

安子合剂对 ACA 阳性流产小鼠母胎界面 JAK/STAT3 信号通路的影响

许家莹, 陆启滨* (南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 观察安子合剂对抗心磷脂抗体(ACA)阳性小鼠母胎界面 JAK/STAT3 信号通路的影响。方法 以人 β 2-GP I 为诱导剂建立 ACA 阳性小鼠模型,空白组给予生理盐水,模型组给予人 β 2-GP I;各治疗组分别给予阿司匹林和高、低两种不同剂量安子合剂,于妊娠第 15 天处死,计算胚胎吸收率,采用 ELISA 方法检测外周血 ACA;采用免疫组化方法检测胎盘、蜕膜组织 JAK、GP130、p-STAT3,以 Western blot 方法检测 STAT3、p-STAT3。结果 安子合剂低、高剂量组、阿司匹林组小鼠的胚胎吸收率明显降低,小鼠血清 ACA 的滴度也显著降低($P<0.05$),母胎界面的 JAK、GP130、p-STAT3 的表达均增高,其中胎盘的 JAK、p-STAT3 的表达与模型组比较具有显著差异($P<0.05$),蜕膜 GP130、p-STAT3 的表达与模型组比较具有显著差异($P<0.05$)。结论 ACA 导致妊娠丢失的病理机制与母胎界面 JAK/STAT3 信号通路有关,安子合剂发挥治疗作用的机制可能是通过提高胎盘 JAK 的表达、增强蜕膜 GP130 的表达,促进胎盘及蜕膜 STAT3 的活化。

关键词:抗心磷脂抗体;流产;JAK/STAT3 信号通路;安子合剂

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2016)03-0259-05

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0259

Influences of Anzi Heji on JAK/STAT3 Signaling Pathway on the Maternal-Fetal Interface of Mice Suffering ACA Positive Abortion

XU Jia-ying, LU Qi-bin*

(The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE It is to observe the influences of Anzi Heji on the JAK/STAT3 signaling pathways on the maternal-fetal interface of anticardiolipin antibody (ACA) positive mice. **METHODS** Establish ACA positive mice model with human β 2-GP I as derivant, and administer normal saline to the blank group and human β 2-GP I to the model group; administer aspirin and high and low dose Anzi Heji respectively to each therapy group, kill the mice at the 15th day of their pregnancy, calculate the embryo resorption rate, and test the ACA of peripheral blood by means of ELISA; test the JAK, GP130 and p-STAT3 of placenta and decidual tissue with immunohistochemical method, and test STAT3 and p-STAT3 with western blot method. **RESULTS** The embryo resorption rate of the mice of low- and high-dose Anzi Heji groups and aspirin group was lowered obviously, so was the titer of ACA in the serum of mice ($P<0.05$), the expression of JAK, GP130 and p-STAT3 on the maternal-fetal interface was raised, and wherein, the expression of JAK, p-STAT3 of placenta had significant difference from that of model group ($P<0.05$), and the expression of GP130 and p-STAT3 of decidual tissue had significant difference from that of the model group ($P<0.05$). **CONCLUSION** The pathomechanism for ACA to induce pregnancy loss is related to the JAK/STAT3 signaling pathways on the maternal-fetal interface, and the mechanism for Anzi Heji to produce therapeutic effect is possibly to promote the activation of STAT3 of placenta and decidual tissue by enhancing the expression of JAK of placenta and strengthening the expression of GP130 of decidual tissue.

