

· 实验研究 ·

养血安胎方含药血清调节外泌体释放影响内皮细胞
及子宫内膜细胞的机制研究姚伟洁^{1,2}, 冯欣^{1,2*}

1. 首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院, 北京 100006;

2. 首都医科大学基础-临床联合实验室, 北京 100006

摘要 目的:探讨养血安胎方含药血清调节人绒毛膜癌(JEG-3)细胞外泌体的释放从而影响内皮细胞及子宫内膜细胞的机制。方法:使用外泌体释放抑制剂 GW4869 抑制 JEG-3 细胞外泌体的释放,养血安胎方含药血清干预 JEG-3 细胞,并建立 JEG-3 细胞或其分泌的外泌体与人子宫内膜腺癌(HEC-1-A)细胞或人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的共培养体系,采用 Western blot 法测定 HUVECs 的血管内皮生长因子 A(VEGFA)及磷酸化血管内皮生长因子受体 2(p-VEGFR2)的表达,HEC-1-A 细胞中上皮-间质转化(EMT)相关蛋白上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)及纤连蛋白(Fibronectin)的表达,以及蜕膜化相关蛋白胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP-1)、催乳素(PRL)、同源框基因 A10(HOXA10)及骨形态发生蛋白 2(BMP2)的表达,细胞划痕实验测定 HUVECs 的细胞迁移率,Transwell 小室实验测定 HUVECs 的侵袭与迁移能力,细胞骨架实验测定 HUVECs 的纤维状肌动蛋白(F-actin)表达,小管生成实验测定 HUVECs 的管腔长度。结果:与空白对照组比较,GW4869 组中 VEGFA 及 p-VEGFR2 的表达显著降低($P < 0.01$);E-cadherin 表达显著增加($P < 0.01$),Vimentin、N-cadherin 和 Fibronectin 的表达显著降低($P < 0.01$);BMP2、HOXA10、PRL 和 IGFBP1 的表达显著降低($P < 0.01$);细胞迁移和侵袭能力显著降低($P < 0.01$),管腔长度显著降低($P < 0.01$),F-actin 表达显著降低($P < 0.01$)。与 GW4869 组比较,GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 VEGFA 及 p-VEGFR2 的表达显著增加($P < 0.01$);E-cadherin 表达显著降低($P < 0.01$),Vimentin、N-cadherin 和 Fibronectin 的表达显著增加($P < 0.01$);BMP2、HOXA10、PRL 和 IGFBP1 的表达显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);细胞迁移和侵袭能力显著增加($P < 0.01$),管腔长度显著增加($P < 0.01$),F-actin 表达显著增加($P < 0.01$)。结论:养血安胎方含药血清通过调节 JEG-3 细胞外泌体的释放,从而影响内皮细胞的血管生成,以及子宫内膜细胞 EMT 及蜕膜化过程。

关键词 外泌体;血管生成;上皮细胞-间质转化;蜕膜化

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2026)03-0006-09

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.260048

养血安胎方作为首都医科大学临床应用多年的院内制剂,在复发性自然流产(Recurrent spontaneous abortion, RSA)的治疗方面表现出显著的疗效^[1-2],但其治疗的分子机制仍需进一步研究。前期动物实验研

究^[3-5]发现,养血安胎方能够通过抑制自噬,改善妊娠小鼠的胎盘发育,促进胎盘的血管生成,并促进妊娠小鼠子宫内膜的上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)及蜕膜化过程,从而降低 RSA 小鼠的流产率,相关结论在细胞实验中也得到验证,即使用自噬诱导剂干预人绒毛膜癌(JEG-3)细胞,随后建立 JEG-3 细胞与人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)及人子宫内膜腺癌(HEC-1-A)细胞的共培养体系发现,自噬会阻碍 HUVECs 的血管生成及 HEC-1-A 细胞的 EMT 及蜕

收稿日期:2025-01-15 修回日期:2025-07-30

基金项目:国家自然科学基金项目(82204783)

作者简介:姚伟洁(1990-),男,博士,主管药师,研究方向:中药药理学。

* 通信作者:冯欣(1965-),女,硕士,主任药师,研究方向:药理学,医院药学。

膜化过程;而使用养血安胎含药血清干预 JEG-3 细胞后,则会通过抑制自噬来促进 HUVECs 的血管生成及 HEC-1-A 细胞的 EMT 及蜕膜化过程。但是,养血安胎方是如何通过影响滋养层细胞进一步影响到内皮细胞或子宫内膜的机制尚未明确,需要进一步研究。

外泌体在刺激血管生成、细胞增殖和细胞存活中均发挥了重要的作用,它能够通过携带来源细胞的蛋白质,信使核糖核酸(Messenger Ribonucleic Acid, mRNA)和微核糖核酸(MicroRNA, miRNA)至受体细胞,进而对受体细胞功能进行调控^[6]。研究^[7]显示,外泌体在滋养层细胞与子宫中细胞的相互作用及交流、保障正常血管生成和胎盘发育中均发挥了重要的沟通作用。由此可以推断,滋养层细胞功能缺陷可能会通过影响外泌体的释放,致使滋养层细胞与其他细胞之间作用及交流出现异常,最终导致 RSA 的发生。前期实验研究^[8]也发现,养血安胎含药血清能够通过抑制 JEG-3 细胞外泌体中 miR-16 水平,进一步抑制 HUVECs 中的 miR-16 水平,进而增加 HUVECs 中血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和磷酸化血管内皮细胞生长因子受体 2(phospho-VEGF Receptor 2, p-VEGFR2)的蛋白表达,促进血管生成,这也为养血安胎方可能通过改善滋养层细胞外泌体的释放,进而影响内皮细胞或子宫内膜细胞的功能提供了有力的数据支撑。

因此,本实验在前期研究基础上,以养血安胎方含药血清为实验药物,使用外泌体释放抑制剂进行干预,并建立 JEG-3 细胞与 HUVECs 及 HEC-1-A 细胞的共培养体系,探讨养血安胎方调节 JEG-3 细胞外泌体的释放从而影响内皮细胞及子宫内膜细胞的机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

