

基于网络药理学探讨桂枝茯苓丸调控 PTEN/PI3K/Akt 信号通路治疗子宫内膜异位症的作用机制

王 爽, 袁 媛, 易迎春, 李 霞, 张晓玲*

江西省妇幼保健院, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 基于网络药理学预测桂枝茯苓丸治疗子宫内膜异位症(EMS)的潜在作用靶点与信号通路, 并通过分子对接和动物实验进行机制验证。 **方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和 SwissTargetPrediction 数据库筛选桂枝茯苓丸(桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、芍药)的活性成分及其靶点; 通过 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 DrugBank 数据库获取 EMS 疾病靶点; 取交集获得桂枝茯苓丸-EMS 共同靶点(R 语言可视化)。构建“活性成分-靶点”调控网络和 STRING 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络; 运用 CytoNCA 进行 PPI 网络拓扑分析筛选核心靶点; 对核心靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 对“成分-靶点”网络中的关键活性成分与核心靶点进行分子对接验证。建立大鼠自体移植 EMS 模型。将 40 只造模成功大鼠随机分为模型组、桂枝茯苓丸低、中、高剂量(0.62、1.24、2.17 g·kg⁻¹)组, 另设 10 只对照组(正常大鼠)。ELISA 法检测各组大鼠血清白细胞介素(IL)-6、IL-1β、肿瘤坏死因子(TNF-α)水平; 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠子宫内膜组织病理变化; 免疫组化、Western blotting 检测异位内膜病灶中磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)蛋白表达。 **结果** 共筛选出桂枝茯苓丸活性成分 82 个, 预测靶点 962 个; EMS 疾病靶点 2 492 个; 桂枝茯苓丸与 EMS 共同靶点 246 个。核心 PPI 网络筛选出关键靶点 164 个, 核心蛋白 21 个。GO 分析显示共同靶点主要富集于化学反应、分子功能调节、信号受体结合等生物过程; KEGG 富集分析提示关键通路包括 TNF、PI3K/Akt、MAPK 等信号通路。分子对接表明关键活性成分(55 个)与核心靶点(341 个)取交集得 164 个关键靶点具有良好结合活性。动物实验: 与对照组相比, 模型组大鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平显著升高($P<0.01$), 子宫内膜组织呈现明显炎症浸润, 且 PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达显著上调($P<0.01$)。与模型组相比, 桂枝茯苓丸各剂量组大鼠血清炎症因子水平显著降低($P<0.01$), 子宫内膜炎性损伤显著减轻, PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达均显著下调($P<0.01$)。 **结论** 桂枝茯苓丸可能通过调控炎症反应、细胞信号转导及血管生成等过程发挥抗 EMS 作用, 其机制可能与抑制 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的异常激活有关。

关键词: 网络药理学; 桂枝茯苓丸; PTEN/PI3K/Akt; 子宫内膜异位症; 桂枝; 茯苓; 牡丹皮; 桃仁; 芍药

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)12-3583-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.015

Exploring mechanism of Guizhi Fuling Pills in regulating PTEN/PI3K/Akt signaling pathway for treating endometriosis via network pharmacology

WANG Shuang, YUAN Yuan, YI Yingchun, LI Xia, ZHANG Xiaoling

Jiangxi Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Nanchang 330006, China

Abstract Objective To predict the potential targets and signaling pathways of Guizhi Fuling Pills in the treatment of endometriosis (EMS) based on network pharmacology, and to verify the mechanism through molecular docking and animal experiments. **Methods** The active components and their targets of Guizhi Fuling Pills (*Cinnamomi Ramulus*, *Poria*, *Moutan Cortex*, *Persicae Semen*, and *Paeoniae Alba Radix*) were screened using the TCMSP and SwissTargetPrediction databases. The disease targets of EMS were obtained from the GeneCards, OMIM, PharmGkb, TTD, and DrugBank databases. The common targets of Guizhi Fuling Pills and EMS were obtained by taking the intersection (visualized by R language). The “active component-target” regulatory network and STRING protein-protein interaction (PPI) network were constructed. The CytoNCA was used for PPI network topological analysis to screen the core

收稿日期: 2025-06-04

基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目(2024B0465)

作者简介: 王 爽(1982—), 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为妇科临床。E-mail: wwwshuang99@163.com

*通信作者: 张晓玲(1973—), 女, 硕士研究生, 主任医师, 研究方向为妇科临床。E-mail: xlzzz777@126.com

targets. The core targets were subjected to Gene Ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Molecular docking was performed to verify the key active components and core targets in the “component-target” network. A rat model of autologous transplantation of EMS was established. Forty rats with successful modeling were randomly divided into the model group, low-, medium-, and high-dose Guizhi Fuling Pills treatment groups, and another 10 rats were set as the control group (normal rats). The levels of serum IL-6, IL-1 β , and TNF- α were detected by ELISA; The pathological changes of endometrial tissue were observed by HE staining; And the expressions of PTEN, PI3K, and Akt proteins in ectopic endometrial lesions were detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** A total of 82 active components and 962 predicted targets of Guizhi Fuling Pills were screened; 2 492 disease targets of EMS were obtained; And 246 common targets of Guizhi Fuling Pills and EMS were identified. The core PPI network screened out 164 key targets and 21 core proteins. GO analysis showed that the common targets were mainly enriched in biological processes such as chemical reactions, molecular function regulation, and signal receptor binding. KEGG enrichment analysis suggested that the key pathways included TNF, PI3K/Akt, and MAPK signaling pathways. Molecular docking indicated that the key active components (55) had good binding activity with the core targets (341, with an intersection of 164 key targets). Animal experiments: Compared with the sham operation group, the levels of serum IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), and the endometrial tissue showed obvious inflammatory infiltration, with significantly upregulated expressions of PTEN, PI3K, and Akt proteins. Compared with the model group, the levels of inflammatory factors in the serum of rats in each dose Guizhi Fuling Pills treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$), the endometrial inflammatory damage was significantly alleviated, and the expressions of PTEN, PI3K, and Akt proteins were significantly downregulated ($P < 0.01$). **Conclusion** GUIZHI FULING PILLS may exert anti-EMS effects by regulating inflammatory responses, cell signal transduction, and angiogenesis, and its mechanism may be related to the inhibition of abnormal activation of the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: network pharmacology; Guizhi Fuling Wan; PTEN/PI3K/Akt; endometriosis; *Cinnamomi Ramulus*; *Poria*; *Moutan Cortex*; *Persicae Semen*; *Paeoniae Alba Radix*

子宫内膜异位症 (EMS) 是一种常见的疼痛性妇科疾病, 在育龄妇女群体中其发生率约为 10%^[1]。EMS 最常见的症状包括痛经、慢性盆腔疼痛和不孕症。肠易激综合征、便秘、卵巢癌、子宫内膜癌等多种合并症的发生率也明显高于普通人群^[2]。目前的治疗方法, 包括手术、非甾体抗炎药、激素治疗等, 这些治疗方法虽然可以缓解 EMS 的显著症状, 但也会导致一些不良反应和高复发率, 进而导致患者的生活质量下降^[3]。因此, 仍有必要寻找更加安全、有效的治疗方法。

据中医史籍记载, 自东汉末年 (公元 200—210 年) 以来, 传统中药配方桂枝茯苓丸已用于治疗类似 EMS 的症状, 如痛经^[4], 由于其疗效好、不良反应小等诸多优点, 至今仍被广泛使用。桂枝茯苓丸由肉桂枝、茯苓、牡丹皮、芍药、桃仁 5 种中药原粉组成^[5]。同时已有动物实验证实, 桂枝茯苓丸具有缓解痛经的作用^[6]。然而, EMS 的复杂发病机制及桂枝茯苓丸对 EMS 的具体治疗机制仍不清楚。

