

基于网络药理学和分子对接技术探讨雷公藤 卵巢毒性的机制

王志强^{1,2}, 宫彩霞³, 李振彬^{1,2}

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院风湿免疫科, 河北 石家庄 050082
2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023
3. 石家庄平安医院肾脏病科, 河北 石家庄 050012

[摘要] 目的:通过网络药理学和分子对接技术探讨雷公藤卵巢毒性的作用机制。方法:通过中药系统药理数据库及分析平台(TCMSP)和比较毒理基因组学数据库(CTD)收集雷公藤的候选毒性化合物和靶点,从CTD中获得雷公藤潜在的卵巢毒性靶点,并利用STRING数据库对雷公藤卵巢毒性的靶点基因进行分析。用Cytoscape软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,用cytoHubba插件鉴定核心基因。此外,利用R软件对雷公藤卵巢毒性的靶点基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。最后,使用Discovery Studio软件对核心毒性化合物和核心基因进行分子对接验证。结果:共获得9个雷公藤候选毒性化合物和56个潜在的卵巢毒性靶点。网络分析结果,雷公藤甲素、山柰酚和雷公藤红素是雷公藤的关键卵巢毒性化合物,核心卵巢毒性基因包括TP53、MYC、PTEN、MAPK3、MTOR、STAT3、EGFR、KRAS、CDH1和AKT1。GO和KEGG分析显示,雷公藤通过氧化应激、生殖系统发育和功能、细胞周期调节、对内源性激素和外源性刺激的反应、细胞凋亡调节、衰老等途径引起卵巢毒性。分子对接研究显示,雷公藤的3个关键卵巢毒性化合物可与10个核心基因的对接口袋相匹配。结论:雷公藤可能通过作用于10个核心基因和140条信号通路而导致卵巢毒性。



[关键词] 雷公藤;卵巢毒性;网络药理学;靶点;通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A

Molecular mechanism of ovarian toxicity of *Tripterygium wilfordii* Hook. F.: a study based on network pharmacology and molecular docking

WANG Zhiqiang^{1,2}, GONG Caixia³, LI Zhenbin^{1,2} (1. Department of Rheumatology and

收稿日期:2021-08-08 接受日期:2021-11-14 网络预发表日期:2022-01-26

基金项目:国家自然科学基金(81873301)

第一作者:王志强,副主任医师,主要从事中西医结合风湿病学研究;E-mail:1040988746@qq.com;https://orcid.org/0000-0002-4245-9122

通信作者:李振彬,教授,主任医师,博士生导师,主要从事中西医结合风湿病学研究;E-mail:lizb1962@126.com;https://orcid.org/0000-0002-9849-2132

Clinical Immunology, the 980th Hospital of the Joint Logistic Support Force of the People's Liberation Army, Shijiazhuang 050082, China; 2. First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Department of Nephrology, Shijiazhuang Ping'an Hospital, Shijiazhuang 050012, China)

Corresponding author: LI Zhenbin, E-mail: lizb1962@126.com, <https://orcid.org/0000-0002-9849-2132>

[**Abstract**] **Objective:** To explore the mechanism of ovarian toxicity of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. (TwHF) by network pharmacology and molecular docking. **Methods:** The candidate toxic compounds and targets of TwHF were collected by the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and the Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Then, the potential ovarian toxic targets were obtained from CTD, and the target genes of ovarian toxicity of TwHF were analyzed using the STRING database. The protein-protein interaction (PPI) network was established by Cytoscape and analyzed by the cytoHubba plug-in to identify hub genes. Additionally, the target genes of ovarian toxicity of TwHF were subjected to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses by using the R software. Finally, Discovery Studio software was used for molecular docking verification of the core toxic compounds and the hub genes. **Results:** Nine candidate toxic compounds of TwHF and 56 potential ovarian toxic targets were identified in this study. Further network analysis showed that the core ovarian toxic compounds of TwHF were triptolide, kaempferol and tripterine, and the hub ovarian toxic genes included *TP53*, *MYC*, *PTEN*, *MAPK3*, *MTOR*, *STAT3*, *EGFR*, *KRAS*, *CDH1* and *AKT1*. Besides, the GO and KEGG analysis indicated that TwHF caused ovarian toxicity through oxidative stress, reproductive system development and function, regulation of cell cycle, response to endogenous hormones and exogenous stimuli, apoptosis regulation and aging. The docking studies suggested that 3 core ovarian toxic compounds of TwHF were able to fit in the binding pocket of the 10 hub genes. **Conclusion:** TwHF may cause ovarian toxicity by acting on 10 hub genes and 140 signaling pathways.

[**Key words**] *Tripterygium wilfordii* Hook. F. ; Ovarian toxicity; Network pharmacology; Target; Pathway

[**缩略语**] 中药系统药理数据库及分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform,TCMSP);比较毒理基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database,CTD);蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI);最大团中心性(maximal clique centrality,MCC);基因本体(Gene Ontology,GO);京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG);蛋白结构数据库(Protein Data Bank,PDB);均方根偏差(root-mean-square deviation,RMSD);促分裂原活化的蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase,MAPK);哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR);信号转导及转录激活因子(signal transduction and activator of transcription,STAT);表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR);钙黏着蛋白(cadherin,CDH);磷脂酰肌醇3激酶(phos-

phoinositide 3-kinase, PI3K)

雷公藤具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛、杀虫解毒等功效,广泛用于治疗类风湿关节炎、红斑狼疮、肾小球肾炎、血小板减少性紫癜及各种皮肤病^[1]。由于临床疗效显著,雷公藤已成为中药现代化较成功的中草药之一。但研究表明,雷公藤也是近半个世纪以来毒性事件发生较多的中草药之一,其不良反应主要涉及生殖、内分泌、消化、血液等系统以及皮肤黏膜损伤^[2]。其中,雷公藤对生殖系统的损害最为突出,如育龄期女性月经紊乱或闭经、男性少精症或无精症、睾丸炎以及儿童远期性腺损害^[2-3],且其引起的不良反应女性比男性更常见^[4]。近年来,雷公藤卵巢毒性发生的机制、预防和治疗成为中医药学者关注的焦点。

