

## 基于生物信息学方法的坤泰胶囊分子网络及生物功能初步探析

王李俊<sup>1</sup>, 杨 琴<sup>1</sup>, 王 飞<sup>2</sup>, 朱 盼<sup>1</sup>

1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000

2. 南昌大学抚州医学院, 江西 抚州 344000

**摘要:** **目的** 基于和颜®坤泰胶囊(以下简称坤泰胶囊)各组分对应靶点信息集, 运用生物信息学方法探析其发挥疗效的潜在分子网络及生物功能。**方法** 将坤泰胶囊 6 味组方药材逐一在中药系统药理学研究数据库(TCMSP)、TCM-mesh 中检索获得每一种药材所对应的化学成分, 并与经液相色谱-电喷雾质谱联用技术(LC-ESI-MS/MS)检测得到的坤泰胶囊活性成分进行比对, 剔除重复成分, 获得坤泰胶囊含有的活性成分, 再将这些成分逐一在数据库中检索获得其对应的靶点信息, 形成化合物-靶点信息集。利用 DAVID、KEGG、COSMIC 等数据库, 对化合物-靶点信息集进行功能富集分析、靶标的组织特异性表达分析, 以及蛋白-蛋白相互关系网络分析。**结果** 结合数据库与 LC-ESI-MS/MS 检测, 共获得 29 个成分, 获得对应的靶基因 186 个。这些靶基因显著富集在神经中枢、乳腺、卵巢等组织中。经 DAVID 的基因本体(gene ontology, GO)分析结果显示, 这些靶标显著集中于细胞质、线粒体、细胞外基质等细胞器, 主要发挥脂肪酶、激酶以及氧化还原酶等活性, 参与代谢、能量通路、凋亡等生物过程。KEGG 通路富集分析表明这些靶标显著参与 PI3K-Akt、mTOR、胰岛素等信号通路。**结论** 通过坤泰胶囊活性成分-靶标信息集的建立, 利用各生物信息数据库与分析手段, 从分子水平为坤泰胶囊的临床疗效提供佐证, 也为进一步拓展其临床应用提供依据。

**关键词:** 和颜®坤泰胶囊; 中药系统药理学研究数据库; 生物信息学; 基因本体; 信号通路; 蛋白-蛋白相互作用;

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)11-2601-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.017

## Investigation for molecular network and biological functions of Kuntai Capsule based on bioinformatics analysis

WANG Li-jun<sup>1</sup>, YANG Qin<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>2</sup>, ZHU Pan<sup>1</sup>

1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China

2. Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 344000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the potential molecular functions and the involved signaling network of Heyan®Kuntai Capsules (HYKTc) based on the ingredient-gene targets clustering by means of bioinformatics analysis. **Methods** The ingredients in HYKTc were obtained by the combination of previous LC-ESI-MS/MS method and searched through Traditional Chinese Medicine System Pharmacology databases. Further the gene ontology (GO) and KEGG enrichment analysis were performed with Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tools. **Results** A total of 29 chemicals were obtained in which 21 chemicals were identified by LC-ESI-MS/MS method. Afterwards, 186 gene targets were acquired in the databases. The HYKTc-gene targets clustering were highly enriched in central nervous system, breast, and ovary. Subsequent GO analysis showed that these gene targets were significantly located in the cytosol, mitochondria and extracellular matrix, mainly functioning as lipase, kinase and oxidoreductase activity. Besides, KEGG results found that these targets were involved in the PI3K-Akt, mTOR, and insulin signaling pathways. **Conclusions** Using TCM databases searching combined with bioinformatics methods, the potential explanations for the clinical efficiency of HYKTc were provided for further clinical applications.

