

五子衍宗丸治疗男性不育症的网络药理学探讨

丁劲¹, 张耀圣^{2*}, 商建伟²

(1. 广州中医药大学附属深圳市宝安中医院(集团), 广东 深圳 518133;
2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] **目的:**基于网络药理学探讨五子衍宗丸治疗男性不育症的物质基础及作用机制。**方法:**应用中药系统药理学分析平台(TCMSP)筛选五子衍宗丸中的活性成分和作用靶点;应用 GeneCards, OMIM, PharmGkb 数据库筛选男性不育症的疾病靶点;应用 R 语言软件筛选药物与疾病共同靶点,应用 Cytoscape 软件构建药物-活性成分-疾病-靶点互作网络;应用 STRING 平台构建共同靶点蛋白互作网络(PPI);应用 ClueGo 插件对共同靶点进行基因本体(GO)分析,并应用 R 语言软件对共同靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集。**结果:**从五子衍宗丸中共获得 72 个有效活性成分,得到 35 个五子衍宗丸治疗男性不育症的可能靶点,这些靶点主要涉及氧化与抗氧化活性等生物学过程,并主要富集在磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt),缺氧诱导因子-1(HIF-1)等信号通路上。**结论:**通过网络药理学证实了五子衍宗丸多成分、多靶点、多途径的作用特点,预测了五子衍宗丸治疗男性不育症的可能作用机制,为进一步研究其活性成分和作用机制提供理论依据。

[关键词] 网络药理学; 男性不育症; 五子衍宗丸; 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt) 通路; 氧化应激
[中图分类号] R2-0; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0025-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191940

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190617.1210.017.html>

[网络出版时间] 2019-06-18 13:22

Network Pharmacology Research of Wuzi Yanzongwan in Treatment of Male Infertility

DING Jin¹, ZHANG Yao-sheng^{2*}, SHANG Jian-wei²

(1. Shenzhen Baoan Hospital of Traditional Chinese Medicine (Group) Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518133, China;
2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Exploring the material basis and mechanism of Wuzi Yanzongwan in the treatment of male infertility based on network pharmacology. **Method:** Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) was used to screen the active ingredients and targets in Wuzi Yanzongwan. GeneCards, OMIM and PharmGkb databases were used to screen the targets of male infertility. R language software was used to screen common targets of drugs and diseases, Pharmaceutical active ingredients-disease target interaction network was constructed by using Cytoscape software. The common target protein interaction network (PPI) was constructed by STRING platform, the gene ontology (GO) analysis of common target was analyzed by ClueGo plug-in, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway was enriched by R language software. **Result:** A total of 72 active ingredients were obtained from Wuzi Yanzongwan, and 35 possible targets for the treatment of male infertility were obtained. These targets are mainly involved in biological processes such as oxidation and antioxidant activity, and are mainly concentrated in phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathways.

[收稿日期] 20190530(019)

[基金项目] 深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(2018JD018)

[第一作者] 丁劲, 主治医师, 从事中医药治疗男性不育症临床及基础研究, E-mail: djdoctor203@163.com

[通信作者] *张耀圣, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治男科疾病研究, E-mail: ysz3129@163.com

Conclusion: The network pharmacology confirmed the multi-component, multi-target and multi-pathway action characteristics of Wuzi Yanzongwan, predicted the possible mechanism of Wuzi Yanzongwan in the treatment of male infertility, and provided theoretical basis for further study of its active ingredients and mechanism.

[Key words] network pharmacology; male infertility; Wuzi Yanzongwan; phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) /protein kinase B (Akt) pathway; oxidative stress

受生物学、环境和社会等多方面因素的影响,近年来男性不育症发病率呈逐年增长的趋势,据世界卫生组织(WHO)统计,全球范围内约有 15% 的育龄夫妇患有不孕不育症,其中男性因素高达 50%^[1-2]。国内研究显示,在过去 15 年中,中国男性精液质量随时间现下降趋势^[3]。随着国家“二孩”政策的开放,整个社会对于生育的需求进一步扩大,男性不育症正成为一项严重的社会学问题。目前临床上尚无治疗男性不育症的有效药物,药物治疗以经验性为主。手术治疗适应症及疗效局限。近年来辅助生殖技术发展迅速,虽解决了部分生育难题,但仍存在费用昂贵、成功率偏低、不良反应较大、遗传风险以及医学伦理等缺陷^[4]。

中医在整体观念指导下,通过辨证论治防治疾病。近年来中医药在男性不育症的治疗中发挥越来越重要的作用,已成为一种安全有效的治疗手段^[5]。其中五子衍宗丸是临床用于治疗男性不育症的常用复方。实验研究显示五子衍宗丸可通过减轻动物模型睾丸组织病理损伤、改善精子线粒体结构及功能,从而改善精液质量^[6-7]。五子衍宗丸可通过细胞外信号调节激酶(ERK)信号传导途径调节线粒体能量代谢、提高支持细胞自噬水平、修复支持细胞骨架,从而改善生精功能^[8-11]。五子衍宗丸可通过干预乙酰基转移酶 Tip60 (KAT5) 诱导细胞凋亡,从而改善微波辐射大鼠模型精液质量^[12]。然而目前该方的药效物质基础研究,以及作用靶点及分子机制的研究多处于单一层面或单角度的研究阶段^[13]。因此,系统、整体地研究五子衍宗丸治疗男性不育症的物质基础和作用机制具有重要意义。

网络药理学是基于系统生物学理论,通过建立药物与作用靶点、疾病与治疗靶点间的关系预测模型,整合两者间的作用网络,分析药物活性成分及靶点在网络模块中相互作用,系统性、整体性去研究药物活性成分与潜在靶点间的作用关系的方法^[14-15]。本研究以网络药理学为切入点,探讨五子衍宗丸治疗男性不育症的有效活性成分和作用靶点,揭示其可能的分子作用机制,对五子衍宗丸科学内涵的阐释具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 五子衍宗丸的活性成分 应用中药系统药理学分析平台(TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)检索五子衍宗丸全方中枸杞子、菟丝子、五味子、覆盆子、车前子的所有活性成分。根据研究结果,以口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 为限制条件进行筛选,得到五子衍宗丸的生物活性成分。

