

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.10.007

绒毛膜促性腺激素对复发性流产大鼠子宫内膜厚度、雌激素受体表达及免疫因子表达的影响*

刘晓庆 刘振国 石晓琳 刘英英 刘亚倩 刘雨婷[△]

(西北妇女儿童医院药剂科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨绒毛膜促性腺激素对复发性流产大鼠的治疗效果,为临床中优化复发性流产的治疗方案提供理论基础。方法:选取未交配生育的 SPF 级雌性大鼠共 40 只,随机分为对照组(A 组)、模型组(B 组)、常规治疗组(C 组)、绒毛膜促性腺激素治疗组(D 组),每组各 10 只。雌鼠妊娠后开始干预。A 组大鼠全天仅灌服生理盐水。B 组大鼠上午灌服生理盐水,C 组大鼠上午灌服地屈孕酮水溶液,D 组大鼠上午注射绒毛膜促性腺激素注射液,下午 B、C、D 组大鼠灌服羟基豚溶液。妊娠第十天给予各组大鼠灌服米非司酮。比较各组大鼠胚胎吸收率、炎症因子水平、免疫因子水平、雌激素受体表达水平及子宫内膜损伤程度。结果:干预后,与 A 组相比,各组大鼠胚胎吸收率增高,与 B 组大鼠相比,C 组、D 组大鼠的胚胎吸收率降低,且 D 组大鼠低于 C 组;与 A 组相比,各组大鼠 IL-17 水平、IL-17/TGF- β 、Th17 细胞比例、Th17/Treg 升高,且 TGF- β 水平、Treg 细胞比例下降,同时 C 组、D 组大鼠的 IL-17 水平、IL-17/TGF- β 、Th17 细胞比例、Th17/Treg 均低于 B 组,且 D 组低于 C 组,同时 TGF- β 水平、Treg 细胞比例高于 B 组,且 D 组高于 C 组;干预后,与 A 组相比,各组大鼠子宫内膜厚度下降,纤维化面积比例增加,与 B 组相比,C 组、D 组大鼠的子宫内膜厚度增加且 D 组高于 C 组,同时子宫内膜纤维化比例低于 B 组,且 D 组低于 C 组;与 A 组相比,各组大鼠 ER、PR、PRLR mRNA 表达水平明显降低,与 B 组相比,C 组、D 组大鼠的 ER、PR、PRLR mRNA 表达水平有所增加,且 D 组高于 C 组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:绒毛膜促性腺激素可能通过调节炎症因子水平和免疫微环境,提高性激素、受体表达,进而修复子宫内膜损伤,降低胚胎吸收率,促进复发性流产的恢复。

关键词:绒毛膜促性腺激素;复发性流产;免疫;雌激素受体;子宫内膜

中图分类号:R-33;R714.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)10-1843-06

Effects of Chorionic Gonadotrophin on Endometrial Thickness, Estrogen Receptor Expression and Immune Factor Expression in Rats with Recurrent Abortion*

LIU Xiao-qing, LIU Zhen-guo, SHI Xiao-lin, LIU Ying-ying, LIU Ya-qian, LIU Yu-ting[△]

(Department of Pharmacy, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect of chorionic gonadotropin on recurrent abortion in rats, and to provide a theoretical basis for optimizing the treatment of recurrent abortion in clinical practice. **Methods:** Forty unmated SPF female rats were randomly divided into control group (group A), model group (group B), conventional treatment group (group C) and chorionic gonadotropin treatment group (group D), with 10 rats in each group. The intervention began after the female was pregnant. Rats in group A were only given normal saline throughout the day. Rats in group B were given normal saline in the morning, rats in group C were given dydrogesterone in the morning, rats in group D were given chorionic gonadotropin injection in the morning, and rats in groups B, C, and D were given hydroxyurea solution in the afternoon. On the tenth day of gestation, rats in each group were given mifepristone. The embryonic absorption rate, inflammatory factor level, immune factor level, estrogen receptor expression level and endometrial injury degree of each group were compared. **Results:** After the intervention, the embryo absorption rate was increased in each group compared with group A, and lower in group C and D rats compared with group B rats, and group D rats were lower than group C rats; Compared with group A, the levels of IL-17, IL-17/TGF- β , the proportion of Th17 cells and Th17/Treg in each group were increased, and the levels of TGF- β and the proportion of Treg cells were decreased. At the same time, the levels of IL-17, IL-17/TGF- β , Th17 cell ratio and Th17/Treg in groups C and D were lower than those in group B, and the levels of TGF- β and Treg cell ratio in group D were higher than those in group B, and those in group D were higher than those in group C. After intervention, compared with group A, the endometrial thickness of rats in each group decreased and the proportion of fibrosis area increased. Compared with group B, the endometrial thickness

