

· 论著 ·

基于m⁶A甲基化修饰探讨减味寿胎丸对自然流产滋养细胞黏附功能的影响

曾丽华^{1,2}, 周月希^{1,2}, 赖裕玲^{1,2}, 谢宝珍^{1,2}, 郜洁^{2,3}, 罗颂平^{2,3}¹广州中医药大学, 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: 探讨自然流产的发生与m⁶A甲基化修饰的相关性及减味寿胎丸对滋养细胞m⁶A甲基化修饰的影响。方法: 临床研究收集自然流产患者(SA组)及正常妊娠女性(NP组)绒毛组织(各15例), 细胞实验以米非司酮诱导损伤的HTR-8/SVneo滋养细胞为流产细胞模型, 分为对照组、模型组、减味寿胎丸组及孕酮组, 药物或基础培养基干预24 h。m⁶A甲基化定量试剂盒检测m⁶A整体水平, Western Blot法检测METTL3、WTAP、YTHDF2、ALKBH5及FN1蛋白的表达, qRT-PCR检测FN1 mRNA的表达, 划痕实验检测各组细胞迁移能力, Transwell实验检测各组细胞侵袭能力。结果: 临床研究: 与NP组比较, SA组绒毛组织中m⁶A整体水平降低($P<0.01$), ALKBH5表达显著升高($P<0.01$), FN1表达显著降低($P<0.01$, $P<0.05$)。细胞实验: 与对照组比较, 模型组滋养细胞METTL3、WTAP及FN1表达显著降低($P<0.01$, $P<0.05$), ALKBH5表达显著升高($P<0.05$), 细胞迁移能力和侵袭能力显著下降($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 减味寿胎丸组METTL3、WTAP、YTHDF2及FN1表达显著升高($P<0.01$, $P<0.05$), ALKBH5表达降低($P<0.01$), 细胞迁移能力和侵袭能力显著增强($P<0.01$, $P<0.05$)。结论: 自然流产的发生与滋养细胞m⁶A甲基化修饰缺陷相关, 减味寿胎丸治疗自然流产可能与上调滋养细胞中FN1的m⁶A甲基化修饰, 促进滋养细胞黏附功能相关。

关键词: N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A甲基化); 纤维连接蛋白; 自然流产; 滋养细胞; 补肾法; 减味寿胎丸; 肾主生殖

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81873336, No.82174424), 广东省重点领域研发计划“岭南中医药现代化”重点专项(No.2020B1111100003)

Effects of Jianwei Shoutai Pills on the adhesion function of trophoblast in spontaneous abortion based on m⁶A methylation

ZENG Li-hua^{1,2}, ZHOU Yue-xi^{1,2}, LAI Yu-ling^{1,2}, XIE Bao-zhen^{1,2}, GAO Jie^{2,3}, LUO Song-ping^{2,3}¹Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ²Lingnan Medical Research Center ofGuangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ³The First Affiliated Hospital of

Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective: To study the correlation between the occurrence of spontaneous abortion and m⁶A methylation, as well as the effects of Jianwei Shoutai Pills on the m⁶A modification in trophoblasts. Methods: Clinical villus originated from spontaneous abortion (SA) women (SA group) and normal pregnant women (NP group) were collected, 15 in each one. Trophoblast cell string, HTR-8/SVneo, induced by mifepristone was used as cell model of SA *in vitro*, which was divided into control group, model group, Jianwei Shoutai Pills group and progesterone group. And cells were treated with culture medium with

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: 020-36588217

E-mail: songpinglu@hotmail.com

or without medicine for 24 h. The total m⁶A level was measured by quantified m⁶A methylation kits. The expression of METTL3, WTAP, YTHDF2, ALKBH5 and FN1 were measured by Western blot, and the expression of FN1 mRNA was measured by qRT-PCR. The experiments of wound-healing and Transwell were used to assess the function of cell migration and invasion. Results: Clinical research: the total m⁶A level in the SA group was lower than that in the NP group ($P<0.01$), with the increased expression of ALKBH5 ($P<0.01$) and decreased expression of FN1 ($P<0.01, P<0.05$). Cell experiment: the expression of METTL3, WTAP and FN1 were lower in the model group than those in the control group ($P<0.01, P<0.05$), with increased expression of ALKBH5 ($P<0.05$) and declined functions of cell migration and invasion ($P<0.01, P<0.05$). And the expression of METTL3, WTAP, YTHDF2 and FN1 were higher in the Jianwei Shoutai Pills group than those in the model group ($P<0.01, P<0.05$), with decreased expression of ALKBH5 ($P<0.01$) and enhanced functions of cell migration and invasion ($P<0.01, P<0.05$). Conclusion: The occurrence of SA is associated with m⁶A modification deficiency, and the mechanism of Jianwei Shoutai Pills on SA may be relevant to up-regulating the m⁶A modification of FN1 and promoting the function of cell adhesion.

