

- 2013: 364-367.
- [5] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南2018年修订版[J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(1): 8.
- [6] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南(2017版)[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(5): 324-335.
- [7] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 146-151.
- [8] 马宝璋, 齐聪. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 119-122.
- [9] 曹泽毅. 中华妇产科学(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 2281.
- [10] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 214.
- [11] 温豆, 王维, 姜尚, 等. 高血压伴失眠的研究进展[J]. 世界睡眠医学杂志, 2020, 7(11): 2037-2040.
- [12] 谢光璟, 黄攀攀, 王平. 天王补心丹加减改善PCPA失眠大鼠Trx系统氧化损伤的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 32-38.
- [13] 谢光璟, 薄文集, 黄攀攀, 等. 天王补心丹对慢性睡眠剥夺模型大鼠心肌、下丘脑视交叉上核VIP、AVP表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 323-326.
- [14] 秦东平, 卞海明, 张红菊. 天王补心丹加减治疗中风后焦虑症疗效观察[J]. 河北中医, 2010, 32(8): 1161.
- [15] 李东腾, 叶明远, 孙晓明. 天王补心丹对记忆能力影响的实验研究[J]. 中成药, 2001, 23(4): 296.
- [16] 黄运芳, 毕欣宁, 郑伟, 等. 交泰丸对心肾不交型失眠大鼠中枢及外周神经递质的调控作用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 2172-2179.
- [17] 洪曹栋, 尹嘉, 张萌, 等. 基于网络药理学探讨交泰丸治疗失眠的作用机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(10): 1522-1530.

【责任编辑: 陈建宏】

补肾活血方对肾虚血瘀型不明原因复发性流产未孕患者分泌晚期血清中VEGF、TGF- β 1的影响

魏爽

(黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:【目的】探讨补肾活血方对肾虚血瘀型不明原因复发性流产(URSA)未孕患者分泌晚期血清中转化生长因子 β 1(TGF- β 1)与血管内皮生长因子(VEGF)的影响。【方法】收集80例未孕的肾虚血瘀型URSA患者, 随机分为试验组和对照组, 每组各40例; 同时收集40例正常未孕妇女作为正常组。对照组给予阿司匹林肠溶片口服治疗, 试验组给予补肾活血方口服治疗, 疗程为4周。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定试验组与对照组患者治疗前后分泌晚期外周血中泌乳素(PRL)及胰岛素样生长因子结合蛋白1(IGFBP-1)、VEGF及TGF- β 1水平, 并与正常组比较。【结果】(1)治疗期间, 试验组剔除2例, 脱落3例; 对照组剔除8例, 脱落12例。最终试验组35例、对照组20例纳入研究。(2)治疗前, 试验组与对照组的URSA未孕患者外周血中VEGF、TGF- β 1水平及蜕膜化标志因子PRL、IGFBP-1水平均明显低于正常组($P < 0.01$), 治疗4周后, 上述各项指标水平均较治疗前明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且试验组的升高作用均明显优于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(3)相关性分析结果显示: VEGF、TGF- β 1与PRL、IGFBP-1均呈正相关, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。【结论】分泌晚期血清中VEGF、TGF- β 1水平与URSA的发生有关, VEGF、TGF- β 1含量过低可能影响子宫内膜蜕膜化过程, 从而导致流产发生。补肾活血方可提高肾虚血瘀型URSA患者VEGF、TGF- β 1水平, 从而促进蜕膜化标志物PRL、IGFBP-1的表达, 保证蜕膜化过程的正常进行, 以维持正常妊娠, 且效果优于西药阿司匹林。

关键词: 补肾活血方; 不明原因复发性流产; 肾虚血瘀型; 血管内皮生长因子; 转化生长因子 β 1; 蜕膜化

中图分类号: R271.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1846-10

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.013

收稿日期: 2021-01-04

作者简介: 魏爽(1990-), 女, 博士研究生; E-mail: 864031535@qq.com

Impact of *Bushen Huoxue* Formula on Serum VEGF and TGF- β 1 in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion and Non-pregnant Patients with Kidney Deficiency and Blood Stasis Type at the Late Secretory Phase

WEI Shuang

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China)

Abstract: Objective To explore the impact of *Bushen Huoxue* Formula on the levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) and non-pregnant patients with kidney deficiency and blood stasis type at the late secretory phase. **Methods** Eighty URSA and non-pregnant patients with kidney deficiency and blood stasis type were randomly divided into trial group and control group, 40 cases in each group. Meanwhile, 40 healthy non-pregnant women served as the normal group. The control group was treated with Aspirin Enteric-coated Tablets orally, and the trial group was treated with *Bushen Huoxue* Formula orally, the treatment lasting for 4 weeks. The peripheral blood levels of prolactin (PRL), insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1), VEGF and TGF- β 1 in the trial group and control group at late secretory phase were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) before and after treatment, and the levels were compared with those of the normal group. **Results** (1) During the treatment, 2 cases were excluded and 3 cases lost to follow-up in the trial group, 8 cases were excluded and 12 cases lost to follow-up in the control group. Eventually, 35 patients in the trial group and 20 patients in the control group were included in the study. (2) Before treatment, the levels of VEGF, TGF- β 1 and decidualization markers of PRL and IGFBP-1 in the peripheral blood of URSA and non-pregnant patients in trial group and control group were significantly lower than those in the normal group ($P < 0.01$). After 4 weeks of treatment, the levels of all above indexes were significantly higher than those before treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the effect on increasing the levels of above indexes in the trial group was significantly stronger than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). (3) Correlation analysis results showed that VEGF and TGF- β 1 were positively correlated with PRL and IGFBP-1, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The levels of VEGF and TGF- β 1 in the serum at late secretory phase are associated with the development of URSA, and extremely low levels of VEGF and TGF- β 1 may affect the endometrial decidualization and lead to abortion. *Bushen Huoxue* Formula can increase VEGF and TGF- β 1 levels in the URSA patients with kidney deficiency and blood stasis, thereby promoting the expression of decidualization markers of PRL and IGFBP-1, ensuring the normal process of decidualization and maintaining normal pregnancy. And the effect of *Bushen Huoxue* Formula is stronger than that of western medicine aspirin.

