

寿胎丸对复发性流产小鼠蜕膜蛋白质组的影响

谭展望, 雷磊*, 罗蕾, 卢丽丽

(湖南中医药大学 中西医结合学院, 湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的:**分析寿胎丸对复发性流产小鼠蜕膜蛋白质组的影响,从分子水平探讨寿胎丸安胎的作用机制。**方法:**50只雌性 CBA/J 小鼠分别与 20 只雄性 DBA/2 和 5 只雄性 BALB/C 小鼠按 2:1 合笼交配,建立复发性流产模型 40 只与正常妊娠模型 10 只。将复发性流产 CBA/J × DBA/2 孕鼠按妊娠先后顺序随机分为模型组(10 只)、寿胎丸低剂量组(10 只, 3 g · kg · d⁻¹)、寿胎丸中剂量组(10 只, 6 g · kg · d⁻¹)和寿胎丸高剂量组(10 只, 12 g · kg · d⁻¹),从妊娠第 1 天开始灌胃给药,至孕 14 d 处死小鼠,计算各组胚胎丢失率。采用双向电泳结合质谱技术分离和鉴定各组小鼠蜕膜差异表达的蛋白质,并利用生物信息学资源对所鉴定蛋白质的功能进行分析。**结果:**寿胎丸高、中剂量组胚胎丢失率较模型组均明显降低($P < 0.01$),寿胎丸低剂量组胚胎丢失率有所降低,但与模型组相比差异无统计学意义;建立了模型组、正常组、寿胎丸高、中、低剂量组小鼠蜕膜组织的 2-DE 图谱,通过比较各组双向凝胶电泳图谱的差异,发现并鉴定了 30 个可能与复发性流产及寿胎丸干预相关的蛋白质,这些蛋白质的功能涉及绒毛外滋养细胞的侵袭、蜕膜组织血管的重建及蜕膜细胞的凋亡等。**结论:**寿胎丸能够降低复发性流产小鼠胚胎丢失率,具有显著的安胎作用;复发性流产是由多种蛋白质参与的复杂过程,寿胎丸可调节复发性流产小鼠蜕膜组织多种蛋白质的表达,该复方具有多靶点的作用特点。

[关键词] 寿胎丸;复发性流产;蜕膜;蛋白质组

自然流产系指妊娠不足 28 周、胎儿体重不足 1 000 g 而终止者,其发生率占人类妊娠的 12% ~ 15%^[1]。当自然流产连续发生 2 次及 2 次以上时则称之为复发性流产(recurrent abortion),复发性流产是一种常见的病理性妊娠,发生率在 1% ~ 2%^[2]。复发性流产属中医学“滑胎”范畴,多为先天不足,复损肾气,以致不能荫胎系胎。寿胎丸源自张锡纯的《医学衷中参西录》,临床用治复发性流产效果颇佳,纵观近 10 年医学文献,有上千例的临床报道,疗效都在 80% 以上^[3-5]。本实验在以往研究的基础上,采用蛋白质组学技术分析小鼠蜕膜组织中蛋白质表达情况,联合生物质谱对差异表达的蛋白质进行鉴定,从分子水平探讨寿胎丸安胎的作用机制,为中医药防治复发性流产提供新的思路和理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康雌性 CBA/J 小鼠 50 只,SPF 级,8

周龄,由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号 SCXK(京)2009-0004;健康雄性 DBA/2 小鼠 20 只,SPF 级,8 周龄,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号 SCXK(沪)2007-0005;健康雄性 BALB/C 小鼠 5 只,SPF 级,8 周龄,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药物 寿胎丸:由菟丝子、桑寄生、续断、阿胶组成,湖南中医药大学附属第一医院药剂科按照经典处方用量比例配伍,采用水提醇沉法制备浓缩液(含生药量 1 g · mL⁻¹)。

1.3 仪器 IPGphor 等电聚焦仪, ETTAN DALT 垂直电泳槽, Image scanner 扫描仪(瑞典 Amersham Biosciences 公司); Voyager-DE STR4307MALDI-TOF-MS 质谱(美国 Applied Biosystem 公司);低温超高速离心机(美国 Beckman 公司);紫外分光光度计(美国 Eppendorf 公司);恒温水浴箱(英国 Grant 公司)。

