

基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS 和网络药理学探讨肉苁蓉水提物治疗糖尿病肾病的作用机制

刘天华¹, 耿若愚¹, 赵耀¹,
王百才¹, 马冲¹, 杨建华^{1,2}, 胡君萍^{1*}

¹新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017; ²新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054

摘要:探究肉苁蓉水提物(the aqueous extract of *Cistanche tubulosa*, AECT)化学成分和 AECT 治疗糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的作用机制。利用 UPLC-MS/MS 对化合物进行分析鉴定;借助 PubChem、GeneCards、OMIM、DAVID 等数据库预测有效成分防治 DN 的作用靶点及通路,对核心基因进行 GO、KEGG 富集分析,并使用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-通路”可视化网络图。MTT 法测定 AECT 的抗 DN 活性;生化试剂盒检测过氧化指标超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)含量水平;ELISA 法检测炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)水平;Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率;Western blot 检测相关蛋白的表达。从 AECT 中共鉴定出 84 个化学成分,并推测出 15 个化合物可能的裂解途径;筛选出 AECT 治疗 DN 的 70 个潜在靶点和多个信号通路。体外实验发现 AECT 能够增加高糖高脂环境中的 HK-2 细胞存活率抑制细胞凋亡;并上调 SOD 活性和 GSH-Px 含量,抑制炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 表达水平;Western blot 结果证明 AECT 影响 PI3K-AKT 信号通路。本研究初步探明了 AECT 中的主要有效成分及其治疗 DN 的潜在靶点与作用机制,为 AECT 治疗 DN 后续的深入研究提供思路。

关键词:肉苁蓉;UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS;化学成分分析;网络药理学;实验验证

中图分类号:R284.1;R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)7-1242-16

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.7.017

Mechanism of *Cistanche tubulosa* water extract in the treatment of diabetic nephropathy based on UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS and network pharmacology

LIU Tian-hua¹, GENG Ruo-yu¹, ZHAO Yao¹,

WANG Bai-cai¹, MA Chong¹, YANG Jian-hua^{1,2}, HU Jun-ping^{1*}

¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China;

²The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract: To investigate the chemical composition of the aqueous extract of *Cistanche tubulosa* (AECT) and the mechanism of action of AECT in the treatment of diabetic nephropathy (DN), UPLC-MS/MS was used to analyse and identify the compounds. Using PubChem, GeneCards, OMIM, DAVID and other databases, we predicted the targets and pathways of the compounds to prevent and control DN, performed GO and KEGG enrichment analysis on the core genes, and constructed a visual ‘compound-target-pathway’ network diagram using Cytoscape software. Determination of Anti-DN Activity of AECT by MTT Method, Biochemical kits were used to detect the activity of superoxide dismutase (SOD) and the levels of glutathione peroxidase (GSH-Px). ELISA was used to measure the levels of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), tumour necrosis

收稿日期:2023-10-22 接受日期:2024-05-14

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(2021D01D11);国家自然科学基金(82160772);新疆天然药物有效成分与药物释放技术重点实验室(XJDX1713)

*通信作者 Tel:86-991-13899853561; E-mail:hjp-yxy@163.com

factor (TNF- α), and transforming growth factor (TGF- β). Detection of apoptosis was performed using the Annexin V-FITC/PI assay. Western blot was performed to detect the expression of relevant proteins. AECT contained 84 chemical components, with 15 compounds identified as possible cleavage pathways. Screening 70 potential targets and multiple signaling pathways of AECT for the treatment of DN. The results of the *in vitro* experiments showed that AECT increased the survival of HK-2 cells and inhibited apoptosis in a high-sugar and high-fat environment, And SOD activity and GSH-Px content were up-regulated, while the expression levels of inflammatory factors IL-1 β , TNF- α and TGF- β were inhibited. The Western blot results indicate that AECT has an impact on the PI3K-AKT signaling pathway. This study investigates the potential targets and mechanisms of action of the main active ingredients in AECT for the treatment of DN. The findings suggest avenues for further research into the use of AECT for DN treatment.

Key words: *Cistanche tubulosa*; UPLC-QE-Orbitrap-MS/MS; component analysis; network pharmacology; experimental verification

糖尿病人群中最重要医疗并发症之一是糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN),据估计,三分之一的1型和2型糖尿病患者会发展为DN^[1]。糖尿病肾损伤的发病机制是动态的、复杂的,涉及多种因素的相互作用^[2]。目前尚无治疗DN的特效方法,糖尿病性肾脏疾病的治疗又是一个长期漫长的过程^[3],因此这种疾病可能使我们付出以前无法预见的社会经济成本。

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎,始载于《神农本草经》,列为上品,其后古典《本草经疏》《本草汇言》《月华子本草》等多有记载,是我国传统名贵中药,素有“沙漠人参”之美誉。肉苁蓉味甘、咸,性温,归肾、大肠二经,具有补肾阳,益精血,润肠通便的功效,用于治疗肾阳不足、精血亏虚,阳痿不孕、腰膝酸软、肠燥便秘^[4]。除古籍记载之外,肉苁蓉经临床治疗或现代药理学证明同样具有不可忽视的治疗DN的作用^[5]。肉苁蓉中的有效成分均为水溶性成分,除苯乙醇苷外的其他水溶性成分作用尚不明确,而中药治疗疾病往往具有多成分-多靶点-多途径的作用特点,为了进一步研究揭示肉苁蓉治疗DN的药效物质基础与作用机制,本文采用液质联用技术(UPLC-MS/MS)分析肉苁蓉水提物(aqueous extract of *Cistanche tubulosa*, AECT)主要成分组成,利用网络药理学研究主要潜在活性成分的作用靶点和作用通路,从而对肉苁蓉治疗DN药效作用机制进行阐明同时为后续实验提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Vanquish 超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱、Heraeus Fresco17 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);ACQUITY UPLC BEH

C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μ m; 美国 Waters 公司);YM-080S 超声仪(深圳市方奥微电子有限公司);明澈 D24 UV 纯水仪(德国 Merck Millipore 公司)。

1.2 药材及试剂

肉苁蓉,自采于新疆和田人工种植地区,由新疆医科大学胡君萍教授鉴定为列当科植物管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* 的肉质茎。8-表去氧马钱子酸对照品(批号:P2303003,纯度 \geq 98%)、京尼平苷酸(批号:O2204001,纯度 \geq 98%)、丁香苷(批号:E2208001,纯度 \geq 98%)、(+)-松脂醇(批号:P2303002,纯度 \geq 98%)(四川普西奥标物科技有限公司);甜菜碱(批号:DJ0615YA13,纯度 \geq 98%,上海源叶生物科技有限公司);甲醇、乙腈(批号:67-56-1、75-05-8,色谱级,CNW Technologies 公司);色谱级甲酸(批号:64-18-6,美国 Sigma 公司);L-2-氯苯丙氨酸(批号:103616-89-3,上海恒柏生物科技有限公司)。

MTT(批号:EZ7890B104,德国 Biofrox 公司);FITC 偶联 Annexin-V 凋亡检测盒(批号:1026022,美国 BD 公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione Peroxide, GSH-Px)试剂盒(批号:20230602 和 20230529,南京建成生物工程研究所);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β) ELISA 试剂盒(批号:YX-091203H、YX-201407H 和 YX-200709H,上海优选生物科技有限公司);p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt(批号:AF3242、AF6241、AF0016、AF6261,江苏亲科生物研究中心有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 肉苁蓉水提液浸膏的制备

将 300 g 肉苁蓉剪块后置于 3 L 的蒸馏水中,

100 ℃煮沸提取 2 h, 过滤, 收集滤液, 将滤渣加 5 L 的蒸馏水继续提取, 重复提取 3 次, 合并滤液, 在 65 ℃真空下旋转蒸发, 浓缩后自然晾干成浸膏。

1.3.2 供试品溶液的制备

取“1.3.1”项下制备的干浸膏粉末适量, 加入提取液(甲醇-水 = 4:1); 涡旋 30 s, 45 Hz 匀浆 4 min, 冰水浴超声 1 h; 40 ℃静置 1 h 后将样本在 4 ℃, 12 000 r/min 条件下离心 15 min; 小心地取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

1.3.3 对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液, 精密吸取各对照品储备液, 混合并稀释成含各化合物质量浓度约为 10 μg/mL 的混合对照品溶液。

1.3.4 色谱条件

UPLC-MS/MS 分析采用 UHPLC 系统(Vanquish, Thermo Fisher Scientific), Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)。流速为 0.5 mL/min, 进样量为 5 μL。流动相为 0.1% 甲酸乙腈(A)和 0.1% 甲酸水(B)。多步线性洗脱梯度程序为: 0~11 min, 15% → 75% A; 11~12 min, 75% → 98% A; 12~14 min, 98% A; 14~14.1 min, 98% → 15% A; 14.1~16 min, 15% A。

