

基于网络药理学研究归肾丸对薄型子宫内膜大鼠的治疗作用机制

邵芷若¹, 关永格^{2*}, 宋阳³, 刘燕¹, 李玥¹, 吕妍¹

(1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广州 510006;
2. 广州中医药大学第三附属医院, 广州 510000; 3. 广州中医药大学护理学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:该研究通过网络药理学的方法探讨归肾丸治疗薄型子宫内膜的关键核心靶点及相关信号通路等作用机制,进一步运用动物实验加以验证所得靶点,验证归肾丸对薄型子宫内膜的影响。方法:利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库检索归肾丸中8味中药组成的有效化学成分、活性成分靶点和靶点简称;运用GeneCards数据库和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)检索薄型子宫内膜相关的靶点基因;运用韦恩软件对归肾丸的药物靶点和薄型子宫内膜的疾病靶点进行取交集操作,将交集靶点导入STRING数据库及Cytoscape 3.7.2软件进行可视化分析获得“药物-疾病”的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;再将交集靶点输入Enrichr数据库和David数据库分别进行基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。以得到的可能核心关键靶点作为理论基础,建立大鼠薄型子宫内膜模型,归肾丸及雌激素干预21 d后,通过苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠的内膜厚度;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测表皮生长因子受体(EGFR),基质金属蛋白酶9(MMP9),白细胞介素1 β (IL-1 β),丝裂原激活蛋白激酶14(MAPK14)这4个核心关键靶点的蛋白和mRNA的表达水平。结果:通过韦恩软件共获得130个交集靶点;将130个交集靶点导入STRING数据库和Cytoscape软件中,得到包括33个节点,107条边的蛋PPI网络;DAVID 6.8数据库进行GO分析中的功能注释分析,共涉及167个生物过程(BP),22个细胞组分(CC),39个分子功能(MF);DAVID 6.8数据库进行KEGG富集分析,与薄型子宫内膜相关的通路共34条;Western blot和Real-time PCR分别对6组大鼠子宫内膜组织中的EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14蛋白和mRNA的表达结果进行分析,归肾丸能够增强EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14蛋白和mRNA在薄型子宫内膜上的表达。结论:通过网络药理学的理论分析及动物实验的研究结果发现,归肾丸能够有效改善薄型子宫内膜的相关指标,并通过增加EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14蛋白和mRNA表达水平,促进内膜组织增殖,改善内膜偏薄的症状。

[关键词] 归肾丸; 薄型子宫内膜; 网络药理学; 作用机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)17-0168-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211113

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210621.1444.002.html>

[网络出版日期] 2021-06-21 16:44

Mechanism of Guishenwan on Thin Endometrium Rats Based on Network Pharmacology

SHAO Zhi-ruo¹, GUAN Yong-ge^{2*}, SONG Yang³, LIU Yan¹, LI Yue¹, LYU Yan¹

(1. The Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China; 3. School of Nursing of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** This study explores the key core targets of Guishenwan in the treatment of thin endometrium and related signaling pathways through the method of network pharmacology, and further uses

[收稿日期] 20210225(019)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2021A1515011435,2020A151501757);国家自然科学基金项目(81873331);广东省中医药局科研项目(20203003)

[第一作者] 邵芷若,在读硕士,从事中医妇科学研究,E-mail:shaozhiruomiao@163.com

[通信作者] *关永格,博士,副主任医师,从事中医药防治女性生殖障碍及妇科杂病研究,E-mail:gyg2013@yeah.net

animal experiments to verify the obtained targets and verify that Guishenwan are effective for thin endometrium. **Method:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was used to retrieve the effective chemical components, active component targets and target abbreviations of the eight Chinese medicines in Guishenwan, the GeneCards database and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database were used to retrieve thin endometrial related targets gene. Use Wayne software to take the intersection of the drug target of Guishenwan and the disease target of the thin endometrium, and import the intersection target into the STRING database and Cytoscape 3.7.2 software for visual analysis to obtain the "drug-disease" protein protein interaction (PPI) network, then input the intersection target into Enrichr database and DAVID database for gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. Using the obtained possible core and key targets as the theoretical basis, a thin endometrial model in rats was established. After Guishenwan and estrogen intervention for 21 days, the endometrial thickness of rats was observed by hematoxylin-eosin staining (HE) staining. Western blot and quantitative real time polymerase chain reaction (Real-time PCR) detect the protein and mRNA expression levels of the four core key targets of epidermal growth factor receptor (EGFR), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), interleukin-1beta (IL-1 β) and mitogen activated protein kinase 14 (MAPK14). **Result:** The Venn software obtained 130 intersection targets in total, imported 130 intersection targets into the STRING database and Cytoscape database, and obtained a protein interaction network diagram including 33 nodes and 107 edges. DAVID 6.8 database for GO analysis. The function annotation analysis involving 167 biological processes (BP), 22 cell components (CC), 39 molecular functions (MF). DAVID 6.8 database for KEGG enrichment analysis, and thin endometrium related A total of 34 pathways. Western blot and Real-time PCR were used to analyze the expression results of EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 protein and genes in the endometrial tissues of the 6 groups of rats. Guishenwan can enhance the expression of EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 protein and mRNA on the thin endometrium. **Conclusion:** According to the theoretical analysis of network pharmacology and the results of animal experiments, it is found that Guishenwan can effectively improve the related indicators of thin endometrium, and promote the expression of EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 protein and genes. The intimal tissue proliferates and improves the symptoms of thin intima.

