

基于网络药理学及实验验证探讨萆薢止带方治疗外阴阴道假丝酵母菌病的作用机制

陈志霞^{1,2,3}, 陈思琪¹, 冯淑仪^{1,2,3}

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120

2. 广东省中医院, 广东 广州 510120

3. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 采用网络药理学方法探究萆薢止带方治疗外阴阴道假丝酵母菌病 (vulvovaginal candidiasis, VVC) 的作用机制, 并进行体内实验验证。 **方法** 运用 TCMSID 数据库获取萆薢止带方中活性成分, 并预测药物作用靶点; 运用 GEO、MelaCards 和 CTD 数据库获取 VVC 疾病基因, 将萆薢止带方作用靶点与 VVC 疾病相关基因取交集。运用 STRING 在线工具构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 使用 Cytoscape 软件进行可视化处理; 使用 WebGestalt 工具进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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; 运用 MCODE 插件筛选关键基因, 运用 CB-DOCK2 对关键靶点和成分进行分子对接。采用雌激素注射联合阴道接种白色念珠菌法制备 VVC 小鼠模型, 给予萆薢止带方干预后, 对阴道灌洗液进行涂片染色, 观察阴道真菌载量; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察阴道组织病理观变化; 采用免疫组化法检测阴道组织雄激素受体 (androgen receptor, AR) 表达。 **结果** 萆薢止带方与 VVC 疾病的共有靶点共 43 个, 涉及代谢、炎症调节、激素等相关生物过程, 富集于氮代谢、雌激素信号传导通路、卵巢类固醇生成、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、内分泌抵抗等信号转导通路。共有靶点网络的核心基因为 AR、基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP1)、聚二磷酸腺苷-核糖聚合酶 1 [poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1, PARP1] 和一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3), 核心子网络共 3 个, 均与多种卵巢类固醇激素相关蛋白及其合成代谢、细胞炎症调控等密切相关。动物实验结果显示, 萆薢止带方能够有效降低 VVC 小鼠阴道灌洗液中真菌载量, 改善阴道黏膜病理, 并下调阴道组织 AR 表达 ($P < 0.001$)。 **结论** 萆薢止带方治疗 VVC 的机制是多靶点、多通路的复杂过程, 其机制可能与调节氮代谢、雌激素和缺氧等通路密切相关, 核心靶点可能是 AR。

关键词: 萆薢止带方; 外阴阴道假丝酵母菌病; 网络药理学; 雄激素受体; 落新妇苷; 京尼平苷酸; 毛蕊花糖苷; 23-乙酰泽泻醇 B; 23-乙酰泽泻醇 C; 芍药苷; 白术内酯 I; 白术内酯 II; 白术内酯 III; 绿原酸; 槲皮苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)20-6995-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.016

Mechanism of Biling Zhidai Decoction on vulvovaginal candidiasis based on network pharmacology and experimental verification

CHEN Zhixia^{1,2,3}, CHEN Siqi¹, FENG Shuyi^{1,2,3}

1. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Biling Zhidai Decoction (萆薢止带方) on treating vulvovaginal candidiasis (VVC) using network pharmacology method, and perform *in vivo* experiments for verification. **Methods** The effective components

收稿日期: 2024-07-15

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2023A1515220004); 广东省科技计划项目 (2023B1212060063); 广州市科技计划项目 (2024A03J0119); 国家中医药管理局——黄健玲全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2022]75 号); 广东省中医药局科研项目 (20232058)

作者简介: 陈志霞, 女, 主任医师, 硕士生导师, 广州中医药大学同等学力申请博士人员, 从事中医药治疗女性生殖道感染性疾病研究。

E-mail: chenxz116@163.com

of Biling Zhidai Decoction were obtained from TCMSID database and targets were predicted; VVC disease genes were acquired from GEO, MelaCards and CTD databases, and the targets of Biling Zhidai Decoction with VVC disease-related genes were intersected. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed using STRING online tool and visualized using Cytoscape software; Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using WebGestalt tool; MCODE plugin was used to screen core targets, CB-DOCK2 was applied for molecular docking between core targets and components. A VVC mouse model was prepared by combining estrogen injection with vaginal inoculation of *Candida albicans*. After intervention with Biling Zhidai Decoction, the vaginal lavage fluid was stained and the vaginal fungal load was observed; Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in vaginal tissue; Immunohistochemistry was used to detect the expression of androgen receptor (AR) in vaginal tissue. **Results** There were 43 common targets shared with Biling Zhidai Decoction and VVC disease, involving metabolism, inflammation regulation, hormones and other biological processes, enriching in nitrogen metabolism, estrogen signaling pathway, ovarian steroidogenesis, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, endocrine resistance and other signaling pathways. The core genes in the common target network were androgen receptor (AR), matrix metalloproteinase 1 (MMP1), poly(adenosine diphosphate-ribose)polymerase 1 (PARP1) and nitric oxide synthase 3 (NOS3), with three core sub-networks, all closely related to various ovarian steroid hormones and synthesis metabolism, cell inflammation regulation. Animal experiment results showed that Biling Zhidai Decoction could effectively reduce the fungal load in vaginal lavage fluid of VCC mice, improve vaginal mucosal pathology, and down-regulate AR expression in vaginal tissue ($P < 0.001$). **Conclusion** The mechanism of Biling Zhidai Decoction in treating VVC is a complex process involving multiple targets and pathways, which may be closely related to the regulation of nitrogen metabolism, estrogen and hypoxia pathways, and the core target may be AR.

Key words: Biling Zhidai Decoction; vulvovaginal candidiasis; network pharmacology; androgen receptor; astilbin; geniposidic acid; acteoside; 23-*O*-acetylalisol B; 23-*O*-acetylalisol C; paeoniflorin; atractylenolide I; atractylenolide II; atractylenolide III; chlorogenic acid; quercetin

外阴阴道假丝酵母菌病 (vulvovaginal candidiasis, VVC) 是育龄期女性的常见病和多发病, 其主要临床表现包括外阴瘙痒、阴道灼热痛、性交困难、排尿痛和阴道分泌物异常等。VVC 的病源体主要是白假丝酵母菌, 少部分病例由光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌等引起^[1]。VVC 的发病率高且易复发, 据统计, 约 75% 的女性一生中至少会发生 1 次 VVC, 40%~45% 的女性会经历 2 次及以上的发病^[2]。目前, 临床上主要采用唑类抗真菌药物治疗 VVC, 但由于其耐药性、微生态失调及二重感染等问题, 治疗后容易反复发作, 严重影响女性的身心健康, 是妇科亟需解决的临床难题。

