DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.07.022

定量蛋白质组学探讨菟丝子黄酮对雷公藤多苷致雄鼠生殖毒性的影响机制

孙利辉[1,2],丁樱[1,2],韩姗姗[1,2],代彦林[1],徐闪闪[1],高敏[1]
(1.河南中医药大学第一附属医院儿科医院,河南 郑州 450000;2.河南中医药大学儿科医学院,河南 郑州 450046)

摘要:目的 基于串联质量标签(Tandem mass tags,TMT)定量蛋白质组学和生物信息学方法探讨菟丝子黄酮(*Cuscuta chinensis* flavonoids,CCF)改善雷公藤多苷(*Tripterygium wilfordii* glycosides,GTW)致雄鼠生殖毒性的作用机制。方法 将21只雄性SD大鼠随机分为空白组、GTW模型组、CCF治疗组,分别灌胃相应药物,连续12周,实验结束后进行苏木精-伊红染色以评价CCF对GTW致生殖毒性的改善作用。利用TMT定量蛋白质组学技术来评估从睾丸组织中提取的蛋白质,通过生物信息学方法对差异表达的蛋白质进行分析,蛋白免疫印迹法验证蛋白质组学筛选出的关键差异表达蛋白。结果 菟丝子黄酮能显著改善大鼠睾丸组织的病理损伤,干预后共检测到29种差异表达的蛋白质,包括6种上调蛋白质和23种下调蛋白质。京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析显示,非洲锥虫病、补体与凝血级联系统、生物合成安沙霉素、组氨酸代谢、维生素消化吸收是CCF改善GTW生殖毒性的主要途径。而基因本体(Gene Ontology,GO)分析显示,CCF改善GTW生殖毒性的差异表达蛋白主要与胶原蛋白、血浆脂蛋白、蛋白质氧化、凝血内在途径、肝素结合相关。COG注释分析显示,防御机制、细胞外结构与CCF改善GTW生殖毒性的机制密切联系。菟丝子黄酮能使Apoa1、Tktl2上调,Hba1、Aldh3a1、Pzp、Serpind1下调。结论 菟丝子黄酮可通过调控非洲锥虫病、补体与凝血级联系统、生物合成安沙霉素、组氨酸代谢、维生素消化吸收通路介导的胶原合成、脂质代谢、细胞凋亡、氧化应激等来减轻雷公藤多苷的睾丸毒性。

关键词:雷公藤多苷;菟丝子黄酮;生殖毒性;定量蛋白质组学
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)07-0117-11

Exploring Effect of Tusizi(*Cuscuta chinensis*) Flavonoids on Reproductive Toxicity of Leigongtong(*Tripterygium wilfordii*) Glycosides in Male Rats Based on Quantitative Proteomics

SUN Lihui[1,2],Ding Ying[1,2],HAN Shanshan[1,2],DAI Yanlin[1],XU Shanshan[1],GAO Min[1]
(1.Pediatric Hospital of The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450000,Henan,China;
2.Pediatric Medical College of Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China)

Abstract:*Objective* To explore the mechanism by which Tusizi(*Cuscuta chinensis*) flavonoids(CCF) improves the reproductive toxicity of Leigongtong(*Tripterygium wilfordii*) glycosides(GTW) in the male rats using Tandem Mass Tags(TMT) quantitative proteomics and bioinformatics methods. *Method* Twenty-one male SD rats were randomly divided into a control group,a GTW model group and a CCF treatment group,and were orally administered with the corresponding drugs for 12 consecutive weeks. After the experiment,hematoxylin eosin staining was performed to evaluate the improvement effect of CCF on GTW-induced reproductive toxicity. TMT quantitative proteomics technology was used to evaluate proteins extracted from testicular tissue,analyzing differentially expressed proteins through bioinformatics methods and verifying key differentially expressed proteins screened by proteomics through western blot. *Result* CCF can significantly improving the pathological damage of the testicular tissues of the rats. After intervention,a total of 29 differentially expressed proteins were detected,including 6 up-regulated proteins and 23 down-regulated proteins. KEGG pathway analysis showed that African trypanosomiasis,complement coagulation cascade system,biosynthesis of amphotericin,histidine metabolism and vitamin digestion and absorption were the main pathways by which

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82205187);河南省中医学"双一流"创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-01);河南中医药大学第一附属医院博士科研启动基金项目(2022BSJJ2005)

作者简介:孙利辉(1998-),女,河南洛阳人,博士在读,研究方向:中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。
通讯作者:丁樱(1951-),女,江苏南京人,国医大师,主任医师、教授,博士研究生导师,学士,研究方向:中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。E-mail:dingying3236@sina.com。

CCF improved the reproductive toxicity of GTW. GO analysis showed that the differentially expressed proteins in CCF improving GTW reproductive toxicity were mainly related to collagen, plasma lipoprotein, protein oxidation, intrinsic coagulation pathways and heparin binding. COG annotation analysis showed that defense mechanisms, extracellular structures and the mechanisms by which CCF improved GTW reproductive toxicity were closely related. Dodder seed flavonoids can up-regulate the expressions of Apoa1 and Tktl2, and down-regulate the expressions of Hba1, Aldh3a1, Pzp and Serpind1. *Conclusion* CCF can alleviate the testicular toxicity of GTW by regulating collagen synthesis, lipid metabolism, cell apoptosis and oxidative stress mediated by African trypanosomiasis, complement and coagulation cascade system, biosynthesis of ansamycins, histidine metabolism, vitamin digestion and absorption pathway.

Keywords: Leigongtong (*Tripterygium wilfordii*) polyglycosides; Tusizi (*Cuscuta chinensis*) flavonoids; reproductive toxicity; quantitative proteomics

雷公藤多苷(*Tripterygium wilfordii* glycosides, GTW)是从雷公藤的根芯中提取的脂溶性混合物,具有抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用,可治疗多种免疫性疾病[1]。然而,也是过去半个世纪中毒最多的中草药之一,雷公藤用药者的总生殖毒性发生率为17.9%[2],可引起女性月经病、男性少精弱精等,成为限制其临床应用的主要原因[3-4]。因此,寻找能够有效降低其生殖毒性的药物至关重要。

菟丝子黄酮(*Cuscuta chinensis* flavonoids, CCF)是菟丝子最重要的活性成分,可改善性功能、调节生殖内分泌和免疫功能[5-6],通过恢复肾脏和睾丸中睾酮、雄激素受体的mRNA和蛋白表达以补肾阳,增加幼鼠睾丸和附睾的重量,促进睾丸间质细胞分泌睾酮,有效抑制生精细胞凋亡并促进其增殖[7-10]。尽管CCF是一种很有前途的拮抗GTW生殖毒性的药物,但其减毒机制尚不清楚,需要进一步探索。

因此,本研究采用串联质量标签(Tandem mass tags, TMT)定量蛋白质组学方法阐明CCF改善GTW雄性生殖毒性的作用机制,对于建立临床安全性和合理用药提供参考依据,也为开发雷公藤多苷的减毒制剂研究奠定基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

雷公藤多苷片(江苏美通药业有限公司,10 mg/片,批号130925),研磨成细粉,用生理盐水溶液配制成1.2 mg/mL的雷公藤多苷混悬液;菟丝子黄酮购自陕西昂盛生物医药科技有限公司(纯度50%,批号ZL20130815),用生理盐水配制成质量浓度为10 mg/mL的菟丝子黄酮混悬液;BCA定量试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号020123230510);TMT标记试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司,批号WB314804);Apoa1抗体(GeneTex公司,批号44370);Pzp抗体(武汉云克隆科技股份有限公司,批号A20220616377);Hba1、Aldh3a1、Serpind1抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别是00090595、00090751、00048588);Tktl2抗体(北京索莱宝科技有限公司,批号20220516);羊抗兔IgG-HRP(安诺伦生物科技有限公司,批号20000858)。

