

安子合剂对抗磷脂抗体阳性流产小鼠 TLR2、TLR4 及 TNF- α 的影响

柳 静, 陆启滨*

南京中医药大学附属医院, 南京 210029

摘要: 探讨安子合剂对抗磷脂抗体阳性流产小鼠母胎界面 TLR2、TLR4 及炎症因子 TNF- α 的影响。以人 β_2 GP I 为免疫原建立抗磷脂抗体阳性流产小鼠模型, 计算胚胎吸收率, 采用 ELISA 法检测小鼠外周血清抗 β_2 GP I 抗体浓度、TNF- α 含量, 实时定量 PCR 测定胎盘组织 TLR2、TLR4 mRNA 水平, 免疫组化化学法检测胎盘组织 TLR2、TLR4 蛋白表达。结果显示, 与空白组相比, 模型组 TLR2、TLR4 mRNA 水平显著升高, 蛋白均呈弥漫性高表达; 与模型组相比, 安子合剂组能显著减少胚胎吸收率, 降低抗 β_2 GP I 抗体及 TNF- α 浓度, 可同时下调模型小鼠 TLR2 及 TLR4 mRNA 水平, 使 TLR2、TLR4 蛋白呈中低表达。综上提示安子合剂抑制母胎界面 TLR2、TLR4 信号转导通路中的上游关键分子, 减少炎症因子释放, 这可能是其安胎作用机制之一。

关键词: 安子合剂; 抗磷脂抗体; 流产; 母胎界面; TLR; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.023

Effect of Anziheji on TLR2, TLR4 and TNF- α in Antiphospholipid Antibodies-Positive Abortive Mice Model

LIU Jing, LU Qi-bin*

Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China

Abstract: The objective of the study was to elucidate the effect of Anziheji on TLR2, TLR4 in maternal-fetal interface and Tumornecrosis factor- α (TNF- α) in antiphospholipid antibodies-positive abortive mice. The mice model immuned with human β_2 -glycoprotein I (β_2 GP I) was built to calculate embryo resorption rate, concentration of anti- β_2 GP I antibody and TNF- α in peripheral blood were determined by ELISA. TLR2 and TLR4 mRNA expression level in placenta tissue was determined by real-time and quantitative PCR. The protein expression of TLR2 and TLR4 ws determined by immunohistochemical method. The results showed that, TLR2 and TLR4 mRNA level was obviously enhanced and proteins were in diffusely higher expression in model group compared with the blank group. Compared with model group, Anziheji evidently reduced embryo resorption rate as well as the concentration of anti- β_2 GP I antibody and TNF- α . At the same time, mRNA level of TLR2 and TLR4 was down-regulated and TLR2 and TLR4 proteins were in lower expression. Above all, Anziheji inhibited key molecules of upstream in signal transduction pathways of TLR2 and TLR4 in maternal-fetal interface and reduced inflammation factor release, which may be one of its action mechanisms.

Key words: Anziheji; antiphospholipid antibody; abortion; maternal-fetal interface; TLR; TNF- α

抗磷脂抗体 (antiphospholipid antibody, APA) 包括抗心磷脂抗体 (anticardiolipin antibody, ACA)、抗 β_2 糖蛋白 I 抗体 (anti- β_2 -glycoprotein I antibody, anti- β_2 GP I antibody)、狼疮抗凝物 (lupus anticoagu-

lant, LAC)。APA 相关性流产, 归属于抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome, APS) 范畴, 可导致复发性妊娠丢失以及严重的产科并发症如早产、宫内生长迟缓或胎盘机能不全, 严重影响广大妇女的生殖健康。最新研究表明抗 β_2 GP I 抗体抗原结合形成复合物, 激活 TLR2、TLR4 信号转导通路, 诱导内皮细胞活化, 释放血栓及炎症相关细胞因子是其重要的病理机制和过程。陆启滨教授团队自 1996 年起开展 APA 阳性免疫性流产流行病学、临床、基础研究以及中药制剂研发等系列工作, 创制院内制剂安

收稿日期: 2015-07-27 接受日期: 2015-12-01

基金项目: 江苏省中医药局中医领军人才课题 (LJ200910); 南京中医药大学附属医院青年项目 (Y14019); 江苏省中医药局国家中医临床研究基地开放课题 (JD201507)

