

·论著·

补肾安胎法调控Piezo1改善肾虚-黄体抑制病证结合流产大鼠母胎界面血管生成的机制

谢宝珍^{1,2}, 黄煦格^{1,2}, 余兆吉^{1,2}, 陈誉之^{1,2}, 王然^{1,2}, 曾粤睿^{1,2}, 刘紫嫣^{1,2}, 邹洁^{2,3}, 罗颂平^{2,3}

(¹广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; ²广州中医药大学岭南医学研究中心, 广州 510405;

³广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

摘要: 目的: 阐明补肾安胎法介导Piezo1改善病证结合大鼠母胎界面血管重铸的作用机制。方法: 构建肾虚-黄体抑制病证结合流产SD大鼠, 将8~10周龄孕鼠随机分为6组, 每组9只: 空白对照(Control)组、模型(Model)组(羟基脲45 mg/mL+米非司酮0.4 mg/mL)、模型+地屈孕酮(Progesterone)组(地屈孕酮0.31 mg/mL)、模型+减味寿胎丸(JSP)低剂量(JSP-L)组(JSP 82.23 mg/mL)、模型+减味寿胎丸中剂量(JSP-M)组(JSP 164.46 mg/mL)、模型+减味寿胎丸高剂量(JSP-H)组(JSP 328.92 mg/mL)。体视镜分析各组孕鼠胚胎及胚胎血管发育情况; 小动物超声比较各组孕鼠子宫动脉血流阻力; 小动物光声成像比较各组孕鼠胎盘血氧饱和度差异; 苏木素-伊红(HE)染色观察各组孕鼠卵巢黄体数目、黄体血管及胎盘血管丰富度; 免疫组织化学染色(IHC)和蛋白免疫印迹法(WB)检测各组孕鼠胎盘Piezo1及血管生成相关分子VEGFR2、VEGFR1及VEGFA的分布、表达及蛋白水平表达。结果: 与Control组比较, Model组孕鼠子宫及胚胎湿重下降($P<0.05$), 胚胎直径缩小($P<0.05$), 流产率升高至65.73%($P<0.001$); 子宫动脉搏动指数PI及阻力指数RI升高($P<0.01$); 胎盘血氧饱和度下降($P<0.05$); HE示妊娠黄体数目下降, 妊娠黄体血管密度及胎盘血管丰富度不足; IHC示Model组孕鼠胎盘Piezo1及VEGFA表达降低($P<0.001$), 血管生成因子受体VEGFR2及VEGFR1表达升高($P<0.001$); Western Blot检测示Model组孕鼠胎盘Piezo1表达下降($P<0.01$), VEGFR2及VEGFR1表达升高($P<0.05$)。与Model组比较, Progesterone组及JSP各剂量组流产率均下降($P<0.01$); 子宫动脉PI及RI下降($P<0.05$); JSP-L及JSP-M组血氧饱和度升高($P<0.01$); HE示Progesterone组及JSP各剂量组妊娠黄体及胎盘血管丰富度增加; IHC检测示JSP各剂量组孕鼠胎盘Piezo1及VEGFA表达升高($P<0.001$); Western Blot检测示JSP-M组孕鼠胎盘Piezo1及VEGFR2表达增加($P<0.01$)。结论: 补肾安胎中药复方减味寿胎丸通过调控机械敏感性离子通道Piezo1介导VEGFA促进母胎界面的血管生成, 降低母体子宫动脉血流阻力, 增加母胎界面血流灌注, 改善母胎界面的血氧物质交换, 从而发挥降低流产的作用。

关键词: 补肾安胎法; 减味寿胎丸; Piezo1; 血管生成; 自然流产; 痘证结合模型

Mechanism of regulating Piezo1 by tonifying kidney and calming fetus method to improve pregnancy outcomes of disease and syndrome combination rats of kidney deficiency and corpus luteum inhibition by promoting angiogenesis at the maternal-fetal interface

XIE Baozhen^{1,2}, HUANG Xuge^{1,2}, YU Zhaoji^{1,2}, CHEN Yuzhi^{1,2}, WANG Ran^{1,2},
ZENG Yuerui^{1,2}, LIU Ziyan^{1,2}, GAO Jie^{2,3}, LUO Songping^{2,3}

(¹First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ²Lingnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ³First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(No.81873336), 中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)——国家中医药领军人才支持计划(No.国中医人教发〔2018〕12号), 广东省重点领域研发计划项目(No.2020B111110003), 市校(院)联合资助项目市重点实验室建设项目(No.202201020383)