* 基金项目:2020 年陕西省社会科学基金年度项目(2020M005)

作者简介:刘晓庆(1994-),女,本科,主管药师,研究方向:妇科、儿科、生殖用药,E-mail:slx199q@163.com

[△] 通讯作者:刘雨婷(1994-),女,本科,主管药师,研究方向:妇科、儿科用药,E-mail:slx199q@163.com

(收稿日期:2022-11-04 接受日期:2022-11-27)

of rats in groups C and D increased, and the proportion of endometrial fibrosis in group D was higher than that in group C, and the proportion of endometrial fibrosis in group D was lower than that in group B, and the proportion of endometrial fibrosis in group D was lower than that in group C. Compared with group A, the mRNA expression levels of ER, PR and PRLR of rats in each group were significantly decreased; compared with group B, the mRNA expression levels of ER, PR and PRLR of rats in groups C and D were increased, and group D was higher than group C, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Chorionic gonadotrophin may improve the expression of sex hormone receptors by regulating the level of inflammatory factors and immune microenvironment, and then repair endometrial injury, reduce embryo absorption rate, and promote the recovery of recurrent abortion.

Key words: Chorionic gonadotropin; Recurrent abortion; Immune; Estrogen receptor; Endometrial

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R714.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)10-1843-06

前言

复发性流产是指育龄期女性发生两次或两次以上的自然流产,即妊娠 28 周以内的胚胎脱离而引起妊娠终止,是妊娠中的常见疾病^[1]。本病的发病原因较为复杂,研究认为与患者的代谢功能异常、生殖系统生理结构异常或存在炎症反应、自身免疫疾病、父母或胚胎染色体异常等因素相关联^[2-3]。孕妇免疫系统功能正常,可耐受胚胎抗原的保护性免疫反应,是维持正常妊娠的前提条件,而当子宫内免疫环境发生异常时,可引起胚胎植入等过程失常,最终引起流产^[4,5]。复发性流产是育龄期女性的疑难疾病之一,最终可发展为不孕症,给患者家庭和社会带来沉重负担,因此寻找有效安全的治疗方法十分重要^[6,7]。目前临床中,针对复发性流产的治疗方法,除针对病因的纠正生理结构异常手术、纠正易栓状态的低分子肝素治疗外,主要以孕酮类药物、中药与免疫疗法等结合治疗为主,但疗效较为有限^[8,9]。绒毛膜促性腺激素能够通过将内分泌系统模拟至妊娠状态而达到治疗的目的,在乳癌等领域已开展相关研究^[10],但将其应用于复发性流产治疗的相关研究尚不充分。故本研究以复发性流产大鼠为研究模型,探讨绒毛膜促性腺激素对复发性流产大鼠疗效,为临床中优化复发性流产的治疗方案提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取未交配生育的 SPF 级雌性大鼠共 40 只,10 周龄,体重 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,SPF 级雄性大鼠 20 只,体重 $350 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,实验动物购于中国医学科学院实验动物研究所,许可编号:SCXK(湘)2016-0002。所有大鼠均进行 1 周的适应性喂养,室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 70%,大鼠自由进食饮水,保持饲养环境安静,12 h 明暗光照交替。

1.2 主要实验仪器

包埋机(中威电子仪器, BMJ-A),切片机(进化益迪实验器材, YD-315),恒温箱(北京六一, DYY-6C),精密 pH 计(雷磁, E-201-C),摇床(其林贝尔, TS-92),超洁净工作台(智净净化设备, SW-CJ-2D),移液器(Thermo, F3),荧光显微镜(Leica, EMIL LED)。

1.3 主要实验试剂

磷酸盐缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Saline, PBS)(pH7.2-7.6)(Wellbio),石蜡(上海国药生物),枸橼酸盐缓冲液(Well-

bio),常规化学试剂(上海国药生物)。

1.4 实验方法

各组干预方法:将雌性大鼠随机分为对照组(A组)、模型组(B组)、常规治疗组(C组)、绒毛膜促性腺激素治疗组(D组),每组各 10 只。将雌性大鼠与雄性大鼠按照 2:1 的比例合笼饲养配对。合笼后每日上午取雌性大鼠阴道涂片,当大鼠发生阴道栓脱落或图片中有大量精子即记录为大鼠妊娠的第一天。从确认大鼠妊娠第一天起开始进行干预。

