基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的作用机制

王志[1]，孟新源[2]，郑董璇[3]，胡君萍[3*]

1. 新疆医科大学第一附属医院 药学部，新疆 乌鲁木齐　830054
2. 新疆医科大学附属肿瘤医院 药学部，新疆 乌鲁木齐　830011
3. 新疆医科大学 药学院，新疆 乌鲁木齐　830017

摘　要：目的　运用网络药理学方法推测肉苁蓉苯乙醇总苷在治疗不育症方面的潜在作用靶点和信号通路，并通过分子对接和动物体内实验来验证并进一步探讨其作用机制。**方法**　应用 TCMSP 等数据库及文献收集肉苁蓉苯乙醇总苷的活性成分及潜在作用靶点，通过基因数据库（Gene Cards）、人类孟德尔遗传数据库（OMIM）获取不育症疾病靶点；通过 Venny 2.1 软件获得交集靶点基因，结合 STRING 数据库绘制蛋白相互作用（PPI）网络，并通过 Cytoscape 3.8.2 软件筛选肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的核心作用靶点；运用 DAVID 数据库，分析交集基因的基因本体（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集情况。选取关键作用靶点与药物活性成分通过 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接验证；最后通过肉苁蓉苯乙醇总苷干预腺嘌呤诱导的不育症大鼠模型，通过反转录 PCR（RT-PCR）法、蛋白质印迹（Western blotting）法验证大鼠睾丸组织中核心靶点和核心通路的表达。**结果**　肉苁蓉苯乙醇总苷共筛选出 21 个潜在活性成分，62 个药物靶点，7 961 个不育症靶点，药物与不育症交集靶点 51 个；核心活性成分主要为毛蕊花糖苷、松果菊苷、管花苷 A 等，核心靶点主要为肿瘤坏死因子（TNF）、基质金属蛋白酶 9（MMP9）、哈维大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（HRAS）、纤溶酶原基因（PLG）、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1（HSP90AA）等；GO 功能富集主要包括蛋白水解、一碳代谢过程、细胞外基质分解等；KEGG 富集通路主要包括雌激素信号通路、GnRH 信号通路、氮代谢、代谢途径信号通路等；分子对接结果显示核心活性组分与不育症关键核心靶基因 *TNF*、*MMP9*、*HRAS*、*PLG*、*HSP90AA1* 的结合度高；体内实验结果表明，给予肉苁蓉苯乙醇总苷后，不育症大鼠睾丸组织 ERα、HSP90 mRNA 和蛋白表达升高，ERβ mRNA 和蛋白表达降低（$P<0.05$）。**结论**　肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症是多靶点、多通路共同调控的结果，其作用机制可能与参与雌激素通路，调控核心靶点 ERα、ERβ 表达有关。

关键词：肉苁蓉苯乙醇总苷；不育症；网络药理学；分子对接；作用机制；毛蕊花糖苷；松果菊苷；管花苷 A；雌激素受体；热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1

中图分类号：R285　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2024)11 - 2781 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.11.006

Mechanism of phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba* in treatment of infertility based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification

WANG Zhi[1], MENG Xinyuan[2], ZHENG Dongxuan[3], HU Junping[3]

1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China
2. Department of Pharmacy, Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China

Abstract: Objective　To explore the potential targets and signaling pathways of phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba* in treatment of infertility by network pharmacology. Molecular docking and animal experiments were used to verify and further explore the mechanism of action. **Methods**　The active components and potential targets of total phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba* were collected using TCMSP and other databases and literature, and infertility disease targets were obtained by Gene Cards and

收稿日期：2024-01-23

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82160772）；新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目（2022D01C286，2022D01C260）

作者简介：王志，主管药师，硕士，研究方向为天然药物化学、临床药学。E-mail: wzls913@163.com

***通信作者：**胡君萍，主任药师，教授，博士生导师，博士，研究方向为天然药物化学。E-mail: 89229613@qq.com

OMIM. The intersection target genes were obtained by Venny 2.1 software, the protein interaction network was plotted by STRING database, and the core target of the treatment of infertility was screened by Cytoscape 3.8.2 software. GO and KEGG enrichment of intersecting genes were analyzed using DAVID database. Key targets and active ingredients were selected for molecular docking verification by AutoDockTools 1.5.6 software. Finally, total phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba* were used to interfere with adenine-induced infertility rat models, and the expression of core targets and core pathways in testicular tissue of rats was verified by RT-PCR and Western blotting. **Results** A total of 21 potential active ingredients, 62 drug targets, 7 961 infertility targets, and 51 drug and infertility intersection targets were identified. The core active ingredients were mainly verminoside, echinoside, tuphonoside A, etc. The core targets were mainly TNF, MMP9, HRAS, PLG, HSP90AA1, etc. GO functional enrichment mainly includes proteolysis, carbon metabolism, extracellular matrix decomposition, etc. KEGG enrichment pathway mainly includes estrogen signaling pathway, GnRH signaling pathway, nitrogen metabolism, metabolic pathway signaling pathway, etc. Molecular docking results showed that the binding degree of the core active components to the key core target genes of infertility *TNF*, *MMP9*, *HRAS*, *PLG*, and *HSP90AA1* was high. The results showed that the expression of ERα and HSP90 mRNA and protein increased, and the expression of ERβ mRNA and protein decreased after the administration of total phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba*（$P < 0.05$）. **Conclusion** The treatment of infertility by total phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba* is the result of multi-target and multi-pathway co-regulation, and the mechanism of action may be related to participation in estrogen pathway and regulation of core target ERα and ERβ expression.

