

·数字中医药·

本文引用:赵志成,史佩玉,邓洁宜,邢万里,王颖.基于网络药理学探讨当归芍药散治疗慢性盆腔炎作用机制[J].湖南中医药大学学报,2019,39(9):1108-1113.

基于网络药理学探讨当归芍药散治疗慢性盆腔炎作用机制

赵志成¹,史佩玉²,邓洁宜³,邢万里²,王颖^{1*}

(1.黑龙江中医药大学附属第一医院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.广州中医药大学第一临床医学院,广东 广州 510405;
3.广州中医药大学第二临床医学院,广东 广州 510405)

〔摘要〕目的 基于网络药理学探讨当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用机制。方法 利用 TCMSp 数据库筛选出当归芍药散活性成分及其相关靶标基因;使用 Genecards 数据库筛选慢性盆腔炎靶标基因;借助 STRING 在线数据库获取靶标基因相互作用关系;采用 David 数据库进行 GO 生物学过程分析和 KEGG 通路功能富集分析;利用 cytoscape 软件构建当归芍药散治疗慢性盆腔炎“活性成分-作用靶标-通路”网络。结果 当归芍药散的核心活性成分有山柰酚、 β -谷甾醇等,核心作用靶标有 PTGS2、TNF、JUN 等;GO 生物学过程分析结果表明当归芍药散活性成分的基因功能主要表现在药物反应、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调节、凋亡过程的负调节、信号转导等生物学过程;KEGG 结果表明当归芍药散主要作用与 TNF、Toll 样受体等信号通路有关。结论 当归芍药散活性成分山柰酚、 β -谷甾醇等可能通过 TNF、Toll 样受体等信号通路作用于 PTGS2、TNF- α 、JUN、IL-6 等关键靶标基因进而发挥其临床功效,达到治疗慢性盆腔炎等疾病的目的。

〔关键词〕慢性盆腔炎;当归芍药散;网络药理学;通路;机制

〔中图分类号〕R285;R711

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.09.013

Exploration on Mechanism of Danggui Shaoyao Powder in Chronic Pelvic Inflammatory Based on Network Pharmacology

ZHAO Zhicheng¹, SHI Peiyu², DENG Jieyi³, XING Wanli², WANG Ying^{1*}

(1. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 3. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the mechanism of Danggui Shaoyao Powder in chronic pelvic inflammatory based on network pharmacology. Methods TCMSp database was used for screening effective components of Danggui Shaoyao Powder and related target genes; target genes for chronic pelvic inflammatory were screened by using Genecards database; interaction relationship of target genes was acquired by STRING online database; David database was used for GO biological progress analysis and pathway enrichment analysis of KEGG; active component-target-pathway network of Danggui Shaoyao Powder in chronic pelvic inflammatory was structured by Cytoscape software. Results The core active components of Danggui Shaoyao Powder were kaempferol, β -sitosterol, etc. and the core targets were PTGS2, TNF, JUN, etc. GO biological progress analysis showed that the gene functions of active components of Danggui Shaoyao Powder mainly manifested in biological progresses like drug reaction, positive regulation in transcription of RNA polymerase II promoter, negative regulation in apoptotic process,

〔收稿日期〕2019-06-10

〔基金项目〕国家自然科学基金资助项目(81703724)。

〔作者简介〕赵志成,男,硕士,主治医师,研究方向:中医药治疗内科疾病。

〔通讯作者〕*王颖,女,硕士,主治医师,E-mail:52227677@qq.com。

signal transduction and so on; KEGG results showed that the main function of Danggui Shaoyao Powder was related to signaling pathways like TNF signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway and so on. **Conclusion** Kaempferol, β -sitosterol and other active components of Danggui Shaoyao Powder may act on PTGS2, TNF- α , JUN, IL-6 and other key target genes through signaling pathways like TNF signaling pathway and Toll-like receptor signaling pathway, thus exerting its clinical efficacy, so as to achieve the goal of treating chronic pelvic inflammation and other diseases.

