



原创论文

基于文献挖掘和网络药理学探讨中药治疗卵巢早衰的作用机制

吴宏进¹, 李深广², 戴薇薇¹, 张婕¹, 王利波¹, 王成龙¹¹上海中医药大学附属龙华医院²上海市闵行区中西医结合医院

摘要: 卵巢早衰 (premature ovarian failure, POE) 病因复杂, 治疗难度较大, 现代研究显示中医药可以提高卵巢对促性腺激素的反应性和性激素受体含量, 改善卵巢功能。本项目组结合文献挖掘和网络药理学分析, 探索中医药治疗卵巢早衰的规律和潜在作用机制。从中国知网 (China National Knowledge Infrastructure, CNKI) 等数据库分别筛选近 30 年收录的相关临床研究文献, 使用 NCINET 6.0 软件建立中药社群网络并进行中心性分析; 利用中药系统药理学分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 等数据库获取核心中药的关键成分和对应靶点; 检索 OMIM 等基因数据库提取卵巢早衰疾病靶点, 将核心药物靶点与卵巢早衰靶点取交集, 构建活性成分-靶点网络和靶点蛋白-蛋白相互作用网络 (protein-protein, PPI network); 对交集基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集分析, 并对核心药物活性成分和靶点基因进行分子对接。共获得中药复方 135 个, 中药 64 味; 中心性较高的核心药物为 “仙茅-淫羊藿-当归-熟地”; 4 味中药的有效化学成分有 81 个, 核心药物组合与卵巢早衰的交集靶点 259 个, PPI 网络主要涉及 AKT1、JUN、IL6、EGFR、MAPK1、RELA 等关键靶蛋白, GO 功能富集分析, 得到生物过程条目 2,139 个 ($p < 0.05$), KEGG 富集得到 181 条通路 ($p < 0.05$), 主要涉及糖基化终末产物 (AGE)/糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、化学致癌-受体激活通路、肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor, TNF) 介导的信号通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路等。分子对接结果显示四味中药主要成分与治疗卵巢早衰的关键靶点结合活性较高且对接构象较稳定。中药中的关键活性成分阿魏酸等可通过调控 AKT1、JUN、IL6 等关键靶点, 借助 AGE-RAGE 信号通路、化学致癌-受体激活通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路等等发挥抗卵巢早衰的作用。

关键词: 网络药理学; 卵巢早衰; 生物信息学; 中药; 活性成分**通讯作者:** 吴宏进: tongbaiwu@163.com

Received: 9 September 2024

Revised: 6 December 2024

Accepted: 9 December 2024

前言

卵巢早衰 (POE) 是一种常见的妇科疾病, 也是 40 岁以下女性不孕的主要原因,^[1,2] 严重者可导致患者骨质疏松及心血管疾病发病率增加。^[3] POE 的发病机制是一个复杂的多因素过程, 研究

表明遗传、^[4] 自身免疫、^[5] 医源性因素^[6] 和环境压力等多种因素与卵巢结构和功能失调有关, 化疗和放疗已逐渐成为导致卵巢功能衰竭的主要原因。^[7,8]

激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT) 是西方医学最常用的治疗卵巢早衰的方法, 同时还有超促排卵、卵巢冷冻移植、免疫调节等, 虽然可以改善患者临床症状, 但存在多种不良反应的制约,^[9] 因此医学上针对卵巢早衰的治疗仍未找到确切方法。基于此, 医学界逐渐把研究方向转投入中医药的治疗上, 运用纯中药或以中药为主导、配合 HRT 治疗卵巢早衰, 取得了比较显著疗效。^[10,11] 中医认为本病与脏腑气血阴阳失和有关, 其本在肾, 虚者多脾肾两虚, 实者多肝郁血瘀, 久则耗气伤血, 阴阳俱损。^[12] 有关卵巢早衰的临床研究日渐增多, 1989 到 2003 年间有关此疾病的中医药临床研究 15 篇文献, 随后此类研究日渐增多, 近 5 年来更大幅提升到平均每年 30 篇, 近年来进行卵巢早衰临床研究的医家大增, 各医家有不同的治疗思路及用药方法, 因此系统整理及分析卵巢早衰的临床用药规律更能提高治疗效果。

网络药理学是人工智能和大数据时代药物系统性研究的新兴、交叉、前沿学科, 强调从系统层次和生物网络的整体角度出发, 解析药物和中药活性化合物发现、整体作用机制阐释、药物组合和方剂配伍规律等,^[13] 可建立药物复合物-基因-疾病网络, 深入揭示药物的作用机制及调控原理, 挖掘中药作用机制。^[14] 近年来, 网络药理学被广泛应用于许多中草药及方剂的研究中以预测其中成分的药效机制。本研究以卵巢早衰临床研究的文献为切入点, 对近年来卵巢早衰的临床研究用药进行总结分析, 提炼出治疗的核心中药, 然后基于网络药理学研究方法, 从系统生物学角度分析核心中药作用的分子机制及靶点, 探讨中药效活性成分调控卵巢早衰作用靶点及作用通路, 并对核心药物活性成分和靶点基因进行分子对接, 验证核心成分和靶点蛋白的亲合性, 为中药治疗卵巢早衰疾病的进一步研究提供实验基础和临床参考。技术路线图见图 1。

