

基于数据挖掘和网络药理学研究含益母草处方“异病同治”月经类病、产后类病和胎孕类病的机制^{*}

徐 婕¹ 于虹敏¹ 陈丽琴² 何丽君³ 王 涛⁴ 王颖峥¹ 王英豪^{1▲}

摘 要 目的:通过数据挖掘分析含益母草处方的用药规律,得出核心处方和主治中医疾病,利用网络药理学探讨核心处方“异病同治”的作用机制。**方法:**通过中医传承平台(V3.0)挖掘含益母草处方的相关证候、中医疾病、核心处方。应用TCMSP及Swiss target prediction数据库检索核心处方药物的有效成分及靶点;通过GeneCards、OMIM和Drugbank数据库搜集含益母草处方主治的中医疾病(排名前3位)相关疾病靶点,将疾病靶点与药物靶点取交集,通过STRING数据库构建交集靶点的蛋白相互作用网络;运用Metascape数据库进行GO功能富集和KEGG通路分析。**结果:**含益母草处方主治中医疾病前3位依次是月经类病、胎孕类病、产后类病;筛选后得到核心处方(益母草、川芎、当归、桃仁、甘草),其药物作用靶点881个;月经类病、胎孕类病和产后类病的疾病靶点分别为840、1070、702个,疾病和药物交集靶点45个。GO富集分析得到生物过程560条,细胞组分41条,分子功能54条;KEGG通路富集分析得到72条通路,主要为甾类激素生物合成、VEGF信号通路、花生四烯酸代谢等,主要与调节激素,调控血管生成和炎症反应等相关。**结论:**核心处方(益母草、川芎、当归、桃仁、甘草)治疗月经类病、胎孕类病和产后类病具有多靶点效应,涉及多条生物过程和信号通路,可能通过调节雌激素水平,抗炎反应和调控血管等发挥“异病同治”作用。

关键词 益母草;中医传承平台;网络药理学;月经类病;胎孕类病;产后类病;异病同治

益母草为唇形科植物益母草(*Leonurus japonicus* Houtt)的新鲜或干燥地上部分^[1],具有活血调经、利水消肿、清热解毒之效。益母草有“经产带下要药”之称,在《神农本草经》中被称为上品,始称茺蔚,又名益明、大札,因其功用宜于妇人,所以又名益母草。本文利用中医传承平台(V3.0),对含益母草的处方加以收集研究,总结其治疗疾病范围、组方规律和核心药物组合等,并运用网络药理学验证核心处方治疗主要疾病的机制,为益母草的临床用药提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 含益母草处方数据挖掘研究

1.1.1 处方收集 本研究所涉及的处方来源于福建省人民医院、福建中医药大学附属康复医院、福建省

三明市中西医结合医院的门诊处方。共收集2018年1月—2019年12月使用益母草的6039首处方,处方信息包括日期、中医疾病、中医证候、方药组成及剂量等。

1.1.2 数据规范化预处理 将6039首处方导入Microsoft Office Excel 2019,将处方的组成、中医疾病、中医证候、处方功效等进行规范化处理,再将其处理结果采用双人负责模式录入中医传承平台(V3.0),进行数据挖掘与分析。规范化处理标准:①中药名称参照《中华人民共和国药典》^[1]及《中药学》^[2],将炮制品药材按照标准名称整理,如“炒白芍”规范为“白芍”,“燀桃仁”规范为“桃仁”等;②主治病证参照《中医病证分类与代码》^[3]进行规范化处理,如“月经后期病”规范为“月经类病”,“痛经病”规范为“月经类病”等。

1.1.3 数据分析 利用中医传承平台(V3.0)挖掘含益母草处方主治的中医疾病、证候出现的频次及用药频次、关联规则、聚类分析,探讨益母草组方规律。

1.2 核心处方网络药理学研究

1.2.1 核心药物靶点筛选 将聚类分析中频次最高的核心组合作为核心处方。利用TCMSP数据库

^{*}基金项目 国家自然科学基金(No.82173996);福建省自然科学基金(No.2021J01920)

