

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research淫羊藿苷对复发性流产小鼠免疫调节作用及
TLR4 信号通路的影响

Effects of Icaritin on immune regulation and TLR4 signaling pathway in mice with recurrent abortion

李金芬¹, 朱俊江², 刘媛媛¹,
罗吉¹, 梁旭晖¹, 肖建英¹(1. 赣州市人民医院 产科, 江西 赣州 341000; 2.
赣南医科大学 第三附属医院 内二科, 江西 赣州
341000)LI Jin-fen¹, ZHU Jun-jiang²,
LIU Yuan-yuan¹, LUO Ji¹,
LIANG Xu-hui¹, XIAO Jian-ying¹(1. Department of Obstetrics, Ganzhou
People's Hospital, Ganzhou 341000,
Jiangxi Province, China; 2. The Second
Department of Internal Medicine, The
Third Affiliated Hospital of Gannan
Medical University, Ganzhou 341000,
Jiangxi Province, China)基金项目: 江西省卫生健康委员会科技计划基
金资助项目(20202078)作者简介: 李金芬(1974-), 女, 副主任医师, 主
要从事妊娠合并风湿免疫系统疾病
方面的临床诊疗工作通信作者: 肖建英, 副主任医师
MP: 15879704826

E-mail: 834819182@qq.com

摘要:目的 探讨淫羊藿苷对复发性自然流产(RSA)小鼠的保护作用及其潜在作用机制。方法 将雌性 CBA/J 小鼠随机分为对照组(与雄性 BALB/c 小鼠交配)、模型组(与雄性 DBA/2 小鼠交配建模)、低剂量实验组(模型组的基础上灌胃给予 25.00 mg·kg⁻¹ 的淫羊藿苷)、高剂量实验组(模型组的基础上灌胃给予 50.00 mg·kg⁻¹ 的淫羊藿苷)、阳性药物组(模型组的基础上灌胃给予 2.6 mg·kg⁻¹ 的地屈孕酮), 治疗 14 d 后收集子宫组织进行后续实验。观察和记录胚胎吸收率, 用酶联免疫吸附试验法检测白细胞介素(IL)-4 和干扰素 γ (IFN- γ) 水平, 用实时荧光定量聚合酶链反应实验检测叉头蛋白 P3(Foxp3) 和 Toll 样受体 4(TLR4) mRNA 的表达水平, 用蛋白质印迹法检测 TLR4 和磷酸化核转录因子- κ B(p-NF- κ B) 蛋白的表达水平。结果 对照组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组和阳性药物组的胚胎吸收率分别为 7.37% (7 只/95 只)、37.33% (28 只/75 只)、20.93% (18 只/86 只)、13.79% (12 只/87 只) 和 12.22% (11 只/90 只), IL-4 水平分别为 (33.84 $\pm$ 5.71)、(10.71 $\pm$ 2.34)、(16.86 $\pm$ 1.13)、(26.91 $\pm$ 3.04) 和 (19.56 $\pm$ 1.79) pg·mL⁻¹, IFN- γ 水平分别为 (25.97 $\pm$ 1.40)、(63.38 $\pm$ 5.39)、(47.23 $\pm$ 6.78)、(34.80 $\pm$ 4.08) 和 (29.61 $\pm$ 3.25) pg·mL⁻¹, Foxp3 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.07、0.57 $\pm$ 0.05、0.72 $\pm$ 0.06、0.90 $\pm$ 0.05 和 0.66 $\pm$ 0.06, TLR4 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 $\pm$ 0.10、2.32 $\pm$ 0.17、1.78 $\pm$ 0.14、1.40 $\pm$ 0.08 和 2.05 $\pm$ 0.26, TLR4 蛋白相对表达水平分别为 0.31 $\pm$ 0.05、0.90 $\pm$ 0.11、0.68 $\pm$ 0.05、0.55 $\pm$ 0.05 和 0.79 $\pm$ 0.10, p-NF- κ B 蛋白相对表达水平分别为 0.27 $\pm$ 0.02、0.82 $\pm$ 0.13、0.66 $\pm$ 0.04、0.42 $\pm$ 0.05 和 0.75 $\pm$ 0.09。模型组的上述指标与对照组比较, 低、高剂量实验组的上述指标分别与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 淫羊藿苷可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路改善 RSA 免疫应答活性来发挥保护作用。

关键词: 淫羊藿苷; 复发性自然流产; 免疫应答; 辅助性 T 细胞 1/2 平衡; Toll 样受体 4 信号通路

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.08.014

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)08-1126-06

Abstract: Objective To investigate the protective effect of icaritin on recurrent spontaneous abortion (RSA) mice and its potential mechanism.