[Keywords] Guishenwan; thin endometrium; network pharmacology; mechanism of action

子宫内膜组织是存在于成年女性体内唯一的生理性血管生成组织,正常女性每个周期的内膜剥落也表现出了内膜组织强大的修复能力^[1],但是如果反复受到刮宫、感染、药物等外界因素刺激或者年龄增加等影响,可能会造成子宫内膜逐渐变薄甚至发展成 Asherman 综合征(人工流产后宫颈或宫腔黏连)等不良结局^[2]。受精卵着床及胚胎种植需要容受性良好的子宫内膜,适当的子宫内膜厚度能够为胚胎植入提供黏附侵入场所以及营养支持^[3],而当子宫内膜厚度 < 7 mm 时,子宫内膜的容受性显著降低,很多专家尝试了各种方法治疗或改善薄型子宫内膜的相关症状,从早期的大剂量雌激素应用、促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH-a) 和他莫昔芬等,到现在粒细胞集落刺激因子、干细胞应用等治疗方式的探索^[4],但因存在个体差异,药物作用效果不够显著,而且存在着或多或少的副作用,目前对

于改善子宫内膜偏薄仍然缺乏一种普遍有效的治疗方法。

中医学认为薄型子宫内膜因其内膜过薄而引起月经量少、进而影响胚胎种植而导致不孕的临床症状^[5],可以归属于中医“不孕症”“月经量少”等范畴。归肾丸出自《景岳全书》,原方由熟地黄、菟丝子、山药、枸杞子、山茱萸、杜仲、当归、茯苓 8 味中药组成,具有补肾填精、补阴温阳养血之功效,书中所记载归肾丸主治“肾水真阴不足,精衰血少,腰酸脚软,形容憔悴,遗泄阳衰等证”;临床上现已证实归肾丸可用于月经量少、崩漏等功能失调性子宫出血、多囊卵巢综合征、卵巢早衰、围绝经期综合征等多种类型得妇科病^[6]。临床上归肾丸治疗薄型子宫内膜确有疗效,目前也有较多文献证实归肾丸对治疗薄型子宫内膜确有一定的疗效,周新艳^[7]通过临床疗效观察发现,归肾丸治疗 100 例子宫内膜偏薄

患者的总有效率为95%(治愈65例,有效30例);赵威^[8]运用归肾丸加味治疗40例子官内膜偏薄患者,结果发现临床总有效率达95%,4项临床指标均较前显著改善;许春燕^[9]通过大鼠实验基于基因及蛋白的表达证实归肾丸能够有效改善薄型子宫内大鼠的相关症状。

但是归肾丸作为中药复方组成药物多,有效化学成分复杂,可能作用靶点多,作用机制不明确;网络药理学打破传统药理学的“单味药、单靶点、单通路”的模式,结合多种学科,发挥系统性和整体性的作用,揭示中药复方归肾丸的活性化学成分以及归肾丸治疗薄型子宫内膜的作用机制。因此,本研究拟采用网络药理学的方法及动物实验分析归肾丸治疗薄型子宫内膜可能的分子机制,为归肾丸的临床应用提供合理的理论依据。

1 材料与方法

1.1 归肾丸活性化合物的检索 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)分别检索“熟地黄”“菟丝子”“山药”“枸杞子”“山茱萸”“杜仲”“当归”“茯苓”这8味中药的全部化学成分,通过设置口服生物利用度(OB)≥30%及类药性(DL)≥0.18筛选出潜在的活性成分。将所有靶点基因导入UniProt数据库中进行规范化处理并设置物种为人类,校正得到官方名称,构建中药活性化合物预测靶点数据集。

1.2 薄型子宫内膜疾病靶点的预测 通过检索GeneCards数据库、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)等相关数据库,设置薄型子宫内膜关键词为“thin endometrium”,查找与薄型子宫内膜相关的基因,合并数据库查找的所有关键基因并去除重复和假阳性的基因,得到疾病靶标数据集。

1.3 归肾丸对薄型子宫内膜的作用靶点的预测及“药物-疾病”蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 通过Venny R软件对归肾丸有效化合物的作用靶点联合薄型子宫内膜的作用靶标进行对比分析,以韦恩图的形式展现出药物与疾病的交集靶点;将获得的交集靶点输入STRING数据库进行PPI网络的构建,导出包含作用节点关系信息的tsv文件;将此tsv文件导入Cytoscape 3.7.2软件进行可视化分析构建“药物-疾病”PPI网络图,并借助Cytoscape 3.7.2软件中的NetworkAnalyzer插件对所构建的网络图进行分析。

1.4 归肾丸“药物-成分-靶点-疾病”可视化网络图的构建 通过Cytoscape 3.7.2软件对药物的有效成

分、有效化合物的作用靶点、疾病相关的作用靶标进行可视化分析,将node1,node2,combined score分别设置为source,target,interaction type,构建“复方-中药材-化学成分-核心靶点-疾病靶标”的多层次网络关联图并明确其具体作用机制。

1.5 基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 通过Enrichr数据库对归肾丸治疗薄型子宫内膜的关键基因进行GO富集分析,再将上述预测的交集关键作用靶点导入DAVID 6.8数据库的功能注释工具进行GO富集分析并描述靶点基因的功能,限定物种为人类;利用DAVID 6.8数据库进行KEGG通路富集分析,得到归肾丸治疗薄型子宫内膜的生物学过程及关键的信号通路。

1.6 动物选取及模型建立 选取具有2~3个规律动情周期的48只未交配的性成熟SD雌性大鼠,鼠龄8~10周,体质量(180±20)g,购于并饲养于广州中医药大学实验动物中心,温度21~23℃,相对湿度约50%,实验动物许可证号为SYXK(粤)2018-0001,随机分配为6组(归肾丸高、中、低剂量组,戊酸雌二醇组,模型组,假手术组)。本实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(20200524002)。

1.7 试剂与仪器 归肾丸组方药材,熟地黄30g(批号S7520321),菟丝子15g(批号T2719016),当归10g(批号200702121),杜仲15g(批号200800781),茯苓15g(批号200801),枸杞子15g(批号200601),山药15g(批号200801),山茱萸15g(批号200801),共130g,由广州中医药大学第一附属医院提供;表皮生长因子受体(EGFR)抗体,基质金属蛋白酶9(MMP9)抗体,白细胞介素(IL)-1β抗体,丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)1抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体(美国Abcam公司,批号分别为Ab52894,Ab76003,Ab9787,Ab32081,Ab181602);MAPK14抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号Bs-28027R);二抗羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)辣根过氧化物酶(HRP)(南京巴傲得生物科技有限公司,批号BS13278);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号C0105);戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司,国药准字J20171038)。