A 组大鼠进行生理盐水灌胃处理, 4 mL/d , 上午、下午各灌服 2 mL , 连续处理 9 天。

B 组大鼠灌服生理盐水, 每日上午灌服 2 mL , 连续处理 9 天。

C 组大鼠给予地屈孕酮水溶液干预, 每日上午将地屈孕酮片(3 mg/kg)与 2 mL 生理盐水混合后灌服, 连续处理 9 天。

D 组大鼠给予绒毛膜促性腺激素注射液腹腔注射治疗, 每日上午依照 10 mL/kg 剂量给予大鼠腹腔注射, 每日 100 IU , 连续处理 9 天。

每日下午除 A 组继续灌服生理盐水干预外, 其余各组均灌服羟甲基(450 mg/kg)制备复发性流产模型。

于妊娠第 10 天, 将米非司酮(RU486)按照 4 mg/kg 计量溶解于 2 mL 生理盐水中给各组大鼠灌服, 制备复发性流产模型。

1.5 试验指标及样本

1.5.1 胚胎吸收率计算 于妊娠第 11 天, 使用 5% 水合氯醛溶液(10 mL/kg)对各组大鼠进行麻醉, 充分麻醉后固定于操作板, 减去腹部及盆腔部绒毛, 对腹部消毒后使用手术剪剖开腹腔, 充分暴露腹腔并将腹膜与子宫分离, 将妊娠子宫离体后, 记录各组大鼠存活胚胎数量(胚胎为粉红色, 形态较为饱满)及吸收胚胎数(胚胎体积明显小于存活胚胎, 颜色暗红, 或胚胎已同孕前状态)。胚胎吸收率 = 吸收胚胎数 / (吸收胚胎数 + 存活胚胎数) $\times 100\%$ 。

1.5.2 炎症因子水平比较 取各组大鼠眼眶血, 室温下静置 10 min 后, 以 3000 rad/min , 离心半径 10 cm , 离心 10 min, 取上层清液检测白细胞介素-17(Interleukin 17, IL-17), 转化因子- β (Transforming Growth Factor β , TGF- β) 水平。试剂盒购于 Bioswamp, 检测步骤参照试剂盒操作说明: 将标准品稀释后, 向酶标包被板中各孔依次加入不同浓度样品, 并向样品孔加入 $10 \mu\text{L}$ 生物素标记的抗体。随后向除空白孔以外的各孔加入酶标试剂 $50 \mu\text{L}$ 后, 将背板用封板膜封板并置于恒温箱, 37°C 孵育 30 min。除去封板膜, 将浓缩洗涤液稀释 30 倍后弃去孔内液

体并甩干,向孔内加入洗涤液并静置 30 s 后弃去,重复洗涤 5 次后拍干。向各孔中加入显色剂 A 50 μ L、显色剂 B 50 μ L,震荡混匀后,在 37℃、避光条件下显色 10min。随后向各孔加入 50 μ L 终止液停止反应,15 min 后,以空白孔作为零点调零,以 450 nm 波长对各孔吸光度依次进行测量。

1.5.3 免疫因子水平比较 将大鼠处死后,分离大鼠脾脏制备单细胞混悬液。使用含 5%双抗的 PBS 漂洗组织 3 次,移入无菌培养皿后,使用手术剪将脾脏组织剪为 1 mm³ 的小组织块。将 0.08 %胰酶和 0.1 % II 型胶原酶 1:1 重悬,置于培养箱中消化 30 min,使用 10%胎牛血清细胞培养液将样本吹打,制备细胞悬液,使用 200 目孔径不锈钢网对悬液进行过滤,弃掉未消化的组织,随后以 175× g 离心 10 min,使用 PBS 反复冲洗 3 次。弃去上层清液后,将红细胞裂解液加入样品并重悬沉淀 5 min,加入等量 PBS 后以 175× g 离心 5 min,弃去上层清液再以 PBS 洗涤,并再次以 PBS 重悬备用。

