

基于网络药理学和分子对接的关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的作用机制研究

宋微, 郭鑫, 巴音桑, 李丽华, 李伟*

乌鲁木齐市妇幼保健院 药剂科, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接探讨关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的分子机制。**方法** 通过 SymMap、中国天然产物化学成分库筛选关黄母颗粒中构成药物主要化学成分, 而后通过 TCMSP 数据库以及既往文献对查询有效化学成分的对应靶点, 结果的匹配规范通过 Uniprot 数据库进行。运用 Cytoscape 3.6.0 软件构建关黄母颗粒的药物-有效成分-作用靶点网络。通过 DrugBank 和 GeneCards 数据库明确围绝经期综合征主要疾病靶点, 并与关黄母颗粒有效成分靶点进行匹配而获得潜在治疗靶点。基于 Metascape 数据库和 DAVID 数据库对潜在治疗靶点进行 GO 生物过程、KEGG 信号通路分析, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络并应用 Cytoscape 软件进行拓扑分析, 应用 Surflex-Dock 进行分子对接。**结果** 共获得有效化学成分 86 种, 通过合并及删除重复值后得到有效成分作用靶点 298 个, 关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的潜在靶点基因 228 个。基因本体论 (GO) 功能分析得到排名前 10 名的差异基因主要涉及蛋白质代谢、细胞周期、细胞器功能、染色体等方面。KEGG 富集分析显示, 关黄母颗粒有效成分治疗围绝经期综合征排名前 10 的信号通路包括血脂和动脉粥样硬化通路 (lipid and atherosclerosis)、化学致癌-受体激活通路 (chemical carcinogenesis-receptor activation)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路等。分子对接结果显示, 梓醇、五羟黄酮、汉黄芩素、山柰酚、芍药苷与黏着连接蛋白 $\beta 1$ (CTNNB1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、肿瘤坏死因子 (TNF)、肿瘤蛋白 P53 (TP53) 具有较好的结合活性。**结论** 关黄母颗粒可能通过梓醇、五羟黄酮、芍药苷等成分, 通过影响 EGFR、TNF 及 CTNNB1 等关键靶点的表达治疗围绝经期综合征。

关键词: 围绝经期综合征; 关黄母颗粒; 网络药理学; 梓醇; 五羟黄酮; 汉黄芩素; 芍药苷

中图分类号: R984 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)01-0048-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.007

Mechanism of Guanhuangmu Granules in treatment of perimenopausal syndrome based on network pharmacology and molecular docking

SONG Wei, GUO Xin, BA Yin-sang, LI Li-hua, LI Wei

Department of Pharmacy, Urumqi Maternal and Child Health Hospital, Urumqi 830000, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of Guanhuangmu Granules in treatment of perimenopausal syndrome based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** The main chemical components of Guanhuangmu Granules were screened by SymMap and Chinese natural product chemical component database, and then the corresponding targets of effective chemical components were queried by TCMSP database and previous literature, and the matching of the results was carried out by Uniprot database. Cytoscape 3.6.0 software was used to construct drug-active component-target network of Guanhuangmu Granules. The main disease targets of perimenopausal syndrome were identified through databases such as DrugBank and GeneCards, and matched with the targets of the active ingredients of Guanhuangmu Granules to obtain potential therapeutic targets. GO biological processes and KEGG signaling pathways were analyzed for potential therapeutic targets based on Metascape database and DAVID database, and protein-protein interaction (PPI) networks were constructed. Molecular docking was performed by Surflex-Dock. **Results** A total of 86 effective chemical components were obtained, 298 active component targets were obtained by merging and deleting duplicate values, and 228 potential target genes were obtained by Guanhuangmu granules in treatment of perimenopausal syndrome.

收稿日期: 2022-09-14

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2021D01A42)

作者简介: 宋微, 女, 主管药师, 本科, 研究方向为药事管理。E-mail: h134849@163.com

*通信作者: 李伟, 副主任药师, 本科, 研究方向为药事管理。E-mail: 45152067@qq.com

The top 10 differential genes were mainly involved in protein metabolism, cell cycle, organelle function, and chromosome by gene ontology (GO) functional analysis. KEGG enrichment analysis showed that the top 10 signaling pathways in treatment of perimenopausal syndrome by the active components of Guanhuangmu Granules include lipid and atherosclerosis pathway, chemical carcinogenesis-receptor activation, PI3K-Akt signaling pathway. Molecular docking results showed that catalpol, pentahydroxyflavone, baicalin, kaempferol, paeoniflorin had good binding activities with CTNNB1, EGFR, GAPDH, TNF and TP53.

Conclusion Guanhuangmu Granules may treat perimenopausal syndrome by influencing the expression of EGFR, TNF, CTNNB1 and other key targets through paeoniflorin, pentahydroxyflavone, catalpa and other components.

Key words: perimenopausal syndrome; Guanhuangmu Granules; network pharmacology; catalpol; quercetin; wogonin; paeoniflorin

围绝经期综合征是影响中老年女性身体及心理健康的常见疾病,目前国内对于中西医结合治疗围绝经期综合征已经累积了较多的经验,且临床治疗效果显著^[1]。关黄母颗粒于 2021 年被国家医保局纳入医保药品目录,其针对肝肾阴虚证的围绝经期综合征具有较好的作用。中医学认为,围绝经期综合征表现为肝肾阴虚证的人群通常原因是年龄所致肾精虚损,而肝肾精血同源,导致水不涵木,从而继发肝血不足,同时还有肾水亏虚,导致心火亦亢,故其主要表现为烘热汗出、腰膝酸软^[2]。关黄母颗粒由熟地黄、龟甲胶、盐关黄柏、盐知母、白芍 5 种中药构成,从中医角度分析,熟地黄、龟甲胶均具有滋阴补血功效^[3-4],盐知母具有滋阴润燥、泻火除烦功效^[5],盐关黄柏清热燥湿、泻火除蒸,白芍养血调经、柔肝止痛^[6],以上 5 类药物共奏补益肝肾,滋阴降火之效。但目前对于其具体药理作用机制尚不清楚,故本研究采用网络药理学寻找关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的靶点,旨在为进一步挖掘关黄母颗粒作用提供参考。

