

# 低分子肝素钠调控 *miR-33a-3p*、*SIPRI* 表达促进不明原因反复妊娠丢失大鼠 Treg 细胞分化

耿旭景, 毛跟红, 项云改, 万利静, 王梦, 朱颖, 谭丽\* (郑州大学第二附属医院生殖医学部, 郑州 450014)

**摘要:**目的 探究低分子肝素钠可否调控 *miR-33a-3p*、1-磷酸鞘氨醇受体 1 (*SIPRI*) 表达影响不明原因反复妊娠丢失 (URPL) 大鼠调节性 T 细胞 (Treg) 分化。方法 60 只雌性大鼠随机分为空白对照组 (Control)、阴性对照组 (NC)、URPL 组、低分子肝素钠组 (LMWH) 和芬戈莫德 (FTY720) 组, 每组 12 只。妊娠第 8 天、第 12 天时, 采用背部多部位皮下注射抗心磷脂抗体 (ACA)-IgG 诱导大鼠 URPL 模型; LMWH 组、FTY720 组在 URPL 组基础上给药。妊娠第 0 天至第 15 天, LMWH 组大鼠皮下注射低分子肝素钠 ( $420 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), FTY720 组尾静脉注射 FTY720 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Control 组、NC 组、URPL 组大鼠尾静脉注射等量生理盐水。治疗结束后, 胚胎称重并计算胚胎吸收率; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察胎盘组织病理学; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清白介素 (IL)-10、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 水平; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 和蛋白印迹 (Western blot) 检测胎盘组织中 *miR-33a-3p*、*SIPRI*、叉头框蛋白 P3 (*FOXP3*)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (*CTLA-4*)、糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体 (*GITR*) mRNA 和蛋白水平; 流式细胞术检测胎盘组织中 Treg 细胞数量。结果 Control 组、NC 组大鼠胎盘细胞排列整齐、结构清晰; 与 Control 组相比, URPL 组胚胎质量减轻, 胚胎吸收率升高, 胎盘组织存在大量炎症细胞浸润、细胞增生和水肿, 血清 IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平降低, 胎盘组织 *miR-33a-3p*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR* mRNA 和蛋白水平降低, *SIPRI* mRNA 和蛋白水平升高, Treg 细胞数量减少 ( $P < 0.05$ ); 与 URPL 组相比, LMWH 组、FTY720 组胚胎质量增加, 胚胎吸收率降低, 胎盘组织病理损伤明显减轻, 可见少量炎症细胞浸润和水肿, 血清 IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平升高, 胎盘组织 *miR-33a-3p*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR* mRNA 和蛋白水平升高, *SIPRI* mRNA 和蛋白水平降低, Treg 细胞数量增多 ( $P < 0.05$ ); LMWH 组、FTY720 组上述指标差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 低分子肝素钠可能通过调控 *miR-33a-3p*、*SIPRI* 表达促进 URPL 大鼠 Treg 细胞分化。

**关键词:**低分子肝素钠; *miR-33a-3p*; 1-磷酸鞘氨醇受体 1; 不明原因反复妊娠丢失; 调节性 T 细胞

doi:10.11669/cpj.2025.01.006 中图分类号:R969 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)01-0047-08

## Low Molecular Weight Heparin Sodium Promotes Treg Cell Differentiation by Regulating the *miR-33a-3p*, *SIPRI* Expression

GENG Xujing, MAO Genhong, XIANG Yungai, WAN Lijing, WANG Meng, ZHU Ying, TAN Li\* (Department of Reproductive Medicine, Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the effect of low molecular weight heparin sodium on regulatory T cell (Treg) differentiation in rats with unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by regulating the *miR-33a-3p*, sphingosine-1-phosphate receptor 1 (*SIPRI*) expression. **METHODS** Sixty female rats were randomly divided into blank control group (Control), negative control group (NC), URPL group, low molecular weight heparin sodium group (LMWH), and fingolimod (FTY720) group, with 12 rats in each group. On the 8th and 12th day of pregnancy, subcutaneous injection of anticardiolipin antibodies (ACA)-IgG into multiple parts of the back was used to induce rat URPL model. LMWH group and FTY720 group were administered on the basis of URPL group. On the 0th and 15th day of pregnancy, LMWH group rats were subcutaneously injected with low molecular weight heparin sodium ( $420 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), while FTY720 group rats were injected with FTY720 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) via tail vein, control group, NC group and URPL group rats were injected with an equal amount of physiological saline via the tail vein. After treatment, weigh the embryo and calculate the embryo absorption rate. HE staining was used to observe the pathology of placental tissue. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect interleukin (IL)-10 and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) levels in serum. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect *miR-33a-3p*, *SIPRI*, forkheadbox protein 3 (*FOXP3*), cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (*CTLA-4*), and glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (*GITR*) mRNA and protein levels

**基金项目:**河南省医学科技攻关计划联合共建项目资助 (LHGJ20220475)

**作者简介:**耿旭景, 女, 博士, 副主任医师 研究方向: 生殖内分泌、复发性流产 \* 通讯作者: 谭丽, 女, 博士, 主任医师, 教授 研究方向: 生殖内分泌、复发性流产、反复着床失败 Tel: (0371) 639741718

in placental tissue. Flow cytometry was used to detect the number of Treg cells in placental tissue. **RESULTS** The placental cells of rats in Control group and NC group were arranged neatly, and structure was clear. Compared with Control group, There was a large amount of inflammatory cell infiltration, cell proliferation, and edema in placental tissue in URPL group, embryo quality was reduced, embryo absorption rate was increased, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 levels in serum were decreased, *miR-33a-3p*, *FOXP3*, *CTLA-4*, *GITR* mRNA and protein levels in placental tissue were decreased, *SIPRI* mRNA and protein levels was increased, the number of Treg cells was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with URPL group, the pathological damage to the placental tissue in LMWH group and FTY720 group were significantly reduced, with a small amount of inflammatory cell infiltration and edema visible, embryo quality was increased, embryo absorption rate was decreased, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 levels in serum were increased, *miR-33a-3p*, *FOXP3*, *CTLA-4*, *GITR* mRNA and protein levels in placental tissue were increased, *SIPRI* mRNA and protein levels was decreased, the number of Treg cells was increased ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference in the above indicators between LMWH group and FTY720 group ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION** Low molecular weight heparin sodium maybe promote Treg cells differentiation in URPL rats by regulating the *miR-33a-3p*, *SIPRI* expression.

