

基于网络药理学和分子对接探讨当归芍药散治疗原发性痛经的作用机制[△]

李敏^{1*}, 郭淼^{2#}, 陈萍², 翟凤霞³, 孙建华¹, 李娜¹ (1. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院妇产科, 郑州 450000; 3. 广州中医药大学第一附属医院妇科, 广州 510405)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)09-1050-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.09.006

摘要 目的:探讨当归芍药散治疗原发性痛经(PD)的多成分、多靶点、多通路作用机制。方法:通过检索公共数据库,筛选当归芍药散的有效成分和作用靶点以及疾病的靶点,通过R软件将药物成分靶基因和疾病靶基因取交集得到交集靶基因。结合STRING数据库构建靶蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,借助网络拓扑属性分析软件Cytoscape 3.8.0构建药物活性成分-作用靶点网络图。利用生物学信息注释数据库对靶点基因本体(GO)生物过程和京都基因与基因组百科全书(KEGG)中代谢通路进行富集分析。选取PPI网络中中度值较高的前几个关键靶点与相应的活性成分进行分子对接。结果:网络药理学研究结果显示,当归芍药散中黄酮类、β-谷甾醇、杨梅酮和豆甾醇等主要化合物,通过调节前列腺素内过氧化合物酶2(PTGS2)、雌激素受体1、蛋白激酶B1、芳基烃受体和孕激素受体等关键基因,参与丝裂原激活的蛋白激酶信号通路、钙信号通路和核因子κB信号通路等多条信号通路,发挥缓解痛经的作用。分子对接结果显示,黄酮类与PTGS2相互作用,结合后呈现稳定状态。结论:本研究初步明确了当归芍药散治疗PD的主要靶点和通路,为后续深入研究提供了一定的参考。

关键词 当归芍药散;原发性痛经;网络药理学;分子对接;作用机制

Mechanism of Danggui Shaoyao Powder in the Treatment of Primary Dysmenorrhea Based on the Network Pharmacology and Molecular Docking[△]

LI Min¹, GUO Miao², CHEN Ping², ZHAI Fengxia³, SUN Jianhua¹, LI Na¹ (1. College of the 1st Clinical Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. Dept. of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 3. Dept. of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the multi-component, multi-target and multi-pathway mechanism of Danggui Shaoyao powder in the treatment of primary dysmenorrhea (PD). **METHODS:** The effective components, action targets and disease targets of Danggui Shaoyao powder were screened by searching the public databases, and the drug component target genes and disease target genes were obtained by R software. The protein-protein interaction (PPI) network of target proteins was constructed by STRING database. The network topology attribute analysis software Cytoscape 3.8.0 was used to construct the active component-target network diagram. Biological information annotation database (DAVID) was used for enrichment analysis of target gene ontology (GO) biological processes and metabolic pathways in Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). The first few key targets with high degree of PPI network were selected for molecular docking with the corresponding active components. **RESULTS:** According to the network pharmacology results, kaempferol, beta-sitosterol, myricanone, stigmaterol, et al are the main effective components of Danggui Shaoyao Powder, which participated in the biological process of MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, NF-κB signaling pathway, et al by regulating prostaglandin lead oxide synthase within 2 (PTGS2), estrogen receptor 1 (ESR1), protein kinase B1 (Akt1), aryl hydrocarbon receptor (AHR) and progesterone receptor (PGR), and other key genes, so as to play a role in relieving dysmenorrhea. Molecular docking results showed that kaempferol interacted with PTGS2 and showed the stable state after binding. **CONCLUSIONS:** This study preliminarily clarified the main targets and pathways of Danggui Shaoyao powder in the treatment of PD, and provided a certain reference for subsequent in-depth research.

