

加味宫外孕Ⅱ号方对人绒毛膜滋养层细胞凋亡的影响

郑文兰¹, 范 敏², 文晓敏¹

(1. 贵州中医药大学第一附属医院妇科, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵阳市花溪区中医院妇科, 贵州 贵阳 550025)

摘要: **目的** 探讨加味宫外孕Ⅱ号方含药血清诱导人绒毛膜滋养层细胞 (HTR-8/SVneo) 凋亡的机制。**方法** 36 只大鼠随机分为阴性对照组, 中药低、中、高剂量组, 西药 (甲氨蝶呤) 组, 中西药结合组, 每组 6 只, 各组给予相应的药物处理, 于第 8 天给药 1 h 后心脏采血, 制备空白血清及含药血清。各组血清与 HTR-8/SVneo 细胞共培养 24 h, 同时设置仅添加培养基处理的 HTR-8/SVneo 细胞作为空白对照组, 流式细胞术检测细胞早、晚期凋亡率及胞浆内游离 Ca^{2+} 水平, Western blot 和 RT-qPCR 法检测细胞钙蛋白酶 1 (calpain-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12 (caspase-12) 蛋白及 mRNA 相对表达量。**结果** 与阴性对照组比较, 各给药组细胞凋亡率、胞浆内 Ca^{2+} 水平、calpain-1、caspase-12 蛋白及 mRNA 表达均升高 ($P<0.05$), 且中药各剂量组作用呈剂量依赖性 ($P<0.05$), 其中中药高剂量组作用优于西药组和中西药结合组 ($P<0.05$)。**结论** 加味宫外孕Ⅱ号方能够诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡, 并呈剂量依赖性, 其机制可能与激活内质网应激 caspase-12 信号通路, 增加细胞胞浆内游离 Ca^{2+} 水平, 上调 calpain-1 和 caspase-12 表达有关。

关键词: 加味宫外孕Ⅱ号方; HTR-8/SVneo 细胞; 内质网应激; 细胞凋亡; calpain-1; caspase-12; Ca^{2+}

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)02-0573-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.041

异位妊娠是妇科常见病, 其中输卵管妊娠占 95% 以上^[1]。祖国医学认为异位妊娠的主要病机是少腹血瘀实证, 治疗以活血化瘀消癥杀胚为法。研究显示化瘀消癥杀胚中药能够诱导人输卵管妊娠滋养细胞凋亡^[2]。本课题组前期研究显示, 加味宫外孕Ⅱ号方可能通过降低早孕大鼠滋养细胞 Bcl-2/Bax 比值及改变滋养细胞的形态与超微结构达到杀胚目的^[3-4], 与文献报道相一致, 但中医药介导滋养细胞凋亡的分子机制尚不清楚。calpain-1 与 caspase-12 是内质网应激 (ERS) 诱导凋亡途径中的重要分子, 有研究指出 ERS 可通过激活 caspase-12 信号通路诱导滋养细胞凋亡^[5], 由此推测加味宫外孕Ⅱ号方可能导致过度 ERS, 激活 caspase-12 信号通路促使滋养叶细胞凋亡。报道显示输卵管妊娠滋养细胞在形态学、生长能力和侵袭能力方面与宫内早孕滋养细胞无明显差异, 提出宫内妊娠滋养细胞可代替输卵管妊娠滋养细胞进行实验研究^[6]。本实验以人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 代替异位妊娠滋养细胞来探讨加味宫外孕Ⅱ号方治疗异位妊娠的机理, 为中医药保守治疗异位妊娠提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞及实验动物 HTR-8/SVneo 人绒毛膜滋养层细胞系由武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院提供。SPF 级雌性 SD 大鼠 36 只, 体质量 180~220 g, 由湖北省实

验动物研究中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2015-0018, 本实验通过湖北省实验动物管理与使用委员会批准 (编号 20182901)。

1.2 药物 加味宫外孕Ⅱ号方由丹参 15 g、赤芍 15 g、桃仁 9 g、三棱 9 g、莪术 9 g、蜈蚣 4 g、全蝎 6 g、土鳖虫 10 g、紫草 25 g 组成; 注射用甲氨蝶呤, 广东岭南制药有限公司生产, 批号 872016, 规格 0.1 g/支, 上述药物均购于贵州省中医院。

