

基于数据挖掘和网络药理学的中药治疗弱精子症 用药规律及潜在机制研究

刘兴欣¹, 陈 敏¹, 杨倩倩², 周 也^{1*}

(1. 昭通市中医医院, 云南 昭通 657000; 2. 成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 610075)

摘要: **目的** 基于数据挖掘和网络药理学方法, 深入研究中药治疗弱精子症的用药规律及潜在作用机制, 并结合分子对接进行验证。 **方法** 在中英文数据库中检索并筛选出中药治疗弱精子症的文献, 构建弱精子症中药处方数据库, 运用 R 语言对其进行性味归经频次统计、关联规则分析、系统聚类分析, 筛选得到核心药物组合。运用网络药理学方法预测核心药物的潜在活性成分、作用靶点, 进而构建 PPI 网络, 筛选出核心药物组合治疗弱精子症的关键靶点, 随后进行 GO、KEGG 富集分析, 利用上述数据构建成分-交集靶点-信号通路网络图, 筛选主要成分。选取关键靶点及主要成分进行分子对接, 验证成分-靶点之间的结合活性。 **结果** 纳入文献 103 篇, 筛选出治疗弱精子症的中药复方或中成药 109 个, 涉及中药 189 味。结合关联规则、系统聚类分析, 得到核心药物组合“覆盆子-车前子-枸杞子-菟丝子-五味子”。进而筛选出潜在活性成分 67 种, 获得 231 个成分作用靶点以及 699 个疾病相关靶点, 得到交集靶点 46 个, 进而构建 PPI 网络, 筛选出关键靶点。富集分析发现, 交集靶点涉及 TNF、MAPK、IL17、HIF-1、mTOR、PI3K-Akt、NF- κ B、p53 等多条信号通路, 包含细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、细胞分化、促性腺激素分泌、细胞周期、血管生成等。分子对接结果显示, 关键靶点与主要成分之间结合活性较好, 其中 β -谷甾醇与 CASP3 靶点结合能最低。 **结论** 中药治疗弱精子症组方用药多以补肾益精、健脾益气为主, 辅以活血化瘀、利湿泄浊等, 注重调畅气机; 核心药物组合治疗弱精子症的关键靶点和信号通路主要参与炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等, 为后续中医药干预弱精子症的临床与实验研究提供思路和参考。

关键词: 弱精子症; 数据挖掘; 网络药理学; 分子对接; 五子衍宗丸

中图分类号: R256.56; R285.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2024)05-0072-10

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2024.05.011

Study on the Fundamental Patterns and Potential Mechanism of Traditional Chinese Medicine for Treating Weak Spermatogenesis Based on Data Mining and Network Pharmacology

LIU Xingxin¹, CHEN Min¹, YANG Qianqian², ZHOU Ye¹

(1. Zhaotong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhaotong 657000, China;

2. Clinical Medical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

ABSTRACT: Objective Based on data mining and network pharmacology methods, in-depth study on the dosing pattern and potential mechanism of action of traditional Chinese medicine for treating weak spermatozoa, combined with molecular docking for validation. **Methods** We searched and screened the literature of traditional Chinese medicines for treating weak spermatids in Chinese and English databases, constructed a prescription database of traditional Chinese medicines for weak spermatids, and screened the core drug combinations by applying the R language to carry out the frequency statistics of sex and flavor attribution, association rule analysis, and systematic clustering analysis. The network pharmacology method was used to predict the potential active ingredients and targets of the core drugs, and then the PPI network was constructed to screen out the key targets of the core drug combinations for the treatment of weak

作者简介: 刘兴欣(1986-), 男, 硕士, 住院医师, E-mail: 52402533@qq.com

* 通信作者: 周 也(1991-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 男科疾病的中医防治研究, E-mail: 1716265939@qq.com

spermatogenesis, followed by GO and KEGG enrichment analysis, and the above data were used to construct the component-intersecting target-signaling pathway network diagram to screen out the main components. The key targets and main components were selected for molecular docking to verify the binding activity between components-targets. Results 103 papers were included in the literature, and 109 Chinese herbal compounds or proprietary Chinese medicines were screened for the treatment of weak spermatogenesis, involving 189 flavors of Chinese medicines. Combined with association rules and systematic clustering analysis, the core drug combination of "raspberry-psyllium-wolfberry-cuscuta-schizandra" was obtained. Then 67 potential active ingredients were screened out, and 231 component targets and 699 disease-related targets were obtained. 46 intersecting targets were obtained, and then a PPI network was constructed to screen out the key targets. Enrichment analysis revealed that the intersected targets involved TNF, MAPK, IL17, HIF-1, mTOR, PI3K-Akt, NF- κ B, p53 and other signaling pathways, including apoptosis, inflammation, oxidative stress, cell differentiation, gonadotropin secretion, cell cycle, angiogenesis and so on. The molecular docking results showed that the binding activity between the key targets and the main components was good, among which β -sitosterol had the lowest binding energy to the CASP3 target. **Results** 103 articles were included, leading to the selection of 109 TCM formulas, involving 189 different medicinal ingredients. By applying association rules and systematic cluster analysis, the core drug combination was identified. Furthermore, 67 potential active ingredients were screened, resulting in 231 component-target interactions and 699 disease-related targets. The intersection yielded 46 key targets, then used to construct the PPI network. Enrichment analysis revealed the involvement of multiple signaling pathways, such as TNF, MAPK, IL17, HIF-1, mTOR, PI3K-Akt, NF- κ B, p53, encompassing processes like apoptosis, inflammatory response, oxidative stress, cell differentiation, gonadotropin secretion, cell cycle, and angiogenesis. Molecular docking results indicated favorable binding activities between key targets and significant components, with β -sitosterol showing the lowest binding affinity to the CASP3 target. **Conclusion** TCM prescriptions for asthenozoospermia primarily focus on reinforcing the kidney, replenishing vital essence, invigorating the spleen, promoting blood circulation, and removing dampness and turbidity while emphasizing the smooth flow of vital energy. The key targets and signaling pathways identified in the core drug combination for treating asthenozoospermia are mainly associated with inflammatory responses, oxidative stress, and apoptosis, providing valuable insights and references for future clinical and experimental research on TCM interventions for asthenozoospermia.

