

# 基于网络药理学探究寿胎丸治疗先兆流产作用机制

杨柳青，陈贊，缪晨韵，赵颖，王如烨，章勤\*

(浙江中医药大学附属广兴医院，浙江杭州310007)

**摘要：**目的 应用网络药理学方法探讨寿胎丸治疗先兆流产可能的作用机制。方法 依托TCMSP和TCMID数据库获取寿胎丸全方4味中药主要活性成分，利用Pubchem、SwissTargetPrediction数据库预测活性成分的潜在靶点，通过TTD、Genecards、NCBI等数据库获取先兆流产相关的靶基因，将药物预测靶点和疾病相关靶点交集，获得交集靶基因，将交集的靶基因上传至STRING数据库，构建PPI网络，通过cytoscape软件构建复方-成分-靶基因-疾病网络图；最后，运用R语言对交集靶点进行GO富集分析和KEGG通路富集分析。结果 分析得到寿胎丸治疗先兆流产的有效成分15种及交集靶点36个，有效成分中自由度较高的为 $\beta$ -sitosterol及quercetin，作用靶点中自由度较高的为KDR、SLC6A4、ESR1等，PPI网络中核心基因为STAT3、EGFR等，GO富集分析显示主要与体内酶活性调节、基因转录、核受体活性、激素受体结合等相关，KEGG通路富集分析显示PI3K/Akt、HIF-1、Estrogen信号通路为显著性最高的通路。结论 本研究初步揭示了寿胎丸治疗先兆流产的潜在活性成分及其可能的作用机制，为该制剂活性成分进一步研究提供了理论依据，同时也证实其多成分、多靶点、整体调节的作用特点。

**关键词：**寿胎丸；先兆流产；网络药理学

**中图分类号：**R285.5

**文献标志码：**B

**文章编号：**1001-1528(2021)03-0809-07

**doi：**10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.048

先兆流产(threatened abortion, TA)指孕28周前出现阴道流血、腹痛腰酸等症状，妇科检查宫颈口未开，无妊娠物排出，是最常见的妊娠并发症之一，发病率为20%~25%，严重影响妇女身心健康，若未及时治疗，则发展为难免流产<sup>[1-3]</sup>。先兆流产病因复杂，其病因机制尚未完全阐明，西医治疗一般采用卧床休息、禁止性生活，并予以人绒毛膜促性腺激素、黄体酮等药物治疗<sup>[1,4]</sup>。该病归属中医“胎漏、胎动不安”范畴，中医药治疗先兆流产有数千年历史，临床疗效显著，不良反应少。中医理论认为肾藏精，主生殖，为五脏之本，元气之根，肾气的强弱是胎元能否稳固的关键，所以肾虚为其基本病机<sup>[5]</sup>。寿胎丸出自张锡纯所著《医学衷中参西录》，具有补肾固冲，安胎之功，主治妇人滑胎，后世医家多以本方为安胎基础方随证化裁进行临床应用，并被“十一五”国家级规划教材—《中医妇科学》收录为肾虚型“胎漏、胎动不安”主治方剂，已成为中医临床治疗先兆流产经典名方<sup>[6-7]</sup>。

网络药理学一词，最先由英国药理学家Andrew L Hopkins于2007年提出，并在2008年将其作为“下一代药物研发模式”进行阐述<sup>[8-9]</sup>。网络药理学是指应用系统生物学和多向药理学方法构建生物学网络，从网络平衡的整体角度描述生物系统、药物和疾病之间的相互作用，研究中药的药理作用、机制和安全性<sup>[10]</sup>。通过构建的网络可显

示：一种疾病可由多种不同基因调控；单个基因亦可调控多种疾病，与中医学“同病异治”和“异病同治”的理论契合。此外，网络药理学能从整体角度系统分析中药复方“多成分-多靶点”的作用机制，其“系统性、整体性”的特点与中医中药“整体观、辨证论治”的原则相吻合。网络药理学能揭示中药药效物质基础及其分子机制，使中医药研究从经验医学向循证医学转变，有效地推动中药复方的深入研究，对现代中药的研究和开发具有重要意义<sup>[10-12]</sup>。因此，本研究通过网络药理学方法挖掘寿胎丸治疗先兆流产可能的潜在活性成分及作用靶点，构建蛋白相互作用(PPI)及中药复方-成分-靶基因-疾病网络，进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析，为寿胎丸治疗先兆流产提供相关科学性依据及启发。

## 1 方法

1.1 寿胎丸的活性成分收集 通过检索中药系统药理学分析平台(TCMSP)<sup>[13]</sup>(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)和TCMID<sup>[14]</sup>(<http://119.3.41.228:8000/>)收集寿胎丸中菟丝子、桑寄生、续断、阿胶化学成分(阿胶化学成分信息来自TCMID，其余三味中药成分信息来自TCMSP)，并根据成分的药代动力学(Absorption and distribution and metabolism and excretion, ADME)参数，口服生物利用

