

黄芩素对绒毛滋养细胞侵袭的影响

吕珊珊¹, 侯莉莉^{2*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210029; 2. 南京市妇幼保健院, 南京 210004)

[摘要] 目的:通过研究黄芩素对人类早孕期绒毛滋养细胞株 HTR-8/SVneo 的增殖活力、侵袭能力的影响,探讨中药黄芩素作用于滋养细胞侵袭相关疾病的可能作用机制。方法:体外培养早孕期绒毛滋养细胞株 HTR-8/SVneo 细胞,以不同浓度(0.01,0.05,0.1,0.5,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)黄芩素作用于细胞,设黄芩素 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为空白组,采用细胞增殖、毒性活力实验法(cell counting kit-8,CCK-8)检测黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞增殖活力的影响,细胞侵袭实验(Transwell)检测黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭作用的影响。提取黄芩素处理后的细胞总 RNA,蛋白,分别运用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测滋养细胞侵袭相关的重要因素-基质金属蛋白酶(MMP)-2,MMP-9 的 mRNA,蛋白表达水平;收集细胞上清,培养基采用明胶酶谱法检测黄芩素对 MMP-2,MMP-9 的分泌及酶活性的影响。结果:与空白组比较,0.01,0.05,0.1,0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素能明显诱导增强滋养细胞 HTR-8/SVneo 的侵袭能力($P < 0.05$),且侵袭率对剂量呈依耐性增长。0.01,0.05,0.1,0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素可明显上调 MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平,增强其酶活性($P < 0.05$)。结论:黄芩素能诱导增强滋养细胞 HTR-8/SVneo 的侵袭能力,可能是通过增强 MMP-9 mRNA 和蛋白表达及酶活性来发挥作用。

[关键词] 黄芩素;滋养细胞;细胞增殖活力;细胞侵袭作用;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0127-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210127

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0932.062.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:32

Effect of Baicalein on Cell Invasion in Human Trophoblast Derived HTR8/SVneo Cells

LYU Shan-shan¹, HOU Li-li^{2*}

(1. First Clinical Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Nanjing Maternity and Child Health Hospital, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of baicalein on proliferation activity and invasive ability of extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells, and explore the potential mechanism of Chinese medicine baicalein in treating trophoblast diseases such as recurrent spontaneous abortion (RSA). **Method:** HTR-8/SVneo cells were cultured *in vitro*, and with baicalein 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ as the blank group, the effect of different concentrations of baicalein (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell proliferation activity was evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8) assays. Transwell assay was performed to evaluate the effect of baicalein on cell invasive ability. Total RNA and protein of HTR-8/SVneo cells exposed with baicalein (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were isolated to assess the mRNA and protein levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 by Real-time PCR and Western blot respectively. At the same time, cell supernatant was collected to observe the effect of baicalein on secretion and enzyme activities of MMP-9, MMP-2 by gelatin zymography. **Result:** As compared with blank group, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ baicalein could significantly increase the invasive ability of HTR-8/SVneo cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). The 0.01, 0.05, 0.1, 0.5

[收稿日期] 20160317(008)

[基金项目] 南京市医学科技发展计划项目(ZKX15047)

[第一作者] 吕珊珊, 硕士, 从事生殖免疫实验研究, Tel:18351890989, E-mail:Lss06885@163.com

[通讯作者] * 侯莉莉, 博士, 副教授, 从事妇科临床诊治工作, Tel:13951829887, E-mail:hlldoctor@sohu.com

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ baicalein could significantly up-regulate the protein and mRNA expressions of MMP-9 and enhance its enzyme activities ($P < 0.05$). **Conclusion:** Baicalein could induce to increase the invasive ability of trophoblast HTR-8/SVneo cells, probably by increasing the protein and mRNA expressions as well as enzyme activities of MMP-9.

[**Key words**] baicalein; trophoblast; cell proliferative activity; cell invasive ability; matrix metalloproteinase (MMP)-2; MMP-9

