

基于网络药理学和睾丸间质细胞模型探讨恩施巴戟促进睾酮分泌的作用机制

朱成珊¹, 李子寒¹, 彭洪兵¹, 尹 聪¹, 李 娟¹, 陈科力¹, 肖 凌², 聂 晶², 刘义梅^{1*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430075

摘要: **目的** 基于网络药理学和睾丸间质细胞模型探究恩施巴戟对睾丸间质细胞睾酮分泌的影响和潜在作用机制。**方法** 利用网络药理学和分子对接预测恩施巴戟治疗睾酮缺乏症的主要作用靶点及通路; 通过 LC-MS/MS 技术分析恩施巴戟主要化学成分; 构建睾丸间质细胞模型, 采用 MTT 法检测睾丸间质细胞的存活率, 采用 ELISA 法检测睾酮分泌量, 采用 qRT-PCR 检测睾酮合成和凋亡相关基因表达, 采用 Western blotting 检测睾酮合成蛋白表达。**结果** 网络药理学和分子对接结果显示, 恩施巴戟主要通过丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1) 等靶点和环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、MAPK、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等信号通路发挥作用, 水晶兰苷为其主要有效成分。LC-MS/MS 分析和睾丸间质细胞实验结果验证了网络药理学预测分析, 恩施巴戟提取物和水晶兰苷均具有促进睾丸间质细胞生长和睾酮分泌的作用, 其作用机制与促进类固醇生成急性调控蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、胆固醇侧链裂解酶 (cholesterol side-chain cleavage enzyme, Cyp11a1)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)/Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01) 并促进 StAR 蛋白表达有关 ($P < 0.01$)。**结论** 恩施巴戟具有促进睾酮分泌的作用, 水晶兰苷为其主要活性成分, 其作用机制与作用于 MAPK、PI3K/Akt 通路调控睾酮合成有关。

关键词: 恩施巴戟; 水晶兰苷; 睾丸间质细胞; 睾酮缺乏症; 网络药理学; 睾酮合成

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)23-7430-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.013

Mechanism of *Damnacanthi Officinari Radix* on promoting testosterone secretion based on network pharmacology and Leydig cells model

ZHU Cheng-shan¹, LI Zi-han¹, PENG Hong-bing¹, YIN Cong¹, LI Juan¹, CHEN Ke-li¹, XIAO Ling², NIE Jing², LIU Yi-mei¹

1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Institute For Drug Control, Wuhan 430075, China

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of Enshi Baji (*Damnacanthi Officinari Radix*) on testosterone secretion in Leydig cells based on network pharmacology and Leydig cells model. **Methods** Network pharmacology and molecular docking were used to predict the potential targets and pathways of *Damnacanthi Officinari Radix* in treating testosterone deficiency. LC-MS/MS was used to analyze the main chemical components of *Damnacanthi Officinari Radix*. In Leydig cells model, MTT assay was used to detect cells survival rate, ELISA kit was used to detect testosterone secretion, qRT-PCR was used to detect the related mRNA expressions of testosterone synthesis and apoptosis, and Western blotting was used to detect the expression of testosterone synthetic protein. **Results** Network pharmacology and molecular docking results showed that *Damnacanthi Officinari Radix* mainly played a role through targets such as mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1), and pathways such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP), MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt). Monotropein was the main active ingredient. LC-MS/MS analysis results and Leydig cells experiment validated the predictive analysis

收稿日期: 2022-08-06

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2020ACA007)

作者简介: 朱成珊 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为中药资源及其品质。Tel: 15927655062 E-mail: 1094544954@qq.com

*通信作者: 刘义梅 (1971—), 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药资源及其品质。Tel: 18908633139 E-mail: 617656021@qq.com

of network pharmacology. Extract of *Damnacanthi Officinari Radix* and monotropein could promote Leydig cells growth and testosterone secretion. Its mechanism was related to promoting steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*), cholesterol side-chain cleavage enzyme (*Cyp11a1*), B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*)/Bcl-2 associated X protein (*Bax*) mRNA expressions ($P < 0.05, 0.01$), and *StAR* protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** *Damnacanthi Officinari Radix* can promote testosterone secretion, and monotropein is the main active ingredient. Its mechanism is related to the regulation of testosterone synthesis by MAPK and PI3K/Akt pathways.

Key words: *Damnacanthi Officinari Radix*; monotropein; Leydig cells; testosterone deficiency; network pharmacology; testosterone synthesis

睾酮是雄性生殖系统分化发育的重要物质、可促进精子的发生、成熟及蛋白质的合成^[1]。任何因素导致睾丸间质细胞数量减少或活性下降将引起雄激素合成量不足。如睾丸间质细胞的过量凋亡,使睾酮的分泌量明显下降,进而促进生精细胞的凋亡,导致男性不育^[2]。睾酮缺乏症是指生物学上缺乏睾丸激素和精子产生从而导致性腺轴功能减退的一种症状^[3]。现代中医认为性腺轴功能衰退与肾虚证关系密切,尤其是男性睾丸间质细胞功能衰退^[4]。采用补肾法可以升高肾虚证患者血清睾酮水平^[5],从而治疗此类疾病。临床有关生殖系统的肾阳虚证通常采用补肾壮阳类中药如巴戟天、淫羊藿等,药理实验表明这些补肾壮阳类中药对睾酮的合成与分泌均有调节作用。因此补肾壮阳类药物用于睾酮缺乏症治疗具有重要意义。

