

基于网络药理学和实验验证探讨右归丸治疗卵巢早衰的作用机制

韩晓萌¹, 施京红^{1*}, 丁 辉², 王秦儒³, 高境媛⁴

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003

3. 安康市中医医院, 陕西 安康 725000

4. 陕西省中医医院, 陕西 西安 710003

摘要: **目的** 通过网络药理学方法和实验验证探讨右归丸治疗卵巢早衰(POF)的潜在作用机制。**方法** 通过网络药理学分析预测右归丸治疗 POF 的相关靶点, 环磷酰胺(CTX)构建小鼠 POF 模型进行实验验证, 实验分为对照组, 模型组, 右归丸低、中、高剂量组。通过大鼠血清激素水平、卵巢组织病理学观察等探究药效; 通过卵巢组织蛋白激酶 B(Akt1)/叉头框蛋白 O1(FOXO1)通路相关蛋白荧光强度观察、免疫印迹法对沉寂信息调节因子(SIRT1)/肿瘤蛋白 53(TP53)信号通路中的关键蛋白定量分析, 研究右归丸改善 POF 是否与该通路相关。**结果** 网络药理学分析得出右归丸治疗 POF 的潜在治疗靶点 145 个, 结合 KEGG 富集通路分析, 其核心靶点可能为 TP53、Akt1、SIRT1、FOXO1 等。与对照组相比, 模型组血清促卵泡激素(FSH)、促性腺激素释放激素(GnRH)水平显著升高($P < 0.01$), 抗穆勒管激素(AMH)水平显著降低($P < 0.01$); 卵巢组织卵泡闭锁增加; 染色可见模型组大鼠卵巢组织 p-丝氨酸和苏氨酸激酶 1(p-Akt1)、磷酸化叉头蛋白家族 1(p-FOXO1)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)蛋白荧光信号减弱, 兔抗人单克隆抗体(Bax)蛋白荧光信号增强; SIRT1 表达减少($P < 0.05$), Ac-p53 表达增加($P < 0.01$)。与模型组相比, 右归丸各剂量组上述血清激素水平均明显改善($P < 0.05$ 、 0.01); 卵巢组织内窦卵泡与闭锁卵泡均可见; 免疫荧光染色可见 p-Akt1、p-FOXO1、Bcl-2 蛋白荧光信号增强, Bax 蛋白荧光信号减弱; 右归丸高剂量组 SIRT1 表达较模型组升高($P < 0.05$), 右归丸各剂量组 Ac-p53 表达均降低($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 网络药理学及实验验证发现右归丸能够改善 POF 大鼠血清激素水平、抑制其病理性卵泡闭锁, 其作用可能与影响 Akt1/SIRT1/FOXO1/TP53 通路相关。

关键词: 卵巢早衰; 网络药理学; 右归丸; 细胞凋亡; Akt1/FOXO1/SIRT1/TP53 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)11-3164-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.011

Exploring mechanism of Yougui Pill in treatment of premature ovarian failure based on network pharmacology combined with experimental validation

HAN Xiaomeng¹, SHI Jinghong¹, DING Hui², WANG Qinru³, GAO Jingyuan⁴

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Shaanxi Academy of Chinese Medicine Sciences, Xi'an 710003, China

3. Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang 725000, China

4. Shaanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

Abstract: **Objective** To investigate the potential mechanisms of Yougui Pill (YGP) in treating premature ovarian failure (POF) through network pharmacology and experimental validation. **Methods** Network pharmacology analysis was employed to predict therapeutic targets of YGP for POF. A cyclophosphamide (CTX)-induced POF mouse model was established and divided into five groups: control, model, low-, medium, and high-doses YGP groups. The therapeutic efficacy of YGP was evaluated through serum hormone levels and ovarian histopathology. The roles of Akt1/FOXO1 and SIRT1/TP53 signaling pathways were investigated via immunofluorescence (IF) staining of pathway-related proteins (p-Akt1, p-FOXO1, Bcl-2, Bax) and quantitative analysis (Western blotting) of SIRT1 and acetylated P53 (Ac-p53). **Results** Network pharmacology analysis identified 145 potential therapeutic targets of YGP in the treatment of POF. Combined with KEGG

收稿日期: 2025-04-18

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2023-JC-YB-733); 陕西中医药大学 2021 年度研究生质量提升工程专项项目(ZG022); 陕西中医药大学 2023 年度研究生质量提升工程专项项目(CXSJ202319)

作者简介: 韩晓萌(1992—), 女, 硕士研究生, 从事中西医结合治疗妇科生殖内分泌疾病的机制研究。E-mail: 1093951198@qq.com

*通信作者: 施京红(1968—), 女, 博士, 教授, 从事中医药防治难治性疾病的免疫学分子机制研究。E-mail: jinghongshii@163.com

pathway enrichment analysis, the core targets may include TP53, Akt1, SIRT1, FOXO1. Compared to the control group, the CTX group exhibited significantly elevated serum FSH and GnRH ($P < 0.01$), reduced AMH ($P < 0.01$), increased follicular atresia, weakened IF signals of p-Akt1, p-FOXO1, and Bcl-2, enhanced Bax fluorescence, decreased SIRT1 expression ($P < 0.05$), and increased Ac-p53 ($P < 0.01$). Compared to the CTX group, YGP-treated groups showed normalized serum hormones ($P < 0.05, 0.01$), reduced follicular atresia, enhanced p-Akt1, p-FOXO1, and Bcl-2 signals, attenuated Bax fluorescence, upregulated SIRT1 in YGPH ($P < 0.05$), and downregulated Ac-p53 across doses ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** YGP ameliorates POF by regulating serum hormones, suppressing follicular atresia, and modulating the Akt1/SIRT1/FOXO1/TP53 pathways, as validated through network pharmacology and experimental studies.

Key words: premature ovarian failure; network pharmacology; Yougui Pills; apoptosis; Akt1/FOXO1/SIRT1/TP53 signaling pathway

卵巢早衰(POF),亦称原发性卵巢功能不全,是育龄女性面临的重要医学问题。该病症定义为40岁之前卵巢功能的丧失,其特征为卵巢储备减少伴随低雌激素水平和高促性腺激素水平^[1]。在实验室检测中,促卵泡激素(FSH)水平显著升高($>40\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$),而雌二醇(E_2)水平则相对较低,抗穆勒管激素(AMH)水平亦通常呈现下降趋势^[2]。临床表现多样,包括原发性闭经、继发性闭经或月经稀少等症状,以及生育能力减退,最终导致不孕,而骨质疏松、阿尔茨海默病等发病率显著提高,这些问题由生殖系统衰老继发,并逐渐成为焦点研究对象^[3]。当下,卵巢功能减退所致的生育问题尤为值得关注,POF之早期防治需求亦愈迫切。目前,激素替代疗法仍为临床治疗POF最常用的方法,但存在不可停药的问题,还可能加增心血管疾病和乳腺癌等危险因素^[4]。

《素问·上古天真论》云:“女子七岁,肾气盛……七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也”,指出女性正常生理“七七”49岁开始生殖机能衰退至极^[5]。中医古籍文献中并

