

范敏,郑文兰,文晓敏. 加味宫外孕II号方对人滋养叶细胞 Caspase-12 通路影响的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 29-34.

Fan M, Zheng WL, Wen XM. Effect of modified ectopic pregnancy formula II on the Caspase-12 pathway in human trophoblasts [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 29-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.005

加味宫外孕II号方对人滋养叶细胞 Caspase-12 通路影响的研究

范敏¹, 郑文兰^{2*}, 文晓敏²

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 观察加味宫外孕II号方对人滋养叶细胞内质网应激 Caspase-12 信号通路凋亡相关蛋白 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 水平的影响及细胞超微结构变化, 探讨其治疗异位妊娠的作用机制。方法 将SD大鼠分为阴性对照组(B组)、低、中、高剂量中药组(C组、D组、E组)、甲氨蝶呤组(F组)、中西药结合组(G组), 予相应药物处理后取血制备含药血清, 将各组含药血清分别作用于 HTR-8/SVneo 细胞 24 h, 并设置未用含药血清处理的细胞作为空白对照组(A组)。采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)与实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 HTR-8/SVneo 细胞中凋亡基因 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白及 mRNA 的表达水平; 采用透射电镜观察细胞超微结构的变化。结果 (1) Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白水平及 mRNA 相对表达量: A组与 B组比较无差异($P>0.05$); 与 B组比较, C组 Caspase-7 mRNA、Caspase-9 蛋白及 Caspase-3 蛋白与 mRNA 表达均上调明显($P<0.05$), 而 Caspase-7 蛋白、Caspase-9 mRNA 表达无差异($P>0.05$); D、E、F、G组 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达量均较 B组明显上调($P<0.05$); E组较 D组上调明显($P<0.05$); E组与 F组比较, Caspase-7、Caspase-9 蛋白与 mRNA 及 Caspase-3 蛋白表达上调明显($P<0.05$); E组与 G组比较, Caspase-9 蛋白与 mRNA 及 Caspase-3 蛋白表达上调明显($P<0.05$); F组与 G组比较无差异($P>0.05$)。 (2) 透射电镜结果显示: A组与 B组细胞染色质均匀散布于核膜内, 细胞内质网、线粒体、高尔基体清晰可见; 与 B组比较, C、D、E、F、G组细胞微绒毛减少, 染色质固缩, 异染色质边缘化, 部分线粒体肿胀、脊紊乱或断裂, 甚至消失, 线粒体空泡化等典型的凋亡特征改变。结论 加味宫外孕II号方可能通过激活内质网应激 Caspase-12 信号通路, 破坏滋养叶细胞的形态学结构, 上调 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 凋亡相关基因的表达, 促进滋养叶细胞凋亡。

【关键词】 加味宫外孕II号方; 内质网应激; HTR-8/SVneo 细胞; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-7; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)08-0029-06

Effect of modified ectopic pregnancy formula II on the Caspase-12 pathway in human trophoblasts

FAN Min¹, ZHENG Wenlan^{2*}, WEN Xiaomin²

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China.

2. the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

【基金项目】 国家自然科学基金(81660805)。

【作者简介】 范敏(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗异位妊娠的基础研究。E-mail: fanmin1207@163.com

【通信作者】 郑文兰(1963—), 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 异位妊娠中西医结合治疗研究。E-mail: yunqq533@163.com