复发性流产(RSA)是指同一配偶连续发生3次及3次以上的自然流产^[1],在育龄妇女中的发病率约1%~5%,是妇产科中较难防治的疾病,严重影响女性生殖健康。目前研究发现,滋养细胞侵袭功能不足可导致反复自然流产、早产、妊娠期高血压疾病等妊娠相关疾病^[2]。妊娠滋养层细胞来源于胚胎的胚外层,具有一定的侵袭分化能力,在胚胎植入子宫内膜过程中,具有关键作用,临床上滋养层细胞与复发性流产的机制联系研究较少。本课题组前期临床研究发现以黄芩为主药的补肾清热活血方(黄芩、菟丝子、白术、苈麻根、党参等)干预可明显增加复发性流产患者再次妊娠后血清绒毛膜促性腺激素(HCG)水平。且有文献报道通过噻唑蓝(MTT)比色法分析黄芩及黄芩水提液对体外分离的人早期绒毛滋养细胞活力的影响,结果表明黄芩水提液对滋养细胞增殖有促进作用^[3],提示中药可能对受精卵着床后到胚芽形成阶段绒毛的“侵袭性生长”具有促进作用。黄芩素是中药黄芩的主要有效成分,本研究通过采用毒性活力实验法(CCK-8),细胞侵袭实验(Transwell),实时荧光定量PCR(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)及明胶酶谱法检测黄芩素对滋养细胞及细胞内金属基质蛋白酶(MMP)-2,MMP-9表达的影响,探讨黄芩素对绒毛滋养细胞侵袭力的调控作用及其机制,目前国内外尚无中药单体黄芩素对复发性流产基于MMPs分子机制的研究,本研究具有创新性,旨在进一步揭示清热安胎药黄芩的主要药效物质基础。

1 材料

1.1 药物 黄芩素(美国Sigma公司,批号465119-100MG),取黄芩素用二甲基亚砜(DMSO)溶解,用培养液稀释制得1,0.5,0.1,0.05,0.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,DMSO终百分浓度为0.1%,储存备用。

1.2 细胞株及培养 人绒毛膜外滋养细胞HTR-8/SVneo购自上海细胞库,将细胞置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置于37℃5%CO₂饱和湿度培养箱中,培养至对数生长期待用。

1.3 试剂及仪器 CCK-8试剂盒(日本Dojindo公

司,批号CK04);蛋白提取及检测试剂盒(南京凯基生物公司,批号分别为KGP150,KGP113-SDS);抗MMP-2,MMP-9,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司,批号分别为4022S,3852S,2118);RPMI-1640培养基[维森特生物技术(中国)有限公司,批号350-000-CL];基质胶(ECM gel,美国BD公司,批号356234);胎牛血清(FBS,美国Life公司,批号10099141);胰酶(美国Sigma公司,批号25-051-CI);Radio-Immunoprecipitation Assay(RIPA)裂解液(中国碧云天生物技术有限公司,批号P0013B);Real-time PCR逆转录试剂盒(日本Takara公司,批号RR014A);SYBR Select Master Mix(美国Applied Biosystems公司,批号4472918);Trizol(美国Invitrogen公司,批号15596018);FITC标记的荧光二抗(北京中杉公司,批号ZF-0311)。Synergy H4型多功能酶标仪(美国Biotek公司),BG-Power 300型化学发光凝胶成像系统(美国Baygene公司),Observer.D1型倒置荧光显微镜(德国Zeiss公司),Professional Thermocycler型逆转录PCR仪(德国Biometra公司),Centrifuge 5810R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司),QuantStudio 6 Flex0型Real-time PCR仪(美国Life公司)。

2 方法

2.1 CCK-8法检测细胞增殖率 取对数生长期的HTR-8/SVneo细胞,调整细胞密度为 4×10^3 个/L,每孔100 μL 接种到96孔培养板中,待细胞贴壁后,用含不同浓度黄芩素(0.01,0.05,0.1,0.5,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基处理细胞,另设空白组(不加黄芩素),每组3个复孔,继续培养12,24,48 h后,每孔加入CCK-8反应液10 μL ,孵箱中孵育2 h后,置于酶标仪测450 nm波长处的吸光度 $A^{[4]}$,计算增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{黄芩素组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.2 Transwell法检测细胞侵袭能力 ECM-gel-无血清培养基按体积(1:8)配制,对Transwell小室进行铺胶,37℃孵箱中放置固化。将HTR-8/SVneo细胞混悬液200 μL (约6~8万个细胞)加

入上室中。待细胞贴壁后,上室中 10% 胎牛血清的完全培养基换成含黄芩素($0 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的无血清培养基,下室中加入完全培养基 500 μL 。培养 24 h 后取出小室,用 4% 多聚甲醛固定小室滤膜外表面细胞 15 min,结晶紫染色,洗涤。在倒置显微镜下随机挑选 5 个区域拍照,计数穿过膜的细胞数。用细胞裂解液将 Transwell 滤膜上细胞裂解,570 nm 波长处检测 A,以黄芩素组/空白组表示其相对表达^[5]。

