补肾安胎冲剂调控 VHL/HIF-1α 信号通路改善复发性流产小鼠母胎界面血管生成的实验研究

郝乐乐[1]，李伟莉[2]，吴 花[1]，金 雅[1]，王媛中[2]，余欣慧[2]

（1.安徽中医药大学，安徽 合肥 230012；2.安徽中医药大学第一附属医院妇产科，安徽 合肥 230031）

[摘要]目的 研究补肾安胎冲剂对复发性流产小鼠蜕膜组织中希佩尔-林道抑癌基因（Von Hippel-Lindau，VHL）、缺氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）的影响，探讨其降低胚胎丢失率的作用机制。**方法** 以CBA/J雌鼠与BALB/C雄鼠合笼复制正常妊娠小鼠模型，以CBA/J雌鼠和DBA/2雄鼠合笼复制复发性流产（recurrent spontaneous abortion，RSA）小鼠模型，将其随机分为模型组，黄体酮组，补肾安胎冲剂高、中、低剂量组，每组10只。妊娠第1天，正常组与模型组采取蒸馏水灌胃，黄体酮组以26 mg/（kg·d）灌胃，补肾安胎冲剂高、中、低剂量组分别按35.1、11.7、3.9 g/（kg·d）灌胃。连续干预15 d后处死小鼠，收集样本，采用ELISA检测各组小鼠血清VHL、HIF-1α水平，采用荧光定量PCR、免疫组织化学法、Western blot法分别检测各组小鼠蜕膜组织中VHL、HIF-1α mRNA及其蛋白表达水平。**结果** 补肾安胎冲剂显著降低RSA小鼠胚胎丢失率（$P<0.05$），降低血清和蜕膜组织中VHL水平和VHL mRNA表达水平（$P<0.05$），升高血清和蜕膜组织中HIF-1α水平和HIF-1α mRNA表达水平（$P<0.05$），呈现明显的剂量依赖性（$P<0.05$）。**结论** 补肾安胎冲剂降低RSA小鼠流产率的机制可能与激活VHL/HIF-1α信号通路有关。

[关键词]补肾安胎冲剂；复发性流产；母胎界面；VHL/HIF-1α信号通路

[中图分类号]R271.14 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2020.01.018

复发性流产（recurrent spontaneous abortion，RSA）指与同一性伴侣发生2次或2次以上的自然流产，是女性妊娠期主要疾病之一，病因复杂，且仍有40%患者病因不明，严重影响育龄女性的身心健康，引起RSA的原因较多，包括先天遗传、女性解剖异常、内分泌紊乱、盆腔感染因素、男性因素、心理因素及免疫因素等，但其确切机制尚不明确[1]。因此RSA的机制研究引起越来越多学者的关注[2-3]。有研究表明，希佩尔-林道抑癌基因（Von Hippel-Lindau，VHL）缺陷会抑制缺氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）的降解，从而升高HIF-1α的表达，引起血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、细胞代谢等一系列改变，促进血管生成[4]。也有研究表明，补肾健脾活血法能改善子宫内环境和胎盘的微循环[5]。补肾安胎冲剂是安徽中医药大学第一附属医院的院内制剂，在寿胎丸的基础上改良而成，具有补肾健脾、养血安胎的作用，广泛应用于RSA患者的防治中，其保胎疗效确切[6-7]。但补肾安胎冲剂影响血管生成的机制尚不明确。故本研究以VHL/HIF-1α信号通路作为切入点，旨在从母胎界面血管生成角度，探讨补肾安胎冲剂的作用机制，为临床保胎应用补肾安胎冲剂提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 健康雌性CBA/J小鼠76只，雄性DBA/2小鼠30只，BALB/C小鼠8只，小鼠体质量均为20 g左右，属于SPF级，8周龄，均购于北京华阜康实验动物有限公司[动物生产许可证号：SCXK（京）2014-0004]。所有小鼠均饲养于安徽中医药大学实验动物中心[环境温度：（24±2）℃；相对湿度：45%±5%；每日光照时间和黑夜时间均等，各12 h]，自由获得水及食物，适应性饲养1周。本实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物 补肾安胎冲剂（每袋10 g，皖药制字BZ20080017）由安徽中医药大学第一附属医院提供；黄体酮胶囊（每粒50 mg，国药制字H20041902）由浙江仙琚制药股份有限公司提供。