* 通讯作者 E-mail: wenwd@nuaa.edu.cn

子合剂,可显著改善患者临床症状,降低 ACA、抗 β_2 GP I 抗体浓度,提高保胎成功率,影响血管内皮细胞凋亡率及细胞增殖,对血管内皮系统损伤具有良好保护作用,但其分子机制有待进一步阐明。本研究采用前期成熟的 β_2 GP I 建立 APA 阳性流产模型^[1];观察安子合剂对 TLR2、TLR4 及炎症因子 TNF- α 的影响,旨在从内皮细胞保护、免疫炎症角度揭示安子合剂安胎作用的分子机理,为中药有效防治免疫性、复发性流产提供新思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠 30 只,8 周龄,体重(25 ± 2) g。雄性 BALB/c 小鼠 15 只,8 ~ 10 周龄,体重(25 ± 2) g 购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号 SCXK(苏)2011-0003,合格证编号: NO. 201401513。实验饲料:SPF 级小鼠标准全营养饲料。

1.2 实验用药

安子合剂:主要成分为川断、桑寄生、菟丝子、杜仲、太子参、白术、苈麻根、黄芩、丹参等,由南京中医药大学附属医院提供,批准文号:苏药制字 Z04000568,产品批号:1308002,250 mL/瓶。阿司匹林:石药集团欧意药业有限公司,产品批号:018140883,25mg(100 片)。

1.3 主要试剂及仪器

人 β_2 GP I 购自 ProSpec,货号 PRO-388,规格 240 μ g; CFA 购自 sigma,货号 F5881-10ML,规格 10ML; IFA 购自 sigma,货号 F5506-10ML,规格 10ML;小鼠 β_2 -GP I Elisa 试剂盒,货号 REF10425;小鼠 TNF- α Elisa 试剂盒,货号 REF:10312,均购自 R&B 公司;TRzol 购自 Takara 公司,货号 9109,引物由南京金斯瑞公司合成,逆转录试剂盒购自 Takara 公司,货号 RR047A;SYBR Green I 购自 Takara 公司,货号 DRR041A;TLR2 抗体购自 abcam,货号 ab108998;TLR4 抗体购自 abcam,货号 ab13556。

光学显微镜(Olympus 公司),Multiskan MK3 酶标仪(Thermo 公司),Mikro 200R 冷冻离心机(Hettich 公司),Nanodrop 2000 核酸定量仪(Thermo 公司),Veriti 96 well thermal Cycler(ABI 公司),Step One Plus Real-Time PCR Systems(ABI 公司)。

1.4 模型制备

以人 β_2 GP I 为免疫原建立抗磷脂抗体阳性流

产小鼠模型^[2,3]。人 β_2 GP I 溶于无菌 PBS 中,调整浓度为 100 μ g/0.25 mL,第 1 d 腹腔注射人 β_2 GP I 溶液与 CFA1:1 比例混合液 50 μ L;第 8 d 以 IFA 代替 CFA 加强免疫 1 次,剂量同第 1 次;至第 18 d 各组雌性小鼠与雄性小鼠 2:1 合笼,自合笼之日起,每天按 8:00 和 14:00 分别观察一次,以观察到角化细胞中夹有大量精子和/或见到阴栓为妊娠第 0.5 d,在妊娠第 9.5 d 时颈椎脱臼法处死小鼠。

1.5 动物分组及给药方法

随机分组给药,每组 6 只小鼠。模型组:妊娠第 1 d 起,蒸馏水灌胃,0.1 mL/10 g,1 次/日,连续 9 d。空白组:妊娠第 1 d 给予蒸馏水灌胃,0.1 mL/10 g,1 次/d,连续 9 d。安子合剂组:妊娠第 1 d 给予浓缩后的安子合剂灌胃,临床等效剂量,37.7 mg/gd,相当于成人剂量,0.1 mL/10 g,1 次/d,连续 9 d。阿司匹林组:妊娠第 1 d 给予溶解后的阿司匹林灌胃,0.0195 mg/gd,0.1 mL/10 g,1 次/d,连续 9 d。

