

• 方药研究 •

基于网络药理学探讨丹栀逍遥散治疗多囊卵巢综合征 的物质基础及作用机制 *

汪碧云¹, 伍庭凤², 李舒婷¹, 谢琳玲¹, 曾 蕾^{3△}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学附属中山中医院, 广东 中山 528400;
3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 通过网络药理学方法, 预测丹栀逍遥散各药物活性成分对多囊卵巢综合征的作用靶点, 探讨丹栀逍遥散(DZXYP)治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的潜在作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库筛选出丹栀逍遥散中各药物的主要活性成分, 并使用 PubChem 数据库和 SwissTarget Prediction 预测相关作用靶点。利用 GeneCards 挖掘已知的 PCOS 基因靶点。结合药物的预测靶点及疾病靶点导入 String 数据库构建药物—疾病靶点蛋白互作网络, 最后采用 DAVID 数据库和 Cytoscape 对关键节点进行生物功能及代谢通路分析。**结果** 丹栀逍遥散 8 味药共筛选出 142 个活性成分, 预测出 483 个相关靶点; 经过数据检索得到 PCOS 相关靶点 3 619 个, 与药物有 140 个交集。对核心靶点共富集出 286 个生物学过程(BP)、81 个分子功能(MF)和 34 个细胞成分(CC), 以及 83 条 KEGG 通路。**结论** 丹栀逍遥散可能是通过对多个靶点作用, 调控磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B(PI3K/Akt)、卵巢类固醇激素合成、胰岛素抵抗(IR)等多个信号通路, 改善 PCOS 的炎症状态、恢复胰岛素敏感性以及降低雄激素的合成起到治疗 PCOS 的作用, 为丹栀逍遥散的作用机制提供了新的阐释以及为进一步开展其药理研究提供新思路。

关键词: 网络药理学; 多囊卵巢综合征; 丹栀逍遥散; 作用机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2019)04-0069-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.04.012

Exploring the Effective Components and Mechanism of Danzhi Xiaoyao Powder in Treatment of PCOS Based on Network Pharmacology

WANG Biyun¹, WU Tingfeng², LI Shuting¹, XIE Linling¹, ZENG Lei³

(1. The First Clinical Medicine College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University
of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China;
3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: Objective To predict the potential target of Danzhi Xiaoyao Powder (DZXYP) treatment of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by the pharmacological method of network, so as to explore the pharmacokinetic mechanism of the DZXYP. **Methods** The main active components of DZXYP were screened by TCMSP database, and the relevant targets were predicted using PubChem database and SwissTarget Prediction. Gene Cards are used to mine known PCOS gene targets. Combined with the drug's predicted target and disease target, the String database was constructed to construct the drug-disease target protein interaction network. Finally, the DAVID database and Cytoscape were used to analyze the biological functions and metabolic pathways of key nodes. **Results** A total of 154 active components were screened by DZXYP, and 483 related targets were predicted. After data retrieval, 3 619 PCOS-related targets were obtained, and there were 140

收稿日期: 2019-07-18

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81804135)

第一作者简介: 汪碧云(1994-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治妇科疾病。

△通信作者: 曾蕾, E-mail: 407687448@qq.com

intersections with drugs. A total of 286 biological processes (BP), 81 molecular functions (MF), 34 cellular components(CC) and 83 KEGG pathways were enriched for key targets. **Conclusion** DZXYYP may act on multiple targets, regulate multiple signaling pathways such as phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), ovarian steroid hormone synthesis, insulin resistance (IR), improve the inflammatory state of PCOS, restored insulin Sensitivity and reduced the synthesis of androgen. Thereby playing a role in the treatment of PCOS. It provides a new interpretation of the mechanism of action of DZXYYP and provides new ideas for further research on its pharmacology.

