

泰山磐石散调控 KEAP1/NRF2/FoxO3 信号通路抑制 滋养层细胞氧化应激损伤的作用机制

段阳阳, 纪翔伦, 陈佳红, 杨竞航, 肖鑫宇, 陈树涛, 林超睿, 林凡*, 江澍*
(福建中医药大学 中西医结合学院, 福州 350122)

[摘要] 目的:探讨泰山磐石散(TSPSP)抑制人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/SVneo)氧化应激损伤的作用与机制,了解TSPSP治疗自然流产(SA)的机制。方法:采用临床数据库(GEO)对SA进行基因差异分析,并与氧化应激相关联,利用网络药理学方法筛选TSPSP活性成分,构建“中药-成分-靶点-疾病”网络,预测TSPSP作用机制。体外验证实验将滋养层细胞HTR-8/SVneo细胞分为空白组,模型组,TSPSP含药血清2.5%、5%、10%组,核因子E₂相关因子2(Nrf2)抑制剂组(ML385, 30 μmol·L⁻¹)。除空白组外,其他组加入150 μmol·L⁻¹ H₂O₂刺激3 h构建细胞氧化应激损伤模型,造模成功后,空白组和模型组给予10%的空白血清,各TSPSP含药血清组分别加入相应浓度含药血清处理,Nrf2抑制剂组在给予10% TSPSP含药血清的基础上,额外加入30 μmol·L⁻¹ ML385,各组细胞在上述条件下培养24 h,收集样本进行后续检测。细胞增殖活性检测(CCK-8)法检测各组细胞活力;划痕实验检测细胞迁移率;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测丙二醛(MDA)、Fe²⁺、谷胱甘肽(GSH)含量;活性氧荧光探针(DCF-DA)检测细胞内活性氧(ROS)水平;免疫荧光(IF)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞Kelch样ECH关联蛋白1(KEAP1)、Nrf2、叉头框蛋白O3(FoxO3)蛋白和mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞KEAP1、Nrf2、FoxO3、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、超氧化物歧化酶(SOD)蛋白表达水平。结果:GEO数据库获取GSE76862与GSE22490数据库,差异基因分析表明KEAP1、Nrf2、FoxO3基因均与疾病相关;同氧化应激通路匹配后,获得9条差异显著通路($P<0.05$),其中3条包含目的基因Nrf2、FoxO3。通过网络药理学共获得TSPSP活性成分靶点246个、SA相关靶点2 804个,取交集后得到154个潜在作用靶点。拓扑分析显示KEAP1、Nrf2等靶点度值较高,基因本体(GO)与KEGG富集分析表明,交集靶点主要涉及氧化应激反应、FoxO及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等。体外实验中,与空白组比较,模型组细胞活力显著下降($P<0.01$);与模型组比较,各TSPSP含药血清组细胞活力显著增高($P<0.01$);与10% TSPSP含药血清组比较,ML385组细胞活力下降至70%左右($P<0.01$)。与空白组比较,模型组MDA、Fe²⁺、ROS含量均显著增高,GSH表达下降($P<0.01$),细胞迁移率显著降低($P<0.01$),模型组KEAP1、FoxO3蛋白及mRNA表达水平均升高($P<0.01$),Nrf2、GPX4、SOD蛋白质及mRNA表达水平降低($P<0.01$);与模型组比较,各TSPSP含药血清组MDA、Fe²⁺、ROS含量均显著降低,GSH表达上升($P<0.01$),迁移率显著升高($P<0.01$),KEAP1、FoxO3蛋白及mRNA表达水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Nrf2、GPX4、SOD蛋白及mRNA表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与10% TSPSP含药血清组比较,ML385组各指标趋势逆转($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:TSPSP能抑制H₂O₂引起的滋养层细胞氧化应激损伤,其作用机制可能与药物激活KEAP1/Nrf2/FoxO3信号通路有关。

[关键词] 泰山磐石散; 自然流产; Kelch样ECH关联蛋白1/核因子E₂相关因子2/叉头框蛋白O3(KEAP1/Nrf2/FoxO3)信号通路; 人绒毛膜滋养层; 氧化应激损伤

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0012-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251808

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251224.1028.002>

[网络出版日期] 2025-12-24 15:05:21 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanism of Taishan Panshisan in Inhibiting Oxidative Stress Injury of Trophoblast Cells by Regulating KEAP1/Nrf2/FoxO3 Signaling Pathway

DUAN Yangyang, JI Xianglun, CHEN Jiahong, YANG Jinghang, XIAO Xinyu, CHEN Shutao,

[收稿日期] 2025-09-07

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2023J01827,2023J01824);福建中医药大学校管科研课题(X2023013);福建省大学生创新创业训练项目(S202510393024,S202510393029,S202510393017)

[第一作者] 段阳阳,从事中西医结合生殖医学基础研究,E-mail:1993671883@qq.com

[通信作者] *林凡,硕士生导师,副教授,从事中西医结合防治代谢疾病的研究,E-mail:biolincn@qq.com;

*江澍,硕士生导师,教授,从事中西医结合生殖医学基础研究,E-mail:314751067@qq.com

LIN Chaorui, LIN Fan*, JIANG Shu*

(*Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,
Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Taishan Panshi powder (TSPSP) on inhibiting oxidative stress injury in human chorionic trophoblast cells (HTR-8/SVneo), and to elucidate the underlying mechanism of TSPSP in the treatment of spontaneous abortion (SA). **Methods:** Gene differential analysis of SA was performed using the Gene Expression Omnibus (GEO) database and correlated with oxidative stress. Network pharmacology was employed to screen the active components of TSPSP, and a "Chinese medicine-component-target-disease" network was constructed to predict the mechanism of action of TSPSP. For *in vitro* validation experiments, HTR-8/SVneo cells were divided into blank group, model group, TSPSP-containing serum 2.5%, 5%, 10% groups, and nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2) inhibitor group (ML385, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Except for the blank group, other groups were stimulated with 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂ for 3 h to establish a cell oxidative stress injury model. After successful modeling, the blank group and model group were given 10% blank serum, each TSPSP-containing serum group was treated with the corresponding concentration of drug-containing serum, and the Nrf2 inhibitor group was additionally given 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ML385 on the basis of 10% TSPSP-containing serum. All groups of cells were continuously cultured under the above conditions for 24 h, and then samples were collected for subsequent detection. Cell viability in each group was detected by CCK-8 assay. Cell migration rate was detected by scratch test. The contents of malondialdehyde (MDA), Fe²⁺, and Glutathione (GSH) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was detected by a fluorescent probe (DCF-DA). The protein and mRNA expression levels of Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), Nrf2, and forkhead box protein O3 (FoxO3) in cells were detected by immunofluorescence (IF) and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression levels of KEAP1, Nrf2, FoxO3, Glutathione peroxidase 4 (GPX4), and superoxide dismutase (SOD) in cells were detected by Western blot. **Results:** The GSE76862 and GSE22490 datasets were obtained from the GEO database. Differential gene analyses showed that the KEAP1, Nrf2, and FoxO3 genes were all associated with the disease. After matching with the oxidative stress pathway, nine significantly differential pathways were identified ($P<0.05$), among which three contained the target genes Nrf2 and FoxO3. A total of 246 active ingredient targets of TSPSP and 2 804 SA-related targets were obtained through network pharmacology, and 154 potential action targets were obtained after taking the intersection. Topological analysis showed that targets such as KEAP1 and Nrf2 exhibited high degree values. GO and KEGG enrichment analyses indicated that the intersection targets were mainly involved in oxidative stress response, FOXO and MAPK signaling pathways, etc. In *in vitro* experiments, compared with the blank group, the cell viability in the model group was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the cell viability in each TSPSP-containing serum group was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the 10% TSPSP-containing serum group, the cell viability in the ML385 group decreased to approximately 70% ($P<0.01$). Compared with the blank group, the model group showed significantly increased contents of MDA, Fe²⁺, and ROS, decreased GSH expression ($P<0.01$), significantly reduced cell migration rate ($P<0.01$), and increased protein and mRNA expression levels of KEAP1 and FoxO3 ($P<0.01$), while decreased protein and mRNA expression levels of Nrf2, GPX4, and SOD ($P<0.01$). Compared with the model group, each TSPSP-containing serum group showed significantly decreased contents of MDA, Fe²⁺, and ROS, increased GSH expression ($P<0.01$), significantly increased migration rate ($P<0.01$), significantly decreased protein and mRNA expression levels of KEAP1 and FoxO3 ($P<0.05$, $P<0.01$), and significantly increased protein and mRNA expression levels of Nrf2, GPX4, and SOD ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the 10% TSPSP-containing serum group, the ML385 group showed reversed trends in all indicators ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** TSPSP can inhibit H₂O₂-induced oxidative stress injury of trophoblast cells, and its mechanism of action may be related to the drug activating the KEAP1/Nrf2/FoxO3 signaling pathway.

