

## 基于网络药理学的蒙药暖宫七味丸治疗原发性痛经作用机制及实验验证研究

张东旭<sup>1,2</sup>, 李 偲<sup>1,2</sup>, 刘羽康<sup>1,2</sup>, 韩 峰<sup>3</sup>, 张爱杰<sup>2</sup>, 董世奇<sup>2\*</sup>, 樊慧蓉<sup>2\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津 300192

3. 内蒙古自治区药品检验研究院, 内蒙古 呼和浩特 010020

**摘要:** 目的 利用网络药理学方法, 探究暖宫七味丸治疗痛经的作用机制并采用痛经模型大鼠对其进行实验验证。方法 使用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、中医药整合药理学研究平台 (TCMIP) 和网络药理学在线数据库 (TCMID) 结合文献报道确定暖宫七味丸的活性成分, 通过 Swiss Target Prediction 在线平台得到活性成分对应的靶点。利用 DisGeNET 数据库和 GeneCard 数据库确定原发性痛经的相关靶点, 手动筛选化合物-疾病的共同靶点, 将潜在共同靶点蛋白上传至 Biogrid 平台, 获取药物-疾病靶蛋白相互作用 (PPI) 网络, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 PPI 网络进行网络图优化和拓扑学分析。利用 DAVID 6.8 数据库对潜在靶点进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析及基因本体论 (GO) 注释分析。动物实验验证采用缩宫素致痛经大鼠模型观察暖宫七味丸高、中、低剂量 (2.0、1.0、0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 的镇痛作用, 采用 Western blotting 方法观察暖宫七味丸高、低剂量 (2.0、0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 对痛经模型大鼠子宫组织环氧合酶-2 (COX-2) 蛋白表达的影响, 并测定各组大鼠子宫组织中前列腺素 F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) 水平。通过大鼠离体子宫肌张力实验观察暖宫七味丸水溶液 (22.5、11.25 mg·mL<sup>-1</sup>) 对大鼠子宫收缩幅度和收缩频率的影响。**结果** 网络药理学预测结果显示, 暖宫七味丸治疗痛经的潜在靶点有 68 个, PPI 核心靶点有 IL-6、PTGS2、TNF 和 TP53 等。涉及到的通路有炎症相关的信号通路、癌症通路和雌激素信号通路等, 涉及到的生物功能有炎症反应、一氧化氮的生物调节过程和对激素的反应和对血管的调节功能等。动物实验结果显示, 与模型组比较, 暖宫七味丸高、中、低剂量组和阳性药组大鼠的扭体反应次数显著减少 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 同时扭体反应的潜伏期均明显延长 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 暖宫七味丸高、低剂量组痛经模型大鼠子宫组织中过氧化氢合成酶 2 (PTGS2) 相关蛋白 COX-2 表达显著下调 ( $P < 0.001$ ), 同时子宫组织中 PGF2 $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。暖宫七味丸高、低剂量水提液对大鼠子宫收缩幅度和频率均有显著的抑制作用 ( $P < 0.001$ )。**结论** 暖宫七味丸可以通过下调 PTGS2 靶点进而调控子宫肌张力起到治疗痛经的效果。

**关键词:** 暖宫七味丸; 原发性痛经; 网络药理学; 肌张力; 前列腺素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 08-1531-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.010

## Mechanism of Nuangong Qiwei Pill for treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology and experimental verification

ZHANG Dongxu<sup>1,2</sup>, LI Cai<sup>1,2</sup>, LIU Yukang<sup>1,2</sup>, HAN Feng<sup>3</sup>, ZHANG Aijie<sup>2</sup>, DONG Shiqi<sup>2</sup>, FAN Huirong<sup>2</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Institute of Radiation Medicine Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

3. Inner Mongolia Institute for Drug Control, Hohhot 010020, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Nuangong Qiwei Pill in treatment of primary dysmenorrhea by network pharmacological methods and to verify the prediction results by animal experiments. **Methods** The active components of Nuangong Qiwei Pills were screened by using the traditional Chinese Medicine System Pharmacology database and analysis platform (TCMSP), traditional Chinese medicine integrated pharmacology research platform (TCMIP) and online pharmacology database (TCMID) combined with literature reports, and the corresponding targets of the active components were obtained through the Swiss

收稿日期: 2022-02-22

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1708203); 中央高校基本科研业务费专项(3332021064); 内蒙古自治区科技计划(2020GG0199)

第一作者: 张东旭(1996—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: zhangdongxu0215@163.com

\*共同通信作者: 樊慧蓉, 女, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: fanhr99@163.com

董世奇, 男, 研究方向为药理学。E-mail: dongsq1314@126.com

target prediction online platform. The relevant targets of primary dysmenorrhea were obtained by using the database of DisGeNET and GeneCard, the common targets of compounds and diseases were manually screened, the potential common target proteins were uploaded to the Biogrid platform. The protein-protein interaction (PPI) network of drug-disease target was obtained, and the network diagram optimization and topology analysis of PPI network were carried out by using the software of Cytoscape 3.7.2. David 6.8 database was used to analyze the enrichment of Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway and Gene Ontology (GO) of potential targets. The rat model of dysmenorrhea caused by oxytocin was used to observe the analgesic effect of high, medium and low doses (2.0, 1.0, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) of Nuangong Qiwei Pills, and the effect of high and low doses (2.0, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) of Nuangong Qiwei Pills on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in the uterus of dysmenorrhea rats was observed by Western blotting method, and prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) level in the uterus of rats in each group was measured. The effects of the aqueous solution of Nuangong Qiwei Pills (22.5, 11.25 mg·mL<sup>-1</sup>) on the amplitude and frequency of uterine contraction in rats were observed by the tension test of isolated uterine muscles in rats. **Results** The predicted results of network pharmacology showed that there were 68 potential targets of Nuangong Qiwei Pills in treatment of dysmenorrhea, and the core targets of PPI were IL-6, PTGS2, TNF and TP53. The pathways involved include inflammation related signaling pathways, cancer pathways and estrogen signaling pathways, and the biological functions involved include inflammatory response, biological regulation process of nitric oxide, response to hormones and regulation function of blood vessels. The results of animal experiments showed that compared with the model group, the number of writhing reaction of rats in the high, medium and low dose of Nuangong Qiwei Pills groups and positive drug groups was significantly reduced ( $P < 0.01, 0.001$ ), and the incubation period of writhing reaction was significantly prolonged ( $P < 0.01, 0.001$ ). The expression of PTGS2 related protein COX-2 in the uterus of dysmenorrhea model rats in the high, medium and low dose groups of Nuangong Qiwei Pills groups was significantly down regulated ( $P < 0.001$ ), and the level of PGF<sub>2α</sub> in the uterus decreased significantly ( $P < 0.001$ ). The high and low doses of water extract of Nuangong Qiwei Pills had significant inhibitory effects on the amplitude and frequency of uterine contraction in rats ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Nuangong Qiwei Pills have therapeutic effect on dysmenorrhea by down regulating PTGS2 target and then regulating uterine muscle tension.

