

当归-川芎药对治疗原发性痛经的网络药理学研究

张科¹,谷冬梅²,李波¹,宋峯¹,李正翔¹,袁恒杰¹(天津医科大学总医院药剂科¹,检验科²,天津 300052)

摘要:目的 探究当归-川芎药对治疗原发性痛经的作用机制。方法 检索 TCMSP 数据库中当归、川芎两味药材的成分和靶点,检索 Drugbank 和 GeneCards 数据库中原发性痛经(PD)靶点,取成分靶点与疾病靶点的交集,使用 Cytoscape3.7.2 软件绘制活性成分-作用靶点网络图,选出关键成分;并应用 STRING 数据库绘制靶点蛋白互作网络(PPI),度值高的靶点蛋白作为当归-川芎药对治疗 PD 的关键靶点,另应用 DAVID 数据库进行基因功能注释分析和功能富集分析。结果 筛选获得当归-川芎药对 9 个活性成分,PD 相关靶点 352 个,活性成分-靶点网络包含 8 个成分(其中 1 个成分没有对应的靶点)和 69 个作用靶点,关键靶点涉及 PTGS2、NCOA2、PTGS1、PRKACA、SCN5A 等。PPI 网络包含 16 个蛋白,关键蛋白涉及 CASP3、PTGS2、ESR1、TGFB1 等。基因功能注释分析和功能富集分析显示,当归-川芎药对治疗 PD 是通过参与雌二醇调节、类固醇激素介导的信号通路、NO 生物合成过程的正向调节、糖皮质激素反应等生物过程,调控雌激素信号通路、NF- κ B 信号通路、细胞凋亡等发挥作用。结论 当归-川芎药对多个成分作用于多个靶点和通路,可发挥治疗 PD 的作用。

关键词:当归;川芎;原发性痛经;网络药理学

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.14.025

文章编号:1006-1959(2021)14-0092-04

A Network Pharmacological Study of Angelica-ligusticum Chuanxiong Medicine in the Treatment of Primary Dysmenorrhea

ZHANG Ke¹,GU Dong-mei²,LI Bo¹,SONG Yin¹,LI Zheng-xiang¹,YUAN Heng-jie¹(Department of Pharmacy¹,Department of Laboratory Medicine²,General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052,China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Angelica-Ligusticum chuanxiong medicine on the treatment of primary dysmenorrhea.**Methods** Searching the components and targets of the two medicinal materials of Angelica sinensis and Chuanxiong in the TCMSP database, and search the primary dysmenorrhea (PD) targets in the Drugbank and GeneCards databases, and take the intersection of the component targets and the disease targets. Using Cytoscape 3.7.2 software to draw a network diagram of active ingredients-targets of action, and select key ingredients. And use the STRING database to draw the target protein interaction network (PPI), the target protein with high degree value is used as the key target of Angelica-Ligusticum chuanxiong medicine for the treatment of PD. In addition, DAVID database is used for gene function annotation analysis and function enrichment analysis.**Results** Screening obtained Angelica-Ligusticum chuanxiong drug pair 9 active ingredients, 352 PD-related targets, and the active ingredient-target network contains 8 ingredients (one ingredient had no corresponding target) and 69 targets. The key targets involve PTGS2, NCOA2, PTGS1, PRKACA, SCN5A, etc. The PPI network contained 16 proteins, the key proteins involve CASP3, PTGS2, ESR1, TGFB1 and so on. Gene function annotation analysis and function enrichment analysis show, Angelica-Ligusticum chuanxiong medicine treated PD by participating in biological processes such as estradiol regulation, steroid hormone-mediated signaling pathways, positive regulation of NO biosynthesis process, and glucocorticoid response. Regulate estrogen signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, cell apoptosis, etc. to play a role.**Conclusion** Multiple components in the Angelica-Ligusticum chuanxiong drug pair act on multiple targets and pathways, and play a role in the treatment of PD.

