基于网络药理学研究妇科调气解毒方对慢性子宫内膜炎的治疗作用机制Δ

陈继香[1]*,李　宁[2#],钟传梅[1],宇文思[1](1.广西中医药大学研究生院,南宁　530000;2.广西中医药大学附属国际壮医医院妇科,南宁　530000)

中图分类号　R932;R96　　文献标志码　A　　文章编号　1672-2124(2023)06-0686-07
DOI　10.14009/j.issn.1672-2124.2023.06.011

摘　要　目的:探讨妇科调气解毒方对慢性子宫内膜炎的作用机制。方法:通过网络药理学,确定妇科调气解毒方作用于子宫内膜炎可能的关键靶点和关键通路。在该理论基础上,建立子宫内膜炎小鼠模型,分为空白组、模型组、西药组(盐酸左氧氟沙星),以及低、中及高剂量组(给予低、中及高剂量的妇科调气解毒方),通过酶联免疫吸附试验(ELISA)法、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)及蛋白质印迹法验证网络药理学结果。结果:在妇科调气解毒方中筛选出219个化合物和相应靶点698个;与子宫内膜炎的靶点取交集获得36个关键靶点。京都基因与基因组百科全书通路富集得到77条代谢通路,主要包括核因子κB(NF-κB)信号通路、晚期糖基化终末产物(AGE)-AGE受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路和白细胞介素(IL)17信号通路等。ELISA法结果显示,与空白组相比,模型组髓过氧化物酶(MPO)活性,炎症因子IL-6及IL-1β含量显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,妇科调气解毒方低剂量组IL-6含量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),但组间MPO活性、IL-1β含量的差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组相比,中剂量组、高剂量组及西药组MPO活性、IL-6及IL-1β含量明显降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。实时荧光定量PCR及蛋白质印迹法结果显示,与空白组比较,模型组子宫组织中磷酸化蛋白65(P-P65)、Toll样受体4(TLR4)的基因及蛋白表达量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$或$P<0.001$)。与模型组比较,低剂量组不能明显抑制P-P65及TLR4 mRNA及蛋白的表达量($P>0.05$),P-P65 mRNA、TLR4 mRNA表达量在中、高剂量组及西药组中明显降低($P<0.05$或$P<0.01$,$P<0.001$),P-P65蛋白、TLR4蛋白表达量在高剂量组及西药组中明显降低($P<0.01$或$P<0.05$),差异均有统计学意义。各组P65蛋白mRNA及蛋白表达量的差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:在脂多糖诱导的子宫内膜炎小鼠模型中,妇科调气解毒方可以明显下调炎症因子水平,抑制TLR4/NF-κB信号通路中关键基因蛋白的表达,从而达到抗炎、保护子宫内膜的目的。

关键词　妇科调气解毒方;慢性子宫内膜炎;网络药理学;作用机制

Therapeutic Mechanism of Gynecological Tiaoqi Jiedu Formula on Chronic Endometritis Based on Network Pharmacology Δ

CHEN Jixiang[1], LI Ning[2], ZHONG Chuanmei[1], YU Wensi[1](1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Dept. of Gynecology, International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To probe into the mechanism of gynecological Tiaoqi Jiedu formula on chronic endometritis. METHODS: Through network pharmacology, the possible key targets and key pathways of gynecological Tiaoqi Jiedu formula on endometritis were identified. On the basis of this theory, the mouse model of endometritis was established and divided into the blank group, model group, western medicine group (levofloxacin hydrochloride), and low-dose group, medium-dose group and high-dose group (low-dose, medium-dose and high-dose gynecological Tiaoqi Jiedu formula). The network pharmacology results were verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting. RESULTS: A total of 219 compounds and 698 corresponding targets were screened from gynecological Tiaoqi Jiedu formula. A total of 36 key targets were obtained by intersections with endometritis targets. Seventy-seven metabolic pathways were obtained by Kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment, including nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway, advanced glycation end products (AGE)-AGE receptor signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway and interleukin (IL)-17 signaling pathway. ELISA results showed that the levels of MPO, IL-6 and IL-1β in the model group were significantly higher than those in the blank group ($P<0.01$). Compared with the model group, the low-dose gynecological Tiaoqi Jiedu formula group had a significant reduction in IL-6, with statistically significant difference ($P<0.05$), but there was no significant difference in MPO and IL-1β between two groups ($P>0.05$).

Δ 基金项目:广西壮族自治区中医药管理局自筹经费科研课题项目(No. 20210061);广西国际壮医医院科研启动基金项目(No. 741)
* 主治医师,硕士研究生。研究方向:妇科肿瘤。E-mail:2539748034@qq.com
# 通信作者:主任医师,硕士生导师。研究方向:子宫内膜异位症及妇科肿瘤。E-mail:lining0771@163.com

Compared with the model group, MPO, IL-6 and IL-1β in the medium-dose group, high-dose group and western medicine group decreased significantly, with statistically significant differences ($P<0.01$). The results of real-time fluorescence quantitative PCR and Western blotting showed that the gene and protein expression of P-P65 and TLR4 in the uterine tissue of the model group were significantly higher than those of the normal group, with statistically significant differences ($P<0.01$ or $P<0.001$). Compared with the model group, the low-dose group could not significantly inhibit the expression of P-P65 and TLR4 mRNA and protein ($P>0.05$), while the expression of P-P65 mRNA and TLR4 mRNA in the medium-dose group, high-dose group and western medicine group decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$, $P<0.001$), the expression of P-P65 protein and TLR4 protein in the high-dose group and western medicine group decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$), the differences were statistically significant. There was no significant difference in the expression of P65 mRNA and protein in each group ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Gynecological Tiaoqi Jiedu formula can significantly down-regulate the levels of inflammatory factors and inhibit the expression of key genes in TLR4/NF-κB signaling pathway in the mouse model of lipopolysaccharide (LPS)-induced endometritis, so as to achieve the purpose of anti-inflammatory and endometrial protection.

