

菟丝子黄酮减轻雷公藤多苷生殖毒性的代谢组学分析

韩姗姗^{1,2}, 魏金辉¹, 代彦林², 徐闪闪², 孙利辉¹, 丁 樱^{1,2*}

¹河南中医药大学儿科医学院; ²河南中医药大学第一附属医院儿科医院, 郑州 450000

摘 要: 探究菟丝子黄酮干预雷公藤多苷生殖毒性的作用机制。随机将 21 只 4 周龄雄性大鼠分为正常组、雷公藤多苷组、菟丝子黄酮组, 每组 7 只, 连续灌胃 12 周。HE 染色观察大鼠睾丸、附睾组织病理改变; 采用超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱联用技术建立大鼠睾丸组织代谢指纹图谱, 通过主成分分析、正交偏最小二乘判别分析筛选菟丝子黄酮干预生殖损伤模型大鼠的睾丸组织潜在生物标志物, 并应用 Metabo Analyst 平台进行代谢通路分析。结果表明与雷公藤多苷组相比, 菟丝子黄酮组各级精原细胞显著增加, 生精小管排列更为规则。通过代谢组学技术共获得 1-亚麻酰甘油磷酸胆碱、溶血磷脂、磷脂酰乙醇胺等 47 个差异代谢物, 主要涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成及代谢、鞘脂代谢、甘油磷脂代谢途径。本研究为菟丝子黄酮减轻雷公藤多苷所致生殖损伤提供科学依据。

关键词: 菟丝子黄酮; 雷公藤多苷; 代谢组学; 生殖毒性

中图分类号: R285.5 文献标识码: A

Metabonomic analysis of *Cuscuta chinensis* flavonoids for attenuating reproductive toxicity of *Tripterygium wilfordii* polyside

HAN Shan-shan^{1,2}, WEI Jin-hui¹,
DAI Yan-lin², XU Shan-shan², SUN Li-hui¹, DING-Ying^{1,2*}

¹Pediatric Medical College of Henan University of Chinese Medicine; ²Pediatric Hospital of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: This study aims to explore the mechanism of the effect of *Cuscuta chinensis* flavonoids (CCF) on reducing reproductive toxicity of *Tripterygium wilfordii* polyside (TWP). A total of 21 four-week-old male rats were randomly divided into normal group, TWP group and CCF group, with seven rats in each group and continuously gavaged for 12 weeks. HE staining was used to observe the histopathological changes of testis and epididymis in rats. The metabolic fingerprints of rat testicular tissues were established by Ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and the potential biomarkers of testicular tissue were screened by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) in the rat model of reproductive injury intervened by CCF

and the Metabo Analyst platform was used for metabolic pathway analysis. The results showed that compared with the TWP group, the spermatogonia at all levels in the CCF group were significantly increased, and the seminiferous tubules were arranged more regularly. A total of 47 differential metabolites such as 1-linolenic glycerophosphocholine, lysophospholipid and phosphatidylethanolamine were obtained by metabolomics technology, which were mainly involved in phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis and metabolism, sphingolipid metabolism and glycerophospholipid metabolism pathways. This study provides a scientific basis for the alleviation of reproductive damage caused by TWP.

Key words: *Cuscuta chinensis* flavonoids; *Tripterygium wilfordii* polyglycosides; metabolomics; reproductive toxicity

雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polyglycosides, TWP) 是从卫矛科植物雷公藤的根芯部位提取出来的一种脂溶性混合物, 广泛应用于系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、紫癜性肾炎等自身免疫性疾病^[1-3]。然毒、效是 TWP 的一体两面, 研究表明 TWP 可引发各种不同程度的生殖损伤, 受国内外学者的高度关注^[4]。

中医药传统七情配伍方式可有效地减轻药物的毒副作用^[5], 本课题组前期数据挖掘出菟丝子为配伍减轻 TWP 生殖毒性的核心中药^[6], 且发现其主要成分菟丝子黄酮 (*Cuscuta chinensis* flavonoids, CCF) 在 100 mg/kg 剂量时拮抗效果更明显^[7-9]。代谢组学是通过利用现代分析技术探索生物体的内源性生物标志物的代谢变化, 对药物毒性、疗效机制的研究具有重要意义。基于此, 本研究拟通过代谢组学技术探讨 CCF 减轻 TWP 生殖毒性的物质基础, 为其拮抗 TWP 的生殖毒性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 21 只, SPF 级, 4 周龄, 体质量 (101~125 g), 购买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。所有动物分笼饲养于河南中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室, 使用许可证号: SYXK (豫) 2020-0004。12 h 循环照明, 室内温度 18~24 °C, 湿度 40%~60%, 自由饮食和饮水。本研究方案经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准, 编号: DWLL202105053。

1.2 药物及试剂

TWP (国药准字 Z32021007, 批号: 210101, 江苏美通制药有限公司); CF (纯度 50%, 生产批号: ZL20130815, 陕西昂盛生物医药科技有限公司); 睾酮 (testosterone, T)、促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)

及雌二醇 (estradiol, E2) ELISA 试剂盒 (批号: E-EL-0155c、E-EL-R0391c、E-EL-R0026c 及 E-OSEL-R0001, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.3 主要仪器

5810 R 高速冷冻离心机 (德国 Ep-endorf 公司); RM2255 全自动轮转式切片机 (德国 Leica 公司); Eclipse 80i 研究型荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); RM2255 全自动轮转式切片机 (德国 Leica 公司); Eclipse 80i 研究型荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); HBS-1096A 酶标分析仪 (南京德铁实验设备有限公司); Vanquish TM 超高效液相色谱仪、Q Exactive TM 组合型四极杆 Orbitrap TM 质谱仪 (美国 Thermo 公司)。

1.4 分组、造模及给药

采用随机数字表法将 21 只 SD 级雄性大鼠分为正常组 (control, Con)、TWP 组、CCF 组, 每组 7 只。Con 组给予生理盐水灌胃, TWP 组给予 12.5 mg/kg TWP 造模, CCF 组在灌胃 TWP 的基础上另给予 CCF 混悬液 100 mg/kg, 大鼠给药剂量均依据人临床剂量 $\times 6.25$ (按照人与动物间药物剂量折算系数)^[10], 灌胃体积均为 1 mL/100 g。各组同时灌胃, 每天一次, 连续 12 周。

