

基于网络药理学和分子对接技术探究黄芪-淫羊藿治疗 甲状腺功能减退症的机理

徐海旭¹, 李长辉²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 基于网络药理学和分子对接技术探究黄芪-淫羊藿治疗甲状腺功能减退症的可能机制。方法 使用中药系统药理数据库(TCMSP)获取药物有效成分,并且预测靶点。获取2D结构图,并录入Pharmmapper数据库获得成分靶点。使用PharmGkb数据库、GeneCard数据库、DrugBank数据库、Therapeutic Target Database数据库预测疾病靶点。使用R 4.3.3获取药物疾病交集靶点。使用String数据库构建靶点蛋白互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)。使用R 4.3.3和Cytoscape软件中Citispace获取核心靶点。通过R 4.3.3中BiocManager包和OrgDb包等和R Studio软件进行基因百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和基因本体(gene ontology, GO)富集分析。使用Cytoscape软件,建立“药物-成分-靶点-通路”网络关系图。结果 获得药物核心成分10个,为槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)、木犀草素(luteolin)、白桦脂酸(betulinic acid)等10个核心成分;PPI蛋白互作网络分析得到RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC-alphaserine/threonine-proteinkinase, AKT1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumornecrosisfactor, TNF)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、细胞肿瘤抗原p53(cellular tumor antigen p53, TP53)等16个淫羊藿-黄芪与甲减的关键靶点。GO富集主要是于质膜外侧、囊泡腔等组分上进行的细胞凋亡与增殖、对氧化应激的反应等过程。KEGG富集主要包括脂质和动脉粥样硬化通路、糖尿病并发症中的糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)-糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路等前30个信号通路。通过药物-成分-靶点-通路网络得到了槲皮素、AKT1、脂质与动脉粥样硬化通路3个关键节点。结论 黄芪-淫羊藿可能通过多种成分共同作用于多个靶点形成多条信号通路来发挥对甲减的治疗作用,其中槲皮素-PI3K/AKT信号通路可能是其关键途径之一。

作者简介:徐海旭(1998-),男,辽宁朝阳人,硕士在读,研究方向:中西医结合治疗内分泌疾病。

通讯作者:李长辉(1975-),男,辽宁锦州人,主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:重症康复及中西医结合治疗内分泌疾病。

E-mail: 114284925@qq.com。

引用格式:徐海旭,李长辉. 基于网络药理学和分子对接技术探究黄芪-淫羊藿治疗甲状腺功能减退症的机理[J]. 中西医结合慢性病杂志, 2024, 1(1): 39-47.

- [49] 熊建团, 顾铃毓, 王青青, 等. TLR4/NF- κ B信号通路对CBS+/-小鼠非酒精性脂肪性肝病的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7): 1227-1232.
- [50] 张新, 陈文娜, 宋因, 等. 基于分子互作网络探讨丹莪片干预PI3K/AKT/NF- κ B/TNF通路防治非酒精性脂肪性肝病的机制[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(11): 1324-1332.
- [51] 张海丽. 基于Nrf2-NF- κ B信号通路探究汉黄芩素对LPS-ATP诱导的巨噬细胞炎症的干预作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [52] IMRAN M, SALEHI B, SHARIFI-RAD J, et al. Kaempferol: a key emphasis to its anticancer potential [J]. Molecules, 2019, 24(12): 2277.
- [53] REN J, LU Y, QIAN Y, et al. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases (review) [J]. Spandidos Publications, 2019, 18(4): 2759-2776.
- [54] CALDERN-MONTA O J M, BURGOS-MORN E, PREZ-GUERRERO C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2011, 11(4): 298-344.
- [55] LEE Y J, CHOI H S, SEO M J, et al. Kaempferol suppresses lipid accumulation by inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells and zebrafish [J]. Food Funct, 2015, 6(8): 2824-2833.
- [56] 张娟, 毛文静, 白庆云. 槲皮素及其衍生物防治肝损伤作用及机制的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(23): 7348-7357.
- [57] 杨莹. 柚皮素改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究[D]. 成都: 四川大学, 2021.
- [58] ALAM S, MUSTAFA G, ALAM M, et al. Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease [J]. 世界胃肠病理生理学杂志: 英文版(电子版), 2016(2): 211-217.
- [59] DONGIOVANNI P, RAMEZZI R, MERONI M, et al. The role of insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis and liver disease development—a potential therapeutic target? [J]. Expert Review of Gastroenterology and Hepatology, 2016, 10(2): 1-14.
- [60] OTSUKA M, KISHIKAWA T, YOSHIKAWA T, et al. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects [J]. Journal of Gastroenterology, 2014, 49(2): 173-184.
- [61] NG E, CHONG W W S, JIN H, et al. Title Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening [J]. Semantic Scholar, 2009, 58(10): 1375-1381.
- [62] GJORGEJEVA M, SOBOLEWSKI C, DOLICKA D, et al. Mirnas and nafld: from pathophysiology to therapy [J]. Gut, 2019, 68(11): 2065-2079.