Key words: m⁶A modification; Fibronectin; Spontaneous abortion; Trophoblast; Therapy of kidney-tonifying; Jianwei Shoutai Pills; Kidney governs the reproduction

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81873336, No.82174424), Key Project of ‘Modernization of Traditional Chinese Medicine in Lingnan’ of Major Research and Development Program of Guangdong Province (No.2020B1111100003)

自然流产是指妊娠28周以前发生胚胎或胎儿丢失,是常见的妊娠并发症,并具有易于反复发作的特点^[1],严重损害了女性的生殖健康。由于自然流产病因复杂,发病机制尚未完全阐明,目前临床治疗仍以病因治疗为主,且尚无公认的特效药。

在中医“肾主生殖”的理论指导下,中医妇科名家罗元恺教授首创的“补肾固冲丸”(后更名为滋肾育胎丸)和罗颂平教授首创的“助孕丸”在临床调经、助孕、安胎中疗效显著^[2-3]。在此基础上,团队进一步筛选出补肾安胎有效组分菟丝子、桑寄生和续断(减味寿胎丸)^[4],并证实其能有效改善自然流产小鼠流产率^[5-6],但其作用机制尚未完全阐明。

表观遗传修饰参与胚胎植入及胎盘发育过程^[7],N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m⁶A)甲基化是哺乳动物体内常见的RNA修饰^[8]。前期研究^[9]表明,自然流产与复发性流产的绒毛组织中存在m⁶A甲基化修饰缺陷,其中,纤维连接蛋白(fibronectin, FN1)是m⁶A差异修饰的靶点之一。FN1是一类大分子糖蛋白,具有介导滋养细胞黏附、迁移、分化,抑制凋亡等功能,对维持妊娠具有重要作用^[10]。本研究拟在临床验证的基础上,深入探讨减味寿胎丸对滋养细胞m⁶A甲基化修饰的影响及功能的调控作用,深化“肾主生殖”的科学内涵。

材料与方法

1. 资料来源 经广州中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(No.K【2019】098),依托中医药防治复发性流产的临床医学研究与转化中心,选取2021年1月至6月广州中医药大学第一附属医院收治的15例自然流产患者为研究组(SA组),同期选取15名非计划正常妊娠女性为对照组(NP组)。于清宫术或

人流术中收集负压吸引出的两组受试者绒毛组织。两组一般情况见表1。两组受试者的年龄、孕周、妊娠次数、舌质和苔质情况无显著性差异;与NP组比较,SA组的生产次数显著降低、自然流产次数显著增加($P<0.05, P<0.01$)。且两组脉象具有显著性差异($P<0.05$),NP组的脉象以滑脉为主,SA组的脉象以沉脉为主。

表1 受试者一般情况

项目	NP组(15名)	SA组(15例)	P值
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	28.33±3.29	30.87±4.36	0.083
孕周($\bar{x} \pm s$, 周)	6.27±0.46	6.33±0.82	0.751
妊娠次数[M(Q25, Q75)]	3(2, 4)	3(2, 4)	0.700
生产次数[M(Q25, Q75)]	2(1, 2)	1(0, 1)	0.030
自然流产次数[M(Q25, Q75)]	0(0, 0)	0(0, 1)	0.007
舌质[例(%)]			
红舌	2(13.33)	1(6.67)	0.298
淡红舌	8(53.33)	12(80.00)	
淡暗舌	5(33.33)	2(13.33)	
舌苔[例(%)]			
薄白苔	11(73.33)	13(86.67)	0.659
薄黄苔	2(13.33)	1(6.67)	
黄腻苔	2(13.33)	1(6.67)	
脉象[例(%)]			
滑脉	10(66.67)	2(13.33)	0.014
数脉	1(6.67)	1(6.67)	
沉脉	2(13.33)	10(66.67)	
细脉	2(13.33)	2(13.33)	

