DOI:10.16016/j.2097-0927.202203225

基于生物信息学联合网络药理学、分子对接法探讨通管丸治疗输卵管性不孕的机制研究

吕秀玮[1],张 翼[2],匡继林[2] 100088 北京,火箭军特色医学中心中医科[1]; 410005 长沙,湖南中医药大学第二附属医院妇科[2]

[摘要] **目的** 基于生物信息学联合网络药理学探讨通管丸治疗输卵管性不孕的作用机制。**方法** 通过 TCMSP、HERB 数据库等收集通管丸的活性成分及相应靶点;GEO、OMIM、RefSeqGene、Genecards 数据库搜集获得输卵管性不孕基因表达谱;R 软件预测通管丸治疗疾病的潜在作用基因;Cytoscape 软件、string 数据库构建网络图并得到核心靶点;将潜在作用基因进行 GO、KEGG 分析;核心靶点与对应的活性成分进行分子对接。**结果** 通管丸存在 243 个活性成分,33 个治疗疾病的靶点,核心靶点为 TP53、EGF、VEGFA、IL1B、JUN、EGFR、ERBB2;GO 富集分析得到 1 581 条生物过程,39 条 KEGG 富集分析筛选出 39 条通道,如局部粘连、雌激素通路、HIF-1 信号通路等,核心靶点与药对成分结合性好。**结论** 通管丸可通过多靶点、多通路治疗输卵管性不孕。

[关键词] 网络药理学;通管丸;输卵管性不孕;分子对接
[中图法分类号] R289.5; R319; R711.6 [文献标志码] A

Mechanism of Tongguan Pills in treatment for tubal factor infertility based on bioinformatics combined with network pharmacology and molecular docking

LYU Xiuwei[1], ZHANG Yi[2], KUANG Jilin[2] [1]Department of Traditional Chinese Medicine, Rocket Force Medical Center of PLA, Beijing, 100088; [2]Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan Province, 410005, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of Tongguan Pills in the treatment for tubal factor infertility based on bioinformatics combined with network pharmacology. **Methods** The active components and corresponding targets of Tongguan Pills were collected through TCMSP and HERB databases. The gene expression profiles of tubal factor infertility were searched from GEO, OMIM, RefSeqGene and Genecards databases. Then R software was used to predict the potential action targets of the herb on tubal factor infertility, and Cytoscape software and String database were adopted to build the network diagram and obtain the core targets. The results were subsequently analyzed with GO biological process and KEGG pathway. Finally, molecular docking of the core targets to the active components was carried out. **Results** A total of 243 active components were found in the Tongguan Pill, and 33 targets were identified for the treatment of tubal factor infertility, with TP53, EGF, VEGFA, IL1B, JUN, EGFR, and ERBB2 as the core targets; 1 581 biological processes were obtained by GO analysis, and 39 pathways were screened out by KEGG analysis, such as local adhesion, estrogen pathway, and HIF-1 signaling pathway. Molecular docking suggested that the core targets were well bound to the active components of the herbs. **Conclusion** Tongguan Pills can treat tubal factor infertility through a multi-target and multi-channel way.

[**Key words**] network pharmacology; Tongguan Pills; tubal factor infertility; molecular docking

Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2017JJ2209) and the Project of Scientific Research Plan for Traditional Chinese Medicine of Hunan Province (2020011). Corresponding author: ZHANG Yi, E-mail: 979963623@qq.com

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2017JJ2209);湖南中医药科研计划项目(2020011)
[通信作者] 张 翼,E-mail: 979963623@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

输卵管是精子、卵子结合及胚胎形成、早期发育的关键场所,输卵管的通畅及功能正常是成功自然妊娠的必要条件。盆腔的各种急慢性炎症、子宫内膜异位症及盆腔手术后粘连均可引起输卵管性不孕(tubal factor infertility,TFI),其发病率占女性不孕症的30%~50%[1]。TFI治疗方法主要包括抗生素控制感染及腹腔镜下输卵管成形术,但存在抗生素耐药及输卵管通而不畅、再阻塞等副作用[2]。

通管丸是湖南中医药大学第二附属医院妇科经验方,方中穿破石行气导滞、活血化瘀,为君药;当归、丹参、赤芍、茺蔚子、王不留行、乳香、没药、泽兰活血调经,气顺血和,络脉自通,香附、薤白行气,以助行血,三七化瘀,共为臣药;党参、白术健脾益气,使活血不伤正,为佐药;路路通引经,甘草调和诸药,为使药。诸药配伍,行气化瘀,通经活络,使输卵管复通。本研究团队在长期临床工作中发现通管丸对输卵管性不孕疗效确切[3-4],可以改善输卵管炎症,提高患者的受孕率[5];通管丸中成分多样,靶点丰富,作用通路广泛,找出通管丸治疗输卵管性不孕的有效靶点基因、靶点蛋白、作用通路可为中医药治疗不孕症提供理论依据,并为下阶段药物研发做铺垫。本研究采用生物信息学联合网络药理学探讨通管丸治疗输卵管性不孕的关键基因和发病机制,并使用分子对接法佐以认证,以期为输卵管性不孕的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 软件与数据库

本研究使用数据库包括GEO数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)、OMIM数据库(https://www.omim.org/)、RefSeqGene数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg)、Genecards数据库(https://www.genecards.org/)、TCMSP数据库(https://old.tcmsp-e.com/index.php)、HERB数据库(http://herb.ac.cn/)、PubChem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)、SwissADME数据库(http://www.swissadme.ch/index.php)、Targetnet数据库(http://targetnet.scbdd.com/calcnet/index/)、Uniprot数据库(https://www.uniprot.org/)、string数据库(https://cn.string-db.org/)、PDB数据库(https://www.rcsb.org/)。本研究使用软件包括R软件(R x64 3.6.2R)、Perl软件(strawberry-perl-5.30.0.1)、Cytoscape软件(Cytoscape_v3.8.0)、ChemBio3D软件(ChemBio3D Ultra 14.0.0.117)、Pymol软件(PyMOL-2.4.0)、AutoDockTools软件(AutoDockTools-1.5.7)。

