

基于网络药理学和分子对接探究夏枯草 治疗乳腺增生的作用机制

王贺松,姜楠,杨岚,陶冠聪,李亚玉,张会宁
(皖南医学院药学院,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 基于网络药理学和分子对接技术探究夏枯草治疗乳腺增生的作用机制。方法 利用 TCMSp 数据库和 GeneCards 数据库获取化合物和疾病相关靶点,利用 String 数据库和 Cytoscape3.8.2 软件构建蛋白相互作用网络,应用 R 软件进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,最后应用 AutoDock Vina 软件进行分子对接验证。结果 共筛选出 13 个活性成分和 117 个潜在靶点,潜在靶点涉及应激反应、信号传导、转录调控和细胞周期调控等生物学过程以及雌激素信号通路等与乳腺增生密切相关的通路。分子对接结果显示雌激素信号通路中 AKT、MAPK1、CREB、PGR 与对应活性成分均能形成稳定构象。结论 夏枯草通过多成分、多靶点、多途径协同作用,发挥治疗乳腺增生的作用。

关键词:夏枯草;乳腺增生;网络药理学;分子对接;雌激素信号通路

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.10.003

文章编号:1006-1959(2024)10-0011-06

The Mechanism of *Prunella Vulgaris L.* in the Treatment of Hyperplasia of Mammary Gland Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

WANG He-song,JIANG Nan,YANG Lan,TAO Guan-cong,LI Ya-yu,ZHANG Hui-ning
(School of Pharmacy,Wannan Medical College,Wuhu 241002,Anhui,China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Prunella vulgaris L.* in the treatment of hyperplasia of mammary gland based on network pharmacology and molecular docking technology.**Methods** TCMSp database and GeneCards database were used to obtain compounds and disease-related targets. String database and Cytoscape 3.8.2 software were used to construct protein interaction network. R software was used to analyze GO function and KEGG pathway enrichment. Finally, AutoDock Vina software was used for molecular docking verification.**Results** A total of 13 active ingredients and 117 potential targets were screened out. The potential targets involved biological processes such as stress response, signal transduction, transcriptional regulation and cell cycle regulation, as well as estrogen signaling pathway and other pathways closely related to breast hyperplasia. Molecular docking results showed that AKT, MAPK1, CREB, PGR and corresponding active components in the estrogen signaling pathway could form a stable conformation.**Conclusion** *Prunella vulgaris L.* plays a role in the treatment of hyperplasia of mammary gland through multi-component, multi-target and multi-channel synergy.

Key words: *Prunella vulgaris L.*;Hyperplasia of mammary gland;Network pharmacology;Molecular docking;Estrogen signaling pathway

乳腺增生(hyperplasia of mammary gland)是乳腺导管、乳腺小叶、腺泡上皮及纤维组织的过度增生^[1]。乳腺增生占全部乳腺疾病的 75%,发病率呈逐年升高、低龄化的趋势。有研究表明^[2],乳腺增生为乳腺癌的一种癌前病变,可使乳腺癌的患病风险增加 1.4~2.5 倍。临床上目前主要使用激素类药物治疗乳腺增生,疗效显著,但药物的副作用严重影响患者的

生活质量^[3]。中医药治疗具有疗效好、毒性低、不易复发等特点,在慢性疑难病治疗中具有特殊的优势^[4]。中医认为乳腺增生属于“乳癖”范畴,因肝郁化火所致^[5,6]。夏枯草为唇形科夏枯草 *Prunella vulgaris L.* 的干燥果穗,具有清肝泻火、明目、散结消肿等功效^[7]。经典古籍《神农本草经疏》等均有夏枯草治疗乳癖、乳岩的记载^[8]。现代临床研究也表明,夏枯草对治疗乳腺增生有明显疗效^[9,10],但夏枯草治疗乳腺增生的具体机制尚不清楚。网络药理学融合了系统生物学、生物信息学、网络科学等学科,从系统层次和生物网络的整体角度出发,探索药物整体的作用机理,符合中医对疾病本质的认识^[4,11]。因此,本研究拟通过网络药理学方法探究夏枯草治疗乳腺增生的活性成分和作用机制,并进行分子对接验证,旨在为夏枯草的临床应用和药物研发提供理论指导。

基金项目:1.皖南医学院中青年科研基金(编号:XJ2021007401);

2.皖南医学院大学生资助金项目(编号:WK2022XS16、WK2022XS12)