1.3 试剂与仪器 RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 11875-093、10091-148); CCK-8 细胞增殖试剂盒 (合肥白鲨生物科技有限公司, 批号 BS350B); BCA 蛋白定量试剂盒、Fluo-3 AM Ca^{2+} 荧光探针 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 P0010、S1056); 兔抗 calpain-1 多克隆抗体、羊抗兔 IgG-HRP (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 BA0679、BA1054); 兔抗 caspase-12 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 ab62484); 细胞凋亡试剂盒 AnnexinV-APC/7-AAD (天津三箭生物技术股份有限公司, 批号 AO2001-11A-H); 逆转录及荧光定量试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 批号 R101-01/02、Q111-02); 引物由武汉擎科生物技术有限公司合成。Multiskan MK3 型酶标仪购于美国 Thermo 公司; QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪购于美国 ABI 公司; CytoFLEX 型流式细

收稿日期: 2021-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660805)

作者简介: 郑文兰 (1963—), 女, 主任医师, 硕士生导师, 从事异位妊娠中西医结合治疗研究。E-mail: zhengWL0930@163.com

胞仪购于美国 Beckman 公司。

2 方法

2.1 加味宫外孕Ⅱ号方药液制备 上述中药材经混合浸泡、水煎、过滤、浓缩，制成生药量 3 g/mL 的药液，保存于 4 ℃ 冰箱备用。

2.2 动物分组及给药 36 只大鼠采用随机数字表法分为 6 组，即阴性对照组，中药（加味宫外孕Ⅱ号方）低、中、高剂量组，西药（甲氨蝶呤）组及中西药结合组（中剂量加味宫外孕Ⅱ号方+甲氨蝶呤）。所有大鼠适应性喂养 3 d 后开始给药，参考人与大鼠等效剂量换算公式^[7]，中药低、中、高剂量组分别灌胃给予 12、24、48 g/kg 加味宫外孕Ⅱ号方；阴性对照组灌胃给予等量生理盐水；西药组与中西药结合组分别灌胃给予生理盐水和 24 g/kg 加味宫外孕Ⅱ号方，每天灌胃 1 次，连续 8 d，在第 8 天灌胃后均一次性肌肉注射 7.775 mg/kg 甲氨蝶呤。

2.3 含药血清制备 每组大鼠分别于第 8 天末次给药 1 h 后，水合氯醛腹腔注射麻醉，心脏采血，静置 2 h，3 000 r/min 离心 12 min，吸取血清，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，56 ℃ 水浴灭活 30 min，将同组所有大鼠的血清混合，分装后置于-80 ℃ 冰箱备用。

2.4 HTR-8/SVneo 细胞培养及给药 用含 10% 胎牛血清的完全培养基重悬细胞，接种到培养皿中，轻揉吹打混匀，37 ℃、5% CO₂ 条件下培养，当细胞融合度达到 80%~90% 时，按 1：3 比例进行传代培养。取对数生长期细胞以 5×10⁵/mL 密度接种于 6 孔板中，培养过夜，弃培养液，更换 RPMI 1640 培养基，加入对应组别的 10% 含药血清，同时设置仅添加细胞培养基的 HTR-8/SVneo 细胞作为空白对照组，以排除灌胃生理盐水组大鼠血清对细胞的异常影响。

2.5 CCK-8 法检测 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力 取对数生长期 HTR-8/SVneo 细胞，按每孔 8×10³ 个的密度接种于 96 孔板中，每孔 200 μL，置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h，弃培养液，分别加入 5%、10%、15% 含药血清继续培养 24 h，然后每孔加入 20 μL CCK-8，轻摇混匀，37 ℃ 培养箱中孵育 4 h，酶标仪检测各孔于 450 nm 波长处吸光度（A）值，以此确定药物作用于细胞的最佳体积分数。细胞增殖抑制率=（A_{对照}-A_{实验}）/（A_{对照}-A_{空白}）×100%。

2.6 指标检测 各组细胞分别与对应的含药血清共培养 24 h，收集细胞，用于以下指标检测。

2.6.1 流式细胞术检测细胞凋亡率 按照 AnnexinV-APC/7-AAD 细胞凋亡试剂盒说明书操作，加入 2 μL AnnexinV-APC 混匀后再加入 2 μL 7-AAD，室温避光反应 15 min，流式细胞仪上机检测。细胞凋亡率=早期凋亡细胞比例+晚期凋亡细胞比例。