1.2 方法

1.2.1 输卵管性不孕差异基因分析 通过GEO数据库搜索输卵管性不孕基因表达谱,检索“Tubal factor infertility”样本,选择“Homo sapiens”为样本,获取芯片表达数据集,下载GSE及GPL文件。将数据导入R软件中,使用Limma包以设定调整后P值(adjust P Value)<0.05,表达变化幅度≥2倍(|log2 FC|≥1.0)为筛选差异基因的标准选出差异基因,并绘制差异基因火山图,使用pheatmap绘制差异基因热图。

1.2.2 输卵管性不孕疾病靶点获取 以“Tubal factor infertility”为关键词在OMIM数据库、RefSeqGene数据库、Genecards数据库中查找输卵管性不孕表达的基因,将3种数据库及GEO数据库获得疾病基因,重复基因靶点保留1个,所得即为疾病靶标,并使用R软件中的“vene”包绘制疾病靶标韦恩图。

1.2.3 通管丸有效成分筛选及靶点预测 利用TCMSP数据库获取党参、白术、当归、赤芍、丹参、泽兰、香附、乳香、没药、王不留行、薤白、茺蔚子、甘草、路路通、三七所含有的化合物,依据药物口服利用度≥30%及类药性≥0.18分别筛选出有效活性成分;收集TCMSP数据库中各有效活性成分的靶点蛋白及基因;因TCMSP中无穿破石、茺蔚子对应的有效成分及靶点,利用HERB数据库搜索穿破石、茺蔚子成分,根据成分名(Ingredient name)通过PubChem数据库找出成分SMILE式;使用SMILE式搜索SwissADME数据库,以“GL absorption: high, Druglikeness-Bioavailability Score>0.18”为标准筛选穿破石、茺蔚子有效成分;利用穿破石、茺蔚子有效成分的SMILE式通过Targetnet数据库查询穿破石成分对应靶点(选定Prog=1.0)。

利用Uniprot数据库以“Homo sapiens(人属)”为关键词进行药物靶点id转换,将药物有效活性成分的靶点全称转换为基因符号(gene symbol),汇总建立中药-成分-靶点数据库。

1.2.4 中药-成分-基因网络图绘制 使用R软件中的“vene”包将药物基因及疾病基因取交集,为通管丸治疗TFI的潜在作用基因,使用perl语言整理交集基因network、type文件,使用Cytoscape进行可视化处理,绘制中药-成分-基因网络图。

1.2.5 PPI蛋白互作网络、核心网络构建与拓扑分析 将1.2.4获得的通管丸治疗TFI的潜在作用基因输入string数据库中,其中Organism中选择Homo sapiens,获得PPI网络;将获取的PPI网络信息导入Cytoscape中,使用CytoNCA插件进行拓扑分析,获得核心网络。

1.2.6 靶点通路分析 将1.2.4获得的通管丸治疗TFI的潜在作用基因通过R软件中的“org.Hs.eg.db”包转换为gene ID,将基因ID通过R软件进行GO、KEGG分析。并根据KEGG分析结果利用Cytoscape

软件绘制靶点-通路网络图。

1.2.7　分子对接　　将1.2.5所获得的核心网络的基因与其对应的药物配体作为研究对象,通过Pubchem数据库查询配体的2D结构,通过ChemBio3D软件转化为3D结果,调节其结构以达自由能最小。通过uniprot数据库筛选核心基因对应蛋白,其中popular organisms选择HUMAN;通过PDB数据库下载核心靶蛋白3D结构,运用Pymol软件移除核心靶蛋白的小分子配体及水分子,并使用PDB数据库查询核心靶蛋白对应的原始配体或抑制剂。采用AutoDockTools软件将各靶蛋白和其对应最低结合能的药物配体进行分子对接,运用Pymol软件进行可视化分析。

2　结果

2.1　GEO差异基因分析

通过GEO数据库查询搜索输卵管性不孕基因表达谱,获取GSE108202芯片表达数据集及GPL21145-48548平台文件,共有3例正常样本(热图中为Type C)及3例输卵管炎症样本(热图中为Type T),设定调整后*P*值(adjust *P* Value)<0.05,表达变化幅度≥2倍(|log2 FC|≥1.0)为筛选差异基因的标准,选出差异基因517个,其中上调基因361个,下调基因156个,差异基因火山图见图1,根据*P*值(*P* Value)筛选前100位显著性意义最大的差异表达基因绘制热图,见图2。火山图中,绿色为下调基因,红色为上调基因,黑色代表无明显异常表达基因;热图中,红色代表高表达,蓝色代表低表达。

2.2　输卵管性不孕疾病靶点获取

从OMIM数据库中获得输卵管性不孕疾病基因200个;从RefSeqGene数据库中获得疾病基因31个;设定score>30,从GeneCards数据库中获得疾病基因41个;1.2.1中获得GEO差异基因518个,使用R软件的"vene"包去重复取并集后得到疾病靶点776个,制作出输卵管性不孕疾病基因韦恩图,见图3。