Keywords: *Bushen Huoxue* Formula; unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA); kidney deficiency and blood stasis type; vascular endothelial growth factor (VEGF); transforming growth factor β 1 (TGF- β 1); decidualization

妇女妊娠不足28周, 胎儿体质量不足1 000 g 而终止妊娠称为流产, 与同一性伴侣连续2次及2次以上发生自然流产称为复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)^[1]。其发病机制十分复杂, 除目前已知的如遗传、内分泌、解剖、感染及

环境等因素外, 大约半数以上患者的发病原因尚不明确, 被称为不明原因复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)^[2]。处于“接受态”的内膜和具备侵入能力的胚胎是妊娠发生并维持的不可或缺的条件。妊娠中蜕膜化作为一

个复杂而精密的生物过程极为关键, 子宫内膜蜕膜化过程的不正常不但可以引起着床失败, 而且还是流产反复发生的一个重要原因。蜕膜化一般发生在月经周期的第23天左右, 可以理解为为了胚胎顺利植入子宫内膜组织所发生的一系列重塑过程。蜕膜化从血管周围开始, 逐渐发展至整个宫腔, 是一个广泛的改变, 其过程伴随着大批的血管形成与重塑。血管的形成在蜕膜化中十分重要, 这些血管为胚胎提供了赖以生长发育的血供及营养, 对正常妊娠的维持至关重要。而血管生成是在多种血管生成因子相互协调配合作用下进行的, 其中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)的作用尤为突出。因此我们推测, VEGF及TGF- $\beta 1$ 可能通过参与子宫内膜血管的生成行为来改变子宫内膜蜕膜化过程, 从而影响妊娠结局。

中医学中, URSA当属于“滑胎”范畴, 其病因病机主要为肝脾肾等脏腑功能失调, 影响冲任, 冲任损伤, 胎元失固, 从而出现滑胎的不良妊娠结局。《景岳全书·妇人规》中明确提出要以“预培其损”作为滑胎的治疗原则。中医药以其独特的理论体系、多系统和多环节的调节作用以及安全有效、副作用少的特点, 在滑胎治疗过程中发挥着其他治疗手段无可媲美的优势。查阅相关资料发现, 前人对滑胎的机制主要分为母体冲任损伤及胎元不固两个方面, 肾虚、脾肾两虚、气血两虚、血瘀、外伤及血热等为临床上常见病因。以虚则补之、孕前治疗为主要治疗原则, 固肾安胎是其关键, 给予URSA患者补肾活血方加减治疗临床疗效显著。本研究通过观察补肾活血方对肾虚血瘀型URSA未孕患者分泌晚期血清中VEGF、TGF- $\beta 1$ 影响, 以探讨补肾活血方对URSA患者的治疗优势及作用机理, 同时也为补肾活血方孕前治疗URSA提供有力的临床依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组 选取80例于2018年4月至2019年3月期间到黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科门诊及住院部就诊并明确诊断为肾虚血瘀型的URSA未孕患者作为给药组, 年龄23~40岁,

平均年龄(30.75 \pm 4.02)岁。采用数字随机表将给药组患者随机分为补肾活血方组(试验组)和阿司匹林组(对照组), 每组各40例。另选取40例同期在黑龙江中医药大学附属第一医院妇产科门诊及住院部接受体检的既往妊娠史正常的未孕妇女为正常组, 年龄23~40岁, 平均年龄(33.8 \pm 3.74)岁。本研究已获得黑龙江中医药大学附属第一医院伦理委员会的审核批准, 并在研究对象知情同意情况下收集相关生物血清样本。

1.2 诊断标准 西医诊断标准: 参照谢幸等主编的第8版《妇产科学》^[3]中有关URSA的诊断标准。中医诊断标准: 参照《中医妇科学》^[4]《中医诊断学》^[5]《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[6]中的相关标准并结合临床实际修改制定肾虚血瘀型的中医证型诊断标准。

1.3 纳入标准

1.3.1 病例纳入标准 ①符合上述URSA的诊断标准; ②中医证型为肾虚血瘀型; ③既往月经规律, 周期在28~30d; ④未经过任何治疗; ⑤无有害毒物接触史; ⑥近期无病毒或寄生虫感染; ⑦尿妊娠试验阴性、血中 β 绒毛膜促性腺激素(β -HCG) < 5 U/L且用药期间避孕; ⑧无精神类疾患, 无血液系统、免疫系统及风湿类等全身系统疾病, 且肝肾功能无异常; ⑨近3个月内未曾服用任何激素类药物; ⑩知情并同意参加本研究的患者。

