

基于网络药理学和实验验证探讨雷公藤多苷致睾丸损伤的机制

赵丽^{1,2}, 贾妹², 吴静怡², 邵静萍², 姚晓敏^{2*}

1. 浙江万里学院, 浙江 宁波 315000

2. 浙江药科职业大学, 浙江 宁波 315000

摘要: **目的** 应用网络药理学方法对雷公藤多苷引起睾丸损伤机制进行研究, 探讨潜在靶点和作用机制, 并进行动物实验验证, 为后续该药物的合理使用提供新的研究策略。 **方法** 依托文献查询和 TCMSP、GeneCards、OMIM、Metascape 数据库挖掘雷公藤多苷中有效成分信息, 挑选主要药物活性成分及与睾丸损伤相关性靶点, 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络。使用 Metascape 数据库对核心靶点进行基因本体 (GO) 基因注释及京都基因与基因百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并进行分子对接和动物实验验证。 **结果** 共筛选出雷公藤多苷 18 个活性成分, 其中雷酚萜醇、苯代南蛇碱、雷公藤对醌 A 等为主要活性成分; 雌激素受体 1 (ESR1)、表皮生长因子受体 (EGFR) 等为核心靶点; KEGG 富集分析雷公藤多苷活性成分作用于睾丸损伤的通路主要涉及癌症信号通路、cAMP 信号通路、Ras 信号通路等; 网络药理学与分子对接结果分析显示呋喃南蛇碱与蛋白激酶 B1 (Akt1) 结合良好, 雷公藤对醌 A 与肿瘤坏死因子 (TNF) 结合良好, 苯代南蛇碱与 ESR1 结合良好; 动物实验中雷公藤多苷组 *ESR1*、*EGFR* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。 **结论** 雷公藤多苷致睾丸损伤的机制可能与核心靶点 ESR1、EGFR 等密切相关。

关键词: 雷公藤多苷; 睾丸损伤; 网络药理学; 雷酚萜醇; 苯代南蛇碱; 雷公藤对醌 A

中图分类号: R285; R287.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)08-1978-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.08.006

Mechanism of testicular injury induced by tripterygium glycosides based on network pharmacology and experimental verification

ZHAO Li^{1,2}, JIA Shu², WU Jingyi², SHAO Jingping², YAO Xiaomin²

1. Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, China

2. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of testicular injury induced by tripterygium glycosides by network pharmacology, explore the potential targets and mechanism of action, and conduct animal experiments to verify it, so as to provide a new research strategy for the rational use of the drug. **Methods** Based on literature search and TCMSP, GeneCards, OMIM, and Metascape databases, the information of active ingredients in tripterygium glycosides was mined, and the main active ingredients and targets associated with testicular injury were selected to construct the protein interaction (PPI) network. Metascape database was used to conduct gene ontology (GO) gene annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genes (KEGG) pathway enrichment analysis for core targets, and molecular docking and animal experiments were conducted. **Results** A total of 18 active components of tripterygium glycosides were screened, among which the main active components were triptonoterpenol, celabenzine, triptoquinone A. Estrogen receptor 1 (ESR1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) were the core targets. KEGG enrichment analysis of the active components of tripterygium glycosides on testicular injury mainly involved cancer signaling pathway, cAMP signaling pathway, Ras signaling pathway, etc. The results of network pharmacology and molecular coupling analysis showed that celafurine was well bound to protein kinase B1 (Akt1), triptoquinone A was well bound to tumor necrosis factor (TNF), and celabenzine was well bound to ESR1. The mRNA expression levels of *ESR1* and *EGFR* in tripterygium glycosides group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Mechanism of testicular injury induced by tripterygium glycosides may be closely related to the core targets such as ESR1 and EGFR. **Key words:** tripterygium glycosides; testicular injury; network pharmacology; triptonoterpenol; celabenzine; triptoquinone A

收稿日期: 2024-03-01

作者简介: 赵丽, 女, 硕士, 研究方向为生物与医药。E-mail: 3206422207@qq.com

*通信作者: 姚晓敏, 女, 博士, 教授, 研究方向为代谢性疾病相关药理学研究。E-mail: 630088408@qq.com

雷公藤多苷是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook F. 去皮根部提取的皂苷类有效成分^[1-2], 临床上常用于治疗类风湿性关节炎、肾病综合征、红斑狼疮等, 然而其有效成分同时也有毒性作用, 雷公藤多苷的不良反应主要造成肝、脾、肾、生殖、内分泌系统和消化系统, 以及血液系统和皮肤黏膜损害, 其中最显著的是对男女生殖系统的毒性作用^[3-5], 即造成男性的睾丸损伤和女性卵巢功能下降。睾丸损伤可能会影响生殖细胞、精子存活和受孕困难, 因其成分复杂, 目前对雷公藤多苷诱导的生殖毒性的作用机制尚不明确^[6], 且雷公藤多苷对男性睾丸损伤的相关研究较少, 急需深入开展相关损伤机制研究, 为雷公藤多苷的临床应用以及毒副作用防治提供实验依据。

网络药理学是一种基于公共数据库和公开数据, 多门学科交叉融合的新兴学科^[7]。网络药理学强调信号通路的多通道调控, 从当前“一种研究靶点, 一种药物”策略到“网络多靶点”策略的范式转变, 因此特别适合于解释中药多化学成分和分子靶点的中药机制^[8]。同时, 通过网络数据库检索和数据分析, 构建中药成分-基因-靶点的网络图, 阐明中药作用的相关成分和靶点。鉴于此, 本研究通过网络药理学进一步筛选了睾丸损伤相关的核心靶点, 借助多个在线数据库资源, 紧扣雷公藤多苷中已知化合物的生物学信息, 构建雷公藤多苷化合物靶标蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并结合相应动物实验进行验证, 为雷公藤多苷引起的睾丸损伤作用防治提供实验依据和研究策略。

