

基于网络药理学探讨玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的作用机制

张云, 茅向军, 范志梁, 周瑞, 李银洛, 周斌, 魏子涵, 柴艺汇*, 张丽艳*

贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年9月13日; 录用日期: 2023年9月22日; 发布日期: 2023年11月17日

摘要

目的: 采用网络药理学的分析方法, 探讨玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的作用机制。方法: 通过TCMSP数据库收集玉蝴蝶祛斑膏潜在有效活性化合物, 并通过Swiss Target Prediction数据库筛查其潜在有效活性化合物的人类潜在有效靶点蛋白; 在DisGeNET、GeneCards、TTD等数据库筛查黄褐斑的疾病靶点蛋白; 通过STRING数据库构建蛋白-蛋白互作网络数据, 并利用Cytoscape软件进行可视化拓扑结构分析, 将关键靶点蛋白通过DAVID数据库进行基因功能和通路富集分析。结果: 筛选得到玉蝴蝶祛斑膏中潜在有效活性成分66个, 所对应潜在靶点蛋白478个, 与黄褐斑疾病相关疾病靶点蛋白120个。“成分-靶点”网络图提示槲皮素、黄芩素等是玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的关键成分。GO富集分析结果显示, 共有225个条目与生物过程相关, 共有40个条目与细胞组成相关, 共有63个条目与分子功能相关; 富集分析显示, 参与治疗黄褐斑疾病的关键靶点蛋白主要与131条通路相关联, 其主要涉及癌症通路、癌症蛋白聚糖通路等。其中癌症通路的P值最高。结论: 文章利用网络药理学多成分、多靶点、多维度、多途径的分析方法, 较为全面地阐明了玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的作用特点, 初步揭示了玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的有效基础物质和作用机制, 为后续研究提供思路与依据。

关键词

玉蝴蝶祛斑膏, 网络药理学, 黄褐斑, 机制, 化学成分, 槲皮素

Mechanism of Yuhudie Macula-Removing in Treatment of Chloasma Based on Network Pharmacology

Yun Zhang, Xiangjun Mao, Zhiliang Fan, Rui Zhou, Yinluo Li, Bin Zhou, Zihan Wei, Yihui Chai*, Liyan Zhang*

School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

*通讯作者。

文章引用: 张云, 茅向军, 范志梁, 周瑞, 李银洛, 周斌, 魏子涵, 柴艺汇, 张丽艳. 基于网络药理学探讨玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的作用机制[J]. 药物化学, 2023, 11(4): 250-261. DOI: 10.12677/hjmce.2023.114030

Received: Sep. 13th, 2023; accepted: Sep. 22nd, 2023; published: Nov. 17th, 2023

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of Yuhudie Macula-removing in the treatment of chloasma by means of network pharmacological analysis. **Methods:** The potential active compounds of Yuhudie Macula-removing were collected by TCMSP database, and its human potential effective target protein of the potential active compounds was screened by Swiss Target Prediction database. The target proteins of chloasma were screened in DisGeNET, GeneCards, TTD and other databases. The protein-protein interaction network data was constructed by using STRING database, and the visual topological structure analysis was carried out by using Cytoscape software. The gene function and pathway enrichment of key target proteins were analyzed through the DAVID database. **Results:** 66 potential active ingredients, 478 potential target proteins and 120 target proteins related to chloasma disease were selected. The “component-target” network diagram indicates that quercetin and baicalein are the key components of Yuhudie Macula-removing in the treatment of chloasma disease. GO enrichment analysis showed that 225 items were related to biological processes, 40 items were related to cell composition, and 63 items were related to molecular function. Enrichment analysis showed that the key target proteins involved in the treatment of chloasma disease were mainly associated with 131 pathways, which mainly involved cancer pathways and cancer proteoglycan pathways. The cancer pathway has the highest *P* value. **Conclusion:** Using the multi-component, multi-target, multi-dimensional, multi-pathway analysis method of network pharmacology, this paper comprehensively elucidates the action characteristics of Yuhudie Macula-removing in the treatment of chloasma disease, and initially reveals the effective basic substances and mechanism of action of Yuhudie Macula-removing in the treatment of chloasma disease, providing ideas and basis for subsequent research.

Keywords

Yuhudie Macula-Removing, Network Pharmacology, Chloasma, Mechanism, Chemical Constituents, Quercetin

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄褐斑(Chloasma), 最早出现在《黄帝内经》中, 主要表现为面颊的黄褐色或咖啡色的色素沉着斑。现代医学按照皮肤颜色、皮损形状特点称其为“黄褐斑”、“蝴蝶斑”, 斑迹形状大小不一, 一般无自觉症状, 是一类色素合成功能失调导致的局限性的慢性获得性的皮肤色素沉着疾病。调查发现, 该病高发于妊娠期前后的女性, 具体发病机制尚不明确, 多数学者认为主要与体内激素失调有关[1] [2] [3] [4], 还与紫外线照射[5] [6]、皮肤光老化[7] [8] [9]等有关, 目前治疗黄褐斑的药物会对患者的心理和生活质量造成较大的影响。因此, 寻求安全有效的防御措施尤为重要和迫切。

玉蝴蝶斑膏(Yuhudie Macula-removing), 由柿叶 20 g、木蝴蝶 15 g、菟丝子 2 g 入组方而成; 柿叶为柿树科植物柿 *Diospyros kaki* L. f. 的干燥叶, 气微, 味微苦涩, 归肺经, 具有活血止血、消渴及各种出血、糜烂的功效, 方中用量最大, 起主要治疗作用, 故为君药; 木蝴蝶为紫葳科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum*

