

参 考 文 献

- [1] 牛亚华,张青,杨国旺,等.中医古籍肿瘤术语研究的流程与方法探索.中医杂志,2015,56(9):745-748
- [2] 梁燕凯,路夷平,吕培文,等.明清时期中医古籍肿瘤防治认知源流述要.北京中医药,2018,37(12):1207-1211
- [3] 白杨,曹珊,韩倩倩,等.中药复方抗食管癌研究进展.中国实验方剂学杂志,2022,28(13):277-282
- [4] 刘福栋,李奕,张曦元,等.脾积丸源流探讨与应用现状.北京中医药,2022,41(4):403-406
- [5] 李焕芹,邹忆怀,姚钰宁,等.古籍循证在中医临床实践指南制定中的应用.中国循证医学杂志,2018,18(2):225-229
- [6] 张磊,曾宪涛,佟琳,等.运用循证医学原则制定中医古籍证据评价分级量表的思路.中华中医药杂志,2020,35(6):2971-2973
- [7] 姚钰宁,曹克刚,托托,等.基于专家问卷的中医古籍证据分级及推荐方法的构建.中医杂志,2021,62(7):572-576
- [8] 张洪春,王成祥,崔红生,等.宣肺止咳合剂治疗咳嗽临床应用专家共识.中华中医药学刊,2022,40(8):252-258
- [9] 张声生,赵鲁卿.溃疡性结肠炎的中医药治疗专题执行编委导读.北京中医药,2022,41(9):943
- [10] 薛清录.中国中医古籍总目.上海:上海辞书出版社,2007:793-869
- [11] 余桂清.历代中医肿瘤案论选粹.北京:北京出版社,1989:2
- [12] 王笑民.中医历代肿瘤术语集.北京:中国中医药出版社,2019:6
- [13] 郁仁存.中医肿瘤学.北京:科学出版社,2022:34
- [14] 周宜强.实用中医肿瘤学.北京:中医古籍出版社,2006:124
- [15] 何裕民.现代中医肿瘤学.北京:中国协和医科大学出版社,2005:384
- [16] 周岱翰.中医肿瘤学.广州:广东高等教育出版社,2020:72
- [17] 林洪生.恶性肿瘤中医诊疗指南.北京:人民卫生出版社,2014:126
- [18] 王璐.中药壁虎多肽成分的体外抗肿瘤筛选及其结构解析.济南:山东中医药大学,2014
- [19] 胡晓峰.卫济宝书.北京:华夏出版社,1997:27
- [20] 李兴睿,徐滔.美国癌症联合委员会第8版分化型甲状腺癌TNM分期更新解读.临床外科杂志,2019,27(1):33-35
- [21] 周天,张培彤,莫爵飞,等.中晚期肿瘤患者对姑息支持和临终关怀的选择倾向研究.中国肿瘤,2011,20(10):741-745
- [22] 贾杰.肿瘤康复:从传统到数字医疗的展望.中国医刊,2022,57(1):1-4,125
- [23] 陈秋平,邵明义,毕倩,等.基于叙事循证医学对中医临床疗效评价问题的解决策略.中国中药杂志,2022,47(2):557-561

(收稿日期:2022年11月28日)

· 论 著 ·

基于非靶向代谢组学探究减味寿胎丸对
流产大鼠尿液的影响黄娴¹, 曾丽华¹, 李婧², 郜洁², 罗颂平²(¹广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; ²广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

摘要: 目的: 借助超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术分析减味寿胎丸(JSP)对大鼠流产模型尿液代谢物以及相关通路的影响, 从而探究其补肾安胎的作用机制。方法: 随机将SD大鼠分成阴性对照组、模型组、JSP组, 每组7只。构建米非司酮诱导大鼠流产模型, 以JSP(180 mg/mL)进行灌胃干预, 每日1次。通过观察各组孕鼠阴道、胚胎形态, 计算流产率对大鼠流产模型进行评价。HE染色观察孕鼠子宫蜕膜组织形态的差异。借助代谢组学技术分析尿液代谢物谱, 寻找可能的差异代谢产物与通路。结果: 与阴性对照组比较, 模型组流产率显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, JSP组流产率下降($P < 0.05$)。共鉴定出潜在的76种生物标志物, JSP干预后发现43种差异性代谢物。干预后显著上调磷酸二氢钾、罗辛丁和对甲酚葡萄糖苷酸代谢物($P < 0.01$, $P < 0.05$), 参与抗坏血酸和醛糖代谢、柠檬酸循环(TCA循环)、戊糖和葡萄糖醛酸转换等代谢通路。结论: JSP可能通过调节尿液代谢产物改善糖、氨基酸代谢等生物过程降低流产率, 起到补肾安胎的作用。