KEY WORDS: asthenozoospermia; data mining; network pharmacology; molecular docking; Wuzi Yanzong pills

弱精子症是导致男性不育的主要原因之一,主要表现为精子活力低下,其原因可分为睾丸前性、睾丸性和睾丸后性3大类^[1-2]。相关研究显示^[3-5],我国约有15%~20%的育龄夫妇不能生育,而弱精子症约占男性不育的40%~50%,且比例逐年升高。目前西医多采用针对病因的特异性治疗,多数情况下可获得良好的结果;但临床上有不少弱精子症患者找不到发病原因,这时通常只能使用左卡尼丁、维参锌、辅酶Q10等非特异性治疗,但疗效一般而且激素治疗往往副作用较多^[6]。相比较而言,近年来大量临床、实验研究已证实中医药在弱精子症防治中疗效明确且安全无副作用,具有独特优势^[7-10],但由于中药复方成分复杂以及各成分多通路、多靶点的药理作用特性,限制了基于生物信息学理论对弱精子症治疗的系统性再认识。因此,本研究拟通过数据挖掘、网络药理学、分子对接综合分析中医药治疗弱精子症的临床用药规律,以期弱精子症的临床诊疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 文献检索与整理 以中药、药、方、丸、散、胶囊、颗粒、冲剂、饮、膏、弱精子症、弱精症、精子活力低下、traditional Chinese medicine、asthenospermia、asthenozoospermia、low sperm motility等为检索词,通过主题词与自由词结合的方式,系统检索中国知网、万方、维普、Sinomed以及PubMed、web of science、Embase等数据库收集中药复方或中成药治疗弱精子症的全部文献,检索年限为建库-2023年1月。

文献纳入标准:(1)符合《WHO人类精液检查与处理实验室手册(1~6版)》弱精子症的诊断标准;(2)文献涉及的中药复方或中成药必须是内服方剂,药物组成确切;(3)治疗过程未联合其他治疗手段,包括西药、针灸、推拿等;(4)文献来源于“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”“中文社会科学引文索引(CSSCI)来源期刊”“中文核心期刊”“中国科技论文统计源期刊”或SCI论文。

文献排除标准:(1)不以弱精子症为主要研究对象的文献,包括以其他疾病为主合并有弱精子症,或少弱精症未予区分的文献;(2)中药复方或中成药药物组成不明确,或研究单味中药及中药提取物的文献;(3)治疗过程中联合使用西药、中医外治或其他非药物疗法等;(4)综述、meta 分析、动物实验研究、会议论文等类型文献;(5)文献来源不是核心期刊或 SCI 论文。

1.2 建立中药处方数据库 2 名研究者对检索到的文献运用 NoteExpress 软件进行管理,根据纳排标准独立筛选文献,其中重复的文献及方剂只纳入 1 次,遇到分歧时组内讨论或由第 3 名研究者决定是否纳入。通过初筛运用 Excel 建立弱精子症中药处方数据库。参照《中华人民共和国药典》2020 年版^[11]和《中药大辞典》第二版^[12],对数据库的中药名称进行规范化处理,如将“丹皮”规范为“牡丹皮”,“萸肉”规范为“山茱萸”等;保留因炮制方法或产地不同而药性差别较大的中药,如“地黄”与“熟地黄”、“甘草”与“炙甘草”等。

1.3 数据挖掘分析 运用 R 4.2.0 软件^[13]对规范后的弱精子症中药处方数据库进行中药性味归经频次分析、组方关联规则分析、系统聚类分析,并对数据可视化。利用基础包(base)中的 sort、table 函数进行中药频数统计、排序,通过 fmsb 包绘制雷达图展示四性、五味、归经情况。通过 arules 包中的 apriori 函数进行组方关联规则分析,其中提升度>1 为有效的强关联规则。对关联规则按置信度降序排列,然后利用 plot 函数绘制气泡图。通过 SPSS 26.0^[14]对方中高频率中药进行系统聚类分析,并绘制树状图。

1.4 网络药理学研究 通过中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP 检索核心药物组合的化学成分。设置口服生物利用度 (OB)≥0.3 且类药性 (DL)≥0.18,对潜在活性成分进行筛选,汇总靶点后去重,通过 Uniprot 蛋白质数据库(<https://sparql.uniprot.org/>)对靶点名称进行规范。然后以“asthenozoospermia”“asthenospermia”、“low sperm motility”为关键词,分别在 GeneCards (<https://sparql.uniprot.org/>)、TTD (<https://sparql.uniprot.org/>)、OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)、DRUGBANK (<https://go.drugbank.com/>)等数据库中检索疾病相关靶点,合并后删除重复值得到疾病相关靶点数据。利用 eulerr 包对核

心药物组合成分靶点与疾病相关靶点取交集,然后将交集靶点提交至 STRING 11.5 数据库 (<http://string-db.org/>)中,进而构建 PPI 网络,并筛选出关键靶点。将交集靶点提交至 Metascape 平台 (<https://metascape.org/>),设定显著性 P 值<0.01,进行 GO 富集分析、KEGG 信号通路注释分析,分析靶点主要的生物学过程与代谢通路,然后采用 ggplot 2 包对富集分析结果进行可视化。利用上述数据构建“成分-交集靶点-信号通路”网络图,然后根据拓扑学参数值判断产生疗效的主要成分。

1.5 分子对接验证 从关键靶点中选取 degree 值排名前 5 的靶点,与“成分-交集靶点-信号通路”网络图中 degree 值最高的 5 个成分分别进行分子对接,以此来验证成分-靶点之间的结合可能性。在进行分子对接前,通过 PDB、PubChem 数据库分别下载关键靶点所对应的蛋白质 3D 结构图以及成分的 3D 化学结构图,导入 PyMOL 软件^[15]中,对蛋白质进行去除水分子、去除小分子配体、加氢等操作。将处理好的文件导入到 AutoDockTools 1.5.7^[15]中再次进行处理,设置好对接参数后运行 AutoDockVina,得到每种活性成分与受体蛋白之间的结合能。能量越低,二者发生交互作用的可能性越高,当结合能≤-5.0kcal/mol 时结合较好。最后通过 PyMOL 2.4.0 软件将最优对接复合物进行可视化展示。

2 结果

2.1 文献筛选以及建立中药处方数据库 初步检索出文献 5 946 篇,其中中文文献 5 784 篇,英文文献 162 篇。根据纳排标准进行筛查,最终纳入文献 103 篇,筛选出治疗弱精子症的中药复方或中成药 109 个,对中药名称规范化处理,构建弱精子症中药处方数据库,文献筛选以及数据库构建流程。见图 1。