2. SA组诊断标准 ①停经史;②或伴有阴道流血、下腹痛、腰酸;③血hCG阳性,或尿妊娠试验阳性或弱阳性;④B超诊断胚胎停止发育,胚胎大小与孕周不相符。

3. 纳入与排除标准

3.1 SA组纳入标准 ①年龄18~40岁;②无明显诱因发生自然流产要求行清宫术;③孕6~8周;④患者及家属同意并签署知情同意书。

3.2 NP组纳入标准 ①年龄18~40岁;②无生育意愿要求行人流术;③孕6~8周;④患者及家属同意并签署知情同意书。

3.3 排除标准 ①近3个月使用影响胚胎发育的药物者;②合并高血压病、肾病、糖尿病等疾病者;③合并精神疾患无法配合者;④未能签署知情同意书者。

4. 药物 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(得膏率20%)并干燥。米非司酮(美国Sigma,批号:101920511)。孕酮(英国Tocris,批号:2A/214156)。

5. 试剂与仪器 m^6A 甲基化定量试剂盒(美国Abcam,批号:GR3266207-1);甲基转移酶3/14(methyltransferase-like 3/14, METTL3)、肾母细胞瘤1相关蛋白(Wilms tumor 1-associating protein, WTAP)、AlkB同系物5(AlkB Homolog 5, ALKBH5)、FN1、山羊抗兔IgG和山羊抗小鼠IgG H&L抗体(武汉Proteintech,批号:10015303、10015909、10019338、10016772、20000199、20000191);含YTH结构域家族1-2(YTH domain family 1-2)(美国Abcam,批号:GR3279782);GAPDH(美国CST,批号:14);RT-qPCR引物合成(上海生工)。Transwell小室(美国Corning,批号:0069002)。Multiskan GO型全波长酶标仪(美国赛默飞公司)。Power PacTM通用蛋白电泳仪、电转仪、T100TM Thermal Cycler逆转录合成仪、CFX96TM Real-time System荧光定量PCR仪(美国Bio-rad公司)。IX71显微镜(日本Olympus)。

6. 人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/Svneo)的培养 HTR-8/SVneo滋养细胞系购自美国ATCC(批号:64275781),经复苏后,加入含10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的RPMI-1640培养基,在37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养。当细胞贴壁生长至90%时,弃去培养液,加入0.25%胰酶消化1 min,加入完全培养基终止消化,1 000 r/min(离心半径10 cm)离心5 min,加入培养基重悬后接种于6孔板(1×10⁵/孔接种)完成后续实验。

7. 细胞实验分组及自然流产模型的建立 取对数生长期的HTR-8/SVneo细胞,分为对照组、模型组、减味寿胎丸组和孕酮组。除对照组外,另3组均采用50 nmol/L米非司酮干预6 h。米非司酮干预结束后,对照组与模型组予以RPMI-1640培养基培养,减味寿胎丸组予以100 μg/mL减味寿胎丸干预24 h,孕酮组予以50 nmol/mL孕酮干预24 h。

8. m^6A 整体水平检测 提取绒毛组织总RNA,将200 ng的RNA滴加在分析孔上。将捕获抗体溶液和检测抗体溶液以合适的稀释浓度分别添加到检测孔中。于450 nm波长处检测吸光度值,根据标准曲线进行计算 m^6A 整体水平。

9. Western Blot检测 m^6A 相关酶及靶蛋白的表达 提取绒毛组织及细胞总蛋白,变性后行SDS-PAGE凝胶电泳及电转,5%牛奶封闭,一抗4℃下过夜孵育,洗膜3次后二抗于常温孵育1 h, ECL显影后拍照, Image J计算光密度值。

10. qRT-PCR检测FN1 mRNA的表达 Trizol法提取绒毛组织及细胞总RNA,以42℃ 60 min、70℃ 5 min逆转录,qPCR扩增条件:50℃ 2 min、95℃ 2 min,重复40个循环:95℃ 3 s、60℃ 30 s、60℃ 1 min、95℃ 15 s。引物设计见表2,采用2^{-ΔΔCt}法进行结果分析。