8 周龄体质量为 (200 ± 20) g 的无特定病原体级(Specific Pathogen Free, SPF)雄性 SD 大鼠 20 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号为 SYXK(京)2022-0010。大鼠饲养于北京妇产医院动物房内,所处室内环境为 12 h/12 h 的昼夜交替,温度保持在 (23 ± 2) °C,湿度维持在 (55 ± 10) %。饲养期间,大鼠自由进食以及饮水。整个实验程序均严格遵循国家动物伦理与福利方面的相关规定与要求,经北京妇产医院伦理委员会批准,伦理编号为 BOGH21-2401-2。

1.2 实验细胞

JEG-3 细胞(货号 CL-0127,购自 Procell),使用 Minimum Essential Medium(MEM)培养基(货号 PM150410,购自 Procell)进行培养;HEC-1-A 细胞(货号 CL-0099,购自 Procell),使用 McCoy's 5A 培养

基(货号 PM150710,购自 Procell)进行培养;HUVECs(货号 IM-H205,购自 Immocell),使用 ECM 专用培养基(货号 IMC-309,购自 Immocell)进行培养。所有细胞均培养于 37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中。

1.3 实验药品

养血安胎方组方:当归 10 g,白芍 10 g,益母草 10 g,茯苓 10 g,山药 10 g,续断 10 g,桑寄生 10 g,川芎 6 g,广木香 6 g,石莲子 10 g 和菟丝子 10 g,购自北京同仁堂。制备方法如下:将上述药品进行充分浸泡,随后进行两次煎煮,利用纱布过滤掉药渣,将两次煎煮所得到的滤液合并,再加热浓缩至稠膏状,放置于真空干燥机内进行干燥处理,使其成为粉末后备用。给药时使用蒸馏水溶解后使用。

1.4 实验试剂

脱脂奶粉(货号 D8340)、丽春红染液(货号 P0012)、0.1% 结晶紫溶液(货号 G1063)均购自索莱宝公司;兔抗 β -actin 抗体(货号 81115-1-RR)、兔抗 E-cadherin 抗体(货号 20874-1-AP)、兔抗 VEGFA 抗体(货号 19003-1-AP)、兔抗 CD9 抗体(货号 20597-1-AP)、兔抗 TSG101 抗体(货号 28283-1-AP)、兔抗 Flotillin1 抗体(货号 15571-1-AP)、兔抗 Calnexin 抗体(货号 10427-2-AP)以及鬼笔环肽(货号 PF00001)均购自 Proteintech 公司;兔抗 p-VEGFR2 抗体(货号 ab38473)、兔抗 Vimentin 抗体(货号 ab92547)、兔抗 N-cadherin 抗体(货号 ab76011)、兔抗 Fibronectin 抗体(货号 ab45688)、兔抗 BMP2 抗体(货号 ab214821)、兔抗 IGFBP1 抗体(货号 ab181141)、兔抗 PRL 抗体(货号 ab170935)均购自 Abcam 公司;兔抗 HOXA10 抗体(货号 58891)购自 CST 公司;山羊抗兔 IgG-HPR 抗体(货号 ZB-2301)购自中杉金桥公司;ECL 超敏发光液(货号 WBKLS0100)购自 Millipore 公司;蛋白 Marker(货号 26616)购自 Pierce 公司;Matrigel 基质胶(货号 356234)购自 BD 公司;GW4869(货号 HY-19363)购自 MCE 公司。

1.5 实验仪器

低温离心机(型号 3K15)购自 Sigma 公司;全波长酶标仪(型号 SpectraMax Plus 384)购自 Molecular Devices 公司;Power Pac™ 型基础电泳仪电源(型号 1645070)、Mini PROTEAN® Tetra 型电泳槽(型号 1658004)、小型 Trans Blot® 转印槽(型号 1703930)均购自 Bio-Rid 公司;微型离心机(型号 S1010E)购自 SCILOGEX 公司;脱色摇床(型号 TS-2)购自其林贝尔公司。

2 实验方法

2.1 养血安胎方含药血清的制备

将大鼠适应性喂养 1 周,随后平均分为两组,每组 10 只,第 1 组给予 $19.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的养血安胎方溶液,每天灌胃给药 1 次;第 2 组则给予等量蒸馏水,每天灌胃 1 次,两组均连续灌胃 7 d。末次给药 1 h 后处死大鼠,自腹主动脉取血,静置 2 h 后放于温度为 4°C ,转速为 $3\,000 \text{ r/min}$ 的离心机中离心 20 min ,离心后吸取上清液并置于 60°C 水浴中进行灭活处理,使用 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径的微孔滤膜过滤除菌后进行分装冻存,以用于后续实验。

2.2 超速离心法分离外泌体

JEG-3 细胞于培养皿中培养 48 h,收集培养基, $1\,637 \text{ r/min}$ 离心 10 min 去除细胞, $4\,239 \text{ r/min}$ 离心 15 min 去除死细胞, $9\,460 \text{ r/min}$ 离心 30 min 去除细胞碎片, $29\,900 \text{ r/min}$ 离心 $70 \text{ min} \times 2$ 次后去除上清液,得到的沉淀物即为外泌体。随后使用 PBS 溶液溶解外泌体,用于后续实验。

2.3 JEG-3 细胞的分组与干预

JEG-3 细胞共分为 5 组,分别为空白对照(Control)组、养血安胎方组、GW4869 组、GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组。其中 Control 组加入 10% 空白血清,养血安胎方组加入 10% 养血安胎含药血清, GW4869 组加入 10% 空白血清及 $20 \mu\text{mol/L}$ GW4869 溶液, GW4869 + 养血安胎方组加入 10% 养血安胎含药血清及 $20 \mu\text{mol/L}$ GW4869 溶液, GW4869 + 外泌体组加入 10% 空白血清及 $20 \mu\text{mol/L}$ GW4869 溶液,以及方法 2.2 离出的外泌体,细胞与外泌体的数量比为 1:40 000。

2.4 HEC-1-A 细胞或 HUVECs 与 JEG-3 细胞的共培养

将 JEG-3 细胞接种于孔径为 $0.4 \mu\text{m}$ 的共培养小室中,同时将 HEC-1-A 细胞或者 HUVECs 接种在 6 孔板内,随后放置于培养箱中过夜培养。参照方法 2.3 的要求,在共培养小室里加入相应的药物。经过 48 h 的处理后,将小室转移至已经培养好且接种了 HEC-1-A 细胞或者 HUVECs 的 6 孔板中。所有组均继续共培养 48 h。