2.2 中药四气、五味、归经频次分析 弱精子症中药处方数据库涉及中药 189 味,用药频次共计 1 269 次。高频中药(频次≥20 次)有 16 味,其中使用最多的是菟丝子 78 次、枸杞子 71 次、淫羊藿 54 次、熟地黄 53 次、五味子 41 次,中药频次分布与药物类别。见表 1。189 味中药的药性以温、寒为主;药味频次共 311 次,以甘味和苦味为主;经络频次共 478 次,以归肝经(111 次)、肾经(88 次)、脾经(63 次)、肺经(58 次)最为多见,具体。见图 2。

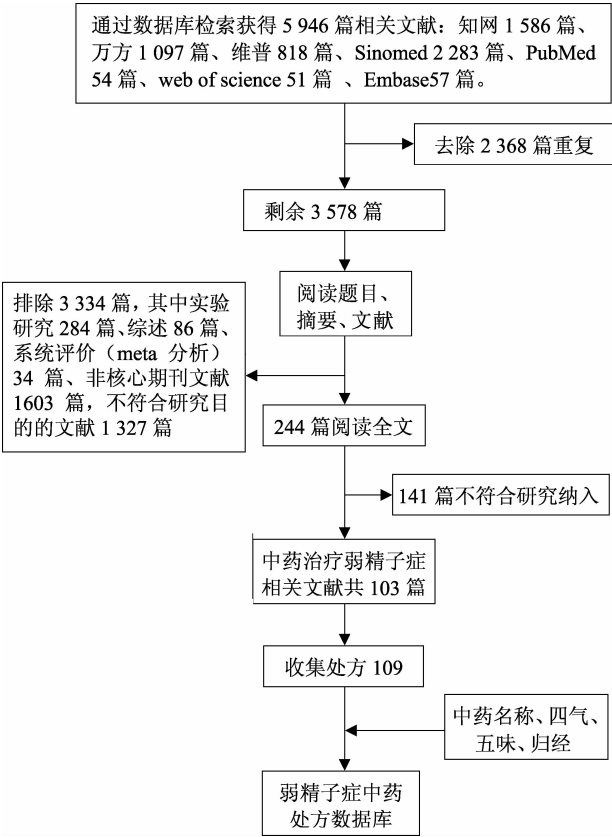


图 1 文献筛选以及数据库构建流程

表 1 高频中药频次分布与药物类别情况

中药	频次	药物类别	频率 A	频率 B
菟丝子	78	补阳药	41.27%	6.15%
枸杞子	71	补阴药	37.57%	5.59%
淫羊藿	54	补阳药	28.57%	4.26%
熟地黄	53	补阴药	28.04%	4.18%
五味子	41	收涩药	21.69%	3.23%
茯苓	40	利水消肿药	21.16%	3.15%
车前子	37	利尿通淋药	19.58%	2.92%
山茱萸	35	固精缩尿止带药	18.52%	2.76%
当归	34	补血药	17.99%	2.68%
覆盆子	34	固精缩尿止带药	17.99%	2.68%
山药	33	补气药	17.46%	2.60%
黄芪	32	补气药	16.93%	2.52%
白术	27	补气药	14.29%	2.13%
黄精	25	补阴药	13.23%	1.97%
肉苁蓉	23	补阳药	12.17%	1.81%
党参	22	补气药	11.64%	1.73%

注: 频率 A: 中药出现频次占处方数的百分比; 频率 B: 中药出现频次占总体用药频次的百分比

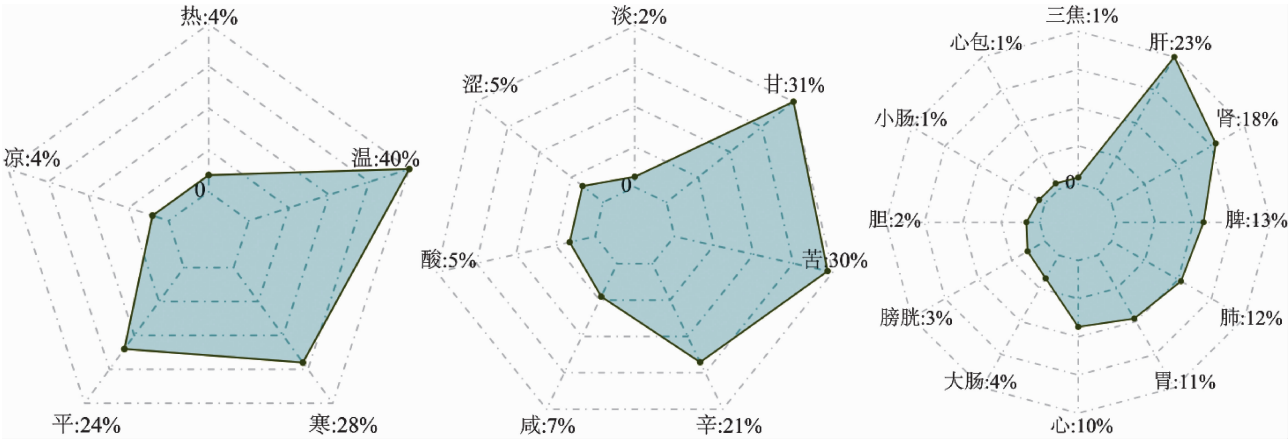


图 2 189 味中药四气、五味、归经情况

2.3 中药组方关联规则分析 利用 Apriori 函数对 109 个处方进行中药关联规则分析, 挖掘治疗弱精子症的高频药对或药物组合, 支持度最小值设置为 0.18, 置信度最小值设置为 0.8, 共得到关联规则 54 条, 均为有效的强关联规则 (提升度 > 1), 其中二项关联规则 10 条, 三项关联规则 22 条, 四项关联规则 17 条, 五项关联规则 5 条。对数据分析结果按置信度降序排列, 从二项至五项关联规则中分别选择排名前 3

的规则进行展示。见表 2。运用 R 语言 plot 函数对 54 条强关联规则进行可视化。气泡图中箭头由前项中药指向后项中药, 表示 2 味中药的关联性; 气泡的大小随着支持度的增加而增加, 颜色随着提升度的增加而变深。见图 3。

2.4 中药系统聚类分析 使用 SPSS 对频次 ≥ 14 的中药进行系统聚类分析, 聚类方法为组间联接, 度量区间采用 Pearson 相关性, 聚类数取 5, 得到 5 类药物

