

本文引用:王茜,何忆清,李哲靓,余歌星,苏艳红,刘慧萍,杨硕.基于网络药理学探讨逍遥散调控多囊卵巢综合征子宫内膜容受性的作用机制及实验验证[J].湖南中医药大学学报,2023,43(1):69-79.

基于网络药理学探讨逍遥散调控多囊卵巢综合征 子宫内膜容受性的作用机制及实验验证

王茜,何忆清,李哲靓,余歌星,苏艳红,刘慧萍,杨硕*
湖南中医药大学,湖南长沙410208

[摘要] **目的** 基于网络药理学及实验验证初步探究逍遥散调控多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)子宫内膜容受性的核心中药、活性成分、药物靶点和作用机制。**方法** 通过TCMSP、ETCM数据库筛选逍遥散活性成分及潜在作用靶标,应用GeneCards和OMIM数据库检索PCOS疾病靶点,GEO数据库筛选子宫内膜容受性相关差异表达基因,取其交集获得PCOS子宫内膜容受性相关靶点;再将药物与PCOS子宫内膜容受性相关靶点取交集;通过STRING数据库对交集基因进行PPI分析,对交集基因进行GO和KEGG功能富集分析;运用Cytoscape软件,初步构建逍遥散调控PCOS子宫内膜容受性的“中药-核心成分-潜在靶点-通路”网络。验证实验以Ishikawa细胞为受试对象,通过Western blot及qRT-PCR检测逍遥散及其核心中药含药血清对Ishikawa细胞VEGF、VEGFR2、COX2、PKC和整合素 $\alpha v\beta 3$ 的蛋白及mRNA表达的影响。**结果** GeneCards和OMIM数据库获得5451个疾病基因,GEO数据库获得375个差异表达基因,取交集获得102个PCOS子宫内膜容受性相关靶点;在逍遥散方中获得161个药物活性成分,222个药物靶点,最终得到29个交集基因。GO功能富集分析发现,主要涉及脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、蛋白多糖等分子功能。KEGG通路富集分析发现,其主要涉及P53、NF- κ B、AGE-RAGE、VEGF等信号通路。初步筛选出逍遥散调控PCOS子宫内膜容受性的核心中药为柴胡、白芍、薄荷、甘草4味。细胞实验表明,与空白血清组比较,逍遥散、逍遥散核心中药、阿司匹林含药血清组的VEGF、VEGFR2、COX2、PKC、整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白及mRNA表达明显升高($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 逍遥散、逍遥散核心中药可能通过调控子宫内膜VEGF信号通路,促进子宫内膜血管生成,改善子宫内膜容受性。

[关键词] 逍遥散;多囊卵巢综合征;子宫内膜容受性;网络药理学;VEGF信号通路

[中图分类号]R271 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.011

Mechanism exploration of Xiaoyao Powder regulating endometrial receptivity in PCOS based on network pharmacology and its experimental verification

WANG Xi, HE Yiqing, LI Zheliang, YU Gexing, SU Yanhong, LIU Huiping, YANG Shuo*
Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of Xiaoyao Powder (XYP) regulating endometrial receptivity in polycystic ovary syndrome (PCOS) and its core herbs, active components and potential therapeutic targets, based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** The active components and potential therapeutic targets of XYP were obtained through TCMSP

[收稿日期]2022-05-18

[基金项目]国家自然科学基金项目(81503611);湖南省自然科学基金项目(2020JJ5427);湖南省教育厅优秀青年项目基金(20B428);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH59)。

[第一作者]王茜,女,硕士研究生,研究方向:妇科疑难症防治研究。

[通信作者]*杨硕,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:42180672@qq.com。

and ETCM database screening. GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databases were used to search for disease targets of PCOS, and Gene Expression Comprehensive database (GEO) was used to find differentially expressed genes associated with endometrial receptivity. Finally, they were crossed to obtain PCOS endometrial receptivity related targets. The intersection of drugs and endometrial receptivity related targets of PCOS was selected. Then the intersected genes were imported into the STRING database for the protein-protein interactions network analysis. And GO biological function process and KEGG metabolic pathway enrichment analysis of them were also performed to explore the potential molecular mechanism. A network of "Chinese medicine-core component-target-pathway" was conducted by Cytoscape. Ishikawa cells were taken as the subjects in the confirmatory experiment. The effects of XYP medicated serum on VEGF, VEGFR2, COX2, PKC, integrin $\alpha\beta 3$ protein and mRNA expression in Ishikawa cells were detected by Western blot and qRT-PCR methods. **Results** A total of 5451 disease genes were acquired from GeneCards and OMIM databases; 375 differentially expressed genes were gained from GEO database, and 102 PCOS endometrial receptivity related targets were obtained by taking the intersection. A total of 161 active pharmaceutical components and 222 drug targets were obtained in XYP, from which 29 intersection genes were finally screened. GO enrichment showed that molecular function, such as lipids and atherosclerosis, fluid shear stress and atherosclerosis, and proteoglycans were concerned. KEGG pathway enrichment analysis indicated that P53, NF- κ B, AGEs-RAGE, VEGF and other signaling pathways were mainly involved. In regulating endometrial receptivity, the core Chinese medicines of XYP were Chaihu (Radix Bupleuri), Baishao (Radix Paeoniae Alba), Bohe (Herba Menthae), and Gancao (Radix et Rhizoma Glycyrrhizae). Cell experiments showed that compared with the blank serum group, the expression of VEGF, VEGFR2, COX2, PKC and integrin $\alpha\beta 3$ protein and mRNA increased significantly in XYP group, XYP core Chinese medicines group and aspirin-containing serum group ($P<0.01, P<0.05$). **Conclusion** XYP and its core Chinese medicines may affect endometrial angiogenesis to improve endometrial receptivity by regulating VEGF signaling pathway.

[**Keywords**] Xiaoyao Powder; polycystic ovary syndrome; endometrial receptivity; network pharmacology; VEGF signaling pathway

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是引起育龄期女性不孕的主要疾病之一,占育龄期女性的6%~10%,且发病率呈逐年上升趋势,严重影响女性生殖健康^[1]。其中,排卵障碍与子宫内膜容受性不良是PCOS患者不孕最重要的两大因素,现代医学尝试多种方法,往往导致高排低孕,疗效不佳。如何提高临床妊娠率和胚胎质量,同时降低子宫内膜容受性不良造成的生化妊娠、自然流产等风险,一直是生殖医学界亟待解决的难点问题。本课题组前期临床研究发现,补肾调泡周期治疗组(以逍遥散、三子汤为基础)总疗效明显优于对照组(克罗米芬组)($P<0.01$),且治疗组治疗后子宫内膜厚度及内膜类型明显优于对照组,A型、B型子宫内膜所占比例明显高于对照组,差异均具有统计学意义($P<0.01$)^[2]。补肾调泡周期疗法在提高胚胎着床率和临床妊娠率方面取得了显著的临床疗效。但其有效性分子机制不明,有待进一步实验探索。

