

归肾丸治疗多囊卵巢综合征的网络药理学作用机制

陆岩¹, 王小云²(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广东省中医院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 通过网络药理学研究方法和分子对接技术预测归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的作用机制。**方法** 利用 TCMSp 数据库, 收集归肾丸有效成分并预测其作用靶标, 通过 GeneCards 与 OMIM 数据库筛选出多囊卵巢综合征的靶标, 运用 R 软件获取疾病交集靶标, 绘制韦恩图。运用 Cytoscape 软件构建归肾丸治疗多囊卵巢综合征的“药物-成分-靶标-疾病”网络, 通过 STRING 数据库构建靶标蛋白相关作用网络并进行关键靶标的 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析。通过 Autodock Vina 软件对药物有效成分与疾病靶标进行分子对接验证。**结果** 筛选得到归肾丸治疗多囊卵巢综合征的 78 个有效成分和 78 个药物-疾病共同靶标, 并推断其作用机制可能与介导 PI3K-Akt、HIF-1 及 TNF 等 124 条信号通路相关。槲皮素、山柰酚、豆甾醇等有效成分与 PTGS1、ESR1、PGR 等靶标对接结果良好。**结论** 归肾丸有效成分可能通过抗炎性反应、改善胰岛素抵抗、促进卵泡发育、控制血糖稳态、调节脂质代谢、调节激素水平等药理作用来治疗多囊卵巢综合征。

关键词: 归肾丸; 多囊卵巢综合征; 作用机制; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)06-0825-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.011

The Network Pharmacological Mechanism of *Guishen* Pills in the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome

LU Yan¹, WANG Xiaoyun²(1. The Second Clinical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: Objective To predict the mechanism of *Guishen* pills in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) through network pharmacology method and molecular docking technology. **Methods** The TCMSp database was used to collect the active ingredients of *Guishen* pills and their targets were predicted. The targets of PCOS were screened out through GeneCards and OMIM databases, and R software was used to obtain targets intersection. Then, a Venn diagram was drawn. Cytoscape software was applied to construct the “drug-component-target-disease” network of *Guishen* pills for the treatment of PCOS. We constructed the target protein interaction network through the STRING database and performed the GO function enrichment analysis of key targets and the KEGG pathway enrichment analysis. Autodock Vina software was used to verify the interaction between the active ingredients of the drug and the disease target. **Results** 78 active ingredients and 78 drug-disease common targets of *Guishen* pills in the treatment of PCOS were screened, and its mechanism of action was inferred to be related to mediating 124 signaling pathways such as PI3K-Akt, HIF-1 and TNF, etc.. Effective ingredients (quercetin, kaempferol and stigmasterol) have good docking results with targets (PTGS1, ESR1 and PGR). **Conclusion** The active ingredients of *Guishen* pills may treat PCOS through anti-inflammatory response, improvement of insulin

收稿日期: 2020-10-09

作者简介: 陆岩, 女, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合妇产科学。Email: ly1104421721@163.com。通信作者: 王小云, 女, 主任医师、教授, 研究方向: 中西医结合妇产科学。Email: tcm1104@126.com。

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1704102); 国家中医药管理局王小云全国名老中医药专家传承工作室项目(国中医药人教发[2016]42号); 广东省中医院中医二院[2013]233号岭南中医妇科流派工作室项目; 广东省科技计划项目(2017B030314166); 广东省自然科学基金项目(2018A030310508)。

resistance, promotion of follicular development, control of blood glucose homeostasis, regulation of lipid metabolism, and regulation of hormone levels.

Keywords: *Guishen* pills; polycystic ovary syndrome; mechanism of action; network pharmacology; molecular docking

多囊卵巢综合征(Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS)是常见的妇科内分泌疾病,以排卵障碍、多卵泡、高雄激素临床表现和/或高雄激素血症为主要特征^[1]。目前其发病机制尚无确切定论,可能与遗传、环境、心理等因素相关,发病率为5%~10%并呈现升高态势^[2]。多囊卵巢综合征可导致育龄期女性生殖功能障碍,远期合并代谢性相关疾病、心血管疾病、雌激素依赖性肿瘤等风险增加^[3]。治疗方式多以口服避孕药为主,然而有数据表明服用口服避孕药的多囊卵巢综合征患者深静脉血栓风险明显升高^[3]。中医药治疗多囊卵巢综合征具有疗效好,安全性高等优势^[5]。其中归肾丸是治疗多囊卵巢综合征疗效明确的经典方,多项研究表明归肾丸具有降低多囊卵巢综合征患者促黄体生成素(Luteinizing Hormone, LH)与雄激素水平,促进排卵,提高妊娠率等作用^[6-8]。

归肾丸出自《景岳全书》,由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、茯苓、当归、杜仲和菟丝子8味药物组成,具有补益肝肾、健脾益气、养血填精的作用。现代研究^[9-11]发现归肾丸具有降低大鼠体内LH水平,提高雌二醇(Estradiol, E2)水平,改善病理状态下大鼠卵巢的结构和功能,抑制颗粒细胞凋亡,清除氧自由基,延缓衰老等作用。

网络药理学通过系统层面揭示中药对机体调控网络的作用,将网络数据库中的数据整合并通过计算机软件等构建药物化合物成分与疾病蛋白间的相互作用图,阐释两者间的关联性,为研究传统中药与现代药理学之间的相互关系搭建了桥梁^[12]。而归肾丸治疗多囊卵巢综合征的具体机制尚无明确定论,本文运用网络药理学及分子对接技术预测其中可能的机制。

1 材料与方法

1.1 归肾丸有效成分的筛选 在中药系统药理学分析平台(TCMSP, <https://tcmsp.com/tcmssp.php/>)检索,获取归肾丸中熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、茯苓、当归、杜仲和菟丝子等8位药物的有效成分。

因中药多为口服制剂,故以药代动力学参数为依据,设置药物口服生物利用度(Oral Bioavailability, OB) $\geq 30\%$,药物相似度(Drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ,筛选出有效成分。

1.2 归肾丸有效成分作用靶标的筛选 通过TCMSP数据库进行“靶标预测”。再利用perl软件(<http://www.perl.org/>)对收集的化学成分及作用靶标标注基因名称。