**Key words:** Nuangong Qiwei Pills; primary dysmenorrhea; network pharmacology; muscular tension; prostaglandin

痛经常出现在女性经期或经期前后,表现为下腹部痉挛性疼痛,严重者会出现恶心、手脚冰凉、甚至会出现昏厥等现象<sup>[1-3]</sup>。临床上可将痛经分为2类:一类是无明显生殖器病变的原发性痛经,也被称为功能性痛经;另一类是由生殖器病变导致的继发性痛经<sup>[4]</sup>。其中原发性痛经为妇科常见病之一,主要发生在青春期少女或未婚未孕的青年女性中。据调查,全世界范围内约有80%的女性患有不同程度的痛经,其中中度及重度患者约占40%<sup>[5]</sup>。痛经的发病率较高,发病原因多样,严重影响患者的生活,故常需要使用药物来缓解痛经的发作。

传统中医药在治疗痛经方面有悠久的历史,积累了丰富的经验,并具有副作用小、疗效好的特点。中医将痛经称为“经性腹痛”,最早的记载见于《金匱要略·妇人杂病脉证并治》:“带下,净水不利,少腹坠疼,经一月再见者,土瓜根散主之”<sup>[6]</sup>。蒙医认为该病的发病机制是下清赫依功能失调,致使气血受阻所致。赫依型体质者,宫寒者,平时或经期饮食起居不慎,嗜寒凉、涩性之品,引起巴达干、赫依偏盛为其诱发原因<sup>[7]</sup>。传统蒙药暖宫七味丸是蒙医临床上治疗妇科疾病的常用方剂,疗效显著,在内蒙古地区得到广泛的应用。暖宫七味丸由天门冬、

手掌参、沉香、豆蔻、肉豆蔻、黄精、丁香组成,其中的主药豆蔻具有抑赫依的作用,辅以同样具有抑赫依作用的肉豆蔻、丁香和沉香,手掌参具有生精壮阳、主治肾寒的功效,黄精强肾固阳,天门冬固精、镇赫依。诸药配伍,调赫依养血、强精补体<sup>[8]</sup>,具有调经养血、温暖子宫、驱寒止痛的功效,在临床上常用于治疗气滞腰痛、小腹冷痛、月经不调、白带过多等妇科疾病。太平等<sup>[9]</sup>将痛经患者随机分为治疗组、对照组,治疗组给予暖宫七味丸和乌力吉-18,对照组给予吡罗美辛肠溶片,结果显示治疗组总有效率98.28%;白金荣等<sup>[10]</sup>将月经不调患者分组后给予暖宫七味丸等蒙药治疗,结果显示总有效率为93.1%。临床数据显示暖宫七味丸在治疗妇科疾病方面具有独特的疗效,但目前对于暖宫七味丸治疗痛经的具体机制尚未阐明,因此本研究拟采用网络药理学方法对暖宫七味丸的作用机制进行预测,并进行实验验证,以期对暖宫七味丸治疗痛经的作用机制进行阐释,为其临床更高效使用提供参考。

## 1 方法

### 1.1 基于网络药理学的暖宫七味丸治疗原发性痛经的作用机制预测

#### 1.1.1 暖宫七味丸的活性成分收集 使用中药系

统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)、中医药整合药理学研究平台(TCMIP, <http://www.tcmip.cn/>)和网络药理学在线数据库(TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>)对暖宫七味丸中除手掌参外的6味中药进行活性成分的搜索,选取口服利用度(OB) $\geq 30\%$ ,类药性(DL) $\geq 0.18$ 的化合物作为中药的活性成分,并根据文献报道,补充了15个未达到筛选标准但含量高或药理活性强的成分。从文献中检索手掌参所包含的活性成分,根据药理活性及含量,确定了7个成分作为手掌参的活性成分。

**1.1.2 暖宫七味丸活性成分靶点的收集及基因名称的标准化** 通过各数据库收集活性成分对应的靶点,从文献报道获取的化学成分,运用 Swiss Target Prediction 在线平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),选择条件设为“Homo sapiens”得到相应的靶点。通过 STRING(<http://string-db.org/>)数据库获取活性成分的靶点蛋白对应的标准基因名称。

**1.1.3 痛经疾病的靶点收集** DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org>)整合了多个数据库的疾病与基因的关系和大量文献;GeneCard(<http://www.genecard.org/>)是一个全面综合收集所有已知或预测人类基因的数据库。在上述数据库中以“dysmenorrhea”作为关键词进行搜索,找到与痛经相关的靶标数据,合并二者靶点数据并取交集作为疾病靶点数据库。

**1.1.4 潜在靶点的选择与蛋白质相互作用(PPI)网络拓扑学分析** 手动筛选出化合物-疾病的共同靶点,即为暖宫七味丸作用于痛经的潜在靶点,将潜在靶点蛋白上传至 Biogrid(<https://thebiogrid.org/>)平台,获取药物-疾病靶蛋白 PPI 网络,将得到的 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 软件中进行网络图优化和拓扑学分析。

