

# 菟丝子黄酮促进蜕膜化改善复发性流产的作用机制研究<sup>Δ</sup>

方芳<sup>1\*</sup>, 崔英<sup>1#</sup>, 黄嘉菁<sup>2</sup>, 陈莉莉<sup>1</sup>, 徐佳<sup>1</sup>, 万云慧<sup>1</sup>(1. 江西省妇幼保健院中医科, 南昌 330006; 2. 江西省妇幼保健院辅助生殖科, 南昌 330006)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)19-2379-08  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.19.04



**摘要** **目的** 探讨菟丝子黄酮(CCF)促进蜕膜化改善复发性流产(RSA)的作用机制。**方法** 将对数生长期的HTR-8/SVneo细胞随机分为空白组、脂多糖(LPS)组、CCF组、血清和糖皮质激素调节激酶2(SGK2)抑制剂(GSK650394,简称“GSK”)组、CCF+GSK组,分别给予相应药物处理;将敲低SGK2的HTR-8/SVneo细胞随机分为SGK2的小干扰RNA(siSGK2)组、siSGK2+CCF组,并另设空白组、LPS组,分别给予相应药物处理。检测敲低SGK2前后各组细胞的存活率、WNK信号通路及蜕膜化相关蛋白和mRNA表达水平以及敲低后的线粒体膜电位水平。构建RSA小鼠模型,随机分为模型组、CCF低剂量组、CCF高剂量组、GSK组、联合给药组,每组4只;另选4只正常妊娠小鼠作为对照组。记录小鼠胚胎着床数、活胎数和丢失胚胎数,观察小鼠子宫内膜结构及蜕膜化情况,检测WNK信号通路及蜕膜化相关蛋白和mRNA表达水平以及线粒体膜电位水平。**结果** 与空白组比较,LPS组细胞存活率,以及SGK2、WNK1、WNK4、催乳素、胰岛素样生长因子结合蛋白1、氧化应激反应激酶1、Ste20相关脯氨酸/丙氨酸丰富激酶的蛋白及mRNA的表达水平均显著降低( $P<0.05$ );与LPS组比较,CCF组细胞存活率和上述蛋白及mRNA的表达水平均显著升高,而GSK组细胞存活率和上述蛋白及mRNA的表达水平均显著降低( $P<0.05$ );与CCF组比较,CCF+GSK组细胞存活率和上述蛋白及mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。敲低SGK2后,与LPS组比较,siSGK2组细胞存活率、红/绿荧光强度比值和上述蛋白及mRNA的表达水平均显著降低( $P<0.05$ );与siSGK2组比较,siSGK2+CCF组细胞存活率、红/绿荧光强度比值和上述蛋白及mRNA表达水平均显著增加( $P<0.05$ )。体内实验结果显示,CCF治疗可显著改善RSA模型小鼠胚胎着床数、活胎数并减少胚胎丢失,子宫内膜组织中上述蛋白及mRNA表达水平均显著升高,并显著提升红/绿荧光强度比值( $P<0.05$ );联合给药组可逆转CCF的作用( $P<0.05$ )。**结论** CCF可激活SGK2,上调WNK信号通路,促进子宫内膜蜕膜化,进而改善RSA。**关键词** 菟丝子黄酮;复发性流产;WNK信号通路;血清和糖皮质激素调节激酶2;蜕膜化

## Study on the mechanism of *Cuscuta chinensis* flavonoids promoting decidualization and improving recurrent spontaneous abortion

FANG Fang<sup>1</sup>, CUI Ying<sup>1</sup>, HUANG Jialü<sup>2</sup>, CHEN Lili<sup>1</sup>, XU Jia<sup>1</sup>, WAN Yunhui<sup>1</sup>(1. Dept. of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330006, China; 2. Dept. of Assisted Reproduction, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the mechanism by which *Cuscuta chinensis* flavonoids (CCF) promote decidualization and improve recurrent spontaneous abortion (RSA). **METHODS** HTR-8/SVneo cells in logarithmic growth phase were randomly divided into blank group, lipopolysaccharide (LPS) group, CCF group, SGK2 inhibitor (GSK650394, abbreviated as “GSK”) group and CCF+GSK group. Each group was treated with the corresponding agents accordingly. HTR-8/SVneo cells with SGK2 knockdown were randomly divided into small interfering RNA of SGK2 (siSGK2) group and siSGK2+CCF group; additionally, blank group and LPS group were established; each group was treated with the corresponding agents accordingly. The cell survival rate, expression levels of WNK signaling pathway- and decidualization-related proteins and mRNAs, as well as mitochondrial membrane potential levels, were assessed in each group before and after SGK2 knockdown. RSA mice model was constructed and randomly divided into model group, CCF low-dose group, CCF high-dose group, GSK group, and combined dosing group, with 4 mice in each group. Other 4 normal pregnant female mice were selected as the control group. The number of implanted embryos, viable fetuses, and lost embryos in mice was recorded. The morphological changes of endometrium and decidualization were observed, and WNK signaling pathway- and decidualization-related proteins and mRNAs expressing levels as well as mitochondrial membrane potential levels were all detected. **RESULTS** Compared with the blank group, the cell survival rate, as well as the protein and mRNA expression levels of SGK2, WNK1, WNK4, prolactin, insulin-like

**Δ 基金项目** 国家自然科学基金项目(No.82260315);江西省自然科学基金项目(No.20232BAB216027);江西省重点研发计划项目(No.20202BBGL73011);协同医疗健康基金会全国肺栓塞与深静脉血栓形成防治能力建设科研基金专项(No.Y112)

\* **第一作者** 副主任中医师, 硕士。研究方向: 中西医结合治疗妇科疾病。E-mail: jxfbzykff@163.com

# **通信作者** 主任医师, 硕士。研究方向: 复发性流产的临床与基础。E-mail: Cuiying388@126.com

growth factor-binding protein-1, oxidative stress responsive kinase 1, and Ste20-like proline-/alanine-rich kinase were significantly reduced in the LPS group ( $P < 0.05$ ); compared with the LPS group, the cell survival rate and the expression levels of the above-mentioned proteins and mRNAs were significantly increased in the CCF group, while the cell survival rate and the expression levels of the above-mentioned proteins and mRNAs were significantly decreased in the GSK group ( $P < 0.05$ ); compared with the CCF group, the cell survival rate and the expression levels of the above-mentioned proteins and mRNAs were significantly reduced in the CCF+GSK group ( $P < 0.05$ ). After knocking down SGK2, compared with the LPS group, the cell survival rate, red/green fluorescence intensity ratio, and the expression levels of the above-mentioned proteins and mRNAs were significantly reduced in the siSGK2 group ( $P < 0.05$ ); compared with the siSGK2 group, the cell survival rate, red/green fluorescence intensity ratio, and the expression levels of the above-mentioned proteins and mRNAs were significantly increased in the siSGK2+CCF group ( $P < 0.05$ ). The *in vivo* experimental results showed that CCF treatment can significantly improve the number of implanted embryos and viable fetuses in RSA model mice and reduce lost embryos, the expression levels of the above-mentioned proteins and mRNAs in endometrial tissue were significantly increased, and the red/green fluorescence intensity ratio was significantly increased ( $P < 0.05$ ); the combined dosing group could reverse the effect of CCF ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS** CCF can activate SGK2, up-regulate the WNK signaling pathway, promote endometrial decidualization, and improve RSA.