表 2 中药组方关联规则

关联规则	前项	后项	支持度	置信度	提升度
二项	覆盆子	枸杞子	0.30	0.97	1.49
	覆盆子	菟丝子	0.29	0.94	1.32
	山药	菟丝子	0.27	0.88	1.23
三项	覆盆子、五味子	菟丝子	0.24	1.00	1.40
	车前子、五味子	枸杞子	0.21	1.00	1.54
	枸杞子、山药	菟丝子	0.21	0.96	1.34
四项	覆盆子、枸杞子、五味子	菟丝子	0.23	1.00	1.40
	车前子、覆盆子、枸杞子	菟丝子	0.20	1.00	1.40
	车前子、覆盆子、菟丝子	枸杞子	0.20	1.00	1.54
五项	车前子、覆盆子、枸杞子、五味子	菟丝子	0.19	1.00	1.40
	车前子、覆盆子、菟丝子、五味子	枸杞子	0.19	1.00	1.54
	车前子、覆盆子、枸杞子、菟丝子	五味子	0.19	0.95	2.54

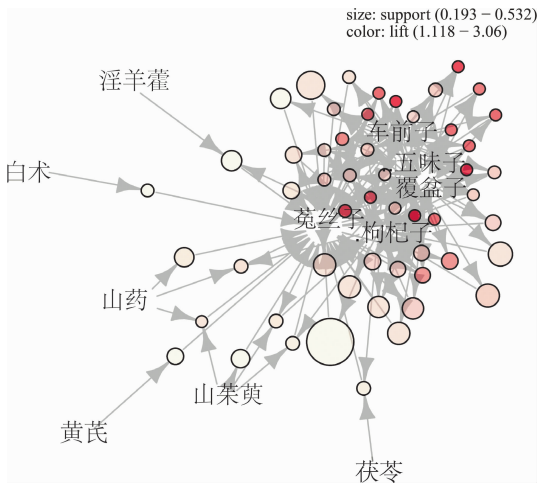


图 3 组方关联规则气泡图

组合。见图 4。第 1 类：黄芪、白术、党参；第 2 类：熟地黄、鹿角胶、山茱萸、山药、茯苓、杜仲、巴戟天、肉苁蓉；第 3 类：覆盆子、车前子、枸杞子、菟丝子、五味子；第 4 类：甘草、牛膝；第 5 类：当归、丹参、黄精、制何首乌、淫羊藿、沙苑子。通过系统聚类所得的 5 类药物组合总体以补益为主，兼顾活血养血、利湿泄浊等，反映弱精子症本虚标实，兼夹湿、瘀、毒、虫的基本病机。

