

基于网络药理学探索青盐方治疗围绝经期综合症的配伍合理性研究

杨一博, 徐颖*, 王璐, 樊媛芳, 林娜

中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 探索青盐方治疗围绝经期综合症的配伍合理性。方法 采用网络药理学方法, 分别对青盐方中君药(肉苁蓉 *Cistanche deserticola*)、君+臣药(肉苁蓉+巴戟天 *Morinda officinalis*)、君+臣+佐药(肉苁蓉+巴戟天+花椒 *Zanthoxylum bungeanum*+牛膝 *Achyranthes bidentata*)、君+臣+佐+使药(肉苁蓉+巴戟天+花椒+牛膝+青盐 *Halitum*)作用于围绝经期综合症的靶点、功能和通路进行预测和筛选, 通过数据整合分析解析青盐方防治围绝经期综合症的作用特点及配伍规律。结果 74个化合物共作用于围绝经期综合症 290个靶点、51个关键靶点, 涉及细胞反应、神经-内分泌、免疫等生物过程, 主要富集在雌激素受体(estrogen receptor, ER)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)等通路。结论 各拆方组通过各靶点相关通路作用于围绝经期综合症的雌激素低下、围绝经期焦虑、生殖道萎缩、骨质疏松病理环节。各配伍组既有不同靶点, 也有相同靶点作用于各个症状, 协同发挥治疗作用。君药囊括方中 216个靶点、40个关键靶点和所有主要通路, 依次增加臣、佐、使药后, 靶点数量及各通路所涉及的靶点均有不同程度增加, 提示君药肉苁蓉在方中的重要地位及其余药味对君药的辅佐补充, 解释了其复方配伍合理性。

关键词: 网络药理学; 青盐方; 围绝经期综合症; 配伍; 雌激素低下; 围绝经期焦虑; 生殖道萎缩症; 骨质疏松

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)03-0749-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.018

Compatibility rationality of Qingyan Formula in treatment of perimenopausal syndrome based on network pharmacology

YANG Yi-bo, XU Ying, WANG Lu, FAN Yuan-fang, LIN Na

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To explore the compatibility rationality of Qingyan Formula (青盐方) in the treatment of perimenopausal syndrome. **Methods** Network pharmacology was used to predict and screen the targets, function and pathways related to perimenopausal syndrome in Qingyan Formula including Sovereign (*Cistanche deserticola*) group, Sovereign-Minister (*C. deserticola* + *Morinda officinalis*) group, Sovereign-Minister-Assistant (*C. deserticola* + *M. officinalis* + *Zanthoxylum bungeanum* + *Achyranthes bidentata*) group and Sovereign-Minister-Assistant-Guide (Jun-Chen-Zuo-Shi) (*C. deserticola* + *M. officinalis* + *Z. bungeanum* + *A. bidentata* + *Halitum*) group. The characteristics and compatibility rules of this prescription in preventing and treating perimenopausal syndrome were analyzed combined with data. **Results** A total of 74 compounds act on 290 targets and 51 key targets of perimenopausal syndrome, mainly involving cell response, neuroendocrine, immune and other related biological processes. Pathway enrichment analysis involved estrogen receptor, PI3K-Akt, MAPK, HIF-1, and other pathways. **Conclusion** Each separated compound prescription group acts on the key pathology parts-hypoestrogenia and short-term anxiety, mid-term genital atrophy and long-term osteoporosis of perimenopausal syndrome through various targets and related pathways. Each prescription group not only has different targets, but also has the same targets to act on symptoms, and plays a synergistic therapeutic role. Jun drug group includes 216 related targets, 40 key targets and all major pathways in the formula. After Chen, Zuo, and Shi drugs were added in sequence, the number of targets and related pathways were increased to different degree, which indicated the importance of Jun drug-*C. deserticola* in the formula and the supplement of other drugs to Jun drug, and explains the compatibility rationality.

Key words: network pharmacology; Qingyan Formula; perimenopausal syndrome; compatibility; hypoestrogenia; perimenopausal anxiety; genital atrophy; osteoporosis

收稿日期: 2020-07-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81774203); 国家自然科学基金面上项目(81573632)

作者简介: 杨一博, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。Tel: 18811708309 E-mail: yyb0230@163.com

*通信作者: 徐颖, 主要从事中药药理和中药药性研究。Tel: 15910527526 E-mail: yxu@icmm.ac.cn

围绝经期综合征是指妇女因卵巢功能衰竭而出现的一系列由雌激素水平下降引起的不适症状,如心悸失眠、血压升高、月经紊乱、烦躁易怒、失眠、骨质疏松等,中医称之为“绝经前后诸症”,经典补肾方剂在临床上具有良好的治疗效果^[1]。青盐方源于宋代《圣济总录》,由肉苁蓉、巴戟天、牛膝、蜀椒、青盐组成,5味药皆入肾经,是补肾益精的经典方剂。肉苁蓉甘咸而温,质地滋腻,性柔而不燥,补肾壮阳之中还兼有强阴润燥、益精之功,为君药;巴戟天辛甘而温,性偏燥而不柔,温阳助火力胜,兼有祛风除湿之力,为臣药;佐以牛膝、蜀椒(花椒),牛膝活血脉、补肝肾,既补且行能引药入肾经,花椒温补脾阳;青盐为使药,能引诸药入肾经,润燥潜降;诸药通过调补肾气阴阳、润燥益精,以达防治绝经前后诸症之功。课题组前期研究表明,青盐方70%乙醇提取物具有雌激素样作用,可促进未成熟小鼠生殖靶器官子宫、阴道的生长发育;还可抑制去双侧卵巢大鼠生殖靶器官萎缩,缓解实验性围绝经期综合征近期焦虑症状和远期骨质疏松症状^[2-5]。但对于青盐方治疗围绝经期综合征的组方配伍规律及合理性研究尚不全面。本研究结合青盐方君臣佐使组方特点,采用网络药理学方法,选取各组药中的代表性成分进行分析,对该方的配伍合理性进行初步探究和阐释。