KEY WORDS: network pharmacology; PCOS; Danzhi Xiaoyao Powder; mechanism

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄期女性中较常见的内分泌代谢紊乱性疾病, 根据不同的诊断标准, 约影响 9%~18% 的育龄期女性^[1-2]。其主要表现为月经失调、多毛、不孕等, 常合并胰岛素抵抗 (IR)。PCOS 发病机制目前尚不明确, 涉及到遗传、环境、精神心理因素等多个方面, 可能为多因素共同作用的结果。目前对于 PCOS 的治疗尚无特效药物, 多根据患者的具体情况个体化治疗, 包括调整月经周期、促进生育、调整代谢等。由于 PCOS 缺乏特异性西药治疗, 越来越多的学者关注中医药对 PCOS 的防治。

中医古籍没有关于 PCOS 病名的记载, 但根据其临床表现, 可归为“月经过少”“月经后期”“闭经”“崩漏”以及“不孕”等范畴。现代中医各医家对 PCOS 的治疗略有差异, 但其病机之本多责之于肾、肝、脾, 缘此三脏功能失常, 致冲任失调、痰壅胞宫、瘀血阻络而发为本病。丹栀逍遥散原方出自明代薛己的《内科摘要》, 其方根据《太平惠民和剂局方》中的逍遥散加减而来, 具有疏肝清热、养血健脾之功效, 主治肝郁血虚内热证。临床多用于 PCOS 肝经郁火证, 该证型的患者多有高雄激素的表现。动物实验证明该方能降低 PCOS 模型大鼠的抗米勒管激素 (AMH) 及雄激素 (T) 的水平, 并能改善 PCOS 的 IR 情况^[3-4]。但由于中药复方药物多且成分复杂, 其具体的作用机制尚不明。因此需要系统地研究药物、化合物、蛋白、基因及疾病的相互作用过程, 以进一步明确该方的药效物质基础及作用机制。本研究基于网络药理学的方法, 查找丹栀逍遥散的活性成分, 并预测其作用靶点, 通过建立药物—疾病靶点的网络图, 探索丹栀逍遥散治疗 PCOS 的作用机制, 为中药复方的机制论证提供新思路。

1 材料与方法

1.1 丹栀逍遥散活性成分筛查 丹栀逍遥散的主要方药组成包括牡丹皮、栀子、当归、白芍、柴胡、茯苓、白术、甘草等, 在中药系统药理学数据库与分析平台

TCMSP^[5] 检索上述各味中药, 得到相关活性化合物后, 以药物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 为条件进一步筛选。将最终得到的活性成分导入化学信息数据库 Pubchem^[6], 检索各个活性成分的规范 SMILES 结构和化学结构式。

1.2 丹栀逍遥散潜在靶点的预测 将各活性成分的结构导入到 Swiss Target Prediction^[7] 数据库, 限定物种为人, 预测其作用靶点, 根据相关性的高低选取潜在作用靶点。

1.3 PCOS 的相关靶点数据构建 疾病靶点的查询基于人类基因数据库 GeneCards^[8], 以“Polycystic Ovary Syndrome”为关键词搜索。获得相关靶点后, 为便于数据分析, 使用 Uniprot^[9] 将靶点的 Gene Symbol 转换成 Uniprot ID。转换完成后, 绘制药物—疾病靶点的 Venn 图 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), 得到药物作用的潜在靶点。

1.4 构建靶点—靶点相互作用 (PPI) 网络图 将丹栀逍遥散作用与 PCOS 的潜在靶点导入 String 数据库构建 PPI 网络, 对于无相互作用的靶点予以剔除, 将全节点关系信息导入到 Cytoscape 构建网络图, 使用 Network Analyzer 插件分析网络图, 以 Degree 值大小对各靶点进行排序, 取 Degree > 10 的核心靶点重新构建 PPI 图。

1.5 靶点的信号通路分析和生物信息富集分析 通过 DAVID 数据库对核心靶点进行生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 及细胞成分 (cellular component, CC) 的 GO 分析; 并利用 Cytoscape 里的 ClueGO 联合 CluePedia 插件进行 KEGG 分析。以此明确丹栀逍遥散治疗 PCOS 的相关生物信息及调控通路。

