

温肾养血方调控PI3K/Akt/FoxO3A信号通路改善高龄雌鼠 子宫内膜容受性的作用机制

辛明蔚, 贡磊磊, 韩倩, 衣彦晓, 何军琴, 武颖, 王景尚, 尹晓丹, 杨维*

(首都医科大学附属北京妇产医院, 北京妇幼保健院, 北京 100026)

[摘要] 目的:基于网络药理学和实验验证,探讨温肾养血方提高高龄雌鼠子宫内膜容受性的有效成分、作用靶点及可能的作用机制。方法:基于BATMAN-TCM和整合药理学平台对温肾养血方中的中药成分及药物靶标进行检索;以“anovulatory sterility”和“anovulatory infertility”为关键词,通过人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和GeneCards数据库,对排卵障碍性不孕症靶标进行搜集;基于STRING数据库中的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)数据库,并通过Cytoscape构建温肾养血方成分靶标及排卵障碍性不孕症靶标核心网络;基于DAVID数据库中基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)对共有靶标进行功能和通路分析,并建立“中药-成分-靶标-通路”分子网络,对核心靶点进行动物实验验证。结果:共获得化学成分253个,药物靶标326个,疾病靶标819个,共有靶标74个。GO和KEGG对共有靶标进行功能和通路分析结果显示,共有靶标主要参与了一氧化氮生物合成过程的正调控、细胞增殖的正调控、对雌二醇的反应、老化、氧化应激反应、血管生成等生物学过程。对GO过程中氧化应激反应以及KEGG前20中的5个重要通路进行分析,通过构建“中药-成分-靶标-生物学过程/通路”多维网络发现,共20种中药41种化学成分,这些成分通过影响35个靶标参与了低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路,肿瘤坏死因子(TNF)信号通路,叉头框蛋白O(FOXO)信号通路,Toll样受体(TLR)信号通路,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路。动物实验结果显示,温肾养血方可提高高龄雌性ICR小鼠子宫磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),磷酸化(p)-PI3K,Akt,p-Akt,叉头框蛋白O3A(FoxO3A)和p-FoxO3A的表达量。结论:温肾养血方通过影响Akt1,双氧化酶-2(DUOX2),表皮生长因子受体(EGFR),血红素加氧酶-1(HMOX1),髓过氧化物酶(MPO)等靶标干预氧化应激及PI3K/Akt/FoxO3A信号通路提高高龄雌鼠子宫内膜容受性。

[关键词] 温肾养血方; 子宫内膜容受性; 网络药理学; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 叉头框蛋白O3A; 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)24-0196-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211513

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211027.1520.005.html>

[网络出版日期] 2021-10-28 9:17

Mechanism of Wenshen Yangxue Prescription Improving Endometrial Receptivity of Aged Female Mice by Regulating PI3K/Akt/FoxO3A Signaling Pathway

XIN Ming-wei, GONG Lei-lei, HAN Qian, YI Yan-xiao, HE Jun-qin, WU Ying, WANG Jing-shang, YIN Xiao-dan, YANG Wei*

(Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing 100026, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effective components, targets, and possible mechanisms of

[收稿日期] 20210705(024)

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7192068);北京市科学技术委员会首都临床特色应用研究项目(Z181100001718163)

[第一作者] 辛明蔚, 博士, 主任医师, 从事中西医结合治疗女性生殖内分泌疾病研究, Tel:010-52276423, E-mail: xinmingwei@ccmu.edu.cn

[通信作者] * 杨维, 硕士, 主任医师, 从事中西医结合治疗女性生殖内分泌疾病, Tel:010-52276423, E-mail: bjiangwei@mail.ccmu.edu.cn

Wenshen Yangxue prescription in improving endometrial receptivity of aged female mice based on network pharmacology and experimental verification. **Method:** Based on Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechANism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) and Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine, the components and targets of Wenshen Yangxue prescription were retrieved, and the targets of ovulatory dysfunctional infertility were collected from the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and GeneCards with "anovulatory sterility" and "anovulatory infertility" as keywords. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed based on STRING and the core targets of Wenshen Yangxue prescription against ovulatory dysfunctional infertility were screened by Cytoscape, followed by Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment of the core targets in DAVID database. Then, the "medicinal-component-target-pathway" network was established and the core targets were verified by animal experiment. **Result:** A total of 253 components and 326 targets of Wenshen Yangxue prescription, 819 disease targets, and 74 common targets were screened out. The common targets were mainly involved in the biological processes such as positive regulation of nitric oxide biosynthetic process, positive regulation of cell proliferation, response to estradiol, aging, response to oxidative stress, and angiogenesis. The GO term of response to oxidative stress and five of the top 20 KEGG pathways were analyzed. According to the "medicinal-component-target-biological process/pathway" network, 41 chemical components in 20 medicinals participated in hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, forkhead box O (FOXO) signaling pathway, Toll-like receptor (TLR) signal pathway, and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway by affecting 35 targets. The results of animal experiment showed that the prescription could increase the expression of PI3K, phosphorylated PI3K (p-PI3K), Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), forkhead box O3A (FoxO3A), and phosphorylated FoxO3A (p-FoxO3A) in uterus of aged female ICR mice. **Conclusion:** Wenshen Yangxue prescription interferes with oxidative stress and PI3K/Akt/FoxO3A signaling pathway by influencing Akt1, dual oxidase 2 (DUOX2), epidermal growth factor receptor (EGFR), heme oxygenase-1 (HMOX1), myeloperoxidase (MPO), and other targets, thereby improving endometrial receptivity of aged female mice.