【Abstract】 Objective To examine the effect of modified ectopic pregnancy formula II on levels of apoptosis-related proteins Caspase-7, Caspase-9, and Caspase-3 in the endoplasmic reticulum stress Caspase-12 signaling pathway in human trophoblasts, as well as associated changes in cell ultrastructure, to explore its treatment mechanism for ectopic pregnancy. **Methods** SD rats were divided into a negative control group (group B), low-, medium-, and high-dose Chinese medicine groups (groups C, D, E), a methotrexate group (group F), and a combined Chinese and Western medicine group (group G). After receiving the corresponding drug treatment, we collected blood to prepare a drug-containing serum. The drug-containing serum from each group was applied to HTR-8/SVneo for 24 h, and cells not treated with drug-containing serum were set as a blank control group (group A). The expression levels of apoptotic genes Caspase-7, Caspase-9, Caspase-3 protein and mRNA in HTR-8/SVneo cells were detected via Western blot and real-time quantitative PCR. Transmission electron microscopy was used to observe changes in cell ultrastructure. **Results** (1) There was no difference between group A and group B in terms of Caspase-7, Caspase-9, or Caspase-3 protein levels and relative mRNA expression ($P > 0.05$). Compared with group B, expression levels of Caspase-7 mRNA, Caspase-9 protein, and Caspase-3 protein and mRNA were significantly up-regulated in group C ($P < 0.05$), but we found no differences in Caspase-7 protein or Caspase-9 mRNA expression ($P > 0.05$). In terms of Caspase-7, Caspase-9, and Caspase-3 protein and mRNA expression, expression was significantly increased in groups D, E, F, and G compared with group B ($P < 0.05$), and expression in Group E was significantly up-regulated compared with group D ($P < 0.05$). Group E was compared with group F, expression levels of Caspase-7, Caspase-9 protein and mRNA, and Caspase-3 protein were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Group E was compared with group G, expression of Caspase-9 protein and mRNA and Caspase-3 protein was significantly increased ($P < 0.05$). There was no difference between group F and group G ($P > 0.05$). (2) Transmission electron microscopy indicated that the cell chromatin in group A and group B was evenly distributed in the nuclear membrane, and the endoplasmic reticulum, mitochondria, and Golgi apparatus were clearly visible. Compared with group B, the cell microvilli in groups C, D, E, F, and G were reduced, chromatin was condensed, heterochromatin was marginalized, some mitochondria were swollen, disordered, broken, or even absent, and mitochondrial vacuolation were typical apoptotic characteristics. **Conclusions** Modified ectopic pregnancy formula II may activate the Caspase-12 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress, destroy the morphological structure of trophoblasts, up-regulate the expression of Caspase-7, Caspase-9, and Caspase-3 apoptosis-related genes, and promote trophoblast apoptosis.

【Keywords】 modified ectopic pregnancy formula II; endoplasmic reticulum stress; HTR-8/SVneo cells; Caspase-7; Caspase-9; Caspase-3

内质网应激信号转导通路是目前研究细胞凋亡的热点之一, Caspase-12 作为特有的仅在内质网应激状态下激活的蛋白, 与细胞凋亡及疾病发展变化的关系已被逐步揭示。Caspase-7、Caspase-9 与凋亡靶因子 Caspase-3 是 Caspase-12 通路中的关键蛋白, 研究显示内质网应激介导细胞凋亡时 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 呈高表达^[1-2]。本院基于“瘀”是导致异位妊娠主要病因病机的中医理论, 运用加味宫外孕 II 号方保守治疗异位妊娠, 取得肯定临床疗效, 且前期研究证实该方具有诱导细胞凋亡的作用^[3], 但是否可以通过内质网过度应激 Caspase-12 信号通路调控 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 基因表达发挥促细胞凋亡作用尚未可知。本实验运用人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 代替异位妊娠滋养细胞来研究该方诱导凋亡的机

制^[4], 为中医药保守治疗异位妊娠及药物开发利用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 36 只, SPF 级, 体重 (200 ± 20) g, 由湖北省实验动物研究中心提供 [SCXK(鄂) 2015-0018]。饲养于湖北省预防医学科学院屏障动物实验环境 [SYXK(鄂) 2017-0065]。本实验通过湖北省实验动物管理与使用委员会批准 (20182901), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 实验细胞

HTR-8/SVneo 人绒毛膜滋养层细胞系来自于武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院。

1.2 主要试剂与仪器

加味宫外孕 II 号方(丹参、赤芍各 15 g,桃仁、三棱、莪术各 9 g,蜈蚣 4 g,全蝎 6 g,土鳖虫 10 g,紫草 25 g,购于贵州省中医院,熬成 3 g/mL 的中药液备用);注射用甲氨蝶呤(广东岭南制药有限公司生产,国药准字 H20054692);胎牛血清(美国 Gibco);Caspase-9(中国武汉博士德);Caspase-7(美国 CST);Caspase-3(美国 Abcam);逆转录及荧光定量试剂盒(中国南京 Vazyme);引物(中国武汉擎科生物)。QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI);FEI TecnaiG200 TWIN 透射电镜(美国 FEI)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理