**Key words:** Heyan® Kuntai Capsules; TCMSP; bioinformatics; gene ontology; signaling pathways; PPI

和颜®坤泰胶囊(以下简称坤泰胶囊)源于医圣张仲景《伤寒论》中黄连阿胶汤, 主要组成包括熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶、茯苓。方中熟地黄补肾填精髓, 白芍和阿胶补血养血敛阴, 黄连和黄芩清热

除烦, 茯苓健脾安神, 为滋肾养阴、清热安神之良剂, 诸药合用起到滋阴养血、补精益髓、交通心肾和调节阴阳平衡的作用。坤泰胶囊临床上已广泛用于因卵巢功能减退引起的围绝经期综合征、不孕症等<sup>[1-2]</sup>。

收稿日期: 2018-01-22

作者简介: 王李俊(1981—), 男, 江西东乡人, 硕士, 副教授, 主管中药师, 主要从事药用植物分子生物学研究。

Tel: (0794)8228608 E-mail: www736@163.com

尽管坤泰胶囊临床疗效已被证明,然而,有关坤泰胶囊的药理作用、在体内的分子机制的研究还处于初级阶段。在卵巢加速衰老模型中,坤泰胶囊显示可重建和维持卵泡发育稳态的作用,其机制可能是通过线粒体的抗氧化和抗凋亡途径<sup>[3]</sup>。另也有研究证明,坤泰胶囊可调控凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达变化<sup>[4]</sup>。考虑到坤泰胶囊是中成药复方,传统的药理研究方法无法全面揭示中成药的作用机制。本研究采用生物信息学的方法,借助中草药系统药理平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP),构建 HKC 主要成分对应靶点信息集,利用 DAVID 对靶点信息集进行基因本体(gene ontology, GO)和 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 通路富集分析,运用 COSMIC、HPRD、BioGrid 等数据库进行组织富集、蛋白-蛋白相互作用网络,为揭示其治疗因卵巢功能减退引起的相关疾病的作用机制提供依据,更可进一步指导科学研究,为延伸临床应用提供线索。

## 1 方法

### 1.1 化学成分与靶点信息集构建

本研究的化学成分主要参考处方的 HPLC-ESI-MS/MS 成分检测结果<sup>[5]</sup>,运用中药系统药理学数据库 TCMSP<sup>[6]</sup>(<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)和 TCM-mesh<sup>[7]</sup>(<http://mesh.tcm.microbioinformatics.org>),查询各组分对应的靶点信息,剔除重复信息,得到坤泰胶囊所含化合物的靶点集合。

### 1.2 组织表达分析

基于 COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) 数据库,采用超几何检验分析靶标显著富集的组织,筛选出  $P < 0.05$  的组织为显著富集组织。

### 1.3 DAVID 生物信息分析

DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 是一个生物信息数据库,整合了生物学数据和分析工具,为大规模的基因或蛋白列表提供系统综合的生物功能注释信息。借助该平台对坤泰胶囊靶点信息集进行 GO 富集分析,包括细胞器、分子功能和生物过程分析,以及 KEGG 通分析。 $P < 0.05$  为显著结果。

### 1.4 靶标蛋白-蛋白相互作用 (protein protein interaction, PPI) 网络分析

从 HPRD、BioGrid 等数据库中下载实验验证的 PPI 关系对,提取出靶标的 PPI 关系对,构建靶标 PPI 网络。

## 2 结果

### 2.1 化合物选定与靶点信息

李定祥等<sup>[5]</sup>对坤泰胶囊进行了 LC-ESI-MS/MS 化

学成分检测,共检测获得 21 个化合物。基于 TCMSP 数据库的成分靶点数据已有较多应用,同样,基于 TCM-Mesh 系统药理学研究平台整合了大量的中药成分靶点疾病信息。现结合两者的优势联合分析,获得较全面的靶点数据集合。其中与阿胶对应的 2 个化合物未在数据库中找到靶点信息。综上,去除重复靶点,共得到坤泰胶囊 29 个成分对应 186 个靶点(表 1)。

### 2.2 靶标的组织特异性表达分析

靶标显著富集在中枢神经系统、乳腺、卵巢和子宫内膜等组织中(图 1)。这一结果与坤泰胶囊治疗因卵巢功能引起的相关疾病相吻合,即坤泰胶囊可能通过调控下丘脑-垂体-卵巢(HPO)发挥作用。另外,结果还显示坤泰胶囊对应靶点显著富集在肺、大肠、肾等组织中,提示坤泰胶囊具有治疗这些组织疾病的潜能。