1.3.5 质谱条件

采用 Orbitrap Exploris 120 质谱仪结合 Xcalibur 软件, 基于 IDA 采集方式获取 MS 和 MS/MS 数据。在每个采集周期中, 质量采集范围为 100~1500。雾化气体流速: 35 Arb, 辅助气体流速: 15 Arb, 离子转移管温度: 350 ℃, 汽化器温度: 350 ℃, 全 MS 分辨率: 60 000, MS/MS 分辨率: 15 000, NCE 模式下碰撞能量: 16/32/48, 喷雾电压: 4 kV(正)或-3.8 kV(负)。

1.3.6 蛋白质互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)的构建及关键作用靶点分析

通过 Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)来预测肉苁蓉潜在活性成分的作用靶点。通过 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>) TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)数据库查询 DN 相关靶点。将肉苁蓉主要成分作用靶点与疾病的靶点进行交集, 绘制韦恩图得到交集靶点。将交集靶点导入 STRING 数据库将物种组织设置为人源(Homo sapiens), 设置最低相互作用评分(minimum required in-

teraction score)为 0.9, 隐藏游离节点, 进行拓扑学分析。将分析结果保存导入 Cytoscape3.9.0 软件构建 PPI, 利用 CytoNCA 插件对 PPI 进行拓扑分析, 除去中介中心性(betweenness centrality, BC)和接近中心性(closeness centrality, CC)值小于平均值的靶点, 并设置 2 倍中位数点度中心性(degree centrality, DC)为最低阈值对靶点进行筛选。

1.3.7 GO 及 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线分析平台(<https://david.ncifcrf.gov/>)对 DN 核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。使用 Cytoscape3.9.0 软件制作“成分-靶点-通路”网络图; 使用微生信平台选取生物学过程(biological process, BP)、细胞成分(cell component, CC)、分子功能(molecular function, MF)及 KEGG 富集通路进行气泡图绘制。

1.3.8 肉苁蓉水提化合物体外抗 DN 验证

1.3.8.1 MTT 法测定 AECT 对高糖高脂环境中 HK-2 细胞增殖作用

将 HK-2 细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板中。细胞贴壁后, 加入葡萄糖和棕榈酸 24 h 形成高糖高脂模型, 将“1.3.1 项”下的浸膏用水溶解, 分别以浓度为 50、100、150、200 mg/L 加入模型细胞干预 48 h。加入 MTT 试剂, 孵育 4 h, 吸弃上清加入 150 μL DMSO 溶液, 在 490 nm 处测定吸光度。每个实验重复三次。

1.3.8.2 生化试剂盒和 ELISA 测定过氧化指标及炎症因子水平

将 HK-2 细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 细胞贴壁后, 加入葡萄糖和棕榈酸 24 h 形成高糖高脂模型, 给药组分别加入肉苁蓉水提化合物干预 48 h。收集待测样本蛋白和上清液, 严格按照说明书操作步骤检测过氧化指标 SOD 活性、GSH-Px 含量和炎症因子 IL-1β、TNF-α、TGF-β 水平。

1.3.8.3 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡

将 HK-2 细胞调整浓度为 7×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养过夜, 加入葡萄糖和棕榈酸干预 24 h, 分别加入 AECT 干预 48 h 后, 严格按照凋亡试剂盒说明收集样品, 尼龙网过滤后上机检测。

1.3.8.4 Western blot 检测相关蛋白的表达

按试剂盒说明书提取给药干预后的细胞蛋白, 测定蛋白质量浓度, 蛋白样品加入上样缓冲液, 金属浴 15 min 使蛋白变性。取变性蛋白适量, 选用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 加入

奶粉孵育 2 h 洗涤后,加入一抗,4 ℃ 孵育过夜;洗涤后加入对应二抗,室温孵育 1 h,洗涤后,显影。用 ImageJ 图像分析软件进行灰度值分析,以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2 结果与分析

2.1 AECT 化学成分分析

按上述方法,从 AECT 中共鉴定出 84 个化学成

分,正离子模式下鉴定出 56 个,负离子模式下鉴定出 28 个,包括 9 个苯乙醇苷类、13 个环烯醚萜类、4 个木脂素类、11 个萜类、6 个氨基酸及其衍生物、11 个黄酮及其苷类、6 个糖和糖苷类、4 个苯丙素类、1 个香豆素类、4 个酚类、14 个其他类,其中 5 个成分由对照品比对鉴定(见表 1)。供试品正、负离子模式下的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)(见图 1)。

表 1 从肉苁蓉水提物鉴定的化学成分
Table 1 Chemical composition identified from AECT

编号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	t_R (min)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	离子模式 Ion mode	碎片离子 Fragment ion
1	8-表马钱子苷 8-Epiloganin ^[6]	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	0.050	391.28	0.7	[M+H] ⁺	149.02, 71.09, 57.07
2	葡萄糖酸 D-Gluconic acid ^[6]	C ₆ H ₁₂ O ₇	0.564	195.05	-3.1	[M-H] ⁻	75.01, 195.05, 59.01
3	没食子酸 Gallic acid ^[6]	C ₇ H ₆ O ₅	0.566	169.01	-4.3	[M-H] ⁻	126.03, 170.02, 128.04
4	琥珀酸 Succinic acid ^[7]	C ₄ H ₆ O ₄	0.597	117.02	0.9	[M-H] ⁻	73.03, 117.02, 99.01
5	Kankanoside C ^[8]	C ₁₅ H ₂₅ ClO ₁₀	0.602	399.10	-2.2	[M-H] ⁻	61.99, 399.11, 96.96
6	甜菜碱 Betaine ^{*[9]}	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.603	118.09	2.3	[M+H] ⁺	118.09, 119.09, 59.07
7	5-Oxo-D-proline ^[10]	C ₅ H ₇ NO ₃	0.619	128.04	-2.6	[M-H] ⁻	128.04, 85.03, 82.03
8	甘露醇 Mannitol ^[8]	C ₆ H ₁₄ O ₆	0.651	181.07	-3.5	[M-H] ⁻	181.07, 71.01, 89.02
9	络氨酸 Tyrosine ^[7]	C ₉ H ₁₁ NO ₃	0.691	182.08	2.4	[M+H] ⁺	165.10, 183.11, 182.08
10	1-Methoxy-3-carbaldehyde	C ₁₀ H ₉ NO ₂	0.743	176.07	3.0	[M+H] ⁺	176.07, 177.10, 145.03
11	Pyrocatechol ^[11]	C ₆ H ₆ O ₂	0.745	109.03	-3.6	[M-H] ⁻	109.03, 110.02, 66.04
12	5,7-二羟基色原酮 5,7-Dihydroxychromone ^[7]	C ₉ H ₆ O ₄	0.886	179.03	-0.9	[M+H] ⁺	179.03, 151.04, 133.03
13	芦丁 Rinderine ^[12]	C ₂₃ H ₂₀ O ₆	0.897	393.21	2.2	[M+H] ⁺	393.21, 128.07, 70.07
14	胆碱 Choline	C ₅ H ₁₄ NO	0.912	104.11	-0.1	[M] ⁺	104.11, 105.03, 87.04
15	缬氨酸 Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.918	118.09	0.9	[M+H] ⁺	118.09, 119.09, 72.08
16	对羟基苯甲醛 P-Hydroxybenzaldehyde ^[13]	C ₇ H ₆ O ₂	0.924	121.03	-4.5	[M-H] ⁻	121.03, 122.02, 93.04
17	愈创木酚 Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	0.939	125.06	1.7	[M+H] ⁺	108.05, 126.06, 124.04
18	苯丙氨酸 Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	0.983	166.09	0.4	[M+H] ⁺	93.03, 169.08, 125.06
19	胡萝卜苷 Daucosterol ^[14]	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	0.994	576.18	4.2	[M+H] ⁺	70.07, 576.17, 274.13
20	吡咯烷酮羧酸锌 Pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	1.091	130.05	-0.5	[M+H] ⁺	84.05, 130.16, 74.10
21	12-羟基茉莉酸 (-)-12-Hydroxyjasmonic acid ^[15]	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	1.331	227.13	2.5	[M+H] ⁺	84.05, 230.13, 229.09
22	DL-异亮氨酸 Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1.342	132.10	0.7	[M+H] ⁺	86.10, 133.10, 105.07
23	脱落酸 Abscisic acid ^[16]	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	1.397	265.14	-0.3	[M+H] ⁺	265.11, 219.14, 247.13
24	Deoxyloganic acid ^[8]	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	1.532	359.13	4.0	[M-H] ⁻	153.02, 135.03, 359.08
25	8-表去氧马钱子酸 8-Epideoxyloganic acid ^{*[8]}	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	1.556	359.14	-2.9	[M-H] ⁻	153.09, 135.08, 197.08
26	Crenatoside ^[8]	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	1.567	621.18	-5.2	[M-H] ⁻	621.18, 161.03, 179.03
27	藤黄酮 E Garcinone E ^[8]	C ₂₈ H ₃₂ O ₆	1.611	463.09	1.7	[M-H] ⁻	300.03, 463.08, 161.03
28	毛蕊花糖苷 Verbascoside ^[8]	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	1.859	623.20	-0.1	[M-H] ⁻	161.03, 624.21, 113.02

