

# 基于网络药理学探讨大黄-水蛭-香附配伍治疗子宫内膜异位症的作用机制<sup>△</sup>

邓颖<sup>1\*</sup>, 刘金坤<sup>2</sup>, 白殊同<sup>2#</sup>(1. 重庆市中医院妇科, 重庆 400021; 2. 重庆市中医院中医药防治自身免疫疾病重庆市重点实验室, 重庆 400021)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)02-0142-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.02.004

**摘要** 目的:采用网络药理方法研究大黄-水蛭-香附治疗子宫内膜异位症的分子机制。方法:采用中药系统药理学数据库与分析平台和 BATMAN-TCM 数据库,筛选大黄-水蛭-香附配伍的活性成分和靶点信息。通过对比治疗靶点数据库和 GeneCards 平台获得子宫内膜异位症疾病靶基因信息,使用 Venny 软件对大黄-水蛭-香附配伍靶基因和子宫内膜异位症靶基因取交集,获得药物作用核心靶点。通过 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-疾病”网络,并通过 STRING 数据库分析核心靶点蛋白质-蛋白质相互作用。通过 R 语言对核心靶点进行基因本体(GO)功能富集分析,通过 DAVID 数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果:共筛选到大黄-水蛭-香附配伍的 38 个活性成分和 98 个潜在核心靶点,其中槲皮素、木犀草素、山柰酚、番红花酸和乌索酸为主要化学成分,PTGS2、AR、PPARG、TOP2A 和 ESR1 为主要靶点。大黄-水蛭-香附配伍影响的主要生物过程包括脂多糖应答、甾体激素应答和活性氧应答,KEGG 通路富集分析得到 330 条信号通路,主要包含磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt)、缺氧诱导因子(HIF)和肿瘤坏死因子(TNF)信号通路。结论:大黄-水蛭-香附的可通过山柰酚、槲皮素和木犀草素等成分与 PTGS2、AR 和 ESR1 等靶点发生相互作用,调节 PI3K-Akt、HIF 和 TNF 等多信号通路,影响细胞功能、氧化应答和免疫调节等一系列生物过程,进而实现治疗子宫内膜异位症的作用。

**关键词** 子宫内膜异位症;大黄;水蛭;香附;网络药理学;药理机制

## Mechanism of Rhubarb-Leech-Incense Compatibility in the Treatment of Endometriosis Based on Network Pharmacology<sup>△</sup>

DENG Ying<sup>1</sup>, LIU Jinkun<sup>2</sup>, BAI Shutong<sup>2</sup>(1. Dept. of Gynecology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine to Prevent and Treat Autoimmune Diseases, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the mechanism of rhubarb-leech-incense compatibility in treatment of endometriosis(EMT) based on network pharmacology. **METHODS:** TCMSP and BATMAN-TCM database were used to screen the active ingredients and target information of rhubarb-leech-incense. The target gene information of endometriosis was obtained through the treatment target database and GeneCards platform. Venny software was used to analyze the intersection of rhubarb-leeches-rhizome compatibility target gene and endometriosis target gene to obtain the core target of drugs. The “ingredient-target-disease” network was constructed by Cytoscape software, and the core target protein-protein interactions were analyzed by STRING database. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis of core targets was performed by R software, and pathway enrichment analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was performed by DAVID database. **RESULTS:** A total of 38 active ingredients and 98 potential core targets were screened. Quercetin, luteolin, kaempferol, safflower acid and ursolic acid were the main chemical constituents, and PTGS2, AR, PPARG, TOP2A and ESR1 were the main targets. The main biological processes affected by rhubarb-leech-incense compatibility included lipopolysaccharide response, steroid hormone

<sup>△</sup> 基金项目:重庆市卫生健康委员会中医药科研项目青年项目(No. 2021ZY4108);重庆市科学技术局科研院所绩效激励引导专项项目(No. cstc2018jxjl130034);重庆市科学技术局科研机构绩效激励引导专项项目(No. cstc2017jxjl130041)

\* 主治中医师。研究方向:中医治疗妇科疾病的临床和基础研究。E-mail:541772231@qq.com

# 通信作者:主管中药师。研究方向:中药新药开发和药理机制研究。E-mail:baishutong@hotmail.com

response and reactive oxygen species response. KEGG pathway enrichment analysis revealed 330 signaling pathways, mainly including PI3K-Akt, HIF and TNF signaling pathways. CONCLUSIONS: Rhubarb-leech-incense can interact with PTGS2, AR and ESR1 through kaempferol, quercetin and luteolin to regulate PI3K-Akt, HIF and TNF and other signaling pathways, affecting cell function, oxidative response and immune regulation, thus achieving a series of biological processes for the treatment of endometriosis.