▲通信作者 王英豪,男,教授,博士研究生导师。研究方向:中药物质基础与药效相关性研究。E-mail:39887219@qq.com

•作者单位 1.福建中医药大学药学院(福建 福州 350122);2.福建省三明市中西医结合医院(福建 三明 365000);3.福建省人民医院(福建 福州 350003);4.福建中医药大学附属康复医院(福建 福州 365000)

(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>), 设置筛选条件为:口服利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18,得到药物的活性成分,再利用PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询成分的2D结构,将成分结构式输入Swiss target prediction数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>),得到有效成分对应的靶点和基因名称,筛选条件设置物种属性为Homo Sapiens,靶点可靠性>10%,获得符合要求的靶点。再用Uniport数据库(<https://www.uniprot.org/>)对基因名称进行校正。

1.2.2 疾病靶点筛选 将“Menstrual diseases、Postpartum diseases、Fetal pregnancy diseases”作为检索词,分别在OMIM数据库(<https://www.omim.org/search/advanced/geneMap>)、Drugbank数据库(<https://go.drugbank.com/>)和Genecards数据库(<https://www.genecards.org/>)检索。根据同类研究^[4]结果,Genecards数据库以Score值大于中位数为条件筛选疾病靶点。汇总并加以标准化和去重处理,分别获得含益母草处方主治的中医疾病(排名前3位)的潜在靶点。

1.2.3 靶点相互作用(PPI)网络的构建及对关键靶点的筛选 将药物靶点和疾病靶点导入Venny 2.1.0数据库(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>),获得药物-疾病交集靶点,通过STRING 11.5数据库(<https://www.string-db.org>),获取共同靶点,绘制蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI)。

1.2.4 GO功能及KEGG通路富集分析 利用Metascape数据库(<http://metascape.org/gp/index.html/>)对“药物-疾病共同靶点”进行基因本体论(gene ontology, GO)生物功能分析和基因组京都百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,根据P值大小对结果进行排序,筛选出前20条,并进行富集结果可视化分析。

2 结果

2.1 含益母草处方数据挖掘研究结果

2.1.1 含益母草处方配伍中药频数分析 6039首含益母草处方中,除益母草外共使用524味中药,其中频数≥2000次的药材共有7味。从高到低进行排序,使用频数排名前5位中药依次是当归、甘草、川芎、桃仁、牛膝。见表1。

2.1.2 含益母草处方主治病证频数分析 将含益母草处方的主治中医疾病和证候从高到低进行排序和分类。主治中医疾病前3位依次是月经类病、胎孕类病、产后类病。主治中医证候前2位依次是气滞血瘀证、气虚血瘀证。见表2、表3。

表1 含益母草处方中常用配伍中药(频次≥2000次)

类别	名称	频次	频率(%)
补血药	当归	4328	71.67
补气药	甘草	3883	64.30
活血止痛药	川芎	3783	62.64
活血调经药	桃仁	2733	45.26
	牛膝	2560	42.39
清热凉血药	赤芍	2386	39.51
理气药	香附	2083	34.49

表2 含益母草处方主治的中医疾病(频次≥100次)

序号	中医疾病	频次	频率(%)	序号	中医疾病	频次	频率(%)
1	月经类病	2441	38.66	5	消渴类病	170	2.69
2	胎孕类病	712	11.28	6	女性杂病	141	2.23
3	产后类病	368	5.83	7	带下类病	122	1.93
4	眩晕	226	3.58				

表3 含益母草处方主治的中医证候(频次≥100次)

序号	中医证候	频次	频率(%)	序号	中医证候	频次	频率(%)
1	气滞血瘀证	1686	27.67	6	湿热下注证	171	2.81
2	气虚血瘀证	720	11.69	7	肝郁肾虚证	146	2.38
3	脾肾两虚证	255	3.86	8	血瘀证	144	2.36
4	肝肾不足证	235	3.40	9	肝阳上亢证	130	2.13
5	痰瘀互结证	207	3.30	10	肝郁血瘀证	130	1.94

2.1.3 含益母草处方关联规则分析 利用中医传承平台(V3.0)的“关联规则”功能,采用Apriori算法进行数据挖掘,设置支持度为30%,置信度为0.85,进行“规则分析”,得出的药物组合有11组。置信度越高说明该配伍药对的相关度越大;提升度(Lift)为区分规则相关性的度量阈值,表示前项出现时后项出现的概率,以1为评判标准,>1为正相关(促进)^[5]。如第一组组合中,置信度为0.99,说明当“益母草-甘草-川芎-桃仁”出现时,“当归”有99%的可能出现;提升度为1.38,说明“益母草-甘草-川芎-桃仁”的出现促进了“当归”的出现。见表4。