**1.1.5 关键靶点的京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析及基因本体论(gene ontology, GO)注释分析** 将上述收集到的活性成分对应的潜在靶点输入 DAVID 6.8 数据库(<http://david.ncifcrf.gov/>),选择 KEGG 通路富集分析与 GO 富集分析,汇总  $P \leq 0.01$  的结果。使用 Cytoscape 3.7.2 制作靶点-通路的网络图。并将 KEGG 通路分析结果和 GO 分析结果上传至 OmicShare Tools 网站(<https://www.omicshare.com/tools/index.php/>)进

行可视化处理,并绘制中药-靶点-通路网络图。

## 1.2 实验验证

**1.2.1 药品与试剂** 暖宫七味丸药粉(由内蒙古蒙药集团有限公司提供,批号:202010,主要药材组成为天门冬、手掌参、沉香、豆蔻、肉豆蔻、黄精、丁香药粉等比例混合);苯甲酸雌二醇(杭州动物药品厂,规格 2 mL:4 mg,批号:20210521);布洛芬片(山东方明药业集团股份有限公司,规格每片 0.1 g,批号:20210125);10%水合氯醛溶液(成都市科隆化学制品有限公司,批号:2020101101);洛氏液(NaCl 9.2 g、KCl 0.42 g、CaCl<sub>2</sub> 0.24 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.15 g、葡萄糖 1.0 g,天津大茂化学试剂有限公司,溶于 1 000 mL 蒸馏水中);甲醇(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司);缩宫素(杭州动物药品厂,10 U·mL<sup>-1</sup>,批号:20210428);大鼠前列腺素 F<sub>2α</sub>(PGF<sub>2α</sub>)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:202107);0.9%氯化钠溶液、0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BCA 蛋白试剂盒、化学发光试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);PVDF 转印膜(美国默克公司);环氧合酶-2(COX-2)兔源抗体由 Proteintech 提供。

**1.2.2 仪器** KQ5200DE 型数控超声波清洗器,上海右一仪器有限公司;Auto Vap S60 样品全自动浓缩仪,美国 ATR 公司;Thermo Legend Micro 17R 低温高速离心机,美国 Thermo scientific 公司;MP-150 多道生理记录仪,美国 BIOPAC 公司;JZ301 肌张力换能器,北京新航兴业科贸有限公司;AcqKnowledge 3.9.1 分析软件,美国 BIOPAC 公司;Imark 全自动酶标仪、Mini-PROTEAN 电泳仪、Trans-Blot 转印槽、XR+IMAGELAB 成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

**1.2.3 实验动物** 雌性 SD 大鼠 72 只,鼠龄 3 个月,体质量(200±20) g,并处于发情间期,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0011,饲养于中国医学科学院放射医学研究所,动物实验通过本机构动物伦理委员会(IACUC)审核,编号为 IRM-DWLL-2021128。实验前进行适应性喂养 3 d,自由饮水及饮食,室温维持在 25 °C 左右,湿度维持(50±5)%,同时室内保持明暗交替周期为 12 h/12 h。

## 1.2.4 暖宫七味丸对大鼠痛经模型的镇痛作用

(1)药物的配制:分别称取 2.0、1.0、0.5 g 暖宫七味丸粉末,在 10 mL 0.5% CMC-Na 中充分混匀,得到含药量 0.2、0.1、0.05 g·mL<sup>-1</sup>的高、中、

低剂量暖宫七味丸CMC-Na混悬液;阳性药布洛芬研磨成粉末,配制为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CMC-Na混悬液。以上药液存放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用。

(2) 分组与给药:将48只大鼠按体质量随机分为对照组、模型组、暖宫七味丸高、中、低( $2.0$ 、 $1.0$ 、 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、布洛芬( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组,每组8只。模型组、暖宫七味丸组、布洛芬组大鼠ip苯甲酸雌二醇连续10 d,每日1次,第1天 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,第2~9天 $1.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,第10天 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,对照组ip给予等量 $0.9\%$ 氯化钠溶液。从第4天开始给药组同时ig给予不同剂量的暖宫七味丸或布洛芬,对照组与模型组ig给予等量 $0.5\%$  CMC-Na。

(3) 指标检测:于第10天末次给药后1 h,除对照组大鼠外均ip给予缩宫素 $20\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。大鼠注射缩宫素后,立即放入透明观察箱内,观察和记录大鼠首次发生扭体的潜伏期和20 min内的扭体次数,并计算扭体反应抑制率,如未发生扭体反应则记潜伏期为20 min。扭体反应标准:腹腔内凹,伸展后肢,臀部抬高。

扭体反应抑制率=(模型组扭体反应次数-给药组扭体反应次数)/模型组扭体反应次数

### 1.2.5 暖宫七味丸对大鼠离体子宫肌张力的影响

(1) 药物提取:称取30 g暖宫七味丸粉末,使用400 mL  $75\%$  甲醇水超声处理60 min得到粗提药液。将粗提药液抽滤,取滤液减压旋蒸浓缩,浓缩过程首先控制温度在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右蒸发掉甲醇,然后升温至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,蒸发浓缩药液至约20 mL。浓缩后的药液离心取上清,纯水补足至20 mL,即得到 $1.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的暖宫七味丸水提液。阳性药布洛芬研磨成粉。

(2) 分组:雌性大鼠24只,随机分为4组,每组6只,分别为对照组、阳性药组(布洛芬, $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )及暖宫七味丸水提液高、低剂量( $22.50$ 、 $11.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )组。各组大鼠实验前ip给予苯甲酸雌二醇,每日1次,连续7 d,第1天 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,第2~6天 $1.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,第7天 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,以提高子宫对药物的敏感性并同步子宫周期。

