

基于网络药理学探讨聚精助育汤治疗不育症的分子机制

傅伟^{1,4}, 徐磊², 林美欣¹, 李晨曦³, 游旭军¹, 秦国政^{4*}

(1. 广州中医药大学第七临床医学院, 广州 深圳 518133;

2. 云南中医药大学第一临床医学院, 云南 昆明 650500;

3. 河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院), 河南 郑州 450000;

4. 云南省中医院 (云南中医药大学第一附属医院), 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 聚精助育汤为临床治疗不育症的自拟复方, 疗效确切, 其药效机制尚未阐明。**方法** 利用 TC MSP 数据库收集聚精助育汤的化合物及其靶点, 利用 Gencards 数据库收集不育症相关疾病靶点, 利用 STRING 11.0 数据库分析聚精助育汤-不育症共同靶点的蛋白质相互作用 (PPI), 应用 Cytoscape 3.8.0 软件进行核心基因的筛选, GO 的生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cell component, CC) 富集分析, 使用 String 数据库, 使用 R 4.0.3 软件, 绘制气泡图、柱状图。将成分-疾病-通路-靶点等导入系统进行通路网络图的绘制。**结果** 经过检索、筛选, 共获得聚精助育汤化合物 248 个, 化合物潜在靶点 2 238 个, 不育症相关疾病基因 1 369 个, 聚精助育汤-不育症共同靶点 185 个。网络药理学分析结果表明, 槲皮素、木犀草素、山奈酚、 γ -氨基丁酸等是聚精助育汤的主要活性成分, ESR1、IL2、FOS、NFE2L2 等是聚精助育汤治疗不育症的主要靶点, 共同靶点富集于 PI3K-Akt 等多个信号通路, 调节细胞、凋亡、基因转录等生物学过程。**结论** 初步确定了聚精助育汤治疗不育症的机制及作用靶点, 为后续研究提供参考。

关键词: 聚精助育汤; 不育症; 网络药理学

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2024)01-0098-09

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2024.01.017

Study on the Molecular Mechanism of Jujing Zhuyu Decoction in Treating Infertility Based on Network Pharmacology

FU Wei^{1,4}, XU Lei², LIN Meixin¹, LI Chenxi³, YOU Xujun¹, QIN Guozheng⁴

(1. Seventh Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518133, China;

2. The First Clinical Medical College of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

3. Henan Traditional Chinese Medicine Hospital, The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese

Medicine, Zhengzhou 450000, China; 4. Yunnan Traditional Chinese Medicine Hospital, The First

Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: Objective Jujing Zhuyu decoction is a self-made compound for the clinical treatment of male infertility. Its curative effect is definite, and its mechanism of action has not been clarified. **Methods** Using the TC MSP database to collect compounds and targets of Jujing Zhuyu decoction, using the gencards database to collect targets of infertility related diseases, using the STRING 11.0 database to analyze protein interactions (PPI) between Jujing Zhuyu decoction and the common target of infertility, using Cytoscape 3.8.0 software to screen core genes, biological processes (BP) and molecular

基金项目: 全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2022]75 号); 国家自然科学基金项目 (81260540, 81760872, 82104853); 深圳市宝安中医院资助项目 (BAZY20200610)

作者简介: 傅伟 (1984-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 泌尿男科疾病研究, E-mail: fuwei84@gzucm.edu.cn

* **通信作者:** 秦国政 (1960-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 泌尿男科疾病研究, E-mail: qin60@tom.com

functions (MF) of GO cell component (CC) enrichment analysis was performed using the string database and R 4.0.3 software to draw bubble and bar charts. Import components, diseases, pathways, targets, etc. into the system to draw a pathway network diagram. **Results** After searching and screening, 248 compounds of Jujing Zhuyu decoction were obtained, including 2 238 potential targets, 1 369 genes related to male infertility, and 185 common targets of Jujing Zhuyu decoction and male infertility. The results of network pharmacological analysis showed that quercetin, luteolin, kaempferol γ -Aminobutyric acid is the main active component of Jujing Zhuyu decoction. ESR1, IL2, Fos and nfe2l2 are the main targets of Jujing Zhuyu decoction in the treatment of male infertility. The common targets are enriched in multiple signal pathways such as PI3K-Akt, and regulate biological processes such as cell, apoptosis and gene transcription. **Conclusion** The mechanism and target of action of Jujing Zhuyu decoction in treating infertility have been preliminarily determined, providing reference for subsequent research.