**KEY WORDS:** low molecular weight heparin sodium; *miR-33a-3p*; sphingosine-1-phosphate receptor 1; unexplained recurrent pregnancy loss; regulatory T cell

反复妊娠丢失 (recurrent pregnancy loss, RPL) 指妊娠 20 周之前出现连续 3 次及以上自然妊娠丢失的临床现象<sup>[1]</sup>。据统计,全世界约有 2% 的育龄女性受此困扰, RPL 占有妊娠丢失的 15% ~ 20%<sup>[2]</sup>。尽管已知多种因素可能导致 RPL, 如胎儿染色体异常、母体生殖道异常、激素和免疫失调、精子质量不佳、感染和环境因素, 但仍有超过 50% 的 RPL 患者病因不明, 称为不明原因反复妊娠丢失 (unexplained recurrent pregnancy loss, URPL), 严重影响孕妇身心健康<sup>[3]</sup>。正常妊娠是一个复杂且精密的生理过程, 其中, 母-胎界面的免疫耐受机制起到了关键作用, 特别是调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 与其细胞因子间的相互作用<sup>[4]</sup>。Treg 细胞是一类表达转录因子叉头框蛋白 P3 (forkhead box protein 3, FOXP3) 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群, 具有免疫抑制作用, 对于维持免疫稳态至关重要<sup>[5]</sup>。研究显示, URPL 患者蜕膜组织中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg 细胞数量较少, 可作为预测 URPL 的潜在标志物<sup>[6]</sup>。调节辅助性 T 细胞 17 (helper T cells 17, Th17)/Treg 细胞平衡能够抑制胚胎吸收, 提高 RPL 大鼠妊娠成功率<sup>[7]</sup>。因此, 促进 Treg 细胞分化可能是治疗 URPL 的有效策略。1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 是一种生物活性鞘脂代谢物, 由鞘氨醇激酶 (sphingosine kinase, SPHK) 催化鞘氨醇磷酸化而成<sup>[8]</sup>。S1P 通过与免疫细胞表面的 S1P 受体 (sphingosine-1-phosphate receptor, S1PR) 结合, 调节免疫细胞的多种功能<sup>[9]</sup>。研究显示, S1P 类似物芬戈莫德 (fingolimod, FTY720) 通过影响 S1P/S1PR 通路, 促进初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Treg 细胞分化, 从而诱导妊娠免疫耐受<sup>[10-11]</sup>。微小 RNA (mi-

croRNA, miRNA) 是一类内源性非编码 RNA, 通过调节靶基因的表达, 参与多种生理和病理过程<sup>[12]</sup>。研究显示, miRNA 表达异常与 RPL 发生相关<sup>[13]</sup>。如某些 miRNA (*miR-33a*, *miR-33b* 和 *miR-181a*) 在 RPL 患者胎盘中的表达减少, 可能通过影响 S1PR1 表达来抑制 Treg 细胞分化<sup>[14]</sup>。低分子肝素钠 (low molecular weight heparin sodium, LMWH) 作为一类抗血栓形成药, 不仅用于血栓性疾病的治疗, 还在先兆流产、复发性流产以及 URPL 中显示出治疗潜力<sup>[15-18]</sup>。尽管其疗效得到了肯定, 但低分子肝素钠调控 URPL 的具体机制仍待进一步阐明。

基于此, 本研究拟探究低分子肝素钠对 URPL 大鼠中 *miR-33a-3p*, *SIPRI* 表达及 Treg 细胞分化的调控作用, 以为低分子肝素钠治疗 URPL 提供理论和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本

人血清样本: 收集 3 例 2022 年 1 ~ 12 月就诊于郑州大学第二附属医院生殖医学部门诊的复发性流产患者的外周血样本 (各 5 mL), 收集样本后 2 h 内样本经 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 分离获得血清, 血清于 -80 °C 冰箱冻存。纳入标准: 患者经历 2 次及以上胎盘丢失或停育; 排除传染病、子宫解剖异常、糖尿病、甲状腺功能障碍等经典危险因素; 近期末使用药物治疗。排除标准: 合并心、肝、肾功能不全者; 合并自身免疫性疾病者。另外, 收集 3 例同期在我院正常妊娠、分娩者的外周血样本作为对照。所有患者均对本研究知情同意, 本研究已通过郑州大学第二附属医院医学

伦理委员会批准(2022004)。

实验动物:8周龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 60 只,体质量为 180~200 g,8周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只,体质量为 200~220 g,均购自中研子创(北京)生物科技有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2022-0010]。大鼠饲养于室温 22~23℃、湿度 45%~55%、光照/黑暗各 12 h 环境中,并喂以高压灭菌食品和水,适应性喂养 1 周后进行实验。本研究所有实验经郑州大学第二附属医院医学伦理委员会批准(2022004)。

### 1.2 药品与试剂

低分子肝素钠注射液(国药准字 H20030429,0.2 mL:2 500 IU,齐鲁制药有限公司);芬戈莫德(FTY720,货号:162359-56-0,美国 MCE 公司);聚乙二醇(货号:95904,美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养基(货号:EY-XY5485,上海一研生物科技有限公司);离子霉素、佛波酯、莫能霉素(货号:S48414、R32414、R32356,上海源叶生物科技有限公司);放射免疫沉淀试验(RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度试剂盒(货号:R301899、B598071,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);S1PR1 兔多抗、糖皮质激素诱导肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor, G1TR)小鼠单抗(货号:IPD-ANP12400、IPD-ANM4085,湖北艾普蒂生物工程有限公司);FOXP3 兔多抗、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T lymphocyte associated protein 4, CTLA-4)兔多抗(货号:bs-10211R、bs-10006R,北京博奥森生物技术有限公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、白介素(interleukin, IL)-10 和转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号:C0105S、PI525、PT878,上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.3 仪器

