

· 基础研究 ·

基于网络药理学的知柏地黄丸治疗性早熟机制研究

蔡颢¹, 黄钢花^{2*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510000;

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510000

[摘要] **目的:** 采用网络药理学方法研究知柏地黄丸治疗性早熟的关键靶点和潜在分子机制。**方法:** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)以吸收、分布、代谢和排泄(ADME)参数筛选活性化合物,并预测活性成分靶点;通过GeneCards、OMIM数据库获取性早熟相关靶点,两者相互映射得到交集靶点;采用Cytoscape 3.3.0软件构建成分-靶点网络;采用STRING数据库构建蛋白质相互作用网络;采用R软件进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果:** 共获得知柏地黄丸中与性早熟相关的潜在活性成分63个[槲皮素、山柰素、 β -谷甾醇、脱水淫羊藿素、(S)-氢化小檗碱等],潜在靶点70个[前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、PTGS1、 β -2肾上腺素能受体(ADRB2)、孕酮受体(PGR)、雄激素受体(AR)等],主要涉及信号通路7条,包括色氨酸代谢、类固醇激素生物合成信号通路等。**结论:** 知柏地黄丸通过多成分、多靶点、多途径综合调控性早熟。

[关键词] 知柏地黄丸;儿童;性早熟;网络药理学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)03-0475-10

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200328002

Mechanism for Zhibai Dihuang Pills in Treating Precocious Puberty Based on Network PharmacologyCAI Si¹, HUANG Gang-hua^{2*}

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

[Abstract] **Objective:** To explore the key targets and latent molecular mechanism of Zhibai Dihuang Pills for the treatment of precocious puberty by network pharmacology. **Methods:** The active ingredients and corresponding targets were collected by using traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) according to absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) parameter. The disease-related genes were retrieved from GeneCards and OMIM database by using the keyword "precocious puberty". Then the corresponding targets were mapped to the set of disease-related genes to obtain intersection targets. The Cytoscape 3.3.0 software was used to build "ingredients-targets" network. Using STRING database to construct protein interaction network. Gene ontology (GO) function enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment were analyzed by using R software. **Results:** A total of 63 potential active ingredients [including quercetin, kaempferol, beta-sitosterol, anhydroicaritin, (S)-canadine and so on] were screened and 70 targets [including prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), PTGS1, β -2 adrenergic receptor (ADRB2), progesterone receptor (PGR), androgen receptor (AR) and so on] were identified. There are 7 signaling pathways related to disease, such as tryptophan metabolism and steroid hormone biosynthesis signaling pathways. **Conclusion:** Zhibai Dihuang Pills systemically regular material basis and biologic mechanism of precocious puberty though multi-ingredient, multi-target and multi-channel.

[Keywords] Zhibai Dihuang Pills; child; precocious puberty; network pharmacology

性早熟是指女性在8岁前、男性在9岁前开始出现第二性征发育的疾病,根据是否启动下丘脑-垂

体-性腺轴(HPGA)可分为中枢性性早熟(促性腺激素释放激素依赖性性早熟, CPP)或外周性性早熟

* [通信作者] 黄钢花, 硕士生导师, 主任中医师, 研究方向: 中医儿科学; E-mail: hy1309@126.com

(非促性腺激素释放激素依赖性性早熟, PPP)。目前, CPP的病因可分为器质性病变及非器质性病变两大类, 其中, 不完全性(部分性)性早熟是CPP中的一种特殊类型, 表现为孤立的性发育, 如单纯性乳房早发育、单纯性阴毛早发育和单纯性早初潮^[1]。本研究中涉及的性早熟疾病主要包括CPP和PPP。

《中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)》2016年版^[2]推荐知柏地黄丸为性早熟主证、兼证的主要治疗方剂。目前, 已有学者研究了知柏地黄丸治疗性早熟的临床疗效^[3]。张穗洪^[4]采用知柏地黄丸化裁方治疗特发性性早熟, 能有效降低患儿的性激素水平, 改善性早熟的症状; 刘超等^[5]研究发现, 知柏地黄丸联合亮丙瑞林治疗女童CPP, 可缓解患儿第二性征的发育且不良反应少、安全性高; 郑怜玉等^[6]发现, 知柏地黄丸治疗部分性性早熟, 能够降低其转为CPP的发生率。然而, 每项研究项目的样本量均较少, 普遍质量偏低, 尤其未采用盲法及分配隐藏, 疗程长短不一, 各项研究间异质性较大, 可能存在发表偏倚等问题^[7]。本研究从网络药理学角度进行分析, 通过寻找知柏地黄丸治疗性早熟的靶基因, 从分子水平推测其作用机制。

1 材料与方法

1.1 知柏地黄丸成分收集与筛选

利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)检索知柏地黄丸化学成分, 并根据成分吸收、分布、代谢和排泄(ADME)参数^[8], 选取口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18的成分作为活性成分, 建立知柏地黄丸活性成分数据库。

1.2 知柏地黄丸、性早熟疾病相关靶点与交集靶点获取

将从TCMSP数据库中得到的知柏地黄丸靶点导出, 并通过UniProt数据库(<http://www.genecards.org/>)矫正为统一官方基因名称。以“precocious puberty”为关键词在GeneCards数据库(<http://www.genecards.org/>)、OMIM数据库(online mendelian inheritance in man, <https://omim.org/>)搜索性早熟疾病相关基因。将药物靶点与疾病靶点通过R软件相互映射, 取交集得到药物-疾病的靶点基因。

1.3 成分-靶点、蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建

采用Cytoscape 3.3.0(<https://cytoscape.org/>)