**KEYWORDS** *Cuscuta chinensis* flavonoids; recurrent spontaneous abortion; WNK signaling pathway; serum and glucocorticoid induced kinase; decidualization

复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)指2次及以上妊娠失败,发病率为1%~2%,对患者的身体和心理健康构成威胁<sup>[1-2]</sup>。RSA的机制尚不完全明确,西医治疗以免疫疗法和抗凝治疗为主,然而上述治疗不仅伴随较高的医疗费用,而且存在诸多应用禁忌证及潜在的不良反应风险<sup>[3-4]</sup>。因此,寻找更有效的治疗方法尤为重要。

菟丝子具有止泻、滋补肝肾、益精壮阳和安胎等多重功效<sup>[5-6]</sup>,其有效成分复杂,其中黄酮类成分为主要活性成分,在女性生殖疾病治疗领域具有一定优势<sup>[7-8]</sup>。已有研究证实,菟丝子黄酮(*Cuscuta chinensis* flavonoids, CCF)可促进辅助型T细胞2及孕激素受体表达,抑制流产模型大鼠胎盘及蜕膜结构产生病理改变,并降低流产率<sup>[9]</sup>。血清和糖皮质激素调节激酶(serum and glucocorticoid induced kinase, SGK)是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,包括SGK1、SGK2、SGK3,参与多种细胞信号的转导<sup>[10]</sup>。研究表明,SGK在RSA中起重要作用,其中SGK2在RSA子宫内膜蜕膜中呈低表达,可能与流产相关<sup>[11-12]</sup>。近年来,WNK赖氨酸缺乏蛋白激酶(WNK lysine deficient protein kinase,简称“WNK”)信号通路被发现与子宫稳态及妊娠支持密切相关<sup>[13-14]</sup>。本研究团队前期利用GeneMANIA数据库预测了与SGK2互作密切的潜在靶点,结果表明SGK2与WNK信号通路相关分子关联。基于此,本研究拟探讨CCF改善RSA的作用机制,以期对RSA的防治提供新的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),DP72型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),Multiskan FC型酶标仪和3308E细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),Power-

Pac型电泳仪(美国Bio-Rad公司),ABI7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)仪(美国ABI公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

CCF(批号PY20220216,纯度 $\geq 98\%$ )购自南京普怡生物科技有限公司;SGK2抑制剂GSK650394的原料药(纯度 $\geq 95\%$ ,批号S7209)购自美国Selleck公司;DMEM培养基(批号C11995500BT)购自美国Gibco公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、二甲基亚砜(DMSO,纯度 $\geq 99\%$ )(批号分别为P4170、L2630、D2650)均购自美国Sigma-Aldrich公司;CCK-8试剂盒(批号CK04)购自日本DOJINDO公司;磷酸盐缓冲液(PBS,批号P1020)购自北京索莱宝科技有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)增殖检测试剂盒、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF;纯度 $\geq 98.5\%$ )、RIPA裂解液、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号分别为C2003S、C0071S、ST2573、P0013B、C0105S)均购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、催乳素(prolactin, PRL)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为ab8227、ab130316、ab9485、ab7090)均购自英国Abcam公司;兔抗胰岛素样生长因子结合蛋白1(insulin-like growth factor-binding protein-1, IGFBP-1)抗体(批号DF7130)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔抗WNK1、WNK4、SGK2、Ste20相关脯氨酸/丙氨酸丰富激酶(Ste20-like proline-/alanine-rich kinase, SPAK)、氧化应激反应激酶1(oxidative stress-responsive kinase 1, OSR1)抗体(批号分别为4979S、5713S、5595S、3729、84671)均购自美国CST公司;SGK2的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)序列由生工生物工

程(上海)股份有限公司设计合成; siRNA 转染试剂盒、Trizol 试剂(批号分别为 L3000015、15596026CN)均购自美国 Invitrogen 公司; FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)试剂盒(批号 04913914001)购自瑞士 Roche 公司; 扩增所用引物由宝生物工程(大连)有限公司协助合成。

### 1.3 实验细胞与动物

人绒毛膜滋养层细胞 HTR-8/SVneo 购自上海雅吉生物科技有限公司。24 只 8~9 周龄 SPF 级雌性 CBA/J 小鼠, 体重(20.2±0.6)g; 10 只 9~10 周龄 SPF 级雄性 DBA/2 小鼠, 体重(20.8±1.1)g; 2 只 9~10 周龄 SPF 级雄性 BALB/C 小鼠, 体重(22.9±1.0)g。所有小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK(京)2021-0011。小鼠在温度 20~25 °C、相对湿度 40%~70%、每 12 h 明暗交替的环境中饲养, 自由饮水、摄食。本实验方案经江西省妇幼保健院伦理委员会批准(审批号: 科研伦审 IACUC 2024153)。

## 2 方法

### 2.1 CCF 对 LPS 诱导的 HTR-8/SVneo 细胞的影响

#### 2.1.1 细胞造模、分组与给药

取 CCF 溶于 DMSO 中, 避光保存于 4 °C 冰箱中, 备用。SGK2 抑制剂 GSK650394 溶于 DMSO 中, 再用水稀释, 备用。取对数生长期的 HTR-8/SVneo 细胞, 以  $6 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 6 孔板, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。待细胞融合至 80%~90%, 将其随机分为空白组、LPS 组、CCF 组、抑制剂组(GSK 组)、CCF+抑制剂组(CCF+GSK 组)。除空白组外, 其余各组细胞用含 100  $\mu$ g/L LPS 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 100  $\mu$ L 诱导 24 h 构建滋养层细胞炎症模型<sup>[15]</sup>; 随后, 空白组、LPS 组细胞加入 100  $\mu$ L 的 1% DMSO, CCF 组细胞加入 100  $\mu$ L 400 mg/L CCF(CCF 剂量根据前期预实验得出, 下同), GSK 组细胞加入 100  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L GSK650394<sup>[16]</sup>, CCF+GSK 组细胞加入 100  $\mu$ L 400 mg/L CCF+100  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L GSK650394, 于培养箱中培养 24 h, 进行后续实验。每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次。