36 只大鼠随机分为 6 组,即阴性对照组(B 组)、低、中、高剂量的中药加味宫外孕 II 号方组(C 组、D 组、E 组)、甲氨蝶呤组(F 组)及中剂量加味宫外孕 II 号方+甲氨蝶呤组(G 组)。由人与大鼠等效剂量换算^[5],计算出加味宫外孕 II 号方低剂量为 12 g/(kg·d),中、高剂量分别为 24、48 g/(kg·d)。B 组予中药中剂量等体积生理盐水灌胃;C 组、D 组、E 组分别予中药低、中、高剂量灌胃;F 组予中药中剂量等体积生理盐水灌胃,G 组予中剂量中药灌胃,两组均在取血前 1 h 按 7.775 mg/kg 体重肌注甲氨蝶呤;灌胃每天 1 次,连续 8 d。

1.3.2 含药血清的制备

第 8 天末次给药 1 h 后心脏采血,3000 r/min 离心 12 min,分离血清,0.22 μm 滤膜过滤除菌,56℃ 灭活 30 min,将同组大鼠的血清混合、分装,存于 -80℃ 冻存备用。

1.3.3 HTR-8/SVneo 细胞培养及处理

用含 10% 胎牛血清和 1% 青、链霉素的 RPMI 1640 完全培养基接种细胞于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中,细胞贴壁生长至 85% 左右,胰酶消化传代。取生长状态良好的细胞接种于六孔板,培养 24 h,加入对应组别含药血清,前期研究证实含药血清体积分数 10% 为最佳,故选用此体积分数含药血清作用于 HTR-8/SVneo 细胞 24 h,收集细胞进行相关指标检测。为排除大鼠含药血清对实验结果的干扰,设置未用含药血清处理的细胞作为空白对照组,作为阴性对照组的参照。

1.3.4 Western blot 检测 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达水平

提取总蛋白并测定浓度,聚丙烯酰胺凝胶上

样,电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗(Caspase-7 1:1000、Caspase-9 1:500、Caspase-3 1:2000 稀释)4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,二抗(1:5000 稀释)37℃ 孵育 2 h,TBST 洗膜,ECL 发光液显影,胶片定影,BandScan 软件进行胶片灰度值分析。

1.3.5 Real-time PCR 检测 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达水平

提取总 RNA 并检测纯度和浓度,RNA 定量后逆转录合成 cDNA,反应条件为 25℃ 5 min,50℃ 15 min,85℃ 5 min,4℃ 10 min,配制 20 μL 体系进行基因扩增,扩增条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 进行所得数据分析。引物设计序列如下(见表 1)。

1.3.6 透射电镜观察细胞超微结构变化

分别用 2.5% 戊二醛及 1% 四氧钼酸室温固定,按常规方法乙醇梯度脱水,再使用丙酮和 Epon-812 包埋剂等体积混合液与纯 Epon-812 包埋剂渗透,制成 70 nm 超薄切片,2% 醋酸双氧铀-枸橼酸铅染色,透射电镜观察细胞超微结构变化。

1.4 统计学方法

GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量

A 组与 B 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较,C 组 Caspase-7 蛋白无差异($P > 0.05$),D、E、F、G 组表达量上调($P < 0.05$);与 C 组比较,E、F、G 组蛋白表达量上调($P < 0.05$);与 D 组比较,E、G 组蛋白表达量上调($P < 0.05$);与 F 组比较,E 组蛋白表达

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	片段长度 Fragment length
GAPDH	F: 5'-TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG-3' R: 5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'	115 bp
Caspase-7	F: 5'-TCTTCGCCTATCCAGGTT-3' R: 5'-GGCAACTCTGTCAATTCACCC-3'	152 bp
Caspase-9	F: 5'-CTTCGTTTCTGCCAACTAACAGG-3' R: 5'-GCACCACTGGGGTAAGGTTT-3'	75 bp
Caspase-3	F: 5'-AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC-3' R: 5'-ACAGTCCAGTCTGTACCACG-3'	81 bp