作者简介:王贺松(2003.3-),男,安徽六安人,本科,主要从事药用动物(植物)养殖(栽培)理论和技术研究

通讯作者:张会宁(1996.1-),女,甘肃白银人,硕士,助教,主要从事药用动物(植物)养殖(栽培)理论和技术研究

1 资料与方法

1.1 筛选夏枯草的活性成分及靶点预测 检索 TCM-SP 数据库 (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>), 将口服利用度(OB)和类药性(DL)作为筛选的关键参数, 以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 为限定条件, 结合相关文献报道, 筛选夏枯草的活性成分并查询其作用靶点。检索 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 和 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), 限定物种为人, 将所获得靶点的蛋白名称统一校正为基因名称。

1.2 筛选夏枯草治疗乳腺增生的靶基因 检索 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), 将“hyperplasia of mammary glands”作为关键词, 以相关分数(relevance score) >10 为筛选标准, 获取乳腺增生疾病的靶基因。通过 venny 2.0.2 网站 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index2.0.2.html>), 将活性成分的作用靶点与乳腺增生的靶点取交集, 获得夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点。

1.3 “药物-活性成分-潜在靶点”的构建 将夏枯草的活性成分与夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点, 导入 Cytoscape3.8.2 软件, 构建“药物-化合物-靶点”网络。网络中的节点(node)表示靶点或化合物, 边(edge)表示药物、活性成分与乳腺增生之间的相互作用。

1.4 蛋白相互作用网络(PPI)构建 将夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点导入 String 数据库, 将物种设置为“Homo sapiens”, 最低相互作用评分设置为 0.950, 隐藏游离点, 其余参数为默认设置, 获得潜在靶点的相互作用关系, 以 TSV 文件导出。将 TSV 文件导入 Cytoscape3.8.2 软件, 使用“Analyze Network”

插件对 PPI 网络进行拓扑分析, 并以节点大小表示 degree 绘制靶点相互作用网络。

1.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 使用 R4.0.3 软件对潜在靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 和 $Q < 0.05$ 为筛选条件, 获得靶点涉及的生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 以及 KEGG 信号通路。

1.6 分子对接验证 通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载活性成分的二级结构, 利用 3D 软件转化为三级结构后以 mol2 格式保存。通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载雌激素信号通路中与乳腺增生相关的蛋白并以 PDB 格式保存。利用 MGLTools1.5.6 软件将活性成分和靶点均转化为 PDBQT 格式后, 利用 Vina1.1.2 软件进行分子对接, 选取最佳对接构象作为分子对接结果, 并通过 PyMol2.5.0 软件进行可视化。

2 结果

2.1 夏枯草活性成分的筛选 夏枯草的活性成分见表 1, 其中符合 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 限定条件的活性成分共 11 个。查阅并整理文献后, 补充 2 个。最终获得黄酮类、甾醇类和三萜类化合物共 13 个。

2.2 夏枯草治疗乳腺增生的靶点预测 通过 TCMSp 数据库查询获得 98 个活性成分作用靶点, 利用 GeneCards 数据库检索获得 862 个乳腺增生疾病靶点。通过 venny 2.0.2 网站将活性成分作用靶点与乳腺增生疾病靶点取交集, 得到夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点 117 个, 见图 1。

表 1 夏枯草的活性成分

Mol ID	Molecule Name	OB(%)	DL
MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.913 91	0.751 23
MOL000422	Kaempferol(山柰酚)	41.882 25	0.240 66
MOL004355	Spinasterol(α-菠甾醇)	42.979 37	0.755 34
MOL000449	Stigmasterol(豆甾烯醇)	43.829 85	0.756 65
MOL004798	Delphinidin(飞燕草色素)	40.634 98	0.277 63
MOL000006	Luteolin(木犀草素)	36.162 63	0.245 52
MOL006767	Vulgaxanthin-I(黄质-I)	56.139 69	0.258 36
MOL006772	poriferasterol monoglucoside_qt(豆甾醇葡萄糖苷)	43.829 85	0.757 69
MOL006774	stigmast-7-enol(7-豆甾烯醇)	37.423 12	0.751 33
MOL000737	Morin(桑色素)	46.229 59	0.274 57
MOL000098	Quercetin(槲皮素)	46.433 35	0.275 25
MOL000263	oleanolic acid(齐墩果酸)	29.020 84	0.755 99
MOL000511	ursolic acid(熊果酸)	16.774 90	0.754 57

