

基于网络药理学探讨琥珀散 治疗子宫内膜异位症的作用机制*

张文娟¹, 李江², 林陶秀¹, 孙新慧¹, 何甜甜¹, 霍超越¹, 马小娜^{1△}

1 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2 北京中医药大学东方医院, 北京 100078

[摘要] 目的: 基于网络药理学研究琥珀散调控上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)治疗子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)的作用机制。方法: 通过中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)、SwissTargetPrediction数据库检索琥珀散的活性成分及靶点; 利用人类基因数据库(the human gene database, GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)、药物靶标数据库(therapeutic target database, TTD)以及DrugBank、PharmGkb数据库检索EMs和EMT靶点, 并绘制韦恩图; 通过Cytoscape 3.7.2软件构建“药物-有效成分-靶点”网络; 对关键靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。结果: 共筛选出琥珀散活性成分111个, 主要包括山柰酚、槲皮素、黄芩苷等; 获得“药物-疾病-表型”靶点198个; GO分析发现主要生物学过程富集在细胞对氧化应激的反应、对活性氧的反应等方面; KEGG分析发现主要富集在PI3K/AKT、MAPK、HIF-1等信号通路方面。结论: 琥珀散调控EMT治疗EMs的作用机制可能与其抑制黏附、侵袭、血管生成等途径有关。

[关键词] 子宫内膜异位症; 上皮-间质转化; 琥珀散; 网络药理学; 作用机制

[中图分类号] R271.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)02-0081-06

Network Pharmacology-based Exploration into the Mechanism of Treating Endometriosis with Amber Powder

ZHANG Wenjuan¹, LI Jiang², LIN Taoxiu¹, SUN Xinhui¹, HE Tiantian¹, HUO Chaoyue¹, MA Xiaona^{1△}

1 The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract Objective: To study the mechanism of treating endometriosis (EMs) with amber (*Hupo*) powder via regulating epithelial mesenchymal transition (EMT) based on network pharmacology. Methods: The active ingredients and targets of the powder were retrieved from TCMSP, SwissTargetPrediction; EMs and EMT targets were searched from GeneCards, OMIM, TTD, DrugBank and PharmGkb database, to draw venney diagrams; Cytoscape 3.7.2 software was used to build "medicine-active ingredients-targets" network; and to perform GO and KEGG enrichment analysis of the key targets. Results: A total of 11 active ingredients of the powder were screened out, mainly containing kaempferol, quercetin and baicalin; all 198 targets of "medicine-disease-phenotype" were obtained; GO analysis displayed that the main biological processes were enriched in the response of cells to oxidative stress and reactive oxygen species; KEGG enrichment analysis indicated that the main pathways were PI3K/AKT, MAPK and HIF-1 and others. Conclusion: The mechanism of the powder in the treatment of EMs via regulating EMT might be related to its inhibition of adhesion, invasion and angiogenesis.

Keywords endometriosis; epithelial mesenchymal transition; amber powder; network pharmacology; mechanism

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是指子宫内膜组织(腺体和间质)出现在子宫体以外部位的疾病, 简称内异症^[1], 其发病率约为10%~15%, 占妇科疾病手术的30%^[2]。EMs可引起女性痛经、不孕、慢性盆腔疼痛等症状, 但其具体发病机制尚未明确。目前, 关于EMs的发病机制仍以经血逆流种植学说为主, 上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)可能是其发病机

制之一^[3-4]。上皮细胞可为基底层与管腔间隙提供片状保护屏障, 当发生EMT后, 子宫内膜细胞因缺乏保护屏障, 容易黏附在腹膜基质上, 最终导致EMs^[5]。这一重要发现是对经血逆流种植学说及在位内膜决定论的进一步补充。因此, 探究EMT在EMs发生发展中的重要作用及确切机制, 对于临床防治EMs具有重要意义。