1.2 仪器

Orbitrap Exploris 480液质联用质谱仪(Product code: 725533, Thermo Scientific, United States);Easy nLC 1200色谱系统(Product code: LC140, Proxeon Biosystems, Thermo Fisher Scientific, United States);高强度超声波处理机(宁波Scientz Biotechnology co. ltd., Ningbo, China)。

1.3 动物

21只清洁级雄性SD大鼠(4周龄,体质量101~125 g),来源于北京维通利华有限公司,质量合格证号110011211104819427,生产许可证号SCXK(京)2016-0011。所有大鼠在(23±3)℃,40%~70%相对湿度,12 h光暗循环条件下进食。实验方案经河南中医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理号:DWLL202105053)。

2 方法

2.1 分组和给药

大鼠适应性喂养后随机分为空白组、GTW模型组(模型组)、GTW联合CCF治疗组(CCF组),每组7只,记录体质量。空白组予0.9%生理盐水10 mL/(kg·d)灌胃。模型组、CCF组均给予雷公藤多苷12 mg/(kg·d)灌胃,1次/d。同时,CCF组给予菟丝子黄酮100 mg/(kg·d)灌胃,大鼠给药剂量均为人临床剂量×6.25(按照人与大鼠的药物剂量折算系数),灌胃体积均为1 mL/100 g,1次/d,连续灌胃12周。各组给予相同饮食。

2.2 苏木精和伊红染色

12周后,腹主动脉放血处死,立即取出两侧睾丸,左侧睾丸组织放入4%多聚甲醛固定48 h,进行苏木精和伊红染色观察病理改变。右侧睾丸组织放入-80 ℃冰箱冻存,用于蛋白质检测及蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)验证。

2.3 TMT定量蛋白质组学分析

2.3.1 提取蛋白质 将空白组、模型组和CCF组的右侧睾丸组织样品中加入裂解液(1.5% SDS/100 mM Tris-Cl, pH 8.0),进行组织匀浆和沸水浴后,在冰水浴中超声10 min,12 000 r/min离心15 min,取上清。用液氮粉碎成粉末。加入8 mol/L尿素和1%4倍体积的裂解缓冲液,用高强度超声波处理机在冰上进行3次超声处理。然后,将需要清除的残留物以12 000 r/min的速度在4 ℃离心10 min。最后,收集上清液,并按照制造商的说明用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。

2.3.2 LC-MS/MS分析 丙酮沉淀法对溶液中的蛋白进行沉淀。向蛋白沉淀中加入复溶液待复溶后,加入二硫苏糖醇打开二硫键;加入碘乙酰胺,于室温、暗处进行烷基化反应以封闭巯基。蛋白质定量后取等量样本用于SDS-PAGE检测,考马斯亮蓝染色后观察蛋白条带。按照酶与蛋白1∶50的质量比

加入胰蛋白酶进行酶切。第2天终止酶切,并调节溶液pH值在6.0左右,12 000 r/min离心15 min。取等量的样品进行TMT处理,利用反相高效液相色谱分离;LC-MS/MS分析;采用Uniprot中Rat的蛋白质组参考数据库;数据统计和生物信息学分析。

2.3.3 生物信息学分析 通过eggNOG-mapper软件的Diamond程序,得到提交蛋白序列对应的基因本体(Gene Ontology,GO)功能、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析和COG注释分析结果。差异倍数变化上调>1.2倍或下调<0.83且$P<0.05$为差异蛋白的筛选条件。对符合条件者,进行GO术语、KEGG通路、COG注释和PPI网络展示。STRING在线网站(http://www.STRING-db.org/)获得差异表达蛋白质PPI网络。微生信在线网站、Origin 2021、GraphPad Prism 9、Adobe Illustrator 2021软件用于图形展示。

2.4 WB检测相关蛋白表达

提取约30 mg睾丸组织并粉碎成粉末,冷PBS洗涤2次,匀浆,用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液裂解,离心10 min,用BCA试剂盒测定浓度。提取30 μg蛋白质样品并通过SDS-PAGE凝胶分离并转移到PVDF膜上。然后用加入5%脱脂奶粉的TBST缓冲液封闭1 h,与一抗4 ℃孵育过夜。用TBST洗涤3次后,加二抗孵育2 h。最后,加入ECL溶液,利用化学发光软件进行显影分析。

2.5 统计学方法

使用SPSS 26.0进行统计分析,计量资料若符合正态分布,则采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用ANOVA分析,方差齐时采用LSD法,方差不齐时采用塔姆黑尼法;若不符合正态分布,则采用中位数和四分位数间距[M(P25,P75)]描述,两组间比较采用曼-惠特尼检验,多组间比较采用克鲁斯卡尔-沃斯利检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 病理学分析

空白组大鼠睾丸生精小管呈圆形或卵圆形,结构清楚,各级生精细胞层次分明、排列紧密,多为5~7层,管腔内可见大量精子;附睾管排列有序,管壁为正常上皮细胞,管腔内充满精子。模型组大鼠睾丸组织的病理损伤明显,生精小管萎缩,管径变细,管间间隙变大,生精上皮变薄、细胞层次疏松,生精细胞部分脱落;附睾管内精子明显减少。CCF组大鼠睾丸生精小管管腔直径较模型组变化不明显,上皮较空白组略薄,较模型组明显变厚,细胞层次尚分明,各级生精细胞明显多于模型组,结构完整且排列整齐,内含的精子也明显增多;附睾管上皮分布规则,管内精子密集。见插页XXⅢ图1。

3.2 菟丝子黄酮处理后差异表达蛋白的TMT定量蛋白质组学研究

经PCA分析,样本重复性较好,见插页XXⅢ图2。病理结果显示CCF具有修复GTW睾丸损伤的作用,故应用TMT蛋白质组学技术对CCF组与模型组之间的差异表达蛋白进行研究,共筛选了7381种蛋白质,其可靠性高。模型组与空白组比较,上调蛋白数目4个,下调蛋白数目30个,差异蛋白总数共计34个。与模型组相比,CCF组总共有29种差异表达蛋白被显著调节,包括6种上调蛋白质和23种下调蛋白,其临界值为1.2倍或0.83倍的变化。见插页XXⅣ图3。

3.3 菟丝子黄酮处理后差异表达蛋白的生物信息学分析

3.3.1 GO功能富集分析 对CCF组和模型组进行GO注释分类分析以评价差异表达蛋白的功能注释,结果如插页XXⅣ图4所示。在生物过程中,差异表达蛋白的前5个过程分别为细胞过程(15%)、生物调控(14%)、多细胞有机体过程(11%)、对刺激的反应(11%)和代谢过程(11%)。在细胞成分中,差异表达蛋白的比例最大的是细胞解剖实体(50%),其次是细胞内(40%)和含蛋白质复合物(10%)。在分子功能中,差异表达的蛋白质主要有结合(47%)、分子功能调节(19%)和催化活性(16%)。进行GO富集分析以评估某些功能类型中差异表达蛋白质的显著富集趋势,结果如插页XXV图5所示。在生物学过程中,差异表达蛋白主要参与血浆脂蛋白颗粒重塑、组织内稳态和对营养的反应。在细胞成分中,差异表达的蛋白质与细胞外分泌体、细胞外细胞器显著相关。在分子功能中,酶抑制剂活性、肽酶调节活性得到显著调节。

3.3.2 KEGG功能富集分析 采用KEGG通路分析CCF组和模型组的差异蛋白。通路富集分析结果显示,主要途径包括非洲锥虫病(African trypanosomiasis)、生物合成安沙霉素(biosynthesis of ansamycins)、组氨酸代谢(histidine metabolism)、补体与凝血级联系统(complement and coagulation cascades)和维生素消化吸收(vitamin digestion and absorption)相关差异表达的蛋白质,见插页XXV图6A。在这些主要途径中,修复雷公藤多苷致睾丸损伤中起重要作用的载脂蛋白A-1(Apoa1)、T激肽原1(Map 1)、血红蛋白亚基alpha-1/2(Hba1)、转酮醇酶样基因2(Tktl2)、乙醛脱氢酶3A1(Aldh3a1)、α-1-巨球蛋白(Pzp)、肝素辅因子Ⅱ(Serpind1)的表达经CCF干预后发生了显著变化。见插页XXV图6B、表1。

