

· 配伍 ·

基于网络药理学研究和细胞实验验证探讨菟丝子-丹参调控 IL-6/STAT3 信号通路治疗复发性流产的作用机制

王浩贤^{1,2}, 李久现^{1*}, 刘妍^{1,2}, 孙烁^{1,2}, 李香玉^{1,2}, 张柯^{1,2}, 王玉玉^{1,2}

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000;

2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:通过网络药理学、分子对接和细胞实验验证,研究菟丝子-丹参治疗复发性流产(RSA)的作用机制。方法:利用中药系统药理学平台(TCMSP)数据库和UniPort数据库筛选并整理菟丝子-丹参的活性成分与相应靶点。利用在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、GeneCards、DrugBank、疾病基因网络(DisGeNET)、疗效药靶数据库(TTD),收集RSA的潜在治疗靶点。通过构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图,并进行拓扑分析,筛选出菟丝子-丹参治疗RSA的潜在核心靶点。同时,利用基因功能注释与整合发现数据库(DAVID)对筛选出的交集靶点进行富集分析。在此基础上,采用AutoDock软件进行分子对接验证,再将数据导入PyMOL软件进行可视化构图。最后,通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)实验、Transwell实验和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测评估菟丝子-丹参含药血清对滋养细胞(HTR-8/SVneo细胞)的影响,并观察对白细胞介素(IL)-6/信号转导和转录激活因子3(STAT3)通路及相关蛋白表达的影响。结果:通过网络药理学分析,共获得69个菟丝子-丹参的活性成分,73个潜在治疗靶点,筛选得到IL-6、IL-10、STAT3等17个核心靶点。73个共有靶点富集于614个基因本体(GO)条目和57条京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路。分子对接结果提示IL-6、STAT3与苦参碱、隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A等活性成分具有较好的结合力。细胞实验结果表明,与空白组比较,菟丝子-丹参含药血清作用24 h后,HTR-8/SVneo细胞的存活率与侵袭率明显上升($P<0.05$),IL-6/STAT3信号通路及通路相关蛋白IL-10和细胞髓细胞瘤基因(c-Myc)的表达均明显升高($P<0.05$),含药血清组的作用趋势与通路激动剂一致。结论:菟丝子-丹参药对可能通过激活IL-6/STAT3信号通路,上调通路下游因子IL-10和c-Myc的表达,改善滋养细胞的存活率和侵袭活性,从而防治RSA。

[关键词] 网络药理学; 分子对接; 菟丝子-丹参; 复发性流产; 白细胞介素(IL)-6/信号转导和转录激活因子3(STAT3)信号通路

[中图分类号] R282;R259;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2025)20-0022-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251001

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250624.0957.003>

[网络出版日期] 2025-06-24 11:08:56 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanism of Cuscutae Semen-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma in Regulating IL-6/STAT3 Signaling Pathway to Treat Recurrent Spontaneous Abortion Based on Network Pharmacology and Cell Experiment Validation

WANG Haoxian^{1,2}, LI Jiuxian^{1*}, LIU Yan^{1,2}, SUN Shuo^{1,2}, LI Xiangyu^{1,2}, ZHANG Ke^{1,2}, WANG Yuyu^{1,2}

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. The First Clinical Medical School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of action of Cuscutae Semen-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma in

[收稿日期] 2025-03-19

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20230689);河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(2022JDZX011);河南省重点研发专项(241111310900)

[第一作者] 王浩贤,在读硕士,从事中医药防治复发性流产研究,E-mail:wanghaoxian2000@163.com

[通信作者] *李久现,博士,副主任医师,硕士生导师,从事中医药防治复发性流产研究,E-mail:lijouxian1982@163.com

the treatment of recurrent spontaneous abortion (RSA) through network pharmacology, molecular docking, and cell experiment verification. **Methods:** The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and UniPort databases were used to screen and organize the active ingredients and corresponding targets of *Cuscutae Semen-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*. The potential therapeutic targets of RSA were screened in Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), GeneCards database, DrugBank database, DisGeNET database, and Therapeutic Target Database (TTD). The potential core targets of *Cuscutae Semen-Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* for treating RSA were further screened by constructing a protein-protein interaction (PPI) network and topological analysis. Meanwhile, the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) was chosen to perform enrichment analysis on intersection targets. On this basis, AutoDock software was used for molecular docking, and the data were imported into PyMOL software for visualization and composition. Finally, the cell counting kit-8 (CCK-8) experiment, Transwell cell invasion assay, and Western blot were used to detect the effects of serum containing *Cuscutae Semen-Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* on HTR-8/SVneo cells and observe the effects on the interleukin (IL)-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway and related proteins. **Results:** Through network pharmacology analysis, a total of 69 active ingredients, 73 potential therapeutic targets, and 17 core targets, including IL-6, IL-10, and STAT3, were collected. The 73 common targets were enriched in 614 Gene Ontology (GO) entries and 57 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathways. The molecular docking results indicated that IL-6 and STAT3 had good binding ability with the main active ingredients, including matrine, cryptotanshinone, and tanshinone II_A. The cell experiment results showed that, compared with those of the control group, after 24 hours of treatment with the drug-containing serum, the survival and invasion rates of HTR-8/SVneo cells were significantly increased ($P<0.05$), and the expression of IL-6/STAT3 signaling pathway and related proteins IL-10 and c-Myc was significantly elevated ($P<0.05$). Moreover, the trend of action in the drug-containing serum group was consistent with that of pathway agonists. **Conclusion:** *Cuscutae Semen-Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* may enhance the survival rate and invasive activity of HTR-8/SVneo cells to further prevent and treat RSA by activating the IL-6/STAT3 signaling pathway and upregulating the expression of downstream factors IL-10 and c-Myc in the pathway.

