

陈思源,王思雨,祁明媛,等. 蛹虫草提取物对肾阳虚模型大鼠睾丸 CYP19/CaM/CaMK II 信号的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 1-8.

Chen SY, Wang SY, Qi MY, et al. Effect of *Cordyceps militaris* extract on CYP19/CaM/CaMK II signaling in testes of kidney yang deficiency model rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.001

## 蛹虫草提取物对肾阳虚模型大鼠睾丸 CYP19/CaM/CaMK II 信号的影响

陈思源<sup>1</sup>,王思雨<sup>1</sup>,祁明媛<sup>2</sup>,李奎坡<sup>1</sup>,徐仪昕<sup>1</sup>,张婷<sup>1</sup>,姚紫研<sup>1</sup>,赵洪庆<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学,长沙 410208;2.湖南炎帝生物工程有限公司,湖南 株洲 412000)

**【摘要】** 目的 明确蛹虫草提取物补肾阳的功效及潜在作用机理。方法 60只SD大鼠分为正常组、模型组、睾丸片组(0.216 g/kg)、蛹虫草提取物高、中、低剂量组(0.72、0.36、0.18 g/kg),每组10只。除正常组外,其余组均采用腺嘌呤(200 mg/kg)灌胃的方法建立肾阳虚大鼠模型,于造模第15天起开始给予受试药,连续28 d。采用ELISA试剂盒检测大鼠血清促性腺激素释放激素(GnRH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)、雌二醇(E2)水平,HE染色观察肾、睾丸、附睾、精囊腺的组织形态,免疫组化和Western blot法检测睾丸CYP19、CaM、CaMK II表达,RT-qPCR检测睾丸CYP19 mRNA表达。结果 与正常组相比,模型组大鼠血清GnRH、LH、T水平均显著降低( $P < 0.05$ ),肾、睾丸、附睾、精囊腺组织均有明显损伤,睾丸CYP19表达降低( $P < 0.01$ )、CaM和CaMK II表达显著增加( $P < 0.01$ ),CYP19 mRNA表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组GnRH、LH、T含量均升高( $P < 0.05$ ),组织损伤缓解,睾丸CYP19表达增加( $P < 0.05$ ),CaM和CaMK II降低( $P < 0.05$ ),CYP19 mRNA水平增加( $P < 0.05$ )。结论 蛹虫草提取物通过调控CYP19/CaM/CaMK II信号发挥补肾阳功效。

**【关键词】** 蛹虫草;肾阳虚;提取物;睾丸;CYP19

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)01-0001-08

### Effect of *Cordyceps militaris* extract on CYP19/CaM/CaMK II signaling in testes of kidney yang deficiency model rats

CHEN Siyuan<sup>1</sup>, WANG Siyu<sup>1</sup>, QI Mingyuan<sup>2</sup>, LI Longpo<sup>1</sup>, XU Yixin<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, YAO Ziyang<sup>1</sup>, ZHAO Hongqing<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.

2. Hunan Yandi Biological Engineering Co., Ltd., Zhuzhou 412000)

**【Abstract】 Objective** To clarify the efficacy and potential mechanism of *Cordyceps militaris* extract to nourish kidney yang. **Methods** SD rats were divided into normal, model, testicular tablet (0.216 g/kg), and *Cordyceps militaris* extract high, medium, and low dose groups (0.72, 0.36 and 0.18 g/kg, respectively) with 10 per group. Except for the normal group, all other groups were administered adenine (200 mg/kg) by gavage to establish a kidney yang deficiency rat model. Test drug administration was started on day 15 of model establishment for 28 consecutive days. ELISA were used to measure rat serum gonadotropin releasing hormone (GnRH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T) and estradiol (E2) levels. HE staining was used to observe the morphology of kidneys, testes, epididymis, and seminal vesicle glands. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect CYP19, CaM and CaMK II expression in testes. CYP19 mRNA expression was detected in testes by RT-qPCR. **Results** Compared with the normal group, serum GnRH, LH and T levels of the model group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), kidney, testis, epididymis and seminal vesicle gland

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82104836);湖南中医药大学产学研合作项目(2020430102003711)。

**【作者简介】** 陈思源(1986—),女,助理实验师,研究方向:中药药理研究。E-mail: 905315440@qq.com

**【通信作者】** 赵洪庆(1992—),男,博士,助理研究员,研究方向:中药药理与创新药物研究。E-mail: 516005398@qq.com

tissues were all significantly damaged, and CYP19 expression in testes was reduced ( $P < 0.01$ ). CaMK II expression was increased significantly ( $P < 0.01$ ). CYP19 mRNA expression was decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, GnRH, LH and T contents in the high-dose *Cordyceps militaris* extract group were increased ( $P < 0.05$ ), tissue damage was relieved, CYP19 expression in testis was increased ( $P < 0.05$ ), CaM and CaMK II were decreased ( $P < 0.05$ ), and the CYP19 mRNA level was increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** *Cordyceps militaris* extract exerts a kidney yang effect by regulating CYP19/CaM/CaMK II signaling.

