

高龄早期复发性流产患者流产原因分析

刘玉昆, 陈欣, 刘颖琳, 陈慧, 谭剑平, 张建平*

(中山大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东广州 510210)

摘要:【目的】探讨高龄早期复发性流产患者的流产原因。【方法】回顾性分析2008年1月至2012年10月, 在我院诊治的高龄早期复发性流产患者的病历资料, 对已行系统病因学检查, 并且流产后成功行绒毛染色体分析的82例患者的病因分布进行分析。并比较了高龄早期复发性流产与高龄偶发性早期流产的绒毛染色体异常发生率, 原发性流产与继发性流产的病因分布, 不同流产次数的复发性流产患者的病因分布。【结果】高龄偶发性流产的绒毛染色体异常发生率(85.1%)高于复发性流产的染色体异常发生率(67.1%), ($P < 0.05$)。胚胎染色体异常是高龄复发性流产最主要的流产原因(67.1%), 其次是内分泌因素(24.4%, 包括亚临床甲状腺功能减退、PCOS、DM、高PRL)、子宫异常(19.5%, 主要为子宫纵隔和宫腔粘连)、APA阳性(12.2%)、夫妇染色体异常(3.7%)、感染(2.4%), 真正不明原因的复发性流产占15.9%。原发性与继发性流产的病因分布无明显差异。不同流产次数的复发性流产患者的病因分布无明显差异。【结论】胚胎染色体异常是高龄早期复发性流产的最主要原因, 对复发性流产患者不仅要行传统的流产病因学检查, 还应对流产胚胎组织进行染色体检查, 以进一步明确流产原因, 及时给予合理的诊治。

关键词: 高龄; 复发性自然流产; 绒毛; 染色体核型分析

中图分类号: R714.21 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)04-0646-06

Etiology of Early Recurrent Spontaneous Abortion in Women with Advanced Maternal Age

LIU Yu-kun, CHEN Xin, LIU Ying-lin, CHEN Hui, TAN Jian-ping, ZHANG Jian-ping*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the etiology of early recurrent spontaneous abortion (RSA) in patients with advanced maternal age. 【Methods】 From January 2008 to October 2012, the data of 82 early RSA patients with advanced maternal age who underwent both conventional examination for RSA and karyotype analysis on products of conception were retrospectively analyzed. The rate of abnormal embryonic karyotype in patients with RSA was compared to that with sporadic spontaneous abortion (SSA). The distribution of causes in primary and secondary RSA was also compared. The distribution of causes of RSA among woman with different number of prior spontaneous abortion were compared. 【Results】 The rate of abnormal embryonic karyotype in patients with SSA was higher than that of patients with RSA (85.1% vs 67.1%). Embryonic karyotype anomaly was the most frequent (67.1%) causes of RSA. The prevalence of endocrinologic factor, uterine anomaly, APA positive, parental chromosomal abnormality and infection were 24.4%, 19.5%, 12.2%, 3.7%, and 2.4%, respectively. The prevalence of RSA of truly unexplained causes was 15.9%. The distribution of causes of early RSA in primary and secondary RSA had no difference. The distribution of causes did not differ among patients with different spontaneous abortion numbers. 【Conclusions】 Abnormal embryonic karyotype was the most common cause of RSA in patients with advanced maternal age. Embryonic karyotype analysis should be added to the list of evaluation items in women with RSA.

Key words: advanced maternal age; recurrent spontaneous abortion; chorionic villus; karyotype analysis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2013, 34(4): 646-610, COV3]

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续发生3次或3次以上的自然流产,

发生率约1%^[1]。其中80%发生于12周以内。其病因包括遗传因素、内分泌因素、解剖因素、感染因

收稿日期: 2013-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81170625); 广东省自然科学基金博士启动基金资助项目(06021369)

作者简介: 刘玉昆, 博士, 主治医师, 研究方向: 围产医学, 生殖免疫, E-mail: yukuunl@126.com, * 通信作者: 张建平, 教授, 博士生导师; E-mail: zjp2570@126.com

