

基于网络药理学研究柴胡-白芍治疗宫颈高危型人乳头状瘤病毒感染的作用机制[△]

朱梓齐^{1*}, 秦琴琴², 辛幸雨¹, 宁雪梅¹, 林寒梅^{2#} (1. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530000; 2. 广西中医药大学第一附属医院妇科, 南宁 530001)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)06-0662-06
DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.06.005



摘要 目的:采用数据挖掘方法发掘中医药治疗宫颈高危型人乳头状瘤病毒(HPV)感染的核心药对,通过网络药理学方法明确核心药对的作用机制。方法:检索中国知网、万方数据库及维普数据库获取相关文献,筛选核心药对。从中药系统药理学数据库与分析平台检索核心药对相关活性成分及靶点;通过人类孟德尔遗传综合数据库、GeneCards 数据库等查询疾病相关靶点;通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建核心靶点网络;基于 DAVID 数据库对靶点进行基因本体功能富集分析和京都基因与基因组百科全书通路富集分析。结果:共纳入文献 216 篇,方剂 209 首,中药 194 味,得到核心药对柴胡-白芍。筛选出柴胡的活性成分共 15 个、靶点 433 个,白芍的活性成分 9 个、靶点 161 个,两者靶点合并去重后为 297 个;与疾病的交集靶点 116 个。柴胡-白芍治疗宫颈高危型 HPV 感染的作用核心靶点包括蛋白激酶 B(Akt)1、肿瘤坏死因子、白细胞介素 6 和过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 等;作用机制主要通过癌症通路、磷脂酰肌醇 3 激酶-Akt 信号通路等发挥;涉及的生物学过程主要包括基因表达的正调控、凋亡过程的负调控等。结论:本研究验证了柴胡-白芍可通过多靶点、多通路参与炎症反应与免疫调控,从而达到治疗宫颈高危型 HPV 病毒感染的效果。

关键词 宫颈高危型人乳头状瘤病毒感染;柴胡;白芍;网络药理学;作用机制

Mechanisms of *Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba* in the Treatment of Cervical High-Risk Human Papilloma Virus Infection Base on Network Pharmacology[△]

ZHU Ziqi¹, QIN Qinqin², XIN Xingyu¹, NING Xuemei¹, LIN Hanmei² (1. Graduate School, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Dept. of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the core drug pairs of traditional Chinese medicine (TCM) in the treatment of cervical high-risk human papilloma virus (HPV) infections by using data mining methods, and to clarify the mechanism of the core drug pairs by network pharmacology methods. **METHODS:** Related literature were retrieved from CNKI, Wanfang Data and VIP database to screen out core drug pairs. The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform was retrieved for the relevant active ingredients and targets of core drug pairs; the On-Line Mendelian Inheritance in Man and GeneCards databases were retrieved for disease-related targets. Cytoscape 3.9.1 software was used to construct core targets network. DAVID database was used to perform gene ontology functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis on the targets. **RESULTS:** A total of 216 studies, 209 prescriptions and 194 kinds of traditional Chinese medicine were enrolled, the core drug pair of *Radix bupleuri-Radix paeoniae aba* was obtained. A total of 15 active ingredients and 433 targets in *Radix bupleuri* as well as 9 active ingredients and 161 targets in *Radix paeoniae alba* were screened out, and 297 targets remained after deduplication; there were 116 intersection targets with disease. The core targets of *Radix bupleuri-Radix paeoniae alba* for the treatment of cervical high-risk HPV infection included protein kinase B (Akt) 1, tumour necrosis factor, interleukin 6 and PPARG. The mechanism of action was mainly exerted through the cancer pathway, phosphatidylinositol 3 kinase-Akt signaling pathway, etc.; the biological processes involved mainly

△ 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目 (No. 82160919); 全国名中医陈慧依学术思想与临床诊疗传承发展推广中心 (No. 04B23008V3)

* 硕士研究生。研究方向:月经病的中医防治。E-mail:1092742854@qq.com

通信作者:主任医师,教授,博士生导师。研究方向:不孕不育症及生殖内分泌。E-mail:linhm0806@163.com

included the positive regulation of gene expression and the negative regulation of apoptotic process, etc.