KEY WORDS: Jujing Zhuyu decoction; infertility; network pharmacology

不育症是男科常见疾病,而且亦是较为难治的 1 种男科疾病。本病有逐渐增多的趋势,不孕不育症夫妇中因男方因素而导致不育的发生率接近 50%。不育症属于中医“无子”“绝育”“男子艰嗣”等范畴,不育症是中医优势病种,中医药治疗不育症在临床中具有较好的疗效,值得进一步探讨。

聚精助育汤具有补肾健脾,养经活血之功,系云南省中医医院秦国政教授根据多年临床经验凝练而成,临床疗效可靠。聚精助育汤由黄芪、地黄、枸杞等 16 味中药组成。虽然聚精助育汤在治疗不育症方面积累了丰富的临床经验,但是其治疗不育症的作用机制尚不明确,采用现代网络药理学方法对聚精助育汤治疗不育症进行分析,以期后续研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 聚精助育汤的化合物成分检索及相关靶点筛选

使用 TCMSp 数据库^[1](<https://tcmsp.com/tcmsp.php>)检索丹参、枸杞子、何首乌、黄精、黄芪、炒麦芽、鸡血藤、沙苑子、熟地黄、太子参、菟丝子、续断、益母草的化合物成分和靶点,成分筛选条件为 OB \geq 30%, DL \geq 0.18。其中,由于 TCMSp 数据库未收录炙黄芪、生地和神曲,因此,炙黄芪和神曲的化合物成分使用 Batman-TCM 数据库^[2](<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)补充完善,选取得分>20 分的成分靶点纳入。神曲的化合物成分从 Herb 数据库^[3](<http://herb.ac.cn/>)进行补充,靶点依据 SwissTargetPrediction 数据库^[4](<http://www.swisstargetprediction.ch/>)行相关检索。uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[5]对相关数据进行校正处理,去掉非人类靶点。

1.2 聚精助育汤-不育症共同靶点筛选 以“Male infertility”为关键词,在 GeneCards^[6]数据库(<https://www.genecards.org/>),NCBI 基因数据库^[7](<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),DisGeNET 数据库^[8](<https://www.disgenet.org/>)行人类基因筛选。筛选出的疾病、药物靶点输入韦恩图,得到聚精助育汤-不育症共同靶点。

1.3 蛋白相互作用网络构建 将疾病、药物共同靶点进行 String 数据库^[9](<https://string-db.org/cgi/input.pl>)PPI 网络构建,导入 Cytoscape 3.8.0^[10]中进行拓扑分析,前 20 个靶点使用 R 4.0.3 进行图片绘制。

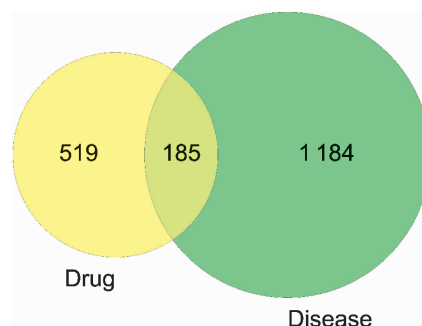
1.4 聚精助育汤-不育症 GO 富集和 KEGG 富集分析 将疾病、药物共同的靶点进行富集分析并绘制气泡图、柱状图。