3.3.3 COG注释分析 对差异表达蛋白COG功能注释富集分析,结果如插页XXⅥ图7所示。在细胞过程和信号中,主要与防御机制、细胞外结构相关。信息的存储与处理、代谢、无明显特征中尚未发现被显著调节的途径。

3.3.4 PPI分析 为了进一步阐明其分子机制,差异表达的蛋白质之间的串扰,使用STRING数据库来确定模型组和治疗组之间的关系,共有26个节点(因String数据库中未显示3个差异蛋白Map1、AABR07060971.1、CON__P02769对应的基因,故图中仅能展示26个差异蛋白的关系)和15条边相互连接。图中Apoa1、Pzp、Map 1、Hba1、Serpind1、Aldh3a1、Tktl2占据PPI网络的中心位置,并充当与其他差异表达蛋白相互作用的枢纽。见插页XXⅥ图8。

3.4 WB分析

与空白组比较,模型组Apoa1蛋白表达降低($P<0.05$)、Hba1($P<0.05$)和Pzp($P<0.01$)蛋白表达升高;与模型组比较,CCF组Apoa1、Tktl2蛋白表达升高,而Hba1、Aldh3a1、Pzp、

表 1 KEGG 通路和基因

KEGG 通路	基因名称	富集倍数	比率	调控类型	*P* value	分子量/(kDa)
非洲锥虫病	Apoa1	30.67	0.643	Up	0.008 109	30.062
	Map1		0.771	Down	0.004 201	47.775
	Hba1		0.798	Down	0.003 790	15.329
生物合成安沙霉素	Tktl2	127.79	1.292	Up	0.043 126	68.364
组氨酸代谢	Aldh3a1	21.30	0.825	Down	0.049 924	50.339
补体与凝血级联系统	Map1	11.28	0.771	Down	0.004 201	47.775
	A1m		0.800	Down	0.008 849	167.125
	Serpind1		0.782	Down	0.005 212	54.552
维生素消化吸收	Apoa1	42.60	0.643	Up	0.008 109	30.062

Serpind1 蛋白表达降低，其中 Hba1（$P < 0.05$）和 Pzp（$P < 0.01$）蛋白表达降低差异具有统计学意义。见图 9、表 2。

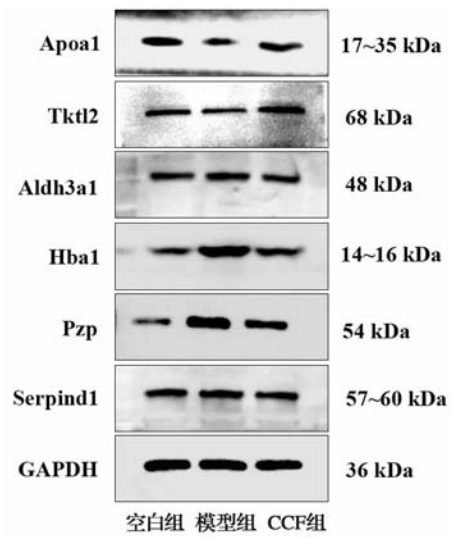


图 9 Apoa1、Tktl2、Aldh3a1、Hba1、Pzp 和 Serpind1 的蛋白表达

4 讨论

GTW 作为临床常用的中成药，相当于西药中的免疫抑制剂，但产生的生殖损伤不良反应亦不可忽视，多个临床医生在应用雷公藤制剂时发现男性生殖器官及精子活率异常[11-12]。许多学者在动物实验中也观察到雷公藤对雄性动物生殖系统的影响与人类相似，可出现抑精等损伤[13-14]。前期研究发现雷公藤多苷长期毒性的靶器官主要为睾丸和附睾，损伤程度与用药剂量和疗程有关，剂量过大或疗程过长可导致成年大鼠睾丸生精小管各级生精细胞和支持细胞减少，附睾内精子数量减少、畸形等，而睾丸支持细胞为精子的发育成熟过程提供主要能量来源，当其遭到损伤后，精子的能量供应受阻，最终导致弱精症[15-16]。故寻找减轻或修复 GTW 生殖毒性的药物尤为重要。

中药菟丝子由黄酮类、酚酸类、多糖类、木质素类和甾体类等化学成分组成[17]。其中，菟丝子黄酮是最常被用于研究的有效成分，前期多项研究发现菟丝子黄酮能保护睾丸组织的生精小管、生精细胞、间质细胞，得到雷公藤多苷作用于大鼠后睾丸损伤及菟丝子黄酮保护损伤的最佳给药剂量[18]。精子毛细管试验和低渗肿胀试验评价精子活力和膜功能的结果表明，CCF 对精子活力和膜功能有促进作用[19]。研究表明，CCF 可通过提高睾丸中 EGF mRNA 及蛋白表达而对抗雷公藤制剂引起的睾丸损伤，调节睾酮的合成与分泌，促进精子的发生[17]。同时，CCF 可上调支持细胞中雄激素受体的水平以促进 p-AKT 的表达，促进幼年支持细胞的增殖和分化[7]。CCF 还可对抗雷公藤制剂所致雄性幼鼠睾丸组织 Bcl-2 蛋白表达减少和 Bax 蛋白表达增强，增强雄性幼鼠生育能力[20-21]。本课题组前期研究发现，CCF 可通过降低生精细胞 S 期细胞百分率、生精细胞凋亡率，增加 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达量，同时可通过下调凋亡基因 Fas 与 Fasl 的表达来发挥调控生殖细胞增殖、分化、减数分裂和细胞凋亡的作用，保护生精细胞的增殖能力，从而修复雷公藤多苷导致的雄性生殖损伤[22-23]。

本研究以蛋白质组学阐明 CCF 修复 GTW 睾丸损伤的作用机制。发现 CCF 干预后共鉴定了 29 种差异表达的蛋白质，与未治疗的模型组比较，其中上调蛋白质有 6 种，下调蛋白质 23 种。WB 结果显示靶蛋白趋势的变化与蛋白质组学结果一致。KEGG 通路和 GO 分析证实，由 CCF 调节的差异表达蛋白可以通过多个靶点和途径作用于雷公藤多苷所致的睾丸损伤。

GO 分析显示，在细胞成分中，差异表达的蛋白参与了细胞外泌体、细胞外细胞器、细胞被膜、细胞包膜、锚定胶原复合物、胶原蛋白修剪、含胶原细胞外基质和血浆脂蛋白颗粒。在生物学过程中，差异表达的蛋白质参与血浆脂蛋白颗粒重塑、调节血浆脂蛋白颗粒水平、高密度脂蛋白颗粒清除、组织内稳态和对营养的反应、其他生物体细胞的破坏、抗菌药体液反应、体液免疫反应、先天免疫反应、防御反应、凝血内在途径、蛋白质氧化、细胞激素代谢过程、激素水平的调节、对细胞外刺激的

表 2 各组实验动物睾丸组织中 Apoa1、Tktl2、Aldh3a1、Hba1、Pzp 和 Serpind1 的蛋白表达量情况（$\bar{x} \pm s$）

组别	*n*	剂量/(mg·kg^{-1})	Apoa1	Tktl2	Aldh3a1	Hba1	Pzp	Serpind1
空白组	3	-	1	1	1	1	1	1
模型组	3	-	0.773 ± 0.172[a]	0.795 ± 0.059	1.447 ± 0.323	1.917 ± 0.320[a]	2.899 ± 0.484[b]	2.277 ± 1.163
CCF 组	3	100	0.874 ± 0.055	1.308 ± 0.449	1.356 ± 0.300	1.054 ± 0.475[c]	1.536 ± 0.384[d]	1.520 ± 0.464

注：a 与空白组比较，$P < 0.05$；b 与空白组比较，$P < 0.01$；c 与模型组比较，$P < 0.05$；d 与模型组比较，$P < 0.01$。

