

基于网络药理学的菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的作用机制研究^Δ

李锦英^{1*}, 张兆萍¹, 叶金飞¹, 曾丽华¹, 梁蕴仪¹, 朱玲^{2#} (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院妇科, 广州 510405)

中图分类号 R285; R711.75 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)18-2202-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.18.05

摘要 目的:探讨菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的潜在作用机制。方法:利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、GenenCards和OMIM数据库获得菟丝子-枸杞子药对活性成分及卵巢早衰的相关靶点,利用Venn在线工具筛选两者的交集基因,并采用Cytoscape 3.7.0软件构建活性成分-靶点网络和靶点间蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络;通过DAVID数据库对交集基因进行基因本体(GO)富集分析和KEGG通路富集分析,最终构建活性成分-靶点-关键通路网络。结果:筛选出菟丝子-枸杞子药对活性成分42个,成分及疾病靶点231、1 913个,节点度值排名靠前的化合物有槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、异鼠李素、黄豆黄素、豆甾醇和芝麻素等。活性成分靶点与卵巢早衰疾病靶点的交集基因共149个,交集基因的PPI网络共包含节点149个、边2 970条,平均节点度值为39.9,平均介数值为0.005 4。GO分析结果显示,上述交集基因的分子功能主要包括蛋白结合、酶结合等,生物过程主要涉及促进RNA聚合酶II启动子转录、促进DNA转录等,细胞组分主要包括细胞核、细胞质等,信号通路主要涉及癌症信号通路、乙型肝炎通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等。活性成分-靶点-关键通路网络显示,菟丝子和枸杞子的主要活性成分均为黄酮类及醇类,关键靶点有蛋白激酶B1(AKT1)、肿瘤抑制蛋白P53(TP53)、白细胞介素6(IL6)、肿瘤坏死因子(TNF)等,通路主要涉及癌症信号通路、乙型肝炎信号通路、PI3K/AKT信号通路、MAPK信号通路等。结论:菟丝子-枸杞子药对的多种活性成分可能通过PI3K/AKT信号通路、MAPK等多条通路作用于AKT1、TP53等多个靶点治疗卵巢早衰,并挖掘出潜在活性成分豆甾醇、芝麻素以及潜在靶点IL6、TNF。

关键词 菟丝子-枸杞子药对;卵巢早衰;网络药理学;作用机制

Study on the Mechanism of Couplet Medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus in the Treatment of Premature Ovarian Failure Based on Network Pharmacology

LI Jinying¹, ZHANG Zhaoping¹, YE Jinfei¹, ZENG Lihua¹, LIANG Yunyi¹, ZHU Ling² (1. The First Clinical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. Dept. of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the potential mechanism of couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus in the treatment of premature ovarian failure. METHODS: Main active components and related targets of couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus in the treatment of premature ovarian failure were obtained from TCMSP, GeneCards and OMIM database. The intersection genes between them were screened using Venn online tool. Cytoscape 3.7.0 software was adopted to establish the active ingredients-target network and the PPI network. GO and KEGG pathway enrichment analysis on intersection genes were carried out by DAVID database. Finally, an active component-target-key pathway network was constructed. RESULTS: Totally 42 active components, 231 and 1 913 targets for active components and disease were obtained from couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus. The components with high node degree included quercetin, kaempferol, β -sitosterol, isorhamnetin, glycitein, stigmaterol and sesamin, etc. There were 149 intersection genes between the active component targets and premature ovarian failure targets. PPI network contained 149 nodes and 2 970 edges, with an average node degree of 39.9 and an average medium of 0.005 4. The results of GO analysis showed that molecule function of the above-mentioned genes mainly involved protein binding, enzyme binding, etc. Biological process mainly included that positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, positive regulation of transcription DNA-templated, etc. Cell components mainly included nucleus, cytoplasm, etc. Signaling pathway mainly involved cancer signaling pathway, hepatitis B signling pathway, PI3K/AKT signaling pathway, MAPK signaling pathway, etc. The results of active component-target-key pathway network showed that active components of Cuscutae Semen and Lycii Fructus were flavonoids and alcohols; key target included AKT1, TP53,

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81674016);国家中医药管理局全国中医学术流派传承工作室“岭南罗氏妇科流派传承工作室”建设项目(No.国中医药人教函[2019]62号);广东省省中医传承工作室建设项目(No.粤中医办函[2019]5号)

* 硕士研究生。研究方向:中医药防治妇科疾病。E-mail: 617693370@qq.com

通信作者:主任中医师,博士生导师,博士。研究方向:卵巢功能障碍的中医药基础与临床。E-mail: 2275898821@qq.com

VEGFA, IL6, TNF, etc. Signaling pathway mainly involved cancer signaling pathway, hepatitis B signaling pathway, PI3K/AKT signaling pathway, MAPK signaling pathway, etc. CONCLUSIONS: Through PI3K/AKT signaling pathway and MAPK signaling pathway, the active components of couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus may act on AKT1, TP53 and other targets, and then play a therapeutic role on premature ovarian failure. The Potential active components stigmasterol, sesamin and potential targets IL6, TNF were found.