1 资料与方法

1.1 主要成分和作用靶点的筛选及确定

通过 SymMap (<http://symmap.org/>) 和中国天然产物化学成分库 (<http://pharmdata.ncmi.cn/cnpc/>),分别以关黄母颗粒为关键词检索此方中各味中药的化学成分。而后对检索到的化学成分进行筛选(口服利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 $\geq 10\%$),并通过 TCMSP 数据库及已发表文献查询以上化学成分的对应该靶点,通过 Uniprot 数据库进行匹配规范。

1.2 药物-有效成分-靶点网络的绘制

运用 Cytoscape 3.6.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 构建药物-有效成分-靶点网络。网络形成后使用软件内置 Network Analyzer 分析工具测算出介度、连接度及紧密度等网络拓扑参数,以获得其中较为重要的活性成分与靶点及两者之间的关系。

1.3 围绝经期综合征相关靶点的搜集、筛选和匹配

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>) 进行检索,搜集可能的疾病靶点;利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>),对收集的靶点可能作用靶点和疾病靶点名称进行筛选和规范化;将筛选后的有效成分所对应的靶标与疾病相关靶标进行匹配,选取二者交集基因。

1.4 基因本体论 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路分析

GO 功能富集依托于 R 语言的 org. Hs. eg. db 包,对象为筛选出的差异表达基因,主要涵盖差异表达基因参与的生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 3 个层面,根据 $P < 0.05$ 取排名前 10 名的差异基因。利用 DAVID 6.8 在线分析网站对筛选出的差异表达基因参与的 KEGG 信号通路进行分析,下载分析结果后应用 R 语言 ggplot2 包按照 $P < 0.05$ 条件筛选出排名前 10 的信号通路。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点的筛选

依托于 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 将之前分析中的药物有效成分靶标与围绝经期综合征疾病相关靶标构建 PPI 网络图,进行筛选(标准为 interaction score > 0.4)并剔除无相互作用的孤立蛋白后,将 PPI 网络图进行可视化处理,以蛋白间的相互作用指标为标准,选取差异表达基因 PPI 网络图。运用 Cytoscape 3.6.0 软件中 CytoNAC 插件对 PPI 网络进行拓扑分析,根据节点的中心度筛选基因,以排行前 50% 作为筛选标准,依次对点度中心性、中介中心性、接近中心性进行拓扑分析,以筛选更具有重要性的靶基因。

1.6 重要成分和靶点的分子对接

将重要性排名前 5 的重要有效成分和相互作用靶点进行分子对接,分别在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PDB 数据库 (<http://>

www.rcsb.org/) 检索晶体结构, 并使用 SYBYL-X 2.1.1 软件, 经受体蛋白加氢等准备后进行相互对接, 应用 Surflex-Dock 对接程序对上述结构进行对接, 获得 Total Score 值, Total Score 值越高显示对接的配体和受体之间的匹配情况越好。

2 结果

2.1 关黄母颗粒活性成分及其靶点

共获得有效成分 86 种, 其中关黄柏 26 种, 熟

地黄 19 种, 白芍 22 种, 知母 21 种, 龟甲胶 4 种, 见表 1。将上述化学成分进行作用靶点匹配, 合并及删除重复值后得到有效成分作用靶点 428 个, 药物 - 有效成分 - 靶点网络见图 1。

2.2 关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的核心靶点

将关黄母颗粒有效成分靶点和围绝经期综合征相关基因取交集, 得到 228 个关黄母颗粒治疗围绝经期综合征靶点基因, 见图 2。

表 1 关黄母颗粒的有效成分

Table 1 Effective components of Guanhuangmu Granules

代号	Mol ID	英文名	OB/%	DL	来源
GHB1	MOL001131	phellodensin qt_	56.60	0.39	关黄柏
GHB2	MOL001454	berberine	36.86	0.78	关黄柏
GHB3	MOL001455	canadine	53.83	0.77	关黄柏
GHB4	MOL001458	coptisine	30.67	0.86	关黄柏
GHB5	MOL000173	wogonin	30.68	0.23	关黄柏
GHB6	MOL001771	clionasterol	36.91	0.75	关黄柏
GHB7	MOL002331	N-methylflindersine	32.36	0.18	关黄柏
GHB8	MOL002650	coniferol	44.88	0.05	关黄柏
GHB11	MOL002714	baicalein	33.52	0.21	关黄柏
GHB12	MOL002894	berberrubine	35.74	0.73	关黄柏
GHB15	MOL005043	campesterol	37.58	0.71	关黄柏
GHB16	MOL006376	dehydrosigmasterol	37.42	0.75	关黄柏
GHB17	MOL006380	dihydrophelloside	48.60	0.43	关黄柏
GHB18	MOL006385	amurensine	49.51	0.69	关黄柏
GHB21	MOL006397	jatrorrhizine	30.44	0.75	关黄柏
GHB27	MOL006414	phellodensin	31.09	0.09	关黄柏
GHB28	MOL006415	phellodenol B	30.95	0.09	关黄柏
GHB29	MOL006416	phellodenol C	66.42	0.13	关黄柏
GHB30	MOL006417	phellodensin A	83.31	0.52	关黄柏
GHB31	MOL006419	tetrahydropalmatrubine	72.65	0.59	关黄柏
GHB32	MOL006421	tetrahydroreticuline	87.93	0.33	关黄柏
GHB33	MOL006422	thalifendine	44.41	0.73	关黄柏
GHB34	MOL000785	palmatine	64.60	0.65	关黄柏
GHB35	MOL000098	quercetin	46.43	0.28	关黄柏
SDH1	MOL000131	linoleic acid	41.90	0.14	熟地黄
SDH3	MOL001739	zoomaric acid	35.78	0.10	熟地黄
SDH5	MOL002321	pyroglutamic acid	96.25	0.02	熟地黄
SDH6	MOL002820	catapol	44.69	0.10	熟地黄
SDH8	MOL000360	ferulic acid	39.56	0.06	熟地黄
SDH9	MOL003689	aeginetic acid	48.31	0.13	熟地黄
SDH10	MOL003692	ajugoside	81.68	0.08	熟地黄
SDH11	MOL003699	melittoside	40.00	0.08	熟地黄
SDH14	MOL003705	jioglutin A	90.70	0.13	熟地黄