[Keywords] network pharmacology; molecular docking; *Cuscutae Semen-Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; recurrent spontaneous abortion; interleukin (IL)-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway

复发性流产(RSA)作为临床中常见的妊娠期不良现象,指与同一性伴侣在妊娠未满28周时,连续发生2次及以上的妊娠丢失^[1]。RSA的发病率约为1%~5%^[2],且近年来呈现出逐年递增的趋势,而对于连续发生3次自然流产的患者而言,其后续妊娠的再丢失风险可高达40%~80%,严重影响患者的身心健康。RSA的病因十分复杂,当前研究发现胚胎染色体异常、免疫系统功能紊乱、血栓前状态及内分泌功能失调等是RSA的主要致病因素^[3-4]。近年来,越来越多研究表明,RSA的发生与绒毛外滋养细胞(EVT)增殖及侵袭功能的减退显著相关^[5]。若妊娠早期滋养细胞浸润减少,则影响胚胎植入,并且导致子宫螺旋动脉重铸受阻,继而胚胎缺血、缺氧,从而引发流产^[6]。现代医学多以对症治疗为主,采用低分子肝素等防治母胎界面微循环障碍^[7],但治疗效果有限,不能改善滋养细胞侵袭能力,并且长期使用后存在肝肾功能损伤、阴道出血等不良反应,因此在药物有效性及安全性方面仍存在争议^[8]。

中医药治疗RSA疗效确切,该病在中医学中被归属为“滑胎”“数堕胎”“屡孕屡堕”等范畴,肾虚血瘀是其重要发病机制^[9-10]。菟丝子-丹参是河南中医药大学第一附属医院临床经验方“补肾活血方”的核心药对,方中菟丝子益肾填精为君,丹参活血养

胎为臣,二者协同,发挥补肾活血,稳固胎元的功效。现代临床安胎药物应用中,菟丝子因其补肾安胎疗效显著,成为高频首选药物^[11]。《本草纲目》亦记载,丹参作为妇科要药,具有“破宿血、补新血、安生胎”的功效,临床广泛应用于妊娠类疾病^[12-13]。现有研究发现,菟丝子^[14]、丹参^[15]的有效成分能够促进滋养细胞增殖、侵袭,改善母胎界面的微循环障碍,调控妊娠早期子宫动脉血流,从而促进胎盘着床。然而,目前关于菟丝子-丹参联合治疗RSA的潜在靶点及分子作用机制尚未明确。

因此,本研究结合网络药理学原理与分子对接验证,对菟丝子-丹参治疗RSA的潜在活性成分及核心靶点进行分析。同时,基于网络药理学结果,以白细胞介素(IL)-6/信号转导和转录激活因子3(STAT3)信号通路为切入点,选择IL-6、磷酸化(p)-STAT3、STAT3、IL-10、细胞髓细胞瘤基因(c-Myc)作为研究靶点,对菟丝子-丹参改善滋养细胞侵袭的机制进行实验验证,以期阐明菟丝子-丹参防治RSA的分子作用机制,为其广泛应用于临床提供依据。

1 材料

1.1 动物和细胞 SPF级雌性SD大鼠10只,体重(230±20)g,购于河南华兴实验动物养殖场[动物

合格证号 SCXK(豫)2019-0002],统一饲养于河南中医药大学第一附属医院实验动物中心,环境温度约为 23 °C,相对湿度约为 50%,自由饮食饮水,实施 12 h 明暗循环照明。本实验获得河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会批准(批准文号 YFYDW2024023/B)。人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/Svneo),购于武汉普诺赛科技有限公司(货号 CL-0765)。

1.2 药物和试剂 菟丝子、丹参购于河南中医药大学第一附属医院,药对组成为菟丝子 30 g、丹参 15 g,加水煎煮 2 次后浓缩药液,配制药物质浓度为 2.6 g·L⁻¹ 的溶液,4 °C 冷藏,备用。STAT3、IL-6、IL-10 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bsm-33223M、bs-6309R、bs-0698R); p-STAT3 (上海雅酶生物医药科技有限公司,批号 P010477); c-Myc(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 10828-1-AP); 6-甲氧基二氢白屈菜红碱(Angoline)抑制剂(上海陶术生物科技有限公司,批号 TN6739); 重组人白细胞介素-6(rIL-6)激动剂(北京云克隆生物科技有限公司,批号 RPA079Hu02); 胎牛血清(北京赛澳美细胞技术有限公司,批号 SA201.02); RPMI1640 培养基(武汉普诺赛科技有限公司,批号 PM150110); 青霉素-链霉素混合液、胰蛋白酶、BCA 蛋白测定试剂盒、苯甲磺酰氟(PMSF)、显色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 P1400、T1350、PC0020、P0100、SQ201); 细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(武汉亚科因生物技术有限公司,批号 BMU106-CN); 放射免疫沉淀法裂解缓冲液(RIPA)裂解液、蛋白酶抑制剂、Tris 缓冲盐溶液(TBST)、脱脂奶粉(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号分别为 PC101、GRF101、PS103S、PS112); 山羊抗兔荧光二抗(美国 BioWorld 公司,批号 BS12378); PVDF 膜(德国默克 Millipore 公司,批号 ISEQ00010)。