关键词: 甲状腺功能减退症; 黄芪-淫羊藿; 网络药理学; PI3K/AKT信号通路

中图分类号: R285, R581.2

文献标志码: A

文章编号: 2097-5031(2024)01-0039-09

Exploration of the Mechanism of Huangqi (Astragali Radix)-Yinyanghuo (Epimedii Wushanensis Folium) in Treating Hypothyroidism Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

XU Haixu¹, LI Changhui²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the potential mechanism by which Huangqi (Astragali Radix) and Yinyanghuo (Epimedii Wushanensis Folium) treat hypothyroidism using network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** Active ingredients of Huangqi (Astragali Radix) and Yinyanghuo (Epimedii Wushanensis Folium) were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP), and their corresponding targets were predicted using the PharmMapper database. Disease targets related to hypothyroidism were identified through databases including PharmGKB, GeneCards, DrugBank, and the Therapeutic Target Database. Intersection targets between the drugs and the disease were identified using R language. Protein-protein interaction networks (PPI) were constructed using the STRING database, and core targets were identified using R language and Cytoscape software. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted using R and OrgDb package in R Studio. A "drug-component-target-pathway" network relationship diagram was visualized using Cytoscape software. **Results** 10 core components of the drug were obtained, including quercetin, kaempferol, luteolin, betulinic acid, etc. Protein interaction network analysis obtained AKT1, IL-6, TNF, IL-1 β , TP53 and other 16 key targets of Astragalus-Epimedium and hypothyroidism. GO enrichment is mainly due to processes such as cell apoptosis, proliferation, and response to oxidative stress that occur on the outside of the plasma membrane, the vesicle cavity, and other components. KEGG enrichment mainly includes the top 30 signaling pathways such as lipid and atherosclerosis pathways, AGE/RAGE signaling pathway in diabetic complications, and PI3K/AKT signaling pathway. Three key nodes of quercetin, AKT1, lipid and atherosclerosis pathways were obtained through the drug-component-target-pathway network. **Conclusion** Huangqi (Astragali Radix)-Yinyanghuo (Epimedii Wushanensis Folium) may alleviate hypothyroidism through synergistic effects of multiple components acting on diverse targets and pathways. Specifically, the quercetin-PI3K/AKT signaling pathway emerges as a potential key pathway mediating their therapeutic effects.

Keywords: hypothyroidism; Huangqi (Astragali Radix)-Yinyanghuo (Epimedii Wushanensis Folium); network pharmacology; PI3K/AKT signaling pathway

甲状腺功能减退症(简称甲减),是由于甲状腺激素合成和分泌减少或组织作用减弱导致的全身代谢减低综合征^[1-2]。近年来,中国甲减粗患病率有升高趋势,成人粗患病率为9.3%,男性和女性的粗患病率分别为7.1%和12.2%^[3]。症状主要表现为代谢率减低和交感神经兴奋性下降为主,病情轻的早期患者可以没有特异症状;典型患者可有畏寒、乏力、手足肿胀感、嗜睡、记忆力减退、少汗、关节疼痛、体重增加、便秘、女性月经紊乱或者月经过多、不孕等症^[2]。

甲减在中医学中无特定病名,根据症状、体征将其归于“瘰病”“劳瘵”“虚劳”等范畴^[4]。《千金要方》将其归为“瘰劳”。该病的发生主要是因为情志内伤、饮食及水土失宜、体质因素等。《圣济总录·瘰瘤门》云:“石瘰、泥瘰、劳瘵、忧瘵、气瘵是为五瘵。石与泥则因山水饮食而得之,忧、劳、气则本于七情。”现代学者对本病病机的认识有所异同。方朝晖^[5]、路志正^[6]、赵进喜^[7]认为甲减以肾阳不足为本;

魏军平^[8]认为,初期表现为肝郁脾虚,中后期则以阳气不足为本;廖思等^[9]认为脾虚是发病的关键因素。总体而言,其病机归结于正虚为本、阴阳失和,阳气虚衰是其发病核心。黄芪、淫羊藿是治疗本病的常见药对^[4],二者皆为补益之品,相须为用共奏补气助阳之功,契合病机。

本研究基于网络药理学和分子对接技术探究黄芪-淫羊藿治疗甲状腺功能减退症的可能机理。

1 材料与研究方法

1.1 黄芪-淫羊藿中的有效成分筛选及靶点预测

通过对中药系统药理数据库(TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com>)的检索,设置药物动力学参数:口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ,以此获取黄芪-淫羊藿的有效活性成分和相应靶点及其2D结构图,并将结构图导入PharmMapper数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>),获得相应靶点,两

者靶点取并集去重后得到最终靶点,将得到靶点导入 String 数据库(<https://string-db.org>)中设置物种为人类得到规范靶点。

1.2 构建“药物-成分-靶点”网络关系

将以上获得的药物活性成分与靶点信息导入 Cytoscape 软件 3.10.2 中,构建“药物-成分-靶点”网络关系图,并取度中心性(degree)>100 的活性成分。

1.3 甲减相关靶点筛选

以“hypothyroidism”为检索词,检索 PharmGKB 数据库(<https://www.pharmgkb.org>)、GeneCard 数据库(<https://www.genecards.org>)、DrugBank 数据库(<https://go.drugbank.com>)、OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)、Therapeutic Target Database 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>),将获得疾病靶点取并集去重后得到最终靶点。

1.4 药物与疾病基因靶点预测

使用 R 4.3.3 绘制药物-疾病靶点 venny 图,并取得交集靶点。

1.5 蛋白互作网络构建

将 1.4 获得靶点录入 STRING 数据库(<https://string-db.org>),设置置信度 $\geq 40\%$,排出无关节点后进行蛋白互作网络分析(protein-protein interaction networks, PPI)并导出结果。将结果导入 Cytoscape 软件 3.10.2 中,用 Citispace 2.2 限定条件为拓扑学参数:度中心性(degree)、接近中心性(closeness)和中介中心性(betweenness),筛选出大于相应阈值的靶点,获得黄芪-淫羊藿治疗甲减的核心靶点。

1.6 GO 分析与 KEGG 通路富集分析

使用 R 4.3.3 进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析,包含生物进程(biological process, BP)、细胞组分(cellular components, CC)、分子功能(molecular functions, MF)与基因百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。

1.7 “成分-靶点-通路”网络构建

将药物与 1.2 获取的活性成分、1.5 获取的核心靶点、1.6 获取的前 30 条通路导入 Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点-通路”网络并通过 Network Analyzer 分析网络节点的拓扑属性,以获得关键节点。