关键词: 非靶向代谢组学; 减味寿胎丸; 流产; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱

基金资助: 国家自然科学基金面上项目 (No.82174424), 广东省重点领域研发计划“岭南中医药现代化”重点专项 (No.2020B1111100003), 市校(院)联合资助项目广州市重点实验室建设项目 (No.202201020383)

Exploration on the effects of Jianwei Shoutai Pills on urine of miscarriage rat based on non-targeted metabolomics

HUANG Xian¹, ZENG Li-hua¹, LI Jing², GAO Jie², LUO Song-ping²

(¹The First Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ²The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective: To analyze the effects of Jianwei Shoutai Pills (JSP) on urinary metabolites and related pathways in a rat miscarriage model by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), so as to investigate its mechanism of tonifying the kidney and calming the fetus. Methods: SD rats were randomly divided into a negative control group, a model group, and a JSP group, with 7 rats in each group. A model of mifepristone-induced abortion was constructed, and the rats were treated with JSP (180 mg/mL) by gavage once a day. The model group was evaluated by observing the vaginal and embryonic morphology of each group of pregnant rats and calculating the abortion rate of each group of pregnant rats. HE staining was performed to observe the differences in the morphology of uterine metaplasia in each group of pregnant rats. The urinary metabolite profiles were analyzed by the UPLC-Q-TOF-MS metabolomics technique to find out the differential metabolites and metabolic pathways. Results: The miscarriage rate was significantly higher in the model group compared with the negative control group ($P < 0.01$); the miscarriage rate was significantly lower in the JSP group compared with the model group ($P < 0.05$). A total of 76 potential biomarkers were identified in the urine of aborted rats, and 43 differential metabolites were identified after the intervention with the JSP. The intervention of the JSP significantly modulated the metabolites potassium dihydrogen phosphate, rosinetin, and p-cresol glucosinolate ($P < 0.01$, $P < 0.05$), which were involved in metabolic pathways such as ascorbate and aldose metabolism, the citric acid cycle (TCA cycle), and pentose and glucuronide interconversion metabolism. Conclusion: The JSP can improve the biological process of sugar and amino acids by regulating urinary metabolites, reduce the rate of miscarriage, and play a role in tonifying the kidney and calming the fetus.

Key words: Non-targeted metabolome; Jianwei Shoutai Pills; Miscarriage; Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS)

Funding: General Program of National of Natural Science Foundation of China (No.82174424), Key Project of 'Modernization of Traditional Chinese Medicine in Lingnan' of the Major Research and Development Program of Guangdong Province (No.2020B1111100003), City University (Institute) Joint Funding Project Guangzhou Key Laboratory Construction Project (No.202201020383)

自然流产是指28周之前的胎儿丢失,是怀孕最常见的并发症^[1]。据统计,全世界每年发生流产约2 300万例,相当于每分钟有44例流产的发生^[2]。流产的原因是十分复杂的,至今尚未被阐明。流产的发生可能跟年龄、身体质量指数、既往不良妊娠史、吸烟、饮酒、夜班工作等有关^[3-4]。有研究表明,早期流产可引起出血、感染等并发症的发生,并且流产后也会引起创伤后应激障碍、焦虑和抑郁等心理疾病^[5-6]。随着我国“三孩”政策的实施和社会观念转变,生育年龄的推迟导致高龄产妇的增加,早期流产也逐渐出现升高的趋势^[7-8]。

减味寿胎丸为课题组经药效验证筛选出补肾安胎中药的优选配方,全方由菟丝子、桑寄生、续断组成,具有补肾安胎的作用。前期研究表明,减味寿胎丸能减轻流产大鼠脂质过氧化及过度铁累

