

基于网络药理学和分子对接探讨褪黑素治疗多囊卵巢综合征的作用机制

郁悦, 陈彤, 刘新敏*

中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘要: **目的** 基于网络药理学方法和分子对接技术探讨褪黑素治疗多囊卵巢综合征的作用机制。 **方法** 使用 PubChem、Swiss Target Prediction、Pharm Mapper、DrugBank、TCMSP 数据库筛选褪黑素作用靶点, GeneCards、OMIM、DisGeNET 检索多囊卵巢综合征相关靶点, 使用韦恩图工具取交集, 获得褪黑素与多囊卵巢综合征的共同靶点。构建靶点蛋白互相作用 (PPI) 网络, 并筛选核心靶点, 并进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 使用 Cytoscape 3.7.1 构建褪黑素治疗多囊卵巢综合征的“靶点-信号通路”网络图。选择主要靶标与褪黑素进行分子对接评价结合性。 **结果** 褪黑素中 109 个有效靶点作用于多囊卵巢综合征, 关键核心靶点为 SRC、PIK3R1、PIK3CA、EGFR、HRAS、RHOA、ERBB2、IGF1、MET、JAK2。富集的 GO 生物过程主要包括腺体发育、磷脂酰肌醇介导信号素、蛋白激酶 B 信号传导等, 富集的 KEGG 通路主要包括黏着斑、胰岛素信号通路、趋化因子信号通路、孕酮-介导卵母细胞成熟等。分子对接结果显示, 褪黑素与核心靶点 PIK3R1、PIK3CA、EGFR、HRAS、RHOA、ERBB2、MET、JAK2 结合较好。 **结论** 褪黑素可能通过抗凋亡、调节代谢、抑制炎症反应、抗氧化应激等作用改善多囊卵巢综合征。

关键词: 褪黑素; 多囊卵巢综合征; 网络药理学; 分子对接; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶受体 2

中图分类号: R984 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)10-2197-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.10.005

Mechanism of melatonin in treatment of polycystic ovary syndrome based on network pharmacology and molecular docking

YU Yue, CHEN Tong, LIU Xin-min

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of melatonin in treatment of polycystic ovary syndrome based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** PubChem, Swiss Target Prediction, Pharm Mapper, DrugBank, TCMSP were used to screen melatonin targets. GeneCards, OMIM, DisGeNET databases were used to obtain polycystic ovary syndrome related targets. The Venn diagram tool was used to obtain the common target of melatonin and polycystic ovary syndrome. The target protein interaction (PPI) network was constructed, and the core targets were screened, and the gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were performed. Cytoscape 3.7.1 was used to construct the “target-signaling pathway” network map of melatonin treatment in polycystic ovary syndrome. The main target and melatonin were selected for molecular docking evaluation. **Results** 109 Effective targets of melatonin act on polycystic ovary syndrome, and the key core targets are SRC, PIK3R1, PIK3CA, EGFR, HRAS, RHOA, ERBB2, IGF1, MET, and JAK2. The enriched GO biological processes mainly included gland development, phosphatidylinositol mediated signaling hormone, protein kinase B signaling, etc. The enriched KEGG pathways mainly included adhesion plaque, insulin signaling pathway, chemokine signaling pathway, progesterone-mediated oocyte maturation, etc. Molecular docking results showed that melatonin binds well to the core targets PIK3R1, PIK3CA, EGFR, HRAS, RHOA, ERBB2, MET, and JAK2. **Conclusion** Melatonin may improve polycystic ovary syndrome by anti-apoptosis, regulating metabolism, inhibiting inflammation and anti-oxidative stress.

Key words: melatonin; polycystic ovary syndrome; network pharmacology; molecular docking; EGFR; ERBB2

收稿日期: 2022-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81674011); 中国中医科学院科技创新工程 (CI2021A02404)

作者简介: 郁悦, 女, 博士研究生, 研究方向为中医药治疗多囊卵巢综合征的基础与临床研究。E-mail: yuyuemg@126.com

*通信作者: 刘新敏, 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为多囊卵巢综合征的基础与临床研究。E-mail: beijingliuxm@163.com

多囊卵巢综合征为育龄期女性最为常见的生殖内分泌疾病，全球发病率为 10%~15%^[1]，持续性无排卵、高雄激素血症、胰岛素抵抗为该疾病的主要特征。性激素类药物及胰岛素增敏剂等对症治疗的合理应用可有效改善患者生殖功能，平衡糖脂代谢水平，预防子宫内膜癌、2 型糖尿病、心血管疾病等远期并发症的发生^[2-4]。但多囊卵巢综合征的异质性使针对病因的治疗作用局限，因此，积极寻求针对多囊卵巢综合征病理机制的辅助药物具有重要意义。

褪黑素是松果体由色氨酸合成的神经激素，是一种广谱抗氧化剂，具有调整昼夜节律、清除自由基、抗血管生成、抗炎和调节免疫功能的作用^[5-7]。褪黑素通过其在下丘脑、垂体和卵巢中的受体影响女性生殖内分泌系统^[8]，在排卵过程中卵泡会产生活性氧，女性卵泡液中的褪黑素浓度随卵泡成熟而升高，推测褪黑素可能通过抗氧化应激来促进卵泡成熟^[9]。多囊卵巢综合征患者卵泡液中褪黑素水平明显低于健康女性^[10]，已有临床研究表明外源补充褪黑素可促进多囊卵巢综合征患者卵母细胞发育，提高患者辅助生殖的化学妊娠率^[11-12]，增强血浆抗氧化能力，改善机体炎性状态，并能降低雄激素、胰岛素与胆固醇水平，调整月经周期，有效调节多囊卵巢综合征患者的代谢与生殖功能^[13-16]。但褪黑素作用于多囊卵巢综合征的药理机制及生物学过程尚不明确。网络药理学可系统整体展示药物活性成分与疾病靶点间的复杂作用^[17]，本文基于网络药理学的方法探讨褪黑素对多囊卵巢综合征的作用靶点及治疗机制，旨在为进一步的药物研发及临床应用提供依据。