1.3.2 正常组纳入标准 ①尿妊娠试验阴性、血 β -HCG < 5 U/L且3个月内避孕; ②既往有一次或一次以上正常生育史且生产子女均健康; ③既往无自然流产史; ④夫妻无遗传病史; ⑤无精神类疾患, 无血液系统、免疫系统及风湿类等全身系统疾病, 且肝肾功能无异常; ⑥近3个月内未曾服用任何激素类药物; ⑦知情并同意参加本研究的健康体检者。

1.4 排除标准

有以下任何一种情况的病例均予以排除: ①不符合上述中西医诊断标准的患者; ②合并有血液系统、免疫系统及风湿类等全身系统疾病, 或肝肾功能存在异常的患者; ③精神病患者; ④近3个月内曾服用过任何激素类药物的患者; ⑤依从性差, 未按规定治疗, 或自行加用其他治疗措施, 从而影响检测结果的患者。

1.5 治疗方法

1.5.1 对照组 给予阿司匹林肠溶片口服治疗。

用法:阿司匹林肠溶片(生产厂家:拜尔医药保健有限公司;批准文号:国药准字J20080078),口服,每次100 mg,每天1次,疗程为4周。

1.5.2 试验组 给予补肾活血方口服治疗。补肾活血方组成:桑寄生15 g、丹参15 g、续断15 g、阿胶(烊化)10 g、黄芪15 g、菟丝子15 g。每日1剂,常规煎取200 mL,分早晚2次温服,每次100 mL,疗程为4周。以上中药汤剂均由黑龙江中医药大学附属第一医院中药局及煎药室提供。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 观察指标 试验组与对照组患者在治疗前和治疗4周后的月经第26天(子宫内膜5~6 mm)时检测静脉血清VEGF、TGF- β 1、泌乳素(PRL)及胰岛素样生长因子结合蛋白1(IGFBP-1)水平;正常组受试者入组后于月经第26天(子宫内膜5~6 mm)时检测静脉血清VEGF、TGF- β 1、PRL及IGFBP-1水平。

1.6.2 标本采集及血清制备 受试者在受检前1 d需低盐低脂饮食,避免饮酒吸烟,零点后禁食和禁饮水,次日早晨取空腹静脉血5 mL,置于促凝管中轻轻摇动混匀后放入离心机中,以3 500 r/min离心15 min,吸出上层分离血清,移入高温灭菌的EP管内,迅速置于-80℃低温冰箱中冻存备用。应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测受试者血清TGF- β 1、VEGF、PRL及IGFBP-1水平。

1.6.3 试剂与仪器 ①试剂:Human VEGF ELISA Kit 试剂盒;Human TGF- β 1 ELISA Kit 试剂盒;Human PRL ELISA Kit 试剂盒;Human IGFBP-1 ELISA Kit 试剂盒;上述试剂均购自碧云天生物有限公司。②仪器:美国Beckman Coulter公司高速冷冻离心机,型号:Allegra-21R;BioTek Instruments, Inc全自动酶标仪,型号:ELX808;上海精宏实验设备有限公司DK-8D型电热恒温水槽;上海三科仪器有限公司318W型洗板机及枪头、移液器等实验耗材。

1.6.4 实验方法 提前将试剂盒放置于室温下40 min,使用前摇匀;待测血清常温下解冻;在酶标板上设置10孔标准品孔,稀释后各孔均加样50 μ L;将样品稀释液40 μ L加入酶标包被板上待测样品孔中,然后再加入10 μ L待测样品,轻轻晃动混匀;用封板膜密封后,置37℃温育30 min;用蒸馏水将浓缩洗涤液30倍稀释后备用;小心揭开封板膜,弃去液体后甩干,将洗涤液加满每微

孔,静置30 s后弃去,如此重复5次,拍干;除去空白孔,每孔再加入50 μ L酶标试剂;重复温育后,除去空白孔,每孔再次加入酶标试剂50 μ L;将50 μ L显色剂A分别加入每微孔中,然后再加入50 μ L显色剂B,轻轻摇动混匀,37℃避光显色15 min;最后将50 μ L终止液分别加入每微孔中,终止反应。以空白孔调零,450 nm波长依序测量各孔吸光度(OD值),且应在加终止液后15 min以内完成测定。

1.6.5 结果判断 依据OD值与标准物的浓度计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的OD值代入方程,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,得到样品的实际浓度。

1.7 统计方法 应用SPSS 19.0统计软件进行数据的统计分析。实验所得数据(计量资料)均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内治疗前后比较采用配对样本 t 检验,组间比较采用两独立样本 t 检验。所有检验均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组患者脱落剔除情况 治疗期间,试验组剔除2例,未按要求治疗脱落3例;对照组剔除8例,未按要求治疗脱落12例。最终试验组35例、对照组20例纳入研究。

2.2 2组患者治疗前后血清VEGF水平比较 表1结果显示:治疗前,2组患者血清VEGF水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),均明显低于正常组水平($P < 0.01$)。治疗后,2组患者血清VEGF水平均较治疗前明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且试验组对血清VEGF水平的升高作用明显优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中试验组已接近正常组水平($P > 0.05$),而对照组尚未接近正常组水平($P < 0.05$)。表明补肾活血方与阿司匹林均可明显提高URSA患者血清VEGF含量,但补肾活血方的提高作用明显优于阿司匹林,而血清VEGF表达水平的提高,可以促进胚胎发育和正常妊娠维持。

2.3 2组患者治疗前后血清TGF- β 1水平比较 表2结果显示:治疗前,2组患者血清TGF- β 1水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),均明显低于正常组水平($P < 0.01$)。治疗后,2组患者血清TGF- β 1

