

基于系统药理学的和颜®坤泰胶囊发挥抗氧化作用的机制及其实验验证

陈银梅, 朱启洪, 高 强

六盘水市妇幼保健院, 贵州 六盘水 553001

摘要: **目的** 探讨并验证中药和颜®坤泰胶囊(HKC)发挥抗氧化作用的潜在机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)探索 HKC 中 21 种成分发挥作用的靶基因, 再利用数据库(DAVID)对这些靶基因进行基因本体(GO)富集和京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路分析; 通过体外构建 H₂O₂ 诱导的 MII 卵母细胞氧化应激模型对分析结果进行验证。**结果** HKC 的 21 个成分共对应 151 个靶基因, GO 富集结果主要集中在线粒体功能、超氧化物歧化酶以及能量代谢途径, 而 KEGG 结果富集在 PI3K/AKT、ErbB1、mTOR 等信号通路。体外实验结果证实氧化应激的 MII 卵母细胞中, HKC 通过改善线粒体功能, 增加 ATP 的产生, 同时也减少线粒体膜电势的降低发挥抗氧化作用。**结论** HKC 通过改善线粒体功能发挥抗氧化作用。

关键词: 坤泰胶囊; 生信分析; 氧化应激; 体外实验; 线粒体功能; 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)17-4506-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.019

Mechanism and experimental verification of antioxidant action of Heyan Kuntai Capsule based on systematic pharmacology

CHEN Yin-mei, ZHU Qi-hong, GAO Qiang

Liupanshui Municipal Maternity and Infant Hospital of Guizhou, Liupanshui 553001, China

Abstract: Objectives To explore and verify the potential antioxidation mechanism of traditional Chinese medicine Heyan Kuntai Capsule (HKC). **Methods** Gene targets of 21 ingredients of HKC were searched for through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) database and analysis platform, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis with Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tools. Further, the anti-oxidative function of HKC was validated in an *in vitro* H₂O₂-induced oxidative stress model in MII oocytes. **Results** A total of 151 genes were obtained as targets to 21 components of HKC, whose GO were further significantly enriched in mitochondrion, superoxide dismutase activity and energy pathways, while KEGG showed the enrichment in PI3K/AKT, mTOR and ErbB1 signaling pathways. Afterwards, it was confirmed that HKC increased ATP production in H₂O₂-treated MII oocytes by improving mitochondrial function and reduced the dissipation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) to exert the antioxidation effect. **Conclusions** HKC exerts anti-oxidative effect by improving mitochondrial function.

Key Words: Heyan Kuntai Capsule; bioinformatics analysis; oxidative stress; *in vitro* experiment; mitochondrial function; signaling pathways

作为一种传统中成药, 和颜®坤泰胶囊(Heyan Kuntai Capsule, HKC)在围绝经期综合征、女性不孕、子宫内膜异位症以及卵巢早衰等妇科疾病领域的应用已经超过 20 年^[1-3]。尽管 HKC 的临床疗效已经较为明确, 但其发挥作用的机制尚不清晰。由于中药中含有多种成分, 传统的药物研究模式难以阐明其分子机制, 阻碍了中医药在世界范围内的广泛

认可, 系统药理学的出现大大改善了这一现状。系统药理学是一门多学科融合科学, 主要基于计算机技术及大量实验结果构建数据库, 再利用数据库将中药、化学成分及可能靶标相结合, 用于研究中药活性物质及组合、识别药效成分的靶点、药效物质和疾病关系的理论和方法, 从而建立基于系统水平的中药药效学, 为中药发挥作用的机制研究提供

收稿日期: 2020-05-07

作者简介: 陈银梅 (1977—), 女, 副主任药师, 主要从事医院药学研究。E-mail: cymabcd@126.com

新思路。中药系统药理学 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP) 是中药研究常用的数据库之一, 通过对各种中药材和中草药的系统分析, 获得药物、靶点和疾病之间的关系。