2.3 Real-time PCR 检测细胞侵袭相关 mRNA 表达

细胞用黄芩素培养液($0 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 24 h。Trizol 法提取细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,按照逆转录试剂盒说明书要求将 RNA 逆转录为 cDNA,按照试剂盒说明书进行 Real-time PCR 反应^[6], β -肌动蛋白(β -actin)为内参。MMP-2, MMP-9, β -actin 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,40 个循环。引物序列^[7]由中国上海吉码制药技术有限公司合成, β -actin:上游 5'-CCATCGTCCACCGCAAAT-3'(18 bp),下游 5'-CATGCCAATCTCATCTTGT-3'(21 bp);MMP-2:上游 5'-CTCATCGCAGATGCCTGGAA-3'(20 bp),下游 5'-TTCAGTAATAGGCACCCCTTGAAGA-3'(25 bp);MMP-9:上游 5'-GTCCACCCCTTGTGCTCTTCC-3'(20 bp),下游 5'-GCCACCCGAGTGTAACCAT-3'(19 bp)。

2.4 Western blot 检测细胞中侵袭相关 MMP-2, MMP-9 蛋白表达

待细胞汇合度约为 50% 时,黄芩素处理 24 h 后,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤离心。加入 RIPA 裂解液,冰浴条件下充分裂解并提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,蛋白电泳,转膜,封闭后分别加入 MMP-2, MMP-9, GAPDH 一抗(1:1 万),摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:1 万)室温孵育 2 h,经 PBS 漂洗后,ECL 化学发光,X 射线曝光显影。统计分析所得条带灰度值。

2.5 明胶酶谱法检测 MMP-2, MMP-9 酶活性

黄芩素处理细胞 24 h 后,收集细胞上清,放入无酶管,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 1 h。取上清液与 5 \times 非变性上样缓冲液混匀分装上样,然后按照明胶酶谱试剂盒说明进行电泳,洗脱,漂洗,孵育,显色,条带扫描并分析统计目的条带灰度值,以黄芩素组/空白组表示其相对表达^[8]。

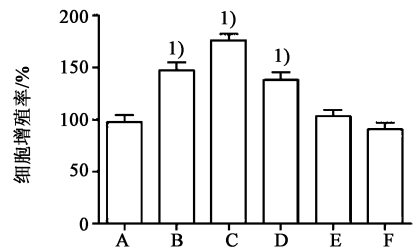
2.6 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件处理数据,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞增殖活力的影响

黄芩素处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后,与空白组比较, $0.01 \sim 0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素组细胞增殖力明显增强($P < 0.05$),黄芩素($0.5, 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组与空白组无差异。见图 1。



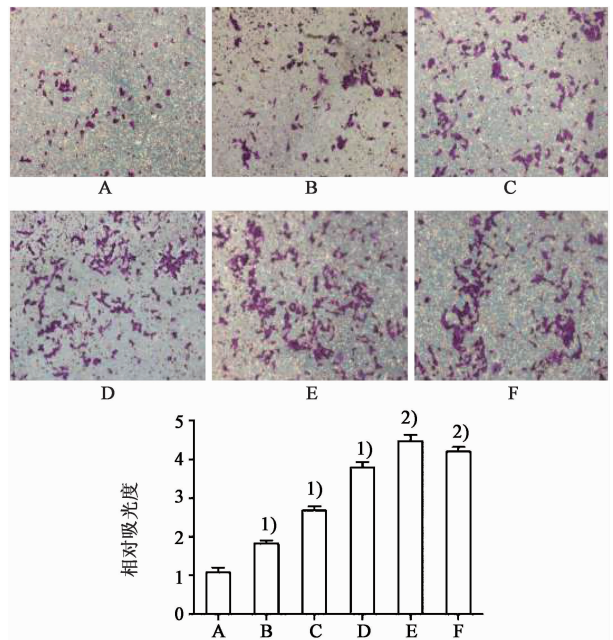
A. 空白组;B~F. 黄芩素($0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组(图 2 同)。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 1 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞的增殖活力影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of baicalein on HTR-8/SVneo cells proliferation ability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭能力的影响

随着黄芩素浓度增加,HTR-8/SVneo 细胞侵袭能力逐渐增强。与空白组比较, $0.01 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素组细胞侵袭力明显增强($P < 0.05$),黄芩素($0.5, 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组细胞侵袭力显著增强($P < 0.01$)。见图 2。

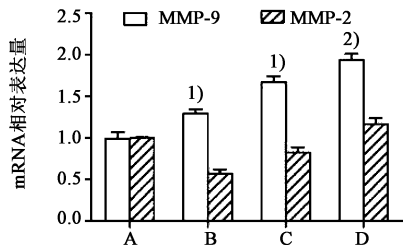


与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 3 同)

图 2 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of baicalein on HTR-8/SVneo cells invasive ability (crystal violet, $\times 200$)