1 材料

1.1 药物与试剂

雷公藤多苷片 (规格 10 mg/片, 批号 2301105B) 购于浙江得恩德制药股份有限公司; 异丙醇 (质量分数 $\geq 99.5\%$, 货号 I811925) 购自上海麦克林生化科技有限公司; 4% PFA 固定液 (货号 BL539A) 均购自北京兰杰柯科技有限公司; 苏木素染液购自北京中杉生物公司; Trizol 试剂 (货号 R401-01) 和 PCR 试剂盒 (货号 Q712-02/03) 购自南京诺唯赞生物有限公司; PCR 引物购自中国天根生物科技有限公司。

1.2 实验动物

雄性 ICR 小鼠共 40 只, 5~6 周龄, 体质量 (20 \pm 2) g, 购于浙江维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SYXK (浙) 2021-0007。实验期

间, 定期观察小鼠生长状况。所有实验动物均严格遵照浙江药科职业大学动物伦理委员会批准的动物使用规程进行操作, 批准号 ZYLL202302002。

1.3 仪器

石蜡切片机 (金华益迪医疗设备有限公司); 荧光正置显微镜-BX53 (日本奥林巴斯公司); 低温离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司); 高速离心机 (Beckman Coulter 公司); 全自动酶联检测仪 (Thermoscientific); 实时定量 PCR 仪 (罗氏诊断公司)。

2 方法

2.1 雷公藤多苷化学成分收集与活性成分筛选

以“雷公藤多苷”为检索词, 在中国知网、万方数据知识服务等平台查阅相关发表文献, 并利用中药系统药理数据库和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 检索药物的基本信息, 包括 SMILE、MOL 分子结构文件, 用以后续靶点预测时使用。

2.2 疾病基因靶点的收集

以“reproductive damage”“testicular dysgenesis”“testis diseases”“testis damage”为关键词, 通过 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库与分析平台, 检索睾丸损伤相关靶点。再以 Score 值 1 000~2 000 为限制条件, 筛选出疾病相关的靶点并将相关基因合并取交集, 记录至疾病基因数据文件夹备用。

2.3 雷公藤多苷关键靶点与疾病关键靶点的映射

利用 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 在线平台完成雷公藤多苷关键靶点与睾丸疾病关键靶点的映射交集, 以推断雷公藤多苷致睾丸损伤的潜在靶点。将经检索、筛选得到的雷公藤多苷关键靶点与生殖疾病关键靶点的信息录入到 Venny 2.1 在线平台中, 导出 png 格式图片结果备用。

2.4 潜在作用靶点的收集

将筛选得到雷公藤多苷的活性成分以 SMILE 格式逐个导入 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 平台, 将研究对象限制为“homo sapiens”, 预测并整理相关化合物的潜在作用靶点, 整理得到的靶点将用于进一步构建靶点-生物通路间的相互作用网络。

2.5 PPI 网络的构建和可视化

根据 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)

Version 10.5) 进行蛋白相互作用网络分析, 获取蛋白相互作用关系, 用以导入 Cytoscape 3.9.0 软件^[9]进行靶蛋白的相互作用网络绘制。利用 Network Analyzer 模块对网络进行分析, 以确定在雷公藤多苷给药中睾丸损伤潜在靶标之间的关系。基于化合物结构相似、生物活性相近的原则, 应用以上数据库中高相似度药物的靶点信息, 构建 PPI 网络。

2.6 基因本体 (GO) 基因注释及京都基因与基因百科全书 (KEGG) 富集分析

运用 Metascape 数据平台 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 对上述靶点蛋白进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。输入靶点信息后, 限定靶基因名称列表为 “human”, 得到相关靶点在基因功能的富集情况和相关作用通路, 收集结果并整理记录信息, 所得结果用微生信数据平台 (<https://bioinformatics.com.cn>) 以热图形式导出并加以分析。

2.7 “药物成分 - 靶点 - 通路” 网络构建

运用 Cytoscape 软件绘制 “药物成分 - 靶点 - 通路” 网络模型图, 并用其插件 Network Analyzer 进行分析。degree 值越大表明与之相连的节点数越多, 在整个网络中调控作用越大。

2.8 分子对接预测雷公藤多苷活性成分与潜在靶点结合能力

使用 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 和 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库筛选雷公藤多苷单体的结构信息, 将其三维结构保存为 pdb 格式, 用 Pymol 软件进行查看。最后根据打分进行分析, 利用 Autodock vina 对处理完成的成分和靶点进行分子对接实操, 展示对接成分与靶点之间的极性作用, 将对结果进一步可视化呈现。

2.9 动物实验验证

2.9.1 分组及给药 将 SPF 级 ICR 雄性小鼠随机分成对照组和雷公藤多苷组, 每组 20 只。雷公藤多苷组将雷公藤多苷片溶于 CMC-Na 溶液配制成雷公藤多苷混悬液 100 mg/kg ig 诱导小鼠睾丸损伤^[10-11]而对照组则给予同体积 0.5% 羧甲基纤维素钠。连续给药 4 周后, 眼球取血, 处死小鼠, 立即取睾丸, 1 个置于 4% 多聚甲醛中固定, 另 1 个立即液氮冻存用于提取 RNA。

2.9.2 睾丸病理组织学检查 用 4% 多聚甲醛溶液来固定睾丸组织, 然后制作病理切片。酒精梯度洗脱, 常规石蜡包埋, 切片 (约 5 μm 厚), 苏木精 - 伊红 (HE) 染色法, 通过光学显微镜来观察小鼠辜

丸组织病理学的改变。**HE 染色步骤:** 将病理组织切片置于乙醇中固定, 并用 PBS 洗涤; 用苏木素-伊红混合染色液滴染, 自来水洗涤; 自然晾干切片后, 用中性树脂胶封片; 显微镜观察并拍照分析。