续表 1 (Continued Tab. 1)

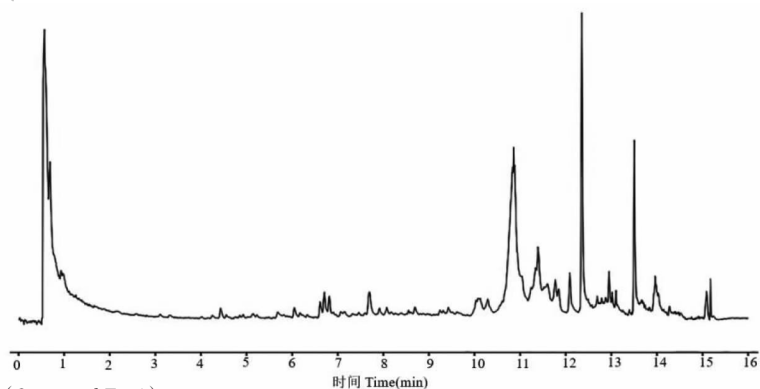
编号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	t_R (min)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	离子模式 Ion mode	碎片离子 Fragment ion
29	异麦角甾昔 Isoacteoside ^[8]	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	2.091	625.21	-0.5	[M+H] ⁺	163.04, 626.26, 608.25
30	6-乙氧基京尼平昔 6-Ethoxygeniposide ^[8]	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₁	2.313	433.11	7.1	[M+H] ⁺	271.06, 433.18, 195.07
31	2-乙酰基毛蕊花糖昔 2-Acetylacteoside ^[6]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	2.679	665.21	1.3	[M-H] ⁻	161.03, 665.20, 461.17
32	3,4,5-三甲氧基肉桂酸 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	2.905	237.08	3.5	[M-H] ⁻	195.11, 239.10, 101.06
33	(+)-丁香树脂酚 (+)-Syringaresinol ^[8]	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	3.268	417.08	-1.4	[M-H] ⁻	417.08, 340.06, 328.06
34	异秦皮啶 Isofraxidin ^[17]	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	3.317	223.06	0.6	[M+H] ⁺	223.06, 208.04, 188.11
35	Rinderine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	3.338	300.18	1.5	[M+H] ⁺	300.18, 110.06, 240.16
36	槲皮素 Quercetin ^[7]	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	3.522	303.05	-0.6	[M+H] ⁺	303.05, 271.10, 183.03
37	胡黄连昔 II Picroside II	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	3.648	513.16	2.9	[M+H] ⁺	163.04, 513.27, 349.09
38	5-[6-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 1,3,3 α ,4,6,6 α -hexahydrofuro [3,4-c]furan-3-yl]-2-methoxyphenol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	3.865	381.14	1.8	[M-H ₂ O+H] ⁺	292.10, 342.14, 324.13
39	2-O-Caffeoylarbutin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	3.882	435.13	2.6	[M+H] ⁺	147.04, 435.28, 123.06
40	苜蓿素 Tricin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	4.243	329.07	-2.2	[M-H] ⁻	315.04, 330.07, 300.02
41	(1 α ,6 α ,7 α H)-2,4(15)-Copadiene	C ₁₅ H ₂₂	4.655	203.18	-1.1	[M+H] ⁺	203.18, 147.12, 133.10
42	京尼平昔酸 Geniposidic acid ^{*[7]}	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	4.756	373.09	1.0	[M-H] ⁻	123.01, 149.06, 167.07
43	染料木素 Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	4.789	269.04	-0.4	[M-H] ⁻	269.05, 201.05, 225.15
44	邻羟基肉桂酸 2-Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₃	4.794	147.04	1.7	[M+H-H ₂ O] ⁺	147.04, 119.05, 105.07
45	黄芩黄酮 Skullcapflavone II	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	4.805	373.09	-1.8	[M-H] ⁻	80.97, 375.19, 258.18
46	2,6-二甲氧基-1,4-苯醌 2,6-Dimethoxyquinone	C ₈ H ₈ O ₄	4.805	167.03	-0.9	[M-H] ⁻	125.10, 169.12, 139.00
47	长叶紫藤碱 A Oblongifoliagarcinine A	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	4.850	269.17	-0.6	[M+H] ⁺	269.17, 93.07, 149.13
48	Zizyberanalic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	5.126	471.35	2.6	[M+H] ⁺	471.34, 472.24, 124.04
49	大豆苷元 Daidzein ^[7]	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5.177	255.10	1.2	[M+H] ⁺	91.06, 255.10, 227.11
50	异鼠李素 Isohammetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	5.226	315.05	-1.0	[M-H] ⁻	315.05, 256.04, 289.07
51	咖啡酸 Caffeic acid ^[7]	C ₉ H ₈ O ₄	5.450	181.05	1.7	[M+H] ⁺	181.05, 123.04, 21.10
52	2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3, 5,7-trimethoxychromen-4-one	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	5.732	373.13	-0.7	[M+H] ⁺	373.13, 343.08, 312.10
53	红景天昔 Salidroside ^[8]	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	6.260	301.07	2.5	[M+H] ⁺	301.07, 286.05, 258.05
54	长叶紫藤碱 C Oblongifoliagarcinine C	C ₂₂ H ₂₂ O ₃	6.490	335.22	0.2	[M+H] ⁺	335.22, 336.22, 137.05
55	Conicaoside	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	6.496	551.10	-0.3	[M-H] ⁻	375.05, 551.09, 331.06
56	7-Hydroxy-1,4 α -dimethyl-9-oxo- 7-propan-2-yl-2,3,4, 4b,5,6,10,10 α -octahydrophenanthrene- 1-carboxylic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	6.586	335.22	0.2	[M+H] ⁺	335.22, 336.26, 317.21
57	五福花昔酸 Adoxosidic acid ^[8]	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	6.763	377.27	1.4	[M+H] ⁺	377.24, 107.09, 125.10
58	丁香苷 Syringin ^{*[8]}	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	6.861	373.13	2.4	[M+H] ⁺	373.13, 343.08, 358.10
59	β -谷甾醇 β -Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	7.299	415.32	6.4	[M+H] ⁺	415.32, 271.21, 253.20
60	α -亚麻酸 α -Linolenic acid ^[9]	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	7.406	279.23	1.3	[M+H] ⁺	81.07, 281.24, 95.09
61	Kankanoside D ^[8]	C ₁₅ H ₂₆ O ₇	7.463	319.23	1.4	[M+H] ⁺	273.19, 319.23, 119.09

