

庞氏安胎止血汤通过调控NLRP3炎症小体改善热证自然流产的作用机制^Δ

马丽亚^{1*}, 吴星霏², 吴刘俊³, 申艳朵³, 谢秉恒³, 张家乐³, 郝锦浩², 于梦², 中山裕美子⁴, 张明昊², 张大伟^{5#}
(1.河南中医药大学教务部, 郑州 450046; 2.河南中医药大学医学院, 郑州 450046; 3.河南中医药大学第五临床医学院, 郑州 450002; 4.河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450002; 5.河南中医药大学第三附属医院妇产科, 郑州 450008)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)01-0037-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.01.07



摘要 **目的** 研究庞氏安胎止血汤通过调控NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体改善热证自然流产的作用机制。**方法** 采用分子对接技术预测庞氏安胎止血汤中13种主要活性成分与NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白质(ASC)、胱天蛋白酶1前体(pro-caspase-1)的结合活性。将60只孕1 d大鼠随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组(0.002 g/kg)和庞氏安胎止血汤低、中、高剂量组(11.025、22.05、44.10 g/kg), 每组10只。各组大鼠灌胃蒸馏水/相应药液, 每天1次, 连续12 d。除正常组外, 其余各组大鼠采用温阳中药和米非司酮诱导热证自然流产模型。末次给药24 h后, 检测大鼠血清中三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)、白细胞介素2(IL-2)、IL-4、IL-6、IL-10、 γ 干扰素(IFN- γ)水平; 计算流产率及子宫系数; 观察大鼠妊娠子宫病理形态; 检测妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平。**结果** 分子对接结果显示, 庞氏安胎止血汤13种主要活性成分与NLRP3、ASC、pro-caspase-1蛋白的结合能均小于-5 kJ/mol。动物实验结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠子宫系数和血清中IL-4、IL-6、IL-10水平均显著降低($P<0.05$), 流产率和血清中T3、T4、IL-2、IFN- γ 水平以及妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$), 妊娠子宫内膜存在流产病变; 与模型组比较, 庞氏安胎止血汤各剂量组大鼠上述大部分定量指标均显著逆转($P<0.05$), 妊娠子宫内膜流产病变均有不同程度改善。**结论** 庞氏安胎止血汤可能通过调节NLRP3炎症小体形成, 下调IFN- γ 、IL-2等促炎因子, 上调IL-4、IL-6、IL-10等抑炎因子, 从而影响母胎之间的免疫平衡, 进而发挥改善热证自然流产的作用。

关键词 庞氏安胎止血汤; 热证; 自然流产; NOD样受体蛋白3; 免疫平衡

Improvement mechanism of Pangshi antai zhixue decoction on spontaneous abortion with heat syndrome by regulating NLRP3 inflammasome

MA Liya¹, WU Xingfei², WU LiuJun³, SHEN Yanduo³, XIE Bingheng³, ZHANG Jiale³, HAO Jinhao², YU Meng², NAKAYAMA Yumiko⁴, ZHANG Minghao², ZHANG Dawei⁵ (1. Dept. of Educational Administration, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Fifth Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 4. Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; 5. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the mechanism of Pangshi antai zhixue decoction in the improvement of spontaneous abortion with heat syndrome by regulating the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome. **METHODS** The binding activities of 13 main components in Pangshi antai zhixue decoction with NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), and caspase-1 precursor (pro-caspase-1) were predicted by molecular docking. Sixty 1-day-old pregnant rats were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone group (0.002 g/kg), and Pangshi antai zhixue decoction low-, medium-, and high-dose

^Δ 基金项目 河南省科技发展计划 (No. 222102310139, No. 242300420168); 河南省中医药科学研究专项课题 (No. 2023ZYZD09, No. 20-21ZY1053)
* 第一作者 副教授, 硕士生导师。研究方向: 中医妇科学。电话: 0371-86550201。E-mail: mary868@163.com
通信作者 教授, 博士生导师。研究方向: 中医妇科学。电话: 0371-86550201。E-mail: 13938427612@126.com