2.9.3 PCR 法检测雌激素受体 1 (ESR1)、表皮生长因子受体 (EGFR) mRNA 表达 收集实验小鼠的辜丸组织, 加入适量液氮充分研磨小鼠辜丸组织, 并采用 Trizol 法进行提取。实验步骤为提取小鼠肝脏组织 50 mg, 加入适量液氮后立即充分研磨小鼠肝组织, 并加入 1 mL Trizol 裂解液对组织进行裂解, 在 13 000 转速下离心 10 min, 取上清液至 EP 管内于室温下放置 5 min。加入氯仿振荡混合均匀后静置 5 min, 在 2~8 °C 下, 以 13 000 r/min 离心 15 min。取上层水相置于新的 EP 管内, 然后加入异丙醇放置 10 min 后 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 再用 75% 乙醇进行洗涤晾干, 放置 -80 °C 冰箱中保存。将提取到的 RNA 逆转录为 cDNA。通过反转录试剂盒, 使 cDNA 溶液稀释 10 倍, 引物序列如表 1 所示。在荧光定量 PCR 分析仪上进行 Real Time PCR 反应, 参照说明书进行扩增。采用相对定量法计算待测基因的相对表达水平, 用 C_t 值来表示, 同时用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

基因	引物序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	正向: CATTGCTGACAGGATG
	反向: GCTGATCCACATCTGCTGG
<i>ESR1</i>	正向: ACGAGACCAATCATCAGAAT
	反向: TTGACCAACCTAGCAGATAG
<i>EGFR</i>	正向: GCCACACTTCACATCCTT
	反向: TAATGTCTGCCACCTATGC

2.9.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析、统计图表绘制, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 形式, 采用非配对 t 检验进行数据组间差异比较。

3 结果

3.1 活性成分的筛选

通过相关文献报道^[12-15]和 TCMSP 数据分析平台, 检索雷公藤多苷所含的化学成分, 共检索得到雷公藤多苷的化学成分 63 个。根据 “类药五原则”, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 40\%$ 及类药性 (DL) $\geq 0.18\%$ 为限制条件, 筛选出雷公藤多苷的有效活性成分, 这些成分可作为预测雷公藤多苷作用靶点的物质基础。再通过 Swiss ADME 网站 (<http://www>.)

swissadme.ch/), 以高胃肠道吸收和类药性的 5 项评分 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) 中至少 2 项为 “yes” 的成分作为筛选标准, 确定雷公藤多苷的潜在有效成分。其中, TCMSP 数据库中可搜索得到且符合筛选原则的有 11 种, 见表 2。另外通过在 Swiss ADME 网站再次评估, 得到 7 种成分, 见表 3。共确定雷公藤多苷的潜在有效成分 18 个, 其中雷公藤丁烯甲醚虽口服 OB 为 16.46%, 但其具有广泛的药理作用^[16], 因此保留该成分。

经过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库收集的靶点, 将获得的靶点进一步映射到 Uniprot 数据库, 并查找其标准化命名, 删除无效与重复靶点, 共获取雷公藤多苷有效活性成分作用靶点 473 个。

表 2 雷公藤多苷主要活性成分 (TCMSP)

Table 2 Main active ingredients and properties of tripterygium glycosides (TCMSP)

编号	化合物	OB/%	DL
LGT1	tripterifordin	76.13	0.49
LGT2	triptonoterpenol	48.84	0.38
LGT4	triptonoditerpenic acid	42.56	0.39
LGT5	triptophenolide	48.50	0.44
LGT6	triptinin B	34.73	0.32
LGT7	triptonoterpene methyl ether	16.46	0.34
LGT8	celafurine	72.94	0.44
LGT9	celabenzine	101.88	0.49
LGT10	celacinnine	28.98	0.59
LGT13	triptonide	68.45	0.68
LGT17	triptonolide	49.51	0.49

表 3 雷公藤多苷主要活性成分 (SWISS ADME)

Table 3 Main active ingredients and properties of tripterygium glycosides (SWISS ADME)

标记	化合物	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	生物利用度评分
LGT3	neotripterifordin	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
LGT11	tripterinin	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
LGT12	triptoquinone A	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.85
LGT14	triptoquinone H	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55
LGT15	triptohairic acid	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.85
LGT16	triptobenzene H	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.85
LGT18	triptobenzene A	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	0.55

3.2 雷公藤多苷成分与疾病相关靶点统计

通过 GeneCards 数据库与 OMIM 数据库检索统计并得到删除重复基因后共获取相关基因 14 771 个与睾丸损伤相关的基因, 通过 Venny 2.1.0 制作韦恩图, 见图 1, 统计交集相关靶点 441 个。

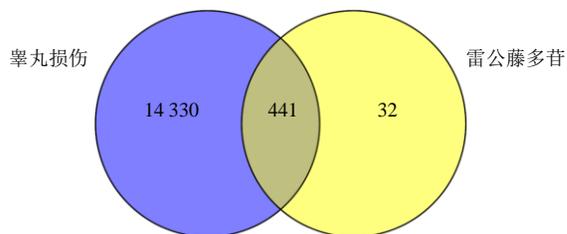


图 1 雷公藤多苷致睾丸损伤相关靶点交集

Fig. 1 Intersection of testicular injury related targets caused by tripterygium glycosides

3.3 网络构建

3.3.1 构建“药物-成分-靶点”网络 使用 Cytoscape 3.9.0 软件将筛选得到活性成分和靶点建立模型, 筛选后共 88 个节点, 1 640 条边。利用“药