网络药理学是以系统生物学和多向药理学为理论基础,集药物作用网络和生物网络于一体,系统研究复杂药物生物学效应,具有整体性和系统性的特点。网络药理学强调生物网络与药物作用网络的整合,从寻找单一目标到综合网络分析,分析药物与网络中节点或网络模块之间的关系。中药化学成分复杂,通常通过多组分、多靶点协同作用发挥药效,而网络药理学整体性、系统性则符合中医药防治疾病的系统整体观^[5]。本研究旨在利用网络药理学和分子对接技术探讨雷公藤的卵巢毒性机制,为进一步实验研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 雷公藤候选毒性化合物及其靶点筛选

在TCMSP数据库(<https://www.tcm-sp.com/>)^[6]获取雷公藤活性化合物,并按照口服生物利用度不低于30%、类药性不低于0.18标准进行筛选。然后,将从TCMSP数据库中筛选出的化合物直接输入CTD(<http://ctdbase.org/>)^[7]进行查询,得到雷公藤的候选毒性化合物和靶点。

1.2 雷公藤潜在卵巢毒性靶点筛选

以“卵巢疾病(ovarian diseases)”、“卵巢发育不全(ovarian dysgenesis)”、“卵巢功能不全(ovarian insufficiency)”、“卵巢早衰(premature ovarian failure)”、“无排卵(anovulation)”为关键词在CTD中搜集可能的卵巢毒性标志物及机制基因。雷公藤候选毒性化合物靶点与卵巢毒性靶点在线(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/beg/>

[tools/venn-diagrams](#))取交集,获得雷公藤潜在卵巢毒性靶点。

1.3 网络的构建与分析

首先,使用网络可视化软件Cytoscape 3.7.2^[8]构建雷公藤毒性化合物-卵巢毒性靶点网络,并利用NetworkAnalyzer工具对网络进行分析,度(degree)值较高的毒性化合物认定为核心化合物。然后,将雷公藤潜在卵巢毒性靶点提交到11.0版STRING数据库(<https://string-db.org/>)^[9],生物体设置为“智人(homo sapiens)”,以评估这些靶点之间潜在的PPI,最低要求的交互得分(minimum required interaction score)设置为中等置信度(medium confidence)0.400,其他参数保持默认,去除网络中不连接的节点,用Cytoscape 3.7.2建立PPI网络,利用Cytoscape软件中的cytoHubba插件(0.1版)根据MCC分数筛选核心靶点。

1.4 基因功能富集分析

用R 4.0.2软件中的ClusterProfiler 3.18.0版^[10]对PPI网络中的靶点基因进行GO和KEGG富集分析。以 $P < 0.05$ 和 $Q < 0.05$ 为显著性标准,筛选生物学过程、细胞组分、分子功能和信号通路进一步分析。

1.5 分子对接验证

以核心化合物作为配体,以PPI网络拓扑分析得到的核心靶点基因作为受体,通过Discovery Studio 2019软件(19.1.0版)的CDOCKER模式进行分子对接验证。核心化合物和核心靶点基因的三维结构分别从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[11]和PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)^[12]下载。核心靶点基因的蛋白质晶体结构经去水、加氢、模拟缺失环区域、计算蛋白质电离、对蛋白质结构进行质子化的预处理。活性对接口袋由原配体和结合位点球确定。提取靶点基因晶体结构中原配体,将其重新对接到预定的活性口袋中,并计算对接后配体构象与晶体结构中原配体构象的RMSD值。RMSD值 $\leq 2.5 \times 10^{-10}$ m时,认为分子对接结果可靠^[13]。如果没有原配体,活性对接口袋由PDB位点记录确定,以确保对接位置为蛋白质活性结构。其他CDOCKER模式对接参数保持默认。在此基础上,通过分子对接法预测和分析核心化合

物与预测核心靶点的潜在结合模式,计算CDOCKER相互作用能值,选择最佳受体-配体结合复合物可视化。

2 结果

2.1 雷公藤候选毒性化合物及其靶点筛选结果

在TCMSP数据库中共检索到144个雷公藤活性化合物,按口服生物利用度不低于30%和类药性不低于0.18筛选后得到51个活性化合物。雷公藤红素(tripterine或celastrol)虽口服生物利用度为17.84%,但其具有广泛的药理作用^[14],因此继续保留。最终共52个活性化合物输入CTD数据库进行化合物检索,获得雷公藤的9个候选毒性化合物和859个对应靶点(表1)。在9个候选毒性化合物中,雷公藤甲素(triptolide)的靶点最多($n=575$),异黄酮醇(isoxanthohumol)的靶点最少($n=3$)。

2.2 雷公藤潜在卵巢毒性靶点筛选结果

在CTD中检索到与卵巢疾病、卵巢发育不良、卵巢功能不全、卵巢早衰和无排卵相关的标志物及机制基因分别为360、4、18、12和1个。去除重复基因后,获得344个卵巢毒性靶点基因。这些靶点基因与859个雷公藤候选毒性靶点取交集,得到56个潜在卵巢毒性靶点。

2.3 毒性化合物-卵巢毒性靶点网络分析

Cytoscape 3.7.3构建的毒性化合物-卵巢毒性靶点网络包括64个节点(8个候选毒性化合物和56个潜在卵巢毒性靶点)和99条连线(图1)。在毒性化合物-卵巢毒性靶点网络中,度值较高的毒性活性化合物包括雷公藤甲素、山柰酚和雷公藤红素,分别对应37、20和20个靶点,提示这三种活性化合物是雷公藤卵巢毒性的主要物质基础。

