

补肾活血方改善抗磷脂抗体相关复发性流产小鼠妊娠结局的机制^Δ

韩永梅^{1*}, 崔天薇¹, 谢俊丹², 何鑫雨², 龚宇婷², 王满满² (1. 河南中医药大学中西医结合学院, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000)

中图分类号 R714.2; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)11-1408-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.11.05



摘要 **目的** 探讨补肾活血方改善抗磷脂抗体相关复发性流产(aPL-RSA)小鼠妊娠结局的作用机制。**方法** 将SPF级BALB/c雌性小鼠随机分为正常对照组、佐剂对照组、模型组和补肾活血方组。以 β_2 糖蛋白I联合弗氏佐剂免疫法构建小鼠aPL-RSA模型。补肾活血方组自妊娠第0天起灌胃给药1.653 6 g/(kg·d),其余3组同期灌胃等体积生理盐水,每日2次,连续给药15 d。观察孕鼠子宫外观,记录单个胚胎质量并计算胚胎吸收率;检测富血小板血浆(PRP)中CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例;检测血清中血栓素B2(TXB2)、血小板因子4(PF4)水平;观察胎盘组织形态变化;检测胎盘组织细胞凋亡率;检测胎盘组织中丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性以及白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-18水平,基质金属蛋白酶3(MMP-3)、MMP-9、增殖细胞核抗原-67(简称Ki67)、超氧化物歧化酶2(SOD2)、Nod样受体蛋白3(NLRP3)、含有CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶1(caspase-1)蛋白表达和SOD2、NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA表达。**结果** 与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠的单个胚胎质量、胎盘组织中T-SOD活性,以及SOD2 mRNA和蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$);胚胎吸收率,PRP中CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例,血清中TXB2、PF4水平,胎盘组织细胞凋亡率和胎盘组织中MDA含量,MMP-3、MMP-9、Ki67蛋白的相对表达量,NLRP3、ASC、caspase-1蛋白和mRNA的相对表达量,IL-1 β 、IL-18水平均显著升高($P<0.05$);模型组孕鼠子宫形态不规则,部分子宫角存在局限性萎缩;胎盘组织蜕膜细胞碎裂,迷路区滋养层细胞广泛空泡化、坏死,伴血管减少。经补肾活血方干预后,孕鼠上述指标水平均显著逆转($P<0.05$),孕鼠子宫形态、病理损伤均明显改善。**结论** 补肾活血方可有效改善aPL-RSA模型孕鼠的妊娠结局,其作用机制可能与抑制血小板活化、减轻氧化应激损伤、增强滋养层细胞功能,以及抑制NLRP3炎症小体通路介导的炎症反应密切相关。

关键词 补肾活血方;复发性流产;抗磷脂抗体;血小板活化;NLRP3炎症小体;妊娠结局

Mechanism of Bushen huoxue formula in improving pregnancy outcomes in mice with antiphospholipid antibody-related recurrent spontaneous abortion

HAN Yongmei¹, CUI Tianwei¹, XIE Jundan², HE Xinyu², GONG Yuting², WANG Manman² (1. School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. The First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the mechanism of Bushen huoxue formula in improving pregnancy outcomes in mice with antiphospholipid antibody-related recurrent spontaneous abortion (aPL-RSA). **METHODS** SPF female BALB/c mice were randomly divided into normal control group, adjuvant control group, model group, and Bushen huoxue formula group. The aPL-RSA mouse model was established by immunization with β_2 glycoprotein I combined with Freund's adjuvant. From gestational day 0, the Bushen huoxue formula group was administered 1.653 6 g/(kg·d) of the prescription by gavage, while the other three groups received an equal volume of normal saline, twice daily for 15 consecutive days. The uterine appearance of pregnant mice was observed; individual embryo weight was recorded, and the embryo resorption rate was calculated. The proportion of activated CD41⁺CD62p⁺ platelets in platelet-rich plasma

^Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82505649);河南省科技发展计划项目(No.262102311269);河南省中医药科学研究专项课题(No.2024ZY3026)