Key words: phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba*; infertility; network pharmacology; molecular docking; mechanism; verminoside; echinoside; tuphonoside A; ER; HSP90AA

不育症是指由于男方因素导致女方不孕，育龄夫妇 1 年以上未避孕且未生育[1]。根据世界卫生组织的统计，大约 15%的育龄夫妇患有不育症，且呈逐年上升的趋势[2]。不育症的病因非常复杂，现代医学主要采取激素治疗、手术治疗以及辅助生殖技术等方法进行治疗，但这些疗法的疗效并不确定，或存在较多不良反应[3]。从中医中药理论角度为楔入点，寻找有效治疗不育症的药物是目前医学领域亟需研究的重点方向。

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎，是历代补肾壮阳方剂中使用最多的补益药，具有补肾益阳、益精益血的功效[4]。现代药理研究表明，肉苁蓉中的苯乙醇总苷类化合物是其主要有效成分，具有改善生殖、保护肾功能、延缓衰老、提高免疫等多种药理活性[5]；动物研究表明，肉苁蓉苯乙醇总苷对生殖功能障碍和睾丸损伤的小鼠模型具有显著的保护作用[6]，提示肉苁蓉苯乙醇总苷对不育症的治疗具有明确的药效价值。目前对于肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的机制研究尚未见报道，其作用机制及潜在靶点有待进一步阐明。

本研究通过网络药理学方法构建“中药－有效成分－靶点－信号通路”的多层次网络[7-8]，探讨肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的核心靶点和作用机制，并通过分子对接和体内实验进行验证，为肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的作用机制研究提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 肉苁蓉苯乙醇总苷类的化学成分收集及靶点预测 以“肉苁蓉苯乙醇总苷”“phenylethanoid glycosides from *Cistanche Herba*”为关键词，通过检索 CNKI 数据库、PubMed 数据库中的相关文献以及权威数据库中的中药系统药理学数据库（TCMSP）、中药百科全书数据库（ETCM）、中药研究综合数据库（TCMID），合并筛选出肉苁蓉苯乙醇总苷类化学成分和靶点信息。

1.1.2 肉苁蓉苯乙醇总苷治疗靶点预测及“活性成分－靶点”网络的构建 利用 UniProt 数据对 SwissTargetPrediction[9]预测的有效成分对应的靶点进行标定，剔除非人类靶点和无效重复靶点，最终得到标准靶点。在 Cytoscape 3.8.2 中构建“活性成分－靶点”网络图。

1.1.3 筛选不育症相关基因及肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的靶点映射 通过在 GeneCards[10]（https://www.genecards.org/）、OMIM[11]（https://omim.org/）数据库中输入关键词“infertility”“sterility”进行检索，从而得到与疾病相关靶点，并对靶点信息进行汇总整理。

利用 Venny 2.1（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）将肉苁蓉苯乙醇总苷成分作

用靶点与不育症靶标映射，以韦恩图形式获得肉苁蓉苯乙醇总苷类成分与不育症的药物－疾病共有靶点。使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物－成分－作用靶点”网络图。

1.1.4　构建蛋白相互作用（PPI）网络　将肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的交集靶点传至互作 String 数据库（https://string-db.org/）[12]构建 PPI 网络。

1.1.5　基因本体（GO）分析与京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析　利用 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp）进行 GO 基因功能分析，从生物过程（BP）、细胞成分（CC）、分子功能（MF）注释肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的作用靶蛋白在基因功能中的作用。对肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的靶点在信号通路中进行 KEGG 通路富集分析，预测肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的作用机制。

1.1.6　“成分－靶点－通路”构建　将肉苁蓉苯乙醇苷的活性成分、不育症的蛋白作用靶点以及富集通路文件分别导入 Cytoscape 3.8.2，进行可视化处理，并绘制通路网络图。其中每个节点代表活性成分、靶点蛋白或信号通路，节点之间的连接代表活性成分、靶点蛋白与相关通路之间的联系。

1.1.7　核心靶点的分子对接　利用 AutoDock Vina 1.1.2 对肉苁蓉苯乙醇总苷活性成分和核心靶点进行分子对接，验证其相互作用活性。

1.2　动物实验

1.2.1　实验动物、试剂及仪器　在新疆医科大学动物实验中心购买 SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只，体质量 240～260 g，所有动物饲养和实验均在 SPF 级屏障环境中进行，恒温恒湿，环境温度 24～26 ℃，相对湿度 40%～70%，动物生产许可证编号 SCXK（新）2022-0011。本实验依照动物实验替代、减少、优化的原则进行操作，符合动物伦理原则，新疆医科大学动物实验伦理审批号 20210301-180。

肉苁蓉苯乙醇总苷（质量分数≥85%，批号 20180502）购于新疆和田帝辰医药生物有限公司；腺嘌呤（批号 J05D10104855）购自北京索莱宝公司；复方玄驹胶囊（规格 0.42 g/粒，批号 20201126）购自浙江施强制药有限公司；羧甲基纤维素钠（CMC-Na，批号 2019010）购自上海麦克林生化科技有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒（北京索莱宝公司，批号 2307001）；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（北京博泰斯生物技术有限公司，批号 6110207）；PVDF 膜（德国罗氏公司，批号 69290400）；蛋白预染 Marker 购自美国 Thermo 公司；兔抗 β-肌动蛋白（β-actin）、雌激素受体（ER）α、ERβ、热休克蛋白 90（HSP90）多克隆抗体均购自美国 Proteintech 公司；甲醇购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

KZ-Ⅲ-FP 型研磨仪（Servicebio 公司）；D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机（DragonLab 公司）；蛋白免疫印迹使用的电源、电泳装置及转膜装置均购自美国 Bio-Rad 公司，PURELAB Chorus 1 Complete 型超纯水仪（英国 Elga 公司）。

