

# 寿胎丸对脂多糖诱导的人绒毛外滋养细胞氧化应激及焦亡的调节作用

乔宗惠<sup>1</sup>, 申思楠<sup>2</sup>, 邓敦<sup>2</sup>, 张舒清<sup>1</sup>, 雷磊<sup>2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学中西医结合学院, 长沙 410208)

**[摘要]** 目的:探讨寿胎丸在脂多糖(LPS)诱导的人绒毛外滋养细胞(HTR-8/SVneo)损伤中的作用及其对细胞损伤中氧化应激和焦亡的调控,为寿胎丸安胎的作用机制研究提供新的方向。方法:采用LPS( $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )诱导HTR-8/SVneo细胞损伤建立细胞模型,设置空白组、模型组、寿胎丸组(10%寿胎丸含药血清)、抗氧化剂组( $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NAC)、NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)抑制剂组( $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MCC950)。分别采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒检测细胞活性情况;Hochest 33342/PI双荧光染色和流式细胞术观察细胞死亡情况;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中白细胞介素-18(IL-18)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)释放情况;DCFH-DA探针检测细胞内活性氧(ROS)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测NLRP3、胱天蛋白酶(Caspase)-1、消化道皮肤素D(GSDMD)、IL-1 $\beta$ 蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测NLRP3、Caspase-1 mRNA的表达。结果:与空白组比较,模型组细胞活力显著降低( $P<0.01$ ),细胞上清液中炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-18含量显著增加( $P<0.01$ ),氧化应激因子ROS、MDA含量升高,SOD活性显著降低( $P<0.01$ ),NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 蛋白和NLRP3、Caspase-1 mRNA表达显著上调( $P<0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、NAC组及MCC950组细胞活力显著升高( $P<0.01$ ),寿胎丸组和NAC组MDA、ROS活性降低,SOD活性显著升高( $P<0.01$ ),寿胎丸组和MCC950组细胞上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-18含量减少( $P<0.01$ ),细胞内NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 蛋白和NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  mRNA表达均明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:寿胎丸可通过抑制氧化应激和细胞焦亡减轻LPS诱导的HTR-8/SVneo细胞损伤,这可能是寿胎丸防治复发性流产,发挥安胎作用的机制之一。

**[关键词]** 寿胎丸; 细胞损伤; 氧化应激; 细胞焦亡; 复发性流产

**[中图分类号]** R2-0;R33;R259;R246.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0017-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221637

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220623.1335.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-24 10:29

## Shoutaiwan Regulate Lipopolysaccharide-induced Oxidative Stress and Pyroptosis in Human Extravillous Trophoblast Cells

QIAO Zonghui<sup>1</sup>, SHEN Sinan<sup>2</sup>, DENG Dun<sup>2</sup>, ZHANG Shuqing<sup>1</sup>, LEI Lei<sup>2\*</sup>

(1. *The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;*

*2. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the regulatory effect of Shoutaiwan on oxidative stress and pyroptosis in lipopolysaccharide (LPS)-induced human extravillous trophoblast (HTR-8/SVneo) cells and provide a new direction for deciphering the mechanism of action of Shoutaiwan. **Method:** LPS ( $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was used to induce the injury of HTR-8/SVneo cells (modeling). Five groups were designed in this study,

**[收稿日期]** 2022-03-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473714);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30493);湖南省教育厅重点科学研究项目(19A364);湖南省中医药管理局重点课题项目(2021007);湖南中医药大学校级科研基金重点项目(2020XJJ001)