素、免疫因素等。但既往对 RSA 的病因研究多缺乏胚胎染色体检查,而近来研究发现一半以上的自然流产胚胎存在染色体异常^[2]。因此基于胚胎染色体检查的流产病因研究具有重要意义。特别是高龄(≥ 35 岁)患者,其胚胎染色体异常的发生率较年轻患者明显增高^[3]。本研究对 2008 年至 2012 年我院收治的,成功行绒毛染色体检查以及系统的流产病因学检查的高龄早期 RSA 患者的病因进行分析,以期对 RSA 患者的咨询和诊治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

2008 年 1 月至 2012 年 10 月在我院诊治、病史资料齐全的高龄复发性流产患者(本次流产时年龄 ≥ 35 岁,自然流产次数大于等于 3 次,流产孕周 ≤ 12 周),在非孕期和本次妊娠期间行全面流产相关病因检查,本次妊娠流产绒毛成功行细胞培养及核型分析者 82 例。年龄 35~45 岁(38.1 ± 2.6),孕次 3~11,产次 0~1,早期自然流产次数 3~11(末次流产计算在内)。流产时平均孕周 42~84 天(59.9 ± 8.3)。原发性流产 62 例,继发性流产 20 例。同期在我院诊治的高龄偶发性早期流产患者(本次流产时年龄 ≥ 35 岁,自然流产 1~2 次,流产孕周 ≤ 12 周),本次妊娠流产后成功行绒毛细胞培养及核型分析者 47 例。年龄 35~43 岁(38.1 ± 2.1),孕次 1~11,产次 0~2,早期自然流产 1 次者 21 例,2 次者 26 例。流产时孕周 44~81 d(61.9 ± 9.6)。复发性流产组与偶发性流产组的年龄和流产时孕周均无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2 复发性流产的病因检查

1.2.1 非孕期行宫腔镜检查 (必要时腹腔镜辅助检查),了解有无子宫畸形(主要为子宫纵隔、单角子宫、双角子宫)及宫腔粘连、子宫内膜息肉、子宫黏膜下肌瘤等子宫异常,行盆腔 B 超检查,注意有无多囊卵巢。抽血检查:E2、FSH、LH、PRL、甲状腺功能三项(TSH、FT3、FT4)、空腹血糖、抗磷脂抗体(antiphospholipid antibody, APA),主要包括抗心磷脂抗体(anticardiolipin antibodies, ACA)、抗 $\beta 2$ 糖蛋白抗体、狼疮抗凝因子(lupus anticoagulant, LA)。

1.2.2 检测 孕早期除了定期检测 HCG、P 及

超声外,复测甲状腺功能三项、空腹血糖(必要时 OGTT)、TORCH(即弓形虫、风疹病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、B19 微小病毒)、APA。

1.2.3 多囊卵巢综合征诊断 多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)诊断按照第七版妇产科教科书的诊断标准。孕早期 TSH 在 2.5~10.0 mIU/L 之间,FT3、FT4 正常,诊断为亚临床甲状腺功能减退(参考 ATA 指南^[4])。

1.3 绒毛的取材、细胞培养和核型分析

确定胚胎停育后向患者交待病情,签署同意后行清宫术,术中将绒毛吸入无菌吸管中,取出绒毛组织,无菌生理盐水漂洗后送实验室。于显微镜下挑取优质绒毛组织 10~20 mg,剪成糊状,加入 1 mL 酶解液,于 37℃水浴箱放置 15 min。离心 10 min(离心半径 $r = 8.5$ cm),弃上清,加入 4 mL 培养液,吹打均匀后接种于 25 cm²培养瓶中,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 温箱内培养 5~7 d。如在倒置显微镜下看到克隆形成即可换液,继续培养至 8~10 个克隆时收获。参照收获羊水的方法收获绒毛染色体,G 显带。核型分析每份标本计数 30 个分裂相,分析 3 个核型,出现嵌合体计数 100 个分裂相。染色体分析系统拍照保存。

1.4 统计分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计数资料的比较采用卡方检验或 Fisher's 精确检验,计量资料的比较应用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高龄早期复发性流产与偶发性流产患者的绒毛染色体核型分析

82 例高龄复发性流产患者中,绒毛染色体正常者 27 例(46XX 15 例,46XY 12 例),绒毛染色体异常者 55 例,占 67%。47 例高龄偶发性流产患者中,绒毛染色体正常者 7 例(46XX 4 例,46XY 3 例),绒毛染色体异常者 40 例,占 85.1%,高于复发性流产患者异常染色体的发生率($P < 0.05$)。复发性流产与偶发性流产中,异常染色体的主要类型均是常染色体三体,分别占 65.5%和 57.5%。在复发性流产组最常见的三体为 22、16、15、18 三体,在偶发性流产组最常见的三体为 16、22、13、15 三体。两组的异常染色体分布无明显差异(表 1)。