3.3 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭相关 mRNA 表达的影响 黄芩素处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后,与空白组比较,0.05 ~ 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素组 MMP-9 mRNA 相对表达量均明显升高 ($P < 0.05$),黄芩素(0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组升高显著 ($P < 0.01$)。黄芩素不能促进 MMP-2 mRNA 的表达。见图 3。



A. 空白组;B~D. 黄芩素(0.05,0.1,0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组(图 4,5 同)
图 3 黄芩素对 MMP-2, MMP-9 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of baicelein on MMP-2, MMP-9 mRNA relative expression levels in HTR-8/SVneo cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞侵袭相关蛋白表达的影响 黄芩素处理 HTR-8/SVneo 细胞 24 h 后,与空白组比较,黄芩素(0.05 ~ 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组 MMP-9 蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$)。见图 4,表 1。

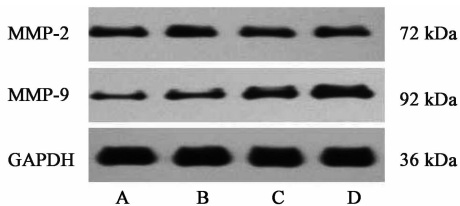


图 4 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞 MMP-2, MMP-9 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of baicelein on MMP2/9 protein expression levels in HTR-8/SVneo cells

表 1 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞 MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of baicelein on MMP-2, MMP-9 protein expression levels in HTR-8/SVneo cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
空白	0	0.367 \pm 0.031	0.176 \pm 0.012
黄芩素	0.05	0.340 \pm 0.024	0.248 \pm 0.021 ¹⁾
	0.1	0.335 \pm 0.026	0.343 \pm 0.033 ¹⁾
	0.5	0.338 \pm 0.028	0.469 \pm 0.051 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.5 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞 MMP-2/9 酶活性的影响 经黄芩素处理 24 h 后,随黄芩素浓度增大, MMP-9 酶活性逐渐增强,与空白组比较,0.05 ~ 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素组 MMP-9 酶活性明显增强

($P < 0.05$)。见图 5,表 2。

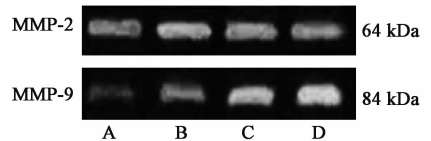


图 5 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞 MMP-2, MMP-9 的分泌和酶活性电泳

Fig. 5 Electrophoresis of baicelein on MMP-2, MMP-9 secretion and enzymes activity in HTR-8/SVneo cells

表 2 黄芩素对 HTR-8/SVneo 细胞 MMP-2, MMP-9 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of baicelein on MMP-2, MMP-9 enzymes activity in HTR-8/SVneo cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-2	MMP-9
空白	0	798.13 \pm 55.26	528.34 \pm 61.70
黄芩素	0.05	1 285.78 \pm 134.35	840.28 \pm 70.44 ¹⁾
	0.1	1 056.14 \pm 92.88	1 127.21 \pm 134.56 ¹⁾
	0.5	692.57 \pm 86.45	1 546.71 \pm 123.53 ¹⁾

4 讨论

妊娠过程中,滋养细胞的增殖、分化以及侵袭功能对于胚胎的成功着床、胎盘形成、胚胎的生长发育具有关键作用。目前已有研究表明滋养细胞侵袭能力不足,可导致胚胎浅着床及子宫螺旋动脉重塑不良,进而导致反复自然流产^[9-10]。因此推测黄芩素在滋养细胞增殖侵袭过程中发挥重要作用。本文选择妊娠过程中对早孕期胚胎着床有重要意义的 HTR-8/SVneo 细胞作为研究对象^[11]。

黄芩临床用于治疗先兆流产、复发性流产古已有之。现代研究表明,黄芩水提液能够促进滋养细胞的增殖生长^[12]。黄芩素是黄芩主要有效成分之一,目前国内关于黄芩素对滋养细胞的作用报道甚少,因此本研究探讨黄芩素对滋养细胞的增殖侵袭能力的影响及其作用机制。发现黄芩素具有促进滋养细胞 HTR-8/SVneo 增殖活力的作用,且黄芩素(0.01 ~ 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组的增殖率与空白组比较有统计学意义。黄芩素(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 HTR-8/SVneo 细胞增殖可产生抑制作用。黄芩素 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对细胞增殖活力几乎无影响,所以排除细胞增殖对侵袭能力可能产生的影响,本课题组选择黄芩素 < 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行 Transwell 实验,发现黄芩素可明显增强滋养细胞 HTR-8/SVneo 的侵袭能力。滋养层细胞的侵袭作用受 MMP-2, MMP-9 的影响。研究表明 MMP-2, MMP-9 的表达过高或过低,都可能造成细胞外基质的过分降解或降解不足,影