1.3 仪器 311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); CF1524R 型冷冻离心机(美国 Scilogex 公司); Spark 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); ICX541 型荧光倒置显微镜[舜宇光学科技(集团)有限公司]; YY-Mini PRO 型迷你垂直电泳槽(北京研雨科技有限公司); Mini Trans-Blot 型迷你转印槽(美国 Bio-Rad 公司); Amersham Imager 600 型凝胶成像系统(美国 Cytiva 公司); 710001 型细胞刮刀(无锡耐思生命科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学及分子对接分析

2.1.1 菟丝子-丹参药物活性成分筛选及靶点收集

利用中药系统药理学平台(TCMSP, <https://www.91tcmsp.com/>),以“菟丝子”“丹参”为关键词,检索药物的有效活性成分。在此基础上,基于口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 的筛选标准,获得药物的有效成分及其相关靶点。随后,通过 UniPort 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对筛选出的靶点名称进行标准化规范处理。

2.1.2 RSA 疾病靶点收集 利用在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.com/>)、疾病基因网络(DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>)、疗效药靶数据库(TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库,以“recurrent spontaneous abortion”为关键词进行检索,收集 RSA 的潜在作用靶点,并且以 Relevance score≥10 为标准,从 GeneCards 数据库中筛选疾病相关靶点。整合以上数据库中收集的靶点信息,剔除重复靶点,得到 RSA 的相关靶点。

2.1.3 菟丝子-丹参药对及 RSA 共有靶点筛选 采用 Jvenn 网站(<https://jvenn.toulouse.inra.fr/app/index.html>)将筛选得到的药物靶点与疾病靶点进行交集分析,并绘制韦恩图,以获得菟丝子-丹参治疗 RSA 的潜在作用靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及核心靶点筛选 将交集靶点信息输入 STRING 12.0 数据库(<https://cn.string-db.org/>),物种设定为“Homo sapiens”,置信度>0.7,获得共有靶点的 PPI 网络图。随后,将所得的数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,设置度中心性(Degree)与中介中心度(BC)筛选核心靶点,最终构建活性成分-核心靶点网络图。

2.1.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 将药物-疾病的共有靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),设置物种为“Homo sapiens”,以 P<0.05 为筛选标准,进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析。将收集到的通路信息导入 ImageGP 网站(<https://www.bic.ac.cn/ImageGP/>),进行信号通路可视化分析。最后,再次利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建信号通路-核心靶点网络图。

2.1.6 分子对接验证及可视化构图 依据活性成分-核心靶点网络图和信号通路-核心靶点网络图,

对关键靶点及其相关的药物成分进行分子对接验证。首先,选择 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载主要靶点的3D结构,保存为PDBQT文件,导入PyMOL软件与AutoDock软件中进行预处理,包括除水、加氢等步骤。接着,选择TCMSP数据库和PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索活性成分的3D结构,并保存为mol2文件。将预处理后的3D文件导入AutoDock,采用Lamarckian遗传算法进行对接分析,以结合能(binding energy) $\leq -5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 为标准筛选对接结果。最后,将对接数据导入PyMOL软件进行可视化构图。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 含药血清制备 10只大鼠被随机分为空白组和菟丝子-丹参组,每组5只。菟丝子-丹参组每日给予药液 $19.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,空白组给予等量生理盐水灌胃。每组大鼠连续灌胃5 d。末次灌胃1 h后,经腹腔注射戊巴比妥钠实施麻醉,在无菌条件下于腹主动脉采集血样。离心后,合并同组血清并混匀,密封置于 $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min,再经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤除菌,分装保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2.2.2 抑制剂组与激动剂组的药物制备 将通路抑制剂Angoline、激动剂rIL-6分别加入空白血清稀释,最终制备质量浓度为 $185.3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Angoline培养液(10%空白血清)与质量浓度为 $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的rIL-6培养液(10%空白血清)。

2.2.3 细胞培养与分组 人绒毛膜滋养层细胞(HTR-8/SVneo细胞)被置于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。次日换液,待细胞融合度达到90%左右时弃去瓶中培养基,用PBS清洗2次,加入胰酶1 mL进行消化,并于显微镜下观察。将传代的HTR-8/SVneo细胞分为5组:空白组(10%空白血清)、中药低剂量组(5%含药血清+5%空白血清)、中药高剂量组(10%含药血清)、Angoline组(10%含药血清)、rIL-6组(1%含药血清)。

2.2.4 体外实验 ①CCK-8细胞活性检测,取对数生长期细胞,将其以 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液形式接种于96孔板内,先将板在培养箱中预培养24 h。弃去培养基,PBS清洗2次,向各组细胞中分别加入预先制备的培养基,并继续于培养箱中培养24 h和48 h。随后,弃去培养基,加入CCK-8反应液 $10 \text{ }\mu\text{L}$,在培养箱孵育2 h,利用酶标仪测量450 nm处的各孔吸光度A,比较细胞最终存活率,实验过程重复3次。②Transwell细胞侵袭实验,取对数生长期细胞,