KEY WORDS: anticardiolipin antibody; abortion; JAK/STAT3 signaling pathway; Anzi Heji

抗心磷脂抗体(Anticardiolipin antibodies, ACA)阳性流产的机理目前主要认为与抗体损伤胎盘绒毛血管上皮细胞,引起凝血障碍,血栓形成,胎盘梗塞有关。陆启滨教授认为 ACA 阳性流产的中医病机为“脾肾两虚,血热夹瘀”^[1],根据补肾健脾、

清热活血法创立安子合剂,临床疗效显著。

近年来研究发现,ACA 阳性流产与酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(Janus protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路相关。JAK/

收稿日期:2016-02-04;修稿日期:2016-04-19

基金项目:江苏省中医药领军人才项目(LJ200910)

作者简介:许家莹(1981—),女,江苏淮安人,南京中医药大学附属医院副主任中医师,南京中医药大学讲师。*通信作者:wenwd@nuaa.edu.cn

STAT 信号通路广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及免疫调节等过程,是众多细胞因子信号转导的重要途径^[2],大多数细胞因子、生长因子、激素等可通过 JAK/STAT 通路进行信号传导。JAK/STAT3 信号通路与肿瘤的发生发展关系密切^[3],滋养细胞和肿瘤细胞生长方式具有相似性,且近年来研究表明 STAT3 与胚胎着床密切相关,抑制 STAT3 活性会导致胚胎着床受阻^[4],故我们认为 JAK/STAT3 信号通路与滋养细胞的增殖和胚胎的发育相关。

本实验在以往的研究基础上建立 ACA 阳性流产动物模型,采用 ELISA 法检测外周血 ACA 的含量,采用免疫组化、Western blot 实验方法测定母胎界面 JAK、GP130、STAT3、p-STAT3 的含量,研究安子合剂与 JAK/STAT3 信号通路的关系,为临床治疗 ACA 阳性先兆流产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雌性 BALB/c 小鼠 80 只,8 周龄,体质量(25±2)g。雄性 BALB/c 小鼠 55 只,8~10 周龄,体质量(30±2)g。购自扬州大学比较医学中心。

1.1.2 实验用药 ①安子合剂:250 mL/瓶,主要成分:川断、桑寄生、菟丝子、太子参、白术、苎麻根、黄芩、丹参、甘草等,为南京中医药大学附属医院院内制剂,批号:1407001。将安子合剂分别浓缩成低、高剂量,合生药量 3.77、7.54 g/mL。②阿司匹林:石药集团欧意药业有限公司生产。将阿司匹林肠溶片溶于蒸馏水中,配成 0.975 mg/mL 的溶液。

1.1.3 主要实验试剂 ①人 $\beta 2$ -GP I ($\beta 2$ -glycoprotein-I),购自 Prospec 公司;② JAK、GP130、STAT3、p-STAT3 抗体,购自 bioworld 公司;③抗心磷脂抗体(IgG)试剂盒,购自为上海联硕生物技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 空白对照组、模型组、阿司匹林组、安子合剂低剂量组、安子合剂高剂量组。

1.2.2 给药方法 ①空白对照组:妊娠第 1 天给予蒸馏水灌胃,每 10 g 灌胃 0.1 mL,每日 1 次。②模型组:妊娠第 1 天给予蒸馏水灌胃,每 10 g 灌胃 0.1 mL,每日 1 次。③阿司匹林组:妊娠第 1 天给予溶解后的阿司匹林灌胃,0.019 5 mg/(g·d),每 10 g 灌胃 0.1 mL,每日 1 次。④安子合剂低剂量组:妊娠第 1 天给予浓缩后的低剂量安子合剂灌胃,37.7

mg/(g·d),相当于成人剂量,每 10 g 灌胃 0.1 mL,每日 1 次。⑤安子合剂高剂量组:妊娠第 1 天给予浓缩后的高剂量安子合剂灌胃,75.4 mg/(g·d),相当于成人剂量的 2 倍,每 10 g 灌胃 0.1 mL,每日 1 次。各组均连续灌胃给药 14 d。

