕酮组和寿胎丸组胚胎丢失率较模型组显著降低, 分别为12.24%和14.29% ($P<0.05$)。妊娠第6天, 与正常组比较, 模型组小鼠胚胎HK2、PKM2和LDHA mRNA及蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), GLUT1、MCT4和GPR81蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 地屈孕酮组除LDHA蛋白表达外其余各指标表达水平均显著升高 ($P<0.05$), 寿胎丸组除PKM2 mRNA表达外其余各指标亦均升高 ($P<0.05$); 与地屈孕酮组比较, 寿胎丸组小鼠胚胎MCT4蛋白表达水平升高, GPR81蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。**结论** 寿胎丸可能通过促进胚胎有氧糖酵解关键酶及相关蛋白的表达, 从而提高有氧糖酵解水平, 降低胚胎丢失率, 进而发挥其保胎作用。

[关键词] 复发性流产; 寿胎丸; 有氧糖酵解; 胚胎丢失率

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是一种常见的妊娠并发症, 定义为育龄期妇女在妊娠24周之前连续发生两次或两次以上流产^[1]。美国生殖医学会2020年发布的流行病学资料显示, RSA发生率占妊娠总数的2%~5%^[2]。RSA的防治已成为国内外生殖领域研究的重点, 并引起了世界各国专家的广泛关注。RSA可归属于中医学“滑胎”“数堕胎”范畴, 具有“屡孕屡堕,

应期而堕”的特点。清代著名医家张锡纯认为“在女子则冲与血室为受胎之处”, 并提出“男女生育皆赖肾脏作强, 肾旺自能荫胎”^[3], 创制寿胎丸补肾安胎以治疗滑胎。既往研究表明, 寿胎丸治疗RSA及先兆流产有较好的疗效^[4-5]。RSA的病因复杂多样, 目前已知的病因可以总结为遗传、解剖、内分泌、免疫、环境、感染、精神心理、男方特有因素八大类, 但临床尚有40%~60%的患者病因不明确^[6-7]。在早期胚胎发育过程中, 快速的细胞增殖和囊胚腔形成需要大量的能量和氧气。在胚胎植入过程中, 高水平的有氧糖酵解(Warburg效应)导致乳酸在细胞外微环境中积累已成为哺乳动

基金项目:国家自然科学基金(U21A20403);河北省创新能力提升计划(20567624H);河北中医学院研究生创新资助项目(CXZZ-BS2022094)

✉ 通讯作者:duhuilan@hebcm.edu.cn

物囊胚公认的代谢特征^[8]。胚胎产生高乳酸，着床时母胎界面相对缺氧，在胚胎周围形成高乳酸/低 pH 的微环境，促进滋养层迁移、侵袭等胚胎着床过程^[9]。因此，本研究拟从有氧糖酵解引起的母胎界面独特微环境角度，深入探讨寿胎丸促进胚胎着床的可能分子机制。本研究经河北中医学院伦理委员会批准（批准号：DWLL2021089）。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 CBA/J 小鼠 56 只，8 周龄，体质量 20~25 g，实验动物许可证号：SCXK（辽）2017-0011；雄性 DBA/2 小鼠 21 只，10 周龄，体质量 35~40 g，实验动物许可证号：SCXK（京）2019-0018；雄性 BALB/c 小鼠 7 只，10 周龄，体质量 35~40 g，实验动物许可证号：SCXK（辽）2020-0001。小鼠均购自辽宁长生生物科技有限公司。

1.2 药物

寿胎丸组成：菟丝子 20 g、桑寄生 10 g、续断 10 g、阿胶 10 g。中药购自石家庄乐仁堂医药有限公司，水煎煮 2 次，制备浓缩药液至含生药浓度 0.75 g/ml。将地屈孕酮片（雅培贸易有限公司，批号：356375，规格：10 mg/片）研磨成粉末，每 13 mg 粉末溶于 6 ml 蒸馏水中，得到浓度为 2.17 g/L 的地屈孕酮溶液。