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	t_R (min)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	离子模式 Ion mode	碎片离子 Fragment ion
62	14-Hydroxy-14-(hydroxymethyl)-5,9-dimethyltetracyclo [11.2.1.01,1?.0?,?]hexadecane-5-carboxylic acid	$C_{20}H_{32}O_4$	8.155	337.24	-0.1	$[M+H]^+$	339.25, 95.09, 293.21
63	松脂素 (+)-Pinoresinol ^[7]	$C_{20}H_{22}O_6$	8.185	359.15	7.2	$[M+H]^+$	359.15, 341.14, 95.09
64	Glucoside	$C_{15}H_{24}O_8$	8.310	333.20	7.4	$[M+H]^+$	333.21, 81.07, 99.08
65	黑麦草内酯 Loliolide	$C_{11}H_{16}O_3$	8.359	197.12	-1.9	$[M+H]^+$	81.04, 198.19, 199.11
66	刺五加甙 E1 Acanthoside B	$C_{28}H_{36}O_{13}$	9.256	579.39	-2.4	$[M-H]^-$	579.61, 387.26, 417.77
67	鸡矢藤次苷甲酯 Feretoside ^[8]	$C_{17}H_{24}O_{11}$	10.095	405.26	5.8	$[M+H]^+$	405.26, 406.26, 293.14
68	卫矛醇 Dulcitol ^[8]	$C_6H_{14}O_6$	10.262	181.07	-1.7	$[M-H]^-$	182.07, 168.01, 102.03
69	肉苁蓉苷 F Cistanoside F ^[8]	$C_{21}H_{28}O_{13}$	10.357	489.36	0.7	$[M+H]^+$	489.32, 443.35, 471.35
70	脱咖啡酰基毛蕊糖苷 Decaffeoyl acteoside ^[8]	$C_{20}H_{30}O_{12}$	10.869	463.30	3.4	$[M+H]^+$	463.30, 464.31, 111.04
71	4,14-Dimethylergosta-8,25-dien-3-ol	$C_{30}H_{50}O$	11.109	427.39	1.8	$[M+H]^+$	271.16, 429.32, 121.06
72	肉苁蓉苷 E Cistanoside E ^[8]	$C_{21}H_{32}O_{12}$	11.369	477.32	3.4	$[M+H]^+$	477.32, 478.32, 337.16
73	香紫苏醇 Scclareol ^[7]	$C_{20}H_{36}O_2$	12.050	326.31	-0.5	$[M+NH_4]^+$	327.09, 326.31, 116.07
74	Dulxanthone B	$C_{24}H_{26}O_6$	12.143	411.36	5.9	$[M+H]^+$	129.10, 411.36, 84.08
75	反式-棕榈油酸 Palmitelaic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	12.291	253.22	-1.5	$[M-H]^-$	253.22, 254.22, 209.07
76	Kankanoside A ^[8]	$C_{16}H_{26}O_8$	12.623	347.26	5.8	$[M+H]^+$	347.26, 89.06, 151.10
77	Jionoside D	$C_{30}H_{38}O_{15}$	12.771	637.43	-2.3	$[M-H]^-$	637.44, 255.23, 153.00
78	长叶紫藤碱 B Oblongifoliagarcinine B	$C_{22}H_{24}O_3$	12.928	337.24	4.2	$[M+H]^+$	337.18, 338.18, 322.16
79	<i>E</i> -Jasmone	$C_{11}H_{16}O$	13.643	165.13	-0.7	$[M+H]^+$	147.04, 166.09, 165.13
80	Azulenol(5,6-c) furan-1(3H)-one, 4,4a,5,6,7,7a,8,9-octahydro-3,4,8-trihydroxy-6,6,8-trimethyl-	$C_{15}H_{22}O_5$	14.096	281.14	-2.1	$[M-H]^-$	281.14, 237.15, 83.05
81	8-氧代香叶醇 8-Hydroxy geraniol	$C_{10}H_{18}O_2$	14.274	169.05	-4.8	$[M-H]^-$	169.05, 142.04, 125.10
82	Bartsioside ^[8]	$C_{15}H_{22}O_8$	15.219	353.08	4.6	$[M+Na]^+$	331.09, 316.06, 301.04
83	北美黄连碱分碱 8-Hydroxy-7-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one	$C_{10}H_8O_4$	15.290	193.05	3.3	$[M+H]^+$	193.05, 194.12, 133.03
84	玉叶金花苷酸 Mussaenosidic acid ^[8]	$C_{16}H_{24}O_{10}$	15.328	377.16	-2.9	$[M+H]^+$	377.25, 179.07, 133.09

注: * 该成分通过与对照品比较后鉴定。

Note: * This compound was identified by comparison with the reference substance.



续图 1 (Continued Fig.1)

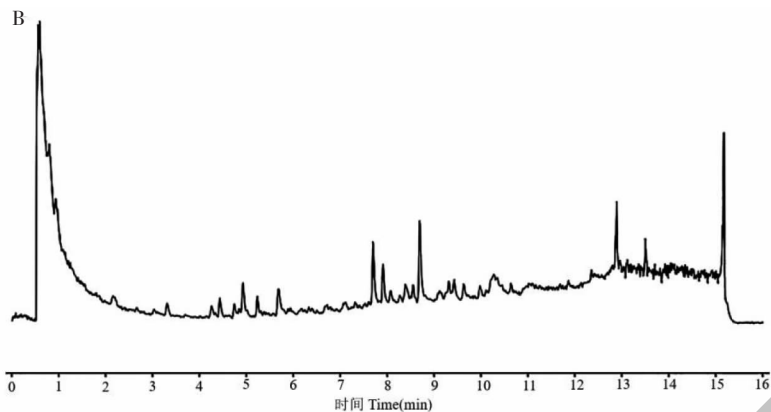


图1 正离子(A)和负离子(B)模式下的肉苁蓉水提物 TIC 图

Fig. 1 TIC of AECT in positive (A) and negative (B) ion modes

2.1.1 苯乙醇苷类的鉴定

化合物 **26** ($t_R = 1.566$ min) 在负离子模式下给出分子离子峰 m/z 621.18 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{29}H_{34}O_{15}$, 其二级质谱图与推断的裂解途径见图 2; 分子离子峰为 621.18 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{29}H_{34}O_{15}$,

分子离子峰脱去 $C_6H_{10}O_5$ (m/z 162) 得到碎片离子 m/z 459.13; 碎片离子 m/z 459.13 继续脱去 $C_{14}H_{16}O_6$ (m/z 280) 形成 m/z 179.03 的二级碎片离子; 分子离子峰脱去 $C_8H_6O_2$ (m/z 134) 得到碎片离子 m/z 487.15。通过与文献比对^[8], 鉴定为 crenatoside。

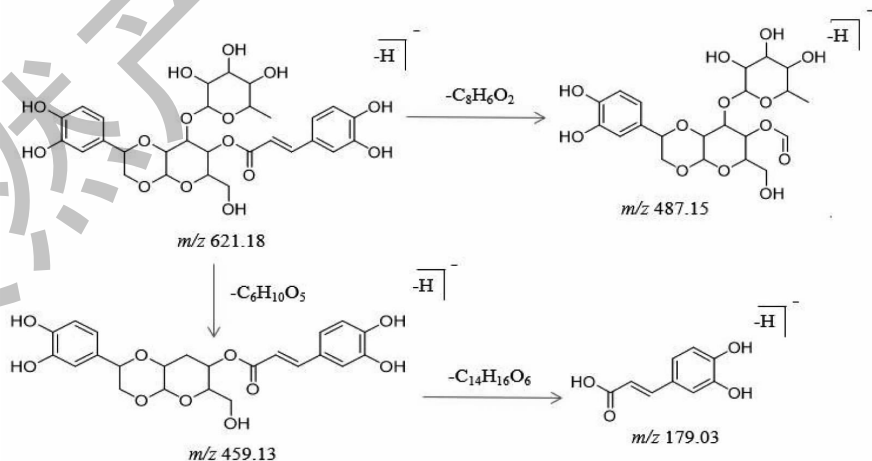
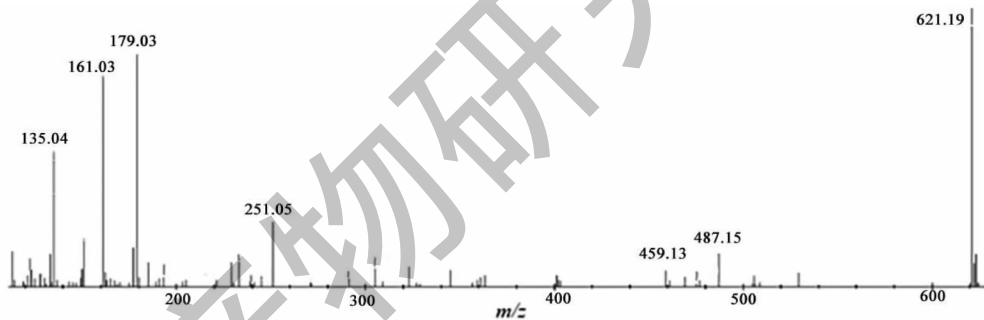


图2 Crenatoside 可能的质谱裂解途径

Fig. 2 Possible mass spectrometry fragmentation pathways of crenatoside

2.1.2 环烯醚萜类的鉴定

化合物 **25** ($t_R = 1.555$ min) 在负离子模式下给

出分子离子峰 m/z 359.14 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{16}H_{24}O_9$, 其二级质谱图与推断的裂解途径见图 3。

分子离子峰 m/z 359.14 $[M-H]^-$ 脱去一分子葡萄糖残基 $C_6H_{10}O_5$ (m/z 162) 得到碎片离子 m/z 197.08, 碎片离子 m/z 197.08 继续脱去一分子 CO_2 (m/z 44) 得到碎片离子 m/z 153.09; 碎片离子 m/z 153.09 再脱去一分子 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子

m/z 135.08; 碎片离子 m/z 153.09 脱去 C_4H_8 (m/z 56) 形成 m/z 97.03 的碎片离子。通过与对照品对比,该化合物的保留时间、二级质谱碎片与 8-表去氧马钱子酸一致,故将化合物 **25** 鉴定为 8-表去氧马钱子酸。