1.2.3 模型建立及检测指标 参照文献方法^[5-6],人 $\beta 2$ -GP I 溶于无菌 PBS 中,调整浓度为 100 μ g/0.25 mL,模型组、安子合剂低剂量组、安子合剂高剂量组、阿司匹林组第 1 天注射人 $\beta 2$ GP-I 溶液与 CFA 1:1 比例混合液 50 μ L,空白对照组注射生理盐水 50 μ L;第 8 天以 IFA 代替 CFA 加强免疫 1 次,模型组、安子合剂低剂量组、安子合剂高剂量组、阿司匹林组注射人 $\beta 2$ GP-I 溶液与 IFA 1:1 比例混合液 50 μ L,空白对照组注射生理盐水 50 μ L;至第 18 天各组雌性小鼠与雄性小鼠 1:1 合笼,自合笼之日起以观察到阴栓为妊娠第 0 天。在妊娠第 15 天时处死孕鼠,摘眼球采血,计算胚胎吸收率,采用 ELISA 方法检测外周血 ACA;取胎盘、子宫组织用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋用于常规组织病理切片及免疫组化检测。取新鲜胎盘、子宫组织-80℃保存,用于 Western blot 检测。

1.2.4 ELISA 实验 严格按照试剂盒说明操作,用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

1.2.5 免疫组化实验 组织标本经 4%多聚甲醛固定后,常规脱水,石蜡包埋,石蜡切片常规脱蜡至水。PBS 洗 3 次,每遍 5 min。抗原修复用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H_2O_2 室温封闭 10 min,蒸馏水洗 1 次。PBS 洗 5 min。甩去多余液体滴加一抗 4℃过夜(过夜后在 37℃复温 45 min)。PBS 洗 3 次各 5 min。甩去 PBS 液,每张切片加 1 滴 MaxVision™ 试剂,室温下孵育 15 min。PBS 洗 3 次各 5 min。每张切片加 2 滴或 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 1~3 min,阳性显色为棕色。蒸馏水洗终止染色,苏木素复染,0.5%盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗返蓝。梯度酒精脱水,透明,封片。JAK、GP130 均定位于细胞浆,以细胞浆着色呈棕黄色为阳性细胞。根据组织中免疫组织化学染色细胞着色的深浅及阳性细胞所占的百分数对每个切片作逐一评分,染色强度评分标准:未被染色为阴性(-),极轻度棕色为极轻微阳性(±),浅棕色为弱阳性(+),棕色为阳性(++),深棕色为强阳性(+++),为了统计方便,分别予以半定量计 0、1、2、3、4 分。

1.2.6 Western blot 实验 用 10 倍体积于组织质量的 RIPA 裂解液对组织进行匀浆,高速离心分离上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 上述蛋白在 10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,将蛋白质从胶恒流转至 PVDF 膜,封闭 2 h,将稀释好的抗体和膜一起孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,PBS 洗涤后,二抗孵育 2 h,ECL 显色系统检测目的蛋白的表达,以 GAPDH 为内参照。扫描胶片,用 Image-J 软件进行统计分析。

1.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS20.0 统计软件进行统计学分析,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法,计数资料采用非参数 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕鼠胚胎吸收率比较

模型组胚胎吸收率明显升高,与空白对照组相比,升高了 462.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明模型建立成功。安子合剂低、高剂量组,阿司匹林组小鼠的胚胎吸收率明显低于模型组,与模型组比较分别降低了 63.5%、53.9%、41.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组孕鼠胚胎吸收率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	胚胎吸收率
模型组	14	0.726 $\pm$ 0.236 Δ
空白对照组	16	0.129 $\pm$ 0.257 $*$
安子合剂低剂量组	17	0.265 $\pm$ 0.161 $*$
安子合剂高剂量组	15	0.335 $\pm$ 0.259 $*$
阿司匹林组	14	0.424 $\pm$ 0.293 $*$

注:与模型组相比, $*$ $P < 0.05$;与空白对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 各组血清 ACA 滴度的比较