groups (11.025, 22.05, 44.10 g/kg), with 10 rats in each group. Each group was given distilled water/corresponding medicinal solution intragastrically, once a day, for 12 consecutive days. Except for normal group, other groups were given traditional Chinese medicine for warming yang and mifepristone to establish a model of spontaneous abortion with heat syndrome. 24 h after the last medication, serum levels of triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, and interferon- γ (IFN- γ) were all detected; the abortion rate and uterine coefficient were calculated; the pathological morphology of the pregnant uterus was observed; protein expressions of NLRP3, ASC and caspase-1 were detected. **RESULTS** The molecular docking results showed that the binding energies of 13 main components of Pangshi antai zhixue decoction with NLRP3, ASC, and pro-caspase-1 were all less than -5 kJ/mol. The animal experiment results showed that compared with normal group, the uterine coefficient and serum levels of IL-4, IL-6 and IL-10 were decreased significantly in model group ($P<0.05$); the abortion rate and serum levels of T3, T4, IL-2 and IFN- γ as well as protein expressions of NLRP3, ASC and caspase-1 were increased significantly ($P<0.05$); there were abortion lesions in the pregnant endometrium. Compared with the model group, most of the quantitative indicators mentioned above were significantly reversed in Pangshi antai zhixue decoction groups ($P<0.05$), and the endometrial miscarriage lesions in pregnancy were improved to varying degrees. **CONCLUSIONS** Pangshi antai zhixue decoction influences the immune balance between mother and fetus by regulating the formation of NLRP3 inflammasome, down-regulating pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-2, and up-regulating anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-6 and IL-10, thereby improving spontaneous abortion with heat syndrome.

KEYWORDS Pangshi antai zhixue decoction; heat syndrome; spontaneous abortion; NOD-like receptor protein 3; immune balance

自然流产是妊娠女性最常见的并发症之一,其发病过程复杂,前期会出现阴道出血,继而出现阵发性下腹痛或腰背痛等多种症状^[1-2]。现代医学认为,导致自然流产的因素有免疫因素、内分泌因素、感染因素及凝血因素等^[3]。中医将自然流产归为“胎漏”“胎动不安”“滑胎”“数堕胎”范畴;肾为先天之本,主生殖,肾虚则滑胎,以肾虚为前提的脾虚、气血虚、血瘀、血热及肝郁共同组成了滑胎的病因病机^[4]。中原庞氏妇科起源于清代乾隆年间,其认为“胎前生热”“妊娠气滞”“胎前之虚”为“胎漏”“胎动不安”的发病机制,其第6代传人庞清治先生更以清热止血、养血安胎为原则,创制了“庞氏安胎止血汤”。该方配伍得当,具有清热止血、养血安胎的功效,临床用于治疗热证之“胎漏”“胎动不安”,效果较好^[5]。

NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体是NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、胱天蛋白酶1前体(caspase-1 precursor, pro-caspase-1)组成的胞内多蛋白复合物,可促进多种炎症因子的分泌与成熟,且大量表达于子宫内膜和胎盘中,与早产、复发性流产等具有较强的相关性^[6-8]。本课题组前期研究指认了庞氏安胎止血汤煎煮后的13种主要活性成分,分别为莫诺苷、绿原酸、芍药苷、芒果苷、异阿魏酸、甘草苷、菊苣酸、迷迭香酸、荷叶碱、黄芩苷、木犀草素、芹菜素、白术内酯Ⅲ^[9],本研究拟采用分子对接技术与动物实验,从调控NLRP3炎症小体角度分析庞

氏安胎止血汤改善热证自然流产的分子机制,以期为该方的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有BS110S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、MR-96TB型酶标仪[碧克仪器(上海)有限公司]、RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司)、D3024R型台式高速冷冻微量离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]、CX23型光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 主要药品与试剂

庞氏安胎止血汤由黄芩10 g、知母30 g、金银花30 g、蒲公英30 g、荷叶10 g、旱莲草30 g、藕节30 g、升麻6 g、苏梗15 g、白术10 g、山茱萸30 g、白芍10 g、甘草4 g组成,各药材均购自河南中医药大学第三附属医院,经河南中医药大学药学院中药资源与鉴定教研室2名副高级及以上职称人员鉴定为真品,且符合2020年版《中国药典》及国家药品标准。该方水煎液由河南中医药大学医学院医学机能实验室制备,具体流程为:取处方量药材加5倍量蒸馏水浸泡30 min,大火煮沸后小火煎煮30 min,共煎3次,合并药液,浓缩为质量浓度为1.11 g/mL(以生药量计)的药液。温阳中药由附子10 g、干姜10 g、肉桂10 g组成,各药材购自河南中医药大学第三附属医院[临用时,以5倍量蒸馏水常规煎煮后,浓缩为质量浓度为1 g/mL(以生药量计)的药液,备用]。

地屈孕酮片(批号363775,规格10 mg/片)购自荷兰Abbott Healthcare Products B.V.公司;米非司酮片(批号43210213,25 mg/片)购自华润紫竹药业有限公司;氨基甲酸乙酯(批号20221014)购自天津市光复科技发展有限公司;苏木素染色液、伊红染色液(批号分别为190805、20211009)购自福州飞净生物科技有限公司;三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃)、甲状腺素(thyroxine, T₄)测定试剂盒(批号分别为H222-1-2、H223-1-2)购自南京建成生物工程研究所;大鼠白细胞介素2(interleukin-2, IL-2)、IL-4、IL-6、IL-10、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)酶联免疫吸附测定试剂盒(批号分别为MM-0192R2、MM-0191R1、MM-0190R1、MM-0195R1、MM-0198R1)购自江苏酶免实业有限公司;兔抗大鼠NLRP3、ASC、caspase-1抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗、DAB显色试剂盒(批号分别为GB114320-100、GB115270-100、GB11383-100、G1213-100UL、G1212-200T)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 实验动物