1.2 男性不育症的疾病靶点 设置检索词为“male infertility”,应用 GeneCards(<https://www.genecards.org/>), OMIM (<https://www.omim.org/>) 以及 PharmGkb 数据库(<https://www.pharmgkb.org/>) 进行检索,汇总、并集、去重后得到男性不育症的疾病靶点。

1.3 药物与疾病共同靶点筛选及互作网络构建 应用 R 语言(<https://www.r-project.org/>)软件取并集获得药物与疾病的共同靶点,并绘制韦恩图;应用 STRING(<https://string-db.org/>)平台构建共同靶点 PPI,最低相互作用阈值设为“highest confidence”(> 0.9)。“节点(node)”代表不同靶点,“边(edge)”代表不同靶点之间的相互关系。并应用 R 语言软件统计出现频次并绘制柱状图。所有 R 包下载通过 R 和 Bioconductor(<https://www.bioconductor.org/>)。

1.4 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络构建 应用 Cytoscape 3.7.1 软件构建药物-活性成分-疾病-靶点互作网络。网络图中“node”代表药物、活性成分、疾病和靶点,“edge”代表以上节点之间的相互关系。

1.5 基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 应用 Cytoscape 3.7.1 软件中 ClueGo 插件对药物与疾病共同靶点进行 GO 分析,将结果以互作网络和饼状图呈现。并应用 R 语言软件对以上共同靶点进行 KEGG 通路富集分析。将结果以条形图或气泡图形式呈现。并根据富集因子值分析核心通路富集程度,以探究五子衍宗丸治疗男性不育症可能的作用机制。

2 结果

2.1 五子衍宗丸活性成分筛选 本研究通过

TCMSP 数据库对五子衍宗丸中 5 味中药已报道活性成分进行检索,得到活性成分结果为枸杞子 188 个、菟丝子 29 个、五味子 130 个、覆盆子 110 个、车前子 55 个,共收集到 512 个活性成分。以 $OB \geq$

30% 和 $DL \geq 0.18$ 为限制条件对五子衍宗丸活性成分进行初步筛选,并去掉重复分子,共得到 72 个生物活性成分。五子衍宗丸中候选的活性成分信息见表 1。

表 1 五子衍宗丸中候选的活性成分信息(含重复)

Table 1 Candidate information of active ingredients in Wuzi Yanzongwan (including duplication)

中药	分子编号	CAS 编号	活性成分名称	OB/%	DL
车前子	MOL001735	1447-88-7	dinatin	30.97	0.27
车前子	MOL001663	508-02-1	(4a <i>S</i> ,6a <i>R</i> ,6a <i>S</i> ,6b <i>R</i> ,8a <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,12a <i>R</i> ,14b <i>S</i>)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	32.03	0.76
车前子	MOL007819	27696-41-9	hypolaetin	33.24	0.28
车前子	MOL000359	83-46-5	sitosterol	36.91	0.75
车前子	MOL005869	474-58-8	daucostero_qt	36.91	0.75
车前子	MOL000098	73123-10-1	quercetin	46.43	0.28
车前子	MOL007836	26046-94-6	plantagininqt	54.04	0.24
车前子	MOL007835	61276-16-2	orobanchoside_qt	55.99	0.82
车前子	MOL007813	78708-33-5	dihydrotricetin	58.12	0.28
覆盆子	MOL001002	476-66-4	ellagic acid	43.06	0.43
覆盆子	MOL001941	482-44-0	ammidin	34.55	0.22
覆盆子	MOL000358	83-46-5	beta-sitosterol	36.91	0.75
覆盆子	MOL000359	149-91-7	sitosterol	36.91	0.75
覆盆子	MOL000422	520-18-3	kaempferol	41.88	0.24
覆盆子	MOL008433	77-52-1	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4a <i>S</i> ,6a <i>S</i> ,6a <i>R</i> ,6b <i>R</i> ,8a <i>R</i> ,12a <i>R</i> ,14b <i>S</i>)-1,11-dihydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-10-oxo-3,4,5,6,6a,7,8,8a,13,14b-decahydro-2H-picene-4a-carboxylic acid	51.16	0.72
覆盆子	MOL000098	73123-10-1	quercetin	46.43	0.28
枸杞子	MOL001323	474-40-8	sitosterol alpha1	43.28	0.78
枸杞子	MOL003578	469-38-5	cycloartenol	38.69	0.78
枸杞子	MOL001494	544-35-4	mandenol	42.00	0.19
枸杞子	MOL001495	1191-41-9	ethyl linolenate	46.10	0.20
枸杞子	MOL001979	79-63-0	LAN	42.12	0.75
枸杞子	MOL000449	83-48-7	stigmasterol	43.83	0.76
枸杞子	MOL000358	83-46-5	beta-sitosterol	36.91	0.75
枸杞子	MOL005406	51-55-8	atropine	45.97	0.19
枸杞子	MOL005438	474-62-4	campesterol	37.58	0.71
枸杞子	MOL006209	523-42-2	cyanin	47.42	0.76
枸杞子	MOL007449	1176-52-9	24-methylidenelphenol	44.19	0.75
枸杞子	MOL008173	474-58-8	daucosterol_qt	36.91	0.75
枸杞子	MOL008400	40957-83-3	glycitein	50.48	0.24
枸杞子	MOL010234	472-92-4	delta-carotene	31.80	0.55
枸杞子	MOL000953	80356-14-5	CLR	37.87	0.68