#### 2.1.2 细胞增殖水平检测

采用 CCK-8 实验检测。取对数生长期的细胞, 按“2.1.1”项下方法造模、分组、给药。培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后, 使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的光密度(OD)值, 并计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(OD<sub>给药组</sub>/OD<sub>空白组</sub>) $\times$ 100%]。

#### 2.1.3 细胞中 SGK2 与 WNK1、WNK4 共定位检测

采用免疫荧光共定位实验检测。取对数生长期的细胞, 按“2.1.1”项下方法造模、分组、给药。培养 24 h 后, 收集细胞, 以  $3 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中, 于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养, 待细胞融合至 70%~80%, 用

4% 多聚甲醛固定; 浸洗后, 细胞以 0.5% TritonX-100(采用 PBS 配制)于室温下通透; 浸洗后, 分别滴加 SGK2、WNK1 或 SGK2、WNK4 一抗(稀释比例均为 1:500), 于 4 °C 下孵育过夜; 加入荧光二抗(稀释比例为 1:1 000), 于 37 °C 下孵育 1 h; 浸洗后, 滴加 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核, 避光孵育 10 min; 浸洗后, 在荧光显微镜下观察并拍照。为评估 SGK2 与 WNK1 或 WNK4 的共定位水平, 采用双重荧光免疫标记的倒置荧光显微图像作为分析基础。将图像导入 Image J 软件后, 应用自动阈值算法将 Merge 图像转化为二值图像, 以明确阳性信号区域。随机选取 5 个无重叠的视野进行定量分析: 利用 IHC Profiler 插件对免疫荧光染色强度进行自动化评分, 并进一步采用 Trainable Weka Segmentation 插件对 SGK2、WNK1 或 SGK2、WNK4 双标阳性细胞进行计数。阳性细胞占比(%)=目的蛋白阳性细胞数/DAPI 阳性细胞数 $\times$ 100%, 计算 SGK2 阳性细胞与 WNK1 或 WNK4 阳性细胞的相对表达量表示共定位水平。

#### 2.1.4 细胞 WNK 信号通路及蜕膜化相关蛋白和 mRNA 的检测

采用 Western blot 法检测蛋白的表达。取对数生长期的细胞, 按“2.1.1”项下方法造模、分组、给药。培养 24 h 后, 收集细胞并消化, 加入 RIPA 蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF, 于 4 °C 下振摇 5 min, 收集上清液。将上清液于 4 °C 下以 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液以 BCA 法测定蛋白浓度后进行加热变性处理(100 °C 加热 15 min)。取变性蛋白适量, 进行电泳分离, 转膜, 用封闭液封闭 1 h; 加入  $\beta$ -actin、SGK2、WNK1、WNK4、PRL、IGFBP-1、OSR1、SPAK 一抗(稀释比例均为 1:500), 于 4 °C 下孵育过夜; 用 PBST 清洗后, 加入二抗(稀释比例为 1:1 000), 于室温下避光孵育 1 h; 用 PBST 清洗 3 次, 使用 ECL 显影液显影后成像。采用 Image J 软件分析, 以目标蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。

采用 qRT-PCR 法检测 mRNA 的表达。取对数生长期的细胞, 按“2.1.1”项下方法造模、分组、给药。培养 24 h 后, 收集细胞, 用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA 后, 按照反转录试剂盒操作说明将其反转录成 cDNA; 以此 cDNA 为模板, 加入相应引物, 使用 FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)试剂盒, 根据试剂盒中的说明书进行 PCR 扩增, 具体反应体系为: FastStart Universal SYBR(2 $\times$ )Forward 10.0  $\mu$ L, 正、反向引物各 0.6  $\mu$ L(具体引物序列及产物长度见表 1), cDNA 模板 2  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L, 共 20  $\mu$ L。反应条件为: 预变性 95 °C 30 s, 变性 95 °C 10 s, 退火 55 °C 30 s, 延伸 72 °C 15 s, 40 个循环, 每组重复 3 次。以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法对目标基因 mRNA 的表达水平进行相对定量分析。

表1 qRT-PCR引物序列及产物长度

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	产物长度/bp
SGK2	TCATCGGCAAGGGAAC	CCTCAGCAGCGTAGAAC	309
WNK1	CAGAGTGAGCAGCAACAGA	CCACGGACTGAGGCATACT	152
WNK4	CACCCAGCAGTCCGTCTGT	CCACCCTCTGTCTGCATCCT	149
PRL	GGTGGCCTTCTTAACGAG	GACCACATCAGGCTCAATGCT	365
IGFBP-1	TGCTCAGATCCCTTGAT	AGCTGGTGGGTTGTGACAT	210
OSR1	CTCCTTCTTCAGGCAGTG	ATCTCGGGCTTGGGTTG	243
SPAK	GGCCATCTGCAGGGAC	CTACACGTTCTGCCTGGT	102
GAPDH	TCGTGAAGGACTCATGACC	TCCACCACCTGTTGCTGTA	469

## 2.2 敲低SGK2对CCF药效的影响

### 2.2.1 细胞分组、siRNA转染与给药

取对数生长期的细胞,分为空白组、LPS组、siSGK2组、siSGK2+CCF组。空白组、LPS组使用正常的HTR-8/SVneo细胞,按“2.1.1”项下方法干预。siSGK2组、siSGK2+CCF组使用转染后的HTR-8/SVneo细胞,具体转染、干预过程如下:根据siRNA转染试剂说明书进行转染体系的配制及转染操作,将携带空白质粒和携带siRNA SGK2质粒的逆转录病毒分别感染HTR-8/SVneo细胞,得到阴性对照细胞和敲低SGK2的HTR-8/SVneo细胞。转染体系为46 μL GA-RNA缓冲液、4 μL 20 μmol/L siRNA和7.5 μL GA-RNA试剂。将配制好的转染体系室温放置20 min,随后加入培养液中,24 h后换液。阴性对照的正向引物为5'-UUCUCCGAACGAGUCACGUTT-3',反向引物为5'-ACGUGACUCGUUCGGAGAATT-3'; siSGK2的正向引物为5'-TAGGTGCTCGACTATGTCAACGG-3',反向引物为5'-AAACCCGTTGACATAGTCGAGCA-3'。参考“2.1.4”项下qRT-PCR法检测转染前后细胞内SGK2 mRNA的表达水平,若转染后SGK2 mRNA的表达水平显著低于转染前,表明SGK2成功敲低<sup>[17]</sup>。取转染后的HTR-8/SVneo细胞,以6×10<sup>5</sup>个/mL的密度接种于6孔板中,以含100 μg/L LPS的DMEM完全培养基100 μL培养24 h后,siSGK2组细胞加入100 μL的1% DMSO,siSGK2+CCF组细胞加入100 μL的1% DMSO+100 μL的CCF(400 mg/L, CCF剂量根据前期预实验得出)。各组细胞于培养箱中培养24 h,进行后续实验。细胞每组设5个复孔,实验重复3次。