积,抑制子宫蜕膜组织铁死亡,上调子宫蜕膜组织中FOXO3和孕激素受体蛋白表达,有效降低流产模型的流产率,起到补肾安胎的作用^[9-11]。代谢组学技术广泛运用于探究中药复方对机体的整体疗效与安全性等研究^[12-13],本研究拟借助非靶向代谢组学技术分析减味寿胎丸对流产大鼠尿液代谢物的影响,探讨其补肾安胎、防治早期流产的可能作用机制。

材料

1. 动物 SPF级雌性SD大鼠30只,8周龄,体质量180~250 g; SPF级雄性SD大鼠25只,8周龄,体质量250~300 g,购自珠海百试通生物科技有限公司,动物许可证号:SCXK(粤)2020-0229,经伦理审核批准号:IAC(S)202111002。常规饲养在SPF级动物房,室内温度为20~25℃,自由进食进水,昼夜间断照明各12 h。

2. 药物与制备 减味寿胎丸由菟丝子、桑寄生、续断按2:1:1比例组成,中药饮片购自广东省药材公司(批号分别为T271901B、S2320711、X0419711)。将药物混合后加10倍量蒸馏水,浓缩、干燥后,冻干成粉,保存于4℃冰箱备用。米非司酮(Sigma公司,批号:M8046-100MG)。

3. 试剂 苏木素染色液、伊红染色液(北京中杉金桥生物科技有限公司,批号:220314、211217);甲醇、乙腈和甲酸(Merck公司,批号:JB02447、JA050130、#BCBK9295V);L-2-氯苯丙氨酸(上海源叶生物科技有限公司,批号:H24J11Y119417);超纯水(华润怡宝饮料有限公司);羧甲基纤维素钠(Sigma公司,批号:SLBW8428)。

4. 仪器 KD-RS全自动组织脱水机(科迪仪器设备有限公司);KD2258切片机、KD-T摊片机(Leica公司);Acquity UPLC™超高压液相色谱仪、Xevo G2QTPF质谱(Waters公司);JR-2200DB色谱Acquity UPLC HSS(2.1 mm×100 mm, T31.8 μm, Waters公司);JR:2200DB超声波清洗器(合肥金尼克机械制造有限公司);N-EVAP™112氮吹仪(Organomation公司)。

方法

1. 分组与给药 按随机区组法把动物进行分组,分为阴性对照组、模型组和减味寿胎丸组(JSP组)。以雌:雄=2:1放入交配笼,次日早上观察阴栓,查出阴栓,认为该鼠为妊娠第0天动物。JSP组自妊娠第0天起至第14天,予180 mg/mL减味寿胎丸;阴性对照组和模型组予0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液灌胃;灌胃体积为10 mL/kg体重,1次/d,连续干预14 d。妊娠第14天,模型组和JSP组于上午灌胃1.2 mg/mL米非司酮(RU486)药液,阴性对照组给予等体积的0.5%CMC-Na溶液。

2. 样品采集与前处理 代谢笼收集大鼠妊娠第14天晨尿,收集后放在-80℃冰箱保存。室温下解冻,取样本200 μL,加入内标(L-2-氯苯丙氨酸,0.3 mg/mL)各10 μL,涡旋振荡10 s。加入600 μL蛋白沉淀剂甲醇-乙腈(V:V=2:1),涡旋震荡1 min。冰水浴超声提取10 min,-20℃静置30 min。用80 μL甲醇复溶,涡旋30 s,超声3 min。4℃离心10 min(离心半径10 cm,13 000 r/min),取150 μL上清液装入带有内衬管的LC-MS进样小瓶中进行分析;质控样本(QC)由所有样本的提取液等体积混合制备而成,

每个QC的体积与样本相同。

3. 子宫蜕膜组织HE染色 用4%多聚甲醛固定大鼠子宫蜕膜组织24 h。自动脱水机脱水,使用包埋机对组织进行包埋,5 μm切片,40℃水浴锅展片捞起组织,60℃烘箱烤片2 h。脱蜡覆水,苏木精染色5 min,1%盐酸乙醇分化,伊红染色3 min,脱水,中性树胶封片,显微镜下观察。