1.6 标本处理方法

血清:小鼠眼眶采血处死后,血样室温静置 2 h,3000 rpm 离心 20 min,仔细收集上清。胎盘组织:解剖后取胎盘组织块,生理盐水充分清洗,用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,供免疫组织化学检测用。

1.7 检测方法

1.7.1 小鼠胚胎吸收率检测

切开子宫检测和计算胚胎吸收率。胚胎吸收率等于被吸收胚胎数/总胚胎数 \times 100%。

1.7.2 ELISA 检测小鼠外周血抗 β_2 GPI 抗体浓度、TNF- α 含量

操作和结果判定均按试剂盒说明书严格进行。

1.7.3 RT-PCR 方法测定母胎界面的 TLR2、TLR4 mRNA 水平

采用 TRIzol 液处理剪碎的组织并提取总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书进行逆转录。在基因表达的半定量分析中,以 GAPDH 为内参,通过与 GAPDH 表达量相比较来做到待测基因表达量的标准化。TLR2 上游引物 5'-CTCTTCAGCAAACGCTGT-TCT-3',下游引物 5'-GGCGTCTCCCTCTATTGTAT-TG-3',TLR4 上游引物 5'-ATGGCATGGCTTACAC-CACC-3',下游引物 5'-GAGGCCAATTTTGTCTCCA-CA-3',GAPDH 上游引物 5'-TGTGGCATCAATG-GATTTGG-3',下游引物 5'-ACACCATGTATTC-CGGGTCAAT-3'。反应条件:扩增阶段:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 循环;溶解曲线阶段:95 $^{\circ}$ C

15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。用荧光定量 PCR 仪自带软件进行溶解曲线分析。经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的 mRNA 表达相对表达量。

1.7.4 免疫组化方法测定母胎界面的 TLR2、TLR4

小鼠胎盘组织石蜡切片,常规脱水、透明、浸蜡、包埋制成蜡块,4 μm 厚切片,苏木素染色,封片后于光学显微镜下观察结果。免疫组化标记:阳性产物均定位于细胞浆,以细胞浆着色呈棕褐色为阳性细胞。计算机图像分析软件(Image-Pro Plus, IPP)分析结果,测定 TLR2、TLR4 的积分光密度(IOD)值并计算出 TLR2、TLR4 浓度。

1.8 统计学分析

各组数据以“均数 \pm 标准误”($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示,运用 SPSS20.0 分析软件进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 各组胚胎丢失率

由表 1 知,与空白组相比,模型组胚胎丢失率显著增加($P < 0.01$);与模型组相比,安子合剂组可降低胚胎吸收率($P < 0.05$)。

表 1 各组胚胎丢失率($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Table 1 Comparison of embryo resorption rate ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

组别 Group	胚胎数 Embryo number	胚胎丢失率 Embryo resorption rate (%)
空白 Blank	37	10.3 \pm 4.1
模型 Model	32	35.6 \pm 2.2 ^{##}
阿司匹林 Aspirin	30	26.8 \pm 5.9
安子合剂 Anziheji	34	17.4 \pm 5.3 [*]

注:与空白组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compared with Blank group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with Model group, ^{*} $P < 0.05$.

2.2 各组小鼠抗 β_2 GPI 抗体、TNF- α 浓度

由表 2 知,与空白组相比,模型组抗 β_2 GPI 抗体浓度显著升高($P < 0.001$),TNF- α 浓度显著升高($P < 0.001$);与模型组相比,安子合剂与阿司匹林组均能显著降低 β_2 GPI 抗体,差异有统计学意义($P <$

0.05),安子合剂优于阿司匹林组,组间差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,安子合剂组、阿司匹林组均能显著降低 TNF- α 浓度,差异有显著统计学意义($P < 0.01$),两组间无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠抗 β_2 GPI 抗体、TNF- α 浓度($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Table 2 Comparison of concentration of anti- β_2 GPI antibody and TNF- α ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

组别 Group	样本数 <i>n</i>	抗 β_2 -GPI 抗体 Anti- β_2 GPI antibody (RU/mL)	TNF- α (ng/L)
空白 Blank	6	0.146 \pm 0.015	7.357 \pm 1.139
模型 Model	6	0.635 \pm 0.036 ^{###}	50.587 \pm 1.223 ^{###}
阿司匹林 Aspirin	6	0.376 \pm 0.036 [*]	16.710 \pm 1.546 ^{**}
安子合剂 Anziheji	6	0.270 \pm 0.008 ^{**Δ}	14.968 \pm 0.792 ^{***}

注:与空白组相比,^{###} $P < 0.001$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$;与阿司匹林组相比, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Blank group, ^{###} $P < 0.001$; Compared with Model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; Compared with Aspirin group, ^{Δ} $P < 0.01$.