2.6.2 Ca²⁺ 荧光探针检测胞浆 Ca²⁺ 水平 按 Fluo-3 AM 试剂说明书，加入 Fluo-3 AM（终浓度 5 μmol/L），置于 37 ℃ 培养箱，避光孵育 30 min，PBS 润洗细胞 2 次，1 500 r/min 离心 3 min，加 500 μL PBS 重悬，流式细胞仪检测荧光强度，激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm，以荧光指数

反映胞浆 Ca²⁺ 水平。

2.6.3 Western blot 法检测 calpain-1、caspase-12 蛋白表达 提取总蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液，100 ℃ 变性 10 min，冷却至室温，于-20 ℃ 保存。SDS-聚丙烯酰胺凝胶上样后电泳分离，转膜，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h，一抗 calpain-1（1：500）、caspase-12（1：1 000）4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗膜 5 次，HRP 标记二抗（1：5 000）37 ℃ 孵育 2 h，TBST 洗膜 5 次，ECL 化学发光试剂曝光，X 胶片显影定影，BandScan 软件分析胶片灰度值。

2.6.4 RT-qPCR 法检测 calpain-1、caspase-12 mRNA 表达 加入 TRIzol 冰上裂解 10 min 提取总 RNA，微量分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度，置于-80 ℃ 保存，用于逆转录。RNA 逆转录合成 cDNA，反应条件为 25 ℃ 5 min，50 ℃ 15 min，85 ℃ 5 min，4 ℃ 10 min；配制 20 μL 体系进行基因扩增，扩增条件为 50 ℃ 2 min，95 ℃ 10 min，95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。以 2^{-ΔΔCT} 法进行分析。GAPDH 正向序列 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'，反向序列 5'-TCAAAGGTGGAGGACTGGGT-3'；caspase-12 正向序列 5'-CATCCAACGGTGTCTCTGCTC-3'，反向序列 5'-TTGCCTGCAATTGAGCTGT-3'；calpain-1 正向序列 5'-GGGTCCCAATTCCTCCAAGA-3'，反向序列 5'-CTGGAAATGGAAGATGCCGG-3'。

2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 5.0 软件进行处理，计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味宫外孕Ⅱ号方对 HTR-8/SVneo 细胞增殖能力的影响 与阴性对照组比较，各含药血清组细胞增殖抑制率增加（P<0.05），且呈剂量依赖性，对 HTR-8/SVneo 细胞具有增殖抑制作用。10% 含药血清作用细胞 24 h，中药高剂量组细胞抑制率大于 50%，为避免含药血清浓度过大引起细胞毒性，本实验确定 10% 含药血清作用于细胞 24 h 为最佳，见表 1。

表 1 各组 HTR-8/SVneo 细胞增殖抑制率比较（ $\bar{x} \pm s$ ，n=3）

组别	细胞增殖抑制率/%		
	5% 含药血清	10% 含药血清	15% 含药血清
阴性对照组	0	0	0
中药低剂量组	17.170±8.948 *	22.140±5.808 *	23.830±2.445 *
中药中剂量组	25.413±6.923 *	29.220±7.804 *	30.737±7.150 *
中药高剂量组	44.497±7.251 *	51.223±6.652 *	59.727±8.029 *
西药组	37.570±6.140 *	47.677±7.290 *	56.300±6.177 *
中西药结合组	41.097±7.515 *	49.277±9.510 *	66.143±6.385 *

注：与阴性对照组比较，*P<0.05。

3.2 加味宫外孕Ⅱ号方对 HTR-8/SVneo 细胞凋亡率的影响 空白对照组与阴性对照组比较无差异（P>0.05）；各给药组细胞凋亡率均高于阴性对照组（P<0.05），其中中药各剂量组作用呈剂量依赖性（P<0.05）；中药高剂量组

细胞凋亡率高于西药组 ($P<0.05$), 与中西药结合组比较无差异 ($P>0.05$); 西药组与中西药结合组比较无差异 ($P>0.05$), 见表2、图1。

