DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.06.017

左归丸减轻雷公藤多苷卵巢毒性的蛋白质组学研究

韩姗姗[1],任晓丹[1,2],丁樱[1,2],任献青[1,2],张霞[1],孙昭恒[1,2],代彦林[1]
(1.河南中医药大学儿科医学院,河南 郑州 450000;2.河南中医药大学第一附属医院儿科医院,河南 郑州 450001)

摘要:目的 评估左归丸(ZGW)减轻雷公藤多苷(TG)卵巢毒性的作用并利用蛋白质组学方法探讨其减毒机制。方法 选取32只SPF级2月龄雌性SD大鼠随机分为空白(CON)组(10只)和模型组(22只),对模型组大鼠连续灌胃2周TG(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})构建卵巢损伤模型,将造模成功的大鼠(20只)随机分为TG组、左归丸(ZGW)组(1.875 g·kg^{-1}·d^{-1}),每组10只,连续灌胃4周,灌胃期间统计大鼠动情周期,灌胃结束后测量大鼠体质量、卵巢及子宫指数,酶联免疫吸附测定法测定血清性激素水平,苏木精-伊红(HE)染色观察卵巢组织病理损伤,Label Free定量蛋白质组学技术进行分析,并通过Western Blot验证富集通路的蛋白表达情况。结果 ZGW能有效调节TG诱导的雌性大鼠动情周期及性激素水平变化,显著减少闭锁卵泡产生($P<0.000\ 1$)。蛋白质组学表明,与CON组相比,TG组有203个差异蛋白,经过TG治疗后,有28个差异蛋白显著回调,KEGG富集分析涉及鞘糖脂生物合成、糖胺聚糖降解、其他聚糖降解、细胞凋亡等信号通路。Western Blot结果表明,ZGW可以下调细胞凋亡信号通路上的细胞色素C(Cycs)、聚ADP核糖聚合酶家族成员3(Parp3)、细胞凋亡调节因子Bax(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和上调B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)蛋白表达。结论 ZGW可以调节由Cycs、Parp3、Bax、Caspase-3、Bcl-2等介导的细胞凋亡信号通路,发挥减轻TG对卵巢组织损伤的作用。

关键词:左归丸;雷公藤多苷片;卵巢毒性;蛋白质组学
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)06-0099-11

Proteomic Study of Zuogui Wan(左归丸) for Reducing Ovarian Toxicity of Tripterygium Glycosides

HAN Shanshan[1], REN Xiaodan[1,2], DING Ying[1,2], REN Xianqing[1,2], ZHANG Xia[1], SUN Zhaoheng[1,2], DAI Yanlin[1]
(1. College of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China;
2. Pediatrics Hospital, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450001, Henan, China)

Abstract: *Objective* To evaluate the effect of Zuogui Wan(左归丸, ZGW) on reducing ovarian toxicity of Tripterygium glycosides(TG) and to explore its attenuated mechanism by proteomic methods. *Methods* Thirty-two 2-month-old female SD rats with SPF grade were randomly divided into control(CON) group(10 rats) and model group(22 rats). The model group rats were given continuous intragastatic administration of TG(50 mg·kg^{-1}·d^{-1}) for 2 weeks to construct the ovarian injury model. The rats with successful model(20) were randomly divided into TG group and ZGW group(1.875 g·kg^{-1}·d^{-1}) with 10 rats in each group. The estrus cycle of the rats was measured during continuous gavage for 4 weeks. After gavage, the body weight, ovarian and uterine indexes were measured, and serum sex hormone levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Hematoxylin-eosin(HE) staining was used to observe the pathological damage of ovarian tissue, and label free quantitative proteomic analysis was performed. Western Blot was used to verify the protein expression of the enrichment pathway. *Results* ZGW could effectively regulate the estrous cycle and sex hormone level of TG-induced female rats, and significantly reduce the production of atretic follicles($P<0.000\ 1$). Proteomics showed that compared with those in the CON group, there were 203 differential proteins in the TG group, and 28 differential proteins were significantly reduced after TG treatment. KEGG enrichment analysis involved signaling pathways such as sphingolipid biosynthesis, glycosaminoglycan degradation, degradation of other glycans and cell apoptosis. Western Blot results showed that ZGW could down-regulate the expressions of Cycs, Parp3, Bax and Caspase-3 and up-regulate the expression of Bcl-2 protein in apoptosis signaling pathway. *Conclusion* ZGW can regulate the apoptosis signaling pathway mediated by Cycs, Parp3, Bax, Caspase-3 and Bcl-2 and plays a role in alleviating the damage of ovarian tissue caused by TG.

Keywords: Zuogui Wan(左归丸); Tripterygium Glycosides Tablets; ovarian toxicity; proteomics

基金项目:国家自然科学基金项目(82205187)
作者简介:韩姗姗(1988-),女,河南郑州人,副主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治小儿肾脏疾病。
通讯作者:丁樱(1951-),女,江苏南京人,教授、主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治小儿风湿免疫及肾脏疾病。E-mail:dingying3236@sina.com。

雷公藤多苷(TG)系从雷公藤根芯部提取的活性组分混合物,素有“中草药激素”的美称,是临床应用最广泛且疗效显著的免疫抑制类中成药[1-2],在肾病综合征、IgA肾病、狼疮性肾炎、强直性脊柱炎等肾脏疾病及自身免疫性疾病的治疗中得到了广泛应用[3-6]。然而,TG是一种疗效与毒性并存的药物,对于生殖系统的损伤尤为突出[7]。对男性生殖系统损伤主要表现为少精或无精症,精子活动、性欲和生殖功能下降等[8],女性生殖系统受损症状主要表现为月经周期不规律、闭经状态、卵巢功能早衰及性功能减退[9]。据研究,雷公藤性腺毒性总发生率为17.9%,而在儿童中,这一比例上升至24.4%[10],2012年国家药监局下发的TG说明书中明确提出儿童禁用,使得TG在儿科的临床应用遭遇困境。因此,亟须寻找一些方法或药物能够使TG充分发挥其临床疗效,同时又能减轻其不良反应,从而推动TG在儿科临床的应用研究和开发推广。

中药配伍减毒历史悠久,“扶正制毒”理论提出有毒中药在使用过程中可适当配伍补益之剂,旨在扶正、维持气血正常生化运行[11]。TG的生殖毒性在中医理论上表现为肾虚精亏,可采用补肾填精药物减轻TG生殖毒性。本团队前期研究主要探讨了TG的雄性生殖毒性及补肾中药菟丝子-熟地黄减轻TG雄性生殖毒性的可能作用机制[12-13]。然TG对女性/雌性生殖系统的损伤亦不容忽视,幼龄时期性腺尚未发育完全,不能通过临床观察及相关指标检测客观评价服用TG期间对性腺的损害。青春期开始在性腺轴的启动下卵泡逐渐发育,故本次研究重点探讨TG对青春期女性/雌性生殖系统的卵巢毒性及补肾中药的减毒机制。

左归丸(ZGW)是中国常用的补肾方药,为明代温补医家张景岳所创,具有滋阴补肾、益精养血的功效,由大怀熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸肉、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟胶8种药物组成,临床上被广泛应用于生殖系统疾病的治疗[14-15]。然而,ZGW对缓解TG所致卵巢毒性的作用及潜在机制尚不明确。蛋白质组学可从蛋白质整体角度认识生命活动规律,与中医药整体观念在思想上具有一致性[16],给中药复方药效机制“多靶点”筛选研究提供了强有力的工具。因此,本研究从蛋白质组学角度探讨ZGW是否能减轻TG的卵巢毒性及可能的作用机制,为突破TG在临床的应用困境提供思路。

