

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.08.013

实验研究

益肾通络方对苯并(a)芘致精子DNA损伤模型小鼠 睾丸靶基因影响的多组学研究

赵莉娜^{1,2}, 张宸铭¹✉, 马思成¹, 孙自学², 门波²

1. 河南中医药大学第二临床医学院, 河南省郑州市郑东新区金水东路156号, 450046; 2. 河南省中医院

[摘要] 目的 探讨益肾通络方对精子DNA损伤的影响及可能作用机制。方法 40只ICR小鼠随机分为空白组, 模型组和益肾通络方低、中、高剂量组, 每组8只。除空白组外其余各组按100 mg/(kg·d)灌胃苯并(a)芘复制精子DNA损伤模型, 益肾通络方低、中、高剂量组上午造模, 下午分别给予益肾通络方水煎液5.95、11.89、23.78 g/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组同时灌胃0.1 ml/10 g生理盐水, 各组均持续8周。检测各组小鼠精子DNA碎片指数(DFI), 根据DFI结果进行睾丸转录组学和蛋白组学分析, 对两组学的结果进行趋势分析、GO分析和KEGG富集通路分析。采用九象限法筛选益肾通络方作用靶基因, 并采用Western blot法进行验证。结果 模型组小鼠精子DFI明显高于空白组($P<0.01$); 与模型组比较, 益肾通络方高剂量组小鼠精子DFI显著下降($P<0.01$), 而益肾通络方低、中剂量组差异无统计学意义($P>0.05$), 故对空白组、模型组、益肾通络方高剂量组进行转录组学和蛋白组学分析。结果显示, 共筛选出1272个差异基因(DEGs)和1309个差异蛋白(DEPs)。趋势分析筛选出8种趋势类型, 其中谱2为模型组表达下调, 益肾通络方干预后恢复的基因/蛋白; 谱5为模型组表达上调, 益肾通络方干预后恢复的基因/蛋白。因此, 选择对谱2和谱5中的基因或蛋白进一步分析。GO分析显示, 在生物学过程、细胞成分、分子功能类别中排第一位分别是发育过程、细胞内部分、分子功能监管。谱2和谱5中基因KEGG富集通路前五位分别为铂类药物抗药性、破骨细胞分化、多种细胞凋亡、凋亡及非酒精性脂肪肝病, 蛋白KEGG通路前五个通路分别为系统性红斑狼疮、氮代谢、蛋白消化吸收、非洲锥虫病和B细胞受体信号通路。九象限法筛选出X线交叉互补修复基因1(Xrcc1)、细胞色素b5还原酶3(Cyb5r3)、血红素结合蛋白1(Hebp1)、丝氨酸蛋白酶45(Prss45)为益肾通络方靶基因。经Western blot验证, 与空白组比较, 模型组小鼠睾丸组织Xrcc1及Prss45蛋白表达显著下调($P<0.05$)。益肾通络方高剂量组Xrcc1蛋白表达较模型组显著上调($P<0.01$)。结论 益肾通络方可修复由苯并(a)芘染毒引起的精子DNA损伤, 其机制可能与耐药、凋亡等通路及Xrcc1有关。

[关键词] 精子; DNA损伤; 益肾通络方; 苯并(a)芘; 转录组学; 蛋白组学

目前全球约有15%的育龄夫妇患不孕不育症, 且发病率逐年增高, 其中男性因素引起的约占50%^[1]。精液分析是主要通过形态学判断精子质量的一项常规检测, 并不能真正反映精子质量, 约有一半左右的不育患者精液分析检查是正常的^[2]。研

究发现, 有反复自然流产史的夫妇中的男性精子的活动率明显降低, 染色质凝聚少, DNA完整性降低^[3]。目前, 精子DNA碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)被用来评估精子的质量, 当男性DFI大于27%时, 其配偶流产率会大大增加, 将难以获得正常妊娠^[4]。另有研究显示, 环境内分泌干扰物多环芳烃、邻苯二甲酸酯是我国各大城市中最主要的空气有机污染物^[5-6], 其在人体中的染毒量与男性激素水平、精子DFI、精液分析参数具有明显的相关性^[7]。其中, 苯并(a)芘是多环芳烃中较为常见的一种有毒物质, 主要由煤炭、石油等化