此前已有研究采用高效液相色谱-电喷雾电离-质谱/质谱 (HPLC-ESI-MS/MS) 分析方法, 从 HKC 中鉴定出 21 种主要成分^[4]。本研究采用生物信息学分析和体外实验验证相结合的方法, 借助中药系统药理平台^[5-8], 构建 HKC 中 21 种主要成分对应的靶基因集, 再利用 DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 在线工具对靶基因进行 GO (Gene Ontology) 分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 信号通路分析^[9-10], 最后通过体外实验对生信分析结果进行验证, 为下一步的临床研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验中所用孕马血清促性腺激素、人体绒毛膜促性腺激素、ATP 检测试剂盒、培养基等试剂材料购置于美国 Sigma 公司; JC-1 检测试剂盒购置于上海翊圣生物科技有限公司; 研究中使用的有 TCMSP 数据库和 DAVID 在线数据库。

1.2 方法

1.2.1 化合物-靶基因聚类分析 利用 TCMSP 数据库将 21 种已鉴定出的化合物成分输入并得到化合物-基因靶点的聚类结果。

1.2.2 功能富集分析 利用 DAVID 在线工具对聚类结果进行 GO 和 KEGG 富集分析, GO 包括生物学过程分析、分子功能分析和细胞组分分析, KEGG 主要包括信号通路分析。 $P < 0.05$ 为显著性结果。

1.2.3 卵母细胞的收集、培养及处理 为诱发促排卵并获取卵母细胞, 3 周龄的 BALB/c 雌性小鼠 ip 孕马血清促性腺激素 (10 IU), 48 h 后, 再 ip 人体绒毛膜促性腺激素 (hCG, 10 IU), 动物于 hCG 注射后 12~16 h 处死。从小鼠离体输卵管壶腹部获取卵丘-卵母细胞复合体, 用移液管轻柔冲洗, 去除复合体的间质组织, 收集卵母细胞培养于含有 14 mmol/L HEPES 和 300 IU 透明质酸酶的钾优化培养基 (KSOM) 中。MII 卵母细胞在 KSOM 培养基中进一步生长, 并于 37 °C、5% CO₂ 的条件中培养。先对细胞进行 HKC (质量浓度为 10、20、50、100 μg/mL) 或 *N*-乙酰半胱氨酸 (NAC) 预处理 1 h, 未经预处理的细胞作为阳性对照组, 再将前述细胞

与 H₂O₂ (100 μmol/L) 孵育 30 min 以对细胞进行氧化损伤。

1.2.4 ATP 含量分析 按照说明使用 ATP 检测试剂盒 (Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit) 对细胞内的 ATP 含量进行测定^[11]。收集“1.2.3”项中的 MII 卵母细胞并分散于 200 μL 超纯水中, 取 50 μL 细胞液并加入 100 μL 预冷的 ATP-releasing 试剂, 置于冰上 5 min, 再加入 100 μL 的 ATP 测定混合液 (使用缓冲液进行 1:25 的稀释), 混匀, 室温下避光反应 5 min, 再使用高灵敏的发光计 (Turner Bio systems Luminometer Model TD-20/20, Turner Bio systems, Sunnyvale, CA, USA) 对样品的生物发光进行测定。样品中的 ATP 含量由 11 个 ATP 梯度浓度 (5 fmol/L 到 5 pmol/L) 生成的标准曲线计算得到。

1.2.5 线粒体膜电势测定 使用 JC-1 检测试剂盒对线粒体膜电势进行测定。MII 卵母细胞体外培养处理后, 将 JC-1 染料加入培养基中。在 529 nm (绿色) 和 590 nm (红色) 波长下观察荧光发射强度。使用 Image-J 软件计算红/绿荧光强度比。

1.2.6 统计学分析 本研究中所有实验和定量数据均至少重复 3 次。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 与 Dunnett's 检验, $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化合物-靶基因聚类结果