VVC 在古代文献中没有明确的记载, 但中医根据其临床症状和体征, 将其归于“带下病”“阴痒”等范畴。多数学者认为其病因病机涉及湿、热、虫、毒, 其中以湿邪为该病总病因。湿邪伤及任带二脉, 使任脉不固, 带脉失约。中医药治疗妇科疑难疾病, 尤其是带下病包括 VVC 的诊治经验独到, 具有深度研发及未来转化的优势。中医认为, VVC 的中医病机特点为正虚邪实, 湿邪贯穿始终, 湿邪为主因, 本虚为根本, 脾虚湿盛证为最常见证型。故治疗上应以健脾化湿、扶正祛邪为法, 据此创立的萆薢止

带方已在临床广泛应用于治疗女性生殖器官炎症疾病 30 余载, 疗效确切^[3]。方中山药、白术补肾固带、健脾益气化湿, 泽泻、土茯苓、川萆薢、车前子可利水渗湿, 白芍柔肝理气养阴, 鱼腥草可清热利湿消肿, 诸药合用, 共奏健脾化湿止带之功。课题组前期开展的随机对照临床试验发现, 萆薢止带方可提高 VVC 患者真菌转阴率, 显著改善患者临床症状和舒适度^[4]。

然而, 萆薢止带方治疗 VVC 的分子机制尚不清楚。由于该复方成分复杂、作用靶点多, 仅依靠传统药理学研究方法难以有效阐明其具体机制。网络药理学作为一种新兴的中药复方研究方法, 通过构建“药物-成分-靶点”网络, 运用网络拓扑学方法发现网络核心, 能够对中药复方复杂的作用机制进行整体研究^[5]。此外, 网络药理学还可以更有助于发现脾虚湿蕴型 VVC 的核心基因, 为揭示中医证候和疾病的现代机制提供参考。因此, 本研究采用网络药理学技术探讨萆薢止带方治疗 VVC 的作用机制, 并进行实验验证。

1 材料

1.1 动物和菌株

50 只 SPF 级雌性未孕 C57BL/6J 小鼠, 42~56 日龄, 由广东至远生物医药科技有限公司提供, 动

物生产许可证号 SVXK (粤) 2023-0318。动物于恒温、恒湿的清洁环境中喂养,光照 12 h 明暗交替。动物实验经广东省中医院动物伦理委员会批准 (批准号 2023018)。

白色念珠菌由广东省中医院检验科提供。

1.2 药材

萆薢止带方由川萆薢 10 g、泽泻 10 g、山药 20 g、土茯苓 20 g、白术 10 g、白芍 10 g、车前子 10 g 及鱼腥草 15 g 组成,以上药材饮片均购自康美药业股份有限公司,经广东省中医院药剂科陈燕芬主任中药师鉴定分别为薯蓣科植物粉背薯蓣 *Dioscorea hypoglauca* Palibin 的干燥根茎、泽泻科植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎、薯蓣科植物薯蓣 *D. opposita* Thunb. 的干燥根茎、百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥成熟种子、三白草科植物戴菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的干燥地上部分。

1.3 药品与试剂

落新妇苷对照品 (批号 DL0054, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都德思特生物技术有限公司; 对照品京尼平苷酸 (批号 G917401, 质量分数为 99%)、23-乙酰泽泻醇 B (批号 B823470, 质量分数 $\geq 98\%$)、23-乙酰泽泻醇 C (批号 A879909, 质量分数为 98%)、白术内酯 I (批号 A860603, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 对照品毛蕊花糖苷 (批号 wkq20042004, 质量分数 $\geq 98\%$)、白术内酯 II (批号 wkq20051503, 质量分数 $\geq 98\%$)、白术内酯 III (批号 wkq20051104, 质量分数 $\geq 98\%$)、绿原酸 (批号 wkq21040904, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品芍药苷 (批号 MUST-18032901, 质量分数为 99.3%)、槲皮苷 (批号 MUST-16051605, 质量分数为 99.81%) 购自成都曼思特生物技术有限公司; 氟康唑片 (国药准字 H20094047, 批号 H1078) 购自四川科伦药业股份有限公司; 雄激素受体 (androgen receptor, AR) 单克隆抗兔抗体 (批号 GCP32) 购自 Bioworld 公司; 免疫显色试剂盒 (含酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物、DAB 显色剂和显色缓冲液 (批号 GK5007) 购自基因科技 (上海) 股份有限公司; 快速革兰氏染色液 (批号 DM0013) 购自北京雷根生物技术有限

公司。

1.4 仪器

Triple QUADTM 5500 型液-质联用系统 (美国 SCIEX 公司); HP300 型全自动组织脱水机 (深圳达科为生物技术股份有限公司); ST5020+CV5030+TS5025 型全自动染色封片一体化工作站 (德国 Leica 公司); BX53+DP72 型正置成像显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 “成分-靶点”网络的构建 萆薢止带方由川萆薢、泽泻、山药、土茯苓、白术、白芍、车前子及鱼腥草 8 味中药组成。通过 TCMSID 数据库 (<https://tcm.scbdd.com/>)^[6] 获取萆薢止带方中各中药的化学成分, 根据化学成分的吸收、分布、代谢、排泄 (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) 参数, 筛选出口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且具有可成药性的成分。

通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中 VVC 的表达谱测序数据集 (GSE67688、GSE207081)、CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) 和 MelaCards 数据库 (<https://www.malacards.org/>) 获取疾病相关靶点。对于 GEO 数据库中的 VVC 表达谱数据, 使用 GEOExplorer 在线工具 (<https://geoexplorer.rosalind.kcl.ac.uk/>) 进行差异基因表达分析, $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) > 1 且 $P < 0.05$ 的基因被纳入; 对于 CTD 数据库, 按有直接研究证据或者推断得分 (基于本文挖掘方法) ≥ 5 进行筛选; MelaCards 数据库中的 VVC 相关基因被全部纳入。

通过 metaTarFisher 预测化合物作用的人源性靶点, 该方法综合 SwissTargetPrediction、SEA、ChEMBL、Polypharmacology Browser 1/2 等工具的结果, 具有较高的准确性。根据 Ji 等^[7]方法, 采用集成学习策略, 同时被 SwissTarget 和 SEA 算法预测的靶点具有最高的准确性和最低的假阳性率, 被纳入后续分析。将萆薢止带方作用靶点与 VVC 疾病相关基因取交集, 构建“成分-靶点”网络。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将萆薢止带方作用靶点和 VVC 疾病相关基因靶点取交集获得共有靶点, 将共有靶点输入 STRING 11.5 在线数据库

(<https://string-db.org/>), 以 combined score > 0.7 为筛选标准获得 PPI 数据, 导入 Cytoscape 3.10.1 软件构建 PPI 网络。