[Keywords] Taishan Panshi powder; spontaneous abortion; Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)/nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2)/forkhead box protein O3 (FoxO3) signaling pathway; human chorionic trophoblast; oxidative stress injury

自然流产(SA)通常是指一定妊娠孕周前的妊娠过程失败,主要包括生化妊娠、空孕囊、胚胎发育逐渐停止、胚胎或胎儿死亡及胚胎及其附属物排出等表现^[1]。SA是妇科的常见病之一,多次流产可造成复发性流产(RSA)^[2],我国近年来SA的发生率呈上升趋势,10%~15%的临床妊娠会发生早期SA^[3],对患者的身心健康和家庭经济负担影响巨大。目

前西医治疗SA主要采用妊娠激素补充、抗凝和免疫治疗等,但疗效不稳定,存在并发感染、过敏等不良反应^[4];且SA发病原因极其复杂,约有50%的病例无法解释,难以治疗^[5]。

中医学认为“肾主生殖”“胞脉者,系于肾”,基于此理论的SA治疗方法具有多成分、多靶点、多途径整体调节的独特优势,对难治性SA治疗效果良

好。泰山磐石散(TSPSP)是由人参、黄芪、白术、炙甘草、当归、川芎、白芍、熟地黄、续断、糯米、黄芩、砂仁12味药组成的经典方剂,有益气健脾、养血安胎的功效。该方在防治RSA及先兆流产方面疗效确切,尤其在改善子宫内膜容受性、促进绒毛血管生成及支持胚胎发育等方面优势明显^[6-7]。课题前期研究发现TSPSP可以降低大鼠胚胎吸收率,调节母胎界面免疫平衡^[5],同时降低流产大鼠血清和胎盘中谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的表达,可减轻氧化应激损伤,但具体机制尚未明确^[8]。

人绒毛膜滋养层细胞的状态对于维持正常妊娠至关重要,其功能障碍可导致胎盘发育异常,进而引发胚胎或死亡^[9]。氧化应激损伤是细胞内氧化与抗氧化作用失衡导致活性氧(ROS)过量积累的状态,与SA密切相关^[10]。近期研究表明,氧化应激损伤对妊娠的损害显著,滋养层细胞损伤参与SA的发生发展,并在其中扮演重要角色^[11]。滋养层细胞抗氧化损伤的能力与胎盘组织的生理结构及功能密切相关,是防治SA的关键机制之一。叉头框蛋白O3(FoxO3)作为细胞内重要的转录因子,当细胞遭遇氧化损伤时,其去磷酸化转入核内,与抗氧化反应元件(ARE)结合启动一系列下游靶基因的转录程序^[12]。

课题组前期经体内实验证实了TSPSP对SA的治疗效果,其间Kelch样ECH关联蛋白1(KEAP1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)抗氧化通路被激活^[8]。在此基础上,本研究通过临床数据库对SA进行基因差异分析,并与氧化应激相关联,再运用网络药理学方法进一步分析,随后采用过氧化氢(H₂O₂)诱导滋养层细胞建立氧化应激损伤模型,分析细胞氧化应激损伤表型及分子变化,验证TSPSP是否通过调控KEAP1/Nrf2/FoxO3信号通路,抑制滋养层细胞氧化应激损伤,旨在为阐释该方防治SA的作用机制提供更多实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF级SD大鼠20只,8~9周龄,体质量200~240 g,购自上海斯莱克动物公司,合格证号SCXK(沪)2022-0004,饲养于福建中医药大学SPF级动物中心实验室,条件为温度24~26℃,湿度40%~60%。人绒毛膜滋养层细胞HTR-8/Svneo购自上海科学院细胞库,批号SCSP-5203。

1.2 伦理 实验符合福建中医药大学动物伦理学要求,伦理编号2023184。

1.3 药物与试剂 人参(吉林,批号230701)、黄芪(甘肃,批号231002)、白术(安徽,批号240102)、炙甘草(内蒙古,批号240401)、当归(甘肃,批号230801)、川芎(四川,批号231201)、白芍(安徽,批号240201)、熟地黄(河南,批号A231204)、续断(四川,批号2312010112)、黄芩(河南,批号240123)、砂仁(广东,批号231010)采购于福建省第三人民医院中药房,糯米(吉林,批号20240505)购自福建永辉超市有限公司,均经福建省第三人民医院罗清华副主任药师鉴定为正品;H₂O₂(南京化学试剂股份有限公司,货号C04045200);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号C0038);MDA、Fe²⁺酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,货号分别为JL48593、JL48596);GSH检测试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,货号CEA294Ge-48T);ROS荧光测定试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号E-BC-K138-F);KEAP1小鼠单克隆抗体、Nrf2兔单克隆抗体、FoxO3小鼠单克隆抗体、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)小鼠单克隆抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、多克隆重组辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗、多克隆重组HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为60027-1-Ig、80593-1-RR-100ul、67763-1-Ig、66428-1-Ig、66009-1-Ig、RGAM001、RGAR001);SOD兔单克隆抗体(美国ImmunoWay Biotechnology公司,批号PT0113R);TRIzol试剂(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,货号15596026);2×Universal Blue SYBR Green实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix、Synthesis Super Mix for Real-time PCR (One-StepgDNARemover)(武汉思科捷科技有限公司,货号0305-C)。