续表 1

中药	分子编号	CAS 编号	活性成分名称	OB/%	DL
枸杞子	MOL009604	N/A	14b-pregnane	34.78	0.34
枸杞子	MOL009612	N/A	(24 <i>R</i>)-4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,25-dien-3beta-ylacetate	46.36	0.84
枸杞子	MOL009615	N/A	24-methylenecycloartan-3beta,21-diol	37.32	0.80
枸杞子	MOL009617	N/A	24-ethylcholest-22-enol	37.09	0.75
枸杞子	MOL009618	N/A	24-ethylcholesta-5,22-dienol	43.83	0.76
枸杞子	MOL009620	N/A	24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol	38.00	0.75
枸杞子	MOL009621	N/A	24-methylenelanost-8-enol	42.37	0.77
枸杞子	MOL009622	17605-67-3	fucosterol	43.78	0.76
枸杞子	MOL009631	2464-44-0	31-norcyclolaudenol	38.68	0.81
枸杞子	MOL009633	N/A	31-norlanost-9(11)-enol	38.35	0.72
枸杞子	MOL009634	N/A	31-norlanosterol	42.20	0.73
枸杞子	MOL009635	1106-35-0	4,24-methyllophenol	37.83	0.75
枸杞子	MOL009639	481-25-4	lophenol	38.13	0.71
枸杞子	MOL009640	N/A	4alpha,14alpha,24-trimethylcholesta-8,24-dienol	38.91	0.76
枸杞子	MOL009641	N/A	4alpha,24-dimethylcholesta-7,24-dienol	42.65	0.75
枸杞子	MOL009642	N/A	4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol	42.30	0.78
枸杞子	MOL009644	N/A	6-fluoroindole-7-dehydrocholesterol	43.73	0.72
枸杞子	MOL009646	N/A	7-O-methyluteolin-6-C-beta-glucoside _{qt}	40.77	0.30
枸杞子	MOL009650	51-55-8	atropine	42.16	0.19
枸杞子	MOL009651	N/A	cryptoxanthin monoepoxide	46.95	0.56
枸杞子	MOL009653	469-39-6	cycloeucaleenol	39.73	0.79
枸杞子	MOL009656	N/A	(<i>E,E</i>)-1-ethyl octadeca-3,13-dienoate	42.00	0.19
枸杞子	MOL009660	27934-98-1	methyl(1 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-4 <i>a</i> ,7-dihydroxy-7-methyl-1-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,5,6,7a-tetrahydrocyclopenta[<i>d</i>]pyran-4-carboxylate	39.43	0.47
枸杞子	MOL009662	467-81-2	lantadene A	38.68	0.57
枸杞子	MOL009664	23027-91-0	physalin A	91.71	0.27
枸杞子	MOL009665	84268-38-2	physcion-8- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -gentiobioside	43.90	0.62
枸杞子	MOL009677	79-62-9	lanost-8-en-3beta-ol	34.23	0.74
枸杞子	MOL009678	N/A	lanost-8-enol	34.23	0.74
枸杞子	MOL009681	16910-32-0	obtusifoliol	42.55	0.76
枸杞子	MOL000098	73123-10-1	quercetin	46.43	0.28
菟丝子	MOL001558	607-80-7	sesamin	56.55	0.83
菟丝子	MOL000184	4736-55-4	NSC63551	39.25	0.76
菟丝子	MOL000354	480-19-3	isorhamnetin	49.60	0.31
菟丝子	MOL000358	83-46-5	beta-sitosterol	36.91	0.75
菟丝子	MOL000422	520-18-3	kaempferol	41.88	0.24
菟丝子	MOL005043	474-62-4	campest-5-en-3beta-ol	37.58	0.71
菟丝子	MOL005440	18472-36-1	isofucosterol	43.78	0.76
菟丝子	MOL005944	519-02-8	matrine	63.77	0.25
菟丝子	MOL006649	3411-37-8	sophranol	55.42	0.28

续表 1

中药	分子编号	CAS 编号	活性成分名称	OB/%	DL
菟丝子	MOL000953	80356-14-5	CLR	37.87	0.68
菟丝子	MOL000098	73123-10-1	quercetin	46.43	0.28
五味子	MOL008968	58546-54-6	gomisin-A	30.69	0.78
五味子	MOL008957	82078-76-0	schizandrer B	30.71	0.83
五味子	MOL008956	N/A	angeloylgomisin O	31.97	0.85
五味子	MOL008974	N/A	gomisin G	32.68	0.83
五味子	MOL008978	N/A	gomisin R	34.84	0.86
五味子	MOL005317	36804-95-2	deoxyharringtonine	39.27	0.81
五味子	MOL008992	61301-33-5	wuweizisu C	46.27	0.84
五味子	MOL004624	75207-67-9	longikaurin A	47.72	0.53

2.2 男性不育症的疾病靶点筛选 通过检索 GeneCards, OMIM, PharmGKB 数据库得到男性不育症的疾病靶点, 其中 GeneCards 数据库中以 score 值 ≥ 30 为限制条件进行筛选, 分别筛选到 283 个, 27 个和 72 个靶点。经过去重共得到 371 个男性不育症的疾病治疗靶点。

2.3 共同靶点筛选及互作网络构建 应用 R 语言软件取并集获得共同靶点, 共同靶点数为 35 个, 得到的韦恩图见图 1, 具体靶点见表 2; 应用 STRING 插件构建共同靶点 PPI, 互作网络中共有节点 32 个, 边数 111 条, 见图 2。应用 R 语言软件统计出现频次前的 20 靶点并绘制条形图, 见图 3。蛋白互作频次较高的有上皮生长因子受体 (EGFR), 血管内皮生长因子 (VEGFA), 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 等是

整个网络的节点蛋白, 说明五子衍宗丸活性成分与其有较高的结合活性, 可作为五子衍宗丸治疗男子不育症的潜在靶点。

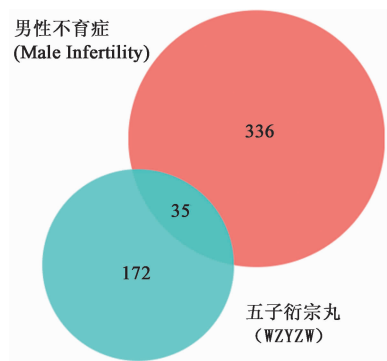


图 1 药物与疾病靶点的韦恩分析

Fig.1 Venn diagram of drug and disease targets

表 2 药物与疾病共同靶点

Table 2 Common targets of drugs and diseases

序号	Entrez ID	蛋白	序号	Entrez ID	蛋白	序号	Entrez ID	蛋白
1	5743	PTGS2	13	3569	IL-6	25	2950	GSTP1
2	5241	PGR	14	5894	RAF1	26	196	AHR
3	367	AR	15	6647	SOD1	27	3643	INSR
4	154	ADRB2	16	2064	ERBB2	28	1401	CRP
5	1956	EGFR	17	1543	CYP1A1	29	3486	IGFBP3
6	207	Akt1	18	3553	IL-1 β	30	3481	IGF2
7	7422	VEGFA	19	3576	CXCL8	31	2944	GSTM1
8	595	CCND1	20	4846	NOS3	32	2099	ESR1
9	596	Bcl-2	21	3558	IL-2	33	1813	DRD2
10	4313	MMP-2	22	5054	SERPINE1	34	2100	ESR2
11	4318	MMP-9	23	3458	IFNG	35	2908	NR3C1
12	3586	IL-10	24	4353	MPO			