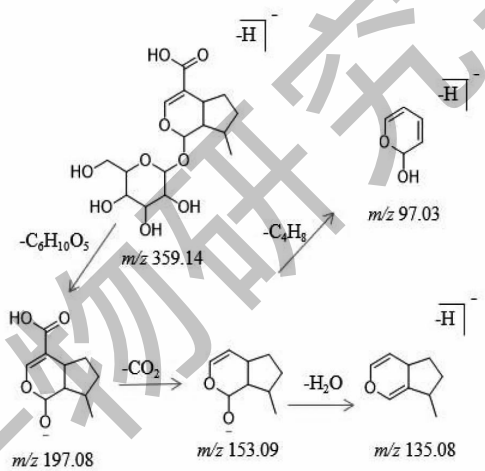
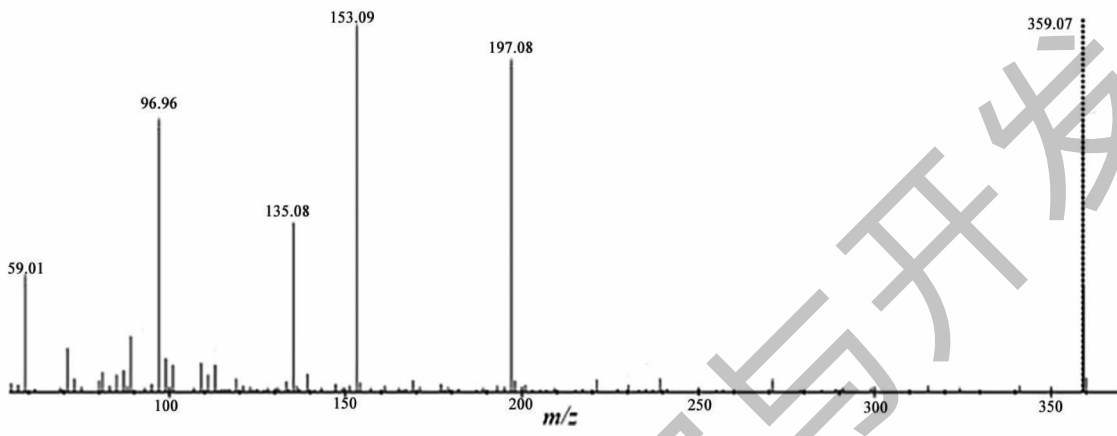
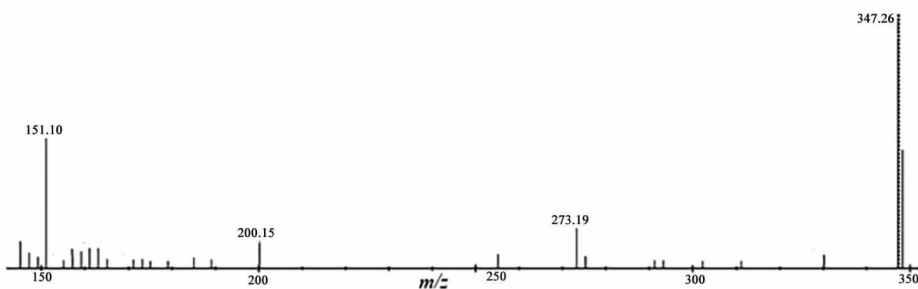


图3 8-表去氧马钱子酸可能的质谱裂解途径

Fig. 3 Possible mass spectrometry fragmentation pathways of 8-epideoxygamic acid

化合物 **76** ($t_R = 12.623$ min) 在正离子模式下给出分子离子峰 m/z 347.14 $[M+H]^+$, 推断其分子式为 $C_{16}H_{26}O_8$, 其二级质谱图与推断的裂解途径见图4。分子离子峰为 $347.14 [M+H]^+$, 分子式为 C_{16}

$H_{26}O_8$, 分子离子峰脱去 1 分子 $C_3H_6O_2$ (m/z 74) 得到碎片离子 m/z 273.13; 分子离子峰脱去 $C_{11}H_{16}O_3$ (m/z 196) 形成 m/z 151.06 的碎片离子。通过与文献比对^[8], 鉴定为 kankanoside A。



续图4 (Continued Fig.4)

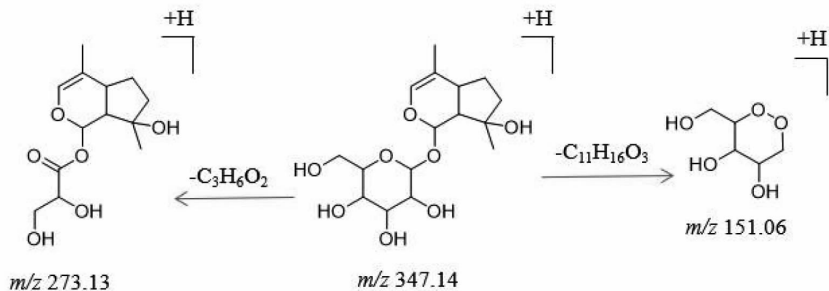


图4 Kankanoside A 可能的质谱裂解途径

Fig. 4 Possible mass spectrometry fragmentation pathways of kankanoside A

2.1.3 木脂素类的鉴定

化合物 **66** ($t_R = 9.255$ min) 在负离子模式下给出分子离子峰 m/z 579.39 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{28}H_{36}O_{13}$, 其二级质谱图与推断的裂解途径见图 5。分子离子峰为 579.39 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{28}H_{36}O_{13}$, 分子离子峰葡萄糖基断裂脱去 $C_3H_6O_2$ (m/z 74) 得到碎片离子 m/z 505.17; 分子离子峰脱去 $C_6H_{10}O_5$

(m/z 162) 得到碎片离子 m/z 417.15, 碎片离子 m/z 417.15 分别再脱去一分子 CH_2O (m/z 30) 和 $C_{13}H_{16}O_4$ (m/z 236) 得到二级碎片离子 m/z 387.14 和 m/z 181.05; 分子离子峰脱去 $C_{19}H_{24}O_{10}$ (m/z 412) 形成 m/z 167.07 的碎片离子。依据该化合物的保留时间、二级质谱碎片信息推测为刺五加甙 E1。

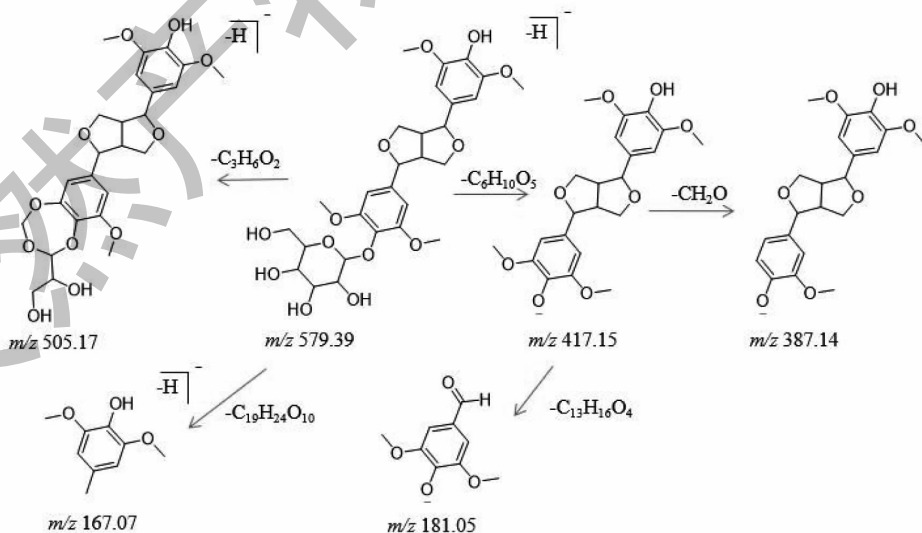
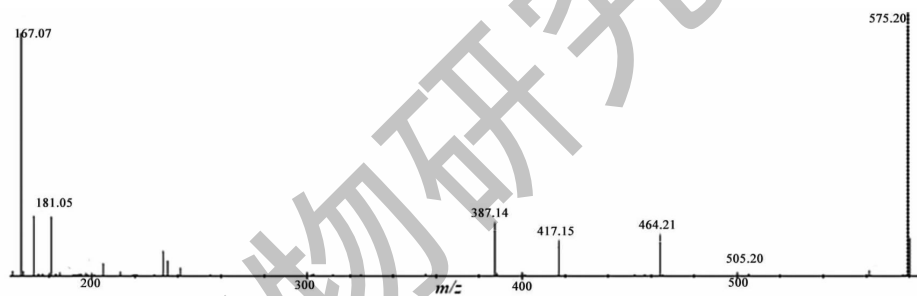