* 第一作者 副教授。研究方向:中西医防治生殖医学。E-mail: yongmeihan2546@163.com

(PRP) was detected. Serum levels of thromboxane B2 (TXB2) and platelet factor 4 (PF4) were measured. Morphological changes of placental tissue were observed. The cell apoptosis rate of placental tissue was detected. The levels of malondialdehyde (MDA) content, total superoxide dismutase (T-SOD) activity, the interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18, the protein expressions of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), MMP-9, nuclear proliferation antigen-67 (Ki67), superoxide dismutase 2 (SOD2), Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), and caspase-1, as well as the mRNA expressions of superoxide dismutase 2 (SOD2), NLRP3, ASC and caspase-1 of placental tissue were detected. **RESULTS** Compared with the normal control group and adjuvant control group, the model group showed significant decreases in individual embryo weight, T-SOD activity of placental tissue, and relative expression levels of SOD2 mRNA and protein ($P<0.05$); while significant increases were observed in embryo resorption rate, proportion of activated CD41⁺CD62p⁺ platelets in PRP, serum levels of TXB2 and PF4, placental cell apoptosis rate, MDA content in placental tissue, relative protein expressions of MMP-3, MMP-9 and Ki67, relative protein and mRNA expression levels of NLRP3, ASC and caspase-1 as well as IL-1 β and IL-18 levels ($P<0.05$). The model group also exhibited irregular uterine morphology with localized atrophy in some uterine horns; placental tissue showed fragmentation of decidual cells, extensive vacuolization and necrosis of trophoblast cells in the labyrinthine zone, accompanied by vascular reduction. After intervention with Bushen huoxue formula, the above indicators were significantly reversed ($P<0.05$), and uterine morphology and pathological damage were markedly improved. **CONCLUSIONS** Bushen huoxue formula can effectively improve pregnancy outcomes in aPL-RSA model mice, and its mechanism may be closely related to inhibiting platelet activation, reducing oxidative stress injury, enhancing trophoblast cell function, and suppressing the inflammatory response mediated by the NLRP3 inflammasome pathway.

KEYWORDS Bushen huoxue formula; recurrent spontaneous abortion; antiphospholipid antibody; platelet activation; NLRP3 inflammasome; pregnancy outcome

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是严重影响育龄期女性生殖健康的疾病,其病因复杂,免疫学异常是关键致病因素之一^[1]。抗磷脂抗体相关复发性流产(antiphospholipid antibody-related recurrent spontaneous abortion, aPL-RSA)作为免疫型RSA的重要亚型,以高凝状态、血栓倾向及不良妊娠结局为主要特征,与抗磷脂抗体综合征(antiphospholipid syndrome, APS)密切相关。aPL-RSA的核心病理机制在于持续存在的抗心磷脂(anticardiolipin, aCL)抗体、抗 β_2 糖蛋白 I (β_2 glycoprotein I, β_2 GP I)抗体等,可引发母胎界面的血栓-炎症反应,导致胎盘灌注不足、功能受损,最终造成流产^[2]。目前,临床以抗凝联合免疫抑制为主要治疗手段,但存在出血风险高、长期用药不便及部分患者疗效不佳等问题^[3],因此亟须探索安全有效的替代或协同治疗方案。

研究表明,aPL-RSA的胎盘损伤是血小板异常活化与Nod样受体蛋白3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体介导的固有免疫炎症共同作用的结果^[4]。aPL可激活血小板并诱发微血栓,导致胎盘缺血;缺血微环境及活化血小板进一步激活NLRP3炎症小体,通过胱天蛋白酶1(caspase-1)促进白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18成熟释放,引发局部炎症,损害滋养细胞的增殖、侵袭与融合功能^[5]。同时,胎盘组

织氧化应激增强,过量活性氧可正反馈激活NLRP3炎症小体并促进血小板活化,形成推动流产发生的“血栓-炎症-氧化”病理环路^[6]。因此,靶向这一环路的关键分子可能是治疗aPL-RSA的潜在策略。

中医学根据aPL-RSA“胎动不安”“滑胎”等临床表现,将其病机归为肾虚血瘀。肾主生殖,为冲任之本,肾虚则胎元失固;血瘀既是病理产物,又是关键致病因素,与APS所致高凝状态及胎盘微血栓形成高度契合。因此,补肾活血成为中医药治疗aPL-RSA的核心治法^[7]。补肾活血方作为名老中医经验方,具有补肾益气、活血安胎之功^[8]。临床研究显示,该方可改善RSA患者妊娠结局^[9]。网络药理学及实验研究提示,补肾活血方及其活性成分可作用于炎症、免疫等多条通路,并能通过抑制血小板活化相关的嘌呤能离子通道型7/NLRP3信号通路发挥保胎作用^[10-11]。然而,补肾活血方如何精准调控aPL-RSA的胎盘局部“血栓-炎症-氧化”恶性循环,其深层分子机制仍缺乏系统阐释。本研究采用 β_2 GP I联合弗氏佐剂免疫法构建aPL-RSA小鼠模型,从妊娠结局、血小板活化、胎盘病理改变、氧化应激及滋养细胞凋亡等方面,系统探讨补肾活血方防治aPL-RSA的潜在分子机制,以期为中医药治疗aPL-RSA提供科学依据与实验支撑。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级6~8周龄BALB/c雌性小鼠40只及同龄雄性小鼠20只,体重18~22 g,购自武汉云克隆动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2023-0021。小鼠饲养于温度(22±2)℃、相对湿度(50±10)%、12 h/12 h明暗循环的SPF级环境中,自由摄食、饮水。本实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号:IACUC-202411046)。