Optima MAX-XP 型超速离心机(美国 BioTek 公司);ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);164-5050 型基础电泳仪、GelDoc XR 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 抗心磷脂抗体(anticardiolipin antibody, ACA)的制备

取复发性流产患者和健康妊娠者的血清样本(各 4 mL),加入硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 饱和溶液,至 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为 33%,4℃过夜沉淀,离心收

集上清液,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液,至 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为 50%,4℃过夜沉淀,离心收集沉淀,加入磷酸缓冲盐溶液(PBS)溶解,装入透析袋,放置在蒸馏水中 4℃透析除盐 2 d,采用聚乙二醇浓缩含有 ACA 组分的免疫球蛋白 G(IgG)蛋白,测定蛋白浓度,配制成 $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白液,来源于复发性流产患者和健康妊娠者的 IgG 分别记作 ACA-IgG 和 NH-IgG。

### 2.2 动物分组与给药

60 只雌鼠随机分为空白对照组(Control)、阴性对照组(NC)、URPL 组、低分子肝素钠组(LMWH)和阳性对照 FTY720 组,每组各 12 只。采用 ACA-IgG 诱导大鼠 URPL 模型,具体如下:各组大鼠分别以雌雄 2:1 的比例合笼过夜,次日清晨对雌鼠进行阴栓检查,以检出栓子视为成功受孕,记为妊娠第 0 天。随后将孕鼠分笼饲养,未孕大鼠继续合笼,最终所有大鼠均成功受孕。URPL 组、LMWH 组和 FTY720 组大鼠分别于妊娠第 8 天、第 12 天时,背部多部位皮下注射 1 mL ACA-IgG( $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),NC 组皮下注射等量 NH-IgG( $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),Control 组注射等量生理盐水。LMWH 组、FTY720 组在 URPL 组基础上给药,妊娠第 0 天至第 15 天,LMWH 组大鼠每日皮下注射 20  $\mu\text{L}$  低分子肝素钠( $420\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),FTY720 组每日尾静脉注射 20  $\mu\text{L}$  FTY720( $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),Control 组、NC 组、URPL 组大鼠尾静脉注射等量生理盐水。最后一次给药 24 h 后,大鼠腹腔注射质量分数 1%戊巴比妥钠( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )麻醉后腹主动脉采血,随后颈椎脱臼处死,收集胚胎和胎盘组织备用。

### 2.3 胚胎称重和胚胎吸收率计算

取各组大鼠胚胎,使用电子天平称重;对活胚胎个数、吸收胚胎个数进行计数,并计算胚胎吸收率(公式 1)。

$$\text{胚胎吸收率}(\%) = \frac{\text{吸收胚胎数}}{\text{活胚胎数} + \text{吸收胚胎数}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

### 2.4 HE 染色观察胎盘组织病理学

取各组大鼠胎盘组织,加入质量分数 10% 福尔马林溶液固定过夜,使用梯度乙醇脱水,二甲苯 I/II 透明,包埋热融化的石蜡,制备 5  $\mu\text{m}$  厚的组织切片。切片依次置于二甲苯 I/II 和梯度浓度乙醇中去蜡,随后使用苏木精染液染色,体积分数 1% 盐酸乙醇溶液酸洗,体积分数 0.6% 氨水返蓝,伊红染液中染色,梯度浓度乙醇脱水,二甲苯 I/II 透明,中性树脂封片,镜检( $\times 400$ )。

## 2.5 ELISA 检测血清 IL-10、TGF-β1 水平

取各组大鼠腹主动脉血,离心收集血清,将血清按体积稀释 100 倍,按照 ELISA 试剂盒进行操作:加样、洗板、加酶结合物、洗板、加显色剂显色、450 nm 波长处检测样品吸光度 (absorbance, A) 值,制作标准曲线,计算各组样品中 IL-10、TGF-β1 水平。

## 2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测胎盘组织中 *miR-33a-3p*、*SIPRI*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR* mRNA 水平

取各组大鼠胎盘组织,剪碎,加入 RNAiso Plus

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[CT(\text{目的基因, 实验组}) - CT(\text{内参基因, 实验组})] - [CT(\text{目的基因, 对照组}) - CT(\text{内参基因, 对照组})]} \quad \text{公式(2)}$$

其中 CT 表示荧光信号达到阈值的 PCR 循环数;ΔCT 表示目的基因的 CT 值-内参基因的 CT 值;ΔΔCT 表示实验组的 ΔCT 值-对照组的 ΔCT 值;2<sup>-ΔΔCT</sup> 表示目的基因在不同样本中的相对表达水平。

表 1 各基因 PCR 引物序列

Tab. 1 PCR primer sequence of each gene

Primers	Primer sequence
<i>miR-33a-3p-F</i>	5'-GACTACCCTCTAGGGGTC-3'
<i>miR-33a-3p-R</i>	5'-TTCGGAATTGCCACGTAT-3'
<i>SIPRI-F</i>	5'-CACTCTGACCAACAAGGAGATG-3'
<i>SIPRI-R</i>	5'-GATGATGGGTGCGTTGAATTTG-3'
<i>FOXP3-F</i>	5'-ACTGCTGACTTTCCGTGG-3'
<i>FOXP3-R</i>	5'-GGCACCTCGGTCAAGCGGA-3'
<i>CTLA-4-F</i>	5'-AGTCCGTCTTACTTGCCA-3'
<i>CTLA-4-R</i>	5'-CCTCAACTCTCAGTGCATC-3'
<i>GITR-F</i>	5'-AGACATTGTGACATCAGGA-3'
<i>GITR-R</i>	5'-CTGAGGACATGCTCCTTCA-3'
<i>U6-F</i>	5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
<i>U6-R</i>	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3'
<i>β-actin-F</i>	5'-TCAGTCACTACTATCGGCAAT-3'
<i>β-actin-R</i>	5'-AAAGAAAGGCTGTAACGCA-3'