1.5 样本采集

在第 12 周末, 各组大鼠禁食 12 h 后, 戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血, 于 4 °C 静置 30min 后, 3 000 r/min (离心半径 10 cm) 离心 15 min, 留取血清, -80 °C 冻存。安乐死大鼠, 剖取两侧睾丸及附睾组织, 将右侧睾丸组织放入 4% 多聚甲醛固定液中固定, 脱水, 石蜡包埋, 做 2 μ m 切片, 待检。另将左侧睾丸组织置于无菌无酶冻存管中并迅速浸入液氮中冻透, 然后转移到 -80 °C 冰箱中冻存用于代谢组学检测。

1.6 血清 T、FSH、LH、E2 含量

严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在 450 nm 波长下, 读取吸光度值。

1.7 睾丸、附睾病理学形态观察

石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, 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。光学显微镜观察睾丸及附睾组织的病理形态。

1.8 代谢组学分析

1.8.1 样品制备

分析前, 取睾丸组织样本 100 mg 在 4 °C 环境下缓慢解冻后, 转移至事先装有适量石英砂和 1 颗 1/4 英寸陶瓷珠的 2 mL 离心管中, 应用 MP 匀浆仪进行匀浆破碎 (6.0 m/s, 60 s, 两次)。向匀浆液中加入 1 mL 的提取液甲醇乙腈溶液 (1:1, V/V) 涡旋 60 s, 低温超声

30 min, 2 次, -20 °C 放置 1 h 沉淀蛋白, 离心半径, 87 mm, 1 2000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 上清冷冻干燥复溶于 200 μ L 30% ACN, 涡旋, 14 000 g 4 °C 离心 15 min, 取上清上机检测。

1.8.2 高效液相色谱分析条件

HPLC 分析在 Waters HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱上进行。流动相: A 相 0.1% 甲酸-水溶液, B 相为 0.1% 乙腈-异丙醇 (1:1)。UPLC 洗脱条件为: 洗脱梯度: 0~2.0 min, 10%B; 2~6 min, 10% \rightarrow 40% B, 6~15 min, 40% \rightarrow 60% B, 15~17 min, 60% \rightarrow 10%B, 流速: 0.3 mL/min, 进样量设置为 2 μ L, 柱温为 40 °C。

整个分析过程中样品置于 4 °C 自动进样器中。为避免仪器检测信号波动面造成的影响, 采用随机顺序进行样品的连续分析。样本队列中插入质控 (quality control, QC) 样品, 用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性。

1.8.3 质谱条件

采用美国 Thermo 公司的 QExactive 高分辨质谱检测系统进行一级、二级谱图的采集。电喷雾离子源 (electro spray ionization, ESI) 条件如下: 鞘气 40 psi; 辅助气 10 psi; 离子喷雾电压 3 000 V/-2 800 V; 温度 350 °C; 离子传输管温度 320 °C。扫描模式为 Full-scan MS2 模式; 扫描方式为正离子/负离子。一级扫描范围 (m/z): 70~1 050 Da; 二级扫描范围 (m/z): 200~2 000 Da, 一级分辨率 70 000, 二级 1 7500。

1.8.4 多变量数据分析和潜在生物标志物的识别

将原始数据导入软件 Progenesis Q1 (Waters Corporation, Milford, 美国) 进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐, 最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵, 然后进行数据预处理: (1) 仅保留任一组样品中非零值 80% 以上的变量; (2) 总峰归一化, 然后删除 QC 样本相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) \geq 30% 的变量; (3) 将数据进行 \log_{10} 转化, 得到最终用于后续分析的数据矩阵。

将数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 进行多变量统计分析, 包括无监督主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和监督正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)。基于 OPLS-DA 分析的变量投影重要度 (variable importance in projection, VIP) 和 S-plot 图用于识别组间代谢物的差异。当某物质同时满足 $VIP > 1.0$ 和 $P < 0.05$ 时, 即被认为是候选生物标志物。根据人类代谢组学数据库 (Human Metabolome Database, HMDB) (<https://www.hmdb.ca/>) 和 Metabolite Link (METLIN) (<https://metlin.scripps.edu/>) 数据库搜索代谢物, 从而以进一步确定两组间的差异代谢物。将上述所得的差异代谢物用于基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,

KEGG) 和 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 分析, 用于生物学解释和代谢途径构建。

1.9 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 计量资料符合正态分布, 用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验法。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCF 对 TWP 生殖损伤大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量的影响

TWP 组大鼠血清 T 含量较 Con 组下降 (P<0.01), CCF 组大鼠血清 T 含量较 TWP 组升高 (P<0.01)。各组间血清 FSH、LH、E2 差异无统计学意义, 结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Comparison of T, FSH, LH and E2 contents of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Group	剂量 Does (mg/kg)	T (μg/L)	FSH (μg/L)	LH (IU/L)	E2 (ng/L)
Con	-	0.96±0.15	58.42±21.84	148.67±13.14	320.59±58.90
TWP	12.5	0.41±0.15 ^{##}	53.85±15.14	139.53±22.19	262.33±63.08
CCF	100	0.93±0.36 ^{**}	57.49±19.49	135.68±20.93	268.08±57.06

注: 与 Con 比较, ^{##}P<0.01; 与 TWP 比较, ^{**}P<0.01。

Note: Compared with the normal group, ^{##}P<0.01; Compared with the TWP group, ^{**}P<0.01.

2.2 CCF 对大鼠睾丸、附睾组织病理形态的影响

图 1 和图 2 结果表明, Con 组大鼠睾丸组织结构正常, 生精小管的断面形状规则, 生精细胞为正常类圆形细胞, 排列有序, 精原细胞排列正常, 基底膜完整, 管腔内可见丰富的精子及精子细胞。与 Con 组相比, TWP 组病理损伤显著, 表现为生精小管组织结构不规则, 管腔存在, 少量间质细胞出现部分空心, 生精细胞排列紊乱, 层数减少、不清晰, 异常形态细胞数量较对照组明显增加。而 CCF 组大鼠的睾丸组织细胞层次分明度可, 间质细胞排列较 TWP 组整齐, 精原细胞、精母细胞、精子细胞均有不同程度的减少, 但减少程度较 TWP 组轻, 在生精小管形态、排列方式及生精细胞的活跃程度上与正常组更为接近。