软件构建活性成分-靶点网络, 节点表示成分和靶标, 分别用不同的颜色和不同的形状的节点(node)代表所对应的成分和作用靶点, 边(edge)表示节点相互作用关系, 构建可视化网络图。利用Tool工具中Network Analyzer分析网络拓扑参数, 计算相关拓扑参数如节点度值(degree)、介数中心性(betweenness centrality), 取度值和介数中心性综合排名靠前的活性成分。

将交集靶点导入STRING(<http://stitch.embl.de>)数据库, 选择“multiple proteins”项, 物种选择为“homo sapiens”, 获得蛋白相互作用关系, 选取combined score置信度值≥0.9, 构建PPI网络。导出文件, 并通过R 3.6.2(<https://www.r-project.org/>)软件计算得到排名前10的PPI网络核心基因。

1.4 靶点基因基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

以R软件为平台, 运用“ClusterProfiler”程序包, 利用Bioconductor提供的GO注释信息和KEGG通路数据库进行信号通路富集分析, 物种和背景栏均选择“homo sapiens”, 分析结果包括GO功能分析和KEGG通路分析, 以校正后的 $P < 0.05$ 为阈值, 筛选显著富集的生物功能和通路, 获得交集基因主要的生物功能和作用通路。

2 结果

2.1 知柏地黄丸活性成分及其治疗性早熟靶点筛选结果

根据OB≥30%和DL≥0.18原则, 共筛选得到知柏地黄丸中113种活性成分。其中, 熟地黄中2个、茯苓中15个、山茱萸中20个、泽泻中10个、牡丹皮中11个、山药中16个、知母中15个、黄柏中37个。依据DL水平列举出前20种活性成分, 见表1。筛选得到知柏地黄丸药物靶点125个, 与性早熟相关的疾病靶点1022个, 取药物与疾病靶点的交集, 可得到70个靶点, 见图1。

2.2 成分-靶点网络构建

将得到的知柏地黄丸成分和其治疗性早熟的靶点导入Cytoscape 3.3.0软件, 得到成分-靶点网络图(图2)。该网络共包含133个节点、276条边, 其中, 63个节点代表知柏地黄丸有效成分, 70个节点代表与有效成分相关的性早熟治疗靶点, 网络平均邻节点数为4.120。节点的度值表示该节点和网络中其他节点相连的路线数目, 度值越大代表该节点是

表1 知柏地黄丸部分活性成分

编号	MOL ID	化合物名称	OB/%	DL	来源
1	MOL002668	甲基黄连碱(worenine)	45.83	0.87	黄柏
2	MOL005458	黄山药皂苷 C(dioscoreside C qt)	36.38	0.87	山药
3	MOL004540	知母皂苷 C(anemarsaponin C qt)	35.50	0.87	知母
4	MOL004514	知母皂苷 B III (timosaponin B III qt)	35.26	0.87	知母
5	MOL001458	黄连碱(coptisine)	30.67	0.86	黄柏
6	MOL004542	知母皂苷 E(anemarsaponin E qt)	30.67	0.86	知母
7	MOL003773	芒果醇酸(mangiferolic acid)	36.16	0.84	知母
8	MOL000787	原阿片碱(fumarine)	59.26	0.83	黄柏
9	MOL000300	去氢齿孔酸(dehydroeburicoic acid)	44.17	0.83	茯苓
10	MOL002673	鬃毛酮(hispidone)	36.18	0.83	黄柏
11	MOL000856	泽泻醇 C 单醋酸酯(alisol C monoacetate)	33.06	0.83	泽泻
12	MOL005557	8, 24-羊毛甾二烯-3 醇, 3-乙酸酯(lanosta-8, 24-dien-3-ol, 3-acetate)	44.30	0.82	山茱萸
13	MOL002660	尼洛替星(niloticin)	41.41	0.82	黄柏
14	MOL000285	(2R)-2-[(5R, 10S, 13R, 14R, 16R, 17R)-16-hydroxy-3-keto-4, 4, 10, 13, 14-pentamethyl-1, 2, 5, 6, 12, 15, 16, 17-octahydrocyclopenta [a] phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	38.26	0.82	茯苓
15	MOL000853	泽泻醇 B(alisol B)	36.76	0.82	泽泻
16	MOL006392	二氢尼洛替星(dihyoniloticin)	36.43	0.82	黄柏
17	MOL006413	黄柏呈(phellochin)	35.41	0.82	黄柏
18	MOL002636	苦参内酯 A(kihadalactone A)	34.21	0.82	黄柏
19	MOL000854	泽泻醇 C(alisol C)	32.70	0.82	泽泻
20	MOL000832	23-乙酰泽泻醇 B(alisol, B, 23-acetate)	32.52	0.82	泽泻

连接其他节点的重要桥梁^[9]。取节点度值和介数中心性综合排名前5的化合物及排名前9的靶点,见表2~3。

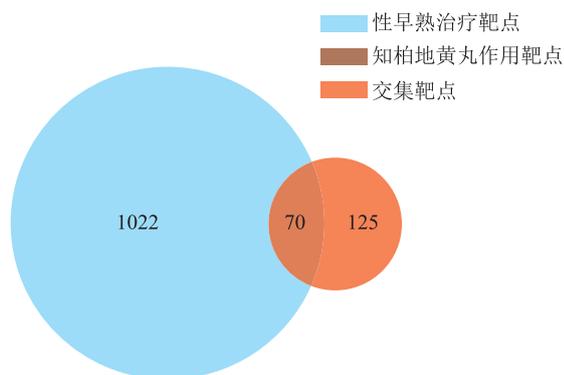


图1 知柏地黄丸药物靶点与性早熟疾病靶点韦恩图

2.3 疾病靶点 PPI 网络

将性早熟相关的靶点基因导入 STRING 数据库,得到疾病 PPI 网络,该网络共有 61 个节点和 140 条边,网络平均邻节点数为 4.590,网络中的节点代表靶点,边表示靶点间的相互作用关系,边数越多表示该节点对应的靶点在网络中的作用越重要,见