1.5 聚精助育汤-不育症“方-药-成分-靶点-通路”网络图构建 使用 Cytoscape3.8.0 进行绘图,多靶点的中药活性成分作用特点可以进行直观展示。

2 结果

2.1 聚精助育汤的潜在靶点及化合物成分 经汇总分析显示,聚精助育汤化合物 248 个,化合物潜在靶点 2 238 个。

2.2 聚精助育汤-不育症共同靶点分析 将筛选出的疾病、药物靶点输入系统可以得到 185 个共有靶点,通路富集分析我们可以从图中进行直观展示。见图 1。



注:Drug:聚精助育汤;Disease:不育症

图 1 聚精助育汤-不育症共同靶点

2.3 PPI 网络 185 个共同靶点输入系统数据库, 我们可以看到 PPI 网络图。见图 2、图 3。

行处理, 可以筛选出 63 个最重要的关键靶点, 20 个靠前的关键靶点进行绘图分析。见图 4。

2.4 拓扑分析 拓扑分析使用 NetworkAnalyzer 进

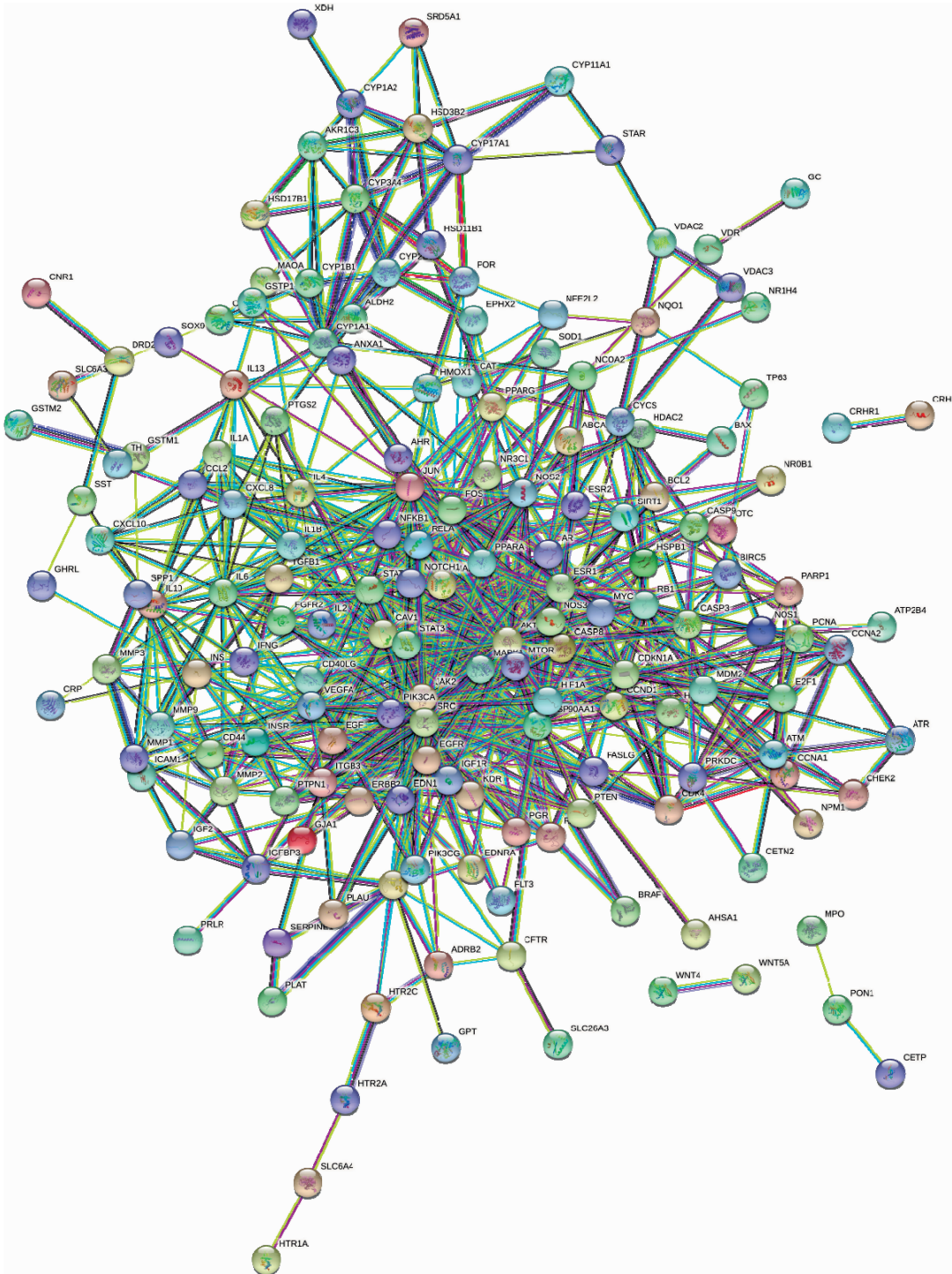


图 2 应用 String 网站绘制聚精助育汤-不育症共同靶点 PPI 网络图

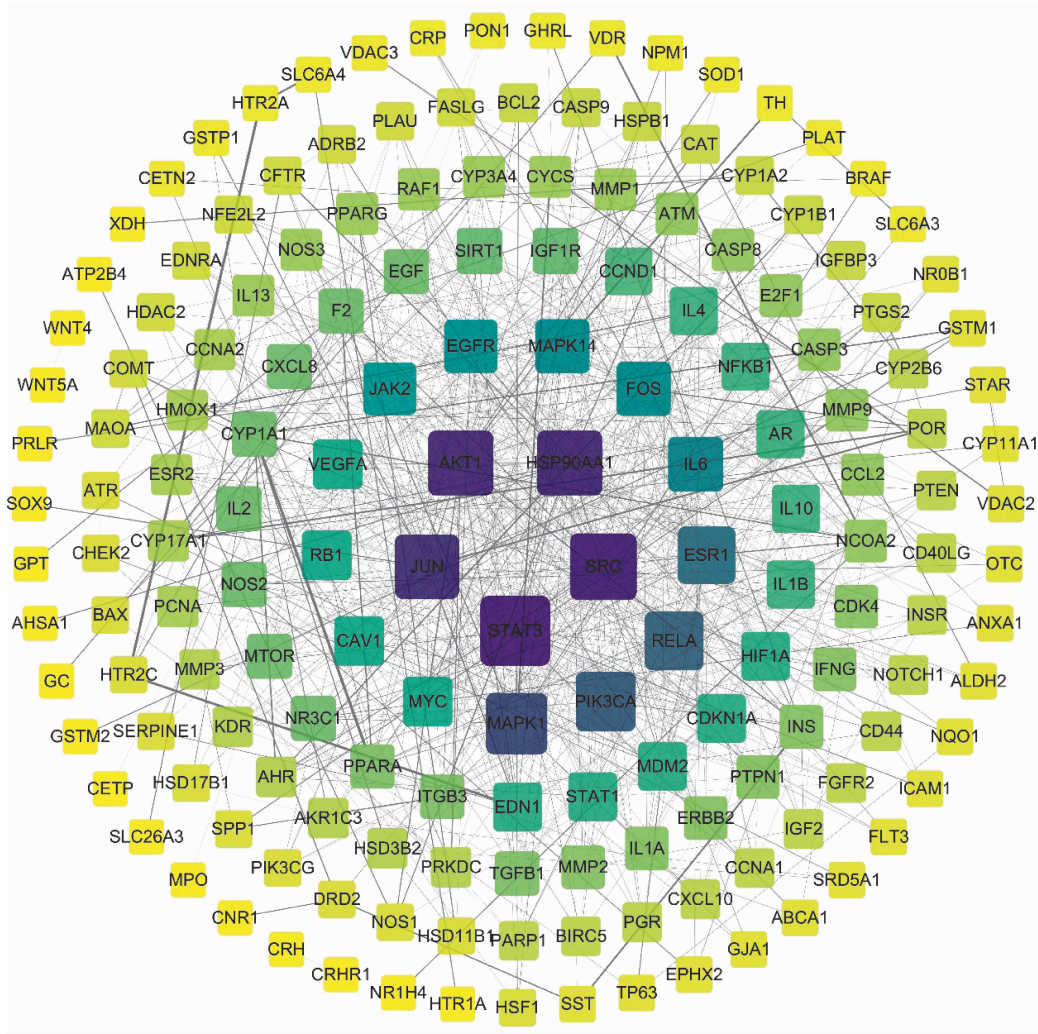


图 3 应用 cytoscape 软件绘制聚精助育汤-不育症共同靶点 PPI 网络图

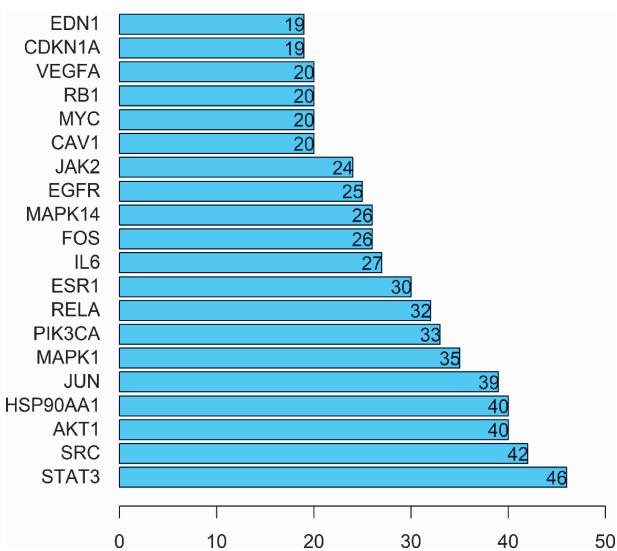


图 4 聚精助育汤-不育症共同靶点拓扑分析图

2.5 MCODE 聚类分析 通过 MCODE 分析^[14]进行核心基因的筛选。研究显示我们可以获取 4 个核心基因、4 个基因簇,核心基因为 FOS,NFE2L2 等。见表 1。

2.6 关键成分筛选 我们使用 cytoscape 3.8.0 软件进行拓扑分析,可以得到聚精助育汤治疗不育症关键成分信息表。见表 2。