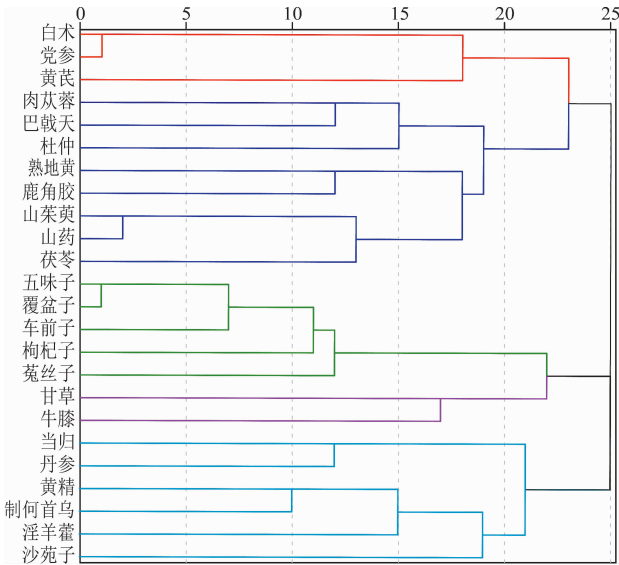


图 4 频次≥14 的中药系统聚类树状图

2.5 网络药理学研究

2.5.1 核心药物组合成分及弱精子症相关靶点筛选

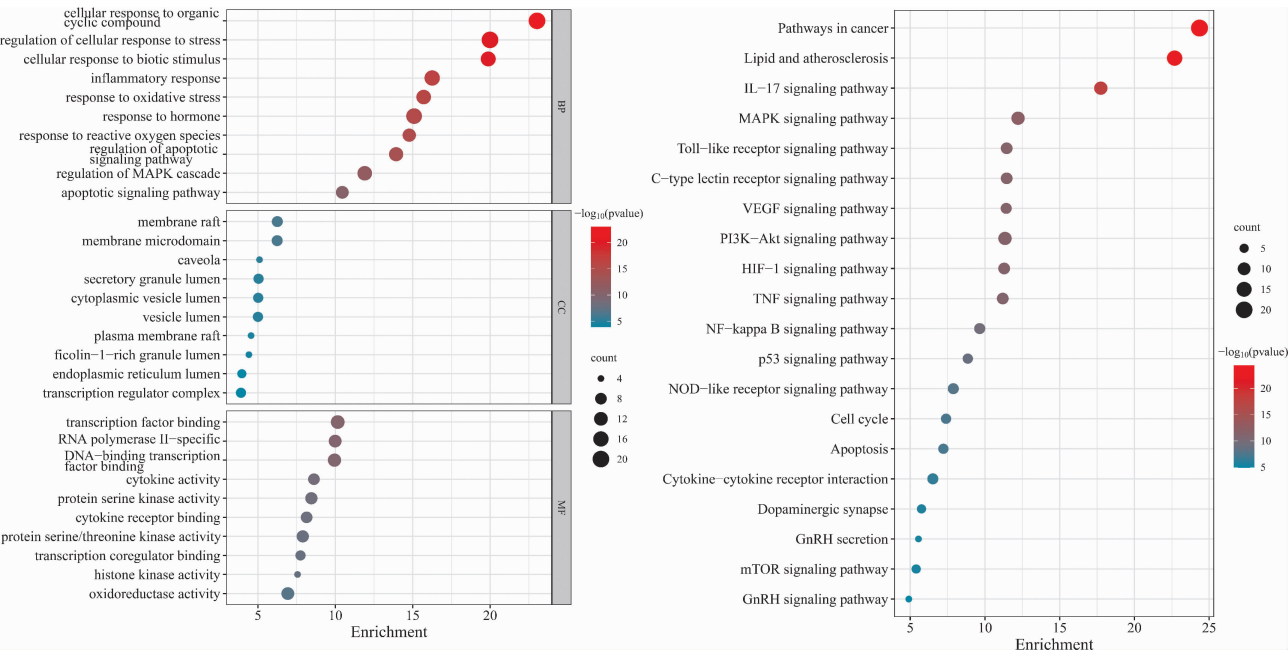
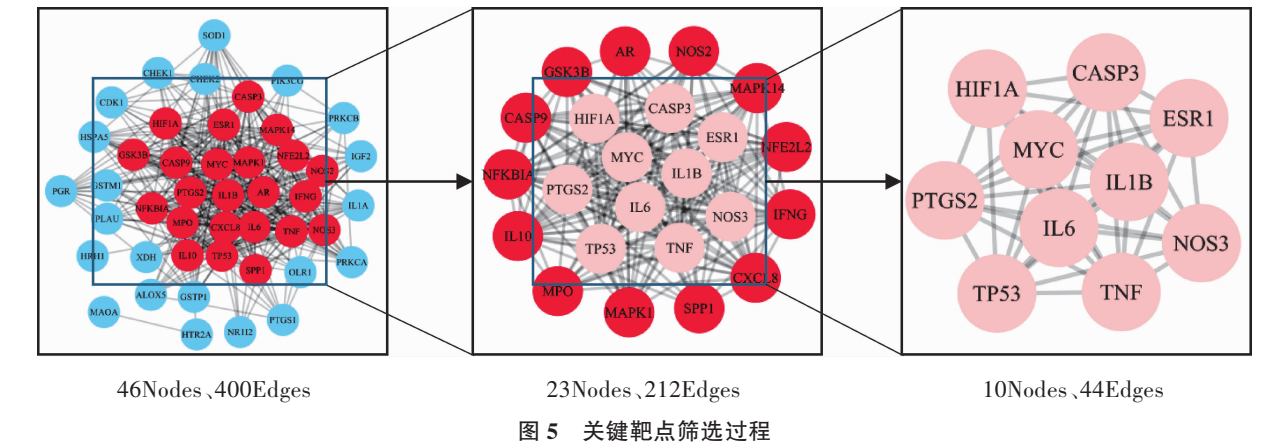
结合中药四气、五味、归经频次分析，组方关联规则分析以及系统聚类分析结果，确定“覆盆子-车前子-枸杞子-菟丝子-五味子”（即五子衍宗丸）为核心药物组合。通过 TCMSP 平台 (<https://tcmsp.w.com/tcmssp.php>) 对上述 5 味中药进行初步筛选，获得潜在活性成分 80 种，获得 231 个作用靶点。合并 GeneCards (<https://sparql.uniprot.org/>)、TTD (<https://sparql.uniprot.org/>)、OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)、DRUGBANK (<https://go.drugbank.com/>) 等数据库得到疾病相关靶点 694 个，中药活性成分与疾病相关靶点两者取交集后得到交集靶点 46 个。

2.5.2 筛选关键靶点

将交集靶点提交至 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 中，构建出核心药物组合治疗弱精子症的 PPI 网络。根据连接度 (degree)、紧密度 (CC)、介度 (BC) 3 个网络拓扑学参数值对交集靶点进行筛选，得到核心药物组合治疗弱精子症的关键靶点，分别为：HIF1A、CASP3、PTGS2、MYC、ESR1、TP53、IL6、IL1B、TNF、NOS3，筛选过程。见图 5。

2.5.3 交集靶点功能与通路的富集分析

本次研究共富集到 GO 基因功能注释 974 条，KEGG 信号通路注释分析 157 条。按照 P 值显著性大小排列 GO、KEGG 条目，选取 BP、CC、MF 的前 10 条和 20 条 KEGG 通路进行可视化展示。见图 6。核心药物组合治疗弱精子症主要涉及的生物学过程包括氧化应激



反应、炎症反应、凋亡信号通路的调控等。主要参与
的信号通路包括 TNF、MAPK、HIF-1、促性腺激素分
泌、mTOR、细胞凋亡、PI3K-Akt、NF- κ B、IL-17 信号
通路等。

2.5.4 筛选主要成分 筛选交集靶点对应的相关中
药成分及信号通路，构建成分-交集靶点-信号通路
网络图，该网络由 108 个节点以及 416 条边组成。见
图 7。其中槲皮素 degree 值为 148，预测槲皮素为核
心药物组合治疗弱精子症的主要成分，其次为山柰
酚、 β -谷甾醇、异鼠李素、鞣花酸。

2.5.5 分子对接验证 结果显示，关键靶点与主要成
分均能够较好结合(结合能 ≤ -5.0 kcal/mol)，在一定
程度上验证了成分-靶点之间的结合活性。见表 3。其中
 β -谷甾醇与 CASP3 靶点结合能最低，为-9.7 kcal/mol。

表 3 主要成分与关键靶点分子对接结果

主要成分	关键靶点(kcal/mol)				
	TP53	TNF	IL1B	CASP3	HIF1A
槲皮素	-6.5	-9.1	-7.6	-8.2	-5.9
山柰酚	-6.2	-8.9	-7.5	-8.1	-5.8
β -谷甾醇	-6.5	-6.3	-6.9	-9.7	-5.9
异鼠李素	-6.7	-9.0	-6.7	-8.0	-5.7
鞣花酸	-6.8	-9.1	-6.7	-7.6	-5.9

3 讨论

根据弱精子症的临床特征，中医学多将其归属于
“精冷”“无子”等范畴。尽管中医学对弱精子症的认识
历史悠久，也积累了丰富的临床诊疗经验，但对弱精
子症的病因病机认识及组方用药方面仍带有鲜明的