1.4 试剂 2D Quant Kit 蛋白定量试剂盒、尿素、硫脲、NP-40、二硫苏糖醇(DTT)、Triton X-100、碘乙酰胺、固相 pH 梯度干胶条(24 cm)、IPG 缓冲液、两性电解质、覆盖液、双向凝胶电泳标准蛋白质、溴酚蓝均购自瑞典 Amersham Biosciences 公司;琼脂糖、亚甲双丙烯酰胺、TEMED、丙烯酰胺、Tris、过硫酸

[稿件编号] 20121016012

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973771);教育部博士点基金博士导师项目(20094323110004)

[通信作者] * 雷磊,教授,博士生导师,从事中西医结合临床专业, Tel:13874804056, E-mail:leilei1398@sina.com

[作者简介] 谭展望,主治医师,博士研究生,从事中西医结合临床专业, Tel:15933316904, E-mail:zhanwang910@sohu.com

胺、CHAPS、甘氨酸、SDS 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、碳酸氢氨 (NH_4HCO_3)、三氟乙酸(TFA)、乙腈和基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 胰蛋白酶购自美国 Promega 公司; ZipTipC₁₈ 购自美国 Millipore 公司; LabScan 扫描软件购自美国 Applied Biosystem 公司; PD Quest 双向凝胶图谱分析软件购自美国 Bio-Rad 公司; Data Explorer 质谱分析软件购自美国 Applied Biosystem 公司; Mascot Distiller 质谱信号峰识别软件、Mascot 肽质量指纹图数据库查询软件、Mascot MS/MS 数据库查询软件均购自英国 Matrixscience 公司。

2 方法

2.1 造模方法 将 50 只雌性 CBA/J 小鼠分别与 20 只雄性 DBA/2 和 5 只雄性 BALB/C 小鼠按 2:1 合笼交配, 检到阴栓者计为妊娠第 0 天, 分别建立复发性流产模型 40 只与正常妊娠模型 10 只。

2.2 动物分组及给药方法 CBA/J × BALB/C 孕鼠作为正常妊娠组(10 只), CBA/J × DBA/2 孕鼠作为复发性流产模型(40 只)。按妊娠顺序随机分为模型组(10 只)、寿胎丸低剂量组(10 只, $3\text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$)、寿胎丸中剂量组(10 只, $6\text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$)、寿胎丸高剂量组(10 只, $12\text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$)。自妊娠第 1 天开始灌胃, 正常妊娠组和模型组给予等量的生理盐水, 另 3 组给予寿胎丸混悬液, 直至孕 14 d。

2.3 胚胎丢失判断标准及胚胎丢失率计算方法 孕 14 d 断颈处死小鼠, 胚胎丢失的判断标准参照尤昭玲等^[6]的方法, 即丢失之胚胎体积明显缩小, 胎儿胎盘单位有明显出血或坏死。胚胎丢失率(embryo loss rate, ELR)的计算方法按下列公式进行: $\text{ELR} = \frac{\text{丢失胚胎数}}{\text{丢失胚胎数} + \text{存活胚胎数}} \times 100\%$ 。

2.4 标本制备方法 孕 14 d 断颈处死小鼠, 妊娠子宫离体后, 自子宫角处钝性撕开子宫壁, 将胎儿胎盘单位从着床部位剥离, 用小号组织剪刀分离着床部位的蜕膜组织, 取 5 个着床部位, 用预冷的 PBS 冲洗干净后, 迅速置液氮中保存。

2.5 总蛋白的提取与浓度测定 将蜕膜组织从液氮中取出, 预冷双蒸水快速充分洗涤, 滤纸吸干液体。采用蛋白裂解液(按 50 mg 标本用 1 mL 裂解缓冲液)提取蜕膜组织总蛋白。蛋白质浓度测定采用 Amersham Biosciences 公司专门针对蛋白质组学研

