

· 方药研究 ·

# 基于网络药理学技术解析海马“壮阳、益精”功效的物质基础、潜在靶点与分子机制<sup>※</sup>

● 万慧琪<sup>1</sup> 李知瑾<sup>2</sup> 许光辉<sup>1,2▲</sup> 郑乐云<sup>3</sup> 林金波<sup>4</sup>

**摘要** 目的:运用网络药理研究技术探讨中药海马“壮阳、益精”功效的物质基础、潜在靶点和分子机制。方法:通过检索中国知网(CNKI)和国际性综合生物医学信息书目数据库(Medline)构建中药海马的功效成分数据库,运用网络药理学技术对药物成分靶点、疾病靶点、疾病-成分核心靶点KEGG通路、基因本体(GO)等进行关联算法分析。结果:筛选得到海马壮阳功效成分核心靶点133个,涉及39条相关信号通路;益精功效成分核心靶点7个,涉及2条信号通路;海马“壮阳、益精”功效的重要靶点显著富集在癌症发生、糖尿病、免疫、炎症相关的7条信号通路。结论:本研究从网络药理学角度初步阐释了氨基酸、脂肪酸、甾体和磷脂等成分均为中药海马“壮阳、益精”的功效物质,其作用机制可能与癌症发生、炎症、免疫与糖尿病等相关信号通路的调节有关。

**关键词** 海马;网络药理学;阳痿;弱精症;物质基础;分子机制

海马(Haima,拉丁学名:hippocampus)为脊索动物门硬骨鱼纲海龙科海马属动物,是我国传统的名贵中药材,素有“南方人参”的美誉<sup>[1]</sup>;味甘、咸,性温,归肝、肾经,具有温肾壮阳、益精种子、止咳平喘、活血通脉、散结消肿之效,主治肾阳不足所致诸证<sup>[2]</sup>。药理研究证实,海马具有性激素样作用、抗疲劳、抗氧化、提高机体免疫力、抗肿瘤、镇静安神等药理活性<sup>[3]</sup>。

近年来,随着我国海马养殖技术的日渐成熟,我国福建、广东等沿海部分地区已实现了海马的规模化养殖<sup>[4]</sup>。海马的工厂化养殖,解决了长期以来药用海马基原不清、质量难控等难点,推动了海马的进一步

开发利用。本研究针对目前海马“壮阳、益精”功效的药物应用热点<sup>[5]</sup>,采用网络药理研究方法,筛选海马的物质基础及作用靶点,明确海马发挥壮阳、益精功效的分子机制,为海马的深度开发提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 相关数据库与软件** 中国知网(<https://www.cnki.net/>);Medline数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>);Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>);STRING数据库(<https://string-db.org/>);DAVID 6.8数据库(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>);RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>);Cytoscape v3.8.0分析软件(<https://cytoscape.org/>)。

**1.2 海马主要化学成分与“壮阳、益精”功效相关疾病靶点数据集构建** 以CNKI、Medline等数据库及相关学术资料为主要数据来源<sup>[6-9]</sup>,对《中华人民共和国药典》<sup>[10]</sup>所收录的5种海马的主要化学成分及其含量进行收集、归类,取化学成分合集建立海马化学总成分集;根据化合物的含量、口服吸收利用度和靶点数

※基金项目 福建省自然科学基金面上项目(No.2019D018);厦门市科技惠民项目(No.3502Z20184053)

▲通讯作者 许光辉,男,副研究员,医学博士,硕士研究生导师。主要从事中药、天然药物生物活性与作用机制研究。E-mail:xghcxm@163.com

• 作者单位 1.福建中医药大学药学院(福建 福州 350122);2.厦门市医药研究所 厦门市天然药物研究与开发重点实验室(福建 厦门 361008);3.福建省水产研究所(福建 厦门 361012);4.厦门小嶼水产科技有限公司(福建 厦门 361100)

