

基于网络药理学及肝肾同源理论探讨肉苁蓉-巴戟天干预迟发性性腺功能减退症作用机制

任慧杰¹, 安立文^{1,2}, 郭玉岩¹, 李洪涛², 陈昕昕², 高山^{1,2*}

¹黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨

²黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2022年7月11日; 录用日期: 2022年8月8日; 发布日期: 2022年8月15日

摘要

目的: 运用肝肾同源理论及网络药理学研究肉苁蓉-巴戟天干预迟发性性腺功能减退症可能存在的作用机制。方法: 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)对肉苁蓉-巴戟天药对中活性成分靶点进行筛选, 通过GeneCards、OMIM数据库检索迟发性性腺功能减退症靶点, 取得交集基因后使用Cytoscape3.9.0建立化合物-疾病-靶点调控网络, 基于生物学信息注释数据库(DAVID)对核心靶点数据信息进行下载, 并用R软件绘制气泡图取得(GO)功能富集分析与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果: 得到肉苁蓉-巴戟天药对的22个活性成分和271个潜在靶点, 相关的疾病靶点2462个。GO富集分析主要包括正向调节凋亡过程、细胞因子介导的信号通路、药物反应、线粒体、蛋白质结合、酶结合等功能途径。KEGG通路分析主要包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、糖尿病并发症中的RAGE信号通路等。结论: 基于网络药理学及肝肾同源理论初步揭示出肉苁蓉-巴戟天药对干预LOH具有活性成分及作用靶点多样、作用途径广泛的特点, 其作用机制可能与有效成分槲皮素、β谷甾醇, 核心靶点及相关通路对睾丸间质细胞及支持细胞的调节, 影响睾酮分泌有关。

关键词

网络药理学, 肝肾同源, 迟发性性腺功能减退症, 肉苁蓉, 巴戟天

Study on the Mechanism of Cistanches Herba and Morindae Officinalis Radix Intervening Late-Onset Hypogonadism Based on Network Pharmacology and the Theory of "Homogeny of Liver and Kidney"

*通讯作者。

文章引用: 任慧杰, 安立文, 郭玉岩, 李洪涛, 陈昕昕, 高山. 基于网络药理学及肝肾同源理论探讨肉苁蓉-巴戟天干预迟发性性腺功能减退症作用机制[J]. 临床医学进展, 2022, 12(8): 7449-7461.

DOI: 10.12677/acm.2022.1281076

Huijie Ren¹, Liwen An^{1,2}, Yuyan Guo¹, Hongtao Li², Xinxin Chen², Shan Gao^{1,2*}

¹Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang

²The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang

Received: Jul. 11th, 2022; accepted: Aug. 8th, 2022; published: Aug. 15th, 2022

Abstract

Objective: Study the possible mechanism of *Cistanches Herba* and *Morindae Officinalis Radix* intervening late-onset hypogonadism (LOH) by using the theory of “homogeny of liver and kidney” and network pharmacology. **Methods:** The active component targets of *Cistanches Herba* and *Morindae Officinalis Radix* were screened through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). The targets of late-onset hypogonadism were searched through Gene Cards and OMIM databases. After obtaining the intersection genes, the compound-disease-target regulation network was established by using Cytoscape 3.9.0, and the core target data information was downloaded based on the database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID). The bubble diagram was drawn with R software to obtain (GO) functional enrichment analysis and genomic encyclopedia (KEGG) pathway enrichment analysis. **Results:** 22 active components and 271 potential targets of *Cistanches Herba*-*Morindae Officinalis Radix* were obtained, and 2462 related disease targets were obtained. GO enrichment analysis mainly includes functional pathways such as positive regulation of protein phosphorylation, cytokine-mediated signaling pathway, angiogenesis, mitochondrion, zinc ion binding, transcription factor binding and so on. KEGG pathway analysis mainly includes MAPK signaling pathway, TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, and RAGE signaling pathway in diabetic complications. **Conclusion:** Based on the network pharmacology and the theory of “homogeny of liver and kidney”, it is preliminarily revealed that *Cistanches Herba* and *Morindae Officinalis Radix* have the characteristics of diverse active components, action targets and wide action pathways in the intervention of LOH, and its action mechanism may be related to the effective components quercetin, β Sitosterol, core targets and related pathways regulating Leydig cells and Sertoli cells, affecting testosterone secretion.

Keywords

Network Pharmacology, Homogeny of Liver and Kidney, Late-Onset Hypogonadism, *Cistanches Herba*, *Morindae Officinalis Radix*

Copyright © 2022 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

迟发性性腺功能减退症(late-onset hypogonadism, LOH)是雄性激素缺乏导致的一系列临床综合征[1][2], LOH 是指老年健康男性相对于健康年轻男性而言, 血睾酮随年龄增长逐渐低于正常参考值[3], 且伴随易疲劳乏力、心血管舒缩、精神心理及性功能障碍等睾酮不足的临床表现, 并逐渐导致生活质量下降和多器官的损害[4]。LOH 和血清睾酮水平低下患者在我国 40 岁以上占 9.1%, 而在欧洲占 2%~15% [5] [6]。

LOH 发病机制并不确切，核心机制是睾酮水平低下[7]，而非唯一原因；我们要不断发掘并完善 LOH 相关机制，争取在临床取得满意的效果。

肝藏血，肾藏精，精聚为髓，髓化生为血，精血同源与肝肾，故肝肾同源；中医学肝肾同源和现代医学研究肝肾疾病与“神经-内分泌-免疫系统”及生殖轴基本相似[8]。

据报道中药补阳药有类雄性激素样作用，“肉苁蓉-巴戟天”相须为用能提高补阳药疗效[9]，临床用于补肾阳、益精血、起阳痿、暖腰膝等。肉苁蓉归肾、大肠经，临床用于补肾阳、益精血、起阳痿等。巴戟天归肾、肝经，临床用于肾阳、筋骨痿软等证[10]。单一的一药一靶点一疾病的研发模式被网络药理学所改变，开启了多靶点、多种疾病间复杂网状关系的新研究模式，与中医的整体观念相吻合[11]。本研究基于网络药理学探讨肉苁蓉-巴戟天药对干预 LOH 的作用机制，意在从分子学角度揭示肉苁蓉-巴戟天干预 LOH 的作用机制，为中医药干预 LOH 提供研究方向以及科学依据。

