

基于网络药理学、分子对接及体外实验探究黄芪治疗多囊卵巢综合征的作用机制

关羽茜¹, 孙雪琴^{2*}, 申仕³

1. 海军青岛特勤疗养中心 疗养科, 山东 青岛 266071

2. 深圳市罗湖区中医院 妇科, 广东 深圳 518004

3. 山河医派(天津)研究院, 天津 滨海 300452

摘要: **目的** 基于网络药理学分子对接及体外实验探究黄芪治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的作用机制。**方法** 基于TCMSP、BATMAN、ETCM、TCMID等数据库,依据口服生物利用度(OB)和类药性(DL)标准筛选黄芪的有效成分并预测其作用靶点。通过TTD、OMIM、GeneCards数据库获取PCOS相关靶点,确定交集靶点。构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络模型,利用Cytoscape软件进行拓扑学分析,筛选核心成分与靶点。借助STRING数据库构建蛋白质相互作用(PPI)网络,筛选核心靶点。利用Metascape数据库进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。采用分子对接技术验证核心成分与关键靶点的结合能力。以肿瘤坏死因子- α (TNF- α)构建KGN细胞PCOS模型,设对照组、模型组及不同剂量常春藤皂苷元处理组,检测细胞活力、凋亡率、脱氢表雄酮(DHEA)、睾酮、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18水平及TP53、JUN基因表达水平。**结果** 筛选出黄芪的17种有效成分,预测其209个作用靶点,与PCOS的2476个靶点对比后获得133个交集靶点。网络分析显示白桦脂酸、常春藤皂苷元、7-O-甲基异木犀草素等为核心成分。PPI网络分析筛选出肿瘤蛋白53(TP53)、JUN、雌激素受体1(ESR1)等核心靶点。GO富集分析显示交集靶点涉及多种生物过程、细胞组分和分子功能;KEGG富集分析揭示了磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等关键通路。分子对接结果显示,白桦脂酸、常春藤皂苷元、7-O-甲基异木犀草素与核心靶点TP53、JUN、ESR1均有较好结合能力,其中常春藤皂苷元与ESR1结合能最低。细胞实验表明,高剂量常春藤皂苷元可显著提升模型KGN细胞活力($P < 0.001$)、降低细胞凋亡率($P < 0.05$ 、 0.001),并下调DHEA、睾酮、IL-1 β 、IL-18水平和TP53、JUN基因表达($P < 0.05$)。**结论** 黄芪通过常春藤皂苷元、白桦脂酸等有效成分,结合TP53、ESR1等关键靶点,调控PI3K/Akt、MAPK等信号通路,从而改善PCOS患者的卵巢功能。

关键词: 黄芪; 多囊卵巢综合征; 网络药理学; 分子对接; 白桦脂酸; 常春藤皂苷元; 7-O-甲基异木犀草素; 肿瘤蛋白53; 雌激素受体1

中图分类号: R285.5; R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)04-0945-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.04.009

Mechanism of *Astragali Radix* in treatment of polycystic ovary syndrome based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments

GUAN Yuxi¹, SUN Xueqin^{2*}, SHEN Shi³

1. Department of Sanatorium, Navy Qingdao Special Rehabilitation Center, Qingdao 266071, China

2. Department of Gynecology, Shenzhen Luohu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518004, China

3. Shanhe Medical School (Tianjin) Research Institute, Tianjin 300452, China

Abstract: Objective To systematically explore *Astragali Radix* in treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments. **Methods** Based on the TCMSP, BATMAN, ETCM, and TCMID databases, the effective components of *Astragali Radix* were screened and their potential targets were predicted according to the standards of oral bioavailability (OB) and drug-likeness (DL). The targets related to PCOS were obtained through the TTD, OMIM, and GeneCards databases, and the intersecting targets were determined. A “drug-active component-target-disease” network model was

收稿日期: 2025-09-12

基金项目: 深圳市罗湖区软科学研究计划项目(LX202402018)

作者简介: 关羽茜, 主管护师, 研究方向为高血压、老年病的中医护理及中西医结合防治。E-mail: 15204692557@163.com

*通信作者: 孙雪琴, 主治中医师, 研究方向为中西医结合防治妇科疾病。E-mail: sunxueqin1128@163.com

constructed, and the core components and targets were screened through topological analysis using Cytoscape software. The protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database to screen the core targets. GO and KEGG enrichment analyses were performed using the Metascape database. The binding ability of core components to key targets was verified by molecular docking technology. A PCOS model of KGN cells was constructed using TNF- α , and groups were set up including a control group, a model group, and different doses of hederagenin treatment groups. The cell viability, apoptosis rate, and levels of DHEA, testosterone, IL-1 β , and IL-18, and expression levels of TP53 and JUN genes were detected. **Results** A total of 17 effective components of *Astragali Radix* were screened out, with 209 predicted targets. After comparison with the 2 476 targets related to PCOS, 133 intersecting targets were obtained. Network analysis showed that betulinic acid, hederagenin, and 7-*O*-methyl luteolin were core components. PPI network analysis screened out TP53, JUN, and ESR1 as core targets. GO enrichment analysis showed that the intersecting targets were involved in various biological processes, cellular components, and molecular functions. KEGG enrichment analysis revealed key pathways such as PI3K/Akt and MAPK. Molecular docking results showed that betulinic acid, hederagenin, and 7-*O*-methyl luteolin had good binding ability to the core targets TP53, JUN, and ESR1, with the lowest binding energy between hederagenin and ESR1. In vitro experiments showed that high-dose hederagenin significantly increased the viability of the model KGN cells ($P < 0.001$), decreased the cell apoptosis rate ($P < 0.05$, 0.001), and downregulated the levels of DHEA, testosterone, IL-1 β , IL-18, and the gene expression of *TP53* and *JUN* ($P < 0.05$). **Conclusion** *Astragali Radix* improves the ovarian function of patients with PCOS by combining its effective components such as hederagenin and betulinic acid with key targets like ESR1 and TP53, and regulating the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways.