**[Keywords]** *Cordyceps militaris*; kidney yang deficiency; extract; testis; CYP19

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

肾阳虚是临床最为常见的证型之一,由于患者素体阳虚、年老肾亏、久病伤肾等因素引起肾阳气衰竭,以腰膝酸软、畏寒肢冷、夜尿频多、精神萎靡、性欲减退等为主要特征,严重影响患者的生活质量。西医针对单一症状进行治疗,存在副作用多、依赖性、成瘾性及停药复发等缺点,中医药立足整体,辨证论治,能够系统调节机体肾阳虚相关症状,疗效独特,从天然产物中开发安全有效的补肾阳产品,将具有重要的临床价值及广阔的市场前景。

蛹虫草又名北冬虫夏草、北虫草,为麦角菌科、虫草属真菌,是由子实体与菌核组成的复合体,其性平味甘,具有补肺益肾、止血化痰、延缓衰老的功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,蛹虫草的活性成分主要包括虫草素、虫草酸、甾醇类及虫草多糖,具有增强免疫力、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、神经保护、性功能保护等作用,因其与冬虫夏草具有类似的活性成分与临床疗效,能够改善患者的肺肾气虚证及疲劳综合征,补肾壮阳,且蛹虫草易于培育,成本相对较低,近年来已逐渐成为冬虫夏草的替代品,应用广泛,具有很强的开发价值<sup>[2-3]</sup>。然而,目前关于蛹虫草的基础研究较少,其能否改善肾阳虚模型大鼠的肾阳虚状态,相关机制如何,尚未有相关报道,需要进一步的相关基础研究进行深入探讨。

芳香化酶基因 CYP19 是细胞色素 P450 超基因家族中的重要成员,主要分布于中枢神经系统及卵巢、睾丸等生殖系统相关组织中。研究表明,CYP19 能够通过调控下游信号编码芳香化酶 P450arom 基因,后者能够催化睾酮转化为雌激素,是雌激素体内合成的关键酶和限速酶,与下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)轴功能密切相关<sup>[4-5]</sup>。钙调蛋白/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (calmodulin/calmodulin kinase II, CaM/CaMK II) 是 CYP19 潜在的下游信号,能够调节 HPG 轴功能,并与睾丸间质细胞的完整性密切相关<sup>[6]</sup>。本研究拟建立肾阳虚大鼠模型,明确蛹虫草通过增加体内 CYP19 的表达,进而抑制 CaM/CaMK II 激活,从而

调控 HPG 轴发挥补肾阳功效的作用机理。该机制的证实将首次明确 CYP19/CaM/CaMK II 信号介导大鼠肾阳虚病理状态及蛹虫草的功效特点与潜在机制,将为蛹虫草的开发应用提供重要理论支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SD 大鼠 60 只,雄性,SPF 级,7 周龄,体重 200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK(湘)2019-0004],质量合格证号(430727201101573875),饲养于湖南中医药大学实验动物中心 [SYXK(湘)2019-0009]。动物饲养室温度(22±2)℃,湿度(60±5)%,12 h 明暗交替,适应性喂养 3 d 后开始实验。实验过程均符合实验动物 3R 原则,经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(LLBH-202009140001)。

### 1.2 主要试剂与仪器

蛹虫草由湖南炎帝生物工程有限公司提供,将蛹虫草粉末用 10 倍量水浸泡 30 min,提取两次,第一次 100℃ 浸提 120 min,提取液过 200 目筛,药渣继续加水浸提 60 min 后过 200 目筛,合并滤液,于 60~80℃ 减压浓缩至相对密度 1.18~1.25,冷冻干燥 48 h 得蛹虫草提取物;睾酮片由江西泽众制药股份有限公司生产,国药准字 H36022006,生产批号:20200103,规格:36 片(每片 0.2 g),人用剂量为 2.4 g/d;腺嘌呤(北京索莱宝科技公司,批号:20200514);大鼠促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)、雌二醇(estradiol, E2)ELISA 试剂盒(江苏菲亚生物科技公司,批号:FY3396-A、FY3676-A、FY3452-A、FY3450-A);CYP19、CaM、CaMK II 一抗(英国 Abcam 公司,批号:ab106168、ab134901、ab134041);β-tubulin 一抗(美国 Proteintech 公司,批号:10094-1-AP);BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 组织裂解液、RNA 提取液(武汉赛维尔生物科技公司,批号:G2026、G2002、

G3013); DAB 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(武汉博士德生物公司,批号:AR1022、MK1613)。

ME204 型万分之一精密天平购自瑞士梅特勒托利多公司; OML-QPA 型生物组织切片机购自湖北欧美莱科技公司; NP-B1 型全自动生物组织包埋机、NP-P3 型组织摊烤片机购自孝感市诺普电子科技有限公司; NanoDrop One 超微量分光光度计、MK3 型全自动酶标仪购自美国 Thermo 公司; Primo Star 型光学显微镜购自德国 Zeiss 公司; Gel Doc XR<sup>+</sup> 型凝胶成像分析仪、CFX 型荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物处理