1 方法

1.1 褪黑素相关靶点筛选

使用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[18]，以“melatonin”为关键词，获取褪黑素的 Canonical SMILES 信息和 3D 结构；将褪黑素的 SMILES 上传到 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库^[19]，选择物种为“Homo sapiens”，将褪黑素的 3D 结构上传到 Pharm Mapper 网站 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)^[20]，目标集选“Human Protein Targets Only (v2010, 2241)”，同时检索 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)^[21]和 TCMSP (<https://tcmssp.com/tcmssp.php>)^[22]数据库，在 TCMSP 数据

库中检索类别选择“Chemical name”。将得到的靶点信息汇总后使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶点名称进行规范，校正为官方名称。校正后使用 Excel 表格去重，得到褪黑素的作用靶点。

1.2 多囊卵巢综合征相关靶点筛选

多囊卵巢综合征相关靶点筛选以“polycystic ovary syndrome”为关键词，在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)^[23]中进行筛选，选择物种为“Homo sapiens”，为提高结果的可信度，在 DisGeNET 中设置基因-疾病关联评分 (GDA) ≥ 0.3 ，GeneCards 中设置相关性评分阈值为 10 筛选多囊卵巢综合征相关靶点，整合汇总后去重获得疾病相关靶点。

1.3 靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络构建

将褪黑素与多囊卵巢综合征的靶点使用维恩图工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 取交集，获得褪黑素与多囊卵巢综合征的共同靶点。将共同靶点上传至 String 11.5 平台 (<https://string-db.org/>)^[24]，选择物种为“Homo sapiens”，设定置信度大于 0.9，为高置信度。隐藏网络中断开连接的节点，获得靶点 PPI 网络。网络中的节点 (nodes) 代表靶蛋白，边 (edges) 代表靶蛋白与靶蛋白之间存在相互作用。度 (degree) 值为网络图中节点的连接数量，degree 值越高该节点在网络中越重要。将 PPI 网络导出为 tsv 格式文件，导入 Cytoscape 3.7.1 软件 (<https://cytoscape.org/>) 使用 Cytohubba 插件根据度值使用 MCC 算法筛选核心靶点。

1.4 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

使用 R 语言软件及 Bioconductor 插件^[25]进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析，导入交集靶点，使用 Cluster Profiler 等处理数据，以 $P < 0.05$ 为标准^[26]。

1.5 分子对接模拟

将褪黑素与 PPI 网络中 degree 值排名最高的 10 个靶点进行分子对接，以验证其与核心靶点的结合强度。使用 RCSB 蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 获取蛋白质受体的晶体结构，使用 PyMol 2.4.0 预处理下载的蛋白质结构，去除原始配体、溶剂分子、多余的蛋白质链并添加极性氢。使用

AutoDock Tools 1.5.6 计算 Gasteiger 并根据天然配体确定对接框的中心和大小^[27]。使用 MMFF94s 力场通过极性氢化和能量最小化处理 MT 的 3D 结构。用 AutoDock Tools 1.5.6 将所有蛋白质和褪黑素的结构转换为 PDBqt 格式, 使用 AutoDock Vina 通过分子对接评估褪黑素与中枢靶点的结合^[28]。计算出的结合亲和力, 并使用 PyMol 2.4.0 软件可视化对接结果。

2 结果

2.1 褪黑素、多囊卵巢综合征靶点的获取

褪黑素靶点合并去重后共获得 377 个作用靶点, 将从 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库中获得的多囊卵巢综合征相关靶点合并去重后得到 1 870 个靶点。

2.2 褪黑素治疗多囊卵巢综合征的 PPI 网络

将褪黑素作用靶点与多囊卵巢综合征相关靶点使用维恩图工具求交集, 获得共同靶点 109 个, 见图 1。将褪黑素治疗多囊卵巢综合征的 109 个交集靶蛋白导入 String 11.5 数据库得到 PPI 网络图, 见图 2。该 PPI 网络共有 108 个节点, 314 条边, 平均节点度 5.81。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 使用 Cytohubba 插件进行网络拓扑分析, 节点颜色越深度值越高, 即与更多的节点发生相互作用, 见图 3。结果显示, 褪黑素治疗多囊卵巢综合征度值排名前 10 的靶点依次为 SRC、PIK3R1、PIK3CA、EGFR、HRAS、RHOA、ERBB2、IGF1、MET、JAK2。

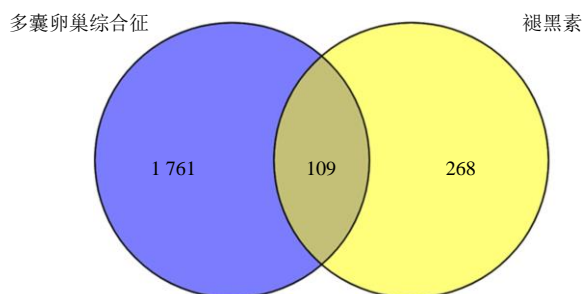


图 1 褪黑素作用靶点与多囊卵巢综合征交集基因韦恩图
Fig. 1 Venn diagram of intersection genes between the targets of melatonin and polycystic ovary syndrome

