

· 生殖医学研究 ·

基于补肾活血法探讨母胎界面外泌体源 miRNA 介导 通信网络促进胚胎着床的机制

郭珮¹, 刘家君², 周航¹, 郭泽毅², 汪弋力⁴, 邓琳雯², 曾倩^{2*}, 黄金珠^{2,3*}

(1. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072;
3. 成都中医药大学护理学院, 成都 611137; 4. 成都中医药大学中医药创新研究院/交叉学科研究院,
成都 611137)

[摘要] 目的: 基于补肾活血法, 探讨补肾活血方是否通过调节外泌体(Exo)源性 miRNA, 影响母胎界面细胞通讯, 进而改善肾虚血瘀型胚胎着床障碍。方法: 动物除空白组外采用羧基脲 450 mg·kg⁻¹ 灌胃 10 d, 肾上腺素 0.3 mg·kg⁻¹ 持续 7 d。米非司酮 5.5 mg·kg⁻¹ 构建肾虚血瘀着床障碍大鼠模型。补肾活血方高、中、低剂量组分别给予 7.30、3.65、1.83 g·kg⁻¹ 药液灌胃, 地屈孕酮组予以 2.63 mg·kg⁻¹ 灌胃 10 d。干预后苏木素-伊红(HE)染色观察子宫病理变化, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测黏蛋白 1(MUC1)、叉头框蛋白 O1(FoxO1)和同源框蛋白 A10(HoxA10)的表达水平; 细胞实验以原代子宫内膜上皮细胞(EEC)和胚胎滋养层细胞(TC)为研究对象, 超离法制备无外泌体含药血清配置完全培养基培养, 超离提取细胞上清液中 Exo 进行交叉培养, 48 h 后采用划痕实验及 Transwell 法检测迁移和侵袭能力, 并进行 EEC 来源 Exo miRNA 测序。结果: 造模后大鼠子宫内膜菲薄, 血管及腺体减少, 胞饮突数量减少, 补肾活血方能改善大鼠子宫内膜形态, 增加胞饮突数量; 造模后各组大鼠 MUC1、FoxO1、HoxA10 的表达均下调($P < 0.05$), 补肾活血方中剂量、高剂量干预上升($P < 0.05$); 无 Exo 含药血清干预后 24 h 各组细胞补肾活血方组迁徙率、侵袭率显著提高($P < 0.01$); EEC 源 Exo 测序基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析主要富集于原肠胚形成、神经元分化调控、细胞发育和再生等生物学过程, 并通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、FoxO1、Wnt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、肿瘤坏死因子(TNF)等信号通路发挥作用。结论: 补肾活血方通过调控外泌体源 miRNA 改善子宫内膜容受性、促进胚胎着床, 为开发基于外泌体 miRNA 的辅助生殖治疗策略提供了潜在靶点, 为中医药治疗不孕症提供了新的理论依据。

[关键词] 补肾活血方; 外泌体; miRNA 测序; 母胎界面

[中图分类号] R552; R285; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0317-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251314

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251016.0937.001>

[网络出版日期] 2025-10-16 13:22:14 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanism of Embryo Implantation Promotion via Exosomal miRNA-mediated Communication Network at Maternal-fetal Interface Based on Bushen Huoxue Therapy

GUO Pei¹, LIU Jiajun², ZHOU Hang¹, GUO Zeyi², WANG Yili⁴, DENG Linwen²,
ZENG Qian^{2*}, HUANG Jinzhu^{2,3*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Chengdu 611137, China; 2. Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China;
3. School of Nursing, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China;

[收稿日期] 2025-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82004415); 成都中医药大学"杏林学者"科研提升计划项目(QJRC2021019); 四川省科学技术厅重点研发项目(2024YFFK0162)

[第一作者] 郭珮, 博士, 助理研究员, 从事中医药防治不孕症的研究, E-mail: xintomas@126.com

[通信作者] * 黄金珠, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治不孕症的研究, E-mail: huangjinzhu@cdutcm.edu.cn;

* 曾倩, 学士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治不孕症的研究, E-mail: Zengqian999d@126.com

4. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy/Institute of Interdisciplinary Studies,
Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether Bushen Huoxue prescription improves embryo implantation through regulating exosomal miRNA to enhance maternal-fetal interface communication based on Bushen Huoxue therapy. **Methods:** In the animal experiment, all the rats (except for the blank group) were administered hydroxyurea ($450 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) via gavage for 10 d, as well as epinephrine ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and mifepristone ($5.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) via subcutaneous injection for 7 d to establish an implantation disorder model of kidney deficiency and blood stasis type. The Bushen Huoxue prescription (BSHX) groups were administered the prescription at different doses ($7.30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the high-dose group, $3.65 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the medium-dose group, and $1.83 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the low-dose group) via gavage. The dydrogesterone group was administered the corresponding medicine ($2.63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) via gavage. After intervention for 10 days, uterine histopathological changes were observed via hematoxylin-eosin (HE) staining. Mucin (MUC1), forkhead box protein O1 (FoxO1), and homeobox A10 (HoxA10) expression levels were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. Cell experiment selected primary endometrial epithelial cells (EEC) and trophoblast cells (TC) as research subjects. Exosome-free medicated serum was prepared by ultracentrifugation and cultured in complete medium. Exosomes were isolated from cell supernatants by ultracentrifugation for cross-co-culture. After 48 h, migration and invasion abilities were assessed by scratch and Transwell assays. Sequencing was then performed on EEC-origin exosomal miRNA. **Results:** The model rats exhibited thin endometrium, along with reduced blood vessels, glandules, and pinopode numbers. BSHX improved endometrial morphology and increased pinopode numbers. MUC1, FoxO1, and HoxA10 expressions were downregulated in the model rats, while these parameters were upregulated after BSHX medium- and high-dose intervention. In the cell experiment, after exosome-free medicated serum intervention for 24 h, migration and invasion abilities were enhanced in the BSHX groups ($P<0.01$). In EEC-origin exosomal miRNA sequencing, gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses revealed enrichment in biological processes (gastrulation, neuronal differentiation, alongside cell development and regeneration), involving the mitogen-activated protein kinase (MAPK), FoxO1, Wnt, mammalian target of rapamycin (mTOR), and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathways. **Conclusion:** BSHX promotes embryo implantation by improving endometrial receptivity via regulating exosomal miRNA. These findings provide potential targets for exosomal miRNA-based assisted reproductive strategies and a novel theoretical basis for infertility treatment by traditional Chinese medicine.