究的蛋白质抽提设计的 2D Quant Kit 定量试剂盒。

2.6 固相 pH 梯度双向凝胶电泳 主要参照 IPG-phor 等电聚焦系统使用指南进行。组织总蛋白上样量为 800 μg , 水化和聚焦均在 20 $^{\circ}\text{C}$ 温度下进行, 30 V 水化 14 h 后依次经 100 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8.5 h 进行等电聚焦, 总电压时间积为 69 920 v \cdot h。等电聚焦后迅速取出 IPG 胶条分别于平衡 A 液和平衡 B 液中各平衡 15 min。将平衡后的 IPG 胶条转移至预先制备好 SDS-PAGE 凝胶上进行第二向电泳, 设置 Ettan DALT 电泳条件为: 每胶 2.0 W 电泳 30 min 后再以每胶 20 W 恒功率电泳。按照文献采用改良的考马斯亮蓝染色方法进行染色。

2.7 双向电泳凝胶图像分析 凝胶经 Imagescanner 扫描仪及 Labscan 扫描软件扫描, 获取二维凝胶的电子图像, 然后用 PDQuest 图像分析软件依次进行点检测、背景消减、标准化、匹配、建立平均凝胶、比较差异等分析。

2.8 MALDI-TOF-MS 质谱分析 将差异蛋白质点从凝胶上切下, 先后进行脱色、酶解、萃取、脱盐、低温真空离心等处理, 将制备好的点样板置于 Voyager-DE STR4307MALDI-TOF-MS 质谱仪器上进行分析, 采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压为 20 000 V, 门电压为 64.5%, 反射电压比为 1.12, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Pa, 获取的质量范围为 800 ~ 3 000 Da, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 质谱使用胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正, 获得肽质量指纹图谱(PMF)。

2.9 质谱图谱分析与数据库查询 MALDI-TOF-MS 质谱图解谱采用 Matrix Science 公司的 Mascot Wizard 软件进行, 解谱的计算机上需安装 ABI 公司的 Data Explore™ 软件以便 Mascot Wizard 调用 Data Explore™ 软件来处理 ABI 公司 MALDI-TOF-MS 质谱产生的原始文件。Mascot Wizard 软件均采用其默认参数设置。数据库查询采用 Matrix Science 公司的 Mascot, 其查询网址为 http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF。

3 结果

3.1 胚胎丢失情况 根据公式计算胚胎丢失率并进行统计分析, 见表 1。与正常组相比, 模型组 ELR 明显升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$); 与模

型组相比,寿胎丸高、中剂量组 ELR 均明显降低,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);寿胎丸低剂量组 ELR 有所降低,但与模型组相比差异无统计学意义。

表 1 各组小鼠胚胎丢失率比较($n = 10$)

Table 1 Comparison of embryo loss rate of every group mice ($n = 10$)

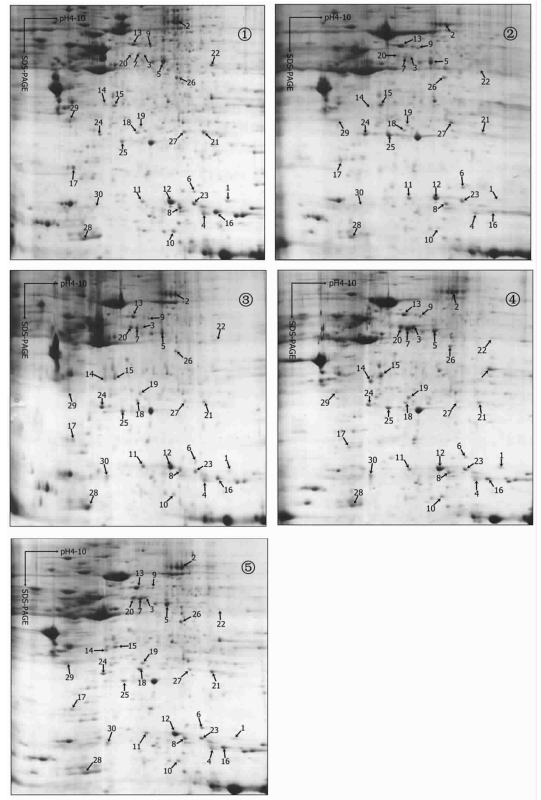
组别	丢失胚胎数	存活胚胎数	胚胎丢失率/%
模型	31	80	27.9
正常	5	86	5.5 ¹⁾
寿胎丸高剂量	9	90	9.1 ¹⁾
寿胎丸中剂量	18	84	17.6 ¹⁾
寿胎丸低剂量	26	72	26.5