1.3 归肾丸治疗多囊卵巢综合征关键靶标的获取

GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)是一个分析人类基因数据的综合数据库;在线“人类孟德尔遗传”数据库(OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, <https://omim.org/>)记录了所有已知疾病的遗传成分,并可以预测它们与人类基因组中的相关基因的关系。在GeneCards与OMIM数据库中检索“Polycystic Ovarian Syndrome”获取相关靶标,去除重复部分。运用R软件(<https://www.rproject.org/>)对归肾丸有效成分相关靶标和疾病靶标取交集,绘制韦恩图(Venn),获得的靶标即为归肾丸治疗多囊卵巢综合征的关键靶标。

1.4 “药物-有效成分-靶标-疾病”网络的构建 使用Cytoscape 3.7.2软件(<http://www.cytoscape.org/>)构建“药物-有效成分-靶标-疾病”关系网络。通过网络可以深入分析归肾丸治疗多囊卵巢综合征可能的作用机制。以网络节点度值(Degree)和介度中心性(Betweenness Centrality, BC)为筛选条件,挖掘网络重要组成。

1.5 靶标蛋白相互作用的网络构建 将归肾丸治疗多囊卵巢综合征的关键靶标导入STRING数据库(<https://string-db.org/>)进行检索,选择“Multiple Proteins”功能,选择“物种”为人类(Homo Sapiens),设定置信度评分 > 0.40 ,从而构建PPI(Protein-Protein Interaction)网络。将PPI网络的靶标导入Cytoscape软件,利用CytoNCA对靶标的BC、接近中心性(Closeness Centrality, CC)、Degree、特征向量中心性(Eigenvector Centrality, EC)等条件进行中位数过滤,循环两次筛选出每个条件均高于

中位值的靶标。

1.6 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析 先用 perl 软件将归肾丸治疗多囊卵巢综合征的关键靶标名称转换成 entrez ID, 然后进入 Bioconductor(<http://www.bioconductor.org/>)找到 R 软件。Bioconductor 是目前最常用的高通量基因组数据分析工具之一, 它以 R 软件为平台提供了 19 个物种(含人类)的 GO(Gene Ontology)注释信息。结合 entrez ID, 设置 $P < 0.05$, 得到 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.7 分子对接 根据网络构建的拓扑结果, 用分子对接模拟研究配体在复杂分子网络中的潜在相互作用。从 RCSB PDB 数据库(Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>)检索 PPI 网络中核心靶标的 3D 结构 PDB 格式文件, 去除水分子、加氢后使用 Autodock

Tool 4.2(ADT)保存为 Pdbqt 格式。从 ZINC 数据库(<http://zinc.docking.org>)下载网络图中核心成分的 Mol2 格式文件。采用 Autodock Vina 进行核心成分与核心靶标间的分子对接验证。以结合能评估分子与靶标的结合能力, 结合能 $< 0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表明能自发结合, 结合能 $\leq -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表明结合良好。

2 结果

2.1 归肾丸有效成分筛选的结果 通过检索 TCMSP 数据库, 设置 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为参数, 得到归肾丸有效成分共 139 个, 其中熟地黄 2 个、山药 16 个、枸杞子 45 个、山茱萸 20 个、茯苓 15 个、当归 2 个、杜仲 28 个和菟丝子 11 个。表 1 展示了归肾丸中多个药物共有的有效成分。

表 1 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)部分有效成分信息表

Table 1 Information table of some active ingredients of *Guishen* pills in the treatment of PCOS

序号	分子 ID	化学名称	中文名称	口服生物利用度(OB)/%	药物相似度(DL)	来源中药
1	MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28	菟丝子、杜仲、枸杞子
2	MOL001495	ethyl linolenate	亚麻酸乙酯	46.10	0.20	山茱萸、枸杞子
3	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76	熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、当归
4	MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75	枸杞子、山茱萸、当归、杜仲、菟丝子
5	MOL001494	mandenol	十八碳-6,9-二烯酸乙酯	42.00	0.19	山茱萸、枸杞子
6	MOL000359	sitosterol	谷甾醇	36.91	0.75	熟地黄、山茱萸
7	MOL000422	kaempferol	山柰酚	41.88	0.24	杜仲、菟丝子
8	MOL005438	campesterol	菜油甾醇	37.58	0.71	枸杞子、山药
9	MOL005440	isofucosterol	异岩藻甾醇	43.78	0.76	山药、菟丝子

2.2 归肾丸有效成分治疗多囊卵巢综合征的潜在作用靶标筛选的结果 排除重复靶标后获得归肾丸有效成分作用靶标 119 个。Gene Cards 及 OMIM 数据库筛选多囊卵巢综合征相关靶标 3 114 个。运行 R 软件“VennDiagram”程序包将归肾丸有效成分相关靶标与多囊卵巢综合征相关靶标取交集, 获得归肾丸有效成分治疗多囊卵巢综合征的潜在作用靶标, 绘制韦恩图(图 1)。

2.3 “药物-有效成分-靶标-疾病”网络的构建

Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物-有效成分-靶标-疾病”相互作用的网络图(图 2)。该网络由 158 个节点组成, 包括药物节点 1 个、成分节点 78 个、靶标节点 78 个及疾病节点 1 个。

网络节点 Degree 和 BC 反映了网络中节点核心度的高低, Degree 越高, 表明该节点越重要。将 Degree 值和 BC 值按大小排序筛选核心成分和靶标, 结果显示, quercetin(槲皮素)、kaempferol(山柰