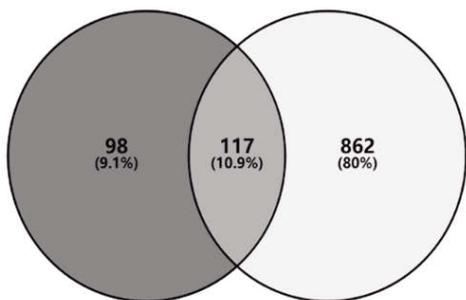


图 1 夏枯草活性成分靶点与乳腺增生靶点交集 Venny 图

2.3“药物-活性成分-潜在靶点”相互作用网络 通过 Cytoscape3.8.2 软件构建“夏枯草-活性成分-靶点网络图”见图 2, 图中矩形的大小表示靶点的度

值 (Degree)。由图可知 PTGS2、PPARG、PIK3CG、HSP90AA1、CD40LG、CASP3、PGR 等是夏枯草活性成分作用的关键靶点。

2.4 潜在靶点相互作用网络分析 将 117 个夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点导入 String 数据库, 得到 PPI 网络关系信息。该网络包括 117 个节点, 391 条边, 平均度值为 6.68。下载 PPI 网络信息, 将文件导入 Cytoscape3.8.2 软件, 根据靶点度值筛选核心靶点, 并构建蛋白网络互作图见图 3。由图可知, AKT、JUN、STAT3、TP53、HSP90AA1 为核心靶点, 其度值分别为 32、32、30、26、24。