基金项目: 国家自然科学基金(81974573, 81603632, 82174377); 中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药青苗人才第二批(111044); 河南省科技攻关计划(192102310159, 232102311199); 河南省自然科学基金(222300420485); 国家中医药临床研究基地专项(2021JDZX2056, 2021JDZX2068); 河南省高等学校大学生创新训练计划(202210471022, 202210471057)

✉ 通讯作者: zcmhnzy@163.com

石燃料燃烧时产生,如汽车尾气、烧烤食物及吸烟等^[8]。益肾通络方是河南省中医院临床应用 20 年的经验方,能显著改善精液质量,并提高弱精子症患者精子 DNA 完整性^[9]。前期研究亦发现,苯并(a)芘可造成大鼠精子 DNA 损伤,而益肾通络方可修复这一损伤^[10-11]。本研究通过复制苯并(a)芘染毒小鼠精子 DNA 损伤模型,通过转录组学、蛋白组学等高通量测序手段筛选得到益肾通络方修复精子 DNA 损伤的靶基因,并进行验证。本研究已通过河南省中医院伦理委员会批准(批准号:PZ-HNSZYY-2020-019)。

1 方法

1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 40 只,8 周龄,体质量(180±10)g,由山东济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(鲁)20190003。实验动物饲养于河南省中医院中心实验室个体通风笼系统中,该系统中笼温 21~25℃,湿度 38%~60%,通风 22 次/h,明暗交替 12 h。小鼠自由食用标准动物饲料并饮用过滤水,正式实验前适应性饲养 1 周。

1.2 实验药物

益肾通络方组成:菟丝子 20 g,淫羊藿 20 g,熟地黄 10 g,丹参 30 g,黄芪 20 g,水蛭 6 g,川牛膝 10 g。中药均购自河南省中医院药房,由药剂室煎成浓度为 2.4 g/ml 的浓缩中药水煎液,4℃冰箱冷藏备用。苯并(a)芘(北京 Solarbio 科学技术有限公司,分析纯,纯度≥96%,批号:C11287800)。

1.3 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠(Sigma 公司,货号 P3761);TNE 缓冲液(货号 N0426)、NEBNext Ultra RNA 文库制备试剂盒(货号 E7530),新英格兰生物实验室;吖啶橙染色液(北京索莱宝科学技术有限公司,货号 YS175111);精子 DNA 检测试剂盒(浙江星博生物科技股份有限公司,批号 201101);TRIzol(Invitrogen 公司,货号 15596-026);Ribo-Zero™ 磁性试剂盒(Epicenter 公司,货号 MRZG12324);裂解缓冲液(货号 P0013B)、BCA 蛋白分析试剂盒(货号 P0010),碧云天生物技术有限公司;序列级改性胰蛋白酶(Promega 公司,货号 V5117);RIPA 裂解液(货号 PC101)、PAGE 凝胶快速制备试剂盒(货号 PG111)、0.5%TBST(货号 PS103S)、HRP-山羊抗兔 IgG(货号 LF101,1:10 000)、ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒(货号 SQ201),上海雅酶

生物科技有限公司;HRP-山羊抗鼠 IgG(EarthOx 公司,货号 E030110-01,1:10 000);X 线交叉互补修复基因 1(Xrcc1)抗体(货号 ab134056,1:5000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号 ab8245,1:5000),Abcam 公司;细胞色素 b5 还原酶 3(Cyb5r3)抗体(货号 bs-12162R,1:1000)、血红素结合蛋白 1(Hebp1)抗体(货号 bs-9887R,1:1000)、丝氨酸蛋白酶 45(Prss45)抗体(货号 bs-24111R,1:1000),北京博奥森生物技术有限公司。

BD Accuri™ C5 流式细胞仪(BD Pharmingen 公司);Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies 公司);Illumina Novaseq 6000 测序仪(Illumina 公司);Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪(Thermo Fisher Scientific 公司);反相 XBridge C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm, Waters Corporation 公司);Spectronaut X 平台(Biognosys AG 公司)。