1.4 仪器 ChemiDoc XRS+型化学发光成像仪、CFX96 Opus型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);Infinite 200 Pro型酶标仪(瑞士Tecan公司);A00-1-1102型流式细胞仪(美国Beckman公司);IX73型倒置显微镜(日本Olympus公司);Countess™型细胞分析仪(美国Life Technologies公司);PowerPac Basic型电泳仪(德国GFL公司);PowerPac Basic型转膜仪(中国亚光医用公司);Universal Hood II型化学发光成像仪(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 TSPSP含药血清的制备 TSPSP组方出自《古今医统大全》，由人参3 g、黄芪3 g、白术1.5 g、炙甘草1.5 g、当归3 g、川芎2 g、白芍2 g、熟地黄2 g、续断3 g、糯米3 g、黄芩3 g、砂仁1.5 g组成^[13]。浸泡、大火煮沸后，文火煮25 min，加入捣碎的砂仁再煮5 min，重复煎煮2次，合并2次药液并过滤，水浴蒸发，浓缩为含生药量 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的TSPSP水煎液， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。SD大鼠进行7 d适应性喂养后，随机数字法将其均匀分为空白组、TSPSP含药血清组，每组10只。根据单位体质量的剂量换算，大鼠的等效剂量相当于成年人(60 kg)的6.3倍，计算得大鼠灌胃量约为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。TSPSP含药血清组大鼠药液灌胃，空白组灌服等体积的生理盐水，均连续给药7 d。末次给药1 h后将大鼠用3%戊巴比妥钠($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔麻醉，经腹主动脉采血，于室温静置3 h， $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径10 cm，下同)，收集血清。将血清于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 min，灭活补体， $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌膜过滤除菌， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。后续实验过程中，为保持各反应体系中血清的终体积分数为10%，使用基础培养基和胎牛血清(FBS)将大鼠血清依次稀释，分别配制为含2.5%、5%和10%血清的完全培养基。

2.2 生物信息学研究

2.2.1 氧化应激通路的生物信息学挖掘 本研究自美国国家生物技术信息中心基因表达综合数据库(NCBI GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索微阵列数据，检索关键词为("recurrent spontaneous abortion" OR "recurrent pregnancy loss" OR "unexplained recurrent spontaneous abortion")和("endometrium" AND "Homo sapiens")，并依据物种为智人、实验类型为表达谱芯片及样本来源于母胎界面滋养层细胞等标准，筛选得到GSE76862与GSE22490 2个数据集。采用GEOquery包获取表达矩阵及相关注释文件，以avereps函数合并同一基因的多探针表达值，利用limma包进行归一化处理，并运用sva包的ComBat函数校正批次效应。进一步从MSigDB(v7.5)获取基因集，筛选出氧化应激相关通路，通过基因集变异分析(GSVA)软件包(v1.42.0)估计各样本通路活性绘制热图。针对目标基因(KEAP1、Nrf2、FoxO3)，系统识别其所属通路，并基于样本表达数据绘制小提琴图，采用Wilcoxon检验评估表达差异。最后，基于GSVA评分，应用limma包分析SA组与健康对照组间通路活

性差异，以 $|t|$ 值 >2 为显著性阈值，并通过双向条形图展示差异通路及其活性变化方向。

2.2.2 网络药理学研究 将TSPSP中的成分通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>)检索[口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18]的活性成分；通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)在“Chemical Structure”模块中提取各成分的Canonical SMILES。输入TargetNet数据库(<http://targetnet.scbdd.com/>)，设定预测概率 ≥ 0.9 ，筛选得到潜在作用靶点；以“spontaneous abortion”为关键词在GeneCards(<https://www.genecards.org/>) (Relevance score ≥ 10)和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)检索并合并去重，获得疾病相关靶点；利用Venny 2.1在线工具(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)取交集获得潜在作用靶点。将交集靶点导入基因/蛋白质相互作用检索工具数据库(STRING, <https://string-db.org/>) (confidence ≥ 0.9)构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络，Cytoscape 3.9.1结合CytoHubba插件依据度值、介数中心性和紧密度中心性筛选核心靶点。采用R语言clusterProfiler等包进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析($P<0.05$)，选取前10条GO条目及前15条KEGG通路，重点聚焦FoxO信号通路，并在Cytoscape中构建“中药-成分-靶点-疾病”网络以可视化TSPSP干预SA的多成分-多靶点机制。

2.3 细胞培养 人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/SVneo)细胞株培养于1640完全培养基培养[含10% FBS, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素]，置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养，2~3 d进行1次传代。使用对数生长期的细胞进行后续实验。

2.4 CCK-8法检测各组HTR-8/SVneo细胞活力影响 将生长状态良好的HTR-8/SVneo以 10^6 个/mL接种于96孔板中，分为空白组，模型组，TSPSP低、中、高剂量组(2.5%、5%、10%)，Nrf2抑制剂组(ML385 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。除空白组外，其余各组加入 H_2O_2 $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，干预3 h，进行造模。造模后空白组和模型组使用空白培养基培养24 h；TSPSP组加入不同体积分数(2.5%、5%、10%)的含药培养基，Nrf2抑制剂(ML385)组加入10%的含药培养基后，另加入 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ML385，培养24 h。随后，弃去原有培养基，每孔加入CCK-8试剂10 μL 和基础培养基90 μL 培养1~2 h，使用酶标仪检测各孔在450 nm

波长下吸光度 A , 计算细胞活力。细胞活力 = (实验组 A - 调零孔 A) / (空白组 A - 调零孔 A) $\times 100\%$ 。

2.5 细胞划痕实验检测 HTR-8/SVneo 细胞迁移能力 将对数生长期的 HTR-8/SVneo 细胞以每孔约 7×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板中, 细胞生长至融合率 90% 以上时, 使用无菌 200 μL 移液枪头在细胞表面力道均匀、垂直地划一道直线。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 小心冲洗脱落的细胞。各细胞分组及给药处理同 2.4 项, 分别在 0 h 和 24 h 置于倒置显微镜下拍照并记录每组划痕宽度, 用 Image J 软件计算迁移率, 迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

2.6 生化法检测细胞中 Fe^{2+} 、MDA 和上清液中 GSH 表达 细胞按照 2.4 项方法分组、造模给药后, $1\,200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 分别收集细胞和上清液, 根据 Fe^{2+} 、MDA、GSH 试剂盒说明书检测 Fe^{2+} 、MDA、GSH。

2.7 荧光染色法 (DCFH-DA) 标记检测细胞 ROS 水平 根据 2.4 项分组进行细胞培养后, PBS 洗涤细胞 2 次, 弃 PBS, 加入 DCFH-DA ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min; PBS 洗涤细胞 2 次, 于 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长下采用荧光显微镜观察各组细胞荧光强度, 并拍照, 采用 Image J 软件分析各组细胞相对荧光强度。

2.8 免疫荧光 (IF) 检测细胞中 KEAP1、Nrf2、FoxO3 的表达水平 按照 2.4 项分组处理细胞后, PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.05% Triton 100 通透 20 min, PBS 清洗 3 次, 加入 5% 牛血清白蛋白于室温下封闭 60 min, 加入一抗 KEAP1 (1:400)、Nrf2 (1:400)、FoxO3 (1:300), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。PBS 清洗 3 次后, 加入山羊抗鼠 Fluorescein 和山羊抗兔 Rhodamine $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 1.5 h, PBS 清洗 3 次, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 复染核 10 min, 于荧光显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件分析荧光强度。

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞中 KEAP1、Nrf2、FoxO3、GPX4、SOD 蛋白水平 细胞分组及给药处理同 2.4 项, 放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液提取细胞总蛋白, 蛋白定量法 (BCA) 检测蛋白质浓度。制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶、上样后进行电泳、转膜及封闭, TBST 洗膜。加入一抗 (1:1 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育摇床过夜。二抗孵育 (1:10 000), 洗膜后使用增强化学发光法 (ECL) 发光液以待显像, 采用 Image J 软件计算蛋白条带灰度值。