逍遥散出自宋代《太平惠民和剂局方》,方由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜、薄荷、甘草组成,具

有调和肝脾、疏肝解郁、养血健脾之功效^[3]。研究表明^[4-7],逍遥散能增加子宫内膜厚度,改善子宫内膜血供,为胚胎着床创造适宜的微环境。近年来,中医药改善子宫内膜容受性的相关研究日益增多,研究结果表明,中医药能提高子宫内膜容受性且疗效显著^[8]。为进一步探究逍遥散通过何种机制发挥改善PCOS子宫内膜容受性的作用,本研究运用网络药理学方法,对逍遥散改善PCOS子宫内膜容受性的核心中药、核心成分、作用靶点、信号通路加以预测及分析。结合体外细胞实验加以验证,在分子水平层面初步探究逍遥散改善子宫内膜容受性的作用机制,为其后续进一步动物实验研究与临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 逍遥散方组成分、靶点收集 应用中草药系统药理学平台TCMSP(<http://tcmsp.com/index.php/>)和中医百科全书ETCM(<http://www.tcmip.cn/ETCM/in->

dex.php/)数据库,输入关键词“柴胡”“当归”“白芍”“白术”“茯苓”“甘草”“生姜”“薄荷”。以口服生物利用度(oral-bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件,构建活性成分数据库,并利用 TC MSP 数据库中靶点预测模型预测所筛选出化合物的潜在作用靶点;ETCM 数据库中以类药性评分(drug-likeness grading) ≥ 0.49 为活性成分筛选条件,以候选基因评分(candidate target genes) > 0.8 为靶蛋白筛选条件,将两个数据库中的数据合并,删除重复项,构建成分对应靶蛋白数据库。

1.1.2 PCOS 子宫内膜容受性基因收集 以“polycystic ovary syndrome”为检索式在人类基因组注释数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和在线《人类孟德尔遗传》数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) 数据库检索,合并删除重复靶点,得到 PCOS 疾病靶点。在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的基因表达数据库 GEO (Gene Expression Omnibus, GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 以“endometrial receptivity”进行检索,查看所有结果。具体数据筛选标准如下:(1)物种为人;(2)样本数量 > 30 ^[9];(3)子宫内膜容受性不良;本研究使用基因芯片数据集 GSE111974 进行后续分析,该数据集包含正常子宫内膜组织 24 例,反复植入失败子宫内膜组织 24 例。利用 R 语言(<https://www.r-project.org/>) 对每个样本进行背景校正处理;设置 $|\log 2FC| > 1$, $P < 0.05$ 为 DEG 截取阈值;最后运用 R 语言对差异基因进行可视化分析。将 PCOS 疾病靶点与子宫内膜容受性不良差异表达基因取交集,得到 PCOS 子宫内膜容受性不良相关基因。

1.1.3 逍遥散调控 PCOS 子宫内膜容受性靶点基因预测 将逍遥散活性成分对应靶蛋白与“1.1.2”项下筛选的 PCOS 子宫内膜容受性不良相关基因进行匹配取交集,得到逍遥散调控 PCOS 子宫内膜的靶基因,绘制韦恩图展示交集。

1.1.4 PPI 网络的构建 将上述“1.1.3”项下获得的交集基因靶点信息提交至功能蛋白联系网络数据库 (STRING) (<https://string-db.org/>), 设置生物种类为人,置信度 > 0.7 , 得到的 PPI 网络图,应用 R 语言统计出现频次前 20 的靶点并绘制条形图。

1.1.5 GO 富集与 KEGG 通路分析 在 R 语言安装“Biconductor”与“Cluster Profiler”软件包,以 $P < 0.01$ 为卡值进行靶点基因的 GO 与 KEGG 富集分析,结果用条形图展示。

1.1.6 逍遥散调控子宫内膜容受性核心中药、成分筛选 通过靶点基因映射,建立中药、活性成分、通路间的对应关系。将“中药-成分”“成分-核心靶点”“核心靶点-通路”对应关系及属性导入 Cytoscape (<https://www.bytesin.com/software/Cytoscape/>), 建立逍遥散调控 PCOS 子宫内膜容受性“中药-成分-核心靶点-通路”网络。并使用 Cytoscape 的 Network Interpretation 工具进行网络分析,以 Degree ≥ 10 筛选网络中核心中药^[9]。

1.2 体外实验验证

1.2.1 被试药物 逍遥散汤剂组方:柴胡 6 g, 当归 10 g, 白芍 10 g, 白术 10 g, 茯苓 10 g, 生姜 3 g, 薄荷 3 g, 炙甘草 5 g。根据上述网络药理学“1.1.6”的筛选结果,逍遥散核心中药即柴胡、白芍、薄荷、炙甘草 4 味。因此逍遥散核心中药组方:柴胡 9 g, 白芍 15 g, 薄荷 4.5 g, 炙甘草 7.5 g (剂量为原方剂量 1.5 倍,当药味减少可适当增加药物剂量,符合临床用药规律^[10])。以上饮片购自湖南中医药大学第一附属医院门诊部中药房。阿司匹林肠溶片(批号:210503,规格:50 mg/片,湖南新汇制药股份有限公司)购自湖南中医药大学第二附属医院。

1.2.2 动物和含药血清制备 健康 SD 大鼠 20 只,雌性,SPF 级,体质量 220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004,动物质量合格证号:430727211102348847,动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心,昼夜交替 12 h,温度 22~26 °C,湿度 40%~50%。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理号:LL2021101306)。按“1.2.1”项剂量分别称取逍遥散及逍遥散核心中药,将薄荷、生姜以外的饮片分别混合并浸泡 30 min,煎煮 2 次,第 1 次加 10 倍量水,煎煮 30 min,第 2 次加 8 倍量水,煎煮 20 min,在煎煮结束前 5 min 加入薄荷、生姜,合并两次煎液离心滤过,滤液减压分别浓缩至含生药浓度为 2.66、2.40 g·mL⁻¹,阿司匹林肠溶片用 0.5%羧甲基纤维素钠配制含药浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的溶液。参照国锦等的方法^[11],20 只 SPF 级 SD 雌性大鼠,常规适应

性喂养 1 周后,按随机数字表法分为空白组、逍遥散组、逍遥散核心中药组、阿司匹林组,每组 5 只,各含药血清组均以临床等效剂量的 5 倍进行灌胃,给药剂量分别为 $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $18.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $39.375 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,空白组给予等体积的生理盐水灌胃,2 次/d,连续 3 d,末次灌胃后 1 h,大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血,随后脱颈椎处死。全血静置 2 h 待血液凝固后 $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心(离心半径 17.8 cm) 15 min,取上层血清,于恒温水浴锅 $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min,经 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器滤过后分装,于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 细胞 人子宫内膜 Ishikawa 细胞,购自中国武汉普诺赛生命技术有限公司,批号:CL-0283,STR 鉴定正确。