1.3 主要试剂及仪器

己糖激酶 2（HK2）抗体（批号：ab209847）、乳酸脱氢酶 A（LDHA）抗体（批号：ab52488）、葡萄糖转运体 1（GLUT1）抗体（批号：ab115730），英国 Abcam 公司；M2-型丙酮酸激酶（PKM2）抗体（批号：15822-1-AP）、单羧酸转运体 4（MCT4）抗体（批号：22787-1-AP）、 β -actin 抗体（批号：81115-1-RR）、HRP 偶联山羊抗兔二抗（批号：SA00001-2），美国 Proteintech 公司；G 蛋白偶联受体 81（GPR81）抗体（美国 Novusbio 公司，批号：NLS2095）；MicroElute Total RNA 试剂盒（广州 OMEGA 公司，批号：R6831-02）；MonScript™ RTIII ALL-in-One Mix with dsDNase 逆转录试剂盒（批号：MR05101）、MonAmp™ ChemoHS qPCR Mix 试剂盒（批号：MQ00401），苏州 Monad 公司；ECL 发光液（美国 Millipore 公司，批号：P90720）；高效 RIPA 裂解液（北京索莱宝生物科技有限公司，批号：R0010）；0.3% 戊巴比妥溶液（德国 Sigma 公司，批号：B0500）；0.4% 台盼蓝染液（北京索

莱宝生物科技有限公司，批号：C0040）。

高压蒸汽灭菌器（日本 SANYO 公司，型号：MLS-3750）；实时荧光定量 PCR 仪（型号：7500 Fast）、冷冻高速离心机（型号：Fresco 21）、分光光度计（型号：NanoDrop 2000），美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Western Blot 凝胶电泳系统（美国 Bio-Rad 公司，型号：Gel Logic 100）；化学发光成像系统（美国 GE 公司，型号：Image Quant LAS 4000）。

1.4 动物造模、分组及给药

适应性喂养 1 周后，将动情周期规律的雌性小鼠用随机数字表法分为正常组、模型组、地屈孕酮组和寿胎丸组，每组 14 只。正常组建立正常妊娠模型：雌性 CBA/J 小鼠与雄性 BALB/c 小鼠 2:1 笼内交配。其余 3 组参考文献^[10]建立 RSA 小鼠模型：雌性 CBA/J 小鼠与雄性 DBA/2 小鼠交配。阴道涂片显示大量精子，并结合观察阴道口出现乳白色、固态胶状物即阴道栓作为妊娠第 1 天^[10]。

参考《中药药理研究方法学》^[11]和前期研究结果^[12]，寿胎丸组雌鼠给予 2 倍临床等效剂量的寿胎丸 1.66 g/（kg·d）灌胃，地屈孕酮组给予临床等效剂量的地屈孕酮片 0.33 g/（kg·d）灌胃，正常组和模型组雌鼠给予 0.4 ml 蒸馏水灌胃。寿胎丸组小鼠采用随机数字表法选取 8 只雌鼠从合笼前 14 天到妊娠第 6 天连续给药，剩余 6 只雌鼠从合笼前 14 天至妊娠第 14 天连续给药；地屈孕酮组采用随机数字表法选取 8 只雌鼠从妊娠第 1 天到妊娠第 6 天连续给药，剩余 6 只雌鼠从妊娠第 1 天到妊娠第 14 天连续给药。正常组和模型组雌鼠采用随机数字表法选取 8 只从合笼前 14 天到妊娠第 6 天连续灌胃蒸馏水，剩余 6 只雌鼠从合笼前 14 天到妊娠第 14 天连续灌胃蒸馏水。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 台盼蓝染色法检测胚胎丢失率 将 6 只妊娠 14 天雌鼠称重，采用 0.3% 戊巴比妥溶液 0.2 ml/10 g 腹腔注射进行麻醉，然后经尾静脉注射 0.4% 台盼蓝染液，持续 30 min。小鼠脱颈椎处死，妊娠子宫离体后，自子宫角处钝性撕开子宫壁，观察妊娠情况。台盼蓝染色显示着床部位呈紫蓝色，有色斑但胚胎体积或正常或缩小，色呈黑褐或瘀血状为丢失胚胎。观察妊娠总数，计算胚胎丢失率（%）= 胚胎丢失数/着床染色数×100%。