反应、细胞分泌和多细胞生物过程的调节。在分子功能方面，差异表达蛋白参与了酶抑制剂活性和肽酶调节活性、肝素结合、氧化还原酶活性作用于供体的醛基或氧代基团、糖胺聚糖结合、DNA聚合酶活性和蛋白质－脂质复合物结合。研究发现，Ⅰ型、Ⅲ型、Ⅳ型胶原等参与睾丸内曲细精管基膜的细胞外基质的组成，进而构成血睾屏障，执行睾丸的免疫豁免功能，维持正常的睾丸免疫微环境平衡，与精子发生和生精细胞的分化具有密切关系[24-25]。高密度脂蛋白主要由多种载脂蛋白（Apoa1、Apoa2、Apoc3和ApoE）组成，负责胆固醇的运输，参与睾丸间质细胞合成睾酮，维持正常的激素水平[26-27]。研究[28-29]发现睾丸局部氧化的低密度脂蛋白表达上升和血脂异常，可导致机体生殖系统代谢紊乱，曲细精管内环境改变，生精细胞数目减少，Leydig细胞损伤，细胞内脂肪含量增多，细胞间信号传递受阻，导致生精过程受阻，精子形成减少，活力降低。超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）是抗氧化酶的代表性指标，谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase，GSH－Px）为非酶抗氧化物，丙二醛（Malondialdehyde，MDA）是细胞膜脂质过氧化反应链的终产物之一，三者含量高低反映了机体氧化应激程度和清除自由基的能力[30-31]。ZHANG K S等[32]发现雷公藤多苷可通过降低SOD、GSH－Px的活性和升高MDA的含量导致睾丸的精子膜出现氧化应激损伤。而CCF可提高精子悬液超氧化物歧化酶活力，降低MDA含量，抑制大鼠睾丸细胞损伤和凋亡，保护精子膜和顶体避免活性氧的攻击；还可通过增强大鼠体内清除氧化自由基的能力来减弱自由基对生精细胞的损伤，下调凋亡基因的表达，促进睾酮分泌，改善精子质量，从而对大鼠少弱精子症起到治疗作用。肝素可通过降低大鼠睾丸组织中MDA和GSH－Px水平，保护睾丸因扭转而出现的缺血再灌注损伤[33]。总的来说，GO分析表明CCF可能通过调节睾丸组织的胶原合成、免疫功能、脂蛋白水平、氧化应激、细胞凋亡、肝素结合等靶蛋白来修复GTW所致的睾丸组织损伤，从而影响细胞过程和结合活性。

KEGG通路富集分析结果表明，经CCF处理后，Apoa1、Hba1、Tktl2、Aldh3a1、Pzp、Serpind1参与了非洲锥虫病、生物合成安沙霉素、组氨酸代谢、补体与凝血级联系统和维生素消化吸收通路途径，以减轻GTW的生殖毒性。Apoa1是高密度脂蛋白颗粒的主要结构蛋白，也是机体组织液中浓度最高的载脂蛋白，主要由肝脏和肠道合成，具有加速胆固醇逆转运、脂质代谢及抗炎、抗感染、抗氧化、抗凋亡和改善内皮细胞功能和精子获能[34]。与心血管疾病、高脂血症、动脉粥样硬化、肿瘤及自身免疫性疾病相关[35-36]。Apoa1还可抑制NF－κB途径、下调Fas/FasL以减少细胞凋亡并增强抗氧化酶活性[37]。特别是以下研究表明Apoa1与雄性生殖有关。CHI X P等[38]、KWON W S等[39]进行免疫荧光分析证实Apoa1位于人类精子的顶体后区域和颈部，是精子的重要组成部分，其基因在成熟精子细胞中转录表达，可能在调节精子胆固醇稳定性和精子氧化应激信号方面发挥重要作用，进一步影响精子的成熟、获能和受精过程。PLUMP A S等[40]从遗传学上证明Apoa1是睾丸类固醇产生细胞中正常胆固醇酯积累所必需的。ISHII T等[41]发现患有StAR KO/Apoa1 KO的小鼠睾丸中的脂质沉积增加，表明Apoa1在睾丸间质细胞中的胆固醇转运和脂质积聚中发挥重要作用。Tktl2存在于细胞质内，是戊糖磷酸途径（Pentose phosphate pathway，PPP）无氧氧化中较重要的酶，能够催化体内的酮糖变成醛糖，再经多步反应不断生成5－磷酸核糖和NAPDH，从而为细胞抗氧化和生物合成等过程提供原料[42-43]。有学者研究比较了卵巢癌、子宫内膜癌等与正常卵巢组织中Tktl2的表达水平无差异，具体机制不详[44]。DAVALIEVA K等[45]发现，人类睾丸组织中的Tktl2与无精子症亚型密切相关，可作为其新的候选生物标志物。Hba1是血红蛋白（Hemoglobin，Hb）的主要成分，脊椎动物红细胞的Hb主要由α、β亚基组成（胎儿、新生儿除外），以四聚体α2β2的形式存在，多种非红系细胞也表达Hb，也是以α、β亚基的形式存在，亚基组成是影响Hb功能的首要因素[46]。大动脉属于传导血管，动脉、微动脉属于阻力血管，静脉属于容量血管，毛细血管属于交换血管。Hb的α、β亚基共同在大鼠传导、阻力、容量等不同类型血管组织中表达，其规律为相对表达量在阻力、容量血管中较高，而在传导血管中较低[47]。Aldh3a1是乙醛脱氢酶超家族的重要成员，存在于胞质和核中，在各种组织中表达，通过影响内源性和外源性醛的代谢来调节细胞功能[48]。它主要编码角膜、胃和肝癌同工酶，并在角膜紫外线过滤中起作用，还可调节细胞增殖、分化、迁移和对氧化应激的反应，通过增强上皮细胞的抗氧化活性和损伤抗性来抑制炎症[49]。先前的一项研究表明，Aldh3a1在脂肪醛代谢和脂肪酸降解中发挥重要作用[50]。DONG X P等[51]综合分析发现Aldh3a1在性腺生殖相关和代谢相关通路中发挥重要作用，包括DNA复制、剪接体和代谢通路、抗生素的生物合成，但具体机制尚不清晰，仍需进一步研究其与睾丸组织的联系。Serpind1是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的重要一员，由肝脏合成，分布于全身组织，该基因与凝血系统、血管损伤、炎症反应、肿瘤等相关[52-53]，具有抗凝、抗炎、诱导血管生成等作用[54-55]，通过基因上的P6位点产生对炎症细胞的趋化作用，因肝素的存在发挥抗凝血酶作用[56]。与GO分析结果一致，尚无报道Serpind1与生殖的关系。Pzp属于α－巨球蛋白家族，这是一组大的糖蛋白，通过捕获机制抑制所有类型的蛋白酶[57]。该蛋白在损伤后2周和5周均有过度表达，可能具有不同的功能。事实上，它被发现在急性炎症模型中上调[58]。到目前为止，对Pzp的研究很少，也没有研究它与生殖的相关性。在本研究中，GTW上调睾丸中Pzp蛋白的表达，而CCF下调睾丸中Pzp蛋白的表达以保护生殖功能，这可能与炎症反应有关。

在本研究中，我们发现在非洲锥虫病、生物合成安沙霉素、组氨酸代谢、补体与凝血级联系统和维生素消化吸收中差异表达的蛋白Apoa1、Hba、Tktl2、Aldh3a1、Pzp、Serpind1在CCF治疗后受到调节。因此，CCF可能通过上调Apoa1、Tktl2发挥抗氧化、抗凋亡、调节自噬、调节免疫的作用，且下调Hba1、Aldh3a1、Pzp、Serpind1以抑制炎症反应、减少氧化损伤、抗凝，以

维持精子活力、调节精子凋亡等,改善 GTW 所致的睾丸组织损伤。

参考文献

[1] 韩姗姗,代彦林,丁樱,等. 雷公藤毒性研究进展的 CiteSpace 知识图谱分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 1085-1094.