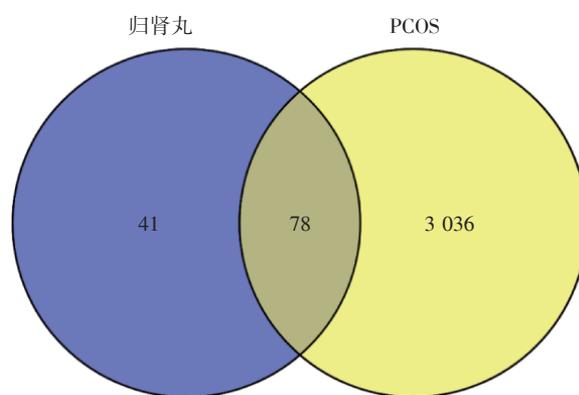
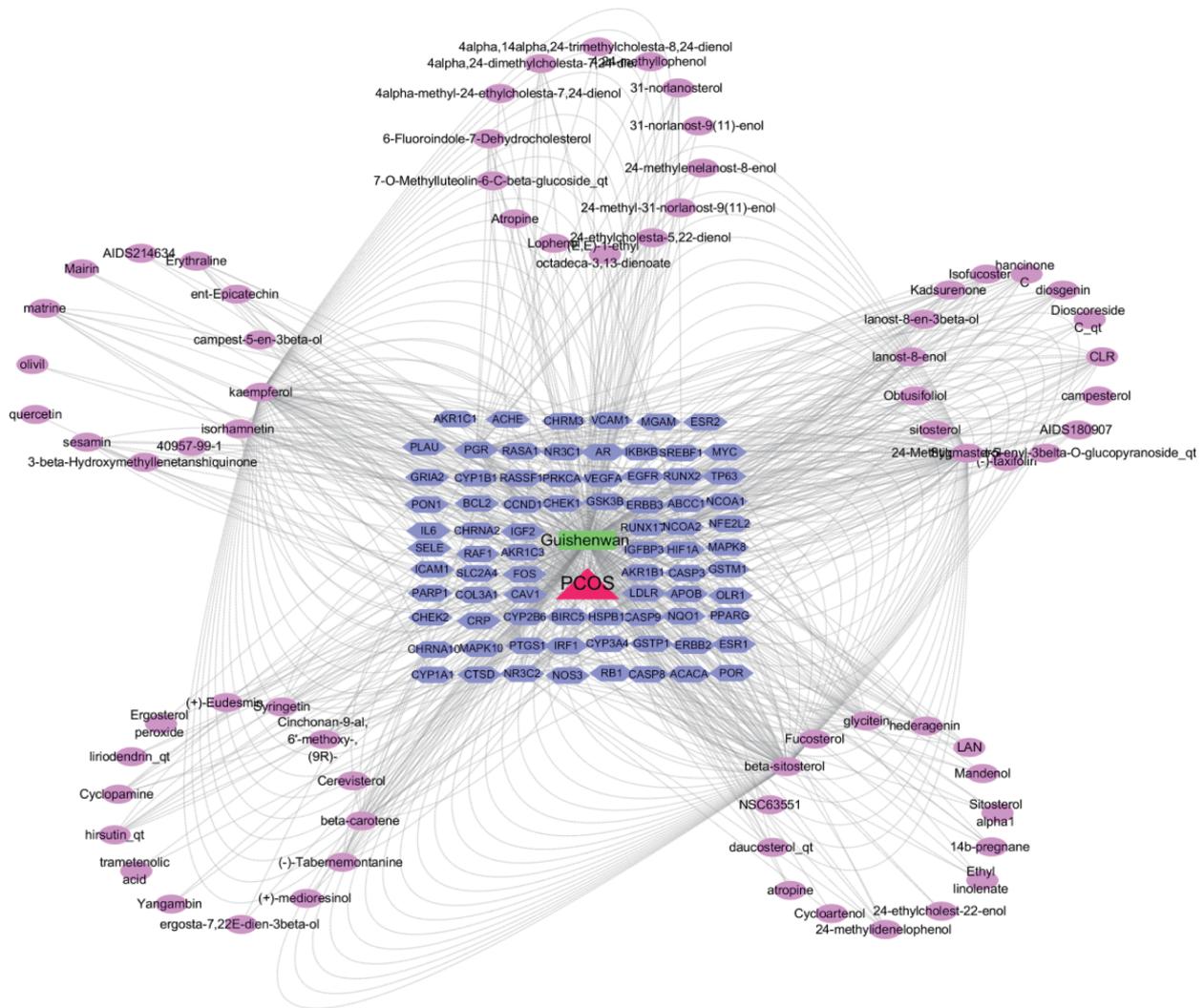


图 1 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)有效成分相关靶标与多囊卵巢综合征相关靶标交集韦恩图

Figure 1 Venn diagram of intersecting PCOS targets and related targets of active ingredients in *Guishen* pill

酚)、beta-sitosterol(β -谷甾醇)、stigmasterol(豆甾醇)、isorhamnetin(异鼠李素)、beta-carotene(β -胡萝卜素)等归肾丸有效成分以及 NCOA2(核受体共激活



注：红色代表疾病，绿色代表药物，紫色代表归肾丸有效成分，蓝色代表作用靶标

图2 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的“药物-有效成分-靶标-疾病”图

Figure 2 The "drug-active ingredient-target-disease" diagram of *Guishen* pill in the treatment of PCOS

因子-2)、PGR(孕激素受体)、NR3C2(核受体亚家族C组成员2)、PTGS1(前列腺素G/H合酶和环氧合酶)、CHRM3(毒蕈碱型乙酰胆碱受体M3)、PPARG(过氧化物酶体增生激活受体 γ)等作用靶标是网络的重要组成(表2)。

2.4 归肾丸治疗多囊卵巢综合征关键靶标的PPI网络

进入STRING数据库,输入归肾丸有效成分治疗多囊卵巢综合征的靶标,设定置信度评分>0.40,得到归肾丸有效成分对应的靶标PPI网络(图3)。将PPI网络靶标导入Cytoscape软件,利用CytoNCA进行二次中位数筛选(图4、表3),其中IL-6(白细胞介素6)、CCND1(G1/S-特异性周期蛋白D1)、ESR1(雌激素受体1)、CAV1(微囊蛋白1)、FOS(核蛋白转录因子)、MAPK8(丝裂原活化蛋白激酶8)、MYC(癌基