表2 引物序列表

名称	序列(5'→3')	长度(bp)
FN1	F: TGG TAT TCA GCT TCC TGG CA	136
	R: CGG GTA TGG TCT TGG CCT AT	
GAPDH	F: GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT	197
	R: GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG	

11. 划痕实验检测滋养细胞迁移功能 药物干预结束后吸弃培养基,PBS润洗,用200 μL枪头在孔板内划线,PBS润洗后改用含2%胎牛血清的培养基培养,光学显微镜下观察0 h和24 h划痕区域的照片, Image J统计分析划痕区域面积。

12. Transwell实验检测滋养细胞侵袭功能 提前4 h在Transwell小室上室中加入Matrigel(Matrigel:RPMI-1640=1:8稀释),置于37℃凝胶。药物干预结束后吸弃培养基,0.25%胰酶消化1 min,1 000 r/min(离心半径10 cm)离心5 min,2%胎牛血清的培养基重悬后以1×10⁴种于小室上室,下室加入含20%胎牛血清的培养基,37℃培养箱中培养48 h,4%多聚甲醛固定20 min,甲醇透化5 min,结晶紫染

色20 min, 光学显微镜下拍照, Image J计数侵袭细胞数。

13. 统计学方法 采用SPSS 26.0进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以M(Q25, Q75)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐时采用秩和检验, 计量资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1. 临床绒毛组织中m⁶A甲基化水平比较 见图1。与NP组绒毛组织比较, SA绒毛组织中m⁶A整体水平显著降低($P < 0.01$)。进一步检测m⁶A相关酶的表达发现, 两组METTL3的表达无显著性差异; 与NP组比较, SA组绒毛组织WTAP及YTHDF2的表达呈下降趋势, ALKBH5的表达显著升高($P < 0.01$)。

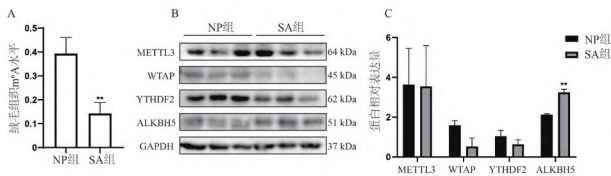


图1 临床绒毛组织中m⁶A甲基化水平

注: A. m⁶A整体水平($\bar{x} \pm s, n=15$); B. m⁶A相关酶蛋白表达条带; C. m⁶A相关酶蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)。与NP组比较, ** $P < 0.01$ 。

2. 临床绒毛组织中FN1表达水平比较 见图2。与NP组比较, SA组绒毛组织中FN1 mRNA及蛋白表达量均显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

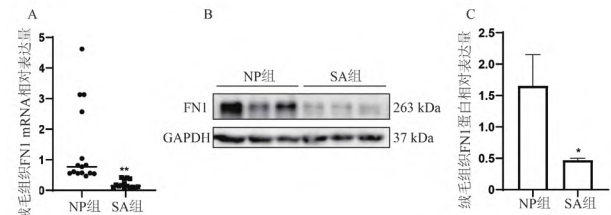


图2 临床绒毛组织中FN1表达情况

注: A. FN1 mRNA表达($\bar{x} \pm s, n=15$); B. FN1蛋白表达条带。C. FN1蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)。与NP组比较, * $P < 0.05, **P < 0.01$ 。

3. 减味寿胎丸对HTR-8/SVneo细胞m⁶A甲基化修饰的影响 见图3。与对照组比较, 模型组滋养细胞中METTL3及WTAP的表达显著降低($P < 0.01$), ALKBH5的表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 减味寿胎丸组和孕酮组METTL3与WTAP的表达均显著升高($P < 0.01, P < 0.05$), 减味寿胎丸组YTHDF2表达显著升高($P < 0.05$), ALKBH5在减味寿胎丸组和孕酮组均显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

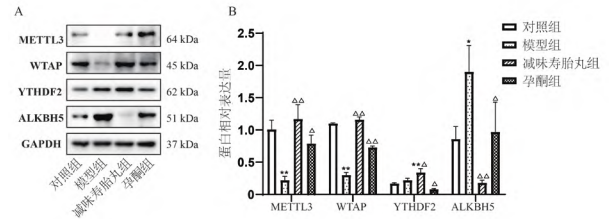


图3 各组HTR-8/SVneo细胞m⁶A相关酶表达比较

注: A. m⁶A相关酶蛋白表达条带; B. m⁶A相关酶蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ 。

