

“血水同治”的桂枝茯苓丸治疗子宫内膜异位症网络药理学机制研究[△]

谢 韬*, 杨碧蓉, 何培芝, 周 华[#] (上海中医药大学附属曙光医院妇科, 上海 201203)

中图分类号 R932; R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)06-0652-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.06.004

摘要 目的:探讨子宫内膜异位症中医常用药物桂枝茯苓丸的网络药理学机制。方法:通过数据库结合文献挖掘选出桂枝茯苓丸(桂枝、茯苓、赤芍、桃仁和牡丹皮)的主要活性成分,收集其靶点,同时通过疾病数据库获取子宫内膜异位症靶点。分析桂枝茯苓丸与子宫内膜异位症的共有靶点,选取共有靶点及其邻居节点构建“成分靶点-疾病靶点”核心网络,筛选出关键靶点进行基因本体(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,分析桂枝茯苓丸治疗 EMT 可能的生物过程和信号通路。结果:子宫内膜异位症靶点 1 600 个;桂枝茯苓丸经过筛选,明确活性成分达 51 个,靶点 823 个;病、药共有靶点 190 个。GO 功能富集分析结果表明,桂枝茯苓丸可能是通过调节大麻素受体 1(CB1)、大麻素受体 2(CB2)、红细胞沉降率(ESR)、孕激素受体(PGR)和花生四烯酸-5-脂加氧酶(ALOX-5)等靶点,上述靶点与蛋白质、DNA 及酶结合紧密相关,并涉及细胞凋亡、增殖和转录过程的正调节等多个生物过程。KEGG 通路富集分析结果表明,上述靶点与丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)等多条信号通路的调控相关。结论:通过网络药理学方法与技术,发现桂枝茯苓丸可通过调节 CB1、CB2、ESR、PGR 和 ALOX-5 等靶点,进而调控 MAPK 信号通路,积极干预了子宫内膜异位症增殖抗凋亡、黏附、侵袭和血管生成等病理过程,发挥其“血水同治”的作用。

关键词 血水同治;桂枝茯苓丸;网络药理学;子宫内膜异位症

Network Pharmacological Mechanism of Guizhi Fuling Pill in the Treatment of Endometriosis by Blood Stasis and Phlegm-Dispelling Therapy[△]

XIE Tao, YANG Birong, HE Peizhi, ZHOU Hua (Dept. of Gynecology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the network pharmacological mechanism of Guizhi Fuling pill in the treatment of endometriosis. METHODS: The main active ingredients of Guizhi Fuling pill (Guizhi, Fuling, Chishao, Taoren, Mudanpi) were selected by database and literature mining, and the targets were collected. Meanwhile, endometriosis targets were obtained by disease database. The common targets of Guizhi Fuling pill and endometriosis were analyzed, and the common targets and the neighbor nodes were selected to construct the “ingredient target-disease target” core network. Key targets were screened for Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, to analyze the possible biological process and signal pathway of Guizhi Fuling pill in the treatment of EMT. RESULTS: Totally 1 600 endometriosis targets were obtained. After screening, 51 active ingredients and 823 targets were identified in Guizhi Fuling pill, there were 190 targets for diseases and drugs. Results of GO functional enrichment analysis showed that Guizhi Fuling pill might regulate modulating cannabinoid receptor 1 (CB1), cannabinoid receptor 2 (CB2), erythrocyte sedimentation rate (ESR), progesterone receptor (PGR) and ALOX-5 and other targets, which were closely related to protein, DNA and enzyme binding, and were involved in many biological processes such as apoptosis, proliferation and positive regulation of transcription. KEGG pathway enrichment analysis showed that the above targets were related to the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and other signaling pathways. CONCLUSIONS: Through network pharmacology, it is found that Guizhi Fuling pill could regulate the MAPK signaling pathway by regulating the targets of CB1, CB2, ESR, PGR and ALOX-5, and intervene in the pathological processes of endometriosis such as proliferation, anti-apoptosis, adhesion, invasion and angiogenesis, and exert the mechanism of “blood stasis and phlegm-dispelling”.