将56个雷公藤卵巢毒性靶点导入STRING数据库,将PPI关系导入Cytoscape 3.7.2构建PPI网络(图2)。PPI网络由54个节点和428条边组成,平均节点度值为15.85。PPI网络中MCC评分较高的靶点包括TP53、MYC、PTEN、MAPK3、MTOR、STAT3、EGFR、KRAS、CDH1和AKT1,这些靶点可能为核心卵巢毒性基因(表2)。

2.4 基因功能富集分析结果

雷公藤卵巢毒性靶点的GO富集分析共获得生物学过程1405条、细胞组分49条、分子功能57条,各项排序前二十的条目见图3。可能与雷公藤卵巢毒性相关的生物学过程包括氧化应激、生殖

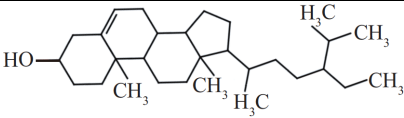
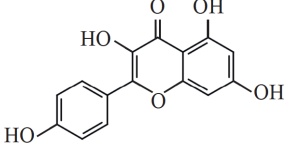
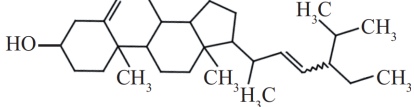
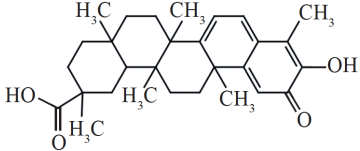
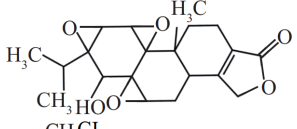
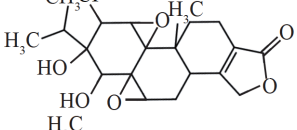
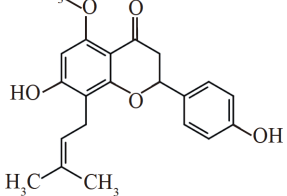
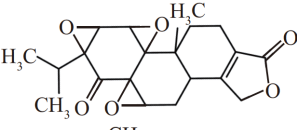
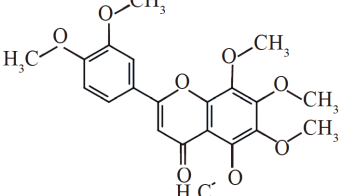
系统发育、细胞周期调控、细胞发育分化、对内源性激素和外源性刺激的反应、凋亡调控、衰老等。

雷公藤卵巢毒性靶点的KEGG富集分析共获得140条信号通路,其中肿瘤特异性和非特异性通路占大多数,这可能是由于雷公藤活性成分在肿瘤领域的研究最多。其他通路包括EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗(EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、细胞衰老(cellular senescence)、内分泌抵抗(endocrine resistance)、FoxO信号通路(FoxO signaling pathway)、PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、糖尿病并发症的AGE-RAGE信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、p53信号通路(p53 signaling pathway)、HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)、凋亡(apoptosis)、催乳素信号通路(prolactin signaling pathway)、铂耐药(platinum drug resistance)、库欣综合征(Cushing syndrome)、ErbB信号通路(ErbB signaling pathway)、甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)、细胞周期(cell cycle)、自噬(autophagy)、卵巢类固醇生成(ovarian steroidogenesis)等。KEGG分析结果排序前二十信号通路见图4。

2.5 分子对接验证结果

以雷公藤核心毒性化合物(雷公藤甲素、山柰酚、雷公藤红素)作为配体,核心卵巢毒性靶点基因(TP53、MYC、PTEN、MAPK3、MTOR、STAT3、EGFR、KRAS、CDH1、AKT1)作为受体进行分子对接。根据靶蛋白晶体结构中原配体位置或PDB位点记录设定的活性对接口袋如下:5HMH(X轴:-14.518 980,Y轴:1.682 552,Z轴:17.704 902)、6U80(X轴:-19.102 382,Y轴:29.653 855,Z轴:4.222 920)、4C4F(X轴:0.239 186,Y轴:-12.319 555,Z轴:-16.771 483)、4QTB(X轴:36.970 997,Y轴:54.769 568,Z轴:50.201 484)、4HVB(X轴:43.837 362,Y轴:15.610 802,Z轴:31.898 271)、5E1E(X轴:-17.968 369,Y轴:-21.351 735,Z轴:17.346 133)、5D41(X轴:-23.651 056,Y轴:31.318 496,Z轴:12.155 018)、6GJ5(X轴:-21.330 351,Y轴:-26.557 530,Z轴:-16.697 526)、3FF8(X轴:-2.589 344,Y轴:9.025 115,Z轴:33.390 049)、3OS5(X轴:39.535 482,Y轴:-18.813 650,Z轴:-11.580 706)。结果表明,所有核心毒性化合物分子都能稳定结

表 1 雷公藤候选毒性化合物及对应靶点数**Table 1** The candidate toxic compounds and the corresponding targets of *Tripterygium wilfordii* Hook. F.