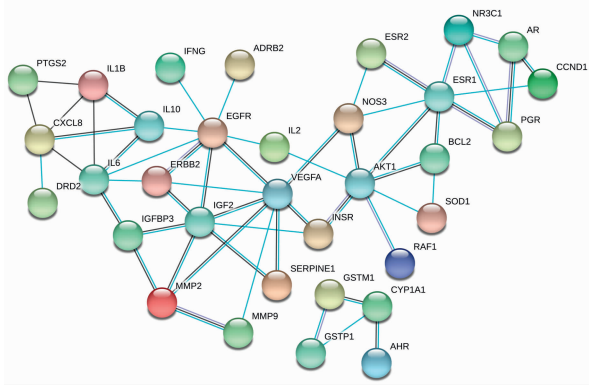


图 2 共同靶点蛋白互作网络

Fig. 2 Common target protein interaction network

2.4 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络构建 应用 cytoscape3. 7. 1 构建药物-活性成分-疾病-靶点互作网络, 共包括 86 个节点(靶点 35 个, 活性成分 48 个, 疾病和药物各 1 个)和 636 条边。见图 4。

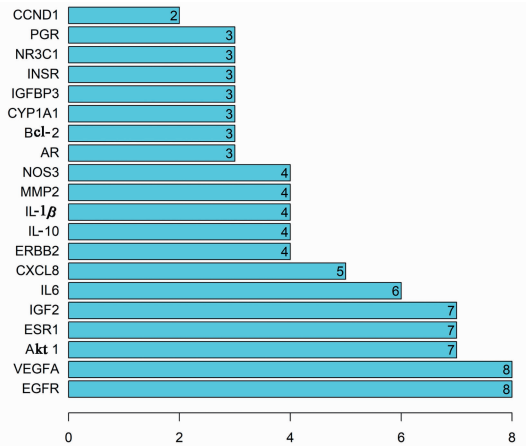
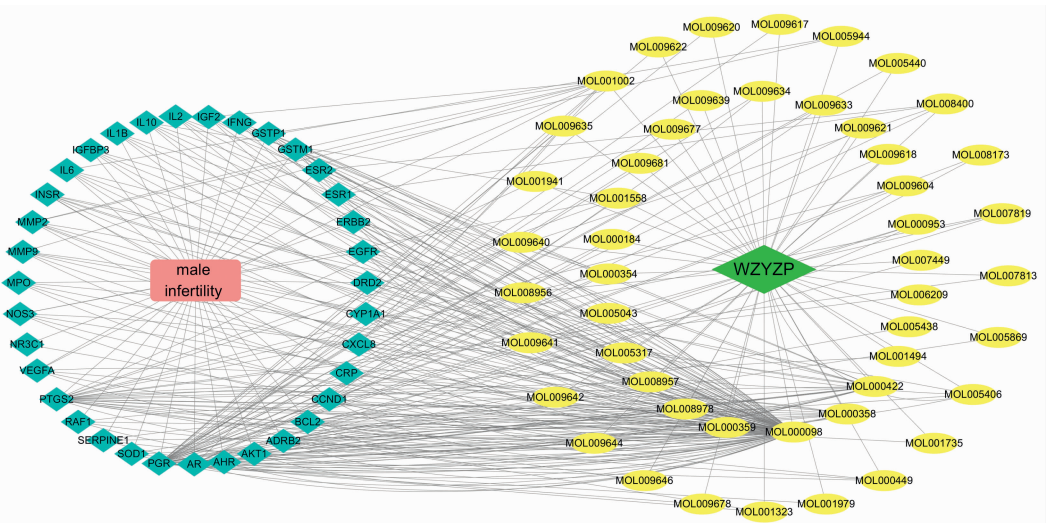


图 3 共同靶点蛋白出现频次

Fig. 3 Frequency of common target proteins

2.5 五子衍宗丸治疗男性不育症核心通路筛选 应用 ClueGo 插件对共同靶点进行 GO 分析, 得到饼状图和互作网络见图 5, 6。主要涉及氧化活性、



注: 红色代表疾病, 淡绿色代表药物, 淡蓝色代表药物和疾病共同靶点, 黄色代表药物活性成分

图 4 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络

Fig. 4 Drug-active component-disease-target interaction network

抗氧化活性、磷酸酶结合等生物学过程。这体现了五子衍宗丸可能通过调控多个复杂的生物过程来治疗男性不育症。应用 R 语言软件对以上共同靶点进行 KEGG 通路富集分析, 见图 7。排除广泛通路后, 表 3 中列出了排名前 20 的信号通路。经分析, 35 个共同靶点主要分布 PI3K/Akt, 缺氧诱导因子-1 (HIF-1), 两面神激酶 (JAK)/信号转导及转录激活因子 (STAT), MAPK 等多条信号通路中, 这提示五子衍宗丸通过作用于多条通路来治疗男性不育症且这些通路间存在着复杂的相互作用关系。其中, 节点的大小表示富集到的靶点数量, 节点的颜色由蓝

色至红色表明 P 值由大到小。因此红色节点越大信号通路的显著性就越高, 说明该条信号通路的重要性越高。

3 讨论

男性不育症可归属于中医学“无子”“乏嗣”“绝育”等范畴。关于其病因病机,《黄帝内经·素问·上古天真论》有云:“丈夫二八, 肾气盛, 天癸至, 精气溢泻, 阴阳和, 故能有子……七八肝气衰, 筋不能动, 天癸竭, 精少……而无子耳。”可见其基本病机为肾气亏虚、肾精不足, 临床治疗当以补肾填精为法。中医药在防治男性不育症领域已取得一定成果, 展现

