

益母草治疗寒凝血瘀型痛经的网络药理学作用机制研究

李明杰, 孙芮芮, 李慧峰, 李国艳, 曾桐春, 裴妙荣

山西中医药大学中药学院, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 构建益母草 *Leonurus japonicus* 化学成分-疾病靶点-代谢信号通路网络, 探究益母草多成分-多靶点-多通路治疗寒凝血瘀型痛经的作用机制。方法 利用 TCMSP 数据库与 Swiss Target Prediction 服务器获取益母草的化学成分与作用靶点, 结合 DrugBank、DisGeNET、TTD 等数据库获取益母草治疗寒凝血瘀型痛经的作用靶点; 通过 DAVID 网站对作用靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析, 采用 Cytoscape 3.6.0 构建益母草活性成分-痛经作用靶点-代谢信号通路网络图, 探讨益母草治疗寒凝血瘀型痛经的作用机制; 并进一步采用 Western blotting 实验验证益母草对寒凝血瘀型痛经模型大鼠子宫组织中花生四烯酸代谢通路环氧酶 1 (PTGS1)、PTGS2 蛋白表达的影响。结果 获得益母草潜在活性成分共 8 个, 与痛经相关疾病靶点 22 个, 关键靶点涉及 PTGS1、PTGS2、ALOX5、PLA2G2A、AKR1C3 等。GO 功能富集分析共得到 GO 条目 71 个 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (BP) 条目 46 个, 细胞组成 (CC) 条目 4 个, 分子功能 (MF) 条目 21 个。益母草治疗痛经可能作用靶点 22 个, KEGG 通路富集筛选得到 7 条信号通路 ($P < 0.05$), 涉及花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、甾类激素生物合成等; 益母草可显著提高模型大鼠子宫中 PTGS1、PTGS2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 验证了网络药理学的部分预测结果。结论 益母草可能通过作用于花生四烯酸代谢通路起到治疗寒凝血瘀型痛经的作用。

关键词: 益母草; 寒凝血瘀型痛经; 网络药理学; 环氧酶 1; 环氧酶 2; 花生四烯酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4251-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.019

Study on network pharmacology mechanism of *Leonurus japonicus* in treating dysmenorrhea caused by cold coagulation and blood stasis

LI Ming-jie, SUN Rui-rui, LI Hui-feng, LI Guo-yan, ZENG Tong-chun, PEI Miao-rong

School of Chinese Pharmacy, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To establish a chemical constitution-disease target-metabolic signaling pathway network of *Leonurus japonicus*, and explore the mechanism of multi-component, multi-target and multi-pathway of *L. japonicus* for the treatment of dysmenorrhea caused by cold coagulation and blood stasis. **Methods** TCMSP database and Swiss Target Prediction server were used to obtain the chemical components and action targets of *L. japonicus*. Combined with DrugBank, DisGeNET, TTD and other databases, the action targets of *L. japonicus* for treating dysmenorrhea symptoms with cold coagulation and blood stasis were obtained. Through DAVID's website, GO function enrichment analysis and KEGG pathway analysis were conducted on the targets, and cytoscape 3.6.0 was used to construct the network diagram of the active component-dysmenorrhea target-metabolic signaling pathway of *L. japonicus*, to explore the mechanism of action of *L. japonicus* in treating dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis. Furthermore, Western blotting experiments were conducted to verify the effect of *L. japonicus* on the expression of PTGS1 and PTGS2 proteins in the uterine tissues of the model rats with cold coagulation and blood stasis dysmenorrhea. **Results** Eight potential active ingredients of *L. japonicus* were obtained, including 22 dysmenorrhea related disease targets, main targets PTGS1, PTGS2, ALOX5, PLA2G2A, AKR1C3, etc. A total of 71 GO items were obtained by GO functional enrichment analysis ($P < 0.05$), including 46 biological process (BP) items, four cell component (CC) items, and 21 molecular function (MF) items. There were 22 possible targets for the treatment of dysmenorrhea, and seven signaling pathways were obtained through KEGG pathway enrichment and screening ($P < 0.05$), involving arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, steroid hormone biosynthesis, etc. *L. japonicus* significantly increased the protein expression levels of PTGS1 and PTGS2 in the uterus of the model rats ($P < 0.05$), which confirmed some of the predicted results

收稿日期: 2020-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 组分配伍四逆汤对甲减肾损伤的保护作用及其作用机制研究 (81373546)

作者简介: 李明杰 (1996—), 男, 山西运城人, 2017 级硕士研究生, 研究方向为中医方剂化学研究。E-mail: limingjie_21@163.com

*通信作者 裴妙荣 (1956—), 女, 山西太原人, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中医方剂化学研究。

of network pharmacology. **Conclusion** *L. japonicus* may treat dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis by acting on arachidonic acid metabolism pathway.

