

## · 基础研究 ·

# 基于网络药理学和分子对接的当归六黄汤治疗围绝经期综合征作用机制研究<sup>△</sup>

汤春花, 梁凤友, 高永坚, 曾杉, 李秀娟, 陈雨平, 李静荣\*

国药集团广东环球制药有限公司, 广东 佛山 528305

**[摘要]** **目的:** 采用网络药理学和分子对接技术研究当归六黄汤治疗围绝经期综合征(PMS)的作用机制。**方法:** 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和UniProt数据库检索当归六黄汤的活性成分和相应的靶点。基于GeneCards、DrugBank、OMIM数据库获取与PMS相关的靶点,并得到当归六黄汤与PMS的交集靶点。构建当归六黄汤活性成分-交集靶点相互作用网络。利用STRING在线数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,筛选核心靶点。采用Metascape在线数据库进行基因本体(GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集。通过Discovery Studio 2016进行分子对接,确定关键活性成分与核心靶点相互作用的分子基础。**结果:** 共获取当归六黄汤112个活性成分,经筛选得到5个关键活性成分,分别为槲皮素、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、山柰酚、7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇,主要发挥抗炎和雌激素样作用。获取当归六黄汤与PMS的交集靶点52个,经筛选得到5个核心靶点,分别是白细胞介素-6(IL-6)、前列腺素G/H合酶2(PTGS2)、雌激素受体1(ESR1)、IL-1B和糖皮质激素受体基因亚科3C组成员1(NR3C1),主要参与炎症反应和激素调节。KEGG富集分析显示,当归六黄汤治疗PMS主要通过化学致癌-受体激活、脂质和动脉粥样硬化、癌症、神经活性配体-受体相互作用、流体剪切应力和动脉粥样硬化、5-羟色胺能突触、雌激素信号通路、突触小泡循环、腺苷酸依赖的蛋白激酶(AMPK)信号通路等发挥作用。分子对接结果验证了当归六黄汤的关键活性成分可以与核心靶点蛋白形成稳定的对接模型。**结论:** 基于网络药理学和分子对接技术,筛选出当归六黄汤治疗PMS的关键活性成分、核心靶点和主要信号通路,为当归六黄汤治疗PMS提供了参考。

**[关键词]** 当归六黄汤;围绝经期综合征;网络药理学;分子对接;作用机制

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)10-1916-10

**doi:** 10.13313/j.issn.1673-4890.20220401001

## Mechanism of Danggui Liu Huang Decoction in the Treatment of Perimenopausal Syndrome Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

TANG Chun-hua, LIANG Feng-you, GAO Yong-jian, ZENG Shan, LI Xiu-xian, CHEN Yu-ping, LI Jing-rong\*

Sinopharm Group Guangdong Medi-World Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528305, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of Danggui Liu Huang Decoction (DGLHD) in the treatment of perimenopausal syndrome (PMS) via network pharmacology and molecular docking. **Methods:** The active ingredients and corresponding targets of DGLHD were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and UniProt. The PMS-related targets were obtained from GeneCards, DrugBank, and OMIM. The common targets shared by DGLHD and PMS were identified. The DGLHD active ingredient-common target network was constructed. The protein-protein interaction (PPI) was predicted via STRING online to screen out the core targets. Gene ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment were performed with Metascape. Molecular docking was simulated in Discovery Studio 2016 to determine the molecular basis for the interaction of key active ingredients with core targets. **Results:** A total of 112 active ingredients of DGLHD were obtained. Five key active ingredients were screened out, including quercetin, stigmasterol, beta-sitosterol, kaempferol, and

<sup>△</sup> [基金项目] 佛山市重点领域科技攻关项目(2120001007987)

\* [通信作者] 李静荣, 副研究员, 研究方向: 中药分析与经典名方研究; E-mail: li-jr2005@163.com

7-O-methylisomucronulatol, which mainly exerted anti-inflammatory and estrogen-like effects. DGLHD and PMS shared 52 common targets, among which 5 core targets were screened out, including interleukin-6 (IL-6), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), estrogen receptor 1 (ESR1), IL-1B, and nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1). The core targets were mainly involved in inflammatory response and hormone regulation. KEGG enrichment analysis predicted that DGLHD treated PMS mainly through chemical carcinogenesis-receptor activation, lipid and atherosclerosis, pathways in cancer, neuroactive ligand-receptor interaction, fluid shear stress and atherosclerosis, serotonergic synapse, estrogen signaling pathway, synaptic vesicle cycle, and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. The molecular docking results verified that the key active components of DGLHD can form a stable docking model with the core targets. **Conclusion:** The key active components, core targets, and main signaling pathways of DGLHD in the treatment of PMS were screened out via network pharmacology and molecular docking, which provided a theoretical basis for the application of DGLHD in the treatment of PMS.

**[Keywords]** Danggui Liu Huang Decoction; perimenopausal syndrome; network pharmacology; molecular docking; mechanism

多数45~55岁的女性体内雌激素和孕激素逐渐减少, 月经周期的频率发生改变, 最初被称为更年期前期, 月经停止12个月时, 被称为更年期, 也称围绝经期(perimenopausal)。这一阶段除了月经周期的改变外, 还会出现如潮热、盗汗、失眠、情绪低落、泌尿生殖系统不适等症状, 这一系列的表现也称为围绝经期综合征(perimenopausal syndrome, PMS)<sup>[1-2]</sup>。目前临床上对于PMS多采用雌激素替代疗法, 但这一疗法不良反应较大、疗效不理想<sup>[3-4]</sup>, 许多人无法耐受。因此, 亟须进一步探讨PMS的发病机制, 为PMS的治疗提供新的安全、有效、耐受的治疗药物。