Key words: Angelica; Chuanxiong; Primary dysmenorrhea; Network pharmacology

原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)是一种青春期女性在月经前后或经期常见疾病,轻者为下腹疼痛、坠胀,重者会出现恶心呕吐、冷汗淋漓甚至昏厥等症状,影响患者的正常生活。PD的发病机制目前尚未完全阐明,临床很难根治^[1]。PD治疗以药物治疗为主,常用药物为非甾体抗炎药,但治疗效果不佳,且不良反应明显^[2]。中医治疗PD具有独特的优势,痛经在中医辨证上属于“经行腹痛”的范畴,是由于气滞血瘀、经血不畅引起的或者是由于着凉受寒所引起的^[3],治则以活血化瘀、行气止痛为法^[4]。当归-川芎是于补血活血、化瘀止痛的经典药对。当归性温味甘辛,归心、肝、脾经,善补血活血,

调经止痛,润肠通便,并能散寒,凡血虚血瘀有寒症均宜,为妇科调经之要药。川芎性温味辛,归肝、胆、心包经,善活血行气,祛风止痛,治血瘀气滞诸痛,兼寒者最宜^[5]。近年来,基于网络药理学探究中药多成分、多靶点作用机制成为研究热点,本文拟采用该方法探究当归-川芎药对治疗PD的作用机制,以期为其临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 活性成分及靶点的筛选 基于TCMSP数据库,以“当归”“川芎”为关键词检索,收集药材的化学成分,然后以OB \geq 30%和DL \geq 0.18为条件筛选有效成分^[6-7]。收集数据库中成分对应的靶点,并使用UniProt数据库,将靶点转换标准基因名。

1.2 当归-川芎药对治疗PD的靶点的筛选 基于Genecards数据库,以“Primary Dysmenorrhea”为关键词检索,收集UC疾病靶点,以Excel格式导出,然后

作者简介:张科(1986.5-),男,山西大同人,硕士,主管药师,主要从事中药药理学和生物信息学的研究

通讯作者:袁恒杰(1973.6-),女,黑龙江佳木斯人,博士,主任药师,主要从事临床药理学与医院药学的研究

将 1.1 中成分靶点的标准基因与疾病靶点基因取交集,作为当归-川芎药对治疗 PD 的靶点。

1.3 活性成分-靶点网络的构建 将 1.1 中成分和靶点信息处理后导入 Cytoscape 软件中绘制活性成分-靶点网络图,然后对网络进行拓扑结构分析,其中不同类型节点分别代表有效成分和靶点,边代表两者之间的关系。再根据节点连接度(Degree)和介数中心性(BC)对网络图进行调整,节点的大小反映 Degree 的大小。

1.4 蛋白质相互作用网络(PPI)的构建及其核心靶点的筛选 蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络是从生物化学、信号转导和遗传网络的角度研究成分和疾病相关蛋白之间的相关性^[8]。使用在线韦恩图工具,获取药对成分靶点和疾病靶点的交集基因,将交集基因导入 STRING 数据库进行分析,将分析数据以 TSV 格式导出,导入 Cytoscape 软件,绘制当归-川芎药对与 PD 靶点的 PPI 网络,并对网络进行拓扑结构分析,再使用“Generate style from statistics”工具对网络节点的大小和颜色进行设置。网络图中节点的大小、颜色深浅代表 Degree 值的大小,边的粗细反映了 Combine Score 的大小,从中筛选出 Degree 值和接近中心度排名靠前的靶点作为核心靶点。

1.5 核心靶点的通路分析 DAVID 数据库能提供系统的生物功能注释信息,进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析和 KEGG 通路分析,由此挖掘特定基因或蛋白的生物学意义^[9]。将当归-川芎药对治疗 PD 靶点导入 DAVID 数据库,并限定物种为人,进行基因功能注释分析和功能富集分析,然后导出数据,对生物过程($P < 0.01$)和信号通路($P < 0.05$)进行筛选,并进行绘图。