2.3 各组母胎界面 TLR2、TLR4mRNA 水平

由图 1 知,TLR2mRNA、TLR4mRNA 在空白组均为低水平表达,模型组表达均显著上升,两组间均有显著性差异($P < 0.01$),其中 TLR2mRNA 有极显著性差异($P < 0.001$);与模型组相比,阿司匹林组、

安子合剂组 TLR2mRNA、TLR4mRNA 表达量均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中安子合剂组有显著差异($P < 0.01$);安子合剂组与阿司匹林组间无差异($P > 0.05$)。

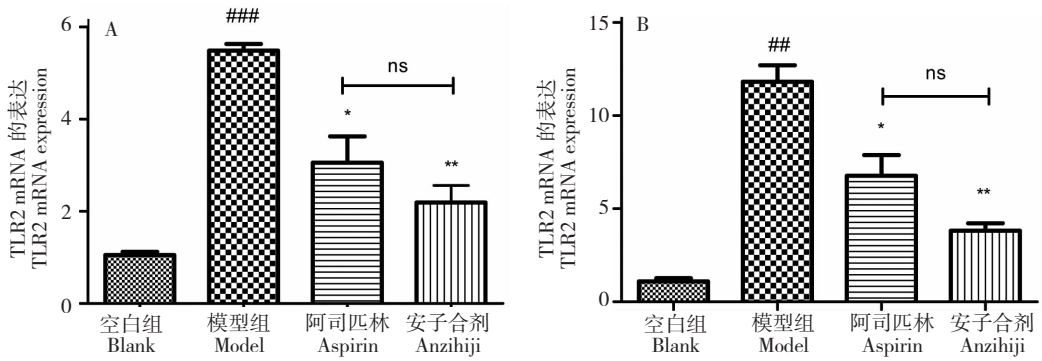


图1 TLR2 (A) 及 TLR4 (B) mRNA 表达量

Fig. 1 mRNA expression level of TLR2 (A) and TLR4 (B)

注:与空白组相比,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$;与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:Compared with Blank group,### $P < 0.01$,#### $P < 0.001$;Compared with Model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.4 各组母胎界面 TLR2、TLR4 蛋白表达

由图2知,模型组 TLR2、TLR4 积分光密度值均显著高于空白组,组间有显著差异($P < 0.01$);阿司匹林组 TLR2、TLR4 积分光密度值均显著低于模型组,组间有显著差异($P < 0.01$);安子合剂组 TLR2、TLR4 积分光密度值均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 TLR2 差异更显著($P < 0.01$);安子合剂组 TLR2、TLR4 表达均略低于阿司匹林组,但组间无差异($P > 0.05$)。

由图3、4知,TLR2、TLR4 蛋白在模型组胎盘组织胞浆中均呈弥漫性高表达,见多量棕褐色表达物;在空白组均呈低表达,见少量表达物呈棕褐色;在阿司匹林组组织胞浆均呈中低表达,见较少表达物呈棕褐色;在安子合剂组组织胞浆均呈中低表达,见较少棕褐色表达物。

3 讨论

APA 是一种以血小板和内皮细胞膜上负电荷磷脂作为靶抗原的自身抗体,其中抗 β_2 GP I 抗体目前被认为妊娠丢失的独立危险因素,近年来内皮功能活化、血栓形成成为研究的热点。西医治疗方法治疗包括单独或联合应用抗凝剂(常用阿司匹林)和免疫抑制剂、静脉注射免疫球蛋白、血浆交换等,但使用剂量、给药途径、安全性等多个问题还存在争议。迫切需要新的安全有效的治疗方法,特异性干预其病理过程。