中医理论中, 雌激素和其他激素统称为精, 精藏在中医的“肾”实体中, 是所有阴阳的起源。PMS是由于精的减少, 导致阴阳之间的平衡紊乱等多种症状, 潮热盗汗即是阴无法抑制阳的活动的信号。《黄帝内经》中描述围绝经期: “女子七七任脉虚, 太冲脉衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形坏而无子也。”<sup>[5]</sup> “天癸”是肾精肾气充盛到一定程度时, 体内出现的具有促进生长、发育、生殖的一种物质, 故PMS的发生主要以肾虚为主。栗春芳等<sup>[6]</sup>认为肾为五脏阴阳之本, 肾虚导致脏腑功能失调, 出现各种临床症状。综上, 肾阴虚是PMS发生的根本原因, 肾阴不足, 不能上济心火, 则心火偏亢, 至虚火伏藏阴分, 寐则卫气行于阴, 助长阴分伏火, 两阳相加, 迫使阴液汗出而盗汗。

当归六黄汤源于金代名医李杲的《兰室秘藏》, 由当归、生地黄、熟地黄、黄芩、黄柏、黄连、黄芪7味药组成, 功能主治为滋阴泻火、固表止汗<sup>[7]</sup>, 《兰室秘藏》卷下称当归六黄汤为“治盗汗之圣药也”<sup>[8]</sup>。现代研究表明, 当归六黄汤治疗阴虚火旺型

围绝经期综合征疗效确切, 治疗后患者雌二醇水平显著高于化学药组, 黄体生成素、卵泡刺激素显著低于化学药组, 且不良反应发生率低, 用药安全性更高<sup>[9]</sup>。但当归六黄汤治疗PMS的作用机制尚不明确。

本研究采用网络药理学, 通过多组分、多靶点、多通路的筛选, 网络可视化和网络拓扑学分析, 阐明药物、靶点和疾病之间复杂的网络关系, 预测和分析中药的多靶点作用机制, 为当归六黄汤治疗PMS提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 当归六黄汤活性成分和靶点筛选

分别以当归、黄芪、熟地黄、生地黄、黄芩、黄连、黄柏为关键词在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索当归六黄汤的全部活性成分, 建立当归六黄汤化学成分数据库。采用口服生物利用度(OB)、类药性(DL)2项指标评价当归六黄汤活性成分的成药性。设置OB≥30%、DL≥0.18筛选活性成分, 并获取活性成分对应蛋白靶点。将蛋白靶点数据输入UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>), 选择物种为人, 进行归一化和标准化命名, 删除没有对应基因名称的目标蛋白, 获得活性成分对应的靶点基因。通过文献报道<sup>[10]</sup>完善生地黄的活性成分和靶点信息。

### 1.2 PMS靶点筛选及其与活性化合物交集靶点的分析

通过GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、

DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库获取与PMS相关的靶点, 将1.1项下获取的活性成分靶点和PMS疾病靶点导入微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线作图网站, 绘制韦恩图, 得到活性成分-PMS的交集靶点。

### 1.3 药物-活性成分-交集靶点网络构建

将1.2项下获取的活性成分和对应的交集靶点数据导入Cytoscape 3.7.1软件, 建立药物-活性成分-交集靶点网络图, 并采用软件中的“Network Analyzer”功能进行网络拓扑分析, 筛选出核心活性成分和潜在靶点。

### 1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及拓扑分析

将1.2项下获取的交集靶点导入STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库, 选择“Multiple proteins”, 种属设置为“Homo sapiens”, Interaction score设定为0.400, 并选择隐藏散在的节点, 获取交集靶点的PPI网络。将PPI网络的结果导入Cytoscape 3.7.1软件中进行可视化分析, 通过CytoNCA插件进行拓扑学分析, 分别以度值 (degree, 表示某一节点与其他节点的连接性)、中间中心性 (betweenness centrality, BC, 表示经过某一节点的最短路径的数量)、接近中心性 (closeness centrality, CC, 表示某一节点与网络中其他节点的平均距离) 的中位数为条件, 筛选确定核心靶点。

### 1.5 交集靶点的基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

将1.2项下获得的交集靶点导入metascape在线数据库 (<https://metascape.org/>), 进行GO功能注释和KEGG通路富集分析。其中, GO富集分析通过3个维度来解释和注释基因, 包括细胞组分 (CC)、

分子功能 (MF) 和生物过程 (BP) 分析; 而KEGG通路富集主要进行路径分析。分析物种为“Human (智人)”, 每条通路至少包含3个基因,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 1.6 药物成分-核心靶点分子对接验证

利用Discovery Studio 2016软件对当归六黄汤关键活性成分与核心靶点的结合能力进行对接预测。当归六黄汤关键活性成分的.Mol2格式文件和蛋白质的.PDB格式文件分别从TCMSP和PDB数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载。导入后, 将目标蛋白的所有晶体水分子清除, 采用软件中的“prepare protein”模块对蛋白质受体进行去除原配体、水分子及添加氢原子等预处理并寻找活性口袋。对小分子配体进行能量最小化处理, 并将小分子配体的所有柔性键设置为可旋转, 应用软件中的CDOCKER功能对核心靶点蛋白受体和活性成分小分子配体进行分子对接。以目标蛋白与配体之间的氢键、静电相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 键或范德华力等各种键能来计算两者的结合能。结合能表示为负数, 数值越高表示结合能力越强, 结合越稳定。受体蛋白和小分子之间相互作用以2D结构表示。