KEYWORDS Blood stasis and phlegm-dispelling therapy; Guizhi Fuling pill; Network pharmacology; Endometriosis

[△] 基金项目:上海市海派中医流派传承人才培养项目(No. 沪卫计中发办 LPRC2017032)

* 硕士研究生。研究方向:中西医治疗子宫内膜异位症。E-mail:tao_tse2020@163.com

[#] 通信作者:主任医师,硕士生导师。研究方向:中西医结合防治子宫内膜异位症的临床及实验研究。E-mail:zhouhua3313@sina.com

子宫内异位症 (endometriosis, EMT) 指有活性的子宫内
膜组织 (腺体或间质) 已经种植在子宫体外的疾病。临床上常
表现为渐进性加重性痛经、难治性不孕且极易复发等特点,严
重影响患者的身心和生殖健康^[1]。中医认为,EMT 的病理基础
为血瘀,多因风寒侵袭、经产留瘀、素性抑郁等导致离经之血蓄
积胞中,瘀阻胞脉冲任,血不归经,气血津液运行失常,导致湿瘀
互阻,积结日久,形成癥瘕包块,治疗以活血化瘀为大法。桂枝
茯苓丸为经典的活血化瘀、消癥散结方,被称为“消癥第一方”,
首载于《金匱要略》,“妇人宿有癥病,经断未及三月……所
以血不止者,其癥不去故也,当下其癥,桂枝茯苓丸主之”^[2]。

网络药理学认为,药物治疗疾病是在各药物组成成分的
干预下,经多靶点、多途径实现共同干预^[3]。尤其在中药的药
理学研究领域,网络药理学分析较为常用和典型。中药复方
治疗疾病遵循整体观思想。而网络药理学具有整体性、系统
性,并注重药物间相互作用,与中医药学基本特点存在一定相
似之处,符合中医药对疾病本质的认识^[4,5]。本研究通过网络
药理学方法,探讨桂枝茯苓丸的靶点、活性成分和分子作用机
制,希望进一步了解该药在 EMT 治疗领域的药理机制,促进
临床合理用药。

1 资料与方法

1.1 活性成分及其作用靶点的筛选

通过 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 检索出桂枝茯苓丸中桂枝、茯苓、赤芍、桃仁和牡
丹皮 5 种中药的化学成分及其相关靶点,并进行筛选,筛选标
准:Score cutoff>20, Adjusted P-value<0.05。

1.2 EMT 靶点的获取

在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>) 中搜索
关键词“endometriosis”,得到 EMT 相关靶点并进行记录。

1.3 关键靶点筛选及构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络

应用 R 软件 (v4.0) 将桂枝茯苓丸化学成分作用靶点和
EMT 相关的疾病靶点进行映射构建韦恩图。存在交集的共同
靶点可能是桂枝茯苓丸中活性成分治疗 EMT 的关键靶点。
以 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 作为操作平台,以
共同靶蛋白为基础,确定“Homo sapiens”蛋白种属,在“medium
confidence”(>0.4) 基础上构建 PPI 网络模型。

1.4 关键靶点基因功能注释和通路富集分析

筛选出的共同靶基因的基因本体 (GO) 以 R 软件 (v4.0)
进行功能注释,所预测化学成分靶点的富集分析在京都基因
与基因组百科全书 (KEGG) 平台上进行操作,保留 $P \leq 0.01$ 的
结果,进行可视化处理,分析桂枝茯苓丸治疗 EMT 可能的生
物过程和信号通路。

2 结果

2.1 桂枝茯苓丸成分-靶点网络的构建

共筛选出桂枝茯苓丸 5 味中药 51 种类药成分,其中,桂枝
16 种,茯苓 18 种,赤芍 8 种,桃仁 3 种,牡丹皮 6 种;共涉及
823 个靶点。

2.2 EMT 疾病靶点的筛选及共同靶点 PPI 网络构建

检索 GeneCard、BATMAN-TCM 等数据库,将获取的靶点
进行“去重”操作后得到 1 600 个不重复的疾病靶点。利用 R

软件制作 1 600 个疾病靶点与 823 个桂枝茯苓丸类药成分作
用靶点的韦恩图,获得疾病-类药活性成分共同靶点 190 个,见
图 1。以 STRING 数据库为操作平台,对上述靶点进行分析,
得到 PPI 作用网络,见图 2。

