

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.09.011

寿胎丸对复发性流产模型小鼠母胎界面
乳酸含量及免疫相关因子表达的影响吕竞芳¹, 蒋敏¹, 周真真¹, 张丽¹, 王淑慧¹, 李丹丹¹, 宋亚静¹, 杜惠兰^{1,2,3}✉

1. 河北中医药大学, 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; 3. 河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室

[摘要] **目的** 从母胎界面酸性微环境下免疫耐受角度探讨寿胎丸治疗复发性流产(RSA)的可能机制。**方法** 雌性CBA/J小鼠随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组、寿胎丸组, 每组15只。正常组和模型组小鼠给予0.2 ml/d蒸馏水灌胃, 寿胎丸组给予寿胎丸水煎液0.15 g/(10 g·d)灌胃, 地屈孕酮组给予地屈孕酮片0.44 mg/(10 g·d)灌胃。灌胃14天后, 正常组CBA/J雌性小鼠与BALB/c雄性小鼠2:1合笼, 其余各组CBA/J雌性小鼠与DBA/2雄性小鼠2:1合笼建立RSA小鼠模型。次日雌性小鼠清晨做阴道涂片, 以阴道涂片出现大量精子并见到阴道栓作为妊娠第1天。见栓后按照之前的给药方式继续给药, 直至妊娠第10天。各组雌鼠在妊娠第10天取母胎界面组织, 乳酸脱氢酶比色法检测乳酸(LA)含量; qPCR法、Western blot法分别检测免疫相关因子白细胞介素4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、叉头转录因子(Foxp3)mRNA和蛋白表达; 流式细胞术检测辅助性T淋巴细胞1(Th1)、辅助性T淋巴细胞2(Th2)、调节性T细胞(Treg)、经典巨噬细胞(M1)、替代巨噬细胞(M2)的数量。采用双变量Pearson检验分析LA含量与Th1、Th2、Treg、M1、M2数量相关性, 以及LA含量与IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1、Foxp3蛋白和mRNA的相关性。**结果** 妊娠第10天, 与正常组比较, 模型组LA含量降低, 母胎界面组织中IL-4、TGF- β 1、Foxp3蛋白及mRNA表达降低, IFN- γ 蛋白及mRNA表达升高, Th1和M1细胞数量增多, Th2、Treg、M2细胞数量减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 寿胎丸组及地屈孕酮组LA含量升高, 母胎界面组织中IL-4、TGF- β 1、Foxp3蛋白及mRNA表达升高, IFN- γ 蛋白及mRNA表达降低, Th1和M1细胞数量减少, Th2、Treg和M2细胞数量增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。LA含量与Th2、Treg、M2细胞数量, IL-4、TGF- β 1、Foxp3蛋白及mRNA表达呈正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$); LA含量与Th1、M1细胞数量, IFN- γ 蛋白及mRNA表达呈负相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 寿胎丸可能通过调控RSA模型小鼠母胎界面酸性微环境中免疫相关因子的表达, 从而提高免疫耐受, 发挥其保胎作用。

[关键词] 复发性流产; 寿胎丸; 母胎界面; 微环境; 免疫耐受

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指与同一配偶连续发生2次及以上妊娠28周之前的妊娠丢失, 包括生化妊娠, 是妇产科最常见的妊娠并发症之一。研究显示, RSA发生率约占妊娠总数的2%~5%^[1]。RSA的发病风险随着流产次数的增加而升高, 曾有3次以上连续自然流产史的患者再次妊娠后胚胎丢失率接近40%^[2]。在胚胎

植入阶段, 母胎界面是一个相对缺氧的环境, 乳酸(LA)在胚胎周围形成高乳酸的微环境, 有助于胚胎的植入过程^[3]。前期研究显示, RSA小鼠母胎界面LA含量降低, 导致局部酸环境不足^[4], 且RSA发生可能与母胎界面免疫紊乱相关^[5], 母胎界面的辅助性T淋巴细胞1(Th1)/辅助性T淋巴细胞2(Th2)失衡可导致RSA^[6]。

RSA属于中医学“滑胎”范畴, 张锡纯创制的寿胎丸具有补肾安胎作用, 可以通过补肾气、益精

基金项目: 国家自然科学基金(U21A20403)

✉ 通讯作者: duhuilan@163.com, (0311)89926025

血的作用调节女性生殖系统^[7], 对 RSA 治疗有较好的临床疗效^[8]。本研究从母胎界面酸性微环境调节免疫耐受角度探讨寿胎丸安胎作用的可能机制, 为其临床应用提供科学依据。本实验经河北中医药大学实验动物伦理委员会审查批准, 批件编号: DWLL2021089。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 CBA/J 雌性小鼠 60 只, 6 周龄, 体质量 18~22 g; SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 8 只, 8 周龄, 体质量 22~26 g; SPF 级 DBA/2 雄性小鼠 23 只, 8 周龄, 体质量 22~26 g。小鼠均购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物合格证号: SCXK(京) 2019-0008。所有实验动物饲养于河北中医药大学实验动物中心, 温度 25~27 ℃、湿度 40%~60%、光照 12 h 的 SPF 级别环境, 每 5 只小鼠为 1 笼, 自由进食水。

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。中药均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 1.5 g/ml。地屈孕酮片 (荷兰 Abbott Biologicals B. V. 公司, 10 mg/片, 批号: 366239) 研磨成粉末, 每 13.2 mg 粉末溶于 3 ml 蒸馏水中, 得到浓度为 4.4 mg/ml 的地屈孕酮溶液。