1.2.2　分组及给药　SD 雄性大鼠随机分为对照组、模型组、复方玄驹胶囊组、肉苁蓉苯乙醇总苷（125、500 mg/kg）组。大鼠给药量按人与大鼠体表面积等效换算及文献报道[13-14]以确定 ig 剂量，以成人（60 kg）和大鼠（250 g）等效系数（6.17）计算各组动物相应每日给药剂量。对照组 ig 等量生理盐水（10 mL/kg），其余各组每天 ig 150 mg/kg 腺嘌呤，连续 14 d，构建大鼠不育症模型；从第 3 周起，复方玄驹胶囊组 ig 复方玄驹胶囊 100 mg/kg，肉苁蓉苯乙醇总苷（125、500 mg/kg）组分别 ig 肉苁蓉苯乙醇总苷 125、500 mg/kg，连续给药 28 d。

1.2.3　取材　取材前禁食不禁水，24 h 后以 0.3～0.4 mL/100 g 的剂量标准给予 10%水合氯醛腹内注射麻醉大鼠，腹主动脉采血，4 ℃放置 2 h 后以 3 000 r/min 转速离心 10 min，留取血清分装待检；迅速剖取睾丸组织，以生理盐水漂洗后睾丸分 2 份，分别以 4%组织固定液固定，用作病理学染色；及液氮速冻后−80 ℃保存，用于蛋白质印迹（Western blotting）检测。

1.2.4　RT-qPCR 法检测大鼠睾丸组织相关基因 mRNA 表达　取于−80 ℃保存的大鼠睾丸组织，采用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA，按照反转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA，通过荧光定量 PCR 仪进行检测，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量，引物序列见表 1。

1.2.5　Western blotting 法检测雌激素通路 ERα、ERβ、HSP90 的蛋白表达　提取大鼠睾丸组织蛋白，蛋白浓度采用 BCA 法测定，蛋白溶液中加入蛋白上样缓冲液，在沸水浴中 15 min 变性，按照十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）说明书混匀后进行电泳，聚偏氟乙烯树脂（PDVF）300 mA 恒流，转膜，TBST 缓冲液快速洗 3 次，加入 5%的脱脂牛奶，摇床放置，封闭 30 min，倒掉孵育

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列（5′→3′）
ERα	正向：CGAGGTGTACGTGGACAACA
	反向：GTGATGCTCGACTGGCCATA
ERβ	正向：GAGGCAGAAAGTAGCCGGAA
	反向：CGTGAGAAAGAAGCATCAGGA
HSP90	正向：TGGACAGCAAACATGGAGAG
	反向：TGTAACCCATTGTTGAGTTGTCT
GAPDH1	正向：CCCCTTCATTGACCTCAACT
	反向：ATGAGTCCTTCCACGATACC
GAPDH2	正向：GGAGTCTACTGGCGTCTTCAC
	反向：ATGAGCCCTTCCACGATGC

槽中的封闭液，加入稀释好的一抗 ERα（1∶1 000）、ERβ（1∶1 000）、HSP90（1∶1 000）、β-actin（1∶2 000），4 ℃孵摇床过夜，加入 TBST，放置脱色摇床上快速洗脱，洗 3 次，每次 5 min，加入二抗，稀释，在室温条件下摇动 30 min，TBST 洗 3 遍二抗，每次 5 min，用 ECL 显色曝光，显影冲洗。将曝光后的底片扫描，并用 Image J 专业灰度分析软件进行分析，计算 CFTR/actin 比值。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析，多样本均数比较采用方差分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两两比较采用 LSD 法；检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 网络药理学研究结果

2.1.1 肉苁蓉苯乙醇总苷活性成分及其靶点 通过检索 TCMSP、PharmMapper、SwissTarget Prediction 数据库及文献[15-16]报道，最终确定 21 个候选化合物，见表 2。将所检索的成分通过 Swiss Target Prediction，以 probability＞0 的靶点纳入，去重后获得 62 个靶点。

2.1.2 不育症靶点 通过“infertility”检索，合并 GeneCards、OMIM 数据库分别获得 5 950、12 个靶点，通过“sterility”检索 GeneCards 数据库获得 4 709 个靶点，将 2 个数据库所有靶点整合在 Excel 中，剔除重复基因，去重后共获得 7 961 个与不育症相关的靶点。将药物的作用靶点与不育症靶点基因取交集后，获得 51 个不育症与药物的交集靶点基因，见图 1。使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物－成分－作用靶点”网络图，见图 2。

2.1.3 PPI 网络构建及核心靶点筛选 不育症与药物的交集靶点基因，为药物治疗不育症的交互靶点基因。将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制蛋白相互作用网络，图中包括 50 个节点和 274 条边，对网络进行拓扑分析，以 degree 值反映靶点大小及颜色，以 combined score 值反映边的粗细，从而构建 PPI 网络，见图 3。其中肿瘤坏死因子（TNF）、基质金属蛋白酶 9（MMP9）、哈维大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（HRAS）、纤溶酶原基因（PLG）、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1（HSP90AA）1、基质金属蛋白酶 2（MMP2）、腺苷脱氨酶（ADA）、F2 基因、丝氨酸蛋白酶 1（PRSS1）为核心靶点。