Key words: *Astragali Radix*; polycystic ovary syndrome; network pharmacology; molecular docking; betulinic acid; hederagenin; 7-*O*-methyl luteolin; TP53; ESR1

多囊卵巢综合征 (PCOS) 作为一种常见的内分泌代谢紊乱疾病, 在育龄妇女群体中具有较高的发病率, 其患病率在 5%~10%^[1-2]。该病的主要临床特征涵盖排卵功能障碍、高雄激素血症、月经周期紊乱、多毛症、不孕、痤疮以及肥胖等^[1-2]。此外, PCOS 患者往往还合并 2 型糖尿病、心血管疾病、代谢综合征等多种并发症, 这些并发症严重降低了患者的生活质量, 并对生殖健康产生了极为不利的影响^[1-2]。近年来, 随着对 PCOS 病理生理机制研究的不断深入, 发现其发病机制复杂, 涉及多种因素, 包括慢性炎症、遗传因素、氧化应激、胰岛素抵抗以及内分泌失调等^[1, 3]。在 PCOS 的发病机制中, 胰岛素抵抗被视为关键的病理生理因素之一, 有 50%~70% 的 PCOS 患者表现出胰岛素抵抗特征^[1]。此外, PCOS 患者体内常伴有慢性低度炎症和氧化应激状态, 这些因素相互作用, 进一步加剧了疾病进展^[4-5]。

黄芪作为一种在中医药领域应用历史悠久且备受推崇的补益类中药, 不仅具有补气固表、利尿消肿、托毒生肌等多种显著的药用功效, 而且在中医临床实践中, 凭借其独特的优势和广泛的应用范围, 被广泛应用于多种疾病的治疗过程, 为众多患者的康复提供了重要支持^[6]。近年来, 研究发现黄芪及其主要成分黄芪甲苷和黄芪多糖等在调节免疫、抗炎、抗氧化以及改善胰岛素抵抗等方面表现出显著的药理作用, 这些作用为其治疗 PCOS 提供了理论依据^[4, 7]。黄芪甲苷被证实可以通过调节胰岛素信号

通路, 改善 PCOS 大鼠的胰岛素抵抗状态, 并降低血清中雄激素水平, 从而改善卵巢功能^[4, 8]。此外, 黄芪多糖能够通过调节沉默信息调节因子 1/叉头框转录因子 O1 (Sirt1/FoxO1) 信号通路, 抑制 PCOS 大鼠颗粒细胞的自噬过程, 从而对卵巢组织的病理改变起到改善作用^[7]。常春藤皂苷元是一种天然五环三萜类化合物, 具有抗炎、抗氧化等药理作用, 从其药理机制推测, 常春藤皂苷元可能通过抑制炎症反应和氧化应激, 改善 PCOS 相关的代谢紊乱和激素失衡^[9]。网络药理学作为一种新兴的多学科交叉研究方法, 近年来在医药研究领域备受关注, 它通过构建药物-靶点-疾病网络模型, 系统分析药物的作用机制, 能够从整体层面揭示中药复方或单体成分的多靶点、多途径药理作用, 为中药现代化研究提供了有力工具, 有助于深入理解中药复杂体系的治疗原理^[10]。而分子对接技术是一种基于计算机模拟的药物设计手段, 通过模拟药物分子与靶点蛋白之间的结合过程, 预测其结合亲和力及作用模式, 为药物作用机制的研究提供了重要的技术支持^[10]。

本研究旨在借助网络药理学与分子对接技术, 深入剖析黄芪在 PCOS 治疗中的机制, 以期黄芪在 PCOS 临床治疗中的应用提供坚实的理论支撑, 同时为开发高效且安全的 PCOS 治疗药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人卵巢癌颗粒细胞 (KGN) 细胞 (上

海抚生实业有限公司)。

1.1.2 药物与试剂 DMEM/F12 完全培养基(美国 Gibco 公司,批号 C11995500BT),10% FBS、1% 青链霉素(美国 Gibco,批号 26140079、10378016),膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司,批号 AP101),白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 JL13044),白细胞介素-18(IL-18)ELISA 试剂盒(上海维亦特生物,批号 WL-H19303),脱氢表雄酮(DHEA)ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程技术有限公司,型号 CSB-E08226h),睾酮 ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号 230869M)。

1.1.3 仪器 MB-580 型酶标仪(深圳汇松科技发展有限公司),FACSymphony A5 流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson and Company 公司),TDZ5-BP 离心机(张家港市鑫栎晨离心机械有限公司),CFX 96 Touch 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)仪(美国 Bio-Rad Laboratories, Inc. 公司)。

1.2 网络药理学与分子对接

1.2.1 黄芪有效成分-靶点筛选 本研究通过检索 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、BATMAN (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)、ETCM^[11] (<http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/>)、TCMID (<https://bidd.group/TCMID/index.html>)、TCMIP(<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/>)、HERB (<http://herb.ac.cn/>) 数据库,对黄芪的活性成分进行了系统筛选,并参考 PubMed、知网、维普、万方等数据库中的相关文献,进一步补充和丰富了黄芪活性成分的信息,全面梳理了黄芪活性成分及其蛋白靶点的相关资料。在筛选过程中,以吸收、分布、代谢和排泄(ADME)原则为依据,将口服生物利用度(OB)和药物相似性(DL)作为关键药动学参数进行筛选,设定筛选标准为口服生物利用度(OB)不低于 30%,药物相似性指数(DL)不小于 0.18。从 PubChem 数据库(PubChem)下载化学结构式或 SMILES 编号。基于 TCMSP 等数据库以及 SwissTargetPrediction 数据库,选择物种为“Homo sapiens”,预测活性成分的潜在作用靶点,并通过 Uniprot 蛋白质数据库(UniProt)获取靶点的基因名称及基因 ID 信息。

1.2.2 PCOS 靶点筛选及黄芪-PCOS 交集靶点筛选 以“polycystic ovary syndrome”为关键词,在治疗靶

点数据库(TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中分别检索出 PCOS 的相关靶点,经过合并与去重处理后,筛选出潜在的靶点。随后,将黄芪的作用靶点(由数据库预测得出)以及 PCOS 相关疾病靶点上传至 Jvenn 平台 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/>),通过该平台确定黄芪与 PCOS 的交集靶点,并绘制交集靶点的韦恩图。

1.2.3 构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络 借助 Cytoscape 3.7.1 软件 (<https://cytoscape.org/>),构建了涵盖“药物-活性成分-靶点-疾病”的复杂关系网络模型。通过 NetworkAnalyzer 插件对网络进行拓扑学分析,依据拓扑学参数筛选核心成分及靶点。