YD-6D型石蜡包埋机(金华市益迪医疗设备厂),7300型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司),C1000 Thermal cycler型PCR仪(美国Bio-Rad公司),RT-6000型自动酶标

仪(上海净信实业发展有限公司),LG2000型数码凝胶图像分析系统(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),CX41型电子显微镜(日本Olympus公司)。

1.8 模型构建及灌胃药液的制备 观察动情周期后,于动情期当天进行薄型子宫内膜模型建立^[34]。打开大鼠腹腔后找到呈“V”型的子宫,将一侧子宫的近端和远端进行活结结扎,无齿镊轻轻拉直子宫,在子宫两侧周围用无菌盐水棉球保护防止无水乙醇损伤腹腔内其他组织;注射器针头从子宫远端沿水平方向刺入,缓慢向宫腔内注射无水乙醇至子宫饱满充盈并保持针头固定以防止无水乙醇外溢,5 min后缓慢回抽无水乙醇;换生理盐水反复冲洗宫腔2~3次后解开活结丝线;另一侧子宫同上处理操作。

归肾丸组方共计130 g,水提2次,每次加入蒸馏水1 000 mL,浸泡30 min,煎煮1 h,过滤取汁后将2次的滤汁混合并浓缩至46 mL,含生药量为 $2.824\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$;取戊酸雌二醇片约25.2 g研磨成粉,配置蒸馏水至320 mL,含生药量 $0.0788\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.9 大鼠用药剂量及给药 大鼠的灌胃药液用量根据大鼠用药量与人的用药量的对比换算,大鼠体质量取225 g,人的体质量取60 kg。换算公式为 $DB=DA\times(KB/KA)\times(WA/WB)^{1/3}$,其中DB为大鼠的每千克体质量剂量,DA为人的每千克体质量剂量,KB为大鼠体型系数,KA人的体型系数,WB为大鼠体质量,WA为人的体质量。

归肾丸高剂量组按照人的给药等效剂量的2倍即含生药量 $5.648\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,即每日取归肾丸药液2 mL稀释至4 mL;归肾丸中剂量组按照人的给药等效剂量的等倍即含生药量 $2.824\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,即每日取归肾丸药液1 mL稀释至4 mL;低剂量组按照人的给药等效剂量的0.5倍即含生药量 $1.412\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,即每日取归肾丸药液0.5 mL稀释至4 mL;戊酸雌二醇组予以戊酸雌二醇灌胃药液 $1.576\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (大鼠体质量);模型组和假手术组每日予以生理盐水4 mL,均连续21 d进行灌胃。停药后连续观察2个动情周期,于动情期的第1天将大鼠处死,并提取标本,将标本置于4%多聚甲醛中固定。

1.10 结果检测 石蜡包埋常规切片,HE染色观察大鼠子宫内膜的形态学变化。蛋白免疫印迹法(Western blot)和Real-time PCR检测子宫内膜上与网络药理学结果对应靶点的蛋白及mRNA表达水平。

2 结果

2.1 归肾丸中药化学成分 通过检索TCMSP数据库,设置范围为 $OB\geq 30\%$, $DL\geq 0.18$,共得到139个有效化学成分,其中当归2个、杜仲28个、茯苓15个、枸杞子45个、山药16个、山茱萸20个、熟地黄2个、菟丝子11个。

2.2 薄型子宫内膜疾病靶标 从GeneCards数据库中收集到1 277个基因,通过OMIM数据库未搜集到与薄型子宫内膜相关的靶点信息,将搜集到的靶点信息经剔除重复处理,共得到1 234个薄型子宫内膜相关的靶标基因。

2.3 归肾丸潜在作用靶点基因与薄型子宫内膜靶标基因的Venn分析 通过Venny R软件对归肾丸中药物的化学成分对应的216个作用靶点与1 234个薄型子宫内膜相关的作用靶标进行Venn分析,得到130个归肾丸治疗薄型子宫内膜的交集的潜在作用靶点,通过Venn分析可以计算出归肾丸对薄型子宫内膜的靶点基因的映射率为9.8%,表明归肾丸治疗薄型子宫内膜可以有显著特异性。

2.4 “药物-疾病”靶点网络 将上述的130个交集靶点输入STRING数据库中,将物种设置为人类、medium confidence>0.900并剔除游离节点,得到了包括130个节点,476条相互作用线,平均节点度为7.32,平均局部聚类系数为0.457的药物-疾病PPI网络;通过数据处理,使得靶点互作的个数按照顺序排列,获得排名前30的归肾丸治疗薄型子宫内膜的关键靶点,即核心靶点蛋白。对这些关键靶点进行分析,一部分参与细胞信号转导的,如MAPK1,MAPK14,MAPK8;一部分参与抗炎作用,如IL-6,IL-1 β ;一些是参与细胞生长、增殖和分化的,如表皮细胞生长因子(EGF),EGFR,血管内皮生长因子(VEGFA);还有一些参与血管内皮细胞黏附作用、血管的舒张收缩等。

2.5 药物-成分-靶点-疾病可视化网络的构建 在Cytosacpa 3.7.2软件中构建药物-成分-靶点-疾病直接靶点网络,代表归肾丸-薄型子宫内膜靶点的相互作用关系。其中不同形状和颜色的节点所代表的信息不同,红色菱形代表疾病,橙色圆形代表中药的组成,绿色三角形代表归肾丸与薄型子宫内膜潜在靶点的交集靶点基因,蓝色方形代表有效成分。见图1。