无POF病名的记载,但“早衰”一词最早见于《素问·阴阳应象大论》,意指生理功能过早衰亡。天癸源于先天,“肾为先天之本”,天癸藏之于肾,而POF发生于40岁之前,天癸过早耗竭,说明POF的根本在于肾精过早的亏耗,故中医辨证治疗POF,多立足于肾^[6]。中医药在治疗POF方面取得了显著疗效,但在作用机制方面尚未完全清楚。

右归丸出自《景岳全书》,是经典补肾方剂,以“阴中求阳”为总旨,“益火之源”培补肾阳为基础^[7],对POF有效干预,具有良好的预防和治疗效果^[8]。既往研究^[9-10]已证实,补肾法可通过“肾-天癸-冲任-胞宫”对卵巢的生理机能进行调控,从而达到补肾阳,益精髓,温养活血的作用,改善女性卵巢储备功能减退,延缓卵巢衰老进程。

本研究从网络药理学角度出发,通过动物实验验证,研究补肾方药右归丸改善POF的可能效应成分与结合疾病靶标,旨在阐明其改善POF的机制。

1 材料

1.1 数据库及分析平台

本研究中所用主要数据库与分析平台。见表1。

表1 相关数据库和分析平台

Table 1 Relevant databases and analysis platforms

名称	网址
中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)	https://www.tcmsp-e.com/#/database
中医百科全书2.0(ETCM2.0)	http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/
中药分子机制生物信息学分析工具(BATMAN-TCM2.0)	http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/#/home
UniProt 数据库	https://www.uniprot.org
化学模组数据库(Pubchem)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI 基因数据库	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
GeneCards 数据库	https://www.genecards.org/
DRUGBANK 数据库	https://go.drugbank.com/
OMIM 数据库	https://omim.org/
卵巢万花筒数据库(OKdb)	https://appliedbioinfo.com/
STRING 数据库	https://string-db.org/
DAVID 数据库	https://david.ncifcrf.gov/
Venny(韦恩)图在线网址	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/
Cytoscape 软件	https://cytoscape.org/

1.2 动物

SPF 级 6 周龄雌性 SD 大鼠 40 只, 体质量 200~220 g。由西安交通大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号 SCXK (陕) 2023-002。饲养环境温度 (24±1) °C, 相对湿度 55%~65%, 自由进食、饮水, 实验前适应性饲养 1 周, 本实验获得了陕西中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (SUCMDL20220606001)。

1.3 药物与试剂

右归丸 (仲景宛西制药股份有限公司, 批号 Z41022170); 注射用环磷酰胺 (CTX, 0.2 g 按 $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ 计, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 H32020857); FSH、AMH、促性腺激素释放激素 (GnRH) ELISA 检测试剂盒 (上海优选生物科技有限公司, 批号 202406、202406、202407); 苏木精-伊红 (HE) 染液 (兰杰柯科技有限公司, 批号 BL700A); DAPI 染色试剂、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、重组抗 β 肌动蛋白 (β -actin) HRP 耦联抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1012、GB23302、ZB15001-HRP); 全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒、New-SUPER ECL 检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号 KGB5303、KGB2101、KGC4602); 沉默信息调节因子 (SIRT1) 重组兔单克隆抗体、肿瘤蛋白 53 (乙酰基 K382) (Ac-p53) 重组兔单克隆抗体、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 重组兔单克隆抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 重组兔单克隆抗体、蛋白激酶 B (Akt) 1/2/3 重组兔单克隆抗体、磷酸化 Akt (S473) 重组兔单克隆抗体、叉头框蛋白 O1A (FOXO1A) 重组兔单克隆抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 批号 ET1603-3、HA722762、ET1702-53、ET1603-34、HA721870、ET1607-73、ET1608-25); 磷酸化总 FOXO1 (Thr24/Thr32) 兔多克隆抗体、磷酸化 FOXO1A (Ser256) 兔多克隆抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号 AF3419、AF3417); 磷酸化 FOXO1 (Ser319) 兔多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, BS-20095R)。

1.4 仪器

ELx-808 酶标仪 (美国博腾仪器有限公司); Heraeus Fresco21 高速冷冻离心机 (中国赛默飞世尔科技公司); UC ENUIITY 病理切片机 (德国徕卡仪器有限公司); NIKON 4 ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜、垂直电泳仪、转印仪 (武汉塞维尔公司); DYY-

6C 型电泳仪电源 (北京六一生物科技有限公司); BG-gdsAUTO 710 MINI 化学发光成像分析系统 (北京百晶生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 右归丸改善 POF 的网络药理学研究

2.1.1 右归丸的潜在化学成分和作用靶点收集 利用 TCMSP、ETCM2.0 及 BATMAN-TCM2.0, 对熟地黄、附子、肉桂、山药、山茱萸、菟丝子、鹿角胶、枸杞子、当归、杜仲等右归丸中的 10 种中药成分进行了筛选, 并构建了相应的成分-靶点数据集。通过化学模组数据库 (PubChem) 对成分名称进行了标准化统一, 并借助蛋白质数据库 (UniProt) 将靶点转换为人类基因名称, 同时剔除了重复的成分和靶点。

2.1.2 POF 疾病靶点筛选 以 “premature ovarian failure” “premature ovarian insufficiency” “POF” “POI” 为检索词在 NCBI、GeneCards、DRUGBANK、OMIM、卵巢万花筒数据库 (OKdb) 等疾病基因数据库进行检索与筛选, 检索可能与 POF 相关的基因。使用 Uniprot 数据库将数据进行人源基因归纳, 将结果合并后删除重复值。

2.1.3 建立交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络及核心靶点筛选 采用 STRING 数据库构建右归丸与 POF 共有的 PPI 网络, 以实现不同蛋白质间潜在相互作用的可视化展示。设定最低交互分数阈值为中等置信度 (0.400)。利用 Cytoscape 3.9.1 软件构 PPI 网络图。运用 CytoHubba 插件和 CentiScaPe2.2 插件执行网络拓扑分析及节点中心性分析, 以筛选出网络中的核心靶点。

2.1.4 右归丸-中药-成分-靶点网络图构建及右归丸主要活性成分筛选 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建右归丸-中药-成分-交集靶点网络图, CentiScaPe 2.2 插件分析度 (degree) 值以筛选右归丸主要活性成分。

2.1.5 基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 为研究右归丸与 POF 共同作用靶点的生物学机制, 及潜在的改善 POF 的信号通路, 利用 DAVID 数据库对右归丸与 POF 共同靶点进行 KEGG 通路富集分析, 设置筛选条件为 $P < 0.05$, 错误发现率 (FDR) < 0.05 。

2.2 右归丸对 POF 模型大鼠的影响

2.2.1 动物分组、给药 将 40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠适应性喂养后按照随机数字表分为对照组、模型组及右归丸低、中、高剂量组。0.9%氯化钠溶液配制