1.2.4 试剂 胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)含酚红(批号:PB180226)、青霉素-链霉素溶液(批号:PB180120)、PBS 缓冲液(批号:PB180327)、RPMI-1640 培养基(批号:PM150110)、Ishikawa 细胞专用培养基(批号:CM-0283)购自武汉普诺赛生命技术有限公司;蛋白酶抑制剂混合物(批号:CW2200S)购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号:E-BC-K318-M)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;ECL 高效化学发光试剂盒(批号:GE2301-100)购自美国 Genview 公司;环氧合酶 2(COX2)抗体、血管内皮生长因子(VEGF)抗体(批号分别为:R23969、251622)购自成都正能生物技术有限责任公司;GAPDH 抗体、整合素 $\alpha\beta 3$ 抗体、蛋白激酶 C(PKC)抗体、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)抗体(批号分别为:AF7021、AF6086、AF6196、AF6281)购自美国 Affinity 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号:E-AB-1003)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;超纯总 RNA 提取试剂盒(批号:5003050)购自杭州新景生物试剂开发有限公司;逆转录试剂盒、扩增试剂盒(批号:E047-01B、E096-01A)购自上海近岸科技有限公司;VEGF、VEGFR2、COX2、PKC、整合素 $\alpha\beta 3$ 、GAPDH 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2.5 仪器 CO_2 培养箱(德国 Heraeus 公司);SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州苏净仪器自控设备有限公司);Heraeus Fresco 17 型超速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Cytation 3 型多功能

酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);T100 Thermal Cycler qRT-PCR 仪;Chemi-DoC-XRS+化学发光成像分析仪;Mini-PROTEAN Tetra 型电泳槽、Mini Trans-Blot 型转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.6 细胞分组及干预 子宫内膜细胞 Ishikawa 为贴壁细胞,细胞置于 Ishikawa 细胞专用培养基, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养。稳定传代,将处于对数生长期的 Ishikawa 细胞以 2×10^6 /孔接种于 6 孔板,待细胞贴壁,用不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基饥饿处理 24 h,使细胞周期同步化。设置空白对照组、逍遥散组、逍遥散核心中药组和阿司匹林组;各组分别加入含 10% 血清的 RPMI-1640 培养液,干预 24 h。

1.2.7 Western blot 检测含药血清对人子宫内膜 Ishikawa 细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha\beta 3$ 蛋白表达的影响 按“1.2.6”项下方法处理细胞和分组,用等渗 PBS 润洗 2~3 次,充分去除残留的培养基,收集各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,将细胞和裂解液转移至 1.5 mL EP 管中,提取细胞总蛋白。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作进行蛋白质量浓度测量,然后配制上样体系。蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜上,加入 5% 牛奶室温封闭 60 min,分别加入 GAPDH(1:8000)、VEGF(1:2000)、VEGFR2(1:2000)、COX2(1:2000)、PKC(1:2000)和整合素 $\alpha\beta 3$ (1:2000)抗体, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 清洗 3 次,加入山羊抗兔二抗(1:10 000), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, TBST 清洗 3 次;采用 ECL 高效化学发光试剂盒显影,采用 Image Lab 软件分析条带灰度值。

1.2.8 qRT-PCR 检测含药血清对人子宫内膜 Ishikawa 细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha\beta 3$ mRNA 表达的影响 按“1.2.6”项下方法处理细胞和分组,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA,然后转录成 cDNA,运用 qRT-PCR 检测各组中各 mRNA 的表达。以 GAPDH 为内参计算上述关键基因的相对表达量,计算公式: $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{样品 Ct 均值}-\text{内参照 Ct 均值})-(\text{对照样品 Ct 均值}-\text{对照内参照 Ct 均值})$,将各组获得目的基因和对照基因 Ct 值求平均值,采用相对定量法计算各组相对于空白组的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值。基因引物序列详见表 1。

表1 qRT-PCR 引物信息

基因名	上游引物	下游引物	长度/bp
VEGF	ACATCACCATGCAGATTATGCC	CTCCAGGGCATTAGACAGCA	229
VEGFR2	GGCATCGCGAAAGTGTATCC	TTCAAAGGGAGGCGAGCAT	154
COX2	CAAATGCTGGCAGGGTTGC	AGGGCTTCAGCATAAAGCGT	139
PKC	CACGAGGTGAAGGACCACAAA	TGTTTCCCAAACCCCCAGAT	95
整合素 α v β 3	CTGCCGTGACGAGATTGAGT	CCTTGGGACACTCTGGCTCT	167
GAPDH	AATGGGCAGCCGTTAGAAA	GCCCAATACGACCAAATCAGAG	166

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,进行正态性检验。服从正态分布且方差齐性的计量资料,两组间比较采用独立样本 t 检验;如不满足正态分布且方差齐性时,两组间比较用 Wilcoxon 秩和检验。多组计量资料比较,符合方差齐性采用单因素方差分析,方差不齐时采用非参数秩和检验。两变量间关系运用直线相关分析。计数资料采用完全随机设计多样本比较的秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 逍遥散方主要成分 通过对 TCMS、ETCM 数据库的检索,并删除重复项后,获得 161 个活性成分,其中柴胡 17 个、白芍 13 个、当归 2 个、白术 7 个、茯苓 15 个、生姜 5 个、薄荷 10 个、甘草 92 个。将活性成分对应的靶点输入 UniProt 数据库,删除无效与重复的靶点,得到逍遥散有效活性成分的作用靶点 222 个。

2.1.2 PCOS 子宫内膜容受性基因 通过对 GeneCards 和 OMIM 数据库检索,合并删除重复靶点,得到 5451 个 PCOS 疾病靶点。应用 R 语言共筛选出 375 个子宫内膜容受性不良差异表达基因,其中 204 个上调、171 个下调(图 1)。表达出现显著差异排名前 40 的基因(图 2)。将 PCOS 疾病靶点与子宫内膜容受性不良差异表达基因取交集,得到 102 个 PCOS 子宫内膜容受性不良相关基因。

2.1.3 药物-疾病相关基因共同靶点 在 Venny 2.1 网站(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)将 PCOS 子宫内膜容受性不良相关基因与逍遥散活性成分靶点基因分别导入,取交集,共得出 29 个交集基因,并绘制韦恩图。详见图 3。

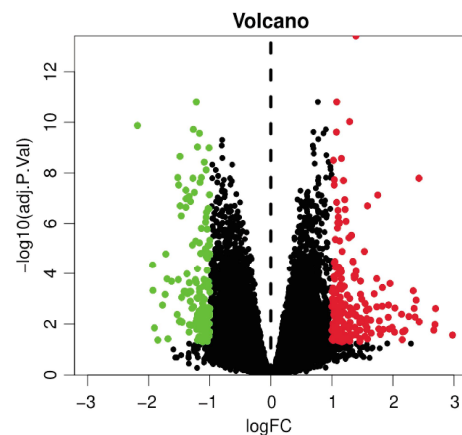


图1 差异表达基因火山图

注:右侧区域(红色)为表达上调的基因,左侧区域(绿色)是表达下调基因,中间区域内为 $|\log_2FC| \leq 1$ 或者 $P \geq 0.05$ 的基因。