2.10 Real-time PCR 检测细胞中 KEAP1、Nrf2、FoxO3 mRNA 表达 细胞分组及给药处理同 2.4 项, 按照 TRIzol 试剂说明书提取细胞总 RNA, 测定总 RNA 纯度及浓度, 并将 RNA 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 反应。PCR 反应体系 20 μL : 含 MIX 10 μL 、cDNA 1 μL 、无菌无酶水 8.2 μL 、上下游引物各 0.4 μL 。95 $^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 延伸 40 个循环。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析各基因在细胞内的相对表达水平。引物由尚亚生物科技技术公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 GAGCACAGAGCCTCGCCTTT	177
	下游 TCATCATCCATGGTGAGCTGG	
KEAP1	上游 GCTCAACCGCTTGCTGTATG	104
	下游 TAATCATCCGCCACTCATTCCT	
Nrf2	上游 CGATTAGAGGCTCATCTCACAA	191
	下游 GTTGAATTGCTCCTTGACATC	
FoxO3	上游 CGGACAAACGGCTCACTCT	155
	下游 GGACCCGCATGAATCGACTAT	

2.11 统计学分析 本次实验采用 SPSS 27.0 分析, 计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先对数据进行正态性检验及方差齐性检验, 若均符合要求, 则采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 并进行多重比较。若不满足正态性检验及方差分析, 则采用非参数秩和检验比较总的差异及组间比较。

3 结果

3.1 生物信息学验证

3.1.1 SA 滋养层细胞中氧化应激相关通路的 GSVA 富集分析 基于 GSE76862 和 GSE22490 数据集, 本研究共纳入 9 例健康对照来源的滋养层细胞样本与 7 例 SA 患者来源的滋养层细胞样本, 在对基因芯片数据进行校正及归一化处理后, 从 MSigDB 的 C2 数据集中匹配到 41 条与氧化应激相关的通路 (见增强出版附加材料)。进一步分析显示, 目标基因 KEAP1、Nrf2 与 FoxO3 在样本组间呈现表达变化; GSVA 富集分析识别出 41 条关键通路中有 9 条在组间具有显著差异, 包括 5 条在 SA 组中表达上调通路和 4 条下调通路。其中 3 条通路包含目的基因 ($t > 2, P < 0.05$), 差异最为显著的上调通路为 “BUYTAERT_PHATODYNAMIC_THERAPY_

STRESS_UP”($t>3, P<0.01$),该通路涵盖了本研究重点关注的2个基因——Nrf2(由Nrf2编码)与FoxO3,提示其在SA氧化应激机制中可能发挥重要作用(见增强出版附加材料)。

3.1.2 TSPSP网络药理学研究 网络药理学分析共获得TSPSP活性成分预测靶点246个、SA相关靶点2 804个,经Venny 2.1取交集后保留154个潜在作用靶点。使用Cytoscape构建“药物-疾病-靶点”网络。将交集靶点导入STRING(confidence ≥ 0.9)后,利用Cytoscape拓扑分析(按STRING数据库中的degree排序)共筛选出98个节点,包括KEAP1、Nrf2、STAT1、TP53等。GO富集结果显示,交集靶点在外源性刺激应答、氧化应激应答等生物过程,膜筏、质膜外侧等细胞组分,以及DNA结合型转录因子结合、激酶调节活性等分子功能条目上呈现富集。KEGG通路分析中,FoxO信号通路、MAPK信号通路及脂质与动脉粥样硬化等182个条目被显著富集,其中FoxO通路内多数核心靶点的表达趋势以上调为主。见增强出版附加材料。

3.2 TSPSP含药血清对滋养层细胞活力的影响 与空白组比较,模型组滋养层细胞活力显著降低($P<0.01$);与模型组比较,给药干预后TSPSP各剂量组滋养层细胞活力均显著升高($P<0.01$);与TSPSP高剂量组比较,ML385组滋养层细胞活力显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。TSPSP可使H₂O₂诱导的滋养层氧化损伤细胞的细胞活力上升。见表2。

表2 TSPSP含药血清对滋养层细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 Effect of TSPSP-contained serum on viability of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	体积分数/%	细胞存活率/%
空白组		100.00 $\pm$ 0.03
模型组		65.31 $\pm$ 0.05 ¹⁾
TSPSP低剂量组	2.5	81.05 $\pm$ 0.02 ²⁾
TSPSP中剂量组	5	81.08 $\pm$ 0.03 ²⁾
TSPSP高剂量组	10	88.75 $\pm$ 0.05 ²⁾
ML385组		74.53 $\pm$ 0.04 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与TSPSP高剂量组比较³⁾ $P<0.01$

3.3 TSPSP含药血清对滋养层细胞迁移率的影响 与空白组比较,模型组滋养层细胞迁移率显著降低($P<0.01$);与模型组比较,给药干预后TSPSP各剂量组滋养层细胞迁移率均显著升高($P<0.01$);与TSPSP高剂量组比较,ML385组滋养层细胞迁移率

显著降低($P<0.01$)。TSPSP可显著改善H₂O₂造模引起的滋养层细胞迁移率降低。见表3及增强出版附加材料。

表3 TSPSP含药血清对滋养层细胞迁移率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of TSPSP-contained serum on migration rate of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	细胞迁移率/%
空白组		76.14 $\pm$ 0.71
模型组		28.75 $\pm$ 1.87 ¹⁾
TSPSP低剂量组	2.5	43.82 $\pm$ 0.17 ²⁾
TSPSP中剂量组	5	53.30 $\pm$ 1.46 ²⁾
TSPSP高剂量组	10	63.17 $\pm$ 2.84 ²⁾
ML385组		46.75 $\pm$ 2.46 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与TSPSP高剂量组比较³⁾ $P<0.01$

3.4 TSPSP含药血清对滋养层细胞氧化应激损伤相关指标的影响 与空白组比较,模型组滋养层细胞Fe²⁺、MDA显著升高($P<0.01$),上清液中GSH显著下降($P<0.01$);与模型组比较,给药干预后TSPSP各剂量组滋养层细胞Fe²⁺、MDA均明显下降($P<0.05, P<0.01$),GSH显著升高($P<0.01$);与TSPSP高剂量组比较,ML385组滋养层细胞Fe²⁺、MDA明显增高($P<0.05$),GSH明显下降($P<0.05$)。TSPSP可显著改善H₂O₂诱导的滋养层细胞氧化应激损伤。见表4。

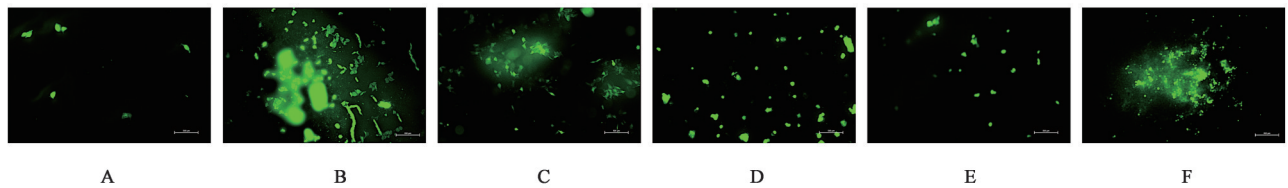
表4 TSPSP含药血清对滋养层细胞氧化应激损伤相关指标的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of TSPSP-contained serum on oxidative stress injury-related indicators of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Fe ²⁺ /nmol $\cdot$ 10 ⁻⁶	MDA /nmol $\cdot$ 10 ⁻⁴	GSH /mg $\cdot$ L ⁻¹
空白组		0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	21.18 $\pm$ 0.71
模型组		0.25 $\pm$ 0.02 ¹⁾	0.25 $\pm$ 0.03 ¹⁾	10.91 $\pm$ 1.73 ¹⁾
TSPSP低剂量组	2.5	0.19 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.16 $\pm$ 0.03 ²⁾	14.98 $\pm$ 1.52 ³⁾
TSPSP中剂量组	5	0.19 $\pm$ 0.03 ²⁾	0.11 $\pm$ 0.04 ³⁾	17.64 $\pm$ 2.01 ³⁾
TSPSP高剂量组	10	0.14 $\pm$ 0.03 ³⁾	0.11 $\pm$ 0.03 ³⁾	18.45 $\pm$ 1.85 ³⁾
ML385组		0.18 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.19 $\pm$ 0.11 ⁴⁾	16.94 $\pm$ 1.23 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05, ^3)P<0.01$;与TSPSP高剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$