Key words: *Leonurus japonicas* Houtt.; cold coagulation and blood stasis dysmenorrhea; network pharmacology; PTGS1; PTGS2; arachidonic acid

痛经 (primary dysmenorrhea) 是临床最常见的疾病, 多发于生育年龄的女性^[1], 痛经在临床上主要分为原发性痛经 (PD) 和继发性痛经 (SD)^[2], PD 是目前妇科最常见疾病, 影响世界上 50% 的女性, 其中 10% 患者症状严重, 是影响妇女正常工作和生活质量的常见原因^[3]。目前西医对 PD 的治疗尚未取得满意的治疗方案, 非甾体抗炎类药和口服避孕药由于其严重的不良反应, 限制了临床使用, 中医药在 PD 治疗方面有许多行之有效的方法, 在痛经症状改善及远期疗效方面有着独特的优势^[4]。

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分, 具有活血调经、利水消肿、清热解毒功效, 临床上常用于血滞经闭、痛经、经行不畅、水肿、小便不利等病症^[5]。本课题组在前期实验^[6]中, 发现益母草颗粒可以减少寒凝血瘀型痛经模型大鼠的扭体次数, 对其具有较好的治疗效果, 因此采用网络药理学分析方法进一步阐释益母草治疗寒凝血瘀型痛经大鼠模型的作用机制。

网络药理学是一门运用网络方法分析药物与疾病和靶点之间“多成分、多靶点、多途径”协同作用关系的药理学分支学科^[7], 是一门从系统层面揭示中药对机体调控网络作用的新兴学科。中药是一个多成分、多作用靶点和多作用途径的复杂系统, 中药及其复方治疗疾病遵循整体观思想。网络药理学的整体性、系统性和注重药物间相互作用的特点与中医药学的基本特点相吻合, 符合中医药对疾病本质的认识^[8-9], 因此网络药理学为研究传统中药与现代药理学之间的相互关系搭建了桥梁。

本研究在系统查阅国内外相关文献的基础上, 构建了益母草成分数据库, 采用网络药理学的方法预测与筛选益母草的潜在活性成分和治疗痛经的作用靶点, 探讨益母草多成分-多靶点-多通路治疗寒凝血瘀型痛经的作用机制, 为益母草的深入开发奠定理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

Wistar 大鼠, 雌性, 体质量 140~150 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK

(京) 2016-0002。

1.2 药物与试剂

益母草颗粒 (北京同仁堂天然药物唐山有限公司, 批号 18110212); 缩宫素注射液 (批号 181026)、苯甲酸雌二醇注射液 (批号 190116), 上海全宇生物科技 (驻马店) 动物药业有限公司; 盐酸肾上腺素注射液 (批号 1812101), 天津金耀药业有限公司; BCA 蛋白浓度定量试剂盒、磷酸酶抑制剂、RIPA 裂解液均购自碧云天生物技术研究; 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 前列腺素内过氧化物合酶 1 (PTGS1) 兔单抗购自英国 Abcam 公司; PTGS2 兔多抗购自 BBI 公司; 小鼠单抗 β -actin、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器

DYY-7C 型电泳仪电源、DYCZ-24DN 型垂直电泳槽、DYCZ-40 型电转移槽 (北京市六一仪器厂); -80 °C 超低温冰箱 (中科美菱低温科技股份有限公司); TS-1 型水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); SHZ-82 型气浴恒温振荡器 (上海汗诺仪器有限公司); T8-1 型磁力搅拌器 (江苏省金坛市中大仪器厂); 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); HI650 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 益母草化学成分收集及活性成分筛选 以“益母草”为关键词, 检索 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 数据库收集益母草现有化学成分数据^[9]; 根据化学成分的药动学参数 (吸收、分布、代谢及排泄, ADME) 对其进行活性成分筛选, 筛选条件为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 。通过筛选共获得 7 个潜在的活性成分, 具体信息见表 1。

2.1.2 活性成分 SMILE 结构式的查询 针对所筛选益母草活性成分, 在 Pubchem (<https://pubchem>).

