

# 寿胎丸通过调控 Nrf2 信号通路减轻人绒毛膜滋养层细胞的氧化损伤治疗复发性流产

申思楠, 牟珍妮, 唐丽, 雷磊\*

(湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 中西医结合学院, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:研究寿胎丸含药血清通过核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)信号通路对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)损伤的人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/Svneo)的保护作用,并阐明其可能的机制。方法:细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液(25、50、100、200、400 μmol·L<sup>-1</sup>)对HTR-8/Svneo增殖的抑制作用,CCK-8法筛选含药血清的最佳浓度。将细胞分为空白组、模型组、地屈孕酮组、寿胎丸组,CCK-8法检测含药血清对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HTR-8/Svneo细胞增殖活力的影响,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组细胞内活性氧(ROS)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测核Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶1(NQO1)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白表达;细胞免疫荧光检测Nrf2、Bcl-2的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测Nrf2、Caspase-3、Bcl-2相关X蛋白(Bax)mRNA的表达。结果:CCK-8法筛选H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>最佳造模浓度为50 μmol·L<sup>-1</sup>,含药血清的最佳体积分数为10%。与空白组比较,模型组细胞的增殖活力显著降低(P<0.01),细胞内ROS含量显著升高(P<0.01),Nrf2、HO-1、NQO1、Bcl-2蛋白表达明显下降(P<0.05, P<0.01),Caspase-3、Bax蛋白表达显著上升(P<0.01),Nrf2 mRNA表达显著降低(P<0.01),Caspase-3、Bax mRNA的表达明显升高(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,寿胎丸组细胞的增殖活力显著上升(P<0.01),细胞内ROS含量显著降低(P<0.01),Nrf2、HO-1、NQO1、Bcl-2蛋白表达明显上升(P<0.05, P<0.01),Caspase-3、Bax蛋白表达明显下降(P<0.05, P<0.01),Nrf2 mRNA表达明显升高(P<0.05),Caspase-3、Bax mRNA的表达明显降低(P<0.05, P<0.01)。结论:寿胎丸含药血清可以通过激活Nrf2信号通路来抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡,对人绒毛膜滋养层细胞具有一定的保护作用。

**[关键词]** 寿胎丸; 氧化应激; 凋亡; 人绒毛膜滋养层细胞; 核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)

**[中图分类号]** R2-0;R33;R289;R714.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0044-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20222240

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220920.0915.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-09-22 12:03:02

## Shoutaiwan Ameliorates Oxidative Damage of Human Chorionic Trophoblast Cells by Regulating Nrf2 Signaling Pathway to Treat Recurrent Abortion

SHEN Sinan, MU Zhenni, TANG Li, LEI Lei\*

(College of Integrated Chinese and Western Medicine, Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of Shoutaiwan-containing serum on the human chorionic trophoblast cells (HTR-8/Svneo) exposed to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway and to decipher the underlying mechanism. **Method:** The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions of 25, 50, 100, 200, 400 μmol·L<sup>-1</sup> were used to treated the HTR-8/Svneo cells. The cell counting kit-8

**[收稿日期]** 2022-07-02

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2021JJ30493);湖南省自然科学基金项目(2022JJ30445);湖南省中医药科研计划项目(2021007);中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH40);湖南中医药大学研究生创新课题(2021CX14)

**[第一作者]** 申思楠,在读硕士,从事中西医结合临床妇科内分泌研究,E-mail:948508424@qq.com

**[通信作者]** \*雷磊,教授,博士生导师,从事妊娠期病中医药防治研究工作,E-mail:leilei1398@163.com

(CCK-8) was employed to measure the proliferation of the cells and further determine the optimal concentration of  $H_2O_2$  solution for modeling and the drug-containing serum. The cells were divided into a blank group, a model group, a dydrogesterone group, and a Shoutaiwan group. The effect of drug-containing serum on  $H_2O_2$ -induced proliferation of HTR-8/Svneo cells was detected by CCK-8 assay. The intracellular reactive oxygen species (ROS) in each group was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was employed to determine the protein levels of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), cysteine-containing aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2). Cellular immunofluorescence was employed to detect the expression of Nrf2 and Bcl-2. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was carried out to examine the mRNA level of Nrf2, Caspase-3, and Bcl-2 associated X protein (Bax). **Result:** The optimal concentration of  $H_2O_2$  for modeling was  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the optimal concentration of drug-containing serum was 10%. Compared with the blank group, the modeling decreased the proliferation of cells ( $P<0.01$ ), increased the intracellular ROS ( $P<0.01$ ), down-regulated the protein levels of Nrf2, HO-1, NQO1, and Bcl-2 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), up-regulated the protein levels of Caspase-3 and Bax ( $P<0.01$ ), down-regulated the mRNA level of Nrf2 ( $P<0.01$ ), and up-regulated the mRNA levels of Caspase-3 and Bax ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, Shoutaiwan-containing serum increased the proliferation of cells ( $P<0.01$ ), reduced the intracellular ROS ( $P<0.01$ ), up-regulated the protein levels of Nrf2, HO-1, NQO1, and Bcl-2 ( $P<0.01$ ), down-regulated the protein levels of Caspase-3 and Bax ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), up-regulated the mRNA level of Nrf2 ( $P<0.05$ ), and down-regulated the mRNA levels of Caspase-3 and Bax ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Shoutaiwan-containing serum can inhibit  $H_2O_2$ -induced apoptosis by activating the Nrf2 signaling pathway and has protective effect on human chorionic trophoblast cells.