表 1 复发性自然流产和偶发性自然流产的绒毛体异常类型比较

Table 1 Spectrum of abnormal karyotype in recurrent spontaneous abortion and sporadic spontaneous abortion

	n (%)		
	RSA	SSA	P
Autosomal trisomy	36(65.5)	23(57.5)	0.430
Monosomy	3(5.5)	4(10)	0.402
Triploidy	2(3.6)	2(5)	0.744
Structural abnormality	2((3.6)	4(10)	0.208
Mosaicism	7(12.7)	4(10)	0.682
Double abnormality	5(9.1)	3(7.5)	0.783
Total	55(100)	40(100)	0.025

RSA: recurrent spontaneous abortion; SSA: sporadic spontaneous abortion

2.2 高龄早期复发性流产患者的流产病因分析

82 例高龄复发性流产患者中, 检出传统病因异常者 40 例, 占 48.8%, 其中一项指标异常者 32 例, 两项指标异常者 5 例, 三项指标异常者 3 例。在 40 例传统病因异常的患者中, 胚胎染色体异常者 26 例(65%), 在传统病因正常的 42 例患者中, 胚胎染色体异常 29 例(69%)。真正不明原因(即传统病因及胚胎染色体均正常)13 例, 占 15.9%。具体病因分布见图 1。最常见的病因依次为胚胎染色体异常(67.1%)、内分泌因素(24.4%, 包括亚临床甲状腺功能减退 9 例、PCOS 1 例、DM 8 例、高 PRL 2 例)、子宫异常(19.5%, 子宫纵隔 6 例、宫腔粘连 10 例)、APA 阳性(12.2%)、夫妇染色体异常(3.7%)、感染(2.4%, 巨细胞病毒阳性和 B19 微小病毒阳性各 1 例)。9 例亚临床甲状腺功能减退患者中, 仅 2 例孕前即发现有亚临床甲状腺功能减退, 其余 7 例孕前甲功正常, 孕早期检查 TSH 在 2.5 ~ 5.0 mIU/L 之间, 诊断为亚临床甲状腺功能减退。

2.3 原发性与继发性复发性流产的病因分布比较

82 例高龄复发性流产患者中, 原发性流产 62 例, 继发性流产 20 例。继发性流产中 APA 阳性率(20%)高于原发性流产患者(9.7%), 但无统计学意义。其他病因分布无明显差异(表 2)。

2.4 不同流产次数的高龄早期复发性流产患者的病因分布比较

82 例高龄复发性流产患者中, 自然流产 3 次者 33 例, 流产 4 次者 22 例, 流产 5 次及以上次数者 27 例, 其病因分布无明显差异(表 3)。

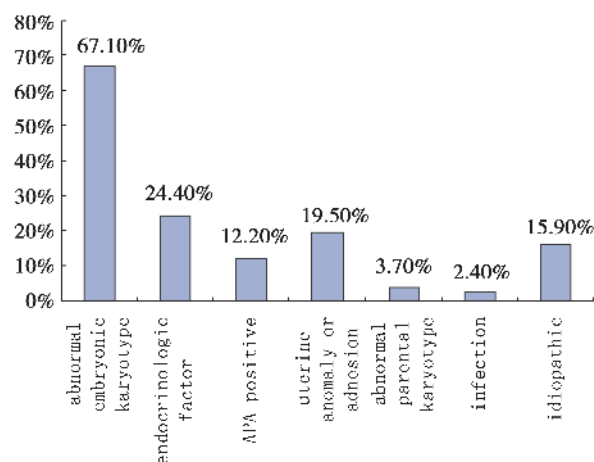


图 1 35 岁以上复发性自然流产妇女的病因分布

Fig. 1 Distribution of causes of recurrent spontaneous abortion in women over 35 years old