2 结果

2.1 丹栀逍遥散活性成分筛查 在 TCMSP 数据库检索丹栀逍遥散各味中药, 共获得 1 081 个活性成分, 根据 DL 及 OB 进一步筛选后, 最终得到 162 个活

性成分,其中牡丹皮 8 个,柴胡 16 个,栀子 15 个,白芍 12 个,白术 2 个,茯苓 15 个,甘草 92 个,当归 2 个。去除无化学结构式及未预测到靶点的活性成分,

以及删除重复项后,最终得到 142 个有效活性成分,构建药物及活性成分网络图,其中粉色的节点为药物共有的活性成分(如图 1 所示)。

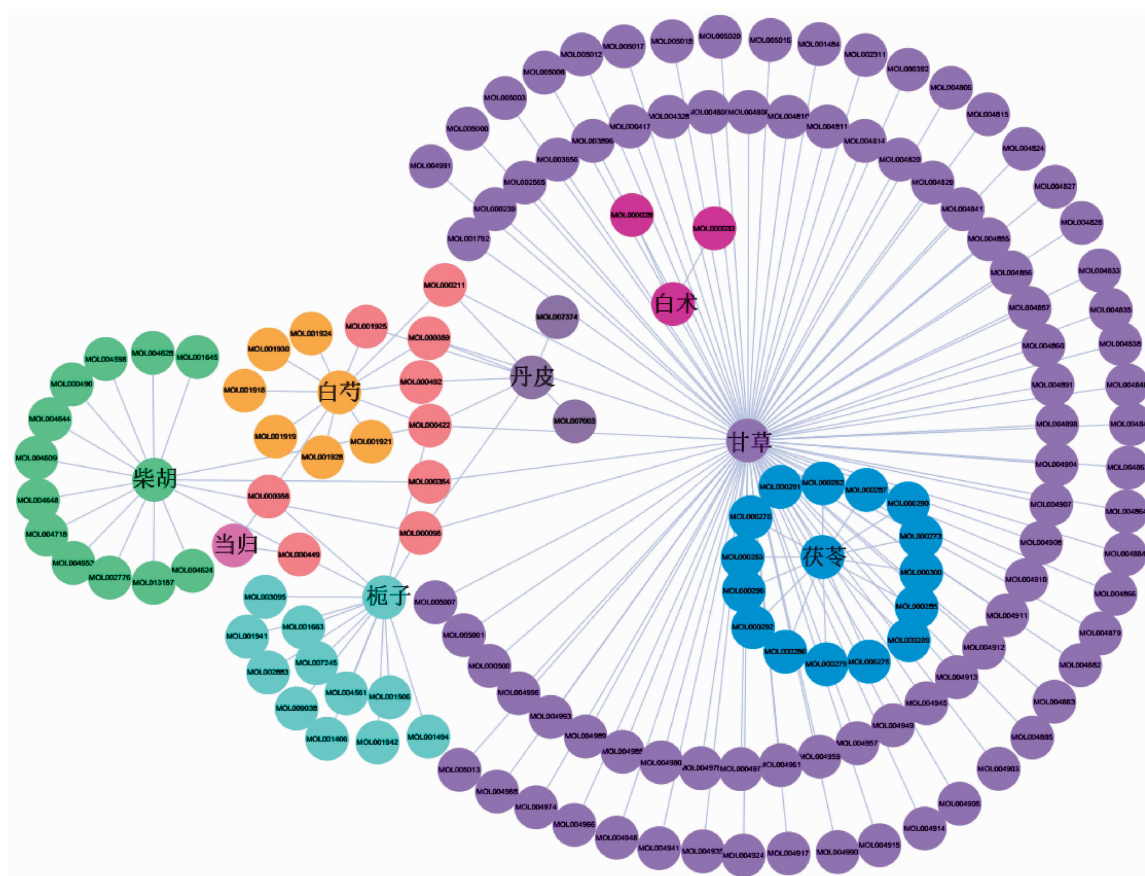


图 1 各个药物的活性成分网络图(粉色为共有的活性成分)