CONCLUSIONS: This study preliminarily verifies that *Radix bupleuri-Radix paeoniae alba* can participate into the inflammatory response and immune regulation through multi-targets and multi-pathways, so as to achieve the therapeutic effect of cervical high-risk HPV infection.

KEYWORDS Cervical high-risk human papilloma virus infection; *Radix bupleuri*; *Radix paeoniae alba*; Network pharmacology; Mechanism

人乳头状瘤病毒 (HPV) 感染是常见的下生殖道病毒感染,可引起生殖道皮肤黏膜发生一系列病变。高危型 HPV (HR-HPV) 感染的潜伏期为 3 周至 8 个月,初期患者无症状,并可自行消失。研究表明,持续的 HR-HPV 感染与 90% 的宫颈癌,65% 的阴道癌和 50% 的外阴癌密切相关^[1]。宫颈癌是威胁我国女性生命健康的第二大恶性肿瘤,其发病率仅次于乳腺癌^[2]。根据宫颈 HR-HPV 感染的临床表现,其可归于中医“带下病”范畴。《傅青主女科》中记载,“夫带下俱是湿症”;《校注妇人大全良方》中记载,“人有带脉……如束带之状,病生于此”。故本病多为任脉不固,带脉失约,湿热毒邪乘机侵淫,下注冲任,结聚于子门所致,属本虚标实之证。近年来,中医药以其整体审查、辨证论治和用药安全等优势而广受青睐。通过中医外治、汤剂内服等方法,调整脏腑,扶助正气,缓解患者临床症状,改善阴道微生态环境,从而提高 HPV 转阴率,有效遏止进一步病变,忠实践行中医“未病先防,既病防变”的思想^[3]。本研究将借助生物信息方法,发掘出治疗宫颈 HR-HPV 感染的核心药对,并探讨该药对的作用机制,以期为临床后续组方用药提供思路。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 纳入标准:(1)研究对象为 HR-HPV DNA 检测阳性的临床患者,感染类型为 HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 及 68 其中一型或混合型。(2)干预措施以口服中药汤剂治疗为主,可合并中医外治或西医治疗。(3)有明确疗效标准的临床研究。(4)中药方剂的组成完整,剂量明确。

1.1.2 排除标准:动物实验、细胞实验等非临床研究;治疗方法未涉及口服中药汤剂的临床研究;重复发表或处方相同的文献,仅纳入其中 1 篇。

1.2 文献检索策略

以“高危型人乳头瘤病毒” OR “高危型 HPV” OR “HR-HPV”+“中医” OR “中药” OR “中医药”为关键词,时间设置为 2003 年 1 月至 2023 年 5 月,从中国知网(CNKI)、万方数据库(Wanfang Data)和维普数据库(VIP)检索相关文献。

1.3 数据处理与录入

参照《中华人民共和国药典:一部》(2020 年版)^[4]对中药名称进行统一规范标准化,如“山萸肉”“山芋肉”统一为“山茱萸”;“七叶一枝花”规范为“重楼”。对于经炮制后性味发生改变,且被《中华人民共和国药典:一部》(2020 年版)单独罗列出的药物则分别统计,如“甘草”与“炙甘草”、“盐牛膝”与“川牛膝”。经双人交叉录入并核对后,将筛选出的处方导

入 Excel 2019 软件,再次进行数据审查。

1.4 数据挖掘方法

采用 IBM SPSS modeler 18.0 软件中 Apriori 算法对纳入中药进行运算,设置支持度 $\geq 10\%$,置信度 $\geq 70\%$,最大前项数 ≤ 2 ,提取药物关联规则结果。

1.5 药物活性成分、靶点筛选

以数据挖掘结果中提升度最高的中药组合作为网络药理学分析对象,利用中药系统药理学数据库与分析平台(<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>),以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.18 为筛选条件,得到中药活性成分。从 Uniprot 数据库(<https://sparql.uniprot.org/>)获取活性成分的有效靶点。对于在 Uniprot 数据库中未检索到的靶点,则利用 Pubchem 数据库检索 smile 序列,再以 Swiss 数据库进行检索补充。