Transwell小室用每孔Matrigel $50 \text{ }\mu\text{L}$ 在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 凝固2 h预先包被后再铺细胞。将复苏后的细胞进行加药预处理,24 h后接种于12孔板中,胰蛋白酶消化细胞。调整细胞密度后,Transwell下室加入胎牛血清(FBS)完全培养基 $400 \text{ }\mu\text{L}$,Transwell上室加入不含血清的细胞悬液 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 。 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中培养24 h,用4%多聚甲醛固定化处理25 min。随后,生理盐水清洗3次,加入结晶紫染色剂染色40 min后,在3个不同的可见光视野随机选择侵袭细胞进行计数,实验过程重复3次,计算侵袭率,从而评估HTR-8/Svneo细胞的侵袭能力。③蛋白免疫印迹法(Western blot)检测,将 2×10^5 个细胞/孔加入6孔板,按不同分组加入培养液培养24 h,弃去原培养基,PBS冲洗3次,每孔加入RIPA裂解液 $100 \text{ }\mu\text{L}$,每1 mL裂解液中包含PMSF($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $10 \text{ }\mu\text{L}$ 和蛋白酶抑制剂($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $10 \text{ }\mu\text{L}$ 。冰上裂解15 min,随后于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径10.8 cm),取上清液,将其转移至 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心管中保存。选择BCA法测蛋白浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电泳结束之后进行转膜,5%TBST脱脂奶粉封闭2 h,TBST洗膜3次。加入一抗(IL-6、p-STAT3、STAT3、IL-10, 1:1 000;c-Myc, 1:2 000),并于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,之后恢复至室温。再次TBST洗膜3次,加入二抗(1:10 000)室温孵育1 h。利用ECL显色液显现条带后,分析蛋白表达水平,实验过程重复3次。

2.2.5 统计学分析 采用SPSS 27.0统计软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式呈现,对于正态分布且方差齐的数据,采用单因素方差分析,并以最小显著性差异法(LSD)进行组间多重比较。若数据非正态分布,则选用多个独立样本的非参数检验,若方差不齐,则使用Games Howell法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 菟丝子-丹参治疗RSA的网络药理学机制及分子对接分析

3.1.1 菟丝子-丹参活性成分及靶点 通过检索TCMSP数据库,得到菟丝子-丹参药对的活性成分69个,其中菟丝子10个,丹参59个,具体成分信息见增强出版附加材料。通过TCMSP数据库收集及经过UniProt数据库整理,整理后获得69个活性成分,共收集251个相对应的潜在靶点。

3.1.2 菟丝子-丹参药对治疗RSA相关靶点筛选 通过检索 OMIM、GeneCards、DrugBank、

DisGeNET、TTD数据库,删除重复靶点后共检索到疾病靶点372个,其中TTD数据库并未检索到RSA相关靶点。利用Jvenn网站,将疾病靶点与菟丝子-丹参的药物靶点取交集,共得到73个共有靶点。见增强出版附加材料。

3.1.3 PPI分析及核心靶点筛选 将收集73个共有靶点导入STRING数据库后,以置信度 >0.7 为标准,获得72个靶点的PPI数据,从而构建PPI网络图,见增强出版附加材料。再将数据导入Cytoscape软件,通过拓扑分析,以中位数的2倍为标准筛选出核心靶点(Degree >28 ,BC >0.02),构建活性成分-核心靶点网络图,见增强出版附加材料。根据Degree值从大到小排序,17个核心靶点为蛋白激酶B(Akt1)、趋化因子配体8(CXCL8)、IL-10、IL-1 β 、IL-6、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、STAT3、肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤蛋白P53(TP53)、干扰素- γ (IFN- γ)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、表皮生长因子(EGF)、前列腺素内过氧化物合成酶2(PTGS2)、分化簇44(CD44)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和细胞间黏附分子1(ICAM1)。根据分析结果推断,这些靶点可能为菟丝子-丹参治疗RSA的核心靶点。

3.1.4 GO和KEGG富集分析 采用DAVID数据库共获得614个GO条目,包括生物过程(BP)493个,分子功能(MF)72个,细胞组分(CC)49个。GO分析主要包括3部分,其中BP涉及对基因表达的正向调控、对细胞增殖的正向调节、缺氧响应、对RNA聚合酶II启动子转录的正向调控及炎症反应等;CC则主要聚焦于细胞外空间、细胞外区、细胞表面、内质网内腔、质膜、核质、染色质等;MF主要涉及酶结合、同源蛋白质结合、细胞因子活性、类固醇结合等。由此表明,菟丝子-丹参药对通过多个生物途径治疗RSA。根据P值,分别取GO分析前10条进行可视化构图,具体结果见增强出版附加材料。

共获得57条相关的KEGG通路,筛选出P值排名前20的信号通路进行可视化处理,从而构建关键通路-核心靶点网络图。这些通路中与血管生成相关的有HIF-1信号通路;参与炎症反应的通路有NF- κ B、TNF及IL-17信号通路等;调控细胞凋亡机制的则涉及细胞凋亡信号通路、p53信号通路、酪氨酸蛋白激酶(JAK)/STAT信号通路和细胞衰老信号通路等;信号转导相关的通路主要有丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路;与激素调节的通路主要包括内分泌抵抗通

路。由此可推测,菟丝子-丹参药对可以通过调控多条信号通路要对RSA产生治疗作用,具体结果见增强出版附加材料。

3.1.5 分子对接 通过AutoDock软件对菟丝子-丹参药对的核心靶点与对应的活性成分进行分子对接,根据结合能预测蛋白质(靶点)和小分子(活性成分)的结合能力,当结合能 ≤ -5 kJ \cdot mol $^{-1}$ 时提示成分与靶点间结合能力较好。核心靶点STAT3(PDB ID:6NJS)、IL-6(PDB ID:1A1U)分别与苦参碱、槲皮素、木犀草素、隐丹参酮、丹参酮II_A对接,具体结果见表1。结果表明,核心靶点与对应的活性成分结合能力较好,尤其是与苦参碱、隐丹参酮及丹参酮II_A的结合,具体分子对接结果见增强出版附加材料。