续表 1

代号	Mol ID	英文名	OB/%	DL	来源
SDH15	MOL003706	jioglutin B	90.71	0.13	熟地黄
SDH16	MOL003708	jioglutin D	39.02	0.14	熟地黄
SDH17	MOL003709	jioglutin E	81.90	0.10	熟地黄
SDH18	MOL003710	jioglutolide	86.95	0.06	熟地黄
SDH20	MOL003717	methyl palmitoleate	34.61	0.12	熟地黄
SDH22	MOL003732	rehmaglutin D	57.03	0.10	熟地黄
SDH23	MOL000414	caffeate	54.97	0.05	熟地黄
SDH25	MOL000748	5-hydroxymethylfurfural	45.07	0.02	熟地黄
BS1	MOL001246	nopinone	57.86	0.05	白芍
BS2	MOL001801	salicylic acid	32.13	0.03	白芍
BS4	MOL001889	methyl linolelaidate	41.93	0.17	白芍
BS6	MOL001893	Bu3	34.87	0.01	白芍
BS7	MOL001895	dibutylphenol	38.90	0.06	白芍
BS11	MOL001904	2-methyl-3-(2-propenyl)-phenol	52.06	0.03	白芍
BS16	MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	白芍
BS17	MOL001919	palbinone	43.56	0.53	白芍
BS19	MOL004480	acetic acid	53.87	0.79	白芍
BS28	MOL000211	mairin	55.38	0.78	白芍
BS29	MOL000219	benzoic acid	31.55	0.02	白芍
BS33	MOL000492	catechin	54.83	0.24	白芍
BS34	MOL000513	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	31.69	0.04	白芍
BS35	MOL000612	cedrene	55.56	0.10	白芍
BS36	MOL000676	dibutyl phthalate	64.54	0.13	白芍
BS37	MOL000775	ethyl acetate	45.02	0.10	白芍
BS38	MOL001924	paeoniflorin	47.87	0.10	白芍
BS39	MOL008707	ethylisobutyrate	83.67	0.01	白芍
ZM1	MOL000118	A-terpineol	48.80	0.03	知母
ZM2	MOL001677	asperglaucide	58.02	0.52	知母
ZM3	MOL000172	furool	34.35	0.01	知母
ZM5	MOL001944	marmesin	50.28	0.18	知母
ZM6	MOL000244	borneol	81.80	0.05	知母
ZM8	MOL000421	nicotinic acid	47.65	0.02	知母
ZM10	MOL004373	anhydroicaritin	45.41	0.44	知母
ZM11	MOL004489	anemarsaponin F	60.06	0.79	知母
ZM13	MOL004497	hippeastrine	51.65	0.62	知母
ZM14	MOL004503	D-nicotine	76.47	0.04	知母
ZM16	MOL004514	timosaponin B	35.26	0.87	知母
ZM17	MOL004517	xuelianlacton	34.58	0.16	知母
ZM22	MOL004540	anemarsaponin	35.50	0.87	知母
ZM24	MOL000483	feruloyltyramine	118.35	0.26	知母
ZM25	MOL002003	caryophyllene oxide	32.67	0.13	知母

续表 1

代号	Mol ID	英文名	OB/%	DL	来源
ZM26	MOL000546	diosgenin	80.88	0.81	知母
ZM27	MOL000631	coumaroyltyramine	112.90	0.20	知母
ZM28	MOL000666	hexanal	55.71	0.01	知母
GJJ1	MOL000050	catalpol	48.74	0.00	龟甲胶
GJJ2	MOL007579	hydroxyproline	83.55	0.02	龟甲胶
GJJ3	MOL000042	Lpg	87.69	0.01	龟甲胶
GJJ4	MOL005448	leucinum	72.92	0.01	龟甲胶
GHB13	MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	关黄柏、白芍
GHB14	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	关黄柏、熟地黄、知母
BS12	MOL001906	methylgallate	30.91	0.05	白芍、知母
BS32	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	白芍、知母
SDH7	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	熟地黄、白芍