KEYWORDS Danggui Shaoyao powder; Primary dysmenorrhea; Network pharmacology; Molecular docking; Action mechanism

△ 基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(No. 20-21ZY2008);河南中医药大学重点学科建设项目(No. 15102044-2020)

* 住院医师,硕士研究生。研究方向:中医药防治妇科疾病。E-mail:2662591370@qq.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:中医药防治妇科疾病。E-mail:guom123321jiaozuo@163.com

原发性痛经 (primary dysmenorrhea, PD) 指育龄期女性机体没有器质性病变的情况下, 经行前后或月经期出现下腹部疼痛、坠胀, 伴有腰酸或其他不适^[1]。该病呈周期性反复发作, 病程长, 发病率高, 我国痛经发生率为 33.1%, 其中原发性痛经占 90%, 影响了育龄期女性的生活和工作^[1-2]。临床应用当归芍药散治疗 PD 的疗效确切, 无不良反应^[3]。当归芍药散可调节血管舒缩物质, 抑制子宫收缩, 改善子宫血供, 从而发挥对 PD 的治疗作用^[4]。在网络药理学的支持下, 本研究拟探究当归芍药散治疗 PD 的活性物质及活性物质的作用靶点、作用通路, 并通过分子对接方法验证活性物质与作用靶点的结合性, 为临床推广应用和进一步研究提供依据。

1 资料与方法

1.1 筛选当归芍药散活性成分及其靶点

分别以“当归”“白芍”“川芎”“白术”“茯苓”和“泽泻”为关键词, 借助中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)^[5] 查找其活性成分, 筛选出符合药动学参数口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (DL) ≥ 0.18 ^[6] 的活性成分及相对应的靶基因, 在 UniProt 数据库^[7] 中优化。删除无对应靶基因的活性成分, 去重, 分别建立活性成分数据集和药物靶基因数据集。

1.2 获取 PD 相关疾病靶基因

在 GeneCards^[8]、人类孟德尔遗传综合数据库^[9] 中检索, 获得 PD 相关的疾病靶基因。去重后, 建立疾病靶基因数据集。

1.3 构建核心靶基因蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI)

运用 R 软件^[10] 将药物成分靶基因和疾病靶基因进行交集, 得出当归芍药散作用于 PD 的核心靶基因集, 并绘制韦恩图。将筛选得到的核心靶点集置入 STRING 11.0 平台^[11], 最低相互作用阈值设为 >0.4 , 其余参数保持默认设置, 获得核心靶点相互作用关系, 并运用 Cytoscape 软件可视化。

1.4 构建活性成分-作用靶点网络图

创建“药物-成分”“成分-靶点”及“疾病-靶点”关系文件, 将其导入 Cytoscape 软件^[12], 构建“活性成分-作用靶点”网络。

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

将所有核心靶点导入 DAVID 数据库^[13], 设定阈值 $P < 0.05$, 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。并根据富集基因数量选择靠前的条目, 分别通过 Excel 软件及 R 软件将其结果可视化。

1.6 当归芍药散活性成分与靶点的分子对接

将 PPI 网络中排序靠前的关键靶点分别与对应的活性成分进行分子对接, 验证成分-靶点之间的可能性。在 PubChem 数据库中找到活性成分的化学结构及二维结构, 在 ChemOffice 软件中进行三维化及优化, 并在 AutoDockTools 软件中转化成 pdbqt 格式。通过 PDB 数据库获取靶蛋白的结构、化学结构, 利用 PyMOL 软件删除水分子, 并在 AutoDockTools 软件中添加氢离子、转化成 pdbqt 格式等预处理。最终在 AutoDockTools 软件中实现 vina 对接, 得到分子对接得分数据, 并在 PyMOL 软件实现可视化。