(L.) Vent.的干燥成熟种子,气微,味苦,归肺胃经,用于肺热咳嗽、清肺理气、喉痹、木蝴蝶实佐君药除祛色斑之外,对于湿热余滞亦能起到良好的效用;菟丝子为旋花科植物菟丝子 *Cuscutachinensis* Lam.的干燥成熟种子,气微,味甘,归肝脾经,具有补益肝肾、消风祛斑的功效。菟丝子为补肝、脾、肾三经之要药,有调节脏腑的功能,达到润肤美白的作用,佐药。

目前虽有大量的文献报道中药治疗黄褐斑的原理与机制,但对于外用制剂的研究较少,并且对于玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的作用机理尚不明确。网络药理学是挖掘国内外医药领域相关数据,通过网络平台建立药物疾病之间的关系,进行网络药理学数据分析,并构建网络互作结构分析、拓扑结构分析[10][11]。在整体上构建药物-成分-靶点-通路的关系和阐述药物作用机制,为玉蝴蝶祛斑膏的研究提供新思路。本研究利用网络药理学独特的研究方法,探讨玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的主要有效化合物和有效潜在靶点蛋白,为玉蝴蝶祛斑膏药物的研发和临床治疗提供理论基础。

2. 材料与方 法

2.1. 玉蝴蝶祛斑膏活性化合物的收集与筛选

以中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmssp.php>)为主,中国知网(CNKI, <https://www.cnki.net/>)为辅,以菟丝子、玉蝴蝶、柿叶为关键词,收集玉蝴蝶祛斑膏全方3味中药化合物。以 $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件,得到玉蝴蝶祛斑膏的潜在有效活性化合物。

2.2. 玉蝴蝶祛斑膏“化合物-靶点蛋白”网络的构建

通过 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)分别查找玉蝴蝶祛斑膏中柿叶、木蝴蝶和菟丝子潜在有效活性化合物的 SMILE 号,去重后利用 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>)进行潜在有效活性靶点蛋白的预测,将三个药味所含潜在有效活性化合物所预测的潜在有效活性靶点蛋白合并、去重,采用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)标准化所得潜在有效活性靶点蛋白,这些靶点蛋白即为玉蝴蝶祛斑膏的关键靶点蛋白,标准化后得到靶点蛋白的基因名称和 UniProt 编号。采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建玉蝴蝶祛斑膏潜在有效化合物及潜在有效靶点蛋白网络,并对其进行网络拓扑结构分析和可视化分析。

2.3. 黄褐斑疾病靶点的获取

以“chloasma”、“melanosis”、“chloasmas”等为关键词,在 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、TTD (Therapeutic Target Database, <http://db.idrblab.net/ttd/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、Drugbank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)中进行检索。合并以上数据库所获得黄褐斑疾病靶点数据,去重,最后将黄褐斑疾病靶点蛋白名称输入 UniProt 数据库中以获取基因名称和 UniPro 编号。

2.4. 黄褐斑关键靶点筛选及蛋白-蛋白互作网络的构建

利用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制玉蝴蝶祛斑膏潜在有效活性成分靶点蛋白和黄褐斑疾病靶点蛋白韦恩图,韦恩图中交集的共同靶点蛋白可能是玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的关键靶点。通过 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建靶点蛋白-靶点蛋白相互作用(Protein-Protein Interaction, PPI)网络模型,将 PPI 网络分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑学分析并可视化 PPI 网络。

2.5. 基因本体论 GO 及 KEGG 分析

通过 DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),对所获得玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的关键靶

点蛋白进行 GO 基因本体论分析, 其分析包括三部分构成, 分为生物过程板块、分子功能板块以及细胞组成板块, 限定 $P < 0.01$ 且 $FDR < 0.05$ 的筛选结果, 对生物过程 P 值前 20 的结果采用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 以三合一双侧条形图的形式进行可视化展现; 通过 KEGG 富集分析, 对所获得玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑疾病的关键靶点进行通路分析, 限定 $P < 0.01$ 且 $FDR < 0.01$ 的筛选结果, 使用微生信平台以气泡图的形式进行可视化呈现富集结果。

3. 结果

3.1. 玉蝴蝶祛斑膏活性化合物的筛选结果

通过 TCMSP 数据库及 CNKI 平台的收集与筛选, 以菟丝子、木蝴蝶、柿叶为关键词, 收集玉蝴蝶祛斑膏全方 3 味中药所含潜在有效活性化学成分。以 $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件对所收集到的潜在有效活性化合物进行筛选, 得到柿叶潜在有效活性成分 11 个, 木蝴蝶潜在有效活性成分 46 个, 菟丝子潜在有效活性成分 16 个。合并去重后共得到 66 个潜在有效活性成分, 具体信息见表 1。