1.2 主要药物与试剂

补肾活血方系由单味中药配方颗粒按处方量组合而成(组方:菟丝子30 g、桑寄生15 g、续断15 g、阿胶15 g、当归10 g、熟地黄20 g、川芎6 g、丹参20 g、白术15 g、海螵蛸12 g、藕节炭15 g、白芍30 g、炙甘草6 g),均购自江阴天江药业有限公司(批号分别为2310102023、2203042318、2205161705、2306270524、2208300451、2311020153、2306273401、2401100852、2208253124、2211210512、2304053745、2212030406、2301071028,规格分别为每袋装10、15、10、6、10、10、10、10、10、10、10、3 g,批准文号分别为3221000149000、3221000016000、3221000060000、3221000037000、3222000542000、3221000241000、3221000254000、3221000075000、3222000545000、3221000027000、3221000558000、3221000053000、3221000250000),由河南中医药大学第一附属医院药房提供;人 β_2 GP I(货号RPA310Hu01)购自武汉优尔生科技股份有限公司;弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)(批号分别为F5881、F5506)均购自美国Sigma-Aldrich公司; β_2 GP I IgA/G/M酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号MBS2607368)购自美国MyBioSource公司;活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)检测试剂盒(批号GL1844)购自北京百奥莱博科技有限公司;抗心磷脂抗体IgG(anti cardiolipin antibody IgG, ACA-IgG)、血栓素B2(thromboxane B2, TXB2)、血小板因子4(platelet factor 4, PF4)、IL-1 β 、IL-18 ELISA试剂盒(批号分别为EM0274、EM1436、EM0006、EM0109、EM1158)均购自武汉菲恩生物科技有限公司;鼠抗CD41(又叫整合素 α IIb)单克隆抗体(批号E-AB-F1183D)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;鼠抗CD62p(又叫P-选择素)单克隆抗体(批号17-0626-80)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、抗荧光淬灭剂、2×Taq Plus PCR MasterMix(不含染料)、SYBR

Green(批号分别为G1120、S2100、PC1150、SR4110)均购自北京索莱宝科技有限公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(批号12156792910)购自德国Roche公司;免疫染色通透液Triton X-100(批号ST1723)购自上海碧云天生物技术有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)测定试剂盒(批号分别为A003-1-2、A001-3-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、ECL发光液、Western blot封闭液,以及兔抗基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、MMP-9、增殖细胞核抗原-67(nuclear proliferation antigen-67, Ki67)、超氧化物歧化酶2(superoxide dismutase 2, SOD2)、NLRP3、含有CARD结构域的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、caspase-1、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(H+L)二抗(批号分别为WLA004、WLA013、WLA006、WLA066、WLA0374、WL03096、WL01384a、WL02506、WL02635、WL02462、WL02996a、WL01372、WLA023)均购自沈阳万类生物科技有限公司;TRIpure总RNA提取试剂(批号RP1001)购自北京百泰克生物技术有限公司;聚合酶链式反应(PCR)引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;血小板计数(platelet count, PLT)试剂购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

1.3 主要仪器

ELX-800型酶标仪购自美国BioTek公司;BC-30型全自动血细胞分析仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;NovoCyte型流式细胞仪购自美国Agilent公司;RM2235型石蜡切片机购自德国Leica公司;BX53型显微镜与DP73型显微拍照系统均购自日本Olympus公司;H-2050R型超速冷冻离心机购自湖南湘仪仪器有限公司;DYY-7C型电泳仪、DYCZ-40D型转移槽、DYCZ-24DN型双垂直蛋白电泳仪均购自北京六一生物科技有限公司;NanoDrop One型紫外分光光度计购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Pangaea 3型PCR仪购自艾普拜生物科技(苏州)有限公司。

2 方法

2.1 造模、分组与干预

将40只雌性小鼠随机分为正常对照组、佐剂对照组、模型组、补肾活血方组,每组10只。模型组和补肾活血方组小鼠采用 β_2 GP I联合弗氏佐剂免疫法构建aPL-RSA模型^[12]:造模第1天,将小鼠用1.5%异氟烷吸入麻

醉,腹部备皮消毒后沿腹中线切开约1 cm切口,轻柔牵出双侧子宫角;使用自制玻璃微管注射器,于每侧子宫角中部避开血管处,缓慢注入含10 μg人β₂GP I的CFA进行免疫;第8天以相同方法注入含10 μg人β₂GP I的IFA加强免疫;术后分层缝合肌肉与皮肤,腹腔注射青霉素预防感染。佐剂对照组同期注射等体积CFA与IFA,正常对照组不进行任何干预,其余步骤同模型组和补肾活血方组。第18天,各组雌鼠与雄鼠按2:1比例合笼;次日清晨检查雌鼠阴道栓,将检出阴道栓者纳入实验,并将该日定为妊娠第0天(E0日)。E0日,对各组小鼠进行颌下采血,若小鼠血清中β₂GP I IgA/G/M及ACA-IgG水平均显著升高,APTT显著延长,PLT显著减少,且后续妊娠结局(胚胎吸收率)与胎盘病理表现符合aPL-RSA特征,则判定造模成功^[12]。所有造模小鼠均造模成功,无意外死亡或淘汰情况。自E0日起,补肾活血方组孕鼠灌胃补肾活血方1.653 6 g/(kg·d)^[12],其余3组孕鼠同期灌胃等体积生理盐水;每日2次,连续灌胃15 d。