**[第一作者]** 乔宗惠,在读博士,从事中医药防治生殖内分泌疾病研究,E-mail:qzh2796@163.com

**[通信作者]** \*雷磊,博士,教授,从事中西医结合防治女性内分泌疾病研究,E-mail:leilei1398@sina.com

including a blank group, a model group, a Shoutaiwan (10% Shoutaiwan-containing serum) group, an antioxidant ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NAC) group, and NOD like receptor thermoprotein domain 3 (NLRP3) inhibitor ( $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MCC950) group. Cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) kit. Hoechst 33342/PI double fluorescence staining and flow cytometry were employed to observe cell death. The levels of interleukin-18 (IL-18), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in cell supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). DCFH-DA probe was used to measure the level of intracellular reactive oxygen species (ROS). Western blot was employed to determine the protein levels of NLRP3, Caspase-1, gastermin D (GSDMD), and IL- $1\beta$  in cells, and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) to measure the mRNA levels of NLRP3 and Caspase-1 in cells. **Result:** Compared with the blank group, the modeling decreased the cell viability ( $P<0.01$ ), elevated the levels of IL- $1\beta$ , IL-18, ROS, and MDA, and weakened the activity of SOD ( $P<0.01$ ). Furthermore, it up-regulated the protein levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD, and IL- $1\beta$  and the mRNA levels of NLRP3 and Caspase-1 ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, Shoutaiwan, NAC, and MCC950 increased the cell viability ( $P<0.01$ ). Further, Shoutaiwan and NAC lowered the levels of MDA and ROS and increased the activity of SOD ( $P<0.01$ ). Shoutaiwan and MCC950 reduced the IL- $1\beta$  and IL-18 in cell supernatant ( $P<0.01$ ), and down-regulated the protein levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD, and IL- $1\beta$  and the mRNA levels of NLRP3, Caspase-1, and IL- $1\beta$  ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Shoutaiwan can regulate oxidative stress and pyroptosis to attenuate the LPS-induced damage of HTR-8/SVneo cells, which may be the mechanism of Shoutaiwan in preventing recurrent spontaneous abortion.

**[Keywords]** Shoutaiwan; cell damage; oxidative stress; pyroptosis; recurrent spontaneous abortion

复发性流产(RSA)是指与同一性伴侣,在妊娠28周之前,发生3次或以上的妊娠丢失<sup>[1]</sup>。RSA的病因复杂,目前已知有染色体、解剖、血栓前状态、免疫、内分泌以及感染等因素。但尚有40%~60%患者原因不明<sup>[2]</sup>,而这原因不明RSA患者中约有50%可能与炎症密切相关<sup>[3]</sup>。研究发现<sup>[3]</sup>RSA患者母胎界面中存在过多的NOD样受体热蛋白结构域3(NLRP3)炎症小体介导的炎症反应,降低绒毛滋养层细胞活性,导致早期胚胎植入失败。而NLRP3炎症小体可激活胱天蛋白酶-1(Caspase-1),进而切割蛋白消化道皮肤素D(GSDMD),使胞膜破裂,释放白细胞介素-18(IL-18)、白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ),导致细胞焦亡的发生。过度的细胞焦亡会扩大炎症反应,加重机体组织器官病理损伤并导致自身炎症性疾病的发生<sup>[4]</sup>。氧化应激是机体产生的不平衡状态,最近的研究强调了氧化应激在复发性流产的病理生理中的作用<sup>[5-6]</sup>。

寿胎丸出自清末名医张锡纯的《医学衷中参西录》,由菟丝子、续断、桑寄生、阿胶4味药物组成,具有补肾、固冲、安胎的功效。临床和实验研究均证实该经方具有明显的防治RSA的作用<sup>[7-9]</sup>。然而其作用机制尚不明确,临床推广受到限制。因此,本研究在课题组前期研究<sup>[9-12]</sup>基础上,以脂多糖(LPS)

诱导HTR-8/SVneo细胞损伤构建细胞模型,通过药物干预后检测氧化应激和细胞焦亡水平,探讨寿胎丸安胎机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雌性SD大鼠10只,体质量( $242.41\pm 16.62$ )g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。所有大鼠饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心,实验动物合格证号SCXK(湘)2021-0004,本实验获得湖南中医药大学伦理委员会批准,伦理审批号LL2020070104。

**1.2 药物及试剂** 寿胎丸由菟丝子6g、续断3g、桑寄生3g、阿胶3g组成,所有饮片均购于湖南中医药大学第一附属医院中药饮片药房,批号分别为20200618、20200419、20200318、20191202,药剂科主任戴冰教授对药材来源及品质进行筛选、鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》规定标准;人绒毛外滋养细胞(HTR-8/SVneo)(上海雅吉生物科技有限公司,批号C7001);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)(南京建成生物工程有限公司,批号分别为A001-3、A003-1);IL- $1\beta$ 和IL-18酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为X14032946、X15032947);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本Dojindo公司,

批号 PH632); 活性氧(ROS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 S0033S); Hoechst 33342/PI 双染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 CA1120); *N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸(NAC,上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0077); NLRP3、GSDMD 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司,批号分别为 DF7438、AF4012); Caspase-1、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin) 抗体、羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 和羊抗小鼠 IgG(美国 Proteintech 公司,批号分别为 22915-1-AP、66009-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2); IL-1 $\beta$  抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab200478); TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 B511321]。