3.5 TSPSP含药血清对滋养层细胞ROS的影响 与空白组比较,模型组细胞ROS表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,给药干预后TSPSP各剂量组细胞ROS表达量均显著降低($P<0.01$);与TSPSP高剂量组比较,ML385组细胞ROS表达量显

著升高($P<0.01$)。TSPSP可显著抑制模型组滋养层细胞的ROS的产生。见图1、表5。



注：A.空白组；B.模型组；C.TSPSP低剂量组；D.TSPSP中剂量组；E.TSPSP高剂量组；F.ML385组(图2-图4同)
图1 TSPSP含药血清对滋养层细胞ROS的影响(DCFH-DA,×100)

Fig. 1 Effect of TSPSP-contained serum on ROS levels in HTR-8/SVneo cells (DCFH-DA,×100)

表5 TSPSP含药血清对滋养层细胞ROS的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of TSPSP-contained serum on ROS of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	ROS表达量
空白组		27.14±1.68
模型组		145.89±6.79 ¹⁾
TSPSP低剂量组	2.5	98.97±7.30 ²⁾
TSPSP中剂量组	5	76.04±6.06 ²⁾
TSPSP高剂量组	10	47.56±2.89 ²⁾
ML385组		108.72±5.95 ³⁾

注：与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较²⁾ $P<0.01$ ；与TSPSP高剂量组比较³⁾ $P<0.01$

3.6 TSPSP含药血清对滋养层细胞KEAP1/Nrf2/FoxO3蛋白的影响 通过IF检测KEAP1、Nrf2、

FoxO3蛋白的表达情况,结果显示,与空白组比较,模型组中Nrf2表达量显著降低($P<0.01$),KEAP1、FoxO3表达量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,TSPSP低、中、高剂量组中Nrf2表达量显著增高,差异具有统计学意义($P<0.01$),KEAP1、FoxO3表达量均显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);与TSPSP低剂量组比较,中、高剂量组中Nrf2表达量明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),KEAP1、FoxO3表达量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);与TSPSP高剂量组比较,ML385组中Nrf2表达量显著降低($P<0.01$),KEAP1、FoxO3表达量显著增高($P<0.01$)。见图2、图3、表6。

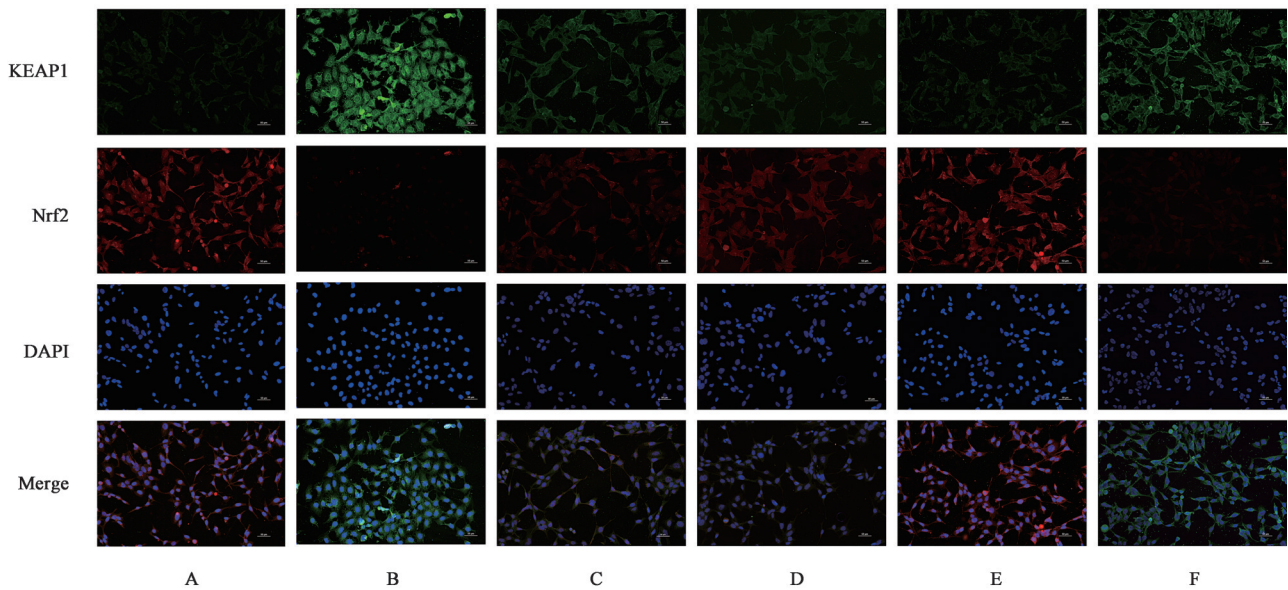


图2 TSPSP含药血清对滋养层细胞KEAP1、Nrf2表达的影响(DAPI染核,×200)

Fig. 2 Effect of TSPSP-contained serum on expression of KEAP1 and Nrf2 in HTR-8/SVneo cells (DAPI nuclear staining,×200)

3.7 TSPSP含药血清对滋养层细胞氧化应激损伤相关蛋白表达的影响 通过Western blot检测KEAP1、Nrf2、FoxO3、SOD、GPX4蛋白的表达情况,结果显示,与空白组比较,模型组中Nrf2、SOD、GPX4表达量均显著降低($P<0.01$),KEAP1、FoxO3

表达量显著增高($P<0.01$);与模型组比较,TSPSP低、中、高剂量组中Nrf2、SOD、GPX4表达量均显著增高($P<0.01$),KEAP1、FoxO3表达量显著降低($P<0.01$);与TSPSP低剂量组比较,TSPSP中、高剂量组中Nrf2、SOD、GPX4表达量均明显增高($P<0.05, P<$

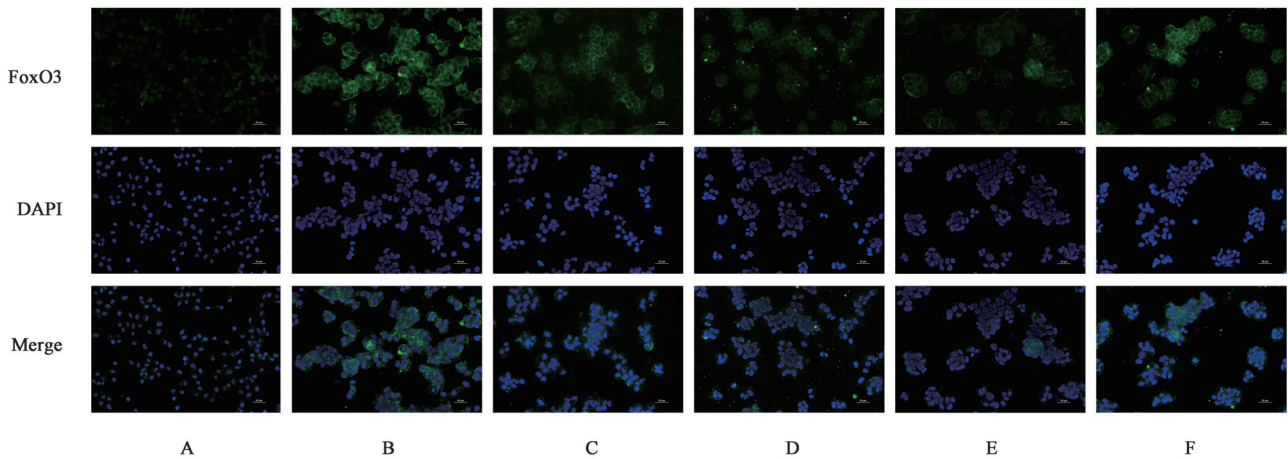


图3 TSPSP含药血清对滋养层细胞FoxO3表达的影响(DAPI染核,×200)