2.1.4 共同靶点 PPI 分析 将共同靶点导入 STRING 数据库,获得 29 个节点、73 条边的 PPI 网络图,见图 4。其中蛋白互作频次较高的有前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2),基质金属蛋白酶 2 (MMP2),过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPARG) 等是整个网络的节点蛋白。

2.1.5 GO 富集和 KEGG 通路分析 通过 R 语言对逍遥散-疾病差异表达基因共同靶点涉及的生物学过程和分子功能进行 GO 富集(图 5A),结果显示共同靶点共富集得到 22 个 GO 条目,主要涉及脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化、蛋白多糖等分子功能;KEGG 共富集了 14 条通路(图 5B),关键靶标主要富集在 P53、NF- κ B、AGE-RAGE、VEGF 等信号通路,上述通路可能是逍遥散改善 PCOS 患者子宫内膜容受性的关键调节通路,而 PTGS2、HMOX1、VCAM1 是各通路主要的富集基因。多项文献研究^[12-15]发现,PCOS 患者子宫内膜容受性低与血管生成及 VEGF 密切相关;再结合 GO、KEGG 的富集结果,逍遥散调控 PCOS 患者子宫内膜容受性的可能机制主要与血管生成、VEGF 信号通路(图 6)相关。因此,我们首先选择 VEGF 信号通路进行体外实验验证。

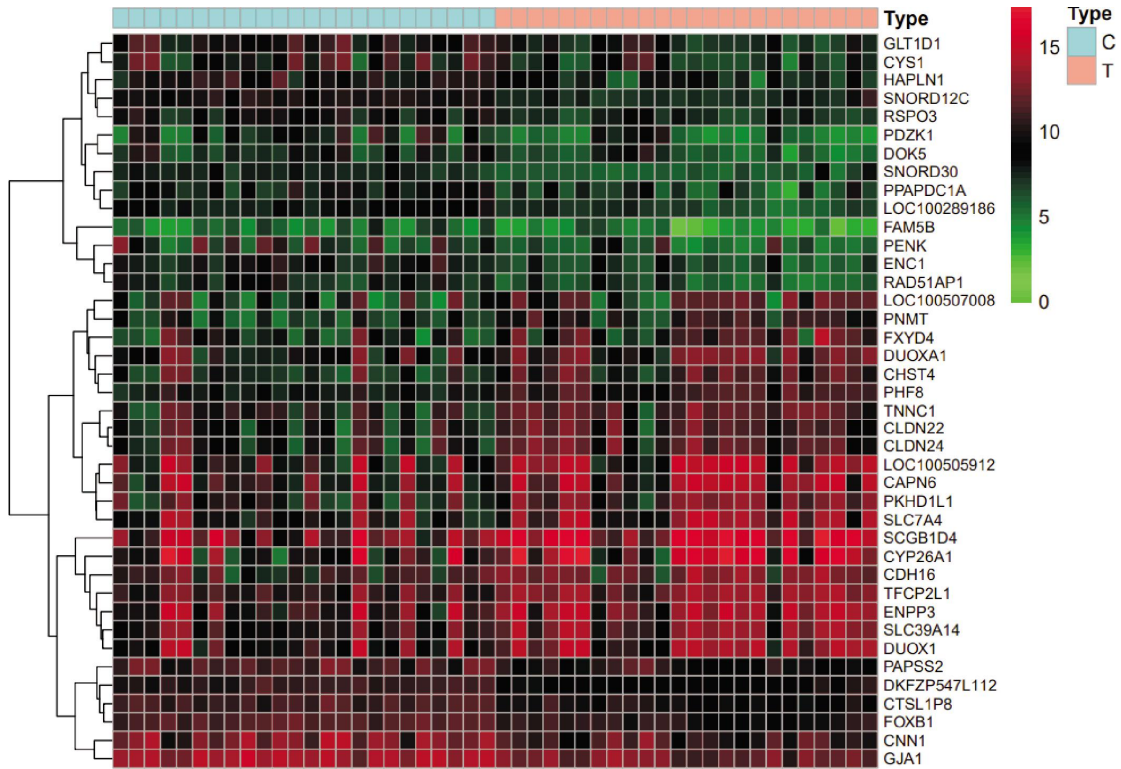


图 2 排名前 40 差异基因热图

注:左侧蓝色样本为正常子宫内膜组织,右侧粉色样本为子宫内膜容受性不良的子宫内膜组织,绿色代表低表达,红色代表高表达。

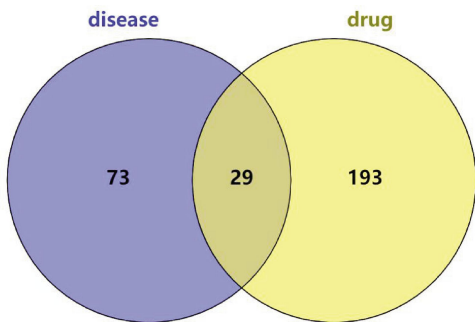


图 3 PCOS 子宫内膜容受性不良相关基因与逍遥散靶点基因交集韦恩图

2.1.6 逍遥散调控 PCOS 子宫内膜核心中药 将 29 个核心靶点通过映射,构建“中药-成分-核心靶点-通路”网络(图 7)。对“中药-活性成分-核心靶点-通路”网络中的中药、活性成分进行 Degree 评价,以 Degree ≥ 10 为卡值筛选核心中药、核心成分,得出核心中药为柴胡、白芍、薄荷、甘草。

2.2 实验验证结果

2.2.1 含药血清对人子宫内膜 Ishikawa 细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白表达的影