2. 材料与方法

2.1.1. “肉苁蓉-巴戟天”活性成分及作用靶点筛选与预测

通过 TCMSP (<http://tcmssp.com/tcmssp.php.2.3>)分别以“肉苁蓉巴戟天”为关键词检索其化学成分，类药性(DL)是测定药物研发过程中，化合物是否符合成药标准的依据，口服药物主要通过小肠上皮细胞吸收，而小肠上皮细胞的通透性在口服生物利用度(OB)中至关重要，从文献[12]阅读相关文献以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ ，类药性(DL) ≥ 0.18 ，渗透性(Caco-2) ≥ -0.4 [13]作为筛选活性成分的标准条件，并去除有效成分中无明确作用的靶点。从 TCMSP 数据库中检索收集候选的活性成分所对应靶点，与利用 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)数据库所筛选靶蛋白名称进行基因配对。

2.1.2. 迟发性性腺功能减退潜在靶点的筛选

以“Late-onset hypogonadism”为关键词，分别在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>, 4.12)、OMIM (<https://omim.org/>)数据库中检索迟发性性腺功能减退症潜在靶点并下载相关数据信息，两组基因取交集并去除重复值。

2.1.3. 核心靶点筛选及 PPI 网络构建

将“肉苁蓉-巴戟天”药对与迟发性性腺功能减退症的交集靶点，导入 STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>, 11.2)选择“multiple proteins”，种属设定为“homo sapiens”，进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析，结合文献，试验将置信度评分设置为 > 0.9 “high confidence”(0.900)“hidden is connected nodes in the network”并剔除蛋白相互作用网络图(PPI网络)中无关联节点其余参数默认，构建交集靶点相互作用网络拓扑。建立调控网络以便于“肉苁蓉-巴戟天”对迟发性性腺功能减退症的作用机制可视化呈现。

2.1.4. GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析

将肉苁蓉-巴戟天干预迟发性性腺功能减退症交集靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, 6.8)，选择智人“Homo sapiens”和函数注释图表“Functional Annotation Chart”数据库下载相关信息，通过 UltraEdit 导入题录更改储存位置，导入 R (R version 4.1.0)语言运行即可得到气泡图。

3. 结果

3.1. “肉苁蓉-巴戟天”活性成分及作用靶点筛选与预测

获取各活性成分的对应该靶点并在中药相关靶点不足时，利用 BATMAN 数据库、TCMIP 数据库对药物成分及靶点进行补充。对所获得的化学成分、靶点、和对应的中药名进行统计，结果见表 1。在 TCMSP

检索得出肉苁蓉-巴戟天活性成分 24 个, 排除未获得对应靶点的 2 个有效成分, 最终获得活性成分 22 个; 有效成分所对应的靶点 271 个, 其中肉苁蓉 175 个, 巴戟天 96 个。

Table 1. Basic information of active ingredients of *Cistanches Herba - Morindae Officinalis Radix*

表 1. 肉苁蓉 - 巴戟天活性成分基本信息

MOLID	化合物	OB (%)	Caco-2	DL	药物
MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	1.32	0.75	肉苁蓉
MOL005320	Arachidonate	45.57	1.27	0.2	肉苁蓉
MOL005384	suchilactone	57.52	0.82	0.56	肉苁蓉
MOL007563	Yangambin	57.53	0.67	0.81	肉苁蓉
MOL000098	Quercetin	46.43	0.05	0.28	肉苁蓉
MOL008871	Marckine	37.05	0.86	0.69	肉苁蓉
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	1.32	0.75	巴戟天
MOL000359	Sitosterol	36.91	1.32	0.75	巴戟天
MOL001506	Supraene	33.55	2.08	0.42	巴戟天
MOL002879	Diop	43.59	0.79	0.39	巴戟天
MOL002883	Ethylolate(NF)	32.4	1.4	0.19	巴戟天
MOL006147	Alizarin-2-methylether	32.81	0.62	0.21	巴戟天
MOL009495	2-hydroxy-1,5-dimethoxy-6-(methoxymethyl)-9,10-anthraquinone	95.85	0.54	0.37	巴戟天
MOL009496	1,5,7-trihydroxy-6-methoxy-2-methoxymethylanthracenequinone	80.42	0.27	0.38	巴戟天
MOL009500	1,6-dihydroxy-5-methoxy-2-(methoxymethyl)-9,10-anthraquinone	104.54	0.37	0.34	巴戟天
MOL009503	1-hydroxy-3-methoxy-9,10-anthraquinone	104.33	0.59	0.21	巴戟天
MOL009504	1-hydroxy-6-hydroxymethylanthracenequinone	81.77	-0.04	0.21	巴戟天
MOL009513	2-hydroxy-1,8-dimethoxy-7-methoxymethylanthracenequinone	112.3	0.46	0.37	巴戟天
MOL009519	(2R,3S)-(+)-3',5-Dihydroxy-4,7-dimethoxydihydroflavonol	77.24	0.13	0.33	巴戟天
MOL009524	3beta,20(R),5-alkenyl-stigmastol	36.91	1.36	0.75	巴戟天
MOL009525	3beta-24S(R)-butyl-5-alkenyl-cholestol	35.35	1.36	0.82	巴戟天
MOL009537	AmericaninA	46.71	-0.08	0.35	巴戟天
MOL009551	Isoprincepin	49.12	-0.08	0.77	巴戟天
MOL009562	OhioensinA	38.13	0.6	0.76	巴戟天

3.2. 迟发性性腺减退症疾病靶点筛选

在 OMIM、GeneCards 数据库中获得相关疾病靶点分别为 647、1817 个; 剔除重复基因后获得与迟发性性腺功能减退症相关的 2462 个靶点。利用 Venny2.1.0 在线平台将肉苁蓉、巴戟天有效靶点与迟发性性腺功能减退症相关的疾病靶点进行映射建立 Venn 图, 筛选交集靶点“肉苁蓉 - 巴戟天”迟发性性腺功能减退症的潜在靶点。获取交集靶点将肉苁蓉-巴戟天的 271 个作用靶点与 LOH 的 2462 个作用靶点进行匹配取交集, 经 Uniprot 校对后得到 74 个共有基因, 其中肉苁蓉和迟发性性腺功能减退的潜在基因有 71 个, 巴戟天和迟发性性腺功能减退的潜在基因有 14 个, “肉苁蓉 - 巴戟天”迟发性性腺功能减退症的潜在作用基因有 74 个, 见图 1。