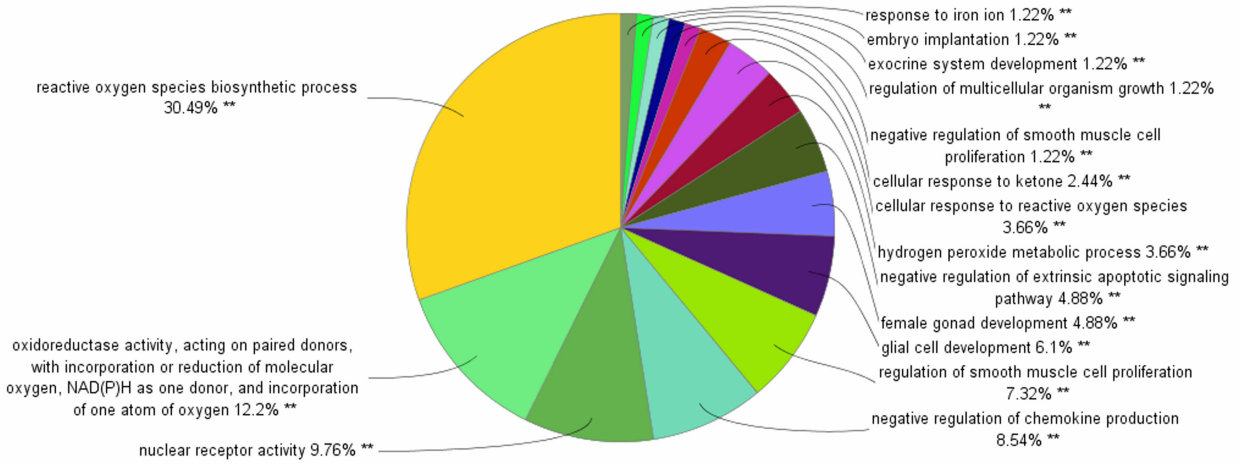


图 5 ClueGo 功能分析生物学过程饼状分析

Fig. 5 Biological process pie chart of ClueGo functional analysis

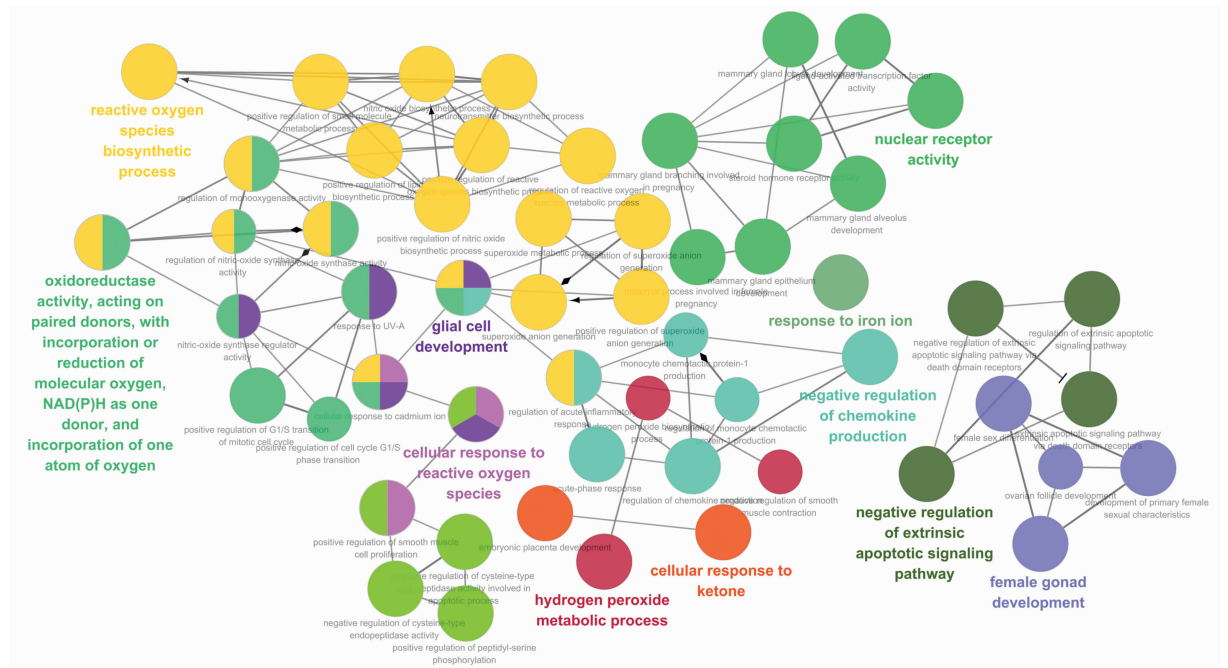


图 6 ClueGo 功能分析生物学过程交互网络

Fig. 6 ClueGo Functional analysis biological process interaction network

出独特优势,具有广阔的前景^[5]。五子衍宗丸始载于唐代《悬解录》,被誉为“古今种子第一方”,由枸杞子、菟丝子、五味子、覆盆子、车前子 5 味中药组成。其中枸杞子性平味甘、菟丝子性温味甘,均始载于《神农本草经》,枸杞子滋补肝肾、益精明目,菟丝子补肾阳、益肾精,共为君药。五味子收敛固涩、益气生津、补肾益阴,覆盆子性温味甘酸,《本草纲目》云:“益肾脏而固精,补肝虚而明目”,共为臣药。车前子性寒味甘,《本草新编》云:“利水而不耗气,水窍开,而精窍闭”,为佐使之用。全方药少而力专,

