# 大豆异黄酮对先兆流产模型大鼠的保胎作用及机制研究Δ

李三阳[1*]，金蓬勃[1]，王秋红[1#]，王晶晶[1]，苗　婷[2]，陈东方[2]，郑伯媛[3]（1.郑州卫生健康职业学院妇儿教研室，河南 荥阳　450199；2.郑州大桥医院妇产科，郑州　450053；3.河南中医药大学第一附属医院妇产科，郑州　450003）

**中图分类号**　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）12-1482-07
**DOI**　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.12

**摘　要　目的**　研究大豆异黄酮对先兆流产大鼠的保胎作用及可能机制。**方法**　取雌鼠促情，与雄鼠交配、妊娠后随机分为正常组（纯化水灌胃，$n$=10）、模型组（纯化水灌胃，$n$=9）、阳性对照药组（黄体酮4 mg/kg，肌内注射，$n$=9）和大豆异黄酮低、中、高剂量组（25、50、100 mg/kg灌胃，$n$=10）。除正常组外，其余各组大鼠均于孕8 d以米非司酮+米索前列醇灌胃建立先兆流产模型。各组大鼠分别于孕1～7 d、孕9～12 d给药/纯化水，每天1次。孕14 d时，计算各组大鼠的保胎率，检测大鼠血清中β-人绒毛膜促性腺激素（β-HCG）、孕酮（P）水平，观察大鼠胎盘与蜕膜组织病理形态学变化并检测其细胞凋亡指数，检测胎盘组织中凋亡相关因子（Fas）、凋亡相关因子配体（FasL）、增殖细胞核抗原（PCNA）和肝素结合表皮生长因子（HB-EGF）mRNA及其蛋白表达，检测蜕膜组织中Fas、PCNA和HB-EGF mRNA及其蛋白表达。**结果**　模型组大鼠胎盘组织充血扩张明显，血管较少且形态不规则，可见大量严重基质水肿、炎症细胞浸润和铁胆黄素沉积。与模型组比较，大豆异黄酮各剂量组大鼠的保胎率，血清β-HCG、P水平，胎盘与蜕膜组织中PCNA、HB-EGF mRNA及其蛋白表达水平均显著升高（$P$<0.05），病理学变化显著改善；胎盘与蜕膜组织细胞凋亡指数，胎盘组织中Fas、FasL mRNA及其蛋白表达水平，蜕膜组织中Fas mRNA及其蛋白表达水平均显著降低（$P$<0.05），且大豆异黄酮的上述作用呈剂量依赖性（$P$<0.05）。**结论**　大豆异黄酮对先兆流产模型大鼠有保胎作用；其作用机制可能与下调母-胎界面Fas、FasL mRNA及其蛋白表达，上调PCNA、HB-EGF mRNA及其蛋白表达有关。

**关键词**　大豆异黄酮；先兆流产；母-胎界面；凋亡相关因子；凋亡相关因子配体；增殖细胞核抗原；肝素结合表皮生长因子

## Study on the protective effect and mechanism of soybean isoflavones against threatened miscarriage model rats

LI Sanyang[1], JIN Pengbo[1], WANG Qiuhong[1], WANG Jingjing[1], MIAO Ting[2], CHEN Dongfang[2], ZHENG Boyuan[3]（1. Women and Children's Teaching and Research Section, Zhengzhou Health Vocational College, Henan Xingyang 450199, China; 2. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Zhengzhou Bridge Hospital, Zhengzhou 450053, China; 3. Dept. of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China）

**ABSTRACT　OBJECTIVE** To study the protective effect and possible mechanism of soybean isoflavones against threatened miscarriage rats. **METHODS** Female mice were selected to promote estrus and mate with male mice. After pregnancy, they were randomly divided into normal group (purified water, i.g., $n$=10), model group (purified water, i.g., $n$=9), positive control drug group (progesterone 4 mg/kg, i.m., $n$=9), low-, medium- and high-dose soybean isoflavone groups (25, 50 and 100 mg/kg, i.g., $n$=10). Except for the normal group, the rest were given mifepristone+misoprostol on the 8th day of pregnancy to establish threatened miscarriage model, and then given purified water or drugs, once a day, on days 1-7 and 9-12 of pregnancy, respectively. At 14 days of pregnancy, the rates of fetal protection were counted. Serum levels of β-human chorionic gonadotrophin (β-HCG) and progesterone (P) in rats were detected. Pathological and morphological changes in rat placenta and decidua tissues were observed, and the apoptosis indexes of cells were detected; mRNA and protein expressions of factor of apoptosis related (Fas), factor of apoptosis related ligand (FasL), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF) were determined in placenta tissues, and mRNA and protein expressions of Fas, PCNA and HB-EGF in decidua tissues were detected. **RESULTS** In the model group, the placental tissues of rats were hyperemia and dilatation, with fewer and irregular blood vessels; severe stromal edema, inflammatory cell infiltration and iron-choledrin deposition were observed. Compared with model group, the fetal survival rates, serum levels of β-HCG and P, the expressions of PCNA

Δ **基金项目** 河南省中医药科学研究专项课题（No.2019JDZX-2094）

＊**第一作者** 主治医师，助教，硕士。研究方向：围产与生殖医学、教育学。E-mail：kpqo6ppq@126.com

\# **通信作者** 副教授，硕士。研究方向：流行病学、统计学。E-mail：15981868989@163.com

and HB-EGF mRNA and proteins in the placenta and decidua tissue of soybean isoflavone groups increased significantly ($P<0.05$), while pathological changes were improved significantly; cell apoptosis index in the placenta and decidua tissue, the expressions of Fas, FasL mRNA and proteins in the placenta and Fas mRNA and protein in the decidua tissue decreased significantly ($P<0.05$). The effect of soybean isoflavones was dose-dependent ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Soybean isoflavone has protective effect on threatened miscarriage, the mechanism of which is related to down-regulating the expressions of Fas and FasL mRNA and protein at the maternal-fetal interface, and up-regulating the expressions of mRNA and protein of PCNA and HB-EGF.