**[Keywords]** Shoutaiwan; oxidative stress; apoptosis; human chorionic trophoblast cells; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

复发性流产(RSA)是指与同一性伴侣,在妊娠28周之前,发生3次或以上的妊娠丢失<sup>[1]</sup>。RSA的病因复杂,除目前已知的染色体异常、解剖异常、内分泌代谢异常、自身免疫性疾病及感染等因素外,仍有高达50%以上的RSA无法明确其致病原因,称为原因不明复发性流产(URSA)<sup>[2-5]</sup>。氧化应激是机体氧化和抗氧化系统失去平衡产生的病理状态,其在复发性流产的病理生理中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。氧化应激可引起卵母细胞减数分裂停滞<sup>[7]</sup>、滋养细胞损伤<sup>[8]</sup>等,最终导致流产的发生。因此,缓解细胞氧化损伤和凋亡是防治RSA的重要策略。

寿胎丸出自清代名医张锡纯的《医学衷中参西录》,由菟丝子、续断、桑寄生、阿胶4味药物组成,具有补肾、固冲、安胎的作用,大量临床和实验研究均证实该方对防治RSA发挥着重要作用<sup>[9-11]</sup>。核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)介导的信号通路是机体抗氧化应激的重要信号通路。Nrf2可以驱动300多个抗氧化反应元件(ARE)来调控基因的转录,从而参与外源性解毒、氧化还原调节、蛋白质稳定等关键的细胞过程<sup>[12]</sup>。研究证明,Nrf2对妊娠早期机体发生的

氧化损伤具有保护作用,过表达其下游基因血红素加氧酶-1(HO-1)的表达可防止流产的发生<sup>[13]</sup>。过氧化氢( $H_2O_2$ )作为活性氧(ROS)诱导剂之一,常被用于诱导细胞氧化应激和死亡<sup>[14]</sup>。因此,本实验拟通过 $H_2O_2$ 诱导人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/Svneo)建立氧化损伤模型,探索寿胎丸的抗氧化作用及其可能机制,为其临床推广应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雌性SD大鼠24只,体质量( $220\pm 20$ )g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,大鼠合格证号SCXK(湘)2019-0004,在湖南中医药大学动物实验中心SPF级动物房饲养,饲养湿度( $50\pm 5$ )%,温度( $22\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,昼夜12 h/12 h间断照明,适应性喂养7 d后进行实验。实验已通过湖南中医药大学动物伦理委员会批准,伦理审批号为LL2020070104。

**1.2 细胞株** 人绒毛膜滋养层细胞HTR-8/Svneo细胞系由上海美湾生物科技有限公司提供,货号C1016,传至第3代用于后续实验。

**1.3 药物与试剂** 寿胎丸由菟丝子30 g、桑寄生

15 g、续断 15 g、阿胶 15 g 组成,饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科(货号均为 20200618),由湖南中医药大学第一附属医院药剂科主任戴冰教授进行筛选、鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》规定标准。根据课题组前期研究,采用水提醇沉法制备寿胎丸药液<sup>[15]</sup>,将菟丝子、续断、桑寄生经浸泡、煎煮、浓缩后加入乙醇,使醇含量达 65%,4 °C 冷藏 24 h 后将醇液滤过、回收至药液无醇味;将阿胶烊化后与药液混合,过滤沉淀;滤液冷藏静置,待无沉淀析出后,加蒸馏水调 pH6.5~7.0,浓缩成生药质量浓度为 2 g·mL<sup>-1</sup>,分装后保存备用。地屈孕酮片(荷兰 Abbott Biologicals B.V. 公司,批号 H20170221);过氧化氢溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号 323381);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号 C0039);活性氧(ROS)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 JL13783);兔 Nr2f2 抗体、HO-1 抗体、醌氧化还原酶 1(NQO1)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗、HRP 标记羊抗鼠二抗、羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)Fluor594 荧光二抗(美国 Affinity 公司,货号分别为 AF0639、AF5393、DF6437、AF7021、S0001、S0002、S0006);胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(上海艾比玛特医药科技有限公司,货号分别为 M005851、T40056、T40051);超纯总 RNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号 5003050);cDNA 反转录试剂盒、SYBR 染料(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,批号分别为 E047、E096)。