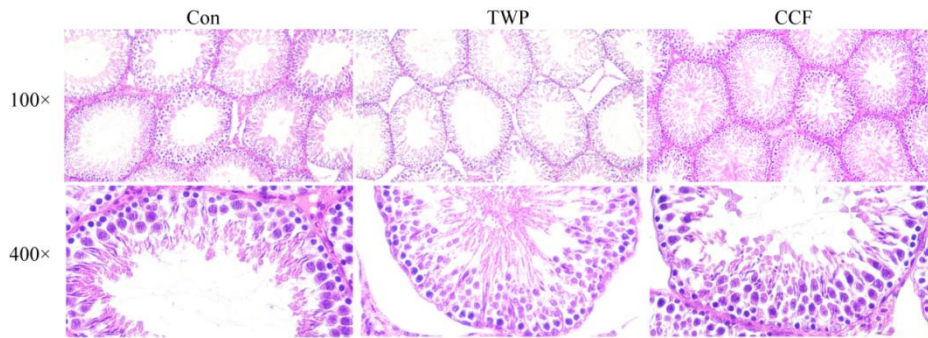


图 1 各组大鼠睾丸病理切片结果

Fig. 1 Results of testicular pathological sections of rats in each group

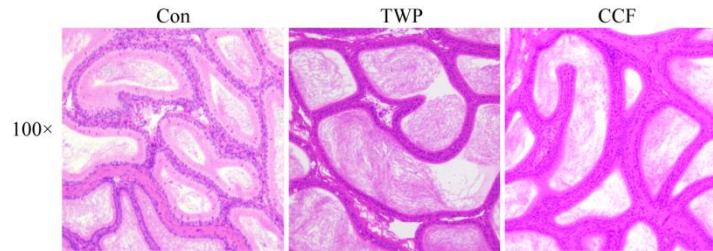


图 2 各组大鼠附睾组织病理切片结果

Fig. 2 Results of histopathological sections of epididymis of rats in each group

2.3 CCF 干预大鼠生殖损伤的代谢组学分析

2.3.1 总离子流色谱图分析

组织样本总离子流量图见图 3。总离子流图提示 TWP 组与 Con 组在 0~1000 ms 期间峰数量及峰形态均有不同，CCF 干预后与 TWP 组比较亦存在变化，表明 3 组睾丸样本中的内源性代谢物存在差异。

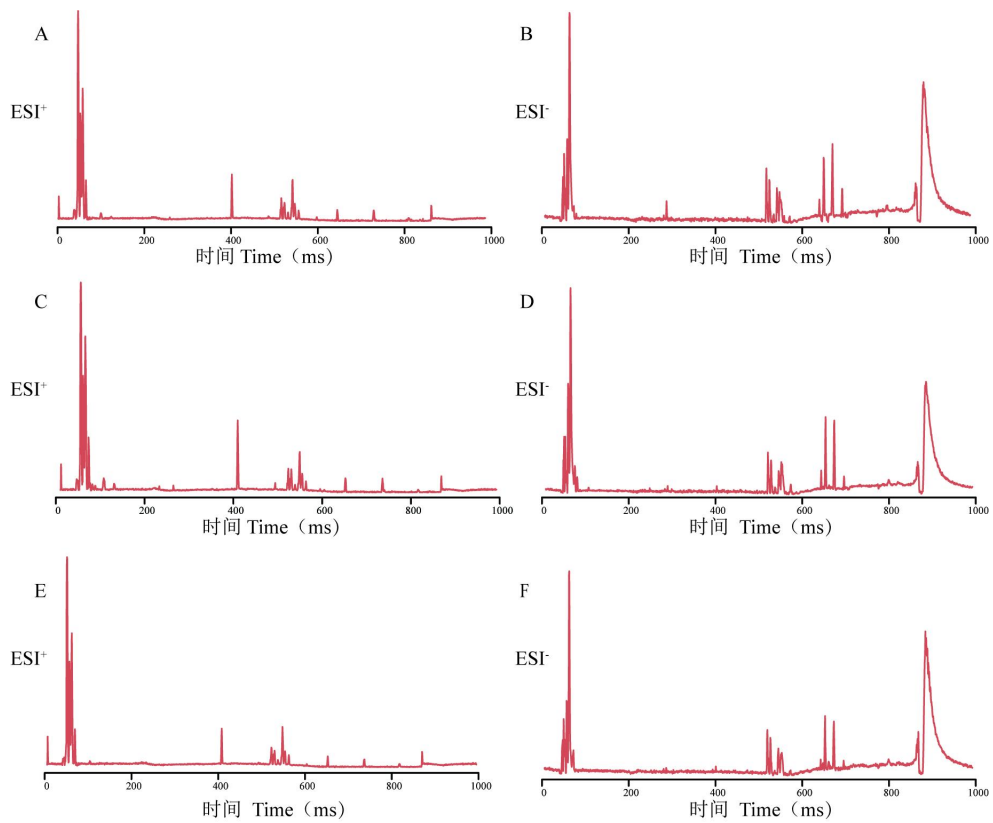


图 3 各组大鼠睾丸及附睾组织样本总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms of testis and epididymis tissue samples of rats in each group

2.3.2 PCA 与 OPLS-DA 分析

对所有样本进行 PCA，结果如图 4 所示，在 PCA 模型中，质量控制样品分布集中，表明样品分析方法重现性好、稳定性高。TWP 组与 Con 组在 PC1 方向有明显区分，表明 2 组代谢轮廓存在差异，CCF 干预后大鼠睾丸组织代谢物分布在 PC1 方向与 TWP 组比较存在显著差异。

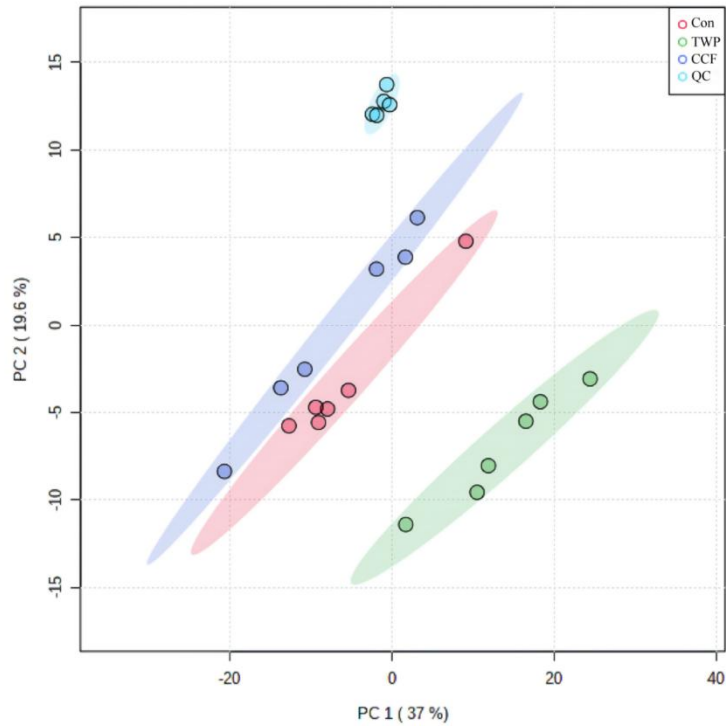


图 4 各组大鼠睾丸代谢轮廓的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of testicular metabolic profile of rats in each group