表1 STAT3、IL-6分子对接结合能

Table 1 Binding energy of molecular docking of STAT3, IL-6

活性成分	kJ \cdot mol $^{-1}$	
	STAT3	IL-6
苦参碱	-6.89	-6.46
槲皮素	-6.31	-6.35
木犀草素	-7.36	-6.41
隐丹参酮	-7.90	-6.62
丹参酮II _A	-7.01	-6.48

3.2 菟丝子-丹参对滋养细胞的干预作用

3.2.1 CCK-8细胞活性检测 培养24 h后,与空白组比较,中药低、高剂量组及rIL-6组的细胞存活率均有明显升高($P<0.05$),Angoline组的细胞存活率明显下降($P<0.05$);与中药低剂量组比较,中药高剂量组的细胞存活率明显提升($P<0.05$),而Angoline组的细胞存活率则明显降低($P<0.05$)。值得注意的是,rIL-6组与中药低剂量组之间的细胞存活率并无统计学意义。

进一步培养至48 h后,与空白组比较,中药高剂量组的细胞存活率略有上升,而中药低剂量组与rIL-6组的细胞存活率则有所下降,Angoline组的细胞存活率依旧明显下降($P<0.05$)。与中药低剂量组比较,中药高剂量组与rIL-6组的细胞存活率有所升高,但Angoline组的细胞存活率明显下降($P<0.05$)。因此,研究结果提示菟丝子-丹参对HTR-8/SVneo细胞存活率的影响具有剂量依赖性,且培养24 h后细胞存活率升高更为显著,故后续实验决定以24 h作为最佳干预时间。见表2。

3.2.2 Transwell细胞侵袭实验 与空白组比较,中

表2 菟丝子-丹参含药血清对HTR-8/Svneo细胞存活率的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of medicated serum of Cuscutae Semen-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma (CSSM) on survival rate of HTR-8/Svneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	体积分数/%	24 h细胞存活率	48 h细胞存活率
空白组		100.000±0.017	100.000±0.057
中药低剂量组	5	128.608±0.015 ^{1,3)}	94.010±0.124 ³⁾
中药高剂量组	10	135.608±0.015 ^{1,2,3,4)}	111.388±0.054 ³⁾
Angoline组	10	65.068±0.018 ^{1,2,4)}	59.723±0.084 ^{1,2,4)}
rIL-6组	1	127.395±0.004 ^{1,3)}	95.109±0.146 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与中药低剂量组比较²⁾ $P<0.05$;与Angoline组比较³⁾ $P<0.05$;与rIL-6组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表3和表4同)

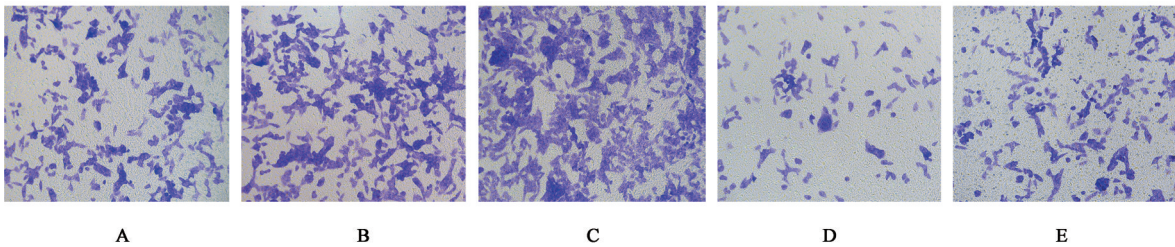
药低剂量组与高剂量组明显提升HTR-8/SVneo细胞的侵袭率($P<0.05$),而Angoline组明显降低细胞

侵袭率($P<0.05$)。rIL-6组虽相较于空白组细胞侵袭率有所升高,但差异无统计学意义。与中药低剂量组比较,中药高剂量组明显提高了细胞侵袭率($P<0.05$),而Angoline组与rIL-6组的细胞侵袭率则明显下降($P<0.05$)。菟丝子-丹参对HTR-8/SVneo细胞侵袭能力的影响呈剂量依赖性。见表3、图1。

表3 菟丝子-丹参含药血清对HTR-8/Svneo细胞侵袭率的影响
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of medicated serum of CSSM on invasion rate of HTR-8/Svneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	侵袭率/%
空白组		108.000±10.149
中药低剂量组	5	252.667±15.177 ^{1,3,4)}
中药高剂量组	10	322.333±20.744 ^{1,2,3,4)}
Angoline组	10	73.000±5.292 ^{1,2,4)}
rIL-6组	1	108.333±7.024 ^{2,3)}



注:A.空白组;B.中药低剂量组;C.中药高剂量组;D.Angoline组;E.rIL-6组(图2同)

图1 菟丝子-丹参含药血清对HTR-8/Svneo细胞侵袭情况的影响(结晶紫×200)

Fig. 1 Effect of medicated serum of CSSM on invasion status of HTR-8/Svneo cells (crystalline purple ×200)

3.2.3 Western blot结果 与空白组比较,中药低、高剂量组及rIL-6组中IL-6、p-STAT3/STAT3、IL-10、c-Myc蛋白表达均明显升高($P<0.05$),Angoline组中各蛋白表达则明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与中药低剂量组比较,中药高剂量组中

IL-6、p-STAT3/STAT3、IL-10、c-Myc蛋白表达水平进一步明显升高($P<0.05$),Angoline组中各蛋白表达明显下降($P<0.05$)。中药高剂量组中IL-6、p-STAT3/STAT3、IL-10、c-Myc蛋白表达均高于rIL-6组($P<0.05$)。见表4、图2。