ncbi.nlm.nih.gov/) 数据库中以前所收集活性成分的 Pubchem Cid 为检索条件, 检索并收集每个活性成分的 Canonical SMILES 结构式。

2.1.3 活性成分靶点预测 采用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 服务器^[10], 依次上传益母草活性成分 Canonical SMILES 结构式, 选择物种为 Homo sapiens, 点击 Predict targets, 即可基于已知配体的二维和三维相似性度量精确预测益母草活性分子的靶点, 获取与益母草活性成分相关的靶点蛋白。

2.1.4 痛经疾病靶点的获取 在 TTD (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu/home>) 数据库中, 以 “dysmenorrhea、primary dysmenorrhea” 为检索词, 收集与痛经相关的疾病靶点, 删除重复的靶点, 并与预测所得的活性成分靶点进行对比, 筛选出益母草治疗原发性痛经的潜在靶点。

2.1.5 蛋白互作网络 (PIN) 的构建与筛选 蛋白互作 (PPI) 是机体细胞功能的基础, 对调节机体生理、病理状态具有重要作用。PIN 是由 PPI 信息构建的网络, 常以网络节点代表蛋白质、以网络连接线代表 PPI, 以节点大小、颜色, 连线长度、粗细代表节点网络的拓扑参数^[11]。为了进一步了解益母草靶点和疾病靶点在蛋白水平上协同的作用机制, 将映射得到的靶点蛋白通过 STRING 10.5 (<https://string-db.org>) 获取 PPI 关系。

2.1.6 GO 和 KEGG 富集分析 将获得的益母草治疗痛经的潜在作用靶点通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, DAVID 6.8 Oct.2016) 输入靶基因名称列表并限定物种为人, 设定阈值 $P < 0.05$, 对益母草治疗痛经潜在活性成分靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 筛选出益母草治疗痛经的重要信号通路。

2.1.7 “活性成分-靶点-通路” 网络模型构建与分析 采用 cytoscape 3.6.0 软件构建益母草治疗痛经的 “活性成分-靶点-通路” 网络模型, 网络包括活性成分、靶点或作用通路 3 类节点 (node), 并以边 (edge) 相连, 通过构建网络模型研究益母草治疗痛经多成分、多靶点、多通路的作用机制。

2.2 Western blotting 实验验证

2.2.1 模型建立、分组及给药 雌性 Wistar 大鼠 30 只随机分为对照组、模型组、益母草颗粒组, 复制

寒凝血瘀痛经模型^[12-13], 造模第 3 天益母草颗粒组大鼠 ig 益母草颗粒溶液 (5 g/kg, 相当于临床用量 10 倍), 对照组、模型组大鼠给予等量蒸馏水, 连续 11 d, 各组大鼠于末次给药后, ip 缩宫素 (20 U/kg), 观察大鼠扭体潜伏时间及 30 min 内扭体反应次数, 实验结束后, 取大鼠子宫, 置 -80 °C 冰箱冻存。

2.2.2 Western blotting 法检测花生四烯酸代谢通路 PTGS1、PTGS2 蛋白的表达 将少量子宫组织置于 2 mL EP 管中, 加入清洗干净的钢珠, 加 200 μ L 单去污剂裂解液裂 (含 2 μ L PMSF、2 μ L 磷酸酶抑制剂), 置于自动匀浆机中匀浆, 冰上裂解 30 min, 而后于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 并用 BCA 法蛋白定量。制备蛋白上样样品, 取蛋白样品 40 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (0.3% Tris、0.8% NaCl、0.01% 聚山梨酯-20、pH 7.4) 封闭 2 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:50 000), 37 °C 摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, ECL 化学发光显色, 采用 IPP 软件对相关蛋白表达进行分析。

2.2.3 数据分析 实验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所得数据作方差齐性检验后作 t 检验。

3 结果

3.1 益母草活性成分筛选

通过 TCMSP 数据库检索到益母草已报道的化学成分共 58 种, 以 ADME 参数 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 筛选后得到益母草活性成分 8 种。筛选所得活性成分具体信息见表 1。通过 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库收集益母草活性成分的 Canonical SMILES 结构式。因查询不到 MOL001422 (*iso-preleoheterin*) PubChem Cid, 未能找到其 Canonical SMILE, 故在接下来实验中不予讨论。