抗 β_2 GP I 抗体与位于血管内皮细胞表面的抗原 β_2 GP I 结合,形成抗 β_2 GP I - β_2 GP I 复合物后进一步结合膜联蛋白 A2 (Annexin A2),但膜联蛋白 A2 无跨膜结构,并不能引起细胞内信号转导^[4]。最

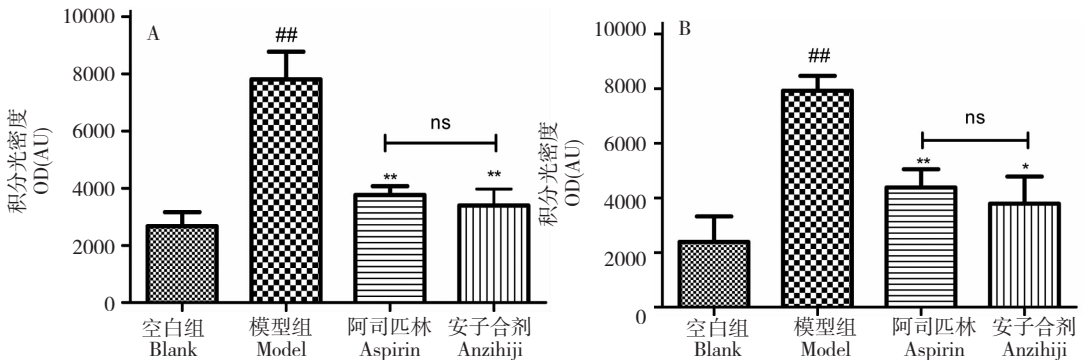


图2 TLR2 (A) 及 TLR4 (B) 积分光密度 (IOD) 值

Fig. 2 Integral optical density of TLR2 (A) and TLR4 (B) protein expression

注:与空白组相比,### $P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:Compared with Blank group,### $P < 0.01$;Compared with Model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

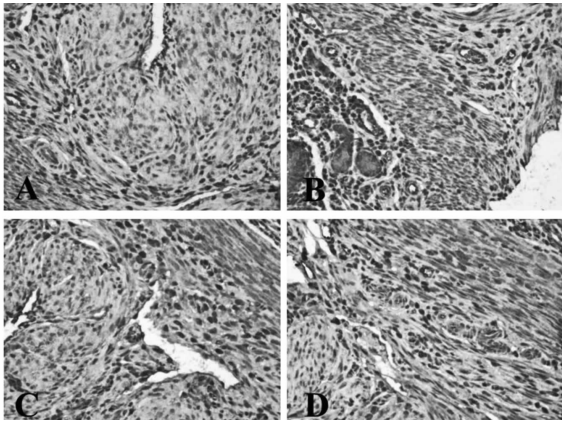


图3 空白组(A)、模型组(B)、安子合剂组(C)及阿司匹林组(D)小鼠胎盘组织 TLR2 蛋白表达情况($\times 200$)

Fig. 3 Protein expression of TLR2 in placenta tissue of Blank group (A), Model group (B), Anziheji group (C) and Aspirin group (D) ($\times 200$)

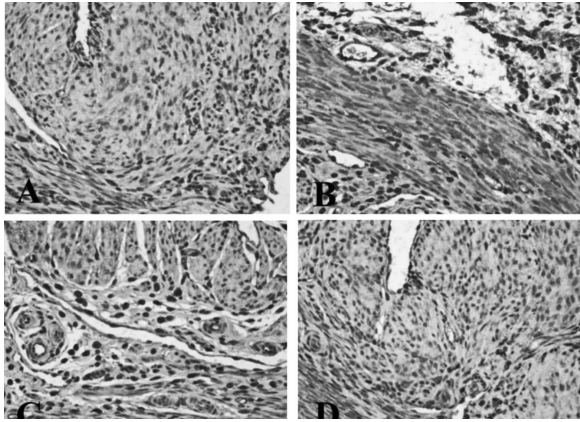


图4 空白组(A)、模型组(B)、安子合剂组(C)及阿司匹林组(D)小鼠胎盘组织 TLR4 蛋白表达情况($\times 200$)