4. UPLC-Q-TOF-MS检测 色谱条件:Acquity UPLC HSS色谱柱,柱温45℃,每次进样5 μL。流动相A由0.1%甲酸水溶液配制而成,流动相B由0.1%甲酸乙腈溶液配制,流速为0.3 mL/min。质谱条件:毛细管电压2.6 kV,椎管电压40 kV,离子源温度100℃,脱溶剂温度350℃,流速600 L/h,锥孔气体流速为50 L/h。扫描时间和扫描时间间隔分别为0.1、0.02 s,每隔5个样品制备QC进行质量监控。

5. 流产率计算 剖开大鼠子宫,剥离胚胎,通过观察子宫和胚胎的外观、血运、完整程度等,记录正常胚胎数和流产胚胎数,计算流产率。判断为正常胚胎标准^[14]:子宫粗大饱满如串珠,粉红色,解剖后见胚胎完好,无瘀血;流产胚胎标准:子宫呈竹节样改变,宫腔内见明显瘀血,胚胎不完整,或仅有着床点而无胚胎。流产率^[15]的计算:流产率(%)=流产胚胎数/(流产胚胎数+正常胚胎数)×100%。

6. 代谢物数据分析及差异性代谢物筛选 采用Progenesis QIv2.3对原始数据进行色谱提取峰的识别、匹配、过滤、对齐以及归一化等处理。代谢物鉴定使用人类代谢物数据库和脂质数据库。使用SIMACA进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),并且将结果可视化。通过OPLS-DA模型将VIP>1和P<0.05筛选出差异代谢物并且通过Metabo Analyst 5.0数据库(<http://www.metaboanalyst.ca/>)行KEGG通路富集分析。

7. 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件分析,多组间采用单因素方差分析。不符合正态分布,采用(Kruskal-Wallis检验)非参数检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

1. 各组大鼠一般情况 剖开大鼠后,可见阴性对照组大鼠胚胎以及胎盘发育良好,偶可见吸收胎;与阴性对照组比较,模型组子宫可见较多的瘀血点以及吸收胎;与模型组比较,JSP组可见多数胚胎以及胎盘发育良好,见少量的吸收胎以及瘀血点。

表1结果显示,与阴性对照组比较,模型组流产率显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,JSP组流产率显著降低($P<0.05$)。图1与图2结果显示,各组大鼠不同时间体质量、肛温比较,差异无统计学意义。

表1 各组大鼠流产率比较($\bar{x} \pm s, n=7, \%$)

组别	流产率
阴性对照组	0
模型组	41.07 ± 21.29**
JSP组	14.00 ± 7.97 [△]

注:与阴性对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$ 。

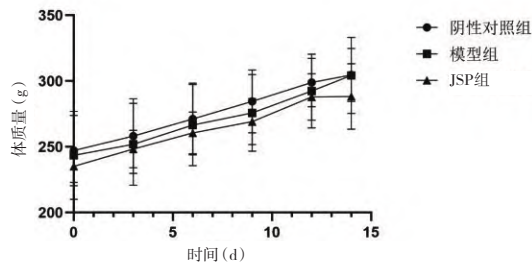


图1 各组大鼠不同时间体质量变化($\bar{x} \pm s, n=7$)

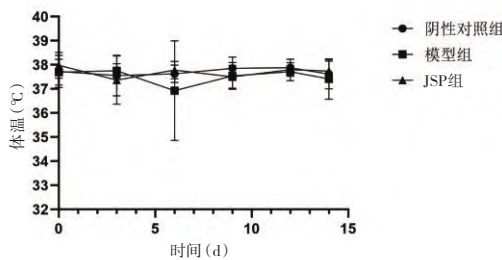


图2 各组大鼠不同时间肛温变化($\bar{x} \pm s, n=7$)

2. 各组大鼠子宫蜕膜组织HE染色结果 见图3。镜下可见,阴性对照组血管较丰富,蜕膜细胞核为卵圆形,核大明显;模型组血管较少,胞浆出现水肿,可见部分细胞核消失;与模型组比较,JSP组血管丰富,有完整的管壁,蜕膜细胞核大明显,无明显坏死。