Methods Female CBA/J mice were randomly divided into control group (mated with male BALB/c mice), model group (modeling mating with male DBA/2 mice), experimental-L group (after modeling, 25.00 mg·kg⁻¹ icaritin was given by intragastric administration), experimental-H group (50.00 mg·kg⁻¹ icaritin was given by intragastric

administration after modeling), positive group ($2.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ desdrogesterone was given by intragastrum after modeling), uterine tissue was collected after 14 days of treatment for follow-up experiments. Embryo absorption rate was observed and recorded. The levels of interleukin (IL) -4 and interferon γ (IFN - γ) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of *Foxp3* and Toll-like receptor 4 (*TLR4*) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Western blot assay was used to detect the expression of TLR4 and phosphorylated nuclear transcription factor - κ B (p - NF - κ B) protein. **Results**

The absorption rates of mouse embryos in control group, model group, experimental - L group, experimental - H group and positive group were 7.37% (7 cases/95 cases), 37.33% (28 cases/75 cases), 20.93% (18 cases/86 cases), 13.79% (12 cases/87 cases) and 12.22% (11 cases/90 cases), respectively; IL -4 expression levels were (33.84 ± 5.71), (10.71 ± 2.34), (16.86 ± 1.13), (26.91 ± 3.04) and (19.56 ± 1.79) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the expression levels of IFN - γ were (25.97 ± 1.40), (63.38 ± 5.39), (47.23 ± 6.78) (34.80 ± 4.08) and (29.61 ± 3.25) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of *Foxp3* mRNA were 1.00 ± 0.07 , 0.57 ± 0.05 , 0.72 ± 0.06 , 0.90 ± 0.05 and 0.66 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of *TLR4* mRNA were 1.00 ± 0.10 , 2.32 ± 0.17 , 1.78 ± 0.14 , 1.40 ± 0.08 and 2.05 ± 0.26 , respectively; the relative expression levels of *TLR4* protein were 0.31 ± 0.05 , 0.90 ± 0.11 , 0.68 ± 0.05 , 0.55 ± 0.05 and 0.79 ± 0.10 , respectively; the relative expression levels of p - NF - κ B protein were 0.27 ± 0.02 , 0.82 ± 0.13 , 0.66 ± 0.04 , 0.42 ± 0.05 and 0.75 ± 0.09 , respectively. The above indicators in the model group compared with the control group, the experimental - L and experimental - H groups were compared with the model group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Icaritin may play a protective role in improving RSA immune response by inhibiting TLR4/NF - κ B pathway.

Key words: icaritin; recurrent spontaneous abortion; immune response; T helper cell 1/2 balance; Toll-like receptor 4 signaling pathway

复发性自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 指的是妊娠 28 周前与同一性伴侣连续发生 3 次或 3 次以上的自然流产, 其是妊娠期间的一种严重并发症。RSA 的病因较为复杂 (如遗传、感染等), 然而仍然有近 50% 的 RSA 患者病因仍不清楚, 这一群体被定义为原因不明的 RSA。临床上通过对这些原因不明的 RSA 病例的频繁检查发现, 该群体存在母胎界面免疫失衡^[1-2]。淫羊藿作为一种传统的补益类中药材, 具有强健筋骨、滋补壮阳等功效。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分之一, 具有提高免疫力的显著作用^[3]。研究表明, 淫羊藿苷在胚胎发育中具有保护作用^[4]。本研究旨在通过构建 RSA 小鼠模型, 探究淫羊藿苷对 RSA 的保护作用及其作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 雌性 CBA/J 小鼠, 鼠龄 8 周, 体质量 20 ~ 22 g, 雄性 DBA/2 小鼠, 鼠龄 8 周, 体质量 24 ~ 26 g, BALB/c 雄性小鼠, 鼠龄 8 周, 体质量 24 ~ 26 g, 均购自赣南创新与转化医学研究院。动物生产许可证号:

SCXK(赣)2024-0003。本实验经赣州市人民医院伦理委员会批准 [伦理批号: 伦审科 2024 第 (15) 号]。

药物与试剂 淫羊藿苷, 规格: 每支 20 mg, 纯度: $\geq 98\%$, 批号: 20240317, 上海源叶生物科技有限公司生产; 地屈孕酮片, 规格: 每片 10 mg, 批准文号: 国药准字 H20243163, 批号: 20240219, 扬州奥锐特药业有限公司生产。苏木精 - 伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色液, 上海博湖生物科技有限公司生产; 白细胞介素 - 4 (interleukin - 4, IL - 4), 上海梵态生物科技有限公司生产; 转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF - $\beta 1$)、干扰素 γ (interferon - γ , IFN - γ) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 武汉爱博泰克生物科技有限公司生产; 逆转录试剂盒、引物, 均由上海碧云天生物技术有限公司生产; CD4 APC、CD3E FITC、INF - γ PE、Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4)、磷酸化核转录因子 - κ B (phosphorylated nuclear transcription factor κ B, p - NF - κ B)、NF - κ B 抗体, 均购自美国 Ancam 公司; IL - 4 BV421、CD25 BV421 抗体, 均购自美国 BD PMG 公司; 细胞刺激试剂盒, 购自美国 eBioscience 公司。

仪器 NIB400 显微镜,美国 Nexcope 公司产品; ELx808 酶标仪,美国 BioTek 公司产品; CytoFLEX 流式细胞仪,美国贝克曼库尔特公司产品; 7500Fast 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 仪器,美国赛默飞世尔公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[5]

将雌性 CBA/J 小鼠与雄性 DBA/2 小鼠按照 2:1 比例合笼,第 2 天清晨对雌性小鼠做阴道涂片,阴道涂片出现大量精子,同时观察阴道口,肉眼可见黄色蜡状阴道栓,即为建模成功,并记为孕 1 d。

2.2 动物分组与处置方法

CBA/J 小鼠按照“2.1”的方法进行建模,RSA 小鼠建模成功后随机分为模型组、低剂量实验组、高剂量实验组和阳性药物组,每组 13 只;对照组将雌性 CBA/J 小鼠与 BALB/c 雄性小鼠按照 2:1 比例合笼,每组 13 只。建模成功后(孕 1 d),低、高剂量实验组小鼠每天灌胃给予 25.00 和 50.00 mg·kg⁻¹ 的淫羊藿苷;阳性药物组小鼠每天灌胃给予 2.6 mg·kg⁻¹ 的地屈孕酮,连续治疗 14 d,对照组和模型组小鼠均灌胃等量的 0.9% NaCl。末次给药 2 h 后,处死小鼠,暴露子宫,取子宫组织进行后续实验。

2.3 小鼠胚胎流产率及吸收率检测

末次给药后,观察各组孕鼠胚胎着床数和胚胎吸收(子宫着床位置呈现黑且小残留物或者完全流失即为胚胎吸收)数,计算胚胎吸收率(%) = 胚胎吸收数/全部胚胎数 × 100%;胚胎流产率(%) = 流产小鼠/本组全部小鼠数量 × 100%(流产小鼠:存在 1 个及以上胚胎吸收的小鼠)。

2.4 HE 染色法检测各组小鼠最大横截面胎盘-子宫组织病理学改变^[6]

随机选取 3 只小鼠,处死后取小鼠相应组织,清洗后用多聚甲醛固定 24 h,然后经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后进行石蜡包埋制片;取石蜡切片,经烤片后脱蜡至水,然后进行 HE 染色(苏木精染色 10 min → 流水冲洗 2 min → 盐酸乙醇浸泡 2 s → 流水冲洗 → 伊红染色 1 min),经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后,用中性树胶封片,在显微镜下观察并拍照。