## 2 结果

### 2.1 当归六黄汤活性成分和靶点筛选结果

通过TCMSP共检索到当归六黄汤主要活性化合物111个, 其中当归2个、黄芪20个、熟地黄2个、黄芩36个、黄连14个、黄柏37个。进一步得到活性成分对应的蛋白靶点, 删除无对应蛋白靶点的活性成分。将蛋白靶点数据输入UniProt数据库进行比对和矫正, 删除无对应靶点基因的靶蛋白, 输出对应的靶点基因。与此同时, 通过查阅文献<sup>[10]</sup>完善了生地黄的活性成分1个和靶点基因38个, 共获得活性成分86个和对应靶点基因216个。活性成分见表1。

表1 当归六黄汤主要活性成分

化合物名称	Mol ID	OB/%	DL	药物来源	编号
金合欢素 (acacetin)	MOL001689	34.97	0.24	HQN	HQN1
汉黄芩素 (wogonin)	MOL000173	30.68	0.23	HQN	HQN2
(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	MOL000228	55.23	0.20	HQN	HQN3
黄芩素 (baicalein)	MOL002714	33.52	0.21	HQN	HQN4
5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	MOL002909	33.82	0.45	HQN	HQN5
红花素 (carthamidin)	MOL002910	41.15	0.24	HQN	HQN6
dihydrobaicalin_qt	MOL002913	40.04	0.21	HQN	HQN7

续表1

化合物名称	Mol ID	OB/%	DL	药物来源	编号
eriodictiol/flavanone	MOL002914	41.35	0.24	HQN	HQN8
三裂鼠尾草素 (salvigenin)	MOL002915	49.07	0.33	HQN	HQN9
5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	MOL002917	45.05	0.33	HQN	HQN10
千层纸素 A (oroxylin A)	MOL002928	41.37	0.23	HQN	HQN11
黄芩黄酮 I (panicolin)	MOL002932	76.26	0.29	HQN	HQN12
5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	MOL002933	36.56	0.27	HQN	HQN13
黄芩新素 (neobaicalein)	MOL002934	104.34	0.44	HQN	HQN14
二氢木蝴蝶素 A (dihydrooroxylin A)	MOL002937	66.06	0.23	HQN	HQN15
去甲汉黄芩素 (norwogonin)	MOL000525	39.40	0.21	HQN	HQN16
5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	MOL000552	31.71	0.35	HQN	HQN17
(+)-表儿茶素 (ent-epicatechin)	MOL000073	48.96	0.24	HQN	HQN18
bis[(2S)-2-ethylhexyl]benzene-1,2-dicarboxylate	MOL001490	43.59	0.35	HQN	HQN19
异丙烯基-2,3-二羟基-1,4-双二苯基膦丁烷 (diop)	MOL002879	43.59	0.39	HQN	HQN20
苏莽苈黄酮 (moslosooflavone)	MOL008206	44.09	0.25	HQN	HQN21
11,13-eicosadienoic acid, methyl ester	MOL010415	39.28	0.23	HQN	HQN22
5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	MOL012245	36.63	0.27	HQN	HQN23
5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	MOL012246	74.24	0.26	HQN	HQN24
黄芩黄酮 (rivularin)	MOL012266	37.94	0.37	HQN	HQN25
phellavin_qt	MOL002641	35.86	0.44	HB	HB1
delta 7-stigmastenol	MOL002643	37.42	0.75	HB	HB2
珊瑚菜素 (phellopterin)	MOL002644	40.19	0.28	HB	HB3
脱氢丹参酮 II <sub>A</sub> (dehydrotanshinone II <sub>A</sub> )	MOL002651	43.76	0.40	HB	HB4
吴茱萸次碱 (rutaecarpine)	MOL002662	40.30	0.60	HB	HB5
茵芋碱 (skimmianin)	MOL002663	40.14	0.20	HB	HB6
白屈菜红碱 (chelerythrine)	MOL002666	34.18	0.78	HB	HB7
卡文定碱 (cavidine)	MOL002670	35.64	0.81	HB	HB8
蓝堇碱 (fumarine)	MOL000787	59.26	0.83	HB	HB9
四氢非洲防己碱 (isocorypalmine)	MOL000790	35.77	0.59	HB	HB10
黄柏苷 (phellamurin_qt)	MOL001131	56.60	0.39	HB	HB11
(S)-四氢小檗碱[(S)-canadine]	MOL001455	53.83	0.77	HB	HB12
poriferast-5-en-3beta-ol	MOL001771	36.91	0.75	HB	HB13
菜油甾醇 (campesterol)	MOL005438	37.58	0.71	HB	HB14
芬氏唐松草定碱 (thalifendine)	MOL006422	44.41	0.73	HB	HB15
(R)-四氢小檗碱[(R)-canadine]	MOL002903	55.37	0.77	HL	HL1
小檗浸碱 (berlambine)	MOL002904	36.68	0.82	HL	HL2
corchoroside A_qt	MOL002907	104.95	0.78	HL	HL3
丁子香萜 (mairin)	MOL000211	55.38	0.78	HQ	HQ1
华良姜素 (jaranol)	MOL000239	50.83	0.29	HQ	HQ2
常春藤皂苷元 (hederagenin)	MOL000296	36.91	0.75	HQ	HQ3
(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	MOL000033	36.23	0.78	HQ	HQ4
异鼠李素 (isorhamnetin)	MOL000354	49.60	0.31	HQ	HQ5
3,9-di-O-methylnissofin	MOL000371	53.74	0.48	HQ	HQ6
7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇 (7-O-methylisomucronulatol)	MOL000378	74.69	0.30	HQ	HQ7
9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside	MOL000379	36.74	0.92	HQ	HQ8
(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	MOL000380	64.26	0.42	HQ	HQ9
联苯双酯 (bifendate)	MOL000387	31.10	0.67	HQ	HQ10