1 材料

1.1 动物

SPF级2月龄SD雌性大鼠,相当于女性13岁(https://www.taletn.com/rats/age/)32只(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0011,于河南中医药大学动物实验中心规范饲养,使用许可证号:SYXK(豫)2020-0004。

1.2 伦理审查

本实验方案经河南中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号:DWLL202209001),实验期间严格遵守实验动物管理规范。

1.3 药物

ZGW购自北京同仁堂股份有限公司(批号:37917605794),每袋9 g。TG购自江苏美通药业(产品批号:220601),符合GMP标准,每片10 mg。

1.4 主要试剂和仪器

卵泡刺激素(Follicle-stimulating hormone,FSH)(批号:E-EL-R0391c)、促黄体生成素(Luteinizing hormone,LH)(批号:E-EL-R0026c)、睾酮(Testosterone,T)(批号:E-OSEL-R0003)和雌二醇(Estradiol,E2)(批号:E-OSEL-R0001)、孕酮(Progesterone,P)(批号:E-OSEL-R0007)ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);B淋巴细胞瘤-2基因(Apoptosis regulator Bcl-2,Bcl-2)(货号:GB113375)、线粒体凋亡相关基因Bcl-2相关X蛋白(Apoptosis regulator BAX,Bax)(货号:GB11690)、细胞色素C(Cytochrome c,somatic,Cycs)(货号:GB12080)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)(货号:GB11767C)、多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶3(Poly[ADP-ribose]polymerase,Parp3)(货号:11289-1-ap)抗体均购自武汉塞维尔生物科技有限公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,货号:P0012),组织研磨仪(美壁,型号:MB-96),ORBITRAP ECLIPSE质谱仪(Thermo Scientific公司,美国),EASY-nLCTM1200色谱仪(Thermo Scientific公司,美国)。

2 方法

2.1 TG致卵巢毒性模型建立和治疗

从32只动情周期正常的SPF级2月龄雌性SD大鼠随机挑选10只作为空白组(Control组,CON组),其余大鼠通过连续灌胃2周TG(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})构建卵巢损伤模型,期间监测动情周期评估造模是否成功,将造模成功的大鼠(20只)随机分为雷公藤多苷组(TG组)、左归丸组(ZGW组),每组10只,ZGW组大鼠给予ZGW灌胃(1.875 g·kg^{-1}·d^{-1})[ZGW成人临床服用剂量为18 g·d^{-1}(青春期药量≈成人药量),换算成大鼠给药剂量为1.875 g·kg^{-1}·d^{-1}],TG组与CON组每日给予等量0.9%氯化钠溶液灌胃,连续灌胃4周。

2.2 样本采集

灌胃期间观察统计各组大鼠动情周期,末次给药2 h后进行取材,先称重后进行腹腔麻醉,通过腹主动脉进行采血,分离收集血清,保存于-80 ℃冰箱。迅速分离子宫、双侧卵巢组织并称重,将子宫、一侧卵巢用4%多聚甲醛固定液进行固定,另一侧卵巢组织冻存于-80 ℃冰箱。

2.3 指标检测

2.3.1 卵巢、子宫脏器指数 子宫/卵巢指数(%)=子宫/卵巢湿重(mg)/体质量(g)×100%。

2.3.2 血清FSH、LH、T、E2、P含量 取出-80 ℃冰箱冻存的血清,按照ELISA试剂盒说明书上步骤进行操作,检测血清FSH、LH、T、E2、P水平。

2.3.3 子宫、卵巢病理形态观察及卵泡数统计 将在多聚甲醛中固定的子宫、单侧卵巢常规石蜡包埋切片、脱蜡、水化,苏木素-伊红染色后,再经梯度乙醇、二甲苯脱水透明后,中性树脂封片。显微镜观察卵巢、子宫组织病理形态,统计各级卵泡数目及比率,各级卵泡率=各级卵泡数目/总卵泡数。

2.4 蛋白质组学

2.4.1 卵巢组织样本蛋白提取及分析 从CON组、TG组、ZGW组3组中各随机挑选3个卵巢样本用于蛋白质组学分析,精确称重至50 mg,加入SDT裂解液和蛋白酶抑制剂,12 000 r/min离心20 min后取上清液以丙酮沉淀法提取蛋白,随后用BCA法测定所得蛋白质的浓度。根据测定结果,取50 μg样品与上样缓冲液混合后进行SDS-PAGE电泳,用考马斯亮蓝染色观察蛋白条带及分布。质量合格后取适量蛋白进行酶解,按50∶1的质量比例添加胰蛋白酶至蛋白质中,于37 ℃条件下酶解过夜,收集样品进行除盐、真空干燥待测。样品采用Easy nLC系统分离,流速为300 nL·min^{-1},利用流动相A

(100%水、0.1%甲酸)、流动相B(80%乙腈、0.1%甲酸)进行梯度洗脱,洗脱条件如下:0~18 min,0%~6% B;18~97 min,12%~30% B;97~113 min,30%~40% B;113~114 min,40%~95% B;114~124 min,95% B;124~125 min,95%~6% B;经色谱分离后使用ORBITRAP ECLIPSE质谱仪进行分析,生成原始质谱检测数据(.raw)。

2.4.2 蛋白质鉴定和质谱数据分析 使用Proteome Discoverer (2.4.1.15)对质谱原始RAW文件进行定量分析,通过内嵌SEQUEST与RefSeq人类蛋白质数据库进行搜库分析。差异表达蛋白筛选条件如下:差异倍数变化>1.2倍且$P<0.05$。

2.4.3 蛋白质生信分析 分别使用WoLF PSORT Ⅱ、基因本体(Gene Ontology,GO)数据库、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)以及String数据库实现对差异蛋白的亚细胞定位、GO、KEGG、蛋白质相关作用网络分析(Protein-Protein Interaction Networks,PPI)。微生信在线网站、GraphPad Prism eight和Cytoscape软件用于图形显示。

2.5 Western blot分析

准备好卵巢组织,用PBS进行冲洗,匀浆后并用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液裂解。将蛋白质以12 000 r/min转速离心10 min,收集所得上清液,采用BCA试剂盒对上清液中的蛋白质浓度进行测定。凝胶分离、封闭,与一抗孵育过夜。用TBST冲洗3次后,将膜与二抗孵育30 min。加入ECL溶液进行显影,Image J软件分析图像,检测目的蛋白灰度值。

2.6 统计分析

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计处理,当计量资料符合正态分布时,结果用$\bar{x}\pm s$表示,参数检验采用单因素方差分析,组间两两比较在方差齐时用LSD检验,方差不齐时用Dunn's test检验。计量资料不符合正态分布时采用非参数检验。$P<0.05$表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ZGW对TG所致卵巢毒性大鼠动情周期、体质量、卵巢及子宫指数影响

与CON组相比,TG组大鼠动情周期明显延长($P<0.000\ 1$),而ZGW组大鼠动情周期较TG组明显缩短($P<0.000\ 1$)。各组间大鼠终末体质量、卵巢重量、子宫重量、卵巢指数、子宫指数变化差异均无统计学意义(具体见表1)。

3.2 ZGW对TG所致卵巢毒性大鼠血清E2、FSH、LH、P、T影响

与CON组比较,TG组大鼠血清E2($P<0.000\ 1$)、P($P<0.000\ 1$)、T($P<0.01$)水平显著下降,FSH($P<0.01$)、LH($P<0.000\ 1$)显著上升。与TG组相比较,ZGW组大鼠血清E2($P<0.01$)、T($P<0.01$)均有所回升,LH($P<0.000\ 1$)、FSH($P<0.05$)下降,但P变化差异无统计学意义(具体见表2)。