通信作者: 罗颂平, 广东省广州市白云区机场路16号广州中医药大学第一附属医院, 邮编: 510405, 电话: 020-36585434

E-mail: songpingluo@hotmail.com

Abstract: Objective: To elucidate the mechanism of how tonifying kidney and calming fetus method mediates Piezo1 to improve angiogenesis at the maternal-fetal interface in a disease and syndrome combination rat model. Methods: Kidney deficiency and corpus luteum inhibition rat abortion model was constructed. 8-10 weeks old pregnant rats were randomly divided into 6 groups (9 rats in each group): blank control group, model group (hydroxyurea 45 mg/mL+mifepristone 0.4 mg/mL), model+ dydrogesterone (progesterone 0.31 mg/mL), model+Jianwei Shoutai Pill (JSP) low dose group (JSP 82.23 mg/mL, JSP-L), model+ JSP medium dose group (JSP 164.46 mg/mL, JSP-M), and model + JSP high dose group (JSP 328.92 mg/mL, JSP-H). The embryonic and its vascular development of each group was analyzed by somatoscopy. Small animal ultrasound was applied to analyze uterine artery flow resistance. Photoacoustic imaging was performed to analyze placental oxygen saturation. Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to analyze the number of ovarian corpus luteum, corpus luteum vessels and placental vascular abundance. Immunohistochemistry (IHC) was performed to analyze distribution and expression of Piezo1, VEGFR2 and VEGFR1, VEGFA in the placenta. Protein expression of Piezo, VEGFR2, VEGFR1 and VEGFA in the placenta were examined by Western Blot (WB). Results: Compared to the Control group, Model group showed a decrease in uterine and embryonic wet weight ($P<0.05$), a decrease in embryonic diameter ($P<0.05$) and an increase in abortion rate to 65.73% ($P<0.001$). It also showed an increase in uterine artery pulsatility index PI and resistance index RI ($P<0.01$), a decrease in placental oxygen saturation ($P<0.05$), a decrease in the number of corpus luteum and a decrease in placental vascular richness. IHC showed decreased expression of Piezo1 and VEGFA ($P<0.001$) and increased expression of VEGFR2 and VEGFR1 in Model group ($P<0.001$). WB also showed decreased expression of Piezo1 ($P<0.01$) and increased expression of VEGFR2 and VEGFR1 in Model group ($P<0.05$). Compared to Model group, Progesterone group and the JSP groups showed a decrease in abortion rate ($P<0.01$) and a decrease in uterine artery PI and RI ($P<0.05$). JSP-L and JSP-M group showed an increase in oxygen saturation ($P<0.01$). Progesterone group and the JSP groups showed an increase in gestational corpus luteum and placental vascularity. IHC showed an increase in placental Piezo1 and VEGFA expression in JSP groups ($P<0.001$). WB showed an increase in placental Piezo1 and VEGFR2 expression in JSP-M group ($P<0.01$). Conclusion: The kidney deficiency and luteinizing body inhibition rat model is characterized by insufficient angiogenesis, increased uterine artery resistance, and decreased oxygen saturation at maternal-fetal interface. JSP, representing method of tonifying kidney and calming fetus, promotes angiogenesis by regulating the mechanosensitive ion channel Piezo1-mediated VEGFA, reduces maternal uterine artery blood flow resistance, enhances blood perfusion and improves blood oxygen exchange at the maternal-fetal interface, thus exerting an effect on reducing miscarriage.

Keywords: Tonifying kidney and calming fetus method; Jianwei Shoutai Pills; Piezo1; Angiogenesis; Spontaneous abortion; Disease and syndrome combination animal models

自然流产(spontaneous abortion, SA)是早期妊娠最为常见的并发症,其发生率约占所有妊娠的15%~25%^[1]。该病的病因复杂,主要包括染色体异常、母胎界面免疫及内分泌失衡、母体血栓前状态、女性生殖道解剖异常及感染等^[2]。研究表明血流动力学异常与自然流产的发病相关,但母胎界面的血流动力学改变与自然流产发病机制的相关研究暂未广泛开展,而针对血流动力学因素所致SA的治疗方法尚未达成专家共识^[3]。

中医理论强调“肾主生殖”,肾为冲任之本,气血之根,而气能载胎,血能养胎。SA属中医“堕胎”“小产”的范畴,该病以肾虚为根本病机,因此,补肾安胎法为中医药防治SA的主要治法。但是,补肾安胎法能否通过改善母胎界面的血流状态继而降低SA的发病暂不明确。因此,本研究以肾虚-黄体抑制病证结合动物模型^[4]为研究载体,通过补肾安胎方药干预,进一步阐明药效机制。

目前,研究已证实机械敏感性阳离子通道蛋白Piezo1在血流剪切力刺激下参与血管生成^[5],由于其独特的机械敏感性及其在血管发育中的重要

调控作用,该分子逐渐成为心血管^[6]、肿瘤^[7]、消化^[8]、呼吸^[9]等领域的研究热点。目前,尚无研究探讨该分子在母胎界面血管生成与重铸中的作用机制。因此,本研究以母胎界面机械敏感性为切入点,探索补肾安胎复方减味寿胎丸调控Piezo1介导母胎界面血管生成的作用机制,深入阐释“肾主生殖”的科学内涵。

材料与方法

1. 动物 SPF级健康SD大鼠,8~10周龄,体质量220~250 g,雌性60只,雄性20只,由广东省医学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2022-0002,实验动物质量合格证号:44007200108091、44007200108092、44007200109026。本实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审核通过。