根据动物体重将 60 只大鼠随机分为正常组、模型组、蛹虫草提取物高剂量组、蛹虫草提取物中剂量组、蛹虫草提取物低剂量组、睾丸片组, 每组 10 只。除正常组外, 其余组均采用腺嘌呤(200 mg/kg)灌胃的方法建立肾虚大鼠模型<sup>[7-8]</sup>, 连续 42 d, 正常组灌胃等体积蒸馏水。从造模第 15 天起开始给予受试药, 依据《中药药理研究方法学(第 3 版)》中人与大鼠体表面积系数换算大鼠用药剂量<sup>[9]</sup>, 蛹虫草提取物高、中、低剂量组给药剂量分别为 0.72、0.36、0.18 g/kg(临床等效 2、1、0.5 倍剂量), 睾丸片组灌胃给予睾丸片水溶液, 给药剂量为 0.216 g/kg(临床等效剂量), 正常组和模型组给予等体积蒸馏水, 灌胃体积均为 10 mL/kg, 每天给药 1 次, 连续 28 d。末次给药后, 检测大鼠在体功能指标, 完成后麻醉大鼠, 剪开腹腔, 游离腹主动脉进行采血, 解剖分离双肾、睾丸、附睾、精囊腺组织, 万分之一精密天平称重, 保存于 4% 多聚甲醛溶液中, 其中睾丸组织保存于特定睾丸组织固定液中, 用于分子生物学实验的睾丸组织置于液氮中冷冻保存。

#### 1.3.2 指标检测

##### (1) 一般指标观察

观察各组大鼠行为状态、毛发、二便、饮水饮食、垫料潮湿等情况, 称重, 检测体温, 并采用旷场箱(80 cm×80 cm×40 cm)评价动物的自主活动情况, 旷场箱底部均匀划分为 25 个方格, 动物从中心放入, 其自由活动 30 s 后记录 4 min 内水平跨格数及垂直站立数的总和。

##### (2) 脏器指数

将组织分离后于万分之一分析天平上称重, 计算脏器指数=脏器重量(mg)/体重(g)。

##### (3) ELISA 实验

采血后将血液静置 1 h, 3000 r/min 离心 15

min, 取上清液, 得到血清样本。采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 GnRH、LH、T、E2 水平, 操作过程严格按照试剂盒说明书进行。根据标准曲线计算各组样本中目的因子的含量。

##### (4) HE 染色

组织充分固定后, 石蜡包埋, 以 5 μm 厚度连续切片, 梯度乙醇脱水、浸蜡、水化、冲洗, 采用苏木精-伊红进行染色, 完成后将切片固定, 中性树脂封片, 显微镜下进行图像采集, 观察各组大鼠肾、睾丸、附睾、精囊腺的病理形态并进行拍照分析。

##### (5) 免疫组化染色

取充分固定的睾丸组织, 石蜡包埋, 切片、脱水、浸蜡、水化、冲洗, 滴加山羊血清于 37℃ 封闭 30 min, 按说明书对一抗进行稀释, 采用稀释后的一抗 4℃ 孵育过夜; 次日采用 PBS 缓冲液洗涤切片 3 次, 反应增强液孵育 10 min 后用二抗继续孵育 15 min; 洗涤 3 次, DAB 显色液显色 5 min 后用苏木精复染 15 s, 脱水, 透明, 封片。于显微镜下选取视野进行拍摄, 应用 Image J 软件分析目的蛋白的积分光密度(IOD)值。

##### (6) Western blot 实验

切取 100 mg 睾丸组织, 加入 1 mL 组织裂解液冰上充分匀浆, 离心取上清液, 检测上清液中总蛋白含量。制备分离胶和浓缩胶, 将蛋白煮沸变性后上样, 上样量为 50 μg, 80 V 恒压电泳, 转膜, 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入按说明书稀释后的一抗, 4℃ 孵育过夜。次日用 TBST 液洗涤条带 3 次, 每次 15 min, 加入二抗继续孵育 4 h, 洗涤条带 3 次, 滴加混合显影液, 将条带置于凝胶成像仪中显影。应用 Image J 软件分析条带灰度值, 目的蛋白的相对表达量为目的蛋白条带灰度值除以内参蛋白(β-tubulin)灰度值。

##### (7) RT-qPCR 实验

切取 100 mg 睾丸组织, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取组织总 RNA, 以 mRNA 为模板, 利用逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为: 95℃、10 min 预变性, 95℃、15 s 变性, 60℃、30 s 退火延伸, 40 个循环。采用经典 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法(Liva 法)根据内参基因 GAPDH 的表达分析目的基因 mRNA 的表达水平。引物由武汉赛维尔公司合成, 其中 CYP19 引物序列(NM\_017085.2): 上游 5'-GCTGGACACTTCTAACACGCTCTT-3', 下游 5'-CTCCTTTGTCAGGTCTCCACGT-3', 片段长度 298 bp; GAPDH 引物序列(NM\_017008.4): 上游 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3', 下游 5'-GGTGAAGAATGGGACTTGCT-

3', 片段长度 138 bp。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。本研究实验数据均以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用单因素方差分析,多重比较方差齐时用 LSD 检验法,方差不齐时用 Tampane's *T* 检验法, $P<0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 蛹虫草提取物对模型大鼠一般指标的影响