## 2.7 流式细胞术检测胎盘组织中 Treg 细胞数量

取各组大鼠胎盘组织,剪碎,加入 PBS 进行组织匀浆,使用 200 目滤网进行过滤,收集滤液,离心收集沉淀,加入细胞稀释液重悬,加入到淋巴细胞分离液中,离心收集淋巴细胞悬液,加入 RPMI 1640 培养基重悬,进行淋巴细胞计数,并调整细胞浓度至密度每毫升 1 × 10<sup>6</sup> 个。将 2 mL 淋巴细胞悬液接种于 24 孔板,分别加入含离子霉素 (终质量浓度 1 μg · mL<sup>-1</sup>)、佛波酯 (终质量浓度 50 μg · mL<sup>-1</sup>) 和莫能霉素 (终质量浓度 0.1 mg · mL<sup>-1</sup>) 的 RPMI 1640 培

进行组织匀浆,离心收集上清液,加入 1/5 体积氯仿,离心收集上清液,加入等体积异丙醇,离心收集 RNA 沉淀,加入体积分数 75% 乙醇清洗,室温干燥,加入焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水溶解 RNA。使用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存。使用 SYBR Green 试剂盒进行 PCR 扩增,选择 *U6* 和 *β-actin* 作为内参基因,反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环,制作 PCR 标准曲线,根据公式 2 计算各组样品中 *miR-33a-3p*、*SIPRI*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR* mRNA 相对水平。PCR 引物序列见表 1。

培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h;培养结束后,收集淋巴细胞,经过 CD4<sup>-</sup> FITC、CD25<sup>-</sup> APC 抗体 4 °C 避光孵育 20 min,细胞固定液固定 20 min,破膜剂破膜 20 min,离心收集沉淀,PBS 重悬淋巴细胞,加入 FOXP3<sup>-</sup> PE 抗体避光孵育 20 min,流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg 细胞比例。

## 2.8 蛋白印迹 (Western blot) 检测胎盘组织中 *SIPRI*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR* 蛋白水平

取各组大鼠胎盘组织,剪碎,加入 RIPA 裂解液进行组织匀浆,离心收集上清液,使用前面已经出现 (BCA) 蛋白浓度试剂盒测定样品蛋白浓度,蛋白样品和上样缓冲液 4:1 混合加热。配置分离胶和浓缩胶,将胶板组装在电泳架上,加入适量电泳液,进行上样。随后进行 SDS-PAGE 电泳。10 mA 电流电泳约 40 min,待蛋白跑到上下胶分界处,调整为 20 mA 电流电泳约 1 h,待蛋白跑到下层胶底部时,停止电泳。留取下层胶,置于转膜液中,按照“负极、海绵、滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸、海绵、正极”顺序进行转膜,将转膜架组装在转膜槽上,加入适量转膜液,200 mA 电流转膜约 90 min。转膜完成后,PVDF 膜置于质量分数 5% 脱脂牛奶中,室温封闭 2 h,含聚山梨酯-20 的 Tris 盐酸缓冲液 (TBST) 洗涤后,加入一抗 (*SIPRI*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR*, 稀释比例为 1:2 000) 4 °C 孵育过夜,次日加入二抗 (HRP 标记山羊源 IgG, 稀释比例为 1:10 000) 室温孵育 2 h。TBST 洗涤后,加入 ECL 试剂,进行曝光、显影,计算各组样品中 *SIPRI*、*FOXP3*、*CTLA-4*、*GITR* 蛋白相对水平。

## 2.9 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。所有数据均表示为平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ),多组间数

据的比较使用单因素方差分析,多组间两两比较使用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

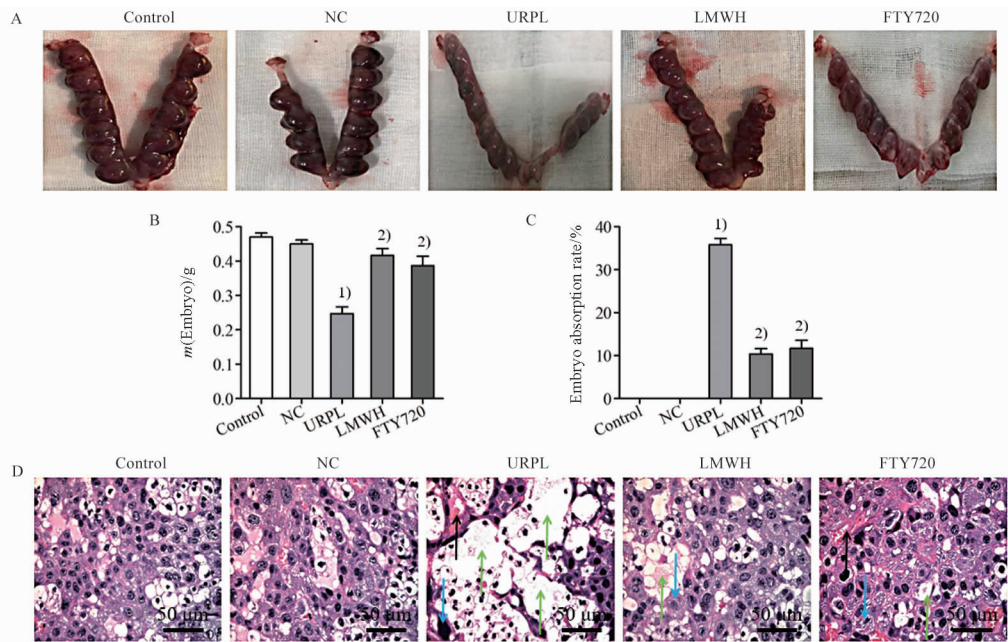
### 3 结果

#### 3.1 低分子肝素钠对 URPL 大鼠胚胎质量、胚胎吸收率及胎盘病理损伤的影响

与 Control 组相比,NC 组大鼠胚胎质量、胚胎吸收率无明显变化( $P > 0.05$ ),而 URPL 组大鼠胚胎质量明显减轻,胚胎吸收率明显升高( $P < 0.05$ );与