2.5 ELISA 法检测各组小鼠子宫组织免疫相关因子表达水平^[5]

取子宫组织,冲洗干净后用滤纸吸干水分,加入 0.9% NaCl 进行组织匀浆,然后离心收集上清液,严格根据试剂盒操作步骤检测 IL-4、TGF-β1 和 IFN-γ

水平。

2.6 RT-qPCR 实验检测相关基因 mRNA 的表达水平^[7]

收集各组子宫组织,用 TRIzol 法提取总 RNA,检测浓度后将总 RNA 逆转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增,并以 β-actin 为内参,以 2^{-ΔΔCt} 法计算 TLR4、IL-4、TGF-β1、IFN-γ 和叉头样转录因子 3 (forkhead box P3, Foxp3) mRNA 相对表达水平。

2.7 流式细胞术检测辅助性 T 细胞(helper T, Th)1、Th2 和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)细胞的表达水平^[8]

将子宫组织 100 mg 剪碎后,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗,加入 30 倍体积的胰蛋白酶进行消化 30 min,之后加入 RPMI1640 培养基停止消化,过筛后收集细胞悬液,然后离心收集细胞沉淀备用。Th1、Th2 细胞数检测:用细胞刺激试剂盒对细胞处理 4 h,然后加入 CD4 APC、CD3E FITC 抗体,避光孵育 30 min,用固定破膜试剂处理 20 min,清洗后加入 IL-4 BV421、INF-γ PE 抗体孵育 30 min,清洗后,用流式细胞仪检测。Treg 细胞数量检测:用细胞刺激试剂盒对细胞处理 4 h,然后加入 CD4 APC、CD3E FITC、CD25 BV421 抗体混合液,避光孵育 30 min,固定破膜试剂处理 20 min,清洗后加入 Foxp3 PE 抗体孵育 30 min,清洗后,用流式细胞仪检测。

2.8 蛋白质印迹法检测 TLR4 信号通路蛋白的表达水平^[9]

取小鼠子宫组织,加入裂解液充分裂解后离心收集上清液,用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度,之后取适量蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,经转膜、封闭(5%脱脂奶粉)后与 TLR4、p-NF-κB、NF-κB-抗孵育(4℃)过夜,次日洗膜后与二抗稀释液(1:5 000)孵育 2 h,洗膜后滴加显色液并曝光,分析灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计数资料用率(%)表示,比较用卡方检验;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,组内两两比较用 LSD-t 检验。

结 果

1 淫羊藿苷对 RSA 小鼠胚胎流产率及吸收率的影响

对照组:雌性 CBA/J 小鼠与 BALB/c 雄性小鼠

合笼;模型组:雌性 CBA/J 小鼠与雄性 DBA/2 小鼠合笼;低剂量实验组:在模型组的基础上灌胃 $25.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 淫羊藿苷;高剂量实验组:在模型组的基础上灌胃 $50.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的淫羊藿苷;阳性药物组:在模型组的基础上灌胃 $2.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的地屈孕酮。

模型组的胚胎流产率及吸收率均显著高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.001$);低、高剂量实验组及阳性药物组的胚胎吸收率均显著低于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$);低、高剂量实验组的胚胎流产率及吸收率组间比较,在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。结果见表 1。

2 淫羊藿苷对 RSA 小鼠胎盘-子宫组织病理学改变的影响

由图 1 可见:对照组小鼠胚胎-子宫组织结构完整饱满,内膜增厚,Labyrinth 区域充满窦,蜕膜整齐致密,无明显病理学改变;模型组小鼠胎盘体积明显减小,组织排列不规则,Labyrinth 区域狭窄,窦状窦数量减少,细胞排列紊乱;相比于模型组,低、高剂量实验组及阳性组子宫组织结构改变均得到恢复。