1.2.4 构建蛋白质相互作用(PPI)网络 本研究将黄芪与 PCOS 的交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>),在该数据库中,设定生物种类为人类,并将最低置信度阈值设定为 0.400,以此来获取蛋白质相互作用的核心网络关系图。随后,将所得结果以 TSV 格式导出,并导入 Cytoscape 3.7.1 软件,借助该软件进一步构建药物与疾病靶蛋白的 PPI。在构建完成的 PPI 网络图上,通过网络拓扑学分析,依据靶点的 degree 值,筛选出排名前 3 的靶标蛋白,将其作为核心靶点,以便后续更深入地分析黄芪对 PCOS 的潜在作用机制。

1.2.5 基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 本研究利用 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/>) 对交集靶点进行 GO 与 KEGG 通路富集分析,分析过程中设定了筛选阈值,具体为 *P* 值小于 0.01,最小计数为 3,富集因子大于 1.5。为了更直观地呈现分析结果,进一步借助微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制了高级气泡图与直方图,并依据 *P* 值从小到大对结果进行了排序,从而实现了对 GO 和 KEGG 富集分析结果的可视化呈现。

1.2.6 分子对接验证 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取配体的 mol2 格式文件,该数据库涵盖了广泛的化学和生物学数据。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取受体的 pdb 格式文件,该数据库提供了丰富的生物大分子结构信息。在 SwissDock 软件中,对受体和配体依次进行去水处理、加氢处理、分配电荷以及设置可旋转键等操作,以优化分子对接的条件。随后,将 degree 值排名前 3 的核心靶点分别与黄芪的有效成分进行

分子对接,并将对接结果导入 Pymol 软件进行可视化处理,以便更直观地观察分子间的相互作用。

1.3 体外实验验证

1.3.1 KGN 细胞的培养、模型建立和活力检测 采用含 10% FBS、1%青链霉素的 DMEM/F12 完全培养基在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 KGN 细胞。取生长状态良好的 KGN 细胞,常规消化后按 1×10⁵ 个/孔接种至 96 孔板中,参考文献报道^[12-13]方法,将 KGN 细胞在无血清的 DMEM/F12 培养基中孵育 24 h 后使用 100 ng/mL 肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 处理 24 h 以模拟 PCOS 下的细胞损伤状态。按处理方式不同,将 KGN 细胞分为 5 组:对照组、模型组 (TNF-α 处理)、常春藤皂苷元低剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 0.01 μmol/L)、中剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 0.10 μmol/L) 和高剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 1.00 μmol/L)。培养 24 h 后采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测细胞活力,晃匀 10 s 后于酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度 (A) 值。

1.3.2 流式细胞术检测 KGN 细胞凋亡 将 KGN 细胞分为 5 组:对照组、模型组 (TNF-α 处理) 和常春藤皂苷元低剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 0.01 μmol/L)、中剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 0.10 μmol/L) 和高剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 1.00 μmol/L)。KGN 细胞培养 24 h 后漂洗,300 μL 工作液重悬,加入 10 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI 避光培养 20 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.3 ELISA 检测 IL-1β、IL-18、DHEA 及睾酮浓度 将 KGN 细胞分为 5 组:对照组、模型组 (TNF-α 进行处理)、常春藤皂苷元低剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 0.01 μmol/L)、中剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 0.10 μmol/L) 和高剂量组 (TNF-α 处理成膜后给予 1.00 μmol/L),KGN 细胞离心后的培养上清液,按照 ELISA 试剂盒操作说明方法检测 IL-1β、IL-18、DHEA 及睾酮的浓度。

1.3.4 RT-qPCR 检测肿瘤蛋白 53 (TP53)、JUN、雌激素受体 1 (ESR1) 基因表达 通过 Trizol 法提取总 RNA 并逆转录为互补 DNA (cDNA) 后,将 cDNA 与荧光染料及水混合均匀,随后分别加入 TP53、JUN、ESR1 和 β-肌动蛋白 (β-actin) 的定量引物。PCR 反应条件设定为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s,40 个循环。以 β-actin 作为内参基因,依据扩增曲线和熔解曲线,运用 2^{-ΔΔCt} 法对数据进行分析。TP53 正向引物序列:

5'-GAGGTTGGCTCTGACTGTACC-3',反向引物序列:5'-TCCGTCC CAGTAGATTACCAC-3'; JUN 正向引物序列:5'-TG GAGACCTTCAAGATCGAG-3',反向引物序列:5'-GCTGCTGTCCTCATCTGATG-3'; ESR1 正向引物序列:5'-CAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3',反向引物序列:5'-TGGAGACCTTCAAGATCGAG-3'; β-actin 正向引物序列:5'-CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3',反向引物序列:5'-AGGCATACAGGGACAGCACAG-3'。

2 结果

2.1 网络药理学与分子对接

2.1.1 活性成分及靶点预测 共筛选出黄芪中的 17 种有效成分,具体包括白桦脂酸、豆蔻、常春藤皂苷元、(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-异丙基辛烷-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊并[a]菲-3-醇、异鼠李素、3,9-二-O-甲基尼索林、7-O-甲基异木犀草素、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷、(6aR,11aR)-9,10-二甲氧基-6a,11a-二氢-6H-苯并呋喃并[3,2-c]色烯-3-醇、联苯双酯、甲氧异黄酮、毛蕊异黄酮、山柰酚、脂肪酸、异木犀草素-7,2'-二-O-葡萄糖苷、1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯、槲皮素,相关成分信息见表 1。随后,借助 UniProt 数据库,将上述成分的名称转化为统一的基因 ID,进而预测出这些主要活性成分可能作用的靶点,共得到 209 个。

2.1.2 PCOS 靶点筛选及交集靶点的确定 经筛选,确定了 209 个黄芪可能的作用靶点。将这些靶点与 PCOS 相关的 2 476 个靶点进行详细的比对分析,最终精准地筛选出 133 个两者共有的交集靶点,见图 1。

2.1.3 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络的构建及核心成分的筛选 本研究构建的“药物-活性成分-靶点-疾病”网络模型中,包含了 152 个节点以及 449 条边。基于对节点拓扑系数的深入分析,筛选出排名位居前 3 的化合物,分别为白桦脂酸、常春藤皂苷元和 7-O-甲基异木犀草素,见图 2。

2.1.4 交集靶点 PPI 网络构建及核心靶点筛选 将筛选得到的 133 个药物与疾病之间的交集靶点导入 STRING 数据库,以此构建 PPI 网络图,以便进一步分析这些靶点之间的相互作用关系(图 3A)。导出 PPI 网络数据,并借助 Cytoscape 3.7.1 软件中的 NetworkAnalyzer 插件,依据 degree 值开展首次网