1.3 试剂与仪器 ①酶联免疫吸附测定试剂盒。VHL（货号 EK-E20775R）、HIF-1α（货号 EK-E20353R）：北京安迪华泰生物科技有限公司。②荧光定量PCR试剂。Trizol（批号 90803）：Life technogies公司；QuantiNova SyBr Green PCR试剂盒（批号 208054）：Qiagen；逆转录试剂盒（批号 00519963）：Thermo Scientific。③免疫组织化学法试剂。VHL（批号 AC11253656）、HIF-1α（批号

基金项目：国家自然科学基金项目（81574017）

作者简介：郝乐乐（1992- ），女，硕士研究生

通信作者：李伟莉（1958- ），女，主任医师，教授，liweiliah@163.com

GR196812-1)；Bioss公司；通用型二抗试剂盒(批号K136830B)、DAB显色剂(批号K136821F)、PBS(批号WK163307-1)：北京中杉公司。④Western blot法试剂。山羊抗小鼠IgG(批号127655)、山羊抗兔IgG(批号129256)、β-actin(批号17AV0303)：北京中杉公司；VHL(批号AC11253656)、HIF-1α(批号AE120101P)：Bioss公司；SDS(批号1029H032)：Solarbio；PVDF膜(批号R8CA8257E)：Millipore；ECL超敏发光试剂盒(批号QF220648)：Thermo。

RM2135切片机(Leica)：德国；普通PCR仪(型号K960)；显微镜(Nikon 80i)：日本；EPS300型电泳仪：Tanon；高速台式冷冻离心机(JW-3021HR)：安徽嘉文仪器装备有限公司；TS-1000水平摇床、LX 300型微量离心机：海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

2 方法

2.1 模型复制、分组及给药 按照文献[8]方法复制RSA小鼠模型和正常妊娠小鼠模型。每日凌晨5:00—6:00检查雌鼠阴道，若见阴道栓，计为妊娠第1天；若未见阴道栓，则继续合笼。共复制RSA模型小鼠50只，正常妊娠小鼠10只。将模型复制成功的RSA小鼠随机分为5组：模型组，黄体酮组，补肾安胎冲剂高、中、低剂量组，每组10只。从妊娠第1天开始给药，正常组、模型组小鼠给予等容积蒸馏水灌胃，黄体酮组小鼠以26 mg/(kg·d)黄体酮灌胃，补肾安胎冲剂高、中、低剂量组小鼠于妊娠第1天分别按35.1、11.7、3.9 g/(kg·d)灌胃。每日1次，连续15 d，末次给药24 h后处死小鼠。

2.2 胚胎丢失率的计算 肉眼观察各组孕鼠胚胎丢失情况并记录，计算胚胎丢失率。参照赵爱明等[9]的方法制定胚胎丢失的标准，记录每组孕鼠的存活胚胎数、丢失胚胎数，然后计算胚胎丢失率。胚胎丢失率＝丢失胚胎数/(存活胚胎数＋丢失胚胎数)×100%。

2.3 ELISA法检测外周血VHL、HIF-1α水平 从眶后静脉丛采血2 mL，4 ℃、3 000 r/min离心10 min，取上清液0.5～1 mL于试管中，－80 ℃保存。采用酶联免疫吸附测定试剂盒测定外周血中VHL、HIF-1α的含量。

2.4 采用荧光定量PCR检测VHL、HIF-1α mRNA的表达水平 运用Trizol法对小鼠蜕膜组织进行总RNA提取，然后进行逆转录操作，严格按照试剂盒说明书进行，荧光定量PCR检测VHL、HIF-1α mRNA的表达水平。以cDNA作为荧光定量的模板，引物序列见表1。

