

# 环孢素 A 对围着床胚胎的作用及在不明原因反复着床失败中的应用探索

黄炜,马燕琳,谢宝国,黄元华\*

基金项目:海南省重大科技计划项目(项目编号:ZDKJ2017007);国家自然科学基金(项目编号:81960283)

作者单位:570102 海南 海口,海南医学院第一附属医院生殖医学中心

作者简介:黄炜,毕业于南京医科大学,博士,副主任医师,主要研究方向为滋养细胞与胚胎种植。黄元华,主任医师,教授,博士生导师,国优专家,兼任中华医学会生殖医学分会委员,中华医学会生殖医学分会伦理管理组副组长,中华医学会计划生育学分会委员,中国医师协会妇产科医师分会委员,擅长生殖内分泌、不孕不育、反复流产及反复种植失败等生殖难题的诊治。

\* 通信作者,E-mail:13036095796@163.com

【关键词】环孢素 A;反复着床失败;围着床胚胎;滋养细胞

【中图分类号】R 711.6 【文献标志码】A 【文章编号】1674-4020(2021)09-037-05

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2021.09.09

体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)中胚胎可能着床失败,但反复着床失败(recurrent implantation failure, RIF)特别是原因不明会给医生和患者带来极大的困扰。RIF 只是一种对治疗经历的描述,作为诊断,目前尚未达成统一的标准。胚胎着床失败的原因源于胚胎、子宫内膜容受性和胚胎-子宫内膜同步等因素。如何改善胚胎因素成为当今关注的焦点。

环孢素 A(cyclosporine A, CsA)是一种传统的免疫抑制药物,是从真菌 *Beauveria nivea* 的代谢产物中提取的环状多肽类化合物<sup>[1]</sup>,由 11 个氨基酸组成,其中一个含 9 碳和 1 个乙烯双键的新氨基酸,主要用于器官移植和治疗自身免疫性疾病。CsA 主要作用于 T 淋巴细胞<sup>[2-3]</sup>,通过与胞质环亲蛋白(cyclophilin)结合形成复合物,再与钙调磷酸酶(calcineurin)催化亚单位结合,抑制其去磷酸化活性,从而抑制活化 T 细胞核因子的活化与向核内转移,下调 T 细胞特异性细胞因子的转录和白介素 2(interleukin 2, IL-2)的分泌,妨碍 T 细胞活化扩增及其免疫应答的产生。此外, CsA 还抑制抗原提呈细胞表面协同刺激分子的表达及 IL-12 的生成,调节 Th1/Th2 型细胞因子的平衡<sup>[4-6]</sup>,同时抑制树突状细胞在中枢的迁移和成熟,诱导免疫耐受<sup>[7]</sup>。

越来越多的研究提示, CsA 存在许多其他的生物学作用,对包括滋养细胞在内的多种类型细胞的生物学功能具有明显影响。

## 1 滋养细胞与胚胎着床

胎盘是胎儿与母体直接接触的器官,其内分泌功能、物质代谢功能和免疫功能是胎盘最为重要的功能,滋养细胞(trophoblast, TB)是胚胎完成着床的功能细胞。人类胚胎约发育到第 5 天形成囊胚,其外围的扁平细胞为 TB。胚胎发育的第 7~8 天,着床部位的 TB 外层分化,细胞膜融合形成合体滋养细胞(syncytiotrophoblast, ST),此时的 TB 称为绒毛前滋养细胞(previllous trophoblast)。子宫内膜若处于胚胎着床窗口期,胚胎通过 TB 经过粘附与附着、侵袭植入子宫内膜,子宫内膜反应性增生并包埋胚胎完成胚胎着床。因此,胚胎 TB 的附着和侵袭功能对着床至关重要。