图5 刺五加甙 E1 可能的质谱裂解途径

Fig. 5 Possible mass spectrometry fragmentation pathways of acanthoside B

2.1.4 其它化合物的鉴定

化合物 **47** ($t_R = 4.849$ min) 在正离子模式下给

出分子离子峰 269.04 $[M+H]^+$, 推断其分子式为 $C_{17}H_{16}O_3$, 其二级质谱图与推断的裂解途径见图 6。

分子离子峰为 $269.04 [M + H]^+$, 分子式为 $C_{17}H_{16}O_3$, 分子离子峰失去一分子 C_6H_4O (m/z 92) 得到碎片离子 m/z 177.08, 碎片离子 m/z 177.08 继续失去一分子 C_4H_6O (m/z 70) 得到碎片离子 m/z 107.01;

分子离子峰失去 $C_{12}H_{12}O_2$ (m/z 188) 得到碎片离子 m/z 81.03; 分子离子峰失去 C_8H_8O (m/z 120) 得到碎片离子 m/z 149.06。依据该化合物的保留时间、二级质谱碎片信息推测为长叶紫藤碱 A。

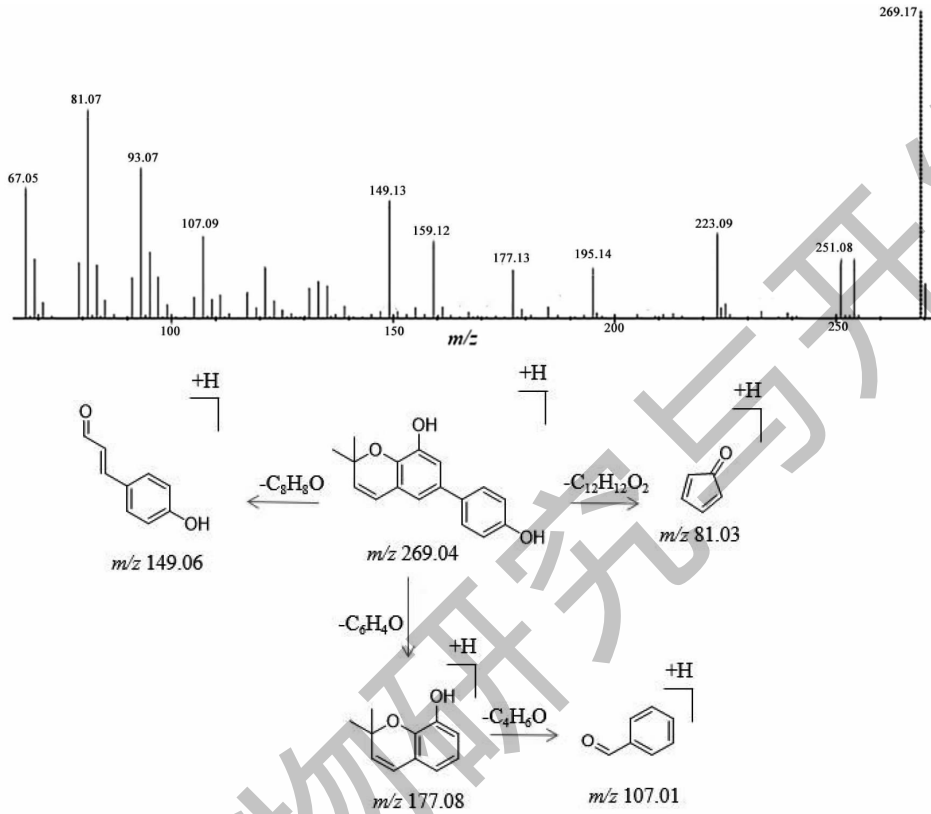


图 6 长叶紫藤碱 A 可能的质谱裂解途径

Fig. 6 Possible mass spectrometry fragmentation pathways of oblongifoliagaricine A

2.2 PPI 的构建及关键作用靶点分析

通过 Swiss Target Prediction 预测肉苁蓉潜在活性成分的作用靶点去重后共 727 个, 通过 GeneCards 等 3 个数据库检索 DN 的相关治疗靶点并合并去重

后, 获得改善治疗 DN 的相关靶点 3 639 个。将肉苁蓉的潜在作用靶点与改善治疗 DN 的相关靶点取交集, 得到 368 个共同靶点, 并通过 Venny2. 1. 0 平台绘制韦恩图(见图 7)。

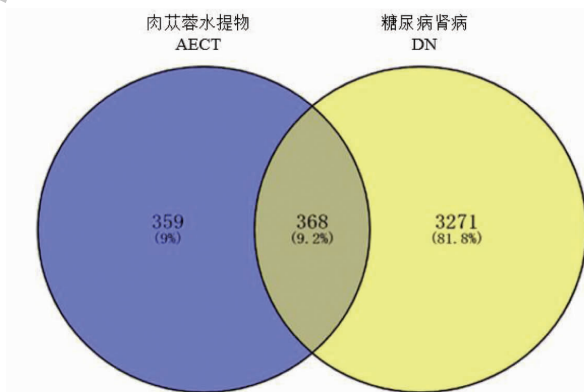


图 7 AECT-糖尿病肾病交集靶点韦恩图

Fig. 7 Venn diagram for the intersection targets of AECT-DN

根据 PPI 作用靶点分析筛选出 70 个靶点(见图 8)。DN 核心靶点包括:核因子 κ B 亚基 1 (nuclear factor kappa B subunit 1, NFKB1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT serine/threonine kinase 1,

AKT1)、肿瘤蛋白 P53 (tumor protein p53, TP53)、磷酸肌苷-3-激酶调控亚基 1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、转录的信号换能器和激活器(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)等(见表 2)。

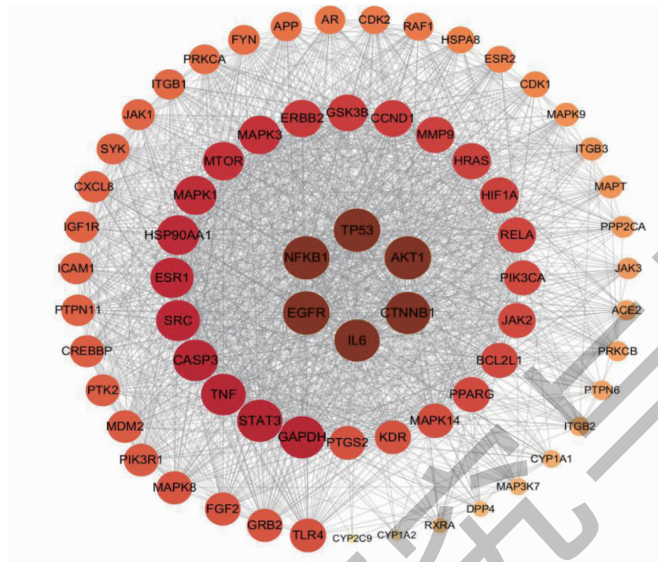


图 8 潜在靶点 PPI 图

Fig. 8 PPI chart of potential targets

表 2 核心靶点基本信息

Table 2 Basic information of core targets

基因 Gene	点度中心性 Degree centrality	中介中心性 Betweenness centrality	接近中心性 Closeness centrality
<i>NFKB1</i>	63	66.079 48	0.931 507
<i>EGFR</i>	63	58.202 47	0.931 507
<i>AKT1</i>	63	73.100 12	0.931 507
<i>TP53</i>	63	121.939 00	0.931 507
<i>STAT3</i>	61	55.708 96	0.906 667
<i>GAPDH</i>	61	64.476 81	0.906 667
<i>IL6</i>	61	73.253 39	0.906 667
<i>CTNNB1</i>	61	50.024 67	0.906 667
<i>CASP3</i>	60	50.390 35	0.894 737
<i>TNF</i>	60	56.409 35	0.894 737
<i>SRC</i>	59	45.595 23	0.883 117
<i>ESR1</i>	58	59.735 92	0.871 795
<i>HSP90AA1</i>	57	88.819 08	0.860 760
<i>MAPK1</i>	56	41.894 50	0.850 000
<i>MAPK3</i>	55	48.356 15	0.839 506
<i>MTOR</i>	55	27.915 84	0.839 506
<i>ERBB2</i>	53	28.553 02	0.819 277
<i>CCND1</i>	52	22.984 46	0.809 524
<i>GSK3B</i>	52	25.900 39	0.809 524
<i>MMP9</i>	51	24.669 71	0.800 000

2.3 GO 及 KEGG 通路富集分析

GO 通路富集分析主要包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。GO 富集分析共得到 787 个结果 (见图 9), 其中 BP 589 条, CC 77 条, MF121 条; BP 主要与基因表达的正向调控、凋亡过程负向调控、蛋白磷酸化、细胞内信号传导等系统应答相关; CC 主要与细胞质、胞液、细胞核等关联;