[Keywords] Bushen Huoxue prescription; exosome; miRNA sequencing; maternal-fetal interface

世界卫生组织(WHO)将不孕症定义为无防护措施下12个月未能妊娠的疾病状态^[1]。该病影响全球约10%——超过1.86亿育龄夫妇,发展中国家发病率高达30%^[2]。近几十年来,体外受精-胚胎移植(IVF-ET)技术已成为治疗不孕症的可靠方法,但约10%接受IVF-ET的女性会出现反复种植失败(RIF)。RIF指40岁以下女性在3次新鲜或冻融周期中移植至少4个优质胚胎后仍未获得临床妊娠(排除结构或染色体异常),是辅助生殖技术中的复杂难题^[3]。胚胎成功定位、黏附及侵入需要子宫内膜处于接受态,这一过程依赖于发育良好的胚胎刺激子宫内膜开放着床窗口(WOI),母胎界面相互作用对妊娠成功至关重要^[4]。RIF确切病因尚未明确,但由着床窗口未开放或移位导致的子宫内膜容受性障碍被认为是主要因素。

中医药治疗不孕症历史悠久且疗效显著。中医认为“肾主生殖”“血养胎元”,RIF患者往往病程较长,且数次经历手术操作,金刃所伤,瘀血留滞,因此肾虚血瘀是不孕主要病机,补肾活血法治疗不孕症卓有成效。基于补肾活血法而立的补肾活血

方,是由四川省名中医曾倩教授基于经典名方——五子衍宗丸和寿胎丸,结合临床实证经验化裁而成。课题组前期临床与实验研究表明,补肾活血方能有效提高自然妊娠率、增加胚胎移植日子宫内膜厚度、改善RIF患者的胚胎着床率及临床妊娠率^[5-7]。其机制包括增强子宫内膜血流灌注、提高雌孕激素水平、促进子宫内膜腺体发育、上调子宫内膜上皮及间质关键因子,从而改善子宫内膜容受性、调节母胎界面免疫微环境表达、促进胚胎着床并最终提高妊娠率^[8-10],但具体分子机制尚未阐明。

母胎界面细胞间通讯对妊娠建立与维持至关重要^[11]。着床窗口期子宫内膜进入短暂的容受状态,胚胎通过滋养层细胞与子宫内膜上皮细胞进行交互对话,是胚胎识别、黏附、着床的重要环节^[12],近年来研究发现,外泌体(Exo)作为妊娠全程维持母胎界面稳态的重要参与者,在病理妊娠中呈现改变^[13-14]。Exo作为细胞间通讯的重要媒介,在母胎界面的细胞交互对话中发挥着关键作用,其通过携带蛋白质、核酸、脂质等生物活性分子参与母体与胎儿之间的信息传递。研究表明,胎盘滋养层细胞

分泌的Exo可被母体蜕膜细胞或免疫细胞摄取,通过传递miRNA、mRNA等调控因子影响母体免疫耐受相关基因的表达,从而维持母胎界面的免疫微环境平衡;同时,母体Exo亦可被滋养层细胞吸收,通过调控侵袭相关信号通路影响胎盘发育和血管重塑^[15]。Exo介导的旁分泌机制还能促进细胞间代谢物交换,协调母胎界面的能量供应与物质转运^[16-17]。

miRNA是长约19~25个核苷酸的非编码小RNA,主要通过靶向mRNA的3'非翻译区(3'-UTR)调控蛋白表达^[18]。游离形式或细胞外囊泡(包括子宫内膜Exo)携带的miRNA被认为是胚胎与腔上皮间的介质,可调控子宫内膜上皮细胞的黏附、侵袭及血管生成,对开放子宫内膜着床窗口、促进胚胎黏附起关键作用^[19-20]。尽管目前对miRNA在癌症等领域的研究较多,但其在胚胎着床中的作用仍未完全阐明。着床障碍病因复杂,由于开展胚胎植入前非整倍体遗传学检测筛选后,子宫内膜对移植结局的影响变得更加凸显,目前,大约2/3的植入失败被认为是由于子宫内膜功能不良引起。因此,改善内膜功能提高胚胎附植概率是生殖领域亟待突破的难点。

因此,本研究以补肾活血方干预肾虚血瘀模型大鼠,观察对子宫内膜容受性的影响;提取大鼠原代子宫内膜上皮细胞(EEC)和基质细胞(TC),用无Exo的含药血清培养细胞后提取细胞上清中Exo,交叉培养后验证补肾活血方对着床期母胎界面交互作用,针对补肾活血方对子宫内膜的影响,本研究进一步通过EEC来源Exo miRNA测序,筛选差异表达miRNA并进行功能富集分析,探索关键生物学功能及信号通路,为揭示补肾活血方促进胚胎着床的潜在机制提供依据。见增强出版附加材料。

1 材料

1.1 动物 SPF级雌性SD大鼠,体质量180~220 g,购自成都达硕实验动物公司,生产合格证号SCXK(川)-2020-0030,饲养于成都中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(川)2020-0124,动物房室温(22±2)℃,相对湿度(60±10)%,12 h/12 h明暗循环,自由摄取标准啮齿类饲料及饮用水。

1.2 伦理 实验方案通过成都中医药大学动物伦理委员会审批,批准号2021-65。

1.3 细胞 动物来源及饲养方式同上,妊娠第8天(8 dpc)大鼠麻醉后快速剥离子宫,冲出胚泡,分别用于提取原代EEC和TC。

1.4 药物 补肾活血方由四川省中医医院中药制

剂实验室提供,组成为菟丝子15 g,覆盆子10 g,枸杞子10 g,丹参10 g,续断20 g,山楂15 g,山药15 g,丝瓜络15 g(批号分别为240310、240401、241020、240611、240913、240805、240611、240901),由成都中医药大学附属医院中药鉴定人李涓主任药师鉴定。地屈孕酮(荷兰Abbott Biologicals公司,批准文号国药准字HJ20170221,规格10 mg/片×20片);羟基脲(齐鲁制药有限公司,国药准字H37021289,规格0.5 g×100片);肾上腺素(武汉武药制药有限公司,国药准字H42022262,规格1 mg×10支);米非司酮(华润紫竹药业有限公司,国药准字H10950202,规格25 mg×6片)。

1.5 试剂 杜氏改良伊格尔培养基/营养混合物F12(DMEM/F12)培养基、胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司,批号分别为12634010、10099141);青霉素-链霉素双抗、Hanks平衡盐溶液(美国HyClone公司,批号分别为SV30010、SH30030.02);总RNA提取试剂盒(RNeasy)、SYBR预混液、逆转录试剂盒(德国Qiagen公司,批号分别为74804、330504、218161);4%多聚甲醛、伊红、TRIzol(北京兰杰柯科技有限公司,批号分别为BL539A、BS248、DK238);苏木素、中性树胶(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为S19007、S18162);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,上海碧云天生物技术有限公司,批号C1002);甘油醛-3-磷酸脱氢酶[GAPDH,生工生物工程(上海)股份有限公司,批号QL589];黏蛋白1(MUC1)抗体、同源异形框A10(HoxA10抗体)(瑞典Atlas Antibodies公司,货号分别为HPA007235、HPA071918);叉头框蛋白O1(FoxO1)抗体(瑞典Agrisera公司,货号AS06-120)。

1.6 仪器 Optima XE-100型超速离心机(美国Beckman Coulter公司),HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司),Touch™CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司),NanoSight NS300型纳米颗粒跟踪分析仪(英国Malvern Panalytical公司),Multiskan GO型全自动酶标仪(美国Thermo Fisher公司);Illumina Nextseq500型测序仪(美国Illumina公司)。

2 方法

2.1 补肾活血方制备 该方剂由四川省中医医院中药制剂实验室提供。临床等效剂量为菟丝子15 g、覆盆子10 g、枸杞子10 g、丹参10 g、续断20 g、山楂15 g、山药15 g、丝瓜络15 g。每付中药8倍水浸泡30 min,武火煎至微沸,文火持续30 min,煎

2次,中药液旋蒸至浓度为 $3.65\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的水煎液。

2.2 补肾活血方液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)分析 补肾活血方混悬液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,甲醇-水(1:1)稀释,离心取上清。色谱条件: C_{18} 色谱柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.7\ \mu\text{m}$);流动相A(0.1%甲酸水溶液)-B(乙腈),梯度洗脱(5%~95%B, 15 min);流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 。质谱参数:离子源,电喷雾电离(ESI)正/负离子模式;扫描范围 m/z 100~1 500;毛细管电压 3.5 kV ;干燥气温度 $300\text{ }^\circ\text{C}$ 。通过MassHunter或Xcalibur软件提取峰,根据本草组鉴(HERB)数据库(<http://herb.ac.cn/>)进行对比。