3. 各组大鼠尿液代谢轮廓分析

3.1 PCA分析 通过PCA分析的方法来评估各组代谢物的总体分布趋势。如图4A与图4B所示,阴性对照组、模型组与JSP组能分开,说明不同组别的大鼠尿液代谢产物轮廓存在差异。

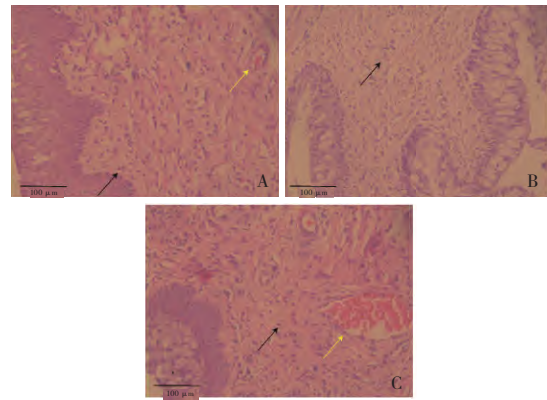


图3 各组大鼠子宫蜕膜组织HE染色观察($\times 400$)

注: A. 阴性对照组; B. 模型组; C. JSP组。黑色箭头: 蜕膜细胞,细胞核为卵圆形,核大明显;黄色箭头: 血管,管腔内有细胞。

3.2 OPLS-DA结果 为了进一步验证组间差异,使用有监督的降维算法OPLS-DA。图4C结果显示,阴性对照组与模型组尿液代谢物分布存在明显差异;图4D结果显示,JSP组与模型组尿液代谢物较能分开。图4E、F分别使用200次响应排序检测验证OPLS-DA是否存在过度拟合。阴性对照组与模型组对比, $R^2Y=0.96, Q^2=0.82$;模型组与JSP组比较,

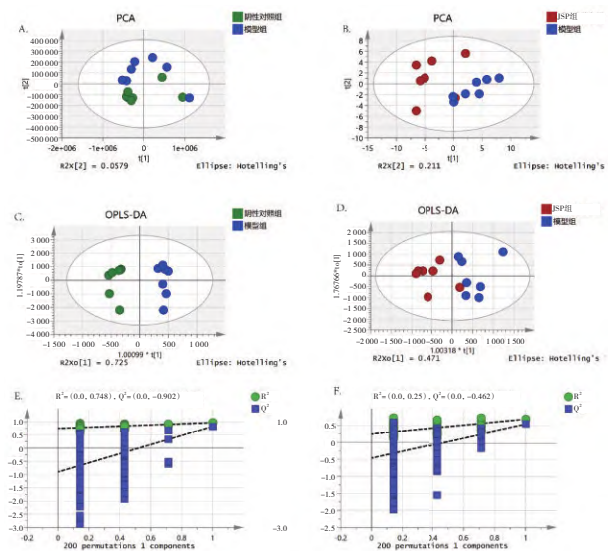


图4 尿液代谢物PCA与OPLS-DA图

注: A、B: 组间大鼠尿液代谢物组间分布PCA图; C、D: 组间分布OPLS-DA得分图; E、F: 组间200次响应排序检测图(E图: 阴性对照组与模型组; F图: JSP组与模型组)。

表2 回调的潜在差异代谢物

序号	质荷比(m/z)	保留时间(min)	代谢物	分子式	模型组/阴性对照组	JSP组/模型组
1	368.9712	3.71	磷酸二氢钾(Dihydrogen phosphate)	$C_{11}H_{12}O_8P_2$	↑*	↓ ^{△△}
2	465.0806	4.83	罗辛丁(Rothindin)	$C_{22}H_{20}O_{10}$	↑*	↓ [△]
3	283.0819	5.06	对甲酚葡萄糖苷酸(p-Cresol glucuronide)	$C_{13}H_{16}O_7$	↑**	↓ [△]