目等指标,组成本研究所需的海马主要功效成分集。

现代药理研究表明,海马补肾壮阳功效主要体现在改善勃起功能障碍(ED)和弱精症(AS)两个方面<sup>[11-12]</sup>。本研究通过 Gene card 数据库获取 ED 和 AS 对应靶标,构建中药海马“壮阳、益精”功效相关的疾病靶点数据集。

**1.3 海马“壮阳、益精”功效潜在靶点筛选** 利用在线软件 Venny2.1.0 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)获取海马主要功效成分集与 ED、AS 疾病靶点数据集的交集数据,并绘制相应的韦恩图。

**1.4 “药物-疾病共有靶点”相互作用分析** 应用在线 STRING 平台 (<https://string-db.org/>),分别对海马“壮阳、益精”功效潜在靶点进行相互作用关系分析。应用 Cytoscape 3.8.0 软件构建靶点蛋白交互网络图(PPI),计算相应的网络拓扑参数,以度值大于中数的节点为核心节点。

**1.5 核心靶点的基因本体(GO)与信号通路(KEGG)**

**富集分析** 将筛选的核心靶点上传至 DAVID 6.8 在线数据分析平台 (<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 和 KEGG 富集分析,以  $P < 0.01$  为显著差异筛选海马“壮阳、益精”功效潜在靶点涉及的生物过程和信号通路,分析其分子机制。

## 2 结果

**2.1 海马“壮阳、益精”功效成分筛选** 现有文献检索结果表明,5种海马共有的化学成分以氨基酸、脂肪酸、甾体和磷脂等化合物为主,其中水解氨基酸平均含量高达海马干重的 64.2%<sup>[13]</sup>,其次是脂肪酸,约占海马干重的 2.9%~4.8%,甾体类约占海马干重的 0.33%~0.78%<sup>[14]</sup>。根据成分含量、口服生物利用度(OB)、类药性(DL)及参与调节相关基因的数目(Number of related genes)等指标综合筛选,纳入氨基酸 21 种、脂肪酸 14 种、甾体类 7 种和磷脂 5 种等 4 大类化合物进行网络药理分析。见表 1。

表 1 海马主要化学成分

序号	名称	口服生物利用度	类药性	靶基因数目	序号	名称	口服生物利用度	类药性	靶基因数目
1	色氨酸	75.93	0.08	30	25	二十烷酸	16.66	0.19	159
2	苏氨酸	73.52	0.01	802	26	二十二烷酸	15.69	0.26	134
3	亮氨酸	72.92	0.01	489	27	二十二碳六烯酸	65.67	0.04	653
4	甲硫氨酸	70.87	0.01	288	28	二十碳四烯酸	45.57	0.2	390
5	异亮氨酸	59.05	0.02	66	29	二十碳五烯酸	45.16	0.21	526
6	缬氨酸	53.33	0.01	194	30	十八碳三烯酸	45.01	0.15	108
7	苯丙氨酸	41.62	0.04	231	31	十八碳二烯酸	41.9	0.14	110
8	赖氨酸	29.33	0.02	16	32	十六碳烯酸	35.78	0.1	3
9	丝氨酸	83.59	0.01	1646	33	十八碳烯酸	33.13	0.14	118
10	酪氨酸	57.55	0.05	1788	34	二十碳烯酸	30.7	0.2	18
11	组氨酸	53.18	0.03	278	35	十六碳二烯酸	-	-	83
12	甘氨酸	48.74	0	44	36	胆固醇	37.87	0.68	640
13	精氨酸	47.64	0.03	777	37	胆甾-4-烯-3-酮	37.18	0.68	51
14	鸟氨酸	47.64	0.03	113	38	谷甾-5,22-二烯-3-醇	36.91	0.75	100
15	胱氨酸	39.58	0.05	39	39	3β-羟基-胆甾-5-烯-7-酮	-	-	117
16	牛磺酸	24.37	0.01	62	40	雄甾-4-烯--3,17-二酮	-	-	91
17	丙氨酸	85.17	0.01	846	41	胆甾-5-烯-3β,7α-二醇	-	-	46
18	羟脯氨酸	83.55	0.02	63	42	胆甾醇硬脂酸酯	-	-	167
19	天冬氨酸	79.74	0.02	31	43	磷脂酰胆碱	13.54	0.13	1901
20	脯氨酸	77.57	0.01	412	44	神经鞘磷脂	0.27	0.33	1274
21	谷氨酸	60.78	0.02	114	45	溶血磷脂酰胆碱	-	-	844
22	十四烷酸	21.18	0.07	163	46	磷脂酰乙醇胺	-	-	967
23	十六烷酸	19.30	0.1	370	47	次黄嘌呤	52.29	0.04	53
24	十八烷酸	17.83	0.14	355					