2.3 动物模型制备及分组给药 选取动情周期规律的SD雌鼠,通过连续2个动情周期阴道涂片观察确定动情前期,随机分为空白组、模型组和补肾活血方组(分为低、中、高剂量组)及地屈孕酮组。模型组与补肾活血方组参照文献[21]及前期实验结果建立肾虚血瘀着床障碍模型,除空白组外各组均建立疾病模型:羟基脲 $450\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃10 d,第4天起皮下注射肾上腺素 $0.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 持续7 d。第11天上午8:00见阴栓记为1 dpc,于6 dpc头颈部皮下注射米非司酮 $5.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 一次建立复合模型^[21]。同时补肾活血方各组给予补肾活血方水煎液灌胃10 d,将中剂量设为临床等效剂量,高剂量为中剂量2倍,中剂量为低剂量2倍,高、中、低剂量分别为 7.30 、 3.65 、 $1.83\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。地屈孕酮组予以 $2.63\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃10 d。空白组、模型组分别以同等体积生理盐水灌胃。

2.4 无Exo含药血清制备 最后一次给药后2 h取腹主动脉血。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 静置2 h, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,离心半径5 cm,收集上血清。将血清置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 超离心管中,在离心半径12 cm, $120\ 000\times g$ 下离心18 h,丢弃下底沉淀。粒径及浓度检测合格后,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,低温保存。分别在空白组、模型组和补肾活血方组(根据动物实验选取中级量即 $3.65\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 为优效剂量)进行细胞培养。

2.5 原代细胞分离提取及分组给药 SPF级成年雌性SD大鼠麻醉后快速剥离子宫,冲出胚泡,用预冷的Hanks平衡盐溶液冲洗3次,置于含1%青霉素-链霉素双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中。将消化液置于离心管中以 $1\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清,重复3次以充分去除消化酶。最后用含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基重悬,剩余细胞悬液转移至T25培养瓶,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养。细胞角蛋白-19(CK-19)和广谱细

胞角蛋白(PCK)标记后用流式细胞仪进行筛选,分出子宫内膜上皮细胞(EECs)和胚胎滋养层细胞(TCs)。分别将EECs和TCs分为空白组、模型组、补肾活血方组,分别给予空白组大鼠无Exo血清、肾虚血瘀模型组大鼠无Exo血清、补肾活血方组大鼠无Exo血清(10%)进行培养。传代2次以后收集细胞上清,提取Exo后进行Exo与细胞交叉培养,具体方式为各组EECs来源Exo与对应组别的TCs培养,各组TCs来源Exo与对应组别的EECs培养。培养48 h后进行划痕与侵袭实验。

2.6 Exo提取及鉴定(超速梯度离心、透射电镜、纳米流式) 采用超速离心法分离细胞上清液样本解冻在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $2\ 000\times g$ 离心30 min,去除沉淀和仔细的上层清液转移到新的离心管, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $10\ 000\times g$ 离心45 min,去除沉淀和过滤通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 过滤膜上层清液,放置在一个新的离心管, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $120\ 000\times g$ 离心70 min,取下上清,再次 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $120\ 000\times g$ 离心70 min,取下上清,收集Exo。

透射电镜(TEM)观察Exo的形态特征。Exo用戊二醛固定,4%醋酸铀酰反染。分层到甲醛膜(formvar)涂层的200目铜网格上。在60 kV下拍摄TEM图像^[22]。使用纳米颗粒跟踪分析仪测量Exo的单颗粒大小和浓度。通过1 000倍稀释制备纯化的Exo,并根据需要调整浓度以确保额外的20~40颗粒/箱。

采用纳米流式细胞术检测Exo表面蛋白。纯化的Exo用染色缓冲液 $100\ \mu\text{L}$ 在室温下黑暗染色30 min。孵育后,选择的样品用细胞痕量液染色 $1\ \mu\text{L}$ 。将染色的Exo用 $0.22\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过滤后的PBS洗涤45 min。洗涤后的细胞外囊泡(EV)用 $50\ \mu\text{L}$ 过滤后的 $0.22\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS重悬,使用流式纳米颗粒分析仪(NanoFCM)流动纳米分析仪进行流动分析。

2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察子宫组织病理变化 子宫组织标本在4%甲醛中固定24 h。用乙醇梯度使水脱水。二甲苯透明3次,每次40 min。将石蜡包埋液切片至 $4\ \mu\text{m}$ 厚度。用盐酸乙醇进行5~10 s的组织分化;用自来水冲洗1~3 min;用自来水冲洗1~3 min;加入85%乙醇3~5 min;用伊红染色3~5 min;梯度遗传脱水;二甲苯透明,最后的显微镜检查。

2.8 扫描电镜观察大鼠子宫发育和胚胎着床情况 子宫组织经戊二醛固定,4%醋酸铀酰反染,分层到formvar涂层的200目铜网格上。预热真空系统并调整至合适的工作真空度,校准电子束参数如

加速电压、束流等以确保图像清晰,优化对比度和亮度后采集图像在30 kV下拍摄电镜图像。

2.9 免疫荧光检测相关蛋白的表达 细胞在培养箱中培养2 h。爬上载玻片后,抽吸培养基,在4 °C下用4%多聚甲醛(PFA)固定30 min,在4 °C下过夜。将载玻片阻断液与0.5% Triton X-100和PBS 1:1混合,加入10%血清。破膜密封后,取一抗(1:300)50 μL涂于防水膜(湿盒)上,盖上玻片,置于4 °C。二抗(1:500)室温暗室孵育2 h后,每次PBS洗涤3次,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色5 min^[23]。

2.10 Real-time PCR检测相关mRNA表达 采用TRIzol法提取组织或细胞总RNA,测定浓度及纯度后,使用逆转录试剂盒将1 μg RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板,加入SYBR Green荧光染料及特异性引物,于实时Real-time PCR仪中进行扩增。反应体系为20 μL,包含SYBR Premix Ex Taq 10 μL、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)0.8 μL、cDNA模板2 μL及ddH₂O 7.2 μL。反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s、60 °C退火延伸30 s,共40个循环。溶解曲线分析验证产物特异性,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用2^{-ΔΔC_t}法计算目的基因相对表达量,每组实验重复3次。根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)中凝结芽孢杆菌MUC1(Gene ID: 24571)、FoxO1(Gene ID: 84482)、HoxA10(Gene ID: 100911668)和内参基因GAPDH(Gene ID: 24383)序列,设计并合成引物,引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
MUC1	上游 ATGCCAGTAGCACTCACCATAG	23
	下游 CAGCCAAGGCAATGAGATAGAC	
FoxO1	上游 TGCATATTTGGAAGCTGCGCCG	180
	下游 CCAAGAGCATCTCSGCTGGGGTT	
HoxA10	上游 CCTGCTTGGGAAGGCTGAGGAG	91
	下游 GGCGCAACTGGGCAGCAATAAC	
GAPDH	上游 GTGGCCAGCCTCGTCSTCATAG	230
	下游 GGTAACCAGGCGGCTCCGATAC	

2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达 提取细胞或组织总蛋白,用放射免疫沉淀法裂解液(RIPA)裂解后离心取上清,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法测定蛋白浓度。调整样品浓度并加入上样缓冲液,95 °C煮沸5 min使蛋白变性。制备十二

烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,将蛋白样品上样后进行电泳分离。电泳结束后将蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭1 h。加入一抗(1:1 000)4 °C孵育过夜,TBST洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:3 000)室温孵育1 h。再次洗涤后加入ECL发光液,在化学发光成像系统中曝光检测目标条带。

2.12 划痕实验 首先将细胞接种于培养板中,待其长满单层后,用无菌枪头或划痕器在细胞层上划出直线划痕,PBS清洗去除脱落细胞,更换低血清或无血清培养基抑制增殖。随后在显微镜下定时拍照记录划痕闭合情况,通过比较不同时间点的划痕宽度评估细胞的迁移能力。

2.13 侵袭实验 将Matrigel基质胶铺于迁移侵袭小室(Transwell)上室底部模拟细胞外基质,待胶凝固后,将细胞悬液加无血清培养基接种于上室,下室加入含10%FBS的培养基。培养一定时间后,用棉签擦去上室未侵袭的细胞,甲醇固定下室膜底面细胞,结晶紫染色,显微镜下计数穿过膜的细胞数,以此评估细胞的侵袭能力。

2.14 miRNA测序建库及生信分析 使用miRNeasy Mini Kit(50)217004分离总RNA。按照QIAseq miRNA Library Kit指南,使用QIAseq miRNA Library Kit合成成对端文库。用cBot将文库稀释至10 pM生成聚类,然后在Illumina HiSeq Xten上测序。采用DESeq软件进行miRNA差异表达分析。根据参考文献[24],保留|log₂(FC)|值>1和P<0.05的差异表达miRNA,认为其被显著调节,以供进一步分析。通过丰富的R软件包对生物过程、细胞成分和分子功能进行了基因本体(GO)分析,并对京都基因与基因组百科全书(KEGG)途径进行了分析(<http://www.genome.ad.jp/kegg>)。根据差异表达miRNA的表达水平进行分层聚类,并进行可视化,使用R统计软件包4.0进行统计分析。所有独立实验均为3个重复,P<0.05为差异有统计学意义。

2.15 统计学分析 统计分析均使用GraphPad Prism 9.5和SPSS 26.0软件,本研究采用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量数据,通过夏皮罗-威尔克正态性检验(Shapiro-Wilk)评估数据正态性,Levene检验验证方差齐性。两组间比较采用独立样本t检验(正态分布)或曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U)(非正态分布),正态检验后多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)结合Tukey事后检验或克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis)检验结合Dunn事后检验。

3 结果

3.1 补肾活血方 LC-MS 分析及成分鉴定 采用 LC-MS 分析了补肾活血方的主要成分。在 m/z 70~1 050 进行了 1 次全质谱扫描和数据库依赖的二次质谱扫描 (dd-MS², Top 10); 所有数据均使用 Xcalibur 软件处理。在优化的液相色谱和质谱条件下, 主要成分得到了很好的分离和检测。利用正负离子模式下的分子离子峰来分析化合物的相对分子量。补肾活血方的总阳性和阴性离子色谱图见增强出版附加材料。所有数据与 LC-MS 分析和 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 进行对比, 确定补肾活血方提取物的化学成分, 然后通过色谱保留时间和 MS 信息的比较对化合物进行定性鉴定, 最后区分出化合物 (Top 20) 见表 2。

3.2 补肾活血方促进着床障碍大鼠子宫发育和胚胎着床 研究证实, 胞饮过程的建立和子宫内膜的接受性及植入窗口的打开是重要的形态学指标, 成熟胞饮的出现标志着子宫内膜处于最佳状态。扫描电镜检测空白组大鼠 6 dpc 可见正常胞饮突出现, 建立着床障碍模型后, 模型大鼠内膜中几乎不可见胞饮突, 经补肾活血方及地屈孕酮干预后, 可见部分胞饮突出现, 其中以高剂量最为明显。子宫内膜形态可见, 模型建立后, 大鼠子宫内膜菲薄, 血管及腺体减少, 上皮细胞基质细胞排列混乱。补肾活血方干预后可见内膜增厚, 上皮细胞及基质细胞致密, 排列整齐, 其中以补肾活血方高剂量、地屈孕酮组最为显著。见图 1。

在子宫内膜容受性建立过程中, MUC1、FoxO1、HoxA10 的表达有助于减弱子宫内膜上皮的抗黏附特性, 促进子宫内膜蜕膜化, 促进子宫内膜间质的增殖与分化, 是容受性窗口期开放的核心分子, 三者协同作用, 共同调控子宫内膜接受胚胎的能力。对各组大鼠 MUC1、FoxO1、HoxA10 的

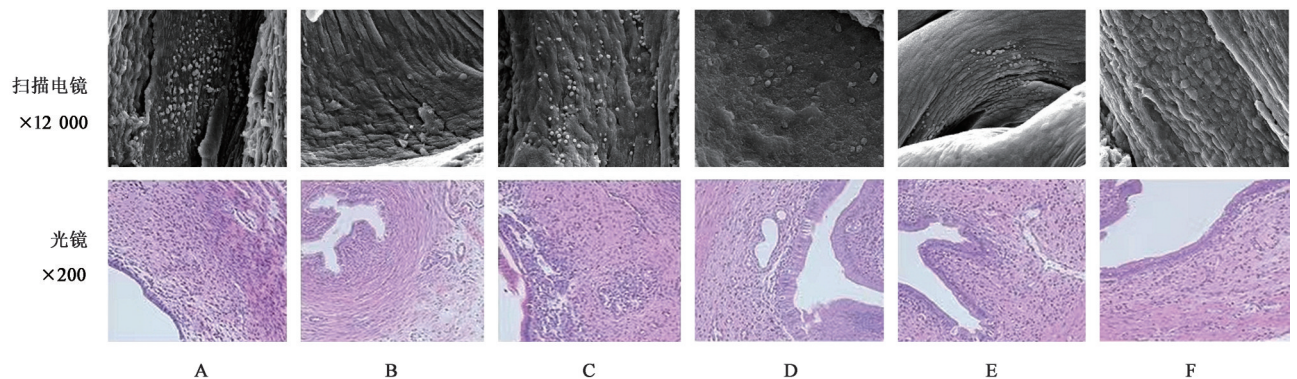
表 2 补肾活血方鉴定筛选的前 20 成分 (n=3)

Table 2 Top 20 active ingredients identified and screened by Bushen Huoxue prescription (n=3)

名称	分子式	m/z	t/min	正离子/负离子
Betaine	C ₅ H ₁₁ O ₂	118.086 30	0.804	+
Dimethyl sulfoxide	C ₂ H ₆ OS	79.021 82	0.914	+
Phthalic anhydride	C ₈ H ₄ O ₃	149.023 07	11.192	+
DRH	C ₁₆ H ₂₆ N ₈ O ₆	214.107 03	0.839	+
7-Hydroxycoumarine	C ₉ H ₆ O ₃	163.038 68	3.632	+
Zeatin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	242.101 78	0.838	+
4-Hydroxy-6-methyl-2-pyrone	C ₆ H ₆ O ₃	127.038 88	4.046	+
Choline	C ₅ H ₁₃ NO	104.107 25	0.779	+
D-(+)-Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	343.122 62	0.802	+
1,6-Anhydro-B-Glucose	C ₆ H ₁₀ O ₅	163.059 81	0.823	+
L-Pyrogutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	130.049 77	0.905	-
Indole	C ₈ H ₇ N	101.038 44	3.328	-
Propyl gallate	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	213.075 29	4.899	-
N-Fructosyl isoleucine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	276.143 65	1.466	-
NP-007491	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	99.044 38	4.049	-
Phloroglucinol	C ₆ H ₆ O ₃	127.038 88	0.838	-
Phosphocholine	C ₅ H ₁₄ NO ₄ P	184.072 98	7.870	-
7-Hydroxycoumarine	C ₉ H ₆ O ₃	163.038 68	5.031	-
methyl orsellinate	C ₉ H ₁₀ O ₄	200.091 49	0.840	-
Cryptotanshinone	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	297.147 77	10.538	-