[**Keywords**] chronic pelvic inflammatory; Danggui Shaoyao Powder; network pharmacology; pathway; mechanism

经方当归芍药散出自于医圣张仲景所著的《金匮要略》,由当归、茯苓、白术、白芍、泽泻和川芎等药物组成,主治“妇人怀妊,腹中疝痛”。临床上可广泛治疗多种妇科疾病,是妇科常用方之一。

慢性盆腔炎是由女性上生殖道感染而引起的一种常见妇科疾病,患者常感到明显的下腹部胀坠感、腰骶部酸胀疼痛,该疾病给患者身心健康带来较大的不良影响^[1]。近年来,有较多文献证实当归芍药散对慢性盆腔炎具有确切的疗效。戴璐等^[2]通过临床随机对照实验发现,当归芍药散治疗慢性盆腔炎患者的总有效率高达90%,明显优于对照组使用甲硝唑联合左氧氟沙星。同样,傅剑锋^[3]把124例慢性盆腔炎患者随机分为试验组62例和参照组62例,试验组和参照组分别使用当归芍药散和妇科千金片治疗,结果显示当归芍药散治疗慢性盆腔炎的疗效明显优于妇科千金片。王志国^[4]、张志鹏^[5]和高升^[6]等人通过大鼠动物实验推测当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用机制与调节机体免疫功能,降低炎症反应有关,但是研究均是通过动物实验及相关指标的测量,其具体作用机制和信号通路等尚未完全阐明。

网络药理学与传统的“一个药物,一种活性成分,一个靶标基因,一种疾病”的思维模式及框架不同^[7],其通过构建多层次的网络,从整体的角度去探究疾病与药物间的联系,具有良好的整体性,与中医药治疗疾病的整体观念与辨证论治原则相吻合^[8],已成为研究药物与疾病间关系的重要方法之一。本研究通过对现有的数据进行分析处理,运用网络药理学的方法从分子机制和信号通路层面探讨当归芍药散治疗慢性盆腔炎的具体作用机制。

1 资料和方法

1.1 当归芍药散活性成分与靶标基因的获取

本研究使用中药系统药理学分析平台(TCM-SP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),以“当归”“白

芍”“茯苓”“白术”“泽泻”和“川芎”6个中药成分作为Herb name检索当归芍药散中当归、白芍、茯苓、白术、泽泻和川芎的所有活性成分,并利用口服生物利用度(OB)和类药性(DL)进行活性成分的筛选。OB是药物吸收、分布、代谢、排泄特性中最重要的药代学参数,其代表口服药物到达体循环所占口服剂量的比例,是决定活性成分DL的关键指标之一^[9]。因此,本课题通过设置 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ ^[10]来进行当归芍药散活性成分的筛选,以提高数据分析处理的价值。通过TCMSP数据库获取当归芍药散活性成分对应的靶点,并输入到STRING数据库(<https://string-db.org/>),获得药物靶点的标准基因名称。

1.2 慢性盆腔炎靶标基因的筛选

以“Chronic pelvic inflammatory disease”为关键词从GeneCards: The Human Gene Databases(<https://www.genecards.org/>)数据库中搜索慢性盆腔炎相关靶标基因,设置Score>10以保证数据的可处理性。

1.3 网络模型的构建和分析

将当归芍药散所有靶标基因输入到STRING数据库(<https://string-db.org/>),设置物种为“Homo sapiens”,选择最高置信度“highest confidence”(0.900),并隐藏PPI网络中不相关的节点,其余参数设置保持默认,获取当归芍药散靶标基因PPI信息。同样,获取慢性盆腔炎靶标基因PPI信息。运用Cytoscape 3.7.0软件(<http://cytoscape.org/>)分别构建当归芍药散与慢性盆腔炎靶标基因PPI网络,使用软件中的Merge功能将两个PPI网络进行交集映射,得到当归芍药散治疗慢性盆腔炎作用靶标的PPI网络图。将获得的作用靶标输入到DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体(GO)生物过程分析和KEGG通路分析。最后,将分析得到的KEGG通路与作用靶标、当归芍药散活性成分相对应,构建“活性成分—作用靶标—KEGG信号通路”网络图。