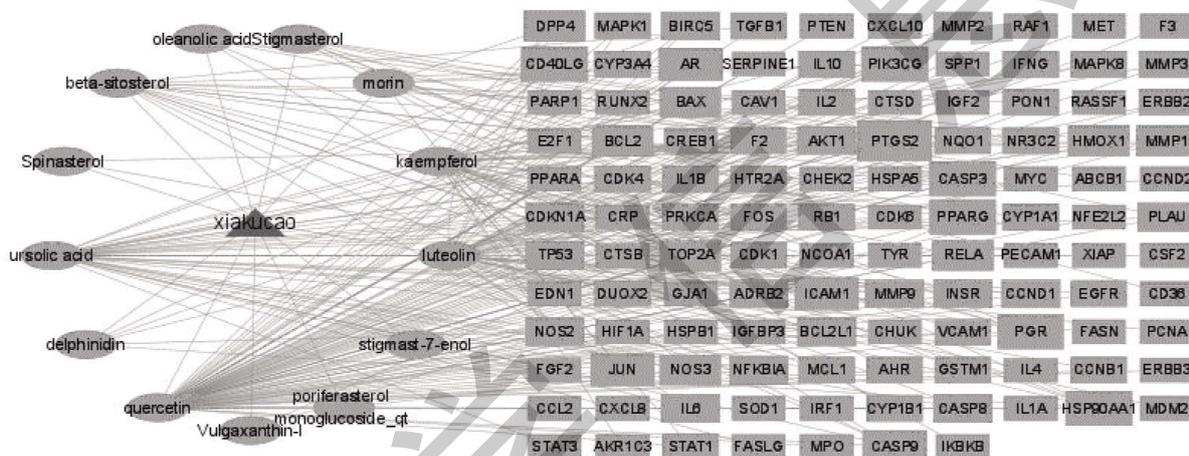


图 2 夏枯草-活性成分-靶点网络图

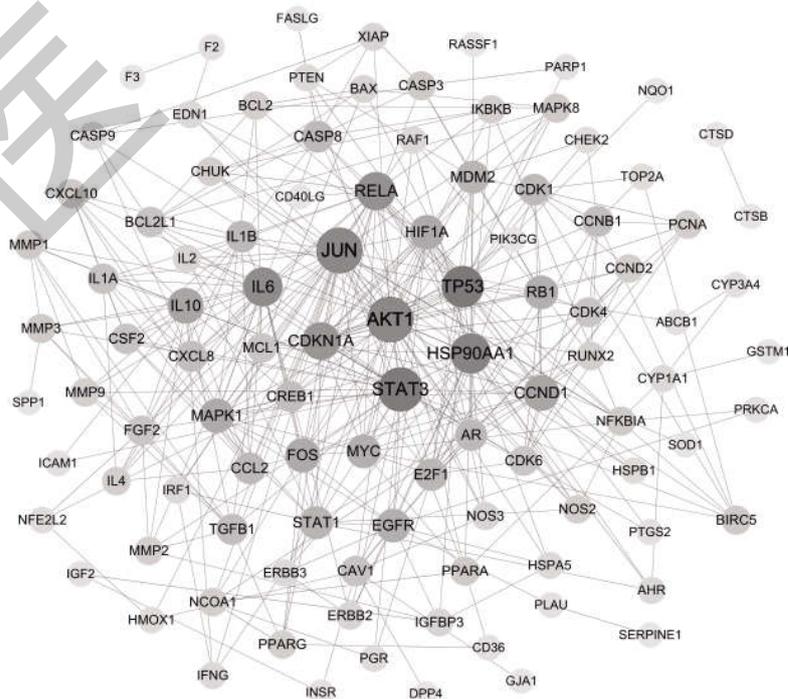


图 3 蛋白网络互作图

2.5 GO 功能富集 通过 R-clusterprofile 包对 117 个潜在靶点进行 GO 富集分析,共获得 GO 条目 2641 条,其中 BP、CC、MF 分别有 2445、50、145 条。按照 Q 值进行排序,分别筛选前 10 条 GO 条目绘制气泡图(图 4)。可见,BP 条目主要涉及应激反应,包括氧化应激、化学应激等。CC 条目主要涉及膜结构、转录调控、细胞周期蛋白等。MF 条目主要涉及受体配体活性、转录因子结合、细胞因子受体结合等。此外,分析发现乳腺相关 GO 条目涉及的基因包括 PGR、BAX、AR、AKT、NCOA1、MAPK1、H1F1A、CAV1、

FASN、CREB1。

2.6 KEGG 通路富集 KEGG 富集分析得到 166 条通路,按照 Q 值从小到大排序,筛选前 30 条通路绘制柱状图见图 5。可见,涉及的通路包括脂质和动脉粥样硬化、传染性疾病、糖尿病并发症、癌症、免疫、激素相关的信号通路等。其中,与乳腺增生密切相关的通路包括雌激素信号通路、泌乳素信号通路、GnRH 信号通路、卵巢类固醇激素合成、GnRH 释放等通路。雌激素信号通路见图 6,灰色代表夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点。