KEYWORDS Gynecological Tiaoqi Jiedu formula; Chronic endometritis; Network pharmacology; Mechanism of action

慢性子宫内膜炎(chronic endometritis,CE)是一种以黏膜间质水肿、局灶性或弥漫性充血、子宫内膜息肉和间质浆细胞浸润为特征的持续性子宫内膜炎症[1]。CE 的患病率在不孕妇女中为 2.8%~56.8%,与不良孕育结局及子宫内膜异位症等有着明确相关性[2-4]。该病严重影响了妇女的健康和生活质量,同时造成了社会家庭经济负担,子宫内膜炎的主要病因为常见细菌感染,如大肠杆菌、链球菌和葡萄球菌等,脂多糖(LPS)为细菌主要成分[5]。目前对于 CE 尚无普遍接受的标准化的诊断指南,也没有统一标准化的治疗方案[6-7]。国内外优先推荐抗炎治疗[8]。但目前的治疗方法存在耐药、反复发作以及有一定的不良反应等问题。因此,探究子宫内膜炎的发病机制,以进行有效治疗十分迫切。妇科调气解毒方作为经验方在临床中治疗 CE 多年,同时有改善月经、提高受孕率等效果,但对其治疗机制缺乏深入研究。本研究在网络药理学基础上推断其作用的通路及靶点,并建立动物模型对其作用机制进行验证,为临床用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 妇科调气解毒方成分库的建立和关键靶点的筛选

从中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP,http://tcmspw.com/)和中药与化学成分数据库[9]中检索白芍、白术、布渣叶、苍术、柴胡、陈皮、甘草、荆芥穗、救必应、绵萆薢、山药和土茯苓,寻找中药化学组成成分时设置口服生物利用度≥30%、类药性≥0.18 对化合物进行筛选;同时,从已发表的论文中检索黄花倒水莲、五指毛桃主要活性成分;将查询得到的 CAS 号和 Pubchem Cid 号通过 PubChem[10] 生成 2 D 蛋白质靶点结构图,通过 SwissADME[11] 对其活性成分进行筛选,根据药动学,排除胃肠道吸收度低的蛋白质靶点,最后通过 TCMSP 和 Uniprot 数据库[12] 将靶蛋白名转换为标准基因名,得到化合物相应关键靶点的基因;运用 SwissTargetPrediction[13] 进行靶点预测,获得妇科调气解毒方靶点基因。

1.2 子宫内膜炎疾病靶点的收集

以“Endometritis”“Endomyometritis”为关键词,使用 GeneCard[14]、DrugBank[15] 和 DisGeNET[16] 收集子宫内膜炎相关的目标基因;使用 Jvenn 在线工具[17] 将药物预测的靶点与疾病的靶点进行映射,获得妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎的潜在靶点。

1.3 重叠基因的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络、药物-化合物-作用靶点-疾病网络的构建

为探索妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎蛋白靶点之间的相互作用并识别关键蛋白,将重叠的潜在靶点通过 STRING 11.5 数据库[18],物种设置为选择“多种蛋白质”后的“智人”;其他参数为默认值,利用 Cytoscape 3.7.1 软件绘制交互网络,设置节点大小和颜色来反映度值的大小,设置边的粗细来反映组合分数的大小,得到最终的 PPI 网络。

1.4 重叠基因的基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

为说明和了解妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎的潜在机制,使用 Metascape 在线平台[19],以 $P<0.01$ 对重叠基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,筛选排序靠前的生物过程和通路,并对富集分析结果进行可视化处理。

1.5 仪器

SIM-F140AY65-PC 型制冰机(日本 Panasonic 公司);PowerPac™ 通用电泳仪电源(美国 BIO-RAD 公司);Fluorchem E 型超灵敏化学发光成像系统(美国 Protein Simple 公司);5430R 型高速冷冻离心机(艾本德中国有限公司);DW-86-L290-80 ℃冰箱(澳柯玛股份有限公司);Light Cycler 96 型全自动实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);Infinite M200 pro 型多功能微孔板检测仪酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.6 药品与试剂

妇科调气解毒方配方组成:黄花倒水莲 15 g,五指毛桃 15 g,麸炒白术 30 g,山药 30 g,救必应 15 g,土茯苓 15 g,布渣叶 15 g,棉萆薢 10 g,麸炒苍术 15 g,白芍 6 g,车前子(布包)9 g,柴胡 3 g,荆芥穗 3 g,甘草 6 g,陈皮 5 g。将饮片水煎成汤剂高、中、低 3 个浓度:3.84、1.92、0.96 g/mL,1 mL 含生药 1.92 g,由广西中医药大学附属国际壮医医院制剂科代煎。

