

分类号 R271.9

学校代号 10572

UDC 610 密级

学 号 20142101010



广州中医药大学

Guangzhou University of Chinese Medicine

博士学位论文

菟丝子总黄酮调控 miRNA-126-3p
促进滋养细胞侵袭功能机制研究

学 位 申 请 人	<u>高飞霞</u>
指 导 教 师 姓 名	<u>罗颂平</u>
专 业 名 称	<u>中医妇科学</u>
申 请 学 位 类 型	<u>科学学位</u>
论 文 提 交 日 期	<u>2017 年 5 月</u>

广州中医药大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是个人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经特别加以注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。


学位论文作者签名 高飞霞

日期：2017年5月19日

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解广州中医药大学有关保留使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门机构送交论文的复印件和电子版，允许被查阅和借阅。本人授权广州中医药大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复印手段保存和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名 高飞霞 论文导师签名 

日期：2017年5月19日

摘 要

自然流产 (SA) 是指怀孕至 20 周以前发生的流产, 是妇产科常见的生殖障碍疾病。近年来随着自然流产的发生率增加, 学术界对自然流产机制研究仍然是一个热门的话题, 但自然流产的发生机制却尚未明确, 很多已有研究提出滋养细胞侵袭功能不足易引发自然流产, 滋养细胞维持正常的迁移和侵袭功能是保证正常妊娠的重要因素。因此滋养细胞则成了研究自然流产病理机制常用的工具, 而划痕试验和 Transwell 试验分别作为检测滋养细胞迁移和侵袭功能常用的实验室检测方法。miRNA 存在人体内的微小 RNA, 在多种疾病中存在着不同的作用。经过对比自然流产患者和正常早孕者的绒毛组织发现 miRNA-126-3p 的表达差异, 提示 miRNA-126-3p 可能与自然流产的发生有关系。而菟丝子总黄酮作为补肾安胎的代表药物, 其对滋养细胞侵袭功能的调控作用尚未见报导, 因此深入研究菟丝子总黄酮的对滋养细胞影响的药效机制具有重要意义, 菟丝子总黄酮是否会通过调控 miRNA-126-3p 来促进滋养细胞的侵袭功能是本课题即将探讨的问题。

目的:

研究自然流产患者绒毛组织与正常早孕者绒毛组织内 miRNA-126-3p 表达差异, 探讨 miRNA-126-3p 对滋养细胞迁移和侵袭功能的影响; 构建自然流产状态滋养细胞模型, 探讨菟丝子总黄酮对正常滋养细胞和自然流产状态细胞模型滋养细胞的调控机制研究。

方法:

1. miRNA-126-3p 的验证及其功能研究: 通过 RT-qPCR 方法验证自然流产患者和正常早孕者绒毛组织中 miRNA-126-3p 的表达差异, 利用 Lipofectamine® 2000 作为载体将 miRNA-126-3p 过表达与抑制型序列转染至滋养细胞, 划痕试验和 Transwell 试验观察滋养细胞的迁移和侵袭能力, 并用 RT-qPCR 方法检测滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达变化。

2. 菟丝子总黄酮对正常滋养细胞侵袭和迁移功能的影响: 采用 UV 和 HPLC 方法测定菟丝子总黄酮的含量, 用 MTT 法检测菟丝子总黄酮对滋养细胞的毒性。划痕试验和 Transwell 试验检测菟丝子总黄酮对正常滋养细胞侵袭和迁移功能影响。

3. 菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能影响: 采用检测不同浓度米非司酮对滋养细胞的迁移功能影响, 再进一步用米非司酮处理已转染 miRNA-126-3p 的滋养细胞, 构建自然流产状态滋养细胞模型, 同时用划痕试验检测其迁移功能的变化, RT-qPCR 方法检测该细胞内 miRNA-126-3p 的变化。用菟丝子总黄酮处理自然流产状态细胞模型, 划痕试验和 Transwell 试验检测不同组的迁移和侵袭功能, 以及用 RT-qPCR 方法检测细胞内 miRNA-126-3p 的表达变化。

4. 菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能的内在机制研究: 采用 miRanda, miRDB, TargetScan, CLIP 四个数据库预测 miRNA-126-3p 的靶基因, 采用 GO 富集分析和 KEGG 通路分析预测 miRNA-126-3p 的靶基因、可能的细胞功能和参与的信号通路, 并用 RT-qPCR 和 WB 的验证可能作用的靶基因变化。最后用双荧光素酶报告基因和绒毛组织验证确定 miRNA-126-3p 与靶基因的调控关系。

5. 菟丝子总黄酮通过影响滋养细胞内 MMP9 调控其迁移和侵袭功能: 通过用 RT-qPCR 检测经菟丝子总黄酮处理后滋养细胞 EVT 内 MMP9 mRNA 表达, 采用 western blotting 方法检测菟丝子总黄酮不同浓度与不同给药时间对 EVT 细胞内 MMP9 与相关信号通路的表达调控。

结果:

一、miRNA-126-3p 的验证及其功能研究

1. 自然流产患者绒毛组织中 miRNA-126-3p 的表达比正常早孕者绒毛组织上调, 两组间有统计学差异 ($p < 0.05$)。

2. 成功转染 miRNA-126-3p 至滋养细胞, 构建 miRNA-126-3p 过表达和干扰模型, 与正常滋养细胞相比, miRNA-126-3p mimic 组的 miRNA-126-3p 表达明显上调 ($p < 0.001$), miRNA-126-3p inhibitor 组的 miRNA-126-3p 表达明显下调 ($p < 0.01$)。

3. 过表达 miRNA-126-3p 后, 滋养细胞的迁移和侵袭能力降低, 侵袭细胞数目明显降低 ($p < 0.05$); 而干扰 miRNA-126-3p 后, 滋养细胞的迁移和侵袭能力提高, 侵袭的细胞数目明显增加 ($p < 0.01$)。

二、菟丝子总黄酮对正常滋养细胞侵袭和迁移功能的影响

1. UV 法测得菟丝子总黄酮的总黄酮含量达 90.876%, 再用 HPLC 方法检测得菟丝子总黄酮内单体含量包括含芦丁 77.75%, 槲皮素占 0.41%, 及其极少量的异鼠李素 0.03%, 其总黄酮的含量总达 78.19%。

2. 不同浓度的菟丝子总黄酮对滋养细胞无明显毒性。

3. $1 \mu\text{g/ml}$ 和 $5 \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮能明显促进滋养细胞的迁移功能, 呈时间和剂量依赖性; $1 \mu\text{g/ml}$ 和 $5 \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮能提高滋养细胞的侵袭能力, 细胞侵袭数目与 DMSO 组相比有统计学差异 ($p < 0.05$)。

三、菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能影响

1. $30 \mu\text{mol/L}$ 和 $60 \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮明显抑制滋养细胞的迁移和侵袭能力, 同时上调滋养细胞内源性 miRNA-126-3p 的表达。

2. $30 \mu\text{mol/L}$ 米非司酮干预转染 miRNA-126-3p 后的滋养细胞, 成功对米非司酮干预 miRNA-126-3p mimic-MIF 组构建自然流产状态下滋养细胞模型, 该模型组对比米非司酮干预 miRNA-126-3p inhibitor-MIF 组迁移能力降低, 且 miRNA-126-3p 表达

更高。

3. 以 miRNA-126-3p mimic negative-DMSO 组为对照, miRNA-126-3p mimic-DMSO 迁移能力降低, 用菟丝子总黄酮干预后, miRNA-126-3p mimic negative-TSZ 组较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 同样地 miRNA-126-3p mimic -TSZ 组较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 说明用菟丝子总黄酮干预后, 对比 DMSO, 能提高正常或过表达 miRNA-126-3p 滋养细胞的迁移能力。

4. 以 miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO 组为对照组, miRNA-126-3p inhibitor-DMSO 迁移能力增加, 用菟丝子总黄酮干预后, miRNA-126-3p inhibitor negative-TSZ 组较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 同样地 miRNA-126-3p inhibitor -TSZ 组较其 DMSO 组细胞迁移能力也增加, 而且 miRNA-126-3p inhibitor -TSZ 组的细胞迁移能力高于 miRNA-126-3p inhibitor negative-TSZ 组, 说明在菟丝子总黄酮作用下, 对比 DMSO, 能明显增加干扰 miRNA-126-3p 后的滋养细胞的迁移能力。

5. miRNA-126-3p inhibitor -TSZ 组的细胞迁移能力高于 miRNA-126-3p mimic -TSZ 组, 从而说明了菟丝子总黄酮能提高滋养细胞的迁移能力, 而且也能提高自然流产状态的滋养细胞的迁移功能, 如果干扰滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达, 使其下调, 此时菟丝子总黄酮提高滋养细胞迁移能力作用更明显。

6. 菟丝子总黄酮促进米非司酮诱导 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的侵袭功能。miRNA-126-3p mimic-TSZ 组较其 DMSO 组细胞侵袭能力增加, 对比 miRNA-126-3p mimic negative -DMSO 组有统计学差异 ($p < 0.05$)。miRNA-126-3p inhibitor -TSZ 组也较其 DMSO 组细胞侵袭能力增加, 对比 miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO 组有统计学差异 ($p < 0.05$)。而 miRNA-126-3p inhibitor -TSZ 组的细胞侵袭能力高于 miRNA-126-3p mimic -TSZ 组 ($p < 0.001$)。

7. 以 miRNA-126-3p mimic negative-DMSO 组为对照组, miRNA-126-3p mimic-DMSO 组和-TSZ 组的 miRNA-126-3p 表达上调, 有统计学差异 ($p < 0.05$); 以 miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO 组为对照组, miRNA-126-3p inhibitor-TSZ 组的 miRNA-126-3p 的表达明显下调, 对比有统计学差异 ($p < 0.05$)。造模组的 miRNA-126-3p mimic-TSZ 组和 miRNA-126-3p inhibitor-TSZ 组两两比较, miRNA-126-3p inhibitor-TSZ 组的 miRNA-126-3p 水平明显降低 ($p = 0.05$)。

四、菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能的内在机制研究

1. 通过数据库筛选出 miRNA-126-3p 的靶基因, 并从中挑选出关于细胞迁移和侵袭功能的靶基因有 10 个, 主要包括 VEGFA, SDC2, GOLPH3, SLC7A5, PEX5, ITGA6, NAV1, SMURF2, PLXNB2, PPP3CB, 关于细胞血管生成功能的有 CRK, PIK3R2 靶基因。

2. 通过 RT-qPCR 方法检测 SLC7A5, NAV1, PLXNB2, PEX5 四个靶基因的 mRNA 的水平在 miRNA-126-3p mimic 组表达下调, 而 miRNA-126-3p inhibitor 组表达上调。

3. 转染 miRNA-126-3p 至滋养细胞作用 48h 后,靶基因 PLXNB2,对比 miRNA-126-3p mimic negative 组, mimic 组的 PLXNB2 蛋白水平明显下调, 两组间有统计学差异 ($p < 0.01$); 以 miRNA-126-3p mimic 为对照组, inhibitor 组和菟丝子总黄酮组的 PLXNB2 蛋白水平明显提高, 具有统计学差异 ($p < 0.01$)。

4. 转染 miRNA-126-3p 至滋养细胞作用 48h 后,靶基因 PEX5,对比 miRNA-126-3p mimic negative 组, mimic 组的 PEX5 蛋白水平明显下降, 两组间有统计学差异 ($p < 0.05$); 以 miRNA-126-3p mimic 为对照组, inhibitor 组 PEX5 蛋白水平明显提高, 具有统计学差异 ($p < 0.01$), 但菟丝子总黄酮组的 PEX5 蛋白水平未见明显升高。

5. 双荧光素酶报告基因结果提示, 相对比野生型 PLXNB2-WT+ Non-target Control 组, PLXNB2-WT+mimic 组的荧光素蛋白的表达水平降低, 两组具有显著性统计学差异 ($p < 0.001$); 而突变型 PLXNB2-Mut+ Non-target Control 组相对于 PLXNB2-WT+ Non-target Control 组荧光素蛋白表达水平无明显差异, PLXNB2-Mut+mimic 组的荧光素蛋白的表达水平与 PLXNB2-Mut+ Non-target Control 组相比有少许降低, 差异不显著。PLXNB2 是 miRNA-126-3p 的靶基因。

6. WB 试验结果证明自然流产组织中 PLXNB2 蛋白水平相比正常妊娠组织水平表达下降, 具有统计学差异 ($p < 0.001$)。

五、菟丝子总黄酮通过影响滋养细胞内 MMP9 调控其迁移和侵袭功能

1. 经菟丝子总黄酮干预后, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮组中 MMP9 的基因水平均显著升高 ($p < 0.01$), 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮组 MMP9 的蛋白水平显著上调 ($p < 0.01$)。1 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮治疗滋养细胞内的 MMP9 蛋白和 mRNA 水平表达升高 ($p < 0.01$), 干预 8h 和 12h 后, MMP9 蛋白和 mRNA 表达水平差异有统计学差异。

2. 对 MAPK 通路的影响, 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮组对比与 DMSO 组, p-ERK 升高最明显 ($p < 0.01$), 而 ERK 总蛋白水平不受影响; 在不同的作用时间, 1 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮作用于滋养细胞后, ERK 的磷酸化水平在 1h, 2h 和 8h 时呈现显著性改变。1 $\mu\text{g/ml}$ 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 菟丝子总黄酮能促进滋养细胞内 p38 的磷酸化水平升高 ($p < 0.01$), 具有统计学差异, 而 p38 总蛋白水平则无明显变化。

3. 对 AKT 通路的影响, 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮作用于滋养细胞时, AKT(308)的磷酸化水平上调 ($p < 0.05$), 其总蛋白 AKT 水平不影响; 5 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮能上调 p-AKT(473)的蛋白表达水平 ($p < 0.05$), 而不影响其总蛋白的变化; 1 $\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮不同的作用时间, p-AKT(308)和 p-AKT(473)在 1h 时升高具有统计学差异 ($p < 0.05$)。

4. 对 Notch 通路的影响, 与对照组相比, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 菟丝子总黄酮均能够显著提高滋养细胞的 Notch1 和 Notch2 的蛋白水平, 差异具有统计学意义 ($p < 0.01$); Notch2 的表达在 1h 和 8h 变化具有统计学差异, 其中 8h 时 Notch2

表达显著上调 ($p < 0.01$)。

结论:

1. miRNA-126-3p 在自然流产绒毛组织中表达上调, 在滋养细胞内过表达 miRNA-126-3p 能抑制细胞的迁移和侵袭能力, 干扰 miRNA-126-3p 后其迁移和侵袭能力增加。

2. 用米非司酮诱导已转染 miRNA-126-3p mimic 的滋养细胞, 构建模拟自然流产状态滋养细胞模型。证实 $30 \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮造模后能抑制滋养细胞迁移能力, 同时上调滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达。此模型的迁移和侵袭能力明显降低, miRNA-126-3p 表达明显上调。

3. 深入研究发现菟丝子总黄酮能明显增加滋养细胞的迁移和侵袭能力, 且能通过激活 MAPK/AKT/Notch 通路上调 MMP9 的表达。

4. 菟丝子总黄酮能下调自然流产状态滋养细胞模型内 miRNA-126-3p 的表达, 同时提高其迁移和侵袭能力, 说明菟丝子总黄酮能通过调控 miRNA-126-3p 来促进滋养细胞的迁移和侵袭能力。

5. 菟丝子总黄酮通过调控 miRNA-126-3p 下游的 PLXNB2 蛋白进一步影响自然流产状态细胞模型滋养细胞的迁移和侵袭功能。体现其安胎, 防治流产的细胞药理作用。

关键词: miRNA-126-3p; 菟丝子总黄酮; 自然流产状态滋养细胞模型; 迁移和侵袭; MMP9

The study of TFSC promoting EVT invasion by targeting miRNA-126-3p

Specialty: Gynecology of Traditional Chinese Medicine

Author: Feixia Gao

Tutor: Prof. Songping Luo

Abstract

Background

Spontaneous abortion (SA) or Miscarriage refers to the abortion before 20 weeks of pregnancy, which is a common reproductive disorders of obstetrics and gynecology. In recent years, with the increase in the incidence of spontaneous abortion, research on spontaneous abortion mechanism is still a hot topic, but the pathogenesis of spontaneous abortion is still unclear. Many studies pointed out the dysfunction of trophoblast invasion easily lead to spontaneous abortion, the maintenance of normal migration and invasion ability of trophoblast cells is an important factor to ensure normal pregnancy. So Extravillous trophoblast cells(EVT) become the tools commonly used to study the pathological mechanism of the spontaneous abortion, and wound healing assay and Transwell assay are always used to detect the migration and invasion ability of EVT cells.

MicroRNAs(miRNAs) are small non-coding RNAs of about 22 nucleotides in length which may be important in many diseases. By comparing the expression of miRNA-126-3p in the villi of spontaneous abortion and normal early pregnancy, it was discovered that miRNA-126-3p could be related to the occurrence of spontaneous abortion. Total flavonoids from semen cuscatae(TFSC)as a representative Bushenantai drug, how it influences the internal mechanism of EVT cells has not been reported, so the pharmacodynamic mechanism of TFSC on EVT cells has important significance, whether TFSC by regulating miRNA-126-3p to promote the invasion ability of EVT cells is the key in this study.

Objective

Aims to study the miRNA-126-3p expression in chorionic villi in patients with spontaneous abortion and in patients with normal pregnancy, the effect of miRNA-126-3p on invasion and migration function of Extravillous trophoblast

cells(EVT); to construct spontaneous abortion state EVT cells model, to explore the pharmacodynamic mechanism of TFSC on the migration and invasion abilities of EVT cells and spontaneous abortion state EVT cells model.

Methods

1. The role and the function of miRNA-126-3p in spontaneous abortion: to verify the differential expression of miRNA-126-3p in patients with early pregnancy and spontaneous abortion villus tissues by RT-qPCR method, using Lipofectamine® 2000 as the vector of miRNA-126-3p mimic and inhibitor was transfected into EVT cells, would healing assay and Transwell assay to observe EVT cells' migration and invasion ability, and RT-qPCR for expression of miRNA-126-3p in EVT cells.

2. The effect of TFSC on the migration and invasion abilities of EVT cells: detect the contain of TFSC by UV and HPLC method; MTT method was used to detect TFSC on EVT cell toxicity. Would healing assay and Transwell assay for migration and invasion ability of EVT cells by TFSC treatment.

3. The effect of TFSC on the migration and invasion abilities of spontaneous abortion state model EVT cells by mifepristone treatment: detect the migration ability of EVT with different dosage of mifepristone by would healing assay. By using mifepristone intervention on EVT cells with the transfection of miRNA-126-3p, to construct spontaneous abortion state EVT cells model. The migration ability of the model was tested by would healing assay and the miRNA-126-3p changes of the model was detected by RT-qPCR. With the treatment of TFSC on spontaneous abortion state EVT cells model, would healing assay and Transwell assay were used for different groups of migration and invasion, and RT-qPCR were for the expression of intracellular miRNA-126-3p changes.

4. The mechanisms of TFSC promoting the migration and invasion abilities of spontaneous abortion state model EVT cells by mifepristone treatment: using miRanda, miRDB, TargetScan and CLIP four database, to predict target gene of miRNA-126-3p, using GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis to predict cell function and signaling pathway that the target gene of miRNA-126-3p might be involved in. And RT-qPCR and WB were used to verify. Finally, the relationship between miRNA-126-3p and target gene was confirmed by double luciferase reporter gene and chorionic villus tissue.

5. TFSC promote the migration and invasion of EVT cells by tarteting MMP9:

RT-qPCR was used to verify for the expression of MMP9 mRNA after TFSC treatment. Relevant signaling pathways that TFSC of different dosages and different time points on EVT cells might regulate were tested via western blotting.

Results

一. The role and the function of miRNA-126-3p in spontaneous abortion

1. The expression of miRNA-126-3p in villus of patients with spontaneous abortion was higher than that in normal pregnant women, and there was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$).

2. Successful transfection of miRNA-126-3p into EVT cells to construct miRNA-126-3p mimic and inhibitor model, compared with normal EVT cells, miRNA-126-3p expression of miRNA-126-3p mimic group was significantly increased ($P < 0.001$), while miRNA-126-3p inhibitor group was significantly lowered ($P < 0.01$).

3. Overexpression of miRNA-126-3p group decreased the migration and invasion of EVT cells, cell numbers were significantly lower ($P < 0.05$); while the migration and invasion of miRNA-126-3p inhibitor group increased, the numbers of cell invasion were significantly increased ($P < 0.01$).

二. The effect of TFSC on the migration and invasion abilities of EVT cells

1. The content of TFSC by UV was 90.876%, HPLC for the detection of TFSC containing concluded 77.75% rutin, quercetin accounted for 0.41%, a very small amount of isorhamnetin for 0.03%, the total content of brass for 78.19%.

2. Different dosages of TFSC had no significant toxicity for EVT cells.

3. 1 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$ TFSC could significantly promote the migration of EVT cells by wound healing assay, in a time and dose-dependent manner; 1 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$ TFSC could increase the invasion ability; compared to DMSO group, the invasion cell number of TFSC were statistically significant ($P < 0.05$).

三. The effect of TFSC on the migration and invasion abilities of spontaneous abortion state model EVT cells by mifepristone treatment

1. 30 $\mu\text{mol/L}$ and 60 $\mu\text{mol/L}$ mifepristone significantly inhibited the migration ability of EVT cells, and up-regulated intracellular miRNA-126-3p in EVT cells.

2. EVT cells of 30 $\mu\text{mol/L}$ mifepristone intervention after miRNA-126-3p transfection, which was miRNA-126-3p mimic-MIF group, was successfully constructed for spontaneous abortion state EVT cells model. Compared with miRNA-126-3p inhibitor-MIF group, the model had lower migration ability, and

higher expression of miRNA-126-3p.

3. Compared with miRNA-126-3p mimic negative-DMSO group, the migration ability of miRNA-126-3p mimic-DMSO was decreased. After TFSC treatment, the migration ability of miRNA-126-3p mimic negative-TSZ was better than its DMSO group, and the migration ability of miRNA-126-3p mimic -TSZ was also better than its DMSO group. TFSC could increase the migration of miRNA mimic and inhibitor groups, compared with the control group.

4. Compared with miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO group, the migration ability of miRNA-126-3p inhibitor-DMSO was increased. After TFSC treatment, the migration ability of miRNA-126-3p inhibitor negative-TSZ was better than its DMSO group, and the migration ability of miRNA-126-3p inhibitor -TSZ was also better than its DMSO group, and better than miRNA-126-3p inhibitor negative-TSZ. TFSC could increase the migration of miRNA-126-3p inhibitor group.

5. The migration ability of miRNA-126-3p inhibitor -TSZ was also better than miRNA-126-3p mimic -TSZ group. TFSC could increase the migration ability of EVT cells, and also promote the migration of spontaneous abortion state EVT cells model. If known down the expression of miRNA-126-3p in EVT cells, the function of TFSC increasing EVT migration ability was more obvious.

6. TFSC could increase the invasion ability of the spontaneous abortion state EVT cells model. The invasion cell number of miRNA-126-3p mimic -TSZ was significantly increased than its DMSO group, and had statistical significance, compared with miRNA-126-3p mimic negative -DMSO group ($p < 0.05$). The invasion cell number of miRNA-126-3p inhibitor -TSZ was significantly increased than its DMSO group, and had statistical significance, compared with miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO group ($p < 0.05$). The invasion cell number of miRNA-126-3p inhibitor -TSZ was increased than miRNA-126-3p mimic -TSZ ($p < 0.001$).

7. Compared with miRNA-126-3p mimic negative-DMSO group, the miRNA-126-3p expression of miRNA-126-3p mimic-DMSO and -TSZ group were up-regulated ($p < 0.05$). Compared with miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO group, the miRNA-126-3p expression of miRNA-126-3p inhibitor-TSZ was down-regulated ($p < 0.05$). And the miRNA-126-3p expression of miRNA-126-3p inhibitor-TSZ was down-regulated, compared with miRNA-126-3p mimic-TSZ, the model group ($p = 0.05$).

四. The mechanisms of TFSC promoting the migration and invasion abilities of spontaneous abortion state model EVT cells by mifepristone treatment

1. Screening of the target genes of miRNA-126-3p target genes through the database, there were ten mRNA about invasion and migration ability of cells, including VEGFA, SDC2, GOLPH3, SLC7A5, PEX5, ITGA6, NAV1, SMURF2, PLXNB2, PPP3CB, about cell angiogenesis function, including CRK, PIK3R2.

2. The mRNA level of SLC7A5, NAV1, PLXNB2, PEX5 on miRNA-126-3p mimic were down-regulated, and on miRNA-126-3p inhibitor were up-regulated, by using RT-qPCR.

3. After miRNA-126-3p transfection to EVT cells after 48h, PLXNB2 protein levels of miRNA-126-3p mimic group, compared with negative group, was significantly decreased ($p < 0.01$); compared with miRNA-126-3p mimic group, PLXNB2 protein level of inhibitor group and TFSC group were significantly up-regulated, with statistical difference ($p < 0.01$).

4. After miRNA-126-3p transfection to EVT cells after 48h, PEX5 protein levels of miRNA-126-3p mimic group, compared with negative group, was significantly decreased ($p < 0.05$); compared with miRNA-126-3p mimic group, PEX5 protein level of inhibitor group was significantly up-regulated, with statistical difference ($p < 0.01$), but TFSC group without change.

5. Dual luciferase reporter gene showed that compared with the wild type PLXNB2-WT+ Non-target Control group, the fluorescein expression level of PLXNB2-WT+mimic protein group decreased, with significant difference ($p < 0.001$); while the Non-target mutant PLXNB2-Mut+ Non-target Control group had no significant difference compared with PLXNB2-WT+ Non-target Control group. The fluorescein expression of PLXNB2-Mut+mimic group, compared with PLXNB2-Mut+ Non-target Control group, was a little lower, without statistical difference. PLXNB2 was the target gene of miRNA-126-3p.

6. The expression of PLXNB2 in spontaneous villus was decreased than in noamal pregnancy villus by Western blotting.

五. TFSC promote the migration and invasion of EVT cells by tarteting MMP9

1. The expression of MMP9 mRNA in EVT cells was obviously increased after 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml and 5 μ g/ml TFSC treatment, MMP9 protein was increased after 1 μ g/ml and 5 μ g/ml TFSC ($p < 0.01$). The mRNA and protein expression were quite different between 8 h and 12 h TFSC treatment in the dosage of 1 μ g/ml ($p < 0.01$).

2. On MAPK signaling pathway, 1 μ g/ml and 5 μ g/ml TFSC up-regulated p-ERK

level, without changing total ERK ($p < 0.05$). $1 \mu\text{g/ml}$ TFSC increased p-ERK levels in different time point (1h, 2h, 8h), especially in 1h, with the most obvious increase in p-ERK expression. TFSC increased p38 phosphorylation in a dose-dependent manner, without changing total p38 ($p < 0.01$).

3. On AKT signaling pathway, $1 \mu\text{g/ml}$ and $5 \mu\text{g/ml}$ TFSC increased p-AKT(308) in EVT cells but no changes in total AKT expression ($p < 0.05$). $5 \mu\text{g/ml}$ TFSC increased p-AKT(473) in EVT cells also without changes in total AKT ($p < 0.05$). Treated with $1 \mu\text{g/ml}$ TFSC for the indicated times (1, 2, 4, 8, 12h), p-AKT(308) and p-AKT(473) were up-regulated in 1h ($p < 0.05$).

4. On Notch signaling pathway, compared with the control group, TFSC highly up-regulated Notch1 and Notch2 expression in EVT cells ($p < 0.01$). Treated with $1 \mu\text{g/ml}$ TFSC for the indicated times (1, 2, 4, 8, 12h), Notch2 was increased in 1h and 8h, especially in 8h ($p < 0.01$), while Notch1 not.

Conclusion(s)

1. The expression of miRNA-126-3p was up-regulated in the spontaneous abortion and the over expression of miRNA-126-3p could inhibit the migration and invasion of EVT cells, and the miRNA-126-3p inhibitor increased the migration and invasion ability.

2. Using mifepristone to construct for spontaneous abortion state EVT cells model. $30 \mu\text{mol/L}$ mifepristone significantly inhibited the migration of EVT cells and up-regulated intracellular miRNA-126-3p in EVT cells. The model group had lower migration ability, and higher expression of miRNA-126-3p.

3. TFSC could increase the migration and invasion of EVT cells, and activate the signal transduction among MAPK, AKT and Notch signaling pathways by increasing MMP9 expression.

4. TFSC treatment on spontaneous abortion state EVT cells model group, decreased the expression of miRNA-126-3p in a certain range, and obviously improved the migration and invasion ability of the model group, in order to show that TFSC could improve the migration and invasion of EVT cells of spontaneous abortion by targeting miRNA-126-3p.

5. TFSC could down-regulate miRNA-126-3p expression of spontaneous abortion state model cells, and activate the downstream PLXNB2, so as to promote the migration and invasion of spontaneous abortion state model cells, play an important role in Bushenantai, pharmacodynamic mechanism on cells to prevent abortion.

Key Words: miRNA-126-3p, TFSC, spontaneous abortion state EVT cells model,
migration and invasion, MMP9

目 录

广州中医药大学学位论文原创性声明.....	
摘 要.....	I
Abstract.....	VI
目 录.....	XIII
引 言.....	1
第一章 文献综述.....	3
第一节 自然流产机制研究.....	3
一、基因因素（染色体异常）.....	3
二、免疫因素.....	4
三、血管生成因素（血栓）.....	4
四、代谢及内分泌因素.....	4
第二节 滋养细胞的功能.....	4
一、细胞凋亡.....	5
二、细胞增殖.....	5
三、细胞侵袭与迁移.....	6
四、细胞血管生成.....	7
五、米非司酮对滋养细胞迁移和侵袭功能的影响.....	7
第三节 菟丝子总黄酮治疗自然流产的研究.....	8
一、改善生殖内分泌的功能.....	8
二、改善缺氧、凋亡的作用.....	9
三、保护心脑血管的作用.....	9
四、改善免疫调节作用.....	10
五、改善骨代谢的作用.....	10
第四节 miRNA 在自然流产中的作用.....	10
一、影响滋养细胞凋亡功能.....	11
二、影响滋养细胞增殖功能.....	11
三、影响滋养细胞侵袭与迁移功能.....	12
四、影响滋养细胞血管生成功能.....	12
五、miRNA-126-3p 与滋养细胞.....	12
第二章 实验研究.....	14
第一节 立论依据及其实验技术路线.....	14
一、立论依据.....	14

二、技术路线.....	14
第二节 miRNA-126-3p 的验证及其功能研究.....	15
一、实验目的.....	15
二、实验材料与方法:	15
三、实验结果:	20
四、讨论.....	25
五、小结.....	27
第三节 菟丝子总黄酮对正常滋养细胞迁移和侵袭功能的影响	27
一、实验目的.....	27
二、实验材料与方法.....	27
三、实验结果.....	30
四、讨论.....	36
五、小结.....	38
第四节 菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能影响	38
一、实验目的.....	38
二、实验材料与方法.....	38
三、实验结果.....	41
四、讨论.....	49
五、小结.....	53
第五节 菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能的内在机制研究	53
一、实验目的.....	53
二、实验材料与方法.....	53
三、实验结果.....	60
四、讨论.....	66
五、小结.....	68
第六节 菟丝子总黄酮通过影响滋养细胞内 MMP9 调控其迁移和侵袭功能	69
一、实验目的.....	69
二、实验材料与方法.....	69
三、实验结果.....	70
四、讨论.....	76
五、小结.....	78
结 语.....	79
参考文献.....	81

附 录.....	94
在校期间发表论文情况.....	97
致 谢.....	98

引 言

自然流产 (spontaneous abortion, SA) 是指怀孕至 20 周以前发生的流产现象, 是妇产科常见的生殖障碍疾病, 其中 10% 的自然流产可在临床上确诊, 20% 的自然流产在下次月经来潮前已经发生。近年来临床上所见的自然流产的发生率逐年增高, 在备孕的夫妇之中高达 1% 可能发生自然流产, 其中发生 2 次以上的自然流产率高达 5% 以上^[1]。自然流产发生率如此之高, 严重影响了夫妇怀孕甚至正常生育, 然而其发病机制尚未完全明确, 目前已有研究报道主要包括基因突变 (染色体异常), 免疫因素, 血栓形成倾向、内分泌及代谢因素、子宫形态异常、感染、环境或者个人习惯以及不明原因的自然流产等^[1, 2]。

正值国家放开二胎政策的实施, 妊娠患者将会比以往增加, 且孕妇年龄亦可能增加, 可以想象前来就诊患者可能发生自然流产的机率将有可能随之升高。因此, 研究自然流产的发病机理对指导临床上治疗自然流产有重要的指导意义。其中, 滋养细胞是受精卵着床后妊娠过程中最重要的一环, 侵袭能力是滋养细胞重要的功能, 滋养细胞正常发挥其侵袭功能, 是维持正常妊娠的关键环节, 如果滋养细胞的功能失调, 易出现胎儿畸形, 胎儿生长阻滞, 自然流产, 死胎等; 如当侵袭功能过强, 易造成胎盘植入或绒毛膜癌, 大出血而危害母体生命; 而当侵袭功能不足, 易引发自然流产或先兆子痫。因此研究滋养细胞的迁移和侵袭功能及其调控机制对了解自然流产发生和预防很有意义。

miRNA 是非编码的小 RNA, 学术界发现 miRNA 的变化会影响细胞的功能, 如增殖, 迁移和侵袭等。miRNA-126-3p 被发现在先兆子痫的发生具有重要作用, 而先兆子痫和自然流产都有可能是因为滋养细胞的侵袭过强或不足引起, 因此, miRNA-126-3p 在自然流产中是否发挥着同样作用以及其是否引起滋养细胞的侵袭功能改变是值得深入探讨的课题。

我们的前期研究表明中药提取物菟丝子总黄酮可以防治自然流产, 且临床疗效显著, 并提出其作用可能是通过影响滋养细胞的功能而实现的, 但其确切的分子机制尚不明确, 本课题将重点研究菟丝子总黄酮如何通过 miRNA-126-3p 来调控滋养迁移和侵袭细胞功能, 明确菟丝子总黄酮的补肾安胎的疗效与机制, 以便更好的指导临床用药。

第一章 文献综述

第一节 自然流产机制研究

自然流产的临床发生机制尚未明确，目前提出的可能因素主要包括染色体异常，免疫因素，血栓形成，代谢与内分泌因素，且有一些表现为子宫形态解剖异常，或者环境因素、感染因素，以及一些不明原因的自然流产等。

一、基因因素（染色体异常）

染色体异常是导致自然流产发生常见的原因，在对 1414 对夫妇得研究中发现，存在 3 个染色体异位的女性携带者（男性染色体正常），亦可生育出染色体正常的健康婴儿。按照遗传学原理，在携带 3 个染色体异位的女性后代中，12.5%可能性是正常染色体，12.5%可能性是染色体平衡易位，75%可能性会出现染色体失衡，大约 0.1% 的机会会出现 RSA^[3]。对发生不明原因的 129 例 RSA 患者对比 183 例正常妊娠妇女染色体进行检查，发现 URSA 患者体内出现 ESR1 基因的多态性，URSA 患者 ESR1 基因上 PvuIIC 和 XbaI G 高度表达，而正常妊娠妇女则没有发现。同时提出 XbaI G 上 GG 基因型及 PvuIIC /XbaI G 上 C-G 单体型是造成 URSA 的危险因子^[4]。进一步对流产患者基因组的 microRNA 进行系列研究，血清内检测到差异，包括 DICER rs3742330, DROSHA rs10719, RAN GTPase (RAN) rs14035 和 exportin-5 (XP05) rs11077, 利用 MDR 方法检测该四种多态性基因间的联系，结果得出 RAN rs14035 CC genotype and DICER rs3742330/DROSHA rs10719 GG/TC+CC, rs3742330/RAN rs14035 GG/CC, DICER rs3742330/XP05 rs11077 GG/AC+CC 联合能够增加 RPL 的危险，而 RAN rs14035 CT, DICER rs3742330/RAN rs14035 AA+AG/CT+TT, DROSHA rs10719/RAN rs14035 TC+CC/CT+TT, RAN rs14035/XP05 rs11077 CT+TT/AA 联合能够减少 RPL 的危险。A-T-T-C and G-C-T-A 等位基因联合在 RPL 患者中表达显著增高^[5]。研究还发现 RSA 患者基因中 HLA-G 5' 上游基因也表达异常^[6]，RSA 患者绒毛组织的 FKBP52 水平降低^[7]，而 HMGB1 水平升高^[8]。在对 RSA 患者内纤溶系统的研究中，发现纤溶系统会引起 RSA 的发生，其 PLAUR rs4251923, SERBP2 rs6098 和 SERBP2 rs6103 的基因多态性是造成 RSA 的危险因子^[9]。

通过对比研究 32 例 RSA 和 35 例有过正常妊娠的妇女早期妊娠时 kisspeptin/GPR54 和 PIBF/PR 在滋养细胞和蜕膜细胞上的表达差异，结果发现，kisspeptin 在两组患者的合体滋养细胞，细胞滋养细胞和蜕膜中都有表达，但在 RSA 患者水平中较低；GPR54 在合体滋养细胞和蜕膜中有表达，在 RSA 患者的合体滋养细胞中表达水平显著降低；kisspeptin/GPR54 在蜕膜细胞联合表达下降可能与 RSA 发生有关。对于 RSA 患者，PR 在蜕膜细胞上表达下降，PIBF 在滋养细胞和蜕膜的表达显著下降，尤其是在合体滋养细胞中，而且 PIBF 与 PR 在蜕膜细胞上表达有相关性；另外滋养细胞和蜕膜细胞上 kisspeptin 的表达与 PIBF 有关^[10]。

二、免疫因素

免疫因素是临床 RSA 患者排查流产原因常需考虑的因素, 在临床统计研究 1140 个 RSA 患者, 发现患者免疫学检测血清 VEGF 和 sFIT-1 水平较正常妊娠患者高, 从而得出 VEGF 和 sFIT-1 可能与 RSA 发病机制有关^[11]。另外发现 RSA 患者中 Th17 细胞水平升高, 而 Treg 细胞水平降低, 血清中 Treg 相关因子 TGF、Th2 分泌增加, 而 Th17 相关因子 IL-17A、Th1 因子分泌减少, Th17 和 Treg 水平的失衡可能是导致流产的原因^[12, 13]。

三、血管生成因素 (血栓)

Dendrinos S^[14]等通过临床调查 100 个希腊 RSA 患者和 100 个正常妇女中 (无血栓形成疾病), 发现 15 个 RSA 患者 FXII 活动缺乏, 而所有正常妇女中则见, 从而提出 FXII 的缺乏与希腊人群罹患 RSA 息息相关。与此同时, 有血栓形成倾向的患者, 自然流产的发生率是正常妊娠患者的 2.9 倍^[15]。

四、代谢及内分泌因素

代谢功能的异常可能是引发 RSA 的病理机制, 在利用 1H NMR 检测和多元统计方法计算 RSM 患者血清中代谢组分后, 发现在 IRSM 患者血清样本的代谢组分, 包括赖氨酸、精氨酸、谷氨酸盐、组氨酸、苏氨酸、苯基丙氨酸、络氨酸表达调控上调, 此类代谢组分可能参与患者子宫内膜容受性的炎症反应和血管功能障碍, 因此阐明维持代谢成分平衡机制可以防治 IRSM 的发生^[16], 但不一定与患者 GSTA1(rs3957357)有关^[17]。临床上出现的部分内分泌因素引起的自然流产也很多见, 如甲状腺功能减退^[18, 19], PCOS^[20]等疾病都会有可能引发自然流产的发生。

总体而言, 已有众多学者研究了自然流产的发病机制, 主要的发现几乎都属于以上几种, 却均未得到确切的证实, 仍尚需继续深入研究其具体发病原因。滋养细胞是胚胎着床后继续生长发育的重要参与者, 发挥着重要的作用, 是探讨自然流产病因必不可少的对象, 因此我们将从另一方面—滋养细胞的功能入手来研究自然流产的发病机制。

第二节 滋养细胞的功能

滋养细胞来源于胚胎外的滋养层, 其包括细胞滋养细胞 (cytotrophoblast, CT)、合体滋养细胞 (syncytiotrophoblast, ST) 和中间型滋养细胞。其中在绒毛膜部分的滋养细胞称为绒毛滋养细胞, 其他部位的为绒毛外滋养细胞 (extravillous trophoblast, EVT)^[21]。滋养细胞和蜕膜细胞是胚胎发育过程中相辅相成, 其功能的正常发挥对维持正常妊娠有重要的意义。滋养细胞在胚胎植入和母体子宫内膜的蜕膜化侵入过程中起着重要作用。滋养细胞的功能包括增殖、凋亡、迁移、侵袭以及血管生成等, 如果滋养细胞的功能失调, 易出现胎儿畸形, 胎儿生长阻滞, 自然流产, 死胎等; 如侵袭功能过强, 易造成胎盘植入或绒毛膜癌, 大出血而危害母体生命; 如侵袭功能不足, 易引发自然流产或先兆子痫, 胎儿生长阻滞等临床常见妇产科疾病^[22, 23]。

因此, 研究滋养细胞的功能于调控机制对阐明自然流产的发病机制有重要的作用。

一、细胞凋亡

Denghua Wei^[24]等人研究 53 个不明原因复发性流产患者和 32 个正常妊娠患者的绒毛组织, qPCR 和免疫组化方法检测绒毛组织 p53 的表达和凋亡率, 结果发现不明原因复发性流产患者的绒毛组织 p53 的表达比正常组升高, 凋亡率也随着增加。另外, 研究发现流产组织中 CDKN1A 和 Bax mRNA 的表达升高, 凋亡率同样增加^[25]。通过光镜和免疫组织化学法分析凋亡调控蛋白 Bcl-2 和 Bax 在流产患者绒毛组织的表达, 得出稽留流产患者绒毛滋养细胞比对照组的凋亡指数明显增高, Bax 阳性表达率增加, 而 Bcl-2 的表达阳性率下降, Bcl-2/Bax 的比值也下降, 以此导致稽留流产^[26]。

在体外实验中, 通过 Percoll 梯度离心法提取早孕原代滋养细胞, 然后用 10 μ g/ml 和 100 μ g/ml 的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 进行干预, 利用 RT-PCR 法测定 Bax 和 Bcl-2 的基因表达水平, TUNEL 法测定细胞凋亡的数目, 结果显示, 与对照组相比, TNF- α 能够增加 Bax 的表达水平, 促进细胞凋亡, 且浓度越高, Bax 表达越高, 细胞凋亡数目越多, 而 Bcl-2 的表达则无统计学意义。进一步实验证明 TNF- α 能够诱导早孕细胞滋养细胞的凋亡^[27]。另外, EGF 能够通过上调 PKB α /AKT 的磷酸化水平来减少滋养细胞的凋亡, 敲除 EGFR 信号通路后, 滋养细胞的凋亡率增加^[28]。