为了确认 HKC 潜在的作用靶点, 利用 TCMSP 数据库将 21 种已鉴定出的成分输入并得到化合物-基因靶点的聚类结果, 共得到 HKC 中 21 个成分对应的 151 个靶基因。利用 DAVID 在线数据库, 对化合物对应的靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, GO 结果包括生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecule function, MF) 分析, 采用超几何检验进行分析, 筛选出 $P < 0.05$ 的显著结果 (图 1)。同时, 本实验也对聚类结果进行 KEGG 通路分析, 并列出具有显著差异的排名前 20 的信号通路, 结果显示靶基因显著富集在 PI3K-AKT、ErbB1、mTOR 等信号通路上 (图 2)。生物信息学分析结果为阐明 HKC 发挥作用的细胞基础及分子机制提供线索, 特别是凸显出对线粒体功能的影响, 也为下一步的机制验证提供了思路。

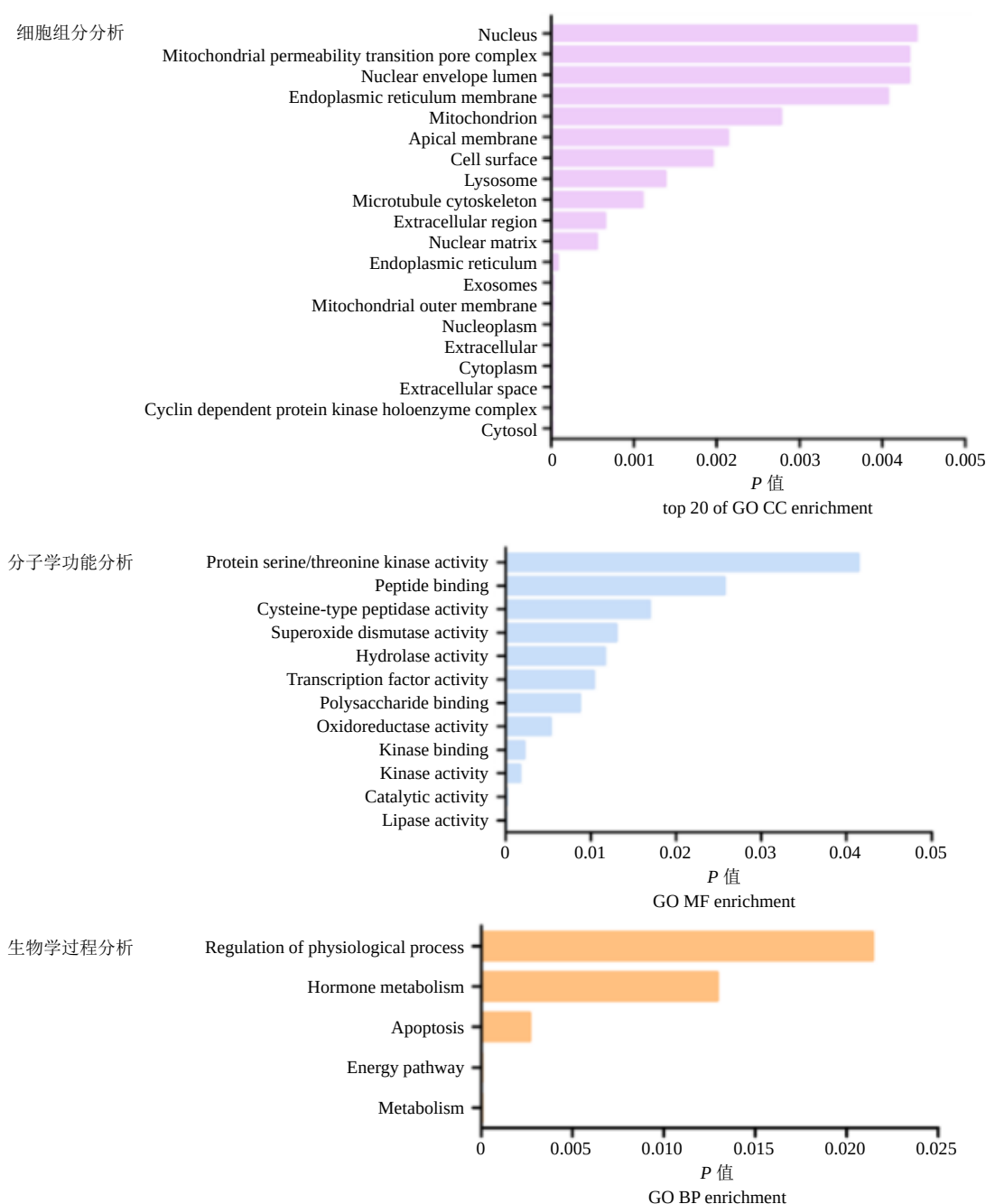