### 2.2.2 敲低SGK2后细胞增殖水平检测

取对数生长期的细胞,按“2.2.1”项下方法分组、转染、给药,按“2.1.2”项下方法检测各组细胞的存活率。

### 2.2.3 敲低SGK2后细胞WNK信号通路及蜕膜化相关蛋白和mRNA的检测

取对数生长期的细胞,按“2.2.1”项下方法分组、转染、给药,按“2.1.4”项下方法检测各组细胞中WNK信号通路及蜕膜化相关蛋白和mRNA的表达水平。

### 2.2.4 敲低SGK2后细胞线粒体膜电位检测

采用流式细胞仪检测。取对数生长期的细胞,按“2.2.1”项下方法分组、转染、给药。培养24 h后,收集细

胞,按照线粒体膜电位试剂盒说明书操作,检测各组细胞单体荧光(绿色)和聚合物荧光(红色),并计算红/绿荧光强度比值以反映线粒体膜电位(上述比值降低表示细胞线粒体膜电位降低)。

## 2.3 CCF对RSA小鼠的影响

### 2.3.1 小鼠造模、分组与给药

参考文献构建小鼠RSA模型<sup>[18]</sup>。小鼠适应性饲养1周后,20只雌性CBA/J小鼠与10只雄性DBA/2小鼠按2:1合笼交配构建RSA模型,4只雌性CBA/J小鼠与2只雄性BALB/C小鼠按2:1合笼交配构建正常妊娠模型。于合笼次日早晨对雌鼠进行阴道涂片,若可见大量精子或阴道栓,记为妊娠第1天。从妊娠第1天开始,将20只RSA模型CBA/J小鼠随机分为5组:模型组(生理盐水灌胃)、CCF低剂量组(20 mg/kg CCF灌胃)、CCF高剂量组(40 mg/kg CCF灌胃)、GSK组(10 mg/kg GSK650394腹腔注射)、联合给药组(40 mg/kg CCF灌胃+10 mg/kg GSK650394腹腔注射),每组4只;将4只正常妊娠模型小鼠作为对照组(生理盐水灌胃)。所有小鼠每天干预1次,持续14 d。CCF的剂量设置参考文献[19],GSK650394的剂量设置参考文献[20]。

### 2.3.2 小鼠胚胎着床数、活胎数及丢失胚胎数的计算

末次给药结束后,处死各组小鼠并剖宫,记录并计算其胚胎着床数、活胎数及丢失胚胎数。胚胎着床数计算方法参考文献[21]。活胎判断标准为:胎鼠体形完整,颜色发红或粉红,有自然动作,胎盘大,色红<sup>[22]</sup>。丢失胚胎判断标准为:胚胎体积明显缩小,或失去正常胚胎形状,胎盘颜色暗红,母胎界面有出血水肿<sup>[23]</sup>。

### 2.3.3 小鼠子宫内层结构及蜕膜化情况观察

采用HE染色法观察。分离各组小鼠的右侧子宫内层组织,置于4%多聚甲醛中固定24 h,经二甲苯透明后进行石蜡包埋、切片。取切片,经脱蜡、梯度乙醇水合后,以苏木精染色10 min;经水冲洗、盐酸乙醇处理30 s、流水冲洗返蓝后,再用伊红染色5 min;依次经梯度乙醇脱水5 min、二甲苯清洗10 min后,用中性树脂封片,使用显微镜观察小鼠子宫内层结构及蜕膜化情况。

### 2.3.4 小鼠子宫内层组织WNK信号通路及蜕膜化相关蛋白和mRNA的检测

分离各组小鼠的右侧子宫内层组织,按“2.1.4”项下方法检测各组小鼠子宫内层组织WNK信号通路及蜕膜化相关蛋白和mRNA的表达水平。

### 2.3.5 小鼠子宫内层组织线粒体膜电位的检测

采用流式细胞仪检测。另取各组小鼠的左侧子宫内层组织,剪碎裂解后离心,取适量上清液,加入96孔板中,向每孔加入等体积的荧光探针工作液,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下避光孵育30 min;以PBS洗涤2~3次后,按“2.2.4”项下方法检测各组小鼠的线粒体膜电位。

## 2.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件绘图,采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料满足正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 CCF 对 LPS 诱导的 HTR-8/SVneo 细胞的影响

#### 3.1.1 CCF 对细胞增殖的影响

空白组、LPS 组、CCF 组、GSK 组、CCF+GSK 组细胞存活率分别为  $(96.10 \pm 3.68)\%$ 、 $(56.21 \pm 3.93)\%$ 、 $(86.41 \pm 2.77)\%$ 、 $(43.98 \pm 3.02)\%$ 、 $(72.25 \pm 5.56)\%$  ( $n=5$ )。与空白组比较,LPS 组细胞存活率显著降低 ( $P<0.05$ );与 LPS 组比较,CCF 组细胞存活率显著升高,而 GSK 组细胞存活率显著降低 ( $P<0.05$ );CCF+GSK 组细胞存活率较 GSK 组有所恢复,但仍低于 CCF 组 ( $P<0.05$ )。

#### 3.1.2 CCF 对细胞中 SGK2 与 WNK1、WNK4 共定位的影响

免疫荧光共定位实验结果(表 2)显示,与空白组比较,LPS 组细胞中 SGK2 与 WNK1 和 WNK4 的共定位水平均显著降低 ( $P<0.05$ );与 LPS 组比较,CCF 组细胞中 SGK2 与 WNK1 和 WNK4 的共定位水平均显著升高,而 GSK 组细胞中 SGK2 与 WNK1 和 WNK4 的共定位水平均显著降低 ( $P<0.05$ );与 CCF 组比较,CCF+GSK 组细胞中 SGK2 与 WNK1 和 WNK4 的共定位水平均显著降低 ( $P<0.05$ )。限于篇幅,免疫荧光共定位图可通过本文首页二维码链接中“增强出版”板块查看附图 1。

表 2 各组细胞中免疫荧光共定位结果比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SGK2/WNK1 的相对表达量	SGK2/WNK4 的相对表达量
空白组	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.02
LPS 组	0.41 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.09 <sup>a</sup>
CCF 组	1.48 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.62 ± 0.15 <sup>b</sup>
GSK 组	0.11 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.12 ± 0.04 <sup>c</sup>
CCF+GSK 组	0.58 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.53 ± 0.11 <sup>c</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 LPS 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 CCF 组比较,  $P<0.05$ 。

#### 3.1.3 CCF 对细胞 WNK 信号通路、蜕膜化相关蛋白和 mRNA 表达的影响

Western blot 法(表 3、图 1)和 qRT-PCR 法(表 4)检测结果显示,与空白组比较,LPS 组细胞中 SGK2、WNK1、WNK4、PRL、IGFBP-1、OSR1、SPAK 蛋白和 mRNA 的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ );与 LPS 组比较,CCF 组细胞中上述蛋白和 mRNA 的表达水平均显著升高,而 GSK 组细胞中上述蛋白和 mRNA 的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ );与 CCF 组比较,CCF+GSK 组细胞中上述蛋白和 mRNA 的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ )。