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 各组小鼠蜕膜组织总蛋白质的 2-DE 分离

在相同条件下分别对模型组、正常组、寿胎丸高剂量组、寿胎丸中剂量组和寿胎丸低剂量组小鼠蜕膜组织总蛋白质各进行了 3 次双向凝胶电泳分离,考染显色后得到背景清晰、分辨率高、重复性好的 2-DE 图谱各 3 块(总蛋白质上样量为 300 μg)。使用 PDQuest 软件对凝胶图谱进行图像分析,选择最弱点、最小点、及最强点后,PDQuest 软件能够自动过滤背景,将识别获得的蛋白质点的面积、灰度等数据拟合合成一张新的凝胶,在拟合凝胶图谱的基础之上对各胶进行匹配分析。PDQuest 软件的分析结果显示,每张 2-DE 图谱约有 800 个蛋白质点,大多数蛋白质点在位置和丰度上是一致的,主要分布在等电点(pI)4.0 ~ 10.0、相对分子质量(M_w)10 ~ 100 kDa。以模型组为参照,其余各组蛋白质点与其匹配率为 83%,表达差异 3 倍以上的蛋白质点有 60 个,其中上调的点有 28 个,下调的点有 32 个。选择差异 3 倍以上的 30 个点作为差异表达的蛋白质点进行质谱分析。图 1 即为各组代表性小鼠蜕膜组织总蛋白质的 2-DE 图谱。差异在 3 倍以上的 30 个蛋白质点用箭头标示。

3.3 差异蛋白质点的质谱分析 选取差异在 3 倍以上的 30 个点作为差异表达的蛋白质点进行质谱分析,采用 MALDI-TOF-MS 质谱对差异表达的蛋白质点进行鉴定,MALDI-TOF-MS 分析,获得的蛋白质点 PMF 图用 Mascot Distiller 软件识别单同位素信号峰,获得的肽片段质荷比(m/z)数值输入 Mascot 查



①模型组;②正常组;③寿胎丸高剂量组;④寿胎丸中剂量组;⑤寿胎丸低剂量组。

图 1 小鼠蜕膜组织总蛋白质双向凝胶电泳 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE patterns of decidua tissue proteins of every group mice

询系统,检索 SWISS-PROT 和 NCBI 蛋白质数据库。如果 Mascot 分数 > 51 分($P < 0.05$)则认为得到鉴定,否则视为未得到鉴定。30 个差异表达的蛋白质点全部得到鉴定,见表 2。

4 讨论

国外报道 CBA/J \times DBA/2 模型 ELR 约在 25% ~ 50%,国内观察 CBA/J \times DBA/2 模型 ELR 约为 27.27% ~ 32.20%,而 CBA/J \times BALB/c 仅为 2.94% ~ 7.69%。本实验结果显示,正常组 ELR 为 5.5%,模型组 ELR 为 27.9%,与正常组相比,模型组 ELR 明显升高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),2 组小鼠 ELR 跟国内外报道基本相符。与模型组相比,寿胎丸高、中剂量组 ELR 均明显降低,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);寿胎丸低剂量组 ELR 有所降低,但与模型组相比差异无统计学意义。由此表明,寿胎丸能够降低复发性流产小鼠胚胎丢失率,具有显著的安胎作用。

表 2 MALDI-TOF-MS 鉴定的 30 个差异蛋白质点

Table 2 30 differential expression protein spots which were identified by MALDI-TOF-MS