MF 主要与酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白磷酸酶结合等相关。KEGG 通路富集分析共得到 168 条通路 (见图 10)。富集结果表明肉苁蓉治疗 DN 机制可能与癌症途径、癌症中的蛋白聚糖、脂质和动脉粥样硬化、乙型肝炎、PI3K-Akt 信号通路、前列腺癌、内分泌的阻力、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等通路密切相关。

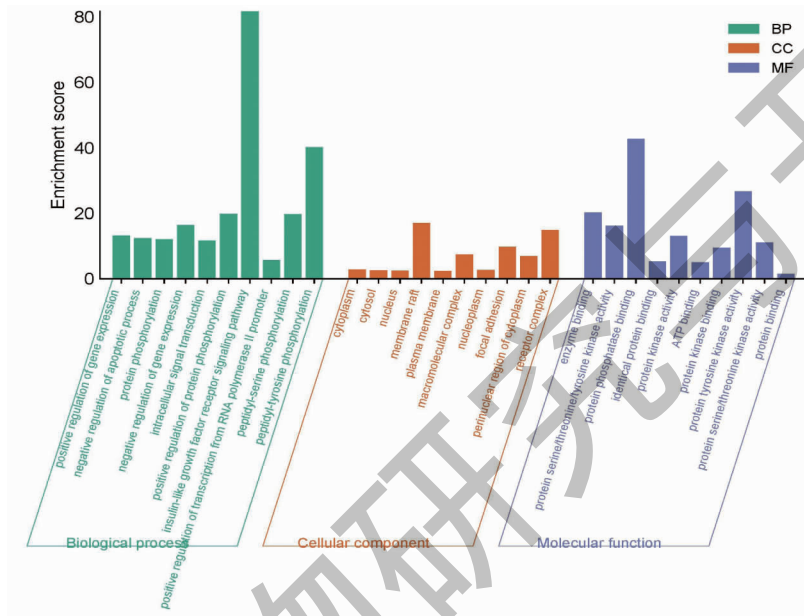


图9 AECT与糖尿病肾病交集靶点的GO功能分析

Fig. 9 GO functional analysis diagram of intersection targets of AECT and DN

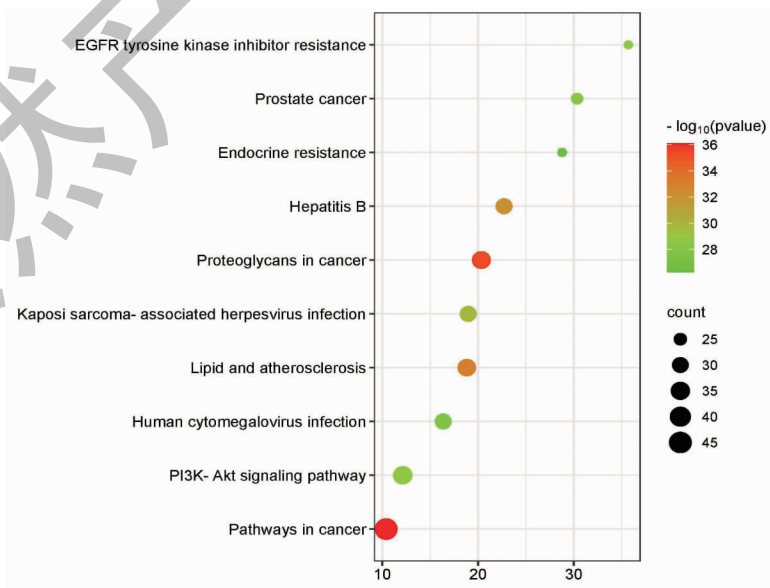


图10 AECT与糖尿病肾病交集靶点的KEGG富集通路分析

Fig. 10 KEGG pathway enrichment analysis diagram of intersection targets of AECT and DN

2.4 肉苁蓉水提化合物体外抗 DN 验证

2.4.1 MTT 法测定肉苁蓉水提对高糖高脂环境中 HK-2 细胞增殖作用

MTT 实验结果显示(见图 11),AECT 对高糖高

脂模型细胞具有药效作用($P < 0.01$)。当剂量为 100 mg/L 时药物对高脂高糖模型细胞具有最佳药效,因此选用给药浓度为 100 mg/L 进行后续研究。

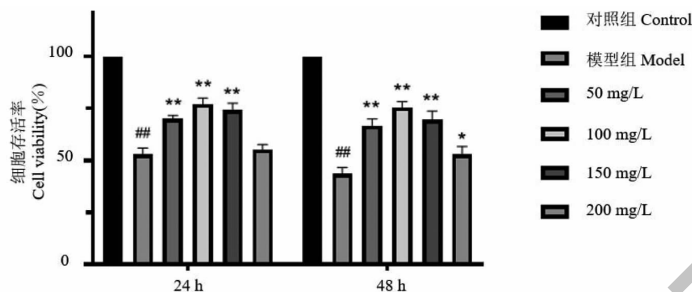


图 11 AECT 对高糖高脂诱导的 HK-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of AECT on HK-2 cell viability induced by high glucose and high fat ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比,### $P < 0.01$;与模型组比,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$,下同。Note:Compared with control,### $P < 0.01$;Compared with model,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$,the same below.

2.4.2 AECT 对高糖高脂 HK-2 模型的抗氧化和抗炎作用

如图 12 所示,模型组与对照组相比过氧化指标 SOD 活性、GSH-Px 含量明显降低($P < 0.01$),给药

组 SOD 活性、GSH-Px 含量远高于模型组($P < 0.01$);模型组与对照组相比 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 含量明显升高($P < 0.01$),给药组 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 含量比模型组均下降($P < 0.01, P < 0.05$)。

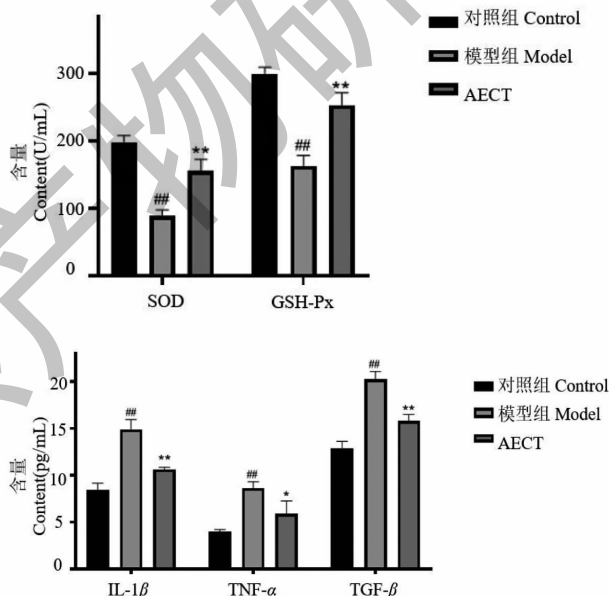


图 12 AECT 对高糖高脂诱导的 HK-2 细胞炎症因子和氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effects of AECT on the levels of inflammatory factors and oxidative stress in

HK-2 cells induced by high glucose and high fat ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4.3 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示(见图 13):模型组和给药组凋亡率分别为 43.6% 和 20.7%;模型组细胞

凋亡比对照组具有差异($P < 0.01$),给药组与模型组相比细胞凋亡率有差异($P < 0.05$)。

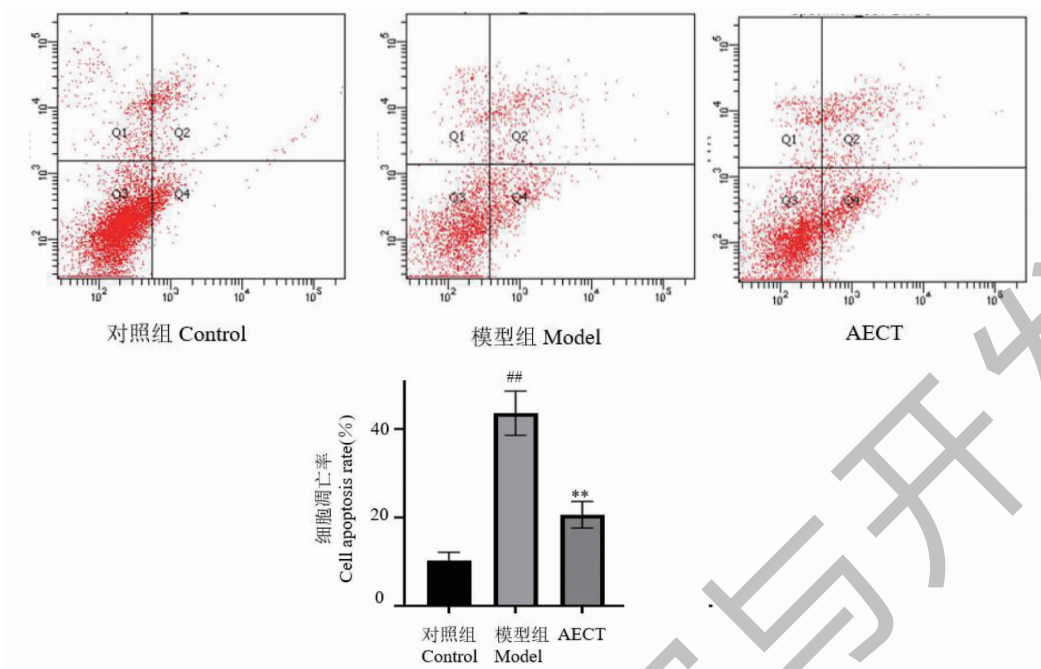


图 13 AECT 对高糖高脂诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effect of AECT on apoptosis in HK-2 cells induced by high glucose and high fat ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4.4 Western blot 检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白的表达