1.4 分组、造模及给药

适应期结束后,采用随机数字表法将小鼠分为空白组,模型组和益肾通络方低、中、高剂量组,每组 8 只。除空白组外,其余各组小鼠给予苯并(a)芘 100 mg/(kg·d)灌胃 8 周复制精子 DNA 损伤模型^[12]。造模结束后,模型组小鼠精子 DFI 较空白组显著升高,差异有统计学意义证明造模成功^[12]。益肾通络方各剂量组上午造模,下午按 0.1 ml/10 g 体质量灌胃益肾通络方水煎液,益肾通络方低、中、高剂量组分别给予 5.95、11.89、23.78 g/(kg·d),相当于成人表面积日口服剂量的 1/4、1/2、1 倍剂量^[13],空白组和模型组小鼠同时给予生理盐水 0.1 ml/10 g 灌胃。各组均灌胃持续 8 周。

1.5 观察指标及方法

最后一次给药后禁食 12 h,采用 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)充分麻醉后,开腹摘除附睾后,用无菌生理盐水冲洗血液,用眼科剪剪开附睾尾部,随后放置在 1 ml 生理盐水中 1~3 min 后混匀,制成精子悬液,-80℃保存,待测精子 DFI。双侧睾丸用液氮速冻后移至-80℃冰箱中保存,以待转录组学及蛋白组学检测。

1.5.1 精子染色质结构分析法(SCSA)^[14]测定精子 DFI 将精子悬液放在室温下解冻,置于 800 μl 冷 TNE 缓冲液中,并通过 100 μm 尼龙过滤器。过滤后的精子悬液用相同的缓冲液稀释至 2×10⁶/ml~3×10⁶/ml。将 100 μl 精子悬液用酸性洗涤剂溶液稀释至 200 μl 静置 30 s 后。随后加入 600 μl 吖啶橙染

色液对精子进行染色。随后使用流式细胞仪对每个样本中至少 5000 个精子进行分析。DFI 计算使用 CellQuest Pro™ 软件（美国 BD Pharmingen 公司，版本 v5.2.1）得出单链（红色）和双链（绿色）荧光的比值即 DFI。

1.5.2 转录组学分析 根据试剂盒说明书，用 TRIzol 试剂盒分离总 RNA。分离到的 RNA 采用生物分析仪进行质量检测，采用不含核糖核酸酶的琼脂糖凝胶电泳进行确认。采用 Oligo（dT）微球聚集真核 mRNA，并用 Ribo-Zero™ 磁性试剂盒消除原核 mRNA。将聚集的 mRNA 片段通过废料缓冲分离为短片段，然后使用 NEBNext Ultra RNA 文库制备试剂盒转化为 cDNA。纯化后的双链 cDNA，修复末端，导入碱基，用 Illumina 测序附件连接 cDNA，连接产物由 Illumina Novaseq 6000 测序仪测序。

1.5.3 蛋白组学分析 3 组共 9 个样本置于裂解缓冲液中纯化总蛋白，用 BCA 蛋白分析试剂盒对蛋白进行定量。在 37℃ 条件下，用序列级改性胰蛋白酶以 50：1（w/w）底物/酶比进行蛋白消化 16 h。将得到的肽混合物溶于甲酸铵水溶液中，采用反相 XBridge C18 色谱柱进行高 pH 分离。随后在 30 μl 的 0.1% 甲酸水中重新溶解肽，并在 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪上进行液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）方法。获得的原始数据在 Spectronaut X 平台上使用默认参数进行处理和分析，获得样品的蛋白表达。

1.5.4 差异基因及蛋白趋势分析 组间基因差异表达分析采用 DESeq2 软件进行（两两比较用 edgeR 进行分析）。错误发现率（FDR）≤0.05 并且差异变化倍数 ≥2 的基因被筛选为差异表达基因（DEGs）及差异表达蛋白（DEPs）。根据筛选得到的 DEGs 和 DEPs，采用趋势分析的方法筛选出益肾通络方发挥作用的潜在靶点。将每个样本的表达信息归一化到 0、log2（v1/v0）、log2（v2/v0），然后使用时间序列研究（STEM，v1.3.13）软件对 3 组进行分层，得到 8 个变化趋势不同的聚类模式的谱。然后对模型组下调、益肾通络方干预后恢复和模型组上调、益肾通络方干预后恢复的 DEGs 进行 GO 分析和 KEGG 通路富集评估。