1.6 疾病靶点筛选及药物-成分-靶点-疾病网络构建

以“Cervical High-risk Human Papilloma Virus Infection”为检索词,于人类孟德尔遗传综合数据库(<https://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中进行检索,获得与宫颈 HR-HPV 感染的相关靶点,并去除重复项。将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件中,生成药物-成分-靶点-疾病网络图。

1.7 关键靶点筛选

利用 Venny 2.1.0 在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)绘制药物与疾病靶点韦恩图,并获取其共同作用靶点。将二者交集靶点导入 STRING 11.5 数据库(<https://string-db.org/>),以 Homo sapiens (智人类)为生物体类别进行筛选。设置最低相互作用阈值为 0.7,构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络,根据节点度值、关联性和中心性,得到核心蛋白靶点。

1.8 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析与基因本体 (GO) 功能富集分析

通过 David 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>)对筛选出的药物-疾病共同靶点进行 KEGG 通路、GO 功能注释富集分析,将相关结果上传至微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行数据可视化处理。

2 结果

2.1 方剂筛选及中药频数统计

本研究初步检索到相关文献 374 篇,经筛选最终纳入文献 216 篇,整理后得到 209 首方剂,涉及中药 194 味,合计使用 2 209 次。

2.2 关联规则分析

对 193 味药物进一步进行关联分析,得到 55 个药物关联组合,按提升度排序,其中排序居前 5 位的药物核心关联组合依次为柴胡-白芍、薏苡仁-白花蛇舌草-白术、薏苡仁-党参-白花蛇舌草、白花蛇舌草-薏苡仁-黄柏、黄芪-当归-白术。

2.3 柴胡-白芍活性成分收集及药物-成分-靶点-疾病网络构建

筛选得到柴胡的有效活性成分 15 个,靶点 433 个;白芍的

有效活性成分 9 个,靶点 161 个,见表 1。将二者所得靶点合并去重后,得到共同靶点 297 个。绘制成分-疾病-靶点网络图,见图 1。该网络包含了 317 个节点和 718 条连线,其中橙色圆形代表中药;黄色三角形代表活性成分;绿色椭圆形代表活性成分靶点;蓝色菱形代表疾病;紫色矩形代表疾病靶点;节点的大小与度值呈正相关。可认为度值高的分子在柴胡-白芍药对中发挥着重要的药理作用。

表 1 柴胡与白芍的有效活性成分靶点

编号	Mol ID	分子名称	编号	Mol ID	分子名称
CH1	MOL001645	linoleylacetate	BS1	MOL001918	paeoniflorgenone
CH2	MOL002776	baicalin	BS2	MOL001919	(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
CH3	MOL000449	stigmasterol	BS3	MOL001924	paeoniflorin
CH4	MOL000354	isorhamnetin	BS4	MOL000211	mairin
CH5	MOL000422	kaempferol	BS5	MOL000358	beta-sitosterol
CH6	MOL004598	3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	BS6	MOL000359	sitosterol
CH7	MOL004609	areapillin	BS7	MOL000422	kaempferol
CH8	MOL013187	cubebin	BS8	MOL000492	(+)-catechin
CH9	MOL004624	longikaurin A	BS9	MOL001921	Lactiflorin
CH10	MOL004653	(+)-anomalin			
CH11	MOL004718	α-spinasterol			
CH12	MOL000490	petunidin			
CH13	MOL000098	quercetin			
CH14	MOL004628	octalupine			
CH15	MOL004644	sainfuran			