化合物	化学结构式	CAS编号	相对分子质量	口服生物利用度(%)	类药性	靶点数
β -谷甾醇 (β -sitosterol)		83-46-5	414.79	36.91	0.75	20
山柰酚 (kaempferol)		520-18-3	286.25	41.88	0.24	174
豆甾醇 (stigmasterol)		83-48-7	412.77	43.83	0.76	42
雷公藤红素 (tripterine 或 celastrol)		34157-83-0	450.67	17.84	0.78	162
雷公藤甲素 (triptolide)		38748-32-2	360.44	51.29	0.68	575
雷公藤氯内酯醇 (tripchlorolide)		132368-08-2	396.90	78.72	0.72	7
异黄腐醇 (isoxanthohumol)		521-48-2	354.43	56.81	0.39	3
雷公藤内酯酮 (triptonide)		38647-11-9	358.42	68.45	0.68	10
川陈皮素 (nobiletin)		478-01-3	402.43	61.67	0.52	34

CAS:化学文摘社

合在核心靶点基因蛋白的对接口袋中。分子对接的CDOCKER相互作用能见表3,雷公藤甲素与核心靶点基因的分子对接模式见图5。从表3的结果可以看出,RMSD值均小于 2×10^{-10} m,说明本分子对接方法和参数设置可靠;通过CDOCKER对接方

法预测了3种核心毒性化合物与核心毒性靶点之间的相互作用。CDOCKER相互作用能越高,配体与靶蛋白的结合能力越强。图5显示,雷公藤甲素分子可通过氢键、烷基等与靶点基因蛋白分子活性对接口袋的氨基酸残基结合。

此外,由于对叶酸、铁的细胞摄取和生物利用度有抑制作用,山奈酚禁用于叶酸、铁缺乏患者^[19]。与山奈酚一样,雷公藤红素具有抗氧化和促氧化的双重作用,这可能与细胞类型有关,与剂量也有关^[20]。雷公藤红素与生殖毒性、心脏毒性、肝毒性和血液毒性相关^[20]。此外,雷公藤红素狭窄的治疗窗口和抑制UGT1A6和UGT2B7介导的四甲基伞形酮(4-Mu)糖醛酸化也值得关注,后者可能导致严重的临床药物间相互作用^[21]。鉴于此,广泛开展雷公藤的毒性机制研究是必要的。

PPI网络的拓扑分析结果提示,*TP53*、*MYC*、*PTEN*、*MAPK3*、*MTOR*、*STAT3*、*EGFR*、*KRAS*、*CDH1*、*AKT1*是雷公藤卵巢毒性的核心靶点基因。*TP53*是一个肿瘤抑制基因,参与调控细胞周期和凋

亡^[22]。雷公藤多苷可通过促进p53磷酸化诱导大鼠卵巢组织凋亡和坏死,导致卵巢早衰^[23]。*MYC*是一种原癌基因,编码核磷蛋白,在细胞生长、分化、凋亡和细胞周期中发挥作用。多囊卵巢综合征大鼠卵巢组织中*MYC*过表达可促进颗粒细胞、闭锁卵泡内膜和周围卵泡膜细胞凋亡,导致闭锁,而有效的治疗可合理调节*MYC*表达水平的升高^[24]。*PTEN*是一种具有特异性磷酸化酶活性的抑癌基因,在细胞周期、细胞迁移、细胞分化、细胞凋亡等生理活性调控中发挥重要作用^[25]。*PTEN*表达失衡在卵巢早衰的发病机制中起重要作用^[26]。*MAPK3*是MAPK家族成员,通过调节各种细胞过程如增殖、分化和细胞周期进程,以响应各种细胞外信号,起到信号级联作用。*MAPK3*活性对于卵母细胞成熟过程中颗粒细胞的正常功能至关重要^[27]。

PI3K/AKT/mTOR信号通路是重要的细胞内信号转导通路,参与卵母细胞的生长发育、闭锁和颗粒细胞的增殖分化,而卵泡过度凋亡可能导致卵巢过早衰老^[28]。

*AKT1*是一种已知致癌基因,可以调节新陈代谢、增殖、细胞存活和生长等诸多过程。在哺乳动物卵巢中,*AKT1*可调控卵泡和卵母细胞发育,并在整个卵泡形成过程中调控颗粒细胞凋亡,因此*AKT1*失调与多种卵巢疾病相关^[29]。可见mTOR和*AKT1*在维持正常卵巢功能中具有重要作用。*STAT3*是STAT家族成员,在细胞增殖、分化、凋亡等过程中起着关键作用。*STAT3*在小鼠原代卵泡、原代卵泡和次生卵泡中均有高表达,并在发育过程中出现一定的表达变化^[30]。*EGFR*作为上游基因,通过PI3K/AKT信号通路在调节雌性生殖中起关键作用。*EGFR*不仅能影响卵巢激素的分泌,还能调节卵泡的生长发育^[31]。肿瘤学研究表明,*KRAS*和*CDH1*基因在卵巢疾病中起重要作用^[32-33]。因此,基于上述基因在卵巢疾病中的重要作用,本研究的生物信息学分析结果是可靠的。