收稿日期：2019-09-24

基金项目：浙江省中医药科技计划项目(2017ZKL004, 2020ZA078)；浙江省名老中医专家传承工作室(GZS2017014)

作者简介：杨柳青(1989—)，女，博士生，从事中医药治疗妇科疾病研究。Tel: 13567178167, E-mail: 370660985@qq.com

\*通信作者：章勤(1965—)，女，教授，博士生导师，从事中医药防治复发性流产研究。Tel: (0571) 85827888, E-mail: zhqin@zjwh.gov.cn

度 (Oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性 (Drug likeness, DL)  $\geq 0.18$  为筛选条件进行检索, 得到寿胎丸生物活性成分, 检索时间为 2019 年 5 月 16 日。

1.2 寿胎丸作用靶点预测 基于上述所筛选的生物活性成分, 从 pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获得各活性成分的 Canonical SMILES 结构式, 并将 Canonical SMILES 结构式导入 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 限定物种为 “homo sapiens”, 获取成分靶点<sup>[15]</sup>。SwissTargetPrediction 数据库目前收录了 3 个不同物种的三千多种蛋白质及其 37 万已知的活性物质, 能有效预测小分子蛋白靶点, 具有应用范围广, 预测速度快等优点, 在中药靶点预测中得到了广泛应用<sup>[16-17]</sup>。

1.3 先兆流产相关靶点收集 以 “threatened abortion” “threatened miscarriage” 为关键词, 利用 TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjtd/>)、Genecards (<http://www.genecards.org/>)、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 3 个数据库进行疾病靶点检索, 将检索结果进行合并, 删除重复靶点, 从而获得先兆流产相关靶点, 检索时间为 2019 年 6 月 20 日。

1.4 基因映射及蛋白-蛋白互作网络构建 将寿胎丸作用靶点与先兆流产相关靶点通过 R 语言软件 (3.6.1 版本) 进行映射, 得到寿胎丸治疗先兆流产的潜在作用靶点 (交集靶点), 绘制韦恩图。将交集靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 限定物种为 “homo sapiens”, 置信度得分阈值设为 “highest confidence” ( $> 0.9$ ), 以 TSV 形式保存结果。此外应用 R 语言软件 (3.6.1 版本) 对所得的 PPI 进行统计, 绘制频次柱状图, 筛选核心基因。

1.5 药物-活性成分-疾病-靶点网络构建 将 “1.4” 项下结果通过 Cytoscape3.2.1 软件绘制药物-活性成分-疾病-靶点网络, 并对网络进行分析, 网络图中节点 (node) 为药物、活性成分、疾病、靶点, 边 (edge) 代表以上节点之间的相互关系。

1.6 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析 首先, 使用 R 语言软件将 1.4 所得潜在作用靶点转换成 entrezID。然后, 给 R 语言软件安装 clusterProfiler、bioconductor 等程序包。再运行 R 语言得到 KEGG 富集分析结果, 以条形图、气泡图、通路图等形式展示, 并根据 *P* 值判断富集功能和通路的显著性, 以探究寿胎丸治疗先兆流产可能的作用机制。

## 2 结果

2.1 寿胎丸活性成分筛选 本研究以 OB  $\geq 30\%$ 、DL  $\geq 0.18$  为限制条件, 通过 TCMSP 数据库对寿胎丸 4 味中药进行检索, 得到活性成分分别为菟丝子 11 种、桑寄生 2 种、续断 8 种, 但未收录阿胶成分信息, 其 3 种成分来自 TCMID (未显示 OB、DL 等 ADME 信息, 检索到的 3 种成分均统计在内)。表 1 为筛选后寿胎丸所含 24 个成分信息,

经过去重及删除无 Pubchem Cid 后得到 15 个。

表 1 寿胎丸中活性成分信息 (含重复)

中药	分子编号	化合物	OB/%	DL
菟丝子	MOL001558	芝麻素	56.55	0.83
菟丝子	MOL000184	5 $\beta$ -stigmast-22-en-3-one	39.25	0.76
菟丝子	MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31
菟丝子	MOL000358	$\beta$ -谷固醇	36.91	0.75
菟丝子	MOL000422	山奈酚	41.88	0.24
菟丝子	MOL005043	菜油甾-5-烯-3 $\beta$ -醇	37.58	0.71
菟丝子	MOL005440	异氟固	43.78	0.76
菟丝子	MOL005944	苦参碱	63.77	0.25
菟丝子	MOL006649	异丙酚	55.42	0.28
菟丝子	MOL000953	胆甾醇	37.87	0.68
菟丝子	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
桑寄生	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
桑寄生	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
续断	MOL003152	龙胆根素	64.06	0.21
续断	MOL000358	$\beta$ -谷甾醇	36.91	0.75
续断	MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
续断	MOL009312	( $-$ )-3,5-二咖啡酰奎宁酸	48.14	0.68
续断	MOL009317	葳岩仙皂苷	43.32	0.81
续断	MOL008188	臭山羊碱	44.11	0.25
续断	MOL009322	匙羹藤皂苷 III	48.02	0.53
续断	MOL009323	匙羹藤皂苷 III-q	56.47	0.43
阿胶	TCM-ID(233)	精氨酸	—	—
阿胶	TCM-ID(234)	组氨酸	—	—
阿胶	TCM-ID(235)	赖氨酸	—	—