KEYWORDS Couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus; Premature ovarian failure; Network pharmacology; Mechanism of action

卵巢早衰(Premature ovarian failure)是临床上常见的生殖内分泌系统疾病,是指女性在40岁以前出现卵巢储备功能下降甚至衰竭的现象,临床主要表现为闭经、不孕、低雌激素症等,部分患者还可出现潮热多汗、烦躁不安、性欲低下、睡眠障碍、骨质疏松等围绝经期症状^[1]。据调查,我国卵巢早衰的发病率为1%~3%^[2],是临床妇科医师关注的热点之一。现代医学治疗卵巢早衰主要有雌孕激素替代疗法、免疫疗法以及诱导排卵、卵巢冷冻移植等对症治疗方法^[3]。而中医认为,卵巢早衰属“闭经”“不孕”“血枯”等范畴,病机总归肾虚,治疗当以补肾填精为主^[4]。

网络药理学是药理学的分支学科,其是在药物、靶点、疾病相互作用的基础上,通过网络分析和生物信息技术等手段系统揭示多成分药物治疗疾病的相关机制^[5]。该学科注重整体性、系统性和药物之间的相互作用,这与中医治病的整体观念相吻合。网络药理学与中药研究的结合,可为阐明中医药治疗疾病的作用机制提供新的研究思路和方法,有利于揭示中药治病的本质,并为中药研发提供强有力的理论支撑,进而推动中医药现代化的发展^[6]。

菟丝子-枸杞子药对为左归丸、归肾丸、五子衍宗丸等治疗卵巢早衰方剂的核心药对,具有补肾填精的作用,临床上多用菟丝子-枸杞子药对治疗肾虚型卵巢早衰,疗效确切^[7]。但菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的作用靶点及分子机制等尚不明确。为此,本研究拟借助网络药理学的方法探讨该药对治疗卵巢早衰的潜在作用机制,旨在为临床应用菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰提供基础生物学信息支撑。

1 资料与方法

1.1 菟丝子-枸杞子药对活性成分及靶点蛋白的筛选

利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmispw.com/tcmisp.php>),以“Tu Si Zi”或“Cuscutae Semen”等为关键词搜索菟丝子的主要化学成分,以“Gou Qi Zi”或“Lycii Fructus”等为关键词搜索枸杞子的主要化学成分;以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18为限定条件初步筛选其活性化合物,去除无明确作用靶点的成分后获得活性成分。同时,提取其蛋白质靶点。此外,为标准化靶点蛋白信息,统一将靶点蛋白转化成Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)

的靶点。

1.2 卵巢早衰相关靶点的筛选

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<http://www.omim.org>)中以“Premature ovarian failure”OR“POF”为关键词检索与卵巢早衰疾病相关的靶点基因,并记录靶点基因的 Score 值(Score 值越高代表靶点与疾病之间的关系越紧密);依据文献经验^[8],若疾病靶点过多,则将 Score 值大于中位值的目标靶点作为卵巢早衰的潜在靶点。合并各数据库的检索结果,删去重复值后获得卵巢早衰靶点。

1.3 主要活性成分-疾病靶点网络的构建

为明确菟丝子-枸杞子药对活性成分靶点与卵巢早衰疾病靶点间的关系,利用 Venn 在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)绘制韦恩图,获得菟丝子-枸杞子药对活性成分靶点与卵巢早衰靶点的交集基因。将药材活性成分靶点与交集基因通过 Cytoscape 3.7.0 软件构建活性成分-疾病靶点网络图。以节点表示活性成分和靶点,节点之间的以边相连;节点度值表示与节点相连边的数量,其值越大,表示该节点在网络中越重要(下同)。

1.4 交集基因蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络的构建

将交集基因导入 STRING 数据库(<https://string-db.org>),生物种类设定为“Homo sapiens”,最小相互作用阈值设定为“Highest confidence>0.9”,其余设置均为默认,构建 PPI 网络图,并通过 Cytoscape 3.7.0 软件进行可视化展示。

1.5 交集基因的富集分析

为阐明菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰潜在靶点在信号通路中的作用,采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对交集基因进行基因本体(GO)富集分析和 KEGG 通路富集分析。限定物种为“Homo sapiens(人)”,标识符(Identifier)设置为“Official gene symbol(官方名称)”,设定 $P < 0.001$ (P 值反映生物功能的显著性及通路的富集程度, P 值越小,则富集结果显著性越高)。将通路 P 值由小到大排序,并将富集结果导入微生物信在线作图平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)中进行可视化展示。

1.6 活性成分-靶点-关键通路网络构建

将前 10 条关键通路与菟丝子-枸杞子药对的活性成

分、潜在作用靶点相对应,并通过Cytoscape 3.7.0软件构建活性成分-靶点-关键通路网络,直观地展现菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的复杂网络关系,阐释该药对治疗卵巢早衰的潜在作用机制。

2 结果

2.1 菟丝子-枸杞子药对活性成分筛选结果

通过TCMSP数据库检索共获得菟丝子活性成分10种、枸杞子活性成分35种,合并去重后共获得活性成分42种,详见表1。菟丝子作用靶点蛋白343个,枸杞子作用靶点蛋白364个,合并去重经Uniprot数据库标准化后得到靶点蛋白231个。

2.2 卵巢早衰相关靶点检索结果

从GeneCards数据库共获得卵巢早衰相关靶点基因3 830个,其Score最大值为201.03、最小值为0.24,中位数为4.39,故设定Score>4.39的靶点为卵巢早衰的潜在靶点,结合OMIM数据库补充相关靶点信息,合并去重后最终获得卵巢早衰疾病靶点1 913个。

2.3 主要活性成分-疾病靶点网络的分析结果

共获得菟丝子-枸杞子药对活性成分靶点与卵巢早衰靶点的交集基因149个,韦恩图见图1。将上述交集基因导入Cytoscape 3.7.0软件中,构建活性成分-卵巢早衰靶点网络图,详见图2。由图2可见,该网络含节点193个,其中药材节点2个、活性成分节点42个、靶点节点149个,成分与靶点之间边507条;活性成分平均节点度值为12.071 4,大于平均节点度值的活性成分有7个。其中,菟丝子和枸杞子共有活性成分槲皮素节点度值最大,为238,预测槲皮素为菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的主要活性成分;其次为山柰酚(菟丝子)、 β -谷甾醇(菟丝子和枸杞子共有)、异鼠李素(菟丝子)、黄豆黄素(枸杞子)和豆甾醇(枸杞子)、芝麻素(菟丝子)。

2.4 菟丝子-枸杞子药对活性成分与卵巢早衰交集基因PPI网络的分析结果

菟丝子-枸杞子药对活性成分与卵巢早衰交集基因的PPI网络图见图3。由图3可见,该网络含节点149个与边2 970条,平均节点度值为39.9,平均介数值为0.005 4。菟丝子-枸杞子药对可能通过蛋白激酶B1(AKT1)、肿瘤抑制蛋白P53(TP53)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、白细胞介素6(IL6)、肿瘤坏死因子(TNF)、胱天蛋白酶3(CASP3)等关键靶点发挥治疗卵巢早衰的作用。