表 1 黄芪活性成分的基本信息

Table 1 Basic information of active components in *Astragali Radix*

Mol ID	成分名称	OB/%	DL	Mol ID	成分名称	OB/%	DL
MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78	MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-二甲氧基-6a,11a-二氢-6H-苯并呋喃并[3,2-c]色烯-3-醇	64.26	0.42
MOL000239	豆蔻	50.83	0.29	MOL000387	联苯双酯	31.10	0.67
MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75	MOL000392	甲氧异黄酮	69.67	0.21
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-异丙基辛烷-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊并[a]菲-3-醇	36.23	0.78	MOL000417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24
MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL000371	3,9-二-O-甲基尼索林	53.74	0.48	MOL000433	脂肪酸	68.96	0.71
MOL000378	7-O-甲基异木犀草素	74.69	0.30	MOL000439	异木犀草素-7,2'-二-O-葡萄糖苷	49.28	0.62
MOL000379	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷	36.74	0.92	MOL000442	1,7-二羟基-3,9-二甲氧基紫檀烯	39.05	0.48
				MOL000098	槲皮素	46.43	0.28

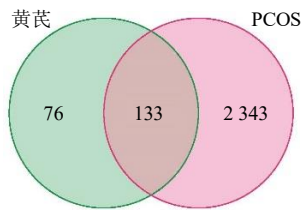


图 1 黄芪与 PCOS 共有靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of common targets between *Astragali Radix* and PCOS

络拓扑分析, 以 degree 中位数作为初步筛选标准, 从而获得包含 33 个节点、161 条边的网络图 (图 3B)。再次运用 degree 中位数进行第二次网络拓扑分析, 最终筛选出 10 个核心靶点, 网络图中仅余 29 条边 (图 3C), 核心靶点分别为 JUN、TP53、ESR1、

丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、TNF、核因子 κB p65 亚基、IL-6、B 淋巴细胞瘤-2、细胞周期蛋白 D1 蛋白激酶 Bα。

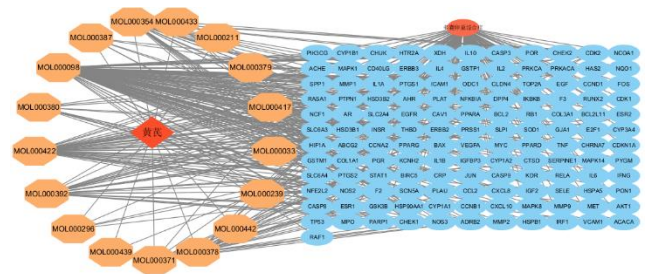


图 2 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络结构

Fig. 2 Network structure of “drug-active component-target-disease”

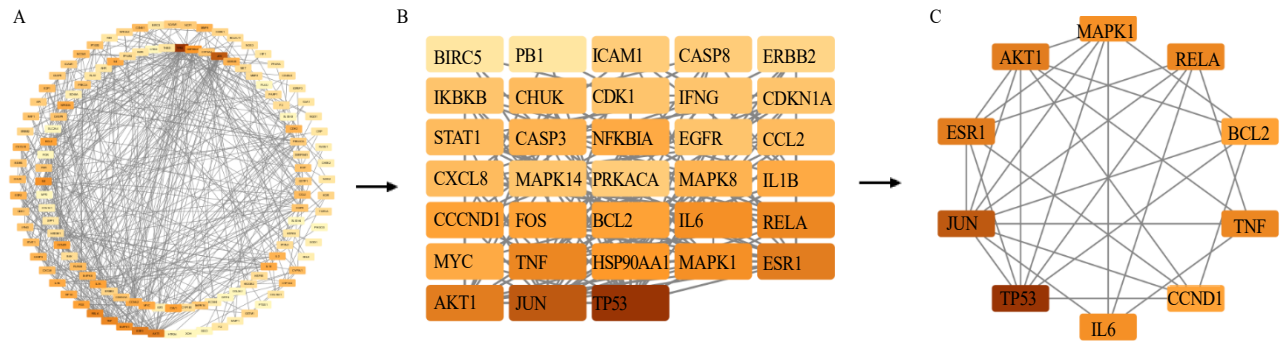


图 3 PPI 网络图 (A)、PPI 网络图第 1 次网络拓扑分析 (B) 和 PPI 网络图第 2 次网络拓扑分析 (C)

Fig. 3 PPI network diagram (A), PPI network diagram after the first network topology analysis (B), and PPI network diagram after the second network topology analysis (C)

2.1.5 GO 和 KEGG 富集分析 对 GO 通路进行富集分析, 分别筛选出了排名前 10 的生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 以及分子功能 (MF)。其中, BP 主要涉及对外源物质刺激的响应、对氧水平变化的响应、对细菌来源分子的响应、对脂多糖的响应、凋亡信号通路的调控、上皮细胞增殖、对缺氧的响应、伤口愈合以及对肽激素的响应等; CC 主要包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合体、蛋白激酶复合体、囊泡腔、膜筏、膜微区、质膜筏、转移酶复合体 (转移含磷基团)、质膜外侧、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合体以及洞穴体等; MF 主要包括蛋白激酶调节活性、激酶调节活性、泛素样蛋白连接酶结合、转录辅调控因子结合、泛素蛋白连接酶结合、DNA 结合转录因子结合、转录辅激活因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、细胞因子受体结合以及激酶激活活性等, 见图 4。