2.5 Western blot 法测定 HEC-1-A 细胞或 HUVECs 的蛋白表达

HEC-1-A 细胞或 HUVECs 在共培养 48 h 后收集,使用 RIPA 裂解液提取细胞及外泌体中蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。于 SDS-PAGE 凝胶中加入等量蛋白,并通过电泳系统将蛋白分离,使用湿转系统将蛋白转运至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h,加入相应一抗 4°C 孵育过夜。吸弃一抗,加入相应二抗室温孵育 1 h,加入 ECL 超敏发光液,于凝胶成像系统中曝光形成图像。通过 Image J 软件计算蛋白的灰度值,

计算相对表达量, β -actin 作为内标蛋白,结果以倍数形式表示。一抗使用情况如下:兔抗 β -actin 抗体,兔抗 CD9 抗体,兔抗 TSG101 抗体,兔抗 Flotillin1 抗体,兔抗 Calnexin 抗体,兔抗 VEGFA 抗体,兔抗 p-VEGFR2 抗体,兔抗 BMP2 抗体,兔抗 HOXA10 抗体,兔抗 PRL 抗体,兔抗 IGFBP1 抗体,兔抗 E-cadherin 抗体,兔抗 Vimentin 抗体,兔抗 N-cadherin 抗体和兔抗 Fibronectin 抗体。

2.6 细胞划痕实验测定 HUVECs 的细胞迁移率

JEG-3 细胞置于孔径为 $0.4 \mu\text{m}$ 的共培养小室中培养,与此同时,将 HUVECs 培养于 6 孔板中。在细胞贴壁后,将接种 HUVECs 的 6 孔板放置在倒置显微镜下,并使用 $10 \mu\text{L}$ 枪头在每个孔的中央划十字线,拍照后计算划痕距离。参照方法 2.4 将 HUVECs 与 JEG-3 细胞进行共培养,48 h 后再次于显微镜下拍照并观察划痕距离。比较不同组之间划痕迁移距离,并计算迁移率,以此评估 HUVECs 的迁移能力。

2.7 Transwell 小室实验测定 HUVECs 的细胞迁移或侵袭数量

参照方法 2.4 将 HUVECs 与 JEG-3 细胞进行共培养,48 h 后将 HUVECs 进行重悬,随后置于 $8 \mu\text{m}$ 孔径的小室中培养(含有或不含有基质胶),同时在培养板下层添加 20% FBS 培养液。HUVECs 在培养箱中继续培养 48 h 后,使用 4% 多聚甲醛溶液对其进行固定,随后加入 0.1% 的结晶紫溶液,置于 37°C 环境下染色 15 min 。于倒置显微镜下进行拍照,分别计数小室中迁移(对应无基质胶的情况)和侵袭(对应含基质胶的情况)的细胞数目,以此评估 HUVECs 的迁移和侵袭能力,结果以倍数的形式表示。

2.8 细胞骨架实验测定 HUVECs 的纤维状肌动蛋白(F-actin)表达

参照方法 2.4 将 HUVECs 与 JEG-3 细胞进行共培养,共培养 48 h 后对下室 HUVECs 展开后续处理,使用多聚甲醛于室温下将其固定 30 min ,随后使用 0.5% Triton-X 100 溶液于冰浴环境中透膜 15 min ,再以 3% BSA 溶液于室温下封闭 30 min 。封闭完成后,使用鬼笔环肽溶液于室温下染色 60 min ,再使用 DAPI 于室温下孵育 5 min 。通过激光共聚焦显微镜采集细胞图像,观察细胞骨架的重塑,并使用 Image J 软件对 F-actin(Filamentous Actin)的表达进行统计,结果以倍数的形式表示。

2.9 管形成实验测定 HUVECs 的新生管腔长度

参照方法 2.4 将 HUVECs 与 JEG-3 细胞进行共培养,48 h 后将 HUVECs 进行重悬,随后加至预先铺好 Matrigel 基质胶的 96 孔板中。细胞继续培养 12 h ,运用倒置显微镜针对管状网络予以成像,通过所成图像,

对新生血管的管腔长度进行统计,结果以倍数形式表示。

2.10 数据处理

运用 SPSS19.0 统计软件对所收集到的数据展开处理,当数据符合正态分布并且方差齐性时,最终结果以平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)的形式呈现。多组独立样本间的比较,采用单因素方差分析(One - Way ANOVA)的方法,组内两两比较则采用最小显著性差异(*LSD*)的方法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 外泌体的鉴定

超速离心法分离了 JEG - 3 细胞分泌的外泌体,使用 Western blot 法对得到的外泌体进行鉴定。结果显示,外泌体标记性蛋白 CD9、肿瘤易感基因 101 (Tumor Susceptibility Gene 101, TSG101) 和 Flotillin1 蛋白表达呈阳性,标记细胞碎片的钙联结蛋白 (Calnexin) 表达呈阴性,表明本实验分离得到的物质为外泌体,且外泌体中不包含细胞碎片,即纯度符合实验标准,见图 1。

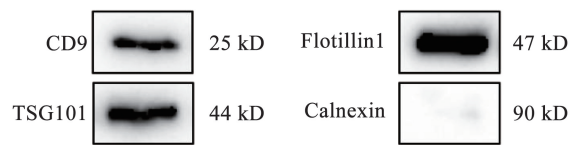
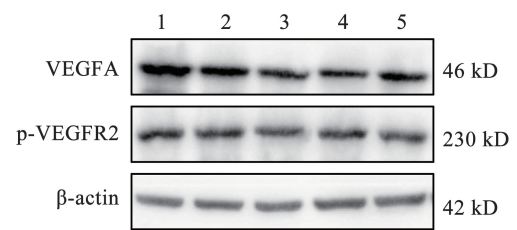


图 1 Western blot 法测定外泌体标志性蛋白表达的结果

3.2 Western blot 法检测 HUVECs 中 VEGFA 及 p - VEGFR2 蛋白表达

与 Control 组比较,GW4869 组中 VEGFA 和 p - VEGFR2 的蛋白表达显著降低($P < 0.01$),表明抑制 JEG - 3 细胞外泌体的分泌会导致 HUVECs 中血管生成出现异常;与 GW4869 组比较,GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 VEGFA 和 p - VEGFR2 的蛋白表达均显著增加($P < 0.01$),表明 JEG - 3 细胞

分泌的外泌体能够促进 HUVECs 的血管生成,且养血安胎方能够促进 JEG - 3 外泌体的分泌,从而促进 HUVECs 的血管生成,见图 2,表 1。



注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;
4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。