物-成分-靶点”的 type 文件和属性文件, 基于网络度 (degree) 和介数 (betweenness) 设置网络图节点的大小及颜色, 以边连接活性成分与靶点以及靶点与通路间的作用关系, 进行相互作用网络的绘制, 见图 2。最终使用工具筛选 degree 值排名前 5 位的成分: LGT2 (triptonoterpenol)、LGT9 (celabenzine)、LGT12 (triptoquinone A) LGT8 (celafurine)、LGT1 (tripterifordin), degree 值见表 4。

3.3.2 PPI 网络构建 利用 STRING 数据库对雷公藤多苷引起睾丸损伤的相关靶点进行 PPI 网络可视化构建, 以挖掘雷公藤多苷引起睾丸损伤靶点相互作用。将从 STRING 数据库得到的蛋白相互作用结果导入 Cytoscape, 使用 Analyze Network 工具计算节点的 degree 值, 根据 degree 值大小显示节点大小, 见图 3。图中 degree 值前 5 位的节点依次为丝氨酸/苏氨酸激酶 (Akt1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、活性表皮生长因子受体 (EGFR), 见表 5。

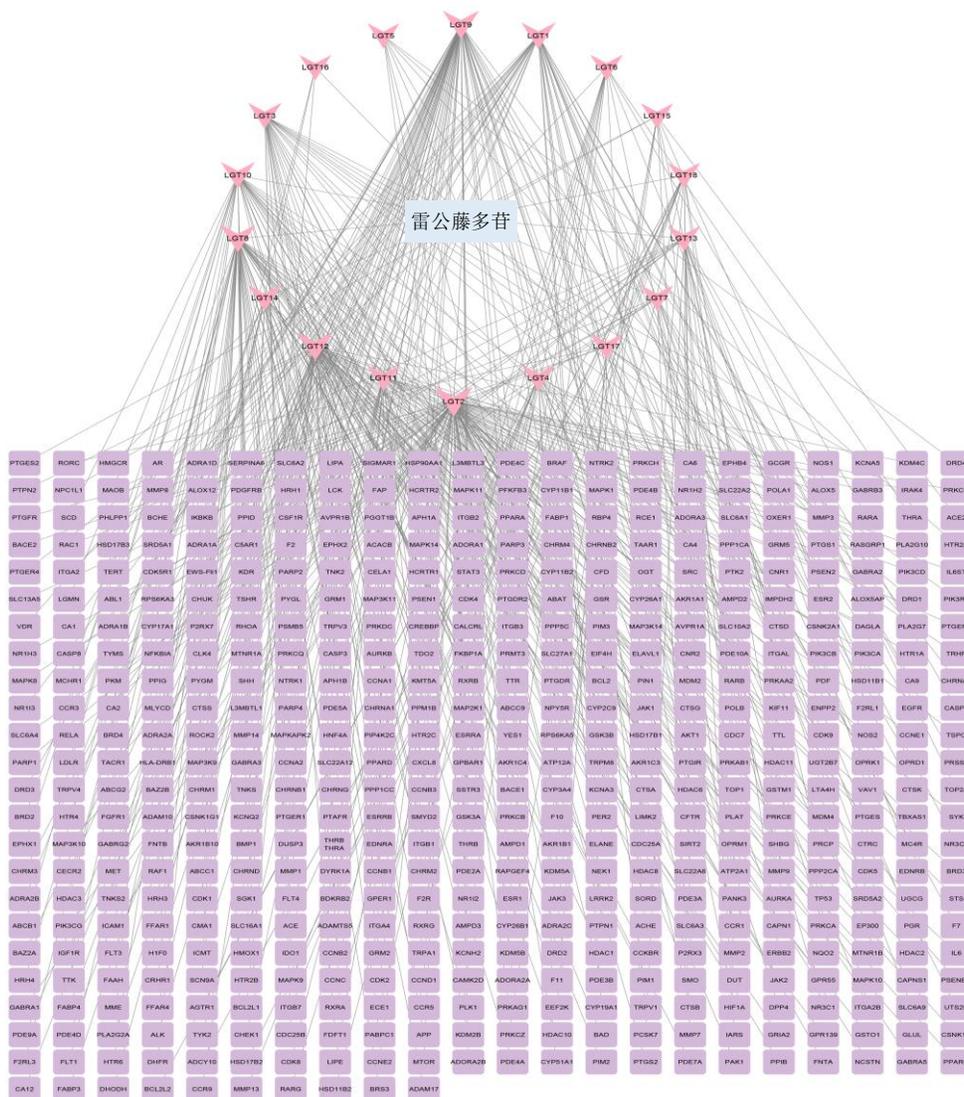


图 2 “药物 - 成分 - 靶点” 的相互作用网络图

Fig. 2 Diagram of the “drug - component - target” interaction network

表 4 雷公藤多苷中筛选出的 5 种关键成分

Table 4 Five key components of tripterygium glycosides

中文名称	英文名称	编号	degree 值
雷酚萜醇	triptonoterpenol	LGT2	94
苯代南蛇碱	celabenzine	LGT9	66
雷公藤对醌 A	triptroquinone A	LGT12	61
呋喃南蛇碱	celafurine	LGT8	55
雷公藤福定	tripterifordin	LGT1	36

3.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

GO 分为 3 部分：分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 和细胞组分 (CC)。通过应用 Metascape 平台对靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并根据 P 值大

小依次排序, 保留优选结果, 最终以气泡图的形式展示, 见图 4。对预测的 441 个靶点进行通路富集分析, 根据 $P < 0.001$ 进行筛选, 对前 10 条通路进行可视化处理, 见图 5。

3.5 “药物成分 - 靶点 - 通路” 网络

使用 Cytoscape 3.9.0 软件将筛选得到的活性成分和靶点建立模型, 基于网络度 (degree) 和介数 (betweenness) 设置网络图节点的大小及颜色, 以边连接活性成分与靶点以及靶点与通路间的作用关系, 绘制相互作用网络, 见图 6。