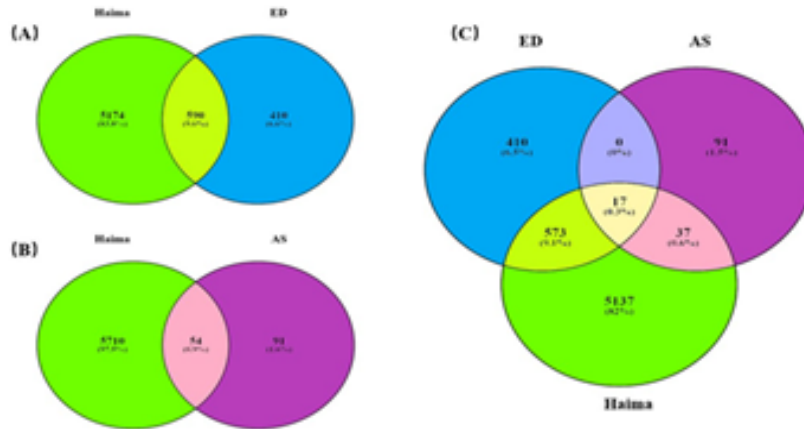
**2.2 海马“壮阳、益精”功效潜在靶点筛选** 通过检索 Gene card 数据库,获得海马中 47 种主要成分对应

5764 个相关靶点,分别与 1000 个 ED 对应靶标和 145 个 AS 对应靶点取交集,得到海马-ED 潜在靶点

(Haima-ED)590个、海马-AS潜在靶点(Haima-AS)54个。见图1。

**2.3 海马“壮阳、益精”功效靶点PPI** 分别将筛选到的海马“壮阳、益精”功效靶蛋白上传至String平台进行网络互作分析。PPI结果表明,海马“壮阳”功效PPI网络节点576个,平均度值为40.2,11567条边,中心

介数0.454,  $P < 1.0E-16$ ;以度值高于平均值、介数低于平均值为标准,筛选得到核心靶标218个。海马“益精”功效PPI网络节点54个,平均度值为3.7,100条边,中心介数0.56,  $P < 1.0E-16$ ;以度值高于平均值、介数低于平均值为标准,筛选得到核心靶标19个。见图2。