图 2 HUVECs 中 VEGFA、p - VEGFR2 蛋白表达印迹图

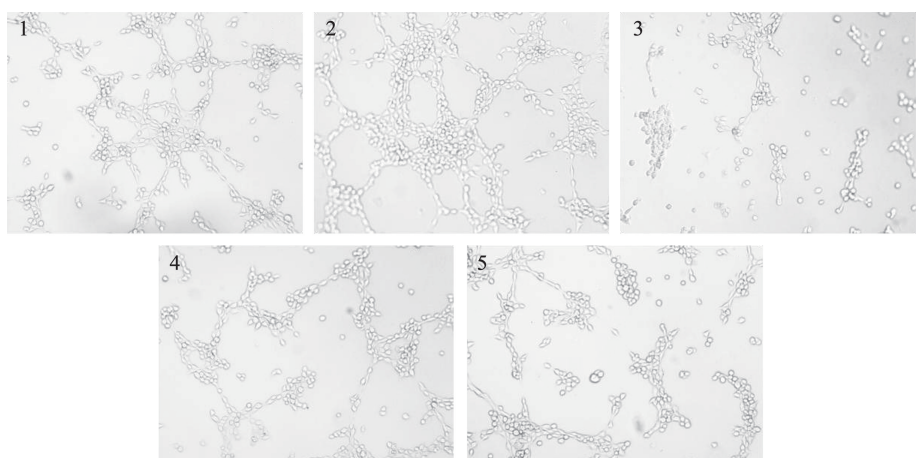
表 1 HUVECs 中 VEGFA、p - VEGFR2 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	VEGFA	p - VEGFR2
Control 组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
养血安胎方组	1.01 ± 0.05	0.99 ± 0.04
GW4869 组	0.57 ± 0.02 ^{aa}	0.75 ± 0.03 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	0.75 ± 0.04 ^{aabb}	0.88 ± 0.02 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	0.77 ± 0.03 ^{aabb}	0.89 ± 0.03 ^{aabb}

注:与 Control 组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

3.3 小管形成实验观察 HUVECs 的管腔长度

与 Control 组比较,GW4869 组中 HUVECs 的管腔长度显著降低($P < 0.01$),表明抑制 JEG - 3 细胞外泌体的分泌会导致 HUVECs 的血管生成出现异常;与 GW4869 组比较,GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 HUVECs 的管腔长度均显著增加($P < 0.01$),表明 JEG - 3 细胞分泌的外泌体能够促进 HUVECs 的血管生成,且养血安胎含药血清能够促进 JEG - 3 细胞外泌体的分泌,进而促进 HUVECs 的血管生成,见图 3,表 2。



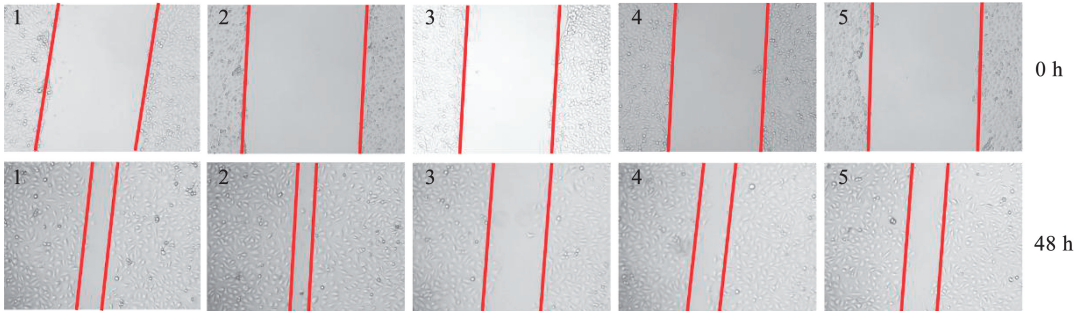
注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。

图 3 HUVECs 的管腔长度($\times 100$)

表 2 HUVECs 中管腔长度($\bar{x} \pm s, n=4$,倍)

组别	管腔长度
Control 组	1.00 ± 0.02
养血安胎方组	1.29 ± 0.04 ^{aa}
GW4869 组	0.50 ± 0.02 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	0.84 ± 0.02 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	0.88 ± 0.01 ^{aabb}

注:与 Control 组比较,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。



注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。

图 4 HUVECs 的细胞迁移率($\times 100$)

表 3 HUVECs 的细胞迁移率($\bar{x} \pm s, n=4$,%)

组别	迁移率
Control 组	78.50 ± 2.60
养血安胎方组	83.00 ± 2.80
GW4869 组	41.00 ± 1.87 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	65.75 ± 2.90 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	63.50 ± 2.21 ^{aabb}

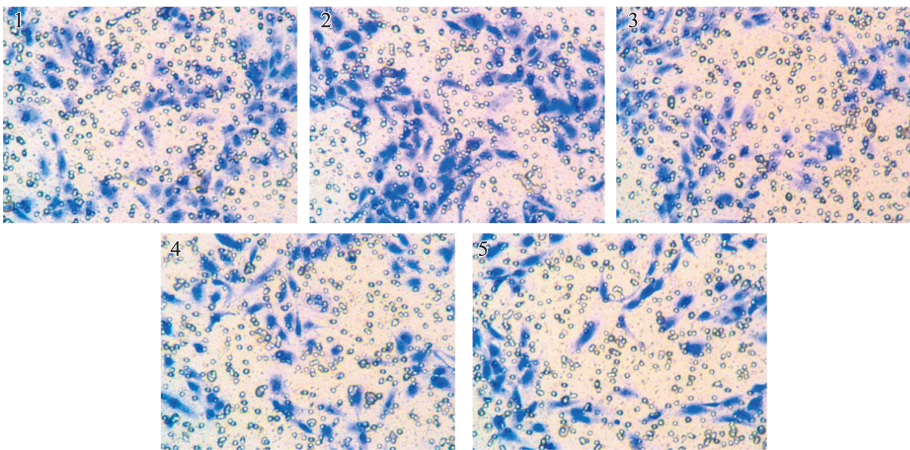
注:与 Control 组比较,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