2.2 样本采集与处理

E15日,采集孕鼠腹主动脉血。将全血收集于无抗凝剂管,室温静置1 h后,以3 000 r/min离心10 min,上清液为血清;将全血收集于抗凝管,以3 000 r/min离心10 min,上清液为血浆;将全血收集于抗凝管,先以1 800 r/min离心10 min,弃底层红细胞,收集上层与中间层,再以3 000 r/min离心6 min,弃75%上清液,剩余为富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)。采血后,注射过量戊巴比妥钠处死孕鼠,剖腹取子宫用于后续实验。分离存活胚胎及其胎盘,取胎盘组织,一部分于-80 °C冻存,另一部分于4%多聚甲醛中固定24 h,用于石蜡包埋。

2.3 孕鼠子宫观察及妊娠结局相关指标计算

取“2.2”项下孕鼠子宫,观察子宫外观;称量各组孕鼠每个存活胚胎的质量,并分别计数胚胎吸收数和存活胚胎数,计算胚胎吸收率。胎吸收率(%)=胚胎吸收数/(胚胎吸收数+存活胚胎数)×100%。

2.4 孕鼠PRP中CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例检测

采用流式细胞术检测。取“2.2”项下PRP,调整血小板浓度后,每个样本取含10 000个血小板的PRP,使用抗CD41和CD62p流式抗体4 °C避光孵育30 min,上机检测。以CD41作为设门标志,圈定血小板群体,分析该群体中CD62p⁺血小板的百分比,即PRP中CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例。

2.5 孕鼠血清中血小板活化产物TXB₂和PF₄检测

取“2.2”项下血清,采用ELISA试剂盒检测血清中血小板活化产物TXB₂和PF₄水平。

2.6 孕鼠胎盘组织形态观察

采用HE染色法观察。取“2.2”项下孕鼠胎盘组织,石蜡包埋后制作5 μm厚切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水,再进行苏木精染色5 min、1%盐酸乙醇分化3 s、伊红染色3 min;经梯度乙醇脱水、二甲苯透明处理,用中性树脂封片,在显微镜下观察染色结果并拍照。

2.7 孕鼠胎盘组织细胞凋亡检测

采用TUNEL染色法检测。取“2.6”项下制作的石蜡切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,用0.1% Triton X-100于室温透化8 min;加入50 μL TUNEL反应液,37 °C避光孵育60 min,随后用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染5 min,以荧光淬灭剂封片。在显微镜下观察染色结果(凋亡细胞呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光),并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=TUNEL阳性细胞数/DAPI阳性细胞数×100%。

2.8 孕鼠胎盘组织中氧化应激指标与炎症因子检测

取“2.2”项下冻存的孕鼠胎盘组织,制备胎盘组织匀浆,采用BCA法测定蛋白浓度。严格按照试剂盒说明书操作,检测MDA含量和T-SOD活性;采用ELISA试剂盒检测IL-1β、IL-18水平。

2.9 孕鼠胎盘组织中MMP-3、MMP-9、Ki67、SOD2、NLRP3、ASC和caspase-1蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下冻存的孕鼠胎盘组织,提取总蛋白,于4 °C下以12 000 r/min离心10 min,采用BCA法测定蛋白浓度。等量蛋白经电泳、转膜后,用Western blot封闭液封闭1 h,分别加入MMP-3、MMP-9、Ki67、SOD2、NLRP3、ASC、caspase-1及β-actin一抗(稀释比例分别为1:2 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:1 000),4 °C孵育过夜;加入HRP标记的二抗(稀释比例为1:5 000)室温孵育45 min后,采用ECL化学发光显影。通过Image J软件分析,以目标蛋白与内参蛋白(β-actin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

2.10 孕鼠胎盘组织中SOD2、NLRP3、ASC和caspase-1 mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测。使用TRIpure总RNA提取试剂提取总RNA,将总RNA反转录为cDNA,进行qRT-PCR反应。反应程序如下:95 °C

预变性 5 min;95 °C变性 10 s,60 °C退火并延伸 45 s,共进行 40 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因的相对表达量。引物序列及产物长度可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表 1。

2.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 Tukey's *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 补肾活血方对 aPL-RSA 模型孕鼠妊娠结局的影响

正常对照组与佐剂对照组孕鼠的子宫形态正常,呈均匀串珠状,两侧子宫角粗细均一、扩张度适中;子宫表面血管清晰且分布规则,胚胎在子宫系膜内排列均匀、大小一致。模型组孕鼠子宫形态不规则,部分子宫角存在局限性萎缩,胚胎发育不均、大小不一,可见胚胎吸收点、流产胚胎及完全空孕囊。补肾活血方组孕鼠子宫形态趋于规则,颜色接近正常,胚胎吸收现象减少,存活胚胎数增多且发育良好。各组孕鼠子宫外观可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图 1。