盐酸左氧氟沙星片(浙江京新药业股份有限公司,国药准字 H19990060,规格为 0.1 g)。LPS 10 mg(美国 Sigma 公司,批号为 L2630);髓过氧化物酶(MPO)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、白细胞介素(IL)6 ELISA 试剂盒、蛋白定量

试剂盒、羊抗兔 IgG、ECL 化学发光底物试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号分别为 MU30238、MU30044、BL521A-1、BL003A、BL523A);IL-1β ELISA 试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号为 MU30369);兔抗 Toll 样受体 4(TLR4)抗体、兔抗核因子 κB(NF-κB) P65 多克隆抗体、P-NF-κB P65 多克隆抗体(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 K003881P、K003407P、K006209P);10% PAGE 彩色凝胶超快速配制试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号为 G2043-50T);定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒、逆转录试剂盒(武汉诺华生物科技有限责任公司,批号分别为 Q204、R202);RNA 总提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号为 DP424]。

1.7 动物选取与模型建立

所有实验动物的处理均遵循国家科学技术委员会颁布的《动物质量管理办法》实施。选取 SPF 级 8 周昆明雌性小鼠 60 只,体重 30~35 g,将小鼠置于 SPF 级实验室,室内温度 20~25 ℃,湿度 50%~60%,普通饲料、水饲养适应性饲养 1 周后,随机抽取 10 只为空白组,剩余 50 只随机分为模型组,妇科调气解毒方低、中、高剂量组,以及西药组。妇科调气解毒方生药为 192 g/付,成人口服剂量为 192 g/d。根据等效剂量系数折算法小鼠日剂量为 29.12 g/kg,因此,妇科调气解毒方低、中及高剂量组分别按 14.56、29.12 及 58.24 g/kg 连续灌胃 5 d,西药组同理推算,1 日 2 次,空白组灌胃等体积 0.9%氯化钠溶液。5 d 后给小鼠子宫腔手术注入 LPS(2.5 μg/μL) 25 μL[20-21]。24 h 后眼球取血后离心,脱颈椎处死小鼠后取组织置于-80 ℃冰箱待测相关指标。

1.8 网络药理学结果的验证

根据 ELISA 试剂盒的步骤对网络药理学对应的关键靶点进行检测,通过 Real-time PCR 及蛋白质印迹法对关键信号通路中的关键蛋白和基因的表达水平进行检测。TLR4、NF-κB 及 P65 NF-κB 的引物序列见表 1。

表 1 TLR4、NF-κB 及 P65 NF-κB 的引物序列

Tab 1 Primer sequences TLR4, NF-κB and P65 NF-κB

基因	序列(5'→3')	长度
TLR4	正向引物	ATGGCATGGCTTACACCACC
	反向引物	GAGGCCAATTTTGTCTCCACA
NF-κB	正向引物	GGAGGCATGTTCGGTAGTGG
	反向引物	CCCTGCGTTGGATTTCGTG
P65 NF-κB	正向引物	AGGCTTCTGGGCCTTATGTG
	反向引物	TGCTTCTCTCGCCAGGAATAC
GAPDH	正向引物	CTGGGCTACACTGAGCACC
	反向引物	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

1.9 统计学方法

所有实验均进行 3 次生物学重复,实验数据采 SPSS 17.0 统计分析软件处理,采用 one-Way ANOVA,并进行 Tukey's 事后检验,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,绘图与数据分析运用软件 GraphPad Prism 8.0 进行,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 妇科调气解毒方的化合物与疾病的靶基因鉴定

妇科调气解毒方由黄花倒水莲、五指毛桃、白术和山药等 15 味中草药组成。按照筛选条件去除重复、冗杂以及未找到靶点的成分后,最终得到化学成分黄花倒水莲 5 个,五指毛桃 48 个,白术 3 个,山药 11 个,救必应 4 个,土茯苓 12 个,布渣叶 7 个,绵萆薢 2 个,苍术 3 个,白芍 8 个,陈皮 5 个,车前子 5 个,柴胡 12 个,荆芥穗 7 个,甘草 87 个,共 219 个化合物。利用数据库查询主要化合物调控的靶点信息,筛选出对应的作用靶点 698 个,通过 Uniprot 对靶点和基因信息进行标准化。从 GeneCards、DrugBank 和 DisGeNET 数据库中共鉴定出 151 个子宫内膜炎相关的靶基因。

2.2 妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎的潜在靶点

运用 Jvenn 在线工具,将妇科调气解毒方主要活性成分调控的靶点与子宫内膜炎的疾病靶点取交集,最终得到 36 个靶点,见图 1。

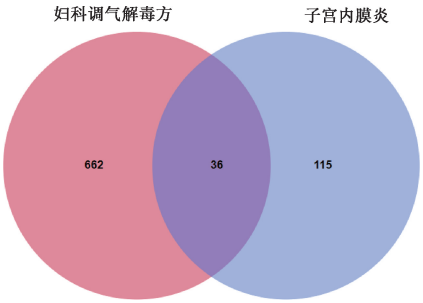


图 1 妇科调气解毒方-子宫内膜炎靶点韦恩图

Fig 1 Venn diagram of gynecological Tiaoqi Jiedu formula-endometritis target

2.3 妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎潜在靶点的 PPI 网络构建

为探索 36 个抗子宫内膜炎靶基因的相关性,构建了 1 个 PPI 网络。PPI 网络中的节点代表蛋白质,边代表蛋白质之间的相互作用,节点的大小和颜色的深浅代表度值;节点的度值越高,其在网络中的作用就越重要;每条边表示蛋白与蛋白之间的相互作用,线条越多表示关联度越大,见图 2。由图 2 可知,IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)、半胱天冬酶 3(CASP3)、环加氧