3 淫羊藿苷对 RSA 小鼠子宫组织免疫相关因子表达的影响

模型组的 IL-4、TGF- β 1 水平和 mRNA 相对表达水平以及 Foxp3 mRNA 相对表达水平均显著低于对照组,IFN- γ 水平和 mRNA 相对表达水平均明显高于对照组 (均 $P < 0.001$);低、高剂量实验组及阳性药物组的 IL-4、TGF- β 1 水平和 mRNA 相对表达水平以及 Foxp3 mRNA 相对表达水平均明显高于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$);低、高剂量实验组间的 IL-4、IFN- γ 和 TGF- β 1 水平和 mRNA 相对表达水平以及 Foxp3 mRNA 相对表达水平比较,在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 2。

4 淫羊藿苷对 RSA 小鼠子宫组织 Th1、Th2、Treg 细胞数的影响

模型组的 Th2、Treg 细胞数均显著低于对照组, Th1 细胞数明显高于对照组 (均 $P < 0.001$);低、高剂量实验组及阳性药物组的 Th2、Treg 细胞数均显著高于模型组, Th1 细胞数明显低于模型组 ($P < 0.01$);低、高剂量实验组间比较, Th1 细胞数在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$),见表 3。

5 淫羊藿苷对 RSA 小鼠子宫组织 TLR4 表达的影响

由图 2 可见,小鼠子宫组织中 TLR4 mRNA 相对表达水平与 IL-4、TGF- β 1、Foxp3 mRNA 相对表达水平均呈显著负相关 (均 $P < 0.05$),与 IFN- γ mRNA 相对表达水平呈显著正相关 ($P < 0.05$)。

模型组子宫组织中 TLR4 和 p-NF- κ B 蛋白相对表达水平均显著高于对照组 (均 $P < 0.001$);低、高剂量实验组子宫组织中 TLR4 和 p-NF- κ B 蛋白相对表达水平均显著低于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$);高剂量实验组子宫组织中 TLR4、p-NF- κ B 蛋白相对表达水平均显著低于低剂量实验组 (均 $P < 0.001$),见表 4 和图 3。

表 1 各组小鼠胚胎流产率及吸收率的比较

Table 1 Comparison of fetal abortion rates and absorption rates of mice in each group

Group	n	Dose ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Abortion rate (%, n/N)	Absorptivity (%, n/N)
Control	13	-	7.69(1/13)	7.37(7/95)
Model	13	-	53.85(7/13)*	37.33(28/75)***
Experimental-L	13	25.00	30.77(4/13)	20.93(18/86)#
Experimental-H	13	50.00	15.38(2/13)#	13.79(12/87)##
Positive	13	2.60	23.08(3/13)	12.22(11/90)###

Compare with control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Compare with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

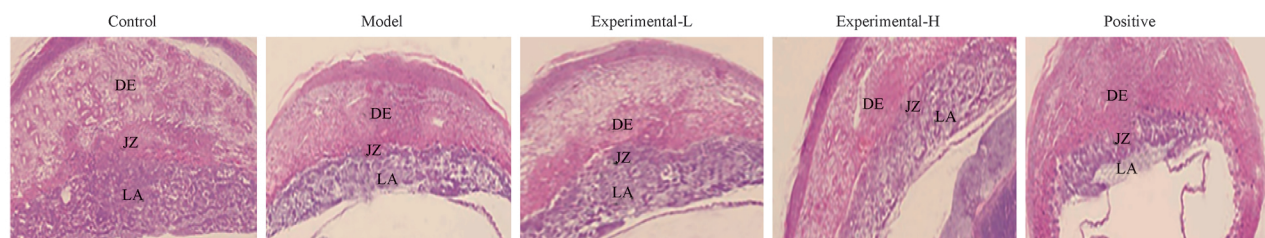


图 1 用苏木精-伊红(HE)染色检测各组小鼠子宫组织病理学变化($\times 40$)

Figure 1 Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to detect the histopathological changes of the uterus of mice in each group ($\times 40$)

DE:Decidua;JZ;junctional zone;LA;Labyrinth.