3.3 ZGW对TG所致卵巢毒性大鼠卵巢、子宫组织病理学及各级卵泡所占百分比影响

CON组大鼠卵巢组织结构正常,各级卵泡结构清晰可见,有少数闭锁卵泡。TG组大鼠卵巢出现明显萎缩,各生长阶段卵泡数目大幅减少,闭锁卵泡增多,卵母细胞周边颗粒层排列紊乱,黄体纤维化且数量增加。与TG组相比,ZGW组大鼠卵巢萎缩有一定程度恢复,各生长阶段的卵泡数目增多,闭锁卵泡数量减少,黄体未见纤维化。CON组大鼠子宫内膜厚度维持在正常水平,上皮主要由分泌细胞构成,且分泌泡较多,固有层内子宫腺丰富,周围毛细血管、小动脉和静脉丰富。与CON组相比,TG组大鼠子宫内膜厚度变薄,其上皮虽仍主要由分泌细胞构成,但胞质内的分泌泡及固有层中的子宫腺数量显著减少,部分宫腔中可见炎细胞分布。与TG组相比,ZGW组大鼠子宫内膜厚度稍有恢复,上皮依旧以分泌细胞为主导,胞质中分泌泡及固有层子宫腺的数量均有所增加,周围分布丰富的毛细血管、小动脉和静脉(具体见插页Ⅻ图1)。

与CON组相比,TG组闭锁卵泡率($P<0.000\ 1$)显著上升($P<0.000\ 1$)。原始、初级($P<0.05$)、次级($P<0.05$)、成熟卵泡率下降,但原始、成熟卵泡率差异无统计学意义。与TG组相比,ZGW组闭锁卵泡率显著下降($P<0.000\ 1$),原始、初级、次级、成熟卵泡率均有所上升,但只有初级卵泡率($P<0.05$)差异具有显著统计学意义(具体见表3)。

3.4 差异蛋白表达的鉴定筛选及亚细胞定位

每组共3个样本进行蛋白质组学分析,在3组样本中共鉴定到了7043种蛋白质以及6740可定量的蛋白质,差异表达蛋白的筛选标准为差异倍数>1.2(上调>1.2或<0.83),同时$P<0.05$,比较各组差异蛋白表达数量,TG组与CON组之间有203个差异表达蛋白,包括81个上调蛋白和122个下调蛋白;TG组和ZGW组之间有216个差异表达蛋白,包括116个上调蛋白和100个下调蛋白;在3组之间的差异蛋白取交集,总共28个差异蛋白重叠,其中,Cycs、Parp3等13个差异蛋白在TG组与CON组之间的表达上调,而经ZGW治疗后表达下调(具体见表4和插页Ⅻ图2)。

3.5 差异表达蛋白的亚细胞定位、GO、KEGG和PPI分析

对差异蛋白进行亚细胞定位,两个比较组(CON组vs TG组和TG组vs ZGW组)的差异蛋白在细胞内的位置相似,大约

表1 各组大鼠动情周期、体质量、卵巢及子宫指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	动情周期	体质量/(g)	子宫/(mg)	卵巢/(mg)	子宫指数/(mg/g)	卵巢指数/(mg/g)
空白组	10	3.98±0.24	283.8±12.69	43.66±6.99	11.72±2.14	0.15±0.03	0.04±0.01
雷公藤多苷组	10	7.03±1.24***	280.2±10.61	39.88±7.81	10.76±2.68	0.14±0.03	0.04±0.01
左归丸组	10	4.34±0.20###	282.1±10.61	44.03±11.87	10.90±2.18	0.16±0.04	0.04±0.01

注:***与CON组相比,$P<0.000\ 1$;###与TG组相比,$P<0.000\ 1$。

表2 各组大鼠血清E2、FSH、LH、P、T比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	E2/(pg/mL)	FSH/(ng/mL)	LH/(mIU/mL)	P/(pg/mL)	T/(ng/mL)
空白组	10	134.15±28.72	55.87±6.91	139.13±26.98	5 478.07±1 370.75	1.74±0.48
雷公藤多苷组	10	91.62±14.52***	77.61±14.43**	259.11±35.07***	2 840.78±646.96***	1.08±0.21**
左归丸组	10	120.75±23.43##	63.40±6.34#	148.26±33.57###	3 355.12±892.07	1.50±0.29##

注:**与CON组相比,$P<0.01$;***与CON组相比,$P<0.000\ 1$;#与TG组相比,$P<0.05$;##与TG组相比,$P<0.01$;###与TG组相比,$P<0.000\ 1$。

表3 各组大鼠卵巢、子宫组织病理形态($\bar{x} \pm s$) 单位:%

组别	n	原始卵泡率	初级卵泡率	次级卵泡率	成熟卵泡率	闭锁卵泡率
空白组	10	0.49 ± 0.08	0.18 ± 0.05	0.16 ± 0.06	0.03 ± 0.02	0.15 ± 0.03
雷公藤多苷组	10	0.42 ± 0.06	0.09 ± 0.02 *	0.03 ± 0.03 *	0.01 ± 0.01	0.45 ± 0.02 * * *
左归丸组	10	0.46 ± 0.02	0.18 ± 0.04#	0.12 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.04###

注:*与CON组相比,$P<0.05$;* * *与CON组相比,$P<0.000\ 1$;#与TG组相比,$P<0.05$;###与TG组相比,$P<0.000\ 1$。

表4 CON组 vs TG组 vs ZGW组重叠差异蛋白

蛋白编号	基因名称	CON组 vs TG组	TG组 vs ZGW组
O88754	Hbg1	↑ * *	↓ ##
Q5RJZ6	Scoc	↑ *	↓ ##
Q5U2Y6	Tfip11	↑ *	↓ #
Q5XHY7	Stam2	↑ * *	↓ #
A0A0G2JYD4	Vps13d	↑ *	↓ #
P62898	Cycs	↑ *	↓ #
Q5U2N3	Pitpnm1	↑ *	↓ #
Q641X3	Hexa	↑ *	↓ #
D4A0Q3	Wdr4	↑ * *	↓ #
Q5U2U3	Parp3	↑ * *	↓ ##
Q5I0I4	Dmac2	↑ *	↓ #
D3ZUM4	Glb1	↑ *	↓ #
Q3KR97	Baiap2l1	↑ *	↓ ##
Q6AXZ0	Paip2	↓ * *	↑ #
Q9Z2T2	Kcnk1	↓ * *	↑ #
D3Z8P5	RGD1566085	↓ *	↑ #
F1M400	Ankrd28	↓ *	↑ #
P35572	Igfbp6	↓ *	↑ #
Q9Z0T0	Tpmt	↓ *	↑ ##
F1M9G8	Hint3	↓ *	↑ ##
D3ZKI9	Nop9	↓ * *	↑ #
D3ZIN7	Mrps23	↓ *	↑ #
F1LPS8	Pura	↓ * *	↑ ##
P12368	Prkar2a	↓ *	↑ ##
P32232	Cbs	↓ *	↑ #
Q9EPF2	Mcam	↓ *	↑ #
O54921	Exoc2	↓ *	↑ ##
D3ZWS0	Scrib	↓ *	↑ #

注:*与CON组相比,$P<0.05$;* *与CON组相比,$P<0.01$;#与TG组相比,$P<0.05$;##与TG组相比,$P<0.01$。

有1/2的差异蛋白位于细胞核(CON组 vs TG组中28.42%,TG组 vs ZGW组的28.9%)和细胞质(CON组 vs TG组中的27.91%,TG组 vs ZGW组的31.7%)中,其余差异蛋白主要分布于细胞膜(CON组 vs TG组中的16.75%,TG组 vs ZGW组的11.7%)、细胞外基质(CON组 vs TG组中的11.16%,TG组 vs ZGW组的12.68%)和线粒体(CON组 vs TG组中的12.69%,TG组 vs ZGW组的11.7%)中(具体见插页Ⅻ图3)。