3.5 Transwell 小室实验测定 HUVECs 的细胞侵袭和迁移能力

3.4 细胞划痕实验测定 HUVECs 的细胞迁移率

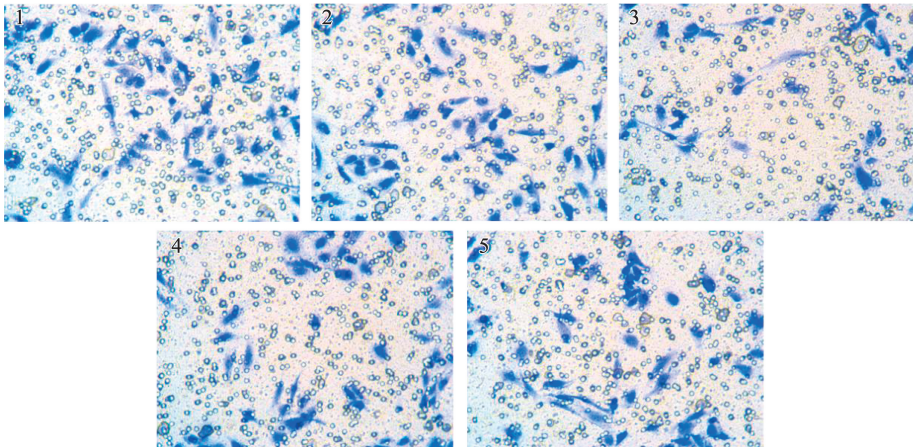
与 Control 组比较, GW4869 组中 HUVECs 的细胞迁移率显著降低($P < 0.01$), 表明抑制 JEG-3 细胞外泌体的分泌会导致细胞迁移能力被抑制; 与 GW4869 组比较, GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 HUVECs 的细胞迁移率显著提高($P < 0.01$), 表明 JEG-3 细胞分泌的外泌体能够促进 HUVECs 的细胞迁移, 且养血安胎含药血清能够促进 JEG-3 细胞外泌体的分泌, 进而促进细胞的迁移能力, 见图 4, 表 3。

与 Control 组比较, GW4869 组中 HUVECs 的细胞迁移和侵袭数量均显著降低($P < 0.01$), 表明抑制 JEG-3 细胞外泌体的分泌会导致细胞迁移和侵袭能力被抑制; 与 GW4869 组比较, GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 HUVECs 的细胞迁移和侵袭数量均显著增加($P < 0.01$), 表明 JEG-3 细胞分泌的外泌体能够促进细胞的迁移和侵袭能力, 且养血安胎方含药血清能够促进 JEG-3 细胞外泌体的分泌, 进而促进细胞的迁移和侵袭能力, 见图 5, 图 6, 表 4。



注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。

图 5 HUVECs 的细胞迁移能力($\times 200$)



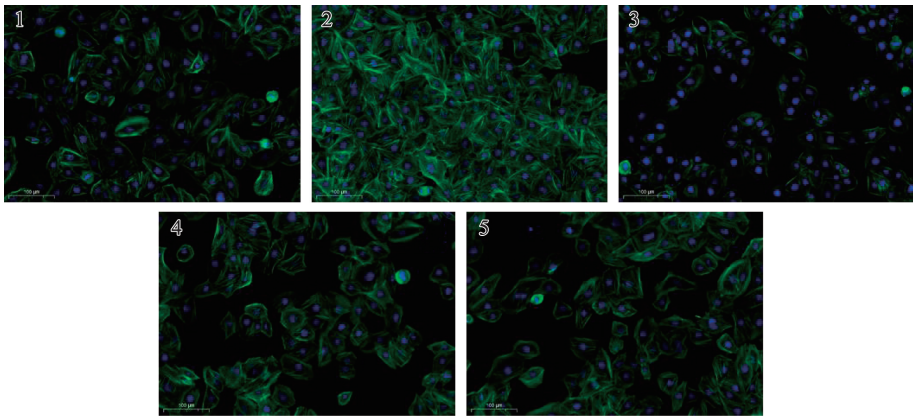
注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。
图6 HUVECs 的细胞侵袭能力(×200)

表 4 HUVECs 的细胞迁移和侵袭能力($\bar{x} \pm s, n = 4$)		
组别	细胞迁移	细胞侵袭
Control 组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.05
养血安胎方组	1.11 ± 0.03	1.03 ± 0.03
GW4869 组	0.63 ± 0.02 ^{aa}	0.58 ± 0.01 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	0.79 ± 0.02 ^{aabb}	0.84 ± 0.02 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	0.83 ± 0.02 ^{aabb}	0.81 ± 0.04 ^{aabb}

注:与 Control 组比较,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

3.6 细胞骨架实验观察 HUVECs 中 F-actin 的表达变化

与 Control 组比较,GW4869 组中 HUVECs 的 F-actin 表达显著降低($P < 0.01$),表明抑制 JEG-3 细胞外泌体的分泌会导致 HUVECs 的细胞骨架重塑受到损伤;与 GW4869 组比较,GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 HUVECs 的 F-actin 表达显著增加($P < 0.01$),表明 JEG-3 细胞分泌的外泌体能够促进 HUVECs 的细胞骨架重塑,且养血安胎含药血清能够促进 JEG-3 细胞外泌体的分泌,进而促进 HUVECs 的细胞骨架重塑,减轻损伤,见图 7,表 5。



注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。
图7 HUVECs 的细胞骨架重塑(×200)

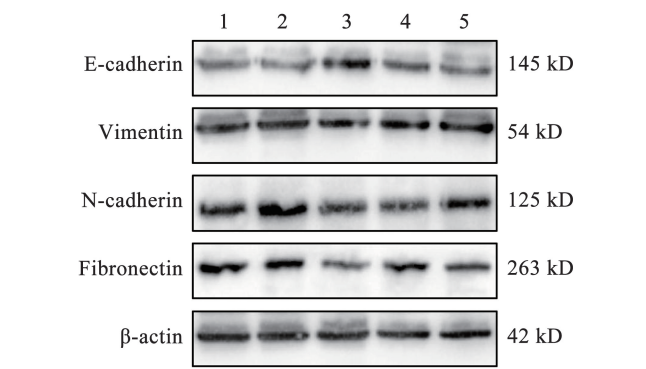
表 5 HUVECs 的 F-actin 表达水平($\bar{x} \pm s, n = 4$)	
组别	F-actin
Control 组	1.00 ± 0.04
养血安胎方组	1.09 ± 0.02
GW4869 组	0.52 ± 0.03 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	0.75 ± 0.02 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	0.78 ± 0.04 ^{aabb}