2 结果

2.1 当归-川芎药对活性成分的确定 在 TCMS 数据库中检索到“当归”“川芎”得到化学成分 314 个,其中 125 个来自当归,189 个来自川芎。以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 筛选出活性成分 9 个,其中 2 个来自当归,7 个来自川芎,包括 β -谷甾醇、豆甾醇、谷甾醇、叶酸、亚油酸乙酯、杨梅酮、川芎啉、川芎萘啉内酯、洋川芎醌碱,具体信息见表 1。检索得到 9 个成分对应靶点 111 个: β -谷甾醇对应靶点 38 个,豆甾醇对应靶点 31 个,谷甾醇对应靶点 3 个,叶酸对应靶点 3 个,亚油酸乙酯对应靶点 3 个,杨梅酮对应靶点 25 个,川芎啉对应靶点 4 个,川芎萘啉内酯对应靶点 4 个,洋川芎醌没有对应靶点。将所得靶点蛋白名称转换为标准基因名,删除重复和无效靶点,共获取当归-川芎药对成分作用靶点 69 个。

表 1 当归-川芎中 9 个活性成分的基本信息

药物	代号	编号	成分名称	中文名	OB(%)	DL	相对分子质量
当归	DG-1	MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75	414.79
	DG-2	MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76	412.77
川芎	CX-1	MOL000359	sitosterol	谷甾醇	36.91	0.75	414.79
	CX-2	MOL000433	FA	叶酸	68.96	0.71	441.45
	CX-3	MOL001494	Mandenol	亚油酸乙酯	42.00	0.19	308.56
	CX-4	MOL002135	Myricanone	杨梅酮	40.60	0.51	356.45
	CX-5	MOL002140	Perlolyrine	川芎啉	65.95	0.27	264.30
	CX-6	MOL002157	wallichilide	川芎萘啉内酯	42.31	0.71	412.57
	CX-7	MOL002151	senkyunone	洋川芎醌	47.66	0.24	326.52

2.2 活性成分-靶点网络 活性成分-靶点网络共包括 77 个节点(8 个活性成分节点,其中 1 个成分没有对应靶点,69 个靶点节点)和 111 条边,见图 1。分析网络可知,1 个活性成分平均作用 13.88 个靶点,1 个靶点平均作用 1.61 个活性成分。从活性成分的角度,8 个活性成分中作用靶点数量最多的前 3 个成分为 DG-1(β -谷甾醇)、DG-2(豆甾醇)、CX-4(杨梅酮),分别能与 38、31、25 个靶点发生相互作用。从靶点的角度,度值排名前 5 位的是 PTGS2、NCOA2、PTGS1、PRKACA、SCN5A,分别能与 6、5、4、3、3 个活性成分发生相互作用。

2.3 成分靶点与疾病靶点的交集 通过数据库获得当归活性成分作用靶点 69 个,川芎活性成分作用靶

点 42 个,PD352 个相关基因。通过在线韦恩图得出当归、川芎与 PD 共有基因 4 个,分别是 PTGS1、PTGS2、PGR、ADRB2; 当归与 PD 的共有基因 8 个,分别是 BAX、BCL2、CASP3、CHRM2、CHRM3、OPRM1、TGFB1、PLAU; 川芎与 PD 的共有基因 4 个,分别是 ESR1、ESR2、PPARG、KDR。当归-川芎药对活性成分作用靶点与 PD 共有 16 个交集基因,见图 2。

2.4 PPI 网络分析 将交集基因导入 STRING 数据库进行分析显示,PPI 网络包含 15 个节点(其中 CHRM3 靶点与其他靶点没有连接关系),34 条边,平均节点 Degree 值为 4.25。网络中 Degree 值排名前 5 的靶点分别是 CASP3、PTGS2、ESR1、TGFB1、KDR、PPARG。从 STRING 数据库中将分析数据以