2. 药物 羟基脲片(齐鲁制药有限公司,批号:2E0333DG0),米非司酮(广州朗圣药业有限责任公司,批号:220506),地屈孕酮(Abbott Biologicals B.V.,批号:367918)。减味寿胎丸由菟丝子、桑寄生和续断组成,饮片均购自广东省药材公司(批号分别

为T271901B、S2320711、X0419711),按菟丝子:桑寄生:续断=2:1:1制备药物并干燥。

3. 试剂与仪器 Piezo1(武汉Proteintech, 批号: 00082878)、VEGFR1(美国Abcam, 批号: GR3321125-10)、VEGFR2(美国CST, 批号: 5)、VEGFA[蛋白免疫印迹法(Western Blot, WB)用:美国Abcam, 批号: GR3412227-8; 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)用: 武汉Proteintech, 批号: 00070191]、GAPDH(武汉Proteintech, 批号: 00083125)、山羊抗兔IgG(H+L)抗体(武汉Proteintech, 批号: 2000217)、二氨基联苯胺(DAB)显色液(中杉金桥, 批号: 220030926)、增强酶标记山羊抗兔IgG聚合物二抗(中杉金桥, 批号: 2208C1017)、伊红染色液(江原, 批号: 211217)、苏木素染液(江原, 批号: 220314)、异氟烷(深圳瑞沃德, 批号: 22090401)。Vevo2100小动物活体成像系统(加拿大Vivo LAZR)、R540增强型动物吸入式麻醉机(深圳瑞沃德)SMZ745体视显微镜(日本Nikon)、IX71显微镜(日本Olympus)、3D HISTEC数字病理切片扫描系统(Pannoramic MIDI)、ARZ1331游标卡尺(青岛美吉特)、Power PacTM通用蛋白电泳仪、电转仪(美国BIO-RAD)。

4. 分组 SD大鼠按照雌:雄为1:1进行合笼,合笼后次日清晨检查雌性大鼠的阴栓并进行阴道涂片,见到阴栓及阴道图片出现大量精子为妊娠0.5 d(GD0.5)。将孕鼠随机分为6组:空白对照组(Control组)、模型组(Model组)、地屈孕酮组(Progesterone组)、减味寿胎丸低剂量组(JSP-L组)、减味寿胎丸中剂量组(JSP-M组)、减味寿胎丸高剂量组(JSP-H组),每组9只。

5. 造模与给药 参照罗颂平教授团队构建的肾虚-黄体抑制病证结合大鼠模型^[14-16],并根据单位体质量动物与人等效剂量的换算方法计算给药剂量^[17]。除Control组,其余5组孕鼠自GD0.5至GD9.5,每日上午灌服羟基脲45 mg/mL,建立肾虚证候模型,至GD9.5上午加灌米非司酮0.4 mg/mL,建立黄体抑制流产模型。Progesterone组在模型构建的基础上,自GD0.5至GD9.5,每日下午灌服地屈孕酮0.31 mg/mL。按照60 kg标准体质量人每日服用减味寿胎丸40 g生药,将临床人用剂量设置为JSP-L,并分别按照2、4倍设置JSP-M及JSP-H,在模型的基础上每日下午分别灌胃JSP 82.23、164.46、328.92 mg/mL。Control组每日上午、下午以及Model组下午分别按10 mL/kg灌胃0.5%CMC-Na溶液。

6. 麻醉与取材 米非司酮给药24 h后,即

GD10.5进行取材。异氟烷吸入诱导麻醉后取仰卧位,碘伏消毒腹部术野皮肤,取下腹部正中线进腹腔,充分暴露子宫、卵巢,于宫颈部位分离,取出子宫及卵巢,术毕,颈椎脱臼法处死动物。沿子宫纵轴剖开,将胚胎、胎盘剥离,分为3份,其中2份放置于冻存管中,于-80 ℃保存;另1份放置于组织包埋盒,于4%多聚甲醛中固定。另取双侧卵巢至组织包埋盒,于4%多聚甲醛中固定。

7. 记录大鼠一般情况及妊娠情况 每天观察大鼠的精神、形态、毛色、饮食、二便等,每3天称量体质量。拍照记录子宫及胚胎,称量子宫、胚胎湿重,记录总胎数、活胎数、流产胎数,计算流产率。正常妊娠子宫及流产子宫判定标准:①正常妊娠子宫:正常子宫粗大如串珠状,呈粉红色或淡红色,解剖后胚胎完好,着床部位及胚胎表面无瘀血点;②部分流产子宫:宫腔内见瘀血点,胚胎不完整;③完全流产子宫:大鼠子宫形态呈竹节样改变,宫腔内明显瘀血点击胚胎颜色发白,无血色;或仅见到胚胎着床点,未见胚胎;或胚胎呈黑褐色并见到阴道出血症状。流产率计算:流产率(%)=(流产胚胎数/(流产胚胎数+正常胚胎数))×100%。体视镜观察各组胚胎的形态及血管丰富度,游标卡尺测量所有胚胎直径(胚胎编号按照右侧子宫末端至左侧子宫末端顺序)。