琥珀散出自《普济本事方》, 具有温阳散寒、祛

瘀消癥之功效,由莪术、三棱、当归、赤芍、蒲黄、牡丹皮、刘寄奴、肉桂、菊花、熟地黄各一两组成,以乌豆、生姜、米醋共煎煮,温酒调服。《医宗金鉴·妇科心法要诀》以延胡索、乌药易蒲黄、菊花,增强琥珀散原方活血散寒之功。现临床多采用《医宗金鉴·妇科心法要诀》之琥珀散治疗痛经,具有消癥散结作用,能够明显改善相关指标^[6],但其分子机制尚未明确。本研究采用网络药理学方法,从EMT角度出发,揭示琥珀散治疗EMs的作用机制,为治疗EMs提供一定理论依据。

1 研究方法

1.1 琥珀散活性成分筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)(<http://tcmspw.com>)收集琥珀散中莪术、三棱、赤芍、牡丹皮、当归、熟地黄、官桂、乌药、刘寄奴、延胡索的活性成分,以口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30%和药物相似性(drug-likeness,DL)≥0.18为条件筛选琥珀散主要活性成分。

1.2 活性成分作用靶点预测 利用TCMSP及SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)检索“1.1”项中活性成分靶点,使用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)将靶点转换为相应基因名称。将所得靶点去除重复后得到活性成分靶点基因。

1.3 “药物-疾病-表型”共同靶点筛选 以“endometriosis”和“epithelial-mesenchymal transition”为关键词,物种设定为“Homo Sapiens”,利用人类基因数据库(the human gene database, GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库(online mendelian inheritance in man, OMIM)、药物靶标数据库(therapeutic target database, TTD)以及DrugBank、PharmGkb数据库获取疾病和表型相关靶点。取交集后得到“药物-疾病-表型”共同靶点,绘制韦恩图。

1.4 “药物-有效成分-靶点”网络构建 借助Cytoscape 3.7.2构建“药物-有效成分-靶点”网络。

1.5 “药物-疾病-表型”蛋白-蛋白互作(protein-protein interactions, PPI)网络构建 为明确琥珀散对EMs与EMT靶点蛋白的相互作用,构建“药物-疾病-表型”靶点的PPI网络,并将所得靶点导入STRING在线平台(<https://string-db.org/>),限定物种为“Homo Sapiens”,设置评分条件>0.90,剔除离散节点,将所得PPI网络保存为“TSV”格式。并导入Cytoscape 3.7.2进行可视

化分析。利用CytoNCA插件对靶标的介度中心性(degree centrality, DC)、中介中心性(betweenness centrality, BC)、接近中心性(closeness centrality, CC)及度值等条件进行中位数过滤,筛选关键靶点。

1.6 “药物-疾病-表型”的基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析 将所得“药物-疾病-表型”的关键靶点名称用perl软件转换成entrez ID,然后进入Bioconductor(<http://www.bioconductor.org/>)下载R 4.0.3软件,对所得靶点进行GO及KEGG富集分析。

2 结果

2.1 琥珀散活性成分 筛选得到活性成分三棱5个、莪术4个、赤芍29个、乌药10个、当归2个、牡丹皮11个、刘寄奴5个、延胡索49个、熟地黄2个、肉桂11个,去掉重复活性成分,最终得到琥珀散活性成分111个。

2.2 活性成分作用靶点 在TCMSP数据库中检索得到琥珀散活性成分相关作用靶点284个,在SwissTargetPrediction数据库检索得到琥珀散活性成分相关作用靶点789个。合并两次获得的靶点并去重,共得到琥珀散活性成分靶点893个。