2.7 KEGG 及 GO 富集分析 将药物疾病共有靶点进行相关分析,引用 String 数据库,获取到 3 056 条生物过程,191 项分子功能相关,67 项细胞组成相关。使用 R 4.0.3 软件,可以进行柱状图绘制。见图 5。KEGG 通路富集分析我们可以富集到 170 条相关通路信号信息。使用 R 4.0.3,安装并引用 clusterProfiler 软件包后,进行气泡图绘制。见图 6。

表 1 聚精助育汤-不育症共同靶点 MCODE 聚类分析详细信息表

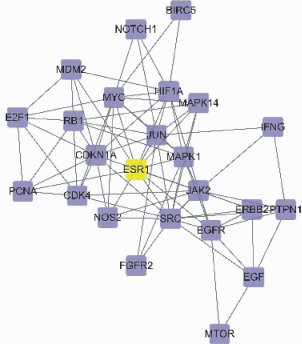
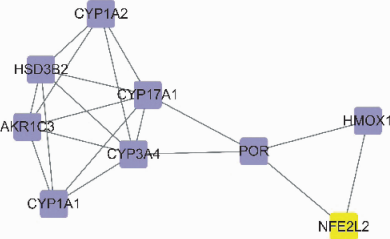
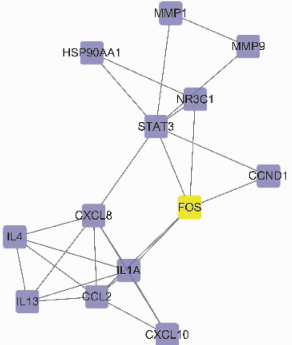
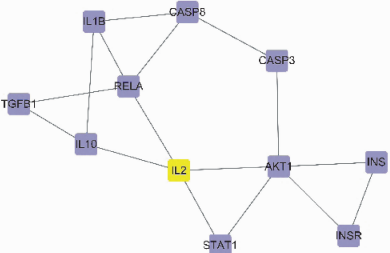
Cluster	Network	Nodes	Edges	Node IDs
1		24	82	HIF1A, NOS2, EGFR, CDKN1A, EGF, SRC, FGFR2, NOTCH1, PTPN1, PCNA, JAK2, JUN, RB1, BIRC5, MTOR, CDK4, MDM2, ESR1, IFNG, MAPK1, ERBB2, E2F1, MYC, MAPK14
2		9	19	NFE2L2, CYP3A4, POR, AKR1C3, HSD3B2, CYP1A1, CYP17A1, HMOX1, CYP1A2
3		13	26	MMP1, CXCL8, CXCL10, CCND1, IL1A, FOS, IL13, CCL2, NR3C1, IL4, MMP9, STAT3, HSP90AA1
4		11	16	IL2, AKT1, CASP3, IL10, INS, TGFB1, INSR, IL1B, STAT1, CASP8, RELA

