

基于网络药理学的益母草治疗产后腹痛的潜在分子机制研究

杨 勇¹, 张乐乐^{2*}, 盛菲亚², 李 维², 陈加容³, 邹 亮⁴, 杨 林^{2*}

¹成都大学药学院; ²成都大学基础医学院, 成都 610106;

³成都大学附属医院药剂科, 成都 610081; ⁴成都大学食品与生物工程学院, 成都 610106

摘要:本文通过网络药理学方法探讨益母草治疗产后腹痛的潜在分子机制。首先根据TCMSP数据库和文献挖掘益母草的活性成分,在TCMSP、Swiss Target Prediction、Similarity ensemble approach平台上检索活性成分靶点,在OMIM、GeneCards上检索产后腹痛靶点,得到益母草-产后腹痛交集靶点。利用STRING数据库构建蛋白互作(PPI)网络,接着利用Cytoscape软件对PPI网络进行拓扑分析,并对拓扑分析筛选出的核心靶点进行基因本体论(Gene Ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析。最后利用免疫组化实验证益母草对流产大鼠模型子宫组织中PGF2αR、MMP9、TIMP1、VEGFA、VEGFR2蛋白表达水平的影响。最终得到益母草活性成分10种,与产后腹痛相关靶点144个;通过PPI网络分析筛选出118个靶点,进一步拓扑分析后得到98个节点;然后对这98个节点进行GO和KEGG注释。GO分析得到1151个生物过程(BP)条目,97个细胞组成(CC)条目,122个分子功能(MF)条目;KEGG分析得到41条通路,主要涉及雌激素、PI3K-Akt、MAPK、HIF-1信号通路等。最后免疫组化实验证明益母草可显著抑制流产模型大鼠子宫组织中PGF2αR、MMP9蛋白上调和TIMP1、VEGFR2蛋白下调。本研究通过网络药理学和免疫组化实验证,显示益母草治疗产后腹痛是多成分、多靶点、多途径相互作用的结果,为益母草的临床应用提供了一定的理论依据。

关键词:网络药理学; 益母草; 产后腹痛; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)2-0294-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.2.015

Potential molecular mechanisms of Yimucao in the treatment of postpartum abdominal pain based on network pharmacology

YANG Yong¹, ZHANG Le-le^{2*}, SHENG Fei-ya²,
LI Wei², CHEN Jia-rong³, ZOU Liang⁴, YANG Lin^{2*}

¹College of Pharmacy, Chengdu University; ²School of Basic Medical Sciences, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

³Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China;

⁴School of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: This study aims to predict potential targets and molecular mechanisms of Yimucao in the treatment of postpartum abdominal pain based on network pharmacology. At first, the active components of Yimucao were screened by TCMSP platform and literature mining, and then the potential targets of active components of Yimucao were screened by TCMSP platform, Swiss Target Prediction platform, Similarity ensemble approach; relevant targets of postpartum abdominal pain were obtained by OMIM database, GeneCards database. Finally, the overlap targets between the disease and drug were obtained. Then a protein-protein interaction (PPI) network and further network topology were constructed to retrieve the key targets of the interaction relationship between Yimucao and postpartum abdominal pain. Finally, the perform gene ontology (GO) analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis were applied to identify the involved mechanisms. Immunohistochemical experiments were carried out to verify the outcomes. Finally, 10 kinds of active components, and 144 kinds of intersecting targets with postpartum abdominal pain were screened. Then 98 targets were retrieved by topological analysis, and fur-

ther analyzed using GO and KEGG enrichment analysis. GO analysis yielded 1 151 entries for biological processes (BP), 97 entries for cell composition (CC) and 122 entries for molecular function (MF); KEGG enrichment analysis identified 41 pathways, which mainly involved estrogen signaling pathway and PI3K-Akt signaling pathway and MAPK signaling pathway and HIF-1 signaling pathway. The results of immunohistochemical experiments showed that Yimucao could significantly inhibit the up-regulation of PGF2 α R and MMP9 proteins and down-regulation of TIMP1 and VEGFR2 proteins in the uterine tissue on abortion rat model. Through network pharmacology and immunohistochemical experiments, we found that the therapeutic effect of Yimucao against postpartum abdominal pain is an intricate result of multi-components, multi-targets and multi-channel, which provides a theoretical basis for the clinical application of Yimucao.

Key words: network pharmacology; Yimucao; postpartum abdominal pain; mechanism

产后腹痛,也称为“宫缩痛”“产后痛”,是指孕妇分娩后1~3日内,由于子宫的收缩恢复作用,产妇的腹部会产生类似于经期的阵痛^[1]。临幊上,西医对产后腹痛较严重的患者多采用阿片类镇痛药物进行干预,如舒芬太尼,然而此类镇痛药物多会引起一定程度的不良反应,如兴奋呕吐中枢而造成恶心呕吐,或使迷走神经兴奋而导致消化功能失调^[2]。中医理论认为,产后腹痛多为气血运行不畅所致,包括血虚和血瘀两种证型^[3],中医临幊上治疗产后腹痛多采用温经祛瘀法祛瘀止痛,同时采用补益气血法补气活血。

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicas* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分,具有活血调经、利水消肿等功效,临幊上常用于血滞经闭、痛经、水肿等病症^[4],素有“妇科圣药”的称号。《本草蒙筌》中记载其“能总调胎产诸证,故加益母之名,具有去死胎,安生胎,行瘀血,生新血”的功效。现代药理学研究表明^[5],益母草提取物具有抗炎镇痛、抗氧化、抑菌等作用。此外,益母草提取物对子宫组织具有双向调节作用,益母草0.5%盐酸水溶液提取生物碱对小鼠离体子宫具有兴奋作用,而益母草氯仿提取生物碱对离体子宫具有抑制作用^[6]。益母草注射液中的水苏碱对子宫的兴奋作用,也可能与动物的种属有关^[7]。此外,益母草对产后子宫内膜具有止血修复作用,有利于产后子宫恢复^[8]。