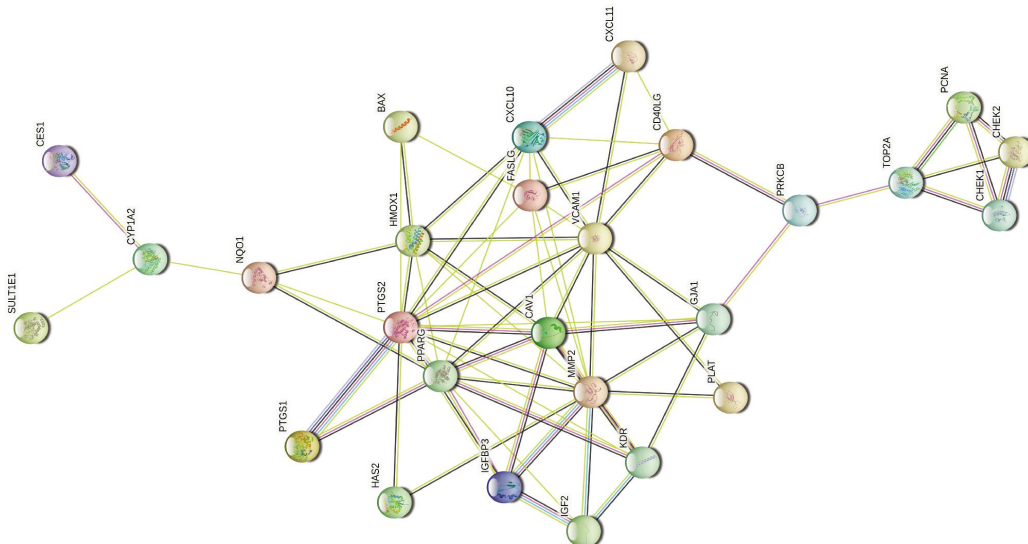


图 4 PPI 蛋白互作网络图

注:图中每个节点代表各基因对应的蛋白质,连接各节点的边代表蛋白质之间的互作关系,节点连边越多代表其互作关系越密切。

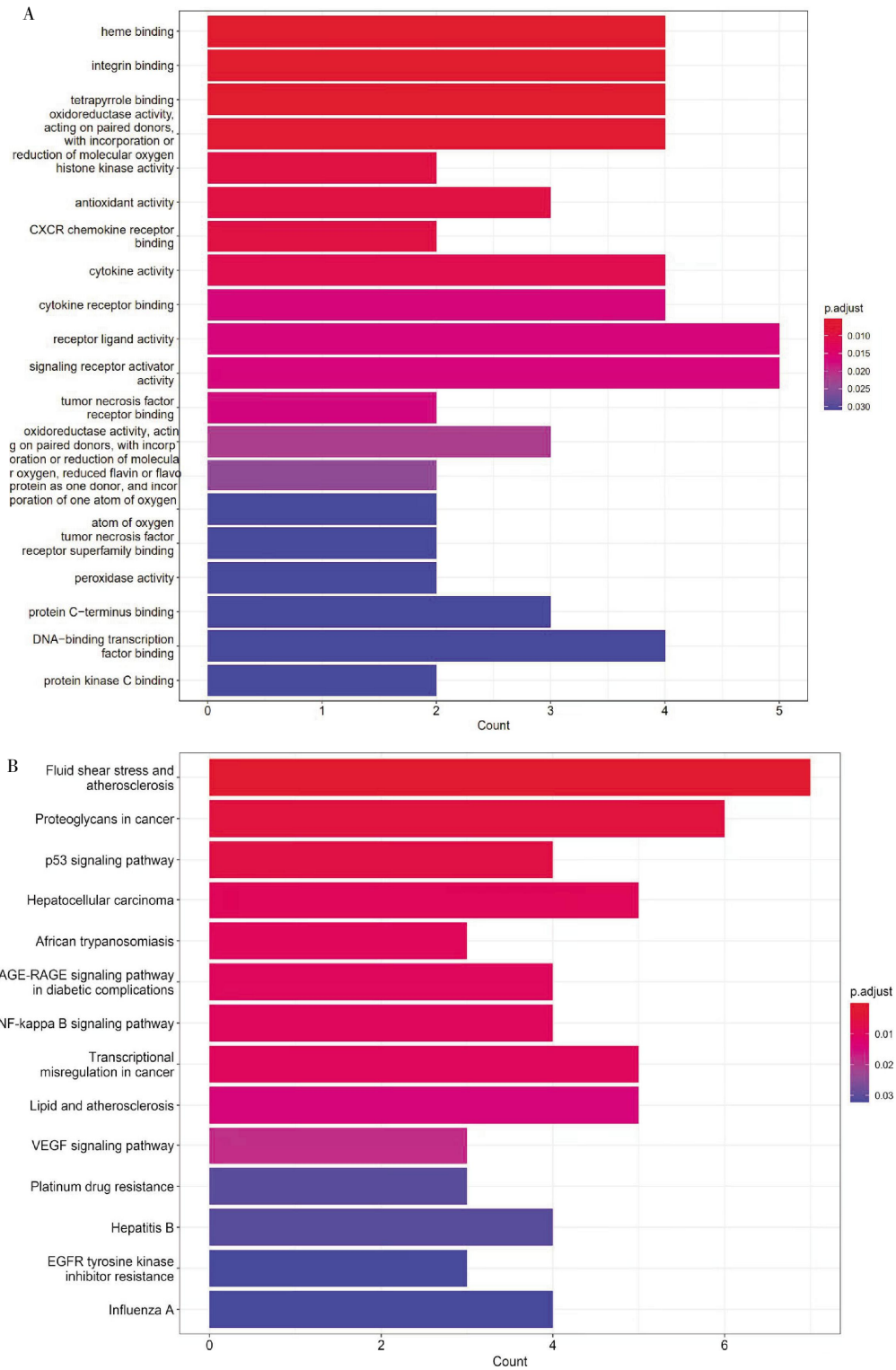


图5 GO功能(A)和KEGG通路(B)富集分析条形图

注:作图限定为最多显示20个条目,横坐标表示基因的数目,颜色代表P值大小,从深红到深蓝表示P值逐渐变大。

响 与空白组比较,逍遥散组、核心中药组、阿司匹林组细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白表达水平均明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$);各给药组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 8。

2.2.2 含药血清对人子宫内膜 Ishikawa 细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha v\beta 3$ mRNA 表达的影响 与空白组比较,逍遥散组、核心中药组、阿司匹林组细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha v\beta 3$ mRNA 表达水平均明显增高,差异有统计