1 材料

中药系统药理学数据库与分析平台(traditional chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)数据库(<http://tcmsp.com/>)、PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)、Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)、DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org/>)、STRING 数据库(<http://string-db.org/>)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)、Cytoscape 3.7.1 软件、Rx64 3.6.1 软件、DAVID 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库。

2 方法

2.1 药物分组

根据中医方剂君、臣、佐、使的配伍法则及青盐方方解,对青盐方进行以下拆方分组:君药(肉苁蓉)组、君+臣药(肉苁蓉+巴戟天)组、君+臣+佐药(肉苁蓉+巴戟天+花椒+牛膝)组、君+臣+佐+

使药(肉苁蓉+巴戟天+花椒+牛膝+青盐)组。

2.2 青盐方各拆方组合的化学成分收集与筛选

在 TCMSP 数据库中以各中药名称检索青盐方 5 味药中所含的化学成分,筛选条件为生物利用度>30%、类药性>0.18。结合文献,不满足筛选条件但文献报道明确的有效成分也纳入候选成分。

2.3 青盐方各拆方组合的化学成分潜在作用靶点收集

在 TCMSP 数据库中以各中药名称进行检索得到潜在药物靶点。将潜在药物靶点导入 UniProt 蛋白数据库,转换为官方名称,在 PubChem 数据库搜索青盐主要成分 NaCl 所对应的靶点,得到各拆方组合的化学成分相关候选靶点。

2.4 围绝经期综合征疾病的靶点预测

在 Genecards 数据库、OMIM 数据库、DisGeNET 数据库查询围绝经期综合征、雌激素低下、围绝经期焦虑、生殖道萎缩、骨质疏松所对应的靶点信息作为疾病靶点信息。

2.5 各拆方组合作用于疾病和各病理时期的靶点预测

采用 Rx64 3.7.1 软件统计青盐方各拆方组合与围绝经期综合征疾病和各病理时期的共同靶点,即为作用于围绝经期综合征疾病和各病理时期的作用靶点;将得到的作用于围绝经期综合征的靶点导入 STRING 平台获得蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,采用 Cytoscape 软件对 PPI 网络中的靶点进行拓扑属性分析,筛选出点度中心性和介数中心性均超过平均值的靶点,作为后续分析的关键作用靶点^[6]。

2.6 基因本体(geneontology, GO)、通路富集分析和网络构建

通过 Cytoscape 软件对筛选得到的关键作用靶点进行 GO 富集分析,在结果中选取 $P < 0.05$, 排名前 10 的项目进行分析^[7]。将关键作用靶点输入 DAVID 数据库,利用 KEGG 数据库,选取 P 值($P < 0.05$)排名前 20 的通路进行分析。结合药物化学成分、作用靶点、GO 富集分析和 KEGG 富集分析结果,利用 Cytoscape 软件制作各拆方组合作用特点网络分析图^[8]。

2.7 成分和机制的文献验证

通过检索国内外文献,挖掘分析青盐方相关的活性成分治疗围绝经期综合征的相关机制,为网络药理学所预测的结果提供文献验证。

3 结果

3.1 君药作用特点分析

如表1所示,共得到君药肉苁蓉18个化学成分、240个靶点。与疾病靶点作交集,得到216个共有靶点,具体成分及靶点见表2。216个共有靶点中,204个与雌激素低下相关、33个与围绝经期焦虑相关、130个与生殖道萎缩相关、139个与骨质疏松有关,共214个靶点参与了PPI网络。

对PPI网络进行拓扑属性分析,点度中心性和

表1 青盐方“中药-化学成分-预测靶点”信息

Table 1 Information of “Chinese medicine-active ingredient-predictive target” for Qingyan Formula

中药	化学成分/个	预测靶点/个
肉苁蓉(君)	18	240
巴戟天(臣)	39	128
花椒(佐)	7	156
牛膝(佐)	16	183
青盐(使)	1	19
君+臣药	54	288
君+臣+佐药	73	306
君+臣+佐+使药	74	322