1.3 主要试剂及仪器

γ 干扰素 (IFN- γ) 抗体 (货号: YT2279)、白细胞介素 4 (IL-4) 抗体 (货号: YT2335), Immunoway 公司; 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 抗体 (货号: 21898-1-AP)、叉头转录因子 (Foxp3) 抗体 (货号: 22228-1-AP)、 β -actin 抗体 (货号: 20536-1-AP)、 β -tubulin 抗体 (货号: 10094-1-AP)、山羊抗兔 IgG (货号: SA00001-2)、山羊抗鼠 IgG (货号: SA00001-1)、胰蛋白酶消化液 (货号: PR40021), 武汉三鹰科技有限公司; ECL 发光液 (货号: p10300), 新赛美生物科技有限公司; RIPA 裂解液 (货号: BB18061), 贝博生物有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号: SW101-02), SEVEN 公司; 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液 (货号: G2013-100ML)、逆转录试剂盒 (货号: G3330-50)、2 $\times$ SYBR Green Qpcr Master Mix (Low Rox) (货号: G3321-01), 武汉赛维尔生物科技有限公司; LA 试剂盒 (货号: A019-2-1), 南京建成生物工程研究

所; RNA 提取试剂盒 (货号: R6934-01), OMEGA 公司; CD3E FITC (货号: 561827)、CD4 APC (货号: 553051)、IFN- γ PE (货号: 554412)、IL-4 BV421 (货号: 562915)、CD86 BV421 (货号: 564198)、CD206 Alexa 647 (货号: 565250)、Foxp3 PE (货号: 563101)、CD25 BV421 (货号: 564370)、固定破膜试剂 (货号: 554714), BD PMG 公司; PE 抗诱导型一氧化氮合酶 (iNOS, 货号: 696806)、PE/Cyanine7 抗鼠 CD71 (货号: 113812), BioLegend 公司; 细胞刺激试剂盒 (货号: 00-4970-93)、小鼠细胞内 (细胞核/转录因子) 蛋白流式细胞分析工作流程套件 (货号: 00-4970-93), eBioscience 公司; RPMI 1640 培养基 (货号: SH30027.02), Hyclone 公司。

实时荧光定量 PCR 仪 (型号: 7500Fast)、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 (型号: Gel Logic 100), 美国 Bio-Rad 公司; 化学发光成像系统 (型号: Image Quant LAS 4000), 美国 GE 公司; 流式细胞仪 (型号: Attune NXT), 美国 Invitrogen 公司。

1.4 动物造模、分组及给药

60 只 CBA/J 雌性小鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为正常组、模型组、地屈孕酮组、寿胎丸组, 每组 15 只。每日 9:00 正常组和模型组雌鼠给予蒸馏水 0.2 ml/d 灌胃; 依据本团队前期研究结果^[9], 寿胎丸的最佳灌胃剂量为临床等效剂量的 2 倍, 故寿胎丸组小鼠给予寿胎丸水煎液 0.15 g/(10 g $\cdot$ d) 灌胃, 根据成人 60 kg 临床用药剂量并按照动物体表面积换算^[10]得出; 地屈孕酮组给予地屈孕酮片 0.44 mg/(10 g $\cdot$ d) 灌胃。灌胃 14 天后合笼, 正常组小鼠建立正常妊娠模型; CBA/J 雌性小鼠与 BALB/c 雄性小鼠 2:1 合笼; 其余各组小鼠建立 RSA 模型^[11]: CBA/J 雌性小鼠与 DBA/2 雄性小鼠 2:1 合笼。次日清晨雌鼠做阴道涂片, 以阴道涂片出现大量精子并见到阴道栓作为妊娠第 1 天, 见栓后按照之前的给药方式继续给药, 直至妊娠第 10 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 乳酸脱氢酶比色法检测母胎界面组织 LA 含量 每组采用随机数字表法选取 6 只妊娠第 10 天的雌鼠取母胎界面组织 50 mg, 按照组织质量 (g): 生理盐水 (ml) 为 1:9 的比例进行冰浴匀浆, 4 ℃、