二、细胞增殖

不同的因子如转录因子, 特定因子, 激素, 生长因子, 细胞因子等都可能参与到滋养细胞的增殖过程。如实验发现表皮生长因子 (EGF)、白血病抑制因子 (LIF), 血管内皮生长因子 (VEGF), 粒细胞刺激因子 (G-CSF) 和转化生长因子 (TGF) 能够调节滋养细胞 HTR-8/Svneo 细胞株的增殖, 而且 LIF 可通过 ERK1/2 信号通路调节滋养细胞的增殖活力^[29]。继续研究 EGF 对滋养细胞增殖的调控功能时, 发现过表达和 shFoxM1 成功转染至 JAR 细胞, 过表达 FoxM1 能够促进 JAR 细胞的增殖, 迁移和侵袭, EGF 能够上调 FoxM1 的表达, 呈时间和剂量依赖性, MMP2 表达升高, 且是通过 ERK 信号通路实现对 FoxM1 的上调, 促进滋养细胞的增殖、侵袭和迁移。体内动物实验也证明沉默 FoxM1 后, 大鼠子宫变薄和充血, 间质细胞遭到破坏。因此说明, EGF 能够通过上调 FoxM1 促进滋养细胞的增殖、侵袭^[30]。而磷蛋白 STMN1, 实验发现其与自然流产息息相关, 经过在原代培养滋养细胞和 HTR-8/Svneo 细胞株研究发现在敲除 STMN1 后下调 N-钙粘蛋白, 上调 E-钙粘蛋白的表达, 影响细胞质核移位, 下调 MMPs 表达, 从而降低滋养细胞的增殖, 迁移和侵袭能力。进一步还发现 TNF- α 能够下调 STMN1 的表达, 降低 TNF- α 表达后滋养细胞迁移和侵袭功能也相对降低, 因此说明 STMN1 在自然流产中其重要作用, 其表达异常能够影响滋养细胞的增殖, 侵袭等功能^[31]。

另外, 在研究人重组 H2 松弛素 (rH2 松弛素) 对滋养细胞的作用时发现, 在 HTR-8/Svneo 细胞株加入 1ng/ml 的 rH2 松弛素, AKT 和 GSK3 β 的磷酸化水平升高, 且呈时间依赖性, 同时能增加细胞株的增殖能力, 因此说明 PI3K/AKT 通路可能激发

滋养细胞的增殖^[32]。其中细胞质酶吲哚胺 2,3-二氧化酶 (IDO), 能够通过 STAT3 信号通路, 增加 p-STAT3 和 MMP9 的表达, 从而促进滋养细胞的增殖和迁移, 由此说明 IDO 的表达水平的失调可能与不明原因的自然流产患者流产病因有关^[33]。

三、细胞侵袭与迁移

PI3K/AKT 通路不仅影响滋养细胞的增殖功能, 还可能影响滋养细胞的侵袭和迁移功能。有学者^[34]研究 CDX1 能够抑制 HTR-8/Svneo 细胞株的侵袭能力, 通过在细胞株内转染 CDX1 后, 发现过表达 CDX1 能够降低滋养细胞的侵袭能力, 但不影响细胞的增殖活力, 进一步发现, 过表达 CDX1 通过抑制 MMP-9 的表达, 增加 TIMP-1 的表达来影响滋养细胞的侵袭, 具体研究后, 在滋养细胞上过表达 CDX1 后, PI3K/AKT 信号通路未见明显变化, 而利用哌立福辛抑制 PI3K 信号后, 能够增加 CDX1 的表达, 相对比对照组, 仅过表达 CDX1 能减少滋养细胞的侵袭 (26%), 而同时过表达 CDX1 和抑制 PI3K 信号, 滋养细胞侵袭降低至 15%, MMP-9 活力也降低。因此说明, PI3K/AKT 能够抑制 CDX1 的表达, 可能与 CDX1 协同影响滋养细胞的侵袭。然而, 在研究 CDX2 时, 过表达 CDX2 同样不影响细胞的增殖活力, 但与 CDX1 不同的是, 过表达 CDX2 能够增加细胞的侵袭能力, 增加 MMP-9 的表达, 抑制 TIMP-1 的表达, 抑制 PI3K/AKT 信号通路能够降低 CDX2 的表达。总的来说, PI3K/AKT 信号通路能够调控 CDX1 和 CDX2, 影响 MMP-9 的表达, 来调节滋养细胞的侵袭, 这为研究与妊娠相关疾病的机制提供了重要的作用^[35]。

另外, 在研究细胞因子类对滋养细胞侵袭和迁移功能的影响, M. Jovanovic Krivokuca^[36]研究巨噬细胞趋化抑制因子 (MIF) 对绒毛滋养细胞和绒毛外滋养细胞的影响, 实验结果同样发现, MIF 也能够增加 MMP-9 的表达, rhMIF 的作用下, 两种细胞的侵袭和迁移能力增加, 合体滋养细胞内 MMP-2 和 HTR-8/SVneo 细胞内 MMP-9 表达也同样升高; 而在 ISO-1 抑制剂作用下, 合体滋养细胞和 HTR-8/Svneo 细胞株的侵袭和迁移能力降低, 说明 MIF 能够促进细胞的迁移和侵袭。同样发现 MMP-9 在滋养细胞有表达差异, Leilei Wang^[37]研究层粘连蛋白受体 (LR1) 对缺氧诱导条件下滋养细胞样细胞 (JEG3 和 Bewo 细胞株) 的迁移和侵袭功能的影响, 通过划痕实验, Transwell, RT-PCR 和 Western blot 等实验, 发现当缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 引发的缺氧条件下, JEG3 细胞内 LR1 的表达, 当敲除 LR1 的时候, 缺氧状况下 JEG3 细胞内 MMP-9 的活力降低, 过表达 LR1 时, JEG3 细胞的迁移和侵袭能力增加, MMP-9 的活力和表达都升高。因此说明 LR1 参与滋养细胞缺氧过程, 能够部分调控 MMP-9 表达。另外发现, 瘦素 (Leptin) 能够通过 Notch1 和 PI3K/Akt 通路的相互影响来上调 MMP14 的表达, 增加滋养细胞 HTR-8/Svneo 的迁移和侵袭能力^[38]。

除此之外, sCD146 也能够调节滋养细胞的迁移, 体外实验结果发现 sCD146 能够抑制 HTR-8/Svneo 的迁移和侵袭能力, 而不影响细胞的增殖和凋亡能力。在正常妊娠过程中 sCD146 的表达量显著降低。体内动物实验也发现 sCD146 能够降低小鼠的生育

力。sCD146 可能可以作为胎盘血管生成的标记物和治疗妊娠病发病的靶点^[39]。研究环孢素 CsA 诱导后原代滋养细胞侵袭功能,发现在加入外源性的 TGF- β 1 和 TGF- β 2 后, CsA 诱导人滋养细胞侵袭、迁移、活力的作用减弱,加入中和性抗体,则作用加强; CsA 能够抑制滋养细胞分泌 TGF- β 2, 呈剂量依赖性,但不影响 TGF- β 1 的分泌。因此 CsA 发挥其免疫抑制性可能是通过下调 TGF- β 2 来促进滋养细胞的侵袭^[40]。

四、细胞血管生成

血管内皮生长因子 (VEGF-A) 是最常用于研究滋养细胞血管生成的血管生成因子^[23]。Victor A. Francis^[41] 研究 Kisspeptin (KP) 是否对滋养细胞血管生成和侵袭能力的影响时就是通过 VEGF-A 表达不同而鉴定 KP 的作用,发现相比于 HTR8 细胞,原代培养的滋养细胞内 KP 和 GPR54 的表达较高; KP 能够抑制滋养细胞的迁移,降低 MMPs 的表达,升高 TIMP1, 3 的表达,明显下调内皮生长因子 A (VEGF-A),而对血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 作用不明显,从而说明 KP 能够影响滋养细胞的血管生成和侵袭能力。另外,有研究发现蜕膜 NK 细胞发挥其迁移和血管生成能力时,FTY720 能够下调蜕膜 NK 细胞的 SIPR 的表达,也能增加 VEGF 的表达,抑制其血管生成能力,说明鞘氨醇 (Sphingosine) SIP 信号参与 VEGF 生成,在蜕膜 NK 细胞血管生成功能去重要作用^[42]。研究表明层粘连蛋白 α 4 (LAMA4) 对滋养细胞的功能有影响,在早期妊娠中的胎盘绒毛细胞和内皮细胞上都有表达,对比正常妊娠患者,先兆子痫患者绒毛细胞中 LAMA4 降低。进一步发现 LAMA4 能够抑制 HTR-8/SVneo cells 的血管生成,侵袭和迁移能力,减少 MMP-2 和 MMP-9 的表达,增加 TIMP2 的表达。抑制 p38 MAPK 通路能够抑制 LAMA4 的表达,沉默 LAMA4 后 p-JNK 和 p-ERK 的表达降低,因此可以说明 LAMA4 能够减少 HTR-8/SVneo 细胞的血管发生,以及侵袭和迁移活力,并且可能与 p38 和 ERK 有关系^[43]。

宏观研究绒毛组织血管数量发现,服用米非司酮流产组和正常终止早孕组的绒毛组织中的基质金属蛋白酶-26 (MMP-26) 和基质金属蛋白酶抑制剂-4 (TIMP-4) 的表达水平存在差异,相对于对照组,米非司酮组的绒毛组织中 MMP-26 表达水平显著降低, ≤ 7 孕周的 A1 组低于对照组的 > 7 孕周的 A2 组,而米非司酮组的绒毛组织中 TIMP-4 却显著升高,各亚组间无差异;两组患者的绒毛微血管数量 (VMs) 无明显差异,结果说明米非司酮可能并非影响绒毛微血管,而是通过影响 MMP-26 和 TIMP-4 表达平衡来引发流产,但具体原因尚需进一步探讨^[44]。

五、米非司酮对滋养细胞迁移和侵袭功能的影响

米非司酮 (mifepristone, RU486) 是用于药物流产的常用药物,其能通过拮抗孕激素受体刺激绒毛和蜕膜脱落而发生流产。米非司酮可以通过降低滋养细胞的增殖能力,增加其凋亡率起到抗早孕的作用^[45]。目前很多学者主要对米非司酮影响受体方面的研究,有研究表明米非司酮 (RU486) 是糖皮质激素受体 GR 的拮抗剂,能够通过拮抗 GR 降低地塞米松增加 11 β -HSD1 的表达作用^[46],米非司酮还能增加 HTR-8/SVneo

滋养细胞内 GR α 的基因和蛋白表达,而不影响 GR β 的表达,而且能够降低 Cx40 的表达,上调 Cx43 和 Cx45,从而降低滋养细胞的增殖^[47]。另外,米非司酮还能下调药物流产后的滋养细胞的 THR α 1, THR α 2 和 THR β 1 的 mRNA 水平,也同时下调胎盘的 THRA 的基因表达,蜕膜中 THR α 1 的下调^[48]。尚有研究发现米非司酮可以增加滋养细胞的凋亡率^[49],其可能是通过 NF κ B 信号通路促进 EM42 细胞的凋亡功能^[50]。而就滋养细胞的迁移和侵袭功能来说,目前有研究发现米非司酮可能通过影响雌激素通路,上调滋养细胞 MTA3 水平从而降低滋养细胞的侵袭功能^[51]。大部分研究集中于探讨米非司酮对绒毛组织上细胞因子或者受体的影响方面的机制研究,如 VEGF, E-钙粘素, NF κ B 等,或者 WGA、RCA、ECL 等受体方面,尚未见很多研究直接观察米非司酮对滋养细胞迁移和侵袭功能的直观研究,本研究将继续验证米非司酮干预后是否会对滋养细胞的迁移和功能有直接影响。

综上所述,目前对于滋养细胞的功能进行了较全面的研究,体内体外实验都验证了滋养细胞具有增殖、凋亡、侵袭和迁移、血管生成能力,因此,本课题将着重从滋养细胞的迁移和侵袭功能入手,研究米非司酮对滋养细胞迁移和侵袭功能的影响,及其菟丝子总黄酮干预后进一步对滋养细胞迁移和侵袭功能是否有修复作用。

第三节 菟丝子总黄酮治疗自然流产的研究

中医药防治自然流产具有独特的优势和特色,而“肾主生殖”在中医基础理论占据着重要地位,肾藏精,肾为先天之本,肾气足则胎元以固。著名的医家罗元恺教授提出“肾—天癸—冲任—胞宫”轴与现代医学的下丘脑—垂体—卵巢(HPO)轴有异曲同工之处^[52]。因此,补肾是安胎之首。

寿胎丸是目前临床上证明有确切疗效可以预防和治疗自然流产的代表方,菟丝子是寿胎丸的君药,其临床疗效已经得到很多学者在临床和实验的验证。菟丝子能够滋补肝肾,安胎,实验证明其还有雌激素样作用^[53]等,而菟丝子总黄酮是菟丝子的一种主要活性成分^[54]。有相关实验证明,菟丝子的药效和生物学作用主要与菟丝子总黄酮有关^[55]。现代药理学说明,菟丝子总黄酮的药效主要是改善生殖内分泌、抗氧化,抗凋亡、保护心脑血管,调节免疫和骨代谢等作用^[56]。

一、改善生殖内分泌的功能

我们课题组前期研究已经证明,寿胎丸能够降低肾虚-黄体抑制模型大鼠的流产率,增加胚胎存活率,上调 PR 的表达水平,起到补肾安胎作用^[57],进一步研究发现菟丝子总黄酮可以提高 ER、PR 的表达,降低肾虚-黄体抑制模型大鼠的流产率,促进滋养细胞的增殖能力,降低细胞凋亡等^[58]。同样的,在分析菟丝子黄酮对肾虚排卵障碍的模型大鼠的功能影响,发现用菟丝子总黄酮治疗后,模型大鼠的子宫和卵巢指数,成熟卵泡及其血清 FSH、LH、E2 水平都显著升高,说明菟丝子总黄酮能够逆转肾虚排卵障碍,具有促排卵作用^[59]。

J. Ke, R. Duan^[60]研究菟丝子总黄酮对暴露在心理压力大的雌性大鼠的下丘脑-

垂体-卵巢(HPO)轴性激素受体的表达影响,结果发现菟丝子总黄酮能够提高海马体、下丘脑和垂体上 ER 的表达,以及卵巢上 LHR 的表达,但卵巢上 FSHR 的表达则无明显变化。说明菟丝子总黄酮对心理压力引发的内分泌失调大鼠有治疗作用。同时发现菟丝子总黄酮能够提高大鼠血清 FSH、LH、E₂、P、HCG 等性激素的水平,大鼠睾丸间质细胞分泌的睾酮水平也增强,菟丝子总黄酮能够显著改善 HPO 轴,恢复大鼠的排卵功能,且以高剂量 20mg/kg 单位的菟丝子总黄酮作用更明显,从而说明菟丝子总黄酮能够改善生殖的内分泌功能^[61, 62]。另外菟丝子总黄酮能够促进大鼠卵泡的生长发育,增加次级卵泡数量^[63]。

通过体内实验对大鼠流产模型血清 P 和 PRL,及细胞因子的测定来研究菟丝子总黄酮的药理机制,溴隐亭造成的大鼠流产模型经菟丝子总黄酮治疗后,发现流产模型 SD 大鼠血清上 P 和 PRL 表达升高,大鼠蜕膜组织的 IL-4,IL-10,PR 的表达水平上调,而 TNF- α 和 IFN- γ 的 mRNA 水平则下调,由此推测菟丝子总黄酮可以影响母胎界面内分泌-免疫网络平衡而起到补肾安胎的疗效^[64]。同时发现菟丝子总黄酮能够促进滋养细胞的增殖能力,且呈时间和剂量依赖性;ERK1/2 磷酸化水平表达升高,推测菟丝子总黄酮可能是通过 MAPK 通路来发挥其对细胞增殖活力的影响^[65]。菟丝子总黄酮不仅可以促进细胞的增殖,也能减少细胞的凋亡,在对菟丝子总黄酮对内分泌衰退痴呆模型小鼠功能的影响研究时,结果发现加入菟丝子总黄酮治疗后的内分泌衰退痴呆模型小鼠的学习记忆能力增加,血清 E₂ 水平升高,神经元细胞数目增加,细胞凋亡率较前降低,相关凋亡蛋白如 bax、Cyt-c, Caspase-3 蛋白及其 mRNA 水平显著下降,而 Bcl-2 水平及其 mRNA 水平显著升高。说明菟丝子总黄酮能够改善模型小鼠的内分泌和记忆功能,且减少细胞凋亡^[66, 67]。

二、改善缺氧、凋亡的作用

菟丝子总黄酮在体外具有清除自由基活性,抗氧化的作用,有实验结果表明菟丝子总黄酮的抗氧化活性比 Vc、BHT 抗氧化剂能力强,菟丝子总黄酮能够抑制大鼠睾丸曲细精管细胞化和凋亡损伤,且呈剂量依赖性,具有很好的抗氧化、抗凋亡的作用^[68-70]。同时菟丝子总黄酮能减少心肌梗死的大鼠心肌细胞的损伤,提升自由基清除能力,提高超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽氧化物酶(GSH-Px)活力和过氧化氢酶(CAT),降低乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)含量,同时能消除心肌纤维之间的炎症反应,保护心肌细胞^[71]。另外还能改善过氧化氢损伤后的血管内皮细胞形态学变化,降低乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)含量,升高超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽氧化物酶(GSH-Px)活力,说明菟丝子总黄酮缺氧损伤有保护作用^[72]。

三、保护心脑血管的作用

体外动物模型研究在体去势雌性大鼠血清雌激素水平变化,通过菟丝子总黄酮灌胃治疗后,大鼠血清中雌激素水平上升,去势后大鼠主动脉平滑肌组织培养的血管平滑肌细胞凋亡率升高^[73, 74];同时研究菟丝子总黄酮在血管平滑肌细胞功能的影响,研

研究发现菟丝子总黄酮高剂量组能够降低细胞凋亡,增加细胞数目,降低 Bax 蛋白表达,升高 Bcl-2 蛋白表达;高剂量和低剂量的菟丝子总黄酮还能显著提高 C-myc mRNA 表达水平^[75]。菟丝子总黄酮治疗心脑血管缺血再灌注损伤后大鼠后,降低缺血侧大脑皮质细胞的凋亡活力和大鼠心肌酶 CK 及 LDH 的含量,上调 Bcl-2 蛋白水平,降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达,从而抑制细胞的凋亡^[76-78]。同时发现也菟丝子总黄酮能够改善大鼠神经功能缺失症状,显著降低 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1 的表达^[79]。因此说明菟丝子总黄酮能够起到保护心血管的作用。

四、改善免疫调节作用

有学者研究菟丝子总黄酮对流产大鼠免疫功能的影响,研究其助孕安胎的药效。通过用 RT-PCR 和免疫组化的方法研究溴隐亭导致的大鼠流产模型上各凋亡因子和免疫相关因子的表达,研究结果发现菟丝子总黄酮能够降低模型大鼠的流产率,增加其胚胎存活率;相对于模型组,菟丝子总黄酮能够增加人肝素结核性表皮生长因子 (HB-EGF),增殖细胞核抗原 (PCNA), IL-4 及 IL-10 的 mRNA,和 PR 的表达,免疫相关的因子 Fas/FasL, TNF- α 和 IFN- γ 的 mRNA 水平表达都降低。而且免疫组化结果提示大鼠胎盘上绒毛和血管丰富,血管合体细胞绒毛增加。从而推测菟丝子总黄酮可能是菟丝子的主要药理作用部位^[80, 81]。另外还发现菟丝子提取物菟丝子总黄酮对 LPS 诱导的 BV-2 神经胶质细胞炎症反应有影响,菟丝子总黄酮能够通过抑制 BV-2 细胞的 iNOS 和 COX-2 的表达,进而降低 NO 和 PGE2 产物,同时下调他们的转录水平来降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平。另外菟丝子总黄酮能够抑制活化细胞的 ERK1/2, JNK 和 p38 MAPK 的磷酸化水平以及 NF- κ B p65 的入核行为。说明菟丝子总黄酮能够抑制细胞的炎症反应,有可能可以用来治疗脑补炎症^[82]。

五、改善骨代谢的作用

菟丝子总黄酮在改善骨代谢作用主要体现于在成骨细胞上的影响上,通过 MTT、PNPP、ELISA 等方法检测菟丝子总黄酮对细胞骨代谢功能影响,结果发现作用 48h 和 72h 后,菟丝子总黄酮能够显著提高骨细胞的增殖活力,碱性磷酸化水平升高,骨钙素和 I 型胶原分泌也增强,ALP 活性显著增加。因此说明菟丝子总黄酮能够提高成骨细胞的骨代谢功能^[83, 84]。

总的来说,大量研究证明了菟丝子总黄酮有改善生殖内分泌、心血管、免疫等人体重要功能,且其有抗氧化和抗凋亡的作用,菟丝子总黄酮显著的临床疗效说明对其继续研究其分子机制有重要的意义,以期能够更好的指导临床用药。

第四节 miRNA 在自然流产中的作用

microRNA 是非编码的大约含 22 个碱基对的微小 RNA,其能够调控细胞功能,如细胞增殖,凋亡,分化、代谢等^[85, 86]。同时也参与到妊娠的环节,miRNA 能够调控早期妊娠的子宫免疫耐受性^[87],如胚胎着床前子宫内膜的准备。有研究发现 miRNA clusters-C14MC, C19MC 和 miR-371-3 簇之间与妊娠疾病相关,它们之间的相关性或

许可以作为妊娠疾病生物标记或治疗手段^[88, 89]。

滋养细胞和蜕膜细胞作为维持妊娠发展主要的组成,其功能失调很可能引发自然流产。研究对自然流产患者内滋养细胞和蜕膜细胞组织 miRNA 筛选,发现 miRNA 表达差异较大,对比研究 15 个正常妊娠患者和 20 个 RSA 患者的绒毛和蜕膜组织 miRNA 的表达差异,结果发现 RSA 患者对比正常妊娠患者的绒毛组织 3 个 miRNA(hsa-miR-184, hsa-miR-187 and hsa-miR-125b-2) 表达升高,而 3 个 miRNA (hsa-miR-520, hsa-miR-3175 和 hsa-miR-4672) 表达降低;蜕膜组织 5 个 miRNA (hsa-miR-517c, hsa-miR-519a-1, hsa-miR-522, hsa-miR-520h 和 hsa-miR-184) 表达升高;hsa-miR-184 的升高在绒毛和蜕膜组织都表达,同时进一步预测 miRNA 靶基因的表达和参与的细胞功能^[90]。在不明原因复发性流产患者内 miRNA-21 和 miRNA-182 表达显著降低^[91]。另外对比发现自然流产和人工流产患者的绒毛组织内,有 93 个 miRNA 表达下调,123 个 miRNA 上调,其中 16.7%(2 人)RSA 患者有染色体异常,大部分染色体都检测正常;而 miR-133a 的表达与 HLA-G 表达相关,在 RSA 患者中 miR-133a 过度表达,有上调作用,而 HLA-G 表达却降低,说明 miR-133a 通过调控 HLA-G 的表达参与到 RSA 的机制当中^[92]。不同的 miRNA 能够对基因表达有多级调控的作用^[93],因此不同 miRNA 对滋养细胞的功能影响不同,目前主要是对滋养细胞凋亡、增殖、迁移和侵袭,血管生成等功能的研究。

一、影响滋养细胞凋亡功能

Pengfei Li^[94, 95]等通过对 miRNA-29b 在先兆子痫的功能研究,在 HTR-8/Svneo, BeWo 和 JAR 三种细胞系,采用 CCK-8, 凋亡试验,流式细胞术和 Transwell, 基质胶试验等方法,实验发现过表达 miRNA-29b 能够诱导细胞凋亡,抑制滋养细胞侵袭和血管生成,但不影响滋养细胞的增殖和细胞周期。进一步实验发现,miRNA-29b 调控髓细胞白血病序列 1 (MCL1)、MMP2, VEGFA, ITGB1, 过表达 miRNA-29b 能够增加目的靶基因的表达,另外,miRNA-29b 能够促进 FAK 的磷酸化,但不影响 p-ERK1/2 的表达,因此说明 miRNA-29b 能够导致 FAK 信号通路的失调,抑制 MMP2 和 integrin $\beta 1$ 的表达,miRNA-29b 可能作为先兆子痫的治疗。

二、影响滋养细胞增殖功能

在研究 miRNA-155 能够抑制绒毛外滋养细胞的增殖和迁移能力,分子生物信息学预测 cyclin D1 是 miRNA-155 的靶基因,通过在 HTR-8/Svneo 细胞株上荧光素酶报告基因和 cyclin D1 3' UTR 转染,流式细胞术,愈合实验, WB, RT-PCR 等方法,实验结果发现过表达 miRNA-155 能够降低 cyclin D1 的表达,减弱细胞的增殖和侵袭,阻滞 G1 阶段的细胞数目。因此说明 miRNA-155 参与 cyclin D1/p27 信号通路调节滋养细胞的增殖和迁移,可能有助于研究 miRNA-155 在先兆子痫发病中的参与作用^[96]。同样在先兆子痫患者组织筛选,发现先兆子痫患者的胎盘组织和血清样品内 miR-376c 表达下调,过表达 miR-376c 后,能诱导 HTR-8/Svneo 滋养细胞的增殖,迁移和侵袭

能力, 增加胎盘生长能力, 抑制转化生长因子 β 和 Nodal 功能, 当过表达抑制转化生长因子 β 受体 (ALK5) 和 Nodal 受体 (ALK7) 时, 可以逆转 miR-376c 的影响, 从而可以看出 miR-376c 通过抑制 ALK5 和 ALK7 影响转化生长因子 β /Nodal 信号通路而增加细胞的增殖和侵袭。转化生长因子 β /Nodal 信号通路的失调可能导致先兆子痫的发生^[97]。

三、影响滋养细胞侵袭与迁移功能

滋养细胞的侵袭和迁移功能失调易导致自然流产的发生, 通过筛选早期自然流产者绒毛组织内 miRNA 的变化, 发现 microRNA-17 和-19b 的表达都下调, microRNA-17-92 是主要参与胎盘绒毛的侵袭功能^[98]。在细胞方面, 检测 microRNA-10b 在人正常滋养细胞系 (HTR-8/SVneo) 细胞的浸润能力的影响, 结果表明 microRNA-10b 的过表达组和抑制组有显著统计学意义, 过表达组的细胞浸润能力提高, 因此得出 microRNA-10b 可能影响滋养细胞的浸润能力, 但与其靶向关系的 sFlt-1 是否可以调节滋养细胞的浸润能力则需进一步研究^[99]。而研究在先兆子痫胎盘内 miRNA 的表达, RT-PCR 结果显示先兆子痫患者的 miR-34a 表达上调, 通过在 JEG-3 细胞上过表达 miR-34a, 能够抑制细胞的增殖, 迁移和侵袭。另外, 通过双荧光素酶报告发现, miR-34a 的靶基因 MYC 下调, 能够减少 JEG-3 细胞的侵袭能力。因此 miR-34a 可能直接调控 MYC 基因从而影响滋养细胞的侵袭能力^[100]。

四、影响滋养细胞血管生成功能

Ting Yan^[101]等研究先兆子痫的发病机制, 通过提起体外血中的内皮祖细胞 (EPCs) 和体内动物实验, 转染 miR-126 后, EPCs 的增殖、分化和迁移增强, 而抑制 miR-126, EPCs 细胞功能减弱。通过转染 MiR-126, PIK3R2 这个血管生成因子下调, 而与血管形成相关的 PI3K-Akt 信号上的 PI3K 和 Akt 表达升高, 抑制 MiR-126, 结果相反, 因而得出先兆子痫内 EPCs 内的 miR-126 的目的基因 PIK3R2 是直接参与 PI3K-Akt 信号通路上的。miR-126 能够抑制 PIK3R2 的表达来促进 EPCs 的功能。另外发现, miRNA-155 和 HIF-1 α 及其 VEGF 参与到滋养细胞的浸润以及血管生成的功能中, 由此说明其能诱导不明原因流产的发生^[102]。

五、miRNA-126-3p 与滋养细胞

miRNA-126-3p, 即 miRNA-126, 位于第 9 条染色体的 EGFL7 内含子上, 存在于大部分哺乳动物上的器官组织, 如人, 大鼠, 小鼠, 狗, 鸡等, 能够调节小鼠血管生成, 器官如心脑血管, 膀胱, 肝脾等^[103]。

目前学术界大部分学者讨论 miRNA-126 对细胞血管生长的功能^[104, 105], 如缺失 miRNA-126 的目的片段会导致血管渗漏, 出血和胚胎死亡, 这些出血的原因可归因于血管生成因子信号的减少, 内皮细胞 (EC) 的生长和粘附, miRNA-126-3p 通过调控 EGFL7 发挥其血管生成功能^[106]。研究发现, miRNA-126 还能够增加 VEGF 和 FGF 表达来激活 MAPK 通路, 同时 miRNA-126 能够抑制 Spred-1 的表达减少细胞内血管生成信号,

因此说明 miRNA-126 的前血管生成行为与 Spred-1 (MAPK 通路的负性调节) 有关, miRNA-126 通过减少 MAPK 通路上的 Spred-1 抑制作用来促进血管生成信号行为^[103]。

另外, 也有学者研究 miRNA-126 的癌症方面的功能^[107, 108], 如在胃癌组织中, miRNA-126 表达下降, 异位的 miRNA-126 表达抑制胃癌细胞的生长, 迁移和侵袭, 抑制癌症转移。Crk 是 miRNA-126 的靶基因, 说明 miRNA-126 可能是通过调控 Crk 抑制癌症的发展。同样的, 在肝细胞癌患者中, miRNA-126 的表达降低, 功能学上, 异位的 miRNA-126 表达抑制胃癌细胞的生长, 迁移和侵袭^[109]。在乳腺癌组织中, miRNA-126 的表达相对高表达^[110], 甲状腺癌组织 miRNA-126 和 VEGF 表达下调, 且 VEGF 能够调控 miRNA-126 的血管生成功能^[111]。而 miRNA-126 在炎症方面研究较少, 有研究表明 miRNA-126 能通过阻断血管壁的粘附和白细胞渗透而抑制 VCAM1 的表达^[112]。而且, miRNA-126 还可作为内皮损伤的标记物^[113]。

对于 miRNA-126-3p 在自然流产方面的研究尚比较少, 有学者分析复发性流产患者的血清发现, miRNA-126 表达显著降低, miRNA-126 可能可以作为不明原因复发性流产的潜在标记物^[114]。提出尤其是研究其对滋养细胞功能的影响, 有部分探讨 miRNA-126 与自然流产相关受体研究, 如研究 miRNA-126 能调控孕酮受体 (PR), 参与大鼠乳腺上皮细胞的增殖和乳汁分泌, 采用荧光素酶报告、RT-PCR、WB、HPLC 等方法, 分析在大鼠乳腺上皮细胞沉默和过表达 miR-126-3p 后 PR 的表达, 结果发现, 在大鼠乳腺不同发育阶段, miR-126-3p 的表达不同, 在乳腺上皮细胞内转染 miR-126-3p 能够下调 PR 的表达, 抑制 miR-126-3p 后, PR 表达上调。荧光素酶报告提示 miR-126-3p 可能通过调控 Pgr 3' 来下调 PR 的表达。另外, 发现 miR-126-3p 能够抑制细胞的增殖活力, 抑制 β -casein 的表达^[115]。因此, 本课题将着重从 miRNA-126 对滋养细胞功能的影响入手研究。

综上所述, 由于菟丝子总黄酮疗效好, 作用明显, 近年来已经成为学术界的研究重点, 但大部分集中在研究菟丝子总黄酮的提取、药理作用方面, 尚很少学者集研究菟丝子总黄酮对细胞功能具体是怎么影响, 菟丝子总黄酮通过哪些机制来影响细胞的功能尚很少见到报导。由于近年来在妇产科学术界, miRNA 逐渐被大家所知, 它的功能逐渐被研发, 大部分研究 miRNA 在癌症细胞的表达及功能作用, 而在妇产科中 miRNA 对生殖障碍自然流产的研究较少, 尤其是对 miRNA-126-3p 对滋养细胞功能的影响方面, 对于不明原因的自然流产, 从 miRNA 着手研究滋养细胞的功能, 也许可为临床了解自然流产发生机制提供新的思路。而且现有的对 miRNA-126-3p 的研究未加入药物进行干预和治疗, 仅仅停留于其功能和机制的研究, 尚未很好的与临床接轨, 因此本研究拟通过在临床使用疗效显著的菟丝子总黄酮入手, 研究其药效作用及其机制, 进一步试图阐明通过研究菟丝子总黄酮如何通过调控 miRNA-126-3p 来影响滋养细胞迁移和侵袭功能。

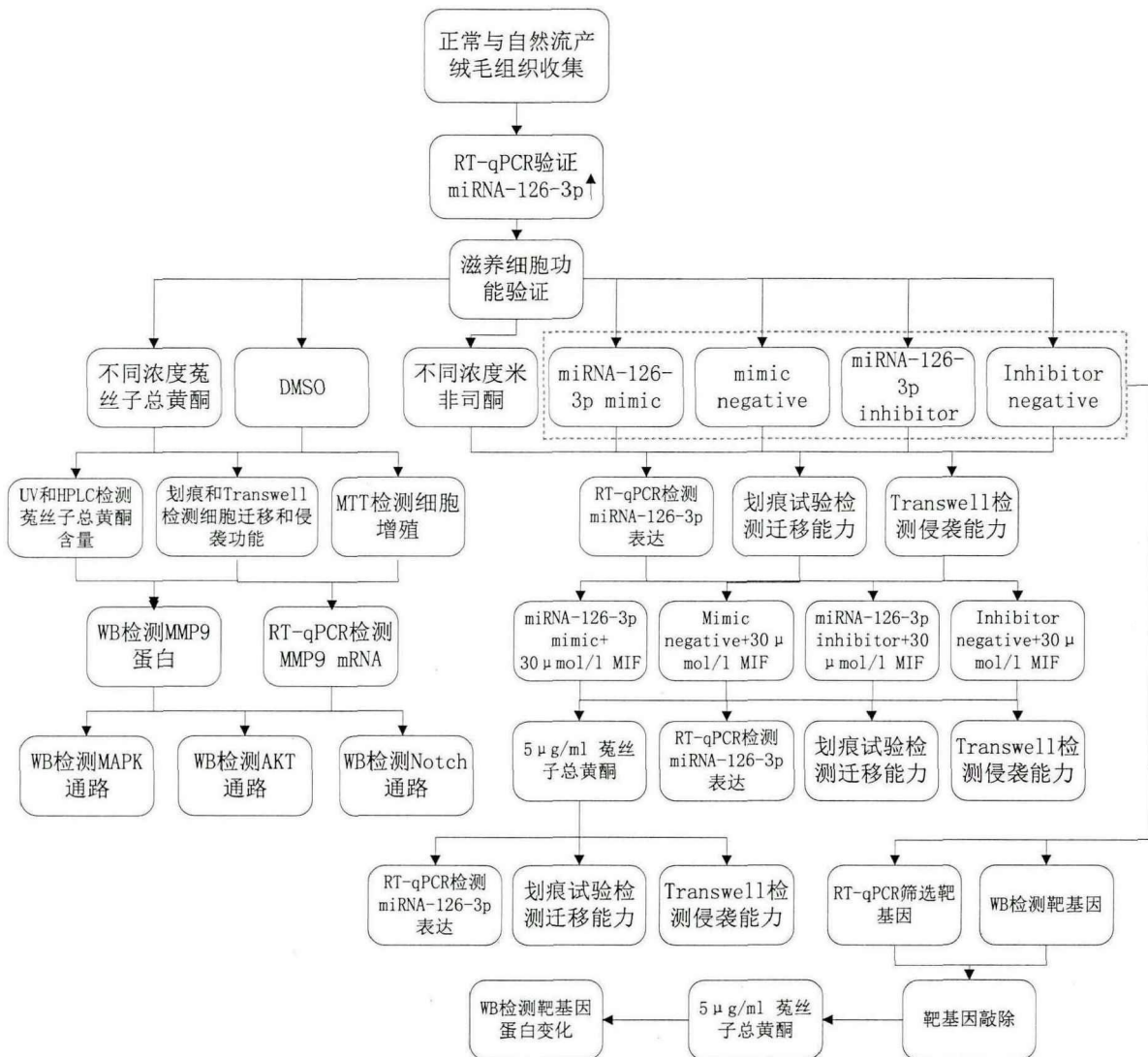
第二章 实验研究

第一节 立论依据及其实验技术路线

一、立论依据

菟丝子具有补肾安胎的作用，菟丝子总黄酮作为菟丝子的主要活性成分，研究其药效机制可以更明确菟丝子的药效作用。研究报导表明 miRNA 与自然流产的发生息息相关。本实验通过基因测序方法筛选出 miRNA-126-3p 的表达在自然流产患者的绒毛组织中显著升高，并以此为切入点，用米非司酮构建转染 miRNA-126-3p 至滋养细胞后的自然流产状态的滋养细胞模型为载体，模拟临床的自然流产疾病，并最终通过菟丝子总黄酮干预治疗，从正常组的滋养细胞和自然流产状态滋养细胞模型组的滋养细胞的迁移和侵袭功能，及其内在的 miRNA-126-3p 表达和下游的靶基因表达差异，来阐述菟丝子总黄酮的药效作用机制，阐明菟丝子总黄酮补肾安胎的作用，以便更好的指导临床用药。

二、技术路线



第二节 miRNA-126-3p 的验证及其功能研究

自然流产是临床上妊娠常见疾病，其发生率正逐年增高，而滋养细胞是研究自然流产发生过程中重要的一环，对其功能探讨的重要性毋庸置疑；miRNA-126-3p 常见于肿瘤组织表达异常，也有研究发现 miRNA-126-3p 在先兆子痫患者中能促进内皮祖细胞的侵袭能力，miRNA-126-3p 的功能对深入探讨先兆子痫的发病机理有重要意义。基于先兆子痫和自然流产都有可能是因为滋养细胞的迁移侵袭不足或者过度有关，那么 miRNA-126-3p 是否在自然流产的发生发展过程中同样发挥着重要的作用呢？目前尚无相关报道，因此本研究拟从自然流产患者和正常早孕者的绒毛组织对比发现的 miRNA-126-3p 的表达差异入手，进一步增加样本量验证 miRNA-126-3p 的差异表达及其 miRNA-126-3p 对自然流产细胞模型功能的影响。

一、实验目的

研究发现自然流产患者绒毛组织与正常早孕者绒毛组织内 miRNA-126-3p 表达不同，自然流产患者绒毛组织 miRNA-126-3p 表达上调，为了进一步验证组织内 miRNA-126-3p 的表达差异，通过 RT-qPCR 方法检测自然流产患者和正常早孕者绒毛组织中 miRNA-126-3p 的表达。同时将 miRNA 转染至滋养细胞，研究其对滋养细胞功能的影响，以探讨 miRNA-126-3p 的可能作用。

二、实验材料与方法：

（一）实验材料

1. 实验试剂

RNA-later: Tiangen 公司

RNA 提取试剂盒: Magen 公司

miRNA 逆转录试剂盒: GeneCopoeia 公司, All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (AMRT-0020)

miRNA -qPCR 试剂盒: All-in-One™ miRNA qPCR Kit, GeneCopoeia 公司

mRNA 逆转录试剂盒: Thermo Scientific™公司, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

mRNA -qPCR 试剂盒: Thermo Scientific™公司, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix

PBS: Hyclone 公司

0.25%胰蛋白酶: Gibco 公司

RPMI-1640 培养基: Gibco 公司

DMSO: Sigma 公司

抗生素 (青霉素-链霉素): Gibco 公司

胎牛血清: BI 公司

miRNA mimic/mimic negative/inhibitor/inhibitor negative: 广州锐博公司

Lipofectamine® 2000: invitrogen 公司

Matrigel: BD 公司

RPMI-1640 培养基: Gibco 公司

Opti-MEM 培养基: Gibco 公司

4%多聚甲醛: LEAGENE 公司

结晶紫染色液: 碧云天生物科技有限公司

2. 实验仪器及器材

离心机: Thermo 公司

PCR 仪: Bio-rad 公司

全波长酶标仪: Thermo 公司

Nanodrop 超微量分光光度计测定仪: Thermo 公司

96 孔荧光定量 PCR 板: Bio-rad 公司

PCR Plate Sealer: Bio-rad 公司

六孔板、24 孔板: Coster 公司

Transwell 小室: BD 公司

RNase free EP 管: Axygen 公司

低温离心机: Thermo 公司

荧光倒置显微镜: Nikon 公司和 Olympus 公司

(二) 实验方法

1. 标本收集

选取在广州中医药大学第一附属医院日间手术室自愿行人工流产和清宫术患者的人早孕绒毛组织, 选择条件为正常早孕者 (Normal, n=25), 停经 6-9 周, B 超可发现孕囊及见胎心, 主动要求行人工流产者; 自然流产 (spontaneous abortion, SA) 患者 (n=25), 停经 6-9 周, B 超发现胚胎停育或者未见胎心, 与停经月份不足, 主动要求行清宫术者。入选患者年龄为 40 岁以下, 月经周期规律, 近 3 个月内未服用激素类药物。征得患者同意, 签署知情同意书, 手术时留取绒毛组织。无菌生理盐水清洗血污, 置于含 RNA-later 的无菌 1.5ml EP 管内, 冰上保存, 即刻送至实验室, 转移至 2ml 无酶冻存管内, -80° 保存。

2. HTR-8 滋养细胞株培养

(1) 购买: 江苏北纳生物科技有限公司购买的原代滋养细胞, 已经通过鉴定为滋养细胞。

(2) 培养条件: 含 1% 抗生素和 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液 5ml, 37°C , 5% CO_2 条件下培养, 每天观察细胞生长状态, 24h-48h 换液。待细胞长满瓶底至 90% 左右时, 用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

(3) 细胞传代: 培养瓶内加入 2ml 胰蛋白酶, 消化 1 分钟后吸弃胰蛋白酶, 加入 4ml 左右培养基终止消化, 轻轻吹打至细胞脱落, 吸取细胞悬液至新的培养瓶或者种

板待用。

3. 转染方法

(1) 载体构建: 采用 Lipofectamine® 2000 脂质体, 将 miRNA-126-3p mimic/mimic negative 和 miRNA-126-3p inhibitor/inhibitor negative 转染至滋养细胞。

(2) 转染: 在转染前一天, 将培养好的滋养细胞以 $4-5 \times 10^4$ 的密度接种于六孔板, 加入 1.5ml 含 10%胎牛血清的 1640 培养基, 细胞培养箱内继续培养 16h; 取 1.5ml EP 管①(稀释 miRNA): 加入 250ul 不含血清的 Opti-MEM®培养基, 再加入 10ul 20 μ mol 的 miRNA 储存液(其中 miRNA inhibitor/inhibitor negative 为 20ul), 轻轻混匀, 室温孵育 5min。取 1.5ml EP 管②(稀释 Lipofectamine® 2000): 加入 250ul 不含血清的 Opti-MEM®培养基, 再加入 5ul lipo2000, 轻轻混匀, 室温孵育 5min。管①加至管②, 轻轻混匀, 室温孵育 20min。将上述 miRNA-lipo2000 混合液 500ul 加入含有 1.5ml 培养基的细胞培养孔内, 轻轻摇晃混匀。37° 细胞培养箱内培养 4h。将含有混合液的培养基弃去, 更换新的不含抗生素的 1640 培养基 2ml。37° 细胞培养箱内培养 24h 后, 继续其余实验。