共奏填精益髓、疏利肾气、种嗣衍宗之功效。

现代药理研究表明枸杞子有效成分枸杞多糖可增强抗氧化酶活性、抑制氧化应激、减轻睾丸损伤^[16]。同时枸杞多糖可上调精子细胞 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 的表达及下调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的表达、增加线粒体膜电位、减轻生精细胞凋亡,对辐射或者环磷酸胺诱导生殖系统损伤及生精功能障碍有显著的保护作用^[17-18]。菟丝子有性成分菟丝子黄酮可保护雄性动物的生殖器官、促进睾丸发育及睾酮分泌、减轻生精细胞的氧化损伤与凋亡^[19-20]。

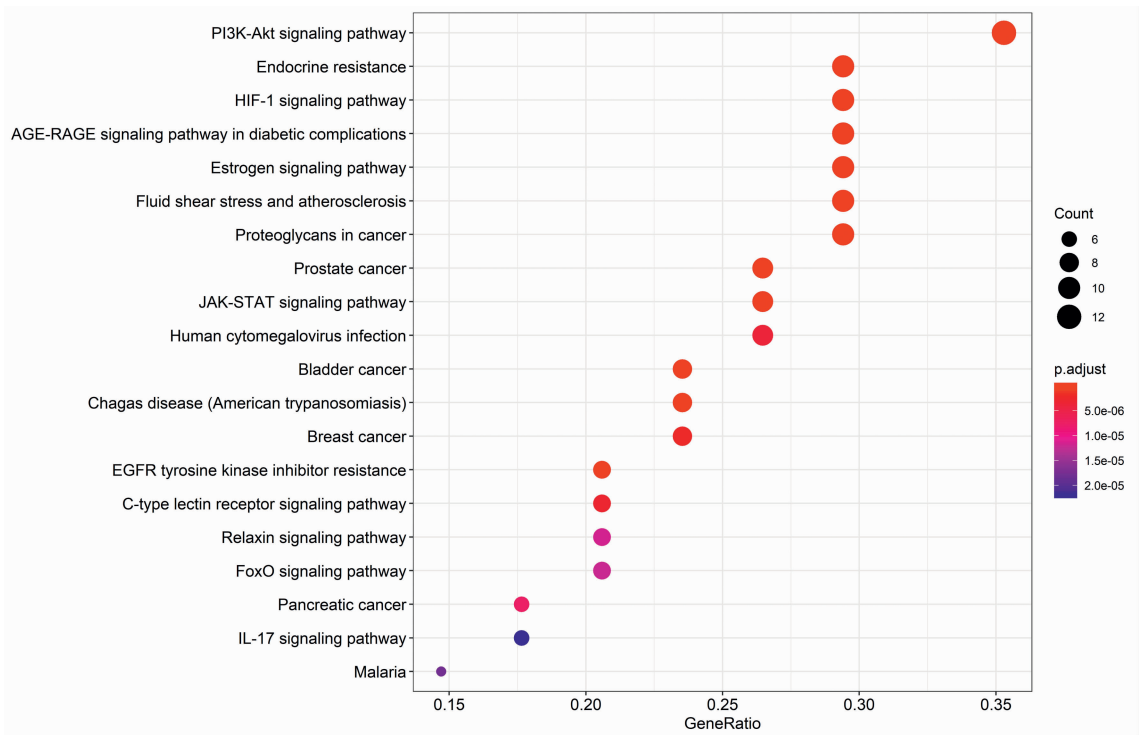


图 7 KEGG 通路富集(前 20 个)

Fig.7 KEGG pathway enrichment (top 20)

表 3 靶点通路富集结果(前 20 个)

Table 3 Result of target pathway enrichment (top 20)

编号	中文名称	英文名称	靶点数目	P 值
hsa04151	磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B	PI3K/Akt signaling pathway	12	1.33×10^{-8}
hsa04066	缺氧诱导因子信号通路	HIF-1 signaling pathway	10	7.31×10^{-12}
hsa04933	糖尿病并发症的晚期糖基化终末产物及其受体信号通路	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	10	7.31×10^{-12}
hsa04915	雌激素信号转导通路	estrogen signaling pathway	10	1.88×10^{-10}
hsa04630	非受体酪氨酸激酶/信号传导及转录激活因子信号通路	JAK/STAT signaling pathway	9	1.85×10^{-8}
hsa04010	丝裂原活化蛋白激酶信号通路	MAPK signaling pathway	8	2.82×10^{-5}
hsa04625	C 型凝集素受体信号通路	C-type lectin receptor signaling pathway	7	2.36×10^{-7}
hsa04926	松弛素信号通路	relaxin signaling pathway	7	1.08×10^{-6}
hsa04068	转录因子叉头盒 O 信号通路	FoxO signaling pathway	7	1.20×10^{-6}
hsa04015	大鼠肉瘤相似 1 信号通路	Rap1 signaling pathway	6	4.21×10^{-4}
hsa04657	白细胞介素-17 信号通路	IL-17 signaling pathway	6	2.43×10^{-6}
hsa04014	大鼠肉瘤信号通路	Ras signaling pathway	6	4.21×10^{-4}
hsa04370	血管内皮生长因子信号通路	VEGF signaling pathway	5	4.77×10^{-6}
hsa04660	T 细胞受体信号通路	T cell receptor signaling pathway	5	6.63×10^{-5}
hsa04917	催乳素信号通路	prolactin signaling pathway	5	1.12×10^{-5}
hsa04921	催产素信号途径	oxytocin signaling pathway	5	4.66×10^{-4}
hsa04668	肿瘤坏死因子信号通路	TNF signaling pathway	5	9.97×10^{-5}
hsa04371	爱帕琳肽信号通路	apelin signaling pathway	5	2.80×10^{-4}
hsa04072	磷脂酶 D 信号通路	phospholipase D signaling pathway	5	4.00×10^{-4}
hsa04115	肿瘤抑制基因信号通路	p53 signaling pathway	4	2.45×10^{-4}

车前子有效成分车前子多糖^[21]具有抗氧化效应及清除氧自由基的作用。覆盆子具有抗氧化、抗炎、降血糖、降血脂等药理作用^[22]。五味子具有护肝、抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤、提高免疫力等药理作用^[23]。