### 2.3 DAVID 生物信息学分析

将坤泰胶囊对应的 186 个靶基因输入 DAVID 生物信息学平台进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析结果(表 2)显示,靶标显著富集于细胞的各个细胞器中,其中以细胞质、细胞外基质和细胞核尤为显著。值得注意的是,这些靶点显著富集在线粒体的各个亚组份中,包括线粒体外膜、线粒体以及线粒体通透性转换孔。GO 分子功能富集分析结果显示,这些靶点信息不仅表现出脂肪酶、激酶、氧化还原酶等活性,还有催化作用、转录因子活性以及肽结合活性等。KEGG 通路富集分析表明,这些靶点信息显著参与能量代谢、激素代谢、凋亡等生物过程。此外,KEGG 通路富集分析显示,靶标显著富集于 PI3K-Akt、mTOR、EGF 受体、胰岛素等信号通路中(表 3)。

### 2.4 构建 PPI 网络

构建靶标 PPI 网络,该网络有 4 253 个节点和 7 750 个边构成(图 2)。红色表示靶标基因,节点越大表示该靶标作用的基因越多,在网络中起的作用越大。通过拓扑性质分析,获得 TP53 调控的基因最多,其次为 CDK2,这 2 个基因在网络中起着节点作用,提示其影响的生物学功能越广。

## 3 讨论

坤泰胶囊已被广泛应用于因卵巢功能减退引起的围绝经期综合征、不孕症等治疗中,显示其能有效改善围绝经期症状<sup>[8-10]</sup>,以及增加卵巢低反应(POR)患者的获卵数、提高卵泡质量和胚胎质量<sup>[11]</sup>及提升临床妊娠率<sup>[12]</sup>。尽管已有研究陆续报道坤泰胶囊的作用机制<sup>[4]</sup>,然而对于由 6 味药组成的中药复方,其在体内发挥作用的机制是多靶点构成的调

表 1 坤泰胶囊所含化合物及其靶点数量

Table 1 Components of Kuntai Capsule and number of targets for each component

| 序号 | 来源中药 | 化合物                                                                              | 靶点个数 |
|----|------|----------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1  | 熟地黄  | 毛蕊花糖苷 (verbascoside, acteoside)                                                  | 22   |
| 2  | 熟地黄  | 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)                                                | 20   |
| 3  | 熟地黄  | 梓醇 (catalpol)                                                                    | 5    |
| 4  | 熟地黄  | 地黄苷 A (rehmannioside A)                                                          | 4    |
| 5  | 熟地黄  | 8-表番木鳖酸 (8-epiloganic acid)                                                      | 4    |
| 6  | 熟地黄  | 地黄苷 D (rehmannioside D)                                                          | 2    |
| 7  | 黄芩   | 黄芩素 (baicalein)                                                                  | 74   |
| 8  | 黄芩   | 汉黄芩素 (wogonin)                                                                   | 54   |
| 9  | 黄芩   | 黄芩黄酮 II (skullcapflavone II)                                                     | 21   |
| 10 | 黄芩   | 黄芩苷 (baicalin)                                                                   | 14   |
| 11 | 黄芩   | 汉黄芩苷 (wogonoside)                                                                | 4    |
| 12 | 黄芩   | 白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷 (chrysin 6-C-arabinoside 8-C-glucoside)                    | 1    |
| 13 | 黄芩   | 白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷 (chrysin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside)                    | 1    |
| 14 | 黄芩   | norwogonin-7-O-glucuronide                                                       | 1    |
| 15 | 黄芩   | 5,6,7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 (5,6,7-trihydroxy-8-methoxyflavone-7-O-glucuronide) | 1    |
| 16 | 黄芩   | 千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷 (oroxyloside, oroxylin A-7-O-glucuronide)                      | 1    |
| 17 | 黄连   | 小檗碱 (berberine)                                                                  | 71   |
| 18 | 黄连   | 非洲防己碱 (columbamine)                                                              | 25   |
| 19 | 黄连   | 木兰花碱 (magnoflorine)                                                              | 24   |
| 20 | 黄连   | 药根碱 (jatrorrhizine)                                                              | 21   |
| 21 | 黄连   | 巴马汀 (palmatine, berbericine)                                                     | 20   |
| 22 | 黄连   | 格兰地新 (groenlandicine)                                                            | 17   |
| 23 | 黄连   | 黄连碱 (coptisine)                                                                  | 10   |
| 24 | 黄连   | 甲基黄连碱 (worenine)                                                                 | 7    |
| 25 | 黄连   | 8-氧化表小檗碱 (oxyepiberberine)                                                       | 1    |
| 26 | 茯苓   | 茯苓酸 (pachymic acid)                                                              | 1    |
| 27 | 茯苓   | 去氢依布利酸 (dehydroeburicoic acid)                                                   | 1    |
| 28 | 白芍   | 芍药苷 (paeoniflorin)                                                               | 4    |
| 29 | 白芍   | 芍药内酯苷 (albiflorin)                                                               | 1    |