Fig. 4 Protein expression of TLR4 in placenta tissue of Blank group (A), Model group (B), Anziheji group (C) and Aspirin group (D) ($\times 200$)

新研究发现 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)可以将信号传递到细胞内。Toll 样受体是近年来发现的一类重要的天然免疫模式识别受体,在天然免疫和获得性免疫中均可发挥重要作用,至今在人类已发现 11 种 TLRs(TLR1 ~ TLR11)。TLRs 不仅在天然免疫细胞如自然杀伤 NK 细胞、T 细胞及巨噬细胞等表达,而且还在母胎界面特有的非免疫细胞如滋养细胞和蜕膜细胞中表达,共同参与母胎界面的天然免疫^[5]。其中 TLR2 和 TLR4 是 TLRs 家族中最

具代表性受体,在胎盘滋养细胞及蜕膜中均有表达,对妊娠维持和妊娠期疾病具有重要意义^[6]。抗 β_2 GP I- β_2 GP I 复合物,可做为配体与 TLR2、4 结合,活化 TLR2、4 进行细胞内信号传导^[7],激活核因子 κ B(NF- κ B)途径,诱导内皮细胞产生炎症细胞因子(肿瘤坏死因子 TNF- α 、白介素 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等)^[8,9],导致绒毛及蜕膜组织的炎症反应,血栓形成,导致胎盘组织坏死,影响滋养细胞的存活,最终致早孕丢失和晚期妊娠并发症的发生^[10-12]。但目前 TLR2、TLR4 在 APA 阳性流产病理过程中的研究仍处于分子机制基础阶段,真正能应用于临床的成果尚少。抑制 TLR2、TLR4 信号通路的关键环节或关键分子,以其作为靶点的药物研究可能会成为今后的研究热点和方向。

南京中医药大学附属医院妇科自上世纪 90 年代开始将先兆流产作为学科主要研究病种,其中 APA 阳性免疫性流产属中医胎漏、胎动不安、滑胎范畴。在国医大师、白求恩奖章获得者夏桂成教授指导下,我们提出脾肾两虚,夹有血热血瘀是其病机关键。肾主生殖,脾为气血生化之源,脾肾两虚与现代医学免疫功能紊乱相似;阴虚生内热,血热迫血妄行,动血伤胎,中医热证与现代医学炎症机制密切相关,影响炎症因子;热壅气滞,血行不畅,瘀阻胞络,与现代医学微循环障碍一致,应用活血化瘀中药治疗可改善微循环。基于以上病机特点,逐步研发了院内制剂安子合剂治疗抗磷脂抗体阳性流产。补肾健脾、清热和血安胎,临床证实安全有效,并进行了系列实验机制研究。

本研究结果显示正常小鼠胎盘组织存在 TLR2、TLR4 表达,与文献报道一致^[13]。有研究发现正常妊娠胎盘组织中 TLR4 明显下调表达^[14],TLR2 表达被抑制^[15],本研究显示 TLR2、TLR4 在 mRNA 和蛋白水平均呈低水平表达,与以上研究结果相一致。目前 TLR2、TLR4 在 APS 病理机制中的作用,有研究报道抗 β_2 GP I 抗体通过 TLR2 活化内皮细胞,并非 TLR4^[16];而有的结论是抗 β_2 GP I 抗体可以激活 TLR4 信号转导通路并导致内皮细胞活化^[17]。本研究 BALB/c 小鼠经抗 β_2 GP I 抗体刺激后,胎盘组织 TLR2、TLR4 mRNA 和蛋白水平均呈高表达,与正常小鼠相比差异有统计学意义,表明抗磷脂抗体阳性流产可能同时激活 TLR2、TLR4 信号通路。TLR2、TLR4 能否成为 APA 阳性流产的预测和疗效指标值得今后进一步开展临床研究观察。TNF- α 是炎症反