表2 青盐方作用于围绝经期综合症的化学成分及靶点信息

Table 2 Components and targets information of Qingyan Formula

化学成分	靶点/个	来源	化学成分	靶点/个	来源
acteoside	1	肉苁蓉	palmitic acid	12	巴戟天
dauricine (8CI)	3	肉苁蓉	stearic acid	5	巴戟天
sitogluside	13	肉苁蓉	cedrol	4	巴戟天
β-sitosterol	24	肉苁蓉、巴戟天、花椒、牛膝	alizarin-2-methylether	8	巴戟天
arachidonate	4	肉苁蓉	2-hydroxy-1,5-dimethoxy-6-(methoxy-methyl)-9,10-anthraquinone	8	巴戟天
suchilactone	9	肉苁蓉	1,5,7-trihydroxy-6-methoxy-2-methoxy-methylanthracenequinone	5	巴戟天
yangambin	4	肉苁蓉	1,6-dihydroxy-5-methoxy-2-(methoxy-methyl)-9,10-anthraquinone	7	巴戟天
quercetin	130	肉苁蓉、花椒、牛膝	1-hydroxy-6-hydroxymethylanthracenequinone	6	巴戟天
marckine	1	肉苁蓉	hydroxyanthraquinone	11	巴戟天
benzyl alcohol	7	肉苁蓉、巴戟天	2-hydroxy-1,8-dimethoxy-7-methoxy-methylanthracenequinone	6	巴戟天
pulegone	4	肉苁蓉	(2R,3S)-(+) -3',5'-dihydroxy-4,7-dimethoxydihydroflavonol	4	巴戟天
eugenol	29	肉苁蓉	3β,20(R),5-alkenyl-stigmastol	1	巴戟天
tyrosol	9	肉苁蓉	3β-24S(R)-butyl-5-alkenyl-cholestol	1	巴戟天
pinoresinol	8	肉苁蓉	americanin A	6	巴戟天
succinic acid	24	肉苁蓉	isoprincepin	2	巴戟天
genistein	81	肉苁蓉	ohioensin-A	2	巴戟天
benzaldehyde	4	肉苁蓉、巴戟天	kokusaginin	1	花椒
menthol	5	肉苁蓉	L-limonen	4	花椒
(L)-α-terpineol	12	巴戟天	skimmianin	2	花椒
geraniol	11	巴戟天	diosmetin	6	花椒
(-)-α-pinene	1	巴戟天	anethole	13	花椒
citric acid	7	巴戟天	poriferasta-7,22E-dien-3β-ol	3	牛膝
NON	2	巴戟天	28-norolean-17-en-3-ol	1	牛膝
2-hydroxy-3-methylanthraquinone	20	巴戟天	berberine	12	牛膝
indole	3	巴戟天	coptisine	8	牛膝
(R)-linalool	12	巴戟天	wogonin	36	牛膝
caffeic acid	21	巴戟天	δ-7-stigmastenol	1	牛膝
2-[(R)-4-methyl-1-cyclohex-3-enyl]propan-2-ol	14	巴戟天	baicalein	27	牛膝
(+)-borneol	7	巴戟天	epiberberine	9	牛膝
diop	3	巴戟天	inophyllum E	6	牛膝
ethyl oleate (NF)	1	巴戟天	kaempferol	49	牛膝
caprylic acid	8	巴戟天	spinasterol	3	牛膝
sitosterol	3	巴戟天	stigmasterol	25	牛膝
esculetin	7	巴戟天	palmatine	13	牛膝
physcion	8	巴戟天	β-daucosterol	1	牛膝
(1S)-4-methyl-1-propan-2-yl-cyclohex-3-en-1-ol	6	巴戟天	NaCl	19	青盐
oleic acid	41	巴戟天			
DBP	13	巴戟天			

介数中心性均超过平均值的关键作用靶点有 40 个, 分别为 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、谷胱甘肽 S 转移酶 P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1)、Myc 原癌基因蛋白 (myc proto-oncogene protein, MYC)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、内皮型一氧化氮合酶 3 (endothelial nitric oxide synthase 3, NOS3)、转录因子 AP-1 (transcription factor AP-1, JUN)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ESR1)、超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN1)、受体酪氨酸蛋白激酶 erbB-2 (receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, ERBB2)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、胰岛素 (insulin, INS)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3, CASP3)、铜锌超氧化物歧化酶 1 (Cu/Zn superoxide dismutase 1, SOD1)、细胞周期蛋白 B1 (G2/mitotic-specific cyclin B1, CCNB1)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、半胱氨酸蛋白酶 8 (caspase-8, CASP8)、小凹蛋白 1 (caveolin-1, CAV1)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC- α serine/threonine-protein kinase, AKT1)、骨桥蛋白 (osteopontin, SPP1)、G1/特异性细胞周期蛋白 D1 (G1/S-specific cyclin D1, CCND1)、细胞色素 P450 酶家族 3A4 亚型 (cytochrome P450 3A4, CYP3A4)、趋化因子 8 (C-X-C motif ligand 8, CXCL8)、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、蛋白激酶 C α (protein kinase C alpha, PRKCA)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、间隙连接蛋白 α -1 (gap junction alpha-1 protein, GJA1)、转录因子 p65 (transcription factor p65, RELA)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG)、丝氨酸蛋白激酶 (serine-protein kinase ATM, ATM)、前列腺素 G/H 合成酶 2

(prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、原癌基因 c-Fos (proto-oncogene c-Fos, FOS), 如图 1 所示。对关键作用靶点进行 GO 富集分析, 君药组治疗围绝经期综合征的相关生物过程涉及化学刺激反应、应激反应、生物过程的正负调控、组织发育、细胞过程的负调控、调控细胞增殖、对类固醇激素刺激的反应、细胞凋亡的调节等。排除广泛通路, KEGG 通路富集分析结果显示其相关通路主要富集在 ER 信号通路 (涉及 9 个靶点)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路 (涉及 17 个靶点)、MAPK 信号通路 (涉及 15 个靶点)、缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 信号通路 (涉及 14 个靶点) 等。

3.2 君+臣药组作用特点分析

如表 1 所示, 共得到君+臣药组 54 个化学成分、288 个靶点。与疾病靶点作交集, 得到 258 个共有靶点, 具体成分及靶点见表 2。258 个共有靶点中肉苁蓉 18 个化学成分对应 216 个靶点, 巴戟天 39 个化学成分对应 116 个靶点。258 个靶点中有 243 个与雌激素低下相关 (较君药组增加 39 个)、38 个有围绝经期焦虑相关 (较君药组增加 5 个)、147 个与生殖道萎缩相关 (较君药组增加 17 个)、166 个与骨质疏松有关 (较君药组增加 27 个), 257 个参与了 PPI 网络。对 PPI 网络进行拓扑属性分析, 点度中心性和介数中心性均超过平均值的关键靶点共有 47 个, 分别为胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2, ABCG2)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)、巴豆酰基转移酶 (histone acetyltransferase p300, EP300)、转录因子 Sp1 (transcription factor Sp1, SP1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPARA)、HIF1A、SOD1、MMP9、MAPK1、PRKCA、MYC、FOS、RELA、MAPK3、ATM、CXCL8、CCND1、FN1、AKT1、IL-1 β 、CASP8、CYP3A4、SPP1、JUN、CCNB1、VEGFA、IL-6、ESR1、INS、CAV1、PTGS2、GSTP1、PPARG、AR、CRP、HMOX1、ERBB2、CASP3、NOS3、EGFR、SOD2、STAT3、EGF、IL-2, 如图 2 所示。对关键