表 1 当归芍药散活性成分基本信息表

药物	活性成分名称	OB/%	DL
当归	Stigmasterol	43.83	0.76
白芍	paeoniflorgenone	87.59	0.37
白芍	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53
白芍	paeoniflorin	53.87	0.79
白芍	Mairin	55.38	0.78
白芍	kaempferol	41.88	0.24
白芍	(+)-catechin	54.83	0.24
茯苓	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81
茯苓	trametenolic acid	38.71	0.8
茯苓	Cerevisterol	37.96	0.77
茯苓	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72
茯苓	Ergosterol peroxide	40.36	0.81
茯苓	hederagenin	36.91	0.75
川芎	Mandenol	42	0.19
川芎	Myricanone	40.6	0.51
川芎	Perlolyrine	65.95	0.27
川芎	wallichilide	42.31	0.71
川芎	FA	68.96	0.71
白术	14-acetyl-12-senecioid-2E,8Z,10E-atractylentriol	63.37	0.3
白术	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
白术	3 β -acetoxyatractylone	54.07	0.22
白术	8 β -ethoxy atractylenolide III	35.95	0.21
泽泻	Alisol B monoacetate	35.58	0.81
泽泻	16 β -methoxyalisol B monoacetate	32.43	0.77
泽泻	alisol C monoacetate	33.06	0.83
泽泻	1-Monolinolein	37.18	0.3
泽泻	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate	35.58	0.81
泽泻	alisol B	36.76	0.82
当归、白芍	beta-sitosterol	36.91	0.75
白芍、川芎、泽泻	sitosterol	36.91	0.75

2 结果

2.1 当归芍药散活性成分与靶标基因的筛选

在 TCMSP 数据库中检索当归芍药散各药物活性成分,设置 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$,同时筛去无对应靶标基因的成分,最终共获得 31 个活性成分(见表 1)与 103 个靶标基因。

2.2 慢性盆腔炎靶标基因的筛选与 PPI 网络的构建

在 GeneCards: The Human Gene Databas 数据

库中共筛选得到慢性盆腔炎靶标基因 1014 个,将当归芍药散靶标基因 PPI 网络与慢性盆腔炎靶标基因 PPI 网络进行交集映射,得到当归芍药散治疗慢性盆腔炎作用靶标 PPI 网络图(由于部分作用靶标未参与网络构建,故舍去),见图 1。图中 40 个节点代表当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用靶标,节点颜色越深代表其在网络中度值越大,这 40 个作用靶标间有相互作用,表明这些作用靶标可能在某些层面上是相互关联的并通过多方面、多途径的协调起到治疗慢性盆腔炎的作用。

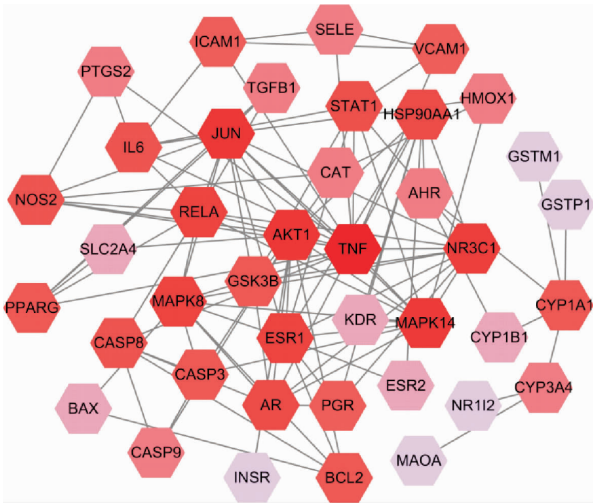


图 1 当归芍药散治疗慢性盆腔炎作用靶标 PPI 网络

2.3 GO 生物学过程富集分析和 KEGG 通路富集分析

将上述得到的当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用靶标导入 David 数据库中,选取排名前 15 名的 GO 生物学过程富集分析和 KEGG 通路富集分析。使用 Omicshare 软件 (<http://www.omicshare.com>) 分别绘制生物学过程气泡图 (见图 2) 和 KEGG 通路气泡图 (见图 3)。由图中可知,当归芍药散对凋亡过程的负调节、信号转导等的影响较大;当归芍药散治疗慢性盆腔炎涉及的通路主要是 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路等。