2.6 GO富集分析 通过Enrichr数据库对归肾丸治疗薄型子宫内膜的关键基因进行GO富集分析。通过David6.8数据库对交集关键靶点进行功能注释

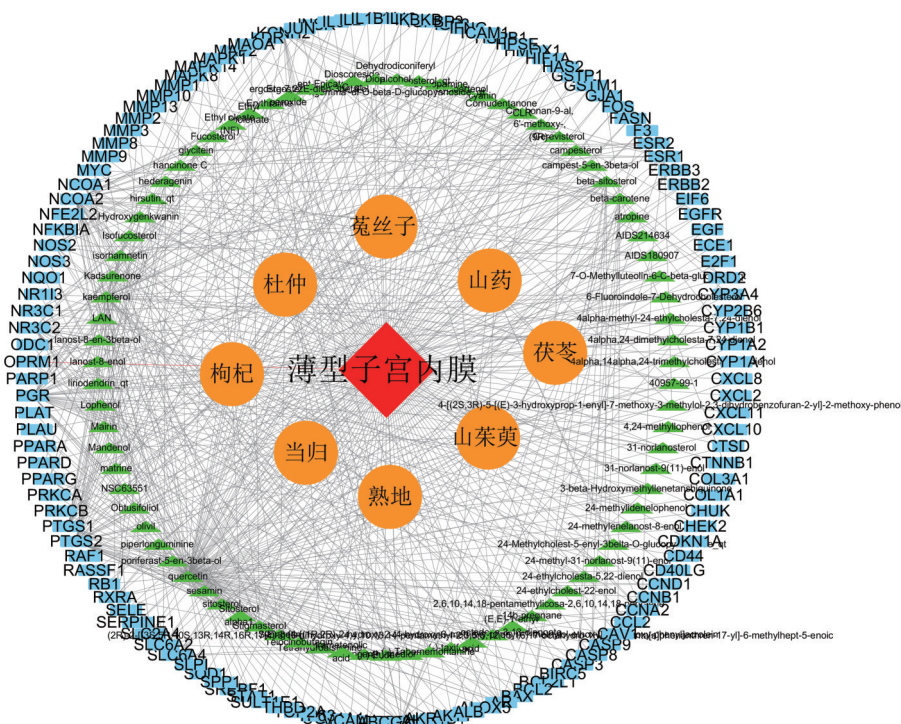


图 1 药物-成分-靶点-疾病的可视化网络

Fig. 1 Visual network diagram of drug-component-target-disease

分析,结果显示涉及 167 个生物过程(BP),22 个细胞组分(CC),39 个分子功能(MF)。

2.7 KEGG 信号通路富集分析 将 130 个交集靶点投入 DAVID 6.8 数据库进行 KEGG 信号通路富集分析,对结果进行功能注释,共得到 105 条信号通路,具有统计学意义($P < 0.01$)的共有 85 条基因通路信息,其中与薄型子宫内膜相关的通路共 34 条。归肾丸可能主要通过调节上述信号通路作用于薄型子宫内膜。见表 1。

2.8 实验大鼠一般情况 空白组大鼠一般情况较好,毛发、爪、尾、耳朵均呈现正常光泽,反应灵敏,大便正常,体质量呈稳态增长。薄型子宫内膜模型组大鼠毛发干枯无光泽,出现蜷缩少动,反应迟钝,大便稀软、便溏等情况,体质量增长幅度小甚至减少;部分大鼠有腹胀现象,腹胀处有一圆形隆起,触感柔软有波动感。造模术后 7 d,大鼠均无感染,模型组大鼠 1 例因麻醉过量致死。

2.9 HE 染色结果观察 假手术组内的正常大鼠子宫内膜组织结构完整,内膜由内到外依次为内膜层、肌层、浆膜层,结构清晰;其中内膜层相较最厚,由单层柱状上皮细胞与间质构成,腺上皮细胞及腔上皮细胞形态完整正常并呈现排列紧密的单层立方状,间质无水肿,其内含丰富腺体及血管。模型组大鼠的子宫组织全壁均变薄,子宫腔或变宽阔或

变狭窄,内膜结构较假手术组相比不完整,腺上皮细胞及腔上皮细胞排列紊乱且少量坏死,呈扁平状或低柱状,间质腺体及血管明显减少稀疏,见图 2。

各组标本内膜厚度相比较,模型组的内膜厚度明显偏低($P < 0.05$),假手术组的内膜厚度较其余各组均偏厚;归肾丸高剂量组较其他用药组的内膜厚,见表 2。

2.10 Western blot 及 Real-time PCR 检测 EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 的蛋白和 mRNA 的表达水平结果 归肾丸组较戊酸雌二醇组及假手术组中子宫内膜组织的 EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 蛋白表达均明显增加($P < 0.05$),其中归肾丸高剂量组较归肾丸中、低剂量组的各蛋白表达水平更明显偏高($P < 0.05$),见表 3,图 3。

归肾丸高剂量组的 EGFR mRNA 相对表达量较戊酸雌二醇组($P < 0.05$)和模型组($P < 0.05$)均明显偏高;归肾丸高、中剂量组的 MMP9 mRNA 的相对表达量较其余各组均增加;归肾丸高、中剂量组较低剂量组和雌激素组的 IL-1 β mRNA 的相对表达量明显升高($P < 0.05$);归肾丸高、中、低剂量组较雌激素组的 MAPK14 mRNA 的相对表达量升高,见表 4。

3 讨论

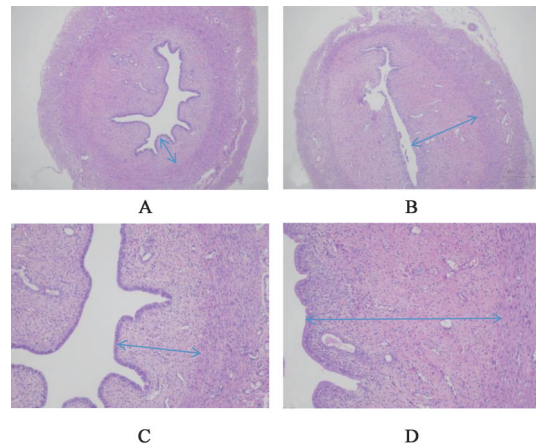
本研究为了更好地探讨归肾丸治疗薄型子宫

表 1 薄型子宫内膜相关通路信息(KEGG 通路富集)

