

胶艾汤活性成分治疗子宫疾病的网络药理学研究

刘春杰, 杨丽华, 余思聪(长春科技学院生命科学学院, 吉林省动物营养与遗传育种重点实验室, 长春 130600)

摘要: **目的** 采用网络药理学研究方法探究胶艾汤的药理作用机制。**方法** 依托中药系统药理学分析平台(TCMSP), 检索胶艾汤 7 味中药的活性成分和基因靶点。采用 Cytoscape 构建化合物-靶点网络、化合物靶点-疾病靶点和靶点-通路网络, 根据在线 STRING 数据库构建蛋白质相互作用网络, 研究胶艾汤药理机制。**结果** 通过筛选获得 64 个化合物, 化合物-疾病相应关键靶点 32 个。蛋白质相互作用网络包含 20 个靶点, 关键靶点涉及 Ptgs2、F2、Tnf、Il6、F3 等。基因本体条目 61 个, 其中生物过程相关的条目 34 个, 细胞组成相关条目 20 个, 分子功能相关的条目 7 个。KEGG 通路富集分析通路 4 条。**结论** 本研究初步验证了胶艾汤的基本药理作用及其机制, 为进一步探究其药理作用奠定了基础。

关键词: 胶艾汤; 网络药理学; 子宫疾病; 靶点; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)17-2136-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.17.005

引用本文: 刘春杰, 杨丽华, 余思聪. 胶艾汤活性成分治疗子宫疾病的网络药理学研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2136-2143.

Study on Network Pharmacology of the Main Active Ingredients of Jiao-ai Tang for the Treatment of Uterine Diseases

LIU Chunjie, YANG Lihua, YU Sicong(Changchun University of Science and Technology, Institute of Animal Science and Technology, Key Laboratory of Animal Nutrition and Genetics & Breeding in Jilin, Changchun 130600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the pharmacological mechanism of Jiao-ai Tang by means of network pharmacology. **METHODS** The active components and gene targets of 7 traditional Chinese medicines were retrieved on the basis of TCMSP. Cytoscape was used to construct compound-target network, compound-target-disease target and target-pathway network, and protein-protein interaction network was constructed according to online STRING database to study the pharmacological mechanism of Jiao-ai Tang. **RESULTS** Sixty-four compounds were obtained through screening, and 32 corresponding key targets were obtained. Protein-protein interaction network contained 20 targets, key targets including Ptgs2, F2, Tnf, Il6, F3, etc. There were 61 items of gene ontology, including 34 items related to biological process, 20 items related to cell composition and 7 items related to molecular function. KEGG channel enrichment analysis of 4 pathways. **CONCLUSION** This study preliminarily verified the basic pharmacological effect and mechanism of Jiao-ai Tang, and laid a foundation for further exploring its pharmacological effect.

KEYWORDS: Jiao-ai Tang; network pharmacology; uterine diseases; target; mice

胶艾汤出自东汉张仲景《金匱要略·妇人妊娠病脉证并治》, 系止血调经的要方。全方由当归、川芎、白芍、艾叶、甘草、生地和阿胶 7 味中药组成^[1]。方中以阿胶、艾叶暖宫止血, 当归、白芍调血养肝, 生地、川芎止血寓活, 防塞留瘀, 炙甘草补中扶正, 调和诸药。医学临床研究表明, 胶艾汤具有调经、止血、安胎的作用; 兽医临床动物实验研究表明, 胶艾汤可以促进小鼠子宫收缩、激活凝血因子、抑制纤溶系统活性, 起到止血的作用。胶艾汤与子宫疾病的有关症状(痛经、凝血障碍、贫血、出血和子宫内膜异位症等)具有多靶点同时调控的特点, 因此必须找到中药中化合物对应的治疗靶点, 有的放矢才能治愈此类疾

病。中药复方具有药物组成多、化合物多、作用靶点多及化合物间协同作用复杂的特点, 因此中药成分系统复杂庞大, 对中药的药理机制研究造成很大困难。而网络药理学的诞生则为解决中药复杂系统研究提供了可能^[2-3]。中药的网络药理学利用计算生物学和靶向药理学的理论和技术, 从动物系统水平探寻中药与疾病的关系, 强调从整体性和系统性角度探究药物-靶点-疾病三者的关系, 以阐明中药化合物-基因靶点-疾病之间的关系, 研究具有整体性、系统性, 与中医从整体性、辨证性的角度诊治疾病相吻合, 因此筛选中药的有效成分、预测靶点及分析药理机制多采用网络药理学研究方法^[2,4-5]。本研究采用网络药理学进行

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字 2015 第 567 号)

作者简介: 刘春杰, 男, 博士, 教授 Tel: 13630592023 E-mail: 743099957@qq.com

研究分析,旨在预测胶艾汤各活性成分及药物-疾病的作用机理。

1 材料与方法

1.1 胶艾汤的化合物成分

本研究采用中药药理学分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmssp.php>)^[6]和中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)检索胶艾汤,全方由当归、川芎、白芍、艾叶、生地、阿胶和甘草 7 味中药组成。在 TCMSP 检索当归、川芎、白芍、艾叶和甘草,用 BATMAN-TCM 检索生地和阿胶。搜索所有药物的化学成分,获得 824 个化合物,其中当归 125 个,川芎 189 个,白芍 77 个,艾叶 135 个,甘草 280 个,生地 15 个,阿胶 3 个。