对于GO富集分析,气泡图中给出了生物途径(Biological process,BP)、细胞成分(Cellular component,CC)和分子功能(Molecular function,MF)中前10条富集结果。TG组与CON组之间BP包括神经元的负调控(negative regulation of neuron death)等,CC包括核周质(perikaryon)等,MF包括蛋白质折叠伴侣(protein folding chaperone)、ATP依赖性蛋白质折叠伴侣(ATP-dependent protein folding chaperone)。TG组与ZGW组之间BP包括眼外骨骼肌的发育(extraocular skeletal muscle development)、氧化去甲基作用(oxidative demethylation)、正向调节催乳素分泌(positive regulation of prolactin secretion)等,CC包括核斑点(nuclear speck)等,MF包括S-腺苷-L-蛋氨酸结合(S-adenosyl-L-methionine binding)等(具体见插页Ⅻ图3)。

KEGG通路分析中,CON组和TG组之间的差异蛋白存在77条通路,TG组和ZGW组的差异蛋白中存在51条富集的通路。3组之间重叠差异蛋白KEGG通路分析共富集到了15条通路,其中有8条差异存在统计学意义($P<0.05$),包括鞘糖脂生物合成(Glycosphingolipid biosynthesis)、糖胺聚糖降解(Glycosaminoglycan degradation)、其他聚糖降解(Other glycan degradation)、细胞凋亡(Apoptosis)等途径(具体见插页Ⅻ图4)。

使用String数据库对3组之间重叠差异蛋白进行蛋白质互作网络分析,PPI网络图中共连接到28个节点和28条边,其中Cycs、Tpmt、Cbs、Hint3、RGD1566085、Wdr4占据了PPI图的核心位置(具体见插页Ⅻ图4)。

3.6 Western Blot验证

蛋白质组学分析表明,CON组和TG组、TG组和ZGW组以及3组重叠差异蛋白均可富集到细胞凋亡信号通路,通过Western Blot方法验证了重叠差异蛋白Cycs、Parp3以及细胞凋亡信号通路上的主要蛋白如Bcl-2、Bax、Caspase-3。与CON组比较,TG组Bax、Cycs、Caspse-3、Parp3蛋白水平上调,Bcl-2水平下调,激活细胞凋亡信号通路,经ZGW治疗后,上述差异通路蛋白上调(见插页Ⅻ图5)。

4 讨论

TG展现出显著的抗炎与免疫抑制效果,在自身免疫性疾病和肾脏疾病的治疗中已被广泛应用,而TG的不良反应尤其是生殖毒性限制了其应用推广[17-18]。相对于TG对男性生殖系统的隐匿性影响不同,女性服药患者应用TG治疗后通常会有更为明显的临床表现[19],主要体现在月经紊乱、闭经、卵巢早衰等[20]。而研究表明,近40年来有关雷公藤毒性表现和机制的研究却是男/雄性偏多,女/雌性偏少[9]。TG对女性生殖系统造成的损伤多属肾虚阴亏精伤范畴,可配伍补肾益精的中药以扶正制毒。左归丸是补肾滋阴填精的代表方剂,诸药配伍、阴阳并用,“多成分”“多靶点”发挥补肾作用。基于此,针对TG对雌性大鼠生殖毒性及左归丸减毒机制进行研究。本研究结果也表明TG可以导致青春期雌性大鼠动情周期显著延长($P<0.000\ 1$),E2($P<0.000\ 1$)、P($P<0.000\ 1$)、T($P<0.01$)水平显著下降,FSH($P<0.01$)、LH($P<0.000\ 1$)水平显著增多,各级生长卵泡减少、闭锁卵泡显著增多($P<0.000\ 1$),而经过ZGW治疗后大鼠动情周期、性激素水平和卵巢组织中卵泡数目可以得到明显调整。

在此基础上,进一步采用蛋白质组学分析ZGW减轻TG卵巢毒性的分子机制,结果表明,与CON组相比,TG组有203个差异蛋白,而经过ZGW治疗后,有28种差异表达蛋白显著回调,显著回调的差异蛋白主要富集在鞘糖脂生物合成、糖胺

聚糖降解、其他聚糖降解、细胞凋亡等信号通路。关于生殖细胞与鞘糖脂生物合成、糖胺聚糖降解、其他聚糖降解的研究很少。代谢组学显示,鞘糖脂生物合成的代谢功能障碍与卵母细胞发育异常密切相关[21]。CHEN 等[22]采用 tRNA 衍生物表达谱分析高级别浆液性卵巢癌组织中差异表达的 tRFs 和 tiRNA,发现其在鞘糖脂生物合成方面显著上调,其他聚糖降解中显著下调。

细胞凋亡在女性卵巢卵泡发育、排卵和黄体形成退化中发挥重要作用[23]。卵巢颗粒细胞凋亡可导致卵巢内体细胞营养不足,进而加速卵泡闭锁、卵巢储备功能下降[24]。Bcl-2 和 Bax 均隶属于 Bcl-2 蛋白家族,在细胞凋亡的调控机制中扮演着核心角色,相互可形成同源或异源二聚体,形成异源二聚体时抑制颗粒细胞凋亡,形成同源二聚体时促颗粒细胞凋亡[25]。研究发现,通过上调卵巢颗粒细胞中 Bcl-2 蛋白,并同时下调 Bax 蛋白,可有效抑制颗粒细胞凋亡,进而促进卵泡发育[26]。Cycs 位于线粒体外膜或线粒体内外膜间的空隙中,可激活凋亡因子而加速细胞凋亡进程,Cycs 释放进入胞质并与 Apaf1 结合导致 Caspase 级联反应,导致细胞凋亡的出现[27]。LI 等通过敲除小鼠的 Cycs 基因,发现其对促凋亡刺激具有更明显的耐受性,说明 Cycs 在线粒体内源凋亡通路中起着重要作用[28]。在细胞凋亡进程中,Caspase 家族蛋白酶扮演着关键角色,Caspase-3 可以被视为细胞凋亡的核心效应蛋白及主要执行分子,其激活状态标志着细胞已进入不可逆的凋亡阶段[29]。Parp3 属于 Parp 家族,Parp 是 Caspase-3 在细胞早期凋亡阶段的作用目标,活化的 Caspase-3 能够促使 Parp 分解,进而加速细胞凋亡信号的传递[30]。Ma 等研究发现 TG 可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路以升高 Bax、Cycs 和 Caspase-3 表达水平、降低 Bcl-2 的表达水平从而减少卵巢储备[31];而 ZGW 可以通过激活 Bcl-2 基因抑制颗粒细胞和卵母凋亡,促进卵巢功能修复[32]。本研究结果显示,相对于空白组,TG 组卵巢组织中 Bax、Cycs、Caspse-3、Parp3 基因上调、Bcl-2 下调,而经 ZGW 干预后 Bax、Cycs、Caspse-3、Parp3、Bcl-2 均显著回调,提示左归丸可能通过调节细胞凋亡通路,起到减轻 TG 卵巢毒性作用(插页Ⅷ图6)。

综上所述,ZGW 可以有效改善 TG 所致青春期雌性大鼠动情周期延长、性激素水平失调、各级生长卵泡明显减少,闭锁卵泡增多的情况,这可能与影响细胞凋亡信号通路有关。本研究为 ZGW 减轻 TG 所致卵巢毒性的作用及机制提供研究基础,为 TG 的推广应用提供解决方案。

参考文献

[1] ZHAO J, DI T, WANG Y, et al. Multi-glycoside of Tripterygium wilfordii Hook. f. ameliorates imiquimod-induced skin lesions through a STAT3-dependent mechanism involving the inhibition of Th17-mediated inflammatory responses[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 38(3): 747-757.

[2] SHAN Y, ZHAO J, WEI K, et al. A comprehensive review of Tripterygium wilfordii hook. f. in the treatment of rheumatic and autoimmune diseases: Bioactive compounds, mechanisms of action, and future directions [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1282610.