2.1.4 含益母草处方的药物聚类分析 利用中医传承平台(V3.0)中“聚类分析”功能,设置“聚类个数”为3,可得到3个药物核心组合,其中频次最高的是核心组合3:益母草,当归,甘草,川芎,桃仁。点击聚类分析中的“网络展示”,进一步将k-means算法与回归模型结合进行展示,显示聚类效果。图中红色点、蓝色点、黑色点分别代表核心组合1、2、3,其中,黑色点数量最多。3个核心组合线性良好且均处于回归曲线附近,说明临床处方较为集中。见表5、图1。

表4 含益母草处方中药物关联规则

序号	关联规则	置信度	提升度
1	益母草,甘草,川芎,桃仁→当归	0.99	1.38
2	益母草,川芎,桃仁→当归	0.98	1.37
3	益母草,甘草,川芎→当归	0.97	1.35
4	益母草,当归,甘草,桃仁→川芎	0.96	1.53
5	益母草,甘草,桃仁→当归	0.95	1.33
6	益母草,当归,桃仁→川芎	0.95	1.52
7	益母草,川芎→当归	0.95	1.33
8	益母草,甘草,桃仁→川芎	0.92	1.47
9	益母草,桃仁→当归	0.89	1.24
10	益母草,当归,甘草→川芎	0.87	1.39
11	益母草,桃仁→川芎	0.86	1.37

表5 含益母草处方药物核心组合

序号	聚类组合	频次
1	益母草,甘草,当归,茯苓,川芎	1274
2	益母草,当归,川芎,牛膝,赤芍	1907
3	益母草,当归,甘草,川芎,桃仁	2858

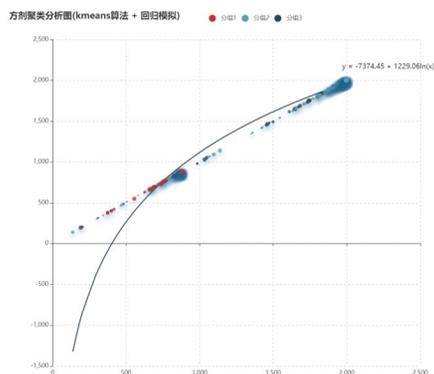


图1 含益母草处方药物聚类分析展示图

2.2 核心处方网络药理学分析结果

2.2.1 药物和疾病潜在靶点 药物靶点方面分别为:益母草 354 个、当归 46 个、甘草 734 个、川芎 302 个、桃仁 258 个,去重后得到作用靶点 881 个。疾病靶点方面,从 GeneCards 数据库、OMIM 数据库和 Drugbank 数据库分别得到:月经类病 (Score>23) 125、544、171 个;胎孕类病 (Score>35.5) 123、535、412 个;产后类病 (Score>23) 77、543、82 个。合并后去重,获得月经类病、胎孕类病和产后类病相关靶点分别为 840、1070、702 个。

2.2.2 蛋白相互作用网络 取药物靶点与疾病靶点交集,得到共同靶点 45 个,导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建 PPI 网络,见图 2。该网络包含 43 个节点和 299 条边,节点度值越大,表明其在网络中越重要。筛选

出度值前 10 的基因,分别为白蛋白 (Albumin, ALB)、白介素 6 (Interleukin 6, IL6)、肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF)、血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGFA)、细胞色素 P450 3A4 酶 (Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4, CYP3A4)、雌激素受体 1 (Estrogen Receptor 1, ESR1)、血管紧张素 I 转换酶 (Angiotensin I Converting Enzyme, ACE)、表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)、前列腺素-过氧化内合酶 2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2, PTGS2)、白介素 1β (Interleukin 1 Beta, IL1β),见表 6。这些基因可能是核心处方“异病同治”月经类病、胎孕类病及产后类病的核心基因。