No.	序号	蛋白质名称	Mw /Da	pI	正 B	高 C	中 D	低 E
1	A849	mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	34 393	9.89	↓	↓	↓	↓
2	A82	ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 5	54 483	5.78	↓	—	↓	—
3	B293	serum albumin	70 682	6.09	↑	↑	↑	↑
4	A864	vimentin	115 074	6.43	↓	↓	↓	↓
5	A379	LETM1 domain-containing protein LETM2, mitochondrial	52 833	9.40	↓	↓	↓	↓
6	B750	alpha-crystallin B chain	20 076	6.76	↑	—	—	—
7	C695	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	64 139	6.72	↑	↑	—	—
8	C707	heat shock protein beta-1	22 936	6.12	↓	↓	↓	↓
9	A181	calreticulin precursor	53 481	5.21	↓	↓	↓	↓
10	A949	transthyretin	15 824	5.77	↓	↓	↓	↓
11	C827	growth factor receptor-bound protein 14	61 181	8.78	—	↑	↑	↑
12	A872	destrin	18 807	8.19	—	↓	↓	↓
13	D195	protein disulfide-isomerase A3	57 044	5.88	—	—	↑	—
14	D566	actin, cytoplasmic 1	42 052	5.29	—	↑	↑	↑
15	D525	tropomyosin-4	36 569	5.96	—	↑	↑	↑
16	A782	syntaxin-binding protein 1	67 925	6.49	↓	↓	↓	↓
17	A783	5-hydroxytryptamine receptor 2B	54 187	9.23	↓	↓	↓	↓
18	E685	peroxiredoxin-6	24 860	5.64	—	—	↑	↑
19	E656	GDNF-inducible zinc finger protein 1	81 546	8.62	—	—	↑	↑
20	E557	cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	55 110	5.52	—	—	↑	↑
21	A683	annexin A1	25 182	4.86	↓	↓	↓	↓
22	A412	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	35 511	7.60	↓	↓	↓	↓
23	A203	alpha-enolase	47 440	6.16	↓	↓	↓	↓
24	B158	serotransferrin	78 512	7.14	↑	↑	—	—
25	A515	annexin A2	38 939	7.55	↑	↑	↑	↑
26	A448	annexin A5	28 928	6.67	↓	↓	↓	↓
27	A106	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B	114 626	6.13	↓	↓	↓	↓
28	C923	galectin-1	15 189	5.14	—	↑	↑	—
29	A640	PPPDE peptidase domain-containing protein 2	18 487	4.86	↓	↓	↓	↓
30	E857	sperm-associated antigen 1	101 807	5.35	—	↑	↑	↑

注:各蛋白质表达量增高(↑)或降低(↓)或无明显变化(—)的判断标准是以模型组 A 为被比较胶(即基准胶),其余 4 组 B,C,D,E 为比较胶而进行;各蛋白质序号字母部分代表组别,数字部分代表该组内的点号。

复发性流产是多因素疾病,其病理发生可涉及母胎界面多种细胞和分子之间复杂的作用机制。以往的研究多是应用传统的生物化学方法针对单个或少数几个基因或蛋白质作用机制的探讨,这些信息远远不能满足对复发性流产母胎界面细胞与分子间动态对话框的系统认识。因此,通过对复发性流产母胎界面与生理状态组织总蛋白质进行比较,对于系统揭示本病发生的分子机制,最终实现早期预测和有效干预具有非常重要的意义^[7]。本实验采用 IPG 等电聚焦结合 SDS-PAGE 的蛋白质分离系统,对模型组、正常组、寿胎丸高、中、低剂量组小鼠蜕膜组织进行了比较蛋白质组分析,2-DE 图谱经 PDQuest 8.0 软件检测,每组蜕膜组织蛋白质点约为

800 个,对其中 30 个差异表达显著的蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 鉴定。在这些鉴定出的差异蛋白质中,其功能主要涉及绒毛外滋养细胞的侵袭、蜕膜组织血管的重建及蜕膜细胞的凋亡等,它们可能在自然流产的发生中扮演着重要角色。

原肌球蛋白在细胞移动、形态发生和胞浆移动中调节肌动蛋白丝的动态变化,近年研究提示原肌球蛋白可能参与肿瘤转移过程^[8-9]。正常妊娠中绒毛外滋养细胞的侵袭转移与肿瘤细胞的侵袭转移在机制上有许多相似之处。肿瘤方面的研究揭示原肌球蛋白具有促进肿瘤细胞侵袭转移的作用,因而原肌球蛋白可能在胚胎绒毛外滋养细胞对子宫内膜的侵袭过程中也具有类似的调节作用。本实验观察到