这提示着玉蝴蝶祛斑膏具有多成分的治疗特点。

Table 1. Active compounds in Yuhudie Macula-removing

表 1. 玉蝴蝶祛斑膏有效活性成分

分子编号	化合物名称	DL	成分编号	来源
MOL010887	Barbinervic acid	0.71	SY1	柿叶
MOL000211	Mairin	0.78	SY2	柿叶
MOL000263	Oleanolic acid	0.76	SY3	柿叶
MOL004375	Trifolin	0.74	SY4	柿叶
MOL000508	Friedelin	0.76	SY5	柿叶
MOL000511	Ursolic acid	0.75	SY6	柿叶
MOL000358	Beta-sitosterol	0.75	AND1	柿叶、木蝴蝶、菟丝子
MOL000098	Quercetin	0.28	AND2	柿叶、木蝴蝶、菟丝子
MOL000357	Sitogluside	0.62	AND3	柿叶、菟丝子
MOL000422	Kaempferol	0.24	AND4	柿叶、菟丝子
MOL004368	Hyperin	0.77	AND5	柿叶、菟丝子
MOL001002	Ellagic acid	0.43	MHD1	木蝴蝶
MOL000012	Arachic acid	0.19	MHD2	木蝴蝶
MOL012101	Mosloflavone	0.26	MHD3	木蝴蝶
MOL012108	Negletein	0.23	MHD4	木蝴蝶
MOL012267	Scutevulin	0.27	MHD5	木蝴蝶
MOL013056	Brassicic acid	0.26	MHD6	木蝴蝶
MOL013061	Baicalein-6-glucuronide	0.76	MHD7	木蝴蝶
MOL013065	Teucvin	0.49	MHD8	木蝴蝶
MOL013068	Oroxindin	0.77	MHD9	木蝴蝶
MOL013071	Scutellarein-7-rutinoside	0.71	MHD10	木蝴蝶
MOL013072	5,7-dihydroxy-2-phenyl-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-4-one	0.72	MHD11	木蝴蝶

Continued

MOL001631	Erucic acid	0.26	MHD12	木蝴蝶
MOL000173	Wogonin	0.23	MHD13	木蝴蝶
MOL001735	Dinatin	0.27	MHD14	木蝴蝶
MOL001993	Tricosanoic acid	0.30	MHD15	木蝴蝶
MOL002560	Chrysin	0.18	MHD16	木蝴蝶
MOL002714	Baicalein	0.21	MHD17	木蝴蝶
MOL002737	Scutellarein	0.24	MHD18	木蝴蝶
MOL002771	Vitamin E	0.55	MHD19	木蝴蝶
MOL002776	Baicalin	0.75	MHD20	木蝴蝶
MOL002928	OroxylinA	0.23	MHD21	木蝴蝶
MOL002931	Scutellarin	0.79	MHD22	木蝴蝶
MOL003044	Chryseriol	0.27	MHD23	木蝴蝶
MOL003333	Acteoside	0.62	MHD24	木蝴蝶
MOL003341	Salidroside	0.20	MHD25	木蝴蝶
MOL000356	Lupeol	0.78	MHD26	木蝴蝶
MOL000399	Docosanoate	0.26	MHD27	木蝴蝶
MOL004004	6-OH-Luteolin	0.28	MHD28	木蝴蝶
MOL000449	Stigmasterol	0.76	MHD29	木蝴蝶
MOL000486	Prunetin	0.24	MHD30	木蝴蝶
MOL005030	Gondoic acid	0.20	MHD31	木蝴蝶
MOL005305	Nepetin	0.31	MHD32	木蝴蝶
MOL000663	Lignoceric acid	0.33	MHD33	木蝴蝶
MOL000008	Apigenin	0.21	MHD34	木蝴蝶
MOL008401	Henicosanoic acid	0.23	MHD35	木蝴蝶
MOL009754	Oroxin A	0.72	MHD36	木蝴蝶
MOL013058	2,5-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone	0.28	MHD37	木蝴蝶
MOL013059	3,7,3',5'-tetramethoxy-2hydrochroxyflavone	0.42	MHD38	木蝴蝶
MOL013063	Chrysin-7-O- β -D-glucuronide	0.70	MHD39	木蝴蝶
MOL013064	Scutellarein-5-galactoside	0.77	MHD40	木蝴蝶
MOL013066	Chrysin-7-O-glucuronide	0.69	MHD41	木蝴蝶
MOL013069	Quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside	0.70	MHD42	木蝴蝶
MOL013070	Quercetin-3-O- β -D-arabinopyranoside	0.70	MHD43	木蝴蝶
MOL000471	Aloe-emodin	0.24	MHD44	木蝴蝶
MOL001558	Sesamin	0.83	TSZ1	菟丝子
MOL000184	Stigmastenone	0.76	TSZ2	菟丝子
MOL001842	Pinoresinol	0.52	TSZ3	菟丝子
MOL000354	Isorhamnetin	0.31	TSZ4	菟丝子
MOL000361	Amyrin	0.76	TSZ5	菟丝子
MOL005043	Campesterol	0.71	TSZ6	菟丝子
MOL005440	Isofucosterol	0.76	TSZ7	菟丝子
MOL005944	Matrine	0.25	TSZ8	菟丝子
MOL006649	Sophoranol	0.28	TSZ9	菟丝子
MOL007228	Kaempferol-3-O- β -D-glucoside	0.74	TSZ10	菟丝子
MOL000953	Cholesterol	0.68	TSZ11	菟丝子

3.2. 玉蝴蝶祛斑膏“药物成分-靶点”网络的构建

将上述三个化合物的 66 个潜在有效活性化合物, 通过 Swiss Target Prediction 数据库, 查找 233 个人类潜在有效活性靶点蛋白存在于柿叶中, 373 个人类潜在有效活性靶点蛋白存在于木蝴蝶中, 294 个人类潜在有效活性靶点蛋白存在于菟丝子中。其中有 8 个潜在有效活性化合物未能找到相关潜在有效活性靶点蛋白, 合并, 去重得到 478 个潜在有效活性靶点蛋白, 其化合物-靶点蛋白网络, 详细信息见图 1。