图 1 GO 富集结果

Fig 1 GO enrichment results

2.2 HKC 恢复氧化损伤卵母细胞的 ATP 水平

此前的研究中, 推测 HKC 可能通过线粒体依赖性途径发挥改善卵巢衰老的作用^[12], 但其潜在作用机制尚未完全阐明。生物信息学结果也表明 HKC 发挥作用的靶基因富集在线粒体功能上, 而线粒体的一个主要功能是抗氧化, 因此, 接下来确定 HKC 是否显示出对氧化损伤的保护作用, 主要通过评估 ATP 的产生来探索 HKC 是否能保护卵母细胞免受氧化损伤。H₂O₂ 是用来构建氧化应激模型的常用氧

化剂^[13], 该模型能够在 MII 卵母细胞中造成氧化损伤^[14], 因此在本研究中构建了该氧化应激模型。在 MII 卵母细胞经历氧化损伤之前, 分别用不同质量浓度的 HKC 对细胞进行预处理, 结果如图 3-A 所示, HKC 能够恢复 ATP 含量, 且具有浓度相关性。此外, 本实验也设置了阳性对照, 使用常规抗氧化剂 NAC 预处理细胞, 结果显示与 NAC 相比, HKC 对 H₂O₂ 引起的氧化损伤具有更好的保护作用 (图 3-B)。