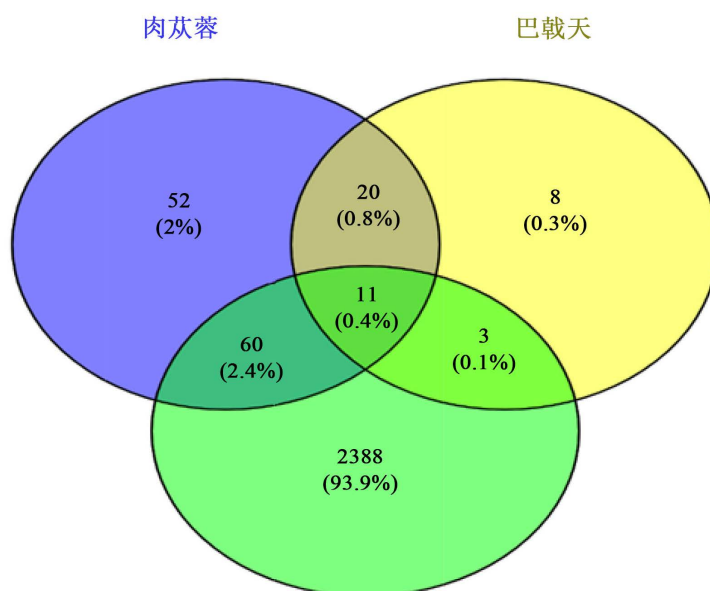


Figure 1. Intersection gene of *Cistanches Herba - Morindae Officinalis Radix* and LOH

图 1. 肉苁蓉 - 巴戟天与 LOH 的交集基因

3.3. 肉苁蓉 - 巴戟天药对干预迟发性性腺减退症核心靶点筛选以及网络互作关系构建

在 Cytoscape3.9.0 软件安装的 CytoHubba 插件, 计算各网络节点的拓扑性质参数(介数、自由度、接近中心性、平均最短路径长度), 以所有节点这四个参数的中值作为筛选条件, 取大于其二倍中位数度值 12 的靶点作为中心靶点。结果显示, 该蛋白互作网络中 74 个靶点通过 224 条边相连接, 关键靶点 13 个, 包括 JUN、MAPK1、TP53、AKT1、FOS、TNF、ESR1、IL6、EGFR、MYC、STAT1、HIF1A、RB1, 以此为基础建立 PPI 网络图, 以节点颜色深浅表现连接度大小, 可视化结果见图 2, 关键靶点信息具体情况见表 2。

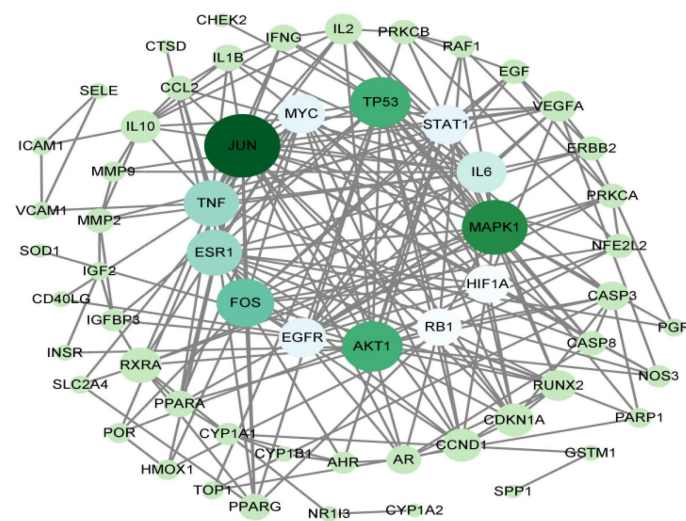


Figure 2. PPI network diagram of *Cistanches Herba - Morindae Officinalis Radix* on the core target of LOH intervention

图 2. 肉苁蓉 - 巴戟天药对干预 LOH 核心靶点 PPI 网络图

Table 2. Network topology parameters of the central target of “Cistanches Herba - Morindae Officinalis Radix” intervention in late-onset hypogonadism

表 2. “肉苁蓉 - 巴戟天” 干预迟发性性腺功能减退中心靶点的网络拓扑学参数

靶点	Degree	Betweenness	Closeness	MOLID	活性成分	来源药物
JUN	24	487.97134	0.5673077	MOL000358	beta-sitosterol	肉苁蓉
				MOL000098M	quercetin	肉苁蓉
				OL000358	beta-sitosterol	巴戟天
MAPK1	20	323.49426	0.5315315	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
TP53	18	337.0527	0.50427353	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
AKT1	18	415.23752	0.5315315	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
FOS	17	182.46278	0.5	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
TNF	16	423.4698	0.5086207	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
ESR1	16	316.04947	0.50427353	MOL006147	Alizarin-2-methylether Estrogen	巴戟天
				MOL009537	americaninA	巴戟天
IL6	14	178.12787	0.48360655	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
EGFR	13	122.105415	0.47580644	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
MYC	13	119.147064	0.51304346	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
STAT1	13	169.52452	0.5086207	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
HIF1A	12	37.311474	0.4876033	MOL000098	quercetin	肉苁蓉
RB1	12	49.88481	0.472	MOL000098	quercetin	肉苁蓉

在 Cytoscape3.9.0 软件绘制中药 - 成分 - 潜在作用靶点肉苁蓉 - 巴戟天网络图, 该网络有 90 个节点, 包括槲皮素(quercetin)、β 谷甾醇(beta-sitosterol)、内酯(suchilactone)等 16 个有效成分; 钠离子通道 α (SCN5A)、类视黄醇 X 受体(RXRA)、特异性钾离子通道蛋白抗体(KCNH2)、等 16 个药物靶点, 并通过 106 条边相连接, 充分说明肉苁蓉巴戟天具有多成分、多靶点共同作用, 以对迟发性性腺功能减退症达到干预的目的, 见图 3。

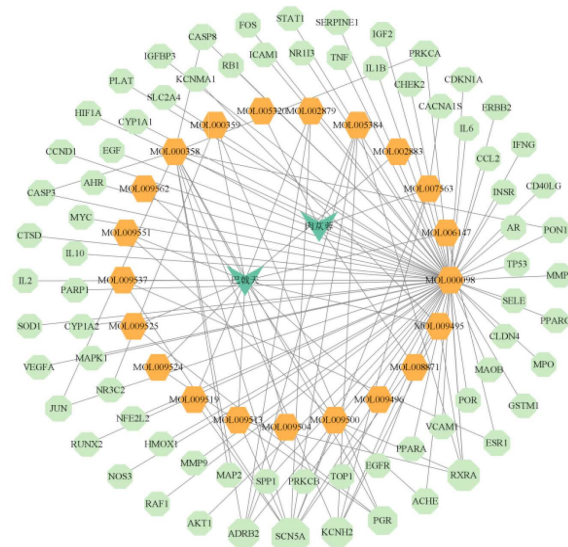


Figure 3. “Cistanches Herba - Morindae Officinalis Radix” drug pair - chemical composition - potential target network diagram
图 3. “肉苁蓉巴戟天” 药对 - 化学成分 - 潜在靶点网络图