Table 1 Information on related pathways of thin endometrium (enriched with KEGG pathway)

| 通路ID | 通路名称 | 数量/个 | -lgP |
|----------|---|------|--------|
| hsa04151 | PI3K/Akt signaling pathway | 26 | 8.742 |
| hsa04010 | MAPK signaling pathway | 24 | 8.955 |
| hsa01522 | endocrine resistance | 19 | 13.829 |
| hsa04066 | HIF-1 signaling pathway | 18 | 11.841 |
| hsa04210 | apoptosis | 18 | 10.160 |
| hsa04218 | cellular senescence | 17 | 8.103 |
| hsa04068 | FoxO signaling pathway | 16 | 8.531 |
| hsa04014 | Ras signaling pathway | 16 | 5.077 |
| hsa01521 | EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance | 15 | 10.815 |
| hsa04064 | NF-kappa B signaling pathway | 15 | 9.164 |
| hsa01524 | platinum drug resistance | 14 | 10.176 |
| hsa04012 | ErbB signaling pathway | 13 | 8.202 |
| hsa04062 | chemokine signaling pathway | 13 | 4.184 |
| hsa04015 | Rap1 signaling pathway | 13 | 3.719 |
| hsa04370 | VEGF signaling pathway | 12 | 9.086 |
| hsa04115 | p53 signaling pathway | 12 | 8.039 |
| hsa04060 | cytokine-cytokine receptor interaction | 12 | 1.949 |
| hsa04071 | sphingolipid signaling pathway | 11 | 4.784 |
| hsa04024 | cAMP signaling pathway | 10 | 2.050 |
| hsa04217 | necroptosis | 9 | 2.392 |
| hsa04215 | apoptosis-multiple species | 8 | 6.948 |
| hsa00980 | metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 | 8 | 4.003 |
| hsa04061 | viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor | 8 | 3.176 |
| hsa04152 | AMPK signaling pathway | 8 | 2.660 |
| hsa04110 | cell cycle | 8 | 2.571 |
| hsa04140 | autophagy-animal | 8 | 2.305 |
| hsa04072 | phospholipase D signaling pathway | 8 | 2.106 |
| hsa04150 | mTOR signaling pathway | 8 | 2.022 |
| hsa00982 | drug metabolism-cytochrome P450 | 7 | 3.345 |
| hsa00140 | steroid hormone biosynthesis | 6 | 2.997 |
| hsa01523 | antifolate resistance | 5 | 3.540 |
| hsa04137 | mitophagy-animal | 5 | 2.080 |
| hsa00830 | retinol metabolism | 5 | 2.026 |
| hsa00380 | tryptophan metabolism | 4 | 2.066 |

内膜的作用机制,采用网络药理学的方法发现,蛋白激酶 B (Akt) 1, MAPK1, IL-6, ESR1, MAPK14,



A, C. 模型组; B, D. 假手术组; A, B. 40 倍镜; C, D. 100 倍镜

图 2 归肾丸大鼠子宫内膜的影响(HE)

Fig. 2 Observation of HE Staining of Endometrium (HE)

表 2 各组大鼠子宫内膜厚度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of endometrial thickness of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·mL | n | 子宫内膜厚度/mm |
|-------|---------|---|-----------------------------|
| 模型 | | 8 | 0.422±0.319 ¹⁾ |
| 假手术 | | 8 | 0.889±0.193 |
| 戊酸雌二醇 | 1.576 | 8 | 0.285±0.211 ¹⁾ |
| 归肾丸 | 1.412 | 8 | 0.355±0.431 ^{1,2)} |
| | 2.824 | 8 | 0.435±0.380 ¹⁾ |
| | 5.648 | 7 | 0.694±0.274 ^{1,3)} |

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05;与戊酸雌二醇组比较²⁾P<0.05;与归肾丸低剂量组相比³⁾P<0.05。

EGFR, VEGFA, 表皮生长因子(EGF), IL-1 β , MMP9 等可能是归肾丸治疗薄型子宫内膜得关键作用靶点,相关研究发现^[10], Akt1 的介导促使巨噬细胞中 miR-155 表达受到抑制,从而对颈动脉结扎诱导的内膜增生产生抑制作用,表明下调 Akt1 的表达可能对内膜的增长有促进作用。MAPK1, MAPK14 在肿瘤细胞的增殖、分化和侵袭过程中发挥着至关重要的作用^[11], 研究发现, MAPK1 能够促进细胞的增殖,有相关报道称 MAPK1 能够促进晶状体上皮细胞的增殖,因此可以通过上调 MAPK1, MAPK14 的表达调控内膜细胞的增殖分化^[12]。ESR1 是一种雌激素受体,正常情况下,雌激素-雌激素受体结合能够促进骨髓间充质干细胞的归巢和迁移,有助于子宫内膜在正常的生理周期中进行增生修复,相关实验^[13]证实过表达的 ESR1 可以增加骨髓间充质干细胞的归巢而预防薄型子宫内膜的发病。EGF 在细胞增殖和凋亡中有着重要作用^[14], 有报道发现 EGF 能够激活内膜细胞的酪氨酸磷酸化并与其具有酪

表 3 归肾丸不同处理组大鼠 EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 蛋白的相对表达 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Expression of EGFR, MMP9, IL-1 β , and MAPK14 of Guishenwan treatment ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 剂量 | n | EGFR/GAPDH | MMP9/GAPDH | IL-1 β /GAPDH | MAPK14/GAPDH |
|-------|-------|---|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 模型 | | 8 | 0.603 \pm 0.199 ¹⁾ | 1.222 \pm 0.286 | 1.455 \pm 0.2121 | 1.618 \pm 0.247 |
| 戊酸雌二醇 | 1.576 | 8 | 0.716 \pm 0.139 | 0.663 \pm 0.255 ²⁾ | 0.638 \pm 0.327 ^{2,4)} | 0.658 \pm 0.263 ²⁾ |
| 归肾丸 | 1.412 | 8 | 0.944 \pm 0.165 ^{2,3)} | 1.234 \pm 0.224 ³⁾ | 0.489 \pm 0.337 ^{2,4)} | 0.946 \pm 0.409 ²⁾ |
| | 2.824 | 8 | 0.911 \pm 0.180 ^{2,3)} | 1.421 \pm 0.237 ³⁾ | 0.954 \pm 0.411 ^{2,4)} | 1.055 \pm 0.342 ^{2,3)} |
| | 5.648 | 7 | 0.854 \pm 0.239 ²⁾ | 1.489 \pm 0.213 ³⁾ | 0.840 \pm 0.348 ^{2,4)} | 1.657 \pm 0.213 ^{3,5)} |