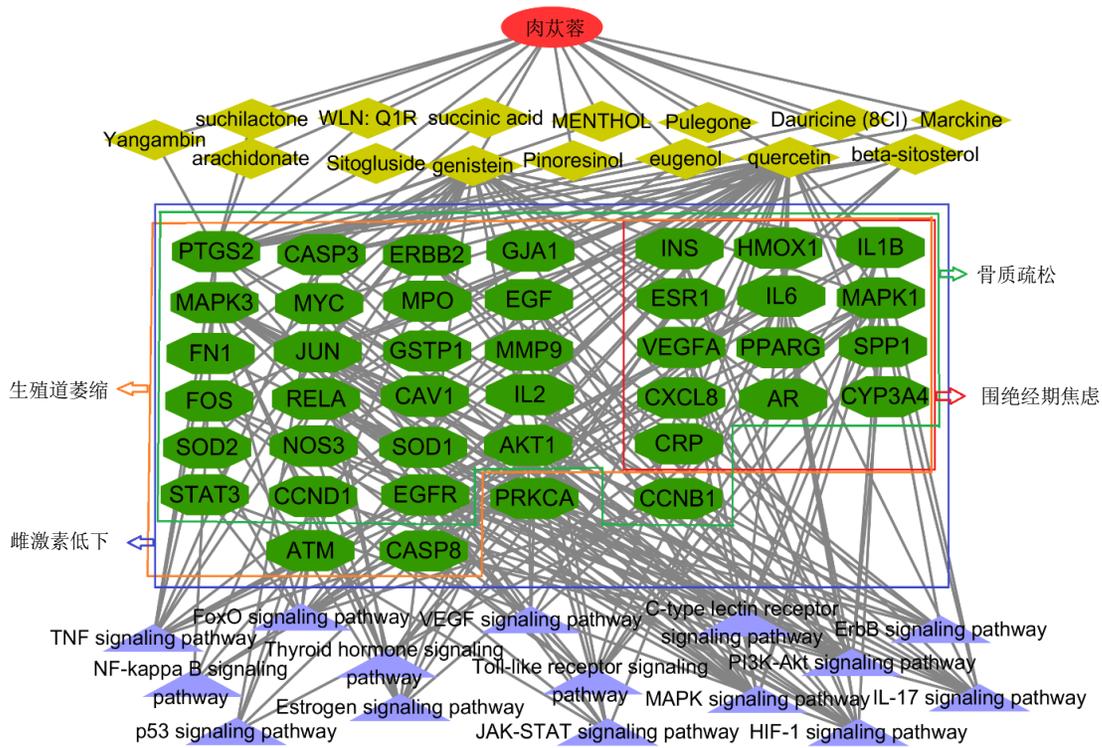


图 1 君药组作用特点网络分析

Fig. 1 Network analysis of pharmacological characteristics of Jun group

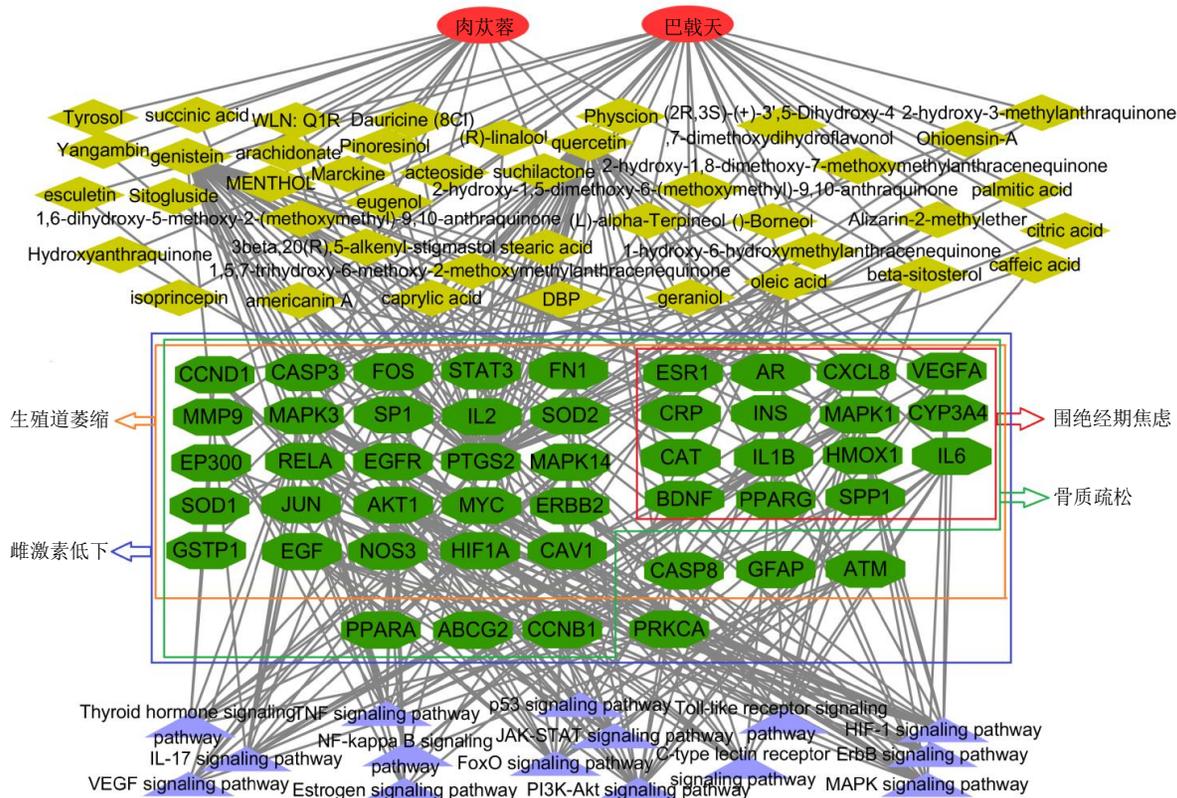


图 2 君十臣药组作用特点网络分析

Fig. 2 Network analysis of pharmacological characteristics of Jun and Chen group

作用靶点进行 GO 富集分析, 君+臣药组治疗围绝经期综合征的相关生物过程涉及化学刺激反应、调控发育过程、生物过程的正负调控、应激反应、组织增殖、细胞过程正负调控、调控细胞增殖、对类固醇激素刺激的反应等。排除广泛通路, KEGG 通路富集分析结果显示其相关通路主要富集在 ER 信号通路 (涉及 10 个靶点)、PI3K-Akt 信号通路 (涉及 18 个靶点)、MAPK 信号通路 (涉及 17 个靶点)、HIF-1 信号通路 (涉及 16 个靶点) 等。

3.3 君+臣+佐药组作用特点分析

如表 1 所示, 共得到君+臣+佐药组 73 个化学成分、306 个靶点。与疾病靶点作交集, 得到 274 个共有靶点, 具体成分及靶点见表 2。274 个共有靶点中肉苁蓉 18 个化学成分对应 216 个靶点, 巴戟天 39 个化学成分对应 116 个靶点, 花椒 7 个化学成分对应 147 个靶点, 牛膝 16 个化学成分对应 170 个靶点。274 个靶点中有 258 个与雌激素低下相关 (较君+臣药组增加 15 个)、40 个有围绝经期焦虑相关 (较君+臣药组增加 2 个)、153 个与生殖道萎缩相关 (较君+臣药组增加 6 个)、176 个与骨质疏松有关 (较