**KEYWORDS** soybean isoflavone; threatened miscarriage; maternal-fetal interface; factor of apoptosis related; factor of apoptosis related ligand; proliferating cell nuclear antigen; heparin binding epidermal growth factor

先兆流产是妊娠期常见病，可发展为难免流产[1]。黄体酮是先兆流产的常用药，可保护子宫内膜，为胎儿生长创造良好的环境[2]。有资料显示，先兆流产患者可使用黄体酮保胎，该药可维持妊娠并防止子宫收缩[3]。然而该药对母-胎界面免疫反应的调节作用并不理想，仍有部分先兆流产患者发展为难免流产[4]，故亟须研发新的药物以积极调节母-胎界面免疫，提高先兆流产的疗效。

大豆异黄酮属于黄酮类化合物，与雌激素结构相似，可促进卵巢发育、调节性激素水平、改善生殖功能[5－6]。也有研究证实，大豆异黄酮可调节机体免疫[7]。先兆流产母-胎界面凋亡相关因子（factor of apoptosis related，Fas）/凋亡相关因子配体（factor of apoptosis related ligand，FasL）通路被激活后，可传导死亡信号、下调增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）和肝素结合表皮生长因子（heparin binding epidermal growth factor，HB-EGF）表达，进而引起滋养细胞凋亡[8]。若未及时调节上述通路的信号传导和分子表达，将会发展为难免流产。目前，大豆异黄酮是否可预防先兆流产，是否通过调节先兆流产母-胎界面Fas/FasL表达、促进PCNA和HB-EGF表达发挥保胎作用尚不清楚。为此，本研究开展了大豆异黄酮治疗先兆流产的效果观察及作用机制探讨的动物实验，以期为先兆流产防治药物的研发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Multiskan FC型酶标仪、Sorvall ST 8型离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司），DM750型光学显微镜（德国Leica公司），DH-160I型二氧化碳培养箱（苏州威尔实验用品有限公司），FQD-48A型聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（上海昨非实验室设备有限公司），DYCP-31CN型蛋白质凝胶电泳仪（北京六一仪器厂）等。

### 1.2 主要药品与试剂

大豆异黄酮原料药（批号2104150，纯度＞98%）购自北京迈瑞达科技有限公司；己烯雌酚原料药（批号100033-201308，纯度＞98%）、米索前列醇原料药（批号410004-201502，纯度＞98%）均购自中国食品药品检定研究院；米非司酮片（批号211107，规格25 mg）购自华润紫竹药业有限公司；黄体酮注射液（批号202104153，规格50 mg）购自浙江仙琚制药股份有限公司；β-人绒毛膜促性腺激素（β-human chorionic gonadotropin，β-HCG）、孕酮（progesterone，P）酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒（批号分别为2108173、2109125）均购自上海酶联生物技术有限公司；苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（批号M202103A）购自北京索莱宝科技有限公司；原位末端标记（TdT-mediated dUTP nick end labeling，TUNEL）试剂盒（批号213107）购自北京普利莱基因技术有限公司；TRIzol试剂（批号2105183）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）（批号20210310A）购自北京兰博利德商贸有限公司；兔抗鼠Fas、FasL、PCNA、HB-EGF、β-肌动蛋白（β-actin）单克隆抗体（稀释比例依次为1∶500、1∶500、1∶1 000、1∶500、1∶500，批号分别为210518、210610、210607、210712、210715）和荧光素标记的山羊抗兔Fas、FasL、PCNA、HB-EGF、β-actin多克隆抗体（稀释比例依次为1∶2 000、1∶2 000、1∶5 000、1∶2 000、1∶2 000，批号分别为210611、210624、210615、210811、210819）均购自艾博抗（上海）贸易有限公司。

### 1.3 动物

本研究所用动物为清洁级雌性SD大鼠60只、雄性SD大鼠30只，7～9周龄，体重260～300 g，购自郑州大学实验动物中心[生产许可证号为SCXK（豫）2022-0001]。本实验经郑州卫生健康职业学院实验动物伦理委员会审批后实施（批准号：ZZHVC-2022-003）。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

60只雌性SD大鼠均灌胃2.25 μg/mL的己烯雌酚促情[9]。次日清晨检查阴道涂片，若光镜下见大量阴道细胞脱落记为已动情[10]。将已动情的雌性SD大鼠与雄性SD大鼠按照2∶1的比例合笼交配，次日清晨若见阴道栓脱落记为孕1 d。结果，60只雌性SD大鼠共成功受孕58只。采用随机数字表法将孕鼠分为6组，分别为正常组（纯化水，$n$=10）、模型组（纯化水，$n$=9）、阳性对照药组（黄体酮4 mg/kg[11]，$n$=9）和大豆异黄酮低、中、高剂量组（25、50、100 mg/kg[6]，$n$=10）。除正常组外，其余各组孕鼠均于孕8 d时采用米非司酮+米索前列醇灌胃造模，其中米非司酮于当天08∶00灌胃8.3 mg/kg，米索前列醇于当天18∶00灌胃100 μg/kg[10]。各组大鼠分别于孕1～7 d、孕9～12 d给以相应药物或纯化水（阳性对照药组肌内注射给药，其余各组均灌胃给药），给药体积均为10 mL/kg，每天给药1次。