3000 r/min 离心（离心半径 8 cm）10 min，取上清并置于冰上待测。根据 LA 试剂盒说明书进行检测，酶标仪波长设置 350 nm 进行测定。

1.5.2 qPCR 法检测母胎界面组织 IL-4、TGF- β 1、Foxp3、IFN- γ mRNA 表达 每组采用随机数字表法选取 6 只妊娠第 10 天的雌鼠取母胎界面组织 50 mg，按照 RNA 提取试剂盒提取 RNA，应用 Nucleic DROP 软件测定 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒配置 cDNA。按照 2 $\times$ SYBR Green Qpcr Master Mix（Low Rox）说明书配置反应体系，配置好后于 PCR 仪上进行检测。PCR 预变性温度为 95 $^{\circ}$ C，10 min，然后进行 40 个循环反应：95 $^{\circ}$ C，10 s；60 $^{\circ}$ C，30 s。引物均由上海生工生物工程有限公司合成， β -actin：上游 GTGACGTTGACATCCGTAAAGA，下游 GTA-ACAGTCCGCCTAGAAGCAC，长度 287 bp；TGF- β 1：上游 TCAGACATTCGGGAAGCAGT，下游 ACGC-CAGGAATTGTTGCTAT，长度 160 bp；IL-4：上游 TTGAACGAGGTCACAGGAGAAG，下游 CTTGGAA-GCCCTACAGACGAG，长度 111 bp；IFN- γ ：上游 CTGGAGGAAGTGGCAAAAGGATGG，下游 GAC-GCTTATGTTGTTGCTGATGGC，长度 121 bp；Foxp3：上游 TGGCAATAGTTCCTTCCAGAGT，下游 ATC-GGATAAGGGTGGCATAGGT，长度 95 bp。扩增结束后，分析结果中 CT 值，以 β -actin 为内参，按照公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.5.3 Western blot 法检测母胎界面组织 IL-4、TGF- β 1、Foxp3、IFN- γ 蛋白表达 每组采用随机数字表法选取 3 只妊娠第 10 天的雌鼠取母胎界面组织 50 mg 加入 1 ml RIPA 裂解液，剪碎组织研磨以充分裂解组织，取上清。将上清液按照 BCA 蛋白定量检测试剂盒说明书测定蛋白浓度后，将上清液与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液按照 4 : 1 的比例混匀，置于沸水中 10 min 使蛋白变性，后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。蛋白上样完成后，以 90 V 电压开始电泳，待 Marker 中红色条带出现后，将电压调整为 120 V，直到条带跑至凝胶最下方时停止电泳。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 1 h，洗膜后加入 IL-4、TGF- β 1、Foxp3、IFN- γ 一抗孵育，抗体浓度均为 1 : 1000，4 $^{\circ}$ C 过夜。次日，TBST 洗膜，室温孵育二抗 1 h，二抗稀释比例为 1 : 5000。清洗膜后，采用 Image J 1.8.0.345 软件对条带的光密度值进行分析，IL-4、Foxp3、IFN- γ 以 β -actin 作为内参对照，TGF- β 1 以 β -tubulin 作为内参对照。

1.5.4 流式细胞术检测母胎界面组织 Th1、Th2、调节性 T 细胞（Treg）、经典巨噬细胞（M1）、替代巨噬细胞（M2）的数量 每组采用随机数字表法选取 3 只妊娠第 10 天的雌鼠，取出母胎界面组织 100 mg，立即放入预冷的 PBS 中，清洗血迹及其他污染物。用眼科剪将组织剪成 1~2 mm 左右的小块，放在预冷的 PBS 中并进行漂洗，洗去剪碎的细胞碎片。将剪好的组织放在培养皿中，加入 30 倍体积的预热胰蛋白酶消化液，37 $^{\circ}$ C 消化 20~30 min，消化完成后，立即加入 4~5 倍体积的培养基终止反应，用移液枪轻轻吹打混匀后，将液体用 100 μ m 的过滤筛过滤，在 50 ml 离心管中收集细胞悬液，去除未消化完全的组织碎块，将收集好的细胞悬液 4 $^{\circ}$ C、1000 r/min 离心（离心半径 8 cm）5 min，去上清留沉淀，并用预冷的 PBS 清洗 1~2 次，用 PBS 重悬。

检测 Th1、Th2 细胞数量：在细胞悬液中按比例加入细胞刺激试剂盒（加蛋白转运抑制剂），在培养箱孵育 3~4 h，将等体积的细胞悬液加入配制 CD3E FITC、CD4 APC 的抗体预混溶液，避光孵育 20 min，细胞用固定破膜试剂 250 μ l 进行固定破膜，4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min，之后用破膜缓冲液洗 2 次，在处理好的细胞中加入 IFN- γ PE、IL-4 BV421 抗体的预混液，避光孵育 20 min，用预冷的染色缓冲液洗 2 次，去除未结合的抗体，设置好参数后，流式细胞仪上机检测。

检测 M1、M2 细胞数量：将等体积的细胞悬液加入配制 CD86 BV421 的抗体预混溶液，避光孵育 20 min，用固定破膜试剂 250 μ l 进行固定破膜，4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min，之后用破膜缓冲液洗 2 次，在处理好的细胞中加入 CD206 Alexa 647、PE 抗 iNOS、PE/Cyanine7 抗鼠 CD71 抗体的预混液，避光孵育 20 min，用预冷的染色缓冲液洗 2 次，去除未结合的抗体，设置好参数后，流式细胞仪上机检测。

检测 Treg 细胞数量：在细胞悬液中按比例加入小鼠细胞内（细胞核/转录因子）蛋白流式细胞分析工作流程套件，在培养箱孵育 3~4 h，将等体积的细胞悬液加入配制 CD3E FITC、CD4 APC、CD25 BV421 的抗体预混溶液，避光孵育 20 min，细胞用固定破膜试剂 250 μ l 进行固定破膜，4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min，之后用破膜缓冲液洗 2 次，在处理好的细胞中加入 Foxp3 PE 抗体的预混液，避光孵育 20 min，用预冷的染色缓冲液洗 2 次，去除未结合的抗体，设置好参数后，流式细胞仪上机检测。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 26.0 软件包进行数据统计分析。正态分布的计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐性多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较选取 LSD 法, 方差不齐时选取 Dumientt' T^3 法。计数资料采用 χ^2 检验。相关性分析采用双变量 Pearson 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 LA 含量比较

正常组 LA 含量为 (0.17±0.04) mmol/L, 模型组为 (0.10±0.03) mmol/L, 地屈孕酮组为 (0.17±0.03) mmol/L, 寿胎丸组为 (0.16±0.04) mmol/L。模型组母胎界面组织 LA 含量较正常组降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 寿胎丸组、地屈孕酮组母胎界面组织 LA 含量升高 ($P<0.01$), 而寿胎丸组与地屈孕酮组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 mRNA 表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组母胎界面组织中 Foxp3、IL-4、TGF- β 1 mRNA 表达降低, IFN- γ mRNA 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 寿胎丸组、地屈孕酮组母胎界面组织 Foxp3、IL-4、TGF- β 1 mRNA 表达升高, IFN- γ mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 地屈孕酮组与寿胎丸组比较, Foxp3、IL-4、TGF- β 1、IFN- γ mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 蛋白表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组母胎界面组织中 Foxp3、IL-4、TGF- β 1 蛋白表达降低, IFN- γ 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 寿胎丸组、地屈孕酮组母胎界面组织 Foxp3、