URPL 组相比,LMWH 组、FTY720 组胎盘质量明显增加,胚胎吸收率明显降低( $P < 0.05$ );而 LMWH 组、FTY720 组大鼠胎盘质量、胚胎吸收率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 1A ~ C)。

HE 染色结果显示,Control 组、NC 组大鼠胎盘细胞排列整齐、结构清晰;与 Control 组相比,URPL 组胎盘组织存在明显的炎症细胞浸润、细胞增生和水肿,空泡化细胞增加;与 URPL 组相比,LMWH 组、FTY720 组胎盘组织病理损伤明显减轻,可见少量炎症细胞浸润和水肿(图 1D)。



A - 妊娠第 16 天时,胚胎植入子宫角情况;B - 胚胎质量;C - 胚胎吸收率;D - 苏木精 - 伊红(HE)染色观察大鼠胎盘病理损伤( $\times 400$ );NC - 阴性对照;URPL - 不明原因反复妊娠丢失;LMWH - 低分子肝素钠;FTY720 - 芬戈莫德;黑色箭头 - 炎症细胞;蓝色箭头 - 水肿;绿色箭头 - 空泡化;与对照组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 URPL 组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

A - on the 16th of pregnancy, the situation of embryo implantation into the uterine horn; B - embryo quality; C - embryo absorption rate; D - HE staining was used to observe pathological damage in rat placenta( $\times 400$ ); NC - negative control; URPL - unexplained recurrent pregnancy loss; LMWH - Low molecular weight heparin; FTY720 - fingolimod; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs URPL group.

图 1 低分子肝素钠对不明原因反复妊娠丢失(URPL)大鼠胚胎质量、胚胎吸收率及胎盘病理损伤的影响。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effects of low molecular weight heparin sodium on embryo quality, embryo absorption rate, and placental pathological damage in URPL rats.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

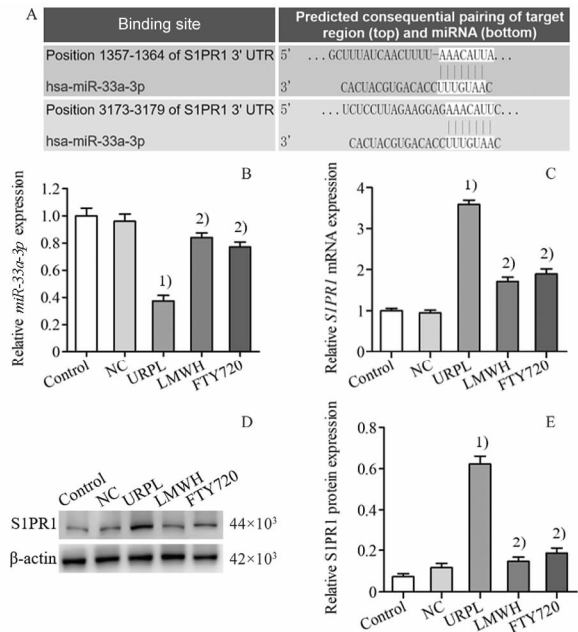
#### 3.2 低分子肝素钠对 URPL 大鼠胎盘组织中 *miR-33a-3p*、*SIP1R1* 表达的影响

Targetscan 数据库显示,*miR-33a-3p* 和 *SIP1R1* 存在结合位点(图 2A)。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,与 Control 组相比,NC 组大鼠胎盘组织中 *miR-33a-3p*、*SIP1R1* mRNA 和蛋白水平无明显变化( $P > 0.05$ ),而 URPL 组大鼠胎盘组织中 *miR-33a-3p* 水平明显降低,*SIP1R1* mRNA 和蛋白水平明显升高( $P < 0.05$ );与 URPL 组相比,LMWH 组、FTY720

组胎盘组织中 *miR-33a-3p* 水平明显升高,*SIP1R1* mRNA 和蛋白水平明显降低( $P < 0.05$ );而 LMWH 组、FTY720 组大鼠胎盘组织中 *miR-33a-3p*、*SIP1R1* mRNA 和蛋白水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 2B ~ E)。

#### 3.3 低分子肝素钠对 URPL 大鼠 Treg 细胞分化及其细胞因子表达的影响

流式细胞术、ELISA 结果显示,与 Control 组相比,NC 组大鼠胎盘组织中 Treg 细胞数量、血清 IL-10、



A - miR-33a-3p 和 SIPRI 的结合示意图; B - RT-qPCR 检测胎盘组织中 miR-33a-3p mRNA 水平; C - RT-qPCR 检测胎盘组织中 SIPRI mRNA 水平; D - Western blot 检测胎盘组织中 SIPRI 蛋白水平; E - Western blot 定量结果; 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 URPL 组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

A - Schematic diagram of miR-33a-3p and SIPRI binding; B - RT-qPCR was used to detect miR-33a-3p mRNA levels in placental tissue; C - RT-qPCR was used to detect SIPRI mRNA levels in placental tissue; D - Western blot was used to detect SIPRI protein level in placental tissue; E - Western blot quantification; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs URPL group.

