

# 低分子肝素钙对小鼠胚胎着床的干预作用及机制研究

杨文<sup>1</sup>, 杨艳<sup>1</sup>, 吴晓燕<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 孙倩<sup>1</sup>, 高原<sup>1</sup>,  
张欢欢<sup>1</sup>, 冯文<sup>1\*</sup>, 马宁<sup>2</sup>

(1. 江苏省连云港第一人民医院, 江苏 连云港 222000; 2. 海南省妇幼保健院生殖医学中心, 海口 570206)

**【摘要】 目的** 探讨低分子肝素钙(Low molecular weight heparin calcium, LMWHC)对小鼠胚胎着床的干预作用及机制。**方法** 构建小鼠妊娠模型,腹腔注射 LMWHC 干预,观察 LMWHC 对小鼠胚胎着床的影响。分离培养小鼠滋养层细胞,用不同浓度 LMWHC 干预细胞,采用 Transwell 小室检测细胞侵袭力,采用 ELISA、Western blot 和 RT-PCR 法检测细胞上清基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 和金属蛋白酶抑制因子-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2) 的蛋白和 mRNA 水平的表达情况。**结果** 妊娠小鼠腹腔注射 LMWHC 后,妊娠 D6 和 D9 的小鼠胚胎着床数明显增多( $P < 0.05$ );用  $1 \times 10^2$  IU/L、 $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 浓度的 LMWHC 干预滋养层细胞 24 h 后,滋养层细胞侵袭细胞数分别为  $(84.83 \pm 14.15)$  个、 $(162.48 \pm 25.49)$  个、 $(98.73 \pm 12.77)$  个,与未用 LMWHC 干预细胞的  $(65.27 \pm 13.92)$  个比较,差异有显著性( $P < 0.05$ ),滋养层细胞上清液中 MMP-2 表达水平较未用 LMWHC 干预的细胞均升高( $P < 0.05$ ),滋养层细胞上清液中 TIMP-2 表达水平较未用 LMWHC 干预的细胞降低( $P < 0.05$ )。**结论** LMWHC 可促进小鼠胚胎着床,其机制可能与 LMWHC 通过影响 MMP-2 和 TIMP-2 表达而增强滋养层细胞侵袭力有关。

**【关键词】** 低分子肝素钙;小鼠;胚胎着床;滋养层细胞;侵袭力

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0061-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.011

## Effect and mechanism of low molecular weight heparin calcium on mouse embryo implantation

YANG Wen<sup>1</sup>, YANG Yan<sup>1</sup>, WU Xiaoyan<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, SUN Qian<sup>1</sup>,  
GAO Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Huanhuan<sup>1</sup>, FENG Wen<sup>1</sup>, MA Ning<sup>2</sup>

(1. The First People's Hospital of Jiangsu Lianyungang, Lianyungang 222000, China;

2. Reproductive Medicine Center, Hainan Maternal and Child Health Care Center, Haikou 570206)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect and mechanism of low molecular weight heparin calcium (LMWHC) on mouse embryo implantation. **Methods** A mouse pregnancy model was established and LMWHC was injected intraperitoneally. The effects of LMWHC on mouse embryo implantation were then observed. Mouse trophoblasts were isolated, cultured, and treated with various concentrations of LMWHC. Transwell chambers were used to examine cell invasiveness. ELISAs, western blotting, and RT-PCR was used to detect the expression levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2). **Results** After intraperitoneal injection of LMWHC into pregnant mice, the numbers of embryo implantations at days 6 and 9 of pregnancy were increased significantly ( $P < 0.05$ ). At 24 h after LMWHC injection at  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ , and  $1 \times 10^4$  IU/L, invading trophoblast numbers were  $(84.83 \pm$

[作者简介] 杨文(1972—),女,本科,主任医师,研究方向:生殖免疫。E-mail: 1138514130@qq.com

[通信作者] 冯文(1968—),女,硕士,主任医师,研究方向:生殖及妇科肿瘤。E-mail: 18961326620@189.cn

14.15), ( $162.48 \pm 25.49$ ), and ( $98.73 \pm 12.77$ ) respectively, significantly different from the cells without LMWHC treatment ( $65.27 \pm 13.92$ ) ( $P < 0.05$ ). The level of MMP-2 in the culture supernatant of trophoblasts was higher than that in the culture supernatant of cells without LMWHC treatment ( $P < 0.05$ ), while the level of TIMP-2 was lower than that in cells without LMWHC treatment ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LMWHC promotes mouse embryo implantation, and its mechanism may be related to enhancement of the invasiveness of trophoblasts by affecting the expression of MMP-2 and TIMP-2.