续表1

化合物名称	Mol ID	OB/%	DL	药物来源	编号
芒柄花黄素 (formononetin)	MOL000392	69.67	0.21	HQ	HQ11
毛蕊异黄酮 (calycosin)	MOL000417	47.75	0.24	HQ	HQ12
山柰酚 (kaempferol)	MOL000422	41.88	0.24	HQ	HQ13
叶酸 (FA)	MOL000433	68.96	0.71	HQ	HQ14
1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	MOL000442	39.05	0.48	HQ	HQ15
$\beta$ -谷甾醇 (beta-sitosterol)	MOL000358	36.91	0.75	DG、SED、HQN、HB	A1
豆甾醇 (stigmasterol)	MOL000449	43.83	0.76	DG、SUD、HQN、HB	B1
槲皮素 (quercetin)	MOL000098	46.43	0.28	HQ、HL、HB	C1
黄连碱 (coptisine)	MOL001458	30.67	0.86	HL、HQN、HB	D1
谷甾醇 (sitosterol)	MOL000359	36.91	0.75	SUD、HQN	E1
表小檗碱 (epiberberine)	MOL002897	43.09	0.78	HL、HQN	F1
黄连素 (berberine)	MOL001454	36.86	0.78	HL、HB	G1
小檗红碱 (berberrubine)	MOL002894	35.74	0.73	HL、HB	G2
广玉兰内酯 (magnograndiolide)	MOL000622	63.71	0.19	HL、HB	G3
非洲防己碱 (palmatine)	MOL000785	64.60	0.65	HL、HB	G4
甲基黄连碱 (worenine)	MOL002668	45.83	0.87	HL、HB	G5

注: HQN.黄芩; HB.黄柏; HL.黄连; HQ.黄芪; DG.当归; SED.生地黄; SUD.熟地黄。

## 2.2 PMS靶点及其与活性化合物交集靶点分析

获取PMS相关的843个靶点基因,将其与当归六黄汤活性化合物的216个靶点基因一并导入微生物在线作图网站,绘制韦恩图,取交集得到活性成分与疾病交集靶点基因共52个(图1),这些基因被认为是当归六黄汤治疗PMS的潜在作用靶点。

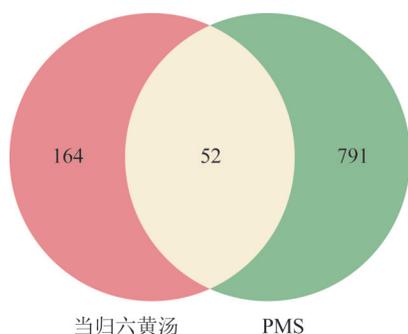


图1 当归六黄汤药物靶点和PMS疾病靶点韦恩图

## 2.3 药物-活性成分-交集靶点网络构建

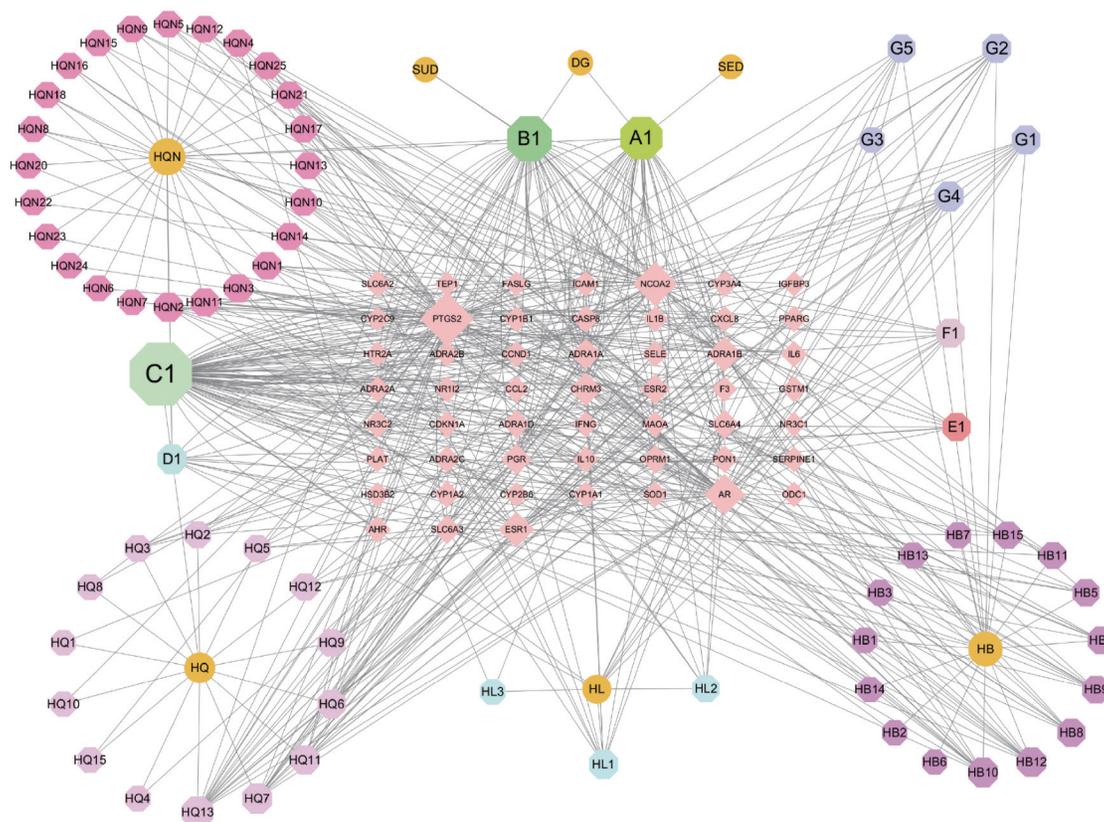
将活性成分和对应的交集靶点导入Cytoscape 3.7.1软件建立药物-活性成分-交集靶点网络,该网络有126个节点、545条边(图2)。并采用软件中的NetworkAnalyzer功能进行网络拓扑分析,筛选出5个关键活性成分,见表2。