图3。结果表明,蛋白激酶 B1(Akt1)、白细胞介素-6(IL-6)、雌激素受体 1(ESR1)、丝裂原活化的蛋白激酶 14(MAPK14)、原癌基因 c-Fos(FOS)、IL-1 β 、IL-4、表皮生长因子(EGF)、IL-10、IL-2 度值较高,说明这些蛋白在网络中的作用显著,是和其他蛋白互通的纽带,见图4。

2.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

通过 GO 注释信息和 KEGG 数据库进行信号通路富集分析,得到校正后 $P < 0.05$ 的排名前 20 的生物学功能(核受体活性;转录因子活性、直接调控配体特异性的 DNA 序列结合;氧化还原酶活性、通过结合或还原氧分子作用于配对供体;类固醇激素受体活性;血红素结合;四吡咯结合;类固醇结合;单加氧酶活性;氧化还原酶活性、通过结合或还原分子氧作用于成对供体,还原黄素或黄素蛋白作为一个供体,并结合一个氧原子;细胞因子受体结合;细胞因子活性;类固醇羟化酶活性;铵离子结合;生长因子受体结合;儿茶酚胺结合;受体配体活性;磷酸酶结合;蛋白酶结合;多巴胺结合;激酶调节活性),见图5。

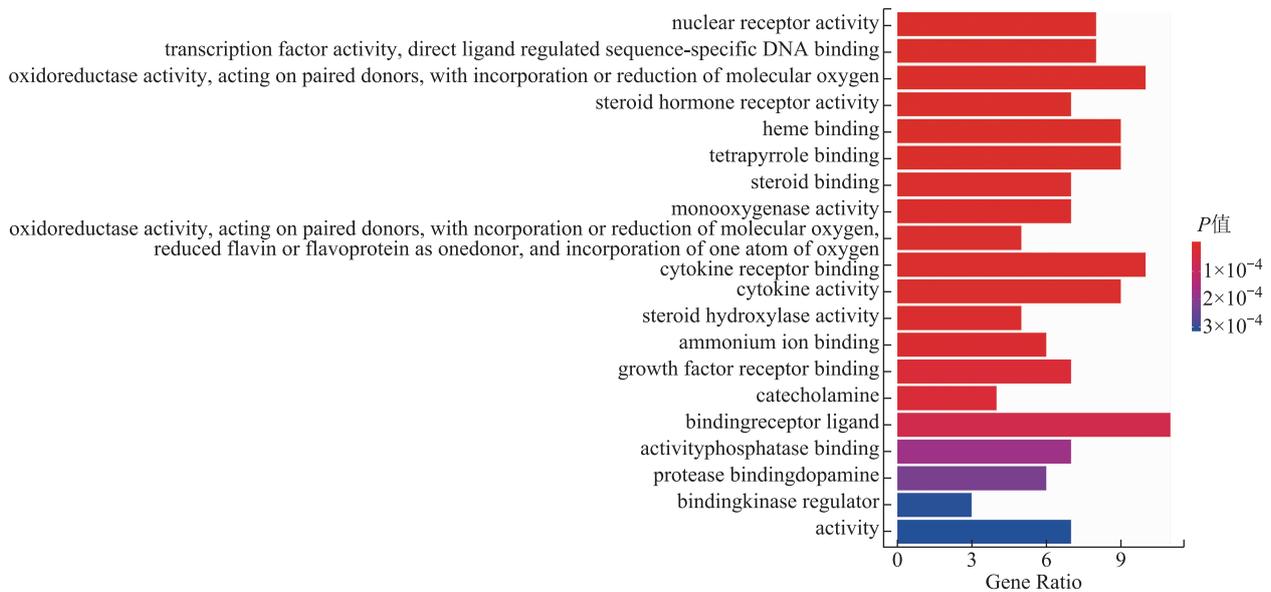


图5 知柏地黄丸治疗性早熟 GO 功能富集

KEGG 通路富集取校正后 $P < 0.05$, 得到 7 条通路, 为色氨酸代谢信号通路, 类固醇激素生物合成信号通路, 精氨酸和脯氨酸代谢信号通路, 苯丙氨酸代谢信号通路, 组氨酸代谢信号通路, 酪氨酸代谢信号通路, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢信号通路, 见图 6。

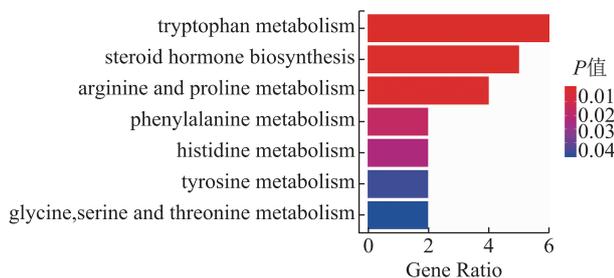


图6 知柏地黄丸治疗性早熟 KEGG 通路富集

3 讨论

CPP 的发病是由于 HPGA 功能提前启动。一旦 HPGA 功能启动, 中枢神经系统将解除对下丘脑的抑制, 下丘脑发育成熟, 并对性激素负反馈调节的敏感性下降, 促性腺激素释放激素 (GnRH) 分泌量增加, 刺激垂体合成与释放促卵泡激素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)^[10]。FSH 可促进男孩睾丸曲细精管中精子的生成, 或促进女孩卵巢中卵泡的产生和发育, 最终启动儿童的青春期发育。LH 可刺激男孩的睾丸间质细胞合成并分泌睾酮, 或触发女孩排卵, 并使排卵后的卵泡壁转化为黄体和分泌孕酮。目前