表4 菟丝子-丹参含药血清对HTR-8/Svneo细胞蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of medicated serum of CSSM on protein expression level of HTR-8/Svneo cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	IL-6/GAPDH	p-STAT3/STAT3	IL-10/GAPDH	c-Myc/GAPDH
空白组		0.682±0.086	0.576±0.154	0.454±0.122	0.586±0.075
中药低剂量组	5	1.199±0.201 ^{1,3,4)}	0.784±0.041 ^{1,3)}	1.099±0.162 ^{1,3)}	1.131±0.162 ^{1,3,4)}
中药高剂量组	10	1.439±0.190 ^{1,3,4)}	0.809±0.103 ^{1,3,4)}	1.306±0.138 ^{1,3)}	1.297±0.018 ^{1,2,3,4)}
Angoline组	10	0.394±0.068 ^{1,2,4)}	0.251±0.013 ^{1,2,4)}	0.375±0.049 ^{2,4)}	0.363±0.032 ^{2,4)}
rIL-6组	1	0.930±0.103 ^{2,3)}	0.601±0.136 ^{2,3)}	1.171±0.257 ^{1,3)}	0.841±0.093 ^{1,2,3)}

4 讨论

中医理论认为,肾藏精,主生殖,构成冲任之基。《医学衷中参西录》记载:“肾水丰盈,胞胎安泰;肾水枯竭,胎动难安”。肾精若亏损,封藏失职,冲任虚损,经脉凝滞而致血瘀,瘀血不散,新血无法化

生,使胎无所养,以至胎元不固,“设或有子,不以迟晚则必堕”^[16],因此“补肾活血”是治疗RSA的主要原则。

菟丝子-丹参出自“补肾活血方”,此方由经典安胎方寿胎丸加味组成,是治疗肾虚血瘀型RSA的临

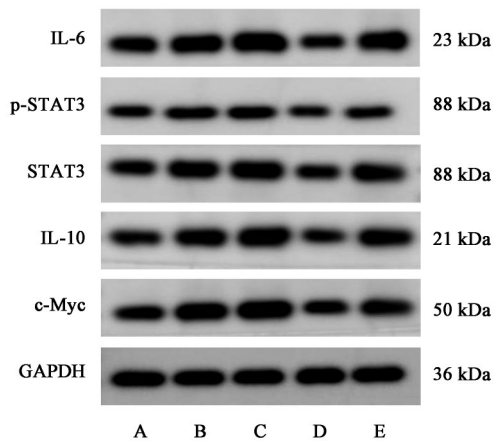


图2 各组HTR-8/Svneo细胞IL-6、p-STAT3、STAT3、IL-10、c-Myc蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of IL-6, p-STAT3, STAT3, IL-10 and c-Myc protein expressions in HTR-8/Svneo cells of each group

床经验方,课题组前期研究已证实补肾活血方可改善EVT增殖、侵袭,促进RSA小鼠子宫螺旋动脉重铸^[17]。菟丝子-丹参作为补肾活血方的核心药对,两药合用切合RSA肾虚血瘀的病机,并且现代药理研究表明,菟丝子主要含有黄酮类、木脂素类、多糖等化学成分,其有效成分主要包括槲皮素、苦参碱、异鼠李素、山柰酚等,具有保护生殖系统、拟雌激素、免疫调节等作用^[18],影响胚胎着床、胎盘及其血管形成^[19]。丹参是治疗复发性流产的常用药,其化学成分为水溶性的酚酸类及脂溶性的丹参酮类化合物,主要包括丹酚酸、丹参酮II_A、隐丹参酮等有效成分,能够促进滋养细胞增殖与侵袭,改善血液循环扩张血管、降低血管阻力,有效防治RSA^[20]。

本研究通过网络药理学研究得出,菟丝子-丹参共包含69个活性成分,可通过73个靶点防治RSA,表明菟丝子-丹参治疗RSA具有多成分、多靶点的特点^[21]。进一步通过拓扑分析发现,菟丝子-丹参治疗RSA可能与IL6、IL-10、STAT3等17个核心靶点有关。而后,KEGG富集分析结果显示,这73个潜在的治疗靶点共涉及57条信号通路,这些信号通路提示菟丝子-丹参能够调节细胞增殖与凋亡,调节炎症反应,促进血管生成,从而对RSA产生治疗作用,主要涉及JAK/STAT信号通路、p53信号通路、HIF-1信号通路等。分子对接结果初步证明,IL-6、STAT3与菟丝子-丹参药对中的主要活性成分苦参碱、隐丹参酮、丹参酮II_A等具有较好的结合力,考虑IL-6、IL-10、STAT3可作为菟丝子-丹参治疗RSA的主要治疗靶点,这与奚婷等^[22]、ALKHURIJI等^[23]的研究结果一致。因此,此次实验基于网络药理学推导与

分子对接验证的结果,以靶点IL-6、p-STAT3、STAT3、IL-10、c-Myc为切入点,选择IL-6/STAT3信号通路展开研究。

IL-6、IL-10由B细胞、T细胞及单核巨噬细胞等分泌,是一种多功能细胞因子,在细胞增殖和分化中发挥重要作用^[24-25]。已有研究证实,IL-6、IL-10的表达增加可调控滋养细胞增殖、侵袭,从而降低胚胎吸收率,改善RSA小鼠的妊娠结局^[22,26]。STAT3是一种潜在的细胞质转录因子,受到IL-6等多种细胞因子的调节,进而影响滋养细胞的增殖、浸润,促进胚胎植入和胎盘形成^[27]。同时,c-Myc作为已被确定的STAT3下游效应子,可在细胞生长与转化过程中与STAT3协同作用^[28]。IL-6/STAT3信号通路与宫颈癌、乳腺癌等肿瘤的发生发展密切相关,参与调节细胞的生长、分化和凋亡^[29],而滋养细胞和肿瘤细胞具有相似的侵袭机制^[30]。研究表明,IL-6作为该通路的上游信号分子,当与其受体结合后,能够激活细胞膜表面的gp130亚基,导致磷酸化的STAT3在细胞质内大量富集^[31],刺激下游效应靶基因的转录,诱导IL10、c-Myc等基因的表达,从而与滋养细胞间形成正反馈回路^[32-33]。