自然流产蜕膜组织中原肌球蛋白表达下降,提示原肌球蛋白对绒毛外滋养细胞的侵袭能力产生影响,造成侵袭转移促进作用减弱,使胚胎植入子宫深度不够而使胚胎流产风险增加。

钙网蛋白前体的产物是钙网蛋白,作为 Ca^{2+} 结合的分子伴侣,协助蛋白质正确折叠和维持细胞 Ca^{2+} 稳态。某些因素诱导细胞内质网应激时,大量未折叠或误折叠蛋白堆积于内质网,进一步加重内质网的负荷,严重时可引起细胞凋亡^[10-11]。近年来,钙网蛋白在血管生成、细胞黏附侵袭中的作用开始受到关注^[12-13]。本实验发现钙网蛋白前体在自然流产的蜕膜组织中表达升高,推测在自然流产蜕膜组织中,细胞内质网处于应激状态,大量未折叠或误折叠的蛋白堆积于内质网急需折叠,因而对分子伴侣的需求增加,钙网蛋白的合成也相应增加。钙网蛋白具有血管生成抑制剂效应,对蜕膜血管的重建可能产生抑制作用,钙网蛋白合成增加不利于蜕膜血管的重建,可能是自然流产发生的重要原因之一。

膜联蛋白 A5 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合通道蛋白,是膜结合蛋白家族成员之一,主要存在于细胞膜和内质网膜上。Annexin A5 与磷脂酰丝氨酸有高度的亲和性,能与早期凋亡细胞胞膜外翻的磷脂酰丝氨酸结合。研究表明,Annexin A5 在宫颈癌细胞系 Hela 细胞和 SiHa 细胞的 mRNA 水平和蛋白质水平均有表达,过表达 Annexin A5 的 SiHa 细胞凋亡显著增多,Annexin A5 具有促进宫颈癌细胞系 SiHa 细胞凋亡的作用^[14-15]。本实验观察到自然流产蜕膜组织 Annexin A5 表达增加,提示 Annexin A5 可能参与了自然流产蜕膜细胞的凋亡过程,它可能是自然流产发生的一个早期信号分子。

蛋白质二硫键异构酶是折叠酶中的一种,细胞内由于蛋白质浓度很高,蛋白质折叠需要有折叠因子(即折叠酶和分子伴侣)的协助。蛋白质二硫键异构酶能催化二硫键形成,具有分子伴侣活性^[16]。蛋白质二硫键异构酶是目前发现的帮助蛋白质折叠活性最高的蛋白质,本实验发现它在自然流产蜕膜组织中表达下调,提示蜕膜组织中部分蛋白质的折叠不完全,蛋白质结构的不完善将影响其功能的正常发挥,从而影响子宫内蜕膜化和胚胎滋养细胞的侵袭过程。

综上所述,复发性流产是一多种蛋白质参与的复杂过程,小鼠蜕膜组织的比较蛋白质组学分析是筛选复发性流产病变相关蛋白质的可靠方法之一;寿胎丸可调节复发性流产小鼠蜕膜组织多种蛋白质的表达,提示该复方具有多靶点的作用特点。

[参考文献]