4. 减味寿胎丸对HTR-8/SVneo细胞FN1表达的影响 见图4。与对照组比较, 模型组滋养细胞中FN1 mRNA及蛋白表达量均显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。与模型组比较, 减味寿胎丸组滋养细胞中FN1 mRNA与蛋白的表达量均显著升高($P < 0.01$), 孕酮组滋养细胞中FN1 mRNA相对表达量显著升高($P < 0.01$)。

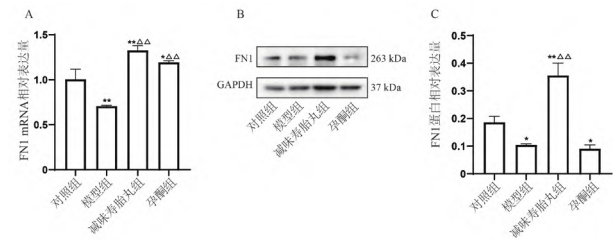


图4 各组HTR-8/SVneo细胞FN1表达比较

注: A. FN1 mRNA相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$); B. FN1蛋白表达条带; C. FN1蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)。与对照组比较, * $P < 0.05, **P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

5. 减味寿胎丸对HTR-8/SVneo细胞迁移能力的影响 见图5。与对照组比较, 模型组滋养细胞迁移率显著降低($P < 0.01$), 减味寿胎丸组迁移率显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 减味寿胎丸组和孕酮组迁移率均显著升高($P < 0.01$)。

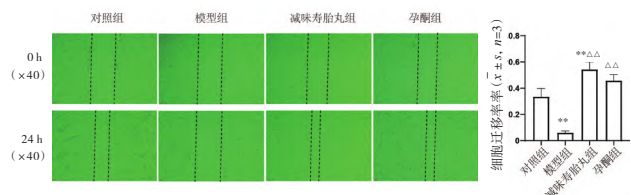


图5 各组HTR-8/SVneo细胞迁移功能比较

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

6. 减味寿胎丸对HTR-8/SVneo细胞侵袭能力的影响 见图6。与对照组比较, 模型组滋养细胞侵袭细胞数显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 减味寿胎丸组和孕酮组侵袭细胞数均显著升高($P < 0.05$)。

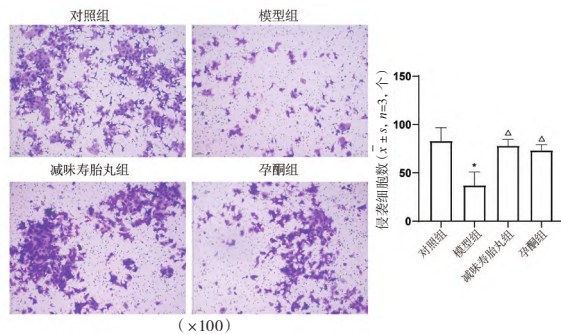


图6 各组HTR-8/Svneo细胞侵袭功能比较

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

讨论

基于“肾-天癸-冲任-子宫轴”理论,罗元恺教授认为肾虚冲任损伤、胎元不固是本病发生的基本病机^[11-12],故安胎首重补肾。减味寿胎丸由补肾固冲丸及助孕丸化裁而来,组方精炼,以菟丝子为君药,具有温阳益阴之功,肾旺自能萌胎;桑寄生、续断为臣药,桑寄生补血安胎,使胎气强壮;续断补肝肾、固冲任,以维系胚胎;三药相伍,使得肾气充盛,任通冲盛,胎元得以固摄。本课题组前期对减味寿胎丸的安胎作用机制研究发现,减味寿胎丸通过上调Notch/Akt/MAPK信号通路,能有效促进滋养细胞增殖、迁移和侵袭^[13];还能抑制滋养细胞凋亡^[14],以维持胚胎发育。此外,减味寿胎丸还能抑制流产模型大鼠蜕膜组织发生铁死亡^[15],上调自然流产小鼠蜕膜组织中FOXO3的表达促进子宫内膜蜕膜化^[6],调节小鼠母胎界面Th17/Treg细胞平衡维持母胎界面免疫微环境^[5],从而促进母体对胚胎的免疫耐受及营养供给。