注:A:海马“壮阳”功效靶基因590个;B:海马“益精”功效靶基因54个;C:海马“壮阳、益精”功效靶基因交互情况

图1 海马主要化学成分对应靶基因与ED、AS相关基因交互情况

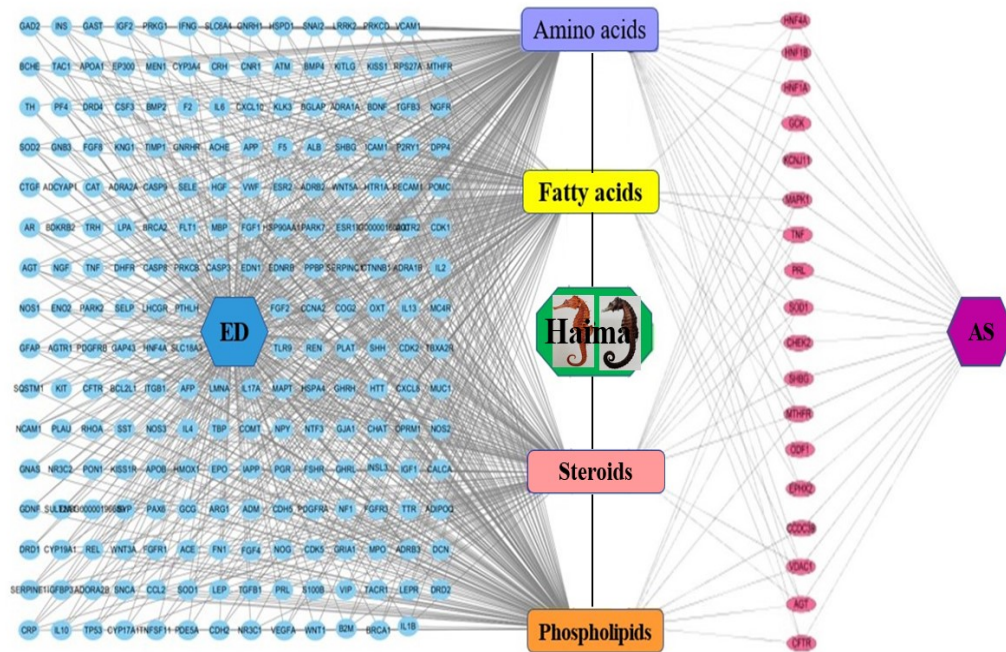


图2 海马“壮阳、益精”功效靶蛋白相互作用网络图

**2.4 海马“壮阳、益精”功效核心靶标GO富集分析结果** 海马“壮阳”功效核心药效靶点,共富集59个生物过程(BP),涉及52个细胞组分和48个分子功能(MF),见图3;海马“益精”功效核心药效靶点,共富集12个生物过程,涉及7种细胞组分和4种分子功能,