**1.4 仪器** SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),Gel Doc XR+凝胶成像系统、T100™ Thermal Cycler 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、Cytation3 型全自动细胞成像多功能检测系统(美国 Bio-Rad 公司),Axio Vert. A1 型倒置式材料金相显微镜(德国 Zeiss 公司),Tissue FAXS 全景组织细胞定量分析系统(奥地利 Tissue Gnostics 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 24 只 SD 大鼠随机分为 3 组,即空白组、地屈孕酮组、寿胎丸组,适应性喂养 7 d 后予以灌胃。以人的临床用量计算,按人与动物体表面积换算及稀释倍数计算,得出大鼠灌胃剂量,即寿胎丸组予以 20.25 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,地屈孕酮组予以

地屈孕酮水溶液 2.7 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,空白组予以等体积蒸馏水灌胃,1 次/d,连续 7 d。末次给药 60 min 后,用 3% 的戊巴比妥钠按 30 mg·kg<sup>-1</sup>麻醉后经腹主动脉取血,静置 1 h,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min(离心半径 10 cm),吸取上层血清,在 56 °C 水浴锅中补体灭活 30 min、0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌后分装置于 -80 °C 保存备用。

**2.2 细胞培养** 将 HTR-8/Svneo 细胞接种于 RPMI 1640 完全培养基中,在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中进行培养,每 2 d 换液 1 次,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

**2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HTR-8/Svneo 细胞氧化损伤模型的建立** 用 0.25% 的胰蛋白酶将处于对数生长期 HTR-8/Svneo 细胞消化后制成细胞悬液,细胞计数后以 5×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板中,置于培养箱培养,待细胞贴壁后弃去旧培养基。磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍后,分别加入完全培养基稀释的最终浓度为 25、50、100、200、400 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 工作液,空白组加入不含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 工作液的完全培养基,每组 5 个复孔,置于培养箱培养 12 h。弃去培养基,用 PBS 洗 2 次后每孔加入 CCK-8 工作液 110 μL,培养箱中孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔的吸光度 A,以不含细胞只有 CCK-8 工作液的孔作为调零孔,计算细胞存活率。细胞存活率 =  $(A_{H_2O_2组} - A_{调零孔}) \div (A_{空白组} - A_{调零孔}) \times 100\%$ 。

**2.4 CCK-8 法筛选含药血清对 HTR-8/Svneo 细胞作用浓度** 实验将细胞分为无血清组、空白组、地屈孕酮组、寿胎丸组,无血清组加入不含血清的 RPMI 1640 培养基,空白组、地屈孕酮组、寿胎丸组每组又分为 5%、10%、15%、20% 4 个浓度,分别加入用培养基稀释的相应浓度的空白组血清、地屈孕酮含药血清、寿胎丸含药血清,每组设 5 个复孔。将细胞以 5×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板中,置于含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱中培养,待细胞贴壁后弃去旧培养基,PBS 洗 2 次。除无血清组外,各组加入用培养基稀释的相应浓度的含药血清,无血清组加入不含血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 12 h。弃去培养基,PBS 洗 2 次后每孔加入 CCK-8 工作液 110 μL,于培养箱中继续孵育 2 h,450 nm 处测定各孔的 A,计算细胞存活率。

**2.5 分组及给药** 用 0.25% 的胰蛋白酶将处于对数生长期 HTR-8/Svneo 细胞消化后制成细胞悬液,以 2×10<sup>6</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,置于培养箱中培养。待细胞贴壁后,将细胞分为空白组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、地屈孕

酮组、寿胎丸组,弃去旧培养基,PBS洗2次,空白组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组予以10%的空白血清干预12 h,地屈孕酮组、寿胎丸组分别予以10%地屈孕酮含药血清、10%寿胎丸含药血清干预12 h。吸弃旧培养基,除空白组外,其余各组加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(50 μmol·L<sup>-1</sup>)继续培养12 h。

**2.6 CCK-8法测定HTR-8/Svneo的增殖活力** 将细胞以5×10<sup>3</sup>个/孔接种于96孔板中,按2.5项下方法处理各组细胞,弃去旧培养基,用PBS洗2次后每孔加入CCK-8工作液110 μL,于培养箱中继续孵育2 h,450 nm处测定各孔的A,计算细胞存活率。

**2.7 ELISA检测各组细胞内ROS含量** 按2.5项中的方法处理各组细胞,弃去旧培养基,收集细胞,进行细胞计数后按每1×10<sup>6</sup>个细胞加入制成细胞悬液,用20 kHz频率,150 W功率的细胞超声破碎仪在冰浴中进行超声破碎,每破碎2 s,间隔3 s,反复破碎3次,4℃、10 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径5 cm),取上清液,按ROS ELISA试剂盒说明书操作,450 nm波长检测各孔A,计算细胞中ROS含量。