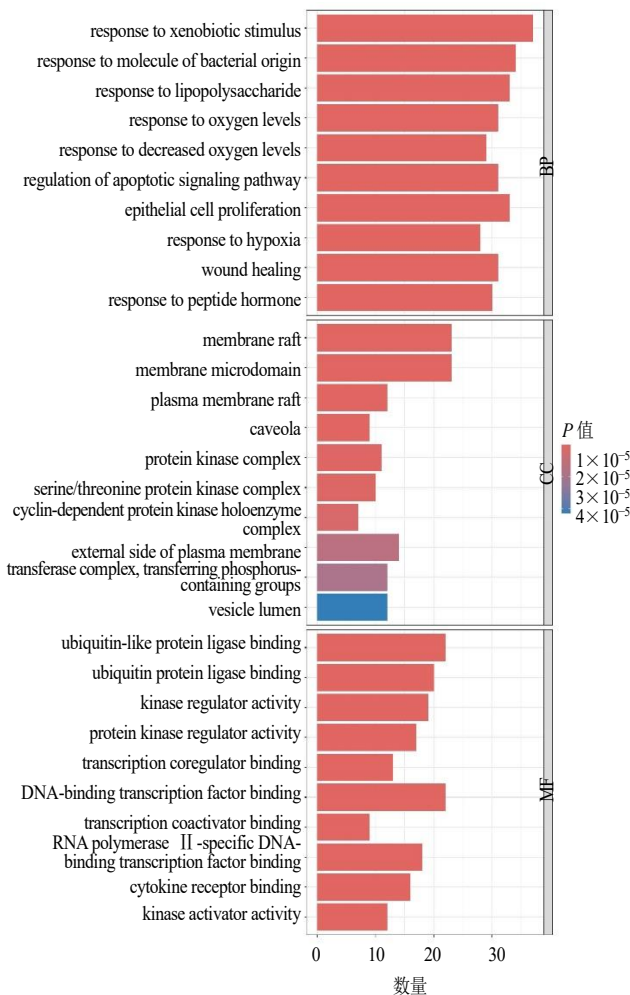


图 4 黄芪治疗 PCOS 交集靶点 GO 分析
Fig. 4 GO analysis of intersection targets of *Astragali Radix* in treatment of PCOS

对 KEGG 通路进行富集分析, 共筛选出 30 个排名靠前的通路, 主要包括流体剪切应力与动脉粥样硬化、人类巨细胞病毒感染、脂质代谢与动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、MAPK 信号通路、化学致癌中的受体激活、糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-RAGE) 信号通路、乙型肝炎病毒感染、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路以及丙型肝炎病毒感染等, 见图 5。

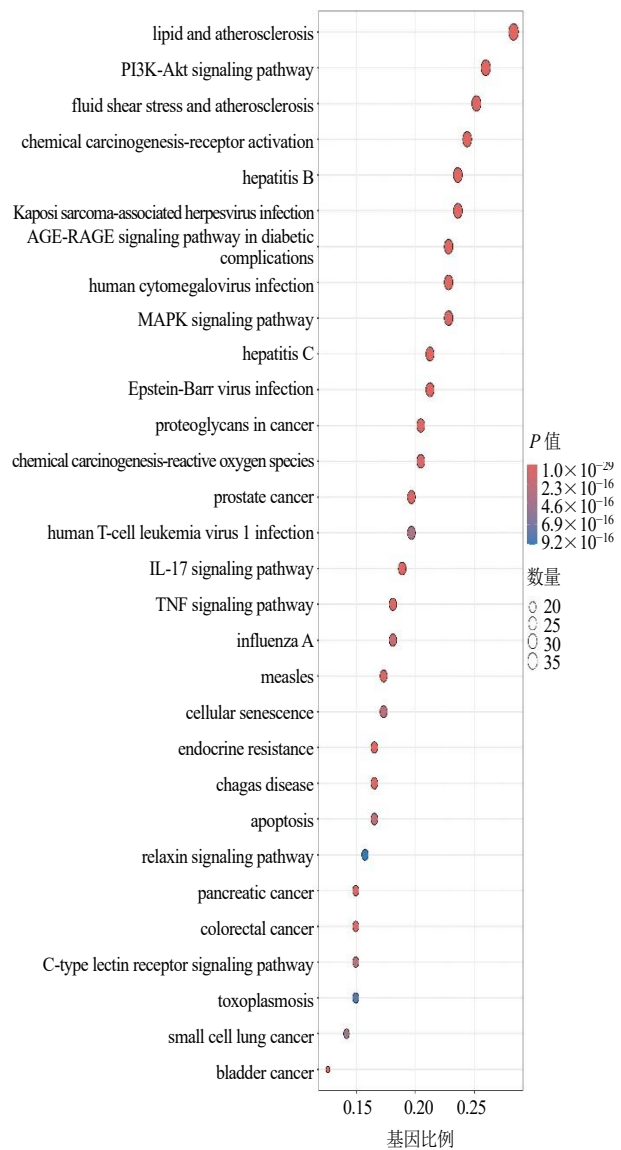


图 5 黄芪治疗 PCOS 交集靶点 KEGG 富集分析
Fig. 5 KEGG enrichment analysis of intersection targets of *Astragali Radix* in treatment of PCOS

2.1.6 分子对接 基于“药物-活性成分-靶点-通路-疾病”网络分析结果, 选取拓扑系数值排名前 3 位的中药活性成分白桦脂酸、常春藤皂苷元、7-O-

甲基异木犀草素作为配体。同时,选取 degree 值排名前 3 位的核心靶点 TP53、JUN、ESR1 作为受体。为了更全面地揭示这些活性成分与靶点蛋白之间的作用机制,采用了分子对接技术进行实验,精确计算了它们之间的结合能,见表 2。基于结合能的数值,筛选出结合亲和力最高的 3 对构象作为最终的对接结果,并利用 Pymol 软件对这些构象进行了可视化分析,以便更直观地展示分子间的相互作用,见图 6。

表 2 活性成分与靶点蛋白的结合能

Table 2 Binding energy between active components and target proteins

活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)		
	TP53	JUN	ESR1
白桦脂酸	-8.8	-7.3	-8.5
常春藤皂苷元	-8.1	-7.6	-9.6
7-O-甲基异木犀草素	-7.2	-5.8	-8.1