君+臣药组增加 10 个), 273 个参与了 PPI 网络。如图 3 所示, 对 PPI 网络进行拓扑属性分析, 点度中心性和介数中心性值均超过平均值的关节靶点共有 48 个, 分别为丝裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、细胞色素 C (cytochrome C, CYCS)、载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, APOA1)、CAT、MMP9、GSTP1、PPARA、AKT1、ESR1、SPP1、NOS3、FOS、SOD2、CCND1、MAPK3、ERBB2、CASP3、CYP3A4、CXCL8、EP300、EGFR、PPARG、AR、GJA1、IL-1 β 、BDNF、SP1、EGF、STAT3、PRKCA、CAV1、MAPK1、FN1、RELA、ATM、CASP8、JUN、HMOX1、PTGS2、VEGFA、MAPK14、ABCG2、IL-2、IL-6、INS、HIF-1 α 、MYC、SOD1。对关键作用靶点进行 GO 富集分析, 君+臣+佐药组治疗围绝经期综合征的相关生物过程涉及化学刺激反应、生物过程的正负调控、调控发育过程、细胞过程正负调控、应激反应、细胞凋亡的调节、代谢过程正负调控、组织增殖、对类固醇激素刺激的反应等。排除广泛通路, KEGG 通路富集分析结果显示其相关通路主要富集在 ER 信号通路 (涉及