表1 2组不明原因复发性流产(URSA)患者治疗前后血清血管内皮生长因子(VEGF)水平比较

Table 1 Comparison of serum VEGF level between the two groups of patients with URSA before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

组别	例数(例)	治疗前	治疗后	P值
试验组	35	612.92 ± 130.56 ^②	836.57 ± 188.75 ^{④⑤}	0.000
对照组	20	628.44 ± 131.47 ^②	717.52 ± 115.82 ^{③①}	0.042
正常组	40	989.90 ± 188.92	—	

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与正常组比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$, 与治疗前比较; ⑤ $P < 0.01$, 与对照组治疗后比较

表2 2组不明原因复发性流产(URSA)患者治疗前后血清转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)水平比较

Table 2 Comparison of serum TGF- $\beta 1$ level between the two groups of patients with URSA before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	例数(例)	治疗前	治疗后	P值
试验组	35	815.78 ± 91.76 ^②	1 012.45 ± 125.00 ^{④⑤}	0.000
对照组	20	811.03 ± 104.86 ^②	879.97 ± 100.06 ^{③①}	0.040
正常组	40	1 209.44 ± 190.07	—	

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与正常组比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$, 与治疗前比较; ⑤ $P < 0.01$, 与对照组治疗后比较

水平均较治疗前明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且试验组对血清TGF- $\beta 1$ 水平的升高作用明显优于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 其中试验组已接近正常组水平($P > 0.05$), 而对照组尚未接近正常组水平($P < 0.05$)。表明补肾活血方与阿司匹林均可明显提高URSA患者血清TGF- $\beta 1$ 含量, 且补肾活血方的提高作用明显优于阿司匹林, 而血清TGF- $\beta 1$ 表达水平的提高, 可以促进胚胎发育和正常妊娠的维持。

2.4 2组患者治疗前后血清PRL水平比较 表3结果显示: 治疗前, 2组患者血清PRL水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 均明显低于正常组水平($P < 0.01$)。治疗后, 2组患者血清PRL水平均较治疗前明显升高($P < 0.01$), 且试验组对血清PRL水平的升高作用明显优于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但均未接近正常组水平($P < 0.05$)。表明补肾活血方与阿司匹林均可明显提高URSA患者血清PRL含量, 且补肾活血方的提高作

用明显优于阿司匹林, 而血清PRL表达水平的提高, 有利于胚胎发育和正常妊娠的维持。

表3 2组不明原因复发性流产(URSA)患者治疗前后血清泌乳素(PRL)水平比较

Table 3 Comparison of serum PRL level between the two groups of patients with URSA before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	例数(例)	治疗前	治疗后	P值
试验组	35	466.40 ± 90.99 ^②	633.06 ± 99.73 ^{④①}	0.000
对照组	20	459.99 ± 11.42 ^②	564.11 ± 81.97 ^{③①}	0.001
正常组	40	802.48 ± 96.81	—	

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与正常组比较; ③ $P < 0.01$, 与治疗前比较; ④ $P < 0.05$, 与对照组治疗后比较

2.5 2组患者治疗前后血清IGFBP-1水平比较 表4结果显示: 治疗前, 2组患者血清IGFBP-1水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 均明显低于正常组水平($P < 0.01$)。治疗后, 2组患者血清IGFBP-1水平均较治疗前明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且试验组对血清IGFBP-1水平的升高作用明显优于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中试验组已接近正常组水平($P > 0.05$), 而对照组尚未接近正常组水平($P < 0.05$)。表明补肾活血方与阿司匹林均可明显提高URSA患者血清IGFBP-1含量, 但补肾活血方的提高作用明显优于阿司匹林, 而血清IGFBP-1表达水平的提高, 有利于胚胎发育和正常妊娠的维持。

2.6 相关性分析 由图1~4可见, 试验组与对照组中的PRL与VEGF及TGF- $\beta 1$ 比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明蜕膜化标志物PRL与VEGF及TGF- $\beta 1$ 均呈正相关, 即当

表4 2组不明原因复发性流产(URSA)患者治疗前后血清IGFBP-1水平比较

Table 4 Comparison of serum IGFBP-1 level between the two groups of patients with URSA before and after treatment ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	例数(例)	治疗前	治疗后	P值
试验组	35	36.35 ± 12.11 ^②	61.98 ± 17.45 ^{④⑤}	0.000
对照组	20	37.34 ± 11.19 ^②	50.07 ± 14.31 ^{③①}	0.017
正常组	40	72.98 ± 18.51	—	

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与正常组比较; ③ $P < 0.05$, ④ $P < 0.01$, 与治疗前比较; ⑤ $P < 0.05$, 与对照组治疗后比较

TGF-β1 和 VEGF 水平升高时, 会伴随着 PRL 水平升高。由图 5~8 可见, 试验组与对照组中的 IGFBP-1 与 VEGF 及 TGF-β1 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明蜕膜化标志物 IGFBP-1 与 VEGF 及 TGF-β1 均呈正相关, 即当 VEGF 和 TGF-β1 水平升高时, 会伴随着 IGFBP-1

水平升高。提示 VEGF、TGF-β1 水平可通过影响蜕膜化过程从而影响妊娠状态。补肾活血方可能通过提高肾虚血瘀型 URSA 患者 VEGF、TGF-β1 水平, 促进蜕膜化标志物 PRL、IGFBP-1 表达, 从而促进蜕膜化过程的正常进行, 以维持正常妊娠。