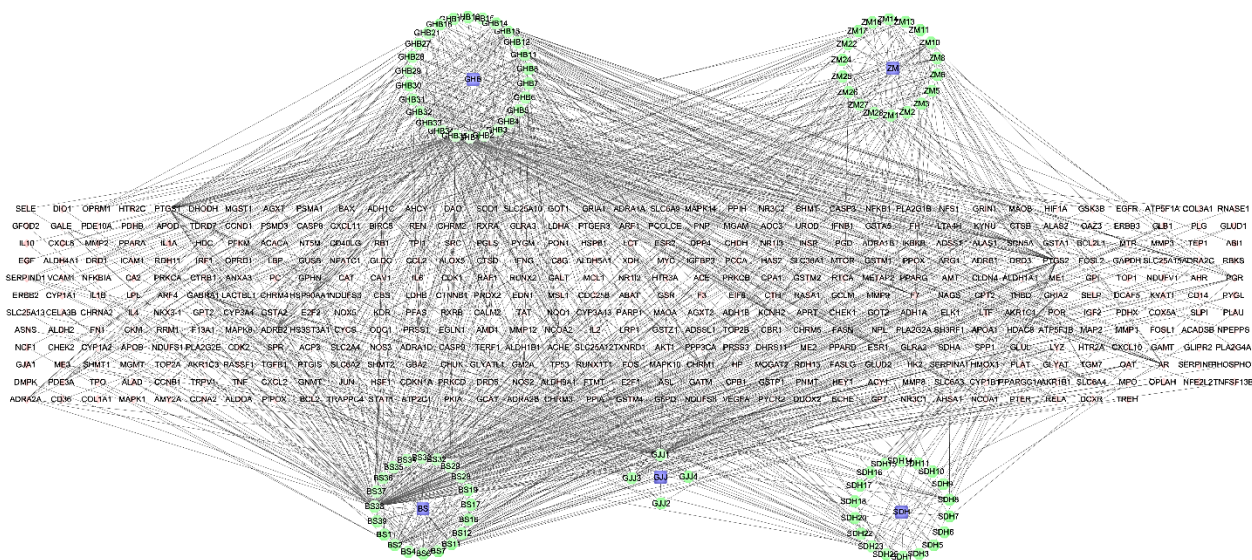


图 1 关黄母颗粒药物 - 有效成分 - 靶点网络

Fig. 1 Drug-active ingredient-target network of Guanhuangmu Granules

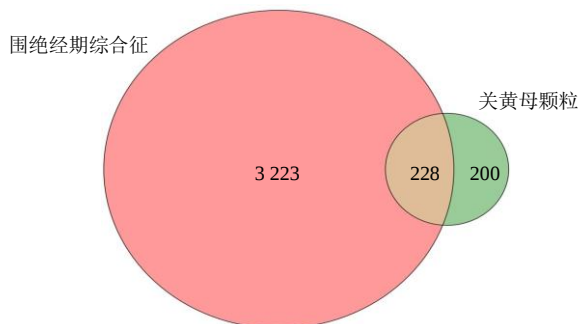


图 2 关黄母颗粒治疗围绝经期综合征相关基因的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of genes related to perimenopausal syndrome treated by Guanhuangmu Granules

2.3 关黄母颗粒有效成分治疗围绝经期综合征核心靶点的 GO 功能分析

关黄母颗粒有效成分治疗围绝经期综合征核心靶点的 GO 功能分析得到差异显著富集条目 30 个, 其中排名前 10 名的 BP、CC、MF 主要涉及蛋白质代谢、细胞周期、细胞器功能、染色体等方面, 见图 3。

2.4 关黄母颗粒有效成分治疗围绝经期综合征核心靶点的 KEGG 信号通路

关黄母颗粒有效成分治疗围绝经期综合征核心靶点的 10 条显著差异性富集信号通路包括血脂和动脉粥样硬化通路 (lipid and atherosclerosis)、化