表2 归肾丸-成分-靶标-多囊卵巢综合征(PCOS)网络关键节点

Table 2 Key nodes of *Guishen* pills-ingredients-targets-PCOS network

序号	化学名称	中文名称	类型	度值	介度中心性
1	quercetin	槲皮素	成分	336	0.184 4
2	beta-sitosterol	β -谷甾醇	成分	88	0.016 0
3	kaempferol	山柰酚	成分	84	0.042 5
4	stigmasterol	豆甾醇	成分	64	0.007 9
5	isorhamnetin	异鼠李素	成分	26	0.016 7
6	beta-carotene	β -胡萝卜素	成分	16	0.008 3
7	NCOA2	核受体共激活因子-2	靶标	48	0.103 1
8	PGR	孕激素受体	靶标	48	0.101 2
9	NR3C2	核受体亚家族C组成员2	靶标	28	0.038 2
10	PTGS1	前列腺素G/H合酶和环氧合酶	靶标	28	0.034 5
11	CHRM3	毒蕈碱型乙酰胆碱受体M3	靶标	18	0.015 6
12	PPARG	过氧化物酶体增生激活受体 γ	靶标	15	0.005 2

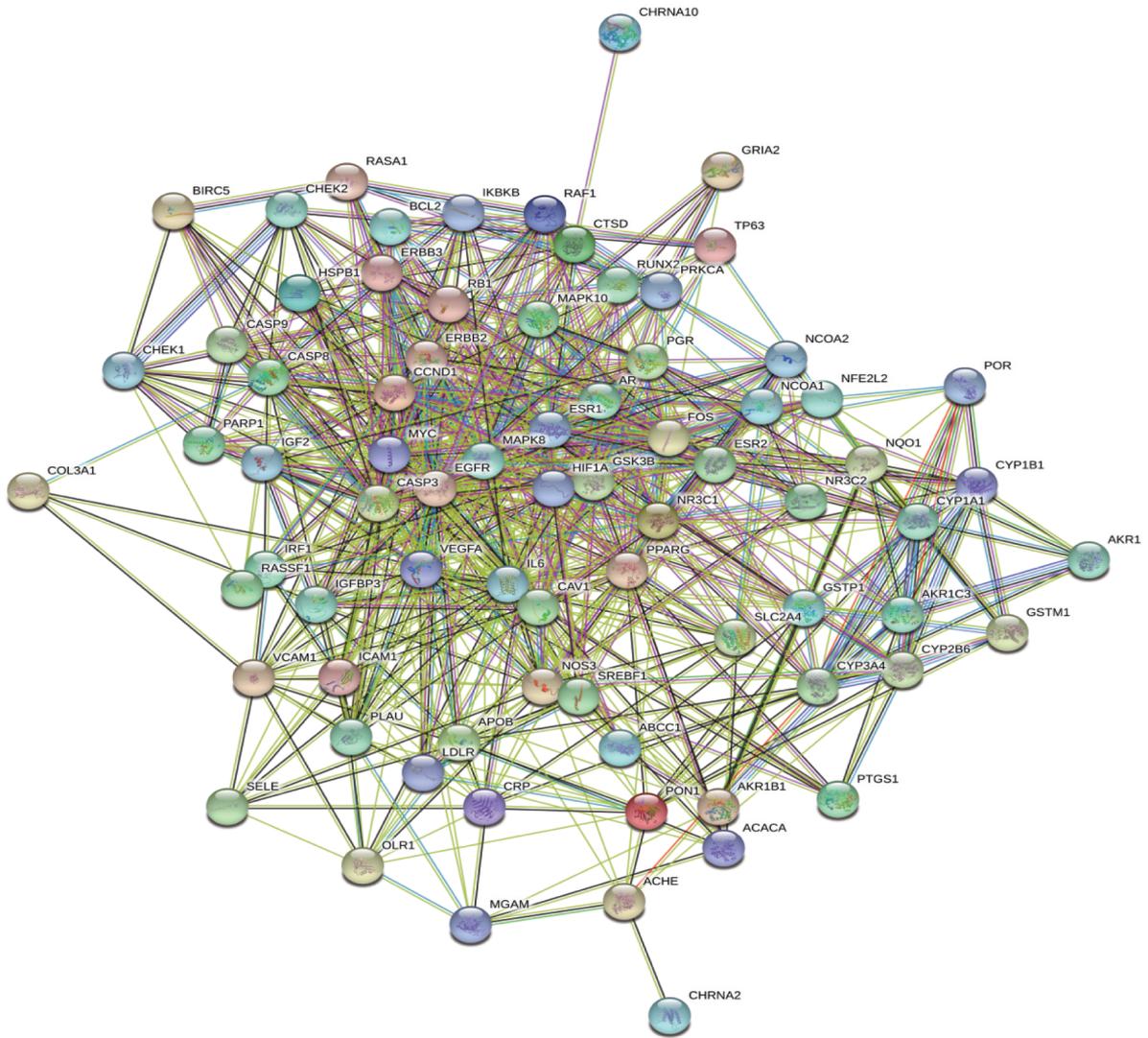


图 3 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)关键靶标的 PPI 网络
Figure 3 The PPI network of *Guishen* pills in the treatment of PCOS key targets