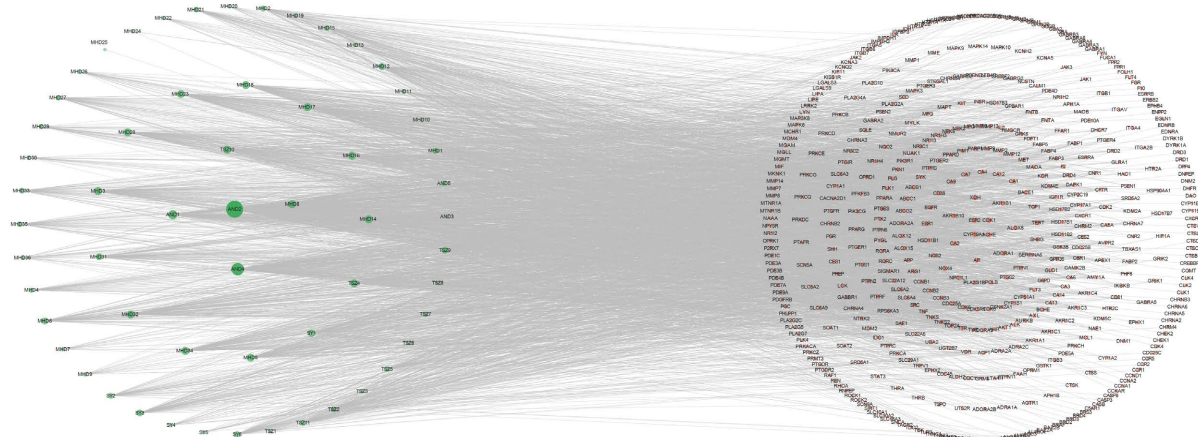


Figure 1. "Compound-target protein" network of Yuhudie Macula-removing

图 1. 玉蝴蝶祛斑膏“化合物-靶点蛋白”网络

该“化合物-靶点蛋白”网络图共 536 个节点(其中包括 58 个潜在有效化合物节点和 478 个潜在有效靶点蛋白节点)和 3655 条边组成, 在所获得的玉蝴蝶祛斑膏的 66 个潜在有效化合物中, 现有数据仅找出 58 个潜在有效化合物有相对应的潜在有效靶点蛋白, 有 8 个潜在有效化合物未找到相对应的潜在有效靶点蛋白, 故玉蝴蝶祛斑膏的“化合物-靶点蛋白”图中只显示 58 个潜在有效化合物节点和 478 个潜在有效靶点蛋白节点。经过网络拓扑结构分析, 左侧圆节点为三个药味所包含的潜在有效活性化合物, 右侧圆节点为潜在有效活性化合物所对应的靶点蛋白, 潜在有效化合物的平均度值为 63.02, 其中高于该平均度值的潜在有效化合物有 23 个。其中, 来自于柿叶、木蝴蝶与菟丝子的共有成分槲皮素(Quercetin)的节点度最高, 度值为 312, 降序依次为来自柿叶、菟丝子中的山柰酚(Kaempferol), 度值为 208, 柿叶、木蝴蝶与菟丝子中的 β -谷甾醇(Beta-sitosterol), 度值为 132, 潜在有效靶点蛋白的平均度值为 7.65, 有 183 个潜在有效靶点蛋白的度值高于该平均度值, 其中节点度最高的为芳香化酶 A1 (Cytochrome P450 19A1, CYP19A1), 靶向 44 个潜在有效活性化合物, 降序依次为细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (Cyclin-Dependent Kinase 1, CDK1), 靶向 39 个潜在有效活性化合物, 乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE), 靶向 38 个化合物, 表 2 仅列出度值最高的前 20 项潜在有效活性化合物和潜在有效活性靶点蛋白。该数据有效表明了玉蝴蝶祛斑膏具有多成分、多靶点的网络药理学分析的特性。

Table 2. Topology parameters of "compound-target protein" network in Yuhudie Macula-removing

表 2. 玉蝴蝶祛斑膏“化合物-靶点蛋白”网络拓扑学参数

编号	度值	类别	名称	度值	类别
AND2	312	成分	CYP19A1	44	基因
AND4	208	成分	CDK1	39	基因
AND1	132	成分	ACHE	38	基因

Continued

MHD8	107	成分	ESR2	37	基因
TSZ10	105	成分	CA2	34	基因
MHD14	104	成分	AR	33	基因
MHD16	104	成分	AKR1B1	32	基因
MHD17	104	成分	AKR1B10	32	基因
MHD18	104	成分	XDH	32	基因
MHD23	104	成分	ADORA1	31	基因
MHD28	104	成分	ALOX5	31	基因
MHD3	104	成分	CA1	30	基因
MHD32	104	成分	CA12	30	基因
MHD34	104	成分	ESR1	30	基因
MHD5	104	成分	PTGS2	29	基因
TSZ4	104	成分	TERT	28	基因
SY1	86	成分	CA4	27	基因
MHD31	82	成分	CA7	27	基因
MHD12	81	成分	EGFR	26	基因
MHD6	81	成分	PTPN1	26	基因

3.3. 黄褐斑疾病靶点的获取、关键靶点的筛选及 PPI 网络的构建

通过数据库检索，GeneCards 检索到黄褐斑相关靶点 954 个、PHarmGKB 数据库检索到黄褐斑相关靶点 201 个、DisGeNET 检索到黄褐斑相关靶点 48 个、OMIM 检索到黄褐斑相关靶点 10 个、Drugbank 检索到黄褐斑相关靶点 4 个、TTD 检索到黄褐斑相关靶点 3 个。合并所获得的黄褐斑疾病靶点蛋白，去重，得到黄褐斑疾病靶点基因 1084 个。将玉蝴蝶祛斑膏化合物的 478 个靶点与黄褐斑疾病靶点的 2084 个靶点导入 Venny 2.1 软件得到玉蝴蝶祛斑膏化合物与黄褐斑疾病的 120 个共同靶点，即视为玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的关键靶点，见图 2。