2.1.3 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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 使用 WebGestalt 工具 (<https://www.webgestalt.org/>) [8] 进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析。将共有靶点输入工具执行富集计算, $P < 0.05$ 的 GO 条目或信号通路被认为是显著富集, 剔除与研究疾病完全无关的信号通路。

2.1.4 网络核心靶点的筛选 使用 MCODE 插件对共有靶点 PPI 网络进行网络拓扑分析, 筛选核心靶点。MCODE 插件按照靶点蛋白在网络中的重要性计算出重要性评分, 用于衡量靶点蛋白在网络中的重要性, 并且通过聚类算法输出核心子网络。

2.1.5 分子对接验证 对核心靶点前 5 位的基因进行分子对接验证。使用基于 Autodock Vina 内核的在线分子对接工具 CB-Dock2 (<http://clab.labshare.cn/cb-dock2/>) [9], 对核心靶点和作用于这些靶点的成分进行分子对接。从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 获取靶点蛋白的三维结构, 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载萆薢止带方中化学成分的结构 (sdf 格式)。用 Vina 对接分数衡量靶点蛋白与化学分子的结合能力。

2.2 实验验证

2.2.1 萆薢止带方的制备及成分分析 按配方比例取萆薢止带方中饮片, 加 10 倍量的水, 以蒸汽加热方式进行煎煮处理, 共煎煮 3 次, 每次 1 h。收集 3 次煎煮液, 置于旋转蒸发器中浓缩直至得到稠厚的药液。加入适量乙醇进行脱杂处理, 采用低压蒸发的方式去除乙醇, 获得浸膏。

采用 LC/MS/MS 测定萆薢止带方浓缩液中 11 种主要成分的含量, 结果显示, 萆薢止带方含落新妇苷 1 724.5 $\mu\text{g/g}$ 、京尼平苷酸 1 742.0 $\mu\text{g/g}$ 、毛蕊花糖苷 655.4 $\mu\text{g/g}$ 、23-乙酰泽泻醇 B 17.1 $\mu\text{g/g}$ 、23-乙酰泽泻醇 C 14.0 $\mu\text{g/g}$ 、芍药苷 3 924.3 $\mu\text{g/g}$ 、白术内酯 I 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、白术内酯 II 2.2 $\mu\text{g/g}$ 、白术内酯 III 24.9 $\mu\text{g/g}$ 、绿原酸 130.5 $\mu\text{g/g}$ 、槲皮苷 557.2 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2.2 动物分组、造模及给药 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组、模型组及萆薢止带方低、高剂量 (21.58、43.16 g/kg) 组和氟康唑 (600 mg/kg) 组, 每组 10 只。采用雌激素注射联合阴道接种白色念

珠菌法制备 VVC 小鼠模型。除空白组外, 其余小鼠 sc 苯甲酸雌二醇 (10 mL/kg), 每 2 天注射 1 次, 同时连续 7 d 阴道接种白色念珠菌 (1×10^8 CFU/mL, 20 μL /只), 第 7 天取阴道灌洗液涂片进行革兰氏染色, 空白组未见真菌孢子和菌丝, 造模小鼠阴道灌洗液可见大量真菌孢子和伸长的菌丝, 表明 VVC 模型制备成功。造模成功后, 萆薢止带方组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 空白组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d; 氟康唑组仅于第 1 天给药 1 次。给药结束后, 次日安乐死小鼠。

2.2.3 阴道灌洗液涂片染色观察 用移液枪取 20 μL 生理盐水, 反复吹打 2~3 次阴道, 得到白色浑浊的阴道灌洗液。以 1 mL 生理盐水稀释, 吹打混匀, 取少量稀释液涂片, 革兰染色后于显微镜下观察并拍照。

2.2.4 阴道组织病理变化观察 取各组小鼠阴道组织, 用 10% 福尔马林固定 24 h, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋后将组织切成 4 μm 厚的切片, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。用中性树脂密封, 于显微镜下观察并拍照。

2.2.5 免疫组化检测阴道组织 AR 表达 对核心靶点重要性排名第 1 的基因进行免疫组化验证。取各组小鼠阴道组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 随后常规进行石蜡包埋、切片、脱蜡。滴加 AR 抗体 (1: 200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 次日孵育二抗, HE 反染后脱水封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.2.6 统计学分析 采用 Prism 10 软件进行数据分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于符合正态分布的数据, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较各组之间的差异, 随后使用 Dunnett's 多重比较检验分析组间差异。

3 结果

3.1 萆薢止带方成分筛选及靶点获取

TCMSID 数据库共获得萆薢止带方化学成分 610 个, 其中白芍 216 个、山药 126 个、白术 122 个、车前子 64 个、土茯苓 54 个、鱼腥草 50 个、泽泻 49 个、川草薢 48 个。以 $\text{OB} \geq 30\%$ 且具有可成药性为标准筛选并去重后, 共获得化学成分 232 个, 分别对应 148 个人源药物靶点。

3.2 萆薢止带方治疗 VVC 靶点获取与网络构建

通过检索 CTD 和 GeneCards 数据库, 并按照“有直接证据”或推断得分 ≥ 5 进行筛选, 共获得 VVC 相关靶点基因 1 357 个。将 VVC 相关靶点基

因与萆薢止带方作用靶点取交集，获得共有靶点 43 个（图 1）。将 43 个共有靶点输入 STRING 数据库构建 PPI 网络，合并“药物-成分”和“成分-靶点”关系，导入 Cytoscape 3.10.1 软件，构建“药物-成分-靶点”网络（图 2）。

3.3 GO 功能富集分析

将 43 个共有靶点输入 WebGestalt 进行 GO 信号通路富集分析。GO 条目主要包括生物过程、细胞成分和分子功能 3 部分，如图 3 所示，富集的生物过程主要与代谢、炎症调节、激素等因素有关，包括对类固醇代谢过程、甾醇代谢过程、神经递质代谢过程、小分子代谢过程的调控、调节炎症反应、

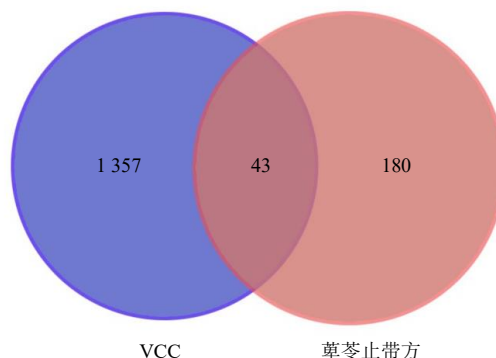


图 1 萆薢止带方与 VCC 共有靶点 Venn 图
Fig. 1 Venn diagram of shared targets of Biling Zhidai Decoction and VCC