中药具有多成分、多靶点、多途径作用等特点,在整体上对疾病发挥着治疗作用,但其物质基础和作用机制研究薄弱,影响了中药发展的现代化进程。网络药理学能整体地、系统地研究药物与疾病之间的作用关系,能对药效物质、作用靶点和通路进行初步的预测,是中药研究新的方法和手段^[9]。本文利用网络药理学研究方法,通过有效数据的挖掘,预测益母草治疗产后腹痛潜在作用靶点及作用机制,并进一步基于药物流产大鼠模型验证益母草治疗产后

腹痛的作用机理,为益母草的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 数据库

中草药系统药理学平台(TCMSP)数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) ; PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)药物分子靶点预测平台 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)、Similarity ensemble approach (<http://sea.bkslab.org/>) ; 疾病靶点标准化数据库 Uniport (<https://www.uniprot.org>) ; 疾病数据库 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、OMIM (<https://omim.org>) ; 功能蛋白联系网络数据库 STRING (<http://string-db.org/cgi/input.pl>) ; GO 富集分析、KEGG 富集分析数据库 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>)、DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>)、Cytoscape3.7.2 (<https://cytoscape.org>) ; Rx644.0.0 ; Win10 操作系统。

1.2 实验动物

SD 大鼠,雌性,8~9周龄,体重200~220 g;雄性,8~9周龄,体重250~300 g,购自成都达硕实验动物有限公司,许可证号 scxk(川)2015—030。

1.3 药物与试剂

益母草膏(批号20190308),主要成分为益母草,贵州百灵企业集团制药股份有限公司。一抗:PGF2 α R(批号00563431)、MMP9(批号02376588)、TIMP1(批号02376588)、VEGFA(批号20334270)、VEGFR2(00233460),艾博抗(上海)贸易有限公司。二抗:Polink-2plus[®] Polymer HRP Detection(批号20200411、20200528),北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 仪器

Finesse E+型转轮式切片机、Section Bath型摊片机、SHANDON Exce型包埋机(赛默飞世尔科技

中国有限公司); DM 3000 型显微镜(Leica 公司); HH500-B1 型烘箱(上海博尼化轻装备有限公司); HCY-260 型 4℃ 孵育箱(海尔股份有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 挖掘益母草活性成分及其可能作用的靶点

以“yimucao”为关键词,在TCMSP数据库挖掘益母草中成分,再依据药物代谢动力学(ADME-吸收、分布、代谢、排泄)原理,以生物利用度(oral bioavailability, OB)和类药性(drug-like, DL)为主要参照依据,设置OB≥30%,DL≥0.18筛选活性成分。此外,结合《中国药典》和相关文献,将不满足上述筛选条件,但具有明显药理活性的化合物也纳入研究。在TCMSP平台,筛选出活性成分的相关靶点,最后利用Uniprot数据库记录Human的相关基因,转换活性成分靶点为对应的Gene symbol;在Pubchem数据库上找出化合物的Canonical SMILES,在Swiss Target Prediction 和 Similarity ensemble approach平台上对化合物可能作用的靶点进行预测,并综合TCMSP上靶点检索结果,用作下一步分析。

2.1.2 挖掘疾病基因,与益母草活性成分的靶基因作交集处理,并绘制Venn图

GeneCards 疾病数据库拥有广泛的数据来源,整合了Drug bank 等多家数据库资源及文献、实验数据,是目前少数综合性疾病数据库之一。OMIM 数据库是人类基因和遗传表型的全面、权威的纲要,每天更新,且可免费获取。在GeneCards 和 OMIM 数据库上,以“postpartum abdominal pain”为关键词,检索疾病相关的基因。并将得到的疾病基因与活性成分的靶基因录入,利用 R 软件,绘制 Venn 图,得到活性成分与疾病的交集靶点。

2.1.3 构建“药物-活性成分-疾病-靶点”网络

利用Cytoscape 3.7.2 软件构建可视化“药物-活性成分-靶点基因-疾病”网络,每个节点分别代表“药物、活性成分、疾病、交集靶点”,直观展示各节点之间的联系。

2.1.4 构建蛋白-蛋白互作网络(PPI 网络)

STRING 是已知和预测的蛋白质-蛋白质相互作用的数据库。将药物与疾病的交集靶点输入 STRING 平台,定义物种为人,构建益母草抗产后腹痛的蛋白-蛋白相互作用网络(PPI 网络)。最低互作评分(minimum required interaction score)设定为 0.9。网络中各节点度值代表该蛋白在相互作用中

的地位,并用柱状图直观表示前 30 名蛋白及节点连接数量,连接数量的大小可直接代表节点在网络中的地位。

2.1.5 利用 Cytoscape 对 PPI 网络进行拓扑分析

将 STRING 平台筛选出来的相互作用的蛋白基因输入 Cytoscape 软件 Bisogenet 插件中,筛选条件为 Identifiers 下选择“Homo sapiens(Human)”“Gene identifiers only”, Data Settings 下只选择“Protein Protein Interaction”,点击“Tools-NetworkAnalyzer-Network Analysis-Analyze Network”,得到第一张拓扑分析图,数据以.csv 格式导出,在 excel 表格中打开,计算“degree”值的 2 倍中位数,以此为筛选条件,得到第二张拓扑分析图,然后打开 Cytoscape 软件中 CytoNCA 插件,Centralities 下除“degree(DC)”项不选择以外,其余几项均选择“without weight”,将得到的数据以.csv 格式导出,在 excel 表格中计算“degree”“betweenness”“closeness”三项的中位数,以此为筛选条件,得到第三张拓扑分析图。