正常组大鼠行为活动、饮水摄食均正常,有明显的探索欲,毛色光亮整洁,垫料较干净,大便成形;模型组大鼠外形消瘦,垫料明显潮湿,大便稀薄不成形,体温降低( $P<0.01$ ),自主活动次数显著减少( $P<0.01$ );蛹虫草提取物组大鼠行为活动较正常,毛色亮洁,垫料较脏,潮湿程度一般,大便基本成形,高剂量组体温升高( $P<0.05$ ),自主活动次数增加( $P<0.05$ )。见表 1。

### 2.2 蛹虫草提取物对模型大鼠脏器指数的影响

与正常组相比,模型组大鼠肾脏指数、睾丸指数显著增加( $P<0.01$ ),精囊腺指数降低( $P<0.01$ );与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组肾脏指数与睾丸指数显著降低( $P<0.05$ ),精囊腺指数增加( $P<$

$0.05$ ),同时,中剂量组与低剂量组肾脏指数均显著降低( $P<0.05$ )。见表 2。

### 2.3 蛹虫草提取物对模型大鼠血清因子水平的影响

与正常组相比,模型组血清 GnRH、LH、T 含量均显著降低( $P<0.01$ ),E2 含量无显著变化;与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组 GnRH、LH、T 含量均升高( $P<0.05$ ),睾丸片组仅睾酮含量显著升高( $P<0.01$ )。见表 3。

### 2.4 蛹虫草提取物对模型大鼠组织病理形态的影响

正常组大鼠肾组织肾小球形状规则,轮廓清晰,未观察到炎性细胞的浸润;睾丸生精小管基膜完整且厚,基膜内可见排列整齐、致密且结构正常的生精细胞及支持细胞,生精小管管腔内可见大量精子;附睾管腔结构清晰,管壁细胞排列紧密整齐,管壁较厚;精囊腺腺腔内有许多皱襞,表面为假复层柱状上皮,内含有丰富的分泌颗粒、脂肪滴及脂褐素;模型组肾小球体积增大,基底膜明显扩张,通透性增加,伴有大量炎性细胞的浸润,部分大鼠可见明显的腺嘌呤代谢物结晶累积;睾丸生精小管基膜变薄,基膜内生精细胞排列紊乱,数量减少,生精小管腔内间隙增大,精子数量减少;附睾部分管腔

表 1 蛹虫草提取物对模型大鼠体重、体温及自主活动次数的影响 ( $n=10$ )

Table 1 Effects of *Cordyceps militaris* extract on body weight, body temperature and the number of voluntary activities in model rats

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	体重(g) Weight	体温(°C) Body temperature	自主活动次数(次) Number of activities
正常组 Normal group	/	444.21±22.92	37.63±0.14	67.56±26.80
模型组 Model group	/	309.55±27.11**	37.33±0.20**	36.22±11.69**
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	334.29±12.93 <sup>#</sup>	37.46±0.18	54.57±20.16 <sup>#</sup>
	0.720	347.57±21.18 <sup>##</sup>	37.53±0.21 <sup>#</sup>	62.57±37.32 <sup>#</sup>
蛹虫草提取物组 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	338.18±32.85 <sup>#</sup>	37.40±0.27	45.32±15.24
	0.180	328.01±26.29	37.42±0.17	39.33±11.05

注:与正常组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, \*\* $P<0.01$ . Compared with the model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ .

表 2 蛹虫草提取物对模型大鼠脏器指数的影响 (mg/g,  $n=10$ )

Table 2 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the organ index of model rats

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	肾脏指数 Kidney index	睾丸指数 Testis index	附睾指数 Epididymal index	精囊腺指数 Seminal vesicle index
正常组 Normal group	/	6.62±0.55	8.14±0.68	2.89±0.25	3.12±0.55
模型组 Model group	/	35.22±4.26**	9.84±0.59**	2.98±0.29	1.81±0.83**
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	26.54±4.91 <sup>##</sup>	9.19±0.77 <sup>#</sup>	3.10±0.35	2.54±0.65 <sup>#</sup>
	0.720	24.99±3.94 <sup>##</sup>	9.18±0.63 <sup>#</sup>	3.07±0.35	2.68±0.68 <sup>#</sup>
蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	27.95±5.75 <sup>#</sup>	9.27±0.91	3.14±0.31	2.42±0.51
	0.180	29.76±5.71 <sup>#</sup>	9.28±0.49	3.23±0.32	2.02±0.72

注:与正常组相比,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, \*\* $P<0.01$ . Compared with the model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ .

拉伸变形,管壁变薄,部分管壁破裂,偶可见碎片,管腔内精子数量下降;精囊腺腺腔皱襞萎缩变薄,通透性增加,内含物丰度减少。经药物治疗后,各脏器损伤有不同程度的缓解,以蛹虫草提取物高剂量组效果最佳。见图 1。

### 2.5 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 阳性表达的影响

与正常组相比,模型组睾丸组织 CYP19 平均光密度值显著下降 ( $P < 0.01$ ), CaM、CaMK II 显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组 CYP19 平均光密度值升高 ( $P < 0.01$ ), CaM、CaMK II 降低 ( $P < 0.01$ ),中剂量组 CYP19 表达增加 ( $P < 0.05$ ), CaM 降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2、表 4。

### 2.6 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠睾丸 CYP19 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), CaM、CaMK II 显著增加 ( $P < 0.01$ );经睾丸片或高剂量蛹虫草提取物干预治疗后,模型大鼠 CYP19、CaM、CaMK II 蛋白表达均得到有效逆转 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ),中剂量组对 CYP19、CaMK II 表达也有显著作用 ( $P < 0.05$ )。见图 3、表 5。

### 2.7 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19 mRNA 表达的影响

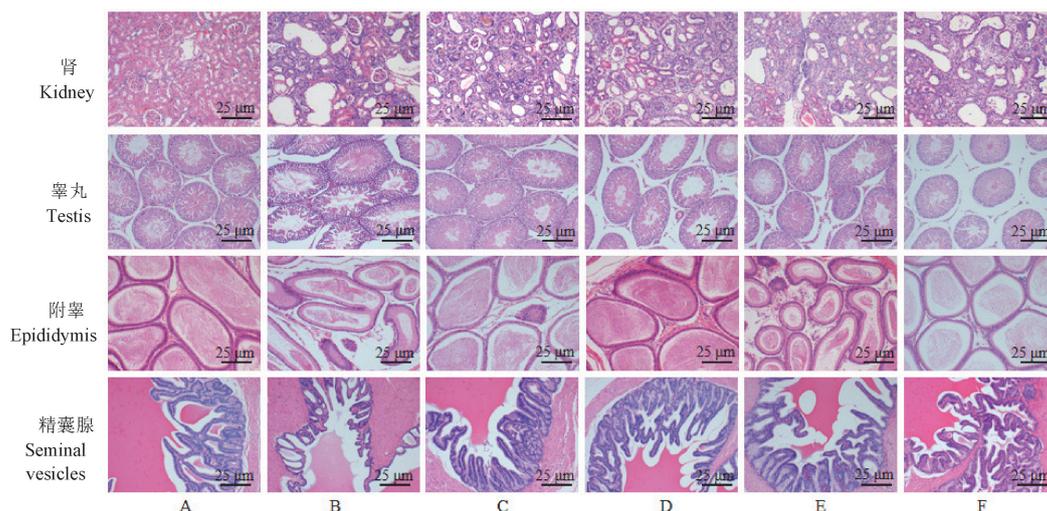
与正常组相比,模型组睾丸 CYP19 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,睾丸片组和蛹虫草提取物高剂量组 CYP19 mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

表 3 蛹虫草提取物对模型大鼠血清因子的影响 ( $n=6$ )  
Table 3 Effects of *Cordyceps militaris* extract on serum factors in model rats

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	GnRH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	T(pg/mL)	E2(pg/mL)
正常组 Normal group	/	70.62±5.78	27.57±2.36	40.14±6.48	50.30±8.67
模型组 Model group	/	53.54±4.12**	23.21±2.85*	28.08±2.44**	61.41±10.20
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	61.14±10.19	24.83±2.51	36.18±4.20##	57.69±3.07
	0.720	67.20±5.41#	26.42±1.13#	32.55±4.46#	51.73±8.81
蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	59.79±7.24	24.64±5.89	29.33±2.20	54.85±7.30
	0.180	53.74±9.28	23.56±3.40	28.46±5.16	53.67±9.13

注:与正常组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

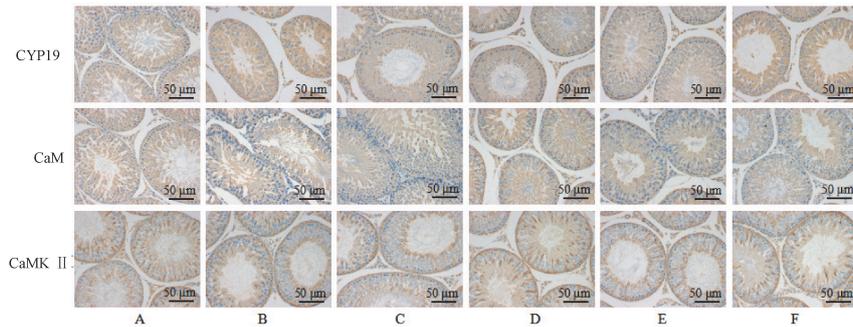


注:A:正常组;B:模型组;C:睾丸片组;D:蛹虫草提取物高剂量组;E:蛹虫草提取物中剂量组;F:蛹虫草提取物低剂量组。

图 1 蛹虫草提取物对模型大鼠组织形态的影响(HE染色)

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Testicular tablet group. D, *Cordyceps militaris* extract high-dose group. E, *Cordyceps militaris* extract medium-dose group. F, *Cordyceps militaris* extract low-dose group.