建立 TWP 组与 Con 组、TWP 组与 CCF 组 OPLS-DA 模型的正交投影,分析结果见图 4。如图 5 所示, Con 组与 TWP 组的睾丸样本点可完全区分开,说明 TWP 组大鼠代谢明显紊乱。采用 7 倍交叉验证法和 200 次响应排序检验评价构建的 OPLS-DA 模型,结果表明 TWP 组与 Con 组相比: $R^2Y(\text{cum}) = 0.919$, $Q^2(\text{cum}) = 0.902$; TWP 组与 CCF 组相比: $R^2Y(\text{cum}) = 0.930$, $Q^2(\text{cum}) = 0.884$, R^2Y 表示模型是否过拟合, Q^2 表示模型的判别能力, R^2Y 、 Q^2 均接近于 1, 表明所建模型稳定可靠。

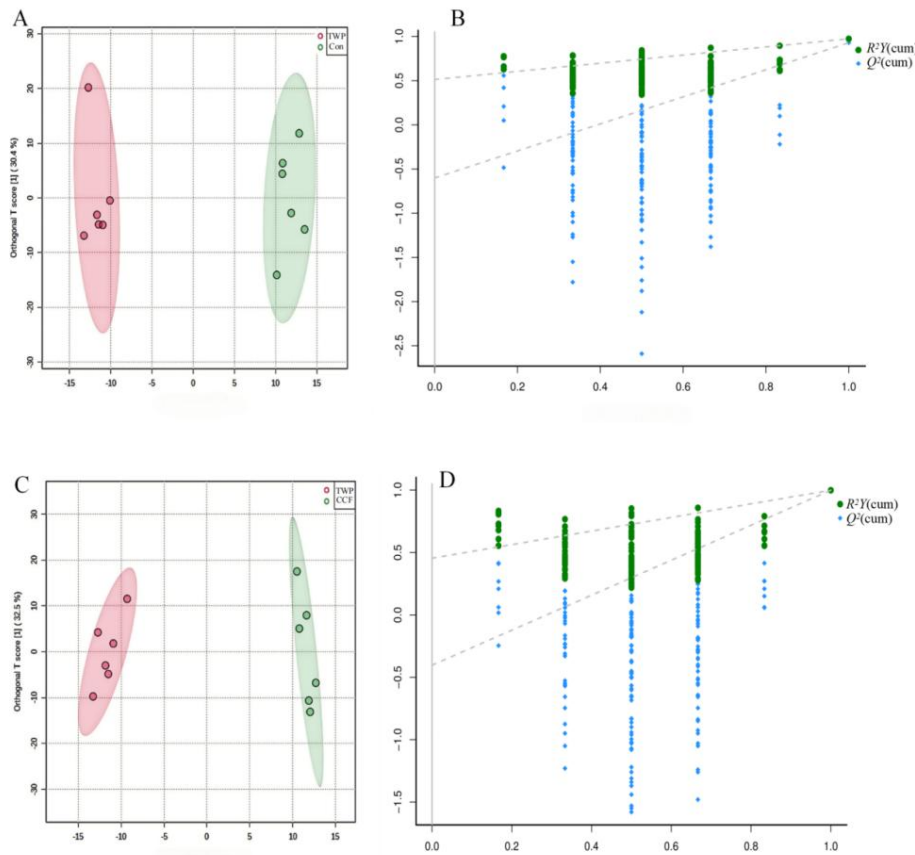
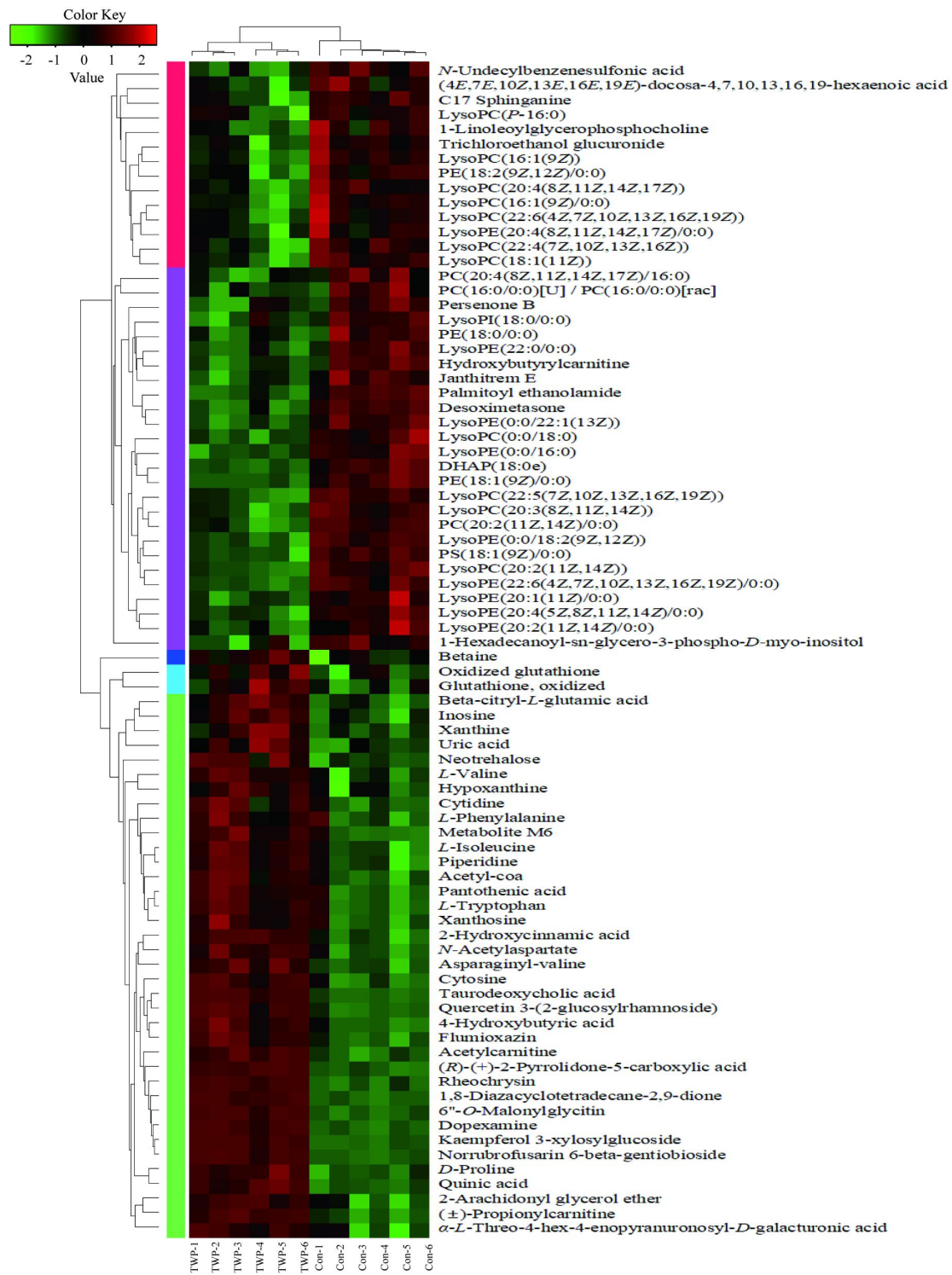