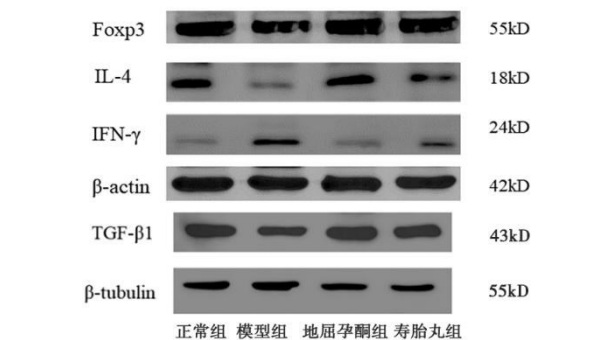
表 1 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 mRNA 表达比较

Table 1 Comparison of Foxp3, IL-4, IFN- γ and TGF- β 1 mRNA expression at the maternal-fetal interface on day 10 of pregnancy in female mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Foxp3	IL-4	IFN- γ	TGF- β 1
正常组	6	1.00	1.00	1.00	1.00
模型组	6	0.54±0.17 ^{a)}	0.66±0.24 ^{a)}	2.50±1.31 ^{a)}	0.64±0.19 ^{a)}
地屈孕酮组	6	1.19±0.34 ^{c)}	0.92±0.20 ^{c)}	1.15±0.41 ^{b)}	1.12±0.20 ^{b)}
寿胎丸组	6	1.13±0.15 ^{c)}	0.99±0.14 ^{c)}	0.87±0.39 ^{c)}	1.06±0.16 ^{c)}

注: Foxp3, 叉头转录因子; IL-4, 白细胞介素 4; IFN- γ , γ 干扰素; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1。
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, $P<0.01$ 。

IL-4、TGF- β 1 蛋白表达升高, IFN- γ 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 地屈孕酮组与寿胎丸组比较, Foxp3、IL-4、TGF- β 1、IFN- γ 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 蛋白电泳图见图 1。



注: Foxp3, 叉头转录因子; IL-4, 白细胞介素 4; IFN- γ , γ 干扰素; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1。

图 1 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 蛋白电泳图
Figure 1 Gel electrophoresis of Foxp3, IL-4, IFN- γ and TGF- β 1 proteins in maternal-fetal interface tissues on day 10 of pregnancy in female mice

表 2 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 蛋白表达比较

Table 2 Comparison of Foxp3, IL-4, IFN- γ and TGF- β 1 protein expression at the maternal-fetal interface on day 10 of pregnancy in female mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Foxp3/ β -actin	IL-4/ β -actin	IFN- γ / β -actin	TGF- β 1/ β -tubulin
正常组	3	0.97±0.07	0.90±0.03	0.42±0.16	1.19±0.08
模型组	3	0.61±0.16 ^{a)}	0.48±0.11 ^{b)}	1.04±0.22 ^{b)}	0.66±0.18 ^{a)}
地屈孕酮组	3	1.03±0.09 ^{c)}	0.87±0.07 ^{d)}	0.66±0.03 ^{c)}	1.26±0.18 ^{d)}
寿胎丸组	3	0.96±0.18 ^{c)}	0.91±0.14 ^{d)}	0.65±0.12 ^{c)}	1.16±0.20 ^{c)}

注: Foxp3, 叉头转录因子; IL-4, 白细胞介素 4; IFN- γ , γ 干扰素; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1。
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, $P<0.01$ 。

2.4 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Th1、Th2、Treg、M1 及 M2 细胞数量比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组母胎界面组织中 Th1、M1 细胞数量增加, Th2、Treg、M2 细胞数量减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 寿胎丸组、地屈孕酮组母胎界面组织 Th1、M1 细胞数量减少, 而 Th2、Treg、M2 细胞数量增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 地屈孕酮组与寿胎丸组比较, Th1、Th2、Treg、M1 及 M2 细胞数量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 LA 含量与 Th1、Th2、M1、M2、Treg 细胞数量相关性分析

图 2 示, LA 含量与 Th2、Treg、M2 细胞数量呈正相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), LA 含量与 Th1、

M1 细胞数量呈负相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.6 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 LA 含量与 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 mRNA 表达相关性分析

图 3 示, LA 含量与 Foxp3、IL-4、TGF- β 1 的 mRNA 表达呈正相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), LA 含量与 IFN- γ 的 mRNA 表达呈负相关 ($P<0.05$)。

2.7 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 LA 含量与 Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 蛋白表达相关性分析

图 4 示, LA 含量与 Foxp3、IL-4、TGF- β 1 蛋白表达呈正相关 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), LA 含量与 IFN- γ 蛋白表达呈负相关 ($P<0.01$)。