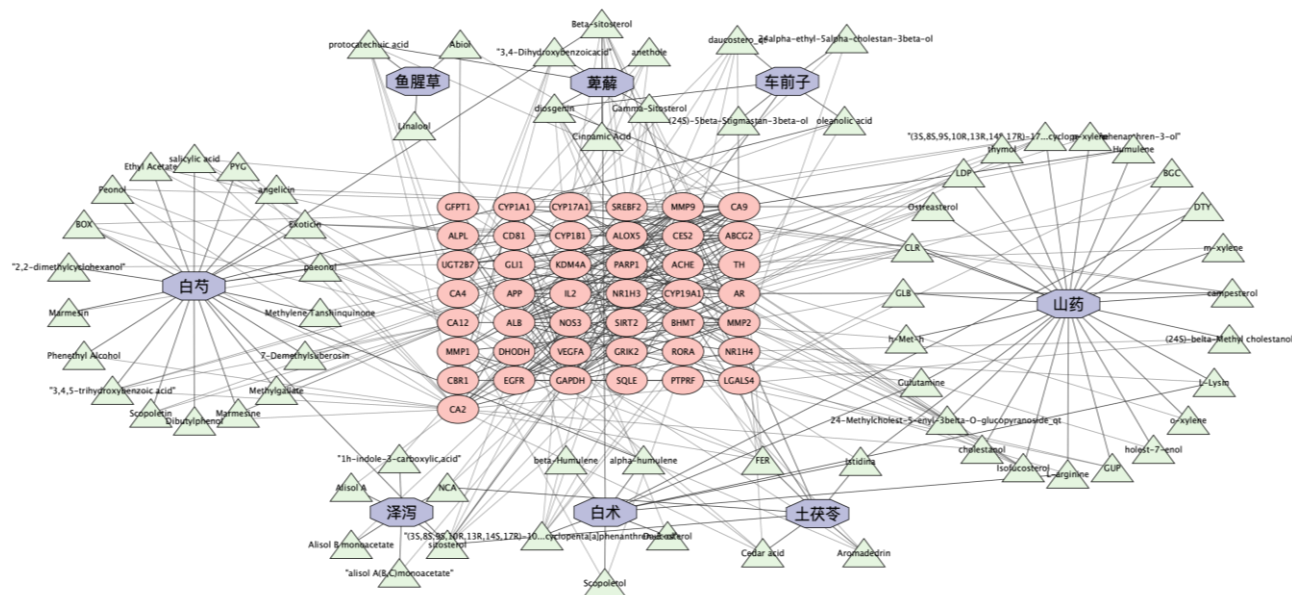


图 2 萆薢止带方治疗 VCC 的“药物-成分-靶点”网络
Fig. 2 “Drug-component-target” network of Biling Zhidai Decoction for treatment of VCC

对营养水平的反应、对类固醇激素的反应、巨噬细胞分化、神经递质生物合成过程、碳酸氢盐转运等；细胞成分主要与膜结构、细胞体有关，包括内质网、神经元细胞体、基底外侧质膜等；分子功能主要与氧化还原有关，包括过渡金属离子结合、氧结合、锌离子结合、辅因子结合、单加氧酶活性等。

3.4 KEGG 信号通路富集分析

将 43 个共有靶点输入 WebGestalt 进行 KEGG 信号通路富集分析。去除与本病绝对无关的信号通路后，显著富集的 KEGG 信号通路主要有氮代谢、卵巢类固醇生成、类固醇激素的生物合成、松弛素信号通路、叶酸的生物合成、细胞色素 P450 对异种生物的代谢、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、代谢途径、雌激素信号

通路、内分泌抵抗等（图 4）。

3.5 共有靶点网络构建与核心基因筛选

将 43 个共有靶点输入 STRING 数据库构建靶点 PPI 网络（图 5-A）。图 5-B~D 为使用 MCODE 计算的核心子网络，靶点蛋白颜色由黄色到红色，则表示 MCODE 计算的网路得分从低到高。子网络 1 包括三磷酸腺苷结合盒超家族 G 成员 2 (adenosine triphosphate-binding cassette subfamily G member 2, ABCG2)、胶质瘤相关癌基因家族锌指蛋白 1 (glioma-associated oncogene family zinc finger 1, GLI1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、白蛋白 (albumin, ALB)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶 9

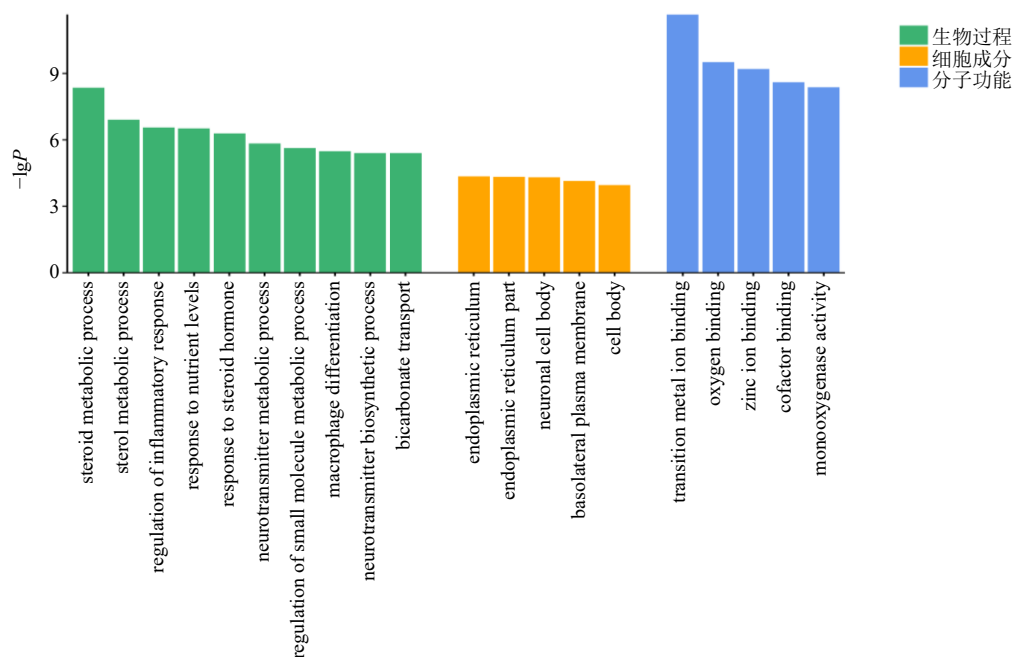


图 3 萆薢止带方治疗 VVC 的 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO function enrichment analysis of Biling Zhidai Decoction for treatment of VVC