2.3 “药物-疾病-表型”共同靶点 通过各数据库检索“药物-疾病-表型”靶点,并删除重复靶点,共获得198个共同靶点,并绘制韦恩图。见图1。

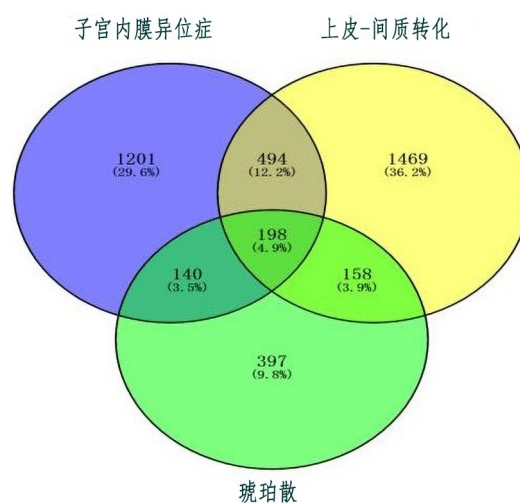


图1 “药物-疾病-表型”共同靶点韦恩图

2.4 “药物-有效成分-靶点”网络 利用Cytoscape软件对药物活性成分-作用靶点关系数据进行网络化构建,其中紫色节点表示琥珀散,蓝色节点代表琥珀散活性成分,红色节点代表活性成分对应的相关靶点,每条边表示活性成分与靶点

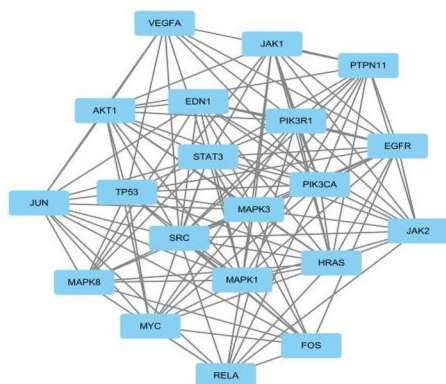
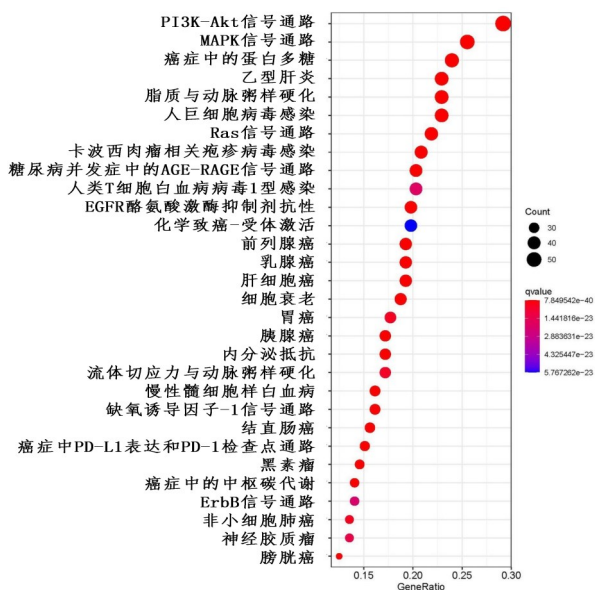


图4 “中药-疾病-表型”PPI核心靶点

表1 “中药-疾病-表型”PPI核心靶点

序号	基因名称	介度中心性	接近中心性	度值
1	VEGFA	2.003246753	0.655172414	9
2	JAK1	2.864307914	0.703703704	11
3	MAPK3	10.76748252	0.863636364	16
4	MAPK8	4.003196803	0.703703704	11
5	PTPN11	2.923110223	0.730769231	12
6	EDN1	3.718398268	0.703703704	11
7	TP53	5.565750916	0.730769231	12
8	HRAS	8.274098124	0.826086957	15
9	SRC	11.42859363	0.863636364	16
10	EGFR	7.935087135	0.791666667	14
11	MAPK1	10.76748252	0.863636364	16
12	FOS	2.054040404	0.678571429	10
13	RELA	4.70966811	0.703703704	11
14	AKT1	7.3001665	0.791666667	14
15	PIK3CA	8.353196803	0.791666667	14
16	JAK2	2.920729271	0.730769231	12
17	JUN	5.769119769	0.730769231	12
18	MYC	3.863514264	0.703703704	11
19	PIK3R1	6.552331002	0.76	13
20	STAT3	12.22647908	0.863636364	16