1.2 阈值设定

口服生物利用度(oral bioavailability, OB)是药理学研究中最重要参数之一,其含义表示到达血液循环系统的药物占口服剂量的比例。生物活性分子类药性的选择一般依据高活性的 OB 值,因此中药中高活性化合物的筛选是采用 OB 和类药性来进行的。

本研究使用 TCMSP,将当归、川芎、白芍、艾叶和甘草的化合物 OB 筛选阈值均设为 $\geq 30\%$,5 味中药的类药性阈值设为 ≥ 0.18 。由于在 TCMSP 中没有阿胶和生地,所以采用 BATMAN-TCM(阈值选为 80, 0.05)搜索出化合物:阿胶 3 个,生地 9 个全部留下。在 824 个化合物分子中,选出符合条件的 64 个作为候选化合物。其中艾叶 9 个,川芎 7 个,白芍 13 个,甘草 23 个。当归按类药性 ≥ 0.18 选出 11 个。将检索的阿胶和生地的化合物输入 TCMSP 查出其化合物编号。

1.3 构建化合物-靶点网络

采用 TCMSP 数据库获得中药胶艾汤中当归、川芎、白芍、艾叶、甘草、生地的小分子化合物对应的靶点基因名称,阿胶的 3 种化合物用 BATMAN-TCM 检索出基因。应用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将靶点基因全称转化为 gene ID 号,通过 Cytoscape 3.6.1 软件(<https://cytoscape.org/>)构建胶艾汤的化合物-靶点网络,以探析胶艾汤的药理学作用机理^[4,7]。

1.4 关键靶点的获得

根据治疗靶点数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>),搜索疾病关键词:痛经

(dysmenorrhea)、疼痛(pain)、子宫内膜异位症(endometriosis)、凝血障碍(blood coagulation disorders)、出血(bleeding)、贫血(anemia)等获得相关靶点基因,采用微软 Microsoft Excel 2010 软件,使获得的疾病靶点与胶艾汤的化合物预测的靶点基因相映射,获得 32 个关键靶点。

1.5 关键靶点 PPI 网络的构建与分析

为了说明靶点蛋白在系统水平上的作用,将映射所得 32 个化合物靶点-疾病共同靶点输入 STRING 10.5 数据库(<https://string-db.org/>),获得基因-基因相互作用数据,将得到的数据导入 Cytoscape 3.6.1 软件,构建 PPI 网络。由于此研究还处在初期,不能采用人体试验;而模式动物小鼠(Mus musculus)疾病靶点研究较为全面、清楚,且后续药理研究所用的材料全面、完整,因此选择小鼠作为模式动物,为以后进一步研究靶点蛋白质的功能奠定基础。

1.6 基因本体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

本研究利用 David v 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对胶艾汤 PPI 网络中涉及的相关关键基因进行基因本体和 PATHWAY 功能富集分析,以此阐述化合物的靶点基因在基因功能和信号通路中的作用,并采用 Cytoscape 软件对 KEGG 通路富集分析中筛选出的信号通路构建靶点-通路网络。

2 结果

2.1 筛选活性化合物

本研究中当归、川芎、白芍、艾叶和甘草的化合物 OB 筛选阈值均 $\geq 30\%$,4 味中药的类药性阈值设为 ≥ 0.18 ^[2]。阿胶和生地采用 BATMAN-TCM 筛选,阈值设为 80 和 0.05,分别选出 3, 9 个,全部留下。在全部的 824 个活性化合物中,最终筛选出符合条件的 75 个活性成分。其中艾叶 9 个,当归 11 个,川芎 7 个,白芍 13 个,甘草 23 个,阿胶 3 个和生地 9 个。胶艾汤中含有的 75 个活性成分基本信息见表 1。

2.2 胶艾汤化合物-靶点相互作用网络

将“2.1”项下筛选出的 75 个高活性化合物采用 TCMSP 分别进行对应靶点的查询,采用 Cytoscape 软件构建化合物-靶点网络。此化合物-靶点网络共包含 161 个节点(其中有 26 个化合物节点,135 个基因节点)和 523 条边,菱形节点表示化合物分子;圆形节点表示基因靶点;边表示