2.1.6 GO 富集分析

使用 R 软件和 Bioconductor 加载包,对上述拓扑分析得到的核心靶点进行 GO 富集分析中的生物过程(biological process, BP)分析,细胞组成(cellular component, CC)分析,分子功能(molecular function, MF)分析,并绘制相应的可视化图片。

2.1.7 KEGG 富集分析

将上述拓扑分析得到的核心靶点导入 DAVID 6.8 数据库中,点击“Functional Annotation”选择“OFFICE_GENE_SYMBOL”“gene list”,种属选为“Homo sapiens”,之后选取“pathways”下的“KEGG_PATHWAY”进行 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路分析。点击“chart”,将数据复制到 excel 表格中,以由小到大且 $P \leq 0.01$ 为筛选条件,选取符合条件的前 20 的 KEGG 通路,使用 R 软件对其进行可视化处理。

2 实验验证

2.2.1 模型建立分组及给药

雌性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、益母草膏组,除对照组大鼠以外,其余各组大鼠按文献方法复制药物流产大鼠模型^[10],每组 6 只,造模第二天益母草膏组大鼠灌胃给予益母草膏(3.6 g/kg,相当于临床剂量的 2 倍),对照组、模型组大鼠给予等量生理盐水,连续 7 天,末次给药后,禁食不禁水 12 h,取大鼠子宫,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。

2.2.2 免疫组化法测 PGF_{2α}R、MMP9、TIMP1、VEGFA、VEGFR2 蛋白表达

取约为 3 mm 大小的中段子宫组织,脱水和透明化处理,用石蜡包埋,做成蜡块,用 Thermo 切片机将组织切成 4 mm 厚的薄片,在温水中将组织展平后捞在载玻片上,60 ℃烘烤切片 2 h;对切片进行免疫组化染色、镜检。切片在高倍镜视野下(200 倍),应用 image pro plus 6.0 图像分析系统进行定量平均光密度分析,棕黄色部位为抗原阳性表达部位。

2.2.3 数据分析

实验数据均采用 GraphPad prism 软件进行统计分析和作图,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所得数据作正态性检验和方差齐性检验后作单因素方差分析。

3 结果

3.1 活性成分筛选

通过 TCMSP 平台数据挖掘,以 OB $\geq 30\%$,与 DL ≥ 0.18 为筛选条件,共得到 8 个成分。根据 2020 版《中国药典》益母草项下含量测定要求,益母草碱和水苏碱为益母草中主要成分。有文献报道,益母草碱通过降低全血黏度、改善大鼠的血瘀状态,通过缩短子宫出血时间、加强子宫收缩和复旧作用^[11];水苏碱能减少米非司酮诱导的流产后子宫出血作用^[12]。因此益母草碱和水苏碱也纳入下一步考察范围。最后得到益母草中活性成分共 10 种,包括花生四烯酸、甘草素、山奈酚、槲皮素、益母草碱等,详见表 1。

表 1 益母草活性成分

Table 1 Active components of Yimuceao

MOLID	化合物 Compound	OB(%)	DL
MOL001439	花生四烯酸 Arachidonic acid	45.57	0.20
MOL001418	甘草素 Galeopsin	61.02	0.38
MOL001422	异胆固醇 Iso-preleoheterin	66.29	0.33
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.60	0.31
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24
MOL001421	卵磷脂 Preleoheterin	85.97	0.33
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28
MOL001420	植物甾醇 Beta-sitosterone	38.00	0.76
MOL001445	益母草碱 Leonurine	19.12	0.20
MOL000447	水苏碱 Stachydrine	0.27	0.03

3.2 化合物靶点和疾病靶点的获取

在 PubChem 数据库中检索益母草活性成分 Canonical SMILES 结构式,输入 Swiss Target Prediction 和 Similarity ensemble approach 平台,并结合 TCMSP 数据库中靶点检索结果,共检索出 601 个靶点;接着

以“postpartum abdominal pain”为关键词,在 OMIM 和 GeneCards 平台上共检索出 800 个产后腹痛相关靶点。利用 R 软件,对化合物靶点和疾病靶点绘制 Veen 图,得到了 144 个化合物与疾病交集靶点(见图 1)。

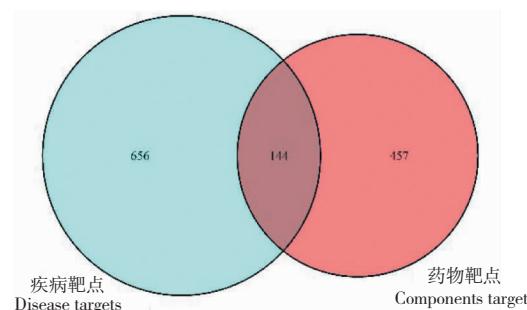


图 1 化合物靶点和疾病靶点 Veen 图

Fig. 1 Veen diagram of component targets and disease targets

3.3 “药物-活性成分-靶点基因-疾病”网络绘制

使用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“药物-活性成分-靶点-疾病”调控网络,共 156 个节点,457 条边。如图 2 所示,外圈红色部分表示 144 个疾病与活性