60只健康雌性未产SD大鼠(10周龄,体质量200~280 g)和30只健康雄性SD大鼠(10周龄,体质量250~280 g)均由郑州市惠济区华兴实验动物养殖场提供,动物生产许可证号为SCXK(豫)2022-0002。所有大鼠饲养于河南中医药大学医学机能实验室,室温为20~22℃,相对湿度为55%~60%,正常光照,大鼠自由饮水采食。本实验获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号DWLL202201012。

2 方法

2.1 分子对接实验

根据本课题组前期研究^[9],从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载庞氏安胎止血汤主要活性成分莫诺苷、绿原酸、芍药苷、芒果苷、异阿魏酸、甘草苷、菊苣酸、迷迭香酸、荷叶碱、黄芩苷、木犀草素、芹菜素、白术内酯Ⅲ的结构文件,经Open Babel GUL转换成PDB结构文件;再从PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)下载NLRP3、ASC、pro-caspase-1蛋白结构文件。利用AutoDock Tools 1.5.7软件将庞氏安胎止血汤的主要活性成分与NLRP3、ASC、pro-caspase-1蛋白进行分子对接(若结合能<-5 kJ/mol,说明两分子具有亲和力,且结合能数值越低,表示两分子结合越稳定),最后采用PyMOL软件分析分子对接结果,预测庞氏安胎止血汤主要活性成分与NLRP3、ASC、pro-caspase-1蛋白之间的结合活性。

2.2 大鼠分组、造模与给药

将60只雌性大鼠与30只雄性大鼠按雌雄比2:1合笼过夜配种,于次日清晨观察雌性大鼠有无阴道栓,有阴道栓者记为妊娠第1天;待60只雌性大鼠全部妊娠后,随机分为正常组、模型组、地屈孕酮组(0.002 g/kg,剂量根据临床等效剂量换算而得)和庞氏安胎止血汤低、中、高剂量组(11.025、22.05、44.10 g/kg,中剂量为临床等效剂量),每组10只。从妊娠第1天起,正常组和模型组大鼠灌胃蒸馏水,各给药组大鼠灌胃相应药液,给药体积均为10 mL/kg,每天1次,连续12 d。另外,除正常组外,其余各组大鼠均在灌胃蒸馏水/药液的同时灌胃温阳中药药液10 g/kg;第13天,除正常组外,其余各组大鼠按5 mg/kg灌胃米非司酮(临用时以蒸馏水溶解)以建立大鼠热证自然流产模型。以造模大鼠血清中T₃、T₄水平和流产率升高为标准判定造模成功^[9]。最终,各组大鼠无死亡,造模大鼠均造模成功。

2.3 大鼠取材和流产率及子宫系数的计算

末次给药24 h后,称定各组大鼠体重,然后腹腔注射氨基甲酸乙酯(1 g/kg)麻醉,腹主动脉取血,以3 000 r/min离心10 min,取上清液于-80℃下储存,备用。解剖大鼠取妊娠子宫,观察胚胎颜色(正常胚胎呈淡红色,宫内未见瘀血;流产胚胎呈黑褐色,胚胎部分消失),统计各组大鼠流产胚胎数和正常胚胎数,并称定妊娠子宫质量,计算流产率[流产率=流产胚胎数/(流产胚胎数+正常胚胎数)×100%]和子宫系数(子宫系数=子宫质量/体重)。观察结束后,去除妊娠子宫周围组织,经生理盐水洗涤后,称重,拍照,然后将妊娠子宫一分为二,其中一份用4%多聚甲醛固定,另一份用液氮速冻后于-80℃下储存用于后续实验。

2.4 大鼠血清中T₃、T₄、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 水平检测

取“2.3”项下血清样品,室温溶解,按照试剂盒说明书方法操作,然后采用酶标仪检测大鼠血清中T₃、T₄、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 水平。

2.5 大鼠妊娠子宫的病理形态观察

取“2.3”项下固定的妊娠子宫,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(4 μ m)等过程制作病理切片;取部分切片经二甲苯脱蜡、HE染色、梯度乙醇脱水后,以中性树胶封片,采用光学显微镜观察大鼠妊娠子宫的病理形态变化,并拍照。