注:圆点越大表示富集基因数目越多;P值越小表示圆点位置越靠下

图6 KEGG通路富集分析气泡图

3 讨论

EMs 虽为妇科良性疾病,却与恶性肿瘤的生物学行为类似,如扩散、转移、侵袭、浸润及复发等。西医常以手术切除病灶联合激素类药物治疗,但患者5年内复发率高达50%,严重危害患者身心健康^[7-8]。EMT是指上皮细胞向高度活跃的间充质表型转化的过程,可促进细胞迁移、侵袭和再定位,这一过程的主要表现是上皮细胞标记物E-钙黏蛋白下调,以及间质细胞标志物N-钙黏蛋白和波形蛋白等上调,同时细胞的运动及侵袭增强^[9]。EMT常发生于胚胎发育、组织修复、纤维化及肿瘤侵袭转移等过程^[10-11]。研究发现,EMT过程对EMs的形成和进展至关重要^[12-14],其可能参与诱导子宫内膜上皮细胞侵袭和迁移,并提高细胞抗凋亡能力,这些特征有利于子宫内膜异位植入^[15]。上皮细胞具有极性,能够增强细胞的连接和黏附,限制其随意运动,而随着EMT的发生,细胞极性消失,与周边细胞及基质层的连接减弱,易从原发病灶游离,甚至发生侵袭和远处种植^[16-18]。EMT的发生与EMs异位种植及侵袭的生物学特征契合。

中医学认为EMs是异位的子宫内膜周期性出血所致,即“离经之血”,而“瘀血阻滞胞宫、冲任”为EMs基本病机。琥珀散具有温阳散寒,祛瘀消癥之功效,其中乌药、官桂温里散寒,行气止痛;莪术、三棱破血散结;延胡索行气止痛;熟地黄、当归养血活血;牡丹皮、刘寄奴、赤芍活血止痛、消痈散结,是临床治疗EMs的有效方剂。本团队前期对琥珀散治疗EMs进行了研究,发现其治疗痛经,改善相关指标方面效果显著^[6]。琥珀散可通过多



图5 GO功能分析条形图

靶点、多通路干预异位内膜组织的黏附、侵袭及血管生成^[19-20]。

本研究得到琥珀散治疗EMs的活性成分111个,包括山柰酚、槲皮素、黄芩苷、鞣花酸等。槲皮素、山柰酚是类黄酮醇类物质,具有抗炎、抑制血管增生作用。研究表明,槲皮素对子宫内膜细胞的增殖有抑制作用,可诱导其凋亡^[21];黄芩苷为异黄酮类物质,有抗炎、抗氧化等药理作用,研究发现黄芩苷可降低异位内膜基质细胞的存活能力,且能调控细胞周期^[22];鞣花酸有抗突变、抗氧化应激、诱导肿瘤细胞凋亡及调控细胞周期等作用,可抑制内膜间质细胞迁移和黏附能力^[23]。可见,以上化合物为琥珀散治疗EMs的重要活性成分。

PPI结果发现琥珀散治疗EMs的核心靶点可能为血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、TP53基因(tumor protein p53, TP53)等。血管生成是EMs发病的中心环节^[24]。VEGFA在血管系统形成和稳态调控中发挥重要作用。研究发现,EMs患者腹腔液及异位病灶中的VEGFA水平高于正常组^[25]。EGFR对上皮组织细胞增殖和分化有促进作用,子宫内膜中EGFR的表达在EMs患者与非EMs中差异显著^[26]。TP53基因是与肿瘤发生相关的抑癌基因,其与肿瘤的增殖、分化等密切相关,且对细胞侵袭和转移有抑制作用^[27-28]。相较于正常样本,TP53在EMs患者异位子宫内膜中明显降低^[29-30]。