表 2 原发性复发性自然流产和继发性复发性自然流产的病因分布比较

Table 2 Comparison of the distribution of causes in primary recurrent spontaneous abortion (RSA) versus secondary RSA

	n (%)		
	Primary RSA (n = 62)	Secondary RSA (n = 20)	P
Abnormal embryonic karyotype	42(67.2)	13(65)	0.821
Endocrinologic factor	13(21)	7(35)	0.204
APA positive	6(9.7)	4(20)	0.220
Uterine anomaly or adhesion	12(19.4)	4(20)	0.950
Abnormal parental karyotype	3(4.8)	0	1.000
Infection	2(3.2)	0	1.000
Idiopathic	12(19.4)	1(5)	0.126

表 3 不同流产次数的复发性流产患者的病因分布比较

Table 3 Comparison of the distribution of causes in recurrent spontaneous abortion according to the times of spontaneous abortion

	n (%)			
	3 times (n = 33)	4 times (n = 22)	≥5 times (n = 27)	P
Abnormal embryonic karyotype	23(69.7)	17(77.3)	15(55.6)	0.251
Endocrinologic factor	10(30.3)	4(18.2)	6(22.2)	0.562
APA positive	5(15.2)	2(9.1)	3(11.1)	0.780
Uterine anomaly or adhesion	7(21.2)	5(22.7)	4(14.8)	0.746
Abnormal parental karyotype	2(6.1)	0	1(3.7)	0.503
Infection	1(3.0)	1(4.5)	0	0.567
Idiopathic	4(12.1)	4(18.2)	5(18.5)	0.749

"No. SA" means number of spontaneous abortion

3 讨论

3.1 胚胎染色体异常是高龄复发性流产患者的主要流产原因

随着年龄的增加,自然流产的风险增加。35岁以下妇女发生自然流产的几率14%,而40岁以上者自然流产的几率则高达40%^[5]。主要原因在于高龄患者的胚胎染色体异常的几率明显增加^[4,6]。本研究中高龄复发性流产患者的胚胎染色体异常发生率高达67.1%。在传统病因正常的42例患者中(既往认为不明原因),29例(69%)胚胎染色体异常。而在40例传统病因异常的患者中,胚胎染色体异常者26例(65%)。可见胚胎染色体异常是高龄复发性流产患者的主要流产原因,仅行传统病因检查还远不够。越来越多的研究支持对复发性流产患者的流产胚胎行染色体检查,以及时明确流产原因,减少患者的焦虑,及时给予合理的诊治^[7-8]。

本研究还对高龄复发性流产患者与偶发性流产患者的流产绒毛异常染色体的发生率进行比较,发现复发性流产患者的染色体异常发生率低于偶发性流产患者(67.1%和85.1%),提示复发性流产患者除了胚胎染色体异常外还存在某些潜在的导致流产的原因。本研究中,不管是复发性流产还是偶发性流产患者,常染色体三体均是染色体异常的主要类型,分别占异常染色体的65.5%和57.5%。在复发性流产组最常见的三体为22、16、15、18三体,在偶发性流产组最常见的三体为16、22、13、15三体,与文献报道基本一致^[9]。其他异常染色体的分布在两组中亦未见差异。

3.2 复发性流产的传统病因

既往对复发性流产的病因检查多不包括胚胎染色体的检查,称为传统病因学检查。比较公认的传统病因学检查包括:APA、夫妇染色体、子宫异常、内分泌异常(甲状腺功能低下或亢进、糖尿病、PCOS、高PRL)。在临床实践中,各实验室筛查病因的项目和方法有一定差异,加之研究人群的年龄、流产次数等不同,导致文献报道的RSA的病因分布有所不同。在Clifford等^[10]的研究中,传统病因的检出占26.2%,其中内分泌异常、子宫异常、APA阳性、夫妇染色体异常所占比例分别为6.8%、1.8%、14%、3.6%。本研究中,传统病因的检出率为48.8%,其中内分泌因素、子宫异常、APA

阳性、夫妇染色体异常及感染所占的比例分别为24.4%、19.5%、12.2%、3.7%、2.4%。原发性流产与继发性流产比较,流产病因的分布无明显差异。对不同流产次数的高龄复发性流产患者的流产病因分布进行比较,未发现明显差异。但本研究的例数尚少,尚需更大样本的进一步研究。

引起复发性流产的内分泌因素主要有糖尿病、甲状腺功能低下或亢进、高PRL、PCOS。本研究中糖尿病和亚临床甲状腺功能减退是主要的内分泌因素。糖尿病引起流产的主要为控制不良的糖尿病,而控制良好的糖尿病并不增加流产的风险。