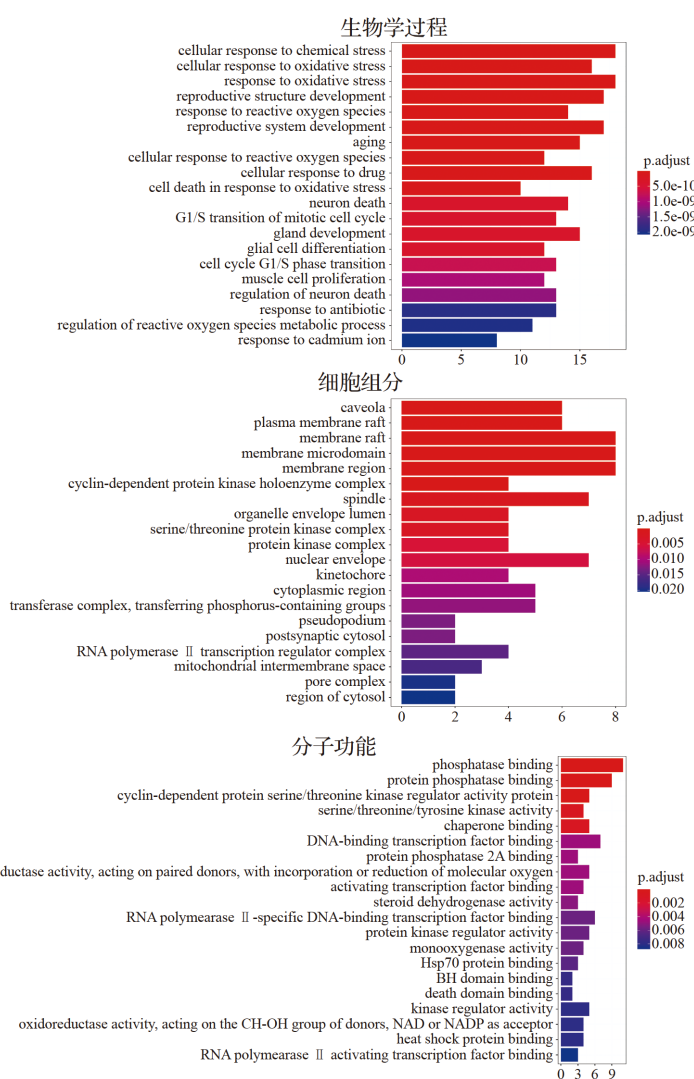


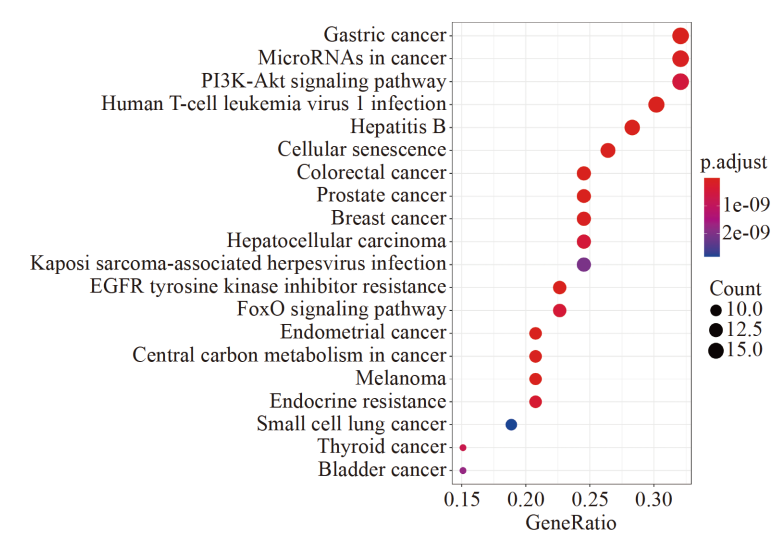
图3 雷公藤卵巢毒性靶点的基因本体(GO)富集分析结果排序前二十条目

Figure 3 The top 20 of Gene Ontology(GO) enrichment analysis of ovarian toxicity targets of *Tripterygium wilfordii* Hook. F.

分子对接结果证实雷公藤核心毒性化合物(雷公藤甲素、山柰酚、雷公藤红素)与核心卵巢毒性靶点基因(*TP53*、*MYC*、*PTEN*、*MAPK3*、*MTOR*、*STAT3*、*EGFR*、*KRAS*、*CDH1*、*AKT1*)结合的可能性。本分子对接研究确定晶体结构中原配体位置或PDB位点记录为活性对接口袋,保证了毒性化合物与毒性靶点蛋白结合位置为关键活性区域。通常认为,CDOCKER相互作用能越高,配体与靶蛋白的结合能力越强^[13]。毒性化合物与毒性靶点蛋白的高亲和力证明了分子对接结果的可靠性。

根据本研究中GO和KEGG富集分析的结果可以推测雷公藤的卵巢毒性与细胞凋亡、类固醇代谢、免疫、炎症等相关。在GO富集分析中,涉及最多的生物学过程是氧化应激,而颗粒细胞的氧化损伤是卵巢功能衰退的关键因素^[34]。PI3K-AKT信号通路在卵母细胞存活、原始卵泡的活化和发育以及卵母细胞的DNA损伤修复中发挥重要作用,PI3K-AKT信号通路的缺陷可引起原始卵泡/卵母细胞存活率降低或卵泡活化缺陷,导致严重的卵巢功能障碍,如卵巢储备下降、卵巢功能不全或卵巢早衰以及卵巢反应差等^[35];颗粒细胞的

过度凋亡是卵巢早衰的典型特征,并且与卵母细胞质量相关^[36];心房利钠肽受体A/孕酮受体膜成分1/EGFR复合物是人卵巢颗粒细胞增殖/凋亡的关键调控因子^[31];高脂饮食诱导肥胖通过AKT/FoxO/Smad信号通路导致小鼠卵泡发育异常^[37]。这些研究所涉及的PI3K-AKT信号通路和凋亡、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗、细胞周期等通路以及FoxO信号通路均包括在本研究KEGG富集分析中。既往研究显示,雷公藤对卵巢毒性机制的研究主要涉及干扰生殖激素分泌、诱导卵巢细胞凋亡、抑制卵泡生长发育等^[2]。雷公藤多苷可致雌性小鼠卵



KEGG:京都基因与基因组百科全书.