2.2 潜在靶点预测 对活性成分进行靶点预测后得到 483 个靶点。在 Gene Cards 数据库检索到 PCOS 相关靶点共 3 619 个。在 Uniprot 数据库中限定物种为人,由于客观未知原因,最终疾病靶点有 3 451 个成功转化 ID。用 Venn 图分析疾病与药物靶点,得到 140 个药物作用的潜在靶点。将潜在靶点导入 String 数据库构建 PPI 网络,将 PPI 网络中全节点关系导入到 Cytoscape,使用 Network Analyzer 对网络进一步分析,将 Degree ≤ 10 的节点剔除。对剩下的 84 个核心靶点进一步分析,得到网络图 2。

2.3 丹栀逍遥散作用于 PCOS 的核心靶点的网络分析 利用 DAVID 数据库对核心靶点进行 GO 分析,设置最小基因富集单位为 2,以 $P < 0.05$ 为有意义,最终得到 286 个 BP、81 个 MF 和 34 个 CC。利用 Cytoscape 对其进行 KEGG 富集,设置 Kappa score 为

0.4,最小富集单位为 3,筛选 $P < 0.05$ 的结果,最终得到 83 条通路,包括卵巢类固醇生成、磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、IR 信号通路、雌激素信号通路、子宫内膜癌等通路(图 3)。为进一步探索丹栀逍遥散治疗 PCOS 的相关通路作用机制,通过 KEGG 中的 KEGG Mapper,把核心靶点映射到相关通路中,最终得到多个通路图,图 4 为其中的一条卵巢类固醇激素生成通路图,绿色标识为丹栀逍遥散的核心靶点。

3 讨论

丹栀逍遥散为中医古籍的经典方剂,但和其他中医方剂一样,中药成分的复杂性导致其难以解释药物治疗疾病的具体作用机制。通过生物信息学构建药物和疾病的互作网络,整合药物作用的靶点,对药物的作用机制及开发有一定的指导意义。