2.2 寿胎丸潜在靶点及先兆流产相关靶点收集、映射 从 Pubchem 数据库获得活性成分的 Canonical SMILES 结构式, 并将 Canonical SMILES 结构式上传到 SwissTargetPrediction 数据库, 获取成分靶点, 去重后获得 507 个相应靶点; 通过 TTD、Genecards、NCBI 数据库, 以 “Threatened abortion” “Threatened miscarriage” 为关键词进行检索, 将 3 个数据库检索结果进行合并, 去重后获得先兆流产相应靶点 196 个。将寿胎丸作用靶点与先兆流产相关靶点通 R 语言软件映射后, 得到交集靶点, 绘制韦恩图, 见图 1、表 2。应用 STRING 数据库构建 PPI 网络图, 见图 2, 网络中节点 36 个, 边数 190 条, 其中节点代表蛋白 (交集靶点), 边代表各蛋白之间相互关系, 边数越多, 关联度越大, 将 STRING 中下载的 tsv 文件用 R 语言软件进行处理, 统计并绘制出各蛋白-蛋白相互作用的边数 (前 20), 见图 3, 边数最多的为 STAT3 (24 条边)、EGFR (21 条边)、MMP-9 (20 条边)。即 PPI 网络中核心基因为信号传导与转录激活因子 (STAT3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 等, 核心基因与寿胎丸活性成分有较高的结合活性, 其在体内治疗先兆流产发挥主要作用。

2.3 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络构建 应用 Cytoscape3.2.1 软件绘制药物-活性成分-疾病-靶点网络, 见图 4, 共包括 56 个节点 (靶点 36 个, 活性成分 15 个, 疾病 1

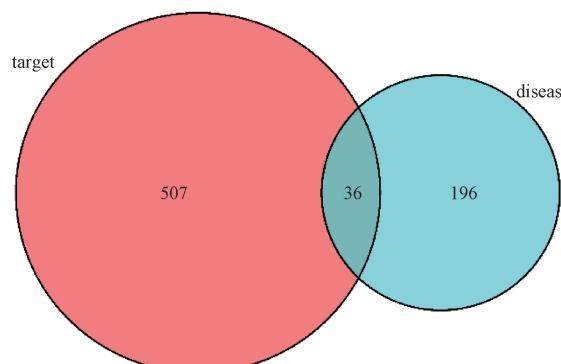


图1 寿胎丸治疗先兆流产潜在靶点

表2 寿胎丸治疗先兆流产潜在靶点

序列	靶点	序列	靶点	序列	靶点
1	SLC6A4	13	F2	25	TEK
2	ABL1	14	MPO	26	MMP8
3	EGFR	15	KDR	27	VCP
4	MTOR	16	MMP9	28	CASP7
5	PARP1	17	MMP2	29	STAT3
6	F8	18	PLG	30	SERPINE1
7	PGR	19	TTR	31	F10
8	AR	20	ESR1	32	HLA-A
9	CCR5	21	IDO1	33	HTR1A
10	POLB	22	JAK3	34	ITGA2B
11	SCN5A	23	JAK2	35	ITGB3
12	HSP90AA1	24	FLT1	36	NOS3