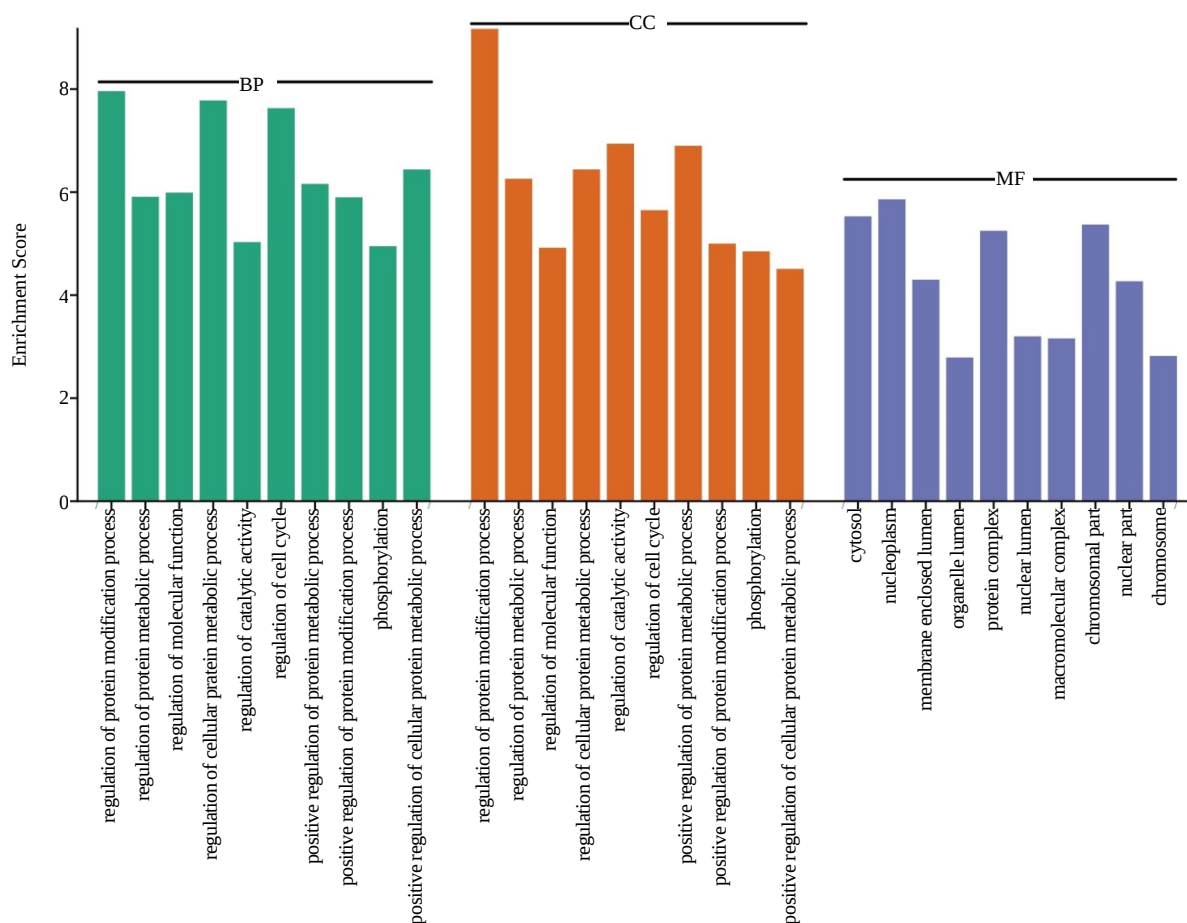


图 3 GO 功能分析

Fig. 3 GO function analysis

学致癌 - 受体激活通路 (chemical carcinogenesis-receptor activation)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、糖尿病性心肌病通路 (diabetic cardiomyopathy)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、铂类药物耐药性通路 (platinum drug resistance)、利什曼病通路 (leishmaniasis)、神经退行性变的多种疾病途径 (pathways of neurodegeneration-multiple diseases)、催乳素信号通路 (prolactin signaling pathway), 见图 4。

2.5 PPI 网络构建及核心靶点的筛选

PPI 网络进行拓扑分析结果见图 5A, 根据 1.5 项下筛选标准, 得到表皮生长因子受体 (EGFR)、肿瘤坏死因子 (TNF)、黏着连接蛋白 $\beta 1$ (CTNNB1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、肿瘤蛋白 P53 (TP53)、苏氨酸蛋白激酶 (AKT1)、半胱氨酸蛋白水解酶 3 (CASP3)、纤维连接蛋白基因 (FN1)、FOS 基因作为核心靶点, 见图 5B。

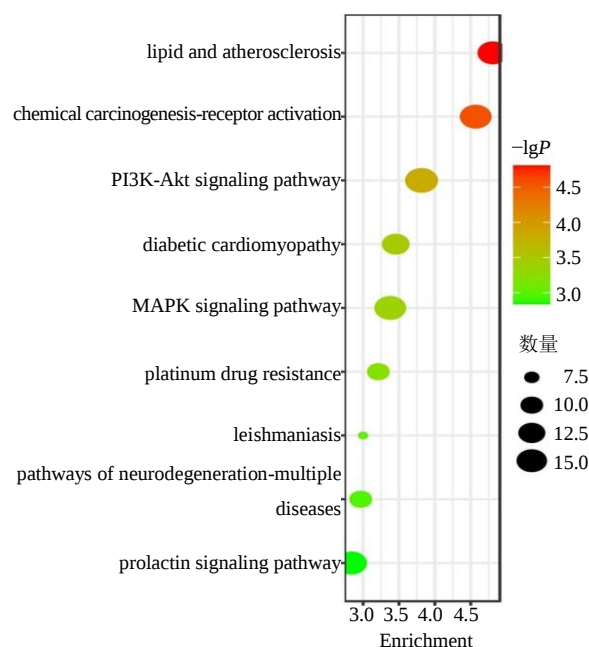


图 4 KEGG 分析气泡图

Fig. 4 Bubbles analyzed by KEGG

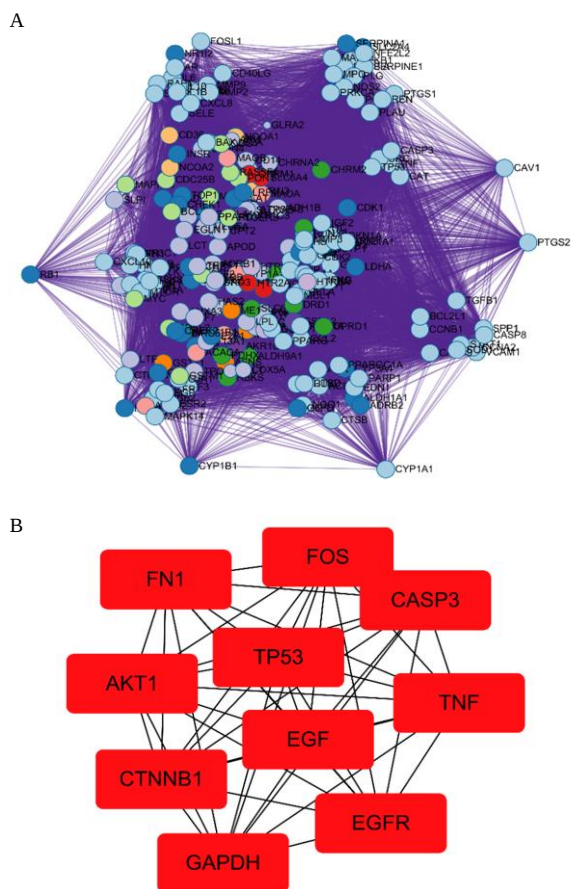


图 5 关黄母颗粒治疗围绝经期综合征靶点的 PPI 网络(A)及核心靶点网络图(B)
Fig. 5 PPI network (A) and core target network (B) of Guanhuangmu Granules in treatment of perimenopausal syndrome