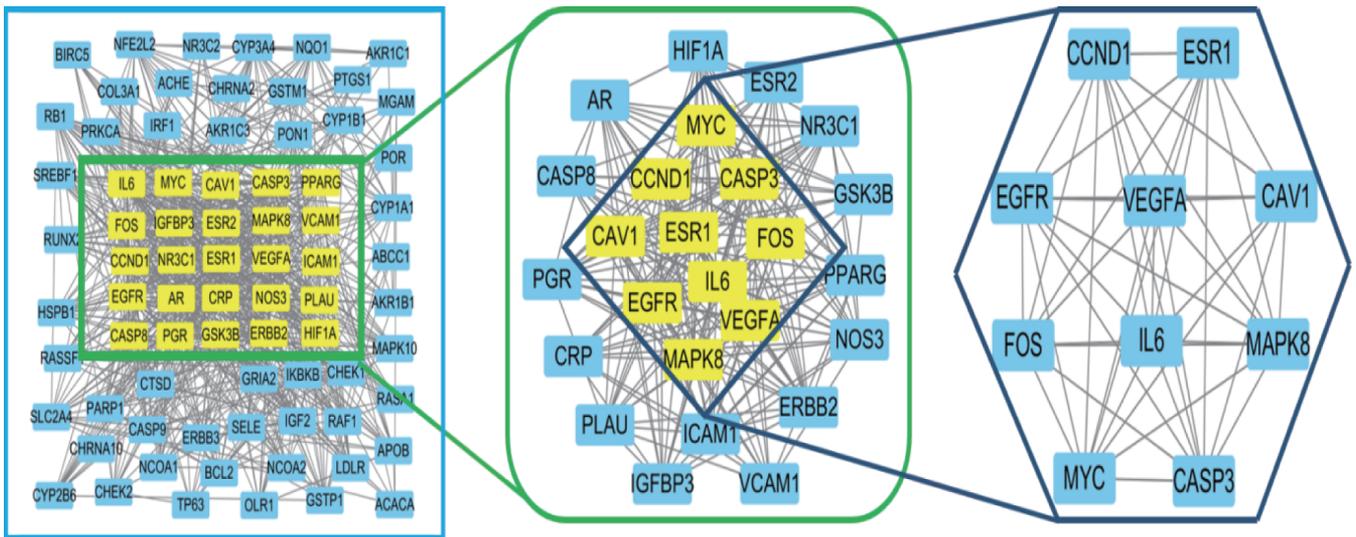


图 4 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的 PPI 核心靶标
Figure 4 PPI key targets of *Guishen* pills in the treatment of PCOS

表 3 归肾丸治疗多囊卵巢综合征的 PPI 核心靶标数据

Table 3 PPI key targets data of *Guishen* pills in the treatment of PCOS

序号	化学名称	中文名称	介度中心性	接近中心性	度值	特征向量中心性
1	CCND1	G1/S-特异性周期蛋白-D1	9.326 6	0.888 9	21	0.231 6
2	CAV1	微囊蛋白-1	9.225 1	0.857 1	20	0.219 5
3	VEGFA	血管内皮生长因子 A	17.115 4	1.000 0	24	0.254 2
4	ESR1	雌激素受体 1	11.881 4	0.888 9	21	0.227 6
5	CASP3	半胱氨酸蛋白酶 3	15.010 8	0.960 0	23	0.245 7
6	IL-6	白细胞介素-6	17.115 4	1.000 0	24	0.254 2
7	MYC	癌基因	7.6240 5	0.857 1	20	0.223 1
8	FOS	核蛋白转录因子	5.991 8	0.827 6	19	0.214 5
9	MAPK8	丝裂原活化蛋白激酶 8	13.433 7	0.960 0	23	0.247 8
10	EGFR	表皮生长因子受体	10.339 9	0.9230 1	22	0.241 4

因)、CASP3(半胱氨酸蛋白酶 3)、VEGFA(血管内皮生长因子 A)、EGFR(表皮生长因子受体)是所有条件均高于中位值的 10 个节点。

2.5 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析 GO 功能富集分析共获得 1 468 个条目, 生物过程(BP, 88.76%)条目 1 303 个, 细胞组成(CC, 2.45 %)条目 36 个, 分子功能(MF, 8.79%)条目 129 个。根据 $P < 0.01$, 各取排名前 10 位的条目制作条形图(图 5)。结果显示归肾丸治疗多囊卵巢综合征关键靶

标的生物过程主要富集在对类固醇激素的反应、细胞对异生素刺激的反应、对酮的反应对酸性化学物质的反应、对异源生物刺激的反应、细胞对类固醇激素刺激的反应、对金属离子的反应、生殖结构发育、生殖系统开发、对皮质类固醇的反应等。细胞组成方面主要富集在膜筏、膜微区、膜区、核染色质、基底外侧质膜、基底质膜、血浆脂蛋白颗粒、脂蛋白颗粒、蛋白质-脂质复合物、内吞小泡膜等。分子功能方面主要富集在核受体活性、转录因子活性, 直接的配体调节序列特异性 DNA 结合、类固醇激素受体活性、类固醇结合、氧化还原酶活性, 作用于成对的供体上, 并结合或还原分子氧、DNA 结合转录激活剂活性, RNA 聚合酶 II 特异性、单加氧酶活性、核激素受体结合、RNA 聚合酶 II 转录因子结合、激素结合等。

KEGG 通路富集分析共得到 124 条通路, 主要包含细胞信号转导途径、免疫炎症、代谢、内分泌等相关通路(图 6)。其中 PI3K-Akt signaling pathway (PI3K-Akt 信号通路)、HIF-1 signaling pathway (HIF-1 信号通路)及 TNF signaling pathway(TNF 信号通路)可能是归肾丸治疗多囊卵巢综合征重要的信号通路。

