

## 补肾助孕方治疗复发性流产的分子作用机制分析

侯梓桐<sup>1</sup>, 苏晓慧<sup>2</sup>, 隋娟<sup>1</sup>, 孟云霄<sup>3</sup>, 周天一<sup>3</sup>, 秦瑜玲<sup>1</sup>, 陈瑞雪<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;  
3. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**基于网络药理学研究补肾助孕方治疗复发性流产(RSA)的主要成分、作用靶点及作用通路,应用分子对接和体外细胞实验验证,从而揭示其潜在作用机制。**方法:**首先,中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),中医药研究综合数据库(TCMID)检索和收集既往文献补肾助孕方的活性成分,应用DrugBank数据库,SwissTargetPrediction数据库等平台查找预测药物作用靶点,检索人类基因注释数据库(GeneCards),人类孟德尔遗传数据库(OMIM)中等数据库获得复发性流产靶点,将药物与疾病预测靶点取交集。应用Cytoscape 3.7.1软件绘制“补肾助孕方-化合物-靶点-复发性流产”网络,蛋白质相互作用平台(String)平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,分析获取核心网络。其次,采用R语言软件对共同靶点分别行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。最后,使用Autodock Vina 1.1.2软件用来行分子对接及体外细胞实验验证补肾助孕方对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)通路的激活作用。**结果:**发现补肾助孕方的49个潜在活性成分可能靶向133个复发性流产相关作用靶点。GO功能富集分析获得470个细胞生物学过程,主要涉及血管形态发生、发育、细胞增殖、氧化活性等生物学过程。KEGG通路富集分析获得103条信号通路( $P < 0.05$ ),主要与PI3K/AKT信号通路、糖基化终末产物/糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路相关。分子对接提示补肾助孕方关键活性成分山柰酚与核心蛋白蛋白激酶B1(AKT1),血管内皮生长因子A(VEGFA)的Vina得分最低且相近。体外细胞实验证实,补肾助孕方可通过活化PI3K/AKT信号通路,上调VEGFA的表达及下游AKT1蛋白的表达水平,促进血管的生成。**结论:**该研究初步揭示补肾助孕方作用于血管形态发生发育、细胞增殖,明显激活PI3K/AKT通路进而上调VEGFA的表达,最终促进母胎界面血管生成利于妊娠早期胎盘的形成为及早孕的维持,起到治疗RSA的作用,为后续新药研发供思路。

**[关键词]** 补肾助孕方; 复发性流产(RSA); 网络药理学; 作用机制; 细胞实验

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0060-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211306

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210521.0951.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-05-21 14:00

### Network Pharmacology-based Study of Bushen Zhuyun Prescription in Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion

HOU Zi-tong<sup>1</sup>, SU Xiao-hui<sup>2</sup>, SUI Juan<sup>1</sup>, MENG Yun-xiao<sup>3</sup>, ZHOU Tian-yi<sup>3</sup>,  
QIN Yu-ling<sup>1</sup>, CHEN Rui-xue<sup>1\*</sup>

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;  
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,  
China; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the active components, targets, and signaling pathways responsible for Bushen Zhuyun prescription in treating the recurrent spontaneous abortion (RSA) based on network

**[收稿日期]** 20210301(003)

**[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ070843)

**[第一作者]** 侯梓桐,在读硕士,从事复发性流产、不孕症的中医药临床与研究,E-mail:1171061659@qq.com

**[通信作者]** \*陈瑞雪,主任医师,博士生导师,从事复发性流产、不孕症的中医药临床与研究,E-mail:chenruixue@gamyy.cn

pharmacology and uncover its potential mechanism by molecular docking and *in vitro* cell experiments. **Method:** The active components of Bushen Zhuyun prescription were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID) and the published articles, followed by the prediction of drug action targets based on such platforms as DrugBank and SwissTargetPrediction. GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) were searched to obtain the RSA targets, which were then intersected with the targets of Bushen Zhuyun Decoction. Following the plotting of Bushen Zhuyun prescription-compound-target-RSA network by Cytoscape 3.7.1, the protein-protein interaction (PPI) network was then constructed with STRING for screening the core network. The resulting common targets were then subjected to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis using R software. Autodock Vina 1.1.2 was used for molecular docking. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway by Bushen Zhuyun prescription was verified in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. **Result:** It was found that 49 potential active components of Bushen Zhuyun prescription might act on 133 RSA targets. GO enrichment analysis yielded 470 biological processes, with angiogenesis, vascular development, cellular proliferation, and oxidative activity mainly involved. KEGG enrichment analysis revealed 103 signaling pathways ( $P < 0.05$ ), and the PI3K/AKT signaling pathway, advanced glycation end product (AGE)/receptor for advanced glycation end product (RAGE) signaling pathway, and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway were the main ones. As indicated by molecular docking, the Vina scores of the main active component kaempferol with AKT1 and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) were the lowest and similar. It was confirmed *in vitro* cell experiments that Bushen Zhuyun prescription activated the PI3K/AKT signaling pathway and up-regulated the expression of VEGFA and downstream AKT protein to promote angiogenesis. **Conclusion:** Bushen Zhuyun prescription promotes angiogenesis at the maternal-fetal interface by regulating angiogenesis and cellular proliferation, activating the PI3K/AKT pathway, and up-regulated the VEGFA expression, which is beneficial to the formation of placenta in early pregnancy and the maintenance of early pregnancy. This study has provided ideas for new drug development.