1.8 分子对接

将 degree 值最高的活性成分与 degree>100 的核心靶点进行分子对接。从 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取活性成分的 2D 结构,导入 Chemdraw 3D 软件中转化为 3D 结构。从 Uniport 数据库(<https://www.uniprot.org/>)获得靶点的 3D 结构。用 Autodock vina 1.1.2 软件进行分子对接后用 PYMOL 和 MOE 分别进行可视化。

2 结果与分析

2.1 黄芪-淫羊藿活性成分与靶点

通过 TCMS 数据库获得黄芪-淫羊藿 41 个有效活性成分、243 个相应靶点。在 Phrammarpper 数据库中取得 Fit Score ≥ 0.7 的相关靶点 410 个。将两个数据库的靶点合并去重后,导入 String 数据库,设置多蛋白,物种设置为人,获得靶点并通过 R 4.3.3 将靶点规范化后得到 414 个靶点。见表 1。

表 1 黄芪-淫羊藿有效成分

活性成分序号	活性成分	口服利用度/%	类药性
MOL000006	luteolin	36.16	0.25
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
MOL000098	quercetin	46.43	0.28
MOL000211	mairin	55.38	0.78
MOL000239	jaranol	50.83	0.29
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75
MOL000371	3,9-di-O-methylisolin	53.74	0.48
MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69
MOL000378	7-O-methylisomuronulatol	74.69	0.30
MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	36.74	0.92
MOL000380	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-c]chromen-3-ol	64.26	0.42
MOL000387	bifendate	31.10	0.67
MOL000392	formononetin	69.67	0.21
MOL000398	isoflavanone	109.99	0.30
MOL000417	calycosin	47.75	0.24
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24
MOL000433	(2S)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-1H-pteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid	68.96	0.71
MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26

续表1 黄芪-淫羊藿有效成分

活性成分序号	活性成分	口服利用度/%	类药性
MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62
MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxypterocarpene	39.05	0.48
MOL000622	magnograndiolide	63.71	0.19
MOL001510	24-epicampesterol	37.58	0.71
MOL001645	linoleylacetate	42.10	0.20
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
MOL001792	liquiritigenin	32.76	0.18
MOL003044	chryseriol	35.85	0.27
MOL003542	8-isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39
MOL004367	olivil	62.23	0.41
MOL004373	anhydroicaritin	45.41	0.44
MOL004380	c-homoerythrinan,1,6-didehydro-3,15,16-trimethoxy-	39.14	0.49
MOL004382	yinyanghuo A	56.96	0.77
MOL004384	yinyanghuo C	45.67	0.50
MOL004386	yinyanghuo E	51.63	0.55
MOL004388	6-hydroxy-11,12-dimethoxy-2,2-dimethyl-1,8-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1h-isochromeno[3,4-h]isoquinolin-2-ium	60.64	0.66
MOL004391	8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone	48.54	0.25
MOL004394	anhydroicaritin-3-O-alpha-L-rhamnoside	41.58	0.61
MOL004396	1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-1,3-diol	52.31	0.22
MOL004425	icariin	41.58	0.61
MOL004427	(2R,3S,4S,5R,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-(7-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenanthren-2-yl)oxyoxane-3,4,5-triol	31.91	0.86

2.2 “药物-成分-靶点”网络构建

将药物、成分、靶点导入Cytoscape中,构建“药物-成分-靶点”网络关系图,并取得dgree>100的活性成分分别为MOL000006、MOL000033、MOL000098、MOL000211、MOL000296、MOL000422、MOL004373、MOL004384、MOL004386、MOL004391。见表2、图1。

2.3 甲减靶点筛选

通过PharmGkb数据库、OMIM数据库、DrugBank数据库、Therapeutic Target Database数据库、GeneCard数据库检索“hypothyroidism”,分别获得疾病基因靶点143、13、3、4925个;GeneCard数据库以相关性得分>1为条件得到疾病基因靶点1085个。使用R 4.3.3绘制疾病venny图,将上述数据库获得的疾病

基因靶点取并集去重后获得1223个疾病基因靶点。见图2。

2.4 药物成分与疾病靶点预测

使用R 4.3.3绘制药物-疾病靶点venny图,获得75个交集靶点。见图3。

2.5 蛋白互作网络构建

将药物与疾病交集靶点录入String数据库(<https://string-db.org>),设置多蛋白、选择物种为人,中等置信度设置为40%,排除无关节点进行蛋白互作网络分析并导出结果,得到74个节点,885条边。见图4。将结果导入Cytoscape软件3.10.2中,用Citispac2.2限定条件为拓扑学参数:DC>47.83、CC>0.0078、BC>60.16,获得16个黄芪-淫羊藿治疗甲减的核心靶点。见图5。

表2 黄芪-淫羊藿核心成分

活性成分序号	活性成分	度中心性	药物名称
MOL000098	槲皮素(quercetin)	604	淫羊藿/黄芪
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	240	淫羊藿/黄芪
MOL004391	8-(3-甲基丁-2-烯基)-2-苯基色酮[8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone]	168	淫羊藿
MOL004384	淫羊藿C (yinyanghuo C)	136	淫羊藿
MOL000006	木犀草素(luteolin)	124	淫羊藿
MOL004386	淫羊藿e (yinyanghuo e)	118	淫羊藿
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙-2-基-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊并[a]菲-3-醇((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol)	118	黄芪
MOL000211	白桦脂酸(betulinic acid)	116	黄芪
MOL000296	常春藤皂苷元(hederagenin)	110	黄芪
MOL004373	脱水淫羊藿素(anhydroicaritin)	104	淫羊藿