近年来中医药整体治疗越来越受到人们的重视, 而其药物治疗作用机制已由单一靶点转向由多种化合物介导的多相互作用靶点。同时网络药理学、分子对接广泛应用到多组分药物治疗疾病的多靶点效应研究、评价, 可从整体上反映中医药治疗

疾病的机制。在生物信息学和药学发展进程中, 网络药理学已成为研究中药复方处方配伍机制重要研究手段。本研究筛选多个数据库查找桂枝茯苓丸的有效成分及治疗 EMS 的可能靶点, 将桂枝茯苓丸和 EMS 靶基因进行靶点匹配, 获得重叠结果, 并从数据库中提取蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络信息, 进行拓扑结构分析。以分子对接方法筛选验证重点活性化合物与核心靶点强相互作用。通过基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析研究关键靶点基因。运用分子对接技术筛选获得桂枝茯苓丸治疗 EMS 的有效成分, 探讨药物的作用机制。最后建立 EMS 大鼠模型, 用体内实验验证网络药理学检测结果。

1 材料

1.1 实验动物

50 只 6 周龄、体质量 150~200 g 的 SPF 级 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司 [许可证号: SYXK (赣) 2023-0030], 在无特定病原体的环境中饲养, 标准温度下, 保持 12 h 光照/黑暗周期, 自由获取食物和水。所有大鼠在实验前均在上述条件下饲养 1~2 周以适应新环境。实验方案经江西省妇幼保健院医学伦理委员会审批 (科伦预审第 2024-01-018 号)。

1.2 实验试剂

桂枝茯苓丸购自成都九芝堂金鼎药业有限公司(规格:每盒 10 丸,每丸重 6 g,国药准字 Z20027562);戊巴比妥钠(国药准字 H31021725)由安徽中医药大学第一附属医院提供;蛋白定量试剂盒购自北京奥秘佳得医药科技有限公司(货号:34021);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自武汉麟盛科技有限公司(货号 PH0427);免疫组化试剂盒购自青岛苏林医学科技有限公司(货号:20240168);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自山东思科捷生物技术有限公司(货号:EC0013-A);磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、丝氨酸和苏氨酸激酶(Akt)、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购自 Abcam 公司(货号:ab267787、ab302958、ab283852、ab8245)。

1.3 实验仪器

4047700 涡旋仪购自浙江纳德科学仪器有限公司;PowerScanner-W 玻片扫描仪购自上海谱华森生物科技有限公司;R510-T 小动物麻醉机购自无锡莱弗思生物实验器材有限公司;YD-6D 脱水机、YD-6K 切片机、YD-315 包埋机等购自金华市益迪医疗设备有限公司;JA5002 电子分析天平购自青岛明博环保科技有限公司;ZF-388 凝胶成像系统购自信钰仪器(北京)有限公司;AXDD5M 低温高速离心机购自盐城市安信实验仪器有限公司;SZX16 荧光显微镜购自上海维翰光电科技有限公司。

1.4 数据库和软件

使用的数据库包括 Protein Data Bank、中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)。在线资源:药遗传学与药物基因组学知识库、DrugBank、GeneCards、治疗靶点数据库、Online Mendelian Inheritance in Man 和 STRING 等;使用的软件包括 Chem3D version 14.0.0.117、Vina version 1.2.2、R (version 4.1.3)、Cytoscape (version 3.9.0)、PyMOL version 2.5 和 Auto Dock Tools version 1.5.6 等。

2. 方法

2.1 桂枝茯苓丸潜在活性成分和靶点预测

利用 TCMSP 数据库检索桂枝茯苓丸组方中药(桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、芍药)的化学成分。基于口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.18 对化学成分进行初步筛选,获得潜在活性成分。随后,综合运用 SwissTargetPrediction 数据库和

TCMSP 数据库的靶点预测功能,对筛选所得活性成分的潜在作用靶点进行预测。

2.2 EMS 相关靶点预测

通过 TTD、PharmGkb、DrugBank、GeneCards、OMIM 等数据库对 EMS 的相关疾病靶点进行了检索,设置“endometriosis”为检索词。

2.3 桂枝茯苓丸治疗 EMS 的潜在活性成分-靶点调控网络及 PPI 网络构建

将“2.1”“2.2”项获得的 EMS 相关疾病靶点和桂枝茯苓丸活性成分作用靶点构建出靶点-活性成分调控网络,并将其节点导入至 STRING 数据库,建立 PPI 网络,其数据文件使用“tsv”格式进行导出。

2.4 桂枝茯苓丸治疗 EMS 关键靶点的拓扑分析

将“2.3”项获取的“tsv”文件使用 Cytoscape 软件进行分析,计算各靶点度(degree)值、特征向量中心性(eigenvector)、网络结构(network)、中介中心度(betweenness)、紧密中心性(LAC)和接近中心性(closeness)6 个拓扑性质参数及其中位值并根据结果建立子网络,再次分析后得到核心网络和靶点。

2.5 GO 与 KEGG 通路富集分析

基于 R 语言生物信息学工具包,对核心靶基因进行功能注释与通路解析。ID 转换:利用 org.Hs.eg.db 包将靶基因名称标准化为 Entrez ID 格式;功能富集:通过 ClusterProfiler 包执行 GO 生物过程(BP)、分子功能(MF)、细胞组分(CC)分类及 KEGG 信号通路富集分析;可视化输出:结合 ggplot2 与 enrichplot 包生成层级聚类图与通路网络图,直观展示显著富集条目。

2.6 分子对接验证

为验证桂枝茯苓丸活性成分与核心靶点的相互作用潜能,按以下流程实施分子对接:靶点-配体筛选:基于网络拓扑分析筛选前 4 位核心靶点,并匹配其对应的活性化学成分;结构预处理。

蛋白结构:从 PDB 数据库获取靶点晶体结构,去除水分子及冗余配体;小分子优化:通过 Chem3D 软件对 PubChem 下载的化合物进行能量最小化与电荷校正;对接模拟:采用 AutoDockTools 1.5.6 生成受体-配体对接格点,运用 AutoDock Vina 进行半柔性对接,PyMOL 2.5 可视化结合模式与关键相互作用力(如氢键、疏水作用)。

2.7 桂枝茯苓丸混悬液的制备

取适量的 CMC-Na,加入少量热水搅拌使其充分

溶胀,形成胶浆。冷却至室温后,加蒸馏水至全量,搅拌均匀。将计算好的桂枝茯苓丸提取物粉末置于研钵中,加入少量 50%乙醇,轻轻研磨,使其充分润湿成均匀的糊状物。将润湿好的药物糊状物少量多次地加入到 CMC-Na 溶液中,边加边剧烈搅拌,使其均匀分布在介质中。最后用蒸馏水补足至所需总体积。使用 HPLC 测定混悬液中代表性成分芍药苷($0.5\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、丹皮酚($0.2\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)的含量。

2.8 动物模型构建和实验分组

所有手术均于无菌状态下进行。40 只大鼠 ip 3%戊巴比妥钠麻醉,拔毛,暴露腹部皮下腹膜,在子宫肌层剥离子宫内膜组织,切除子宫内膜组织大小约 5 mm,移植到腹壁腹膜的内表面,缝合腹腔,使大鼠麻醉清醒。

