

基于网络药理学和分子对接技术探讨桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的分子作用机制

贾菲菲, 郭苏兰, 梁国琼, 贾俊*

深圳市龙华区中心医院, 广东 深圳 518000

摘要:目的 通过网络药理学分析和分子对接技术来探讨桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的分子靶点和机制。方法 通过 TCMSP 平台筛选桂枝茯苓丸的有效成分及相关靶点, 从 GEO 数据库中获得子宫肌瘤疾病差异基因, 并通过 Perl 软件获取差异基因; 交叉基因经过构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 并进行基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析; 将筛选出的关键活性成分和靶基因利用 AutoDock 软件进行分子对接, 选择最佳结合靶标进行分子对接。结果 共筛选出 92 个活性化合物, 其中活性成分槲皮素、山柰酚、黄芩苷、豆甾醇、 β 谷甾醇被确定为关联靶标最高的活性成分, 获得交叉基因 41 个, 其中 PTGS2、PGR、NR3C2、GRIA2 等为关联活性成分数量最多的靶标基因。通过拓扑分析, 发现 30 个强关联蛋白, 有 11 个靶点为中药的核心预测靶点。细胞组分 (CC) 共富集 17 个条目, 分子功能 (MF) 共富集 32 个条目, 生物过程 (BP) 共富集 501 个条目; KEGG 通路富集共富集 52 个条信号通路, 主要为基因在流体剪切应力与动脉粥样硬化、化学致癌 - 受体激活、脂质与动脉粥样硬化等通路。分子对接结果表明, 桂枝茯苓丸的关键成分具有与目的基因 E2F1、MMP9、BAX、FOS 结合的良好潜力。结论 桂枝茯苓丸可能通过调控类固醇激素, 流体剪切应力与动脉粥样硬化、化学致癌 - 受体激活通路等途径发挥作用。

关键词: 桂枝茯苓丸; 子宫肌瘤; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 山柰酚; 黄芩苷; β 谷甾醇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2022)09 - 1965 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.011

Molecular mechanism of Guizhi Fuling Pills in treatment of hysteromyoma based on network pharmacology and molecular docking

JIA Fei-fei, GUO Su-lan, LIANG Guo-qiong, JIA Jun

Shenzhen Longhua District Central Hospital, Shenzhen 518000, China

Abstract: Objective To explore the molecular target and mechanism of Guizhi Fuling Pills in treatment of hysteromyoma through network pharmacological analysis and molecular docking technology. **Methods** The active components and related targets of Guizhi Fuling Pills were screened by TCMSP platform, and the differential genes of uterine fibroids were obtained from GEO database, and the differential genes were obtained by Perl software. Protein interaction (PPI) network was constructed, and analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. The key active components and target genes were screened out for molecular docking using AutoDock software, and the best binding target was selected for molecular docking. **Results** A total of 92 active compounds of Guizhi Fuling Pills were screened, including quercetin, kaempferol, baicalin, stigmasterol β -sitosterol was identified as the highest active component of the associated target, and 41 cross genes were obtained, among which PTGS2, PGR, NR3C2, and GRIA2 were the target genes with the largest number of associated active components. Through topological analysis, it was found that 30 strongly associated proteins and 11 targets were the core prediction targets of traditional Chinese medicine. 17 entries were enriched in CC, 32 entries in MF, and 501 entries in BP. KEGG pathway enriches a total of 52 signal pathways, including genes are particularly enriched in fluid shear stress and atherosclerosis, chemical carcinogen receptor activation, lipid and atherosclerosis. The results of molecular docking showed that the key components of Guizhi Fuling Pills had good potential to combine with target genes E2F1, MMP9, Bax, and FOS. **Conclusion** Guizhi Fuling Pills may play a role by regulating

收稿日期: 2022-04-16

作者简介: 贾菲菲 (1988—), 研究方向为产科肿瘤的保守治疗。E-mail: 511064071@qq.com

*通信作者: 贾俊 (1987—), 主管技师, 研究方向为盆底康复治疗。E-mail: 281846535@qq.com

steroid hormones, fluid shear stress and atherosclerosis, chemical carcinogen receptor activation pathway.

Key words: Guizhi Fuling Pills; hysteromyoma; network pharmacology; quercetin; kaempferol; baicalin; β -sitosterol

子宫肌瘤是女性生殖器官最常见良性肿瘤之一, 又称平滑肌瘤, 占妇科良性肿瘤的 51.8%, 在育龄期妇女中较为高发, 青春期和围绝经期妇女的发病率相对较低^[1-2]。约 30% 的子宫肌瘤患者会出现典型的异常阴道流血、月经不调、剧烈盆腔痛和不孕等临床表现, 严重影响患病妇女的心理健康和生活质量^[3]。目前药物治疗方面西医首选激素类药物, 但部分患者因耐药而需增大剂量, 或因使用激素类药物导致子宫内膜增生, 限制了该类药物的使用^[4]。子宫肌瘤属于中医“癥瘕”“瘕积”等范畴, 中医治疗该病以“活血化瘀消瘕”为法, 而且近几年临床研究及 Meta 分析结果均显示, 桂枝茯苓丸加减或联合其他治疗均可治疗子宫肌瘤^[1, 5-8]。本研究借助网络药理学研究方法及分子对接技术, 寻找桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的药物成分及作用靶点。