表1 引物序列

基因名称	正向引物(5′-3′)	反向引物(5′-3′)	扩增长度/bp
β-actin	AGTGTGACGTTGACATCCGT	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	120
VHL	AGCAGCAGGAGTTGTACTGT	TGACTGAAGACTCCACGCTG	134
HIF-1α	CAGCATACAGTGGCACTCAC	AGGCTCCTTGGATGAGCTTT	94

2.5 免疫组织化学法检测蜕膜组织VHL、HIF-1α表达水平 蜕膜组织石蜡切片，常规脱蜡至水，3% H_2O_2灭活内源性过氧化物酶，微波修复抗原。PBS液洗涤3次，滴加一抗(VHL、HIF-1α，稀释至1∶200)，37 ℃孵育60 min。PBS洗涤后再滴加通用型二抗，37 ℃孵育20 min。DAB显色，复染，脱水，封片。光镜下以细胞胞浆、胞核中呈棕黄色或棕褐色为阳性对照。采用JEDR 80ID形态学图像分析系统软件(Version 1.0)对阳性反应细胞的积分光密度值(integral optical density，IOD)进行分析。

2.6 Western blot法检测蜕膜组织中VHL、HIF-1α蛋白水平 取小鼠蜕膜组织，按照总蛋白提取试剂盒说明书提取小鼠蜕膜组织总蛋白，用BCA蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白分离后转移至PVDF膜上，然后用5%脱脂奶粉溶液在摇床上室温封闭2 h，加入不同一抗VHL(稀释至1∶300)和HIF-1α(稀释至1∶300)，4 ℃孵育过夜。PBST洗涤3次，加入二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(稀释至1∶10 000)，孵育2 h。室温孵育2 h，PBST洗涤3次。使用ECL超敏发光试剂盒检测蛋白条带，最后用Image J软件分析条带灰度值，以目的条带与内参照β-actin的灰度比值表示蛋白相对表达水平。

2.7 统计学方法 采用SPSS 24.0进行统计分析。实验数据以“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。数据符合正态性及方差齐性则采用单因素方差分析，均数多重比较用LSD方法。$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠胚胎丢失率 与正常组比较，模型组小鼠胚胎丢失率显著升高($P<0.05$)。与模型组比较，所有治疗组小鼠胚胎丢失率均显著下降($P<0.05$)；与补肾安胎冲剂低剂量组比较，补肾安胎冲剂高、中剂量组胚胎丢失率显著升高($P<0.05$)；黄体酮组与补肾安胎冲剂高剂量组小鼠胚胎丢失率比

较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表2。

表2 各组小鼠胚胎丢失率比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	n	胚胎丢失率/%
正 常	10	8.23±6.10
模 型	10	41.99±5.60*
黄体酮	10	15.35±3.87#
补肾安胎冲剂低剂量	10	27.24±4.50#□
补肾安胎冲剂中剂量	10	21.22±4.36#△□
补肾安胎冲剂高剂量	10	11.11±6.88#△◇

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$；与黄体酮组比较，□ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂低剂量组比较，△ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂中剂量组比较，◇ $P<0.05$

3.2 各组小鼠血清中VHL、HIF-1α含量比较 与正常组比较，模型组小鼠血清中VHL含量明显上升（$P<0.05$），HIF-1α含量明显下降（$P<0.05$）；与模型组比较，所有治疗组小鼠血清中VHL含量均明显下降（$P<0.05$），HIF-1α含量均明显升高（$P<0.05$）；补肾安胎冲剂高剂量组小鼠血清中VHL含量低于低、中剂量组（$P<0.05$），HIF-1α含量高于低、中剂量组（$P<0.05$）。见表3。

表3 各组小鼠血清中VHL、HIF-1α含量比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	n	VHL/(pg/mL)	HIF-1α/(pg/mL)
正 常	10	42.54±6.66	48.42±5.24
模 型	10	89.60±9.69*	17.81±3.76*
黄体酮	10	63.93±4.52#	42.66±5.29#
补肾安胎冲剂低剂量	10	72.59±6.05#□	33.42±2.98#□
补肾安胎冲剂中剂量	10	57.39±8.34#△□	38.30±4.19#△
补肾安胎冲剂高剂量	10	50.57±6.48#△□	42.55±2.66#△◇