## 2.4 PPI网络构建及拓扑分析

将上述52个交集靶点导入STRING网站构建PPI网络,隐藏游离节点。将获得的PPI网络的.TSV格式文件导入Cytoscape 3.7.1软件进行可视化分析,得到含51个节点、670条边的网络(图3A)。利用NetworkAnalyzer对PPI网络进行拓扑分析和计算后,进行第一轮筛选,取度值 $\geq 12$ 、 $BC \geq 0.009$ 、 $CC \geq 0.510$ 的靶点,得到含有20个节点、232条边的网络(图3B)。第二轮筛选取度值 $\geq 20$ 、 $BC \geq 0.024$ 、 $CC \geq 0.575$ 的靶点,得到含有5个节点、20条边的网络(图3C)。经过2轮筛选最终得到5个核心靶点,分别为白细胞介素-6(IL-6)、前列腺素G/H合酶2(PTGS2)、雌激素受体1(ESR1)、IL-1B和糖皮质激素受体基因亚科3C组成员1(NR3C1),见表3。

## 2.5 交集靶点的GO功能注释和KEGG富集分析

对52个交集靶点的GO功能注释分析共得到800个条目( $P < 0.05$ ),包括BP 678个、CC 37个、MF 85个。其中BP主要涉及对异种刺激的反应、细胞对有机环状化合物的反应、对类固醇激素的反应、管径调节、异生物分解代谢过程、对脂多糖的反应等;CC主要涉及膜筏、突触前膜的组成部分、转录调节复合物、受体复合物、细胞器外膜等;MF主要集中于 $\alpha$ -肾上腺素能受体活性、核受体活性、



注：圆形代表药物；正八边形代表活性成分；菱形代表靶点基因。

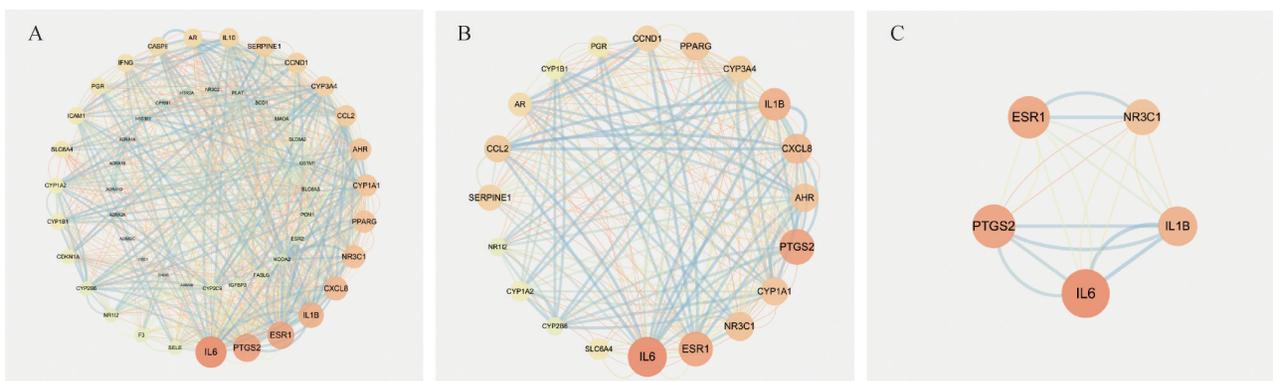
图2 当归六黄汤治疗PMS的药物-活性成分-交集靶点网络

表2 当归六黄汤治疗PMS度值和BC值均在前10的关键活性成分

化合物	度值	BC
槲皮素	90	0.258 959 16
豆甾醇	48	0.080 031 66
$\beta$ -谷甾醇	42	0.070 158 51
山柰酚	17	0.069 456 77
7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇	13	0.021 353 67

雌激素 2-羟化酶活性、细胞因子受体结合等，见图4A。

KEGG 富集分析主要集中在化学致癌-受体激活、脂质和动脉粥样硬化、癌症、神经活性配体-受体相互作用、流体剪切应力和动脉粥样硬化、5-羟色胺能突触、雌激素信号通路、突触小泡循环、AMPK 信号通路等。KEGG 信号通路气泡图如图4B所示。结果提示，发挥抗炎和雌激素样协同作用，



注：A. 交集靶点PPI网络；B. 度值 $\geq 12$ 、BC $\geq 0.009$ 、CC $\geq 0.510$ 的交集靶点；C. 度值 $\geq 20$ 、BC $\geq 0.024$ 、CC $\geq 0.575$ 的交集靶点。

图3 当归六黄汤治疗PMS交集靶点PPI网络

表3 当归六黄汤治疗PMS核心靶点

靶点	度值	BC	CC
IL-6	32	0.133 926 99	0.704 225 35
PTGS2	28	0.057 393 43	0.625 000 00
ESR1	27	0.094 275 46	0.657 894 74
IL-1B	25	0.054 623 22	0.641 025 64
NR3C1	22	0.091 932 08	0.632 911 39