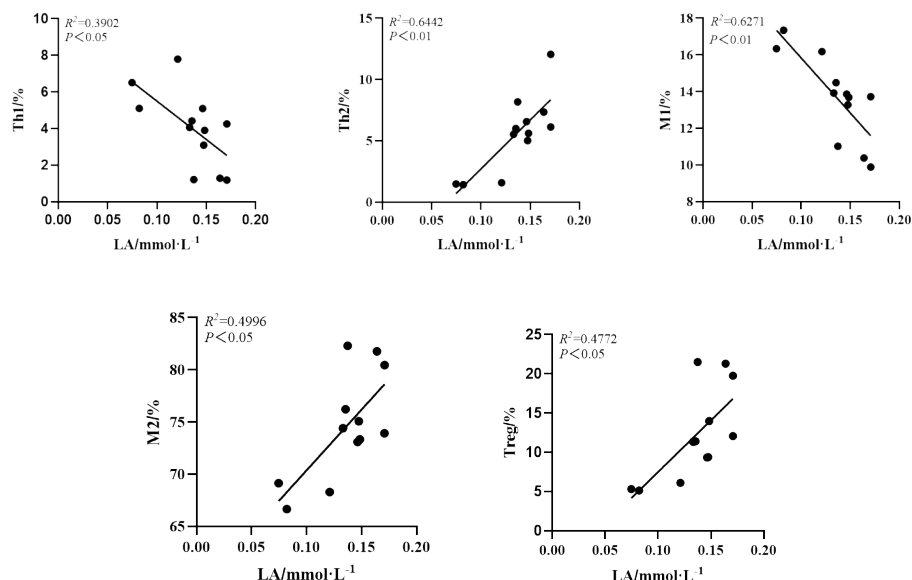
表 3 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 Th1、Th2、M1、M2、Treg 细胞数量比较

Table 3 Comparison of the number of Th1, Th2, M1, M2 and Treg cells at the maternal-fetal interface on day 10 of pregnancy in female mice (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Th1	Th2	M1	M2	Treg
正常组	3	1.23 $\pm$ 0.06	9.20 $\pm$ 2.86	10.43 $\pm$ 0.59	81.51 $\pm$ 1.05	20.86 $\pm$ 1.09
模型组	3	6.47 $\pm$ 1.36 ^{a)}	1.50 $\pm$ 0.09 ^{a)}	16.62 $\pm$ 0.73 ^{a)}	68.03 $\pm$ 1.38 ^{a)}	5.53 $\pm$ 0.59 ^{a)}
地屈孕酮组	3	4.03 $\pm$ 1.06 ^{b)}	5.73 $\pm$ 0.83 ^{b)}	13.61 $\pm$ 0.33 ^{c)}	73.83 $\pm$ 1.24 ^{c)}	10.90 $\pm$ 3.09 ^{c)}
寿胎丸组	3	4.24 $\pm$ 0.18 ^{b)}	5.89 $\pm$ 0.35 ^{b)}	14.04 $\pm$ 0.44 ^{c)}	74.85 $\pm$ 1.37 ^{c)}	11.61 $\pm$ 0.47 ^{c)}

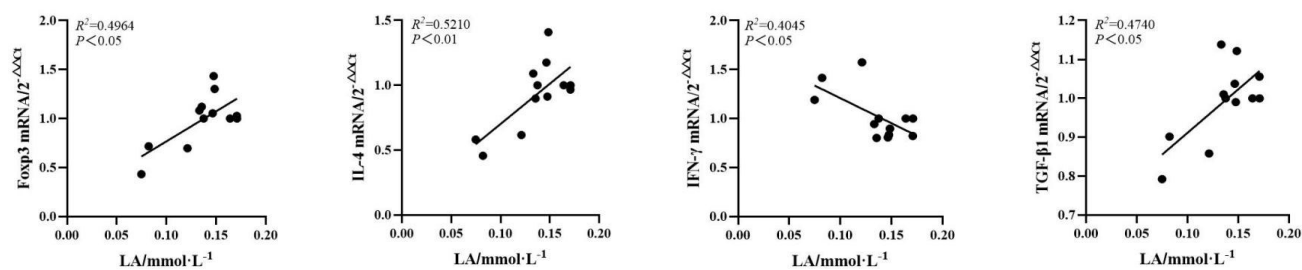
注: Th1, 辅助性 T 淋巴细胞 1; Th2, 辅助性 T 淋巴细胞 2; Treg, 调节性 T 细胞; M1, 经典巨噬细胞; M2, 替代巨噬细胞。

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, $P<0.01$ 。



注: LA, 乳酸; Th1, 辅助性 T 淋巴细胞 1; Th2, 辅助性 T 淋巴细胞 2; M1, 经典巨噬细胞; M2, 替代巨噬细胞; Treg, 调节性 T 细胞。

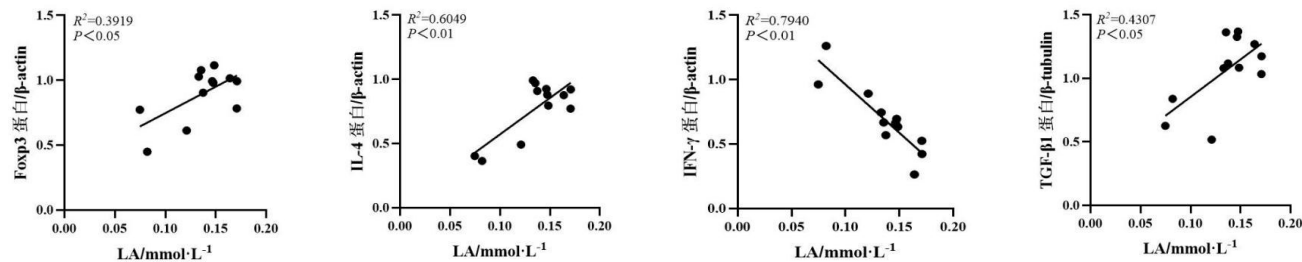
图 2 各组雌鼠妊娠第 10 天母胎界面组织 LA 含量与 Th1、Th2、M1、M2、Treg 细胞数量相关性
Figure 2 Correlation analysis between LA content and the number of Th1, Th2, M1, M2 and Treg cells in maternal-fetal interface tissues on day 10 of pregnancy in female mice