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$；与黄体酮组比较，□ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂低剂量组比较，△ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂中剂量组比较，◇ $P<0.05$

3.3 各组小鼠蜕膜VHL、HIF-1α mRNA表达水平比较 与正常组比较，模型组VHL mRNA表达水平显著升高（$P<0.05$），HIF-1α mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物治疗组VHL mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$），HIF-1α mRNA表达水平显著升高（$P<0.05$）；补肾安胎冲剂对VHL、HIF-1α mRNA表达的影响具有剂量依赖性，以补肾安胎冲剂高剂量作用最优（$P<0.05$）。见表4。

3.4 免疫组织化学法检测的各组小鼠蜕膜组织中VHL、HIF-1α蛋白表达水平比较 VHL、HIF-1α在各组妊娠小鼠蜕膜组织中皆有表达，主要表达于细胞的细胞浆中，除此之外在细胞核中也可见表达。见图1。与正常组比较，模型组小鼠蜕膜组织中VHL蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），HIF-1α蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各治疗组小鼠蜕膜组织中VHL蛋白表达水平显著下降（$P<0.05$），HIF-1α蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；补肾安胎冲剂降低模型小鼠蜕膜组织中VHL蛋白和升高HIF-1α蛋白的作用具有明显的剂量依赖性（$P<0.05$）。见表5。

表4 各组小鼠蜕膜VHL、HIF-1α mRNA相对表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	n	VHL mRNA	HIF-1α mRNA
正 常	10	0.10±0.02	1.00±0.10
模 型	10	6.89±0.05*	0.28±0.06*
黄体酮	10	3.45±0.05#	0.73±0.06#
补肾安胎冲剂低剂量	10	5.64±0.05#□	0.41±0.04#□
补肾安胎冲剂中剂量	10	5.37±0.05#□△	0.54±0.04#△□
补肾安胎冲剂高剂量	10	2.08±0.05#□◇	0.89±0.06#□◇

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$；与黄体酮组比较，□ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂低剂量组比较，△ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂中剂量组比较，◇ $P<0.05$

表5 免疫组织化学法检测的各组小鼠蜕膜组织中VHL、HIF-1α蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	n	VHL/$^{10-2}$ IOD	HIF-1α/$^{10-2}$ IOD
正 常	10	30.32±2.09	45.81±1.79
模 型	10	79.95±5.18*	21.22±1.78*
黄体酮	10	54.41±4.86#	37.87±1.10#
补肾安胎冲剂低剂量	10	66.25±3.82#□	28.91±1.19#□
补肾安胎冲剂中剂量	10	60.04±4.55#□△	31.33±1.40#□△
补肾安胎冲剂高剂量	10	37.30±3.51#□△◇	41.01±1.74#□△◇