Th17 细胞检测操作步骤: 取各组样本,1 mL 细胞培养液重悬后向各组样本加入 2 μ L 离子酶素和阻断合剂,于 37℃,5% CO₂ 恒温箱内培育 6 h。向样品中加入 2 mL PBS 冲洗后,以 4℃离心 5 min,弃上清液。随后加入 2 mL 染色缓冲液洗涤,4℃离心 5 min,弃去上层清液。重悬细胞后,加入 CD4-FITC 抗体,于 4℃、避光条件下孵育 30 min。随后加入固定剂,重悬,避光孵育后离心,弃去上层清液;加入破膜剂,重悬,避光孵育后离心,弃去上层清液;加入 100 μ L 重悬细胞,并加入 IL-17 抗体,孵育 45 min。加入 400 μ L PBS 重悬细胞后避光保存,使用仪器检测细胞数目,并使用 NovoCyte 对实验结果进行分析。

Treg 细胞检测操作方法: 取各组样本,100 μ L PBS 重悬后,向各样品中加入 0.5 μ L CD4-FITC 抗体和 0.625 μ L CD25-PE-Cy5 抗体,4℃避光孵育 30 min。向样品中加入 2 mL PBS 缓冲液洗涤后 4℃离心 5 min,弃去上清,依次加入固定剂,重悬、避光孵育 20 min 后 4℃离心 5 min,弃去上清后加入破膜剂,重悬、避光孵育 10 min 后 4℃离心 5 min,弃去上清后加入 100 μ L 重悬细胞,并向各样品中加入 Foxp3-PE 抗体 5 μ L,避光孵育 45 min 后,加入 400 μ L PBS 重悬细胞后避光保存,上机检测,并使用 NovoCyte 对实验结果进行分析。

1.5.4 子宫内膜病理损伤程度比较 将大鼠子宫离体后,使用生理盐水冲洗干净后,置于 4%多聚甲醛中固定过夜,石蜡包埋

后切成 4 μ m 切片,进行 Masson 染色和 HE 染色,观察记录子宫内膜损伤程度和胶原蛋白积累量,使用 Image-Pro Plus6.0 软件分析子宫内膜厚度,并计算纤维化面积比。纤维化面积比 = 子宫内膜间质纤维化面积 / 子宫内膜腺体、间质总面积 × 100%。子宫浆膜层与宫腔表面的垂直距离即可记为子宫内膜厚度。

1.5.5 雌激素受体表达水平比较 选用 qRT-PCR 法对子宫组织中雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、孕激素受体(Prolactin receptor, PR)、催乳素受体(Progesterone receptor, PRLR)的表达水平进行测定。选用 TRIzol 试剂对子宫组织中的总 RNA 进行提取,逆转录合成 cDNA 后,以 qRT-PCR 法对样本中 ER、PR、PRLR mRNA 表达量进行检测。95℃预变性 10 min,95℃变性 10 s,55℃退火 35 s,72℃延伸 60 s,上述步骤重复 40 次。引物设计如下:

ER	上游:5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3'
	下游:5'-GGTCTTTTCGTATCCACCTTTC-3'
PR	上游:5'-TCGTACAAGCATGTCAGTGGACAC-3'
	下游:5'-CATGGTAAGGGACAGGGAGTACAA-3'
PRLR	上游:5'-CCAGATGGAAGTGTACTGCTTGGA-3'
	下游:5'-GGTGGAATCCTGGGACAGATC-3'
GAPDH	上游:5'-CCACTTGAAGGGTGGAGC-3'
	下游:TGAAGTCGCAGGAGACAA-3'

1.6 统计学分析

选用 SPSS 22.0 对数据进行整理分析,计数资料选用卡方检验或 Fisher 确切概率分析法;计量资料行正态性检验,若符合正态分布则使用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠干预后胚胎吸收率比较

结果表明,干预后,A 组大鼠胚胎吸收率为 8.45 %,明显低于 B 组大鼠的 47.06 %胚胎吸收率,提示复发性流产模型制备成功。与 B 组大鼠相比,C 组、D 组大鼠的胚胎吸收率降低,且 D 组大鼠低于 C 组($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组胚胎吸收率比较

Table 1 Comparison of embryo absorption rate in each group

Groups	n	Viable embryos(n)	Absorbed embryos(n)	embryo absorption rate(%)
Group A	10	65	6	8.45
Group B	10	36	32	47.06 ^a
Group C	10	42	19	31.15 ^{ab}
Group D	10	58	10	14.71 ^{abc}

Note: Compared with Group A, ^a $P < 0.05$; Compared with Group B, ^b $P < 0.05$; Compared with Group C, ^c $P < 0.05$, the same below.