**KEYWORDS** Endometriosis; Rhubarb; Leech; Incense; Network pharmacology; Pharmacological mechanism

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT)是一种发病机制尚未明确,以子宫内膜腺体或间质细胞出现在子宫腔或宫体肌层外为主要表现,且具有显著雌激素依赖性的慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。EMT的发病率为10%~15%,是诱发慢性盆腔疼痛和不孕的主要病因之一,且该病具有显著的恶变倾向,给患者的身心健康造成严重危害<sup>[2]</sup>。EMT的治疗方法以药物治疗和手术治疗为主,虽然在临床中取得了良好的治疗效果,但仍存在部分患者疗效不佳和不良反应大的困扰<sup>[3]</sup>。因此,寻找新的EMT治疗药物具有极高的临床价值和广阔的市场前景。中医认为,EMT属于“经行腹痛”范畴,因情志或外感导致胞宫经血阻滞而不通则痛,或胞宫冲任濡养不足而不荣则痛所致<sup>[4-5]</sup>。我院妇科创始人张进主任中医师经过长期临床经验总结出“瘀血”为EMT的主要病机,并通过从瘀论治研制出长青胶囊,临床用于EMT的疗效显著。我院妇科夏敏主任结合自身长期治疗EMT的临床经验,在长青胶囊的基础上根据气行则血行的理论,加用香附,研制出大黄-水蛭-香附配伍方,该方功效为活血、祛瘀和止痛,临床研究结果表明该方能够降低EMT患者血清中CA<sub>125</sub>水平,缓解EMT引发的疼痛症状效果良好<sup>[6]</sup>。大黄-水蛭-香附配伍的作用机制至今仍未被阐述清楚,本研究采用网络药理学方法,通过构建大黄-水蛭-香附“化学成分-靶点-疾病靶标”之间的作用网络,分析各节点之间的相互作用,从而分析该方影响的潜在生物过程和信号通路,从“药物-靶点”网络分析大黄-水蛭-香附治疗EMT的作用机制,为基于该验方的中药新药开发提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 大黄-水蛭-香附的化学成分和治疗靶点收集

通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),选择“Herb name”,检索大黄、香附和水蛭的成分和靶点信息。根据口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18作为筛选条件,获取大黄-水蛭-香附的潜在药效物质及其靶点信息。TCMSP系统未收录的中药信息,通过BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)补充检索水蛭活性成分和靶点信息,检索条件为“Score cutoff ≥ 20, P-value cutoff < 0.05”。将上述2个数据库获得的活性成分和靶点信息整合,并通过Uniprot数据库将靶蛋白名转换为标准基因名。

### 1.2 EMT疾病靶点数据库的构建

以“Endometriosis”作为关键词在治疗靶点数据库(TTD)<https://bidd.nus.edu.sg/group/cjtt/>)和GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)中检索疾病靶点蛋白信息,将GeneCards的检索条件设定为相关性评分≥2.00。合并上述

数据库中获取的EMT靶点,并通过Uniport数据库将靶点名称转换为标准基因名,构建EMT疾病靶点数据库。

### 1.3 成分-靶点-疾病网络构建

通过Venny 2.1.0在线软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),筛选大黄-水蛭-香附活性成分靶点基因与EMT疾病基因的交集,作为大黄-水蛭-香附治疗EMT的核心靶点并绘制韦恩图<sup>[7]</sup>。使用Cytoscape 3.7.1软件将大黄-水蛭-香附化学成分和核心靶点进行网络可视化构建<sup>[8]</sup>。

### 1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析

通过STRING数据库(Version 11.0)(<https://string-db.org/>),将98个核心靶点蛋白信息上传至STRING数据库中进行检索,蛋白种属设置为“Homo sapiens”,以“minimum required interaction score > 0.900”作为筛选条件,同时设置隐藏游离点,构建PPI网络<sup>[9]</sup>。

### 1.5 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

通过R语言(3.6.1)中的Cluster Profiler数据包对98个靶点数据进行GO生物过程分析,结果展示排序前15位。通过DAVID(Vision 6.8)在线分析平台,对98个核心靶点进行KEGG通路富集分析,以P < 0.01为筛选标准,下载数据保存文件,通过Excel软件对KEGG数据进行可视化,结果展示P值排序居前15位的信号通路。

