

基于指纹图谱及网络药理学预测乌药汤冻干粉治疗原发性痛经的作用机制



程浩^{1,2}, 韩丹蕊^{1,2}, 褚素霞³, 刘明松¹, 马东来^{1,4}, 段绪红^{1,2,4}

1. 河北中医药大学药学院 (石家庄 050200)
2. 河北省中药炮制技术创新中心 (石家庄 050200)
3. 河北省药品医疗器械检验研究院 (石家庄 050200)
4. 闫国强全国名老中医药专家传承工作室 (河北沧州 061000)

【摘要】目的 建立乌药汤冻干粉超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱, 表征其共有峰的化学成分, 采用生信分析技术探讨乌药汤冻干粉治疗原发性痛经的物质基础和潜在作用机制。**方法** 建立乌药汤冻干粉的 UPLC 指纹图谱, 采用液质联用技术对共有峰进行结构表征。应用网络药理学构建“化学成分-靶点-通路”关系网络, 参考文献资料对其治疗原发性痛经的潜在活性成分及作用机制进行预测, 最后采用 Autodock Vina 分子对接验证。**结果** 建立了 10 批乌药汤冻干粉基准样品 UPLC 指纹图谱, 对 17 个共有峰进行了结构指认; 从上述成分中筛选得到乌药汤治疗原发性痛经的 6 个关键成分、12 个核心靶点和 10 条信号通路, KEGG 通路分析显示肿瘤坏死因子 (TNF)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路参与度高; 分子对接结果显示香叶木素等化学成分能与磷酸肌醇-3-激酶催化亚基 α 肽 (PIK3CA) 等蛋白稳定结合。**结论** 香叶木素、羟基薯蓣素、阿魏酸、波尔定碱、槐黄醇和臭灵丹酸可能是乌药汤缓解原发性痛经的潜在活性成分, 并作用于 PIK3CA、雌激素受体 1 (ESR1) 等核心靶点蛋白, 通过调控 TNF、PI3K/Akt、MAPK 等信号通路, 共同发挥治疗原发性痛经的作用, 初步探讨了乌药汤在治疗原发性痛经中的潜在机制, 为缓解原发性痛经提供多成分、多靶点、多通路的干预策略。建立的 UPLC 指纹图谱及其化学成分分析为后续药效学的深入研究奠定了基础。

【关键词】 乌药汤; 冻干粉; 原发性痛经; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 网络药理学; 作用机制

【中图分类号】 R285

【文献标识码】 A

Prediction of the mechanism of Wuyao decoction lyophilized powder in treating primary dysmenorrhea based on fingerprint and network pharmacology

CHENG Hao^{1,2}, HAN Danrui^{1,2}, CHU Suxia³, LIU Mingsong¹, MA Donglai^{1,4}, DUAN Xuhong^{1,2,4}

1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China
2. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050200, China
3. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang 050200, China
4. YAN Guoqiang National Famous Elderly Chinese Medicine Experts Inheritance Workshop, Cangzhou 061000, Hebei Province, China

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202409099

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (23372504D); 河北中医药大学燕赵医学研究项目 (YZZY2023017)

通信作者: 段绪红, 博士, 副教授, 副主任中药师, 硕士研究生导师, Email: duanxuhong@hebcm.edu.cn

Corresponding author: DUAN Xuhong, Email: duanxuhong@hebcm.edu.cn

【Abstract】Objective To establish ultra performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint for Wuyao decoction lyophilized powder, characterize the chemical components of its common peaks, and explore the material basis and potential mechanism of Wuyao decoction lyophilized powder in the treatment of primary dysmenorrhea using bioinformatics analysis techniques. **Methods** UPLC fingerprint for the lyophilized powder of Wuyao decoction was established, and the structures of the common peaks were characterized using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Network pharmacology was applied to construct a "chemical component-target-pathway" relationship network. The potential active components and mechanisms of action for the treatment of primary dysmenorrhea were predicted by consulting literature, and finally verified through molecular docking using Autodock Vina. **Results** UPLC fingerprint for 10 batches of Wuyao decoction lyophilized powder reference samples was established, and the structures of 17 common peaks were identified. From these components, six key components, 12 core targets, and 10 signal pathways for Wuyao decoction in the treatment of primary dysmenorrhea were screened. KEGG pathway analysis showed high involvement of TNF, PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. Molecular docking results indicated that chemical components such as diosmetin can stably bind to proteins such as the phosphoinositide-3-kinase catalytic subunit alpha peptide. **Conclusion** Diosmetin, desacetylmaticarin, ferulic acid, boldine, sophoradiol and pterodontic acid are likely to be the potential active ingredients in Wuyao decoction for alleviating primary dysmenorrhea, and act on core target proteins such as PIK3CA and ESR1. By regulating signaling pathways such as TNF, PI3K/Akt and MAPK, these components can jointly play a role in the treatment of primary dysmenorrhea. A preliminary exploration of the potential mechanism of Wuyao decoction in treating primary dysmenorrhea has been carried out, providing a multi-component, multi-target, and multi-pathway intervention strategy for relieving primary dysmenorrhea. The established UPLC fingerprint and its chemical composition analysis have laid a solid foundation for the in-depth study of subsequent pharmacodynamics.

【Keywords】 Wuyao decoction; Lyophilized powder; Primary dysmenorrhea; Ultra performance liquid chromatography; Fingerprint; Network pharmacology; Mechanism of action

原发性痛经是指伴随月经发生的周期性下腹疼痛而无生殖器官器质性病变的疾病。通常在月经开始前不久或开始时发生小腹痉挛性疼痛,并伴有头痛、嗜睡、乏力、乳房胀痛、小腹下坠、腰酸背痛等症状,个别患者还会出现食欲不振、恶心、呕吐和腹胀、腹泻等胃肠道症状,是最常见的妇科疼痛性疾病之一^[1-2]。在中医临床上,以血瘀、湿滞、寒凝症状常见,辨证以气滞血瘀证、寒凝血滞证、湿热瘀结证等多见。从西医角度看,该病的发病诱因及产生机制较复杂,如患者子宫形态的改变、内分泌激素水平的高低、精神心理和社会因素等都可能其影响因素^[3]。目前该病的治疗现状,西医多对症治疗,采用具有抗炎作用的非甾体抗炎药;用于调节内分泌、缓解子宫平滑肌异常收缩等作用的口服避孕药、钙通道阻滞剂、维生素。但以上药物长期使用会对人体肾、肝等器官产生药物不良反应。而中医药治疗原发