恩施巴戟为茜草科植物四川虎刺 *Damnacanthus officinarum* Huang 的干燥根^[6],又名湖北巴戟天,是湖北省土家族习用的补肾壮阳类药材,主要用于治疗肾虚腰痛、阳痿遗精等。其肉质、链珠状根与巴戟天相似,且在成分和功效上有诸多相似之处^[7]。因其临床疗效确切、有一定的资源量,将其收入湖北省食品药品监督管理局组织制定的湖北省地方习用药材第一部技术标准《湖北省中药材质量标准》2009 年版,并保留于 2018 年版。药理研究表明,恩施巴戟能够促进小鼠生长,增强小鼠抗疲劳能力,并且具有助阳作用^[8]。据报道,恩施巴戟的主要成分为蒽醌类、环烯醚萜类、多糖类等,其中环烯醚萜类成分在改善肾阳虚证过程中发挥重要作用^[9],其中水晶兰苷质量分数可至 1.872%,为恩施巴戟的主要成分^[10]。同时,本课题组在动物实验中发现恩施巴戟提取物能够提高小鼠血清中睾酮的含量,但其具体作用机制有待进一步研究。因此,本研究通过网络药理学^[11]和分子对接技术预测其治疗睾酮缺乏症的靶点、活性成分和分子机制,并采用 LC-MS/MS 技术和体外大鼠睾丸间质细胞模

型进一步验证网络药理学结果,为恩施巴戟的进一步研究与开发提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~200 g,购自湖北省实验动物研究中心,动物许可证号 SCXK(鄂)2020-0018。所有大鼠均在标准实验室条件下饲养,温度 20~24 °C,相对湿度 40%~60%,明暗循环 12 h。本研究的实验方案经湖北中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批准号 SYXK2017-0067)。

1.2 药材

恩施巴戟采于湖北省恩施土家族苗族自治州咸丰县高乐镇田坝村,经湖北省中医药大学刘义梅教授鉴定为茜草科植物四川虎刺 *D. officinarum* Huang 的干燥根。

1.3 药品与试剂

DMEM/F12 培养基(批号 WH0021K191)购自 Procell 公司;MTT(批号 MKBL6647V)购自美国 Sigma 公司;胶原酶 I(批号 I1904MG100)购自 BioFRox 公司;胎牛血清(批号 21110704)购自浙江天杭生物科技股份有限公司;马血清(批号 SH3007402)购自 Hyclone 公司;双抗(批号 MA0110)、Western 及 IP 细胞裂解液(批号 MB9900)购自大连美仑生物技术有限公司;2.5%胰酶(批号 2323073)购自美国 Gibco 公司;Percoll 分离液(批号 69120070)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 BL521A)购自 Biosharp 公司;水晶兰苷对照品(批号 5945-50-6,质量分数≥98%)购自成都植标化纯生物技术有限公司;Forskolin(Fsk,批号 GC11920)购自 Glpbio Technology 公司;睾酮 ELISA 试剂盒(批号 20220106)购自南京建成生物工程研究所;TRIzol 试剂(批号 W9712)、反转录试剂盒(批号 W0106)、Real Universal 彩色荧光定量预混试剂 SYBR Green(批号 S7918)购自天根生化科技有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase, GAPDH)、类固醇生成急性调控蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, *Star*)、胆固醇侧链裂解酶 (cholesterol side-chain cleavage enzyme, *Cyp11a1*)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, *Bax*) 引物由生工生物工程股份有限公司合成; GAPDH 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自 Servicebio 公司; Star 抗体购自 ABclonal 公司。

1.4 仪器

HH-6 型数显恒温水浴锅 (常州朗越仪器制造有限公司); Synergy 2 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); BNP-80CH 型 CO₂ 培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); IX-73 型荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); LightCycler 480II 型荧光定量 PCR 仪 (罗氏诊断产品有限公司); Xevo G2-XS QTOF 飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司); PowerPacTM Basic 型电泳仪、Mini Trans-Blot Cell 型蛋白转印仪 (美国 Bio-Rad 公司); FCQ 型荧光化学发光凝胶成像仪 (上海普诺森生物科技)。

2 方法

2.1 恩施巴戟的网络药理学研究

查阅文献,将所获得的恩施巴戟中的化学成分,通过数据库 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 确认结构,导入到 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行预测,在 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 中校正靶点。再通过 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/home/>) 等与疾病靶点相关的数据库,获得睾酮缺乏症相关的靶点。

将以上 2 种靶点导入韦恩图工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 中取交集,用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 将蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 综合得分 > 0.9 作为筛选条件,利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建 PPI 网络图,筛选出潜在靶点。将化学成分与潜在作用靶点构建“活性成分-核心靶点”关联网络图,然后根据 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.2 恩施巴戟活性成分与潜在靶点分子对接

分别在 TCMSp 数据库 (<https://tcmsp-e.com/>) 和 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载活性成分和潜在靶点的结构,然后用 AutoDockTools 1.5.7 软件对蛋白进行去水、加氢等处理,利用插件“autogrid”及“autodock”进行活性位点对接,并计算结合能来评估活性成分与潜在靶点之间的结合活性,最后以结合能 ≤ -5 kJ/mol 作为筛选标准,用 PyMOL 2.5.3 软件展示其结构模式。

2.3 恩施巴戟提取物的成分分析

2.3.1 色谱条件 Welchrom-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 99% A; 0.5~14.0 min, 99%~85% A; 14.0~18.0 min, 85%~70% A; 18.0~20.0 min, 70%~40% A; 20.0~22.0 min, 40%~20% A; 22.0~25.0 min, 20%~0 A; 柱温 35 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μL; 检测波长 240 nm。

2.3.2 质谱条件 采用 ESI 离子源,正、负离子模式下采集数据; MS^E 模式采集一级质谱离子和二级质谱离子,采集范围均为 *m/z* 100~1200; 电喷雾电压 3000 V; 脱溶剂温度 500 °C; 一级碰撞能量 10 eV, 二级碰撞能量 35 eV; 碰撞能量波动 ± 10 eV。