(3) 离体子宫肌张力测定:在连续注射7 d苯甲酸雌二醇同步化子宫周期后,使用 $10\%$ 水合氯醛溶液将大鼠麻醉,冰上取中段子宫组织约 $0.5\text{ cm}$ ,将子宫颈端与卵巢端一端固定于麦氏槽底部,另一端连接于肌力换能器上,麦氏槽中加20 mL洛氏液,温度设置为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,并持续通入 $95\%$ 氧气。通过调节螺母增加1 g的负荷,平衡20 min,待子宫收缩稳定,自发节律恢复后开始记录。预先记录5~10 min的收

缩曲线,按组别加入不同质量浓度药物(暖宫七味丸高剂量组 $0.3\text{ mL}$ 浓缩水溶液,暖宫七味丸低剂量组 $0.15\text{ mL}$ 浓缩水溶液,阳性药组每份样品加入布洛芬原药 $1\text{ mg}$ ),给药后记录各组子宫20 min内的收缩曲线。使用分析软件记录分析给药前和给药后的子宫肌张力及收缩频率,并按以下公式分别计算子宫收缩幅度和频率抑制率<sup>[11]</sup>。

收缩幅度抑制率=(给药前收缩幅度-给药后收缩幅度)/给药前收缩幅度

收缩频率抑制率=(给药前收缩频率-给药后收缩频率)/给药前收缩频率

**1.2.6 暖宫七味丸对前列腺素内过氧化物合成酶2(PTGS2)影响的实验验证** 根据“1.2.5”项实验结果可知,暖宫七味丸可能是通过抑制子宫的收缩活动来起到治疗痛经的作用,结合网络药理学的PPI拓扑学结果,选择度值(degree)排名靠前基因中的PTGS2进行验证,对其相应的COX-2蛋白进行Western blotting实验。PTGS2具有调控PGF $2\alpha$ 合成的作用,PGF $2\alpha$ 可对子宫平滑肌产生影响,为研究痛经的常见指标,故对其含量进行测定。

“1.2.4”项实验中,各组大鼠在记录完扭体潜伏期和20 min的扭体次数后,将大鼠处死,取对照组、模型组、暖宫七味丸高剂量组和低剂量组大鼠子宫组织。每组各取3份子宫组织用于Western blotting实验,每份40 mg,冰上加500  $\mu\text{L}$  RIPA(含 $1\%$  PMSF)匀浆,匀浆后裂解30 min,期间涡旋振荡5次,离心取上清,用BCA法测蛋白浓度。使用 $10\%$  SDS-PAGE胶电泳分离,蛋白分离后在转移缓冲液中转移至PVDF膜。转移后迅速将PVDF膜置于缓冲液中,在室温下用含 $5\%$ 脱脂奶粉的TBST封闭1 h。封闭后洗涤,用相应的一抗按 $1:1\ 000$ 的比例稀释后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温孵育过夜,孵育后洗膜3次。之后加入 $1:1\ 000$ 比例稀释的二抗孵育2 h,二抗孵育完成后洗膜3次,进凝胶成像系统显影。其余组织进行匀浆处理,按试剂盒说明书对其中PGF $2\alpha$ 含量进行检测。

### 1.3 数据统计分析

采用SPSS 24.0软件进行数据的分析处理,组间比较采用单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学预测机制结果

**2.1.1 潜在靶点** 通过各数据库收集到暖宫七味丸对应靶点586个,GeneCard数据库和疾病基因与

突变位点数据库(DisGeNET)收集痛经的靶点271个。将痛经相关的271个靶点与暖宫七味丸所对应的586个靶点取交集得出68个共同靶点。这68个靶点即为暖宫七味丸防治痛经的潜在靶点,见图1。图1网络图中共有75个节点、240条边。

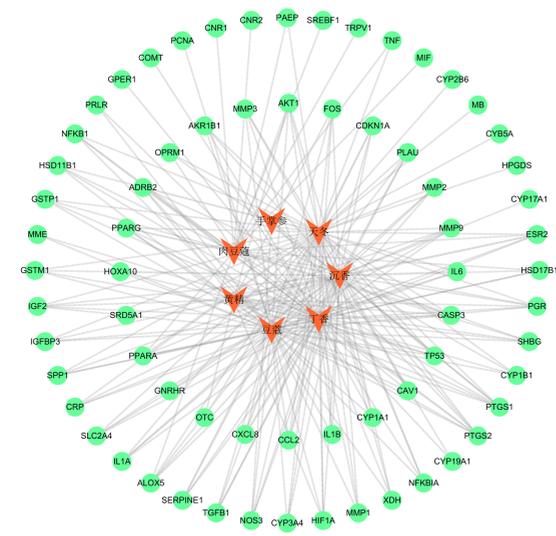


图1 暖宫七味丸治疗痛经的药材-潜在靶点网络  
Fig. 1 Network of medicinal materials-potential targets of Nuangong Qiwei Pills in treatment of dysmenorrhea

**2.1.2 潜在靶点的PPI分析** 将筛选到的潜在靶蛋白基因名上传至BioGRID平台,获取PPI信息,再经Cytoscape 3.7.2软件优化得图2,图中共68个节点,712条边。由拓扑学分析中的度值表示各靶点在拓扑学分析中的重要性,度值越大则节点越大。在PPI拓扑学分析中,排名较高的靶点分别是IL-6、PTGS2、TNF和TP53等,这体现了中药治疗时多靶点的特点,推测暖宫七味丸可能是作用于以上靶点起到治疗痛经的作用。