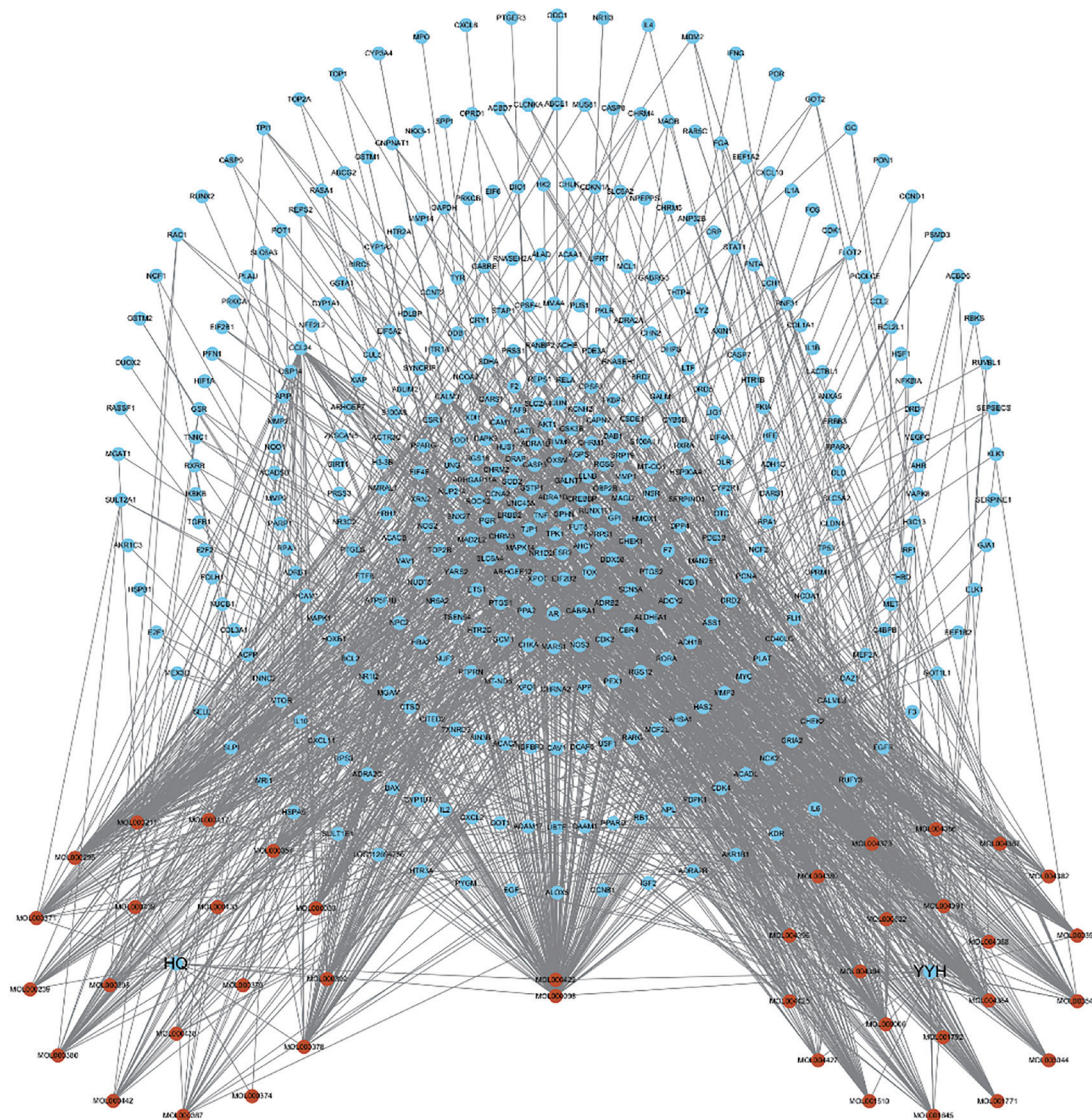


图 1 药物-成分-靶点网络关系

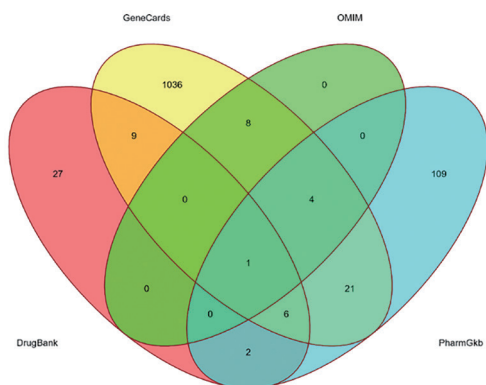


图 2 甲减疾病靶点 venny 图

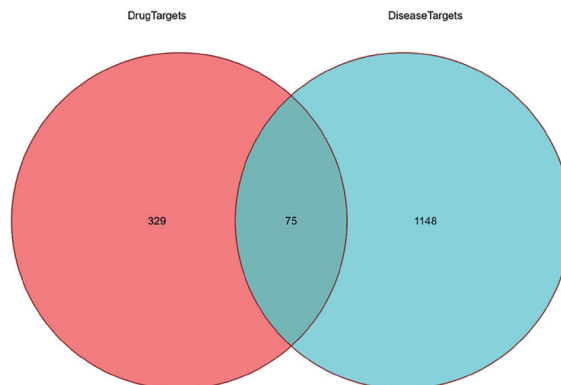


图 3 药物-疾病靶点 venny 图

2.6 GO 和 KEGG 富集分析

通过 R 4.3.3 进行 GO 富集分析共得到 1755 条, 包括 BP1649 条、CC26 条、MF80 条。设置参数: $P < 0.05$ 、 $q < 0.05$ 。根据 q 值升序排列取前 10 条进行可视化分析。见图 6。