**【Keywords】** low molecular weight heparin calcium; mouse; embryo implantation; trophoblasts; invasiveness

胚胎着床是胎生哺乳动物生殖过程中决定妊娠是否成功的关键所在。胚胎着床主要包括定位、黏着、侵入 3 个步骤,囊胚在一定位置靠近内膜,并被安置在子宫角腔中某个适当的位置,接着囊胚滋养层细胞黏着能力增强,使囊胚进一步贴紧子宫内膜,最后囊胚滋养层细胞通过分泌某种物质使之侵入内膜基质。该过程是由细胞因子、黏着分子、性激素等多种分子通路所介导<sup>[1-2]</sup>。临床上,低分子肝素钙(low molecular weight heparin calcium, LMWHC)常用于复发性流产以及反复着床失败患者的治疗,并认为与 LMWHC 抗血栓抗凝作用有关<sup>[3-4]</sup>。本研究通过构建妊娠小鼠模型,探讨 LMWHC 对小鼠胚胎着床的影响,并从细胞分子水平上分析 LMWHC 的可能作用机制,现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

24 只 8~10 周龄成熟未育的清洁级雌性昆明小鼠购于苏州新药研究中心有限公司[SCXK(苏)2013-0003],体重 30-35 g,实验动物饲养于苏州市立医院动物中心实验室[SYXK(苏)2017-0043],室温环境恒定温度为 25℃,每 12 h 黑暗光照条件循环交替,动物摄食和饮水自由,福利伦理审查证号 201711A。动物实验过程中遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 液体培养基购自 Hyclone 公司(美国);胎牛血清、青链霉素混合液购自于 Life Technologies 公司(美国);胰蛋白酶购自于 Sigma 公司(美国);鼠抗人细胞角蛋白(cytokeratin, CK7)、波形蛋白(Vimentin, V9)单克隆抗体以及免疫组织化学试剂盒购自于北京中杉生物试剂公司;基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)和金属蛋白酶抑制因子-2(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2, TIMP-2)ELISA 试剂盒购自于 ADL 公司(美国);Transwell 小室购自于 Corning 公司(美国);Matrigel

购自于 BD 公司(美国);二氧化碳培养箱购自于 FORMA 公司(美国);OLYMPUS BX50 生物显微镜购自于 OLYMPUS 公司(日本)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型的建立与材料收集

按 2:1 的比例与成年雄性小鼠合笼交配,次日对雌性小鼠阴道进行检查,将检出阴栓的小鼠视作妊娠 D1。将妊娠小鼠随机分为对照组和 LMWHC 组,每组各 12 只,LMWHC 组小鼠按 1000 U/kg 腹腔注射 LMWHC,对照组腹腔注射等量生理盐水。妊娠 D6 时(6 只孕鼠),尾静脉注射 1% 台盼蓝 100  $\mu\text{L}$ ,5 min 后处死孕鼠(颈椎脱臼法),取出子宫,观察子宫形态,记录小鼠子宫蓝色着床位点数。妊娠 D9 时(6 只孕鼠),着床点肉眼可见,直接处死,记录小鼠子宫着床位点数。统计着床位点数,计算每组小鼠着床位点平均数。

#### 1.3.2 滋养层细胞的原代培养及鉴定

另外选取妊娠 D14 的小鼠,颈椎脱臼法处死后分离胎盘组织,无菌盐水清洗后将其剪碎,采用 Zhou WH 改良法<sup>[5]</sup>分离纯化滋养层细胞。将滋养层细胞悬液浓度调整至每孔  $3 \times 10^8$  个接种于放置有载玻片的 6 孔板内培养,培养基为含 10% 胎牛血清和双抗(链霉素、青霉素)的 DMEM/F12。待细胞生长至 80% 时,取出载玻片,PBS 清洗 3 次后固定 10 min,再次清洗 3 次,然后用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  去离子水孵育 10 min,清洗后室温封闭 30 min。加入一抗(CK-7 抗体、V9 抗体以及 PBS 代替一抗作为阴性对照)低温孵育过夜,PBS 清洗 3 次后,加入二抗,室温孵育 60 min,PBS 清洗 3 次后,经显色、复染、脱水、透明等步骤后封片,并观察拍照,计算阳性细胞率和阴性细胞率。

#### 1.3.3 Transwell 实验

预先将 Matrigel 包被在 Transwell 板滤膜表面,上室中加入浓度为每孔  $2 \times 10^5$  个的滋养层细胞,分别采用  $1 \times 10^2$  IU/L、 $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 浓度的 LMWHC 干预,不加 LMWHC 的细胞作为对照,