2.6 大鼠妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平检测

取“2.3”项下妊娠子宫切片,经二甲苯脱蜡、水化后,

以柠檬酸盐缓冲液热修复 8 min;待切片温度降至室温后用 H₂O₂ 孵育 10 min,以磷酸盐缓冲液浸洗后,以山羊血清孵育 30 min,滴加 NLRP3(稀释度为 1:3 000)、ASC(稀释度为 1:1 000)、caspase-1(稀释度为 1:3 000)一抗,4℃孵育过夜;次日,将切片复温至 37℃后滴加二抗(稀释度为 1:1 000)孵育 20 min,以磷酸盐缓冲液浸洗后,以 DAB 显色 10 min,自来水冲洗终止;再以苏木素复染 3 min,经盐酸乙醇分化后,以自来水再次冲洗;经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后镜检。每只大鼠子宫切片在 400 倍镜下随机选取 1 个视野,以棕黄色为阳性染色,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定每个视野中的积分光密度(integrated optical density,IOD)值表示目的蛋白表达水平。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 分子对接结果

由图 1 可知,庞氏安胎止血汤 13 种活性成分与 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 蛋白的结合能均小于 -5 kJ/mol,表明这 13 种活性成分与 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 蛋白结合稳定。另外,这 3 种蛋白与甘草苷的结合能在同类蛋白与活性成分对接中最低,表明这 3 种蛋白与甘草苷结合较为牢固。甘草苷与 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 蛋白的分子对接模拟图见图 2。

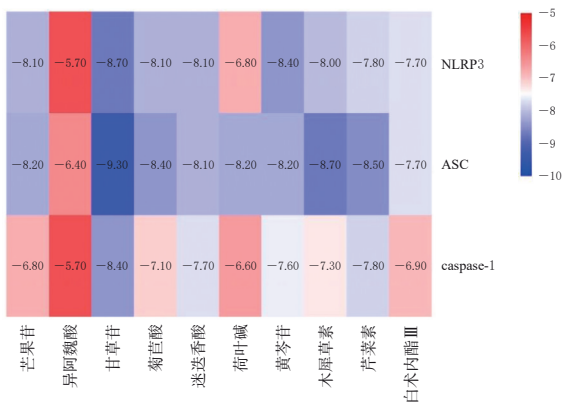
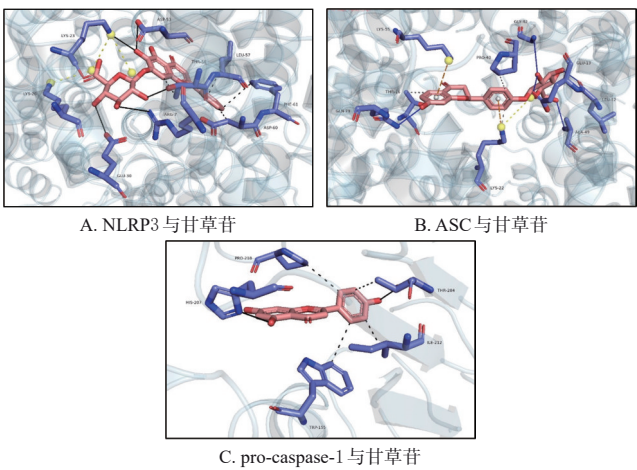


图1 分子对接结合能热图(部分)

3.2 大鼠流产率及子宫系数计算结果

与正常组比较,模型组大鼠流产率显著升高($P<0.05$),子宫系数显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,地屈孕酮组和庞氏安胎止血汤各剂量组大鼠流产率均显著降低($P<0.05$),子宫系数均显著升高($P<0.05$)。结果见表 1。



注:黑色实线代表氢键;黑色虚线代表疏水作用;黄色虚线代表盐桥。
图2 庞氏安胎止血汤中甘草苷与 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 蛋白分子对接模拟图

表1 各组大鼠流产率、子宫系数比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	流产率/%	子宫系数($\times 10^{-3}$)
正常组	6.66±0.35	57.74±11.64
模型组	27.74±4.49 ^a	35.61±3.14 ^a
地屈孕酮组	8.20±0.57 ^b	63.49±8.44 ^b
庞氏安胎止血汤低剂量组	8.60±0.50 ^b	53.35±6.64 ^b
庞氏安胎止血汤中剂量组	8.61±0.50 ^b	57.00±2.55 ^b
庞氏安胎止血汤高剂量组	8.52±0.64 ^b	57.73±10.87 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.3 大鼠血清中 T3、T4 水平检测结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中 T3、T4 水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,地屈孕酮组和庞氏安胎止血汤各剂量组大鼠血清中 T3、T4 水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表 2。

表2 各组大鼠血清中 T3、T4 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$, ng/mL)