KEGG通路富集结果显示PI3K/AKT、MAPK、癌症相关、RAS、HIF-1等相关信号通路与EMs密切相关。MAPK信号通路可被生长因子和类固醇激素激活,可调控细胞基因表达、增殖、凋亡、浸润、转移及恶变等,其在EMs的研究中越来越受关注^[31]。雌激素能激活MAPK信号通路,EMs病灶中MAPK呈高表达,当鞘内注射抑制剂后可使病灶缩小,且疼痛及神经纤维分布消失^[32-33]。研究发现,PI3K/AKT信号通路对EMs的发生发展具有重要意义,其不仅参与调控异位内膜间质细胞(ectopic endometrial stromal cells, EESC)的增殖、侵袭和迁移,而且影响细胞的EMT^[34]。而抑制PI3K/AKT信号通路活性对EMs有抑制作用^[35-36],PI3K/AKT和RAS-MAPK信号通路能被酪氨酸激酶受体(recepteur d'origine nantaïs, RON)刺激,介导内膜上皮细胞发生EMT^[37]。子宫内膜上皮细胞可能在HIF-1 α 诱导下向间质属性转化,导致细胞转移和侵袭能力增强,从而导致异位病变的发生^[38]。

综上所述,琥珀散调控EMT治疗EMs的作用机制可能与其抑制黏附、侵袭、血管生成等途径有关。本研究运用网络药理学方法,从多层面、多角度对琥珀散调控EMT治疗EMs的潜在作用机制进行了初步探索,今后将在此基础上借助动物与细胞实验进行深入研究,为临床应用提供更重要的证据支持。

参考文献

- [1] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社,2018:261.
- [2] 郎景和. 子宫内膜异位症的研究与设想[J]. 中华妇产科杂志,2003,38(8):33-35.
- [3] BILYK O, COATHAM M, JEWER M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in the female reproductive tract: from normal functioning to disease pathology[J]. Front Oncol, 2017, 7:145.
- [4] OWUSU AKYAW A, KRISHNAMOORTHY K, GOLDSMITH L T, et al. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function[J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(1): 114-133.
- [5] 马雪松, 张宗峰. 上皮-间质转化在子宫内膜异位症发病机制中的作用[J]. 国际妇产科学杂志, 2020, 47(1):101-105.
- [6] 马小娜, 任国辉, 张洪丽, 等. 加味琥珀散治疗肾虚血瘀型子宫内膜异位症患者疗效观察[J]. 河北医药, 2018, 40(23): 3616-3618.
- [7] 赵秀萍, 马小娜, 郭亚楠. 基于网络药理学及分子对接探讨散结镇痛胶囊治疗子宫内膜异位症的分子机制[J]. 西部中医药, 2024, 37(2):77-82.
- [8] 庞瑞康, 冯卓, 何列涛, 等. 子宫内膜异位症相关信号通路及中医药疗法干预研究[J]. 西部中医药, 2024, 37(4):86-90.
- [9] WENG W, WEI Q, TODEN S, et al. Circular RNA ciRS-7-a promising prognostic biomarker and a potential therapeutic target in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(14):3918-3928.
- [10] PAN H, LI T, JIANG Y, et al. Overexpression of circular RNA ciRS-7 abrogates the tumor suppressive effect of miR-7 on gastric cancer via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 440-446.
- [11] XU L, ZHANG M, ZHENG X, et al. The circular RNA ciRS-7(Cdr1as) acts as a risk factor of hepatic microvascular invasion in hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(1):17-27.
- [12] GIUDICE L C, KAO L C. Endometriosis[J]. Lancet, 2004, 364(9447):1789-1799.
- [13] MATSUZAKI S, DARCHA C. Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis[J]. Hum Reprod, 2012, 27(3):712-721.
- [14] HULL M L, ESCARENO C R, GODSLAND J M, et al. Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment[J]. Am J Pathol, 2008, 173(3): 700-715.