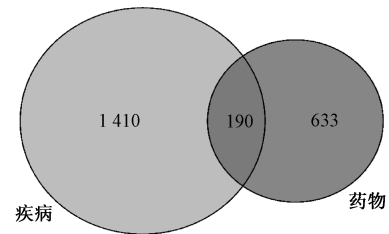


图 1 中药靶点基因和疾病靶点基因的交集韦恩图

Fig 1 Venn diagram of intersection of traditional Chinese medicine target genes and disease target genes

2.3 关键靶点 GO 生物功能注释

应用 R 软件中 clusterProfiler 包对桂枝茯苓丸成分-EMT
疾病的 190 个共同作用靶蛋白进行 GO 生物功能注释,根据保
留 $P \leq 0.01$ 的结果,进行可视化分析,得到 GO 分析柱状图,见
图 3。可见,共同作用靶点主要富集在受体配体活性 (receptor
ligand activity)、激素活性 (hormone activity)、生长因子活性
(growth factor activity)、生长因子受体结合 (growth factor
receptor binding)、RNA 聚合酶 II 转录因子结合 (RNA
polymerase II transcription factor binding) 和细胞因子活性
(cytokine activity) 等 55 个生物过程。表明桂枝茯苓丸可能
通过调节受体配体活性及生长因子受体结合等方面治疗
EMT。

2.4 KEGG 通路富集分析

应用 R 软件中 clusterProfiler 包对桂枝茯苓丸成分-EMT
疾病的 190 个共同作用靶蛋白进行 KEGG 通路富集分析,根
据保留 $P \leq 0.01$ 的结果,可视化分析,得到 KEGG 通路富集气
泡图,见图 4。可见,共同靶点主要富集于非酒精性脂肪肝
(non-alcoholic fatty liver disease)、美洲锥虫病 (chagas
disease)、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 信号通路 (MAPK
signaling pathway)、细胞因子间相互作用 (cytokine-cytokin-
ereceptor interaction) 和内分泌抵抗 (endocrine resistance) 等。

2.5 “药物-成分-靶点”网络调控图

通过 Cytoscape 3.2.1 软件绘制桂枝茯苓丸的“药物-成分-
靶点”网络调控图,见图 5;网络拓扑图分析见表 1。图 5 中,
箭头代表桂枝茯苓丸中的五味中药,菱形代表五味中药所含
的各种成分,椭圆形代表相关靶点。结果显示,桂枝茯苓丸通
过 5 味中药所含的 47 种成分作用于 190 个相关靶点治疗
EMT。

3 讨论

3.1 EMT 的病机和治疗

EMT 的发病机制较复杂,目前被广泛接受的是“在位内膜
决定论”,即子宫在位内膜细胞通过上皮间充质转化具备了转
移侵袭的能力,进而与同种细胞脱离,穿过腹水或腹腔液、腹
腔细胞和腹腔外基质三道防线进入腹腔完成异种细胞间的黏
附,为进一步的侵袭和病灶血管形成奠定基础^[6,7]。现代医学