个, 药物4个)和1156条边。自由度(Degree)表示在蛋白相互作用网络中该节点直接相互作用的节点的数目, 节

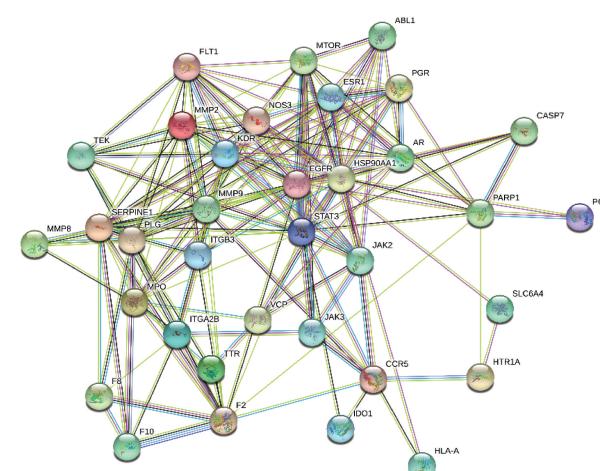


图2 STRING数据库分析蛋白-蛋白的相互作用

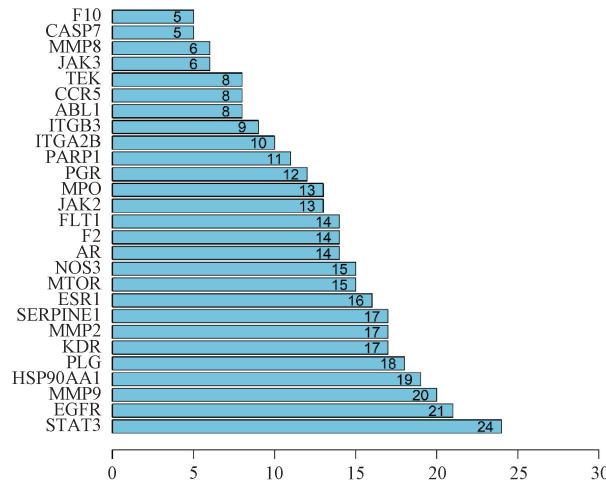
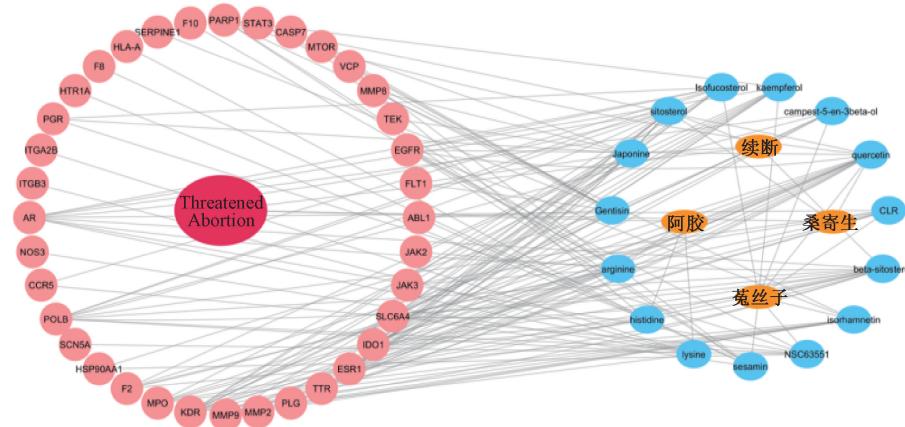


图3 PPI中的核心基因



注: 红色的椭圆形表示疾病名称, 外周粉红色的圆形表示靶点, 橙色的椭圆形表示中药, 蓝色的椭圆形表示活性成分, 连线表示各点之间的相互关系。

图4 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络图

点的度越大则参与的生物功能越多, 其生物重要性越强。分析结果显示, 有效成分中自由度最高的为 $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol)及槲皮素(quercetin), 自由度分别为18、14, 靶点KDR(酪氨酸激酶受体)、SLC6A4(5-羟色胺转运体基因)、ESR1(雌激素受体 $\alpha$ )自由度(Degree)最高, 分