[Keywords] Wenshen Yangxue prescription; endometrial receptivity; network pharmacology; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K); protein kinase B (Akt); forkhead box O3A (FoxO3A); mechanism

随着社会的发展,晚婚晚育成为一种社会趋势,而“三孩政策”的放开使更多的高龄夫妇具有生育需求。随年龄增加生育能力呈明显下降趋势,与30岁女性相比,38~39岁下降30%,40~41岁能达到53%,42~44岁甚至能到59%^[1]。排卵障碍和子宫内膜容受性差是影响妊娠的重要因素,因此,如何提高优质卵泡排卵率及子宫内膜容受性是提高高龄患者生育能力的主要策略。促排卵治疗是提高排卵率的常规治疗方法,但对于高龄女性,促排卵治疗对子宫内膜容受性、卵巢储备功能有一定的负面效应,不仅具有排卵率高、妊娠率低的特点,而且增加不良妊娠结局的风险^[2-3]。因此,临床亟需新的诊治方法来改善高龄女性妊娠结局。

温肾养血方是北京市名老中医赵松泉先生总结多年临床经验创制的治疗不孕症的经典方,由赤芍、川芎、丹参、当归、覆盆子、枸杞子、红花、鸡血

藤、木香、牛膝、蒲黄、羌活、肉苁蓉、山茱萸、熟地黄、菟丝子、细辛、香附、益母草、淫羊藿及泽兰21味中药组成,具有温肾填精、活血养血之功效,临床应用30余年,安全有效^[4-8]。

笔者前期已经初步探讨了温肾养血方治疗不孕症作用机制可能与通过调节抑制素-激活素-卵泡抑素(INH-ACT-FS)系统和性腺激素水平促进卵泡发育有关^[9-10],但其是否能改善高龄雌鼠子宫内膜容受性及作用机制尚不明确。本文采用网络药理学方法构建中药-成分-靶标-通路分子网络,筛选出温肾养血方治疗排卵障碍性不孕症潜在的作用靶标及信号通路,探究其可能的作用机制,再结合实验验证、最新数据库以及分析方法,进一步阐明温肾养血方改善高龄雌鼠子宫内膜容受性的作用机制,为临床应用提供科学依据。

1 材料

基于BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)和整合药理学平台检索温肾养血方中赤芍、川芎、丹参、当归、覆盆子、枸杞子、红花、鸡血藤、木香、牛膝、蒲黄、羌活、肉苁蓉、山茱萸、熟地黄、菟丝子、细辛、香附、益母草、淫羊藿、泽兰中药所有化学成分,建立21味中药化学成分库,并筛选口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18的成分作为候选成分。

2 方法

2.1 温肾养血方靶标预测和排卵障碍性不孕症靶标收集 基于BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)和整合药理学平台数据库,收集21味中药化学成分潜在的靶点,合并所有靶点并去重,建立21味中药候选靶标库。采用在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)及GeneCards数据库,以“anovulatory sterility”和“anovulatory infertility”为关键词,对排卵障碍性不孕症靶标进行检测,对收集的靶标去重,采用DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>, version 6.7)对靶点进行标准化,建立排卵障碍性不孕症靶标库。

2.2 温肾养血方药物靶标与排卵障碍性不孕症靶标核心网络构建、核心靶标功能及通路分析 STRING数据库(<http://string-db.org/>, Version 10.5)中提取21味中药候选靶标与排卵障碍性不孕症相关靶标相互作用信息,设置蛋白种类为“homosapines”,最高置信度参数评分值>0.4,其他参数不变。对参数度值、介数、邻接节点进行分析,对相互作用靶标与其相互作用关系导入cytoscape3.5.1软件构建温肾养血方成分靶标及排卵障碍性不孕症靶标核心网络,并将这些核心靶标导入DAVID 6.7,基因本体(GO)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路数据库(<http://www.geneontology.org> <http://www.genome.jp/kegg/>)分别对核心网络靶标进行功能和通路分析。