**2.1.3 潜在靶点的KEGG和GO富集分析** 将潜在

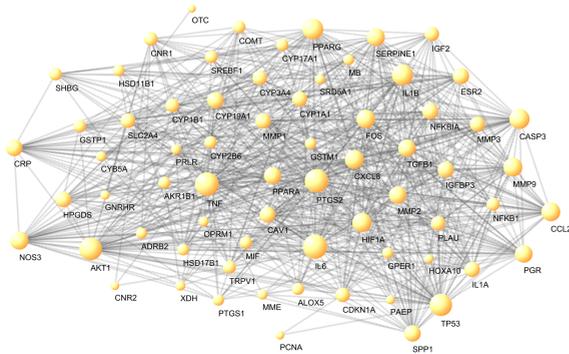


图2 暖宫七味丸治疗痛经潜在靶点的PPI分析  
Fig. 2 PPI analysis of potential targets of Nuangong Qiwei Pills in treatment of dysmenorrhea

靶点导入David数据库进行KEGG通路分析和GO富集分析,结果显示,暖宫七味丸中的主要成分及入血成分靶点主要与炎症相关的信号通路(如TNF信号通路、乙型肝炎等)、癌症相关通路(如癌症中的蛋白糖、癌症的途径)和雌激素信号通路有关,将结果中排名前20的通路绘制气泡图,见图3。GO富集结果显示暖宫七味丸治疗痛经主要与炎症反应、一氧化氮的生物调节过程(如一氧化氮生物合成过程的正调控、对一氧化氮合酶活性的调节和一氧化氮合酶调节活性等)、对激素的反应(如酶结合、对雌激素的反应和、雌二醇的反应和对孕酮的反应等)和对血管的调节(血管内皮生长因子产生的正调节、血管生成的正向调节和血红素结合等)等过程相关,将结果中排名前20的GO富集结果进行可视化,结果见图4。结果说明暖宫七味丸可能是通过调节以上通路和生物功能来发挥治疗痛经的作用。

## 2.2 验证实验结果

**2.2.1 暖宫七味丸对大鼠痛经模型的镇痛作用** 观察各组大鼠的扭体反应,对各组大鼠扭体反应次数进行统计处理,结果见表1。与对照组比较,模型组大鼠有明显的扭体反应( $P < 0.001$ ),提示造模成功。与模型组比较,暖宫七味丸高、中剂量组和阳性药组大鼠的扭体反应次数显著减少( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ),同时扭体反应的潜伏期均明显延长( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。此外,结果还显示暖宫七味丸的镇痛作用与剂量相关,高剂量组的镇痛作用强于中、低剂量组。暖宫七味丸对痛经大鼠具有显著的镇痛作用。

**2.2.2 暖宫七味丸对大鼠离体子宫肌张力的影响** 通过多道生理记录仪收集到大鼠子宫的收缩曲线,对大鼠收缩曲线的幅度与频率进行统计计算,统计后实验结果见表2。与给药前比较,暖宫七味丸高、低剂量和阳性药布洛芬给药后,大鼠子宫的收缩幅度均显著降低( $P < 0.001$ ),且各给药组大鼠子宫的收缩频率也显著减少( $P < 0.001$ ),说明高、低剂量暖宫七味丸对大鼠子宫的收缩幅度和收缩频率均有显著的抑制作用,结果显示暖宫七味丸可能是通过抑制子宫的收缩活动来达到治疗痛经的效果。

**2.2.3 PTGS2靶点的实验验证结果** Western blotting实验结果见图5,与对照组比较,模型组大鼠子宫组织的COX-2蛋白表达量明显增加,说明原发性痛经模型大鼠体内PTGS2表达量明显增加;与模型组比较,各给药组大鼠子宫组织的COX-2蛋白表

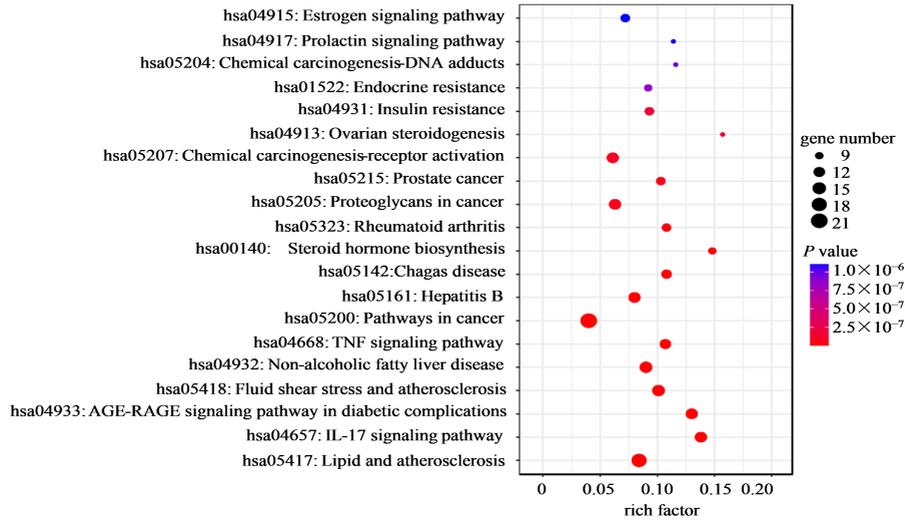


图3 暖宫七味丸治疗痛经潜在靶点的KEGG富集分析

Fig. 3 KEGG enrichment analysis of of Nuangong Qiwei Pills in treatment of dysmenorrhea