下室中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 800  $\mu$ L, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置 24 h, 然后取出, 将上室滤膜内表面的细胞擦拭干净, 将滤膜下表面的细胞固定, 经瑞氏染色后, 在高倍镜( $\times 200$ )下观察, 每孔随机选择 5 个视野进行计数, 每次不同 LMWHC 干预浓度以及对照设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

### 1.3.4 上清液中 MMP-2 和 TIMP-2 浓度检测

将浓度为每孔  $3 \times 10^8$  个的滋养层细胞接种于 6 孔板内, 培养箱内静置 30 min 后, 分别采用  $1 \times 10^2$  IU/L、 $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 浓度的 LMWHC 干预, 不加 LMWHC 的细胞作为对照, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置 24 h 后收集上清, 采用 ELISA 法检测上清中 MMP-2 和 TIMP-2 水平。

### 1.3.5 Western blot 实验

细胞蛋白提取后按配方配制 SDS-PAGE 胶进行电泳, 待溴酚蓝接近电泳槽底部时停止电泳, 在电压 15 V, 时间 1.5 h, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 孵育一抗、孵育二抗, 0.1% TBST 漂洗 PVDF 膜, 按 1:1 等比例去 ECL 发光液 A 液和 B 液混合, 在 Alpha FluorChem Q 凝胶成像系统下曝光并成像, 保留图片后用于统计分析。蛋白条带灰度值半定量分析: 用 Image J 软件对拍照下的蛋白条带进行灰度值测定。以目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 条带灰度值来校正上样量的偏差, 用二者灰度比值的高低表示各样本目的蛋白表达量的多少。

### 1.3.6 逆转录 PCR (RT-PCR) 实验

采用 Trizol 法并利用 TIANGEN<sup>®</sup> RNA simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒, 提取总 RNA, 按

照 StarScript II First-strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒操作说明进行反转录。采用 GenStar 2  $\times$  Taq PCR Mix with Loading Dye 试剂盒加入引物进行扩增, 反应结束用 2.1% 凝胶电泳。MMP-2 引物序列, Forward primer: 5'-CGCTCAGATCCGTGGTGAGAT-3'; Reverse primer: 5'-CGGGAGCTCAGGCCAG AATG-3', 扩增片段 310 bp; TIMP-2 引物序列, Forward primer: 5'-CTCGCTGGACGTTGGAGGAAAG AA-3', Reverse primer: 5'-AGCCCATCTGGTACC TGTGTTC-3', 扩增片段 150 bp; 内参  $\beta$ -actin 引物序列: Forward primer: 5'-ATATCGCTGCCGCTGGTC GTC-3'; Reverse primer: 5'-AGGATGGCGTGAG GGAGACC-3', 扩增片段 517 bp。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 延伸, 共计 35 个循环。反应结束后用 2.1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

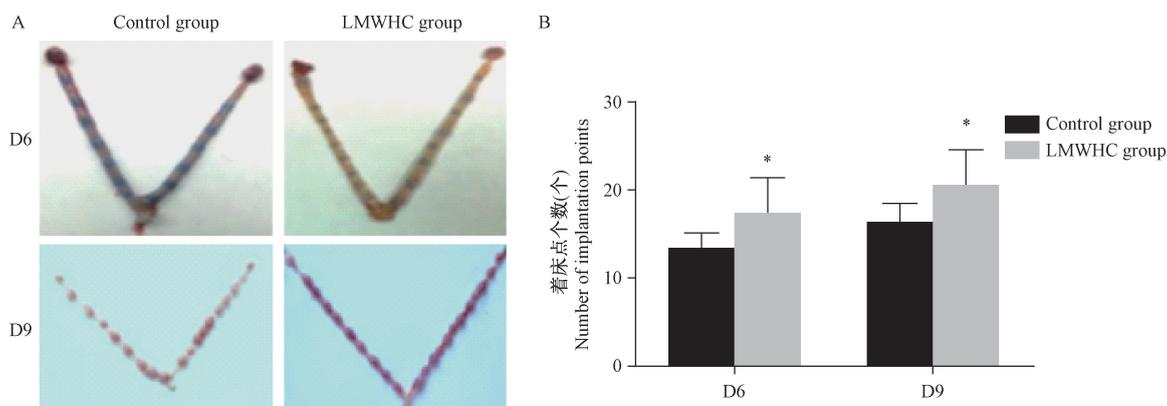
### 1.4 数据分析

计量数据用 SPSS 20.0 软件分析, 用平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 服从正态分布及方差齐性的使用  $t$  检验或  $\chi^2$  进行分析, 不服从正态分布及方差齐性的计量数据采用非参数检验, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 LMWHC 对小鼠胚胎着床的影响