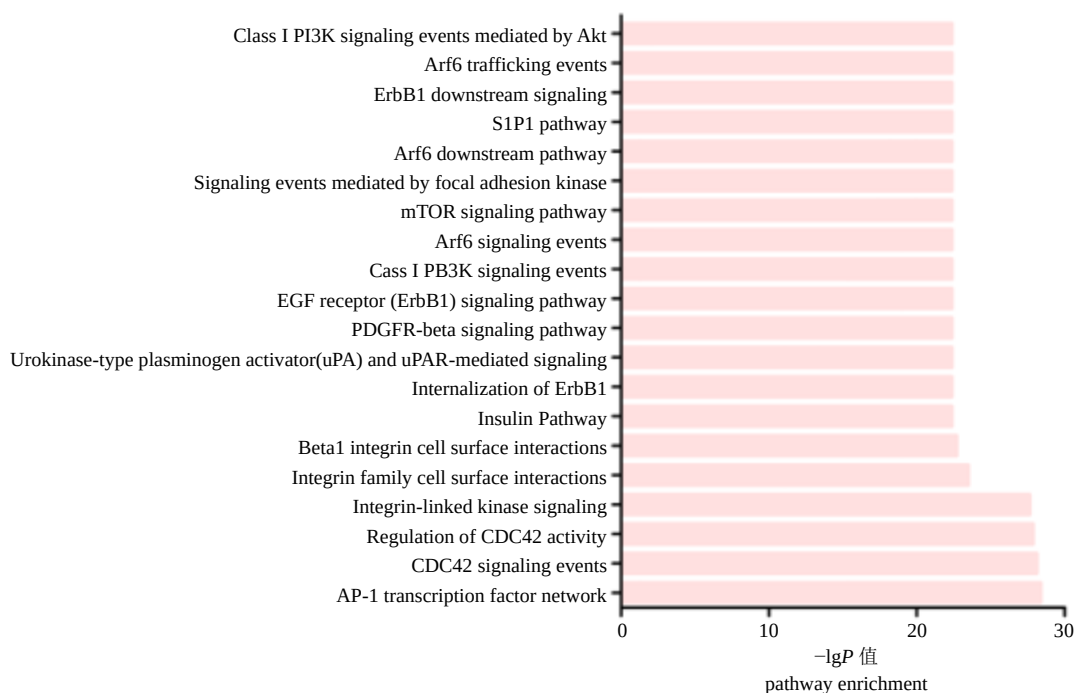
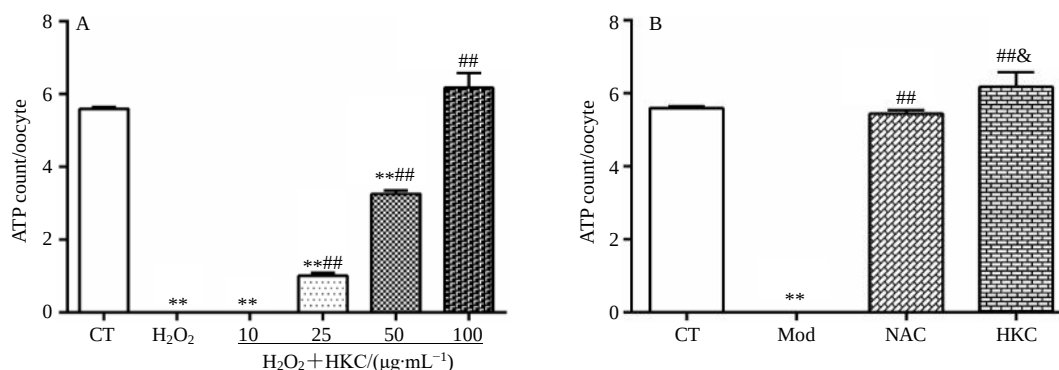


图 2 KEGG 富集分析

Fig 2 KEGG enrichment analysis



A-HKC 对 H_2O_2 处理的卵母细胞产生 ATP 具有浓度相关性 B-NAC 或大剂量 HKC 预处理抵消了 H_2O_2 对卵母细胞 ATP 产生的影响
与 CT 组比较: ** $P < 0.01$ 与 H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$ 与 Mod 组比较: && $P < 0.01$ 与 NAC 组比较: $\Delta P < 0.05$

A-HYKT capsule promoted ATP production with a concentration-dependent manner in H_2O_2 -treated oocytes B-NAC or high-dose HYKT capsule pretreatment counteracted the effect of H_2O_2 on ATP production in oocytes ** $P < 0.01$ vs CT group ## $P < 0.01$ vs H_2O_2 group && $P < 0.01$ vs Mod group $\Delta P < 0.01$ vs NAC group

图 3 HKC 对 H_2O_2 诱导的卵母细胞氧化损伤的影响

Fig 3 Effect of HKC on H_2O_2 -induced oxidative damage in oocytes

2.3 HKC 改善 H_2O_2 诱导的卵母细胞线粒体功能障碍

线粒体膜电势 ($\Delta\psi_m$) 是公认的评估线粒体功能的指标之一, 本实验通过 JC-1 染色法对 MII 卵母细胞中线粒体膜电势的变化进行了检测。结果如图 4-A 所示, H_2O_2 处理促进了 JC-1 单体的形成, 表明 H_2O_2 处理后线粒体膜电势丢失, 线粒体功能发生障碍; 而在细胞遭受氧化损伤之前给予 HKC 和 NAC 预处理, JC-1 聚集体显著增加 (图 4-B), 表明 HKC