研究表明, CPP 的发病与 *DLKI* 基因突变有关, 正常的 *DLKI* 基因编码前脂肪细胞因子 1 (Pref-1), 其主要抑制脂肪细胞分化, 把脂肪储存变为外周脂质氧化。当 *DLKI* 基因发生突变, 血清中的 DLK1 蛋白水平降低, 可产生 1 种新的介于生殖系统与代谢之间的抗脂肪代谢途径, 表现为生殖器官发育伴肥胖、糖耐量异常或 2 型糖尿病、高脂血症^[11]。已知当瘦素达到生殖标准时, 会促进青春期的启动, 而瘦素是一种由白色脂肪组织分泌的蛋白质, 主要是调节机体能量平衡^[12]。因此, 一部分肥胖、脂代谢异常的患儿可能会出现性早熟。

中医认为, 性早熟的发病与肾的功能密切相关, 其病机为相火旺盛, 致阴虚火旺, 治疗当以滋阴降火为法^[13], 首选知柏地黄丸。知柏地黄丸出自《医宗金鉴》, 含有泽泻、山茱萸、黄柏、熟地黄、牡丹皮、山药、茯苓、知母 8 味中药, 其中泽泻能够清热利便、引火下行, 山茱萸具有补肾涩精之功效, 黄柏具有清热泻火等功效, 诸药合用能够填补肾阴、泄相火。

3.1 有效成分

本研究结果表明, 槲皮素、山柰素、 β -谷甾醇、脱水淫羊藿素、(S)-氢化小檗碱、豆甾醇等为知柏地黄丸中治疗性早熟的主要有效成分。槲皮素、山柰素均属黄酮类化合物, 均为植物雌激素^[14-15]。研究表明, 槲皮素可抑制卵巢细胞基础功能(增殖和凋亡、卵巢类固醇和肽激素的释放)及其上游激素刺激

因子 FSH 的激活反应^[14]。山柰素则在人体雌二醇 (E_2) 水平偏高时通过抗 E_2 发挥作用^[15]。在肥胖的性早熟患儿中, 胰岛素抵抗可能干扰肝脏中性激素结合球蛋白的合成, 导致 E_2 失活的减少, 外周组织会持续存在未对抗的 E_2 ^[16]。 E_2 水平与子宫、卵巢容积呈正相关, 高水平的 E_2 持续作用于骨骺生长板, 可促进骨成熟^[17]。山柰素还可抑制脂质积累, 增加脂肪细胞中脂肪酸氧化信号^[18]。 β -谷甾醇和豆甾醇都属植物甾醇。研究表明, 雄性大鼠的睾酮和雌性大鼠的 E_2 等性激素水平因摄入 β -谷甾醇而升高^[19]。而对山羊的研究表明, β -谷甾醇对生殖能力的影响却相反^[20]。另外, β -谷甾醇一方面可增加脂肪细胞对葡萄糖的摄取, 并在分化为前脂肪细胞时刺激脂肪生成, 一方面还能诱导脂肪细胞的脂解^[21]。豆甾醇比 β -谷甾醇在减少脂肪生成上更有效^[22]。脱水淫藜素是淫羊藿苷的代谢产物, 淫羊藿苷属于黄酮类化合物。脱水淫羊藿素是一种有效的转录因子固醇调节元件结合蛋白 (SREBPs) 抑制剂^[23]。已知 SREBPs 涉及人体游离脂肪酸和胆固醇合成的全过程, 在脂代谢的调节过程中有重要的作用^[24]。因此, 脱水淫羊藿素可通过抑制 SREBPs 调节脂质代谢的功能, 改善血脂异常和胰岛素抵抗。

3.2 作用靶点

通过构建成分-靶点网络, 分析网络拓扑结构参数, 得到的关键靶点有前列腺素内源性过氧化物合酶 2 (PTGS2)、PTGS1、 β -2 肾上腺素能受体 (ADRB2)、孕酮受体 (PGR)、雄激素受体 (AR)、ESR1、 γ -氨基丁酸受体亚单位 α -1 (GABRA1)、核受体亚家族 3C 组成员 1 (NR3C1) 等。其中, PGR 为孕酮受体, 可调节许多下游靶基因的表达。孕酮、 E_2 等类固醇激素通过 PGR 发挥对靶细胞的作用^[25]。PGR 也调节卵母细胞从卵泡中成功释放。研究表明, PGR 的表达被抑制时, 小鼠排卵率严重降低, 卵母细胞被截留^[26]。此外, 孕酮对靶基因转录的激活过程需要共调节因子参与其与 PGR 的结合。其中一种是共激活因子, 起增强靶基因转录的作用; 另一种是共抑制因子, 起抑制靶基因转录的作用^[25]。根据成分-靶点图, 发现 PGR 为 β -谷甾醇、谷甾醇、山柰素等成分的作用靶点。因此, β -谷甾醇、谷甾醇、山柰素等成分可能作为共抑制因子抑制 PGR 靶基因转录。已知, 介导 E_2 生理作用的雌激素受体 (ER) 有