- [15] WU R F, HUANG Z X, RAN J, et al. Lipoxin A₄ suppresses estrogen-induced epithelial-mesenchymal transition via ALXR-dependent manner in endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2018, 25(4):566-578.
- [16] CAMPBELL K. Contribution of epithelial-mesenchymal transitions to organogenesis and cancer metastasis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 55:30-35.
- [17] ROUT-PITT N, FARROW N, PARSONS D, et al. Epithelial mesenchymal transition(EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1):136.
- [18] YU M, CHEN Y, LI X, et al. YAP1 contributes to NSCLC invasion and migration by promoting Slug transcription via the transcription co-factor TEAD[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):464.
- [19] 李冰冰, 刘雁峰, 马小娜, 等. 琥珀散对子宫内膜异位症大鼠 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(3):1047-1051.
- [20] MA X, WU Y, LI B, et al. Effect of amber powder on endometrial ultrastructure and MAPK pathway in endometriosis model rats[J]. *Trop J Pharm Res*, 2021, 18(9):1845-1851.
- [21] PARK S, LIM W, BAZER F W, et al. Quercetin inhibits proliferation of endometriosis regulating cyclin D1 and its target microRNAs in vitro and in vivo[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 63:87-100.
- [22] JIN Z, HUANG J, ZHU Z. Baicalein reduces endometriosis by suppressing the viability of human endometrial stromal cells through the nuclear factor- κ B pathway *in vitro*[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4):2992-2998.
- [23] CORMACK B AMC, BILOTAS M A, MADANES D, et al. Potential use of ellagic acid for endometriosis treatment: its effect on a human endometrial cell cycle, adhesion and migration[J]. *Food Funct*, 2020, 11(5):4605-4614.
- [24] YERLIKAYA G, BALENDRAN S, PRÖSTLING K, et al. Comprehensive study of angiogenic factors in women with endometriosis compared to women without endometriosis[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016, 204:88-98.
- [25] DANASTAS K, MILLER E J, HEY-CUNNINGHAM A J, et al. Expression of vascular endothelial growth factor A isoforms is dysregulated in women with endometriosis[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2018, 30(4):651-657.
- [26] AGHAJANOVA L, GIUDICE L C. Molecular evidence for differences in endometrium in severe versus mild endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2011, 18(3):229-251.
- [27] WANG Y, ZHANG Y X, KONG C Z, et al. Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 384(1):121-127.
- [28] NEILSEN P M, NOLL J E, MATTISKE S, et al. Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155[J]. *Oncogene*, 2013, 32(24):2992-3000.
- [29] YANG H, KANG K, CHENG C, et al. Integrative analysis reveals regulatory programs in endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(9):1060-1072.
- [30] ALLAVENA G, CARRARELLI P, DEL BELLO B, et al. Autophagy is upregulated in ovarian endometriosis: a possible interplay with p53 and heme oxygenase-1[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(5):1244-1251.
- [31] 周卫东, 陈琼华, 陈清西. p38 MAPK 及其抑制剂在子宫内膜异位症中的作用[J]. *药学报*, 2010, 45(5):548-554.
- [32] WU Z Y, YANG X M, CHENG M J, et al. Dysregulated cell mechanical properties of endometrial stromal cells from endometriosis patients[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(2):648-655.
- [33] GENOVESE M C. Inhibition of p38: has the fat lady sung?[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(2):317-320.
- [34] MADANES D, BILOTAS M A, BASTÓN J I, et al. PI3K/AKT pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(5):436-440.
- [35] BARRA F, FERRO DESIDERI L, FERRERO S. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway for the treatment of endometriosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(17):3626-3627.
- [36] ZHOU A, HONG Y, LV Y. Sulforaphane attenuates endometriosis in rat models through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Dose Response*, 2019, 17(2):1559325819855538.
- [37] YU Q, WANG J, LI T, et al. Recepteur d'origine nantaïs contributes to the development of endometriosis via promoting epithelial-mesenchymal transition of a endometrial epithelial cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3):1601-1612.
- [38] 熊晓. HIF-1 α 介导子宫内膜腺上皮细胞 EMT 在子宫内膜异位症发病机制中的作用研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.

收稿日期: 2024-06-23

*基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973895)。

作者简介: 张文娟(1995—), 女, 硕士学位。研究方向: 子宫内膜异位症的中西医结合防治。

△通讯作者: 马小娜(1973—), 女, 博士学位, 教授, 主任医师。研究方向: 子宫内膜异位症的中医药治疗。Email: fightandfight@yeah.net。