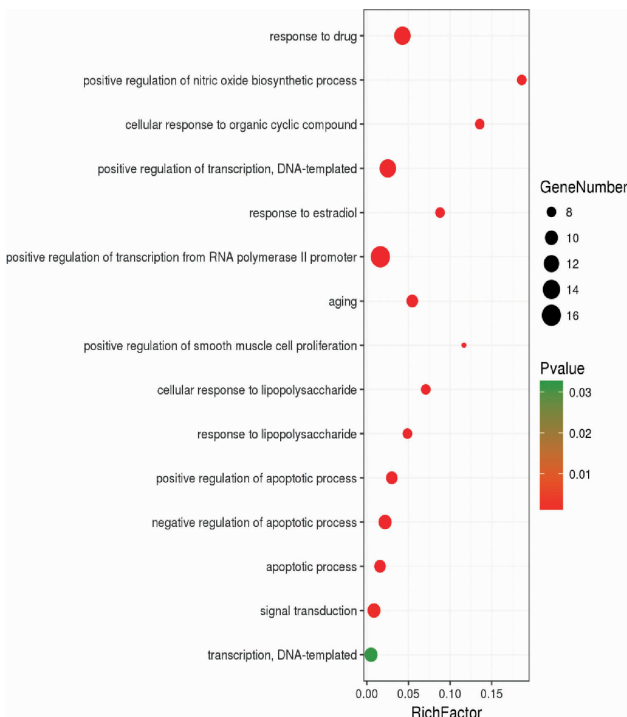


图 2 GO 生物学过程高级气泡图

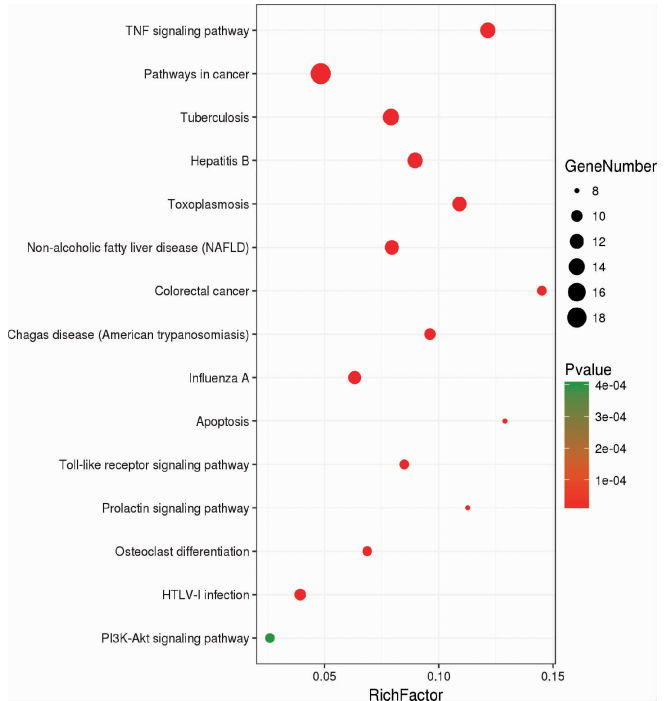


图 3 KEGG 通路气泡图

2.4 当归芍药散治疗慢性盆腔炎“活性成分—作用靶标—通路”网络

将 KEGG 通路富集分析得到的基因富集数排名前 15 的通路和当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用靶标和活性成分相对应,得到“活性成分—作用靶标—KEGG 信号通路”网络,见图 4。该网络由 57 个节点和 506 条边组成,13 个绿色菱形节点代表当归芍药散活性成分,29 个红色圆形节点代表当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用靶标,15 个橙色箭头节点代表 KEGG 信号通路,边代表三者间的相互作用。图中节点越大,说明其在网络中越重要,对慢性盆腔炎的影响也越大。网络拓扑学结果表明,山柰酚 (kaempferol)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol) 等活性成分与 PTGS2、TNF- α 、JUN 等靶标基因在网络中的节点度值排名靠前可能是当归芍药散治疗慢性盆腔炎的核心活性成分与核心作用靶标。网络中每种活性成分对应多个作用靶标,每个作用靶标又连接多种活性成分,且多条通路中间通过共有作用靶标相互连接,表示当归芍药散治疗慢性盆腔炎具备多成分、多靶点、多通路的特点,与中医学整体观念不谋而合。

3 讨论

本研究基于网络药理学的方法探讨当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用机制,结果显示山柰酚、 β -谷