别为13、10、9, 表示其生物学重要性较强。

2.4 GO功能富集分析及KEGG通路富集分析 经R语言软件处理后显示, 交集靶点共富集48个生物学功能, 排名前20的GO功能富集见图5, 圆点颜色代表P值功能富集的显著性, 颜色越偏向红色, P值越小, 显著性越强; 圆

点大小代表参与该功能的靶点数目,圆点越大,参与该功能靶点越多。由此可知,寿胎丸治疗先兆流产主要与体内

酶活性调节、基因转录、核受体活性、激素受体结合等方面内容有关。

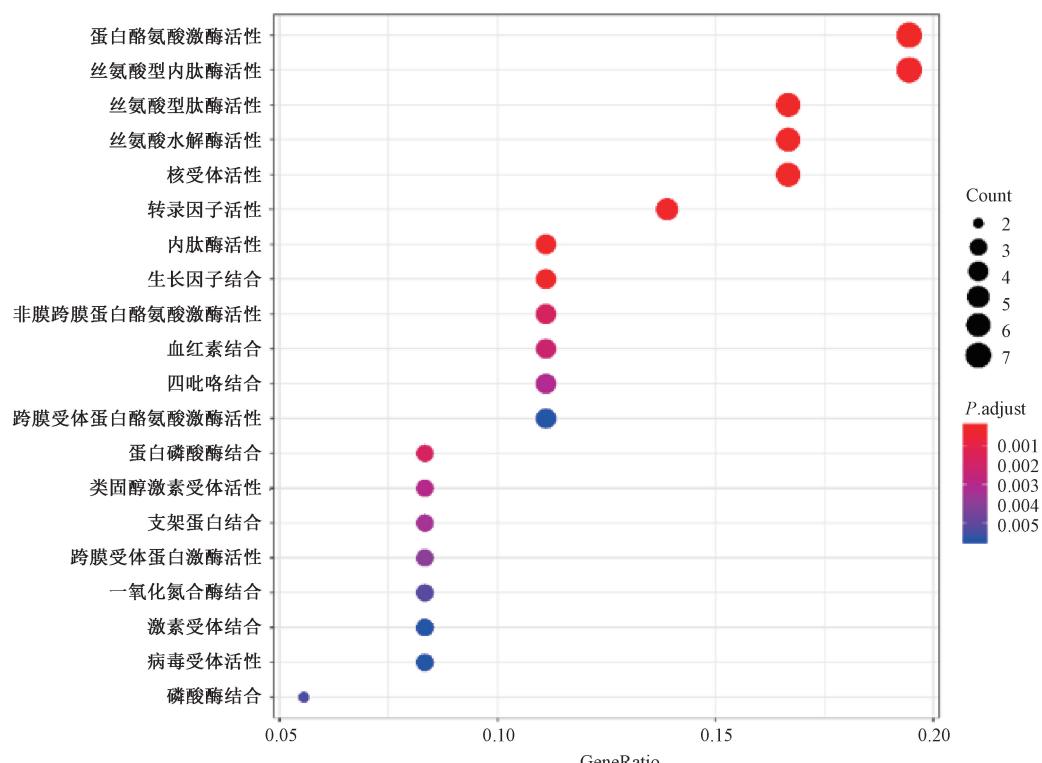


图5 寿胎丸治疗先兆流产潜在靶点的GO功能富集

将所得的36个交集靶点使用R语言程序进行KEGG通路富集分析,处理后得到35条通路,显著性最高的15条通路见表3,将显著性排名前15的通路作条形图,见图6,横坐标表示参与该通路靶点数,颜色表示P值,颜色越偏向红色,则P值越小,显著性越高。经分析,36个交集靶

点主要分布于磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶(PI3K/Akt)、缺氧诱导因子(HIF-1)、雌激素(Estrogen)等多条信号通路,表明寿胎丸主要活性成分可通过多条信号通路来治疗先兆流产,通路间存在着复杂的相互作用关系,多成分、多靶点、相互调节是治疗先兆流产的可能作用机制。

表3 靶点通路富集结果(前15个)

编号	通路名称	P值	基因数/个
hsa04151	磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶信号通路	$2.00 \times 10^{-7}$	11
hsa04066	缺氧诱导因子信号通路	$3.86 \times 10^{-7}$	7
hsa04915	雌激素信号通路	$1.92 \times 10^{-6}$	7
hsa05418	流体剪切压力与动脉粥样硬	$2.0 \times 10^{-6}$	7
hsa05205	Janus 激酶/信号转导与转录激活子信号通路	$2.24 \times 10^{-6}$	8
hsa01521	表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制	$2.27 \times 10^{-5}$	5
hsa04610	补体与凝血级联	$2.27 \times 10^{-5}$	5
hsa04917	催乳素信号通路	$6.13 \times 10^{-5}$	5
hsa01522	内分泌抵抗	$6.44 \times 10^{-5}$	5
hsa04933	糖尿病并发症 AGE-RAGE 信号通路	$7.09 \times 10^{-5}$	5
hsa04659	Th17 细胞分化	$9.79 \times 10^{-5}$	5
hsa04015	Rap1 信号通路	0.000 281 136	6
hsa05163	人巨细胞病毒感染	0.000 407 444	6
hsa05235	PD-1-PD-L1 信号通路	0.000 605 574	4
hsa04217	坏死性凋亡	0.000 675 429	5