注：LA，乳酸；Foxp3，叉头转录因子；IL-4，白细胞介素4；IFN- γ ， γ 干扰素；TGF- β 1，转化生长因子 β 1。

图3 各组雌鼠妊娠第10天母胎界面组织LA含量与Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1 mRNA表达相关性

Figure 3 Correlation analysis between LA content and Foxp3, IL-4, IFN- γ and TGF- β 1 mRNA expression in maternal-fetal interface tissues on day 10 of pregnancy in female mice



注：LA，乳酸；Foxp3，叉头转录因子；IL-4，白细胞介素4；IFN- γ ， γ 干扰素；TGF- β 1，转化生长因子 β 1。

图4 各组雌鼠妊娠第10天母胎界面组织LA含量与Foxp3、IL-4、IFN- γ 、TGF- β 1蛋白表达相关性

Figure 4 Correlation analysis between LA content and Foxp3, IL-4, IFN- γ and TGF- β 1 protein expression in maternal-fetal interface tissues on day 10 of pregnancy in female mice

3 讨论

中医学认为，滑胎的主要病机是各种因素导致冲任胞宫虚损或阻滞，引起胎元不固，其中肾虚为主要病因。肾藏精，主生殖，为先天之本，胚胎之所系。《医学衷中参西录》云：“男女生育，皆赖肾脏作强，肾旺自能荫胎”，《傅青主女科》曰：“妇人受妊，本于肾气之旺也，肾旺是以摄精”，说明肾气充盛，阴阳平衡，是孕育胚胎的前提与关键。肾气盛则天癸至而具备孕育能力，肾气衰则天癸竭而丧失生殖能力^[12]。张锡纯提出补益肾气、固冲安胎之法，创立寿胎丸治疗滑胎，效果显著^[13]。方中菟丝子补肾益精，固摄冲任，使肾旺自能荫胎，故重用为君；桑寄生补肝肾、强筋骨、祛风湿、安胎元，续断补肝肾、强筋骨、安胎，二者共用发挥补益肝肾、养血安胎作用为臣；阿胶滋阴养血为佐使，使冲任血旺，则胎元自固。四药合用，共奏补肾养血，固冲安胎之效。地屈孕酮是一种天然孕激素类药物，可提高患者体内孕激素水平，能够通过孕激素受体的强烈亲和力改善子宫内膜容受性，调节免疫功能，维持正常子宫生理机能，进

而减少流产的发生^[14]。因此，本研究将地屈孕酮片作为阳性对照药物。

母胎界面是指母体的子宫部分和胎儿的绒毛滋养细胞部分，包括蜕膜、胚胎及其滋养外胚层、胎盘及母体子宫微血管系统^[15]。母胎界面是胚胎植入的关键位置，是胚胎生长发育的重要场所。早期胚胎发育时葡萄糖代谢显著增加，胚泡、滋养细胞和蜕膜免疫细胞通过有氧糖酵解（又称瓦氏效应）产生大量LA^[16]。本团队前期研究^[9, 17]结果显示，寿胎丸可降低RSA小鼠的胚胎丢失率，促进胚胎植入以安胎，其机制可能为通过调节滋养细胞、蜕膜组织、母胎界面的有氧糖酵解关键酶活性和表达水平产生LA，促进有氧糖酵解，改善母胎界面微环境，有利于胚胎顺利植入。研究显示，小鼠囊胚着床于子宫内膜时，胎盘发育开始，在妊娠第10天时胎盘的结构已基本形成^[18]，因此本研究选择在妊娠第10天取材。本研究结果表明，妊娠第10天模型组小鼠母胎界面组织中LA含量明显低于正常组，而寿胎丸组和地屈孕酮组母胎界面组织中LA含量明显高于模型组。进一步证实了正常胚胎

发育过程中有氧糖酵解产生了 LA, 使母胎界面局部形成酸环境, 而 RSA 小鼠母胎界面 LA 含量降低使局部酸环境异常, 导致不良妊娠结局。寿胎丸和地屈孕酮均能提高母胎界面 LA 含量, 提示这两种药物均可通过促进有氧糖酵解产生 LA, 维持母胎界面的正常酸环境, 从而防治 RSA 的发生。寿胎丸组与地屈孕酮组母胎界面组织中 LA 含量比较差异无统计学意义, 说明两药均具有保胎作用且疗效相当。