4. RT-qPCR 方法

(1) 组织 RNA 的提取

① 取 50mg 左右的绒毛组织, 转入至一 1.5ml 无 RNase 的 EP 管内, 先加入 150ml Magzol, 天根 OSE-Y30 第三代高速组织研磨器间断研磨 40s, 再加入 850ml Magzol, 吹打混匀, 室温静置 5 分钟, 4°C, 12000g, 离心 5 分钟, 吸取上清液至新的 EP 管内。

② 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈上下震荡 15s, 室温静置 5min。

③ 4°C, 12000g, 离心 15min。离心后样品分为 3 层, 上层为透明的水相层, 即 RNA 溶解层; 中层为白色蛋白质层, 下层为苯酚-氯仿层。小心吸取水相层, 至新的无 RNase 的 1.5ml EP 管。大约 500 μ L。

④ 加入 1.5 倍体积的无水乙醇, 涡旋混匀 20s。

⑤ 将一半体积的混悬液加入含 RNA mini Column 的 2ml 收集管中, 8000g, 离心 30s。

⑥ 弃滤液, 把柱子装回收集管, 将剩余的混悬液加入含 RNA mini Column 的 2ml 收集管中, 8000g, 离心 30s。

⑦ 弃滤液。将 500 μ L 的 Buffer RWC 加入至 RNA mini Column 中。8000g, 离心 1min。

⑧ 弃滤液。将 500 μ L 的 Buffer 己用乙醇稀释的 RW2 加入至 RNA mini Column 中。8000g, 离心 30s。

⑨ 弃滤液, 重复第 8 步操作一次。

⑩ 将 RNA mini Column 放回收集管中。10000g, 离心 2min, 以甩干柱子内基质。

⑪ 将柱子安装于新的 1.5mlRNase Free EP 管。在 Column 膜中央加入 30 μ L 的

RNase Free ddH₂O (沿膜中央加), 室温静置 2min。10000g, 离心 1min, 洗脱 RNA。

⑫ 为得到高浓度的 RNA, 可再将 30ul RNase Free ddH₂O 加入至 RNA mini Column 中。室温静置 2min。离心 1min, 10000g。

⑬ 弃柱子, RNA 样品-80℃保存或者继续下一步实验。

(2) 细胞 RNA 的提取

细胞诱导结束后, 弃培养基, 用 2ml 预冷 PBS 洗 3 次, 再加入 1ml Magzol, 轻轻吹落细胞, 收集细胞悬液至 RNase free 1.5ml EP 管内, 室温静置 10min, -80℃冰箱保存或者继续余下步骤实验。

(3) RNA 浓度测定

用 Thermo-NANODROP 2000 测定工具, 用无 RNase ddH₂O 擦洗机器光纤表面后, 分别取 1ul 样品检测, 读取样品浓度, 260/280, 260/230 的比值。260/280 的比值在 1.8~2.1 之间代表 RNA 纯度好。

(4) 逆转录合成 cDNA (miRNA 部分)

按照 All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (AMRT-0020) 试剂盒说明书, 配制 25ul 体系, 按照下面表格的反应体系, 加好反应液后, 瞬离, 在 Bio-Rad 的 PCR 仪中进行逆转录。反应条件为: 37℃ 孵育 60min, 85℃ 孵育 5min 后终止, -20℃ 保存。

表 1 miRNA 逆转录反应体系

试剂	体积	质量
Total RNA*		2 μg†
or small-molecule RNA		100 ng
2.5 U/μl Poly A Polymerase	1 μl	
RTase Mix	1 μl	
5×PAP/RT Buffer	5 μl	1×
dd H ₂ O (RNase/Dnase free)	至终体积 25 μl	

(5) 荧光定量 PCR 扩增 (miRNA 部分)

在 Bio-Rad 的 CFX96 检测仪进行实时定量反应。

① 引物由生工生物工程股份有限公司设计与合成。

表 2 miRNA-PCR 引物序列

Primer	sequences (5' -3')
U6	Forward: ATGGCCCTGCGCAAGGA
Has-miRNA-126-3p	Forward: TCGTACCGTGAGTAATAATGCG

合成引物加入 RNase-free water 溶解成 100 μM, 再稀释成 2 μM 的稀释液使用。

② 采用 All-in-One™ qPCR 试剂盒进行 PCR 扩增。以 U6 作为内参基因, 参照说明书, 按照下表配制反应混合液: cDNA 稀释 5 倍后使用

表 3 荧光定量 PCR 反应体系

试剂	体积/孔
2×All-in-One qPCR Mix	5 μl
All-in-One™ miRNA qPCR Primer (2 μM)	1 μl
Universal Adaptor PCR Primer (2 μM)	1 μl
First-strand cDNA	1ul
Water (double distilled)	Not using ROX Reference Dye 2 μl

每孔设置 2 个复孔, 按照每孔 10ul 加入 Bio-rad 96 孔板加样, 贴上贴膜, 瞬时离心 1min。按照说明书程序进行 PCR 反应, 条件如下:

Stage 1: 预变性

95.0°C, 10min Repts: 1

Stage 2: PCR 反应

95.0°C, 10s

60.0°C, 20s

72.0°C, 10s

Reps: 40

Stage 3: 溶解曲线

65.0°C, 6s

95.0°C, 0.5°C

5. 划痕实验

(1) 提前一天将细胞种至六孔板, 转染, 转染 4h 后更换无抗生素的含 8%FBS 的 1640 培养基。(注: 由于此次转染时间需要 48h, 预防细胞生长太密而影响实验结果, 故用含 8%FBS 的培养基)

(2) 将已转染 48h 后的六孔板细胞板, 荧光倒置显微镜镜下观察细胞状态, 并选择好每组大致相同细胞数的位置, 用 200 μl 枪头划一大致相等的横线, X40 镜下拍照。

(3) 更换新的无抗生素的含 8%FBS 的 1640 培养基, 其中一个孔更换为含 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮药液, 细胞培养箱内继续培养 6h。

(4) 6h 后, 选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。

(5) 12h 后, 选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。实验重复 3 次, 根据细胞迁移距离判定细胞划痕结果。

6. Transwell 实验

(1) 在 24 孔的 Transwell 上室加入 50ul 用无血清的 RPMI-1640 培养基按 3: 1 稀释的 Matrigel, 在 37°C, 5%CO₂ 的细胞培养箱敷育 1h;

(2) 将已转染 24h 的细胞用胰酶消化 1min, 加入无 FBS 的 RPMI-1640 培养基终止消化, 离心, 再用 PBS 重悬细胞, 再次离心, 用无 FBS 的 RPMI-1640 培养基重新悬浮细胞, 细胞密度为 5×10⁴/ml。

(3) 各加入 200 μl 重新悬浮的细胞悬液至 Transwell 上室中, 下室加入 500 μl 含

10%FBS 的 RPMI-1640 培养基, 37°C 5%CO₂ 的细胞培养箱中继续孵育 48h。

(4) 48h 后, 用棉签轻轻擦拭去掉上室滤膜内面细胞, 保留滤膜外面细胞, 用多聚甲醛固定 30min, 结晶紫染色 20min。平整切下滤膜。

(5) ×200 高倍显微镜下, 随机选择每孔内 5 个视野计数细胞。

(6) 侵袭指数=实验组细胞数/对照组细胞数 (计算每高倍镜视野中迁移至滤膜下表面的细胞数)。实验重复 2 次, 取平均数。

(四) 实验统计方法

1. RT-qPCR: 本实验采用 U6 作为内参基因, 检测目的基因 miRNA-126-3p 相对于内参基因 U6 的表达量进行定量分析, 利用表达量的倍数 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算:

$$\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{U6}, \quad -\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{诱导} - \Delta Ct_{对照}$$

其中, Ct_{miRNA} 代表 miRNA 组的循环数, $\Delta Ct_{诱导}$ 代表经药物诱导后检测的循环数。

2. 所有数据采用 SPSS 19.0 软件和 STATA 软件统计分析, 两组数据用 t 检验, 多组间采用 ANOVA 方差分析进行统计学分析, 若各组间方差不齐, 采用非参数检验统计方法, 多组比较用 Kruskal-Wallis H 检验方法, 两两比较用 Mann-Whitney U 检验方法。数据用均数±标准差表示。作图在 GraphPad Prism 6.0 软件执行。P<0.05 表示有统计学差异。

三、实验结果:

(一) 样本的临床资料

选取符合收集标准的自然流产患者绒毛组织 25 例, 平均年龄为 30 岁, 平均孕周为 8.4 周, 证型以脾肾两虚证及肾虚证为主。正常早孕者绒毛组织 25 例, 平均年龄为 28.6 岁, 平均孕周为 6.5 周, 证型以肝郁证为主。月经规律, 近 3 个月无服用激素类药物者。

表 4 流产患者临床资料

NO.	年龄	孕周	产次	流产次数	证型
142SA	28	8	1	1	肾虚
147SA	25	7	0	1	肾虚
160SA	28	7+	0	2	湿热
164SA	26	9	0	1	肾虚
184SA	40	8+	0	2	肾虚
192SA	27	9-	0	2	肾虚
209SA	23	8	0	1	脾肾两虚
210SA	25	9	0	2	脾肾两虚
269SA	21	8+	0	3	肾虚
272SA	35	7	2	3	脾肾虚弱
274SA	23	8	0	1	血瘀证
296SA	28	8	0	1	肾虚血瘀
312SA	34	10	1	2	肾虚血瘀
320SA	27	9	1	2	肾虚
324SA	34	9	2	2	脾虚
326SA	40	9	1	2	肾虚血瘀

331SA	26	8+	1	2	脾虚
332SA	33	8	1	2	脾虚
344SA	29 ⁻	8	0	3	肾虚血瘀
348SA	30	9+	1	2	肾虚
349SA	27	9	1	2	肾虚血瘀
357SA	43	9	1	8	肝郁
358SA	33	8	2	1	肾虚
367SA	40	8+	1	2	肾虚
389SA	25	8	0	1	肾虚

表 5 正常早孕者临床资料

NO.	年龄	孕周	孕次	流产次数	证型
148N	22	7	0	2	肾虚
149N	35	6	0	1	脾虚
150N	22	7+	0	1	肾虚
153N	24	6+	1	2	肾虚
183N	41	7+	2	2	肝郁
251N	21	5+	0	1	脾肾两虚
255N	31	7+	1	2	脾虚
262N	37	8+	2	1	肝郁肾虚
263N	38	7+	1	2	肾虚
264N	40	8+	1	3	肝郁肾虚
266N	30	6+	2	4	肝郁肾虚
273N	28	6	0	2	血瘀
276N	25	6+	0	3	肝郁
277N	25	7+	0	1	脾虚
282N	31	6	1	3	肝郁
293N	33	7	2	2	肝郁
294N	27	7	1	2	肾虚
295N	24	8+	0	1	血瘀
298N	23	6	0	1	肝郁
301N	25	7	0	1	肾虚血瘀
302N	24	7	0	1	脾虚
303N	17	8+	0	1	肝郁
304N	33	6+	2	3	脾虚
305N	24	6+	1	2	血热
306N	34	6	1	3	肝郁

(二) miRNA-126-3p 在正常早孕者和自然流产患者绒毛组织中的表达

用 U6 作为内参分析, miRNA-126-3p 在不同组织间的差异 (表 6, Fig.1)。结果显示自然流产绒毛组织内 miRNA-126-3p 的表达比正常早孕者绒毛组织升高 ($p=0.024 < 0.05$)。

表 6 两组间 miRNA-126-3p 表达差异比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 N	$\Delta\Delta_{ct}(\bar{x} \pm s)$
SA	25	$1.24 \pm 0.43^*$
N	25	1.02 ± 0.21

注: 采用 t-test 方法检验, 与对照组相比, * $p < 0.05$

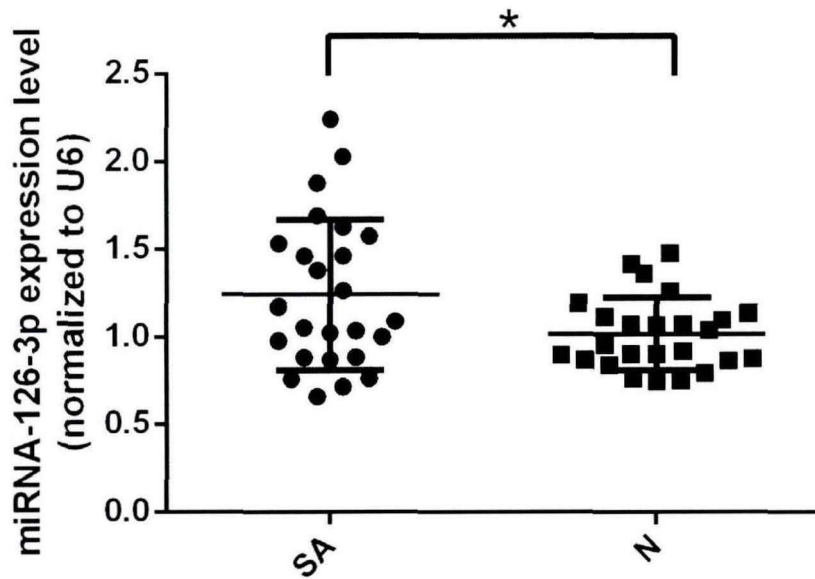


Figure 1 miRNA-126-3p 在自然流产患者和正常早孕者绒毛组织中的表达差异
注：自然流产组（SA）的组织 (n=25) 比正常早孕组（N）组织 (n=25) 内的 miRNA-126-3p 显著上调 (p<0.05)。以 U6 为内参。* p<0.05。

（三）EVT 细胞内 miRNA-126-3p 过表达及其干扰载体构建

1、转染效率

经转染后，下图中，荧光倒置显微镜镜下可见带荧光细胞数较多，转染率可达 60% 以上，说明转染成功，可以继续进一步实验。

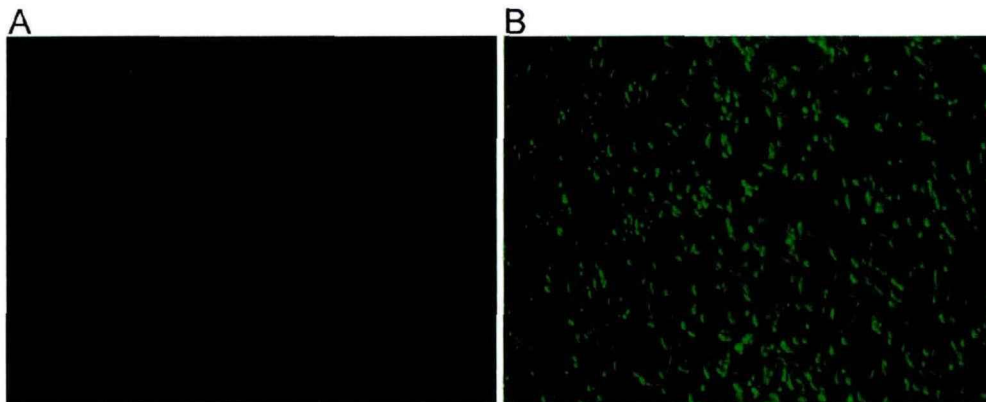


Figure 2 转染后细胞荧光观察 (X100)

注：(A) 为荧光状态下的细胞数，带荧光细胞数目大于 60%；(B) 为荧光倒置显微镜的明场状态下的细胞数。

2、转染后 miRNA-126-3p 的基因表达水平

用 RT-qPCR 方法检测 EVT 滋养细胞转染 miRNA-126-3p 后的基因表达水平（表 7，Fig. 3），结果表明转染 24h 后，滋养细胞内 miRNA-126-3p mimic 过表达组相对比未

转染正常滋养细胞显著性升高 ($p < 0.001$), 而 miRNA-126-3p inhibitor 干扰组的表达相比于未转染正常滋养细胞显著下调 ($p < 0.01$)。虽然 miRNA-126-3p mimic negative 和 inhibitor negative 组的 miRNA-126-3p 有少量的升高, 但与 mimic 组相比相差巨大, 基本可以忽略不计, 对后续实验无影响。结合以上说明用 miRNA-126-3p mimic 和 inhibitor 构建的转染载体符合前期实验发现的自然流产的绒毛组织内 miRNA-126-3p 表达升高的现象, 可以用于进一步实验。

表 7 转染后各组间 miRNA-126-3p 的表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	$\Delta\Delta\Delta_{ct}(\bar{x} \pm s)$
Ctrl	3	1.00 ± 0.00
mimic	3	221741.27 ± 1759.34***
mimic negative	3	303.44 ± 41.08
inhibitor	3	0.32 ± 0.03**
inhibitor negative	3	4.40 ± 0.52

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测, 与 Ctrl 组相比, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

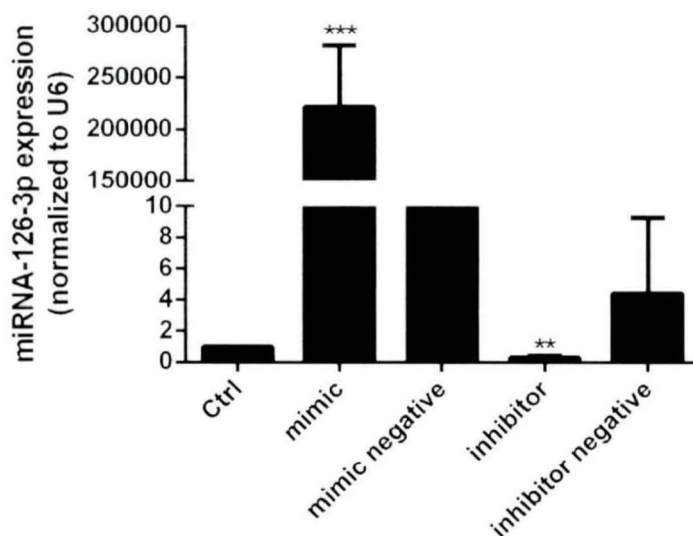


Figure 3 转染后 miRNA-126-3p 在 EVT 细胞内的表达

注: 对比正常滋养细胞 Ctrl 组, miRNA-126-3p mimic 组的 miRNA-126-3p 表达明显上调 ($p < 0.001$), miRNA-126-3p inhibitor 组的 miRNA-126-3p 表达明显下调 ($p < 0.01$), 有统计学差异。以 U6 作为内参。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ 。

(四) miRNA-126-3p 抑制滋养细胞迁移和侵袭功能

前文结果得出了 miRNA-126-3p 在自然流产绒毛组织中的上调, 可能引发自然流产。为了验证 miRNA-126-3p 对滋养细胞迁移和侵袭能力的影响, 我们通过将 miRNA-126-3p mimic、mimic negative 和 inhibitor、inhibitor negative 分别转染至 EVT 滋养细胞 48h 后, 对比未转染组正常滋养细胞, 检测细胞的迁移功能。划痕试验结果提示, 随着划痕时间的延长, 显微镜下观察细胞的迁移距离变化, miRNA-126-3p

mimic 组细胞迁移能力降低,而 miRNA-126-3p mimic negative 和 inhibitor negative 组的细胞迁移能力与正常组相当,miRNA-126-3p inhibitor 组的滋养细胞迁移能力明显增加 (Fig. 4)。进一步通过 Transwell 试验结果表示,检测滋养细胞的侵袭能力,对比 miRNA-126-3p mimic negative 组,miRNA-126-3p mimic 组细胞侵袭数目明显下降,两者之间有统计学差异 ($p < 0.05$),而 miRNA-126-3p inhibitor 组对比 miRNA-126-3p inhibitor negative 细胞侵袭的数目明显增加,有统计学差异 ($p < 0.01$),miRNA-126-3p mimic 组和 inhibitor 组细胞侵袭数目相比有统计学差异 ($p = 0.001$),miRNA-126-3p mimic negative 和 inhibitor negative 组的侵袭细胞数之间无统计学差异 (表 8, Fig. 5)。结果表明经转染后,miRNA-126-3p mimic 组,即过表达 miRNA-126-3p 后,抑制了滋养细胞的迁移和侵袭能力,而干扰抑制 miRNA-126-3p 后,滋养细胞的迁移和侵袭能力增加,从而证明了 miRNA-126-3p 的表达升高,影响了滋养细胞正常的迁移和侵袭能力,这有可能就是引发自然流产的原因之一。

表 8 各组间细胞侵袭数目

组别	N	侵袭数目 ($\bar{x} \pm s$, 个)
M	3	426.0 ± 353.17 ^{*,SSS}
MN	3	3646.0 ± 1850.7
I	3	14358.0 ± 2581.52 ^{**}
IN	3	3883.33 ± 2353.75

注: 采用 t-tests 方法检验。

与 MN 相比, ^{*} $p < 0.05$; 与 IN 相比, ^{**} $p < 0.01$, 与 I 相比, ^{SSS} $p = 0.001$

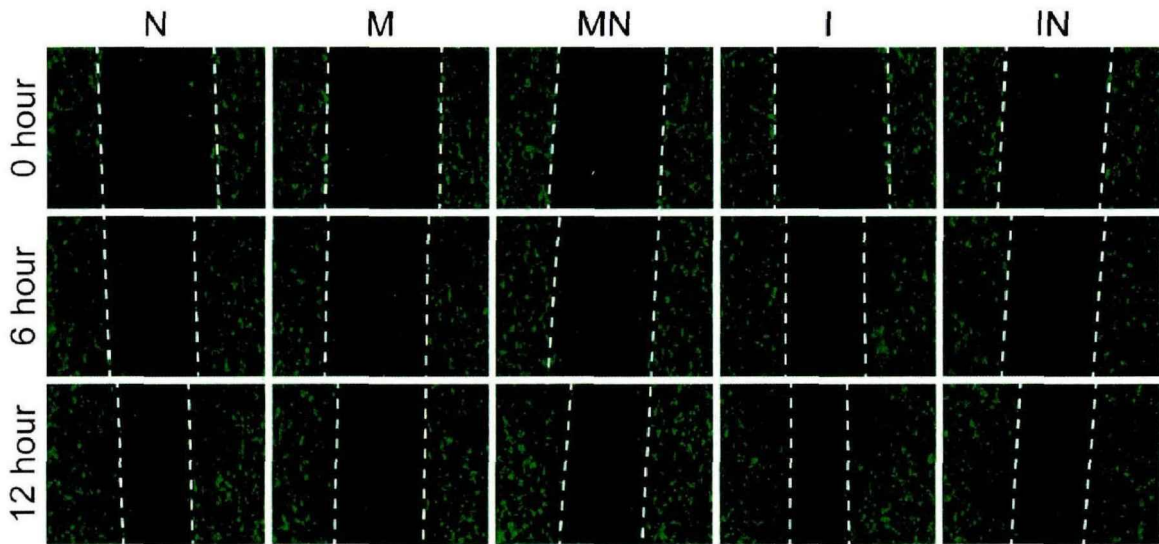


Figure 4 转染 miRNA-126-3p 后对滋养细胞迁移功能的影响 (X40)

注: N: normal; M: miRNA-126-3p mimic; MN: miRNA-126-3p mimic negative; I: miRNA-126-3p inhibitor; IN: miRNA-126-3p inhibitor negative。划痕试验提示对比正常组,miRNA-126-3p mimic 组细胞迁移能力降低,miRNA-126-3p inhibitor 组的滋养细胞迁移能力增加,而 miRNA-126-3p mimic negative 和 inhibitor negative 组的细胞迁移能力与正常组相当。

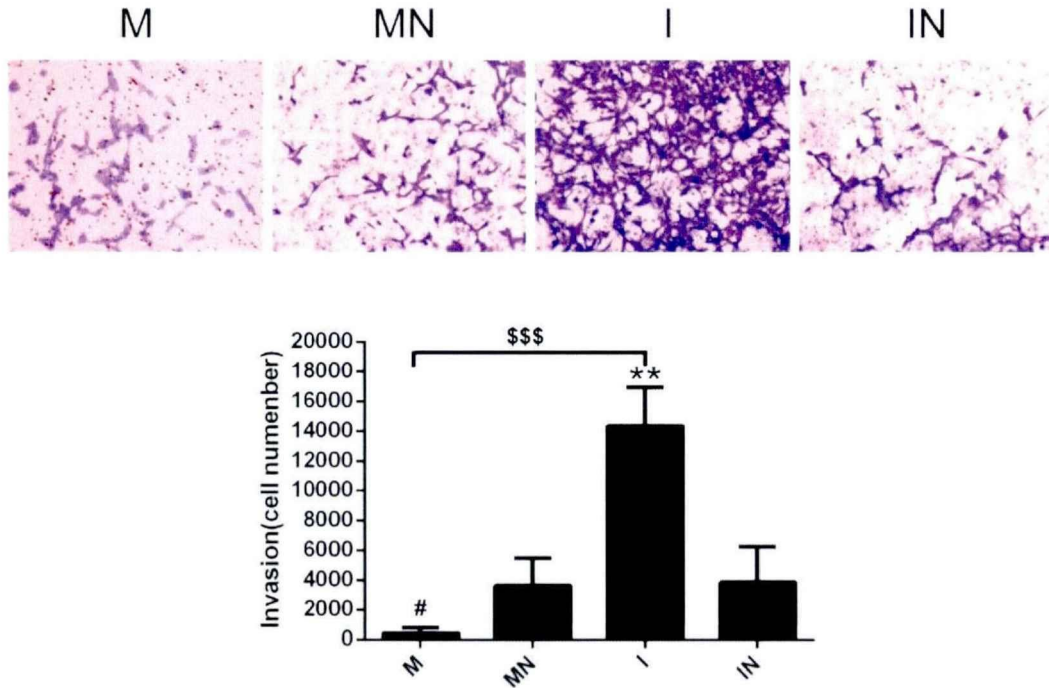


Figure 5 转染 miRNA-126-3p 后对滋养细胞侵袭功能的影响 (X200)

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative。对比 miRNA-126-3p mimic negative 组, miRNA-126-3p mimic 组细胞侵袭数目明显下降 ($p < 0.05$), 而 miRNA-126-3p inhibitor 组对比 miRNA-126-3p inhibitor negative 细胞侵袭的数目明显增加, 有统计学差异 ($p < 0.01$), miRNA-126-3p mimic 组和 inhibitor 组细胞侵袭数目相比有统计学差异 ($p = 0.001$)。 ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$, \$\$\$ $p = 0.001$ 。

四、讨论

类似于肿瘤细胞, 侵袭功能是滋养细胞植入蜕膜和胎盘, 维持胎儿正常发育的重要功能^[116], 但具体的侵袭功能内在机制尚未非常明确, 因此深入研究滋养细胞的侵袭功能对了解先兆子痫和自然流产的病理机制有很大的临床意义。自然流产的发生机制目前尚未非常明确, 随着 miRNA 被大家的认可, 很多研究逐渐发现自然流产的发生与 miRNA 的变化息息相关。研究发现在早期自然流产患者的胎盘内 miRNA-17 和 miRNA-19b 表达明显下调^[117], 不明原因复发性流产患者内的 miRNA-21 和 miRNA-182 也同样表达降低^[118]。不同的 miRNA 在自然流产组织中有不同程度的表达。近年来, miRNA-126-3p 的表达及其功能被发现多表现在肿瘤细胞及其细胞的血管生成功能等方面^[119-121], 有研究表明在先兆子痫患者中 miRNA-126-3p 的表达下调, miRNA-126-3p 促进内皮祖细胞 (EPCs) 的增殖和迁移分化^[122], 而先兆子痫的发生与自然流产发生的机制有可能是因为滋养细胞的侵袭不足或者侵袭过度而引发, 既然 miRNA-126-3p 在

先兆子痫患者中低表达，而其在自然流产患者中是如何表达的？

本研究通过比较自然流产患者和正常早孕者的绒毛组织发现 miRNA-126-3p 在自然流产患者的绒毛组织中比正常早孕者的组织表达升高，这与 miRNA-126-3p 促进 EPCs 的迁移和侵袭而发生先兆子痫有相似之处，本研究中自然流产患者绒毛组织的 miRNA-126-3p 的表达升高，我们猜想可能是因为 miRNA-126-3p 抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能，引起滋养细胞的侵袭不足而引发自然流产。但这个结果与前面研究发现复发性流产患者血清中 miRNA-126-3p 表达下调相反^[123]，为了明确 miRNA-126-3p 在自然流产组织表达上调这个结果，我们首先通过验证 25 例自然流产患者绒毛组织和 25 例正常早孕者组织 miRNA-126-3p 的表达差异进行对比，然后再通过进一步的实验得到证明。

在胚胎正常植入过程中，绒毛外滋养细胞(human extravillous trophoblast (EVT) cells) 的增殖，迁移和侵袭等功能的相互协调，尤其是侵袭功能的正常发挥，以维持母胎营养平衡和正常的妊娠过程^[124]。侵袭能力是滋养细胞重要的功能，滋养细胞能够正常发挥其侵袭功能，是维持正常妊娠的关键环节，如果滋养细胞的功能失调，易出现胎儿畸形，胎儿生长阻滞，自然流产，死胎等；如侵袭功能过强，易造成胎盘植入或绒毛膜癌，大出血而危害母体生命；如侵袭功能不足，易引发自然流产或先兆子痫，胎儿生长阻滞等临床常见妇产科疾病^[125, 126]。EVT 的侵袭功能类似与肿瘤细胞，但其又不同于肿瘤细胞，它的侵袭功能受到时间和空间的限制，以防止过度侵袭^[127]。因此 EVT 细胞侵袭功能的正常调节是维持正常妊娠的关键所在，但具体的侵袭功能内在机制尚未非常明确，因此深入研究滋养细胞的侵袭功能对了解自然流产的病理机制有很大的临床意义。HTR-8 滋养细胞是常用于实验研究的绒毛外滋养细胞，大部分学者研究滋养细胞的功能时候都采用 HTR-8 细胞系，本研究研究细胞的迁移和侵袭功能都是在 HTR-8 细胞系上探索。

因此，为了验证上述的猜想，我们从研究 EVT 滋养细胞的迁移和侵袭功能入手，通过进一步实验，将 miRNA-126-3p mimic 和 inhibitor 转染至滋养细胞，上调和干扰滋养细胞内 miRNA-126-3p 内的表达检测滋养细胞的迁移和侵袭功能的变化，实验结果发现过表达 miRNA-126-3p 后抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能，侵袭的细胞数目减少，而干扰 miRNA-126-3p 后滋养细胞的迁移和侵袭功能得以增加，这就说明了 miRNA-126-3p 在滋养细胞内表达的多少会直接影响到滋养细胞的迁移和侵袭功能，同时也可以说明 miRNA-126-3p 对滋养细胞迁移和侵袭功能有一定的调控作用。因此证明了 miRNA-126-3p 的表达多少会直接影响到滋养细胞的迁移和侵袭功能，存在一定的调控作用，其表达上调会引起自然流产的发生，或许可以说明 miRNA-126-3p 是引起自然流产发生机制的其中一个因素，它的表达差异直接关系到自然流产是否会发生，这个发现对了解自然流产的发病机制提供了一个新的理论依据，从基因层面上解释了自然流产的其中一个发病因素，在以后的临床使用上，或许可以检测妊娠者中

miRNA-126-3p 的表达来预测妊娠结局, 提早进行干预, 从而避免自然流产的再次发生。

然而 miRNA-126-3p 是如何发挥调控滋养细胞的迁移和侵袭功能这一作用呢? 我们猜想可能是在干扰滋养细胞的内源性 miRNA-126-3p 后, 激活了 miRNA-126-3p 下游的某个靶基因, 该靶基因对滋养细胞的迁移和侵袭功能有促进作用, 从而增加了滋养细胞的迁移和侵袭功能, 而过表达 miRNA-126-3p 后, 抑制了该靶基因的功能, 也就降低了滋养细胞的迁移和侵袭功能。所以从这可能存在的因素入手, 为了更好的探讨 miRNA-126-3p 抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能的内在机制作用, 我们会继续深入研究 miRNA-126-3p 可能调控的靶基因, 及其用药效明显的补肾安胎中药菟丝子总黄酮进行干预细胞, 对 miRNA-126-3p 转染后的滋养细胞进行拯救实验, 探讨菟丝子总黄酮的药效机制。

五、小结

在自然流产患者对比正常早孕患者的绒毛组织中, miRNA-126-3p 的基因表达水平明显上调, 通过将 miRNA-126-3p 转染至 HTR-8 滋养细胞后, miRNA-126-3p mimic 组的滋养细胞迁移和侵袭能力受到抑制, 相反地, miRNA-126-3p inhibitor 组的滋养细胞迁移和侵袭功能增加了, 说明 miRNA-126-3p 对滋养细胞的功能有一定的调控作用。

第三节 菟丝子总黄酮对正常滋养细胞迁移和侵袭功能的影响

寿胎丸出自《医学衷中参西录》, 是常用来治疗胎动不安, 先兆流产的经典方剂, 其能够补肾安胎, 固护冲任, 而菟丝子是寿胎丸的君药, 能补肾益精, 为安胎之首要药, 有研究证明, 菟丝子总黄酮是菟丝子发挥药效的主要活性成分, 能够安胎补肾, 调节生殖内分泌等作用。那菟丝子总黄酮如何起到补肾安胎, 防治流产作用的? 其是否对滋养细胞有一定的影响, 通过本研究我们即将探讨菟丝子总黄酮对滋养细胞的作用影响。

一、实验目的

测定菟丝子总黄酮的含量, 研究菟丝子总黄酮对正常滋养细胞的迁移和侵袭功能的作用影响。

二、实验材料与方法

(一) 实验材料与仪器

1. 实验试剂

菟丝子总黄酮: 南京普怡生物科技有限公司购买的菟丝子 (Cuscuta) 提取物菟丝子总黄酮。

乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠: 天津大茂化学厂有限公司

甲醇: 默克公司, 色谱纯

芦丁标准品: 中国食品药品检定研究院

金丝桃苷标准品: 中国食品药品检定研究院

槲皮素标准品：中国食品药品检定研究院
槲皮苷标准品：中国药品生物制品检定所
异鼠李素标准品：中国食品药品检定研究院
MTT 粉剂：Sigma 公司

余试剂同第二节

2. 实验仪器

紫外分光光度计：尤尼柯（上海）仪器有限公司
高效液相：Waters 公司
万分之一电子分析天平：BSA 124S, Sartorius 公司
十万分之一电子分析天平：MS105 Du, METTLER TOLEDO 公司
酶标仪：Thermo 公司

（二）实验方法

1. 菟丝子总黄酮溶液制备：

精密称取菟丝子总黄酮粉剂 60mg，溶于 600 μ l DMSO 中，混匀后充分溶解形成浓度为 100mg/ml 的菟丝子总黄酮母液，再吸取 100 μ l 母液，加入 900 μ l 含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，最后形成 10mg/ml 的菟丝子总黄酮储存液。用含 10%胎牛血清的培养基稀释至所需浓度。

2. 菟丝子总黄酮含量测定方法（紫外分光光度法）

（1）标准曲线的制作：

① 精密称取芦丁标准品约 10mg，70%乙醇超声下溶解，10ml 容量瓶定容，取 5.0ml 至 50ml 容量瓶定容，得芦丁对照品浓度为 0.1015mg/ml。

② 10ml 容量瓶内精密吸取 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0ml 芦丁对照品溶液，再分别加入 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0ml 的 70%乙醇，轻轻摇匀，加入 5%亚硝酸钠溶液各 0.3ml，轻轻摇匀后室温放置 6min；加入 10%硝酸铝溶液分别 0.3ml，轻轻摇匀后放置 6min；最后加入 4%氢氧化钠溶液 4.0ml，70%乙醇定容，摇匀放置 15min；510nm 处测定吸光度。计算可得标准曲线。

（2）样品含量测定：精密称取菟丝子总黄酮溶于 70%乙醇，使得浓度约为 0.3 mg/ml，按照制作标准曲线方法，在 510nm 处测得吸光度。根据标准曲线，最终得菟丝子总黄酮的含量。

3. HPLC 方法测定菟丝子总黄酮的含量

（1）标准品配置：

① 金丝桃苷：精密称量金丝桃苷标准品（纯度为 93.3%）10.51mg，甲醇溶解，定容至 10ml，作为浓度为 0.9806mg/ml 的标准品储备液。

② 芦丁：精密称量芦丁标准品（纯度为 91.9%）6.85mg，甲醇溶解，定容至 10ml，作为浓度为 0.6295mg/ml 的标准品储备液。

③ 槲皮素：精密称量槲皮素标准品（纯度为 96.5%）5.71mg，甲醇溶解，定容至 10ml，作为浓度为 0.5510mg/ml 的标准品储备液。

④ 槲皮苷：精密称量槲皮苷标准品（纯度为 100%）5.72mg，甲醇溶解，定容至 10ml，作为浓度为 0.5720mg/ml 的标准品储备液。

⑤ 异鼠李素：精密称量异鼠李素标准品（纯度为 99.0%）1.19mg，甲醇溶解，定容至 10ml，作为浓度为 0.1178mg/ml 的标准品储备液。

⑥ 混标（定量）：从上述 5 种标准品储备液中，用移液管各取 1ml，转移到 10ml 容量瓶中，用 50% 甲醇稀释定容。金丝桃苷终浓度为 98.06 $\mu\text{g/ml}$ ，芦丁终浓度为 62.95 $\mu\text{g/ml}$ ，槲皮素终浓度为 55.10 $\mu\text{g/ml}$ ，槲皮苷终浓度为 57.20 $\mu\text{g/ml}$ ，异鼠李素终浓度为 11.78 $\mu\text{g/ml}$ 。

(2) 供试品配置：

精密称量供试品 49.49mg，甲醇溶解，定容至 10ml，浓度为 4.949 mg/ml 供试品储备液。用移液管取 1ml，转移到 10ml 容量瓶中，用 50% 甲醇稀释定容，浓度为 494.9 $\mu\text{g/ml}$ 的供试品溶液。

(3) 色谱条件

色谱柱：waters XBridgeC18(250*4.6mm, 5 μm)

流速 1.0ml/min；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；波长：360nm

流动相：甲醇-0.4%磷酸水

洗脱梯度：

时间	甲醇	0.4%磷酸水
0	25	75
60	40	60
80	60	40

4. MTT 试验

(1) 将 HTR-8 滋养细胞消化传代后以 $1.5 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种至 96 孔板，100 μl /孔，细胞边缘各加入 100 μl PBS，以防细胞培养基干燥。摇匀后，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的细胞培养箱继续培养 48h。

(2) 吸弃培养液，实验组分别加入 2ml 含有不同浓度的菟丝子总黄酮（0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/ml}$ ）的 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基，对照组加入含 0.1% 的 DMSO 的 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基，重新将 96 孔板置于细胞培养箱中，继续孵育 48h。

(3) 将 MTT 粉剂，加入 PBS，稀释成 5mg/ml 的 MTT 稀释液，过滤膜；

(4) 每孔加入 10 μl MTT 稀释液，继续在细胞培养箱内孵育 3-4h，促使 MTT 还原为甲赞月；

(5) 吸弃上清液，每孔各加入 100 μl DMSO 溶液，使甲赞月溶解，室温，置于平板摇床上震荡 10min，使结晶物完全溶解。

(6) 各孔吸光度值 (OD 值) 检测: 酶联免疫分析仪, 490nm 波长处检测。每组实验重复 3 次, 取 3 次实验后平均值再进行统计分析。

5. 划痕试验

(1) 提前一天将细胞种至六孔板。

(2) 第二天上午, 荧光倒置显微镜镜下观察孔板内细胞状态, 并选择好每组大致相同细胞数的位置, 用 200 μ l 枪头划一大致相等的横线, X40 镜下拍照。

(3) 实验组分别加入 2ml 含有不同浓度的菟丝子总黄酮 (0.5、1、5 μ g/ml) 的 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基, 空白对照组加入含 0.1% 的 DMSO 的 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基, 细胞培养箱内继续培养 6h。

(4) 6h 后, 选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。

(5) 12h 后, 选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。实验重复 3 次, 根据细胞迁移距离判定细胞划痕结果。

6. Transwell 试验

(1) 在 24 孔的 Transwell 上室加入 50 μ l 用无血清的 RPMI-1640 培养基按 3:1 稀释的 Matrigel, 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱敷育 1h;

(2) 将细胞用胰酶消化 1min, 加入无 FBS 的 RPMI-1640 培养基终止消化, 离心, 再用 PBS 重悬细胞, 再次离心, 分别用不同浓度的菟丝子总黄酮 (0.5、1、5 μ g/ml) 的 RPMI-1640 培养基重新悬浮细胞, 细胞密度为 5×10^4 /ml。

(3) 各加入 200 μ l 重新悬浮的细胞悬液至 Transwell 上室中, 下室加入 500 μ l 含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 的细胞培养箱中继续孵育 48h。

(4) 48h 后, 用棉签轻轻擦拭去掉上室滤膜内面细胞, 保留滤膜外面细胞, 用多聚甲醛固定 30min, 结晶紫染色 20min。平整切下滤膜。

(5) $\times 400$ 高倍显微镜下, 对每个孔内所有细胞进行计数。

(6) 侵袭指数=实验组细胞数/对照组细胞数。实验重复 2 次, 取平均数。

三、实验结果

(一) 菟丝子总黄酮的含量测定

1. 紫外分光光度法

根据上述方法测得标准曲线如下(Fig. 6), $y=11.859x-0.0044$, $R^2=0.9998 > 0.999$, 说明该标准曲线可以用来进行下一步测定。将菟丝子总黄酮的吸光度值按照标准曲线方程计算 (表 9), 结果得出菟丝子总黄酮的含量为 90.876%, 菟丝子总黄酮的含量较高, 说明该菟丝子提取物的主要成分为菟丝子总黄酮。

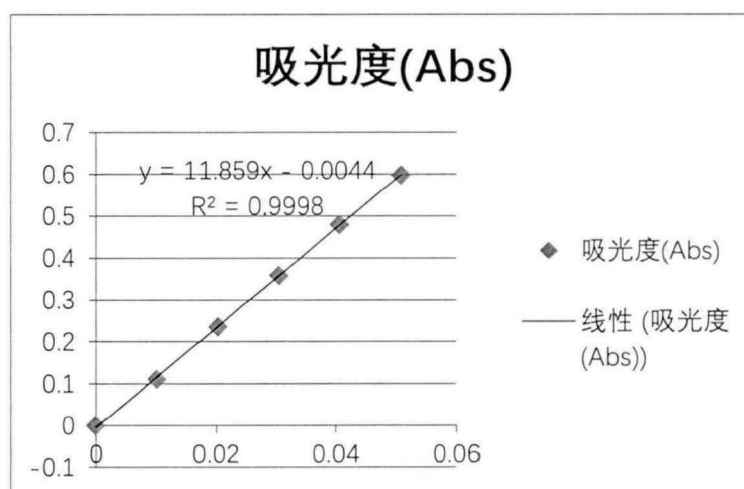
Figure 6 用回归分析计算得出标准曲线。R² = 0.9998。

表 9 菟丝子总黄酮含量计算

编号	吸光度	浓度(mg/mL)	提取物总黄酮含量	提取物总黄酮平均含量
1	0.254	0.0218	89.375%	
2	0.264	0.0226	92.839%	90.876%
3	0.257	0.0220	90.414%	