本研究经初步筛选得到五子衍宗丸 71 个活性成分。在图 5 中,药物-活性成分-疾病-靶点互作网络中 degree 表示网络中节点与节点相连路线的数目。degree 值高的活性成分有可能在五子衍宗丸的药理功能中发挥着较为重要的作用或者五子衍宗丸治疗男性不育的潜在靶点。其中槲皮素 degree 为 121,五子衍宗丸 degree 为 50,孕酮受体(PGR) degree 为 41,男性不育症 degree 为 35,山奈酚 degree 为 21。86 个节点中有 56 个与 2 个以上节点发生作用。以上表明“五子衍宗丸”中候选活性成分可能作用于整个生物网络系统,而非作用于某一个蛋白靶点,体现了中药作用的整体性与复杂性,同时也说明了五子衍宗丸治疗男性不育症多成分、多靶点的作用机制。

通过分析五子衍宗丸作用靶点与男性不育症的疾病治疗靶点得到两者的共同靶点数为 35 个,说明五子衍宗丸治疗男性不育症的作用靶点范围较小,具有较为明确的治疗作用。构建共同靶点的 PPI 中,出现频次较高的有 EGFR, VEGFA, PI3K 等,是整个网络的节点蛋白,说明五子衍宗丸活性成分与其有较高的结合活性,可作为五子衍宗丸治疗男子不育症的潜在靶点。研究发现 ERGF 与顶体反应关系密切,EGFR 被蛋白激酶 A(PKA)及其配体 EGF 激活后可促进磷脂酶 D(PLD)激活,进而聚合肌动蛋白、增加细胞内钙离子浓度,促进顶体反应发生^[24-25]。雄性小鼠睾丸中 VEGFA 亚型的缺失会引起精原干细胞稳态失衡,出现精子数量减少,导致生育力低下^[26-27]。

ClueGo 生物功能分析显示,五子衍宗丸治疗男性不育症的潜在靶点多与氧化与抗氧化活性等生物学过程相关。既往的研究也表明在生理情况下活性氧(ROS)对精子功能具有重要的调节作用^[28],如生殖细胞信号转导、激素生成、精子运动、精子获能、顶体反应等^[29]。而精索静脉曲张、吸烟、感染、辐射等可导致 ROS 异常增多^[30],异常增多的 ROS 可诱发多种凋亡诱导信号,破坏精子质膜的流动性及完整性、损伤精子 DNA 及线粒体、影响精子运动能力等,导致精子数量及活力下降进而引起男性生育能力下降^[31]。KEGG 通路富集分析与氧化和抗氧化活性相关的通路有 PI3K/Akt, HIF-1 等通路。其中 PI3K/Akt 信号通路参与调控细胞的增殖、分

化、生长、凋亡等多种生命现象,同时在肿瘤、炎症、代谢和生殖系统疾病的发病机制中起重要作用^[32]。研究发现 PI3K/Akt 信号通路在雄性生殖发育和维持睾丸稳态、附睾功能中起重要作用^[33]。在睾丸中可调控精原干细胞的数量,与精原干细胞增殖密切相关;并可调控附睾精子成熟微环境,对于增进精子运动能力具有重要作用^[34]。然而缺氧、氧化应激等条件下可抑制 PI3K/Akt 信号通路,降低 Akt 磷酸化水平,诱导细胞发生凋亡^[35]。HIF-1 信号通路中的 HIF 有 3 个亚基^[36],由 HIF-1A 编码的基因 HIF-1 α 与 ROS 存在相互调控^[37]。HIF-1 α 在缺氧条件下可下调 Bcl-2 的表达诱导凋亡^[38]。而在氧化应激条件下,HIF-1 α 表达上调可阻止线粒体产生过多 ROS,从而抵抗氧化应激^[39]。因此五子衍宗丸治疗男性不育症可能通过调控 PI3K/Akt, HIF-1 等信号通路,促使氧化与抗氧化水平保持动态平衡,促进精子增殖和增进精子运动能力。

本研究通过网络药理学和整合生物信息学方法,对五子衍宗丸治疗男性不育症的物质基础及其作用机制进行探析。从五子衍宗丸中共获得 72 个生物活性成分,活性成分-靶点互作网络中,degree 值较高槲皮素,山奈酚, β -谷甾醇可能在五子衍宗丸的药理作用发挥重要作用。得到 35 个五子衍宗丸治疗男性不育症的可能靶点,可作为男性不育症核心治疗靶点的有 ERGF, VEGFA, PI3K 等。这些靶点主要包含氧化与抗氧化活性等生物学过程,涉及到与氧化及抗氧化应激相关的 PI3K/Akt, HIF-1 等多条信号通路。以上均体现了中药复方多成分、多靶点、多途径治疗疾病的特点,为男性不育症的治疗提供了思路借鉴。

然而网络药理学研究无论是数据挖掘、正反向分子对接、药物-靶点相似性算法等,都存在诸多不足,如反向靶点预测工具所依赖的靶点数据库信息不全,相似性算法存在精度不高,药物与靶点关联性差、体内实际情况与预测分析差距较大等^[40-41]。因此,开发新一代高精度、高标准、高智能化的中药化学数据库以及靶点预测工具,综合应用多成分、多靶点、多途径数的数据挖掘技术,并结合相关体内实验验证,将是今后中药网络药理学研究的发展方向之一。本文尚需综合 TCMID, TCM-Database@Taiwan, TCM-MESH 等多个中药数据库完善药物-活性成分-靶点筛选,以及对五子衍宗丸中五味中药配伍剂量进行综合考量,同时网络药理学分析结果尚需进一步实验验证。

[参考文献]