1 资料和方法

1.1 桂枝茯苓丸活性成分和靶基因的筛选

在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>)以生物利用度(OB) $\geq 30\%$, 类药性(DL) ≥ 0.18 为条件筛选桂枝茯苓丸中桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、赤芍 5 味中药的有效成分。筛选化合物的预测靶标来自药物库(<https://www.drugbank.ca/>)数据库和已验证的文献。并用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)再一次比较目标信息。

1.2 差异基因的获得

在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载子宫肌瘤和健康人的基因样本数据(GSE64763、GPL571)。将原始数据按脚本在 Perl (5.30.2.1) 软件中运行, 按照基因探针的名称注释为基因符号, 并分组。Perl 软件中安装了“limma”包, 对样本值进行了校正和 $\log_2FC$ 转换。筛选出 $|\log_2FC| > 0.5$ 且 $P < 0.05$ 的数据为统计学上显著的差异基因, 生成样本的基因火山图, 选取上调和下调最显著的前 20 个基因绘制热图。

1.3 桂枝茯苓丸-疾病调控网络

利用 Perl 软件获取疾病差异基因与中药目标基因的交集基因, 以及中药有效成分。随后, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件生成了桂枝茯苓丸-子宫肌瘤

调控网络。

1.4 蛋白质相互作用(PPI)网络和拓扑分析

在 Cytoscape 3.7.2 软件中安装“bisogenet, CytoNAC”包, 输入了交集基因, 选择参数“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络的数据来源于 6 个主要的实验研究数据库: 人类蛋白质参考数据库、生物分子相互作用网络数据库、交互作用数据集的生物通用存储库、分子相互作用数据库、完整分子相互作用数据库以及相互作用蛋白质数据库。选择“Input nodes and its neighbors”的方法获得 PPI 网络, 并根据其网络中心性进行拓扑分析。

1.5 基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析

软件 R4.1.1 中安装了“colorspace”“stringi”和“ggplot2”在内的 R 包, 用于进行 GO 和 KEGG 富集分析。将前 20 个富集结果可视化条形图, KEGG 调控网络由 Cytoscape 3.7.2 软件生成。

1.6 分子对接

在 PDB 数据库中检索 KEGG 富集结果的前 5 个途径的靶基因, 其中获得了通过 X 晶体衍射确定的晶体分辨率介于 2~3 的 3D 蛋白质构象, 从 PubChem 数据库获取化合物 3D SDF 格式文件, 应用 PyMol 去掉蛋白水分子和配体, 采用 AutoDockTools 1.5.6 软件选择相应的蛋白和配体, 对接盒被调整为包括所有蛋白质结构, 记录配体坐标, 使用 Auto Dock Vina 1.1.2 软件获得分子对接结合能^[9]。

2 结果

2.1 活性成分和靶基因的筛选

以 OB $\geq 30\%$ 和 DL ≥ 0.18 为条件筛选桂枝茯苓丸中活性成分, 结果得到 92 个活性成分和 582 个药物作用靶点, 见表 1。

2.2 差异基因筛选

通过比较 GEO 数据库中 29 个正常样本和 50 个疾病样本, 共获得 12 548 个差异基因, 包括 7 058 个上调基因和 5 490 个下调基因, 经过筛选共获得 543 个上调基因和 785 个下调基因, 疾病样本中的差异基因呈正态分布, 显著下调的基因($\log_2FC < 0$)数量多于显著上调的基因($\log_2FC > 0$), 见图 1、2。

表 1 桂枝茯苓丸中的有效成分

Table 1 Active ingredients in Guizhi Fuling Pills

Mol_ID	成分名称	OB/%	DL	中药
MOL001689	acacetin	34.97	0.24	赤芍
MOL000173	wogonin	30.68	0.23	赤芍
MOL000228	(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.20	赤芍
MOL002714	baicalein	33.52	0.21	赤芍
MOL002908	5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone	37.01	0.27	赤芍
MOL002909	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	33.82	0.45	赤芍
MOL002910	carthamidin	41.15	0.24	赤芍
MOL002911	2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychaleone	69.04	0.22	赤芍
MOL002913	dihydrobaicalin_qt	40.04	0.21	赤芍
MOL002914	eriodictiol (flavanone)	41.35	0.24	赤芍
MOL002915	salvigenin	49.07	0.33	赤芍
MOL002917	5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	45.05	0.33	赤芍
MOL002925	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	37.01	0.24	赤芍
MOL002926	dihydrooroxylin A	38.72	0.23	赤芍
MOL002927	skullcapflavone II	69.51	0.44	赤芍
MOL002928	oroxylin a	41.37	0.23	赤芍
MOL002932	panicolin	76.26	0.29	赤芍
MOL002933	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	36.56	0.27	赤芍
MOL002934	NEOBAICALEIN	104.34	0.44	赤芍
MOL002937	DIHYDROOROXYLIN	66.06	0.23	赤芍
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	赤芍
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	赤芍
MOL000525	norwogonin	39.40	0.21	赤芍
MOL000552	5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	31.71	0.35	赤芍
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	赤芍
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	赤芍
MOL001458	coptisine	30.67	0.86	赤芍
MOL001490	bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	43.59	0.35	赤芍
MOL001506	supraene	33.55	0.42	赤芍
MOL002879	diop	43.59	0.39	赤芍
MOL002897	epiberberine	43.09	0.78	赤芍
MOL008206	moslosooflavone	44.09	0.25	赤芍
MOL010415	11,13-eicosadienoic acid, methyl ester	39.28	0.23	赤芍
MOL012245	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	36.63	0.27	赤芍
MOL012246	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.24	0.26	赤芍
MOL012266	rivularin	37.94	0.37	赤芍
MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	牡丹皮
MOL000211	mairin	55.38	0.78	牡丹皮
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	牡丹皮
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	牡丹皮
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	牡丹皮
MOL007003	benzoyl paeoniflorin	31.14	0.54	牡丹皮
MOL007369	4-O-methylpaeoniflorin_qt	67.24	0.43	牡丹皮
MOL007374	5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid	43.44	0.30	牡丹皮
MOL007382	mudanpioside-h_qt 2	42.36	0.37	牡丹皮
MOL007384	paeonidanin_qt	65.31	0.35	牡丹皮
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	牡丹皮
MOL001371	populoside_qt	108.89	0.20	桃仁
MOL001368	3-O-p-coumaroylquinic acid	37.63	0.29	桃仁
MOL001340	GA120	84.85	0.45	桃仁
MOL001349	4a-formyl-7alpha-hydroxy-1-methyl-8-methylidene-4aalpha,4bbeta-gibbane-1alpha, 10 beta-dicarboxylic acid	88.60	0.46	桃仁