[**Keywords**] Bushen Zhuyun prescription; recurrent spontaneous abortion (RSA); network pharmacology; mechanism of action; cell experiment

复发性流产(RSA)指妊娠20周前发生连续2次或2次以上自然流产,在育龄期女性发病率为5%<sup>[1]</sup>。既往文献报道,流产2次患者再次妊娠后发生自然流产的几率高达70%~80%<sup>[2]</sup>。目前西医认为其病因复杂,除了染色体的异常、解剖结构异常、内分泌紊乱、免疫因素等明确病因外,仍有50%患者病因诊断不明,西医治疗有明显的局限性<sup>[3]</sup>。研究证实中医治疗RSA重点是健脾补肾、益气补血,兼顾疏肝解郁、化痰活血等法,具有不良反应小、治愈率高的优势<sup>[4]</sup>。

补肾助孕方是中国中医科学院广安门医院陈瑞雪教授临床经验方,方剂由桑寄生、续断、菟丝子、酒女贞子、百合、山药、益母草、泽兰组成。既往临床研究证实该方能够促进RSA患者子宫内膜厚度的增加,促进内膜形态优势转化,双侧螺旋动脉血流阻力指数(RI)降低,有利于提高子宫内膜容受

性,治疗RSA<sup>[5]</sup>。

补肾助孕方治疗RSA效果明显,其作用机制待进一步明确。中药应用强调配伍,多具备相须相使关系,临床重视整体观念,单一的机制研究难以揭示该方作用机制。本研究拟应用网络药理学,建立各活性成分间互作网络,寻找共同靶点,阐释复方的成分及作用途径<sup>[6]</sup>,以期中药制剂研发、临床新用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 收集补肾助孕方化学成分与靶标** 中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和中医药研究综合数据库(TCMID)检索各单味中药的化学成分并结合既往文献收集具有治疗RSA的活性成分。查阅文献可知,类药性(DL)和口服生物利用度(OB)是筛选药物的关键参数<sup>[7]</sup>,选择OB≥30%, DL≥0.18,初步筛选、收集候选化合物。将候选化合

物经 DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>) 匹配靶点, Uniprot 蛋白数据库 (Universal Protein) 校正后确定标准基因名称, 经 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swiss target prediction.ch/>), 限定物种为“智人 (Homo sapiens)”, 初步对潜在化合物行靶标预测, 然后汇总去重获得药物靶点。

**1.2 检索 RSA 靶点** 人类基因注释数据库 (GeneCards), 人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 中, 设立关键词为“Recurrent spontaneous abortion or RSA”。GeneCards 数据库中, 设定分数 (score) 值大于中位数搜索潜在靶点, 然后汇总去重各数据库靶点, 获得 RSA 相关靶点。

**1.3 构建“补肾助孕方 (BSZYF)-化合物-靶点-RSA”网络** 利用 Venny 软件将 RSA 靶基因与补肾助孕方潜在靶点取得交集, 获取共同靶点, 绘制韦恩图。Cytoscape 3.7.1 软件建立“BSZYF-化合物-靶点-RSA”相互关系网络图, 进行分析。“节点” (Node) 表示属性类型, “边” (Edge) 体现相互关系。

**1.4 构建蛋白质相互作用网络** 补肾助孕方作用靶点导入 STRING (<https://www.string-db.org/>), 选择种类为“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络, 建立靶蛋白之间的网络关系。利用 Cytoscape 3.7.1 软件分析 PPI 结果, 节点越大度值 (degree) 越高, 边越粗结合分数 (combined score) 越高, 相互关系越强<sup>[8]</sup>。

**1.5 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** 利用 R 语言软件对候选基因行 GO 和 KEGG 分析。获得前 25 位具有显著性差异的 GO 和 KEGG, 应用微生信软件 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化分析, 将富集结果以气泡图样式输出。

**1.6 分子对接** 登录 TCMSp 数据库下载该方排名前 6 位主要成分结构, 对 3D 结构进行能量最小化后保存, 利用 AutodockTools 1.5.6 软件生成 pdbqt 格式。然后登录 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载前 6 位靶点蛋白 3D 晶体结构, 对其去水、配体, 加氢, 从新计算电荷; 然后将活性成分文件导入, 检测总电荷, 分配电荷, 查看柔性可旋转键。最后使用 Autodock Vina 程序进行分子对接, 计算结合能大小。Pymol 软件将结果可视化。结合能绝对值 > 4.25 代表分子与靶点初步具有结合能力, > 5.0 代表较强结合能力, > 7.0 代表很强结合能力<sup>[9]</sup>。

### 1.7 实验验证

**1.7.1 药材与试剂** 补肾助孕方: 桑寄生 12 g, 续断 15 g, 菟丝子 15 g, 酒女贞子 10 g, 百合 10 g, 山药

12 g, 益母草 15 g, 泽兰 12 g, 以上中药饮片均购自中国北京同仁堂 (集团) 有限公司, 经中国中医科学院中药研究所孔祥英研究员鉴定均为正品。将中药饮片加入 10 倍水浸泡 30~60 min 后加热, 采用回流提取, 趁热过滤, 将 2 次滤液合并, 浓缩至每 1 mL 药液含 1 g 生药, 临用时配成所需浓度。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC, 上海子实生物科技有限公司, 货号 8000); RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司, 货号 SH30809.01B); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 货号 16000-044); RIPA 裂解液, 5×SDS-PAGE 变性蛋白上样缓冲液, Bradford 法蛋白定量试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司, 货号分别为 C1053, B1012, P1510); 小鼠抗血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 抗体 (Proteintech 公司, 货号 19003-1-AP); 兔抗蛋白激酶 B1 (AKT1) 抗体, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗小鼠免疫球蛋白 (Ig)G 二抗, HRP 标记的抗兔 IgG 二抗 (美国 CST 公司, 批号分别为 2934, 7076S, 7074S); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab181602)。

**1.7.2 仪器** LX-100 手掌型离心机 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Powerpac™ Basic 型电泳仪, Mini Trans-Blot Cell 型转移电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); TS-1 型水平摇床 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Fusion FX6 型凝胶成像仪 (法国 Vilber 公司); CX31 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