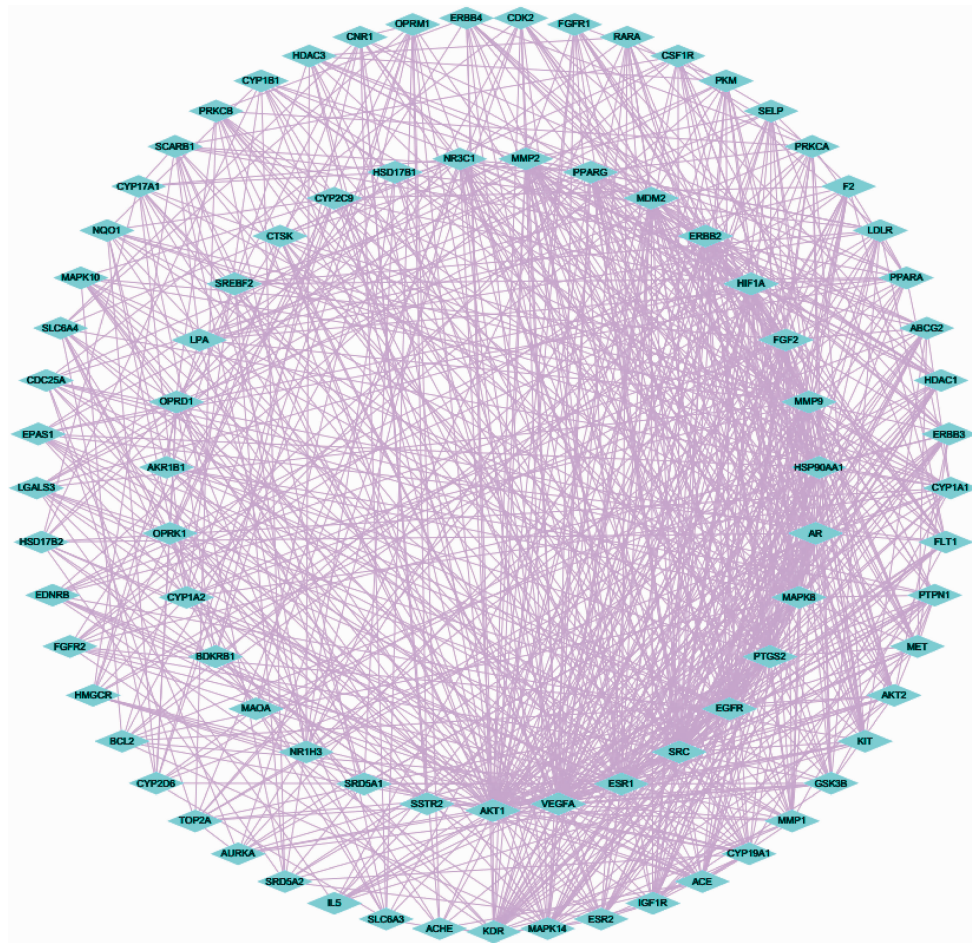


图 2 药物与疾病核心靶点交互作用的 PPI 网络



图 3 Cytoscape 中 ClueGO 对核心靶点富集出的 KEGG 通路图

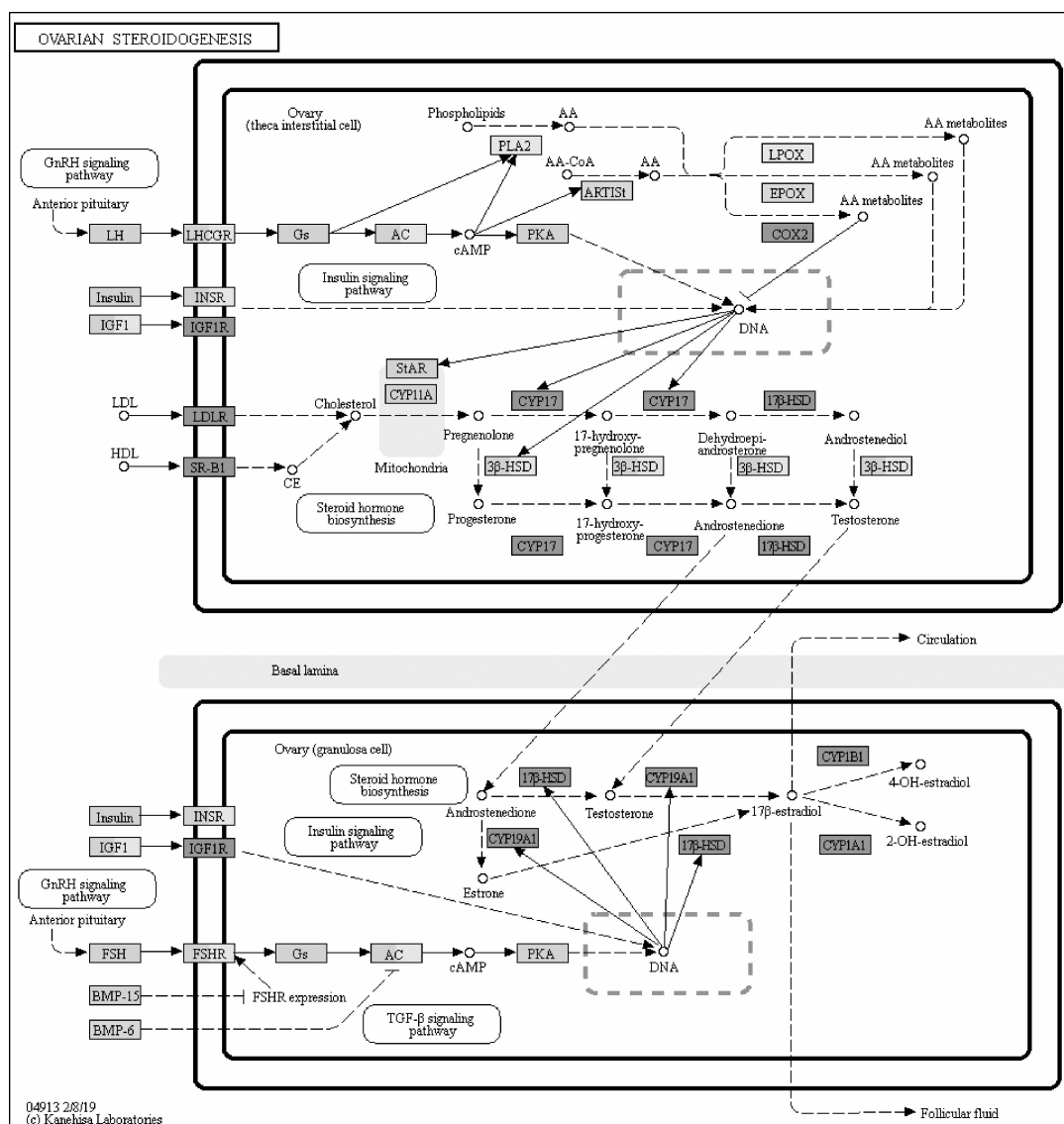


图4 卵巢类固醇激素生成通路图,绿色标识为本研究中的核心靶点

丹栀逍遥散作为治疗 PCOS 常用的方剂之一,对于 PCOS 以高雄激素血症为主要表现的患者有较好的治疗效果,本研究运用网络药理学的方法探索本方疗效的物质基础和分子机制。

3.1 化合物作用靶点 目前已经有关于本方中关键化合物对 PCOS 的作用机制研究。槲皮素(querceetin)是一种黄酮类化合物,为柴胡、栀子、牡丹皮及甘草的共有的化合物。已经证明槲皮素可以促进肝脏己糖激酶(HK)和葡萄糖激酶(GK)活性,并降低 PCOS 大鼠白介素 1β(IL-1β)、白介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的水平,改善大鼠的胰岛素抵抗(IR)状态^[10-11]。它还可以增加 PCOS 模型大鼠子宫的雌激素受体 α(ERα)和葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)基因的表