的预处理能够增加线粒体的膜电势。这一结果表明, HKC 对氧化应激模型中 MII 卵母细胞的 $\Delta\psi_m$ 具有保护作用。

3 讨论

通过系统药理学、数据库与体外验证相结合的方法, 对中药可能的作用机制进行了梳理, 并通过体外实验进行了验证。首先利用开放获取数据库对妇科常用中药 HKC 发挥作用的靶基因进行了聚类, 再利用在线数据库工具对靶基因进行 GO 富集分析

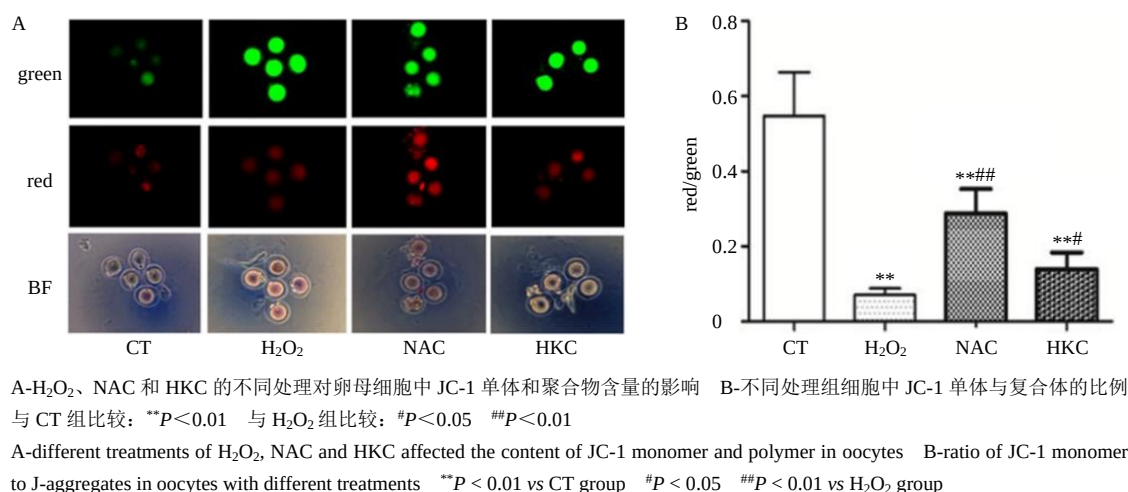


图 4 HKC 对卵母细胞线粒体功能障碍的影响

Fig 4 Effect of HKC on H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction in oocytes

及 KEGG 分析, 预测了这些靶基因的细胞器定位、分子功能以及在生物学过程中的参与, 随后, 进一步通过体外实验对分析结果进行验证, 最终证实 HKC 通过一种依赖于线粒体的方式保护小鼠卵母细胞免受氧化损伤, 这与此前在衰老小鼠模型中的研究结果一致, HKC 能够保护卵泡发育, 维持体内平衡^[12]。

值得注意的是, GO 分析结果显示, 线粒体参与了 HKC 发挥作用的过程, 这不仅与分子功能中的超氧化物歧化酶、氧化还原酶、催化活性等基因富集结果一致, 也与生物学过程中的细胞凋亡与能量相关基因富集结果一致。线粒体在卵巢衰老过程中发挥了重要作用^[20], 其功能障碍能够很大程度地对卵泡发育、卵母细胞质量和胚胎非整倍性造成损害^[16-19]。抗氧化是线粒体发挥作用的诸多功能之一, 很多研究已经证明, 线粒体能够消耗有毒的代谢产物如活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS) 以减少其积累, 从而抑制颗粒细胞凋亡、减少卵泡闭锁, 并减少有害代谢产物对其他组分如脂质、蛋白质和 DNA 造成的损伤, 最终保护卵巢功能甚至能改善女性不孕^[20]。研究表明大多患有多囊卵巢综合征 (PCOS) 或原发性卵巢功能不全 (POI) 的女性表现出线粒体功能障碍^[22]。有研究表明对于卵巢低反应 (POR) 的女性, HKC 的预处理可以提高妊娠率^[3]。卵泡液中活性氧水平等氧化应激指标可以用来预测体外受精的结果和胚胎质量^[23-24]。使用活性氧清除剂 (如辅酶 Q10、白藜芦醇和褪黑素等) 预处理的治疗方式已被用于辅助生殖领域^[25-27]。而本研究结果进一步证实, HKC 可作为辅助生殖中预处理方式的一种