**1.3 仪器** PW-812 型全自动酶标洗板机、MB-530 型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司); DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); SMA4000 型微量分光光度计(美国 Merinton 公司); iCycler IQ 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞损伤模型、分组** 将 HTR-8/SVneo 细胞解冻,取状态较好的对数生长期细胞,以  $6 \times 10^5$  个/mL 密度,铺种于 6 孔板,加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,放于培养箱中 12 h。次日镜下观察细胞状态,待细胞长至 80%~90%,随机分为 5 组。其中空白组,10% 空白血清;模型组,100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS+10% 空白血清;寿胎丸组,100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS+10% 寿胎丸含药血清;抗氧化剂 NAC 组,100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS+1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$  NAC; NLRP3 抑制剂 MCC950 组,100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  LPS+50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MCC950。细胞经干预后于培养箱中培养 24 h,进行下一步指标检测。细胞每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

**2.2 药物制备** 由湖南中医药大学附属第一医院药剂科制剂室,按照《医学衷中参西录》中原方比例(菟丝子-桑寄生-续断-阿胶 2:1:1:1)用量配备,采用水提醇沉法制备寿胎丸浓缩液。首先,将菟丝子、续断、桑寄生以 7 倍蒸馏水浸泡 0.5 h,水液煎煮 2 次(1.5 h/次),合并滤液,并浓缩;然后加乙醇使醇含量达 65%,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱 24 h 后,醇液滤过,滤液回收乙醇,至无醇味;再将滤液与烊化后的阿胶混合,过滤沉淀;滤液冷藏静置,待无沉淀析出后,加蒸馏水调 pH 至 6.5~7.0,调至含生药 2 g $\cdot \text{mL}^{-1}$ ;最后进行精滤、灌封、灭菌。

**2.3 寿胎丸含药血清的制备** 将 SD 大鼠分为寿胎

丸组和空白组,每组 5 只。根据前期动物实验,寿胎丸中剂量即临床等效剂量,治疗效果较理想。根据大鼠每单位体质量的药物剂量约为 6.25 倍于成人每单位体质量的剂量(按 60 kg 计算),计算寿胎丸组大鼠灌胃剂量,即为 4.2 g $\cdot \text{kg}^{-1}$ 。空白组予以等体积蒸馏水灌胃。灌胃时间为上午 8:00 和下午 8:00,连续 7 d。末次给药 1 h 后,用 0.1 g $\cdot \text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠麻醉大鼠,从腹主动脉采集血液。血液在室温下静置 2 h 后,以 3 000 r $\cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min(离心半径 5 cm,下同),吸取上清液,置入 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中灭活 30 min。经过 0.22  $\mu\text{m}$  无菌过滤器过滤后,储存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。

**2.4 Hoechst33342/PI 荧光染色检测细胞膜受损情况** 培养中的细胞经磷酸盐缓冲液(PBS)洗后弃上清。加入染色缓冲液 1 mL、Hoechst 33342 5  $\mu\text{L}$  和 PI 染色液 5  $\mu\text{L}$ 。混匀后,4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min。经 1 500 r $\cdot \text{min}^{-1}$ ,室温离心 5 min,弃上清、PBS 洗涤后,于镜下观察细胞内蓝、红色荧光情况。正常细胞镜下呈低蓝光/无红光,凋亡细胞呈高蓝光/低(无)红光,焦亡细胞呈低蓝光/高红光<sup>[13]</sup>。

**2.5 流式细胞术检测细胞内 ROS 活性** 将二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)按 1:1 000 用无血清培养液稀释后,加入于收集的细胞中重悬,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 20 min。无血清培养基洗涤 2 次,1 500 r $\cdot \text{min}^{-1}$  室温离心 5 min,弃上清,PBS 重悬,用流式细胞检测仪检测荧光强度。

**2.6 ELISA 检测血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18、SOD、MDA 含量** 取细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明步骤检测 IL-1 $\beta$ 、IL-18、SOD、MDA 含量,用酶标仪测定 450 nm 波长的样品吸光度 *A*,根据曲线方程计算出上清液中各因子的含量。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞内 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平** 取待测的细胞,以混有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 500 r $\cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度,取等分的上清,含匹配蛋白量 50  $\mu\text{g}$ ,分离电泳、转膜、染色、剪膜、封闭、洗膜。稀释一抗(NLRP3、Caspase-1、GSDMD 为 1:1 000,IL-1 $\beta$  1:2 000, $\beta$ -actin 1:5 000)后孵育,4  $^{\circ}\text{C}$  震荡过夜。稀释二抗(1:5 000)后,37  $^{\circ}\text{C}$  下振荡 90 min。加 ECL 荧光底物显色,曝光并采集照片。使用 Image-Lab 以目的蛋白与内参蛋白  $\beta$ -actin 灰度值的比值,计算 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  相对蛋白表达量。