2. HPLC

用金丝桃苷, 芦丁, 槲皮素, 槲皮苷, 异鼠李素五种标准品, 测定菟丝子总黄酮提取物中所占的含量, 经过用 HPLC 方法得出菟丝子总黄酮的指纹图谱及其各标准品的图谱 (Fig. 7-14), 根据各标准品的峰面积与对照品的峰面积计算菟丝子总黄酮内含各标准品的含量 (表 10, 11), 其中芦丁占大部分, 约 77.75%, 槲皮素占 0.41%, 及其极少量的异鼠李素 0.03%, 总含量达 78.19%, 而含少量甚至不含金丝桃苷和槲皮苷, 可以认为该菟丝子总黄酮提取物内绝大部分是黄酮类物质。

表 10 对照品信息表

标准品	质量 (mg)	纯度 (%)	储备液浓度 (mg/ml)	进样浓度 (μg/ml)
金丝桃苷	10.51	93.3	0.98	98.06
芦丁	6.85	91.9	0.63	62.95
槲皮素	5.71	96.5	0.55	55.10
槲皮苷	5.72	100.0	0.57	57.20
异鼠李素	1.19	99.0	0.12	11.78
样品	49.49	/	4.95	494.90

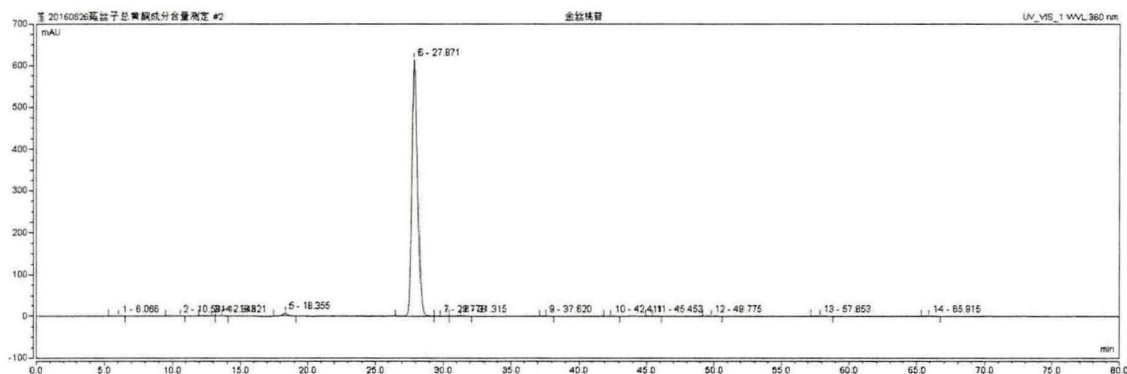


Figure 7 金丝桃苷高效液相色谱图谱

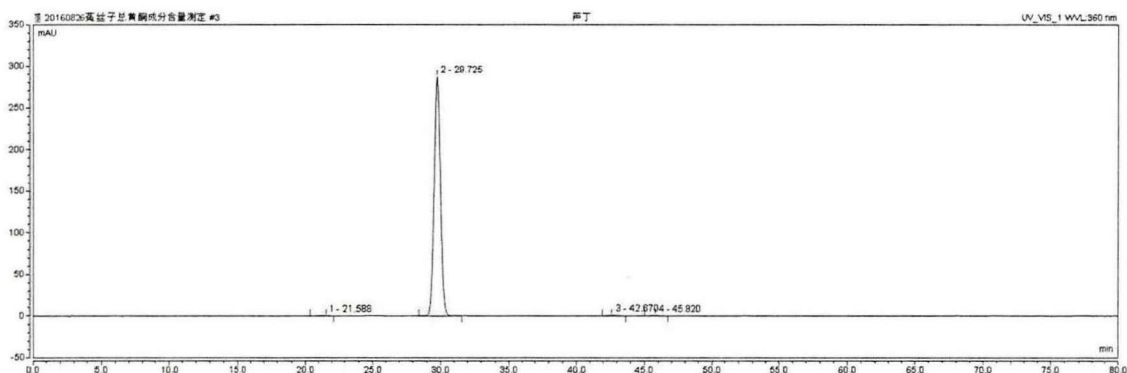


Figure 8 芦丁高效液相色谱图谱

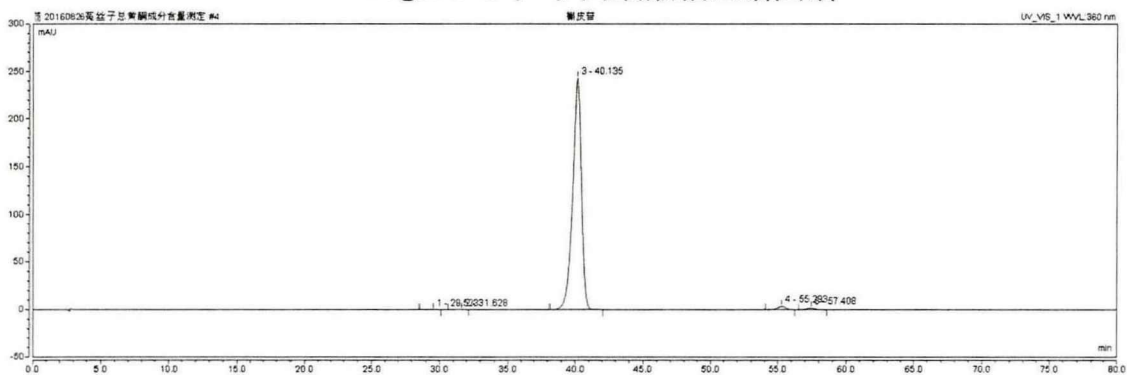


Figure 9 槲皮苷高效液相色谱图谱

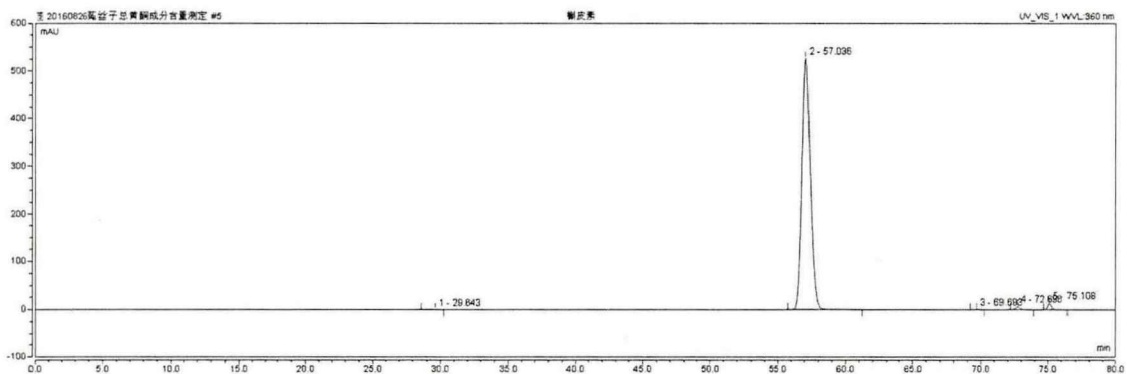


Figure 10 槲皮素高效液相色谱图谱

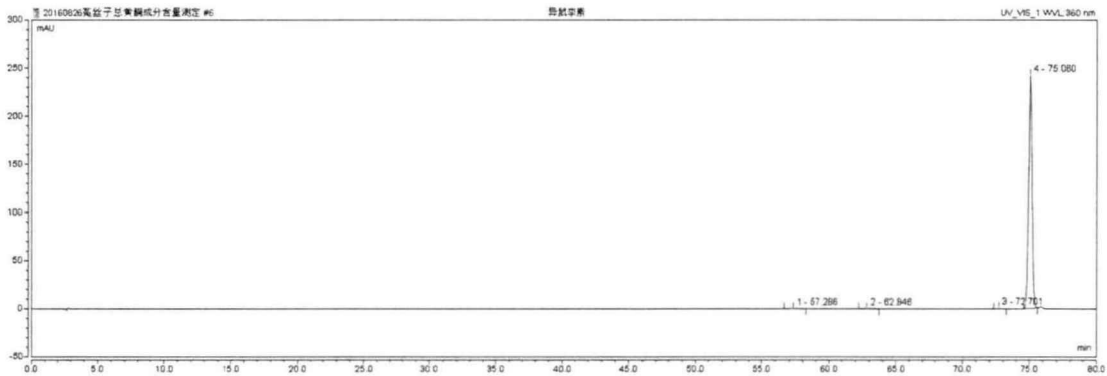


Figure 11 异鼠李素高效液相色谱图谱

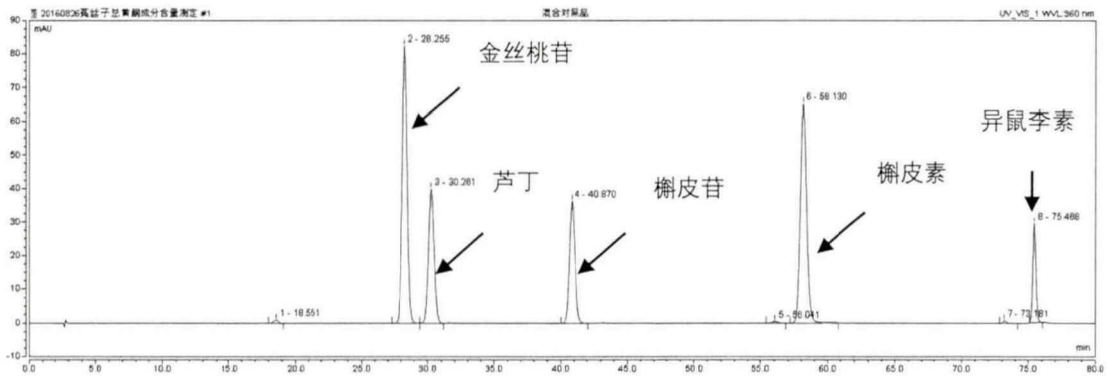


Figure 12 混合标准品高效液相色谱图谱

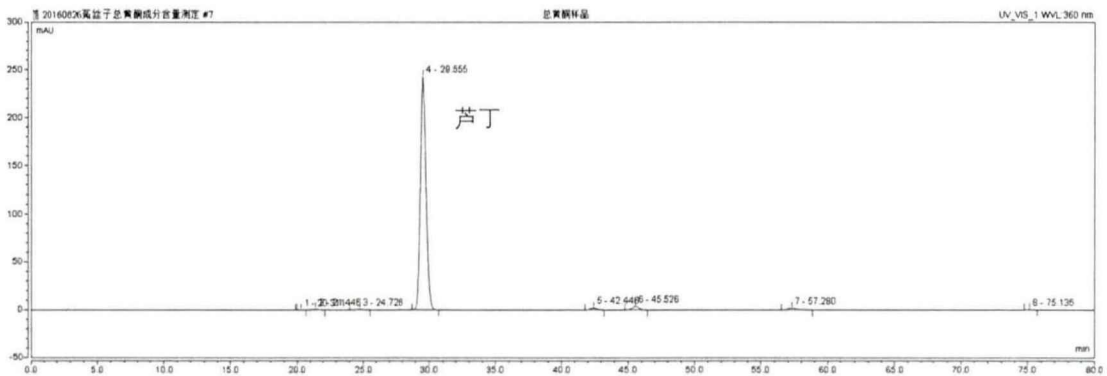


Figure 13 黄酮样品高效液相色谱图谱 (原图)

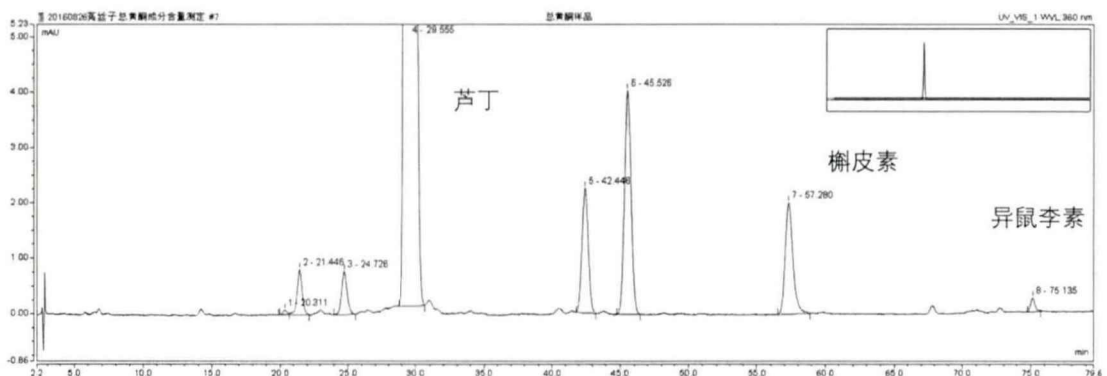


Figure 14 黄酮样品高效液相色谱图谱 (放大)

表 11 黄酮中各成分含量结果

面积	金丝桃苷	芦丁	槲皮苷	槲皮素	异鼠李素
对照品峰面积	37.1477	18.8972	18.1249	36.5702	7.9136
样品峰面积	/	115.5054	/	1.3513	0.0962
分离度		16.32		23.40	n. a.
含量 (%)	/	77.75	/	0.41	0.03

(二) MTT 法检测菟丝子总黄酮对滋养细胞毒性

为了检测菟丝子总黄酮对滋养细胞的毒性, EVT 滋养细胞经不同浓度菟丝子总黄酮作用 48h 后, MTT 法检测滋养细胞的活力, 结果显示菟丝子总黄酮对 EVT 细胞的增殖活力没有影响, 各组间无统计学差异, 说明菟丝子总黄酮对滋养细胞无明显毒性。

(表 12, Fig. 15)

表 12 各组间细胞增殖活力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	N	48h 后吸光度($\bar{x} \pm s$)
DMSO	4	1.00±0.24
0.1 μg/ml	5	1.07±0.25
0.5 μg/ml	5	1.03±0.20
1 μg/ml	3	1.03±0.05
5 μg/ml	4	1.14±0.15
10 μg/ml	5	0.96±0.12

注: 与 DMSO 组相比, 各组间无统计学差异。

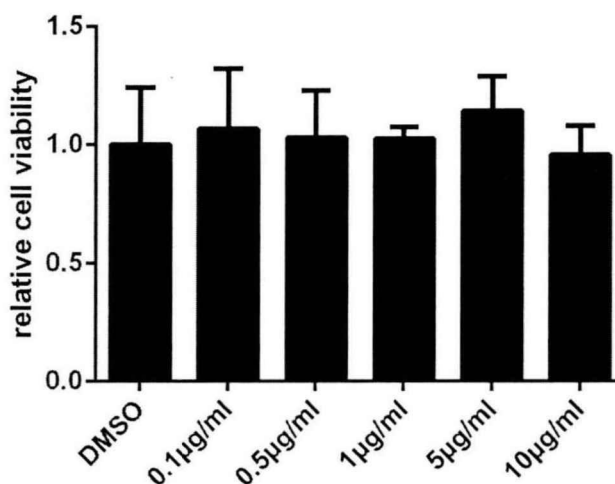


Figure 15 不同浓度的菟丝子总黄酮不影响滋养细胞的增殖能力

Figure15 Difference dosage of TFSC showed no decrease in vitality of cells

(三) 菟丝子总黄酮促进滋养细胞迁移和侵袭能力

为了进一步检测菟丝子总黄酮对滋养细胞迁移和侵袭功能的影响 (Fig. 16), 0.5 μg/ml, 1 μg/ml 和 5 μg/ml 不同浓度的菟丝子总黄酮分别作用于 EVT 细胞 0h, 6h, 12h 和 24h, 对照组为 DMSO, 划痕试验结果提示, 随着划痕时间的延长, 菟丝子

总黄酮组的滋养细胞迁移能力增加,含 1 μg/ml 和 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮作用促细胞迁移能力作用更明显。

Transwell 试验提示在加入不同浓度的菟丝子总黄酮作用滋养细胞 48h 后(表 13, Fig. 16), 1 μg/ml 和 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮组细胞侵袭的数目增加,对比 DMSO 组有统计学差异 ($p < 0.05$), 呈剂量依赖性, 因此可以说明菟丝子总黄酮不仅能够增加滋养细胞的迁移能力, 而且还能增加滋养细胞的侵袭能力。

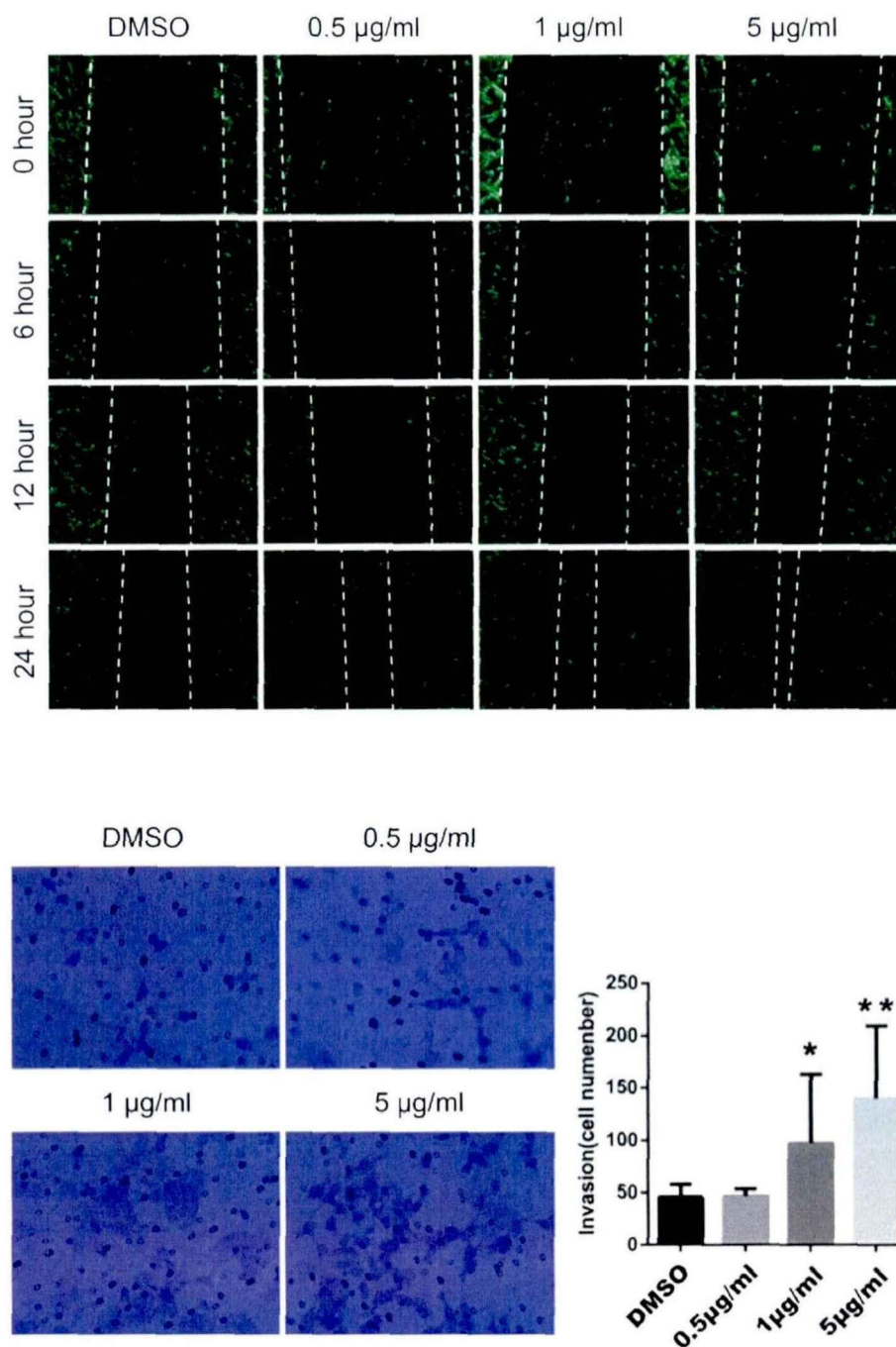


Figure 16 菟丝子总黄酮对正常滋养细胞迁移 (X40) 和侵袭功能 (X400) 的影响

注: X40 显微镜下, 对比 DMSO 组, 在 12h 和 24h, 1 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的菟丝子总黄酮增加滋养细胞的迁移能力, 呈时间和剂量依赖性。X400 显微镜下, 1 μ g/ml 和 5 μ g/ml 的菟丝子总黄酮能明显增加滋养细胞的侵袭细胞数目。* p <0.05, ** p <0.01.

Figure 16 The effect of TFSC on the migration and invasion of EVT cells

注: Observed under an inverted X40 microscope, compared with DMSO, 1 μ g/ml and 5 μ g/ml TFSC significantly increase the migration ability of EVT cells in 12h and 24h, showed in a dose- and time-dependent manner. Observed under an inverted X400 microscope after 48h of culture, the cell numbers were significantly increased in 1 μ g/ml and 5 μ g/ml TFSC.

表 13 菟丝子总黄酮作用后各组间细胞侵袭数目 ($\bar{x} \pm s$, 个)

组别	N	侵袭数目 ($\bar{x} \pm s$)
DMSO	3	45.67 \pm 11.68
0.5 μ g/ml	3	46.67 \pm 6.66
1 μ g/ml	3	97.0 \pm 14.42*
5 μ g/ml	3	139.67 \pm 39**

注: 采用 ANOVA 方差分析检测。对比 DMSO 组, * p <0.05, ** p <0.01.

四、讨论

自古以来,《女科正宗·广嗣总论》曰:“男精壮而女经调,有子之道也”,说明在男女生殖之精正常,在“氤氲之候”之时,胎孕而成。正常的妊娠过程,需要女子肾气的充盛,天癸的成熟,冲任二脉的充盛,胞宫藏泻有期,以此胎孕乃成。早在著名的中医妇科学专家罗元恺教授提出“肾-天癸-冲任-胞宫”生殖轴,该生殖轴是女性在生殖调节中的核心,调经、助孕、安胎贯穿于女性一生之中^[128]。自然流产,即“胎元不固”的发生,是最后一环妊娠安胎过程常见病,往往是因为肾虚而阴血无以下注而养胎,肾虚冲任不固导致,在治疗上常以“治病与安胎并举”的治疗大法,首先以补肾为主,肾气充盛则胎元已固,同时辅以疏肝健脾,益气养血之法。《素问·上古天真论》如是说:“肾者主水,受五脏六腑之精而藏之。故五脏盛,乃能写(泻)”,此处说的就是肾能藏精,精气盛,胎元安。罗元恺教授治疗自然流产或者安胎的患者,也主要从补肾入手,其治疗思路主要是:封藏之本,以补肾固摄为主;潜阳制胜以治相火易亢;同时主张以静制动以安冲任^[129]。也有不少研究用补肾活血法和补肾健脾法治疗自然流产^[130, 131],无论如何,补肾法是治疗自然流产的首选治法。目前治疗自然流产的代表方剂是以寿胎丸为主。寿胎丸包括菟丝子、桑寄生、续断,阿胶四种药物。近年来对于寿胎丸的研究不甚其数。寿胎丸具有抑制子宫平滑肌的收缩作用,就导师课题组而言,建立肾虚-黄体抑制病症结合模型,并以寿胎丸治疗的药效试验得出寿胎丸的优选方-减味寿胎丸(菟丝子、桑寄生、续断)^[132, 133],同时构建出复方中菟丝子、桑寄生、续断三种药物的指纹图谱^[134-136],并深入研究减味寿胎丸的药效部位,如菟丝子中以菟丝子总黄酮总黄酮,菟丝子总多糖为主^[137],续断以续断总皂苷,续断总生物碱为主^[138],桑寄生以桑寄生总多糖,桑寄生总黄酮为主^[139],并且通过实验都证

明了该三味药能够提高大鼠 ER, PR 的表达, 增加胚胎成活率。菟丝子是寿胎丸的君药, 在寿胎丸复方中占据主导地位, 能够补肾安胎, 是安胎药的首选。

菟丝子总黄酮是菟丝子的一种主要活性成分, 是目前认为菟丝子发挥药效的主要部位。现代药理学表明, 菟丝子总黄酮的药效主要是改善生殖内分泌、抗氧化, 抗凋亡、保护心脑血管, 调节免疫和骨代谢等作用^[140]。菟丝子总黄酮对暴露在心理压力大的雌性大鼠的下丘脑-垂体-卵巢 (HPO) 轴性激素受体的表达影响, 结果发现菟丝子总黄酮能够提高海马体、下丘脑和垂体上 ER 的表达, 以及卵巢上 LHR 的表达^[141]。与此同时, 菟丝子总黄酮能够促进滋养细胞的增殖能力, 且呈时间和剂量依赖性; ERK1/2 磷酸化水平表达升高, 推测菟丝子总黄酮可能是通过 MAPK 通路来发挥其对细胞增殖活力的影响^[142]。目前对于菟丝子总黄酮的研究大部分集中于成分提取工艺及鉴定, 或者少部分研究菟丝子总黄酮的药效作用, 据我们所知, 尚未发现其在滋养细胞迁移和侵袭功能方面的报导, 那么菟丝子总黄酮是否会影响滋养细胞的迁移和侵袭功能呢?

通过本节研究中发现, 经过紫外分光光法, 以芦丁为对照品, 测得菟丝子提取物中菟丝子总黄酮的含量达 90% 以上, 菟丝子总黄酮含量相对较高。经过 HPLC 方法, 发现菟丝子总黄酮内主要含芦丁, 槲皮素和少量的异鼠李素, 这与目前研究中发现菟丝子总黄酮中黄体成分包括金丝桃苷、紫云英苷、山奈酚和槲皮素、异槲皮苷、异鼠李素、绿原酸是相一致的^[143, 144]。本方法测定菟丝子总黄酮内的芦丁含量占 77.75%, 该提取物主要成分是芦丁, 芦丁属于一种黄酮类物质, 是黄酮类物质槲皮素的糖苷。前期已有研究发现菟丝子提取物中主要含芦丁和异鼠李素, 少量的金丝桃苷和山奈酚^[145, 146], 与本次实验的结果相似, 这也可以说明菟丝子总黄酮是来自于菟丝子的提取物。总的来说, 菟丝子总黄酮的提取物的纯度较好, 具有稳定性, 能够用来反映菟丝子总黄酮的药效。

进一步通过 MTT 试验证明菟丝子总黄酮对滋养细胞没有毒性作用, 不会造成滋养细胞的伤害, 菟丝子总黄酮具有安全性和稳定性。划痕试验和 Transwell 试验进一步发现 $1\ \mu\text{g/ml}$ 和 $5\ \mu\text{g/ml}$ 菟丝子总黄酮能够促进 HTR-8 滋养细胞的迁移和侵袭能力, 呈时间和剂量依赖性, 这与之前研究菟丝子总黄酮能够促进滋养细胞的增殖能力是相应的, 菟丝子总黄酮不仅具有提高滋养细胞的增殖能力, 与此同时还能促进滋养细胞的迁移和侵袭能力, 而迁移和侵袭能力的正常发挥, 是维持正常妊娠的重要条件, 菟丝子总黄酮通过提高滋养细胞的迁移和侵袭能力, 保证滋养细胞发挥正常的侵袭功能, 从而保证妊娠的顺利的完成, 或许这就是菟丝子总黄酮通过此作用来起到补肾安胎, 防治自然流产的药效。那么, 菟丝子总黄酮是如何发挥这一作用呢? 结合第二节中发现自然流产组织中 miRNA-126-3p 的表达上调, 菟丝子总黄酮是否会调控 miRNA-126-3p 进而影响滋养细胞的迁移和侵袭功能? 我们将在进一步的功能和机制研究中阐述。在本节中发现含 $5\ \mu\text{g/ml}$ 菟丝子总黄酮对滋养细胞迁移和侵袭功能的药效最好, 因此在进一步实验研究使用的菟丝子总黄酮剂量都是为 $5\ \mu\text{g/ml}$, 以保证菟

丝子总黄酮能发挥最好的药效作用。

五、小结

菟丝子总黄酮的含量达到 90%以上,对滋养细胞没有毒性作用,具有稳定性和安全性。经实验证明,菟丝子总黄酮能够促进滋养细胞的迁移和侵袭能力,呈时间和剂量依赖性,且 $5 \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮的药效作用最好。

第四节 菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能影响

前面章节我们得出了菟丝子总黄酮能够促进正常滋养细胞的迁移和侵袭功能,那么菟丝子总黄酮对于自然流产状态滋养细胞模型的滋养细胞是否有同样的功能呢?众所周知,米非司酮是孕激素受体拮抗剂,是进行药物流产的常用药。课题组前期通过羟基脲-米非司酮造成大鼠肾虚-黄体抑制模型,在滋养细胞模型上,采用 $60 \mu\text{mol/L}$ 米非司酮造成滋养细胞凋亡流产模型,且经过减味寿胎丸治疗后,流产模型的滋养细胞凋亡率降低。本实验拟优化滋养细胞自然流产模型,采用米非司酮和同时转染 miRNA-126-3p 干预细胞,构建自然流产状态细胞模型,以期更好的模拟临床上发生的自然流产,进一步探讨菟丝子总黄酮的补肾安胎药效。

一、实验目的

采用米非司酮和 miRNA-126-3p 转染干预细胞,构建自然流产状态滋养细胞模型,同时用菟丝子总黄酮干预,探讨菟丝子总黄酮对自然流产状态细胞模型的滋养细胞的迁移和侵袭功能的影响。

二、实验材料与方法

(一) 实验材料与仪器

米非司酮 (RU486): Sigma 公司, 分子量为 429.61.

RNA-later: Tiangen 公司

RNA 提取试剂盒: Magen 公司

miRNA 逆转录试剂盒: GeneCopoeia 公司, All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (AMRT-0020)

miRNA -qPCR 试剂盒: All-in-One™ miRNA qPCR Kit, GeneCopoeia 公司

mRNA 逆转录试剂盒: Thermo Scientific™公司, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

mRNA -qPCR 试剂盒: Thermo Scientific™公司, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix

PBS: Hyclone 公司

0.25%胰蛋白酶: Gibco 公司

RPMI-1640 培养基: Gibco 公司

DMSO: Sigma 公司

抗生素（青霉素-链霉素）：Gibco 公司

胎牛血清：BI 公司

miRNA mimic/mimic negative/inhibitor/inhibitor negative：广州锐博公司

Lipofectamine® 2000：invitrogen 公司

Matrigel：BD 公司

RPMI-1640 培养基：Gibco 公司

Opti-MEM 培养基：Gibco 公司

4%多聚甲醛：LEAGENE 公司

结晶紫染色液：碧云天生物科技有限公司

2. 实验仪器及器材

离心机：Thermo 公司

PCR 仪：Bio-rad 公司

全波长酶标仪：Thermo 公司

Nanodrop 超微量分光光度计测定仪：Thermo 公司

96 孔荧光定量 PCR 板：Bio-rad 公司

PCR Plate Sealer：Bio-rad 公司

六孔板、24 孔板：Coster 公司

Transwell 小室：BD 公司

RNase free EP 管：Axygen 公司

低温离心机：Thermo 公司

荧光倒置显微镜：Nikon 公司和 Olympus 公司

移液器：Eppendorf 公司

（二）实验方法

1. 米非司酮溶液的配制：

精密称取米非司酮粉剂 128.877mg，溶于 5ml DMSO 中，混匀后充分溶解形成浓度为 60mmol/L 的米非司酮母液。用含 10%胎牛血清的培养基稀释至所需浓度。

2. 转染方法：具体转染方法同第二节

3. 划痕试验

（1）米非司酮干预后的划痕试验方法：

① 提前一天将细胞种至六孔板。

② 转染，转染 4h 后更换无抗生素的含 10%FBS 的 1640 培养基。

③ 将已转染 24h 的六孔板细胞板，荧光倒置显微镜镜下观察细胞状态，并选择好每组大致相同细胞数的位置，用 200 μ l 枪头划一大致相等的横线，X40 镜下拍照。

④ 弃培养基，对照组加入 2ml 含 0.1% DMSO 的含 10%FBS 的 1640 培养基，实验组分别加入 2ml 含 30 μ mol/L 米非司酮药液，细胞培养箱内继续培养 6h。

在单独检测米非司酮对滋养细胞的迁移功能影响时,省去上述第二步步骤,在第四步步骤时的实验组分别加入 2ml 含 $1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $5\ \mu\text{mol/L}$ 、 $10\ \mu\text{mol/L}$ 、 $30\ \mu\text{mol/L}$ 、 $60\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮药液,继续培养 6h。

⑤ 6h 后,选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。

⑥ 12h 后,选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。实验重复 3 次,根据细胞迁移距离判定细胞划痕结果。

(2) 用菟丝子总黄酮干预后的划痕试验方法:

① 提前一天将细胞种至 2 个六孔板,转染,转染 4h 后更换无抗生素的含 10%FBS 的 1640 培养基。在转染 12h 时,弃培养基,分别加入 2ml 含 $30\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮药液,其中剩余两个孔不更换药液,作为空白对照组。培养箱内继续培养 12h。

② 将已转染 24h,米非司酮造模 12h 的六孔板细胞板,荧光倒置显微镜镜下观察细胞状态,并选择好每组大致相同细胞数的位置,用 $200\ \mu\text{l}$ 枪头划一大致相等的横线, X40 镜下拍照。

③ 弃培养基,对照组分别加入 2ml 含 0.1% DMSO 的含 10%FBS 的 1640 培养基(共 6 个孔),实验组分别加入 2ml 含 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮药液(共 6 个孔),细胞培养箱内继续培养 6h。

④ 6h 后,选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。

⑤ 12h 后,选择相同拍照位置, X40 镜下拍照。实验重复 3 次,根据细胞迁移距离判定细胞划痕结果。

4. Transwell 试验

(1) 提前一天将细胞种至六孔板。

(2) 转染,具体转染方法同第二节,转染 4h 后更换无抗生素的含 10%FBS 的 1640 培养基。

(3) 在 24 孔的 Transwell 上室加入 50ul 用无血清的 RPMI-1640 培养基按 3:1 稀释的 Matrigel,在 37°C , 5% CO_2 的细胞培养箱敷育 1h;

(4) 将各组细胞用胰酶消化 1min,加入无 FBS 的 RPMI-1640 培养基终止消化,离心,再用 PBS 重悬细胞,再次离心,分别用无 FBS 的 RPMI-1640 培养基重新悬浮细胞,细胞密度为 $5\times 10^4/\text{ml}$ 。

(5) 实验组加入 $100\ \mu\text{l}$ 无 FBS 含 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮的 RPMI-1640 培养基,对照组加入含 0.1% 的 DMSO 的无 FBS 的 RPMI-1640 培养基,各再加入 $100\ \mu\text{l}$ 重新悬浮均匀的细胞悬液至 Transwell 上室中,分别在下室加入 $500\ \mu\text{l}$ 含 10%FBS 的培养基, 37°C 5% CO_2 的细胞培养箱中继续孵育 48h。

(6) 48h 后,用棉签轻轻擦拭去掉上室滤膜内面细胞,保留滤膜外面细胞,用多聚甲醛固定 30min,结晶紫染色 20min。平整切下滤膜。

(7) $\times 200$ 高倍显微镜下,对每个孔内所有细胞进行计数。

(8) 侵袭指数=实验组细胞数/对照组细胞数。实验重复 2 次, 取平均数。

5. RT-qPCR 方法

(1) 细胞 RNA 的提取

① 将上述 3 个划痕试验结束后的滋养细胞, (即加入米非司酮, 转染后加入米非司酮, 及其再加菟丝子总黄酮干预三个试验), 用 PBS 洗 3 次, 再各加入 1ml Magzol, 轻轻吹落细胞, 收集细胞悬液至 1.5ml RNase free EP 管, 室温静置 10min, -80°C 保存或者进行下一步实验。

② 余下实验同第二节

(2) RNA 浓度的测量, 同第二节

(3) 逆转录合成 cDNA, 同第二节

(4) 荧光定量 qPCR 合成, 同第二节

三、实验结果

(一) 米非司酮抑制滋养细胞迁移功能

米非司酮是用于药物流产的常见药物, 能够通过增加滋养细胞凋亡, 抑制滋养细胞增殖迁移功能而发挥作用。划痕实验采用 $1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $5\ \mu\text{mol/L}$ 、 $10\ \mu\text{mol/L}$ 、 $30\ \mu\text{mol/L}$ 、 $60\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮孵育滋养细胞后, 观察划痕的愈合情况。结果发现 (Fig. 17A), 对比 DMSO 组, 随着划痕时间的延长, 不同浓度的米非司酮对滋养细胞的抑制作用不同, 其中含 $1\ \mu\text{mol/L}$ 、 $5\ \mu\text{mol/L}$ 、 $10\ \mu\text{mol/L}$ 米非司酮对滋养细胞的迁移功能未见明显影响, 而 $30\ \mu\text{mol/L}$ 和 $60\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮, 可明显抑制滋养细胞的迁移能力, 米非司酮浓度越高, 抑制滋养细胞的迁移能力越明显。

进一步经过 qPCR 试验结果同样发现, 相对于 DMSO 组, $1\ \mu\text{mol/L}$ 和 $5\ \mu\text{mol/L}$ 米非司酮组的 miRNA-126-3p 的基因水平未见明显改变, 而 $10\ \mu\text{mol/L}$ 、 $30\ \mu\text{mol/L}$ 和 $60\ \mu\text{mol/L}$ 米非司酮组的 miRNA-126-3p 的基因水平相对于 DMSO 组有明显升高 (Fig. 17B)。结合前述研究, 自然流产绒毛组织的 miRNA-126-3p 水平上调, 本实验中 $30\ \mu\text{mol/L}$ 和 $60\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮都可以抑制滋养细胞的迁移功能, 且用米非司酮诱导滋养细胞后 miRNA-126-3p 表达升高, 因此可以看出, 米非司酮作用滋养细胞后, 对细胞迁移功能的抑制作用, 可能是通过上调细胞内源性的 miRNA-126-3p 基因的表达, 从而引发自然流产的倾向。

本实验说明采用米非司酮来诱导细胞发生自然流产的方法是可行的, 由于实验时镜下观察发现 $60\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮, 漂浮死亡细胞较多, 为预防米非司酮对滋养细胞造成流产的损伤过大而不可逆, 在接下来的实验, 我们选取 $30\ \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮作为诱导滋养细胞发生自然流产的米非司酮剂量。

(二) EVT 滋养细胞自然流产状态细胞模型的建立

米非司酮诱导后对 miRNA-126-3p 过表达和干扰的滋养细胞迁移功能影响, 经划痕试验发现 (Fig. 18), 在用 miRNA-126-3p 过表达和干扰滋养细胞 24h 后, 再根据不同组间, 一组加上 30 $\mu\text{mol/L}$ 的米非司酮继续干预, 剩余一组更换新的培养基培养, 随着划痕时间的延长, 各组间的细胞迁移距离不同。对比 mimic negative 无药物组 (MN), miRNA-126-3p mimic 组 (M) 细胞迁移能力降低, 对比 inhibitor negative 无药物组 (IN), miRNA-126-3p inhibitor 组 (I) 细胞迁移能力增加, 这再次验证了 miRNA-126-3p 表达上调, 能抑制滋养细胞的迁移能力。经过将各组用米非司酮干预后, 对比 mimic negative-MIF 组 (MN-MIF), miRNA-126-3p mimic-MIF 组 (M-MIF) 细胞迁移能力显著降低, 对比 inhibitor negative-MIF 组 (IN-MIF), miRNA-126-3p inhibitor-MIF 组 (I-MIF) 细胞迁移能力稍增加, 总的来说, 加入米非司酮后, 各米非司酮处理组, 相比无米非司酮处理组, 迁移能力都有所下降。进一步将 M-MIF 组和 I-MIF 组对比, 可以明显发现 M-MIF 组的细胞迁移距离显著低于 I-MIF 组的细胞迁移距离, 说明了采用米非司酮诱导转染后的滋养细胞, miRNA-126-3p mimic 的迁移能力进一步降低, 从而可以推测, 经过转染和米非司酮处理后, miRNA-126-3p M-MIF 组的滋养细胞很好的模拟了临床上的自然流产状态。

为了进一步验证这一模型是否可以成立, 我们通过继续用 RT-qPCR 方法验证各处理组细胞的 miRNA-126-3p 的基因水平表达 (表 14, Fig. 19), 以 MN 作为对照组, M 组的 miRNA-126-3p 表达升高 ($p < 0.05$), 而经过加入米非司酮诱导后, 都能上调 M-MIF 和 MN-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达 ($p < 0.05$); 以 IN 组作为对照组, I 组的 miRNA-126-3p 表达降低 ($p < 0.05$), 而经过加入米非司酮诱导后, 只有 IN-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达升高 ($p < 0.05$), 而 I-MIF 组 miRNA-126-3p 表达稍微上升, 但与 IN 组相比无统计学差异 ($p > 0.05$), 以此可以说明, 加入米非司酮作用滋养细胞后, 可以继续过表达 miRNA-126-3p, 增加细胞内源性的 miRNA-126-3p, 在干扰掉细胞内源性 miRNA-126-3p 后, 即使加入米非司酮, 也尚未能增加细胞内源性的 miRNA-126-3p 的上升, 从而间接地说明了, 在加入米非司酮作用已干扰细胞内源性的 miRNA-126-3p, 也不足以引发滋养细胞发生流产。而在本身已过表达细胞外源性 miRNA-126-3p 的基础上, 加入米非司酮后, 可以继续增加细胞内源性的 miRNA-126-3p, 从而引发滋养细胞的进一步流产。在转染后, 可以得出 miRNA-126-3p 过表达 M 组与干扰 I 组有统计学差异 ($p = 0.05$), M 组的 miRNA-126-3p 表达升高, 进一步对比, 米非司酮干预后, miRNA-126-3p M-MIF 组与干扰 I-MIF 组有统计学差异 ($p = 0.05$), M-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达有显著性升高。

结合这几个组从而可以证明, 滋养细胞加入外源性 miRNA-126-3p 过表达 (mimic) 后, 再利用米非司酮进行诱导, 可以进一步增加滋养细胞内源性的 miRNA-126-3p 的表达, 这正好可以说明通过这些处理后, 上调滋养细胞内外源性 miRNA-126-3p 的表达, 从而给滋养细胞构建了自然流产状态的细胞模型, 这与我们前面章节得出的自然