成 CTX 溶液 (造模首日 $12.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、其余造模日 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。除对照组外其余各组 ip CTX 造模^[1]: 首日给药剂量 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 后 14 d 给药剂量 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 于造模 7 d 后每日早 9:00 取阴道分泌物涂片监测造模大鼠动情周期, 动情周期紊乱即为造模成功。造模成功后, 按照右归丸说明书人每日服用药量 $0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 通过体质量进行人与大鼠给药剂量换算, 得到大鼠给药剂量 $2.835 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各治疗组分别 ig 给予低、中、高剂量 1.418、2.835、 $5.670 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 右归丸-0.9%氯化钠溶液混悬液, 持续给药 28 d。

2.2.2 标本采集与处理 于末次 ig 给药 24 h 后取材。戊巴比妥钠 ip 麻醉大鼠后腹主动脉取血, 室温静置 3 h 后 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离血清用于 ELISA 检测。剥离一侧卵巢, 置于 10% 甲醛内固定 24 h, 石蜡包埋、切片, 制成 $4 \mu\text{m}$ 组织切片, 进行 HE 染色、免疫荧光染色。另一侧卵巢组织冻存, 用于 Western blotting 检测。

2.2.3 ELISA 法测定大鼠血清激素水平 取制备好的大鼠血清, 参照试剂盒说明书的步骤, 用 ELISA 法检测血清中 FSH、AMH、GnRH 水平。

2.2.4 HE 染色法观察各组卵巢组织 取大鼠卵巢组织石蜡切片, 按照 HE 染色试剂盒说明分别用苏木素染液、伊红染液染色 3 min, 之后常规脱水、透明、封片完成 HE 染色, 观察卵巢组织病理变化。

2.2.5 免疫荧光染色观察卵巢组织蛋白表达 取大鼠卵巢组织石蜡切片, 将切片置于抗原修复液中, 微波炉设置为高温低火, 以进行抗原修复; 用 3% BSA 室温封闭 30 min; 在切片上滴加适量山羊血清, 避光滴加抗体, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 孵育完成后, 用磷酸盐 (PBS) 清洗切片, 避光滴加对应 HRP 标记二抗完全覆盖组织, PBS 清洗切片, 每次 5 min, 共 3 次; 滴加对应的 TSA, 避光室温孵育 10 min, 孵育完后, 置于 TBST 中摇晃洗涤, 每次 5 min, 共 3 次; 避光滴加 DAPI 完全覆盖组织, 室温孵育 1 h; 吸去切片上的多余水分, 滴加抗荧光淬灭剂后封片, 对切片进行观察并拍照。

2.2.6 Western blotting 法测定卵巢组织 SIRT1/TP53 通路相关蛋白表达水平 冰上进行卵巢组织总蛋白提取, 根据试剂盒说明书按 Lysis Buffer: 磷酸酶抑制剂: 蛋白酶抑制剂: PMSF = 1 000: 10: 1: 10 比例配制裂解液, 30 mg 剪碎组织中加入 $300 \mu\text{L}$ 裂解液, 冷冻研磨仪研磨 1 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度并将各组

调至同一浓度; 蛋白样品凝胶电泳后转印至 PVDF 膜上, 用抗体稀释液按 1:2 000 比例稀释的 SIRT1、Ac-p53 一抗, β -actin (HRP 耦联) 一抗, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜; 一抗孵育结束后, 室温下 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; HRP 山羊抗兔 IgG 抗体按 1:5 000 稀释, 除 β -actin (HRP 耦联) 一抗孵育膜之外其他膜室温孵育 1 h, 所有膜 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 化学发光法显影, Image J 1.54 软件进行蛋白条带分析。

2.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行数据分析, 采用单因素方差 ANOVA 分析进行比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 右归丸干预 POF 的关键靶点及通路预测

3.1.1 右归丸药物成分及相关靶点 通过 TCMSP、ETCM2.0、BATMAN-TCM2.0 数据库检索, PubChem 数据库统一标准名称, 合并删除重复值后, 共获取右归丸药物活性成分 1 502 个。利用 Uniprot 数据库获取基因名称, 经去重后对应的靶点共有 2 112 个。

3.1.2 POF 疾病靶点 在 NCBI、GeneCards、DrugBank、OMI、OKdb 等数据库筛选疾病靶点, Uniprot 数据库统一名称, 合并数据集, 选取重复次数 ≥ 2 的靶点, 最后共得到疾病靶点 439 个。

3.1.3 交集靶点 Venn 图、PPI 网络构建 将所得右归丸活性成分靶点与 POF 靶点取交集, 得到 145 个右归丸改善 POF 的潜在靶点, 绘制 Venn 图, 见图 1-A。将交集靶点导入 STRING 平台, 删除游离靶点, 得到 PPI 网络图, 见图 1-B。

3.1.4 右归丸-中药-成分-交集靶点网络图 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建右归丸-中药-成分-交集靶点网络可视化分析图, 得到 1 030 个节点, 3 766 条边, 见图 2。通过节点中心性分析 degree 值筛选^[12], 高于平均值且按照由高到低排序, 得到右归丸中主要活性成分。见表 2。

3.1.5 筛选主要活性成分及核心靶点 利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建 PPI 互作网络图, 得到 141 个节点, 2 056 条边, 通过 CytoHubba 插件, 选择 MCC 法执行网络拓扑分析, 通过 CentiScaPe2.2 插件进行节点中心性分析, MCC 法网络拓扑排序为颜色由深至浅, degree 值排序节点从大到小, 见图 3-A, MCC 法筛选核心靶点 top10。见图 3-B。

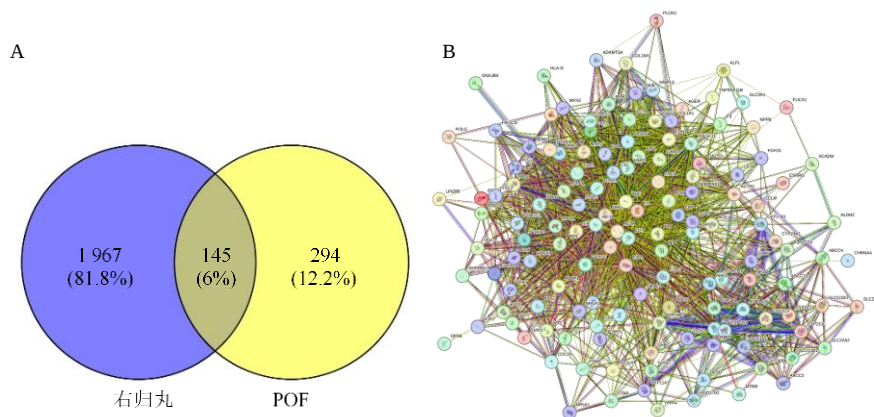
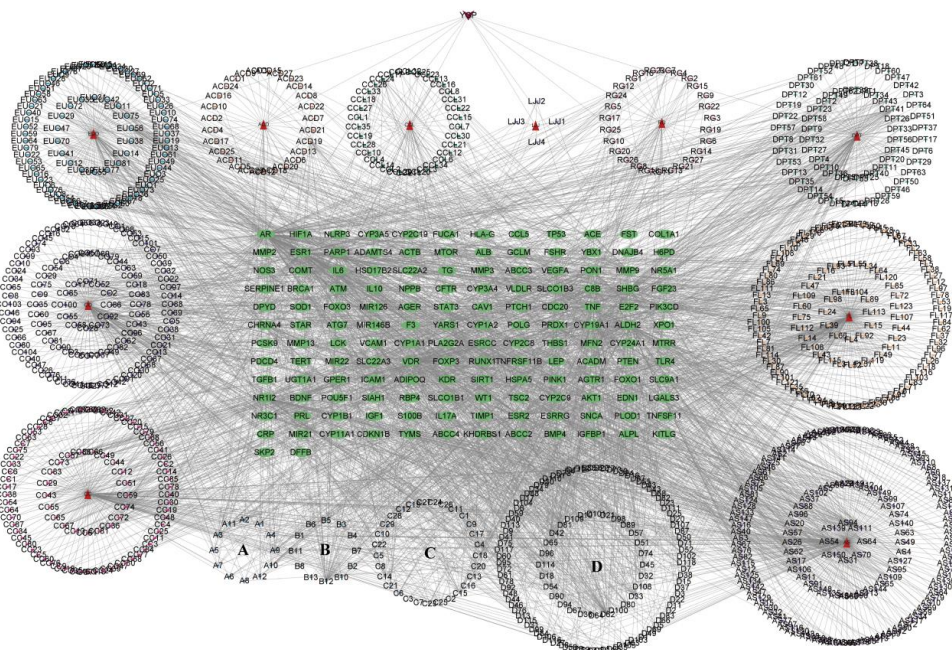