2.5 交集基因的富集分析结果

将交集基因导入DAVID生物信息学数据库中进行GO分析,共得到GO条目247个($P<0.001$),其中分子功能39个、生物过程185个、细胞组分23个,主要涉及蛋白结合、促进RNA聚合酶II启动子转录等,且主要集中在细胞核,其中分子功能、生物过程、细胞组分富集基因数排序前10位的GO分析结果见表2~表4。KEGG通

表1 菟丝子-枸杞子药对活性成分基本信息

Tab 1 Basic information of active compounds in couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus

TCMSP编号	化合物(英文名称)	OB,%	DL	来源
MOL000358	β -谷甾醇(Beta-sitosterol)	36.91	0.75	菟丝子,枸杞子
MOL000953	胆固醇(Cholesterol)	37.87	0.68	菟丝子,枸杞子
MOL000098	槲皮素(Quercetin)	46.43	0.28	菟丝子,枸杞子
MOL001558	芝麻素(Sesamin)	56.55	0.83	菟丝子
MOL000184	NSC63551	39.25	0.76	菟丝子
MOL000354	异鼠李素(Isorhamnetin)	49.60	0.31	菟丝子
MOL000422	山柰酚(Kaempferol)	41.88	0.24	菟丝子
MOL005043	菜油甾醇(Campest-5-en-3beta-ol)	37.58	0.71	菟丝子
MOL005440	δ -燕麦甾醇(δ -isofucosterol)	43.78	0.76	菟丝子
MOL005944	苦参碱(Matrine)	63.77	0.25	菟丝子
MOL001323	谷甾醇 α 1(Sitosterol alpha 1)	43.28	0.78	枸杞子
MOL003578	环阿屯醇(Cycloartenol)	38.69	0.78	枸杞子
MOL001494	亚油酸乙酯(Mandanol)	42.00	0.19	枸杞子
MOL001495	亚麻酸乙酯(Ethyl linolenate)	46.10	0.20	枸杞子
MOL001979	羊毛甾醇(Lanosterol)	42.12	0.75	枸杞子
MOL000449	豆甾醇(Stigmasterol)	43.83	0.76	枸杞子
MOL005406	阿托品(Atropine)	45.97	0.19	枸杞子
MOL005438	菜油甾醇(Campesterol)	37.58	0.71	枸杞子
MOL006209	花青苷(Cyanin)	47.42	0.76	枸杞子
MOL007449	24-亚甲基苯酚(24-methylidenelphenol)	44.19	0.75	枸杞子
MOL008173	西托糖苷(Helenien)	36.91	0.75	枸杞子
MOL008400	黄豆黄素(Glycitein)	50.48	0.24	枸杞子
MOL009604	14b-孕烷(14b-pregnane)	34.78	0.34	枸杞子
MOL009617	24-乙基胆甾-22-烯醇(24-ethylcholest-22-enol)	37.09	0.75	枸杞子
MOL009618	24-乙基胆甾-5,22-二烯醇(24-ethylcholesta-5,22-dienol)	43.83	0.76	枸杞子
MOL009620	24-甲基-31-norlanost-9(11)-烯醇[24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol]	38.00	0.75	枸杞子
MOL009621	24-亚甲基-8-烯醇(24-methylenelanost-8-enol)	42.37	0.77	枸杞子
MOL009622	岩皂甾醇(Fucosterol)	43.78	0.76	枸杞子
MOL009633	31-去甲羊毛甾-9(11)-烯醇[31-norlanost-9(11)-enol]	38.35	0.72	枸杞子
MOL009634	31-去甲羊毛甾醇(31-norlanosterol)	42.2	0.73	枸杞子
MOL009635	4,24-甲基烯醇(4,24-methylphenol)	37.83	0.75	枸杞子
MOL009639	4-甲基-7-烯胆甾醇(Lophenol)	38.13	0.71	枸杞子
MOL009640	4 α ,14 α ,24-三甲基胆甾-8,24-二烯醇(4 α ,14 α ,24-trimethylcholesta-8,24-dienol)	38.91	0.76	枸杞子
MOL009641	4 α ,24-二甲基胆甾-7,24-二烯醇(4 α ,24-dimethylcholesta-7,24-dienol)	42.65	0.75	枸杞子
MOL009642	4 α -甲基-24-乙基胆甾-7,24-二烯醇(4 α -methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol)	42.30	0.78	枸杞子
MOL009644	6-氟吲哚-7-脱氢胆甾醇(6-fluoroindeole-7-dehydrocholesterol)	43.73	0.72	枸杞子
MOL009646	7-O-甲基木犀草素-6-C- β -葡萄糖苷(7-O-methyluteolin-6-C-beta-glucoside _{qt})	40.77	0.30	枸杞子
MOL009650	阿托品(Atropine)	42.16	0.19	枸杞子
MOL009665	大黄素甲醚-8-O- β -D-龙胆二糖苷(Physcion-8-O-beta-D-gentiobioside)	43.90	0.62	枸杞子
MOL009677	羊毛甾醇-8-烯-3 β -醇(Lanost-8-en-3beta-ol)	34.23	0.74	枸杞子
MOL009678	羊毛甾醇-8-烯醇(Lanost-8-enol)	34.23	0.74	枸杞子
MOL009681	钝叶醇(Obtusifolol)	42.55	0.76	枸杞子

路富集分析共筛选出信号通路87条($P<0.001$),主要涉及癌症信号通路、乙型肝炎信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、叉头框转录因子O亚族(FoxO)信号通路等,详见图4。