表达水平进行 Real-time PCR 和 Western blot 检测可见, 造模后可见表达均下调, 药物干预后有所上升, 其中以补肾活血方高剂量和中剂量为主。见表 3 和图 2。

3.3 补肾活血方对 EECs、TCs 的 Exo 影响 为了进一步验证补肾活血方是否通过子宫内膜上皮与胚



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 补肾活血方高剂量组; D. 补肾活血方中剂量组; E. 补肾活血方低剂量组; F. 地屈孕酮组 (图 2 同)

图 1 补肾活血方对各组大鼠子宫内膜病理及胞饮突形态的影响

Fig. 1 Effect of Bushen Huoxue prescription on endometrial pathology and pinopode morphology in rats of each group

表3 补肾活血方对各组大鼠MUC1、FoxO1、HoxA10的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Bushen Huoxue prescription on MUC1, FoxO1, and HoxA10 in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MUC1/ β -actin	FoxO1/ β -actin	HoxA10/ β -actin
空白组		2.11±1.10	1.71±0.27	2.43±1.17
模型组		0.97±0.37 ¹⁾	0.90±0.41 ¹⁾	1.02±0.73 ¹⁾
补肾活血方高剂量组	7.30	1.53±0.26 ²⁾	1.59±0.27 ²⁾	1.45±0.60 ²⁾
补肾活血方中剂量组	3.65	1.72±1.29 ²⁾	1.56±0.15 ²⁾	1.23±0.98 ²⁾
补肾活血方低剂量组	1.83	1.05±0.22	1.33±0.34 ²⁾	1.33±0.26
地屈孕酮组	2.63×10 ⁻³	1.95±0.37 ²⁾	1.45±0.59 ²⁾	1.56±0.60 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05

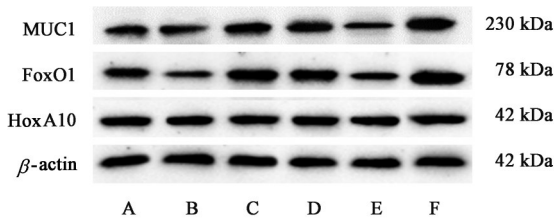


图2 各组大鼠着床期子宫内膜MUC1、FoxO1、HoxA10蛋白表达水平电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression levels of MUC1, FOXO1 and HoxA10 proteins in endometrium of each group of rats during implantation period

胎滋养层Exo交互影响母胎界面着床对话,课题组分别分离提取了原代EECs、TCs,通过CK-19、PCK免疫荧光检测细胞纯度,EECs可被CK-19标记,TCs可被PCK标记,所有细胞鉴定为P1代细胞,纯度均大于90%。超速离心提取上清后,利用透射电子显微镜确定分离的Exo形态。NanoSight分析表明,Exo的直径分布范围约为50 nm至150 nm。四跨蛋白分化簇9(CD9),分化簇63(CD63),分化簇81(CD81)阳性表明分离的囊泡主要是Exo。见图3及增强出版附加材料。

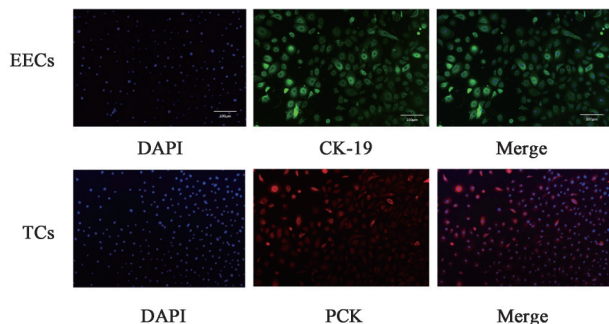


图3 原代EECs、TCs细胞鉴定及Exo鉴定(免疫荧光,×100)

Fig. 3 Identification of EECs, TCs, and Exo (IF, ×100)

超速离心提取无Exo含药血清,超离前粒子总浓度:1.4×10⁸ Particles·mL⁻¹;超离后粒子总浓度:2.7×10⁷ Particles·mL⁻¹,总粒子清除率大于90%,可用作于收集Exo的细胞完全培养基,见增强出版附

加材料。不同血清以此方法清除Exo后分组干预各组细胞,不同细胞来源Exo进行交叉培养,通过免疫荧光标记观察Exo被细胞吞噬现象,从图4可以看出,24 h后,均在细胞内部检测到Exo荧光标记,说明Exo细胞吞噬效应良好。为证明Exo被吞噬后的细胞功能,课题组检测了细胞的划痕试验,由图5和图6可见,所有组细胞24 h均有所愈合,其中补肾活血方划痕愈合最为明显。EECs和TCs Transwell共培养后可见,补肾活血方干预后两种细胞穿膜融合率最高。因此可以认为补肾活血方可以提高EECs和TCs的迁移能力,增强胚胎的母胎界面黏附能力。计数统计后可见EECs各组及TCs各组细胞划痕愈合迁移率及Transwell小室侵袭率中药组显著高于模型组(P<0.01)。见表4、表5。

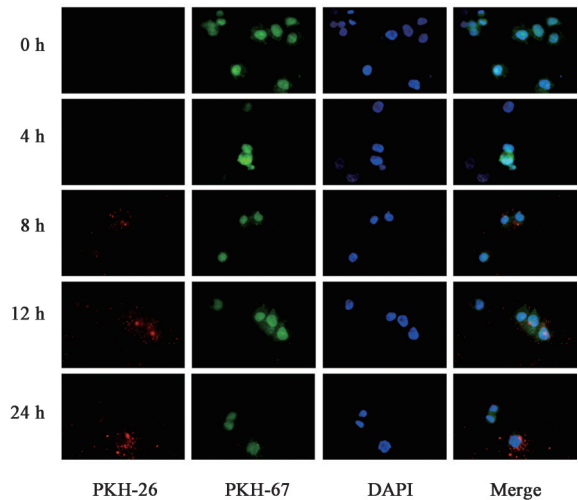
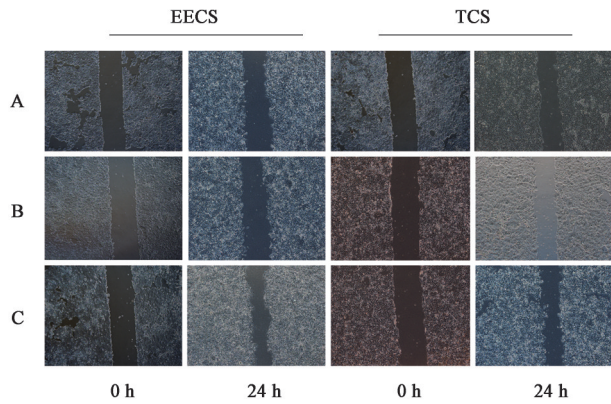


图4 EECs来源Exo与EECs来源Exo共培养免疫荧光标记(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Immunofluorescence labeling of co-cultured Exo derived from EECs and TCs (IF, ×400)

3.4 补肾活血方对EECsExo miRNA影响 着床障碍病因复杂,由于开展胚胎植入前非整倍体遗传学检测筛选后,子宫内膜对移植结局的影响变得更加凸显,目前,约2/3的植入失败被认为是由于宫内