1.5.2 qRT-PCR 法检测胚胎组织 HK2、PKM2、LDHA mRNA 表达 将 8 只妊娠第 6 天雌鼠取胚胎组织，采用 MicroElute Total RNA 试剂盒用于提取

胚胎组织中的总 RNA, 使用分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度。以 RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。按照 MonAmp™ ChemoHS qPCR Mix 试剂盒说明书配制最终反应体系, 于 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪上进行反应, PCR 热循环参数为 95 ℃, 10 min 进行预变性, 然后进行 40 个循环反应: 95 ℃, 10 s; 60 ℃, 30 s。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。 β -actin: 上游 GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG, 下游 ATGCCACAGGATTCCATACC, 长度 117 bp; HK2: 上游 TGCGAATATGTTGCCTCATCTTGG, 下游 TAC-TGCTCCTCCTCCTCCTCCTC, 长度 143 bp; PKM2: 上游 ACCATCAAGAATGTCCGTGAAGCC, 下游 GT-ATCCAGAGCCACCGCAACAG, 长度 83 bp; LDHA: 上游 AGGGCTTCTAGGCAGACCACAC, 下游: CA-CACTAACCAGGTCACCACTACAC, 长度 143 bp。每组待测样品设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。对结果中的 CT 值进行数据处理, 以 β -actin 为内参照基因, 采用 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因表达的相对定量值。

1.5.3 Western blot 法检测胚胎组织 HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4 和 GPR81 蛋白表达 8 只妊娠第 6 天雌鼠的胚胎组织中加入 RIPA 裂解液, 剪碎胚胎, 研磨杵研磨以充分裂解组织, 取上清。Bradford 法测蛋白质浓度后按 4:1 的比例加入上样缓冲液混匀, 沸水浴 10 min 进行蛋白变性。等蛋白上样进行电泳及转膜, 浓缩胶电压为 75 V, 时间为 30 min, 分离胶电压为 120 V, 直到溴酚蓝条带跑至分离胶的最低处关闭电源。半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 电压为 25 V, 时间为 30 min。封闭液中封闭 2 h, 洗膜后一抗孵育, HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4 和 GPR81 抗体浓度分别为 1:1000、1:2000、1:5000、1:5000、1:2000、1:1000, 4 ℃过夜。次日, TBST 洗膜, 室温孵育二抗 2 h, 二抗稀释比例为 1:2000。避光条件下, 加 ECL 发光液于膜的蛋白面, 反应 1 min 后置于全自动化学凝胶成像仪中进行蛋白显影。采用 Image J 1.8.0.345 软件对条带的光密度值进行分析, 以 β -actin 作为内参对照。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 进行统计分析。计数资料以百分比表示, 采用 χ^2 检验。计量资料符合正态分布采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐用单因素方差分析进行检验, 组间两两比较用 Bonferroni 法或

Tukey 法; 如方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 组间两两比较, 采用 Bonferroni 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组雌鼠妊娠第 14 天胚胎情况比较

表 1 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, 地屈孕酮组和寿胎丸组小鼠胚胎丢失率降低 ($P<0.05$); 地屈孕酮组与寿胎丸组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组雌鼠妊娠第 14 天胚胎情况比较

Table 1 Comparison of embryo conditions on the 14th day of pregnancy in female rats in each group

组别	鼠数	着床染色数/个	胚胎存活数/个	胚胎丢失数/个	胚胎丢失率/%
正常组	6	49	46	3	6.12
模型组	6	48	32	16	33.33
地屈孕酮组	6	49	43	6	12.24
寿胎丸组	6	49	42	7	14.29

2.2 各组雌鼠妊娠第 6 天胚胎组织 HK2、PKM2、LDHA mRNA 相对表达量比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠胚胎 HK2、PKM2、LDHA mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 地屈孕酮组小鼠胚胎 HK2、PKM2、LDHA mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$), 寿胎丸组小鼠胚胎 HK2、LDHA mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$); 地屈孕酮组与寿胎丸组比较, HK2、PKM2、LDHA mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组雌鼠妊娠第 6 天胚胎组织 HK2、PKM2、LDHA mRNA 相对表达量比较