应过程中出现最早、最重要的炎性介质,使血管内皮细胞通透性增加使之水肿,具有较强的促炎促凝作用。作为 TLR2、TLR4 信号通路下游反应因子,参与调节免疫应答与炎症反应。模型小鼠外周血清 TNF- α 水平高于正常小鼠,差异有统计学意义,表明炎症分子的大量释放参与了抗磷脂抗体阳性流产的病理过程。因此推测有可能 TLR2 和 TLR4 信号协同作用是导致小鼠炎性反应增强,从而胚胎丢失的机制。目前 APA 阳性免疫性流产国际、国内专家共识意见采用阿司匹林治疗,以改善妊娠结局^[18]。本研究结果显示与阿司匹林相比,安子合剂更能显著降低模型小鼠抗 β_2 GP I 抗体浓度,控制 APA 阳性流产的危险因素。推测可减少抗 β_2 GP I- β_2 GP I 复合物数量,从而减少活化 TLR2、4 的配体数量,同时能直接降低母胎界面 TLR2、TLR4 mRNA 水平和蛋白表达。总之抑制了 TLR2 和 TLR4 信号转导通路上游关键分子,最终减少炎症因子 TNF- α 分泌释放,抑制炎症损伤,减少胚胎吸收率,改善妊娠结局,这可能安子合剂安胎机制之一。其对 TLR2、TLR4 信号转导通路中的其他信号蛋白如膜联蛋白 A2、NF- κ B 等的影响,值得进一步研究。

参考文献

- Ding C (丁超), Lu QB (陆启滨). Anziheji Effect on mmp2 and mmp9 of ACA Positive Abortion in Mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 967-969.
- Katzav A, Menachem A, Maggio N, et al. IgG accumulates in inhibitory hippocampal neurons of experimental antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*, 2014, 55: 86-93.
- Tolomeo T, Rico De Souza A, Roter E, et al. T cells demonstrate a Th1-biased response to native beta2-glycoprotein I in a murine model of anti-phospholipid antibody induction. *Autoimmunity*, 2009, 42: 292-295.
- Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, et al. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β_2 glycoprotein I antibodies. *Blood*, 2012, 119: 884-893.
- Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63: 587-600.
- Amirchaghmaghi E, Taghavi SA, Shapouri F, et al. The role of toll like receptors in pregnancy. *Int J Fertil Steril*, 2013, 7: 147-154.
- Brandt KJ, Kruihof EK, de Moerloose P. Receptors involved in cell activation by antiphospholipid antibodies. *Thromb Res*, 2013, 132: 408-413.
- Poulton K, Rahman A, Giles I. Examining how antiphospholipid antibodies activate intracellular signaling pathways: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*, 2012, 41: 720-736.
- Chang YL, Chen TH, Wu YH, et al. A novel TLR2-triggered signaling crosstalk synergistically intensifies TNF-mediated IL-6 induction. *J Cell Mol Med*, 2014, 18: 1344-1357.
- Mulla MJ, Salmon JE, Chamley LW, et al. A role for uric acid and the Nalp3 inflammasome in antiphospholipid antibody-induced IL-1 β production by human first trimester trophoblast. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65237.
- Mulla MJ, Brosens JJ, Chamley LW, et al. Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR4/MyD88 pathway. *Am J Reprod Immunol*, 2009, 62: 96-111.
- Oku K, Amengual O, Atsumi T. Pathophysiology of thrombosis and pregnancy morbidity in the antiphospholipid syndrome. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42: 1126-1135.
- Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology*, 2002, 107: 145-151.
- Gonzalez JM, Xu H, Ofori E, et al. Toll-like receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 197: 296. e1-6.
- Dabagh-Gorjani F, Anvari F, Zolghadri J, et al. Differences in the expression of TLRs and inflammatory cytokines in pre-eclamptic compared with healthy pregnant women. *Iran J Immunol*, 2014, 11: 233-245.
- Satta N, Kruihof EK, Fickentscher C, et al. Toll-like receptor 2 mediates the activation of human monocytes and endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Blood*, 2011, 117: 5523-5531.
- Borghi MO, Raschi E, Grossi C, et al. Toll-like receptor 4 and β_2 glycoprotein I interaction on endothelial cells. *Lupus*, 2014, 23: 1302-1304.
- Lin QD (林其德), Su XL (苏小玲). The diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion related to antiphospholipid antibody. *Chin J Pract Obstet Gynecol* (中国实用妇科与产科杂志), 2013, 29: 106-108.