3.4. 肉苁蓉-巴戟天药对干预迟发性性腺减退症 GO 通路富集分析

将肉苁蓉-巴戟天干预迟发性性腺功能减退潜在作用靶点导入 DAVID6.8 数据库, 对 74 个交集靶点进行 GO 富集分析以 $P < 0.05$ 为筛选条件得到 493 条相关通路。其中生物学过程(BP)通路 375 条; 细胞组成(CC)通路 37 条; 分子功能(MF)通路 81 条。以 P 值排序, 各取其前 20 条通路, 用 R 软件绘制气泡图, 见图 4~6。

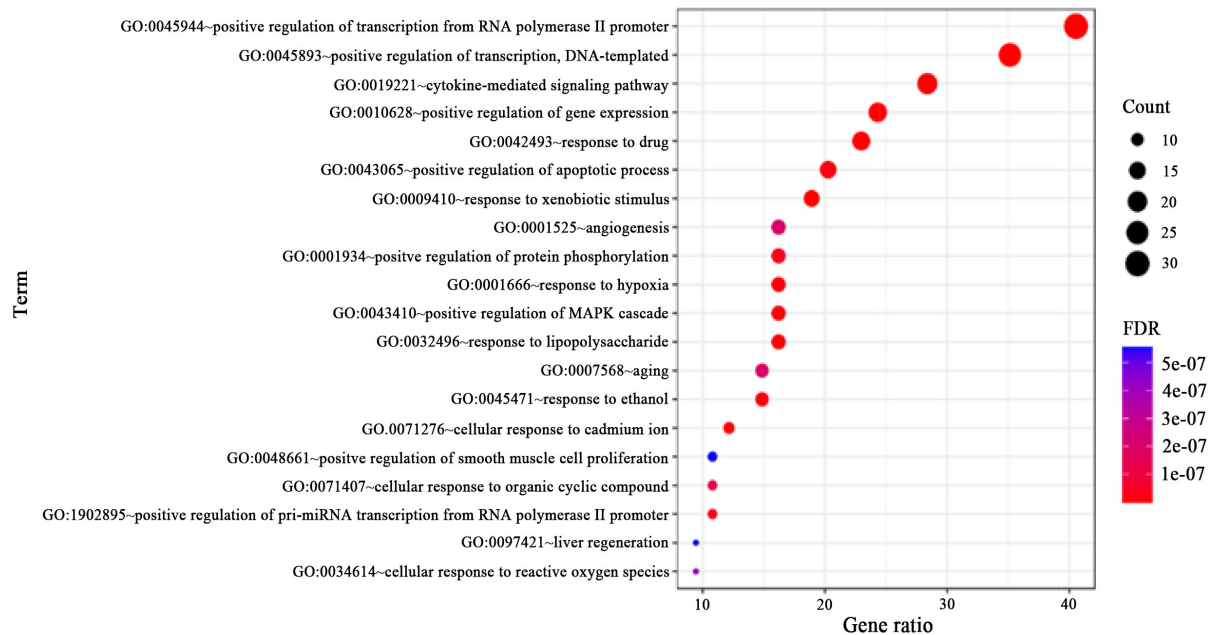


Figure 4. GO-BP enrichment analysis

图 4. GO-BP 富集分析

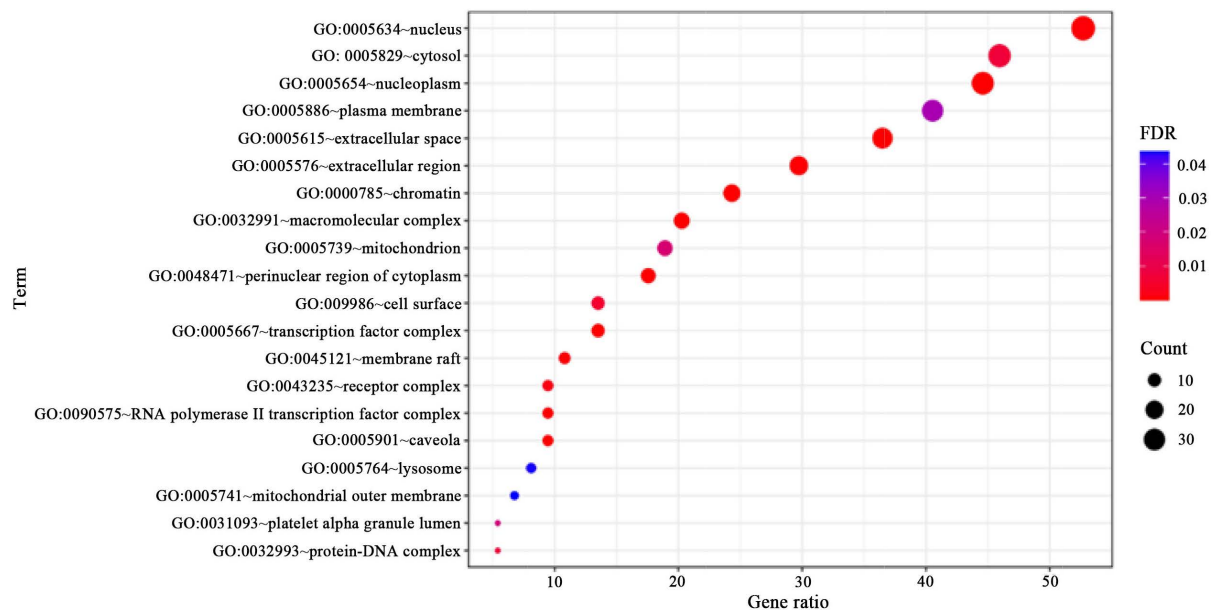


Figure 5. GO-CC enrichment analysis

图 5. GO-CC 富集分析

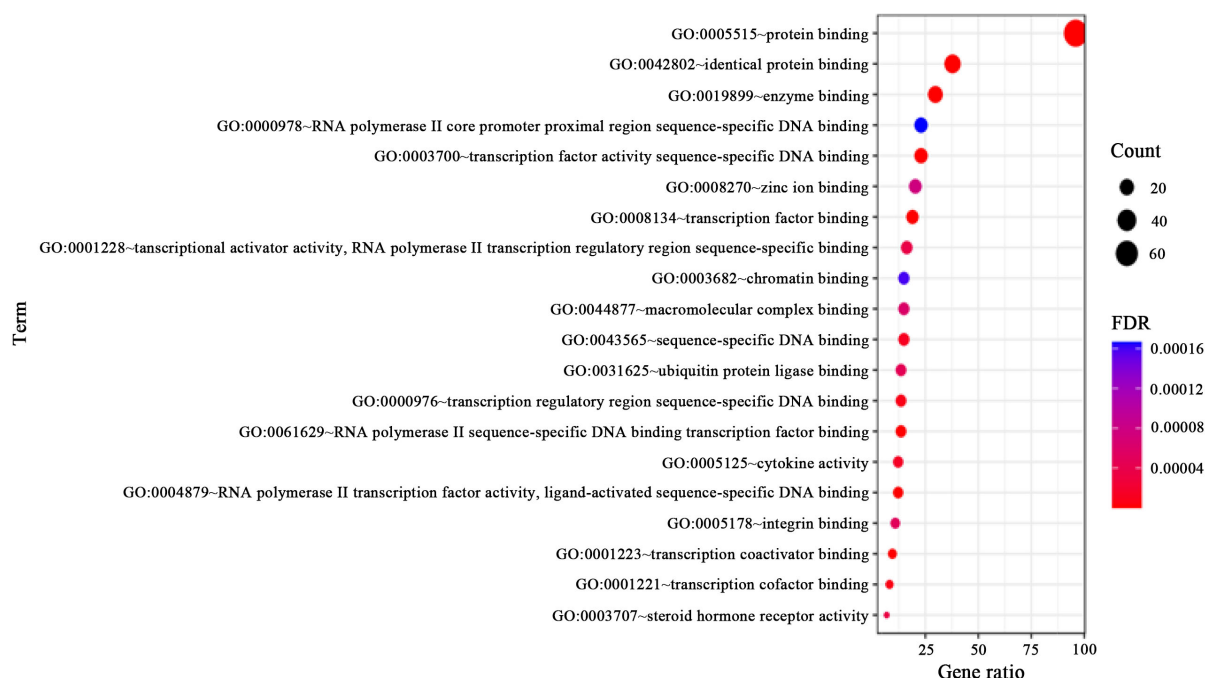


Figure 6. GO-MF enrichment analysis

图 6. GO-MF 富集分析

生物学过程, 细胞组分, 分子功能结果前 10 个条目主要包括: 蛋白质磷酸化的正向调控(positive regulation of protein phosphorylation); 缺氧反应(response to hypoxia); 染色质(chromatin); 高分子复合物(macromolecular complex); 线粒体(mitochondrion); 锌离子结合(zinc ion binding); 转录因子结合(transcription factor binding)等。

3.5. 肉苁蓉 - 巴戟天的潜在作用靶点 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID6.8 数据库对 74 个“肉苁蓉 - 巴戟天”的潜在作用靶点进行 KEGG 富集分析, 共得到 159 条相关通路, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 得到 151 条相关通路。取其前 20 条, 用 R 软件绘制气泡图, 见图 7, 各数值表现方法同 GO 通路表现。