响胚泡植入,是导致病理性自然流产发生的重要原因之一^[13-14]。因此进一步探讨黄芩素对滋养细胞的调控是否通过 MMP-2, MMP-9 发挥作用,本研究表明黄芩素处理 24 h 后能明显增强 HTR-8/SVneo 细胞内 MMP-9 的 mRNA 及蛋白表达水平,但是对 MMP-2 无明显影响。MMP-2, MMP-9 以酶原形式存在于细胞中,被剪切后形成具有酶活性形式的蛋白水解酶,被分泌到细胞外基质中降解底物,促进滋养细胞侵袭,因此本课题用明胶酶谱法检测 MMP-2, MMP-9 酶的活性,显示黄芩素能增强 HTR-8/SVneo 细胞 MMP-9 活性,进一步证实了黄芩素通过 MMP-2, MMP-9 的分泌和活性来影响滋养细胞的侵袭能力。

综上所述,本研究发现黄芩素可能通过增加明胶酶 MMP-9 的表达及酶活性,促进 HTR-8/SVneo 人滋养细胞的侵袭能力。揭示了中药黄芩对反复自然流产可能的分子机制,但需要进一步研究。此外本研究探讨了黄芩素对滋养细胞 MMP-9 的影响,而 MMP-9 的表达受多条信号通路的影响^[15],本课题将进一步验证黄芩素对 MMP-9 的影响通过哪些信号通路起作用。

[参考文献]

[1] Carp H. A systematic review of dydrogesterone for the treatment of recurrent miscarriage [J]. Gynecol Endocrinol, 2015, 31 (6) : 422-430.

[2] 袁媛,侯莉莉. 补肾调冲法治疗早期不明原因反复自然流产例临床观察 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 3 (34) : 162-164.

[3] 刘惠萍,王若光. 黄芩苷及黄芩水提液对体外培养的滋养细胞生长的影响 [J]. 中医药导报, 2013, (6) : 14-16.

[4] Lei L T, Chen J B, Zhao Y L, et al. Resveratrol attenuates senescence of adipose-derived mesenchymal stem cells and restores their paracrine effects on promoting insulin secretion of INS-1 cells through Pim-1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20 (6) : 1203-1213.

[5] Huang Y, Wu Y, Chang X, et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on human trophoblast cell functions *in vitro* [J]. Stem Cells Int, doi:10.1155/2016/9156731.

[6] Lv J, Fu Z, Shi M, et al. Systematic analysis of gene expression pattern in has-miR-760 overexpressed resistance of the MCF-7 human breast cancer cell to doxorubicin [J]. Biomed Pharmacother, 2015, 69 (3) : 162-169.

[7] Zhang S, Ma J, Fu Z, et al. Promotion of breast cancer cells MDA-MB-231 invasion by di (2-ethylhexyl) phthalate through matrix metalloproteinase-2/-9 overexpression [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2016, 23 (10) : 9742-9749.

[8] Zhang Z, Lv J, Lei X, et al. Baicalein reduces the invasion of glioma cells via reducing the activity of p38 signaling pathway [J]. PLoS One, 2014, 9 (2) : e90318.

[9] Park D W, Lee S K. Expression of Kisspeptin and its receptor GPR54 in the first trimester trophoblast of women with recurrent pregnancy loss [J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67 (2) : 132-139.

[10] Bowen J M, Chamley L, Mitchell M D, et al. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women [J]. Placenta, 2002, 23 (4) : 239-256.

[11] Zhang H, Hou L, Li C M, et al. The chemokine CXCL6 restricts human trophoblast cell migration and invasion by suppressing MMP-2 activity in the first trimester [J]. Hum Reprod, 2013, 28 (9) : 2350-2362.

[12] 刘惠萍,王若光. 黄芩苷及黄芩水提液对体外培养的滋养细胞生长的影响 [J]. 中医药导报, 2013 (6) : 14-16.

[13] Perez N, Ostojic S, Volk M, et al. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion [J]. Reprod Biomed Online, 2012, 24 (5) : 567-575.

[14] Pollheimer J, Fock V, Knofler M. Review: The ADAM metalloproteinases-novel regulators of trophoblast invasion? [J]. Placenta, 2014, 35 : 57-63.

[15] 白冰,李娟,罗欣,等. 滋养细胞侵袭力分子调节机制的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38 (10) : 1110-1113.

[责任编辑 张丰丰]