2 结果

2.1 当归芍药散活性成分及其靶点的获取与筛选

在 TCMSP 数据库中, 根据相应条件筛选、去重后, 最终得

出 54 个药物的有效活性成分及 100 个药物靶点基因。

2.2 PD 疾病靶点的获取与 PPI 网络的构建

在 2 个疾病基因数据库中收集疾病的致病靶点, 获得 406 个 PD 相关的疾病靶点。将其与 100 个药物成分靶点通过 R 软件绘制韦恩图 (见图 1), 两者取交集后, 获得共同核心靶点 23 个。将当归芍药散与 PD 相关的 23 个核心靶点导入 STRING 数据库获取的相互作用关系, 再借助 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络图, 见图 2。该网络图共包括节点 23 个, 边 90 个; 图中度值越大则颜色越深, 位置越靠近圆的中心。结果提示, 药物成分-疾病共同核心靶点中度值最高的 6 个关键节点为前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、雌激素受体 1 (ESR1)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、芳基羟受体 (AHR)、孕激素受体 (PGR)、谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (GSTP1) 和胱天蛋白酶 3 (CASP3)。

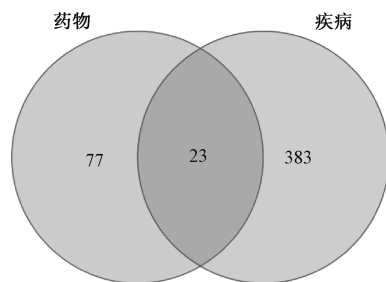


图 1 当归芍药散活性成分-PD 靶点韦恩图

Fig 1 Venn diagram of Danggui Shaoyao powder active components-PD targets

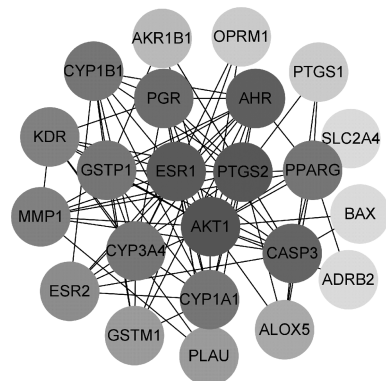


图 2 当归芍药散治疗 PD 核心靶点的 PPI 网络图

Fig 2 PPI network of core targets of Danggui Shaoyao powder in the treatment of PD

2.3 当归芍药散治疗 PD 的活性成分-作用靶点网络拓扑图构建

应用 Cytoscape 软件构建当归芍药散中活性成分-作用靶点共表达的网络拓扑图 (见图 3), 该网络图共包括节点 42 个, 边 57 条; 23 个方形节点代表作用靶点, 19 个圆形节点代表当归芍药散作用于 PD 的有效活性成分。其中, 山柰酚 (MOL000422, kaempferol)、 β -谷甾醇 (MOL000358, beta-sitosterol)、杨梅酮 (MOL002135, myricanone) 和豆甾醇 (MOL000449, stigmasterol) 等与靶基因连线最多, 为主要的活性成分。

2.4 当归芍药散治疗 PD 核心靶点 GO 功能富集分析

GO 功能富集分析中, 根据富集基因数目, 分别在生物过

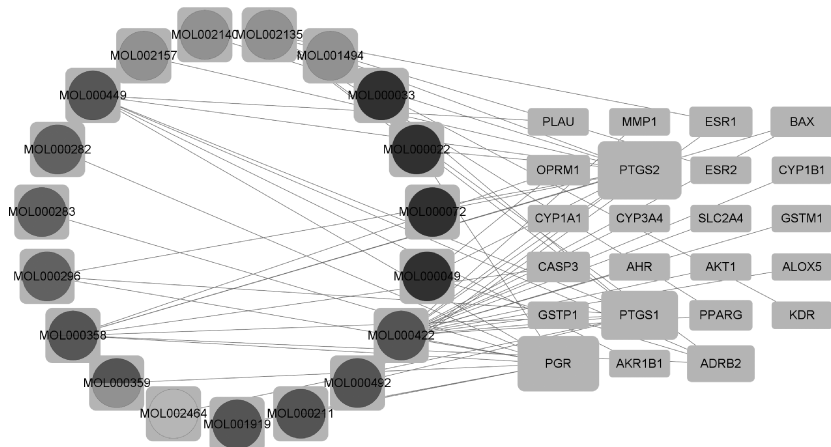


图3 当归芍药散作用于PD的活性成分-作用靶点网络图

Fig 3 Active components-targets network of Danggui Shaoyao powder in the treatment of PD