KEGG 部分前 20 位信号通路包括: 癌症的途径(Pathways in cancer); 化学致癌 - 受体激活(Chemical carcinogenesis-receptor activation); 脂质与动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis); 丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway); 糖尿病并发症中的 RAGE 信号通路(RAGE signaling pathway in diabetic complications); 缺氧诱导因子 1 信号通路(HIF-1 signaling pathway); 肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway); 非洲锥虫病(African trypanosomiasis)等。

4. 讨论

临床上部分 LOH 患者血清睾酮水平降低程度与症状体征严重程度并不完全吻合, 目前对睾酮补充治疗(testosterone supplementation therapy, TST)的标准值尚未达到共识, 这些都为中医药干预 LOH 提供了可能[14]。《千金翼方》记载: “人五十以上, 阳气日衰, 损与日至……心无聊赖, 健忘嗔怒, 情性变异, 食欲无味, 寝处不安”与 LOH 症状基本吻合。《素问·上古天真论》曰: “五八, 肾气衰, 六八, 阳气衰竭于上, 七八, 肝气衰, 八八, 天癸竭, 精少, 肾脏衰” LOH 相当于男子“六八”至“八八”的年龄段, 天癸竭、肾气衰是其致病之本, 但 LOH 临床证型肾虚证并非唯一, 其往往兼肝郁、脾虚、心血不足,