TSV 格式导出,然后导入 Cytoscape 软件中,绘制当归-川芎药对与 UC 靶点的 PPI 网络图,见图 3。

2.5 功能注释分析和富集分析 当归-川芎药对与 PD 的交集基因共在 108 个 ($P<0.05$)GO term 上富集,其中生物过程(BP)78 个,分子功能(CC)11 个,细胞组成(MF)19 个,见图 4。主要涉及生物学功能

与过程包括雌二醇调节、类固醇激素介导的信号通路、NO 生物合成过程的正向调节、糖皮质激素反应等;交集基因共在 62 条 ($P<0.05$)通路上富集,主要通过调控雌激素信号通路、NF- κ B 信号通路、细胞凋亡等发挥作用,见图 5。

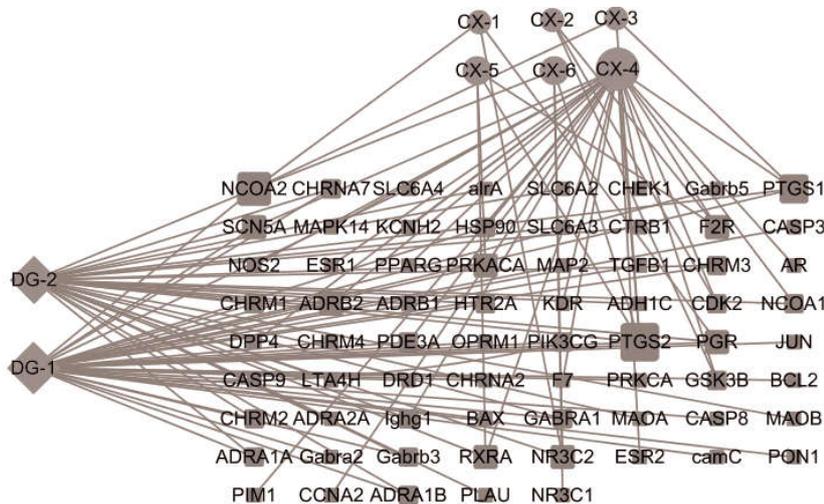


图 1 当归-川芎活性成分-靶点网络图

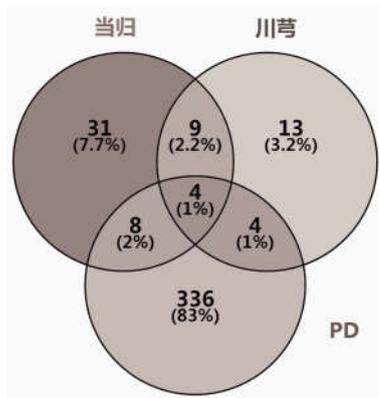


图 2 交集基因的韦恩图

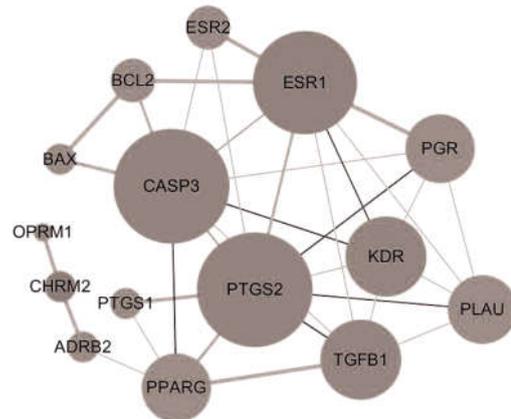


图 3 当归-川芎作用靶点与 PD 蛋白互作网络图