性痛经方法较多,尤其是一些经典名方或临床经验方,疗效确切且不良反应少,越来越受到广大患者的青睐。

2018 年国家公布的《古代经典名方目录(第一批)》中,乌药汤位列其中。该方出自金·李东垣《兰室秘藏》:“当归、甘草、木香各五钱,乌药一两,香附子二两,治妇人血海疼痛。”乌药汤的现代临床应用广泛,现代研究表明,该方可用于治疗月经不调、痛经、乳房胀痛、乳腺增生等疾病,临床效果显著^[4],前期虽有文献^[5]对乌药汤治疗原发性痛经的网络药理学进行了初步预测研究,发现其作用机制是由多成分、多靶点、多通路发挥药效,但并未对乌药汤的基准样品进行分析,所得的活性成分在汤剂中含量较少,进入人体血液的可能性较小,有可能并非其发挥药理作用的物质基础,其具体的潜在活性成分及机制尚待进一步深入研究。

网络药理学是利用生物分子网络分析方法,

系统性探究中药与疾病之间的相关作用机制的一种较为成熟的方法。现已广泛应用于有效成分发现、作用机制研究和临床前研究等领域^[6-7]。本研究在前期工艺筛选的基础上^[8]，采用随机组合的方法制备了10批乌药汤物质基准样品冻干粉，建立UPLC指纹图谱，并进行相似度评价，得到共有峰，然后采用液相色谱高分辨质谱联用技术对其共有峰进行结构表征；基于结构确证的化学成分，再结合网络药理学方法，筛选潜在活性成分、作用靶点和通路之间的关系，分析预测乌药汤冻干粉治疗原发性痛经的潜在药效成分及可能的机制，最后进行分子对接的相关验证，以期为乌药汤冻干粉的质量控制及治疗原发性痛经提供科学依据与参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1290型超高压液相色谱仪和Agilent 6530型高分辨质谱仪购自美国安捷伦科技有限公司；RE-52型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；BSA2245-CW型电子天平（瑞士赛多利斯科学仪器有限公司）；MH-1000型电热套（北

京科伟永兴仪器有限公司）；WP-Z-UV型超纯水机（四川沃特尔水处理设备有限公司）；BK-360B型超声提取机（济南巴克超声波科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

乙腈和甲酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为屈臣氏蒸馏水（屈臣氏公司）。

乌药汤由当归、木香、甘草、乌药、香附5味中药组成，中药饮片经河北中医药大学药学院侯芳洁副教授鉴定，当归（产地：甘肃岷县）为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，木香（产地：云南大理）为菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根，甘草（产地：内蒙古乌兰察布）为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎，乌药（产地：浙江台州）为樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kos-term. 的干燥块根，香附（产地：山东泰安）为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎，凭证标本存放于河北中医药大学药学院中药炮制学教研室。采用“RANDBETWEEN”函数生成随机数在Excel中生成随机组合表，结果见表1。

表1 乌药汤冻干粉饮片随机组合信息

Table 1. Random combination information of Wuyao decoction lyophilized powder pieces

编号	批号				
	当归	木香	甘草	乌药	香附
S1	DG200601	MX200601	GC20092201	WY19122901	XF20010603
S2	DG200891021	MX2005010061	GC20072810	WY20010301	XF20010603
S3	DG20062301	MX20092101	GC200701c099	WY20190101	XF20010603
S4	DG200891001	MX20071901	GC20180905	WY2001010084	XF20040803
S5	DG200891001	MX2005010061	GC20092201	WY20010301	XF20040802
S6	DG20062301	MX20071901	GC20072810	WY20010301	XF20010603
S7	DG200601	MX20092101	GC20180905	WY20190101	XF20040801
S8	DG200891021	MX2005010061	GC200701c099	WY19122901	XF20010603
S9	DG200891021	MX20071901	GC20092201	WY19122901	XF20040801
S10	DG20062301	MX20092101	GC20072810	WY2001010084	XF20040801

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 供试品溶液的制备

按日处方量，分别称取乌药8g，香附16g，甘草4g，香附4g，木香4g，参考“上咬咀，每服五钱，水二大盏，去滓”制法^[8]，将上述处方剂量饮片粉碎，过10目筛，置2000mL圆底烧瓶，加水1080mL，浸泡0.5h，回流提取，

先武火（功率：300W）1h，后保持微沸状态2h，趁热滤过，滤液65℃减压浓缩至稠浸膏，再冷冻干燥成干粉。取冻干粉约0.2g，精密称定，加入75%甲醇5mL，再次精密称定，超声（功率：250W，频率：40kHz）提取30min后，放冷，精密称定，用75%甲醇补足重量，13680×g离心10min，取上清液过0.22μm滤膜，即得。

2.1.2 色谱条件

色谱条件：以Waters ACQUITY UPLC HSS

T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 为色谱柱；流动相为乙腈 (A) -0.2% 甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~40 min, 15%~50% A；40~45 min, 50%~90% A；45~50 min, 90% A；50~50.5 min, 90%~15% A；50.5~55 min, 15% A)；流速为 0.3 mL/min；柱温为 35 ℃；检测波长为 254 nm；进样量为 5 μL。

2.1.3 精密度试验

取同一份供试品溶液 (编号: S1)，按“2.1.2”项下色谱条件连续进样 6 次，以甘草酸色谱峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 范围分别为 0.32%~0.56%、0.68%~1.74% (n=6)，均 < 3.0%，结果表明该仪器精密度良好。

2.1.4 重复性试验

取同一样品 (编号: S1)，按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，以甘草酸色谱峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 范围分别为 0.87%~1.29%、1.21%~1.74%

(n=6)，均 < 3.0%，结果表明该方法重复性良好。

2.1.5 稳定性试验

取同一份供试品溶液 (编号: S1)，室温放置，分别于 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，以甘草酸色谱峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 范围分别为 0.23%~0.62%、0.51%~0.66% (n=6)，均 < 3.0%，结果表明供试品溶液在室温条件 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 相似度评价

根据表 1 各饮片的随机组合，按“2.1.1”项下方法制得 10 批供试品溶液，再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012A 版)，以供试品 S1 图谱作为参照图谱 (R)，再采用中位数法多点校正和色谱峰匹配，得到 10 批样品指纹图谱叠加图 (图 1)，并计算相似度，表 2 结果显示，S1~S10 样品的相似度范围在 0.967~0.998，均 > 0.96，表明乌药汤样品质量稳定，均一性良好。