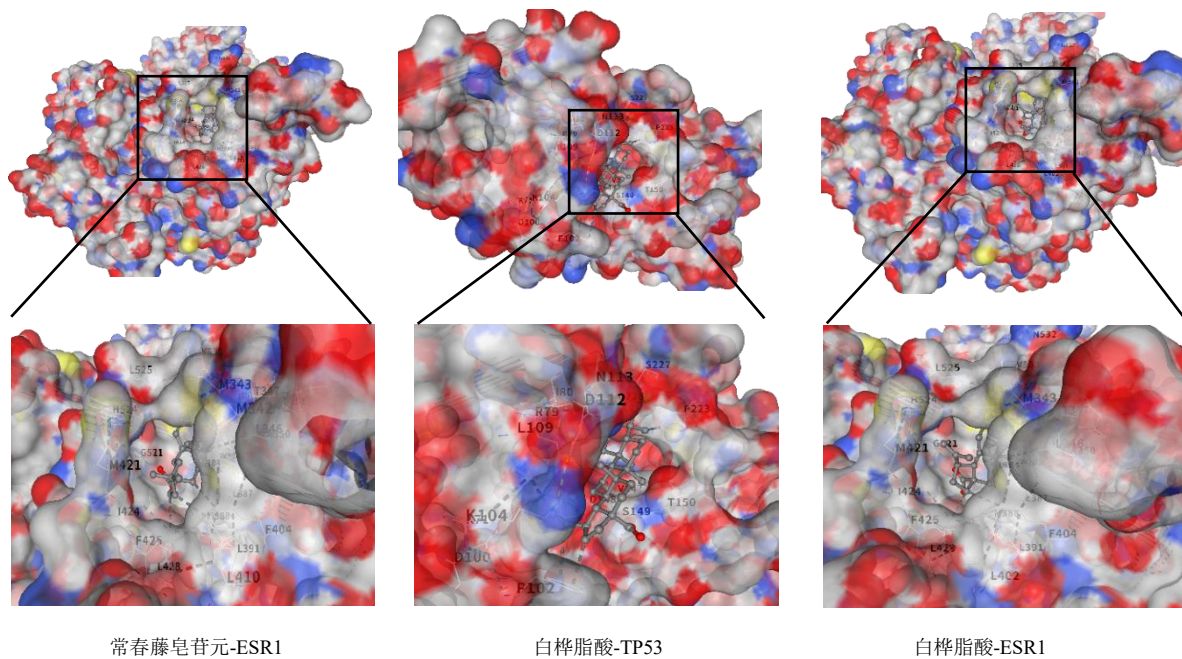


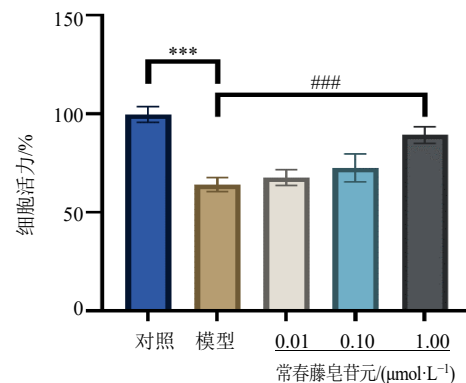
图 6 分子对接模式图

Fig. 6 Molecular docking mode diagram

2.2 体外实验

2.2.1 常春藤皂苷元对 KGN 细胞活力的影响 与对照组相比,模型组细胞活力显著降低($P<0.001$),表明模型建立成功。与模型组相比,不同浓度的常春藤皂苷元处理组均显示出细胞活力的提升,且该效应呈剂量相关性。其中,高剂量常春藤皂苷元处理可显著逆转模型诱导的细胞活力抑制,使细胞活力回升至接近对照组水平,与模型组相比差异显著($P<0.001$),见图 7。

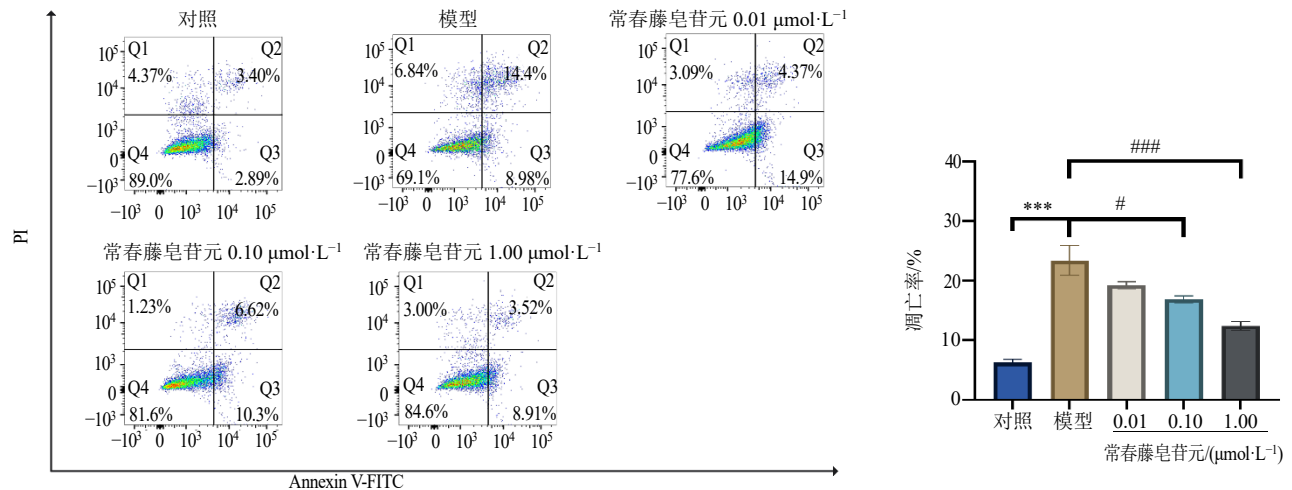
2.2.2 常春藤皂苷元对 KGN 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,模型组 KGN 细胞凋亡率显著升高($P<0.001$);经常春藤皂苷元高剂量组干预后,中、高剂量常春藤皂苷元组 KGN 细胞凋亡率较模型组均显著降低($P<0.05$ 、 0.001),见图 8。



与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs model group.

图 7 常春藤皂苷元对 KGN 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)Fig. 7 Effect of hederagenin on KGN cell viability ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 8 流式细胞术检测各组 KGN 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 8 Flow cytometry detection of apoptosis rate of KGN cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.2.3 常春藤皂苷元对 KGN 细胞中雄激素分泌和炎症因子表达水平的影响 与对照组相比, 模型组 KGN 细胞中 DHEA、睾酮、IL-1 β 、IL-18 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 低、中、高剂量常春藤皂苷元处理后, KGN 细胞中 DHEA、睾酮、IL-1 β 、IL-18 水平呈剂量相关性降低, 且高剂量组上述指标水平与模型组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.2.4 常春藤皂苷元干预对 PCOS 模型 KGN 细胞内 TP53、JUN、ESR1 基因表达水平 与对照组相比, 模型组中 TP53、JUN 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 而 ESR1 基因表达差异无统计学意义; 与模型组相比, 低剂量组、中剂量组 TP53、JUN 基因表达无显著变化; 高剂量组 TP53、JUN 基因表达较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。各组 ESR1 基因表达水平差异无统计学意义, 见表 4。

表 3 ELISA 检测各组 KGN 细胞中雄激素分泌和炎症因子表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 ELISA detection of androgen secretion and inflammatory factor expression levels in KGN cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	DHEA/(pg·mL ⁻¹)	睾酮/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-18/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	377.36 \pm 63.30	220.08 \pm 43.17	18.76 \pm 2.17	109.07 \pm 37.38
模型	—	2 433.48 \pm 328.64*	1 046.48 \pm 214.40*	97.81 \pm 16.91*	1 142.22 \pm 216.9*
常春藤皂苷元	0.01	2 191.89 \pm 233.55*	992.67 \pm 146.09*	79.86 \pm 16.78*	950.86 \pm 150.09*
	0.10	1 945.02 \pm 237.98*	775.04 \pm 105.50*	65.88 \pm 15.96*	831.05 \pm 126.59*
	1.00	1 371.64 \pm 313.44*#	628.29 \pm 29.96*#	46.71 \pm 6.98*#	501.38 \pm 38.46*#

与对照组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group.