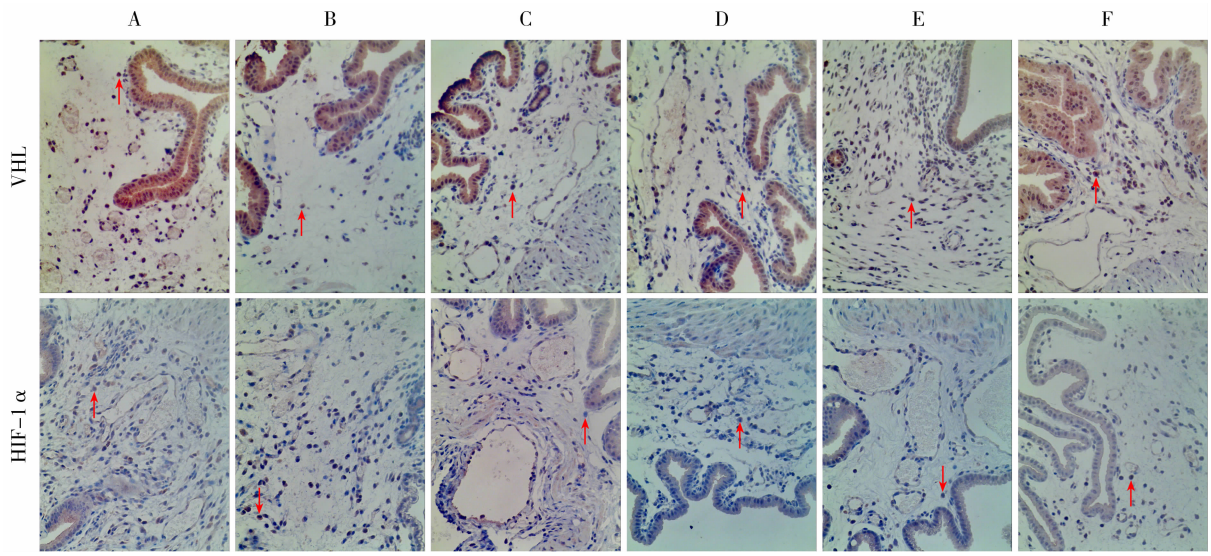
注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组相比，# $P<0.05$；与黄体酮组比较，□ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂低剂量组比较，△ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂中剂量组比较，◇ $P<0.05$

3.5 Western blot检测的各组小鼠蜕膜组织中VHL、HIF-1α蛋白表达水平比较 与正常组比较，模型组小鼠蜕膜组织中VHL蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），HIF-1α蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各治疗组蜕膜组织中VHL蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），HIF-1α蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）；补肾安胎冲剂降低模型小鼠蜕膜组织中VHL蛋白和升高HIF-1α蛋白的作用具有明显的剂量依赖性（$P<0.05$）。见图2、表6。

表6 Western blot检测的各组小鼠蜕膜组织中VHL、HIF-1α蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

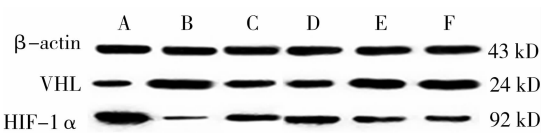
组 别	n	VHL	HIF-1α
正 常	10	0.27±0.05	1.38±0.01
模 型	10	1.12±0.06*	0.33±0.02*
黄体酮	10	0.70±0.04#	1.16±0.03#
补肾安胎冲剂低剂量	10	1.02±0.07#□	0.64±0.04#□
补肾安胎冲剂中剂量	10	0.84±0.06#□△	0.83±0.03#□△
补肾安胎冲剂高剂量	10	0.57±0.05#□△◇	1.15±0.04#△◇

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$；与黄体酮组比较，□ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂低剂量组比较，△ $P<0.05$；与补肾安胎冲剂中剂量组比较，◇ $P<0.05$



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄体酮组；D. 补肾安胎冲剂低剂量组；E. 补肾安胎冲剂中剂量组；F. 补肾安胎冲剂高剂量组；箭头所示棕黄色或棕褐色颗粒是 VHL、HIF-1α 蛋白

图1 各组小鼠蜕膜组织中 VHL、HIF-1α 蛋白表达水平比较（免疫组织化学法，10×20倍）



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄体酮组；D. 补肾安胎冲剂低剂量组；E. 补肾安胎冲剂中剂量组；F. 补肾安胎冲剂高剂量组