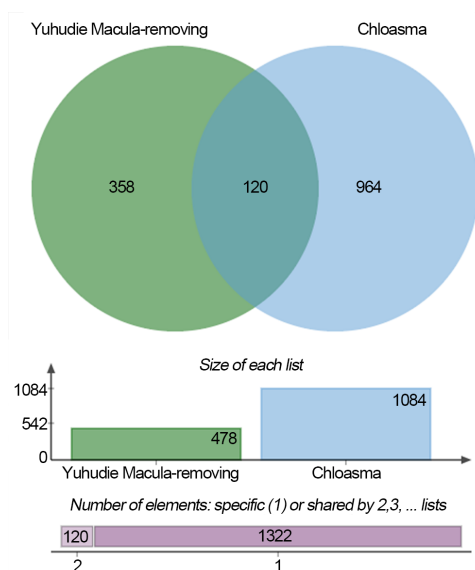


Figure 2. Venn diagram of compound target-chloasma target in Yuhudie Macula-removing
图 2. 玉蝴蝶祛斑膏化合物靶点 - 黄褐斑靶点韦恩图

将 120 个关键靶点导入 STRING 数据库中，结果进一步导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑学分析并构建 PPI 网络，见图 3。

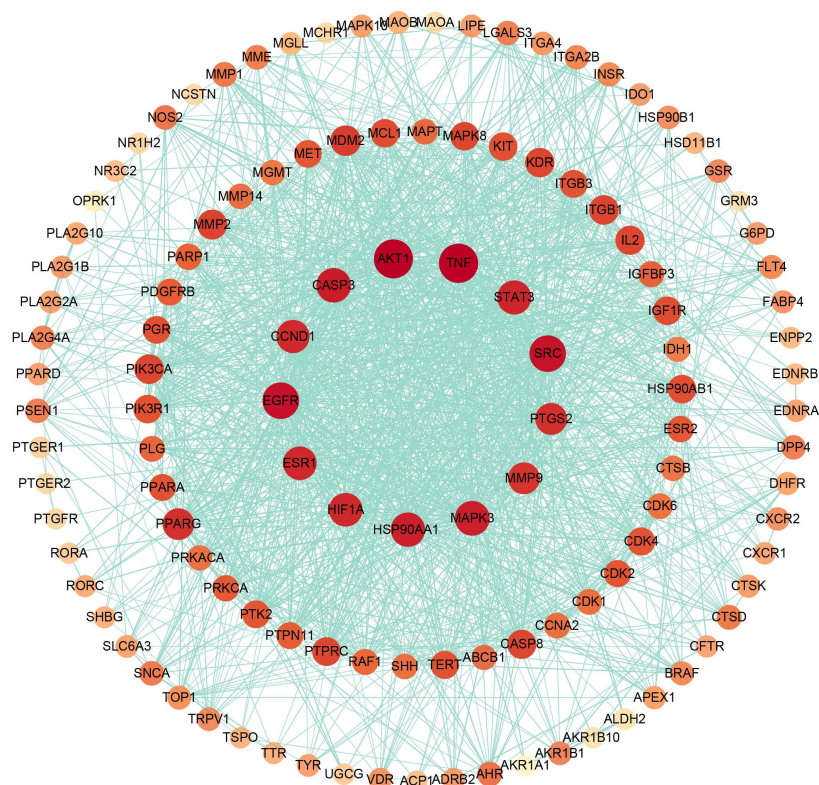


Figure 3. PPI network of key targets
图 3. 关键靶点 PPI 网络

该 PPI 网络图包含 120 个节点和 1414 条边。节点颜色的深浅表示度值大小，其节点颜色越深，其所对应节点度值越大，反之越小；节点大小表示度值大小，其节点越大，其所对应节点度值越大，反之越小；经过网络拓扑学结构分析和优化，关键靶点蛋白的节点平均自由度为 23.57，平均介数为 0.0082，平均接近中心性为 0.52 以及平均最短路径长度的均值为 1.97。其中有 21 个关键靶点蛋白的节点自由度、介数以及接近中心性数均高于均值，并且这 21 个关键靶点蛋白的节点平均最短路径长度低于均值，表 3 仅列出度值最高的前 20 项关键靶点蛋白数据，提示着这些关键靶点蛋白可能在黄褐斑疾病的治疗中起到关键性作用。

Table 3. Topology parameters of key targets in treatment of chloasma with Yuhudie Macula-removing
表 3. 玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的关键靶点拓扑学参数

基因名称	度值	平均最短路径长度	介数	接近中心性
TNF	84	1.310 924	0.119 266	0.762 821
AKT1	83	1.310 924	0.088 519	0.762 821
SRC	72	1.420 168	0.046 731	0.704 142
EGFR	72	1.411 765	0.043 714	0.708 333
MAPK3	64	1.487 395	0.030 499	0.672 316