本实验以24h作为最佳干预时间,研究发现Angolone作为IL-6/STAT3通路抑制剂,与激动剂rIL-6均可调控滋养细胞中IL-6、p-STAT3、STAT3、IL-10及c-Myc的蛋白表达,影响滋养细胞的存活和侵袭能力。此外,通过比较空白组与不同剂量中药组间IL-6、p-STAT3/STAT3、IL-10、c-Myc的表达情况及细胞存活率与侵袭率,发现菟丝子-丹参能够促进IL-6、p-STAT3/STAT3、IL-10、c-Myc在滋养细胞中的表达,并且呈剂量依赖性。通过比较中药组与抑制剂组、激动剂组的结果,发现中药低剂量组与高剂量组能够产生类激动剂样作用,中药高剂量组的作用趋势甚至优于通路激动剂,能够显著促进滋养细胞侵袭,抑制滋养细胞凋亡。由此推测,菟丝子-丹参可能是通过产生类激动剂样作用,激活IL-6/STAT3信号通路及其下游IL-10、c-Myc蛋白的表达,抑制EVT凋亡,促进EVT侵袭,从而改善胎盘植入与胚胎发育,改善妊娠结局。

本研究也有不足之处,首先,网络药理学存在其自身的局限性,药物与疾病相关数据的准确性与数据库密切相关,未来有待进一步依托更多样化、更全面的数据库资源深入挖掘菟丝子-丹参在RSA中的潜在治疗能力。其次,本实验仅验证了IL-6/STAT3通路中的部分靶点,并未完全阐明菟丝子-丹

参的协同作用机制,研究团队还需在后续实验中进一步探索该通路上下游靶点的表达。此外,本实验未设置菟丝子、丹参的单味药空白组,无法直接比较药对与单药的疗效差异,下一步将通过拆方进行实验验证。

综上所述,本研究首次尝试将网络药理学、分子对接技术与细胞实验验证相结合,研究菟丝子与丹参配伍在防治RSA方面的潜在作用机制,为菟丝子-丹参在RSA中的临床应用奠定了初步的实验基础,并指明了后续研究的新方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 自然流产诊治中国专家共识编写组. 自然流产诊治中国专家共识(2020年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(11):1082-1090.
Writing Group of Chinese Expert Consensus on Diagnosis and Treatment of Spontaneous Abortion. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of spontaneous abortion (2020 edition)[J]. Chin J Pract Gynecol Obstet, 2020, 36(11):1082-1090.
- [2] GREEN D M, O'DONOGHUE K. A review of reproductive outcomes of women with two consecutive miscarriages and no living child[J]. J Obstet Gynaecol, 2019, 39(6):816-821.
- [3] 奚婷, 刘雁峰, 包晓霞, 等. 中医药治疗复发性流产的研究进展[J]. 世界中医药, 2023, 18(10):1482-1486.
XI T, LIU Y F, BAO X X, et al. Research progress on TCM in the treatment of recurrent spontaneous abortion [J]. World Chin Med, 2023, 18(10):1482-1486.
- [4] 钟兴明. 关于复发性流产诊治中争议问题的思考[J]. 实用医学杂志, 2022, 38(9):1045-1050.
ZHONG X M. Discussing on controversial issues in diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion [J]. The J Pract Med, 2022, 38(9):1045-1050.
- [5] 董胜雯, 郭洁, 宋殿荣. 子宫螺旋动脉重铸与病理妊娠[J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(2):176-179.
DONG S W, GUO J, SONG D R. Uterine spiral artery remodeling and pathology pregnancy [J]. Int J Obstet Gynecol, 2017, 44(2):176-179.
- [6] SUN X, TONG X, HAO Y, et al. Abnormal Cullin1 neddylation-mediated p21 accumulation participates in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion by regulating trophoblast cell proliferation and differentiation[J]. Mol Hum Reprod, 2020, 26(5):327-339.
- [7] 孙莹, 杜惠兰, 李蓉, 等. 复发性流产中西医结合诊疗指南[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(9):2544-2556.
SUN Y, DU H L, LI R, et al. Guideline for diagnosis and treatment of recurrent spontaneous abortion with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2024, 49(9):2544-2556.
- [8] DEVALL A J, PAPADOPOULOU A, PODESEK M, et al. Progestogens for preventing miscarriage: A network Meta-analysis [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 4: CD013792.
- [9] 卫爱武, 张文华, 胡晓芳, 等. 原因不明复发性流产300例中医证候分布规律研究[J]. 中医学报, 2013, 28(5):712-714.
WEI A W, ZHANG W H, HU X F, et al. Syndrome distribution research of 300 cases unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. Acta Chin Med, 2013, 28(5):712-714.
- [10] 冯晓玲, 张婷婷. 中医妇科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
FENG X L, ZHANG T T. Gynecology of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Press Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [11] 郑涵予, 刘雁峰, 周雨玫, 等. 浅析菟丝子在《傅青主女科》中的应用[J]. 天津中医药, 2023, 40(1):42-45.
ZHENG H Y, LIU Y F, ZHOU Y M, et al. Application of cuscuta chinensis in FU Qingzhu's obstetrics and gynecology [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2023, 40(1):42-45.
- [12] KONG J, LI S, LI Y, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* active compounds on placenta-mediated pregnancy complications[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11:1034455.
- [13] 柏杏丽, 王静, 赵淑云, 等. 低分子肝素联合丹参治疗复发性流产的疗效分析[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(10):774-779.
BAX X L, WANG J, ZHAO S Y, et al. Effect of low molecular heparin combined with *Salvia miltiorrhiza* in the treatment of recurrent spontaneous abortion [J]. J Pract Obstet Gynecol, 2019, 35(10):774-779.
- [14] GAO F, ZHOU C, QIU W, et al. Total flavonoids from Semen Cuscutae target MMP9 and promote invasion of EVT cells via Notch/Akt/MAPK signaling pathways[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):17342.
- [15] 唐帅, 李阳, 黄飞跃, 等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路探究丹参素减轻滋养细胞氧化应激反应的机制[J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(12):1458-1463.
TANG S, LI Y, HUANG F Y, et al. Mechanism of Danshensu attenuating oxidative stress in trophoblast cells through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Chin J Lab Diag, 2023, 27(12):1458-1463.
- [16] 葛梦妮, 许小凤. 补肾活血类方剂治疗APS型复发性流产研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10):199-202.
GE M W, XU X F. Research progress of Chinese herbal compound for strengthening kidney and promoting blood circulation in the treatment of APS-RSA [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(10):199-202.
- [17] 李久现, 刘玉楠, 孙烁, 等. 补肾活血方调控Wnt/ β -catenin信号通路改善复发性流产小鼠子宫螺旋动脉重铸的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(3):37-44.
LI J X, LIU Y N, SUN S, et al. Kidney-tonifying and blood-