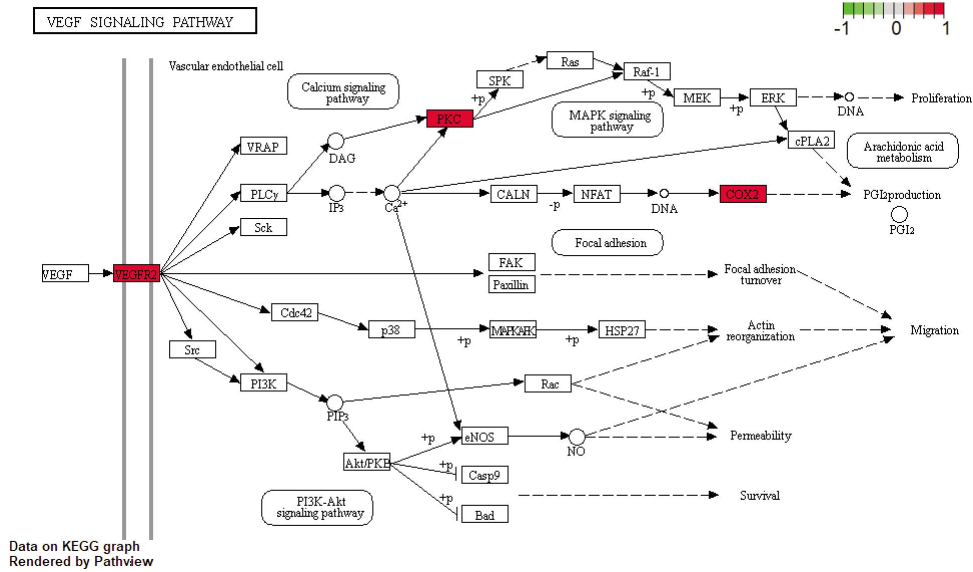


图 6 VEGF 信号通路

注:通路图中矩形代表基因或者蛋白质,圆形代表化学分子,红色代表上调,箭头代表分子间的相互作用或关系,钝角矩形代表其他信号通路。

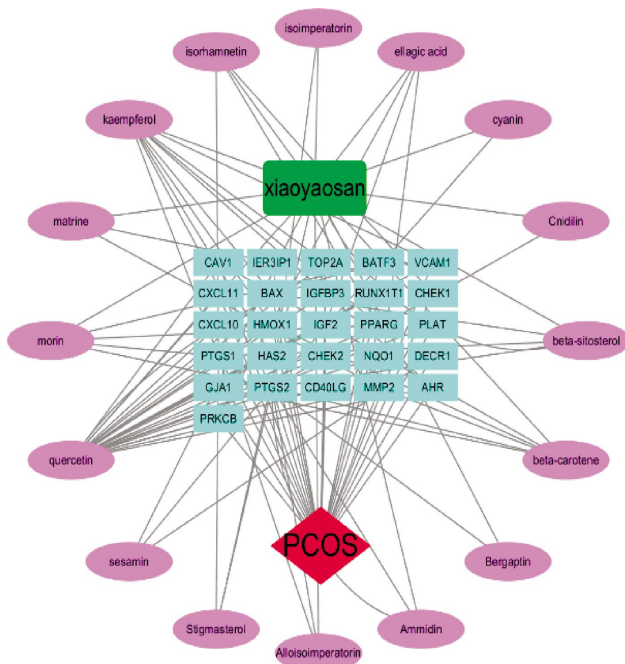


图 7 “中药-活性成分-核心靶点-通路”网络图

注:圈内天蓝色矩形节点为交集靶点,绿色矩形节点为方剂名,红色菱形节点代表疾病,圈外紫色圆形节点代表药物活性成分,每条边表示各节点之间的相互作用关系。

学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);各给药组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 9。

3 讨论

PCOS 是育龄期女性最常见的一种妇科内分泌疾病。在临床中发现 PCOS 患者临床妊娠率、持续妊娠率均显著低于正常女性^[16]。相关研究表明^[17],在形

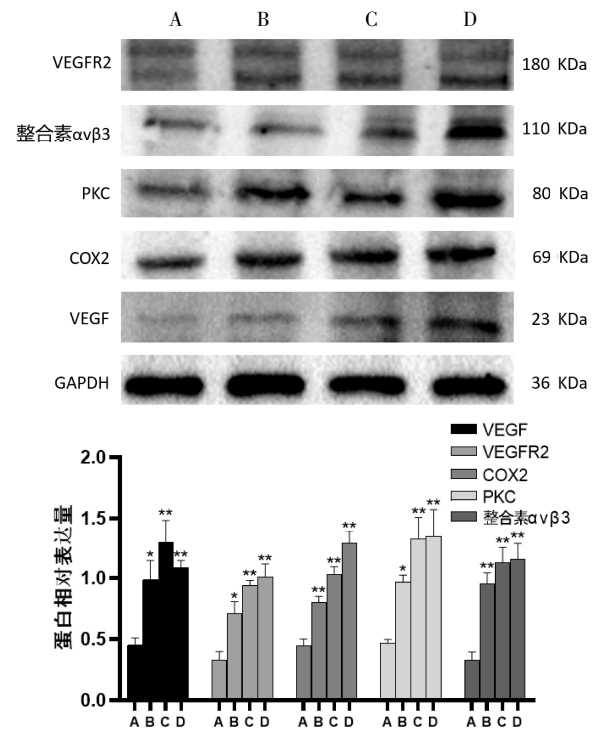


图 8 含药血清对子宫内 Ishikawa 细胞 VEGF、VEGFR2、COX2、PKC 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.空白组;B.逍遥散组;C.逍遥散核心中药组;D.阿司匹林组。与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

态学方面,PCOS 患者黄体期子宫内膜厚度较正常女性明显偏薄,子宫动脉搏动指数(plusatility index PI)与阻力指数(resistance index, RI)升高,子宫血流减少,子宫内膜种植窗期胞饮突表达缺陷。在分子生物学方面,PCOS 患者子宫内膜容受性调控因子表达降低,包括整合素 $\alpha v \beta 3$ 、白血病抑制因子(leukemia

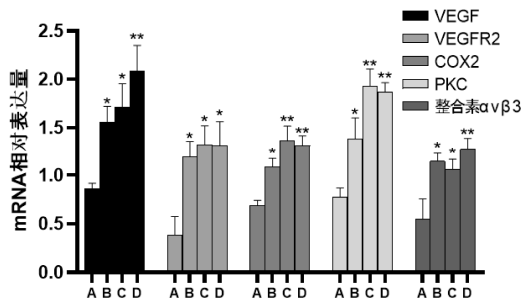


图9 含药血清对子宫内Ishikawa细胞VEGF、VEGFR2、COX2、PKC和整合素 $\alpha v \beta 3$ mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
注:A.空白组;B.逍遥散组;C.逍遥散核心中药组;D.阿司匹林组。与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

inhibitory factor, LIF)、同源框(homeobox, HOX)基因中HOXA10、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、性激素及其受体等。在临床中,即使是优秀的胚胎通过体外受精移植,也难以改变PCOS患者的高流产率^[18-19]。如何改善子宫内膜容受性,提高妊娠率,降低生化妊娠、自然流产的风险是我们攻克PCOS不孕的最后一道障碍也是生殖医学界亟待解决的难题。

中医学中多将PCOS归属于“月经后期”“月经过少”“闭经”“崩漏”“不孕”等范畴。柯印霞等^[20]在PCOS中医病因病机临床分析的研究中表明,病位证素中肾、肝、脾是其主要病位;在实证证素中,气滞积分最高。由上可知肝郁气滞是PCOS的重要病证类型,逍遥散的功效与PCOS的临床证素非常相符。陈兰等^[21]在对照组的基础上,运用丹栀逍遥散辅治PCOS不孕患者,与治疗前及同期对照组相比,丹栀逍遥散辅治能够增加子宫内膜厚度,降低RI、PI,提高妊娠率,有效改善子宫内膜容受性。实验研究表明^[22],疏肝法能改善超促排卵小鼠子宫内膜组织形态及血管通透性,增加妊娠率及胚胎着床数。为促进中药复方逍遥散作用机制可视化、证据化的研究与发展,本研究运用生物信息学技术,系统分析了逍遥散改善PCOS子宫内膜容受性的药效靶点及作用机制。