注:与 Control 组比较,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

3.7 Western blot 法检测 HEC-1-A 细胞 EMT 相关蛋白表达变化

与 Control 组比较,GW4869 组中上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)的表达显著增加($P < 0.01$),波形蛋白(Vimentin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)及纤连蛋白(Fibronectin)的表达显著降低($P < 0.01$),表明抑制 JEG-3 细胞外泌体的分泌会导致 HEC-1-A 细胞中 EMT 过程出现障碍;与 GW4869 组比较,GW4869 + 养

血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 E - cadherin 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Vimentin、N - cadherin 和 Fibronectin 的蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$) 表明 JEG - 3 细胞分泌的外泌体能够促进 HEC - 1 - A 细胞的 EMT 过程,且养血安胎方能够促进 JEG - 3 外泌体的分泌,从而促进 HEC - 1 - A 细胞的 EMT 过程,见图 8,表 6。



注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;
4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。
图 8 HEC - 1 - A 细胞中 EMT 相关蛋白的表达印迹图

3.8 Western blot 法检测 HEC - 1 - A 细胞蜕膜化相关蛋白表达变化

与 Control 组比较,GW4869 组中胰岛素样生长因

表 6 HEC - 1 - A 细胞中 EMT 相关蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)				
组别	E - cadherin	Vimentin	N - cadherin	Fibronectin
Control 组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
养血安胎方组	0.98 ± 0.03	1.01 ± 0.03	1.12 ± 0.05	0.94 ± 0.04
GW4869 组	1.48 ± 0.03 ^{aa}	0.75 ± 0.02 ^{aa}	0.75 ± 0.03 ^{aa}	0.55 ± 0.01 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	1.20 ± 0.02 ^{aabb}	0.86 ± 0.02 ^{aabb}	0.92 ± 0.03 ^{bb}	0.81 ± 0.03 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	1.00 ± 0.06 ^{bb}	0.92 ± 0.01 ^{abb}	0.91 ± 0.02 ^{bb}	0.79 ± 0.04 ^{aabb}

注:与 Control 组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^{bb} $P < 0.01$ 。

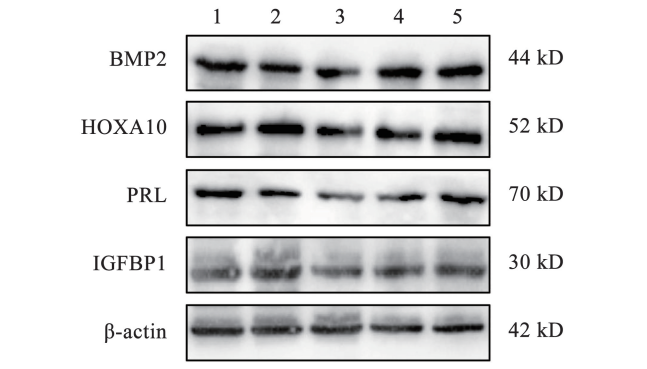
表 7 HEC - 1 - A 细胞中蜕膜化相关蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)				
组别	BMP2	HOXA10	PRL	IGFBP1
Control 组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.05	0.96 ± 0.03
养血安胎方组	0.93 ± 0.02	1.08 ± 0.03	0.92 ± 0.05	1.06 ± 0.04
GW4869 组	0.78 ± 0.02 ^{aa}	0.82 ± 0.02 ^{aa}	0.54 ± 0.02 ^{aa}	0.82 ± 0.03 ^{aa}
GW4869 + 养血安胎方组	0.94 ± 0.02 ^{bb}	0.94 ± 0.01 ^{bb}	0.76 ± 0.04 ^b	0.95 ± 0.01 ^{aabb}
GW4869 + 外泌体组	0.97 ± 0.03 ^{bb}	0.99 ± 0.05 ^{bb}	0.90 ± 0.02 ^{bb}	0.96 ± 0.02 ^{bb}

注:与 Control 组比较,^{aa} $P < 0.01$;与 GW4869 组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。

4 讨论

细胞外囊泡 (Extracellular vesicles, EVs) 在血管生成、黏附、增殖、细胞存活、炎症以及免疫应答等诸多过程中均发挥作用,可由多种细胞分泌。常见的 EVs 有 3 种类型,分别是微囊泡、外泌体和凋亡小体,其中外泌体的研究最为普遍。外泌体具有双层膜结构,大小在 40 ~ 100 nmol/L,跨膜蛋白 CD9、CD63、多泡体产生

子结合蛋白 1 (IGFBP - 1)、催乳素 (PRL)、同源框基因 A10 (HOXA10) 及骨形成发生蛋白 2 (BMP2) 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$),表明抑制 JEG - 3 细胞外泌体的分泌会导致 HEC - 1 - A 细胞中蜕膜化过程出现障碍;与 GW4869 组比较,GW4869 + 养血安胎方组和 GW4869 + 外泌体组中 BMP2、HOXA10、PRL 和 IGFBP1 的蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明 JEG - 3 细胞分泌的外泌体能够促进 HEC - 1 - A 细胞的蜕膜化过程,且养血安胎方能够促进 JEG - 3 外泌体的分泌,从而促进 HEC - 1 - A 细胞的蜕膜化过程,见图 9,表 7。



注:1. Control 组;2. 养血安胎方组;3. GW4869 组;
4. GW4869 + 养血安胎方组;5. GW4869 + 外泌体组。
图 9 HEC - 1 - A 细胞中蜕膜化相关蛋白的表达印迹图

的蛋白 TSG101 以及转膜和融合相关蛋白 Flotillin1 可用于外泌体的鉴定^[9]。外泌体内部含有多来源细胞的蛋白质、mRNA 和 miRNA,释放到细胞外后,能够通过受体识别、膜融合以及内吞作用等方式进入受体细胞,从而发挥细胞通讯的功能。