1.5.5 九象限法分析靶点基因 为筛选表达趋势相同的基因和蛋白，使用 R（v3.5.1）软件根据基因在转录组和蛋白组中的表达变化绘制九象限图。对九象限图谱中每个区域的基因进行定量和富集评估。其中以基因和蛋白表达趋势相同的第三和第七象限为重点。

1.5.6 Western blot 验证 根据上述蛋白组学结果进行 Western blot 验证。使用添加了蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液进行睾丸组织匀浆，使用 BCA 方法进行蛋白定量。用 7.5% 的 SDS-PAGE 对蛋白进行分离，然后将蛋白转移到硝化纤维素膜上。随后，用 5% TBST 在室温下封闭膜 2 h，用 TBST 洗涤，然后在 4℃ 下接种相应的一抗过夜。随后用 HRP 连接的二抗在室温下接种 1 h。用增强的化学发光试剂显示蛋白条带，用 ImageJ v2.1 软件定量蛋白强度。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。本研究所有计量资料均符合正态分布且方差齐，以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，采用单因素方差分析进行组间比较，并应用 LSD 法进行各组间两两比较， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

给药过程中空白组、模型组、益肾通络方中剂量组小鼠各死亡 1 只，益肾通络方高、低剂量组小鼠各死亡 2 只，尸体解剖后发现各脏器未出现明显衰竭，排除急性中毒、感染引起的死亡，考虑灌胃时出现的意外窒息死亡。

2.1 各组小鼠精子 DFI 比较

表 1 示，与空白组比较，模型组小鼠精子 DFI 显著升高（ $P<0.01$ ）。与模型组比较，益肾通络方高剂量组小鼠精子 DFI 显著降低（ $P<0.01$ ），而益肾通络方中、低剂量组小鼠精子 DFI 差异无统计意义（ $P>0.05$ ）。益肾通络方各剂量组间精子 DFI 比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。因此，本研究仅对空白组、模型组和益肾通络方高剂量组进行转录组学及蛋白组学分析，采用随机数字表法每组选取 3 只小鼠睾丸进行检测。

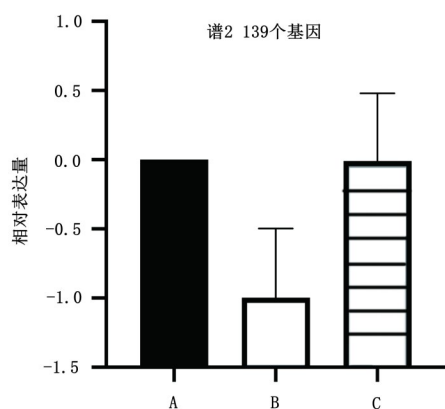
表 1 各组小鼠精子 DFI 比较
Table 1 Comparison of mice sperm DFI in each group（%， $\bar{x}\pm s$ ）

组别	鼠数	DFI
空白组	7	4.04±1.39
模型组	7	18.43±5.37 ^{a)}
益肾通络方低剂量组	6	14.10±4.75
益肾通络方中剂量组	7	14.22±6.65
益肾通络方高剂量组	6	9.78±7.40 ^{b)}

注：DFI，DNA 碎片指数。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠睾丸蛋白组学和转录组学分析结果 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组基因及蛋白的总表达量进行两两比较，得到 1272 个 DEGs