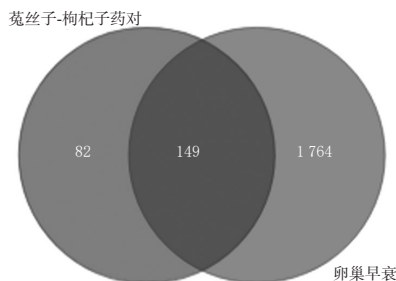


图1 菟丝子-枸杞子药对活性成分与卵巢早衰交集基因的韦恩图

Fig 1 Venn diagram of intersection genes between active compounds in couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus and premature ovarian failure

2.6 成分-靶点-关键通路网络的分析结果

将关键通路与“菟丝子-枸杞子”药对的活性成分、潜在作用靶点一一对应,构建活性成分-靶点-关键通路网络,详见图5。由图5可见,菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰涉及多个活性成分、靶点及通路。主要活性成分有菟丝子中的黄酮类及醇类,枸杞子中的黄酮类及醇类,主要靶点有 AKT1、TP53、VEGFA、IL6、TNF、CASP3 等,通路主要涉及癌症信号通路、乙型肝炎信号通路、PI3K/AKT 信号通路、MAPK 信号通路、FoxO 信号通路等。

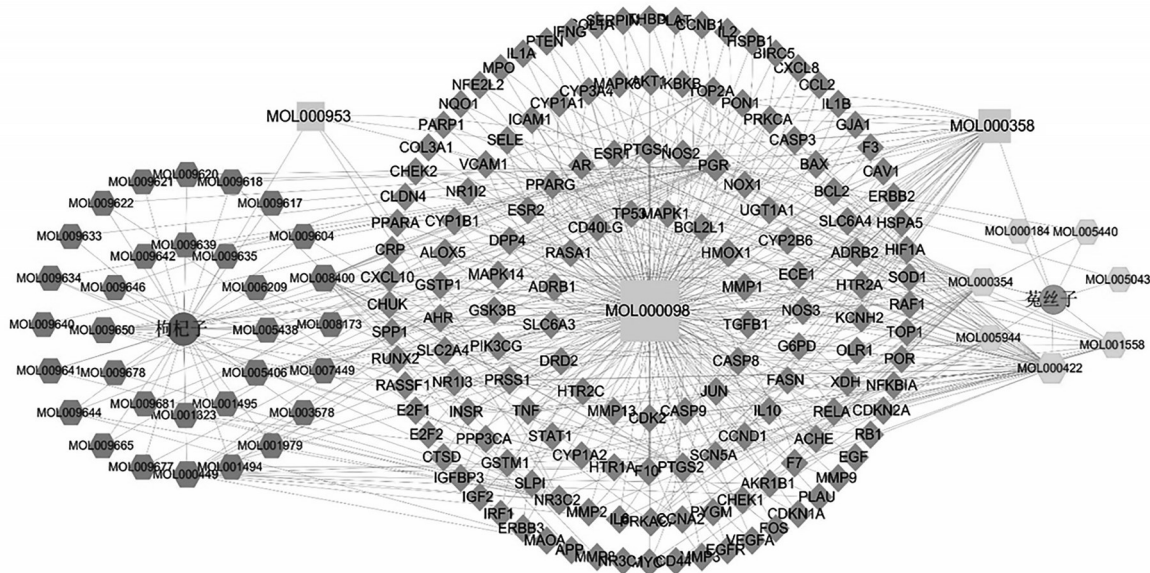
3 讨论

菟丝子-枸杞子药对是中医临床治疗卵巢早衰的常用药对,具有补肾填精、调节肾阴阳平衡的功效,是左归丸、归肾丸、五子衍宗丸的核心药对^[7,9]。现代药理研究

显示,菟丝子的主要药理作用包括增强免疫力、调节内分泌、营养神经、增加冠脉血流量、降血糖、抗氧化和抗衰老等^[10],枸杞子的主要药理作用包括提高免疫力、抗氧化、抗衰老、保护神经、降压、降血糖、抗肿瘤等^[11]。菟丝子-枸杞子配伍的现代研究表明,二者配伍可以治疗卵巢早衰、更年期综合征、不孕不育等疾病^[7]。陈雯玥等^[12]利用中医传承辅助平台对270个治疗卵巢早衰方剂组方药材的用药频次进行分析,结果菟丝子和枸杞子在处方中出现频次分别居3、4位,可见菟丝子和枸杞子在卵巢早衰临床治疗中具有重要意义。目前,菟丝子-枸杞子药对配伍作用于卵巢早衰的药理学研究报道较少,因此本研究对菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的潜在作用机制进行了深入分析。

3.1 菟丝子-枸杞子药对活性成分与靶点分析

本研究共筛选出菟丝子-枸杞子药对潜在活性化合物42个,其中部分化合物已通过研究证实其具有保护卵巢的作用。例如,王永霞等^[13]研究表明,菟丝子总黄酮具有类雌激素样活性,可以改善下丘脑-垂体促性腺功能和卵巢内分泌功能,促进卵泡发育,增加卵巢激素受体的数量,对改善模型大鼠的卵巢早衰有很好的效果。槲皮素能促进各级卵泡生长发育,增加颗粒细胞的雌激素分泌并促进其正常增殖,有效地改善卵巢功能^[14]。 β -谷甾醇具有雌激素样活性,可促进卵巢颗粒细胞产生雌激素,对卵巢早衰致骨代谢失衡具有协同调节作用^[15]。在活性成分-靶点网络的构建中,菟丝子-枸杞子药对活性成分中节点度值较高的化合物有槲皮素、异鼠李素、山柰酚、 β -谷甾醇、芝麻素、黄豆黄素、豆甾醇等,表明这



注:圆形代表药材;六边形代表活性成分;正方形代表药物共有的活性成分;菱形代表预测靶点;节点大小与节点度值成正比

Note: circle represents crude medicine; hexagon represents active component; square represents common active component; diamond represents predicted target; the node size is proportional to the node degree value

图2 菟丝子-枸杞子药对活性成分-潜在靶点网络

Fig 2 Active component-potential target network of couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus

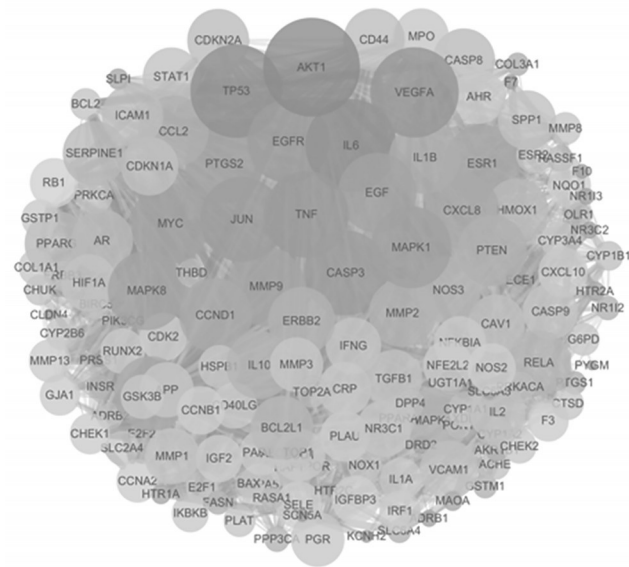


图3 菟丝子-枸杞子药对活性成分与卵巢早衰交集基因的PPI网络

Fig 3 PPI network of intersection genes between active compounds in couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus and premature ovarian failure

表2 交集基因的GO分析结果(分子功能)

Tab 2 GO analysis results of intersection genes (molecular function)

GO编号	GO功能注释(英文名称)	富集基因数	P
0005515	蛋白结合(Protein binding)	124	1.88×10^{-15}
0019899	酶结合(Enzyme binding)	36	5.05×10^{-28}
0042802	相同蛋白结合(Identical protein binding)	36	1.68×10^{-16}
0042803	蛋白质同二聚化活性(Protein homodimerization activity)	31	1.09×10^{-12}
0046982	蛋白质异二聚化活性(Protein heterodimerization activity)	24	1.68×10^{-11}
0003700	转录因子活性,序列特异性脱氧核糖核酸结合(Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding)	24	1.05×10^{-5}
0008134	转录因子结合(Transcription factor binding)	20	6.48×10^{-12}
0019901	蛋白激酶结合(Protein kinase binding)	20	7.92×10^{-10}
0043565	序列特异性脱氧核糖核酸结合(Sequence-specific DNA binding)	19	6.67×10^{-7}
0004672	蛋白激酶活性(Protein kinase activity)	16	6.23×10^{-7}

表3 交集基因的GO分析结果(生物过程)

Tab 3 GO analysis results of intersection genes (biological process)

GO编号	GO功能注释(英文名称)	富集基因数	P
0045944	促进RNA聚合酶II启动子转录(Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)	46	6.75×10^{-21}
0045893	促进DNA转录(Positive regulation of transcription, DNA-templated)	32	1.26×10^{-17}
0042493	药物反应(Response to drug)	30	5.54×10^{-22}
0043066	抑制凋亡过程(Negative regulation of apoptotic process)	28	3.18×10^{-15}
0007165	信号转导(Signal transduction)	28	3.01×10^{-6}
0006954	炎症反应(Inflammatory response)	24	2.79×10^{-13}
0008284	促进细胞增殖(Positive regulation of cell proliferation)	24	1.95×10^{-11}
0006915	凋亡过程(Apoptotic process)	23	5.11×10^{-9}
0010628	促进基因表达(Positive regulation of gene expression)	22	1.45×10^{-14}
0055114	氧化还原过程(Oxidation-reduction process)	21	2.58×10^{-7}

表4 交集基因的GO分析结果(细胞组分)

Tab 4 GO analysis results of intersection genes (cellular component)

GO编号	GO功能注释(英文名称)	富集基因数	P
0005634	细胞核(Nucleus)	68	4.26×10^{-5}
0005737	细胞质(Cytoplasm)	63	3.70×10^{-1}
0005829	细胞质基质(Cytosol)	61	1.64×10^{-10}
0005886	核浆(Plasma membrane)	60	1.75×10^{-6}
0005615	细胞外间隙(Extracellular space)	50	4.68×10^{-30}
0005654	核浆(Nucleoplasm)	49	1.29×10^{-7}
0070062	胞外泌体(Extracellular exosome)	41	1.96×10^{-4}
0005576	胞外区(Extracellular region)	38	4.28×10^{-9}
0005739	线粒体(Mitochondrion)	31	2.64×10^{-7}
0009986	细胞表面(Cell surface)	19	4.30×10^{-7}

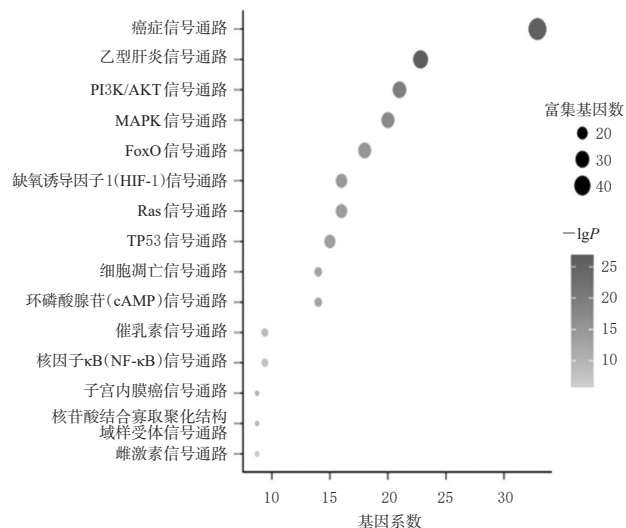
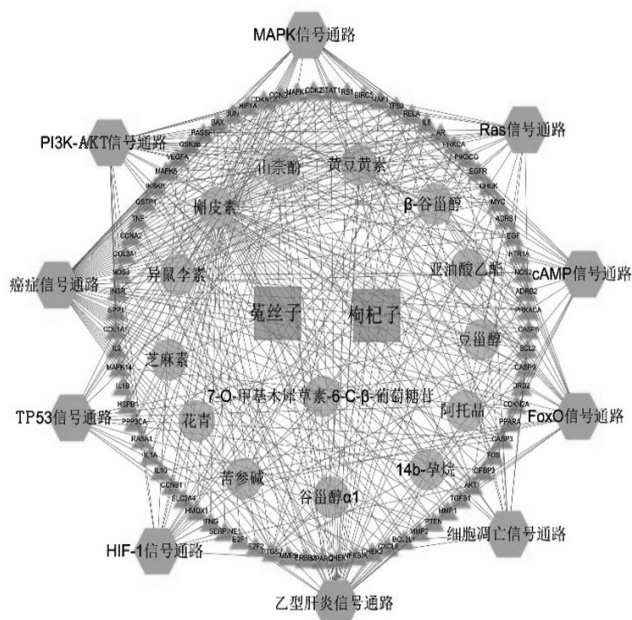