Western blot 检测结果表明(见图 14),模型组

与正常组相比 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达量明显升高($P < 0.01$),而给药 AECT 处理组中 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达量被明显下调($P < 0.05$)。

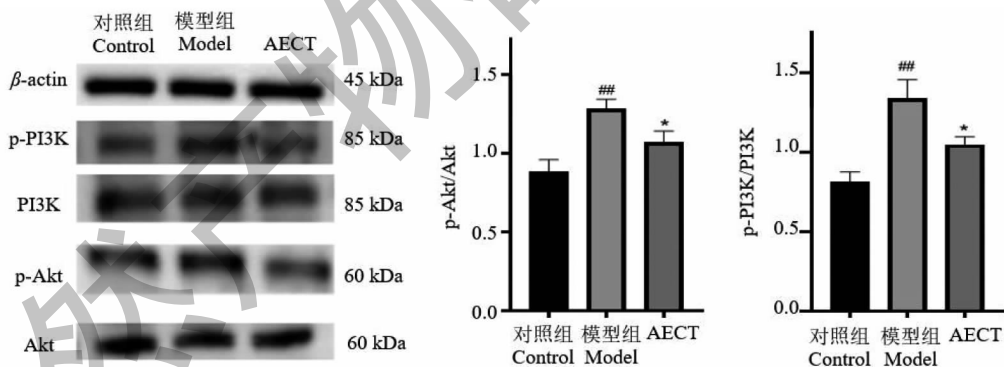


图 14 肉苁蓉水提物对 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Effect of AECT on p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

UPLC-MS/MS 分析结果表明, AECT 中所含萜类、苯乙醇苷类、环烯醚萜类和木脂素类成分占比较高,同时还具有多种氨基酸、黄酮类和糖类及其衍生物;肉苁蓉中的有效成分均为水溶性成分,大多传统用酒浸泡、炮制之法现今已不再使用^[4]。此次使用水提取方法获得了苯乙醇苷类、环烯醚萜类、木脂素类等大部分的主要药效物质成分;据此推测,实验利

用 UPLC-MS/MS 结合网络药理学分析出的包括毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷等苯乙醇苷类、京尼平苷酸、8-表去氧马钱子酸等环烯醚萜类,以及松脂素等木脂素类、甘露醇等糖类及其衍生物与其有效性相关,很可能是主要药效物质基础。例如:水溶性的苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷能通过减轻体内氧化应激来保护中枢受损神经^[18];通过降低炎症因子的表达抑制骨关节炎大鼠滑膜炎^[19];环烯醚萜类化合

物京尼平苷酸能够通过降低促炎因子的表达来减轻肾脏炎症损伤^[20]。

PPI 构建结果显示:NFKB1、EGFR、AKT1、TP53 是 AECT 治疗 DN 的关键靶点。AKT1 是许多信号通路的关键组成部分,这些信号通路涉及到膜结合配体的结合,如受体酪氨酸激酶、G 蛋白偶联受体和整合素连接激酶^[21],AKT1 缺失将会导致肾纤维化和肾小管脱分化的减弱,并直接或间接影响多种慢性肾疾病;因此,AKT1 可能是用来开发新的预防和治疗 DN 策略的一个新目标。KEGG 通路富集分析显示,靶点主要富集在癌症通路和 PI3K-Akt 信号通路,PI3K-Akt 信号通路是影响氧化应激、炎症和肌成纤维细胞激活的关键信号通路,能够减轻糖尿病小鼠肾脏细胞外基质的积聚,影响肾小管细胞上皮间质转化进程^[22]。

实验明确了 AECT 能够增加高糖高脂环境中的 HK-2 细胞存活率,可以在一定程度上调控细胞凋亡、氧化应激和炎症水平;Western blot 检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达验证了 AECT 确实可以影响 PI3K-Akt 信号通路来发挥治疗 DN 作用;HK-2 细胞在高糖高脂环境下,会激活 PI3K-Akt 信号通路,Akt 属于 PI3K 的下游靶点,当 PI3K 磷酸化的同时,会引起 Akt 的聚集和磷酸化,从而调控氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等生理活动,加剧氧化应激和炎症反应,其检测结果表现为抗氧化因子 SOD 活性、GSH-Px 含量降低;炎性因子 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 含量升高;细胞凋亡率增加。而 AECT 可以通过抑制 PI3K-Akt 信号通路,减少 PI3K 和 Akt 的磷酸化,从而减轻氧化应激和炎症反应并抑制细胞的凋亡;其检测结果表现为抗氧化因子 SOD 活性、GSH-Px 含量升高;炎性因子 IL-1 β 、TNF- α 和 TGF- β 含量降低;细胞凋亡率减少。

综上所述,本研究采用 LC-MS/MS,对肉苁蓉丰富的化学成分进行分析鉴定,结合网络药理学探究 AECT 和 DN 之间的复杂网络关系,并对 PI3K-Akt 信号通路进行了初步验证,证明了肉苁蓉治疗 DN 多成分、多靶点、多途径的作用机制特点:可能涉及癌症通路、脂质和动脉粥样硬化通路和 PI3K-Akt 等信号通路作用于 NFKB1、EGFR、AKT1、TP53 等靶点发挥抗 DN 作用,为后续探究肉苁蓉治疗 DN 的作用机制提供了思路和方向。

参考文献

1 La C, Raye M, Orejud M, et al. Could IL-17A be a novel

- therapeutic target in diabetic nephropathy? [J]. J Clin Med, 2020, 9: 272.
- 2 Xu Z, Xiang X, Su S, et al. Multi-omics analysis reveals the pathogenesis of db/db mice diabetic kidney disease and the treatment mechanisms of multi-bioactive compounds combination from *Salvia miltiorrhiza* [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 987668.
- 3 Papado T, Casemysyou A, Neau E, et al. Systems biology combining human- and animal-data miRNA and mRNA data identifies new targets in ureteropelvic junction obstruction [J]. BMC Syst Biol 2017, 11: 31.
- 4 Tu PF, Jiang Y. Update classical literature on *Cistanches Herba* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 5670-5679.
- 5 Wang J. Discussion on the prescription of the ancient medicine of diabetic nephropathy and the prescription of astragalus compound [D]. Zhengzhou: Henan University of Traditional Chinese Medicine (河南中医药大学), 2019.
- 6 Song QQ. Study on the chemical composition group and *in vivo* pharmacodynamic substances against vascular dementia of the Chinese medicine *Cistanche sinensis* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), 2019.
- 7 Zhi YJ, Zhen YQ, Tian W, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects *Cistanche deserticola* and predictive analysis of quality markers (Q-Marker) [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2758-2767.
- 8 Hu Y, Ding JX, Sun XM, et al. Chemical compositions and fragmentation pattern of estrogen effective fraction of *Cistanche deserticola* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2021, 56: 1149-1159.
- 9 Shi HY, Xu N, Wang P, et al. Analysis on ingredients of *Sparganii Rhizoma* absorbed into plasma based on UPLC-QE-Orbitrap-MS [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2023, 43: 910-919.
- 10 Tang M, Gao X, Geng T, et al. Identification of chemical constituents in Qiwei Tongbi oral liquid by HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52(08): 2226-2236.
- 11 Ma L, Shi HY, Cai MC, et al. Analysis on ingredients of Wendan Decoction absorbed into plasma based on UPLC-QE-Orbitrap-MS [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2022, 33: 1090-1097.
- 12 Pan HC, Qin WH, Li XM, et al. Analysis of chemical constituents in *Eupatorium lindleyanum* by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 3147-3156.

(下转第 1141 页)