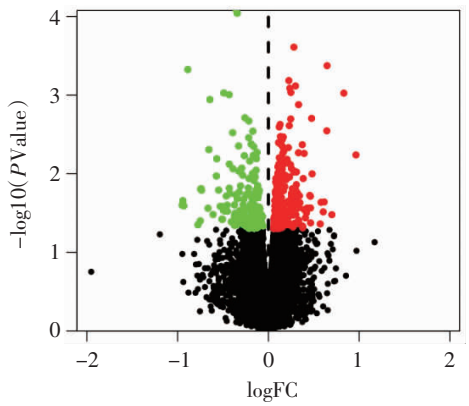


图1　输卵管性不孕差异表达基因火山图

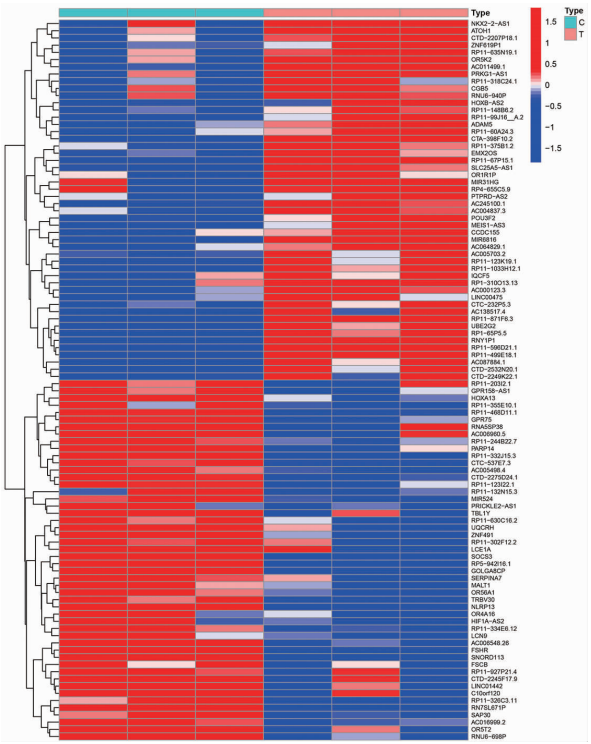


图2　输卵管性不孕前100位显著性意义最大的基因热图

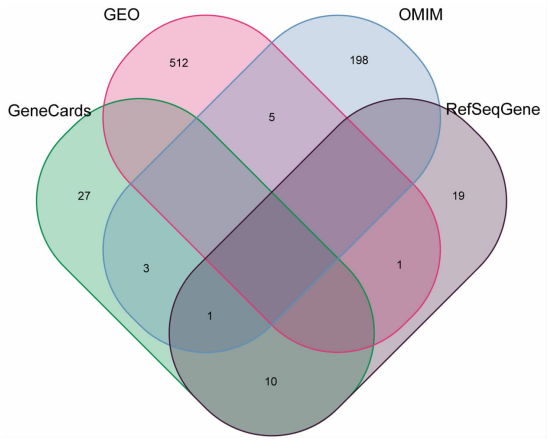


图3　输卵管性不孕基因韦恩图

2.3　通管丸有效成分筛选及靶点预测

筛选得出通管丸有效成分243种,其中白术4种,赤芍13种,莪蔚子8种,穿破石7种,当归2种,党参16种,丹参58种,甘草88种,路路通4种,没药30种,乳香5种,三七7种,王不留行4种,香附16种,薤白11种,泽兰2种;得到通管丸有效成分对应靶点(除去重复靶点后)337个。

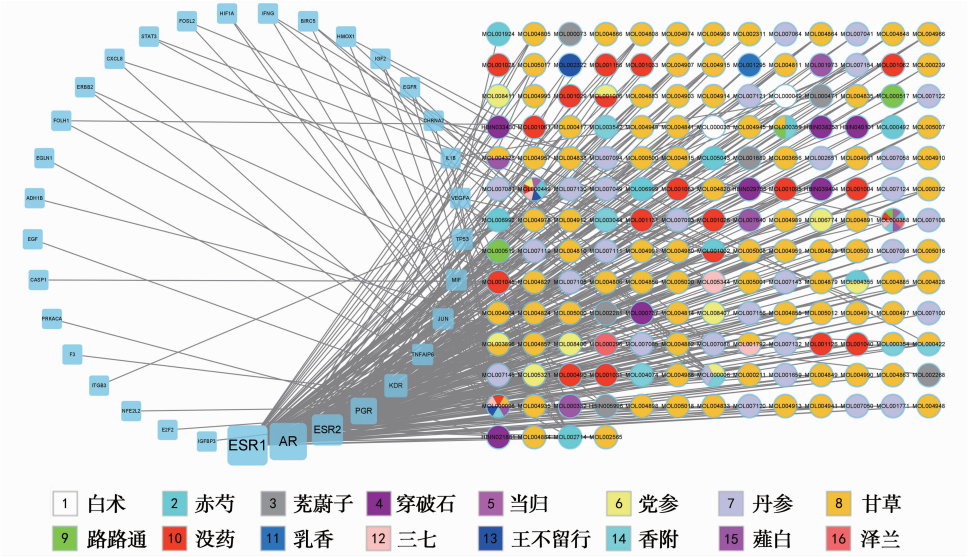
2.4　中药-成分-基因网络图绘制

预测通管丸治疗TFI基因33个,对应中药成分173种,将所得结果导入Cytoscape中,绘制中药-成分-基因网络图,见图4。图中方形节点为通管丸治疗输卵管性不孕的靶基因,面积代表与此靶基因相关的成

分的数目,面积越大,与此靶基因相关的药物成分越多。图中圆形节点为药物成分,颜色与中药名称对应,1 号色为白术,2 号色为赤芍,3 号色为芜蔚子,4 号色为穿破石,5 号色为当归,6 号色为党参,7 号色为丹参,8 号色为甘草,9 号色为路路通,10 号色为没药,11 号色为乳香,12 号色为三七,13 号色为王不留行,14 号色为香附,15 号色为薤白,16 号色为泽兰。

2.5　PPI 蛋白互作网络、核心网络构建与拓扑分析

将 33 个通管丸治疗 TFI 的潜在作用基因输入 string 数据库中,其中 Organism 中选择 Homo sapiens,minimum required interaction score≥0.15,同时删去游离靶基因,获得 PPI 网络,PPI 网络中存在 33 个节点(靶点),762 条边(靶点间相互作用关系)。将获取的 PPI 信息导入 Cytoscape 中,根据 Betweenness>5.55,Closeness>0.82,Degree>50,Eigenvector>0.19,LAC>42.67,Network>46.21 进行拓扑分析,所得网络中存在 14 个节点,182 条边;再将获取到的网络信息导入 Cytoscape 中,根据 Betweenness>0.78,Closeness>0.81,Degree>24,Eigenvector>0.28,LAC>22.77,Network>22.94,获得核心网络,所得网络中存在 7 个节点,91 条边,见图 5、6。