3.2 靶点预测与筛选

通过 Swiss Target Predaction 对益母草筛选所得活性成分进行靶点预测, 其中 7 种成分均与痛经有关, 将预测靶点与 TTD、DrugBank、DisGeNET 数据库所获得与痛经疾病相关的靶点进行映射, 筛选得到益母草治疗痛经的潜在靶点 22 个, 具体靶点信息见表 2。

3.3 PIN 的构建与筛选

将 “3.2” 项得到的 22 个交集基因带入 STRING

表 1 益母草筛选所得活性成分具体信息

Table 1 Information on active ingredients of *L. japonicus*

MOL_ID	化合物	OB/%	DL	PubChem_Cid
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.27	5280343
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31	5281654
MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24	5280863
MOL001418	鼬瓣花二萜 (galeopsin)	61.01	0.37	92966417
MOL001420	zinc04073977	37.99	0.75	9801811
MOL001421	前益母草乙素 (preleoheterin)	85.97	0.33	15726752
MOL001422	iso-preleoheterin	66.28	0.33	—
MOL001439	花生四烯酸 (arachidonic acid)	45.57	0.20	444899

表 2 益母草治疗痛经相关靶点信息

Table 2 Information on target of *L. japonicus* for dysmenorrhea

编号	基因	蛋白	Uniprot	类型
1	AR	雄激素受体	P10275	target
2	ESR1	雌激素受体	P03372	target
3	PPARA	过氧化物酶体增殖激活受体 α	Q07869	target
4	CA2	碳酸酐酶-2	P00918	target
5	PTGS2	前列腺素 G/H 合酶 2	P35354	target
6	CHRM5	毒蕈碱乙酰胆碱受体 M5 受体	P08912	target
7	ALOX5	花生四烯酸 5 脂氧合酶	P09917	target
8	PTGS1	前列腺素 G/H 合酶 1	P23219	target
9	PGR	孕激素受体	P06401	target
10	ABCG2	三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2	Q9UNQ0	transporter
11	CYP2C9	细胞色素 P450 2 C9	P11712	enzyme
12	ABCC1	多药耐药相关蛋白 1	P33527	target
13	CYP1A2	细胞色素 P4501A2	P05177	enzyme
14	CA3	碳酸酐酶-3	P07451	target
15	AVPR2	血管加压素 V2 受体	P30518	target
16	AVPR1A	血管加压素 V1A 受体	P37288	target
17	PLA2G2A	磷脂酶 A2	P14555	enzyme
18	CXCR1	CXC 趋化因子 1 型受体	P25024	target
19	AKR1C3	醛酮还原酶家族 1 成员 C3	P42330	target
20	TTR	甲状腺素运载蛋白	P02766	carrier
21	FABP2	肠道脂肪酸结合蛋白	P12104	target
22	PPARG	过氧化物酶体增殖激活受体 γ	P37231	target

进行分析, PIN (图 1) 包含 22 个节点, 44 条边, 其中节点表示蛋白, 每条边则表示 PPI 关系, 其中平均介度值 (degree) 为 3.82。

3.4 GO 和 KEGG 富集分析

对益母草治疗痛经的 22 个潜在靶点通过 DAVID 数据库进行 GO 富集, 共得到 GO 条目 71

个 ($P < 0.05$), 其中生物过程 (BP) 条目 46 个, 细胞组成 (CC) 条目 4 个, 分子功能 (MF) 条目 21 个, 生物过程、细胞成分和分子功能分别占 61%、11% 和 28%, 见图 2。22 个靶点主要集中于细胞质膜上, 涉及前列腺素生物合成过程的正向调控、雌激素反应、血压调节、RNA 聚合酶 II 启动子的转