表 2 肉苁蓉苯乙醇总苷化学成分

Table 2 Chemical composition of phenylethanoid glycosides from *Cistanche*

化合物名称	化学式	相对分子质量
2′-acetylacteoside	$C_{31}H_{38}O_{16}$	666.6
acteoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.6
calceolarioside A	$C_{23}H_{26}O_{11}$	478.4
cis-echinacoside	$C_{35}H_{46}O_{20}$	786.7
cistanoside A	$C_{36}H_{48}O_{20}$	800.8
cistanoside B	$C_{37}H_{50}O_{20}$	814.8
cistanoside D	$C_{31}H_{40}O_{15}$	652.6
cistanoside E	$C_{21}H_{32}O_{12}$	476.5
echinacoside	$C_{35}H_{46}O_{20}$	786.7
eutigoside A	$C_{23}H_{26}O_{9}$	446.4
isoacteoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	624.6
isocistanoside C	$C_{30}H_{38}O_{15}$	638.6
kankanoside F	$C_{26}H_{40}O_{17}$	624.6
osmanthuside B	$C_{29}H_{36}O_{13}$	592.6
osmanthuside B6	$C_{29}H_{36}O_{13}$	592.6
poliumoside	$C_{35}H_{46}O_{19}$	770.7
purpureaside C	$C_{35}H_{46}O_{20}$	786.7
salidroside	$C_{14}H_{20}O_{7}$	300.3
salsaside F	$C_{31}H_{38}O_{15}$	650.6
tubuloside A	$C_{37}H_{48}O_{21}$	828.8
tubuloside B	$C_{31}H_{38}O_{16}$	666.6

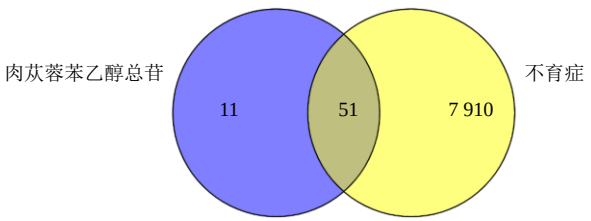


图 1 肉苁蓉苯乙醇总苷与不育症共同靶点

Fig. 1 Phenylethanoid glycosides of *Cistanche* and infertility common targets

2.1.4 GO 功能分析与 KEGG 通路分析结果 利用 DAVID 数据库进行 GO 基因功能富集分析，共筛选出 113 条 GO 条目，以 P＜0.05 作为标准筛选肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的显著富集的 BP 主要条目 66 条，主要涉及蛋白水解、一碳代谢过程、细胞外基质分解、细胞外基质组织、对外源性刺激

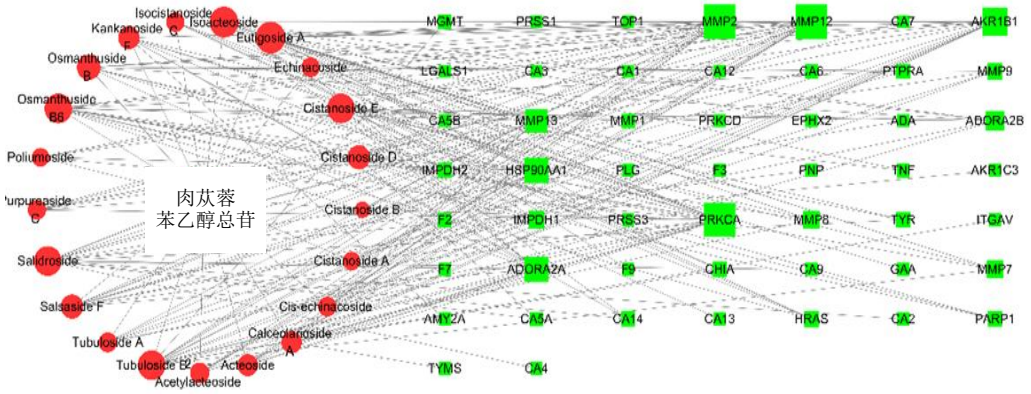


图 2　“活性成分－靶点”网络

Fig. 2　“Active ingredient – target” network

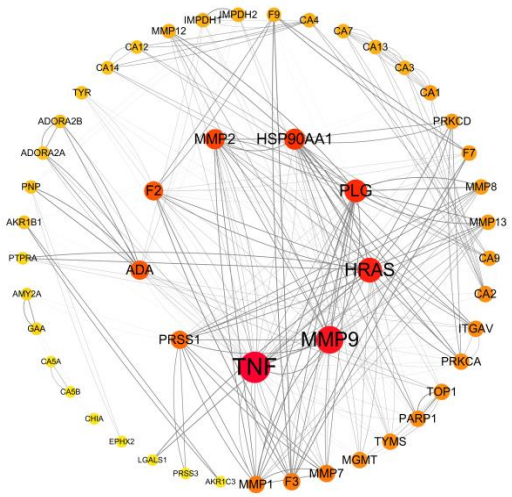


图 3　肉苁蓉苯乙醇总苷与不育症交集靶点基因 PPI 网络

Fig. 3　Phenylethanoid glycosides of *Cistanche Herba* and infertility intersection target gene PPI network

的反应、细胞迁移的正向调节等；CC 相关的有 22 条，涉及细胞外区、细胞外泌体、质膜、胞质溶胶、细胞质、膜等；其中 MF 相关的有 25 条，涉及锌离子结合、丝氨酸型内肽酶活性、碳酸盐脱水酶活性、水解酶活性、内肽酶活性、钙离子结合等，见图 4。

利用 DAVID 数据库进行通路富集分析，共富集到 24 条与肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症相关的通路，根据 $P<0.05$ 筛选出肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的通路 20 条，主要涉及氮代谢、晚期糖基化终产物及其受体（AGE-RAGE）信号通路与糖尿病并发症的关系、膀胱癌、癌症中的蛋白多糖、脂质与动脉粥样硬化、雌激素信号通路、GnRH 信号通路糖尿病性心肌病等，见图 5。

2.1.5　“成分－靶点－通路”网络图　通过 Cytoscape 3.8.2 软件构建肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的“成分－靶点－通路”网络，见图 6。