Figure 1 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the tissue morphology of model rats (HE staining)



注:A:正常组;B:模型组;C:睾丸片组;D:蛹虫草提取物高剂量组;E:蛹虫草提取物中剂量组;F:蛹虫草提取物低剂量组。

图 2 各组大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 阳性表达情况 (免疫组化)

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Testicular tablet group. D, *Cordyceps militaris* extract high-dose group. E, *Cordyceps militaris* extract medium-dose group. F, *Cordyceps militaris* extract low-dose group.

Figure 2 The positive expression of CYP19, CaM and CaMK II in testis of rats in each group (immunohistochemistry)

表 4 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 平均光密度值的影响 (n=4)

Table 4 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the average optical density of CYP19, CaM and CaMK II in the testis of model rats

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	CYP19	CaM	CaMK II
正常组 Normal group	/	0.268±0.049	0.099±0.012	0.165±0.017
模型组 Model group	/	0.198±0.019**	0.208±0.060**	0.252±0.023**
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	0.222±0.007 <sup>#</sup>	0.147±0.029 <sup>#</sup>	0.183±0.011 <sup>##</sup>
	0.720	0.241±0.015 <sup>##</sup>	0.130±0.011 <sup>##</sup>	0.200±0.021 <sup>##</sup>
蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	0.233±0.023 <sup>#</sup>	0.135±0.023 <sup>##</sup>	0.222±0.031
	0.180	0.219±0.015	0.161±0.030	0.228±0.051

注:与正常组相比, \*\*P<0.01;与模型组相比, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01。

Note. Compared with the normal group, \*\*P<0.01. Compared with the model group, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01.

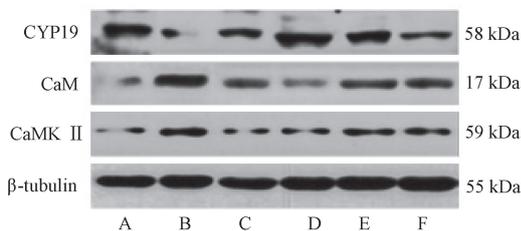
表 5 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 表达的影响 (n=4)

Table 5 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the expression of CYP19, CaM and CaMK II in the testis of model rats

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	CYP19	CaM	CaMK II
正常组 Normal group	/	0.572±0.096	0.132±0.067	0.213±0.031
模型组 Model group	/	0.256±0.074**	0.330±0.053**	0.542±0.057**
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	0.455±0.114 <sup>#</sup>	0.220±0.027 <sup>#</sup>	0.261±0.032 <sup>##</sup>
	0.720	0.592±0.103 <sup>##</sup>	0.198±0.051 <sup>##</sup>	0.278±0.045 <sup>##</sup>
蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	0.487±0.095 <sup>#</sup>	0.294±0.068	0.337±0.068 <sup>#</sup>
	0.180	0.415±0.080	0.286±0.033	0.352±0.057

注:与正常组相比, \*\*P<0.01;与模型组相比, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01。

Note. Compared with the normal group, \*\*P<0.01. Compared with the model group, <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01.



注:A:正常组;B:模型组;C:睾丸片组;D:蛹虫草提取物高剂量组;E:蛹虫草提取物中剂量组;F:蛹虫草提取物低剂量组。

图 3 各组大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 蛋白电泳图

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Testicular tablet group. D, *Cordyceps militaris* extract high-dose group. E, *Cordyceps militaris* extract medium-dose group. F, *Cordyceps militaris* extract low-dose group.

Figure 3 Electrophoresis of CYP19, CaM and CaMK II proteins in testis of rats in each group

表 6 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19 mRNA 表达的影响 (n=4)

Table 6 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the expression of CYP19 mRNA in the testis of model rats

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	CYP19
正常组 Normal group	/	1.000±0.048
模型组 Model group	/	0.466±0.105**
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	0.773±0.141 <sup>#</sup>
	蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.720
	0.360	0.739±0.131
	0.180	0.530±0.161

注:与正常组相比, \*\*P<0.01;与模型组相比, <sup>#</sup>P<0.05。

Note. Compared with the normal group, \*\*P<0.01. Compared with the model group, <sup>#</sup>P<0.05.

### 3 讨论

《中华本草》中记载,虫草入肺肾二经,既能滋肺阴,又能补肾阳,主治肾虚,阳痿遗精,腰膝酸痛,病后虚弱等。现代药理研究证实,蛹虫草具有肾保护作用。Sun 等<sup>[10]</sup>研究表明,蛹虫草通过影响 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B (toll-like receptor 4/nuclear factor  $\kappa$ B, TLR4/NF- $\kappa$ B) 氧化还原信号通路改善慢性肾疾病;Cai 等<sup>[11]</sup>发现蛹虫草通过调控沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 介导的自噬改善大鼠肾性高血压损伤和肾纤维化;李冰等<sup>[12]</sup>研究发现蛹虫草提取物能够同时发挥降血糖和肾保护作用,减缓糖尿病大鼠肾病程进展;此外,蛹虫草对慢性肾衰、肾小球肾炎、肺气虚证等病证也有一定的治疗作用<sup>[13-15]</sup>。蛹虫草肾保护作用主要与虫草素以及多糖类成分有关。Kopalli 等<sup>[16]</sup>明确来源于药用真菌蛹虫草的虫草素能够减轻自然衰老大鼠体内炎症介导的肾和睾丸组织损伤;虫草素还具有补肾益精、改善性功能的功效<sup>[17]</sup>,蛹虫草多糖则是蛹虫草治疗糖尿病肾病的主要有效成分<sup>[18]</sup>。然而,目前关于蛹虫草对肾阳虚模型动物的研究仅限于小鼠的在体功能及组织病理变化<sup>[19]</sup>,未涉及相关机制,对于蛹虫草的开发有一定局限。本研究旨在建立肾阳虚大鼠模型,通过予以不同剂量的蛹虫草提取物干预,研究其补肾阳的疗效及潜在作用机理。