### 2.2 保胎率计算和血清β-HCG、P水平检测

孕14 d时，采取脊椎脱臼法处死大鼠，同时取其腹主动脉血3 mL。观察各组大鼠的胚胎：宫内未见瘀血、胚胎呈淡红色的为正常胚胎；宫内胚胎呈黑褐色，或有阴道出血史，解剖时子宫呈竹节状，宫腔内有瘀血或坏死胚胎的为流产胚胎。按下式计算保胎率：保胎率＝正常胚胎/（正常胚胎+流产胚胎）×100%。将血液样本在室温下以3 500 r/min离心10 min，取上清液，按试剂盒说明书操作，于450 nm波长下检测并计算各组大鼠血清中β-HCG、P水平。

### 2.3 胎盘与蜕膜组织病理形态学观察

采用HE染色法进行观察。取各组大鼠胎盘（胎鼠部分的羊膜组织）及蜕膜组织，常规制备石蜡切片（厚度4 μm），参照HE染色试剂盒说明书处理，在光学显微镜下观察其病理形态学变化。

### 2.4 胎盘与蜕膜组织细胞凋亡指数检测

采用TUNEL法进行检测。取各组大鼠胎盘及蜕膜组织，参照TUNEL试剂盒说明书处理，加二氨基联苯胺显色液，室温孵育。用甲基绿复染，脱水、透明后，用中性树胶封片。镜下细胞核中可见棕黄色颗粒，记为凋亡阳性细胞。凋亡指数＝凋亡阳性细胞数/总细胞数。

### 2.5 胎盘与蜕膜组织中Fas通路相关基因mRNA表达检测

采用逆转录定量PCR法检测胎盘组织中Fas、FasL、PCNA、HB-EGF mRNA与蜕膜组织中Fas、PCNA、HB-EGF mRNA的表达情况。取胎盘和蜕膜组织，分别采用TRIzol法提取组织中总RNA，检测RNA的浓度和纯度后，将其逆转录为cDNA，并以cDNA为模板进行PCR扩增。扩增体系包括上、下游引物各1 μL，Taq酶0.5 μL，6 μmol/L氯化镁2.5 μL，10×RNA PCR buffer 8 μL，加入纯化水至总体积为60 μL。各基因引物序列参照Primer 5.0设计，委托宝生物工程（大连）有限公司合成，详细信息见表1。反应程序如下：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性1 min，56 ℃退火1 min，72 ℃延伸1 min，共40个循环；72 ℃再延伸10 min，结束反应。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA的表达水平。

**表1 各基因引物序列及扩增产物长度**

| 基因 | 引物序列 | 扩增产物长度/bp |
|---|---|---|
| *Fas* | 上游：5′-CAAGTCCCTCCATGCCCATT-3′ | 782 |
| | 下游：5′-GCAAAATCTTTGCGGGGGTT-3′ | |
| *FasL* | 上游：5′-CCAGAGATCAGAGCGGTTCC-3′ | 127 |
| | 下游：5′-GGGATGCATGTCAGGTGTGT-3′ | |
| *PCNA* | 上游：5′-ACTCTCTCAGGGGTGAAGCA-3′ | 596 |
| | 下游：5′-CATCCGCGCTTTCTGATTGG-3′ | |
| *HB-EGF* | 上游：5′-GTAAGGGTGTGGGAATGGGG-3′ | 333 |
| | 下游：5′-GCGTGGTAGAGAGGGGTCTA-3′ | |
| *β-actin* | 上游：5′-TCCTATGGGAGAACGGCAGA-3′ | 676 |
| | 下游：5′-TCCTTTGTCCCCTGAGCTTG-3′ | |

### 2.6 胎盘与蜕膜组织中Fas通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测胎盘组织中Fas、FasL、PCNA、HB-EGF蛋白与蜕膜组织中Fas、PCNA、HB-EGF蛋白的表达情况。取胎盘和蜕膜组织，加入裂解液，冰浴中超声匀浆；在4 ℃下以12 000 r/min离心20 min，收集上清液，采用BCA法对总蛋白进行定量。将蛋白高温变性后，按50 μL/孔上样进行SDS-PAGE电泳（分离胶12%，浓缩胶5%）。在样品进胶前设置电压为100～200 V，电泳时间约15 min；当样品中溴酚蓝指示剂到达分离胶后将电压调至200 V，当溴酚蓝指示剂迁移至距凝胶前沿1～2 cm时停止电泳。然后在300 mA电流下转膜30 min至聚偏二氟乙烯膜上，用脱脂奶粉封闭2 h。加入Fas、FasL、PCNA、HB-EGF、β-actin一抗，4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入对应二抗，室温孵育1 h。显影，用凝胶电泳成像分析系统观察并拍照，利用Image J软件对电泳条带进行分析，扫描蛋白条带灰度值，以各目的蛋白与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。采用Shapiro-Wilk法检验计量资料的正态性，符合正态分布的数据用$\bar{x}\pm s$描述，并采用单因素方差分析和SNK-$q$检验进行组间比较。检验水准$\alpha$=0.05。

## 3 结果

### 3.1 保胎率和血清中β-HCG、P水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠的保胎率和血清中β-HCG、P水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照药组和大豆异黄酮各剂量组大鼠的保胎率和血清中β-HCG、P水平均显著升高（$P<0.05$），且大豆异黄酮的作用具有剂量依赖性（$P<0.05$）；与阳性对照药组比较，大豆异黄酮高剂量组大鼠上述指标均显著升高（$P<0.05$）。结果见表2（模型组与阳性对照药组各有1只大鼠因灌胃操作不慎死亡）。