研究显示,自噬在调节外泌体的生物生成和释放方面发挥着重要的作用。自噬的降解过程发生在溶酶

体中,溶酶体降解功能障碍会导致货物降解失败,若自噬体与溶酶体融合受阻,货物也无法进入溶酶体降解。当溶酶体无法降解超负荷的货物时,这些货物就会通过外泌体释放的方式释放到细胞外,以补偿其在细胞内降解的减少,从而维持细胞的平衡,这个过程被称作分泌性自噬,因降解过程未发生在溶酶体中,因此从严格意义上讲分泌性自噬并不属于自噬^[10]。多泡体(Multivesicular Bodies, MVBs)同样可以与溶酶体融合,或与自噬体形成自噬内涵体后与溶酶体融合来解决降解问题;此外,MVBs或自噬内涵体还可以与质膜融合,以外泌体的形式释放到细胞外^[11]。可见,外泌体在溶酶体中被清除的过程是先于直接排放到细胞外的。自噬水平的增加会导致释放到细胞外的外泌体减少,从而对受体细胞的调控能力下降。前期的实验研究^[3-4]也显示,养血安胎方能够抑制自噬体和溶酶体的融合,从而抑制自噬。这些研究均显示,养血安胎方通过调控滋养层细胞并影响内皮细胞及子宫内膜细胞功能的机制可能是通过调节外泌体释放的方式实现的。

为了验证这一观点,在本实验中首先通过差速离心法分离了JEG-3细胞分泌的外泌体,通过Western blot法对外泌体的标志性蛋白进行了鉴定,CD9、TSG101和Flotillin1蛋白表达呈阳性,表明分离得到的物质为外泌体;标记细胞碎片的Calnexin蛋白表达呈阴性,表明外泌体中不包含细胞碎片,纯度符合实验标准,可用于后续实验。

通过使用外泌体释放抑制剂GW4869干预JEG-3细胞后,首先观察了其对HUVECs中血管生成的影响。首先测定了血管生成相关蛋白VEGFA及p-VEGFR2的表达,VEGF能够促进血管生成,也能够使VEGFR-2发生磷酸化,从而发挥促血管生成的作用^[12-13],结果显示,HUVECs中VEGFA及p-VEGFR2的表达显著降低,而加入JEG-3细胞释放的外泌体后,HUVECs中VEGFA及p-VEGFR2的表达明显增加,这表明JEG-3细胞通过调节外泌体的释放从而影响了HUVECs的血管生成;而使用养血安胎含药血清干预以后,HUVECs中VEGFA及p-VEGFR2的表达显著增加,与加入外泌体达到了同样的效果,这表明养血安胎含药血清能够促进JEG-3细胞中外泌体的释放。这在HUVECs的小管形成实验中也得到了验证,外泌体释放抑制剂干预JEG-3细胞后,小管管腔长度显著降低,使用外泌体及养血安胎含药血清干预后会导致小管管腔长度增加,表明养血安胎含药血清通过促进JEG-3细胞中外泌体的释放,促进了血管生成。

细胞侵袭和迁移若受到抑制,会致使血管生成出现障碍^[14]。通过细胞划痕实验测定了HUVECs的细胞迁移率,Transwell小室实验测定了HUVECs的迁移

和侵袭数量,结果显示,外泌体释放抑制剂对JEG-3细胞进行干预后,HUVECs的细胞迁移和侵袭能力均显著降低;而外泌体与养血安胎含药血清则能使HUVECs的细胞迁移和侵袭能力明显增加。细胞骨架在细胞形状、迁移、分裂以及转录反应中起着重要作用,同时也参与血管生成,其损伤会导致血管生成异常^[15]。其中,微丝作为细胞质骨架的重要组成部分,是F-actin的聚合形式,参与了细胞骨架的重排,细胞的侵袭和迁移都依赖于F-actin的富集^[16]。实验结果显示,外泌体释放抑制剂干预JEG-3细胞后,HUVECs的F-actin表达显著降低;外泌体及养血安胎含药血清能够增加HUVECs中的F-actin表达。以上结果表明养血安胎含药血清通过促进JEG-3细胞中外泌体的释放,促进了HUVECs的细胞骨架重塑,减轻了损伤,并促进了细胞的迁移与侵袭。

EMT在胚胎发育中发挥了重要的作用,可使细胞间黏附能力减弱,迁移和侵袭的能力增强^[17-19],本实验通过测定上皮标志物E-cadherin和间质型标志物N-cadherin、Vimentin及Fibronectin来确定EMT的发生^[20]。结果显示,外泌体释放抑制剂干预JEG-3细胞后,HUVECs的EMT相关蛋白E-cadherin的表达增加,N-cadherin、Vimentin及Fibronectin的表达均降低,表明EMT过程出现障碍,而外泌体及养血安胎含药血清均能够通过促进外泌体的分泌进而促进EMT过程。

蜕膜化是指子宫内膜由子宫内膜基质细胞转变成分泌性蜕膜细胞的过程^[21],蜕膜化过程的缺陷会导致不孕、流产、早产等妊娠疾病的发生^[22]。通过测定IGFBP-1、PRL、HOXA10及BMP2可用于确定蜕膜化过程是否存在缺陷^[23-25]。结果显示,外泌体释放抑制剂干预JEG-3细胞后,HUVECs的蜕膜化相关蛋白BMP2、PRL、HOXA10和IGFBP-1的表达均降低,表明蜕膜化过程出现障碍,而外泌体及养血安胎含药血清均能够通过促进外泌体的分泌进而促进蜕膜化过程。

综上所述,养血安胎方通过促进JEG-3细胞中外泌体的释放,从而促进内皮细胞的细胞骨架重塑,增加细胞的迁移和侵袭能力,促进血管生成,促进子宫内膜细胞EMT及蜕膜化过程。

参考文献:

- [1] 何军琴,李玛建,王玉雯,等.养血安胎颗粒对复发性流产血栓前状态的中西医结合干预模式的建立[J].世界中西医结合杂志,2014,9(6):620-623.
- [2] 李恩棠,李玛建,高爱平,等.养血安胎冲剂防治习惯性流产及对短寿命抑制性T细胞的影响[J].中国中西医结合杂志,2000,20(4):248-250.
- [3] 姚伟洁,闫仕祺,袁偲偲,等.养血安胎方对复发性自然流产小鼠胎盘血管生成与自噬的调控作用研究[J].中国药物警戒,2024,21(4):371-377.
- [4] 姚伟洁,闫仕祺,袁偲偲,等.养血安胎方调节自噬治疗复发性自然流产小鼠的机制研究[J].中国药物警戒,2024,21(4):378-385.