图 1 交集靶点图 (A) 与 STRING PPI 图 (B)

Fig. 1 Intersection target map (A) and STRING protein interaction map (B)



YGP-右归丸; CO-山茱萸; AS-当归; CC-肉桂; EUO-杜仲; CCL-菟丝子; FL-枸杞子; DPT-山药; ACD-附子; RG-熟地黄; LJJ-鹿角胶;

A-≥5 个中药共同含有的成分; B-4 个中药共同含有的成分; C-3 个中药共同含有的成分; D-2 个中药共同含有的成分。

YGP-Yougui Pill, CO-Corni Fructus; AS-Angelicae Sinensis Radix; CC-Cinnamomi Cortex; EUO-Eucommiae Cortex; CCL-Cuscutae Semen; FL-Lycii Fructus; DPT-Dioscoreae Rhizoma; ACD-Aconiti Lateralis Radix Praeparata; RG-ehmanniae Radix Praeparata; LJJ-Cervus nippon antler glue; A-components commonly found in over five traditional Chinese medicine; B-components commonly found in four traditional Chinese medicine; C-components commonly found in three traditional Chinese medicine; D-components commonly found in two traditional Chinese medicine.

图 2 右归丸-中药-成分-交集靶点网络图

Fig. 2 Yougui Pill-traditional Chinese medicine-component-intersection target network map

表 2 右归丸中主要活性成分

Table 2 Major active ingredients in Yougui Pill

序号	PubChem CID	成分	Degree 值	来源
1	969516	姜黄素	52	当归、山茱萸
2	5280343	槲皮素	50	杜仲、枸杞子、山茱萸、菟丝子
3	119245	薯蓣皂苷	30	山药
4	5280961	染料木黄酮	29	杜仲
5	2353	小檗碱	27	杜仲、枸杞子

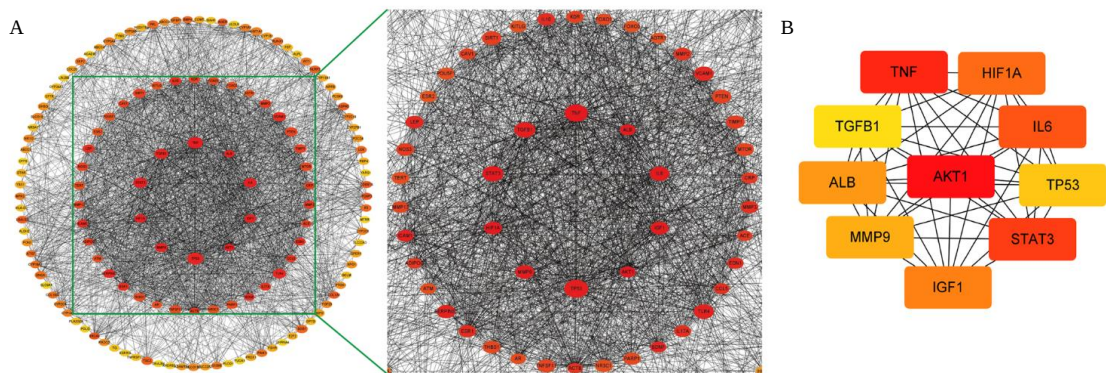


图 3 交集靶点 PPI 互作网络图 (A) 与 MCC 法筛选 top10 核心靶点 (B)
Fig. 3 Interaction network of intersection targets (A) and top 10 core targets (B)

3.1.6 KEGG 富集分析 通过 DAVID 数据库对潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析, 筛选条件 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$ 。KEGG 通路富集分析筛选后得到 92 条通路, 选取 P 值最小的前 20 作图。KEGG 通路富集分析前 20 的通路分别为: AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、蛋白质聚糖在癌症中的作用、脂质与动脉粥样硬化、HIF-1 信号通路、癌症中的通路、流体剪切力与动脉粥样硬化、FOXO 信号通路、细胞衰老、前列腺癌、内分泌抵抗、类固醇激素生物合成、PI3K-Akt 信号通路、化学致癌作用-受体激活、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗、癌症中的微小 RNA (MicroRNA)、人类 T 淋巴细胞白血病病毒 1 型感染、寿命调控通路、疟疾、卵巢类固醇生成、化学致癌作用-DNA 加合物。以上 20 条通路按富集靶点数量排序。通过 P 值大小与富集到通路的靶点数量综合分析, 与 POF 相关的通路可能是 PI3K-Akt 信号通路、细胞衰老、FOXO 信号通路。见表 3、图 4。

3.1.7 GO 富集分析 GO 富集分析筛选后得到生物学过程 (BP) 225 个、细胞成分 (CC) 26 个、分子功能 (MF) 56 个, 分别选取 P 值最小的前 10 作图 (图 5)。BP 包括基因表达的正调控、miRNA 转录的正调控、RNA 聚合酶 II 转录的正调控、缺氧响应、外源物质代谢过程、血管生成的正调控、凋亡过程的正调控、外源物质刺激的响应、PI3K-AKT 信号转导的正调控、ERK1 和 ERK2 级联的正调控。CC 包括细胞外空间、细胞外区、含蛋白质复合物、细胞外基质、细胞质、细胞内膜结合细胞器、血小板 α 颗粒内腔、内质网腔、细胞表面、染色质。MF 包括酶结合、相同蛋白质结合、类固醇结合、芳香