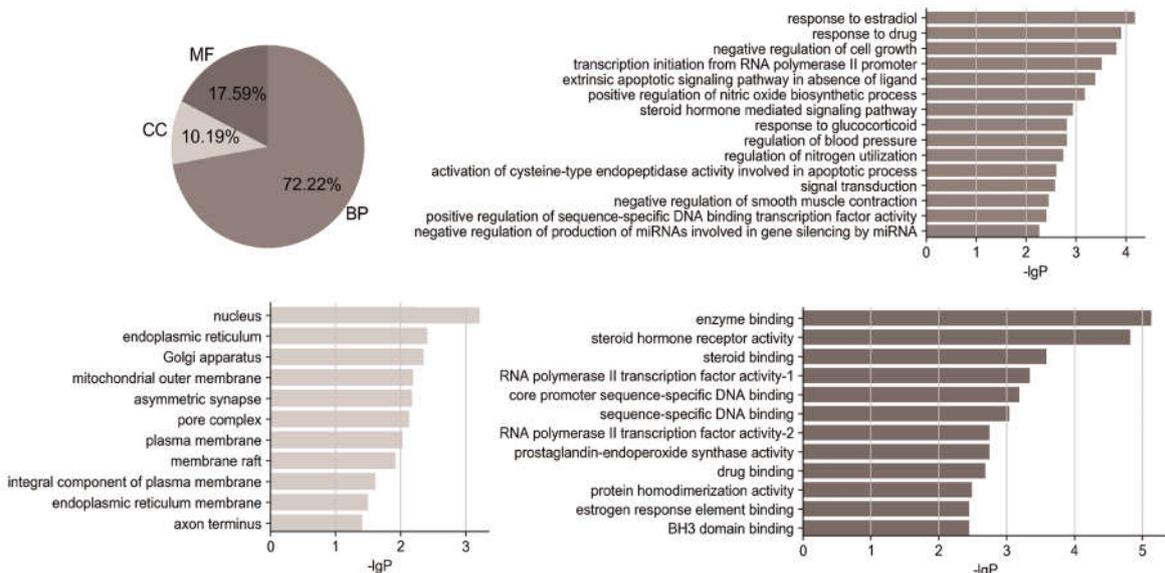


图 4 GO 富集分析图

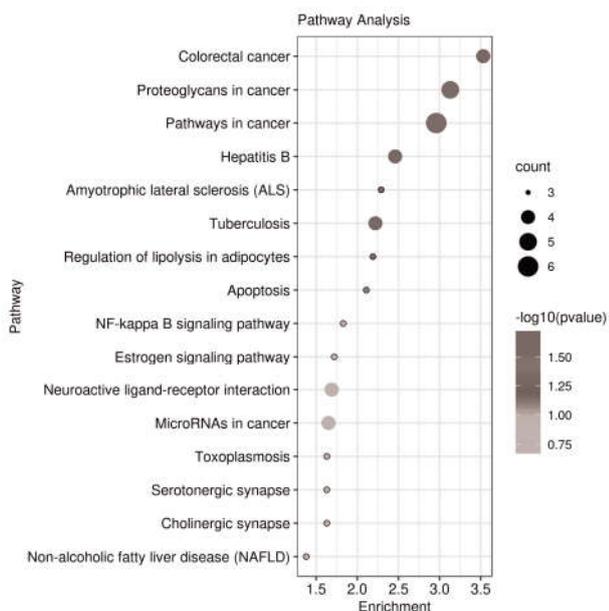


图 5 KEGG 富集分析的 16 条通路图

3 讨论

原发性痛经的发病机制可能与前列腺素水平升高、白细胞介数水平升高、血管内皮细胞功能障碍和经期体内激素水平的变化密切相关^[1]。前列腺素水平升高可使子宫平滑肌的血流量减少,出现收缩甚至痉挛,增加周围神经对疼痛的敏感性。研究表明^[10],与生殖系统密切相关的前列腺素是 PGE₂ 和 PGF_{2α},在月经周期的不同阶段子宫内膜中二者的含量呈周期性变化。黄体期及月经期子宫内膜产生的前列腺类产物增多,黄体期 PGE₂ 的含量比 PGF_{2α} 高,而月经期则相反。此外,原发性痛经与经期性激素变化也有关,雌二醇(E₂)可使子宫肌细胞的钙离子内流,引起子宫收缩,同时还可以通过激活磷酸肌醇循环,促进 PGF_{2α} 的合成,降低疼痛阈值。本研究药对中当归为气中之血药,擅补血活血、调经止痛;川芎为血中之气药,可活血行气、祛瘀止痛,二药配伍,既可补血活血以调经,又能行气祛瘀以止痛^[5]。