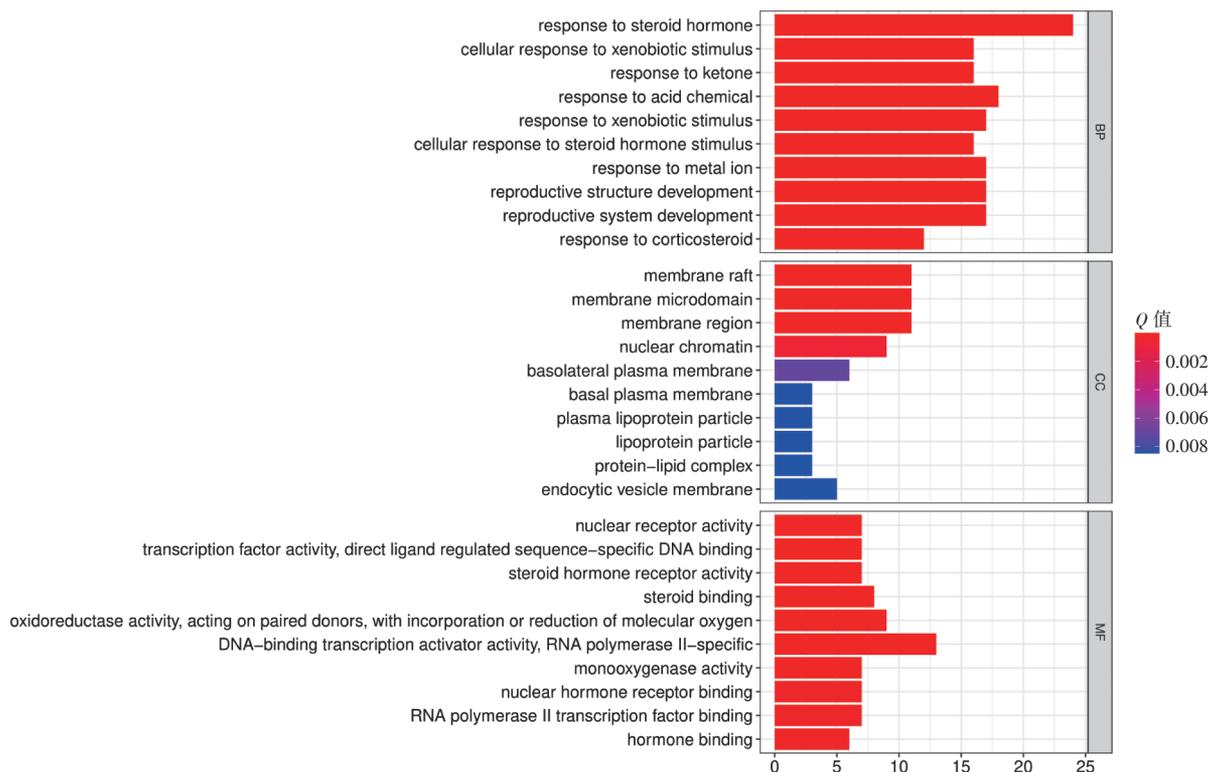


图 5 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)核心靶标的 GO 功能富集分析条形图

Figure 5 Bar graph of Go function enrichment analysis for key targets of *Guishen* pills treatment of PCOS

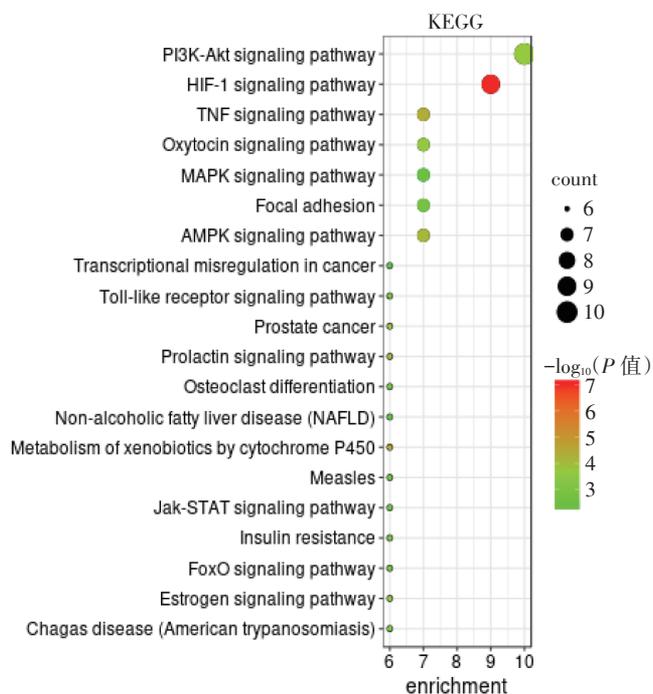
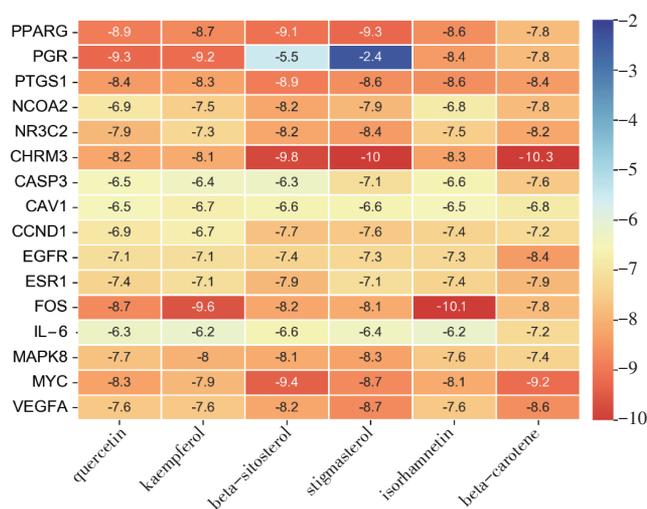


图 6 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)核心靶标的 KEGG 通路富集分析气泡图

Figure 6 Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis for the key targets of *Guishen* pills in the treatment of PCOS

2.6 分子对接结果分析 对核心靶标与核心有效成分进行分子对接,结果显示 PPARG、PTGS1、NCOA2、NR3C2、CHRM3、CASP3、CAV1、CCND1、EGFR、ESR1、FOS、IL6、MAPK8、MYC 和 VEGFA 与 6 个有效成分的对接结合能量均低于 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明对接结果良好。使用 R 语言将对接结果以热力图的形式直观反映(图 7), 红色越深, 拟合度越高。每个蛋白与小分子结合能量最低的对接结果分别是 PPARG 与 stigmasterol (豆甾醇) 结合能为 $-9.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, PGR 与 quercetin (槲皮素) 结合能为 $-9.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, PTGS1 与 beta-sitosterol (β -谷甾醇) 结合能为 $-8.9 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, NCOA2 与 beta-sitosterol 结合能为 $-8.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, NR3C2 与 stigmasterol 结合能为 $-8.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, CHRM3 与 beta-carotene (β -胡萝卜素) 结合能为 $-10.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, CASP3 与 beta-carotene 结合能为 $-7.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, CAV1 与 beta-carotene 结合能为 $-6.8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, CCND1 与 beta-sitosterol 结合能为 $-7.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, EGFR 与 beta-carotene 结合能为 $-8.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, ESR1 与 beta-carotene 结合能为 $-7.9 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, FOS 与 isorhamnetin (异鼠李素) 结合能为 $-10.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, IL6 与 beta-carotene 结合能为 $-7.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, MAPK8 与 stigmasterol 结合能为 $-8.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,



注: 横坐标为核心成分, 纵坐标为核心靶标。红色越深, 拟合度越高。结合能单位为 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$

图 7 归肾丸治疗多囊卵巢综合征(PCOS)核心成分与关键靶标进行分子对接结合能热图

Figure 7 Heat map of binding energy for molecular docking between key components and key targets in *Guishen* pills for the treatment of PCOS

MYC 与 beta-sitosterol 结合能为 $-9.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, VEGFA 与 stigmasterol 结合能为 $-8.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