2 种亚型, 分别为 ER α 和 ER β , 分别由 *ESR1* 和 *ESR2* 基因编码^[27], 与黄体形成过程有关。其中, 女性 ER α 和 ER β 主要分布于卵巢及乳房中, 子宫中以 ER α 为主; 男性 ER α 和 ER β 主要分布于睾丸中, 前列腺中以 ER β 为主, ER α 同时高表达于下丘脑、终纹床核与生殖调节有关的脑区^[28]。性早熟的发病需要 ER 与相应性激素结合活化而发挥作用, 已知槲皮素、山柰素等植物雌激素有拮抗部分性激素的作用。因此, 含有此类成分的知柏地黄丸可能通过拮抗 E_2 的分泌, 或抑制环境内分泌干扰物 (EEDs) 对 ER 的介导作用, 从而发挥治疗性早熟的作用。另外, AR 与 PGR、ER 同为类固醇激素受体, 是配体激活的转录因子。雄激素通过和 AR 的结合调控男性生殖器官的发育及维持正常的性功能, 并在女性生殖器官的发育及功能发挥中起重要的作用。若雄激素与 AR 结合后的信号失调, 则可能扰乱正常的生殖系统发育^[29]。因此, AR 作为性腺受体在治疗性早熟中发挥着传递信号的作用。结合 GO 功能富集结果可知, 知柏地黄丸通过作用于 PGR、ESR1、ESR2、AR 等, 影响机体的核受体活性、转录因子活性、直接配体调控的特异性 DNA 序列结合、类固醇激素受体活性功能。另外, 研究表明, GABRA1 在哺乳动物的初情期, 其受体会达到峰值, 并刺激下丘脑, 使 GnRH 脉冲分泌加强, 进一步刺激促性腺激素分泌, 最终导致卵泡发育和排卵^[30]。因此, GABRA1 作为主要靶点可能受到槲皮素、山柰素等植物雌激素负反馈调节作用。

NR3C1 为糖皮质激素受体 α -D3 亚型, *NR3C1* 基因遗传缺陷可致全身或局部对糖皮质激素不敏感^[31]。若血皮质醇 (CORT) 减少, 对 HPGA 的抑制作用会减弱, 则促肾上腺皮质激素 (ACTH) 代偿性分泌增多, 促使孕酮及 17-羟孕酮堆积并向雄激素合成途径转化, 致睾酮、雄烯二酮等增多, 部分患儿可出现发育早、骨龄超出年龄^[32]。且部分性早熟患儿可出现肥胖, 随着肥胖的发展, CORT 影响下丘脑的糖皮质激素受体水平上升, 因此, 糖皮质激素受体是代谢紊乱的中介^[33]。研究发现, 知柏地黄丸能提高肾上腺皮质激素型肾阴虚大鼠的 CORT 水平, 恢复肾上腺组织形态和细胞正常分泌功能^[34]。ADRB2 在能量消耗和脂类代谢方面有重要作用, 并与肥胖有一定相关性^[35]。知柏地黄丸中的小檗碱、豆甾醇等成分有纠正脂代谢异常的作用^[22,36], 且作用靶点为

ADRB2。综上所述,知柏地黄丸通过纠正性早熟患儿体内各种代谢功能异常而达到治疗作用。

知柏地黄丸节点度值最高的作用靶点为 PTGS1 和 PTGS2。PTGS1 和 PTGS2 是前列腺素(PG)合成所必需的2个催化酶,PG则可刺激垂体前叶分泌 LH 和 FSH^[37]。PTGS2 还可产生一些分子信号,诱导 LH、FSH 等与相应受体结合^[38]。根据成分-靶点图,槲皮素、山柰素、 β -谷甾醇、脱水淫羊藿素、(S)-氢化小檗碱、豆甾醇等成分均可作用于 PTGS1 和 PTGS2。因此,知柏地黄丸可能通过作用 PTGS1 和 PTGS2 拮抗 PG,从而影响垂体前叶对 LH 和 FSH 的分泌作用、性激素的释放及其与受体结合等功能。

3.3 PPI 网络

PPI 网络是由单个蛋白之间通过相互作用构成,表示参与生物信号传递、基因表达调节、能量和物质代谢及细胞周期调控等生命过程的各个环节,对了解蛋白之间的功能联系有重要意义。已知 Akt1、MAPK14、IL-6、IL-1 β 、IL-4、IL-10、IL-2、EGF、FOS 等为 PPI 网络度值较高的蛋白。在 PPI 中, Akt1、MAPK14 参与磷酸酶结合功能。Akt1 为 3 种密切相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶之一,主要调节代谢、增殖、细胞存活等过程^[39]。已知, Akt1 参与的磷酸酶结合功能是胰岛素样生长因子 1(IGF1)和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)介导脂肪细胞分化作用所必需的, IGF1 是前脂肪细胞存活、增殖和分化必不可少的介质^[40]。而 PI3K 则是脂肪细胞生物活性特定的信号传导途径,抑制 PI3K 会显著损害前脂肪细胞的分化^[41]。因此, Akt1 参与的磷酸酶结合与脂肪代谢相关。MAPK14 主要参与调节卵巢细胞功能的活动,包括卵丘卵母细胞(COC)的膨胀和类固醇激素的生成^[42]。MAPK 也是连接细胞膜表面受体与决定性基因表达之间的重要信号调节酶之一,其蛋白质磷酸化是快速传递细胞内信号的重要途径,也是快速调节细胞对外界反应的基础^[43]。因此, MAPK14 通过磷酸酶结合发挥信号通路作用,在细胞因子产生、转录调节中起重要作用^[44]。IL-6、IL-1 β 、IL-1、IL-2 均为细胞因子,GO 富集提示,其主要参与细胞因子活性、生长因子受体结合、受体配体活性功能。其中, IL-6 与瘦素在脂质代谢和体质量增加方面具有显著的功能^[45]。IL-1 β 则可参与骨细胞代谢调节,在一定剂量下,对成骨细胞表型具有显著拮抗作用^[46]。