注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血方组(图6同)

图5 补肾活血方对EECs来源Exo迁移的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 5 Effect of Bushen Huoxue prescription on migration of Exo derived from EECs (inverted microscope, ×200)

表4 各组细胞划痕试验迁移率($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Migration rate in wound healing assay for each cell group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	0 h 划痕宽度/ μm	24 h 划痕宽度/ μm	迁移率/%
EECs空白组		496.18±15.38	431.80±32.15	13.1±2.5
EECs模型组	10	503.12±23.16	462.34±26.65	8.2±3.1
EECs补肾活血方组	10	501.03±18.02	271.59±41.16	45.9±5.2 ¹⁾
TCs空白组		502.26±36.39	371.11±17.48	26.1±4.7
TCs模型组	10	508.39±16.44	415.54±25.65	18.3±3.9
TCs补肾活血方组	10	505.75±21.84	301.26±33.29	40.4±6.0 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$

表5 各组细胞侵袭实验穿膜率($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Transmembrane rate in invasion assay for each cell group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	穿膜细胞数(每视野)	相对侵袭率/%
EECs空白组		178.22±23.64	100.0±13.0
EECs模型组	10	39.36±11.98	21.9±6.2
EECs补肾活血方组	10	1 226.89±65.59	688.8±36.5 ¹⁾
TCs空白组		64.19±12.16	36.0±6.7
TCs模型组	10	52.28±16.36	29.2±9.0
TCs补肾活血方组	10	553.47±33.75	310.7±18.5 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$

膜功能不良引起。因此,改善内膜功能提高胚胎种植概率是生殖领域亟待突破的难点。课题组针对性的进一步对补肾活血方干预后的EECs的Exo进行了miRNA测序,以鉴定差异表达的miRNA。基于序列相似性,共鉴定出1 026个已知的miRNA。空白组与模型组有8个成熟miRNA表达差异。在8个差异表达的miRNA中,3个上调,5个下调。10个在空白组和补肾活血方组之间差异表达,6个上调,4个下调。模型组与补肾活血方组差异表达17个,

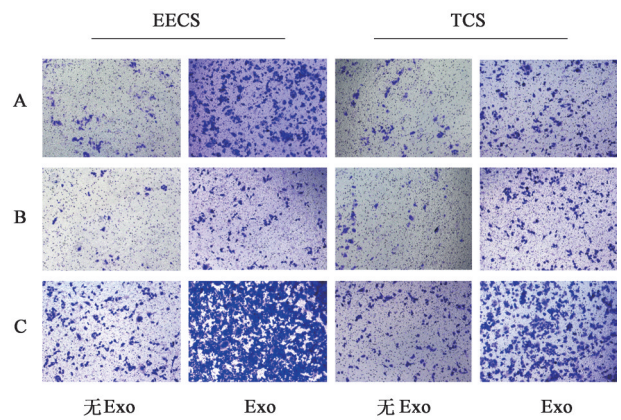


图6 补肾活血方对EECs来源Exo侵袭能力影响(结晶紫,×200)

Fig. 6 Effect of Bushen Huoxue prescription on invasion capabilities of Exo derived from EECs (crystal violet, ×200)

上调12个,下调5个($\log_2|\text{FC}| < 1, P < 0.05$)。包括有 rno-miR-199a-3p、rno-miR-199a-5p、rno-miR-31a-5p、rno-miR-34c-5p、rno-miR-155-5p、rno-miR-196a-5p、rno-miR-203a-3p 和 rno-miR-450a-5p 等 miRNA,同时下调 rno-miR-124-3p、rno-miR-126a-5p、rno-miR-128-3p、rno-miR-150-5p、rno-miR-340-5p、rno-miR-140-3p 和 rno-miR-140-5p 等 miRNA。

GO分析在补肾活血方组和模型组间明显富集11 710项($P < 0.05$),可能参与多种生物学事件。空白组与补肾活血方组间共11 871项,模型组与补肾活血方组间共15 631项。生物过程、细胞成分和分子功能分类中排名前10位的GO见增强出版附加材料。这些miRNA的靶基因显著富集于原肠胚形成、神经元分化调控、细胞发育、再生及糖皮质激素反应等生物学过程。KEGG分析可见靶基因涉及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、FoxO、Wnt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和肿瘤坏死因子(TNF)信号通路。

4 讨论

母胎界面是由蜕膜与胚外组织共同形成的结构,该界面的细胞间通讯对妊娠建立与维持至关重要

要。最新研究表明,Exo作为新型细胞间通讯工具,参与维持母胎界面稳态,并在病理妊娠中呈现改变^[25]。Exo通过将其内容物转移至靶细胞,触发细胞迁移等生物学效应。这些内容物包括mRNAs、miRNA和蛋白质,他们在释放前被特异性分选进入Exo。子宫内膜上皮细胞分泌的Exo可到达囊胚表面,被滋养外胚层摄取,促进囊胚黏附与着床^[26]。在传递的分子中,miRNA是母胎通讯的关键信号。miRNA是长约22个核苷酸的非编码小RNA,通过转录后抑制或mRNA降解调控基因表达。miRNA具有稳定性,可调控靶细胞中大量基因,其中ExomiRNA约占细胞总miRNA的70%^[27]。miRNA表达改变在子宫内膜容受性和胚胎着床中起关键作用。胚胎与EECs的体外共培养研究揭示了两者间分子对话的组成部分^[28],但仍有诸多未知。

中医药治疗不孕症历史悠久,临床疗效确切。中医理论认为“胞宫摄精成孕”是正常妊娠的前提,胞宫摄精成孕的关键在于肾、精、血。肾通过胞络与胞宫相系,不孕发病往往日久,多种病因交杂,久病及肾,久病必瘀,肾中精气亏虚则胞络不荣,血瘀则胞脉胞络不畅,亦直接对胞宫有影响,使胞宫不能摄精成孕。基于补肾活血法而立的补肾活血方,是由四川省名中医曾倩教授基于经典名方——五子衍宗丸和寿胎丸,结合临床实证经验化裁而成。五子衍宗丸(出自《证治准绳》)以枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子组成,功擅补肾益精,适用于肾精亏虚所致的不孕;寿胎丸(出自《医学衷中参西录》)由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶组成,重在补肾固冲、养血安胎;佐以活血化瘀之品,兼顾肾虚精亏与瘀阻胞宫的病机特点。补肾活血方补肾调肝活血通络,本研究发现补肾活血方能提高肾虚血瘀着床障碍大鼠子宫内膜容受性,模型大鼠子宫内膜形态明显改善,胞饮突数量增加,内膜厚度和腺体发育显著恢复,并且能提高子宫内膜中MUC1、FoxO1和HoxA10的表达水平,促进EECs、TCsExo分泌,增加EECs、TCs的迁移、侵袭能力,转录组学测序发现补肾活血方主要上调Exo中rno-miR-199a-3p、rno-miR-199a-5p、rno-miR-31a-5p、rno-miR-34c-5p、rno-miR-155-5p、rno-miR-196a-5p、rno-miR-203a-3p和rno-miR-450a-5p等miRNA,同时下调rno-miR-124-3p、rno-miR-126a-5p、rno-miR-128-3p、rno-miR-150-5p、rno-miR-340-5p、rno-miR-140-3p和rno-miR-140-5p。通过GO和KEGG通路分析显示,这些miRNA的靶基因显著富集于原肠胚形成、神经