注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。

$R^2Y=0.70$, $Q^2=0.55$, R^2Y 与 Q^2 均 >0.5 , 说明OPLS-DA模型拟合良好。

3.3 差异代谢物的筛选与鉴定 根据OPLS-DA模型的结果, 将差异倍数(FC) >2 或者 $FC<0.5$, $P<0.05$ 作为差异代谢物的筛选的标准。结果见表2。阴性对照组与模型组比较, 鉴定出76种差异代谢物, 其中51种代谢物上调; 25种代谢物下调。与模型组比较, JSP组共鉴定出43种差异代谢物, 其中11种上调, 32种下调。其中, 能显著回调的差异代谢组有3种, 分别是磷酸二氢钾、罗辛丁和对甲酚葡萄糖苷酸($P<0.01$, $P<0.05$)。

3.4 代谢物通路分析 将差异代谢物导入Metabo Analyst 5.0数据库进行KEGG代谢通路富集分析, 根据VIP >0.1 和 $P<0.05$, 筛选出的差异代谢物主要富集在抗坏血酸和醛糖代谢、柠檬酸循环(TCA循环)、戊糖和葡萄糖醛酸转换, 提示JSP可能通过调控上述富集的代谢通路起到维持妊娠、防治流产的作用。具体见表3、图5。

表3 潜在差异代谢通路分析

通路名称	P值	$-\log_{10}(P)$ 值	VIP值
抗坏血酸和醛糖代谢	0.00	3.58	0.25
柠檬酸循环(TCA循环)	0.00	3.93	0.24
戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	0.00	2.78	0.27
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.00	2.22	0.05
乙醛酸和二羧酸代谢	0.00	2.05	0.03
精氨酸和脯氨酸代谢	0.01	1.84	0.08
药物代谢-细胞色素P450	0.05	1.28	0.08
β -丙氨酸代谢	0.26	0.59	0.10
丙酮酸代谢	0.27	0.57	0.21
赖氨酸降解	0.30	0.53	0.14
糖酵解/葡萄糖生成	0.30	0.51	0.10

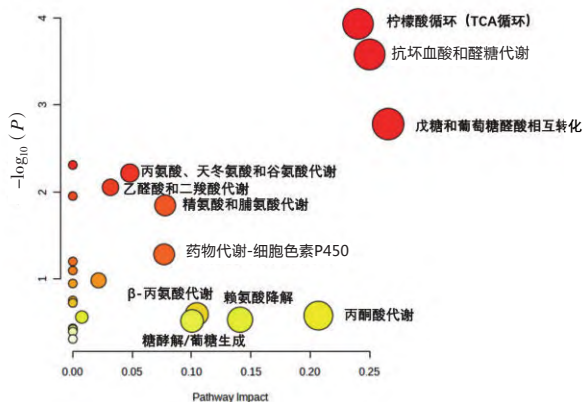


图5 减味寿胎丸对大鼠流产模型差异物代谢通路分析

讨论

中医理论认为, 生殖孕育以肾为本^[16]。自然流产发生的主要病机是肾气亏虚, 故以补肾固冲任为法^[17]。寿胎丸是补肾安胎中药的代表方。本课题组基于UPLC-Q-TOF-MS非靶向代谢组学技术, 对JSP干预米非司酮诱导大鼠流产模型尿液代谢物进行系统研究, 并筛选出差异代谢物和潜在的代谢通路。在米非司酮诱导大鼠流产模型尿液中发现了76种潜在的疾病标志物, JSP干预后, 筛选出了43种差异性代谢物。其中, 有3种差异代谢物发生了显著回调, 分别是磷酸二氢钾、罗辛丁和对甲酚葡萄糖苷酸代谢物, 主要涉及抗坏血酸和醛糖代谢、柠檬酸循环(TCA循环)、戊糖和葡萄糖醛酸转换等多个生物过程。

对甲酚葡萄糖苷酸是一种葡糖苷酸衍生物, 一种通过尿液排泄的对甲酚。对甲酚主要作为厌氧肠道细菌酪氨酸生物转化的最终产物产生。甲酚可导致孕妇出现阴道出血、腹痛、腹胀、恶心和呕吐等先兆流产症状。另外, 甲酚等混合物能引起宫腔内静脉和子宫旁静脉血栓的形成, 导致蜕膜和胎盘出现凝血并且坏死^[18]。低剂量砷暴露的孕妇尿液中检测出对甲酚葡萄糖苷酸, 这可能与砷引起的肝肾代谢紊乱有关^[19]。有研究表明, 基于代谢组学的产前筛查发现, 携带畸形胎儿基因的妇女血清中能检测到低水平的对甲酚^[20]。本研究发现, JSP干预大鼠流产模型后能显著下调对甲酚葡萄糖苷酸水平, 降低流产率。