成分的交集靶点,内圈紫色方块表示的是 10 个活性成分,黄色圆圈表示的是药物益母草,淡蓝色菱形表示疾病“产后腹痛”。

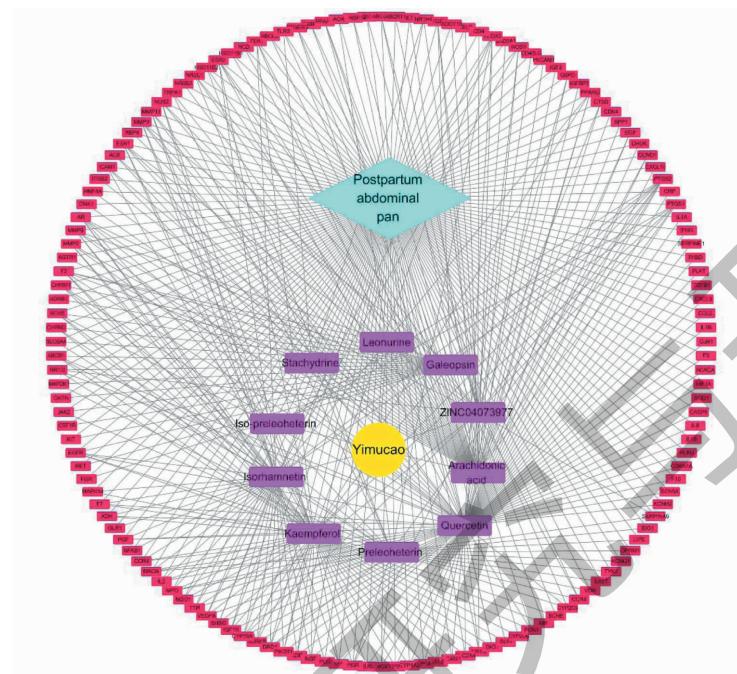


图 2 “药物-活性成分-靶点-疾病”调控网络

Fig. 2 “Drug-active components-targets-disease” regulatory network

3.4 关键靶点蛋白互作网络

将前面得到的 144 个交集靶点输入 STRING 数据库,将最低互作评分(minimum required interaction score)设定为 0.9,得到一个 118 个节点、375 条连线的 PPI 图。如图 3A 所示,利用 R 软件对导出的数据绘图,绘制连接数目处于前 30 名的柱状图。如图 3B 所示,其中度值最高的是 PIK3R1 蛋白,是 PI3K-Akt 通路调控网络中的重要靶点。MMP9、VEGFA 等皆处于较靠前的位置,可能是益母草治疗产后腹痛的重要作用靶点。

3.5 PPI 网络拓扑分析

为进一步研究益母草治疗产后腹痛的潜在作用机制,将上述 PPI 网络筛选出来的靶点录入 Cytoscape 软件的 Bisogenet 插件中进行网络分析,得到第一张有 4 163 个节点、100 338 条边的拓扑分析图。然后以第一张拓扑分析图中 2 倍“degree”中位数值为筛选条件,得到第二张有 1 061 个节点、45 805 条边的拓扑分析图。最后打开 Cytoscape 软件中 CytoNCA 插件,计算“degree”“betweenness”

“closeness”三项的中位数值,并以此为筛选条件,得到第三张包含 98 个节点、2 060 条边的拓扑分析图。分析过程如图 4 所示。

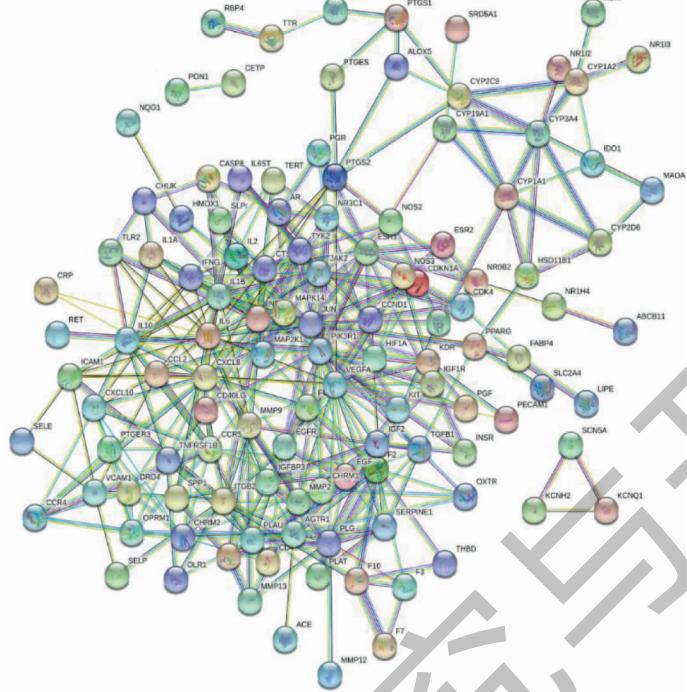
3.6 GO 富集分析

使用 R 软件和 Bioconductor 加载包,对上述拓扑分析得到的 98 个核心靶点以 $P \leq 0.05$ 为筛选条件进行 GO 富集分析,对前 20 项进行可视化。如图 5 所示,GO 生物过程(BP)部分共得到 1 151 个条目,主要包括固有凋亡信号通路、DNA 代谢过程的调控、细胞内受体信号通路、DNA 代谢过程的正向调控、对不正确的蛋白质的反应等过程;GO 细胞组成(CC)分析共确定 97 个条目,主要表现在核染色、粘着斑、细胞基质连接部位、蛋白质-DNA 复合物、泛素连接酶复合物等位置;GO 分子功能(MF)分析根据确定 122 个条目,主要包括与泛素蛋白、泛素样蛋白、类固醇激素受体、核受体、核激素受体结合等方面。

3.7 KEGG 富集分析

将上述拓扑分析得到的 98 个核心靶点导入

A



B

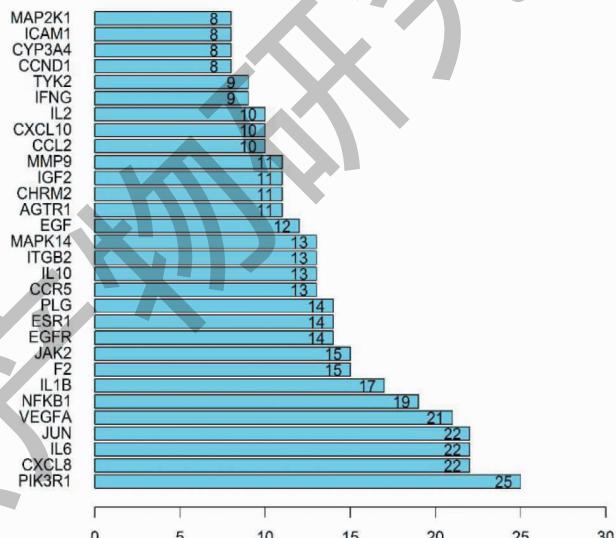


图 3 PPI 网络分析

Fig. 3 The PPI network analysis

注: A: PPI 网络; B: PPI 网络核心节点。Note: A: The PPI network; B: PPI network core nodes.