流产组织的 miRNA-126-3p 表达升高有相同之意，以此也很好的模拟了临床上发生自然流产时的体内基因表达状态，同时验证了 Fig. 4 的划痕试验结果。

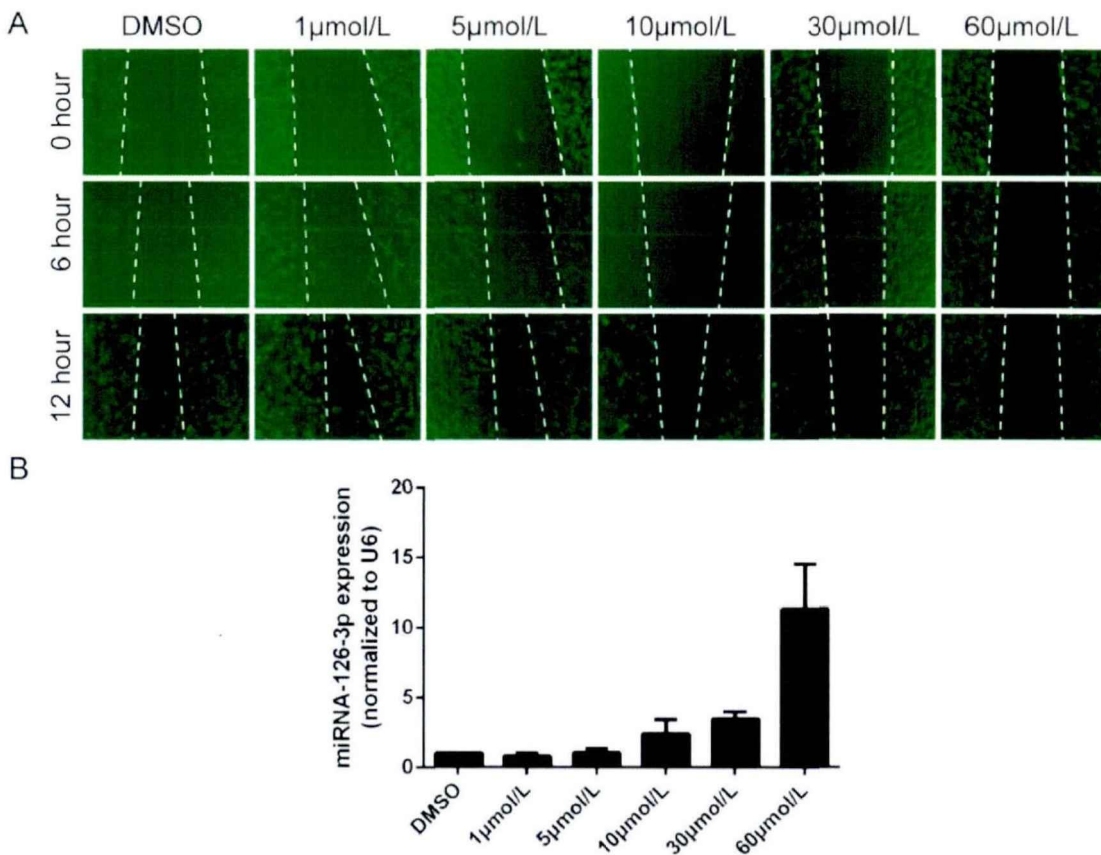


Figure 17 米非司酮对滋养细胞的影响 (X40)

注：(A)划痕试验，X40 显微镜下，米非司酮抑制滋养细胞的迁移能力。30 μmol/L 和 60 μmol/L 的米非司酮对比 DMSO 组，能显著抑制滋养细胞的迁移功能，而 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L 的米非司酮抑制滋养细胞迁移能力不明显。(B) RT-qPCR，米非司酮上调滋养细胞内的 miRNA-126-3p 表达。10 μmol/L、30 μmol/L 和 60 μmol/L 的米非司酮组的 miRNA-126-3p 的基因水平相对于 DMSO 组有明显升高。以 U6 作为内参。

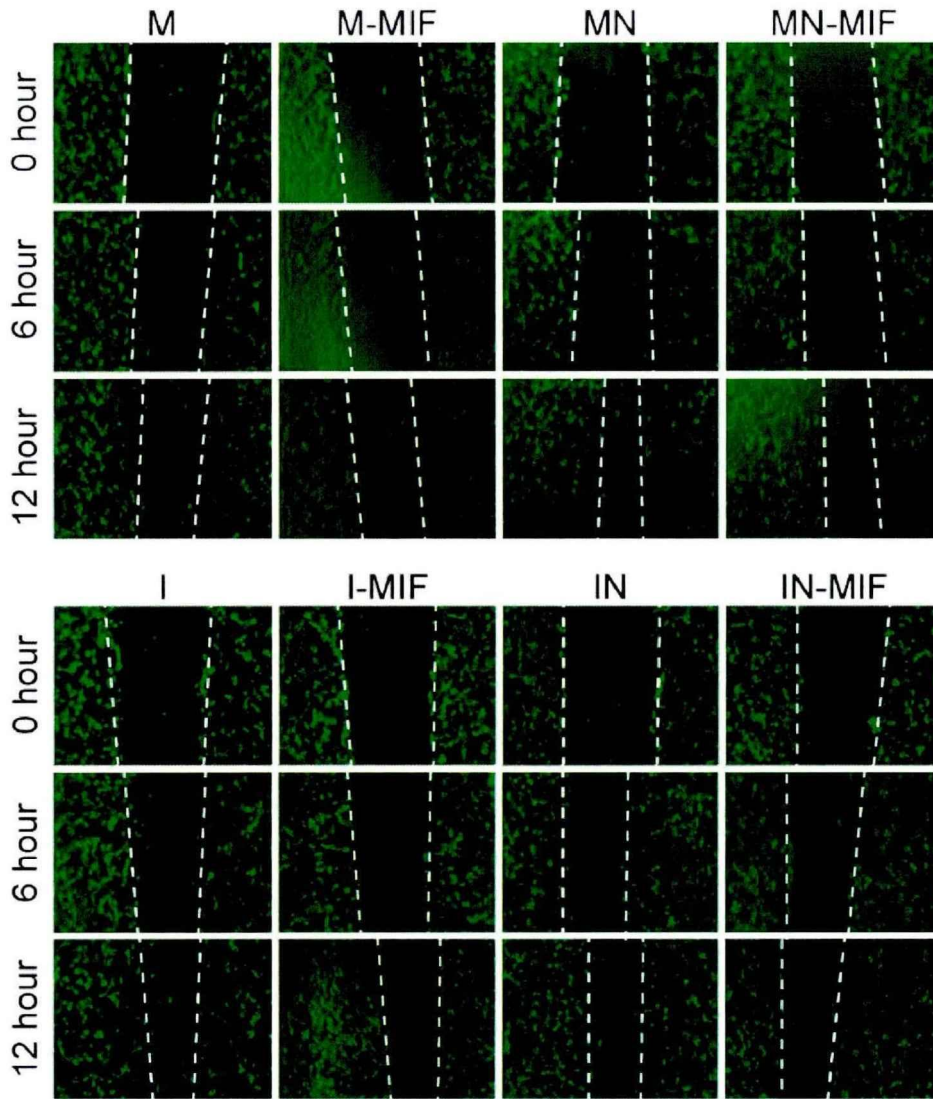


Figure 18 米非司酮诱导滋养细胞建立自然流产状态模型 (X40)

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; MIF: 米非司酮。加入米非司酮诱导细胞, 同时对比 MN-MIF 和 IN-MIF 组, M-MIF 组的迁移能力下降, I-MIF 组的迁移能力增加, 而 M-MIF 组的迁移能力相对比 I-MIF 组的细胞迁移后显著降低。

表 14 米非司酮干预前后各组的 miRNA-126-3p 水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	$\Delta\Delta_{ct}(\bar{x} \pm s)$	P	P ₂
M	3	35.46 ± 17.38	0.037*	0.050 ^s
M-MIF	3	119.32 ± 24.19	0.037*	0.050 ^s
MN	3	1.00 ± 0.00	/	
MN-MIF	3	8.46 ± 2.74	0.037*	
I	3	1.00 ± 0.00	0.037 ^z	0.050 ^s
I-MIF	3	0.38 ± 0.36	0.487	0.050 ^s
IN	3	2.24 ± 2.60	/	
IN-MIF	3	16.89 ± 25.72	0.037 ^z	

注: 采用 Mann-Whitney U 检验方法。对比 MN 组, * p < 0.05; 对比 IN 组, ^z p < 0.05; 对比 I 组, ^s p = 0.05, 对比 I-MIF 组, ^s p = 0.05

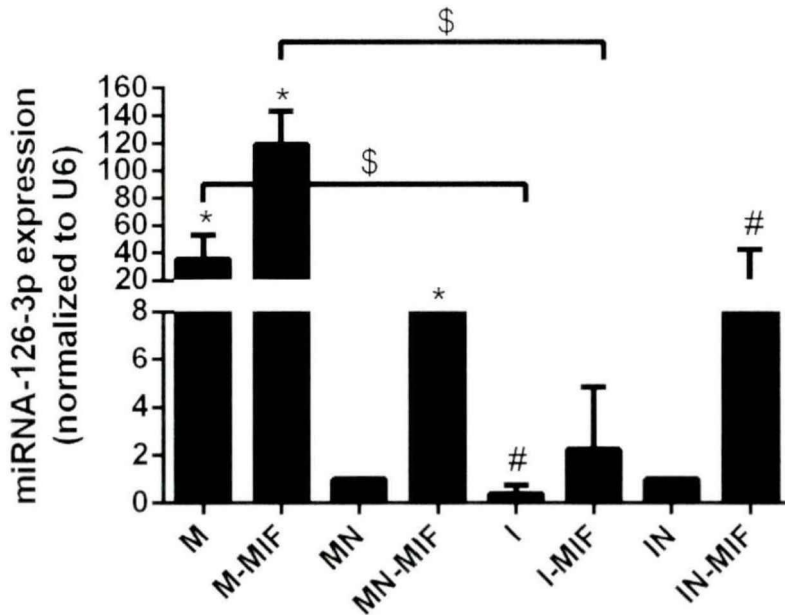


Figure 19 米非司酮诱导滋养细胞后 miRNA-126-3p 的表达

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; MIF: 米非司酮。与 miRNA-126-3p MN 组对比, 加入米非司酮后, M-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达上调 ($p < 0.05$); 与 miRNA-126-3p IN 组对比, 加入米非司酮后, I-MIF 内 miRNA-126-3p 稍升高, 但无统计学差异 ($p > 0.05$), 而 IN-MIF 组的 miRNA-126-3p 有明显升高 ($p < 0.05$)。M-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达比 I-MIF 组有明显上调 ($p = 0.05$)。以 U6 作为内参。* $p < 0.05$, # $p = 0.05$ 。

(三) 菟丝子总黄酮促进米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能

1、菟丝子总黄酮促进自然流产状态细胞模型的迁移功能

通过前面结果我们构建出用米非司酮诱导 miRNA-126-3p 过表达的滋养细胞自然流产状态细胞模型, 滋养细胞的迁移能力降低, 本实验在此基础上, 在转染 12h 后加上米非司酮诱导 12h, 再进行对实验组用 $5 \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮和对照组 DMSO 干预 6h 和 12h, 划痕试验结果发现 (Fig. 20), (1)、以 miRNA-126-3p mimic negative-DMSO 组 (MN-DMSO) 为对照组, miRNA-126-3p mimic-DMSO (M-DMSO) 迁移能力降低, 用菟丝子总黄酮干预后, miRNA-126-3p mimic negative-TSZ 组 (MN-TSZ) 较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 同样地 miRNA-126-3p mimic -TSZ 组 (M-TSZ) 较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 说明用菟丝子总黄酮干预后, 对比 DMSO, 能提高自然流产状态模型组 M-TSZ 的细胞迁移能力。但 M-TSZ 组的细胞迁移能力稍低于 MN-TSZ 组。

(2)、另外, 以 miRNA-126-3p inhibitor negative-DMSO 组 (IN-DMSO) 为对照组, miRNA-126-3p inhibitor-DMSO (I-DMSO) 迁移能力增加, 用菟丝子总黄酮干预后, miRNA-126-3p inhibitor negative-TSZ 组 (IN-TSZ) 较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 同样地 miRNA-126-3p inhibitor -TSZ 组 (I-TSZ) 较其 DMSO 组细胞迁移能力

也增加,而且 I-TSZ 组的细胞迁移能力高于 IN-TSZ 组,说明在菟丝子总黄酮作用下,对比 DMSO,能明显增加干扰 miRNA-126-3p 后的滋养细胞的迁移能力。综合整个划痕试验结果发现, I-TSZ 组的细胞迁移能力高于 M-TSZ 组,从而说明了菟丝子总黄酮能提高滋养细胞的迁移能力,而且也能提高自然流产状态模型的滋养细胞的迁移功能,如果干扰滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达,使其下调,此时菟丝子总黄酮提高滋养细胞迁移能力作用更明显。

2、菟丝子总黄酮促进自然流产状态细胞模型的侵袭功能

同样地,从 Transwell 试验结果(表 15, Fig. 21)可以看出在转染 24h 后,各用菟丝子总黄酮和 DMSO 干预滋养细胞,得出,(1)、以 MN-DMSO 组为对照组, M-DMSO 侵袭的细胞数量降低,两组间有统计学差异 ($p < 0.01$),用菟丝子总黄酮干预后, MN-TSZ 组较其 DMSO 组细胞侵袭数目增加,同样地 M-TSZ 组较其 DMSO 组细胞侵袭数目增加,与 MN-DMSO 组相比有统计学差异 ($p < 0.05$)。说明用菟丝子总黄酮干预后,对比 DMSO,能提高自然流产状态模型组 miRNA-126-3p mimic 的细胞侵袭能力。但 M-TSZ 组的细胞侵袭能力稍低于 MN-TSZ 组。

(2)、以 IN-DMSO 组为对照组, I-DMSO 侵袭能力增加,用菟丝子总黄酮干预后, IN-TSZ 组较其 DMSO 组细胞侵袭数目增加,同样地 I-TSZ 组较其 DMSO 组细胞侵袭数目也增加,且与 IN-DMSO 组相比有统计学差异 ($p < 0.05$),而且 I-TSZ 组的细胞侵袭能力高于 IN-TSZ 组,说明在菟丝子总黄酮作用下,对比 DMSO,能明显增加干扰 miRNA-126-3p 后的滋养细胞的侵袭能力。综合整个 Transwell 试验结果发现, I-TSZ 组的细胞侵袭能力显著高于 M-TSZ 组,两者之间存在统计学差异 ($p < 0.001$),从而说明了菟丝子总黄酮能提高滋养细胞的侵袭能力,而且也能提高自然流产状态细胞模型的滋养细胞的侵袭功能,如果干扰滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达,使其下调,此时菟丝子总黄酮提高滋养细胞侵袭能力作用更明显。

3、菟丝子总黄酮降低自然流产状态细胞模型内 miRNA-126-3p 的表达

为了进一步验证菟丝子总黄酮的作用,通过 RT-qPCR 方法检测各组处理后滋养细胞内 miRNA-126-3p 基因水平的差别(表 16, Fig. 22),结果得出:(1)、以 MN-DMSO 组为对照组, M-DMSO 组和 M-TSZ 组的 miRNA-126-3p 表达上调,有统计学差异 ($p < 0.05$), MN-TSZ 组 miRNA-126-3p 表达稍下调,但以其 DMSO 组无统计学差异 ($p > 0.05$),但 M-DMSO 组和 M-TSZ 组两两比较, M-TSZ 组中 miRNA-126-3p 表达稍下调,但无统计学差异 ($p > 0.05$)。

(2)、以 IN-DMSO 组为对照组,与 I-DMSO 组和 IN-TSZ 组相比无统计学差异 ($p > 0.05$),而 I-TSZ 组的 miRNA-126-3p 的表达明显下调,与 IN-DMSO 组相比具有统计学差异 ($p < 0.05$)。最后将造模组的 M-TSZ 组和 I-TSZ 组两两比较, I-TSZ 组的 miRNA-126-3p 水平明显降低,两组之间有统计学差异 ($p = 0.05$)。因此可以说明菟丝子总黄酮能够通过降低滋养细胞内 miRNA-126-3p 的水平从而降低自然流产的发生率。

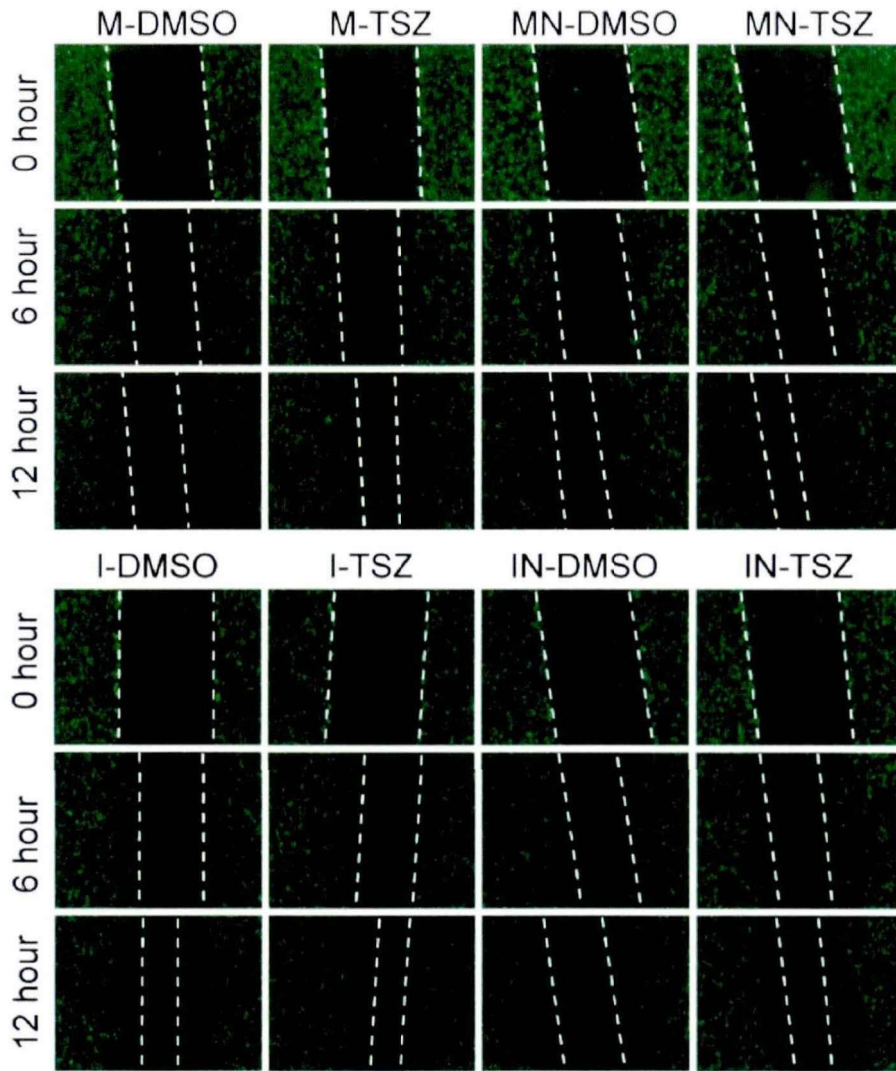


Figure 20 菟丝子总黄酮对自然流产状态滋养细胞模型迁移功能影响 (X40)

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; TSZ: 菟丝子总黄酮。M-TSZ 组较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, I-TSZ 组也较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 而 I-TSZ 组的细胞迁移能力高于 M-TSZ 组。

表 15 菟丝子总黄酮干预后各组细胞侵袭数目差异 ($\bar{x} \pm s$, 个)

组别	N	侵袭数目 ($\bar{x} \pm s$)	P	P ₂
M-DMSO	3	12848.67 ± 4491.23	0.001**	0.000 ^{SS}
M-TSZ	3	19991.67 ± 4279.93	0.025*	0.000 ^{SSS}
MN-DMSO	3	32248.33 ± 8465.15	/	/
MN-TSZ	3	36694.00 ± 2364.25	0.384	/
I-DMSO	3	37728.00 ± 5809.09	0.331	0.000 ^{SSS}
I-TSZ	3	45403.67 ± 2050.34	0.021 [†]	0.000 ^{SSS}
IN-DMSO	3	32747.33 ± 6382.93	/	/
IN-TSZ	3	39890.00 ± 10066.95	0.170	/

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测。

对比 MN-DMSO 组, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 对比 IN-DMSO 组, [†] $p < 0.05$;

对比 I-DMSO 组, ^{SSS} $p < 0.001$, 对比 I-TSZ 组, ^{SSS} $p < 0.001$ 。

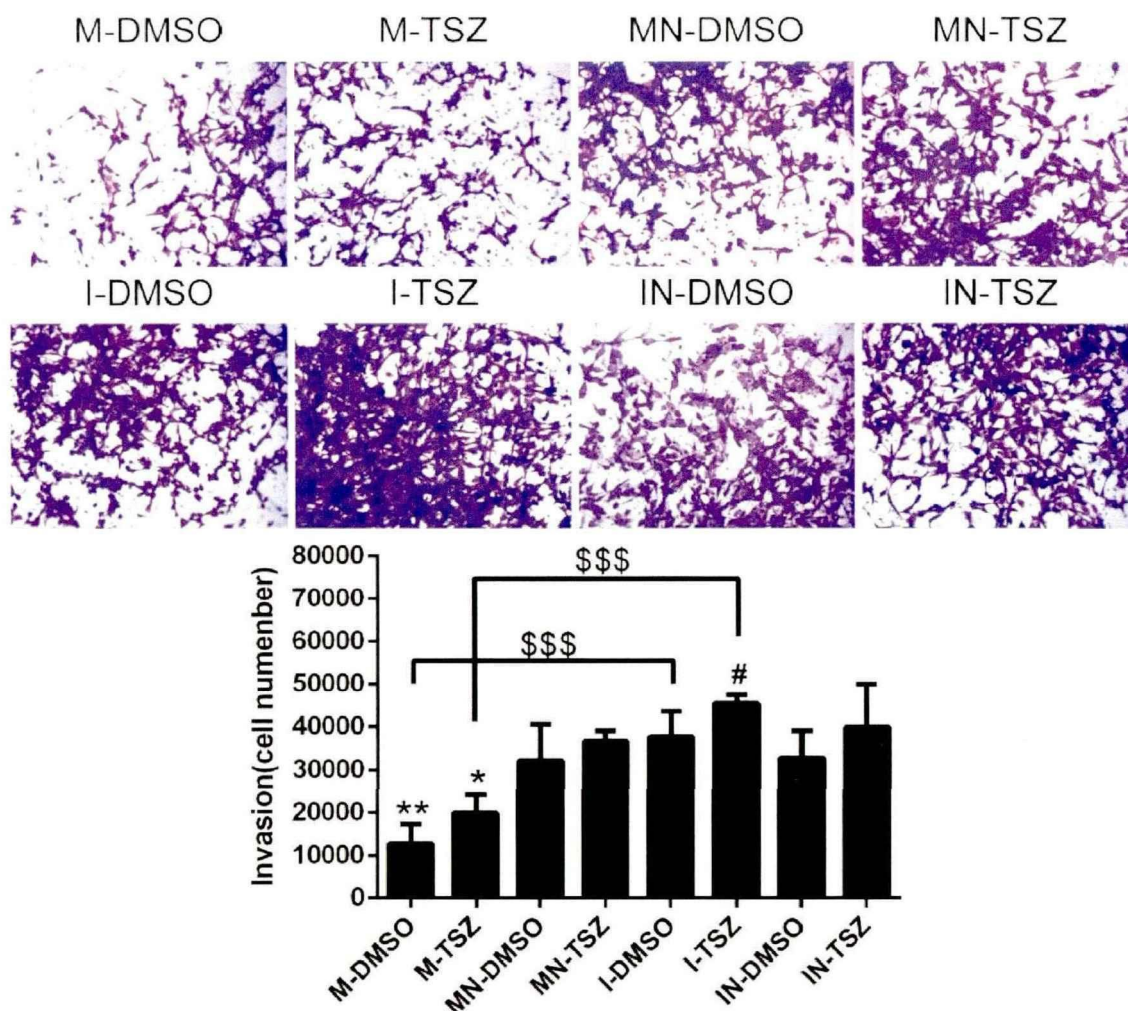


Figure 21 菟丝子总黄酮对自然流产状态滋养细胞模型侵袭功能的影响 (X200)

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; TSZ: 菟丝子总黄酮。M-TSZ 组较其 DMSO 组细胞侵袭能力增加, 对比 MN - DMSO 组有统计学差异 ($p < 0.05$)。I-TSZ 组也较其 DMSO 组细胞侵袭能力增加, 对比 IN-DMSO 组有统计学差异 ($p < 0.05$)。而 I-TSZ 组的细胞侵袭能力高于 M-TSZ 组 ($p < 0.001$)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$ 。

表 16 菟丝子总黄酮干预后各组的 miRNA-126-3p 水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	$\Delta\Delta_{ct}(\bar{x} \pm s)$	P ₁	P ₂
M-DMSO	3	47.34 ± 53.50	0.037*	0.050 ^s
M-TSZ	3	28.97 ± 21.08	0.037*	0.050 ^s
MN-DMSO	3	1.00 ± 0.00	/	/
MN-TSZ	3	0.88 ± 1.06	0.487	/
I-DMSO	3	0.51 ± 0.74	0.487	0.050 ^s
I-TSZ	3	0.38 ± 0.22	0.037 [#]	0.050 ^s
IN-DMSO	3	1.00 ± 0.00	/	/
IN-TSZ	3	1.11 ± 1.39	0.487	/

注: 采用 Mann-Whitney U 方法检测。

对比 MN-DMSO 组, * $p < 0.05$; 对比 IN-DMSO 组, [#] $p < 0.05$;

对比 I-DMSO 组, ^s $p = 0.05$; 对比 I-TSZ 组, ^s $p = 0.05$ 。

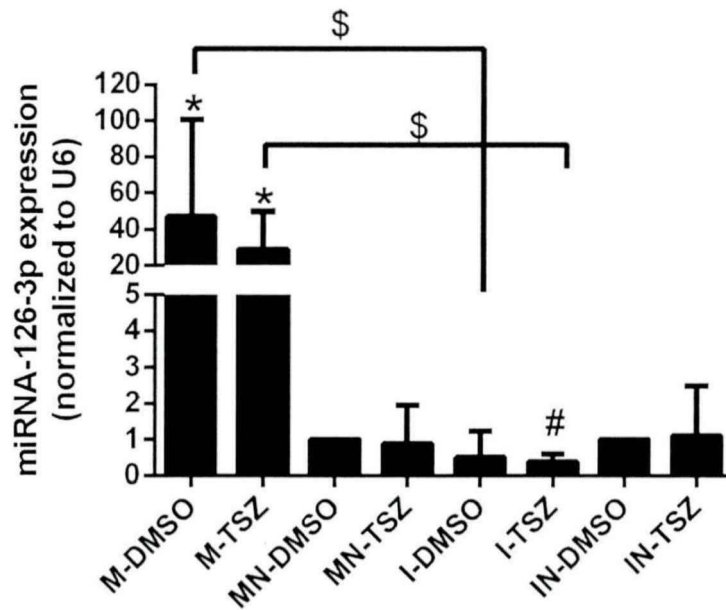


Figure 22 菟丝子总黄酮对自然流产状态滋养细胞模型的 miRNA-126-3p 表达影响

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; TSZ: 菟丝子总黄酮。以 MN-DMSO 组为对照组, M-DMSO 组和 M-TSZ 组的 miRNA-126-3p 表达上调, 有统计学差异 ($p < 0.05$); 以 IN-DMSO 组为对照组, I-TSZ 组的 miRNA-126-3p 的表达明显下调, 对比有统计学差异 ($p < 0.05$)。造模组的 M-TSZ 组和 I-TSZ 组两两比较, I-TSZ 组的 miRNA-126-3p 水平明显降低, $p = 0.05$ 。以 U6 作为内参。* $p < 0.05$, # $p = 0.05$ 。

四、讨论

自然流产是胚胎在 20 周以内发生的自发流产状态, 有研究发现自然流产的发生机制常常表现为滋养细胞的侵袭能力不足, 胚胎无法着床而引发流产。在上节研究中, 我们采用的是正常状态的滋养细胞, 在加入菟丝子总黄酮后能够促进滋养细胞的迁移和侵袭功能, 为了更好的模拟临床上发生的自然流产疾病, 也为了更好的证明菟丝子总黄酮治疗自然流产, 补肾安胎的药效, 在本节研究中, 利用米非司酮对滋养细胞进行干预, 从而模拟构建出滋养细胞的自然流产状态细胞模型。

米非司酮是临床上常用于药物流产的药物, 其能够拮抗孕激素受体, 导致子宫内膜坏死脱落而引发流产, 米非司酮抗早孕的机理可能是通过 Wnt, MMP, 前列腺素 (PG) 或者趋化因子等信号通路, 引发子宫内膜容受性降低起作用^[147]。有研究表明米非司酮通过抑制药流后患者绒毛组织上的滋养细胞增生结节, 下调 survivin 表达, 上调 caspase-3 基因表达, 引发滋养细胞凋亡^[148], 同时也能使滋养细胞变性坏死, 绒毛间质发生水肿, 抑制 MMP-26 表达, 上调 TIMP-4 基因表达, 破坏 MMP-26 和 TIMP-4 之间的平衡, 抑制了滋养细胞的侵袭能力, 导致流产^[149]。本研究中同样也发现 $30 \mu\text{mol/L}$ 和 $60 \mu\text{mol/L}$ 的米非司酮能够明显抑制滋养细胞的迁移功能, 浓度越高, 抑制作用越

明显。说明米非司酮可能是通过抑制滋养细胞的迁移能力而实现其引发自然流产的作用,那么米非司酮起作用的内在机制是什么呢?目前很多研究集中于发现米非司酮通过信号通路、细胞因子等对组织或者细胞造成影响,如可能是通过 NF- κ B 信号通路抑制子宫内膜细胞的生长^[150],同时降低滋养细胞中血管内皮生长因子 VEGF 的表达,增加 TSP 的表达,降低胎盘血管的形成^[151, 152],改变绒毛组织的 DCN, IGFBP5, CCR1, MIF, leptin, E-cadherin 的表达等^[153, 154]。少部分研究发现米非司酮与 miRNA 有相关性,用 20 μ g 的米非司酮作用小鼠后,小鼠的早产率增加,同时上调了 miR-200a 的表达,抑制 STAT5b 的 mRNA 水平,同时上调 20 α -HSD 的表达。这有可能是米非司酮通过调控 miR-200a,抑制 STAT5b,增加 20 α -HSD 的表达水平,从而增加 P4 的代谢,进一步降低 PR 的功能而引发先兆流产^[155]。另外米非司酮还可以诱导 miR-153 的表达抑制 KLF5 的基因水平^[156]。同样地,我们采用 RT-qPCR 的方法也发现 30 μ mol/L 的米非司酮诱导滋养细胞后,可以增加细胞内 miRNA-126-3p 的表达,前面我们已经证明自然流产组织的 miRNA-126-3p 的表达上调,说明米非司酮作用后促使滋养细胞的内源性 miRNA-126-3p 升高,进而抑制滋养细胞的迁移功能,发生流产。既然我们已经得出米非司酮可以抗早孕,引发流产,那么利用米非司酮构建滋养细胞的自然流产也是可行的,本实验用 30 μ mol/L 的米非司酮造模,是源于本课题组前期采用 60 μ mol/L 的米非司酮的构建滋养细胞的凋亡模型以及研究使用的 60 μ mol/L 的米非司酮可以构建体外子宫内膜间质细胞(ESC)损伤模型^[157],进一步优化而成,发现 30 μ mol/L 的米非司酮构建的模型,滋养细胞内源性的 miRNA-126-3p 不仅表达上调,死亡漂浮的滋养细胞也相对较少,有利于进一步实验加入目的药物菟丝子总黄酮的拯救实验。

因此,我们在将 miRNA-126-3p mimic/mimic negative 和 miRNA-126-3p inhibitor/inhibitor negative 转染至滋养细胞后,再分别加入 30 μ mol/L 的米非司酮干预 12h,发现 miRNA-126-3p M-MIF 组相比对照组迁移能力降低,反之 I-MIF 迁移能力增加,而 M-MIF 组的细胞迁移能力对比 I-MIF 显著降低,说明 miRNA-126-3p M-MIF 组即是我们构建的自然流产状态滋养细胞模型,miRNA-126-3p mimic 属于化学合成的产物,转染至细胞,使细胞短时间内过表达 miRNA-126-3p,从而利于研究 miRNA-126-3p 的功能。因而在转染 miRNA-126-3p mimic 至滋养细胞后,首先增加了滋养细胞外源性的 miRNA-126-3p 的表达,再加入米非司酮诱导,促使滋养细胞流产增加内源性的 miRNA-126-3p 的表达,在这样结合下,此时得到的滋养细胞即是我们想要的自然流产状态的滋养细胞模型,为了进一步验证这样构建的模型是否可靠,我们通过 RT-qPCR 的方法检测各组滋养细胞的 miRNA-126-3p 的表达,实验结果得出,与 miRNA-126-3p MN 对比,加入米非司酮后,M-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达上调,M-MIF 组的 miRNA-126-3p 表达比 I-MIF 组也明显上调,I-MIF 对比 IN 组,miRNA-126-3p 表达未见明显升高,说明在干扰抑制滋养细胞内的 miRNA-126-3p,即使加入米非司酮促使其流产,也未能增加 miRNA-126-3p 的表达,则达不到流产的状态,这也可以说明,

对比 I-MIF 这个组, M-MIF 组既有外源性 miRNA-126-3p 表达升高, 也有内源性的 miRNA-126-3p 上调, 正好就是我们需要模拟的自然流产状态的滋养细胞模型。或许大家会问, 为什么不能直接用 miRNA-126-3p mimic 组作为自然流产的模型, 原因是即使过表达 miRNA-126-3p 后, 滋养细胞也不一定会发生流产, 就算滋养细胞的迁移能力降低, 但是因为加入的是外源性的 miRNA-126-3p, 不能代表滋养细胞自身的 miRNA-126-3p 会表达升高, 因此借助米非司酮这个抗早孕促使流产的药物, 刺激滋养细胞发生内部的流产状态, 以达到我们研究自然流产状态细胞模型的目的。虽然操作繁琐, 可通过这样的模型后, 能更好的反映了临床上发生的自然流产, 也更好地结合了临床, 为解决临床上出现的自然流产疾病的病理原因提供一个理论依据。

第三节我们发现菟丝子总黄酮可以促进正常滋养细胞的迁移和侵袭功能, 那么菟丝子总黄酮是否也对自然流产状态细胞模型的滋养细胞的迁移和侵袭功能有促进作用? 通过进一步实验发现, 在构建好 miRNA-126-3p M-MIF 自然流产状态的细胞模型基础上, 以 DMSO 作为对照组, 实验组用 5 μ g/ml 的菟丝子总黄酮干预各组处理好的滋养细胞, 划痕实验和 Transwell 结果表明, 经菟丝子总黄酮干预后, M-TSZ 组较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, I-TSZ 组也较其 DMSO 组细胞迁移能力增加, 说明菟丝子总黄酮能促进自然流产状态细胞模型滋养细胞的迁移和侵袭能力, 而 I-TSZ 组的细胞迁移能力高于 M-TSZ 组, 可以看出在干扰滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达, 即使加上米非司酮增加滋养细胞内源性的 miRNA-126-3p 表达, 菟丝子总黄酮仍可以促进滋养细胞的迁移和侵袭功能, 这也间接说明菟丝子总黄酮能够降低滋养细胞内源性的 miRNA-126-3p 的表达, 也同时说明菟丝子总黄酮可以通过调控滋养细胞的 miRNA-126-3p 的表达来发挥其促进滋养细胞迁移和侵袭功能, 从而达到治疗和预防自然流产的药效, 起到安胎的作用。然而, 针对 RT-qPCR 方法检测各组间 miRNA-126-3p 的表达差异, 虽然 M-TSZ 组的 miRNA-126-3p 的表达比对照组升高, 但与其 DMSO 组仍有所降低, 而 I-TSZ 组的 miRNA-126-3p 却明显下降, 这就说明了菟丝子总黄酮是可以降低滋养细胞内源性的 miRNA-126-3p 的表达, 在米非司酮诱导后的 miRNA-126-3p inhibitor 组, 菟丝子总黄酮的效果更加明显, 虽然 M-TSZ 组的 miRNA-126-3p 表达水平很高, 或许是因为菟丝子总黄酮只能在一定水平的条件下降低 miRNA-126-3p 的表达, 而造模组的内外源性 miRNA-126-3p 的表达升高太多, 即使菟丝子总黄酮能够降低造模组内源性 miRNA-126-3p 的表达, 也会由于外界加入的外源性 miRNA-126-3p 的表达太多, 无法很快被菟丝子总黄酮下调, 而在实验中被检测出来, 这就造成了 M-TSZ 组的 miRNA-126-3p 的表达升高过于明显的原因。

结合这几节内容可以得出, miRNA-126-3p 在自然流产患者的绒毛组织中上调, 在进一步的滋养细胞实验中, 同样验证了 miRNA-126-3p 的升高抑制了滋养细胞的迁移和侵袭功能, 从而影响了滋养细胞发挥正常的侵袭功能, 引发了自然流产, 因此可以说明, miRNA-126-3p 在自然流产的发生机制中起到重要的作用, 在基因层面上证明了,

自然流产的发生可能是由于该患者妊娠时候, 胎儿绒毛组织内 miRNA-126-3p 的异常上升而终止了继续妊娠。鉴于目前自然流产的发生机制尚未明确, miRNA-126-3p 的发现对于了解自然流产的病因查找具有重要作用, 在以后的临床运用上, 或许可以检测有流产史患者的再次妊娠中, 通过检测体内的 miRNA-126-3p 表达, 从而预测妊娠的结局, 并且进一步通过干预验证, 可能可以作为治疗自然流产的一种替代疗法。

在清楚了 miRNA-126-3p 在流产当中的意义后, 我们课题采用菟丝子总黄酮来干预, 以更好地了解菟丝子总黄酮的作用。菟丝子作为补肾安胎的首要药物, 其在临床上的作用已得到证实, 而其具体的药理机制却尚未非常明确。有研究表明, 菟丝子的提取物山奈酚可以抑制树突细胞的免疫功能, 减弱树突细胞的功能从而用来治疗慢性炎症反应或者自身免疫性疾病^[158]。菟丝子总黄酮作为菟丝子的主要活性成分的提取物, 其的药理作用对于了解菟丝子的药效有直接意义。我们课题组在前期基础上通过动物实验已经证明了菟丝子的主要提取物菟丝子总黄酮能提高肾虚-黄体抑制模型大鼠的 ER、PR 表达, 从而降低流产率, 提高大鼠妊娠率。而在本研究中, 采用细胞模型进一步验证菟丝子总黄酮的药理作用, 通过前面几个实验得出, 菟丝子总黄酮不具有细胞毒性, 能够明显促进正常滋养细胞和自然流产状态细胞模型滋养细胞的迁移和侵袭功能, 在补充前期在体实验研究的基础上, 利用离体细胞模型进一步研究菟丝子总黄酮的药效, 且得到证明菟丝子总黄酮确实能够提高自然流产细胞模型的迁移和侵袭功能, 从而促进滋养细胞发挥到正常的侵袭功能而有利于着床, 以维持进一步的妊娠, 而起到安胎的作用。同时还发现, 菟丝子总黄酮能够降低自然流产状态细胞模型滋养细胞的 miRNA-126-3p 的表达, 结合 miRNA-126-3p 在自然流产发生机制中的重要性, 菟丝子总黄酮下调滋养细胞 miRNA-126-3p 内的表达, 正好从基因层面上验证解释了菟丝子总黄酮对滋养细胞的促进保护作用, 为了解菟丝子总黄酮的细胞药理机制提供了理论依据。结合菟丝子的临床作用, 或许可以说明, 菟丝子总黄酮通过下调自然流产绒毛内 miRNA-126-3p 的表达, 促进滋养细胞的迁移和侵袭功能, 有利于细胞着床, 从而维持进一步的妊娠, 发挥菟丝子的补肾安胎, 并预防流产的作用, 也弥补了菟丝子的具体药理药效机制。在以后的临床使用上, 可以通过检测自然流产患者的病因内是否有 miRNA-126-3p 的表达异常, 从而采用菟丝子的针对性治疗, 以更好地为下一次妊娠做好治疗铺垫作用。同时, 从菟丝子总黄酮对于滋养细胞的最好量效和时效作用, 可以明确菟丝子总黄酮的有效含量, 为临床上使用菟丝子总黄酮有效治疗作用提供了理论依据, 可以参照这个剂量, 以发挥菟丝子总黄酮的最大药效浓度。

总体来说, 菟丝子总黄酮是可以一定程度降低自然流产状态滋养细胞模型组的内源性 miRNA-126-3p 表达水平, 增加其迁移和侵袭功能, 起到补肾安胎的临床药效。这其中的机制是因为菟丝子总黄酮能够通过调控滋养细胞的 miRNA-126-3p 的表达, 但菟丝子总黄酮是否只是单独调控 miRNA-126-3p 从而来促进滋养细胞的迁移和侵袭呢? 结合第二节内容, 在过表达 miRNA-126-3p 后滋养细胞的迁移能力降低, 而干扰

miRNA-126-3p 后迁移能力增加，我们猜想是因为激活了 miRNA-126-3p 下游的靶基因而引发这一现象，那么菟丝子总黄酮在调控 miRNA-126-3p 的过程，是否也参与了激活下游靶基因的过程呢？为了更加具体研究菟丝子总黄酮是否存在这样的作用机制，在下一节中，我们通过检测转染后不同靶基因的 mRNA 水平和蛋白表达，确定一个可能的靶基因，探讨菟丝子总黄酮对该靶基因的影响。

五、小结

米非司酮可以抑制滋养细胞的迁移功能并上调其 miRNA-126-3p 的表达，通过用米非司酮干预过表达 miRNA-126-3p 的滋养细胞构建自然流产状态滋养细胞模型，且米非司酮能促使模型组细胞内源性和外源性的 miRNA-126-3p 表达上调，更好的模拟临床上发生的自然流产疾病。进一步用菟丝子总黄酮治疗后，自然流产状态滋养细胞模型组的迁移和侵袭能力增加，且一定程度降低其内源性 miRNA-126-3p 的表达。菟丝子总黄酮是通过调控滋养细胞的 miRNA-126-3p 表达体现出其促进滋养细胞的迁移和侵袭能力，起到补肾安胎的药效。

第五节 菟丝子总黄酮对米非司酮所致 EVT 细胞内自然流产状态细胞模型的迁移和侵袭功能的内在机制研究

通过前述实验结果可知道 miRNA-126-3p 在自然流产中起到抑制滋养细胞迁移和侵袭的功能的作用，通过转染 miRNA-126-3p 和米非司酮进一步干预滋养细胞后，可以造成滋养细胞的内源性和外源性 miRNA-126-3p 升高，形成自然流产状态的滋养细胞模型，经菟丝子总黄酮干预后，miRNA-126-3p 的基因表达降低，同时滋养细胞的迁移和侵袭能力得到提升，这一系列的过程，菟丝子总黄酮是通过调控 miRNA-126-3p 来促进滋养细胞的迁移和侵袭功能，但是通过怎样的方式来完成这一调控呢，如何进一步通过调控 miRNA-126-3p 下游的靶基因来促进此功能，本节的研究将进一步寻找 miRNA-126-3p 的靶基因，且继续研究菟丝子总黄酮是否通过 miRNA-126-3p 来调控该靶基因发挥功能而促进滋养细胞的迁移和侵袭功能，以更好的深入挖掘菟丝子总黄酮对滋养细胞的内在机制作用和菟丝子总黄酮的药效机制研究。