由于孕期各种激素的影响,研究认为孕早期的血清TSH水平较非孕期降低20%~30%。近来国际上多个组织(包括美国临床内分泌医师协会、美国甲状腺协会等)重新将妊娠期TSH的正常上限由以往的5.0调整为2.5 mIU/L^[11]。并且发现孕早期TSH在2.5~5.0 mIU/L之间者(既往认为正常范围),其早期流产率明显增加^[12]。2009年一项关于甲状腺功能与妊娠结局的研究发现,胎儿丢失与母体TSH水平呈正相关,包括以往定义为正常TSH范围的患者^[13]。由于既往关于复发性流产病因的研究中,TSH的检测多在非孕期,而本研究中无论孕前TSH是否正常,在孕早期均常规行TSH检测,并且采用新的诊断标准(即TSH大于2.5 mIU/L)。发现不少孕前甲功正常者在孕早期出现TSH异常。因此本研究中亚临床甲状腺功能减退的检出率高于文献报道^[14]。我们建议对于RSA患者即使在非孕期检查甲功正常,在孕早期仍应复测,以及早发现甲状腺功能减退,及时给予治疗,减少孕期并发症。

与复发性流产有关的子宫异常主要包括单角子宫、双角子宫、纵隔子宫。文献报道,在RSA患者中,子宫畸形的检出率10%~25%,而对照组则为5%^[15]。Sugiura等^[16]的研究则认为纵隔的深度与发生RSA的风险有关。本研究中子宫异常(主要为纵隔和粘连)检出率为19.5%。子宫纵隔引起流产的可能机制为纵隔多是有纤维组织组成,供血不足,影响胎盘的生长发育^[17]。另外本研究发现RSA患者中宫腔粘连发生率也较高。既往对宫腔粘连与RSA的关系研究不多。宫腔粘连一方面是反复流产、刮宫的后果,而反过来又可以进一步引起流产。在对子宫异常的检查中,有研究应用HSG或三维超声,我们认为对RSA患者行宫腔镜检查

可提高对宫腔粘连等宫腔病变的检出率,而单纯行 HSG 或超声则可能会漏诊宫腔粘连患者。

抗磷脂抗体(APA)是引起复发性流产的较明确的病因。复发性流产患者中 APA 的阳性率 5%~15%^[7],目前临床上主要的检测指标为 ACA、LA 和抗 $\beta 2$ 糖蛋白抗体。本研究中 APA 的阳性率为 12.2%。APA 导致流产的机制与增加滋养细胞的凋亡,影响滋养细胞的分化和入侵等有关^[18]。临床上应用肝素和阿司匹林治疗可明显降低 APA 阳性的复发性流产患者的妊娠丢失率^[19]。

另外引起复发性流产的因素尚有夫妇一方或双方染色体异常(主要为平衡移位),RSA 患者中其发生率为 3%~6%^[20]。本研究中发现 3 例(3.7%),与文献报道类似。

虽然某些病毒或细菌(如支原体、衣原体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、B19 微小病毒、弓形虫等)可导致偶发性流产,但关于感染因素与复发性流产的关系尚存争议。目前多不推荐其作为复发性流产的常规检查项目^[1,21]。考虑到 TORCH 与胎儿致畸有关,对复发性流产患者,我们以往仍将其作为复发性流产的常规检查项目。本研究中仅发现 2 例为 TORCH 阳性,这也支持了 TORCH 不作为 RM 常规检查项目的观点。

3.3 不明原因复发性流产的可能原因

尽管本研究对复发性流产患者进行了较为全面的检查和流产绒毛染色体分析,仍有 13 例(15.9%)的患者未能找到流产的原因。Ogasawara 等^[8]报道的 482 例复发性流产患者中,真正不明原因者 24.5%。Marquard 等^[22]报道 50 例高龄 RSA 中,经过胚胎染色体分析后,真正不明原因者占 18%。如何解释这些不明原因的复发性流产?首先,胚胎染色体核型分析仅是较粗略的遗传分析手段。流产胚胎中可能还存在其他导致胚胎停止发育的异常基因,无法用核型分析的方法检出。目前应用的 aCGH 等新的分子遗传学方法将能检出更多的胚胎基因异常导致的流产^[23]。另外,除了常见的引起复发性流产的原因外,目前还发现了越来越多的与 RSA 有关的因素,如 NK 细胞毒性增高、胰岛素抵抗、遗传性易栓症等。但这些因素目前尚存在争议,尚未作为常规检查项目应用到临床实践中。随着对复发性流产的研究深入,其病因将被越来越深入的阐明。