图4 菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰交集基因的KEGG通路富集分析结果(前15条)

Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis results of couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus in the treatment of premature ovarian failure (Top 15)

几种化合物在保护卵巢功能中起着主要的作用,可能是菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的有效成分。但目前对于这几种有效成分的相关作用机制尚不明确,有待进一步深入研究。通过PPI网络的构建可以发现,菟丝子-枸杞子药对可能通过AKT1、TP53、CASP3等关键靶点发挥治疗卵巢早衰的作用,且结合GO富集分析、KEGG通路富集分析以及活性成分-靶点-关键通路网络,发现靶点涉及多种生物过程和信号通路与卵巢早衰的发生发展关系密切。目前已有相关研究发现,AKT1是PI3K/AKT信号通路中重要的下游靶激酶,参与了细胞生长的调控,当AKT1正常表达时,可以维持原始卵泡正常的生长发育,可以调节卵母细胞的生长和颗粒细胞的增殖分化,并可抑制细胞凋亡;当AKT1表达异常时,则会使原始卵泡生长发育失常,导致卵巢发生病理性改变,从而加速卵巢衰老的进程^[16]。TP53也与卵巢颗粒细胞的



注:正方形代表药材;圆形代表活性成分;三角形代表靶点;六边形代表信号通路

Note: square represents crud medicine; circle represents active ingredient; triangle represents target; hexagon represents signal pathway

图5 菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的活性成分-靶点-关键通路网络

Fig 5 Active components-target-key pathway network of couplet medicine of Cuscutae Semen-Lycii Fructus in the treatment of premature ovarian failure

凋亡和增殖密切相关^[17]。CASP3是CASP家族中的一个凋亡效应子,在卵母细胞、颗粒细胞中均有表达,主要参与细胞凋亡过程,当CASP3系统被激活时可触发细胞凋亡,进而加速卵巢早衰^[18]。可见,菟丝子-枸杞子药对可能通过调节以上主要靶点而发挥治疗卵巢早衰的作用。

3.2 菟丝子-枸杞子药对GO生物过程分析

通过GO富集分析发现,菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰涉及多种分子功能、生物过程和细胞组分。生物过程主要涉及促进RNA聚合酶II启动子转录、信号转导、氧化还原过程、炎症反应、促进细胞增殖、凋亡过程等。其中,凋亡过程与卵巢早衰的发生发展密切相关,当卵母细胞DNA受到损伤时,下游信号分子促凋亡基因被激活,可诱发细胞凋亡级联反应,直接或间接使卵巢储备功能下降^[19]。氧化还原过程也在卵巢早衰的发生发展中发挥了重要的作用,某些化疗药物可以使活性氧增加,可能是由PI3K/AKT等信号通路介导产生,活性氧不仅可通过激活卵泡凋亡信号、上调凋亡蛋白和下调抑凋亡蛋白表达、破坏细胞微管结构和染色体排列来降低卵母细胞的质量,加速卵母细胞老化,还可以对线粒体脂质、脱氧核糖核酸和蛋白质造成氧化损伤,当线粒体受损时,可以触发线粒体自噬途径,受损的线粒体向

胞质释放高水平的钙和细胞色素C,最终引起颗粒细胞凋亡或死亡^[20-21]。与卵巢早衰相关的微小RNA(miRNA)的上调与下调对卵巢早衰的形成具有一定的作用^[22],并逐渐成为潜在的治疗靶点。在卵巢中miRNA的广泛表达在卵泡成熟过程中具有重要的作用,已有实验研究发现,西洋参能够通过增加miR-29a和miR-144水平来调节前列腺素的生物合成,以调节排卵、预防卵巢衰老,从而保护卵巢功能^[23]。此外,有研究表明,卵巢早衰患者中IL6等炎症因子水平较高,可通过降低卵巢炎症反应、降低血清中炎症因子水平从而达到改善卵巢功能的目的^[24-25]。以上均表明,菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰可能涉及了多种复杂的生物过程。