KEGG 富集分析共获得 134 条, 设置参数: $P < 0.05$ 、

$q < 0.05$ 。根据基因数降序排列取前 30 条进行可视化分析。见图 7。

2.7 “药物-成分-靶点-通路”网络

将以上获得的 2 个药物、10 个活性成分、16 个核心靶点、30 条通路导入 Cytoscape 软件 3.10.2 进行“药物-成分-靶点-通路”网络构建, 结果显示

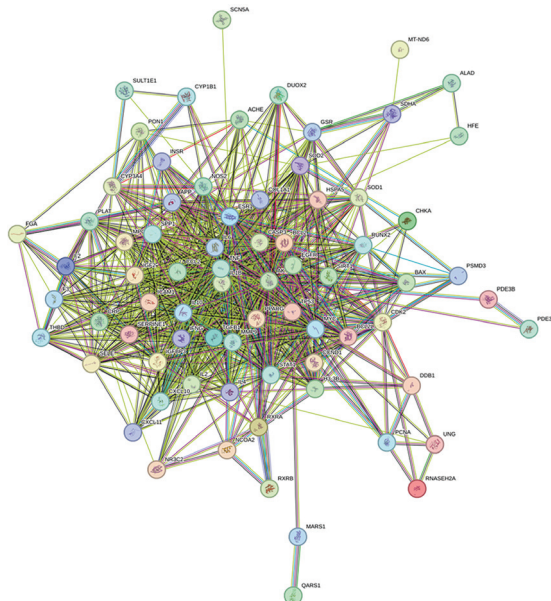


图4 PPI蛋白互作网络图

槲皮素、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、脂质与动脉粥样硬化通路是该网络的关键节点。见图8。

2.8 分子对接

将degree值最高的药物活性成分MOL000098,即槲皮素,与degree>100的核心靶点进行分子对接。从Pubchem数据库下载活性成分的2D结构,导入Chemdraw 3D中,取其优势结构转化为3D结构。从Uniport数据库中下载核心靶

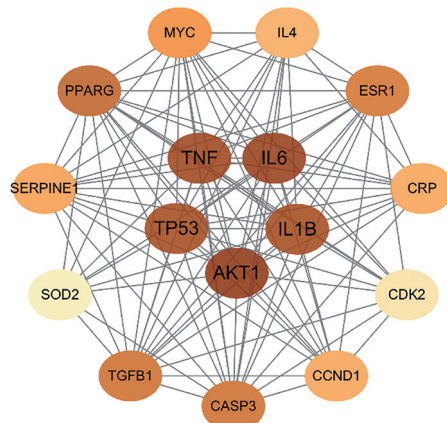


图5 黄芪-淫羊藿治疗甲减核心靶点图

点相应3D结构,然后用Mgtools 1.5.6进行去水、加氢等处理后,使用Autodock vina 1.1.2将配体与受体进行半柔性对接,取打分较高的构象用Pymol和MOE分别进行可视化。分子对接得到的结合能结果,其中槲皮素-AKT1的结合能最高,为-9.9 kcal/mol,表明两者有较为强烈的结合能力。见图9、表3。

3 讨论

3.1 中西医对甲减的认识

西医认为甲减病因复杂,以原发性甲减最为多见,约占甲减的99%,其中自身免疫损伤是其最常见的因素,以左甲状腺素(levothyroxine, L-T4)替代治疗为主,需终身服药^[1-2]。中医认为本病属于“癯劳”