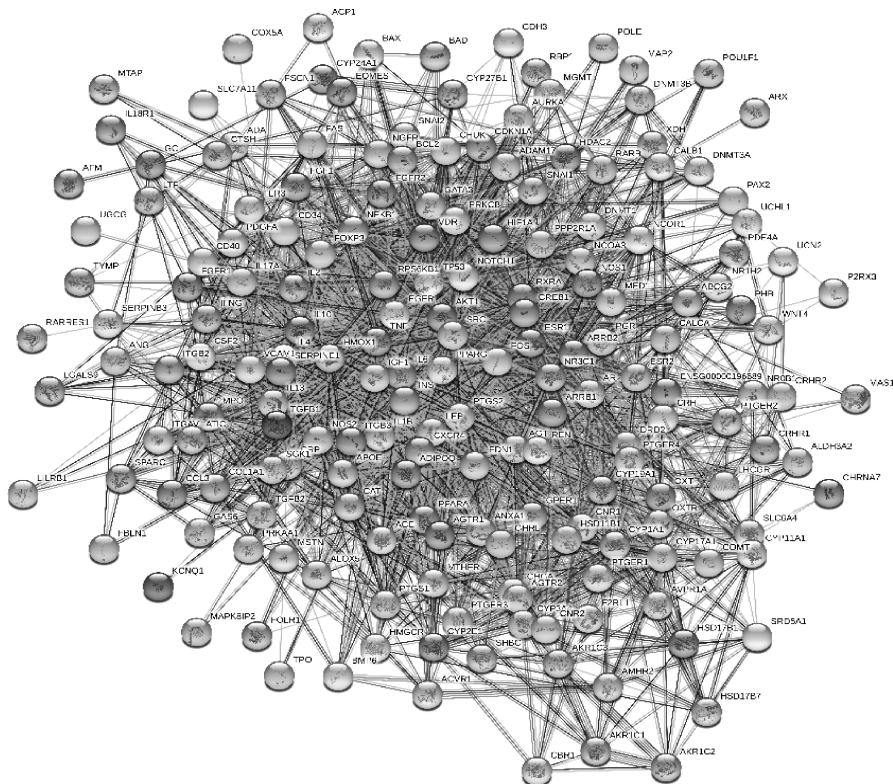


图2 桂枝茯苓丸治疗 EMT 的靶点基因 PPI 网络图

Fig 2 PPI network of target gene of Guizhi Fuling pill in treatment of EMT

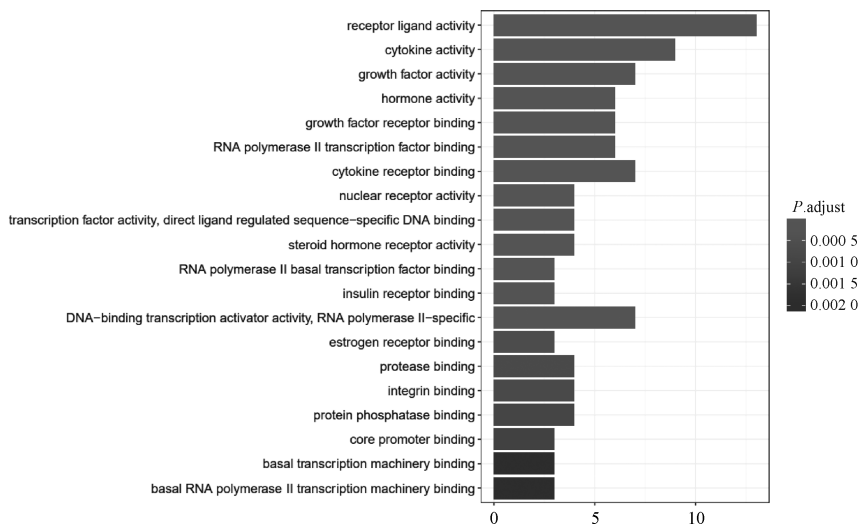


图3 GO 功能富集分析柱状图

Fig 3 GO functional enrichment analysis histogram

以手术和激素类药物治疗为主,但其应用有限。近年来,中医药在缓解 EMT 痛经、缩小包块和促进生育方面疗效显著。

3.2 桂枝茯苓丸的效用和现代药理学探讨

“血水同治”为桂枝茯苓丸治疗 EMT 的典型疗效,方中桂枝为君药,味辛、甘,性温,主通脉祛瘀、助气行水;茯苓为臣药,可利腰脐间血;桃仁味甘、性平,消癥且不伤正,协同茯苓共奏利水渗湿之功;芍药柔肝调血;丹皮活血凉血消癥^[8]。众多医家以该方为基础治疗 EMT,获得了满意的临床疗效,至今仍被

广泛应用。现代药理学研究结果证实,桂枝有抗病毒、抗菌、抗炎、抗凝、抗血小板聚集和抗过敏等疗效^[9];茯苓有抗病毒、抗炎、抗氧化、保肝和利尿等功效^[10];赤芍有抗血栓、抗肿瘤、保肝和抗凝等疗效^[11];桃仁有抗氧化、抗炎、活血祛瘀和促进血流动力学改善等疗效^[12];牡丹皮能抗炎、抗菌,调节心血管系统。尽管现代药理学对桂枝茯苓丸各成分的药理作用有深入的研究,但是对于全方的药理学机制和临床治疗 EMT 的作用机制却少有报道^[13]。