2.3 GO 和 KEGG 通路富集分析

使用 R 语言的 ClusterProfiler 包对 109 个目标靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, GO 富集分析包括细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological

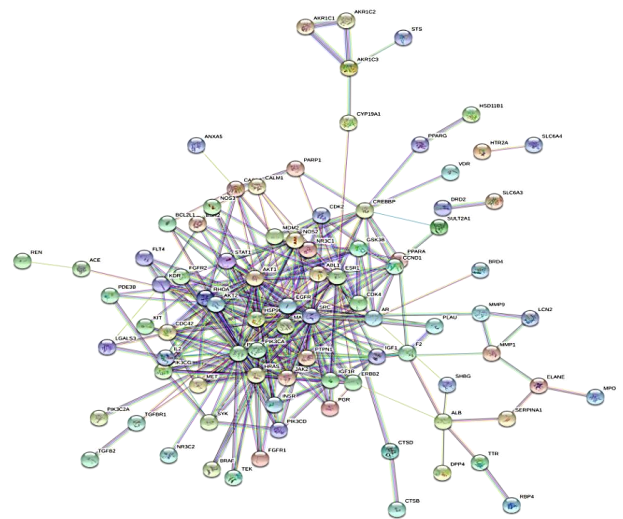


图 2 褪黑素治疗多囊卵巢综合征的靶点 PPI 网络
Fig. 2 PPI network of the targets of melatonin in treatment of polycystic ovary syndrome

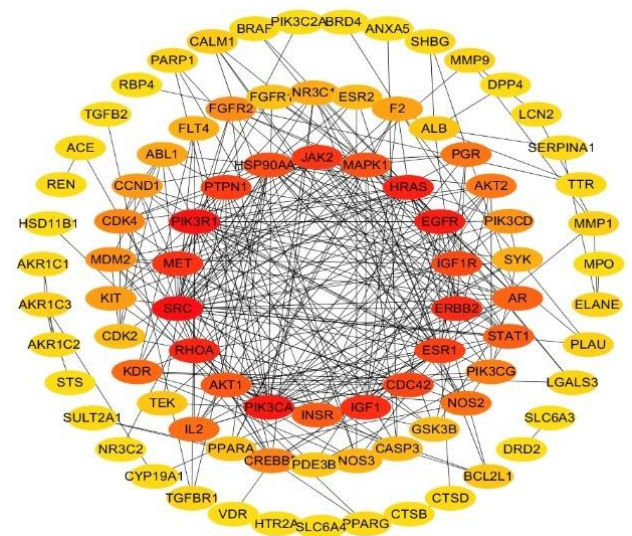


图 3 褪黑素治疗多囊卵巢综合征靶点拓扑分析
Fig. 3 Topological analyses of the targets of melatonin in treatment of polycystic ovary syndrome

process, BP) 3 个部分。根据靶点计数, 选择每个部分显著富集的前 10 项, 使用 R 软件包的 ggplot2 将结果进行可视化, 见图 4。富集的 GO 功能主要包括腺体发育、磷脂酰肌醇介导信号素、蛋白激酶 B 信号传导等。KEGG 通路富集分析, 将筛选后的前 20 条富集信息制成气泡图, 见图 5。进一步使用 Cytoscape 3.7.1 构建了“关键靶点 - 信号通路”网络, 见图 6。富集的主要 KEGG 通路包括黏着斑、胰岛素信号通路、趋化因子信号通路、孕酮 - 介导卵母细胞成熟、ErbB 信号通路、神经营养素信号通路、血管内皮生长因子信号通路等, 见表 1。