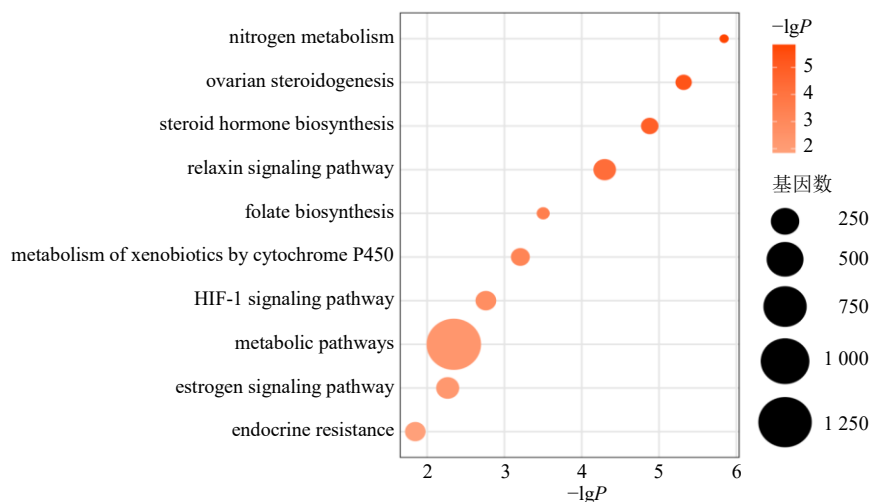


图 4 萆薢止带方治疗 VVC 的 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of Biling Zhidai Decoction for treatment of VVC

(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、核受体 1 亚家族 H 组成员 4 (nuclear receptor subfamily 1 group H member 4, NR1H4)、碳酸酐酶 2 (carbonic anhydrase 2, CA2)、酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) (图 5-B), 子网络 2 包括 AR、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、MMP1、淀粉样 β 前体蛋白 (amyloid β precursor protein, APP)、聚二磷酸腺苷-核糖聚合酶 1 [poly(adenosine diphosphate-ribose)polymerase 1, PARP1]、MMP2、一氧化氮合酶 3 (nitric oxide synthase 3, NOS3)、细胞色素 P450 家族 1 亚家族 B 成员 1 (cytochrome P450 family 1

subfamily B member 1, CYP1B1)、细胞色素 P450 家族 17 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1, CYP17A1)、角鲨烯环氧化物酶 (squalene epoxidase, SQLE) (图 5-C), 子网络 3 包括细胞色素 P450 家族 1 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1, CYP1A1)、细胞色素 P450 家族 19 亚家族 A 成员 1 (cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1, CYP19A1)、二磷酸尿苷葡萄糖醛酸转移酶家族 2 成员 B7 (uridine diphosphate glucuronosyltransferase family 2 member B7, UGT2B7) (图 5-D)。

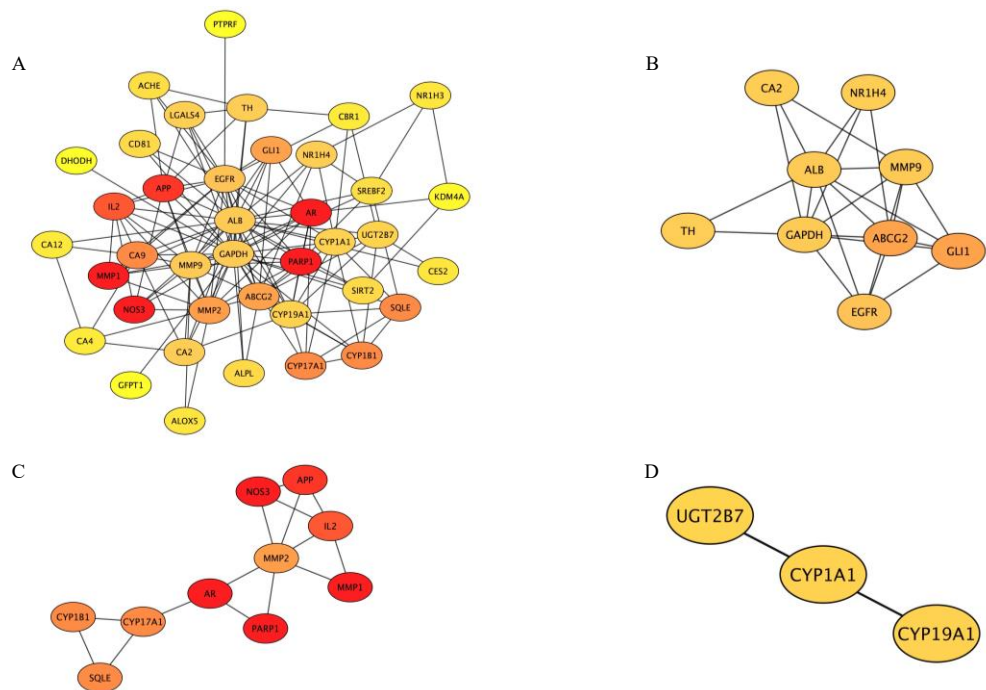


图 5 萆薢止带方治疗 VVC 靶点的 PPI 网络 (A) 与核心子网络 (B~D)

Fig. 5 PPI network (A) and core sub-networks (B—D) of targets of Biling Zhidai Decoction for treatment of VVC

3.6 核心靶点与萆薢止带方成分的分子对接

选取 MCODE 得分并列排名第 1 的核心靶点 PARP1、AR、MMP1、NOS3，与作用于这些靶点

的萆薢止带方成分进行在线分子对接。如表 1 和图 6 所示，这些成分与核心靶点之间均能形成稳定的结构。

表 1 萆薢止带方治疗 VVC 关键靶点与成分的分子对接结果

Table 1 Molecular docking results of key targets and components of Biling Zhidai Decoction for treatment of VVC

靶点	成分	Vina 对接分数	来源
AR	β-谷甾醇	-8.7	萆薢、白术、土茯苓、白芍
AR	γ-谷甾醇	-8.3	萆薢
AR	胆固醇	-8.2	山药
AR	赤桐甾醇	-8.7	山药
AR	菜油甾醇	-7.9	山药
AR	牡蛎甾醇	-8.7	山药
AR	异褐藻甾醇	-8.5	山药
AR	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙-2-辛烷-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊[a]菲-3-醇	-8.6	白术
AR	谷甾醇	-8.8	土茯苓、车前子、泽泻、白芍
AR	赤藓醇	-7.2	车前子
PARP1	烟酰胺	-5.6	土茯苓、泽泻
MMP1	阿魏酸	-6.8	土茯苓
NOS3	L-精氨酸	-5.9	山药、白术

3.7 动物实验验证

3.7.1 各组小鼠阴道灌洗液涂片染色观察 对各组小鼠阴道灌洗液进行革兰染色，并在显微镜下观察，结果显示，空白组小鼠阴道灌洗液中未见真菌孢子和菌丝，模型组可见大量真菌孢子和伸长的菌丝，各给药组真菌孢子明显减少，可见少量较短的菌丝（图 7）。