综上所述,胚胎染色体异常是高龄复发性流

产的最主要原因,对复发性流产患者不仅要行传统的流产病因学检查,还应对流产胚胎组织进行染色体检查,以进一步明确流产原因,及时给予合理的诊治。

参考文献:

- [1] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage [J]. *Lancet*, 2006, 368(9535): 601-611.
- [2] Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss [J]. *Semin Reprod Med*, 2006, 24(1): 17-24.
- [3] Grande M, Borrell A, Garcia-Posada R, et al. The effect of maternal age on chromosomal anomaly rate and spectrum in recurrent miscarriage [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(10): 3109-3117.
- [4] ATA. Guideline of ATA for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum [J]. *Thyroid*, 2011, 21(10): 1081-1125.
- [5] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Aging and infertility in women [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(5s1): s248-s252.
- [6] Kroon B, Harrison K, Martin N, et al. Miscarriage karyotype and its relationship with maternal body mass index, age, and mode of conception [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(5): 1827-1829.
- [7] Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice: recurrent miscarriage [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(18): 1740-1747.
- [8] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(8): 2297-2303.
- [9] Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriage from couples with recurrent miscarriage: a case-control study [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(2): 446-451.
- [10] Clifford K, Rai R, Watson H, et al. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases [J]. *Hum Reprod*, 1994, 9(7): 1328-1332.
- [11] Krassas GE, Popper K, Glinioer D. Thyroid function and human reproductive health [J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(5): 702-755.
- [12] Negro R, Schwartz A, Gismondi R, et al. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95

(上接第 650 页 from page 650)

(9): E44-E48.

- [13] Benhadi N, Wiersinga WM, Reitsma JB, et al. Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death [J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 160(6): 985-991.
- [14] Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4): 1234-1243.
- [15] Salim R, Regan L, Woelfer B, et al. A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(1): 162-166.
- [16] Sugiura-ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, et al. Midline uterine defect size is correlated with miscarriage of euploid embryos in recurrent cases [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(6): 1983-1988.
- [17] Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, et al. Uterine anomaly and recurrent pregnancy loss [J]. *Semin Reprod Med*, 2011, 29(6): 514-521.
- [18] Rote NS, Stetzer B. Autoimmune disease as a cause of

reproductive failure [J]. *Clin Lab Med*, 2003, 23(2): 265-293.

- [19] Ziakas PD, Pavlou M, Voulgarelis M. Heparin treatment in antiphospholipid syndrome with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis [J]. *Obstet Gynecol*, 2010, 115(6): 1256-1262.
- [20] Meza-Espinoza JP, Anguiano LO, Rivera H. Chromosomal abnormalities in couples with reproductive disorders [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2008, 66(4): 237-240.
- [21] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion [J]. *Fertil and Steril*, 2012, 98(15): 1103-1111.
- [22] Marquard K, Westphal L, Milki AA, et al. Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(4): 1473-1477.
- [23] Robberecht C, Pexsters A, Deprest J, et al. Cytogenetic and morphologic analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss [J]. *Prenat Diagn*, 2012, 32(10): 933-942.

(编辑 张思健)

(上接第 520 页 from page 520)

素-(1-7)对 NIT-1 细胞胰岛素信号通路的影响 [J]. *中华内分泌与代谢杂志*, 2011, 27(10): 844-848.

- Chai JN, Xu MT, Xue SN, et al. Effect of angiotensin II, angiotensin-(1-7) on insulin signaling pathway in NIT-1 cell line [J]. *Chin J Endocrinol Metab*, 2011, 27(10): 844-848.
- [7] Costes S, Langen R, Gurlo T, et al. beta-Cell Failure in Type 2 Diabetes: A Case of Asking Too Much of Too Few? [J]. *Diabetes*, 2013, 62(2): 327-335.
- [8] Lee YC, Nielsen JH. Regulation of beta cell replication [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 297(1-2): 18-27.
- [9] Lee SH, Park MH, Kang SM, et al. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* protects against high-glucose induced damage to rat insulinoma cells by reducing oxidative stress and apoptosis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(8): 1445-1451.
- [10] Wei P, Shi M, Barnum S, et al. Effects of glucokinase activators GKA50 and LY2121260 on proliferation and apoptosis in pancreatic INS-1 beta cells [J]. *Diabetologia*, 2009, 52(10): 2142-2150.
- [11] Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESA. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-

7)-Mas axis [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(5): 519-527.