续表 1

Mol_ID	成分名称	OB/%	DL	中药
MOL001339	GA119	76.36	0.49	桃仁
MOL001348	gibberellin 17	94.64	0.49	桃仁
MOL001358	gibberellin 7	73.80	0.50	桃仁
MOL001343	GA122	64.79	0.50	桃仁
MOL001328	2,3-didehydro GA70	63.29	0.50	桃仁
MOL001360	GA77	87.89	0.53	桃仁
MOL001353	GA60	93.17	0.53	桃仁
MOL001329	2,3-didehydro GA77	88.08	0.53	桃仁
MOL001352	GA54	64.21	0.53	桃仁
MOL001342	GA121-isolactone	72.70	0.54	桃仁
MOL001344	GA122-isolactone	88.11	0.54	桃仁
MOL001355	GA63	65.54	0.54	桃仁
MOL001350	GA30	61.72	0.54	桃仁
MOL001351	Gibberellin A44	101.61	0.54	桃仁
MOL001361	GA87	68.85	0.57	桃仁
MOL000493	campesterol	37.58	0.71	桃仁
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	桃仁
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	桃仁
MOL001323	sitosterol alpha1	43.28	0.78	桃仁
MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81	茯苓
MOL000275	trametenolic acid	38.71	0.80	茯苓
MOL000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81	茯苓
MOL000279	cervisterol	37.96	0.77	茯苓
MOL000280	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	31.07	0.82	茯苓
MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	43.51	0.72	茯苓
MOL000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81	茯苓
MOL000285	(2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82	茯苓
MOL000287	3beta-hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.70	0.81	茯苓
MOL000289	pachymic acid	33.63	0.81	茯苓
MOL000290	poricoic acid A	30.61	0.76	茯苓
MOL000291	poricoic acid B	30.52	0.75	茯苓
MOL000292	poricoic acid C	38.15	0.75	茯苓
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75	茯苓
MOL000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83	茯苓
MOL001736	(-)-taxifolin	60.51	0.27	桂枝
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	桂枝
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	桂枝
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	桂枝
MOL000073	ent-epicatechin	48.96	0.24	桂枝
MOL004576	taxifolin	57.84	0.27	桂枝
MOL011169	peroxyergosterol	44.39	0.82	桂枝

2.3 构建桂枝茯苓丸 - 子宫肌瘤基因调控网络

桂枝茯苓丸与子宫肌瘤共有 41 个交叉基因(表 2), 中药有效成分和交叉基因之间的靶向调控网络图见图 3。活性成分槲皮素、山柰酚、黄芩苷、豆甾醇、 β 谷甾醇分别与 31、12、11、7、5 个靶基因相关; 基因 PTGS2 是与最高数量的活性成分相关

的基因, 其次是 PGR、NR3C2、GRIA2、ADRB2、BAX。

2.4 PPI 及拓扑分析

如图 4 所示, 交叉基因获得了 2 245 个蛋白质节点和 46 549 条边, 根据度中心性 (DC) > 81、中介中心性 (BC) > 491 的条件进行筛选, 共筛选出

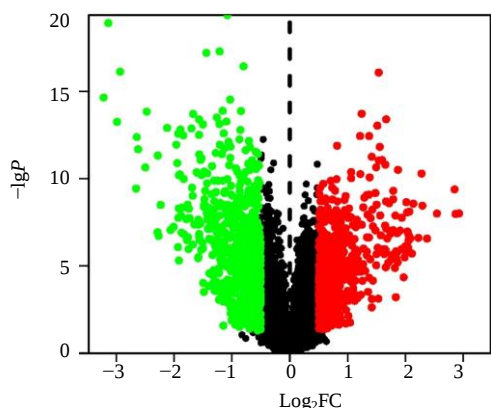


图 1 差异基因火山图

Fig. 1 The differential gene volcano map

排名前 30 的治疗关键靶点, 其中有 11 种蛋白质是活性成分的主要预测靶标, 它们对应的基因是 TP53、ESR1、NTRK1、NPM1、EP300、BRCA1、CDK2、HSPA5、PARP1、CTNNB1、AR, 其中 AR 和 PARP1 是交叉基因 (表 3)。