3.7.2 各组小鼠阴道组织病理学变化 如图 8 所示，空白组小鼠阴道黏膜可见完整的上皮细胞和角质层；模型组小鼠角质层受损，间质可见大量中性粒细胞浸润；萆薢止带方干预后，中性粒细胞浸润减弱，以萆薢止带方高剂量组效果最佳，并可见角质层部分修复；氟康唑组未见中性粒细胞浸润，角质层完整，阴道上皮细胞排列整齐。

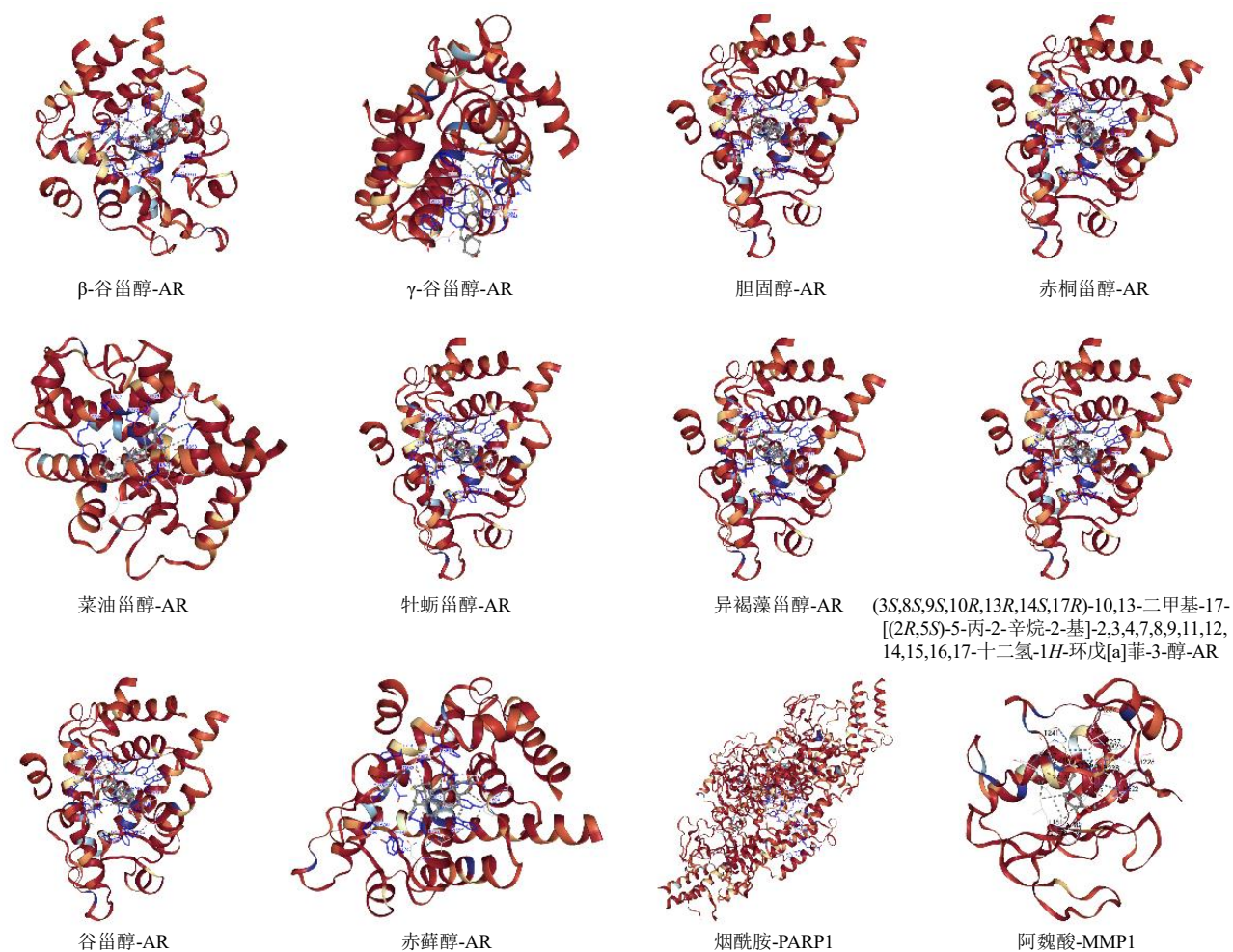


图 6 VVC 关键靶点与草苈止带方成分的分子对接可视化

Fig. 6 Visualization of molecular docking between key targets of VVC and components of Biling Zhidai Decoction

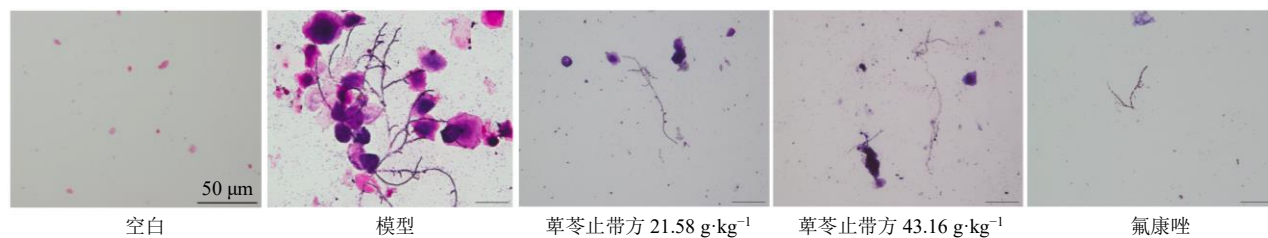


图 7 各组小鼠阴道灌洗液革兰氏染色结果 (×20)

Fig. 7 Gram staining results of vaginal lavage fluid of mice in each group (×20)

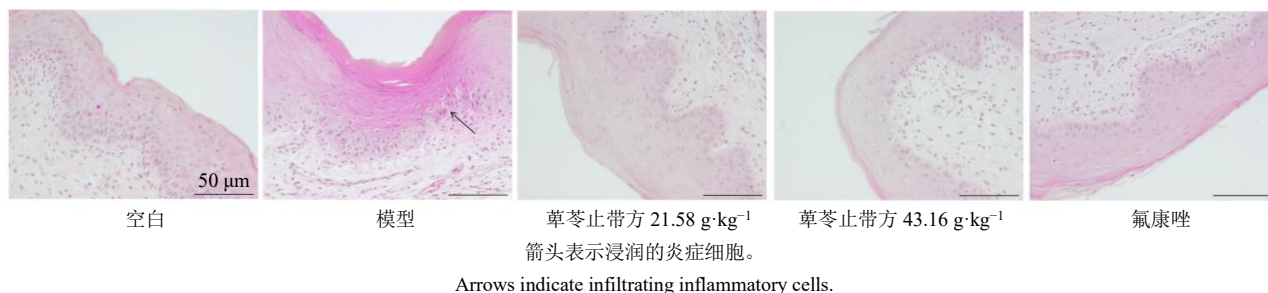


图 8 各组小鼠阴道组织 HE 染色结果 (HE, ×20)