圆圈颜色显示通管丸相关成分

图 4　通管丸-成分-基因网络图

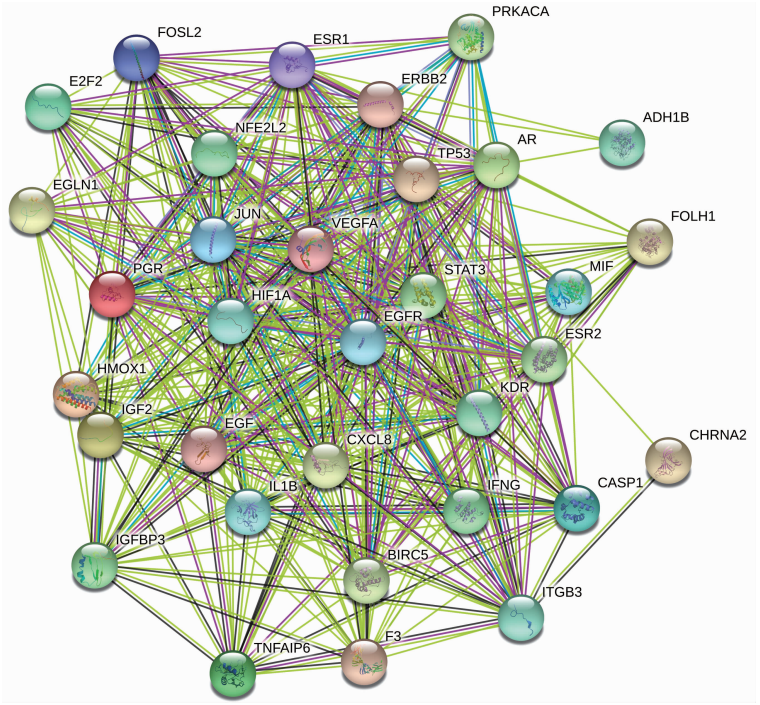


图 5　通管丸治疗 TFI 潜在靶基因的蛋白-蛋白交互作用网络图

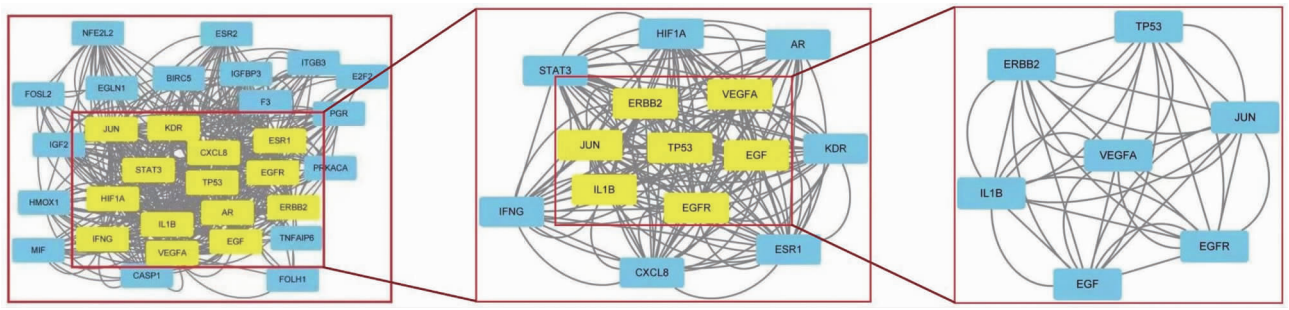


图 6 通管丸治疗 TFI 的 PPI 核心网络

2.6 靶点通路分析

将 33 个通管丸治疗 TFI 的潜在作用基因通过 R 软件进行 GO 分析及 KEGG 分析,共筛选得到 1 581 条 GO 条目(P<0.05)和 39 条 KEGG 通路(P<0.05)。

选取 GO 富集分析前 10 位条目绘制气泡图(图 7),纵坐标代表 GO 名称,圆圈面积大小代表富集在该 GO 上基因的数目,颜色代表富集显著性。GO 富集显著且基因数目较多的生物学过程主要涉及上皮细胞增殖、上皮细胞增殖调节、血管生成调节、血管发育调节、酪氨酸磷酸化、内皮细胞增殖阳性调节;主要涉及核染色质、RNA 聚合酶Ⅱ转录因子、核转录因子复合体、囊泡腔、薄膜筏等细胞组分;主要涉及细胞因子受体结合、核受体活性等分子功能。

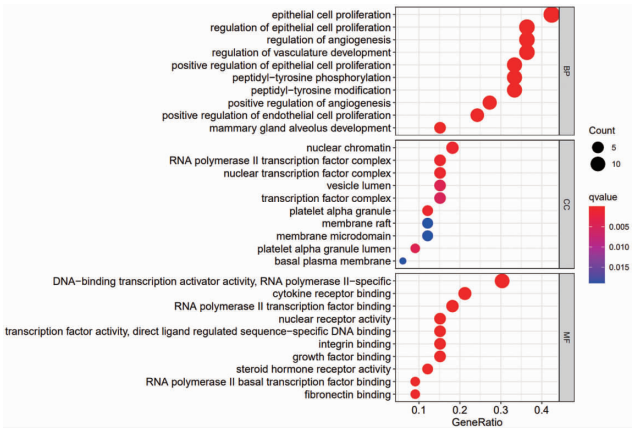


图 7 潜在靶基因的 GO 富集气泡图

将 39 条 KEGG 通路绘制气泡图(图 8),原理同 GO 富集分析。由此可见靶点显著富集于流体剪应力与动脉粥样硬化,内分泌抵抗,局部粘连,脂质和动脉粥样硬化,细胞衰老,坏死,缝隙连接,酪氨酸代谢,生长激素的合成、分泌和作用,细胞凋亡,内分泌及其他因素调节的钙的重吸收、黏着小带等。生物通路主要涉及 HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路、P13K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、钙信号通道、ErbB 信号通路、IL-17 信号通路、Rap1 信号通路、JAK-STAT 信号通路、Toll 样受体信号通路等。将 KEGG 结果输入 Cytoscape_v3.8.0 中,绘制靶点-通路网络图(图 9),图中图面积越大,连接的点越多。图 9 中 MAPK 信号通路(hsa04010)与 10 个基因相联,居通路之首,基因 EGFR 与 18 个通道相联,居基因之首。