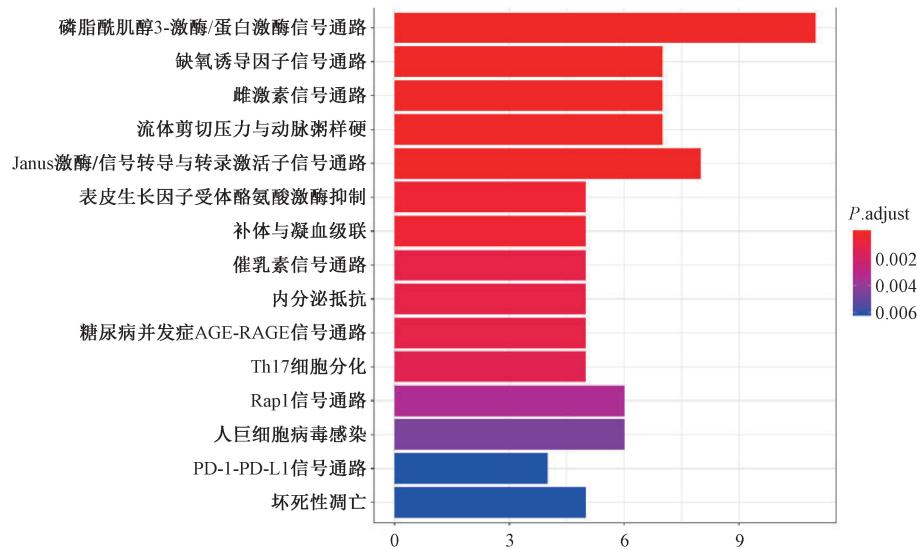


图6 KEGG 通路富集

### 3 讨论

寿胎丸具有补肾安胎之功，临床中应用寿胎丸或以寿胎丸为基础方治疗先兆流产具有较好的效果。因此，对寿胎丸治疗先兆流产的研究具有重要意义。中医临床中以整体观和辨证论治为指导原则，中药复方有着多成分、多靶点、相互联系的特征，网络药理学能从整体角度系统分析中药复方“多成分·多靶点”的作用机制，可以揭示中药药效物质基础及其分子机制使中医药研究从经验医学向循证医学转变，为研究中药复方的一种新策略，对现代中药的研究和开发具有重要意义。临床研究表明，寿胎丸能明显改善先兆流产患者阴道流血、腰酸、腹痛等临床症状，促进血清  $\beta$ -HCG、孕酮、雌二醇含量，降低血清 IL-17、IL-10 及 TNF- $\alpha$  水平<sup>[18-19]</sup>，联合西药治疗早期先兆流产合并绒毛膜下血肿效果优于单纯西药治疗组<sup>[20-21]</sup>，相关 Meta 分析显示寿胎丸治疗先兆流产的疗效优于单纯西药治疗<sup>[22]</sup>，实验研究表明，寿胎丸含药血清可促进人早孕滋养层细胞的增殖活性及侵袭迁移能力，减少细胞凋亡<sup>[23]</sup>，提高促排卵妊娠大鼠的胚泡着床点数<sup>[24]</sup>，并通过调节控制性超排卵小鼠子宫内膜 Ang 及受体表达，提高 COH 小鼠子宫内膜容受性<sup>[25]</sup>。

本研究根据 TCMSP 和 TCMID 数据库获取寿胎丸全方 4 味中药主要活性成分，然后再进行活性成分筛选的，所以筛选后的成分均是主要药味的主要成分，共收集寿胎丸有效成分 15 种，现有的研究大多根据有效成分及靶点与药材的关联度来对组方规律进行君、臣、佐、使解释，活性成分及靶点越多的药材，在处方中地位越重要，通过本研究中药-有效成分-靶点-疾病网络分析，根据自由度排名前 8 的活性成分中，5 种来源于菟丝子，由此体现出菟丝子的君药地位。寿胎丸相关靶点 507 个，与先兆流产 196 个疾病相关靶点，交集后获得 36 个基因，构建 PPI 网络，网络中核心基因为信号传导与转录激活因子 (STAT3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 等。

研究表明 STAT3 作为一种转录因子，在各种组织的发育，细胞生长和体内平衡中起着关键作用<sup>[26]</sup>，胎盘发育需要细胞增殖，分化和迁移的精确协调，更需滋养层细胞侵入子宫内膜以建立胚胎血液，STAT3 激活对于滋养细胞的侵袭至关重要<sup>[27]</sup>，STAT3 亦可以通过增加 LIF (白血病抑制因子) 和 LIFR (白血病抑制因子受体) 之间的相互作用增强粘附分子的表达，从而提高胚胎植入成功率<sup>[28]</sup>。EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一，广泛分布于哺乳动物细胞膜上，是一种参与多种细胞活动的重要信号转导分子，可通过自分泌、旁分泌和内分泌途径刺激滋养层细胞的增殖和分化，从而调节胚胎发育和胚胎植入<sup>[29]</sup>，有文献报道复发性自然流产患者绒毛滋养细胞中 EGFR 表达显著降低<sup>[30]</sup>，这可能与 EGFR 下调引起滋养层细胞的增殖、迁移和侵袭功能异常有关。MMP-9 在滋养细胞侵袭蜕膜过程中起重要作用，滋养细胞自分泌 Mmps，诱导其侵入蜕膜，MMP-9 是滋养层细胞侵入蜕膜的限速酶，能降解蜕膜基底膜和细胞外基质<sup>[31]</sup>，动物实验发现 MMP-9 水平在流产大鼠模型的血清和蜕膜组织中均下降，通过抑制 Mmps 与可导致妊娠大鼠子宫内膜蜕膜发育不良、胚胎植入困难等<sup>[32]</sup>。STAT3、EGFR、MMP-9 等核心基因与寿胎丸活性成分有较高的结合活性，其在体内治疗先兆流产可能发挥主要作用。

根据中药-有效成分-靶点-疾病网络分析，靶点 KDR (酪氨酸蛋白激酶)、SLC6A4 (5-羟色胺转运体基因)、ESR1 (雌激素受体  $\alpha$ ) 自由度 (Degree) 最高，表示其生物学重要性较强。KDR 酪氨酸蛋白激酶，为 VEGF (血管内皮生长因子) 的细胞表面受体，VEGF 及 KDR 是胎盘血管生成的重要蛋白，在胎盘、胚胎发育中起重要作用，VEGF 和 KDR 的转录对于维持妊娠至关重要<sup>[33-35]</sup>，寿胎丸可以通过增加 KDR 含量，激活 VEGF/KDR 途径，调节子宫内的血管生成，从而维持早孕。SLC6A 主要与情感表达相关，有“快乐基因”之称，其多态性与强迫症、人格障