2.7 随访结果 截止 2019 年 4 月 31 日, 除去本研

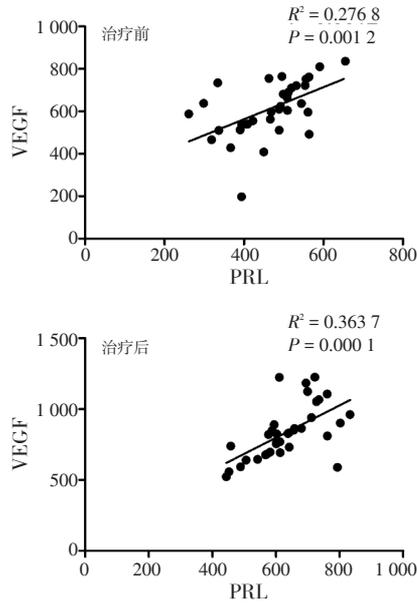


图 1 试验组治疗前后血管内皮生长因子(VEGF)与 PRL 相关性比较

Figure 1 Comparison of correlation between VEGF and PRL in the trial group before and after treatment

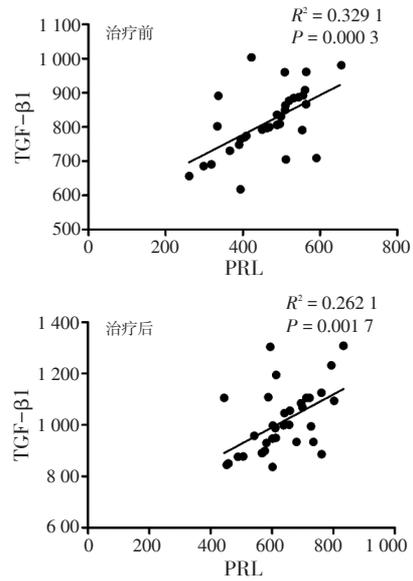


图 3 试验组治疗前后转化生长因子β1(TGF-β1)与 PRL 相关性比较

Figure 3 Comparison of correlation between TGF-β1 and PRL in the trial group before and after treatment

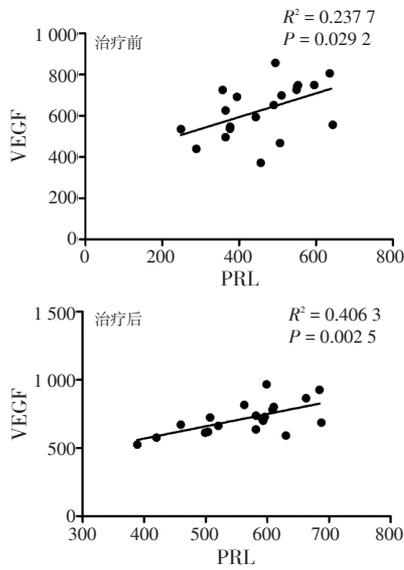


图 2 对照组治疗前后血管内皮生长因子(VEGF)与 PRL 相关性比较

Figure 2 Comparison of correlation between VEGF and PRL in the control group before and after treatment

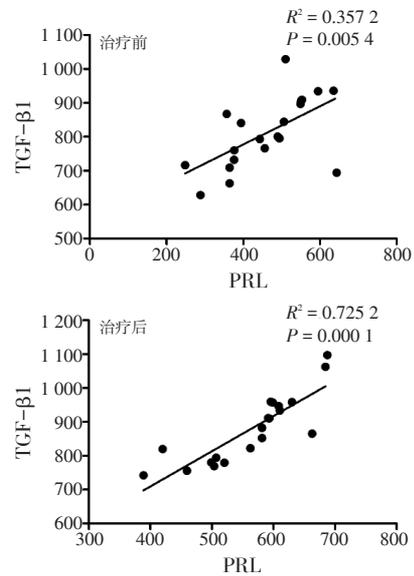


图 4 对照组治疗前后转化生长因子β1(TGF-β1)与 PRL 相关性比较

Figure 4 Comparison of correlation between TGF-β1 and PRL in the control group before and after treatment

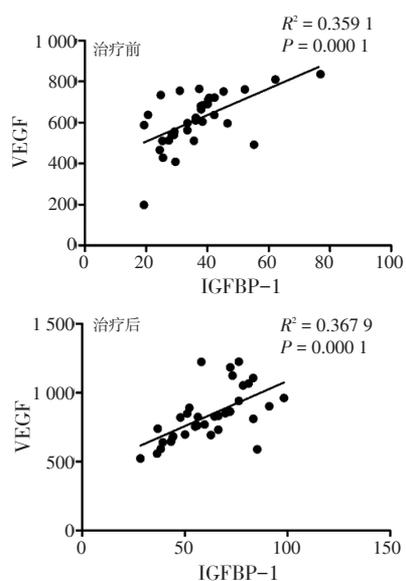


图5 试验组治疗前后血管内皮生长因子(VEGF)与IGFBP-1相关性比较

Figure 5 Comparison of correlation between VEGF and IGFBP-1 in the trial group before and after treatment