肾阳虚病理模型主要包括大剂量激素造模、化学药物诱导损伤、手术造模、自然衰老等,其中应用最广泛的是激素造模中的氢化可的松致肾阳虚模型及药物造模中的腺嘌呤致肾阳虚模型,且两者原理均是通过影响机体内分泌轴的功能而引起肾阳虚症状<sup>[20-21]</sup>。腺嘌呤是核酸的主要组成成分之一,当机体摄入大剂量腺嘌呤时,在酶的作用下转变成极难溶解于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,沉积于肾小管,导致肾功能低下,同时其具有毒性作用,使肾组织中糖、脂肪、蛋白质代谢有关的多种酶活性受到抑制,影响肾组织的能量代谢<sup>[22]</sup>。经文献调研及前期预实验摸索,本研究采用 200 mg/kg 剂量的腺嘌呤造模,发现大鼠外形消瘦、皮毛无光泽、活动减少、体温降低、尿量明显增多、大便稀溏,表现出典型的肾阳虚症状,模型建立成功。

HPG 轴是机体三大功能轴之一,主要负责调控机体生殖功能。中医认为肾主生殖,肾与生殖系统

功能关系密切,肾虚与 HPG 轴功能异常亦密切相关<sup>[23]</sup>。HPG 轴通过下丘脑分泌 GnRH,作用于垂体释放促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、LH,该类激素的合成分泌又进一步作用于性腺组织,调节睾酮、雌二醇等性激素的分泌并反馈于下丘脑,从而调节机体生殖功能<sup>[24]</sup>。肾阳虚通常伴随着生殖功能的衰退,性激素分泌紊乱,在雄性中主要表现为睾酮分泌不足。本研究发现,模型大鼠体内 GnRH、LH、睾酮含量均显著下降,雌二醇含量有上升趋势,同时肾、睾丸、附睾、精囊腺等与生殖相关的组织均存在明显损伤,而蛹虫草提取物能够上调 HPG 轴相关激素的水平,恢复 HPG 轴功能,缓解生殖组织的损伤状态。

CYP19 是细胞色素 P450 超基因家族中 19 号家族的唯一成员,负责编码芳香化酶 P450arom 基因,后者与性腺激素的合成分泌密切相关。一方面,CYP 敲除的雄性小鼠不能产生雌激素,导致生精细胞发育受阻,精子数量及活性明显降低,小鼠生殖功能低下甚至完全不育<sup>[25]</sup>;另一方面,睾丸组织 CYP19 的过表达会导致雌激素产生过多,也可引起不育<sup>[26]</sup>。CYP19 基因主要通过 cAMP 依赖性蛋白激酶信号在转录水平进行调节,对于维持雌雄激素间的平衡、保证机体的正常生理功能具有重要意义<sup>[27]</sup>。CaM/CaMK II 信号通路是 cAMP 依赖性蛋白激酶信号传导系统的重要组成部分。CaM 是一种钙结合蛋白,静息态下无生物活性,在胞内  $Ca^{2+}$  增加时,CaM 会结合形成  $Ca^{2+}$ /CaM 复合物,并通过激活其特异性激酶 CaMK II 发挥生物学活性<sup>[28-29]</sup>。CaM 与垂体-靶腺轴的分泌功能密切相关,可以作用于 HPG 轴的不同环节、不同层次,并通过不同的途径对其进行着复杂而精细的调节作用。研究表明,CaM 表达增加可以通过线粒体途径引起睾丸细胞凋亡,抑制 CaMK II 能够缓解内质网应激和氧化损伤,提高睾丸间质细胞的完整性<sup>[30]</sup>。本研究发现,模型大鼠睾丸组织 CYP19 mRNA 和蛋白表达均显著降低,CaM、CaMK II 表达显著增加,证实 CYP19 通过 CaM/CaMK II 信号通路介导大鼠生殖损伤,而蛹虫草提取物则能明显逆转该趋势。

综上,蛹虫草提取物能够调节 HPG 轴功能,缓解肾、睾丸等组织损伤,发挥补肾阳功效,其机制可能与调控 CYP19/CaM/CaMK II 信号有关。本研究首次阐明蛹虫草补肾阳的潜在机理,有助于进一步开发应用,下一步继续挖掘其功效作用及潜在靶点。