**表2 各组大鼠的保胎率和血清中β-HCG、P水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $n$ | 保胎率/% | β-HCG/(pg/L) | P/(pg/L) |
|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 10 | 100±0.00 | 2 358.97±312.85 | 115.21±20.32 |
| 模型组 | 8 | 10.61±2.87[a] | 1 403.47±226.07[a] | 30.06±5.13[a] |
| 阳性对照药组 | 8 | 56.85±9.93[b] | 1 923.87±267.06[b] | 72.63±11.55[b] |
| 大豆异黄酮低剂量组 | 10 | 36.86±8.33[bc] | 1 712.86±253.78[bc] | 54.84±8.29[bc] |
| 大豆异黄酮中剂量组 | 10 | 56.45±8.24[bd] | 1 921.53±265.09[bd] | 73.06±11.38[bd] |
| 大豆异黄酮高剂量组 | 10 | 90.40±8.68[bcde] | 2 166.39±279.81[bcde] | 92.07±15.67[bcde] |

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与阳性对照药组比较，$P<0.05$；d：与大豆异黄酮低剂量组比较，$P<0.05$；e：与大豆异黄酮中剂量组比较，$P<0.05$。

### 3.2 胎盘与蜕膜组织病理形态学观察结果

#### 3.2.1 胎盘组织

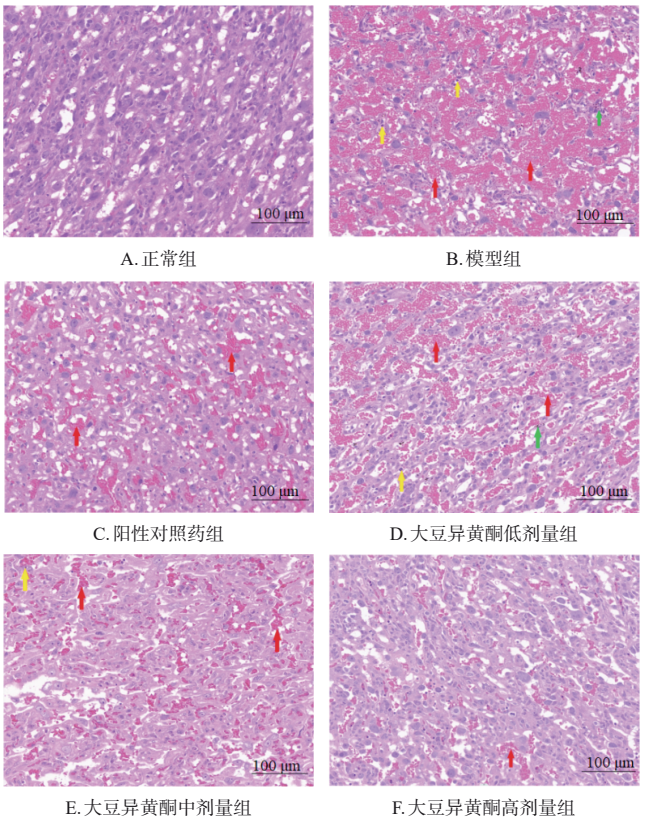
正常组大鼠胎盘组织细胞排列整齐，腺体丰富、呈椭圆形，间质疏松且较厚，可见大量血管。模型组大鼠胎盘组织充血扩张明显，细胞严重皱缩，腺体大量减少且不规则、间质较薄，血管较少且形态不规则，可见大量严重基质水肿、炎症细胞浸润和铁胆黄素沉积。阳性对照药组和大豆异黄酮各剂量组大鼠胎盘组织的上述病理形态学改变均有不同程度减轻，大豆异黄酮的改善作用呈现剂量依赖性，且大豆异黄酮中剂量组与阳性对照药组的改善情况基本一致。结果见图1。

#### 3.2.2 蜕膜组织

正常组大鼠蜕膜组织较厚，结构正常，细胞排列紧密。模型组大鼠蜕膜组织较薄，绒毛结构模糊，且可见严重纤维素化、间隙增宽、气球样变性，有严重炎症细胞渗出、充血坏死。阳性对照药组和大豆异黄酮各剂量组大鼠蜕膜组织的上述病理改变均有不同程度减轻，大豆异黄酮的作用具有剂量依赖性，且大豆异黄酮中剂量组与阳性对照药组的改善情况基本一致。结果见图2。