2.4 样品制备

取恩施巴戟药材粉末 2.5 g, 分别加入 10 倍量的水及 50%、70%、95% 乙醇, 85 °C 加热回流 2 h, 滤过, 滤渣再分别加入 10 倍量溶剂回流 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 挥至浸膏状, 冷冻干燥, 得到药材不同提取物粉末。将所得提取物粉末用二甲基亚砜溶解, 配制成 100 mg/mL 的母液, 即得到水提取物、50% 乙醇提取物、70% 乙醇提取物、95% 乙醇提取物。水晶兰苷对照品用二甲基亚砜溶解, 配制成 50 mmol/L 的母液。Fsk 用二甲基亚砜溶解, 配制成 10 mmol/L 的母液。

2.5 睾丸间质细胞分离纯化及纯度鉴定

将雄性大鼠处死, 取出睾丸, 置于冰上的 PBS 中, 清洗 3 次。将睾丸脱膜, 剪碎, 放入离心管中, 用 DMEM/F12 培养基清洗剩余残留。向离心管中加入适量 DMEM/F12 培养基, 34 °C 震荡 15 min; 再加入 0.05% 胶原酶 I, 37 °C 震荡 15 min, 加入等体积 DMEM/F12 培养基 (含 8% 马血清、2% 牛血清、1% 双抗) 终止消化, 用 70 μm 尼龙滤网滤过, 取滤过后的组织重复操作 1 次。合并滤液, 离心后除去

上清, 重复 2 次。收集所有细胞, 加到不同密度梯度的离心液中^[12] (从上往下依次为 5%、30%、58%、70%), 4 ℃、3000 r/min 离心 30 min, 吸取 58% 处条带。加入适量 DMEM/F12 培养基, 离心后除去上清, 重复 2 次。收集以上细胞, 重悬, 加到 DMEM/F12 培养基中, 放入培养箱中, 24 h 后换液, 继续培养, 及时换液。

将所得的原代细胞消化, 取 50 μ L 细胞悬液, 加入 200 μ L 现配的 3 β -HSD 进行染色, 孵育 2 h, 于显微镜下观察, 计算阳性染色细胞数, 鉴定细胞纯度。

2.6 MTT 法检测睾丸间质细胞存活率

将对数生长期的睾丸间质细胞消化, 计数, 配制成细胞悬液, 按照 8×10^3 个/孔均匀铺在 96 孔板中。待细胞贴壁后, 分别加入恩施巴戟不同提取物和水晶兰苷, 作为给药组。另设对照组和空白组, 对照组加入与给药组等体积含血清的培养液, 空白组不含细胞只加入培养液, 每组设 3 个复孔。培养 24 h, 除去上清液, 每孔加入 100 μ L MTT 稀释液, 于培养箱中孵育 4 h, 加入 100 μ L 的二甲基亚砷, 震荡, 使结晶溶解, 用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

2.7 睾丸间质细胞睾酮分泌量测定

采用大鼠睾酮 ELISA 试剂盒检测样本中的睾酮的含量。将对数生长期的睾丸间质细胞, 配制成悬液, 按照 4×10^4 个/孔接种在 12 孔板。待细胞贴壁后, 加入恩施巴戟提取物和水晶兰苷, 作为给药组, 另设对照组和阳性组, 对照组加入与给药组等体积含血清的培养液, 阳性组加入 10 μ mol/L 的 Fsk。培养 24 h, 收集上清, 2500 r/min 离心 20 min, 取上清, 按试剂盒说明书测定每孔睾酮分泌量。

2.8 qRT-PCR 检测相关基因表达

取对数生长期的睾丸间质细胞, 按照 2.5×10^5 个/孔接种在 6 孔板。加入恩施巴戟 95% 乙醇提取物和水晶兰苷作为给药组, 另设对照组和阳性组, 对照组加入与给药组等体积含血清的培养液, 阳性组加入 10 μ mol/L 的 Fsk。使用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA, 通过反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 再将所得 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1, 以 GAPDH 为内参。

2.9 Western blotting 检测蛋白表达

按照“2.8”项下方法处理细胞, 置冰上提取睾丸间质细胞蛋白, BCA 法定量蛋白, 蛋白变性处理

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: GGCTCTCTGCTCCTCCCTGT R: CGTTCACACCGACCTTCACC
<i>StAR</i>	F: GGAACCCAAATGTCAAGGAAATCA R: CAGGCATCTCCCCAAAGTGTG
<i>Cyp11a1</i>	F: GTCCAGTTGGTCCCACTCCTC R: AAGCACCAGGTCGTTCAATATAC
<i>Bcl-2</i>	F: GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA R: AGGCACCCAGGGTGATGCAA
<i>Bax</i>	F: GGCCCACCAGCTCTGAGCAGA R: GCCACGTGGGCGTCCCAAAGT

后电泳、转膜, 封闭后加入相应一抗 (用 4% 牛血清白蛋白按照 1:1000 稀释), 孵育过夜; 洗涤后加入二抗 (用 TBST 按照 1:3000 稀释), 室温孵育; 洗涤后显影。

2.10 数据处理

利用 Graph Pad Prism 软件运用 Dunnett's t 检验对组间差异进行分析, 并绘制柱形图; 利用 mELISA 软件处理试剂盒数据, 采用四参数方程, 计算各组睾酮分泌量; 采用 MassLynx V4.1 软件对 LC-MS/MS 数据进行处理, 结合参考文献中的保留时间和碎片离子, 对各主要分子离子峰进行归属。