与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠单个胚胎质量显著降低,胚胎吸收率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组孕鼠单个胚胎质量显著增加,胚胎吸收率显著降低($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组孕鼠单个胚胎重量、胚胎吸收率比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	单个胚胎重量/g	胚胎吸收率/%
正常对照组	0.55±0.05	2.27±0.46
佐剂对照组	0.52±0.05	2.83±0.57
模型组	0.22±0.03 ^a	45.12±6.41 ^a
补肾活血方组	0.43±0.04 ^b	16.77±2.61 ^b

a: 与正常对照组和佐剂对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2 补肾活血方对 aPL-RSA 模型孕鼠血小板活化的影响

与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠 PRP 中 CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例以及血清中血小板活化产物 TXB2、PF4 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组孕鼠 PRP CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例以及血清中 TXB2、PF4 水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表 2。各组孕鼠 PRP 中 CD41⁺CD62p⁺检测流式细胞图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图 2。

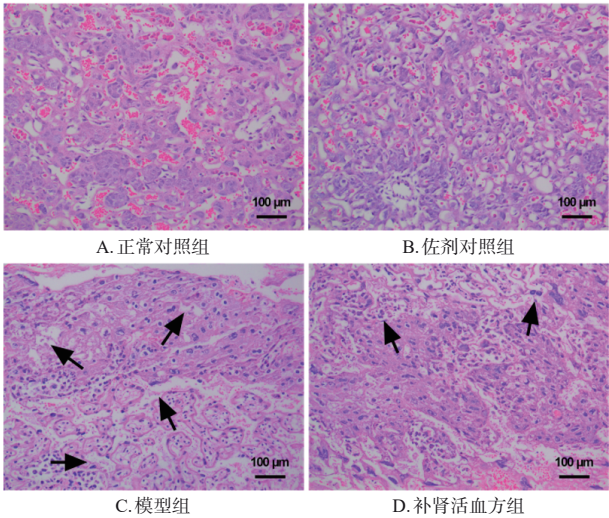
表 2 各组孕鼠 PRP 中 CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例以及血清中 TXB2、PF4 水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	CD41 ⁺ CD62p ⁺ 活化血小板比例/%	TXB2/(pg/mL)	PF4/(pg/mL)
正常对照组	4.55±0.39	66.15±6.90	88.08±7.44
佐剂对照组	5.45±0.56	68.83±7.88	94.01±9.76
模型组	31.16±2.96 ^a	146.75±13.63 ^a	315.35±29.95 ^a
补肾活血方组	16.01±1.74 ^b	83.36±7.94 ^b	141.01±14.06 ^b

a: 与正常对照组和佐剂对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.3 补肾活血方对 aPL-RSA 模型孕鼠胎盘病理损伤和细胞凋亡的影响

HE 染色结果显示,正常对照组孕鼠胎盘结构完整,蜕膜与迷路区形态正常;佐剂对照组孕鼠仅见偶发炎症细胞,无特征性病变;与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠胎盘呈现典型病理损伤,蜕膜细胞碎裂,迷路区滋养层细胞广泛空泡化、坏死,伴血管减少;与模型组比较,补肾活血方组孕鼠上述病变显著改善,胎盘结构趋于完整。结果见图 1。



注:箭头指示病理损伤部位。

图 1 各组孕鼠胎盘组织形态变化 HE 染色显微图

TUNEL 染色结果显示,正常对照组、佐剂对照组、模型组、补肾活血方组孕鼠胎盘组织细胞凋亡率分别为 (5.05±0.54)%、(6.07±0.87)%、(23.25±1.58)%、(14.41±1.25)%($n=10$)。与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠胎盘组织细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组孕鼠胎盘组织细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)。各组孕鼠胎盘组织细胞凋亡 TUNEL 染色显微图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图 3。

3.4 补肾活血方对 aPL-RSA 模型孕鼠胎盘组织中氧化应激指标的影响

与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠胎盘

组织中MDA含量显著增加,T-SOD活性以及抗氧化酶SOD2蛋白和mRNA的相对表达量均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组孕鼠胎盘组织中MDA含量显著减少,T-SOD活性以及SOD2蛋白和mRNA的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。各组孕鼠胎盘组织中SOD2蛋白表达的电泳图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图4。

表3 各组孕鼠胎盘组织中MDA含量、T-SOD活性、SOD2蛋白和mRNA的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MDA/(nmol/mg protein)	T-SOD/(U/mg protein)	SOD2/ β -actin	SOD2 mRNA
正常对照组	1.18±0.13	14.37±1.36	0.90±0.07	1.00±0.10
佐剂对照组	1.27±0.10	13.29±1.26	0.83±0.06	1.06±0.09
模型组	2.60±0.19 ^a	4.15±0.57 ^a	0.42±0.05 ^a	0.52±0.06 ^a
补肾活血方组	1.86±0.12 ^b	10.39±1.13 ^b	0.64±0.05 ^b	0.78±0.04 ^b

a:与正常对照组和佐剂对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.5 补肾活血方对aPL-RSA模型孕鼠胎盘组织中滋养层细胞功能相关蛋白表达的影响