[2] 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.

[3] 张维真,王淑华. 雷公藤、瘤可宁对肾病患儿性腺功能的远期影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(2): 113-114.

[4] 陈桂基,陈义开. 雷公藤多苷致睾丸炎[J]. 药物不良反应杂志, 2000, 2(1): 56.

[5] HAN C, WEI Y Y, GENG Y M, et al. Bisphenol A *in utero* exposure induces ovary dysfunction in mice offspring and the ameliorating effects of Cuscuta chinensis flavonoids[J]. Environ Sci Pollut Res, 2020, 27(25): 31357-31368.

[6] WEI Y Y, HAN C, LI S Y, et al. Cuscuta chinensis flavonoids down-regulate the DNA methylation of the H19/Igf2 imprinted control region and estrogen receptor alpha promoter of the testis in bisphenol A exposed mouse offspring[J]. Food Funct, 2020, 11(1): 787-798.

[7] 姜淼,韩珊珊,张霞,等. 雷公藤多苷片联合中药对儿童成年后生育能力影响的远期随访[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3558-3561.

[8] 胡素芹,郭健,简郭雪娇,等. 菟丝子黄酮对幼年大鼠睾丸支持细胞增殖和分化的影响及机制[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(2): 131-137.

[9] 夏卉芳,王毓. 菟丝子水提液对磷酰胺致雄性小鼠生殖损伤的保护作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2017(11): 200-203, 297.

[10] GUAN S Q, ZHU Y T, WANG J S, et al. A combination of Semen Cuscutae and Fructus Lycii improves testicular cell proliferation and inhibits their apoptosis in rats with spermatogenic dysfunction by regulating the SCF/c-kit-PI3K-Bcl-2 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 251: 112525.

[11] 周善根,方镕全. 雷公藤中毒63例报告[J]. 武汉医学院学报, 1981, 10(4): 67-69.

[12] 丁菊红,季力,钱绍祯. 雷公藤对人附睾功能的影响[J]. 中国药学杂志, 1989, 24(1): 29-30.

[13] 卢清显,沈晓明,程凯,等. 雷公藤总甙对大鼠生精作用及主要脏器的影响[J]. 中国医学科学院学报, 1990, 12(3): 203-207, 235-236.

[14] 杨建一,高宝珍,李莉,等. 雷公藤多甙对雄性小鼠生殖细胞毒性的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20(5): 393-397.

[15] 张才田,王雪松,胡雪玲,等. 雷公藤多甙抑制大鼠精子发生的研究[J]. 生殖医学杂志, 2008, 17(2): 118-122.

[16] 顾惠琴,赵昂,周艳芬,等. 基于代谢组学技术对雷公藤多苷和奥硝唑诱导大鼠弱精子症的病理机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(7): 721-730.

[17] NOUREEN S, NOREEN S, GHUMMAN S A, et al. The genus Cuscuta (Convolvolaceae): An updated review on indigenous uses, phytochemistry, and pharmacology[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(11): 1225-1252.

[18] 景晓平,崔瑞琴,程伟伟,等. 菟丝子黄酮干预雷公藤多苷所致雄性幼鼠生殖损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 113-117.

[19] OMIRINDE J O, OZEGBE P C, OYEYEMI M O. Comparative evaluation of the sperm characteristics and morphology of adult Wistar rats fed either low or normal protein-energy diets and orally dosed with aqueous Cuscuta australis extracts[J]. Niger J Physiol Sci, 2014, 29(1): 55-61.

[20] 马腾,丁樱. 菟丝子黄酮对雷公藤多苷损伤雄性幼鼠睾丸组织凋亡相关蛋白 Bcl-2 和蛋白 Bax 表达的影响[J]. 中医学报, 2011, 26(11): 1342-1344.

[21] OKUMURA A, FUSE H, KAWAUCHI Y, et al. Changes in male reproductive function after high altitude mountaineering[J]. High Alt Med Biol, 2003, 4(3): 349-353.

[22] 任献青,郑贵珍,苏杭,等. 菟丝子黄酮对雷公藤多苷片致生精细胞周期阻滞、凋亡及相关蛋白表达降低的影响[J]. 药物评价研究, 2018, 41(1): 55-60.

[23] 孙晶晶,吴秀娟,鲍军,等. 菟丝子总黄酮对氢化可的松致大鼠少弱精子症的治疗作用及其机制[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(1): 14-17.

[24] PARK M H, PARK J E, KIM M S, et al. Effects of extracellular matrix protein-derived signaling on the maintenance of the undifferentiated state of spermatogonial stem cells from porcine neonatal testis[J]. Asian Australas J Anim Sci, 2016, 29(10): 1398-1406.

[25] BAERT Y, STUKENBORG J B, LANDREH M, et al. Derivation and characterization of a cytocompatible scaffold from human testis[J]. Hum Reprod, 2015, 30(2): 256-267.

[26] WAYNE HOU J, COLLINS D C, SCHLEICHER R L. Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine leydig cells[J]. Endocrinology, 1990, 127(5): 2047-2055.

[27] YANG L D, MA T T, ZHAO L J, et al. Circadian regulation of apolipoprotein gene expression affects testosterone production in mouse testis[J]. Theriogenology, 2021, 174: 9-19.

[28] SCHISTERMAN E F, MUMFORD S L, BROWNE R W, et al. Lipid concentrations and couple fecundity: the LIFE study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(8): 2786-2794.

[29] SAEZ LANCELLOTTI T E, BOARELLI P V, MONCLUS M A, et al. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13457.

[30] ZGHEEL F, ALHOSIN M, RASHID S, et al. Redox-sensitive induction of src/PI_3^- kinase/Akt and MAPKs pathways activate eNOS in response to EPA: DHA 6: 1[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105102.

[31] CHI A P, LI H, KANG C Z, et al. Anti-fatigue activity of a novel polysaccharide conjugates from Ziyang green tea[J]. Int J Biol Macromol, 2015, 80: 566-572.

[32] ZHANG K S, FU L L, AN Q, et al. Effects of Qilin pills on sper-

matogenesis, reproductive hormones, oxidative stress, and the TSSK2 gene in a rat model of oligoasthenospermia[J]. BMC Complementary Med Ther, 2020, 20(1): 42.

[33] MERTOĞLU C, SENEL U, CAYLI S, et al. Protective role of methylprednisolone and heparin in ischaemic - reperfusion injury of the rat testicle[J]. Andrologia, 2016, 48(7): 737 - 744.

[34] ASANO A, NELSON J L, ZHANG S, et al. Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub - types in murine sperm[J]. Proteomics, 2010, 10(19): 3494 - 3505.

[35] AMIN R, MUTHURAMU I, ABOUMSALLEM J P, et al. Selective HDL - raising human apo A - I gene therapy counteracts cardiac hypertrophy, reduces myocardial fibrosis, and improves cardiac function in mice with chronic pressure overload[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 2012.

[36] LIU D H, DING Z Z, WU M Z, et al. The apolipoprotein A - I mimetic peptide, D - 4F, alleviates ox - LDL - induced oxidative stress and promotes endothelial repair through the eNOS/HO - 1 pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 105: 77 - 88.

[37] TIAN H, YAO S T, YANG N N, et al. D4F alleviates macrophage - derived foam cell apoptosis by inhibiting the NF - κB - dependent Fas/FasL pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7: 7333.

[38] CHI X P, XIANG D J, SHA Y J, et al. Inhibition of human sperm function by an antibody against apolipoprotein A1: a protein located in human spermatozoa[J]. Andrologia, 2022, 54(4): e14365.

[39] KWON W S, RAHMAN M S, LEE J S, et al. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa[J]. BMC Genom, 2014, 15(1): 897.

[40] PLUMP A S, ERICKSON S K, WENG W, et al. Apolipoprotein A - I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production[J]. J Clin Invest, 1996, 97(11): 2660 - 2671.

[41] ISHII T, HASEGAWA T, PAI C I, et al. The roles of circulating high - density lipoproteins and trophic hormones in the phenotype of knockout mice lacking the steroidogenic acute regulatory protein [J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(10): 2297 - 2309.