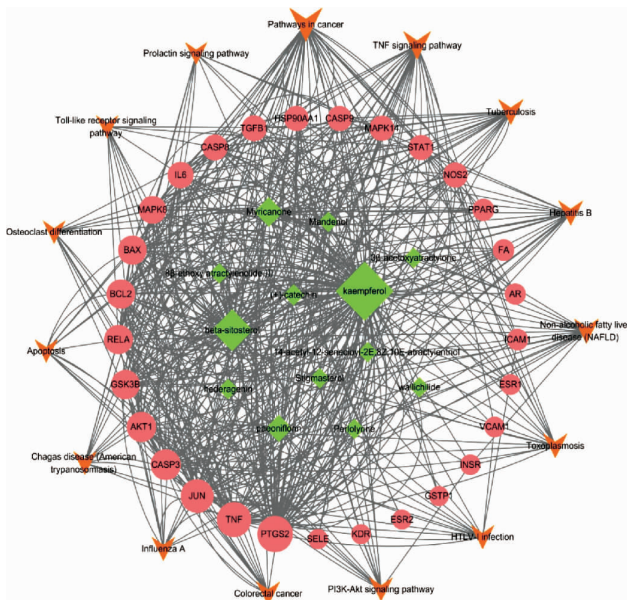


图4 活性成分—作用靶标—KEGG 信号通路网络

甾醇等可能是核心活性成分。山柰酚是一种黄酮类化合物,相关研究表明其具有抗氧化反应、抗炎、保护神经等诸多作用^[1]。山柰酚可以抑制 PTGS2(COX-2)、IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症介质的释放,减少炎症反应的发生与减轻炎症反应过程中出现的黏膜充血、水肿、局部红肿热痛等症状^[12-13]。 β -谷甾醇能够增强机体氧自由基清除能力,提升血清 NO 含量,抑制 TNF- α 等炎症因子的聚集与释放,下调 NF- κ B 信号转导通路的活化^[14-15],具有广泛的抗炎活性。因此,笔者推测当归芍药散的关键活性成分与抗炎机制有一定的关联,其通过抗炎机制作用于慢性盆腔炎,与近年来研究当归芍药散治疗慢性盆腔炎的机制基本一致。

本研究预测出 PTGS2、TNF- α 、IL-6、JUN 等为当归芍药散治疗慢性盆腔炎的核心作用靶标。PTGS2 又称环氧酶-2(COX-2),在细胞受到促炎细胞因子等刺激时,COX-2 表达上调,并参与炎症的形成和发展^[16]。许多实验研究表明,通过下调 COX-2 可以减轻炎症反应^[17-18]。TNF- α 、IL-6 为重要的炎症因子,其大量分泌能够导致细胞因子水平的失衡与紊乱,最终引起盆腔周围结缔组织发生充血、水肿,逐渐演变成慢性盆腔炎^[19-20]。c-jun 在整个月经周期中对子宫内膜的细胞增殖和凋亡起作用,c-jun 蛋白水平的循环变化可以防止基质细胞在晚期分泌期进入细胞凋亡^[21]。因此,这些靶标基因都在炎症反

应、细胞增殖与凋亡、免疫反应中起到重要作用,是当归芍药散治疗慢性盆腔炎的关键作用靶标。

KEGG 富集结果显示,作用靶标显著富集在 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路等信号通路上。TNF 信号通路是由于 TNF 与 TNFR1 相互结合而激活,激活的 TNF 信号通路可以加强促炎性细胞因子、生长因子和 TNF- α 本身等基因的表达^[22]。Toll 样受体是 I 型跨膜蛋白受体,属于白细胞介素-1 受体超家族成员,TLRs 广泛存在于免疫细胞表面,可激活先天性免疫系统产生亲炎症细胞因子,启动后天性免疫系统。TLRs 介导免疫的信号转导途径中的 TLRs/NF- κ B 信号通路已基本阐明,此通路在免疫调节中发挥着极其重要的作用^[23]。当归芍药散可能通过作用于该通路,启动后天免疫系统,激活相关活性因子如 NF- κ B,调控相关炎症的基因表达,激活特异性免疫系统,抑制相关炎症因子的释放,从而起到抗炎等治疗效果,其与王志国^[4]、张志鹏^[5]和高升^[6]等人通过大鼠动物实验推测与调节机体免疫功能有关相吻合。

综上所述,本研究通过运用网络药理学研究方法,对当归芍药散治疗慢性盆腔炎的作用机制进行探讨,结果表明:当归芍药散活性成分山柰酚、 β -谷甾醇等活性成分可能通过 TNF、Toll 样受体等信号通路作用于 PTGS2、TNF- α 、JUN、IL-6 等关键靶标基因进而发挥其临床功效,达到治疗慢性盆腔炎等疾病的目的。分析结果与近年来基础研究及临床研究结果具有高度的一致性,具有一定的参考和提示价值,将为本课题组进一步深入设计实验研究当归芍药散抗炎抗菌、调控机体免疫力等复杂效用机制奠定基础,也为其它复杂成分方药的研究提供一定的方法学参考。