### 3.2 敲低 SGK2 对 CCF 药效的影响

#### 3.2.1 敲低 SGK2 对细胞增殖的影响

空白组、LPS 组、siSGK2 组、siSGK2+CCF 组细胞的存活率分别为  $(97.09 \pm 2.94)\%$ 、 $(54.88 \pm 3.37)\%$ 、 $(22.28 \pm$

表 3 各组细胞中 WNK 信号通路、蜕膜化相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SGK2/ $\beta$ -actin	WNK1/ $\beta$ -actin	WNK4/ $\beta$ -actin	PRL/ $\beta$ -actin	IGFBP-1/ $\beta$ -actin	OSR1/ $\beta$ -actin	SPAK/ $\beta$ -actin
空白组	1.09 ± 0.05	1.06 ± 0.08	1.08 ± 0.05	1.04 ± 0.06	1.02 ± 0.07	1.05 ± 0.08	1.03 ± 0.06
LPS 组	0.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.10 <sup>a</sup>
CCF 组	0.82 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.11 <sup>b</sup>
GSK 组	0.24 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.06 <sup>c</sup>
CCF+GSK 组	0.41 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.60 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.53 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>c</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 LPS 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 CCF 组比较,  $P<0.05$ 。

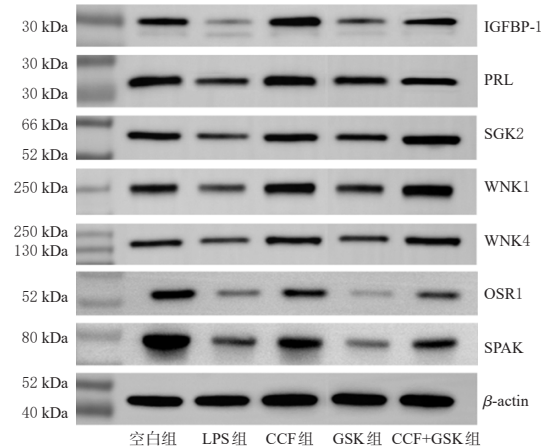


图 1 各组细胞中 WNK 信号通路、蜕膜化相关蛋白表达电泳图

表 4 各组细胞中 WNK 信号通路、蜕膜化相关基因 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SGK2	WNK1	WNK4	PRL	IGFBP-1	OSR1	SPAK
空白组	2.15 ± 0.12	2.23 ± 0.14	2.08 ± 0.19	2.17 ± 0.11	2.20 ± 0.15	2.21 ± 0.14	2.19 ± 0.13
LPS 组	0.59 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.12 <sup>a</sup>
CCF 组	1.68 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.13 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.17 <sup>b</sup>
GSK 组	0.36 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.49 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.60 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.44 ± 0.09 <sup>c</sup>
CCF+GSK 组	0.81 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.72 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.59 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.92 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.70 ± 0.11 <sup>c</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b: 与 LPS 组比较,  $P<0.05$ ; c: 与 CCF 组比较,  $P<0.05$ 。

2.49)%、 $(41.27 \pm 3.15)\%$  ( $n=5$ )。与空白组比较,LPS 组细胞存活率显著降低 ( $P<0.05$ );与 LPS 组比较,siSGK2 组细胞存活率显著降低 ( $P<0.05$ );与 siSGK2 组比较,siSGK2+CCF 组细胞存活率显著升高 ( $P<0.05$ )。

#### 3.2.2 敲低 SGK2 对细胞中 WNK 信号通路、蜕膜化相关蛋白和 mRNA 表达的影响

Western blot 法(表 5)和 qRT-PCR 法(表 6)检测显示,与空白组比较,LPS 组细胞中 SGK2、WNK1、WNK4、PRL、IGFBP-1、OSR1、SPAK 蛋白和 mRNA 的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ );与 LPS 组比较,siSGK2 组细胞中上述蛋白和 mRNA 的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ );与 siSGK2 组比较,siSGK2+CCF 组细胞中上述蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P<0.05$ )。限于篇幅,敲低 SGK2 后的蛋白表达电泳图可通过本文首页二维码链接中“增强出版”板块查看附图 2。

表5 敲低SGK2后各组细胞中WNK信号通路、蜕膜化相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SGK2/ $\beta$ -actin	WNK1/ $\beta$ -actin	WNK4/ $\beta$ -actin	PRL/ $\beta$ -actin	IGFBP-1/ $\beta$ -actin	OSR1/ $\beta$ -actin	SPAK/ $\beta$ -actin
空白组	1.07±0.07	1.06±0.06	1.07±0.08	1.05±0.06	1.02±0.06	1.03±0.05	1.04±0.05
LPS组	0.47±0.06 <sup>a</sup>	0.48±0.08 <sup>a</sup>	0.51±0.09 <sup>a</sup>	0.40±0.06 <sup>a</sup>	0.54±0.08 <sup>a</sup>	0.50±0.11 <sup>a</sup>	0.46±0.09 <sup>a</sup>
siSGK2组	0.21±0.04 <sup>a</sup>	0.19±0.03 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>a</sup>	0.16±0.02 <sup>a</sup>	0.14±0.03 <sup>a</sup>	0.18±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.02 <sup>a</sup>
siSGK2+CCF组	0.35±0.06 <sup>a</sup>	0.31±0.05 <sup>a</sup>	0.32±0.04 <sup>a</sup>	0.29±0.03 <sup>a</sup>	0.27±0.06 <sup>a</sup>	0.33±0.05 <sup>a</sup>	0.29±0.04 <sup>a</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b: 与LPS组比较,  $P<0.05$ ; c: 与siSGK2组比较,  $P<0.05$ 。

表6 敲低SGK2后各组细胞中WNK信号通路、蜕膜化相关基因mRNA表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SGK2	WNK1	WNK4	PRL	IGFBP-1	OSR1	SPAK
空白组	2.32±0.14	2.28±0.13	2.19±0.15	2.07±0.16	2.21±0.14	2.06±0.17	2.15±0.13
LPS组	1.05±0.12 <sup>a</sup>	0.97±0.12 <sup>a</sup>	1.03±0.10 <sup>a</sup>	0.84±0.09 <sup>a</sup>	0.92±0.11 <sup>a</sup>	0.81±0.11 <sup>a</sup>	0.95±0.12 <sup>a</sup>
siSGK2组	0.29±0.08 <sup>a</sup>	0.31±0.08 <sup>a</sup>	0.26±0.07 <sup>a</sup>	0.28±0.06 <sup>a</sup>	0.23±0.08 <sup>a</sup>	0.27±0.06 <sup>a</sup>	0.22±0.08 <sup>a</sup>
siSGK2+CCF组	0.53±0.11 <sup>a</sup>	0.61±0.12 <sup>a</sup>	0.49±0.12 <sup>a</sup>	0.52±0.14 <sup>a</sup>	0.58±0.13 <sup>a</sup>	0.63±0.13 <sup>a</sup>	0.61±0.15 <sup>a</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b: 与LPS组比较,  $P<0.05$ ; c: 与siSGK2组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.2.3 敲低SGK2对细胞中线粒体功能的影响