量上调($P < 0.05$); G 组与 E、F 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较, C、D、E、F、G 组 Caspase-9 蛋白表达量上调($P < 0.05$); 与 C 组比较, D、E、F、G 组蛋白表达量上调($P < 0.05$); 与 D、F、G 组比较, E 组蛋白表达量上调($P < 0.05$); F 组与 G 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较, C、D、E、F、G 组 Caspase-3 蛋白表达量上调($P < 0.05$); 与 C、D 组比较, E、F、G 组蛋白表达量上调($P < 0.05$); 与 F、G 组比较, E 组蛋白表达量上调($P < 0.05$); F 组与 G 组比较无差异($P > 0.05$), (见图 1、表 2)。

2.2 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 相对表达量

A 组与 B 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较, C、D、E、F、G 组 Caspase-7 mRNA 表达量上调($P < 0.05$); 与 C、D 组比较, E、G 组 mRNA 表达量上调($P < 0.05$); 与 F 组比较, E 组 mRNA 表达量上调($P < 0.05$), G 组无差异($P > 0.05$); E 组与 G 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较, C 组 Caspase-9 mRNA 表达无差异($P > 0.05$), D、E、F、G 组表达量上调($P < 0.05$); 与 C 组比较, E、F、G 组 mRNA 表达量上调($P < 0.05$); 与 D、F、G 组比较, E 组 mRNA 表达量上调($P < 0.05$); F 组与 G 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较, C、D、E、F、G 组 Caspase-3 mRNA 表达量上调($P < 0.05$); 与 C 组比较, E、G 组

mRNA 表达量上调($P < 0.05$); 与 D 组比较, E、F、G 组 mRNA 表达量上调($P < 0.05$); E、F、G 组三者比较无差异($P > 0.05$), (见表 3)。

2.3 透射电镜观察 HTR-8/SVneo 细胞超微结构的变化

A、B 组细胞包膜完整, 表面有微绒毛, 见清晰的核膜及核仁, 均匀的染色质散布于核膜内, 细胞内线粒体、内质网、高尔基体清晰可见, 线粒体内外膜完整、形态良好; C、D、E、F、G 组微绒毛减少, 其中 C、D 组异染色质沿核膜边集, 部分线粒体肿胀、脊紊乱或断裂, E、F、G 组细胞核不规则, 染色质固缩, 边集于核内的异染色质增多, 胞浆内布满肿胀的线粒体, 部分出现脊紊乱或断裂、甚至消失, 线粒体空泡化; E、G 组观察到自噬体形成增多, (见图 2)。

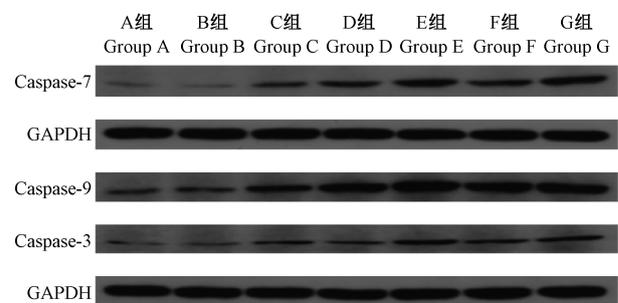


图 1 HTR-8/SVneo 细胞蛋白表达量

Figure 1 Protein expression of HTR-8/SVneo cells

表 2 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Protein expression of Caspase-7, Caspase-9 and Caspase-3 in HTR-8/SVneo cells

组别 Groups	Caspase-7	Caspase-9	Caspase-3
A 组 Group A	0.037±0.005	0.070±0.005	0.053±0.008
B 组 Group B	0.036±0.006	0.073±0.009	0.057±0.011
C 组 Group C	0.081±0.015	0.121±0.018*	0.141±0.006*
D 组 Group D	0.129±0.032*	0.187±0.019*▲	0.104±0.009*
E 组 Group E	0.264±0.016*▲●	0.269±0.027*▲●	0.272±0.014*▲●
F 组 Group F	0.182±0.024*▲□	0.212±0.010*▲□	0.173±0.005*▲●□
G 组 Group G	0.231±0.010*▲●	0.216±0.004*▲□	0.202±0.012*▲●□

注: 与 A、B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, ▲ $P < 0.05$; 与 D 组比较, ● $P < 0.05$; 与 E 组比较, □ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with group A and B, * $P < 0.05$. Compared with group C, ▲ $P < 0.05$. Compared with group D, ● $P < 0.05$. Compared with group E, □ $P < 0.05$.