化合物分子与基因的相互作用关系。在 75 个化合物中有 49 个未参与构建网络。根据网络拓扑学性质, 在整个网络中起枢纽作用的节点是连接化合

物或基因较多的节点, 被认为是关键的化合物或者基因, 因此筛选节点度较大的节点进行分析, 结果见图 1。

表 1 胶艾汤中筛选出的活性成分基本信息

Tab. 1 Basic information of active ingredients screened in Jiaoai Tang

编号	活性成分	口服生物 利用率/%	类药性	来源	编号	活性成分	口服生物 利用率/%	类药性	来源
M5735	dammaradienyl acetate	44.83	0.83	艾叶	M8278	4-chloro-N-[1-methyl-5-[[1-methyl-5-[[1-methyl-5-(2-morpholinoethylcarbamoyl)pyrrol-3-yl]carbamoyl]pyrrol-3-yl]carbamoyl]pyrrol-3-yl]-5-[2-(2-pyridyl)ethylamino]isothiazole-3-carboxamide	7.18	0.31	当归
M5741	cycloartenol acetate	41.11	0.80	艾叶	M8248	phosphatidylinositol	4.63	0.29	当归
M5720	24-methylenecycloartanone	41.11	0.79	艾叶	M5438	campesterol	37.58	0.72	生地
M0449	Stigmasterol	43.83	0.76	艾叶	M3333	acteoside	2.95	0.63	生地
M0358	beta-sitosterol	36.91	0.75	艾叶	M3703	glutinoside	21.33	0.52	生地
M0098	quercetin	46.43	0.28	艾叶	M2819	catalpol	5.07	0.44	生地
M1040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	42.36	0.21	艾叶	M3725	rehmaglutin C	12.89	0.34	生地
M1494	mandenol	42.00	0.19	艾叶	M3721	rehmaglutin B	64.62	0.11	生地
M2883	ethyl oleate(NF)	32.40	0.19	艾叶	M3731	rehmaglutin A	29.70	0.10	生地
M0359	sitosterol	49.12	0.80	川芎	M3732	rehmaglutin D	57.03	0.10	生地
M2157	wallichilide	53.87	0.79	川芎	M0388	gamma-aminobutyric acid	24.09	0.01	生地
M0433	FA	55.34	0.78	川芎	M0054	arginine	47.64	0.03	阿胶
M2135	myricanone	36.91	0.75	川芎	M0071	histidine	53.18	0.03	阿胶
M2140	perlolyrine	36.91	0.75	川芎	M0055	lysine	29.33	0.02	阿胶
M2151	senkyunone	31.27	0.75	川芎	M4903	liquiritin	65.69	0.74	甘草
M1494	mandenol	43.56	0.53	川芎	M4891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
M1921	lactiflorin	49.12	0.80	白芍	M2311	glycyrol	90.78	0.67	甘草
M1924	paeoniflorin	53.87	0.79	白芍	M4904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
M0211	mairin	55.38	0.78	白芍	M4959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
M0358	β -sitosterol	36.91	0.75	白芍	M4824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25	0.63	甘草
M0359	sitosterol	36.91	0.75	白芍	M5007	glyasperins M	72.67	0.59	甘草
M1930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75	白芍	M5017	phaseol	78.77	0.58	甘草
M1919	(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	43.56	0.53	白芍	M1484	inermine	75.18	0.54	甘草
M1925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	白芍	M4810	glyasperin F	75.84	0.54	甘草
M1910	11 α ,12 α -epoxy-3 β -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 β -olide	64.77	0.38	白芍	M4914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano [3,2-c]chromenone	62.90	0.53	甘草
M1918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	白芍	M4855	licoricone	63.58	0.47	甘草
M1928	albiflorin_qt	66.64	0.33	白芍	M4808	glyasperin B	65.22	0.44	甘草
M0492	(+)-catechin	54.83	0.24	白芍	M4863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37	0.41	甘草
M0422	kaempferol	41.88	0.24	白芍	M5000	gancaonin G	60.44	0.39	甘草
M2102	levistolid A	2.15	0.82	当归	M4907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
M0449	stigmasterol	43.83	0.76	当归	M4829	glepidotin B	64.46	0.34	甘草
M0358	β -sitosterol	36.91	0.75	当归	M4990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	83.71	0.27	甘草
M4613	6,7,3',8'-diligustilide	9.83	0.70	当归	M0392	formononetin	69.67	0.21	甘草
M0357	Sitogluside	20.63	0.62	当归	M0500	vestitol	74.66	0.21	甘草
M8253	sphingomyelin	0.31	0.51	当归	M4841	licochoalcone B	76.76	0.19	甘草
M8247	L- β , γ -dimyristoyl- α -cephalin	20.69	0.47	当归	M4835	glypallichalcone	61.60	0.19	甘草
M8290	lecithin	0.31	0.40	当归	M4941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	71.12	0.18	甘草
M8288	Coniferyl ferulate	4.54	0.39	当归					

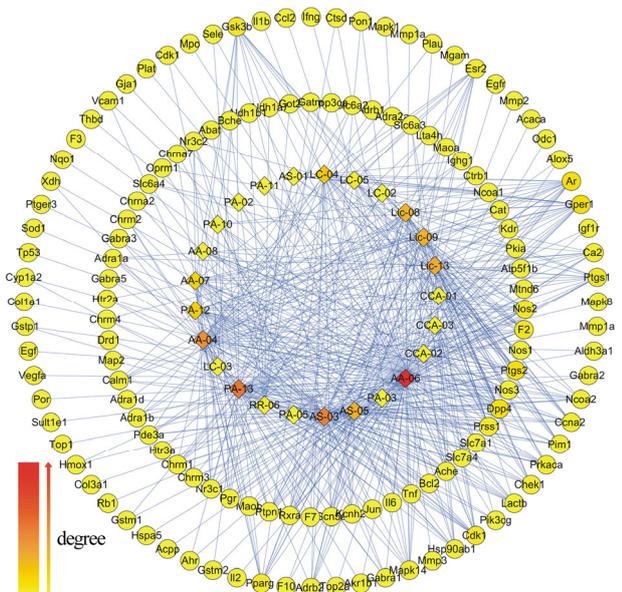


图1 胶艾汤化合物-靶点网络
菱形节点表示化合物；圆形节点表示靶点。

Fig. 1 Compound target network of Jiaoai Tang
A diamond node represented a compound; a circular node represents a target.