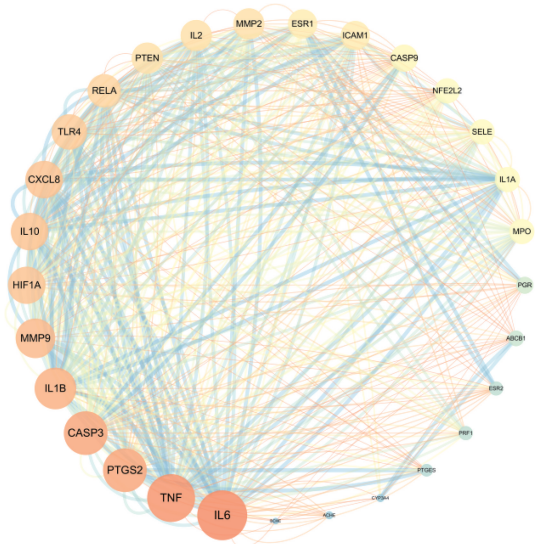


图 2 妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎交接靶点 PPI 网络

Fig 2 PPI network of handover targets of gynecological Tiaoqi Jiedu formula in the treatment of endometritis

酶 2(PTGS2)、IL-1β、基质金属蛋白酶(MMP)9、CXC 趋化因子配体 8(CXCL8)、IL-10、缺氧诱导因子 1a(HIF1A)的度值显著高于其余靶点,在 PPI 网络中起着重要的联系作用,可能是妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎最主要的潜在靶点。

2.4 药物-化合物-作用靶点-疾病网络的构建

运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建药物-化合物-作用靶点-疾病网络,见图 3。图 3 中,中间代表疾病,第 2 圈代表交接作用靶点,第 3 圈代表药物名称,每条边表示化合物和靶点之间相互作用的关系,根据节点度值等网络拓扑学特征进行核心节点的筛选,节点越大,颜色越深,代表化合物的作用越大。结果显示,槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)、木犀草素(luteolin)和 β-谷甾醇(beta-sitosterol)等化合物在整个网络中发挥着关键作用,可能是妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎的核心化合物。

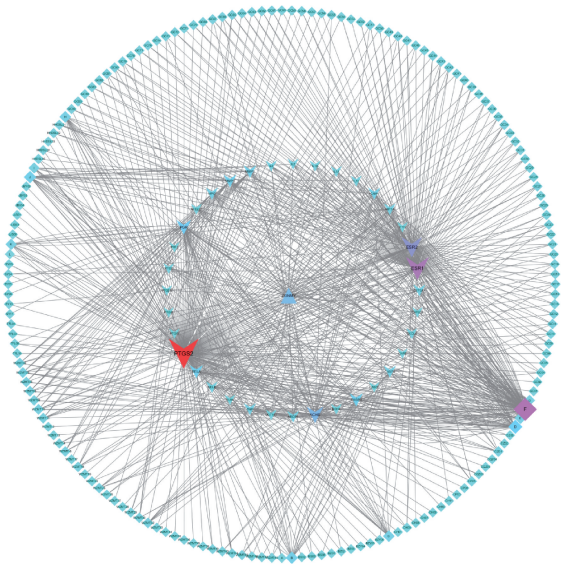
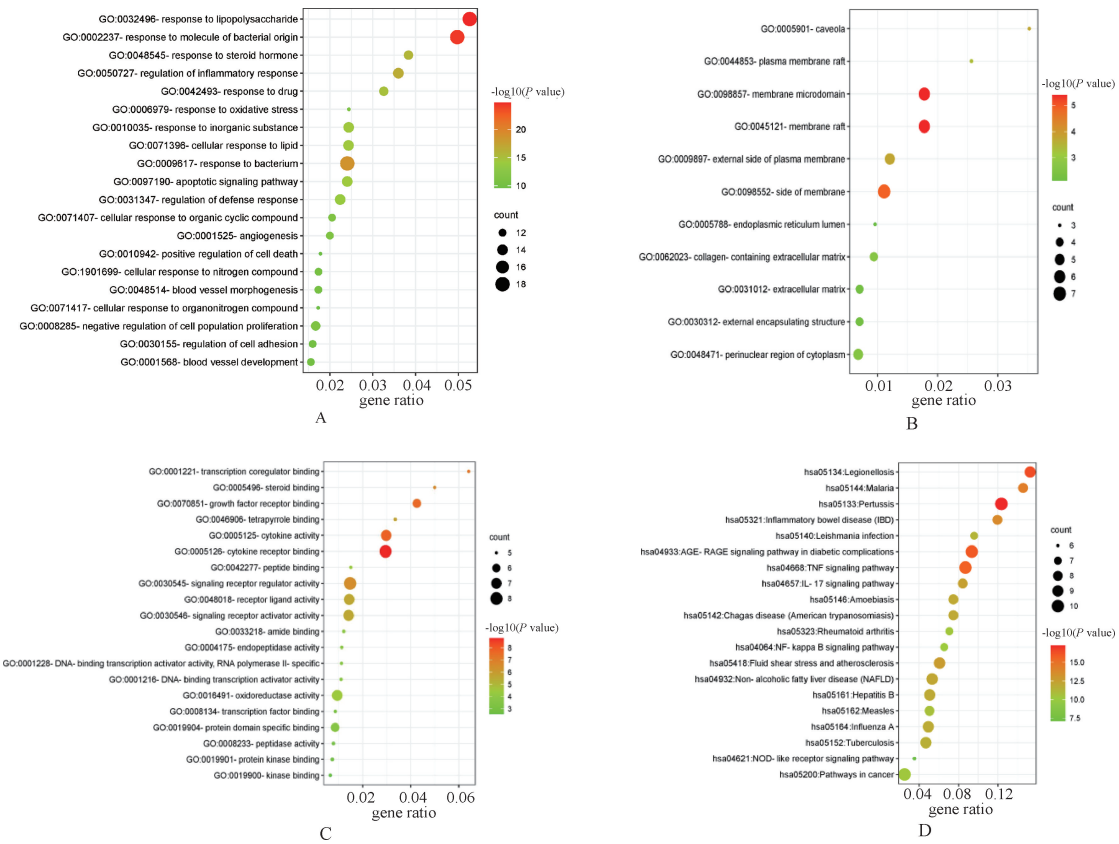