8. 小动物彩色多普勒超声检测各组孕鼠子宫动脉血流阻力 异氟烷诱导麻醉后,将光声探头沿腹部正中线向两侧进行平扫,注意避开肠道的伪影干扰,调整Focus Depth(调焦点深度)将焦点调至10~11 mm, B模式下寻找最佳的胎盘切面,切换至Color模式寻找最佳的子宫动脉血流切面,将探测线与血流方向平行,随后切换至PW模式探测血流并进行记录。每组分别取3只孕鼠进行检测,每只孕鼠分别测量5个子宫动脉搏动周期的动脉期最大血流速度(peak systolic velocity, PSV)、舒张末期血流速度(end diastolic velocity, EDV)及平均血流速度(mean velocity, MnV),并根据公式计算:搏动指数(pulsatility index, PI)及阻力指数(resistance index, RI)。RI=(PSV-EDV)/PSV; PI=(PSV-EDV)/MnV; MnV=(PSV+EDV)/2。

9. 小动物光声成像检测各组孕鼠胎盘血氧饱和度 麻醉、备皮及B模式探测操作同“8.”项,寻找最佳的胎盘切面后切换至PA光声模式,选OxyHemo模式观察记录目标区域的血氧饱和度,每组取3只孕鼠,每只选取3个切面观察清晰且无伪影干扰的胎盘进行检测。

10. 苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)

观察组织形态 解剖胎盘及卵巢, 用4%多聚甲醛溶液固定, 经脱水、包埋、切片等处理后行常规HE染色, 于显微镜下观察妊娠卵巢黄体数目、黄体血管及胎盘血管丰富度。

11. IHC检测Piezo1及血管生成相关蛋白分布与表达 将TO透明剂脱蜡和梯度乙醇水化后的石蜡切片浸于抗原修复液中, 高温修复9 min, 冷却至室温后滴加适量3%过氧化氢, 室温静置8 min, 磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗3次, 加稀释后一抗: Piezo1 (1:250), VEGFR2 (1:80), VEGFR1 (1:250), VEGFA (1:250), 4 °C孵育过夜。PBS漂洗3次后, 滴加增强酶标记山羊抗兔IgG聚合物, 37 °C孵育30 min, PBS漂洗后, DAB显色, 苏木素复染, 脱水、透明、中性树胶封片, 显微镜下观察拍照。采用Image J软件读取图片的阳性蛋白面积。

12. Western Blot检测Piezo1及血管生成相关蛋白分布与表达 剪取各组孕鼠胎盘组织, 提取蛋白后BCA法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离蛋白后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 快速封闭液封闭。一抗Piezo1 (1:1 000), VEGFR2 (1:1 000), VEGFR1 (1:1 000), VEGFA (1:1 000), 4 °C孵育过夜。辣根酶标记山羊抗兔IgG (H+L) (1:5 000)室温孵育1 h, ECL显影后拍照, 以GAPDH作为内参蛋白(1:10 000)。采用Image J计算相对光密度值。

13. 统计学方法 采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析, 正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐时采用非参数检验。孕鼠体质量为重复测量资料, 采用两因素重复测量资料的方差分析方法分析, 两两比较采用Bonferroni检验。若因变量的方差协方差矩阵服从球形分布, 以球形度检验判读结果; 若不服从球形分布, 以Greenhouse-Geisser方法校正 ϵ 判读参数检验结果。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 各组孕鼠各时间点体质量情况($\bar{x} \pm s$, $n=9$, g)

组别	GD0.5	GD3.5	GD6.5	GD9.5
Control组	298.00±20.71	316.78±20.34	337.33±20.27 ^{△△}	355.44±22.83 ^{△△△}
Model组	288.33±24.82	294.11±23.38	299.67±23.70 [*]	311.22±34.14 [†]
Progesterone组	281.11±27.01	289.00±22.38	293.78±26.47 [*]	298.56±25.76 ^{**}
JSP-L组	291.33±24.80	300.89±24.80 [△]	294.33±24.09	306.67±34.82
JSP-M组	290.78±30.78	303.33±26.88 [△]	298.66±29.21	309.89±33.05 [△]
JSP-H组	292.11±20.76	297.33±23.55	297.89±27.98	300.44±24.96 ^{**}

注: 与Control组同期比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与本组GD0.5比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$, ^{△△△} $P<0.001$ 。

结果

1. 一般情况 见表1。与Control组孕鼠比较, Model组孕鼠于造模后出现纳食减少、活动减弱、反应迟钝、毛色晦暗、消瘦等症状, JSP各组孕鼠饮食、活动及毛色未见异常。各组孕鼠体质量与测量不同时点存在交互效应($F=3.709$, $P<0.001$), 需单独分析时间及组别的独立效应。GD6.5及GD9.5 Model组孕鼠体质量较Control组孕鼠体质量显著下降($P<0.05$)。GD6.5及GD9.5分别与GD0.5比较, Control组孕鼠体质量随妊娠时间增加而增加($P<0.01$); JSP-L及JSP-M组孕鼠GD3.5体质量分别较GD0.5体质量增加($P<0.05$)。