减少癌症和心血管并发症，可能是当归六黄汤治疗PMS的主要机制。

## 2.6 药物成分-核心靶点分子对接验证结果

将2.3项下所得关键活性成分和2.4项下所得的5个核心靶点基因进行分子对接验证，并通过Discovery Studio 2016计算配体与受体的结合能。结果显示当归六黄汤关键活性成分能够与不同核心靶点活性口袋中1个或多个氨基酸残基结合，形成氢键、 $\pi-\pi$ 键或范德华力等，从而形成稳定的对接模式，各化合物与核心靶基因结合能见表4。选择结合能最低的构象（-CDOCKER\_INTERACTION\_ENERGY得分最好）对接结果进行2D可视化展示（图5）。

## 3 讨论

本研究采用网络药理学与分子对接相结合的方法，研究当归六黄汤治疗PMS的潜在活性成分、靶点和作用机制。通过对当归、黄芪、熟地黄、生地黄、黄芩、黄连、黄柏化学成分分析，确定了当归六黄汤中关键活性成分可能为槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、山柰酚和7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇。分子对接结果证明，这些化合物可以与大多数核心靶形成稳定的对接模式。槲皮素和山柰酚是黄酮醇类植物雌激素，其结构与雌二醇结构类似，可以结合雌激素受体并经其介导发挥作用，是很好的雌激素替代药物<sup>[11-12]</sup>。槲皮素和山柰酚还具有抗癌、抗炎、保护血管和神经元等生物活性<sup>[13-15]</sup>。豆甾醇和 $\beta$ -谷甾醇是常见的植物甾醇，被用于治疗各种炎症性疾病<sup>[16]</sup>，研究表明，豆甾醇对毒性诱导的神经元细胞具有很好的保护作用<sup>[17]</sup>。此外， $\beta$ -谷甾醇还具有抗糖尿病、调血脂、抗癌等作用<sup>[18]</sup>。

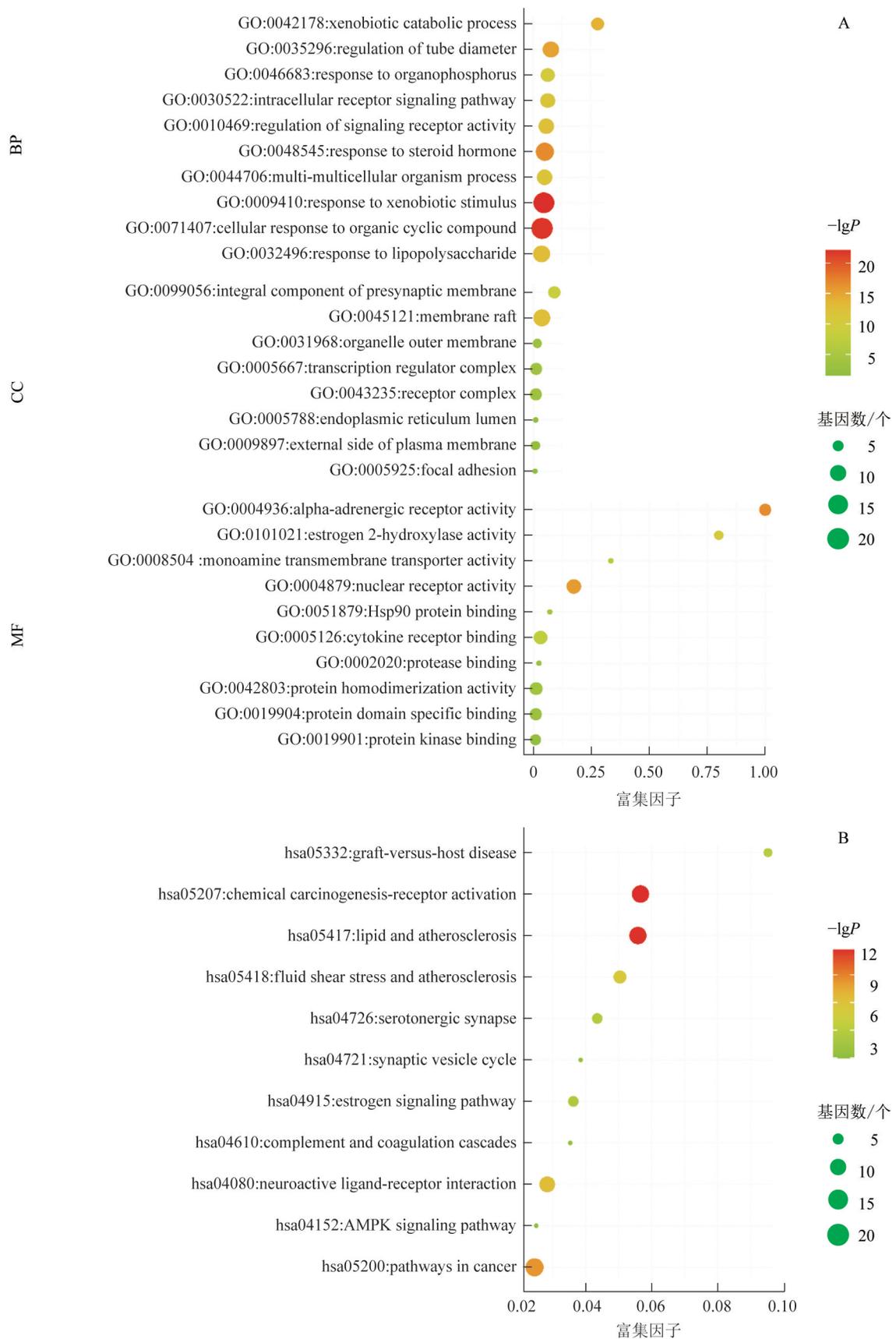
对当归六黄汤和PMS的52个交集靶点基因进行PPI分析，筛选确定了当归六黄汤治疗PMS的5个核心靶基因，即IL-6、PTGS2、ESR1、IL-1B和NR3C1。研究表明，雌激素缺乏会引起女性外阴、阴道和膀