2.3 实验验证

2.3.1 药物和试剂 药材从北京同仁堂股份有限公司采购。药物组成为牛膝、鸡血藤、红花、丹参、当归、川芎、蒲黄、熟地黄、淫羊藿、山茱萸、菟丝子、枸杞子、覆盆子、鹿角、羌活、细辛、肉苁蓉等,经北京中医药大学中药学院谭鹏副教授鉴定均符合2020年版《中华人民共和国药典》项下要求。首都医科大学中医药学院中药制剂实验室制备,中药浸

泡1 h,先煎鹿角40 min(武火煮沸,文火煎煮40 min),后下其他中药,武火煮沸,再用文火煮20 min,关火后,将中药倒出,然后再加水,再上锅煮,同样的方法,将药液倒出,与第一次的药混合浓缩。药液后放4℃冰箱储存。孕马血清促性腺激素(PMSG),人绒毛膜促性腺激素(HCG)(以色列Prospec公司,批号分别为HOR-272, P139079);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),磷酸化(p)-PI3K,磷酸化蛋白激酶B(p-Akt),Akt,磷酸化叉头框蛋白O3A(p-Foxo3A),叉头框蛋白O3A(FoxO3A)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab182651, ab189403, ab38449, ab8805, ab47285, ab23683);β-肌动蛋白(β-actin,美国Rayantibody公司,批号RM2001);预染蛋白Marker(美国Thermo公司,批号#26617);动物组织总RNA提取试剂盒, FastQuant cDNA第一链合成试剂盒, SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为DP431, KR106, FP205)。

2.3.2 试验动物 SPF级健康32周龄ICR小鼠[北京斯贝福实验动物有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0002]。小鼠根据随机数字表法分为空白组:生理盐水;控制性超促排卵组(COH):PMSG 10 U/只;实验药物分为低、中、高3个剂量,根据成人223 g/60 kg的摄入量×9倍的公式换算成的小鼠灌胃剂量,设定为温肾养血方中剂量组(Mid Dose) 33.5 g·kg⁻¹,将中剂量的1/2和2倍分别设定为低剂量和高剂量,即温肾养血方低剂量组(Low Dose) 16.75 g·kg⁻¹和温肾养血方高剂量组(High Dose) 67 g·kg⁻¹;灌胃药物剂量0.2 mL,每组16只。所有操作均严格按照首都医科大学附属北京妇产医院伦理委员会有关动物研究指导原则进行。

2.3.3 仪器 Centrifuge 5415R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);SpectraMax M5型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);VE180型微型垂直电泳槽,VE-186型转移电泳槽(上海天能科技有限公司);PowerPace Basic型基础电泳仪电源(美国Bio-Rad公司);PHS-25型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);TS-1型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);OSE-Y10(G)型电动组织研磨器(天根生化科技北京有限公司);SMA-1000型分光光度计(美林恒通北京仪器有限公司);StepOne Plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司)。

2.3.4 给药取材方法 给药方法参考文献[11],每

日下午 18:00 时灌胃给药共 10 d, 第 11 日对 COH, Low Dose, Mid Dose, High Dose 组雌鼠同时腹腔注射 PMSG 10 U/只, 空白组雌鼠同时注射等量生理盐水, 48 h 后, 腹腔注射 HCG 10 U/只, 并于注射 HCG 后 14 h 各组小鼠处死后剖腹取出小鼠迅速解剖并分离子宫, 小心操作, 在冰盘上完整的剪取, 剥离附着的脂肪后迅速洗涤、滤纸吸干, 取子宫一半放在 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 然后切片, 再免疫组织化学染色, 免疫组化法检测 PI3K, Akt, FoxO3A 的表达, 另一半放 -80 °C 冰箱用于 Real-time PCR 检测; 预冷 RIPA 蛋白抽提试剂, 加入蛋白酶抑制剂 Protease inhibitor cocktail 和磷酸酶抑制剂, 组织按照 10% 匀浆, 即组织 10 mg 加入 RIPA 裂解液 100 μL , 充分匀浆, 然后冰上孵育 15 min, $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 °C) 离心 30 min (离心半径 9 cm, 下同)。取上清, 再次 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (4 °C) 离心 1 h, 取上清, 分装 -80 °C 保存, 用于蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测。