3 结果

3.1 恩施巴戟网络药理学分析

3.1.1 恩施巴戟的 PPI 网络构建 结合文献报道, 共得到恩施巴戟 36 个成分 (表 2), 总成分对应的作用靶点为 1021 个。整合多个疾病数据库, 共得到睾酮缺乏症潜在靶点 3401 个。通过韦恩图将恩施巴戟的成分靶点与睾酮缺乏症疾病靶点进行映射, 共获得 397 个共同交集靶点, 构建 PPI 网络, 见图 1。选取度值排名前 10 名的靶点, 综合筛选, 获得与睾酮合成紧密关联的 6 个靶点, 分别为丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、组蛋白乙酰转移酶 p300 (histone acetyltransferase p300, EP300)、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α 亚型 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, PIK3CA)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1)、转录因子 Jun (transcription factor Jun, JUN)。

表 2 恩施巴戟的化学成分

Table 2 Chemical composition of *Damnacanthi Officinari Radix*

序号	化合物	序号	化合物
ESBJ1	1-羟基-2-羟甲基蒽醌	ESBJ19	1,4-二羟基-2-甲基蒽醌
ESBJ2	大黄素甲醚	ESBJ20	车叶草苷
ESBJ3	百眼藤素 A	ESBJ21	水晶兰苷
ESBJ4	1-羟基-2-甲基蒽醌	ESBJ22	去乙酰基车叶草苷酸
ESBJ5	5-羟基百眼藤素 A	ESBJ23	车叶草苷酸
ESBJ6	甲基异茜草素	ESBJ24	车叶草苷酸甲酯
ESBJ7	甲基异茜草素-1-甲醚	ESBJ25	鸡屎藤次苷
ESBJ8	1,3-二羟基-2-甲氧基蒽醌	ESBJ26	玄参参种苷元
ESBJ9	1-甲氧基-2-羟甲基蒽醌-龙胆二糖苷	ESBJ27	(1S,5S,9S)- $\Delta^{3(4),7(8)}$ -10-二羟甲基-4-环烯醚萜酸-1-O- β -D-葡萄糖
ESBJ10	1-甲氧基-2-羟基蒽醌	ESBJ28	豆甾醇
ESBJ11	1,4-二甲氧基-2-羟基蒽醌	ESBJ29	β -谷甾醇
ESBJ12	茜素二甲醚	ESBJ30	二十四烷酸
ESBJ13	2,5-二羟基-1-甲氧基蒽醌	ESBJ31	β -胡萝卜苷
ESBJ14	1,3-二羟基-2-乙氧甲基蒽醌	ESBJ32	齐墩果酸乙酸酯
ESBJ15	2-甲基蒽醌	ESBJ33	正丁基-O- β -D-吡喃果糖苷
ESBJ16	1,3-二甲氧基-2-乙氧甲基蒽醌	ESBJ34	硬脂酸
ESBJ17	2-羟基-3-羟甲基蒽醌	ESBJ35	α -D-葡萄糖
ESBJ18	1-羟基-2-羟甲基蒽醌-龙胆二糖苷	ESBJ36	β -D-葡萄糖

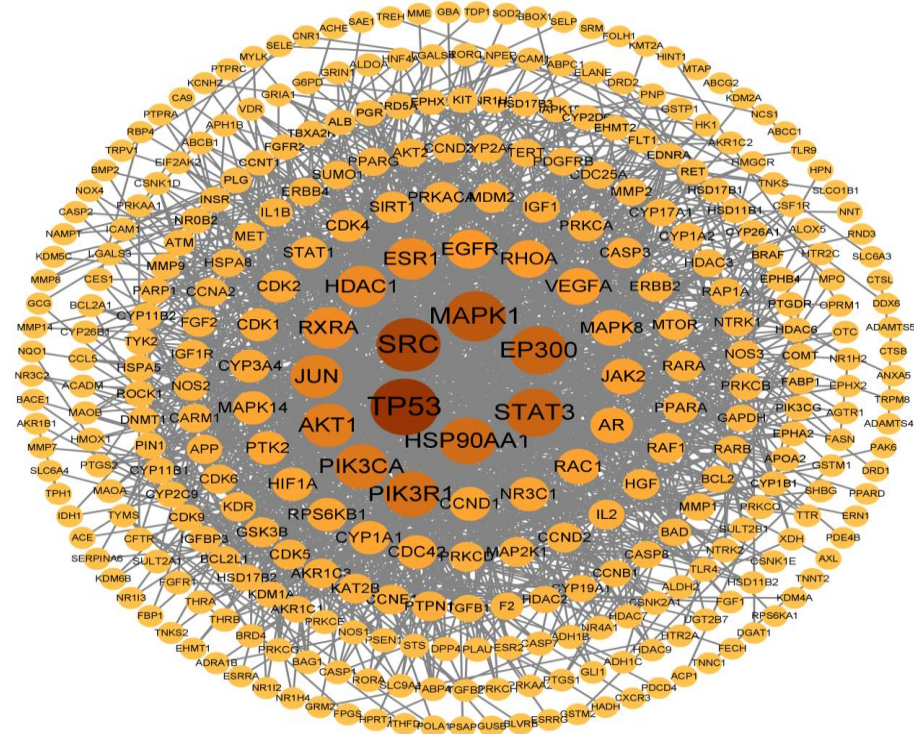


图 1 恩施巴戟治疗睾酮缺乏症的 PPI 网络图

Fig. 1 PPI network diagram of testosterone deficiency treated by *Damnacanthi Officinarum Radix*

3.1.2 恩施巴戟“活性成分-潜在靶点”网络构建
将 36 个恩施巴戟活性成分和 397 个潜在作用靶点进行“活性成分-潜在靶点”网络构建,结果见图 2。度值越大,节点越大,说明该节点在网络中越重要,水晶兰苷为恩施巴戟中的主要活性成分之一。

3.1.3 恩施巴戟的 KEGG 通路富集分析 通过富集

分析,共获得 178 条 KEGG 通路,选择前 20 位结果绘图,见图 3。其中富集程度较高,且与睾酮合成紧密关联的条目为环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路、MAPK 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)信号通路等。