表 2 聚精助育汤治疗不育症关键成分信息表

ID	Name	Average Shortest Path Length	Betweenness Centrality	Closeness Centrality	Degree
MOL000098	quercetin	2.144809	0.090848	0.466242	87
MOL000006	luteolin	2.505464	0.022101	0.399128	39
MOL000422	kaempferol	2.434426	0.020278	0.410774	35
ID:23042	Gamma-Aminobutyric Acid	3.057377	0.009298	0.327078	32
HBIN037659	obscurine	2.964481	0.012225	0.337327	31
MOL000358	beta-sitosterol	2.478142	0.021657	0.403528	24

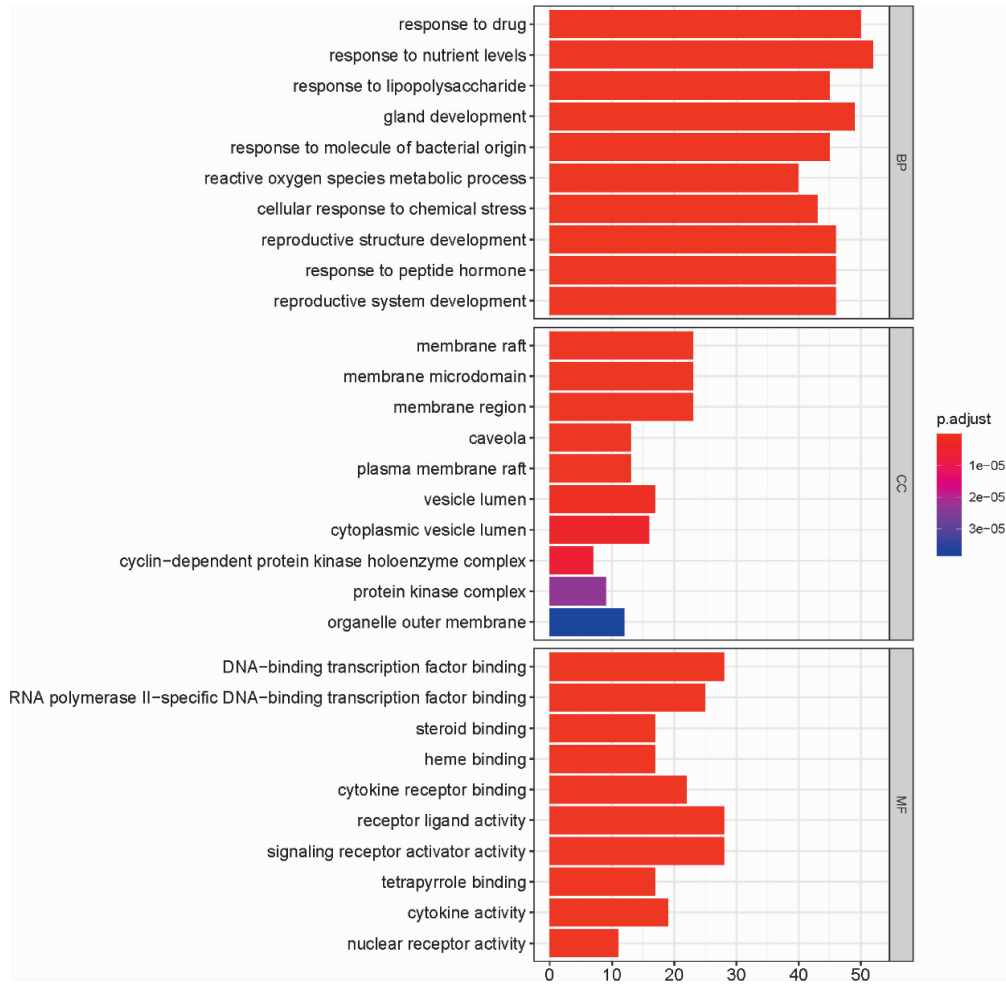


图 5 聚精助育汤-不育症共同靶点 GO 富集图

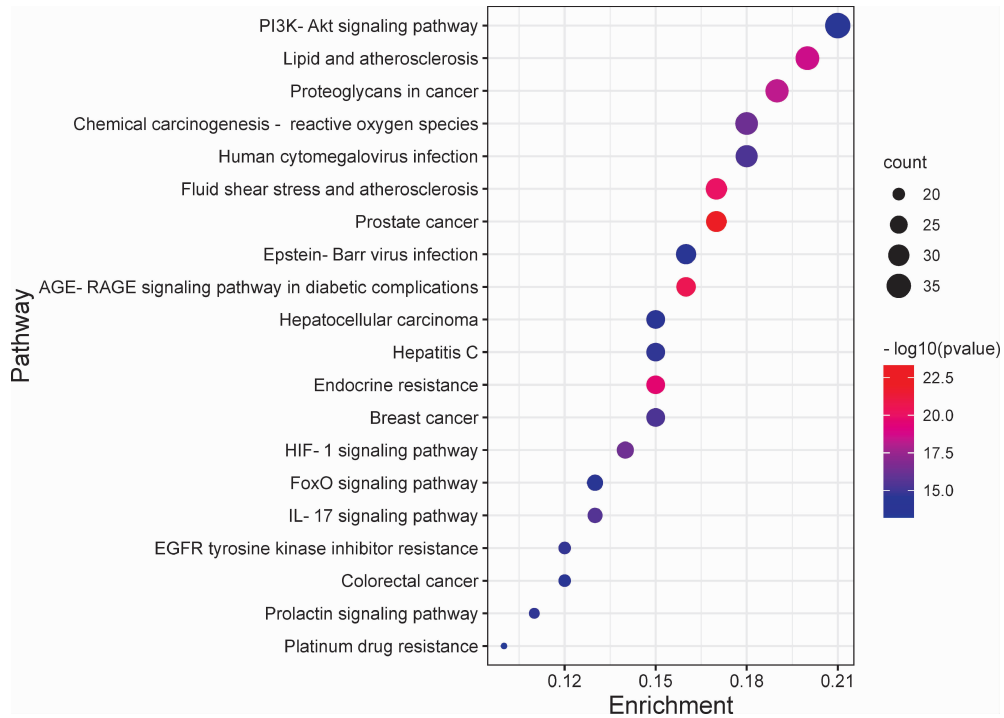


图 6 聚精助育汤-不育症共同靶点气泡图

2.8 聚精助育汤-不育症“中药复方-药物组成-化学成分-作用靶点-作用通路”网络图 我们使用 Cy-

toscape3.8.0 软件可以获取聚精助育汤-不育症“方-药-成分-靶点-通路”网络图。见图 7。

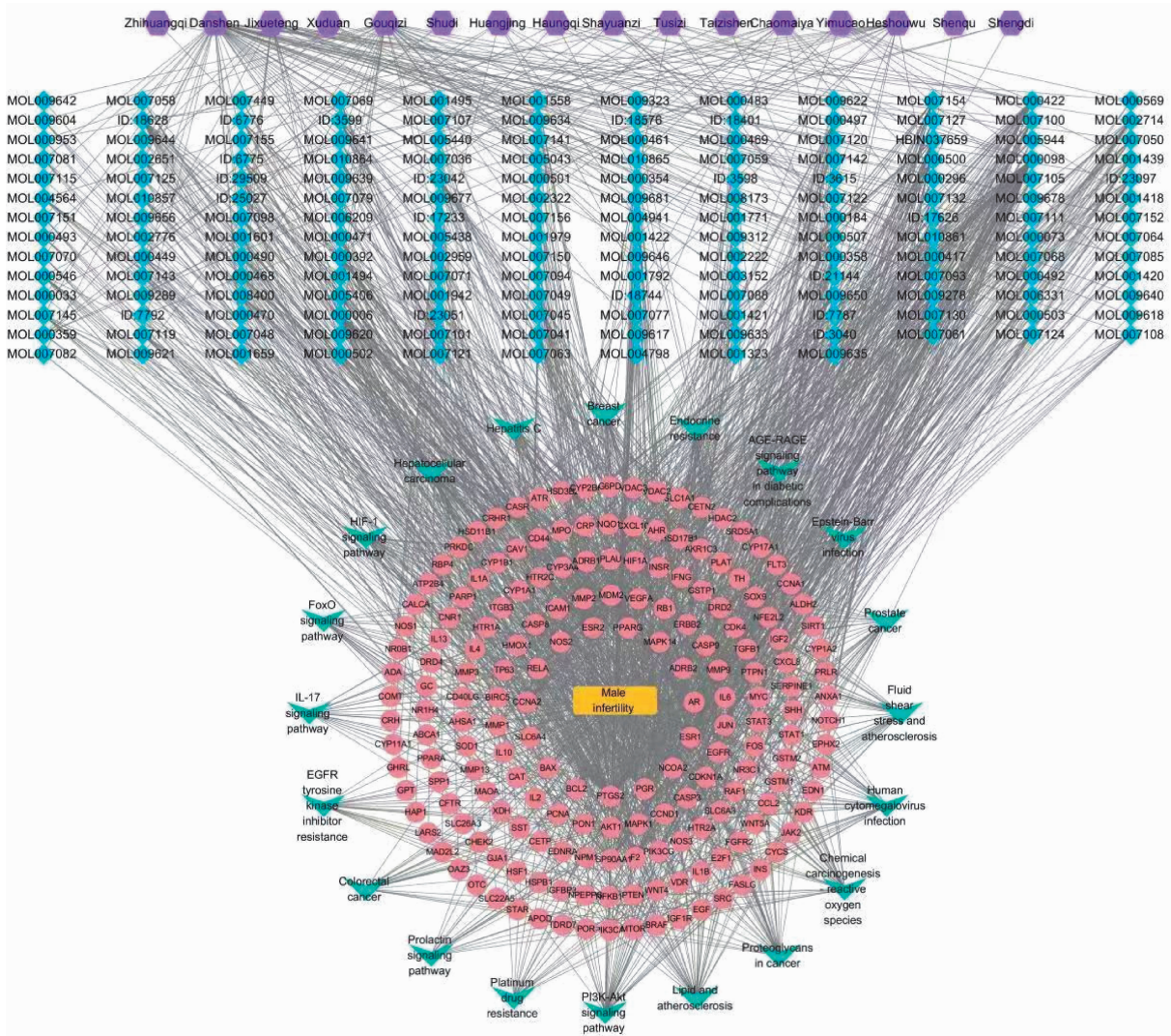


图 7 聚精助育汤-不育症“方-药-成分-靶点-通路”网络图

3 讨论