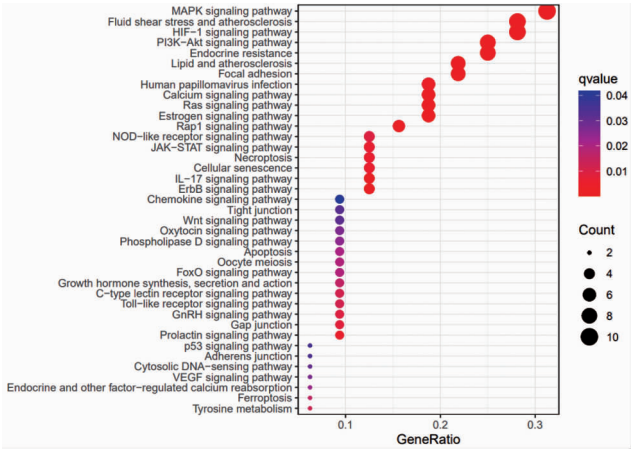


图 8 潜在靶基因 KEGG 富集气泡图

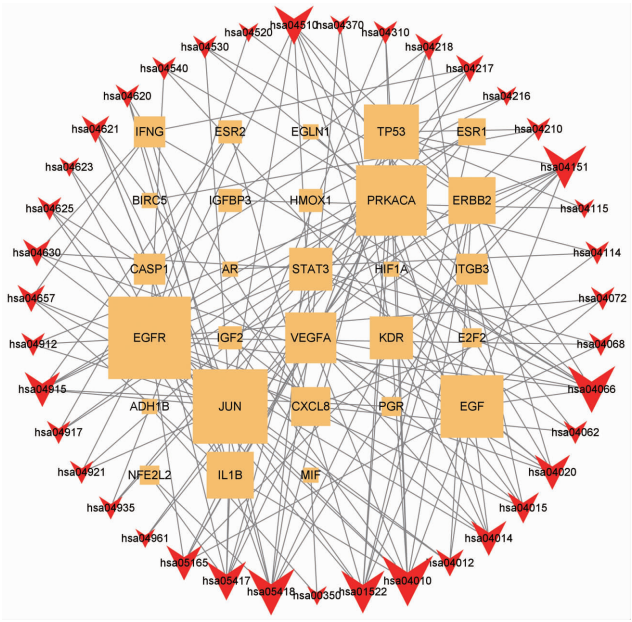


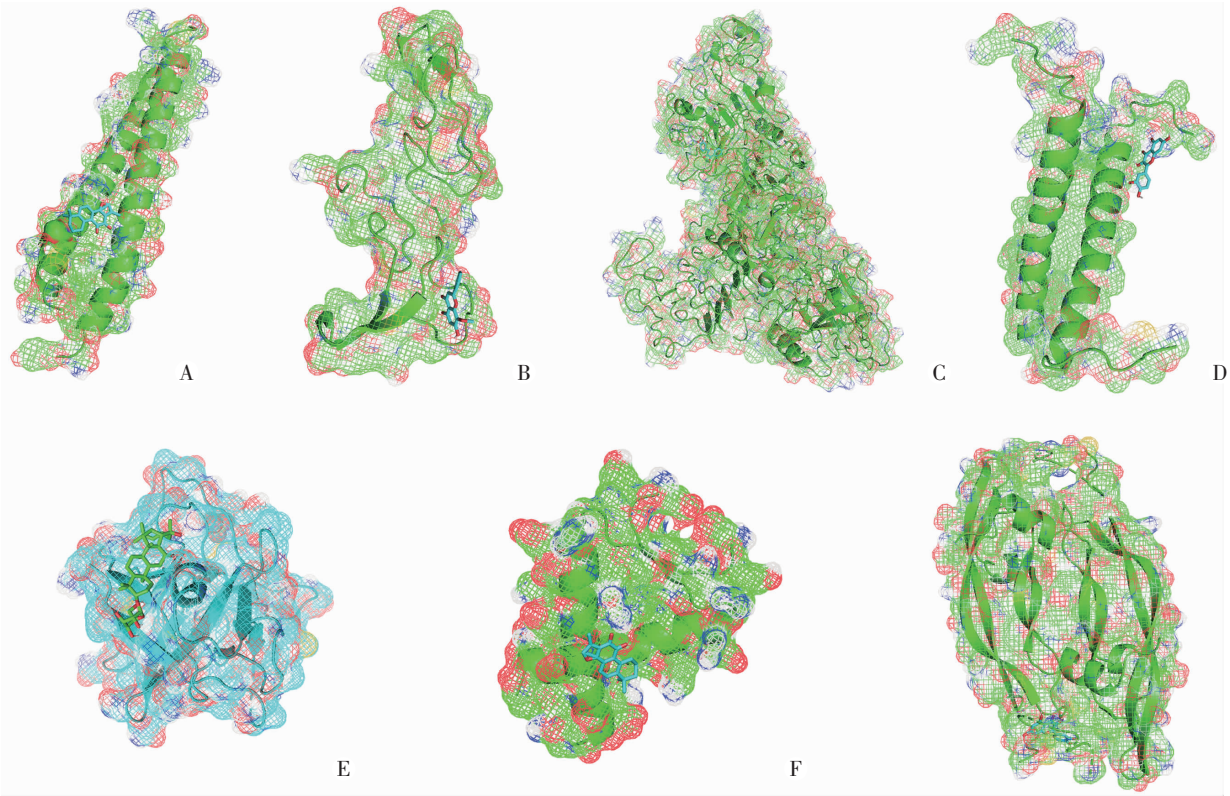
图 9 通管丸治疗 TFI 的靶点-通路分析

2.7 分子对接

将核心靶点 TP53、EGF、VEGFA、IL1B、JUN、EGFR、ERBB2 与其对应的药物成分进行分子对接,并采用原始配体或抑制剂作为阳性对照,以评价核心靶点蛋白与配体互相结合的能力,见表 1,配体和受体结合越稳定,所需能量越低,结合能<0 kcal/mol 代表受体及配体可自发结合。通管丸治疗 TFI 的核心靶点与其对应的成分结合的结合能均<-5 kcal/mol,提示上述成分与靶点的结合活性好。由此可知,beta-sitostero、formononetin、kaempferol、luteolin、quercetin、rhein、tanshinone iia 与 JUN 蛋白,quercetin 与 EGF 蛋白,luteolin、n-coumaroyltyramine、quercetin 与 EGFR 蛋白,aloeemodin、ginsenoside rh2、quercetin 与 IL1B 蛋白,acacetin、aloeemodin、baicalein、luteolin、quercetin、tanshinone iia 与 TP53 蛋白,baicalein、ellagic acid、luteolin、quercetin 与 VEGFA 蛋白相互结合所需结合能比其所对应的原始配体或抑制剂更小,存在较好的结合。而 luteolin、quercetin 与 ERBB2 蛋白结合较原始配体所需结合能更多,结合相对较差。然后选取各靶蛋白和其对应最低结合能的药物配体进行分子对接,运用 Pymol 软件进行可视化分析,如图 10。