造模成功后,随机抽取 30 只大鼠作为桂枝茯苓丸低、中、高剂量组,每组 10 只;剩下 10 只作为模型组。根据人用临床剂量按体表面积折算系数法进行种属间剂量换算,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组大鼠每天 ig 桂枝茯苓丸混悬液 0.62 、 1.24 、 $2.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [7],连续 ig 30 d。另取 10 只大鼠作为对照组,开腹不剥离子宫内膜,缝合腹腔,ig 同体积 0.9%氯化钠溶液。

2.9 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测

通过腹主动脉穿刺采血法获取大鼠血液样本。经离心处理后,小心收集上清液。随后严格按照 ELISA 试剂盒制造商的操作规程,使用 ELISA 法测定吸光度值,进而对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的表达水平进行定量分析。

2.10 苏木精-伊红(HE)染色

各组大鼠异位子宫内膜组织经福尔马林溶液固定后,依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明及石蜡包埋处理。切片经脱蜡水化,进行 HE 染色,再经梯度乙醇脱水、二甲苯充分透明后树胶封片,于显微镜下观察并拍摄。

2.11 免疫组化检测

异位子宫内膜组织固定、洗涤,脱水,打蜡,包埋。在洗涤缓冲液中浸泡一夜的载玻片,用流水冲洗并晾干。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 聚赖氨酸中浸泡 30 min 后,将载玻片放入干净的玻璃架中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下过夜。切片机切出 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的连续切片,其中 5 张切片 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。染色前,切片置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中 1 h。切片在二甲苯中脱

蜡,再水化,然后在 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中微波提取抗原。切片用 PBS($0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4)洗涤 3 次,洗涤 3 min。免疫组织化学法具体步骤按照制造商说明书(中国福州迈鑫生物公司)进行。抗 PTEN、PI3K、Akt (Abcam) 稀释比为 1:1 000。

2.12 Western blotting 分析

用蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液提取切分的小块异位子宫内膜组织。在蛋白酶抑制剂存在的情况下,经 $600\times g$ 离心 10 min 后,小心收集上清液。用裂解液 $600\times g$ 离心 15 min 除去不溶性成分,确定好各组蛋白上样量后使用 SDS 凝胶分离。然后转移至 PVDF 膜上,用封闭液封闭,孵育过夜针对 PTEN、PI3K、Akt、GAPDH 蛋白抗体。并用相应的二抗孵育,ChemiDocMP 图像系统检测化学发光信号。蛋白条带的分析由 IMAGEJ 软件完成。

3 结果

3.1 核心治疗靶点筛选

通过 TC MSP 与 SwissTargetPrediction 平台鉴定桂枝茯苓丸中 55 种生物活性物质及其 341 个潜在作用靶点;疾病靶点整合:从 GeneCards 等 5 大数据库共获取 EMS 相关靶点 2 492 个(图 1-A);关键靶点识别:Venn 分析显示桂枝茯苓丸与 EMS 存在 164 个共有靶点(图 1-B),提示其为桂枝茯苓丸治疗 EMS 的潜在作用枢纽。

3.2 活性成分-靶点网络建模与解析

应用 Cytoscape 3.8.2 构建桂枝茯苓丸-EMS 多组分调控网络(图 2),揭示以下特征:核心成分:槲皮素(MOL000098)可能作用 91 个潜在靶点,山柰酚(MOL000422)调控 36 个靶点;关键靶标:PTGS2 (19 个成分作用)与 GABRA1 (12 个成分作用)为网络核心节点;不同颜色节点表征成分来源(桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、芍药)。

3.3 靶点网络拓扑学特征

通过 STRING 11.5 构建 PPI 网络并实施双轮拓扑筛选:初筛网络:基于 betweenness(79.14)、closeness(0.225)等参数,筛选 60 个高连接性靶蛋白构建子网络(图 3-B);核心网络:二次筛选获得 21 个核心蛋白(子网络参数中位数:degree=21.00, eigenvector=0.136),形成最终互作网络(图 3-C)。

3.4 功能富集与通路解析

对 164 个关键靶点进行多维度富集分析见图 4, PI3K-Akt 调控机制见图 5。

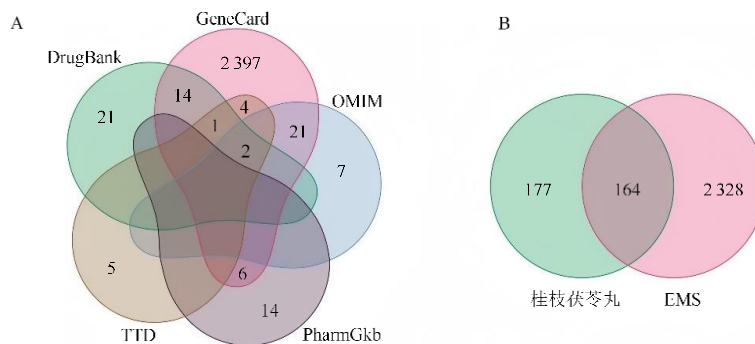
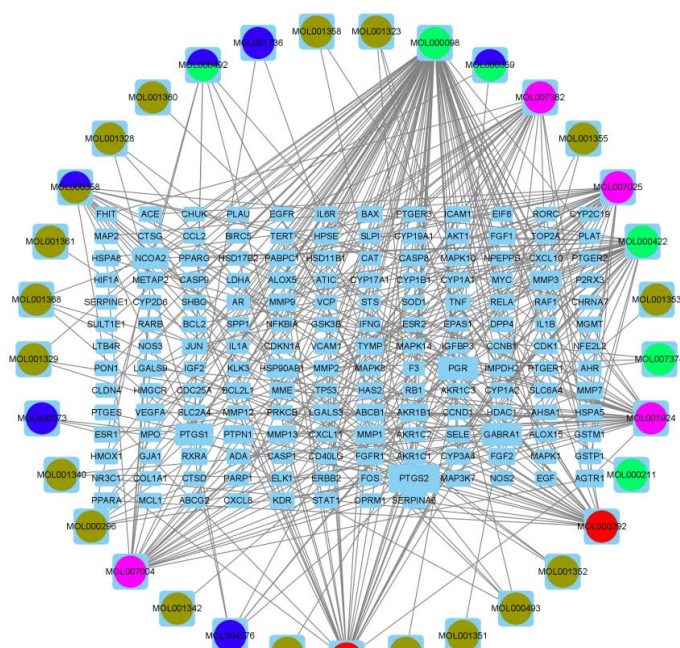


图 1 EMS 疾病相关靶点 (A) 和桂枝茯苓丸治疗 EMS 的关键靶点预测 (B)

Fig. 1 EMS disease-related targets (A) and key target prediction of Guizhi Fuling Pills for EMS treatment (B)



蓝色代表来源于桂枝；红色代表来源于茯苓；绿色代表来源于牡丹皮；棕色代表来源于桃仁；粉色代表来源于芍药。
Blue represented derived from *Cinnamomi Ramulus*; Red represented derived from *Poria*; Green represented derived from *Moutan Cortex*; Brown represented derived from *Persicæ Semen*; Pink represented comes from *Paeoniae Alba Radix*.