Table 2 Comparison of relative mRNA expression levels of HK2, PKM2, and LDHA in embryonic tissues of female mice on the 6th day of pregnancy in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	HK2	PKM2	LDHA
正常组	8	1.10 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.10	1.01 $\pm$ 0.10
模型组	8	0.31 $\pm$ 0.09 ^{a)}	0.43 $\pm$ 0.11 ^{a)}	0.49 $\pm$ 0.02 ^{a)}
地屈孕酮组	8	0.78 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.93 $\pm$ 0.14 ^{b)}	0.69 $\pm$ 0.04 ^{b)}
寿胎丸组	8	0.76 $\pm$ 0.15 ^{b)}	0.71 $\pm$ 0.08	0.70 $\pm$ 0.01 ^{b)}

注: HK2, 己糖激酶 2; PKM2, M2-型丙酮酸激酶; LDHA, 乳酸脱氢酶 A。

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

2.3 各组小鼠妊娠第 6 天胚胎 HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4、GPR81 蛋白相对表达量比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组小鼠胚胎

表3 各组小鼠妊娠第6天胚胎HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4、GPR81蛋白相对表达量比较

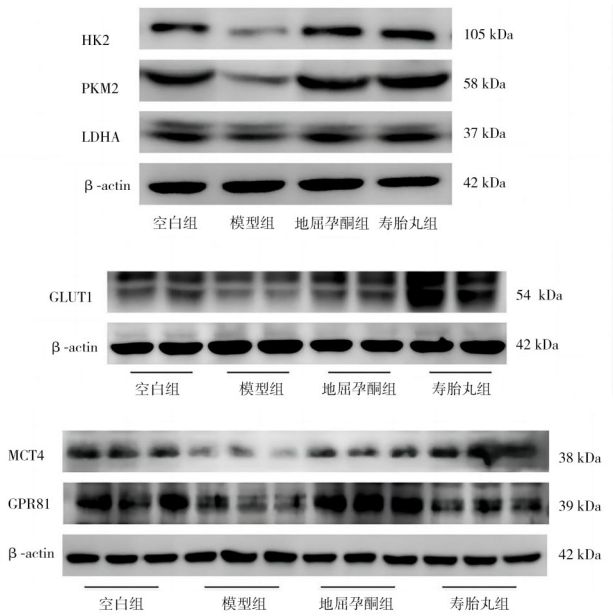
Table 3 Comparison of the relative protein expression levels of HK2, PKM2, LDHA, GLUT1, MCT4, and GPR81

in mice embryos on the 6th day of pregnancy in each group							(/β-actin, $\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	HK2	PKM2	LDHA	GLUT1	MCT4	GPR81
正常组	8	1.10±0.13	1.20±0.09	0.93±0.07	1.00±0.18	0.93±0.12	1.14±0.02
模型组	8	0.54±0.09 ^{a)}	0.28±0.11 ^{a)}	0.67±0.04 ^{a)}	0.71±0.07 ^{a)}	0.34±0.09 ^{a)}	0.73±0.07 ^{a)}
地屈孕酮组	8	1.15±0.05 ^{b)}	1.08±0.15 ^{b)}	0.83±0.16	1.15±0.05 ^{b)}	0.61±0.07 ^{b)}	1.41±0.05 ^{b)}
寿胎丸组	8	1.23±0.07 ^{b)}	1.20±0.09 ^{b)}	0.96±0.12 ^{b)}	1.30±0.09 ^{b)}	1.07±0.13 ^{b) c)}	0.90±0.06 ^{b) c)}

注：HK2，己糖激酶2；PKM2，M2-型丙酮酸激酶；LDHA，乳酸脱氢酶A；GLUT1，葡萄糖转运体1；MCT4，单羧酸转运体4；GPR81，G蛋白偶联受体81。

a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与地屈孕酮比较， $P<0.05$ 。

HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4、GPR81蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，地屈孕酮组小鼠胚胎HK2、PKM2、GLUT1、MCT4、GPR81蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)，寿胎丸组小鼠胚胎HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4、GPR81蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)；与地屈孕酮组比较，寿胎丸组小鼠胚胎MCT4蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)，而GPR81蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。各组小鼠妊娠第6天胚胎HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4、GPR81蛋白电泳图见图1。