母胎界面的免疫耐受失衡可能导致反复自然流产等不良妊娠结局, CD4⁺T 细胞各亚群及其分泌的细胞因子、趋化因子在免疫微环境中占据重要地位^[19]。CD4⁺T 细胞包括 Th 细胞和 Treg 细胞两大类。Th 细胞包括 Th0、Th1、Th2 等, Th1/Th2 平衡是母胎界面免疫耐受机制中的关键点^[20]。Th1 细胞分泌 IFN- γ 介导细胞免疫; Th2 细胞分泌 IL-4 介导体液免疫; Treg 细胞活化后可分泌细胞因子 TGF- β 1; Foxp3 是 Treg 细胞分化及发育最重要的调节基因。当巨噬细胞被 Th1 型细胞因子 IFN- γ 刺激后会促进炎症反应, 被称为 M1 型巨噬细胞; 当巨噬细胞被 Th2 型细胞因子 IL-4 刺激发生分化时, 被称为 M2 型巨噬细胞, 发挥免疫抑制功能。研究^[21]表明, 与正常妊娠者比较, RSA 患者中 M1 型巨噬细胞极化增多, M2 型巨噬细胞数量减少, 导致母胎界面发生炎症反应, 不利于胚胎的发育。Treg 细胞缺乏成为 RSA 的关键潜在原因^[22]。另有研究表明, Th1 细胞因子 IFN- γ 在 RSA 患者外周血和蜕膜组织中高表达, 而 Th2 细胞因子 IL-4 在 RSA 患者中表达量降低^[23]; RSA 患者外周血与蜕膜组织中转录因子 Foxp3、细胞因子 TGF- β 1 等表达下调^[24]。本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠母胎界面组织中 Th2、Treg、M2 细胞数量减少, IL-4、Foxp3、TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达降低, Th1、M1 细胞数量增多、IFN- γ mRNA 及蛋白表达升高, 提示过度的炎症因子活化加剧了母胎界面局部的炎症反应, 导致 Th1/Th2、M1 和 M2 细胞平衡紊乱, Treg 细胞分化及发育不足, 不能诱导和维持免疫耐受, 对胚胎造成免疫损伤从而导致 RSA 的发生。进一步研究发现, 寿胎丸和地屈孕酮均可增加 RSA 模型小鼠母胎界面组织中 Th2、M2 及 Treg 细胞数量, 上调 IL-4、Foxp3、TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达水平, 下调 Th1、M1 细胞数量及 IFN- γ mRNA 及蛋白表达水平。以上提示, 通过寿胎丸和地屈孕酮的治疗, 母胎界面的 Th1/Th2 恢复了平衡, 促进了 RSA 小鼠

母胎界面组织中 Th2 细胞分化并抑制了 Th1 细胞活化, 同时促进 Th2 细胞分泌的 IL-4 介导体液免疫, 抑制了炎症的发生, 使 Th1/Th2、M1 和 M2 细胞平衡, 促使 Treg 细胞的分化与发育, 保护胎儿免受母体免疫系统的攻击, 从而维持母胎界面的免疫耐受。证实了寿胎丸可以通过调节 RSA 模型小鼠母胎界面免疫耐受失衡来改善免疫应答活性, 进而促进胚胎植入。

为了进一步研究 RSA 模型小鼠母胎界面酸性微环境对免疫耐受的影响, 我们进行了 LA 与免疫指标之间的相关性分析。结果表明, 母胎界面的 LA 含量与 Th2、M2、Treg 细胞数量以及 Foxp3、IL-4、TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达呈正相关, 与 Th1、M1 细胞数量以及 IFN- γ mRNA 和蛋白表达呈负相关。推测寿胎丸可通过上调 RSA 小鼠母胎界面 LA 含量, 使母胎界面局部呈高乳酸的微环境, 进而增加 Th2、M2、Treg 细胞数量, 上调 IL-4、Foxp3 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达, 下调 Th1、M1 细胞数量及 IFN- γ mRNA 和蛋白表达, 有利于 Th1/Th2 以及 M1 和 M2 细胞的平衡, 促进 Treg 细胞分化及发育, 诱导和维持免疫耐受, 进而有利于促进胚胎植入。

综上所述, 寿胎丸通过改善 RSA 模型小鼠母胎界面酸性微环境进而调节免疫应答活性, 这可能是寿胎丸促进胚胎植入以安胎的作用机制。但本研究仅从免疫细胞及免疫因子表达进行了研究, 寿胎丸如何通过调节母胎界面酸性微环境影响免疫耐受的具体机制有待进一步探究。

参考文献

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2013, 99(1): 63.
- [2] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 复发性流产诊治专家共识编写组. 复发性流产诊治专家共识(2022) [J]. 中华妇产科杂志, 2022, 57(9): 653-667.
- [3] ZHAO H, WONG RJ, STEVENSON DK, et al. The impact of hypoxia in early pregnancy on placental cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9675.
- [4] ZHANG L, WANG S, MA Y, et al. Shoutai Wan regulates glycolysis imbalance at the maternal-fetal interface in threatened abortion mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 312: 116502. doi: 10.1016/j.jep.2023.116502.
- [5] ARCK PC, HECHER K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health