取妊娠 D6 和 D9 的小鼠子宫, 记录各小鼠胚胎着床位数, 结果显示, LMWHC 组妊娠 D6 和 D9 的着床位数均多于对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 见表 1 和图 1。



注: A: 子宫形态图; B: 胚胎着床点数统计。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 1 小鼠胚胎着床点数

Note. A: Uterine morphogram; B: Embryo implantation count. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 1 Number of mouse embryo implantation sites

表 1 两组胚胎着床位点数比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Comparison of embryo implantation sites in two groups

组别 Groups	D6	D9
对照组 Control group	13.24 ± 1.86	16.15 ± 2.34
LMWHC 组 LMWHC group	17.41 ± 3.95	20.48 ± 4.22
Z	2.453	2.657
P 值 P-value	<0.05	<0.05

## 2.2 小鼠滋养层细胞鉴定

经免疫细胞化学 DAB 实验,结果发现大多数贴壁生长的细胞为 CK7 阳性,细胞 CK7 阳性率为

(94.83 ± 3.15)%,大多数细胞为 V9 阴性,细胞 V9 阴性率为(91.18 ± 2.87)%,见图 2。

## 2.3 LMWHC 对小鼠滋养层细胞侵袭力的影响

用  $1 \times 10^2$  IU/L、 $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 浓度的 LMWHC 干预滋养层细胞 24 h 后,Transwell 实验结果显示,各组细胞侵袭细胞数分别为(84.83 ± 14.15)个、(162.48 ± 25.49)个、(98.73 ± 12.77)个,与未用 LMWHC 干预细胞的(65.27 ± 13.92)个比较,差异有显著性( $P < 0.05$ ),见图 3。

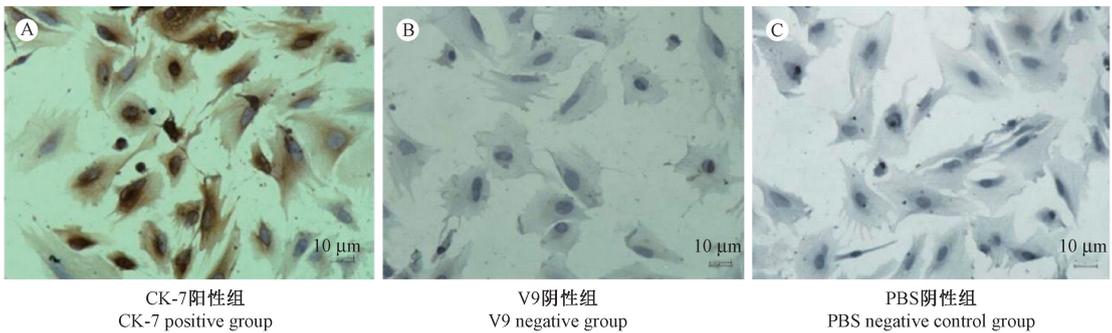
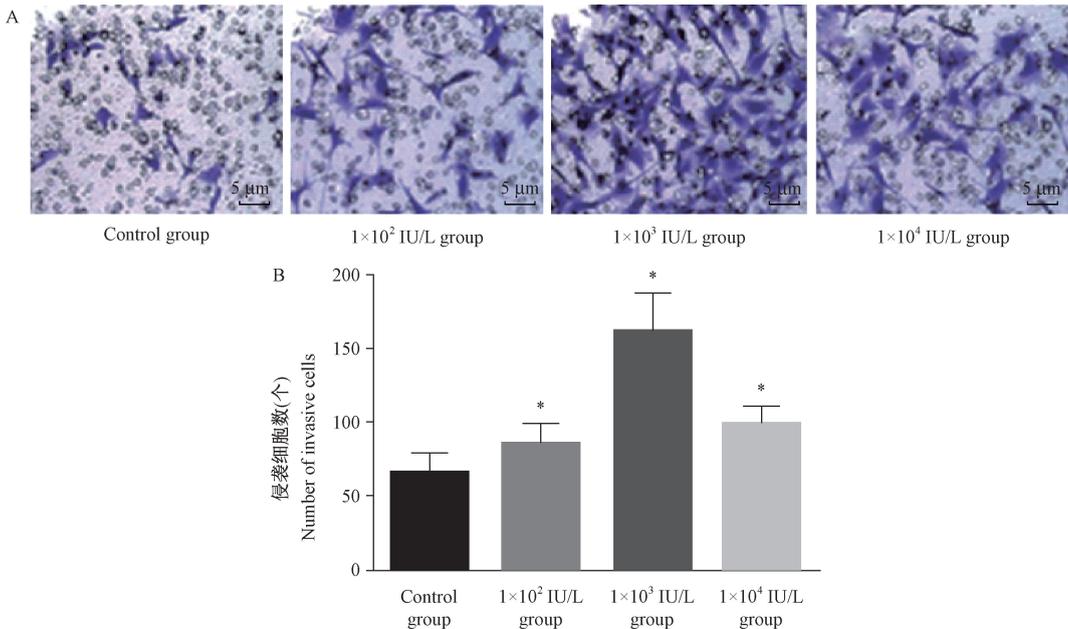
图 2 小鼠滋养层细胞免疫细胞化学结果( $\times 200$ )