2.6 关黄母颗粒治疗围绝经期综合征重要成分和靶点的分子对接情况

分子对接结果显示, 梓醇、五羟黄酮、汉黄芩素、山柰酚、芍药苷 5 个主要成分与 CTNNB1、EGFR、GAPDH、TNF、TP53 5 个关键靶点分子对接得分均高于 3, 提示分子与靶点具有较好的结合活性, 见表 2。其中图 6 所示为梓醇与 EGFR 蛋白的分子对接图像, 左侧为整体图像, 右侧为结合位点局部放大图像。

3 讨论

网络药理学是一门由系统生物学的理论衍生的药理分析方法, 主要从系统生物学和生物网络平衡角度对疾病的病因、发展过程进行阐述, 并从药物作用及疾病恢复 2 方面用药物类别 - 化学成分 - 疾病靶点之间构成的关系网分析认识药物与机体的相互作用, 为进一步挖掘药物的功效打下了坚实

表 2 黄母颗粒治疗围绝经期综合征重要成分和靶点的分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of important components and targets of Huangmu Granules in treatment of perimenopausal syndrome

活性成分	分子对接得分				
	CTNNB1	EGFR	GAPDH	TNF	TP53
梓醇	4.59	4.34	4.49	7.78	8.59
五羟黄酮	7.13	6.37	7.97	7.39	5.50
汉黄芩素	7.70	6.91	7.99	7.33	8.95
山柰酚	5.53	7.16	4.51	4.21	5.11
芍药苷	8.16	7.30	6.14	5.79	5.75

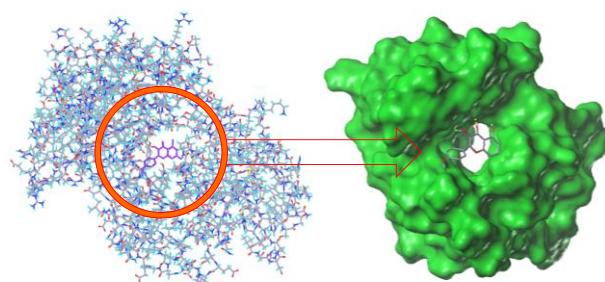


图 6 梓醇分子与 EGFR 蛋白的分子对接图像
Fig. 6 Molecular docking image of catalpol molecule and EGFR protein

的理论基础^[7-8]。通过近年来对大量中药方剂的相关研究成果, 目前网络药理学已经得到世界中医药联合会认证, 并大力推广到阐释中药、中成药方剂的药理机制方面^[9]。

本研究从关黄母颗粒中 5 味药物中选取有效成分 86 个, 而排名前 10 的有效成分中, 白芍含有芍药苷、山柰酚、2,3-丁二醇、水杨酸 4 种。在既往研究中认为白芍的养血调经、柔肝止痛作用, 主要是由于上述成分对于机体炎性介质白细胞介素、TNF 等具有较好的抑制作用, 而围绝经期综合征患者由于性腺激素轴分泌异常可能导致上述炎性介质升高, 进而引起脑源性神经营养因子分泌失调, 从而诱发抑郁症、慢性疾病等情况发生, 故白芍有效成分可能通过抑制炎性介质分泌从而缓解围绝经期综合征症状的发生^[10-12]。关黄柏中的有效成分有五羟黄酮、汉黄芩素、黄芩素、 β -谷固醇, 其中前三者均属于类黄酮类物质, 可以通过调节细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/ERK2) 通路, 提升中枢 5 羟色胺神经系统功能, 进而达到改善抑郁状态, 治疗睡眠障碍的作用, 以上作用对于促进围绝经期综合

征患者病情缓解具有积极的作用^[13]。而 β -谷固醇属于胆固醇替代物，能有效组织游离胆固醇与转运蛋白结合从而降低体内胆固醇含量，改善围绝经期综合征患者由于性激素分泌异常导致的胆固醇含量升高情况，避免诱发心血管疾病的风险^[14]。而龟甲胶中的甘氨酸及(2S)-2-氮杂丙酸具有抗氧化作用，能有效缓解围绝经期综合征患者体内被加剧的氧化反应，从而起到缓解不适的功效^[15]。

GO 功能富集分析显示，关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的主要过程涉及蛋白质代谢、细胞周期、细胞器功能、染色体等方面，由此可见关黄母颗粒对围绝经期综合征患者的作用主要通过调节体内关键蛋白质分泌，从而达到改善细胞周期，维持正常细胞功能，避免体内激素分泌异常导致的内环境改变诱发相关症状以及疾病的发生。而 KEGG 富集分析的主要作用通路中，首先是血脂和动脉粥样硬化通路，围绝经期综合征与血脂异常及动脉粥样硬化之间具有密切的关系，国内外多个研究均提示，围绝经期综合征是女性动脉粥样硬化性疾病的高危因素，而在之前的有效成分分析中已经说明，关黄母颗粒可以调节体内胆固醇代谢，降低炎症因子释放，从而达到调节血脂代谢，避免血管内皮损伤的作用^[16-17]。围绝经期综合征是妇科肿瘤的危险因素，如乳腺癌、卵巢癌等，而目前国内外研究均提示，化学毒性与肿瘤发生之间存在有显著的相关性，主要是通过化学致癌-受体激活通路^[18]。通过以上分析不难看出，围绝经期综合征与化学致癌-受体激活通路之间存在一定的相关性，而关黄母颗粒中的有效物质如类黄酮类化合物、萜类化合物等均被证实对于肿瘤细胞增殖具有一定的抑制作用，故认为关黄母颗粒与围绝经期综合征之间的关系与化学致癌-受体激活通路有关^[19]。研究显示，信号传导与转录激活因子 3(STAT3)和 p53/RAS 可以通过 Slug/MAPK/PI3K/Akt 途径介导上皮-间充质转化(EMT)控制卵巢癌顺铂耐药的情况，由此可见，MAPK、PI3K/Akt、铂类药物耐药 3 条通路之间存在有一定的相关性，而 PI3K/Akt 在女性卵巢内表达可以调节 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达从而调节性激素轴信号传导，最终调节女性激素分泌状态，故认为以上 3 条通路与围绝经期综合征之间存在一定联系^[20]。而目前在动物实验中已经证实，熟地黄中的梓醇、白芍中的白芍苷、知母当中的知母皂苷等有效成分对于 PI3K/Akt 通路具有一