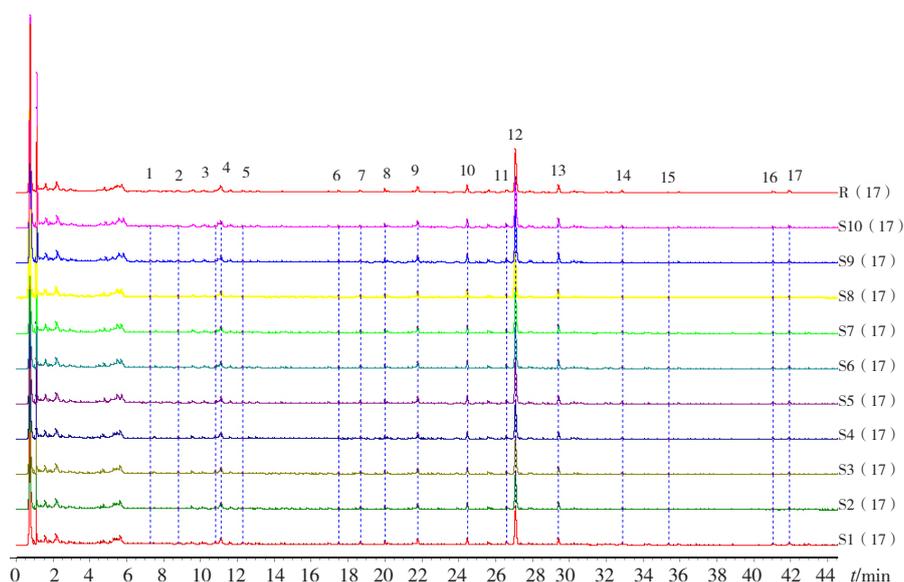


图1 10批乌药汤冻干粉的指纹图谱叠加图

Figure 1. Overlay diagram of fingerprint chromatograms for 10 batches of Wuyao decoction lyophilized powder

表2 10批乌药汤冻干粉指纹图谱相似度

Table 2. Similarity of fingerprint chromatograms of 10 batches of Wuyao decoction lyophilized powder

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.996	S6	0.975
S2	0.967	S7	0.998
S3	0.996	S8	0.983
S4	0.996	S9	0.997
S5	0.967	S10	0.996

2.1.7 共有峰表征

色谱条件：以 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 为色谱柱；流动相为乙腈 (A) -0.2% 甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~40 min, 15%~50% A；40~45 min, 50%~90% A；45~50 min, 90% A；50~50.5 min, 90%~15% A；50.5~65 min, 15% A)；流速为

0.3 mL/min; 柱温为 35℃; 检测波长为 254 nm; 进样量为 1 μL。

质谱条件: 一级质谱选用质谱成像模式, 质量扫描范围为 m/z 100~1 700; 二级质谱选用选择离子监测模式; 碰撞电压为 10、20、40 eV; 干燥气温度为 300 ℃; 干燥气流速为 6 L/min; 雾化气压力为 30 psi; 毛细管电压为 3 500 V (正离子模式) 和 3 000 V (负离子模式); 碰撞电压为 150 V; 采用 Agilent MassHunter 软件, 采集正、负离子模式下的质谱信息。

得到乌药汤冻干粉供试品溶液的 UPLC-UV 色谱图和 UPLC-TOF-MS 总离子流图 (正、负离子模式) 后, 将采集数据导入 Qualitative Analysis 10.0 软件, 设置方法, 建立化合物鉴定流程, 将样品中的特征峰进行提取和分析, 拟合出可能的分子式, 并将碎片信息与成都普

思生物科技股份有限公司自建的 个人化合物数据库与谱库 (personal compound database and library, PCDL) 二级数据库进行匹配, 过滤质量偏差 >7.5 ppm、匹配得分 <80 分的结果; 同时, 用在线数据库 SIRIUS 5.8.5 版本匹配二级碎片结果, 选择匹配得分 >80 分、Finger ID <50 的化合物, 获得最终测试报告结果。具体见图 2 和表 3。

2.2 网络药理学预测分析

2.2.1 乌药汤-原发性痛经共同靶点预测

将液质表征鉴定出的 17 个指纹图谱共有峰成分作为潜在活性成分, 其中儿茶素和洋川芎内酯 I 的作用靶点由相似性集成方法 (Similarity Ensemble Approach, SEA) 数据库 (<https://sea.bkslab.org/>) 和中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP,