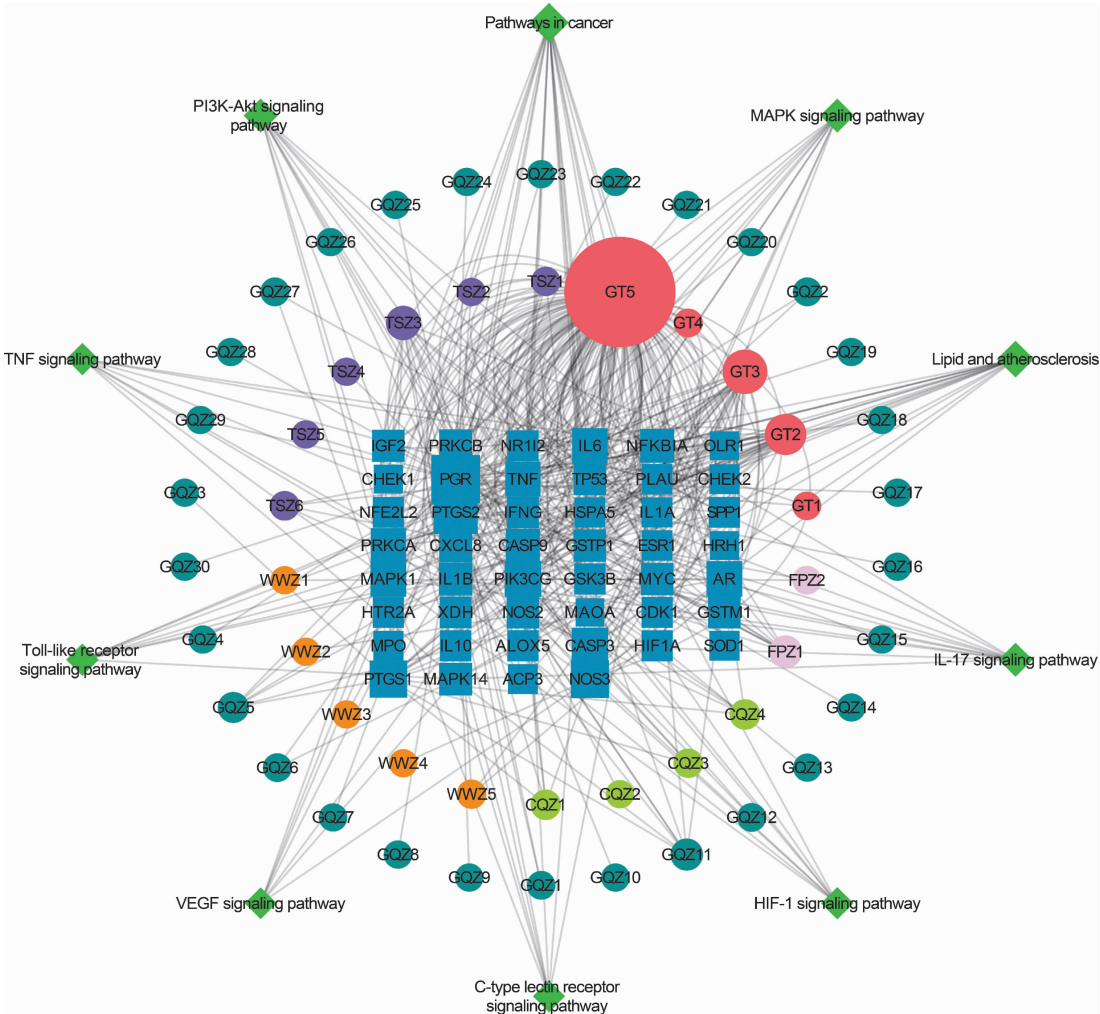


图 7 成分-交集靶点-信号通路网络图

个人色彩。如李海松^[16]认为弱精子症的中医病机主要为脾肾两虚,其病位在附睾,当从脾肾论治;其认为“痰”的形成对精液的液化与精子活力有重要的影响,痰湿阻滞精室,或肾阳不足,精寒不化,导致精子活力降低,因此在治疗中注重运用半夏、陈皮等化痰药,始终把化痰祛瘀贯穿在弱精子症治疗过程中。郭军^[17-18]基于“阳化气,阴成形”理论认为该病多是“阳化气”不足,精子失去阳气的温煦、推动导致活力低下,或痰湿内生,导致精子活动环境不佳,运动障碍,治疗上多采用温阳、益气之品。秦国政^[19]认为脾肾不足是弱精子症发病基础,瘀滞不畅是发病趋势,“脾虚”“肾虚”“血瘀”构成了弱精子症发病的 3 大关键环节。

核心期刊是公认的学术水平较高的刊物,是我国学术评价体系的重要组成部分;SCI 论文是科学引文索引所收录的 SCI 期刊上刊登的学术论文。因此二者更具参考意义^[20]。本研究严格根据纳排标准进行筛

查,最终纳入文献 103 篇,筛选出治疗弱精子症的中药复方或中成药 109 个,涉及中药 189 味。性味归经统计结果显示,治疗弱精子症的中药以性温、味甘苦为主,归经以归肝、肾、脾经多见,频次 ≥ 20 次的高频中药有 16 味,绝大部分为补益类药物,少部分为利湿类药物,用药多以补肾益精、健脾益气为主,辅以活血化瘀、利湿泄浊等,注重调畅气机。通过关联规则分析挖掘治疗弱精子症的高频药对或药物组合,发现置信度排名靠前的关联规则所包含的中药基本为五子衍宗丸的组成药物,而且关联规则气泡图也显示五子衍宗丸为网络的核心,这在中药系统聚类分析也得到了验证。核心药物组合(即五子衍宗丸)被誉为“古今种子第一方”,方中菟丝子辛甘,味平,温肾壮阳;枸杞子补肝肾之阴,使精血化生有源;覆盆子甘酸、微温,固精益肾;五味子酸甘、温,补中寓涩,敛肺补肾;车前子甘、寒,泄而通之,使得全方补而不滞,另能泻肾中之

虚火,制约方内其他药物的温性。诸药合用,共奏补肾益精之功。这与弱精子症本虚标实,兼夹湿、瘀、毒、虫的基本病机相契合。

在本文当中网络药理学研究显示,核心药物组合治疗弱精子症的关键靶点分别为 HIF1A、CASP3、PTGS2、MYC、ESR1、TP53、IL6、IL1B、TNF、NOS3。其中 TP53 为细胞肿瘤抗原 p53,是调控细胞周期的重要转录因子,主要功能除调节细胞周期外,还能激活线粒体凋亡途径,引起 Caspase 级联反应,从而促进细胞凋亡^[21]。TNF 包括 TNF- α 和 TNF- β 两类细胞因子,是炎症反应的始动因素,可加速并放大炎症反应^[22]。CASP3 为半胱天冬酶原 3,是细胞凋亡的主要执行者,活化后可特异地裂解 1 系列底物导致 DNA 崩解^[23-24]。HIF1A 为缺氧诱导因子 1A,在缺氧环境下稳定表达,主要与缺氧适应、炎症发展、细胞存活及凋亡密切相关。研究表明^[25-26],五子衍宗丸能显著降低自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤和凋亡,其机制与调节 p53 信号通路相关。其能够调控 TNF- α 、IL-3 等基因的表达,显著影响睾丸内生精细胞的免疫功能。柯明辉等^[27]研究表明,五子衍宗丸能显著降低 Caspase-3 的表达,抑制细胞凋亡,改善弱精子症。