**2.8 Real-time PCR检测细胞内NLRP3、Caspase-1 mRNA表达** 采用TRIzol总RNA抽提试剂盒操作步骤提取RNA,提取后的RNA测 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ ,计算RNA含量。DNase I处理总RNA,行Real-time PCR,目的基因与内参基因 $\beta$ -actin分管扩增。反应条件为94℃预变性5 min,热循环94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环30次,终末延伸72℃保温10 min。以 $\beta$ -actin表达量作为内参对照,计算各目的基因相对表达量。各引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
$\beta$ -actin	上游 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	163
	下游 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3'	
NLRP3	上游 5'-AGTGGATAGGTTTGTCTGGGATA-3'	164
	下游 5'-CTGGGTGTAGCGTCTGTTGAG-3'	
Caspase-1	上游 5'-CGGGCAAGCCAGATGTTA-3'	172
	下游 5'-CGCCACCTTCTTTGTTTCAGTT-3'	

**2.9 统计学分析** 采用SPSS 26.0软件对数据进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数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。

### 3 结果

#### 3.1 对HTR-8/SVneo损伤模型细胞活力的影响

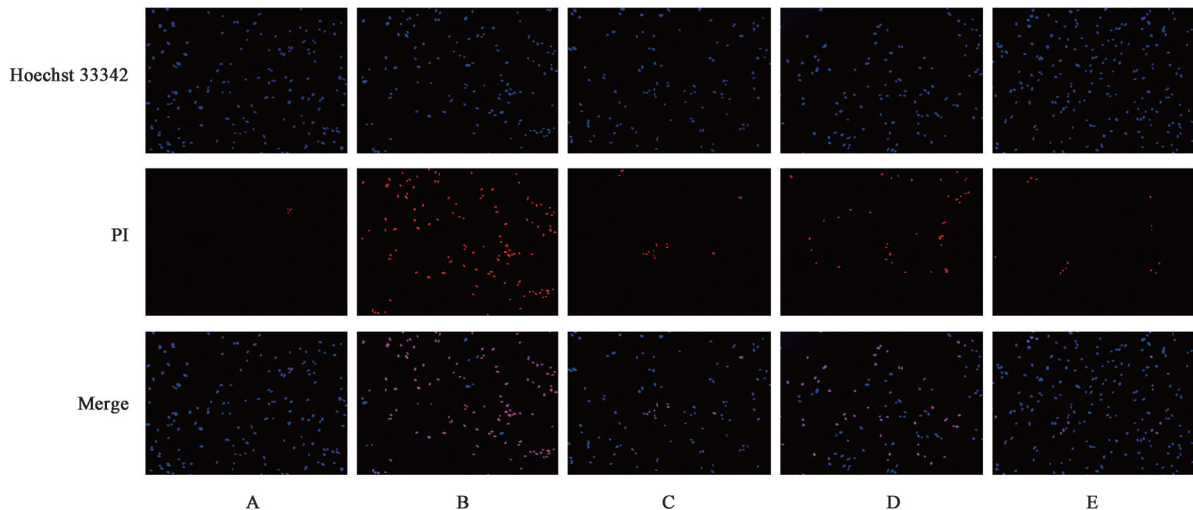
采用CCK-8试剂盒检测细胞活力,并筛选出10%寿胎丸含药血清、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAC及 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MCC950作为干预浓度。与空白组比较,模型组细胞活性显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、NAC组、MCC950组细胞活性均显著升高( $P < 0.01$ )。Hochest33342/PI荧光染色结果显示,与空白组比较,模型组细胞膜受损比例显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、NAC组、MCC950组细胞膜受损比例显著减少( $P < 0.01$ )。流式细胞术检测发现,与空白组比较,模型组PI阳性细胞数增加显著( $P < 0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、NAC组、MCC950组PI阳性细胞数明显减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表2,图1。

表2 寿胎丸对LPS诱导的HTR-8/SVneo细胞损伤模型活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Shoutaiwan on viability of LPS-induced HTR-8/SVneo cell injury model ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	A	PI/Hochest33342/%	PI阳性细胞率/%
空白组		1.00±0.00	3.06±1.22	2.63±1.17
模型组		0.49±0.05 <sup>1)</sup>	88.40±2.20 <sup>1)</sup>	33.47±3.11 <sup>1)</sup>
寿胎丸组	4.2	0.71±0.48 <sup>3)</sup>	41.44±4.48 <sup>3)</sup>	18.24±1.88 <sup>3)</sup>
NAC组	1 <sup>4)</sup>	0.62±0.06 <sup>3)</sup>	67.30±4.60 <sup>3)</sup>	27.15±2.43 <sup>2)</sup>
MCC950组	$5 \times 10^{-2}$ <sup>4)</sup>	0.69±0.08 <sup>3)</sup>	56.08±6.60 <sup>3)</sup>	22.82±2.60 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;<sup>4)</sup>表示浓度单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表3-表6同)