定的调节作用^[21-23]。MAPK、PI3K/Akt 及铂类药物耐药在本研究中是关黄母颗粒作用与围绝经期综合征排名靠前的通路，可以通过上述研究推导出此结论的正确性。

在 PPI 网络进行拓扑中，包括 EGFR、TNF、CTNNB1、GAPDH、TP53、AKT1、CASP3、FN1、FOS 这些关键基因。其中，上述蛋白除 FOS 主要集中在表达于神经细胞外，其余蛋白在全身各器官内均有表达，而根据其对于细胞作用的功能，将除 FOS 外的几个关键蛋白分为促进细胞增殖以及导致细胞凋亡 2 组进行分析。通过既往研究可以明确 EGFR、CTNNB1 诱导多种不同器官内细胞增殖，而 FN1 则是可以通过延长细胞周期达到延缓细胞凋亡的作用^[24-25]。CASP3 则是可以通过 DNA 裂解促进细胞凋亡，AKT1 通过调节胞内葡萄糖代谢从而导致细胞凋亡，TP53 作为抑癌基因被发现，而抑制癌细胞增殖则是其表达后的主要功能^[26-27]。在既往研究中已经指出，当归六黄汤作用治疗围绝经期综合征的主要靶点中包括 EGFR、TNF，而关黄母颗粒中的熟地黄也已经被证实可以通过抑制 EGFR 和 TNF 表达从而达到抗炎及抗肿瘤的作用，故以上 2 个靶点作用可以明确^[28-29]。而白芍当中的白芍苷可以通过与 GAPDH 特异性结合从而缓解肝脏缺血再灌注损伤，而 GAPDH 在绝经期妇女体内表达状态异常被认为是诱发围绝经期综合征的可能原因之一，故可以明确 GAPDH 的作用点^[30]。Wang 等^[31]的研究中指出，TP53 是以熟地黄为成分的补中益气汤主要治疗靶点，故可以看出二者之间可能存在一定联系，但目前对于围绝经期综合征与 TP53 之间的关系尚无相关研究可以证实，故可以作为今后进一步探讨的问题之一。AKT1 作为 PI3K/Akt 途径中的关键影响因素，直接关系到 PI3K/Akt 途径的信号传导问题，而关黄母颗粒与 PI3K/Akt 途径之间的关系在前文已经进行了较为详细的叙述，故可以明确 AKT1 可能是关黄母颗粒作用于围绝经期综合征患者 PI3K/Akt 途径的主要靶点。有研究指出，CASP3 蛋白可以影响体内雌激素表达从而影响着性腺轴情况，而熟地黄中的梓醇可以通过降低血管内的 CASP3 蛋白表达，从而抑制 NAPDH 氧化酶 4/核因子- κ B(Nox4/NF- κ B)和葡萄糖调节蛋白 78/蛋白激酶 R 样内质网激酶(GRP78/PERK)通路，综合以上观点可以明确 CASP3 有作为本研究靶点的可能性^[32-33]。FN1 是熟地黄作用于糖尿病肾病的关

键靶点,而 FN1 基因的多态性对于影响女性体内雌激素分泌具有显著的作用,而本研究也指出, FN1 是熟地黄作用于围绝经期综合征的主要靶点,再次证实了 FN1 是围绝经期综合征发生过程中可能发生改变的关键因素^[34-35]。Liao 等^[36]的研究中指出,白芍当中的芍药苷可以通过抑制 FOS 表达从而达到缓解患者偏头痛的作用,而偏头痛症状是围绝经期综合征患者常见的合并症之一,主要原因在于激素分泌异常导致脑血管异常收缩所致,故可以推测 FOS、PS 及关黄母颗粒之间的关系。

此外,本研究还应用分子对接方法筛选出 5 种有效成分和 5 个靶点进行了模拟对接分析,梓醇等前 5 重要的成分与 CTNNB1 等 5 个蛋白间的分子对接总分均高于 3,进一步为研究关黄母颗粒治疗围绝经期综合征的机制提供了分子层面的证据。