替代选择。

作为一种类固醇激素, 性激素的合成和分泌受下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus-pituitary-ovarian axis, HPO 轴) 的调节, 下丘脑释放促性腺激素释放激素 (GnRH), 刺激垂体分泌并释放卵泡刺激素 (FSH) 和黄体生成素 (LH), 这 2 种激素再作用于卵巢并促进卵泡发育。POI^[28]、不孕^[29]和 PCOS^[30]等妇科疾病与 HPO 轴的失调密切相关。虽然激素替代疗法是主要的治疗方法, 但激素补充可能会增加乳腺癌风险^[31], 也并不适合患有激素禁忌症的女性。本研究结果显示了 HKC 调控的基因在激素代谢中亦有参与, 然而, 此前的研究并未发现 HKC 对性激素的代谢有显著影响, 比如在子宫内膜异位症的 GnRH-a 反添加治疗的研究中^[2]。尽管如此, 依然不能确定 HKC 是否对血清性激素水平有影响, 为了解释 HKC 缓解更年期综合征症状的临床疗效^[32]的分子机制, 需要进一步的深入研究来验证 HKC 是否参与了激素代谢。

当然, 本研究也存在一些局限性。首先, HKC 的有效成分并未完全被 HPLC-ESI-MS/MS 鉴别^[4]。HKC 的组方包括熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶和茯苓, 这 6 味中药包含的有效化合物应该超过 21 个, 但由于现有分析方法无法识别某些化合物 (如多糖等), 因此今后应该根据化合物的特性采用其他更合适的方法对 HKC 中的有效成分进行分析。其次, TCMSP 数据库中的信息尚不完善, 化合物-基因聚类结果并不全面, 而未来的研究将继续补充靶向中药基因和疾病的信息, 为中医药研究提供更全面的线索。

本研究不仅通过生物信息学分析发现了 HKC 化学成分靶基因定位在线粒体等部位, 也通过体外实验证实了 HKC 主要通过改善线粒体功能发挥抗氧化作用, 为阐明 HKC 在卵巢衰老相关疾病中的作用提供了依据。