- [12] Munoz MC, Giani JF, Burghi V, et al. The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7) [J]. *Regul Pept*, 2012, 177(1-3): 1-11.
- [13] Santos SH, Braga JF, Mario EG, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(5): 953-961.
- [14] Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism [J]. *Diabetes*, 2008, 57(2): 340-347.
- [15] Rodgers K, Xiong S, Dizerega GS. Effect of angiotensin II and angiotensin(1-7) on hematopoietic recovery after intravenous chemotherapy [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 51(2): 97-106.
- [16] Bindom SM, Hans CP, Xia H, et al. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2010, 59(10): 2540-2548.

(编辑 孙慧兰)

小檗碱及其亲脂性衍生物抑制恶性胶质瘤 C6 细胞的增殖及迁移与侵袭

(付胜楠, 等)

(正文见第 531-536 页 Text in page 531-536)

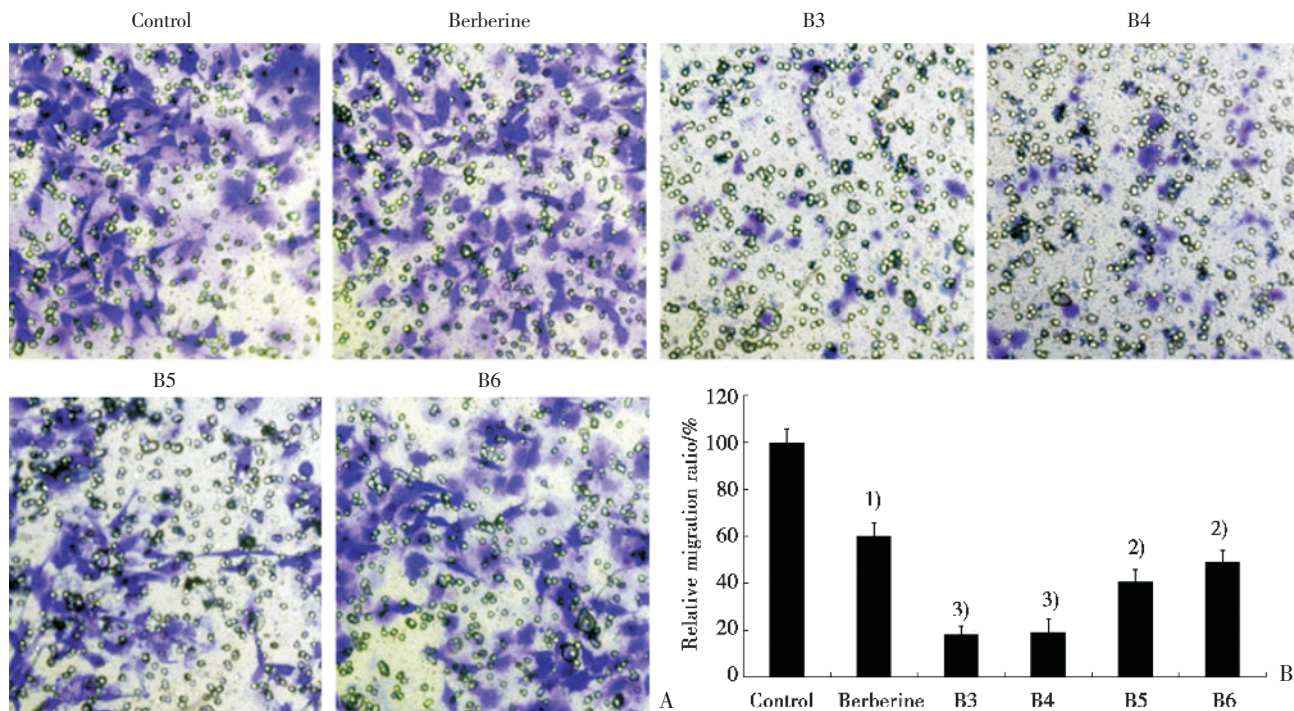


图 4 Transwell 迁移实验检测细胞的迁移能力

Fig.4 Cell migrating capability detected with transwell migration assay

A: Microscopy images of cells migrating into the inner membrane ($\times 200$); B3: 9-O-dodecyl-berberine; B4: 9-O-cetyl-berberine; B5: 9-O-octadecyl-berberine; B6: 9-O-benzyl-berberine. B: Cell migration quantified as described in Methods, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. 1) $P < 0.05$, versus control; 2) $P < 0.01$, versus control; 3) $P < 0.001$, versus control.