粘附是胚胎着床的基础,它既是 TB 的基本功能,同时也为 TB 发挥侵袭能力,分解细胞外基质创造了物理条件。TB 在子宫内的侵袭过程中一直改变着其与细胞外基质的粘附性,表现为具有滋养干细胞的特征性粘附分子减少,而具有血管细胞特征的粘附分子表达增加。纤连素(fibronectin)是整合素  $\alpha v \beta 3$  的生理受体之一<sup>[8]</sup>,着床前后胚胎和子宫内膜出现整合素  $\alpha v \beta 3$  被认为是胚胎着床窗口出现的标志。绒毛外 TB 上调与细胞外基质结合的整合素  $\alpha v \beta 3$  表达,下调与细胞间结合的 E-钙粘素的表达<sup>[9-10]</sup>,细胞的迁移与侵袭能力增强。用整合素  $\alpha v \beta 3$  单克隆抗体处理 TB 后, TB 的侵袭能力受到严重抑制。此外,蛋白酶与细胞的侵袭能力密切相关,多项

研究提示基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein, MMP)-9 是胚胎侵袭能力的标志<sup>[11]</sup>。

## 2 环孢素 A 对滋养细胞和围着床胚胎的影响

### 2.1 环孢素 A 与肿瘤细胞增殖

CsA 对细胞生物学功能的影响研究源于器官移植中患者恶性肿瘤高发现象。长期应用 CsA 的器官移植的患者恶性肿瘤的发生率增加<sup>[12-15]</sup>,认为是免疫抑制治疗后导致免疫监视体系弱化产生的结果<sup>[16-20]</sup>。然而, Hojo M 等<sup>[21]</sup>在研究 CsA 对肿瘤细胞增殖作用中发现, CsA 在体外不依赖于免疫系统的条件下使腺癌细胞发生明显的形态学变化,包括细胞膜变得活跃,伪足明显伸出、侵袭性生长,这些变化可以被 TGF- $\beta$  单克隆抗体阻断。在活体成瘤实验中,将癌细胞移植到免疫缺陷鼠 SCID-beige 体内, CsA 可以促进移植瘤形成,使用 TGF- $\beta$  单克隆抗体则可以阻断这一作用。这说明 CsA 可不依赖于降低免疫监视功能而直接作用于肿瘤细胞。TB 增生活跃,具有侵袭特性,能有效逃避免疫系统的攻击,它在增殖、侵袭和迁移等方面与肿瘤细胞极为相似<sup>[22]</sup>,被誉为“假恶性”型组织(pseudo-malignant type of tissue)或生理性转移(physiological metastasis)<sup>[23-27]</sup>。研究表明, CsA 可影响 TB 的增殖、迁移和侵袭能力。

### 2.2 环孢素 A 与人类早孕绒毛滋养细胞

免疫性流产在复发性流产中占较大比重。应用 CBA(♀) × DBA/2(♂) 小鼠免疫流产模型,杜美蓉等<sup>[29-31]</sup>在小鼠孕 4 天,胃饲 CsA 5、10 和 15mg/kg,使小鼠胚胎吸收率由 20.25%,分别降到 2.86%、6.25% 和 11.24%,说明对于小鼠免疫性流产,小剂量使用 CsA 治疗是有效的,提示了其临床应用的可能。进一步的研究中发现, CsA 对人早孕绒毛 TB 有直接作用,包括促进增殖、迁移和侵袭,抑制凋亡。

杜美蓉等观察了 CsA 对人早孕期绒毛 TB 的影响。在 0.001、0.01、0.1、1  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, TB 的伪足增加、延长,但当浓度增加到 10  $\mu\text{mol/L}$  后,其作用反倒减弱。在 transwell assay 实验中,在 0.001、0.01、0.1、1  $\mu\text{mol/L}$  浓度下,随浓度增加,细胞的侵袭迁移能力增强,到 10  $\mu\text{mol/L}$  时,迁移受到抑制。周文慧等<sup>[32]</sup>发现 CsA 增加人早孕期合体绒毛 TB 的侵蚀性,促进 MMP-9 和 MMP-2 的表达,增加其活性。

CsA 可上调包括 Titin 在内的 6 个基因的表达<sup>[33]</sup>,推测这些因子可能在 CsA 调节人类 TB 生长和侵袭中发挥了重要的作用。TB 的金属蛋白酶在分解细胞外基质,使 TB 侵入子宫内膜具有重要的作用。Titin 也称为 connectin,是连接构成横纹肌(striated muscle) A-段和 I-段的一种巨型蛋白(肌肉巨球蛋白),也是细胞运动、细胞形态和跨膜信息转导的结构基础,该蛋白涉及肌肉的收缩和弹性,并涉及细胞核中的染色体凝聚。