达^[11],这可能是 PCOS 合并不孕的新的治疗方向。同样在人体也已经证明口服槲皮素可以通过上调脂联素受体和激活 AMP 激活蛋白激酶(AMPK)改善患者的 IR 状态^[12-13]。

芍药苷(paeoniflorin)可以抑制大鼠卵巢睾酮的合成,并对刺激大鼠卵巢芳香酶活性以促进雌二醇合成^[14],还能促进脂肪细胞腺苷的释放,激活腺苷 A1 受体,增加葡萄糖的摄取^[15]。

黄芩苷(baicalin)可以通过抑制 PCOS 模型大鼠的卵巢 HSD3B2 基因表达,降低雄激素的生成^[16],还能上调葡萄糖转运蛋白 2 (GLUT2) 和 GLUT4 的表达,刺激肝细胞对细胞外葡萄糖浓度的瞬时响应和长期响应,对葡萄糖转运进行精细调控,从而改善肝 IR

状态^[17]。

茯苓酸 (pachymic acid) 可以调节 IL-6、TNF- α 抑制 PCOS 的炎症状态,减少氧化应激,改善 IR,减少卵巢颗粒细胞的凋亡,促进卵泡发育^[18]。藏红花酸 (crocetin) 作为一种天然类胡萝卜素,能改善肥胖诱导的 IR^[19],还可以调节 PCOS 小鼠的动情周期,恢复其紊乱的激素水平,从而促进排卵^[20]。

以上各类化合物以及其他山柰 (kaempferol)、柚皮素 (naringenin) 等均能通过不同的途径改善 PCOS 的高雄激素血症/IR/低度炎症情况,体现了丹栀逍遥散治疗 PCOS 多成分、多靶点的特点。