### 3.3 胎盘与蜕膜组织细胞凋亡指数测定结果

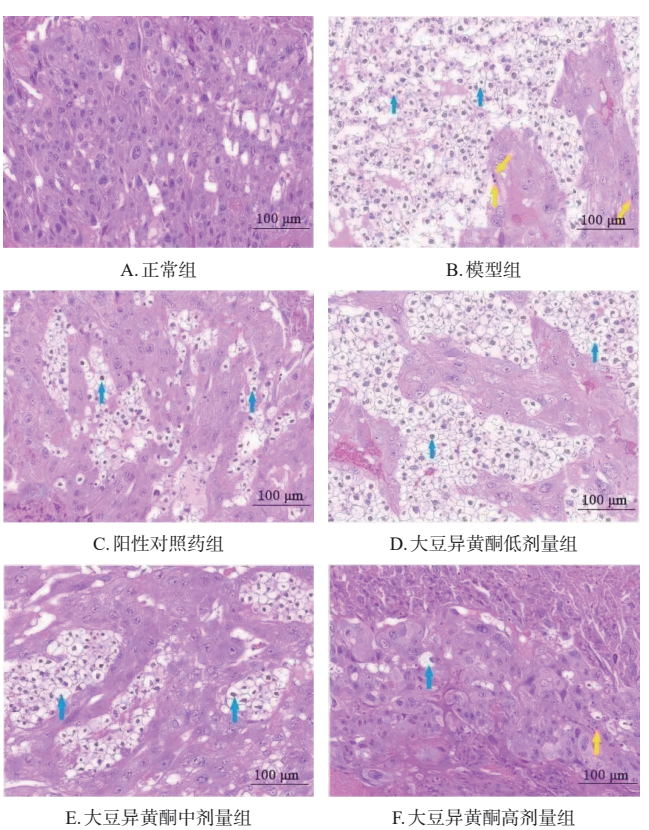
与正常组比较，模型组大鼠胎盘与蜕膜组织细胞凋亡指数均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照药组及大豆异黄酮各剂量组大鼠胎盘与蜕膜组织细胞凋亡指数均显著降低（$P<0.05$），且大豆异黄酮的作用




A. 正常组　B. 模型组　C. 阳性对照药组　D. 大豆异黄酮低剂量组　E. 大豆异黄酮中剂量组　F. 大豆异黄酮高剂量组

注：黄色箭头所指为炎症细胞浸润，绿色箭头所指为铁胆黄素沉积，红色箭头所指为充血扩张。

**图1 各组大鼠胎盘组织病理观察的显微图（HE染色）**




A. 正常组　B. 模型组　C. 阳性对照药组　D. 大豆异黄酮低剂量组　E. 大豆异黄酮中剂量组　F. 大豆异黄酮高剂量组

注：蓝色箭头所指为气球样变性，黄色箭头所指为炎症细胞浸润。

**图2 各组大鼠蜕膜组织病理观察的显微图（HE染色）**

具有剂量依赖性（$P<0.05$）；与阳性对照药组比较，大豆异黄酮高剂量组大鼠上述指标显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

**表3　各组大鼠胎盘与蜕膜组织细胞凋亡指数比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $n$ | 胎盘组织细胞 | 蜕膜组织细胞 |
|---|---|---|---|
| 正常组 | 10 | 0.11±0.03 | 0.14±0.05 |
| 模型组 | 8 | 0.48±0.07[a] | 0.52±0.10[a] |
| 阳性对照药组 | 8 | 0.29±0.05[b] | 0.33±0.06[b] |
| 大豆异黄酮低剂量组 | 10 | 0.39±0.05[bc] | 0.41±0.07[bc] |
| 大豆异黄酮中剂量组 | 10 | 0.30±0.06[bd] | 0.32±0.05[bd] |
| 大豆异黄酮高剂量组 | 10 | 0.22±0.04[bcde] | 0.24±0.05[bcde] |

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与阳性对照药组比较，$P<0.05$；d：与大豆异黄酮低剂量组比较，$P<0.05$；e：与大豆异黄酮中剂量组比较，$P<0.05$。

### 3.4　胎盘、蜕膜组织中Fas通路相关基因mRNA表达测定结果

与正常组比较，模型组大鼠胎盘组织中Fas、FasL mRNA和蜕膜组织中Fas mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$），胎盘和蜕膜组织中PCNA、HB-EGF mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照药组与大豆异黄酮各剂量组大鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$），且大豆异黄酮的作用具有剂量依赖性（$P<0.05$）。与阳性对照药组比较，大豆异黄酮中、高剂量组大鼠上述指标均进一步改善（$P<0.05$）。结果见表4、表5。

**表4　各组大鼠胎盘组织中Fas、FasL、PCNA和HB-EGF mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $n$ | Fas | FasL | PCNA | HB-EGF |
|---|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 10 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 模型组 | 8 | 1.99±0.30[a] | 1.85±0.31[a] | 0.41±0.07[a] | 0.35±0.06[a] |
| 阳性对照药组 | 8 | 1.71±0.25[b] | 1.69±0.23[b] | 0.55±0.09[b] | 0.58±0.10[b] |
| 大豆异黄酮低剂量组 | 10 | 1.72±0.27[b] | 1.70±0.25[b] | 0.54±0.08[b] | 0.59±0.12[b] |
| 大豆异黄酮中剂量组 | 10 | 1.44±0.25[bcd] | 1.41±0.23[bcd] | 0.79±0.12[bcd] | 0.74±0.14[bcd] |
| 大豆异黄酮高剂量组 | 10 | 1.19±0.20[bcde] | 1.17±0.18[bcde] | 0.90±0.12[bcde] | 0.86±0.15[bcde] |

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与阳性对照药组比较，$P<0.05$；d：与大豆异黄酮低剂量组比较，$P<0.05$；e：与大豆异黄酮中剂量组比较，$P<0.05$。