## 2 结果

### 2.1 大黄-水蛭-香附活性成分筛选

通过TCMSP数据库获得大黄和香附的化学成分信息共196个,其中大黄92个,香附104个。在OB ≥ 30%和DL ≥ 0.18条件下,筛选出大黄活性成分10个,香附化学成分16个,共26个化学成分信息,其中β-谷甾醇(beta-sitosterol)为共有成分。通过BATMAN-TCM数据库获得水蛭活性成分15个,其中2个成分无靶点信息。合并上述数据,共获得38个化学成分和对应靶点信息。

### 2.2 EMT疾病靶点

通过TTD数据库检索到EMT疾病靶点基因15个,GeneCards数据库相关性评分≥2.00分的EMT疾病靶点共423个。合并上述基因库靶点基因并剔除重复项,共获得EMT疾病靶点基因信息432个,通过Uniprot数据库将靶点转换为标准基因名,以此构建EMT疾病靶点数据库。

### 2.3 大黄-水蛭-香附“成分-核心靶点-疾病”网络构建

大黄-水蛭-香附靶点数据库与EMT疾病靶点数据库合并结果显示,两数据库间的共同靶点基因98个(见图1),提示其



## 2.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

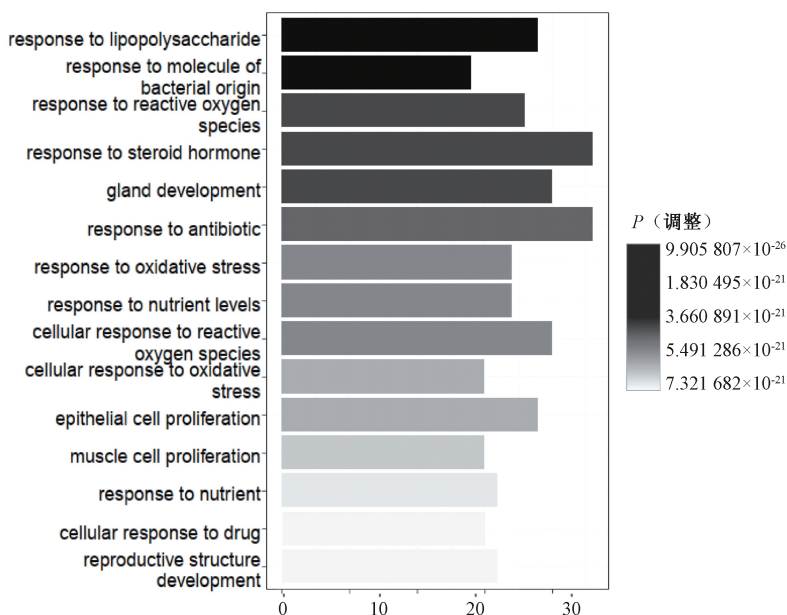
(1)GO 功能富集分析结果显示,大黄-水蛭-香附配伍的 98 个抗 EMT 核心基因共涉及 2 300 个生物过程,其中排序居前 15 位的生物过程为脂多糖反应、细菌来源分子的应答、活性氧簇反应、甾醇激素反应、腺体发育、细胞氧化应激反应、细胞对活性氧应答、上皮细胞增殖、肌肉细胞增殖及细胞对药物和营养的应答等多个生物过程,见表 1、图 4。提示大黄-水蛭-香附可通过参与上述多种生物过程实现抗 EMT 作用。

(2)KEGG 通路富集分析共富集到 330 条通路信息,排序居前 15 位的信号通路见图 5,图中横坐标代表基因数量,纵坐标表示信号通路名称。大黄-水蛭-香附配伍潜在靶点富集后的通路主要为肿瘤信号通路(35 个靶基因)、乙型肝炎信号通路(22 个靶基因)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K-Akt)信号通路(23 个靶基因)、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路(15 个靶基因)、缺氧诱导因子(HIF)信号通路(13 个靶基因)、前列腺癌、类风湿关节炎和炎性肠病等信号通路。提示大黄-水蛭-香附的药效成分通过上述信号通路实现抗 EMT