图 3 药物-化合物-作用靶点-疾病网络图

Fig 3 Drug-compound-target-disease network

2.5 妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎潜在靶点的 GO 分析

GO 富集分析的结果包括生物过程、分子功能和细胞成分 3 类。GO 生物功能分析共包含 690 条富集结果($P<0.01$),其中生物过程 636 条,分子功能 43 条,细胞成分 11 条。将数据可视化,Gene Radio 指差异表达基因中位于 term entry 的基因数与所有基因中位于 term entry 的基因总数的比值。气泡的大小表示基因的数量(count 值),气泡越大,该富集的基因数量越多。气泡颜色的深浅表示富集程度(P 值);颜色越红,表示富集程度越高。结果表明,妇科调气解毒方可能是对炎症反应调节、信号受体调节、细胞因子介导的信号通路、细胞因子活子和生长因子受体结合等生物过程进行干预的,见图 4(A—C)。



A. 生物过程;B. 细胞成分;C. 分子功能;D. KEGG 通路

A. biological process; B. cellular component; C. molecular function; D. KEGG pathway

图 4 妇科调气解毒方治疗子宫内膜炎潜在靶点的 GO 和 KEGG 通路富集分析

Fig 4 GO and KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of gynecological Tiaoqi Jiedu formula in the treatment of endometritis

2.6 KEGG 通路富集分析

对重叠基因进行 KEGG 通路富集分析，以 $P<0.01$ 进行筛选，共获得了 77 条信号通路，对 P 值从小排序居前 20 位的信号通路进行可视化，见图 4(D)。结果表明，潜在靶点主要参与 NF-κB 信号通路、晚期糖基化终末产物(AGE)-AGE 受体(RAGE)信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路和 NOD-like 受体信号通路等，与子宫内膜炎发病机制报道相吻合。

2.7 小鼠造模一般情况

空白组小鼠精神状态佳，反应灵敏，饮食饮水正常、毛发光泽、大小便正常，阴道分泌物正常。模型组、低剂量组小鼠精神萎靡少动，反应迟钝，饮食饮水量变少，阴道分泌物增多。其余组无明显异常。

2.8 妇科调气解毒方对 MPO 及炎症因子的影响

与空白组相比，模型组小鼠 MPO 活性明显升高，差异有统计学意义($P<0.01$)；与模型组相比，中剂量组、高剂量组及西药组小鼠 MPO 活性明显降低，差异均有统计学意义($P<0.01$)，低剂量组小鼠 MPO 活性与模型组的差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白组相比，模型组小鼠炎症因子 IL-6、IL-1β 含量显著升高($P<0.01$)；与模型组相比，低剂量组小鼠 IL-6 含量明显降低($P<0.05$)，中剂量组、高剂量组及西药组小鼠 IL-6、IL-1β 含量明显降低($P<0.01$)，差异均有统计学意义。对高、中、低剂量组及西药组之间的 MPO 活性、IL-6 及 IL-1β 含量进行比较，高剂量组与西药组的差异无统计学意义($P>0.05$)，其余差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表 2。

表 2 各组小鼠血清细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$，pg/mL，$n=10$)

Tab 2 Comparison of serum cytokine levels in each group ($\bar{x}\pm s$, pg/mL, $n=10$)

组别	MPO	IL-6	IL-1β
空白组	0.47±0.10	23.51±2.78	58.34±3.75
模型组	4.16±0.28$^{\#\#}$	66.07±4.39$^{\#\#}$	152.00±5.61$^{\#\#}$
低剂量组	4.11±0.46	63.29±2.28*	146.01±3.73
中剂量组	2.84±0.29**	48.42±1.17**	129.45±6.06**
高剂量组	0.99±0.10**	32.25±1.42**	63.22±5.35**
西药组	1.05±0.16**	32.50±0.74**	64.43±3.93**