程、细胞组分及分子功能3个方面共筛选出12个GO生物过程条目,见图4。柱状图居上者为系列1,表示该条目Count值;居下者为系列2,表示该条目基因数目占所有基因总数的比例。生物过程功能包括序列特异性DNA结合转录因子活性

的正调控、棕色脂肪细胞分化、细胞氧化剂解毒和血压调节;细胞组分中的定位包括线粒体、细胞溶质、内质网膜和高尔基体;分子功能包括血红素结合、铁离子结合、谷胱甘肽转移酶活性和核心启动子序列特异性DNA结合。

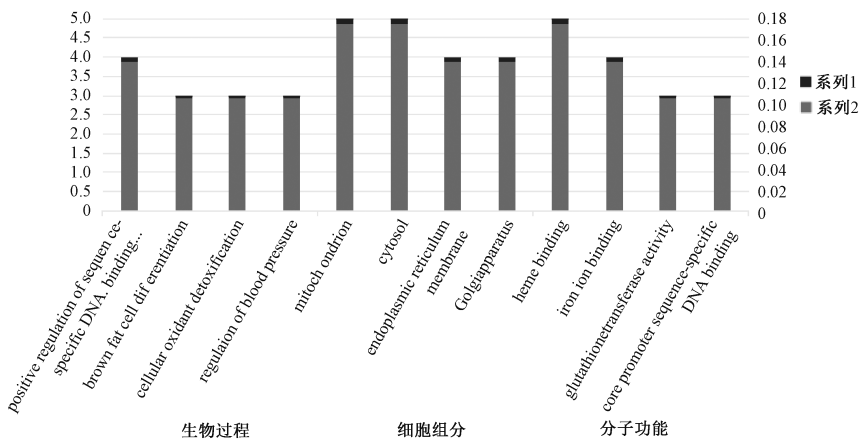


图4 当归芍药散治疗PD核心靶点GO功能富集分析柱状图

Fig 4 Histogram of GO enrichment analysis of core targets of Danggui Shaoyao powder in the treatment of PD

2.5 KEGG 通路富集分析当归芍药散治疗PD的通路

根据富集基因数量,选择前20条通路进行气泡图展示,见图5。由图可见,当归芍药散治疗PD的KEGG富集通路主要有丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号通路、钙信号通路和核因子 κ B(NF- κ B)信号通路等。可见,当归芍药散可通过调节多条通路发挥治疗PD的作用。

2.6 分子对接验证结果

利用AutoDockTools软件对PPI网络中排序居前6位的关键靶点与相应的活性成分进行分子对接后,得到对接的自由能,见表1。其中山柰酚与PTGS2的结合的自由能最小,山柰酚与PTGS2结合后呈现稳定状态,见图6。

3 讨论

本研究通过网络药理学方法对当归芍药散治疗PD的作用机制进行了较为系统的分析,结果显示,共筛选出19个潜在活性成分,其中当归芍药散的主要活性成分包括山柰酚、 β -谷甾醇、杨梅酮和豆甾醇等。PD的发生是由于月经来潮时,子宫

内膜前列腺素(PG)在炎症刺激下,经一系列合成酶促代谢反应产生并释放PGF_{2 α} ^[14]。生理状态下,PGF_{2 α} 在大部分细胞中处于沉默状态,当机体出现炎症反应时,PGF_{2 α} 活性显著表达。环氧合酶2(COX-2)是PGF_{2 α} 合成步骤的关键酶^[15]。研究表明,在炎症反应中,山柰酚可以使转录因子(STAT3)和NF- κ B失活,以此减弱白介素(IL)6诱导的THP-1细胞中COX-2的表达^[16];通过降低NF- κ B p65、IL-6和肿瘤坏死因子(TNF) α 水平发挥抗炎作用,缓解小鼠神经根疼痛^[17]。 β -谷甾醇、豆甾醇对脂多糖诱导的单核巨噬细胞(RAW264.7)具有抗炎作用。研究表明,植物甾醇类化合物均能减轻脂多糖诱导的巨噬细胞炎症反应,抑制细胞吞噬功能、TNF- α 释放、COX-2和p-ERK的表达和活性^[18]。其中, β -谷甾醇的抗炎活性高于豆甾醇。杨梅酮对炎症反应中的细胞因子具有调节作用,通过抑制巨噬细胞中的NF- κ B和STAT1活化及诱导出血红素加氧酶1(HO-1)的抗炎活性^[19]。另有研究结果显示,在脂多糖诱导的炎症模型中,杨梅素能显著降低诸多细胞炎症