的作用。

表 1 大黄-水蛭-香附配伍的生物学功能信息

ID	生物过程	基因数	P
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	30/97	$2.40 \times 10^{-29}$
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	30/97	$7.72 \times 10^{-29}$
GO:0000302	response to reactive oxygen species	26/97	$8.83 \times 10^{-28}$
GO:0048545	response to steroid hormone	30/97	$2.46 \times 10^{-27}$
GO:0048732	gland development	31/97	$4.13 \times 10^{-27}$
GO:0046677	response to antibiotic	28/97	$1.27 \times 10^{-26}$
GO:0006979	response to oxidative stress	31/97	$1.34 \times 10^{-26}$
GO:0031667	response to nutrient levels	32/97	$1.53 \times 10^{-26}$
GO:0034614	cellular response to reactive oxygen species	22/97	$4.63 \times 10^{-26}$
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	26/97	$9.15 \times 10^{-25}$
GO:0050673	epithelial cell proliferation	29/97	$1.71 \times 10^{-24}$
GO:0033002	muscle cell proliferation	24/97	$1.77 \times 10^{-24}$
GO:0007584	response to nutrient	23/97	$6.39 \times 10^{-24}$
GO:0035690	cellular response to drug	27/97	$7.91 \times 10^{-24}$
GO:0048608	reproductive structure development	28/97	$2.67 \times 10^{-23}$



P 值代表富集的显著性,P 值越小,其颜色越偏向深色,P 值增大,图标颜色偏向浅色;横坐标表示富集的基因数目  
P-value represents the significance of enrichment, the smaller the P-value, the darker the color, and the higher the P-value, the lighter the color. The horizontal axis represents the number of enriched genes

图 4 大黄-水蛭-香附配伍抗 EMT 核心靶基因 GO 功能富集图

Fig 4 GO functional enrichment diagram of rhubarb-leech-incense compatibility against EMT core target gene

## 3 讨论

EMT 是一种临床常见的妇科疾病,患者常表现出痛经、腹腔包块等症状,甚至引起患者不孕。目前,西医治疗 EMT 仍存在一定的不足,无法获得满意的疗效<sup>[10]</sup>。大黄-水蛭-香附配伍是由我院妇科临床验方加工而成的协定处方,对 EMT 引起的月经痛、性交痛等具有良好的疗效。

本研究通过网络药理学方法对大黄-水蛭-香附配伍的药效物质和靶点进行筛选,最终获得 38 个活性成分和 518 个靶

基因。通过分析活性成分靶点与 EMT 靶点的交集,构建“活性成分-靶点-EMT”作用网络,在该核心网络中槲皮素、木犀草素、山柰酚、番红花酸和乌索酸的自由度值最高,能够与 14 个以上的 EMT 靶点发生相互作用。槲皮素、山柰酚和木犀草素具有调节脂代谢异常、抗炎、免疫调节和抗氧化,抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移等多种功效<sup>[11]</sup>。槲皮素在实验研究中表现出显著的抗 EMT 作用<sup>[12]</sup>。提示上述 5 种活性成分与 EMT 的多个疾病靶点具有亲和活性,是大黄-水蛭-香附发挥多靶点协

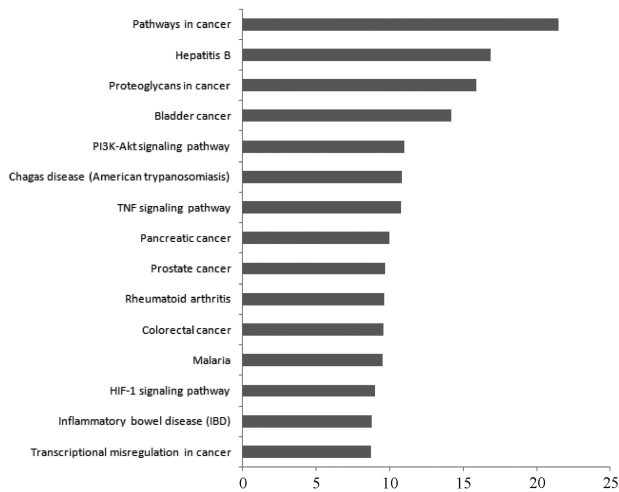


图5 KEGG 通路富集结果

Fig 5 KEGG pathway analysis

同作用的关键物质。PTGS2、AR、PPARG、TOP2A 和 ESR1 是网络中自由度最高的 5 个靶点,能够与多个大黄-水蛭-香附成分靶点发生结合,而 PTGS2、PPARG 和 TOP2A 具有调节细胞的增殖、迁移、炎症、缺氧环境应答、脂质代谢和肿瘤发生等多种生物学功能,其中 PTGS2 在卵丘细胞中的低表达与 EMT 患者不孕相关<sup>[13]</sup>;ESR1 和 AR 表达异常也与 EMT 的发生关系密切<sup>[14-15]</sup>。提示上述靶点是大黄-水蛭-香附发挥功效的关键靶点。