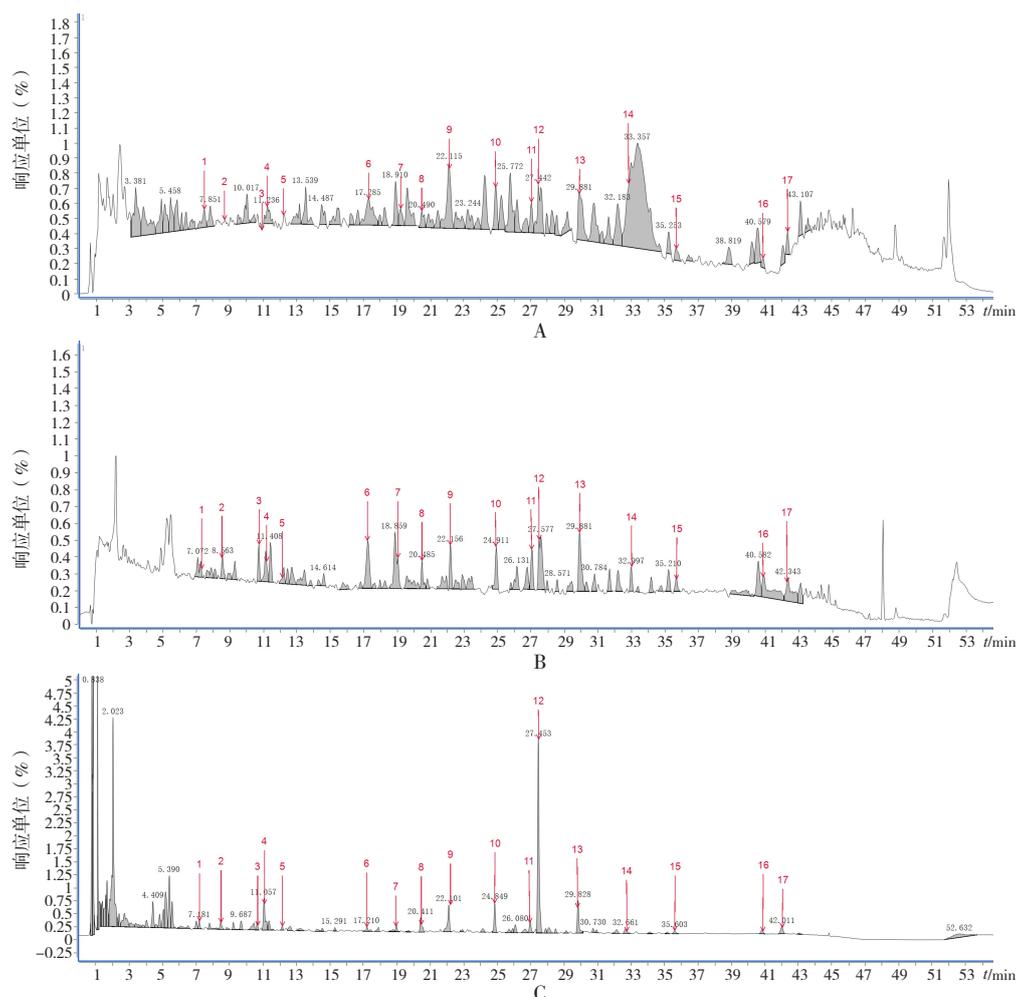


图2 乌药汤冻干粉指纹图谱共有峰及正、负离子模式下的质谱离子流图

Figure 2. Common peaks in the fingerprint chromatogram of Wuyao decoction lyophilized powder and mass spectrometry ion-flow diagrams in positive and negative

注: A. 正离子模式; B. 负离子模式; C. 乌药汤冻干粉指纹图谱。

表3 乌药汤冻干粉指纹图谱共有峰信息

Table 3. Information of the common peaks in the fingerprint chromatogram of Wuyao decoction lyophilized powder

序号	保留时间 (min)	化合物名称	分子式	理论值 (m/z)	实测值		二级碎片信息	备注
					正离子模式	负离子模式		
1	7.181	异绿原酸B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.126 8	517.138 6	515.119 3	(-434,353,191,179,173,161,135	PCDL二级库
2	8.469	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.063 4	301.072 3	299.056 7	(+286,231,188,167 (-255,240,199,147	PCDL二级库
3	10.645	芹糖甘草苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	550.168 6	551.179 1	549.160 0	(+419,257,137 (-417,297,255,135,119	PCDL二级库
4	11.057	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	430.126 4	431.137 2	465.123 2	(+269,213,116 (-267,252	PCDL二级库
5	12.143	异甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.126 4	419.136 2	417.119 0	(+257,211,137 (-255,135,119	PCDL二级库
6	17.210	羟基蓍含蓍素	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	262.1205	263.129 1	261.111 1	(+245,231,199,171,119 (-243,199,183,127	SIRIUS在线数据库
7	18.970	去甲异波尔定	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313.131 4	314.138 2	-	(+297,265,237,205,177	PCDL二级库
8	20.411	波尔定碱	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327.147 1	328.154 3	326.139 8	(+297, 282,265,237,205,194,177 (-311,296,283,267,253,225,197	PCDL二级库
9	22.101	甘草皂苷G2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.398 7	839.413 7	837.391 5	(+663,487,469 (-775,661,351,193	SIRIUS在线数据库
10	24.849	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 9	195.065 2	-	(+177,162,149,145,117,106	PCDL二级库
11	26.969	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.079	291.085 9	289.072 0	(+249,207,165,139,123 (-245,203,179,151,109	PCDL二级库
12	27.453	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.403 8	823.418 6	821.398 6	(+647,471,453,407 (-759,351,193	PCDL二级库
13	29.828	洋川芎内酯I	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.104 9	225.108 1	223.097 4	(+207,189,179,165,161,147,133 (-205,187,161,121	PCDL二级库
14	32.136	槐黄醇	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.126	369.135 8	367.116 9	(+313,285,270,243,123 (-337,309,284,203,148	PCDL二级库
15	35.603	甘草异黄酮A	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354.110 3	355.121 5	353.101 5	(+299,281,243,217,153 (-309,285,243,216,201	PCDL二级库
16	40.826	洋川芎内酯H	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.104 9	225.112 0	-	(+207,189,179,165,161,147,133	PCDL二级库
17	42.011	臭灵丹酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.162	235.169 8	-	(+217,189,179,161,133	SIRIUS在线数据库

<http://tcmospw.com/tcmosp.php>) 进行预测筛选; 洋川芎内酯 H 在 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、SEA 数据库和 TCMSp 数据库均未预测到作用靶点, 故舍弃。其余 14 个成分均在 SwissTargetPrediction 数据库中进行预测。疾病靶点以“primary dysmenorrhea”为检索词, 于在线人类孟德尔遗传 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库 (<https://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (Disease Gene Network) 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中进行检索。将成分靶点蛋白信息和疾病靶点蛋白信息通过 UniProt (Universal Protein) 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行标准化处理成统一的基因名, 删除 UniProt 数据库中不包含、非人类和未经实验验证的基因, 合并去重后, 收集到成分靶点 434 个、

疾病靶点 368 个和“成分-疾病”共同靶点 55 个, 利用 Venny 2.1.0 软件将表征出的 14 个潜在活性成分靶点和原发性痛经相关靶点进行韦恩图映射, 得到两者共同的交集靶点。结果见图 3。

2.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建与分析

将“成分-疾病”交集靶点导入到 STRING 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 物种设置为“Homo sapiens”, 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 参数评分值设为“high confidence>0.9”, 隐藏游离节点, 将结果保存为 tsv 格式文件并导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建 PPI 网络 (图 4)。PPI 网络中每个节点的直径大小和颜色深浅均代表一定的度 (degree) 值, 直径越大, 颜色越深, degree 值越大。利用 Cytoscape 3.9.1 软件中的“Analyze Network”功能

对 PPI 网络进行拓扑参数分析并以中位数为临界值, 将符合 degree 值 > 3、介数中心性 > 0.004 492,

并且接近中心度 > 0.319 7 的靶点列为核心靶点, 经筛选得到 12 个核心靶点, 结果见表 4。

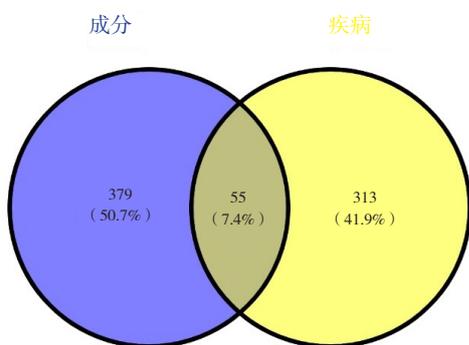


图3 “乌药汤-原发性痛经” 共同靶点韦恩图
Figure 3. Venn diagram of common targets between Wuyao decoction and primary dysmenorrhea