- activating prescription regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway to improve uterine spiral artery remodeling in mouse model of recurrent miscarriage [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(3):37-44.
- [18] 陈鲁宁, 胡扬, 辛国松, 等. 菟丝子化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测[J]. *中草药*, 2024, 55(15):5298-5314.
CHEN L N, HU Y, XIN G S, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects of Cuscutae Semen and its quality marker prediction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(15):5298-5314.
- [19] 孟永丽, 李晖. 菟丝子活性成分预防复发性流产作用机制研究进展[J]. *江苏中医药*, 2023, 55(1):73-77.
MENG Y L, LI H. Review of active components of cuscuta chinensis in preventing recurrent abortion [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2023, 55(1):73-77.
- [20] WU L, CHENG B, LIU Q, et al. CRY2 suppresses trophoblast migration and invasion in recurrent spontaneous abortion [J]. *J Biochem*, 2020, 167(1):79-87.
- [21] HOPKINS A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11):682-690.
- [22] 奚婷, 包晓霞, 许梦白, 等. 复发性流产相关基因的生物信息学分析[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(5):142-146.
XI T, BAO X X, XU M B, et al. Bioinformatics analysis of genes related to recurrent spontaneous abortion [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2020, 38(5):142-146.
- [23] ALKHURIJI A F, AL OMAR S Y, BABAY Z A, et al. Association of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and TGF- β_1 gene polymorphisms with recurrent spontaneous abortion in polycystic ovary syndrome [J]. *Dis Markers*, 2020, 2020:6076274.
- [24] CHAMPION H, INNES B A, ROBSON S C, et al. Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy [J]. *Mol Hum Reprod*, 2012, 18(8):391-400.
- [25] LI M, SUN F, QIAN J, et al. Tim-3/CTLA-4 pathways regulate decidua immune cells-extravillous trophoblasts interaction by IL-4 and IL-10 [J]. *Faseb J*, 2021, 35(8):e21754.
- [26] 吴蓉, 翁宇红, 李玉佳, 等. IL-6改善反复自然流产小鼠妊娠结局的机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(8):1615-1619.
WU R, WENG Y H, LI Y J, et al. Mechanism of IL-6 in improving pregnancy outcomes in mice with recurrent spontaneous abortion [J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(8):1615-1619.
- [27] FANG Y, FENG X, XUE N, et al. STAT3 signaling pathway is involved in the pathogenesis of miscarriage [J]. *Placenta*, 2020, 101:30-38.
- [28] TOLOMEO M, CASCIO A. The multifaced role of STAT3 in cancer and its implication for anticancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):603.
- [29] 窦丹彬, 张新. IL-6/STAT3在宫颈癌发生发展中作用的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2023, 32(5):397-398.
DOU D B, ZHANG X. Research progress on the role of IL-6/STAT3 in the occurrence and development of cervical cancer [J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2023, 32(5):397-398.
- [30] KITROSER E, POMERANZ M, EPSTEIN S G, et al. The involvement of eukaryotic translation initiation factor 4E in extravillous trophoblast cell function [J]. *Placenta*, 2012, 33(9):717-724.
- [31] SEHGAL P B. Interleukin-6 at the host-tumor interface: STAT3 in biomolecular condensates in cancer cells [J]. *Cells*, 2022, 11(7):1164.
- [32] HEDRICH C M, RAUEN T, APOSTOLIDIS S A, et al. STAT3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through trans-activation and chromatin remodeling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(37):13457-13462.
- [33] BERNEKING L, BEKERE I, ROB S, et al. A bacterial effector protein promotes nuclear translocation of STAT3 to induce IL-10 [J]. *Eur J Cell Biol*, 2023, 102(4):151364.

[责任编辑 周冰冰]