2.3.5 Real-time PCR 检测小鼠子宫 PI3K, Akt, FoxO3A mRNA 的表达 将子宫组织置于 0.9% 氯化钠注射液的焦碳酸二乙酯水中, 采用电动组织研磨器低温研磨, 采用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒反转录, 用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒进行 Real-time PCR 检测: 在 20 μL 体系中加入 PCR Mix 12.5 μL , 上、下游引物各 5 μL , 模板 cDNA 1 μL , ddH₂O 10 μL , 置于 Real-time PCR 仪中, 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火, 延伸 20 s, 95 °C 变性 15 s, 在 72 °C 采集荧光信号, 共 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 PI3K, Akt 和 FoxO3A mRNA 的相对含量。引物序列由苏州鸿讯生物科技有限公司合成, 信息见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	序列(5'-3')	长度/bp
PI3K	上游 CCACGACCATCTTCGGGTG	75
	下游 GGGGAGTAAACATTCCACTAGGA	
Akt	上游 ATGAACGACGTAGCCATTGTG	116
	下游 TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT	
FoxO3A	上游 CTGGGGGAACCTGTCCTATG	210
	下游 TCATTCTGAACGCGCATGAAG	
β -actin	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTG	123
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

2.3.6 Western blot 法检测小鼠子宫 PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, FoxO3A, p-FoxO3A 蛋白表达 采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 每个泳道上样 120 μg 。浓缩胶 60 V 电泳 20 min, 分离胶恒压 100 V, 通过预染蛋白 Marker 来确定电泳停止时间。300 mA 恒流下用 0.22 μm 孔径聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜转膜 90 min。5% 脱脂牛奶-TBST 稀释一抗 (1:2 000), 4 °C 水平摇床孵育过夜。次日洗膜, TBST 洗 3 次, 每次 15 min。二抗孵育: 5% 脱脂牛奶-TBST 稀释二抗, 山羊抗兔 IgG(H+L)HRP 1:5 000, 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 15 min, 洗 3 次。ECL 发光液化学发光显色法曝光, 曝光时间为 2~30 min。凝胶成像系统对条带进行采集和分析。

2.3.7 免疫组织化学法检测子宫组织中 PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, FoxO3A, p-FoxO3A 蛋白表达 取子宫组织, 组织样本, 取材 3 mm 厚, 梯度乙醇脱水, 透明, 浸蜡, 包埋至蜡块, 冻台冷冻 20 min, 切片 4 μm , 烤片, 然后经切片、脱蜡、水化、热修复, 采用内源性过氧化物酶阻断剂进行阻断, 室温下放置 10 min; 然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 每次 3 min。加入一抗后 4 °C 过夜; PBS 冲洗 3 次后, 加入相应二抗进 37 °C 温箱 20 min; PBS 冲洗 3 min \times 3 次; DAB 显色剂显色, 光镜下观察。

2.3.8 统计学方法 统计学分析采用 SPSS 22.0 软件, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 单因素方差分析多组间比较。方差齐性用最小显著性差异法 (LSD) 检验, 方差不齐用 Games-Howell 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温肾养血方化学成分及其靶标预测 通过搜索 BATMAN-TCM 中药数据库温肾养血方中 OB \geq 30%, DL \geq 0.18 化学成分, 共收集化学成分 253 个, 并对这些成分对应的靶标进行搜集, 共获得 326 个药物靶标。

3.2 温肾养血方治疗排卵障碍性不孕症核心靶标网络分析 通过 OMIM 数据库, 收集了排卵障碍性不孕症相关靶标, 经过 DAVID 标准化, 去重后共获得 819 个疾病靶标。基于 STRING 数据库中的蛋白质-蛋白质相互作用数据库, 构建温肾养血方潜在靶标与排卵障碍性不孕症疾病靶标之间的相互作用网络。根据相互作用网络, 共获得共有靶标 74 见表 1, 基于 STRING 数据库, 并通过 Cytoscape 获得相互作用网络。见表 2。

3.3 温肾养血方治疗排卵障碍性不孕症核心靶标功能及通路分析 基于 DAVID 数据库中 GO 和

表2 温肾养血方治疗排卵障碍性不孕症核心靶标

Table 2 Core targets of Wenshen Yangxue prescription in treatment of ovulation disorder infertility

编号	靶标	编号	靶标	编号	靶标
1	TP53	26	IL6	51	DRD2
2	PTEN	27	MMP2	52	SERPINE1
3	Akt1	28	IFNG	53	PON1
4	CTNNA1	29	FN1	54	OPRM1
5	TNF	30	SPP1	55	IGFBP3
6	AR	31	STAT3	56	NCOA2
7	CHEK2	32	CDKN2A	57	ALOX5
8	EGF	33	ADRA2C	58	GSK3B
9	MYC	34	ADRB1	59	MAPK14
10	IGF2	35	AHR	60	PTGS2
11	EGFR	36	BAX	61	SOD1
12	INSR	37	PGR	62	BCL2
13	ESR1	38	RUNX1T1	63	CASP3
14	MAPK1	39	TDRD7	64	CXCL8
15	RAF1	40	TOP1	65	CASP8
16	PPARG	41	F2	66	CCL2
17	ERBB2	42	CRP	67	STAT1
18	TGFB1	43	CAT	68	IL4
19	EDN1	44	VEGFA	69	PLAU
20	IL10	45	MMP9	70	MMP1
21	IL1B	46	KDR	71	DUOX2
22	ESR2	47	POR	72	HMOX1
23	FOS	48	NR3C1	73	MPO
24	AKR1C3	49	CTSD	74	PTGS1
25	TNFRSF1B	50	PCNA		