2.1.6　肉苁蓉苯乙醇总苷与核心靶点的分子对接结果　对接结果表明小分子均能进入靶蛋白的活性中心，选取与每个蛋白对接最好的小分子作图进行展示；毛蕊花糖苷与 HRAS 的 ASP-119、CYS-32、THR-35、LYS-16、VAL-14、LYS-117 形成氢键，氢键的长度分别为 2.8、3.0、3.0、2.9、3.2、3.3 Å（1 Å＝0.1 nm）；管花苷 A 与 HSP90AA1 的 TYR-139、ASN-51、GLU-47、SER-50 形成氢键，氢键的长度分别为 2.5、2.4、2.5、2.7 Å；毛蕊花糖苷与 MMP9 的 ALA-191、HIS-230、HIS-226、LEU-243 形成氢键，氢键的长度分别为 1.9、2.7、2.5、2.7 Å；管花苷 A 与 PLG 的 GLU-679、ASN-207、THR-386、THR-421、THR-375 形成氢键，氢键的长度分别为 3.2、2.7、2.9、3.0、3.1、3.2 Å；管花苷 A 与 TNF 的 ARG-103、GLU-116、ARG-98、SER-99、CYS-69、GLN-102 形成氢键，氢键的长度分别为 2.8、2.6、3.1、3.5、2.8、3.1 Å，对接结果见表 3、图 7。

2.2　动物实验验证

2.2.1　实时荧光定量法检测肉苁蓉苯乙醇总苷对不育症大鼠雌激素通路相关基因表达的影响　结果显示，与对照组相比，模型组 *ERα*、*HSP90* mRNA 在睾丸组织表达量明显降低，*ERβ* mRNA 表达明显升高（$P<0.05$）。与模型组相比，肉苁蓉苯乙醇总苷 500 mg/kg 组的 *ERα* mRNA 表达明显升高，肉苁蓉苯乙醇总苷 125、500 mg/kg 组 *ERβ* mRNA 表达明显降低（$P<0.05$），见图 8。

2.2.2　Western blotting 法测定肉苁蓉苯乙醇总苷对

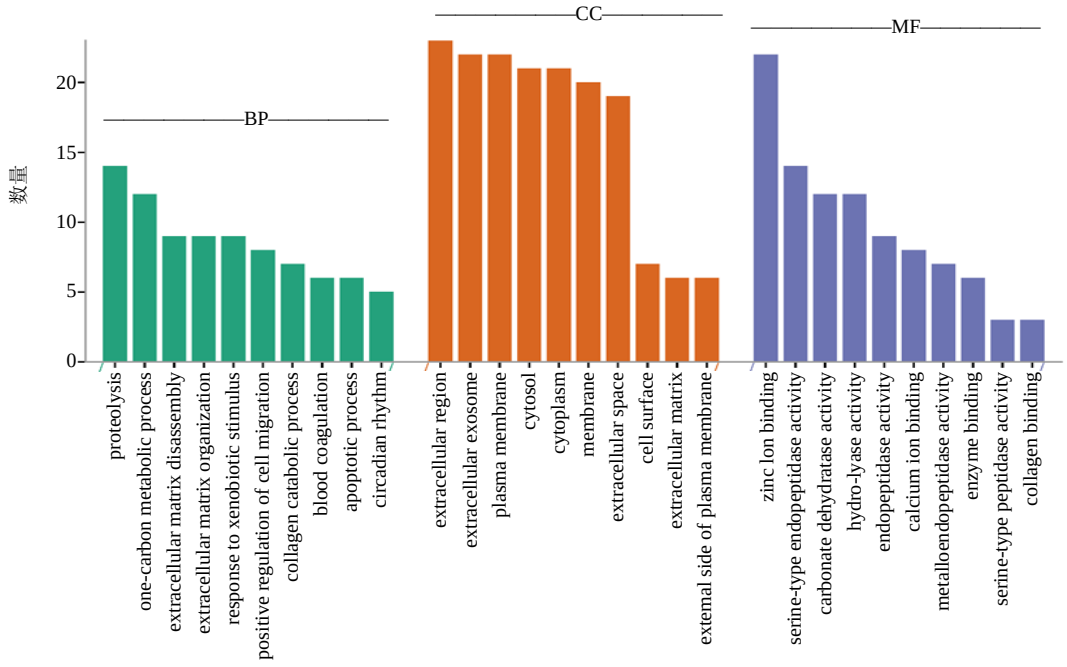


图 4 肉苁蓉苯乙醇总苷潜在靶标的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of potential targets of phenylethanoid glycosides of *Cistanche*

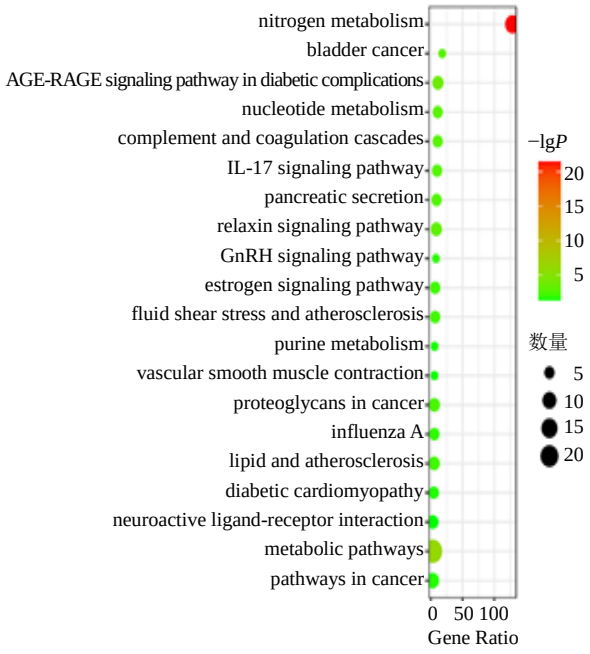


图 5 肉苁蓉苯乙醇总苷潜在靶标的 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis of potential targets of phenylethanoid glycosides of *Cistanche*