2.5 GO 功能和相关靶基因的 KEGG 富集分析。

GO 功能分析从细胞组分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP) 3 个层面阐明基因功能, BP 共涉及 501 个条目, 主要涉及对类固醇激素的反应、对酮的反应、对有毒物质的反应等。CC 涉及 17 个条目, 主要影响细胞器外膜、膜小凹、线粒体外膜等; MF 涉及 32 个条目, 主要包括参与类固醇结合、核受体活性、配体-活化转录因子活性等方面。

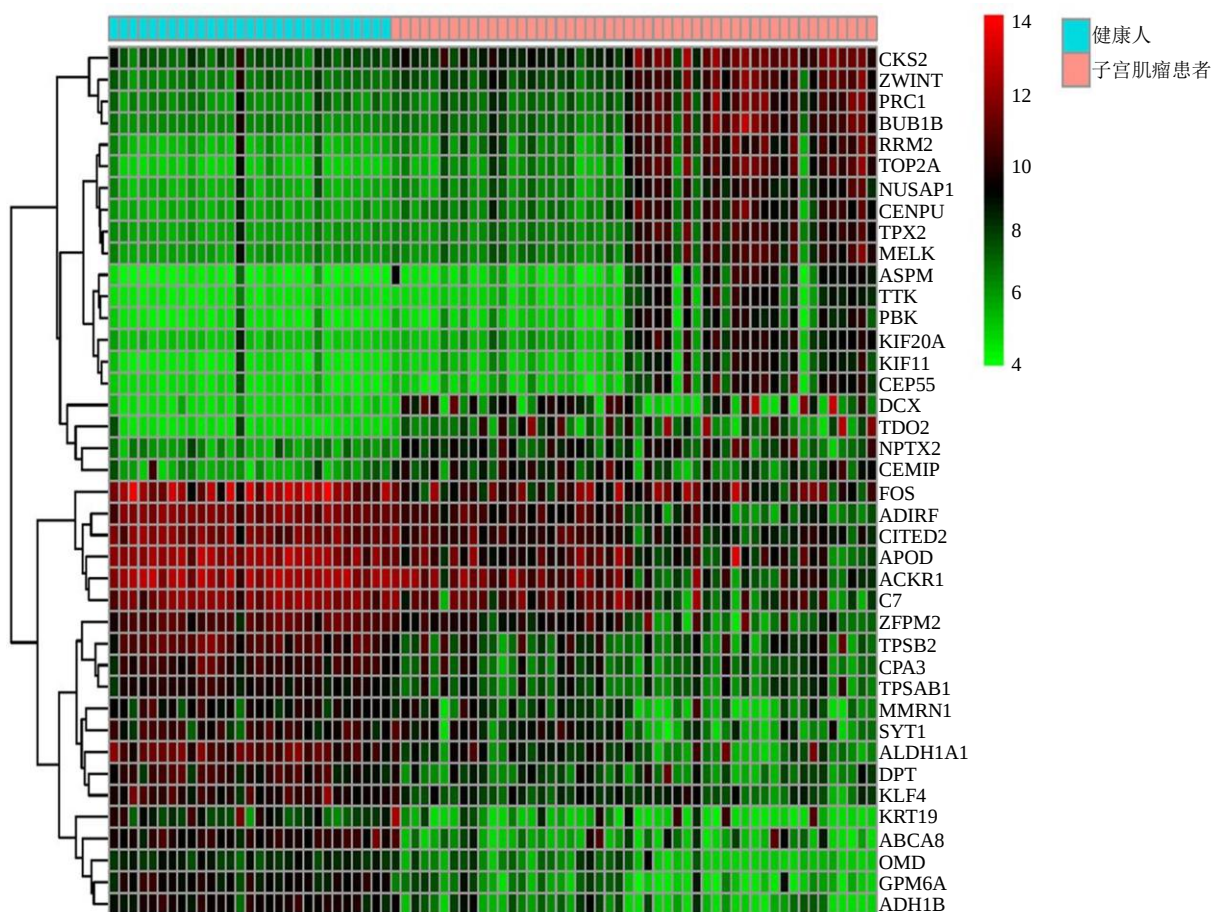


图 2 基因热图

Fig. 2 Gene heat map

KEGG 通路富集共涉及 52 个信号通路, 主要集中在流体剪切应力与动脉粥样硬化、化学致癌-受体激活、脂质与动脉粥样硬化等通路相关。与多途径相关的基因有 JUN、FOS、BAX、MMP9、