表2 各组 HTR-8/SVneo 细胞凋亡率及胞浆内 Ca^{2+} 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%	胞浆内 Ca^{2+} 水平
空白对照组	6.110±1.230	15 721.467±1 808.218
阴性对照组	7.443±0.601	15 718.067±2 020.665
中药低剂量组	12.660±1.087 *	18 822.567±1 668.550
中药中剂量组	19.033±1.556 *▲	21 113.867±1 416.908 *
中药高剂量组	34.717±2.353 *▲□	37 108.733±747.866 *▲□
西药组	28.307±0.648 *△	28 022.400±1 514.660 *△
中西药结合组	31.797±0.832 *	32 229.367±1 621.479 *△

与阴性对照组比较, * $P<0.05$; 与中药低剂量组比较, ▲ $P<0.05$; 与中药中剂量组比较, □ $P<0.05$; 与中药高剂量组比较, △ $P<0.05$ 。

3.3 加味宫外孕Ⅱ号方对 HTR-8/SVneo 细胞胞浆内 Ca^{2+} 水平的影响 空白对照组与阴性对照组比较无差异 ($P>0.05$); 与阴性对照组比较, 中药低剂量组细胞胞浆内 Ca^{2+}

水平无明显上升 ($P>0.05$), 但中、高剂量组、西药组及中西药结合组细胞胞浆内 Ca^{2+} 水平升高 ($P<0.05$); 中药高剂量组细胞胞浆内 Ca^{2+} 水平高于西药组及中西药结合组 ($P<0.05$); 西药组与中西药结合组比较无差异 ($P>0.05$), 见表2、图2。

3.4 加味宫外孕Ⅱ号方对 HTR-8/SVneo 细胞 calpain-1、caspase-12 蛋白表达的影响 空白对照组与阴性对照组比较无差异 ($P>0.05$); 与阴性对照组比较, 各给药组细胞 calpain-1 蛋白表达均升高 ($P<0.05$); 中药高剂量组细胞 calpain-1 蛋白表达高于低、中剂量组、西药组及中西药结合组 ($P<0.05$); 中西药结合组细胞 calpain-1 蛋白表达高于西药组 ($P<0.05$)。与阴性对照组比较, 中药低、中剂量组 caspase-12 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$), 高剂量组、西药组及中西药结合组 caspase-12 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与西药组和中药高剂量组比较, 中西药结合组 caspase-12 蛋白表达量升高更明显 ($P<0.05$), 见表3、图3。