不育症大鼠雌激素通路相关蛋白表达的影响 结果显示，与对照组相比，模型组 ERα、HSP90 蛋白相对表达量明显降低，ERβ 蛋白相对表达量明显升高（$P<0.05$）。与模型组相比，肉苁蓉苯乙醇总苷 500 mg/kg 组的 ERα、HSP90 蛋白相对表达量明显升高；肉苁蓉苯乙醇总苷 125、500 mg/kg 组 ERβ 蛋白相对表达量明显降低（$P<0.05$），见图 9。

3 讨论

目前不育症的病因复杂，其中至少 60%尚未明确。现有研究显示，不育症发病主要与激素分泌失调、遗传畸变、免疫学因素等因素密切相关，其中激素分泌失调是关键[17]。肉苁蓉苯乙醇总苷可改善不育症大鼠生殖临床症状，显著改善肾脏、睾丸病理形态，提高精子存活率[18-20]。然而，由于肉苁蓉苯乙醇总苷有效活性成分复杂，对于肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的具体作用机制仍有待明确。

本研究通过网络药理学方法，构建肉苁蓉苯乙醇总苷“成分－靶点”网络图，肉苁蓉苯乙醇总苷有效化合物中，毛蕊花糖苷、松果菊苷、管花苷 A、肉苁蓉苷 A、2-乙酰毛蕊花糖苷节点度高，推测这些化合物可能在不育症治疗发挥主要的药效作用。毛蕊花糖苷、松果菊苷作为肉苁蓉苯乙醇总苷最主要的有效成分，《中国药典》2020 年版收载这 2 种化合物为控制肉苁蓉药材质量的指标成分[21]。药理研究表明，毛蕊花糖苷能有效提高不育症大鼠的精子质量，改善性激素紊乱、生殖功能及肾脏、睾丸组织病理性损伤，发挥自噬调节作用[22]；松果菊苷可改善生精功能障碍大鼠精子质量、睾丸结构，调

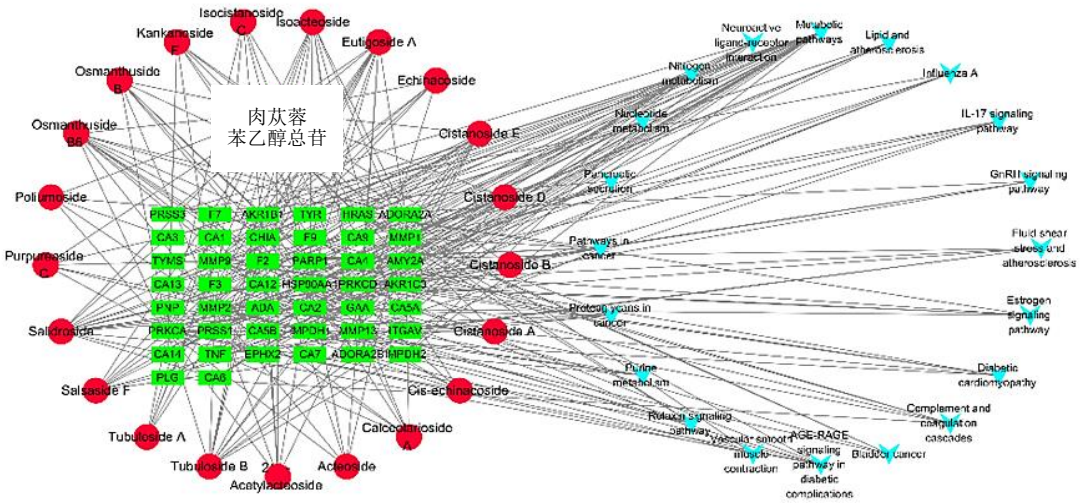


图 6　肉苁蓉苯乙醇总苷成分治疗不育症的“成分－靶点－通路”网络

Fig. 6　“Ingredient－target－pathway” network of phenylethanoid glycosides of *Cistanche* in treatment of infertility

表 3　核心小分子与核心靶蛋白对接结果

Table 3　Docking results of core small molecules and core target proteins

化合物	靶点	PDB ID	结合能/(kcal mol^{-1})
管花苷 A	TNF	2E7A	−10.6
毛蕊花糖苷			−9.8
松果菊苷			−8.7
肉苁蓉苷 A			−9.7
2-乙酰毛蕊花糖苷			−8.3
管花苷 A	HSP90AA1	6U98	−8.9
毛蕊花糖苷			−8.6
松果菊苷			−8.8
肉苁蓉苷 A			−8.5
2-乙酰毛蕊花糖苷			−8.6
管花苷 A	PLG	4DUR	−9.4
毛蕊花糖苷			−8.6
松果菊苷			−9.3
肉苁蓉苷 A			−8.8
2-乙酰毛蕊花糖苷			−8.8
管花苷 A	HRAS	2CL6	−9.5
毛蕊花糖苷			−10.9
松果菊苷			−7.2
肉苁蓉苷 A			−9.8
2-乙酰毛蕊花糖苷			−8.6
管花苷 A	MMP9	4XCT	−8.9
毛蕊花糖苷			−9.9
松果菊苷			−9.8
肉苁蓉苷 A			−9.8
2-乙酰毛蕊花糖苷			−9.4