图4 雷公藤卵巢毒性靶点的KEGG通路富集分析结果排序前二十信号通路

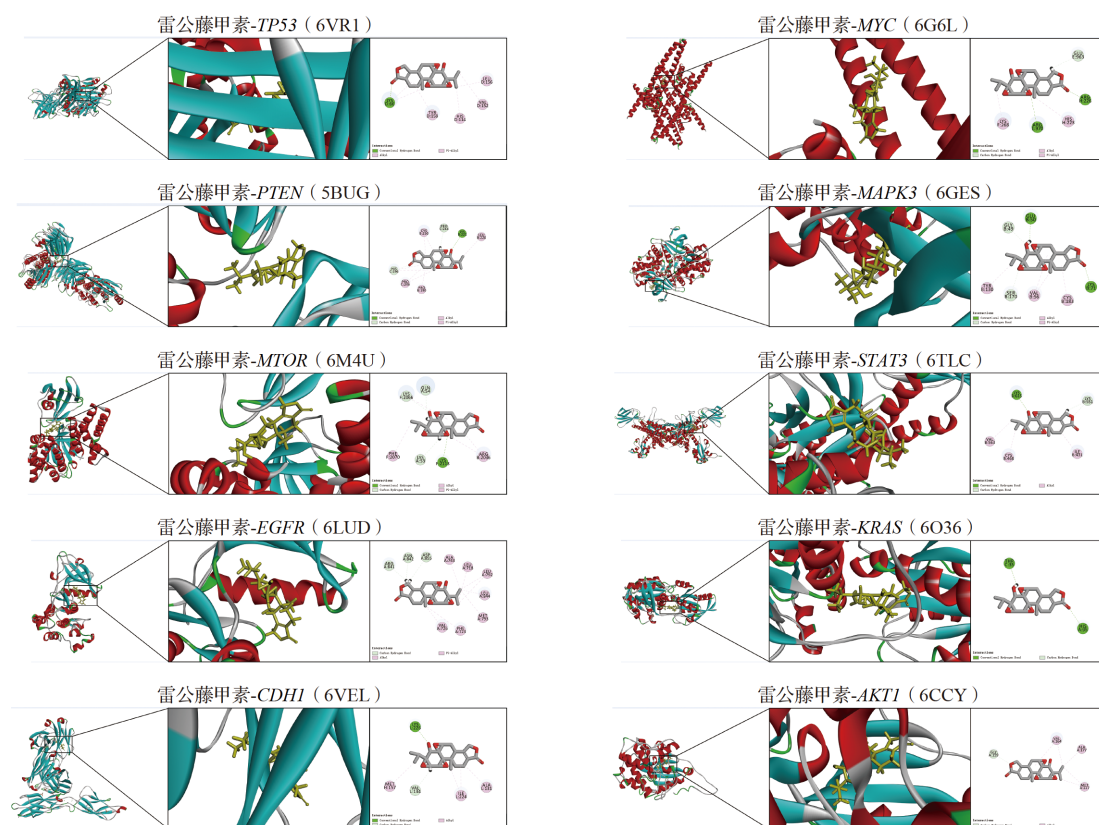
Figure 4 The top 20 of KEGG enrichment analysis of ovarian toxicity targets of *Tripterygium wilfordii* Hook. F.

表3 雷公藤核心毒性化合物与核心卵巢毒性靶点基因分子对接的CDOCKER相互作用能

Table 3 The CDOCKER interaction energy between core toxic compounds and hub ovarian toxicity target genes of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. in molecular docking

毒性靶点基因	PDBID	RMSD($\times 10^{-10}$ m)	CDOCKER相互作用能(kJ/mol)			
			雷公藤甲素	山柰酚	雷公藤红素	原配体
<i>TP53</i>	5HMH	0.474 937	137.2	267.1	298.6	309.1
<i>MYC</i>	6U80	0.280 991	157.4	228.3	263.3	184.0
<i>PTEN</i>	4C4F	0.213 419	134.5	236.2	212.9	170.7
<i>MAPK3</i>	4QTB	1.212 460	182.1	283.5	193.3	360.9
<i>MTOR</i>	4HVB	0.753 273	166.4	302.6	263.9	245.6
<i>STAT3</i>	5E1E	0.754 705	204.2	205.9	194.7	216.0
<i>EGFR</i>	5D41	0.458 168	94.1	239.0	183.8	223.4
<i>KRAS</i>	6GJ5	0.646 935	145.8	144.5	164.9	156.4
<i>CDH1</i>	3FF8	—	125.8	239.3	197.3	—
<i>AKT1</i>	3OS5	0.945 302	172.6	191.1	183.9	207.6

“—”:靶点基因蛋白晶体结构中无配体。PDBID:蛋白结构数据库编号;RMSD:均方根偏差。



黄色结构为雷公藤甲素,彩色结构为卵巢毒性核心靶点基因分子。

图5 雷公藤甲素与卵巢毒性核心靶点基因的分子对接模式图

Figure 5 Molecular docking pattern diagram of triptolide with hub genes of ovarian toxicity

巢指数和雌二醇水平下降,各级生长卵泡和黄体数减少、闭锁卵泡明显增加^[38]。雷公藤通过破坏卵巢凋亡基因*Bcl-2/Bax*的平衡,增加肿瘤坏死因子- α 和 γ 干扰素的生成^[39],激活Stk11-p53-p21信号通路^[23],下调Smad2和AKT表达^[40],诱导卵巢组织凋亡坏死和卵巢早衰。雷公藤还通过氧化应激、PI3K-AKT信号通路诱导卵巢颗粒细胞自噬,导致卵泡生长发育受阻,卵巢储备下降^[41-42]。上述研究结果与本研究的KEGG结果一致。

综上所述,本研究基于网络药理学方法结合分子对接技术表明,雷公藤可能通过作用于10个核心基因和140条信号通路而导致卵巢毒性。但本研究还存在一些局限性。首先,由于筛选条件和数据库容量的限制,一些关键活性化合物、靶点和通路可能未纳入本研究;其次,本研究仅分析了部分单一活性化合物,未考虑其协同和累积效应,而复合化合物在中草药中的生物活性远强于单一、分离的化合物,内部相互作用(中草药有效成分之间的相互作用)和外部相互作用(与目标机体