组别	T3	T4
正常组	0.43±0.05	209.93±4.33
模型组	0.90±0.06 ^a	243.68±5.99 ^a
地屈孕酮组	0.51±0.02 ^b	225.41±2.61 ^b
庞氏安胎止血汤低剂量组	0.59±0.04 ^b	224.56±4.30 ^b
庞氏安胎止血汤中剂量组	0.44±0.03 ^b	217.79±4.47 ^b
庞氏安胎止血汤高剂量组	0.37±0.04 ^b	214.35±1.74 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.4 大鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 水平检测结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中 IL-2、IFN- γ 水平均显著升高($P<0.05$),IL-4、IL-6、IL-10 水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,地屈孕酮组和庞氏安胎止血汤各剂量组大鼠血清中 IL-2、IFN- γ 水平均显著降低($P<0.05$),IL-4、IL-10 水平均显著升高($P<0.05$);地屈孕酮组和庞氏安胎止血汤中、高剂量组大鼠血清中 IL-6 水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表 3。

表3 各组大鼠血清中IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γ水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IFN-γ
正常组	34.43 ± 2.22	51.20 ± 5.32	15.53 ± 1.31	6.38 ± 0.24	126.96 ± 3.91
模型组	72.29 ± 7.22 ^a	35.22 ± 1.94 ^a	7.99 ± 0.45 ^a	3.38 ± 0.25 ^a	209.07 ± 20.07 ^a
地屈孕酮组	44.59 ± 2.86 ^b	46.82 ± 3.70 ^b	11.60 ± 0.86 ^b	5.39 ± 0.34 ^b	138.01 ± 4.24 ^b
庞氏安胎止血汤低剂量组	54.06 ± 1.08 ^b	40.37 ± 2.08 ^b	8.96 ± 0.39	4.37 ± 0.18 ^b	165.40 ± 4.79 ^b
庞氏安胎止血汤中剂量组	51.33 ± 2.07 ^b	41.22 ± 1.86 ^b	9.69 ± 0.34 ^b	4.75 ± 0.25 ^b	157.61 ± 2.46 ^b
庞氏安胎止血汤高剂量组	46.38 ± 3.58 ^b	45.45 ± 2.12 ^b	11.97 ± 1.17 ^b	5.29 ± 0.33 ^b	148.59 ± 5.85 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 大鼠妊娠子宫的病理形态观察结果

正常组大鼠妊娠子宫内膜组织无损伤,蜕膜细胞排列整齐紧密。与正常组比较,模型组大鼠蜕膜细胞数量减少且存在损伤和充血等流产病变。与模型组比较,地屈孕酮组和庞氏安胎止血汤各剂量组大鼠蜕膜细胞损伤及充血等流产病变均有不同程度的改善。结果见图3。

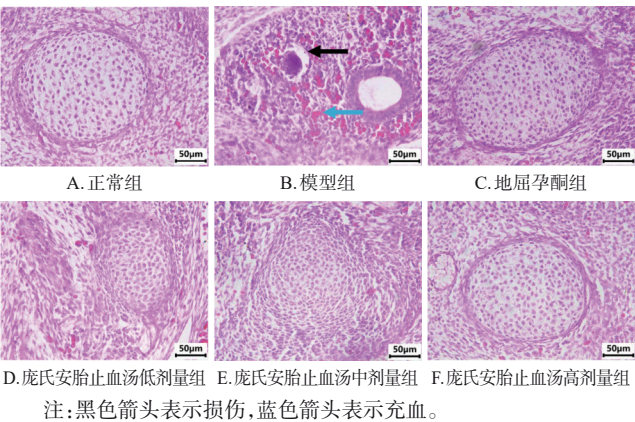


图3 各组大鼠妊娠子宫的病理形态显微图(HE染色)

3.6 大鼠妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平检测结果

与正常组比较,模型组大鼠妊娠子宫中NLRP3、caspase-1、ASC蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,地屈孕酮组和庞氏安胎止血汤各剂量组大鼠妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见图4和表4。

4 讨论

自然流产发病率约占妊娠女性的15%,是不孕症的主要原因之一^[1],但限于伦理原因,流产研究无法直接在人体开展,只能借助符合人体流产病理特征的药物模型开展相关研究,揭示发病机制,研究更安全、更有效的临床干预手段。已有研究表明,使用米非司酮、米索前列醇等药物诱导的流产特征与人类自然流产类似,可以作为自然流产动物模型的构建手段^[10]。米非司酮是一种孕激素受体拮抗剂,可以选择性地拮抗孕酮受体,使孕酮活性降低,引发妊娠终止^[11]。热证是以机体阳盛阴