图 5 各组大鼠睾丸代谢 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plot of rats in each group

2.4 差异代谢物的筛选及鉴定

采用 OPLS-DA 模型的 VIP 值 ($VIP > 1$)，结合 t 检验的 P 值 ($P < 0.05$)，通过搜索在线数据库 HMDB (比较质荷比或精确分子质量) 并结合相关文献对 713 种代谢物进行差异代谢物筛选，TWP 组与 Con 组比较，共获得 80 种差异代谢物，其中 40 种代谢物上调，包括奎宁酸、牛磺酸脱氧胆酸、4-羟基丁酸、氧化谷胱甘肽等；40 种代谢物下调，包括脱氧米松、溶血磷脂酰胆碱、棕榈酰乙醇胺等。CCF 组与 TWP 组比较，共获得 70 种差异性代谢物，其中 32 种代谢物上调，包括绿原酸、4-羟基丁酸乙酰酯等；38 种代谢物下调，包括 N -乙酰天门冬氨酸、泛酸、乙酰左旋肉碱、 S -苯汞基酸等。通过 MetaboAnalyst 5.0 对各组间的差异代谢物进行聚类分析，用热图展示聚类结果并进行组间差异的分析，红色代表代谢物水平的升高，绿色代表代谢物水平的降低 (见图 6)。



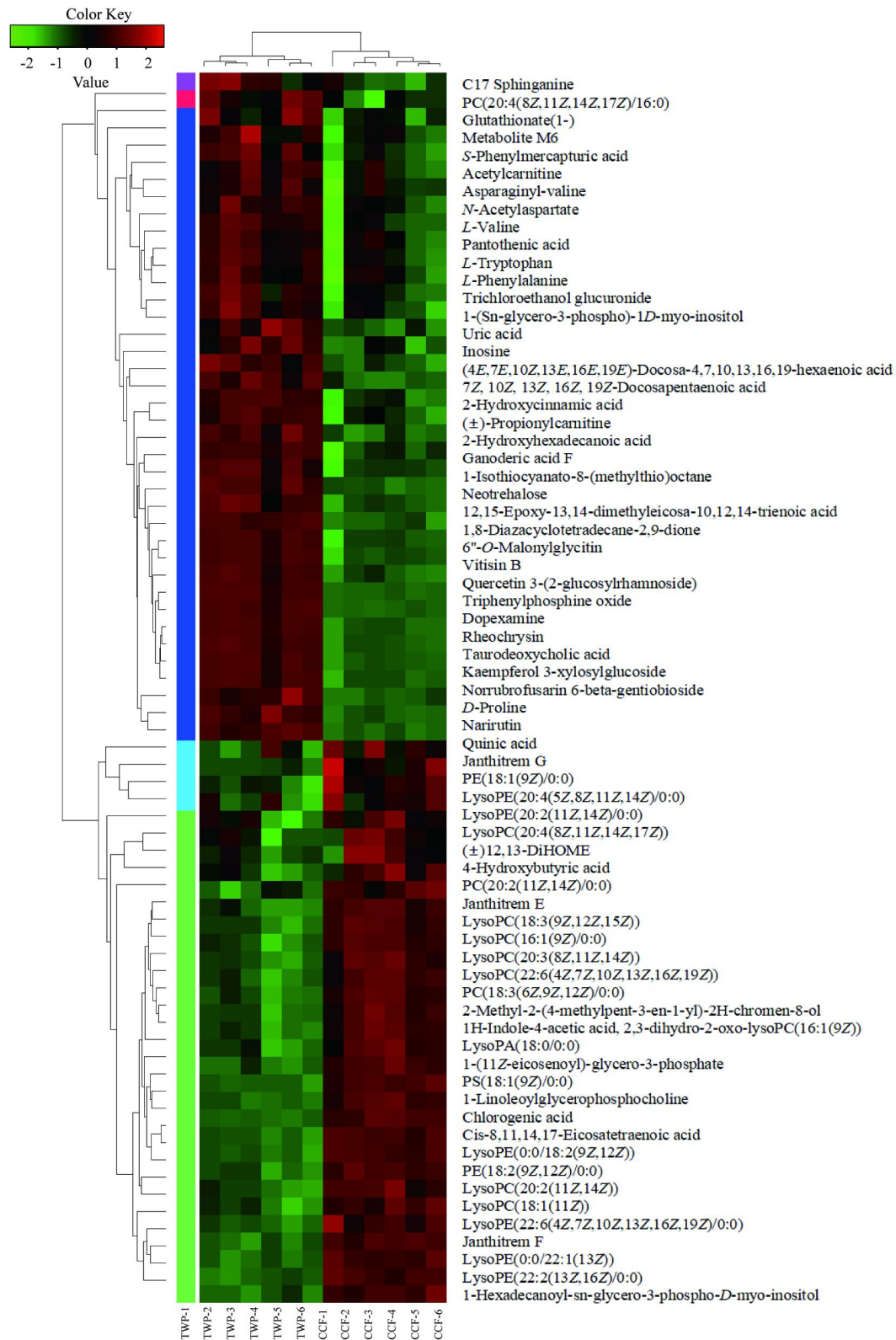


图 6 TWP 组和正常组、TWP 组和 CCF 组差异代谢物热图

Fig. 6 Differential metabolite heat maps of TWP and normal groups, TWP and CCF groups