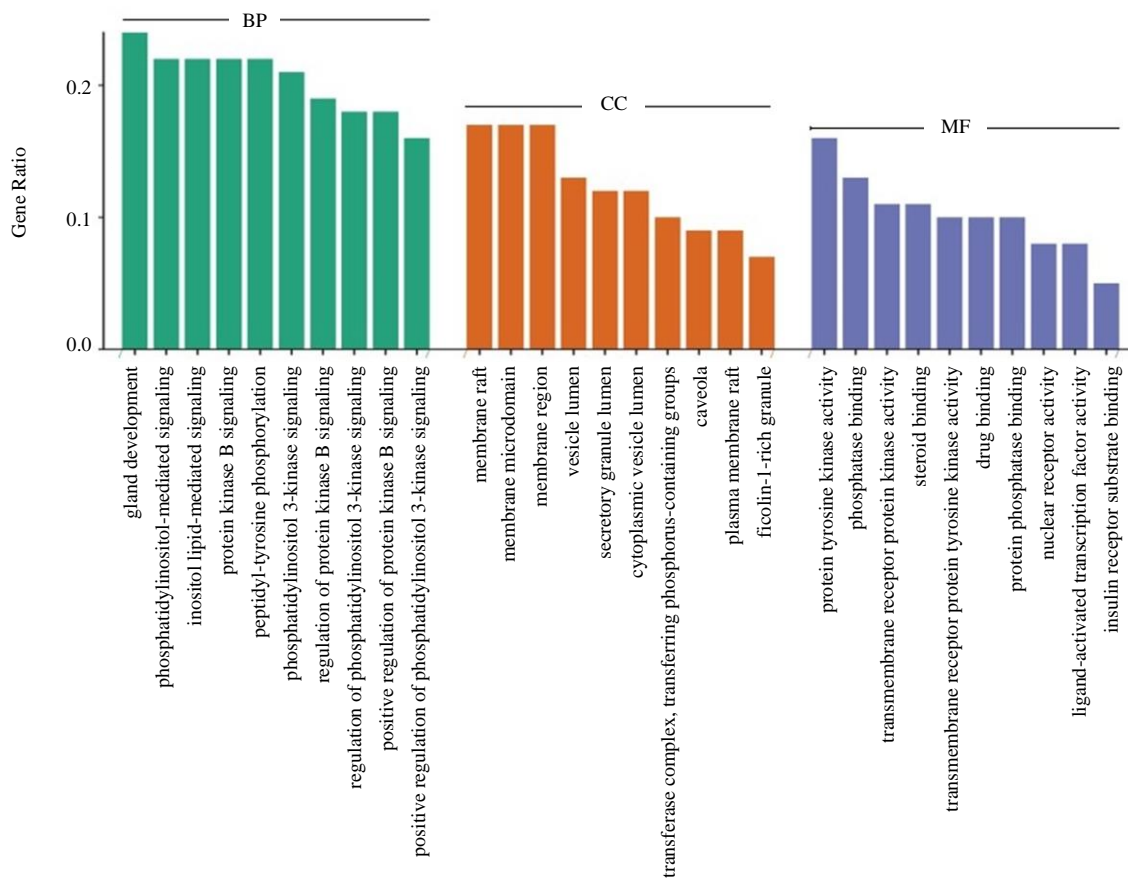


图 4 GO 富集分析 (前 10 项)
Fig. 4 GO enrichment (Top 10)

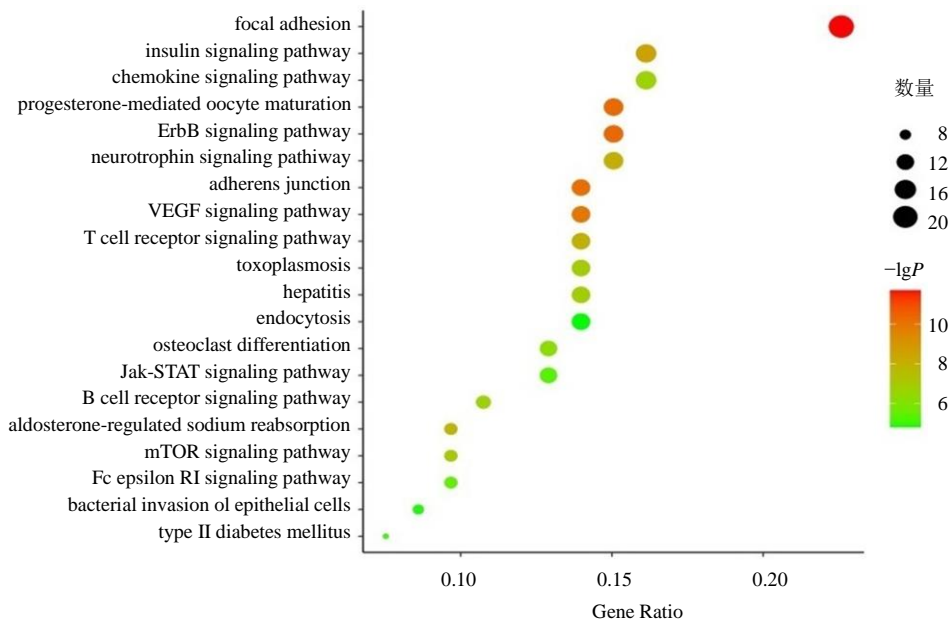


图 5 KEGG 途径富集气泡图
Fig. 5 Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis

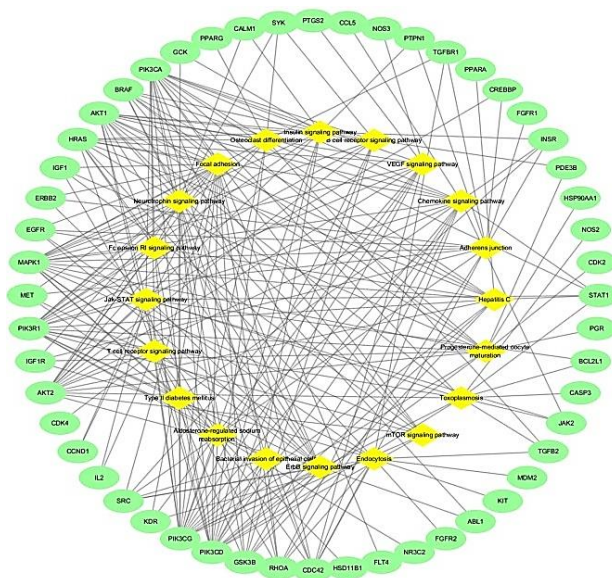


图 6 褪黑素治疗多囊卵巢综合征的“靶点 - 信号通路”网络图

Fig. 6 Target-signaling pathway network diagram of melatonin in treatment of polycystic ovary syndrome