表 3 富集信号通路
Table 3 Enriched signaling pathways

ID	信号通路名称	靶点数量
hsa05200	癌症中的通路	28
hsa05205	蛋白质聚糖在癌症中的作用	23
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	21
hsa05417	脂质与动脉粥样硬化	20
hsa04933	AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用	19
hsa05206	癌症中的微小 RNA (MicroRNA)	18
hsa05207	化学致癌作用-受体激活	16
hsa05418	流体剪切力与动脉粥样硬化	15
hsa04218	细胞衰老	15
hsa05166	人类 T 淋巴细胞白血病病毒 1 型感染	15
hsa04066	HIF-1 信号通路	14
hsa04068	FOXO 信号通路	14
hsa05215	前列腺癌	12
hsa01522	内分泌抵抗	12
hsa00140	类固醇激素生物合成	10
hsa01521	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗	10
hsa04211	寿命调控通路	10
hsa05204	化学致癌作用-DNA 加合物	9
hsa05144	疟疾	8
hsa04913	卵巢类固醇生成	8

化酶活性、雌激素 16α -羟化酶活性、氧化还原酶活性, 作用于成对供体, 伴有分子氧的掺入或还原, 其中一个供体为还原型黄素或黄素蛋白, 并掺入一个氧原子、核受体活性、铁离子结合、单加氧酶活性、血红素结合。

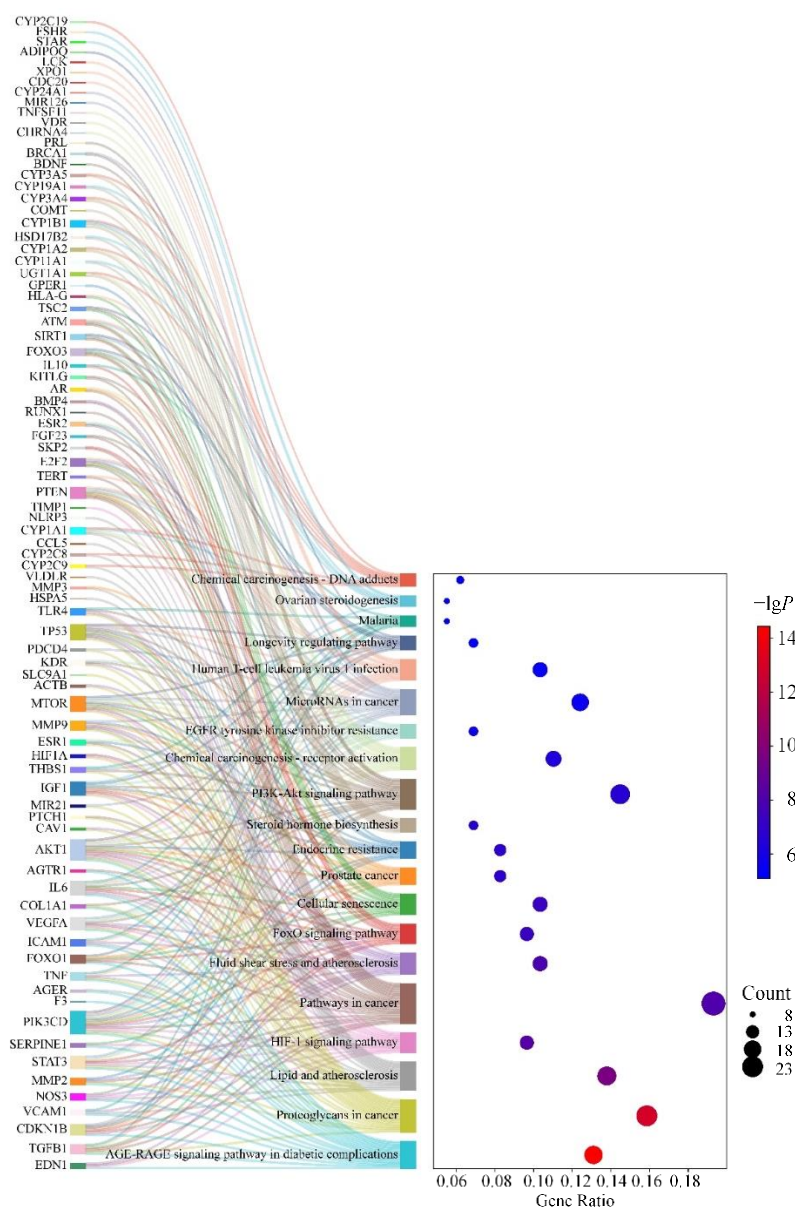


图 4 KEGG 富集分析图

Fig. 4 KEGG enrichment analysis map

3.2 右归丸对大鼠 POF 的改善作用

3.2.1 对 POF 大鼠血清 FSH、AMH、GnRH 激素水平影响 与对照组比较, 模型组大鼠血清 FSH、GnRH 水平显著升高 ($P < 0.01$), 血清 AMH 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 右归丸各剂量治疗组大鼠以上血清激素水平均得到明显改善 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见图 6。

3.2.2 对 POF 大鼠卵巢组织病理学影响 HE 染色结果显示, 对照组大鼠卵巢组织中可见各级卵泡。与对照组比较, 模型组大鼠卵巢组织中观察到多数卵泡出现闭锁卵泡的特征, 表明 CTX 诱导 POF 大

鼠模型成功。

右归丸各剂量组大鼠卵巢中虽然仍可观察到闭锁卵泡, 但也可见窦卵泡的出现, 表明右归丸能够有效改善 POF 大鼠的卵泡生长发育。见图 7。

3.2.3 卵巢组织免疫荧光染色观察蛋白表达 对比对照组, 模型组大鼠卵巢组织 p-Akt1 (Ser473)、p-FOXO1 (Thr24、Ser256、Ser319)、Bcl-2 的荧光阳性信号减少, 而 Bax 的荧光阳性信号增多; 相对于模型组, 右归丸各剂量组大鼠的卵巢组织 p-Akt1 (Ser473)、p-FOXO1 (Thr24、Ser256、Ser319)、Bcl-2 的荧光阳性信号增多, Bax 荧光阳性信号减弱。见图 8。