本研究通过网络药理学构建了逍遥散调控PCOS子宫内膜容受性的“中药-成分-核心靶点-通路”网络,筛选出逍遥散方组核心中药4味:柴胡、白芍、薄荷、炙甘草。PPI交集网络中核心蛋白有PTGS2、MMP2、PPARG、VCAM1、CAV1、HMOX1、CXCL10等,核心蛋白多数存在于富集分析得到的关键通路图

中;KEGG富集分析结果显示,关键靶标主要富集在P53、NF- κ B、AGE-RAGE、VEGF等14条信号通路。P53信号通路在蜕膜化进程中扮演重要角色,过度激活P53信号通路会干扰细胞周期调控因子的表达,细胞周期进入停滞状态,最终导致子宫内膜蜕膜化障碍^[23]。敲除小鼠p53基因会直接导致LIF水平下降,LIF是常用的子宫内膜容受性标志物,对胚胎植入起关键作用,LIF水平下降使子宫内膜容受性下降进而导致胚胎着床失败^[24]。研究发现,PCOS患者的着床窗口期子宫内膜呈现NF- κ B低表达,可能使子宫内膜容受性下降^[25]。KING等^[26]研究发现,NF- κ B在正常对照组着床窗口期子宫内膜的腺上皮细胞和间质细胞的胞浆内均呈阳性表达,与以上研究结果一致,均提示NF- κ B可能参与胚泡着床过程。AGE-RAGE信号通路能激活NF- κ B信号通路,能增强基质金属蛋白酶(MMPs)、血管内皮生长因子(VEGF)等的表达,从而促进炎症因子的表达和释放,诱导细胞凋亡、促进新生血管生成,从多方面调控子宫内膜^[27]。结合大量文献报道,VEGF信号通路与所研究的内容关系密切,VEGFR2、PKC和COX2是其潜在作用靶点。

Ishikawa细胞是子宫内膜上皮细胞株,表达雌、孕激素受体,免疫学和生物化学功能类似于正常子宫内膜,可表达正常子宫内膜上皮细胞的酶和结构蛋白,因此,国内外许多子宫内膜容受性相关研究选择Ishikawa细胞作为载体^[28-32]。本研究进一步通过细胞实验证实逍遥散及逍遥散核心中药组方含药血清均能明显上调人子宫内膜Ishikawa细胞中VEGF、VEGFR2、COX2、PKC和整合素 $\alpha v \beta 3$ 的蛋白和mRNA表达。整合素 $\alpha v \beta 3$ 在胚泡植入中可以介导胚泡与子宫内膜的双向识别、黏附及植入,是子宫内膜容受性的标记分子之一;逍遥散及逍遥散核心中药组方能明显上调整合素 $\alpha v \beta 3$ 的蛋白和mRNA表达。初步验证,逍遥散及逍遥散核心中药组方具有改善子宫内膜容受性的作用,可能通过VEGF信号通路上调VEGF、VEGFR2、COX2和PKC表达,促进子宫内膜血管生成,从而改善子宫内膜容受性。VEGF信号通路是逍遥散发挥作用的关键靶标通路,这与LIU等^[33]的研究结果一致;VEGF是血管内皮细胞特

异而强烈的有丝分裂原和血管发生的关键因子^[12],由 VEGF 介导的各信号通路分别参与血管新生各个过程,直接控制血管新生的发生发展,并在一定程度上决定了血管新生的结果^[34]。多项研究^[35-36]发现,VEGF 在整个月经周期子宫内膜上均有表达,黄体中期显著增加,说明 VEGF 与子宫内膜的容受性密切相关。与生育正常的妇女相比,PCOS 患者子宫内膜组织中 VEGF 的 mRNA 水平较低,VEGF 表达水平降低,影响血管生成及发育,减少子宫内膜血流量,从而导致子宫内膜容受性下降^[37]。VEGFR2 是 VEGF 主要功能受体,在早期胚胎着床时即表达升高,可在时间和空间上对子宫内膜血管新生进行调节^[7]。VEGF 与 VEGFR2 结合后,VEGFR2 胞内区 1175 位酪氨酸发生磷酸化,随后激活磷脂酶 C(PLC),PLC 又切割磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)转化为肌醇三磷酸酯(IP3)和二酰甘油(DAG),IP3 刺激内质网中 Ca²⁺释放进入细胞质,与 DAG 共同激活传统型 PKC^[38-39]。目前发现 PKC 有 3 种亚型 PKC- α 、PKC- β 和 PKC- ϵ 均参与 VEGF 调控的细胞增殖^[40-41]。有研究发现^[42],提高 PKC- α 和 PKC- ϵ 的活性能促进人子宫内膜细胞增殖,调控子宫内膜细胞因子和着床相关因子表达,促使子宫内膜达到接受态,胚胎顺利着床。COX2 是介导前列腺素合成的关键酶,在血管通透性和血管生成中也起着关键作用,COX2 缺乏会导致植入失败,其主要原因在于血管生成减少^[43]。

本研究基于网络药理学基础,结合体外细胞实验验证,初步证实:逍遥散调控 PCOS 子宫内膜容受性的核心中药为柴胡、白芍、薄荷、甘草 4 味;逍遥散可通过 VEGF 信号通路调控血管生成提高子宫内膜容受性;逍遥散及其核心中药在调控血管生成方面与阿司匹林疗效相当。该研究从分子、细胞水平和生物信息学技术全面阐述逍遥散药效靶点与作用机制,为深入开展基础研究及临床应用提供了参考依据。但本研究仅通过现有数据库和相关软件初步筛选逍遥散的有效成分和靶点,仅从细胞层面对筛选的某条通路进行初步验证,仍存在一定局限性。下一步将通过动物实验和临床研究等进一步阐释逍遥散调控 PCOS 子宫内膜容受性的作用机制及量效关系。