Figure 2 Morphology of the mouse trophoblast cells. Immunohistochemical staining.



注:A:不同浓度 LMWHC 干预滋养层细胞 24 h 后 Transwell 实验( $\times 200$ )。B:不同浓度 LMWHC 干预滋养层细胞 24 h 后侵袭细胞数统计。与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

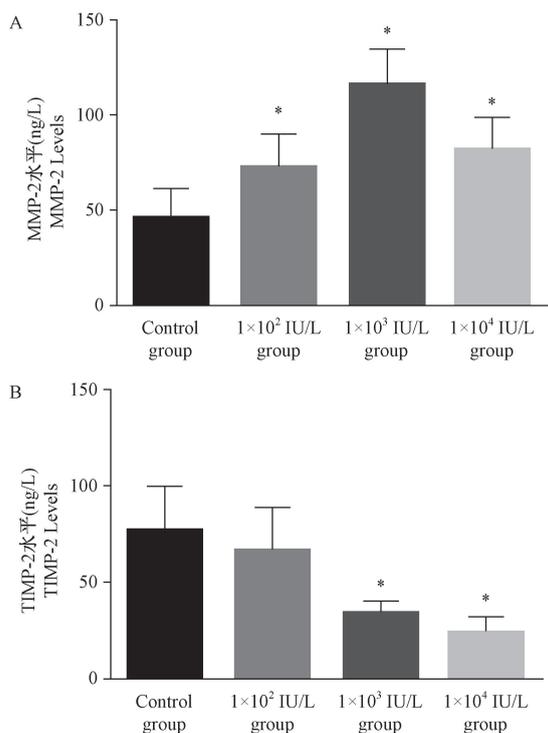
图 3 LMWHC 对小鼠滋养层细胞侵袭力的影响

Note. A: Transwell assay after 24 h of different concentrations of LMWHC on trophoblast cells( $\times 200$ ). B: Statistics of invading cells in trophoblast cells after 24 h of different concentrations of LMWHC. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ .

Figure 3 Effects of LMWHC on the invasiveness of mouse trophoblast cells

## 2.4 LMWHC 对小鼠滋养层细胞中细胞因子的影响

用  $1 \times 10^2$  IU/L、 $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 浓度的 LMWHC 干预滋养层细胞 24 h 后,滋养层细胞上清液中 MMP-2 表达水平较未用 LMWHC 干预的细胞均升高,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),当 LMWHC 干预浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 时, MMP-2 表达水平最高。滋养层细胞上清液中 TIMP-2 表达水平随着 LMWHC 干预浓度的升高而降低, LMWHC 干预浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 时,与未用 LMWHC 干预的细胞比较,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),见图 4。



注:A:不同浓度 LMWHC 干预小鼠滋养层细胞后,培养基上清中 MMP-2 的表达水平。B:不同浓度 LMWHC 干预小鼠滋养层细胞后,培养基上清中 TIMP 的表达水平。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

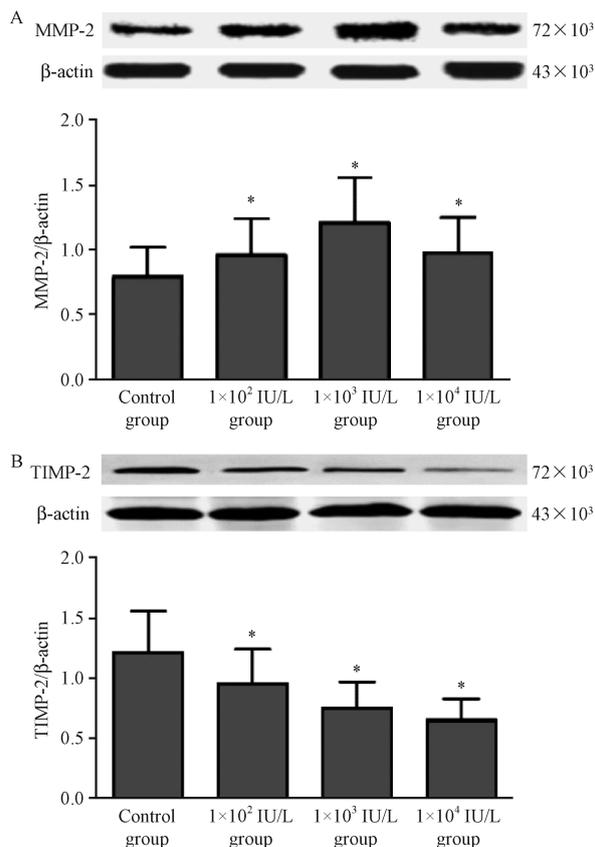
**图 4** LMWHC 对小鼠滋养层细胞培养基上清中 MMP-2 和 TIMP 的影响