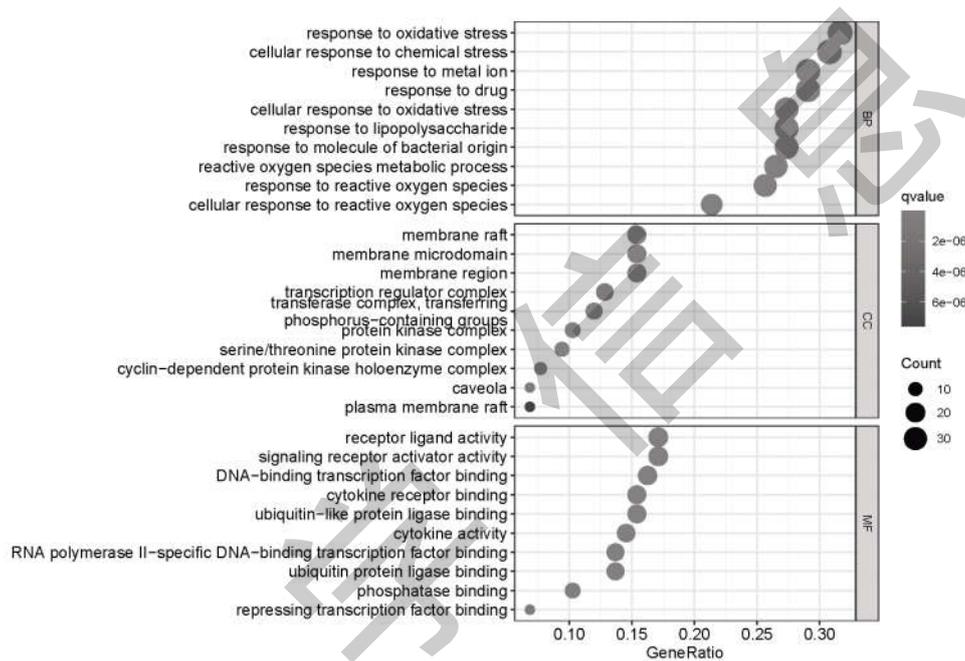


图 4 GO 功能富集分析

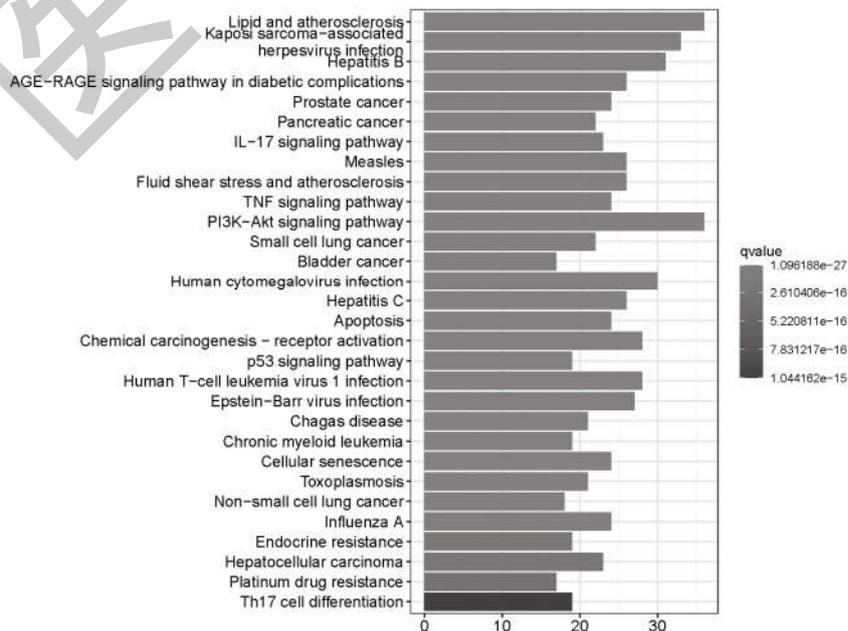


图 5 KEGG 通路富集分析

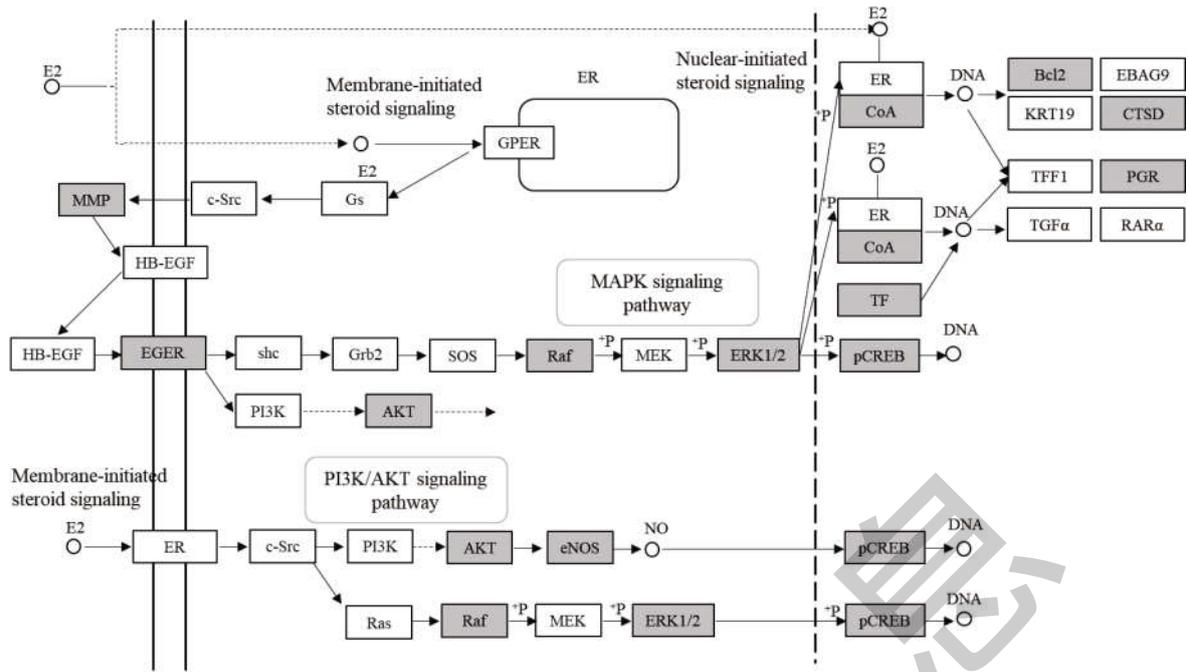


图 6 雌激素信号通路

2.7 分子对接预测成分和靶点的结合能力 依据网络药理学分析的“药物-活性成分-靶点网络”，将雌激素信号通路中与乳腺增生相关的靶点 AKT、ERK、CREB、PGR 与对应的活性成分进行分子对接（表 2），结果显示除了 AKT 与对应的活性成分有较好的结合能力外，其他靶点均与对应活性成分有强烈的结合能力。