空白组、LPS组、siSGK2组、siSGK2+CCF组细胞中红/绿荧光强度比值分别为  $11.53 \pm 1.81$ 、 $3.03 \pm 0.26$ 、 $2.16 \pm 0.17$ 、 $5.37 \pm 0.61$  ( $n=5$ )。与空白组比较, LPS组细胞中红/绿荧光强度比值显著降低 ( $P<0.05$ ); 与LPS组比较, siSGK2组细胞中红/绿荧光强度比值显著降低 ( $P<0.05$ ); 与siSGK2组比较, siSGK2+CCF组细胞中红/绿荧光强度比值显著升高 ( $P<0.05$ )。限于篇幅, 流式细胞图可通过本文首页二维码链接中“增强出版”板块查看附图3。

## 3.3 CCF对RSA小鼠的影响

### 3.3.1 CCF对RSA小鼠妊娠结局的影响

与对照组比较, 模型组小鼠胚胎着床数、活胎数均显著减少, 丢失胚胎数均显著增加 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, CCF低、高剂量组小鼠胚胎着床数和活胎数均显著增多, 丢失胚胎数均显著减少 ( $P<0.05$ ), 而GSK组以上指标均进一步恶化 ( $P<0.05$ ); 与CCF高剂量组比较, 联合给药组小鼠胚胎着床数、活胎数均显著减少, 丢失胚胎数显著增加 ( $P<0.05$ )。结果见表7。

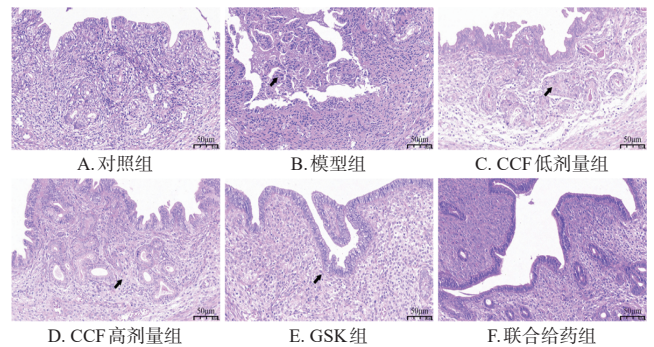
表7 各组小鼠胚胎着床数、活胎数及丢失胚胎数比较( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	胚胎着床数	活胎数	丢失胚胎数
对照组	14.00±0.82	12.25±0.96	1.75±0.50
模型组	6.00±0.82 <sup>a</sup>	5.25±0.50 <sup>a</sup>	4.00±0.82 <sup>a</sup>
CCF低剂量组	9.00±0.82 <sup>b</sup>	7.25±0.96 <sup>b</sup>	3.00±0.82 <sup>b</sup>
CCF高剂量组	11.75±0.96 <sup>b</sup>	11.00±0.82 <sup>b</sup>	2.50±0.58 <sup>b</sup>
GSK组	5.00±0.82 <sup>b</sup>	4.00±0.82 <sup>b</sup>	4.25±0.50 <sup>b</sup>
联合给药组	6.50±1.29 <sup>a</sup>	5.25±0.96 <sup>a</sup>	3.50±0.58 <sup>a</sup>

a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与CCF高剂量组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.3.2 CCF对RSA小鼠子宫内膜结构及蜕膜化的影响

HE染色结果(图2)显示, 对照组小鼠的子宫内膜组织中, 细胞形态结构完整且有序排列, 细胞间连接紧密, 胞质颜色均匀, 可观察到丰富的血管; 与对照组比较, 模型组小鼠的子宫内膜血管密度降低, 细胞出现嗜酸性变, 部分细胞显示出核碎裂和胞质溶解现象, 提示有细胞坏死及凋亡的病理过程存在; 与模型组比较, CCF低、高剂量组小鼠子宫内膜结构及蜕膜化进程明显恢复, GSK组小鼠子宫内膜结构和蜕膜化状态有所恶化; 与CCF组比较, 联合给药组小鼠的子宫内膜结构及蜕膜化状态有所恶化。



注: 箭头所指为小鼠子宫内膜结构。

图2 各组小鼠子宫内膜结构及蜕膜化HE染色显微图

### 3.3.3 CCF对RSA小鼠WNK信号通路、蜕膜化相关蛋白和mRNA表达的影响

Western blot法(表8)和qRT-PCR法(表9)检测结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠子宫内膜组织中SGK2、WNK1、WNK4、OSR1、SPAK、PRL和IGFBP-1蛋白和mRNA表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, CCF低、高剂量组小鼠子宫内膜组织中上述蛋白及mRNA的表达水平均显著升高, 而GSK组小鼠子宫内膜组织中上述蛋白和mRNA的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ ); 与CCF高剂量组比较, 联合给药组小鼠子宫内膜组织中上述蛋白和mRNA的表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ )。限于篇幅, 蛋白电泳图可通过本文首页二维码链接中“增强出版”板块查看附图4。

表8 各组小鼠子宫内膜组织中WNK信号通路、蜕膜化相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	SGK2/ $\beta$ -actin	WNK1/ $\beta$ -actin	WNK4/ $\beta$ -actin	PRL/ $\beta$ -actin	IGFBP-1/ $\beta$ -actin	OSR1/ $\beta$ -actin	SPAK/ $\beta$ -actin
对照组	1.09±0.08	1.07±0.07	1.05±0.09	1.04±0.07	1.01±0.10	1.04±0.09	1.02±0.08
模型组	0.34±0.06 <sup>a</sup>	0.44±0.05 <sup>a</sup>	0.56±0.05 <sup>a</sup>	0.32±0.05 <sup>a</sup>	0.48±0.05 <sup>a</sup>	0.37±0.06 <sup>a</sup>	0.41±0.05 <sup>a</sup>
CCF低剂量组	0.52±0.07 <sup>b</sup>	0.63±0.06 <sup>b</sup>	0.78±0.07 <sup>b</sup>	0.60±0.08 <sup>b</sup>	0.71±0.08 <sup>b</sup>	0.67±0.07 <sup>b</sup>	0.58±0.09 <sup>b</sup>
CCF高剂量组	0.89±0.10 <sup>b</sup>	0.79±0.09 <sup>b</sup>	0.93±0.11 <sup>b</sup>	0.86±0.09 <sup>b</sup>	0.98±0.11 <sup>b</sup>	0.81±0.12 <sup>b</sup>	0.74±0.11 <sup>b</sup>
GSK组	0.19±0.04 <sup>a</sup>	0.32±0.06 <sup>a</sup>	0.37±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>a</sup>	0.29±0.04 <sup>a</sup>	0.23±0.04 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>a</sup>
联合给药组	0.30±0.05 <sup>a</sup>	0.49±0.07 <sup>a</sup>	0.58±0.06 <sup>a</sup>	0.36±0.05 <sup>a</sup>	0.45±0.06 <sup>a</sup>	0.42±0.05 <sup>a</sup>	0.44±0.07 <sup>a</sup>

a: 与对照组比较,  $P<0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与CCF高剂量组比较,  $P<0.05$ 。