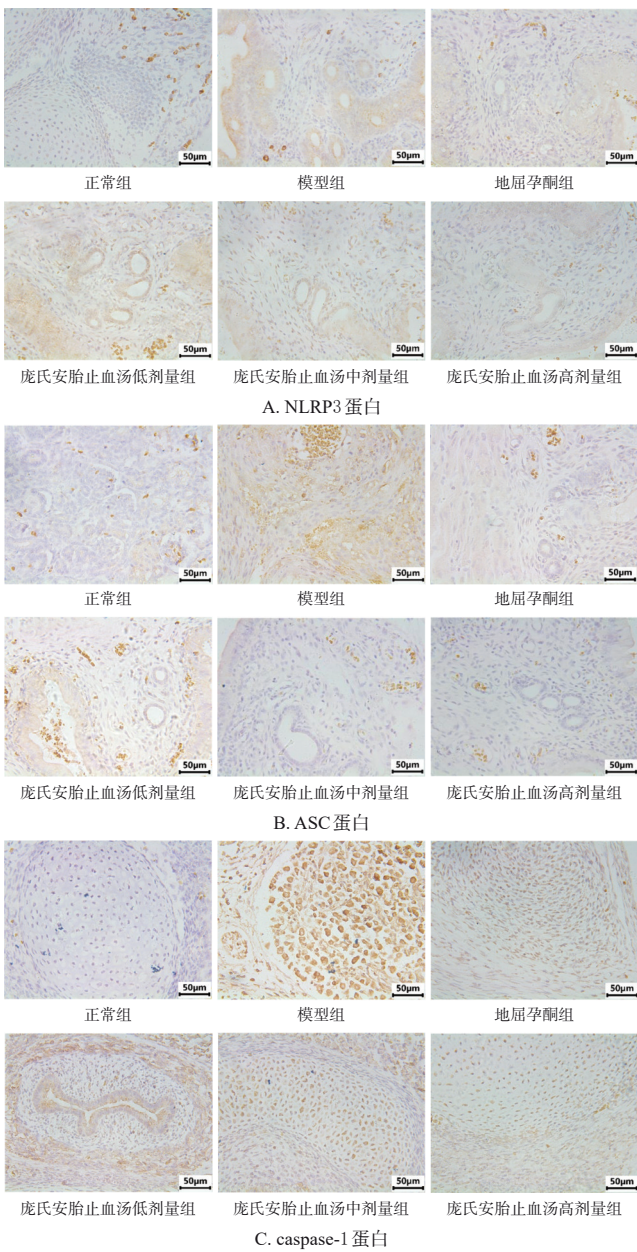


图4 各组大鼠妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达的免疫组化图

表4 各组大鼠妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白IOD值比较($\bar{x} \pm s, n=10, \times 10^2$)

组别	NLRP3	ASC	caspase-1
正常组	509.00 ± 6.74	1 527.73 ± 26.58	1 043.90 ± 28.78
模型组	1 972.27 ± 34.81 ^a	5 875.06 ± 64.37 ^a	6 624.43 ± 14.87 ^a
地屈孕酮组	618.63 ± 5.50 ^b	1 431.49 ± 31.79 ^b	2 451.86 ± 34.18 ^b
庞氏安胎止血汤低剂量组	925.65 ± 3.39 ^b	1 935.67 ± 15.60 ^b	4 050.09 ± 14.63 ^b
庞氏安胎止血汤中剂量组	682.06 ± 5.23 ^b	1 645.76 ± 32.07 ^b	2 943.74 ± 28.40 ^b
庞氏安胎止血汤高剂量组	571.12 ± 6.20 ^b	1 363.80 ± 25.26 ^b	1 953.42 ± 30.98 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

虚、脏腑阳气亢盛为因,以机能活动亢进为表现的一种证候形式,分实热和虚热两种类型。《景岳全书·妇人规》有云“凡胎热者,血易动,血动者,胎不安”,由此可知血虚热证是自然流产的病因之一。本研究以“温热药易伤阴助火,内热由生”为理论基础,采用温热中药附子、干

姜配伍诱导虚热证动物模型^[12-13],该动物模型主要表现为甲状腺功能亢进,血清中T₃、T₄水平升高以及流产率增加,表明造模成功。

中原庞氏妇科依据女性妊娠期特殊的生理病理特点,将体质与病症结合,创立了庞氏安胎止血汤,该方清热安胎,兼以补肾、健脾、理气。方中黄芩清热燥湿、泻火解毒、止血安胎,知母滋阴降火,二者为君药。金银花和蒲公英清热解毒、防治感染,旱莲草和藕节凉血止血、养阴化瘀,四者为臣药。苏梗理气和胃、止痛安胎,白术健脾益气、燥湿利水、止汗安胎;升麻少量配白术、荷叶可升阳止血安胎;山茱萸、白芍补血固肾、安胎,白芍缓急止痛,与知母合用则治妊娠腹痛;知母、山茱萸、白芍虽滋补阴血,但易碍胃生湿;苏梗、白术虽理气祛湿,亦有伤津之弊,两组药物配合使用,滋补阴血而无碍胃生湿之弊,理气祛湿而无伤津之虞——此六者为佐药。甘草为使药,调和诸药,可达清热养阴、理气安胎的功效^[14-15]。本研究结果显示,经庞氏安胎止血汤干预后,模型大鼠子宫系数升高,流产率降低,血清中T₃、T₄水平降低,妊娠子宫病理形态明显改善,这表明庞氏安胎止血汤对热证自然流产大鼠有较好的改善作用。