CsA 对 T 淋巴细胞功能的抑制是通过 MAPK 信号

传导中 JNK 和 p38MAPK 通路传导<sup>[34]</sup>。对于 TB,杜美蓉等<sup>[35-36]</sup>证实 CsA 通过 MAPK/ERK(1/2) 信号通路促进 TB 的增殖、迁移和 MMPs(MMP-9 和 MMP-2)的表达。有证据表明,无论在细胞内或细胞外, ERK1/2 的酪氨酸残基先于苏氨酸残基被磷酸化<sup>[37]</sup>,仅有酪氨酸磷酸化的 ERK 激酶不具有活性,必须积聚起来,达到阈值才能使苏氨酸磷酸化,使激酶迅速转为活性状态。由此推测 MEK-MAPK 激活的特点可增强 MAPK 激酶活化的协同性,并允许其它信号途径进行调节。MAPK/ERK 的生物效应包括促进细胞增殖、调节细胞分化和调节细胞周期,具有双相活性(G1 至 S 期和 G/M 期活性增强,而在 G1 期和 M 期发生双相激活)。在大多数细胞中,如成纤维细胞、蛤卵母细胞中, MAPK 的激活是 one-time 事件,可调节细胞周期中的 G0/G1 期转换。MAPK/ERK 信号传导的生物学效应与 CsA 在 TB 功能效应影响相一致。

着床是围着床胚胎的基本功能,就胚胎而言,主要涉及囊胚外层合体 TB 和随后分化的绒毛外 TB。不同于早孕绒毛 TB,围着床胚胎具有以下特点:① 它是一个生命整体,其总体功能取决于不断变化的胚胎内多系细胞(细胞 TB、合体 TB、绒毛外 TB、内细胞团)的相互作用。② 其功能表现最终以整个胚胎表现呈现。

黄元华等<sup>[38]</sup>以小鼠胚胎为模型进行了有关 CsA 影响的研究。在 0.1 ~ 10  $\mu\text{M}$  CsA 的作用浓度下,从 2 细胞期到胚胎孵出前(4 日胚胎)没有发现 CsA 对胚胎的发育速度、细胞数量、胚胎质量、细胞凋亡、囊胚形成率、内细胞团/TB 比例和囊胚孵出率等存在影响。在胚胎孵出后,发现 CsA 存下以下方面的影响:① 胚胎在层粘连蛋白(laminin)包被的培养皿底部的粘附能力增强;② 胚胎占据层粘连蛋白包被的培养皿底部的面积增加,提示迁移细胞迁移能力提高;③ CsA 上调整合素  $\beta 3$  亚基和 MMP9 mRNA 转录,上调它们的表达,研究提示在胚胎整体层面, CsA 改善胚胎粘附、滋养细胞迁移和侵袭功能。直接观察胚胎与层粘连蛋白粘附的研究中发现<sup>[39]</sup>, CsA 促进围着床胚胎粘附经荧光标记的层粘连蛋白活性片段 Fn 120 的能力,并且这个能力通过  $\text{Ca}^{2+}$ 、钙粘素和蛋白激酶 C 自行放大。

李丹等<sup>[40]</sup>电镜下观察了 CsA 对围着床胚胎 TB 微结构的改变。TB 顶端的囊泡内含大量的蛋白质、核酸、mRNA 转录酶等物质,与质膜融合并释放内容物到其他细胞,其功能主要促进细胞生长、侵袭、转移<sup>[41]</sup>;将 D4 孵出的胚胎置于层粘连蛋白包被的培养皿培养,并于 D5 和 D6 观察囊泡变化发现, D5 胚胎 TB 内囊泡的数量明显增加, D6 胚胎 TB 的囊泡明显增大。

在着床的过程中,同时伴有 TB 的分化。绒毛外 TB 在这个过程中形成,并在此后的胎盘形成中发挥了关键性的作用。黄炜、汪佳星等<sup>[42-43]</sup>分别用胚胎干细胞诱导分化的绒毛外 TB、iPS 细胞诱导分化的绒毛外 TB、原代 TB 分化的绒毛外 TB 和 HTR-8/SVneo 细胞株(一种绒毛