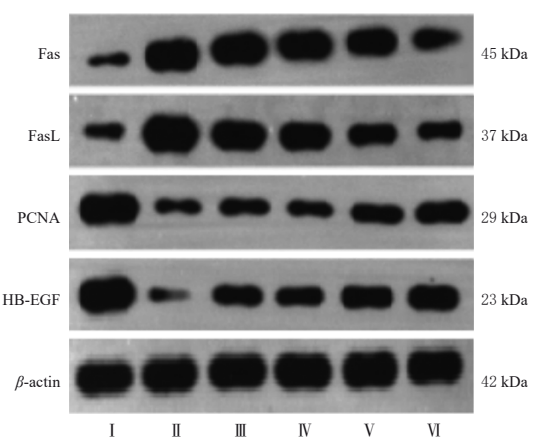
**表5　各组大鼠蜕膜组织中Fas、PCNA、HB-EGF mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $n$ | Fas | PCNA | HB-EGF |
|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 10 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 模型组 | 8 | 2.01±0.31[a] | 0.36±0.05[a] | 0.32±0.05[a] |
| 阳性对照药组 | 8 | 1.76±0.27[b] | 0.50±0.08[b] | 0.51±0.09[b] |
| 大豆异黄酮低剂量组 | 10 | 1.75±0.26[b] | 0.51±0.08[b] | 0.49±0.07[b] |
| 大豆异黄酮中剂量组 | 10 | 1.49±0.23[bcd] | 0.72±0.10[bcd] | 0.70±0.11[bcd] |
| 大豆异黄酮高剂量组 | 10 | 1.21±0.22[bcde] | 0.86±0.12[bcde] | 0.83±0.11[bcde] |

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与阳性对照药组比较，$P<0.05$；d：与大豆异黄酮低剂量组比较，$P<0.05$；e：与大豆异黄酮中剂量组比较，$P<0.05$。

### 3.5　各组大鼠胎盘、蜕膜组织中Fas通路相关蛋白表达测定结果

与正常组比较，模型组大鼠胎盘组织中Fas、FasL蛋白和蜕膜组织中Fas蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），胎盘与蜕膜组织中PCNA、HB-EGF蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照药组与大豆异黄酮各剂量组大鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$），且大豆异黄酮的作用具有剂量依赖性（$P<0.05$）。与阳性对照药组比较，大豆异黄酮中、高剂量组大鼠胎盘组织中Fas、FasL蛋白表达水平及蜕膜组织中Fas、PCNA、HB-EGF蛋白表达水平均不同程度改善，除大豆异黄酮中剂量组大鼠胎盘组织中PCNA、HB-EGF蛋白表达水平与阳性对照药组比较差异无统计学意义外（$P>0.05$），其余各指标差异均有统计学意义（$P<0.05$）。各组大鼠胎盘组织中蛋白表达结果见图3、表6，蜕膜组织中蛋白表达结果见图4、表7。



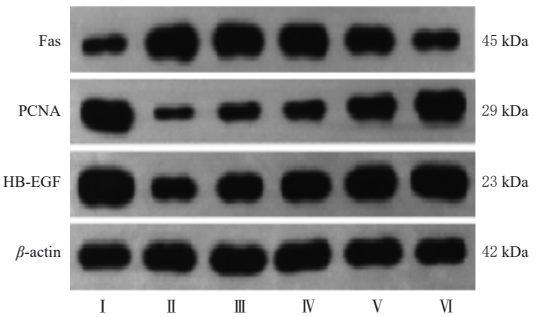

Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：阳性对照药组；Ⅳ：大豆异黄酮低剂量组；Ⅴ：大豆异黄酮中剂量组；Ⅵ：大豆异黄酮高剂量组。

**图3　各组大鼠胎盘组织中Fas、FasL、PCNA和HB-EGF蛋白表达的电泳图**

**表6　各组大鼠胎盘组织中Fas、FasL、PCNA和HB-EGF蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $n$ | Fas/β-actin | FasL/β-actin | PCNA/β-actin | HB-EGF/β-actin |
|---|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 10 | 0.51±0.10 | 0.81±0.14 | 1.53±0.35 | 1.31±0.27 |
| 模型组 | 8 | 1.90±0.35[a] | 2.11±0.40[a] | 0.21±0.06[a] | 0.12±0.04[a] |
| 阳性对照药组 | 8 | 1.60±0.32[b] | 1.70±0.33[b] | 0.80±0.18[b] | 0.68±0.12[b] |
| 大豆异黄酮低剂量组 | 10 | 1.58±0.31[b] | 1.69±0.30[b] | 0.54±0.10[bc] | 0.43±0.07[bc] |
| 大豆异黄酮中剂量组 | 10 | 1.32±0.28[bcd] | 1.42±0.28[bcd] | 0.82±0.19[bd] | 0.70±0.12[bd] |
| 大豆异黄酮高剂量组 | 10 | 1.01±0.22[bcde] | 1.11±0.23[bcde] | 1.23±0.22[bcde] | 1.01±0.20[bcde] |

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与阳性对照药组比较，$P<0.05$；d：与大豆异黄酮低剂量组比较，$P<0.05$；e：与大豆异黄酮中剂量组比较，$P<0.05$。




Ⅰ：正常组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：阳性对照药组；Ⅳ：大豆异黄酮低剂量组；Ⅴ：大豆异黄酮中剂量组；Ⅵ：大豆异黄酮高剂量组。

**图4　各组大鼠蜕膜组织中Fas、PCNA和HB-EGF蛋白表达的电泳图**

**表7　各组大鼠蜕膜组织中Fas、PCNA和HB-EGF蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $n$ | Fas/β-actin | PCNA/β-actin | HB-EGF/β-actin |
|---|---|---|---|---|
| 正常组 | 10 | 0.81±0.13 | 1.72±0.36 | 1.64±0.35 |
| 模型组 | 8 | 2.18±0.41[a] | 0.52±0.10[a] | 0.62±0.09[a] |
| 阳性对照药组 | 8 | 1.71±0.35[b] | 0.83±0.16[b] | 0.91±0.12[b] |
| 大豆异黄酮低剂量组 | 10 | 1.70±0.33[b] | 0.81±0.15[b] | 0.93±0.14[b] |
| 大豆异黄酮中剂量组 | 10 | 1.42±0.27[bcd] | 1.09±0.23[bcd] | 1.20±0.23[bcd] |
| 大豆异黄酮高剂量组 | 10 | 1.11±0.22[bcde] | 1.41±0.28[bcde] | 1.43±0.28[bcde] |