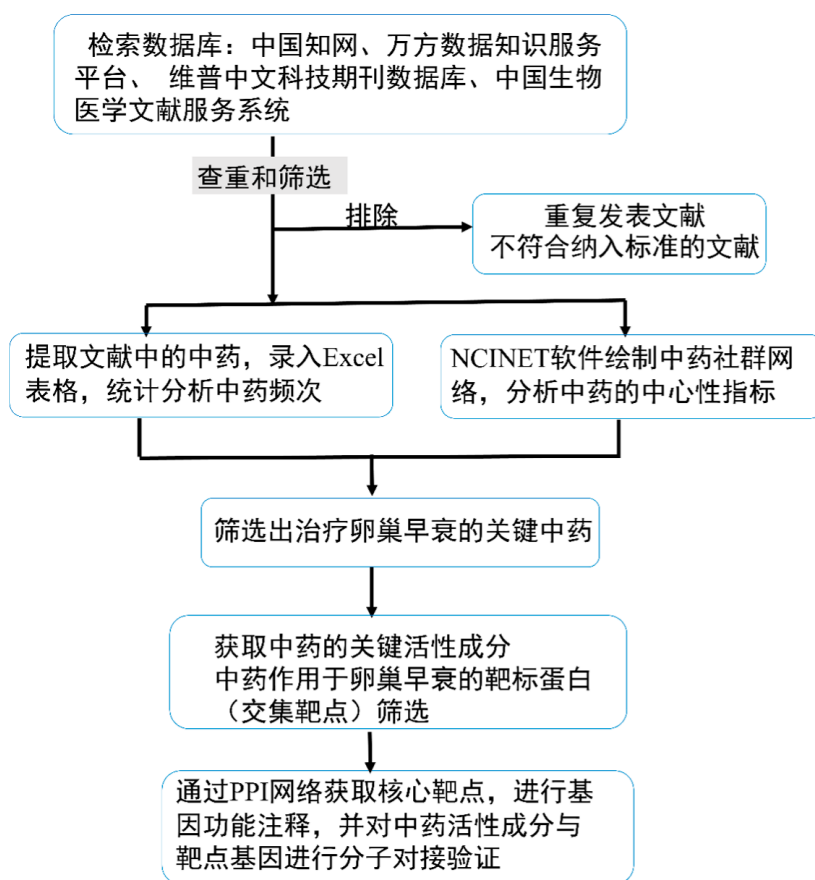


图 1 技术路线图

资料与方法

1. 数据来源

选择中国知网 (CNKI) 和万方数据知识服务平台 (Wanfang Data Knowledge Service Platform)、维普中文科技期刊数据库 (China Science and Technology Journal Database)、中国生物医学文献服务系统 (SinoMed) 等数据库, 以“中药”、“卵巢早衰”为检索词, 对数据库收录的中医药治疗卵巢早衰的临床研究文献进行搜索查询, 时间范围是 1989 年 1 月-2023 年 4 月。

2. 文献筛选

纳入标准: ① 文献为与中药复方抗卵巢早衰相关临床研究 (不区分是否为随机对照试验); ② 文献中的中药复方包含完整药物组成; ③ 须符合《早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识》^[15]《早发性卵巢功能不全中西医结合诊疗指南》^[16]

排除标准:^[17] ① 内容相似文献; ② 细胞、动物等基础研究; ③ 综述、理论研究类文献; ④ 无具体药物组成的文献研究。

3. 文献数据提取和分析

参考《中华人民共和国药典》(2015 年版)^[18] 规范中药名称。提取中药并将数据录入 Excel 表格中。使用 SPSS Statistics 20.0 对复方中的中药进行频次统计分析; 并建立中药矩阵表, 采用 NCINET 6.0 软件, 绘制社群网络图, 采用中心性指标对网络进行拓扑分析,^[19] 筛选出中心性指标皆大于各自均值的中药, 结合中药频次分析结果, 获得仙茅、淫羊藿、当归、熟地为治疗卵巢早衰的关键药物, 并进行进一步网络药理分析。^[20]

4. 中药活性成分收集及靶标蛋白的筛选

借助中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)、中医药分子机制生物信息学数据库 (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)、中药系统药理学分析平台 (TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid>), 获取“仙茅、淫羊藿、当归、熟地”四味中药的活性成分和靶点基因, 按口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 而且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.10 为有效活性

成分的筛选标准; 并将靶点信息输入 UniProt 蛋白质数据库平台 (<http://www.uniprot.org/>), 获得相应化学成分对应的规范化人源蛋白质靶点信息。

5. 关键靶点的提取及“活性成分-靶点”网络的构建

选取 OMIM (<http://www.omim.org/>)、Gene cards (<http://www.genecards.org/>) 和 TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>) 数据库, 以“premature ovarian failure”为关键词进行检索, 将获取的卵巢早衰有关的靶点与药物靶点取交集绘制韦恩图, 将筛选出的关键基因靶点数据集、药物活性成分列表等输入到 Cytoscape 3.7.2 软件中, 构建“活性成分-靶点”关系网络, 分析化合物和基因靶点的度 (degree) 值。

6. 蛋白质相互作用网络 (PPI) 的构建及其核心基因的筛选

将 5 中获得的药物活性成分调控卵巢早衰的关键基因靶点, 提交至在线网站 STRING 网站 (<https://string-db.org/>), 取最小相互作用阈值为 (medium confidence 大于 0.70), 构建 PPI 网络, 将所获取的信息以 TSV 形式导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 绘制网络图, 依据度值的高低排序获得蛋白互作网络的核心基因。

7. 关键靶点的 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

利用 R 4.0.2 软件, 以 $p < 0.05$ 为标准, 对中药活性成分调控卵巢早衰关键靶点数据进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。

8. “药效成分-靶点”分子对接分析

由 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载中药治疗卵巢早衰“活性成分-靶点”网络中 Degree 值排名前 5 的活性成分的 SDF 格式结构文件, 使用 OpenBabel 软件将 SDF 文件转换为“PDB”格式文件。由 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 下载中药治疗卵巢早衰靶点 PPI 网络 degree 值排名前 5 的靶点, 以“PDB”格式保存。使用 AutoDock Tools 软件确定小分子配体可扭转键,

并对蛋白受体进行去水加氢等处理, 将小分子配体和蛋白受体均转存为“PDBQT”格式文件, 使用 Gird 模块设置对接盒子并调整参数, 运行 AutoDock Vina 软件将小分子配体和蛋白受体进行分子对接, 并分析得到的对接结果。使用 PyMol 软件对部分分子对接结果进行可视化。

结果

1. 复方筛选和中药频次分布情况

通过筛选得到符合要求的复方有 135 个, 中药复方主要以补肾为主, 兼疏肝、柔肝、健脾、活血, 获得 64 味中药, 出现频次在 50 次以上的中药有熟地 112 次、当归 111 次、菟丝子 98 次、淫羊藿 69 次、仙茅 67 次、山药 67 次、枸杞子 66 次、山茱萸 58 次、白芍 54 次。

2. 社群网络中心性分析

将生成的中药分布矩阵表导入 UCINET 6.0 软件, 利用 NetDraw 工具绘制中药社群网络图, 该网络有 64 个节点, 2,952 条边, 对网络中各个节点进行中心性分析; 中心性一般用于衡量一个节点的重要性, 中心性越高, 该节点在网络中充当的角色就越重要,^[21] 中心性分析的指标包括点度中心度 (degree)、中间中心度 (betweenness)、接近中心度 (closeness)、特征向量中心性 (eigenvector)。网络中点度中心度、特征向量中心性和中间中心度排名前 10 的中药, 如表 1 所示。其中熟地、当归、淫羊藿和仙茅的点度中心度和特征向量中心性均大于各自均值, 选择这 4 味中药作为核心中药进行进一步网络药理学分析。