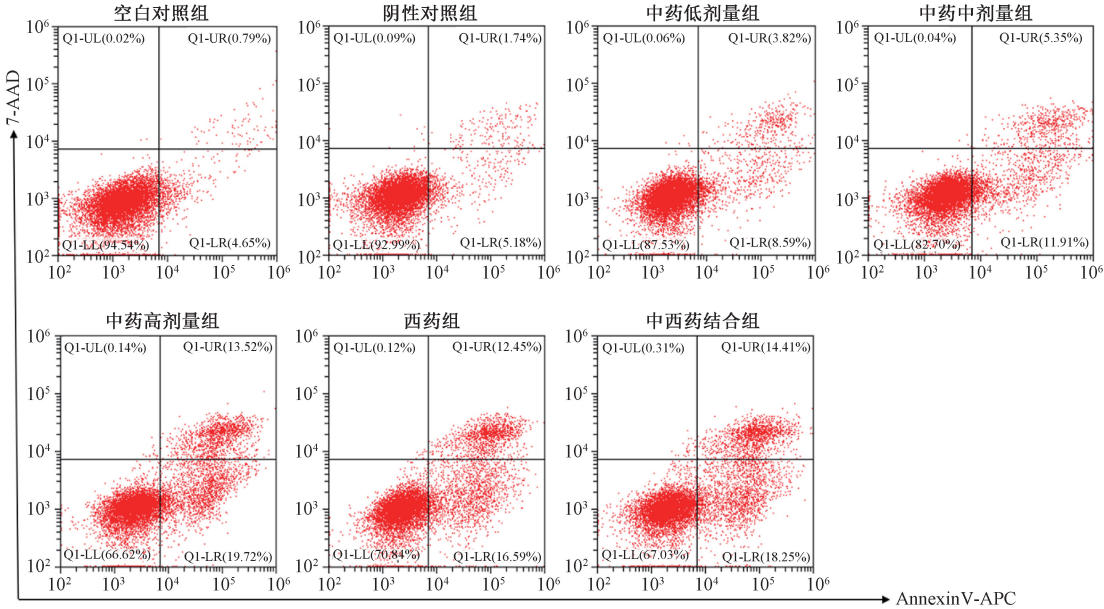


图1 各组 HTR-8/SVneo 细胞凋亡率比较

表3 各组 HTR-8/SVneo 细胞 calpain-1、caspase-12 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	calpain-1	caspase-12
空白对照组	0.200±0.013	0.067±0.014
阴性对照组	0.194±0.008	0.065±0.012
中药低剂量组	0.350±0.026 *△	0.073±0.005
中药中剂量组	0.267±0.022 *△	0.072±0.009
中药高剂量组	0.440±0.019 *	0.110±0.008 *
西药组	0.293±0.022 *△	0.157±0.015 *△
中西药结合组	0.353±0.021 *△●	0.196±0.021 *△●

注: 与阴性对照组比较, * $P<0.05$; 与中药高剂量组比较, △ $P<0.05$; 与西药组比较, ● $P<0.05$ 。

3.5 加味宫外孕Ⅱ号方对 HTR-8/SVneo 细胞 calpain-1、caspase-12 mRNA 表达的影响 空白对照组与阴性对照组比

较无差异 ($P>0.05$); 与阴性对照组比较, 各给药组 calpain-1 mRNA 表达均升高 ($P<0.05$); 中药高剂量组 calpain-1 mRNA 表达高于低、中剂量组及西药组 ($P<0.05$); 中西药结合组与中药高剂量组比较无显著差异 ($P>0.05$)。与阴性对照组比较, 中药高剂量组、西药组及中西药结合组 caspase-12 mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 而中药低、中剂量组无明显变化 ($P>0.05$); 中西药结合组与中药高剂量组比较无显著差异 ($P>0.05$), 见表4。

4 讨论

加味宫外孕Ⅱ号方中丹参、赤芍、桃仁、三棱、莪术有活血化瘀消癥之功效; 蜈蚣、全蝎、土鳖虫、紫草有破血、通络、损害胚胎的作用。现代药理研究认为丹参、赤芍、桃仁、三棱、莪术能促进盆腹腔胚胎组织及包块的吸

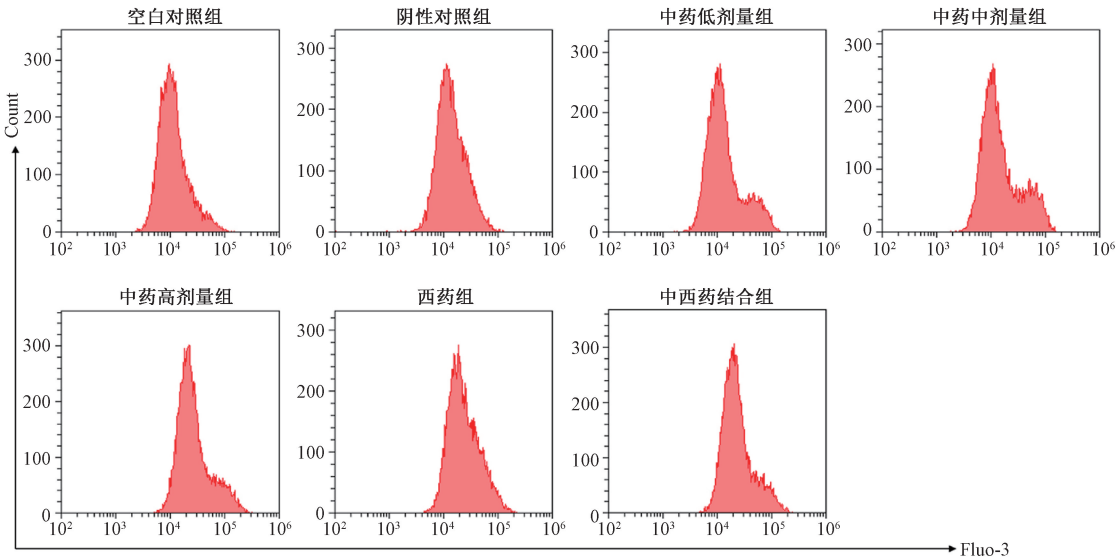
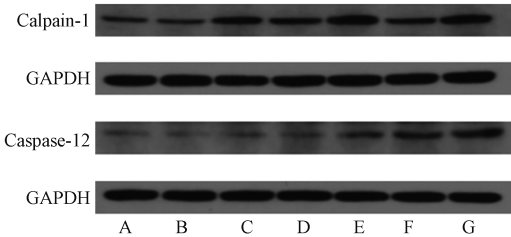