图2 Western blot 法检测各组小鼠蜕膜组织中 VHL、HIF-1α 蛋白表达水平

4 讨论

RSA 属于中医“滑胎”范畴，是妊娠期的一种常见疾病，RSA 主要是由“脾肾气血两虚”所致。目前对于 RSA 的治疗，中医主要通过补肾健脾法进行治疗。《胎产指南》指出：“凡孕妇脾胃旺而血气充，则胎安而正。”脾气主升，气能载胎，中气升提有力，胎儿正常发育而不致堕胎。《傅青主女科》指出：“肾水足而胎安，肾水亏而胎动。”肾主固胎，肾气盛则孕后胞脉固胎有力，使胎无下坠之虑，说明胎儿生长发育全赖母体之肾所系，脾胃化生之气血所养，气以载之，冲任以固之。补肾安胎冲剂是基于此理论的一种经验性复方，主要由菟丝子、桑寄生、续断、黄芪、白术、黄芩等药物组成，具有补肾健脾、养血安胎的作用。菟丝子能补肾，肾旺自能荫胎；桑寄生能养血，强筋骨，使胎气强壮；续断亦为补肾要药；黄芪、白术配伍，健脾益气安胎；白术、黄芩为安胎圣药，白术健脾除湿，黄芩滋阴清热，合而用之养血健脾，清化湿热，以安胎气。

HIF-1 是一种异源二聚体，主要由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚单位组成。HIF-1α 作为唯一的活性亚基，能调节多种基因的表达，如参与红细胞生成、血管形成等生物学效应，同时还对胚胎及胎盘发育起重要作用[10]。有研究[11-12]表明，HIF-1α 通过诱导或调控血管生成相关基因促进血管新生，如增加 VEGF 等细胞因子的分泌从而调控动物对缺血反应的适应。VHL 是一种蛋白质编码基因，参与 HIF 的泛素化和降解[13]。有研究[14]表明，VHL 的关键组成部分 E3 连接酶复合体可泛素化和降解 HIF-1α，当 VHL 蛋白失活会抑制 E3 连接酶复合体，从而上调 HIF-1α 的表达水平，过量的 HIF-1α 会积聚于细胞内，激活其靶基因转录，间接启动 VEGF、Notch 和 PI3K/AKT/mTOR 等信号通路，激活缺血传导途径，促使肿瘤血管新生及肿瘤细胞的增殖。另有研究[15-16]表明，VHL/HIF-1α 信号通路对胚胎的发育和机体组织的生长等均有重要的调控作用。因此，本研究进一步从微观角度探讨经补肾安胎冲剂干预后，VHL、HIF-1α 蛋白表达及这一信号通路在 RSA 过程中的作用。

CBA/J×DBA/2 交配组合具有易患反复自然性流产的特点，可以用作研究反复自然性流产的动物模型[17]。因此，本研究采用 CBA/J×DBA/2 交配组合经典反复流产小鼠模型，观察补肾安胎冲剂对 RSA 小鼠胚胎丢失率、血清和蜕膜组织中 VHL、HIF-1α 表达的影响。结果发现，与正常组比较，模型组 RSA 小鼠胚胎丢失率高，血清中 VHL 含量升高，HIF-1α 含量降低；蜕膜组织中 VHL mRNA 及蛋白表达水平升高，HIF-1α mRNA 及其蛋白表达水平下降。经药物干预后，RSA 小鼠胚胎丢失率降

低;血清 VHL 含量和蜕膜组织中 VHL mRNA 及其蛋白表达水平明显降低,血清 HIF-1α 含量和蜕膜组织中 HIF-1α mRNA 及其蛋白表达水平明显增加,其中补肾安胎冲剂高剂量组效果最为显著。因此可以推测,补肾安胎冲剂可能是通过 VHL/HIF-1α 信号通路诱导 RSA 小鼠胎盘血管的形成,降低胚胎丢失率,从而达到保胎的效果。因此,补肾安胎冲剂可以作为一种潜在的、有益的中药复方制剂,用于 RSA 的预防和治疗中。

参考文献:

[1] 王瑞雪,董小鹏,储继军.复发性流产肾虚证小鼠子宫蜕膜组织 miRNA 表达谱检测及生物信息学分析[J].安徽中医药大学学报,2019,38(4):61-66.

[2] HAO F,ZHOU X Y,JIN L P. Natural killer cells: functional differences in recurrent spontaneous abortion [J]. Biol Reprod,2019[2019-12-02]. https://doi.org/10.1093/biolre/ioz203.

[3] 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.

[4] 梁楚婷,郭炜骅,谭理,等.低氧诱导因子-1:细胞适应氧供应改变的关键蛋白[J].生物化学与生物物理进展,2019,46(11):1041-1049.