另外, IL-1 β 和 IL-6 可协同刺激小鼠颅骨成骨细胞中前列腺素 E₂ (PGE₂),从而促进合成环加氧酶-2(COX-2)和酪氨酸激酶,为鼠成骨细胞中 PTGS2 表达的有效刺激因子^[47]。IL-6、IL-1 β 与性早熟导致儿童骨龄提前、骨骺融合过早等临床特征相关^[48]。IL-1 β 还可通过参与蛋白酶合成、PG 产生和颗粒细胞类固醇激素生成过程,进而参与机体的排卵,并激活人体颗粒-叶黄素细胞中的细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 和 p38 途径,增加环状单磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化来刺激孕酮的合成^[49]。而 IL-10 则具有抑制炎症反应和抑制基因转录作用^[50],实验发现,激活骨骼肌中 IL-10 信号, IL-10 可通过糖异生途径改善慢性高脂饮食的肥胖小鼠的葡萄糖代谢,改善胰岛素抵抗^[51]。细胞因子 IL-2 与 IL2R 结合后,能促进各种亚型淋巴细胞活化。已知 PI3K/Akt 通路在 T 细胞活化和生长的合成代谢管理中发挥作用^[52]。因此, IL-2 受体配体活性功能也参与了 PI3K/Akt 通路。FOS 在骨骼细胞的形成和发育方面起着关键作用,其在骨组织中的表达受 ADRB2、p38MAPK 等多种因素调节^[53]。被 MAPK 磷酸化后可改变其活性与稳定性^[54]。在 KEGG 通路中, FOS 与作用靶点 MAPK14 间存在内分泌阻力、MAPK 信号通路等通路。EGF 可直接影响卵巢内分泌功能,表现为抑制 E₂ 合成分泌,促进孕酮合成代谢,还可促进垂体分泌 FSH 和 LH^[55],还是促卵泡 LH 信号的关键传递子,对卵母细胞的发育和成熟至关重要^[56]。在 PPI 中, EGF 主要是与 Akt1、IGF2 通过 PIK3/Akt 信号通路和 MAPK 信号通路发生联系。

3.4 KEGG 通路

通过 KEGG 通路发现,知柏地黄丸的作用靶点主要富集于色氨酸代谢、类固醇激素生物合成等信号通路。已知色氨酸代谢作为细胞和组织沟通的一部分,其代谢的底物在免疫反应和神经传递等途径中发挥作用^[57]。而单胺类氧化酶 A(MAOA)和单胺类氧化酶 B(MAOB)在 PPI 中参与了色氨酸代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,苯丙氨酸代谢,组氨酸代谢,酪氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 6 条通路。普遍认为,单胺氧化酶与神经变性、神经递质代谢紊乱相关,MAOA 为 5-羟色胺和肾上腺素的底物,并在脑内分布在肾上腺素能神经元,而 MAOB 分布在 5-羟色胺能神经元和神经胶质细胞^[58]。因此,MAOA

和 MAOB 在 KEGG 通路上参与神经递质代谢。已知知柏地黄丸治疗性早熟的作用可能与抑制 HPGA 功能提前发动有关,并抑制机体分泌雄激素、 E_2 等类固醇激素参与第二性征发育^[59]。在 KEGG 通路中,参与类固醇激素合成信号通路的有 CYP3A4、CYP1A2、CYP1A1 及 CYP1B1,为细胞色素 P450 家族,能将性激素等类固醇激素氧化,参与类固醇代谢途径^[60]。而该通路上的醛酮还原酶 1C3 (AKR1C3) 则减少 E_2 、睾酮等类固醇激素和 PG,并参与外源性生物转化,影响增殖信号通路^[61]。而参与类固醇合成功能的有 PGR、ESR1、ESR2、AR 等靶点,为知柏地黄丸主要的作用靶点。因此,考虑知柏地黄丸通过抑制该通路上的信号传递以达到治疗性早熟的目的。