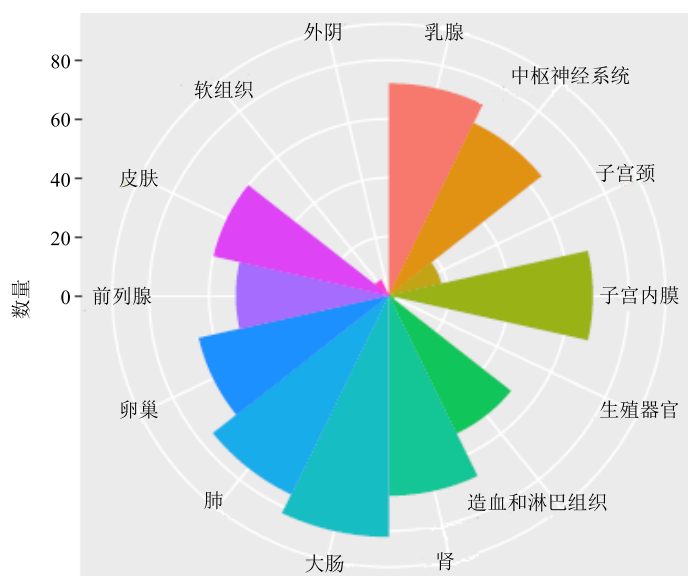


图 1 靶基因组织富集结果

Fig. 1 Tissue enrichment for gene targets

表 2 GO 富集分析结果

Table 2 GO enrichment results

| GO 富集前 20 位的细胞器                                    | P 值         |
|----------------------------------------------------|-------------|
| nucleus                                            | $P < 0.005$ |
| mitochondrial permeability transition pore complex | $P < 0.005$ |
| nuclear envelop lumen                              | $P < 0.005$ |
| endoplasmic reticulum membrane                     | $P < 0.005$ |
| mitochondrion                                      | $P < 0.005$ |
| apical membrane                                    | $P < 0.005$ |
| cell surface                                       | $P < 0.005$ |
| lysosome                                           | $P < 0.005$ |
| microtubule cytoskeleton                           | $P < 0.005$ |
| extracellular region                               | $P < 0.001$ |
| nuclear matrix                                     | $P < 0.001$ |
| exosomes                                           | $P < 0.001$ |
| mitochondrial outer membrane                       | $P < 0.001$ |
| nucleoplasm                                        | $P < 0.001$ |
| extracellular                                      | $P < 0.001$ |
| cytoplasm                                          | $P < 0.001$ |
| extracellular space                                | $P < 0.001$ |
| cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex | $P < 0.001$ |
| cytosol                                            | $P < 0.001$ |
| GO 富集的分子功能                                         | P 值         |
| protein serine/threonine kinase activity           | $P < 0.05$  |
| peptide binding                                    | $P < 0.05$  |
| cysteine-type peptidase activity                   | $P < 0.05$  |
| superoxide dismutase activity                      | $P < 0.05$  |
| hydrolase activity                                 | $P < 0.05$  |
| transcription factor activity                      | $P < 0.05$  |
| polysaccharide binding                             | $P < 0.05$  |
| oxidoreductase activity                            | $P < 0.01$  |
| kinase binding                                     | $P < 0.01$  |
| kinase activity                                    | $P < 0.01$  |
| catalytic activity                                 | $P < 0.01$  |
| lipase activity                                    | $P < 0.01$  |
| GO 富集的生物学过程                                        | P 值         |
| regulation of physiological process                | $P < 0.025$ |
| hormone metabolism                                 | $P < 0.025$ |
| apoptosis                                          | $P < 0.005$ |
| energy pathway                                     | $P < 0.005$ |
| metabolism                                         | $P < 0.005$ |