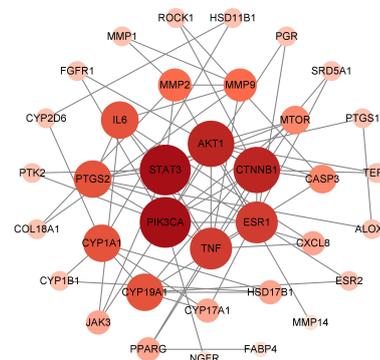


图4 “乌药汤-原发性痛经” 共同靶点PPI网络构建图
Figure 4. Construction diagram of PPI network of common targets in "Wuyao decoction-primary dysmenorrhea"

表4 “乌药汤-原发性痛经” 关键靶点信息

Table 4. Key target information of "Wuyao decoction-primary dysmenorrhea"

靶点	degree值	介数中心性	接近中心度
磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α 基因 (phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide, PIK3CA)	9	0.142 871	0.406 977
信号传导和转录激活因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)	9	0.360 542	0.466 667
丝氨酸/苏氨酸激酶1 (serine/threonine kinase 1, Akt1)	8	0.116 525	0.448 718
β -连环蛋白 (β -catenin, CTNNB1)	8	0.130 783	0.402 299
肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)	7	0.105 085	0.393 258
雌激素受体1 (estrogen receptor 1, ESR1)	7	0.429 683	0.472973
前列腺素内过氧化物合成酶2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)	6	0.118 179	0.357143
白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)	6	0.039 579	0.376 344
细胞色素P450家族19亚家族A成员1 (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1, CYP19A1)	6	0.335 574	0.376 344
基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)	5	0.135 372	0.346 535
胱天蛋白酶3 (caspase-3, CASP3)	4	0.028 327	0.360 825
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)	4	0.052 961	0.376 344

2.2.3 GO功能和KEGG通路富集分析

利用 DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对 12 个核心靶点展开 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析, 设置属性为 “Homo sapiens”, 以 $P \leq 0.05$ 为筛选条件进行筛选。GO 富集分析共得到 132 条相关生物过程, 包括 111 条生物过程 (biological process, BP)、9 种细胞功能 (cellular component, CC) 和 12 种分子功能 (molecular function, MF), 分别选取 BP、CC、MF 中前 10 个条目进行可视化分析 (图 5)。GO 分析结果表明, BP 主要涉及雌二醇反应、基因表达负调控和凋亡过程正调控等; CC 主要富集在细胞质、质膜、大分子复合物和板状伪足等区

域; MF 主要涉及相同蛋白质结合、蛋白激酶结合和酶结合等分子作用功能。通过 KEGG 通路富集分析, 得到了 87 条相关通路, 选取排名前 10 条通路 ($P \leq 0.01$) 进行可视化分析, 结果见图 6。结果显示: 12 个核心靶点主要通过调节 TNF、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositide 3-kinases, PI3K)-Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、雌激素、IL-17 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等信号通路, 共同起到治疗原发性痛经的作用。

2.2.4 “成分-核心靶点-通路” 网络

将 16 个化学成分、核心靶点和 KEGG 富集分析前 10 条通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件中, 构建

“成分-核心靶点-通路”网络 (图 7)，其中绿色代表通路、蓝色代表成分、黄色代表核心靶点。对其进行拓扑参数分析，发现香叶木素 (degree 值 =5)、羟基黄酮 (degree 值 =4)、阿魏酸

(degree 值 =4)、波尔定碱 (degree 值 =3)、槐黄醇 (degree 值 =3)、臭灵丹酸 (degree 值 =3) 的 degree 值较高，为乌药汤的关键活性成分，可用于进行分子对接验证。

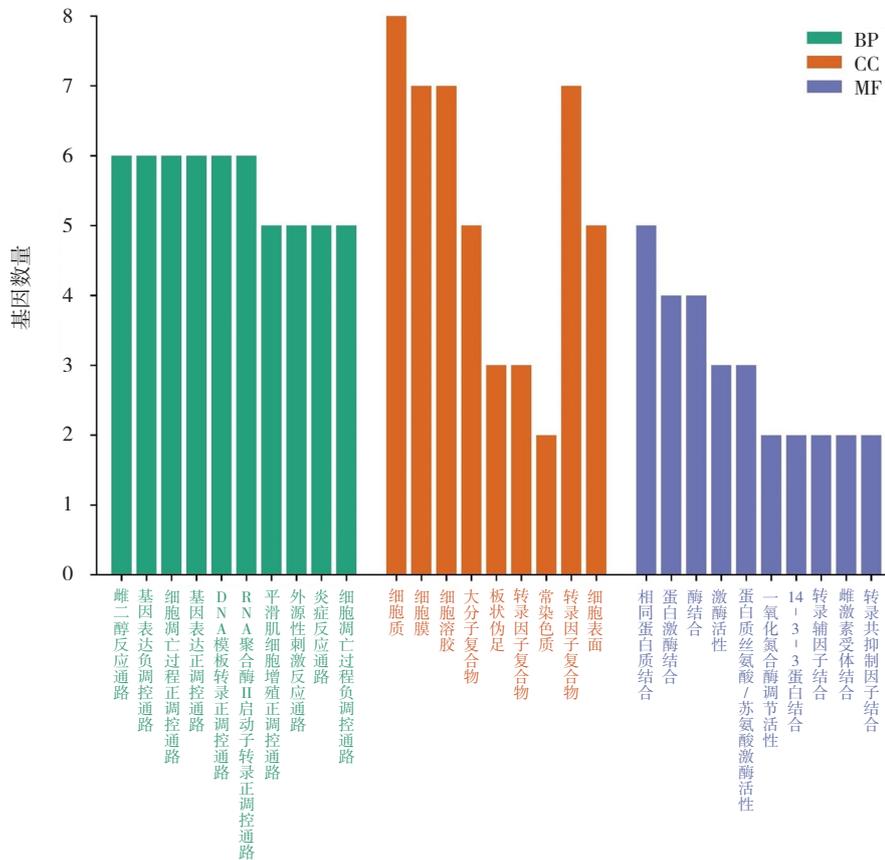


图5 “乌药汤-原发性痛经” 共同靶点GO功能富集分析

Figure 5. GO function enrichment analysis of common targets in "Wuyao decoction-primary dysmenorrhea"