Continued

CASP3	63	1.470 588	0.036 434	0.680 000
HSP90AA1	62	1.504 202	0.032 768	0.664 804
STAT3	61	1.529 412	0.023 371	0.653 846
HIF1A	59	1.546 218	0.021 844	0.646 739
ESR1	59	1.537 815	0.026 467	0.650 273
CCND1	57	1.554 622	0.019 764	0.643 243
MMP9	51	1.613 445	0.011 363	0.619 792
PTGS2	51	1.588 235	0.060 938	0.629 630
PPARG	50	1.596 639	0.035 426	0.626 316
MDM2	45	1.655 462	0.013 599	0.604 061
ITGB1	41	1.722 689	0.008 578	0.580 488
IL2	39	1.722 689	0.011 707	0.580 488
KIT	36	1.781 513	0.014 419	0.561 321
PPARA	29	1.789 916	0.014 186	0.558 685
ESR2	27	1.823 529	0.010 680	0.548 387
PRKCA	26	1.806 723	0.011 782	0.553 488

3.4. GO 富集分析结果

将 120 个关键靶点蛋白通过 DAVID 数据库的 GO 本体论分析, 共得到 328 个富集条目($P < 0.01$, $FDR < 0.05$), 其中 BP 获得 225 个条目, 主要涉及激素应答、细胞对有机物的反应、氧化反应、规律性细胞死亡的正调控、蛋白酶正向调节、细胞增殖的调控、调节蛋白质磷酸化和炎症反应等; CC 获得 40 个条目, 主要涉及膜筏、膜侧、色素粒、细胞基质、胞外区、细胞质和线粒体等; MF 获得 63 个条目, 主要涉及氧化还原酶活性、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、转录酶活性、ATP 结合和 NADP 结合等。分别选取 BP、CC 和 MF 根据 P 值最小前 20 的条目, 见图 4。该富集结果提示着玉蝴蝶祛斑膏在治疗黄褐斑过程中通过参与调控多种生物学过程而发挥作用。

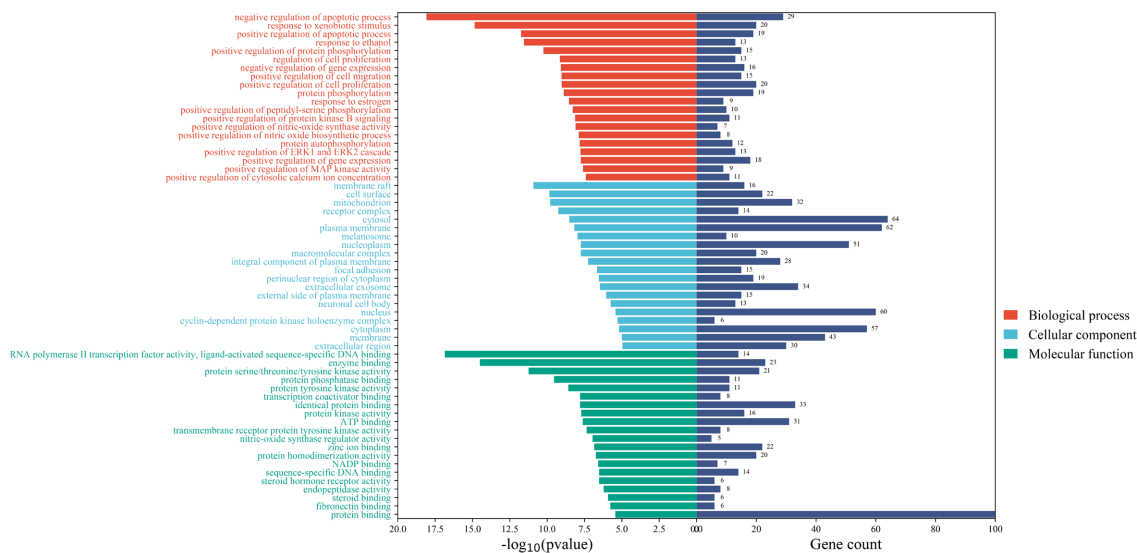


Figure 4. GO entries of key targets

图 4. 关键靶点的 GO 条目

3.5. KEGG 富集分析

通过分析发现, 120 个靶点集中显著富集在 131 条通路($P < 0.01$, $FDR < 0.01$), 选取 P 值排名最小的前 20 条富集通路, 见表 4、图 5, 主要涉及癌症通路(Pathways in cancer)、癌症蛋白聚糖(Proteoglycans in cancer)、内分泌信号通路(Endocrine resistance)等。这提示着玉蝴蝶祛斑膏可能通过作用于多条通路来发挥治疗黄褐斑疾病的作用。

Table 4. Pathway table of key targets in treatment of chloasma with Yuhudie Macula-removing
表 4. 玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑关键靶点的通路表

通路	基因数	P 值	FDR
Pathways in cancer	48	1.3E-26	1.4E-24
Proteoglycans in cancer	27	2.6E-18	1.5E-16
Endocrine resistance	20	4.4E-17	1.6E-15
PI3K-Akt signaling pathway	29	3.1E-14	8.7E-13
Focal adhesion	22	3.7E-13	6.9E-12
Human cytomegalovirus infection	23	3.7E-13	6.9E-12
Prostate cancer	16	3.7E-12	5.9E-11
Progesterone-mediated oocyte maturation	16	7.9E-12	1.1E-10
Ras signaling pathway	22	8.5E-12	1.1E-10
Chemical carcinogenesis-receptor activation	21	9.6E-12	1.1E-10
Melanoma	14	1.4E-11	1.5E-10
Human papillomavirus infection	25	1.9E-11	1.7E-10
Glioma	14	2.5E-11	2.1E-10
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	14	4.9E-11	3.9E-10
Estrogen signaling pathway	17	6.2E-11	4.6E-10
Bladder cancer	11	1.5E-10	1.1E-09
Non-small cell lung cancer	13	2.4E-10	1.5E-09
Relaxin signaling pathway	16	2.5E-10	1.5E-09
Pancreatic cancer	13	4.7E-10	2.8E-09
Rap1 signaling pathway	19	5.7E-10	3.2E-09