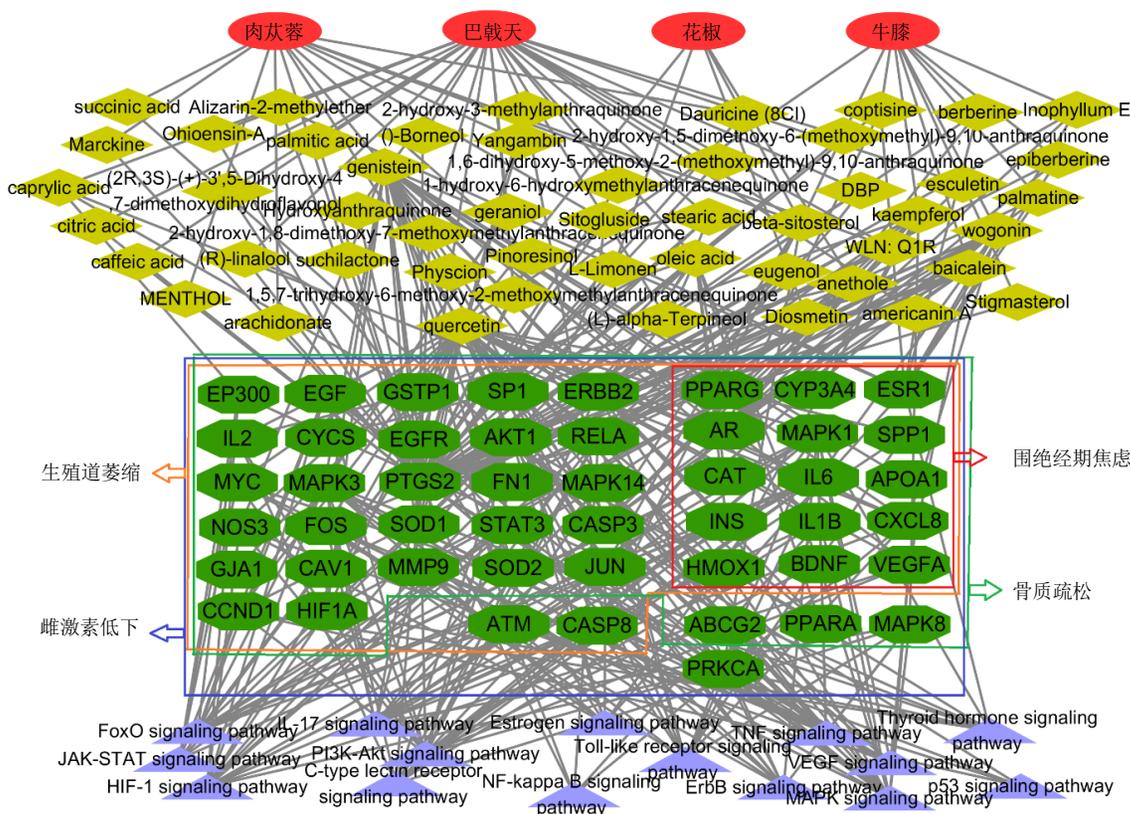


图 3 君+臣+佐药组作用特点网络分析

Fig. 3 Network analysis of pharmacological characteristics of Jun-Chen-Zuo group

10个靶点)、MAPK信号通路(涉及18个靶点)、PI3K-Akt信号通路(涉及18个靶点)、HIF-1信号通路(涉及16个靶点)等。

3.4 君+臣+佐+使药(全方)组作用特点分析

如表1所示,共得到君+臣+佐+使药(全方)组74个化学成分、322个靶点。与疾病靶点作交集,得到290个共有靶点,具体成分及靶点见表2。290个共有靶点中肉苁蓉18个化学成分对应216个靶点,巴戟天39个化学成分对应116个靶点,花椒7个化学成分对应147个靶点,牛膝16个化学成分对应170个靶点,青盐1个化学成分对应19个靶点。290个共有靶点中有273个与雌激素低下相关(较君+臣+佐药组增加15个)、40个与围绝经期焦虑相关(较君+臣+佐药组未增加)、162个与生殖道萎缩相关(较君+臣+佐药组增加9个)、182个与骨质疏松有关(较君+臣+佐药组增加6个),288个参与了PPI网络。如图4所示,对PPI网络进行拓扑属性分析,点度中心性和介数中心性值均超过平均值的靶点共有51个,分别为趋化因子2(C-C motif chemokine 2, CCL2)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphatedehydrogenase, G6PD)、尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type

plasminogen activator, PLAU)、热休克蛋白A4(heat shock protein A4, HSPA4)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、CCND1、ATM、MMP9、CYP3A4、EGFR、CXCL8、HIF-1 α 、PRKCA、PPARG、APOA1、STAT3、ESR1、CASP8、IL-2、CAT、PTGS2、SOD2、JUN、VEGFA、MYC、NOS3、RELA、BDNF、SOD1、CYCS、GSTP1、HMOX1、MAPK3、AR、ERBB2、MAPK14、EP300、FOS、CAV1、EGF、CASP3、MAPK1、IL-1 β 、MAPK8、SP1、PPARA、FN1、INS、SPP1、AKT1、IL-6。对关键作用靶点进行GO富集分析,君+臣+佐+使药组治疗围绝经期综合征的相关生物过程涉及化学刺激反应、应激反应、组织发育、生物过程的正负调控、细胞过程正负调控、细胞凋亡的调节、调节细胞增殖、对类固醇激素刺激的反应等。排除广泛通路,KEGG通路富集分析结果显示其相关通路主要富集在ER信号通路(涉及10个靶点)、PI3K-Akt信号通路(涉及18个靶点)、MAPK信号通路(涉及18个靶点)、HIF-1信号通路(涉及16个靶点)等。

4 讨论

网络药理学涉及生物信息学、计算机科学、网络数据库检索等技术和知识,能预测出药物与通

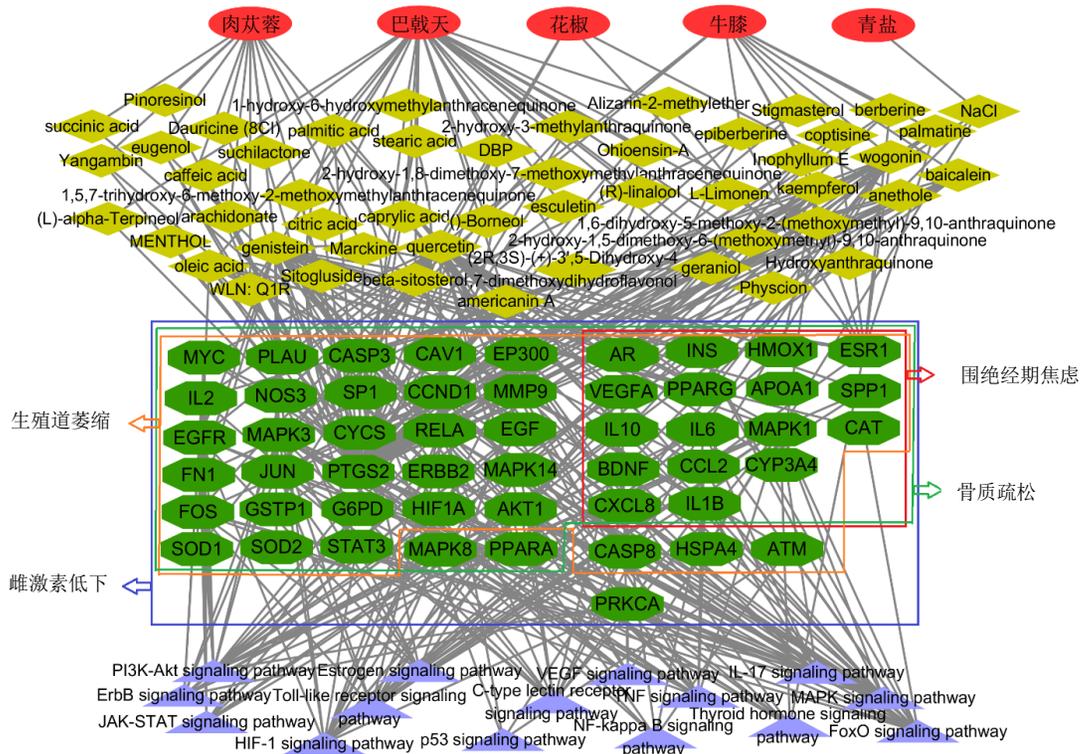


图4 君+臣+佐+使药(全方)组作用特点网络分析

Fig. 4 Network analysis of pharmacological characteristics of Jun-Chen-Zuo-Shi group