- [1] Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, et al. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update[J]. *Eur Urol*, 2012, 62(2): 324-332.
- [2] Barratt C L R, Björndahl L, Tournaye H, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 660-680.
- [3] HUANG C, LI B, XU K, et al. Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015[J]. *Fertil Steril*, 2017, 107(1): 83-88.
- [4] 中华医学会男科分会. 2016 版中国男科疾病诊断治疗指南与专家共识[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017, 39-56.
- [5] ZHOU S H, DENG Y F, LIU Z D, et al. Traditional Chinese medicine as a remedy for male infertility: a review[J]. *World J Mens Health*, 2019, doi: 10.5534/wjmh.180069.
- [6] 王桐生, 黄金玲, 吴德玲, 等. 五子衍宗丸对少弱精子症模型大鼠精子线粒体膜电位及超微结构影响[J]. *中华男科学杂志*, 2013, 19(5): 446-450.
- [7] 张晨曦, 王永辉, 许凯霞, 等. 不同补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(8): 148-153.
- [8] 高云霄, 刘保兴, 秦茂, 等. 五子衍宗丸通过增强支持细胞自噬改善生精功能[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 961-964.
- [9] 张秀平, 刘保兴, 秦茂, 等. 五子衍宗丸对肾精亏虚证大鼠细胞色素 C 氧化酶 7a2 及细胞外信号调节激酶磷酸化水平表达的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(12): 806-810.
- [10] 高云霄, 刘保兴, 秦茂, 等. 五子衍宗丸通过增强支持细胞自噬改善生精功能[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 961-964.
- [11] XU Y P, LIU B X, WANG C H, et al. A Chinese herbal formula, Wuzi Yanzong pill, improves spermatogenesis by modulating the secretory function of Sertoli cells[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(3): 194-199.
- [12] HU H X, SUN J, XIE Y L, et al. Effect of modified Wuzi Yanzong Pill on Tip60-mediated apoptosis in testis of male rats after microwave radiation[J]. *Chin J Integr Med*, 2017, doi: 10.1007/s11655-017-2425-9.
- [13] 刘伟, 周建良, 陈碧莲, 等. HPLC 同时测定五子衍宗丸中 5 种活性成分的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3): 74-78.
- [14] LUO T T, LU Y, GUO J, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective[J]. *Chin J Integr Med*, 2019, doi: 10.1007/s11655-019-3064-0.
- [15] 周远, 苏式兵. 中药复方配伍的研究方法及其进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi: org/10.13422/j.cnki.syfx.20191550.
- [16] ZHANG L, LI Q, LIN X, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides against cadmium-induced testicular toxicity in male mice[J]. *Food Funct*, 2017, 8(6): 2322-2330.
- [17] LUO Q, LI J, XING C, et al. The effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the male rats' reproductive system and spermatogenic cell apoptosis exposed to low-dose ionizing irradiation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1): 249-258.
- [18] QIAN L, YU S. Protective effect of polysaccharides from *Lycium barbarum* on spermatogenesis of mice with impaired reproduction system induced by cyclophosphamide[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 76(5): 383-385.
- [19] 景晓平, 崔瑞琴, 程伟伟, 等. 菟丝子黄酮干预雷公藤多苷所致雌性幼鼠生殖损伤[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(10): 113-117.
- [20] 孙晶晶, 吴秀娟, 鲍军, 等. 菟丝子总黄酮对氢化可的松致大鼠少弱精子症的治疗作用及其机制[J]. *华西药学杂志*, 2016, 31(1): 14-17.
- [21] 张宁, 王素敏, 车文文, 等. 车前子多糖抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞增殖及其机制[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(5): 683-688.
- [22] 程丹, 李洁, 周斌, 等. 覆盆子化学成分与药理作用研究进展[J]. *中药材*, 2012, 35(11): 1873-1876.
- [23] 刘燕, 孙红霞. 五味子多糖的药理学作用研究进展[J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2016, 17(5): 607-610.
- [24] Breitbart H, Etkovitz N. Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction[J]. *Asian J Androl*, 2011, 13(1): 106-110.
- [25] Rajamanickam G D, Kastelic J P, Thundathil J C. Na/K-ATPase regulates bovine sperm capacitation through raft-and non-raft-mediated signaling mechanisms[J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(11): 1168-1182.
- [26] LU N, Sargent K M, Cupp A S, et al. Loss of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in the testes of male mice causes subfertility, reduces sperm numbers, and alters expression of genes that regulate undifferentiated spermatogonia[J]. *Endocrinology*,

- 2013,154(12): 4790-802.
- [27] Sargent K M, Clopton D T, Cupp A S, et al. VEGFA splicing: divergent isoforms regulate spermatogonial stem cell maintenance[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 363(1): 31-45.
- [28] Aitken R J, Clarkson J S, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function [J]. *Biol Reprod*, 1989, 41(1): 183-197.
- [29] Aitken R J, Jones K T, Robertson S A. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health [J]. *J Androl*, 2012, 33(6): 1096-1106.
- [30] Ashok A, Eva T, Rakesh S. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12(1): 45-53.
- [31] Nowicka-Bauer K, Lepczynski A, Ozgo M, et al. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, doi: 10. 26402/jpp. 2018. 3. 05.
- [32] YANG J, CHEN L, YANG J, et al. High mobility group box-1 induces migration of vascular smooth muscle cells via TLR4-dependent PI3K/Akt pathway activation[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(3): 3361-3367.
- [33] Chambard J C, Leeloch R, Pouysségur J, et al. ERK implication in cell cycle regulation[J]. *BBA Mol Cell Research*, 2007, 1773(8): 1299-1310.
- [34] Schultz M B, Sinclair D A. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging [J]. *Development*, 2016, 143(1): 3-14.
- [35] Rashid H O, Yadav R K, Kim H R, et al. ER stress: autophagy induction, inhibition and selection [J]. *Autophagy*, 2015, 11(11): 1956-1977.
- [36] Manalo D J, Rowan A, Semenza G L, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 [J]. *Blood*, 2005, 105(2): 659-669.
- [37] Kim J W, Tchernyshyov I, DANG C V, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia[J]. *Cell Metab*, 2006, 3(3): 177-185.
- [38] Volm M, Koomägi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(3A): 1527-1533.
- [39] WANG G L, JING B H, Semenza G L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. *PNAS*, 1995, 92(12): 5510-5514.
- [40] 方坚松, 刘艾林, 杜冠华, 等. 基于化学信息学方法预测药物靶点的研究进展 [J]. *药理学学报*, 2014, 49(10): 1357-1364.
- [41] 彭利红, 李泽军, 陈敏, 等. 一种多信息融合的药物-靶标关联预测算法 [J]. *计算机工程*, 2016, 42(6): 218-223, 229.

[责任编辑 孙丛丛]