2. JSP改善流产孕鼠妊娠情况 见图1-图2。Control组妊娠子宫及胚胎饱满, 表面无瘀血点, 胚胎表面血管丰富。与Control组比较, Model组妊娠子宫呈竹节样改变, 宫腔及胚胎着床点可见瘀血点, 胚胎

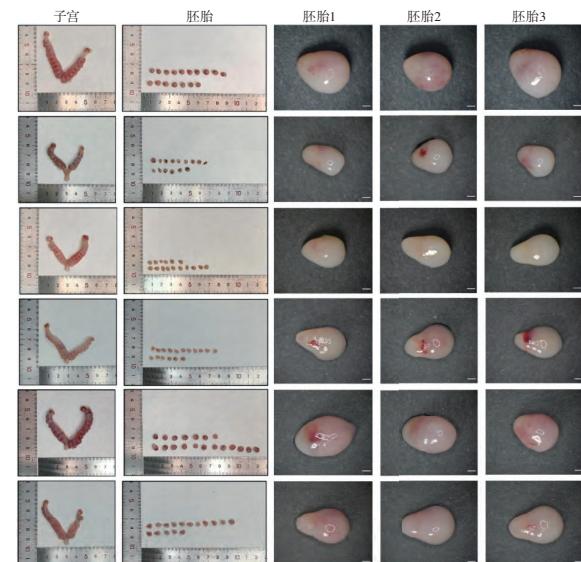
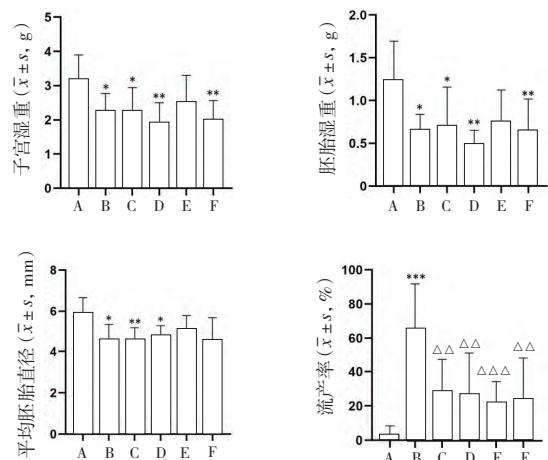


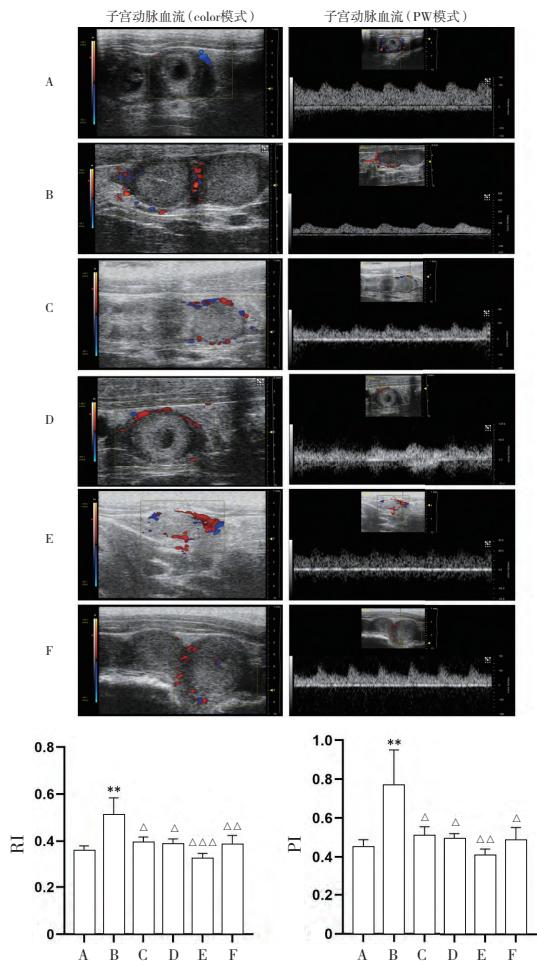
图1 各组孕鼠妊娠子宫及胚胎大体观察
(体视镜比例尺: 0.1 cm)

注: A. Control组; B. Model组; C. Progesterone组; D. JSP-L组; E. JSP-M组; F. JSP-H组。下图同。

苍白或呈黑褐色, 子宫及胚胎湿重降低 ($P<0.05$), 胚胎直径缩小 ($P<0.01$), 流产率升高至65.73% ($P<0.01$); 与Model组比较, Progesterone组及JSP各剂量组妊娠子宫较为饱满, 宫腔及胚胎表面瘀血点减少, 流产率显著降低 ($P<0.01$)。

图2 各组孕鼠妊娠情况 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

注: 与Control组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与Model组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$, $\triangle\triangle\triangle P<0.001$ 。下图同。