聚精助育汤的主要活性成分有 γ -氨基丁酸、槲皮素、木犀草素等。通过本次网络药理学展示,乳清蛋白负载槲皮素改善了西式饮食大鼠的雄性生育能力参数和动脉粥样硬化指数,以高脂肪高果糖摄入为特征的西方式饮食,通过致动脉粥样硬化指数紊乱和氧化应激诱导精子发生和睾丸功能的改变,证明了槲皮素的抗氧化性能^[12];槲皮素对氰化物诱导的 Wistar 大鼠睾丸组织病理具有调节作用。槲皮素对受到氰化物环境污染的个人有潜在的预防或治疗作用^[13]。添加木犀草素对猪精子冷冻-解冻后各项检测指标有一定的作用,添加剂量与冻后精子的活力活性、顶体、质膜和

DNA 完整率以及线粒体活性之间有弱的正相关性^[14]。槲皮素、木犀草素通过其刺激呼吸活性状态的能力,在弱精子症样品中被发现改善线粒体功能^[15]。山柰酚在 CP 诱导的 OA 小鼠模型中能够增强小鼠 leydig (TM3)和小鼠 sertoli(TM4)细胞活力,提高雄性生殖器官重量、精子质量,减轻睾丸组织损伤^[16]。在猪精子冷冻保存稀释液中添加一定浓度的山柰酚可以显著提高解冻后猪精子体外受精过程中的穿透率、单精入卵率和总受精率($P<0.05$)^[17],山柰酚可改善保存的猪精液的体外质量,5~25 $\mu\text{mol/L}$ 的山柰酚对精子有较好的保护作用,可延长保存期限,提高猪精液保存质量^[18]。0.05 mmol/L ~2.5 mmol/L 的 γ -氨基丁酸可提

高获能马鹿精子的顶体反应率;以 0.5 mmol/L γ -氨基丁酸处理组的顶体反应率最高 ($P < 0.01$), 达到 $(77.94 \pm 6.53)\%$ ^[19]。

聚精助育汤治疗不育症的靶点主要包括 ESR1、IL2、FOS、NFE2L2 等。雌激素通过与雌激素受体 (ERs) 相互作用, 在男性生殖中发挥重要作用, 其表达可通过 ESR1 和 ESR2 基因不同区域的多态性来调控, Meta 分析研究显示 ESR1 Pvu II 和 ESR2 Rsa I 多态性与不育风险显著相关^[20]; 精浆中白细胞介素 2 (IL2) 含量与不育症患者之间存在密切关系^[21], 白细胞精子症不育精液 IL 2 水平升高使男性生殖管壁中淋巴细胞活化, 白细胞聚集于精液, IL2 对精子和生殖组织具有重要作用^[22]。