[5] 杨璇,张晓莉,余小琴,等.补肾活血法对自然流产血栓前状态早期干预研究[J].安徽中医药大学学报,2019,38(1):27-29.

[6] 周先韦,李伟莉,汪丹,等.补肾安胎冲剂联合免疫疗法治疗反复自然流产 40 例[J].安徽中医学院学报,2011,30(1):27-29.

[7] 李伟莉,胡瑞华.补肾安胎冲剂对复发性流产患者血清血管内皮生长因子及其可溶性受体-1 的影响[J].安徽中医学院学报,2013,32(1):20.

[8] 曹晓梅,李伟莉.补肾安胎冲剂对复发性流产小鼠蜕膜组织 RAS、MAPK 蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2016,27(1):13-15.

[9] 赵爱民,林其德,鲍世民,等.自然流产小鼠模型的胚胎丢失率[J].上海实验动物科学,1999(4):26-27.

[10] 廖长春,范阳华,肖兵,等.缺氧诱导因子-1α 与着丝粒蛋白 W 在人胶质瘤组织及细胞中表达的相关性[J].肿瘤,2014,34(11):1045-1051.

[11] 夏宇,江丽霞.缺氧诱导因子 HIF-2α 和 HIF-1α 在血管生成调控中的差别[J].检验医学与临床,2017,14(12):1838-1840.

[12] HASHIMOTO T, SHIBASAKI F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch[J]. Front Pediatr,2015,3(1):33-38.

[13] 王涛,郭启振.基于数据挖掘分析 VHL,PBRM1,TTN,SETD2,BAP1 在肾透明细胞癌中的表达及预后意义[J].现代肿瘤医学,2019,27(20):3663-3666.

[14] 刘娟,闫志凤,叶棋浓,等.Von Hippel-Lindau(VHL)的表达、纯化及结合活性分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2018,34(6):535-540.

[15] 涂福平,黄莉,王祥财.缺氧环境下 VHL 和 HIF-1α 的变化[J].医疗装备,2017,30(5):93-94.

[16] 邵进,邓廉夫.VHL/HIF 信号转导通路在骨发育及相关疾病中的调控机制[J].国际骨科学杂志,2009,30(4):254-260.

[17] 林羿.以小鼠 CBA/J×DBA/2 模型为基础的妊娠耐受机理研究[D].广州:暨南大学,2002:28-29.

(收稿日期:2019-09-24;编辑:姚实林)

Bushen Antai Granule Promotes Maternal-Fetal Interface Angiogenesis in Mice with Recurrent Spontaneous Abortion by Regulating the VHL/HIF-1α Signaling Pathway: An Experimental Study

HAO Le-le[1], *LI Wei-li*[2], *WU Hua*[1], *JIN Ya*[1], *WANG Yuan-zhong*[2], *YU Xin-hui*[2]

(1. *Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230012, *China*; 2. *Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230031, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Bushen Antai Granule on VHL and HIF-1α in the decidual tissue of mice with recurrent spontaneous abortion (RSA) and its mechanism of action in reducing embryo loss rate. **Methods** Female CBA/J mice and male BALB/C mice were caged to establish a mouse model of normal pregnancy, and female CBA/J mice and male DBA/2 mice were caged to establish a mouse model of RSA. The mice were randomly divided into model group, progesterone group, and high-, middle-, and low-dose Bushen Antai Granule groups, with 10 mice in each group. On day 1 of pregnancy, the mice in the normal group and the model group were given distilled water by gavage, those in the progesterone group were given progesterone at a dose of 26 mg/(kg·d) by gavage, and those in the high-, middle-,

补益肺肾汤对变应性哮喘大鼠模型 Th1/Th2 的影响

陈 宏[1]，张 伟[1]，苏玉明[1]，宋倩男[1]，董国玉[1]，秦 琪[1]，陈 群[2]，隋博文[3]

（1.黑龙江中医药大学附属第一医院儿一科，黑龙江 哈尔滨 150040；
2.黑龙江省哈尔滨市阿城区人民医院检验科，黑龙江 哈尔滨 150300；
3.黑龙江中医药大学附属第一医院呼吸科，黑龙江 哈尔滨 150400）