胱尿道区域出现萎缩症状，50%以上的围绝经期女性受之困扰，临床上主要表现为生殖器刺激、干燥和灼热等炎性症状<sup>[19]</sup>。IL-6和IL-1B是细胞因子，可介导炎性反应参与免疫细胞的形成<sup>[20-21]</sup>。PTGS2是一种诱导型酶，在大多数细胞中不表达或少量表达，当细胞受到促炎细胞因子和癌症促进剂的刺激时，PTGS2的表达上调并参与炎症和肿瘤的形成和发展<sup>[22]</sup>。ESR1基因编码雌激素受体 $\alpha$ （ER $\alpha$ ），可以结合槲皮素、山柰酚等植物雌激素发挥雌激素样作用<sup>[11]</sup>。据研究，NR3C1基因的甲基化水平与认知障碍有关<sup>[23]</sup>。

KEGG富集分析主要集中在化学致癌-受体激活、脂质和动脉粥样硬化、癌症、神经活性配体-受体相互作用、流体剪切应力和动脉粥样硬化、5-羟色胺能突触、雌激素信号通路、突触小泡循环、AMPK信号通路等。临床研究显示，围绝经期女性是生殖系统恶性肿瘤的高发期<sup>[24]</sup>，当归六黄汤可能通过“化学致癌-受体激活”和“癌症”信号通路发挥抑制肿瘤的作用。心血管疾病是PMS的远期并发症之一，随着女性趋于绝经年龄，雌激素缺乏导致机体组织中的内皮型一氧化氮合酶（eNOS）活性下调、NO合成受阻进而影响血管正常功能，这是促使冠心病、高血压等一系列心血管疾病发生发展的主要因素<sup>[19]</sup>。当归六黄汤可能通过脂质和动脉粥样硬化、流体剪切应力和动脉粥样硬化和AMPK信号通路来防治PMS患者的心血管疾病。PMS患者绝大部分会伴有盗汗和精神神经症状。雌激素水平低下会导致植物神经功能紊乱和代谢障碍，从而引发盗汗症状<sup>[25]</sup>。同时低水平的雌激素还会致使中枢神经系统内单胺氧化酶的活性失于抑制，进而促进了中枢神经递质的降解，5-羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）、多巴胺（DA）等神经递质的合成受限，导致情绪障碍类症状的发生<sup>[26-27]</sup>。当归六黄汤可能通过雌激素信号通路、神经活性配体-受体相互作用、5-羟色胺能突触、突触小泡循环信号通路发挥雌激素样作用，从而调控PMS患者的盗汗和精神神经症状。研究发现，激活AMPK信号通路可有效抑制IL-1B、IL-6等促炎因子的分泌<sup>[28]</sup>，推测当归六黄汤可通过激活AMPK信号通路发挥抗炎作用。

## 4 结论

本研究采用网络药理学和分子对接分析了当归



注：A. GO功能注释；B. KEGG通路富集。

图4 当归六黄汤治疗PMS靶点的GO功能注释和KEGG通路富集分析

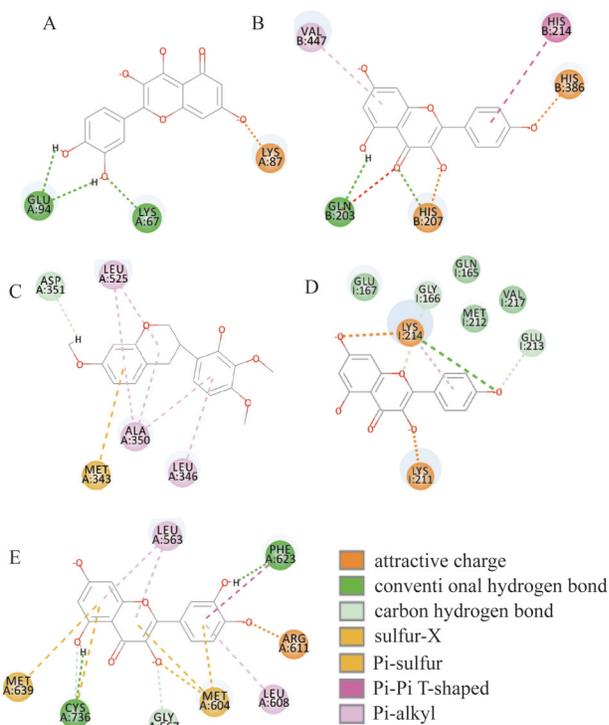
表4 当归六黄汤治疗PMS活性化合物与核心靶基因结合能

靶点	化合物	结合能 kcal·mol <sup>-1</sup>
IL-6	槲皮素	-41.1
	山柰酚	-38.9
PTGS2	槲皮素	-50.6
	豆甾醇	-40.7
	$\beta$ -谷甾醇	-41.9
	山柰酚	-53.9
	7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇	-38.0
ESR1	槲皮素	-42.5
	豆甾醇	-21.3
	$\beta$ -谷甾醇	-25.5
	山柰酚	-40.6
	7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇	-43.1
IL-1B	槲皮素	-68.8
	山柰酚	-69.3
	7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇	-33.8
NR3C1	槲皮素	-54.6
	豆甾醇	-23.9
	$\beta$ -谷甾醇	-29.4
	山柰酚	-52.9
	7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇	-41.4