表 1 药物有效成分与核心靶点的对接结果

靶标	名称	Molld	活性成分	来源	结合能(kcal/mol)
JUN	转录因子 AP-1	MOL000358	β-谷甾醇(beta-sitosterol)	赤芍、当归、路路通、没药、三七、香附、薤白、泽兰	-5.5
JUN	转录因子 AP-1	MOL000392	芒柄花素(formononetin)	甘草	-5.7
JUN	转录因子 AP-1	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	甘草、香附	-5.5
JUN	转录因子 AP-1	MOL000006	木犀草素(luteolin)	党参、丹参、香附	-5.6
JUN	转录因子 AP-1	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-5.3
JUN	转录因子 AP-1	MOL002268	大黄酸(rhein)	茺蔚子	-5.7
JUN	转录因子 AP-1	MOL007154	丹参酮 IIA(tanshinone iia)	丹参	-6.1
JUN	转录因子 AP-1		JEF	原始配体	-3.7
EGF	表皮细胞生长因子	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-6.4
EGF	表皮细胞生长因子		NAG	原始配体	-5.5
EGFR	表皮细胞生长因子受体	MOL000006	木犀草素(luteolin)	党参、丹参、香附	-8.4
EGFR	表皮细胞生长因子受体	MOL000332	n-香豆素(n-coumaroyltyramine)	薤白	-8.4
EGFR	表皮细胞生长因子受体	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-8.6
EGFR	表皮细胞生长因子受体		erlotinib	抑制剂	-8.3
ERBB2	酪氨酸激酶受体 2	MOL000006	木犀草素(luteolin)	党参、丹参、香附	-6.0
ERBB2	酪氨酸激酶受体 2	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-6.2
ERBB2	酪氨酸激酶受体 2		VOY	原始配体	-6.3
IL1B	白介素 1B	MOL000471	芦荟大黄素(aloeemodin)	茺蔚子	-6.5
IL1B	白介素 1B	MOL005344	人参皂苷 rh2(ginsenoside rh2)	三七	-7.1
IL1B	白介素 1B	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-6.9
IL1B	白介素 1B		JGY	原始配体	-5.9
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	MOL001689	醋酸乙酯(acacetin)	茺蔚子	-6.2
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	MOL000471	芦荟大黄素(aloeemodin)	茺蔚子	-6.0
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	MOL002714	黄芩素(baicalein)	赤芍	-6.3
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	MOL000006	木犀草素(luteolin)	党参、丹参、香附	-6.4
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-6.2
TP53	细胞肿瘤抗原 p53	MOL007154	丹参酮 IIA(tanshinone iia)	丹参	-6.9
TP53	细胞肿瘤抗原 p53		QNN	原始配体	-3.5
VEGFA	血管内皮生长因子 A	MOL002714	黄芩素(baicalein)	赤芍	-7.3
VEGFA	血管内皮生长因子 A	MOL001002	鞣花酸(ellagic acid)	赤芍、没药	-7.2
VEGFA	血管内皮生长因子 A	MOL000006	木犀草素(luteolin)	党参、丹参、香附	-7.3
VEGFA	血管内皮生长因子 A	MOL000098	槲皮素(quercetin)	甘草、没药、三七、王不留行、香附、薤白	-7.6
VEGFA	血管内皮生长因子 A		MPD	原始配体	-4.0



A: tanshinone iia-JUN; B: quercetin-EGF; C: quercetin-EGFR; D: quercetin-ERBB2; E: ginsenoside rh2-IL1B; F: tanshinone iia-TP53; G: quercetin-VEGFA

图 10 TFI 核心靶点与通管丸对应成分的分子对接图

3 讨论

中医将 TFI 归于“不孕”“无子”“断绪”范畴,本团队认为妇人或盼子心切、肝郁气滞、疏泄失常;或邪入胞宫;或寒凝血瘀;或热灼血瘀,导致气血循行子管不畅,日久致瘀,瘀血内阻要塞,精卵不能交融则致不孕。

本研究采用网络药理学方法,显示通管丸含有有效成分 243 种、对应靶点 337 个。甘草有效成分芒柄花素(formononetin)可诱导人输卵管细胞合成雌激素,上调白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factre,LIF)水平,促进胚胎的运输及植入[6-7]。丹参注射液可改善输卵管再通术后输卵管通畅情况[8]。此外,还有一些未被报道的有效活性成分,可作为未来研究通管丸治疗输卵管性不孕的潜在方向。

通过对预测的 33 个治疗靶点的 PPI 网络进行拓扑分析,发现 TP53、EGF、VEGFA、IL-1B、JUN、EGFR、ERBB2 是通管丸治疗输卵管性不孕的关键靶点。IL-1B 作为白细胞介素,存在于输卵管纤毛细胞的顶端蛋白质里,在哺乳动物中,其浓度与不孕相关[9]。EGF、EGFR、ERBB2 作为表皮生长因子及受体,参与细胞增殖、凋亡及局部粘连形成。表皮生长因子(EGF)可在牛输卵管上皮细胞中促进 MARK 磷酸化[10],EGFR 通路也可调节 Notch 信号,在输卵管中产生多种纤毛[11],调节输卵管微环境,利于受精及胚胎存活。VEGFA 作为血管生长因子的重要元件,在猪的发情周期的输卵管均有表达,其主要分布在输卵管内皮细胞和成纤维细胞及肌层的肌纤维和血管中,参与调节输卵管分泌动力学和输卵管收缩[12]。文献搜索结果与本文 GO 聚类分析结果类似,但关键靶点在人体中发挥的作用鲜有发表,可作为探究输卵管性不孕机制的突破口。分子对接显示:beta-sitostero、formononetin、kaempferol、luteolin、quercetin、rhein、tanshinone iia 与 JUN 蛋白,quercetin 与 EGF 蛋白,luteolin、n-coumaroyltyramine、quercetin 与 EGFR 蛋白,aloeemodin、ginsenoside rh2、quercetin 与 IL-1B 蛋白,acacetin、aloeemodin、baicalein、luteolin、quercetin、tanshinone iia 与 TP53 蛋白,baicalein、ellagic acid、luteolin、quercetin 与 VEGFA 蛋白之间存在较好的结合。