图 2 桂枝茯苓丸治疗 EMS 的潜在活性成分-靶点调控网络模型

Fig. 2 Potential active ingredient-target regulatory network model of Guizhi Fuling Pills in treatment of EMS

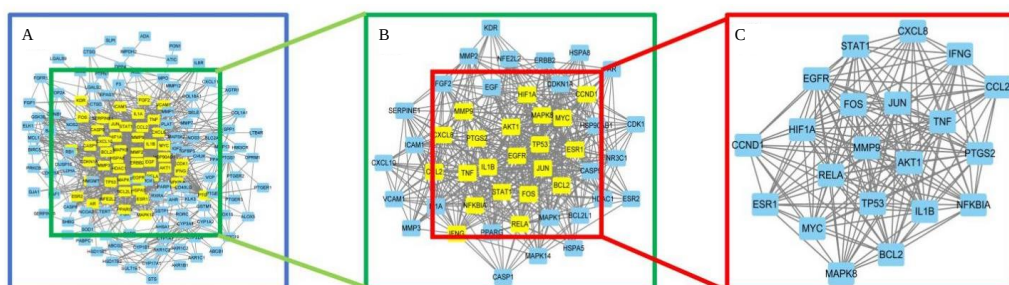


图 3 桂枝茯苓丸治疗 EMS 关键靶点的拓扑分析

Fig. 3 Topological analysis of key targets of Guizhi Fuling Pills in treatment of EMS

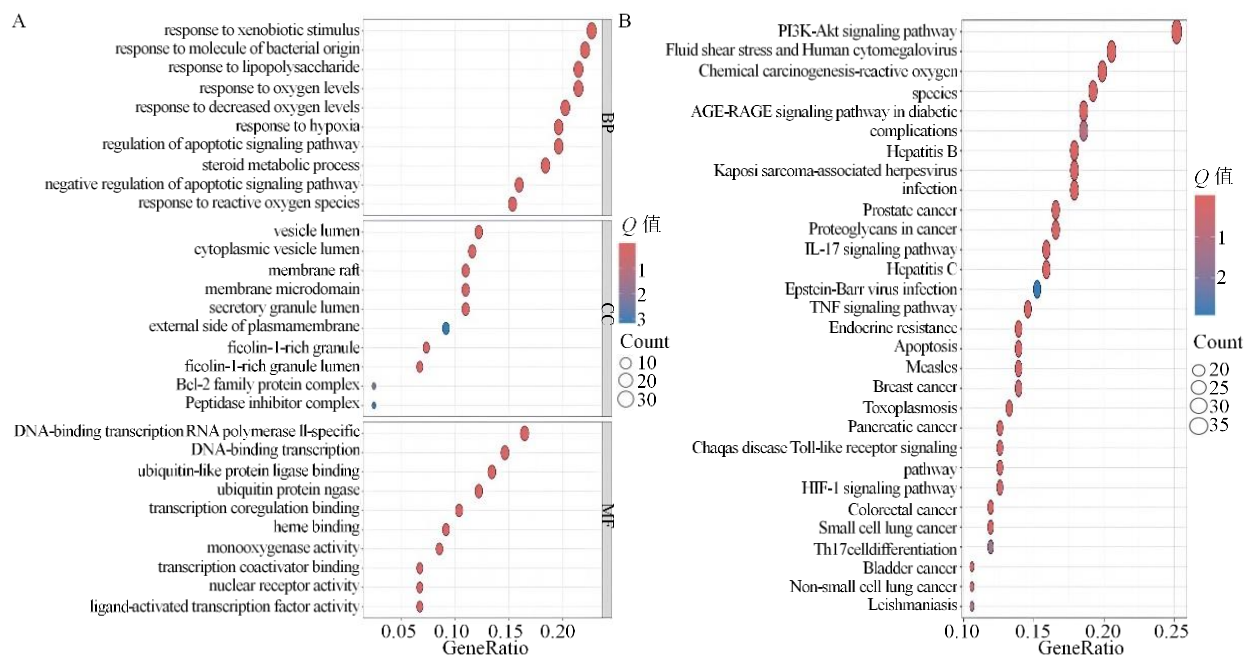


图 4 桂枝茯苓丸治疗 EMS 关键靶点的 GO (A) 和 KEGG 通路 (B) 分析

Fig. 4 Analysis of GO (A) and KEGG pathway (B) of key targets of Guizhi Fuling Pills in treatment of EMS

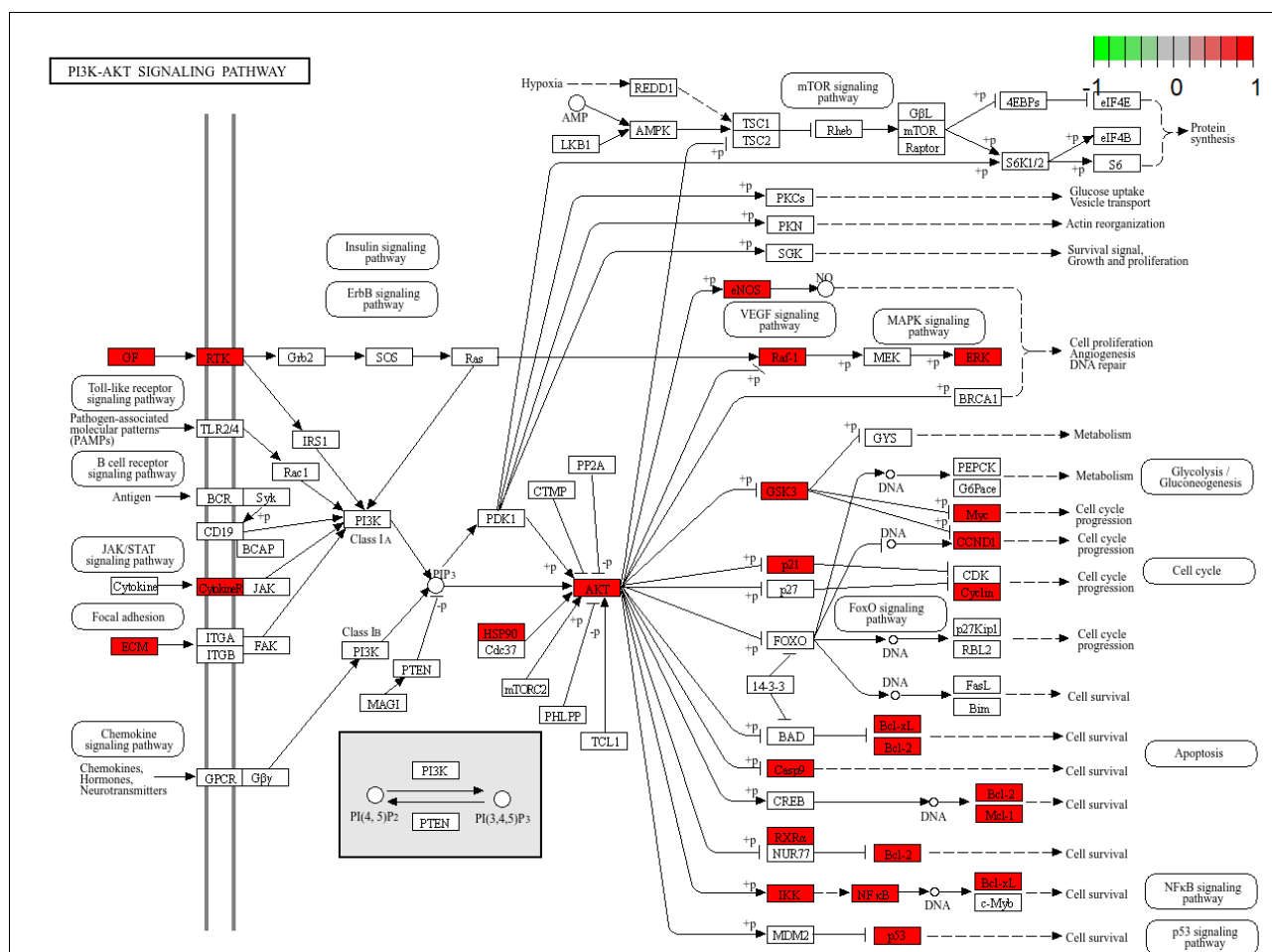


图 5 PI3K-Akt 信号通路图

Fig. 5 Diagram of PI3K-Akt signaling pathway

3.5 分子对接验证

选取核心靶点（AKT1、IL1B、EGFR、TP53）与对应活性成分进行配体-受体对接：结合能分析：

所有复合物结合能 $\leq -20.9\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，提示自发结合（表 1）；构象稳定性：氢键与疏水作用主导结合界面，形成稳定复合物。见图 6。