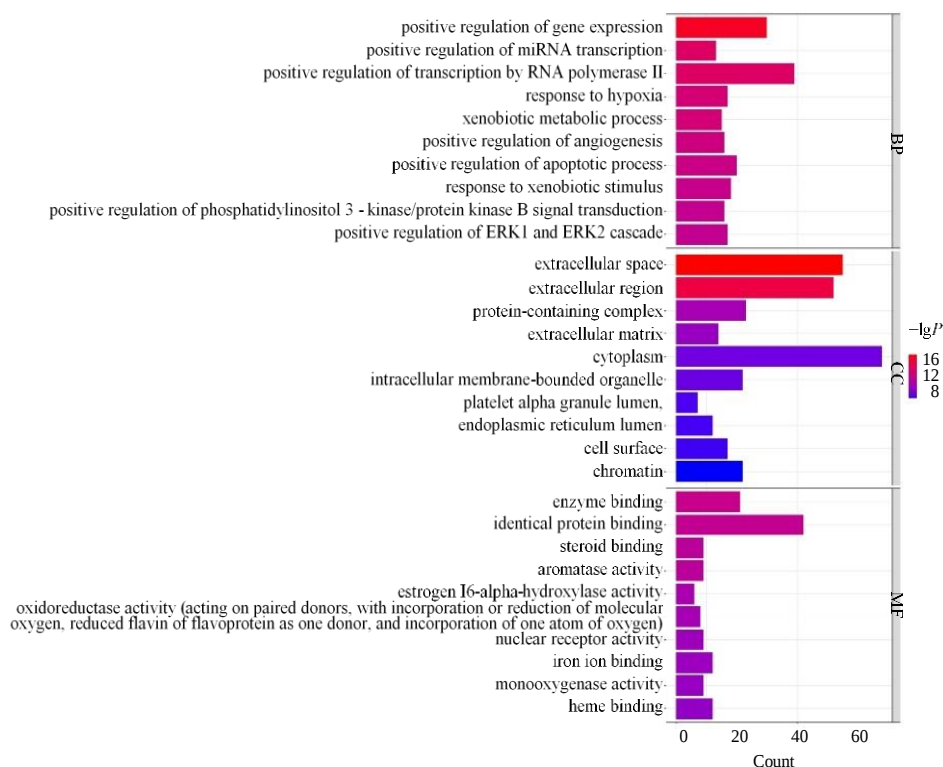
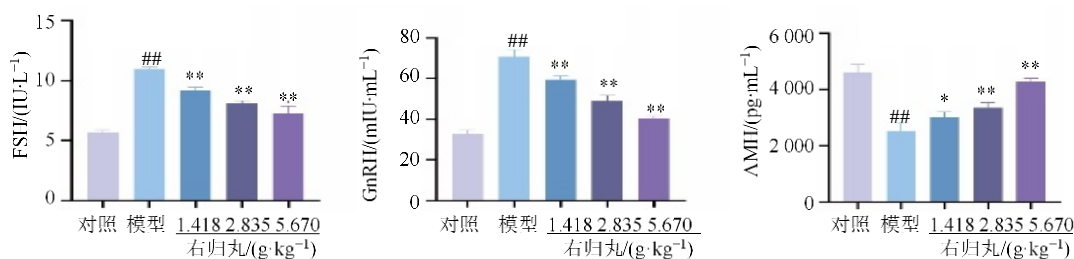


图 5 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis

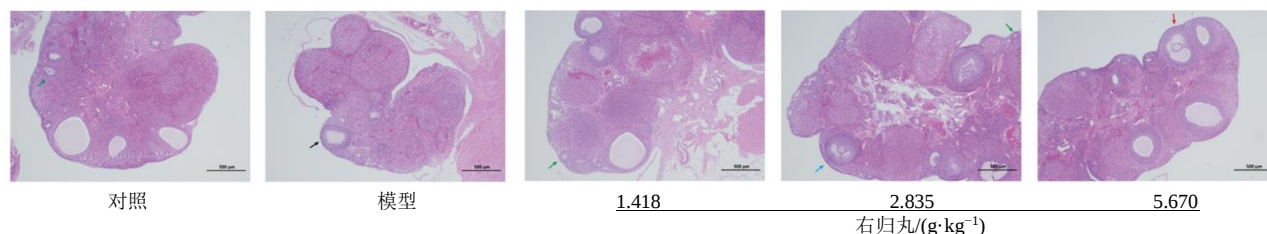


与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 6 大鼠血清 FSH、GnRH、AMH 激素水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 6 Serum hormone levels of FSH, GnRH, and AMH in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

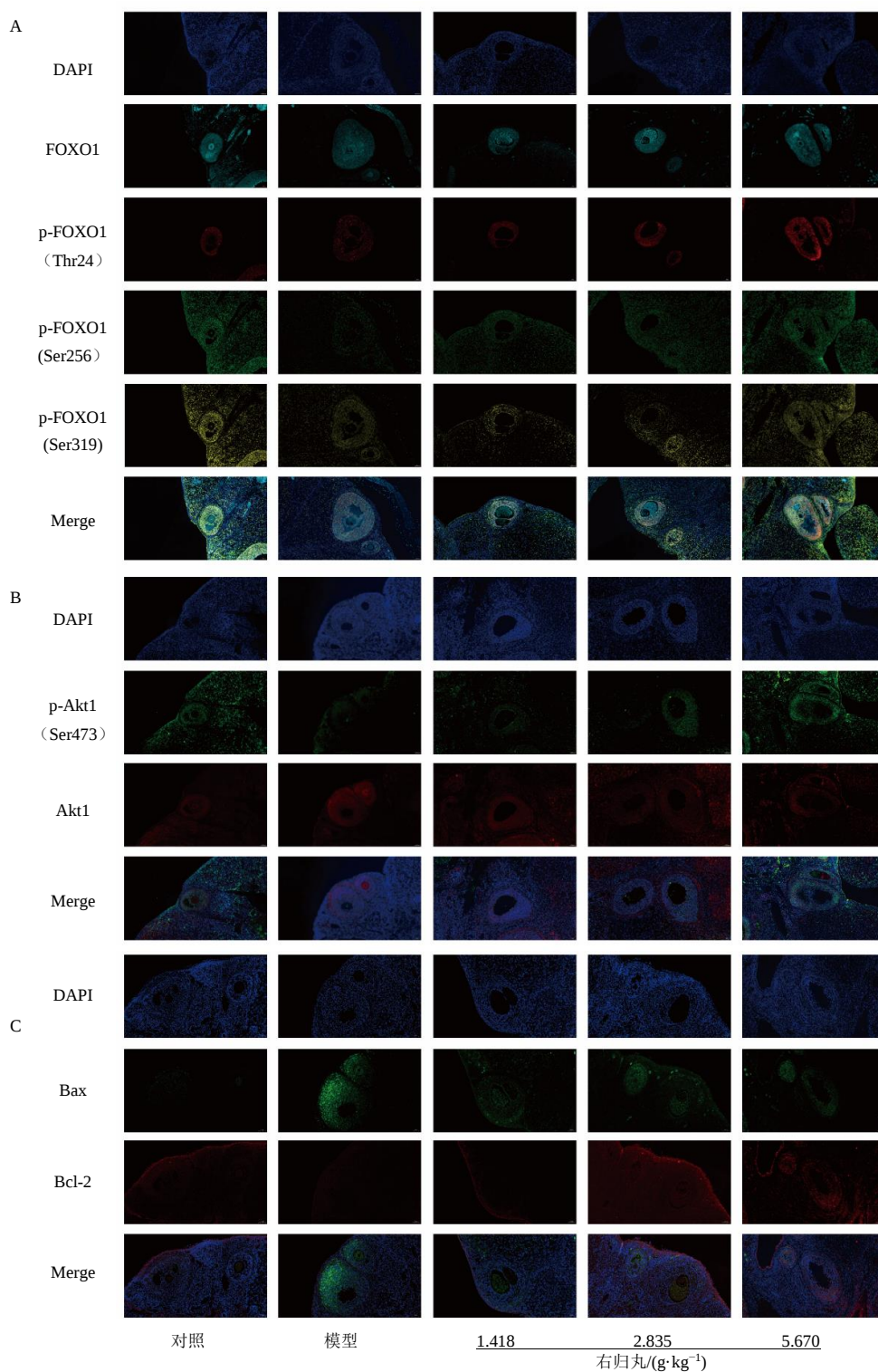


绿色箭头-初级卵泡; 蓝色箭头-次级卵泡; 红色箭头-成熟卵泡; 黑色箭头-闭锁卵泡。

Green arrow-primary follicle; Blue arrow-secondary follicle; Red arrow-mature follicle; Black arrow-atretic follicle.