DAVID 6.8 数据库中,以 $P \leq 0.01$ 为筛选条件,得到 41 条相关通路,按照 P 值由小到大的顺序,选取前 20 的 KEGG 通路,使用 R 软件对其进行可视化处理。如图 6 所示,除了与癌症相关的通路外,雌激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路可能是益母草治疗产后腹痛的主要作用途径。

3.8 实验验证

结合 PPI 网络核心节点分析结果和 KEGG 信号通路富集结果,我们选择 MMP9、TIMP1、VEGFA、VEGFR2 蛋白表达水平进行验证。此外,PGF2 α 能引起子宫平滑肌过度收缩,血管痉挛,造成子宫缺血、缺氧状态而造成腹痛,因此也对 PGF2 α R 蛋白表达水平进行验证。如图 7 所示,与对照组 (control,

Con) 相比, 模型组 (model, Mod) 大鼠子宫中 PGF2 α R、MMP9 蛋白表达水平显著升高; TIMP1、VEGFA、VEGFR2 蛋白表达水平显著降低。而经益母草治疗干预后, 益母草组 (Yimiao, YMC) 大鼠子

宫组织中 PGF2 α R、MMP9 蛋白表达水平相较于模型组显著降低；同时 TIMP1、VEGFR2 蛋白表达水平相较于模型组显著升高。

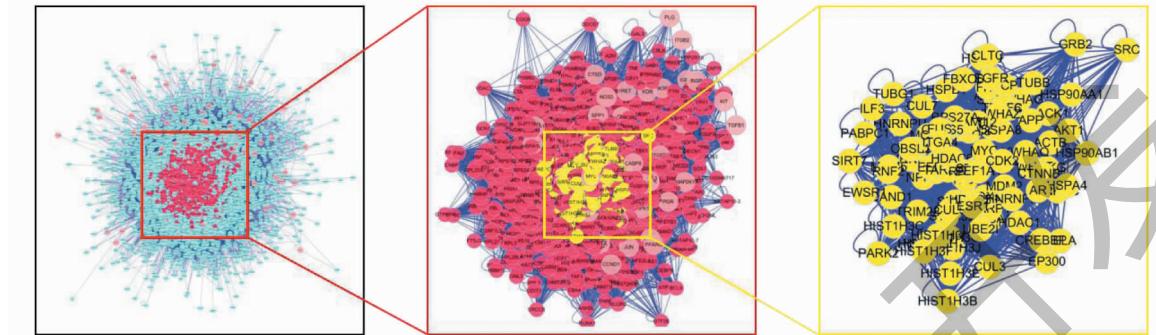
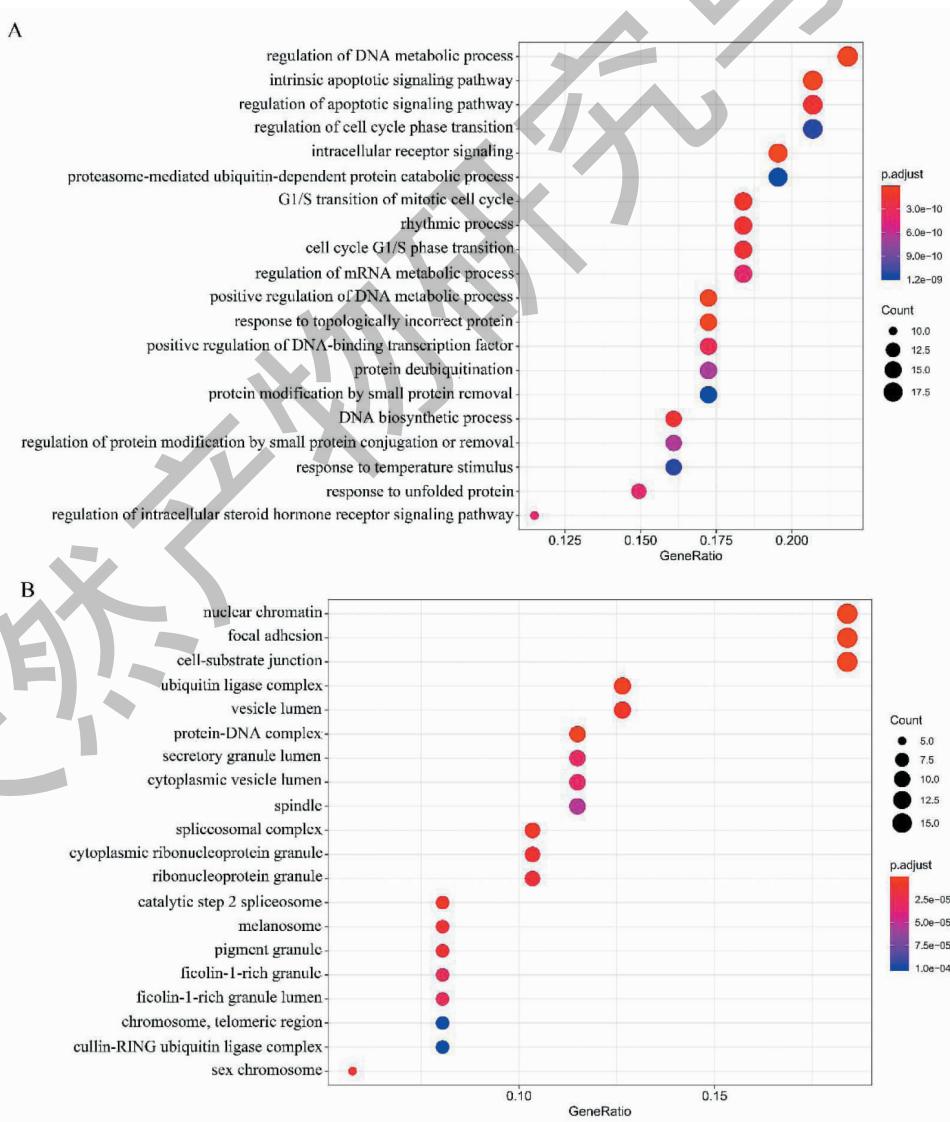