**1.7.3 分组及给药** 将 HUVEC 细胞正常苏醒, 培养在添加 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培育, 将培养至对数成长期的 HUVEC 细胞配制成混悬液, 接种在 6 孔板, 每孔接种细胞 20 万个。培养 24 h 待细胞贴壁后, 再将细胞分为空白组、补肾助孕方水提物低、中、高浓度共 4 组。补肾助孕方低浓度组每孔加入 12.5 mg·L<sup>-1</sup> 水提物 2 mL, 中浓度组每孔加入 25 mg·L<sup>-1</sup> 水提物 2 mL, 高浓度组加入 50 mg·L<sup>-1</sup> 水提物 2 mL。补肾助孕方的给药浓度参考文献 [4] 的基础上, 结合前期预试验观察而确定, 该浓度范围既不会破坏细胞活性, 又对血管生成有效。空白组每孔加入 RPMI 1640 液 2 mL, 继续培养 24 h 后收集细胞。

**1.7.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测不同分组细胞的 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达** 药物作用 24 h 后收集细胞, 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白, 采用 Bradford 法测定蛋白浓度及蛋白定量, 加热法进行蛋白变性, 制备 10% 十二烷

基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上样后进行电泳、转膜、封闭,4℃过夜孵育AKT1(1:1 000),VEGF(1:500)及GAPDH(1:1 000)一抗,次日用二抗(1:5 000)室温孵育2 h,随后按照ECL试剂盒所示方法进行显影,显影结果采用Image J 1.48软件测量条带灰度值。

**1.8 统计学处理** 采用SPSS 21.0软件对数据统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较运用 $t$ 检验,

以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 补肾助孕方的活性成分筛选** 通过TCMSP,TCMID数据库,设置标准参数OB $\geq$ 30%,DL $\geq$ 0.18筛选后获得化合物桑寄生2个,续断8个,菟丝子11个,女贞子13个,山药15个,百合7个,益母草8个,泽兰2个。对收集化合物去重,最终得到潜在化合物49个,见表1。

表1 补肾助孕方作用于RSA的潜在化合物

Table 1 Potential compounds of Bushen Zhuyun prescription in treatment of RSA

ID号	化合物中文名	化合物英文名	中药
MOL000006	木犀草素	luteolin	女贞子
MOL000098	槲皮素	quercetin	女贞子、益母草、菟丝子、桑寄生
MOL000296	常春藤皂苷	hederagenin	续断
MOL000310	玉兰脂素B	denudatin B	山药
MOL000322	海风藤酮	kadsurenone	山药
MOL000354	异鼠李素	isorhamnetin	菟丝子、益母草
MOL000358	$\beta$ -谷甾醇	beta-sitosterol	女贞子、续断、百合、菟丝子、泽兰
MOL000359	谷甾醇	sitosterol	泽兰
MOL000422	山柰酚	kaempferol	女贞子、益母草、菟丝子
MOL000449	豆甾醇	stigmasterol	山药、百合
MOL000546	薯蓣皂素	diosgenin	山药
MOL000953	降钙素基因相关肽受体	CLR	菟丝子、山药
MOL001418	鸢尾花二萜	galeopsin	益母草
MOL001421	前益母草乙素	preleoheterin	益母草
MOL001439	花生四烯酸	arachidonic acid	益母草
MOL001558	芝麻素	sesamin	菟丝子
MOL001559	萆薢宁	piperlonguminine	山药
MOL001736	二氢槲皮素	(-)-taxifolin	山药
MOL002039	异海松酸	isopimaric acid	百合
MOL003152	龙胆根素	gentisin	续断
MOL004576	花旗松素	taxifolin	女贞子
MOL005043	菜油固醇	campest-5-en-3beta-ol	山药
MOL005146	女贞果苷D	lucidumoside D	女贞子
MOL005147	女贞果苷元D	lucidumoside D_qt	女贞子
MOL005169	(20S)-24-烯-3 $\beta$ ,20-二醇-3-乙酸酯	(20S)-24-ene-3 $\beta$ ,20-diol-3-acetate	女贞子
MOL005190	圣草酚	eriodictyol	女贞子
MOL005195	丁香树脂醇双葡萄糖苷	syringaresinol diglucoside_qt	女贞子
MOL005209	光泽乌头碱	lucidusculine	女贞子
MOL005211	长蒴黄麻甙	olitoriside	女贞子
MOL005212	长蒴黄麻苷元	olitoriside_qt	女贞子
MOL005429	山药醇	hancinol	山药

续表 1

ID号	化合物中文名	化合物英文名	中药
MOL005430	山药酮 C	hancinone C	山药
MOL005435	24-甲基胆固醇-3 $\beta$ -O-吡喃葡萄糖苷	24-methylcholest-5-enyl-3beta-O-glucopyranoside_qt	菟丝子
MOL005438	菜油甾醇	campesterol	山药
MOL005440	异黄酮	isofucosterol	菟丝子、山药
MOL005458	黄山药皂苷元 C	dioscoreside C_qt	山药
MOL005461	皮黄质	doradexanthin	山药
MOL005463	甲基升麻苷	methyleimicifugoside_qt	山药
MOL005465	萜类化合物	AIDS180907	山药
MOL005944	苦参碱	matrine	菟丝子
MOL006649	槐醇	sophornol	菟丝子
MOL008188	臭山羊碱	Japonine	续断
MOL009312	(E,E)-3,5-二咖啡酰奎宁酸	(E,E)-3,5-Di-O-caffeoylquinic acid	续断
MOL009317	茎苷元 A	cauloside A_qt	续断
MOL009322	林生续断苷-III	sylvestroside III	续断
MOL009323	林生续断苷元-III	sylvestroside III_qt	续断
MOL009471	26-O-B-D-吡喃葡萄糖基-3 $\beta$ ,26-二羟基胆固醇-16,22-二氧代-3-O-A-L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-B-D-吡喃葡萄糖苷	26-O-B-D-glucopyranosyl-3 $\beta$ ,26-dihydroxy-cholestan-16,22-dioxo-3-O-A-L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-B-D-glucopyranoside_qt	山药、百合
MOL009458	3-去甲基秋水仙碱	3-demethylcolchicine	山药、百合
MOL009449	伪原纤细薯蓣皂苷	26-O-beta-D-glucopyranosyl-3beta,26-dihydroxy-cholesten-16,22-dioxo-3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-beta-D-glucopyranoside_qt	山药、百合