图3 小动物多普勒超声分析各组孕鼠子宫动脉血流阻力差异 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3. JSP降低流产大鼠子宫动脉血流阻力 见图3。与Control组比较, Model组孕鼠子宫动脉血流RI及PI显著升高 ($P<0.01$); 与Model组比较, Progesterone组及JSP各剂量组孕鼠子宫动脉血流RI及PI显著下降 ($P<0.05$)。

4. JSP改善流产大鼠胎盘血氧饱和度 见图4。与Control组比较, Model组孕鼠胎盘血氧饱和度下降 ($P<0.05$); 与Model组比较, JSP-L及JSP-M组孕鼠胎盘血氧饱和度升高 ($P<0.01$)。

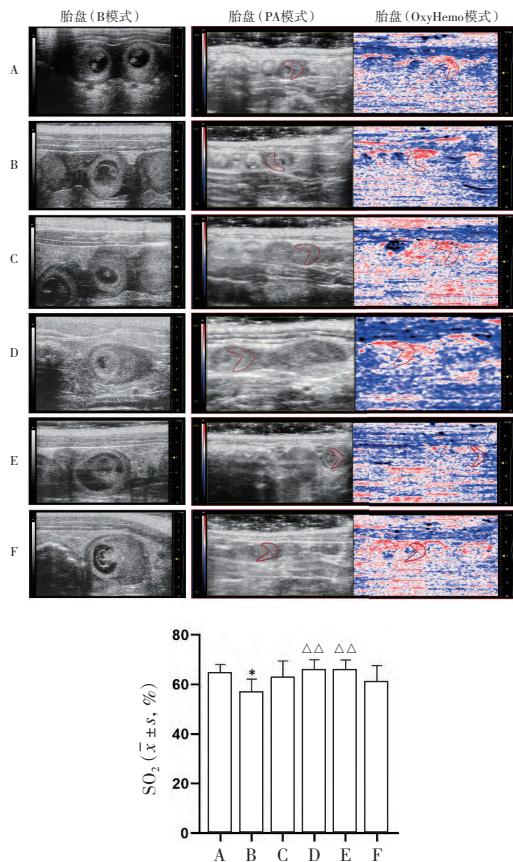


图4 小动物光声成像分析各组孕鼠胎盘血氧饱和度差异 (n=3)

注: 红色区域标注胎盘。

5. JSP提高流产孕鼠卵巢黄体数目、黄体血管及胎盘血管丰富度 见图5。与Control组比较, Model组妊娠黄体数目下降, 妊娠黄体及胎盘的血管密度显著不足。与Model组比较, Progesterone及JSP各剂量组妊娠黄体数目升高, 妊娠黄体及胎盘的血管丰富度增加。

6. JSP提高流产孕鼠胎盘Piezo1、VEGFA及VEGFR2分布与表达 见图6。与Control组比较, Model组Piezo1及VEGFA阳性面积下降 ($P<0.001$), VEGFR1及VEGFR2阳性面积显著升高 ($P<0.001$)。与Model组比较, JSP各剂量组Piezo1及VEGFA的表达显著升高 ($P<0.001$)。

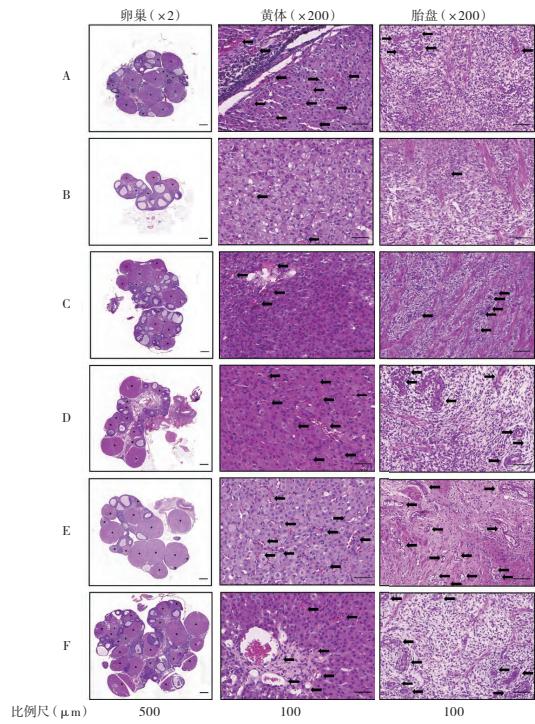


图5 HE染色分析各组孕鼠卵巢黄体血管及胎盘血管重铸情况($n=3$)