[3] ZHENG B, LU D, CHEN X, et al. Tripterygium glycosides improve abnormal lipid deposition in nephrotic syndrome rat models[J]. Renal Failure, 2023, 45(1): 2182617.

[4] WANG Z, YU C, ZHOU L N, et al. Effects of tripterygium wilfordii induction therapy to IgA nephropathy patients with heavy proteinuria [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2017, 40(11): 1833-1838.

[5] CAI B, LU H, YE Q, et al. Identification of potent target and its mechanism of action of Tripterygium wilfordii Hook F in the treatment of lupus nephritis[J]. International Journal of Rheumatic Diseases, 2023, 26(8): 1529-1539.

[6] DING X, LIU J, SUN Y, et al. Triptolide alleviates the development of inflammation in ankylosing spondylitis via the NONHSAT227927.1/JAK2/STAT3 pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2024, 27(1): 17.

[7] JIANG S, WAN F, LIAN H, et al. Friend or foe? The dual role of triptolide in the liver, kidney, and heart[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedecine Pharmacotherapie, 2023, 161: 114470.

[8] YANG Z, ZHANG X, CHEN Z, et al. Effect of wuzi yanzong on reproductive hormones and TGF-β1/smads signal pathway in rats with oligoasthenozoospermia[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2019, 2019: 7628125.

[9] 徐颖, 樊媛芳, 赵元, 等. 近40年雷公藤生殖毒性研究概述[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3406-3414.

[10] 孙凤, 杨兴华, 马冬梅, 等. 雷公藤用药者生殖毒性发生率的Meta分析[J]. 中国药物警戒, 2014, 11(2): 94-99, 103.

[11] 李长青, 周学平. 中药复方配伍扶正制毒法精微探要[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7093-7095.

[12] DAI Y, SUN L, HAN S, et al. Proteomic study on the reproductive toxicity of tripterygium glycosides in rats[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 888968.

[13] HAN S, DAI Y, SUN L, et al. Molecular mechanism of Cuscutae semen-radix rehmanniae praeparata in relieving reproductive injury of male rats induced with tripterygium wilfordii multiglycosides: A tandem mass tag-based proteomics analysis[J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1050907.

[14] 焦存, 芦现杰, 张梅红, 等. 基于转录组学分析左归丸治疗环磷酰胺诱导卵巢早衰大鼠的分子机制[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(3): 328-334.

[15] 唐立明, 段恒, 肖彩仙, 等. 左归丸对大鼠卵巢血管生成与胎盘生长因子、肝细胞生长因子及其受体关系的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(5): 582-588.

[16] MIAO Y, ZHANG Q, YUAN Z, et al. Proteomics analysis reveals novel insights into the mechanism of hepatotoxicity induced by Tripterygium wilfordii multiglycoside in mice[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1032741.

[17] CHENG Y, ZHAO Y, ZHENG Y. Therapeutic potential of triptolide in autoimmune diseases and strategies to reduce its toxicity[J]. Chinese Medicine, 2021, 16(1): 114.

[18] 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]. Journal of Zhejiang University Science B, 2020, 21(4): 280-290.

[19] AI A, XIONG Y, WU B, et al. Induction of miR-15a expression by tripterygium glycosides caused premature ovarian failure by suppressing the Hippo-YAP/TAZ signaling effector Lats1[J]. Gene, 2018, 678: 155-163.

[20] 于德勇. 雷公藤总甙治疗类风湿性关节炎144例临床观察[J]. 中医杂志, 1982(7): 32-35.

[21] LIU L, YIN T L, CHEN Y, et al. Follicular dynamics of glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms in polycystic ovary syndrome patients[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 185: 142-149.

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.06.018

黄精黄芩通过 NF－κB/IκB－α 通路提升非小细胞肺癌对顺铂的敏感性

张嘉铖,张雯,范理宏
(上海同济大学医学院附属第十人民医院,上海 200072)

摘要:目的 探究中药复方黄精加黄芩对顺铂抗肿瘤的增敏作用,并进一步研究其潜在机制。方法 构建小鼠肺癌皮下瘤模型,分别给予黄精黄芩(HH)、顺铂(cisplatin,DDP)、黄精黄芩联用顺铂处理(HH+DDP),观察小鼠肿瘤体积变化。体外培养小鼠肺癌LLC(Lewis Lung Carcinoma)细胞系,施加相应干预后分别检测细胞增殖活力、细胞凋亡和活性氧(ROS)产生情况,以及线粒体膜电位的改变情况。结果 体内外结果表明,HH+DDP组相较于DDP组和HH组可以显著抑制LLC细胞系生长增殖。HH+DDP组干预后,凋亡蛋白相关蛋白Bax和Bcl－2的比值升高,Caspase－3表达上调,促进了细胞凋亡,抑制了肿瘤细胞增殖。同时,还发现HH+DDP组对NF－κB/IκB－α有显著抑制作用。流式细胞术发现HH+DDP组出现更高程度的细胞凋亡和ROS产生。此外,HH+DDP组还降低了线粒体膜电位,促进了细胞凋亡发生。结论 黄精加黄芩联用顺铂可以显著提升其抗肿瘤敏感性,并且通过线粒体相关的细胞凋亡途径诱导细胞凋亡,抑制体内外肿瘤细胞增殖。

关键词:黄精;黄芩;顺铂敏感性;细胞凋亡;线粒体
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)06-0104-08

Anti－Tumor Sensitivity of Cisplatin About NSCLC Enhanced by Huangjing(Polygonati Rhizoma)－Huangqin(Scutellariae Radix) During NF－κB/IκB－α Pathway

ZHANG Jiacheng,ZHANG Wen,FAN Lihong
(Shanghai Tenth People's Hospital,Tongji University School of Medicine,Shanghai 200072,China)

基金项目:国家中医药管理局新型冠状病毒感染中医药应急专项(2023ZYLCYJ02－6);上海市科委国际合作项目(20400750600);上海市卫生健康委员会中西医结合创新旗舰医院建设项目(ZY〔2021－2023〕－0205－05,ZXXT－202203)
作者简介:张嘉铖(1999－),男,江西吉安人,博士在读,研究方向:肺癌及线粒体能量医学。
通讯作者:范理宏(1966－),女,上海人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:肺结节发病机制和线粒体能量医学。E-mail:15770638955@163.com。

[22] CHEN B, LIU S, WANG H, et al. Differential expression profiles and function prediction of transfer rna－derived fragments in high－grade serous ovarian cancer[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 5594081.
[23] ALMEIDA C P, FERREIRA M C F, SILVEIRA C O, et al. Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells－A review[J]. Cell Biology International, 2018, 42(10): 1276－1281.
[24] IBRAHIM M A, ALBAHLOL I A, WANI F A, et al. Resveratrol protects against cisplatin－induced ovarian and uterine toxicity in female rats by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. Chemico－Biological Interactions, 2021, 338: 109402.
[25] ZONG W X, LI C, HATZIVASSILIOU G, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis[J]. The Journal of Cell Biology, 2003, 162(1): 59－69.
[26] 赵粉琴, 王馨怡, 李娜娜, 等. bcl－2/bax 凋亡基因诱导大鼠卵巢颗粒细胞凋亡以及当归黄芪超滤膜提取物的干预作用[J]. 中医药学报, 2018, 46(2): 59－62.
[27] GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria[J]. Cell Death and Differentiation, 2006, 13(9): 1423－1433.
[28] LI K, LI Y, SHELTON J M, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress－induced apoptosis[J]. Cell, 2000, 101(4): 389－399.
[29] MOSLEHI A H, HOSEINPOUR F, SABER A, et al. Fertility－enhancing effects of inositol & vitamin C on cisplatin induced ovarian and uterine toxicity in rats via suppressing oxidative stress and apoptosis[J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2023, 179: 113995.
[30] MA D, LIU Q, ZHANG M, et al. iTRAQ－based quantitative proteomics analysis of the spleen reveals innate immunity and cell death pathways associated with heat stress in broilers (Gallus gallus)[J]. Journal of Proteomics, 2019, 196: 11－21.
[31] MA K, CHEN Y, FAN X, et al. Dingkun Pill replenishes diminished ovarian reserve through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in TWP－induced mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 262: 112993.
[32] 赵粉琴, 胡芝霞, 苟雅姣, 等. 左归丸对^{60}Coγ射线损伤大鼠外周血细胞及卵巢组织 TAP63 和 Bcl－2 蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(6): 204－207, 224.