表 1 部分核心靶点蛋白与桂枝茯苓丸潜在活性成分最低结合能

Table 1 Partial core target proteins have lowest binding energy with potential active ingredients in Guizhi Fuling Pills				
序号	核心靶点	PDB ID	化合物	结合能/($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
1	AKT1	7nh5	山柰酚	-41.481
2	IL1B	6y8i	槲皮素	-28.911
3	EGFR	5gtv	槲皮素	-38.548
4	TP53	8f2i	槲皮素	-32.682

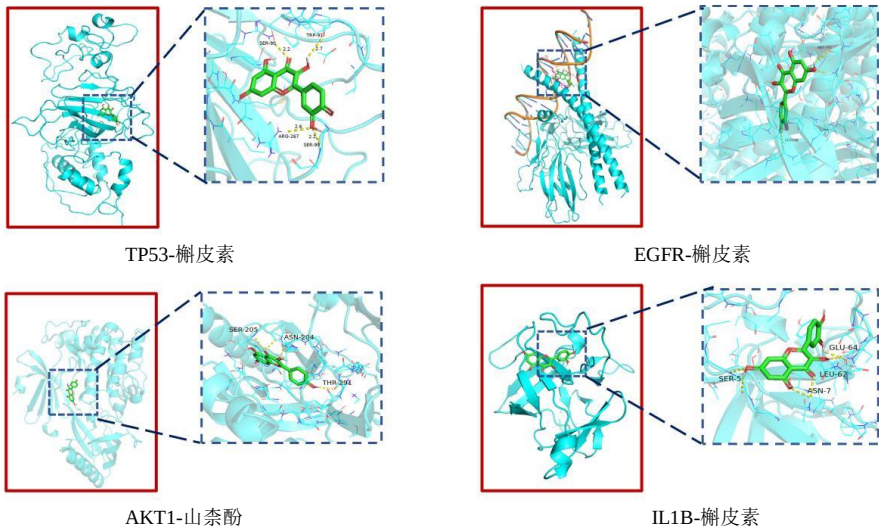


图 6 部分核心靶点与桂枝茯苓丸中潜在活性成分分子对接模式

Fig. 6 Schematic diagram of molecular docking mode between core targets and potential active ingredients in Guizhi Fuling Pills

3.6 ELISA 检测结果

ELISA 实验结果显示，与对照组相比，模型组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平显著升高（ $P <$

0.01）；与模型组相比，桂枝茯苓丸低、中、高剂量组治疗后，大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低（ $P < 0.01$ ）。见表 2。

表 2 各组大鼠子宫内膜组织炎症细胞因子水平比较（ $\bar{x} \pm s$, $n=10$ ）

Table 2 Comparison of inflammatory cytokine levels in endometrial tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)				
组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照		10.66 $\pm$ 1.22	8.33 $\pm$ 1.18	18.77 $\pm$ 2.10
模型		39.88 $\pm$ 4.51 ^{##}	22.60 $\pm$ 3.02 ^{##}	40.22 $\pm$ 4.05 ^{##}
桂枝茯苓丸	0.62	18.55 $\pm$ 2.88 ^{**}	12.29 $\pm$ 1.05 ^{**}	22.66 $\pm$ 2.89 ^{**}
	1.24	25.88 $\pm$ 3.15 ^{**}	15.88 $\pm$ 1.29 ^{**}	26.98 $\pm$ 3.01 ^{**}
	2.17	27.61 $\pm$ 3.10 ^{**}	17.10 $\pm$ 1.14 ^{**}	28.85 $\pm$ 2.29 ^{**}

与对照组比较：^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{**} $P < 0.01$ 。
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

3.7 HE 染色结果

HE 染色结果显示，与对照组相比，模型组大鼠的异位子宫内膜面积增大，腺体和间质细胞排列

紊乱，炎症浸润明显。经过低、中、高剂量桂枝茯苓丸治疗后，模型大鼠的异位子宫内膜面积减小，子宫内膜细胞的形态和结构得到改善（图 7）。

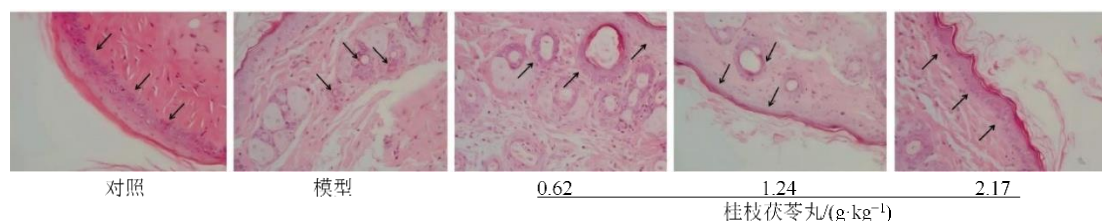


图 7 各组大鼠子宫内膜组织 HE 染色 (×200)

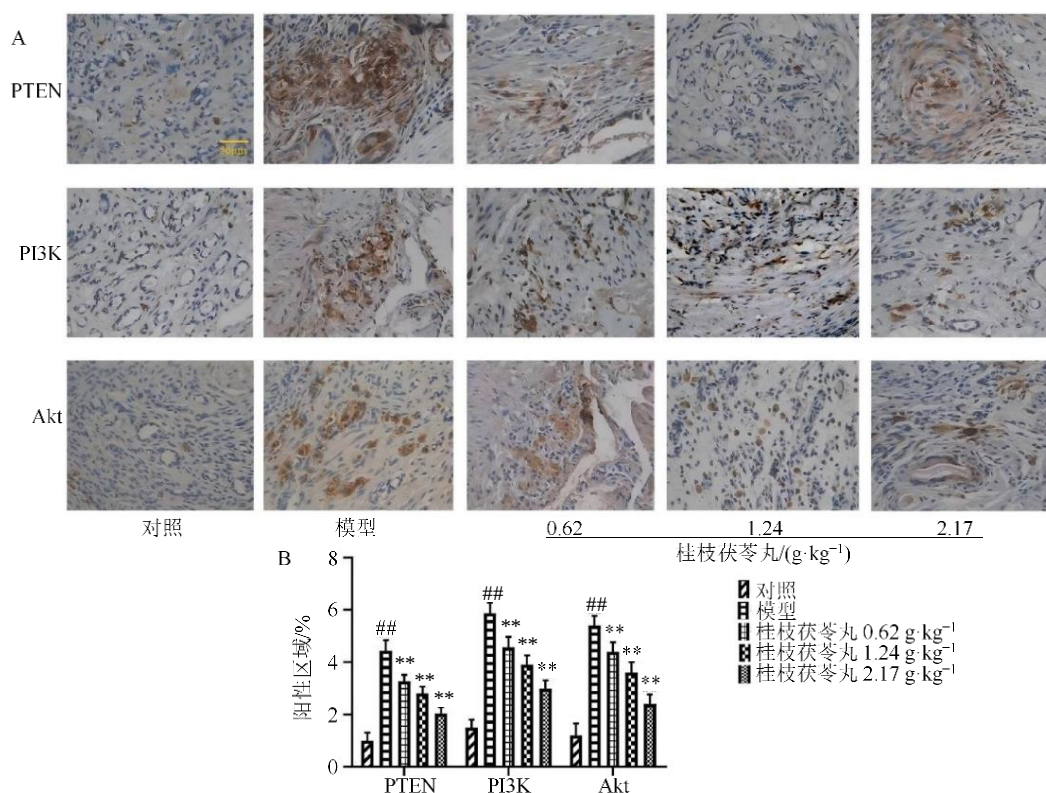
Fig. 7 HE staining of endometrial tissues in each group of rats (×200)