表 4 RT-qPCR 检测各组 KGN 细胞中 TP53、JUN 和 ESR1 基因的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 RT-qPCR detection of TP53, JUN, and ESR1 gene expression levels in KGN cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	mRNA 相对表达量		
		TP53	JUN	ESR1
对照	—	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.08
模型	—	1.75 \pm 0.07*	2.04 \pm 0.11*	1.13 \pm 0.05
常春藤皂苷元	0.01	1.71 \pm 0.04*	1.95 \pm 0.09*	1.07 \pm 0.04
	0.10	1.67 \pm 0.03*	1.92 \pm 0.10*	1.05 \pm 0.05
	1.00	1.38 \pm 0.03*#	1.37 \pm 0.02*#	1.05 \pm 0.02

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。
 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group.

3 讨论

PCOS 是一种复杂的内分泌代谢紊乱疾病,其发病机制较为复杂,涉及多种因素,如胰岛素抵抗、高雄激素血症、氧化应激以及炎症反应等^[14-15]。黄芪及其有效成分在 PCOS 治疗中的作用已得到多项研究证实,其机制主要涉及调节代谢紊乱、改善胰岛素抵抗及保护卵巢功能。黄芪甲苷在对肥胖型 PCOS 大鼠的实验中表现出显著的疗效,能够有效降低大鼠的体质量、卵巢指数以及血清中的睾酮和黄体生成素水平,显著改善胰岛素抵抗状况^[4,8]。其作用机制与抑制 MAPK/细胞外调节蛋白激酶信号通路的活化密切相关,黄芪甲苷还可平衡性激素水平,有效缓解氧化应激损伤,并下调甾类激素合成急性调节蛋白的表达^[4,8]。黄芪多糖在 PCOS 治疗中发挥重要作用,其可通过激活 PI3K/Akt 信号通路,有效下调血清中睾酮与黄体生成素的水平,同时上调卵泡刺激素水平,进而显著改善卵巢组织的病理变化,黄芪多糖还可通过抑制 Sirt1/FoxO1 通路,减少颗粒细胞的自噬现象,并调节肠道菌群的多样性,从而对代谢紊乱起到改善作用^[7,16]。黄芪与丹参配伍可协同降低血清睾酮及胰岛素水平,下调雄激素受体信使核糖核酸及蛋白表达,同时上调胰岛素受体表达,通过多靶点改善高雄激素及高胰岛素状态^[6,10]。此外,黄芪提取物能上调胰岛素受体底物 1 表达,降低胰岛素及睾酮水平,增加黄体数量,减少囊性卵泡^[17]。结果表明,黄芪及其有效成分能够借助多条通路作用于多个靶点发挥治疗 PCOS 的作用。

本研究通过 TCMSP 等数据库筛选出黄芪的 17 个有效成分,并预测其 209 个作用靶点。与 PCOS 的 2476 个靶点进行比对,获得 133 个交集靶点。构建的“药物-活性成分-靶点-疾病”网络,筛选出白桦脂酸、常春藤皂苷元、7-O-甲基异木犀草素为核心成分。白桦脂酸是一种天然的五环三萜类化合物,具有抗炎、抗氧化等生物活性。研究表明,白桦脂酸可能通过调节炎症反应和氧化应激来对 PCOS 产生影响^[18]。研究显示,常春藤皂苷元是桂枝茯苓丸的核心成分之一,该药方可通过调节脂质和动脉粥样硬化等信号通路,作用于 Akt1、表皮生长因子受体、IL-6、TNF、TP53 等靶点,从而对 PCOS 起到治疗作用^[19]。在 PCOS 的研究中,7-O-甲基异木犀草素及其类似物木犀草素被发现具有潜在的治疗作用,根据 Shi 等^[20]研究,木犀草素及其类似物木犀草素-7-甲醚能够通过抑制芳香化酶介导的雌激

素生物合成来缓解 PCOS,其作用机制涉及对肿瘤进展位点 2 的抑制。PPI 网络分析进一步筛选出 TP53、JUN、ESR1 等 10 个核心靶点,TP53、JUN 和 ESR1 是 PCOS 中的关键靶点,其异常表达与 PCOS 的发病过程有着极为密切的关联。TP53 作为一种关键的肿瘤抑制基因,在细胞周期的精细调控、细胞凋亡的诱导以及应激反应的响应过程中扮演着不可或缺的角色,研究表明,TP53 的异常表达与 PCOS 患者的胰岛素抵抗和卵巢功能障碍密切相关^[21]。JUN 是一种转录因子,其在细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用,研究表明,JUN 的异常表达与 PCOS 患者的炎症反应和氧化应激密切相关^[22]。ESR1 是雌激素受体 α ,其在调节生殖功能和代谢过程中发挥重要作用,研究表明,在 PCOS 患者中,ESR1 的异常表达与高雄激素血症及胰岛素抵抗之间存在着极为紧密的关联^[23-24]。这些研究结果表明,TP53、JUN 和 ESR1 是 PCOS 中的潜在靶点,其异常表达与 PCOS 的多种病理生理过程密切相关。分子对接结果显示,白桦脂酸、常春藤皂苷元、7-O-甲基异木犀草素与核心靶点 TP53、JUN、ESR1 均有较好结合能力,其中常春藤皂苷元与 ESR1 结合能达 -9.6 kJ/mol,亲和力较强。这些结果进一步支持了黄芪及其活性成分在治疗 PCOS 中的潜在作用机制,即通过与关键靶点的结合,调节 PCOS 的病理生理过程。GO 富集分析结果显示,交集靶点广泛参与了对外源物质刺激的响应、细胞周期的精细调控等重要的生物过程,还涵盖了转录因子结合、酶结合等关键功能,以及膜筏、蛋白激酶复合体等细胞组分的构成。KEGG 富集分析则进一步揭示了包括 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路在内的 30 个与疾病发生发展密切相关的关键信号通路。TNF- α 构建的 PCOS 模型 KGN 细胞,呈现出活力降低、凋亡率升高,且 DHEA、睾酮及 IL-1 β 、IL-18 水平上升的病理特征,与 PCOS 患者卵巢颗粒细胞功能异常及炎症-高雄激素紊乱状态一致。高剂量常春藤皂苷元可显著逆转上述改变,这与分子对接结果呼应,其与 TP53、JUN、ESR1 均有良好结合能力,尤其与 ESR1 结合能最低;RT-qPCR 亦显示高剂量组可下调 TP53、JUN 基因表达。结合前期网络药理学发现的 PI3K/Akt、MAPK 通路,提示常春藤皂苷元可能通过结合核心靶点、调控关键通路,保护颗粒细胞功能、抑制炎症与高雄激素,为黄芪多成分-多靶点-多通路治疗 PCOS 提供证据。