Fig. 3 Effect of TSPSP-contained serum on expression of FoxO3 in HTR-8/SVneo cells (DAPI nuclear staining, ×200)

表6 TSPSP含药血清对滋养层细胞氧化应激损伤相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of TSPSP-contained serum on oxidative stress injury-related proteins expression of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	KEAP1	Nrf2	FoxO3
空白组		38.99±0.03	117.92±0.62	19.66±0.44
模型组		121.32±1.00 ¹⁾	36.24±0.29 ¹⁾	70.56±1.15 ¹⁾
TSPSP低剂量组	2.5	55.01±0.88 ²⁾	50.86±1.42 ²⁾	52.41±1.88 ²⁾
TSPSP中剂量组	5	48.24±0.79 ^{2,3)}	61.00±0.83 ^{2,3)}	34.82±0.67 ^{2,3)}
TSPSP高剂量组	10	43.85±0.35 ^{2,4)}	105.22±0.66 ^{2,4)}	35.97±0.33 ^{2,4)}
ML385组		108.85±0.85 ⁵⁾	40.69±1.21 ⁵⁾	57.44±0.95 ⁵⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与TSPSP低剂量组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与TSPSP高剂量组比较⁵⁾ $P<0.01$ (表7同)

0.01), KEAP1、FoxO3 表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$); 与 TSPSP 高剂量组比较, ML385 组中 Nrf2、SOD、GPX4 表达量显著降低($P<0.01$), KEAP1、FoxO3 表达量显著增高($P<0.01$)。见表7、图4。

表7 TSPSP含药血清对滋养层细胞氧化应激损伤相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of TSPSP-contained serum on oxidative stress injury-related proteins expression of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	KEAP1/ β -actin	Nrf2/ β -actin	FoxO3/ β -actin	GPX4/ β -actin	SOD/ β -actin
空白组		0.37±0.01	1.65±0.03	0.75±0.03	0.67±0.02	0.34±0.03
模型组		0.74±0.03 ¹⁾	0.91±0.02 ¹⁾	1.44±0.03 ¹⁾	0.27±0.01 ¹⁾	0.15±0.03 ¹⁾
TSPSP低剂量组	2.5	0.53±0.02 ²⁾	1.11±0.04 ²⁾	1.17±0.05 ²⁾	0.38±0.02 ²⁾	0.19±0.02 ²⁾
TSPSP中剂量组	5	0.46±0.02 ^{2,3)}	1.22±0.05 ^{2,3)}	1.04±0.04 ^{2,3)}	0.44±0.03 ^{2,3)}	0.23±0.00 ^{2,3)}
TSPSP高剂量组	10	0.41±0.02 ^{2,4)}	1.40±0.05 ^{2,4)}	0.85±0.02 ^{2,4)}	0.57±0.02 ^{2,4)}	0.29±0.01 ^{2,4)}
ML385组		0.58±0.02 ⁵⁾	0.82±0.02 ⁵⁾	1.25±0.04 ⁵⁾	0.35±0.03 ⁵⁾	0.15±0.02 ⁵⁾

3.8 TSPSP含药血清对滋养层细胞KEAP1/Nrf2/FoxO3通路mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组细胞Nrf2 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$), KEAP1、FoxO3 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, TSPSP低、中、高剂量组给药后细胞的Nrf2 mRNA表达水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$), KEAP1及FoxO3 mRNA表达水平明显下降($P<0.05, P<0.01$); 与TSPSP低剂量组比较,

TSPSP中、高剂量组中Nrf2 mRNA相对表达量明显增高($P<0.05, P<0.01$), KEAP1及FoxO3 mRNA相对表达量明显降低($P<0.05, P<0.01$); 与TSPSP高剂量组比较, ML385组中Nrf2 mRNA相对表达量显著降低($P<0.01$), KEAP1、FoxO3 mRNA相对表达量明显增高($P<0.05, P<0.01$)。见表8。

4 讨论

SA的临床发病率在育龄夫妇中占5%~15%,且

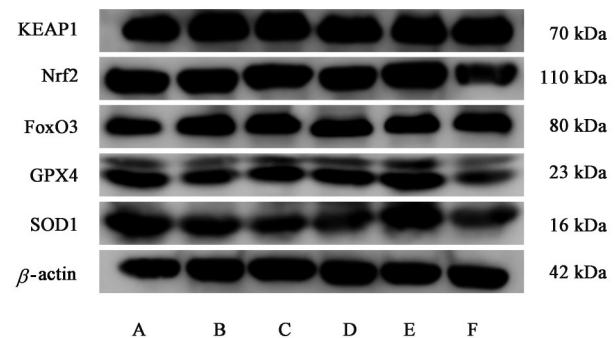


图4 各组滋养层细胞 KEAP1、Nrf2、FoxO3、GPX4、SOD 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of KEAP1, Nrf2, FoxO3, GPX4, and SOD protein expression in HTR-8/SVneo of each group

表8 TSPSP 含药血清对滋养层细胞氧化应激损伤相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of TSPSP-contained serum on oxidative stress injury-related mRNA expression of HTR-8/SVneo cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	KEAP1	Nrf2	FoxO3
空白组		1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.02
模型组		1.96±0.05 ¹⁾	0.34±0.01 ¹⁾	1.46±0.04 ¹⁾
TSPSP 低剂量组	2.5	1.41±0.04 ³⁾	0.44±0.02 ²⁾	1.30±0.05 ²⁾
TSPSP 中剂量组	5	1.18±0.13 ^{3,5)}	0.57±0.01 ^{3,5)}	1.12±0.07 ^{3,5)}
TSPSP 高剂量组	10	1.15±0.09 ^{3,5)}	0.84±0.02 ^{3,5)}	1.14±0.10 ^{3,4)}
ML385 组		1.76±0.05 ⁷⁾	0.45±0.02 ⁷⁾	1.29±0.10 ⁶⁾

注：与空白组比较 ¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ ；与 TSPSP 低剂量组比较 ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$ ；与 TSPSP 高剂量组比较 ⁶⁾ $P<0.05$, ⁷⁾ $P<0.01$

有逐年上升的趋势,其中在妊娠 12 周以前的流产被称为早期流产^[14]。SA 临床症状包括妊娠过程中妊娠终止、胚胎丢失,在中医中属“滑胎”“堕胎”“小产”的范畴,是我国中医治疗的优势病种。