综上,本研究通过网络药理学方法对关黄母颗粒与围绝经期综合征靶点之间的复杂关系网络进行了深入探讨,得出了相关机制,为完善关黄母颗粒的临床价值提供有效参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 高鹏飞,陶柱萍,王雪雪,等.中医药治疗围绝经期综合征的研究进展[J].中华中医药学刊,2021,39(3):21-26.
- [2] 马媛媛,李光荣,王宁,等.李光荣治疗围绝经期综合征经验[J].中华中医药杂志,2021,36(9):5345-5347.
- [3] 肖丹,唐宇,刘俐,等.龟甲(胶)的临床应用及其用量探究[J].现代中西医结合杂志,2020,29(22):2505-2508.
- [4] 丁齐又,徐坤元,杨浩宇,等.熟地黄的临床应用及其用量[J].长春中医药大学学报,2020,36(2):228-230.
- [5] 支美汝,许金凯,刘凯洋,等.生知母和盐知母抗炎作用比较[J].中华中医药杂志,2020,35(12):6345-6349.
- [6] 叶先文,夏澜婷,任洪民,等.白芍炮制的历史沿革及化学成分、药理作用研究进展[J].中草药,2020,51(7):1951-1969.
- [7] 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.
- [8] Nogales C, Mamdouh Z M, List M, et al. Network pharmacology: Curing causal mechanisms instead of treating symptoms[J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(2): 136-150.
- [9] 世界中医药学会联合会.网络药理学评价方法指南[J].世界中医药,2021,16(4):527-532.
- [10] Zhang T, Cao S, Yuan H, et al. Alleviation of androgenetic alopecia with aqueous *Paeonia lactiflora* and *Poria cocos* extract intake through suppressing the steroid hormone and inflammatory pathway[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(11): 1128.
- [11] Bae T, Jang J, Lee H, et al. *Paeonia lactiflora* root extract suppresses cancer cachexia by down-regulating muscular NF- κ B signalling and muscle-specific E3 ubiquitin ligases in cancer-bearing mice[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 246: 112222.
- [12] 冯媛,郭龙,常雅晴,等.基于指纹图谱和多成分含量测定的关黄柏及川黄柏差异性研究[J].中草药,2022,53(16):5179-5184.
- [13] Liu H T, Lin Y N, Tsai M C, et al. Baicalein exerts therapeutic effects against endotoxin-induced depression-like behavior in mice by decreasing inflammatory cytokines and increasing brain-derived neurotrophic factor levels[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(5): 947.
- [14] Wang S, Ye K, Shu T, et al. Enhancement of galloylation efficacy of stigmasterol and β -sitosterol followed by evaluation of cholesterol-reducing activity[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(11): 3179-3187.
- [15] Wang W, Wu Z, Dai Z, et al. Glycine metabolism in animals and humans: Implications for nutrition and health[J]. Amino Acids, 2013, 45(3): 463-477.
- [16] Nair A R, Pillai A J, Nair N. Cardiovascular changes in menopause[J]. Curr Cardiol Rev, 2021, 17(4): e230421187681.
- [17] 孙冰,王海昌.动脉粥样硬化性心血管疾病高危人群胆固醇管理的临床研究进展[J].南京医科大学学报:自然科学版,2021,41(10):1546-1551.
- [18] Liu Y J, Wang W, Yeh J, et al. Calcified chondroid mesenchymal neoplasms with FN1-receptor tyrosine kinase gene fusions including FGFR2, FGFR1, MERTK, NTRK1, and TEK: A molecular and clinicopathologic analysis[J]. Mod Pathol, 2021, 34(7): 1373-1383.
- [19] Chen Z, Teng X, Zhang J, et al. Molecular features of lung adenocarcinoma in young patients[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 777.
- [20] Liang F, Ren C, Wang J, et al. The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls cancer cell metastasis and cisplatin resistance via the Slug/MAPK/PI3K/AKT-mediated regulation of EMT and autophagy[J]. Oncogenesis, 2019, 8(10): 59.
- [21] Feng M, Liu F, Xing J, et al. Anemarrhena saponins attenuate insulin resistance in rats with high-fat diet-induced obesity via the IRS-1/PI3K/AKT pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 277: 114251.
- [22] Ma X, Zhang W, Jiang Y, et al. Paeoniflorin, a natural product with multiple targets in liver diseases-a mini

- review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 531.
- [23] Fu C, Wu Y, Liu S, *et al.* Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 115021.
- [24] Chang Y S, Tu S J, Chen Y C, *et al.* Mutation profile of non-small cell lung cancer revealed by next generation sequencing [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 3.
- [25] Geng Q S, Huang T, Li L F, *et al.* Over-expression and prognostic significance of FN1, correlating with immune infiltrates in thyroid cancer [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 8: 812278.
- [26] Ren B C, Zhang Y F, Liu S S, *et al.* Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12355-12367.
- [27] Levine A J. Spontaneous and inherited TP53 genetic alterations [J]. *Oncogene*, 2021, 40(41): 5975-5983.
- [28] Liu Y M, Zhu L L, Li R, *et al.* Xijiao Dihuang Decoction and *Rehmannia glutinosa* Libosch. protect mice against lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha-induced acute liver failure [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(6): 446-453.
- [29] Xue B, Chen X, Wang X, *et al.* Application of multivariate statistical analysis and network pharmacology to explore the mechanism of Danggui Liu Huang Tang in treating perimenopausal syndrome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114543.
- [30] Kirshner Z Z, Gibbs R B. Use of the REVERT® total protein stain as a loading control demonstrates significant benefits over the use of housekeeping proteins when analyzing brain homogenates by Western blot: An analysis of samples representing different gonadal hormone states [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 473: 156-165.
- [31] Wang Y, Yu W, Shi C, *et al.* Network pharmacology of Yougui Pill combined with Buzhong Yiqi Decoction for the treatment of sexual dysfunction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1243743.
- [32] Preciados M, Yoo C, Roy D. Estrogenic endocrine disrupting chemicals influencing NRF1 regulated gene networks in the development of complex human brain diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2086.
- [33] Hu H, Wang C, Jin Y, *et al.* Catalpol inhibits homocysteine induced oxidation and inflammation via inhibiting Nox4/NF-κB and GRP78/PERK pathways in human aorta endothelial cells [J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 64-80.
- [34] Chan K W, Yu K Y, Yiu W H, *et al.* Potential therapeutic targets of rehmannia formulations on diabetic nephropathy: A comparative network pharmacology analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 794139.
- [35] Matalliotaki C, Matalliotakis M, Rahmioglu N, *et al.* Role of FN1 and GREB1 gene polymorphisms in endometriosis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(1): 111-116.
- [36] Liao C C, Li J M, Chen C H, *et al.* Effect of *Paeonia lactiflora*, a traditional Chinese herb, on migraines based on clinical application and animal behavior analyses [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109276.

[责任编辑 高源]