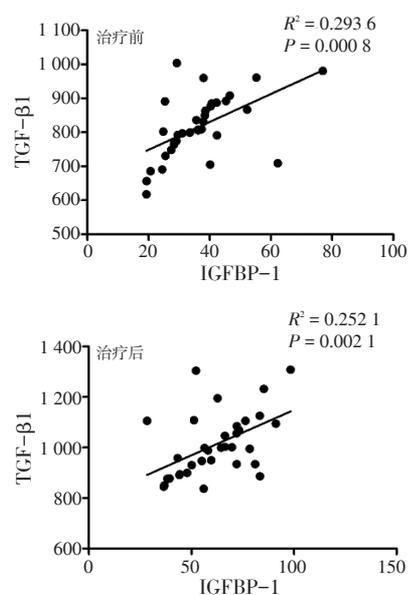


图7 试验组治疗前后转化生长因子β1(TGF-β1)与IGFBP-1相关性比较

Figure 7 Comparison of correlation between TGF-β1 and IGFBP-1 in the trial group before and after treatment

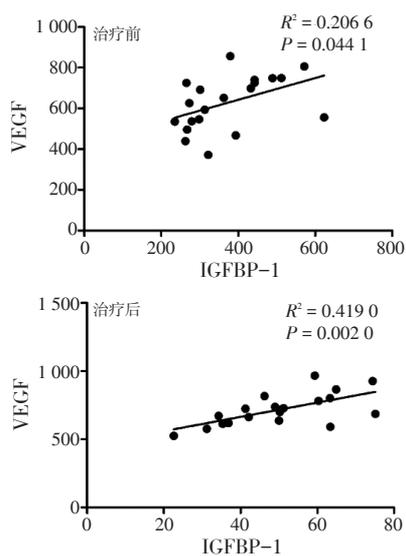


图6 对照组治疗前后血管内皮生长因子(VEGF)与IGFBP-1相关性比较

Figure 6 Comparison of correlation between VEGF and IGFBP-1 in the control group before and after treatment

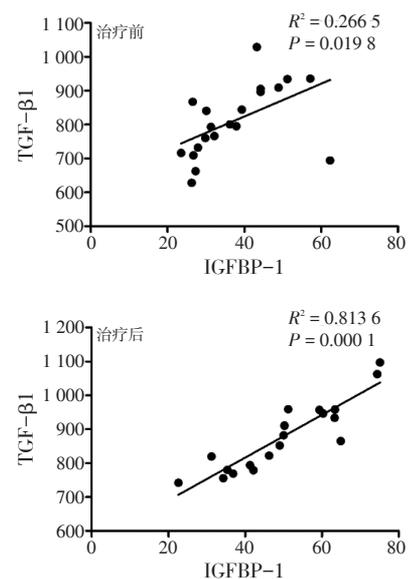


图8 对照组治疗前后转化生长因子β1(TGF-β1)与IGFBP-1相关性比较

Figure 8 Comparison of correlation between TGF-β1 and IGFBP-1 in the control group before and after treatment

究中剔除和脱落的患者,电话随访调查其余55例患者,记录是否妊娠及其妊娠结局。结果显示:对照组发生妊娠15例,其中已成功分娩3例,未发现胎儿畸形及新生儿疾病;妊娠中期3例,未见流产征兆;妊娠早期5例,未见流产征兆;妊娠期

早期流产4例,尚未妊娠5例。试验组发生妊娠29例,其中已成功分娩4例,未发现胎儿畸形及新生儿疾病;妊娠中期14例,未见流产征兆;妊娠早期5例,未见先兆流产征兆;妊娠中期流产4例,妊娠8周流产3例,尚未妊娠6例。

3 讨论

很多已知和未知的不良因素都可影响妊娠结局, 胚胎植入前子宫容受态形成和胚胎植入后子宫内膜蜕膜化都与胚胎植入和妊娠维持密切相关, 其中任意因素异常均可致母胎识别失败而出现早期流产。近年来, 随着对子宫内膜蜕膜化研究的逐渐深入, 已经发现缺乏蜕膜化或蜕膜化不足在生殖中发挥着至关重要的作用, 其可能是不明原因复发性流产(URSA)发生的一个主要原因。排卵后, 因孕激素水平的升高而使处于增生期的子宫内膜向分泌期转变, 这一过程即为子宫内膜蜕膜化, 是子宫为了适应妊娠做出的最早改变之一, 可概括为使胚胎顺利植入子宫内膜组织而发生的一系列重塑过程。子宫内膜蜕膜化一般发生在月经周期的第23天左右, 是子宫内膜基质细胞在蜕膜化诱导因子的刺激下增殖并再分化, 腺体和螺旋小动脉发育以及自然杀伤细胞的聚集, 为胚胎提供营养的同时调节滋养层以减少局部免疫反应, 是胚胎植入母体及维持妊娠的保障^[7]。大量的生长因子、催乳素、胰岛素样生长因子结合蛋白1(IGFBP-1)、细胞因子、组织因子、神经肽、细胞外基质成分等在间质细胞发生蜕膜化的过程中分泌, 其中IGFBP-1与泌乳素(PRL)被广泛用来作为蜕膜化标志的因子^[8-11]。大量的血管形成与血管重塑在蜕膜化过程中进行, 这些血管的生成是子宫内膜蜕膜化过程的核心环节, 通过建立一个复杂的血窦与血管网络系统以利于胚胎与母体之间的物质交换, 从而维持妊娠的正常进行。因此, 异常的血管生成过程可导致蜕膜化过程缺陷而引起妊娠失败, 影响妊娠结局。在多种血管生成因子的相互协调配合作用下血管才能正常生成, 其中又以转化生长因子 β (TGF- β)与血管内皮生成因子(VEGF)尤为突出。