KEGG对共有靶标进行功能和通路分析,对数据库中富集的生物学过程P值最小的前20进行深入分析,以生物学过程为纵坐标,以基因比率为横坐标构建气泡图。这些核心靶标主要富集于前20的GO中生物学过程有一氧化氮生物合成过程的正调控(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process),细胞增殖的正调控(positive regulation of cell proliferation),对雌二醇的反应(response to estradiol),老化(aging),氧化应激反应(response to oxidative stress),血管生成(angiogenesis)等。此外,这些共有靶标主要富集于HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway),TNF信号通路(TNF signaling pathway),FOXO信号通路(FOXO signaling pathway),Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway),PI3K/Akt信号通路(PI3K/Akt

signaling pathway)等信号通路。

3.4 温肾养血方治疗排卵障碍性不孕多维网络分析 对GO过程中氧化应激反应(response to oxidative stress)及KEGG前20中的5个重要通路进行分析,构建了“中药-成分-靶标-生物学过程/通路”多维网络。在排卵障碍方干预氧化应激过程中,中药中山柰酚(kaempferol),槲皮素(quercetin),木犀草素(luteolin),黄芩素(baicalin),汉黄芩素(wogonin)和β-胡萝卜素(beta-carotene)参与了氧化应激过程,这些成分主要存在于牛膝、赤芍、枸杞子、益母草等15种中药中,通过作用于Akt1,DUOX2,EGFR,HMOX1,MPO靶标完成。以KEGG通路富集分子中P值最小的前20中的5个主要通路分析,结果发现共20种中药41种化学成分,这些成分通过影响35个靶标参与了HIF-1 signaling pathway, TNF signaling pathway, FoxO signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway 和 PI3K/Akt signaling pathway。

3.5 温肾养血方对高龄ICR小鼠子宫PI3K/Akt/FoxO3A mRNA影响 与空白组相比,Low Dose组PI3K mRNA升高,Mid Dose组PI3K mRNA下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),COH组,Low Dose组Akt mRNA,FoxO3A mRNA升高,差异具有统计学意义($P<0.01, P<0.05$),Mid Dose组FoxO3A mRNA表达均显著升高($P<0.01$);与COH组比较,Mid Dose组PI3K mRNA下降,High Dose组Akt mRNA,FoxO3A mRNA表达下降,差异具有统计学意义($P<0.01, P<0.05$)。见表3。

表3 温肾养血方对8月龄ICR小鼠子宫PI3K, Akt, FoxO3A mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=16$)

Table 3 Effect of expression of Wenshen Yangxue prescription on PI3K, Akt, FoxO3A mRNA in uterus of 8-month-old female ICR mice ($\bar{x}\pm s, n=16$)

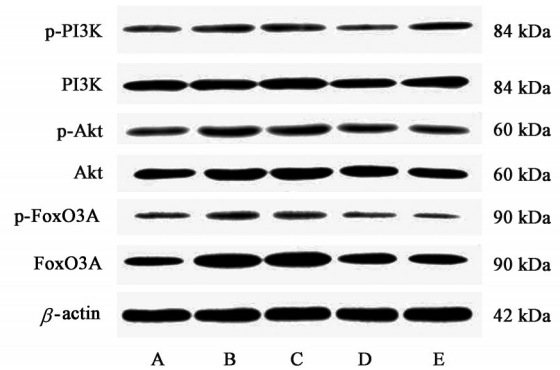
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PI3K	AktA	FoxO3A
空白		1.00±0.16	1.01±0.20	1.01±0.12
COH	10 U/只	1.35±0.16	1.49±0.14 ¹⁾	3.01±0.27 ²⁾
Low Dose	16.75	1.54±0.19 ¹⁾	1.46±0.13 ¹⁾	2.92±0.29 ²⁾
Mid Dose	33.5	0.55±0.08 ^{1,4)}	0.94±0.12 ⁴⁾	1.87±0.17 ^{2,4)}
High Dose	67	1.38±0.18	0.97±0.14 ³⁾	1.50±0.29 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与COH组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4同)。