结果见表 2。

表 2 各组孕鼠血清 ACA 滴度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ACA 滴度/(AU $\cdot$ mL $^{-1}$)
模型组	6	257.015 $\pm$ 16.504 Δ
空白对照组	5	11.030 $\pm$ 1.526 $*$
安子合剂低剂量组	6	54.095 $\pm$ 2.404 $*$
安子合剂高剂量组	6	56.308 $\pm$ 3.437 $*$
阿司匹林组	6	66.378 $\pm$ 2.549 $*$

注:与模型组比较, $*$ $P < 0.05$;与空白对照组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

模型组 ACA 滴度明显升高,与空白对照组相比,升高了 2 230.1%,差异有统计学意义($P < 0.05$);安子合剂低、高剂量组、阿司匹林组小鼠的 ACA 滴度明显低于模型组,与模型组比较分别降低

了 63.5%、53.9%、41.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组母胎界面 JAK 结果

与空白对照组相比,模型组胎盘及蜕膜 JAK 均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);安子合剂低、高剂量组,阿司匹林组小鼠胎盘 JAK 明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。阿司匹林组小鼠蜕膜 JAK 明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);安子合剂低、高剂量组蜕膜 JAK 无统计学差异。见图 1~2,表 3。

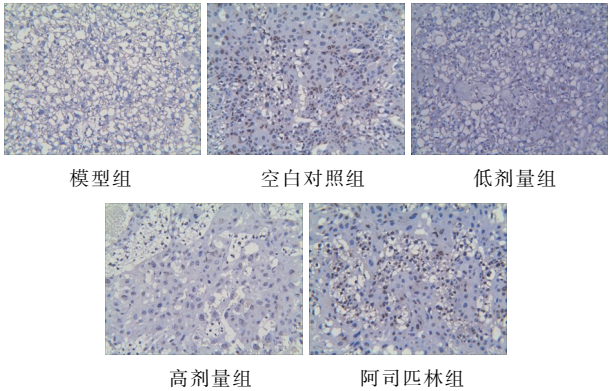


图 1 胎盘 JAK 的表达(SP, $\times 200$)

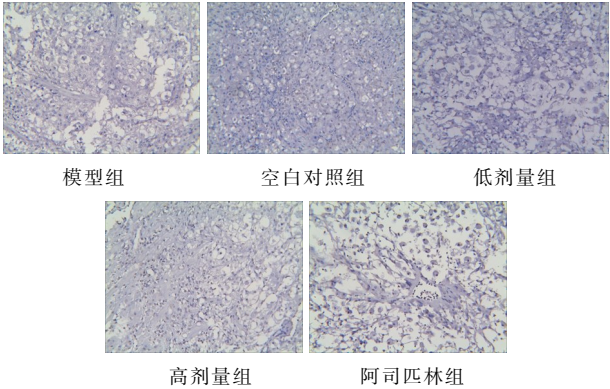


图 2 蜕膜 JAK 的表达(SP, $\times 200$)

表 3 各组孕鼠胎盘及蜕膜 JAK 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	胎盘均分	蜕膜均分
模型组	5	0.200 $\pm$ 0.447 Δ	0.200 $\pm$ 0.447 Δ
空白对照组	4	1.500 $\pm$ 1.000	1.500 $\pm$ 0.577
安子合剂低剂量组	5	1.333 $\pm$ 1.033 $*$	1.167 $\pm$ 0.983
安子合剂高剂量组	6	1.333 $\pm$ 1.033 $*$	0.500 $\pm$ 0.836
阿司匹林组	6	1.600 $\pm$ 0.984 $*$	1.600 $\pm$ 0.894 $*$

注:与模型组相比, $*$ $P < 0.05$;与空白对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

2.4 各组母胎界面 GP130 结果

与空白对照组相比,模型组胎盘及蜕膜 GP130 均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);阿司匹林组小鼠的胎盘 GP130 明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),安子合剂低、高剂量与

模型组无统计学差异。阿司匹林组、安子合剂高剂量组小鼠的蜕膜 GP130 明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),安子合剂低剂量组与模型组比较无统计学差异。见图 3~4,表 4。