3 讨论

本研究运用 TCMSP 数据库筛选出归肾丸潜在的有效成分, 根据拓扑出的关键节点(见表 2), 槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇可能是归肾丸作用于多囊卵巢综合征(PCOS)的主要成分。槲皮素是黄酮类化合物, 有抗炎、抗氧化、控制葡萄糖稳态、抑制胰岛素分泌等作用^[13-16]。山柰酚是黄酮类化合物, 有抗炎、抗氧化、降低血脂、扩张血管、抗肿瘤等作用^[17-20]。 β -谷甾醇是四环三萜类化合物, 有抗炎、抗氧化、免疫调节、降糖、降脂、降低雄激素等作用^[21-23]。Asma Neisy 等^[24]通过观察槲皮素对脱氢表雄酮诱导的多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗(IR)的影响, 发现槲皮素可以明显改善多囊卵巢综合征大鼠的 IR 状态。Sarwat Jahan 等^[25]通过将槲皮素与二甲双胍、来曲唑分别喂养雌性多囊卵巢综合征大鼠, 发现槲皮素具有减轻大鼠体质量, 减少卵巢直径, 促进卵泡正常发育和脂质调节等作用。有研究^[26]发现卵泡生长发育异常可能是引起多囊卵巢综合征无排卵及临床内分泌改变的病理基础。而山柰酚可以在绵羊次级卵泡的体外培养过程中保持卵泡存活率, 增加活性线粒体水平并通过介导 PI3K 信号通路促进卵母细胞减数分裂^[27]。由于多囊卵巢综合征患者的

“卵泡刺激素-颗粒细胞轴”功能低下, 卵泡内膜细胞合成的雄激素不能有效转化为 E_2 , 因此体内雄激素过多导致卵泡募集异常^[28]。而已有研究^[29]证实杜仲叶 β -谷甾醇可明显促进卵巢颗粒细胞分泌 E_2 , 故 β -谷甾醇可能通过改善高雄激素状态以促进卵泡发育, 发挥治疗多囊卵巢综合征的作用。由此可见, 槲皮素、山柰酚及 β -谷甾醇具有调节多囊卵巢综合征中激素水平和代谢紊乱, 促进卵泡正常发育, 促进排卵等作用。

核心靶标 PPI 网络拓扑分析显示(见表 2), NCOA2、PGR、NR3C2 等可能是归肾丸治疗多囊卵巢综合征的核心靶标。有研究^[30]发现多囊卵巢综合征大鼠子宫中 PGR 靶向基因异常表达与 NCOA2 表达失调重叠, NCOA2 是与子宫内膜出现孕酮抵抗现象相关基因。在对子宫孕酮信号通路调节作用的研究中, 二甲双胍可以调节多囊卵巢综合征大鼠 PGR 以及部分 PGR 靶基因的异常表达。有研究^[31]发现多囊卵巢综合征患者的 PGR 表达上调, 而二甲双胍可通过调节多种细胞因子的分泌以降低 PGR 的表达。NR3C2 产物盐皮质激素受体主要参与紧张焦虑情绪调控, 最新研究^[32]提示 NR3C2 可能在牛卵巢中发挥内分泌、旁分泌、自分泌作用。

KEGG 富集通路分析显示(见图 6), 归肾丸治疗 PD 的主要信号通路是 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路等。多囊卵巢综合征的主要临床表现包括高雄激素血症和胰岛素抵抗(IR)。有研究^[33]发现六味地黄丸可通过介导 PI3K/Akt 信号通路改善卵巢多囊及 IR 状态, 以恢复卵泡发育。多囊卵巢综合征的发病机理可能与炎症相关^[34]。IFN- γ 可对细菌进行免疫防御^[35], 而有研究^[36]发现脱氢表雄酮可通过激活 PI3K/Akt 信号通路恢复 IFN- γ 的表达以促进卵巢颗粒细胞的增殖。HIF-1 介导的内皮素信号在大鼠排卵中有重要作用^[37]。有研究^[38]发现 HIF-1 介导的内皮素信号通路可以调节哺乳动物多囊卵巢综合征形成, 是多囊卵巢综合征临床预防与治疗的重要靶标。TNF 信号通路是经典的炎症信号通路。有研究^[39]发现肥胖可以加重多囊卵巢综合征患者体内炎症状态, 其中 TNF- α 信号传导是主要途径之一。另有研究^[40]发现 TNF- α 与其受体结合可以诱导胰岛素受体底物 1 丝氨酸残基的磷酸化, 而这是 IR 主要的细胞内调节方式。

综上所述, 归肾丸的有效成分槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇等可能通过介导 PI3K-Akt、HIF-1、TNF

等信号通路发挥抗炎、改善胰岛素抵抗、促进卵泡发育、控制血糖稳态、调节脂质代谢、调节激素水平等药理作用来治疗多囊卵巢综合征。本研究通过分子对接证实归肾丸的有效成分与疾病靶标对接良好, 可为后续深入进行机制研究提供基础。

参考文献:

- [1] GOODARZI M O, DUMESIC D A, CHAZENBALK G, et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(4): 219-231.
- [2] LIZNEVA D, SUTURINA L, WALKER W, et al. Criteria, prevalence and phenotypes of polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(1): 6-15.
- [3] WILD R A, CARMINA E, DIAMANTI-KANDARAKIS E, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the androgen excess and polycystic ovary syndrome (AE-PCOS) society[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5): 2038-2049.
- [4] ROTTERDAM ESHRE/ASRM- SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(1): 19-25.
- [5] 赵少英, 许二平. 中医药防治多囊卵巢综合征的特色与优势[J]. *中医学报*, 2016, 31(6): 853-856.
- [6] 王轶蓉, 王秀云. 归肾丸治疗多囊卵巢综合征的临床经验总结[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(6): 1160-1163.
- [7] 柴海兰, 陈守龙, 高仁美, 等. 归肾丸为主治疗PCOS致排卵障碍性不孕症及对血清TGF- β 1、CTGF水平的影响[J]. *陕西中医*, 2017, 38(8): 1065-1067.
- [8] 柴海兰, 陈守龙, 高仁美, 等. 归肾丸配合穴位针刺治疗PCOS致排卵障碍性不孕症临床研究[J]. *陕西中医*, 2017, 38(11): 1542-1544.
- [9] 张军武. 归肾丸对大鼠卵巢早衰防治作用的实验研究[J]. *中国现代医药杂志*, 2008, 10(6): 79-80.
- [10] 陈景华, 候丽辉. 归肾丸对卵巢功能早衰大鼠FSH、 E_2 含量的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2007, 36(5): 48.
- [11] 史云, 张玉珍, 刘清飞. 加减归肾丸含药血清对卵巢颗粒细胞凋亡的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(1): 37-39.
- [12] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [13] YUAN K, ZHU Q, LU Q, et al. Quercetin alleviates rheumatoid arthritis by inhibiting neutrophil inflammatory activities[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 84: 108454.
- [14] WANG Y Y, CHANG C Y, LIN S Y, et al. Quercetin protects against cerebral ischemia/reperfusion and oxygen glucose deprivation/reoxygenation neurotoxicity[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 83: 108436.
- [15] EID H M, HADDAD P S. The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(4): 355-364.