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中Nrf2、HO-1、NQO1、Caspase-3蛋白的表达** 将密度为2×10<sup>5</sup>个/mL的细胞悬液接种于6孔板中,每孔2 mL,按2.5项中方法处理各组细胞,处理结束后用PBS洗3遍,用细胞刮板收集细胞,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度,将各组蛋白质量浓度定为3 g·L<sup>-1</sup>配制样品。将定量后的样品与标准品蛋白上样进行凝胶电泳;5%脱脂奶粉封闭1 h,TBST漂洗3次,4℃过夜孵育一抗[GAPDH(1:2万)、Nrf2、HO-1、NQO1、Caspase-3、Bcl-2、Bax(1:2 000)],次日弃去一抗,洗膜后37℃孵育二抗(1:1万)1 h,孵育完成后弃去二抗,洗膜,ECL显影液显影,使用Image Lab软件分析目的条带灰度值。

**2.9 免疫荧光法检测Nrf2、Bcl-2蛋白的表达** 将细胞爬片放入24孔板,将密度为1×10<sup>4</sup>个/mL的细胞悬液接种于孔板中,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养12 h,按2.5项下方法处理细胞,弃去旧培养基,预冷PBS洗涤爬片2次,4%多聚甲醛固定20 min,PBS洗涤3次,加入0.5%曲拉通X-100通透30 min,PBS洗涤3次,一抗4℃孵育过夜[Nrf2(1:300)、Bcl-2(1:300)、GAPDH(1:200)]。次日,弃去一抗,用PBS洗涤3次,羊抗兔IgG(H+L)Fluor594(1:300)37℃避光孵育1 h,PBS洗3次,加入DAPI染核5 min,PBS洗3次,将爬片勾出,吸水纸吸干水分后滴加抗荧光衰减封片剂封片,全景组织细胞定

量分析系统观察并拍照,使用Image J软件分析。

**2.10 Real-time PCR检测Nrf2、Caspase-3、Bax的mRNA表达** 按2.5项下方法处理细胞后收集细胞,超纯总RNA提取试剂盒提取各组细胞总RNA,测定RNA样品浓度及纯度后,逆转录为cDNA,置于-80℃冰箱保存备测。自行设计引物,由北京擎科生物科技有限公司合成,序列见表1。循环参数为95℃预变性90 s,95℃变性20 s,60℃退火20 s,72℃延伸60 s,40个循环。以GAPDH为内参,采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法进行相对定量。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 CAACTACTCCAGGTTGCC	129
	下游 AGTGACTGAAACGTAGCCGA	
Caspase-3	上游 GGCGGTTGTAGAAGAGTTTCG	101
	下游 CACGGCCTGGGATTTCAAG	
Bax	上游 ACATGGAGCTGCAGAGGATG	299
	下游 CAGGGACATCAGTCGCTTCA	
GAPDH	上游 CTGGGCTACACTGAGCACC	101
	下游 AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	

**2.11 统计学方法** 采用SPSS 25.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,各组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD),若方差不齐,采用Dunnett's T3法,以P<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HTR-8/Svneo细胞氧化损伤模型的建立** 为选择合适的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度建立细胞氧化损伤模型,通过CCK-8检测不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理HTR-8/Svneo细胞的增殖情况。CCK-8结果表明,与空白组比较,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组细胞存活率显著下降(P<0.01),且呈浓度依赖性;50 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液处理细胞12 h后,HTR-8/Svneo细胞存活率为52.32%,最接近半数致死量,故选用该浓度作为造模浓度。见表2。

**3.2 对HTR-8/Svneo细胞存活率的影响** CCK-8结果表明,与无血清组比较,体积分数为5%、15%、20%的空白组、地屈孕酮组、寿胎丸组含药血清处理后的HTR-8/Svneo细胞存活率显著降低(P<0.01);体积分数为10%空白组、地屈孕酮组、寿胎丸组含药血清处理后的HTR-8/Svneo细胞存活率优于5%、15%和20%的含药血清处理后的HTR-8/Svneo

表2 不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞生存率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		100.00±5.02
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	25	74.14±1.98 <sup>1)</sup>
	50	52.32±1.79 <sup>1)</sup>
	100	31.14±3.07 <sup>1)</sup>
	200	13.09±1.25 <sup>1)</sup>
	400	7.36±1.05 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$