表2列出了化合物-靶点网络中的关键节点及其拓扑学性质。在表中可见化合物的平均靶点数为40个，平均每个靶点分别与15个化合物对应，由此可推断胶艾汤的化合物与基因靶点间有相互作用关系，同一个化合物作用于不同基因靶点，不同化合物共同作用于同一基因靶点，这表明胶艾汤具有多个成分与多个靶点相互作用的关系，符合中药复方的药理作用机理。若从化合物的方面来看，有73%化合物的作用靶点 ≥ 30 个，尤其有3个化合物靶点 ≥ 50 个。

Degree排名前4位的是艾叶中的槲皮素(querctin, M0098)、白芍中的山奈酚(kaempferol, M0422)、白芍中的 β -谷甾醇(β -sitosterol, M0358)和当归中的豆甾醇(stigmasterol, M0449)，分别能与85, 53, 50和44个基因靶点产生相互作用关系，比其他化合物要高很多。从靶点基因的角度看，Degree排名前4位的是雌激素受体(estrogen receptor, Gper1)、前列腺素g/H合酶2(prostaglandin G/H synthase 2, Pts2)、二肽基肽酶IV(dipeptidyl peptidase IV, Dpp4)和雄激素受体(androgen receptor, Ar)，分别能与17, 16, 16和16个化合物发生相互作用，其作用皆为正性作用。

2.3 化合物靶点-疾病靶点映射获得关键靶点

在TTD数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)搜索疾病关键词疼痛(pain)、痛经(dysmenorrhea)、

表2 化合物-靶点网络的关键节点及其拓扑学性质

Tab. 2 Key nodes and topological properties of compound target network

序号	名称	类别	介数	Degree
M0098	querctin	compound	0.484 802 11	85
M0422	kaempferol	compound	0.141 000 07	53
M0358	β -sitosterol	compound	0.133 156 02	50
M0449	Stigmasterol	compound	0.143 500 65	44
M0392	formononetin	compound	0.059 629 65	36
M0357	sitogluside	compound	0.035 524 67	33
M0500	vestitol	compound	0.033 276 55	32
M1484	inermine	compound	0.033 445 55	31
M2135	myricanone	compound	0.026 947 66	25
M0492	(+)-catechin	compound	0.018 236 7	23
M1040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	compound	0.010 941 89	21
Gper1	estrogen receptor	target	0.0315 544 9	17
Pts2	prostaglandin g/h synthase 2	target	0.022 413 73	16
Dpp4	dipeptidyl peptidase IV	target	0.031 272 06	16
Ar	androgen receptor	target	0.030 025 69	16
F2	thrombin	target	0.023 883 17	14
Nos2	nitric oxide synthase, inducible	target	0.016 740 62	13
Pts1	prostaglandin G/H synthase 1	target	0.014 380 14	13
Gsk3b	mitogen-activated protein kinase 14	target	0.012 422 77	13
Cdk1	cell division protein kinase 2	target	0.016 822 7	13

子宫内膜异位症(endometriosis)、出血(bleeding)、贫血(anemia)等获得的相关靶点基因，与胶艾汤的化合物预测的靶点基因相映射，获得32个胶艾汤化合物靶点-疾病靶点基因，结果见表3。

2.4 化合物靶点-疾病靶点 PPI 网络的分析

为了充分了解胶艾汤的作用机理，根据PPI，本研究采用STRING数据库构建了胶艾汤化合物靶点-疾病靶点的PPI网络(图2)。PPI网络包含20个基因靶点，37条相互作用关系的边。PPI节点表示蛋白，节点的颜色与节点的度呈正比例关系。