**2.2 药物-疾病共同靶点筛选** 将 DrugBank, SwissTargetPrediction 中获得靶点去重后得到 239 个药物成分靶点。检索 GeneCards, OMIM, 其中 GeneCards 数据库中设定 score 值大于中位数 4.63, 共获得 2 065 个疾病靶点。维恩软件平台将 RSA 靶基因与补肾助孕方化合物潜在靶点取交集, 得到 133 个共同靶点, 见图 1。

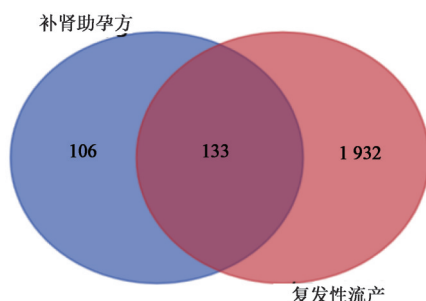


图 1 补肾助孕方-RSA 共同靶点数

Fig. 1 Common targets of Bushen Zhuyun prescription- RSA

**2.3 补肾助孕方-化合物-靶点-疾病网络图构建及分析** 分别将补肾助孕方的 49 个活性成分和 133 个药物-疾病共同靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建 BSZYF-化合物-靶点-RSA 网络图, 见图 2。考虑

到候选靶点较多, 根据 degree 值由大到小排序, 选取 degree $\geq$ 6 的靶点进行展示, 见表 2。图 3 由 151 个节点和 798 条边组成, 化合物度值排名前 6 为槲皮素 (quercetin), 山柰酚 (kaempferol), 木犀草素 (luteolin), 异鼠李素 (isorhamnetin), 花生四烯酸 (arachidonic acid),  $\beta$ -谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol) 分别对应 141, 46, 39, 32, 29, 22 推测为补肾助孕方治疗 RSA 较为有效的活性成分。

**2.4 构建 PPI 网络** 将 133 个共同靶点输入 STRING 数据库构建 PPI 网络, 网络中共有 133 个节点, 2 639 条边, 节点度数平均值为 39.7, 剔除掉游离节点, 构建图示, 见图 3。按 degree 值由大到小排序, 统计出频次前 25 靶点并绘制条形图, 见图 4, 可知该网络中 AKT1, VEGFA, IL6, TP53, TNF, EGF 等是整个核心蛋白, 存在较多的相互关系, 说明补肾助孕方可通过这些蛋白发挥治疗作用。PPI 网络中较高密度区域生物学意义比较高, 称为 module。为精确分析补肾助孕方用机制, 通过 MCODE 软件, 根据 score 值保留最佳评分的网络 module<sup>[10-12]</sup>, 见图 5。

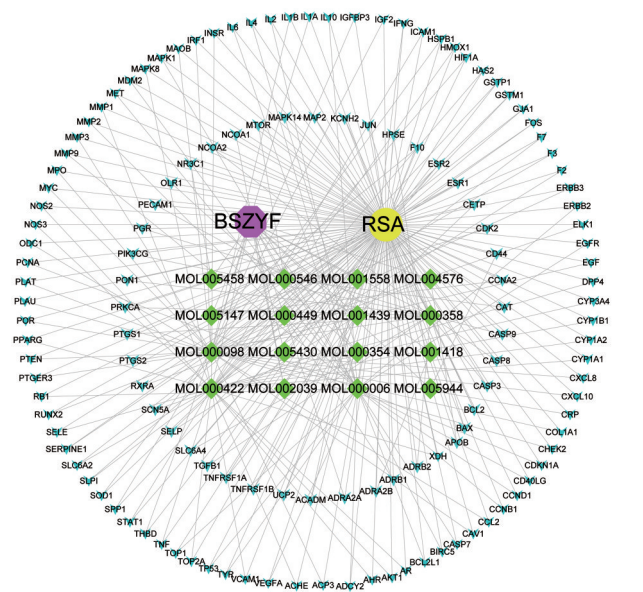


图2 补肾助孕方(BSZYF)-化合物-靶点-RSA网络  
Fig. 2 Bushen Zhuyun prescription-compounds-target-RSA network diagram

**2.5 GO功能和KEGG通路富集** GO富集取得470个细胞生物学过程,KEGG通路富集得到103条信号通路。设置 $P < 0.05$ ,根据 $\lg P$ 排序,选择前25个建立气泡图,图6,7。富集名称位于图左,气泡红色越深表示 $\lg P$ 值越大,气泡越大表示位于该通路基因越多,横轴表示输入基因在该通路基因的占比。GO富集分析主要与血管形态发生、发育,细胞增殖等生物学过程有关。KEGG富集分析主要触及PI3K/AKT信号通路,AGE/RAGE信号通路,TNF信号通路。PI3K/AKT信号通路上靶点基因最多,提示补肾助孕方可能通过调控多信号通路发挥作用。

**2.6 分子对接** 补肾助孕方主要化合物(槲皮素,山柰酚, $\beta$ -谷甾醇,木犀草素,异鼠李素,花生四烯酸)和潜在靶点的对接结合能均 $\leq -4.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $1 \text{ cal}\approx 4.186 \text{ J}$ ),初步推断补肾助孕方与潜在靶点有较好的结合活性,具体对接分数见表3。由表可知山柰酚(MOL000422)与各潜在靶点的对接结合能均 $< -6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。山柰酚与AKT1,VEGFA亲和力较强。分子对接模式图8(a),山柰酚结合到AKT1,与活性位点附近的谷氨酸40(GLU40),谷氨酰胺47(GLN47),赖氨酸39(LYS39)氨基酸形成氢键相互作用;图8(b),山柰酚结合到VEGFA,与甘氨酸59(GLY59),亮氨酸32(LEU32),亮氨酸66(LEU66),半胱氨酸68(CYS68),半胱氨酸57(CYS57)氨基酸形成氢键相互作用。