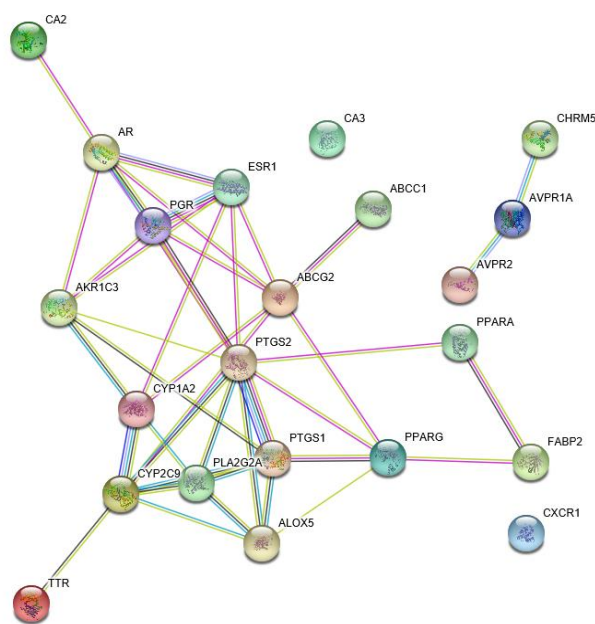


图 1 益母草靶点和疾病靶点的 PIN

Fig. 1 PIN of *L. japonicus* target and disease target

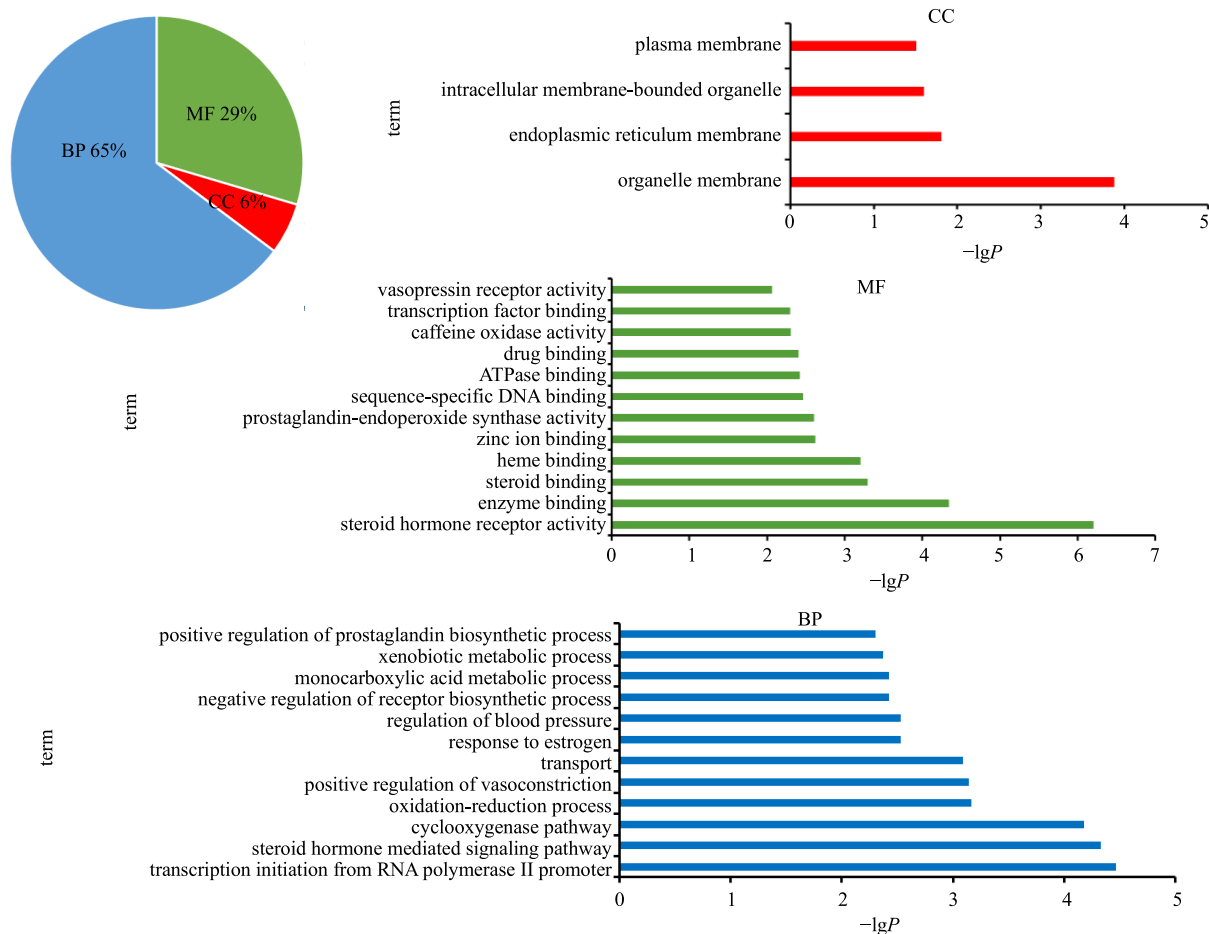


图 2 益母草靶标的 GO 富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis of *L. japonicus* target