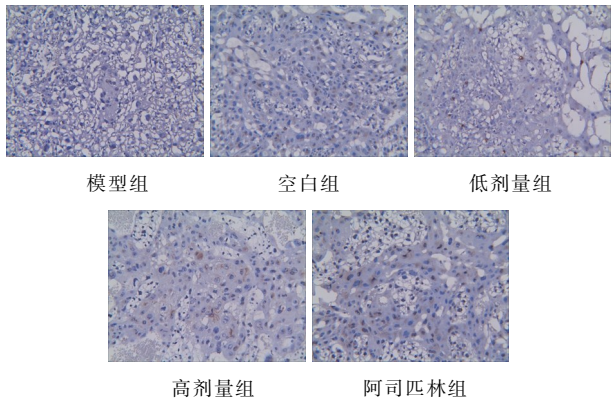


图 3 胎盘 GP130 的表达(SP,×200)

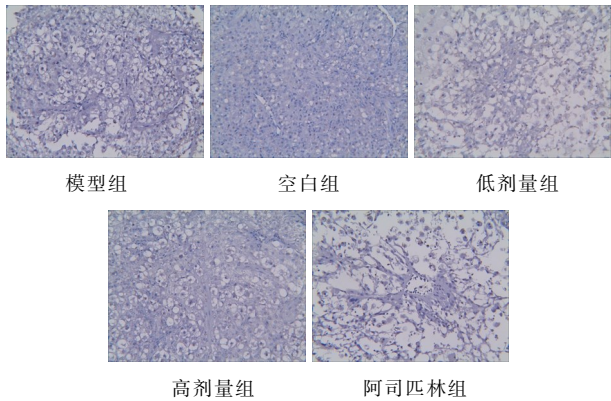


图 4 蜕膜 GP130 的表达(SP,×200)

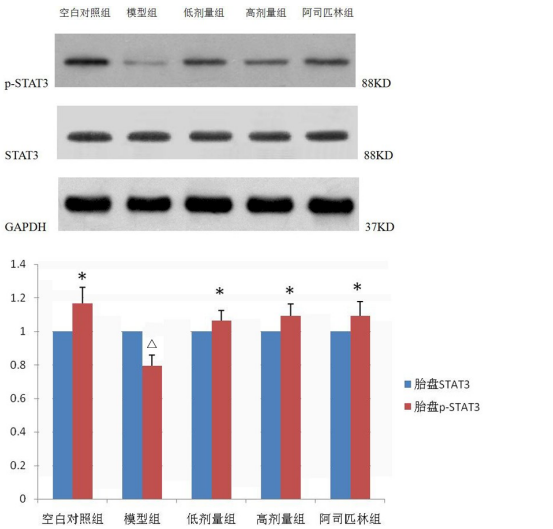
表 4 各组孕鼠胎盘及蜕膜 GP130 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胎盘均分	蜕膜均分
模型组	5	0.200±0.447 [△]	0.400±0.548 [△]
空白对照组	4	1.500±1.000	1.750±0.500
安子合剂低剂量组	5	0.500±0.837	0.833±0.753
安子合剂高剂量组	6	1.167±0.983	1.500±0.837*
阿司匹林组	6	1.600±0.894*	1.600±0.894*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与空白对照组比较, $\Delta P<0.05$ 。