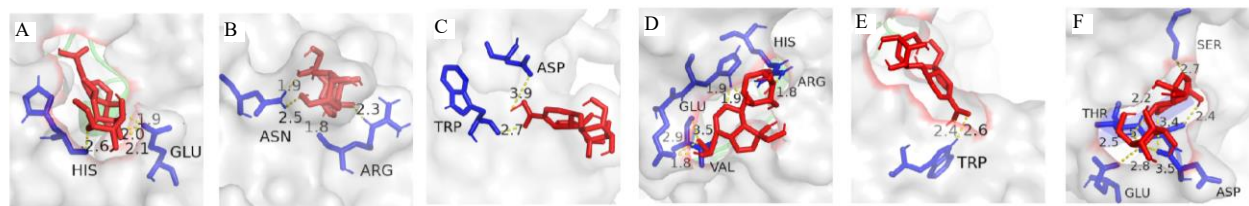


图 4 水晶兰苷与关键靶点 MAPK1 (A)、EP300 (B)、PIK3R1 (C)、PIK3CA (D)、AKT1 (E)、JUN (F) 的分子对接模型
Fig. 4 Molecular docking model of monotropein to key target MAPK1 (A), EP300 (B), PIK3R1 (C), PIK3CA (D), AKT1 (E) and JUN (F)

3.3 恩施巴戟 LC-MS/MS 分析

恩施巴戟提取物的 LC-MS/MS 成分分析总离子图见图 5。通过数据解析,与文献报道^[13-20]比对,共鉴定出 10 个化合物(表 4),包括环烯醚萜类成分 6 个、蒽醌类成分 4 个,其中丰度最高的峰为水晶兰苷,与网络药理学分析结果一致。

3.4 睾丸间质细胞模型验证

3.4.1 睾丸间质细胞的分离纯化及纯度鉴定 如图 6 所示,原代分离培养的睾丸间质细胞呈多角形、三角形或梭形,核较大,存在“拉网”现象,台盼蓝染色后细胞存活率 90%以上;经 3 β -HSD 染色的

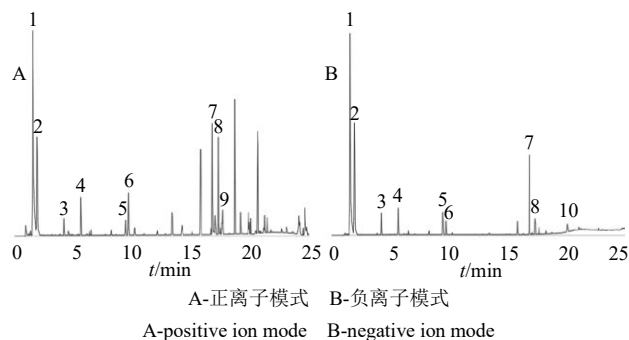
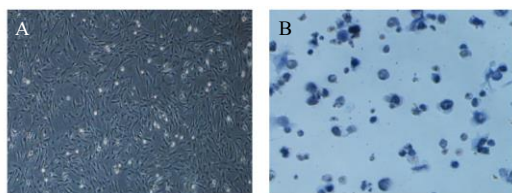


图 5 恩施巴戟提取物 LC-MS/MS 总离子图
Fig. 5 Total ion chromatogram of *Damnacanthi Officinari Radix* extract by LC-MS/MS

表 4 恩施巴戟的化学成分鉴定

Table 4 Identification of chemical components from *Damnacanthi Officinari Radix*

峰号	t_R /min	相对分子质量 (m/z)	分子式	碎片离子 (m/z)	类型	推测成分
1	1.61	389	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389, 209, 191, 183, 147	环烯醚萜类	水晶兰苷
2	1.95	389	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389, 227, 209, 183, 139	环烯醚萜类	去乙酰基车叶草苷酸
3	4.24	389	$C_{16}H_{22}O_{11}$	413, 389, 227	环烯醚萜类	鸡屎藤次苷
4	5.67	431	$C_{18}H_{24}O_{12}$	269, 121	环烯醚萜类	车叶草苷酸
5	9.43	413	$C_{18}H_{22}O_{11}$	147, 191	环烯醚萜类	车叶草苷
6	9.71	193	$C_9H_{14}O_3$	363, 159	环烯醚萜类	玄参参种苷元
7	16.76	253	$C_{15}H_{10}O_4$	238, 225, 152, 151, 105	蒽醌类	1-羟基-2-羟甲基蒽醌
8	17.22	307	$C_{16}H_{12}O_5$	269, 208, 152	蒽醌类	1,4-二甲氧基-2-羟基蒽醌
9	17.66	253	$C_{15}H_{10}O_4$	531, 239, 208, 152, 105	蒽醌类	1,4-二羟基-2-甲基蒽醌
10	20.95	237	$C_{15}H_{10}O_3$	209, 126	蒽醌类	1-羟基-2-甲基蒽醌



A-细胞形态 ($\times 40$) B-3 β -HSD 染色 ($\times 200$)
A-cell morphology ($\times 40$) B-3 β -HSD staining ($\times 200$)