外 TB 株)进行研究表明,CsA 具有改善绒毛外 TB 增殖、迁移和侵袭能力。

毋梦兰等<sup>[44]</sup>在活体观察了 CsA 对小鼠胚胎着床的影响。取 3 日小鼠囊胚,依据 Gardner 评级标准,内细胞团 A、B 级胚胎用于移植。依据 TB 发育,胚胎分为 A、B 和 C 级,每级分为治疗组和对照组。治疗组于移植日腹腔注射 CsA 5 mg/kg,每组使用 6 个雌鼠作为代孕鼠。移植后 11 日处死代孕鼠,计数着床胚胎。结果显示,在 TB 为 B 级的囊胚中,使用了 CsA 的代孕鼠胚胎着床率为 73.9%,明显高于对照组(50%, $P < 0.05$ )。当 TB 为 A 级或 C 级时,CsA 并不能显著改善胚胎着床率。提示 TB 完整的胚胎期着床能力具有一定限度,TB 严重缺陷时 CsA 的作用有限,在 TB 层轻度受损时,其作用较为明显。

### 3 环孢素 A 在反复着床失败中的临床应用探索

#### 3.1 原因不明反复着床失败的原因混杂

对于具有明确原因的着床失败,原则上是针对原因处理。但在具体患者中,每个月经周期的内分泌与卵母细胞、子宫内膜、胚胎都具备独特性,科学认知和检验方法存在局限性,并受到患者年龄、IVF-ET 方案、治疗的规范性、不孕症人群特征等影响,较多的 RIF 的因素无法在具体的患者中得到确定<sup>[45-47]</sup>,常常归类于原因不明。因此在不同的被研究的不明原因 RIF 对象中,病因组成各不相同,这给临床研究、观察和方案制定带来了诸多困扰。目前尚不明了 TB 功能不足相关的着床失败在 RIF 人群中的比例。经过严格原因检查,仍然不能解释着床失败者,CsA 对 TB 功能的影响可能在解决部分 RIF 中发挥作用。

#### 3.2 环孢素 A 在不明原因反复着床失败的应用尝试

我们以不少于 2 次胚胎移植,或不少于 3 个优质胚胎移植无着床者为 RIF 标准,在严格对 RIF 进行病因检查的基础上,对 35 岁以下、不明原因的 RIF 进行了 CsA 随机对照研究(未发表资料),对照组 140 例,(32.7 ± 4.5)岁,共移植(3.5 ± 0.8)优质胚胎,治疗组 122 例,(32.9 ± 4.4)岁,共移植(3.8 ± 1.8)优质胚胎。治疗组于取卵后 3 天(或子宫内膜孕激素转化后 3 天)开始使用 CsA 150 mg/日共 13 日,生化妊娠阳性者继续用药 30 天至出现胎心。结果显示,对照组和治疗组的胚胎着床率、临床妊娠率、继续妊娠率和获婴率分别为 14.2% 和 20% ( $P = 0.002$ ),27.1% 和 39.3% ( $P = 0.048$ ),21.4% 和 34.4% ( $P = 0.026$ ),20% 和 31.1% ( $P = 0.046$ )。治疗组的治疗结局虽然较同期 IVF-ET 差,但较对照组有明显的改善。结果初步说明:① 不明原因 RIF 患者中部分患者存在 TB 功能不足;② 部分患者通过改善 TB 功能而取得胚胎着床。但目前的结果尚不足以得出结论,多中心观察正在进行中。

#### 3.3 环孢素 A 在改善胚胎着床中的应用前景展望

基础研究表明,CsA 对围着床胚胎的作用发生于囊

胚孵出后,且作用点在 TB,而临床上难以就 TB 功能障碍做出明确的判断,这成为确定应用场景的难点。减少不必要的用药十分关键,因此其在 RIF 的应用场景需符合以下条件:胚胎具备发育成囊胚并孵出的能力,同时需排除形态学上胚胎质量问题、胚胎存在遗传学问题(或胚胎植入前遗传学检测观察具备遗传学问题的胚胎比例过高)、导致胚胎着床障碍的宫腔病变、腹腔病变、既往移植中胚胎-子宫内膜同步调节问题等。