细胞,因此选用10%的含药血清作为给药浓度。见表3。

表3 寿胎丸含药血清对细胞生存率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on cell viability ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	体积分数/%	细胞存活率/%
无血清组		100.00±8.19
空白组	5	83.74±4.53 <sup>1)</sup>
	10	96.42±4.96
	15	85.63±6.83 <sup>1)</sup>
	20	81.54±5.19 <sup>1)</sup>
地屈孕酮组	5	79.80±1.85 <sup>1)</sup>
	10	92.86±5.49
	15	85.68±4.43 <sup>1)</sup>
	20	81.36±7.71 <sup>1)</sup>
寿胎丸组	5	78.22±3.77 <sup>1)</sup>
	10	94.56±5.27
	15	85.70±4.46 <sup>1)</sup>
	20	74.60±7.23 <sup>1)</sup>

注:与无血清组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$

3.3 对造模后HTR-8/Svneo细胞存活率影响 与空白组比较,模型组的细胞存活率显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,地屈孕酮组、寿胎丸组的细胞

生存率明显提高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

表4 含药血清对造模后HTR-8/Svneo细胞存活率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on survival rate of HTR-8/Svneo cells after modeling ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	浓度	细胞存活率/%
空白组	10%空白血清	100.00±9.81
模型组	10%空白血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	68.98±7.04 <sup>1)</sup>
地屈孕酮组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	81.44±5.44 <sup>1,2)</sup>
寿胎丸组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	91.90±6.29 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$

3.4 对HTR-8/Svneo细胞内ROS含量的影响 与空白组比较,模型组细胞中ROS含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,地屈孕酮组、寿胎丸组细胞中的ROS含量显著降低( $P<0.01$ )。见表5。

表5 寿胎丸含药血清对各组细胞ROS含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 5 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on ROS content in cells of each group ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	浓度	ROS/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组	10%空白血清	8.62±5.37 <sup>2)</sup>
模型组	10%空白血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99.48±36.44 <sup>1)</sup>
地屈孕酮组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.85±11.65 <sup>1,2)</sup>
寿胎丸组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11.43±4.48 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$

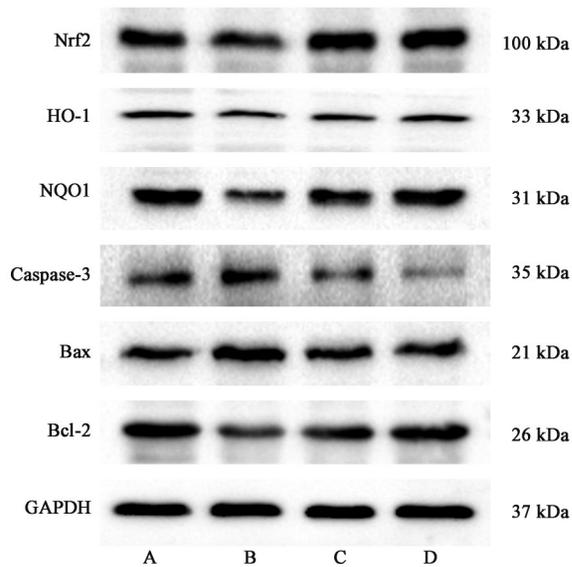
3.5 对HTR-8/Svneo细胞内Nrf2、HO-1、NQO1、Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组细胞Nrf2、HO-1、NQO1、Bcl-2蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ), Caspase-3、Bax蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组细胞Nrf2、HO-1、NQO1、Bcl-2蛋白表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ), Caspase-3、Bax蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见表6、图1。

表6 寿胎丸含药血清对各组细胞Nrf2、HO-1、NQO1、Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on Nrf2, HO-1, NQO1, Caspase-3, Bcl-2 and Bax proteins in cells of each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	Nrf2 /GAPDH	HO-1 /GAPDH	NQO1 /GAPDH	Caspase-3 /GAPDH	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH
空白组	10%空白血清	0.87±0.10	0.61±0.15	1.07±0.09	0.59±0.16	0.63±0.16	2.77±0.71
模型组	10%空白血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.59±0.05 <sup>1)</sup>	0.30±0.03 <sup>2)</sup>	0.59±0.05 <sup>1)</sup>	1.25±0.08 <sup>2)</sup>	1.18±0.11 <sup>2)</sup>	1.64±0.61 <sup>1)</sup>
地屈孕酮组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.97±0.10 <sup>4)</sup>	0.46±0.12	0.81±0.33	1.03±0.33 <sup>1)</sup>	1.01±0.06 <sup>2)</sup>	2.32±0.58
寿胎丸组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.94±0.14 <sup>4)</sup>	0.53±0.10 <sup>3)</sup>	1.08±0.25 <sup>3)</sup>	0.75±0.18 <sup>3)</sup>	0.58±0.05 <sup>4)</sup>	3.21±0.11 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表7和表8同)



注:A.空白组;B.模型组;C.地屈孕酮组;D.寿胎丸组(图2同)

图1 各组细胞 Nrf2、HO-1、NQO1、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Nrf2, HO-1, NQO1, Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein expression in each group of cells