最终导致阴阳失调, 脏腑功能紊乱而发病[15]。肾藏精, 司气化, 内寓真阴真阳, 一身阳气有赖肾阳温煦; 益精填髓精足上充于脑, 则髓海充足神志清明。

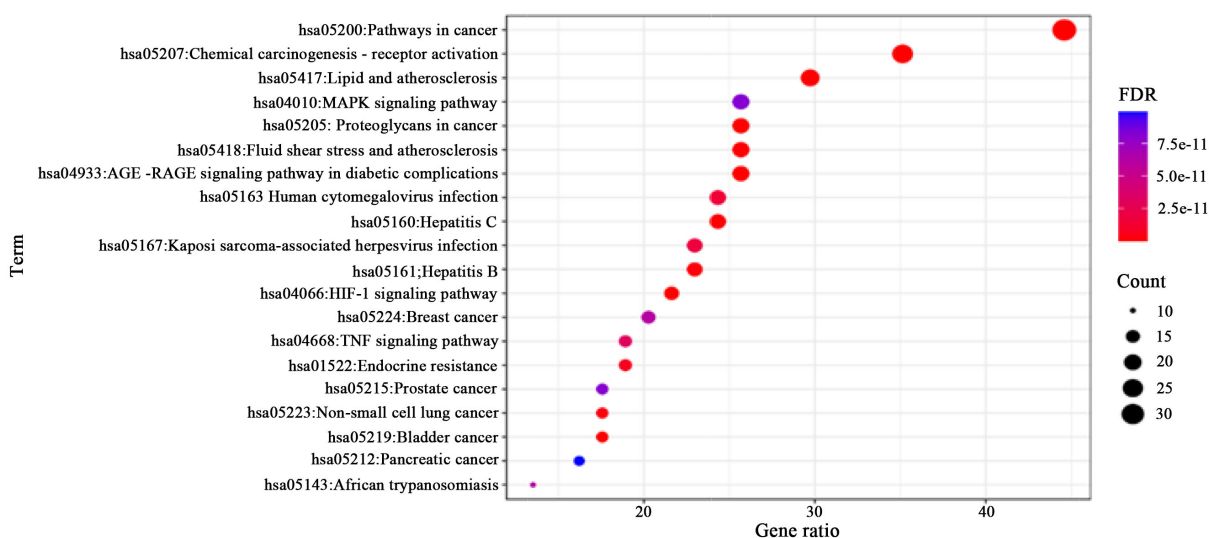


Figure 7. GO-KEGG enrichment analysis

图 7. GO-KEGG 富集分析

本研究初步筛选肉苁蓉巴戟天有效成分 22 个, 干预 LOH 的核心靶点有 13 个, 化合物 - 疾病 - 靶点调控网络表明肉苁蓉 - 巴戟天药对干预 LOH 作用机制复杂多样且靶点众多。药理研究表明肉苁蓉具有缓解衰老、抗疲劳、平衡免疫、保护肝功能、促进生殖等方面的作用[16]; 巴戟天具有抗骨质疏松、延缓衰老、平衡机体免疫、缓解抑郁、缓解心肌缺血、促进生殖功能等作用[17]。肉苁蓉 - 巴戟天药对有效成分中均含有大量槲皮素及 β -谷甾醇。槲皮素具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抑制免疫应答、抗抑郁等多种药理作用[18] [19]; 睾丸间质细胞(leydigcells, LCs)在下丘脑 - 垂体 - 睾丸间质细胞轴调控下产生睾酮[20], 槲皮素促进骨髓间充质干细胞向睾丸间质细胞分化, 从而槲皮素对雄性激素分泌具有直接或间接的影响作用[21] [22]。 β -谷甾醇具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗抑郁、调节免疫、抗衰老作用[23] [24]。慢性炎症可能通过直接调节睾丸间质细胞功能而下调雄性激素的生成[25], 炎症细胞因子 TNF、IL1 β 和 IL6 导致 TM3 睾丸间质细胞类固醇生成的剂量依赖性下降, 而 β -谷甾醇能有效抑制包括肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-6 在内的炎症反应, 并使促炎症细胞因子的水平下降[26] [27]。C-JUN 能促进人绒毛膜促性腺激素(Hcg)诱导下, 体外培养的大鼠 LC 的睾酮分泌[28]; C-FOS 参与 HCG 诱导大鼠 LC 睾酮的分泌, 其途径很可能是通过 cAMP-PKA 通路来表达[29]。热敏感有可能通过扰乱支持生殖细胞粘附链接动力学, 激活睾丸支持细胞中 MAPK1/3, 并促进生殖细胞凋亡[30]。在 MDM2/TP53 介导下, 可以导致类固醇生长因子 1 (Nr5a1)消融诱导的细胞凋亡, 从而控制支持细胞的细胞周期[31]。实验表明 LC 通过 PI3K/Akt 信号通路的激活可产生睾酮, 而镍可能对其有抑制作用[32]; 全氟十一烷酸(PFUnA)抑制 LH 分泌, 导致 AKT1 低磷酸化, 并诱导 ROS 导致 AKT1、ERK1/2 低磷酸化, 从而抑制 LC 增殖, 直接或间接导致睾酮分泌减少[33]; 雌激素通过雌激素受体 1 (ESR1)抑制 LC 介导的类固醇产生, 从而抑制睾酮分泌[34]。表皮生长因子(EGF)与其受体(EGFR)结合, 促进睾丸间质干细胞增殖并向睾丸间质细胞方向的分化, 直接或间接促进睾酮分泌[35]; 而在睾丸间质细胞、管周肌样细胞中 MYC 高度表达, 能有效稳定睾丸干细胞生态[36]; 据相关研究报道, Jak1/Stat1 通路在 lncRNA-XIST 分泌的 miR-142-5p 作用下, 通过 YY1、NFkB 调节类固醇生成 β -HSD、StAR, 导致睾丸间质细胞中睾酮的产生受到抑制[37]; HIF 可以调节小鼠 KK1

颗粒细胞中的 cJUN 表达, 并参与调节 P-CREB 向 STAR 启动因子的募集[38]。相关研究报道, Rb1 能有效改善血管内皮功能障碍、抑制炎症或衰老; 并且发现 Rb1 在前列腺癌细胞中对睾酮有拮抗作用; 在 VSMC 中 Rb1 通过雄激素受体发挥雄激素样作用, 从而防止血管钙化[39]。

GO 分析表明“肉苁蓉-巴戟天”干预 LOH 涉及多个生物过程, 如药物反应、线粒体、蛋白质结合、酶结合等。KEGG 通路富集分析显示丝裂原活化蛋白激酶信号通路; 糖尿病并发症中的 RAGE 信号通路, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、缺氧诱导因子 1 (HIF-1)信号通路、糖尿病并发症中的 RAGE 信号通路等, 这些通路都可能是“肉苁蓉-巴戟天”干预 LOH 的主要通路。糖尿病睾丸间质细胞中 miR-504、miR-935 过度表达, 通过抑制 MAPK 通路调节间质细胞增殖、凋亡, 从而影响雄性激素分泌、精子形成[40]; T3 刺激 LC 通过类固醇、HIF-1 α 产生 VEGF, VEGF 反过来刺激睾丸间质细胞增殖和睾酮分泌[41]。RAGE 通路导致 NF- κ B 活化, 刺激细胞因子、生长因子产生, 导致慢性炎症和癌症进展[42]; 慢性炎症导致睾丸中支持和间质细胞功能进行性下降, 是睾酮下降的原因之一[43]。研究表明 TNF α 通路促成了 LC 中睾酮生物合成的障碍, 从而导致了雄性动物中睾酮激素的减少[44]。