CDKN1A、E2F1、BIRC5、NOS3、CCL2、CXCL2 等, 见图 5、6。

2.6 分子对接

桂枝茯苓丸中的大部分成分都能很好地与靶

表 2 按 $\log_2FC$ 值排序的 41 个交叉基因
Table 2 41 Cross genes sorted by $\log_2FC$ value

基因	$\log_2FC$	P 值
TOP2A	2.869 020	1.05×10^{-8}
GRIA2	1.971 004	4.44×10^{-5}
MMP9	1.868 910	6.18×10^{-6}
CCNB1	1.838 302	1.43×10^{-6}
SPP1	1.835 609	0.000 615
CDK1	1.598 773	1.07×10^{-6}
BIRC5	1.372 880	2.33×10^{-7}
HK2	0.893 593	0.000 409
CA2	0.864 888	0.007 197
BAX	0.818 043	1.29×10^{-12}
COL3A1	0.708 293	1.32×10^{-10}
HMOX1	0.683 800	0.001 135
E2F1	0.587 990	1.88×10^{-5}
PARP1	0.557 271	8.54×10^{-8}
CDKN1A	0.515 041	0.002 259
RUNX1T1	-0.504 270	4.22×10^{-5}
TDRD7	-0.546 170	3.13×10^{-6}
AR	-0.551 180	0.021 004
DPP4	-0.591 140	0.000 902
AHR	-0.604 290	0.001 597
ADRA2A	-0.653 300	0.001 890
CCL2	-0.678 800	0.004 934
NOS3	-0.725 400	3.05×10^{-5}
CAV1	-0.772 540	5.15×10^{-5}
JUN	-0.805 490	1.97×10^{-7}
ADRB2	-0.913 140	2.98×10^{-7}
PGR	-0.969 570	0.012 847
AKR1C3	-1.050 710	0.001 469
F10	-1.080 640	4.29×10^{-20}
MAOA	-1.103 970	2.2×10^{-7}
CXCL2	-1.182 670	0.000 833
ABCG2	-1.272 710	0.000 277
PLAT	-1.282 840	4.73×10^{-8}
PTGS2	-1.300 310	0.000 266
THBD	-1.429 890	1.83×10^{-10}
NR3C2	-1.528 640	6.23×10^{-11}
MAOB	-1.586 520	3.58×10^{-6}
SELE	-1.751 470	1.07×10^{-6}
FOS	-2.063 220	8.76×10^{-8}
APOD	-2.499 860	2.24×10^{-11}
ADH1B	-2.936 130	7.41×10^{-17}

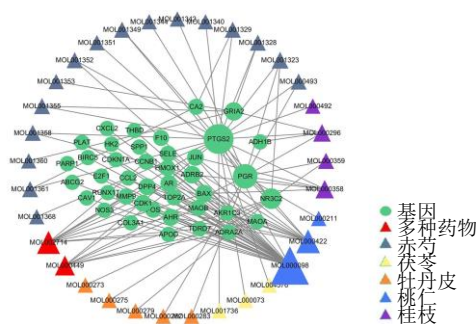


图 3 桂枝茯苓丸有效成分-靶基因网络图

Fig. 3 Network diagram of effective components and target genes of Guizhi Fuling Pills

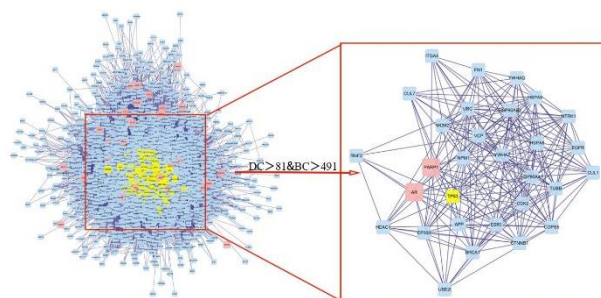


图 4 桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的 PPI 网络

Fig. 4 PPI network of Guizhi Fuling Pills in treatment of hysterosmyoma

表 3 关键靶点 (前 30)

Table 3 Key target (Top 30)

基因	DC	BC
TP53	460	2 175.62
ESR1	397	1 620.59
NTRK1	568	1 591.61
NPM1	266	1 142.75
MCM2	323	1 113.61
EP300	314	1 082.19
YWHAZ	257	892.20
BRCA1	256	882.90
HSP90AA1	312	870.36
COPS5	268	798.99
CDK2	331	740.82
UBC	333	739.20
HSPA5	200	719.59
ITGA4	239	710.64
RNF2	238	703.75
PARP1	270	702.35
FN1	306	634.61
HSPA8	196	634.54
CTNNB1	207	633.14
VCP	249	620.95
HSP90AB1	239	613.44
AR	346	599.38
CUL1	261	597.87
YWHAQ	195	583.85
EGFR	342	576.95
APP	418	573.47
CUL7	279	572.57
HDAC1	263	546.00
TUBB	141	493.82
UBE2I	232	491.98