表 1 褪黑素治疗多囊卵巢综合征的主要富集通路
Table 1 KEGG enrichment pathway of melatonin in treatment of polycystic ovary syndrome

| 编号 | 通路 | P 值 | 数量 |
|----------|---|------------------------|----|
| hsa04510 | focal adhesion | 2.13×10^{-12} | 21 |
| hsa04910 | insulin signaling pathway | 2.67×10^{-9} | 15 |
| hsa04062 | chemokine signaling pathway | 1.95×10^{-7} | 15 |
| hsa04914 | progesterone-mediated oocyte maturation | 4.62×10^{-11} | 14 |
| hsa04012 | ErbB signaling pathway | 4.62×10^{-11} | 14 |
| hsa04722 | neurotrophin signaling pathway | 7.94×10^{-9} | 14 |
| hsa04520 | adherens junction | 6.35×10^{-11} | 13 |
| hsa04370 | VEGF signaling pathway | 1.08×10^{-10} | 13 |
| hsa04660 | T cell receptor signaling pathway | 9.68×10^{-9} | 13 |
| hsa05145 | toxoplasmosis | 1.22×10^{-7} | 13 |
| hsa05160 | hepatitis C | 1.46×10^{-7} | 13 |
| hsa04144 | endocytosis | 1.49×10^{-5} | 13 |
| hsa04380 | osteoclast differentiation | 6.14×10^{-7} | 12 |
| hsa04630 | Jak-STAT signaling pathway | 4.73×10^{-6} | 12 |
| hsa04662 | B cell receptor signaling pathway | 2.09×10^{-7} | 10 |
| hsa04960 | aldosterone-regulated sodium reabsorption | 1.19×10^{-8} | 9 |
| hsa04150 | mTOR signaling pathway | 8.63×10^{-8} | 9 |
| hsa04664 | Fc epsilon RI signaling pathway | 3.40×10^{-6} | 9 |
| hsa05100 | bacterial invasion of epithelial cells | 1.34×10^{-5} | 8 |
| hsa04930 | type II Diabetes mellitus | 8.43×10^{-6} | 7 |

2.4 分子对接

选择 10 个核心靶点与褪黑素进行分子对接。本研究设定结合自由能小于 -5.0 kcal/mol ($1 \text{ J} = 4.4$

kcal) 代表结合具有显著性, 以此佐证活性成分与核心靶点之间作用关系的可信度, 将对接结果进行可视化展示, 见图 7。

如表 2 所示, 除 IGF1、SRC 外, 其余靶标与褪黑素的亲和力均低于 -5.0 kcal/mol, 表明褪黑素与多囊卵巢综合征潜在靶点有较好的亲和力。

3 讨论

根据本研究结果发现 SRC、PIK3R1、PIK3CA、EGFR、HRAS、RHOA、ERBB2、IGF1、MET、JAK2 在褪黑素改善多囊卵巢综合征方面发挥着重要的作用。其中 PIK3R1、PIK3CA、EGFR、HRAS、RHOA、ERBB2、MET、JAK2 基因和褪黑素的分子对接表现出高亲和力, 表明这 8 个基因与褪黑素对多囊卵巢综合征的治疗作用高度相关。

PIK3R1、PIK3CA 与磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 家族相关, PI3K 依据结构特征分为 I、II 和 III 3 类^[29]。I 类进一步分为 IA 和 IB 亚组, IA 类 PI3K 由 p110 催化亚基和 p85 调节亚基的异二聚体组成^[30]。在哺乳动物中, p85 由 PI3K 调节亚基 PIK3R1、PIK3R2 和 PIK3R3 编码, p110 由 PI3K 催化亚基 PIK3CA、PIK3CB 和 PIK3CD 编码^[31]。蛋白激酶 B (Akt) 是 PI3K 信号传导中重要的下游效应器, 可抑制细胞凋亡、刺激依赖性细胞生长和调节细胞代谢^[32], PI3K-Akt 信号通路在调节多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗、脂肪细胞分化和卵泡生长机制中起着非常重要的作用^[33], 已有研究表明褪黑素可通过 PI3K-Akt 通路改善多囊卵巢综合征大鼠模型的排卵障碍^[34]。

EGFR 属酪氨酸激酶型受体, 参与胚胎植入与蜕膜等重要生殖过程^[35], 其影响卵巢颗粒细胞的增殖和凋亡^[36], 诱导卵母细胞的分裂与成熟^[37]。与非多囊卵巢综合征患者的卵母细胞相比, 多囊卵巢综合征患者卵母细胞中的 EGFR 在发育的 GV 阶段显著下调, 进而导致更多未成熟卵泡的产生^[38]。有研究发现, 褪黑素可以上调 EGFR 的表达水平, 有效促进体外卵母细胞的成熟^[39]。

RHOA 是 GTP 酶 Rho 族的成员^[40], RHOA 参与调节胰岛素分泌^[41], 其通过胰岛素受体底物 1 的丝氨酸磷酸化造成胰岛素信号受损^[42], 可能与多囊卵巢综合征患者的胰岛素抵抗相关。Fbx17 通过泛素化降解 RHOA, 增强胰岛素信号通路, 而褪黑素能上调小鼠肝脏中因辅助生殖而降低的 Fbx17 表达, 改善辅助生殖小鼠后代的葡萄糖代谢受损^[43]。