综上所述,通过网络药理学和分子对接技术的分析,本研究揭示了黄芪中 17 个有效成分能够通过 133 个交集靶点对 PCOS 发挥治疗作用,其中核心成分包括白桦脂酸、常春藤皂苷元、7-O-甲基异木犀草素等,核心靶点包括 TP53、JUN、ESR1 等,通过与靶点的结合,激活或抑制 PI3K/Akt、MAPK 等关键信号通路,调节炎症反应、胰岛素抵抗等病理过程,改善卵巢功能。为黄芪在 PCOS 治疗中的应用提供了多成分、多靶点、多通路的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 陈星蓓,王洁,俞瑾,等.多囊卵巢综合征国内外指南或共识治疗方案分析[J].中华中医药学刊,2023,41(11):86-91.

[2] 周惠芳,洪艳丽,刁飞扬,等.多囊卵巢综合征中西医结合诊疗指南(2024年版)[J].中医杂志,2025,66(6):649-656.

[3] Aversa A, Vignera S L, Rago R, et al. Fundamental concepts and novel aspects of polycystic ovarian syndrome: Expert consensus resolutions [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 516.

[4] 刘冷,贺春花.黄芪甲苷对肥胖型多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗及 MAPK/ERK 通路的影响[J].中成药,2024,46(1):94-100.

[5] González F, Considine R V, Abdelhadi O A, et al. Saturated fat ingestion stimulates proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2021, 321(5): E689-E701.

[6] 麦秀云,张静,郭乐琴.黄芪丹参对多囊卵巢综合征大鼠雄激素/胰岛素受体表达影响的研究[J].世界中医药,2020,15(20):3051-3054.

[7] 阳丽,吴湘,李昂,等.黄芪多糖调控 Sirt1/FoxO1 通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究[J].中国比较医学杂志,2021,31(10):93-98.

[8] 李艳青,赵方,傅金英,等.黄芪甲苷对多囊卵巢综合征大鼠性激素水平及氧化应激损伤的影响[J].中国病理生理杂志,2020,36(12):2244-2250.

[9] 鲍姝畅,李松哲,蔡凌云,等.常春藤皂苷元及其衍生物的药理作用及分子机制研究进展[J].中国医药,2024,19(7):1083-1086.

[10] 廖韵诺,赵凯丽,郭宏伟.中药网络药理学的应用与挑战[J].中草药,2024,55(12):4204-4213.

[11] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, et al. ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.

[12] Yang D Y, Wang Y Q, Zheng Y J, et al. Silencing of lncRNA UCA1 inhibited the pathological progression in PCOS mice through the regulation of PI3K/AKT signaling

pathway [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 48.

[13] 符山花,包利利,赵达,等.抑制 NLRP3 炎症小体激活可调节自噬改善多囊卵巢综合征颗粒细胞凋亡[J].中国免疫学杂志,2024,40(8):1646-1652.

[14] 石百超,王宇,常惠,等.槲皮素改善多囊卵巢综合征的作用机制研究进展[J].中草药,2025,56(13):4852-4865.

[15] 丁蕾蕾,田秦杰.《多囊卵巢综合征合并胰岛素抵抗诊治专家共识》解读[J].中国临床新医学,2025,18(5):481-485.

[16] Li R Y, Hu R, Huang Y, et al. Astragalus polysaccharide alleviates polycystic ovary syndrome by reducing insulin resistance and oxidative stress and increasing the diversity of gut microbiota [J]. *Endocrine*, 2024, 83(3): 783-797.

[17] Nejati A, Shahri M P K, Farahvash T. Astragalus hamosus acts as an insulin sensitizer in the treatment of polycystic ovary syndrome rat models by affecting IRS1 expression [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022, 22(3): 348-356.

[18] 谷倩倩,肖新华.白脂素在代谢性疾病中的作用研究进展[J].中国现代医学杂志,2020,30(10):63-66.

[19] 黄婷婷,霍少川,麦哲芬,等.基于网络药理学和分子对接探讨桂枝茯苓丸“异病同治”多囊卵巢综合征和子宫内膜异位症的作用机制[J].广州中医药大学学报,2024,41(4):973-980.

[20] Shi X K, Peng T, Azimova B, et al. Luteolin and its analog luteolin-7-methylether from *Leonurus japonicus* Houtt suppress aromatase-mediated estrogen biosynthesis to alleviate polycystic ovary syndrome by the inhibition of tumor progression locus 2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 331: 118279.

[21] Biglari-Zadeh G, Sargazi S, Mohammadi M, et al. Relationship between genetic polymorphisms in cell cycle regulatory gene TP53 and polycystic ovarian syndrome: A case-control study and in silico analyses [J]. *Biochem Genet*, 2023, 61(5): 1827-1849.

[22] Ding L F, Jiang L L, Xing Z, et al. Map4k4 is up-regulated and modulates granulosa cell injury and oxidative stress in polycystic ovary syndrome via activating JNK/c-JUN pathway: An experimental study [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110841.

[23] Muccee F, Ashraf N M, Razak S, et al. Exploring the association of ESR1 and ESR2 gene SNPs with polycystic ovary syndrome in human females: A comprehensive association study [J]. *J Ovarian Res*, 2024, 17: 27.

[24] Mir R, Tayeb F J, Barnawi J, et al. Biochemical characterization and molecular determination of estrogen receptor- α (ESR1 PvuII-rs2234693 T>C) and MiRNA-146a (rs2910164 C>G) polymorphic gene variations and their association with the risk of polycystic ovary syndrome [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(5): 3114.

[责任编辑 金玉洁]