元分化调控、细胞发育、再生及糖皮质激素反应等生物学过程,并涉及MAPK、FoxO、Wnt、mTOR和TNF信号通路。补肾活血方调控Exo miRNA的助孕机制图见增强出版附加材料。

在转录组学结果中许多基因于子宫内膜容受性及着床相关,rno-miR-199a-3p在子宫内膜容受性调控中发挥关键作用,其通过靶向核转录因子- κ B抑制蛋白激酶 β (IKK β)抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路降低子宫内膜干细胞的黏附、迁移和侵袭能力,从而优化子宫内膜的接受性。研究表明,miR-199a-3p表达下调会导致子宫内膜异位症患者的子宫内膜基质细胞侵袭性增强,而恢复其表达可改善子宫内膜稳态,促进胚胎着床^[29]。此外,miR-199a-3p还通过调控血管内皮生长因子A(VEGFA)影响血管生成,进一步影响子宫内膜的血流供应,这对胚胎植入至关重要^[30]。rno-miR-126a-5p在子宫内膜异位症患者中表达下调,其低表达与子宫内膜细胞凋亡减少、增殖及血管生成能力增强相关。miR-126a-5p通过靶向CT10肉瘤癌基因同源物(Crk)和乳腺癌抗雌激素耐药蛋白3(BCAR3)调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)信号通路,影响子宫内膜细胞的迁移和侵袭能力,进而影响胚胎着床。此外,miR-126a-5p可能通过调节VEGF信号通路影响子宫内膜血管生成,从而影响胚胎植入时的血流供应^[31]。

近年来,miR-34c-5p作为miR-34家族的重要成员,因其在细胞周期调控、凋亡及肿瘤抑制中的关键作用而备受关注,但其在胚胎着床及子宫内膜容受性中的作用仍待深入探讨^[32-33]。研究表明,miR-34c-5p可能通过调控子宫内膜上皮细胞和基质细胞的增殖与分化,影响胚胎植入的关键窗口期——种植窗^[34]。在RIF患者中,miR-34c-5p的表达异常可能干扰子宫内膜蜕膜化过程,从而降低胚胎着床率^[35]。miR-34c-5p作为母胎界面Exo传递的囊括基因,对成功着床至关重要。胚胎源性因子被分泌并被子宫内膜细胞摄取,可调节子宫内膜基因表达以促进着床。例如,miR-34c-5p可能被包装在胚胎分泌的细胞外囊泡中递送至子宫内膜细胞,进而调控与细胞黏附等着床关键过程相关的靶基因表达^[36-37]。

此外,miR-34c-5p的作用涉及多种信号通路,如MAPK信号通路方面,miR-34c-5p已被证实可抑制MAP2K1(MEK1),从而减弱ERK信号传导,这可能影响子宫内膜细胞的增殖和迁移能力,进而调控子宫内膜的蜕膜化进程^[38]。同时,miR-34c-5p可通过调控可能通过增强FoxO3a的稳定性促进FoxO通路,增

加子宫内膜细胞的凋亡抵抗,维持子宫内膜的稳态,从而提高胚胎着床的成功率^[39]。在Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路中,miR-34c-5p可能通过靶向Wnt通路的关键调控因子Wnt1抑制其过度激活,从而防止子宫内膜的异常增生,并维持适当的子宫内膜容受性^[40]。而在TNF信号通路方面,miR-34c-5p可能通过抑制TNF- α 介导的炎症反应,减少子宫内膜的过度免疫激活,防止胚胎被母体免疫系统排斥,从而改善妊娠结局^[41]。鉴于miR-34c-5p在子宫内膜容受性和胚胎-子宫内膜对话中的作用,有望成为预测着床成功的潜在生物标志物。

本研究证实基于补肾活血法的补肾活血方能改善大鼠子宫内膜容受性,并且促进母胎界面不同细胞的Exo分泌促进胚胎黏附着床的交互对话。由于条件限制,暂未能验证组学结果中与子宫内膜容受性及胚胎黏附着床的相关基因(如miR-34c-5p),后续将进行目标基因的功能探索实验,为辅助生殖治疗策略提供潜在治疗靶点。现代研究逐渐揭示中医药影响胚胎着床的分子机制,其中Exo作为介导细胞间通讯的微小囊泡成为研究热点^[42]。Exo和miRNA在介导中医药作用中的角色,展现了传统疗法与现代生物医学研究结合的潜力^[43]。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] CARSON S A, KALLEN A N. Diagnosis and management of infertility: A review[J]. *Jama*, 2021, 326(1): 65-76.

[2] World Health Organization. Mental disorders[EB/OL]. (2022-06-08) [2025-07-8]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>.

[3] FRANSIAK J M, ALECSANDRU D, FORMAN E J, et al. A review of the pathophysiology of recurrent implantation failure[J]. *Fertil Steril*, 2021, 116(6): 1436-1448.

[4] 中国医师协会生殖医学专业委员会, 中国女医师协会生殖医学专业委员会. 反复种植失败临床诊治中国专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2023, 103(2): 89-100.

Reproductive Medicine Committee of Chinese Medical Doctor Association, Reproductive Medicine Committee of Chinese Women Doctors Association. Clinical expert consensus on recurrent implantation failure in China[J]. *Natl Med J China*, 2023, 103(2): 89-100.

[5] 黄金珠, 周航, 夏宛廷, 等. 补肾活血方经导法治疗112例肾虚血瘀不孕患者的临床疗效观察[J]. *成都中医药大学学报*, 2017, 40(4): 41-44.

HUANG J Z, ZHOU H, XIA W T, et al. Clinical efficacy of Bushen Huoxue formula via enema administration in 112 infertile patients with kidney deficiency and blood stasis[J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2017, 40(4): 41-44.

[6] 黄金珠, 钟燕梅, 王珍, 等. 补肾活血方经直肠给药对肾虚血瘀不孕患者的临床助孕疗效观察[J]. *成都中医药大学学报*, 2014, 37(4): 33-35.

HUANG J Z, ZHONG Y M, WANG Z, et al. Clinical pregnancy outcomes of Bushen Huoxue formula via rectal administration in infertile patients with kidney deficiency and blood stasis[J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2014, 37(4): 33-35.

[7] 夏宛廷, 马黔红, 王珍, 等. 中医药分步论治再次IVF-ET患者降调日至胚胎移植日助孕疗效分析[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(11): 2684-2686.

XIA W T, MA Q H, WANG Z, et al. Efficacy analysis of stepwise TCSM treatment on assisted reproduction from down-regulation day to embryo transfer day in repeat IVF-ET patients[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2017, 28(11): 2684-2686.

[8] 曾倩, 马黔红, 夏宛廷, 等. 中医药分步论治IVF-ET失败137例患者再次IVF-ET助孕疗效分析[J]. *四川中医*, 2017, 35(8): 146-148.

ZENG Q, MA Q H, XIA W T, et al. Efficacy analysis of repeat IVF-ET with stepwise TCSM treatment in 137 patients with previous IVF-ET failure[J]. *Sichuan J Tradit Chin Med*, 2017, 35(8): 146-148.

[9] 段培培, 韩雪梅, 王毅, 等. 补肾活血方对肾虚血瘀型大鼠着床期子宫内膜血供相关因子的调控[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(12): 3193-3196.

DUAN P P, HAN X M, WANG Y, et al. Regulation of blood supply-related factors in endometrium during implantation window by Bushen Huoxue formula in rats with kidney deficiency and blood stasis[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(12): 3193-3196.