表 1 中心性分析排名前十位的治疗卵巢早衰的中药

中药	点度中心度 (degree)	中间中心度 (betweenness)	接近中心度 (closeness)	特征向量中心性 (eigenvector)
熟地	62	33.081	194	0.151
当归	61	20.905	195	0.152
淫羊藿	61	20.905	195	0.152
仙茅	61	20.905	195	0.152
菟丝子	60	26.030	196	0.149
山药	60	19.138	196	0.150
枸杞子	59	19.916	197	0.148
山茱萸	59	22.994	197	0.147
巴戟天	59	17.377	197	0.149
川牛膝	59	19.919	197	0.148

3. 中药活性成分-作用靶点筛选及相互作用网络构建

获得 5,106 个与卵巢早衰相关的基因靶点。将经 UniProt 标准化的药物成分基因靶点与卵巢早衰基因靶点进行分析, 绘制韦恩图 (图 2 A), 获得中药活性成分作用卵巢早衰的可能基因靶点共 259 个; 将这些靶点输入到 Cytoscape 3.7.2 软件中生成药物活性成分-靶基因可视化网络图 (图 2 B), 共包括 340 个节点 (81 个

化合物节点、259 个靶点节点) 和 714 条边。度值排名前 5 位的活性成分分别是槲皮素 (quercetin) (来源于淫羊藿), β -谷甾醇 (beta-sitosterol) (来源于仙茅、当归), 豆甾醇 (stigmasterol) (来源于仙茅、当归、熟地), 阿魏酸 (FER) (来源于当归、熟地), 棕榈酸 (palmitic acid) (来源于当归); 度值排名前 5 位的基因靶点分别是 PTGS2, PTGS1, ADRB2, SLC6A2, CHRM2 (图 2 C)。

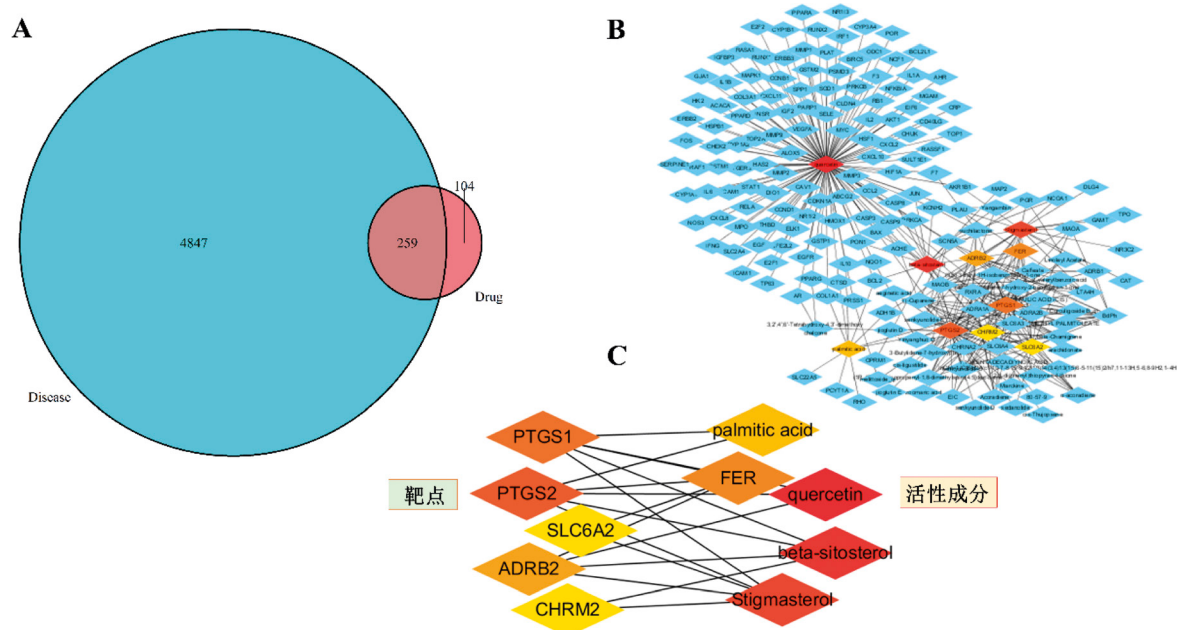


图 2 Drug (仙茅、淫羊藿、当归、熟地) - Disease (卵巢早衰) - 靶基因韦恩图及网络图

(A) 蓝色-卵巢早衰; 红色-中药; (B) 药物活性成分-靶点网络图; (C) 度值排名前 5 位的活性成分和靶点

4. 靶点蛋白互作网络 (PPI)

将获得的 259 个交集靶基因提交至 String 数据库, 并将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件生成 PPI 网络; 度值 (degree) 越高, 邻接节点

数目越多, 成为核心基因的概率越大, degree 值排名前 10 位的基因中, AKT1、JUN、MAPK1、IL6、EGFR 的连接度和度值较高, 为 PPI 网络的核心基因 (图 3)。