- [J]. Nat Med, 2013, 19(5): 548–556.
- [6] 杨小梅, 陈梅, 李楠. 复发性流产 TH1/TH2、TH17/Treg 细胞失衡与阴阳失衡的关系探究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(7): 1466–1470.
- [7] 孙梦林, 游卉, 尤昭玲. 从精血同源探讨寿胎丸对女性生殖系统的调节 [J]. 世界中医药, 2023, 18(13): 1883–1886.
- [8] 马琚卓, 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.
- [9] 梁潇, 唐思玲, 宋亚静, 等. 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 [J]. 中医杂志, 2023, 64(10): 1044–1050.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 罗颂平. 从阴阳论女性生殖调节 [J]. 中医杂志, 2018, 59(23): 2013–2016.
- [13] LI HF, SHEN QH, LI XQ, et al. The efficacy of traditional Chinese medicine Shoutai pill combined with western medicine in the first trimester of pregnancy in women with unexplained recurrent spontaneous abortion: a systematic review and meta-analysis [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 7495161. doi: 10.1155/2020/7495161.
- [14] 林琳, 陈丽春, 陈溶鑫. 黄体酮、地屈孕酮在先兆流产保胎治疗中的疗效对比观察 [J]. 北方药学, 2022, 19(11): 73–75.
- [15] BARRERA-ZARATE JA, DETMER SE, PASTERNAK JA, et al. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 on angiogenesis and cell proliferation at the maternal-fetal interface [J]. Vet Pathol, 2022, 59(6): 940–949.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 陈镇燕, 王琪, 黄光英. 鼠类胎盘结构、血液循环及其来源 [J]. 解剖学杂志, 2010, 33(2): 256–259.
- [19] ALI S, MAJID S, NIAMAT ALI M, et al. Evaluation of T cell cytokines and their role in recurrent miscarriage [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 82: 106347. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106347.
- [20] KHESHTCHIN N, GHARAGOZLOO M, ANDALIB A, et al. The expression of Th1- and Th2-related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage: the impact of lymphocyte immunotherapy [J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 64(2): 104–112.
- [21] DING J, YIN T, YAN N, et al. FasL on decidual macrophages mediates trophoblast apoptosis: a potential cause of recurrent miscarriage [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(6): 2376–2386.
- [22] ZHANG YH, SUN HX. Immune checkpoint molecules in pregnancy: focus on regulatory T cells [J]. Eur J Immunol, 2020, 50(2): 160–169.
- [23] 龚玲玲, 卓睿, 周正欣, 等. 母胎免疫耐受平衡与复发性流产关系的研究进展 [J]. 实用医院临床杂志, 2021, 18(1): 187–190.
- [24] 牛甜甜, 陈元平, 归绥琪, 等. 补肾益气方调控 TGF- β 1 对反复自然流产患者外周血 Treg/Th17 细胞平衡的影响 [J]. 现代免疫学, 2016, 36(5): 364–368.

The Influence of *Shoutai Wan* (寿胎丸) on Lactic Acid Content at the Maternal-Fetal Interface and Expression of Immune-Related Factors in Recurrent Miscarriage Model Mice

LYU Jingfang¹, JIANG Min¹, ZHOU Zhenzhen¹, ZHANG Li¹, WANG Shuhui¹, LI Dandan¹, SONG Yajing¹, DU Huilan^{1,2,3}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050091; 2. Hebei Collaborative Innovation Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Reproductive Disease; 3. Hebei Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanisms of *Shoutai Wan* (寿胎丸) in treating recurrent miscarriage (RSA) from the perspective of immune tolerance under the acidic microenvironment at the maternal-fetal interface. **Methods** Female CBA/J mice were randomly divided into normal group, model group, progesterone group, and *Shoutai Wan* group, with 15 mice in each group. The mice in the normal group and model group were given 0.2 ml

distilled water by gavage each day, the *Shoutai Wan* group given *Shoutai Wan* decoction 0.15 g/(10 g·d) by gavage, the progesterone group given progesterone tablets 0.44 mg/(10 g·d) by gavage. After gavage for 14 days, the mice were cohabited. Female CBA/J mice in the normal group were mated with male BALB/c mice at a ratio of 2:1, and female CBA/J mice in the other groups were mated with male DBA/2 mice at a ratio of 2:1 to establish the RSA mouse model. Vaginal smears were taken from the female mice the next morning, and the appearance of a large number of spermatozoa and the presence of a vaginal plug were considered as the first day of pregnancy. After the appearance of the plug, the mice were continued to be administered according to the previous method until the 10th day of pregnancy. On the 10th day of pregnancy, maternal-fetal interface tissues were collected from each group of mice, and lactate dehydrogenase colorimetric method was used to detect lactate (LA) content; qPCR method and Western blot method were used to detect the expression of immune-related factors interleukin-4 (IL-4), interferon-gamma (IFN- γ), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), and forkhead box protein 3 (Foxp3) mRNA and protein; flow cytometry was used to detect the numbers of helper T lymphocyte 1 (Th1), helper T lymphocyte 2 (Th2), regulatory T cell (Treg), classical macrophage (M1), and alternative macrophage (M2). The bivariate Pearson test was used to analyze the correlation between LA content and the numbers of Th1, Th2, Treg, M1, and M2 cells, as well as the correlation between LA content and the expression of IL-4, IFN- γ , TGF- β 1, Foxp3 protein, and mRNA. **Results** On the 10th day of pregnancy, compared with the normal group, the LA content decreased in the model group, and the expression of IL-4, TGF- β 1, Foxp3 protein and mRNA in the maternal-fetal interface tissues decreased, while the expression of IFN- γ protein and mRNA increased. The numbers of Th1 and M1 cells increased, while the numbers of Th2, Treg, and M2 cells decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the LA content increased in the *Shoutai Wan* group and progesterone group. The expression of IL-4, TGF- β 1, Foxp3 protein and mRNA in the maternal-fetal interface tissues increased, while the expression of IFN- γ protein and mRNA decreased. The numbers of Th1 and M1 cells decreased, while the numbers of Th2, Treg, and M2 cells increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The LA content was positively correlated with the numbers of Th2, Treg, and M2 cells, and the expression of IL-4, TGF- β 1, Foxp3 protein, and mRNA ($P<0.05$ or $P<0.01$); the LA content was negatively correlated with the numbers of Th1, M1 cells, and the expression of IFN- γ protein and mRNA ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** *Shoutai Wan* may improve immune tolerance by regulating the expression of immune-related factors in the acidic microenvironment at the maternal-fetal interface of RSA model mice, thereby exerting its role in preventing miscarriage.

Keywords recurrent miscarriage; *Shoutai Wan* (寿胎丸); maternal-fetal interface; microenvironment; immune tolerance

(收稿日期: 2023-12-16; 修回日期: 2024-01-20)

[编辑: 邓媛]