图 4 PPI 网络拓扑分析
Fig. 4 PPI network topology analysis



续图 5(Continued Fig.5)

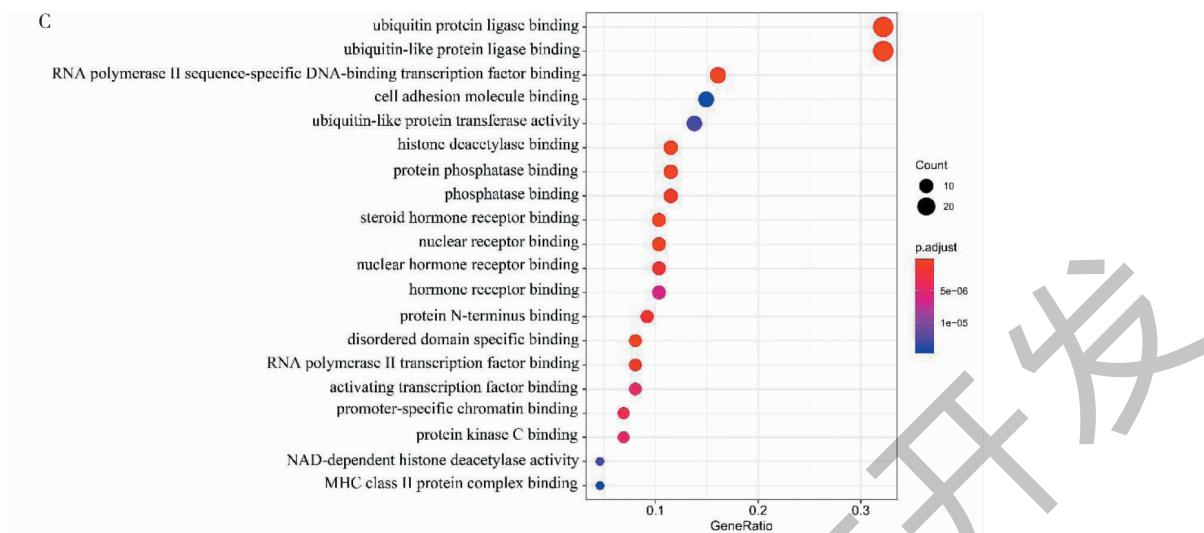


图5 GO富集分析气泡图

Fig. 5 The GO enrichment analysis bubble diagram

注:A:生物过程(BP)分析;B:细胞组成(CC)分析;C:分子功能(MF)分析。Note: A: biological process (BP) analysis; B: cell composition (CC) analysis; C: molecular function (MF) analysis.

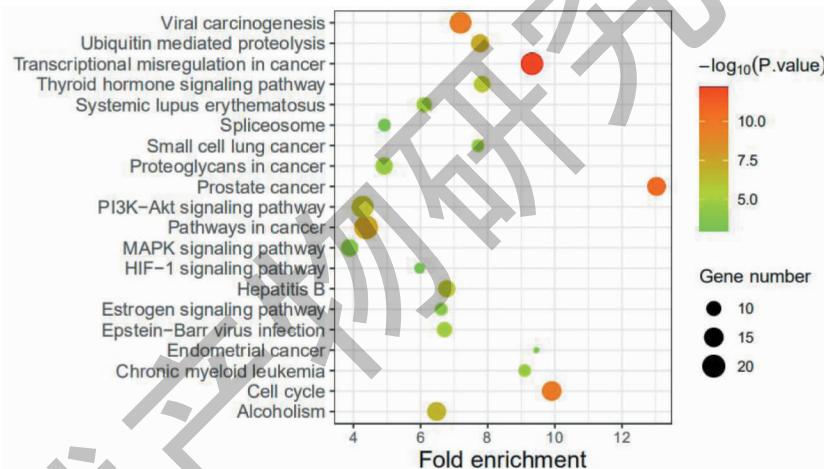


图6 KEGG富集分析气泡图

Fig. 6 KEGG enrichment analysis bubble diagram

4 讨论与结论

网络药理学能整体且系统地研究药物与疾病的相互作用关系,能反应中药多成分、多靶点、多途径相互作用的特点,是研究药物治疗疾病作用机制的一种新方法和工具。益母草是一种常用的中药材,具有活血化瘀、祛瘀生新的功效;研究表明,益母草提取物能启动产后子宫内膜止血修复机制,缓解子宫痉挛。产后腹痛是由于产后子宫缩复作用引起的,中医认为,产后腹痛是由于产后气血运行不畅、瘀滞不通,或产后失血过多造成气血两虚所致^[1]。本文采用网络药理学研究方法,对益母草治疗产后

腹痛的作用靶点及作用机制进行探讨,得到益母草10个活性成分及其144个作用于产后腹痛靶点,免疫组化结果显示益母草可显著抑制模型大鼠子宫组织中 PGF2αR、MMP9 蛋白上调和 TIMP1、VEGFR2 蛋白下调,结合 GO 和 KEGG 富集结果,提示对雌激素、PI3K-Akt、MAPK、HIF-1 信号通路的调控作用可能是益母草治疗产后腹痛的主要作用机理。网络分析结果显示,益母草治疗产后腹痛可能的主要活性成分为槲皮素、山奈酚、花生四烯酸等。研究表明,槲皮素作可为雌激素受体调节剂,与雌激素受体(ER)结合,调控 ER 下游许多底物及信号通路^[13],