综上所述,知柏地黄丸中的槲皮素、山柰素、 β -谷甾醇、脱水淫羊藿素、(S)-氢化小檗碱、豆甾醇等主要活性成分作用于 PTGS2、PTGS1、ADRB2、PGR、AR、ESR1、GABRA1、NR3C1 等靶点和色氨酸代谢、类固醇激素生物合成等信号通路,在分子水平上综合调控性早熟。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 性早熟诊疗试行指南 [EB/OL]. (2010-12-07) [2020-03-08]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxwj/201304/96b3668491d94d5284562ff61fc2446a.shtml>.
- [2] 林魁,杨文庆,俞建. 中医儿科临床诊疗指南·性早熟(修订)[J]. 中医儿科杂志,2016,12(3):1-5.
- [3] 任娟,李辉,叶进. 单纯乳房早发育的中医药治疗现状[J]. 中医儿科杂志,2019,15(6):113-116.
- [4] 张穗洪. 知柏地黄丸化裁方治疗儿童特发性性早熟的疗效分析[J]. 中国中西医结合儿科学,2019,11(4):356-358.
- [5] 刘超,汪治华,王旭艳,等. 知柏地黄丸联合亮丙瑞林治疗女童中枢性性早熟的效果分析[J]. 药物评价研究,2019,42(8):1592-1595.
- [6] 郑怜玉,杨文庆,李淑闽. 知柏地黄丸治疗对部分性早熟转为中枢性性早熟比率的影响[J]. 中国医药指南,2019,17(19):1-2.
- [7] 傅倩云,梁家红,戴燕青,等. 知柏地黄丸辅助治疗儿童中枢性性早熟有效性和安全性的系统评价[J]. 中国现代应用药学,2020,37(1):85-90.
- [8] LIU H, WANG J N, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice[J]. J Ethnopharmacol, 2013,146(3):773-793.
- [9] 刘鑫旭,吴嘉瑞,简梦娟,等. 基于网络药理学的四君子汤作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):194-202.
- [10] 马勤旭. 儿童性早熟性激素水平及性早熟发生影响因素分析[J]. 中国高等医学教育,2018(4):136,147.
- [11] HABIB W A, BRIOUDE F, AZZI S, et al. Transcriptional profiling at the *DLKI/MEG3* domain explains clinical overlap between imprinting disorders[J]. Sci Adv,2019,5(2):9425.
- [12] 郭兰芳,杨敏,周梦婕,等. 特发性中枢性性早熟女性患儿血浆中 Kisspeptin 及骨钙素水平研究[J]. 中国妇幼保健,2015,30(34):6023-6025.
- [13] 张庆梅,尚清,马彩云,等. 滋肾疏肝泻火方对特发性性早熟女童第二性征和生长发育的影响[J]. 南京中医药大学学报,2016,32(6):524-527.
- [14] SIROTKIN A V, ŠTOCHMAL'OVÁ A, ALEXA R, et al. Quercetin directly inhibits basal ovarian cell functions and their response to the stimulatory action of FSH[J]. Eur J Pharmacol,2019,860:172560.
- [15] CAL DERÓN-MONTAÑO J M, BURGOS-MORÓN E, PÉREZ-GUERRERO C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol[J]. Mini Rev Med Chem,2011,11(4):298-344.
- [16] LEE H Y, LEE Y J, AHN M B, et al. The effect of overweight on the luteinizing hormone level after gonadorelin stimulation test in girls with idiopathic central precocious puberty[J]. Ann Pediatr Endocrinol Metab, 2018,23(4):215-219.
- [17] 杨绿绿,毕丹东,梁世山,等. 102 例性早熟女童性器官发育及血清激素水平分析[J]. 中外医疗,2016,35(23):29-32.
- [18] REN J, LU Y, QIAN Y, et al. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases[J]. Exp Ther Med,2019,18(4):2759-2776.
- [19] RYÖKKYNE A, KÄYHKÖ U R, MUSTONEN A M, et al. Multigenerational exposure to phytosterols in the mouse[J]. Reprod Toxicol,2005,19(4):535-540.
- [20] CHATTOPADHYAY D, DUNG DUNG S R, MANDAL A B, et al. A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract[J]. Contraception, 2005,71(5):372-378.
- [21] BIN SAYEED M S, KARIM S M R, SHARMIN T, et al. Critical analysis on characterization, systemic effect, and

- therapeutic potential of beta-sitosterol: A plant-derived orphan phytosterol [J]. *Medicines (Basel)*, 2016, 3(4):E29.
- [23] ZHENG Z G, ZHOU Y P, ZHANG X, et al. Anhydroicaritin improves diet-induced obesity and hyperlipidemia and alleviates insulin resistance by suppressing SREBPs activation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 122:42-61.
- [24] 谢治深, 赵振彪, 张振强, 等. SREBPs 天然小分子抑制剂的药理学研究进展[J]. *中国药房*, 2018, 29(10): 1435-1440.
- [25] 张经纬, 张正红, 王正朝. 黄体类固醇激素受体的结构功能及其生理调节[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(8):1628-1632.
- [26] AKISON L K, ROBKER R L. The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction [J]. *Zuchthygiene*, 2012, 47(Suppl 4):288-296.
- [27] FELDMAN R D, LIMBIRD L E. GPER (GPR30): A nongenomic receptor (GPCR) for steroid hormones with implications for cardiovascular disease and cancer [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57:567-584.
- [28] 林燕燕, 俞建. 雌激素受体与青春期发育研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(12):3176-3178.
- [29] CHANG C, LEE S O, WANG R S, et al. Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems; Lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells [J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(1):21.
- [30] 王海飞, 刘萍, 赵西彪, 等. *gabral* 基因在小梅山猪和苏姜猪下丘脑中表达量的比较[J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2008, 28(3):72-74.
- [31] NICOLAIDES N C, CHARMANDARI E. Glucocorticoid resistance [J]. *Gene Endocrine Dis Syndrom*, 2019, 111:85-102.
- [32] 王小燕, 谷伟军, 窦京涛, 等. 先天性肾上腺皮质增生症临床特点及转归分析[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(9):922-925.
- [33] SEFTON C, HARNO E, DAVIES A, et al. Elevated hypothalamic glucocorticoid levels are associated with obesity and hyperphagia in male mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(11):4257-4265.
- [34] 史正刚, 潘翌翌, 张士卿. 知柏地黄丸对肾上腺皮质激素型肾阴虚幼龄大鼠血浆 CORT、ACTH、CRH 及肾上腺指数和组织学结构的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2006, 12(3):167-171.
- [35] 涂彩霞, 李惠英, 任丹阳, 等. *ADRB2* 基因多态性在疾病中的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2018, 45(6):412-415.
- [36] 乔琳琳, 李怡. 小檗碱与代谢综合征 [C] // 中华中医药学会糖尿病分会. 5TH 全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病论坛论文集. 北京: 中华中医药学会糖尿病分会, 2012:533-536.
- [37] 史洪才, 冯利君, 白杰, 等. 策勒黑羊 *Fec^B* 突变与卵泡发育相关基因的表达水平 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(4):807-811.
- [38] 海日汗, 张通, 王兆琛, 等. C 型钠肽预处理对绵羊卵母细胞体外成熟及相关基因表达的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(7):49-54.
- [39] SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(1):59-71.
- [40] LIU P, KONG F, WANG J, et al. Involvement of IGF-1 and MEOX2 in PI3K/Akt1/2 and ERK1/2 pathways mediated proliferation and differentiation of perivascular adipocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 331(1):82-96.
- [41] CLEVELAND-DONOVAN K, MAILE L A, TSIARAS W G, et al. IGF-I activation of the AKT pathway is impaired in visceral but not subcutaneous preadipocytes from obese subjects [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(8):3752-3763.
- [42] LIU Z L, FAN H Y, WANG Y B, et al. Targeted disruption of MAPK14 (p38MAPKalpha) in granulosa cells and cumulus cells causes cell-specific changes in gene expression profiles that rescue COC expansion and maintain fertility [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(9):1794-1804.
- [43] 赵东杰, 李琪, 王玉华, 等. 针刺对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白酶和血清白介素 1β 的影响 [J]. *环球中医药*, 2019, 12(4):486-492.
- [44] MĂRGINEAN C O, MĂRGINEAN C, MELIȚ L E. New insights regarding genetic aspects of childhood obesity: A minireview [J]. *Front Pediatr*, 2018, 6:271.
- [45] KIM C H, KANG B S, LEE T K, et al. IL-1beta regulates cellular proliferation, prostaglandin E2 synthesis, plasminogen activator activity, osteocalcin production, and bone resorptive activity of the mouse calvarial bone cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2002, 24(3):395-407.
- [46] PARK Y G, KANG S K, KIM W J, et al. Effects of TGF-beta, TNF-alpha, IL-beta and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on cyclooxygenase expression, prostaglandin E2 production and bone resorption in mouse calvarial bone cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(11):2270-2280.