图 7 大鼠卵巢组织 HE 染色 ($\times 4$)

Fig. 7 HE staining of ovarian tissue in rats ($\times 4$)



A-大鼠卵巢 FOXO1 (青)、p-FOXO1 (Thr24 红、Ser256 绿、Ser319 黄) 染色；B-大鼠卵巢 Akt1 (红)、p-Akt1 (Ser473 绿) 染色；C-大鼠卵巢 Bcl-2 (红)、Bax (绿) 染色。

A-Immunostaining FOXO1 (blue) and phosphorylated FOXO1 (p-FOXO1: Thr24 red, Ser256 green, Ser319 yellow) in rat ovaries; B-immunostaining of AKT1 (red) and phosphorylated Akt1 (p-Akt1: Ser473 green) in rat ovaries; C-immunostaining of Bcl-2 (red) and Bax (green) in rat ovaries.

图 8 免疫荧光检测 POF 大鼠卵巢组织相关蛋白表达 ($\times 200$)

Fig. 8 Immunofluorescence staining of ovarian tissue in POF rats ($\times 200$)

3.2.4 Western blotting 法测定卵巢组织蛋白表达 为了验证右归丸对 SIRT1/TP53 信号通路的影响, 对大鼠卵巢组织中的特定蛋白进行分析检测。Western Blotting 结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠卵巢组织 SIRT1 蛋白表达降低,

Ac-p53 蛋白表达增高 ($P < 0.01$ 、 0.05); 与模型组相比, 右归丸低、中剂量组 SIRT1 表达无显著差异, 右归丸高剂量组大鼠卵巢组织 SIRT1 蛋白表达增高, Ac-p53 蛋白表达降低 ($P < 0.01$ 、 0.05)。见图 9。

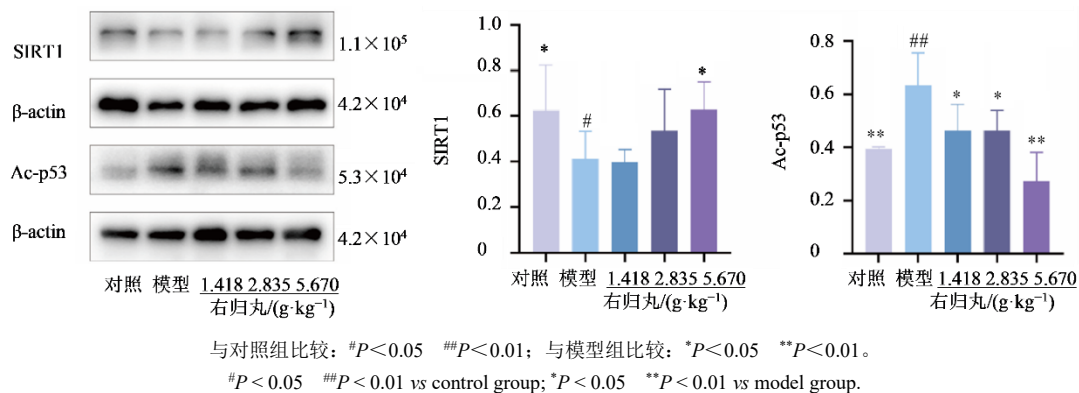


图 9 Western blotting 测定卵巢组织 SIRT1、Ac-p53 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Western blotting analysis of SIRT1 and Ac-p53 protein expression in ovarian tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

POF 是一种生殖内分泌疾病, 最核心的症状为不孕症, 且逐渐向年轻化发展^[13]。本研究应用网络药理学方法, 通过数据库进行右归丸有效活性成分及靶点筛选、疾病靶点筛选, 并进行靶点交集互作分析、GO、KEGG 富集分析, 以此预测出右归丸干预 POF 的主要有效活性成分可能为: 姜黄素、槲皮素、薯蓣皂苷、染料木黄酮、小檗碱; 相关信号通路为: PI3K/Akt 信号通路、细胞衰老和 FOXO 信号通路; 关键效应靶点可能为: TP53、Akt1、SIRT1、FOXO1。综上分析, 右归丸以多靶点多通路方式对 POF 进行干预。

通过 CTX 建立 POF 大鼠模型, 同时给予右归丸进行干预, 以验证网络药理学预测。动物实验证实, 右归丸可以显著调节 POF 大鼠的血清性激素水平, 改善卵巢病理形态, 减少卵泡的过度闭锁。其作用机制可能与网络药理学相关预测靶点有关, 即可能通过 Akt1/SIRT1/FOXO1/TP53 通路, 上调 SIRT1、p-Akt1、p-FOXO1、Bcl-2 表达, 下调 Ac-p53、Bax 表达, 改善 POF。

Akt1/SIRT1/FOXO1/TP53 通路通过精细的动态交互机制, 维持卵巢细胞的生存与凋亡平衡, 其功能失调与 POF 密切相关。本研究聚焦于这一通路的交互框架, 并深入探讨补肾中药复方在其中的调控机制, 旨在为卵巢功能障碍的治疗提供新的理论依据和干预策略。Akt1 在该通路中扮演着关键的信

号枢纽角色。其激活能够驱动 Akt1 的磷酸化 (Ser473), 进而介导下游的抗凋亡效应^[14]。Akt1 通过磷酸化 FOXO1 (Thr24/Ser256/Ser319), 促进其在胞质中的滞留, 抑制核内促凋亡基因的转录, 从而维持线粒体膜的稳定性^[15]。然而, 在病理状态下, Akt1 的失活会导致 FOXO1 的核转位, 激活促凋亡基因, 从而引发细胞凋亡^[16]。SIRT1 则通过去乙酰化修饰在该通路中发挥表观调控作用, SIRT1 能够去乙酰化 FOXO1 (Lys242/Lys245), 抑制其促凋亡活性, 并转而激活抗氧化基因^[17]。此外, SIRT1 还通过去乙酰化 TP53 (Lys382), 加速其降解, 从而阻断 DNA 损伤引发的过度凋亡^[18]。在氧化应激条件下, SIRT1 的活性受到抑制, 导致 FOXO1 的乙酰化和 TP53 的稳定化, 进而加剧细胞凋亡和 DNA 损伤^[19]。在 Akt1 与 SIRT1 双抑制的情况下, 核内的 FOXO1 与 TP53 协同激活促凋亡基因 Bax, 放大线粒体凋亡信号。这种协同作用在氧化应激条件下尤为显著^[20], 形成一个恶性循环: 氧化应激致使 Akt1/SIRT1 抑制、FOXO1 乙酰化/TP53 稳定 (乙酰化等)、DNA 损伤应答, 使线粒体通透性增加, 最终导致细胞凋亡和卵巢功能损伤^[21-22]。