表9 各组小鼠子宫内膜组织中WNK信号通路、蜕膜化相关基因mRNA表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	SGK2	WNK1	WNK4	PRL	IGFBP-1	OSR1	SPAK
对照组	2.26±0.16	2.34±0.20	2.18±0.15	2.13±0.12	2.10±0.14	2.16±0.12	2.21±0.13
模型组	0.65±0.09 <sup>a</sup>	0.72±0.10 <sup>a</sup>	0.81±0.07 <sup>a</sup>	0.53±0.09 <sup>a</sup>	0.68±0.09 <sup>a</sup>	0.74±0.10 <sup>a</sup>	0.86±0.11 <sup>a</sup>
CCF低剂量组	1.38±0.17 <sup>b</sup>	1.53±0.18 <sup>b</sup>	1.68±0.12 <sup>b</sup>	1.47±0.11 <sup>b</sup>	1.71±0.14 <sup>b</sup>	1.39±0.13 <sup>b</sup>	1.42±0.15 <sup>b</sup>
CCF高剂量组	2.06±0.20 <sup>c</sup>	1.93±0.17 <sup>c</sup>	2.20±0.10 <sup>c</sup>	2.12±0.17 <sup>c</sup>	2.29±0.12 <sup>c</sup>	2.10±0.16 <sup>c</sup>	2.24±0.16 <sup>c</sup>
GSK组	0.32±0.10 <sup>a</sup>	0.54±0.06 <sup>a</sup>	0.53±0.06 <sup>a</sup>	0.28±0.11 <sup>a</sup>	0.48±0.06 <sup>a</sup>	0.39±0.14 <sup>a</sup>	0.45±0.14 <sup>a</sup>
联合给药组	0.72±0.12 <sup>a</sup>	0.80±0.14 <sup>a</sup>	0.77±0.08 <sup>a</sup>	0.61±0.10 <sup>a</sup>	0.75±0.08 <sup>a</sup>	0.77±0.14 <sup>a</sup>	0.89±0.14 <sup>a</sup>

a:与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与CCF高剂量组比较, $P<0.05$ 。

### 3.3.4 CCF对RSA小鼠子宫内膜组织中线粒体功能的影响

对照组、模型组、CCF低剂量组、CCF高剂量组、GSK组、联合给药组小鼠子宫内膜组织中的红/绿荧光强度比值分别为 $10.47 \pm 1.00$ 、 $3.71 \pm 0.36$ 、 $5.31 \pm 0.51$ 、 $6.95 \pm 0.89$ 、 $3.08 \pm 0.32$ 、 $5.08 \pm 0.55$  ( $n=4$ )。与对照组比较,模型组小鼠子宫内膜组织中的红/绿荧光强度比值显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,CCF低、高剂量组小鼠子宫内膜组织中的红/绿荧光强度比值均显著升高,GSK组小鼠子宫内膜组织中的红/绿荧光强度比值显著降低( $P<0.05$ );与CCF高剂量组比较,联合给药组小鼠子宫内膜组织中的红/绿荧光强度比值显著降低( $P<0.05$ )。限于篇幅,流式细胞图可通过本文首页二维码链接中“增强出版”板块查看附图5。

## 4 讨论

RSA是妊娠期常见并发症,发病率较高。近年来,中药作为辅助治疗方法,逐渐展现出显著疗效和良好的安全性。根据中医理论,RSA常与肾气不足、气血两虚及瘀血阻络有关,以保胎固肾为主要治则。菟丝子具有滋养肝肾、稳固胎元等疗效<sup>[24]</sup>,CCF作为其主要活性成分,含量可达到3.42%<sup>[25]</sup>。因此,本研究主要探讨CCF改善RSA的作用机制。

SGK2是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,其表达与多种生理过程密切相关;而WNK信号通路是一类调控细胞内离子转运、渗透压平衡及细胞存活的重要激酶家族,其中WNK1已被确认能够调节人子宫内膜基质细胞蜕膜化、增殖和迁移,与子宫稳态及其支持受孕的能力密切相关<sup>[14-15]</sup>,WNK4则与妊娠期高血压密切相关<sup>[26]</sup>。本研究团队前期预实验利用GeneMANIA数据库预测与SGK2互作密切的潜在靶点,结果表明,WNK信号通路可能是SGK2的作用靶点之一,本研究通过免疫荧光共定位实验结果证实了SGK2与WNK1、WNK4存在直接互作关系。

RSA与子宫蜕膜化异常密切相关。蜕膜化是指子宫内膜基质细胞转化为蜕膜细胞的过程,此过程伴随多

核蜕膜细胞形成、新生血管生成、蜕膜标志蛋白表达增加,PRL和IGFBP-1显著上调<sup>[26]</sup>。在胚胎发育过程中,IGFBP-1和PRL的表达在子宫内膜蜕膜化和胚胎植入中发挥重要作用,因此IGFBP-1和PRL可作为子宫内膜的蜕膜化指标。OSR1与SPAK均为WNK激酶的相关下游因子,其中OSR1在子宫内膜中表达较高,与子宫内膜增殖和凋亡有关;SPAK可调节肾脏钠氯协同转运蛋白的磷酸化水平,进而参与妊娠过程<sup>[27]</sup>。本研究进一步的实验表明,LPS可以诱导HTR-8/SVneo细胞WNK通路及蜕膜化相关因子水平降低,使用SGK2抑制剂可进一步降低上述因子水平;CCF可促进WNK通路及蜕膜化相关因子的表达,逆转SGK2抑制剂的作用。敲低SGK2后,细胞的增殖能力降低,凋亡增加,且WNK信号通路及蜕膜化相关因子表达均降低;CCF可逆转敲低SGK2对细胞的影响。以上实验表明,CCF能够上调SGK2,上调WNK信号通路,进而促进细胞增殖,减少细胞凋亡。