LOH 为本虚标实之症, 肾精不足为本, 肝郁为标。肾藏精, 主脏腑气化, 肾精化肾气, 肾气分阴阳, 肾精肾气充盈则筋骨强, 身体壮实; 精生髓, 肾精充足则髓海得养, 思捷敏锐, 精力充沛。肝藏血, 肝主疏泄, 条畅情志, 《灵枢平人绝谷》曰: “血脉和利, 精神乃居。”肝气疏泄, 气血调和则情志舒畅[45]。水谷精微化生肾精、肝血, 精与血又可互相化生, 因此可称为肝肾同源; [46]《医通诸血门》云: “精不泄, 归精于肝而化清血。”肾精溢于肝化生为血, 血归于脉道滋养于肾。《素问·生气通天论》曰: “骨髓坚固, 气血皆从”可见精与髓, 是化生血液的重要物质基础。有关文献报道维生素 D (Vitamin D)轴及 VitaminD-FGF23-Klotho 轴对造血功能有干预作用, 其功能可能与“肾主骨生髓”中医论相对应; 而相关动物实验表明, VD 水平及其活性与动物衰老相关, 运用补肾药物可使其升高; 这与 VitaminD-FGF23-Klotho 轴与造血功能相互作用相关, 可能是“精血同源”理论现代生物学本质[47]。血管内皮生长因子能促进血管生成, 而睾丸间质细胞及支持细胞产生的血管内皮生长因子, 还能调控睾酮及生精细胞分化[48]。研究发现补肾中药可促进生殖器官血管生成及 VEGF 表达[49] [50]。《药鉴》曰: “肉苁蓉俊补精血。”，《玉楸药解》曰: “巴戟天温补精血, 滋益宗筋。”“肉苁蓉-巴戟天”相须为用可提高温肾补精之功, 取精聚为髓, 髓化生为血, 血脉合利, 精神乃居之目的。中医理论中的“肾”和现代医学的“下丘脑-垂体-性腺”生殖轴基本相似, 而肝肾同源理论又与“神经-内分泌-免疫系统”功能相似[8] [51]。基于网络药理学肉苁蓉-巴戟天药对干预 LOH 发现, 肉苁蓉-巴戟天药对可通过对睾丸间质细胞及支持细胞的调节, 促进血管内皮生长因子的分泌及生成并产生睾酮, 从而产生类雄性激素样作用[9], 而且还具有疏肝解郁抗抑郁的作用[52]。

5. 结论

综上所述, 基于网络药理学及肝肾同源中医学理论发现肉苁蓉-巴戟天药对干预 LOH 具有活性成分及作用靶点多样、作用途径广泛的特点, 主要靶点包括: JUN、MAPK1、TP53、AKT1、FOS、TNF、ESR1、IL6 等, 涉及生物学通路包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、缺氧诱导因子 1 (HIF-1)信号通路、糖尿病并发症中的 RAGE 信号通路等可通过对睾丸间质细胞及支持细胞的作用而影响睾酮分泌, 本研究为后续针对肝肾同源及“肉苁蓉-巴戟天”干预 LOH 研究提供了有力的依据及参考方向。

值得注意的是, 此研究不足之处在于: ① 条件受限, 无法测出药物在体内的代谢过程以及发生的一系列化学反应, ② 数据库可能不够完备, 有些成分可能尚未发现, ③ 药物的含量及浓度和挥发度欠缺, 因此仅作为机制预测方向, 具体药物机制与中医理论相结合还需要进一步实验研究。

基金项目

黑龙江省中医药学会青年中医药科技创新项目(ZHY19-014)。

参考文献

- [1] 闵潇, 解圣麟, 焦拥政. 中西医结合治疗迟发性性腺功能减退症的思路[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(3): 365-368.
- [2] 张奥, 薛耀, 郝川. 迟发性性腺功能减退与激素代谢水平相关性的研究进展[J]. 中国性科学, 2021, 30(10): 24-27.
- [3] 高丰衣, 李国平. 中老年男性迟发型性腺功能减退症的研究进展[J]. 中华老年医学杂志, 2017, 36(11): 1267-1270.
- [4] Tajar, A., Forti, G., O'Neill, T.W., et al. (2010) Characteristics of Secondary, Primary, and Compensated Hypogonadism in Aging Men: Evidence from the European Male Ageing Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **95**, 1810-1818. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1796>
- [5] Liu, Z.Y., Zhou, R.Y., Lu, X., et al. (2016) Identification of Late-Onset Hypogonadism in Middle-Aged and Elderly Men from a Community of China. *Asian Journal of Andrology*, **18**, 747-753. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.160883>
- [6] Huhtaniemi, I. (2014) Late-Onset Hypogonadism: Current Concepts and Controversies of Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Asian Journal of Andrology*, **16**, 192-202. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122336>
- [7] Grossmann, M. and Matsumoto, A.M. (2017) A Perspective on Middle-Aged and Older Men with Functional Hypogonadism: Focus on Holistic Management. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **102**, 1067-1075. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3580>
- [8] 张阳, 王琴, 朱勤, 等. 陈洪宇基于“乙癸同源, 肝肾共治”理论治疗糖尿病肾病的经验[J]. 浙江中医药大学学报, 2022, 46(1): 28-32.
- [9] 闫朋宣, 杜宝骏, 罗然. 中药类激素样作用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 531-534.
- [10] 唐德才, 吴庆光. 中药学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 324-324.
- [11] 张贝贝, 曾梦楠, 张钦钦, 等. 基于网络药理学及实验验证的“麻黄-葶苈子”药对治疗支气管哮喘的作用研究[J/OL]. 中国中药杂志, 1-15. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20220211.403>, 2022-08-10.
- [12] Li, Y., Wang, J., Xiao, Y., et al. (2015) A Systems Pharmacology Approach to Investigate the Mechanisms of Action of Semen Strychni and *Tripterygium wilfordii* Hook F for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, **175**, 301-314. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.016>
- [13] 陈晶, 邵先明, 侯志涛. 基于网络药理学的黄芪-山药药对治疗 2 型糖尿病作用机制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 89-95.
- [14] 梁国庆, 刘晓强. 迟发性性腺功能减退症的诊治进展[J]. 中国男科学杂志, 2020, 34(5): 83-88.
- [15] 周兴, 唐雪, 周青, 等. 男性迟发性性腺功能减退症的中西医认识与中医药干预可能机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(3): 1327-1331.
- [16] 支雅婧, 甄亚钦, 田伟, 等. 肉苁蓉化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2758-2767.
- [17] 杨霞, 邵蒙苏, 朱向东. 巴戟天的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37(5): 983-986.
- [18] 冯亚莉, 李浩, 刘娟, 等. 槲皮素研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5185-5193.
- [19] 华深, 罗晓东, 徐波, 等. 槲皮素对应激致小鼠抑郁症的作用及相关机制[J]. 浙江医学, 2021, 43(12): 1264-1267.
- [20] Chistiakov, D.A., Myasoedova, V.A., Melnichenko, A.A., et al. (2018) Role of Androgens in Cardiovascular Pathology. *Vascular Health and Risk Management*, **14**, 283-290. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S173259>
- [21] 李小云, 杨丽, 张荣华. 雌激素受体信号通路介导的槲皮素调控骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6011-6014.
- [22] 闫秀文. bFGF 对大鼠骨髓间充质干细胞向睾丸间质细胞分化的作用研究[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- [23] 陈元莹, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [24] Panayotis, N., Freund, P.A., Marvaldi, L., et al. (2021) β -Sitosterol Reduces Anxiety and Synergizes with Established Anxiolytic Drugs in Mice. *Cell Reports Medicine*, **2**, Article ID: 100281. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100281>