[42] BOROS L G, PUIGJANER J, CASCANTE M, et al. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation[J]. Cancer Res, 1997, 57(19): 4242 - 4248.

[43] SCHAFER Z T, GRASSIAN A R, SONG L, et al. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment[J]. Nature, 2009, 461(7260): 109 - 113.

[44] ZHAO M H, YE M M, ZHOU J H, et al. Prognostic values of transketolase family genes in ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 18(5): 4845 - 4857.

[45] DAVALIEVA K, RUSEVSKI A, VELKOV M, et al. Comparative proteomics analysis of human FFPE testicular tissues reveals new candidate biomarkers for distinction among azoospermia types and subtypes[J]. J Proteom, 2022, 267: 104686.

[46] GREK C L, NEWTON D A, SPYROPOULOS D D, et al. Hypoxia up - regulates expression of hemoglobin in alveolar epithelial cells [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(4): 439 - 447.

[47] 臧家涛, 李清晖, 吴跃, 等. 血红蛋白α、β亚基在大鼠不同类型血管组织中的表达[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(5): 399 - 405.

[48] PATEL M, LU L, ZANDER D S, et al. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: Correlation with histologic type and potential precursors[J]. Lung Cancer, 2008, 59(3): 340 - 349.

[49] BLACK W, CHEN Y, MATSUMOTO A, et al. Molecular mechanisms of ALDH3A1 - mediated cellular protection against 4 - hydroxy - 2 - nonenal[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(9): 1937 - 1944.

[50] HOLMES R S, HEMPEL J. Comparative studies of vertebrate aldehyde dehydrogenase 3: Sequences, structures, phylogeny and evolution. Evidence for a mammalian origin for the ALDH3A1 gene [J]. Chem Biol Interact, 2011, 191(1 - 3): 113 - 121.

[51] DONG X P, YAN Y J, CHEN P, et al. Species and tissue specific analysis based on quantitative proteomics from allotetraploid and the parents[J]. J Proteom, 2021, 232: 104073.

[52] GUO Q, ZHU L, WANG C, et al. SERPIND1 affects the malignant biological behavior of epithelial ovarian cancer via the PI3K/AKT pathway: A mechanistic study[J]. Front Oncol, 2019, 9: 954.

[53] TORPY D J, BACHMANN A W, GARTSIDE M, et al. Association between chronic fatigue syndrome and the corticosteroid - binding globulin gene ALA SER224 polymorphism[J]. Endocr Res, 2004, 30(3): 417 - 429.

[54] IKEDA Y, AIHARA K I, YOSHIDA S, et al. Heparin cofactor Ⅱ, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis *via* activation of the AMP - activated protein kinase - endothelial nitric - oxide synthase signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(41): 34256 - 34263.

[55] ZHOU L H, XU J Y, DAI C, et al. Label - free quantitative proteomics reveals fibrinopeptide B and heparin cofactor Ⅱ as potential serum biomarkers in respiratory syncytial virus - infected mice treated with Qingfei oral liquid formula[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(4): 241 - 251.

[56] VICENTE C P, HE L, PAVÃO M S, et al. Antithrombotic activity of ermatan sulfate in heparin cofactor Ⅱ - deficient mice[J]. Blood, 2004, 104(13): 3965 - 3970.

[57] PEREIRA BRAGA C, CAVALCANTE SOUZA VIEIRA J, DE LIMA LEITE A, et al. Metalloproteomic and differential expression in plasma in a rat model of type 1 diabetes[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 104: 414 - 422.

[58] BURGOS - RAMOS E, SACKMANN - SALA L, BAQUEDANO E, et al. Central leptin and insulin administration modulates serum cytokine - and lipoprotein - related markers[J]. Metabolism, 2012, 61(11): 1646 - 1657.

定量蛋白质组学探讨菟丝子黄酮对雷公藤多苷致雄鼠生殖毒性的影响机制

（正文见 117－123 页）

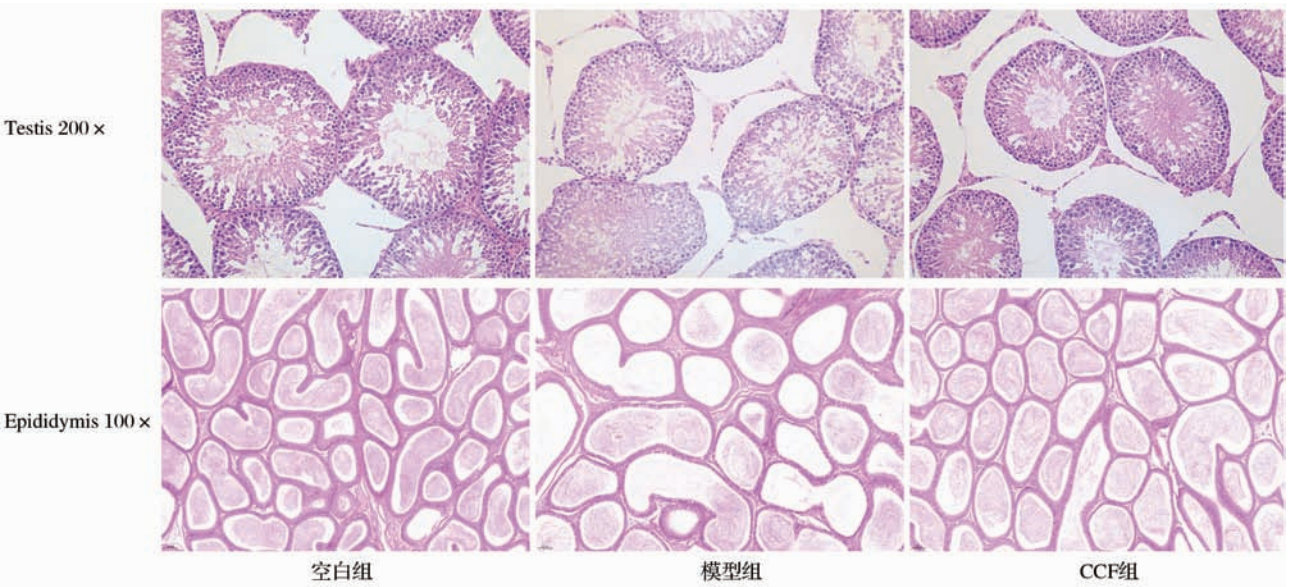
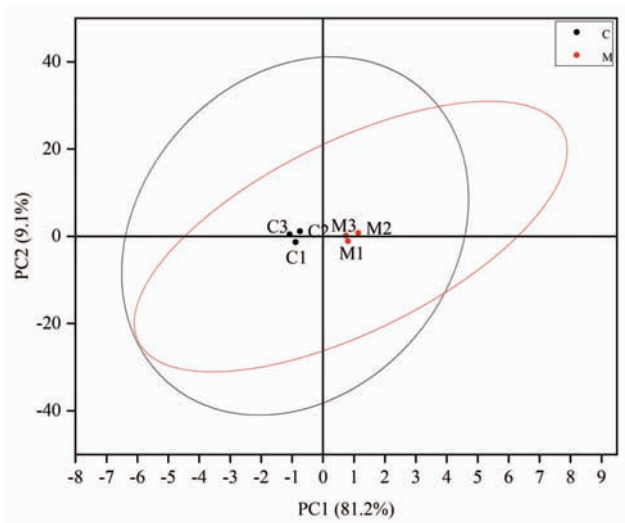
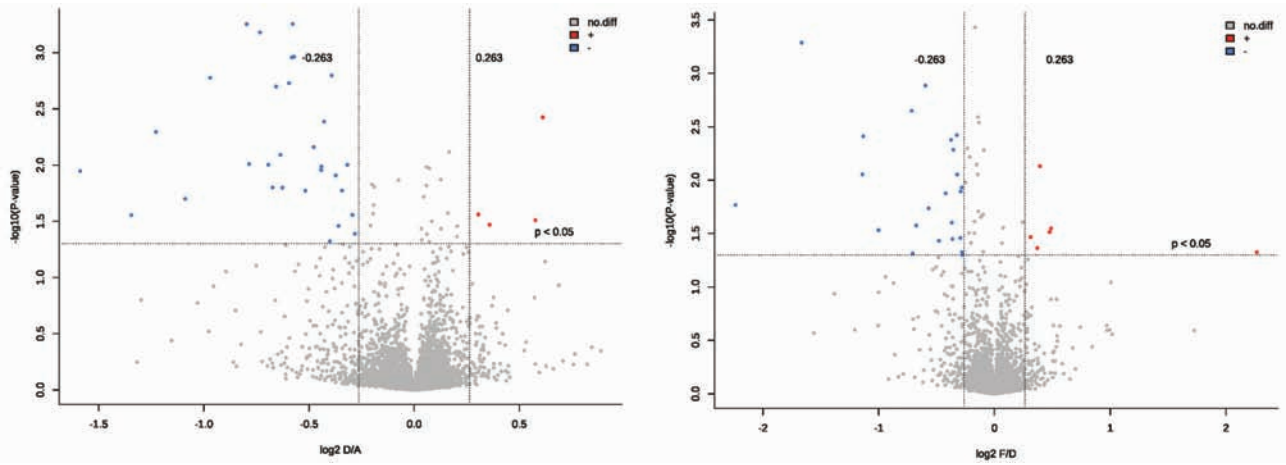