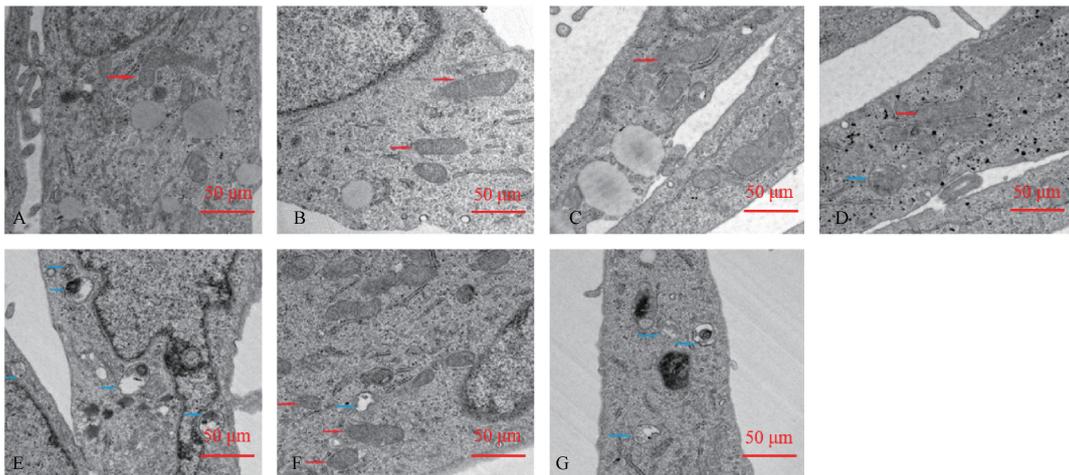
表 3 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Expression of Caspase-7, Caspase-9 and Caspase-3 mRNA in HTR-8/SVneo cells

组别 Groups	Caspase-7	Caspase-9	Caspase-3
A 组 Group A	1.030±0.088	1.004±0.054	0.940±0.071
B 组 Group B	1.089±0.057	1.019±0.063	1.025±0.143
C 组 Group C	1.507±0.193*	1.380±0.123	1.895±0.149*
D 组 Group D	1.583±0.063*	1.655±0.122*	1.805±0.218*
E 组 Group E	2.312±0.159*▲●	2.444±0.176*▲●	3.060±0.340*▲●
F 组 Group F	1.701±0.078*□	1.950±0.185*▲□	2.483±0.351*●
G 组 Group G	1.988±0.179*▲●	1.905±0.219*▲□	2.964±0.084*▲●

注: 与 A、B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, ▲ $P < 0.05$; 与 D 组比较, ● $P < 0.05$; 与 E 组比较, □ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with group A and B, * $P < 0.05$. Compared with group C, ▲ $P < 0.05$. Compared with group D, ● $P < 0.05$. Compared with group E, □ $P < 0.05$.



注:红色箭头指示为线粒体,蓝色箭头指示为自噬体。

图 2 HTR-8/SVneo 细胞透射电镜观察

Note. Red arrow indicates mitochondria. Blue arrow indicates autophagy.