3.2 核心靶点的富集分析 对核心靶点的 GO 富集分析提示丹栀逍遥散作用于 PCOS 可能与甾体激素合成、细胞增殖、氧化还原等多个 BP 过程有关。MF 层分析其涉及到酪氨酸激酶、类固醇激素、ATP 等;CC 层面分析提示其涉及到细胞膜、内质网膜、细胞质、受体复合物及膜筏等多细胞成分。

在对核心靶点的 KEGG 富集分析中,进一步体现了丹栀逍遥散通过多个通路对 PCOS 产生作用,包括氧化应激、激素合成、代谢等多个方面,涉及到 PI3K/Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、甾体激素合成及胰岛素等多个信号通路。

IR 作为 PCOS 病机的关键之一,不仅存在于 PCOS 患者的外周组织中,同时也表达于卵巢及子宫内膜局部,降低患者的受孕机率并增加流产风险。胰岛素信号传导通路主要有 2 条,一条为 PI3K/Akt 途径。当胰岛素与胰岛素受体结合,促进胰岛素受体底物 (IRS) 磷酸化,进而激活 PI3K,生成第二信使 PIP3,激活下游的 Akt,调节糖代谢。PCOS 患者的胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 介导的 PI3K 活性下降以及葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 减少,造成 IR 状态^[21]。同时,PCOS-IR 患者的胰岛素可能通过 PI3K/Akt 通路促进子宫内膜的异常增生^[22]。另一条为丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (MAPK/ERK) 促有丝分裂通路。当 PCOS-IR 时,2 条信号通路失衡,MAPK/ERK 活化,导致 PI3K/Akt 信号通路缺陷,可以进一步促进 IR 形成^[23]。

目前的研究已经证实 PCOS 患者存在代谢性炎症状态,且其代谢性炎症可进一步促进患者的代谢紊乱。而 PI3K/Akt 通路不仅与 PCOS 的胰岛素代谢有

关,还与 PCOS 患者的炎症及氧化应激状态相关,Zhao 等人^[24]利用特异性抑制剂探索 NF- κ B、Akt、JNK、Erk1/2 等通路,发现 WNT5a 主要依赖于 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路诱导 PCOS 患者的炎症及氧化应激。

高雄激素血症表现的痤疮、脱发、油脂分泌旺盛等中医多辨证为肝郁化火,治以丹栀逍遥散多有疗效。已用实验证明丹栀逍遥散能降低 PCOS 瘦素水平,抑制 AMH 分泌等,从而改善高雄激素血症^[3,25]。另外根据关键靶点的 KEGG 通路图所知 (如图 4 所示),丹栀逍遥散降雄的机理可能与 CYP17、CYP19A1、CYP11B1、17 β -HSD 等有关。CYP17 主要调节 17 α -羟化酶和 17,20-裂解酶活性,为雄激素合成的关键酶。PCOS 患者的 17 α -羟化酶活性增加而 17,20-裂解酶活性下降,致使两者活性失调而引起雄激素合成增加^[26]。CYP17 可能为丹栀逍遥散作用的重要靶点之一,具体需待进一步实验认证。

综上所述,网络药理学结果提示丹栀逍遥散在治疗 PCOS 上共涉及到 142 个活性成分、84 个核心靶点,其作用机制包括甾体激素合成、氧化还原等,涉及到卵巢类固醇生成、PI3K/Akt、IR 等多个信号通路,体现了中药治疗疾病的多中心、多靶点、多途径的作用特点。本研究涉及到的部分靶点及分子机制已被相关研究证实,另有一部分挖掘出的靶点及相关通路可作为下一步研究的理论基础,为丹栀逍遥散的作用机制的进一步研究提供方向。

参考文献:

- [1] MARCH W A, MOORE V M, WILLSON K J, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria [J]. Human Reproduction, 2010, 25(2): 544-551.
- [2] YILDIZ B O, BOZDAG G, YAPICI Z, et al. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria [J]. Human Reproduction, 2012, 27(10): 3067-3073.
- [3] 侯丽莹,邓丽玲,罗佩,等. 丹栀逍遥散对多囊卵巢大鼠血清 T、AMH 及卵巢局部 AMH 蛋白表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(2): 141-144.
- [4] 刘颖,邢福祺,张丽华,等. 丹栀逍遥散调控多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的作用机制 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(17): 2842-2844.