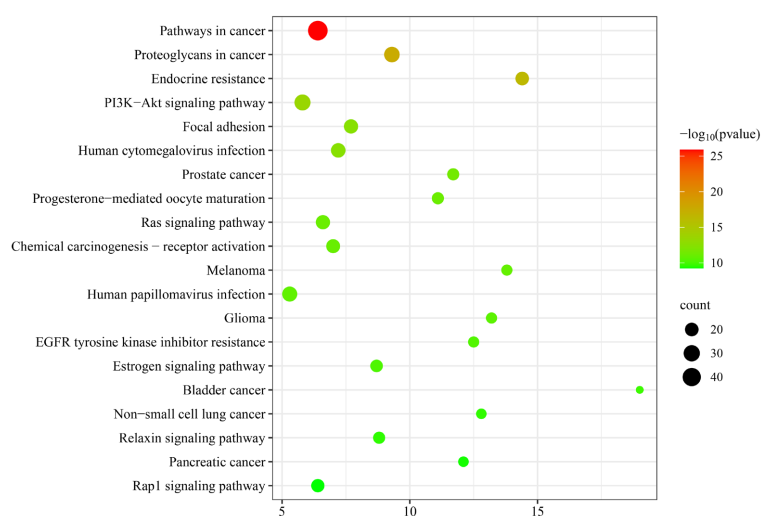


Figure 5. Bubble chart of pathway enrichment analysis

图 5. 通路富集分析气泡图

4. 讨论

《灵枢·邪气藏府病形篇》云：“十二经脉、三百六十五络，其气血皆上于面，而走空窍”。说明黄褐斑属肝郁气滞者，宜疏肝理气，通络活血为主；属脾虚湿蕴者，宜健脾益气，祛湿化斑为主。根据发病的表现，其治疗应综合考虑病因、症候、标本兼治，可通过益气填精、化瘀消斑的功效来治疗黄褐斑疾病。本文利用网络药理学多成分、多靶点的科学分析方法探讨中药新药玉蝴蝶祛斑膏黄褐斑的作用机制。

4.1. 潜在有效成分分析

玉蝴蝶祛斑膏由柿叶、木蝴蝶和菟丝子组方而成，具有养颜、护肤、祛斑的功效。本研究以 TCMSP 数据库为基础，分别以柿叶、木蝴蝶及菟丝子等关键词收集到的化学成分在一定程度上可以代表玉蝴蝶祛斑膏全方所含的化学成分。通过“药物成分-靶点”网络拓扑学分析，汇总玉蝴蝶祛斑膏潜在活性成分 66 个，其中自由度较高的化学成分有槲皮素、山奈酚、白杨素、黄芩素、金丝桃苷和野黄芩素等。有研究表明，黄酮类化合物具有很好的抗氧化活性[12] [13] [14]，其槲皮素、山奈酚在体外具有显著的抗氧化活性，在一定条件下可作为抗氧化剂的使用[15] [16]，有学者通过 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞释放 NO、TNF- α 、IL-6 等炎症因子，研究黄芩素对 DPPH 和超氧阴离子的清除作用，实验结果表明，黄芩素主要通过清除过量的 DPPH 自由基和超氧阴离子而发挥抗氧化的作用[17]。研究表明，金丝桃苷能显著抑制自由基脂质过氧化，增强机体抗氧化能力，加速机体对自由基的清除作用[18]。

4.2. 成分靶点分析

网络拓扑分析结果显示，玉蝴蝶祛斑膏的潜在成分对应 478 个靶点，其中与黄褐斑疾病靶点相关的共同靶点有 120 个，通过构建 PPI 网络发现，TNF、AKT1、SRC、EGFR、MAPK3 等的度值较大，可能是玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的关键靶点。TNF 可诱导多种细胞内信号并具有细胞增殖、代谢等多种生物活性，通过降低 TNF- α 的炎性级联反应，能够抑制皮肤表皮黑色素细胞的活性，并且能够有效降低黑素瘤细胞的络氨酸酶的活性，以达到显著减少黑色素的合成，在治疗黄褐斑等皮肤疾病上有显著的优势[19] [20]。AKT1 可调节细胞增殖、代谢等生物过程，过程中 PI3K 和 AKT 信号通路能够被许多细胞刺激而激活，并促进自由基的表达，发挥抗氧化作用[21]。

4.3. 生物富集分析

通过 GO 功能富集分析可知，玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的生物进程主要涉及激素应答、细胞对有机物的反应、氧化反应、规律性细胞死亡的正调控、蛋白酶正向调节、细胞增殖的调控、调节蛋白质磷酸化和炎症反应等。通过 KEGG 功能富集分析可知，玉蝴蝶祛斑膏治疗黄褐斑的生物学进程主要以 T 细胞、B 细胞以及巨噬细胞为代表的免疫细胞为主导，涉及白介素-17 信号通路(IL-17 signaling pathway)、TNF 肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)、破骨细胞分化(Osteoclast differentiation)、自然杀伤细胞介导的细胞毒性(Natural killer cell mediated cytotoxicity)、TRP 通道炎性介质调节(Inflammatory mediator regulation of TRP channels)等。黄褐斑的发病机理复杂、多样，单一靶点的药物难以取得较好的疗效，因此寻找一种多成分、多靶点的药物已成为未来治疗黄褐斑的一大优势。