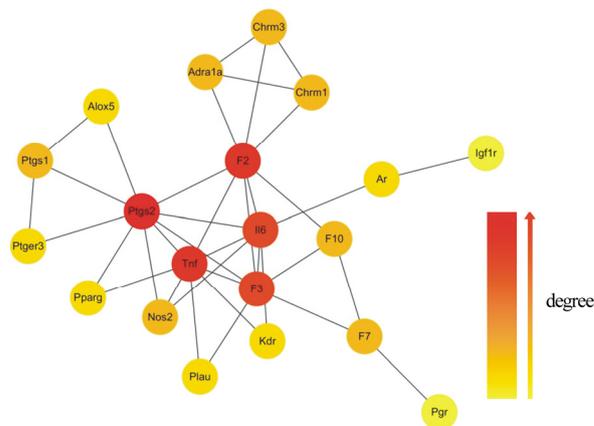


图2 化合物基因-疾病基因 PPI 网络
Fig. 2 Compound gene-disease gene PPI network

表 3 化合物靶点-疾病靶点相映射的基因靶点

Tab. 3 Gene targets map of compound targets and disease targets

靶点名称	基因	疾病
nitric oxide synthase, inducible	<i>Nos2</i>	pain
thrombin	<i>F2</i>	blood coagulation disorders
prostaglandin G/H synthase 2	<i>Ptgs2</i>	pain; endometriosis; dysmenorrhea
prostaglandin G/H synthase 1	<i>Ptgs1</i>	pain
acetylcholinesterase	<i>Ache</i>	pain
insulin receptor	<i>Igf1r</i>	pain
estrogen receptor	<i>Gper1</i>	dysmenorrhea; pain
androgen receptor	<i>Ar</i>	pain
arachidonate 5-lipoxygenase	<i>Alox5</i>	thrombosis
tumor necrosis factor	<i>Tnf</i>	neuropathic pain
urokinase-type plasminogen activator	<i>Plau</i>	thromboembolism
interleukin-6	<i>Il6</i>	anemia
cell division control protein 2 homolog	<i>Cdk1</i>	pain
tissue factor	<i>F3</i>	bleeding
prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	<i>Ptger3</i>	pain
potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	<i>Kcnh2</i>	pain
peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>Pparg</i>	endometriosis
coagulation factor Xa	<i>F10</i>	bleeding; thromboembolism
coagulation factor VII	<i>F7</i>	bleeding
progesterone receptor	<i>Pgr</i>	endometriosis; endometrial cancer; menstrual disorders
muscarinic acetylcholine receptor M3	<i>Chrm3</i>	spasms; pain
Muscarinic acetylcholine receptor M1	<i>Chrm1</i>	neuropathic pain
Dopamine D1 receptor	<i>Drd1</i>	pain
Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-2 subunit	<i>Gabra2</i>	neuropathic pain
Alpha-1A adrenergic receptor	<i>Adra1a</i>	pain
Sodium-dependent serotonin transporter	<i>Slc6a4</i>	pain
Mu-type opioid receptor	<i>Oprm1</i>	pain
Cholinesterase	<i>Bche</i>	pain
Sodium-dependent noradrenaline transporter	<i>Slc6a2</i>	pain
Alpha-2A adrenergic receptor	<i>Adra2a</i>	pain
Amine oxidase [flavin-containing] A	<i>Maoa</i>	neuropathic pain
Vascular endothelial growth factor receptor 2	<i>Kdr</i>	angiogenesis disorder

将构成 PPI 网络的 20 个关键基因按 Degree 由大到小排列, 结果见表 4。

表 4 关键基因节点列表

Tab. 4 List of key gene nodes

靶点	Degree	靶点	Degree	靶点	Degree	靶点	Degree
<i>Ptgs2</i>	9	<i>Nos2</i>	3	<i>F10</i>	3	<i>Pparg</i>	2
<i>F2</i>	8	<i>Adra1a</i>	3	<i>F7</i>	3	<i>Ptger3</i>	2
<i>Tnf</i>	8	<i>Chrm3</i>	3	<i>Ar</i>	2	<i>Alox5</i>	2
<i>Il6</i>	7	<i>Ptgs1</i>	3	<i>Plau</i>	2	<i>Igf1r</i>	1
<i>F3</i>	7	<i>Chrm1</i>	3	<i>Kdr</i>	2	<i>Pgr</i>	1

根据基因节点的 Degree 绘制出 20 个关键基因节点的条形图, 结果见图 3。

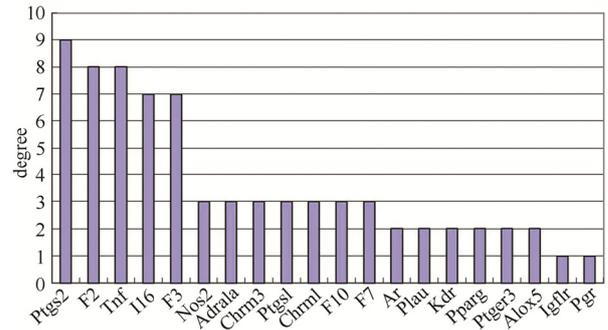


图 3 关键基因节点-degree 条形图

Fig. 3 Bar chart of key gene node-degree

Degree ≥ 7 的靶点包括 *Ptgs2*、*F2*、*Tnf*、*Il6*、*F3*, 其中, *Ptgs2*(Degree=9) 的 Degree 高于其他基因节点, 说明此基因在 PPI 网络中起到关键作用, 具有桥梁和枢纽作用。

2.5 基因本体富集与 KEGG 通路富集分析

本研究采用 DAVID 平台的基因本体和 PATHWAY 富集分析功能, 对胶艾汤化合物-疾病靶点网络中涉及的 32 个基因的功能进行研究。在基因本体富集分析中, 根据错误发现率(Benjamini < 0.05)确定了 61 个基因本体条目, 其中生物过程相关的条目 34 个, 涉及药物反应、血管收缩的正向调节、MAPK 级联的正向调节、炎症反应、蛋白激酶 B 信号通路的正向调节、细胞增殖的正向调节、血管收缩调节、平滑肌收缩的正调控等方面; 细胞组成相关的条目 20 个, 涉及树突、神经元投影、质膜整体组分、轴突、质膜、细胞表面、核膜等方面; 分子功能相关的条目 7 个, 涉及药物结合、蛋白结合、丝氨酸型肽链内切酶活性、受体结合、信号转导活性等方面。表 5 根据 Benjamini < 0.05 列出前 30 个。

在 KEGG 通路富集分析中, 得到 23 条信号通路, 根据 Benjamini < 0.05 筛选出 4 条通路, 结果见表 6。由表 6 可见 4 条通路为神经活性配体-受体作用、补体和凝血级联、钙信号途径和 5-羟色胺突触信号通路, 采用 Cytoscape 构建通路-靶点网络可知, 胶艾汤活性化合物作用于这些信号通路可以治疗子宫出血、凝血障碍、子宫内膜异位症和痛经等产科疾病。以上研究表明, 神经活性配体-受体相互作用通路有 9 个基因, 为 *Oprm1*、*Ptger3*、*F2*、*Chrm3*、*Drd1*、*Chrm1*、*Gabra2*、*Adra2a*、*Adra1a*; 补体和凝血级联反应通路有 5 个基因,

为 *Plau*, *F10*, *F7*, *F2*, *F3*; 钙信号途径通路有 6 个基因, 为 *Nos2*, *Adra1a*, *Chrm1*, *Drd1*, *Chrm3*, *Ptger3*; 5-羟色胺突触通路有 5 个基因, 为 *Ptgs1*, *Slc6a4*, *Maoa*, *Ptgs2*, *Alox5*。节点的颜色与节点的 Degree 呈正比例关系, 结果见图 4。