左归丸减轻雷公藤多苷卵巢毒性的蛋白质组学研究

(正文见99－104页)

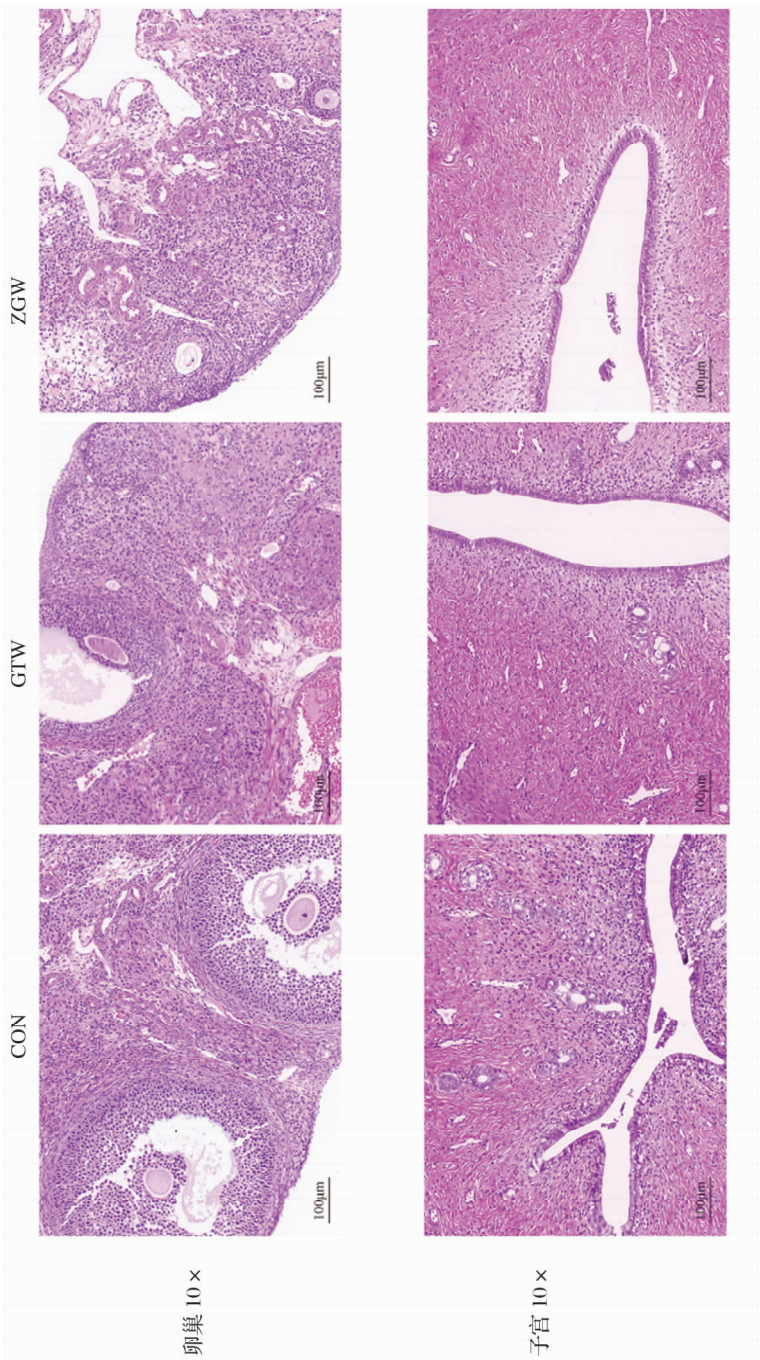
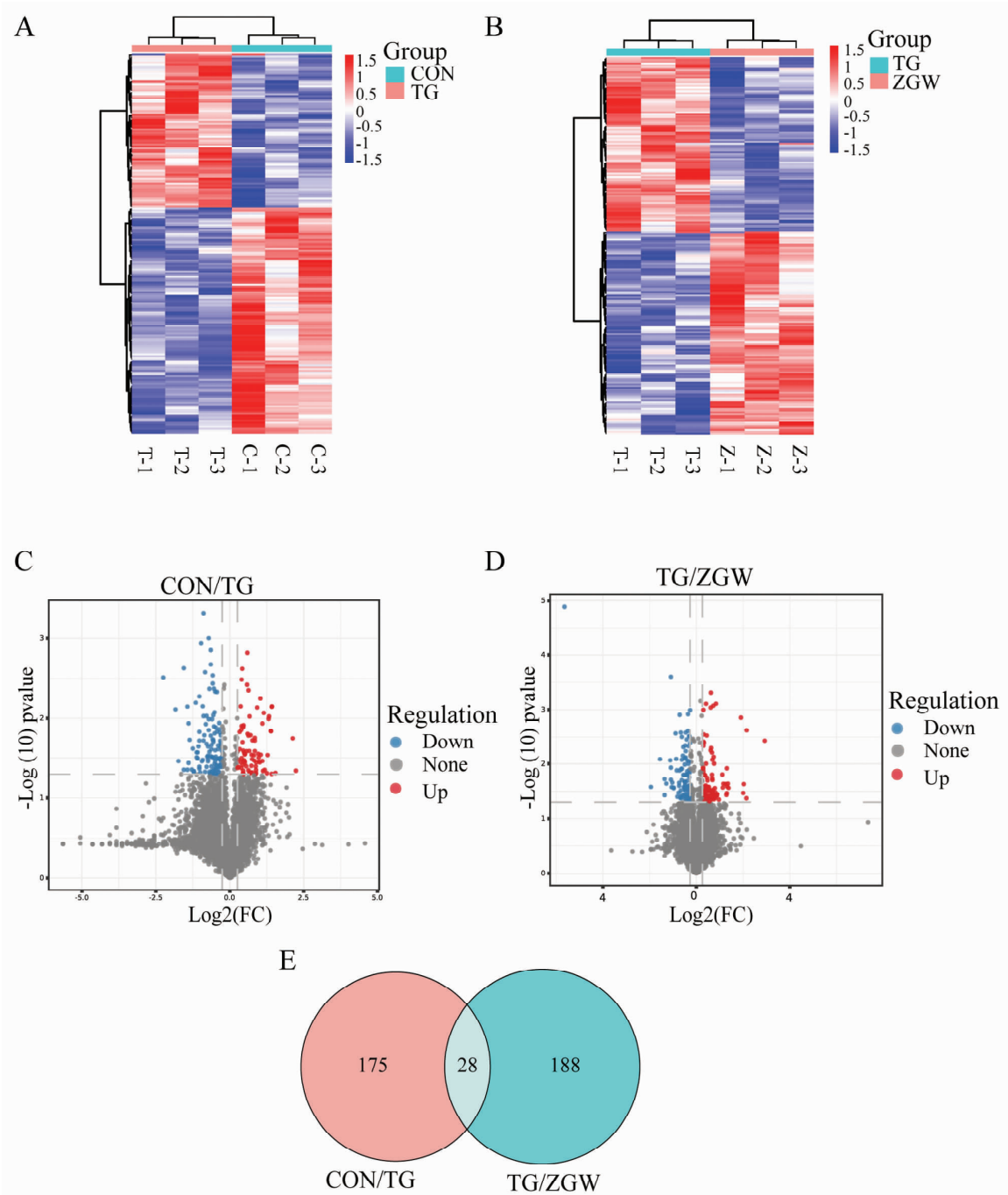
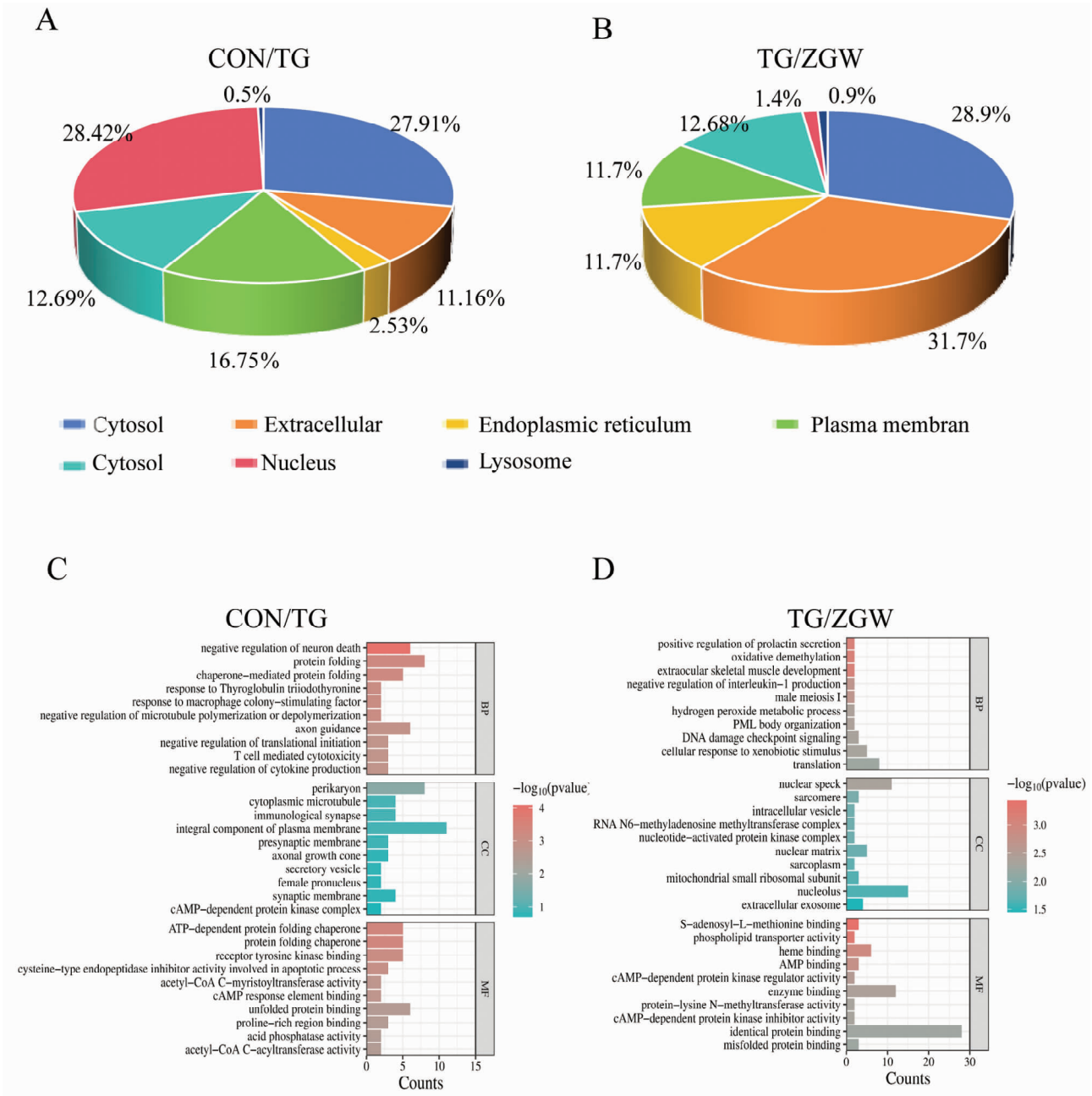