**图 2** 低分子肝素钠对 URPL 大鼠胎盘组织中 miR-33a-3p、SIPRI 表达的影响。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

**Fig. 2** Effects of low molecular weight heparin sodium on miR-33a-3p and SIPRI expression in URPL rat placental tissue. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

TGF- $\beta$ 1 水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 而 URPL 组大鼠胎盘组织中 Treg 细胞数量、血清 IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平明显减少 ( $P < 0.05$ ); 与 URPL 组相比, LMWH 组、FTY720 组胎盘组织中 Treg 细胞数量、血清 IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平明显增多 ( $P < 0.05$ ); 而 LMWH 组、FTY720 组大鼠胎盘组织中 Treg 细胞数量、血清 IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3A ~ C)。

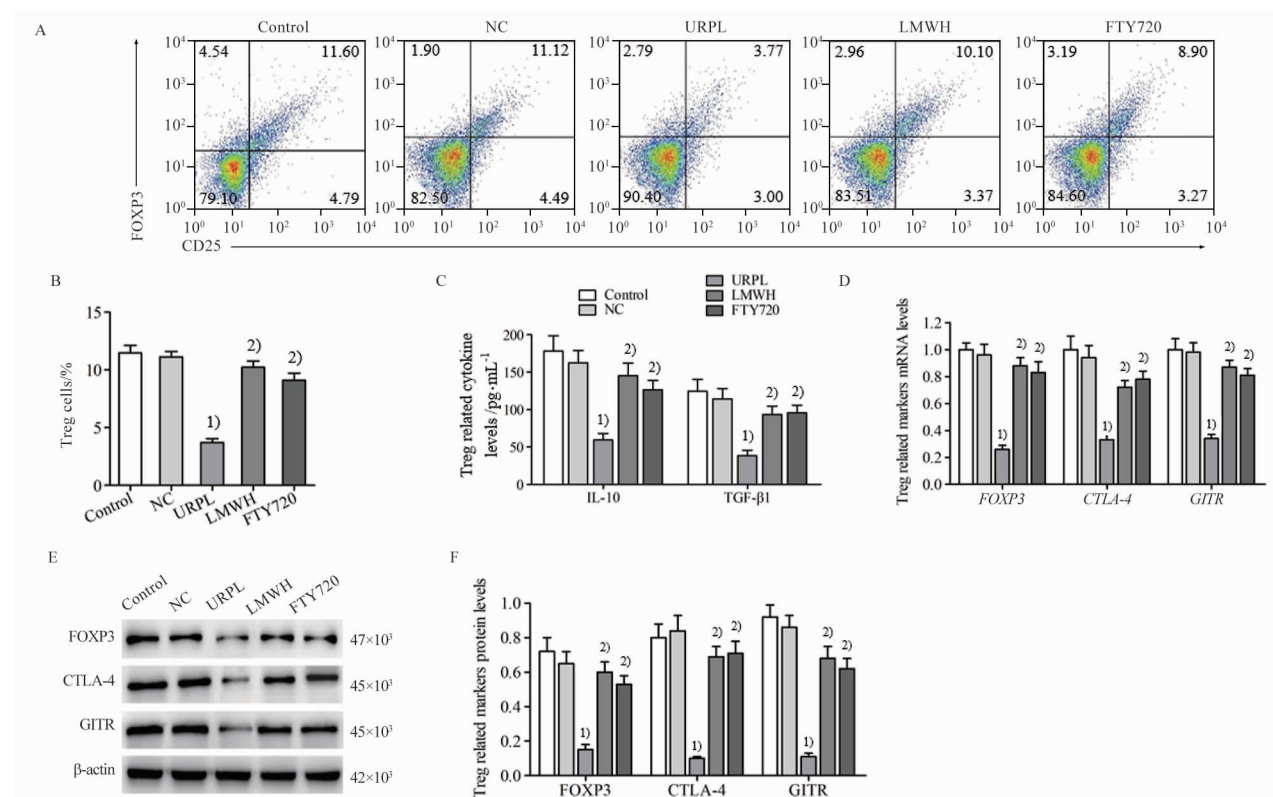
RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, NC 组大鼠胎盘组织中 FOXP3、CTLA-4、GITR mRNA 和蛋白水平无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 而 URPL 组大鼠胎盘组织中 FOXP3、CTLA-4、GITR mRNA 和蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 URPL 组相比, LMWH 组、FTY720 组胎盘组织中 FOXP3、CTLA-4、GITR mRNA 和蛋白水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 而 LMWH 组、FTY720 组大鼠胎盘组织中

FOXP3、CTLA-4、GITR mRNA 和蛋白水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3D ~ F)。

#### 4 讨论

低相对分子质量肝素钠通过抑制纤维蛋白形成, 从而防止血栓形成及生长, 常用于流产、血栓性疾病的预防和治疗<sup>[19]</sup>。然而, 低分子肝素钠调控 URPL 的相关机制尚不清楚。因此, 本研究通过背部多部位皮下注射 ACA-IgG 诱导大鼠 URPL 模型。既往研究表明 ACA 阳性与凝血功能障碍、血管形成和补体激活等免疫异常相关, 是导致 RPL 的机制之一<sup>[20]</sup>。本研究发现, 模型组大鼠胚胎质量减轻, 胚胎吸收率升高, 胎盘细胞存在明显的炎症细胞浸润、细胞增生和水肿, 提示 ACA-IgG 可能诱导了大鼠妊娠流产。经过低分子肝素钠干预后, 大鼠胚胎质量增加, 胚胎吸收率降低, 胎盘组织病理损伤减轻, 提示低分子肝素钠可能阻止 URPL 发生。