进一步研究判断在胚胎着床障碍中使用 CsA 的明确的静态或动态形态学特征、生物化学的相关参数仍需进一步的研究和探索。

### 4 环孢素 A 在生殖领域的应用探索与风险

必须清晰地认识到,在药典上明确规定 CsA 是用于器官移植和自身免疫性疾病的药物,且在使用说明书中明确表示孕妇和哺乳妇女禁用。因此应用于生殖领域包括法律、子代、孕妇的风险不可忽视,其中法律风险与子代风险尤为突出。

#### 4.1 母体和子代风险

实验动物和人类的数据均表明 CsA 不存在遗传毒性作用<sup>[48]</sup>。在器官移植长期服用 CsA 的患者中肿瘤的发生风险增加,其机制尚不十分明了,免疫抑制和对细胞增殖的促进作用可能是因素之一。在生殖和发育方面,动物实验中应用高剂量 CsA 会产生一些不良影响。在人类临床应用中尚没有观察到先天性畸形和遗传疾病增加,但出现轻度的发育受限(体重略低)。人类的数据主要来自于器官移植妇女妊娠的观察。但上述患者的结果需要考虑两个方面的影响因素:一方面患者由于接受移植器官而整个孕期都在用药中,另一个方面是这些妇女的健康问题(如肾功能)。目前尚不知道 CsA 在其中发挥的作用。同时也必须注意到,人类的观察数据受到标本数量的限制,对于子代观察的数据也缺乏统一标准。CsA 用于器官移植免疫排异抑制的剂量较大(维持剂量为 2~6 mg/kg/日),且整个孕期暴露于药物中。就我们的观察而言,在生殖领域的应用剂量小(2~3 mg/kg/日),不同于器官移植妇女的全孕期用药,用药时间短(胚胎着床前后到孕 60 天),孕妇风险推测较小,估计子代风险不高于器官移植妇女生育所经历的风险。

#### 4.2 环孢素 A 在不明原因反复着床失败的作用探索与药物滥用问题

生育中胚胎发育是受精卵的基因组依据编程在正确的时间、正确的空间以正确的强度表达的结果。尽可能避免对这一过程的干扰是每个生殖医学工作者必须遵循的原则。然而,在实际工作中,在面对不明原因 RIF 和其他早期妊娠异常(如不明原因复发性流产),药物滥用现象严重,包括 CsA 的滥用,给予子代安全带来了较大的潜在风险。医生必须杜绝基于“怕”胚胎不着床或“帮助”胚胎着床对非特异性患者进行滥用药物。



目前,尽管对 CsA 在生殖领域对子代的风险进行了估计,但数据主要来源于动物实验和器官移植妇女的生育观察,存在偏差的可能性,不能排除潜在风险。CsA 对围着床胚胎的研究主要集中在 TB 及其功能研究,对内细胞团的研究及胚胎形成研究极少,多中心的临床观察尚未完成,对子代的观察尚不深入。这决定了临床医生对这方面的探讨必须持十分谨慎的态度。

不明原因 RIF 不是单因素导致的结果,因此,不同的患者产生的机制各不相同,并不存在一种措施能解决所用不明原因 RIF 的药物方案。对于 RIF“不明原因”,预示着临床处理都带有一定的试探性。CsA 作用于孵出后围着床胚胎的 TB,在实际探索中,RIF 发生机制须较大的可能性发生于这一环节。建议试探性用 CsA 处理不明原因 RIF 需符合以下条件:1. 正面清单。体外培养表明胚胎具备发育成囊胚的能力,如观察到胚胎具有孵出能力则更好。2. 负面清单。① 静态或动态形态学观察,胚胎质量差;② 胚胎存在遗传学问题,或胚胎植入前遗传学检测观察具备遗传学问题的胚胎比例过高;③ 既往移植胚胎-子宫内膜同步调节问题的可能性高;④ 存在可能导致胚胎着床障碍的宫腔病变。

胚胎着床不仅是妊娠的开始,同时也是生殖安全的重要自然选择机制。为了避免不必要的对胚胎着床的干扰和药物影响,最大限度地保障生殖安全,在专业人员内部需要对 RIF 的诊断标准、病因判断程序等方面达成共识。