图1 各组大鼠卵巢、子宫组织病理形态



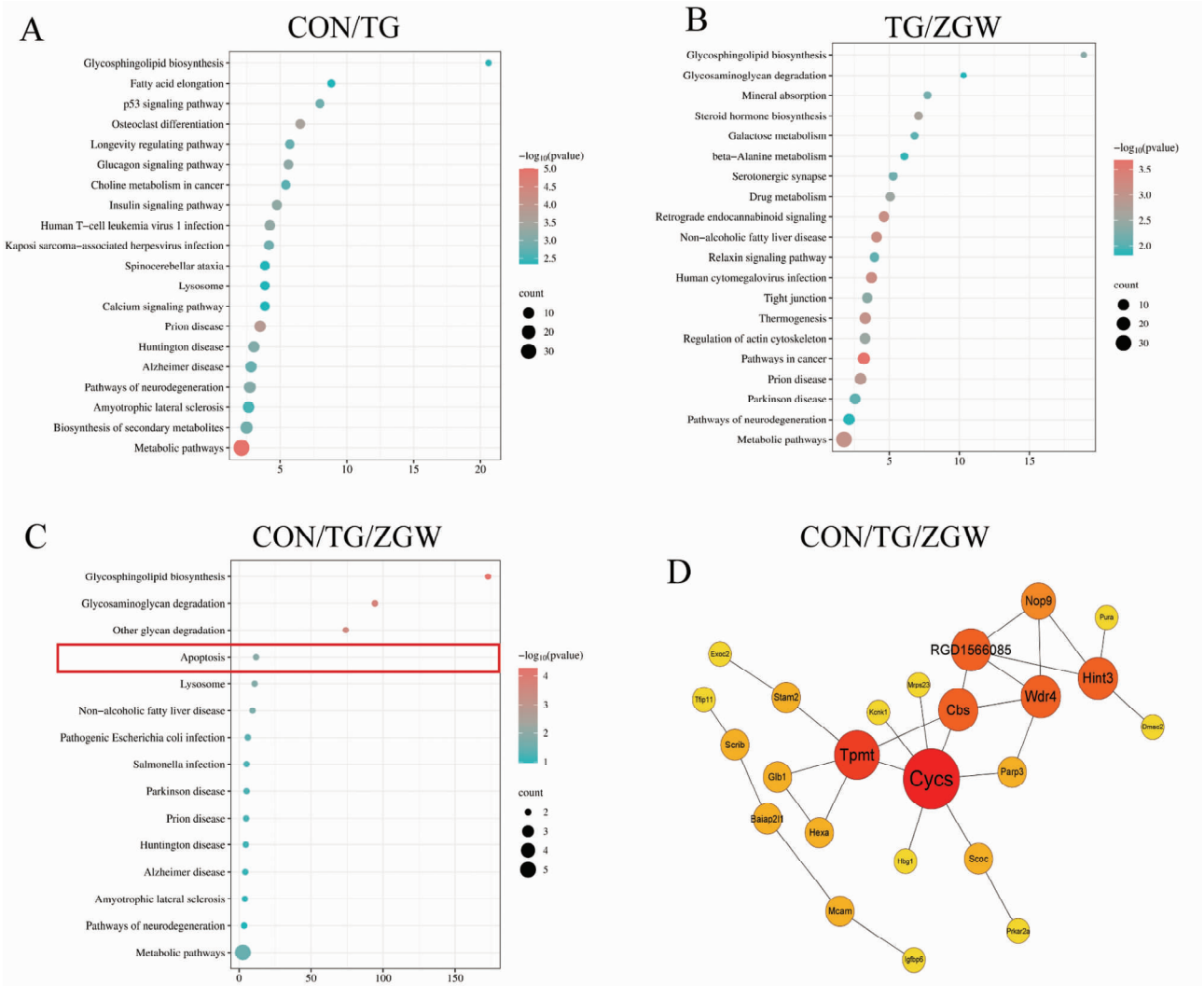
注:(A)CON 组和 TG 组聚类热图;(B)TG 组和 ZGW 组聚类热图;(C)CON 组和 TG 组火山图;(D)TG 组和 ZGW 组火山图;(E)CON 组和 TG 组与 ZGW 组韦恩图。