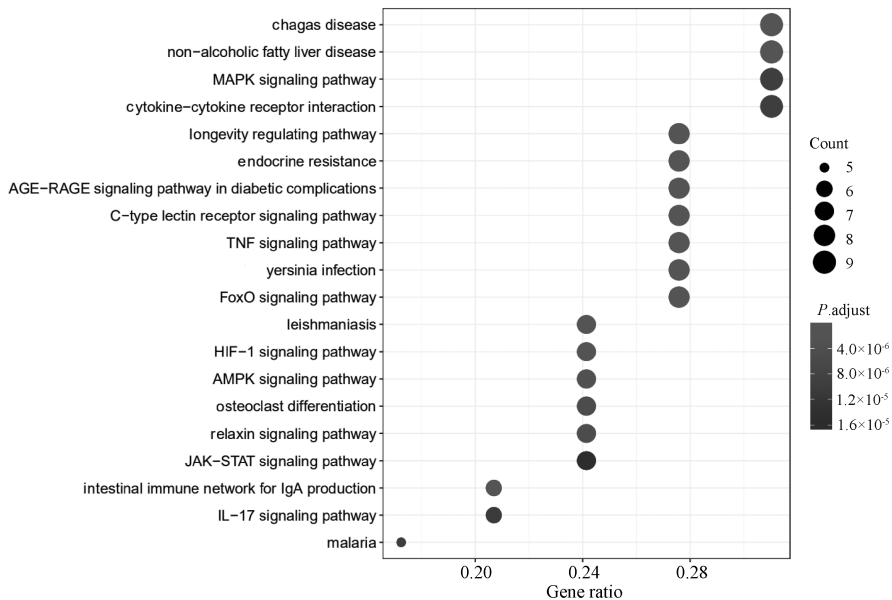


图 4 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig 4 KEGG functional enrichment analysis bubble plot

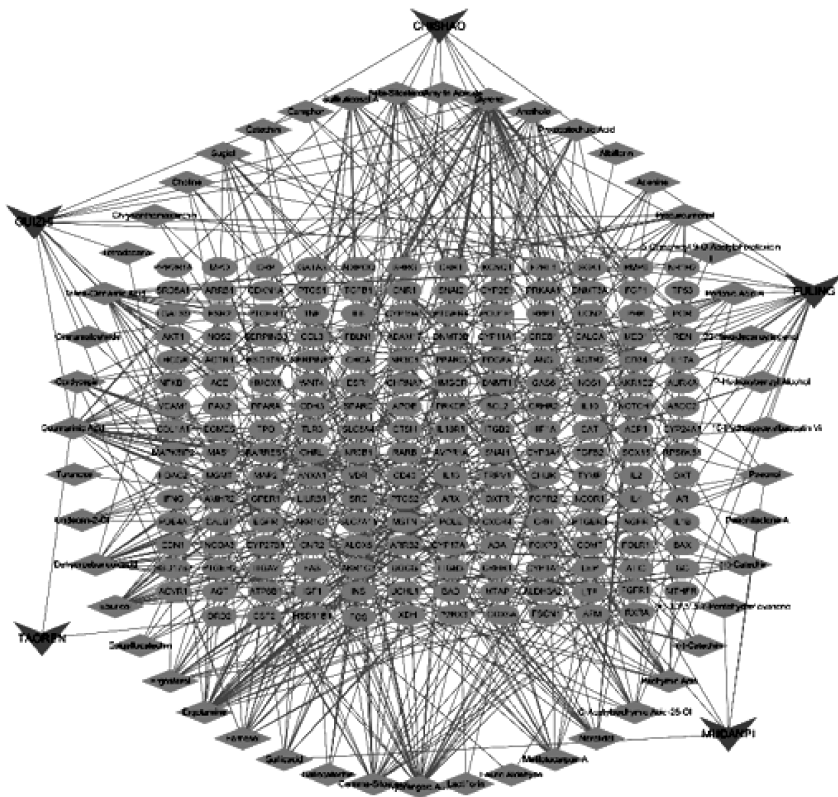


图 5 桂枝茯苓丸“药物-成分-靶点”网络调控图

Fig 5 Network regulation diagram of “drug-ingredient-target” in Guizhi Fuling pill