表 3 KEGG 富集信息

Table 3 KEGG enrichment information

| 信号通路富集                                                         | P 值         |
|----------------------------------------------------------------|-------------|
| class I PI3K signaling events mediated by AKT                  | $P < 0.001$ |
| Arf6 signaling pathway                                         | $P < 0.001$ |
| ErbB1 downstream signaling                                     | $P < 0.001$ |
| S1P1 pathway                                                   | $P < 0.001$ |
| signaling events mediated by focal adhesion kinase             | $P < 0.001$ |
| mTOR signaling pathway                                         | $P < 0.001$ |
| EGF receptor signaling pathway                                 | $P < 0.001$ |
| PDGFR-beta signaling pathway                                   | $P < 0.001$ |
| Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and insulin pathway | $P < 0.001$ |
| integrin family cell surface interactions                      | $P < 0.001$ |
| integrin-linked kinase signaling                               | $P < 0.001$ |
| regulation of CDC42 activity                                   | $P < 0.001$ |
| CDC42 signaling events                                         | $P < 0.001$ |
| AP-1 transcription factor network                              | $P < 0.001$ |

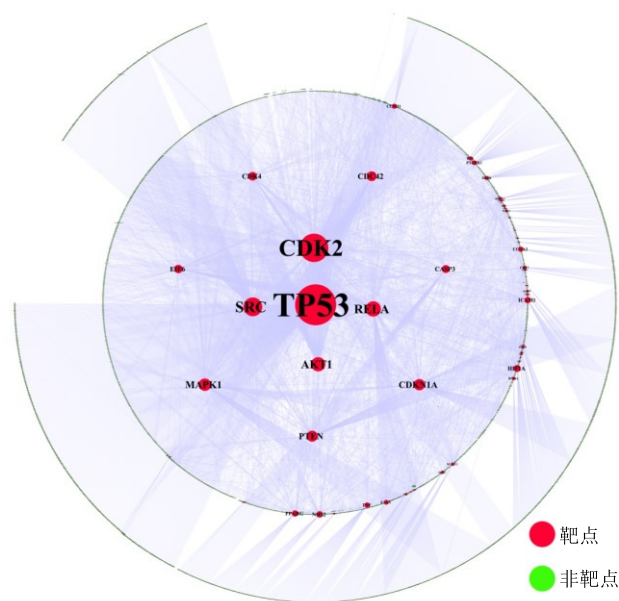


图 2 靶标 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of gene targets

控网络。由此，传统的药理实验方法研究不完全适用于中药复方机制的研究。

近年来日渐成熟的中成药系统药理研究为成药机制研究以及中成药新药开发提供了很好的平台，通过中药活性物质及组合，识别药效成分的靶点，从而建立起药效物质与疾病关系，从系统水平为中药药效学和中医药基础理论研究提供基础<sup>[13]</sup>。借助于这些平台，已开展了一些中成药和复方制剂的药理研究<sup>[14-15]</sup>。借鉴这一方法，对坤泰胶囊所

含活性成分进行了系统药理学分析,并结合生物信息分析手段,分析坤泰胶囊对应靶标基因的生物功能以及参与的信号通路。利用 LC-ESI-MS/MS 技术检测得到坤泰胶囊中含有的 21 个化学成分,借助 TCMSP 数据库和 TCM-Mesh 系统药理学研究平台共找到对应的 186 个靶基因,其中阿胶对应的化学成分在数据库中未检索到靶基因信息。进一步通过生物信息学分析手段,从分子水平预测坤泰胶囊的药理作用,并对其在卵巢功能减退引起的相关疾病中发挥疗效阐明可能的作用机制。

通过组织富集分析发现,坤泰胶囊的靶点信息集主要富集在中枢神经系统、乳腺、卵巢和子宫内膜等组织中,这一结果与坤泰胶囊主治因卵巢功能减退引起的相关疾病相吻合,也提示坤泰胶囊更可能是参与调控 HPO 轴来发挥作用。进一步的 GO 富集结果中表明,坤泰胶囊靶基因富集在线粒体、发挥超氧化物歧化酶(SOD)酶活性,与前期报道的坤泰胶囊的机制结果相一致,即在卵巢加速衰老小鼠模型中,坤泰胶囊处理组的小鼠卵巢组织中,线粒体形态明显优于模型组,更接近于正常小鼠卵巢组织中的线粒体;凋亡实验也表明,坤泰胶囊处理后,小鼠卵泡闭锁数量明显减少,卵泡发育过程更趋向于健康小鼠水平<sup>[3]</sup>。这一结果证明利用系统药理学数据平台,结合生物信息学方法来分析中成药多组分、多靶点信息的可行性。