研究显示繁殖蚁精巢中能够形成足够的精子, 以便受精, 与 Fos 调控精原细胞增殖具有相关性^[23]。C-fos 是原癌基因, 为细胞内信号传递的第 3 信使, 具有重要的细胞生殖凋亡调控作用^[24]。抗氧化活性被发现通过调节 Nfe2l2 的表达来减轻氧化应激、睾丸损伤和精子异常^[25]。NFE2L2 的 mRNA 相对丰度较大与精子活力呈正相关, 并与精子功能特性密切相关^[26]。

PI3K-Akt 是聚精助育汤治疗不育症的主要潜在信号通路。经典的 PI3K/Akt 信号通路在细胞凋亡、增殖、分化等细胞过程中具有举足轻重的作用。近来研究表明, 该通路的活化与精子发生、成熟有着密切的联系, 与不育症的预后密切相关^[27]。不育与睾丸组织基因表达异常或信号传导异常所致的生精障碍密切相关, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白是细胞代谢的中枢调节器, 在细胞增殖、分化、翻译、肌动蛋白聚合、细胞周期、能量代谢和自噬等细胞活动中起重要调控作用。PI3K-Akt 经典信号通路可通过不同分子路径调节 mTOR 信号及其下游靶蛋白表达^[28]; 不育症 KEGG 通路分析提示主要与 PI3K-Akt 等信号通路相关, PI3K-Akt 是不育症核心信号通路^[29]。

综上所述, 聚精助育汤中的多个成分有可能通过 IL2、FOS、NFE2L2 等靶点起作用, PI3K-Akt 信号通路的具体作用机制尚需动物实验进一步验证。

参考文献:

[1] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal

medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6: 13.