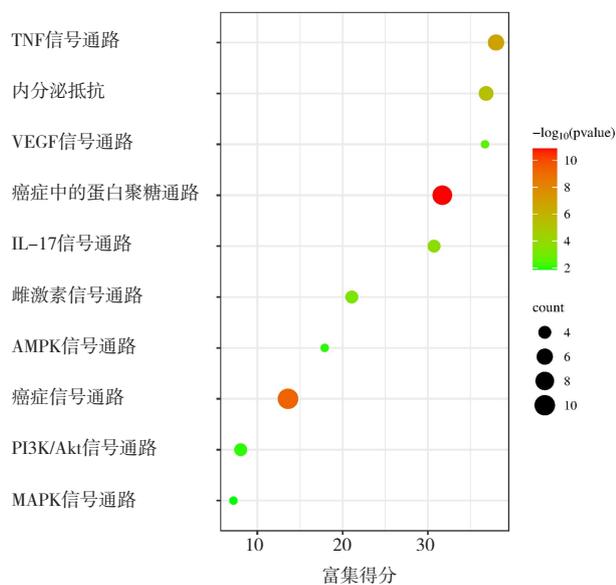


图6 “乌药汤-原发性痛经” 共同靶点KEGG信号通路 (前10)

Figure 6. KEGG signaling pathways (top 10) of the common targets in "Wuyao decoction-primary dysmenorrhea"

2.2.5 分子对接验证

利用 TCMSP 数据库、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载关键活性成分的小分子结构并以 OpenBabelGUL 软件转换为 .mol2 格式, 通过 PPI 网络分析确定度值排名前 6 位的核心靶点, 从 Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) 中获取其三维晶体结构 .pdb 文

件。运用 AutoDockTools1.5.6 对受体分子进行去水分子、加氢操作, 通过 AutoDock Vina 进行分子对接检测配体与受体的结合能力, 结合能越小, 配体与受体的结合能力越强。利用 PyMOL 软件对分子对接结果中 6 个核心靶点和关键活性成分最稳定的构象进行可视化, 其可视化结果见图 8, 分子对接具体结果见表 5。乌药汤中筛

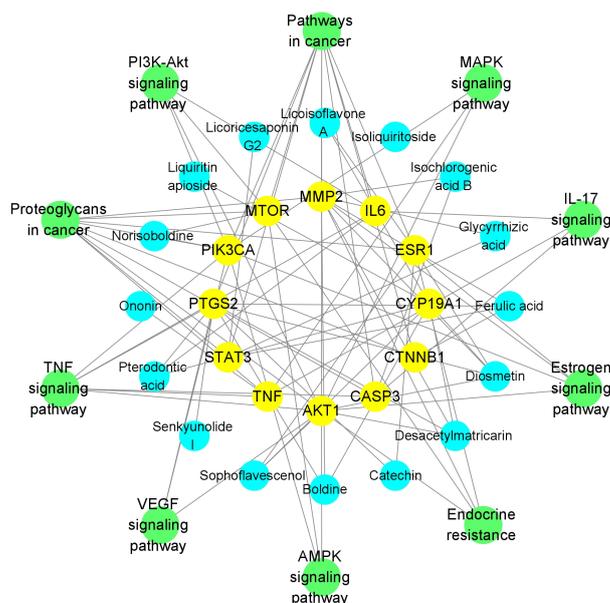


图7 “成分-核心靶点-通路”网络图

Figure 7. "Component-core target-pathway" network diagram

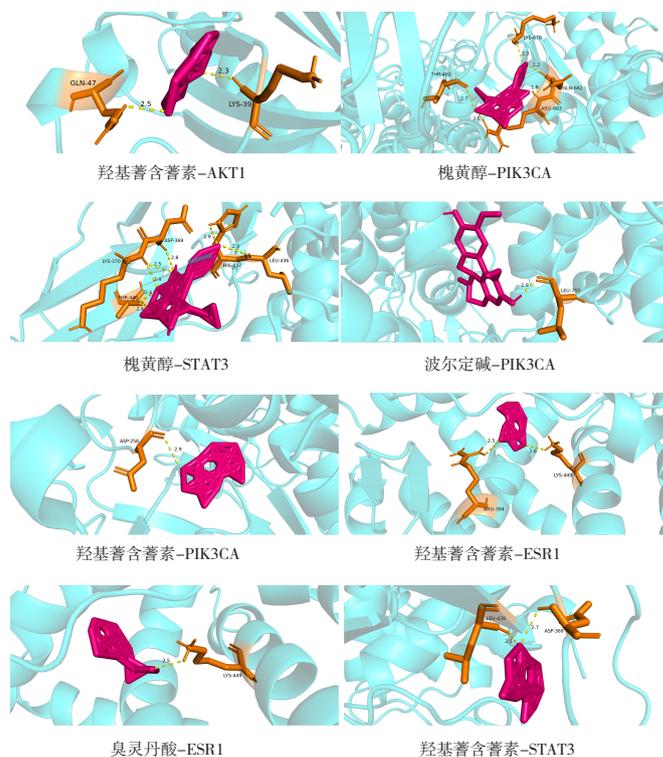


图8 部分分子的“蛋白-分子”作用模式图

Figure 8. "Protein-molecule" interaction pattern diagrams of some molecules

表5 分子对接结果
Table 5. Molecular docking results

成分	结合能 (kcal/mol)					
	PIK3CA	STAT3	Akt1	CTNNB1	ESR1	TNF
香叶木素	-7.6	-6.4	-6.5	-6.9	-6.5	-6.3
羟基薯蓣素	-11.1	-8.3	-8.3	-8.2	-10.4	-8.1
阿魏酸	-6.6	-5.8	-5.0	-5.5	-5.4	-5.2
波尔定碱	-7.8	-6.7	-6.0	-6.2	-6.4	-6.1
槐黄醇	-8.2	-8.1	-6.7	-7.6	-8.0	-7.4
臭灵丹酸	-9.7	-7.4	-7.7	-7.1	-9.4	-7.0

选的 6 种关键活性成分与核心靶点的结合能均 < -5.0 kcal/mol, 有较强的结合能力, 其中结合能 < -7.0 kcal/mol 的有 16 组, 具有强烈的结合活性; 羟基薯蓣素和臭灵丹酸与 6 个核心靶点蛋白对接结合能均 < -7.0 kcal/mol, 可进行高质量的分子对接, 其中羟基薯蓣素与 PIK3CA 和 ESR1 的对接活性最高。以上结果表明乌药汤中香叶木素、羟基薯蓣素、阿魏酸、波尔定碱、槐黄醇和臭灵丹酸 6 种关键活性成分可与核心靶点蛋白结合, 共同发挥治疗原发性痛经的作用。