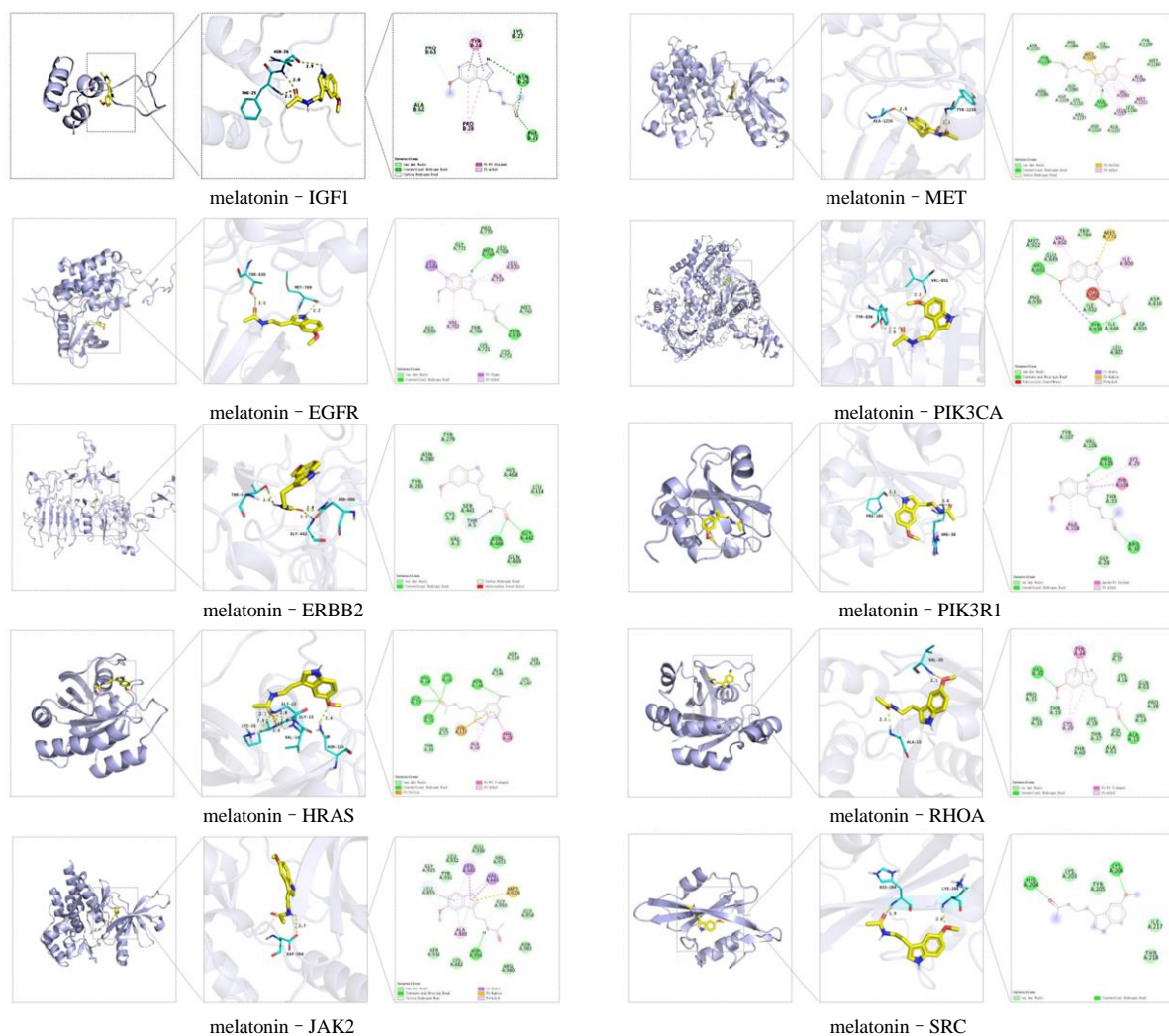


图 7 10 个核心靶点与褪黑素的分子对接

Fig. 7 Molecular docking of 10 core targets with melatonin

表 2 褪黑素与核心靶点的结合能

Table 2 Binding energy between melatonin and core target

| 配体 | 受体 | 结合能/(kcal·mol ⁻¹) |
|-----|--------|-------------------------------|
| 褪黑素 | IGF1 | -4.9 |
| | EGFR | -6.8 |
| | ERBB2 | -6.5 |
| | HRAS | -7.0 |
| | JAK2 | -7.7 |
| | MET | -7.0 |
| | PIK3CA | -6.7 |
| | PIK3R1 | -6.1 |
| | RHOA | -6.8 |
| | SRC | -4.5 |

细胞自噬在多囊卵巢综合征相关代谢紊乱的发病机制中有潜在作用，在患多囊卵巢综合征的患者和大鼠卵巢组织中的自噬增强。相关基因 ERBB2、EGFR 可能高度参与多囊卵巢综合征中

自噬相关的细胞过程^[44]，研究表明褪黑素可以通过减少自噬延缓卵巢衰老^[45]。

MET 也称 MNNG HOS 转化基因，是编码肝细胞生长因子 (HGF) 受体酪氨酸激酶 c-MET 的原癌基因^[46]。HGF/c-MET 信号参与调节包括卵泡膜生长及颗粒细胞凋亡等卵泡发育的各重要阶段^[47]，1 项对包括 21 名接受辅助生殖治疗的多囊卵巢综合征患者的研究表明，HGF/c-MET 信号通路的传导可能是受精成功的关键因素^[48]，褪黑素可以上调 HGF/c-MET 系统而抑制动脉粥样硬化兔子的巨噬细胞的浸润^[49]。

JAK2 属非受体型酪氨酸蛋白激酶家族，JAK2/STAT3 信号通路是参与瘦素细胞内信号转导的主要调控通路，多囊卵巢综合征患者血清瘦素的水平显著高于排卵周期正常的健康女性^[50]，多囊卵

巢综合征大鼠血清 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平显著增加^[51], 研究证明褪黑素可以通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路而减少氧化应激损伤, 保护内皮细胞^[52]。