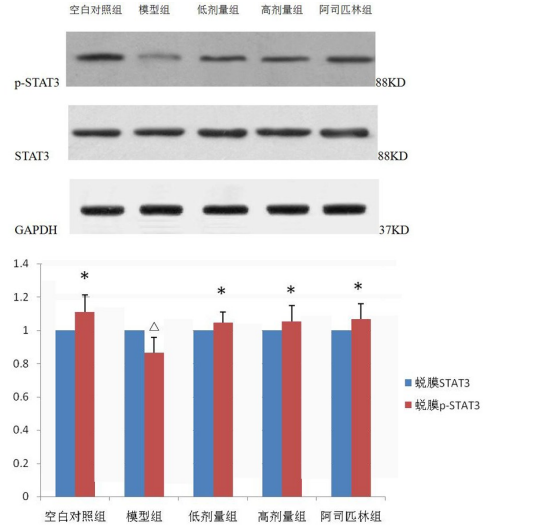
2.5 各组母胎界面 p-STAT3 结果

与空白对照组相比,模型组胎盘及蜕膜 p-STAT3 表达水平分别降低了 37.3%、29.3%,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,安子合剂低、高剂量组、阿司匹林组小鼠的胎盘 p-STAT3 表达水平分别升高了 48.0%、38.6%、41.9%;安子合剂低、高剂量组、阿司匹林组小鼠的蜕膜 p-STAT3 表达水平与模型组相比,分别升高了 34.1%、30.8%、32.0%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 5~6。



注:与模型组相比,* $P<0.05$;与空白对照组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 5 胎盘 p-STAT3 的表达



注:与模型组相比,* $P<0.05$;与空白对照组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 6 蜕膜 p-STAT3 的表达

3 讨论

ACA 与复发性流产关系极大。以往研究认为主要病因是 ACA 导致胎盘部位血管栓塞和组织梗死,损伤胎盘绒毛血管上皮细胞。但后来发现栓塞不足以解释全部原因^[7-8]。抗磷脂抗体可直接作用于滋养层细胞磷脂,诱导凋亡、促进炎症反应和无法控制的免疫反应,抑制其分化成熟,导致合体滋养细胞融合障碍,HCG 合成下降;滋养细胞侵蚀能力下降,子宫螺旋动脉血管重铸障碍,最终导致滋养细胞受损、凋亡,胚胎着床失败^[9]。

近年来由于分子生物学的发展,国内外学者提出 ACA 阳性流产的病理机制与细胞信号转导通路异常有关,研究较多的是 STAT3、MAPK、TLR4、NF- κ B 等信号通路。其中 STAT3 被认为与抗磷脂

抗体导致流产的机制相关^[10-12]。

在生理状态下,STAT3 可被 JAK 激酶(Janus kinase)、白介素 6(IL-6)、表皮生长因子受体(EGFR)等多种细胞因子、生长因子受体或癌蛋白激活,参与细胞增殖、分化、存活、凋亡、转化、免疫等过程^[13],活化的 STAT 蛋白抑制因子(PIAS)、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)等负性调控因子的调节^[14],在早期胚胎发育和许多正常组织分化中发挥重要作用。

ACA 可以抑制 STAT3 的活化,从而限制胚胎滋养层的移植。STAT3 的下降可引起滋养细胞的迁移异常^[15],STAT3 的下降引起 NF- κ B 活化的抑制、VEGF 分泌下降和 MMP-2 活性的受损^[2],致子宫内膜细胞的血管生成减少,STAT3 的活性被抑制,胚胎滋养层的移植受限,在胚胎着床期间降低 STAT3 磷酸化可以降低小鼠着床率。p-STAT3 是 STAT3 的活化形式,p-STAT3 的低表达亦与小鼠流产相关^[11-12]。

本研究发现在 ACA 的作用下 JAK/STAT3 信号通路相关蛋白表达下降,表明 ACA 导致妊娠丢失的病理机制之一是 JAK/STAT3 信号通路的失活,使相关蛋白表达下降,降低滋养细胞增殖活性,从而引起母胎界面组织损伤,导致妊娠丢失。

安子合剂为南京中医药大学附属医院院内制剂,主要药物组成为:川断、桑寄生、菟丝子、太子参、白术、苎麻根、黄芩、丹参、甘草等,是治疗 ACA 阳性先兆流产的安胎中成药,具有补肾健脾、清热和血安胎功效,经 20 年的临床应用,疗效确切,总有效率达 85%以上,ACA 转阴率达 90%左右,且未发现明显毒副作用和不良反应^[16]。