### 4.3 风险防范

CsA 在不明原因 RIF 的应用探索属于超范围用药,其临床验证和子代风险评估研究不充分,因此临床探索必须坚持以下原则,同时建议其他应用于不明原因 RIF 的超范围使用的药物也遵循这些原则。

① 应当清醒地认识到临床超范围用药的法律责任,以十分谨慎的态度对待临床各种治疗探索。

② 病因判断上尽可能缩小 RIF 的范围,提高用药机制的相对精准性。杜绝不针对患者特定情况和药物作用机制的药物滥用。

③ 机构必须对超使用说明书范围用药进行管控,对超范围用药进行伦理审查。对于具体患者,需要建立超范围使用药物的专业管理和程序,且一人一议。

④ 严格执行知情同意程序并签订知情同意书。签订知情同意书一定要建立在当面详细谈话的基础上。包括具体患者 RIF 原因判断,CsA 对胚胎着床作用的不确定性,超范围用药可能的受益和风险(特别是子代),不良事件的责任和义务,超范围用药的自愿原则,纠纷解决方式等。

⑤ 患者的决定应当是慎重考虑后决定的。用药需在子宫内膜准备或促排卵前确定,避免治疗中甚至移植前的仓促谈话与决定。

⑥ 应对子代进行严格的监测,保障其安全性。

### 【参考文献】

- [1] Borel JF, Kis ZL. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune) [J]. *Transplant Proc*, 1991, 23(2):1867-1874.
- [2] Leitner J, Drobits K, Pickl WF, et al. The effects of Cyclosporine A and azathioprine on human T cells activated by different costimulatory signals [J]. *Immunol Lett*, 2011, 140(1-2):74-80.
- [3] Nussenblatt RB, Scher I. Effects of cyclosporine on T-cell subsets in experimental autoimmune uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, 26(1):10-14.
- [4] Azuma H C A, Nadeau K E A. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(22):12439-12444.
- [5] Duperrier K F A, Biennu J E A. Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002, 72(5):953-961.
- [6] Weimer R M A, Daniel V E A. Switch from cyclosporine A to tacrolimus in renal transplant recipients: impact on Th1, Th2, and monokine responses [J]. *Human Immunology*, 2000, 61(9):884-897.
- [7] Chen T, Guo J, Yang M, et al. Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression [J]. *Blood*, 2004, 103(2):413-421.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1):57-70.
- [9] Irish JM, Kotecha N, Nolan GP. Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(2):146-155.
- [10] Harris LK, Jones CJ, Aplin JD. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast [J]. *Placenta*, 2009, 30(4):299-304.
- [11] Chen L, Nakai M, Belton RJ Jr, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development [J]. *Reproduction*, 2007, 133(2):405-414.
- [12] Penn I. Cancers following cyclosporine therapy [J]. *Transplant Proc*, 1987, 19(1 Pt 3):2211-2213.
- [13] Yokoyama I, Carr B, Saitsu H, et al. Accelerated growth rates of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. *Cancer*, 1991, 68(10):2095-2100.
- [14] London NJ, Farmery SM, Will EJ, et al. Risk of neoplasia in renal transplant patients [J]. *Lancet*, 1995, 346(8972):403-406.
- [15] Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(6):365-376.
- [16] Kahan BD. Cyclosporine [J]. *N Engl J Med*, 1989, 321(25):1725-1738.
- [17] Shimizu T, Martin M S, Pelletier H, et al. Effects of cyclosporin A on progressive and regressive tumors induced by two cancer lines derived from a single colon carcinoma chemically induced in the rat [J]. *Immunobiology*, 1989, 178(4/5):401-415.
- [18] Van de Vrie W, Marquet RL, Eggermont AM. Cyclosporin A enhances locoregional metastasis of the CC531 rat colon tumour [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123(1):21-24.