图 2 各组 HTR-8/SVneo 细胞胞浆内 Ca²⁺水平流式图



注：A 为空白对照组，B 为阴性对照组，C 为中药低剂量组，D 为中药中剂量组，E 为中药高剂量组，F 为西药组，G 为中西药结合组。

图 3 各组 HTR-8/SVneo 细胞 calpain-1、caspase-12 蛋白条带图

表 4 各组 HTR-8/SVneo 细胞 calpain-1、caspase-12 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	calpain-1	caspase-12
空白对照组	0.980±0.045	1.039±0.039
阴性对照组	1.030±0.062	1.045±0.066
中药低剂量组	1.815±0.088 *	1.141±0.063
中药中剂量组	1.535±0.111 *	1.100±0.056
中药高剂量组	2.201±0.121 *▲□	1.369±0.080 *
西药组	1.810±0.207 *△	1.442±0.105 *
中西药结合组	1.886±0.044 *	1.519±0.119 *

注：与阴性对照组比较，* $P<0.05$ ；与中药低剂量组比较，▲ $P<0.05$ ；与中药中剂量组比较，□ $P<0.05$ ；与中药高剂量组比较，△ $P<0.05$ 。

收；配伍蜈蚣、全蝎、土鳖虫、紫草可抑制滋养细胞的生长与分化，致其变性坏死，降低胚胎活性，增强杀胚作用，且能改善输卵管通畅度^[8-9]。为验证加味宫外孕Ⅱ号方对细胞凋亡影响的剂量依赖性，本研究比较了不同剂量中药组对细胞凋亡的影响。

本研究发现，中药各剂量组、西药组和中西药结合组细胞凋亡率升高，说明加味宫外孕Ⅱ号方及甲氨蝶呤均可以诱导 HTR-8/SVneo 细胞凋亡，间接提示该方可以降低滋

养细胞对输卵管管壁的增殖和侵袭能力，减少病灶破裂风险，保留输卵管的完整性。中药高剂量组、西药组及中西药结合组 Ca²⁺ 水平较阴性对照组上升了约 2 倍，提示经中药与西药处理后细胞内 Ca²⁺ 水平增加，钙超载。Ca²⁺ 作为细胞内第二信使，当内质网腔内集聚过多未折叠及错误折叠蛋白，可引起大量 Ca²⁺ 外流，胞质 Ca²⁺ 水平升高，钙超载，calpain 被激活，发挥蛋白水解功能，产生细胞凋亡级联反应^[10]。研究显示中药各剂量组作用呈剂量依赖性，细胞凋亡率与胞浆内 Ca²⁺ 水平有升高趋势。

calpain 属于钙依赖性半胱氨酸蛋白水解酶家族成员，根据激活时所需 Ca²⁺ 水平差异，分为 calpain-1 (μ-calpain) 和 calpain-2 (m-calpain)，对细胞凋亡、细胞骨架重塑及信号转导有重要作用^[11]，正常状态下以无活性的酶原形式存在于组织和细胞中，由 Ca²⁺ 紊乱激活，多项研究提示 calpain-1 与细胞凋亡密切相关^[12-13]，calpain-1 在滋养细胞凋亡中起作用^[14]。caspase-12 是 caspase 家族中唯一仅在 ERS 反应时激活的蛋白，在死亡受体途径及线粒体途径中不生活化^[15]，是 ERS 反应性凋亡的关键分子。caspase-12 被激活的机制之一是 Ca²⁺ 依赖的 calpain 水解活化，calpain 从胞质进入内质网，剪切激活 caspase-12 前体，进一步活化 caspase-12，最终通过激活下游靶分子 caspase-3 促进细胞凋亡^[16-17]。进一步研究显示，经中药与西药含药血清处理 24 h 后，calpain-1、caspase-12 蛋白及 mRNA 相对表达量均上调，说明其参与了调控 ERS 反应，被过度激活，说明加味宫外孕Ⅱ号方含药血清作用于人滋养细胞后使细胞发生过度 ERS 反应，从而加速细胞凋亡。中药和甲氨蝶呤发挥促滋养叶细胞凋亡作用可能是依赖 caspase-12 途径；再结合 HTR-8/SVneo 细胞的凋亡率及 Ca²⁺ 水平变化，提示加味宫外孕Ⅱ号方和甲氨蝶呤可能通过上调胞浆内 Ca²⁺ 水平，调控细胞 caspase-12 通路中关键信号分子的表达促滋养叶细胞凋亡而终止妊娠。从研究结果看，中药高剂量组与西药组及中西药结合组效果相近，而甲氨蝶呤副作用大，