3.3 关键通路的相关机制分析

PI3K/AKT信号通路是卵巢早衰的重要通路之一,该通路与多种疾病发生有关,主要参与调节原始卵泡的发育、颗粒细胞的增殖分化、卵母细胞生长等过程,该通路中各信号分子表达异常会导致原始卵泡生长发育受限,阻碍颗粒细胞增殖分化,进而导致卵巢功能下降。FoxO信号通路为PI3K/AKT通路下游众多通路中的一条,相关研究发现,PI3K表达上调并激活AKT时,可以促进FoxO3a磷酸化并丧失转录活性,导致原始卵泡池过度激活,使卵巢原始卵泡和初级卵泡减少、卵巢纤维化、髓质破坏和卵巢萎缩,从而降低卵巢储备^[26]。有研究表明,中药复方新加归肾丸可以通过增强PI3K/AKT信号通路的活性,从而促进卵泡的生长发育和颗粒细胞的增殖,抑制卵泡的过度闭锁,修复卵巢功能^[27]。PI3K/AKT下游的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)对卵泡的调节起重要作用,mTOR活化水平下降则会阻碍卵泡生长发育;此外,过度活化的mTOR也会加速原始卵泡颗粒细胞的分化,过早激活休眠卵母细胞和原始卵泡,导致卵泡池过度耗竭,从而加速卵巢早衰^[28]。进一步验证PI3K/AKT信号通路在卵巢早衰中具有重要意义。MAPK信号通路在卵泡生长、发育、成熟过程中有重要的调节作用^[29]。Ras信号通路参与卵巢颗粒细胞的正常生长和增殖过程,间接影响卵母细胞的成熟,当通路中任一环节发生异常时,可以导致恶性肿瘤的发生^[30]。TP53信号通路也是卵巢早衰发生发展的重要通路之一,TP53的一个同系物TAp63是DNA损伤凋亡通路的关键调控因子,当细胞DNA受损时,TAp63与磷酸化的非受体酪氨酸激酶c-Abl相互作用,激活下游信号分子促凋亡基因,诱发细胞凋亡级联反应,直接或间接使卵巢储备功能下降^[31]。以上结果提示,菟丝子-枸杞子药对可能通过调节上述代谢通路进而改善卵泡的生长发育、颗粒细胞的增殖分化和卵母细胞的生长过程,发挥治疗卵巢早衰的作用。

4 结语

本研究通过检索共获得菟丝子-枸杞子药对的活性成分42个,活性成分治疗卵巢早衰的潜在作用靶点有149个。活性成分-靶点网络直观体现了该药对通过多成分、多靶点治疗卵巢早衰的特点;同时,靶点PPI网络反映出该药对治疗卵巢早衰相关的各靶点之间联系紧密;通过GO富集分析和KEGG通路富集分析发现,菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰涉及多种细胞生物过程和信号通路。以上均表明菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的作用机制较为复杂,涉及多个活性成分、作用靶点及生物通路。本研究对药物治疗作用的潜在分子机制进行了初步探讨,为进一步实验研究奠定了基础。但考虑到两味中药组合一起在煎煮时可能会发生复杂的化学反应,本研究忽略了菟丝子-枸杞子药对煎煮后的化学成分及药材中各成分的含量,故具有一定的局限性,其具体作用机制还需后续实验研究加以验证。同时,除现有相关研究报道的活性成分外,本研究还发现了菟丝子-枸杞子药对治疗卵巢早衰的其他潜在活性成分(芝麻素、豆甾醇等)以及靶点(IL6、TNF等),为卵巢疾病后续治疗及新药研发提供了参考。

参考文献

[1] GOWRI V, AL SHUKRI M, AL-FARSI FA, et al. Aetiological profile of women presenting with premature ovarian failure to a single tertiary care center in Oman[J]. *Post Reprod Health*, 2015, 21(2): 63-68.

[2] LAML T, SCHULZ-LOBMEYER I, OBRUCA A, et al. Premature ovarian failure: etiology and prospects[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2000, 14(4): 292-302.

[3] 王松露, 任锦锦, 朱玲, 等. 卵巢早衰的中西医治疗概况[J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(1): 134-137.

[4] 朱玲, 罗颂平. 卵巢早衰病因病机再认识[J]. *新中医*, 2015, 47(4): 327-329.

[5] HOPKINS AL. Network pharmacology[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1110-1111.

[6] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.

[7] 沈劫, 王旭东, 李新霞, 等. 卵巢早衰古今用药规律探析[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2016, 14(21): 42-45.

[8] 但文超, 何庆勇, 曲艺, 等. 基于网络药理学的积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.

[9] 邵建柱, 郭杏林, 张婧, 等. 菟丝子临床应用及其用量[J]. *吉林中医药*, 2019, 39(1): 36-39.

[10] 王焕江, 赵金娟, 刘金贤, 等. 菟丝子的药理作用及其开发前景[J]. *中医药学报*, 2012, 40(6): 123-125.

[11] 赵明宇. 枸杞子的药理作用及临床应用研究[J]. *北方药学*, 2018, 15(4): 156.

[12] 陈雯玥, 任青玲, 洪丹丹, 等. 基于中医传承辅助平台分析

中医药治疗卵巢早衰的用药规律[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(9): 1251-1254.

[13] 王永霞, 马娜, 钟兴明, 等. 菟丝子总黄酮对卵巢早衰大鼠卵巢功能的作用研究[J]. *医学综述*, 2019, 25(13): 2695-2699.

[14] 黄长盛, 贺守第, 管雁丞, 等. 菟丝子黄酮和槲皮素对雷公藤多苷致卵巢早衰大鼠卵巢功能的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(6): 667-670.

[15] 曾莉萍, 徐贤柱, 饶华, 等. 杜仲叶 β -谷甾醇对成骨细胞和卵巢颗粒细胞的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(5): 1051-1053.

[16] 杨静, 梁嘉丽, 秦佳佳. PI3K/Akt信号通路与卵巢早衰相关性的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(2): 156-158.

[17] SIROTKIN AV, PETRAK J, ALWASEL S, et al. Apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) and transcription factor tumor suppressor protein TP53 suppress rabbit ovarian granulosa cell functions[J]. *Anim Reprod Sci*, 2019. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.03.018.

[18] 徐丁洁, 徐洪, 张碧澈, 等. 金匱温经汤对围绝经期大鼠卵巢凋亡因子Caspase3、Caspase9、Apaf-1蛋白表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(10): 2502-2504.

[19] QUYNH-NHU N, NADEEN Z, LIEW SH, et al. Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-damaging chemotherapy and preserves fertility[J]. *Cell Death Dis*, 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0633-7.

[20] ASHRAFI G, SCHWARZ TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42.

[21] BRAYBOY LM, CLARK H, KNAPIK LO, et al. Nitrogen mustard exposure perturbs oocyte mitochondrial physiology and alters reproductive outcomes[J]. *Reprod Toxicol*, 2018. DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.10.002.