5. 总结

玉蝴蝶祛斑膏可能是通过作用于 TNF、AKT1、SRC 等多种靶点，调节癌症通路、癌症蛋白聚糖、Toll 样受体信息通路内分泌阻力、前列腺癌、Rap1 信息通道、C 型凝集素受体信息通道、白细胞介素-17

信息通道、催产素信息通道、环磷酸腺苷信息通道、破骨细胞分化细胞接受器信息通道、催乳素受体信息通道、血管内皮生长因子信号通道等途径,从而控制细胞凋亡、控制炎症反应、调整身体免疫功能,以防治黄褐斑。本研究结果表明,用玉蝴蝶祛斑膏防治黄褐斑具有多成分、多靶点、多途径协同作用的优点,为进一步的试验研究和临床运用奠定思路和参考基础。

参考文献

- [1] Cario, M. (2019) How Hormones May Modulate Human Skin Pigmentation in Melasma: An *in Vitro* Perspective. *Experimental Dermatology*, **28**, 709-718. <https://doi.org/10.1111/exd.13915>
- [2] Tamega, A., Miot, H.A., Moço, N.P., *et al.* (2015) Gene and Protein Expression of Oestrogen- β and Progesterone Receptors in Facial Melasma and Adjacent Healthy Skin in Women. *International Journal of Cosmetic Science*, **37**, 222-228.
- [3] Sarkar, R., Ailawadi, P., Garg, S., *et al.* (2018) A Review of Clinical, Etiological, and Management Issues. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, **11**, 53-59.
- [4] Jang, Y.H., Lee, J.Y., Kang, H.Y., *et al.* (2010) Oestrogen and Progesterone Receptor Expression in Melasma: An Immunohistochemical Analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, **24**, 1312-1316. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03638.x>
- [5] Hernández, B.R., Torres, A.B., Castanedo, C.J.P., *et al.* (2008) Solar Elastosis and Presence of Mast Cells as Key Features in the Pathogenesis of Melasma. *Clinical and Experimental Dermatology*, **33**, 305-308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2008.02724.x>
- [6] Passeron, T. and Picardo, M. (2017) Melasma, a Photoaging Disorder. *Pigment Cell & Melanoma Research*, **31**, 461-465. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12684>
- [7] Soon, H.K., Young, J.H., Soo, K.L., *et al.* (2016) Heterogeneous Pathology of Melasma and Its Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, Article 824. <https://doi.org/10.3390/ijms17060824>
- [8] Abdel, N.M., Seltsmann, H. and Zouboulis, C. (2012) SZ95 Sebocytes Induce Epidermal Melanocyte Dendricity and Proliferation *in Vitro*. *Experimental Dermatology*, **21**, 393-395. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01468.x>
- [9] Inomata, S., Matsunaga, Y., Amano, S., *et al.* (2003) Possible Involvement of Gelatinases in Basement Membrane Damage and Wrinkle Formation in Chronically Ultraviolet B-Exposed Hairless Mouse. *The Journal of Investigative Dermatology*, **120**, 128-134. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12021.x>
- [10] 胡月珍, 易继才, 彭晓国, 等. 玉蝴蝶美容祛斑膏及其制备方法[P]. 中国专利, CN101342223B. 2013-02-20.
- [11] Hopkins, A.L. (2007) Network Pharmacology. *Nature Biotechnology*, **25**, 1271-1273. <https://doi.org/10.1038/nbt1007-1110>
- [12] 胡栋宝, 赵剑雄. 中药满山红中 4 个黄酮类化合物结构及其抗氧化活性的理论研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2675-2679.
- [13] 李菁萱, 梁继展, 练秀媚, 等. 橘红中黄酮成分的提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 山西化工, 2023, 43(4): 9-10+32. <https://doi.org/10.16525/j.cnki.cn14-1109/tq.2023.04.003>
- [14] 刘艺苑, 刘传敏, 李新朋, 等. 金莲花黄酮类成分抗菌及抗氧化活性研究[J]. 药学研究, 2023, 42(4): 228-231+242. <https://doi.org/10.13506/j.cnki.jpr.2023.04.003>
- [15] 荣家闯, 张仁文. 槲皮素体外抗氧化活性研究[J]. 科学技术创新, 2019(29): 43-44.
- [16] 耿佳琳, 焦玉苗, 焉炳飞, 等. 罗布麻中 5 种黄酮化合物抗氧化活性 DFT 研究[J]. 当代化工, 2015, 44(12): 2763-2765. <https://doi.org/10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2015.12.011>
- [17] 张倩, 李惠香, 刘攀, 等. 黄芩素的体外抗炎及抗氧化活性研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2018, 31(3): 232-238. <https://doi.org/10.13951/j.cnki.37-1213/n.2018.03.008>
- [18] 黄明春, 陈剑鸿, 胡小刚, 等. 金丝桃苷对 CCl_4 诱导大鼠急性肝损伤抗氧化应激研究[J]. 局解手术学杂志, 2013, 22(6): 588-590+593.
- [19] 潘素跃, 胡敏, 王朴, 等. 逍遥丸治疗黄褐斑的分子机制: 基于整合网络药理学和生物信息学方法[J]. 皮肤病病诊疗学杂志, 2023, 30(3): 211-218.
- [20] 曹站霞, 陈毓龙, 李伟霞, 等. 基于网络药理学和细胞试验探讨补骨脂致肝损伤的毒理机制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(16): 2052-2062. <https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.16.002>
- [21] 赵静, 袁瑞华, 王海芳, 等. 活血胶囊激活 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 通路对血管内皮细胞发挥抗氧化损伤作用[J]. 云南中医学院学报, 2019, 42(3): 10-16. <https://doi.org/10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.03.002>