注：“*”标注黄体；“→”标注血管。

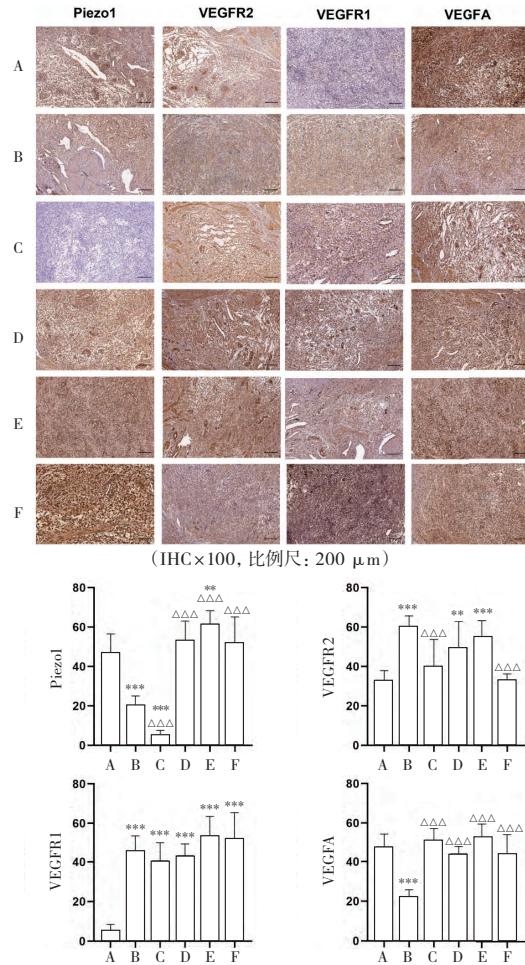


图6 IHC检测各组孕鼠胎盘Piezo1及血管生成相关分子的表达差异($\bar{x} \pm s, n=3$, %)

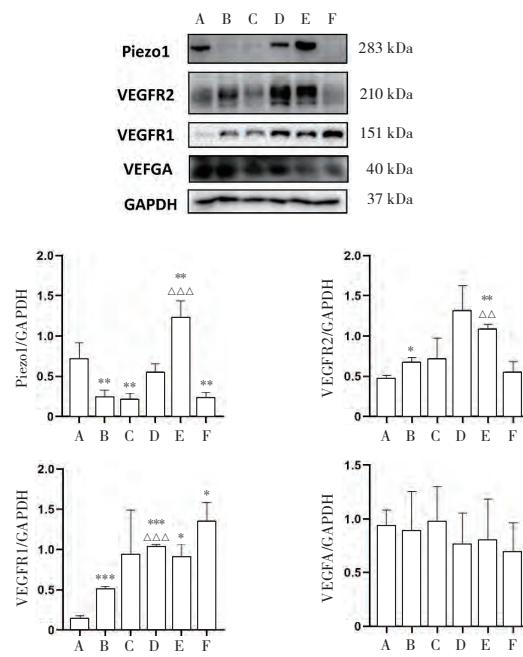


图7 Western Blot检测各组孕鼠胎盘Piezo1及血管生成相关分子的表达差异($\bar{x} \pm s, n=3$)

见图7。与Control组比较, Model组Piezo1表达显著下降($P<0.01$), VEGFR2及VEGFR1表达显著升高($P<0.05$)。与Model组比较, JSP-M组Piezo1及VEGFR2表达升高($P<0.01$), JSP-L组VEGFR1表达显著升高($P<0.001$)。

讨论

SA为常见的女性生殖障碍,且该病有反复发生的倾向,属于临床疑难病。目前,尚缺乏血流动力学因素与SA发病的相关研究,而针对该病因尚未形成统一且有效的治疗方案。

中医药在防治SA中具有显著优势。中医理论认为“肾主生殖”,《景岳全书·妇人规·胎候》云:“母之肾脏系于胎,是母之真气,子之所赖也”,强调肾在妊娠中具有主导地位。肾为五脏之本,气血之根。《冯氏锦囊秘录》载:“气之根,肾中之真阳也;血之根,肾中之真阴也”。女子孕育胎儿有赖气血滋养,《济阴纲目·求子门》云:“阳精之施,阴血能摄之,精成其子,血成其胞,胎孕乃成”。气不足则不能载胎,血不足则不能养胎。《景岳全书·妇人规·数堕胎》曰:“凡妊娠之数见堕胎者,必以气脉亏损而然……凡胎孕不固,无非气血损伤之病,盖气虚则提摄不固,血虚则灌溉不周,所以多致小产”。临床研究提示反复自然流产患者子宫动脉血流阻力增加,内膜血流灌注量下降^[18]。本研究通过小动物超声检测表明肾虚-黄体抑制流产大鼠母胎界面血流阻力增加,结合组织形态学分析该模型母胎界面具有血管生成不足的病理特点,并创新性引入小动物光声成

像评估发现流产大鼠胎盘血氧饱和度下降,进一步研究证实自然流产的发病与母胎界面血流动力学异常相关。中医理论认为气血相互依存,气为血之帅,血为气之母,血能载气,气能生血。气虚则不能生血,同时,气虚亦不能行血,血液不能灌溉荣养胚胎,故致胎堕。因此,本研究所发现血流动力学异常所致SA的病理机制与肾气不足,气不生血,亦不行血,血不养胎所致堕胎、小产的中医病机有相通之处。