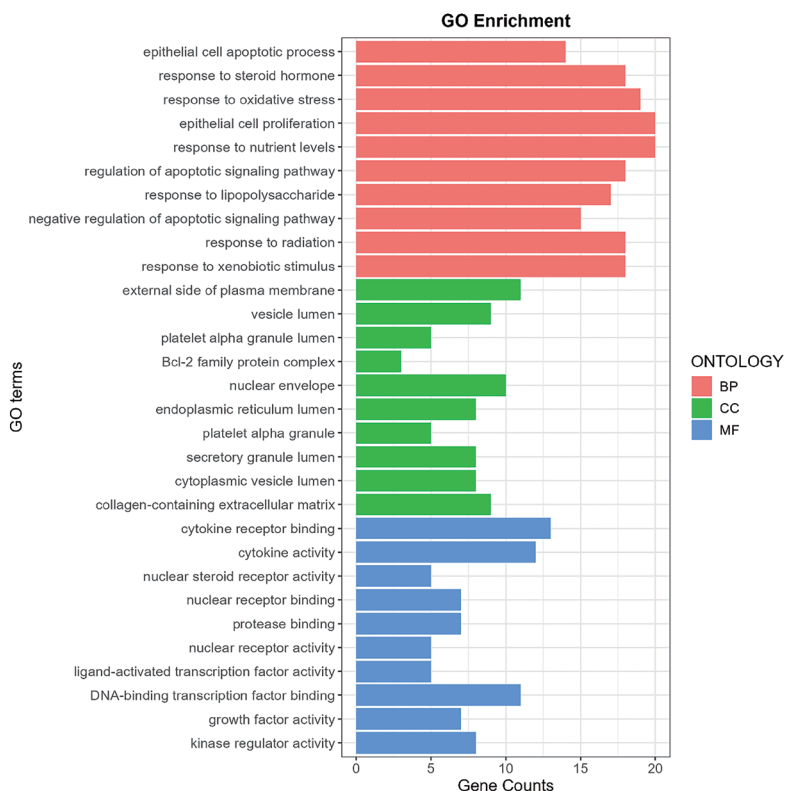


图6 GO富集分析图

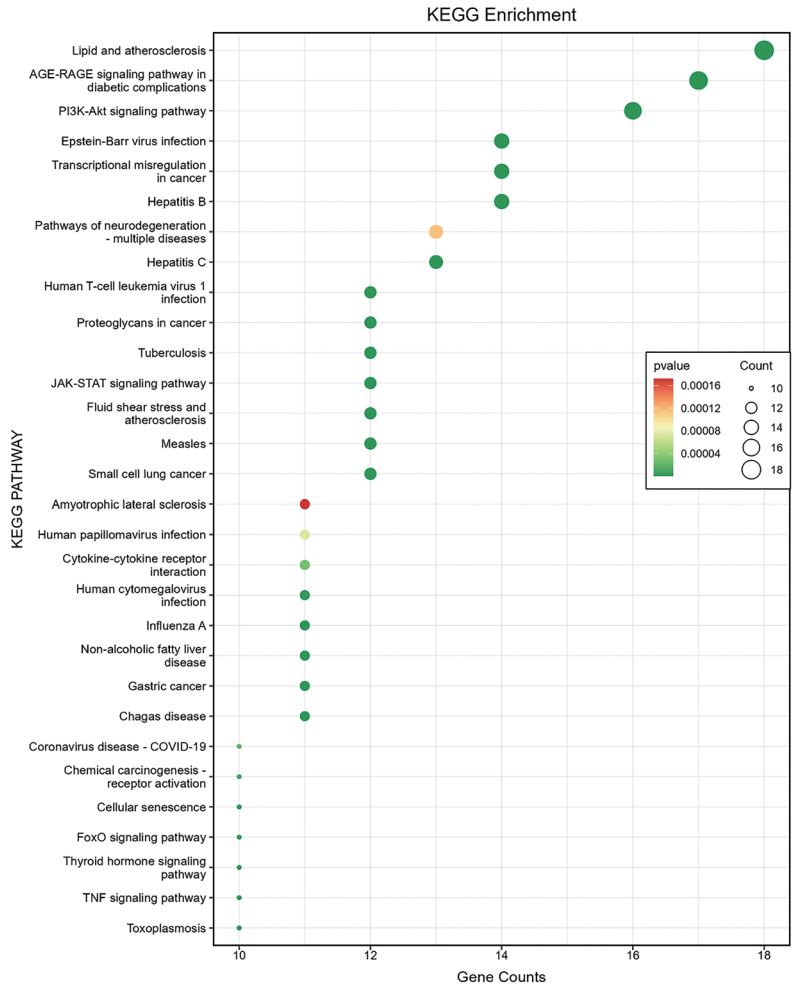


图7 KEGG 富集分析图

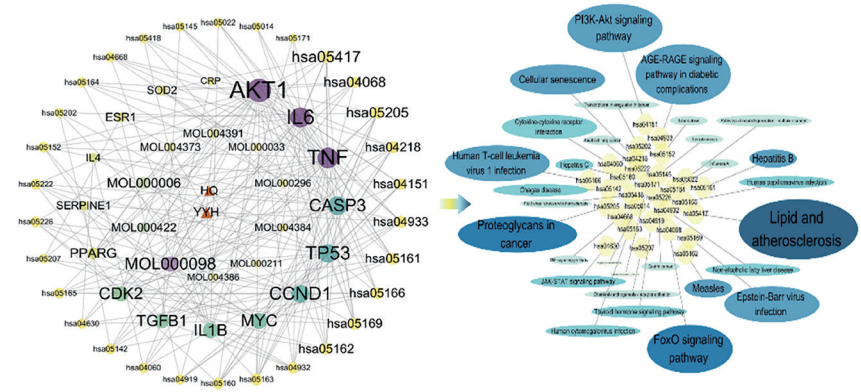


图8 “药物-成分-靶点-通路”网络

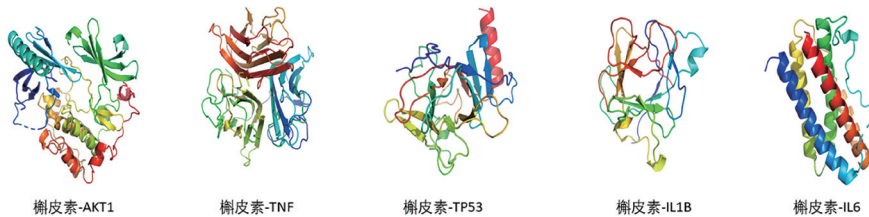


图9 分子对接图

范畴,是由“癯病”继发的“虚劳”“虚损”^[10],阳气亏虚是其核心病机。《内经》有言:“精气夺则虚”,又言:“劳者温之”。黄芪、淫羊藿俱是补气助阳之品,

《名医别录》言:“黄芪,补丈夫虚损,五劳羸瘦”,《本草备要》有“淫羊藿,益精气,坚筋骨”的记载。故此二者配伍是治疗本病之良品。

表3 活性成分-靶点结合能

活性成分序号	名称	度中心性	蛋白质编号	结合能/(kcal/mol)
MOL000098	IL-6	106	1alu	-6.1
MOL000098	IL-1B	102	5r8q	-7.3
MOL000098	TP53	102	6ggc	-7.9
MOL000098	TNF	104	2e7a	-8.5
MOL000098	AKT1	108	7nh5	-9.9