Note. A: Expression level of MMP-2 in the supernatant of culture medium after different concentrations of LMWHC on mouse trophoblastic cells. B: Expression level of TIMP in supernatant of culture medium after different concentrations of LMWHC on mouse trophoblastic cells. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ .

**Figure 4** Effects of LMWHC on MMP-2 and TIMP in the supernatant of culture medium of mouse trophoblast cells

## 2.5 LMWHC 对小鼠滋养层细胞 MMP-2 和 TIMP-2 蛋白水平表达的影响

LMWHC 不同浓度干预滋养层细胞 24 h 后,滋养层细胞上清液中 MMP-2 表达水平较未用 LMWHC 干预的细胞均升高 ( $P < 0.05$ ),当 LMWHC 干预浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 时, MMP-2 表达水平最高。滋养层细胞上清液中 TIMP-2 表达水平随着 LMWHC 干预浓度的升高而降低, LMWHC 干预浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 时,与未用 LMWHC 干预的细胞比较,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),见图 5。



注:A:不同浓度 LMWHC 干预小鼠滋养层细胞后,培养基上清中 MMP-2 的表达水平。B:不同浓度 LMWHC 干预小鼠滋养层细胞后,培养基上清中 TIMP 的表达水平。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

**图 5** LMWHC 对小鼠滋养层细胞培养基上清中 MMP-2 和 TIMP 的影响

Note. A: Expression level of MMP-2 in the supernatant of culture medium after different concentrations of LMWHC on mouse trophoblastic cells. B: Expression level of TIMP in the supernatant of culture medium after different concentrations of LMWHC on mouse trophoblastic cells. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

**Figure 5** Effects of LMWHC on MMP-2 and TIMP in supernatant of culture medium of mouse trophoblast cells

## 2.6 LMWHC 对小鼠滋养层细胞 MMP-2 和 TIMP-2 mRNA 水平表达的影响

LMWHC 不同浓度干预滋养层细胞 24 h 后,滋养层细胞上清液中 MMP-2 mRNA 表达水平较未用 LMWHC 干预的细胞均升高 ( $P < 0.05$ ), 且当 LMWHC 干预浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 时, MMP-2 表达水平最高。滋养层细胞上清液中 TIMP-2 表达水平随着 LMWHC 干预浓度的升高而降低, LMWHC 干预

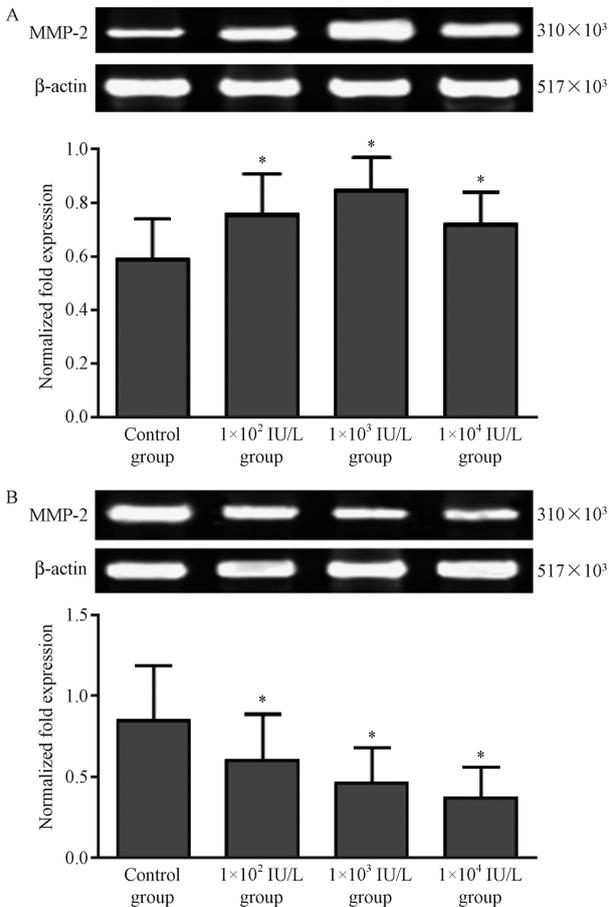
浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 和  $1 \times 10^4$  IU/L 时, 与未用 LMWHC 干预的细胞比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。