[22] KUANG H, HAN D, XIE J, et al. Profiling of differentially expressed microRNAs in premature ovarian failure in an animal model[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30(1): 57-61.

[23] ZHU L, LI J, XING NN, et al. American ginseng regulates gene expression to protect against premature ovarian failure in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2015. DOI: 10.1155/2015/767124.

[24] 张彩荣, 邓吉立, 朱维娜, 等. PI3K/Akt/mTOR信号通路介导艾灸改善大鼠卵巢早衰的研究[J]. *针刺研究*, 2018, 43(2): 75-79.

[25] 刁瑞英, 蔡学泳, 甘辉梅, 等. 坤泰胶囊对卵巢早衰患者血清炎症指标、相关激素及血脂水平的影响[J]. *中国计划生育学杂志*, 2019, 27(3): 308-311.

[26] KIM SY, CHO GJ, DAVIS JS. Consequences of chemotherapeutic agents on primordial follicles and future clinical applications[J]. *Obstet Gynecol Sci*, 2019. DOI:

郁金4种基源饮片的止痛作用及其水提物中莪术烯醇含量的比较研究[△]

石典花*, 苏本正, 张 军#, 戴衍朋(山东省中医药研究院, 济南 250014)

中图分类号 R285;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)18-2209-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.18.06

摘要 目的:研究郁金药材4种基源饮片[温郁金、广西莪术(桂郁金)、蓬莪术(绿丝郁金)、姜黄(黄丝郁金)]的止痛作用,比较其水提物中莪术烯醇含量。方法:以阿司匹林为阳性对照药物,使用醋酸扭体法考察郁金4种基源饮片水提液对小鼠扭体潜伏期和扭体次数的影响。按照2015年版《中国药典》(四部)中的“烘干法”测定郁金4种基源饮片(每种基源10批,下同)的水分得率。使用热浸法考察郁金4种基源饮片水提物得率,采用高效液相色谱法测定其水提物中莪术烯醇含量;并进行比较。结果:与模型组比较,阿司匹林和郁金4种基源饮片水提液均能显著延长模型小鼠的扭体潜伏期,温郁金水提液和绿丝郁金水提液还能显著减少模型小鼠的扭体次数($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。温郁金、桂郁金、绿丝郁金、黄丝郁金的水分含量分别为7.39%~8.80%、7.88%~9.88%、7.66%~9.86%、7.68%~10.20%,水提物平均得率分别为46.30%、60.40%、38.65%、42.99%,水提物中莪术烯醇平均含量分别为0.271、0.066、0.310、0.058 mg/g。除个别批次外,郁金同种基源饮片的水提物得率越高,莪术烯醇含量也越高。结论:郁金4种基源饮片均有止痛作用,温郁金与绿丝郁金中莪术烯醇含量相近,桂郁金和黄丝郁金中莪术烯醇含量约为绿丝郁金、温郁金的1/5。

关键词 郁金饮片;不同基源;止痛作用;莪术烯醇;含量比较

Study on Analgesic Effect of 4 Sources of Curcumae Radix Decoction Pieces and Comparison of Curcuminol Content in Its Water Extracts

SHI Dianhua, SU Benzeng, ZHANG Jun, DAI Yanpeng(Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the analgesic effects of 4 sources of Curcumae Radix decoction pieces (*Curcuma wenyujin*, *C. kwangsiensis*, *C. phaeocaulis* and *C. longa*), and compare the contents of curcumenol in their water extracts. METHODS: Using aspirin as positive control, acetic acid writhing method was used to investigate the effects of 4 sources of Curcumae Radix decoction pieces water extract on writhing latency and times of writhing in mice. The moisture contents of 4 sources of Curcumae Radix decoction pieces (10 batches of each source, the same below) were determined according to the drying method in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV). The yield of water extract in 4 sources of Curcumae Radix decoction pieces were investigated by hot dipping method, the contents of curcumenol in water extract of 4 sources of Curcumae Radix decoction pieces were determined by HPLC, and comparison was conducted. RESULTS: Compared with model group, aspirin and water extracts of 4 sources of Curcumae Radix decoction pieces could significantly prolong the writhing latency of model mice, and the water extracts of *C. wenyujin* and *C. phaeocaulis* could significantly reduce the writhing times of model mice ($P<0.05$ or $P<0.01$). For *C. wenyujin*, *C. kwangsiensis*, *C. phaeocaulis* and *C. longa*, the contents of moisture were 7.39%-8.80%, 7.88%-9.88%, 7.66%-

10.5468/ogs.2019.62.6.382.

[27] 李雅文.新加归肾丸对雷公藤多苷致卵泡发育障碍模型大鼠卵巢组织 FoxO3a、HIF-1 α 、IGF-1R 调控机制的研究[D].成都:成都中医药大学,2016.

[△]基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81503255);国家中医药管理局全国中药特色技术传承人培训项目(No.国中医药人教函[2019]43号);国家中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目;山东省中医药科技发展计划项目(No.2013-115, No.2015-173, No.2017-130);山东省职业教育技艺技能传承创新平台建设计划

*副研究员,博士。研究方向:中药炮制。E-mail:shidianhua81@163.com

#通信作者:副研究员。研究方向:中药炮制。电话:0531-82949800。E-mail:sdzyybg@sina.com

[28] 姜凤丽,王晓滨,宗婧,等. PI3K-Akt/mTOR 信号通路对卵巢早衰相关性研究进展[J].黑龙江科学,2019,10(2):50-51.

[29] 陈龙,王曼,刘利平. MiR-184通过MAPK信号通路促进多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞的增殖[J].临床与病理杂志,2019,39(1):1-8.

[30] 王天琪,何秀萍. Ras-MAPK-MMP信号通路在卵巢癌研究中的进展[J].中国妇幼保健,2018,33(24):6070-6073.

[31] 张晨曦. MDM2-p53信号通路在卵泡的存活和发育过程中的作用研究[D].南京:南京大学,2016.

(收稿日期:2020-06-08 修回日期:2020-08-02)

(编辑:邹丽娟)