表 2 活性成分与靶点活性中心结合的结合能

靶点	成分	结合能 (kcal/mol)
PGR	beta_sitosterol	-7.1
PGR	kaempferol	-9.2
PGR	poriferasterol_monoglucoside	-8.3
PGR	Spinasterol	-7.8
PGR	stigmast_7_enol	-7.6
PGR	Stigmasterol	-7.5
AKT	kaempferol	-6.1
AKT	luteolin	-6.3
AKT	quercetin	-6.2
CREB	ursolicacid	-7.8
MAPK1	luteolin	-8.8
MAPK1	quercetin	-8.5

3 讨论

中医认为乳腺增生属于“乳癖”范畴，因肝郁化火所致^[5,6]。夏枯草为唇形科夏枯草的干燥果穗，具

有清肝泻火、明目、散结消肿的功效^[7]，对治疗乳腺增生有明显疗效^[9,10]，但夏枯草治疗乳腺增生的物质基础及药理作用机制尚不明确。

本研究通过网络药理学分析，获得夏枯草治疗乳腺增生的活性成分包括 β-谷甾醇、山柰酚、α-菠甾醇、豆甾烯醇、飞燕草色素、木犀草素、黄质-I、豆甾醇葡萄糖苷、7-豆甾烯醇、桑色素、槲皮素、齐墩果酸、熊果酸。有研究表明，槲皮素在体外具有抗增殖活性，可抑制信号转导靶点，阻滞细胞周期，促进细胞凋亡^[12,13]。熊果酸能显著抑制癌细胞增殖，促进线粒体介导的细胞凋亡^[14]。以 β-谷甾醇为代表的植物甾醇具有雌激素样作用，可与雌激素受体结合发挥雌激素或抗雌激素作用^[15]。因此，夏枯草可能以槲皮素、β-谷甾醇和熊果酸等多种活性成分协同发挥治疗乳腺增生的作用。

研究表明^[2]，“下丘脑-垂体-性腺轴”失衡，体内雌二醇、孕酮及垂体催乳素等内分泌激素紊乱是导致乳腺增生发生的原因。本研究通过 GO 和 KEGG 富集分析发现夏枯草治疗乳腺增生的潜在靶点涉及应激反应、信号传递、转录调控、细胞周期调控等生物学过程以及雌激素信号通路、泌乳素信号通路、GnRH 信号通路、卵巢类固醇激素合成、GnRH 释放等与乳腺增生密切相关的通路，与乳腺增生的发病机制相吻合。另有研究表明^[16]，夏枯草对下丘脑-垂

体激素的作用不明显,但对雌激素、孕酮的作用比较明显。现代医学也多认为雌激素分泌相对过多,孕激素分泌相对过少是导致乳腺增生的常见原因^[2]。因此推测,雌激素信号通路可能是夏枯草治疗乳腺增生的关键信号通路。

雌激素是通过雌激素受体介导一系列信号传导^[17]。研究表明^[18,19],雌激素与其膜受体结合可以激活 PI3K/Akt 或 MAPK 等多条信号通路,从而参与细胞增殖和凋亡等生物过程,也可以通过调控 CREB 等转录因子调节靶基因转录。通常认为配体与受体结合能越低,结合构象越稳定。结合能小于-4.25 kcal/mol,表示配体与受体有一定的结合活性;结合能小于-5.0 kcal/mol,表示配体与受体有较好的结合活性;结合能小于-7.0 kcal/mol,表示配体与受体有强烈的结合活性^[20]。本研究将雌激素信号通路上的蛋白与对应成分进行分子对接,发现雌激素信号通路中 AKT、MAPK1、PGR、CREB 均可与对应活性成分较好的结合,因此推测夏枯草可能通过调控雌激素信号通路中 PI3K/Akt 通路或 MAPK 信号通路或直接作用于转录因子,多途径协调作用发挥治疗乳腺增生的作用,但具体机制还需进一步深入研究。