## 3 讨论

生殖是物种繁衍的重要生理过程, 而相对低效率的妊娠对生殖造成严重影响。正常育龄期女性每个排卵周期妊娠成功的几率仅在 30% 左右, 妊娠失败的原因主要为胚胎着床失败<sup>[6]</sup>。尽管现代的体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 技术为不孕患者提供了妊娠机会, 但 IVF-ET 的着床率也仅 20% ~ 30%, 胚胎着床失败仍是当前生殖医学的难题之一<sup>[7]</sup>。胚胎着床是否成功主要与影响配子或胚胎发育的因素、影响子宫内膜容受性的因素、影响子宫的全身因素有关<sup>[8]</sup>。

LMWHC 是肝素经化学解聚或在酶的作用下产生的小分子片段, 可通过抑制凝血因子 II a 和凝血酶 X a 活性发挥抗凝作用, 同时对血管内皮细胞具有保护作用, 使血液粘稠度降低, 从而增加胎盘血液供应, 改善胎盘微循环, 有利于胚胎生长发育<sup>[9-10]</sup>。在产科中多用于妊娠合并症、复发性流产的治疗, 且应用于 IVF-ET 多次失败患者, 可有效改善妊娠结局<sup>[11-13]</sup>。

为探讨 LMWHC 对胚胎着床的影响及其作用机制, 本研究构建了妊娠小鼠模型, 给予 LMWHC 干预, 结果发现, LMWHC 组妊娠 D6 和 D9 小鼠的着床位数均多于对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 提示 LMWHC 对胚胎着床具有促进作用。滋养细胞源于胚胎外的滋养层, 可分化为胎盘和胎膜。滋养细胞在胎盘着床过程中分化为 2 个不同亚群, 即绒毛膜滋养细胞和绒毛膜外滋养细胞。其中绒毛膜外滋养细胞能通过母体蜕膜和子宫血管的侵入降解并重建子宫内膜组织结构。滋养细胞侵入子宫内膜不足会影响胚胎着床以及胎盘血管重塑, 导致各种妊娠期并发症以及胎儿发育迟缓、流产、死胎发生<sup>[14-15]</sup>。Chen<sup>[16]</sup>等人发现 LMWH 对孕早期滋养层细胞的侵袭能力具有调节作用,  $2.5 \times 10^2$  IU/L 和  $2.5 \times 10^3$  IU/L 组滋养层细胞侵袭能力明显增强,  $2.5 \times 10^4$  IU/L 和  $2.5 \times 10^5$  IU/L 组滋养层细胞侵袭能力则受到抑制。但 Quenby<sup>[17]</sup>等人研究结果显示, 无论是  $2.5 \times 10^2$  IU/L 还是  $2.5 \times 10^3$  IU/L 的 LMWH 对滋养层细胞侵袭能力均无明显作用。鉴



注: A; 不同浓度 LMWHC 干预小鼠滋养层细胞后, 培养基上清中 MMP-2 mRNA 表达水平。B; 不同浓度 LMWHC 干预小鼠滋养层细胞后, 培养基上清中 TIMP mRNA 表达水平。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

**图 6** LMWHC 对小鼠滋养层细胞培养基上清中 MMP-2 和 TIMP 的影响

Note. A: MMP-2 mRNA expression level in the supernatant of culture medium after different concentrations of LMWHC on mouse trophoblast cells. B: TIMP mRNA expression level in the supernatant of culture medium after different concentrations of LMWHC on mouse trophoblastic cells. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

**Figure 6** Effects of LMWHC on MMP-2 and TIMP in supernatant of culture medium of mouse trophoblast cells

于此,本研究对小鼠滋养层细胞进行分离培养,并采用不同浓度 LMWHC 处理细胞,结果发现,当不同浓度 LMWHC 处理后,滋养层细胞的侵袭力均明显增强,且在 LMWHC 浓度为  $1 \times 10^3$  IU/L 时最强,提示一定浓度范围内的 LMWHC 可通过增强滋养层细胞侵袭力而促进胚胎着床。不同研究结果存在差异,可能与选取样本、实验方法或取样部位不同有关。