- [19] Van Der Elst J, DeGreve J, Geerts F, et al. Quantitative study of liver metastases from colon cancer in rats after treatment with cyclosporine A [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1986, 77(1): 227-232.
- [20] Masuhara M, Ogasawara H, Katyal SL, et al. Cyclosporine stimulates hepatocyte proliferation and accelerates development of hepatocellular carcinomas in rats [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14(8): 1579-1584.
- [21] Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism [J]. *Nature*, 1999, 397(6719): 530-534.
- [22] Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, et al. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts [J]. *Human Reproduction Update*, 2007, 13(2): 121-141.
- [23] Strickland S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts [J]. *Cell*, 1992, 71(3): 355-357.
- [24] Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, et al. Regulation of human placental development by Oxygen tension [J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1669-1672.
- [25] Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, et al. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes [J]. *Nature Medicine*, 1998, 4(8): 909-914.
- [26] Mullen CA. Review: analogies between trophoblastic and malignant cells [J]. *Am J Reprod Immunol*, 1998, 39(1): 41-49.
- [27] Du MR, Dong L, Zhou WH, et al. Cyclosporin a improves pregnancy outcome by promoting functions of trophoblasts and inducing maternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings in the mouse [J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 76(5): 906-914.
- [28] 杜美蓉, 董琳, 周雯慧, 等. 环孢素 A 诱导自然流产模型孕鼠脾脏 CD4 + CD25 + Foxp3 + 的调节性 T 细胞扩增及外周母胎免疫耐受 [J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(10): 920-923, 927.
- [29] 闫凤亭, 李大金, 孙晓溪, 等. 环孢霉素 A 对小鼠妊娠失败模型妊娠预后的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(10): 711-713.
- [30] Zhou WH, Du MR, Dong L, et al. Cyclosporin A increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(10): 2743-2750.
- [31] 杜美蓉, 闫凤亭, 李大金, 等. 环孢素 A 作用于人滋养层细胞差异表达的功能基因 [J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(3): 189-192.
- [32] Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2-3): 119-125.
- [33] Du MR, Zhou WH, Dong L, et al. Cyclosporin a promotes growth and invasiveness in vitro of human first-trimester trophoblast cells via MAPK3/MAPK1-mediated AP1 and Ca2 + /calcineurin/NFAT signaling pathways [J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(6): 1102-1110.
- [34] Du MR, Zhou WH, Yan FT, et al. Cyclosporine a induces titin expression via MAPK/ERK signalling and improves proliferative and invasive potential of human trophoblast cells [J]. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 2007, 22(9): 2528-2537.
- [35] Ferrell JE Jr, Bhatt RR. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase [J]. *JBiol Chem*, 1997, 272(30): 19008-19016.
- [36] Huang YH, Ma YL, Ma L, et al. Cyclosporine a improves adhesion and invasion of mouse preimplantation embryos via upregulating integrin  $\beta 3$  and matrix metalloproteinase-9 [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(4): 1379-1388.
- [37] 田胜男. 细胞内 Ca2 + 与整合素信号调节围着床胚胎粘附 FN 能力的机制和 CsA 的影响 [D]. 海口: 海南医学院, 2018.
- [38] 李丹. 环孢素 A 对围着床期胚胎滋养细胞侵袭性的影响 [D]. 海口: 海南医学院, 2014.
- [39] Garbers C, Hermanns HM, Schaper FA, et al. Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2012, 23(3): 85-97.
- [40] 黄炜. 环孢素 A 对人绒毛外滋养层 HTR-8/SVneo 细胞增殖, 迁移和侵袭能力的影响 [D]. 南京: 南京医科大学, 2019.
- [41] 汪佳星. 体外定向诱导 EVT 及环孢素 A 对其功能影响的初步探讨 [D]. 海口: 海南医学院, 2020.
- [42] 毋梦兰. 环孢素 A 对小鼠移植胚胎着床的影响 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [43] Mekanian A, Cohen J, Alijotas-Reig JA, et al. Unexplained recurrent miscarriage and recurrent implantation failure; is there a place for immunomodulation? [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2016, 76(1): 8-28.
- [44] Moustafa S, Young SL. Diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure [J]. *F1000Res*, 2020, 9.
- [45] Findikli N, Kahraman S, Saglam Y, et al. Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage [J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006, 13(1): 38-46.
- [46] Olshan AF, Mattison DR, Zwanenburg TS. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Cyclosporine A: review of genotoxicity and potential for adverse human reproductive and developmental effects. Report of a Working Group on the genotoxicity of cyclosporine A, August 18, 1993 [J]. *Mutat Res*, 1994, 317(2): 163-173.

(收稿日期: 2021-03-31 编辑: 舒砚)