3 讨论

中药复方的化学成分复杂, 饮片的质量影响因素较多。本实验根据不同产地和不同批号进行随机组合, 确保乌药汤物质基础的一致性。同时在 UPLC 指纹图谱试验中, 对流动相组成和比例、色谱柱型号、样品制备方式等多方面进行考察, 以期确定最适宜的色谱条件及供试品制备方法。最终建立了 10 批乌药汤冻干粉基准样品的 UPLC 指纹图谱, 筛选出 17 个共有峰, 并利用成都普思生物科技股份有限公司自建的 PCDL 二级数据库及对照品保留时间进行比对和指认, 再运用网络药理学预测了上述 17 个化学成分对原发性痛经治疗作用的靶点预测和通路富集分析。

通过“成分-核心靶点-通路”网络发现, 香叶木素、羟基薯蓣素、阿魏酸、波尔定碱、槐黄醇和臭灵丹酸可作为治疗原发性痛经关键活性成分。PPI 网络分析结果表明, PIK3CA、STAT3、Akt1、CTNNB1、TNF、ESR1、PTGS2、IL-6、CYP19A1、MMP-2、CASP3 和 mTOR 是乌药汤治疗原发性痛经的核心靶点。KEGG 通路分析结果显示, 乌药汤治疗原发性痛经的作用机制, 由多条信号通路的共同参与。如: TNF、PI3K-Akt、MAPK、IL-17、VEGF、雌激素等信号通路。

PIK3CA 是一种癌基因, 具有重要的生理功能, 如调节体细胞增殖、分化和存活等^[9], Akt1 是丝氨酸/苏氨酸激酶家族的成员, 在调节代谢、增殖和血管生成等方面发挥作用^[10], PIK3CA 和 Akt1 是 PI3K/Akt 信号通路的重要组成部分, PI3K/Akt 信号通路具有调控细胞的增殖和凋亡的功能, 可促进子宫内 PI3K、Akt 磷酸化, 调节子宫的血液供应, 缓解缺血缺氧状态^[11], 减轻痛经的症状。研究表明 PIK3CA 突变可能使 PI3K/Akt 通路的异常激活, 导致肿瘤细胞增殖和侵袭能力升高而凋亡水平降低^[12]; Akt1 可参与调节细胞内的代谢过程, 代谢的改变导致细胞内微环境的变化, 影响到基因表达的调控网络, 使得孕酮受体的表达受到抑制, 间接影响孕酮受体的表达^[13]。现代研究表明原发性痛经的发生与前列腺素 $F_{2\alpha}$ 的合成及释放密切相关, 前列腺素 $F_{2\alpha}$ 的增加会促使子宫平滑肌发生强烈收缩, 导致子宫血流供应不足, 进而引起缺血和缺氧, 导致痛经^[14]。ESR1 与雌激素结合后形成二聚体, 可促进子宫合成前列腺素 $F_{2\alpha}$ ^[15], 雌激素信号通路也可通过雌激素调节前列腺素的生成影响痛经的形成。PTGS2 作为将花生四烯酸代谢途径转化为前列腺素类物质的关键合酶, 能够促进炎性前列腺素的产生, 导致痛经的发生^[16]。此外, 炎症在原发性痛经的发病过程中也占据重要地位。炎性细胞因子 IL-6 可引发炎症反应, 致使子宫平滑肌缺血缺氧, 导致痛经^[17], TNF 促炎因子可通过激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路、促进前列腺素合成等途径引发原发性痛经^[18]。MAPK 信号通路可影响体内前列腺素含量改善子宫平滑肌痉挛收缩导致的子宫缺血缺氧^[19], 在痛经时, 子宫内膜中的 IL-6、TNF- α 等炎症因子增加, 引发炎症反应, 并与细胞膜上的酪氨酸激酶受体结合, 激活 MEK 引发 ERK 的磷酸化, 磷酸化后的

ERK 促进 NF- κ B 转移至细胞核，与环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 基因启动子结合，调节 COX-2 的表达，COX-2 是前列腺素合成的限速酶，可调控前列腺素 F_{2 α} 的合成^[20]。分子对接结果表明乌药汤中香叶木素、羟基萹蓄素、阿魏酸、波尔定碱、槐黄醇和臭灵丹酸可分别与 PI3K/Akt、MAPK、雌激素等信号通路中的核心靶点 PIK3CA、Akt1、ESR1、TNF 等稳定地结合，进一步证明乌药汤可通过多成分、多靶点、多通路协同作用来治疗原发性痛经。

综上，本研究结果表明，乌药汤通过处方药味中的香叶木素、羟基萹蓄素、阿魏酸、波尔定碱、槐黄醇和臭灵丹酸等潜在活性成分，作用于 PIK3CA、Akt1、TNF 等 12 个核心靶点，干预调节 PI3K/Akt、MAPK、雌激素等信号通路发挥治疗原发性痛经的作用，初步揭示了乌药汤治疗原发性痛经的多成分、多靶点、多通路协同作用机制。然而，本研究结果对乌药汤治疗原发性痛经后续研究意义的探讨仍存在局限性。尽管确定了部分潜在活性成分及核心靶点，但在这些活性成分于体内的吸收、分布、代谢、排泄过程以及其在复杂生物体内环境中如何精准调控靶点和信号通路的动态变化等方面，仍有待深入探究。在后续研究中，可基于本研究成果进一步开展体内药代动力学研究，深入了解活性成分的体内行为；同时，结合细胞实验与动物模型，深入剖析关键靶点与信号通路之间的相互作用网络及其在痛经病理过程中的时空特异性调节机制，更全面、深入地阐明乌药汤治疗原发性痛经的潜在活性物质基础及作用机制，为乌药汤质量标准的精细化建立以及创新性药物研发提供更为坚实的理论依据和实践指导。