VEGF在子宫血管生成中十分重要, 是最有力的血管生成因子。其受体仅存在于血管内皮细胞中, VEGF通过与其受体结合而发挥生物学效应, 在正常组织中很少合成, 但在有血管新生的组织内多呈高表达状态。VEGF的生物学特性主要表现为: 增加微血管的通透性并与血管内皮细胞受体特异性地结合, 促进血管内皮细胞的增殖和分裂, 进而导致新生血管的生成^[12]。薄而密的子宫内膜在VEGF的调节作用下可转化为通透性高且厚的

分泌性内膜, 血管通透性发生改变^[13]。分泌期的子宫内膜容受性良好, 子宫血管丰富, 血管通透性增加, 子宫轻微水肿, 基质细胞增殖分化并进行蜕膜转化, 同时伴有大量血管的重塑和新生^[14-15]。在妊娠的过程中, VEGF可以促进血管生成参与子宫内膜的蜕膜转换, 故其正常的分泌水平是蜕膜化过程正常进行的保障, 以维持胚胎与母体之间的物质交换, 是维持正常妊娠的关键。研究表明VEGF低水平时可导致子宫内膜蜕膜化异常或缺陷, 从而导致流产发生。

TGF- β 超家族成员众多, 它们在调节细胞增殖、分化、凋亡及组织重塑等方面具有重要作用并形成了网络化调节模式, 从而参与了蜕膜化过程的调节^[16]。颗粒细胞作为TGF- β 产生的主要部位之一, 其存在的类型以TGF- β 1为主。通过实验研究, Chang H J等^[17]发现, 通过磷酸化Smad和Erk TGF- β 1可诱导蜕膜化发生, 使PRL分泌增加。同时, 通过促进环氧化酶(COX-2)及前列腺素E2(PGE2)的表达, TGF- β 1可间接发挥诱导ESCs蜕膜化的作用。Brogi E等^[18-19]根据TGF- β 1在血管生成等方面的作用, 将其称为“间接”血管生成因子, 认为TGF- β 1可调节滋养细胞中血管内皮生长因子的生成, 上调VEGF的表达, 甚至在适当条件下可以直接参与VEGF产生, 在妊娠早期可以促进胎盘血管形成, 有助于胚胎着床及胎盘形成, 使蜕膜化过程正常进行, 以利妊娠的维持。TGF- β 1主要存在于结缔组织细胞及血管内皮细胞, 在大鼠的整个正常妊娠过程中, 其在子宫和胎盘中都有表达, 另外, 其分布早期主要集中在子宫蜕膜组织中, 中晚期则主要集中在滋养层以及植入点附近的腔上皮和腺上皮周围, 在胚胎着床、胎盘发育和胎儿生长等各方面发挥重要作用^[20]。通过刺激纤维和血管内皮生长因子的生长作用, TGF- β 1在胚胎种植过程中发挥重要作用^[21]。亦有研究^[11]表明, 在TGF- β 1的刺激下子宫内膜中的基质细胞分泌细胞外基质蛋白, 可促进内膜的蜕膜化, 从而有利于孕卵的着床。

复发性流产在祖国医学中相当于“滑胎”范畴。《诸病源候论》指出肾虚冲任损伤、胎元不固为滑胎的主要发病机制, 肾虚为堕胎发病之本, 血瘀为发病之标。肾虚温煦失职或生内热, 寒凝血滞不行而生血瘀或热灼精血, 瘀滞胞宫, 新血

不能下注胞宫以养胎,均可导致胎动不安、胎漏甚至堕胎;同时,流产反复发生也会导致瘀血内阻于胞宫,冲任胞络损伤或癥瘕发生,瘀血不去,新血不生,胎失所养或癥瘕碍胎生长发育,从而导致胎漏、胚胎发育不良甚至枯萎,终致胎元难固而流产。肾虚血瘀,屡屡胎堕,故应补肾活血,通过补肾药与活血药相互结合,才能够更好地发挥相互促进的作用,进而提高妊娠成功率。在中医学理论体系中,“治未病”贯穿始终,众多思想观念、治疗原则、组方用药均是在“治未病”基础之上建立的。在该理论思想指导下,张景岳将“预培其损”作为对滑胎病的治疗原则。结合该理论,为最大程度地对堕胎者进行治疗,避免患者再次出现妊娠不良结局,从而最大限度地提高妊娠成功率,补肾活血功效的药物应在患者未孕前给予,以达到孕前治疗的目的。本研究使用的补肾活血方是根据对肾虚血瘀证URSA患者的临床诊疗经验及其致病机理拟定的,在临床使用上疗效确切。经该方治疗后患者月经第26天(子宫内膜5~6 mm)静脉血中PRL及IGFBP-1水平显著升高,再次妊娠者孕期检测血清孕激素、血清雌激素和人绒毛膜促性腺激素,其水平均有明显的升高。