- [2] LIU Z Y, GUO F F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.
- [3] FANG S S, DONG L, LIU L, et al. HERB: a high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D1197-D1206.
- [4] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [5] The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [6] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator[J]. Database: the Journal of Biological Databases and Curation, 2010, 2010: baq020.
- [7] NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D8-D13.
- [8] PINERO J, BRAVO À, QUERALT-ROSINACH N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D833-D839.
- [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 Research, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [10] DONCHEVA N T, MORRIS J H, GORODKIN J, et al. Cytoscape stringApp: network analysis and visualization of proteomics data[J]. Journal of Proteome Research, 2019, 18(2): 623-632.
- [11] SUN C H, YUAN Q, WU D D, et al. Identification of core genes and outcome in gastric cancer using bioinformatics analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8 (41): 70271-70280.
- [12] MOUSAVI S N, DORRAJI M S S, POURMANSOURI Z, et al. Quercetin-loaded on whey protein improves male fertility parameters and atherogenic indices of rats on a western-style diet[J]. Journal of Functional Foods, 2022,

- 88:104904.
- [13] OYEWOPO A O, ADELEKE O, JOHNSON O, et al. Regulatory effects of quercetin on testicular histopathology induced by cyanide in Wistar rats[J]. *Heliyon*, 2021, 7(7):e07662.
- [14] 何涛. 绿原酸、木犀草素和黄精多糖对猪精液冷冻保存效果的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2021.
- [15] FERRAMOSCA A, LORENZETTI S, GIACOMO M D, et al. Modulation of human sperm mitochondrial respiration efficiency by plant polyphenols[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2):217.
- [16] BAI X, TANG Y B, LI Q, et al. An integrated analysis of network pharmacology, molecular docking, and experiment validation to explore the new candidate active component and mechanism of cuscuteae semen-mori fructus coupled-herbs in treating oligoasthenozoospermia[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021, 15:2059-2089.
- [17] 刘定帮. 花旗松素、山奈酚和根皮素对猪精子保存效果的影响[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2020.
- [18] DURACKA M, DEBACKER M, BUCKO O, et al. The effect of kaempferol and naringenin may improve the in vitro quality of stored boar semen[J]. *Journal of Central European Agriculture*, 2019, 20(4):1069-1075.
- [19] 任艳玲. 孕酮、 γ -氨基丁酸诱发马鹿精子顶体反应及对离子转运调节的研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2006.
- [20] GE Y Z, XU L W, JIA R P, et al. Association of polymorphisms in estrogen receptors(ESR1 and ESR2) with male infertility: a meta-analysis and systematic review[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2014, 31(5):601-611.
- [21] 谢瑞亭, 高菊兴, 王彩英, 等. 不育症患者精浆中细胞因子测定的临床研究[J]. *临沂医学专科学校学报*, 2004(1):5-8.
- [22] 杨麦贵, 张竹映, 郝晓柯, 等. 白细胞精子症患者精液中IL-2, 8及NO的变化[J]. *第四军医大学学报*, 2003(1):76-77.
- [23] 朱蓉. 尖唇散白蚁精子发生的调节研究[D]. 西安:西北大学, 2010.
- [24] 雷忻, 廉振民, 李游游, 等. C-fos与生殖细胞发育[J]. *延安大学学报(自然科学版)*, 2007(1):72-74, 58.
- [25] GUVVALA P R, PARAMESWARAIAH R J, SELLAPAN S, et al. Ellagic and ferulic acids protect arsenic-induced male reproductive toxicity via regulating Nfe2l2, Ppargc1a and StAR expressions in testis[J]. *Toxicology*, 2019, 413:1-12.
- [26] ARANGASAMY A, SHARMA R B, HEMALATHA K, et al. Relationship of organic mineral supplementation and spermatozoa/white blood cells mRNA in goats[J]. *Animal Reproduction Science*, 2018, 197:296-304.
- [27] 赵丰, 耿强, 杜冠潮, 等. PI3K/Akt/mTOR信号通路与精子发生成熟关系的研究进展[J]. *中国计划生育学杂志*, 2020, 28(8):1325-1329.
- [28] 段鹏, 全超, 黄文婷, 等. PI3K-Akt/LKB1-AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1信号通路参与调节睾丸发育和精子发生的研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2016, 22(11):1016-1020.
- [29] 申毅锋, 朱坤, 董良, 等. 基于网络药理学联合分子对接探析强精片治疗男性不育症的分子机制[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(12):4505-4518.

(收稿日期:2023-09-11)