参考文献

- [1] Zhou Q, Tao J, Song H M, *et al.* Chinese herbal medicine Kuntai capsule for treatment of menopausal syndrome: A systematic review of randomized clinical trials [J]. *Complement Ther Med*, 2016, 29: 63-71.
- [2] Chen J M, Gao H Y, Ding Y, *et al.* Efficacy and safety investigation of Kuntai capsule for the add-back therapy of gonadotropin releasing hormone agonist administration to endometriosis patients: A randomized, double-blind, blank- and tibolone-controlled study [J]. *Chin Med J-Peking*, 2015, 128(4): 427-432.
- [3] Gao H, Xia T, Ma R, *et al.* Heyan Kuntai capsule versus dehydroepiandrosterone in treating Chinese patients with infertility caused by diminished ovarian reserve: A multicenter, randomized controlled trial [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(4): 530-537.
- [4] 杨燕飞. RP-HPLC 同时测定坤泰胶囊中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱含量 [J]. *中成药*, 2010, 32(6): 958-960.
- [5] Ru J L, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminformatics*, 2014, 6(1): 13.
- [6] Huang J H, Tang H T, Cao S M, *et al.* Molecular targets and associated potential pathways of Danlu Capsules in hyperplasia of mammary glands based on systems pharmacology [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2017, <https://doi.org/10.1155/2017/1930598>.
- [7] Chen S J, Cui M C. Systematic understanding of the mechanism of salvianolic acid A via computational target fishing [J]. *Molecules*, 2017, doi:10.3390/molecules22040644.
- [8] Li Y, Wang J H, Xiao Y C, *et al.* A Systems pharmacology approach to investigate the mechanisms of action of *Semen Strychni* and *Tripterygium wilfordii* Hook. f for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 175(Complete): 301-314.
- [9] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 37(1): 1-13.
- [10] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2008, 4(1): 44-57.
- [11] van Blerkom J, Davis P W, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after *in-vitro* fertilization and embryo transfer [J]. *Hum Reprod*, 1995, 10(2): 415-424.
- [12] Zhang J J, Fang L, Shi L Y, *et al.* Protective effects and mechanisms investigation of Kuntai capsule on the ovarian function of a novel model with accelerated aging ovaries [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 173-181.
- [13] Winterbourn C C. The biological chemistry of hydrogen peroxide [J]. *Method Enzymol*, 2013, 528: 3-25.
- [14] Zhang X, Wu X Q, Lu S, *et al.* Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles [J]. *Cell Res*, 2006, 16(10): 841-850.
- [15] Zhang D, Keilty D, Zhang Z F, *et al.* Mitochondria in oocyte aging: Current understanding [J]. *Facts views Vis ObGyn*, 2017, 9(1): 29-38.
- [16] Wang T R, Zhang M, Jiang Z L, *et al.* Mitochondrial dysfunction and ovarian aging [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2017, 77(5): e12651.
- [17] Suganuma N, Kitagawa T, Nawa A, *et al.* Human ovarian aging and mitochondrial DNA deletion [J]. *Horm Res*, 1993, 39(1): 16-21.
- [18] Shi L Y, Zhang J J, Lai Z W, *et al.* Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162194.
- [19] Zhang K, Smith G W. Maternal control of early embryogenesis in mammals [J]. *Reprod Fert Develop*, 2015, 27(6): 880-896.
- [20] Lim J, Luderer U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(4): 775-782.
- [21] Rezvanfar M A, Saadi H A S, Gooshe M, *et al.* Ovarian aging-like phenotype in the hyperandrogenism-induced murine model of polycystic ovary [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014(8): 948951.
- [22] Zhen X M, Wu B L, Wang J, *et al.* Increased incidence of mitochondrial cytochrome c oxidase 1 gene mutations in patients with primary ovarian insufficiency [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132610.
- [23] Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, *et al.* Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in *in vitro* fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(supp-S3): 1171-1176.
- [24] Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S. Reactive oxygen

- species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(9): 2403-2407.
- [25] Song C, Peng W, Yin S, *et al*. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice [J]. *Sci Rep-Uk*, 2016, 6: 35165.
- [26] Liu M Y, Yin Y, Ye X Y, *et al*. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(3): 707-717.
- [27] Ben-Meir A, Burstein E, Borrego-Alvarez A, *et al*. Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging [J]. *Aging Cell*, 2015, 14(5): 887-895.
- [28] Sullivan S D, Sarrel P M, Nelson L M. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(7): 1588-1599.
- [29] Quaas A M, Hansen K R. The role of steroid hormone supplementation in non-assisted reproductive technology treatments for unexplained infertility [J]. *Fertil Steril*, 2016, 106(7): 1600-1607.
- [30] Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, *et al*. The polycystic ovary syndrome: A position statement from the European society of endocrinology [J]. *Eur J Endocrinol*, 2014, 171(4): 1-29.
- [31] Zhao S S, Chlebowski R T, Anderson G L, *et al*. Sex hormone associations with breast cancer risk and the mediation of randomized trial postmenopausal hormone therapy effects [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(2): 1-9.
- [32] Sun A J, Wang Y P, Gu B, *et al*. A multi-center, randomized, controlled and open clinical trial of Heyan Kuntai Capsule (和颜®坤泰胶囊) and hormone therapy in perimenopausal women [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 24(7): 1-7.