注：与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

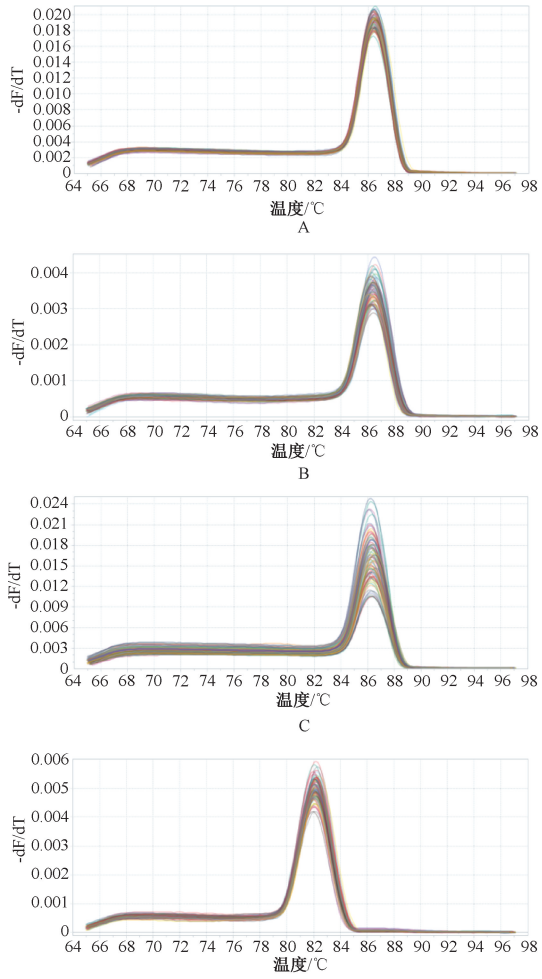
Note: *vs.* blank group, $^{\#\#}P<0.01$; *vs.* model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

2.9 Real-time PCR 检测 TLR4/NF-κB 信号通路中 P65、磷酸化蛋白 65(P-P65)及 TLR4 mRNA 的表达

GAPDH 和 NF-κB 信号通路中，P65、P-P65 及 TLR4 的溶解曲线均为重叠的单峰，表示 PCR 产物单一，特异性好，见图 5。根据得出的内参平均 Ct 值及目的基因平均 Ct 值算出 ΔCt，最后用 ΔΔCt 值为相对表达量。结果显示，与空白组比较，模型组小鼠子宫组织内 P-P65、TLR4 mRNA 的表达量显著升高，差异均有统计学意义($P<0.01$，$P<0.001$)。与模型组比较，低剂量组不能明显抑制 P-P65 及 TLR4 mRNA 的表达($P>0.05$)，中、高剂量组及西药组小鼠 P-P65、TLR4 mRNA 表达明显降低，差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$，$P<0.001$)，各组小鼠 P65 mRNA 表达的差异均无统计学意义($P>0.05$)，见图 6。

2.10 蛋白质印迹法检测 TLR4/NF-κB 信号通路中 P-P65、P65 及 TLR4 蛋白表达量

与空白组比较，模型组小鼠子宫组织 NF-κB P65 磷酸化水平(P-P65)及 TLR4 蛋白表达量显著升高($P<0.01$)；与模型组比较，低、中剂量组小鼠对 NF-κB P65 磷酸化水平及 TLR4 蛋白表达的抑制不明显($P>0.05$)；高剂量组、西药组能显著抑制 P-P65 及 TLR4 蛋白表达量，与模型组的差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)；其中蛋白 P65 表达的差异无统计学意义($P>0.05$)，见图 7。