米非司酮诱导的滋养细胞损伤模型是较为成熟的流产细胞模型,米非司酮属于孕激素受体拮抗剂,早期研究认为米非司酮对母胎界面的损伤机制主要是诱导蜕膜基质细胞凋亡,但近年来研究发现米非司酮能直接抑制滋养细胞增殖、迁移能力,其机制可能与干扰转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)等信号通路相关^[16]。本研究所采用的造模方法是在文献研究^[17]及本课题组前期实验^[18]的基础上摸索。经造模后,与对照组比较,模型组滋养细胞中m⁶A METTL3与WTAP表达显著降低($P<0.01$),ALKBH5表达显著升高($P<0.05$),提示米非司酮诱导的细胞损伤模型中m⁶A甲基化修饰缺陷,与临床组织验证中SA组绒毛组织中m⁶A整体水平降低具有一致性。细胞实验结果表明,减味寿胎丸干预能显著上调米非司酮诱导的细胞损伤模型中

m⁶A甲基转移酶METTL3、WTAP及YTHDF2的表达($P<0.01$, $P<0.05$),下调ALKBH5的表达($P<0.01$),从而增加滋养细胞中m⁶A整体水平。目前m⁶A甲基化修饰在妊娠维持中的研究较为有限,但在胚胎发育的研究中表明,m⁶A甲基化修饰缺陷可导致胚胎干细胞分化异常、神经发育异常^[19-20]。虽然尚无安胎中药与m⁶A甲基化修饰的相关报道,但较为有趣的是,王启阳等^[21]发现肾虚所致的胚胎损伤与m⁶A甲基化修饰缺陷相关。

m⁶A甲基化修饰是一种动态的表观遗传修饰,不仅影响mRNA的稳定性,还能影响mRNA的翻译潜能^[22]。临床组织验证中发现,SA组绒毛组织中m⁶A整体水平降低与ALKBH5表达升高密切相关,进一步检测其修饰的靶基因发现在绒毛组织及米非司酮诱导损伤的滋养细胞中FN1表达均下降,而减味寿胎丸干预能上调FN1的表达($P<0.01$),并且减味寿胎丸能显著改善米非司酮诱导损伤的滋养细胞迁移能力及侵袭能力($P<0.01$, $P<0.05$),考虑与上调FN1的表达相关。FN1属于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)糖蛋白家族,具有促进细胞黏附、侵袭、上皮-间充质转化及维持细胞形态等多种作用^[23]。滋养细胞的黏附功能不仅在胚胎植入前发挥着重要作用,也是植入后阶段滋养细胞发挥侵袭、迁移功能的重要启动前提^[24]。在早期妊娠阶段,滋养细胞黏附、侵袭、迁移功能下降,会进一步影响母胎间营养供给、免疫沟通、血管重铸等多个生理过程^[25-26]。既往文献研究中补肾中药对ECM的调控主要集中于母体蜕膜层面,且呈负向调控以促进滋养细胞侵袭、迁移^[27]。而本研究着眼于胚胎层面,发现补肾安胎中药能促进滋养细胞黏附功能,进而影响其迁移及侵袭能力。杨帆等^[28]发现补肾中药能抑制ECM的降解,促进组织修复。

综上所述,自然流产的发生与滋养细胞m⁶A甲基化修饰缺陷相关,减味寿胎丸通过上调滋养细胞中FN1的m⁶A甲基化修饰,促进滋养细胞黏附功能,使得胎有所系,揭示了“肾主生殖”的现代科学内涵。本研究首次从中医药调控m⁶A甲基化修饰的角度探讨了防治自然流产的机制,为中医药防治自然流产提供了新的证据支持。

参考文献

- [1] 谢幸.妇产科学.北京:人民卫生出版社,2007:47-51
- [2] Li L,Ning N,Wei J A,et al.Metabonomics study on the infertility treated with Zishen Yutai Pills combined with in vitro fertilization-