3.8 免疫组化结果

免疫组化结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠子宫内膜基质细胞的细胞质中 PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达显著增多 ($P<0.01$), 不同剂量的桂枝茯苓丸治疗后, PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达明显减少。见图 8。

3.9 Western blotting 检测结果

与对照组相比, 模型组 PTEN、PI3K、Akt 蛋白水平显著升高 ($P<0.01$), 与模型组相比, 低、中、高剂量桂枝茯苓丸治疗后, PTEN、PI3K、Akt 蛋白水平显著下降 ($P<0.01$)。见图 9。



与对照组比较: $^{##}P<0.01$; 与模型组比较: $^{**}P<0.01$ 。

$^{##}P<0.01$ vs control group; $^{**}P<0.01$ vs model group.

图 8 各组大鼠子宫内膜组织免疫组化检测图 (A) 和半定量分析结果 (B) (×400, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Immunohistochemical detection images (A) and semi-quantitative analysis results (B) of endometrial tissues in each group of rats (×400, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

4 讨论

中药复方制剂由于存在多组分、多靶点和多种途径治疗疾病的特点, 因此其药理研究和作用机制解析十分困难。网络药理学是一种系统性研究方

法, 适用于中药多成分、多靶点、多通路协同作用的特点^[8-9]。本研究第 1 次通过网络药理学和分子对接技术对桂枝茯苓丸治疗 EMS 的作用机制进行相关研究, 为进一步的实验研究提供思路和方向。

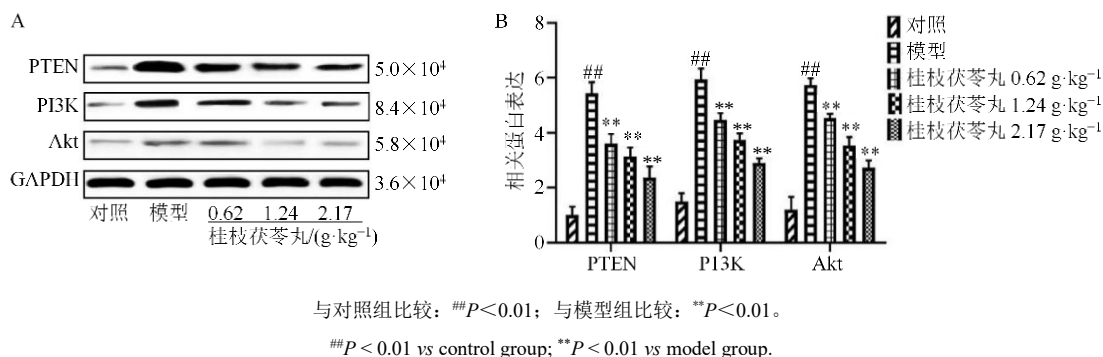


图 9 各组大鼠相关蛋白免疫印迹检测条带图 (A) 和半定量分析结果 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 9 Western blotting detection band diagrams (A) and quantitative analysis results (B) of related proteins in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

基于核心靶点-化合物网络分析,发现桂枝茯苓丸的主要成分包括:肉桂枝、茯苓、牡丹皮、芍药、桃仁。其活性成分中的枢纽化合物(槲皮素、山柰酚、紫杉叶素、黄芩素)可通过以下途径发挥抗 EMS 活性:显著缓解症状并抑制 CA-125 水平;通过抗增殖和抗炎作用减少异位子宫内膜面积^[10-12]。植物甾醇(β -谷甾醇、菜油甾醇)可促进 EMS 病灶退化^[13]。黄芩素通过抑制子宫内膜间质细胞(ESC)活性治疗 EMS^[14]。因此推测上述成分是桂枝茯苓丸治疗 EMS 的潜在物质基础。

桂枝茯苓丸中的常春藤皂苷元、菜油甾醇、 β -谷甾醇、茯苓酸、槲皮素及紫杉叶素等成分可通过抑制炎症因子表达,调控整体炎症反应^[15-16]。常春藤皂苷元通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)和核因子- κ B(NF- κ B)通路,降低 TNF、IL-1、IL-6 及环氧酶-2(COX-2)等炎症因子表达^[17]。植物甾醇(菜油甾醇和 β -谷甾醇)显著降低 EMS 模型小鼠腹腔液中 TNF- α 和 IL-6 水平^[18]。实验证实黄酮类化合物(槲皮素)通过抗炎作用减轻 EMS 症状^[19]。分子对接验证上述成分的分子对接结果与文献报道一致,进一步支持桂枝茯苓丸通过多成分协同作用抑制炎症的机制假说。

细胞凋亡被抑制及伴随的细胞过度增殖是 EMS 发生发展的重要机制。桂枝茯苓丸通过多成分、多靶点的协同作用调控 EMS 的细胞增殖与凋亡,其机制涉及以下关键通路与成分:桂枝茯苓丸中的槲皮素和黄芩素通过靶向抑制 PTEN、p38 MAPK 和 Akt 信号通路,调控细胞周期与凋亡^[20]。PTEN 与 Akt 在细胞增殖、炎症反应中起核心作用。研究显示,抑制这些通路可减少 EMS 细胞的迁移

与侵袭。Akt 通路的激活与细胞存活密切相关。桂枝茯苓丸通过抑制 Akt 磷酸化,促进 EMS 细胞的凋亡^[21]。桂枝茯苓丸中的黄酮类化合物(如槲皮素、山柰酚)通过下调前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)/COX-2 的表达,抑制前列腺素 E2(PGE2)的合成,从而阻断 COX-2/PGE2 信号轴。该通路在 EMS 中与疼痛、炎症反应及细胞增殖密切相关^[22]。黄芩素通过抑制 NF- κ B 通路,减少促炎因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的释放,并降低 ESC 的活性^[23]。NF- κ B 的激活与 EMS 病灶的免疫逃逸和炎症微环境形成密切相关,其抑制可显著降低细胞增殖并诱导凋亡^[24]。桂枝茯苓丸中的天然三萜类化合物(如茯苓酸、 β -谷甾醇)通过直接抑制肿瘤细胞的能量代谢或干扰脂肪酸结合蛋白功能,阻断核酸和脂肪酸的合成,从而抑制细胞增殖^[25]。值得一提的是,在分子对接结果中,除芍药苷外,其余主要活性成分与 EGF 的对接评分都很高。这表明桂枝茯苓丸可能通过多成分协同作用的方式影响细胞的增殖和凋亡。