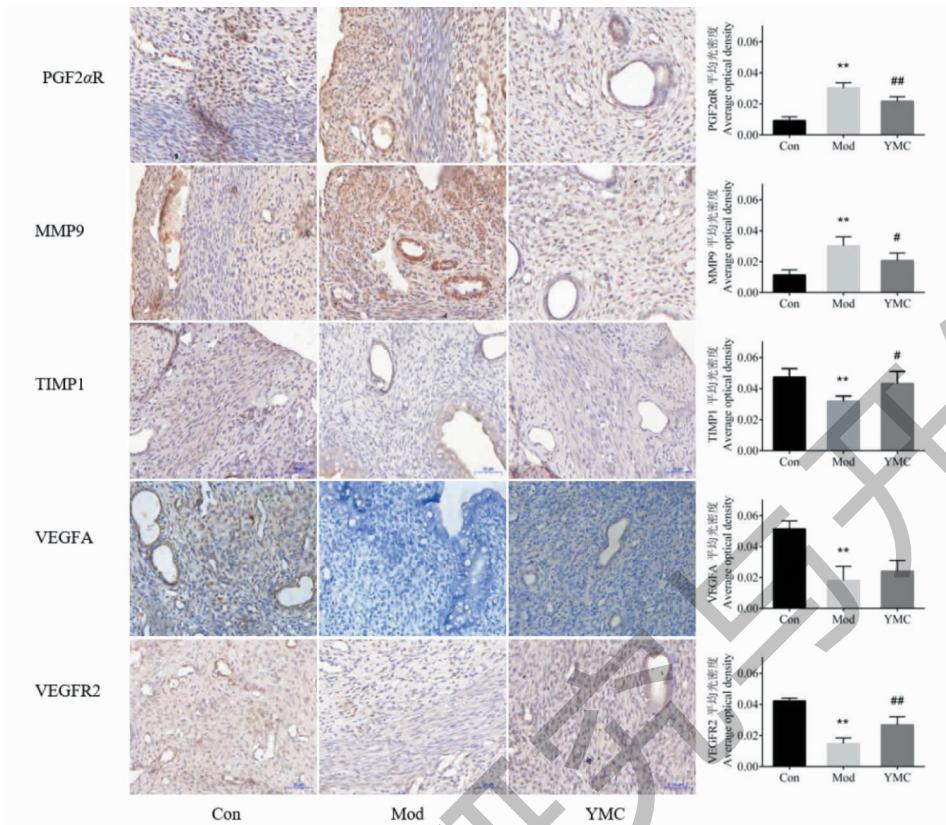


图 7 益母草对流产模型大鼠子宫蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of Yimucao on uterine protein expression in rats with abortion model

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

参与调控子宫收缩,表现出对产后腹痛有调节作用。山奈酚是黄酮类化合物,具有多种生物活性,有研究表明^[14],山奈酚能显著降低兔子动脉血中细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、整合蛋白、单核细胞趋化因子-1 (MCP-1)等黏附分子的基因和蛋白水平,说明山奈酚能够改善血管的瘀滞状况。花生四烯酸既是炎症反应的前体物质,也直接参与调节机体细胞内多种酶的活性和离子通道。作用于 Ca^{2+} 通道,能直接调控 Ca^{2+} 在细胞内的进出,进而影响组织的收缩与松弛,而子宫的缩复也依赖于子宫组织平滑肌细胞对 Ca^{2+} 的调控,因此,山奈酚也对产后腹痛有调节作用。

蛋白互作网络显示,益母草中活性成分可能是通过 PIK3R1、CXCL8、IL6、JUN、VEGFA、NFKB1、IL1B、MMP9 等药物与疾病共有靶点起作用。PIK3R1 中文名为“磷脂酰肌醇 3 激酶”,其在胰岛素的代谢作用中起着重要作用,该基因的突变与胰岛素抵抗有关^[15]。CXCL8 即 IL-8,是趋化因子中的

一员,近年研究发现,其参与了哺乳动物整个生殖过程,也与某些生殖病理过程有关^[16]。VEGFA 即血管内皮生长因子 A,可特异性地作用于内皮细胞,并具有多种作用,如增加血管通透性、诱导血管生成、诱导内皮细胞生长、促进细胞迁移等^[17]。此外,PPI 网络拓扑分析结果显示,多种凋亡抑制因子、细胞增殖因子等也参与了该过程,如 CUL7、AKT1、TP53 等。而产后腹痛的一大原因是产后子宫内膜损伤,造成大出血或恶露不绝,因此,止血损伤修复机制的启动对治疗产后腹痛尤为重要。

GO 注释结果提示,拓扑后的核心靶点主要参与固有凋亡信号通路、DNA 代谢过程的调控、细胞内受体信号通路、DNA 代谢过程的正向调控、对不正确的蛋白质的反应、DNA 生物合成等生物学过程;定位在细胞核染色、粘着斑、细胞基质连接部位、蛋白质-DNA 复合物、泛素连接酶复合物等位置;并与泛素蛋白、泛素样蛋白、类固醇激素受体、核受体、核激素受体等结合。KEGG 富集分析结果显示,有

41 条通路可能参与了益母草治疗产后腹痛的调节,在靠前的 20 条通路中,除了与癌症有关的通路以外,雌激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路等涉及其中。PI3K-Akt 信号通路在调控各种不同细胞功能,如代谢、生长、增殖、存活、转录以及蛋白质合成方面发挥重要作用^[18]。MAPK 存在多种亚族,其中 ERK 广泛存在于多种组织中,高度参与细胞的增殖分化调控^[19]。产后子宫是一个缺氧环境,能激活 HIF-1 信号通路,调控葡萄糖代谢、细胞增殖和血管形成^[20]。