3.6 分子对接验证

利用 Autodock 对关键成分和关键靶点进行对接, 对接结合能数据如图 7 所示。分子对接结合能

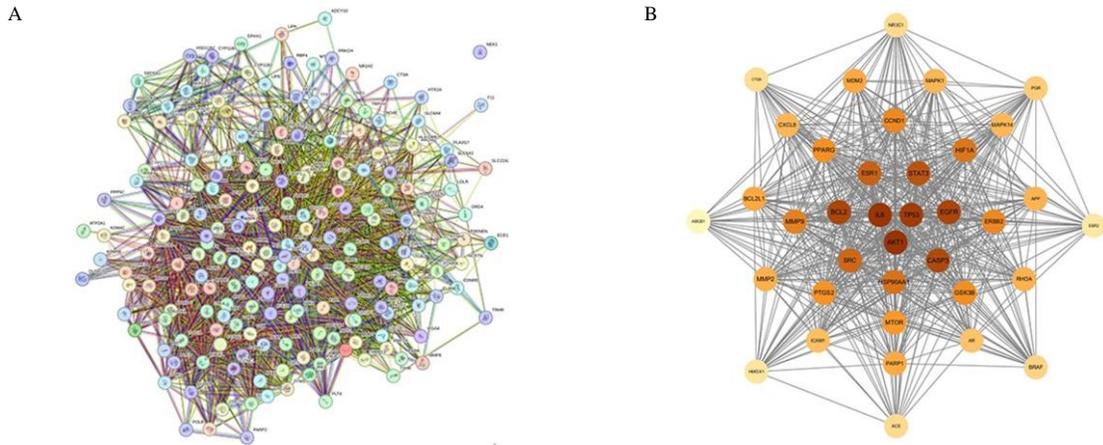


图 3 STRING 数据库 (A) 导出和 Cytoscape (B) 完成的雷公藤多苷致睾丸损伤潜在靶点的 PPI 可视化网络
 Fig. 3 PPI visualization network of potential targets of tripterygium polyglycosides induced testicular injury by STRING database (A) and Cytoscape (B)

表 5 degree 值前 5 位的潜在靶点

Table 5 Degree value of top 5 potential targets

靶点	degree
Akt	190
TNF	180
SRC	174
CASP3	117
EGFR	90

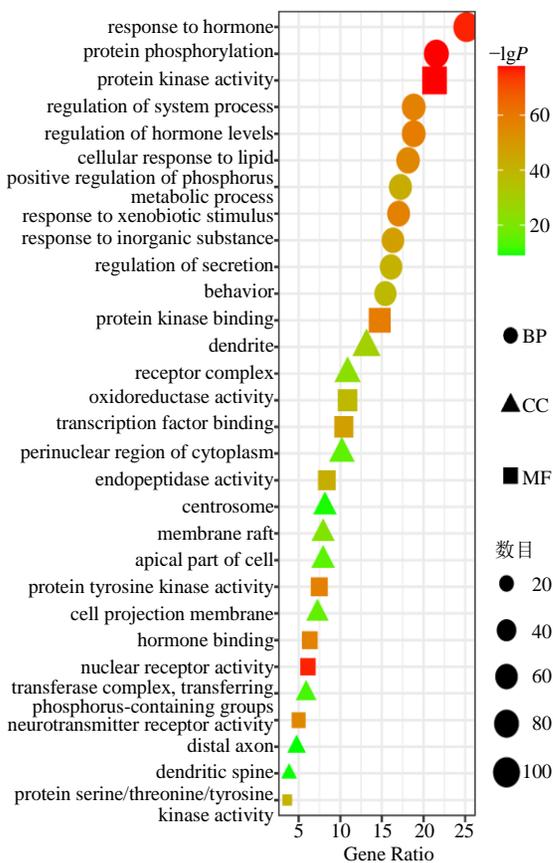


图 4 GO 富集分析结果

Fig. 4 Results of GO enrichment analysis

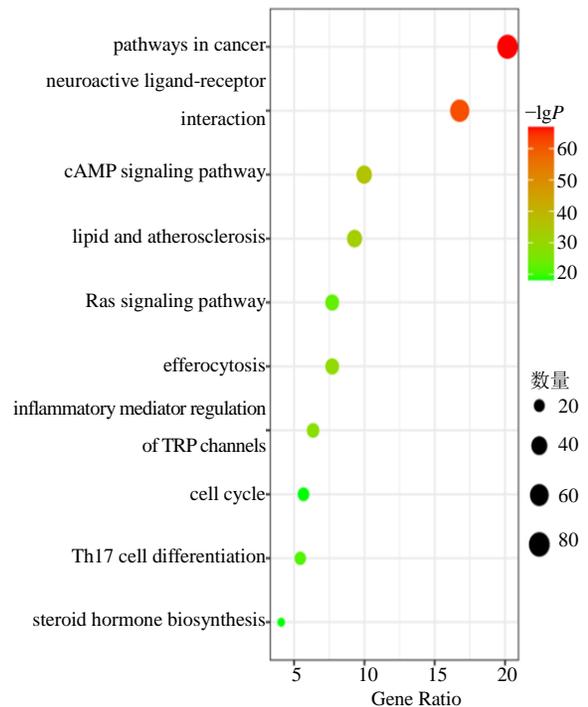


图 5 KEGG 富集分析结果

Fig. 5 Results of KEGG enrichment analysis

均 $< -3 \text{ kcal/mol}$ ($1 \text{ cal} = 4.2 \text{ J}$), 表示所有对接的化合物与靶点之间存在相互作用, 活性物质与蛋白质结合的构象越稳定能量越低, 发生的作用可能性越大, 对接结果越可靠。而结合能越小表明相互作用越强, 结合越紧密。利用 Pymol 对结果进行可视化, 展示对接成分与靶点之间的极性作用。本研究选择结合能排名前 3 位进行展示, 见图 8, 在图中可以看出活性成分与蛋白中的氨基酸残基之间存在氢键相互作用。分子对接结果表明, 雷公藤多苷致睾丸