对核心靶基因的 GO 分析结果显示,大黄-水蛭-香附主要参与脂多糖应答、甾体激素应答、抗氧化、抑制细胞氧化应激反应和抗肿瘤等多个生物过程,上述生物过程均与 EMT 的发生和发展相关,对上述生物过程的干预作用可能是该方发挥药效的关键。KEGG 分析结果显示,大黄-水蛭-香附主要影响肿瘤信号通路、乙型肝炎、PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路和 TNF 信号通路,上述通路 EMT 的细胞增殖、侵袭、转移和血管新生等生物过程相关<sup>[16]</sup>。PI3K/Akt 信号通路对子宫内膜异位发生和发展过程中的细胞增殖、侵袭、转移和血管新生过程具有调控作用<sup>[17]</sup>。HIF 信号通路是细胞和组织响应外部缺氧环境应答的主要调节通路,在该信号通路激活条件下,EMT 模型大鼠的异位内膜组织体积增大,新生血管数量增多<sup>[18]</sup>。

综上所述,本研究通过网络药理学方法对大黄-水蛭-香附治疗 EMT 的药效物质和作用机制进行了初步探讨,分析了大黄-水蛭-香附抗 EMT 的药效物质和作用靶基因网络,以及其中涉及的主要生物过程和潜在调控作用信号通路,为进一步分析其作用机制提供了新线索。

## 参考文献

[1] ZHANG T, DE CAROLIS C, MAN G C W, et al. The link between immunity, autoimmunity and endometriosis: a literature update [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(10):945-955.

[2] CHAPRON C, MARCELLIN L, BORGHESE B, et al. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(11):666-682.

[3] ARAFAH M, RASHID S, AKHTAR M. Endometriosis: a comprehensive review [J]. *Adv Anat Pathol*, 2021, 28(1): 30-43.

[4] 武梅, 程雯, 张丹英, 等. 子宫内膜异位症中医证型研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1): 253-255.

[5] 何珏, 胡国华. 子宫内膜异位症(子宫腺肌病)痛经的中医治疗方法研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(3): 692-695.

[6] 张利梅, 赵磊, 陈丽, 等. 黄蛭内异胶囊治疗子宫内膜异位症的临床研究 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9(30): 90-92.

[7] 黄李冰雪, 张涛, 钟婵, 等. 基于网络药理学的清热化湿方治疗胃癌的药理机制研究 [J]. *中药材*, 2019, 42(10): 2375-2384.

[8] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2):110-120.

[9] LUO TT, LU Y, YAN SK, et al. Network Pharmacology in Research of Chinese Medicine Formula; Methodology, Application and Prospective [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(1):72-80.

[10] GRUBER T M, MECHSNER S. Pathogenesis of endometriosis: the origin of pain and subfertility [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1381.

[11] LEE Y, LEE J, LIM C. Anticancer activity of flavonoids accompanied by redox state modulation and the potential for a chemotherapeutic strategy [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2021, 30(3): 321-340.

[12] 张曦, 王鑫, 王红静, 等. 槲皮素对子宫内膜异位症的抑制作用及机理探讨 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2009, 40(2): 228-231, 244.

[13] DA LUZ C M, DA BROI M G, DONABELA F C, et al. *PTGS2* down-regulation in cumulus cells of infertile women with endometriosis [J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 35(4): 379-386.

[14] ZHAO L Y, GU C L, HUANG K, et al. Association between oestrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of 24 case-control studies [J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 33(3): 335-349.

[15] 郭欢, 任艺婷, 李晓燕, 等. ER、PR 和 AR 在子宫内膜异位症组织中的表达及其意义 [J]. *中国医学创新*, 2014, 11(12): 39-41.

[16] 王静, 王燕, 杜欣, 等. 萝卜硫素通过 PI3K/Akt 信号通路对腹腔子宫内膜异位症大鼠的保护作用 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(20): 2176-2180.

[17] 李燕, 朱君, 张煜. PI3K/AKT 信号转导通路和 VEGF 在子宫内膜异位症中的表达 [J]. *中国性科学*, 2017, 26(4): 45-47.

[18] 赵军, 刘肖, 李亚里, 等. 低氧预处理对大鼠子宫内膜异位病灶形成的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(10): 1369-1376.

(收稿日期:2021-04-23 修回日期:2021-10-28)