注:A.空白组;B.模型组;C.寿胎丸组;D.NAC组;E.MCC950组(图2同)

图1 寿胎丸对LPS诱导的HTR-8/SVneo细胞损伤模型膜通透性的影响(Hochest 33342/PI荧光染色,×100)

Fig. 1 Effect of Shoutaiwan on membrane permeability of LPS-induced HTR-8/SVneo cell injury model (Hochest 33342/PI fluorescent staining, ×100)

**3.2 对 HTR-8/SVneo 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量的影响** 与空白组比较,模型组细胞上清液中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、MCC950 组 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量均显著降低( $P<0.01$ ),而 NAC 组 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量差异无统计学意义。见表 3。

**3.3 对 HTR-8/SVneo 细胞氧化应激损伤的影响** 与空白组比较,模型组细胞内 SOD 活性降低,MDA、ROS 含量增加( $P<0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、NAC 组细胞内 SOD 活性显著增加,MDA、ROS 含量显著降低( $P<0.01$ ),而 MCC950 组 SOD、

表 3 寿胎丸对 HTR-8/SVneo 损伤细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Shoutaiwan on levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in supernatant of HTR-8/SVneo injured cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-18
空白组		23.2±4.5	47.0±4.2
模型组		47.8±4.5 <sup>1)</sup>	67.9±5.3 <sup>1)</sup>
寿胎丸组	4.2	35.1±3.3 <sup>3)</sup>	55.4±4.2 <sup>3)</sup>
NAC 组	1 <sup>4)</sup>	45.4±3.2	63.7±6.2
MCC950 组	5×10 <sup>-2</sup> <sup>4)</sup>	39.4±5.0 <sup>3)</sup>	56.8±4.6 <sup>3)</sup>

MDA、ROS 水平差异无统计学意义。见表 4。

表 4 寿胎丸对 LPS 诱导的 HTR-8/SVneo 细胞氧化应激损伤的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Shoutaiwan on LPS-induced oxidative stress injury in HTR-8/SVneo cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/ $\mu$ mol·g <sup>-1</sup>	ROS/(×10 <sup>3</sup> ) $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>
空白组		14.07±2.04	5.14±0.87	0.91±0.02
模型组		5.23±0.86 <sup>1)</sup>	10.24±0.76 <sup>1)</sup>	2.28±0.33 <sup>1)</sup>
寿胎丸组	4.2	11.21±1.42 <sup>3)</sup>	5.37±0.70 <sup>3)</sup>	1.31±0.11 <sup>3)</sup>
NAC 组	1 <sup>4)</sup>	13.78±1.13 <sup>3)</sup>	5.26±0.81 <sup>3)</sup>	0.91±0.08 <sup>3)</sup>
MCC950 组	5×10 <sup>-2</sup> <sup>4)</sup>	7.08±0.69	9.04±0.72	1.90±0.22

**3.4 对 HTR-8/SVneo 细胞内 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组细胞内 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、MCC950 组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  蛋白表达均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),而 NAC 组上述焦亡蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 2、表 5。

**3.5 对 HTR-8/SVneo 细胞内 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组细胞内 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,寿胎丸组、MCC950 组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 的表达均显著降低( $P<0.01$ );而 NAC 组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达差异无统计学意义。见表 6。

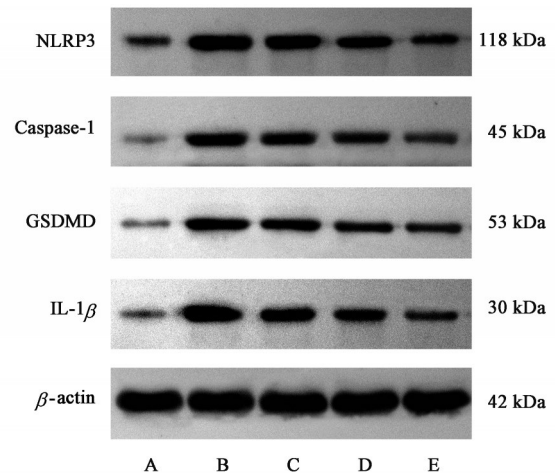


图 2 HTR-8/SVneo 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$  protein expression in HTR-8/SVneo cells