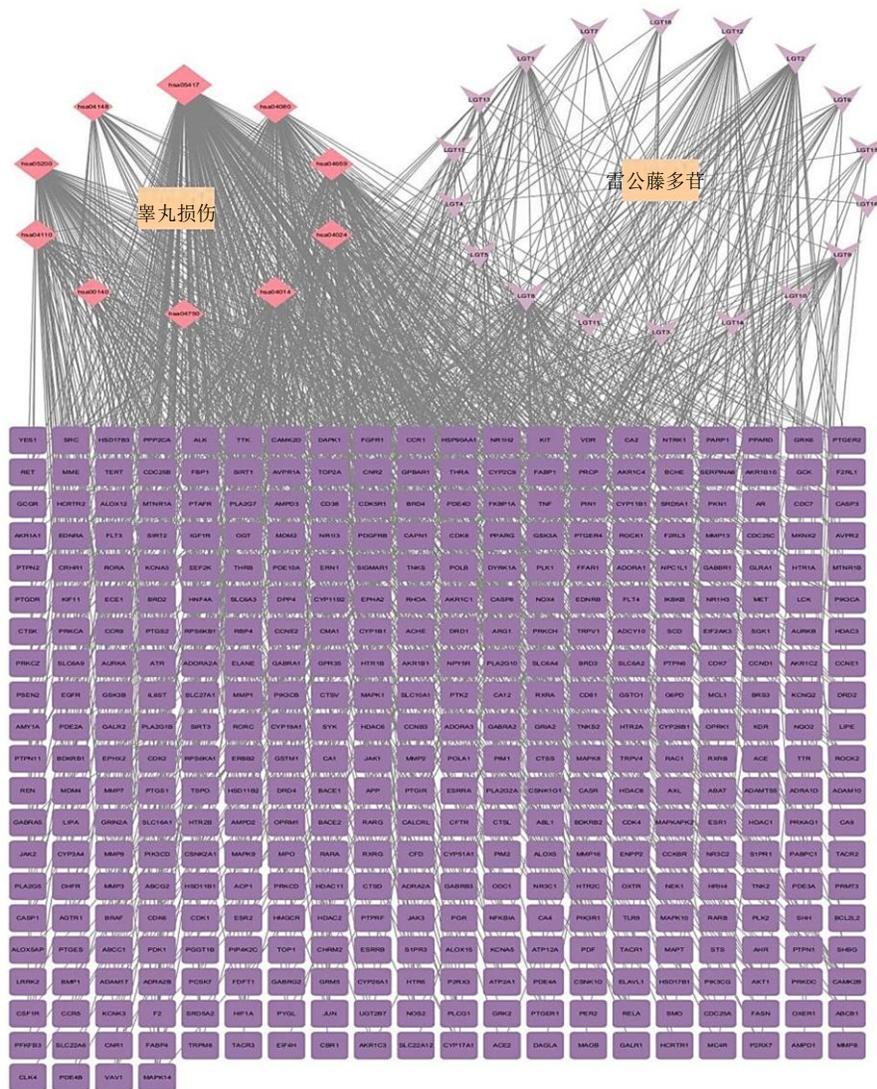


图 6 “药物成分 - 靶点 - 通路”网络图

Fig. 6 “Drug component - target - pathway” network diagram



图 7 雷公藤多苷致引起睾丸损伤的关键成分与关键靶点对接结合能

Fig. 7 Docking binding energy between key components of tripterygium glycosides causing testicular injury and key targets

损伤相关重要活性成分与蛋白质靶点之间具有较强结合性，预测结果可信。

3.7 雷公藤多苷对小鼠睾丸组织病理学的影响

如图 9 所示，对照组大鼠睾丸组织结构清楚，生精小管内各级生精细胞排列规则，基底膜完整，基底面至腔面可见不同发育阶段的生精细胞，附睾管腔充盈，可见大量的线性精子。而雷公藤多苷组部分睾丸组织生精小管萎缩，生精细胞排列紊乱，可见空泡化，各级生精细胞不同程度的减少，附睾管内线性精子显著减少。

3.8 雷公藤多苷对小鼠睾丸组织 *ESR1*、*EGFR* 基因表达的影响

选取核心靶点基因进行荧光定量 PCR 实验验证。如图 10 所示，与对照组比较，雷公藤多苷给药

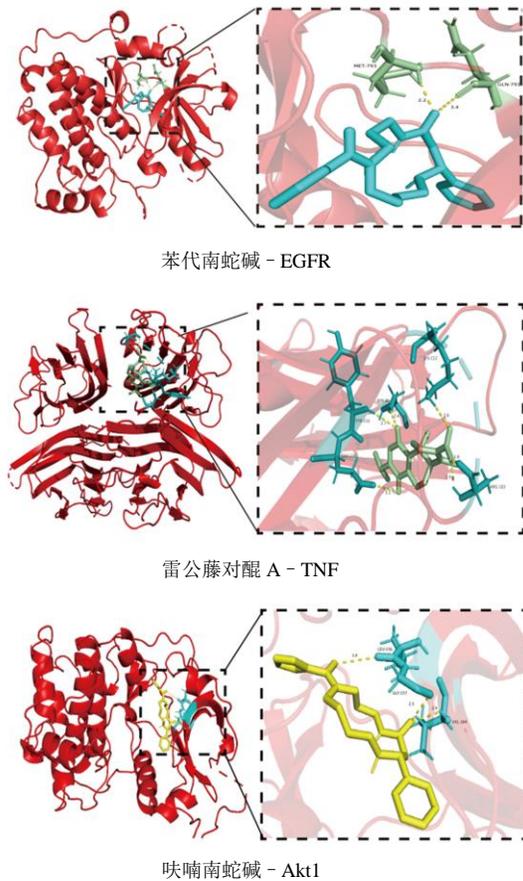
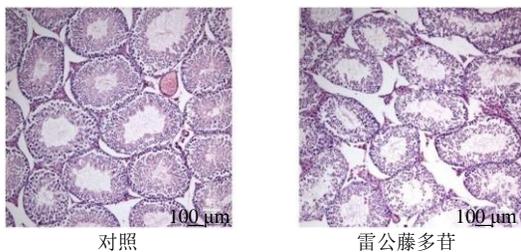