2.2 各组大鼠干预后炎症因子水平比较

结果表明,干预后,与 A 组相比,各组大鼠 IL-17 水平、IL-17/ TGF- β 升高,且 TGF- β 水平下降,同时 C 组、D 组大鼠

的 IL-17 水平、IL-17/ TGF- β 均低于 B 组,且 D 组低于 C 组,同时 TGF- β 水平高于 B 组,且 D 组高于 C 组($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组 IL-17、TGF-β、IL-17/ TGF-β 水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of level of IL-17, TGF-β, IL-17/ TGF-β in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	IL-17(pg/mL)	TGF-β(pg/mL)	IL-17/ TGF-β
Group A	10	66.05± 8.34	497.08± 58.02	14.12± 2.83
Group B	10	151.12± 18.91 ^a	267.81± 27.09 ^a	57.15± 8.36 ^a
Group C	10	89.32± 11.85 ^{ab}	325.83± 41.08 ^{ab}	29.37± 6.02 ^{ab}
Group D	10	76.07± 9.98 ^{abc}	461.25± 51.64 ^{abc}	16.41± 4.59 ^{abc}

2.3 各组大鼠干预后免疫因子水平比较

结果表明,干预后,与 A 组相比,各组大鼠的 Th17 细胞比例、Th17/Treg 升高,同时 Treg 细胞比例下降,与 B 组相比,C

组、D 组大鼠的 Th17 细胞比例、Th17/Treg 降低,且 D 组低于 C 组,同时 Treg 细胞比例升高,且 D 组高于 C 组($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组 Th17、Treg、Th17/Treg 水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of level of Th17, Treg, Th17/Treg in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Th17(%)	Treg(%)	Th17/Treg
Group A	10	0.39± 0.09	3.21± 0.82	0.13± 0.03
Group B	10	1.18± 0.21 ^a	0.68± 0.15 ^a	1.77± 0.57 ^a
Group C	10	0.92± 0.18 ^{ab}	1.19± 0.23 ^{ab}	0.82± 0.18 ^{ab}
Group D	10	0.58± 0.13 ^{abc}	2.28± 0.56 ^{abc}	0.24± 0.06 ^{abc}

2.4 各组大鼠干预后子宫内膜厚度和纤维化比例比较

结果表明,干预后,与 A 组相比,各组大鼠子宫内膜厚度下降,纤维化面积比例增加,与 B 组相比,C 组、D 组大鼠的子

宫内膜厚度增加且 D 组高于 C 组,同时子宫内膜纤维化比例低于 B 组,且 D 组低于 C 组($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 各组大鼠干预后子宫内膜厚度和纤维化比例比较($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of level of Endometrial thickness, Fibrotic area in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Endometrial thickness(mm)	Fibrotic area(%)
Group A	10	3.65± 0.83	21.40± 5.61
Group B	10	1.81± 0.45 ^a	50.18± 11.35 ^a
Group C	10	2.14± 0.73 ^{ab}	38.21± 6.32 ^{ab}
Group D	10	2.97± 0.88 ^{abc}	31.86± 5.82 ^{abc}

2.5 各组大鼠干预后子宫组织中 ER、PR、PRLR mRNA 表达水平比较

结果表明,干预后,与 A 组相比,各组大鼠 ER、PR、PRLR

mRNA 表达水平明显降低,与 B 组相比,C 组、D 组大鼠的 ER、PR、PRLR mRNA 表达水平有所增加,且 D 组高于 C 组($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 各组大鼠干预后子宫组织中 ER、PR、PRLR mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of level of ER mRNA, PR mRNA, PRLR mRNA in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	ER mRNA	PR mRNA	PRLR mRNA
Group A	10	1.09± 0.15	1.05± 0.13	0.99± 0.11
Group B	10	0.58± 0.07 ^a	0.63± 0.07 ^a	0.50± 0.07 ^a
Group C	10	0.71± 0.09 ^{ab}	0.75± 0.09 ^{ab}	0.68± 0.08 ^{ab}
Group D	10	0.87± 0.11 ^{abc}	0.89± 0.11 ^{abc}	0.82± 0.09 ^{abc}