一、实验目的

通过数据库挖掘 miRNA-126-3p 的靶基因，进行 RT-qPCR 和 WB 的验证，再将菟丝子总黄酮进行干预滋养细胞，探究菟丝子总黄酮是否调控靶基因来影响滋养细胞的迁移和侵袭功能。

二、实验材料与方法

（一）实验材料与仪器

1. 实验试剂

配胶试剂盒：碧云天生物科技有限公司

RIPA 裂解液：碧云天生物科技有限公司

蛋白酶抑制剂: 碧云天生物科技有限公司
 Tris Base: 广州瑞舒生物科技有限公司
 Glycine: 广州瑞舒生物科技有限公司
 SDS: 广州瑞舒生物科技有限公司
 5X 蛋白上样缓冲液: 碧云天生物科技有限公司
 Nacl: 广州化工试剂厂
 无水乙醇: 广州化工试剂厂
 吐温-20: 广州瑞舒生物科技有限公司
 脱脂奶粉: 广州瑞舒生物科技有限公司
 Wesrten 转膜液: 碧云天生物科技有限公司
 一抗稀释液: 碧云天生物科技有限公司
 BSA: 广州翔博生物科技有限公司
 一抗抗体: Tubulin β 碧云天生物科技有限公司 (1:2000);
 NAV1、PLXNB2: abcam 公司, GAPDH: abcam 公司
 PEX5: CST 公司
 二抗抗体: Anti-Rabbit/Mouse IgG(H+L) HRP Conjuate 美国 Promega 公司
 ECL 化学发光液: Bio-rad 公司
 NC 膜: millipore 公司
 双荧光素酶报告基因检测试剂盒: 碧云天生物科技有限公司

2. 实验试剂配置

Western Blottin 试剂配置

分离胶 (ml)	8%	10%	12%
蒸馏水	5.0	4.0	3.0
30%Acr-Bis (29:1)	4.0	5.0	6.0
1M Tris, Ph8.8	5.7	5.7	5.7
10%SDS	0.15	0.15	0.15
10%过硫酸铵	0.15	0.15	0.15
TEMED	0.009	0.006	0.006

浓缩胶 (ml)	5%
蒸馏水	4.1
30%Acr-Bis (29:1)	1.0
1M Tris, Ph6.8	0.75
10%SDS	0.06

10%过硫酸铵	0.06
TEMED	0.006

电泳缓冲液	1X	10X
Tris base	3.03g	30.3g
Glycine	14.4g	144g
SDS	1.0g	10g
蒸馏水	定容至 1000ml	定容至 1000ml

TBS	10X	1X TBST
Tris base	24.2g	10X 100ml+蒸馏水 900ml,
Nacl	80.0g	再加 1ml 吐温-20, 混匀
pH	调至 7.5	

3. 实验仪器及器材

离心机: Thermo 公司

全波长酶标仪: Thermo 公司

96 孔荧光定量 PCR 板: Bio-rad 公司

PCR Plate Sealer: Bio-rad 公司

六孔板: Coster 公司

低温离心机: Thermo 公司

蛋白电泳、电转仪: Bio-rad 公司

凝胶成像仪: Bio-rad 公司

荧光倒置显微镜: Nikon 公司

(二) 实验方法

1. RT-qPCR 方法

(1) 细胞 RNA 的提取和浓度测定同第二节

(2) 逆转录合成 cDNA (mRNA 部分)

按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书, 配制 20 μ l 体系, 按照下面表格的反应体系, 加好反应液后, 瞬离, 在 BioWorld 的 PCR 仪中进行敷育, 65 $^{\circ}$ C, 5min。

表 17-1 mRNA 逆转录反应体系

Template RNA	Total RNA 2 μ g
Primer	Oligo (dT)18 primer 1 μ l
Water, nuclease-free	To 12 μ l
Total volume	12 μ l

加热完后, 按照下列表格配置 Mix 反应液, 每孔各加入 8 μ l 反应液, 瞬离, PCR 仪上反应, 反应条件为: 42 $^{\circ}$ C 60min, 70 $^{\circ}$ C 5min 后终止, -20 $^{\circ}$ C 保存。

表 17-2 mRNA 逆转录反应体系

试剂	每管用量
5X Reaction Buffer	4 μ l
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	1 μ l
10 mM dNTP Mix	2 μ l
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L)	1 μ l
Total volume	20 μ l

(3) 荧光定量 PCR 扩增 (mRNA 部分)

在 Bio-Rad 的 CFX96 检测仪进行实时定量反应。

① 引物由生工生物工程股份有限公司设计与合成。

表 18 mRNA-PCR 引物序列

Primer	sequences (5' -3')
β -actin	Forward: GCCGCCAGCTCACCAT
	Reverse: AATCCTTCTGACCCATGCC
VEGFA	Forward: AGAAGGAGGAGGGCAGAATC
	Reverse: GCATTCACATTTGTTGTGCTG
SDC2	Forward: GAGCAGAGCTGACATCTGATAAA
	Reverse: CAGAAGCGTAGTCATCGTCATC
GOLPH3	Forward: GAAAGTACAGGAAGCCGTTCT
	Reverse: GAGGCATGAGCCAGGTAAT
SLC7A5	Forward: GGAAGGGTGATGTGTCCAATC
	Reverse: TAATGCCAGCACAAATGTTCCC
PEX5	Forward: AACCAGAGTGAAGAAGCAGTAG
	Reverse: CAGCTGATGCCCAGTTATAG
ITGA6	Forward: GCGGAGCAAGCTATGAAATC
	Reverse: AAAGCAACCATTGCCATTG
NAV1	Forward: AAATGGGCGCAAGACTAGCTT
	Reverse: ACTGGATGTTAGAACGGGCTC
SMURF2	Forward: TATGCAAACCTCGGGCAAATG
	Reverse: CCTGTGCCTATTCGGTCTCTG
PLXNB2	Forward: AGCCTCTTCAAGGCATCTG
	Reverse: GCCACGAAAGACTTCTCCCC
PPP3CB	Forward: CCCC AACACATCGCTTGACAT
	Reverse: GGCAGCACCCCTCATTGATAATTC
CRK	Forward: CATCTTGAGAATCCGGGACAA
	Reverse: GACGTAAGGGACTGGAATCATC
PIK3R2	Forward: gCAAgATCCAgggCgAgTACA
	Reverse: TgAggTCCACAACggAgCAg

② 采用 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应。以 β -actin 为内参, 参照说明书, 按照以下表格配置反应液:

表 19 荧光定量 PCR 反应体系

试剂	每孔用量
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), no ROX*	5 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
Total volume	5 μ l

将逆转录好的 cDNA 加入 180 μ l nuclease-free Water 稀释 10 倍, 先加入 5 μ l Mix 反应液至 96 孔板, 再加入 5 μ l 稀释好的 cDNA, 贴膜, 离心 1min, PCR 仪反应, 反应条件如下:

stage 1: 预变性

95.0 $^{\circ}$ C, 10min Reps: 1

Stage 2: PCR 反应

95.0 $^{\circ}$ C, 10s

60.0 $^{\circ}$ C, 34s

Reps: 40

Stage 3: 95.0 $^{\circ}$ C, 15s Reps: 1

Stage 4: 溶解曲线

65.0 $^{\circ}$ C, 6s

95.0 $^{\circ}$ C, 0.5 $^{\circ}$ C

2. Western Blotting 方法

(1) 细胞总蛋白提取

细胞诱导结束后, 吸去培养基, 加入 2ml 预冷的 PBS 液洗 3 次, 再加入 100 μ l 含 RIPA 细胞裂解液, 轻轻用刮匙将细胞全部刮下, 收集至 1.5ml 的 EP 管内, 冰上裂解 30min, 每 10min 涡旋震荡混匀一次, 充分裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C, 12000g, 离心 15min, 收集上清, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

(2) BCA 蛋白定量

① 蛋白标准曲线制作: 从室温中取出 2mg/ml BSA 储备液, 用超纯水梯度稀释成以下各种浓度: A. 2.0mg/ml; B. 1.0mg/ml; C. 0.5mg/ml; D. 0.25mg/ml; E. 0.125 mg/ml; F: 0.0625mg/ml。(从前一个浓度分别取 100 μ l, 至下一个浓度)

② 按照 50: 1 的比例将 BCA 蛋白定量试剂盒中的 A+B 液混合。

③ 取一个干净的 96 孔普通酶标板。每孔先加入 20 μ l 超纯水, 再取配制好的 BSA 蛋白标准液, 每孔加 5 μ l, 最后加 A+B 混合液 200 μ l, 每个样本设置两个复孔以减少误差, 空白组以加入 5 μ l 超纯水作为对比。

④ 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 酶标仪 562nm 处测定各孔的 OD 值。

⑤ 每组求平均值, 减去空白组的 OD 值, 在 Excel 上计算得出蛋白定量标准曲线回归方程。

⑥ 检测样品蛋白含量

在 96 孔普通酶标板，每孔加入 20ul 超纯水，再加入 5ul 蛋白样品和 A+B 混合液 200ul，充分混匀，37℃ 孵育 30min，酶标仪 562nm 处测定各孔的 OD 值。根据标准曲线计算所需样品的浓度。

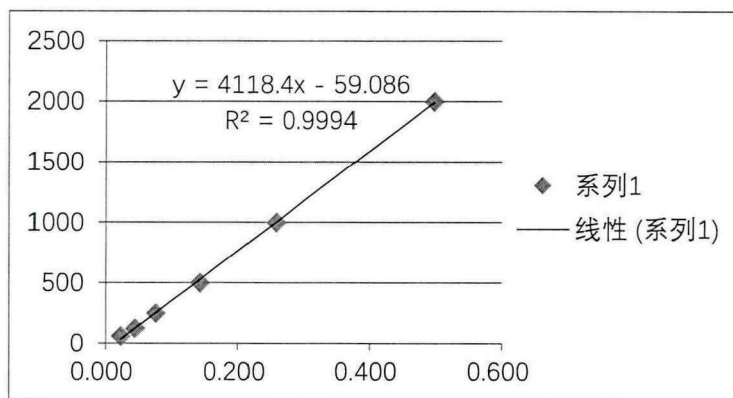


Figure 23 BCA 蛋白标准曲线, $R^2=0.9994$.

(3) Western blotting 步骤

① 样品前处理: 用定量好的等量蛋白样品, 加入 $5\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 用 PBS 调至相同上样体积, 混匀, 100℃ 变性 10min, 瞬离后 -20℃ 冰箱保存备用或进行下一步操作。

② 制胶

分别将两块 1.5mm 厚板和薄板的玻璃板对齐后固定在灌胶支架上, 垂直卡紧。(可以在厚板两边涮点水, 将薄板在厚板中间开始往下推至底部)。按照碧云天配胶试剂说明书, 根据目的蛋白大小选择配置 8%, 10%, 12% 分离胶。充分混匀, 用 1ml 移液枪迅速将胶灌入玻璃平板夹层中, 上端加入超纯水, 目的是使胶液面平齐, 大约 40min 左右胶可凝固。配置 5% 浓缩胶, 充分混匀后, 倾去凝胶顶层水, 用吸水纸吸干玻璃板外侧水。用 200ul 移液枪迅速灌胶, 直至夹层的顶部, 根据需要插入 15 孔的梳子, 室温使胶凝固。

③ 电泳

待胶凝固后, 转入电泳槽, 灌入电泳缓冲液, 小心拔去梳子, 用 200ul 移液枪轻轻冲洗上样孔后, 即可上样, 用 20ul 的移液枪缓慢将蛋白样品加入至上样孔内, 其中 3ul marker 在目的蛋白左侧, 2ul $5\times$ loading buffer 加在所有样品外侧。上样结束后, 槽内灌满电泳液。连接电源, 先在 70V 电泳 30min, 再将电压调至 120V 继续电泳 1h。关闭电源, 回收电泳缓冲液, 取出上槽。

④ 转膜

取出凝胶, 撬起玻璃薄板, 进行转膜, 将 NC 膜先浸泡在盛有少量转移缓冲液的容器中, 4 张滤纸和 4 张海棉垫浸泡在浅托盘内备用。按照 NC 膜大小切胶, 将切好的胶和膜继续放在容器内。按顺序放置转换装置, 先铺一张海绵垫片, 再放置一张滤纸,

挤出气泡。凝胶平放在滤纸上，再将 NC 膜平行放在凝胶上方，注意排除气泡，最后再放置一层滤纸和一张海绵垫，卡好并装好转换装置，连接电源，根据目的蛋白大小，在 220mA 转移 1h。

⑤ 封闭与孵育

把 NC 膜放入 5%脱脂牛奶溶液的容器内，平板摇床上缓慢室温封闭 1h。用 1×TBST 洗荡一次，按照目的蛋白大小，切膜，将切好的膜，放在对应的含有一抗的 15ml 离心管内，旋转摇床内，4℃孵育过夜。用 1×TBST 漂洗滤膜 3 次(中间换液)，每次 10min。倾去 TBST，加入 30ml 二抗，室温平板摇床缓慢温育 1h。最后再用 1×TBST 漂洗 3 次，每次 10min。

⑥ 显色

把漂洗好的 NC 膜转移至一浅托盘上，加入按照 1:1 的试剂 A 和试剂 B 的显色液，室温反应 1~2min，在 Bio-rad 凝胶成像仪系统成像。

3、双荧光素酶报告基因

(1) 载体构建：由广州迎欣生物技术有限公司构建。

(2) 双荧光素酶报告基因具体实验步骤

① 在 37℃，5%的 CO₂ 的细胞培养箱中常规培养 293T 细胞。

② 取对数生长期的 293T 细胞，以 1.5×10^6 的密度接种于 96 孔板内，每孔 100 μ L，培养箱中继续培养 24h。

③ 取 1.5mlEP 管①(稀释 miRNA)：加入 10 μ L 不含血清的 Opti-MEM®培养基，稀释 miRNA mimics 或 Non-target Control，轻轻混匀，室温孵育 5min。取 1.5mlEP 管②(稀释 载体)：加入 15 μ L 不含血清的 Opti-MEM®培养基稀释靶基因 3' UTR 双荧光报告基因载体或突变载体，轻轻混匀，室温孵育 5min。取 1.5mlEP 管③(稀释 lipo2000)：加入 25 μ L 不含血清的 Opti-MEM®培养基，再加入 0.25 μ L lipo2000，轻轻混匀，室温孵育 5min。三管轻轻混匀，共 50 μ L，室温孵育 20min。

④ 每孔吸走 50uL 培养基，后再加入上述 50uL 混合液，保持最终每孔 100 μ L 总体积。其中 miRNA mimics 转染浓度均为 50nM，质粒浓度为 100ng/孔。培养 6h，再加入 100 μ L 新鲜培养基继续培养。每组设 3 个复孔。

⑤ 裂解细胞：按照说明书将双荧光素酶报告基因充分混匀后，每孔加入 100 μ L 裂解液充分裂解细胞。

⑥ 样品测定：取样品 20-100 μ L 进行样品测定。

⑦ 以报告基因细胞裂解液作为空白对照组。每孔加入 100 μ L 萤火虫萤光素酶检测试剂，混匀后再进行测定 RLU(relative light unit)。

⑧ 再加入 100 μ L 海肾萤光素酶检测工作液，轻轻用枪进行混匀后测定 RLU(relative light unit)。

⑨ 实验重复两次。

三、实验结果

(一) 候选靶基因 (数据库资料, GO 分析)

利用生物信息学中 miRanda, miRDB, TargetScan, CLIP 四个数据库预测 miRNA-126-3p 的靶基因, 采用 GO 富集分析和 KEGG 通路分析预测 miRNA-126-3p 的靶基因可能参与的细胞功能作用和参与的信号通路 (Fig. 24)。结果显示: 数据库预测出来的 miRNA-126-3p 的靶基因有 839 个, 将靶基因在 GO 富集分析其对细胞功能的影响, 挑选关于细胞迁移和侵袭功能的靶基因有 10 个, 主要包括 VEGFA, SDC2, GOLPH3, SLC7A5, PEX5, ITGA6, NAV1, SMURF2, PLXNB2, PPP3CB, 关于细胞血管生成功能的有 CRK, PIK3R2 靶基因。

利用 KEGG 通路和 metascape 网站预测 miRNA-126-3p 的靶基因可能涉及的信号通路, 发现参与到 Insulin signaling pathway, cGMP-PKG signaling pathway, AMPK signaling pathway, FoxO signaling pathway, Phospholipase D signaling pathway, Axon guidance 等信号通路当中。(Fig. 25-26)

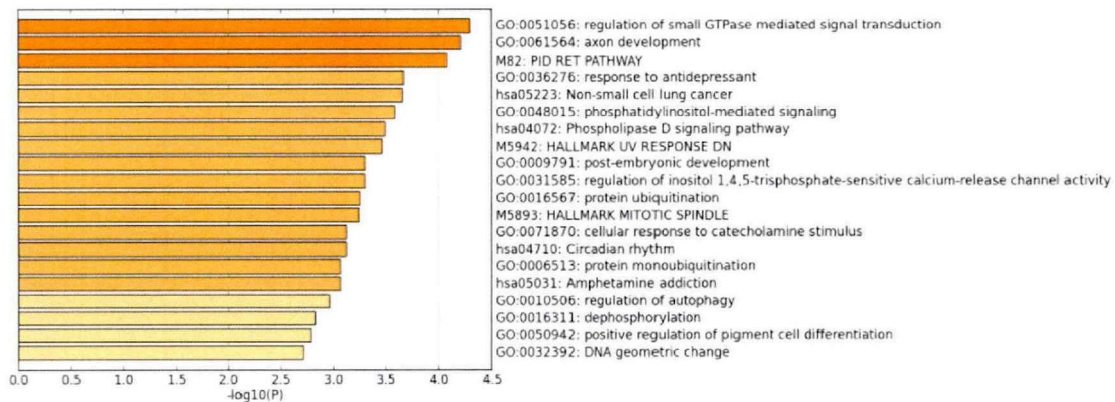


Figure 24 miRNA-126-3p 的候选靶基因参与的相关功能

注: 该图引用 metascape 网站

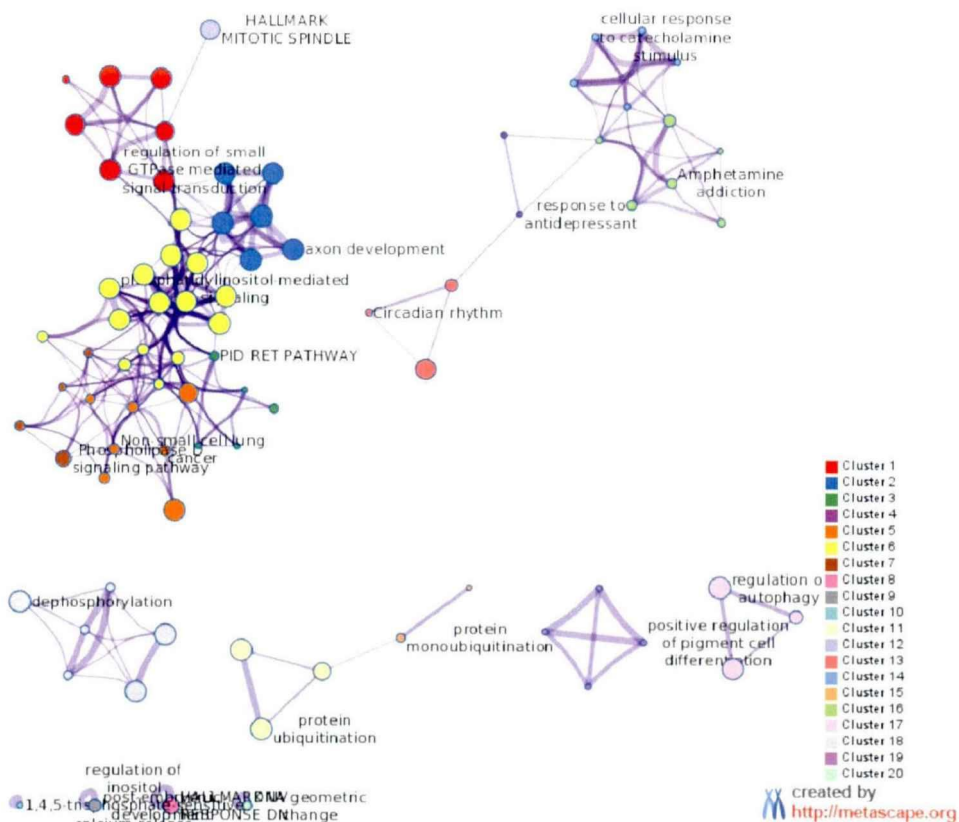


Figure 25 候选靶基因可能参与的信号通路 1

注：该图引用 metascape 网站

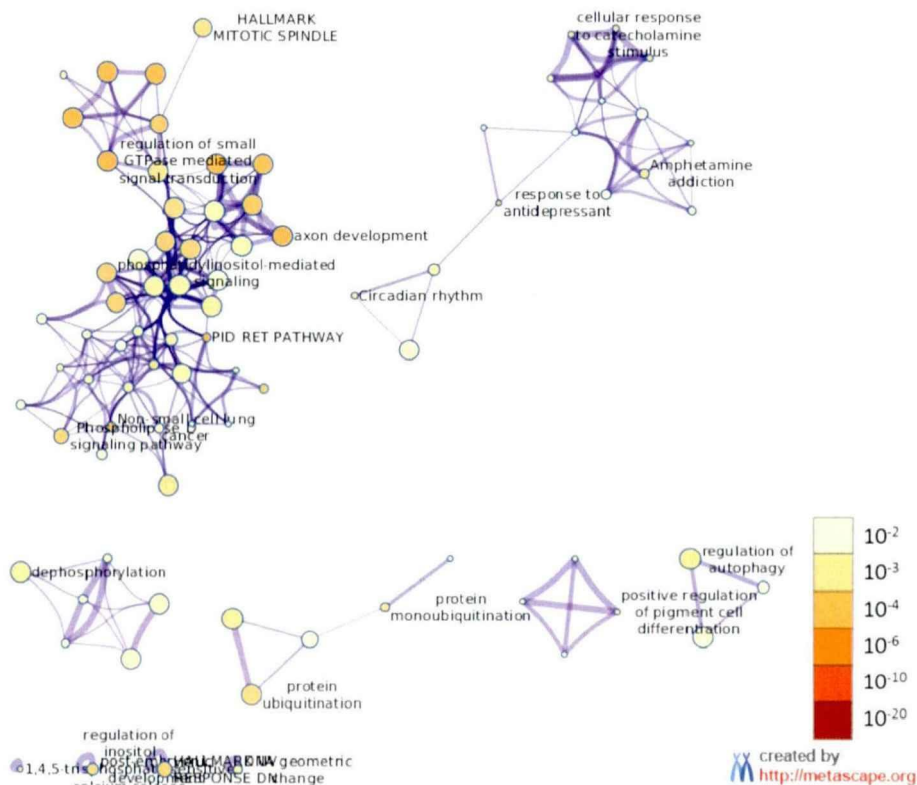


Figure 26 候选靶基因可能参与的信号通路 2

注：该图引用 metascape 网站

(二) 候选靶基因的验证

为了进一步筛选 miRNA-126-3p 最有可能调控的靶基因，我们将所筛选出的 12 个靶基因利用 RT-qPCR 和 WB 方法进行进一步验证，结合 miRNA-126-3p 表达上调，则其靶基因应下调的原则，筛选靶基因表达条件为相对于正常滋养细胞，转染后细胞 miRNA-126-3p mimic 组表达下调，而 miRNA-126-3p inhibitor 组表达上调(Fig. 27)。

1、NAV1, PLXNB2, PEX5 的 mRNA 表达差异

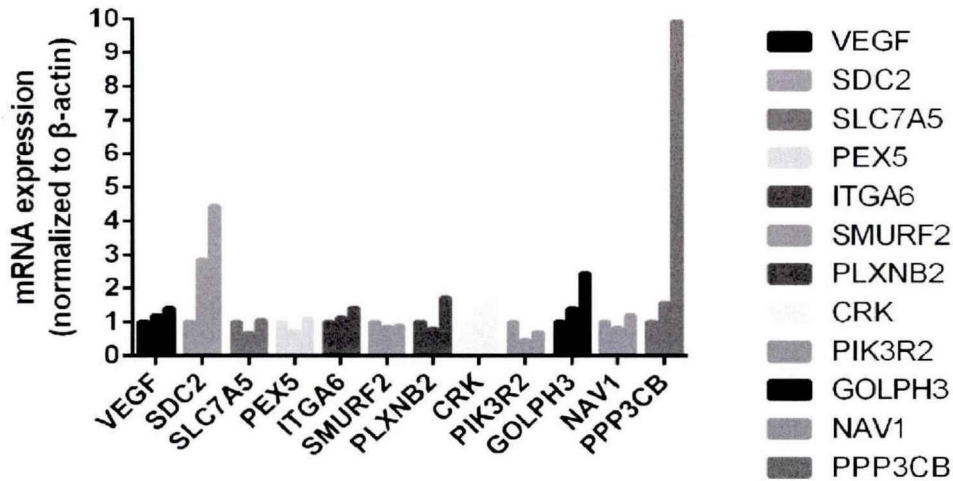


Figure 27 靶基因 mRNA 表达水平差异

由上图可以得出, SLC7A5, NAV1, PLXNB2, PEX5 四个靶基因符合 miRNA-126-3p mimic 组表达下调，而 miRNA-126-3p inhibitor 组表达上调，由于 SLC7A5 已有文献报导，本研究不再对此基因进行进一步研究，因此我们选择 NAV1, PLXNB2, PEX5 表达差异的靶基因进一步验证蛋白水平的表达。

2、NAV1, PLXNB2, PEX5 的 WB 蛋白水平结果

在前期转染的基础上，将 miRNA-126-3p 转染至滋养细胞 HTR-8 细胞，48h 后收集细胞蛋白检测靶基因的相对蛋白表达量，结果如下 (表 20, Fig. 28):

表 20 靶基因的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	PLXNB2 ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	PEX5 ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
M	3	0.65 ± 0.05	0.007**	0.75 ± 0.05	0.026*
MN	3	0.86 ± 0.08	/	0.93 ± 0.10	/
I	3	0.89 ± 0.04	0.003**	1.08 ± 0.07	0.001**
IN	3	0.83 ± 0.04	0.016	0.89 ± 0.04	0.077
TSZ	3	0.85 ± 0.13	0.008**	0.74 ± 0.13	0.890

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; TSZ: 菟丝子总黄酮。采用 ANOVA 方差分析方法检测。

对比 MN 组, * p < 0.05, ** p < 0.01; 对比 M 组, ** p < 0.01。

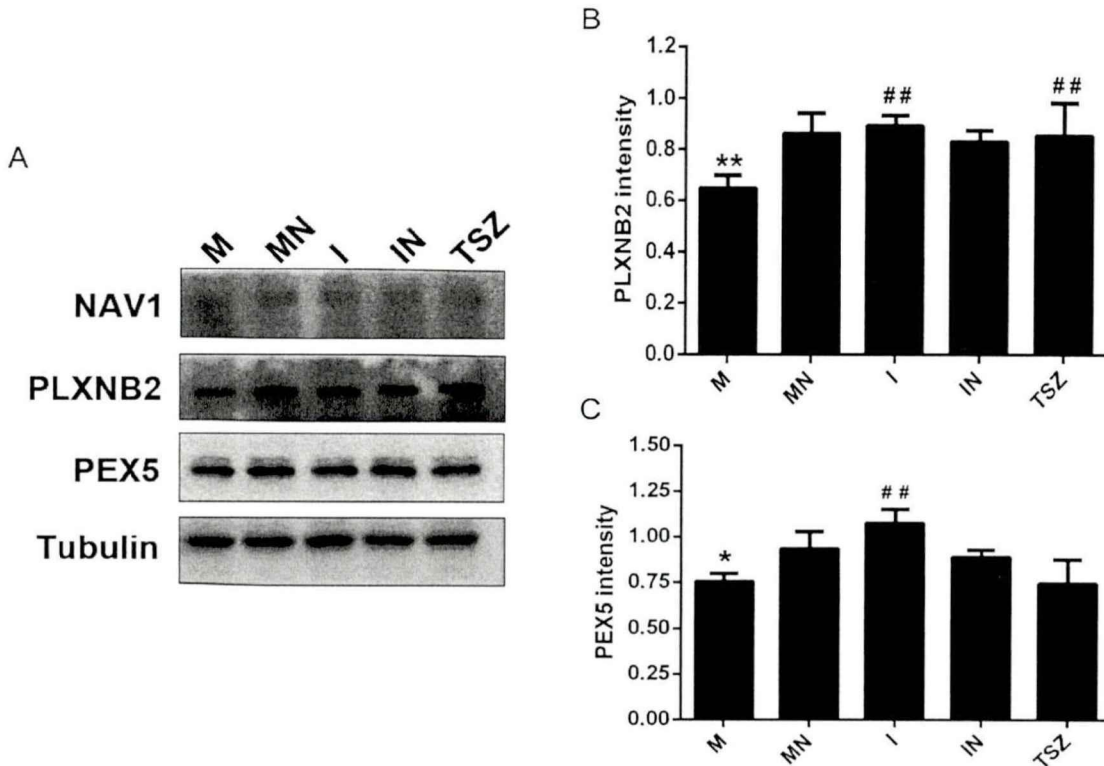


Figure 28 NAV1, PLXNB2, PEX5 的蛋白水平差异

注: M: mimic; MN: mimic negative; I: inhibitor; IN: inhibitor negative; TSZ: 菟丝子总黄酮。(A and B)以MN组相比, M组的PLXNB2蛋白水平明显下调;以M组相比, I组和TSZ组的PLXNB2蛋白水平明显上调,具有统计学差异。(A and C)以MN组相比, M组的PEX5蛋白水平明显下调;以M组相比, I组PEX5蛋白水平明显上调,具有统计学差异。对比MN组, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 对比M组, ## $p < 0.01$ 。

由上图发现,经过转染 miRNA-126-3p 48h后,同时在最后一个组加上 $5 \mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮干预 24h,结果发现,在 NAV1, PLXNB2, PEX5 三个蛋白中, NAV1 的蛋白水平无明显变化。(1)作用 48h后,靶基因 PLXNB2 (Fig 28A and B),对比 miRNA-126-3p mimic negative 组, mimic 组的 PLXNB2 蛋白水平明显下调,两组间有统计学差异 ($p < 0.01$);以 miRNA-126-3p mimic 为对照组, inhibitor 组和菟丝子总黄酮组的 PLXNB2 蛋白水平明显提高,具有统计学差异 ($p < 0.01$),其中菟丝子总黄酮组的 PLXNB2 升高水平与 inhibitor 组表达相当。因此可以说明,菟丝子总黄酮作用后能够增加滋养细胞内 PLXNB2 的蛋白表达水平。

(2)作用 48h后,靶基因 PEX5 (Fig 28A and C),对比 miRNA-126-3p mimic negative 组, mimic 组的 PEX5 蛋白水平明显下降,两组间有统计学差异 ($p < 0.05$);以 miRNA-126-3p mimic 为对照组, inhibitor 组 PEX5 蛋白水平明显提高,具有统计学

表 21 各组间相对荧光值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	相对荧光值 ($\bar{x} \pm s$)	P
PLXNB2-WT+ NC	3	1.00 ± 0.02	/
PLXNB2-WT+mimic	3	0.77 ± 0.03	0.000***
PLXNB2-Mut+ NC	3	1.00 ± 0.01	0.872
PLXNB2-Mut+mimic	3	0.94 ± 0.03	0.029*

注：采用 ANOVA 方差分析方法检测。

相对比野生型 PLXNB2-WT+ NC 组，PLXNB2-WT+mimic 组的荧光素蛋白的表达水平降低，两组具有显著性统计学差异，*** $p < 0.001$ 。

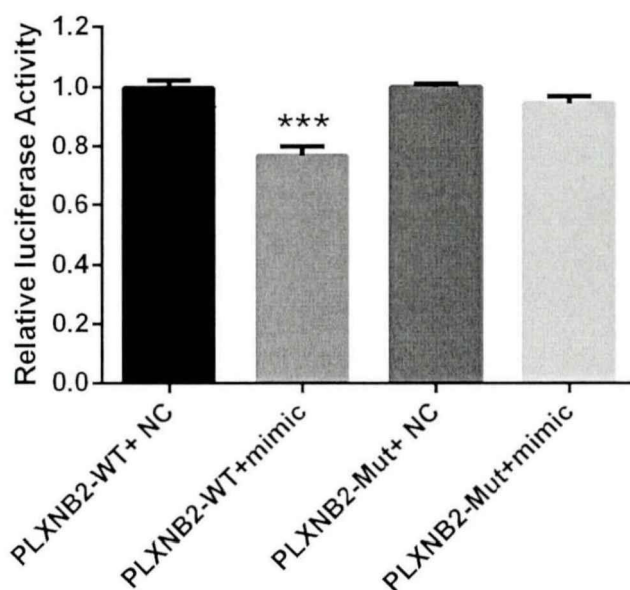


Figure 30 双荧光素酶报告基因结果

注：相对比野生型 PLXNB2-WT+ Non-target Control 组，PLXNB2-WT+mimic 组的荧光素蛋白的表达水平降低，两组具有显著性统计学差异，*** $p < 0.001$ 。

综合以上 RT-qPCR、WB 和双荧光素酶报告基因的结果说明，PLXNB2 是 miRNA-126-3p 的靶基因，miRNA-126-3p 通过影响其下游 PLXNB2 的功能从而发挥其抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能，进而造成自然流产的发生。菟丝子总黄酮通过上调 PLXNB2 的蛋白水平促进滋养细胞的迁移和侵袭功能，从而起到补肾安胎的药效机制。

(四) 绒毛组织 PLXNB2 的蛋白表达差异

从第二节中验证 miRNA-126-3p 的表达差异的绒毛组织随机各挑选出 3 个自然流产患者和正常早孕者的绒毛组织，进行全蛋白提取，并进行 WB 检测组织内靶基因 PLXNB2 和内参的蛋白表达水平，结果发现，相对比正常早孕者绒毛组织中 PLXNB2 蛋白表达水平，在 3 个自然流产患者的绒毛组织中 PLXNB2 的蛋白表达水平显著下调，分别以 SA1 组织蛋白水平为对照组，正常早孕 N 组的 3 个组织蛋白水平升高，相比具有统计学差异 ($p < 0.01$)；以 SA2 组为对照组，正常早孕组 N2 和 N3 组织蛋白水平升高，具

有统计学差异 ($p < 0.001$); 以 SA3 组为对照组, 正常早孕组 N2 组织蛋白水平升高, 具有统计学差异 ($p < 0.001$)。结果可以证明, 自然流产组织中 PLXNB2 蛋白水平相比正常早孕组织水平表达下降, 这正好也与前面实验结果中, 组织中 miRNA-126-3p 表达水平上调, 而转染 miRNA-126-3p mimic 后, PLXNB2 蛋白水平下调, 具有一致性, 再次证明了 PLXNB2 是 miRNA-126-3p 调控作用的靶基因。

表 22 各组间 PLXNB2 蛋白的表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	Protein($\bar{x} \pm s$)	P ₁	P ₂	P ₃
SA1	3	0.27±0.02	/		
SA2	3	0.41±0.03		/	
SA3	3	0.63±0.05			/
N1	3	0.41±0.04	0.006**	0.956	0.000
N2	3	1.13±0.09	0.000***	0.000***	0.000***
N3	3	0.58±0.04	0.000***	0.001***	0.279

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测。

对比 SA1 组, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; 对比 SA2 组, **** $p < 0.001$; 对比 SA3 组, *** $p < 0.001$ 。

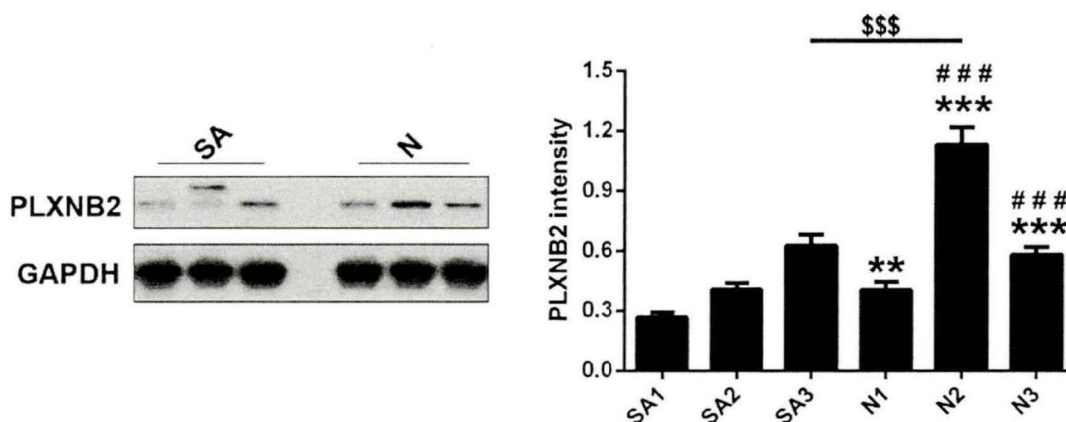


Figure 31 自然流产患者和正常早孕者的绒毛组织的 PLXNB2 蛋白水平表达差异

注: 自然流产组织中 PLXNB2 蛋白水平相比正常早孕组织水平表达下降。对比 SA1 组, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; 对比 SA2 组, **** $p < 0.001$; 对比 SA3 组, *** $p < 0.001$ 。

四、讨论

随着 miRNA 被发现地越来越多, 生物信息学也随着兴起。生物信息学能用来分析癌症里早期诊断和治疗时 miRNA 的作用^[159], 是目前用来探索 miRNA 与靶基因预测常用的方法, 常用来分析 miRNA 靶基因的数据库有 miRBase、TargetScan、TarBase、miRanda, 或者 RNAhybrid, miRecords 等, 还可以通过 KEGG 和 Go 分析 miRNA 可能作用的信号通路及其可能行驶的生物学功能^[160-162]。同一个 miRNA, 不同的数据库预测结果不一样, 而且容易出现假阳性的结果, 就需要针对多个数据库的结果综合计算和筛选^[163, 164]。与此同时, 一个 miRNA 可以对应不同的 mRNA, 而一个 mRNA 也可以由不同的 miRNA 进行调控^[165], 因此, 在利用数据库预测出来的 mRNA, 需要进行进一步的检验和功能实

验。本研究中,利用在 CLIP 数据库预测的靶基因当中,再进一步的 GO 功能分析,筛选出关于细胞迁移和侵袭功能的靶基因进行滋养细胞上的表达和功能验证。在前面实验中,我们发现自然流产组织中 miRNA-126-3p 表达上调,而其靶基因在自然流产中组织表达则相应的下调。在实验中,进行滋养细胞转染,滋养细胞内过表达和抑制 miRNA-126-3p 的表达,在筛选靶基因时候,相对比正常的滋养细胞,miRNA-126-3p mimic 组的靶基因的 RNA 和蛋白表达水平应当下调,而 miRNA-126-3p inhibitor 组的靶基因的 RNA 和蛋白表达水平则上调。按照这个原则,通过 RT-qPCR 验证,从关于滋养细胞迁移和侵袭功能的靶基因 VEGFA, SDC2, GOLPH3, SLC7A5, PEX5, ITGA6, NAV1, SMURF2, PLXNB2, PPP3CB, CRK, PIK3R2 等 12 个靶基因,结果得出 NAV1, PLXNB2 和 PEX5 三个靶基因符合条件。进而通过 WB 验证滋养细胞内的蛋白表达水平,在滋养细胞转染 miRNA-126-3p 后, mimic 组的 PLXNB2 和 PEX5 的蛋白水平显著下调,而 inhibitor 组的蛋白水平显著上调,这正说明了,通过在滋养细胞内过表达后 miRNA-126-3p 后,下调了其下游的靶基因 PLXNB2 和 PEX5 的蛋白表达,从而抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能引发自然流产的发生,反之,抑制滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达,激活其下游 PLXNB2 和 PEX5 的蛋白表达,从而促进滋养细胞的迁移和侵袭功能,维持继续妊娠。然而,与此同时,在菟丝子总黄酮作用滋养细胞 24h 后,检测滋养细胞内 PLXNB2 和 PEX5 的蛋白表达,结果发现菟丝子总黄酮作用只有在 PLXNB2 的蛋白水平上调,而 PEX5 蛋白表达未见明显变化。由前面实验结果,我们知道在菟丝子总黄酮作用滋养细胞后,可以通过下调自然流产状态滋养细胞内的 miRNA-126-3p 的表达,从而促进自然流产滋养细胞的迁移和侵袭功能,以改善自然流产的疾病状态。那么,菟丝子总黄酮发挥这一药效机制,是否在下调 miRNA-126-3p 的同时,上调 miRNA-126-3p 下游的靶基因,从而进一步发挥药理作用呢?在本实验中检测到菟丝子总黄酮组的 PLXNB2 的蛋白水平升高正好验证了这一结果,也说明了菟丝子总黄酮通过上调滋养细胞内 PLXNB2 的蛋白水平表达发挥其促进自然流产状态细胞模型的滋养细胞的迁移和侵袭功能,起到补肾安胎的作用。而 PLXNB2 是否为 miRNA-126-3p 的靶基因呢,我们进行了验证实验。

miRNA 的生物学功能往往是通过目的基因 mRNA 进行转录调节而实现^[166],常通过 3'-UTR 端与其靶基因 mRNA 相连接^[167],调控 mRNA,进而完成蛋白合成、蛋白翻译等功能。双荧光素酶报告基因正式利用此原理进行验证 miRNA 与靶基因的关系,也是检验这一靶关系的“金标准”。萤火虫单荧光素酶报告基因只能作为限定细胞内检测转录活动的一个受体,而双荧光素酶报告基因可以检测由启动子和转录子引发的一系列转录活动,用于检测 miRNA 对 mRNA 的调节和转录后调节的影响^[168]。目前对于 miRNA-126 的靶基因研究比较多,研究发现,双荧光素酶报告基因结果提示 miRNA-126 能抑制 VCAM-1 的荧光素蛋白活性,降低 20%以上,通过抑制 VCAM-1 的表达从而限制白细胞粘附至内皮细胞上,调节血管炎症反应^[169]。miRNA-126 参与至血管生成和代谢性疾病,