[10] 曾倩, 王田平, 夏宛廷, 等. 助孕I号方对肾虚血瘀模型大鼠孕早期子宫内膜蜕膜化形态学的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(2): 708-711.

ZENG Q, WANG T P, XIA W T, et al. Effects of enema-assisted pregnancy I prescription on morphology of endometrium decidualization in rats with syndrome of kidney deficiency and bloodstasis at the early stage of pregnancy[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(2): 708-711.

[11] SUN Y, LI T, ZHANG Y, et al. Determining diagnostic criteria of unexplained recurrent implantation failure: A retrospective study of two vs three or more implantation failure[J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 619437.

[12] TONG M, KAYANI T, JONES D M, et al. Antiphospholipid antibodies increase endometrial stromal cell decidualization, senescence, and inflammation via Toll-like receptor 4, reactive oxygen species, and p38 MAPK signaling[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74(6): 1001-1012.

[13] ANDER S E, DIAMOND M S, COYNE C B. Immune responses at the maternal-fetal interface[J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(31): eaat6114.

[14] KRAMER A C, JANSSON T, BALE T L, et al. Maternal-fetal cross-talk via the placenta: Influence on offspring development and metabolism[J]. *Development*, 2023, 150(20): dev202088.

[15] ADAM S, ELFEKY O, KINHAL V, et al. Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles-implications for complications of pregnancies[J]. *Placenta*, 2017, 54: 83-88.

- [16] MILLER D, GARCIA-FLORES V, ROMERO R, et al. Single-cell immunobiology of the maternal-fetal interface [J]. *J Immunol*, 2022, 209(8): 1450-1464.
- [17] FAZELI A, GODAKUMARA K. The evolving roles of extracellular vesicles in embryo-maternal communication [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 754.
- [18] VOROS C, ATHANASIOU D, MAVROGIANNI D, et al. Exosomal communication between cumulus-oocyte complexes and granulosa cells: A new molecular axis for oocyte competence in human-assisted reproduction [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(11): 5363.
- [19] KARAKASIS P, THEOFILIS P, MILARAS N, et al. Epigenetic drivers of atrial fibrillation: Mechanisms, biomarkers, and therapeutic targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(11): 5253.
- [20] MARTÍNEZ-CAMPOS C, LANZ-MENDOZA H, CIME-CASTILLO J A, et al. RNA through time: From the origin of life to therapeutic frontiers in transcriptomics and epitranscriptional medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(11): 4964.
- [21] 冯倩怡, 何东杰, 许丽绵. 肾虚血瘀-子宫内膜容受性不良模型大鼠的建立 [J]. *河南中医*, 2014, 34(4): 618-621.
FENG Q Y, HE D J, XU L M. Establishment of rat model with kidney deficiency and blood stasis-induced endometrial receptivity dysfunction [J]. *Henan J Tradit Chin Med*, 2014, 34(4): 618-621.
- [22] TIZRO P, CHOI C, KHANLOU N. Sample preparation for transmission electron microscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897: 417-424.
- [23] WU X, HE L, LIN Y, et al. The activation of cGAS-STING pathway promotes the epithelial-mesenchymal transition and inflammation in intrauterine adhesion [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 159: 114840.
- [24] LIN R, ZHENG S, SU H, et al. Integrated transcriptome analysis of lncRNA, miRNA, and mRNA reveals key regulatory modules for polycystic ovary syndrome [J]. *Phenomix*, 2024, 4(6): 570-583.
- [25] BRUNO V, ZIZOLFI B, FERRETTI M, et al. Hystero-embryoscopy as a tool for RPL immunological research at the maternal-fetal interface [J]. *Placenta*, 2025, 168: 28-34.
- [26] COENEN C S, HIDALGO T N, LYNN T, et al. Antiphospholipid-exposed trophoblast-derived extracellular vesicles express elevated levels of TLR7/8-activating microRNAs and induce endometrial endothelial activation, in part, through TLR7 [J]. *J Reprod Immunol*, 2024, 164: 104255.
- [27] YANG J, LI L, WANG L, et al. Trophoblast-derived miR-410-5p induces M2 macrophage polarization and mediates immunotolerance at the fetal-maternal interface by targeting the STAT1 signaling pathway [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 19.
- [28] BIDARIMATH M, LINGEGOWDA H, MILLER J E, et al. Insights into extracellular vesicle/exosome and miRNA mediated bi-directional communication during porcine pregnancy [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 654064.
- [29] ZHU R, NASU K, HIJIYA N, et al. HSA-miR-199a-3p inhibits motility, invasiveness, and contractility of ovarian endometriotic stromal cells [J]. *Reprod Sci*, 2021, 28(12): 3498-3507.
- [30] KLICKA K, GRZYWA T M, KLINKE A, et al. Decreased expression of miR-23b is associated with poor survival of endometrial cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 18824.
- [31] LIU P, HU L, SHI Y, et al. Changes in the small RNA expression in endothelial cells in response to inflammatory stimulation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, doi: 10.1155/2021/8845520.
- [32] CHEN J A. MiR-34 at the crossroads of SMA pathogenesis and therapy: Emerging biomarker and therapeutic target [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025, 36(2): 102557.
- [33] IELPO D, SALVATORI I, FIORI E, et al. Genetic deletion of microRNA-34 unmasks cardiac vulnerability to psychosocial stress in male mice [J]. *Physiol Behav*, 2025, 299: 114984.
- [34] HU S, WANG Y, ZHOU Y, et al. MicroRNA-34-5p regulates the expression of ecdysteroid receptor (ECR) in the process of salivary gland degeneration of ticks [J]. *Parasit Vectors*, 2025, 18(1): 187.
- [35] LUO Y, WANG D, CHEN S, et al. Corrigendum to "The role of miR-34c-5p/Notch in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in endometriosis" [J]. *Cell Signal*, 2025, 132: 111764.
- [36] TAN Q, SHI S, LIANG J, et al. MicroRNAs in small extracellular vesicles indicate successful embryo implantation during early pregnancy [J]. *Cells*, 2020, 9(3): 645.
- [37] CAI H, ZHU X, LI Z, et al. MicroRNA dysregulation and steroid hormone receptor expression in uterine tissues of rats with endometriosis during the implantation window [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(18): 2193-2204.
- [38] XU Q, PENG A, ZHAO L, et al. Down-regulated circ_0001853 inhibits lipopolysaccharide-induced endometritis progression via sponging miR-34c-5p [J]. *Mol Cell Probes*, 2025, 81: 102023.
- [39] ZHAO Y, MA Q, GAO W, et al. Dextran sulfate inhibits proliferation and metastasis of human gastric cancer cells via miR-34c-5p [J]. *Heliyon*, 2024, 10(15): e34859.
- [40] WEI H, LI Y, LIU H, et al. miR-34c-5p targets ROCK1 expression to inhibit kidney injury in diabetic nephropathy rats through MAPK/ERK signaling pathway [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2025, 61(6): 669-680.
- [41] ZHANG Y, QIU P, LU J, et al. Identification of miR-34c-5p as a potential regulatory molecule associated with testicular development of black goat [J]. *Faseb J*, 2025, 39(5): e70384.
- [42] LAI W, YUE Y, ZENG G. MicroRNA-34c-5p reduces malignant properties of lung cancer cells through regulation of TBL1XR1/Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Curr Mol Med*, 2024, 24(1): 114-122.
- [43] BEAL J R, MA Q, BAGCHI I C, et al. Role of endometrial extracellular vesicles in mediating cell-to-cell communication in the uterus: A review [J]. *Cells*, 2023, 12(22): 2584.

[责任编辑 周冰冰]