3.2 黄芪-淫羊藿治疗甲状腺功能减退机理探究

3.2.1 研究结果分析

本次研究筛选出槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)、木犀草素(luteolin)、白桦脂酸(betulinic acid)等41种有效成分。其中,槲皮素、山柰酚为黄芪、淫羊藿共有成分,槲皮素、山柰酚、木犀草素都是黄酮类化合物,白桦脂酸属于一种羽扇豆烷型五环三萜类化合物,上述4种成分都具备抗炎、抗氧化应激作用^[11-14]。此外槲皮素还具有免疫调节、抗肿瘤等作用^[11],而磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(proteinkinase B, AKT)信号通路是与槲皮素有益作用最相关的途径^[15]。槲皮素可以调节甲减小鼠腺嘌呤核苷酸水解,减少核酸苷形成和腺苷脱氨,改善氧化特征,减少血小板聚集^[16]。实验发现山柰酚可能通过调节PI3K/AKT信号通路来实现抗氧化应激与抗炎作用^[17]。山柰酚能够通过线粒体内膜上的解偶联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP1)调控人体的能量代谢平衡,而甲状腺素受体(thynoid hormone receptor, THR)参与UCP1的表达,这与其治疗甲减患者的低代谢表现不谋而合^[18]。研究表明木犀草素可以明显改善自身免疫性甲状腺炎小鼠甲状腺实质的单核细胞浸润,抑制其炎症介导^[19]。白桦脂酸可以改善甲减大鼠的甲状腺功能,抑制其上调的炎症细胞因子(tumornecrosisfactor, TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),可能是潜在的治疗甲减的活性成分^[20]。因此槲皮素等有效成分可能通过抗炎和抗氧化应激作用来改善甲减患者症状。

通过PPI蛋白互作网络分析得到AKT1、IL-6、TNF、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、细胞肿瘤抗原P53(cellular tumor antigen p53, TP53)等16个黄芪-淫羊藿与甲减的共同靶点。AKT1是蛋白激酶(proteinkinase B, AKT)的三种亚型之一,广泛存在人体组织中^[21]。AKT是PI3K/AKT通路的关键环节,可以将受体和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)之间的相互作用与细胞合成代谢途径联系起来,同时,AKT在多种细胞过程中起关键作用,如细胞存活、增殖、迁移、细胞凋亡等^[21-22]。IL-6、TNF、IL-1 β 是核转录因

子- κ B(nuclear factor-kap-pa, NF- κ B)通路的组成部分, NF- κ B通路具有免疫和炎症反应、细胞存活和增殖、新陈代谢等生理功能^[23]。TP53能够介导肿瘤抑制,从而导致细胞死亡或维持细胞稳态^[24]。

GO富集分析提示参与上皮细胞凋亡与增殖、对氧化应激的反应、对营养水平的反应、对类固醇激素的反应、凋亡信号通路的调控与负调控等过程,包括质膜外侧、囊泡腔、血小板 α 颗粒腔、B淋巴细胞瘤-2基因家族蛋白复合物、核包膜、内质网腔、血小板 α 颗粒、分泌性颗粒腔、细胞质囊泡腔、含胶原蛋白的细胞外基质等,具有细胞因子受体结合、细胞因子活性、核类固醇受体活性、核受体结合、蛋白酶结合、核受体活性、配体激活的转录因子活性、DNA结合转录因子结合、生长因子活性、激酶调节活性等分子功能。

KEGG分析主要获得脂质和动脉粥样硬化通路、糖尿病并发症中的糖基化终末产物(advourced glycation end products, AGE)-糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)信号通路、PI3K/AKT信号通路等前30个信号通路。PI3K/AKT信号通路是其中的核心通路。在动脉粥样硬化进程中,高脂因素等激活PI3K,后者被磷酸化后激活其直接下游因子AKT, AKT被激活后,经过一系列磷酸化非磷酸化反应进一步激活I κ B激酶(I κ B kinase, IKK),导致IKK降解,进一步激活NF- κ B通路参与如内皮细胞损伤、血管壁炎症反应等斑块形成与稳定的病理生理过程^[25]。在慢性持续炎症条件下, AGE-RAGE信号通路中的RAGE信号转导上调,导致病理状态的发展和进展,是糖尿病血管并发症、心血管疾病、癌症、阿尔茨海默病等炎症性疾病主要驱动机制,在此过程中多种因素相互作用激活PI3K/AKT等信号通路从而介导炎症反应^[26]。PI3K/AKT信号通路控制细胞存活、代谢、细胞生长和细胞迁移等不同生物过程中起着核心作用,其中断或异常上调与癌症、炎症、免疫缺陷等不同疾病有关^[27]。有研究表明可以通过调节PI3K/AKT信号通路改善大鼠的甲状腺功能减退症^[28]。

通过成分-靶点-通路网络得到了槲皮素、AKT1、脂质与动脉粥样硬化通路3个关键节点。结合文献分析发现得分较高的脂质和动脉粥样硬化通路、叉头盒蛋白O(forkhead box protein O, FOXO)信号通路、糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路均与PI3K/AKT信号通路密切相关,其中PI3K/AKT的磷酸化是FOXO信号通路的核心调节机制^[25-26,29]。因此该网络的关键通路是PI3K/AKT信号通路。

本研究通过分子对接进行虚拟验证,其结果表明二者的主要成分槲皮素对AKT1有较强的结合能力。综合以上分析与本研究构建的成分-靶点-通路发现,槲皮素-AKT1-PI3K/Akt信号通路可能是黄芪-淫羊藿治疗甲减的途径之一,符合分子对接结果。

3.2.2 潜在中西医机理探讨

从西医来看自身免疫性甲状腺炎是甲减的最主要因素^[1-2],而中医则以气虚阳虚为主。黄芪-淫羊藿可能通过调控PI3K/AKT信号通路来发挥对甲减的治疗作用。细胞自噬在免疫与炎症反应中发挥着平衡作用,PI3K/AKT/mTOR信号通路作为自噬的经典途径,已被证明在自身免疫性甲状腺炎的发生发展中起着关键作用^[30-31]。自噬作为细胞自我消化、更新代谢的过程,与中医气化功能不谋而合^[32]。自噬不足,阳不化气自然会出现甲减典型患者的畏寒、乏力、嗜睡等症状。因此黄芪-淫羊藿治疗甲减可能是通过PI3K/AKT通路调控细胞自噬来改善阳化气不足之表现。

综上所述,本研究通过PPI蛋白互作网络、KEGG分析、构建成分-靶点-通路网络分析等方法,并结合分子对接技术验证发现黄芪-淫羊藿可能是多种成分共同作用于多个靶点通过多条信号通路来发挥对甲减的治疗作用,其中槲皮素-PI3K/AKT信号通路可能是其关键途径之一。

参考文献

[1] 中华医学会全科医学分会. 甲状腺功能减退症基层诊疗指南(2019年)[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(11): 1022-1028.