六黄汤治疗PMS潜在活性成分、靶点和作用途径。共获取112个有效活性成分,经筛选得到5个关键活性成分,分别为槲皮素、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、山柰酚和7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇,主要发挥抗炎和雌激素样作用;获取52个交集靶点,并筛选得到5个核心靶点,分别是IL-6、PTGS2、ESR1、IL-1B和NR3C1,主要参与炎症反应和激素调节。KEGG富集分析结果显示,当归六黄汤治疗PMS主要通过化学致癌-受体激活、脂质和动脉粥样硬化、癌症、神经活性配体-受体相互作用、流体剪切应力和动脉粥样硬化、5-羟色胺能突触、雌激素信号通路、突触小泡循环、AMPK信号通路等发挥作用。同时,通过分子对接验证了当归六黄汤的关键活性成分可以与核心靶点蛋白形成稳定的对接模型。综上所述,当归六黄汤通过多成分、多靶点、多途径的作用机制治疗PMS,主要发挥抗炎和雌激素样协同作用。

## 参考文献

- [1] MIAO M S, TIAN S, GUO L, et al. The effect of curculigoside on mouse model of perimenopausal depression[J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24(8): 1894-1902.
- [2] 王铁枫, 刘雁峰, 吴杨乔, 等. 心理应激因素与更年期综合征的相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3665-3669.
- [3] MENG F, DUAN P B, ZHU J Y, et al. Effect of Gua Sha therapy on perimenopausal syndrome: A randomized controlled trial[J]. Menopause, 2017, 24(3): 299-307.
- [4] SUN A J, WANG Y P, GU B, et al. A multi-center, randomized, controlled and open clinical trial of heyuan Kuntai capsule (和颜坤泰胶囊) and hormone therapy in perimenopausal women [J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(7): 487-493.
- [5] 王庆其. 内经选读[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 29.
- [6] 栗春芳, 王珊珊, 李真. 李真教授运用当归六黄汤治疗更年期汗证经验[J]. 光明中医, 2017, 32(8): 1096-1097.
- [7] CAO H, TUO L L, TUO Y L, et al. Immune and metabolic regulation mechanism of Dangguihuang Decoction against insulin resistance and hepatic steatosis [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 445.
- [8] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 123-124.
- [9] 布立影. 当归六黄汤治疗阴虚火旺型围绝经期综合征的临床研究[J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(7): 56-57.



注: A. 槲皮素-IL-6; B. 山柰酚-PTGS2; C. 7-O-甲基-异微凸剑叶莎醇-ESR1; D. 山柰酚-IL-1B; E. 槲皮素-NR3C1; 不同颜色代表不同作用力; 1 cal $\approx$ 4. 186 J。

图5 当归六黄汤治疗PMS活性化合物与核心靶点结合能最低的构象

- [10] CAO H, LI S L, XIE R, et al. Exploring the mechanism of Danggui Liu Huang Decoction against hepatic fibrosis by network pharmacology and experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 187.
- [11] BASU P, MAIER C. Phytoestrogens and breast cancer: *In vitro* anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1648-1666.
- [12] BINGHAM S A, ATKINSON C, LIGGINS J, et al. Phytoestrogens: Where are we now? [J]. *Br J Nutr*, 1998, 79(5): 393-406.
- [13] LI Y, YAO J Y, HAN C Y, et al. Quercetin, inflammation and immunity [J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 167.
- [14] PEREIRA S C, PARENTE J M, BELO V A, et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 270: 146-153.
- [15] 闫姝. 骨碎补中两种植物雌激素成分对  $A\beta_{25-35}$  致 PC-12 细胞损伤的保护作用及机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [16] MARAHATHA R, GYAWALI K, SHARMA K, et al. Pharmacologic activities of phytosteroids in inflammatory diseases: Mechanism of action and therapeutic potentials [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 5103-5124.
- [17] PRATIWI R, NANTASENAMAT C, RUANKHAM W, et al. Mechanisms and neuroprotective activities of stigmasterol against oxidative stress-induced neuronal cell death via sirtuin family [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 648995.
- [18] 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.
- [19] 姚倩. 清心滋肾方治疗围绝经期综合征肾不交型的临床研究及网络药理学分析 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [20] 闫孟丹. 白介素基因多态性与陕西汉族乳腺癌遗传易感性及临床病理特征的关联研究 [D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [21] 薛美, 闫庆新. 妊娠期高血压、子痫前期孕妇血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-6 水平及临床意义 [J]. *中国临床医生杂志*, 2018, 46(9): 1106-1108.
- [22] XUE B B, CHEN X P, WANG X L, et al. Application of multivariate statistical analysis and network pharmacology to explore the mechanism of Danggui Liu Huang Tang in treating perimenopausal syndrome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114543.
- [23] MISIAK B, SAMOCHOWIEC J, KONOPKA A, et al. Clinical correlates of the *NR3C1* gene methylation at various stages of psychosis [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2021, 24(4): 322-332.
- [24] 贺巧丽. 社区心理干预对围绝经期综合征妇女焦虑和抑郁的影响 [J]. *全科护理*, 2010, 8(13): 1217-1218.
- [25] 鞠诣然, 付东升. 当归六黄汤加减治疗更年期妇女自汗盗汗 80 例 [J]. *光明中医*, 2011, 26(4): 703-705.
- [26] 陈春萍, 程大志, 罗跃嘉. 雌激素对情绪的影响: 心理、神经、内分泌研究 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(11): 1049-1062.
- [27] 叶小芳, 王静, 邓君霞. 文拉法辛联合帕罗西汀治疗围绝经期抑郁症患者的疗效及对脑源性神经营养因子水平的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(20): 3829-3831.
- [28] 陈文凯. 血红素加氧酶-1 激活 AMPK 信号通路调节脊髓损伤后小胶质细胞介导的神经炎症 [D]. 福州: 福建医科大学, 2021.

(收稿日期: 2022-04-01 编辑: 田苗)