综上所述,夏枯草可能通过槲皮素、 β -谷甾醇、熊果酸等多种活性成分,通过调控雌激素信号通路中 PI3K/Akt 或 MAPK 通路或直接作用于转录因子,多成分、多靶点、多途径协同作用发挥治疗乳腺增生的作用。

参考文献:

- [1]张金爱,张国营.中西医结合治疗乳腺增生病 1080 例[J].现代中西医结合杂志,2008,17(30):4722-4723.
- [2]尹佳,马金柱.蒙药乳腺-I 号(M-I)治疗乳腺增生的机制研究现状[J].中国临床药理学杂志,2021,37(17):2373-2376.
- [3]Yang JM,Wu JH,Shen XY,et al.Efficacy of moxibustion by stimulating acupoints of Danzhong (CV17) and Ganshu (BL 18) on hyperplasia of mammary gland in rats [J].J Tradit Chin Med, 2018,38(1):76-82.
- [4]赵宏,孔令洲,张宇,等.基于网络药理学和分子对接技术及动物实验探究巴亚格七味散对酒精性肝病的作用机制 [J].中药新药与临床药理,2021,32(10):1480-1489.
- [5]张志强.夏枯草片加逍遥丸治疗乳腺增生症临床分析[J].中医临床研究,2017,9(32):104-105.
- [6]曾飞剑,李廷冠.小金丸夏枯草胶囊联用治乳腺囊性增生症(肝郁痰凝型)36 例[J].江西中医药,2009,40(11):43.
- [7]国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:292.
- [8]缪希雍.神农本草经疏[M].点校本.北京:中医古籍出版社,2002:431.
- [9]唐甜,闵美林.夏枯草口服液应用于乳腺纤维腺瘤手术后的临床研究[J].天津中医药大学学报,2021,40(4):472-476.
- [10]刘义芬,陈章生.单味夏枯草治疗乳腺增生病 32 例临床观察[J].时珍国医国药,1999,10(10):772.
- [11]杜康,王唯丁,韩彬,等.基于网络药理学研究“虎杖-女贞子”配伍治疗急性痛风性关节炎机制及实验验证[J].中国中药杂志,2022,47(6):1677-1686.
- [12]Chen X,Xu PL,Zhang HJ,et al.EGFR and ERK activation resists flavonoid quercetin induced anticancer activities in human cervical cancer cells in vitro[J].Oncol Lett,2021,22(5):754.
- [13]Deng XH,Song HY,Zhou YF,et al.Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro[J].Exp Ther Med,2013,6(5):1155-1158.
- [14]Wang SQ,Chang X,Zhang JP,et al.Ursolic Acid Inhibits Breast Cancer Metastasis by Suppressing Glycolytic Metabolism via Activating SP1/Caveolin -1 Signaling [J].Front Oncol, 2021,11:745584.
- [15]陶仕英,牛建昭,赵丕文,等. β -谷甾醇对 T47D 细胞雌激素受体表达及其下游基因 PS2 的影响[J].中国中医基础医学杂志,2015,21(2):165-167,174.
- [16]郭娜.夏枯草颗粒对气滞血瘀证乳腺增生模型大鼠下丘脑-垂体-性腺相关激素分泌和单胺类神经递质含量的影响[J].中医临床研究,2017,9(36):97-100.
- [17]Li XD,Huang J,Fluharty BR,et al.What are comparative studies telling us about the mechanism of ER action in the ERE-dependent E2 signaling pathway? [J].J Steroid Biochem Mol Biol,2008,109:266-272.
- [18]Lee YR,Park J,Yu HN,et al.Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17 β -estradiol through activation of estrogen receptor- α , but not estrogen receptor- β , and stimulates cell growth in breast cancer cells [J].Biochem Biophys Res Commun, 2005,336(4):1221-1226.
- [19]Zhao Y,Xu Y,Zheng HX,et al.QingYan formula extracts protect against postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rat model via active ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways[J].J Ethnopharmacol,2020,268:113644.
- [20]梁研,孙若岚,刘夫艳,等.基于网络药理学和实验验证分析黄芪-莜术-蚤休角药配伍抗结直肠癌的作用机制[J].中国中药杂志,2022,47(3):776-785.

收稿日期:2023-06-19;修回日期:2023-06-29

编辑/肖婷婷