与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠胎盘组织中滋养层细胞侵袭相关蛋白MMP-3、MMP-9以及增殖标志物蛋白Ki67的相对表达量均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组孕鼠胎盘组织中MMP-3、MMP-9、Ki67的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。结果见表4。各组孕鼠胎盘组织中MMP-3、MMP-9、Ki67蛋白表达的电泳图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图5。

表4 各组孕鼠胎盘组织中MMP-3、MMP-9、Ki67蛋白的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MMP-3/ β -actin	MMP-9/ β -actin	Ki67/ β -actin
正常对照组	0.31±0.02	0.92±0.05	0.64±0.06
佐剂对照组	0.30±0.02	0.90±0.06	0.61±0.04
模型组	0.12±0.01 ^a	0.45±0.04 ^a	0.22±0.03 ^a
补肾活血方组	0.24±0.02 ^b	0.80±0.05 ^b	0.46±0.03 ^b

a:与正常对照组和佐剂对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.6 补肾活血方对aPL-RSA模型孕鼠胎盘组织中NLRP3炎症小体活化的影响

与正常对照组和佐剂对照组比较,模型组孕鼠胎盘组织中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白和mRNA的相对表达量,以及IL-1 β 、IL-18水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血方组孕鼠胎盘组织中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白和mRNA的相对表达量,以及IL-1 β 、IL-18水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表5。各组孕鼠胎盘组织中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达的电泳图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图6。

表5 各组孕鼠NLRP3、ASC、caspase-1蛋白和mRNA的相对表达量及IL-1 β 、IL-18水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NLRP3/ β -actin	ASC/ β -actin	caspase-1/ β -actin	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	caspase-1 mRNA	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)
正常对照组	0.18±0.02	0.32±0.04	0.26±0.02	1.00±0.11	1.00±0.16	1.00±0.16	50.12±3.60	44.22±4.37
佐剂对照组	0.20±0.03	0.31±0.03	0.24±0.03	0.92±0.06	1.01±0.11	1.06±0.09	55.73±3.44	47.91±4.18
模型组	0.61±0.04 ^a	0.67±0.04 ^a	0.58±0.04 ^a	3.18±0.15 ^a	2.16±0.08 ^a	2.15±0.18 ^a	208.52±17.15 ^a	134.29±12.58 ^a
补肾活血方组	0.35±0.03 ^b	0.45±0.03 ^b	0.38±0.02 ^b	2.05±0.16 ^b	1.47±0.11 ^b	1.58±0.13 ^b	125.60±14.90 ^b	85.74±6.72 ^b

a:与正常对照组和佐剂对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

aPL-RSA是APS最主要的产科表现,以持续存在的病理性aPL引发胎盘血栓形成与炎症损伤,最终导致妊娠丢失为特征,是临床上重要的RSA亚型。既往研究表明,补肾活血方可调节母胎界面的精氨酸代谢及巨噬细胞极化,从而减轻RSA症状^[13];还能抑制Janus激酶2/信号转导及转录激活因子3信号通路,改善RSA小鼠的高凝状态,减少细胞凋亡,提高妊娠率^[14]。本研究发现,补肾活血方对人 β_2 GP I诱导的aPL-RSA模型孕鼠的妊娠结局有显著改善作用,具体表现为胚胎吸收率降低、单个胚胎质量增加。

血小板异常活化是aPL导致血栓形成与胎盘灌注障碍的始动环节^[15]。本研究发现,模型组孕鼠PRP中CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例、血清中TXB2和PF4水平均显著升高,同时伴随PLT减少和APTT延长,这与aPL-RSA患者的高凝状态特征一致^[16]。其中,TXB2是血小板活化后环氧化酶途径的稳定代谢产物,可促进血管收缩与血小板聚集;PF4则通过中和肝素样分子、激活白细胞等途径加剧局部炎症和血栓形成^[17]。经补肾活血方干预后,CD41⁺CD62p⁺活化血小板比例及TXB2、PF4水平均显著降低。方中当归、川芎、丹参等活血化瘀药的有效成分已被证实具有抗血小板聚集、调节血栓素/前列环素平衡、保护血管内皮的作用^[18-19]。本研究结果提示,补肾活血方可能通过其活血化瘀组分抑制aPL触发的血小板活化,进而改善胎盘微循环的高凝状态,为胚胎营造更稳定的血液供应环境。值得注意的是,尽管活血化瘀类药物在妊娠期应用存在理论风险(如诱发子宫收缩、增加出血倾向等),但本研究中补肾活血方组孕鼠均未出现子宫异常收缩或明显出血现象,且胚胎吸收率显著降低。这一结果提示,在“补肾固本”以稳固胎元的基础上,配伍海螵蛸、藕节炭等收敛止血之品,可实现“活血而不破血,祛瘀而不伤正”的配伍目的——在有效抑制微血栓、改善胎盘灌注的同时,最大程度规避活血化瘀方对妊娠的潜在威胁,为临床安全应用补肾活血方治疗aPL-RSA提供了初步实验依据。