注: 设假手术组各指标蛋白相对表达为 1; 与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较²⁾ $P<0.05$; 与戊酸雌二醇组比较³⁾ $P<0.05$; 与归肾丸低剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$; 与归肾丸中剂量组比较⁵⁾ $P<0.05$ (表 4 同)。

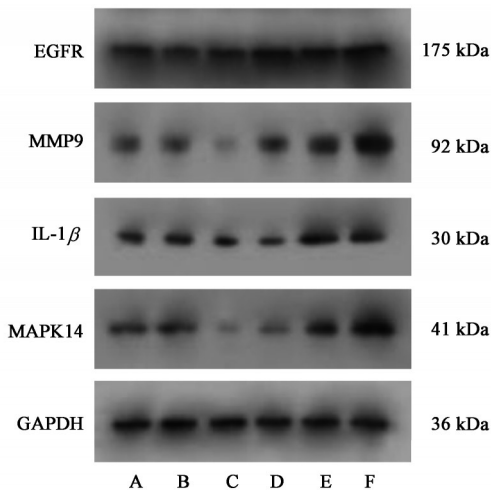


图 3 不同归肾丸处理组中 EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 的蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of EGFR, MMP9, IL-1 β , and MAPK14 protein expression

氨酸激酶活性的细胞受体结合,使 ERK 信号通路激活,有利于加速内膜上皮细胞的增殖并改善薄型子宫内膜的症状,从而提高子宫内膜的容受性^[15-16]。IL-1 β 是目前公认的子宫内膜容受性的具有特征性的细胞因子,有报道通过检测提示 IL-1 β 的分泌水平可能作为胚胎着床潜能的参考指标,表明通过对 IL-1 β 在内膜上的表达的调控,可能可以改善子宫内膜的容受性^[17]。MMP9 是促进血管生成并反应

内膜增殖的相关基因,相关研究证实调控通过 MAPK 家族中的相关信号通路可以将磷酸化 ERK, P38 等的表达水平提高,上调下游的目的基因的蛋白以及 mRNA 的表达水平,从而提高 MMP9 蛋白及 mRNA 的表达水平,有利于细胞的迁移和促进血管的生成等多重因素,最终使得子宫内膜的容受性提高^[18]。

基于前期的网络药理学研究,考虑到排名靠前的作用靶点和信号通路,认为 MAPK 信号通路在归肾丸治疗薄型子宫内膜发挥重要作用,同时 IL-1 β , MAPK1, MMP9, EGFR, MAPK14 等属于该信号通路的关键基因也在网络药理学结果中处于排名靠前的作用靶点,因此将这些候选靶点作为后面动物实验研究中的重点研究指标。

归肾丸主要功效为补肾填精,目前国内已有许多学者通过对补肾中药修复子宫内膜、增加子宫内膜厚度进行研究,探索中药改善薄型子宫内膜症状的可行性。刘卓等^[19]设置了 40 例观察组和 40 例对照组肾阴虚型不孕症患者,观察组服用中成药二至天葵颗粒,对照组不做处理,结果发现观察组的子宫内膜厚度、容积及分型,子宫内膜下血流,子宫动脉搏动指数(PI)和阻力指数(RI),内膜下血管化指数(VI),血流指数(FI),血管化血流指数(VFI)均较对照组有所改善,并且有显著性差异。尹晓丹等^[20]

表 4 EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Relative expression of EGFR, MMP9, IL-1 β , and MAPK14 mRNA ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 剂量 | n | EGFR | MMP9 | IL-1 β | MAPK14 |
|-------|-------|---|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 假手术 | | 8 | 0.941 \pm 0.114 | 0.939 \pm 0.161 | 1.169 \pm 0.170 | 1.391 \pm 0.360 |
| 模型 | | 8 | 0.701 \pm 0.215 | 0.968 \pm 0.134 | 1.129 \pm 0.510 | 1.914 \pm 0.477 |
| 戊酸雌二醇 | 1.576 | 8 | 0.731 \pm 0.168 | 0.429 \pm 0.136 ^{2,4,5)} | 0.170 \pm 0.031 ^{2,4,5)} | 0.349 \pm 0.084 ^{2,4,5)} |
| 归肾丸 | 1.412 | 8 | 1.462 \pm 0.851 | 0.893 \pm 0.213 ³⁾ | 0.153 \pm 0.039 ²⁾ | 0.724 \pm 0.173 ^{2,3)} |
| | 2.824 | 8 | 1.284 \pm 0.457 | 1.141 \pm 0.220 ^{3,4)} | 0.312 \pm 0.422 ^{2,3,4)} | 0.778 \pm 0.167 ^{2,3)} |
| | 5.648 | 7 | 1.277 \pm 0.308 ^{2,3)} | 1.656 \pm 0.226 ^{2,3,4,5)} | 0.303 \pm 0.065 ^{2,3,4)} | 1.780 \pm 0.401 ^{3,4,5)} |