3 讨论

复发性流产是临床中常见的妊娠并发症,且近年来发病率

有逐渐升高的趋势。复发性流产的病因病机较为复杂,研究证实其与遗传、生理结构、内分泌、感染等多种因素相关,孕妇的心理状态也会产生一定影响^[11-13]。免疫机制失衡也是引起复发

性流产的主要因素之一,其中 Th1/Th2 平衡以及 Th17/Treg 平衡是妊娠过程中的两个关键平衡体系^[14]。

Treg 细胞是在高水平 TGF- β 环境下,由 CD4⁺T 细胞分化而得,Treg 在母胎界面中,通过抑制母体对胎儿的固有免疫应答以及免疫排斥反应,进而产生免疫耐受^[15,16]。Treg 细胞可分泌 IL-10 和 TGF- β ,当缺乏 Treg 细胞时,孕鼠极易发生流产,而将 Treg 细胞重新移植到 Treg 缺乏的孕鼠后,流产的发生率明显下降,提示 Treg 细胞在妊娠过程中的重要性^[17]。TGF- β 、IL-6 可作用于 Th17/Treg 中间细胞,使其分化为 Th17,Th17 具有促炎作用,妊娠过程中发生感染后,Th17 可介导保护性免疫,但同时可导致中性粒细胞在母胎界面中过度浸润^[18]。同时 Th17 可分泌 IL-17,IL-17 是孕早期的主要促炎因子,可激活自然杀伤细胞,进而引起子宫动脉损伤^[19]。Treg 与 Th17 具有拮抗作用,处于动态平衡中。研究发现,复发性流产患者中,血清样本的 Treg 细胞数目减少,Th17 细胞数量明显增加,Th17/Treg 具有升高的趋势^[20]。本研究中,与 A 组大鼠相比,各组大鼠干预后 IL-17 水平升高、TGF- β 水平下降,同时 IL-17/TGF- β 比值上调,提示复发性流产会激活炎性反应,引起促炎因子的水平升高,而 C、D 组大鼠的 IL-17 水平、IL-17/TGF- β 高于 B 组,且 TGF- β 水平低于 B 组,且 D 组由于 C 组提示绒毛膜促性腺激素治疗能够通过抑制促炎因子的分泌,降低炎性反应水平,进而发挥治疗作用。同时与 B 组相比,C、D 组大鼠 Th17 细胞数量上升、Th17/Treg 比值升高、Treg 细胞数量降低,且 D 组优于 C 组,提示复发性流产大鼠的免疫微环境平衡失调,而绒毛膜促性腺激素治疗可以通过上调 Th17 细胞、抑制 Treg 细胞、动态调整 Th17/Treg 细胞比例,而改善子宫内免疫微环境,发挥治疗作用。

适当的子宫内膜厚度能够为胚胎的植入提供稳定的环境,也是妊娠成功的关键因素之一^[21,22],但复发性流产极易损伤子宫内膜,使其厚度降低,同时内膜间质和腺体体积下降,纤维组织明显增生,损伤部位明显瘢痕化,使得子宫内膜的容受性下降,极易再次引起胚胎着床失败^[23-25]。因此子宫内膜厚度和纤维化损伤程度是评价子宫内膜损伤程度的关键因素。本研究结果显示,干预后,B、C、D 组大鼠的子宫内膜厚度均低于 A 组,提示复发性流产会使得子宫内膜受损,内膜纤维化比例增加,而 D 组大鼠的内膜厚度大于 B、C 组,提示绒毛膜促性腺激素治疗能够更好的改善受损的子宫内膜,缓解其纤维化程度,提高子宫的容受性。

ER、PR、PRLR 是女性内分泌功能的重要评价指标,也是维持正常代谢的关键激素,在妊娠过程中,这三种激素与子宫内膜中的激素受体相结合,共同调控子宫内膜的变化^[26,27]。研究表明,PR 可以通过与 ER 联合治疗而降低子宫内膜癌变的几率^[28,29],同时 ER 可以通过调节细胞自噬而提高子宫内膜基质的存活率,同时针对药物流产的患者,PR、ER 可减少临床并发症,减轻出血量^[30]。本研究中,干预后,A 组大鼠的 ER、PR、PRLR mRNA 表达明显高于其他各组,提示复发性流产后大鼠子宫内膜受损较为严重,性激素和相应受体的表达水平均下降。而 D 组大鼠的 ER、PR、PRLR mRNA 水平明显高于 B、C 组大鼠,提示绒毛膜促性腺激素可以通过提高复发性流产大鼠的相应性激素受体表达水平,进一步促进子宫内膜的损伤修复。