见图4。

**2.5 海马“壮阳、益精”功效核心靶标KEGG信号通路富集分析结果** 应用DAVID 6.8生物信息在线分析平台,分别对海马的218个“壮阳”功效核心靶点和54个“益精”功效核心靶点进行KEGG通路富集分析。

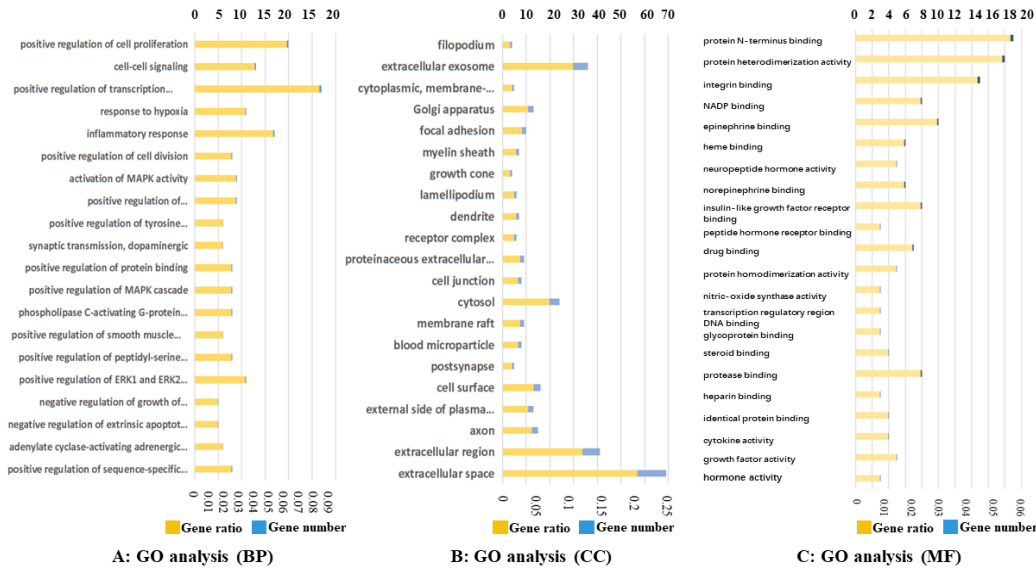


图3 海马“壮阳”功效核心靶标GO富集分析图

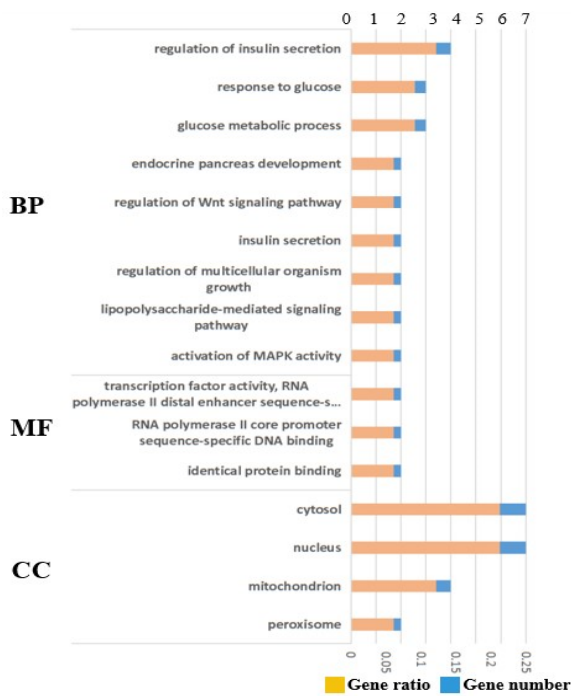


图4 海马“益精”功效核心靶标GO富集分析图

根据  $P < 0.01$  和  $FDR < 0.01$  对 88 条海马“壮阳”功效通路和 6 条海马“益精”功效的主要通路进行富集筛选, 结果表明: (1) 海马“壮阳”功效核心通路 39 条, 对应四类主要功效成分, 共有核心靶点基因 133 个, 包括氨基酸类成分对应靶标 123 个, 脂肪酸类成分对应靶标 81 个, 甾体类成分对应靶标 74 个, 磷脂等成分对应靶标 95 个。其中, 排名前 5 的信号通路对应的核心靶点最多, 分别为癌症发生信号通路 (pathways in

cancer)、磷脂酰肌醇 3 激酶信号通路 (PI3K-AKT)、神经内分泌及神经信号传递 (Neuroactive ligand-receptor interaction)、细胞因子相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction) 和 Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway)。(2) 海马“益精”功效核心通路 2 条, 对应四类主要功效成分, 共有核心靶点基因 7 个, 包括氨基酸类成分对应靶标 7 个, 脂肪酸类成分对应靶标 3 个, 甾体类成分对应靶标 6 个, 磷脂等成分对应靶标 2 个。其中, 涉及的核心通路分别为青春晚期糖尿病 (Maturity onset diabetes of the young) 和 2 型糖尿病 (Type II diabetes mellitus)。见图 5。

**2.6 海马“壮阳”“益精”功效的主要成分及参与的核心通路** 共有 35 种主要化学成分协同发挥了“壮阳”功效的药理作用, 主要成分包括 14 种氨基酸、10 种脂肪酸、7 种甾体和 4 种磷脂。其中, 有 12 种核心功效成分参与 10 个以上靶基因的调节, 分别为丝氨酸、酪氨酸、丙氨酸、精氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、二十碳四烯酸、胆固醇、磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。共有 22 种主要化学成分协同发挥了“益精”功效的药理作用, 主要成分包括 9 种氨基酸、5 种脂肪酸、4 种甾体和 4 种磷脂, 分别为亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、缬氨酸、组氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、二十碳四烯酸、十八碳二烯酸、十四烷酸、胆固醇、胆甾-4-烯-3-酮、 $3\beta$ -羟基-胆甾-5-烯-7-酮、胆甾-5-烯- $3\beta, 7\alpha$ -二醇、磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。