碍等相关。雌激素通过雌激素受体 (ESR1/ESR $\alpha$ 、ESR2/ESR $\beta$ ) 在胎儿和胎盘发育中起着关键作用，并在植入前和妊娠维持过程中起着至关重要的作用，有研究表面 ESR1 多态性与自然流产和不明原因型复发性流产相关<sup>[36-37]</sup>。

为了进一步分析寿胎丸活性化合物可能作用于先兆流产的相关基因和信号通路，交集后的 36 个基因进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析显示寿胎丸治疗先兆流产主要与体内酶活性调节、基因转录、核受体活性、激素受体结合等方面内容有关。KEGG 通路富集分析显示寿胎丸治疗先兆流产可能的信号通路为磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 (PI3K/Akt)、缺氧诱导因子 (HIF-1)、雌激素 (Estrogen) 信号通路。PI3K/AKT 信号是调节滋养层生长和侵袭的重要途径<sup>[38]</sup>，有研究表明，抑制 FAK/SRC/PI3K/AKT 途径引起 MMP2 和 eNOS 下调，进而抑制人 EVT HTR-8/SVneo 细胞 (人绒毛外滋养层细胞的体外模型) 的迁移和侵袭，从而影响胚胎着床<sup>[39]</sup>。血管生成是胎儿和胎盘发育中药因素，有研究显示早期自然流产组绒毛组织 HIF-1 $\alpha$  水平明显低于人工流产组，且 HIF-1 $\alpha$  水平与微血管密度 (MVD) 呈正相关，敲除 HIF-1 基因后 MVD 水平明显下降，并可导致胎盘血管生成失败，引起胎盘缺血缺氧<sup>[40]</sup>，HIF-1 $\alpha$  的表达参与了滋养细胞侵袭和迁移的控制<sup>[41]</sup>。雌激素是一种类固醇激素，调节哺乳动物体内过多的生理过程，包括生殖、心血管保护、骨骼完整性、细胞内稳态和行为。雌激素通过与不同的 ER 结合改变细胞生理功，不但能与核 ER 结合，也能与膜 ER 结合激活 PI3K 信号通路，可以直接或间接地通过一个或多个因素在维持灵长类动物妊娠过程中发挥着极其重要的生理作用<sup>[42-43]</sup>。

综上所述，本研究表明寿胎丸治疗先兆流产主要的活性成分可能为  $\beta$ -谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol)、槲皮素 (quercetin) 等，这些活性成分通过作用于 KDR、SLC6A4、ESR1、STAT3、EGFR 等靶标以及调节 PI3K/Akt、HIF-1、Estrogen 等信号通路发挥治疗作用，寿胎丸治疗先兆流产可能通过调节绒毛组织微血管密度、促进子宫内膜血管生成、刺激滋养层细胞的增殖、分化及侵入等生物过程来维持早孕，为后续深入研究寿胎丸治疗先兆流产奠定理论基础。

## 参考文献：

- [1] 吴昕，李艳青，胡俊攀. 孕宝煎剂对先兆流产患者孕激素诱导阻滞因子及内分泌因子影响的临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5678-5681.
- [2] Pillai R, Konje J, Tincello D, et al. Role of serum biomarkers in the prediction of outcome in women with threatened miscarriage: A systematic review and diagnostic accuracy meta-analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(22): 228-239.
- [3] Greene M. Progesterone for threatened abortion [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(19): 1867-1868.
- [4] 黄玉华, 柯海, 魏颖楠, 等. 1010 例早期先兆流产患者中医证型分布及妊娠结局相关因素分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(8): 22-26.
- [5] 陈文俊. 寿胎丸加味治疗早期肾虚型先兆流产的临床观察 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [6] 曾雪利. 寿胎丸加减治疗肾虚型早期先兆流产的临床观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [7] 张玉珍. 中医妇科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 211-212.
- [8] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biology*, 2008, 4(11): 682-690.
- [9] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Chem Biology*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [10] Zhang R, Zhu X, Bai H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- [11] 李杰, 石金凤, 聂欣, 等. 基于网络药理学的四物汤治疗原发性痛经的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 559-565.
- [12] 曹亚娟, 方媛, 吴建春, 等. 基于网络药理学预测北沙参治疗肺癌的作用机制 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1302-1305.
- [13] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [14] Xue R, Fang Z, Zhang M, et al. TCMID: traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 1089-1095.
- [15] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 429(1): 32-38.
- [16] 逮克娜, 林寒梅, 黄巍, 等. 基于网络药理学的化瘀通脉饮“半夏-当归”药对抗多囊卵巢综合征作用机制的研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 539-543.
- [17] Antoine D, Olivier M, Vincent Z. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(2): 357-364.
- [18] 吴玉霞, 徐宁, 李伟莉. 寿胎丸加减治疗黄体功能不全型先兆流产及其对细胞因子影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(9): 100-103.
- [19] 王永富, 陈孝萍, 薛云云, 等. 加减寿胎丸联合黄体酮胶囊治疗先兆流产肾虚证 34 例 [J]. 现代中医药, 2019, 39(2): 73-79.
- [20] 高秀娟. 寿胎丸加减联合西药治疗妊娠早期合并绒毛膜下血肿先兆流产 39 例 [J]. 湖南中医志, 2019, 35(5): 57-58.
- [21] 李雁南. 寿胎丸加减联合西药治疗妊娠早期合并绒毛膜下血肿的先兆流产临床研究 [J]. 光明中医, 2018, 33(4): 565-566.
- [22] 高飞霞, 巫海旺, 罗颂平, 等. 寿胎丸治疗先兆流产: 随机对照试验的 Meta 分析 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2637-2642.