临床上用于异位妊娠保守治疗的不良反应时有报道，除肝肾、皮肤毒性外，对生殖系统可产生致畸、致突变作用^[18-19]，因此，对于今后异位妊娠保守治疗用药选择上是否可以首选中药，并根据患者情况适当增加中药剂量，制定个体化最佳用药方案具有参考价值。

综上所述，加味宫外孕Ⅱ号方能够诱导滋养叶细胞凋亡，且高剂量作用最佳，其机制可能是通过激活 caspase-12 信号通路，使细胞内质网发生过度应激反应，上调促凋亡因子的表达而加速滋养细胞的凋亡。

参考文献：

[1] Parker V L, Srinivas M. Non-tubal ectopic pregnancy[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 294(1): 19-27.

[2] 李晓荣, 黄艳茜, 邓高丕. 化瘀消癥杀胚中药复方诱导人输卵管妊娠滋养细胞凋亡[J]. *中成药*, 2014, 36(9): 1813-1817.

[3] 郑文兰, 赵春梅, 杨江燕. 活血杀胚消癥法对早孕大鼠妊娠滋养细胞影响的实验研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2013, 34(10): 60-61; 89.

[4] 郑文兰, 杨江燕, 谢 智, 等. 加味宫外孕Ⅱ号方对早孕大鼠滋养细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2 的影响[J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(12): 73-74.

[5] Xu X C, Liu T T, Zhang A M, *et al.* Reactive oxygen species-triggered trophoblast apoptosis is initiated by endoplasmic reticulum stress *via* activation of caspase-12, CHOP, and the JNK pathway in *Toxoplasma gondii* infection in mice[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4): 1735.

[6] 陈 涛. 邓高丕教授关于输卵管妊娠基础研究的总结与创新[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

[7] 张君涛, 王 平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 4006-4009.

[8] 古子娟, 袁 烁, 卢如玲, 等. 系统评价活血化瘀中药治疗异位妊娠疗效观察[J]. *中医临床研究*, 2017, 9(13): 1-8.

[9] 温旭敏. 米非司酮联合中药保守治疗异位妊娠 120 例[J].

中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 237-239.

[10] Ono Y, Saido T C, Sorimachi H. Calpain research for drug discovery: challenges and potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(12): 854-876.

[11] Storr S J, Carragher N O, Frame M C, *et al.* The calpain system and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 364-374.

[12] Yan M L, Chen K K, He L, *et al.* Uric acid induces cardiomyocyte apoptosis *via* activation of calpain-1 and endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5): 2122-2135.

[13] Wang H, Zhai N H, Chen Y, *et al.* Cadmium induces Ca²⁺, mediated, calpain-1/caspase-3-dependent apoptosis in primary cultured rat proximal tubular cells[J]. *J Inorg Biochem*, 2017, 172: 16-22.

[14] Huang Q, Chen H B, Wang F C, *et al.* Reduced syncytin-1 expression in choriocarcinoma BeWo cells activates the calpain1-AIF-mediated apoptosis, implication for preeclampsia[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(16): 3151-3164.

[15] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 98-103.

[16] Sergeev I N. Calcium signaling in cancer and vitamin D[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 97(1-2): 145-151.

[17] Lee J K, Kang S M, Wang X, *et al.* HAP1 loss confers l-asparaginase resistance in ALL by downregulating the calpain-1-Bid-caspase-3/12 pathway [J]. *Blood*, 2019, 133(20): 2222-2232.

[18] Howard S C, McCormick J, Pui C H, *et al.* Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate[J]. *Oncologist*, 2016, 21(12): 1471-1482.

[19] Gaies E, Ben Sassi M, Charfi R, *et al.* Fatal methotrexate toxicity in a patient treated for an ectopic pregnancy [J]. *Therapie*, 2016, 71(3): 348-350.