图 8 分子对接可视化结果

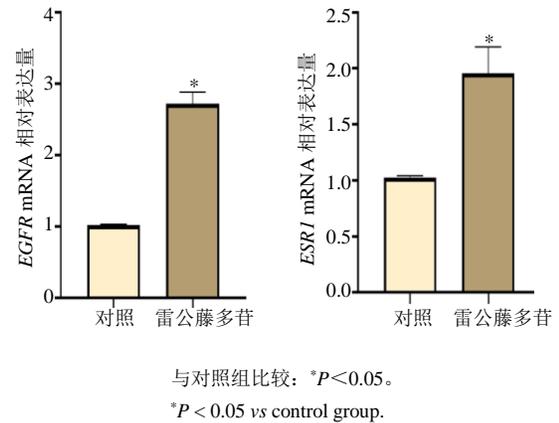
Fig. 8 Molecular docking visualization results

图 9 雷公藤多苷致小鼠睾丸组织病理学改变 (HE 染色, $\times 100$)Fig. 9 Histopathological changes of testis in mice induced by tripterygium glycosides (HE staining, $\times 100$)

组睾丸组织 *ESR1*、*EGFR* mRNA 表达量显著上调 ($P < 0.05$)。

4 讨论

雷公藤多苷的生殖毒性已成为限制其临床应用的一个重要因素, 如少精子症、弱精子症等睾丸疾病, 导致男性睾丸损伤、生育能力下降, 甚至不育。因雷公藤多苷致睾丸损伤的作用机制尚不明确, 本研究从网络药理学的角度出发, 结合分子对接和动

图 10 小鼠睾丸组织中 *ESR1*、*EGFR* mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Fig. 10 mRNA expression of *ESR1* and *EGFR* in mouse testis tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

物实验验证, 研究其可能的作用机制。研究结果显示, 雷公藤多苷 100 mg/kg 连续给药 4 周可引起小鼠睾丸质量减小, 睾丸组织形态出现生精小管萎缩, 生精细胞排列紊乱现象, 与文献报道基本一致^[17]。

本研究通过综合分析雷公藤多苷的药物靶点与睾丸损伤相关疾病靶点的筛选结果, 结合药物与疾病靶点的 PPI 网络、分子对接, 发现雷酚萜醇、苯代南蛇碱、雷公藤对醌 A 等成分 degree 值排名较高, 预测这些成分可能为雷公藤多苷致生殖损伤疾病的关键核心成分。其中雷公藤对醌 A 具有抗氧化和抗炎特性, 已被证明可以通过内毒素和白细胞介素-1 β 抑制一氧化氮合酶诱导, 有效防止血管平滑肌松弛^[18]。PPI 网络显示, 雷公藤多苷与睾丸损伤靶点涉及 Akt1、SRC、CASP3、TNF、EGFR、ESR1 等。以往研究通过蛋白质组学分析可知, 雷公藤多苷可以显著下调 p-PI3K 和 p-Akt 的表达, 表明雷公藤多苷可能通过影响 PI3K/Akt 信号通路产生生殖毒性^[19]; 雷公藤苷片通过升高血清中 TNF- α 表达水平, 进而诱导促精功能障碍^[20-21]; 临床研究发现, SRC 基因与男性不育症存在一定的相关性。SRC 是一个非受体酪氨酸激酶的大家族, 其过表达发生在各种癌症中, 特别是前列腺癌^[22-23]; 雷公藤通过上调睾丸细胞中 *Caspase-3* mRNA 和蛋白水平诱导精子细胞凋亡, 且显著降低精子存活率^[24]; 此外, 以往研究显示, EGFR 与精子获能有关^[25]。

本研究通过 KEGG 信号通路富集分析, 发现雷公藤多苷致睾丸损伤的关键信号通路可能与癌症通路 (pathways in cancer)、神经活性配体受体相互作用

用 (neuroactive ligand-receptor interaction)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)、TRP 通道的炎症介质调节 (inflammatory mediator regulation of TRP channels)、AMPK 信号转导通路 (AMPK signaling pathway) 等有关。其中, 在中药增效减毒的定量分析报道中, cAMP 信号通路被认为可能是造成雷公藤毒性的关键机制^[26]; 以往研究证明, 雷公藤及其成分具有抗糖尿病并发症的潜力, 可能与 AMPK 介导通路有关^[27]。

分子对接结果显示, 雷公藤多苷成分中吡喃南蛇碱与睾丸损伤相关疾病的核心靶点结合度最佳。本研究利用动物实验进行相关验证, 为进一步验证雷公藤多苷引起睾丸损伤与筛选出来的核心靶点间的关联性。雷公藤多苷组 *ESR1* 和 *EGFR* mRNA 表达较对照组均呈现明显上升趋势。*EGFR* 为 PI3K/Akt 信号通路的关键靶点, 在正常的组织发育和功能中发挥着重要的作用。*ESR1* 基因是编码 ER 的基因, 在大约 70% 的乳腺癌中表达^[28]。*ESR1* 异常通常包括基因的扩增、重排及突变等几种形式, 经常发生在上皮性癌症中, 提示 *ESR1* 可能参与癌症信号通路。因此, 雷公藤多苷给药所致睾丸损伤与 *ESR1* 和 *EGFR* 基因表达密切相关。