路、疾病的相关性,构建“药物-成分-靶点-疾病”网络,揭示多分子药物协同作用机制,与中药及其复方多成分、多靶点、多途径协同作用的原理契合度较高,因此本研究采用网络药理学方法,将青盐方拆方作用于围绝经期综合征分别进行靶点预测筛选及功能和通路富集分析,探索补肾方剂青盐方治疗围绝经期综合征的作用机制和配伍合理性。

本课题组前期开展的青盐方治疗围绝经期焦虑症的网络分析^[4],为更广泛获得该方治疗该疾病的潜在靶标,结合 TCMIP v2.0 和 Swiss Target Prediction 得到青盐方 45 个化合物对应的 455 个潜在靶标信息,并进行初步实验验证。本研究采用 TCMSP 数据库中的相关靶点功能,并结合文献发现及知识归纳筛选出青盐方 74 个潜在化学成分及 322 个潜在靶标信息,旨在从网络药理学角度阐释青盐方防治围绝经期的作用特点及配伍规律。各药可通过多种成分、多个靶点、多种信号通路作用于围绝经期综合征,各药之间既有重复,又互相补充,全方作用于围绝经期综合征的靶点 290 个,其中关键靶点 51 个,可通过化学刺激反应、应激反应、组织发育、生物过程的正负调控、细胞过程正负调控、细胞凋亡的调节、调节细胞增殖、对类固醇激素刺激的反应等生物过程作用于围绝经期综合征,主要通过影响细胞因子如 AKT1、CCND1、凋亡调节剂 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), 炎症因子如 IL-1 β 、IL-10、CCL2, 内分泌因子如 BDNF、ESR1、AR 参与神经系统、内分泌系统、免疫系统等,从而作用于围绝经期综合征。KEGG 通路富集结果显示,青盐方主要通过 ER、PI3K-Akt、MAPK、HIF-1 等信号通路作用于围绝经期综合征。

肉苁蓉作为方中君药,囊括了全方 290 个靶点中的 216 个靶点,涉及围绝经期焦虑、生殖道萎缩、骨质疏松各个不同症状和雌激素低下关键病理环节。在君药基础上依次增加臣、佐、使药后,靶点个数和各通路所涉及的靶点均有不同程度的增加。君+臣药组作为方中的核心药对,囊括了 290 个靶点中 258 个靶点,臣药巴戟天在君药基础上增加了 42 个靶点,尤以增加雌激素低下关键病理环节的靶点为最多,也涉及各个不同症状靶点的增加,提示君药、君-臣药对在方中的关键地位,对各个不同症状和雌激素低下关键病理环节均有防治作用。在君臣药对基础上加入佐药花椒、牛膝后,增加了 16 个靶点,涉及各个不同症状和关键病理环节均有增加,显示其在方中“佐”

的地位。在君、臣、佐药基础上增加使药青盐后增加了 16 个靶点,在各个不同时期症状和关键病理环节均有涉及,如血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶 (serum/ glucocorticoid-regulated kinase 1, SGK1)^[9]、乙酰胆碱转移酶 (cholin acetyltransferase, CHAT)^[10] 涉及神经-内分泌系统;炎症因子高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)^[11]、整合素 β 2 (integrin beta 2, ITGB2)^[12] 涉及免疫、炎症因子; G6PD^[13]、15-羟基前列腺素脱氢酶 (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, 15-PGDH)^[14] 涉及细胞凋亡;碳酸酐酶 1 (carbonic anhydrase 1, CA1)^[15]、碳酸酐酶 2 (carbonic anhydrase 2, CA2)^[16] 涉及骨代谢过程。表明青盐作为引经药,在方中润燥潜降,引诸药入肾经,可关联多个围绝经期综合征涉及的系统及功能,增加君臣佐药组在各个不同症状和关键病理环节的参与防治,起到引经报使的作用。

《素问·上古天真论》云:“女子七岁肾气盛,齿更发长;二七而天癸至,任脉通……时至七七则任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”中医认为妇女时至七七时,肾气衰,天癸竭,进而出现“绝经前后诸症”即围绝经期综合征,故肾虚是致围绝经期综合征之本。课题组前期多项研究发现,补肾方药作用于围绝经期综合征与雌激素网络有着密切联系^[2-3,17-19]。雌激素在整个生命过程中影响着雌性丘脑下部的活动,对性分化、发育和成熟均有影响,对骨代谢具有重要调节作用^[20-21]。研究表明,方中肉苁蓉、巴戟天、花椒、牛膝均含有雌激素样作用的成分,如槲皮素 (quercetin) 作为肉苁蓉、花椒、牛膝的共有成分,可与 ESR1 结合发挥雌激素样保护作用^[22],并调控雌激素受体下游底物和信号通路,通过雌激素受体介导的通路促进骨髓间充质干细胞的增殖和成骨向分化,改善骨组织结构和功能^[23]。MAPK 信号通路可介导卵巢颗粒细胞增殖、分化、迁移、凋亡^[24]。HIF-1 信号通路既可促进骨形成和血管形成^[25],又可增加破骨细胞的数量和破骨活性^[26]。PI3K/Akt 信号通路及其下游靶蛋白可参与骨形成和骨重建过程^[27]。ErbB 信号通路可激活 PI3K/Akt 途径,促进神经干细胞分化,干预神经系统疾病^[28]。调节 VEGF 信号通路可改善脑部微循环与脑代谢异常,从而缓解焦虑、抑郁等情况^[29]。p53 信号通路参与诱导子宫内膜细胞凋亡^[30],抑制原代海马神经元细胞凋亡^[31]。