[2] 中华医学会内分泌学分会. 成人甲状腺功能减退症诊疗指南[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(2): 167-180.

[3] 关云凤, 陆征, 姜鹏, 等. 我国成人甲状腺功能减退症患病率的系统综述[J]. 中华地方病学杂志, 2017, 36(10): 772-776.

[4] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病学专业委员会, 庞国明, 倪青. 成人原发性甲状腺功能减退症病证结合诊疗指南[J]. 世界中医药, 2023, 18(16): 2265-2272.

[5] 赵进东, 胡秀, 吴吉萍, 等. 方朝晖从温补肾阳论治甲状腺功能减退症的临床经验[J]. 成都中医药大学学报, 2021, 44(2): 91-94.

[6] 魏华, 路洁, 殷翠儿. 国医大师路志正教授临证辨治成人甲状腺功能减退症经验浅析[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3132-3134.

[7] 张耀夫, 赵进喜, 蒋里, 等. 赵进喜辨体质、辨病、辨证“三位一体”诊治甲状腺功能减退症经验[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1875-1877.

[8] 王耀立, 魏军平. 魏军平治疗甲状腺功能减退症经验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(6): 869-871.

[9] 廖思, 李增英, 赵恒侠, 等. 从脾辨治甲状腺功能减退症[J]. 环球中医药, 2020, 13(1): 96-98.

[10] 蒋里, 赵进喜, 张耀夫, 等. 基于肾-命门-三焦系统辨证治疗甲状腺功能减退症[J]. 中医杂志, 2021, 62(4): 352-355.

[11] 刘晟文, 刘建英. 槲皮素药理学作用的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2020, 13(1): 104-106.

[12] 李珂如, 胡光强, 吴安国, 等. 山奈酚及其衍生物在神经系统

疾病中的药理作用研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(4): 412-416.

- [13] 胡泽香, 佟雷, 耿艳萌, 等. 木犀草素的药理活性及其制剂研究进展[J]. 中医临床研究, 2022, 14(10): 141-145.
- [14] 魏翔, 翁希里, 董建山, 等. 白桦脂酸的药理活性及分析检测研究进展[J]. 精细化工中间体, 2024, 54(2): 6-10.
- [15] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI H, SASI A K, et al. The impact of the phytotherapeutic agent quercetin on expression of genes and activity of signaling pathways [J]. *Biomedicine And Pharmacotherapy*, 2021, 141: 111847.
- [16] BALDISSARELLI J, SANTI A, SCHMATZ R, et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism [J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2016, 84(1): 1849-1857.
- [17] 李秋霞, 王广谋, 陈健, 等. 山奈酚调节PI3K/AKT信号通路对亚硒酸盐致白内障大鼠晶状体组织损伤的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2023, 42(3): 362-369.
- [18] XU C, ZHANG X, WANG Y, et al. Dietary kaempferol exerts anti-obesity effects by inducing the browning of white adipocytes via the AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Current Research in Food Science*, 2024, 8: 100728.
- [19] 夏楠. 自身免疫性甲状腺疾病动物模型的建立及抗炎治疗的研究[D]. 南京: 南京大学, 2015.
- [20] KAR A, MAHAR D, BISWAS S, et al. Phytochemical profiling of polyphenols and thyroid stimulatory activity of *Ficus religiosa* leaf extract in 6-propyl-thiouracil-induced hypothyroid rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 313 (Suppl C): 116479.
- [21] XUE C, LI G, LU J, et al. Crosstalk between circmas and the PI3K/AKT signaling pathway in cancer progression [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 400.
- [22] 王梦华, 卢均坤. PI3K/AKT信号通路及其抑制剂的研究进展[J]. 医学信息, 2018, 31(10): 34-36.
- [23] GUO Q, JIN Y, CHEN X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 53.
- [24] Levine A J. P53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2020, 20(8): 471-480.
- [25] 吕丽. 基于PI3K/AKT/NF- κ B信号通路槲皮素抗动脉粥样硬化作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [26] HUDSON B I, LIPPMAN M E. Targeting Rage signaling in inflammatory disease [J]. *Annual Review of Medicine*, 2018, 69(1): 349-364.
- [27] VIDAL S, BOUZAHER Y H, EL M A, et al. Overview of the regulation of the class ia PI3K/AKT pathway by sumo [J]. *Seminars Cell and Developmental Biology*, 2021, 132(6): 51-61.
- [28] WANG Y Y, SUN Y P, YANG B Y, et al. Application of metabolomics and network analysis to reveal the ameliorating effect of four typical "hot" property herbs on hypothyroidism rats [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 955905.
- [29] MA J, MATKAR S, HE X, et al. Foxo family in regulating cancer and metabolism [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2018, 50(10): 32-41.
- [30] 司新颖, 李会龙, 郭志礼, 等. 基于“虚气留滞”理论探讨细胞自噬在桥本甲状腺炎中的作用[J]. 吉林中医药, 2024, 44(1): 22-27.
- [31] 张秋娥, 潘雅婧, 张程斐, 等. 甲炎康泰对自身免疫性甲状腺炎大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 环球中医药, 2022, 15(6): 984-990.
- [32] 王蓓蕾, 阮越勇, 于洋, 等. 从中医“气化”角度探讨自噬现象[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5452-5454.