HRAS 属于 RAS 基因家族, 是 RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK 通路的上游调控因子, 在多囊卵巢综合征患者中, 血清 HRAS 表达与患者体质量指数、空腹血糖、空腹胰岛素等代谢特征相关^[53], 目前尚未有褪黑素直接通过 HRAS 靶点改善多囊卵巢综合征的报道, 但基于研究结果, 推测褪黑素可以通过其治疗多囊卵巢综合征中发挥有益作用。

GO 富集分析结果表明, 褪黑素治疗多囊卵巢综合征的靶点富集最显著的生物学过程是腺体发育、磷脂酰肌醇介导信号素、蛋白激酶 B 信号传导等, KEGG 通路主要富集于黏着斑、胰岛素信号通路和趋化因子信号通路。黏着斑与细胞基底层紧密连接以促进细胞与外界环境的联系, 有研究表明褪黑素水平的升高可以触发黏着斑局部黏附, 促进颗粒细胞的黄体化, 导致胚胎植入增强^[54]。胰岛素信号通路缺陷与多囊卵巢综合征患者的胰岛素抵抗、高雄激素血症和无排卵高度相关^[55-57], 治疗药物二甲双胍可调节胰岛素信号通路中传导蛋白质的表达从而改善多囊卵巢综合征相关症状^[58], 褪黑素可触发胰岛素受体及其细胞内底物的磷酸化而动员胰岛素信号传导途径^[59]。趋化因子有管理白细胞群迁移的特性, 白细胞或在排卵、黄体化和黄体溶解中发挥重要作用, 治疗药物二甲双胍即可通过 AMPK 依赖性途径减少趋化因子介导的炎症反应, 从而促进颗粒细胞功能^[60]。动物实验发现, 褪黑素可通过抑制内皮趋化因子和黏附因子从而减少小鼠肺中巨噬细胞的数量^[61], 作用于以上通路可能为其治疗多囊卵巢综合征的内在机制。

综上所述, 以上结果探讨了褪黑素治疗多囊卵巢综合征的分子机制, 展示出其以多环节、多靶点、多途径方式对多囊卵巢综合征患者生殖内分泌的调节作用, 以期为进一步研究提供思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Dumesic D A, Oberfield S E, Stener-Victorin E, et al. Scientific statement on the diagnostic, criteria, epidemiology, pathophysiology, and molecular genetics of polycystic ovary syndrome [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(5): 487-525.

[2] Glinborg D, Altinok M L, Mumm H, et al. Body composition is improved during 12 months' treatment with metformin alone or combined with oral contraceptives compared with treatment with oral contraceptives in polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(7): 2584-2591.

[3] Teede H J, Misso M L, Deeks A A, et al. Assessment and management of polycystic ovary syndrome: Summary of an evidence-based guideline [J]. *Med J Aust*, 2011, 195(6): S65-112.

[4] Fauser B C, Tarlatzis B C, Rebar R W, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS consensus workshop group [J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(1): 28-38.

[5] Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(16): 3190-3199.

[6] Markus R P, Fernandes P A, Kinker G S, et al. Immune-pineal axis-acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(16): 3239-3250.

[7] Yi W J, Kim T S. Melatonin protects mice against stress-induced inflammation through enhancement of M2 macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 48: 146-158.

[8] Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle [J]. *J Ovarian Res*, 2012, 5: 5.

[9] Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [J]. *Endocr J*, 2013, 60(1): 1-13.

[10] Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, et al. Melatonin and reproduction revisited [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(3): 445-56.

[11] Yu K, Wang R X, Li M H, et al. Melatonin reduces androgen production and upregulates heme oxygenase-1 expression in granulosa cells from PCOS patients with hypoestrogenia and hyperandrogenia [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 20: 8218650.

[12] Mokhtari F, Akbari Asbagh F, Azmoodeh O, et al. Effects of melatonin administration on chemical pregnancy rates of polycystic ovary syndrome patients undergoing intrauterine insemination: A randomized clinical trial [J]. *Int J Fertil Steril*, 2019, 13(3): 225-229.

[13] Tagliaferri V, Romualdi D, Scarinci E, et al. Melatonin treatment may be able to restore menstrual cyclicality in women with PCOS: A pilot study [J]. *Reprod Sci*, 2018,