表2 各组小鼠子宫组织免疫相关因子表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of immune-related factors expression levels in uterine tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Content (pg · mL ⁻¹)			
		IL-4	TGF-β1	IFN-γ	
Control	10	33.84 ± 5.71	90.42 ± 8.79	25.97 ± 1.40	
Model	10	10.71 ± 2.34 ^{***}	47.48 ± 5.75 ^{***}	63.38 ± 5.39 ^{***}	
Experimental-L	10	16.86 ± 1.13 ^{###}	55.82 ± 4.20 ^{##}	47.23 ± 6.78 ^{###}	
Experimental-H	10	26.91 ± 3.04 ^{####ΔΔ}	67.51 ± 5.54 ^{####ΔΔ}	34.80 ± 4.08 ^{####ΔΔ}	
Positive	10	19.56 ± 1.79 ^{###}	60.24 ± 6.22 ^{###}	29.61 ± 3.25 ^{###}	

Group	n	mRNA			
		IL-4	TGF-β1	IFN-γ	Foxp3
Control	10	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.07
Model	10	0.61 ± 0.04 ^{***}	0.68 ± 0.08 ^{***}	2.20 ± 0.22 ^{***}	0.57 ± 0.05 ^{***}
Experimental-L	10	0.67 ± 0.07 [#]	0.77 ± 0.09 [#]	1.74 ± 0.19 ^{###}	0.72 ± 0.06 ^{###}
Experimental-H	10	0.77 ± 0.07 ^{####Δ}	0.88 ± 0.09 ^{####Δ}	1.45 ± 0.15 ^{####Δ}	0.90 ± 0.05 ^{####Δ}
Positive	10	0.65 ± 0.06 ^{###}	0.79 ± 0.04 ^{##}	1.76 ± 0.19 ^{###}	0.66 ± 0.06 ^{##}

Dose refer to table 1; Compared with control group, ^{***} $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Compared with experimental-L group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; IL-4: Interleukin-4; TGF-β1: Transforming growth factor β1; IFN-γ: Interferon-γ; Foxp3: Forkhead box P3.

表3 各组小鼠子宫组织辅助性 T(Th)1、Th2 和调节 T(Treg) 细胞数的比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of T helper (Th)1, Th2 and regulatory T(Treg) cell number in uterine tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	Th1 (%)	Th2 (%)	Treg (%)
Control	1.33 ± 0.15	9.01 ± 0.89	23.70 ± 2.20
Model	5.51 ± 0.66 ^{***}	1.63 ± 0.23 ^{***}	7.98 ± 0.73 ^{***}
Experimental-L	4.12 ± 0.25 ^{###}	5.27 ± 0.53 ^{###}	9.80 ± 1.30 ^{##}
Experimental-H	3.33 ± 0.44 ^{####ΔΔ}	7.64 ± 0.98 ^{####ΔΔ}	13.74 ± 0.87 ^{####ΔΔ}
Positive	4.04 ± 0.44 ^{###}	5.16 ± 0.50 ^{###}	10.08 ± 1.26 ^{###}

Dose and n refer to table 2; Compared with control group, ^{***} $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Compared with experimental-L group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; Th: T helper, Treg: Regulatory T.

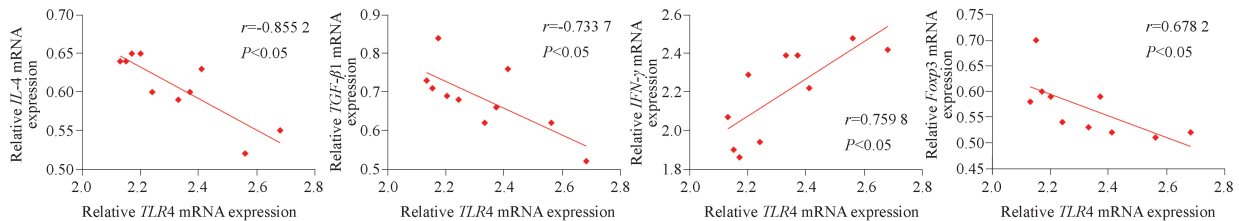


图2 复发性自然流产(RSA)小鼠子宫组织 Toll 样受体 4(TLR4) mRNA 相对表达水平与白细胞介素 4(IL-4)、转化生长因子 β1(TGF-β1)、干扰素 γ(IFN-γ)、叉头样转录因子 3(Foxp3) mRNA 相对表达水平的相关性分析