胚胎作为同种半抗原, 依赖于母-胎界面的免疫耐受机制而不被母体排斥, URPL 发生与胚胎免疫耐受失败相关。Treg 细胞在诱导母体耐受及母体对胎儿免疫排斥反应中扮演重要角色<sup>[21]</sup>。Treg 细胞 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>) 具有抗炎和免疫抑制功能, 其通过广泛识别自身或外来抗原, 以接触依赖的方式分泌 IL-10、TGF- $\beta$ 1 等抑制性因子, 从而抑制 T 细胞的活化及其免疫应答反应。研究显示, URPL 患者外周血和蜕膜组织中 Treg 细胞数量显著降低, Treg 细胞可作为预测不良妊娠结局的潜在标志物<sup>[22-23]</sup>。本研究发现, 模型组大鼠胎盘组织中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg 细胞数量、Treg 细胞相关标志物 FOXP3、CTLA-4、GITR mRNA 和蛋白水平及血清 IL-10、TGF- $\beta$ 1 水平均减少, 说明 ACA-IgG 诱导的大鼠妊娠流产与 Treg 细胞介导的免疫异常有关。分析原因可能是 ACA-IgG 注射到大鼠体内, 大量消耗 Treg 细胞, 使得机体免疫调节能力降低; ACA-IgG 通过结合母-胎界面的磷脂分子, 形成免疫复合物, 进而损伤蜕膜及胎盘组织的血管内皮, 导致血栓形成, 从而引发流产。经过低分子肝素钠干预后, 大鼠 Treg 细胞数量增多, 提示低分子肝素钠可能通过诱导 Treg 细胞分化阻止 URPL 发生。分析原因可能是低分子肝素钠能够抑制补体激活, 减少机体免疫炎症反应; 同时, 低分子肝素钠能够结合 ACA-IgG, 减少血管内皮损伤, 抑制中性粒细胞、自然杀伤细胞功能, 并促进母-胎界面细胞因子向辅助型 T 细胞 2 (Th2) 转化。此推测有待进一步的实验验证。



**图 3** 低分子肝素钠对 URPL 大鼠调节性 T 细胞 (Treg) 分化及其细胞因子表达的影响。n = 3,  $\bar{x} \pm s$   
**Fig. 3** Effects of low molecular weight heparin sodium on treg cell differentiation and cytokine expression in URPL rats. n = 3,  $\bar{x} \pm s$   
 A - flow cytometry was used to detect the number of Treg cells in placental tissue; B - percentage of Treg cells; C - ELISA was used to detect serum IL-10 and TGF-β1 levels; D - RT-qPCR was used to detect *FOXP3*, *CTLA-4*, and *GITR* mRNA levels in placental tissue; E - Western blot was used to detect FOXP3, CTLA-4, and GITR protein levels in placental tissue; F - Western blot quantification; <sup>1)</sup>P < 0.05, vs control group; <sup>2)</sup>P < 0.05, vs URPL group.

**图 3** 低分子肝素钠对 URPL 大鼠调节性 T 细胞 (Treg) 分化及其细胞因子表达的影响。n = 3,  $\bar{x} \pm s$

**Fig. 3** Effects of low molecular weight heparin sodium on treg cell differentiation and cytokine expression in URPL rats. n = 3,  $\bar{x} \pm s$

miRNA 表达异常与 RPL 发生相关。研究表明, 某些 miRNA (*miR-19a*、*miR-181a*、*miR-542*) 可直接靶向 *SIP1R1*、*SIP1R2* 表达, 调节 SIP 通路<sup>[24-26]</sup>。*SIP1R1* 广泛表达于在免疫细胞表面, 能够调节免疫细胞增殖、迁移和细胞因子释放。有研究发现 RPL 患者胎盘中 *miR-33a-3p* 表达减少, *miR-33a-3p* 通过靶向抑制 *SIP1R1* 表达, 抑制 Treg 细胞分化, 从而导致 RPL<sup>[14]</sup>。本研究发现, 模型组大鼠胎盘组织中 *miR-33a* 水平降低, *SIP1R1* mRNA 和蛋白水平升高, 且数据库预测 *miR-33a-3p* 和 *SIP1R1* 具有结合位点, 说明 *miR-33a-3p* 可能调控 *SIP1R1* 表达, 并在大鼠妊娠流产中发挥调节作用。分析原因可能是机体免疫细胞表面的 *SIP1R1* 通过激活自身免疫, 削弱 Treg 细胞免疫抑制作用, 从而胚胎免疫耐受失败, 引发流产。此推测有待进一步的实验验证。经过低分子肝素钠或 FTY720 干预后, 大鼠胎盘组织中 *miR-33a* 水平升高, *SIP1R1* 水平降低, 且低分子肝素钠和 FTY720 作用效果相似, 说明低分子肝素钠可能通过

调节 *miR-33a-3p*、*SIP1R1* 表达阻止 URPL 发生。分析原因可能是低分子肝素钠能够诱导细胞膜 *SIP1R1* 内化并降解, 抑制自身免疫细胞流出及其应答反应, 从而增强胚胎免疫耐受。此推测有待进一步的实验验证。

综上所述, 低分子肝素钠可能通过调控 *miR-33a-3p*、*SIP1R1* 表达促进 URPL 大鼠 Treg 细胞分化, 这一研究为 URPL 的治疗提供了新的理论依据和实验支持。然而, 妊娠涉及母体和胎儿多种复杂因素的相互作用, *miR-33a-3p*、*SIP1R1* 表达是否可用于 URPL 的治疗仍需进一步研究。

## REFERENCES

- [ 1 ] ZHANG L, LI H L, HAN L T, et al. Association between semen parameters and recurrent pregnancy loss: an umbrella review of meta-analyses[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2024, 50 (4) : 545-556.
- [ 2 ] DONCKERS J, VAN DRONGELEN J, SPAANDERMAN M E A, et al. Unexplained recurrent pregnancy loss and markers of arterial vascular health: an experimental case-control study[J].