3.3 有效药物成分的机制分析

本研究中发现,在中药-成分-靶点-信号通路网络中,苯乙烯、麦角胺、间羟基肉桂酸、八仙花酸和去氢齿孔酸的自由度高。但目前仍不了解上述药物成分在 EMT 治疗中发挥的作用,有待深入研究。

3.4 桂枝茯苓丸治疗 EMT 的潜在靶点预测

在中药-成分-靶点-信号通路网络中,自由度高的靶点有 CB1、CB2、ESR1 和 PGR1。CB1 被发现主要表达于子宫、胎盘、睾丸以及中枢神经组织中^[14]。CB2 可表达于多种免疫细胞中。研究结果表明,2 种大麻素受体均可参与 EMT 的细胞增

表 1 网络拓扑图分析表

Tab 1 Network topology analysis table

类别	名称	Degree
成分	苯乙烯(styrene)	39
成分	麦角胺(ergotamine)	29
成分	苦马酸/间羟基肉桂酸(coumarinic acid)	28
成分	八仙花酸(hydrangeic acid)	28
成分	去氢齿孔酸(dehydroshikimic acid)	23
靶点	1型大麻素受体(CNR1,CB1)	13
靶点	雌激素受体1(estrogen receptor 1,ESR1)	13
靶点	孕激素受体(progesterone receptor,PGR)	13
靶点	花生四烯酸 5-脂氧合酶(ALOX5)	12
靶点	2型大麻素受体(CNR2,CB2)	12

殖、凋亡、黏附、侵袭和血管形成过程,进而影响 EMT 的发生发展^[15]。大麻素受体还可调控异位子宫内膜组织的神经生长^[16]。CB1 和 CB2 在异位内膜中与磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路关系密切,可以通过抑制后者的活性起到抗细胞增殖的作用^[17]。胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)信号通路可与 PI3K/Akt 信号通路相结合,共同参与 CB 激动剂甲烷甲酰胺增强子宫内膜间质细胞的迁移过程,研究检测到经甲烷甲酰胺处理后的异位内膜中 N-钙黏蛋白及白细胞介素 6 的表达增加,提示 CB1 促进了异位内膜细胞的黏附、侵袭过程^[18-19]。经迁移、黏附、侵袭以及心血管生成等变化后,异位子宫内膜可发展形成异位病灶。血管内皮生长因子(VEGF)是血管生成过程中的关键因子,大麻素受体已被证实能够在多种恶性肿瘤细胞中有效阻断 VEGF 通路,继而抑制肿瘤血管生成^[20]。

雌激素在 EMT 异位病灶中的水平高于同期血清水平,始终是异位病灶微环境中发病的关键因素^[21]。高雌激素水平在 EMT 中发挥促进病灶细胞增殖、促进异位内膜细胞上皮间质转化、促血管形成以及促进炎症反应发生等作用^[22]。因此,减少雌激素的合成对于 EMT 的治疗具有重要作用。雌激素受体(ER) β 可以诱导相关基因转录,从而促进诱导异位内膜细胞增殖^[23];并可以抑制肿瘤坏死因子 α 诱导的凋亡过程^[24]。 β -联蛋白(β -catenin)反映上皮细胞间充质转化, β -catenin 主要作用于细胞骨架,能够与上皮细胞的钙黏蛋白构成复合体,对细胞间的相互黏附作用进行介导。研究结果指出,在 EMT 发病的初始阶段,ER 能够与 β -catenin 的雌激素反应元件结合进而启动 β -catenin 的转录,促进异位内膜细胞的 EMT^[25]。在异位病灶形成过程中,ER 上调 β -catenin 转录激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路,后者能够直接促进 VEGF 的转录,促进病灶周围小血管的形成,为病灶形成提供物质基础。