本研究通过网络药理学方法,分析青盐方中各拆方组合作用于围绝经期综合征的作用靶点及机制,揭示青盐方作用于围绝经期综合征的作用机制及君、臣、佐、使配伍的合理性,为进一步探究其发挥作用的药效物质基础和作用机制提供方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙亚,夏小雯,蔡亚伟,等. 脱氢表雄酮对围绝经期综合征影响的研究进展 [J]. 广西医学, 2019, 41(23): 3053-3057.
- [2] Zheng H X, Zhao Y, Xu Y, *et al.* Long-time qingyan formula extract treatment exerts estrogenic activities on reproductive tissues without side effects in ovariectomized rats and via active ER to ERE-independent gene regulation [J]. *Aging*, 2019, 11(12): 4032-4049.
- [3] Zhao Y, Zheng H X, Xu Y, *et al.* Estrogenic effect of the extract of QingYan formula on reproductive tissues in immature mice [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019, 2019: 5493714.
- [4] 赵元,郑红霞,徐颖,等. 青盐方治疗围绝经期焦虑症的网络分析及实验验证 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4129-4139.
- [5] Zhao Y, Xu Y, Zheng H X, *et al.* QingYan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113644.
- [6] 刘志强,王博龙. 基于网络药理学预测二妙丸“一方多效”的分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 198-206.
- [7] 雷伟,邓艳芳,姜民,等. 速效救心丸治疗心肌缺血疾病的网络药理学研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(1): 7-16.
- [8] 马江涛,黄红,万雷,等. 骨碎补治疗骨质疏松性骨折的网络药理学研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 89-92.
- [9] 孟琴琴,郭美亮,袁定芬,等. SGK1 功能的研究进展及临床意义 [J]. 医学综述, 2020, 26(3): 427-432.
- [10] 贾晓玉,张兰,罗艺,等. 参芪醒脑方对痴呆模型小鼠学习记忆能力及脑组织胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱酯酶含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(4): 56-61.
- [11] Kim J H, Kim S J, Lee I S, *et al.* Bacterial endotoxin induces the release of high mobility group box 1 via the IFN-beta signaling pathway [J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 2458-2466.
- [12] 谢娜. 三种吞噬细胞功能缺陷病的临床特征及基因诊断 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2008.
- [13] 任丽丽,张然,古同男,等. 下调 G6PD 表达对肝癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2019, 28(2): 163-166.
- [14] 赖跃兴. 胃癌中 15-羟基前列腺素脱氢酶与环氧合酶-2 关系的研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [15] 郑亚冰,王林,常建芳,等. 碳酸酐酶 1 对骨形成作用的研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(4): 22-27.
- [16] 黄慧. II型碳酸酐酶、活化 T 细胞核因子与老年男性骨质疏松症中医证型关系的探讨 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [17] Xu Y, Ma X P, An J N, *et al.* Short-time QiBaoMeiRan formula treatment exerts estrogenic activities without side effects on reproductive tissues in immature mice [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17436.
- [18] Xu Y, Ma X P, Ding J, *et al.* Treatment with qibaomeiran, a kidney-invigorating Chinese herbal formula, antagonizes estrogen decline in ovariectomized rats [J]. *Rejuvenation Res*, 2014, 17(4): 372-381.
- [19] Xu Y, Ma X, An J, *et al.* Treatment with QiBaoMeiRan, a Chinese herbal formula, prevents bone loss in ovariectomized rat [J]. *Climacteric*, 2016, 19(1): 98-106.
- [20] 马庆芬,姚紫薇. 雌激素对骨质疏松作用机制的研究进展 [J]. 国外医学: 妇产科学分册, 2005, 32(3): 162-164.
- [21] 赵晓苗,杨冬梓. 雌激素在生殖内分泌疾病的临床应用 [J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(9): 643-645.
- [22] 钟明. 槲皮素对大鼠皮层神经元的雌激素样保护作用及其机制研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2016.
- [23] Pang X G, Cong Y, Bao N R, *et al.* Quercetin stimulates bone marrow mesenchymal stem cell differentiation through an estrogen receptor-mediated pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 4178021.
- [24] Chen M J, Chou C H, Shun C T, *et al.* Iron suppresses ovarian granulosa cell proliferation and arrests cell cycle through regulating p38 mitogen-activated protein kinase/p53/p21 pathway [J]. *Biol Reprod*, 2017, 97(3): 438-448.
- [25] Wang Y, Wan C, Deng L F, *et al.* The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1616-1626.
- [26] Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, *et al.* HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(41): 16568-16573.
- [27] 林院,徐杰,罗奋棋,等. 基于 PI3K/AKT 信号通路研究丹酚酸 B 对成骨细胞骨形成的调控作用 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(11): 2760-2763.
- [28] Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signalling network [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 127-137.
- [29] 徐崇利. 胸痹伴发焦虑抑郁相关因素分析及益心舒胶囊联合干预的系统评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [30] 刘洋. 姜类萜类化合物激活 P53 信号通路诱导子宫内皮细胞凋亡研究 [D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [31] 熊万霞,赵曦宁,王颖. 抗衰老酶 1-p53 信号通路在吸入麻醉致原代海马神经元细胞凋亡中的神经保护作用 [J]. 中国临床医学, 2019, 26(6): 848-854.

[责任编辑 李亚楠]