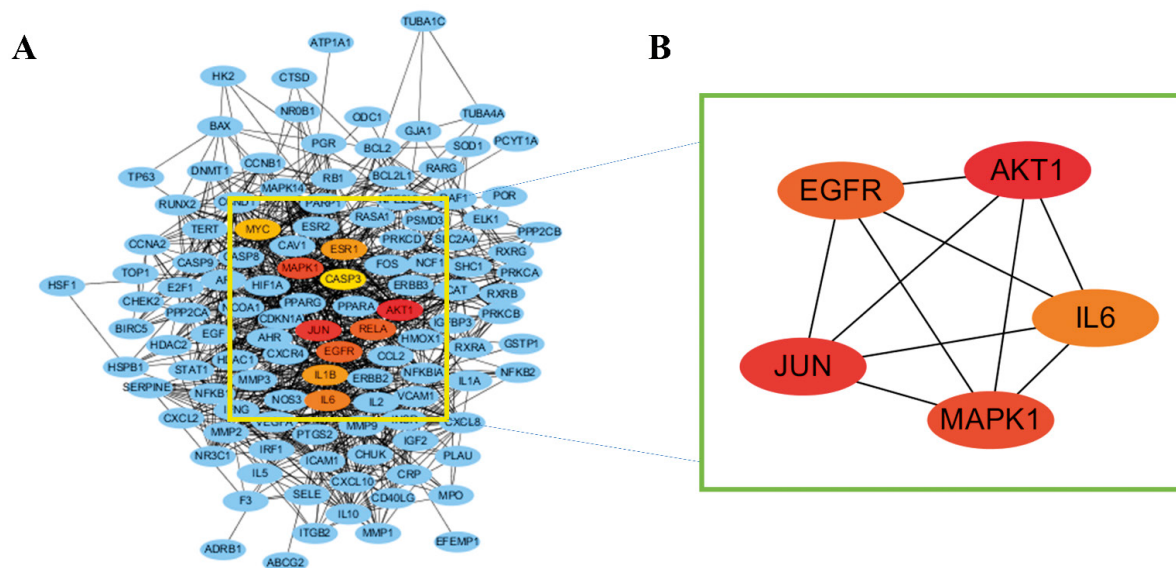


图 3 蛋白质-蛋白质互作 PPI 网络和靶点基因筛选

5. 活性成分作用于卵巢早衰靶点的基因功能注释

应用 R4.0.2 软件将获得的交集靶基因, 进行 GO 生物学功能富集分析 ($p < 0.01$), GO 富集分析包括 2,139 条生物过程 (biological process, BP), 主要涉及趋化和调控反应 (response to xenobiotic stimulus), 对脂多糖的反应 (response to lipopolysaccharide), 与细菌来源分子的反应 (response to molecule of bacterial origin), 对营养水平的反应 (response to nutrient levels) 等 (图 4 A)。

获得 165 条 KEGG 相关通路, 根据 P 值由小大到排名前 20 的 KEGG 通路富集结果 (图 4 B), KEGG 网络中 degree 值排名前 10 的信号通路 (图 4 C), 中药活性成分主要作用于化学致癌性受体激活 (chemical carcinogenesis-receptor activation)、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis), AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications), TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、IL-17 信号通 (IL-17 signaling pathway) 等。其中 hsa 05207、hsa 05417 通路是富集基因数目最多的通路 (图 4 D, E)。

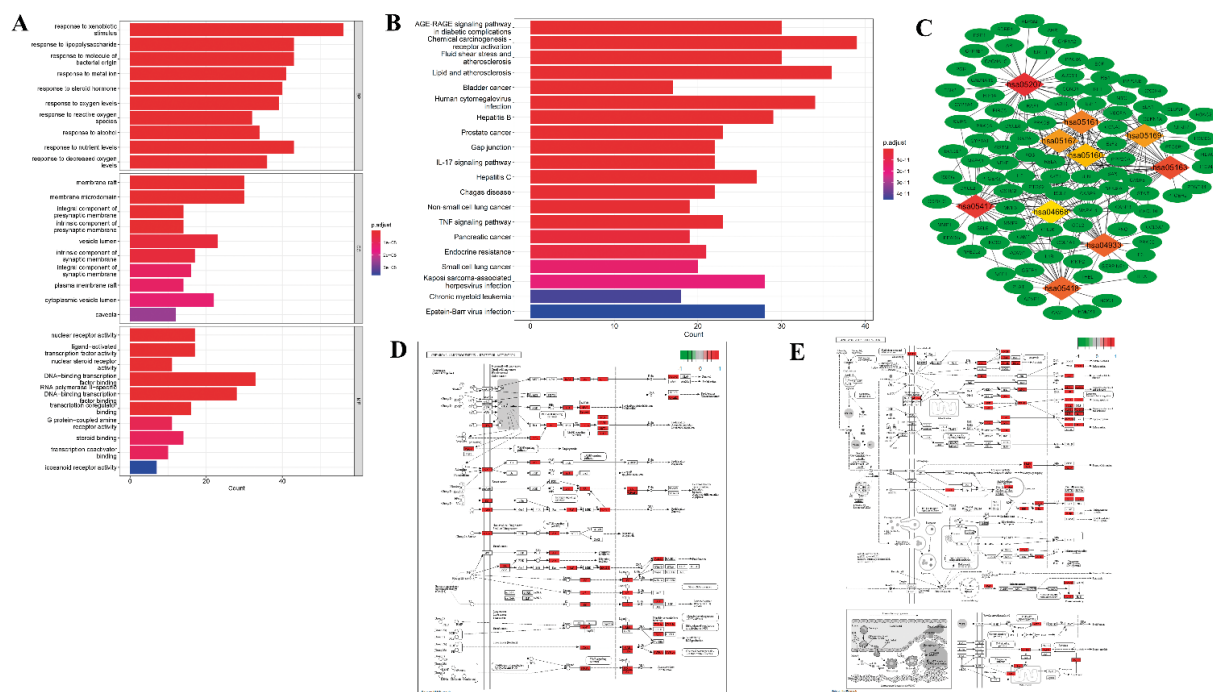


图 4 靶点生物学功能及通路信息、调控网络及代表性信号通路图

(A) GO 功能富集分析柱形图; (B) KEGG 通路富集分析柱形图; (C) KEGG 富集通路-靶点基因调控网络图;

(D) hsa 05207 (chemical carcinogenesis-receptor activation 信号通路图);

(E) hsa 05417 (lipid and atherosclerosis 信号通路图)

6. 中药活性成分与靶点基因分子对接验证

为验证中药对卵巢早衰疾病的调控作用, 将部分核心靶点与其对应的成分进行分子对接, 4 个核心药效分子与 5 个核心靶点基因蛋白的分子对接结合能见表 2。计算核心化合物和核心靶点之间的结合能以预测它们的亲和力, 结合能低于 0 表明 2 个分子能够自发结合, 结合能负值越高提示构象越稳定, 由表 2 可以看出,

各组结合能均 < -5 kcal/mol, 提示具有良好的结合活性。四味中药的核心药效成分与卵巢早衰的核心靶点基因之间的关联性很强, 这些药效成分与靶点基因可能是四味中药治疗卵巢早衰的主要作用靶点。对每个核心靶点蛋白结合能最低的分子对接结果进行分析, 见图 4。氢键是促进配体和活性位点相结合的主要作用力,^[22] 选择氢键数 ≥ 3 的结合构象的相互作用进行

可视化展示（图 5），阿魏酸与编码蛋白 IL-6（PDB id: 1ALU）的活性位点 ARG104、GLU106、THR163 形成氢键；阿魏酸与编码蛋白 AKT1（PDB id: 7NH5）的活性位点 ARG15、LYS20、