录起始及类固醇激素介导的信号通路等生物学过程，发挥调节类固醇激素受体活性、酶结合、类固醇结合、前列腺素过氧化物合酶活性 2、加压素受体活性等功能作用。

KEGG 通路富集筛选得到 7 条信号通路 ($P < 0.05$)，涉及花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、血清素突触、卵巢类固醇生成、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、化学致癌作用、氮代谢 7 条信号通路，见表 3。

3.5 “活性成分-靶点-通路”网络模型构建与分析

采用 Cytoscape 3.6.0 软件建立“益母草活性成分-疾病靶点-代谢通路”网络模型，如图 3 所示，共有 36 个节点 (7 个活性成分节点、22 个靶点节点及 7 个通路节点)。采用 Network Aanalyzer 插件对网络的拓扑参数进行分析，平均相邻节点数 (average number of neighbors) 为 4.278，网络异质性 (network heterogeneity) 为 0.579，网络密度 (network density)

表 3 相关通路信息

Table 3 Information of related pathways

编号	通路	靶点数	P 值
1	花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)	6	6.49×10^{-7}
2	亚油酸代谢 (linoleic acid metabolism)	3	3.11×10^{-3}
3	血清素突触 (serotonergic synapse)	4	3.81×10^{-3}
4	卵巢类固醇生成 (ovarian steroidogenesis)	3	8.70×10^{-3}
5	PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)	3	0.015 8
6	化学致癌作用 (chemical carcinogenesis)	3	0.022 1
7	氮代谢 (nitrogen metabolism)	2	0.048 3

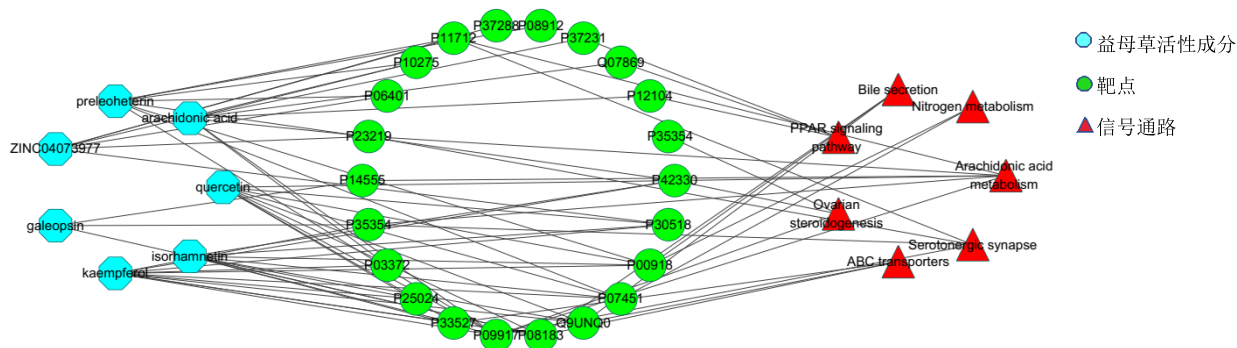


图 3 活性成分-靶点-通路网络

Fig. 3 Active ingredient-target-pathway network of *L. japonicus*

为 0.122, 网络中心度 (network centralization) 为 0.203。活性成分、靶点、通路 3 者存在复杂的网络关系, 活性成分通过不同的蛋白靶点在不同的代谢通路中发挥作用, 相互协调, 符合中药作用的“多成分-多靶点-多通路”特性。从化合物的角度, 槲皮素、异鼠李素、山柰酚、鼬瓣花二萜、ZINC04073977、前益母草乙素、花生四烯酸的介数 (betweenness) 中心性值分别为 9、9、11、3、6、8、7; 从靶点的角度, 度值排名前 5 位的依次为 ALOX5、AKR1C3、CA2、ABCB1、CA3。从信号通路的角度, 花生四烯酸代谢信号通路显著性最小, 提示益母草可能通过花生四烯酸代谢起到治疗寒凝血瘀型痛经的作用。花生四烯酸代谢通路中涉及 6 种蛋白, 分别为 PTGS1、PTGS2、ALOX5、PLAG2A、AKR1C3、CYP2C9。

3.6 益母草对寒凝血瘀型痛经模型大鼠扭体反应的影响

寒凝血瘀型痛经模型大鼠扭体次数及潜伏期结果见表 4。与对照组比较, 在 sc 苯甲酸雌二醇、ip 缩宫素后, 模型组大鼠扭体潜伏期显著缩短, 扭体次数显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 益母草