- [48] 杨运,茹锦岩. 中医辨证联合西药治疗女童特发性性早熟的有效性研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(6): 1278-1280.
- [49] DANG X, ZHU Q, WANG Y, et al. IL-1 β upregulates StAR and progesterone production through the ERK1/2-and p38-mediated CREB signaling pathways in human granulosa-lutein cells[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(10): 3281-3291.
- [50] DU J, ZHANG J, ZOU D X, et al. Effects of interleukin-10 gene deficiency on hepatic biochemical metabolism in mice[J]. *Clin Exp Med*, 2015, 15(3): 321-325.
- [51] DAGDEVIREN S, JUNG D Y, LEE E, et al. Altered interleukin-10 signaling in skeletal muscle regulates obesity-mediated inflammation and insulin resistance[J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(23): 2956-2966.
- [52] VALENCIA A O, KNIRSCH M C, FERRO E S, et al. Interleukin-2 as immunotherapeutic in the autoimmune diseases[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106296.
- [53] 刘文和. 原癌基因 c-fos 与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(10): 770-775.
- [54] 曹锡文, 刘文和. 原癌基因 c-fos 及其相关因子[J]. 湖南学院学报(医学版), 2011, 13(1): 70-73.
- [55] 曹金玲, 丁青. 右归丸干预自身免疫性卵巢早衰小鼠 EGF 的实验研究[J]. 中医临床研究, 2014, 6(31): 3-6.
- [56] RICHANI D, GILCHRIST R B. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence [J]. *Hum Reprod Update*, 2018, 24(1): 1-14.
- [57] PLATTEN M, NOLLEN E A A, RÖHRIG U F, et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 379-401.
- [58] 李静, 王秀英, 孙伟. 单胺氧化酶抑制剂在神经变性疾病中的研究进展[J]. 首都医药, 2003, 10(16): 17-19.
- [59] 刘孟渊, 徐雯, 肖柳英, 等. 知柏地黄丸对抑那通诱导特发性性早熟小鼠模型的干预作用[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(8): 67-69.
- [60] WANG Y, LI X L, GAO Y Y, et al. Genetic polymorphisms of CYP3A4 among Chinese patients with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(44): e5332.
- [61] PLAVŠA J J, ŘEZÁČOVÁ P, KUGLER M, et al. *In situ* proteolysis of an N-terminal His tag with thrombin improves the diffraction quality of human aldo-keto reductase 1C3 crystals[J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2018, 74(Pt 5): 300-306.

(收稿日期: 2020-03-28 编辑: 田苗)

(上接第 474 页)

- [6] 高淑怡, 李卫民, 高英. HPLC 法测定百合、卷丹、细叶百合中 3 种甾体皂苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 675-678.
- [7] 傅春燕, 刘永辉, 李明娟, 等. HPLC 测定中药百合中 2 个甾体皂苷的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1250-1252.
- [8] 蔡萍, 何丹, 陈林, 等. 高效液相色谱-飞行时间-串联质谱和随机森林算法的蜜炙百合与生百合指纹图谱研究[J]. 分析科学学报, 2019, 35(4): 474-478.
- [9] 聂慧, 严辉, 钱大玮, 等. 百合药材 UPLC 特征图谱及特征峰 QTOF-MS 分析研究[J]. 中药材, 2013, 36(7): 1087-1092.
- [10] 曲伟红, 周日宝, 童巧珍, 等. 百合产地加工方法对百合质量影响的研究[J]. 湖南中医杂志, 2004, 20(4): 73-75.
- [11] 刘畅宇, 周日宝, 陈勋, 等. 百合药材质量标准研究进展[J]. 中医药导报, 2018, 24(16): 117-120.
- [12] 周日宝, 曲伟红, 童巧珍, 等. 中药材百合质量标准的研究[J]. 湖南中医药导报, 2004, 10(4): 70-71.
- [13] 梁军, 刘彩凤, 刘冬涵, 等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(2): 356-363.
- [14] 徐男, 孙蓉, 李元媛, 等. 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1682-1689.

(收稿日期: 2020-03-03 编辑: 王笑辉)