- [5] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2014, 6(1): 1–6.
- [6] KIM S, CHEN J, CHENG T, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D1102–D1109.
- [7] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. Swiss TargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W357–W364.
- [8] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1–30.
- [9] T C U. UniProt: the universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D158–D169.
- [10] WANG Z, ZHAI D, ZHANG D, et al. Quercetin decreases insulin resistance in a polycystic ovary syndrome rat model by improving inflammatory microenvironment [J]. *Reproductive Sciences*, 2017, 24(5): 682–690.
- [11] NEISY A, ZAL F, SEGHA TOLESLAM A, et al. Amelioration by quercetin of insulin resistance and uterine GLUT4 and ER α gene expression in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019, 31(2): 315.
- [12] REZVAN N, MOINI A, GORGANI-FIRUZJAEI S, et al. Oral quercetin supplementation enhances adiponectin receptor transcript expression in polycystic ovary syndrome patients: a randomized placebo-controlled double-blind clinical trial [J]. *Cell J*, 2018, 19(4): 627–633.
- [13] REZVAN N, MOINI A, JANANI L, et al. Effects of quercetin on adiponectin-mediated insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized placebo-controlled double-blind clinical trial [J]. *Hormone and metabolic research*, 2017, 49(2): 115.
- [14] TAKEUCHI T, NISHII O, OKAMURA T, et al. Effect of paeoniflorin, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on ovarian androgen production [J]. *Am J Chin Med*, 1991, 19(1): 73–78.
- [15] TANG L M, LIU I M, CHENG J T. Stimulatory effect of paeoniflorin on adenosine release to increase the glucose uptake into white adipocytes of wistar rat [J]. *Planta Medica*, 2003, 69(4): 332–336.
- [16] YU J, LIU Y, ZHANG D, et al. Baicalin inhibits recruitment of GATA1 to the HSD3B2 promoter and reverses hyperandrogenism of PCOS [J]. *J Endocrinol*, 2019, 240(3): 497–507.
- [17] 涂珺, 朱水兰, 周小妹. 黄芩苷、小檗碱和葛根素体外胰岛素抵抗细胞差异化降糖作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(20): 4097–4103.
- [18] 符贤佩. 茯苓酸改善 PCOS 小鼠卵母细胞损伤的作用研究[D]. 厦门大学, 2018.
- [19] SHENG L, QIAN Z, SHI Y, et al. Crocetin improves the insulin resistance induced by high-fat diet in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(5): 1016–1024.
- [20] HU Q, JIN J, ZHOU H, et al. Crocetin attenuates DHT-induced polycystic ovary syndrome in mice via revising kisspeptin neurons [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 107: 1363–1369.
- [21] FORNES R, ORMAZABAL P, ROSAS C, et al. Changes in the expression of insulin signaling pathway molecules in endometria from polycystic ovary syndrome women with or without hyperinsulinemia [J]. *Mol Med*, 2010, 16(3–4): 129–136.
- [22] 马欣, 王蕊. 胰岛素通过 PI3K/AKT/GSK3 通路促多囊卵巢综合征患者子宫内膜病变机制的研究 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22(4): 330–334.
- [23] CORBOULD A, KIM Y B, YOUNGREN J F, et al. Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(5): E1047–E1054.
- [24] ZHAO Y, ZHANG C, HUANG Y, et al. Up-regulated expression of WNT5a increases inflammation and oxidative stress via PI3K/AKT/NF- κ B signaling in the granulosa cells of PCOS patients [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 100(1): 201–211.
- [25] 邓丽玲, 罗佩, 侯丽莹, 等. 丹栀逍遥散对多囊卵巢大鼠高雄激素血症雄激素、瘦素及其受体表达的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(4): 353–356.
- [26] NESTLER J E, JAKUBOWICZ D J. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 α activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome [J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(9): 617–623.