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与阳性对照药组比较，$P<0.05$；d：与大豆异黄酮低剂量组比较，$P<0.05$；e：与大豆异黄酮中剂量组比较，$P<0.05$。

## 4　讨论

本研究中阳性对照药组大鼠的平均保胎率仅为56.85%，远低于既往报道的79.17%[12]，这可能与物种不同、基础保胎措施差异等有关。本研究发现，受试药物大豆异黄酮和阳性对照药物黄体酮对先兆流产模型大鼠均有保胎作用，不仅提高了保胎率，改善了血清中β-HCG、P水平，还减轻了胎盘和蜕膜组织病理损伤。有报道显示，大豆衍生的植物雌激素对促进和维持妊娠有积极作用[13]，本研究结果与上述报道相符。本研究中，大豆异黄酮高剂量组大鼠的保胎率及血清中β-HCG、P水平均显著高于阳性对照药组，胎盘组织与蜕膜组织细胞凋亡指数均显著低于阳性对照药组，提示高剂量大豆异黄酮对先兆流产的效果优于黄体酮，证实了大豆异黄酮在先兆流产防治药物的开发中具有重要价值。

有研究显示，流产与母-胎界面免疫紊乱有关，Fas、FasL高表达和PCNA、HB-EGF低表达均不利于胚胎的生长发育[14-15]。Fas、FasL介导的细胞凋亡在母-胎界面免疫调控中有着重要作用：在Fas抗体与FasL的作用下，细胞表面的Fas可发生分子交联，传导死亡信号，引起滋养细胞凋亡[16]。在受精后初期，子宫蜕膜会表达FasL，以此来避免母体中活化的T细胞攻击胎盘组织和受精卵/胚胎；随着胚胎的发育，FasL则表达在滋养细胞中[17]。FasL不仅能够防止母体活化的T细胞攻击胎儿，还可防止胎儿的T细胞攻击母体。PCNA是一种以脱氧核糖核酸聚合酶δ的辅助蛋白为靶抗原的自身抗体，属于细胞周期相关蛋白，其表达越高对胚胎生长发育的促进作用越显著[18]。HB-EGF属于一种肽类生长因子，是成纤维细胞与平滑肌细胞的有丝分裂原与趋化因子，可从卵泡发育、卵泡成熟、排卵、受精卵发育、胚胎植入、妊娠维持等方面参与生殖过程[19]。PCNA和HB-EGF表达下降会对胚胎的生长发育造成不良影响，引起先兆流产甚至难免流产[20]。另外，受各种病理、生理因素的影响，PCNA和HB-EGF活性下降也可影响细胞增殖，导致胎盘和蜕膜组织充血坏死，引起流产[21-22]。本研究结果显示，阳性对照药物黄体酮和受试药物大豆异黄酮均可改善先兆流产模型大鼠母-胎界面Fas、FasL、PCNA、HB-EGF表达，并可减少胎盘和蜕膜组织细胞凋亡，提示大豆异黄酮对先兆流产的保胎作用可能与上述分子机制有关。

综上，大豆异黄酮对先兆流产模型大鼠有保胎作用；其作用机制可能与下调母-胎界面Fas、FasL mRNA及其蛋白表达，上调PCNA、HB-EGF mRNA及其蛋白表达有关。

## 参考文献

[1] 尹建蓝，陈慧. 卵巢储备功能降低与自然流产[J]. 中国计划生育和妇产科，2022，14(6)：20-22.
YIN J L，CHEN H. Diminished ovarian reserve and spontaneous abortion[J]. Chin J Fam Plan Gynecotokology，2022，14(6)：20-22.

[2] ZHAO H Q，HE W，YANG Z. A pairwise and network meta-analysis comparing the efficacy and safety of progestogens in threatened abortion[J]. Int J Gynaecol Obstet，2022，156(3)：383-393.

[3] ZENG P F，ZHOU H，GUO P，et al. Efficacy and safety of traditional Chinese herbal medicine in the treatment of threatened abortion：a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine，2021，100(5)：e23288.

[4] KARACA I，ERDOĞAN Ş V，DOĞAN K，et al. The effects of exogenous oral micronized progesterone on first trimester aneuploidy screening markers in women with threatened miscarriage：a matched case control study[J]. J Matern Fetal Neonatal Med，2022，35(7)：1224-1229.

[5] 王文祥，蔡淑凤，张文昌. 大豆异黄酮持续暴露对小鼠卵巢发育影响[J]. 中国公共卫生，2015，31(5)：597-599.
WANG W X，CAI S F，ZHANG W C. Effects of continuous soy isoflavones exposure on ovarian development in mice[J]. Chin J Public Health，2015，31(5)：597-599.

[6] 陈益钦，管芳圆，申琪，等. 大豆异黄酮对成年期大鼠卵巢卵泡发育的影响[J]. 环境与职业医学，2019，36(9)：812-817.
CHEN Y Q，GUAN F Y，SHEN Q，et al. Effects of soy isoflavone on ovarian follicle development in adult rats[J].

J Environ Occup Med，2019，36(9)：812-817.