TCA循环中间体(包括丙酮酸、乳酸和柠檬酸盐)在妊娠期间升高, 可能是由于母亲基础代谢率增加, 以进一步为胎儿提供发育所需的重要底物^[21-22]。有研究表明, 妊娠早期患有糖尿病的女性与患有2型糖尿病的非妊娠女性具有相似的代谢特征, 包括异亮氨酸升高, 但甘氨酸、苏氨酸、组氨酸、谷氨酰胺和TCA循环中间体降低^[23]。宫内炎症对胎盘代谢有广泛的不利影响, 伴随着TCA循环中间体、核苷酸代谢物、氧化脂质和类固醇代谢物的改变, 改变的代谢物可能通过能量衰竭、炎症、早期衰老和母胎不耐受在胎盘功能障碍中发挥作用^[24]。妊娠晚期母亲皮质醇过量后新生儿心脏中氨基酸和TCA周期代谢以及脂质和甘油磷脂代谢的改变, 并限制正常的心脏代谢成熟^[25]。因此, TCA循环中间体代谢产物的变化可能在维持妊娠中起到重要的作用。JSP可能通过TCA循环中间体代谢产物的变化, 起到补肾安胎的作用。另外, 有研究表明, 植入前保持最佳葡萄糖利

用率对于胚胎存活至关重要。胚胎发育和子宫内膜蜕膜化对葡萄糖的需求很高,植入前发育过程中葡萄糖转运的减少与这些胚胎中程序性细胞死亡的早期步骤有关^[26-27]。2型糖尿病小鼠糖原浓度显著降低,导致能量供应不足,无法正常子宫内膜功能,从而阻碍胚胎着床^[28]。有研究表明,复发性流产的女性与葡萄糖代谢功能障碍有关^[29]。JSP可能通过柠檬酸循环(TCA循环)、戊糖和葡萄糖醛酸转换及其他氨基酸代谢等能量代谢通路起到维持妊娠、防治流产的作用。

本研究发现米非司酮诱导大鼠流产模型存在着代谢紊乱,而减味寿胎丸能调节流产大鼠的尿液代谢,使代谢产物趋向于正常代谢物回调,主要改善糖、氨基酸代谢等生物过程降低流产率。本研究首次借助尿液代谢组学技术探究减味寿胎丸治疗自然流产,发现其可能通过多靶点、多通路发挥补肾安胎的作用,从而进一步阐明其更深层次的分子作用机制,深化“肾主生殖”的科学内涵。

参 考 文 献

[1] 中华医学会妇产科学分会产科学组.复发性流产诊治专家共识编写组.复发性流产诊治专家共识(2022).中华妇产科杂志,2022,57(9):653-667

[2] Quenby S,Gallos I D,Dhillon-Smith R K,et al.Miscarriage matters:The epidemiological,physical,psychological,and economic costs of early pregnancy loss.Lancet,2021,397(10285):1658-1667

[3] Coomarasamy A,Williams H,Truchanowicz E,et al.A randomized trial of progesterone in women with recurrent miscarriages.N Engl J Med,2015,373(22):2141-2148

[4] American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins-Gynecology.ACOG Practice Bulletin No.200:Early pregnancy loss.Obstet Gynecol,2018,132:e197-e207

[5] Murphy F A,Lipp A,Powles D L.Follow-up for improving psychological wellbeing for women after a miscarriage.Cochrane Database Syst Rev,2012,3:CD008679

[6] Farren J,Jalmbant M,Falconieri N,et al.Posttraumatic stress,anxiety and depression following miscarriage and ectopic pregnancy:A multicenter,prospective,cohort study.Am J Obstet Gynecol,2020,222(4):367.e1-367.e22