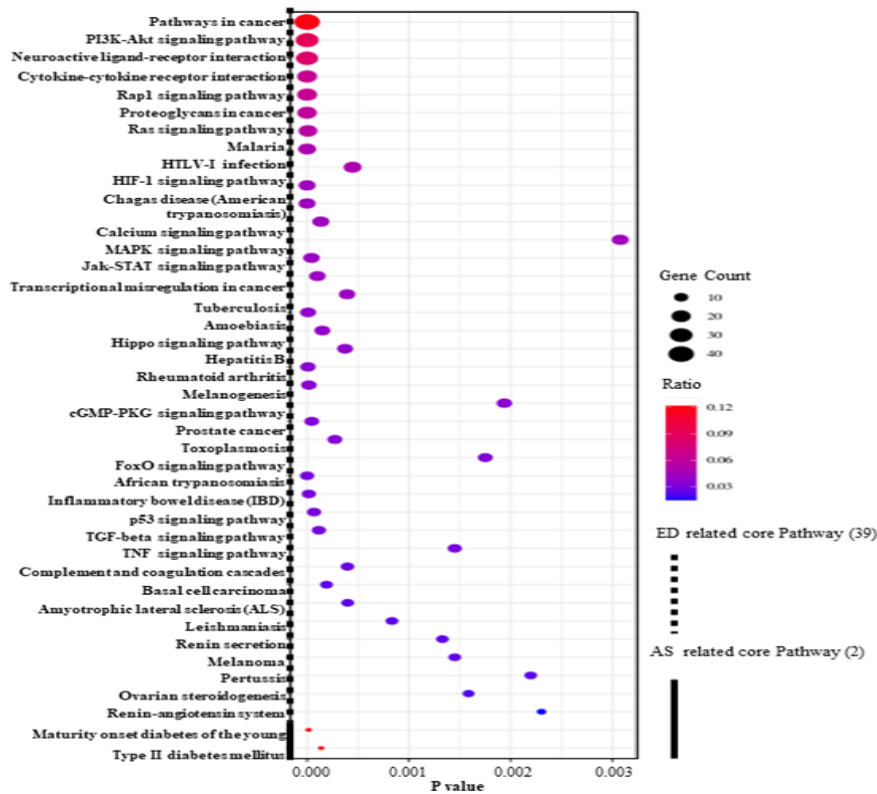


图5 海马“壮阳、益精”功效核心靶标KEGG通路图

### 3 讨论

海马在我国及东南亚各国药用历史悠久,其“补肾壮阳”的功效广泛被认可,历版《中华人民共和国药典》均收录了海马“温肾壮阳”的功能主治<sup>[15-16]</sup>。本研究对《中华人民共和国药典》2020版所收录的5种海马的47种共有主要化学成分纳入研究,主要有氨基酸、脂肪酸、甾体和磷脂等4大类成分,其中氨基酸类成分数量及含量占比最高,网络药理学研究结果表明氨基酸、脂肪酸、甾体和磷脂等4类成分均为海马“壮阳、益精”功效的物质基础。

研究表明,在治疗勃起功能障碍方面,海马粉末可显著提高大鼠的性交能力和性功能,海马壮阳胶囊也可以增强大鼠的交配能力<sup>[17-18]</sup>。在治疗弱精方面,海马乙酸乙酯提取物具有减轻良性前列腺增生症状并逆转弱精症<sup>[19]</sup>。从文献查阅中可知,在海马壮阳、益精药理作用上,主要的有效部分是海马粉末和粗提取物。本研究通过网络药理学分析发现,根据成分含量、口服生物利用度、类药性及参与调节相关基因的数目等指标综合筛选出的21种氨基酸类化合物、14种脂肪酸类化合物、7种甾体类化合物和5种磷脂类化合物具有壮阳、益精的作用,这为海马壮阳、益精药