越来越多的证据表明,EMS 的病理生理机制是复杂的,缺氧在 EMS 损伤中起着至关重要的作用^[26]。据报道,三萜和类黄酮包括常春藤皂苷元、谷甾醇、油菜甾醇、紫杉素和厚绿酸是天然抗氧化剂^[27-28]。通过 MAPK 和 PI3K/Akt 通路在一定程度上抑制 EMS 损伤过程中的活性氧产生,从而降低氧化应激^[29]。分子对接结果表明,萜类和类黄酮与靶蛋白 AKT1、MAPK1 和 MAPK8 有紧密的结合。然而,需要进一步的实验来证实桂枝茯苓丸是否通过 MAPK 和 PI3K/Akt 通路来对抗 EMS。

缺氧和炎症作为 EMS 微环境的基本特征,可

以刺激缺氧诱导因子 (HIF) 和炎症诱导因子 COX-2 基因的转录, 从而通过 PI3K/mTOR 和 MAPK 途径激活血管生成^[30]。据报道, 血清和子宫内膜中 HIF-1 α /VEGF 表达与 EMS 的分期和痛经的严重程度有关^[31]。研究证实, 在小鼠模型中, COX-2 的一些抑制剂能够通过调节 HIF-1 α /VEGF 来治疗 EMS 并抑制 ESC 的血管生成^[32]。值得一提的是, 在桂枝茯苓丸中检测到了三萜 (β -谷甾醇、油菜甾醇、常春藤皂苷元) 和黄酮类 (槲皮素), 它们在 EMS 中可能具有适度的抑制 VEGF 的作用^[33]。先前的研究也表明, 芍药苷可以通过 HIF-1 α /VEGF 途径抑制血管生成^[34]。

本研究运用网络药理学、分子对接等方法, 从抑制炎症反应、调节细胞凋亡和增殖、降低氧化应激、抑制血管生成 4 个方面探讨桂枝茯苓丸在治疗 EMS 中的潜在作用。为了验证桂枝茯苓丸治疗的具体作用机制, 进行体内实验, 证实其作用机制可能与其参与 PTEN/PI3K/Akt 信号通路调控有关。在体内实验中, 通过自体移植法构建 EMS 大鼠模型, 通过 ELISA 检测血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平, HE 染色检测大鼠子宫内膜组织病理学变化, 免疫组化和 Western blotting 检测大鼠 EMS 病灶中 PTEN、PI3K、Akt 蛋白的表达水平。结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平显著升高, 子宫内膜组织出现明显炎症浸润, PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达明显上调, 不同剂量的桂枝茯苓丸治疗后, 大鼠血清内 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低, 子宫内膜组织炎症损伤被显著抑制, PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达明显下调, 且桂枝茯苓丸的治疗效果呈浓度相关性。

综上所述, 本研究表明桂枝茯苓丸可能对 EMS 有多重影响。虽然其机制还有待进一步的实验证实, 但桂枝茯苓丸抗 EMS 的相关靶点和信号通路已经得到初步的证实, 即其作用机制可能与其参与 PTEN/PI3K/Akt 信号通路调控有关。本研究存在局限性。首先, 网络药理学分析在一定程度上有助于预测桂枝茯苓丸治疗 EMS 可能的分子机制。然而, 只能推测, 而不能证实这种机制是否有影响, 因为在循证医学中, 结论要到随后的生物学实验才能确定。其次, 通过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库检索桂枝茯苓丸中 5 味中药的潜在活性成分的作用靶点, 并通过 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD 和 DrugBank 数据库建立了相关靶点数据库,

选择不同的数据库可能会导致研究偏差。此外, 由于使用的所有数据库都是基于现有的研究结果, 这可能会限制发现与 EMS 治疗相关的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Flores-Caldera I, Lou-Mercadé A C, Nieves Y, et al. Voices of women with endometriosis in Latin America: Tales of invalidation, high costs, and diagnostic delays [J]. *Women Health*, 2025, 65(3): 224-226.
- [2] Huang Y, Zhang D Y, Zhou Y F, et al. Causal relationship between abortion and endometriosis: A bidirectional two-sample mendelian randomization study [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2025, 93(3): e70064.
- [3] Arendt W, Kleszczyński K, Gagat M, et al. Endometriosis and cytoskeletal remodeling: The functional role of actin-binding proteins [J]. *Cells*, 2025, 14(5): 360.
- [4] 柯桦. 桂枝茯苓丸联合地诺孕素治疗子宫内膜异位症的临床效果 [J]. *妇儿健康导刊*, 2024, 3(19): 91-94.
Ke H. Clinical Effect of Guizhi Fuling Pills combined with denogesterone in the treatment of endometriosis [J]. *J Women Child Health*, 2024, 3(19): 91-94.
- [5] 麻鑫亚, 李敏, 封艳梅. 化瘀温经汤结合桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症 (寒凝血瘀型) 的疗效及血清 MMP-3、TGF- β 、PGF2 α 、EMAb 水平的影响 [J]. *四川中医*, 2024, 42(10): 172-174.
Ma X Y, Li M, Feng Y M. The therapeutic effect of Huayu Wenjing Decoction combined with Guizhi Fuling Capsules on endometriosis (Cold Coagulation and Blood Stasis Type) and its influence on the levels of serum MMP-3, TGF- β , PGF2 α and EMAb [J]. *Sichuan J Tradit Chin Med*, 2024, 42(10): 172-174.
- [6] Armour M, Al-Dabbas M A, Ee C, et al. The effectiveness of a modified Gui Zhi Fu Ling Wan formulation (Gynoclear™) for the treatment of endometriosis: A study protocol for a placebo-controlled, double-blind, randomised controlled trial [J]. *Trials*, 2021, 22(1): 299.
- [7] 刘泽滨, 林立鹏, 晁艳, 等. 桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症大鼠血清免疫球蛋白和炎症因子水平的影响 [J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(16): 1955-1957.
Liu Z B, Lin L P, Chao Y, et al. The effect of Guizhi Fuling Pills on the levels of serum immunoglobulin and inflammatory factors in rats with endometriosis [J]. *Intern J Lab Med*, 2018, 39(16): 1955-1957.
- [8] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.
Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese

- medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [9] Zhao W B, Wang B Y, Li S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence artificial intelligence [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 558-560.
- [10] 黄婷婷, 霍少川, 麦哲芬, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨桂枝茯苓丸“异病同治”多囊卵巢综合征和子宫内膜异位症的作用机制 [J]. *广州中医药大学学报*, 2024, 41(4): 973-980.
- Huang T T, Huo S C, Mai Z F, et al. Based on network pharmacology and molecular docking, the mechanism of action of Guizhi Fuling Pills in "treating different diseases simultaneously" for polycystic ovary syndrome and endometriosis was explored [J]. *J Guangzhou Univ Chin Med*, 2024, 41(4): 973-980.
- [11] Xin W, Yaxin S, Li X, et al. Traditional Chinese medicine prescription Guizhi Fuling Pills in the treatment of endometriosis. [J]. *Intern J Med Sci*, 2021, 18(11): 2401-2408.
- [12] 洪倩, 熊员焕, 彭凯欣. 桂枝茯苓丸通过下调 miR-23b 抑制子宫内膜间质细胞迁移的机制和功能研究 [J]. *江西医药*, 2023, 58(11): 1246-1250.
- Hong Q, Xiong Y H, Peng K X. Study on the Mechanism and Function of Guizhi Fuling Pills in Inhibiting Endometrial Stromal Cell Migration by Down-regulating miR-23b [J] *Jiangxi Med*, 2023, 58(11): 1246-1250.
- [13] 黄家宓, 陈静, 万怡婷, 等. 基于网络药理学探讨痛经宁方治疗子宫内膜异位症的分子机制 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(6): 1049-1057.
- Huang J F, Chen J, Wan Y T, et al. To explore the molecular mechanism of Tongjingning Formula in the treatment of endometriosis based on network pharmacology [J]. *World J Integr Tradit Chin West Med*, 2021, 16(6): 1049-1057.
- [14] Park W, Jang H, Kim S H, et al. Therapeutic efficacy and anti-inflammatory mechanism of baicalein on endometriosis progression in patient-derived cell line and mouse model [J]. *Phytomedicine: Intern J Phytother Phytopharmacol*, 2024, 130155469-155469.
- [15] 贾菲菲, 郭苏兰, 梁国琼, 等. 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 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(9): 1965-1974.
- Jia F F, Guo S L, Liang G Q, et al. Molecular mechanism of Guizhi Fuling Pills in treatment of hysteromyoma based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Drug Clin*, 2022, 37(9): 1965-1974.
- [16] Wang X, Shi Y X, Xu L, et al. Traditional Chinese medicine prescription Guizhi Fuling Pills in the treatment of endometriosis [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(11): 2401-2408.
- [17] Shan H, Siyuan L, Jilang L, et al. Hederasaponin C inhibits LPS-induced acute kidney injury in mice by targeting TLR4 and regulating the PIP2/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Phytotherapy Res: PTR*, 2023, 37(12): 5974-5990.
- [18] 11-Hydroxycorticosteroids; Reports Outline 11-Hydroxycorticosteroids Study Results from Ponce School of Medicine and Health Science (Stress management affects outcomes in the pathophysiology of an endometriosis model)[J]. *Sci Lett*, 2016.
- [19] 黄山鹰, 唐国玲, 王佳慧, 等. 槲皮素通过调控 CLDN6 基因表达量对子宫内膜异位症细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(10):1497-1503.
- Huang S Y, Tang G L, Wang J H, et al. Study on the effect and mechanism of quercetin on the proliferation, migration and invasion of endometriosis cells by regulating the expression level of CLDN6 Gene [J]. *J Anhui Med Univ*, 2020, 55(10):1497-1503.
- [20] Wang H X, Zhou G, Zhuang M Y, et al. Utilizing network pharmacology and molecular docking to explore the underlying mechanism of Guizhi Fuling Wan in treating endometriosis [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11087.
- [21] 罗艳, 林丹玫. 桂枝茯苓丸治疗子宫内膜异位症的成分-靶点-通路网络药理学研究 [J]. *中医临床研究*, 2021, 13(14): 1-7.
- Luo Y, Lin D M. Pharmacological study on the component-target-pathway network of Guizhi Fuling Pills in the treatment of endometriosis [J] *Clin Res Tradit Chin Med*, 2021, 13(14): 1-7.
- [22] Ding Y, Yang X, Wei Q, et al. Macranthoidin B restrains the epithelial-mesenchymal transition through COX-2/PGE2 pathway in endometriosis [J]. *Frontiers in Pharmacol*, 2024,151492098-1492098.
- [23] Lu L, Zeng W, Wang J, et al. Mechanisms of Neiyiting Decoction in preventing postoperative recurrence of endometriosis by inhibiting macrophage M1 polarization through the TREM1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Sichuan Univ Med Sci Ed*, 2025, 56(2): 371-381.
- [24] 章永平, 罗姚, 朱小玲, 等. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路研究黄芪甲苷IV对子宫内膜异位症模型小鼠炎症反应的影响及作用机制 [J]. *妇儿健康导刊*, 2025, 4(4): 181-186.
- Zhang Y P, Luo Y, Zhu X L, et al. To study the effect and mechanism of astragaloside IV on the inflammatory response of endometriosis model mice based on the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Women Child Health*

- Guide, 2025, 4(4): 181-186.
- [25] 栾莹, 张伟娜, 冯珊珊. 桂枝茯苓丸联合亮丙瑞林对子宫内膜异位症患者卵巢功能及血清 VEGF 和 MCP-1 的影响 [J]. 中国医学创新, 2024, 21(9): 39-42.
- Luan Y, Zhang W N, Feng S S. The effect of Guizhi Fuling Pills combined with levedrine on ovarian function and serum VEGF and MCP-1 in patients with endometriosis [J]. Chin Med Innov, 2024, 21(9): 39-42.
- [26] Camp O, Goud P, Goud A, et al. Cortical and peri-follicular blood flow is decreased in the presence of an endometrioma leading to hypoxia in the affected ovary [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 224: S105.
- [27] 殷杰, 魏敏平, 姚卫蓉. 无患子皂苷及常春藤皂苷元生物活性的研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2021, 41(5): 126-134.
- Yin J, Wei M P, Yao W R. Research progress on the Biological activities of saponins from *Sapindus mukorossi* and Ivy saponins [J]. Chem Indust For Prod, 2021, 41(5): 126-134.
- [28] 周玉芳, 刘玉琴, 黄绍权, 等. 不同生长阶段紫灵芝中多糖、三萜和甾醇的含量测定及其抗氧化活性研究 [J]. 中国食用菌, 2024, 43(5): 67-72.
- Zhou Y F, Liu Y Q, Huang S Q, et al. Determination of polysaccharides, triterpenoids and sterols in Purple *Ganoderma lucidum* at different growth stages and study on their antioxidant activities [J]. Chin Edib Fungi, 2024, 43(5): 67-72.
- [29] 张作良, 王婉润, 林祥羽, 等. 基于 EGFR/PI3K/AKT 信号通路探讨延胡索乙素对子宫内膜异位症痛经 SD 大鼠的作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2025, 41(3): 381-386.
- Zhang Z L, Wang W R, Lin X Y, et al. To explore the effect of Corysoderin on dysmenorrhea in SD rats with endometriosis based on the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Chin J Clin Pharm, 2025, 41(3): 381-386.
- [30] Jia J J, Lai H J, Sun B W, et al. miR-21 regulates autophagy and apoptosis of ectopic endometrial stromal cells of adenomyosis via PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 7639.
- [31] Wang C, Li Q. Retraction Note: Optical imaging medical diagnosis and analysis of drug treatment for endometriosis and the impact of serum VEGF and MMP-9 [J]. Optical and Quantum Electronics, 2024, 56(10): 1696-1696.
- [32] Kulikova V N, Kovalenko I I, Baibuz V D, et al. The role of genetic polymorphisms of the VEGF, COX2, MUC genes in the development of endometriosis-associated infertility [J]. Гинекология, 2019, 21(2): 34-37.
- [33] Tarumi Y, Takaoka O, Izumi Y, et al. Daidzein-rich isoflavone aglycones inhibit 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and increase estrogen sulfotransferase in endometriosis [J]. Gynecol endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinol, 2025, 41(1): 2516202.
- [34] Takeuchi A, Koga K, Tokita Y, et al. The effects of tokishakuyakusan, a traditional Japanese medicine (kampo), ferulic acid and paeoniflorin, on human endometriotic stromal cells and peritoneal macrophages [J]. J Reprod Immunol, 2020, 139(publish): 103104.

[责任编辑 齐静雯]