1 kcal·mol^{-1}＝4.2 kJ·mol^{-1}

控 MAPK 信号通路减轻氧化应激损伤[23]。肉苁蓉苯乙醇总苷核心化合物尽管结构上存在差异，却通过多途径、多靶点协同发挥生殖调节的作用。

PPI 网络显示，TNF、HSP90AA1、MMP9、HRAS、PLG 等是肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症主要的靶基因。TNF 是维持睾丸组织内环境稳态的重要的信号分子，同时在精子发生过程中可作用于生精细胞凋亡[24]。MMP9 调控机体正常的生理过程，包括胚胎发育、组织塑性、再生等[25]。*HRAS* 基因表达下调促进睾丸间质细胞 PTEN 信号通路激活[26]。HSP90 是雄激素和雌激素的结合蛋白，参与甾体激素与相应受体的结合[27]。分子对接验证结果表明，肉苁蓉苯乙醇总苷 5 个活性组分与不育症关键核心靶基因 TNF、HSP90AA1、MMP9、HRAS、PLG 的结合度高，最低结合能均≤−8.0 kcal/mol，表明核心活性成分与关键靶点之间均有很强的结合力，证明肉苁蓉苯乙醇总苷多靶点对不育症治疗发挥正性调控作用。

GO 富集分析结果显示肉苁蓉苯乙醇总苷可对蛋白水解、一碳代谢过程、细胞外基质分解、细胞外基质组织、对外源性刺激的反应、细胞迁移的正向调节等生物过程起调控作用，涉及细胞膜、核等细胞组成过程，并通过与离子、酶各类受体结合等分子功能从而发挥活性作用。KEGG 富集分析结果显示，肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症可能调控雌激素信号通路、GnRH 信号通路、氮代谢、代谢途径、核苷酸代谢、脂质与动脉粥样硬化等多条信号转导

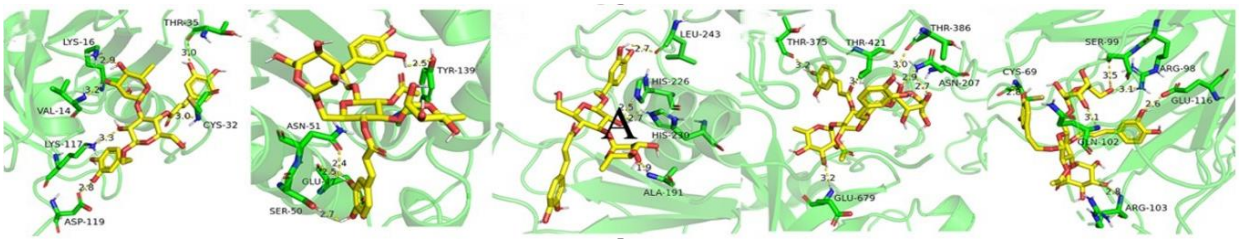
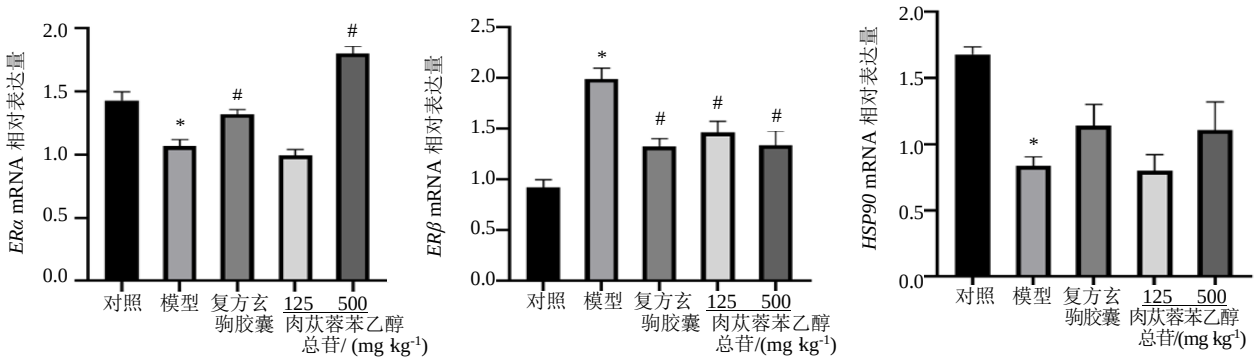


图 7 靶点受体蛋白与活性成分的分子对接模式

Fig. 7 Molecular docking patterns of target receptor proteins and active ingredients

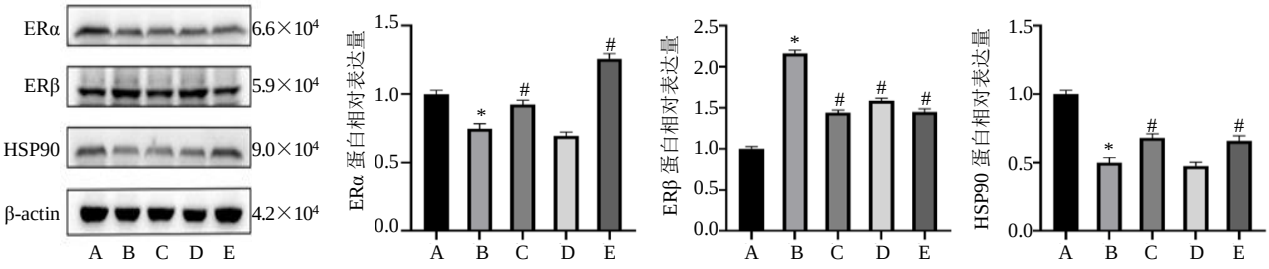


与对照组比较：*P<0.05；与模型组比较：#P<0.05。

*P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* model group.

图 8 大鼠雌激素相关基因 mRNA 表达（$\bar{x} \pm s$，n = 7）

Fig. 8 Results of related mRNA expression of rat estrogen ($\bar{x} \pm s$, n = 7)



A-对照，B-模型，C-复方玄驹胶囊，D-肉苁蓉苯乙醇总苷 125 mg·kg^{-1}，E-肉苁蓉苯乙醇总苷 500 mg·kg^{-1}；与对照组比较：*P<0.05；与模型组比较：#P<0.05。

A- control, B- model, C-Compound Yunju Capsules, D-phenylethanoid glycosides of *Cistanche Herba* 125 mg·kg^{-1}, E-phenylethanoid glycosides of *Cistanche Herba* 500 mg·kg^{-1}; *P < 0.05 *vs* control group; #P < 0.05 *vs* model group.