[7] 陈卫.中国的低生育率与三孩政策:基于第七次全国人口普查数据的分析.人口与经济,2021,248(5):25-35

[8] 陈霞,许剑.孕期保健对高龄产妇并发症及妊娠结局的影响.中国妇幼保健,2015,30(4):536-538

[9] 周月希,余庆英,罗颂平,等.减味寿胎丸对自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织中FOXO3及PR蛋白表达的影响.中医杂志,2021,62(4):335-340

[10] 余庆英,黄娴,张慧敏,等.减味寿胎丸对流产大鼠母胎界面FOXO3、PR表达的影响.中华中医药杂志,2022,37(9):

5390-5394

- [11] 赖裕玲,张莹轩,曾丽华,等.减味寿胎丸对流产模型大鼠子宫蜕膜脂质过氧化及铁死亡蛋白表达的影响.中医杂志,2021,62(21):1917-1922,1929
- [12] 王喜军.中药药效物质基础研究的系统方法学:中医方证代谢组学.中国中药杂志,2015,40(1):13-17
- [13] 刘萍,王平,陈刚,等.应用代谢组学探讨中医药复杂理论体系的研究思路和方法.中华中医药杂志,2011,26(5):993-998
- [14] 郝晓丽,王冬盈,郜洁,等.寿胎丸减味方对肾虚自然流产模型小鼠IL-17的影响.世界中西医结合杂志,2020,15(2):292-295
- [15] 岳明明,罗颂平,谭宇蕙.补肾中药对肾虚黄体抑制流产大鼠的实验研究.中医药学报,2005,33(1):47-49
- [16] 罗颂平.封藏之本,静以制动:论罗元恺教授安胎的思路与方法.广州中医药大学学报,2006,23(5):363-365
- [17] 刘雅倩,周英.从《妇人规》安胎学术思想论岭南罗氏妇科的传承与发展.中医杂志,2020,61(5):449-452
- [18] Burnhill M S.Treatment of women who have undergone chemically induced abortions.J Reprod Med,1985,30(8):610-614
- [19] Li H,Wang M,Liang Q,et al.Urinary metabolomics revealed arsenic exposure related to metabolic alterations in general Chinese pregnant women.J Chromatogr A,2017,1479:145-152
- [20] Troisi J,Lombardi M,Scala G,et al.A screening test proposal for congenital defects based on maternal serum metabolomics profile. Am J Obstet Gynecol,2023,228(3):342.e1-342.e12
- [21] Chamberlain G.Clinical Physiology in Obstetrics.Oxford,UK: Blackwell Scientific Publications,1980:163-192
- [22] Pinto J,Barros A S,Domingues M R,et al.Following healthy pregnancy by NMR metabolomics of plasma and correlation to urine.J Proteome Res,2015,14(2):1263-1274
- [23] Walejko J M,Chelliah A,Keller-Wood M,et al.Diabetes leads to alterations in normal metabolic transitions of pregnancy as revealed by time-course metabolomics.Metabolites,2020,10(9):350
- [24] Lien Y C,Zhang Z,Barila G,et al.Intrauterine inflammation alters the transcriptome and metabolome in placenta.Front Physiol, 2020,11:592689
- [25] Walejko J M,Antolic A,Koelmel J P,et al.Chronic maternal cortisol excess during late gestation leads to metabolic alterations in the newborn heart.Am J Physiol Endocrinol Metab,2019,316(3): E546-E556
- [26] Riley J K,Moley K H.Glucose utilization and the PI3K pathway: Mechanisms for cell survival in preimplantation embryos.Reproduction, 2006,131(5):823-835
- [27] Vrhovac Madunić I,Karin-Kujundžić V,Madunić J,et al. Endometrial glucose transporters in health and disease.Front Cell Dev Biol,2021,9:703671
- [28] Ma Y D,Cui Z H,Zhao D,et al.The effects of altered endometrial glucose homeostasis on embryo implantation in type 2 diabetic mice.Reprod Sci,2021,28(3):703-714
- [29] Edugbe A E,James B,Akunaeziri U A,et al.Beta-cell dysfunction and abnormal glucose metabolism among non-diabetic women with recurrent miscarriages.Arch Gynecol Obstet,2020,301(2): 559-564

(收稿日期:2022年11月28日)