Fig. 8 HE staining results of vaginal tissues of mice in each group (HE, ×20)

3.7.3 各组小鼠阴道组织 AR 蛋白表达 由于 AR 在核心靶点的重要性评分中位居第 1, 且分子对接实验显示与萆薢止带方中最多的活性成分发生互作, 故对各组小鼠阴道黏膜中的 AR 表达进行免疫

组化验证。如图 9 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠阴道组织 AR 阳性表达量显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组阴道组织 AR 阳性表达量显著均降低 ($P<0.001$)。

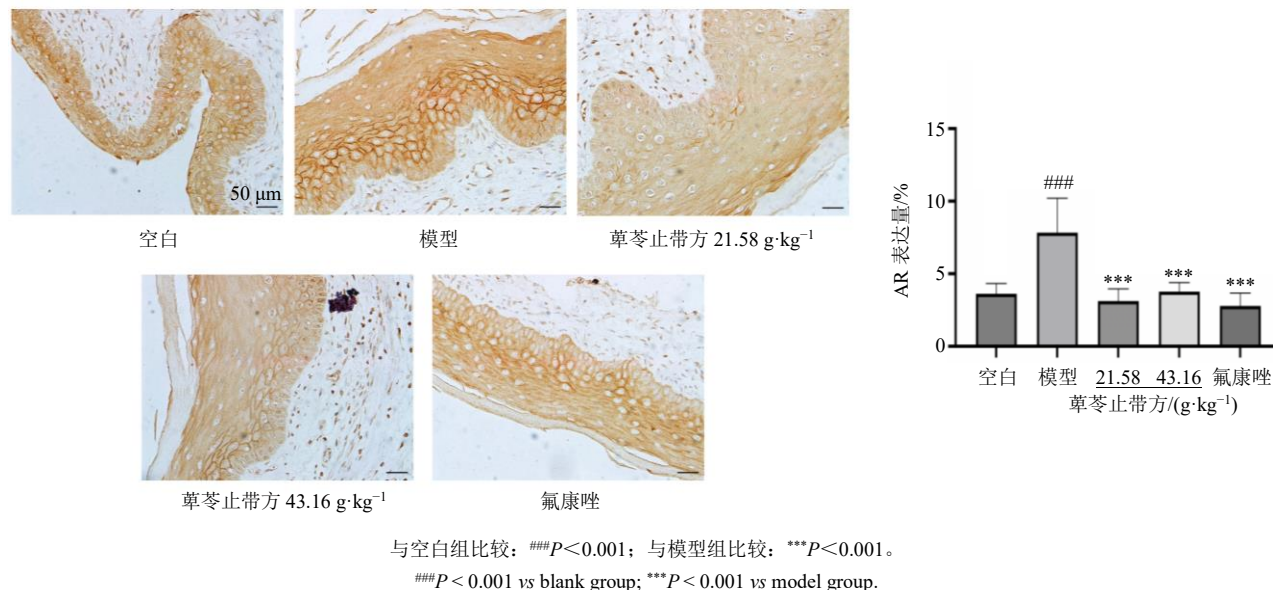


图 9 各组小鼠阴道组织 AR 蛋白表达 ($\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 9 Expression of AR protein in vaginal tissues of mice in each group ($\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

本研究采用网络药理学方法探究了萆薢止带方治疗 VVC 的潜在靶点和作用机制, 发现萆薢止带方治疗 VVC 涉及的靶点基因共 43 个。这些基因在 GO 富集分析中主要与代谢和炎症相关的生物过程有关, 在 KEGG 信号通路富集分析中则主要富集于氮代谢、类固醇激素合成、叶酸的生物合成以及松弛素信号通路等。

VVC 的病原体白色念珠菌的丝状形成是其整体毒力策略的一个组成部分^[10], 在 VVC 的发生和进展中起着至关重要的作用。研究表明, 氮源可以诱导有利于丝状生长的形态转变^[11]。提示萆薢止带方可能通过影响氮代谢, 减弱氮源对酵母菌生长的诱导, 从而抑制其毒力, 达到治疗效果。雌激素是卵巢类固醇激素的一种, 与 VVC 的发生密切相关。雌激素显著影响 VVC 的易感性, 雌激素水平低的女性 (如绝经后女性) 发生 VVC 的风险较低, 而雌激素水平高的女性 (如妊娠期间或服用含高雌激素口服避孕药的女性) 发生 VVC 的风险较高。阴道内环境中的雌激素水平升高会增加阴道黏膜处的糖原, 减少白细胞浸润, 降低上皮细胞的抗真菌活性, 从而促进感染的发生。从病原微生物的角度来看,

雌激素增加有利于酵母菌黏附在阴道黏膜上皮细胞上^[12]。此外, 雌激素还促进菌丝形成和酶的合成, 如分泌的天冬氨酰蛋白酶和磷脂酶。这些毒力因子进一步增强定植^[13]。本研究结果显示, 萆薢止带方与卵巢类固醇合成高度相关, 推测其可能是通过抑制卵巢类固醇 (如雌激素) 的生成, 从而减弱酵母菌的毒力。甾醇在酵母中是协调膜异质性、防止水渗透、维持细胞膜完整性、刚性和流动性的关键因素^[14]。细胞器膜和转运囊泡的融合依赖于甾醇和其他脂质的正确组装^[15]。萆薢止带方可能通过调控甾醇代谢, 从而影响假丝酵母菌的细胞膜功能及形态, 起到抑制作用。

研究显示, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体过度激活引起的异常免疫反应在 VVC 的发生和发展中起重要作用^[16]。巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的过度激活已被证明在 VVC 中起关键作用, 并受到 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) /髓样分化因子 88 (molecule myeloid differentiation factor 88, MyD88) 和树突状细胞相关性 C 型凝集素-1 (dendritic cell-associated C-type lectin 1, Dectin-1) /脾酪氨酸激酶 (spleen

tyrosine kinase, Syk) 信号通路的调节^[17]。提示萆薢止带方调节局部炎症的关键可能是通过调控巨噬细胞分化实现的, 其具体机制有待进一步研究。