Figure 2 TEM observation of HTR-8/SVneo cells

3 讨论

本实验从蛋白、基因水平测定及形态学观察,研究妊娠滋养叶细胞凋亡情况。为排除大鼠含药血清对实验结果的干扰,设置空白对照组作为参照,确保实验结果的准确性。细胞凋亡是指在多种条件刺激下,多基因、多通路联合调控的细胞主动有序的死亡方式^[6]。细胞凋亡的发生可清除体内有害、多余、突变或衰老的细胞,同时抑制细胞过度增殖^[7],在胚胎发育、肿瘤的发生及自身免疫系统疾病中占有重要地位^[8]。现研究的细胞凋亡途径主要有死亡受体、线粒体和内质网途径^[9]。研究显示中药可以通过调控内质网应激对疾病产生影响^[10]。活血化淤中药可通过死亡受体通路和线粒体通路促使异位妊娠胚胎死亡已有报道,而关于本院经验方加味宫外孕 II 号方能否通过内质网应激介导滋养细胞凋亡尚未阐明。研究表明内质网应激参与子痫前期、妊娠期糖尿病等妊娠相关疾病的发生发展^[11-12]。各种因素如 Ca^{2+} 紊乱、氧化应激、病毒感染、营养缺乏、缺氧、药物或环境应激引起内质网功能障碍^[13-14],蛋白质在腔内正确折叠受阻,出现过量的错误折叠和未折叠蛋白在内质网腔中积累的现象称为内质网应激^[15-16]。适当的内质网应激可促进蛋白质的重新折叠或抑制蛋白质的合成以减轻细胞损伤,同时清除不可逆损伤细胞恢复稳态,而过强的内质网应激超过未折叠蛋白的承受能力无法修复细胞损伤时,则引起 Caspase 和相关蛋白酶的激活,引发凋亡级联放大效应^[17]。

内质网过度应激时,胞质中的 Caspase-7 转移到内质网表面发生蛋白水解, Caspase-7 激活 Caspase-12,活化的 Caspase-12 裂解 Caspase-9,进而分解凋亡效应因子 Caspase-3 诱发细胞凋亡^[18]。课题前期研究结果提示加味宫外孕 II 号方含药血清处理的 HTR-8/SVneo 细胞中仅在内质网应激时活化的 Caspase-12 蛋白及基因水平呈高表达。从以上数据分析,我们发现经中、高剂量中药、甲氨蝶呤及二者联合用药干预后的大鼠血清作用于 HTR-8/SVneo 细胞, Caspase-7、Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达水平与所有药物处理组的 Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达量均较空白及阴性对照组增加,中药低剂量组 Caspase-7 mRNA、Caspase-9 蛋白表达增加,提示中药及甲氨蝶呤能够上调 Caspase-12 通路中凋亡因子的表达。中药低剂量组 Caspase-7 蛋白、Caspase-9 mRNA 表达与空白及阴性对照组比较无差异,考虑可能与此剂量下蛋白剪切激活、转录后修饰有关。经中药中、高剂量与甲氨蝶呤处理的滋养叶细胞蛋白与基因表达处于高水平,说明 HTR-8/SVneo 细胞内质网发生过度应激,内质网凋亡通路被激活,通过调控 Caspase-12 信号通路发挥凋亡作用。由此推测,加味宫外孕 II 号方及甲氨蝶呤促妊娠滋养叶细胞凋亡的机制之一可能是通过内质网过度应激激活 Caspase-12 通路诱导 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 因子活化的凋亡途径。其中中药高剂量组较中药低、中剂量组表达更显著,说明高剂量较低、中剂量促细胞凋亡作用增强,可达到进一步促进胚胎消亡的功效。而中药高剂量组杀胚效果与

甲氨蝶呤组、中西药结合组相近,郑文兰等^[19]研究显示中药加大剂量时杀胚效果增强,且对肝的损伤较使用甲氨蝶呤小,鉴于中药具有高效杀胚且低毒副作用的特点,临床值得推广应用。

本实验还通过细胞形态学、超微结构的变化进一步观察细胞凋亡情况。发现低、中、高剂量中药、甲氨蝶呤与中西药结合含药血清处理 HTR-8/SVneo 细胞,出现染色质固缩,异染色质边缘化,部分线粒体肿胀、脊紊乱或断裂、甚至消失,线粒体空泡化等凋亡特征。电镜下未见明显凋亡小体,可能与细胞尚处于凋亡早期,未进入核碎裂阶段有关。线粒体在细胞凋亡发生时反应较灵敏,中药高剂量组、甲氨蝶呤组与中西药结合组线粒体损伤严重,且中药高剂量组与中西药结合组可见自噬体形成增多,研究提示细胞自噬过度可启动凋亡,使细胞程序化死亡,二者存在协同关系^[20]。本研究从形态学上证实经不同剂量的中药、西药及中西药结合含药血清处理的细胞存在不同程度损伤和细胞凋亡的典型特征。因此我们推断加味宫外孕 II 号方通过破坏妊娠滋养叶细胞正常形态结构,使线粒体功能障碍,ATP 合成受阻,致妊娠组织失去营养支持而消亡。