注：HK2，己糖激酶2；PKM2，M2-型丙酮酸激酶；LDHA，乳酸脱氢酶A；GLUT1，葡萄糖转运体1；MCT4，单羧酸转运体4；GPR81，G蛋白偶联受体81。

图1 各组小鼠妊娠第6天胚胎HK2、PKM2、LDHA、GLUT1、MCT4、GPR81蛋白电泳图

Figure 1 Protein electrophoresis of HK2, PKM2, LDHA, GLUT1, MCT4, and GPR81 in the mice embryos on the 6th day of pregnancy in each group

3 讨论

张锡纯在《医学衷中参西录》中言：“流产，或不流产，不尽关于妊妇身体之强弱，实兼视所受之胎善吸取其母之气化否也”，“胎在母腹，如果善吸其母之气化，自无下坠之虞”，首次提出滑胎的病因不但有母体的因素，还有胎元方面的原因，进而完善了滑胎发生的病因学说。病机方面张锡纯提出“男女生育，皆赖肾脏作强，肾旺自能荫胎，肾气盛则胎元固，自无胎漏、胎动不安之虑”。肾藏精，主生殖，为先天之本，同时肾主系胞，与任脉交会于关元，与冲脉下行者相并而行，通过冲任二脉与胞宫间接相连。只有肾精充盛，任通冲盛，才能正常孕育胎儿，胎固母安。若先天禀赋不足，素体肾虚或孕后房劳所伤，均可导致肾虚，肾虚则固摄无权，系胎无力，则导致胎元不固而流产，且流产次数愈多，肾气愈虚，肾气愈虚则愈不能系胎，屡孕屡堕，故而强调肾虚胎元不固是滑胎的基本病机。因此，张锡纯创制治疗滑胎的经典妙方——寿胎丸，方中菟丝子补肾益精；桑寄生、续断补肾安胎；阿胶滋阴养血，使冲任气血充盈。诸药合用，共奏补肝肾、固胎元之功效。中医强调“治未病”，RSA的治疗讲究妊娠前预培其损，固护肾气；妊娠后则以补肾为基础，安胎固元。故本研究对RSA模型组雌鼠在合笼前14天至妊娠第6或14天给予寿胎丸干预，以达到妊娠前预防和妊娠后安胎的效果。

妊娠早期，胚胎植入过程是影响妊娠成功与否的关键^[13]。小鼠胚胎从妊娠第5天晚上到第6天早上通过腔上皮侵入基质，从而与母体血管系统建立联系^[14]。因此，我们在妊娠第6天取材对胚胎有氧糖酵解关键酶及相关蛋白表达进行检测。本研究选择雌性CBA/J小鼠与雄性DBA/2小鼠交配建立RSA小鼠模型属于早期胚胎植入期流产模型，且流产率

相对稳定^[15]。临床中对于连续流产3次或以上的患者,经验性孕激素给药具有一定潜在益处并可降低流产率^[16-17],因此我们在实验中选择地屈孕酮作为对照药物。本研究结果显示,在妊娠第14天与正常组比较,模型组胚胎丢失率显著增加,而地屈孕酮或寿胎丸干预后胚胎丢失率明显降低,且地屈孕酮组与寿胎丸组比较差异无统计学意义,说明寿胎丸和地屈孕酮均具有显著的保胎作用且疗效相当。这一结果与相关研究结果^[4,18]基本一致。