表 5 寿胎丸对 LPS 诱导的 HTR-8/SVneo 损伤细胞模型中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Shoutaiwan on expression of NLRP3, Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$  in LPS-induced HTR-8/SVneo injury cell model ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin	GSDMD/ $\beta$ -actin	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin
空白组		0.20±0.04	0.30±0.05	0.30±0.05	0.32±0.04
模型组		0.49±0.05 <sup>1)</sup>	0.55±0.04 <sup>1)</sup>	0.57±0.04 <sup>1)</sup>	0.54±0.03 <sup>1)</sup>
寿胎丸组	4.2	0.35±0.06 <sup>2)</sup>	0.37±0.05 <sup>3)</sup>	0.33±0.05 <sup>3)</sup>	0.37±0.05 <sup>3)</sup>
NAC 组	1 <sup>4)</sup>	0.44±0.04	0.53±0.06	0.55±0.03	0.51±0.04
MCC950 组	5×10 <sup>-2</sup> <sup>4)</sup>	0.22±0.05 <sup>3)</sup>	0.31±0.03 <sup>3)</sup>	0.29±0.03 <sup>3)</sup>	0.34±0.03 <sup>3)</sup>

表6 寿胎丸对LPS诱导的HTR-8/SVneo损伤细胞模型中NLRP3、Caspase-1 mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Shoutaiwan on NLRP3 and Caspase-1 mRNA expression in LPS-induced HTR-8/SVneo injury cell model ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3	Caspase-1
空白组		1.03±0.09	0.99±0.05
模型组		3.50±0.05 <sup>1)</sup>	2.56±0.52 <sup>1)</sup>
寿胎丸组	4.2	2.28±0.36 <sup>3)</sup>	1.92±0.50 <sup>3)</sup>
NAC组	1 <sup>4)</sup>	3.89±0.57	2.43±0.31
MCC950组	5×10 <sup>-2</sup> <sup>4)</sup>	2.08±0.46 <sup>3)</sup>	1.75±0.39 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

氧化应激是指ROS生成与抗氧化防御系统之间的不平衡状态<sup>[14]</sup>。在病理状态下(如缺血、缺氧、炎症等),由于ROS生成过多,或抗氧化物质含量减少和(或)活性降低,机体内氧化/抗氧化平衡状态受到破坏,容易引发氧化应激<sup>[15]</sup>。目前大量临床、动物研究均发现RSA与氧化应激密切相关<sup>[16-17]</sup>。细胞焦亡是一种程序性细胞死亡方式,表现为细胞胀大直至胞膜破裂,导致细胞内容物的释放进而激活强烈的炎症反应。正常情况下,细胞焦亡是机体主动免疫的一部分,在一定程度上起着免疫防御的作用。但细胞过度焦亡会导致细胞的大量死亡及一系列的炎症反应。本研究结果显示,LPS诱导的HTR-8/SVneo细胞炎性损伤模型中,存在氧化应激和细胞焦亡。

RSA在中医学中属于“滑胎”“数堕胎”范畴,具有屡孕屡堕及应期而下的特点。寿胎丸为治疗滑胎的验方,仅由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶4味药组成,功效以补益为主,恢复肾气本位。课题组前期研究利用HPLC技术确定了寿胎丸中的7个特征活性成分:对香豆酸、金丝桃苷、槲皮素、山柰酚、槲皮苷、绿原酸和川续断皂苷VI<sup>[10]</sup>。这些生物活性化合物可能是寿胎丸防治RSA的物质基础。现代药理学发现,寿胎丸中含有多种抗氧化剂,包括对香豆酸<sup>[18]</sup>、金丝桃苷<sup>[19]</sup>、槲皮素<sup>[20]</sup>、绿原酸<sup>[21]</sup>、槲皮苷<sup>[22]</sup>和山柰酚<sup>[23]</sup>。此外,构成寿胎丸的中药,如菟丝子和阿胶,在细胞和动物模型中显示出抗氧化活性<sup>[24-25]</sup>。金梅君等<sup>[26]</sup>研究认为,寿胎丸可明显促进孕鼠胎盘中总抗氧化能力、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶水平升高,降低MDA水平,纠正胎盘组织内氧化应激失衡状态,改善妊娠结局。国内外研究均发现,金丝桃苷<sup>[27]</sup>、槲皮素<sup>[28]</sup>、山柰酚<sup>[29]</sup>、绿原酸<sup>[30]</sup>可通过抑制NLRP3炎性小体活性发挥抗炎作