## 参考文献:

- [ 1 ] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 1979.
- [ 2 ] 李陈雪, 刘雅芳. 蛹虫草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2019, 33(10): 55-57.
- [ 3 ] 左锦辉, 贡晓燕, 董银卯, 等. 蛹虫草的活性成分和药理作用及其应用研究进展 [J]. 食品科学, 2018, 39(21): 330-339.
- [ 4 ] Ke Y, Yang LY, Zhu L, et al. The association between CYP19 polymorphism and endometriosis risk: a system review and meta-analysis [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 199(4): 42-48.
- [ 5 ] Lardone MC, Argandoña F, Flórez M, et al. Overexpression of CYP19A1 aromatase in Leydig cells is associated with steroidogenic dysfunction in subjects with Sertoli cell-only syndrome [J]. Andrology, 2017, 5(1): 41-48.
- [ 6 ] 段鹏, 韩慧蓉, 房春燕, 等. 二甲双胍对大鼠垂体-性腺轴钙调蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(4): 521-523.
- [ 7 ] 张希, 廖宇娇, 杨卓, 等. 覆盆子盐制前后对肾阳虚多尿大鼠肾脏改善作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 140-142.
- [ 8 ] 鞠成国, 李媛媛, 王巍, 等. 仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 101-107.
- [ 9 ] 陈奇. 中药药理研究方法学(第 3 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2011.
- [ 10 ] Sun T, Dong W, Jiang G, et al. Cordyceps militaris improves chronic kidney disease by affecting TLR4/NF- $\kappa$ B redox signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 31(3): 7850863.
- [ 11 ] Cai Y, Feng Z, Jia Q, et al. Cordyceps cicadae ameliorates renal hypertensive injury and fibrosis through the regulation of SIRT1-mediated autophagy [J]. Front Pharmacol, 2022, 12(10): 801094.
- [ 12 ] 李冰, 王静凤, 杨延村, 等. 蛹虫草对糖尿病大鼠肾脏病程发展的抑制作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(15): 255-259.
- [ 13 ] 冯云. 蛹虫草抗慢性肾衰有效成分及其分离方法的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2005.
- [ 14 ] 杨楠. 蛹虫草提取物对大鼠系膜增生型肾小球肾炎模型的防治作用 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [ 15 ] 朱铁珍, 张英平, 朱铁英. 蛹虫草菌粉胶囊治疗慢性气管炎(肺肾气虚证)30 例 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 64-65.
- [ 16 ] Kopalli SR, Cha KM, Cho JY, et al. Cordycepin from medicinal fungi *Cordyceps militaris* mitigates inflammaging-associated testicular damage via regulating NF- $\kappa$ B/MAPKs signaling in naturally aged rats [J]. Mycobiology, 2022, 50(1): 89-98.
- [ 17 ] Chen YY, Chen CH, Lin WC, et al. The role of autophagy in anti-cancer and health promoting effects of cordycepin [J]. Molecules, 2021, 26(16): 4954.
- [ 18 ] 陈丹丹. 基于 JAK/STAT 通路调控足细胞自噬探讨蛹虫草多糖防治糖尿病肾病的作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [ 19 ] 陈育, 魏巍, 许晓燕, 等. 蛹虫草对腺嘌呤致肾阳虚证小鼠影响的实验研究 [J]. 四川动物, 2015, 34(4): 594-598.
- [ 20 ] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [ 21 ] 陈颖颖, 罗静, 徐愿, 等. 肾阳虚动物模型造模方法评价及进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(11): 2697-2700.
- [ 22 ] 张子怡, 陈宝军, 张庆, 等. 肾阳虚证动物模型的造模方法与评价指标 [J]. 福建中医药, 2014, 45(2): 61-63.
- [ 23 ] 张嘉妮. 从 HPG 轴角度探讨六味地黄汤及其“补泻”药对的补肾作用机制和药效成分 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [ 24 ] 王启新, 陈则华, 罗璇捷, 等. 肉苁蓉不同提取部位改善肾阳虚大鼠性能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 95-101.
- [ 25 ] 南亚昶, 王宗仁, 卢兹凡, 等. 菟丝子提取物对肾阳虚大鼠辜丸 P450arom、CYP19 表达及性激素和精子的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(2): 20-25.
- [ 26 ] Carpino A, Rago V, Carani C, et al. Detection of aromatase and estrogen receptors in human Leydig cell tumor [J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(2): 239-244.
- [ 27 ] 王慧, 李霞, 张育辉. CYP19 基因表达与芳香化酶活性调控因子的研究进展 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(3): 304-308.
- [ 28 ] 高震, 陈婉莹, 张萌, 等. 葛根素对氧糖剥夺细胞模型 CaM、CaMK II、MECP2、BDNF 及 Akt 表达的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2019, 40(1): 153-157.
- [ 29 ] Akizuki K, Ono A, Xue H, et al. Biochemical characterization of four splice variants of mouse Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I [J]. J Biochem, 2021, 169(4): 445-458.
- [ 30 ] 吴震, 朱文祥, 刘洪茂, 等. 热应激对辜丸钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(12): 1938-1942.

[ 收稿日期 ] 2022-02-28