能通过调控 PIK3R2 和 SPRED1 基因参与至 PI3K 和 ERK 信号通路中,发挥血管生成功能,敲除 miRNA-126 后,MAPK 和 VEGF 及 FGF 信号通路受影响^[170],还能通过下调 Spred1、Plk2 和 Irs1 的表达,促进母体血管周围细胞的粘附、迁移和细胞间的相互作用^[171]。还有研究发现 miRNA-126 作用于造血干细胞,调控 CDK3 参与 Notch 和 Wnt 信号通路中引发白血病^[172, 173],同时 miRNA-126-3p 能通过抑制 SLC7A5 和 ADAM9 的表达抑制甲状腺癌细胞的生长与转移^[174]。然而,目前尚未有研究 miRNA-126-3p 与 PLXNB2 之间的靶关系。本实验通过双荧光素酶报告基因方法和组织蛋白验证的方法发现 PLXNB2 是 miRNA-126-3p 的靶基因,miRNA-126-3p 能抑制野生型 PLXNB2 的荧光素蛋白活性,而不影响突变型 PLXNB2 的荧光活性,并且自然流产患者绒毛组织内 PLXNB2 的蛋白表达水平下调,这就可以确定了 miRNA-126-3p 是可以调控 PLXNB2 这个 mRNA 行使其生物学功能,同时也验证了前面的 WB 实验结果中,过表达 miRNA-126-3p 后,PLXNB2 的蛋白表达下调,进而抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能;而且在加入菟丝子总黄酮后,miRNA-126-3p 表达下调,而 PLXNB2 蛋白水平表达上调,也正好说明了菟丝子总黄酮正是通过调控 miRNA-126-3p,进而激活下游 PLXNB2 的表达,促进自然流产状态细胞模型的滋养细胞的迁移和侵袭功能,起到补肾安胎,防治自然流产的细胞药效作用。

目前学术界研究结果发现 PLXNB2 在神经胶质瘤中表达升高,通过激活 MET 信号通路,促进恶性神经胶质瘤的侵袭生长,缩短患者生存率,同时利用 Sema4/Plexin-B 信号通路调控神经胶质细胞和内皮细胞的连接促进神经胶质瘤的血管外侵袭^[175]。在此之前,研究发现 PLXNB 家族与分散因子受体(scatter factor receptors)的相互作用促进肿瘤的生长和转移^[176],这就说明了 PLXNB2 具有促进肿瘤细胞侵袭的生物学功能。另外,有学者发现子宫内膜顶端和侧面范围有 PLXNB2 的表达存在^[177]。我们知道,滋养细胞是类肿瘤细胞,那么 PLXNB2 存在于绒毛组织中,是否能像促进肿瘤细胞那样促进滋养细胞的迁移和侵袭功能,从而发挥菟丝子总黄酮的药效作用预防自然流产呢,是我们需要进一步研究和探讨,且菟丝子总黄酮通过调控哪些信号通路上调 PLXNB2 表达发挥其促进滋养细胞迁移和侵袭功能,防治自然流产的内在机制需要在未来时间里进一步深入阐述。

五、小结

miRNA-126-3p 通过调控其靶基因 PLXNB2,抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能。菟丝子总黄酮能够通过下调自然流产状态细胞模型滋养细胞内 miRNA-126-3p 表达,进而激活下游 PLXNB2 的表达,从而促进自然流产状态细胞模型滋养细胞的迁移和侵袭功能,起到补肾安胎,防治流产的细胞药效机制,同时也为临床上更好地了解和使用菟丝子总黄酮提供了理论依据。

第六节 菟丝子总黄酮通过影响滋养细胞内 MMP9 调控其迁移和侵袭功能

滋养细胞的侵袭过程需要依赖于金属蛋白酶 (MMPs) 对蜕膜细胞外基质的溶解和重建, MMPs 可能能够促进滋养细胞的侵袭^[178]。MMP9 是 MMPs 其中一个家族成员, MMP9 在妊娠过程中, 参与早期胚胎的着床和胎盘的植入时具有不可替代的作用^[179], 滋养细胞在体内分泌 MMP9, MMP9 的正常分泌对维持滋养细胞的正常侵袭功能有重要作用^[180], 另外有研究发现, MMP9 在早期妊娠中的缺乏, 降低滋养细胞的分化和侵袭功能, 引发大鼠胎盘的异常, 宫内生长抑制, 甚至是死胎^[181]。因此研究滋养细胞内 MMP9 的表达, 对了解滋养细胞的侵袭功能有直接的作用意义。前面研究发现菟丝子总黄酮能够促进滋养细胞的迁移和侵袭功能, 那么菟丝子总黄酮是否会同时作用滋养细胞内 MMP9 的蛋白表达呢? 本研究欲探讨菟丝子总黄酮对滋养细胞的 MMP9 的影响, 和其可能涉及的信号通路如 MAPK, AKT, Notch 信号通路等方面, 以更好阐明菟丝子总黄酮的药效作用机制。

一、实验目的

通过将不同浓度和不同时间点的菟丝子总黄酮干预滋养细胞后, 检测滋养细胞的 MMP9 的蛋白和基因表达, 同时检测菟丝子总黄酮可能调控的 MAPK, PI3K/AKT, Notch 等信号通路来发挥其促进滋养细胞的迁移和侵袭功能。

二、实验材料与方法

(一) 实验材料与仪器

1. 实验试剂

信号通路试剂盒: P-MAPK/MAPK Family Ab Sample Kit (9910S), 美国 CST 公司

Notch Isoform Ab Sample Kit (3640S), 美国 CST 公司

Phospho-Akt/AKT Pathway Antibody Sample Kit (9916S) 为美国 CST 公司

anti-Tubulin (AT819-1): 碧云天生物科技有限公司

MMP9 抗体: millipore 公司, Lot 1857970

余试剂同第五节

2. 实验器材

同第五节所述

(二) 实验方法

1、RT-qPCR 方法:

(1) 细胞 RNA 的提取和浓度测定同第二节

(2) 逆转录合成 cDNA (mRNA 部分)

具体操作同第四节

(3) 荧光定量 PCR 扩增

具体操作同第四节

本节使用引物序列如下:

表 23 mRNA-PCR 引物序列

Primer	sequences (5' -3')
β-actin	Forward: GCCGCCAGCTCACCAT
	Reverse: AATCCTTCTGACCCATGCCC
MMP9	Forward: GCTACGTGACCTATGACATCCT
	Reverse: TCCTCCAGAACAGAATACCACTT

2、Western blotting 方法:

(1) 细胞总蛋白提取

① 提前一天将细胞种至六孔板, 对照组加入含 0.1%DMSO 的 10%FBS 的 1640 培养基药液, 实验组分别加入含 0.5 μg/ml、1 μg/ml 和 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮的 10%FBS 的 1640 培养基药液, 分别作用 12h 提取细胞蛋白;

② 在进行时效部分时候, 提前一天将细胞种至六孔板, 对照组加入含 0.1%DMSO 的 10%FBS 的 1640 培养基药液, 实验组分别加入含 1 μg/ml 的菟丝子总黄酮的 10%FBS 的 1640 培养基药液, 分别作用 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 收集细胞, 提取细胞总蛋白;

③ 具体提取办法同第五节

(2) BCA 蛋白定量, 同第五节

(3) WB 方法步骤: 同第五节

三、实验结果

(一) 菟丝子总黄酮增加滋养细胞内 MMP9 的表达

采用 RT-qPCR 和 western blotting 检测菟丝子总黄酮作用于 EVT 细胞内 MMP9 的基因和蛋白表达。加药作用 12 后检测滋养细胞内 MMP9 的表达, 结果发现, MMP9 蛋白表达水平显著升高, 相对于 DMSO 组, 其中 1 μg/ml 和 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮组 MMP9 蛋白表达上调具有显著性差异 (p<0.05) (表 24; Fig. 32A)。同样加药作用 12h 后, 相对比 DMSO 组, mRNA 水平升高, 各浓度的菟丝子总黄酮组 MMP9 的基因水平显著升高, 具有统计学差异 (p<0.05), 呈时间和剂量依赖性 (表 24; Fig. 32C)。

进一步验证菟丝子总黄酮作用滋养细胞不同时间段内 MMP9 蛋白表达差异, 实验采用 1 μg/ml 浓度 (中间浓度) 的菟丝子总黄酮作用于 EVT 细胞 1h, 2h, 4h, 8h 后, 发现不同时间点的菟丝子总黄酮组对比 DMSO 组, 菟丝子总黄酮在作用 8h 和 12h 时候 HTR-8 细胞内的 MMP9 mRNA 和蛋白表达升高最明显, 具有统计学差异 (p<0.05) (表 25; Fig. 32B)。因此说明菟丝子总黄酮能够显著增加滋养细胞内的 MMP9 的 mRNA 和蛋白水平。

表 24 各组间滋养细胞内 MMP9 的 mRNA 和蛋白水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	mRNA ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	Protein ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00±0.00	/	1.00±0.00	/
0.5 μg/ml	3	1.38±0.16	0.020*	1.44±0.30	0.086
1 μg/ml	3	1.97±0.16	0.000***	1.52±0.21	0.047*
5 μg/ml	3	2.76±0.34	0.000***	1.77±0.55	0.006**

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

表 25 不同时间点菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 MMP9 的蛋白水平表达差异
($\bar{x} \pm s$)

组别	N	mRNA ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	Protein ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	4	1.00±0.00	/	1.00±0.00	/
1H	4	1.00±0.12	0.974	1.20±0.33	0.376
2H	4	1.09±0.23	0.413	1.12±0.38	0.584
4H	4	1.09±0.10	0.390	1.22±0.30	0.340
8H	4	1.27±0.11	0.022*	1.54±0.39	0.023*
12H	4	1.37±0.21	0.003**	1.51±0.24	0.031*

注：采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组，* p<0.05，** p<0.01。

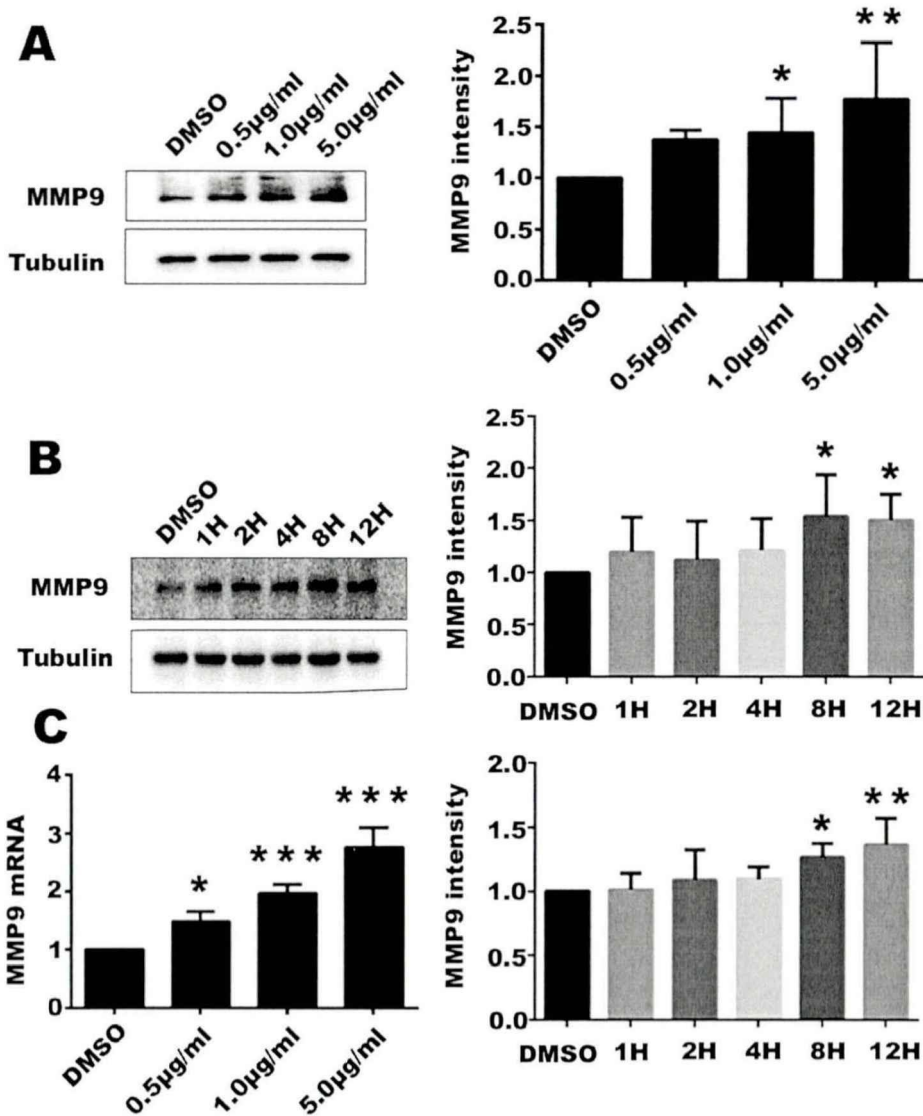


Figure 32 菟丝子总黄酮对 EVT 细胞内 MMP9 的表达水平影响

Figure 32 The effect of TFSC on MMP9 expression in EVT cells

注：(A)对比 DMSO 组，1 µg/ml 和 5 µg/ml 的菟丝子总黄酮组的 MMP9 蛋白表达显著上调，有统计学差异 (p<0.01)；(B) 1 µg/ml 的菟丝子总黄酮作用于 EVT 细胞不同的时间点，菟丝子总黄酮在作用 8h 和 12h 时 HTR-8 细胞内的 MMP9 表达升高最明显，具有统计学差异 (p<0.05)，以 Tubulin

为内参。(C)不同浓度的菟丝子总黄酮能够增加滋养细胞内 MMP9 的 mRNA 表达水平,对比 DMSO 组,菟丝子总黄酮随着浓度增加, MMP9 的 mRNA 水平也随着上调,菟丝子总黄酮在作用 8h 和 12h 时, MMP9 的 mRNA 水平上调,呈剂量和时间依赖性。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

注: (A) MMP9 expression with $1\mu\text{g/ml}$ and $5\mu\text{g/ml}$ TFSC were significantly higher than with DMSO. (B) $1\mu\text{g/ml}$ TFSC increased MMP9 expression at certain time, especially in 8h and 12h compared with the control (DMSO) group, Tubulin was used as an internal reference. (C) Different arrange dosageconcentration of TFSC could all improve the mRNA level of MMP9 vs DMSO, β -actin as an internal reference. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

(二) 菟丝子总黄酮通过 MAPK/ATK/Notch 通路增加滋养细胞的侵袭能力

为了进一步研究菟丝子总黄酮对滋养细胞内 MMP9 水平促进其迁移和侵袭功能的内在机制, western blotting 实验通过 MAPK/ATK/Notch 3 个通路进行研究探讨。实验都采用 $0.5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ 和 $5\mu\text{g/ml}$ 作用于 EVT 细胞 12h 后对比 DMSO 组检测通路蛋白的变化, 以及不同时间点 (0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h) 检测不同通路上蛋白的变化水平。

1、MAPK 通路上蛋白的变化

实验结果发现 MAPK 通路的 p-ERK 水平升高, $1\mu\text{g/ml}$ 和 $5\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮作用后, EVT 细胞内 p-ERK 水平上调, 其中 $5\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮组对比与 DMSO 组, p-ERK 升高最明显 ($p<0.01$), 而 ERK 总蛋白水平不受影响 (表 26, Fig. 33A)。通过改变菟丝子总黄酮的作用时间, 发现 $1\mu\text{g/ml}$ 的菟丝子总黄酮作用于 EVT 细胞后, ERK 的磷酸化水平在 1h, 2h 和 8h 时上调最明显, 具有显著性差异 ($p<0.001$) (表 27, Fig. 33B)。

而对于 MAPK 通路的另一个蛋白, p-p38, 在菟丝子总黄酮作用 12h 后, 其在 $1\mu\text{g/ml}$ 和 $5\mu\text{g/ml}$ 组, p38 的磷酸化水平上调, 具有统计学差异 ($p<0.05$), 而 p38 总蛋白水平则无明显变化 (表 26, Fig. 33C)。但菟丝子总黄酮不同的作用时间点对 p-p38 表达无明显影响, 各组间无明显统计学差异 ($p>0.05$) (表 27, Fig. 33 D)。因此可以说明菟丝子总黄酮可能是通过影响 p-ERK 和 p-p38 的水平从而提高滋养细胞内 MMP9 的表达。

表 26 不同浓度的菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 MAPK 通路上蛋白水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	p-ERK ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	p-p38 ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00±0.00	/	1.00±0.00	/
0.5 $\mu\text{g/ml}$	3	1.17±0.20	0.287	1.44±0.32	0.064
1 $\mu\text{g/ml}$	3	1.41±0.25	0.021*	1.55±0.10	0.027*
5 $\mu\text{g/ml}$	3	1.59±0.30	0.002**	2.01±0.37	0.001**

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

表 27 不同时间点菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 MAPK 通路上蛋白水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-ERK ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	p-p38 ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00 ± 0.00	/	1.00 ± 0.00	/
1H	3	2.30 ± 0.31	0.000***	1.14 ± 0.12	0.109
2H	3	1.75 ± 0.14	0.000***	1.02 ± 0.11	0.775
4H	3	0.87 ± 0.06	0.396	1.10 ± 0.15	0.261
8H	3	1.77 ± 0.13	0.000***	1.05 ± 0.04	0.540
12H	3	1.12 ± 0.22	0.408	1.12 ± 0.09	0.157

注：采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组，*** p < 0.001。

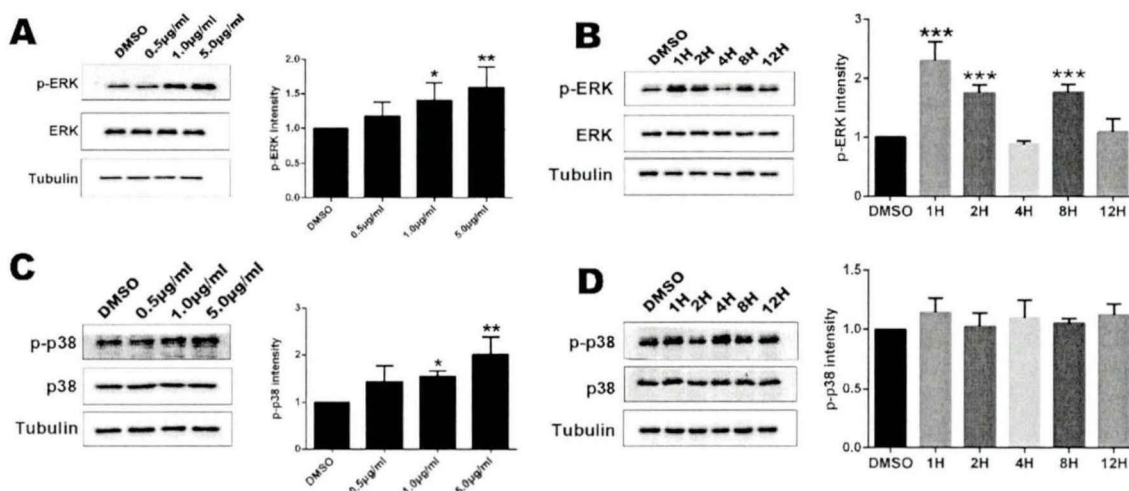


Figure 33 菟丝子总黄酮对 EVT 内 MAPK 通路蛋白的表达水平影响

注：(A and B) 1 μg/ml 和 5 μg/ml 菟丝子总黄酮增加 ERK 的磷酸化表达水平，而不影响 ERK 总蛋白的表达水平。1 μg/ml 菟丝子总黄酮作用不同时间点，p-ERK 的表达在 1h, 2h, 8h 升高最明显，具有统计学差异。(C and D) 1 μg/ml 和 5 μg/ml 菟丝子总黄酮增加 p38 的磷酸化表达水平，呈剂量依赖性，而不影响 p38 总蛋白的表达水平。1 μg/ml 菟丝子总黄酮作用不同时间点，不影响 p-p38 的表达变化。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001。

2、AKT 通路上蛋白的变化

继续研究菟丝子总黄酮作用于 EVT 细胞时，AKT 通路上蛋白的变化水平。结果发现，对比 DMSO 组，1 μg/ml 和 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮作用于滋养细胞 12h 后，p-AKT(308)的蛋白水平对比 DMSO 组有明显上调，具有统计学差异 (p < 0.01) (表 28, Fig. 34A)，而其 AKT 总蛋白表达水平未见明显变化。在 1 μg/ml 的菟丝子总黄酮不同的作用时间，p-AKT(308)在作用时间 1h 时上调最明显，对比 DMSO 组，两组间存在统计学差异 (p < 0.001) (表 29, Fig. 34B)。

另外，对比 DMSO 组，5 μg/ml 的菟丝子总黄酮作用于滋养细胞 12h 后，AKT(473)的磷酸化水平上调，两组间具有统计学差异 (p < 0.01)，而不影响其 AKT 总蛋白的变化 (表 28, Fig. 34C)。在用 1 μg/ml 的菟丝子总黄酮不同的作用时间，p-AKT(473) 与

p-AKT(308)一样在菟丝子总黄酮作用时间 1h 时上调最明显, 与 DMSO 组相比具有统计学差异 ($p < 0.05$) (表 29, Fig. 34D)。

表 28 不同浓度的菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 AKT 通路上蛋白水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	p-AKT473 ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	p-AKT308 ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00 ± 0.00	/	1.00 ± 0.00	/
0.5 μg/ml	3	1.16 ± 0.05	0.191	1.11 ± 0.07	0.070
1 μg/ml	3	1.14 ± 0.11	0.643	1.15 ± 0.05	0.022*
5 μg/ml	3	1.27 ± 0.01	0.004**	1.21 ± 0.09	0.004**

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

表 29 不同时间点菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 AKT 通路上蛋白水平表达差异 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	p-AKT473 ($\bar{x} \pm s$)	P ₁	p-AKT308 ($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00 ± 0.00	/	1.00 ± 0.00	/
1H	3	1.55 ± 0.23	0.018*	1.31 ± 0.10	0.000***
2H	3	1.21 ± 0.06	0.327	1.12 ± 0.11	0.069
4H	3	1.24 ± 0.27	0.259	0.97 ± 0.06	0.588
8H	3	1.22 ± 0.27	0.279	1.07 ± 0.02	0.262
12H	3	1.27 ± 0.40	0.199	0.94 ± 0.07	0.313

注: 采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

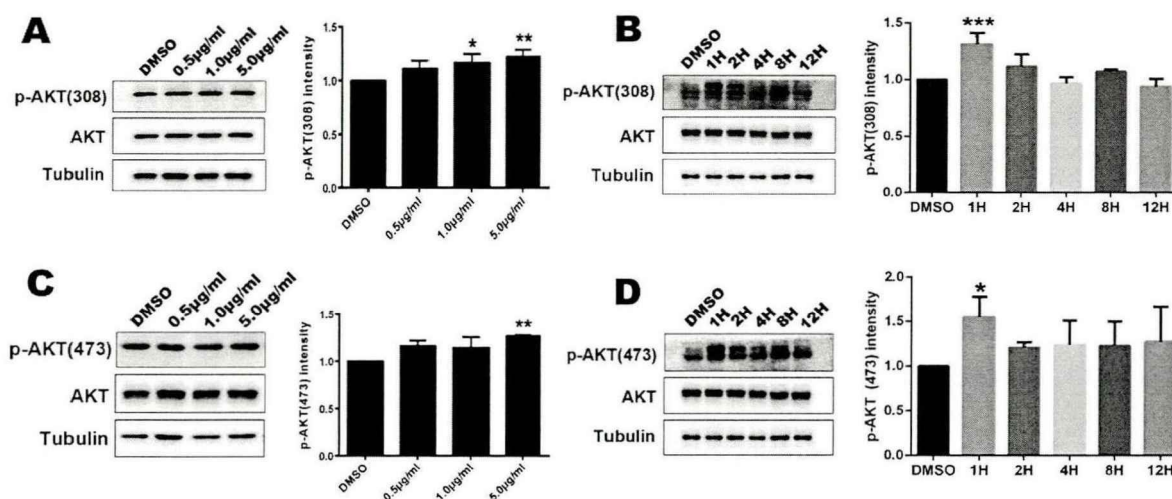


Figure34 菟丝子总黄酮对 EVT 内 AKT 通路蛋白的表达水平影响

注: (A and B)对比 DMSO 组, 1 μg/ml 和 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮作用于滋养细胞 12h 后, 能上调细胞内 p-AKT(308) 蛋白表达水平而不影响 AKT 总蛋白的表达。1 μg/ml 的菟丝子总黄酮不同的作用时间, p-AKT(308) 在 1h 时上调最明显。(C and D) 5 μg/ml 的菟丝子总黄酮作用于滋养细胞 12h 后, p-AKT(473) 蛋白水平上调, 其 AKT 总蛋白的变化不明显。1 μg/ml 的菟丝子总黄酮不同的作用时间, p-AKT(473) 也在 1h 时上调最明显。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

3、Notch 通路上蛋白的变化

Notch 通路在生殖当中起着重要的地位。Western Blotting 进一步实验发现，菟丝子总黄酮能够提高 EVT 细胞的 Notch 蛋白水平。同样是 0.5 μg/ml, 1 μg/ml 和 5 μg/ml 菟丝子总黄酮和 DMSO 作用于 EVT 细胞，与对照组相比，各个浓度的菟丝子总黄酮都能够显著上调滋养细胞的 Notch1 和 Notch2 的蛋白水平，差异具有统计学意义 (p<0.05) (表 30, Fig. 35 A and C)。

当 1 μg/ml 菟丝子总黄酮作用于滋养细胞不同的时间点，Notch2 的表达在 1h 和 8h 变化具有统计学差异，其中 8h 时候上调最显著，具有统计学差异 (p<0.01)。同时不同作用时间点的菟丝子总黄酮能部分影响 Notch1 的变化，但各组间没有统计学差异 (p>0.05) (表 31, Fig. 35, B and D)。

因此可以说明，菟丝子总黄酮能够通过 MAPK/ATK/Notch 信号通路的级联反应来一步步调控滋养细胞的 MMP9 的表达，从而促进滋养细胞的迁移和侵袭能力。

表 30 不同浓度的菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 Notch 通路上蛋白水平表达差异
($\bar{x} \pm s$)

组别	N	Notch 1($\bar{x} \pm s$)	P ₁	Notch 2($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00±0.00	/	1.00±0.00	/
0.5 μg/ml	3	6.04±2.12	0.003**	2.22±0.45	0.001**
1 μg/ml	3	4.65±1.22	0.017*	2.22±0.53	0.001**
5 μg/ml	3	4.52±1.70	0.020*	2.38±0.33	0.001**

注：采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组，*p<0.05, **p<0.01.

表 31 不同时间点菟丝子总黄酮作用滋养细胞内 Notch 通路上蛋白水平表达差异
($\bar{x} \pm s$)

组别	N	Notch 1($\bar{x} \pm s$)	P ₁	Notch 2($\bar{x} \pm s$)	P ₂
DMSO	3	1.00±0.00	/	1.00±0.00	/
1H	3	2.12±0.58	0.702	2.06±0.66	0.035*
2H	3	1.30±0.23	0.907	1.37±0.38	0.418
4H	3	1.68±0.43	0.831	1.79±0.67	0.101
8H	3	2.16±0.66	0.766	2.73±0.78	0.002**
12H	3	1.10±0.12	0.993	1.25±0.39	0.581

注：采用 ANOVA 方差分析方法检测。对比 DMSO 组，*p<0.05, **p<0.01.

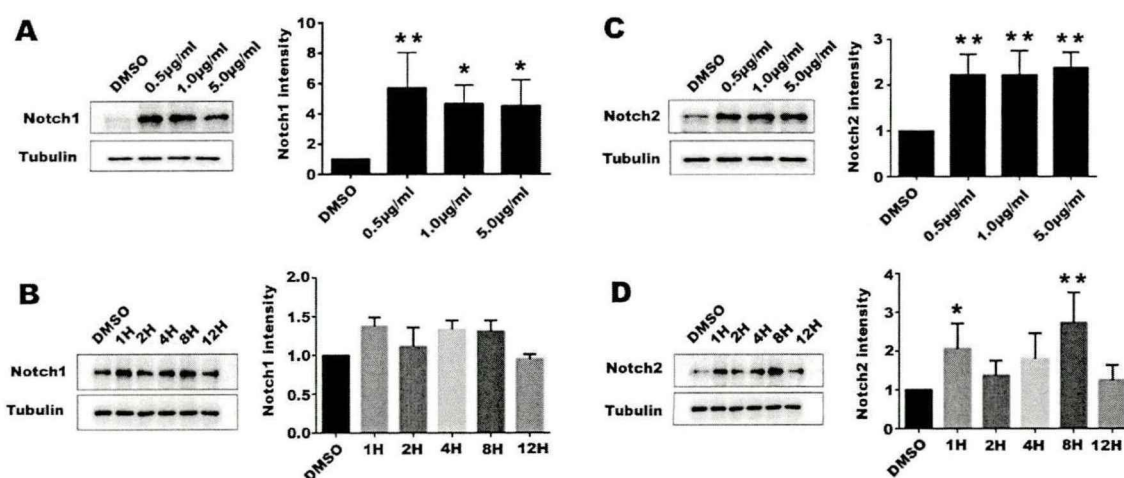


Figure 35 菟丝子总黄酮对 EVT 内 Notch 通路蛋白的表达水平影响

注：(A and B)菟丝子总黄酮能够显著上调 EVT 细胞内 Notch1 的蛋白水平，但在不同的作用时间点，Notch1 在各组间的变化无显著性差异。(C and D)菟丝子总黄酮显著上调 Notch2 的蛋白水平表达，而且在作用时间点 1h 和 8h，Notch2 水平增加最明显。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。

四、讨论

通过前面实验我们可以知道，菟丝子总黄酮能够促进滋养细胞的侵袭能力。而 MMP9 对滋养细胞侵袭能力方面有重要的作用^[179]，但目前研究中，发现菟丝子总黄酮是否与滋养细胞 MMP9 的表达有相关性，而且其是否会影响且如何影响 MMP9 的蛋白表达尚未有研究。因此我们本实验假设研究菟丝子总黄酮究竟如何调控 MMP9 促进滋养细胞的侵袭能力。

MMP9 已被证明是与迁移和侵袭相关的分子，滋养细胞的迁移和侵袭受到调控可能是由于在 MMP9 等蛋白酶和其抑制剂 TIMP 之间的平衡参与调节的，MMP9 的表达减少可能降低滋养细胞的侵袭功能而导致先兆子痫，有研究发现，CDX2 能通过调控 MMP9 促进滋养细胞的侵袭功能^[182]。通过本研究发现我们发现在加入菟丝子总黄酮治疗滋养细胞后，滋养细胞 MMP9 蛋白的表达显著上调，同时也促进滋养细胞的迁移和侵袭功能，其中 5 µg/ml 菟丝子总黄酮这种作用更明显，我们研究猜想菟丝子总黄酮可能是潜在通过调节与 MMP9 的相关性来增加滋养细胞的侵袭。

为了继续验证菟丝子总黄酮发挥药效的作用机制，我们从 MAPK/AKT/Notch 3 条级联通路进行研究。之前研究发现，MAPK 信号通路参与滋养细胞的增殖，迁移和侵袭，分化和凋亡等功能中^[183, 184]，滋养细胞的迁移侵袭功能的发挥往往很多时候通过激活 MAPK 通路而实现，比如 EGF 能同时激活 PI3K 和 MAPK 信号通路促进滋养细胞分泌 MMP9 和 TIMP1^[185]，TNF- α 和 LAMA4 通过激活 MAPK 通路诱导滋养细胞 MMP9 的表达，增加滋养细胞的侵袭功能^[186, 187]。我们本研究发现，滋养细胞的 MMP9 之所以能够上调，初步猜测是由于加入菟丝子总黄酮 12h 后，MAPK 信号通路被激活，在不影响总 ERK 和总

p38 蛋白表达的条件下, ERK 和 p38 的磷酸化水平表达升高, 在加药 1h 左右的磷酸化水平升高最明显, 与此同时, 上调了 p-AKT(473)和 p-AKT(308)蛋白水平提高, 总 AKT 蛋白不影响。对于 AKT 通路, 此前有研究报导激活 PI3K/AKT 通路能增加滋养细胞的迁移和侵袭功能, 其中 AKT1, AKT3 参与到滋养细胞的迁移过程, 而 AKT2 可能参与代谢过程或者细胞存活状态, 对滋养细胞的迁移功能无太大影响^[188]。本研究发现菟丝子总黄酮能上调 AKT(473)和 AKT(308)的磷酸化水平的表达。

研究报导 Notch1 通过激活 PI3K/AKT 信号通路调控 MMP14 的表达, 而 MMPs 的功能影响肿瘤细胞侵袭能力方面依赖于 Notch 通路^[189], 不同细胞种类中存在 PI3K/AKT 和 Notch1 的信号传导^[190], Notch 信号通路中 Notch1 和 Notch2 往往表达与母胎界面当中, 维持正常的胎盘形成, 种植, 蜕膜化, 母胎界面容受性^[191, 192], 调节滋养细胞的侵袭, 分化等^[193, 194], 我们研究首次发现菟丝子总黄酮同时能显著增加 Notch1 和 Notch2 的表达, 这有可能是 Notch 通路也参与到菟丝子总黄酮增加 EVT 细胞 MMP9 的表达当中。Notch, MAPK 和 AKT 通路的协同作用有少数研究报导, 有研究提出 CCN3 能通过 ERK1/2, AKT 和 Notch/p21 通路调节 JEG3 细胞的增殖和迁移, 糖基化和非糖基化模式的 CCN3 与 MMP2 和 MMP9 的表达增加有关^[195]。EGFL7 能通过 MAPK, PI3K 和 Notch1 信号通路促进滋养细胞的迁移和侵袭, 敲除 Notch1 后, 滋养细胞的迁移功能降低, 且 EGFL7 表达也相应下降^[196]。这正好与我们研究得出 MAPK, AKT 和 Notch 信号通路的协同作用相一致。目前尚未有研究表明菟丝子总黄酮与 MAPK, AKT, Notch 3 条信号通路的相关关系, 从我们研究表明, 菟丝子总黄酮能够通过 MAPK, AKT 和 Notch 信号通路促进滋养细胞的迁移和侵袭能力, 同时调控滋养细胞内 MMP9 蛋白和 mRNA 的表达。而 Notch 通路可能是 MAPK 和 AKT 通路上的信号传导, 通过同时激活 MAPK 和 AKT 信号通路来发挥作用, 可能是菟丝子总黄酮调控滋养细胞侵袭过程中 MMP9 表达是当中一个重要的中介。这也有可能是 MMP9 参与到 Notch 通路的反馈调节当中, 才引起的与 Notch, MAPK 和 AKT 通路之间的复杂过程, 这或许就有理由可以推测到在胎盘形成过程中的相似的负反馈调节从而控制滋养细胞的过度侵袭。

相似的机制研究中发现 Notch1 信号通路能够促进滋养细胞的迁移和侵袭功能, 增加滋养细胞 MMP9 的分泌, 经用 siRNA 敲除 Notch1 后, 抑制 NF- κ B 信号通路, 下调 MMP9 的表达, 从而抑制了滋养细胞的迁移和侵袭^[197]。本次研究中, Notch 信号通路如何介导 MAPK 和 AKT 通路上调菟丝子总黄酮引起的滋养细胞的 MMP9 的表达需要进一步的研究探讨。总的来说, 我们研究初次得出了菟丝子总黄酮能够通过调控 MMP9 来增加滋养细胞的迁移和侵袭功能, 同时发现 MAPK, AKT 和 Notch 信号通路能参与到菟丝子总黄酮这个调控过程, 这为了我们更好的了解菟丝子总黄酮的药效作用, 而且为更好的了解滋养细胞的过度侵袭的负反馈调节的内在机制, 这些结果为我们更好了解与侵袭相关的疾病发生病理机制, 比如自然流产, 先兆子痫, 宫内生长抑制, 并为预防和治疗这些疾病提供了理论指导。

在前面的实验结果中,我们发现菟丝子总黄酮可以通过调控 miRNA-126-3p 及其靶基因 PLXNB2 来促进滋养细胞的迁移和侵袭功能,防治自然流产,在本节实验中还发现菟丝子总黄酮还可以通过上调 MMP9 的表达促进滋养细胞的功能,那么在菟丝子总黄酮的这一调控过程,是否 miRNA-126-3p 及 PLXNB2 与 MMP9 有相关的进一步调控关系呢?目前已有研究中发现能够调控 MMP9 的 miRNA 比较多,如在胶质母细胞瘤中,miR-491-5p 能够通过调控 MMP9 抑制神经胶质细胞瘤的侵袭功能^[198];而 miRNA-218 通过下调 MMP9 的表达抑制 Saos-2 细胞的迁移和侵袭功能,从而引起骨肉瘤的发生^[199];在于妇产科疾病方面,研究报导在先兆子痫患者中发现 miRNA-204 显著上调,并且通过调控靶基因 MMP9 抑制滋养细胞的侵袭功能^[200],而对于自然流产发生机制中,尚未发现 miRNA-126-3p 与 MMP9 的调控关系。我们知道 MMP9 在滋养细胞着床侵袭过程起着重要的作用,而 miRNA-126-3p 通过调控 PLXNB2 引发抑制滋养细胞的侵袭功能,那么在这调控过程,是否同时抑制了 MMP9 的表达呢?这种协同作用的研究,有发现 miR-346 和 miR-582-3p 能够抑制 MMP2 及其 MMP9 来调控 EG-VEGF 从而抑制滋养细胞的侵袭功能,miR-346 和 miR-582-3p 可能可以作为诊断 EG-VEGF 相关产科疾病的标记物^[201]。另外,发现 miR-203 能下调靶基因 Robo1,同时抑制了 ERK 的磷酸化和 MMP9 的表达,从而抑制神经胶质细胞的迁移和侵袭功能,说明了 miR-203 通过干扰 Robo1/ERK/MMP9 这一信号通路轴来抑制肿瘤细胞的迁移功能^[202]。这一系列的研究也正好可以说明,本研究中,miRNA-126-3p 可能是通过调控 PLXNB2 同时也抑制了 MMP9 的表达,这一协同信号通路轴的作用从而抑制了滋养细胞的迁移和侵袭功能,而菟丝子总黄酮正好引发了这一系列的过程。这与研究中报导的 oxLDL 能上调 HASMCs 细胞中 miR-29b 表达,下调靶基因 DNMT3b,进一步调控 MMP-2/MMP-9,一步步参与到细胞的迁移功能当中,同时也说明了 miRNA 介导的表观遗传调控可能是动脉粥样硬化疾病发生病因的新机制^[203],有着相同之意。因此,这是否可以说明,菟丝子总黄酮可能是通过下调了 miRNA-126-3p 的表达,上调 PLXNB2,进一步上调了 MMP9 的表达,从而促进自然流产疾病滋养细胞的迁移和侵袭功能呢?这需要在以后的时间里继续加以验证和说明。

总的来说,本研究中,从基因层面,miRNA 以及 mRNA 等生物学过程阐述菟丝子总黄酮促进滋养细胞迁移和侵袭功能,防治自然流产的内在机制作用,更好的解释了菟丝子总黄酮的药理学机制,为我们临床上使用菟丝子总黄酮提供了一个理论依据,以此更好地指导临床用药。

五、小结

总体来说,菟丝子总黄酮作为治疗自然流产达到安胎作用的常用药物,其能够通过增加滋养细胞 MMP9 的表达来增加滋养细胞迁移和侵袭能力,同时通过激活 MAPK, AKT 和 Notch 信号通路的相互信号传导发挥其预防和治疗自然流产的药效作用。

结 语

一、结论:

(一) miRNA-126-3p 在自然流产绒毛组织中表达上调, 在滋养细胞内过表达 miRNA-126-3p 能抑制细胞的迁移和侵袭能力, 干扰 miRNA-126-3p 后其迁移和侵袭能力增加。

(二) 用米非司酮诱导已转染 miRNA-126-3p mimic 的滋养细胞, 模拟构建自然流产状态滋养细胞模型。证实 30 $\mu\text{mol/L}$ 的米非司酮造模后能抑制滋养细胞迁移能力, 同时上调滋养细胞内 miRNA-126-3p 的表达。此模型的迁移和侵袭能力明显降低, miRNA-126-3p 表达明显上调。

(三) 深入研究发现菟丝子总黄酮能明显增加滋养细胞的迁移和侵袭能力, 且能通过激活 MAPK/AKT/Notch 通路上调 MMP9 的表达。

(四) 菟丝子总黄酮能下调自然流产状态滋养细胞模型 miRNA-126-3p 的表达, 同时提高其迁移和侵袭能力, 说明菟丝子总黄酮能通过调控 miRNA-126-3p 来促进滋养细胞的迁移和侵袭能力。

(五) 菟丝子总黄酮通过调控 miRNA-126-3p 下游的 PLXNB2 蛋白进一步影响自然流产状态细胞模型滋养细胞的迁移和侵袭功能。体现其安胎, 防治流产的细胞药理作用。

二、创新之处:

(一) 进一步明确米非司酮能抑制滋养细胞的迁移和侵袭功能, 同时将米非司酮干预过表达 miRNA-126-3p 的滋养细胞, 构建自然流产状态滋养细胞模型, 并以此模型探讨菟丝子总黄酮补肾安胎的药理学机制。

(二) 深入研究菟丝子总黄酮的作用机制, 发现菟丝子总黄酮能通过调控 miRNA-126-3p 来促进滋养细胞的迁移和侵袭能力, 并且发现菟丝子总黄酮能进一步通过调控 miRNA-126-3p 的下游靶基因 PLXNB2 实现其促进自然流产状态细胞模型的滋养细胞的迁移和侵袭能力。

三、不足与展望:

(一) 仅研究菟丝子总黄酮对滋养细胞的迁移和侵袭功能影响的药效机制, 未进行对滋养细胞其他功能的研究。

(二) 大部分实验都在加药干预进行 12h 所进行, 在以后的研究中, 可以增加菟丝子总黄酮的作用时间段。

(三) 展望: 本研究发现了 miRNA-126-3p 对自然流产发生的重要作用, 其表达的上调可能是引发自然流产病理机制之一。同时结合用米非司酮干预转染后的滋养细胞构建自然流产状态滋养细胞模型, 进一步发现菟丝子总黄酮不仅能通过调控 MAPK/AKT/Notch 信号通路增加正常滋养细胞的 MMP9 的表达从而促进其迁移和侵袭功

能, 还能通过调控 miRNA-126-3p 及其下游的靶基因 PLXNB2 来增加自然流产状态细胞模型滋养细胞的迁移和侵袭能力, 以实现菟丝子总黄酮补肾安胎的药效。但由于时间因素, 尚未能进一步探讨菟丝子总黄酮调控 PLXNB2 蛋白的内在机制, 在后续实验中, 可以继续深入研究菟丝子总黄酮是通过哪个信号通路实现对 PLXNB2 蛋白的调控, 从而一步步调控 miRNA-126-3p 的作用机制。

参考文献

- [1] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage[J]. *The Lancet*, 2006, 368(9535):601-611.
- [2] Stephenson M D. Management of recurrent early pregnancy loss. [J]. *The Journal of reproductive medicine*, 2006, 51(4):303-310.
- [3] Nonaka T, Ooki I, Enomoto T, et al. Complex chromosomal rearrangements in couples affected by recurrent spontaneous abortion[J]. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2015, 128(1):36-39.
- [4] Pan H, Suo P, Liu C, et al. The ESR1 gene in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Systems biology in reproductive medicine*, 2014, 60(3):161-164.
- [5] Jung Y W, Jeon Y J, Rah H, et al. Genetic variants in microRNA machinery genes are associate with idiopathic recurrent pregnancy loss risk[J]. *PloS one*, 2014, 9(4):e95803.
- [6] Agrawal D, Prakash S, Misra M K, et al. Implication of HLA-G 5' upstream regulatory region polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortions[J]. *Reproductive biomedicine online*, 2015, 30(1):82-91.
- [7] Chen H, Li O, Pang L, et al. Expression of FK506-binding protein 52 (FKBP52) in chorionic villi with early recurrent spontaneous abortion[J]. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2015, 28(10):1165-1169.
- [8] Jin H, Wu J, Yang Q, et al. High mobility group box 1 protein polymorphism affects susceptibility to recurrent pregnancy loss by up-regulating gene expression in chorionic villi[J]. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2015, 32(7):1123-1128.
- [9] Andraweera P H, Dekker G A, Thompson S D, et al. Polymorphisms in the fibrinolytic pathway genes and the risk of recurrent spontaneous abortion[J]. *Reproductive biomedicine online*, 2014, 29(6):745-751.
- [10] Wu S, Zhang H, Tian J, et al. Expression of kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the first trimester trophoblast and decidua of women with recurrent spontaneous abortion[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2014, 210(1):47-54.
- [11] Pang L, Wei Z, Li O, et al. An increase in vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF soluble receptor-1 (sFlt-1) are associated with early recurrent spontaneous abortion[J]. *PloS one*, 2013, 8(9):e75759.
- [12] Sereshki N, Gharagozloo M, Ostadi V, et al. Variations in T-helper 17 and regulatory T cells during the menstrual cycle in peripheral blood of women with recurrent spontaneous abortion[J]. *International journal of fertility & sterility*, 2014, 8(1):59.
- [13] Wu L, Luo L, Zhang Y, et al. Alteration of Th17 and Treg cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after lymphocyte immunization therapy[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12:74.
- [14] Dendrinou S, Deliveliotou A, Anastasiou A, et al. Role of coagulation factor XII in unexplained recurrent abortions in the Greek population. [J]. *The Journal of reproductive medicine*, 2013, 59(1-2):56-62.