基因结合, 其中豆甾醇、槲皮素、山柰酚的结合性能最好 (表 4、图 7)。其中 E2F1、MMP9、BAX、FOS 等基因能与大部分活性成分很好地对接。

3 讨论

在本研究中, 对桂枝茯苓丸中 5 味中药的药物

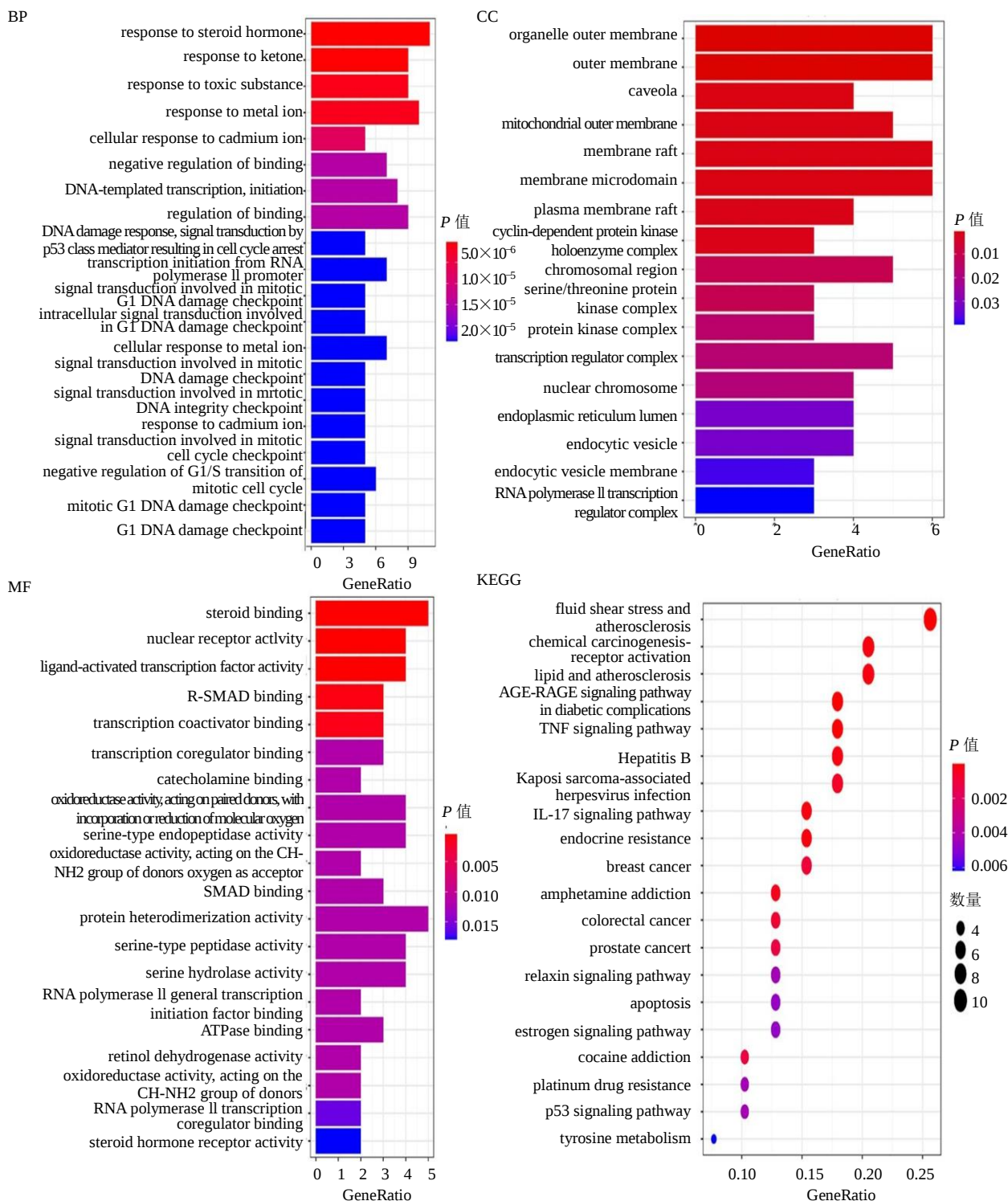


图 5 GO 和 KEGG 富集分析
Fig. 5 GO and KEGG enrichment analysis

成分进行了网络药理学分析,其中槲皮素、山柰酚、黄芩苷、豆甾醇、 β -谷甾醇被确定为与大多数目标靶基因相关的活性成分,同时分子对接的结果也证实了它们与大多数靶基因具有良好的结合特性。槲

皮素是自然界中常见、最丰富的多酚类黄酮之一,广泛存在于水果、蔬菜及草药中。被认为是最有效的活性氧清除剂,可抑制多种促炎因子的产生^[10],具有抗纤维化的作用^[11],可以抑制转化生长因子 β

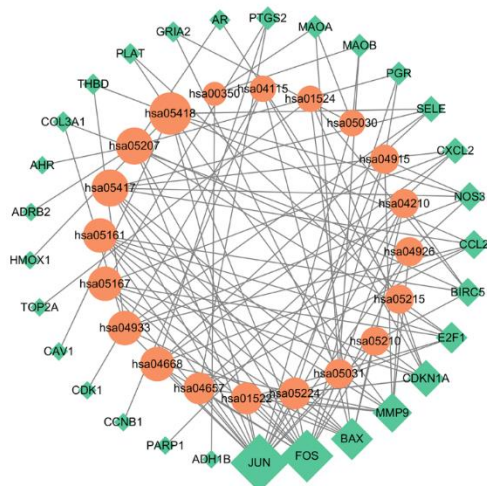


图 6 靶点基因与 KEGG 通路相互关系的网络图

Fig. 6 Network diagram of the relationship between target genes and KEGG pathway

表 4 桂枝茯苓丸的关键成分与靶基因分子的结合能

Table 4 The binding energy between key components of Guizhi Fuling pill and target gene molecules

有效成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)					
	E2F1	MMP9	BAX	JUN	FOS	CDKN1A
豆甾醇	-9.2	-7.4	-7.2	-6.2	-5.6	-4.6
槲皮素	-8.2	-8.3	-7.4	-5.4	-5.6	-5.5
β-谷甾醇	-7.9	-7.0	-7.0	-5.5	-5.8	-4.6
黄芩苷	-7.7	-7.6	-7.6	-5.8	-6.4	-5.4
山柰酚	-6.6	-7.3	-7.5	-5.7	-5.7	-5.0