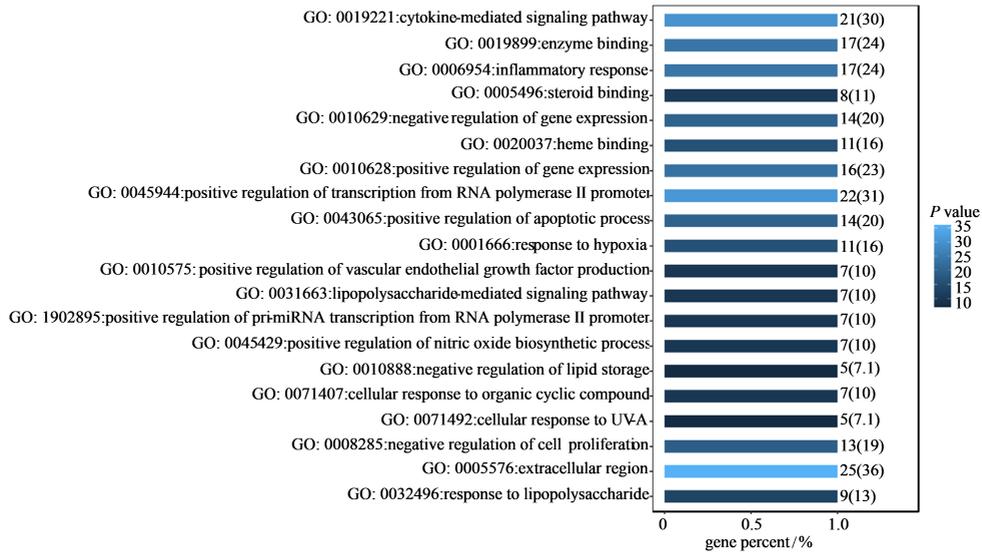


图4 暖宫七味丸治疗痛经潜在靶点的GO分析

Fig. 4 GO analysis of Nuangong Qiwei Pills in treatment of dysmenorrhea

表1 暖宫七味丸对原发性痛经模型大鼠扭体反应潜伏期及扭体次数的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effects of Nuangong Qiwei Pills on latency and times of writhing response in primary dysmenorrhea model rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	潜伏期/min	潜伏期延长率/%	20 min内扭体次数	扭体次数抑制率/%
对照	—	20.00±0.0	—	0.00±0.00	—
模型	—	1.17±1.83 <sup>###</sup>	—	42.50±6.50 <sup>###</sup>	—
布洛芬	0.02	9.50±1.05 <sup>***</sup>	1 171.43	3.83±2.86 <sup>#####</sup>	90.98
暖宫七味丸	2.0	14.83±5.98 <sup>***</sup>	714.29	1.67±2.73 <sup>***</sup>	96.08
	1.0	4.83±1.47 <sup>#####</sup>	314.29	13.83±7.02 <sup>#####</sup>	67.45
	0.5	1.50±1.37 <sup>#####</sup>	28.57	23.00±9.25 <sup>###</sup>	45.88

与对照组比较: <sup>#</sup>P<0.05 <sup>##</sup>P<0.01 <sup>###</sup>P<0.001; 与模型组比较: <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 <sup>\*\*\*</sup>P<0.001

<sup>#</sup>P<0.05 <sup>##</sup>P<0.01 <sup>###</sup>P<0.001 vs control group; <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 <sup>\*\*\*</sup>P<0.001 vs model group

表2 暖宫七味丸对大鼠离体子宫平滑肌收缩活动的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Nuangong Qiwei Pills on contractile activity of isolated uterine smooth muscle of rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	收缩幅度/g			平均抑 频率/(10 min收缩次数)	平均抑 制率/%	平均抑 频率/(10 min收缩次数)		平均抑 制率/%
		给药前	给药后	差值(给药前-给药后)			给药前	给药后	
对照	—	3.166±0.019	3.189±0.016	-0.022 8±0.032 6	—	6.2±0.1	6.3±0.3	—	
暖宫七味丸	11.25	4.390±0.019	3.557±0.065	0.833 8±0.069 1***	18.97	5.7±0.1	4.6±0.1	19.68***	
	22.50	3.378±0.107	2.282±0.012	1.095 6±0.119 2***	32.45	6.8±0.1	4.1±0.2	39.21***	
布洛芬	0.05	4.180±0.040	3.640±0.024	0.545 2±0.039 0***	12.92	6.3±0.3	4.8±0.2	24.01***	

与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group

达量有所下调,说明在给药后的原发性痛经模型大鼠体内PTGS2表达量降低。

使用ELISA试剂盒对各组大鼠子宫的PGF2 $\alpha$ 水平进行检测与统计,结果见表3。与对照组比较,模型组大鼠子宫中的PGF2 $\alpha$ 水平显著升高( $P < 0.001$ ),各给药组与模型组相比有不同程度的回调( $P < 0.01, 0.001$ ),暖宫七味丸高、中、低各剂量组间呈现剂量相关性,随剂量的增大回调程度也增加。

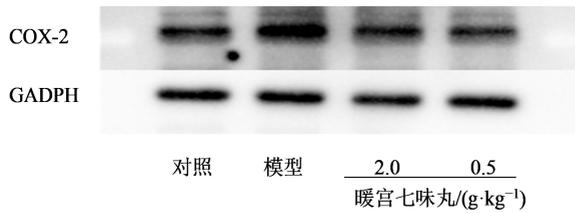


图5 Western blotting法检测各组大鼠子宫组织COX-2蛋白表达

Fig.5 COX-2 protein expression in uterine tissue of primary dysmenorrhea model rats measured by Western blotting

表3 暖宫七味丸对原发性痛经模型大鼠子宫组织PGF2 $\alpha$ 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Nuangong Qiwei Pills on PGF2 $\alpha$  in uterine tissue of primary dysmenorrhea model rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	PGF2 $\alpha$ /(ng·L <sup>-1</sup> )
对照	—	206.34±18.06
模型	—	278.19±14.71###
布洛芬	0.02	220.27±18.93***
暖宫七味丸	2.0	192.92±9.75***
	1.0	213.08±8.81***
	0.5	242.36±21.47***

与对照组比较: # $P < 0.05$  ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

# $P < 0.05$  ### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

### 3 讨论

蒙药是祖国传统医药的重要组成部分,其特点鲜明,有巨大的开发潜力,而明确蒙药传统用药的内在机制,将是蒙药二次开发研究的关键点。原发性痛经具有多重发病机制,传统研究方法难以全面阐释蒙药暖宫七味丸治疗原发性痛经的作用机制。网络药理学基于疾病-药物-靶点-通路的相互作用网络<sup>[12-14]</sup>,可以从整体观的角度系统地阐释药物对疾病的作用机制,这与蒙药复方多成分、多靶点的特点不谋而合,成为研究蒙药复杂作用机制的一种方法。