用。XIA等<sup>[31]</sup>发现桑寄生可抑制经LPS处理的RAW 264.7巨噬细胞内一氧化氮合成酶、IL-1 $\beta$  mRNA表达,以及IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等的蛋白表达,从而发挥抗炎作用。杨迪等<sup>[32]</sup>研究发现寿胎丸中的君药菟丝子黄酮能显著降低缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的表达,抑制炎症因子的分泌,从而起到保护作用。 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )与IL-2是重要的促炎因子,ZHAO等<sup>[33]</sup>发现寿胎丸可以下调大鼠血清中IFN- $\gamma$ 、IL-2水平,改善子宫内膜容受性,提高妊娠率。因此,结合本课题组前期研究和文献研究结果,可以初步认定寿胎丸具有抗氧化应激和炎症反应的功效。课题组前期动物和细胞实验证实,寿胎丸中剂量(即临床等效剂量)、高剂量对RSA小鼠和大鼠蜕膜组织、细胞具有明显的改善作用<sup>[9,11,34]</sup>,故本研究选择寿胎丸中剂量作为干预剂量。

本研究结果显示寿胎丸可以降低LPS诱导的HTR-8/SVneo细胞损伤模型中ROS、MDA的表达,增加SOD活性。作为公认的抗氧化剂NAC,同样可通过抑制细胞ROS、MDA的表达,增加SOD活性,改善氧化应激状态,提示寿胎丸改善LPS诱导的HTR-8/SVneo损伤模型细胞活性的机制之一是改善氧化应激状态。同时寿胎丸可以抑制NLRP3、Caspase-1活性,使GSDMD不能被切割、释放活性结构域,进而减少细胞内炎症因子IL-18、IL-1 $\beta$ 的生成,改善细胞炎症反应。而作为NLRP3抑制剂的MCC950,同样可通过抑制NLRP3炎性小体的活化,抑制损伤模型细胞焦亡,进而减轻炎症反应,提示NLRP3可能是寿胎丸抑制LPS诱导的HTR-8/SVneo损伤模型细胞焦亡的作用靶点。

总之,本研究结果与其他研究组的结果相符合,支持寿胎丸可通过抑制氧化应激和细胞焦亡减轻LPS诱导的HTR-8/SVneo细胞损伤,这可能是寿胎丸防治RSA,发挥安胎作用的机制之一。但本研究仅为体外细胞实验,尚存在不足,下一步将补充多个体外细胞模型,进行交叉验证实验结果。此外,本研究仅选择了临床等效剂量的寿胎丸进行研究,未完全排除药物对细胞毒性、增殖性等影响,下一步将补充不同剂量的寿胎丸药物血清对损伤细胞模型的作用比较实验,以期得出更严谨的结论。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 张建平. 复发性流产诊治的专家共识[J]. 中华妇产