图 6 睾丸间质细胞形态

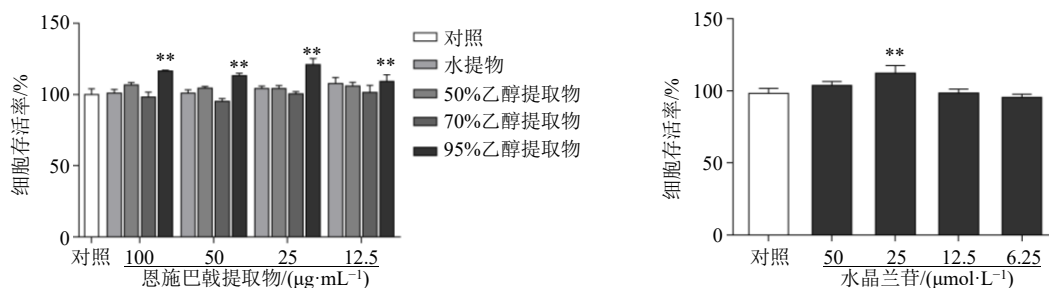
Fig. 6 Leydig cells morphology

细胞质呈深蓝色,细胞纯度大于 90%。

3.4.2 恩施巴戟提取物和水晶兰苷对睾丸间质细胞存活率的影响 如图 7 所示,不同质量浓度的恩

施巴戟水提取物及 50%、70%、95%乙醇提取物和水晶兰苷作用于睾丸间质细胞后,细胞存活率均大于 90%,对细胞无明显的毒性作用。同时,与对照组比较,12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 恩施巴戟 95%乙醇提取物及 25 $\mu\text{mol/L}$ 水晶兰苷作用 24 h 后,均具有促进细胞增殖的作用 ($P < 0.01$)。

3.4.3 恩施巴戟提取物和水晶兰苷对睾酮分泌的影响 如图 8 所示,与对照组比较,恩施巴戟水提取物、50%乙醇提取物对睾酮分泌无明显影响。5~10 $\mu\text{g/mL}$ 的恩施巴戟 70%乙醇提取物、2.5~10 $\mu\text{g/mL}$ 95%乙醇提取物、12.5~25 $\mu\text{mol/L}$ 的水晶兰苷等可促进睾酮分泌,且具有显著差异 ($P < 0.05$ 、0.01)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below figures

图 7 恩施巴戟提取物及水晶兰苷对睾丸间质细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of *Damnacanthi Officinarum Radix* extract and monotropine on survival rate of Leydig cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

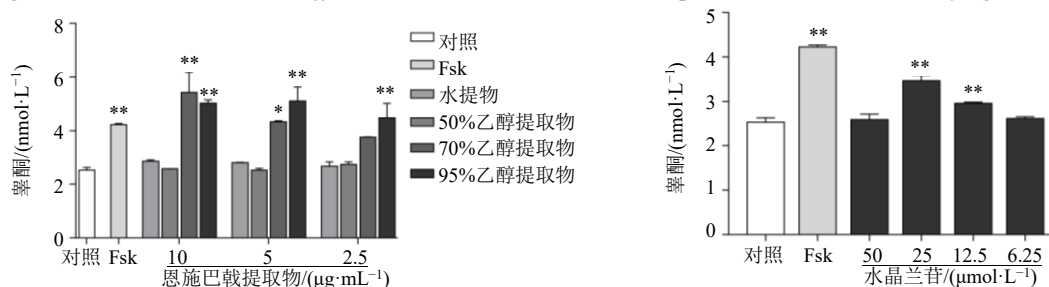


图 8 恩施巴戟提取物及水晶兰苷对睾酮分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of *Damnacanthi Officinarum Radix* extract and monotropine on testosterone production ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4.4 恩施巴戟提取物和水晶兰苷对睾酮合成和凋亡相关基因表达的影响 选取具有促进睾丸间质细胞增殖和睾酮分泌作用的 95%乙醇提取物进行后续研究,如图 9 所示,与对照组比较,恩施巴戟的 95%乙醇提取物 (25 $\mu\text{g/mL}$) 和水晶兰苷 (25 $\mu\text{mol/L}$) 均显著促进 *StAR* 和 *Cyp11a1* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 升高 *Bcl-2/Bax* 值 ($P < 0.01$); 水晶兰苷 (50 $\mu\text{mol/L}$) 显著促进 *Cyp11a1* 的 mRNA 表达

($P < 0.05$), 升高 *Bcl-2/Bax* 值 ($P < 0.01$)。因而,恩施巴戟的 95%乙醇提取物和水晶兰苷可促进睾酮合成相关基因 (*StAR* 和 *Cyp11a1*) 以及抗凋亡相关基因的表达。

3.4.5 恩施巴戟提取物和水晶兰苷对 Star 蛋白表达的影响 如图 10 所示,与对照组比较,恩施巴戟的 95%乙醇提取物 (100 $\mu\text{g/mL}$) 和水晶兰苷 (25 $\mu\text{mol/L}$) 显著促进 *StAR* 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。