- [23] 余佩琳, 刘新玉, 李亚, 等. 寿胎丸含药血清对人早孕滋养层细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(2): 85-88.
- [24] 陈丽, 张娟, 郑翠红, 等. 不同剂量寿胎丸对促排卵大鼠胚胎着床的影响及机制[J]. 华南国防医学杂志, 2017, 31(1): 1-5.
- [25] 尹巧芝, 李利民, 宁楠, 等. 寿胎丸对控制性卵巢刺激下小鼠子宫内膜容受性的影响[J]. 中国计划生育学杂志, 2016, 24(2): 85-89.
- [26] Cai J, Li M, Huang Q, et al. Differences in cytokine expression and STAT3 activation between healthy controls and patients of unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) during early pregnancy[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163252.
- [27] Chang X, Bian Y, He Q, et al. Suppression of STAT3 signaling by Δ9-tetrahydrocannabinol (THC) induces trophoblast dysfunction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 537-550.
- [28] Chung T W, Park M J, Kim H S, et al. Integrin αVβ3 and αVβ5 are required for leukemia inhibitory factor-mediated the adhesion of trophoblast cells to the endometrial cells [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2016, 469(4): 936-940.
- [29] Wei Z, Park K W, Day B N, et al. Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(4): 457-462.
- [30] Bai X, Zheng C Y, Ren N. Trophoblast proliferation, migration, and invasion is regulated by the miR-195/EGFR signaling pathway in recurrent spontaneous abortion patients[J]. *BioRxiv*, 2019, doi: 10.1101/630590.
- [31] Li X, Yang Z, Song W, et al. Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(3): 793-802.
- [32] He Y, Sun Q. IFN-γ induces upregulation of TNF-α, downregulation of MMP-2 and MMP-9 expressions in abortion rat[J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2018, 22(15): 4762-4767.
- [33] Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 110(1): 10-18.
- [34] Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy [J]. *Matern Fetal Neonatal Med*, 2009, 22(5): 371-378.
- [35] Greene J M, Dunaway C W, Bowers S D, et al. *In vivo* monitoring of fetoplacental Vegfr2 gene activity in a murine pregnancy model using a Vegfr2-luc reporter gene and bioluminescent imaging[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, DOI: 10.1186/1477-7827-9-51.
- [36] Negin A, Arash H N, Firouzeh B, et al. Association study of estrogen receptor α gene polymorphisms with spontaneous abortion: is this a possible reason for unexplained spontaneous abortion? [J]. *Bio Med Res Int*, 2013, 2013: 256470.
- [37] Jin J K, Young M C, Sung K L, et al. Estrogen receptor β gene polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a case-control study[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 31(11): 870-873.
- [38] Zhu R, Huang Y H, Tao Y, et al. Hyaluronan up-regulates growth and invasion of trophoblasts in an autocrine manner via PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways in early human pregnancy[J]. *Placenta*, 2013, 34(9): 784-791.
- [39] Wang R, Wang W P, Ao L, et al. Benzo[a]pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide suppresses the migration and invasion of human extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells by down-regulating MMP2 through inhibition of FAK/SRC/PI3K/AKT pathway[J]. *Toxicology*, 2017, 386(1): 72-83.
- [40] Zhi Z, Yang W, Liu L, et al. Early missed abortion is associated with villous angiogenesis via the HIF-1α/VEGF signaling pathway [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 298(3): 537-543.
- [41] Dubinsky V, Poehlmann T G, Suman P, et al. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2010, 63(3): 193-199.
- [42] Eugene D. Albrecht, Graham W, et al. The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 182(2): 432-438.
- [43] 屈超, 刘中洋, 裴荣刚, 等. 雌激素信号通路概述[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(3): 448-450.