A. GAPDH；B. P-P65；C. P65；D. TLR4

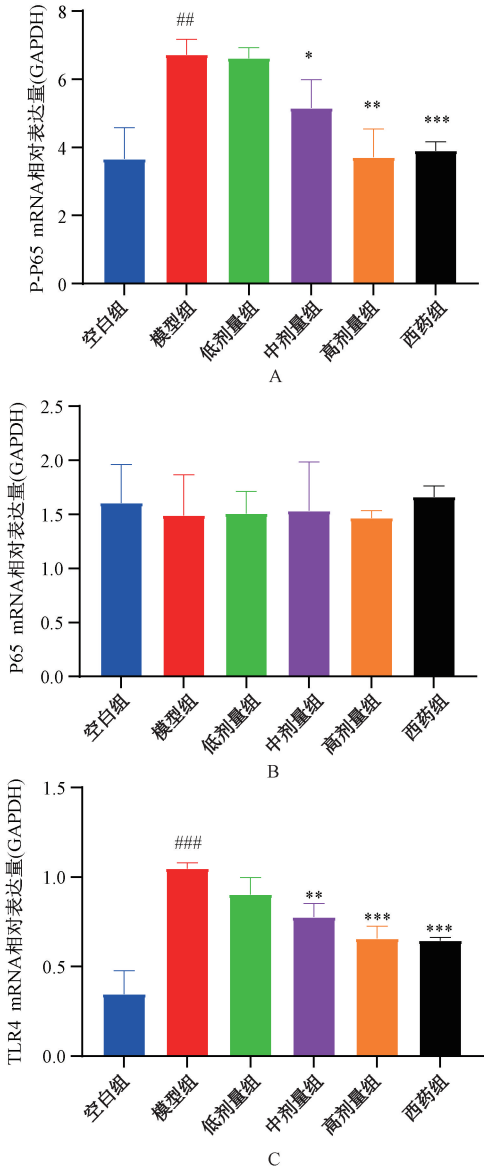
A. GAPDH；B. P-P65；C. P65；D. TLR4

图 5 TLR4/NF-κB 中实时荧光定量 PCR 溶解曲线

Fig 5 Dissolution curve of real-time PCR in TLR4/NF-κB

3 讨论

子宫内膜炎的发生不是一条通路的改变造成的，其中涉及多条通路间相互作用，但筛选出的重要潜在靶点(见图 2)均可激活 NF-κB 信号通路。研究结果发现，TLR4 在羊膜细胞、滋养细胞、母-胎界面蜕膜细胞及子宫内膜中表达极高，起到调节免疫、炎症和妊娠着床的作用[22]。LPS 是激活 TLR 信号通路的主要模式，一旦被激活就会触发炎症通路上调，尤其是 NF-κB 通路，进而引起 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 等炎症因子的表达上调，以及 MPO 的激活[23-24]。因此，NF-kB 信号通路在 CE 免疫系统中起关键作用。在 ELISA 的检测结果中，妇科调气解毒方作用于 CE 的重要靶点，即显著的向下调控炎症因子 IL-1β、IL-6 的表达及较少 MPO 的激活；同时检测由 TLR4 介导



A. P-P65 mRNA；B. P65 mRNA；C. TLR4 mRNA；与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

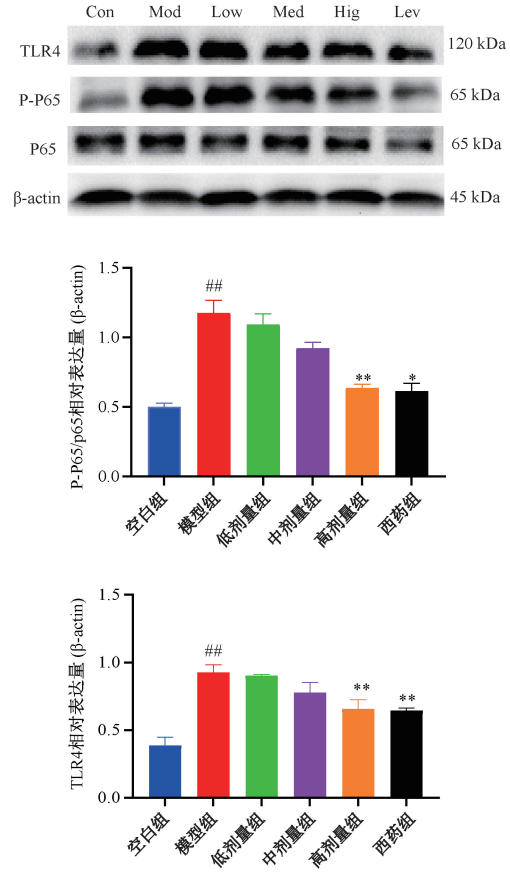
A. P-P65 mRNA; B. P65 mRNA; C. TLR4 mRNA; *vs.* blank group, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$; *vs.* model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$

图 6　各组 P-P65、P65 及 TLR4 mRNA 相对表达量的比较

Fig 6　Comparison of relative expression of P-P65, P65 and TLR4 mRNA in each group

的 NF-κB 信号通路的重要基因及蛋白的表达，结果显示，与空白组比较，模型组显示基因及蛋白 P-P65 和 TLR4 的相对表达量明显增加。妇科调气解毒方中、高剂量组及盐酸左氧氟星组能显著地向下调控基因及蛋白 P-P65 及 TLR4 的表达。

在筛选的在活性化合物中（见图 2），槲皮素综合评分远高于其他化合物。研究结果表明，槲皮素能被胃肠吸收且发挥抗氧化应激的作用[25]；并且可抑制胆固醇诱导的细胞凋亡、线粒体功能障碍和炎症[26-28]。此外，槲皮素可显著抑制 LPS 诱导的小胶质细胞炎症因子的产生、细胞增殖和 NF-κB 活化；降低 NLR 家族及细胞焦亡相关蛋白（如 NLRP3、Caspase-1、GSDMD



与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

vs. blank group, $^{\#\#}P<0.01$; *vs.* model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

图 7　各组小鼠子宫 NF-κB 信号通路相关蛋白表达

Fig 7　Expression of NF-κB signaling pathway-related proteins in the uterus of mice in each group

裂解的 IL-1β）的表达水平[29]。

将妇科调气解毒方主要活性成分调控的靶点与子宫内膜炎的治疗靶点取交集，得到 36 个关键靶点，其中 IL-6 的度值最大，IL-6 是一种多效性细胞因子[30-31]。目前研究结果表明，通过 IL-6 阻断能进行多种疾病的免疫治疗[32]。妇科调气解毒方可能从疾病通路的上游进行干预，通过抑制 IL-6 的表达，保护子宫内膜细胞的焦亡。同时作为重要作用靶点的 CXCL8，具有血管生成、新的黄体生成及孕酮分泌的作用[33]。从而解释了临床中妇科调气解毒方在治疗 CE 的同时能改善月经异常及提高受孕率的作用机制。