**2.7 补肾助孕方对PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达的影响** 与空白组比较,补肾助孕方低、中、高3

个剂量均可促进AKT1和VEGF蛋白表达,其中补肾助孕方中、高浓度组表达明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见表4。由此提示,补肾助孕方可显著促进HUVEC细胞AKT1蛋白表达,引起PI3K/AKT信号通路活化,上调VEGFA蛋白的表达,最终促进血管生成达到治疗RSA的目的。见图9,表4。

### 3 讨论

中医多从“滑胎”“数堕胎”论治该病,《景岳全书·妇人规》曰:“凡妊娠数堕胎者,必以气脉亏损而然……非先天之最完固者不能,而常人则未之有也。”中医认为病因责之脾肾亏虚、气血两虚、瘀热内阻及肝郁气滞,以脾肾亏虚为主,病机为肾脾亏虚,冲任受损,“虚则补之”是治疗原则。陈瑞雪教授自拟补肾助孕方由桑寄生、续断、菟丝子、酒女贞子、百合、山药、泽兰、益母草8味药组成。该方以填精益肾,活血调经为主,菟丝子、续断、桑寄生益肾精固冲任,女贞子滋补肝肾,肾旺自能荫胎,山药脾肾同调,益母草、泽兰祛瘀通经,祛离经之血,百合清心安神。诸药为伍,肾气旺盛,胎有所养,载养正常。

补肾助孕方主要化合物主要是槲皮素,山柰酚, $\beta$ -谷甾醇,异鼠李素,木犀草素,山柰酚,花生四烯酸。山柰酚、木犀草素属黄酮化合物。黄酮类化合物使下丘脑-垂体-性腺生殖轴对生殖的调节功能恢复,进而利于雌、孕激素的生成与释放,促进卵巢及子宫的质量增加,利于优质卵泡排出。同时能恢复卵巢的病理变化,增加卵巢各级卵泡总数,诱发优势卵泡<sup>[13]</sup>。菟丝子、桑寄生、女贞子、益母草均含有槲皮素,现代药理学证明槲皮素具备抑制单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的生成的作用,减少TNF合成,调控妊娠小鼠子宫环境、降低胚泡着床障碍率高等,利于胚胎着床<sup>[14-15]</sup>。另外,PI3K/AKT信号通路在异鼠李素的激活作用下显著抑制氧化应激反应,减少细胞损失<sup>[16-17]</sup>,调节子宫环境,益于内膜容受性提高。花生四烯酸可兴奋子宫,研究显示花生四烯酸在延长大鼠妊娠<sup>[18]</sup>方面作用关键。

PPI网络可知,补肾助孕方起效的关键蛋白主要是AKT1,VEGFA,TNF,IL6等。AKT1值最高,可促进细胞存活、发育和增殖等过程。血管生成发育离不开AKT1作用,因此缺乏易引起胎盘供养功能减弱,胚胎发育迟缓引发流产<sup>[19]</sup>。初期妊娠时母体-胎盘血管生成、重塑至关重要,子宫内膜血管生成和通透性在VEGFA的调节下,有利于子宫内膜蜕膜化,利于胚胎种植<sup>[20]</sup>。研究发现,先兆流产患

表 2 补肾助孕方治疗 RSA 的关键靶点

Table 2 Key targets of Bushen Zhuyun prescription for RSA

UniProt ID	基因名	靶点中文名	靶点英文名
P35354	PTGS2	前列腺素内过氧化物酶-2	prostaglandin G/H synthase 2
P55211	CASP9	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9	Caspase-9
P05412	JUN	转录因子 AP-1	transcription factor AP-1
P42574	CASP3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3	Caspase-3
Q14790	CASP8	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8	Caspase-8
P01137	TGFB1	转化生长因子 $\beta$ -1 原蛋白	transforming growth factor beta-1
P37231	PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
P29474	NOS3	内皮细胞一氧化氮合酶	nitric oxide synthase, endothelial
P31749	AKT1	RAC- $\alpha$ 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
P01375	TNF	肿瘤坏死因子	tumor necrosis factor
P45983	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	mitogen-activated protein kinase 8
P03956	MMP1	基质金属蛋白酶-1	matrix metalloproteinase-1
P42224	STAT1	信号转导与转录激活子 1	signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
P09601	HMOX1	血红素加氧酶 1	heme oxygenase 1
P05362	ICAM1	细胞间黏附分子 1	intercellular adhesion molecule 1
P16581	SELE	E-选择素	E-selectin
P19320	VCAM1	血管细胞粘附蛋白 1	vascular cell adhesion protein 1
P00533	EGFR	表皮生长因子受体	epidermal growth factor receptor
P15692	VEGFA	血管内皮生长因子 A	vascular endothelial growth factor A
P24385	CCND1	G <sub>1</sub> /S 特异性细胞周期蛋白 D <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> /S-specific cyclin-D <sub>1</sub>
Q07817	BCL2L1	Bcl-2-样蛋白 1	Bcl-2-like protein 1
P38936	CDKN1A	环素依赖激酶抑制剂 1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
P08253	MMP2	基质金属蛋白酶-2	matrix metalloproteinase-2
P14780	MMP9	基质金属蛋白酶-9	matrix metalloproteinase-9
P28482	MAPK1	丝裂原活化蛋白激酶 1	mitogen-activated protein kinase 1
P22301	IL10	白细胞介素-10	interleukin-10
P05231	IL6	白细胞介素-6	interleukin-6
P04637	TP53	细胞肿瘤抗原 p53	cellular tumor antigen p53
P04626	ERBB2	酪氨酸激酶受体 2	receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
P60568	IL2	白细胞介素-2	interleukin-2
P01579	IFNG	$\gamma$ -干扰素	interferon gamma
P05112	IL4	白细胞介素-4	interleukin-4
P08254	MMP3	基质金属蛋白酶-3	matrix metalloproteinase-3
P01100	FOS	原癌基因 c-Fos	proto-oncogene c-Fos
P00749	PLAU	尿激酶型纤溶酶原激活物	urokinase-type plasminogen activator