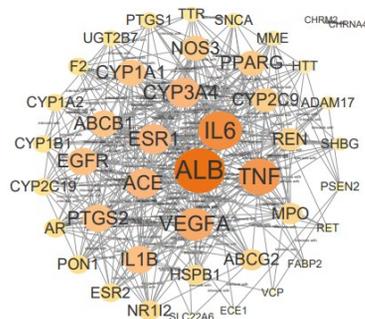
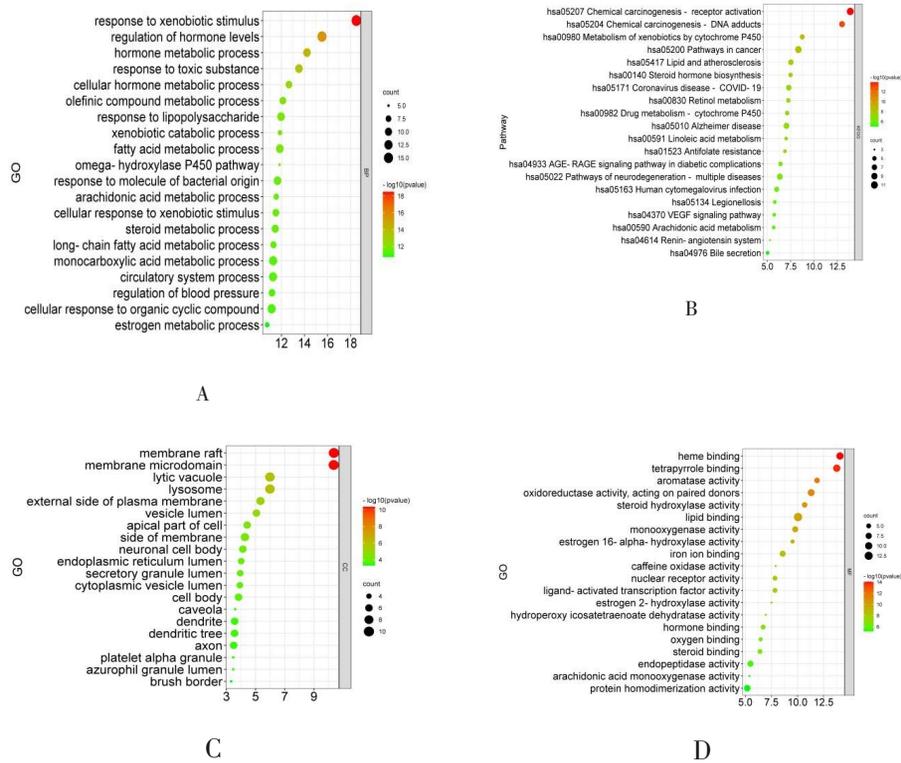


图2 核心处方治疗主要疾病靶蛋白 PPI 网络图

表6 核心处方治疗月经类病、胎孕类病和产后类病的核心基因

序号	核心基因	Degree 值	序号	核心基因	Degree 值
1	ALB	34	6	ESR1	22
2	IL6	29	7	ACE	22
3	TNF	27	8	EGFR	20
4	VEGFA	24	9	PTGS2	20
5	CYP3A4	22	10	IL1B	20

2.2.3 GO 和 KEGG 富集分析结果 45 个交集基因 GO 富集分析结果显示:生物过程 (Biological Process, BP) 有 560 条,主要与激素水平的调节、花生四烯酸的代谢过程、类固醇代谢过程及调节血压等相关,见图 3A;细胞组分 (Cellular Component, CC) 有 41 条,主要包括膜筏、膜区域、溶酶体等,见图 3B;分子功能 (Molecular Function, MF) 有 54 条,涉及血红素结合、类固醇羟化酶活性、雌激素活动、花生四烯酸单加氧酶活性等,见图 3C;KEGG 通路富集分析得到 72 条通路,主要为甾类激素生物合成、VEGF 信号通路、花生四烯酸代谢等,见图 3D。