- [1] 梁小妍,刘学庆,丁裕斌,等. 难免流产蜕膜组织遗传印记基因 PEG10 的表达[J]. 遗传,2008,30(6):735.
- [2] 陈巧儿,秦卫兵,叶嘉玲,等. 丙种球蛋白被动免疫治疗原因不明性反复自然流产研究[J]. 中国妇幼保健,2007,22(23):3260.
- [3] 苗凌娜. 寿胎丸加味治疗习惯性流产 35 例[J]. 四川中医,2011,29(7):93.
- [4] 丘春东,孔晓玲. 寿胎丸治疗免疫因素所致复发性流产 68 例的临床观察[J]. 中国医药指南,2011,9(19):309.
- [5] 谢玲,王玉. 寿胎丸加味治疗先兆流产和习惯性流产 43 例[J]. 江西中医药,2011,42(342):51.
- [6] 尤昭玲,赖毛华,何冬梅,等. 寿胎丸对反复自然流产小鼠 SOCS1 基因表达和妊娠结局的影响[J]. 中国中医药科技,2008,15(6):455.
- [7] Hess A P, Hamilton A E, Talbi S. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators[J]. Biol Reprod,2007,76(1):102.
- [8] 包世新. 原肌球蛋白及其在膀胱癌中的表达[J]. 现代泌尿外科杂志,2006,11(3):185.
- [9] 孙明莉,李薇,张一琼,等. 原肌球蛋白、丙酮酸激酶在急性早幼粒细胞白血病耐药细胞中表达上调[J]. 中国实验诊断学,2007,11(3):388.
- [10] 徐菲菲,刘秀华. 钙网蛋白的生理及病理生理学作用[J]. 生理科学进展,2006,37(3):216.
- [11] Liu Xiuhua. Calreticulin and cardiovascular diseases[J]. Int J Pathol Clin Med,2006,26(5):440.
- [12] Zhao K J, Cheng H, Zhu K J, et al. Recombined DNA vaccines encoding calreticulin linked to HPV6bE7 enhance immune response and inhibit angiogenic activity in B16 melanoma mouse model expressing HPV6bE7 antigen [J]. Arch Dermatol Res, 2006, 298(2):64.
- [13] 董艳玲,何俊琳,刘学庆,等. 早孕小鼠子宫内蜕膜钙网蛋白的表达规律[J]. 细胞生物学杂志,2008,30:372.
- [14] 李欣,高福祿,何晓文,等. 膜联蛋白 A5 与宫颈黏膜上皮细胞癌变的关系[J]. 解剖学杂志,2006,29(4):433.
- [15] 李欣,高福祿,窦志杰,等. 膜联蛋白 A5 过表达对宫颈癌细胞系 SiHa 细胞凋亡的影响[J]. 解剖学杂志,2008,31(5):668.
- [16] 王志强,周智敏,郭占云. 蛋白质二硫键异构酶家族的结构与功能[J]. 生命科学研究,2009,13(6):548.

Effects of Shoutai Wan on proteome in decidua tissues of recurrent abortion mice

TAN Zhan-wang, LEI Lei^{*}, LUO Lei, LU Li-li

(College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[**Abstract**] **Objective:** To analysis the differential expression of decidua tissue proteins and effective mechanisms of recurrent abortion mice with Shoutai Wan, and explore the mechanism of Shoutai Wan in preventing miscarriage. **Method:** The abortion-prone CBA/J × DBA/2 matings were established as the model of recurrent abortion and the nonabortion-prone CBA/J × BALB/c matings were used as the model of normal pregnancy. The model of recurrent abortion CBA/J × DBA/2 of mice pregnant were randomly divided into four groups according to the sequence of pregnancy, including model group, Shoutai Wan low-dose group, Shoutai Wan middle-dose group and Shoutai Wan high-dose group. From the 1st day of pregnant, mice of normal group, model group, Shoutai Wan low-dose group ($3 \text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$), Shoutai Wan middle-dose group ($6 \text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$) and Shoutai Wan high-dose group ($12 \text{ g} \cdot \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$) are oral administration in different doses. On the 14th day of pregnancy, all mice are killed and the embryo loss rate (ELR) was counted. The expression of differential proteins of mice decidua tissues were separated by means of 2-DE and identified by MALDI-TOF-MS. The functions of identified proteins were further analysed according to bioinformatics resources. **Result:** Compared with model group, low-dose Shoutai Wan can not significantly improve the model of recurrent abortion in pregnant mice ELR; Shoutai Wan middle-dose and high-dose group of pregnant mice ELR were significantly decreased ($P < 0.01$). The results showed that the well-resolved, reproducible 2-DE patterns of mice decidua tissues of model group, normal group and Shoutai Wan low middle high-dose group were obtained. Through comparative proteome analysis of decidua tissues of all groups, 30 differential expression protein spots which maybe related to recurrent abortion and Shoutai Wan intervention were identified by MALDI-TOF-MS. These differential expression proteins mainly refer to invasion of the blastocyst, blood vessel remodeling and cell apoptosis. **Conclusion:** Shoutai Wan can decrease recurrent abortion mice ELR significantly, and play a role in preventing miscarriage. Recurrent abortion is a complicated process refer to diverse proteins participate. For several protein spots expression of decidua tissues in recurrent abortion mice was regulated by Shoutai Wan, it provides contribution to the effect characteristic of multitarget.

[**Key words**] Shoutai Wan; recurrent abortion; decidua; proteome

doi:10.4268/cjcm20130424

[责任编辑 陈玲]