表 5 胶艾汤化合物-疾病靶点网络中的基因本体条目 (Benjamini<0.05)

Tab. 5 List of gene ontology enrichment results in compound -disease target network(Benjamini<0.05)

类别	编号	名称	基因数/个	错误发现率 Benjamini
生物过程	0042493	response to drug	10	2.95×10^{-6}
细胞组成	0030425	dendrite	10	4.56×10^{-6}
细胞组成	0043005	neuron projection	9	1.11×10^{-5}
细胞组成	0005887	integral component of plasma membrane	12	2.16×10^{-5}
生物过程	0045907	positive regulation of vasoconstriction	5	2.05×10^{-4}
生物过程	0043410	positive regulation of MAPK cascade	6	2.35×10^{-4}
生物过程	0006954	inflammatory response	8	2.46×10^{-4}
生物过程	0051897	positive regulation of protein kinase B signaling axon terminus	6	2.49×10^{-4}
细胞组成	0043679	membrane	5	2.62×10^{-4}
细胞组成	0016020	membrane	24	2.87×10^{-4}
生物过程	0008284	positive regulation of cell proliferation	9	3.62×10^{-4}
细胞组成	0030424	axon	7	3.76×10^{-4}
生物过程	0019229	regulation of vasoconstriction	4	5.96×10^{-4}
细胞组成	0009986	cell surface	8	6.82×10^{-4}
生物过程	0045987	positive regulation of smooth muscle contraction	4	9.21×10^{-4}
细胞组成	0005886	plasma membrane	19	0.00107075
细胞组成	0005635	nuclear envelope	5	0.001267206
生物过程	0030335	positive regulation of cell migration	6	0.002065237
生物过程	0008285	negative regulation of cell proliferation	7	0.002820155
生物过程	0042127	regulation of cell proliferation	6	0.00288441
生物过程	0045909	positive regulation of vasodilation	4	0.003018553
生物过程	0010628	positive regulation of gene expression	7	0.003222004
生物过程	0031622	positive regulation of fever generation	3	0.003465732
生物过程	0007599	hemostasis	4	0.00358668
细胞组成	0045211	postsynaptic membrane	5	0.003804321
细胞组成	0005615	extracellular space	10	0.004018003
生物过程	0043401	steroid hormone mediated signaling pathway	4	0.00514317
细胞组成	0045121	membrane raft	5	0.006493895
分子功能	0008144	drug binding	5	0.007591568
生物过程	0014068	positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	4	0.008486124

表 6 胶艾汤化合物-疾病靶点网络中的通路 (Benjamini<0.05)

Tab. 6 List of pathway enrichment results in compound -disease target network(Benjamini<0.05)

编号	名称	基因数/个	错误发现率 Benjamini
mmu04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	9	4.63×10^{-4}
mmu04610	Complement and coagulation cascades	5	0.007854065
mmu04020	Calcium signaling pathway	6	0.014121014
mmu04726	Serotonergic synapse	5	0.031974229

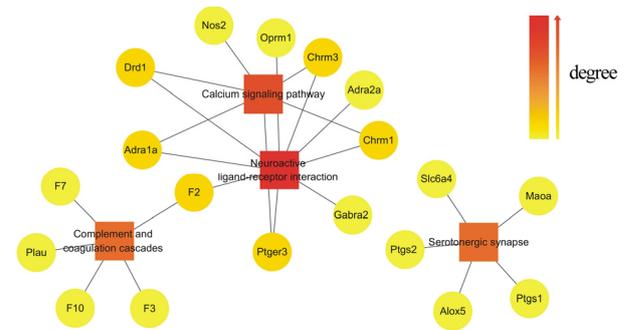


图 4 靶点-通路网络

方形代表通路, 圆形代表基因。

Fig. 4 Target-pathway network

Square represented the pathway; the circle represented the gene.

3 讨论

近百年来, 胶艾汤一直用于治疗妇科疾病, 主要用于妇科止血、活血、调经、止痛等作用。现代药理机制研究表明, 胶艾汤组方具有补血、促凝血、调节微循环、收缩子宫等作用^[8]。胶艾汤也是中兽医临床常用的养血、止血的基础方剂。其作用和缓, 养血止血, 调补冲任, 用药历史悠久^[9]。胶艾汤药理作用研究结果表明, 胶艾汤主要有促进造血功能、增强止血凝血作用, 提高机体免疫, 收缩子宫、调节内分泌的药理作用^[10-11]。为了更深入地分析研究胶艾汤的止血活血、调经作用机制, 本研究采用 TCMSp 和 BATMAN-TCM 中药系统药理学分析平台, 分析了胶艾汤 7 味中药(当归、川芎、白芍、艾叶、甘草、生地、阿胶)的化合物活性成分, 同时利用 Cytoscape 构建了化合物-基因靶点网络和基因靶点-疾病靶点网络, 分析了他们的相互作用关系, 为今后胶艾汤多靶点的药理作用机理研究奠定了基础。在胶艾汤的化合物-靶点网络中, Degree 远高于其他化合物的关键化合物包含艾叶中的槲皮素、白芍中的山萘酚、β-谷甾醇和当归中的豆甾醇。有研究表明, β-谷甾醇具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、镇痛、促进伤口愈合等广泛的药理活性^[12-13]。山萘酚具有抗肿瘤、

抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抗癌和预防心血管疾病、增强机体免疫等多种药理作用^[14]。豆甾醇的药理作用是抗氧化、抗肿瘤、抗炎、降低血液中胆固醇等药理活性^[15]。将胶艾汤的靶点与多种子宫疾病紧密相关的关键靶点进行 PPI 映射并构建网络,对网络分析后发现了多个关键靶点包括 Gper1、Ptgs2、Dpp4、Ar、F2、Tnf、Il6、F3 等,这些关键靶点参与调控的疾病包括各种妇科疾病,如子宫内膜异位症、痛经、疼痛、子宫肌瘤、子宫内膜癌、绝经后骨质疏松、原因不明月经过少及复发性流产等疾病,都与雌激素受体基因有关。由此可推测胶艾汤可能是通过化合物与疾病的关键基因直接或间接作用,从而进行疾病的治疗。这与已有的胶艾汤治疗上述疾病的研究相一致^[9]。

雌激素发挥作用主要通过 Gper1 结合而实现。白芍、地黄、川芎中的谷甾醇、桦木酸等多种化合物的基因靶点-雌激素受体 α (ER α),是由 Gper1 编码,其作用不但调节体内雌激素的含量,而且还是激活配体的转录因子,在 DNA 转录表达中起关键作用,ER α 主要分布于雌激素起作用的子宫、乳腺、胎盘、心血管系统和骨组织等组织中^[16]。白芍中的山奈酚,当归中的 β -谷甾醇,川芎中的川芎嗪的靶点-前列腺素内过氧化物合酶(Ptgs)是合成前列腺素的限速酶,此酶有 2 种异构体:Ptgs1 和 Ptgs2。研究表明 Ptgs 的药理作用是参与血压调节、炎症反应、凝血平衡等多种生理和病理过程^[17]。Ptgs2 又称为环氧化酶(Cox2),负责产生炎症-前列腺素。Ptgs2 的上调与细胞粘附、表型改变、抗凋亡和肿瘤血管生成有关,最终导致疼痛和炎症反应。Ptgs2 是非甾类抗炎药物的一个重要靶点,因此下调 Ptgs2 的表达有减轻炎症反应和治疗痛经的作用^[18]。白芍中的山奈酚和儿茶素的作用靶点-DPP4 是一种分布广泛的膜相关性丝氨酸蛋白酶,能够影响糖代谢、脂质代谢、免疫调节、神经调节、信号转导、癌症发展等多种生理功能。DPP4 与机体的免疫刺激、脂肪积累、细胞外基质退化及抑制抗癌剂有关的蛋白酶^[19]。由此可以推测白芍对 Ar 的调控可能在胶艾汤治疗多种复杂疾病中发挥着重要作用。凝血酶 F2 是由机体损伤处血管内皮细胞产生的参与凝血过程的关键酶。其在发挥止血作用的同时还可能诱发炎症、增生及修复等反应^[20]。有研究表明,如果凝血酶原出现异常,血液就会凝固,可能导致血栓

发生。任利等^[21]研究表明,胶艾汤可使模型动物血浆组织纤溶酶原激活剂含量降低而纤溶酶原激活剂抑制物含量增加,从而抑制组织纤溶酶原激活剂激活纤溶,达到止血不留瘀的目的。

为了阐释胶艾汤在基因功能和信号通路中所起的作用,本研究构建了 PPI 网络,并进行了基因本体功能和通路富集分析。基因本体功能富集分析研究表明,胶艾汤治疗疾病的基因功能主要体现在生物过程方面,有药物反应、血管收缩的正向调节、MAPK 级联的正向调节、炎症反应、蛋白激酶 B 信号通路的正向调节、细胞增殖的正向调节、血管收缩调节、平滑肌收缩的正调控等方面;细胞组成涉及树突、神经元投影、质膜整体组分、轴突、质膜、细胞表面、核膜等方面;分子功能涉及药物结合、蛋白结合、丝氨酸型肽链内切酶活性、受体结合、信号转导活性等方面。通路富集分析发现 4 条通路,分别是神经活性配体-受体相互作用、补体和凝血级联反应、钙信号通路和 5-羟色胺突触信号通路。神经活性配体-受体相互作用信号通路是细胞膜上相关受体的配体集合,构成细胞内外信号通路,在生理上与神经功能密切相关。该信号通路调节雄激素、雌激素、胆汁酸、脂肪酸、甘油酯、氨基酸、糖酵解/糖生和 PPAR 信号通路等^[22]。病原微生物侵入机体后,激活凝血系统,这种炎症-凝血交叉反应的结果是血栓的形成。机体严重感染时凝血系统表现为促凝活性增强、抗凝活性减低和纤溶系统受抑等,临床表现为血管血栓形成^[23]。贺卫和等^[24]采用 SD 大鼠探讨胶艾汤的止血作用机制,研究结果表明胶艾汤可能是通过激活内源性、外源性凝血系统发挥止血功能。李祥华等^[25]以缩宫素作为对照,研究了胶艾汤对子宫收缩的作用,结果表明胶艾汤有止血的作用。有研究表明钙离子信号通路中的关键分子具有调节细胞内酶活性、肌肉收缩和舒张、神经系统功能、调节前列腺素等生理功能^[26]。由此可推测胶艾汤能收缩血管,达到止血的目的。5-羟色胺为血管活性物质或神经递质,分布于外周组织和中枢神经系统中,是一种强血管收缩剂和平滑肌收缩刺激剂,起调控痛觉、睡眠、内分泌功能、心血管功能等作用^[27]。