胚胎是母体的半同种异体移植物,会受到母体排斥。母胎之间的免疫耐受取决于母胎界面免疫细胞及细胞因子之间的动态平衡,若此平衡被打破,胎儿将受到母体排斥而发生流产^[16]。目前研究认为,妊娠期母体免疫系统主要通过辅助性T细胞1(T helper 1 cell, Th1)/Th2模式维持正常妊娠,Th1细胞分泌的IFN- γ 、IL-2等促炎因子,可介导细胞免疫,促进炎症反应,抑制胎盘滋养层细胞生长,干扰胚胎和胎儿发育,引起胚胎丢失,增加流产风险;Th2细胞分泌的IL-4、IL-6和IL-10等抑炎因子,可抑制炎症反应,促进同种异体移植物免疫耐受,维持母胎界面妊娠,IL-10还可挽救免疫平衡破坏引起的妊娠不良结局^[17-18]。本研究结果显示,经庞氏安胎止血汤干预后,模型大鼠血清中IFN- γ 、IL-2水平降低,IL-4、IL-6及IL-10水平升高,这表明庞氏安胎止血汤可通过调节炎症因子水平影响母胎之间的免疫平衡,从而实现热证自然流产的改善作用。

NLRP3炎症小体是一种多聚蛋白复合物,其组成包括一个模式识别受体蛋白NLRP3,一个含有CARD结构域的ASC(起中枢衔接蛋白的作用),一个炎性半胱氨酸天冬酶caspase-1。NLRP3蛋白作为模式识别受体蛋白,由一个C端富含亮氨酸的重复序列(LRP)、一个核苷酸结合寡结构域(NOD)和一个N末端pyrin结构域(PYD)组成。NLRP3被激活后,其PYD结构域与ASC同源结

构域结合,激活ASC,活化的ASC可募集前体蛋白pro-caspase-1,促其水解为有活性的caspase-1;具有活性的caspase-1可剪切多种IL前体蛋白,促进促炎因子成熟与分泌,介导下游炎症反应,此炎症反应加剧可能是早期不明原因流产的原因之一^[6]。本研究分子对接结果显示,庞氏安胎止血汤的13种主要活性成分与NLRP3、ASC、pro-caspase-1蛋白结合牢固;动物实验结果发现,经庞氏安胎止血汤干预后,模型大鼠妊娠子宫中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平降低,表明庞氏安胎止血汤可能通过调节NLRP3炎症小体形成,介导炎症反应,影响母胎之间的免疫平衡,从而实现对热证自然流产的改善作用。

综上所述,庞氏安胎止血汤可能通过调节NLRP3炎症小体形成,下调IFN- γ 、IL-2等促炎因子,上调IL-4、IL-6、IL-10等抑炎因子,从而影响母胎之间的免疫平衡,进而发挥改善热证自然流产的作用。本课题组未来考虑采用NLRP3抑制剂或构建NLRP3敲除大鼠模型,以更深入地探究庞氏安胎止血汤干预热证自然流产的作用机制,为其进一步的临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 自然流产诊治中国专家共识编写组. 自然流产诊治中国专家共识:2020年版[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(11):1082-1090.
Writing Group of Chinese Expert Consensus on Diagnosis and Treatment of Spontaneous Abortion. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of spontaneous abortion: 2020 edition[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2020, 36(11):1082-1090.
- [2] WANG Y, LIU H Z, LIU Y, et al. Disordered p53-MALAT1 pathway is associated with recurrent miscarriage[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2019, 35(2):87-94.
- [3] ISMAIL A M, ABBAS A M, BAKRY A K, et al. Expression of ERK and Akt proteins in women with unexplained first-trimester recurrent miscarriage[J]. Middle East Fertil Soc J, 2017, 22(1):33-38.
- [4] 周月希,余庆英,罗颂平,等. 减味寿胎丸对自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织中FOXO3及PR蛋白表达的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(4):335-340.
ZHOU Y X, YU Q Y, LUO S P, et al. Effect of Jianwei shoutai pill on FOXO3 and PR protein expression in decidua of spontaneous abortion model mice[J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(4):335-340.
- [5] 马丽亚,张大伟,张颖,等. 庞氏安胎止血汤治疗先兆流产血热证临床疗效及对T淋巴细胞亚群因子的影响[J].