- [16] ZENG H, GUO X, ZHOU F, et al. Quercetin alleviates ethanol-induced liver steatosis associated with improvement of lipophagy[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 125: 21–28.
- [17] NAM S Y, JEONG H J, KIM H M, Kaempferol impedes IL-32-induced monocyte-macrophage differentiation[J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 274: 107–115.
- [18] TORRES-VILLARREAL D, CAMACHO A, CASTRO H, et al. Anti-obesity effects of kaempferol by inhibiting adipogenesis and increasing lipolysis in 3T3-L1 cells[J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(1): 83–88.
- [19] MAHOBIYA A, SINGH T U, RUNGSUNG S, et al. Kaempferol induces vasorelaxation via endothelium-independent pathways in rat isolated pulmonary artery[J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(5): 863–874.
- [20] IMRAN M, SALEHI B, SHARIFI-RAD J, et al. Kaempferol: a key emphasis to its anticancer potential[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2277.
- [21] HIDAYATHULLA S, SHAHAT A A, AHAMAD S R, et al. GC/MS analysis and characterization of 2-Hexadecen-1-ol and beta sitosterol from schimpera arabica extract for its bioactive potential as antioxidant and antimicrobial[J]. *J Appl Microbiol*, 2018, 124(5): 1082–1091.
- [22] PONNULAKSHMI R, SHYAMALADEVI B, VIJAYALAKSHMI P, et al. In silico and in vivo analysis to identify the antidiabetic activity of beta sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29(4): 276–290.
- [23] TURCK D, CASTENMILLER J, DE HENAUW S, et al. A combination of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside and normal function of the immune system: evaluation of a health claim pursuant to article 13(5) of regulation(EC) No 1924/2006[J]. *EFSA J*, 2019, 17(7): e5776.
- [24] NEISY A, ZAL F, SEGHA TOLESLAM A, et al. Amelioration by quercetin of insulin resistance and uterine GLUT4 and ERalpha gene expression in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2019, 31(2): 315–323.
- [25] JAHAN S, ABID A, KHALID S, et al. Therapeutic potentials of quercetin in management of polycystic ovarian syndrome using letrozole induced rat model: a histological and a biochemical study [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 26.
- [26] RAFA L, DESSEIN A F, DEVISME L, et al. REG4 acts as a mitogenic, motility and pro-invasive factor for colon cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(3): 689–698.
- [27] SANTOS J, MONTE A, LINS T, et al. Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway[J]. *Theriogenology*, 2019, 136: 86–94.
- [28] 李慧蓉, 魏兆莲. 多囊卵巢综合征卵巢颗粒细胞凋亡研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2009, 28(5): 331–333, 340.
- [29] 曾莉萍, 徐贤柱, 饶华, 等. 杜仲叶 β -谷甾醇对成骨细胞和卵巢颗粒细胞的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(5): 1051–1053.
- [30] HU M, ZHANG Y, FENG J, et al. Uterine progesterone signaling is a target for metformin therapy in PCOS-like rats[J]. *J Endocrinol*, 2018, 237(2): 123–137.
- [31] XIONG F, XIAO J, BAI Y, et al. Metformin inhibits estradiol and progesterone-induced decidualization of endometrial stromal cells by regulating expression of progesterone receptor, cytokines and matrix metalloproteinases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1578–1585.
- [32] MUKANGWA M, TAKIZAWA K, AOKI Y, et al. Expression of genes encoding mineralocorticoid biosynthetic enzymes and the mineralocorticoid receptor, and levels of mineralocorticoids in the bovine follicle and corpus luteum[J]. *J Reprod Dev*, 2020, 66(1): 75–81.
- [33] QIU Z, DONG J, XUE C, et al. Liuwei Dihuang Pills alleviate the polycystic ovary syndrome with improved insulin sensitivity through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250(250): 11965.
- [34] LIMA P, NIVRT A L, WANG Q, et al. Polycystic ovary syndrome: possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages[J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(4): 838–852.
- [35] KUBOTA K, KADOYA Y. Innate IFN- γ -producing cells in the spleen of mice early after *Listeria monocytogenes* infection: importance of microenvironment of the cells involved in the production of innate IFN- γ [J]. *Front Immunol*, 2011, 2(2): 26.
- [36] LI Y, ZHENG Q, SUN D, et al. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7435–7447.
- [37] WANG Z, ZHANG Z, WU Y, et al. Effects of echinomyacin on endothelin-2 expression and ovulation in immature rats primed with gonadotropins[J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(10): 615–621.
- [38] WANG F, ZHANG Z, WANG Z, et al. Expression and clinical significance of the HIF-1 α /ET-2 signaling pathway during the development and treatment of polycystic ovary syndrome[J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(2): 173–181.
- [39] ORÓSTICA L, ASTORGA I, PLAZA-PARROCHIA F, et al. Proinflammatory environment and role of TNF- α in endometrial function of obese women having polycystic ovarian syndrome[J]. *Int J Obes(Lond)*, 2016, 40(11): 1715–1722.
- [40] YUAN M, KONSTANTOPOULOS N, LEE J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β [J]. *Science*, 2001, 293(5535): 1673–1677.

(编辑: 修春)