综上所述, 雷公藤多苷是通过癌症通路、神经活性配体受体相互作用、cAMP 信号通路、TRP 通道的炎症介质调节、Ras 信号转导通路等信号通路诱导男性睾丸损伤, 主要涉及雷酚萸醇、苯代南蛇碱、雷公藤对醌 A 等成分, 其损伤机制主要与 *ESR1*、*EGFR* 等核心靶点密切相关。雷公藤多苷潜在的睾丸损伤机制靶点的揭示, 为雷公藤多苷临床应用以及其损伤治疗药物的研发提供重要的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 姜淼, 张海波, 丁樱. 雷公藤多苷药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(3): 59-63.
- [2] 杨冬梅, 刘俊. 雷公藤多苷临床应用及不良反应的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(20): 2185-2190.
- [3] 陈文娟, 吴晶金. 雷公藤毒性及中药配伍减毒研究进展 [J]. 中成药, 2023, 45(2): 499-503.
- [4] Song C Y, Xu Y G, Lu Y Q. Use of *Tripterygium wilfordii* Hook F for immune-mediated inflammatory diseases: progress and future prospects [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21(4): 280-290.
- [5] 宋晓笛, 高畅. 雷公藤的药理作用、毒性及减毒策略研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2023, 43(10): 987-992.
- [6] 崔东晓, 乐世俊, 徐顶巧, 等. 雷公藤多苷及其主要活性成分抑制类风湿性关节炎的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6913-6921.
- [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] 赵少磊, 原震, 朱艳茹, 等. 基于网络药理学和分子对接探究地骨皮调血脂的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1487-1497.
- [9] Otasek D, Morris J H, Boucas J, et al. Cytoscape Automation: Empowering workflow-based network analysis [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [10] Chen M J, Ni Y, Duan H Q, et al. Mass spectrometry-based metabolic profiling of rat urine associated with general toxicity induced by the multiglycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. F [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(2): 288-294.
- [11] Qin Z Y, Zhang G Y, Jiang S Q, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics to reveal ferroptosis is involved in *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablet-induced testicular injury [J]. *J Ethnopharmacology*, 2023, 304: 116055.
- [12] 袁薪蕙, 王保和, 杜犀. 雷公藤多苷片治疗肾病综合征作用机制的网络药理学研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3209-3214.
- [13] 李明炀, 侯继芹, 韦丹丹, 等. HPLC-QTOF-MS 法鉴别雷公藤多苷工艺残渣中的化学成分 [J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(6): 689-695.
- [14] 郭建龙, 刘利民, 江振洲, 等. 原料雷公藤多苷的化学成分研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(4): 41-44.
- [15] 章欣怡, 辛贵忠, 刘建群, 等. 基于 UPLC-QTOF/MS 技术鉴定雷公藤多苷片中的化学成分 [J]. 中医药学报, 2020, 48(9): 12-20.
- [16] Zhao J Q, Zhang F L, Xiao X L, et al. *Tripterygium hypoglaucom* (Lévl.) Hutch and its main bioactive components: Recent advances in pharmacological activity, pharmacokinetics and potential toxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 715359.
- [17] 代彦林, 丁樱, 韩姗姗, 等. 双补丸干预雷公藤多苷致生殖损伤的作用及代谢组学分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(4): 467-475.
- [18] Xu Q Y, Zhang X Z, Ge S Q, et al. Triptoquinone A and B exercise a therapeutic effect in systemic lupus erythematosus by regulating NLRC3 [J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15395.
- [19] Dai Y L, Sun L H, Han S S, et al. Proteomic study on the reproductive toxicity of tripterygium glycosides in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 888968.

- [20] Xiao S X, Li S J, Situ Y L, *et al.* Exploring the mechanism of *Tripterygium wilfordii* against cancer using network pharmacology and molecular docking [J]. *World J Trad Chin Med*, 2022, 8(3): 417-425.
- [21] Zhang L, Jiang S Q, Guan Z H, *et al.* Effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extracts on improving the efficacy and reducing the toxicity of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116782.
- [22] Ashrafizadeh M, Paskeh M D A, Mirzaei S, *et al.* Targeting autophagy in prostate cancer: Preclinical and clinical evidence for therapeutic response [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 105.
- [23] Lu Y N, Dong B J, Xu F, *et al.* CXCL1-LCN2 paracrine axis promotes progression of prostate cancer via the Src activation and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 118.
- [24] Lin X Y, Li Q R, Li H Y, *et al.* Jujing Zhuyu decoction inhibits apoptosis in rats with asthenozoospermia by regulating the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Andrologia*, 2022, 54(11): e14632.
- [25] Michailov Y, Ickowicz D, Breitbart H. Zn²⁺-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation [J]. *Dev Biol*, 2014, 396(2): 246-255.
- [26] Zhang X Y, Wang K X, Dai H, *et al.* Quantification of promoting efficiency and reducing toxicity of traditional Chinese medicine: A case study of the combination of *Tripterygium wilfordii* hook. f. and *Lysimachia christinae* hance in the treatment of lung cancer [J]. *Front Pharm*, 2022, 13: 1018273.
- [27] Chauhan S, Singh A P, Rana A C, *et al.* Natural activators of AMPK signaling: Potential role in the management of type-2 diabetes [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2022, 22(1): 47-59.
- [28] 孔启超, 王伏生. 晚期乳腺癌 ESR1 基因突变患者内分泌治疗相关研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(1): 189-193.

[责任编辑 高源]