氧化应激是连接免疫异常、血栓形成与细胞损伤的共同通路^[9]。本研究结果显示,模型组孕鼠胎盘组织中MDA含量升高,T-SOD活性下降及SOD2表达下调,提示存在氧化还原失衡状态。作为定位于线粒体的关键抗氧化酶,SOD2表达下调意味着活性氧清除能力受损,这将直接引发滋养层细胞功能障碍与凋亡^[20]。已有研究证实,补肾活血方及其主要成分具有抗氧化与抗凋亡活性^[21-22];林洁等^[23]亦报道,该方可减轻流产小鼠的氧化应激反应,减少外周血MDA含量,升高T-SOD活性。与上述研究结果一致,本研究发现,经补肾活血方干预后,aPL-RSA模型孕鼠胎盘组织中T-SOD活性显著升高,SOD2表达显著上调,MDA含量显著减少;此外,该方能有效减轻胎盘组织空泡化、坏死等病理损伤,并抑制细胞凋亡。以上结果表明,补肾活血方可能通过抗氧化作用改善胎盘损伤。

滋养层细胞适度增殖与侵袭是胎盘锚定及子宫螺旋动脉重塑的关键环节,其成功迁移并侵入母体组织对健康胎盘形成及妊娠维持至关重要^[24]。研究表明,细胞凋亡或过早分化可导致滋养层干细胞池严重耗竭,进而影响胎盘形态发生改变,最终引发早期流产及妊娠相关并发症^[25]。本研究发现,模型组孕鼠胎盘组织中滋养层细胞增殖标志物Ki67及侵袭相关蛋白MMP-3、MMP-9表达均显著下调,提示aPL-RSA存在滋养层细胞功能受损;经补肾活血方干预后,胎盘组织中Ki67、MMP-3、MMP-9表达均显著上调。以上结果表明,补肾活血方可能通过促进滋养层细胞增殖与侵袭,恢复其正常生物学功能,从而改善妊娠结局。

NLRP3炎症小体介导的滋养层细胞焦亡是aPL-RSA胎盘炎症损伤的核心机制^[26-27]。本研究结果显示,模型组孕鼠胎盘组织中NLRP3炎症小体相关指标NLRP3、ASC、caspase-1的表达及其下游效应因子IL-1 β 、IL-18水平均显著上调/升高。活化的caspase-1切割促炎因子前体,生成成熟的IL-1 β 与IL-18,进而引发辅助性T淋巴细胞1型免疫偏移及细胞焦亡,破坏母胎免疫耐受状态^[28]。已有研究表明,健胃寿胎丸可通过调节大鼠母胎界面肠道微生物产生的胆汁酸及NLRP3炎症小体缓解流产症状^[29];宋艳丽等^[30]亦发现,在aCL诱导的RSA大鼠模型中,补肾活血方可抑制胎盘组织中NLRP3炎症小体活化,并降低IL-1 β 、IL-18水平。与上述研究结果一致,本研究证实,补肾活血方可下调aPL-RSA模型孕鼠胎盘组织中NLRP3、ASC、caspase-1表达,同时降低IL-1 β 与IL-18水平。以上结果提示,补肾活血方可能通过抑制NLRP3炎症小体激活,减轻aPL-RSA模型孕

鼠胎盘炎症损伤。

本研究存在以下局限性:(1)本研究未设置低分子肝素或阿司匹林等临床一线药物作为阳性对照组,无法直接比较补肾活血方与标准疗法的疗效差异;(2)本研究仅采用基于临床等效剂量换算的单一给药剂量[1.653 6 g/(kg·d)],未设置不同剂量梯度以探索量效关系,无法明确该方剂的最佳剂量及其量效关系特征;(3)本研究未通过基因敲除或特异性抑制剂开展阻断/挽救实验,其直接因果关系尚需进一步验证。未来研究将针对上述不足进行完善。

综上所述,补肾活血方可有效改善aPL-RSA模型孕鼠的妊娠结局,其作用机制可能与抑制血小板活化、减轻氧化应激损伤、增强滋养层细胞功能,以及抑制NLRP3炎症小体通路介导的炎症反应密切相关。

参考文献

- [1] GUAN D F, SUN W J, GAO M X, et al. Immunologic insights in recurrent spontaneous abortion: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117082.
- [2] MURVAI V R, GALIŞ R, PANAITESCU A, et al. Antiphospholipid syndrome in pregnancy: a comprehensive literature review[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2025, 25 (1): 337.
- [3] DENG T Q, LIAO X Y, ZHU S M. Recent advances in treatment of recurrent spontaneous abortion[J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2022, 77(6): 355-366.
- [4] 宋艳丽. 补肾活血方对aPL致复发性流产的疗效及对血小板/P2X7/NLRP3通路的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2023.
- [5] TAN Y, LIU Q, LI Z X, et al. Pyroptosis-triggered pathogenesis: new insights on antiphospholipid syndrome[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1155222.
- [6] 乔宗惠. 寿胎丸通过抑制ROS介导的NLRP3炎症小体防治复发性流产[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [7] 葛梦妮, 许小凤. 补肾活血类方剂治疗APS型复发性流产研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(10): 199-202.
- [8] 韩永梅, 卫爱武, 肖惠冬子. 补肾活血方联合低分子肝素治疗产科非典型抗磷脂综合征[J]. *中医学报*, 2021, 36 (8): 1768-1771.
- [9] 肖惠冬子, 卫爱武, 何东杰, 等. 补肾活血方在子宫动脉血流异常致复发性流产患者中的疗效研究[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(6): 1405-1407.
- [10] 黄素宁, 宋雨笛, 蔡益, 等. 基于网络药理学-分子对接探讨补肾活血方治疗复发性流产合并抗磷脂综合征的作用机制[J]. *现代中医药*, 2025, 45(4): 43-52.