THR87 形成氢键；槲皮素与编码蛋白 MAPK1（PDB id: 6SLG）的活性位点 ARG24、ARG91、GLN355 形成氢键。

表 2 关键靶点与活性成分分子对接结合能

药效成分	活性成分与靶点基因结合能 (kcal.mol ⁻¹)				
	AKT1 (PDB id: 7NH5)	IL-6 (PDB id: 1ALU)	JUN (PDB id: 4Y46)	EGFR (PDB id: 5UG9)	MAPK1 (PDB id: 6SLG)
阿魏酸	-7.01	-5.68	-5.56	-5.07	-5.17
槲皮素	-5.44	-6.84	-5.35	-6.17	-5.70
β-谷甾醇	-9.29	-10.54	-7.47	-12.10	-9.60
豆甾醇	-9.97	-9.74	-8.97	-12.21	-9.68

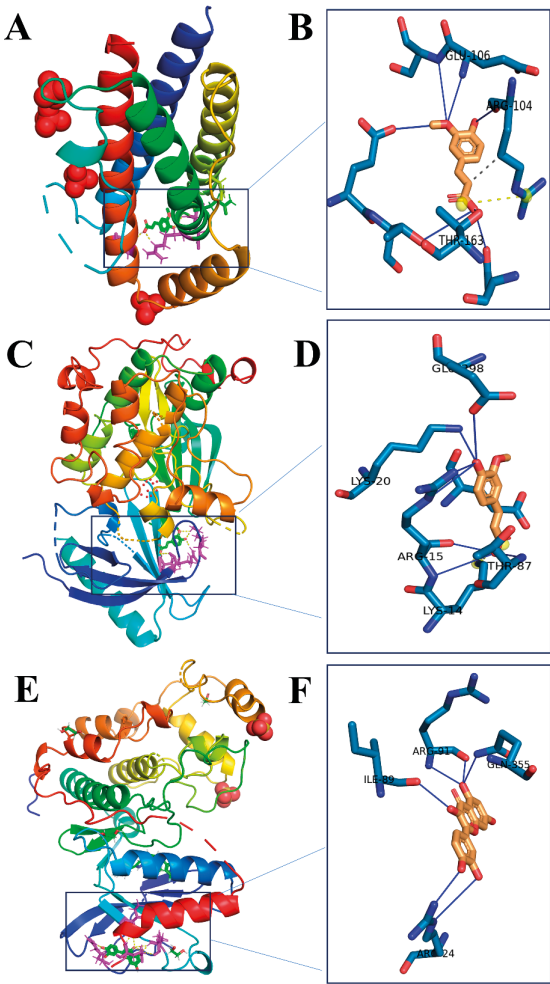


图 5 活性成分与靶点基因分子对接示意图

（A,B）阿魏酸与 IL-6（PDB id: 1ALU）分子对接结果；（C,D）阿魏酸与 AKT1（PDB id: 7NH5）分子对接结果；
（E,F）槲皮素与 MAPK1（PDB id: 6SLG）分子对接结果

讨论

卵巢早衰可导致女性雌激素分泌降低及促性腺激素升高,从而引发闭经、不孕、骨质疏松症及心血管等疾病,^[23] 中医古籍中并无“卵巢早衰”的病名,根据其临床表现及发病特点归属于“闭经”、“经水早断”、“血枯”、“不孕”等范畴。中药治疗卵巢早衰的临床和实验研究都证实,中药在治疗卵巢早衰方面具有多系统、多环节的调节作用,可以提高卵巢对促性腺激素的反应性,进而恢复和改善卵巢功能。^[24]

对知网、万方等数据库中卵巢早衰相关的中药方剂进行统计分析,共获得 64 味中药、4 味中心性指标较高中药(熟地、当归、仙茅、淫羊藿)。卵巢早衰的主要病机是肾虚、冲任衰少,当归和熟地、仙茅和淫羊藿是中药临床常用的滋阴精和补肾阳药对,具有明显补肾填精作用。通过中药网络药理学研究结果显示,当归、熟地、仙茅、淫羊藿四味中药的主要活性成分可能为阿魏酸、槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇等,主要靶点可能为 AKT1、JUN、IL6、EGFR、MAPK1,可能参与的通路有化学致癌-受体激活通路、AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路等。由此可见,当归、熟地、仙茅、淫羊藿四味中药治疗卵巢早衰是通过多成分、多靶点、多途径达到治疗效果的。

阿魏酸主要来源于当归、熟地,也是中国药典规定的当归药材中的主要药用指标,药理研究表明阿魏酸具有抗氧化活性,能够清除自由基、调节免疫、降血脂和改善动脉粥样硬化,还有抗菌消炎、保护卵巢和抑制肝损伤等作用。^[25] 槲皮素主要来源于中药淫羊藿,具有抗炎、抗氧化、免疫调节等生物活性和广泛的药理作用,^[26,27] 能够促进卵巢早衰模型大鼠的各级卵泡发育,促进窦状卵泡颗粒细胞层增殖,增加颗粒细胞的雌激素分泌。^[28] β -谷甾醇主要来源于仙茅、当归,豆甾醇主要来源于仙茅、当归、熟地,均属于植物甾醇,具有类雌激素样作用,作用于卵巢颗粒细胞,促进其产生雌二醇,从而调节体内激素水平,^[29] 研究表明其具有降低胆固醇含量、抗氧化及抗炎等多种生物

活性。^[30] 分子对接结果显示阿魏酸、槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇与 AKT1、JUN、IL6、EGFR、MAPK1 等靶点对接良好,结合能较低,结合活性较高。故当归、熟地、仙茅和淫羊藿四味中药与卵巢早衰疾病关系较为密切,其中阿魏酸与靶点基因的结合能均 $<-5\text{kcal/mol}$,且与 5 个靶点基因结合的氢键数均在 2 个以上,具有良好的结合活性,提示阿魏酸对卵巢功能具有明显的保护功能,该研究为临床治疗卵巢早衰提供新的视角和实验基础。