通过将 TWP 组与 Con 组和 TWP 组与 CCF 组之间的差异性代谢物进行交集处理,发现 CCF 能显著回调 C17 鞘氨醇、三氯乙醇葡萄糖醛酸盐、1-亚麻酰甘油磷酸胆碱、溶血磷脂、磷脂酰乙醇胺等 23 种差异代谢物,具体见表 2。

表 2 CCF 对大鼠睾丸组织差异代谢物的影响

Table 2 Effect of CCF on differential metabolites in rat testis

序号 No.	t_R (s)	离子模式 Ion mode	m/z	分子式 Molecular formula	代谢物 Metabolite	趋势 Trend	
						TWP	CCF
1	8.96	[M+H] ⁺	478.29	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	↓	↑
2	9.57	[M+H] ⁺	522.35	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(18:1(11Z))	↓	↑
3	9.81	[M+H] ⁺	548.37	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(20:2(11Z,14Z)/0:0)	↓	↑
4	0.79	[M+NH ₄] +	249.15	C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	天冬氨酰缬氨酸 Asparaginyl-valine	↑	↓
5	0.90	[M+H] ⁺	204.12	C ₉ H ₁₇ NO ₄	乙酰肉碱 Acetylcarnitine	↑	↓
6	1.12	[M+H] ⁺	218.13	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	(±)-丙酰肉碱 (±)-Propionylcarnitine	↑	↓
7	8.69	[M+H] ⁺	494.32	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(16:1(9Z))	↓	↑
8	9.18	[M+H] ⁺	546.35	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(20:3(8Z,11Z,14Z))	↓	↑
9	7.64	[M+H] ⁺	288.28	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	C17 鞘氨醇 C17 Sphinganine	↓	↑
10	8.81	[M+H] ⁺	478.29	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(0:0/18:2(9Z,12Z))	↓	↑
11	0.90	[M+H] ⁺	118.08	C ₅ H ₁₁ NO ₂	L-缬氨酸 L-Valine	↑	↓
12	1.00	[M+H] ⁺	269.08	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	肌苷 Inosine	↑	↓
13	8.97	[M+H] ⁺	568.33	C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	↓	↑
14	9.00	[M+H] ⁺	520.33	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	1-亚麻酰甘油磷酸胆碱 1-Linoleoylglycerophosphocholine	↓	↑
15	2.59	[M+H] ⁺	220.11	C ₉ H ₁₇ NO ₅	泛酸 Pantothenic acid	↑	↓
16	9.65	[M+H] ⁺	548.37	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(20:2(11Z,14Z))	↓	↑
17	8.54	[M+H] ⁺	494.32	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(16:1(9Z)/0:0)	↓	↑

18	1.00	[M+H] ⁺	182.08	C ₉ H ₈ O ₃	2-羟基肉桂酸 2-Hydroxycinnamic acid	↑	↓
19	8.89	[M+H] ⁺	544.33	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	↓	↑
20	3.92	[M+H] ⁺	227.17	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	1,8-二氮杂环十四烷-2,9-二酮 1,8-Diazacyclotetradecane-2,9-dione	↑	↓
21	0.82	[M+H] ⁺	116.07	C ₅ H ₉ NO ₂	脯氨酸 D-Proline	↑	↓
22	4.73	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	565.15	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	6"-O-丙二酰甘氨酸 6"-O-Malonylglycitin	↑	↓
23	11.87	[M+Na] ⁺	804.54	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/16:0)	↓	↑
24	0.82	[M-H] ⁻	191.05	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸 Quinic acid	↑	↓
25	10.56	[M-H] ⁻	571.29	C ₂₅ H ₄₉ O ₁₂ P	1-十六酰基-sn-甘油-3-磷酸-D-肌醇 D-myo-inositol	↓	↑
26	9.27	[M+Na-2 H] ⁻	526.29	C ₂₅ H ₄₈ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(20:2(11Z,14Z)/0:0)	↓	↑
27	8.83	[M-H] ⁻	524.27	C ₂₇ H ₄₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/ 0:0)	↓	↑
28	9.53	[M-H] ⁻	478.29	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(18:1(9Z)/0:0)	↓	↑
29	4.73	[M-H ₂ O- H] ⁻	563.14	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₅	6-β-龙胆生物苷 Norrubrofusarin 6-β-gentiobioside	↑	↓
30	9.57	[M+FA- H] ⁻	580.36	C ₂₇ H ₅₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(0:0/22:1(13Z))	↓	↑
31	1.16	[M-H] ⁻	103.04	C ₄ H ₈ O ₃	4-羟基丁酸 4-Hydroxybutyric acid	↑	↓
32	4.69	[M+FA- H] ⁻	401.24	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₂	邻苯二酚 Dopexamine	↑	↓
33	8.89	[M-H] ⁻	602.34	C ₃₇ H ₄₉ NO ₆	(2S,3R,6S,8S,9R,12S,15S,21S,22R)-8-(2- -Hydroxypropan-2-yl)-2,3,23,23,25,25- hexamethyl-7,24-dioxo-31-azaocetacyclo [15.14.0.02,15.03,12.06,11.018,30.020, 28.022,27]hentriaconta-1(17),10,18,20(28),26,29-己烯-9,12,21-三醇 Janthitrem E	↓	↑
34	1.71	[M-H] ⁻	164.07	C ₉ H ₁₁ NO ₂	L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	↑	↓
35	9.93	[M-H] ⁻	522.28	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	磷脂酰胆碱 PS(18:1(9Z)/0:0)	↓	↑
36	0.90	[M-H] ⁻	167.02	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	尿酸	↑	↓