本研究通过网络药理学的筛选获得了暖宫七味丸治疗痛经的潜在靶点68个,潜在靶点的KEGG通路富集结果显示暖宫七味丸治疗痛经与炎症相关的信号通路、癌症相关通路、雌激素信号通路等有关。GO富集结果显示暖宫七味丸具有抗炎(如炎症反应、细胞因子活性、细胞对白介素-1的反应和T细胞共刺激等)、对一氧化氮的调节(一氧化氮生物合成过程的正调控、对一氧化氮合酶活性的调节和一氧化氮生物合成过程等)、对血管的调节(血管内皮生长因子产生的正调节、血管生成、血管生成的正向调节和血管收缩的积极调节等)和对激素的反应(如对雌激素的反应、对雌二醇的反应和对孕酮的反应等)等生物功能。相关研究表明,原发性痛经的发病原因之一是患者体内前列腺素、白三烯等一系列炎症因子表达的明显增加<sup>[15]</sup>。原发性痛经患者机体处于微炎症状态,有利于血栓形成,使经血易形成血块而加重经期腹痛症状<sup>[16]</sup>,目前临床对于原发性痛经以对症治疗为主,多采用非甾体抗炎药物进行镇痛治疗<sup>[17]</sup>,而网络药理学结果显示暖宫七味丸具有调节炎症反应的功能。NO是一种具有多种生物功能的气体分子,参与外周及中枢水平的痛觉调制,是内皮舒张因子的主要成分,具有扩张血管的作用,通过抑制血小板的黏附、聚

集和血栓素 $B_2$ ( $TXB_2$ )的释放来减少血栓的形成,可通过子宫中的左旋精氨酸-NO-环磷鸟苷(CGMP)系统来调节子宫收缩性<sup>[8,18]</sup>。原发性痛经患者子宫血流明显不同于无痛经女性,呈高阻低速血流特征,由此造成组织缺血、缺氧,使子宫肌肉痉挛而产生疼痛<sup>[19-20]</sup>,暖宫七味丸可能通过调节血管生成、血管收缩等过程来治疗痛经。雌二醇和孕酮主要经卵巢合成和分泌,雌二醇( $E_2$ )是主要的雌性激素,是一种由卵巢分泌的类固醇激素;而孕酮(P)则是一种天然孕激素,由卵巢黄体分泌,并可通过促进 $E_2$ 而转化为无活性的雌酮<sup>[21]</sup>。当 $E_2$ 含量增加时,可加剧子宫收缩,引发痛经,而P含量增加时,可缓解子宫的收缩,二者呈现拮抗作用<sup>[3,22]</sup>,暖宫七味丸也可能通过调节 $E_2$ 和P治疗痛经。

潜在靶点的PPI分析结果显示重要性排名靠前的靶点有IL-6、PTGS2、TNF和TP53等,提示暖宫七味丸可能是作用于以上靶点而起到治疗痛经的作用。白细胞介素-6(IL-6)是一种用途广泛的多效性细胞因子,可以调节多种细胞的分化与生长,具有调节免疫应答、抗感染等作用。现代医学认为痛经过程与炎症有密不可分的关系,如前列腺素(PG)在体内可以在炎症因子如IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和IL-1B等的作用下诱发炎症,导致子宫的平滑肌缺血、缺氧引起疼痛<sup>[23]</sup>。PTGS2是生物体内PG合成起始部位的关键酶,可以作用于平滑肌,且具有一定抗炎作用<sup>[24-25]</sup>,它的下游产物PGF2 $\alpha$ 可作用于螺旋小动脉壁上的PGF2 $\alpha$ 受体,引起子宫平滑肌的痉挛性收缩,是现代医学认为引起原发性痛经的主要因素<sup>[2,21]</sup>。故本研究选择PTGS2与其下游产物PGF2 $\alpha$ 作为后续实验指标,对PTGS2的表达进行验证。

首先对暖宫七味丸药效进行评价,该痛经模型采用ip苯甲酸雌二醇以同步雌鼠生理周期和提高子宫对药物的敏感度,末次给药后注射缩宫素致痛的方法<sup>[26]</sup>。结果显示暖宫七味丸可以明显减少大鼠的扭体反应次数并延长扭体反应的潜伏期,且具有一定的剂量相关性,说明暖宫七味丸对于原发性痛经具有较好的药效。根据文献的报道<sup>[27]</sup>,离体子宫肌张力实验可以验证药物对子宫平滑肌的作用,于是设计了该实验验证暖宫七味丸对大鼠子宫平滑肌的作用。为保证离体子宫活性不受药物影响,采用了甲醇水提取后挥发甲醇的方法制备暖宫七味丸水提液。结果显示,暖宫七味丸水提液对离体子宫的收缩幅度和收缩频率均有抑制作用且呈现剂量相关性,说明暖宫七味丸具有抑制子宫肌张力

的作用,而且可能是通过此作用起到治疗痛经的效果。最后,根据前期实验结果,对PTGS2靶点蛋白COX-2进行Western blotting实验验证,并对大鼠子宫组织的PGF2 $\alpha$ 进行含量测定。实验结果显示,暖宫七味丸可以通过下调PTGS2,从而降低大鼠体内PGF2 $\alpha$ 含量,缓解子宫平滑肌收缩,起到治疗痛经的效果。