[7] 陈浩瀚，王锦湘，王敏奇. 大豆异黄酮对生长猪生长性能、血清生化、免疫和抗氧化能力的影响[J]. 中国畜牧杂志，2022，58(5)：229-233，238.
CHEN H H，WANG J X，WANG M Q. Effects of dietary supplementation of soybean isoflavones on growth performance，serum biochemistry，immunity and antioxidant capacity in growing pigs[J]. Chin J Anim Sci，2022，58(5)：229-233，238.

[8] 张曼. 大豆衍生的植物雌激素调节牛发情期和怀孕早期中的子宫内膜前列腺素的分泌[J]. 国外医药(植物药分册)，2006，21(2)：79-80.
ZHANG M. Soybean-derived phytoestrogens regulate the secretion of prostaglandin in bovine endometrium during estrus and early pregnancy[J]. World Phytomedicines，2006，21(2)：79-80.

[9] 张堃，吕向坤，焦艾丽，等. JAK2/STAT3通路槲皮素对先兆流产大鼠的保胎作用及对激素水平的影响[J]. 武警医学，2021，32(11)：963-968.
ZHANG K，LV X K，JIAO A L，et al. Effect of quercetin on anti-abortion and hormone levels in threatened abortion in rats based on JAK2/STAT3 pathway[J]. Med J Chin People's Armed Police Force，2021，32(11)：963-968.

[10] 戴仕林，陈蓉，胥京生，等. 培土孕康汤防治大鼠先兆流产的作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16(16)：113-115.
DAI S L，CHEN R，XU J S，et al. Effect of Peitu yunkang decoction on threatened abortion in rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2010，16(16)：113-115.

[11] 游祥，王金玲，马晓宇，等. 中药复方方剂对先兆流产大鼠妊娠结局及$PGF_{2\alpha}$、PPAP-A的影响[J]. 中兽医医药杂志，2018，37(6)：5-8.
YOU X，WANG J L，MA X Y，et al. Effects of compound traditional Chinese medicine on $PGF_{2\alpha}$ and PAPP-a level in rats with threatened abortion[J]. J Tradit Chin Vet Med，2018，37(6)：5-8.

[12] 王培培. 益气补肾方联合黄体酮对肾虚型先兆流产保胎率及对血绒毛膜促性腺激素、孕酮、雌二醇的影响[J]. 四川中医，2022，40(3)：176-178.
WANG P P. Effects of Yiqi bushen recipe combined with progesterone on pregnancy retention rate of threatened abortion with kidney deficiency and on serum gonadotropin，progesterone and estradiol[J]. J Sichuan Tradit Chin Med，2022，40(3)：176-178.

[13] 陈海英，孟涛. oxLDL和大豆异黄酮对滋养细胞LOX-1表达的调控及意义[J]. 中国医科大学学报，2008，37(4)：465-467.
CHEN H Y，MENG T. The regulation of oxLDL and soybean isoflavones on expression of LOX-1 in trophoblast cells and its significance[J]. J China Med Univ，2008，37(4)：465-467.

[14] OZMEN A，KIPMEN-KORGUN D，ISENLIK B S，et al. Does fresh or frozen embryo transfer affect imprinted gene expressions in human term placenta?[J]. Acta Histochem，2021，123(3)：151694.

[15] LAI K M，GOH B H，LEE W L. Attenuating influenza a virus infection by heparin binding EGF-like growth factor [J]. Growth Factors，2020，38(3/4)：167-176.

[16] SONG Z Y，TIAN X Y，SHI Q Y. Fas，caspase-8，and caspase-9 pathway-mediated bile acid-induced fetal cardiomyocyte apoptosis in intrahepatic cholestasis pregnant rat models[J]. J Obstet Gynaecol Res，2021，47(7)：2298-2306.

[17] ZHAI J L，XIAO Z Y，WANG Y M，et al. Human embryonic development：from peri-implantation to gastrulation [J]. Trends Cell Biol，2022，32(1)：18-29.

[18] 田洪成，马鹤，张向卉，等. 表皮-钙黏蛋白、增殖细胞核抗原在来曲唑诱导大鼠多囊卵巢综合征模型卵巢中的表达[J]. 实用妇产科杂志，2023，39(3)：217-220.
TIAN H C，MA H，ZHANG X H，et al. Expression of E-cadherin and PCNA in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats[J]. J Pract Obstet Gynecol，2023，39(3)：217-220.

[19] ZHOU L，ZHOU W Q，JOSEPH A M，et al. Group 3 innate lymphoid cells produce the growth factor HB-EGF to protect the intestine from TNF-mediated inflammation[J]. Nat Immunol，2022，23(2)：251-261.

[20] 马红霞，尤昭玲，王小云. 菟丝子总黄酮对大鼠流产模型母-胎界面Fas/FasL、PCNA、HB-EGF表达的影响[J]. 中药材，2008，31(11)：1706-1709.
MA H X，YOU Z L，WANG X Y. Effect of total flavones from Cuscuta chinensis on expression of Fas/FasL，PCNA and HB-EGF in SD rats model with bromocriptine-induced abortion[J]. J Chin Med Mater，2008，31(11)：1706-1709.

[21] YU J，LUO Y，YANG XF，et al. Effects of perinatal exposure to nonylphenol on delivery outcomes of pregnant rats and inflammatory hepatic injury in newborn rats[J]. Braz J Med Biol Res，2016，49(12)：e5647.

[22] OZBILGIN K，KARACA F，TURAN A，et al. The higher heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in missed abortion[J]. Taiwan J Obstet Gynecol，2015，54(1)：13-18.

（收稿日期：2023-11-08　修回日期：2024-03-22）
（编辑：林　静）