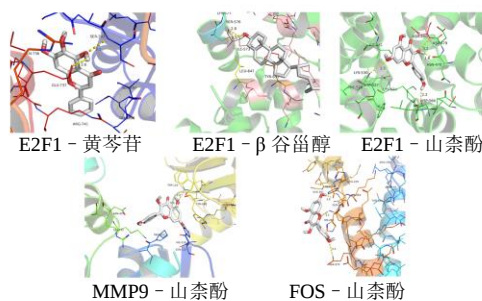


图 7 分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram

诱导的肺成纤维细胞胶原生成^[12]。相关研究表明槲皮素可以降低原发性子宫肌层和平滑肌瘤细胞中所有浓度的胶原蛋白 1A1 mRNA，在子宫肌瘤的治疗中槲皮素和 I3C 的体外抗纤维化、抗迁移和抗增殖作用构成了开发用于子宫平滑肌瘤的新治疗剂、预防剂或两者兼有的科学基础^[13]。

已知植物甾醇是胆固醇的植物类似物，已经鉴定出 200 多种不同的植物甾醇，豆甾醇和 β-谷甾醇是最常见的^[14-15]。研究人员从乙酸乙酯 (AHE-ea) 中鉴定出 2 种植物甾醇，豆甾醇和 β-谷甾醇，并且豆甾醇处理过的小鼠减少了子宫肌层的增生^[16]。山柰酚主要来源于姜科植物山柰的根茎，属于黄酮醇类。近几年研究表明山柰酚对恶性肿瘤细胞增殖起抑制及诱导凋亡的作用^[17]，可体外抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖，并诱导其发生凋亡，可能与调控 Notch1、Cleaved caspase-3 蛋白表达有关^[18]。蔡云郎等^[19]研究发现山柰酚能抑制离体人子宫肌瘤细胞增殖，下调 ER、IGF-1 和 VEGF mRNA 和蛋白的表达。

黄芩素是从黄芩的根中提取的最丰富的化合物和生物活性黄酮类化合物之一，具有抗癌和抗炎作用^[20]。黄芩素减弱了孕酮对管腔上皮以及孕酮受体靶基因 HAND2 和 ZBTB16 的抗增殖作用。在子宫增生、肌瘤和子宫癌等状态下，黄芩素可能会对孕酮有对抗的作用^[21]。

PPI 网络的拓扑学分析发现有 11 个靶点基因 (TP53、ESR1、NTRK1、NPM1、EP300、BRCA1、CDK2、HSPA5、PARP1、CTNNB1、AR) 处于网络的核心位置。这 11 个靶点基因不仅对应多个活性成分，而且在 PPI 网络中具有重要作用，提示可能是桂枝茯苓丸发挥治疗作用的极重要的靶点。这些靶点基因均在肿瘤细胞的增殖与凋亡中发挥一定的作用。其中 TP53 是一种广谱肿瘤抑制基因，在 50% 以上的人类肿瘤中均找到了 TP53 的突变，这是肿瘤最常见的遗传学改变。有学者研究发现扶正祛瘀中药对大鼠子宫肌瘤 p53 信号通路的细胞凋亡、细胞周期、细胞生长增殖和分化、DNA 修复等相关基因均有调节作用^[22]。AR 和 PARP1 是交叉基因。肾上腺素能受体 (AR) 是细胞表面儿茶酚胺的 G 蛋白偶联受体。研究者将 AR 基因敲除小鼠的子宫肌瘤模型为研究对象，发现 AR 在平滑肌瘤中的表达呈强正相关，而在正常子宫肌层组织中则没有，说明 AR 是子宫肌瘤体内子宫肌层生长的重要调节因子^[23]。聚 ADP 核糖聚合酶 1 (PARP1)，参与调节各种重要的细胞过程，如分化、增殖和肿瘤转化，还参与调节细胞从 DNA 损伤中恢复所涉及的分子事件。Hassan 等^[24]研究发现子宫肌瘤组织中 PARP1 成高表达，经药物治疗后可成低表达，说明 PARP1 同样是子宫肌瘤生长的重要调节因子之一。

分子对接结果表明, 核心靶点 (JUN、FOS、BAX、MMP9、CDKN1A、E2F1) 与桂枝茯苓丸的主要活性成分 (槲皮素、山柰酚、黄芩苷、豆甾醇、 β -谷甾醇) 均拥有良好的对接活性 (结合能 < -6.0 kcal/mol), 进一步说明了桂枝茯苓丸主要活性成分可通过调控上述核心靶点对子宫肌瘤起到治疗作用, 验证了上述网络药理学预测结果的可靠性。

子宫肌瘤为激素依赖性肿瘤^[25], 结合 GO 功能分析, 可以认为桂枝茯苓丸主要影响类固醇激素及其配体激活等方面相关, 这与子宫肌瘤发病机制密切相关; KEGG 富集显示, 基因在流体剪切应力与动脉粥样硬化、化学致癌 - 受体激活、脂质与动脉粥样硬化等通路中特别富集。近几年研究发现, 经桂枝茯苓丸治疗后的肌瘤患者血清中血浆黏度、全血黏度高低切、血小板聚集率显著降低, 临床症状明显缓解^[26-30]。