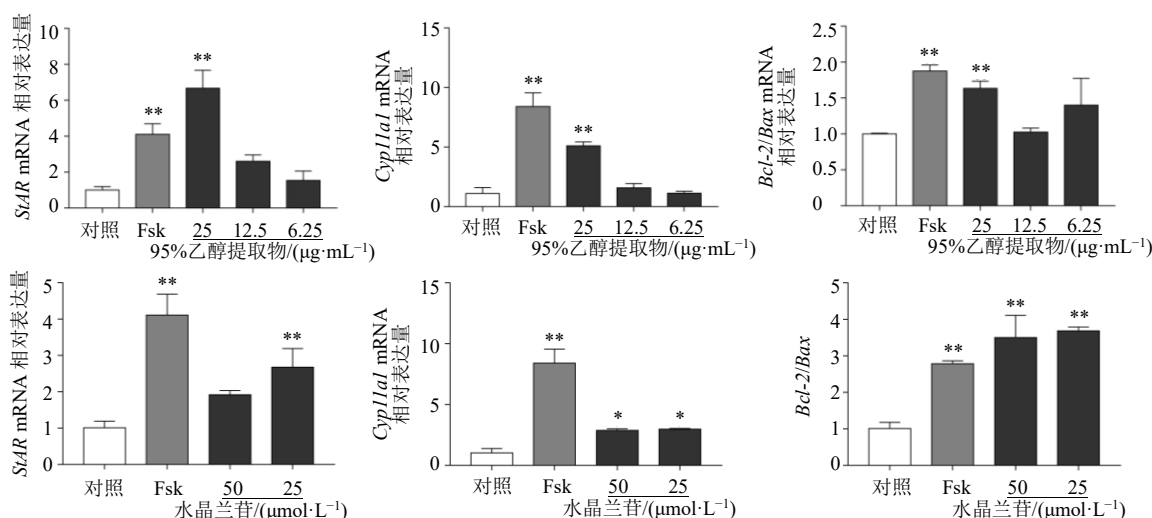


图 9 恩施巴戟 95%乙醇提取物及水晶兰苷对睾酮合成和凋亡相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of 95% ethanol extract of *Damnacanthi Officinarum Radix* and monotropine on testosterone synthesis and apoptosis-related genes expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

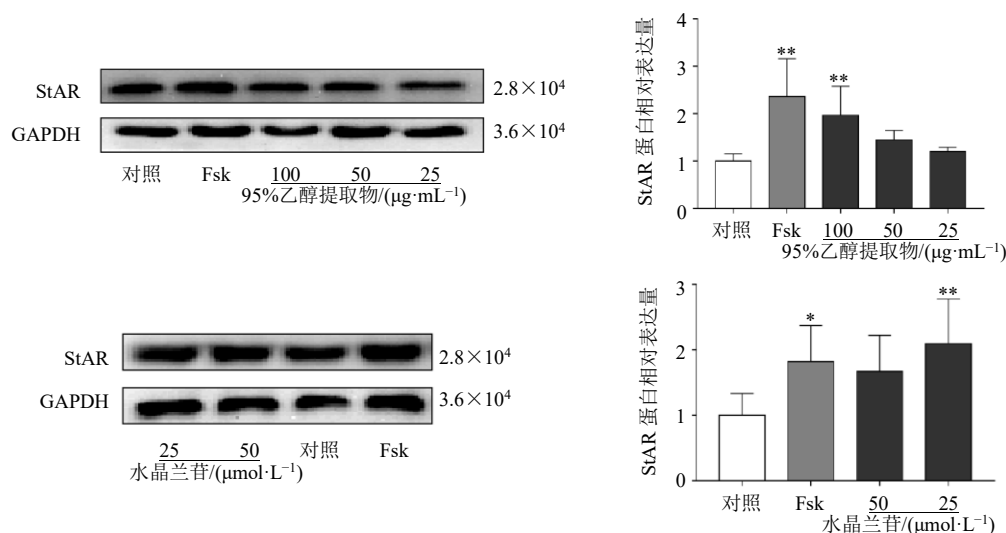


图 10 恩施巴戟 95%乙醇提取物及水晶兰苷对 StAR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effect of 95% ethanol extract of *Damnacanthi Officinarum* and monotropein on StAR protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

乔智胜等^[21]通过文献考证和实地考察认为,唐代至清末广泛运用的巴戟天为归州巴戟天,即《湖北省中药材质量标准》收录的恩施巴戟。恩施巴戟是传统补肾壮阳药,一般认为该类药材主要通过提高血清中睾酮水平,缓解阳虚症状,从而维持正常性功能^[22]。LC-MS 分析显示,恩施巴戟主要含有水晶兰苷、车叶草苷酸、去乙酰基车叶草苷酸等环烯醚萜苷类成分及 1-羟基-2-羟甲基蒽醌等蒽醌类成分。水晶兰苷等环烯醚萜苷类成分对肾损伤有着一定治疗作用^[20],同时本研究表明水晶兰苷具有促进睾丸间质细胞生长和睾酮分泌的作用,因而水晶兰苷可能为恩施巴戟补肾壮阳作用的药效物质基础。

通过网络药理学和分子对接预测恩施巴戟治疗睾酮缺乏症的潜在靶点主要为 MAPK1、EP300、PIK3R1、PIK3CA、AKT1 等。MAPK1 作为 MAPK 信号转导途径的重要组成部分,可激活 MAPK/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 途径^[23]; PIK3R1、PIK3CA、AKT1 均属于 PI3K/Akt 通路上的靶点;而 EP300 通过与磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element-binding protein, CREB) 特异性结合来介导 cAMP 基因调控^[24]。由此可见,恩施巴戟的潜在靶点主要分布于 cAMP、MAPK、PI3K/Akt 等信号通路,与 KEGG 通路富集分析结果一致。cAMP 信号通路^[25]、p38 MAPK 等的磷酸化水平^[26]以及

PI3K/Akt 通路^[27]等均可调控睾酮合成相关蛋白 (StAR、HSD3B1、Cyp11a1 等) 和 CREB 磷酸化水平,从而调控睾酮合成的过程,调节睾酮水平^[28]。

睾酮由胆固醇经 Star、Cyp11a1 等一系列蛋白酶作用下合成并分泌,雄性体内 95% 的睾酮由睾丸间质细胞分泌^[29]。本实验采用原代分离培养的睾丸间质细胞为研究对象, cAMP 促进剂 Fsk 具有促进睾酮分泌的作用^[30],以 Fsk 作为阳性对照。睾丸间质细胞实验进一步验证了网络药理学预测结果,水晶兰苷含量较高的提取物 (70% 和 95% 乙醇提取物) 促进睾丸间质细胞生长和睾酮分泌的作用更显著。作用机制与其上调 *Bcl-2* 与 *Bax* 的比值,增强睾丸间质细胞的抗凋亡能力,以及促进 *StAR* 等睾酮合成相关酶的基因和蛋白表达有关。