中医理论强调“肾主生殖,脾为气血生化之源”。脾肾两虚可致气血亏虚,胞宫失于濡养,进而引发胚胎发育不良;脾虚运化不力,则水湿内停、聚痰阻胞,进一步妨碍胚胎正常生长。TSPSP 出自《古今医统大全》,为补肾健脾、益气养血之经典方。全方以人参、黄芪、白术、炙甘草健脾益气;熟地黄、当归、川芎、白芍滋阴养血;续断、黄芩、砂仁、糯米安胎和胃,共奏补脾肾、益气血、固冲任而安胎之效^[15]。现代药理学研究证实,方中活性成分人参皂苷 Rg₁、黄芪甲苷、黄芩苷、芍药苷等具有协同抗氧化作用,可有效清除自由基、增强细胞抗氧化防御能力,从而保护胚胎发育^[16-18]。临床实践表明,TSPSP 可通过多靶点调控,改善脾肾功能、纠正气

血不足、减轻氧化应激损伤,对防治 SA 具有显著疗效,尤其在改善母胎界面耐受性、促进胚胎稳固发育方面有重要应用价值^[19]。先前的研究已经发现,KEAP1/Nrf2 介导的抗氧化通路与 SA 密切相关,有动物实验证实,TSPSP 能上调流产大鼠蜕膜组织中 Nrf2 及其下游因子的表达^[6],并减轻胎盘组织氧化应激,减少胚胎吸收率^[8],但具体在细胞的调控机制尚不明确。

本研究基于 GEO 芯片数据,分析健康对照与 SA 患者滋养层细胞的差异表达基因,揭示疾病状态下的转录组变化。结果观察到健康和疾病组中 KEAP1、Nrf2 与 FoxO3 基因表达存在变化,虽因样本量所限,差异未达显著,但仍提示了其潜在的生物学作用,并且这些基因表达的变化得到本实验的证实。GSVA 富集分析进一步发现,Nrf2 与 FoxO3 参与的氧化应激通路在 SA 组中显著上调,提示二者可能在滋养层细胞氧化应激调控中作为关键转录因子发挥作用。同时发现 TSPSP 通过多成分、多靶点特性与 KEAP1、Nrf2、FoxO3 等关键因子密切相关。PPI 网络中,KEAP1 与 Nrf2 的 degree 值显著居前,提示其在靶点网络中处于核心地位;FoxO3 亦被纳入交集靶点,并在通路中显著上调。GO 与 KEGG 富集分析表明,TSPSP 潜在靶点显著集中于“应答氧化应激”及 FoxO 信号通路。综合提示,TSPSP 可能通过调控 KEAP1/Nrf2 轴及 FoxO3 节点,参与滋养层细胞氧化应激过程,从而干预 SA,但具体机制有待实验进一步验证。

在体外试验中,本研究首次发现 TSPSP 含药血清可逆转 H₂O₂ 诱导的滋养层细胞氧化应激损伤。氧化应激是细胞内氧化与抗氧化作用失衡,导致 ROS 过度积累的状态,其典型特征包括 MDA 含量升高、SOD 等抗氧化酶活性降低,可伴随 Fe²⁺ 代谢异常和脂质过氧化物蓄积,最终引起细胞膜结构损伤和功能异常^[20]。本研究中,H₂O₂ 诱导的滋养层细胞呈现典型的氧化应激状态,表现为细胞内 Fe²⁺、MDA 及 ROS 水平显著升高,GSH、GPX4 与 SOD 活性明显下降;而 TSPSP 含药血清可有效逆转上述指标,同时促进细胞增殖与迁移,表明其可能通过缓解氧化应激、恢复抗氧化防御能力,实现对滋养层细胞的保护作用。

进一步机制研究表明,该保护作用与 KEAP1/Nrf2/FoxO3 信号轴的调控密切相关。KEAP1/Nrf2 通路是细胞氧化应激应答的核心环节,静息状态下 KEAP1 介导 Nrf2 泛素化降解,应激状态下 Nrf2 核

转位激活 ARE 依赖的抗氧化基因转录; FoxO3 作为重要应激转录因子,最先在人胎盘组织中被发现,其核质穿梭与磷酸化状态调控多种抗氧化及细胞存活相关基因^[12,21-22]。有研究发现,流产患者的胎盘组织中滋养层细胞的 FoxO3 水平增高^[23],FoxO3 能通过 PI3K/Akt 信号通路抑制滋养层细胞的增殖、侵袭并促进其发生凋亡^[24]。此外,早产患者胎盘组织中 FoxO3 表达明显高于足月分娩者,表明滋养层细胞中 FoxO3 表达增加参与妊娠相关疾病的发生发展^[25]。本研究显示,TSPSP 含药血清可下调 KEAP1 和 FoxO3 表达,同时上调 Nrf2 及其下游抗氧化因子 GPX4 和 SOD 的表达;而使用 Nrf2 抑制剂后,FoxO3 与 KEAP1 表达回升,Nrf2、GPX4、SOD 表达则受到抑制,不仅证实 TSPSP 依赖 Nrf2 通路激活发挥抗氧化功能,也提示 Nrf2 可能对 FoxO3 存在负向调控作用,KEAP1/Nrf2/FoxO3 可能构成一个协同响应氧化应激的关键网络,TSPSP 则可调节该网络增强抗氧化能力,从而缓解滋养层细胞的氧化损伤。

本研究通过体外实验初步证实了 TSPSP 通过调控 KEAP1/Nrf2/FoxO3 信号通路减轻 H₂O₂ 诱导氧化应激损伤的潜在机制。但由于体内存在免疫微环境、代谢酶系统及药物动力学等多重因素,可能影响 TSPSP 在体内的药效及信号通路表达,因此结果可能与体内实验结果存在差异。后续仍需通过构建 SA 动物模型,对信号通路的表达情况进行体内验证,以进一步验证 TSPSP 的疗效与作用机制。此外,本研究虽通过加入 Nrf2 抑制剂 ML385,表明 TSPSP 可通过激活 Nrf2 信号通路,在滋养层细胞中发挥抗氧化保护作用,但 ML385 的非特异性效应及作用可逆性可能导致难以精准控制其抑制程度,同时未能排除 FoxO3 在应激状态下的协同或代偿作用。在未来的研究中,拟通过 siRNA 分别敲低 Nrf2 与 FoxO3,并在双敲背景下实施单个基因的回补,进一步解析 TSPSP 对 KEAP1/Nrf2/FoxO3 信号通路上下游因子的调控关系。

SA 发病机制复杂,越来越多的研究认为 SA 的核心与母胎界面微环境失衡有关^[26]。而该界面由滋养层细胞、蜕膜免疫细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞及基质成纤维细胞等共同构成^[27]。仅凭单一滋养层细胞实验,无法从整体上模拟母胎界面微环境,难以展现 TSPSP 对母胎界面多细胞互作网络的具体影响,因而无法全面呈现 TSPSP 在 SA 治疗中的真实效应。因此,后续研究应构建包含滋养层细

胞、蜕膜基质细胞及免疫细胞等多细胞组分的共培养体系或类器官模型,借助微流控系统构造出更具生理性的母胎界面,系统研究 KEAP1/Nrf2/FoxO3 信号通路与其他信号通路之间的交互网络,并评估 TSPSP 在母胎界面互作网络中的综合作用,以更深入揭示其防治 SA 的潜在机制。