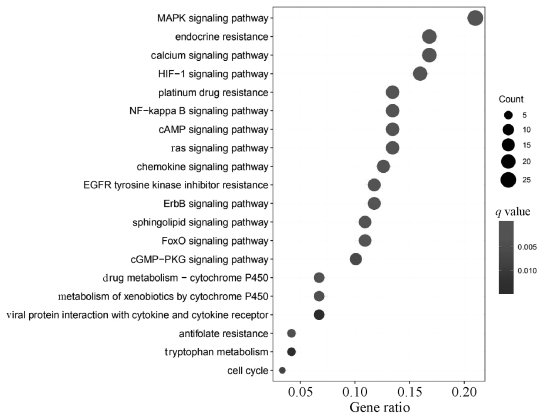


图5 当归芍药散治疗PD的KEGG通路富集分析图(前20条通路)

Fig 5 KEGG enrichment analysis of Danggui Shaoyao powder in the treatment of PD (top 20 pathways)

表1 当归芍药散有效化合物与作用靶蛋白的对接结果

Tab 1 Docking results of effective compounds of Danggui Shaoyao powder and target proteins

靶点名称	PBB-ID	化合物编号	自由能/(kJ/mol)
Akt1	1unq	MOL000422	-28.424
AHR	5nj8	MOL000422	-34.276
CASP3	5i9b	MOL000358	-34.276
CASP3	5i9b	MOL000422	0
ESR1	1hep	MOL000492	-27.588
ESR1	1hep	MOL002135	-0.836
GSTP1	5l6x	MOL000422	-19.646
PGR	2c7a	MOL00033	-25.916
PGR	2c7a	MOL000211	-31.350
PGR	2c7a	MOL000282	-11.704
PGR	2c7a	MOL000283	-13.376
PGR	2c7a	MOL000296	-31.768
PGR	2c7a	MOL000358	-24.244
PGR	2c7a	MOL000359	-11.704
PGR	2c7a	MOL000422	-31.350
PGR	2c7a	MOL000449	-28.424
PGR	2c7a	MOL001919	-31.350
PTGS2	5f19	MOL000296	-38.038
PTGS2	5f19	MOL000358	-37.202
PTGS2	5f19	MOL000422	-38.874
PTGS2	5f19	MOL000492	-36.784
PTGS2	5f19	MOL001494	-21.736
PTGS2	5f19	MOL002140	-29.678
PTGS2	5f19	MOL002157	-34.694