MMP9 是基质金属蛋白酶家族的一员,参与调节雌激素信号通路,在血管生成、细胞迁移和伤口愈合等生理过程发挥作用,在产后子宫复旧的过程中,能促进子宫血管生成和生长。TIMP1 是基质金属蛋白酶组织抑制因子家族的一员,是 HIF-1 信号通路下游效应分子,能和 MMP9 形成复合物而抑制 MMP9 的活性,在产后子宫生理病理过程中起重要作用^[21]。VEGFA、VEGFR2 是血管内皮生长因子的一员,参与子宫内膜血管重塑过程,在产后子宫复旧过程中起重要作用^[22]。

产后腹痛的主要原因是产后子宫血瘀、强直收缩所致。子宫收缩时,引起血管缺血,组织缺氧,神经纤维受压等而产生类似于痛经的疼痛。PGF2 α 过高能引起子宫平滑肌过度收缩,血管痉挛,造成子宫缺血、缺氧状态而造成腹痛^[23]。产后子宫组织处于一个损伤修复状态,血瘀的产生可能与子宫修复过程中微循环障碍有关,即子宫内膜血管修复再生困难。因此,本研究通过米非司酮和米索前列醇制备药物流产大鼠模型,该模型能使大鼠处于子宫出血和血瘀状态,与产后腹痛的部分临床症状相符合,用益母草膏进行干预,对子宫组织中 PGF2 α R、MMP9、TIMP1、VEGFA、VEGFR2 的蛋白表达进行测定。研究结果表明,益母草可显著抑制模型大鼠子宫组织中 PGF2 α R、MMP9 蛋白上调和 TIMP1、VEGFR2 蛋白下调。

综上所述,本研究通过网络药理学,分析了益母草治疗产后腹痛潜在的作用机制,结果指出益母草治疗产后腹痛是通过多成分、多靶点、多途径的方式发挥作用。通过进一步检测益母草对流产模型大鼠子宫组织中相关蛋白表达水平的影响,验证了部分网络药理学的结果,即 PI3K-Akt 信号通路、雌激素信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路可能是益母草治疗产后腹痛的主要作用途径,为进一步研

究益母草的药效及其作用机理提供了可靠的参考。

参考文献

- Tian D,Zhang YL,Dai HQ,et al. Study on the evaluation of clinical application of diagnostic content of TCM Clinical Practice Guidelines for Postpartum Abdominal Pain[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志),2016,31:5130-5133.
- Yang WH,He J,Pan HY. Analysis of new-type usage of analgesics and clinical use of it during perioperative period [J]. China Pharm(中国药房),2012,23:507-509.
- Xie J,Jia CH. Discussion of women's abdominal pain after childbirth in Golden Chamber [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2011,29:1414-1415.
- Wan JL,Du JR,Zeng QZ,et al. Advance in studies on chemical components,pharmacological effect and clinical application of *Leonurus japonicus* [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药),2003,34(11):15-19.
- Zhang RH,Liu ZK,Yang DS,et al. Phytochemistry and pharmacology of the genus *Leonurus*:the herb to benefit the mothers and more [J]. Phytochemistry,2018,147:167-183.
- Huang QF,Feng CE. Bidirectional regulation of motherwort to the uterus smooth muscle in mince [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药),2014,10(14):11-13.
- Dai LP,Xie XF,Sun C,et al. Effect of alkaloid monomer of Yimucao injection on isolated smooth muscle of uterus [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:1633-1638.
- Ye Z,Wang RG. Endometrial hemostasis repair of motherwort in postpartum endometritis rats [J]. Drug Eval Res(药物研究评价),2012,35:246-249.
- Dong PL,Li H,Han H. Application and thinking of Chinese medicine network pharmacology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,26(17):204-211.
- Wang XD,Zhao JN,Zhang BJ,et al. Establishment of uterine bleeding model by mifepristone and misoprostol in early pregnancy rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),1999,15(2):182.
- Li X,Chen FH,Yuan F,et al. Effects of leonurine on uterus induced by drug-abortion in rats [J]. Chin J Clin Pharm Ther (中国临床药理学与治疗学),2009,14:481-486.
- Li X,Wang B,Li Y,et al. The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice [J]. J Ethnopharmacol,2013,145:241-253.
- Pang XG,Cong Y,Bao NR,et al. Quercetin stimulates bone marrow mesenchymal stem cell differentiation through an es-

- trogen receptor-mediated pathway [J]. Biomed Res Int, 2018, 4178021.
- 14 Kong LX, Luo C, Li XY, et al. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits [J]. Lipids Health Dis, 2013, 12:115.
- 15 Ivanova T, Mendez P, Garcia-Segura LM, et al. Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen [J]. J Neuroendocrinol, 2010, 14(1):73-79.
- 16 Huang Z, Du G, Huang X, et al. The enhancer RNA Inc-*SLC4A1-1* epigenetically regulates unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by activating CXCL8 and NF- κ B pathway [J]. EBioMedicine, 2018, 38:162-170.
- 17 Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. J Intern Med, 2013, 273:114-127.
- 18 Pompura SL, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. J Immunol, 2013, 190:531-538.
- 19 Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35:600-604.
- 20 Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. Crit Care Med, 2006, 33:423-425.
- 21 Nothnick , Warren. Regulation of uterine matrix metalloproteinase-9 and the role of microRNAs [J]. Semin Reprod Med, 2008, 26:494-499.
- 22 Girling JE, Rogers PAW. Regulation of endometrial vascular remodelling: role of the vascular endothelial growth factor family and the angiopoietin-TIE signalling system [J]. Reproduction, 2009, 138(6):883.
- 23 Sharif NA. Synthetic FP-prostaglandin-induced contraction of rat uterus smooth muscle in vitro [J]. Prostag Leukot Ess, 2008, 78:199-207.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社