- [15] Preston F E, Rosendaal F R, Walker I D, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. [J]. Lancet, 1996, 348(9032):913-916.
- [16] Banerjee P, Dutta M, Srivastava S, et al. 1H NMR Serum Metabonomics for Understanding Metabolic Dysregulation in Women with Idiopathic Recurrent Spontaneous Miscarriage during Implantation Window[J]. Journal of proteome research, 2014, 13(6):3100-3106.
- [17] Zong C, Sha Y, Xiang H, et al. Glutathione S-transferase A1 polymorphism and the risk of recurrent spontaneous abortion in Chinese Han population[J]. Journal of assisted reproduction and genetics, 2014, 31(3):379-382.
- [18] Maraka S, Singh Ospina N M, O'Keefe D T, et al. Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-analysis. [J]. Thyroid Official Journal of the American Thyroid Association, 2016, 26(4):580.
- [19] Velkeniers B, Van M A, Poppe K, et al. Levothyroxine treatment and pregnancy outcome in women with subclinical hypothyroidism undergoing assisted reproduction technologies: systematic review and meta-analysis of RCTs. [J]. Human Reproduction Update, 2013, 19(3):251.
- [20] Garridogimenez C, Alijotasreig J. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. [J]. Postgraduate Medical Journal, 2015, 91(1073):151.
- [21] Takao T, Asanoma K, Kato K, et al. Isolation and characterization of human trophoblast side-population (SP) cells in primary villous cytotrophoblasts and HTR-8/SVneo cell line[J]. PLoS One, 2011, 6(7):e21990.
- [22] Lunghi L, Ferretti M E, Medici S, et al. Control of human trophoblast function[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2007, 5(6):b20.
- [23] Cross J C, Hemberger M, Lu Y, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta[J]. Molecular and cellular endocrinology, 2002, 187(1):207-212.
- [24] Wei D, Wu Q, Shi H. Apoptosis and p53 expression in the placental villi of females with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2014, 7(1):191-194.
- [25] Shang W, Shu M M, Liu M, et al. Elevated expressions of p53, CDKN1A, and Bax in placental villi from patients with recurrent spontaneous abortion[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(24):3376-3380.
- [26] 杨兴爽. 正常早孕与稽留流产绒毛组织结构中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的对比研究[J]. 中国实用医药, 2014(7):3-4.
- [27] 张琳琳, 张晓萍, 刘媛. 肿瘤坏死因子 α 诱导早孕原代培养细胞滋养细胞的凋亡[J]. 安徽医学, 2014, 35(1):83-84.
- [28] Bolnick J, Albitar L, Laidler L L, et al. Blocking Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in HTR-8/SVneo First Trimester Trophoblast Cells Results in Dephosphorylation of PKB α /AKT and Induces Apoptosis[J]. Obstetrics and gynecology international, 2011, 2011.
- [29] Prakash G J, Suman P, Prieto D M M, et al. Leukaemia inhibitory factor mediated

proliferation of HTR-8/SVneo trophoblast cells is dependent on activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, 23(5):714-724.

[30] Xie Y, Cui D, Sui L, et al. Induction of forkhead box M1 (FoxM1) by EGF through ERK signaling pathway promotes trophoblast cell invasion[J]. *Cell and tissue research*, 2015, 362(2):421-430.

[31] Tian F, Qin C, Li X, et al. Decreased Stathmin-1 Expression Inhibits Trophoblast Proliferation and Invasion and Is Associated with Recurrent Miscarriage[J]. *The American journal of pathology*, 2015, 185(10):2709-2721.

[32] Astuti Y, Nakabayashi K, Deguchi M, et al. Human recombinant H2 relaxin induces AKT and GSK3 β phosphorylation and HTR-8/SVneo cell proliferation[J]. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 2015, 61(1):E1-E8.

[33] Zong S, Li C, Luo C, et al. Dysregulated expression of IDO may cause unexplained recurrent spontaneous abortion through suppression of trophoblast cell proliferation and migration[J]. *Scientific reports*, 2016, 6.

[34] Jia R, Rui C, Li J, et al. CDX1 restricts the invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells by inhibiting MMP-9 expression[J]. *Placenta*, 2014, 35(7):450-454.

[35] Jia R, Ding G, Gu C, et al. Cdx2 enhances htr-8/svneo trophoblast cell invasion by altering the expression of matrix metalloproteinases[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2014, 34(3):628-636.

[36] Krivokuća M J, Stefanoska I, Rabi T A, et al. Pharmacological inhibition of MIF interferes with trophoblast cell migration and invasiveness[J]. *Placenta*, 2015, 36(2):150-159.

[37] Wang L, Yu Y, Guan H, et al. 67 - kDa Laminin receptor contributes to hypoxia - induced migration and invasion of trophoblast - like cells by mediating matrix metalloproteinase - 9[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2015, 42(5):549-558.

[38] Wang H, Cheng H, Shao Q, et al. Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling[J]. *Biology of reproduction*, 2014, 90(4):78.

[39] Kaspi E, Guillet B, Piercecchi-Marti M, et al. Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development[J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(2):329-342.

[40] 李彦虹, 王松存, 朴海兰, 等. 转化生长因子- β 在环孢素 A 诱导人早孕滋养细胞体外侵袭性生长中的调节作用[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(8):658-663.

[41] Francis V A, Abera A B, Matjila M, et al. Kisspeptin regulation of genes involved in cell invasion and angiogenesis in first trimester human trophoblast cells[J]. *PloS one*, 2014, 9(6):e99680.

[42] Zhang J, Dunk C E, Lye S J. Sphingosine signalling regulates decidual NK cell angiogenic phenotype and trophoblast migration[J]. *Human Reproduction*,

2013, 28(11):3026-3037.

[43] Shan N, Zhang X, Xiao X, et al. Laminin $\alpha 4$ (LAMA4) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas[J]. *Placenta*, 2015, 36(8):809-820.

[44] 张爱娟, 修瑞杰, 侯自红, 等. 米非司酮对早孕绒毛组织中 MMP-26, TIMP-4 表达的影响[J]. *生殖医学杂志*, 2013, 22(9):647-651.

[45] 苗荷. 米非司酮的应用现状[J]. *医学综述*, 2012, 18(6):912-914.

[46] Sun K, He P, Yang K. Intracrine Induction of 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression by Glucocorticoid Potentiates Prostaglandin Production in the Human Chorionic Trophoblast1[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 67(5):1450-1455.

[47] Cervellati F, Pavan B, Lunghi L, et al. Betamethasone, progesterone and RU-486 (mifepristone) exert similar effects on connexin expression in trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells. [J]. *Reproduction, fertility, and development*, 2011, 23(2):319.

[48] Vattai A, Ziegelmueller B, Kost B, et al. The expression of thyroid hormone receptors (THR) is regulated by the progesterone receptor system in first trimester placental tissue and in BeWo cells in vitro. [J]. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology*, 2015, 195:31-39.

[49] 冯婷, 刘秀明, 方家, 等. 黄芪注射液对米非司酮诱导滋养细胞凋亡的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2014, 31(4):683-684.

[50] Han S, Sidell N. RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells involves the nuclear factor-kappa B signaling pathway. [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88(2):713-719.

[51] 钟颖, 黄紫蓉. 米非司酮对绒毛组织中 MTA3、ER 及 PR 的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(4):541-543.

[52] 张玉珍, 罗颂平. 罗元恺妇科经验集[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005:89-90.

[53] Li W, Zhang Y, Mu Y, et al. Identification of Estrogenic Constituents in Serum after Oral Administration of Tu-Si-Zi Extract Using HPLC - ESI/Q - TOF MS/MS[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2015, 38(16):1521-1525.

[54] Shekarchi M, Kondori B M, Hajimehdipoor H, et al. Finger Printing and Quantitative Analysis of *Cuscuta chinensis* Flavonoid Contents from Different Hosts by RP-HPLC[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 2014.

[55] Hajimehdipoor H, Amin G R, Adib N, et al. Development of a validated HPLC method for the simultaneous determination of flavonoids in *Cuscuta chinensis* Lam. by ultra-violet detection[J]. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 20(1):1.

[56] Donnapee S, Li J, Yang X, et al. *Cuscuta chinensis* Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2014, 157:292-308.

[57] 郜洁. 寿胎丸的药物组成及其补肾安胎的药效学研究[D]. 广州中医药大学, 2009.

[58] 刘新玉. 菟丝子及其主要成分补肾安胎药效研究[D]. 广州中医药大学, 2012.

[59] 朱晓南, 宗利丽, 张宸铭, 等. 菟丝子及其主要成分黄酮对肾虚排卵障碍大鼠的影响[J].

中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8):169-172.

[60] Ke J, Duan R. Effects of flavonoids from semen cuscudae on the hippocampal-hypothalamic-pituitary-ovarian sex hormone receptors in female rats exposed to psychological stress[J]. Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology, 2013, 40(2):271-274.

[61] 罗克燕, 杨丹莉, 徐敏. 菟丝子总黄酮对排卵障碍大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴性激素水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13):258-260.

[62] 秦达念, 余运初. 菟丝子黄酮对实验动物及人绒毛组织生殖功能的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(6):349-351.

[63] 罗克燕, 杨丹莉, 徐敏. 菟丝子总黄酮对大鼠排卵障碍的治疗作用及其机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(20):2184-2186.

[64] 马红霞, 尤昭玲, 王若光. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型血清 P, PR, Th1/Th2 细胞因子表达的影响[J]. 中药材, 2008, 31(8):1201-1204.

[65] 马红霞, 尤昭玲, 刘华, 等. 菟丝子总黄酮对早孕期人细胞滋养细胞增殖能力的影响及其信号机制[J]. 中药材, 2009, 32(6):939-943.

[66] 彭申明, 陈勤, 陈逸青, 等. 菟丝子总黄酮对内分泌衰退痴呆模型小鼠学习记忆功能的影响及保护作用机制[J]. 激光生物学报, 2014, 23(3):218-226.

[67] 彭申明. 菟丝子总黄酮对内分泌衰退型小鼠痴呆模型作用以及相关作用机制的研究[D]. 安徽大学, 2014.

[68] 陈林林, 吴春, 李伟. 菟丝子黄酮的抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2008(11):116-117.

[69] 吴春, 陈林林. 菟丝子黄酮体外清除自由基活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 17(5):553-556.

[70] 王晟, 秦达念. 菟丝子总黄酮对大鼠睾丸曲细精管无血清培养所致细胞凋亡的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8):984-987.

[71] 胡小芳. 菟丝子黄酮抗大鼠心肌梗死的药效评价及其机制研究[D]. 河南大学, 2014.

[72] 刘海云, 崔艳茹, 伍庆华, 等. 菟丝子总黄酮对过氧化氢损伤的血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18):215-218.

[73] 王晓敏, 王建红, 伍庆华, 等. 菟丝子黄酮对去势雌性大鼠血清雌激素水平和血管平滑肌细胞的影响[J]. 天津医药, 2005, 33(10):650-652.

[74] 王晓敏, 王建红, 邹志坚, 等. 菟丝子黄酮对去势雌性大鼠血脂和血管雌激素受体的影响[J]. 中成药, 2008, 30(2):255-256.

[75] 王晓敏, 席晓甜, 刘海云, 等. 菟丝子总黄酮对血管平滑肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 20:26.

[76] 张曼, 王桂敏. 菟丝子黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡及 Bcl-2, Bax, Caspase-3 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5):78-81.

[77] 王桂敏, 翟宏颖. 菟丝子黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 Bcl-2, Caspase-3 表达的影响[J][J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(2):343.

[78] 翟宏颖, 王桂敏. 菟丝子黄酮对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(3):211-215.

- [79] 杨迪, 王桂敏, 翟宏颖. 菟丝子黄酮对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织中炎症反应的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(11):979-982.
- [80] 刘华, 韦炳华, 马红霞, 等. 菟丝子黄酮对流产大鼠模型母胎免疫平衡因子的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(10):837-841.
- [81] 马红霞, 尤昭玲, 王小云. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型母-胎界面 Fas/FasL, PCNA, HB-EGF 表达的影响[J]. 中药材, 2008, 31(11):1706-1709.
- [82] Kang S Y, Jung H W, Lee M, et al. Effect of the semen extract of *Cuscuta chinensis* on inflammatory responses in LPS-stimulated BV-2 microglia[J]. Chinese journal of natural medicines, 2014, 12(8):573-581.
- [83] 谢雁鸣, 秦林林, 于向东, 等. 骨碎补, 淫羊藿, 菟丝子总黄酮对成骨细胞体外培养影响的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(7):22-24.
- [84] 刘芳. 菟丝子总黄酮对成骨细胞骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):232-234.
- [85] Bushati N, Cohen S M. microRNA functions[J]. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2007, 23:175-205.
- [86] Ji L, Brkić J, Liu M, et al. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia[J]. Molecular aspects of medicine, 2013, 34(5):981-1023.
- [87] Schjenken J E, Zhang B, Chan H Y, et al. miRNA Regulation of Immune Tolerance in Early Pregnancy[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2016, 75(3):272-280.
- [88] Zhao Z, Moley K H, Gronowski A M. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases[J]. Clinical biochemistry, 2013, 46(10):953-960.
- [89] Morales-Prieto D M, Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, et al. Pregnancy-associated miRNA-clusters[J]. Journal of reproductive immunology, 2013, 97(1):51-61.
- [90] Dong F, Zhang Y, Xia F, et al. Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients[J]. Reproduction, 2014, 148(1):33-41.
- [91] El-Shorafa H M, Sharif F A. Levels of miR-21 and miR-182 in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion[J]. International Journal of Chemical and Life Sciences, 2013, 2(06):1185-1188.
- [92] Wang X, Li B, Wang J, et al. Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression[J]. Reproductive biomedicine online, 2012, 25(4):415-424.
- [93] Makeyev E V, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs[J]. Science, 2008, 319(5871):1789-1790.
- [94] Li P, Guo W, Du L, et al. microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells[J]. Clinical science, 2013, 124(1):27-40.
- [95] 李鹏飞. MiR-29b 通过调控滋养层细胞功能参与 PE 发病机制的研究[D]. 南京大学, 2012.
- [96] Dai Y, Qiu Z, Diao Z, et al. MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of

human extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1[J]. *Placenta*, 2012, 33(10):824-829.

[97] Fu G, Ye G, Nadeem L, et al. MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion[J]. *Hypertension*, 2013, 61(4):864-872.

[98] Ventura W, Koide K, Hori K, et al. Placental expression of microRNA-17 and-19b is down-regulated in early pregnancy loss[J]. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2013, 169(1):28-32.

[99] 杨洋, 吴胜军, 雷蕾. miR-10b 对人正常滋养细胞浸润能力的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2014, 45(9):791-794.

[100] Sun M, Chen H, Liu J, et al. MicroRNA-34a inhibits human trophoblast cell invasion by targeting MYC[J]. *BMC cell biology*, 2015, 16(1):21.

[101] Yan T, Liu Y, Cui K, et al. MicroRNA - 126 regulates EPCs function: Implications for a role of miR - 126 in preeclampsia[J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2013, 114(9):2148-2159.

[102] Xiao B, Xue X, Hu F, et al. Expression and regulatory mechanism of microRNA-155 in the villi of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. *Zhonghua fu chan ke za zhi*, 2014, 49(2):130.

[103] Wang S, Aurora A B, Johnson B A, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. *Developmental cell*, 2008, 15(2):261-271.

[104] Meister J, Schmidt M H. miR-126 and miR-126*: new players in cancer[J]. *The Scientific World Journal*, 2010, 10:2090-2100.

[105] El-Shorafa H M. Association between Selected Maternal Plasma Micro-RNAs and Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss[D]. *Islamic University-Gaza*, 2012.

[106] Musiyenko A, Bitko V, Barik S. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates prostein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells[J]. *Journal of molecular medicine*, 2008, 86(3):313-322.

[107] Feng R, Chen X, Yu Y, et al. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer[J]. *Cancer letters*, 2010, 298(1):50-63.

[108] Brase J C, Wuttig D, Kuner R, et al. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer[J]. *Molecular cancer*, 2010, 9(1):1.

[109] Chen H, Miao R, Fan J, et al. Decreased expression of miR-126 correlates with metastatic recurrence of hepatocellular carcinoma[J]. *Clinical & experimental metastasis*, 2013, 30(5):651-658.

[110] Tavazoie S F, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *nature*, 2008, 451(7175):147-152.

[111] Salajegheh A, Vosgha H, Rahman M A, et al. The modulatory role of miRNA 126 in thyroid cancer angiogenesis[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(19 Supplement):528.

[112] Harris T A, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial

expression of vascular cell adhesion molecule 1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008,105(5):1516-1521.

[113] Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzler S, et al. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults[J]. European journal of preventive cardiology, 2014,21(4):484-491.

[114] El-Shorafa H M, Sharif F A. Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss[J]. Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol, 2013,2:330-335.

[115] Cui W, Li Q, Feng L, et al. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2011,355(1-2):17-25.

[116] Knöfler M, Pollheimer J. IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. [J]. Placenta, 2012,33 Suppl(2):S55.

[117] Ventura W, Koide K, Hori K, et al. Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in early pregnancy loss. [J]. European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology, 2013,169(1):28-32.

[118] El H M. Levels of miR-21 and miR-182 in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion[J]. Shorafa, 2013.

[119] Hansen T F, Sørensen F B, Lindebjerg J, et al. The predictive value of microRNA-126 in relation to first line treatment with capecitabine and oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2012,12(1):83.

[120] Jusufović E, Rijavec M, Keser D, et al. let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non-small-cell lung cancer. [J]. PloS one, 2012,7(9):e45577.

[121] Frampton A E, Krell J, Jacob J, et al. Loss of miR-126 is crucial to pancreatic cancer progression. [J]. Expert Review of Anticancer Therapy, 2012,12(7):881-884.

[122] Yan T, Liu Y, Cui K, et al. MicroRNA-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia. [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2013,114(9):2148-2159.

[123] Elshorafa H M, Sharif F A. Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss[J]. International Journal of Reproduction Contraception Obstetrics & Gynecology, 2013,2(3):330-335.

[124] Pijnenborg R, Bland J M, Robertson W B, et al. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy[J]. Placenta, 1983,4(4):397-413.

[125] Lunghi L, Ferretti M E, Medici S, et al. Control of human trophoblast function[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2007,5(1):6.

[126] Cross J C, Hemberger M, Lu Y, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. [J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2002,187(1-2):207-212.

- [127] Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, et al. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts[J]. *Human Reproduction Update*, 2006, 13(2):121-141.
- [128] 张玉珍, 罗颂平. 罗元恺教授调经、助孕、安胎的思路与方法[J]. *广州中医药大学学报*, 2004, 21(5):352-355.
- [129] 罗颂平. 封藏之本, 静以制动——论罗元恺教授安胎的思路与方法[J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(5):363-365.
- [130] 王云凤, 陆启滨. 补肾活血法治疗抗心磷脂抗体阳性免疫性流产的研究进展[J]. *西部中医药*, 2008, 21(1):8-9.
- [131] 许秀平, 王文君, 归绥琪, 等. 补肾健脾方联合孕激素保胎效果分析[J]. *复旦学报(医学版)*, 2013, 40(4):458-462.
- [132] 郜洁. 寿胎丸的药物组成及其补肾安胎的药效学研究[D]. 广州中医药大学, 2009.
- [133] 郜洁, 罗颂平. 肾虚黄体-抑制大鼠流产模型补肾安胎药效的初步评价[J]. *内蒙古中医药*, 2011, 30(13):145-146.
- [134] 曹越, 彭维, 苏薇薇, 等. 续断药材指纹图谱的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(1):50-54.
- [135] 曹越, 彭维, 苏薇薇, 等. 菟丝子指纹图谱研究新进展[J]. *生物产业技术*, 2009(6):90-93.
- [136] 曹越, 彭维, 苏薇薇, 等. 广东从化桑寄生药材的HPLC指纹图谱研究[J]. *中药材*, 2010, 33(4):532-535.
- [137] 刘新玉. 菟丝子及其有效部位提取物补肾安胎药效研究[D]. 广州中医药大学, 2012.
- [138] 缪江霞. 续断有效部位的提取及其补肾安胎的药效学研究[D]. 广州中医药大学, 2012.
- [139] 黄长盛. 桑寄生及其有效部位的补肾安胎药效学研究[D]. 广州中医药大学, 2012.
- [140] Donnapee S, Li J, Yang X, et al. *Cuscuta chinensis* Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine. [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 157:292-308.
- [141] Ke J, Duan R. Effects of flavonoids from semen *cuscutae* on the hippocampal-hypothalamic-pituitary-ovarian sex hormone receptors in female rats exposed to psychological stress. [J]. *Clinical & Experimental Obstetrics & Gynecology*, 2013, 40(2):271.
- [142] 马红霞, 尤昭玲, 刘华, 等. 菟丝子总黄酮对早孕期人细胞滋养细胞增殖能力的影响及其信号机制[J]. *中药材*, 2009, 32(6):939-943.
- [143] 许晓嘉, 徐丽媛, 郭志勇, 等. HPLC法同时测定中药菟丝子中五种黄酮类成分含量的研究[J]. *世界中医药*, 2014(4):491-493.
- [144] 王达, 王帅, 包永睿, 等. UPLC测定不同产地菟丝子药材中6种黄酮类成分的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016(5):96-100.
- [145] Shekarchi M, Kondori B M, Hajimehdipoor H, et al. Finger Printing and Quantitative Analysis of Flavonoid Contents from Different Hosts by RP-HPLC[J]. *Food & Nutrition Sciences*, 2014, 05(10):914-921.
- [146] Hajimehdipoor H, Kondori B M, Amin G R, et al. Development of a validated HPLC method

- for the simultaneous determination of flavonoids in *Cuscuta chinensis* Lam. by ultra-violet detection. [J]. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 20(1):57.
- [147] Catalano R D, Critchley H O, Heikinheimo O, et al. Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium. [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2007, 13(9):641-654.
- [148] 侯自红, 何双, 顾向应, 等. 米非司酮对人早孕不同时期绒毛组织病理结构及survivin、caspase-3表达的影响[J]. *中国计划生育学杂志*, 2013, 21(9):580-584.
- [149] 修瑞杰. 米非司酮对人早孕期绒毛组织结构及MMP-26、TIMP-4表达的影响[D]. 天津医科大学, 2012.
- [150] Han S, Sidell N. RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells involves the nuclear factor-kappa B signaling pathway. [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88(2):713-719.
- [151] 唐薇, 王自能, 赵影庭. 米非司酮对孕7~9周人胎盘绒毛滋养细胞VEGF的影响[J]. *中国热带医学*, 2010, 10(5):584-585.
- [152] 楼湘莹, 王自能, 耿蕾. 米非司酮对早孕绒毛滋养细胞TSP表达及绒毛间质血管生成的影响: 第九次全国妇产科病理学术会议, 2007[C].
- [153] Meiling L, Xinquan S, Mengchun J. Differentially expressed genes in early gestational chorionic villi after administration of mifepristone. [J]. *Gynecological Endocrinology the Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 2011, 27(6):371-378.
- [154] Zheng X, Sun Y, Zhang H, et al. Prospective study evaluating the effect of mifepristone on E-cadherin expression in villi in early pregnancy[J]. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology*, 2015, 194:115-118.
- [155] Williams K R C, Renthall N E, Condon J C, et al. MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(19):7529-7534.
- [156] Liu R, Shi P, Nie Z, et al. Mifepristone Suppresses Basal Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells by Down-regulating KLF5 Expression[J]. *Theranostics*, 2016, 6(4):533-544.
- [157] 杨晓清, 张玉泉, 徐云钊, 等. 子宫内膜间质细胞体外损伤模型的建立[J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(4):274-280.
- [158] Lin M K, Yu Y L, Chen K C, et al. Kaempferol from *Semen cuscutae* attenuates the immune function of dendritic cells. [J]. *Immunobiology*, 2011, 216(10):1103-1109.
- [159] Banwait J K, Bastola D R. Contribution of bioinformatics prediction in microRNA-based cancer therapeutics. [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 81:94.
- [160] Kunz M, Ke X, Liang C, et al. Bioinformatics of cardiovascular miRNA biology[J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2014, 89(Pt A):3.
- [161] Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Web Server issue):451-454.

- [162] Xiao F, Zuo Z, Cai G, et al. miRecords: an integrated resource for microRNA - target interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(1):D105-D110.
- [163] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- [164] Ritchie W, Flamant S, Rasko J E. Predicting microRNA targets and functions: traps for the unwary. [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(6):397-398.
- [165] Gomes C P C, Cho J H, Hood L, et al. A Review of Computational Tools in microRNA Discovery[J]. *Frontiers in Genetics*, 2012, 4:81.
- [166] Jin Y, Chen Z, Liu X, et al. Evaluating the MicroRNA Targeting Sites by Luciferase Reporter Gene Assay[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 936:117-127.
- [167] Brennecke J, Stark A, Russell R B, et al. Principles of microRNA-target recognition. [J]. *Plos Biology*, 2005, 3(3):e85.
- [168] Jin Y, Chen Z, Liu X, et al. Evaluating the MicroRNA Targeting Sites by Luciferase Reporter Gene Assay[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 936:117-127.
- [169] Harris T A, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(5):1516.
- [170] Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. [J]. *Circulation Research*, 2012, 110(3):508-522.
- [171] Pitzler L, Auler M, Probst K, et al. miR-126-3p promotes matrix-dependent perivascular cell attachment, migration and intercellular interaction. [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(5):1297-1309.
- [172] Lechman E R, Gentner B, Ng S W, et al. miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(2):214-228.
- [173] Raffel S, Trumpp A. miR-126 Drives Quiescence and Self-Renewal in Leukemic Stem Cells[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(2):133-135.
- [174] Xiong Y, Kotian S, Zeiger M A, et al. miR-126-3p Inhibits Thyroid Cancer Cell Growth and Metastasis, and Is Associated with Aggressive Thyroid Cancer[J]. *Plos One*, 2015, 10(8):82-90.
- [175] Le A P, Huang Y, Pingle S C, et al. Plexin-B2 promotes invasive growth of malignant glioma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9).
- [176] Conrotto P, Corso S, Gamberini S, et al. Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth. [J]. *Oncogene*, 2004, 23(30):5131-5137.
- [177] Singh H, Aplin J D. Endometrial apical glycoproteomic analysis reveals roles for cadherin 6, desmoglein-2 and plexin b2 in epithelial integrity. [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2015, 21(1):81-94.
- [178] Cohen M, Meisser A, Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. [J]. *Placenta*, 2006, 27(8):783-793.
- [179] Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, et al. Expression and importance of matrix

- metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004, 2(1):59.
- [180] Bischof P, Meisser A, Campana A. Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface. [J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2002, 55(1-2):3-10.
- [181] Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(27):11109-11114.
- [182] Jia R Z, Ding G C, Gu C M, et al. CDX2 enhances HTR-8/SVneo trophoblast cell invasion by altering the expression of matrix metalloproteinases. [J]. *Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2014, 34(3):628-636.
- [183] Fitzgerald J, Busch S, Wengenmayer T, et al. Signal Transduction in Trophoblast Invasion[J]. *Chemical Immunology & Allergy*, 2005, 88(10):181.
- [184] Daoud G, Amyot M, Rassart E, et al. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. [J]. *Journal of Physiology*, 2005, 566(2):409-423.
- [185] Qiu Q, Yang M, Tsang B K, et al. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. [J]. *Reproduction*, 2004, 128(128):355-363.
- [186] Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, et al. Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2006, 12(4):225.
- [187] Shan N, Zhang X, Xiao X, et al. Laminin α 4 (LAMA4) Expression Promotes Trophoblast Cell Invasion, Migration, and Angiogenesis and is Lowered in Pre-Eclamptic Placentas[J]. *Placenta*, 2015, 36(8):809.
- [188] Haslinger P, Haider S, Sonderegger S, et al. AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans1[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 88(3):178-182.
- [189] Wang H, Cheng H, Shao Q, et al. Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling. [J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(4):78.
- [190] Palomero T, Ferrando A. Oncogenic NOTCH1 control of MYC and PI3K: challenges and opportunities for anti-NOTCH1 therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemias and lymphomas. [J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(17):5314-5317.
- [191] Hunkapiller N M, Gasperowicz M, Kapidzic M, et al. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. [J]. *Development*, 2011, 138(14):2987-2998.
- [192] Cuman C, Menkhorst E, Winship A, et al. Fetal-maternal communication: the role of Notch signalling in embryo implantation. [J]. *Reproduction*, 2014, 147(3):R75-R86.
- [193] Zhao W X, Lin J H. Notch signaling pathway and human placenta. [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2012, 9(6):447-452.

- [194] Haider S, Meinhardt G, Velicky P, et al. Notch signaling plays a critical role in motility and differentiation of human first-trimester cytotrophoblasts. [J]. *Endocrinology*, 2013, 155(1):263-274.
- [195] Wagener J, Yang W, Kazuschke K, et al. CCN3 regulates proliferation and migration properties in Jeg3 trophoblast cells via ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase 1/2), Akt (protein kinase B) and Notch signalling [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2012.
- [196] Massimiani M, Vecchione L, Piccirilli D, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 promotes migration and invasion of human trophoblast cells through activation of MAPK, PI3K and NOTCH signaling pathways. [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2015, 21(5):3957-3965.
- [197] Yu Y, Wang L, Tang W, et al. RNA interference-mediated knockdown of Notch-1 inhibits migration and invasion, down-regulates matrix metalloproteinases and suppresses NF- κ B signaling pathway in trophoblast cells. [J]. *Acta Histochemica*, 2014, 116(5):911-919.
- [198] Yan W, Zhang W, Sun L, et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. [J]. *Brain Research*, 2011, 1411(1):108-115.
- [199] Jin J, Cai L, Liu Z M, et al. miRNA-218 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion by down-regulating of TIAM1, MMP2 and MMP9. [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2013, 14(6):3681-3684.
- [200] Yu Y, Wang L, Liu T, et al. MicroRNA-204 suppresses trophoblast-like cell invasion by targeting matrix metalloproteinase-9. [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2015, 463(3):285-291.
- [201] Su M T, Tsai P Y, Tsai H L, et al. miR - 346 and miR - 582 - 3p - regulated EG - VEGF expression and trophoblast invasion via matrix metalloproteinases 2 and 9 [J]. *Biofactors*, 2016.
- [202] Dontula R, Dinasarapu A, Chetty C, et al. MicroRNA 203 Modulates Glioma Cell Migration via Robo1/ERK/MMP-9 Signaling [J]. *Genes & Cancer*, 2013, 4(7-8):285.
- [203] Chen K C, Wang Y S, Hu C Y, et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases [J]. *Faseb Journal*, 2011, 25(5):1718-1728.

附 录

附录 1: 中英文对照缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
SA	Spontaneous abortion	自然流产
EVT	Extravillous trophoblast	绒毛外滋养细胞
TFSC	Total flavonoids from semen cuscutae	菟丝子总黄酮
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	基质金属蛋白酶 9
ERK	Extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide	噻唑蓝
RT	Reverse transcriton	逆转录反应
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
MEM	Modified eagle medium	细胞培养基
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸二钠
DMSO	Dimethyl suiphoxide	二甲基亚砷
SDS	Sodium dodecyl sulfate, sodium salt	十二烷基硫酸钠
DCN	decorin	核心蛋白多糖
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5	胰岛素样生长因子结合蛋白 5
CCR1	CC-chemokine receptor 1	细胞表面趋化因子受体 1
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	巨噬细胞移动抑制因子
NAV1	Neuron navigator 1	神经细胞引领蛋白
PLXNB2	Plexin-B2	神经丛蛋白 B2
PEX5	Peroxisomal targenting signal 1 receptor	过氧化物酶体生物合成因子 5
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	血管内皮生长因子 A
SDC2	Syndecan-2	多配体聚糖-2
GOLPH3	Golgi phosphoprotein 3	高尔基体磷蛋白 3
SLC7A5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	CD98 轻链 1
PIK3R2	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	磷酸化磷脂酰肌醇激酶 p85 β
ITGA6	Integrin alpha-6	整合素 α -6
SMURF2	E3 ubiquitin-protein ligase	Smad 蛋白 E3 泛素连接酶 2

附录 2: 菟丝子总黄酮检测报告



Nanjing Puyi Biological Technology CO.,LTD

南京普怡生物科技有限公司

TEL: +86-025-58886742 +86-025-58886743

FAX: +86-025-58886740 Web: Http://www.nanjingpuyi.com

检验报告单 Certificate of Analysis

产品名称 Product Name	菟丝子提取物 Semen Cuscutae Extract		
生产批号 Batch No.	PY0150825	生产日期 Manufacturing Date	Aug. 25, 2015
生产批量 Butch Quantity	300g	报告日期 Date of Certificate	Aug. 25, 2015

检测项目 Items	检测标准 Specifications	检测结果 Results
黄酮检测 Flavonoids Assay	≥85.00%	87.06%
检测方法 Test Method	UV	符合 Conforms
提取溶剂 Extraction Solvent	乙醇和水 Ethanol&Water	符合 Conforms
性状检查 Organoleptic		
外观 Appearance	精细粉末 Fine Powder	符合 Conforms
颜色 Color	黄色 Yellow	符合 Conforms
气味 Odor	特殊 Characteristic	符合 Conforms
味道 Taste	特殊 Characteristic	符合 Conforms
物理性状 Physical Characteristics		
粒径 Partical Size	100%通过 80 目 100%Through 80 Mesh	符合 Conforms
干燥失重 Loss on Drying	≤5.0%	0.38%
灰分 Ash Content	≤5.0%	2.48%
溶剂残留 Solvent Residue	欧洲药典 Eur.Pharm	符合 Conforms
农药残留 Pesticide Residue	未检出 Negative	未检出 Negative
重金属 Heavy Metals		
总量 Total Heavy Metals	≤10ppm	符合 Conforms
砷 As	≤2ppm	符合 Conforms
铅 Pb	≤2ppm	符合 Conforms
微生物检测 Microbiological Tests		
菌落总数 Total Plate Count	≤1000cfu/g	符合 Conforms
酵母菌及霉菌 Total Yeast & Mold	≤100cfu/g	符合 Conforms
大肠杆菌 E.Coli.	未检出 Negative	未检出 Negative
沙门氏菌 Salmonelia	未检出 Negative	未检出 Negative
葡萄球菌 Staphylococcus	未检出 Negative	未检出 Negative

结论 Conclusion	符合检测标准 Conform to specification.
保存方法 Storage	放置于干燥通风处, 避免太阳和高温照射 Store in a cool and dry
保质期 Shelf Life	密封保存两年 Two years if sealed and store away from direct sun light.

Person in Charge: 张华

Testing Person: 刘晓君

Re-inspector: 谭康

附录 3:

统计学审核证明

学号: 20142101010

广州中医药大学研究生学位论文统计学审核证明

兹有 博 士研究生 高飞霞 (导师 罗颂平) 的学位论文《菟丝子总黄酮调控 miRNA-126-3p 促进滋养细胞侵袭功能机制研究》中有关统计学方面的内容, 经我部门审定合格, 特此证明。

广州中医药大学临床药理研究所

负责人:



二〇一七年四月三十日

在校期间发表论文情况

- [1] 高飞霞, 巫海旺, 郜洁, 罗颂平. 寿胎丸治疗先兆流产-随机对照试验的 meta 分析[J], 中华中医药学刊, 2016, 34(11), 2637-2642.
- [2] 高飞霞, 郜洁, 巫海旺等. 月经过少中西医病因的相关性及致病因素研究[J], 辽宁中医杂志, 2016, 43(5), 919-922.
- [3] 高飞霞, 朱玲, 郜洁. 罗颂平教授预培其本、固冲安胎的经验[J], 南京中医药大学学报, 2016, 32(1), 90-92.
- [4] Jie Gao, Chun Zhou, Yadi Li, Feixia Gao et al. Asperosaponin VI promotes progesterone receptor expression in decidual cells via the notch signaling pathway[J], Fitoterapia, 113 (2016) 58 - 63.
- [5] 高飞霞等, 罗颂平产后膏方调理经验撷粹[J], 南京中医药大学学报, 录用待刊。

在校期间获奖情况:

《月经过少与性激素、子宫内膜厚度相关性研究及中医诊治》一文获得“第 16 次全国中医妇科年会暨第二届青年论坛”优秀奖。

致 谢

毕业季，终究是个伤感而感慨万千的季节，而时间如潺潺流水，总在不经意间在之间划走，不知不觉，走进罗氏团队已经将近六年矣！

回想起六年前，至今仍记得，还在本科阶段的我，揣着一颗紧张的心，跟早已崇拜已久的罗颂平老师“表白”，希望有机会拜在罗老师门下，这个愿望，自大学以来从未间断过，而在那时，才知道距离罗老师招硕士生已是 10 年前，其实并不敢确定是否能有幸进入门内，经过长时间的跟诊，或许是我的真诚与坚持打动了罗老师，罗老师最终同意了当我的导师，对于这份恩赐，至今心里还怀着感恩的心去感受，久久回味。也正是这份感恩，支持我从还对科研懵懂不知的小硕一直走到至今博士生涯的即将结束，罗老师对科研的严谨时时刻刻鞭策着我，对临床的热忱时时刻刻渲染着我，这一路，有苦，有累，有辛酸，有快乐，也有欣喜和绝望，走过了，体会过了，才会觉得这一切过得这么充实，这么刻骨铭心！

在这期间，有多少个夜晚，辗转反侧，为课题的设计而失眠；又有多少个哭泣，蜷缩角落，为得不到满意的实验结果而嚎啕大哭，然而，都经历过来了，正是罗老师的嘘寒微暖让我充满无限的动力，体会到罗教授平时的辛苦与努力，就鼓励自己有什么理由可以不坚持呢；也依然还有我的爱人李昶博士背后无限的支持与无限的信任，无数的夜里熬夜陪我处理数据，帮我打气，才让我有继续坚持的勇气和信心。而在这完成实验，做完整个课题过程中，感谢郜洁老师一直以来对课题的指导和课题所需提供的无限帮助，以及在课题进展不顺利时候给予的信心；同时，在整个课题执行的过程，真得很谢谢南方医科大学的周春老师，从课题的设计和课题的执行，甚至课题问题的解决，都提供了详细而认真的解答，从我对实验基本一无所知，到一手教会我所需要的实验技能，就像是强心针，才会让我如此快速进入状态坚持完成这个博士课题，这份教导与恩情，无以言谢。

曾几何时，看着一届届毕业的师姐，心里的焦躁，感叹何时才能轮到自己，而如今，在此刻，真正等到自己要毕业了，不是体会到终点的欢乐，而是更多的不舍与害怕。不舍得这给我平台发展的罗氏团队，也不舍得一起奋斗的小伙伴，也害怕着未来的不确定，生怕自己不能胜任；但这将近六年的时间，教会了我成长，教会了我思考，教会了我面对，相信在以后的日子里，可以继续用这份耐心从容应付。

都说只有吃过苦的博士生活才是真正的博士，但在体会实验苦的过程中，也充满着欣喜与快乐，因为在这里，不仅赠与我一份珍贵的回忆，同时也收获了一起奋战过的友情，这里要感谢的人太多太多，有着庞大罗氏的团队，罗老师犹如慈母，在学习和生活中，一次次的指引我；有着曾诚老师，朱玲老师和赵颖老师的鼓励指导与关心；有着许丽绵老师、叶敦敏老师和李莉老师的引领我走入妇科；郜洁老师给我们课题的

支持与指导，时时刻刻的为我们着想；李婧老师，曹蕾老师，曾蕾老师给我的实验和临床指导；更有着互相帮忙，互相进步的巫海旺师弟，给予我生活上和实验上的巨大帮忙；还有着一帮可爱的师妹，丘维钰，杜鑫，林炜娴，给予我热忱鼓励和实验上的协助；以及其他同门李亚迪，杨利林，李佩琼，蔡逸苗，丘敏，彭晋婷，刘方，李元琪平日里的关切陪伴与帮助；另外，还想感谢中山大学附属第二医院的韩博炜博士，在课题的思路设计和方法提供了重要的建议；还要感谢博士班伙伴李洁，左强，张嘉晔等博士的帮忙与关心；还有许许多多的朋友和同学的关心与帮助……

在此，还想感谢几位闺蜜，汪金玲，郑慧敏，汪德琴，在郁闷时候可以互相倾诉与鼓励，得此友谊也是我此生的福气。最后，还想深深的致敬我的家人，父母，弟弟妹妹，一直鼓励着我完成自己的梦想，让我远离生活上的忧愁，总能给我提供最好的明路，在困难的时候总是能得到第一时间的解决，在压抑的时候总是能第一时间给予鼓励，为自己在这个家庭里而自豪；与此同时，还想感谢我的婆婆，在求学的这2年，任劳任怨，不顾自己的辛劳，和蔼认真地照顾我的女儿，我为没有太多时间陪伴你们致以深深的歉意。最后的最后，再次感谢生命里最重要的陪伴我走过的李昶博士，谢谢你！

衷心感谢在论文评审和答辩的专家老师，感谢您在百忙之中的指导！

本研究感谢在国家自然科学基金面上项目（NO. 81373672）资助下独立完成！

路漫漫其修远兮，吾将上下而求索，这六年，终将会在思绪里慢慢汇成一股暖暖的热流，一份满满感动的回忆！