者子宫蜕膜中 VEGFA 表达明显低下<sup>[21-22]</sup>。TNF 作为多功能细胞因子,在卵巢、输卵管、子宫、胎盘和胚胎组织中均有表达。多数专家同意 TNF 是导致免疫性妊娠丢失的细胞因子之一,作为胚胎应激介质存在<sup>[23]</sup>。临床观察发现桑寄生、续断等补肾中药能提高妊娠成功率,降低患者 TNF 炎症因子,而

AKT1 表达升高<sup>[24]</sup>。

KEGG 富集通路结果表明靶点在多种通路的调控下,补肾助孕方可能调节 PI3K/AKT 信号通路, TNF 信号通路, AGE/RAGE 信号通路来发挥治疗作用。

早期妊娠中, AGE/RAGE 信号通路包含了

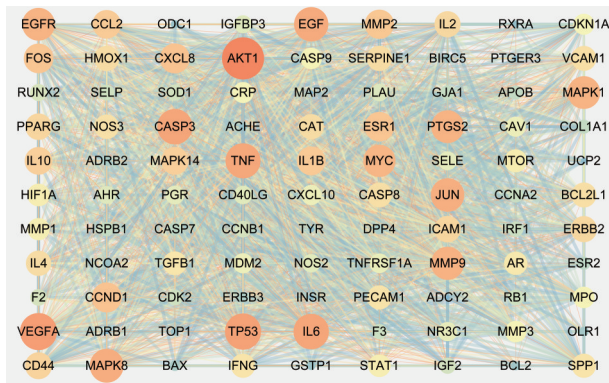


图 3 补肾助孕方治疗 RSA 的分子机制 PPI 网络

Fig. 3 Molecular mechanism of PPI network in treatment of RSA by Bushen Zhuyun prescription

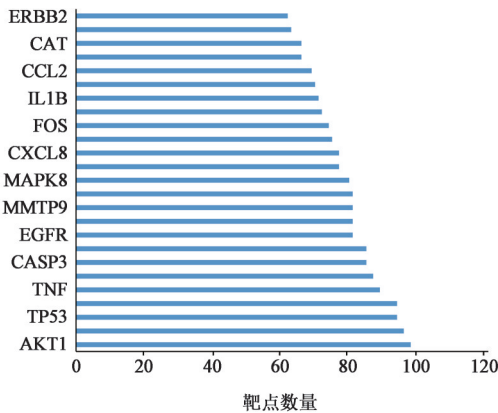


图 4 补肾助孕方治疗 RSA 的分子机制前 25 个作用靶点

Fig. 4 Top 25 action targets of molecular mechanism of Bushen Zhuyun prescription in treatment of RSA

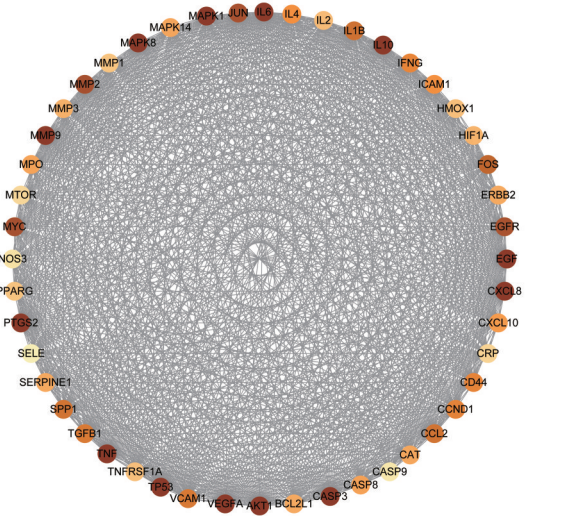


图 5 补肾助孕方治疗 RSA 核心 module 网络

Fig. 5 Bushen Zhuyun prescription treatment RSA core module of network

PI3K/AKT 被证实相关性高<sup>[25-26]</sup>。PI3K 及其下游 AKT 共同组成 PI3K/AKT 信号通路,在多条信号通路之间相互沟通中起承转作用。绒毛膜和胚胎组

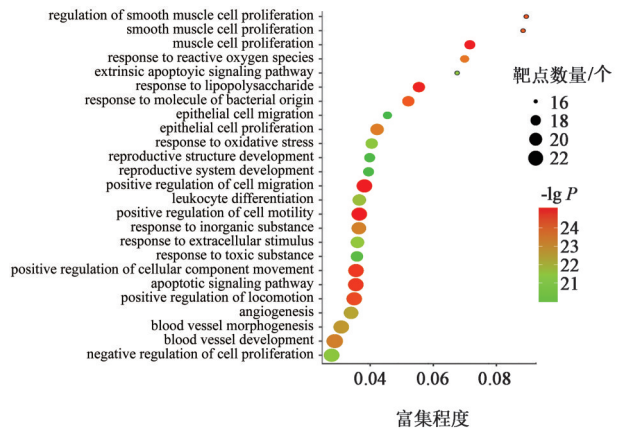


图 6 补肾助孕方治疗 RSA 的分子机制 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of molecular mechanism of Bushen Zhuyun prescription in treatment of RSA