同时,本研究发现坤泰胶囊的靶点主要富集的通路有 PI3K/AKT、mTOR 信号和 IGF-1 等信号通路,这些信号通路已被证明参与在卵泡发育早期的卵泡募集阶段<sup>[16]</sup>。这些信号通路的调控出现异常,会导致卵泡过早募集,致使卵泡池过度耗竭,临床表现为卵巢早衰(POF)或原发性卵巢功能不全(POI)。已有临床试验显示,服用坤泰胶囊的 POF 患者,其血清促卵泡生成素(FSH)、黄体生成素(LH)和雌二醇(E<sub>2</sub>)得到明显改善<sup>[17-18]</sup>。

基于此,本研究提供的生物功能与分子调控机制,将为坤泰胶囊的临床疗效提供潜在的分子机制解释,更为将来坤泰胶囊拓展其临床应用提供参考。

#### 参考文献

- [1] 陈继明,高丽虹,高红艳,等.坤泰胶囊在妇产科临床中的应用[J].实用妇科内分泌杂志,2016,3(14):12-15.
- [2] 高慧,徐文君,李杨,等.坤泰胶囊治疗卵巢早衰的研究进展[J].现代药物与临床,2016,31(8):1309-1312.
- [3] Zhang J, Fang L, Shi L, et al. Protective effects and mechanisms investigation of Kuntai capsule on the

- ovarian function of a novel model with accelerated aging ovaries [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 173-181.
- [4] 耿利华,谈勇.坤泰胶囊对卵巢储备功能下降大鼠卵巢凋亡调控蛋白 Bcl-2, Bax 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(8):138-143.
- [5] 李定祥,王珍,罗建光,等.坤泰胶囊化学成分的 LC-ESI-MS/MS 分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(19):90-93.
- [6] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [7] Zhang R Z, Yu S J, Bai H, et al. TCM-Mesh: The database and analytical system for network pharmacology analysis for TCM preparations [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2821.
- [8] Sun A J, Wang Y P, Gu B, et al. A multi-center, randomized, controlled and open clinical trial of Heyan Kuntai Capsule and hormone therapy in perimenopausal women [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, doi: 10.1007/s11655-016-2266-y.
- [9] Zhou Q, Tao J, Song H, et al. Chinese herbal medicine Kuntai capsule for treatment of menopausal syndrome: a systematic review of randomized clinical trials [J]. *Compl Ther Med*, 2016, 29: 63-71.
- [10] 李存存,王晶晶,陈潮,等.坤泰胶囊与激素替代疗法治疗更年期综合征有效性和安全性比较的 Meta 分析[J].中国中西医结合杂志,2013,33(9):1183-1190.
- [11] 连方,姜晓媛.坤泰胶囊对体外受精卵巢低反应患者获卵数、卵细胞及胚胎质量的影响[J].中国中西医结合杂志,2014,34(8):917-921.
- [12] Gao Hui, Xia T, Ma R H, et al. Heyan Kuntai capsule versus dehydroepiandrosterone in treating Chinese patients with infertility caused by diminished ovarian reserve: a multicenter, randomized controlled trial [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(4): 530-537.
- [13] 王永华,杨凌.基于系统药理学的现代中药研究体系[J].世界中医药,2013,8(7):801-808.
- [14] Li X, Xu X, Wang J, et al. A system-level investigation into the mechanisms of Chinese Traditional Medicine: Compound Danshen Formula for cardiovascular disease treatment [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43918.
- [15] Li B, Xu X, Wang X, et al. A systems biology approach to understanding the mechanisms of action of chinese herbs for treatment of cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10): 13501-13520.
- [16] Hsueh A J W, Kawamura K, Cheng Y, et al. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis [J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(1): 1-24.
- [17] 吴海燕.坤泰胶囊对卵巢早衰患者血清 FSH、LH、E<sub>2</sub> 及血脂水平的影响[J].中国妇幼保健,2016,31(8):1599-1600.
- [18] 胡利霞,涂雪松,陈玉环,等.坤泰胶囊治疗卵巢储备功能低下及卵巢早衰的临床观察[J].海峡药学,2016,28(2):211-212.