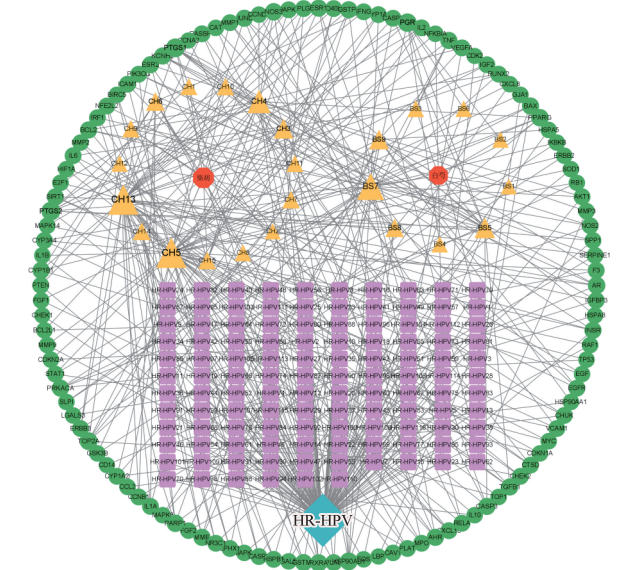


图 1 成分-疾病-靶点网络图

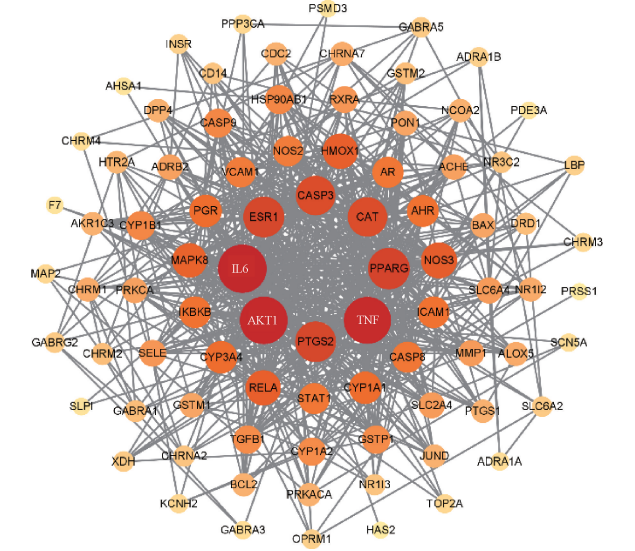


图 2 柴胡-白芍治疗宫颈 HR-HPV 感染的 PPI 网络图

2.4 PPI 网络

通过 GeneCards 数据库收集到与宫颈 HR-HPV 感染相关的靶点共 1 237 个,从 Venny 2.1.0 在线工具中提取药物-疾病交集靶点 116 个,获取 PPI 数据后导入 Cytoscape 3.9.0 软件,生成柴胡-白芍治疗宫颈 HR-HPV 感染的 PPI 网络图,见图 2。图 2 中共包括 116 个节点,1 041 条连线。利用该软件的 network analyzer 插件计算得到核心蛋白靶点,将度值排序居前 10 位的核心靶点绘制为条形图,见图 3。

2.5 富集分析结果

将关键靶点导入 DAVID 数据库进行 KEGG 通路及 GO 功

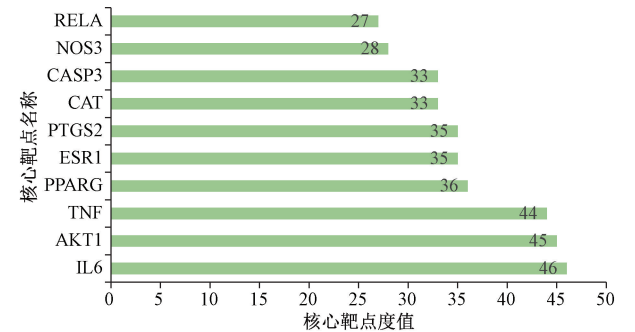


图 3 核心靶点条形图

能富集分析,设置 $P<0.05$ 筛选出富集通路 154 条,取富集程度前 20 位通路,见图 4。GO 功能分析结果包含生物过程 567 个,主要涉及基因表达正向调控、RNA 聚合酶 II 启动子转