细胞对氧气变化的响应并介导后续信号通路传导是缺氧的核心生物途径, 在病原微生物感染、代谢适应、癌症等应激反应中具有重要作用。HIF 通过感知缺氧调节一系列下游基因表达, 参与细胞代谢、细胞生长/死亡、细胞增殖、糖酵解、免疫反应、微生物感染、肿瘤发生和转移等生物学途径^[18]。HIF-1 是参与细胞和生物体对缺氧适应过程的关键转录因子。病原体激活 HIF-1 在细菌、病毒、真菌和原生动物感染中普遍存在^[19]。提示调节 HIF-1 信号通路可能也是萆薢止带方治疗 VVC 的机制之一。

此外, 萆薢止带方作用靶点还显著富集于叶酸的生物合成、松弛素、细胞色素 P450 对异种生物的代谢等。这些生物途径在 VVC 机制研究中几乎没有报道, 但这些生物途径可能也是萆薢止带方治疗 VVC 的潜在机制, 需要进一步研究。

对萆薢止带方治疗 VVC 的 43 个靶点进行 PPI 分析并构建 PPI 网络, 运用网络拓扑算法进行网络核心计算, 发现网络中最核心的 3 个靶点 (AR、MMP1、PARP1) 均与雌激素受体和代谢有关, 另 1 个核心靶点 NOS3 则与氮代谢有关。运用 MCODE 计算发现 4 个核心子网络, 其中子网络 1、2 与多种卵巢类固醇激素相关蛋白及卵巢类固醇激素合成代谢 (如 AR、MMP1、PARP1) 有关; 子网络 3 主要与细胞炎症调控蛋白有关。这与富集分析中共有靶点主要富集在氮代谢、卵巢类固醇合成、调节炎症反应等结果基本一致, 并进一步缩小了范围, 明确了其中的核心靶点。同时, 分子对接结果显示, 萆薢止带方成分能与 AR 等多个核心靶点形成稳定的复合结构, 其中直接作用于 AR 的成分最多, 进一步明确了萆薢止带方对核心靶点的调控作用。

本研究对萆薢止带方干预的核心靶点 AR 进行动物实验验证, 发现萆薢止带方不但能显著降低 VVC 小鼠的阴道真菌载量, 改善阴道黏膜病理变化, 还能显著降低核心靶点 AR 表达。研究表明, AR 在维持阴道黏膜完整性、调节一氧化氮和炎症等通路方面具有重要作用^[20], 并且与促炎通路如核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 及炎症因子如 IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-15、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF) 和

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等有关^[21], 提示抑制 AR 表达可能有助于保护阴道黏膜完整性及抑制局部炎症。此外, AR 在绝经后女性阴道中的表达下降, 而绝经后 VVC 发病率显著下降^[22], 间接提示了抑制 AR 表达可能降低了 VVC 的发病风险。

综上, 萆薢止带方治疗 VVC 的机制是通过多靶点、多通路的复杂过程, 可能涉及调节卵巢类固醇激素尤其是雌激素的合成与代谢、氮代谢途径、细胞炎症反应调节及 HIF-1 信号通路等途径, 其中作用的核心靶点可能是 AR。基于网络药理学研究结果, 可进一步开展多靶点、多通路的药理学验证, 为深入阐明名老中医有效经验方的作用机制提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会妇产科分会感染协作组, 刘朝晖, 廖秦平. 外阴阴道假丝酵母菌病 (VVC) 诊治规范修订稿 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(6): 401-402.
- [2] Workowski K A, Bachmann L H, Chan P A, *et al.* Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2021, 70(4): 1-187.
- [3] 陈志霞, 邹思颖, 王聪, 等. 萆薢止带片对盆腔炎性疾病后遗症大鼠血清 MCP-1、ICAM-1 及 TNF- α 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(1): 88-92.
- [4] 陈志霞, 冯淑仪, 陈惠超. 萆薢止带片治疗脾虚湿盛证外阴阴道假丝酵母菌病的临床疗效及对生殖道微生态的作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(6): 3235-3240.
- [5] 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.
- [6] Zhang L X, Dong J, Wei H, *et al.* TCMSID: A simplified integrated database for drug discovery from traditional Chinese medicine [J]. *J Cheminform*, 2022, 14(1): 89.
- [7] Ji K Y, Liu C, Liu Z Q, *et al.* Comprehensive assessment of nine target prediction web services: Which should we choose for target fishing? [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 24(2): bbad014.
- [8] Liao Y X, Wang J, Jaehnig E J, *et al.* WebGestalt 2019: Gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W199-W205.
- [9] Liu Y, Yang X C, Gan J H, *et al.* CB-Dock2: Improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W159-W164.
- [10] Kumamoto C A, Vences M D. Contributions of hyphae and

- hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(11): 1546-1554.
- [11] Alvarez F J, Ryman K, Hooijmaijers C, *et al.* Diverse nitrogen sources in seminal fluid act in synergy to induce filamentous growth of *Candida albicans* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(8): 2770-2780.
- [12] He Y F, Tang R Y, Deng J, *et al.* Effects of oestrogen on vulvovaginal candidosis [J]. *Mycoses*, 2022, 65(1): 4-12.
- [13] Kumwenda P, Cottier F, Hendry A C, *et al.* Estrogen promotes innate immune evasion of *Candida albicans* through inactivation of the alternative complement system [J]. *Cell Rep*, 2022, 38(1): 110183.
- [14] Lv Q Z, Yan L, Jiang Y Y. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn [J]. *Virulence*, 2016, 7(6): 649-659.
- [15] Abe F, Usui K, Hiraki T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(36): 8494-8504.
- [16] Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Carnero-Gregorio M, *et al.* Pathogenesis and clinical relevance of *Candida* biofilms in vulvovaginal candidiasis [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 544480.
- [17] Hu K F, Zhang H, Shi G X, *et al.* Effects of *n*-butanol extract of *Pulsatilla* decoction on the NLRP3 inflammasome in macrophages infected with *Candida albicans* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 304: 116041.
- [18] Luo Z, Tian M F, Yang G, *et al.* Hypoxia signaling in human health and diseases: Implications and prospects for therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 218.
- [19] Werth N, Beerlage C, Rosenberger C, *et al.* Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11576.
- [20] Maseroli E, Vignozzi L. Testosterone and vaginal function [J]. *Sex Med Rev*, 2020, 8(3): 379-392.
- [21] Maseroli E, Cellai I, Filippi S, *et al.* Anti-inflammatory effects of androgens in the human vagina [J]. *J Mol Endocrinol*, 2020, 65(3): 109-124.
- [22] Baldassarre M, Perrone A M, Giannone F A, *et al.* Androgen receptor expression in the human vagina under different physiological and treatment conditions [J]. *Int J Impot Res*, 2013, 25(1): 7-11.

[责任编辑 李亚楠]