根据网络药理学结果及实验验证,可以推测出暖宫七味丸是通过下调PTGS2来影响大鼠体内的PGF2 $\alpha$ 含量,进而缓解子宫平滑肌的收缩,起到治疗痛经的效果;同时,推测暖宫七味丸还具有调节NO含量、抗炎、调节激素和调节血管等功能,这些功能可能也是该药治疗痛经的作用机制,有待于进一步研究验证。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Dawood M Y. Primary dysmenorrhea: Advances in pathogenesis and management [J]. *Obstet Gynecol*, 2006, 108(2): 428-441.
- [2] French L. Dysmenorrhea [J]. *Am Fam Phys*, 2005, 71(2): 285-291.
- [3] 王煜婷. 原发性痛经发病机制及口服药物治疗进展 [J]. *医学信息*, 2018, 31(13): 56-58.  
Wang Y T. Research progress in pathogenesis and oral medication of primary dysmenorrhea [J]. *Med Inf*, 2018, 31(13): 56-58.
- [4] Iacovides S, Avidon I, Baker F C. What we know about primary dysmenorrhea today: A critical review [J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(6): 762-778.
- [5] 陈玲, 田园. 女大学生痛经相关因素调查分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2012, 6(24): 137-138.  
Chen L, Tian Y. Investigation and analysis of related factors of dysmenorrhea in female college students [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2012, 6(24): 137-138.
- [6] 包蕾, 王济, 闵佳钰, 等. 从中医体质学角度论治原发性痛经 [J]. *中医学报*, 2016, 31(12): 1919-1921.  
Bao L, Wang J, Min J Y, et al. Discussion primary dysmenorrhea through constitution of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Chin Med*, 2016, 31(12): 1919-1921.
- [7] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书-蒙医学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992.  
Editorial Committee of Chinese Medical Encyclopedia. *Encyclopedia of Chinese Medicine-Mongolian Medicine* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1992.
- [8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-蒙药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.  
Editorial board of Chinese materia medica of the State

- Administration of traditional Chinese medicine. *Chinese Materia Medica-Mongolian Medicine Roll* [M] Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004.
- [9] 太平, 金花. 蒙药治疗原发性痛经疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(2): 19-20.  
Tai P, Jin H. Effect of Mongolian medicine on primary dysmenorrhea [J]. *J Med Pharm Chin Minor*, 2014, 20(2): 19-20.
- [10] 白金荣, 斯琴其木格, 白银荣. 蒙医辨证论治月经不调58例临床报告 [J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(1): 6-7.  
Bai J R, Siqin Q, Bai Y R. The clinic report of treating the 58 cases of anrmal menstruation by monglian medical theory [J]. *J Med Pharm Chin Minor*, 2007, 13(1): 6-7.
- [11] 陶晓倩, 李娜, 曹亮, 等. 桂枝茯苓胶囊中主要成分对子宫肌瘤细胞增殖及小鼠离体子宫收缩活动的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 91-96.  
Tao X Q, Li N, Cao L, et al. Effect of main components from Guizhi Fuling capsule on human leiomyoma cell proliferation and contraction of isolated mouse uterine [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2016, 22(2): 91-96.
- [12] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [13] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110-120.
- [14] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. «网络药理学评价方法指南»解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-412.  
Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(14): 4119-412.
- [15] Fujiwara H, Konno R, Netsu S, et al. Efficacy of montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of dysmenorrhea: A prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2010, 148(2): 195-198.
- [16] 孙桂芳, 王佩娟. 原发性痛经血瘀证实质及活血化瘀研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(1): 98-100.  
Sun G F, Wang P J. Study on essence of blood stasis syndrome of primary dysmenorrhea and promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. *J Chang Univ Tradit Chin Med*, 2012, 28(1): 98-100.
- [17] 谢丹, 居明乔, 曹鹏, 等. 炎症因子和原发性痛经相关性的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(3): 346-350.  
Xie D, Ju M Q, Cao P, et al. Research progress on the correlation of inflammation factor and primary dysmenorrhea [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2014, 19(3): 346-350.
- [18] Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, et al. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 170(1 Pt 1): 175-185.
- [19] 陈勇, 尚国栋, 付国兵, 等. 推拿对原发性痛经患者子宫动脉血流动力学参数及血清前列腺素的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(10): 1355-1358.  
Chen Y, Shang G D, Fu G B, et al. Effect of massage on hemodynamics parameters of uterine artery and serum prostaglandin in treating patients with primary dysmenorrhea [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2011, 31(10): 1355-1358.
- [20] Celik H, Gurates B, Parmaksiz C, et al. Severity of pain and circadian changes in uterine artery blood flow in primary dysmenorrhea [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2009, 280(4): 589-592.
- [21] 曹泽毅. 中华妇产科学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2014.  
Cao Z Y. *Chinese Obstetrics and Gynecology* [M]. 3rd Edition. Beijing: People's Health Publishing House, 2014.
- [22] 华永庆, 洪敏, 朱荃. 原发性痛经研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(1): 62-64.  
Hua Y Q, Hong M, Zhu Q. Research progress of primary dysmenorrhea [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2003, 19(1): 62-64.
- [23] 李英, 孙兴云. 布洛芬缓释胶囊联合经痛康颗粒对原发性痛经患者炎症因子、 $\beta$ -EP、PGE<sub>2</sub>及PGF<sub>2a</sub>的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(17): 2854-2856.  
Li Y, Sun X Y. Effects of ibuprofen sustained-release capsules combined with Jingtongkang granules on inflammatory factors,  $\beta$ -EP, PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in patients with primary dysmenorrhea [J]. *Matern Child Heal Care China*, 2015, 30(17): 2854-2856.
- [24] 杨惠玲. 高级病理生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.  
Yang Huiling. *Advanced Pathophysiology* [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [25] Leslie C C. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: Physiological function and role in disease [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(8): 1386-1402.
- [26] 嵇波, 张露芬, 朱江, 等. 痛经模型建立和评价方法的思考 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6): 711-714.  
Ji B, Zhang L F, Zhu J, et al. On building the dysmenorrhea model and assessment methods [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2008, 24(6): 711-714.
- [27] 朱敏, 段金廛, 唐于平, 等. 四物汤及其组方药物对小鼠离体子宫收缩的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 149-152.  
Zhu M, Duan J N, Tang Y P, et al. Inhibition of contraction of isolated mouse uterine by siwu decoction and its composite drugs [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2011, 17(5): 149-152.