A. GO分析-BP; B. GO分析-CC; C. GO分析-MF; D. KEGG分析

图3 核心处方治疗月经类病、胎孕类病和产后类病靶点富集分析

3 讨论

“异病同治”是指不同疾病在发展过程中出现相同病证时,可采用同样的治法治则。月经类病、胎孕类病及产后类病的中医病因虽有不同,但三者均与血瘀证有关。月经类病是由于先天或后天因素,致使冲任失衡,经脉不利等引起月经周期、行经期、月经量等的变化。胎孕类病是由于母体方面引起冲任不固,不能摄气血以载胎养胎,导致胎元不固而发病。产后类病是因为血虚、血瘀、气滞,或产后冲任失衡、气血运行失常、瘀血凝滞不除,引起血不归经、胞衣不下、阴道流血不止,使子宫难以复旧^[6]。总结来说,三类病的病位均在胞宫,与冲、任有关。《素问·奇病论》曰:“胞络者,系于肾。”肾脉与任脉交会于“关元”,与冲脉下行支相并而行,与督脉同是“贯脊属肾”,所以肾脉又通过冲、任、督三脉与胞宫相联系。故治疗应以固元培本、活血通经、调理冲任为主。

本研究显示,含益母草的6039首处方的中医疾病集中在月经类、胎孕类、产后类疾病,主要中医证候为气滞血瘀证和气虚血瘀证。药物配伍频次分析表明,益母草常与川芎、桃仁等活血化瘀类,当归、甘草等补气类中药联合使用。益母草、当归、川芎、桃仁乃

桃红四物汤的药物组成,主治瘀血内阻所致的经期延长,漏下淋漓不净,且颜色暗红有块,舌暗红或边有瘀点。其中益母草活血调经,当归补血活血,可使瘀血下行,调畅冲任;处方中益母草、当归、川芎相配伍常用于治疗妇女妊娠期出现的胎前诸症,如安胎煎^[7],主治闪跌小产、死胎不下等;处方中益母草、当归、川芎相配伍也可用于治疗产后瘀血腹痛,如益母草膏^[8],以达到祛瘀生新之功。

聚类分析得到的核心组合3(益母草、当归、甘草、川芎、桃仁)使用频次最高,为2858次。核心组合3为《医方简义·卷六》中桂枝生化汤的组成。方中益母草、当归为君药,重在祛瘀养血,补血活血,化瘀生新,行滞止痛;川芎为臣药,发挥活血行气作用;桃仁乃活血调经药,对闭经、痛经及产后病均有良好的治疗作用;甘草和中缓急,调和诸药。全方补血活血,调和补虚,对女性生殖系统疾病有一定治疗作用。

核心处方“异病同治”月经类病、胎孕类病及产后类病的核心基因为:ALB、IL6、TNF、VEGFA、CYP3A4、ESR1、ACE、EGFR、PTGS2、IL1B。其中ALB是血浆中最丰富的蛋白质,也是最丰富的循环抗氧化剂^[9],ALB以电荷依赖的方式阻止由组蛋白引起的血小板聚集来发挥抗凝血作用^[10]。血管内皮生长因子A(VEGFA)

是血管生成所必需的主要血管生成因子,促进卵泡募集和早期卵泡发育^[11]。ACE是血管紧张素转换酶,其主要功能是在血管内皮细胞表面催化无生物活性的血管紧张素 I 转化为有生物活性的血管紧张素 II,而後者的功能是刺激血管平滑肌收缩、促进醛固酮分泌,在维持动脉血压中发挥着重要作用。IL6和IL1B均为炎症因子,参与炎症发生,还能促进新生血管形成^[12],炎性白细胞能够释放促血管生成因子的数量,如VEGFA和TNF^[13]。ESR1是介导雌激素发挥生物学作用的核内生物大分子,顾兵等^[14]研究表明,内分泌治疗激素受体阳性乳腺癌的效果与ESR1单核苷酸多态性位点密切相关。雌激素可通过EGFR信号转导途径介导内皮细胞稳定和血管生成^[15]。PTGS2是一种诱导酶,具有抗炎作用,可促进血管生成^[16]。CYP3A4可将花生四烯酸转化为环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs),EETs具有分泌表氧二十碳三烯酸(EET)和合成EET刺激血管生成的能力,EET是血管松弛因子存在于心血管系统中^[17]。