图 2 各组之间差异蛋白鉴定筛选



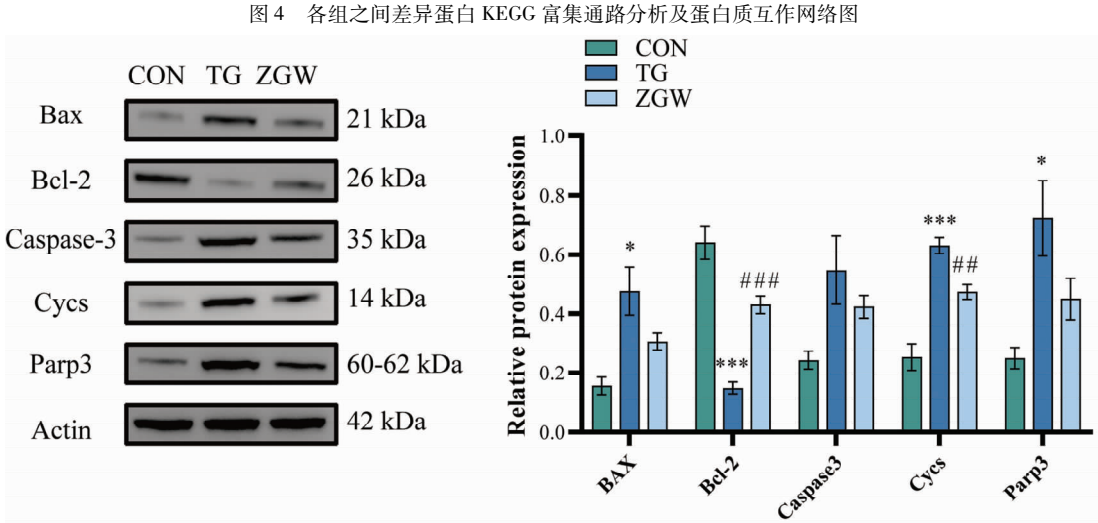
注：(A)CON 组和 TG 组差异蛋白亚细胞定位图；(B)TG 组和 ZGW 组差异蛋白亚细胞定位图；(C)CON 组和 TG 组差异蛋白 GO 分析图；(D)TG 组和 ZGW 组差异蛋白 GO 分析图。

图 3 各组之间差异蛋白亚细胞定位和 GO 功能分析



注：(A)CON 组和 TG 组 KEGG 富集气泡图；(B)TG 组和 ZGW 组 KEGG 富集气泡图；(C)CON 组、TG 组和 ZGW 组重叠差异蛋白 KEGG 富集气泡图；(D)CON 组、TG 组和 ZGW 组重叠差异蛋白的蛋白质互作网络图。

图 4 各组之间差异蛋白 KEGG 富集通路分析及蛋白质互作网络图



注：* 与 CON 组相比，$P<0.05$；* * * 与 CON 组相比，$P<0.000\ 1$；## 与 TG 组相比，$P<0.01$；### 与 TG 组相比，$P<0.000\ 1$。

图 5 各组大鼠卵巢组织中 Bax、Cycs、Caspase－3、Parp3、Bcl－2 蛋白表达水平($n=3$)

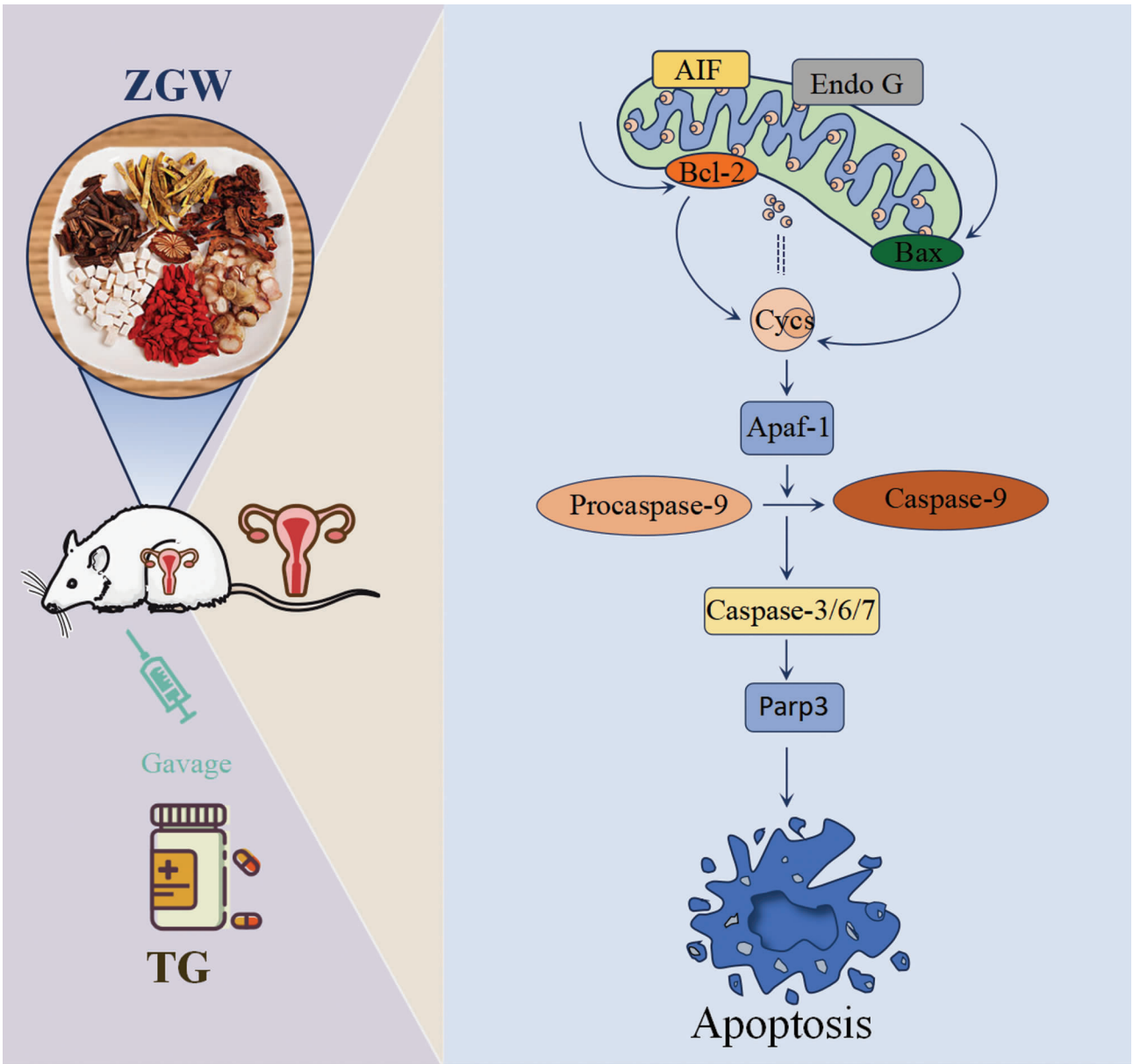


图 6 ZGW 减轻 TG 诱导卵巢毒性的分子机制