表 4 益母草对寒凝血瘀型痛经模型大鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effect of *L. japonicus* on writhing response of rats with dysmenorrhea caused by cold coagulation and blood stasis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	潜伏期/s	扭体次数
对照	—	0	0
模型	—	294.50 ± 43.01 ^{##}	40.11 ± 16.12 ^{##}
益母草	5.00	374.50 ± 85.38 [*]	19.75 ± 13.69 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

可以显著延长大鼠的扭体潜伏期, 减少其扭体次数 ($P < 0.05$), 表明益母草对寒凝血瘀型痛经大鼠模型扭体反应改善作用明显, 对疼痛症状具有缓解作用。

3.7 益母草对花生四烯酸代谢通路 PTGS1、PTGS2 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠子宫中 PTGS1、PTGS2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 经益母草干预后 PTGS1、PTGS2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

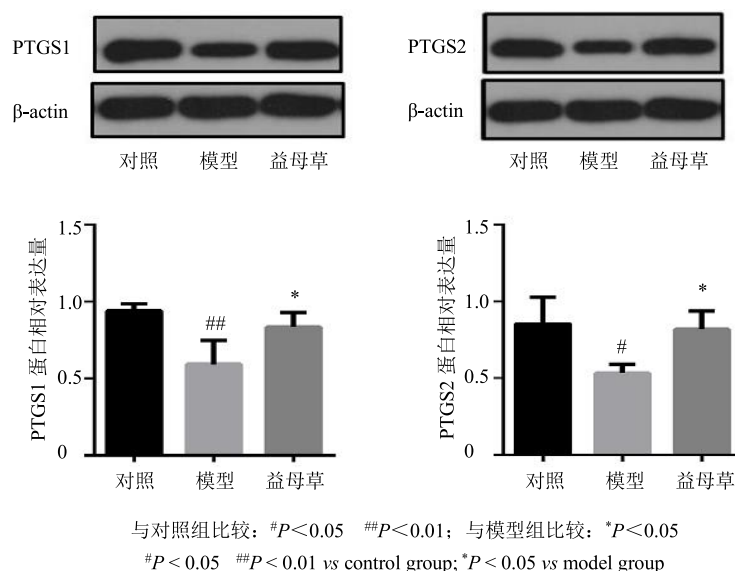


图 4 益母草颗粒对模型大鼠子宫 PTGS1、PTGS2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of *L. japonicus* granule on PTGS1 and PTGS2 protein expression in rat uterus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中药及复方因其具由多成分、多靶点、多途径协同作用及作用机制不明确等特点, 影响其进一步深入研究。而网络药理学是基于药物之间的构效相似性, 考虑体内生物分子及靶标的相互作用关系, 通过构建“药物成分-靶点”“疾病-靶标”和“成分-靶点-信号通路”网络, 能有效预测药物的功效或产生特定功效对应的机制, 是目前复方中药研究的新方法^[14], 网络药理学为中药及复方作用机制的研究提供了新思路, 实现了对中药及复方作用机制整体化、系统化研究, 也为中药复方安全性评价及新药的开发奠定了基础^[15]。

本研究通过 TCMSP 数据库, 搜集并整理益母草化学成分, 通过“ADME 原则”筛选出潜在的活性成分, 采用 Swiss Target Prediction 服务器对潜在活性成分的靶点进行预测, 并与痛经相关疾病靶点进行比对分析, 获得益母草治疗痛经的 22 个潜在靶点, 通过构建“成分-靶点-信号通路”的网络及 KEGG 通路富集分析, 确定了包括花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、血清素突触、卵巢类固醇生成、PPAR 信号通路、化学致癌作用、氮代谢 7 条信号通路。其中, 花生四烯酸代谢信号通路的显著性最高, 提示益母草可能通过该信号通路发挥治疗寒凝血瘀痛经的作用。其中花生四烯酸信号通路涉及的靶点有 PTGS1、PTGS2、ALOX5、PLA2G4A、AKR1C3、CYP2C9。