中药具有多靶点、整体调节等优点,可通过调节细胞凋亡、抗卵巢纤维化、干预机体免疫反应,达到缓解卵巢功能减退进程的作用。^[31,32] 丝/苏氨酸激酶 1 (AKT1),是蛋白激酶 B (AKT) 的亚型之一,参与细胞的生存和生长调控,^[33] 促进卵巢颗粒细胞增殖。AKT1 异常表达可能会导致原始卵泡生存和发育的缺陷,造成卵巢的病理状态。^[34] c-Jun 氨基末端蛋白激酶 (c-Jun NH2-terminal kinase, JNK) 是一种位于胞质的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 激酶,各种刺激因子激活 JNK 可以诱导细胞的凋亡。^[35,36] 卵巢颗粒细胞是卵泡闭锁过程中最先发生凋亡的细胞,在卵泡发育中起到决定性作用,IL-6 是一种具有广泛作用的细胞因子,人的卵巢颗粒细胞可产生 IL-6,^[37] MAPK1 为炎症的评价指标之一,其与炎症密切相关,^[38] 局部炎症严重影响卵巢卵泡储备和卵母细胞发育。RELA 是 NF- κ B 家族的成员之一,NF- κ B 对哺乳动物的卵巢细胞功能及病理变化有重要的调节作用,在黄体细胞中过表达 RELA 可抑制颗粒细胞的凋亡。^[39] 表皮生长因子受体 (EGFR) 是原癌基因 c-erbB1 所编码的跨膜糖蛋白,c-erbB2 基因和 EGFR 可能参与了卵巢早衰中的卵泡成熟障碍及卵泡凋亡调控。^[40] 氧化应激、内质网激活、线粒体功能障碍会加速卵巢衰老,^[41] AGE 与 RAGE 结合可通过激活促炎转录因子 NF- κ B 和 NADPH 氧化酶促进 ROS 产生,^[42] 从而导致卵巢组织发生纤维化和功能减退。糖基化终产物 (AGEs) 是在由葡萄糖或其他糖衍生物与蛋白质或脂质

反应的非酶产物衍生而来的异相分子, 各种过于精细的饮食及不良生活习惯均会引起 AGEs 的产生, AGEs 积累会直接造成蛋白质损伤, 激活应激诱导的转录因子或相关通路, 如 TNF- α 、AP-1、NF- κ B 及 MAPK 通路等, 产生促炎和炎症介质, 对卵巢功能造成损伤。^[43,44]

本研究基于文献总结和网络药理学的角度, 将生物信息技术与传统中医理论结合, 分析治疗卵巢早衰的核心中药的有效成分和作用靶点, 以及疾病的靶点基因, 并且运用相关软件分析与构建作用网络及通路, 筛选出的活性成分主要有阿魏酸、槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇等, 通过 AGE-RAGE 信号通路、化学致癌-受体激活通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路等对原始卵泡的发育和卵母细胞的生长进行调控, 以及通过体内炎症因子的表达, 调整卵巢局部炎症反应等。综上, 临床可以通过熟地、当归、仙茅、淫羊藿相须配伍应用, 通过多成分、多靶点及多通路的协同作用, 调节细胞凋亡、干预机体免疫反应, 缓解卵巢功能减退而起的预防和治疗作用, 为临床研究中药治疗卵巢早衰提供一定的思路及依据。鉴于网络药理学的局限性, 课题组后期将围绕物质基础-药效学评价-通路验证等开展实验研究, 为中药调控卵巢早衰免疫机制以及后期的药物开发提供理论和实验依据。

References

1. Ai GH, Meng M, Guo J, Li CX, Zhu JH, Liu L, et al. Adipose-derived stem cells promote the repair of chemotherapy-induced premature ovarian failure by inhibiting granulosa cells apoptosis and senescence. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):75.
2. Chon SJ, Umair Z, Yoon MS. Premature ovarian insufficiency: past, present, and future. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:672890.
3. Freaney PM, Ning HY, Carnethon M, Allen NB, Wilkins J, Lloyd-Jones DM, et al. Premature menopause and 10-year risk prediction of atherosclerotic cardiovascular disease. *JAMA Cardiol.* 2021;6(12):1463-5.
4. Qin YY, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update.* 2015;21(6):787-808.
5. Szeliga A, Calik-Ksepka A, Maciejewska-Jeske M, Grymowicz M, Smolarczyk K, Kostrzak A, et al. Autoimmune diseases in patients with premature ovarian insufficiency-our current state of knowledge. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2594.
6. Mauri D, Gazouli I, Zarkavelis G, Papadaki A, Mavroeidis L, Gkoura S, et al. Chemotherapy associated ovarian failure. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:572388.
7. Michalczyk K, Cymbaluk-Płoska A. Fertility preservation and long-term monitoring of gonadotoxicity in girls, adolescents and young adults undergoing cancer treatment. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):202.
8. Codacci-Pisanelli G, Del Pup L, Del Grande M, Peccatori FA. Mechanisms of chemotherapy-induced ovarian damage in breast cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;113:90-6.
9. Zhou Q, Lu YC. New progress in the treatment of premature ovarian failure. *Chinese Journal of Medicinal Guide.* 2023;25(1):35-8. (in Chinese)
10. Liu XL, Hu CY, Liu G, Guo Q. The latest research progress on the pathogenesis and related treatment mechanisms of premature ovarian failure. *Journal of Jiangsu University (Medicine Edition).* 2021;31(6):541-8. (in Chinese)
11. Shao H. Research progress of traditional Chinese medicine combined with hormone replacement therapy in the treatment of premature ovarian failure. *Chinese Journal of Urban and Rural Enterprise Hygiene.* 2022;37(5):13-5. (in Chinese)

12. Li GG, Cui XP, Yi L, Zhang JJ, Huang MZ. Research progress of Chinese medicine in premature ovarian failure. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine. 2023;44(4):534-7. (in Chinese)
13. World Federation of Chinese Medicine Societies. Network pharmacology evaluation methodology guidance. World Chinese Medicine. 2021;16(4):527-32. (in Chinese)
14. Zheng WL, Wu JY, Gu JY, Weng H, Wang J, Wang T, et al. Modular characteristics and mechanism of action of herbs for endometriosis treatment in Chinese medicine: a data mining and network pharmacology-based identification. Front in Pharmacol. 2020;11:147.
15. Chen ZJ, Tian QJ, Qiao J, Liu JY, Yang DZ, Huang HF, et al. Chinese expert consensus on clinical diagnosis and treatment of early-onset ovarian insufficiency. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology. 2017;52(9):577-81. (in Chinese)
16. The Professional Committee of Obstetrics and Gynecology, the Chinese Association of Integrative Medicine. Guideline for the diagnosis and treatment of premature ovarian insufficiency with integrated traditional Chinese and western medicine. Journal of Traditional Chinese Medicine. 2022;63(12): 1193-8. (in Chinese)
17. Ma BF, Shu WJ, Sun XQ. Study on regularity of modern Chinese medicine treatment of Parkinson's disease based on data mining. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology. 2022;24(10):4015-21. (in Chinese)
18. Chinese Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 version). Beijing: Chinese Medicine Publishing House; 2015. (in Chinese)
19. Wang XM, Liu WQ. Screening and analysis of key genes in gastric cancer based on complex network. Journal of Data Acquisition and Processing. 2019;34(5):854-62. (in Chinese)
20. Wang HK, Su D, Wu N, Zhang YH. Mechanism of Tongfengshu tablets in treatment of gout based on network pharmacology and molecular docking. Drugs & Clinic. 2022;37(5):952-60. (in Chinese)
21. Zou MC. The research of linked data in domestic and abroad based on co-word analysis and social network analysis. Journal of Modern Information. 2016;36(3):135-43. (in Chinese)
22. Huang Y, Yang SS, Lin X, Zhao SJ, Wei XY, Fu CM, et al. The mechanism of action of Fuzi-Lizhong pill in treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology-molecular docking. Acta Pharmaceutica Sinica. 2020;55(8):1812-22. (in Chinese)
23. Zhang XJ, Ye GX, Ji DJ, Feng YH. Progress of pathogenesis and treatment of premature ovarian failure in recent 5 years. Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine. 2022;36(12):79-81. (in Chinese)
24. Ren HX, Si F, Zhu K, Zhu XX, Wang CH. Study on the medication rules of Chinese medicine compound in the treatment of premature ovarian failure based on data mining technology. Chinese Medicine Modern Distance Education of China. 2022;20(4):45-8. (in Chinese)
25. Zhang X, Gao ZP. Research progress in ferulic acid. Modern Chinese Medicine. 2020;22(1): 138-47. (in Chinese)
26. Yang Y, Wang YY, Jiang YC. Advancement of researches in quercetin. Special Economic Animal and Plants. 2020;23(5):24-8. (in Chinese)
27. Liu SW, Liu JY. Advancement of researches in quercetin. Chin J Lung Dis (Electronic Edition). 2020;13(1):279-81. (in Chinese)