3.6 对 HTR-8/Svneo 细胞内 Nrf2、Bcl-2 蛋白平均荧光强度的影响 与空白组比较,模型组和地屈孕

酮组的 Nrf2、Bcl-2 的平均荧光强度明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),寿胎丸组 Bcl-2 平均荧光强度明显下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,寿胎丸组 Nrf2、Bcl-2 的平均荧光强度显著升高( $P < 0.01$ )。见图2、表7。

3.7 对 HTR-8/Svneo 细胞内 Nrf2、Caspase-3、Bax 的 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 Nrf2 mRNA 相对表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),Caspase-3、Bax 的 mRNA 相对表达水平明显上升( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组 Nrf2 mRNA 相对表达明显上升( $P < 0.05$ ),Caspase-3、Bax mRNA 相对表达水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表8。

#### 4 讨论

RSA 是女性妊娠常见的并发症之一,RSA 患者的妊娠结局不仅是患者和妇产科医生关心的问题,而且涉及优生优育、国家经济 and 政策等诸多领域,其防治已成为国内外生殖领域研究的重点,深受各国专家的关注。RSA 的发生发展与多种因素有关,氧化应激引起的细胞凋亡是 RSA 的重要原因之一,使用抗氧化剂可以有效防治 RSA 的发生<sup>[16-17]</sup>。

中医学中无 RSA 的病名,根据其“屡孕屡堕、应

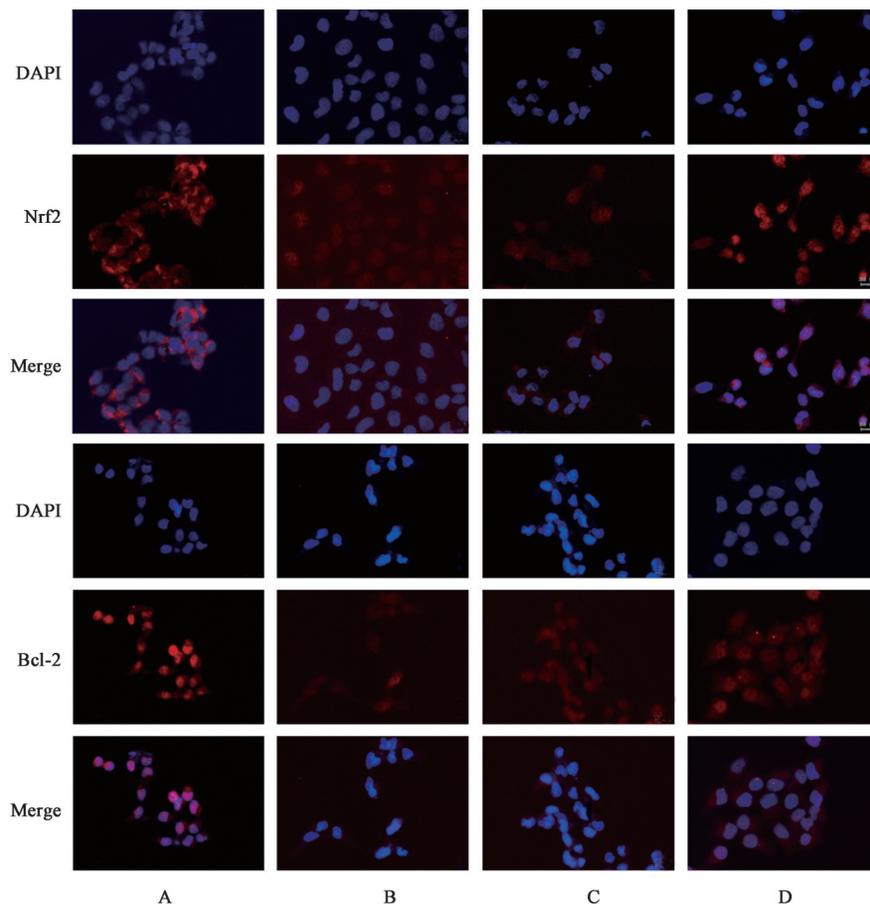


图2 寿胎丸含药血清对各组细胞中 Nrf2、Bcl-2 平均荧光强度的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 2 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on average fluorescence intensity of Nrf2 and Bcl-2 in cells of each group (IF, ×200)

表7 寿胎丸含药血清对各组细胞中Nrf2、Bcl-2相对表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on relative expression levels of Nrf2 and Bcl-2 in each group of cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	Nrf2/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
空白组	10%空白血清	39.19±8.90	50.91±6.48
模型组	10%空白血清+50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	22.60±2.34 <sup>2)</sup>	22.01±2.89 <sup>2)</sup>
地屈孕酮组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	24.69±0.82 <sup>1)</sup>	29.22±2.41 <sup>2)</sup>
寿胎丸组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	38.84±5.73 <sup>4)</sup>	37.41±5.54 <sup>2,4)</sup>