综上所述,网络药理学和分子对接结果显示,恩施巴戟主要通过 MAPK1、EP300、PIK3R1、PIK3CA、AKT1 等潜在靶点和 cAMP、MAPK、PI3K/Akt 等信号通路发挥作用,水晶兰苷为其补肾壮阳作用的主要有效成分之一。LC-MS/MS 分析和睾丸间质细胞实验结果验证了网络药理学预测分析,恩施巴戟提取物和水晶兰苷均具有促进睾丸间质细胞生长和睾酮分泌的作用,其作用机制与增强睾丸间质细胞的抗凋亡能力和促进睾酮合成相关酶的表达有关。本研究提供了恩施巴戟的药理学研究基础和新的思路,为恩施巴戟质量标准的制定和临床应用奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Smith L B, Walker W H. The regulation of spermatogenesis by androgens [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 30: 2-13.
- [2] 吴剑锋. 男性基础性激素水平与精子质量参数的相关性探讨 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(3): 69-71.
- [3] Salter C A, Mulhall J P. Guideline of guidelines: Testosterone therapy for testosterone deficiency [J]. *BJU Int*, 2019, 124(5): 722-729.
- [4] 许兵, 王萧枫, 王冠华, 等. 补肾活血颗粒对去势大鼠肾虚证的影响及机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(12): 2846-2849.
- [5] 顾银霞, 罗毅. 补肾法在去势抵抗性前列腺癌治疗中的应用 [J]. *内蒙古中医药*, 2020, 39(5): 149-151.
- [6] 湖北省中药材质量标准: 2018 年版 [S]. 2019: 188-189.
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第六卷, 第一分册-蕨类植物门) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 175.
- [8] 乔智胜, 吴焕, 苏中武, 等. 巴戟天、鄂西巴戟天和川巴戟药理活性的比较 [J]. *中西医结合杂志*, 1991, 11(7): 415-417.
- [9] 李正磊. 基于补肾阳谱效关系的盐巴戟天质量标准研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [10] 段金辉, 刘阳, 黄容吉, 等. 恩施巴戟环烯醚萜苷类成分提取工艺优选及抗氧化活性研究 [J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(4): 346-349.
- [11] 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.
- [12] 况海斌, 王新长, 方康. 大鼠睾丸间质细胞分离及其鉴定 [J]. *江西医学院学报*, 2002, 42(5): 7-9.
- [13] 苏现明. 鸡眼藤化学成分及药理活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [14] 张长弓, 鄢元和, 杨铁军, 等. 恩施巴戟化学成分的研 究(II) [J]. *同济医科大学学报*, 1991, 20(2): 93-95.
- [15] 鄢元和, 张长弓, 宁嘉赓, 等. 恩施巴戟化学成分的研 究 [J]. *同济医科大学学报*, 1989, 18(3): 201-202.
- [16] 赵祥升, 弓宝, 周亚奎, 等. UPLC-MS/MS 同时测定巴 戟天中 4 个环烯醚萜苷的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(9): 1490-1495.
- [17] 董雅倩, 张佳幸, 龚琳娜, 等. 白花蛇舌草环烯醚萜的 鉴定及基于网络药理学的抗肾纤维化作用的机制研究 [J]. *药学学报*, 2020, 55(12): 2934-2941.
- [18] 雒晓梅, 宿美凤, 常晓燕, 等. 基于 LC-MS 联用的杜仲 主要化学成分定性及定量分析 [J]. *中国现代中药*, 2019, 21(8): 1029-1040.
- [19] 任晓航, 石梦鸽, 刘博男, 等. UPLC-QQQ-MS 法测定 巴戟天炮制前后 10 种成分的含量 [J]. *中药材*, 2019, 42(3): 588-593.
- [20] 岳建民, 陈绍农, 杨升平, 等. 簇序草化学成分的研究 [J]. *植物学报*, 2001, 43(11): 1199-1201.
- [21] 乔智胜, 苏中武, 李承祜. 巴戟天应用的名实沿革考 [J]. *广西植物*, 1993, 13(3): 252-256.
- [22] 王锦辉, 樊梅月, 郭连澍. 补肾壮阳药对阳痿患者血清 睾酮的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2002, 11(24): 2468.
- [23] López-Bucio J S, Raya-González J, Ravelo-Ortega G, et al. Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate [J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 96(4/5): 339-351.
- [24] Xiang Q P, Wang C, Zhang Y, et al. Discovery and optimization of 1-(1*H*-indol-1-yl)ethanone derivatives as CBP/EP300 bromodomain inhibitors for the treatment of castration-resistant prostate cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 147: 238-252.
- [25] Otani M, Kogo M, Furukawa S, et al. The adiponectin paralog C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) stimulates testosterone production through the cAMP/PKA signaling pathway [J]. *Cytokine*, 2012, 58(2): 238-244.
- [26] Jing J, Ding N, Wang D D, et al. Oxidized-LDL inhibits testosterone biosynthesis by affecting mitochondrial function and the p38 MAPK/COX-2 signaling pathway in Leydig cells [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 626.
- [27] Eid A H, Gad A M, Fikry E M, et al. Venlafaxine and carvedilol ameliorate testicular impairment and disrupted spermatogenesis in rheumatoid arthritis by targeting AMPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 364: 83-96.
- [28] 朱清玉, 郭乐薇, 刘红羽, 等. 睾丸间质细胞睾酮合成 机制的研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(5): 28-33.
- [29] Pongkan W, Chattipakorn S C, Chattipakorn N. Roles of testosterone replacement in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2016, 21(1): 27-43.
- [30] Godard M P, Johnson B A, Richmond S R. Body composition and hormonal adaptations associated with forskolin consumption in overweight and obese men [J]. *Obes Res*, 2005, 13(8): 1335-1343.

[责任编辑 李亚楠]