					Uric acid		
37	3.92	[M-H] ⁻	203.08	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-色氨酸 L-Tryptophan	↑	↓
38	4.95	[M-H] ⁻	609.14	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	槲皮素 3-2-葡萄糖 Quercetin 3-(2-glucosylrhamnoside)	↑	↓
39	0.97	[M-H] ⁻	174.04	C ₆ H ₉ NO ₅	N-乙酰天冬氨酸 N-Acetylaspartate	↑	↓
40	4.74	[M-H] ⁻	322.95	C ₈ H ₁₁ Cl ₃ O ₇	三氯乙醇葡萄糖醛酸盐 Trichloroethanol glucuronide	↓	↑
41	8.85	[M-H] ⁻	500.27	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰乙醇胺 LysoPE(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0)	↓	↑
42	0.79	[M+Cl] ⁻	377.08	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	B-海藻糖 β-Trehalose	↑	↓
43	4.50	[M-H] ⁻	579.13	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	山柰酚 3-木糖基葡萄糖苷 Kaempferol 3-xylosylglucoside	↑	↓
44	10.97	[M-H] ⁻	327.23	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	(4E, 7E, 10Z, 13E, 16E, 19E)-二十二 碳-4,7,10,13,16,19-六烯酸 (4E, 7E, 10Z, 13E, 16E, 19E)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid	↓	↑
45	11.49	[M+Cl] ⁻	557.29	C ₃₀ H ₄₂ N ₄ O ₄	代谢物 M6 Metabolite M6	↑	↓
46	6.47	[M-H] ⁻	498.29	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	牛磺酸脱氧胆酸 Taurodeoxycholic acid	↑	↓
47	5.49	[M+FA- H] ⁻	491.12	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	大黄素 Rheochrysin	↑	↓

2.5 潜在生物标志物代谢途径分析

采用 Metabo Analyst 5.0 途径分析模块对 CCF 干预后显著回调的 47 个潜在生物标志物进行代谢通路分析，筛选出 6 条相关性最强的通路（影响值 > 0.1），分别是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、鞘脂代谢、色氨酸代谢、酪氨酸代谢和甘油磷脂代谢通路（见图 7、表 3）。

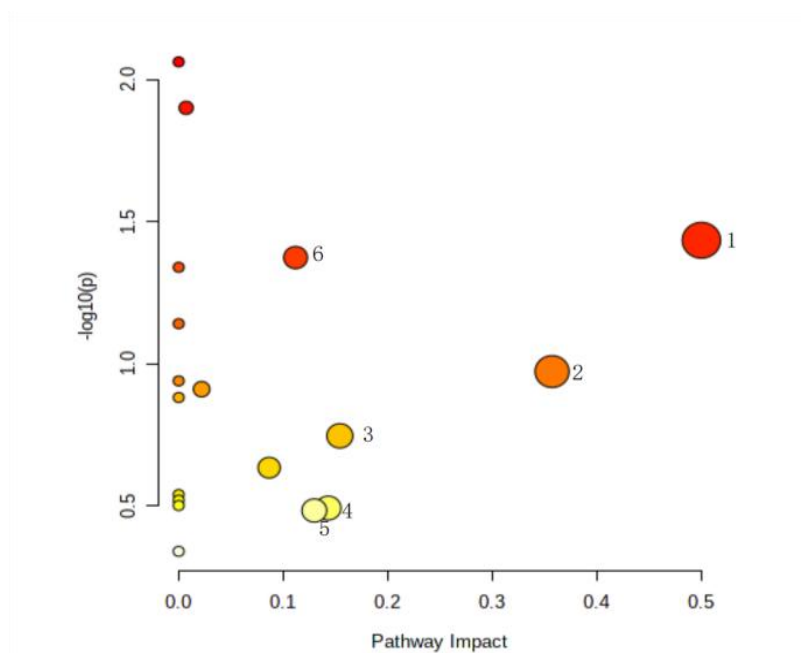


图 7 大鼠睾丸组织差异代谢物通路分析

Fig. 7 Pathway analysis of differential metabolites in rat testis

注：1.苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成；2.苯丙氨酸代谢；3.鞘脂代谢；4.色氨酸代谢；5.酪氨酸代谢；6.甘油磷脂代谢。

Note: 1. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 2. Phenylalanine metabolism; 3. Sphingolipid metabolism; 4. Tryptophan metabolism; 5. Tyrosine metabolism; 6. Glycerophospholipid metabolism.

表 3 相关代谢途径的主要信息

Table 3 Main information on related metabolic pathways

序号 No.	通路 Pathway	代谢物总数		错误发现率		
		Total count of metabolite	原始 P 值 Raw p	-lgP	False discovery rate	影响 Impact
1	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	0.036 70	1.435 30	0.767 5	0.500 00
2	苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	12	0.106 39	0.973 09	1.000 0	0.357 14
3	鞘脂代谢 Sphingolipid metabolism	21	0.179 18	0.746 71	1.000 0	0.154 16
4	色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	41	0.321 67	0.492 58	1.000 0	0.143 05
5	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	42	0.328 16	0.483 92	1.000 0	0.129 72
6	甘油磷脂代谢	36	0.042 22	1.374 50	0.767 5	0.111 82

3 讨论与结论

本研究结果显示：CCF 干预后经 TWP 灌胃的大鼠病理形态出现了显著改善，代谢组学共筛选出有显著回调作用的正离子模式下潜在生物标志物 23 个，负离子模式下潜在生物标志物 24 个，关系密切的代谢通路 6 条，主要包括氨基酸、鞘脂、甘油磷脂代谢途径。

研究结果显示，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成通路可能是 CCF 减轻 TWP 带来生殖毒性的主要通路。实验结果表明，TWP 组大鼠体内的 *L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸、色氨酸的量均高于正常组，这一发现表明 TWP 可能诱导氨基酸代谢紊乱而致生殖损伤。而氨基酸在促精子生成方面起到重要作用，充足的氨基酸浓度可为精子提供能量，推动精子成熟，提高精子活性，并有效抵抗其他毒素对精子的损害^[11-12]。苯丙氨酸在体内大部分经苯丙氨酸羟化酶作用后生成酪氨酸，并与酪氨酸一起合成神经递质和激素，参与机体糖脂、氨基酸代谢过程^[13-14]。本研究中 CCF 能够下调大鼠体内 *L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸、色氨酸水平，推测 CCF 可能通过苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成和代谢来降低 TWP 的生殖毒性。而鞘脂是脂质的重要组成部分，主要包括神经酰胺、鞘磷脂、鞘脂糖等成分，参与调控细胞凋亡及炎症反应^[15-16]。本实验中 TWP 大鼠体内 C17-鞘磷脂量降低，考虑可能是由于生殖损伤状态诱发了鞘脂类物质的消耗；而 CFFs 能上调大鼠睾丸中神经酰胺及 C17-鞘磷脂量，推测其可能是通过调节鞘脂代谢途径降低 TWP 的生殖毒性。而调控甘油磷脂代谢途径是 CCF 降低 TWP 的生殖毒性的另一通路，本研究 TWP 组大鼠睾丸的溶血磷脂酰胆碱（18:1(11Z)）、溶血磷脂酰胆碱（22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)）、磷脂酰乙醇胺（18:0/0:0）、溶血磷脂酰乙醇胺（20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)）、溶血磷脂酰乙醇胺（20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0）的含量出现了不同程度的变化，而 CCF 组大鼠睾丸中的上述代谢物水平均明显回调，表明 CCF 能够通过调节甘油磷脂代谢通路来降低 TWP 的生殖毒性。另有研究反向验证了甘油磷脂代谢紊乱可改变精子细胞膜流动，导致其活率及活力下降，甚至不育^[17-19]。另外，本课题组前期通过高通量转录组测序发现^[20]，CFFs 干预后，TWP 组下调的类 DNA 甲基转移酶蛋白 3L（DNA methyl-transferase 3-like protein, DNMT3L）基因出现上调，而氨基酸在该基因的转录修饰作用下形成具有活性的酶；通过代谢组学发现，CCF 作用后的 TWP 组多种氨基酸丰度出现了不同程度的改变，由此推测 CCF 改善 TWP 所致的生殖毒性可能是通过氨基酸代谢通路上调 DNMT3L 基因的表达所实现。