KEGG通路富集分析共得到72条通路,主要为甾类激素生物合成、VEGF信号通路、花生四烯酸代谢等。甾类激素主要有:雌激素类、雄激素类、皮质甾类激素^[18]。雌激素是受体与促黄体生成素结合后促进胆固醇合成的,能改善月经失调和调节雌孕激素水平^[19]。PI3K/AKT是VEGF下游信号通路中极其重要的组成部分,林章英等^[20]通过抑制miR-126-VEGF/PI3K/AKT信号通路的活化,调节细胞因子网络,进而实现延缓或抑制血瘀状态。花生四烯酸代谢的改变导致前列腺素产生的改变,以及一氧化氮的产生,从而导致特定生殖过程的生理调节变化,如减数分裂成熟、排卵、着床和器官发生^[21]。因此,花生四烯酸代谢调控途径能直接影响这些生殖过程。

综上所述,核心处方治疗月经类病、胎孕类病和产后类病是通过调控血管相关因子达到机体抗凝和凝血系统的平衡,调节炎症介质达到抗炎作用,调节雌激素实现体内雌激素保持平衡状态等多维网络调控,最终使冲任平衡、气血运行正常,从而发挥“异病同治”的作用。

参考文献

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:308.
 [2]钟赣生.中药学[M].第4版.北京:中国中医药出版社,2016:281.
 [3]国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.中医病证分类与

代码:GB/T 15657-2021[S].北京:中国标准出版社,2021:7-67.
 [4]但文超,何庆勇,曲艺,等.基于网络药理学的枳术丸调治血脂异常的分子机制研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(11):2396-2405.
 [5]董俊龙.关联规则和聚类分析在方剂配伍规律研究中的应用[D].沈阳:东北大学,2010.
 [6](明)张景岳.妇人规[M].北京:中国医药科技出版社,2017:56-57.
 [7]李慧,雷磊.浅述《妇人规》安胎之法[J].中医文献杂志,2009,27(4):24-26.
 [8]李玉霞,刘丽平,周燕.复方益母草膏联合屈螺酮炔雌醇片对药物流产后患者血清孕酮及Th1/Th2细胞因子的影响[J].中国药房,2017,28(32):4520-4523.
 [9]CARIDI G, LUGANI F, ANGELETTI A, et al. Variations in the human serum albumin gene: molecular and functional aspects [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1159.
 [10]孙梦,温宗梅.细胞外组蛋白在肺缺血/再灌注损伤中的作用及机制[J].国际麻醉学与复苏杂志,2019,40(3):251-255.
 [11]MCFEE R M, ROZELL T G, CUPP A S. The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(3): 635-647.
 [12]梁雪娇,杜红艳.IL-6与血管源性眼病关系的研究进展[J].医学综述,2020,26(14):2748-2752.
 [13]JAIPERSAD A S, LIP G Y, SILVERMAN S, et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(1): 1-11.
 [14]顾兵,吴旦平,张晶晶.内分泌治疗激素受体阳性乳腺癌的效果及其与ESR1基因位点的关系[J].中国医药导报,2020,17(26):26-29.
 [15]SKANDALIS S S, AFRATIS N, SMIRLAKI G, et al. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans [J]. Matrix Biol, 2014, 35: 182-193.
 [16]SAHIN M, SAHIN E, GÜMÜSLÜ S. Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis [J]. Angiology, 2009, 60(2): 242-253.
 [17]THUY PHUONG N T, KIM J W, KIM J A, et al. Role of the CYP3A4-mediated 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid pathway in the development of tamoxifen-resistant breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(41): 71054-71069.
 [18]王焯辉,杨虹.甾类激素的信号转导作用[J].内蒙古科技与经济,2008,162(8):78-79.
 [19]刘云,刘琼辉.月经过少(肾虚型)中医治疗研究进展[J].实用中医药杂志,2015,31(10):975-976.
 [20]林章英,汪元,黄传兵,等.新风胶囊通过调控miR-126-VEGF/PI3K/AKT信号通路改善类风湿关节炎患者血瘀状态的作用机制研究[J].海南医学院学报,2022,28(7):522-527.
 [21]JAWERBAUM A, GONZALEZ E. The role of alterations in arachidonic acid metabolism and nitric oxide homeostasis in rat models of diabetes during early pregnancy [J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(10): 1327-1342.

(收稿日期:2022-01-07)

(本文编辑:金冠羽)