同时干预后,与 B 组大鼠相比,C 组、D 组大鼠的胚胎吸收率降低,且 D 组大鼠低于 C 组,提示绒毛膜促性腺激素治疗可明显的改善子宫容受性,缓解流产症状。

综上,绒毛膜促性腺激素治疗可明显改善复发性流产大鼠的症状,其机制可能与调节炎性因子和免疫反应,提高雌激素受体表达水平,进而改善子宫内膜损伤程度相关。

参考文献(References)

- [1] Du L, Deng W, Zeng S, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals defective decidua stromal niche attributes to recurrent spontaneous abortion[J]. Cell Prolif, 2021, 54(11): e13125
- [2] Quenby S, Gallos ID, Dhillon-Smith RK, et al. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss[J]. Lancet, 2021, 397(10285): 1658-1667
- [3] Pirtea P, Cicinelli E, De Nola R, et al. Endometrial causes of recurrent pregnancy losses: endometriosis, adenomyosis, and chronic endometritis[J]. Fertil Steril, 2021, 115(3): 546-560
- [4] Zhu D, Zou H, Liu J, et al. Inhibition of HMGB1 Ameliorates the Maternal-Fetal Interface Destruction in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion by Suppressing Pyroptosis Activation[J]. Front Immunol, 2021, 12(2): 782792
- [5] Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, et al. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells[J]. Front Immunol, 2020, 11(1): 2025
- [6] 周良燕. 低分子肝素联合阿司匹林治疗对复发性流产患者 D-二聚体纤维蛋白降解产物表达水平及妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(17): 4016-4019
- [7] Turocy JM, Rackow BW. Uterine factor in recurrent pregnancy loss[J]. Semin Perinatol, 2019, 43(2): 74-79
- [8] 徐艳, 孙颖, 张晓璐. 糖皮质激素联合依诺肝素钠对复发性早期流产患者 BA、LP、AIA、ADPN 影响[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(08): 1574-1577
- [9] Coomarasamy A, Devall AJ, Brosens JJ, et al. Micronized vaginal progesterone to prevent miscarriage: a critical evaluation of randomized evidence[J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 223(2): 167-176
- [10] 全细云, 李明, 朱建思, 等. 人绒毛膜促性腺激素对乳腺癌大鼠肿瘤生长及相关基因表达的影响[J]. 现代医学, 2020, 48(3): 303-307
- [11] Liu Y, Shan N, Yuan Y, et al. The efficacy of enoxaparin for recurrent abortion: a meta-analysis of randomized controlled studies[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2021, 34(3): 473-478
- [12] Zhang S, Ding J, Wang J, et al. CXCL5 Downregulation in Villous Tissue Is Correlated With Recurrent Spontaneous Abortion [J]. Front Immunol, 2021, 12(5): 717483
- [13] Bunnewell SJ, Honess ER, Karia AM, et al. Diminished ovarian reserve in recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis[J]. Fertil Steril, 2020, 113(4): 818-827.e3
- [14] Alecsandru D, Klimczak AM, Garcia Velasco JA, et al. Immunologic causes and thrombophilia in recurrent pregnancy loss[J]. Fertil Steril, 2021, 115(3): 561-566
- [15] Granne I, Shen M, Rodriguez-Caro H, et al. Characterisation of peri-implantation endometrial Treg and identification of an altered phenotype in recurrent pregnancy loss[J]. Mucosal Immunol, 2022, 15(1): 120-129
- [16] Fu XQ, Cai JY, Li MJ. Prednisone may rebuild the immunologic