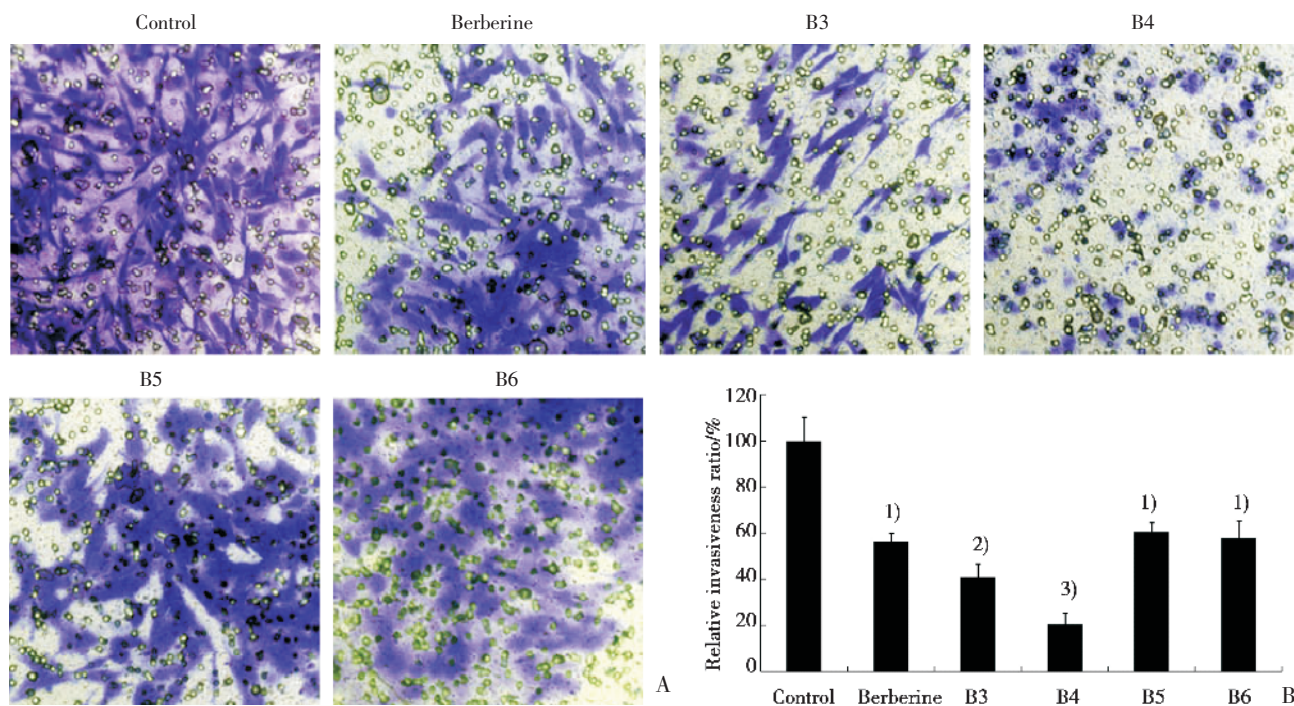


图 5 Transwell 侵袭实验检测细胞的侵袭能力

Fig.5 Cell invasiveness detected with transwell invasion assay

A: Microscopy images of cells invading into the inner membrane through a layer of Matrigel ($\times 200$); B3: 9-O-dodecyl-berberine; B4: 9-O-cetyl-berberine; B5: 9-O-octadecyl-berberine; B6: 9-O-benzyl-berberine. B: Cell invasiveness quantified as described in Methods; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. 1) $P < 0.05$, versus control; 2) $P < 0.01$, versus control; 3) $P < 0.001$, versus control.