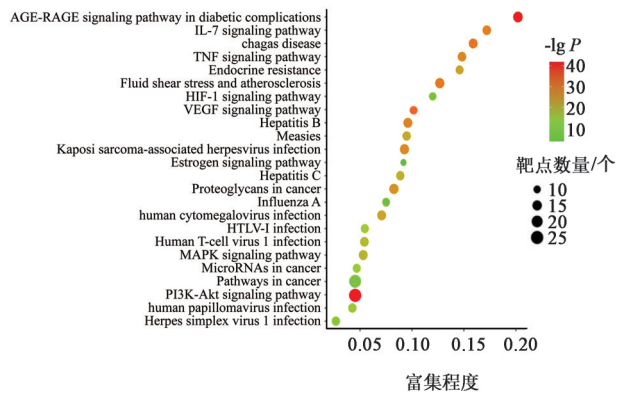


图 7 补肾助孕方治疗 RSA 的分子机制 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of molecular mechanism of Bushen Zhuyun prescription in treatment of RSA

表 3 补肾助孕方治疗 RSA 的分子对接结合能

Table 3 Molecular docking binding energy of Bushen Zhuyun prescription in treatment of RSA

化合物	AKT1	VEGFA	TNF	EGF	IL6	TP53
槲皮素	-5.99	-4.95	-6.17	-6.19	-5.76	-7.04
山柰酚	-7.67	-7.55	-6.71	-6.97	-6.83	-6.63
$\beta$ -谷甾醇	-5.22	-7.24	-7.01	-6.80	-7.12	-6.28
木犀草素	-6.62	-5.14	-6.26	-6.11	-4.67	-5.42
异鼠李素	-5.88	-7.43	-6.27	-5.51	-4.87	-4.96
花生四烯酸	-4.55	-4.69	-4.77	-4.90	-4.64	-4.63

织的血管化状态是维持早期妊娠的关键。研究证实,PI3K/AKT 信号通路不仅在维持细胞增殖、分化等过程中起到作用,血管的生成过程亦有调节<sup>[27]</sup>。FURMENTO 等<sup>[28]</sup>研究证明,PI3K/AKT 信号通路活化后有益于 VEGF 的分泌,在滋养层功能调节中可见,可促进血管发生,从而维持妊娠。若 PI3K/AKT 信号通路在早孕绒毛胎盘血管形成过程中受到抑制,以致胎盘绒毛血管形成障碍,造成流产<sup>[29]</sup>。TNF 作

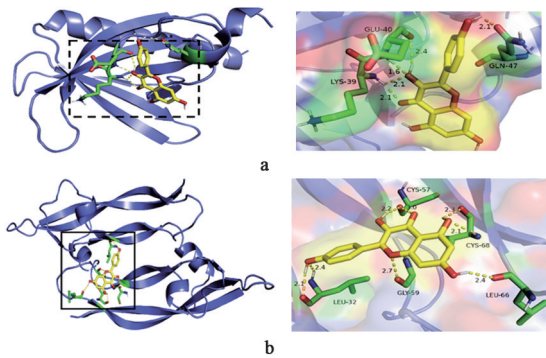


图8 山奈酚-AKT1(a)及山奈酚-VEGFA(b)分子对接模式  
Fig. 8 Molecular docking model of kaempferol-AKT1 (a) and kaempferol-VEGFA (b)

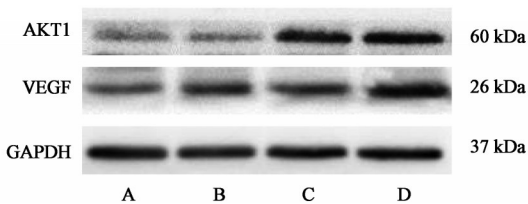


图9 补肾助孕方浓度不同培养条件下AKT1, VEGF表达电泳  
A. 正常组; B. BSZYF 12.5 mg·L<sup>-1</sup>组; C. BSZYF 25 mg·L<sup>-1</sup>组; D. BSZYF 50 mg·L<sup>-1</sup>组

图9 补肾助孕方浓度不同培养条件下AKT1, VEGF表达电泳  
Fig. 9 Electrophoresis of AKT1 and VEGF expression under different Bushen Zhuyun prescription concentrations

表4 补肾助孕方浓度不同培养条件下AKT1/VEGF表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Comparison of expression levels of AKT1/VEGF under different concentrations of Bushen Zhuyun prescription ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	AKT1/GAPDH	VEGF/GAPDH
正常		1.00±0.00	1.00±0.00
BSZYF	12.5	0.97±0.04	1.38±0.07 <sup>1)</sup>
	25	1.87±0.08 <sup>2)</sup>	1.40±0.03 <sup>1)</sup>
	50	1.91±0.11 <sup>2)</sup>	2.09±0.11 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01,设正常组各指标蛋白相对表达量均为1。

为TNF信号通路中重要的细胞因子,可以诱导多种细胞内信号通路。研究表明,妊娠期一定TNF因子有利于胚胎发育及促进孕妇能量代谢。ZOLTI等<sup>[30]</sup>认为卵泡液、黄体化卵泡颗粒细胞、卵丘及6~8细胞胚胎皆具备TNF活性。生理浓度下,胚胎早期发育过程以及稳定早期胚胎质量、母体免疫识别及黄体维持等具有关键作用。

分子对接显示补肾助孕方主要活性物质山奈酚与AKT1蛋白,VEGFA蛋白结合性较强。体外细胞实验结果证实补肾助孕方中、高浓度可明显促进AKT1蛋白表达,活化PI3K/AKT通路,上调VEGF

蛋白表达,最终促进母胎界面血管生成而利于怀孕早期胎盘的生成及早孕的维持,起到治疗RSA的作用。

结合网络药理学、分子对接和细胞实验的结果,本研究初步揭示了补肾助孕方可通过活化PI3K/AKT通路治疗RSA。补肾助孕方的靶标基因通过激活PI3K/AKT通路,促进VEGF蛋白的表达,利于内皮细胞生成、复制,增加血管内皮细胞存活,改善血管重塑,促进内膜蜕膜化,利于胚胎种植,继续妊娠<sup>[31]</sup>。

综上所述,研究基于网络药理学结合体外细胞实验初步明确了补肾助孕方“多成分-多靶点-多通路”的治疗促进母胎界面血管发生,维持妊娠,治疗RSA的结论,为中药制剂普及应用提供依据。但该研究过程未明确补肾助孕方配伍关系、服用方法及煎煮时间,因此有待动物实验和稳定性试验明确。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] PRACTICE COMMITTEE of the AMERICAN SOCIETY for REPRODUCTIVE MEDICINE. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion[J]. Fertil Steril, 2012, 9(5): 1103-1111.