有研究^[9]显示,妊娠前3个月的母胎界面微环境与肿瘤微环境相似,具有低氧、酸性和免疫特征。妊娠早期,母体胎盘血管尚未建立,子宫腔内氧气浓度相对偏低,这会影响有利于生物体生长和存活的特定代谢途径的利用^[19]。RSA患者绒毛中乳酸和丙酮酸的含量低于非医学原因终止妊娠的患者,提示RSA的发病机制可能与绒毛有氧糖酵解水平不足有关^[20]。另有一项研究^[21]显示,RSA患者母胎界面的乳酸水平与正常妊娠相比有所升高,这可能是因为RSA患者的蜕膜微环境更容易缺氧,因此蜕膜通过无氧糖酵解增加了乳酸的产生。因此,我们从有氧糖酵解过程探究寿胎丸治疗RSA的可能作用机制。己糖激酶(HK)是糖酵解途径中的第一个限速酶,HK2在乏氧条件下生长的胚胎中高表达以支持有氧糖酵解^[22]。丙酮酸激酶(PK)是有氧糖酵解途径中的最终限速酶,PKM2主要在胚胎组织和增殖细胞中表达^[23]。PKM2可促进有氧糖酵解,将丙酮酸转化为乳酸以产生能量,并允许糖酵解中间体重分布以支持大分子生物合成和细胞增殖^[24]。LDHA催化丙酮酸转化为乳酸并维持升高的NAD⁺水平以支持糖酵解^[25]。本研究结果显示,RSA模型小鼠妊娠第6天胚胎组织中HK2、PKM2和LDHA mRNA及蛋白的表达水平降低,提示RSA流产的发病机制可能与有氧糖酵解中关键酶的表达水平异常有关,从而抑制有氧糖酵解,影响胚胎着床过程。地屈孕酮或寿胎丸干预后,HK2、LDHA mRNA及HK2、PKM2蛋白的表达水平升高,提示寿胎丸可通过调节有氧糖酵解中关键酶的表达水平来促进有氧糖酵解,从而改善胚胎着床微环境,促进胚胎着床。

当胚胎发育到桑椹胚期以后,葡萄糖的消耗量急剧增加,为囊腔的形成和维持提供了能量来源。小鼠囊胚中内细胞团几乎完全采用糖酵解方式,滋养细胞则消耗一半葡萄糖转化为乳酸^[26]。葡萄糖的摄取和转运由葡萄糖转运蛋白介导,而GLUT1

是葡萄糖代谢中的一种限速酶^[27]。在雌激素和孕激素的影响下,GLUT1增加了蜕膜细胞、极化滋养层细胞和内细胞团的表达,有助于胚胎的植入^[28]。当细胞发生糖酵解时,需要将细胞内的乳酸转运到细胞外,以避免细胞内积聚对糖酵解通量的负反馈抑制^[29]。乳酸的功能取决于特定的受体,主要是单羧酸转运蛋白(MCTs)和G蛋白偶联受体(GPRs),MCT4是一种低亲和力的乳酸转运蛋白,主要在高糖酵解细胞中表达,它负责将乳酸输出到细胞外以响应高糖酵解通量,并响应缺氧而上调^[30]。GPR81作为乳酸传感器,根据周围环境中的乳酸浓度调节乳酸代谢和转运基因的表达^[31]。本研究结果表明,RSA小鼠胚胎组织中GLUT1、MCT4和GPR81蛋白表达降低,而寿胎丸和地屈孕酮均可上调胚胎组织中GLUT1、MCT4和GPR81蛋白表达水平,且寿胎丸在上调MCT4和表达方面优于地屈孕酮,但在上调GPR81蛋白方面不如地屈孕酮。结果提示寿胎丸可通过上调RSA模型小鼠胚胎组织中有氧糖酵解相关蛋白的表达来改善有氧糖酵解水平,进而促进胚胎着床。

综上所述,RSA模型小鼠胚胎组织中有氧糖酵解不足会导致胚胎着床微环境异常,从而导致胚胎着床失败。寿胎丸可通过促进高水平的有氧糖酵解来改善胚胎着床微环境,从而促进胚胎着床。本研究仅从滋养细胞方面进行了探究,未来拟从胚胎和子宫内膜之间的双向通讯及相互作用入手进一步研究,以期揭示胚胎植入的复杂机制。

参考文献

- [1]RAI R,REGAN L. Recurrent miscarriage[J]. Lancet, 2006,368(9535):601.
- [2]Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2020, 113(3):533-535.
- [3]张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 太原:山西出版集团, 2009:174.
- [4]ZENG L,YANG K,LIU L,et al. Systematic biological and proteomics strategies to explore the regulation mechanism of Shoutai Wan on recurrent spontaneous Abortion's biological network [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 263: 113156. doi: 10.1016/j.jep. 2020. 113156.
- [5]何丽萍,余次碧,潘艳华. 寿胎丸加减治疗胎动不安(肾虚型)的临床效果及对性激素水平的影响[J]. 湖北中医杂志,2022,44(3):10-13.