图 1　睾丸和附睾的病理变化



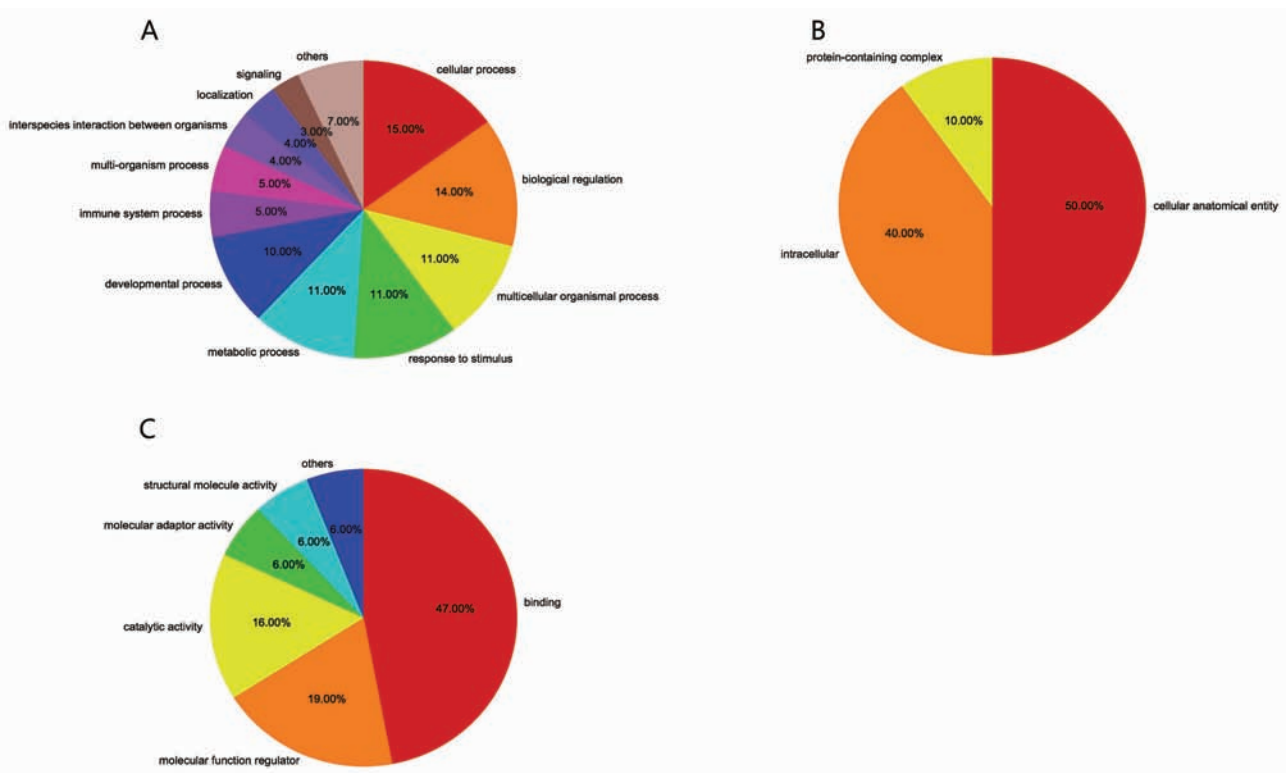
注：M 为模型组，C 为 CCF 组。

图 2　PCA 分析



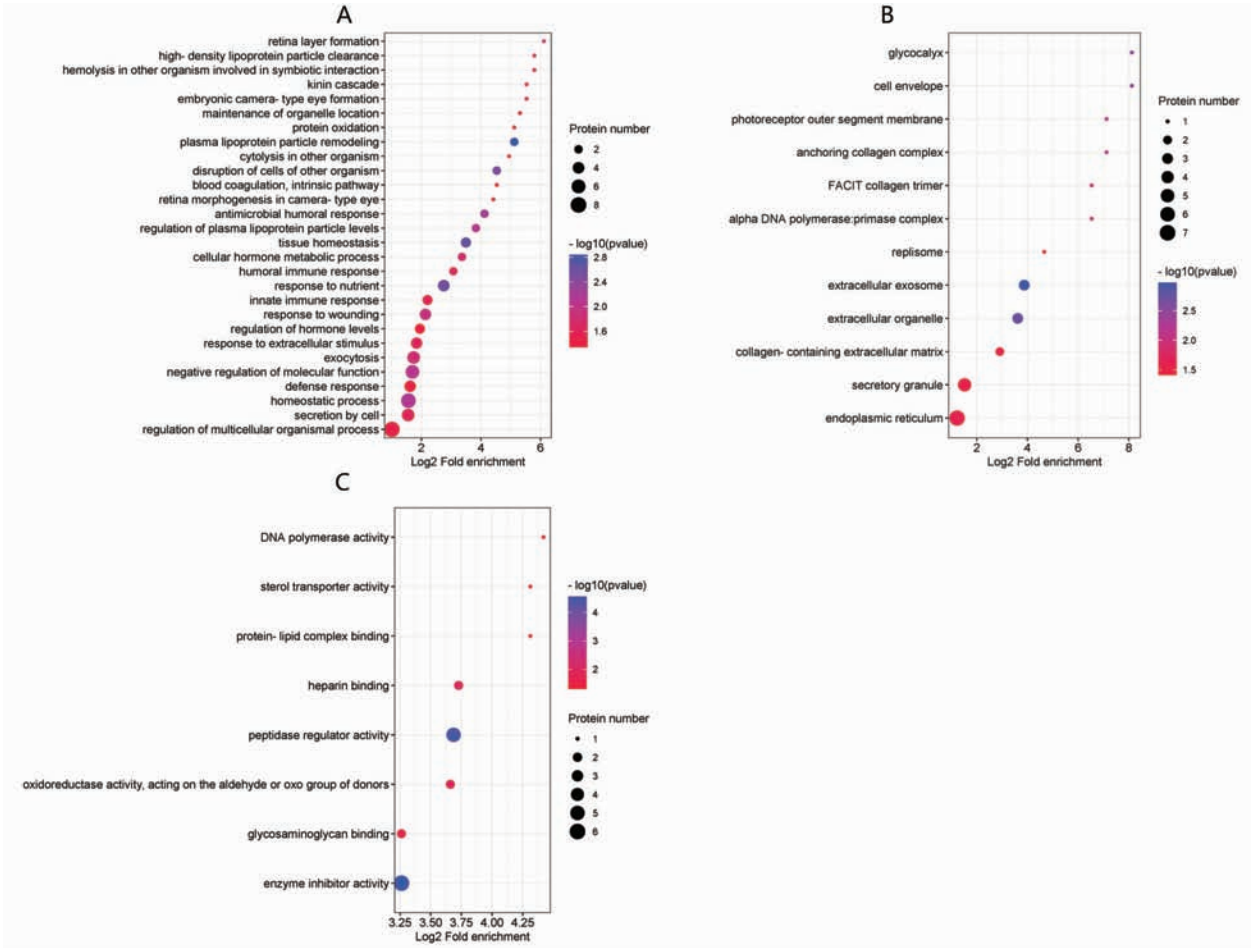
注:左侧是模型组 vs 空白组,右侧是 CCF 组 vs 模型组。

图3 差异蛋白火山图



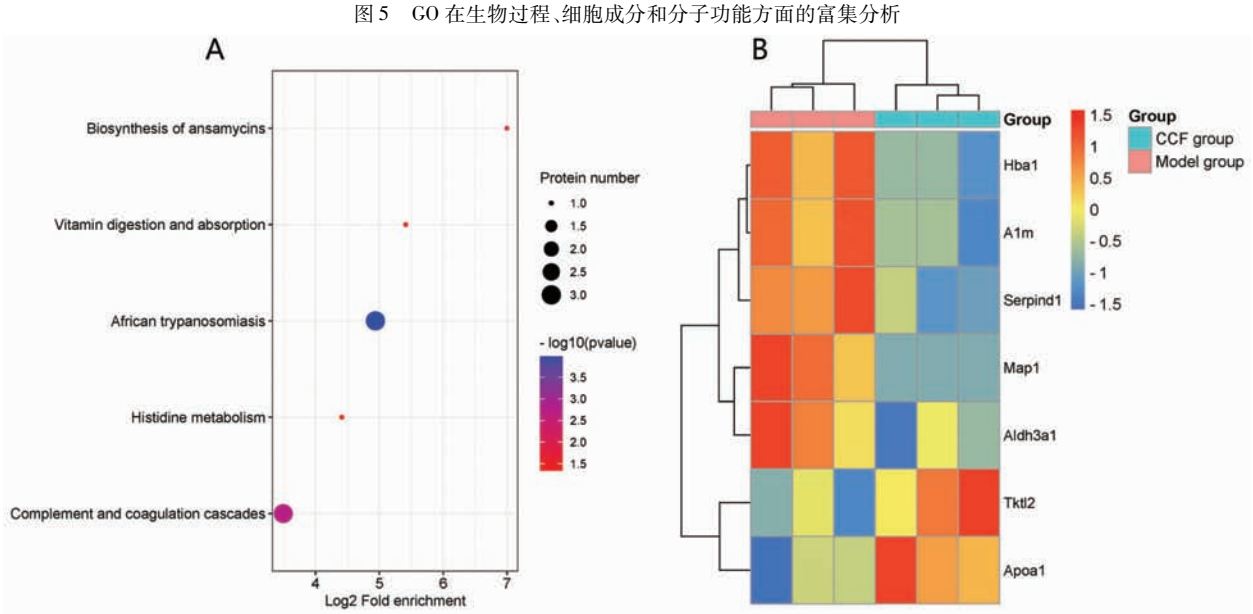
注:A 代表生物过程;B 代表细胞成分;C 代表分子功能。

图4 生物过程、细胞组分和分子功能中的 GO 注释分类分析



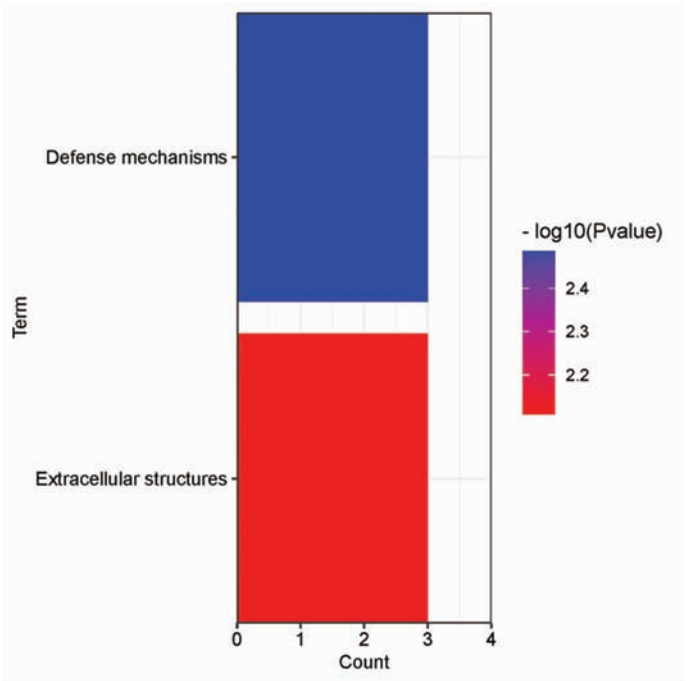
注：A 代表生物过程；B 代表细胞成分；C 代表分子功能。

图5 GO 在生物过程、细胞成分和分子功能方面的富集分析