- 25(2): 269-275.
- [14] Jamilian M, Foroozanfard F, Mirhosseini N, *et al.* Effects of melatonin supplementation on hormonal, inflammatory, genetic, and oxidative stress parameters in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 273.
- [15] Mousavi R, Alizadeh M, Asghari Jafarabadi M, *et al.* Effects of melatonin and/or magnesium supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021. doi: 10.1007.
- [16] Shabani A, Foroozanfard F, Kavossian E, *et al.* Effects of melatonin administration on mental health parameters, metabolic and genetic profiles in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J Affect Disord*, 2019, 250: 51-56.
- [17] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [18] Kim S, Thiessen P A, Bolton E E, *et al.* PubChem substance and compound databases [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1202-1213.
- [19] Daina A, Michielin O, Zoete V. Swiss target prediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [20] Wang X, Shen Y, Wang S, *et al.* PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-360.
- [21] 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): D1074-1082.
- [22] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [23] Piñero J, Ramírez-Anguita J M, Saúch-Pitarch J, *et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 Update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D845-D855.
- [24] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [25] Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(14): 1830-1831.
- [26] Yu G, Wang L G, Han Y, *et al.* ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omics*, 2012, 16(5): 284-287.
- [27] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [28] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [29] Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, *et al.* Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, homeostasis, and cancer [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 615-675.
- [30] Yuan T L, Cantley L C. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme [J]. *Oncogene*, 2008, 27(41): 5497-5510.
- [31] Engelman J A, Luo J, Cantley L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(8): 606-619.
- [32] Fruman D A, Chiu H, Hopkins B D, *et al.* The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.
- [33] Li T, Mo H, Chen W, *et al.* Role of the PI3K-Akt signaling pathway in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(5): 646-655.
- [34] Xie F, Zhang J, Zhai M, *et al.* Melatonin ameliorates ovarian dysfunction by regulating autophagy in PCOS via the PI3K-Akt pathway [J]. *Reproduction*, 2021, 162(1): 73-82.
- [35] Large M J, Wetendorf M, Lanz R B, *et al.* The epidermal growth factor receptor critically regulates endometrial function during early pregnancy [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(6): e1004451.
- [36] Zheng Q, Li Y, Zhang D, *et al.* ANP promotes proliferation and inhibits apoptosis of ovarian granulosa cells by NPRA/PGRMC1/EGFR complex and improves ovary functions of PCOS rats [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3145.
- [37] Yang L, Wei Q, Li W, *et al.* NPR2 is involved in FSH-mediated mouse oocyte meiotic resumption [J]. *J Ovarian Res*, 2016, 9: 6.
- [38] Liu Q, Li Y, Feng Y, *et al.* Single-cell analysis of differences in transcriptomic profiles of oocytes and cumulus cells at GV, MI, MII stages from PCOS patients [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39638.
- [39] Tian X Z, Wang F, He C J, *et al.* Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: A mechanistic approach [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(3): 239-247.

- [40] Stankiewicz T R, Linseman D A. Rho family GTPases: Key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 314.
- [41] Liu X, Yan F, Yao H, *et al.* Involvement of RhoA/ROCK in insulin secretion of pancreatic β -cells in 3D culture [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(2): 359-369.
- [42] Kanda T, Wakino S, Homma K, *et al.* Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension [J]. *FASEB J*, 2006, 20(1): 169-171.
- [43] Jia Y, Liu W, Bai D, *et al.* Melatonin supplementation in the culture medium rescues impaired glucose metabolism in IVF mice offspring [J]. *J Pineal Res*, 2021, 11: e12778.
- [44] Li D, You Y, Bi F F, *et al.* Autophagy is activated in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome [J]. *Reproduction*, 2018, 155(1): 85-92.
- [45] Tamura H, Kawamoto M, Sato S, *et al.* Long-term melatonin treatment delays ovarian aging [J]. *J Pineal Res*, 2017, 62(2): e12381.
- [46] Sattler M, Salgia R. c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy [J]. *Curr Oncol Rep*, 2007, 9(2): 102-108.
- [47] Uzumcu M, Pan Z, Chu Y, *et al.* Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the antiapoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells *in vitro* [J]. *Reproduction*, 2006, 132(2): 291-299.
- [48] Şahin Nur, Toylu A, Gülekli B, *et al.* The levels of hepatocyte growth factor in serum and follicular fluid and the expression of c-Met in granulosa cells in patients with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1): 264-269.
- [49] Hu Z P, Fang X L, Sheng B, *et al.* Melatonin inhibits macrophage infiltration and promotes plaque stabilization by upregulating anti-inflammatory HGF/c-Met system in the atherosclerotic rabbit: USPIO-enhanced MRI assessment [J]. *Vascul Pharmacol*, 2020, 127: 106659.
- [50] Alshaker H, Sacco K, Alfraidi A, *et al.* Leptin signalling, obesity and prostate cancer: Molecular and clinical perspective on the old dilemma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35556-35563.
- [51] Zhou Y, Lü L, Liu Q, *et al.* Total flavonoids extracted from *Nervilia Fordii* function in polycystic ovary syndrome through IL-6 mediated JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2019, 9(1): BSR20181380.
- [52] Duan W, Yang Y, Yi W, *et al.* New role of JAK2/STAT3 signaling in endothelial cell oxidative stress injury and protective effect of melatonin [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57941.
- [53] Xu N, Geller D H, Jones M R, *et al.* Comprehensive assessment of expression of insulin signaling pathway components in subcutaneous adipose tissue of women with and without polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Transl Endocrinol*, 2015, 2(3): 99-104.
- [54] He C, Ma T, Shi J, *et al.* Melatonin and its receptor MT1 are involved in the downstream reaction to luteinizing hormone and participate in the regulation of luteinization in different species [J]. *J Pineal Res*, 2016, 61(3): 279-290.
- [55] Højlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance [J]. *Dan Med J*, 2014, 61(7): B4890.
- [56] Azziz R. Polycystic ovary syndrome, insulin resistance and molecular defects of insulin signaling [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9): 4085-4087.
- [57] Ciaraldi T P. Molecular defects of insulin action in the polycystic ovary syndrome: Possible tissue specificity [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2000, 13(Suppl 5): 1291-1293.
- [58] Wang F, Wang S, Zhang Z, *et al.* Defective insulin signaling and the protective effects of dimethyldiguanide during follicular development in the ovaries of polycystic ovary syndrome [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8164-8170.
- [59] Cipolla-Neto J, Amaral F G, Afeche S C, *et al.* Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review [J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(4): 371-381.
- [60] Kai Y, Kawano Y, Yamamoto H, *et al.* A possible role for AMP-activated protein kinase activated by metformin and AICAR in human granulosa cells [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13: 27.
- [61] Zhang J, LU X, LIU M, *et al.* Melatonin inhibits inflammasome-associated activation of endothelium and macrophages attenuating pulmonary arterial hypertension [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(13): 2156-2169.