《景岳全书·妇人规·数堕胎》指出:“凡治堕胎者,必当察此养胎之源,而预培其损”。气血之源头在肾,肾气充盛,气血有源,则胎有所养。罗颂平教授团队前期围绕补肾安胎名方寿胎丸开展了系列药效学研究,并优化了药物组成配比,将寿胎丸化裁为减味寿胎丸^[19-20]。减味寿胎丸去滋腻碍胃之阿胶,方中菟丝子平补肾中阴阳,为君药,桑寄生固冲任,安胎元,续断补肾气,续血脉,二者共为臣药,相辅相成,助君药奏补肾安胎之效。临床研究初步探索发现补肾法能降低肾虚血瘀型复发性流产患者子宫血流阻力^[21]。本研究以机械敏感性阳离子通道Piezo1为切入点,该分子对血流应力变化敏感,并在血流剪切力增加时激活,调控血管的发育与生成^[9]。研究进一步阐明减味寿胎丸通过提高母胎界面Piezo1介导VEGFA表达,促进胎盘血管生成,降低子宫动脉血流阻力,改善胎盘血氧供应,继而发挥降低流产的药效作用机制。

综上,本研究以肾虚-黄体抑制病证结合流产模型为载体,创新地引入小动物超声及光声复合成像的检测方法,深入阐释补肾安胎法改善病证结合流产模型母胎界面血管生成的作用机制,进一步丰富了“肾主生殖”及“气血理论”的科学内涵。

参 考 文 献

- [1] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, 2012, 98(5):1103-1111
- [2] The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent Miscarriage (Green-top Guideline No.17). [2022-03-28]. <https://www.rcog.org.uk/guidance/browse-all-guidance/green-top-guidelines/the-investigation-and-treatment-of-couples-with-recurrent-miscarriage-green-top-guideline-no-17/>
- [3] Reijnders I F, Mulders A, Koster M, et al. First-trimester maternal haemodynamic adaptation to pregnancy and placental,embryonic and fetal development: The prospective observational Rotterdam Periconception cohort. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2022, 129:785-795
- [4] Morley L C, Debant M, Walker J J, et al. Placental blood flow sensing and regulation in fetal growth restriction. *Placenta*, 2021, 113:23-28
- [5] James J L, Saghan R, Perwick R, et al. Trophoblast plugs: Impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Human Reproduction*, 2018, 33(8):1430-1441
- [6] Mandala M, Osol G. Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012, 110(1):12-18
- [7] Xie B Z, Wu H W, Li J, et al. Mechanical forces on trophoblast motility and its potential role in spiral artery remodeling during pregnancy. *Placenta*, 2022, 123:46-53
- [8] 谢宝珍, 鄒洁, 曾丽华, 等. 中医妇科病证结合流产动物模型的研究思路. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2):589-594
- [9] Li J, Hou B, Tumova S, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*, 2014, 515(7526):279-308
- [10] Baratchi S, Zaldivia Maria T K, Wallert M, et al. Transcatheter aortic valve implantation represents an anti-inflammatory therapy via reduction of shear stress-induced Piezo-1-mediated Monocyte Activation. *Circulation*, 2020, 142(11):1092-1105
- [11] Aykut B, Chen R, Kim J I, et al. Targeting Piezo1 unleashes innate immunity against cancer and infectious disease. *Science Immunology*, 2020, 5(50):eabb5168
- [12] Swain S M, Romac J M J, Shahid R A, et al. TRPV4 channel opening mediates pressure-induced pancreatitis initiated by Piezo1 activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2020, 130(5): 2527-2541
- [13] Friedrich E E, Hong Z G, Xiong S Q, et al. Endothelial cell Piezo1 mediates pressure-induced lung vascular hyperpermeability via disruption of adherens junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(26):12980-12985
- [14] 宁艳, 罗颂平, 梁国珍. 补肾健脾中药复方对肾虚黄体抑制妊娠大鼠流产模型的实验研究. *中国医药学报*, 2000, 15(6): 28-30, 82
- [15] 罗颂平, 梁国珍, 张玉珍, 等. 助孕3号方防治大鼠自然流产的机理研究. *中国中西医结合杂志*, 2003, 33(7):522-525
- [16] 鄒洁, 巫海旺, 杜鑫, 等. 正交设计法研究羟基脲和米非司酮的优选配比制作大鼠流产模型. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(16):114-118
- [17] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072
- [18] Habara T, Nakatsuka M, Konishi H, et al. Elevated blood flow resistance in uterine arteries of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction* (Oxford, England), 2002, 17(1):190-194
- [19] 鄒洁, 罗颂平. 不同提取方法提取寿胎丸对流产孕鼠模型妊娠结局的影响. *北方药学*, 2011, 8(4):37-39
- [20] 鄒洁, 罗颂平. 寿胎丸不同提取部位对肾虚流产模型孕鼠补肾安胎的药效学筛选. *中药材*, 2011, 34(8):1251-1255
- [21] 孙丽, 郑晶, 刘芦屏, 等. 中药分期治疗复发性流产的疗效观察及对子宫血流动力学的影响. *四川中医*, 2016, 34(9):132-134

(收稿日期: 2022年11月28日)