补肾活血方的主要成分有丹参、菟丝子、续断、桑寄生、阿胶(烊化)、黄芪。其中,桑寄生益肾安胎。《本草纲目》认为,桑寄生能够“安胎……助筋骨,益血脉,主怀妊漏血不止,令胎牢固。”药理学研究发现,桑寄生含有丰富的锰、锌等微量元素,有益于胚胎生长和发育。丹参活血通经,养血消痈,止痛安神。菟丝子补肾安胎,固精止泻。《山东中药》指出,菟丝子能“治妇人常习流产。”张锡纯提出,菟丝子是治流产的主药,“菟丝子大能补肾,肾旺能荫胎。”续断补益肝肾,止血安胎,强筋健骨,疗伤续折。《本草纲目》云:“久服……破癥结瘀血……胎漏。”黄芪益气升阳固表,可维系胞脉,升举阳气,固摄胎元。现代药理学认为,黄芪能够调节机体免疫,平衡Th1/Th2,增强细胞免疫力。阿胶补血止血。《神农本草经》记载阿胶能“主女子下血,安胎,久服益气。”综观全方,针对肾虚血瘀证URSA拟定的补肾活血方,以续断、菟丝子、丹参为君药,达补肾与活血并重之功;以桑寄生为臣

药,发挥益肾安胎之效;以黄芪与阿胶为佐药,发挥补气补血止血、以血养胎之效,并使血脉伏藏,以防活血化瘀药散血动血之弊。故全方适用于肾虚血瘀证URSA未孕患者的治疗。

诸多研究表明,复发性流产的发生与血栓前状态有一定关系,故使用抗凝药物在临床上也可取得一定疗效。作为治疗复发性流产传统药物的阿司匹林,可抑制血小板的释放反应,抑制血小板聚集,在体内具有抗血栓的作用,是西医治疗复发性流产血栓前状态的主要临床药物。

本研究结果显示,治疗前,试验组与对照组的URSA未孕患者外周血中VEGF、TGF- β 1水平及蜕膜化标志因子PRL、IGFBP-1的水平均明显低于正常组($P < 0.01$),治疗4周后,上述各项指标水平均较治疗前明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且试验组的升高作用均明显优于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时,VEGF、TGF- β 1与PRL、IGFBP-1均呈正相关,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明补肾活血方与阿司匹林均可明显提高URSA患者血清VEGF、TGF- β 1及蜕膜化标志因子PRL、IGFBP-1水平,且补肾活血方的提高作用明显优于阿司匹林。血清VEGF、TGF- β 1及蜕膜化标志因子PRL、IGFBP-1表达水平的提高,有利于母胎界面大量的血管形成与血管重塑,可为胚胎与母体之间的物质交换建立桥梁,改善母胎界面免疫微环境,促进子宫内膜蜕膜化的正常进行,从而有利于胚胎发育和正常妊娠的维持。

综上所述,应用中药补肾活血方治疗肾虚血瘀型URSA未孕患者具有显著的临床疗效,该研究结果可为临床孕前治疗URSA患者提供较为客观的科学依据。

参考文献:

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 83.
- [2] 王春倩. 滋肾育胎丸防治脾肾虚弱型复发性流产的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [3] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [4] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 208-213.
- [5] 朱文峰. 中医诊断学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 160.
- [6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 253-260.

- [7] 张娟娟, 何俊琳, 刘学庆, 等. 复发性流产患者子宫蜕膜基因表达谱[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(4): 450-459.
- [8] GANEFF C, CHATEL G, MUNAUT C, et al. The IGF system in in-vitro human decidualization[J]. Mol Hum Reprod, 2009, 15(1): 27-38.
- [9] STOIKOS C J, HARRISON C A, FRANKENNE F, et al. A distinct cohort of the TGF β superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization [J]. Hum Reprod, 2008, 23(6): 1447-1456.
- [10] KODAMA A, YOSHINO O, OSUGA Y, et al. Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells[J]. Hum Reprod, 2010, 25(3): 751-756.
- [11] KANE N M, JONES M, BROSENS J J, et al. TGF beta1 attenuates expression of prolactin and IGFBP-1 in decidualized endometrial stromal cells by both SMAD-dependent and SMAD-independent pathways[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12970.
- [12] 谢平, 刘庆维. 血管内皮生长因子、转化生长因子- β 与血管生成[J]. 医学综述, 2004, 10(8): 449-452.
- [13] LAI T H, VLAHOS N, SHIH I M, et al. Expression patterns of VEGF and Flk-1 in human endometrium during the menstrual cycle[J]. J Reprod Infertil, 2015, 16(1): 3-9.
- [14] PLAISIER M. Decidualisation and angiogenesis [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011, 25(3): 259-271.
- [15] KLIMAN H J. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion [J]. Am J Pathol, 2000, 157(6): 1759-1768.
- [16] FLORIO P, GABBANINI M, BORGES L E, et al. Activins and related proteins in the establishment of pregnancy [J]. Reprod Sci, 2010, 17(4): 320-330.
- [17] CHANG H J, LEE J H, HWANG K J, et al. Transforming growth factor (TGF)-beta1-induced human endometrial stromal cell decidualization through extracellular signal-regulated kinase and Smad activation in vitro: peroxisome proliferator-activated receptor gamma acts as a negative regulator of TGF-beta1 [J]. Fertil Steril, 2008, 90(Suppl 4): 1357-1365.
- [18] BROGI E, WU T, NAMILKI A, et al. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only [J]. Circulation, 1994, 90(2): 649-652.
- [19] STAVRI G T, ZACHARY I C, BASKERVILLE P A, et al. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: synergistic interaction with hypoxia [J]. Circulation, 1995, 92(1): 11-14.
- [20] 王文娟. TGF- β 和 IL-10 在胚胎停育绒毛组织中的表达及其意义[D]. 西宁: 青海大学, 2012.
- [21] BOUSSAT S, EDDAHIBI S, COSTE A, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(2): L371-L378.

【责任编辑: 陈建宏】