- [6]FEODOR-NILSSON S, ANDERSEN PK, SRTANDBERG-LARSEN K. Risk factors for miscarriage from a prevention perspective: a nationwide follow-up study [J]. BJOG, 2014, 121(11):1375-1385.
- [7]张潇潇,吕群. 复发性流产的病因研究[J]. 现代临床医学, 2017, 43(3):394-396.
- [8]GARDNER DK. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion [J]. Bioessays, 2015, 37(4):364-371.
- [9]MA LN, HUANG XB, MUYAYALO KP, et al. Lactic acid: a novel signaling molecule in early pregnancy [J]. Front Immunol, 2020, 11: 279. doi: 10.3389/fimmu.2020.00279.
- [10]CLARK DA, CHAPUT A, TUTTON D. Active suppression of host-vs-graft reaction in pregnant mice. VII. Spontaneous abortion of allogeneic CBA/J x DBA/2 fetuses in the uterus of CBA/J mice correlates with deficient non-T suppressor cell activity [J]. J Immunol, 1986, 136(5):1668-1675.
- [11]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:1103.
- [12]LIANG X, TANG S, LI D, et al. Shoutai Wan improves embryo survival by regulating aerobic glycolysis of trophoblast cells in a mouse model of recurrent spontaneous abortion [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022:8251503. doi: 10.1155/2022/8251503.
- [13]PATTERSON AL, PIROCHTA J, TUFANO SY, et al. Gain-of-function β -catenin in the uterine mesenchyme leads to impaired implantation and decidualization [J]. J Endocrinol, 2017, 233(1):119-130.
- [14]MATSUMOTO L, HIROTA Y, SAITO-FUJITA T, et al. HIF2 α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment [J]. J Clin Invest, 2018, 128(7):3186-3197.
- [15]CLARK DA. The use and misuse of animal analog models of human pregnancy disorders [J]. J Reprod Immunol, 2014, 103:1-8. doi: 10.1016/j.jri.2014.02.006.
- [16]Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2012, 98(5):1103-1111.
- [17]CARP H. A systematic review of dydrogesterone for the treatment of recurrent miscarriage [J]. Gynecol Endocrinol, 2015, 31(6):422-430.
- [18]ZHAO L, XU Y, DUO X, et al. A probe into effect of Shoutai pill on endometrial receptivity [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4):3765-3768.
- [19]BAZER FW, SEO H, WU G, et al. Interferon tau: influences on growth and development of the conceptus [J]. Theriogenology, 2020, 150:75-83. doi: 10.1016/j.theriogenology.
- [20]WANG XH, XU S, ZHOU XY, et al. Low chorionic villous succinate accumulation associates with recurrent spontaneous abortion risk [J]. Nat Commun, 2021, 12(1):3428.
- [21]GAO L, XU QH, MA LN, et al. Trophoblast-derived lactic acid orchestrates decidual macrophage differentiation via SRC/LDHA signaling in early pregnancy [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2):599-616.
- [22]REDE BK, BROWN AN, SPATE LD, et al. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg effect [J]. Mol Reprod Dev, 2012, 79(4):262-271.
- [23]SU Y, GUO S, LIU C, et al. Endometrial pyruvate kinase M2 is essential for decidualization during early pregnancy [J]. J Endocrinol, 2020, 245(3):357-368.
- [24] TSAI KYF, TULLIE B, MEJI J, et al. Regulation of trophoblast cell invasion by Pyruvate Kinase isozyme M2 (PKM2) [J]. Placenta, 2021, 103:24-32. doi: 10.1016/j.placenta.2020.10.019.
- [25]SHAHZAD Q, PU L, WADOOD AA, et al. Proteomics analysis reveals that Warburg effect along with modification in lipid metabolism improves in vitro embryo development under low oxygen [J]. Int J Biol Sci, 2020, 21(6):1996.
- [26]张宁媛,孙海翔. 培养液成份变化对胚胎发育的影响 [J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(11):1255-1258.
- [27]ZHANG L, YU X, WU Y, et al. Gestational diabetes mellitus-associated hyperglycemia impairs glucose transporter 3 trafficking in trophoblasts through the downregulation of AMP-activated protein kinase [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:722024. doi: 10.3389/fcell.2021.722024.
- [28]FROLOVA A, FLESENER L, CHI M, et al. Facilitative glucose transporter type 1 is differentially regulated by progesterone and estrogen in murine and human endometrial stromal cells [J]. Endocrinology, 2009, 150(3):1512-1520.
- [29]MARCIQ I, POUYSSEGUR J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H⁺ symporters [J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(2):155-171.
- [30]HALESTRAP AP. The SLC16 gene family-structure, role