- [11] 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, 42:09603271231163476.
- [12] 韩永梅, 刘蔚霞, 肖惠冬子, 等. 补肾活血方对抗磷脂综合征小鼠母胎界面 VEGF、HIF-1 α 、TGF- β 、sFlt-1 蛋白表达影响研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(4):475-479, 485.
- [13] SONG J Y, XU Y, LIU J H, et al. Bushen huoxue formula attenuates recurrent spontaneous abortion by modulating arginine metabolism and macrophage polarization at the maternal-fetal interface[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2026, 267:117161.
- [14] 赵佳琳, 陈萍, 徐广立, 等. 补肾活血方通过下调 JAK2/STAT3 通路改善小鼠的复发性流产[J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(2):265-270.
- [15] WANG P, WU L, LU Y, et al. Risk factors in immune-related recurrent spontaneous abortion and construction of predictive models[J]. *Am J Transl Res*, 2024, 16(11):6564-6572.
- [16] 马寅芙, 刘磊, 王起来, 等. APS 复发性流产患者血小板的活化及其对内皮细胞的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(19):2396-2399.
- [17] SIKARA M P, ROUTSIAS J G, SAMIOTAKI M, et al. β_2 Glycoprotein I (β_2 GP I) binds platelet factor 4 (PF4): implications for the pathogenesis of antiphospholipid syndrome[J]. *Blood*, 2010, 115(3):713-723.
- [18] DING J H, TAN X J, SONG K K, et al. Bushen huoxue recipe alleviates implantation loss in mice by enhancing estrogen-progesterone signals and promoting decidual angiogenesis through FGF2 during early pregnancy[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:437.
- [19] SONG Y F, ZHOU F R, TAN X J, et al. Bushen huoxue recipe attenuates early pregnancy loss via activating endometrial COX2-PGE2 angiogenic signaling in mice[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1):36.
- [20] ZHAO M J, PANG Z Q, JIA C H, et al. Core promoters of pig SOD2 gene and its expression regulation by DNA methylation[J]. *Vet Sci*, 2025, 12(12):1133.
- [21] WANG X, ZHANG Y H, CHANG X, et al. The inhibitory effect of the active ingredients in the Bushen huoxue formula on the IL-17A signaling pathway and its alleviating effect on osteoarthritis[J]. *J Inflamm Res*, 2025, 18:6505-6527.
- [22] HUANG Y J, ZHU M D, ZHANG Z, et al. Integrating network pharmacology and transcriptomics reveals that Bushen huoxue recipe ameliorates ferroptosis and apoptosis in granulosa cells by regulating PI3K/Akt signaling pathway in premature ovarian insufficiency mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 351:120057.
- [23] 林洁, 陈雪鲤, 杨娟, 等. 补肾活血方调控 Keap1/Nrf2/ARE 通路减缓 LPS 诱导流产小鼠氧化应激的研究[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(3):414-418.
- [24] TURCO M Y, GARDNER L, KAY R G, et al. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation[J]. *Nature*, 2018, 564(7735):263-267.
- [25] JI L, JIAO Z Y, ZHANG L, et al. Role of increased IGFBP2 in trophoblast cell proliferation and recurrent spontaneous abortion development: a pilot study[J]. *Physiol Rep*, 2024, 12(3):e15939.
- [26] XU M Y, JI X Y, ZHANG H Y, et al. Anti- β_2 GP I antibodies induce trophoblast pyroptosis and placental inflammation through TLR4/NLRP3/GSDMD axis[J]. *Placenta*, 2025, 170:64-74.
- [27] GAO P, ZHA Y, GONG X, et al. The role of maternal-fetal interface inflammation mediated by NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion[J]. *Placenta*, 2020, 101:221-229.
- [28] OMELJANIUK W J, GARLEY M, PRYCYNICZ A, et al. NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of miscarriages[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19):10513.
- [29] CHEN S, XUE X M, ZHANG H M, et al. Jianwei shoutai pills alleviates miscarriage by modulating gut microbial production of BAs and NLRP3-inflammasome at the maternal-fetal interface of rats[J]. *Phytomedicine*, 2024, 135:156000.
- [30] 宋艳丽, 石少琦, 崔天薇, 等. 补肾活血方对抗心磷脂抗体致复发性流产大鼠的治疗效果[J]. *中华医院感染学杂志*, 2024, 34(12):1849-1854.

(收稿日期:2026-03-05 修回日期:2026-04-07)

(本文责编:舒安琴)