注：A 为模型组和 CCF 组的 KEGG 通路分析。蓝色表示差异蛋白极显著地富集了 KEGG 途径（$P<0.01$），紫色表示差异蛋白显著富集了 KEGG 途径（$P<0.05$），红色表示差异蛋白不显著富集 KEGG 通路。圆圈的大小表示富集程度。B 为模型组和 CCF 组的聚类热图分析。色条（－1.5～1.5）表示－log10 和 z－score 转换后的富集 P 值。为了解释本图例中对颜色的引用，黄色越多表示－log10（P 值）越接近0，蓝色越多表示－lg10（P 值）越靠近－1.5，红色越多则表示－log10（P 值）越接近1.5。

图6 KEGG 通路分析



注：蓝色越多表示 $-\log10(P\text{ 值})$ 越大，红色越多则表示 $-\log10(P\text{ 值})$ 越小。

图 7 COG 注释分析

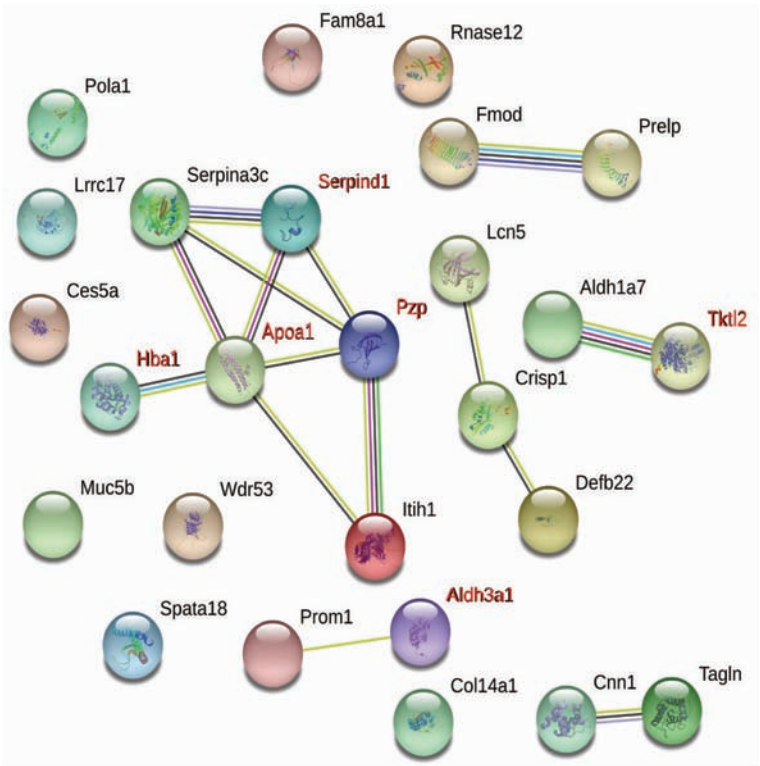


图 8 差异蛋白的 PPI 分析