生物环境中其他物质的相互作用)可能会对中草药的药代动力学、药效学和毒理学性质产生重要的影响^[43];再次,本研究未考虑雷公藤活性化合物含量和浓度对其毒性的影响,如不同浓度的雷公藤甲素作用效应有差异^[44];最后,由于缺乏相关数据,本研究未讨论活性化合物与靶点和通路之间的相互关系,包括作用类型和作用效果。因此,需要更多研究来阐明雷公藤的卵巢毒性机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵莉,周学平. 中药配伍减轻雷公藤生殖毒性的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(2): 482-484. ZHAO Li, ZHOU Xueping. Research advance of reducing reproduction toxicity of *Tripterygium wilfordii* with compatibility of Chinese medicine[J]. **China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy**, 2015, 30(2): 482-484. (in Chinese)
- [2] 徐颖,樊媛芳,赵元,等. 近40年雷公藤生殖毒性

- 研究概述[J]. **中国中药杂志**, 2019, 44(16): 3406-3414.
- XU Ying, FAN Yuanfang, ZHAO Yuan, et al. Overview of reproductive toxicity studies on *Tripterygium wilfordii* in recent 40 years[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2019, 44(16): 3406-3414. (in Chinese).
- [3] 李逸群, 胡瑞学, 贾可欣, 等. 雷公藤多苷(甙)片治疗类风湿关节炎的安全性系统评价[J]. **中国中药杂志**, 2020, 45(4): 775-790.
- LI Yiqun, HU Ruixue, JIA Kexin, et al. Meta-analysis on safety of *Tripterygium* glycosides ablets in treatment of rheumatoid arthritis[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2020, 45(4): 775-790. (in Chinese)
- [4] LIU L, JIANG Z, LIU J, et al. Sex differences in subacute toxicity and hepatic microsomal metabolism of triptolide in rats[J]. **Toxicology**, 2010, 271(1-2): 57-63.
- [5] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. **Chin J Nat Med**, 2013, 11(2): 110-120.
- [6] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. **J Cheminform**, 2014, 6(1): 13.
- [7] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): update 2021[J]. **Nucleic Acids Res**, 2021, 49(D1): D1138-D1143.
- [8] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, et al. Cytoscape automation: empowering workflow-based network analysis[J]. **Genome Biol**, 2019, 20(1): 185.
- [9] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. **Nucleic Acids Res**, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [10] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. **OMICS-J Integrative Biol**, 2012, 16(5): 284-287.
- [11] KIM S, CHEN J, CHENG T, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data[J]. **Nucleic Acids Res**, 2019, 47(D1): D1102-D1109.
- [12] GOODSELL D S, ZARDECKI C, DI COSTANZO L, et al. RCSB Protein Data Bank: enabling biomedical research and drug discovery[J]. **Protein Sci**, 2020, 29(1): 52-65.
- [13] ZHANG B, ZHAO J, WANG Z, et al. Identification of multi-target anti-AD chemical constituents from traditional Chinese medicine formulae by integrating virtual screening and *in vitro* validation[J]. **Front Pharmacol**, 2021, 12: 709607.
- [14] FAN D, GUO Q, SHEN J, et al. The effect of triptolide in rheumatoid arthritis: from basic research towards clinical translation[J]. **Int J Mol Sci**, 2018, 19(2): 376.
- [15] 曾又佳, 孙惠力, 徐缘钊, 等. 颗粒细胞凋亡在雷公藤甲素诱导卵巢损伤中的作用[J]. **广东医学**, 2014, 35(7): 969-973.
- ZENG Youjia, SUN Huili, XU Yuanzhao, et al. The role of granulosa cell apoptosis in *Triptolide*-induced ovary injury in NIH mice[J]. **Guangdong Medical Journal**, 2014, 35(7): 969-973. (in Chinese)
- [16] 周雪, 赵光锋, 陈士雯, 等. MSCs上清可减轻雷公藤甲素对KGN细胞的损伤作用[J]. **中国免疫学杂志**, 2014, 30(12): 1641-1646.
- ZHOU Xue, ZHAO Guangfeng, CHEN Shiwen, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium could ameliorated triptolide induced damage in KGN cells[J]. **Chinese Journal of Immunology**, 2014, 30(12): 1641-1646. (in Chinese)
- [17] FRANCIS A R, SHETTY T K, BHATTACHARYA R K. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine[J]. **Carcinogenesis**, 1989, 10(10): 1953-1955.
- [18] NIERING P, MICHELS G, WÄTJEN W, et al. Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: implication of oxidative stress and apoptosis[J]. **Toxicol Appl Pharmacol**, 2005, 209(2): 114-122.
- [19] ALAM W, KHAN H, SHAH M A, et al. Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: current therapeutic standing[J]. **Molecules**, 2020, 25(18): 4073.
- [20] CASCÃO R, FONSECA J E, MOITA L F. Celastrol: a spectrum of treatment opportunities in chronic diseases[J]. **Front Med**, 2017, 4: 69.
- [21] HOU W, LIU B, XU H. Celastrol: progresses in structure-modifications, structure-activity relationships, pharmacology and toxicology[J]. **Eur J Medicinal Chem**, 2020, 189: 112081.
- [22] BERGAMASCHI D, SAMUELS Y, O'NEIL N J, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. **Nat Genet**, 2003, 33(2): 162-167.
- [23] LIU T E, ZHANG L, WANG S, et al. *Tripterygium* glycosides induce premature ovarian failure in rats by promoting p53 phosphorylation and activating the serine/threonine kinase 11-p53-p21 signaling pathway[J]. **Exp Therapeutic Med**, 2015, 10(1): 12-18.
- [24] SEYYED ANVARI S, DEHGAN G H, RAZI M. Preliminary findings of platelet-rich plasma-induced ameliorative effect on polycystic ovarian syndrome[J]. **Cell J**, 2019, 21(3): 243-252.
- [25] JIANG B H, LIU L Z. PI3K/PTEN signaling in