表8 寿胎丸含药血清对各组细胞Nrf2、Caspase-3、Bax mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Shoutaiwan drug-containing serum on expression of Nrf2, Caspase-3 and Bax mRNA in each group of cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	Nrf2	Caspase-3	Bax
空白组	10%空白血清	1.02±0.24	1.00±0.03	1.00±0.00
模型组	10%空白血清+50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.47±0.22 <sup>2)</sup>	1.95±0.18 <sup>1)</sup>	2.64±0.35 <sup>2)</sup>
地屈孕酮组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.79±0.06	1.43±0.03 <sup>2)</sup>	1.12±0.08 <sup>4)</sup>
寿胎丸组	10%含药血清+50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.95±0.12 <sup>3)</sup>	1.14±0.21 <sup>3)</sup>	0.84±0.04 <sup>4)</sup>

期而下”的临床特点,归属于“滑胎”“数堕胎”范畴。中医认为“肾主生殖,胞络系于肾”,滑胎本于肾虚所致冲任虚衰、胎失所养,胎结不实。因此,历代医家重视补肾安胎法以防治滑胎。寿胎丸由炒菟丝子、桑寄生、续断、阿胶4味药组成,君药菟丝子多脂微辛,阴中有阳,守而能走,为补肾安胎要药;臣药桑寄生补肝肾,养血安胎;续断补益肝肾,调理冲任;阿胶补血止血。四药合用,补肾固冲安胎,为治疗滑胎的验方。研究发现,菟丝子、桑寄生具有良好的抗氧化性,菟丝子水提取物可以保护小鼠成骨细胞MC3T3-E1细胞免受叔丁基过氧化氢的损伤,桑寄生提取液可以提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性,加强清除超氧化物自由基的能力<sup>[18-19]</sup>。

正常生理状态下,体内存在着氧化/抗氧化平衡。病理状态下,机体受到各种内外因素的刺激,线粒体ROS产生过多,体内氧化/抗氧化失去平衡,则会启动氧化应激,进而引起细胞损伤。Nrf2/HO-1信号通路是细胞抗氧化防御机制的一个重要组成部分,当ROS过量产生时,Nrf2被激活易位到细胞核,识别并激活ARE,进而诱导下游NQO1、HO-1等下游抗氧化基因的表达<sup>[20]</sup>。有研究报道Nrf2信号通路的失调与流产、先兆子痫和胎儿宫内发育迟缓等不良出生结局有关<sup>[21-22]</sup>。

细胞凋亡是指细胞的程序性死亡,在维持机体内环境稳态中发挥着重要作用。Caspase是细胞凋亡的关键介质,其中Caspase-3是一种被频繁激活的死亡蛋白酶,可由降低的线粒体膜电位激活,进而引起不可逆的凋亡过程<sup>[23-24]</sup>。Bcl-2家族蛋白是通过调节促凋亡与抗凋亡之间的平衡来维持线粒体的完整性的一类关键蛋白<sup>[25]</sup>。Bcl-2为抗凋亡因子,

可抑制线粒体释放细胞色素C(Cyt C),抑制Caspase级联反应发生,从而抑制细胞凋亡;Bax为促凋亡蛋白,可被激活易位到线粒体膜上,引起线粒体功能障碍,进而诱导细胞凋亡<sup>[26]</sup>。

本研究结果发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导后HTR-8/Svneo细胞活力下降ROS生成显著增加,细胞凋亡率显著升高,表明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起了氧化应激及细胞凋亡。通过对Nrf2、HO-1、NQO1、Caspase-3、Bcl-2、Bax进行检测,发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导后细胞内Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达明显降低,Caspase-3、Bax蛋白表达明显升高,Bcl-2蛋白表达明显降低;Nrf2的mRNA表达升高,Caspase-3、Bax mRNA表达升高,表明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激可抑制Nrf2信号通路促进细胞凋亡。而寿胎丸能显著提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导后HTR-8/Svneo细胞活力,抑制ROS的产生,提高Nrf2、HO-1、NQO1、Bcl-2的表达,减低Caspase-3、Bcl-2的表达,表明寿胎丸可能通过激活Nrf2信号通路来抑制细胞凋亡,从而减轻氧化应激引起的细胞损伤。

综上所述,寿胎丸可通过激活Nrf2信号通路抑制氧化应激减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HTR-8/SVneo细胞损伤,这可能是寿胎丸防治RSA,发挥其安胎作用的机制之一。但本研究仅对Nrf2信号通路相关指标进行直接验证,未使用通路抑制剂对细胞进行处理来进行反向验证,下一步将采用Nrf2抑制剂HTR-8/SVneo细胞进行处理,以期得出更严谨的结论。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2016, 51(1): 3-9.