3.6 温肾养血方对高龄ICR小鼠子宫PI3K/Akt/FoxO3A通路蛋白表达水平的影响 与空白组相

比, COH组 p-Akt, Akt, p-FoxO3A, FoxO3A 表达均升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 COH 组相比, Mid Dose 组 p-PI3K, PI3K 表达下降, Mid Dose 组和 High Dose 组 p-Akt, Akt, p-FoxO3A, FoxO3A 表达水平下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

3.7 免疫组织化学检测温肾养血方对 ICR 小鼠子宫 PI3K/Akt/FoxO3A 通路的影响 与空白组相比, COH 组 p-PI3K 升高, Low Dose 组和 Mid Dose 组 p-PI3K 下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); COH 组, Low Dose 组, Mid Dose 组 p-Akt, p-FoxO3A 显著升高, High Dose 组 p-FoxO3A 显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 COH 组比较, Low Dose 组和 Mid Dose 组 p-PI3K 下降, Mid Dose 组和 High Dose 组 p-Akt, p-FoxO3A 下降, 差异具有统计学意义 ($P <$



A. 空白; B. COH; C. Low Dose; D. Mid Dose; E. High Dose (图 2 同)
图 1 温肾养血方对小鼠子宫 PI3K/Akt/FoxO3A 通路蛋白水平的影响

Fig. 1 Effect of Wenshen Yangxue prescription on PI3K/Akt/FoxO3A pathway protein level in uterus of mice

0.01)。见图 2, 表 4。

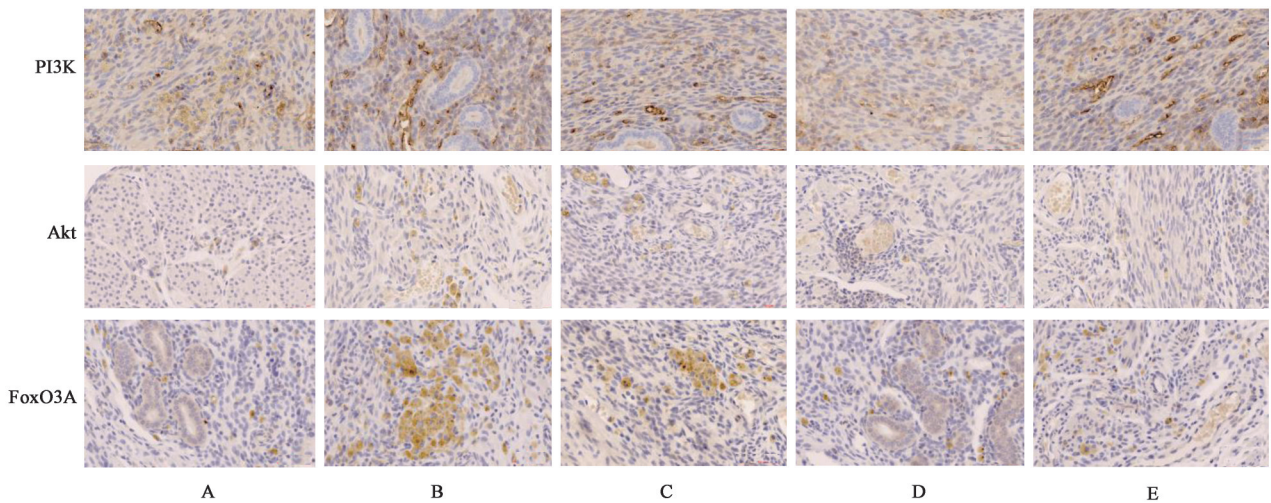


图 2 温肾养血方对小鼠子宫 PI3K/Akt/FoxO3A 通路免疫组化水平的表达

Fig. 2 Expression of Wenshen Yangxue prescription on immunohistochemical level PI3K/Akt/FoxO3A pathway protein level in uterus of mice

表 4 温肾养血方对小鼠子宫 PI3K/Akt/FoxO3A 通路蛋白水平的表达 ($\bar{x} \pm s, n=16$)

Table 4 Effect of Wenshen Yangxue prescription on PI3K/Akt/FoxO3A pathway protein level in uterus of mice ($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PI3K /β-actin	Akt /β-actin	FoxO3A /β-actin
空白		37.81±1.39	12.61±1.02	13.76±0.40
COH	10 U/只	44.12±3.54 ¹⁾	28.95±1.34 ²⁾	38.98±1.57 ²⁾
Low Dose	16.75	22.73±0.54 ^{2,4)}	28.49±1.26 ²⁾	38.66±1.03 ²⁾
Mid Dose	33.5	16.26±0.99 ^{2,4)}	19.53±1.41 ^{2,4)}	28.45±0.79 ^{2,4)}
High Dose	67	42.16±3.92	12.74±1.71 ⁴⁾	22.63±0.65 ^{2,4)}