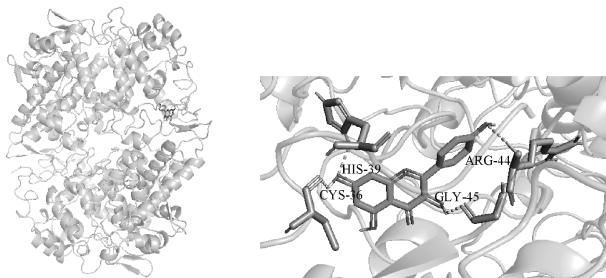


图6 山柰酚与PTGS2的分子对接图

Fig 6 Molecular docking diagram of kaempferol and PTGS2

因子的活性^[20]。以上说明,当归芍药散的主要有效活性成分通过抑制炎症反应,下调COX-2的表达水平,抑制PGF_{2α}活性,达到缓解经期疼痛的作用。

PPI网络显示,当归芍药散治疗PD是通过多靶点实现的。袁立明等^[21]发现,PD大鼠子宫平滑肌中COX-2表达水平上调,表明PD是一种炎症反应过程。性激素参与PD的发病。国内研究结果发现,雌激素水平与痛经的疼痛程度呈正相关关系,孕激素水平则呈负相关关系^[22]。即雌激素升高促进PG的合成与释放,从而促使平滑肌痉挛,孕激素则与之表现出拮抗的作用。进一步研究结果发现,二者相应的受体,即ESR、PGR也参与了PD病理的发生^[23]。通过降低ESR mRNA水平,提高PGR mRNA水平,可缓解子宫平滑肌痉挛,从而发挥治疗作用。分子对接结果亦显示,山柰酚与靶基因COX-2结合较为稳定。

KEGG通路富集分析结果显示,当归芍药散治疗PD是通过多条信号通路作用的,其中MAPK信号通路、NF-κB信号通路和钙信号通路等相关研究较多。NF-κB信号通路中的NF-κB因子是一种炎症反应及免疫表达的转录调节因子,能够调控COX-2的表达与活性^[24]。唐文静等^[25]发现,PD大鼠中NF-κB的磷酸化水平升高,以此活化COX-2调控PGF_{2α}的合成和分泌。当归芍药散可以通过抑制NF-κB信号通路,抑制炎症反应,发挥抗炎免疫作用,以此达到缓解疼痛的效果^[26]。MAPK信号通路是细胞内外信号传递的信使通路,MAPK被应激刺激激活后,其磷酸化级联反应可触发下游多种转录因子的激活,从而调节相关基因的表达,影响生物信号传递,促进子宫平滑肌收缩^[27]。细胞内钙离子的释放或细胞外钙离子的内流参与子宫平滑肌的收缩^[28-29]。关于GO功能富集方面,主要集中在序列特异性DNA结合转录因子活性的正调控、分子功能包括血红素结合、铁离子结合、谷胱甘肽转移酶活性和核心启动子序列特异性DNA结合等方面,上述生物学过程和功能体现在复方药物活性成分调节对应靶点和具体通路过程中。

综上所述,当归芍药散治疗PD具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,本研究结果探讨了当归芍药散的基本药理学作用和相关机制,并为进一步的基础研究奠定了良好基础。

参考文献

- [1] 谢幸,孔北华,段涛.妇产科学[M].9版.北京:人民卫生出版社,2018:351.
- [2] 李翠红,荀世宁.针灸联合中药热敷治疗原发性痛经的临床疗效分析[J].临床医学研究与实践,2017,2(6):145-146.
- [3] 张琦,洪恩四,洪静,等.针刺结合当归芍药散治疗气滞血瘀型原发性痛经90例疗效观察[J].中国处方药,2020,18(5):115-117.
- [4] 华永庆,丁爱华,段金殿,等.当归芍药散对缩宫素诱导的大鼠在体子宫收缩及血管舒缩因子的影响[J].中草药,2013,44(4):459-462.
- [5] 高烁.中药系统药理学一体化分析平台的构建和应用[D].咸阳:西北农林科技大学,2018.
- [6] 刘艳飞.中药治疗代谢综合征的药物筛选及分子作用机制研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [7] 罗静初.UniProt蛋白质数据库简介[J].生物信息学,2019,17(3):131-144.
- [8] 蒿花,田国祥,耿辉,等.人类基因综合分析数据库GeneCards的应用介绍[J].中国循证心血管医学杂志,2021,13(8):902-906.
- [9] 施雯.基于OMIM与PhenOMIM数据的信息系统[D].沈阳:东北大学,2012.
- [10] 谷恒明,胡良平.快速学会使用R软件的方法[J].四川精神卫生,2016,29(6):489-496.

(下转第1059页)