本研究通过网络药理学方法探讨了补肾中药复方右归丸对卵巢功能调控的潜在机制, 揭示了 Akt1/SIRT1/FOXO1/TP53 通路在其中的关键作用。然而, 网络药理学作为一种系统生物学工具, 仍存在一些局限性, 如靶点预测的可靠性和多成分复方

作用机制的模糊性等,需要在后续研究中进行完善。未来可以进一步通过细胞实验及多组学分析来解析卵母细胞以及颗粒细胞的特异性响应网络,利用类器官模型或人源性细胞验证靶点-通路的保守性,提高临床转化潜力。采用“成分-靶点-效应”模块化分析,解析右归丸的君臣佐使配伍规律,以及开发纳米递送系统优化复方中低生物利用度成分的靶向性等多方向探索。

本研究揭示了 Akt1/SIRT1/FOXO1/TP53 通路在卵巢功能调控中的重要作用,初步发掘补肾方药右归丸“益肾填精、调补冲任”功能可能涉及的现代科学作用机制。补肾中药复方可能通过激活 Akt1 磷酸化级联、SIRT1 去乙酰化修饰、双靶点沉默促凋亡信号以及增强抗氧化防御等多维度机制,实现了对卵巢功能的有效保护。本研究为开发抗卵巢衰老中药新药和中西医整合治疗 POF 提供了一定的创新思维。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Touraine P, Chabbert-Buffet N, Plu-Bureau G, et al. Premature ovarian insufficiency [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10(1): 63.
- [2] 冯晓玲, 李力, 曲凡, 等. 早发性卵巢功能不全中西医结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2022, 63(12): 1193-1198.
Feng X L, Li L, Qu F, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of early onset ovarian insufficiency with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(12): 1193-1198.
- [3] Hamoda H, Sharma A. Premature ovarian insufficiency, early menopause, and induced menopause [J]. Best Pract Res Clin Endocrin Metab, 2024, 38(1): 101823.
- [4] Armeni E, Paschou S A, Goulis D G, et al. Hormone therapy regimens for managing the menopause and premature ovarian insufficiency [J]. Pract Res Clin Endocrin Metab, 2021, 35(6): 101561.
- [5] 张登本, 陈震霖. 《黄帝内经》论妇科及其意义 [J]. 中医药通报, 2024, 23(7): 1-5.
Zhang D B, Chen Z L. The Yellow Emperor's Inner Canon discusses gynecology and its significance [J]. Tradit Chin Med J, 2024, 23(7): 1-5.
- [6] 李格铭, 崔晓萍, 宜莉, 等. 卵巢早衰的中医研究进展 [J]. 陕西中医, 2023, 44(4): 534-537.
Li G G, Cui X P, Yi L, et al. Research progress of Chinese medicine in premature ovarian failure [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2023, 44(4): 534-537.
- [7] 萧闵, 邓朝阳, 江晓翠, 等. 右归丸含药血清通过下调瘦素表达抑制 RLE-6TN 细胞上皮间质转化的机制研究 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6250-6260.
Xiao M, Deng C Y, Jiang X C, et al. Mechanism of Yougui Pills containing serum on inhibiting epithelial-mesenchymal transition in RLE-6TN cells by down-regulating leptin expression [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(18): 6250-6260.
- [8] 张凤凤, 崔晓萍, 赵潘婷, 等. 崔晓萍主任医师治疗卵巢早衰经验撷英 [J]. 西部中医药, 2022, 35(2): 48-51.
Zhang F F, Cui X P, Zhao P T, et al. Chief physician Cui Xiaoping's experience in treating premature ovarian failure [J]. West J Chin Med, 2022, 35(2): 48-51.
- [9] 宋春侠, 刘玉兰, 权兴苗, 等. 高慧教授治疗卵巢早衰经验浅析 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(24): 3472-3475.
Song C X, Liu Y L, Quan X M, et al. Analysis of Professor Gao Hui's Experience in treating premature ovarian failure [J]. Western J Chin Med, 2023, 32(24): 3472-3475.
- [10] 杨琪, 杨文文, 蔡连香, 等. 蔡氏补肾填精方治疗卵巢储备功能减退肝肾阴虚证的临床研究 [J]. 世界中医药, 2023, 18(24): 3561-3566.
Yang Q, Yang W W, Cai L, et al. Clinical effect of Cai's Bushen Tianjing Formula on diminished ovarian reserve due to liver-kidney yin deficiency [J]. World Chin Med, 2023, 18(24): 3561-3566.
- [11] Dai F, Wang R, Deng Z, et al. Comparison of the different animal modeling and therapy methods of premature ovarian failure in animal model [J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 135.
- [12] Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe [J]. Bioinformatics, 2009, 25(21): 2857-2859.
- [13] Chon S J, Umair Z, Yoon M-S. Premature ovarian insufficiency: Past, present, and future [J]. Front Cell Develop Biol, 2021, 9: 672890.
- [14] Siddika T, Shao R, Heinemann I U, et al. Delivery of Akt1 phospho-forms to human cells reveals differential substrate selectivity [J]. IUBMB life, 2024, 76(9): 632-646.
- [15] Zhou P, Deng F, Yang Z, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits oxidative stress-induced ovarian granulosa cell injury through Akt-FoxO1 interaction [J]. Sci China Life Sci, 2022, 65(11): 2301-2315.
- [16] Li C, Wu G, Ning C, et al. FOXO1-mediated nuclear sequestration of STAT3 and Akt1 triggers FOXO3-dependent autophagic death in hypoxic granulosa cells [J]. Intern J Biol Sci, 2024, 20(15): 5939.

- [17] Lu C, Gao C, Wei J, et al. SIRT1-FOXOs signaling pathway: A potential target for attenuating cardiomyopathy [J]. Cell Signal, 2024: 111409.
- [18] Sivakumar K K, Stanley J A, Behlen J C, et al. Inhibition of Sirtuin-1 hyperacetylates p53 and abrogates Sirtuin-1-p53 interaction in Cr (VI)-induced apoptosis in the ovary [J]. Reprod Toxicol, 2022, 109: 121-134.
- [19] Yin J Y, Lu X T, Hou M L, et al. Sirtuin1-p53: a potential axis for cancer therapy [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 212: 115543.
- [20] Soh R, Hardy A, Zur Nieden N I. The FOXO signaling axis displays conjoined functions in redox homeostasis and stemness [J]. Free Rad Biol Med, 2021, 169: 224-237.
- [21] Mishra D, Mohapatra L, Tripathi A S, et al. The influential responsibility of sirtuins in senescence and associated diseases: A review [J]. J Biochem Molecul Toxicol, 2024, 38(9): e23812.
- [22] Liu H, Yang H, Qin Z, et al. Exploration of the Danggui Buxue decoction mechanism regulating the balance of ESR and AR in the TP53-Akt signaling pathway in the prevention and treatment of POF [J]. Evid-Based Complem Altern Med 2021, 2021(1): 4862164.

[责任编辑 齐静雯]