- homeostasis: Alteration of Th17 and Treg cells in the lymphocytes from rats' spleens after treated with prednisone-containing serum[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(7): e00800
- [17] Zhu L, Liu M, Zhang S, et al. Foxp3 TSDR Hypermethylation Is Correlated with Decreased Tregs in Patients with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28 (2): 470-478
- [18] Ji J, Zhai H, Zhou H, et al. The role and mechanism of vitamin D-mediated regulation of Treg/Th17 balance in recurrent pregnancy loss[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2019, 81(6): e13112
- [19] Liu B, Wu H, Huang Q, et al. Phosphorylated STAT3 inhibited the proliferation and suppression of decidual Treg cells in unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82 (12): 106337
- [20] 祝丽琼, 陈慧, 刘梅兰, 等. 不明原因复发性流产患者外周血 Treg 细胞及细胞因子 TGF- β 、IL-10 的表达及临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(1): 96-99+103
- [21] Kliman HJ, Frankfurter D. Clinical approach to recurrent implantation failure: evidence-based evaluation of the endometrium [J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(4): 618-628
- [22] Li Y, Yu S, Huang C, et al. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure[J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(1): 187-196.e1
- [23] Kliman HJ, Frankfurter D. Clinical approach to recurrent implantation failure: evidence-based evaluation of the endometrium [J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(4): 618-628
- [24] Saxtorph MH, Hallager T, Persson G, et al. Assessing endometrial receptivity after recurrent implantation failure: a prospective controlled cohort study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 41 (6): 998-1006
- [25] Cao Y, Sun H, Zhu H, et al. Allogeneic cell therapy using umbilical cord MSCs on collagen scaffolds for patients with recurrent uterine adhesion: a phase I clinical trial [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 192
- [26] Haas DM, Hathaway TJ, Ramsey PS. Progesterone for preventing miscarriage in women with recurrent miscarriage of unclear etiology [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2019, 2019(11): CD003511
- [27] Liang Q, Tong L, Xiang L, et al. Correlations of the expression of $\gamma\delta$ T cells and their co-stimulatory molecules TIGIT, PD-1, ICOS and BTLA with PR and PIBF in the peripheral blood and decidual tissues of women with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 203(1): 55-65
- [28] Hu M, Zhang Y, Ma S, et al. Suppression of uterine and placental ferroptosis by N-acetylcysteine in a rat model of polycystic ovary syndrome[J]. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(12): gaab067
- [29] Monsivais D, Nagashima T, Prunskaitė-Hyyryläinen R, et al. Endometrial receptivity and implantation require uterine BMP signaling through an ACVR2A-SMAD1/SMAD5 axis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3386
- [30] 张桂馨. 雌孕激素序贯治疗药物流产后阴道出血的疗效 [J]. *中国医药指南*, 2021, 19(11): 104-106

(上接第 1897 页)

- [13] 郭娉, 张艳明, 申钰涵. 卒中后运动功能康复的脑可塑性理论的研究进展[J]. *中国老年保健医学*, 2018, 16(3): 57-60
- [14] Ko EJ, Hong MJ, Choi EJ, et al. Effect of Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Combined With Cognitive Training for Improving Cognition and Language Among Children With Cerebral Palsy With Cognitive Impairment: A Pilot, Randomized, Controlled, Double-Blind, and Clinical Trial[J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 713792
- [15] Kang E, Kim D, Paik N. Transcranial direct current stimulation of the left pré-frontal cortex improves attention in patients with traumatic brain injury: a pilot study[J]. *J Rehabil Med*, 2012, 44: 346-350
- [16] Saleem GT, Crasta JE, Slomine BS, et al. Transcranial direct current stimulation in pediatric motor disorders: a systematic review and meta-analysis[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2019, 100: 1-15
- [17] Horvath JC, Vogrin SJ, Carter O, et al. Effects of a common transcranial direct current stimulation (tDCS) protocol on motor evoked potentials found to be highly variable within individuals over 9 testing sessions[J]. *Exp Brain Res*, 2016, 234: 2629-2642
- [18] Nitsche MA, Liebetanz D, Lang N, et al. Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans [J]. *Clin Neurophysiol*, 2003, 114: 2220-2222
- [19] Spampinato DA, Satar Z, Rothwell JC. Combining reward and M1 transcranial direct current stimulation enhances the retention of newly learnt sensorimotor mappings[J]. *Brain Stimul*, 2019, 12: 1205-1212
- [20] O'Brien AT, Bertolucci F, Torrealba-Acosta G, et al. Non-invasive brain stimulation for fine motor improvement after stroke: a meta-analysis[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25: 1017-1026
- [21] Ji Y, Ji Y, Sun B. Effect of acupuncture combined with repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function and cerebral hemodynamics in children with spastic cerebral palsy with spleen-kidney deficiency[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2019, 44: 757-761
- [22] Makovac E, Thayer JF, Ottaviani C. A meta-analysis of non-invasive brain stimulation and autonomic functioning: implications for brain-heart pathways to cardiovascular disease[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 74: 330-341