- embryo transfer. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 686133
- [3] 刘方. 助孕丸治疗早期先兆流产临床疗效的回顾性研究. 广州: 广州中医药大学, 2017
- [4] 郝洁. 寿胎丸的药物组成及其补肾安胎的药效学研究. 广州: 广州中医药大学, 2009
- [5] 郝晓丽, 王冬盈, 郝洁, 等. 寿胎丸减味方对肾虚自然流产模型小鼠IL-17的影响. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(2): 292-295
- [6] 周月希, 余庆英, 罗颂平, 等. 减味寿胎丸对自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织中FOXO3及PR蛋白表达的影响. *中医杂志*, 2021, 62(4): 335-340
- [7] Hemberger M, Hanna C W, Dean W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(1): 27-43
- [8] Li J, Tong Y, Wang Z, et al. A comprehensive multiomics analysis identified ubiquitin 4 as a promising prognostic biomarker of immune-related therapy in pan-cancer. *J Oncol*, 2021, 2021: 7404927
- [9] Li X C, Jin F, Wang B Y, et al. The m⁶A demethylase ALKBH5 controls trophoblast invasion at the maternal-fetal interface by regulating the stability of CYR61 mRNA. *Theranostics*, 2019, 9(13): 3853-3865
- [10] Ji J, Chen L, Zhuang Y, et al. Fibronectin 1 inhibits the apoptosis of human trophoblasts by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2020, 46(5): 1908-1922
- [11] 刘敏如. 罗元恺的女性生殖轴学说. *中国中医药报*, 2014-10-15(004)
- [12] 罗颂平, 张玉珍. 罗元恺妇科经验集. 上海: 上海科学技术出版社, 2005
- [13] Gao F, Zhou C, Qiu W, et al. Total flavonoids from Semen Cuscutae target MMP9 and promote invasion of EVT cells via Notch/AKT/ MAPK signaling pathways. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17342
- [14] 冯婷. 减味寿胎丸补肾安胎有效部位对RU486诱导滋养细胞损伤模型的影响. 广州: 广州中医药大学, 2014
- [15] 赖裕玲, 张莹轩, 曾丽华, 等. 减味寿胎丸对流产模型大鼠子宫蜕膜脂质过氧化及铁死亡蛋白表达的影响. *中医杂志*, 2021, 62(21): 1917-1922
- [16] 赵立美, 颜磊, 申晓畅, 等. 米非司酮、米索前列醇对滋养细胞TRIM22表达的影响. *山东大学学报(医学版)*, 2019, 57(10): 86-92
- [17] 孙颖. 米非司酮抑制滋养细胞和卵巢癌细胞系SKOV3的作用及共同机制的研究. 济南: 山东大学, 2010
- [18] 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. *广州中医药大学学报*, 2014, 31(4): 612-616
- [19] Wen J, Lv R, Ma H, et al. Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 2018, 69(6): 1028-1038
- [20] Li M, Zhao X, Wang W, et al. Ythdf2-mediated m⁶A mRNA clearance modulates neural development in mice. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 69
- [21] 王启阳, 潘明敏, 杨丽萍. 基于mRNA的m⁶A修饰角度探讨恐伤肾致胎损机制的可行性. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4): 2173-2178
- [22] Shi H, Wei J, He C. Where, when, and how: Context-dependent functions of RNA methylation writers, readers, and erasers. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640-650
- [23] Chen Z, Tao Q, Qiao B, et al. Silencing of LINC01116 suppresses the development of oral squamous cell carcinoma by up-regulating microRNA-136 to inhibit FN1. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6043-6059
- [24] Moreira-Soares M, Cunha S P, Bordin J R, et al. Adhesion modulates cell morphology and migration within dense fibrous networks. *J Phys Condens Matter*, 2020, 32(31): 314001
- [25] Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 75(3): 341-350
- [26] Jia N, Li J. Human uterine decidual NK cells in women with a history of early pregnancy enhance angiogenesis and trophoblast invasion. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6247526
- [27] 刘卓, 连方, 孙振高, 等. 补肾中药对肾阴虚型IVF-ET患者子宫内膜容受性的影响. *西部中医药*, 2020, 33(4): 30-33
- [28] 杨帆, 袁芳, 侯秀娟, 等. 补肾通络方对大鼠膝关节关节炎膝关节软骨细胞外基质代谢的影响. *吉林中医药*, 2018, 38(1): 67-71

(收稿日期: 2021年11月28日)