本研究发现给予安子合剂治疗的小鼠胚胎吸收率明显降低,小鼠血清 ACA 的滴度也显著降低,母胎界面的 JAK、GP130、p-STAT3 的表达均增高,其中胎盘的 JAK、p-STAT3 的表达与模型组比较具有显著差异,蜕膜 GP130、p-STAT3 的表达与模型组比较具有显著差异。这表明安子合剂发挥治疗作用的机制可能是通过提高胎盘 JAK 的表达、增强蜕膜 GP130 的表达,促进胎盘及蜕膜 STAT3 的活化。

参考文献:

[1] 陆启滨.抗心磷脂抗体阳性先兆流产的病因病机探析[J].中华中医药学刊,2008,26(6):1127-1129.
Lu QB. The etiopathogenesis and pathogenesis investigation of threatened abortion in pregnant women with antiphospholipid antibody positive[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2008, 26

(6): 1127-1129.
[2] Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2623-2629.
[3] 蒋树龙.JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路与肿瘤转移[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2014,21(6):698-702.
Jiang SL. JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway and tumor metastasis[J]. Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 698-702.
[4] 许袖,杨增明.胚胎着床过程中的 STAT3 调控网络[J].中国细胞生物学学报,2011,33(5):570-576.
Xu X, Yang ZM. Molecular network of STAT3 during embryo implantation[J]. Chin J Cell Biol, 2011, 33(5): 570-576.
[5] 肖世金,赵爱民,鲍世民.补体过度激活与自身免疫型复发性流产的关系[J].上海交通大学学报(医学版),2011,31(8):1125-1128.
Xiao SJ, Zhao AM, Bao SM. Relationship between excessive complement activation and autoimmune-type recurrent spontaneous abortion[J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci), 2011, 31(8): 1125-1128.
[6] Katzav A, Menachem A, Maggio N, et al. IgG accumulates in inhibitory hippocampal neurons of experimental antiphospholipid syndrome[J]. J Autoimmun, 2014, 55: 86-93.
[7] Al Jameil N, Tyagi P, Al Shenefy A. Incidence of anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant factor among women experiencing unexplained recurrent abortion and intrauterine fetal death[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 3204-3209.
[8] Bose P, Black S, Kadyrov M. et al adverse effects of lupus anticoagulant positive blood sera on placental viability can be prevented by heparin in vitro[J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 191(6): 2125-2131.
[9] Kwak-Kim J, Agcaoili MS, Aleta LA, et al. Management of women with recurrent pregnancy losses and antiphospholipid antibody syndrome[J]. Am J Reprod Immunol, 2013, 69(6): 596-607.
[10] Mulla MJ, Myrtolli K, Brosens JJ, et al. Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 63(5): 339-348.
[11] Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, et al. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies[J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(10): 1327-1333.
[12] Silvia DiIppolito, Riccardo Marana, Fiorella Di Nicuolo, et al. Effect of Low Molecular Weight Heparins (LMWHs) on antiphospholipid Antibodies (aPL) - Mediated Inhibition of Endometrial Angiogenesis[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29660.
[13] Stepkowski SM, Chen WH, Ross JA, et al. STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions[J]. Transplantation, 2008, 85(10): 1372-1377.
[14] Singh A, Jayaraman A, Hahn J. Modeling regulatory mechanisms in IL-6 signal transduction in hepatocytes[J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 95(5): 850-862.
[15] Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(6): 539-552.
[16] 陆启滨,任青玲,黄文华,等.安子合剂治疗先兆流产临床研究[J].南京中医药大学学报,2011,27(5):414-417.
Lu QB, Ren QL, Huang WH, et al. Clinical evaluation of an Zi mixtures effects on treating threatened abortion[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2011, 27(5): 414-417.

(编辑:董宇)