参考文献

- 1 Tu F, Hellman K. Primary dysmenorrhea: diagnosis and therapy[J]. *Obstet Gynecol*, 2021, 137(4): 752. DOI: [10.1097/AOG.0000000000004341](https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004341).
- 2 刘斯祺, 王昕. 基于古书名方探讨原发性痛经中医治疗优势[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(4): 155-159. [Liu SQ, Wang X. Discussion on treatment advantages of primary dysmenorrhea based on ancient books and famous prescribes[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 24(4): 155-159.] DOI: [10.13194/j.issn.1673-842x.2022.04.032](https://doi.org/10.13194/j.issn.1673-842x.2022.04.032).
- 3 李梦雪, 王昕. 基于网络药理学及分子对接探究血府逐瘀汤治疗原发性痛经作用机制[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(12): 69-75. [Li MX, Wang X. Study on mechanism of Xuefu Zhuyu decoction in the treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 23(12): 69-75.] DOI: [10.13194/j.issn.1673-842x.2021.12.015](https://doi.org/10.13194/j.issn.1673-842x.2021.12.015).
- 4 徐英, 王小文, 李娜, 等. 经典名方乌药汤的历史沿革与现代临床应用分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(10): 31-38. [Xu Y, Wang XW, Li N, et al. Historical evolution and modern clinical application of classic formula Wuyao tang[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29(10): 31-38.] DOI: [10.13422/j.cnki.syfjx.20230411](https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230411).
- 5 袁胜男, 袁冲, 毛志海, 等. 基于网络药理学对乌药汤治疗原发性痛经作用机制的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(10): 1116-1121. [Yuan SN, Yuan C, Mao ZH, et al. Study on the mechanism of Wuyao decoction in treating primary dysmenorrhea based on network pharmacology[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2020, 40(10): 1116-1121.] DOI: [10.13286/j.1001-5213.2020.10.10](https://doi.org/10.13286/j.1001-5213.2020.10.10).
- 6 Nogales C, Mamdouh ZM, List M, et al. Network pharmacology: curing causal mechanisms instead of treating symptoms[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(2): 136-150. DOI: [10.1016/j.tips.2021.11.004](https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.11.004).
- 7 Li X, Liu Z, Liao J, et al. Network pharmacology approaches for research of traditional Chinese medicines[J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 21(5): 323-332. DOI: [10.1016/S1875-5364\(23\)60429-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(23)60429-7).
- 8 王舒琪. 经典名方乌药汤物质基准研究[D]. 石家庄: 河北中医学院, 2023. DOI: [10.27982/d.cnki.ghbyz.2021.000109](https://doi.org/10.27982/d.cnki.ghbyz.2021.000109).
- 9 郑丹, 鲍蕾蕾, 卞俊. 靶向 PIK3CA 突变的抗肿瘤药物研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(2): 175-182. [Zheng D, Bao LL, Bian J. Research progress in anti-tumor drugs targeting PIK3CA mutations[J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2024, 31(2): 175-182.] DOI: [10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.009](https://doi.org/10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.009).
- 10 Lisa H, Nabil K, Anne F, et al. Akt1 and Akt2: differentiating the action[J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(5): 651-662. DOI: [10.14670/HH-26.651](https://doi.org/10.14670/HH-26.651).
- 11 戴淑颖, 邵田娱, 吕品秋, 等. 基于网络药理学探究红花注射液治疗原发性痛经的作用机制[J]. *中成药*, 2022, 44(2): 626-633. [Dai SY, Shao TY, Lyu PQ, et al. Exploring the mechanism of action of safflower injection in the treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology[J]. *Traditional Chinese Patent Medicine*, 2022, 44(2): 626-633.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.055](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.055).
- 12 Hall DCN, Benndorf RA. Aspirin sensitivity of PIK3CA mutated colorectal cancer: potential mechanisms revisited[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(7): 393. DOI: [10.1007/s00018-022-04430-y](https://doi.org/10.1007/s00018-022-04430-y).
- 13 Lehnes K, Winder AD, Alfonso C, et al. The effect of estradiol on in vivo tumorigenesis is modulated by the human epidermal growth factor receptor 2/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 pathway[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(3): 1171-1180. DOI: [10.1210/en.2006-1179](https://doi.org/10.1210/en.2006-1179).
- 14 何雅岚, 周惠芳. 原发性痛经的发病机制综述[J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2023, 10(30): 49-51. [He YL, Zhou HF.

- Review on pathogenesis of primary dysmenorrhea[J]. *Journal of Practical Gynecologic Endocrinology*, 2023, 10(30): 49–51. DOI: [10.3969/j.issn.2095-8803.2023.30.016](https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-8803.2023.30.016).
- 15 Siebel AL, Gehring HM, Parry LJ. Steroid-independent regulation of uterine oxytocin receptors[J]. *J Neuroendocrinol*, 2004, 16(4): 398–402. DOI: [10.1111/j.0953-8194.2004.01164.x](https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01164.x).
- 16 黄玉芳, 谭银丰, 任喜康, 等. 基于网络药理学-分子对接及实验研究探讨高良姜-香附药对治疗原发性痛经的作用机制[J]. *广东药科大学学报*, 2023, 39(6): 24–36. [Huang YF, Tan YF, Ren XK, et al. Mechanism of *Alpinia officinarum*-*Cyperus rotundus* in the treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology, molecular docking and experimental study[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2023, 39(6): 24–36.] DOI: [10.16809/j.cnki.2096-3653.2023100702](https://doi.org/10.16809/j.cnki.2096-3653.2023100702).
- 17 邹胜男, 孙可丰, 王鑫. 针灸联合治疗EMs痛经对血清TNF- α 、IL-6、TGF- β 水平的影响[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(6): 1403–1405. [Zou SN, Sun KF, Wang X. Effect of acupuncture combined with medicine on serum TNF- α , IL-6 and TGF- β levels in patients with dysmenorrhea induced by EMs[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2023, 34(6): 1403–1405.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-0805.2023.06.32](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-0805.2023.06.32).
- 18 冯馨锐, 崔雨舒, 何志涛, 等. 肿瘤坏死因子- α 的生物学功能研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2019, 40(1): 66–68. [Feng XR, Cui YS, He ZT, et al. Research progress on the biological functions of tumor necrosis factor- α [J]. *Journal of Jilin Medical University*, 2019, 40(1): 66–68.] DOI: [10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2019.01.030](https://doi.org/10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2019.01.030).
- 19 Barcikowska Z, Rajkowska LE, Grzybowska EM, et al. Inflammatory markers in dysmenorrhea and therapeutic options[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(4): 1191. DOI: [10.3390/ijerph1704119](https://doi.org/10.3390/ijerph1704119).
- 20 李玉兰, 赵娜, 王彦娇, 等. 艾附暖宫丸通过调控MAPK/ERK信号通路对寒凝血瘀型原发性痛经大鼠的影响[J]. *中成药*, 2024, 46(9): 3131–3136. [Li YL, Zhao N, Wang YJ, et al. The effect of Aifu Nuangong pills on rats with primary dysmenorrhea of cold congealing and blood stasis type by regulating the MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Traditional Chinese Patent Medicine*, 2024, 46(9): 3131–3136.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.048](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.048).

收稿日期: 2024 年 09 月 28 日 修回日期: 2024 年 12 月 08 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