28. Huang CS, He SD, Guang YC, Zhou RY, Tan N, Luo SC, et al. Effects of dodder flavonoids and quercetin on the ovarian function in rat model of premature ovarian failure induced by tripterygium glycosides. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology. 2020;36(6):667-70. (in Chinese)
29. Zeng LP, Xu XZ, Rao H, Wang MY, Cai XF, Rao Y. Regulation of β -sitosterol in Duzhongye on homeostasis of bone metabolism. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research. 2012;23(5):1051-3. (in Chinese)
30. Wang XK, Chen W, Zhang TJ, Yin ZG, Gu YL, Li T. Research and application prospect of phytosterols (esters). China Surfactant Detergent & Cosmetics. 2023;53(4):445-52. (in Chinese)
31. Liu HP, Zeng LT, Hu LJ, Wang C, Yang KL, Zhang GM. Effects of Bushen Huoxue recipe on the expressions of TGF- β 1, TGF- β RII and Smad2/3 in granulosa cells in mice with premature ovarian failure. Chinese Traditional Patent Medicine. 2017;39(9):1782-8. (in Chinese)
32. Liu WH, Cui L, Shen YC, Ding Y, Ma CF. The effect of Qutan Huayu formula on sex hormones and ovarian fibrosis related factors in PCOS model rats induced by dehydroepiandrosterone. Traditional Chinese Medicinal Research. 2018;31(7):73-6. (in Chinese)
33. Luo LL, Huang J, Sui XX, Liu H, Qian YS, Fu YC. Experimental study on FOXO3a involved in the regulation of oocyte apoptosis in neonatal rat ovaries. Reproduction and Contraception. 2007;(5):314-9. (in Chinese)
34. Yang J, Liang JL, Qin JJ. Research on the correlation between PI3K/Akt signaling pathway and premature ovarian failure. Progress in Obstetrics and Gynecology. 2016;25(2):156-8. (in Chinese)
35. Bai Y, Long QF. The progress of relation between MAPK pathway and apoptosis. Studies of Trace Elements and Health. 2011;28(3):58. (in Chinese)
36. Zhou L, Hu FY, Xu XY. Research progress on MAPK signaling regulation pathway and its role in cell apoptosis. Chinese Journal of Health Laboratory Technology. 2010;20(10):2655-7. (in Chinese)
37. Li QL, Ni J. The regulatory effect of cytokines on ovarian function. Progress in Physiological Sciences. 2000;31(4):361-3. (in Chinese)
38. Guo L, Xia DZ, Luo YJ, Zhang XX, Zhao XY. Mechanism of *Smilax glabra* in treatment of gout based on network pharmacology. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 2019;50(6):1413-8. (in Chinese)
39. Telleria CM, Goyeneche AA, Stocco CO, Gibori G. Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of rat luteal function: potential roles as survival factor and inhibitor of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. J Mol Endocrinol. 2004;32(2):365-83.
40. Xu AX, Xue B, Yu YH, Ji L. Expression of proto-oncogene c-erbB2 and EGFR in rat models with premature ovarian failure. Experimental and Laboratory Medicine. 2015;33(5):546-8. (in Chinese)
41. Liu MY, Yin Y, Ye XY, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL, et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. Hum Reprod. 2013;28(3):707-17.
42. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. Biochim Biophys Acta. 2000;1498(2-3):99-111.

43. Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020(3):3818196.
44. Volpe C, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):119.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การสำรวจกลไกการรักษาภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควรด้วยยาสมุนไพรจีนโดยใช้เภสัชวิทยาเครือข่าย

อู๋ หงจิ้น¹, หลี่ เซินกว่าง², ไต้ เวยเว่ย¹, จาง เจี้ยน¹, หวัง ลีป้อ¹, หวัง เฉิงหลง¹