Figure 2 Correlation analysis of Toll-like receptors 4(TLR4) mRNA levels and mRNA expressions of Interleukin-4(IL-4), transforming growth factor β1(TGF-β1), interferon-γ(IFN-γ) and forkhead box P3(Foxp3) in the uterine tissue of recurrent spontaneous abortion(RSA) mice

表4 各组小鼠子宫组织中 TLR4 信号表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of TLR4 signal expression levels in uterine tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	TLR4 mRNA	TLR4 protein	p-NF-κB protein	NF-κB protein
Control	1.00 ± 0.10	0.31 ± 0.05	0.27 ± 0.02	0.90 ± 0.08
Model	2.32 ± 0.17 ^{***}	0.90 ± 0.11 ^{***}	0.82 ± 0.13 ^{***}	0.91 ± 0.15
Experimental-L	1.78 ± 0.14 ^{###}	0.68 ± 0.05 ^{###}	0.66 ± 0.04 ^{##}	0.88 ± 0.08
Experimental-H	1.40 ± 0.08 ^{####ΔΔ}	0.55 ± 0.05 ^{####ΔΔ}	0.42 ± 0.05 ^{####ΔΔ}	0.92 ± 0.10
Positive	2.05 ± 0.26 [#]	0.79 ± 0.10 [#]	0.75 ± 0.09	0.89 ± 0.10

Dose and n refer to table 2; Compared with control group, ^{***} $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Compared with experimental-L group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; p-NF-κB: Phosphorylated nuclear transcription factor κB.

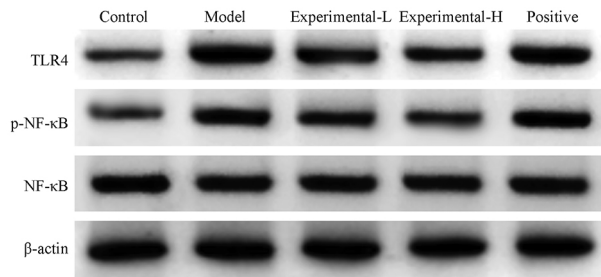


图3 用蛋白质印迹实验检测子宫组织中TLR4相关蛋白的表达情况

Figure 3 Western blot assay was used to detect TLR4-related protein expression in uterine tissue

讨论

母胎界面免疫失衡是不明原因RSA发生的重要原因之一。有研究表明,淫羊藿苷可能通过调节mTOR信号通路在RSA动物模型中发挥保护作用^[10]。CBA/J×DBA/2J小鼠交配组合由于流产率相对较高,再加上近交系小鼠具有实验可重复性高、个体间同质性高等固有优势,是RSA研究的重要动物模型^[5]。本研究发现,RSA小鼠胚胎流产率及吸收率均明显降低,同时病理学染色结果也显示淫羊藿苷可以明显降低RSA小鼠母胎界面子宫炎症反应,这提示淫羊藿苷对RSA小鼠具有明显的保胎作用,这与PENG等^[10]研究结果一致。

研究表明,Treg细胞缺乏是RSA发展的关键因素^[11-13]。在本研究中,RSA模型小鼠母胎界面Th2和Treg细胞数减少,Th1细胞增多,同时相关细胞因子IL-4、TGF-β1和Foxp3水平降低,IFN-γ水平升高,提示RSA小鼠免疫失衡,而经不同剂量的淫羊藿苷治疗后,相关T细胞数及其细胞因子水平均得到不同程度的改善。这提示淫羊藿苷可以通过改善免疫应答活性来改善RSA妊娠结局。