通过细胞实验验证补肾活血中药对阻断 Wnt/ β -连环蛋白(catenin)信号通路从而起到影响薄型子宫内膜干细胞标志物的作用,结果发现与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关的蛋白 CD34/CD117/ABCG2 蛋白及 Oct-4 基因的表达在高剂量组和西药组中均下降,证实补肾中药作用于薄型子宫内膜是有效的。王慧等^[21]选取 48 例采用米非司酮和米索前列醇造成完全流产的大鼠模型,结果显示补肾中药组大鼠的血清雌二醇(E₂)和子宫内膜组织的 VEGF 含量都较其他各组明显升高,孕酮(P)较各组明显降低,证实了补肾中药促进子宫内膜修复的作用。本实验研究用 HE 染色法测量各组大鼠的内膜厚度,从实验结果分析显示归肾丸各剂量组大鼠较其他模型组大鼠的内膜间质更疏松、内膜腺体数量及微小血管更为丰富、子宫内膜厚度偏厚,且作用效果与归肾丸的浓度增加成正比。本实验结果表明归肾丸可以明显改善薄型子宫内膜的症状,增加子宫内膜厚度,对于损伤后的子宫内膜具有良好的修复作用。

进一步研究归肾丸对改善薄型子宫内膜的影响,采用 Western blot 和 PCR 检测子宫内膜组织上的 EGFR, MMP9, IL-1 β , MAPK14, MAPK1 蛋白和 mRNA 的表达水平。EGF 能够通过刺激血管细胞生长和促进血管生成在细胞增殖和凋亡中发挥重要作用,其受体 EGFR 则能发挥雌激素样作用促进子宫内膜细胞的增殖^[22]。有报道显示 EGF 能够激活内膜细胞上的细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路,促酪氨酸磷酸化并与其具有酪氨酸激酶活性的细胞受体结合,有利于加速内膜上皮细胞的增殖并改善薄型子宫内膜的症状,从而提高子宫内膜的容受性。本实验结果发现,归肾丸高、中、低剂量组的 EGFR 蛋白表达较雌激素组和模型组的 EGFR 蛋白表达增加;高剂量组的 EGFR 基因相对表达量比雌激素组和模型组的相对表达量偏高,说明归肾丸能够增强 EGFR 在子宫内膜上的表达水平,从而刺激子宫内膜细胞增殖,促进内膜生长;浓度相对来说越高发挥作用的效果越突出。

MMP9 的表达与子宫内膜容受性相关,有研究认为 MMP9 等蛋白的强阳性表达能够加速其相关蛋白的水解酶活性并通过完成细胞外基化的过程,促使内膜细胞进行分化和蜕膜化表现,从而增加子宫内膜的容受性^[23]。同时,研究发现 MMP9 在子宫内膜中的腺上皮上于增殖早期表达几乎为零,在增殖晚期和排卵后期的表达显示为显著强阳性表达^[24]。从 MMP9 蛋白在本实验中的子宫内膜组织

上的表达情况观察,归肾丸高剂量组与假手术组相比表达增加,归肾丸低、中、高剂量组与雌激素组相比 MMP9 的表达水平均明显升高,其中归肾丸高剂量组的 MMP9 蛋白表达明显最高;从 MMP9 基因的相对表达量分析,归肾丸高、中、低剂量组的 MMP9 基因相对表达量均较戊酸雌二醇组偏高,其中高剂量组较其他各组的 MMP9 基因相对表达量均偏高且最高、中剂量组较低剂量组和戊酸雌二醇组的 MMP9 基因相对表达量升高,说明归肾丸能够增加 MMP9 在子宫内膜组织上的表达且与表达量与浓度成正比,从而促进内膜细胞分化,修复损伤的子宫内膜。

IL-1 β 是一种具有多细胞效应的与生殖活动密切相关的一种细胞因子,其能够促进或抑制细胞生长和参与细胞增殖分化^[25];IL-1 β 还是目前公认的子宫内膜容受性的具有特征性的细胞因子,有报道通过检测提示 IL-1 β 的分泌水平可能作为胚胎着床潜能的参考指标,表明通过对 IL-1 β 在内膜上的表达的调控,可能可以改善子宫内膜的容受性^[26],有助于胚胎植入^[27]。Western blot 结果显示,模型组的 IL-1 β 蛋白较假手术组的正常子宫内膜表达降低,但是归肾丸高剂量组和中剂量组较低剂量组的 IL-1 β 蛋白表达偏高,说明归肾丸可以刺激 IL-1 β 蛋白表达且随着归肾丸浓度升高效果增加;戊酸雌二醇组与各组 IL-1 β 蛋白表达差异无统计学意义,说明雌激素对于子宫内膜组织上的 IL-1 蛋白表达无影响作用;PCR 检测结果显示归肾丸高、中、低剂量 IL-1 β mRNA 的相对表达量逐渐降低,且较戊酸雌二醇组的相对表达量偏高,说明归肾丸作用于子宫内膜,能够明显上调 IL-1 β mRNA 的表达,而且作用效果比雌激素更佳。

MAPK 家族的激活与改善子宫内膜容受性和形成蜕膜关系密切^[28]。有研究用乳酸杆菌培养子宫内膜上皮细胞并对 MAPK1 进行磷酸化水平的检测,发现 MAPK 通路被激活,能够促进子宫内膜上皮细胞增殖^[29]。MAPK 中的 ERK 是常见侵袭性信号通路中的常见蛋白,其组成成分中的 ERK2 (MAPK1)在有关子宫内膜基质细胞的研究中显示,ERK1/2 信号通路激活能促进雌激素受体以及孕激素受体介导的子宫内膜基质细胞发生增生反应^[30];若增加信号通路的活性,可以促进 ERK 磷酸化反应,增加 ERK 蛋白的表达,上调下游的目的基因的表达,使子宫内膜基质细胞的增殖,从而改善子宫内膜容受性和子宫内膜偏薄的症状^[31-32]。本实验研

究结果显示,归肾丸高、中剂量组的MAPK14蛋白表达量较雌激素组是升高的,归肾丸高剂量组比低剂量组的MAPK14 mRNA表达更显著;归肾丸高、中、低剂量组的MAPK14基因的相对表达量较雌激素组的MAPK14 mRNA相对表达量增加,但与假手术组相比相对表达量降低,说明归肾丸增加MAPK14的表达效果比雌激素更佳。

本研究中的网络药理学部分所得数据均来自于网络上的数据库,相关化学成分以及作用靶点均有可能因为数据库更新不足,部分化学成分及作用靶点会因此遗漏;同时,后续的动物实验也由于各方面原因只选取了少量核心可能的靶点和信号通路,未完全验证。因此后期希望能够深度挖掘网络药理学相关内容,进行更加深入的动物实验或细胞实验来加以验证归肾丸治疗薄型子宫内膜的作用机制,发挥药物在临床上的最佳治疗效果。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] GROW D R, IROMLOO K. Oral contraceptives maintain a very thin endometrium before operative hysteroscopy[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(1):204-207.