[2] 马韵,郑梅玲. 不明原因复发性流产发病机制研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2016, 12(2):237-240.

[3] KANNDORP S P, GODDIJN M, HUTTEN B A, et al. Aspirin plus heparin or aspirin alone in women with recurrent miscarriage[J]. N Engl J Med, 2010, 362(17):1586-1596.

[4] 陈莎. 补肾助孕方治疗复发性流产的网络药理学研究及临床观察[D]. 北京:北京中医药大学, 2019.

[5] 车蕊. 补肾助孕方对肾虚型复发性流产患者子宫内膜容受性影响的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2020.

[6] 张华敏,刘思鸿,高宏杰,等. 复方中药网络药理学方法研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(10):1270-1273, 1276.

[7] TIAN S, WANG J, LI Y, et al. Drug-likeness analysis of traditional chinese medicines: prediction of drug-likeness using machine learning approaches[J]. Mol Pharm, 2012, 9(10):2875-2886.

[8] 庞爽,赵栓,徐夏莲,等. 基于网络药理学和体外细胞实验分析黄芪治疗IgA肾病的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, doi: 10.13422/j.cnki.

- syfjx. 20210848.
- [9] 宗阳,姚卫峰,单进军,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻清宣止咳颗粒治疗儿童新型冠状病毒肺炎活性化合物[J]. 世界中医药,2020,15(4):477-483.
- [10] 幸彩梅,钟菊珍,范世珍,等. 寿胎丸治疗对反复自然流产患者Th17/Treg细胞表达水平的影响[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(1):14-15,19.
- [11] ZYGMUNT M, HERR F, MUNSTEDT K, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003, 110(Suppl 1): S10-S18.
- [12] NEWTON H B. Molecular neurooncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2004,4(1):105-128.
- [13] 杨斌,周文清,陈莎,等. 补肾助孕方对肾虚薄型子宫内膜大鼠内膜容受性的影响及机制研究[J]. 世界中医药,2020,15(17):2565-2569.
- [14] SONG D, CHENG L, ZHANG X, et al. The modulatory effect and the mechanism of flavonoids on obesity[J]. J Food Biochem,2019,43(8):e12954.
- [15] 卢浩,吴雷振,张瑞平,等. 槲皮素对细菌脂多糖诱导流产小鼠子宫蜕膜巨噬细胞功能的影响[J]. 解剖学杂志,2018,41(4):391-394.
- [16] 余洁,彭哲,谢婷,等. 木犀草素对哮喘患儿外周血单核细胞TNF- $\alpha$ 和IL-6分泌的影响及机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2019(13):1580-1583.
- [17] WANG J, GONG H M, ZOU H H, et al. Isorhamnetin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells [J]. Mol Med Rep, 2018,17(1):648-652.
- [18] 缪存静,陈俊杰,厉星,等. 木犀草素逆转由TGF- $\beta_1$ 诱导的人肺癌细胞上皮-间充质转化的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(7):1163-1168.
- [19] PLAKS V, BERKOVITZ E, VANDOORNE K, et al. Survival and size are differentially regulated by placental and fetal PKB a/Akt1 [J]. Biol Reprod, 2011, 84(3):537-545.
- [20] BINDER N K, EVANS J, GARDNER D K, et al. Endometrial signals improve embryo outcome: functional role of vascular endothelial growth factor isoforms on embryo development and implantation in mice[J]. Hum Reprod, 2014, 29(10):2278-2286.
- [21] 植枝福,刘俐伶,杨文梅,等. 绒毛中表皮生长因子受体和血管内皮生长因子的表达对早孕绒毛血管生成的影响及与稽留流产的关系[J]. 中华生殖与避孕杂志,2017,37(10):793-796.
- [22] 郭文,温勤坚,白玲,等. 雌、孕激素受体在不明原因性复发性流产蜕膜组织中的表达及意义[J]. 包头医学院学报,2017,33(11):81-83.
- [23] TODER V, FEIN A, CARP H, et al. TNF- $\alpha$  in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? [J]. J Assist Reprod Genet, 2003, 20(2): 73-81.
- [24] 杨碧蓉,周华. 寿胎丸加味联合黄体酮及低分子肝素治疗复发性流产的临床观察[J]. 世界中医药,2019, 14(6):1502-1506.
- [25] 彭尧. 脾肾双补方经 p38MAPK-MMPs/TIMPs 级联信号通路调控滋养细胞侵袭活力和相关免疫因子的机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2018.
- [26] FABI F, GRENIER K, PARENT S, et al. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177387.
- [27] YU X, PENG Y, LIANG H, et al. TSLP/TSLPR promote angiogenesis following ischemic stroke via activation of the PI3K/AKT pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2):3411-3417.
- [28] FURMENTO V A, MARINO J, BLANK V C, et al. The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) up regulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells[J]. Placenta, 2014, 35(11):937-946.
- [29] 夏妍芬,植枝福,梁爽,等. PI3K/AKT通路在稽留流产发病中的作用研究[J]. 广西医科大学学报,2020, 37(11):2003-2008.
- [30] ZOLTI M, BEN-RAFAEL Z, MEIROM R, et al. Cytokine involvement in oocytes and early embryos [J]. Fertil Steril, 1991, 56(2):265-272.
- [31] 刘丹,叶杨阳,程旭阳,等. 寿胎丸治疗先兆流产作用机制的网络药理学分析[J]. 中医药导报, 2020, 26(10):171-177,185.

[责任编辑 周冰冰]