录正向调控和凋亡过程的负调控等;细胞组分 62 个,主要涉及大分子复合物、细胞外间隙等;分子功能 119 个,主要涉及酶结合、同种蛋白结合等,见图 5。

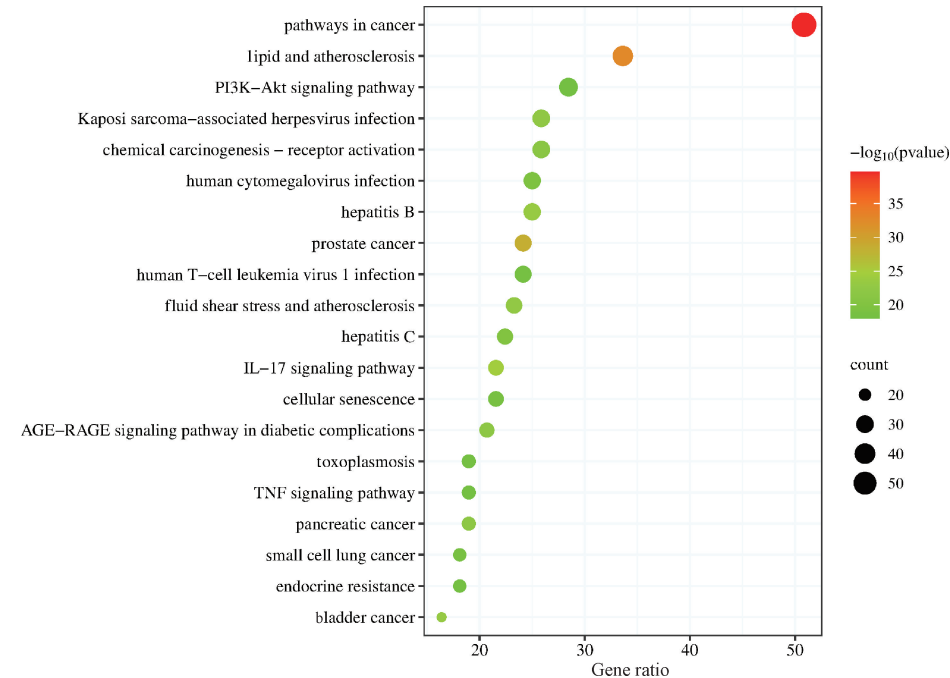


图 4 KEGG 通路富集分析结果

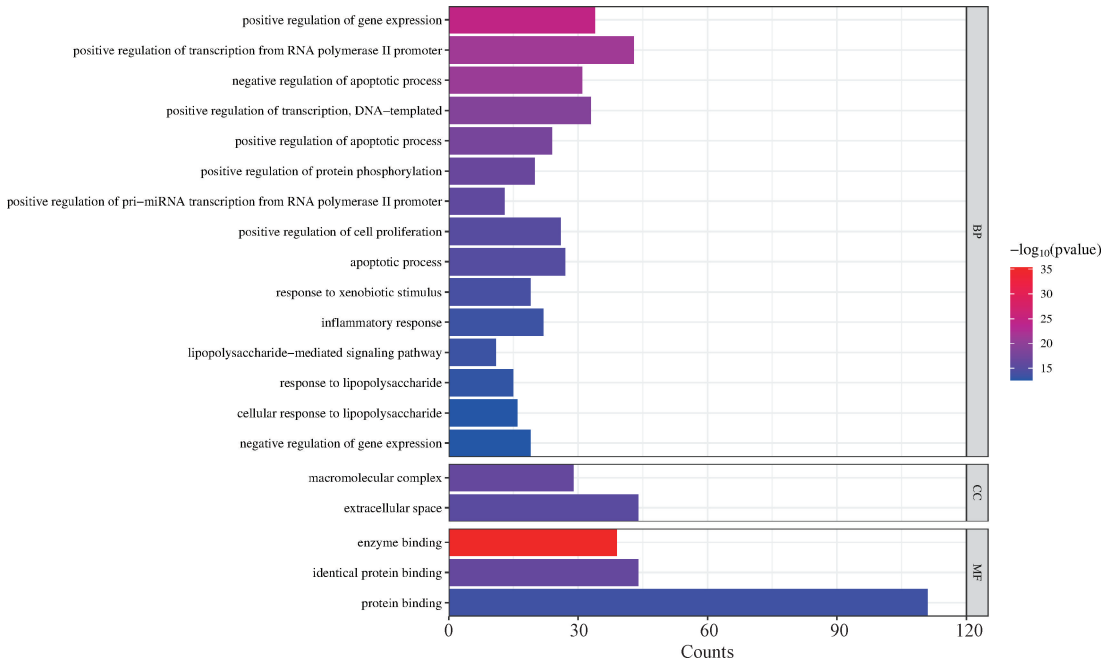


图 5 GO 功能富集分析结果

3 讨论

本研究中所纳入的中药经关联规则分析,得到柴胡-白芍为提升度最高的药对。结合网络药理学结果,推测槲皮素、山柰酚、异鼠李素和β-谷甾醇等为柴胡-白芍治疗宫颈 HR-HPV 感染的关键活性成分。槲皮素能通过诱导严重的宫颈癌细胞内质网应激,激活蛋白激酶 R 样内质网激酶/真核生物起始因

子 2α/活化转录因子 4/增强子结合蛋白同源蛋白信号通路,促使宫颈癌细胞凋亡^[5]。此外,槲皮素可通过调控磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路,增强顺铂对人宫颈癌顺铂耐药细胞 HeLa/DDP 的抗肿瘤作用,抑制细胞增殖和迁移能力,降低肿瘤细胞活性。山柰酚可有效抑制缺氧诱导因子 1α-己糖激酶 2 通路,改善库普弗细胞糖代谢重编程,并可

阻碍蛋白激酶 CK2 与 ATP 结合,因此具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化和抗炎等多种功效^[6-7]。Kashafi 等^[8]发现,山柰酚呈剂量和时间依赖性地诱导宫颈癌细胞凋亡,通过抑制 PI3K-Akt 通路,增加肿瘤蛋白 p53(TP53)、Bcl-2 相关 X 蛋白表达。异鼠李素可通过阻滞人宫颈癌 HeLa 细胞的 G₂/M 期,进而达到抗宫颈癌的效果^[9]。 β -谷甾醇可促进白细胞介素(IL)2 和 γ 干扰素的分泌,抑制巨噬细胞炎症因子产生,缓解宫颈炎症反应;并能阻滞细胞周期激活,加强自然杀伤细胞对宫颈癌 HeLa 细胞的裂解^[10-12]。