[摘要]目的 观察补益肺肾汤对变应性哮喘大鼠模型辅助性T淋巴细胞(helper T cell，Th)1/Th2的影响，探讨其治疗变应性哮喘的作用机制。**方法** 选取60只雄性SD大鼠，将其随机分成正常对照组、模型组、生理盐水组、补益肺肾组，每组15只，采用0.5%磷酸组胺溶液超声雾化法复制变应性哮喘大鼠模型，最后一次激发后处死大鼠，收集血清和支气管肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid，BALF)，采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清免疫球蛋白E(immunoglobin E，IgE)、白细胞介素-4(interleukin-4，IL-4)和干扰素γ(interferon-gamma，IFN-γ)水平，用流式细胞仪检测脾Th1、Th2细胞比例。**结果** 与正常对照组比较，模型组大鼠血清IgE和IL-4水平均显著升高($P<0.05$)；与模型组比较，补益肺肾组血清IgE和IL-4水平均显著降低($P<0.05$)；补益肺肾组大鼠血清IgE和IL-4水平显著低于生理盐水组($P<0.05$)。与模型组比较，生理盐水组和补益肺肾组大鼠BALF中IL-4水平明显降低($P<0.05$)，IFN-γ水平明显上升($P<0.05$)；补肾益肺组大鼠BALF中IFN-γ水平显著高于生理盐水组($P<0.05$)。与模型组比较，生理盐水组和补益肺肾组大鼠脾中Th1/Th2明显上升($P<0.05$)；补肾益肺组大鼠脾中Th1/Th2显著高于生理盐水组($P<0.05$)。**结论** 补益肺肾汤可能通过下调IL-4水平和提高IFN-γ水平，调节变应性哮喘大鼠体内Th1/Th2失衡。

[关键词]变应性哮喘；补益肺肾汤；辅助性T细胞；免疫功能
[中图分类号]R562.2+5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2020.01.019

变应性哮喘是过敏原所引起的呼吸道慢性炎症及气道过度反应而导致支气管过度收缩，气流阻塞和呼吸不顺的一种常见疾病[1]。其免疫病理机制为过敏原活化免疫系统中的第2型辅助性T淋巴细胞(helper T cell，Th)[2-3]。白细胞介素-4(interleukin-4，IL-4)可通过B细胞同型开关介导免疫球蛋白E(immunoglobin E，IgE)合成。变应原与IgE交联使肥大细胞和嗜碱性细胞迅速活化，组胺和白三烯等递质的释放使血管通透性增加，平滑肌收缩和黏液分泌增加[4]。晚期过敏反应的特征是嗜酸性粒

基金项目：黑龙江省自然科学基金项目(H2018052)；黑龙江省中医药科研项目(ZHY19-004)
作者简介：陈宏(1977-)，男，博士，副主任医师
通信作者：隋博文(1979-)，男，博士，主任医师，112211116@qq.com

and low-dose Bushen Antai Granule groups were given Bushen Antai Granule at a dose of 35.1，11.7，and 3.9 g/(kg·d)，respectively，by gavage. After 15 days of consecutive intervention，the mice were sacrificed and the samples were collected. ELISA was used to measure the serum levels of VHL and HIF-1α，and quantitative real-time PCR，immunohistochemistry，and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of VHL and HIF-1α in decidual tissue. **Results** Bushen Antai Granule significantly reduced the embryo loss rate of RSA mice ($P<0.05$)，the serum level of VHL，and the mRNA expression of VHL in decidual tissue ($P<0.05$) and significantly increased the serum level of HIF-1α and the mRNA expression of HIF-1α in decidual tissue ($P<0.05$)，in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** Bushen Antai Granule can reduce the abortion rate of RSA mice，possibly by activating the VHL/HIF-1α signaling pathway.

[**Key words**] Bushen Antai Granule；Recurrent spontaneous abortion；Maternal-fetal interface；VHL/HIF-1α signaling pathway