综上,加味宫外孕 II 号方可破坏滋养叶细胞的超微结构,诱导细胞凋亡,其机制可能是内质网过度应激激活 Caspase-12 通路,通过上调 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 凋亡基因的表达促使滋养叶细胞凋亡。本研究在细胞超微结构中发现大量自噬体形成,可能该方与自噬也存在一定关系,下一步可针对滋养叶细胞自噬机制开展研究,挖掘中医药保守治疗异位妊娠的更多理论依据。

参考文献:

- [1] Ren MT, Gu ML, Zhou XX, et al. Sirtuin 1 alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(38): 5800-5813.
- [2] 王海臻,蔡丹纯,廖丹丹,等. 内质网应激介导滋养细胞凋亡在妊娠期肝内胆汁淤积症中的作用及机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(5): 572-577.
- [3] 郑文兰,杨江燕,谢智,等. 加味宫外孕 II 号方对早孕大鼠滋养细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2 的影响 [J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(12): 73-74.
- [4] 陈涛. 邓高丕教授关于输卵管妊娠基础研究的总结与创新 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [5] 张君涛,王平,刘爱峰,等. 中药含药血清制备方法的研究概述 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 4006-4009.
- [6] Zeng C, Xing R, Liu J, et al. Role of CSL-dependent and independent Notch signaling pathways in cell apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(1): 1-12.
- [7] 阎海. 细胞凋亡研究进展 [J]. *中山大学研究生学刊(自然科学与医学版)*, 2012, 33(3): 8-13.
- [8] Mondal T, Lavanya AVS, Mallick A, et al. Novel Triazole linked 2-phenyl benzoxazole derivatives induce apoptosis by inhibiting miR-2, miR-13 and miR-14 function in *Drosophila melanogaster* [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(6): 786-799.
- [9] Dai C, Li J, Tang S, et al. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(7): 4075-4085.
- [10] 顾静,郭超,车敏,等. 黄芪对高血压大鼠血管重构中内质网应激反应的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 65-71.
- [11] Xiong J, Ding N, Gao T, et al. Hypermethylation of endoplasmic reticulum disulfide oxidase 1 α leads to trophoblast cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress in preeclampsia [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8588-8599.
- [12] 韩云,陈丽平,郑艳莉,等. 内质网应激介导的胎盘滋养细胞凋亡在妊娠期糖尿病合并胎儿生长受限中的研究 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(5): 445-446.
- [13] Lin X, Zhao Y, Li S, et al. Astaxanthin attenuates glutamate-induced apoptosis via inhibition of calcium influx and endoplasmic reticulum stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 806(7): 43-51.
- [14] Simard JC, Vallieres F, de Liz R, et al. Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 leading to activation of the NLRP-3 inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5926-5939.
- [15] Clayton BLL, Popko B. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia [J]. *Brain Res*, 2016, 1648: 594-602.
- [16] Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78 [J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1600-1609.
- [17] Jong CJ, Ito T, Prentice H, et al. Role of mitochondria and endoplasmic reticulum in taurine-deficiency-mediated apoptosis [J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 795.
- [18] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 33869-33874.
- [19] 郑文兰,杨江燕,文晓敏,等. 加味宫外孕 II 号方对早孕大鼠滋养细胞及肝脏的影响 [J]. *贵州医药*, 2016, 40(10): 1032-1035.
- [20] 蔺婷,罗晶婧,周芳亮,等. 益气解毒方通过诱导自噬促进鼻咽癌细胞凋亡的作用研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(10): 1149-1158.

[收稿日期] 2020-01-06