- angiogenesis and tumorigenesis[J]. **Adv Cancer Res**, 2009, 102: 19-65.
- [26] KUANG H, ZHANG L, PENG J, et al. Premature ovarian failure, menopause and ovarian cancer, three nodes on the same string: *Pten* and other potential genes on the GO[J]. **Med Hypotheses**, 2009, 73(6): 961-962.
- [27] GRATAO A A, DAHLHOFF M, SINOWATZ F, et al. Betacellulin overexpression in the mouse ovary leads to MAPK3/MAPK1 hyperactivation and reduces litter size by impairing fertilization[J]. **Biol Reprod**, 2008, 78(1): 43-52.
- [28] GROSBOS J, DEMEESTERE I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during *in vitro* human follicle activation[J]. **Hum Reprod**, 2018, 33(9): 1705-1714.
- [29] CECCONI S, MAURO A, CELLINI V, et al. The role of Akt signalling in the mammalian ovary[J]. **Int J Dev Biol**, 2012, 56(10-11-12): 809-817.
- [30] TSCHERNER A, BROWN A C, STALKER L, et al. STAT3 signaling stimulates miR-21 expression in bovine cumulus cells during *in vitro* oocyte maturation[J]. **Sci Rep**, 2018, 8(1): 11527.
- [31] ZHENG Q, LI Y, ZHANG D, et al. ANP promotes proliferation and inhibits apoptosis of ovarian granulosa cells by NPRA/PGRC1/EGFR complex and improves ovary functions of PCOS rats[J/OL]. **Cell Death Dis**, 2017, 8(10): e3145.
- [32] TEASLEY H E, BEESLEY A, KIM T H, et al. Differential expression of KRAS and SIRT1 in ovarian cancers with and without endometriosis[J]. **Reprod Sci**, 2020, 27(1): 145-151.
- [33] LIN C, XU X, YANG Q, et al. Circular RNA ITCH suppresses proliferation, invasion, and glycolysis of ovarian cancer cells by up-regulating CDH1 via sponging miR-106a[J]. **Cancer Cell Int**, 2020, 20(1): 336.
- [34] TESARIK J, GALÁN-LÁZARO M, MENDOZA-TE-SARIK R. Ovarian aging: molecular mechanisms and medical management[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(3): 1371.
- [35] DE FELICI M, KLINGER F G. PI3K/PTEN/AKT signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(18): 9838.
- [36] REGAN S L P, KNIGHT P G, YOVICH J L, et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view[J]. **Front Endocrinol**, 2018, 9: 61.
- [37] WU Y, ZHANG Z, LIAO X, et al. Effect of high-fat diet-induced obesity on the Akt/FoxO/Smad signaling pathway and the follicular development of the mouse ovary[J]. **Mol Med Rep**, 2016, 14(4): 3894-3900.
- [38] 陈燕霞, 袁 苑, 马 堃, 等. 定坤丹对雷公藤多苷诱导卵巢储备功能低下小鼠性激素和卵泡计数的影响[J]. **中国实验方剂学杂志**, 2020, 26(14): 78-84.
- CHEN Yanxia, YUAN Yuan, MA Kun, et al. Effect of Dingkundan on sex hormone and follicle count in mice of *Tripterygium Wilfordii* Polyglycosides induced diminished ovarian reserve[J]. **Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2020, 26(14): 78-84. (in Chinese)
- [39] 徐文君, 高 慧, 李 杨. 补肾调冲方对卵巢早衰大鼠性激素水平及TNF- α 、IFN- γ 蛋白表达的影响[J]. **药物评价研究**, 2016, 39(6): 953-957.
- XU Wenjun, GAO Hui, LI Yang. Effect of Bushen Tiaochong Prescription on sex hormone level and TNF- α and IFN- γ protein expression in rats with premature ovarian failure[J]. **Drug Evaluation Research**, 2016, 39(6): 953-957. (in Chinese)
- [40] SU J, CHENG J, SUN H X, et al. Tripterygium glycosides impairs the proliferation of granulosa cells and decreases the reproductive outcomes in female rats[J]. **Birth Defects Res B**, 2014, 101(3): 283-291.
- [41] 马蔚蓉, 谈 勇. 金丝桃苷改善雷公藤诱导的POI小鼠卵巢储备的作用及机制[J]. **四川大学学报(医学版)**, 2021, 52(3): 458-466.
- MA Weirong, TAN Yong. The effect and mechanism of hyperin on ovarian reserve of tripterygium glycosides-induced POI mice[J]. **Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)**, 2021, 52(3): 458-466. (in Chinese)
- [42] 白 俊, 吴也可, 吴克明, 等. 雷公藤甲素通过PI3K/AKT/mTOR通路诱导卵巢颗粒细胞自噬的实验研究[J]. **中国中药杂志**, 2019, 44(16): 3429-3434.
- BAI Jun, WU Yeke, WU Keming, et al. Triptolide induces autophagy of ovarian granulosa cells via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. **China Journal Chinese Materia Medica**, 2019, 44(16): 3429-3434. (in Chinese)
- [43] BURIANI A, FORTINGUERRA S, SORRENTI V, et al. Essential oil phytocomplex activity, a review with a focus on multivariate analysis for a network pharmacology-informed phylogenomic approach[J]. **Molecules**, 2020, 25(8): 1833.
- [44] 李芳琼, 赵东晓, 王 娟, 等. 基于iTRAQ技术分析不同浓度的雷公藤甲素作用肺癌细胞后的差异蛋白表达[J]. **中国新药杂志**, 2018, 27(11): 1321-1328.
- LI Fangqiong, ZHAO Dongxiao, WANG Juan, et al. Identification of differential expression proteins in lung cancer cells treated with triptolide by iTRAQ[J]. **Chinese Journal of New Drugs**, 2018, 27(11): 1321-1328. (in Chinese)

[本文编辑 余 方 刘丽娜]