[2] KUMBAK B, ERDEN H F, TOSUN S, et al. Outcome of assisted reproduction treatment in patients with endometrial thickness less than 7 mm [J]. *Reprod Biomed Online*, 2009, 18(1):79-84.

[3] SIMON A, LAUFER N. Repeated implantation failure: clinical approach [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(5):1039-1043.

[4] 徐伊宁,孙晓溪. 薄型子宫内膜的治疗进展[J]. *上海医学*, 2019, 42(2):107-112.

[5] MAEKAWA R, TAKETANI T, MIHARA Y, et al. Thin endometrium transcriptome analysis reveals a potential mechanism of implantation failure [J]. *Reprod Med Biol*, 2017, 16(2):206-227.

[6] 王宝娟,夏天,苍荣. 归肾丸的现代研究进展[J]. *湖北中医杂志*, 2011, 33(10):77-79.

[7] 周新艳. 归肾丸加味治疗子宫内膜偏薄不孕症的临床效果观察[J]. *中国医药指南*, 2018, 16(16):197-198.

[8] 赵威. 评价归肾丸加味治疗子宫内膜偏薄不孕症40例临床疗效[J]. *北方药学*, 2017, 14(5):194-195.

[9] 许春燕. 基于miR-135a调控作用探讨归肾丸治疗肾虚一薄型子宫内膜大鼠的机制研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2016.

[10] 张若楠. 通心络抑制血管内膜增生的作用和机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.

[11] SUN Y, LIU W Z, 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(6):600-604.

[12] UPADHYA D, OGATA M, RENEKER L W. Mapk1 is required for establishing the pattern of cell proliferation and for cell survival during lens development [J]. *Development*, 2013, 140(7):1573-1582.

[13] 胡红梅. ESR1经SDF-1/CXCR4轴介导的BMSCs归巢与迁移在薄型子宫内膜中的作用及机制[D]. 重庆:重庆医科大学, 2016.

[14] HOFMANN G E, RAO C V, BARROWS G H, et al. Binding sites for epidermal growth factor in human uterine tissues and leiomyomas [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 58(5):880-884.

[15] GARGIULO A R, FICHOVA R N, POLITCH J A, et al. Detection of implantation-related cytokines in cervicovaginal secretions and peripheral blood of fertile women during ovulatory menstrual cycles [J]. *Fertil Steril*, 2004, 8(2):1226-1234.

[16] 盛威. 雌激素对子宫内膜异位症子宫内膜细胞EGF、EGFR基因及蛋白表达的影响[D]. 天津:天津医科大学, 2013.

[17] SEQUEIRA K, ESPEJEL-NUNEZ A, VEGA-HERNANDEZ E, et al. An increase in IL-1B concentrations in embryo culture-conditioned media obtained by invitro fertilization on day 3 is related to successful implantation [J]. *Assist Reprod Genet*, 2015, 32(11):1623-1627.

[18] KARAR J, MAITY A. PI3K/AKT/m TOR Pathway in Angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 31(4):51-55.

[19] 刘卓,董相丽,连方,等. 补肾中药对子宫内膜容受性影响的临床观察[J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(2):242-245.

[20] 尹晓丹,薛晓鸥,杨维,等. 阻断Wnt/ β -catenin信号通路对补肾活血中药作用后薄型子宫内膜干细胞标志物的影响[J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(10):1425-1430.

[21] 王慧,谢波,陈小平,等. 补肾中药对药物流产大鼠子宫内膜修复作用的研究[J]. *新中医*, 2017, 49(2):1-3.

[22] 孔文娟,苏先芝,刘一斐,等. 加减归肾丸对卵巢储备功能减退模型小鼠卵巢组织PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2020, 61(12):1085-1089.

[23] 刘伟杰,刘玉芹. 自拟中药方对剖宫产术后恶露及子宫内膜MMP-9、TIMP-1的影响[J]. *长春中医药大学*

- 学报,2018,34(3):550-553.
- [24] SEHATZ F, KRIKUN G, RUSIC R, et al. Implications of decidualization-associated protease expression in implantation and menstruation [J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1999, 17(1):3-12.
- [25] LYONS J G. Interleukin-1beta and transforming growth factor- α epidermal growth factor induced expression of M₉₅₀₀₀ type IV gelatinase and interstitial fibroblast-type gelatinase by rat mucosal keratinocytes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(8):3091-3096.
- [26] ROSSI M, SHARKEY A M, VIGANO P, et al. Identification of genes regulated by interleukin-1beta in human endometrial stromal cells[J]. *Reproduction*, 2005, 130(5):721-729.
- [27] BOUCHER A, KHARFI A, et al. Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium [J]. *Bio Reprod*, 2001, 65(3):890-898.
- [28] LANDEROS R V, JOBE S O, ARANDA-PINO G, et al. Convergent ERK1/2, p38 and JNK mitogen activated protein kinases (MAPKs) signalling mediate catecholestradiol-induced proliferation of ovine uterine artery endothelial cells [J]. *J Physiol*, 2017, 595(14):4663-4676.
- [29] 何金英,朱素芳,莎如拉,等. MAPK/ERK1/2对乳酸杆菌介导的子宫内膜上皮细胞增殖的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(2):152-156.
- [30] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2):807-869.
- [31] VALLEJO G, BALLARE C, BARANAO J L, et al. Progestin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor beta induces proliferation of endometrial stromal cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(12):3023-3025.
- [32] 许春燕,宋阳,李坤寅,等. 薄型子宫内膜模型的动物选择及其造模方法改进[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2):217-220.

[责任编辑 顾雪竹]