图 9 大鼠雌激素相关蛋白表达结果（$\bar{x} \pm s$，n = 7）

Fig. 9 Results of related protein expression of rat estrogen ($\bar{x} \pm s$, n = 7)

通路，其中以雌激素信号通路的作用最为关键。在正常雄性生殖系统，雌激素在靶细胞内先与 ER 结合，ER 与 HSP90 分离，配体－受体复合物进入细胞核，ER 活化形成二聚体，从而激活转录。当雌二醇与 ERα 结合时，转录效应就会被激活；并且在与 ERβ 结合时，转录会受到抑制。雌激素可影响 FSH 分泌以促进精子发生[28]。研究发现，敲除 *ERα* 基因的成年雄性小鼠呈现睾丸萎缩，生精上皮受损，精子数量减少，引起生育力下降，甚至彻底不育[29]。已有药理研究结果显示，肉苁蓉具有类雌激素样作用[30]，同时结合网络药理学及分子对接的分析结果，本研究对雌激素信号通路进行在体水平的初步验证研究，结果显示，肉苁蓉苯乙醇总苷升高不育症大鼠睾丸组织中 ERα 表达水平，同时降低 ERβ

表达水平，调节雌激素信号通路，发挥治疗不育症的作用。

综上，本研究采用网络药理学探讨肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的关键靶点和潜在信号通路，联合分子对接技术验证核心化合物与潜在靶点的结合力，验证了肉苁蓉苯乙醇总苷对不育症雌激素通路相关蛋白的表达水平，发现肉苁蓉苯乙醇总苷可调控雌激素通路核心靶点，间接促进精子发生。本研究为阐明肉苁蓉苯乙醇总苷治疗不育症的潜在作用机制、开发新的治疗不育症的药物提供有益的参考，今后仍需进一步的研究来深入发掘机制。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, *et al*. European Association of Urology Guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 Update on male infertility [J]. *Eur Urol*, 2021, 80(5): 603-620.
[2] Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, *et al*. Male infertility [J]. *Lancet*, 2021, 397(10271): 319-333.
[3] 张继伟, 晏斌, 郭博达. 男性不育症中西医结合多学科诊疗指南（2023 版） [J]. 中国男科学杂志, 2023, 37(2): 13-19.
[4] 翁倩倩, 赵佳琛, 金艳, 等. 经典名方中肉苁蓉的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(2): 228-235.
[5] 王启新. 肉苁蓉抗疲劳与促生殖作用的补肾阳活性筛选与机制初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
[6] Wang Q X, Dong J T, Lu W J, *et al*. Phenylethanol glycosides from *Cistanche tubulosa* improved reproductive dysfunction by regulating testicular steroids through CYP450-3β-HSD pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112500.
[7] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
[8] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
[9] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, *et al*. SwissTarget Prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): 32-38.
[10] Safran M, Dalah I, Alexander J, *et al*. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database*, 2010, 2010: baq020.
[11] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, *et al*. OMIM.org: Online mendelian inheritance in man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
[12] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, *et al*. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
[13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004(9): 1069-1072.
[14] 张石蕾, 刘佳丽, 龚福恺, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨肉苁蓉防治癌因性疲劳的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(5): 1330-1342.
[15] 李瑞燕, 赵明波, 屠鹏飞, 等. 一标多测法同时测定肉苁蓉中 5 种苯乙醇苷类成分的含量（英文） [J]. 中国药学, 2019, 28(8): 537-546.
[16] 颜昱. 中药肉苁蓉化学成分及体内成分分析 [D]. 北京: 中央民族大学, 2018.
[17] Liu C Y, Shen Y, Shen Q S, *et al*. Novel mutations in X-linked, USP26-induced asthenoteratozoospermia and male infertility [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1594.
[18] 张鹏, 高珍珍, 马晓彤, 等. 列当对肾阳虚模型大鼠血清中内分泌激素水平的影响 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(10): 2020-2025.
[19] 王启新, 陈则华, 罗琥捷, 等. 肉苁蓉不同提取部位改善肾阳虚大鼠性能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 95-101.
[20] Wang T, Chen C, Yang M, *et al*. Cistanche tubulosa ethanol extract mediates rat sex hormone levels by induction of testicular steroidgenic enzymes [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(3): 481-487.
[21] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 126.
[22] 王志, 侯强, 冉峥, 等. 毛蕊花糖苷对腺嘌呤所致不育症大鼠的影响 [J]. 中成药, 2024, 46(3): 771-779.
[23] 王莺. 松果菊苷治疗大鼠生精功能障碍的疗效和机制研究 [D]. 延边: 延边大学, 2020.
[24] Biton S, Ashkenazi A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-α feedforward signaling [J]. *Cell*, 2011, 145(1): 92-103.
[25] Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, *et al*. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 868.
[26] 阎臻, 付晓瑞, 李新敏, 等. HRAS 基因表达对宫颈癌细胞自噬及凋亡作用及机制 [J]. 青岛大学学报: 医学版, 2021, 57(2): 240-245.
[27] Rasola A. HSP90 proteins in the scenario of tumor complexity [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20521-20522.
[28] 朱芳菲, 丁晶鑫, 刘梦娇, 等. 中药肉苁蓉的雌激素作用研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2015, 31(1): 1-3.
[29] Baines H, Nwagwu M O, Furneaux E C, *et al*. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse: role of androgens [J]. *Reproduction*, 2005, 130(5): 643-654.
[30] Hess R A, Zhou Q, Nie R, *et al*. Estrogens and epididymal function [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2001, 13(4): 273-283.

[责任编辑　高源]