理作用提供了有效的物质基础。

氨基酸在机体的含氮代谢、蛋白质合成和更新中占重要地位,并参与激素、酶、维生素和其他生物活性物质的合成。氨基酸的不足不仅导致精子生成障碍,而且严重影响精子的抗原活性。游离氨基酸参与活动精子的细胞代谢,是能量补充源,可以促进其活性,降低毒素的有害作用;必需氨基酸是合成核酸的重要原材料,补充必需氨基酸将改善机体合成核酸的能力,从而促进生精能力<sup>[20]</sup>。其中,酪氨酸参与调节激素水平和细胞代谢过程;精氨酸最显著的特点是产生NO以维持机体氮平衡,与动物的繁殖性能有关;天冬氨酸盐是机体氮的来源之一;赖氨酸可调节NO的合成;甘氨酸作为核酸的组成成分之一,与精子的质量和数量有关<sup>[21]</sup>。据报道,口服补充L-精氨酸可显著增加大鼠阴茎组织NO水平和NOS活性<sup>[22]</sup>。彭建平等人通过给大鼠口服高剂量L-瓜氨酸8周,显著增强了大鼠阴茎的勃起功能<sup>[23]</sup>。研究表明,严重ED患者血清L-精氨酸水平明显低于轻度ED患者<sup>[24]</sup>;体外L-精氨酸孵育可改善老龄大鼠海绵体对乙酰胆碱刺激的舒张反应<sup>[25]</sup>;口服L-精氨酸可改善男性不育患者的精子质量和勃起功能<sup>[20]</sup>。此外,氨基酸复配维生素能够提高精子质量<sup>[26-28]</sup>。本世纪初,我国研制出了主要由精

氨酸氨和硫酸锌组成的复方氨基酸, 临床试验结果显示其对 AS 有一定的疗效<sup>[29]</sup>, 进一步证实了氨基酸类成分的“壮阳、益精”功效。除氨基酸类成分外, 脂肪酸、甾体及磷脂等成分在治疗 ED 和 AS 方面也发挥了重要的作用。磷脂是动物和人体细胞膜的重要组成部分, 具有强精益肾, 提高机体免疫功能, 保肝补血等作用, 还与机体的生殖生理和激素的代谢密切相关<sup>[30]</sup>。脂肪酸和胆固醇是各种生物膜的重要组成部分, 它们的缺失会导致精子受损<sup>[31]</sup>, 其中, 二十二碳六烯酸是前列腺及精子的主要物质基础<sup>[32]</sup>。日本学者曾报道海马乙醇提取物能使雄鼠前列腺、精囊、提肛肌的重量明显增加, 具有雄激素样作用<sup>[32]</sup>, 证实了脂肪酸、甾体、磷脂等成分改善 ED 和 AS 的药理作用。

综上, 本研究对海马“壮阳、益精”的功效物质基础、潜在靶点和分子机制进行了初步解析, 并为海马的现代药理的进一步研究指明了方向。

### 参考文献

[1] 赵晓喆. 基于代谢组学技术研究不同海马商品药材化学成分差异性[D]. 太原: 山西大学, 2018.

[2] 余 晟, 吕圭源, 陈素红. 海马性味归经的相关药理研究[J]. 安徽医药, 2009, 13(5): 469-471.

[3] 陈 梦, 陈建真, 葛宇清, 等. 海马化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(19): 4089-4099.

[4] 魏祥东, 陈东红, 叶长明. 海马的人工养殖现状及前景[J]. 中山大学学报论丛, 2002, 22(3): 236-239.

[5] 许东晖, 冯 星, 梅雪婷, 等. 海马胶囊的补肾壮阳药理作用[J]. 中药材, 2000, 23(2): 98-99.

[6] 赖庆来, 梁爱武, 何妙仪, 等. 化湿败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的药理学机制探讨和网络药理学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 909-919.

[7] 宋建波, 廖 晖, 李元平. 基于网络药理学探讨黄芪治疗糖尿病肾病作用机制[J]. 中草药, 2020, 51(11): 2988-2996.

[8] 凌晓颖, 陶嘉磊, 孙 逊, 等. 基于网络药理学的莲花清瘟方抗冠状病毒的物质基础及机制探讨[J]. 中草药, 2020, 51(7): 1723-1730.

[9] 姚运秀, 贺楨翔, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在物质基础研究[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-1396.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020年版 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 305-306.