4 讨论

良好的子宫内膜容受性是胚胎着床的关键, 西

药促排卵药物可促进卵泡生长、诱导排卵, 但同时对于子宫内膜具有一定的负面效应, 影响子宫内膜容受性, 而出现排卵率高、妊娠率低的临床特征^[12-13], 而且 COH 对小鼠胎盘功能有影响, COH 引起的胎盘氧化应激可能是其影响胎盘功能的重要原因^[14]。

既往研究已经证实温肾养血方可以增加高龄小鼠促排卵数, 提高小鼠生育数量^[15-16], 但是其机制是否与改善促排小鼠子宫内膜情况有关尚不清楚, 因此本文采用网络药理学方法分析温肾养血方治疗排卵障碍性不孕症潜在靶标, 并构建药物和疾病共有靶标和互作网络, 对共有靶标进行生物信息学分析, 构建“中药-成分-靶标-生物学过程/通路”多维网络。通过以上方法, 以期阐明温肾养血方治疗排

卵障碍性不孕潜在的生物学过程及其相关通路^[17-19];通过动物实验验证了温肾养血方能够通过调节小鼠子宫PI3K, Akt和FoxO3A的表达量,提高高龄雌鼠子宫内膜容受性。

对药物靶标和疾病靶标分析后,共有74个共有靶标,采用STRING数据库和Cytoscape,构建共有靶标相互作用关系网络,并对这些靶标进行生物信息学分析,这些共有靶标主要参与了一氧化氮生物合成过程的正调控(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process),对雌二醇的反应(response to estradiol),氧化应激(response to oxidative stress),炎症反应(inflammatory response)等过程。在排卵障碍性不孕中,氧化应激和低度炎症是导致排卵障碍的重要因素,并且通过氧化应激和低度炎症诱导的多囊卵巢综合征和卵巢储备功能下降可诱发排卵障碍性不孕^[20-21]。对氧化应激反应过程进行进一步分析,发现共有靶标Akt1, DUOX2, EGFR, HMOX1, MPO参与了氧化应激反应,这些靶标可能是温肾养血方通过影响氧化应激反应干预排卵障碍性不孕的主要靶标。此外,对共有靶标进行KEGG分析,对P值最小值前20通路中的主要通路进行分析,PI3K/Akt信号通路在卵巢储备功能下降过程中发挥重要调节作用。JOHN等^[22]发现PI3K/Akt信号通路是一条与卵泡发育密切相关的通路,若PI3K通路中信号分子表达异常会导致原始卵泡生长缺陷,影响初级卵泡向次级卵泡的转变,造成卵泡的病理状态。有研究表明中药或针灸通过调控PI3K/Akt信号通路可以提高卵巢储备功能,改善不孕^[23-24]。通过“中药-成分-靶标-生物学过程/通路”多维网络发现温肾养血方通过影响Akt1, DUOX2, EGFR, HMOX1, MPO等靶标干预氧化应激及PI3K/Akt及FoxO3A信号通路治疗排卵障碍性不孕。

子宫内膜蜕膜化在胎盘形成以前为胚胎发育提供支持和营养,是胚胎着床和成功妊娠的关键因素。在蜕膜化过程中,细胞增殖与凋亡在动态平衡中调节子宫内膜蜕膜化的进行。一旦平衡打破,细胞过度增殖或过度凋亡,子宫内膜蜕膜化进程受损,胚胎着床及后续妊娠过程将无法完成。PI3K/Akt信号通路是一条参与调控机体内细胞增殖、分化最重要的信号通路^[25]。Akt对细胞迁移和生长的调控至关重要^[26]。p-Akt是Akt的活性形式,与胚胎着床密切相关,在子宫内膜蜕膜化过程中p-Akt起重要作用。FOXO家族成员是PI3K/Akt通

路的主要效应蛋白。PI3K/Akt通过作用于FoxO蛋白上的磷酸化位点来控制影响FoxO下游一系列与细胞增殖、凋亡及周期阻滞相关基因的表达^[27]。FoxO3A参与小鼠子宫内膜蜕膜化,且这一过程可能与细胞增殖、凋亡有关^[28]。本研究发现COH组,子宫PI3K, Akt和FoxO3A的表达量均升高,说明COH过程影响了子宫内膜细胞的增殖和凋亡过程,中药温肾养血方作用后PI3K, Akt和FoxO3A的表达量均有不同程度下降,基本恢复至空白组表达水平,可以推测中药可能通过调控PI3K/Akt/FoxO3A信号通路改善COH引起的子宫内膜容受性,提高高龄雌鼠生育力。