参考文献

- [1] 俞 瑾,俞超芹,侯丽辉,等.多囊卵巢综合征证治方案研究及应用[J].中国中西医结合杂志,2021,41(2):246-251.
- [2] 杨 硕.多囊卵巢综合征性不孕卵泡发育规律及中西医结合诊治临床研究[D].长沙:湖南中医药大学,2014.
- [3] 李 冀,魏 爽,郝 峰,等.散析逍遥散[J].中医药学报,2021,49(11):58-60.
- [4] 黄紫微,赵嘉梅,王希浩,等.疏肝补肾法对慢性应激肝郁证模型小鼠子宫内膜容受性的影响[J].中医学报,2018,33(8):1504-1509.
- [5] 高 星.补肾法、疏肝法改善子宫内膜容受性的作用及其与 Sphk1/S1P 通路的关系[D].石家庄:河北医科大学,2015.
- [6] 李 丽.补肾法、疏肝法改善子宫内膜容受性与调控 VEGFR-2 下游 MAPK 家族信号通路的关系[D].石家庄:河北医科大学,2017.
- [7] 魏学聪.补肾法、疏肝法改善超促排卵小鼠子宫内膜容受性与调控 MAPK 家族信号通路的关系[D].石家庄:河北医科大学,2017.
- [8] 于广琳,郑 晶.中医药改善子宫内膜容受性的研究进展[J].国际中医中药杂志,2021,43(3):304-307.
- [9] 张 迪,姜 凡,刘璐佳,等.基于 GEO 数据库对儿童哮喘急性发作靶基因的生物信息学分析[J].生命科学研究,2021,25(1):70-79.
- [10] 李 娟.基于网络药理学联合 mRNA 芯片探讨益气活血解毒方治疗卵巢癌的效应机制[D].北京:中国中医科学院,2020.
- [11] 国 锦,高 燕,赵瀚年.中药复方血清药理学研究方法进展[J].中华中医药杂志,2017,32(4):1656-1658.
- [12] HE M, LI L, WEI X, et al. Xiaoyao Powder improves endometrial receptivity via VEGFR-2-mediated angiogenesis through the activation of the JNK and P38 signaling pathways[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 282: 114580.
- [13] ZHAO D M, QU Q L, DAI H G, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α on endometrial receptivity of women with polycystic ovary syndrome[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(1): 414-421.
- [14] WANG L, LV S, LI F, et al. Letrozole versus clomiphene citrate and natural cycle: Endometrial receptivity during implantation window in women with polycystic ovary syndrome[J]. Front Endocrinol, 2020, 11: 532692.
- [15] TAL R, SEIFER D B, ARICI A. The emerging role of angiogenic factor dysregulation in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome[J]. Seminars in Reproductive Medicine, 2015, 33(3): 195-207.
- [16] 杨东霞,申儒霞,李红梅,等.微小 RNA 在多囊卵巢综合征发病机制中的研究进展[J].中国生育健康杂志,2022,33(1):81-83,89.
- [17] 王 丽,吕淑兰,毛文军,等.多囊卵巢综合征患者子宫内膜容受性和妊娠率分析[J].山西医科大学学报,2020,51(6):577-581.
- [18] GUO F, HUANG Y, FERNANDO T, et al. Altered molecular path-

- ways and biomarkers of endometrial receptivity in infertile women with polycystic ovary syndrome [J]. *Reproductive Sciences*, 2022.
- [19] ZHAO J, CHEN Q, XUE X. An update on the progress of endometrial receptivity in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Reproductive Sciences*, 2022, 29(8): 2136–2144.
- [20] 柯印霞,王常松,吕绍光.多囊卵巢综合征中医病因病机临床分析[J].*天津中医药大学学报*,2016,35(3):156–159.
- [21] 陈 兰,孔彩霞,莫一超.丹栀逍遥丸辅治多囊卵巢综合征排卵障碍性不孕症的疗效及对子宫内膜容受性影响[J].*中国医院药学杂志*,2022,42(3):304–307.
- [22] 耿丹丹,杜惠兰,魏学聪,等.补肾助孕方、逍遥丸对超促排卵小鼠围产期妊娠结局和子宫内膜容受性的影响[J].*中国中西医结合杂志*,2019,39(9):1095–1102.
- [23] 王 炜,赵小莹,古玥儒,等.p53介导蜕膜化受损致复发性流产的研究进展[J].*国际生殖健康/计划生育杂志*,2018,37(5):430–434.
- [24] FENG Z, ZHANG C, KANG H J, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members[J]. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011, 25(7): 2245–55.
- [25] 叶彩云.NF- κ B 和 Galectin-3 在 多 囊 卵 巢 综 合 征 患 者 着 床 窗 口 期 子 宫 内 膜 的 表 达 及 意 义[D].*郑州:郑州大学*,2012.
- [26] KING A E, COLLINS F, KLONISCH T, et al. An additive interaction between the NF kappa B and estrogen receptor signaling pathways in human endometrial epithelial cells[J]. *Human Reproduction*, 2010, 25(2): 510–518.
- [27] 宗春晓,徐 信,薛晓鸥,等.基于网络药理学的桃红四物汤治疗子宫内膜异位症作用机制研究[J].*中华中医药学刊*,2021,39(6): 137–140, 277–279.
- [28] WANG Z, KOTTAWATTA K S A, KODITHUWAKKU S P, et al. The fungicide Mancozeb reduces spheroid attachment onto endometrial epithelial cells through downregulation of estrogen receptor β and integrin β 3 in Ishikawa cells [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111606.
- [29] CHENG X, ZHANG Y, MA J, et al. NLRP3 promotes endometrial receptivity by inducing epithelial–mesenchymal transition of the endometrial epithelium[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2021, 27(11): gaab056.
- [30] BI Y, HUANG W, YUAN L, et al. HOXA10 improves endometrial receptivity by upregulating E–cadherin[J]. *Biology of Reproduction*, 2022, 106(5): 992–999.
- [31] 孔成才,雷 磊.阿司匹林通过上调 Ishikawa 细胞中 HOXA10 的表达促进胚胎的黏附[J].*临床与病理杂志*,2015,10:1810–1815.
- [32] 杨一凡,谢青贞.跨膜蛋白 16A 对胚胎着床和子宫内膜容受性的影响[J].*生殖医学杂志*,2019,04:397–403.
- [33] LIU K, MIN XL, PENG J, et al. The changes of HIF-1 α and VEGF expression after TACE in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Clinical Medicine Research*, 2016, 8(4): 297–302.
- [34] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等.VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J].*中国比较医学杂志*,2015,25(12):81–86.
- [35] GUO X, YI H, LI T C, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human embryo implantation: clinical implications[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 253.
- [36] ZHAO D M, SHAN Y H, LI F H, et al. Correlation between endometrial receptivity with expressions of IL-1 and VEGF in rats with polycystic ovary syndrome[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(13): 5575–5580.
- [37] 耿丹丹.补肾法、疏肝法改善子宫内膜容受性的作用与调控PI3K/Akt 通路的关系[D].*石家庄:河北医科大学*,2017.
- [38] CLAESSEON–WELSH L. Vascular permeability—the essentials[J]. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 2015, 120(3): 135–43.
- [39] 肖 书,赵佳仪,朱丽红.TREM2 在阿尔茨海默病发病进程中双重作用的研究进展[J].*生理科学进展*,2019,50(4):259–262.
- [40] HOLMES K, ROBERTS O L, THOMAS A M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor–2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition[J]. *Cellular Signalling*, 2007, 19(10): 2003–2012.
- [41] RASK–MADSEN C, KING GL. Differential regulation of VEGF signaling by PKC–alpha and PKC–epsilon in endothelial cells[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2008, 28(5): 919–924.
- [42] 李亚丽.DAG/PKC 信号转导途径调控机制的初步研究[D].*大连:大连医科大学*,2006.
- [43] SONG Y, ZHOU F, TAN X, et al. Bushen Huoxue recipe attenuates early pregnancy loss via activating endometrial COX2–PGE2 angiogenic signaling in mice [J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 36.