¹โรงพยาบาลหลงหัว สังกัดมหาวิทยาลัยการแพทย์แผนจีนเซี่ยงไฮ้

²โรงพยาบาลการแพทย์ผสมผสานแผนปัจจุบันและการแพทย์แผนจีนเขตหมิ่นหังนครเซี่ยงไฮ้

บทคัดย่อ: สาเหตุของภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควร (premature ovarian failure, POF) มีความซับซ้อนและรักษาได้ยาก การวิจัยในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่ายาสุนไพรมะเร็งจีนสามารถเพิ่มการตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) เพิ่มปริมาณตัวรับฮอร์โมนเพศ (hormone receptor) และสามารถปรับปรุงการทำงานของรังไข่ให้ดีขึ้นได้ การวิจัยนี้ได้รวบรวมผลงานทางวรรณกรรมและการวิเคราะห์ทางเภสัชวิทยาเครือข่ายเพื่อสำรวจกลไกการทำงานและการออกฤทธิ์ของยาสมุนไพรจีนในการรักษาภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควร โดยคัดกรองเอกสารงานวิจัยทางคลินิกที่เกี่ยวข้องในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา จากฐานข้อมูลต่างๆ เช่น China National Knowledge Infrastructure (CNKI) เป็นต้น ใช้ซอฟต์แวร์ NCINET6.0 เพื่อสร้างเครือข่ายข้อมูลยาสมุนไพรจีนและทำการวิเคราะห์แบบรวมศูนย์กลาง และใช้แพลตฟอร์มการวิเคราะห์เภสัชวิทยาระบบยาสมุนไพรจีน (Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) เพื่อดึงข้อมูลองค์ประกอบสำคัญและเป้าหมายที่สอดคล้องกันของยาสมุนไพรจีน ฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น OMIM เพื่อหาเป้าหมายของภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควร นำเอาจุดตัดของเป้าหมายยาสมุนไพรจีนที่สำคัญกับเป้าหมายของภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควรมาสร้างเครือข่ายระหว่างองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์กับเป้าหมายและเครือข่ายการปฏิสัมพันธ์การทำงานระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction network, PPI network) ทำการวิเคราะห์แปลผลโดยใช้ gene ontology (GO) และการวิเคราะห์โดยอาศัยฐานข้อมูล (KEGG) kyoto encyclopedia of genes and genomes เพื่อศึกษาเส้นทางทางชีวภาพ และจำลองการจับกันของโมเลกุลระหว่างองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์กับเป้าหมาย โดยได้รวบรวมข้อมูลตำรายาจีนทั้งหมด 135 รายการ ยาสมุนไพรจีน 64 ชนิด ยาสมุนไพรจีนหลักที่มีความเป็นศูนย์กลางสูงคือ “เซียนเหมา (仙茅)-หยินหยางฮั่ว (淫羊藿)-ดั่งกู่ (当归)-สุตี้ (熟地)” องค์ประกอบทางเคมีที่ประสิทธิภาพทั้งหมดของ 4 ตัวยานี้มี 81 จุด และจุดร่วมระหว่างกลุ่มตัวยาสมุนไพรจีนกับภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควรมีทั้งหมด 259 จุด เครือข่ายการปฏิสัมพันธ์การทำงานระหว่างโปรตีนส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับโปรตีนเป้าหมายที่สำคัญ เช่น AKT1, JUN, IL6, EGFR, MAPK1, RELA เป็นต้น ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ GO พบรายการกระบวนการทางชีวภาพ 2,139 รายการ ($p < 0.05$) ส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์ KEGG พบว่ามี 181 เส้นทาง ($p < 0.05$) ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับสารที่ทำให้ร่างกายเกิดการเสื่อมสภาพหรือแก่ชรา (advanced glycation end products, AGEs)/เส้นทางการส่งสัญญาณทางชีวภาพที่เกิดขึ้นจากการจับกันของ AGE-RAGE เส้นทางการกระตุ้นตัวรับในกระบวนการก่อมะเร็งทางเคมี เส้นทางการส่งสัญญาณของ TNF และ interleukin-7 เป็นต้น ผลการเชื่อมต่อระดับโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบหลักของยาสมุนไพรจีน ทั้ง 4 ชนิด มีการก่อตัวรวมกันกับเป้าหมายหลักในการรักษาภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควรค่อนข้างสูง และมีโครงสร้างการเชื่อมต่อที่มั่นคง ferulic acid เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในยาสมุนไพรจีนซึ่งมีบทบาทในการส่งเสริมและต้านภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควรได้ โดยสามารถควบคุมยีนเป้าหมายสำคัญ เช่น AKT1, JUN, IL6 โดยผ่านเส้นทางการส่งสัญญาณของ AGE-RAGE, เส้นทางการกระตุ้นตัวรับในกระบวนการก่อมะเร็งทางเคมี เส้นทางการส่งสัญญาณของ TNF และ interleukin-7

คำสำคัญ: เภสัชวิทยาเครือข่าย; ภาวะรังไข่ล้มเหลวก่อนวัยอันควร; ชีวสารสนเทศศาสตร์; ยาสมุนไพรจีน; สารออกฤทธิ์สำคัญ

ผู้รับผิดชอบบทความ: อู๋ หงจิ้น: tongbaiwu@163.com



Original Article

Mechanism of Chinese herbs against premature ovarian failure based on literature mining and network pharmacology

Wu Hongjin¹, Li Shenguang², Dai Weiwei¹, Zhang Jie¹, Wang Libo¹, Wang Chenglong¹

¹Longhua hospital Shanghai University of traditional Chinese Medicine, China

²Shanghai Minhang integrated traditional Chinese and Western Medicine Hospital, China

Abstract: The etiology of premature ovarian (POF) failure is complex and the treatment is difficult. Modern research has shown that traditional Chinese medicine (TCM) can increase the responsiveness of the ovaries to gonadotropins and the content of sex hormone receptors, which can improve ovarian function. This study investigated the medication patterns and potential mechanisms of TCM in the treatment of premature ovarian failure using literature mining and network pharmacology analysis. The relevant clinical research literatures in the past 30 years were screened from the China National Knowledge Infrastructure (CNKI) and other databases. We established a community network software and conducted a central analysis on the core herbs using NCINET 6.0. The chemical composition and targets of the core herbs were searched from the traditional Chinese medicine system pharmacology platform (TCMSP) database. The POF related genes were searched by from OMIM database. The compound-targets (genes) network and protein-protein interaction (PPI) network were constructed. We analyzed the enrichment of gene ontology (GO) function and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), and performed molecular docking on the active ingredients of core drugs and target genes. Finally, A total of 135 TCM formulas were screened, and 4 core herbs with high centrality were obtained among 64 herbs. There were 81 effective chemical components and 259 intersection targets between the core drugs and POF. PPI network mainly involved key target proteins such as AKT1, JUN, IL6, EGFR, MAPK1, RELA; and The GO functional enrichment analysis revealed 2,139 biological process entries ($p < 0.05$), and the KEGG enrichment analysis identified 181 pathways ($p < 0.05$), primarily involving the following pathways: chemical carcinogenesis receptor activation pathway, AGE-RAGE signaling pathway in diabetes complications, TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway. The molecular docking results showed that the main active components of herbs had high binding activity and stable docking conformation with the key target of POF disease. The key active components in the core herbs, such as ferulic acid, can play a role in an anti-premature ovarian failure, chemical carcinogenesis receptor activation, AGE-RAGE signaling pathway, TNF signaling pathway, IL-17 signaling pathway through regulating AKT1, JUN, and IL6.

Keywords: network pharmacology; premature ovarian failure; biological information; Chinese herbs; active pharmaceutical ingredient

Corresponding author: Wu Hongjin: tongbaiwu@163.com