综上所述,本研究采用网络药理学等多种研究方法,对胶艾汤复方的药理机制进行研究。初步验证了胶艾汤的基本药理学机制,为深入探讨其详细作用机制奠定了基础。由于本研究只是利

用小鼠基因进行的研究, 并且没有考虑各种中药不同剂量、煎煮过程中药物可能发生的化学变化及给药途径等对药效的影响, 因此需要在接下来的研究中将胶艾汤应用在不同动物的产科疾病上, 以便更加深入地探讨其药理作用机制, 为更好地应用于临床实践, 为古方新用奠定基础。

REFERENCES

- [1] ZHAO M H, HAO Z. Clinical application progress of Jiaoai decoction [J]. *J Chang Univ Chin Med*(长春中医药大学学报), 2018, 34(3): 606-609.
- [2] LIU X K, WU J R, LIN M J, et al. Study on mechanism of wuzhuyu tang based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(16): 203-210.
- [3] WU J R, JIN Y P, WANG K H, et al. Mechanism of Lonicerae Japonicae flos-weeping Forsythia herbal pair based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(5): 179-183.
- [4] LIU Z H, SUN X B. Network pharmacology: new opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin*(药理学报), 2012, 47(6): 696-703.
- [5] LIU X K, WU J R, LIN M J, et al. Study on mechanism of wuzhuyu tang based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(16): 203-210.
- [6] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014(6): 13. Doi: 10.1186/1758-2946-6-13. eCollection 2014.
- [7] GAO Y, GAO L, GAO X X, et al. An exploration in the action targets for antidepressant bioactive components of Xiaoyaosan based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin*(药理学报), 2015, 50(12): 1589-1595.
- [8] 于杰, 牛建昭, 王继峰. 胶艾汤及其加味方的雌激素样作用及其机制研究[C]//第九届中国中西医结合实验医学学术研讨会论文汇编, 中国吉林长春: 北京中医药大学, 2009: 19-21.
- [9] 刘音吟. 胶艾汤的实验研究进展[C]//第十一次全国中医妇科学术大会, 中国河南郑州: 中华中医药学会, 2011: 397-398.
- [10] 任利, 翟亚平, 商保军. 胶艾汤缩宫止血作用及对性激素水平的影响[J]. *陕西中医*, 2001, 22(6): 380-381.
- [11] 杨淑君, 彭树灵. 胶艾汤药理作用研究进展[J]. *国际医药卫生导报*, 2010, 16(6): 760-762.
- [12] 肖志彬, 贾韩学, 刘小雷. β -谷甾醇药理活性的研究现状[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(8): 66-68.
- [13] WEI J T, LIU W Q. B-sitosterol, one of functional component in phytosterols [J]. *J Putian Univ*(莆田学院学报), 2007, 14(2): 38-40, 46.
- [14] 雷晓青, 陈鳌, 刘毅, 等. 山萘酚药理作用的研究进展[J]. *微量元素与健康研究*, 2017, 34(2): 61-62.
- [15] ZHOU Z Y, LU Q, LIU Y, et al. Research and development progress of stigmasterol [J]. *China Mod Med*(中国当代医药), 2015, 22(24): 15-17.
- [16] 闫懿, 敖锋, 宋健. 雌激素及雌激素受体信号转导途径的研究进展[J]. *山西医药杂志*, 2016, 45(9): 1032-1034.
- [17] 田亚汀, 张玉平, 田小菲, 等. 环氧化酶在肠道运动功能障碍中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(4): 1124-1127.
- [18] ZHOU W. Systems pharmacology-based analysis for the traditional Chinese medicine typing, treatment and exogenous toxicity of cardiovascular diseases [D]. Yangling, China: Northwest A & F University, 2014.
- [19] XING X M, ZHANG B, HAN Y, et al. Progress in DPP-4 genomics research and clinical application of DPP-4 inhibitor [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2015, 35(20): 1885-1888.
- [20] 王汉斌, 刘龙斌, 史寅奎, 等. 凝血酶受体的研究进展[J]. *国外医学(分子生物学分册)*, 1998, 20(3): 118-122.
- [21] 任利, 张红瑞, 翟亚平, 等. 胶艾汤止血作用的机制研究[J]. *山东中医杂志*, 2002, 21(3): 170-172.
- [22] PAN L Z. Studies on dependance of Valeriana jatamansi Jones by toxicogenomics [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2011.
- [23] 王鸿利. 炎症-凝血网络与血栓形成的关系[J]. *外科理论与实践*, 2006, 11(1): 61-63.
- [24] HE W H, WANG Z Q, JIANG M L, et al. Experimental research of jiaoai decoction on hemostasis mechanism [J]. *World J Integr Tradit West Med*(世界中西医结合杂志), 2012, 7(12): 1032-1033, 1041.
- [25] 李祥华, 王文英. 胶艾汤对动物离、在体子宫活动的影响[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(2): 154-156.
- [26] DUAN Y Q. Response of Ca²⁺/CaM signal pathways in soma generalization effect of splenasthenic syndrome rats and effects of qi-activating and spleen-strengthening herbs on the pathways [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2014.
- [27] 陈咏华. 5-羟色胺对心肺迷走神经节前神经元突触传入的调节作用[D]. 上海: 复旦大学, 2008.

收稿日期: 2018-12-28

(本文责编: 蔡珊珊)