成分-交集靶点-信号通路网络图拓扑分析显示,槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、异鼠李素、鞣花酸等成分 degree 值较高,可能为核心药物组合治疗弱精子症的主要物质基础。药理学研究发现,槲皮素可直接清除细胞内的氧自由基,抑制氧化应激通路的信号转导以及炎症通路的激活,降低白细胞活化来发挥抗氧化应激、抗炎作用^[28]。山柰酚通过激活核因子 Nrf2 发挥抗氧化应激作用^[29];也能抑制 TLR4 炎性通路从而发挥抗炎作用^[30];此外,山柰酚能上调 Bcl-2 基因的表达,抑制 Caspase-3/9 的活性,从而发挥抗细胞凋亡作用^[31]。 β -谷甾醇^[32-33]具有抗氧化作用,减轻脂质过氧化物的发生,还能抑制炎性细胞因子表达,发挥抗炎作用。异鼠李素能抑制血管内皮细胞增殖,通过激活 PI3K/AKT 信号通路,使得抗氧化酶系表达增加,发挥抗氧化应激的作用^[34];异鼠李素还能作用于细胞的线粒体凋亡通路,抑制细胞自噬的发生^[35]。鞣花酸能快速清除氧自由基,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,减少炎症因子的分泌与释放,发挥抗氧化应激、抗炎作用^[36];有学者研究发现,鞣花酸能明显降低 Cas-

pase-3、细胞色素 C、Bcl-x 的表达,从而抑制 Caspase-3 诱导的缺血区细胞凋亡^[37]。本次研究分子对接证实,槲皮素、山柰酚、异鼠李素等主要成分与 TP53、TNF、IL1B、CASP3、HIF1A 等关键靶点结合活性较好,其中 β -谷甾醇与 CASP3 的苏氨酸残基形成了 1 个氢键。

GO、KEGG 富集分析结果提示,核心药物组合治疗弱精子症可能通过作用于 TP53、TNF、IL1B、CASP3、HIF1A 等关键靶点,影响 TNF、MAPK、IL17、HIF-1、mTOR、PI3K-Akt、NF- κ B、GnRH、p53、VEGF 等信号通路,从而调控细胞对压力的反应、炎症反应、对激素的反应、凋亡信号通路的调控、MAPK 级联反应的调控等生物学过程,进而通过抑制炎症反应、抗氧化应激、调控细胞凋亡、调控生殖内分泌激素的分泌等作用,最终影响精子的生成与活力。研究表明^[38-41],五子衍宗丸能显著影响少精症小鼠睾丸组织的基因表达,调节生精细胞的减数分裂、睾丸同源重组等生物过程,其通过提高睾丸支持细胞的自噬水平,抑制少弱精症模型中过高的 ROS 水平,继而改善炎症状态,抑制细胞凋亡,同时促进睾酮生成,最终缓解氧化应激导致的精子质量下降和精子发生不足。高瑞芳等^[42]研究发现五子衍宗丸能促进六磷酸肌醇激酶 1(IP6K1)表达,抑制 DNA 甲基转移酶 1/线粒体 DNA D-loop 甲基化,进而促进线粒体编码基因的表达,改善睾丸组织病理学损伤和生精细胞的凋亡。毛静等^[43]认为五子衍宗丸可能通过下调 IL-17 通路减少细胞凋亡发挥治疗作用。此外,有学者^[44]发现五子衍宗丸能干预精子线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放,减少线粒体功能障碍引起的精子凋亡,从而提高精子活力和质量。以上研究证实了部分 GO、KEGG 富集分析结果,但由于中药复方的多成分、多靶点、多通路的特点,五子衍宗丸如何调控这些通路网络还需要实验研究进一步验证。

综上所述,本研究基于数据挖掘技术深入分析、挖掘了中药治疗弱精子症的组方用药规律,用药总体以补益为主,兼顾活血养血、利湿泄浊等,反映出弱精子症本虚标实,兼夹湿、瘀、毒、虫的基本病机,与现代医家对弱精子症的总体认识基本相符;筛选得到了中药治疗弱精子症的核心药物组合,即“覆盆子-车前子-枸杞子-菟丝子-五味子”。采用网络药理学方法

对核心药物组合治疗弱精子症的潜在活性成分、作用靶点、机制通路等进行了预测分析,涉及 TNF、MAPK、IL17、HIF-1、mTOR、PI3K-Akt、NF- κ B、p53 等多条信号通路,包含细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、细胞分化、促性腺激素分泌、细胞周期、血管生成等。通过分子对接技术对主要成分与关键靶点之间的结合活性进行了验证,为后续中医药干预弱精子症的临床与实验研究提供了思路 and 参考。

参考文献:

- [1] 王均旭,胡志伟,张宏,等. 基于网络药理学的右归胶囊治疗弱精症的作用机制研究[J]. 中国性科学,2023,32(1): 121-124.
- [2] 陈国超,孙成亮,陈健. 右归丸联合左卡尼汀治疗肾阳虚弱精症患者的临床研究[J]. 时珍国医国药,2022,33(10): 2453-2454.
- [3] BARRATT C,BJORND AHL L,De JONGE C J,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.
- [4] THURSTON L,ABBARA A,DHILLO W S. Investigation and management of subfertility[J]. J Clin Pathol, 2019, 72(9):579-587.
- [5] LIU L,LI T,LI F M Z,et al. The influence of l-carnitine on the expression of miRNAs in asthenospermia spermatozoa and the network regulation of the associated molecules[J]. Andrologia,2020,52(1):e13478.
- [6] 丁旭锋,史卿菁,孙大林. 中西医结合治疗弱精子症的疗效评价[J]. 中国处方药,2019,17(4):66-67.
- [7] 孙智,张彬彬,刘铁军,等. 益肾活血方对肾阳虚型弱精子症临床疗效研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2022,24(7): 96-99.
- [8] 萧冈,王威,魏巍,等. 疏肝补肾毓麟汤调节 VDAC2 基因甲基化影响弱精症大鼠精子线粒体功能改善精子质量[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(23):72-79.
- [9] 尤传静,田红飞,丁旭锋,等. 清浊汤对湿热瘀阻型慢性前列腺炎合并弱精症的精子质量影响及作用机制探微[J]. 中国性科学,2021,30(7):99-102.
- [10] 耿强,陈少峰,李重,等. 基于 Keap1-Nrf2-ARE 通路探讨加味天雄散调节弱精症大鼠精子活力的作用机制[J]. 中国中西医结合杂志,2021,41(1):86-90.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:854-1059.
- [12] 南京中医药大学. 中药大辞典(第2版)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:673-896.
- [13] IHAKA R,GENTLEMAN R. R:A Language for Data Analysis and Graphics[J]. Journal of Computational and Graphical Statistics,1996,5(3):299-314.
- [14] HILBE,J. A Review of Current SPSS Products:SPSS 12, SigmaPlot 8. 02,SigmaStat 3. 0,Part 1[J]. The American Statistician,2003,57(4):310-315.
- [15] Morris,G,Goodsell,D,Halliday,R,et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function [J]. COMPUT CHEM,1998, 19(14):1639-1662.
- [16] 王继升,耿金海,王彬,等. 李海松教授治疗少弱畸精子症临床经验[J]. 世界中西医结合杂志,2018,13(1):22-25.
- [17] 付海强,赵丰,郭俊,等. 郭军教授运用“阳化气,阴成形”理论辨治特发性少弱精子症经验[J]. 环球中医药,2021, 14(7):1280-1282.
- [18] 晏斌,高庆和,张修举,等. 郭军从痰湿论治特发性弱精子症经验[J]. 北京中医药,2019,38(6):561-563.
- [19] 秦国政,李曰庆,裴晓华,等.《基于脾胃两虚夹瘀论治无症状性弱精子不育症》专家共识[J]. 中华中医药杂志, 2016,31(6):2235-2238.
- [20] 魏佳明,刘承鑫,李雅,等. 基于数据挖掘与网络药理学的慢性心力衰竭中医证型、用药规律及相关药理分析[J]. 天然产物研究与开发,2023,35(1):1139-150.
- [21] CHEN X,SHAO B,YU C,et al. The cyclopeptide α-amatotoxin induced hepatic injury via the mitochondrial apoptotic pathway associated with oxidative stress [J]. Peptides,2020,45(3):129-130.
- [22] AMARAL F A,BASTOS L F,OLIVEIRA T H,et al. Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout [J]. Eur J Immunol,2016,46(1):204-211.
- [23] 张子昂,董倩,官瑞丽,等. 盐酸小檗碱通过抑制 TNF- α /Caspase-8/Caspase-3 信号通路减轻急性低氧暴露引起的肝损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2022,38(1):48-53.
- [24] 黄健清,梁红玲,张绪超,等. CASP3 与 Cleaved-CASP3 在肺癌中的表达及意义[J]. 实用医学杂志,2012,28(8): 1247-1250.

- [25] 韦燕飞,吕贝贝,金丽杰,等. 缺氧条件下白花丹醌对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡与侵袭及 HIF-1 α 表达的影响[J]. 中国现代应用药学,2022,39(14):1789-1795.
- [26] 马娜,赵海霞,陈茜,等. 五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤和凋亡的保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(8):1675-1681.
- [27] 柯明辉,陆兴,刘保兴,等. 基于 Caspase-3 研究五子衍宗丸治疗少精子症的疗效及机制[J]. 中国男科学杂志,2018,32(5):29-34.
- [28] WU Z Y,ZHANG H,LI F,et al. Evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids by an online capillary electrophoresis-based immobilized enzyme microreactor[J]. Electrophoresis,2020,41(15):1326-1332.
- [29] YUAN Y,ZHAI Y,CHEN J,et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis[J]. Biomolecules,2021,11(7):34-40.
- [30] SILVA D S J,GONÇALVES C J,DE OLIVEIRA C P,et al. The pharmacological action of kaempferol in central nervous system diseases: a review[J]. Front Pharmacol,2020,11(6):1372-1380.
- [31] 朱文瑛,唐跃,张琳,等. 山奈酚对高糖诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用及其机制[J]. 广东医学,2018,39(S2):10-13.
- [32] GUPTA S,VED A. Operculina turpethum (Linn.) Silva manso as a medicinal plant species: a review on bioactive components and pharmacological properties[J]. Pharmacogn Rev,2017,11(22):158-166.
- [33] YIN Y, LIU X, LIU J, et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/ d-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice[J]. Bioorg Med Chem Lett,2018,28(9):1525-1533.
- [34] SHI H,HE J,LI X,et al. Isorhamnetin,the active constituent of a Chinese herb Hippophae rhamnoides L,is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking[J]. Int Immunopharmacol,2018,55(3):216-222.
- [35] 巩亮,胡威,王晓春,等. 异鼠李素对多柔比星诱导的心肌细胞自噬和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(4):385-388.
- [36] 何宇鸿,梁敏桐,刘璐群,等. 鞣花酸药理作用综述[J]. 化学工程与装备,2022(3):216-217.
- [37] 翟锴华,娄季宇. 基于 PI3K/Akt/NOS 通路探讨鞣花酸在脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用[J]. 中国实用神经疾病杂志,2020,23(13):1105-1109.
- [38] 马娜,赵海霞,陈茜,等. 五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤和凋亡的保护作用研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(8):1675-1681.
- [39] 柯明辉,陆兴,刘保兴,等. 基于 Caspase-3 研究五子衍宗丸治疗少精子症的疗效及机制[J]. 中国男科学杂志,2018,32(5):29-34.
- [40] 王宁,张树成,陈西华,等. 五子衍宗丸对无精症小鼠的免疫促进作用基因表达谱分析[J]. 上海中医药大学学报,2013,27(4):63-67.
- [41] 孟雪丹,赵崇军,赵霞,等. 五子衍宗丸对少精症小鼠睾丸基因表达谱的影响[J]. 环球中医药,2020,13(10):1653-1660.
- [42] 高瑞芳,孙丽丽,张桂贤,等. 五子衍宗丸对少弱精子症小鼠生精功能、IP6K1 表达及线粒体 DNA 甲基化影响[J]. 现代药物与临床,2024,39(8):1944-1953.
- [43] 毛静,张立新,王文凯,等. 五子衍宗丸通过下调 IL-17 通路减少细胞凋亡治疗少弱精子症[J]. 药物评价研究,2024,47(7):1540-1555.
- [44] 刘红娟,吴德玲,童小慧,等. 五子衍宗丸干预线粒体通透性转换孔抑制精子凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(21):34-39.

(收稿日期:2024-07-01)