- Br J Obstet Gynaecol*, 2024, 131(6):777-785.
- [ 3 ] BLIDDAL S, FELDT-RASMUSSEN U, FORMAN J L, *et al.* Anti-Müllerian hormone and live birth in unexplained recurrent pregnancy loss[J]. *Reprod Biomed Online*, 2023, 46(6):995-1003.
- [ 4 ] ESPARVARINHA M, MADADI S, ASLANIAN-KALKHORAN L, *et al.* Dominant immune cells in pregnancy and pregnancy complications:T helper cells(TH1/TH2, TH17/Treg cells), NK cells, MDSCs, and the immune checkpoints[J]. *Cell Biol Int*, 2023, 47(3):507-519.
- [ 5 ] PAOLINO M, KOGLGRUBER R, CRONIN S J F, *et al.* RANK links thymic regulatory T cells to fetal loss and gestational diabetes in pregnancy[J]. *Nature*, 2021, 589(7842):442-447.
- [ 6 ] FU X, GUO H C, LI H, *et al.* Levels of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg and CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg in deciduate tissues of women with unexplained recurrent abortion and their values for predicting unexplained recurrent abortion[J]. *Chin J Fam Plan* (中国计划生育杂志), 2023, 31(10):2401-2404.
- [ 7 ] WEI A W, XIAO H D Z, SONG Y L, *et al.* Effects of danshou decoction on Th17/Treg cell balance in rats with pregnancy loss [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2021, 39(11):1-4.
- [ 8 ] WANG D C, HAN S B, LV G Z, *et al.* Pancreatic acinar cells-derived sphingosine-1-phosphate contributes to fibrosis of chronic pancreatitis via inducing autophagy and activation of pancreatic stellate cells [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(6):1488-1504. e20.
- [ 9 ] TIAN L L, WU Y X, CHOI H J, *et al.* S1P/S1PR1 signaling differentially regulates the allogeneic response of CD4 and CD8 T cells by modulating mitochondrial fission[J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(11):1235-1250.
- [ 10 ] ZEHRA OKUS F, BUSRA AZIZOGLU Z, CANATAN H, *et al.* S1P analogues SEW2871, BAF312 and FTY720 affect human Th17 and Treg generation ex vivo[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107:108665. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108665.
- [ 11 ] XIONG M, XU L, LI L, *et al.* The experimental research of pregnancy immune tolerance induced by FTY720 via blocking S1P signal transduction pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4):5897-5905.
- [ 12 ] KZAR AL-SHUKRI H H, ABDUL-JABBAR ALI S, AL-AKKAM K A, *et al.* The role of exo-miRNA in diagnosis and treatment of cancers, focusing on effective miRNAs in colorectal cancer[J]. *Cell Biol Int*, 2024, 48(3):280-289.
- [ 13 ] SRIVASTAVA P, BAMBA C, CHOPRA S, *et al.* Role of miRNA polymorphism in recurrent pregnancy loss:a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomark Med*, 2022, 16(2):101-115.
- [ 14 ] GENG X J, MAO G H, ZHAO D M, *et al.* Downregulation of miR-33a/b and miR-181a contributes to recurrent pregnancy loss by upregulating S1PR1 and repressing regulatory T cell differentiation[J]. *Placenta*, 2022, 121:137-144.
- [ 15 ] YANG T X, LIU Z G, ZHANG B W, *et al.* Comparison of the efficacy of low-molecular-weight heparin and fondaparinux sodium after total knee arthroplasty: a retrospective cohort study [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2023, 24(1):552. DOI: 10.1186/s12891-023-06674-6.
- [ 16 ] WU N N. Effects of low molecular weight Heparin sodium combined with Dydrogesterone in treatment of patients with threatened abortion[J]. *Med J Chin People's Health* (中国民康医学), 2024, 36(2):64-66.
- [ 17 ] SHAABAN O M, ABBAS AM, ZAHRAN K M, *et al.* Low-molecular-weight heparin for the treatment of unexplained recurrent miscarriage with negative antiphospholipid antibodies: a randomized controlled trial [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017, 23(6):567-572.
- [ 18 ] SCHLEUSSNER E, KAMIN G, SELIGER G, *et al.* Low-molecular-weight heparin for women with unexplained recurrent pregnancy loss:a multicenter trial with a minimization randomization scheme[J]. *Ann Intern Med*, 2015, 162(9):601-609.
- [ 19 ] WEN J, ZHANG X Q, LI C J. Clinical effect of low molecular weight heparin sodium combined with magnesium sulfate in the treatment of patients with severe preeclampsia[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29(2):119-122.
- [ 20 ] SONG Y L, HE D J, SHI S Q, *et al.* Hyperoside exerts protective effects against anticardiolipin antibody-induced recurrent pregnancy loss *in vivo* and *in vitro*[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2023, 42:9603271231163476.
- [ 21 ] FARSHCHI M, ABDOLLAHI E, SAGHAFI N, *et al.* Evaluation of Th17 and Treg cytokines in patients with unexplained recurrent pregnancy loss[J]. *J Clin Transl Res*, 2022, 8(3):256-265.
- [ 22 ] TANG C, HU W Q. The role of Th17 and Treg cells in normal pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA): new insights into immune mechanisms [J]. *Placenta*, 2023, 142:18-26.
- [ 23 ] HUANG S Q, XIA L, XIA Y Q, *et al.* Icaritin attenuates recurrent spontaneous abortion in mice by modulating Treg/Th17 imbalance via TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2024, 1871(1):119574. DOI: 10.1016/j.bbamer.2023.119574.
- [ 24 ] GUZZOLINO E, CHIAVACCI E, AHUJA N, *et al.* Post-transcriptional modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 by miR-19a affects cardiovascular development in zebrafish [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6:58. DOI: 10.3389/fcell.2018.00058.
- [ 25 ] ZHANG C X, SHEN J T, KONG S B, *et al.* MicroRNA-181a promotes follicular granulosa cell apoptosis via sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression downregulation? [J]. *Biol Reprod*, 2019, 101(5):975-985.
- [ 26 ] WU H X, WANG G M, LU X, *et al.* miR-542-3p targets sphingosine-1-phosphate receptor 1 and regulates cell proliferation and invasion of breast cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(1):108-114.

(收稿日期:2024-06-18)