通过分析并查阅既往相关研究文献^[13-14],考虑 IL-6、Akt1、肿瘤坏死因子(TNF)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPARG)、前列腺素 G/H 合成酶 2(PTGS2)、雌激素受体 1(ESR1)和过氧化氢酶(CAT)等可能成为柴胡-白芍发挥治疗宫颈 HR-HPV 感染作用的潜在核心靶点。多种信号通路(如 Akt、PI3K-Akt 信号通路)和炎症介质(如 IL-6、TNF- α)等诱导的免疫炎症被认为是宫颈病变发生、发展及恶性转化的重要因素^[15-16]。IL-6 是一种多效炎症因子,其在血管生成、免疫应答和恶性肿瘤免疫逃逸等过程中起着重要作用,是目前被广泛用以判断宫颈病变程度的有效指标^[17-18]。高危型 HPV16/18 基因组可激活信号转导及转录激活因子 3 通路,促进宫颈癌细胞生成 IL-6,促使正常成纤维细胞衰老,最终导致肿瘤恶变及加速转移^[19]。任春霞等^[20]指出,衰老的成纤维细胞在早期释放出大量包括 IL-6 在内的炎症因子,或可促进宫颈癌的生长和放化疗抵抗。TNF 是由单核巨噬细胞分泌的细胞因子。过度表达的 TNF- α 会引起宫颈炎症反应,造成组织强烈损伤,对宫颈肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等过程有着深远的影响^[21]。文献报道,TNF 可通过介导凋亡相关基因(如单核苷酸多态性)而引起宫颈癌细胞系的裂解,从而达到抑制宫颈癌细胞增殖的作用^[22]。TNF- α 可以通过激活 Akt 和胞外信号调节激酶通路,促进宫颈癌淋巴转移。Akt1 是 PI3K-Akt 通路中的重要蛋白,可通过充当 miR-942-5p 的海绵分子而在慢性宫颈炎及宫颈癌病变组织中呈高表达^[23]。过往研究已证实,通过下调 Akt1 蛋白的表达可达到抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用^[24]。