PTGS 又叫环氧化酶 (COX), 是生物体内前列腺素 (PG) 合成起始步骤的关键酶, 是生物活性脂类调节物包括前列腺素、血栓烷素和前列环素等各家族的前体^[16]。PTGS 可以发挥 2 种作用, 一是环氧化酶作用, 将花生四烯酸 (AA) 环氧化产生前列腺素 G2 (PGG2); 二是过氧化物酶作用, 将 PGG2 还原为前列腺素 H2 (PGH2)。PGH2 在各种特异性合成酶的作用下产生前列腺素 D2 (PGD2)、前列腺素 E2 (PGE2)、前列腺素 F2 α (PGF2 α) 等类花生四烯酸类物质^[17]。PTGS 的代谢产物 PGF2 α 、PGE2 目前研究较多, 且现代研究表明^[18-20], PD 与子宫内膜 PG 增多有关, PG 增多是 PD 的主要发病机制。PGF2 α 可促进子宫平滑肌和螺旋动脉收缩, PGE2 则减缓子宫平滑肌的自发活动从而抑制子宫收缩, PGF2 α /PGE2 异常引起子宫平滑肌痉挛性收缩是 PD 发生的主要病理生理机制^[21]。因此, 花生四烯酸信号通路为 PD 治疗的关键信号通路。本研究通过制备寒凝血瘀型痛经大鼠模型, 选用益母草颗粒进行干预, 选取花生四烯酸信号通路, 对子宫匀浆中关键靶点 PTGS1、PTGS2 的蛋白表达进行测定。研究结果表明, 益母草可使寒凝血瘀型痛经模型大鼠子宫中 PTGS1、PTGS2 蛋白表达水平升高。

本研究应用网络药理学方法, 对益母草的多成分-多靶点与 PD 之间复杂网络关系进行研究, 并初步验证了益母草治疗寒凝血瘀型痛经的基本药理学作用和相关机制, 然而益母草治疗寒凝血瘀痛经的

具体作用机制仍需大量的体内外实验进行阐明,本研究旨在为进一步深入探讨其作用机制奠定基础。

参考文献

- [1] Harel Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: Etiology and management [J]. *J Pediatr Adol Gynec*, 2007, 19(6): 363-371.
- [2] Proctor M, Farquhar C. Diagnosis and management of dysmenorrhoea [J]. *Brit Med J*, 2006, 332(7550): 1134.
- [3] Ylikorkala O, Dawood M Y. New concepts in dysmenorrhea [J]. *Am J Obstetr Gynecol*, 1978, 130(7): 833-847.
- [4] 孙 兰, 李家春, 王振中. 中药防治原发性痛经机制研究进展 [J]. 中医药信息, 2019, 36(4): 109-112.
- [5] 乔晶晶, 吴啟南, 薛 敏, 等. 益母草化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5691-5704.
- [6] 李明杰. 四逆汤治疗寒凝血瘀型痛经的药效作用及机制研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
- [7] Hopkins A L. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.
- [8] 解 静, 高 杉, 李 琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [9] Zhu B C, Zhang W T, Lu Y, et al. Network pharmacology based identification of protective mechanism of *Panax notoginseng* saponins on aspirin induced gastrointestinal injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 159-166.
- [10] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminformatics*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [11] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. Swiss Target Prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucl Acid Res*, 2014, doi: 10.1093/nar/gku293.
- [12] 刘志强, 王博龙. 中药网络药理学研究: 蛋白互作网络构建与功能注释 [J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2018, 35(3): 49-52.
- [13] 痛经动物模型制备规范(草案) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 20-24.
- [14] 许咏思, 嵇 波, 胡琅琳, 等. 寒凝血瘀证痛经大鼠模型制备和评价方法述评 [J]. 中医药学报, 2013, 41(4): 25-30.
- [15] 张彦琼, 李 梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [16] Zhang Y Q, Mao X, Guo Q Y, et al. Network pharmacology-based approaches capture essence of Chinese herbal medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 107-116.
- [17] 王训翠, 储明星, 陈宏权. 前列腺素内过氧化物合酶 2 基因的研究进展 [J]. 生命科学, 2004, 16(1): 31-34.
- [18] Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(5): 379-385.
- [19] Bernardi M, Lazzeri L, Perelli F, et al. Dysmenorrhea and related disorders [J]. *F1000Res*, 2017, doi: 10.12688/f1000research.11682.1.
- [20] 张 恺, 李娜娜, 李 嵩, 等. 元胡止痛口服液对原发性痛经的镇痛作用及机制研究 [J]. 天津中医药, 2019, 36(10): 1006-1011.
- [21] 张 斌, 杜冠华. NSAIDs 抗炎作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(8): 905-910.
- [22] 杜美容, 杜宝俊, 王雪超, 等. 隔姜灸配合中药离子导入治疗原发性痛经疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(9): 1241-1244.