[11] 陈建设, 周 东, 孙自学, 等. 海马补肾壮阳丸治疗特发性弱精子症[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 186-188.

[12] 张金锋. 海马补肾壮阳丸对特发性弱精子症精液质量及精子功能的影响[D]. 郑州: 河南中医学院, 2014.

[13] 黄 娣, 徐永健. 不同方法提取大海马脂类及脂肪酸组成分析[J]. 中国海洋药物, 2016, 35(2): 35-40.

[14] 蒋 超, 刘金艳, 袁 媛, 等. 基于形态和 DNA 序列分析的海马类药材商品基原调查[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 4553-4561.

[15] 温琬莲. 中药海马的品种与 DNA 条形码鉴定研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.

[16] 韩松霖. 中国海马的分类、资源、利用与保护[D]. 桂林: 广西师范大学, 2013.

[17] Xu DH, Mei XT, Li BJ, et al. The pharmacological effects of Hippocampus capsule on enhancing sexual functions of rats[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 26 (11): 807-808.

[18] Lu Y, Chen WX, Hua YQ, et al. Pharmacological research on effect of Haima Zhuangyang capsule in warming kidney and strengthening Yang[J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2001, 17 (2): 99-101.

[19] Xu DH, Wang LH, Mei XT, et al. Protective effects of seahorse extracts in a rat castration and testosterone-induced benign prostatic hyperplasia model and mouse oligospermia model[J]. Environmental toxicology and Pharmacology, 2014, 37: 679-688.

[20] Kobori Y, Suzuki K, Iwahata T, et al. Improvement of seminal quality and sexual function of men with oligoasthenoteratozoospermia syndrome following supplementation with L-arginine and Pycnogenol[J]. Arch Ital Urol Androl, 2015, 87(3): 190-193.

[21] 印遇龙. 猪氨基酸营养与代谢[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 6-7.

[22] 吴晓军, 张家华, 宋 波, 等. L-arginine 及衰老对大鼠阴茎组织中 no, et-1 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(4): 307-309.

[23] 彭建平, 李京涛, 张 杰, 等. 口服 L-瓜氨酸对大鼠勃起功能的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2007, 29(3): 63.

[24] Barassi A, Corsi R, Omanelli M M, et al. Levels of L-arginine and L-citrulline in patients with erectile dysfunction of different etiology[J]. Andrology, 2017, 5(2): 256-261.

[25] Un O, Yilmaz D, Bayatli N, et al. L-arginine and tetrahydrobiopterin, but not sodium nitrite partially restored erectile dysfunction in aged rats[J]. Aging Male, 2014, 17(4): 248-255.

[26] Stanislavov R, Rohdewald P. Sperm quality in men is improved by supplementation with a combination of L-arginine, L-citrullin, roborins and Pycnogenol[J]. Minerva Urol Nefrol, 2014, 66(4): 217-223.

[27] 李厚龙. 复方玄驹胶囊与维生素 E、C 并用治疗少弱精症 102 例临床观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(2): 210-210.

[28] Yun JI, Gong SP, Song Y H, et al. Effects of combined antioxidant supplementation on human sperm motility and morphology during sperm manipulation in vitro[J]. Fertil Steril, 2013, 100(2): 373-378.

[29] 周青松, 曾凡春, 张祯雪, 等. 复方氨基酸胶囊联合维生素 E 治疗特发性弱精子症的临床研究[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(4): 343-346.

[30] 许益民, 陈建伟, 郭 戍. 海马和海龙中磷脂成分与脂肪酸的分析研究[J]. 中国海洋药物, 1994, 13(1): 14-18.

[31] 顾惠琴, 赵 昂, 周艳芬, 等. 基于代谢组学技术对雷公藤多苷和奥硝唑诱导大鼠弱精子症的病理机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(7): 721-730.

[32] 张前进. 海龙海马的化学成分和药理活性[J]. 陕西中医, 2004, 25(4): 363-364.

(收稿日期: 2020-02-07)

(本文编辑: 金冠羽)