- [5] 姚伟洁, 闫仕祺, 袁偲偲, 等. 养血安胎方调节自噬改善复发性自然流产小鼠子宫内膜上皮细胞间质转化及蜕膜化的作用研究[J]. 中国药物警戒, 2024, 21(5): 547–552.
- [6] GOWDA R, ROBERTSON B M, IYER S, et al. The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma[J]. Cancer Treat Rev, 2020, 85: 101975.
- [7] ALAM S K, JASTI S, KSHIRSAGAR S K, et al. Trophoblast glycoprotein (TPGB/5T4) in human placenta: expression, regulation, and presence in extracellular microvesicles and exosomes[J]. Reprod Sci, 2018, 25(2): 185–197.
- [8] 姚伟洁, 杜博冉, 李潇, 等. 养血安胎颗粒抑制外泌体中 miR-16 促进血管生成的作用研究[J]. 环球中医药, 2022, 15(5): 745–751.
- [9] KALRA H, DRUMMEN G P C, MATHIVANAN S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 170.
- [10] BURATTA S, TANCINI B, SAGINI K, et al. Lysosomal exocytosis, exosome release and secretory autophagy: the autophagic – and endo – lysosomal systems go extracellular[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2576.
- [11] RAUDENSKA M, BALVAN J, MASARIK M. Crosstalk between autophagy inhibitors and endosome – related secretory pathways: a challenge for autophagy – based treatment of solid cancers[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 140.
- [12] ZHI Z F, YANG W M, LIU L L, et al. Early missed abortion is associated with villous angiogenesis via the HIF – 1 α /VEGF signaling pathway[J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 298(3): 537–543.
- [13] SONG P, HAI Y, WANG X, et al. Realgar transforming solution suppresses angiogenesis and tumor growth by inhibiting VEGF receptor 2 signaling in vein endothelial cells[J]. Arch Pharm Res, 2018, 41(4): 467–480.
- [14] 陈佳. hCG 调控 VEGF – MEK/ERK 信号通路对 HUVEC 血管生成的作用及机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- [15] YADUNANDANAN NAIR N, SAMUEL V, RAMESH L, et al. Actin cytoskeleton in angiogenesis[J]. Biol Open, 2022, 11(12): 058899.
- [16] 彭威. ACTN4 调控滋养细胞增殖和侵袭能力在早发型子痫前期发病中的作用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [17] MOSER G, WEISS G, SUNDL M, et al. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: evidence for the invasion of uterine veins[J]. Histochem Cell Biol, 2017, 147(3): 353–366.
- [18] LAI R, JI L, ZHANG X, et al. Stanniocalcin2 inhibits the epithelial – mesenchymal transition and invasion of trophoblasts via activation of autophagy under high – glucose conditions[J]. Mol Cell Endocrinol, 2022, 547: 111598.
- [19] WANG J, DING J, ZHANG S, et al. Decreased USP2a expression inhibits trophoblast invasion and associates with recurrent miscarriage[J]. Front Immunol, 2021, 12: 717370.
- [20] 唐思玲, 梁潇, 李荣霞, 等. 寿胎丸对复发性流产小鼠胚胎滋养细胞 EMT 的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(8): 1139–1149.
- [21] 赵杨, 闻安民, 梁洁玲, 等. 血 β – HCG、孕酮、雌二醇和 B 超检查预测宫内妊娠早期阴道流血结局[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2015, 36(1): 108–113.
- [22] GELLERSEN B, BROSENS J J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure[J]. Endocr Rev, 2014, 35(6): 851–905.
- [23] 杨琪. PAX1 通过调节 eATP 浓度影响复发性植入失败患者子宫内膜蜕膜化的机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [24] 刘慧敏, 熊晓, 文雪, 等. 双酚 A 通过 MLL1 调控子宫内膜蜕膜化分子标志物 HOXA10 表达的分子机制[J]. 中国生育健康杂志, 2023, 34(1): 60–65.
- [25] LEE K Y, JEONG J W, WANG J R, et al. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(15): 5468–5478.

Study on the Mechanism of Medicated Serum from Yangxue Antai Formula in Influencing Endothelial and Endometrial Cells via Regulating Exosome Release

YAO Weijie^{1,2}, FENG Xin^{1,2}

1. *Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing 100006, China;*

2. *Joint Laboratory for Basic Clinical Medicine, Capital Medical University, Beijing 100006, China*

Abstract Objective: To investigate the mechanism of Yangxue Antai serum in regulating the release of exosomes from JEG-3 cells to affect endothelial cells and endometrial cells. Methods: The exosome release inhibitor GW4869 was used to inhibit the release of exosomes from JEG-3 cells, and the Yangxue Antai serum interfered with JEG-3 cells, A co-culture system was established in which JEG-3 cells or exosomes secreted by JEG-3 cells were co-cultured with HEC-1-A cells or HUVECs. The expression of VEGFA and p-VEGFR2 in HUVECs, the expression of EMT-related proteins E-cadherin, Vimentin, N-cadherin and Fibronectin as well as the expression of decidualization-related proteins BMP2, HOXA10, PRL and IGFBP1 in HEC-1-A cells were measured by Western blot. The migration rate of HUVECs was measured by cell scratch assay. The invasion and migration ability of HUVECs were measured by Transwell assay, F-actin expression was measured by cytoskeleton assay, and the lumen length in HUVECs was measured by tubule formation assay. Results: Compared with Control group, the expressions of VEGFA and p-VEGFR2 in GW4869 group were significantly decreased. The expression of E-cadherin was significantly increased, while the expression of Vimentin, N-cadherin and Fibronectin were significantly decreased. The expressions of BMP2, HOXA10, PRL and IGFBP1 were significantly decreased. Cell invasion and migration ability were significantly decreased, the lumen length was decreased, and the expression of F-actin was significantly decreased. Compared with GW4869 group, the expressions of VEGFA and p-VEGFR2 in GW4869 + Yangxue Antai and GW4869 + exosome group were significantly increased. The expression of E-cadherin was significantly decreased, while the expression of Vimentin, N-cadherin and Fibronectin was significantly increased. The expressions of BMP2, HOXA10, PRL and IGFBP1 were significantly increased. Cell invasion and migration ability were increased significantly, the lumen length was increased, and the expression of F-actin was increased significantly. Conclusion: Yangxue Antai serum can affect the angiogenesis of endothelial cells, EMT and decidualization of endometrial cells by regulating the release of exosomes from JEG-3 cells.

Key words Exosome; Angiogenesis; Epithelial – mesenchymal transformation; Decidualization