综上，本研究实验结果表明，CCF 可以有效减轻 TWP 导致的大鼠睾丸及附睾组织病理

损伤,这可能与通过下调大鼠睾丸组织中苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成导致氨基酸代谢紊乱,上调神经酰胺及 C17-鞘磷脂量调节鞘脂代谢以及回调溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰乙醇胺等调节甘油磷脂代谢通路有关。本研究为 CCF 减轻 TWP 所致生殖损伤提供实验数据基础,同时也为解决 TWP 的临床应用困境提供新的解决思路。

参考文献

- 1 Ding Y,Zhai WS,Ren XQ,et al.Treatment of pediatric Henoch-Schönlein purpura nephritis by a stepwise Chinese medicine scheme: a multicenter clinical study[J].J Beijing Univ TCM(北京中医药大学学报),2023,46:456-466.
- 2 Lin N,Jiang Q,Liu W,et al.Clinical practice guideline for *Tripterygium glycosides/Tripterygium wilfordii* tablets in treatment of rheumatoid arthritis[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2020,45:4149-4153.
- 3 Wang Y.Effect of Tripterygium glycosides tablets in treatment of systemic lupus erythematosus[J].Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志),2022,49:124-126.
- 4 Sun S,Yang XH,Ma DM,et al.Reproductive Toxicity of *Tripterygium wilfordii* Hook .f:a systematic review and meta-analysis[J].Chin J Pharmacov(中国药物警戒),2014,11:94-99.
- 5 Yin LS,Zhang LN,Zhang H,et al.Modern research progress and thinking on compatibility and detoxification of traditional chinese medicine[J].Chin J Ration Drug Use(中国合理用药探索),2021,18:1-5.
- 6 Sun LH,Ding Y,Han SS,et al.Analysis of regularity of traditional Chinese medicine for attenuating female reproductive toxicity of *Tripterygium wilfordii* based on literature mining[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2023,54:1886-1895.
- 7 Ren XQ,Ding Y,Cui RQ,et al.Experimental study on the intervention of flavonoids from *Cuscuta* in the testicular tissue injury of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides in young male rats[J].Chin Pediatr Integr Tradit West Med(中国中西医结合儿科学),2010,2:302-305.
- 8 Jing XP,Ding Y,He L.Juvenile male rats reproductive damage by glycosides of *Tripterygium wilfordii* and its protection role bushen chinese herbs and observation finals fertility of male rats[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2013,19:230-233.
- 9 Jing XP,Cui RQ,Cheng WW,et al.Effect of different doses of *Cuscutae Semen* flavone on *Tripterygium glycosides*-induced reproductive damage in male juvenile rats[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2016,22:113-117.
- 10 Ding XK; Guo XJ; Zhang XY.Effects of Huazhuo Jiedu Yikui decoction on Th1/Th2 balance, stress response and intestinal mucosa in rats with ulcerative colitis[J].Chin Pharmacol Bull(中国药理学通

报),2024,40:1905-1911

- 11 Jukarainen S,Heinonen S,Ramo J T,et al.Obesity is associated with low NAD(+)/SIRT pathway expression in adipose tissue of BMI-discordant monozygotic twins[J].J Clin Endocrinol Metab,2016,101:275-283.
- 12 Ottosson F,Ericson U,Almgren P,et al.Postprandial levels of branch chained and aromatic amino acids associate with fasting glycaemia[J].J Amino Acids,2016,2016:8576730.
- 13 Hiroi T,Imaoka S,Funae Y.Dopamine formation from tyramine by CYP2D6[J].Biochem Biophys Res Commun,1998,249:838-843.
- 14 Lindemann L,Hoener MC.A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family[J].Trends Pharmacol Sci,2005,26:274-281.
- 15 Liu RP,Yang JK,Yan YN,et al.Extraction of ceramide from konjac and its sphingomyelin analysis[J].Nat Prod Res(天然产物研究与开发),2011,23:542-546.
- 16 Jin DZ,Zhu XZ.Regulation of metabolism and apoptotic signal by ceramide[J].Chin Bull Life Sci(生命科学),2006,18:481-486.
- 17 Wang T,Shi X,Quan S.Germ cell membrane lipids in spermatogenesis[J].Nat J Androl(中华男科学杂志),2016,22:450-454.
- 18 Zhang JS,Chen BQ,Gao YH,et al.Effect of conjugated linoleic acid on rate-limiting enzymes in the linoleic acid metabolism pathway in tumor cells[J].Chin J Prev Med(中华预防医学杂志),2005,39:195-198.
- 19 Fu JL.Construction of clinical diagnostic models of adolescent-onset type 2 and type 3 diabetes mellitus and metabolomics studies[D].Beijing:Beijing University(北京大学),2020.
- 20 Zhang B,Su H,Ren XQ,et al.Study on mechanism of Cuscutae Semen flavonoids in improving reproductive damage of *Tripterygium* glycosides tablets in rats based on high-throughput transcriptome sequencing[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2019,44:3478-3485.

收稿日期: 2024-05-31

接受日期:

基金项目: 国家自然科学基金(82205187); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20230684)

*通信作者 Tel: 13503840642; E-mail:dingying323@sina.com