滋养层细胞的侵袭力主要受其分泌的 MMPs 调节,MMP-2 是妊娠早期滋养细胞分泌的最主要蛋白酶,可将子宫内膜细胞外基质中的 IV 型胶原降解,促进滋养细胞侵入。TIMP 是 MMP 的抑制物,两者的相互制约对于滋养细胞侵袭力的控制起到重要作用<sup>[18-19]</sup>。Chen<sup>[16]</sup>等人虽指出 LMWHC 可调节孕早期滋养层细胞的侵袭能力,但未对其调节机制进一步探索,本研究采用不同浓度 LMWHC 处理小鼠滋养层细胞,通过 ELISA 法、Western blot 和 RT-PCR 检测细胞上清液中 MMP-2 和 TIMP-2 的蛋白和 mRNA 水平表达情况,结果显示采用 LMWHC 处理的细胞上清中 MMP-2 表达水平较未处理细胞明显上升,而 TIMP-2 表达水平较未处理细胞明显下降,以上结果提示 LMWHC 可能是通过上调 MMP-2 表达同时下调 TIMP-2 表达而增强滋养层细胞侵袭力。

综上所述,LMWHC 对小鼠胚胎着床具有积极作用,其机制可能与 LMWHC 调控 MMP-2 和 TIMP-2 表达,进而增强滋养层细胞侵袭力有关。当然,影响滋养层细胞侵袭力的因素众多,LMWHC 是否与其他细胞因子的表达以及信号通路有关,还需进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 王倩,陈圆辉,徐晓航,等. 白血病抑制因子对胚胎着床影响的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2016, 25(2):190-193.

[2] 马雪倩,叶英辉. 子宫自然杀伤细胞在胚胎着床期功能的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2017, 37(7):594-597.

[3] 薛红艳,王敬敏,吴明媛. 小剂量低分子肝素钙用于原因不明复发性流产的疗效观察[J]. 临床医学, 2017, 37(7):46-48.

[4] 熊正方,党小红,李冰,等. 低分子肝素钙在多次着床失败患者中的应用[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(8):614-617.

[5] 李静,邓东锐,左伟,等. 小鼠滋养层细胞原代培养方法的

优化[J]. 中国妇幼健康研究, 2011, 22(1):16-18.

[6] Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990; a systematic analysis of 277 health surveys [J]. PLoS Med, 2012, 9(12):e1001356.

[7] 刘婧,宋亚丽,许茜亚,等. 反复着床失败的治疗现状与进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2017, 36(1):53-56.

[8] 沈茶,何俊琳,刘学庆,等. 孕早期苯并(a)芘暴露对小鼠胚胎着床的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(7):675-679.

[9] 王丹,潘长青,邓艳梅,等. 叶酸联合低分子肝素和小剂量阿司匹林治疗复发性流产的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(9):1705-1709.

[10] 毛小刚,江红,刘韵,等. 低分子肝素钙对妊娠期糖尿病患者肾功能、凝血功能及血压的影响[J]. 疑难病杂志, 2016, 15(5):494-497.

[11] 路艳辉,韩连菊,张蕾,等. 低分子肝素钙联合丹参注射液对妊高征患者血清前列腺素 E2 水平的影响[J]. 河北医药, 2016, 38(11):1661-1663.

[12] 陈志敏,牛阳,刘肖,等. 熊去氧胆酸联合低分子肝素钙注射液与丁二磺酸腺苷蛋氨酸治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的临床研究[J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(6):642-646.

[13] 李雪兰,陈薪. 低分子肝素在存在血栓前状态的反复着床失败患者中的应用研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(10):735-738.

[14] 吴晓霞,陈颖,谭剑平,等. 低分子肝素及肝素结合型表皮生长因子对孕早期滋养细胞生物学功能的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2013, 48(2):107-112.

[15] 向阳,赵峻. 妊娠滋养细胞疾病诊治进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33(1):14-18.

[16] Chen Y, Wu XX, Tan JP, et al. Effects of low molecular weight heparin and heparin-binding epidermal growth factor on human trophoblast in first trimester [J]. Fertil Steril, 2012, 97(3):764-770.

[17] Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, et al. Effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin on trophoblast function[J]. Obstet Gynecol, 2004, 104(2):354-361.

[18] 焦雪娟,丛林. MMP-2 及 TIMP-2 在复发性流产绒毛组织中的表达及意义[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(7):536-537.

[19] 秦喆,侯海燕,史海霞,等. MMP-2 和 MMP-9 参与多种因素对胎盘滋养细胞侵袭力的调控[J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(3):350-355.

[收稿日期]2018-05-10