本研究活性成分-靶点网络中当归-川芎药对中 8 个活性成分通过作用于 69 个靶点发挥药理作用,同时网络中中度值排名前 2 个活性成分分别是 β-谷甾醇和豆甾醇,二者均证实有明显的抗炎作用。β-谷甾醇通过提高抗炎因子 IL-10 的活性,减小趋化因子和促炎因子活性等抑制核转录因子(NF-κB)的迁移^[11]。豆甾醇可明显减少由脂多糖刺激增多的致炎因子环氧化酶-2 和诱生型一氧化氮合酶 mRNA 的表达,进而减少 PGE₂ 和 NO 的释放发挥抗炎作用^[12]。从活性成分-疾病交集靶点可知,当归-川芎

药对治疗原发性痛经是多靶点协同作用的,如调节炎症细胞因子 TGFβ1 和 PTGS2,作用于阿片样物质受体 OPRM1 等;GO 富集分析显示,疾病靶点主要富集在 BP 环节,如雌二醇调节、类固醇激素介导的信号通路、NO 生物合成过程的正向调节、糖皮质激素反应等;从 DAVID 通路分析显示,疾病靶点涉及的通路 PD 相关包括雌激素信号通路、NF-κB 信号通路、细胞凋亡等,其中雌激素信号通路涉及的靶点有 IL6、TNF、SLC2A4、PTPN1、INSR, NF-κB 信号通路涉及的靶点有 TNF、SLC2A4、INSR,细胞凋亡涉及的靶点有 SLC2A4、PTPN1、INSR。

综上所述,当归-川芎药对中多个成分作用于多个靶点和通路,可发挥治疗 PD 的作用。

参考文献:

- [1]于红权.当归-川芎对原发性痛经患者雌激素水平变化、炎症因子表达情况的影响[J].陕西中医,2018,39(4):434-436.
- [2]李杰,江华娟,何瑶,等.四物汤治疗原发性痛经的方剂配伍内涵及作用机制研究[J].中国中药杂志,2020,45(12):229-235.
- [3]江绣英.芳香疗法配合穴位点按治疗原发性痛经的临床研究[D].广州中医药大学,2014.
- [4]杨燕婷,张韬.上海城郊地区初级中学女生痛经与中医体质相关性分析[J].中国中医药信息杂志,2017,24(8):27-31.
- [5]曹秋实,李德顺,余青,等.当归-川芎对原发性痛经小鼠 E₂、AVP、OT 表达的影响[J].江西中医药,2016,47(11):36-38.
- [6]姚楠,丁茂鹏,王志旺,等.基于网络药理学研究当归平喘的分子机制[J].中国临床药理学杂志,2019,35(24):3250-3253.
- [7]Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6(1):13.
- [8]刘鑫旭,吴嘉瑞,张丹,等.基于网络药理学的参附汤作用机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(16):211-218.
- [9]王志旺,李荣科,蔺兴遥,等.当归主咳逆上气的中医药理论及现代研究与应用[J].新中医,2016,48(1):4-6.
- [10]徐拥军,沈聪玲.间苯三酚联合益母草制剂对青少年痛经患者前列腺素 E₂ 水平、前列腺素 F_{2α} 水平、子宫微循环变化指标及临床疗效的影响[J].中国生化药物杂志,2016,3(1):65-67.
- [11]严宁,杨春霞,马娟,齐国雪,杨立波,马玉茹,马学平.β-谷甾醇对大鼠心肌缺血再灌注损伤和 ERK1/2 信号通路的影响[J].心血管病学进展,2020,41(3):321-325.
- [12]Feng S, Dai Z, Liu AB, et al. Intake of stigmasterol and β-sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018, 1863(10):1274-1284.

收稿日期:2021-01-27;修回日期:2021-02-11

编辑/杜帆