- 科杂志, 2016, 51(1):3-9.
- [ 2 ] 李航. 中药干预母-胎免疫耐受异常机制研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(8):2137-2140.
- [ 3 ] GAO P, ZHA Y, GONG X, et al. The role of maternal-foetal interface inflammation mediated by NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion [J]. *Placenta*, 2020, 11 (101) : 221-229.
- [ 4 ] 田旭升, 李云凤, 李寒, 等. 黄连温胆汤对 IGT 大鼠骨骼肌细胞焦亡经典通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18):1-8.
- [ 5 ] AL-SHEIKH Y A, GHNEIM H K, ALHARBI A F, et al. Molecular and biochemical investigations of key antioxidant/oxidant molecules in Saudi patients with recurrent miscarriage[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6) : 4450-4460.
- [ 6 ] GHNEIM H K, ALSHEBLY M M. Biochemical markers of oxidative stress in saudi women with recurrent miscarriage [J]. *Korean Med Sci*, 2016, 31 (1):98-105.
- [ 7 ] LI H F, SHEN Q H, LI X Q, et al. The efficacy of traditional Chinese medicine Shoutaiwan combined with western medicine in the first trimester of pregnancy in women with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2020, doi:10.1155/2020/7495161.
- [ 8 ] 宋艳丽, 卫爱武, 孙自学, 等. 寿胎丸合芍药甘草汤加味对复发性流产患者的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7):36-42.
- [ 9 ] 刘玲, 邵良, 雷磊, 等. 寿胎丸对复发性流产大鼠蜕膜细胞水通道蛋白 1、2 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7):3608-3611.
- [ 10 ] ZENG L T, YANG K L, LEI L, et al. Systematic biological and proteomics strategies to explore the regulation mechanism of Shoutaiwan on recurrent spontaneous Abortion's biological network [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 5(263):113-156.
- [ 11 ] 梁程程, 雷磊, 毛思思, 等. 寿胎丸对复发性流产大鼠子宫蜕膜组织 AQP 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11):2657-2661.
- [ 12 ] 雷磊, 李慧芳, 谭展望, 等. 寿胎丸对反复自然流产模型小鼠子宫蜕膜蛋白表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(7):42-45.
- [ 13 ] WU X, ZHANG H, QI W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9:171.
- [ 14 ] BURTON G J, JAUNUAUX E. Oxidative stress [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011, 25 (3) : 287-299.
- [ 15 ] 肖文霞, 王会芝, 周广杰, 等. 绒毛组织氧化应激状态与稽留流产的相关性研究[J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29(4):358-359.
- [ 16 ] JAYASENA C N, RADIA U K, FIGUEIREDO M, et al. Reduced testicular steroidogenesis and increased semen oxidative stress in male partners as novel markers of recurrent miscarriage[J]. *Clin Chem*, 2019, 65(1):161-169.
- [ 17 ] 黄慧群, 陆浩天, 纪冬梅. 线粒体异常与复发性流产 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2020, 39(6) : 490-494.
- [ 18 ] KHEIRY M, DIANAT M, BADA VI M, et al. p-Coumaric acid attenuates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats by scavenging ROS production: An *in vivo* and *in vitro* study [J]. *Inflammation*, 2019, 42(6):1939-1950.
- [ 19 ] KWON S H, LEE S R, PARK Y J, et al. Suppression of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by hyperoside via activation of Nrf2/HO-1 signaling in dopaminergic neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (23):5832.
- [ 20 ] LU X L, ZHAO C H, YAO X L, et al. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85 (8) : 658-671.
- [ 21 ] YAO J, PENG S J, XU J Q, et al. Reversing ROS-mediated neurotoxicity by chlorogenic acid involves its direct antioxidant activity and activation of Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2019, 45 (4) : 616-626.
- [ 22 ] LI X C, JIANG Q, WANG T T, et al. Comparison of the antioxidant effects of quercitrin and isoquercitrin: Understanding the role of the 6''-OH group [J]. *Molecules*, 2016, 21(9):1246.
- [ 23 ] SIMUNKOVA M, BARBIERIKOVA Z, JOMOVA K, et al. Antioxidant vs. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu ( II ) ions: A ROS-scavenging activity, fenton reaction and DNA damage study [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4) : 1619.
- [ 24 ] LIN M K, LEE M S, HUANG H C, et al. *Cuscuta chinensis* and *C. campestris* attenuate scopolamine-induced memory deficit and oxidative damage in mice [J]. *Molecules*, 2018, 23(12):3060.

- [25] WANG D L, LIU M X, CAO J C, et al. Effect of colla corii asini (E'jiao) on D-galactose induced aging mice [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(12): 2128-2132.
- [26] 金梅君, 传洁, 沈毅, 等. 寿胎丸对邻苯二甲酸二乙酯染毒孕鼠免疫功能及氧化应激的影响[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(6): 850-855.
- [27] WEI A W, SONG Y L, NI T T, et al. Hyperoside attenuates pregnancy loss through activating autophagy and suppressing inflammation in a rat model [J]. Life Sci, 2020, 254(8): 117735.
- [28] LI W J, WANG Y Y, TANG Y Q, et al. Quercetin alleviates osteoarthritis progression in rats by suppressing inflammation and apoptosis via inhibition of IRAK1/NLRP3 signaling [J]. J Inflamm Res, 2021, 14(7): 3393-3403.
- [29] TIAN H W, LIN S M, WU J, et al. Kaempferol alleviates corneal transplantation rejection by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and macrophage M1 polarization via promoting autophagy [J]. Exp Eye Res, 2021, 208: 108627.
- [30] FAKHAR-E-ALAM K M, YAO W Y, DING Y M, et al. Chlorogenic acid suppresses mitochondrial apoptotic effectors Bax/Bak to counteract NOD-like receptor pyrin domain 3 (NLRP3) inflammasome in thiram exposed chondrocytes [J]. Phytomedicine, 2021, 95(1): 153865.
- [31] XIA H, MOKRISH A, SHARIDA F, et al. Anti-inflammatory evaluation of *Scurrula ferruginea* (jack) danser parasitizing on *Tecoma stans* (L.) H. B. K. in LPS/IFN- $\gamma$ -induced RAW 264.7 macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268(5): 113647.
- [32] 杨迪, 王桂敏, 翟宏颖. 菟丝子黄酮对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织中炎症反应的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(11): 979-982.
- [33] ZHAO L J, XU Y, DUO X L, et al. A probe into effect of Shoutai pill on endometrial receptivity [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3765-3768.
- [34] 何冬梅. 寿胎丸影响反复自然流产模型小鼠妊娠结局的分子机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2010.

[责任编辑 孙丛丛]