因此, 本研究表明桂枝茯苓丸中的槲皮素、山柰酚、黄芩苷、豆甾醇、 β -谷甾醇等有效成分, 可能通过流体剪切应力与动脉粥样硬化、化学致癌 - 受体激活、脂质与动脉粥样硬化等通路等途径, 作用于 JUN、FOS、BAX、MMP9、CDKN1A、E2F1 等基因靶点, 在激活类固醇激素的结合与反应以及配体激活等生物学功能方面发挥作用, 从而起到治疗子宫肌瘤的临床效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 章凯文, 谢鸣, 朱昊如. 桂枝茯苓丸联合米非司酮治疗子宫肌瘤随机对照试验的 Meta 分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2019, 28(11): 722-727.
- [2] Giuliani E, As-Sanie S, Marsh E E. Epidemiology and management of uterine fibroids [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2020, 149(1): 3-9.
- [3] Grube Me, Neis F, Brucker S Y, et al. Uterine fibroids — Current trends and strategies [J]. *Surg Technol Int*, 2019, 34: 257-263.
- [4] 戚昕蕊, 龚小辉, 李冬华. 子宫肌瘤的流行病学研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(22): 3693-3695.
- [5] 王俏, 张真真, 万贵平. 桂枝茯苓丸在子宫肌瘤治疗中的应用研究 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2021, 3(5): 52-57.
- [6] 吴海霞, 王瑛坚, 苑家林, 等. 桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤的临床疗效研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(2): 362-364.
- [7] 李晓霞, 徐旭, 马会霞, 等. 经典名方桂枝茯苓丸的临床和实验研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(9): 1724-1729.
- [8] 李娜, 王信, 孙萍, 等. 桂枝茯苓方治疗妇科血瘀证类疾病的物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2210-2218.
- [9] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [10] Sotnikova R, Nosalova V, Navarova J. Efficacy of quercetin derivatives in prevention of ulcerative colitis in rats [J]. *Interdiscip Toxicol*, 2013, 6(1): 9-12.
- [11] Ramyaa P, Krishnaswamy R, Padma V V. Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells-up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- κ B and COX-2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(1): 681-692.
- [12] Qi B W, Zhao Y L, Wei X, et al. A further investigation concerning correlation between anti-fibrotic effect of liposomal quercetin and inflammatory cytokines in pulmonary fibrosis [J]. *Eur J Pharm*, 2010, 642(1-3): 134-139.
- [13] Greco S, Islam M S, Zannotti A, et al. Quercetin and indole-3-carbinol inhibit extracellular matrix expression in human primary uterine leiomyoma cells [J]. *Reprod Biomed Online*, 2020, 40(4): 593-602.
- [14] Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil J C, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(1): 18-31.
- [15] Piironen V, Lindsay D G, Miettinen T A, et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(7): 939-966.
- [16] Lin P H, Shih C K, Yen Y T, et al. Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf.) hull extract and active compounds inhibit proliferation of primary human Leiomyoma cells and protect against sexual hormone-induced mice smooth muscle hyperproliferation [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1556.
- [17] 杜标炎, 周瑶, 谭宇蕙, 等. 山柰酚对人胃癌 MGC-803 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用 [J]. 肿瘤, 2010, 30(6): 477-480.
- [18] 李鹰飞, 曾世彬, 邱华平, 等. 山柰酚对乳腺癌细胞增殖及诱导凋亡的作用研究及机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(22): 3679-3682.
- [19] 蔡云朗, 高永星, 任慕兰, 等. 山柰酚对子宫肌瘤体外抑制作用的实验研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(5): 350-353.
- [20] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory

- disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 131: 68-80.
- [21] Li K, Diakite D, Austin J, *et al*. The flavonoid baicalein negatively regulates progesterone target genes in the uterus *in vivo* [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85(1): 237-247.
- [22] 李冬华, 谢小磊, 张亚兰, 等. 扶正祛瘀中药调控子宫肌瘤模型大鼠 p53 信号通路基因表达谱的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(33): 4910-4913.
- [23] Lan M, Li H, Bao L, *et al*. *In vivo* evidence of the androgen receptor in association with myometrial cell proliferation and apoptosis [J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(2): 264-271.
- [24] Hassan M H, Fouad H, Bahashwan S, *et al*. Towards non-surgical therapy for uterine fibroids: Catechol-O-methyl transferase inhibitor shrinks uterine fibroid lesions in the Eker rat model [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(11): 3008-3018.
- [25] 陈庆云, 张小燕. 子宫肌瘤发病机制研究进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(12): 950-952.
- [26] 冯文丽. 桂枝茯苓丸辅助治疗子宫肌瘤的效果及对激素水平和血液流变学的影响 [J]. 中国医药科学, 2018, 8(9): 65-67.
- [27] 谢晓虹. 桂枝茯苓丸联合米非司酮治疗子宫肌瘤的效果及对激素水平和血液流变学的影响 [J]. 中国当代医药, 2017, 24(20): 103-105.
- [28] 柳学芳. 桂枝茯苓丸配合米非司酮治疗子宫肌瘤的疗效及对患者血液流变学的影响 [J]. 吉林中医药, 2017, 37(8): 805-808.
- [29] 叶智慧, 尹家瑶, 杨滢, 等. 桂枝茯苓丸联合米非司酮对子宫肌瘤患者血液流变学及血红蛋白、人附睾蛋白 4 的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(9): 1753-1756.
- [30] 郑萍萍, 郑建军, 任晓丽. 桂枝茯苓丸与米非司酮联合治疗在改善子宫肌瘤患者血液流变学指标的价值 [J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(4): 98-100.

[责任编辑 高源]