本研究进一步探究淫羊藿苷作用的可能潜在机制发现,RSA小鼠母胎界面TLR4及p-NF-κB表达显著上调,而经淫羊藿苷治疗后可以明显减弱TLR4及p-NF-κB表达。TLR4相关炎症信号已被证实与RSA发展相关^[14]。TLR4被活化后会激活NF-κB,NF-κB可以有效诱导多种炎症细胞因子的表达并刺激其从细胞中释放,介导炎症反应。已有研究证实,Treg可以通过TLR4/NF-κB途径影响RSA小鼠的炎症细胞因子释放进而介导免疫平衡^[15]。本研究还观察到,TLR4的表达与IL-4、TGF-β1、Foxp3表达均呈负相关,与IFN-γ表达呈显著正相关,这提示TLR4与RSA小鼠

免疫平衡失调有关,这与QIN等^[15]研究结果一致。

本研究提示,淫羊藿苷可能通过TLR4/NF-κB信号通路调节免疫应答活性在RSA模型小鼠中发挥保护作用。

参考文献:

- [1] YU N, KWAK - KIM J, BAO S. Unexplained recurrent pregnancy loss: Novel causes and advanced treatment [J/OL]. *J Reprod Immunol*, 2023, 155: 103785. 2022 - 12 - 19 [2024 - 10 - 15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36565611/>.
- [2] LI D, ZHENG L, ZHAO D, et al. The role of immune cells in recurrent spontaneous abortion [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28 (12): 3303—3315.
- [3] 王义翠, 彭慧霞, 夏子岚, 等. 淫羊藿苷药理作用及应用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(6): 182—186.
- [4] 李美玲. 淫羊藿苷通过调节卵巢颗粒细胞增殖与分泌功能改善DOR患者IVF助孕结局的临床与机制研究[D]. 江苏南京: 南京中医药大学, 2020.
- [5] 余甜. 白术对复发性流产模型小鼠免疫耐受安胎机制研究[D]. 陕西咸阳: 陕西中医药大学, 2022.
- [6] 陈梦雅. PD-1/PD-L1信号通路在自身免疫性甲状腺炎流产中的作用及免疫机制的研究[D]. 辽宁大连: 大连医科大学, 2020.
- [7] 龚竹韵, 杨晓丹, 程序, 等. 葛根芩连汤调控微RNA-542-3p对溃疡性结肠炎的保护机制[J]. *世界中医药*, 2022, 17(16): 2317—2321.
- [8] 吕竞芳, 蒋敏, 周真真, 等. 寿胎丸对复发性流产模型小鼠母胎界面乳酸含量及免疫相关因子表达的影响[J]. *中医杂志*, 2024, 65(9): 934—942.
- [9] 辛卉, 周平生, 徐鹏, 等. 隔药饼灸调控子宫内膜异位症小鼠磷脂酰肌醇3-激酶信号通路的研究[J]. *世界中医药*, 2023, 18(16): 2314—2318.
- [10] PENG F, HAN Z, CHEN H, et al. The effects of treatment with icariin on immune tolerance in the recurrent spontaneous abortion mice [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(9): 2794—2804.
- [11] 常兴隆. 复发性流产患者Th1/Th2型细胞因子的表达分析[J]. *数理医药学杂志*, 2021, 34(1): 45—46.
- [12] LUO J, WANG Y, QI Q, et al. Sinomenine improves embryo survival by regulating Th1/Th2 balance in a mouse model of recurrent spontaneous abortion [J/OL]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e927709. 2021 - 01 - 04 [2024 - 10 - 15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33390585/>.
- [13] 祝丽琼, 陈慧, 刘梅兰, 等. 不明原因复发性流产患者外周血Treg细胞及细胞因子TGF-β、IL-10的表达及临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(1): 96—99, 103.
- [14] 李素叶, 王娇, 焦艳, 等. 复发性流产生殖道感染病原学和蜕膜组织TLR4、MIF、Bax/Bcl-2表达水平及其临床意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2024, 34(14): 2192—2196.
- [15] QIN S, LI L, LIU J, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells regulate immune balance in unexplained recurrent spontaneous abortion via the Toll-like receptor 4/nuclear factor-κB pathway [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(12): 300060520980940.

(收稿日期 2024 - 10 - 30)