根据 KEGG 聚类分析及靶点-通路分析显示,通管丸治疗输卵管性不孕存在多靶点、多通路作用,其中靶

点参与较多通路为 MAPK 信号通路(hsa04010)、HIF-1 信号通路(hsa04066)、PI3K-Akt 信号通路(hsa04151)、局部粘连(hsa04510)、雌激素抵抗(hsa01522);主要包含以下几个机制:①抑制输卵管促炎症因子引起的局部粘连、瘢痕:MAPK 通路可激活输卵管黏膜上皮细胞中的 S100A8 基因,抑制炎症因子 IL-1β[13],参与抗菌、抗炎修复等病理过程,维持输卵管的免疫环境。IL-6 可促进巨噬细胞中的 Akt 磷酸化,维持巨噬细胞的存活,增强成纤维细胞的收缩活性并导致严重的疤痕[14]。各种衣原体可以利用各种不同但相关的细胞表面受体来进入宿主细胞,这些不同的受体可能通过 G 蛋白,特别是通过 PI3K-Akt 途径共享一个共同的下游信号传导过程,形成瘢痕[15]。②抑制血管平滑肌细胞钙化,引起的胚胎运输异常:雌海龟输卵管内雌激素的增加可抑制 TOLL 样受体 TLR2/4 通路抑制的免疫反应,使精子不会作为外来物质被移除直至受精为止[16]。输卵管上皮细胞睫状体长度和波动频率受到 ESR1 调节,输卵管上皮细胞中 ESR1 信号的中断会改变纤毛功能并损害胚胎的运输[17]。敲除 PRKACA 基因可抑制血管平滑肌细胞的钙化[18],利于输卵管的运输功能。③减轻细胞凋亡对输卵管不孕影响:排卵后卵细胞在输卵管内发育,应激可诱导输卵管细胞凋亡而损害胚胎发育[19];输卵管上皮细胞凋亡会在 TP53 蛋白和 bcl-2 家族凋亡蛋白的参与下激活[20],严重的炎症可导致糖蛋白和粘液聚集,加速输卵管上皮细胞凋亡,使丧失紧密连接的输卵管上皮脱落而不利于受精[21]。

本课题组曾进行体外动物实验显示,通管丸可抑制输卵管炎性阻塞性不孕大鼠模型血清 IL-1、EGFR 的水平,改善输卵管组织粘连、纤维组织增生等慢性损伤[22-23],与本研究吻合,但通管丸在抑制胚胎运输异常及控制输卵管上皮细胞凋亡方面无相关研究,可作为下一步研究方向。

综上所述,本研究通过生物信息学联合网络药理学、分子对接法探讨通管丸治疗输卵管性不孕的机制,发现通管丸治疗 TFI 基因 33 个,对应中药成分 173 种,其中核心靶点 TP53、EGF、VEGFA、IL-1B、JUN、EGFR、ERBB2 可能发挥重要作用,涉及上皮细胞增殖调节、血管生成调节等过程,参与细胞因子受体结合、核受体活性等分子功能;可能通过 MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、P3K-Akt 信号通路、雌激素抵抗等代谢通路,在抑制输卵管促炎症因子引起的局部粘连、瘢痕,抑制血管平滑肌细胞钙化引起的胚胎运输异常及控制输卵管上皮细胞凋亡等机制下治疗输卵管性不孕。由此可见,通管丸具有多成分、多靶点、多途径治疗疾病的特点,为 TFI 治疗提供思路,也为中药治疗 TFI 提供理论基础。

参考文献:

[1] 戴守方, 戴芳芳, 张丽晓, 等. 输卵管再通术联合中药及理疗治疗阻塞性不孕临床效果研究[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(15): 42-47. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2021.15.008.
DAI S F, DAI F F, ZHANG L X, *et al*. Clinical study on application of fallopian tube recanalization plus traditional Chinese medicine and physiotherapy in treating obstructive infertility[J]. China J Mod Med, 2021, 31(15): 42-47. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2021.15.008.

[2] 宋亚静, 高星, 管凤丽, 等. 杜惠兰基于"通法"理论治疗输卵管性不孕经验[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1804-1807.
SONG Y J, GAO X, GUAN F L, *et al*. Experience of DU Hui-Lan in treating tubal infertility based on 'Tong method' theory[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(4): 1804-1807.

[3] 吴璐璐, 匡继林, 张翼, 等. 通管方对输卵管妊娠保守术后再妊娠结局的影响[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(5): 64-65. DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2015.05.031.
WU L L, KUANG J L, ZHANG Y, *et al*. Effect of Tongguanfang on repregnancy outcome after conservative operation of tubal pregnancy[J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2015, 31(5): 64-65. DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2015.05.031.

[4] 黄紫纯, 匡继林, 朱维昊. 通管方治疗宫腹腔镜术后输卵管性不孕患者的疗效及其对炎症因子、子宫动脉血流的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(12): 1539-1543. DOI:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.12.019.
HUANG Z C, KUANG J L, ZHU W H. Efficacy of Tongguan prescription in treating tubal infertility patients after hysteroscopy combined with laparoscopic surgery and its effects on inflammatory factors and uterine artery blood flow[J]. J Hunan Univ Chin Med, 2020, 40(12): 1539-1543. DOI:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.12.019.