本研究体内实验结果显示,与对照组比较,模型组小鼠胚胎着床数量和活胎数显著减少,丢失胚胎数显著增加;SGK2抑制剂可进一步加重小鼠RSA;经CCF干预后,胚胎着床和活胎数量显著增加,丢失胚胎数显著减少。HE染色观察到CCF可以促进子宫内膜结构恢复,促进蜕膜化进程。以上结果提示,CCF在子宫内膜结构恢复和促进蜕膜化程度提升方面效果显著。进一步的实验结果表明,模型组小鼠子宫内膜组织中WNK信号通路、蜕膜化相关蛋白和mRNA表达均显著降低;抑制SGK2可导致WNK信号通路、蜕膜化相关蛋白和mRNA表达进一步减少;CCF可使WNK信号通路、蜕膜化相关蛋白和mRNA表达显著升高。此外,与体外实验结果相同,CCF低、高剂量组小鼠子宫内膜组织中线粒体膜电位显著升高,表明小鼠子宫内膜组织内细胞凋亡减少,进一步证实了CCF对RSA的改善作用。

综上所述,CCF可激活SGK2,上调WNK信号通路,促进子宫内膜蜕膜化,进而改善RSA。

## 参考文献

- [1] NDJAPA-NDAMKOU C, GOVENDER L, CHAUKE L. Role of genetic factors in recurrent miscarriages: a review [J]. Afr J Reprod Health, 2022, 26(10): 72-82.
- [2] DENG T Q, LIAO X Y, ZHU S M. Recent advances in treatment of recurrent spontaneous abortion [J]. Obstet Gynecol Surv, 2022, 77(6): 355-366.
- [3] 刘志兰,康晓敏,张晓欣,等.复发性自然流产1101例病因分析[J].上海交通大学学报(医学版),2015,35(3): 396-401,417.
- [4] LI J, FENG D Q, HE S W, et al. Meta-analysis: associa-

- tion of homocysteine with recurrent spontaneous abortion [J]. *Women Health*, 2021, 61(7): 713-720.
- [5] HAO F, ZHOU X Y, JIN L P. Natural killer cells: functional differences in recurrent spontaneous abortion[J]. *Biol Reprod*, 2020, 102(3): 524-531.
- [6] 郭丽, 杜寒倩, 李佳珊, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷对生殖毒性的减毒作用[J]. *中成药*, 2025, 47(3): 958-963.
- [7] 陈雪梅, 朱争艳. 菟丝子三阴交穴位贴敷改善复发性流产大鼠妊娠结局及母胎界面 Th1/Th2 平衡[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(12): 2585-2590.
- [8] 方永光, 王莎, 代欣旖, 等. 菟丝子及其有效成分治疗阿尔茨海默病的药理机理研究进展[J]. *江苏中医药*, 2024, 56(12): 73-78.
- [9] 孟娜, 徐双坤, 吕维瑶, 等. 菟丝子黄酮类化合物治疗不孕症的药理机制研究进展[J]. *环球中医药*, 2025, 18(4): 857-862.
- [10] 马红霞, 尤昭玲, 王若光. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型血清 P、PR、Th1/Th2 细胞因子表达的影响[J]. *中药材*, 2008, 31(8): 1201-1204.
- [11] CHENG L L, HE Q L, LIU B, et al. SGK2 promotes prostate cancer metastasis by inhibiting ferroptosis via upregulating GPX4[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 74.
- [12] 张旻轶, 楼毅云, 傅萍. 滑胎安胎协定方调节 PI3K 信号通路对肾虚型复发性自然流产子宫内膜蜕膜化的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2020, 55(12): 892-894.
- [13] DI X Q, DUAN Z B, MA Y C, et al. Jiawei shoutai pill promotes decidualization by regulating the SGK1/ENaC pathway in recurrent spontaneous abortion[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A): 116939.
- [14] CHI R A, WANG T Y, HUANG C L, et al. WNK1 regulates uterine homeostasis and its ability to support pregnancy[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(22): e141832.
- [15] ADAMS N R, VASQUEZ Y M, MO Q X, et al. WNK lysine deficient protein kinase 1 regulates human endometrial stromal cell decidualization, proliferation, and migration in part through mitogen-activated protein kinase 7[J]. *Biol Reprod*, 2017, 97(3): 400-412.
- [16] 乔宗惠, 申思楠, 邓敦, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(17): 17-24.
- [17] 安一娜, 谭姝瑜, 刘天龙, 等. SGK 通过下调抑癌基因 p27 蛋白促进小鼠肿瘤生长[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(11): 1-10.
- [18] 刘晴晴, 刘福民, 刘小云, 等. 人早孕蜕膜基质细胞表达的 SGK1 对育龄女性外周血 Treg/Th17 平衡的影响[J]. *徐州医科大学学报*, 2022, 42(5): 349-352.
- [19] 赵贵霜, 刘娟, 李孟瑶, 等. 温阳健脾方调节 AMPK/mTOR/ULK1 通路上调 RSA 小鼠孕期自噬水平改善其蜕膜化的机制研究[J]. *陕西中医*, 2024, 45(9): 1155-1160.
- [20] HAN C, WEI Y Y, GENG Y M, et al. Bisphenol A in utero exposure induces ovary dysfunction in mice offspring and the ameliorating effects of *Cuscuta chinensis* flavonoids[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(25): 31357-31368.
- [21] 黄耀孟. 糖皮质激素受体介导 NPR-A 兴奋后抑制 SGK1 和 ENaC 发挥利钠利尿效应[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2022.
- [22] 汤鹏, 姚军, 李曼, 等. GnRHa 控制性超促排卵对小鼠种植窗期 Ezrin 表达的影响[J]. *广东医学*, 2016, 37(23): 3515-3518.
- [23] 孙伟伟, 常欢, 赵瑞华. 活血消异方对子宫内膜异位症大鼠生育力和早期妊娠毒性的影响[J]. *药物评价研究*, 2019, 42(4): 648-652.
- [24] 党慧敏, 刘艳巧, 吴晓玲, 等. 补体过度激活在应激致早期流产及宫内发育迟缓中的作用[J]. *山西医科大学学报*, 2014, 45(10): 929-933, 1001-1002.
- [25] RANZUGLIA V, LORENZON I, PELLARIN I, et al. Serum and glucocorticoid inducible kinase 2, SGK2, is a novel autophagy regulator and modulates platinum drugs response in cancer cells[J]. *Oncogene*, 2020, 39(40): 6370-6386.
- [26] MAYAN H, MOUALLEM M, SHAHARABANY M, et al. Resolution of hypertension during pregnancy in familial hyperkalemia and hypertension with the WNK4 Q565E mutation[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(2): 598-603.
- [27] FILIPPI B M, PAOLA H L D, YOUCEF M, et al. MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases[J]. *EMBOJ*, 2011, 30(9): 1730-1741.

(收稿日期: 2025-05-23 修回日期: 2025-09-11)

(编辑: 舒安琴)