孕激素抵抗是 EMT 形成的重要机制,但抵抗的具体原因不完全明确^[26]。Tanaka 等^[27]指出,在 EMT 中,雌激素和孕激素信号可以调节大麻素受体 mRNA 的表达,说明三者之间存在联系,影响着 EMT 的发生发展。

ALOX5 是炎症介质白细胞三烯和脂氧素生成的一个起始酶,在肿瘤等疾病中通常表达量过高^[28]。EMT 为一种良性肿瘤,但其发病机制与一般的恶性肿瘤具有一定的相似性。孙平等^[29]认为,ALOX5 在 EMT 组织中的高表达,与 EMT 发病存在一定关系,通过上调 VEGF 表达促进 EMT 新生血管形成。

综合上述药物作用的靶点,桂枝茯苓丸可能通过 CB1、

CB2、ESR、PGR 和 ALOX5 等靶点调控 EMT 中异位内膜细胞的增殖抗凋亡、黏附、侵袭和血管生成的过程,从而起到治疗 EMT 的作用。

3.5 桂枝茯苓丸治疗 EMT 的潜在通路预测分析

从 KEGG 通路富集分析结果可知,在治疗过程中可能涉及的主要通路为 MAPK 信号通路。MAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在哺乳动物体内广泛存在,并接受细胞外信号刺激,参与细胞增殖、分化、迁移以及衰老的过程;同时,其与炎症、肿瘤等多种疾病的发生关系密切^[30]。ERK1/2、c-Jun 氨基末端蛋白激酶(JNK)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38)和细胞外信号调节激酶 5(ERK5)均为 MAPK 信号通路,且各分支通路的生物效能各不相同^[31]。MAPK 信号通路调节 EMT 中异位子宫内膜细胞黏附、侵袭、血管生成和抗凋亡的过程,参与 EMT 的发生发展^[32]。MAPK 信号通路还可促进异位内膜细胞的侵袭,主要作用机制为作用于多种细胞黏附分子介导的细胞黏附运动。侵袭过程涉及到细胞外基质的降解过程,基质金属蛋白酶(MMP)是该过程中的主要酶类,多种因子可以通过通路间接调控 MMP 的表达,有利于异位侵袭种植。新生血管形成是 EMT 异位病灶形成的关键,异位病灶需要足够的血液供应支持,并且其快速生长离不开大量新生血管的供应。在环氧合酶-2(COX-2)的诱导下,VEGF 可加速合成,促进新血管的生成。Huang 等^[33]研究结果指出,EMT 中过量表达的白细胞介素 1 β 通过 MAPK 信号通路刺激 COX-2 的表达,间接促进了 VEGF 的表达。

综上所述,本研究利用网络药理学方法与技术,挖掘到桂枝茯苓丸中 51 种类药性成分及 823 个潜在靶点,EMT 相关靶点 1 600 个,其中桂枝茯苓丸-疾病共同靶点 190 个;进行 GO 生物分析初步预测出桂枝茯苓丸可能通过调节 CB1、CB2、ESR、PGR 和 ALOX-5 等靶点,通过 KEGG 通路富集分析和过程分析初步预测出桂枝茯苓丸可能通过调控 MAPK 信号通路,从而发挥抗炎、抗肿瘤和促凋亡等作用,从 EMT 中异位内膜细胞的黏附、侵袭和血管生成等病理过程干预,达到治疗 EMT 的作用,对临床治疗具有重要意义。网络药理学是依托于已研究出的数据,借助各种平台数据库数据及配套的软件算法进行分析,得出的结果可作为实验研究的线索,其具体的作用机制还有待实验研究证实。

参考文献

- [1] 李雅洁, 高颖. miRNA 与子宫内膜异位症的最新研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(4): 428-434.
- [2] 王付, 王林玉. 桂枝茯苓丸方证思考与探索[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2618-2620.
- [3] 袁岸, 刘淇, 饶志粒, 等. 基于网络药理学的荆芥挥发油主要成分抗炎机制研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(1): 97-103.
- [4] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [5] ZHU B C, ZHANG W T, LU Y, et al. Network pharmacology-based identification of protective mechanism of *Panax Notoginseng Sapponins* on aspirin induced gastrointestinal injury[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 159-166.

(下转第 660 页)