and regulation in health and disease [J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2/3):337-349.

[31] GURNER KH, EVANS J, HUTCHISON JC, et al. A mi-

croenvironment of high lactate and low pH created by the blastocyst promotes endometrial receptivity and implantation[J]. Reprod Biomed Online, 2022, 44(1):14-26.

Effects of *Shoutai Pills* (寿胎丸) on the Expression of Key Enzymes and Related Proteins of Aerobic Glycolysis in Embryos of Recurrent Spontaneous Abortion Model Mice

LIANG Xiao¹, TANG Siling¹, SONG Yajing¹, LI Dandan¹, DUAN Yancang^{1,2}, DU Huilan^{1,2}

1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050091;

2. Hebei Collaborative Innovation Center of Integrated Chinese and Western Medicine on Reproductive Disease

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Shoutai Pill* (寿胎丸) in the treatment of recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods** Female CBA/J mice were randomly divided into normal group, model group, dydrogesterone group and *Shoutai Pill* group, with 14 mice in each group. Female CBA/J mice were co-mated with male BALB/c mice in the normal group, while those were co-mated with male DBA/2 mice to establish an RSA model group in the other three groups. Female mice in *Shoutai Pill* group were given 1.66 g/(kg·d) of *Shoutai Pill* by gavage from 14 days before mating until the 6th or 14th day of pregnancy. The dydrogesterone group was given 0.33 g/(kg·d) of dydrogesterone by gavage from the 1st day to the 6th or 14th day of pregnancy, while the normal group and the model group were given 0.4 ml of distilled water by gavage. On the 6th day of pregnancy, eight female rats were randomly selected from each group to take embryonic tissues, and the mRNA and protein expressions of key enzymes of aerobic glycolysis in embryos including hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2), and lactate dehydrogenase A (LDHA) were detected, as well as the protein expression of glucose transporter 1 (GLUT1), monocarboxylic acid transporter 4 (MCT4) and G protein-coupled receptors 81 (GPR81). The remaining six female mice in each group were anesthetized on the 14th day of pregnancy, injected with trypan blue dye, and the embryo loss rate (ELR) was calculated. **Results** On the 14th day of pregnancy, the ELR of female mice in the normal group was 6.12%, and that in the model group was 33.33%, with statistically significant difference between the groups ($P < 0.05$). The ELR of female mice in the dydrogesterone group and *Shoutai Pill* group was 12.24% and 14.29%, respectively, significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). On the 6th day of pregnancy, compared to those in the normal group, the mRNA and protein expression levels of HK2, PKM2 and LDHA in the model group decreased ($P < 0.05$), as well as the protein expression levels of GLUT1, MCT4 and GPR81 ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the expression levels of all the indicators except for LDHA protein in the dydrogesterone group ($P < 0.05$) and PKM2 mRNA in the *Shoutai Pill* group significantly increased ($P < 0.05$). Compared to those in the dydrogesterone group, the protein expression level of MCT4 in the *Shoutai Pill* group increased, and the protein expression level of GPR81 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Shoutai Pill* can improve the level of aerobic glycolysis and reduce the embryo loss rate by promoting the expression of key enzymes and related proteins of aerobic glycolysis in RSA mouse embryos, thereby exerting its fetal protection effect.

Keywords recurrent spontaneous abortion; *Shoutai Pills* (寿胎丸); aerobic glycolysis; embryo loss rate

(收稿日期: 2022-09-09; 修回日期: 2023-01-20)

[编辑: 邓媛]