综上所述，妇科调气解毒方可以通过多靶点、多通路、多途径协同作用治疗 CE，并可以在疾病早期进行干预。本研究的不足之处是基于网络药理学进行的动物实验验证，与人体具有一定差异性。但本研究为今后进一步研究奠定了基础，为妇科调气解毒方在治疗 CE 的同时保护子宫内膜、提高受孕率提供了新的思路及临床用药依据。

参考文献

[1]　PUENTE E, ALONSO L, LAGANÀ A S, et al. Chronic endometritis: old problem, novel insights and future challenges[J]. Int J Fertil Steril, 2020, 13(4): 250-256.

[2] KIMURA F, TAKEBAYASHI A, ISHIDA M, et al. Review: chronic endometritis and its effect on reproduction[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2019, 45(5): 951-960.
[3] BUZZACCARINI G, VITAGLIANO A, ANDRISANI A, et al. Chronic endometritis and altered embryo implantation: a unified pathophysiological theory from a literature systematic review[J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37(12): 2897-2911.
[4] 梁炎春, 叶海花, 陆丽美, 等. 慢性子宫内膜炎对子宫内膜异位症相关性不孕妊娠结局的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2021, 59(3): 55-60.
[5] KITAYA K, TAKEUCHI T, MIZUTA S, et al. Endometritis: new time, new concepts[J]. Fertil Steril, 2018, 110(3): 344-350.
[6] XIONG Y J, CHEN Q, CHEN C X, et al. Impact of oral antibiotic treatment for chronic endometritis on pregnancy outcomes in the following frozen-thawed embryo transfer cycles of infertile women: a cohort study of 640 embryo transfer cycles[J]. Fertil Steril, 2021, 116(2): 413-421.
[7] 杨静, 马彩虹, 陶立元, 等. 反复着床失败患者慢性子宫内膜炎治疗后妊娠结局改善情况分析[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(2): 115-119.
[8] CICINELLI E, MATTEO M, TINELLI R, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy[J]. Hum Reprod, 2015, 30(2): 323-330.
[9] 中国科学院上海有机化学研究所. 化学专业数据库[EB/OL]. [2022-08-04]. https://organchem.csdb.cn.
[10] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
[11] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.
[12] RIGDEN D J, FERNÁNDEZ X M. The 2021 Nucleic Acids Research database issue and the online molecular biology database collection[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D1-D9.
[13] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
[14] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
[15] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
[16] PIÑERO J, SAÜCH J, SANZ F, et al. The DisGeNET cytoscape app: Exploring and visualizing disease genomics data[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19: 2960-2967.
[17] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 293.
[18] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D605-D612.
[19] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523.
[20] 孙兰, 刘莉娜, 李家春, 等. 丹皮酚对 LPS 诱导小鼠子宫内膜炎 NF-κB 信号通路的影响[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(11): 960-964, 971.
[21] DAR S H, QURESHI S, PALANIVELU M, et al. Evaluating a murine model of endometritis using uterine isolates of *Escherichia coli* from postpartum Buffalo[J]. Iran J Vet Res, 2016, 17(3): 171-176.
[22] 蒋莎, 李娜, 张杨, 等. Toll 样受体 4 通过调节性 T 细胞引起不明原因复发性流产的机制研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(10): 869-874.
[23] 林巧卫, 张思, 陆维祺. NOD 样受体介导的信号转导通路及其与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(3): 223-228.
[24] DONG X B, WANG L, SONG G R, et al. Physcion protects rats against cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibition of TLR4/NF-kB signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 277-287.
[25] CASTANGIA I, NÁCHER A, CADDEO C, et al. Therapeutic efficacy of quercetin enzyme-responsive nanovesicles for the treat-ment of experimental colitis in rats[J]. Acta Biomater, 2015, 13: 216-227.
[26] DI PETRILLO A, ORRÙ G, FAIS A, et al. Quercetin and its derivates as antiviral potentials: a comprehensive review[J]. Phytother Res, 2022, 36(1): 266-278.
[27] 冯亚莉, 李浩, 刘娟, 等. 槲皮素研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5185-5193.
[28] CARRASCO-POZO C, TAN K N, REYES-FARIAS M, et al. The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial bioenergetics of pancreatic β-cells, glycemic control and inflammation: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Redox Biol, 2016, 9: 229-243.
[29] 陈冬琳, 刘煜, 纪翠芳, 等. 槲皮素通过 NLRP 炎症小体相关通路对顺铂诱导肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2105-2109.
[30] SCHAPER F, ROSE-JOHN S. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(5): 475-487.
[31] YAMASAKI K, TAGA T, HIRATA Y, et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor[J]. Science, 1988, 241(4867): 825-828.
[32] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Aug 1; 10(8): a028456. doi: 10.1101/cshperspect.a028456. PMID: 28778870; PMCID: PMC6071487.
[33] TALBOTT H, DELANEY A, ZHANG P, et al. Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion[J]. Reproduction, 2014, 148(1): 21-31.

(收稿日期:2022-08-04 修回日期:2022-12-09)