[5] 龚倩, 匡继林, 张翼. 通管丸含药血清对巨噬细胞炎症模型磷酸化 IRAK4、磷酸化 IKKs 蛋白表达的影响[J]. 中医药导报, 2021, 27(1): 47-50. DOI:10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2021.01.010.
GONG Q, KUANG J L, ZHANG Y. Effect of Tongguan pills containing serum on the expression of phosphorylated IRAK4 and phosphorylated IKKs in macrophage inflammatory[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(1): 47-50. DOI:10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2021.01.010.

[6] REINHART K C, DUBEY R K, KELLER P J, *et al*. Xeno-oestrogens and Phyto-oestrogens induce the synthesis of

leukaemia inhibitory factor by human and bovine oviduct cells [J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(10): 899-907. DOI:10.1093/molehr/5.10.899.

[7] 王倩, 陈圆辉, 徐晓航, 等. 白血病抑制因子对胚胎着床影响的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2016, 25(2): 190-193. DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2016.2.018.
WANG Q, CHEN Y H, XU X H, *et al*. Research progress of effect of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation [J]. J Reproduc Med, 2016, 25(2): 190-193. DOI:10.3969/j.issn.1004-3845.2016.2.018.

[8] HUANG C, HE X P, LUO W F, *et al*. Combined chitosan and Dan-Shen injection for long-term tubal patency in fallopian tube recanalization for infertility [J]. Drug Deliv Transl Res, 2019, 9(4): 738-747. DOI:10.1007/s13346-018-00611-0.

[9] TANAKA H, OHTSU A, SHIRATSUKI S, *et al*. Age-dependent changes in inflammation and extracellular matrix in bovine oviduct epithelial cells during the post-ovulatory phase [J]. Mol Reprod Dev, 2016, 83(9): 815-826. DOI:10.1002/mrd.22693.

[10] WIJAYAGUNAWARDANE M P,HAMBRUCH N,HAEGER J D, *et al*. Effect of epidermal growth factor (EGF) on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the bovine oviduct *in vitro*: alteration by heat stress[J]. J Reprod Dev, 2015, 61(5): 383-389. DOI:10.1262/jrd.2014-061.

[11] ZHU M B, IWANO T, TAKEDA S. Estrogen and EGFR pathways regulate Notch signaling in opposing directions for multi-ciliogenesis in the fallopian tube[J]. Cells, 2019, 8(8): E933. DOI:10.3390/cells8080933.

[12] LÓPEZ ALBORS O, OLSSON F, LLINARES A B, *et al*. Expression of the vascular endothelial growth factor system (VEGF) in the porcine oviduct during the estrous cycle[J]. Theriogenology, 2017, 93: 46-54. DOI:10.1016/j.theriogenology.2017.01.028.

[13] 李晓丹. 雌二醇调控绵羊输卵管黏膜上皮细胞 S100A8 和 A9 表达的机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
LI X D. Study on the mechanism of estradiol regulating the expression of S100A8 and A9 in the sheep oviduct mucosal epithelial cells[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.

[14] KECHAGIA J Z, EZRA D G, BURTON M J, *et al*. Fibroblasts profiling in scarring Trachoma identifies IL-6 as a functional component of a fibroblast-macrophage pro-fibrotic and pro-inflammatory feedback loop[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28261. DOI:10.1038/srep28261.

[15] ROBERTS C H, OUBURG S, PRESTON M D, *et al*. Pathway-wide genetic risks in chlamydial infections overlap between tissue tropisms: a genome-wide association scan [J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 3434101. DOI:10.1155/2018/3434101.

[16] CAI W L, CHEN W, WANG Y J, *et al*. Sperm storage in the oviduct of the Chinese pond turtle Mauremys reevesii depends on oestrogen-based suppression of the TLR2/4 immune pathway[J]. Reprod Fertil Dev, 2021, 33(12): 736-745. DOI:10.1071/RD20341.

[17] LI S, O'NEILL S R, ZHANG Y, *et al*. Estrogen receptor α is required for oviductal transport of embryos[J]. FASEB J, 2017, 31(4): 1595-1607. DOI:10.1096/fj.201601128R.

[18] MOSER B, POETSCH F, ESTEPA M, *et al*. Increased β-adrenergic stimulation augments vascular smooth muscle cell calcification *via* PKA/CREB signalling[J]. Pflugers Arch, 2021, 473(12): 1899-1910. DOI:10.1007/s00424-021-02621-3.

[19] KONG Q, WANG G L, AN J S, *et al*. Effects of postovulatory oviduct changes and female restraint stress on aging of mouse oocytes[J]. Reproduction, 2021, 162(1): 95-105. DOI:10.1530/REP-21-0160.

[20] WAWRYK-GAWDA E,CHYLIŃSKA-WRZOS P,LIS-SOCHOCKA M, *et al*. Intrinsic apoptosis pathway in fallopian tube epithelial cells induced by cladribine[J]. Sci World J, 2014, 2014: 928036. DOI:10.1155/2014/928036.

[21] OWHOR L E, REESE S, KÖLLE S. Salpingitis impairs bovine tubal function and sperm-oviduct interaction[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10893. DOI: 10.1038/s41598-019-47431-x.

[22] 覃君玲, 匡继林, 刘奇英, 等. 通管方对输卵管炎性阻塞性不孕大鼠模型血清 IL-1、TNF-α 含量的影响[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(4): 69-72. DOI:10.16305/j.1007-1334.2012.04.029.
QIN J L, KUANG J L, LIU Q Y, *et al*. Effect of "Tongguan Decoction" on IL-1 and TNF-α in rat models with tubal infertility[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2012, 46(4): 69-72. DOI:10.16305/j.1007-1334.2012.04.029.

[23] 张翼, 匡继林, 刘奇英, 等. 通管方对输卵管炎性阻塞性不孕大鼠模型 EGFR、ICAM-1 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(12): 13-15, 29. DOI:10.3969/j.issn.1674-070X.2011.12.005.013.04.
ZHANG Y, KUANG J L, LIU Q Y, *et al*. The influence of Tong Guan Fang on the EGFR and ICAM-1's expression of the fallopian tube inflammatory obstructive infertility rat models[J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan, 2011, 31(12): 13-15, 29. DOI: 10.3969/j.issn.1674-070X.2011.12.005.013.04.

(**收稿**:2022-03-25;**修回**:2022-04-07)
(编辑 张 维)