综上所述,TSPSP 含药血清可通过调控 KEAP1/Nrf2/FoxO3 信号通路,显著抑制 H₂O₂ 诱导的滋养层细胞氧化损伤,改善细胞功能,为其进一步开发和应用提供了理论基础和实验支持。后续研究将结合动物模型,并明确复方中的有效成分,以推动该方在生殖医学领域的精准治疗应用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MU F, HE T, WANG K, et al. Knowledge, attitudes, and practices of patients with recurrent pregnancy loss toward pregnancy loss[J]. *Front Public Health*, 2024, 11: 1308842.
- [2] WANG J, LI D, GUO Z, et al. Clinical predictive value of pre-pregnancy tests for unexplained recurrent spontaneous abortion: A retrospective study[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11: 1443056.
- [3] LIU P, CHEN G, ZHAO S, et al. The alteration of uterine microbiota participated in the activation of the decidual inflammatory response in early spontaneous abortion [J]. *PLoS One*, 2025, 20(2): e0317595.
- [4] WANG D, ZHAO X R, LI Y F, et al. Quercetin promotes the proliferation, migration, and invasion of trophoblast cells by regulating the miR-149-3p/Akt1 axis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2024, 40(10): 903-915.
- [5] 陆登艳,陈苏苏,钟滨,等. TSPSP 对自然流产模型大鼠子宫蜕膜组织中 T-bet/GATA-3 的影响[J]. *福建中医药*, 2024, 55(3): 29-31, 50.
LU D Y, CHEN S S, ZHONG B, et al. Effect of Taishan Panshi powder on T-bet/GATA-3 expression signaling pathway in the uterine decidual tissue of spontaneous abortion model rats [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2024, 55(3): 29-31, 50.
- [6] 刘小倩,冉添福,林超睿,等. 基于 Keap1/Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路探讨 TSPSP 对流产大鼠子宫蜕膜的影响[J]. *福建中医药*, 2023, 54(3): 19-22, 30.
LIU X Q, RAN T F, LIN C R, et al. Effect of Taishan Panshi powder on uterine decidua of abortion rats based on Keap1/Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway [J]. *Fujian J Tradit Chin Med*, 2023, 54(3): 19-22, 30.
- [7] YAO Y, YE Y, CHEN J, et al. Maternal-fetal immunity and recurrent spontaneous abortion [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2024, 91(5): e13859.
- [8] 冉添福. 基于 Nrf2-HO-1 信号通路研究 TSPSP 对流产模型

- 大鼠胎盘组织氧化应激的调控作用[D]. 福州:福建中医药大学,2022.
- RAN T F. Regulation of Taishan Panshi powder on oxidative stress in placental tissue of abortion model rats via Nrf2-HO-1 signaling pathway [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2022.
- [9] YANG Z, MAN J, LIU H, et al. Study on the *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential mechanism of *Polygonum viviparum* L [J]. Antioxidants (Basel), 2025, 14(1):41.
- [10] CHEN X, LI J, XIANG A, et al. BMP and activin receptor membrane bound inhibitor: BAMBI has multiple roles in gene expression and diseases (Review) [J]. Exp Ther Med, 2023, 27(1):28.
- [11] GUO S, PAN Q, CHEN B, et al. Placental trophoblast aging in advanced maternal age is related to increased oxidative damage and decreased YAP [J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13:1479960.
- [12] WEI P, ZHANG X, YAN C, et al. Mitochondrial dysfunction and aging: Multidimensional mechanisms and therapeutic strategies [J]. Biogerontology, 2025, 26(4):142.
- [13] 李冀. 方剂学 [M]. 4版. 北京:中国中医药出版社, 2016:255.
- LI J. Formulas of Traditional Chinese Medicine [M]. 4th ed. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2016:255.
- [14] ZHAO L, LIU L, YANG H. The relationship between thyroid autoantibodies and X chromosome monosomy in the chorionic tissue of patients with missed miscarriage [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2024, 22(1):70.
- [15] 赵小茜, 孙晶, 陈莹. 基于预培其损理论探究 TSPSP 治疗不明原因复发性流产的临床疗效 [J]. 中西医结合慢性病学杂志, 2025, 2(1):63-68.
- ZHAO X Q, SUN J, CHEN Y. Observation on clinical effect of Taishan Panshi powder on unexplained recurrent spontaneous abortion by the preventive treatment of insufficiency [J]. J Integr Tradit Chin West Med Chronic Dis, 2025, 2(1):63-68.
- [16] 周宜灿, 陈晓春, 朱元贵, 等. 人参皂苷 Rg₁ 可能通过抗氧化作用来保护帕金森病鼠黑质神经元 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(3):273-277.
- ZHOU Y C, CHEN X C, ZHU Y G, et al. Down-regulation of oxidative stress is the possible mechanism of ginsenoside Rg₁ protecting the substantia nigra neurons in PD mice [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2003, 8(3):273-277.
- [17] 杨诗钰. Nrf2 在黄芩苷抗氧化作用中的调控机制探析 [J]. 生物化工, 2020, 6(6):126-129, 145.
- YANG S Y. An analysis of the regulatory mechanism of Nrf2 in Baicalin's antioxidant action [J]. Biol Chem Eng, 2020, 6(6):126-129, 145.
- [18] 潘晴, 蔡诗敏, 胡清睿, 等. 黄芪甲苷通过抑制氧化应激和铁死亡促糖尿病大鼠皮肤溃疡愈合 [J]. 吉林中医药, 2025, 45(7):830-835.
- PAN Q, CAI S M, HU Q R, et al. Astragaloside IV inhibiting oxidative stress and suppressing ferroptosis to promot skin ulcer healing in diabetic rats [J]. Jilin J Chin Med, 2025, 45(7):830-835.
- [19] 张萌萌. TSPSP 加减对脾肾两虚型复发性流产患者孕前干预的临床疗效观察 [D]. 郑州:河南中医药大学, 2023.
- ZHANG M M. Clinical efficacy of preconception intervention in patients with recurrent spontaneous abortion with spleen and kidney deficiency [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2023.
- [20] YUKSEL M B, KAVAK S, GECIT I, et al. Short-term levosimendan treatment protects rat testes against oxidative stress [J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(8):716-720.
- [21] YAMAMOTO M, KENSLER T W, MOTOHASHI H. The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis [J]. Physiol Rev, 2018, 98(3):1169-1203.
- [22] GARUFI A, GIORNO E, GILARDINI MONTANI M S, et al. P62/SQSTM1/Keap1/NRF2 axis reduces cancer cells death-sensitivity in response to Zn (II) -curcumin complex [J]. Biomolecules, 2021, 11(3):348.
- [23] 黄晨曦. 缺氧条件下 HIF-1 α 调节 FoxO3a 影响滋养细胞侵袭和凋亡能力的研究 [D]. 郑州:郑州大学, 2020.
- HUANG C X. HIF-1 α affects the trophoblastic invasion and apoptosis by regulating FoxO3a under hypoxia conditions [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2020.
- [24] 张孝丽, 车立群, 吴红敬, 等. FoxO3a 通过 PI3K/Akt 信号通路介导炎症因子 TNF- α 抑制滋养细胞的增殖、侵袭及促进细胞发生凋亡 [J]. 免疫学杂志, 2020, 36(6):482-489.
- ZHANG X L, CHE L Q, WU H J, et al. FoxO3a mediates inflammatory factor TNF- α through PI3K/Akt signaling pathway to inhibit the proliferation, invasion and apoptosis of trophoblasts [J]. Immunol J, 2020, 36(6):482-489.
- [25] OZBILGIN K, KAHRAMAN B, TURAN A, et al. The expression of Forkhead transcription factors in decidua and placenta in patients with missed abortion [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2015, 42(4):510-514.
- [26] CHEN H, CHEN Y, ZHENG Q. The regulated cell death at the maternal-fetal interface: Beneficial or detrimental? [J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1):100.
- [27] CHANG R Q, LI D J, LI M Q. The role of indoleamine-2, 3-dioxygenase in normal and pathological pregnancies [J]. Am J Reprod Immunol, 2018, 79(4):e12786.

[责任编辑 周冰冰]