参考文献

- [1] 生秀杰,陈敦金.盆腔炎的抗生素合理化应用[J].中国实用妇科与产科杂志,2008,24(4):259-261.
- [2] 戴璐,张思超.当归芍药散治疗慢性盆腔炎 40 例[J].山东中医药大学学报,2011,35(1):49-50.
- [3] 傅剑锋.当归芍药散治疗慢性盆腔炎 62 例疗效观察[J].湖南中医杂志,2017,33(6):70-72.
- [4] 王志国.当归芍药散对慢性盆腔炎模型大鼠的 TNF- α 、IL-2 影响[J].中医药学报,2005,33(5):39-40.

- [5] 张志鹏,高升,任存霞.当归芍药散对慢性盆腔炎模型大鼠分子免疫调控的影响[J].中华中医药学刊,2015,33(11):2684-2686.
- [6] 高升,高飞,闫亚楠,等.当归芍药散对慢性盆腔炎大鼠外周血Th、Tc细胞和NO、IL-4、IL-10的影响[J].中药新药与临床药理,2016,27(4):528-533.
- [7] 周文霞,程肖蕊,张永祥.网络药理学:认识药物及发现药物的新理念[J].中国药理学与毒理学杂志,2012,26(1):4-9.
- [8] 刘志华,孙晓波.网络药理学:中医药现代化的新机遇[J].药学报,2012,47(6):696-703.
- [9] 谢燕,马越鸣,王长虹,等.改善中药制剂口服生物利用度的研究概况与思考[J].国际药学研究杂志,2011,38(3):195-200.
- [10] CHEN G, HUANG C, LIU Y, et al. A Network pharmacology approach to uncover the potential mechanism of yinchensini decoction [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018,2018:1-14.
- [11] 张雅雯,邵东燕,师俊玲,等.山奈酚生物功能研究进展[J].生命科学,2017,29(4):400-405.
- [12] 周运江,王虎,李丽,等.山奈酚对脂多糖诱导的肥大细胞炎症反应的抑制作用[J].药学报,2015,50(6):702-707.
- [13] 陈美琪,金宏伟,陈振胜,等.山奈酚对脂多糖诱导RAW264.7细胞中COX-2和iNOS表达及产物生成的影响[J].沈阳药科大学学报,2013,30(12):982-985.
- [14] 肖志彬,刘小雷,成日青,等. β -谷甾醇对阿司匹林致胃黏膜损伤副作用及其药理作用的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(1):148-152.
- [15] 姚凤,周清燕,熊瑛,等. β -谷甾醇对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用研究[J].中国农学通报,2015,31(2):55-61.
- [16] 刘智豪,刘叔文,余乐.COX-2抑制剂联合抗肿瘤的研究进展[J].中国药理学通报,2012,28(12):1651-1654.
- [17] 黄小华,孙永,沈能,等.双亲姜黄素衍生物减轻大鼠肝纤维化与抗炎抗氧化作用的研究[J].中国药理学通报,2015,31(4):470-475.
- [18] 王斌,曹慧,沈甜,等.麝香、冰片对大鼠脑缺血-再灌注急性期和恢复早期炎症损伤的保护作用及机制研究[J].中药材,2015,38(10):2139-2143.
- [19] 凌娜,陈莹.妇炎宁汤对慢性盆腔炎大鼠模型体内TNF- α 影响[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(5):110-112.
- [20] 王莉,吕耀凤,姚丽娟.慢性盆腔炎患者促炎因子与抗炎因子的关系[J].中国妇幼保健,2012,27(33):5292-5294.
- [21] UDOU T, HACHISUGA T, TSUJIOKA H, et al. The role of c-Jun protein in proliferation and apoptosis of the endometrium throughout the menstrual cycle[J]. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2004,57(3):121-126.
- [22] 陈国铭,汤顺莉,邝梓君,等.基于系统药理学的茵陈作用机制研究[J].中国药房,2018,29(10):1312-1319.
- [23] FANG H, WU Y, HUANG X, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011,35(286):30393-30400.

(本文编辑 苏维)