本文通过网络药理学方法,构建温肾养血方20种中药-成分-靶标-生物学过程/通路多维网络,该网络较好显示了温肾养血方中多成分-多靶标之间的关联,并且能够明确温肾养血方治疗排卵障碍性不孕主要靶标及其相关生物学过程和可能的作用机制,为温肾养血方治疗排卵障碍性不孕提供临床依据,也为下一步体内外实验提供了参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] STEINER A Z, JUKIC A M. Impact of female age and nulligravidity on fecundity in an older reproductive age cohort[J]. *Fertil Steril*, 2016, 105(6): 1584-1588.
- [2] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 369.
- [3] 许茜亚, 全松. 排卵障碍性不孕症的诊疗策略[J]. *实用妇产科杂志*, 2020, 36(5): 328-332.
- [4] 葛秦生, 张以文, 沈龙珠. 中医补肾法诱导排卵[J]. *中医杂志*, 1982, 5: 19-22.
- [5] 赵松泉. 排卵汤治疗95例各种排卵功能失调的观察[J]. *天津中医*, 1985, 4: 8-9.
- [6] 李玲. 应用赵松泉老中医排卵方治疗不孕症42例[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2011, 9(13): 13-14.
- [7] 辛明蔚, 梁欣楹, 何军琴, 等. 温肾养血颗粒治疗卵泡发育不良性不孕症临床研究[J]. *中医学报*, 2012, 27(2): 233-236.
- [8] 辛明蔚, 梁欣楹, 何军琴, 等. 温肾养血颗粒联合枸橼酸氯米芬对卵泡发育不良性不孕症抑制素-激活素-卵泡抑素系统的调控[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(12): 1596-1600.
- [9] 辛明蔚, 张秋霞, 赵晖, 等. 温肾养血方对无排卵大鼠抑制素-激活素-卵泡抑素系统的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(12): 1491-1495.
- [10] 辛明蔚, 张秋霞, 赵晖, 等. 温肾养血方对无排卵模型

- 大鼠子宫、卵巢体重和卵巢形态学的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(3):68-71.
- [11] 李婷婷, 连方, 孙振高. 二至天葵颗粒对小鼠卵细胞及胚胎质量的影响及其机制[J]. 山东医药, 2017, 57(4):37-39.
- [12] 马堃. 中西医结合诊治肾虚血瘀型排卵障碍性不孕(不育)优势的探究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11):2623-2628.
- [13] 谈勇, 黄紫薇. 排卵障碍性不孕症的中西医结合诊治思考[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(5):521-524.
- [14] 姚琦, 周阁, 戴建国, 等. 控制性超促排卵对小鼠胎盘功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(5):497-502.
- [15] 辛明蔚, 张莹, 何军琴, 等. 温肾养血方对高龄雌鼠卵泡发育的作用及其对PI3K-AKT-FOXO3a通路影响的研究[J]. 首都医科大学学报, 2019, 40(3):344-351.
- [16] XIN M W, HE J Q, ZHANG Y, et al. Chinese herbal decoction of Wenshen Yangxue formula improved fertility and pregnancy rate in mice through PI3K/Akt signaling[J]. J Cellular Biochem, 2019, 120(3):3082-3090.
- [17] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6):1-8.
- [18] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D976-D982.
- [19] 许海玉, 刘振明, 付岩, 等. 中药整合药理学计算平台的开发与应用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18):3633-3638.
- [20] MANCINI A, BRUNO C, VERGANI E, et al. Oxidative stress and low-grade inflammation in polycystic ovary syndrome: controversies and new insights[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4):1667.
- [21] DUICA F, DANILA C A, BOBOC A E, et al. Impact of increased oxidative stress on cardiovascular diseases in women with polycystic ovary syndrome [J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2021, 12:614679.
- [22] JOHN G B, SHIDLER M J, BESMER P, et al. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation[J]. Dev Biol. 2009, 331(2):292-299.
- [23] MA K, CHEN Y, FAN X, et al. Dingkun pill replenishes diminished ovarian reserve through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in TWP-induced mice[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 262:112993.
- [24] ZHANG H, QIN F, LIU A, et al. Electro-acupuncture attenuates the mice premature ovarian failure via mediating PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Life Sci, 2019, 217:169-175.
- [25] 黄晋琰, 徐珉, 王彦彦, 等. 补肾填精中药仙子益真胶囊对卵巢早衰模型小鼠卵巢PI3K/AKT通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(10):1203-1208.
- [26] CHO H J, BAEK M O, KHALIQ S A, et al. Microgravity inhibits decidualization via decreasing Akt activity and FOXO3a expression in human endometrial stromal cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):12094.
- [27] ZHANG X, TANG N, HADDEN T J, et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(11):1978-1986.
- [28] 龙菁. FOXO3a在早孕小鼠子宫内蜕膜化中的作用及机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2019:26-27.

[责任编辑 顾雪竹]