- [ 2 ] 张宏展,余姝毅,陈现,等. 复发性流产的病因分析[J]. 生殖医学杂志,2017,26(9):932-935.
- [ 3 ] SRINIVAS S K, MA Y, SAMMEL M D, et al. Placental inflammation and viral infection are implicated in second trimester pregnancy loss[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 195(3): 797-802.
- [ 4 ] COHN D M, GODDIJN M, MIDDELDORP S, et al. Recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies: Prognosis of subsequent pregnancy [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(10):2208-2213.
- [ 5 ] DEAN D D, AGARWAL S, MIDDELDORP S. Defining the role of FMR1 gene in unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2019, 36(11):2245-2250.
- [ 6 ] AL-SHEIKH Y A, GHNEIM H K, ALHARBI A F, et al. Molecular and biochemical investigations of key antioxidant/oxidant molecules in Saudi patients with recurrent miscarriage[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4450-4460.
- [ 7 ] BURRUEL V, KLOOSTER K, BARKER C M, et al. Abnormal early cleavage events predict early embryo demise: Sperm oxidative stress and early abnormal cleavage[J]. *Sci Rep*, 2014, 4:6598-6607.
- [ 8 ] JAUNIAUX E, HEMPSTOCK J, GREENWOLD N, et al. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(1): 115-125.
- [ 9 ] 邓永丽,黄月颖,桑晓庆,等. 寿胎丸联合桃红四物汤在不孕症患者治疗期间对妊娠质量和免疫因子的影响[J]. *中药材*, 2021, 44(7): 1767-1769.
- [ 10 ] 付笑笑,褚楚,黑国真,等. 寿胎丸靶向 miR-374c-5p/ATG12 信号轴减轻滋养细胞自噬治疗原因不明复发性自然流产[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(3): 358-364.
- [ 11 ] 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[J]. *中医杂志*, 2021, 62(21):1917-1922, 1929.
- [ 12 ] ZHANG D D, CHAPMAN E. The role of natural products in revealing NRF2 function [J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(6):797-826.
- [ 13 ] HUSSAIN T, TAN B, LIU G, et al. Modulatory mechanism of polyphenols and Nrf2 signaling pathway in LPS challenged pregnancy disorders [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:8254289.
- [ 14 ] 汤同娟,王翔,左梦雨,等. 苓桂术甘汤含药血清通过 PI3K/Akt 信号通路保护 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞损伤 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(13):1-9.
- [ 15 ] 乔宗惠,申思楠,邓敦,等. 寿胎丸对脂多糖诱导的人绒毛外滋养细胞氧化应激及焦亡的调节作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(17):17-24.
- [ 16 ] WANG X, FALCONE T, ATTARAN M, et al. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(6):1272-1277.
- [ 17 ] KITAGAWA Y, SUZUKI K, YONEDA A, et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos [J]. *Theriogenology*, 2004, 62(7):1186-1197.
- [ 18 ] GAO J M, LI R, ZHANG L, et al. Cuscuta chinensis seeds water extraction protecting murine osteoblastic MC3T3-E1 cells against tertiary butyl hydroperoxide induced injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 587-595.
- [ 19 ] 华一琳,吴慧平,张融瑞,等. 桑寄生的降脂作用和抗脂质过氧化反应的研究[J]. *中国医药学报*, 1995, 1: 40-41.
- [ 20 ] WAZ S, HEEBA G H, HASSANIN S O, et al. Nephroprotective effect of exogenous hydrogen sulfide donor against cyclophosphamide-induced toxicity is mediated by Nrf2/HO-1/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 264(5):118630-118638.
- [ 21 ] KWEIDER N, HUPPERTZ B, WRUCK C J, et al. A role for Nrf2 in redox signalling of the invasive extravillous trophoblast in severe early onset IUGR associated with preeclampsia [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47055.
- [ 22 ] LUAN X, YAN Y, ZHENG Q, et al. Excessive reactive oxygen species induce apoptosis via the APPL1-Nrf2/HO-1 antioxidant signalling pathway in trophoblasts with missed abortion [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117781-117793.
- [ 23 ] PORTER A G, JÄNICKE R U. Emerging roles of Caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2):99-104.
- [ 24 ] KALAGATUR N K, ABD ALLAH E F, PODA S, et al. Quercetin mitigates the deoxynivalenol mycotoxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells by modulating the oxidative stress mediators [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(1):465-477.
- [ 25 ] CUI J, PLACZEK W J. Post-transcriptional regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family members [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1):308-329.
- [ 26 ] 严伟伟,李国辉,贾仰民,等. 芍药苷对醋酸铅诱导海马神经元凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(6):730-737.

[责任编辑 孙丛丛]