- [25] Leisegang, K. and Henkel, R. (2018) The *in Vitro* Modulation of Steroidogenesis by Inflammatory Cytokines and Insulin in TM3 Leydig Cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **16**, 26. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0341-2>
- [26] Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., *et al.* (2017) Evaluation of the Anti-Inflammatory Capacity of Beta-Sitosterol in Rodent Assays. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **14**, 123-130. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.13>
- [27] Yang, Q., Yu, D. and Zhang, Y. (2019) β -Sitosterol Attenuates the Intracranial Aneurysm Growth by Suppressing TNF- α -Mediated Mechanism. *Pharmacology*, **104**, 303-311. <https://doi.org/10.1159/000502221>
- [28] Yuan, S., Xu, S., Yang, X., *et al.* (2004) Effects of c-jun on hCG-Induced Testosterone Secretion of Rat Leydig Cells *in Vitro*. *National Journal of Andrology*, **10**, 345-347, 350.
- [29] 况海斌, 方廉, 王新长, 等. 反义 c-fos 寡脱氧核苷酸对 hCG 诱导大鼠睾丸间质细胞睾酮分泌的影响[J]. 基础医学与临床, 2003(6): 682-683.
- [30] Jia, Y., Castellanos, J., Wang, C., *et al.* (2009) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Male Germ Cell Apoptosis in the Rat. *Biology of Reproduction*, **80**, 771-780. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072843>
- [31] Anamthakula, P., Miryala, C., Moreci, R.S., *et al.* (2019) Steroidogenic Factor 1 (Nr5a1) Is Required for Sertoli Cell Survival Post Sex Determination. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 4452. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41051-1>
- [32] 俄倩男. 镍致大鼠 Leydig 细胞类固醇合成障碍中 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络的构建及相关机制研究[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [33] Yan, H., Li, C., Zou, C., *et al.* (2021) Perfluoroundecanoic Acid Inhibits Leydig Cell Development in Pubertal Male Rats via Inducing Oxidative Stress and Autophagy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **415**, Article ID: 115440. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115440>
- [34] Oh, Y.S., Koh, I.K., Choi, B., *et al.* (2017) ESR1 Inhibits hCG-Induced Steroidogenesis and Proliferation of Progenitor Leydig Cells in Mice. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 43459. <https://doi.org/10.1038/srep43459>
- [35] 张磊, 纪洵敏, 苏志坚, 等. 表皮生长因子对大鼠睾丸间质干细胞增殖和分化的影响研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(10): 1589-1593.
- [36] Ventelä, S., Mäkelä, J.A., Sears, R.C., *et al.* (2016) MYC Is Not Detected in Highly Proliferating Normal Spermatogonia But Is Coupled with CIP2A in Testicular Cancers. *Matters*, **2016**. <https://doi.org/10.19185/matters.201602000040>
- [37] Liu, C., Qu, J., Wu, M., *et al.* (2021) Cypermethrin Triggers YY1-Mediated Testosterone Biosynthesis Suppression. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **225**, Article ID: 112792. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112792>
- [38] Lanfranchi, B., Rubia, R.F., Gassmann, M., *et al.* (2022) Transcriptional Regulation of HIF1 α -Mediated STAR Expression in Murine KK1 Granulosa Cell Line Involves cJUN, CREB and CBP-Dependent Pathways. *General and Comparative Endocrinology*, **315**, Article ID: 113923. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2021.113923>
- [39] Nanao-Hamai, M., Son, B.K., Komuro, A., *et al.* (2019) Ginsenoside Rb1 Inhibits Vascular Calcification as a Selective Androgen Receptor Modulator. *European Journal of Pharmacology*, **859**, Article ID: 172546. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172546>
- [40] Hu, L., Wei, S., Wu, Y., *et al.* (2021) MicroRNA Regulation of the Proliferation and Apoptosis of Leydig Cells in Diabetes. *Molecular Medicine*, **27**, 104. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00370-8>
- [41] Dhole, B., Gupta, S. and Kumar, A. (2021) Triiodothyronine Stimulates Steroid and VEGF Production in Murine Leydig Cells via cAMP-PKA Pathway. *Andrologia*, **53**, e13972. <https://doi.org/10.1111/and.13972>
- [42] Waghela, B.N., Vaidya, F.U., Ranjan, K., *et al.* (2021) AGE-RAGE Synergy Influences Programmed Cell Death Signaling to Promote Cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **476**, 585-598. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03928-y>
- [43] Aldahhan, R.A., Stanton, P.G., Ludlow, H., *et al.* (2021) Experimental Cryptorchidism Causes Chronic Inflammation and a Progressive Decline in Sertoli Cell and Leydig Cell Function in the Adult Rat Testis. *Reproductive Sciences*, **28**, 2916-2928. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00616-0>
- [44] Azhar, N.A., Paul, B.T., Jesse, F., *et al.* (2021) Responses of Testosterone Hormone and Important Inflammatory Cytokines in Bucks after Challenge with Mannheimia Haemolytica A2 and Its LPS Endotoxin. *Tropical Animal Health and Production*, **53**, 242. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02683-6>
- [45] 杨田. 基于数据挖掘技术的名中医刘真治疗原发性高血压伴焦虑抑郁状态的经验总结[D]: [硕士学位论文]. 张家口: 河北北方学院, 2020.
- [46] 孙大林, 金保方. 从血管内皮生长因子在生精中的作用浅析中医“精血同源”理论[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(10): 1261-1264.

-
- [47] 陈伟, 曹敏玲, 管连城, 等. “精血同源”现代生物学本质理论探析[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(4): 429-433.
- [48] Sun, D.L. and Jin, B.F. (2016) Explanation of “Essence and Blood from the Same Source” in Theory of Chinese Medicine from the Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Spermatogenesis. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, **36**, 1261-1264.
- [49] 段恒, 周滢. “补肾生脉”理论与卵巢功能低下性疾病及血管生成的关系[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(7): 1680-1681.
- [50] 崔晓萍, 肖新春, 刘霞, 等. 基于“精血同源”理论从大鼠卵巢 VEGF、BCL-1/Bax 揭示过度瘦身对女性生殖功能的影响[J]. 陕西中医药大学学报, 2020, 43(3): 56-61.
- [51] 马健雄, 陈望强, 王彬, 等. 李曰庆治疗男性迟发性性腺功能减退药对浅析[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5015-5019.
- [52] 李龙龙, 周亚兰, 高丽娟, 等. 补肾药抗抑郁的研究进展[J]. 中医研究, 2020, 33(8): 73-77.