中华中医药杂志,2021,36(5):3049-3052.

MA L Y, ZHANG D W, ZHANG Y, et al. Clinical effect of Pangshi antai zhixue decoction on threatened abortion with blood heat syndrome and its influence on T lymphocyte subgroup factor[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(5):3049-3052.

- [6] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13):3328.

- [7] HOFFMAN H M, WANDERER A A, BROIDE D H. Familial cold autoinflammatory syndrome: phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 108(4):615-620.

- [8] JO E K, KIM J K, SHIN D M, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(2):148-159.

- [9] 马丽亚, 崔荣洽, 李康, 等. 庞氏安胎止血标准汤剂 HPLC 指纹图谱建立及 7 种成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(2):166-170, 208.

MA L Y, CUI R Q, LI K, et al. Establishment of HPLC fingerprint and determination of seven components in Pangshi antai zhixue standard decoction[J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(2):166-170, 208.

- [10] 杨倩, 郁琳, 顾艳, 等. 米非司酮导致孕激素功能不足的自然流产小鼠模型的建立及其评价[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(5):327-333.

YANG Q, YU L, GU Y, et al. Establishment and evaluation of spontaneous abortion mouse models of progesterone insufficiency induced by mifepristone[J]. Lab Anim Comp Med, 2016, 36(5):327-333.

- [11] 郜洁, 巫海旺, 杜鑫, 等. 正交设计法研究羟基脲和米非司酮的优选配比制作大鼠流产模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16):114-118.

GAO J, WU H W, DU X, et al. Orthogonal design method to study optimal ratio of hydroxyurea and mifepristone in miscarriage models of rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(16):114-118.

- [12] 曹明慧, 张学智, 叶晖, 等. 中医热证动物模型构建及评价方式现状研究[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2024, 48(3):11-16.

CAO M H, ZHANG X Z, YE H, et al. Research progress on the construction and evaluation of animal models of TCM heat syndrome[J]. Chin J Libr Inf Sci Tradit Chin Med, 2024, 48(3):11-16.

- [13] 马丽亚, 赵君玫, 王磊, 等. CBA/J 小鼠虚热型反复自然流产模型的建立[J]. 中医学报, 2020, 35(2):358-361.

MA L Y, ZHAO J M, WANG L, et al. Establishment of recurrent spontaneous abortion with deficiency heat syndrome in CBA/J model mice[J]. Acta Chin Med, 2020, 35(2):358-361.

- [14] 马丽亚, 张颖, 庞玉琴, 等. 庞氏安胎止血汤对热证自然流产大鼠 T 细胞亚群表达干预的研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(11):2632-2635.

MA L Y, ZHANG Y, PANG Y Q, et al. Intervention of Pangshi antai zhixue decoction on expression of T lymphocyte subsets in spontaneous abortion rats with heat syndrome[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(11):2632-2635.

- [15] 马丽亚, 杜玉洁, 王磊, 等. 庞氏安胎汤对先兆流产大鼠的影响[J]. 中医学报, 2017, 32(9):1686-1689.

MA L Y, DU Y J, WANG L, et al. Effect of Pangshi antai decoction on threatened abortion rats[J]. Acta Chin Med, 2017, 32(9):1686-1689.

- [16] 方紫璇, 余楠. 不明原因复发性流产中 Th17/Treg 免疫平衡机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(21):2657-2663.

FANG Z X, YU N. Research progress of Th17/Treg immune balance mechanism in unexplained recurrent abortion[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(21):2657-2663.

- [17] 刁玉芳, 宋香金, 刘芬, 等. 寿胎丸加减联合黄体酮注射液对早期肾虚型先兆流产患者疗效、性激素及血清 IL-2、IL-6、CRP 水平的影响[J]. 中国性科学, 2024, 33(4):140-144.

DIAO Y F, SONG X J, LIU F, et al. Influences of modified Shoutai pill combined with progesterone injection on curative effect, sex hormones, serum IL-2, IL-6 and CRP levels in patients with early threatened abortion of kidney deficiency type[J]. Chin J Hum Sex, 2024, 33(4):140-144.

- [18] 邵文嘉, 崔金全. 子宫动脉血流参数、血清 IL-6、IFN- γ 水平与复发性流产患者妊娠结局的相关性[J]. 河南医学研究, 2024, 33(4):675-679.

SHAO W J, CUI J Q. Correlation between uterine artery blood flow parameters, serum IL-6, IFN- γ levels and pregnancy outcomes in patients with recurrent abortion[J]. Henan Med Res, 2024, 33(4):675-679.

(收稿日期:2024-08-20 修回日期:2024-12-02)

(编辑:唐晓莲)