KEGG 分析结果表明,癌症通路 with 宫颈 HR-HPV 感染的发生最为密切。该通路可通过调控细胞内 DNA 损伤反应、细胞衰老和诱导凋亡等发挥作用^[25]。癌症通路涉及的靶点主要包括 Caspase 家族、TP53 等。CASP9 是引起细胞凋亡的关键分子,研究证明细胞受到 HPV 感染后,CASP9 表达水平降低,调控细胞凋亡的通路受阻,导致 HPV 持续复制^[26]。TP53 基因异常表达可促进宫颈癌细胞从正常癌变到高低分化的发展。实验证明,降低肿瘤蛋白 P53 诱导性核蛋白 1(TP53INP1)在宫颈癌细胞中的表达可对宫颈癌细胞的生物学行为造成影响,促进宫颈癌细胞凋亡^[25]。脂质与动脉粥样硬化通路在抗炎、抗氧化和抑制内皮细胞凋亡等方面均有重要影响^[27]。但该通路在 HPV 感染中的作用尚未阐明,今后可加强此方面的研究。PI3K-Akt 信号通路是促进细胞存活、增殖、抗凋亡、促血管生

成和化疗耐受的关键途径,与宫颈癌的发生、侵袭及转移密切相关^[28-29]。龙燕等^[25]发现,TP53 亦可通过调控 PI3K-Akt 信号通路,进而影响宫颈癌细胞的侵袭、迁移。GO 富集分析主要涉及基因表达的正调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录正向调控、凋亡过程的负调控等信息处理与信号传导过程。其中凋亡过程的负调控值得引起重视,预测该生物进程将成为中药治疗宫颈 HR-HPV 感染的研究重点。而大分子复合物、细胞外间隙、酶结合和同种蛋白结合等对于生物体内蛋白质合成、物质运输等生命活动具有重要意义。

综上所述,本研究运用数据挖掘方法,从近 20 年的文献中获取治疗宫颈 HR-HPV 感染的核心药物组合柴胡-白芍;根据网络药理学分析,发现该药对通过多成分、多靶点、多通路参与炎症反应与免疫调控,发挥治疗作用。本研究结果仍需进一步实验及临床研究加以验证,以期日后治疗宫颈 HR-HPV 感染提供更有力、更科学的理论依据。

参考文献

[1] 伊欣,张蕾,陈汶,等. 高危型人乳头瘤病毒与女性下生殖道感染联合检测专家共识[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(5): 524-528.

[2] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5): 584-590.

[3] 金亦涵,郭桂兰,金保方. 宫颈 HPV 感染的中西医结合防治研究进展[J]. 中国性科学, 2018, 27(4): 88-91.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 699.

[5] 脱淑梅,李瑞瑞,李娟,等. 槲皮素通过内质网应激诱导宫颈癌细胞凋亡的机制[J]. 甘肃医药, 2022, 41(9): 769-773.

[6] 高进,殷娟,沈文娟,等. 山柰酚对脓毒症大鼠肝损伤的影响及其与 HIF-1 α /HK2 通路的关系[J]. 中国急救医学, 2023, 43(4): 279-284.

[7] 林小聪,刘新光,陈小文,等. 山柰酚抑制蛋白激酶 CK2 活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(11): 894-901.

[8] KASHAFI E, MORADZADEH M, MOHAMADKHANI A, et al. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 573-577.

[9] WEI J, SU H L, BI Y, et al. Anti-proliferative effect of isorhamnetin on HeLa cells through inducing G2/M cell cycle arrest[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3917-3923.

[10] 王莉,杨永杰,陈松华,等. β -谷甾醇对子宫颈癌细胞微管系统的影响[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(39): 2771-2775.

[11] LIAO P C, LAI M H, HSU K P, et al. Identification of β -sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in moringa oleifera[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(41): 10748-10759.

[12] ALVAREZ-SALA A, ATTANZIO A, TESORIERE L, et al. Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol (β -sitosterol) in human cancer cell lines[J]. Int J Food Sci Nutr, 2019, 70(3): 323-334.

(下转第 671 页)