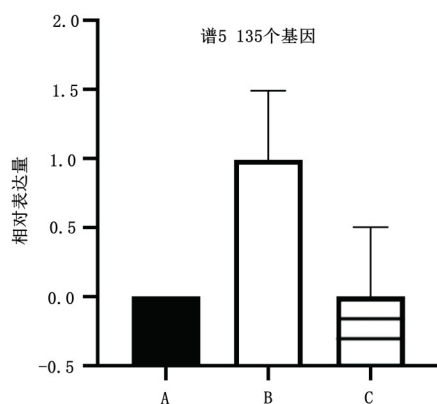
和 1309 个 DEPs。对这些 DEGs 和 DEPs 进行趋势分析。根据 3 组变化趋势的不同, 分为 8 种趋势类型, 即谱 0~谱 7。其中, 谱 2 为模型组表达下调, 益肾通络方干预后恢复的基因/蛋白, 谱 5 为模型组表达上调, 益肾通络方干预后恢复的基因/蛋白。因此选择对谱 2 和谱 5 中的基因或蛋白进一步分析。在转录组谱 2 中, 139 个 DEGs 在模型组表达下调, 益肾通络方高剂量干预后恢复; 谱 5 中, 135 个 DEGs 在模型组表达上调, 益肾通络方高剂量干预后恢复 (见图 1、图 2)。在蛋白组谱 2 中, 107 个 DEPs 在模型组表达下调, 益肾通络方高剂量干预后恢复; 谱 5 中, 模型组 216 个 DEPs 表达上调, 在益肾通络方高剂量干预后恢复 (见图 3、图 4)。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 益肾通络方高剂量组。

图 1 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸转录组学谱 2 基因分析

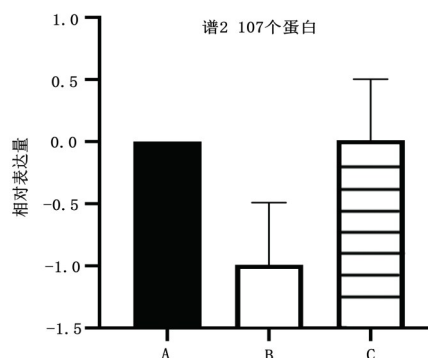
Figure 1 Analysis of testis transcriptome profile 2 gene in the control group, BaP group and YSTLH group



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 益肾通络方高剂量组。

图 2 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸转录组学谱 5 基因分析

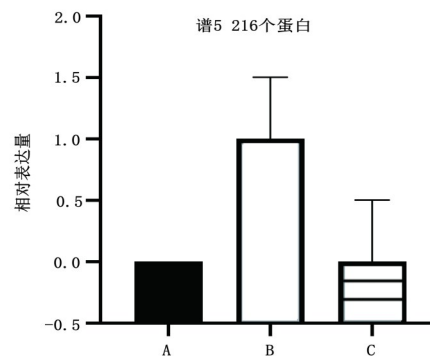
Figure 2 Analysis of testis transcriptome profile 5 gene in the control group, BaP group and YSTLH group



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 益肾通络方高剂量组。

图 3 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸蛋白组学谱 2 蛋白分析

Figure 3 Analysis of testis proteomics profile 2 protein in the control group, BaP group and YSTLH group



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 益肾通络方高剂量组。

图 4 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸蛋白组学谱 5 蛋白分析

Figure 4 Analysis of testis proteomics profile 5 protein in the control group, BaP group and YSTLH group

2.3 各组小鼠差异蛋白和差异基因的 GO 分析结果

将两组学中谱 2 和谱 5 中的基因及蛋白进行 GO 分析。在生物学过程类别中, 数量最多的 3 个 GO 项分别是发育过程、代谢过程调节和生物过程的正向调节。在细胞成分类别中, 数量最多的 2 个 GO 项分别是细胞内部分和细胞内。在分子功能类别中, 数量最多的 GO 项是分子功能监管。

2.4 KEGG 富集通路分析结果

我们将转录组学中谱 2 和谱 5 中的基因进行了 KEGG 富集通路分析。按照 q 值由低到高排列, 前 5 个通路分别为铂类药物抗药性、破骨细胞分化、多种细胞凋亡、凋亡及非酒精性脂肪肝病 (图 5)。将蛋白组学中谱 2 和谱 5 中的蛋白进行了 KEGG 通路分析。按照 P 值及 q 值由低到高排列, 前 5 个通路分别为系统性红斑狼疮、氮代谢、蛋白消化吸收、非

洲锥虫病和B细胞受体信号通路（图6）。

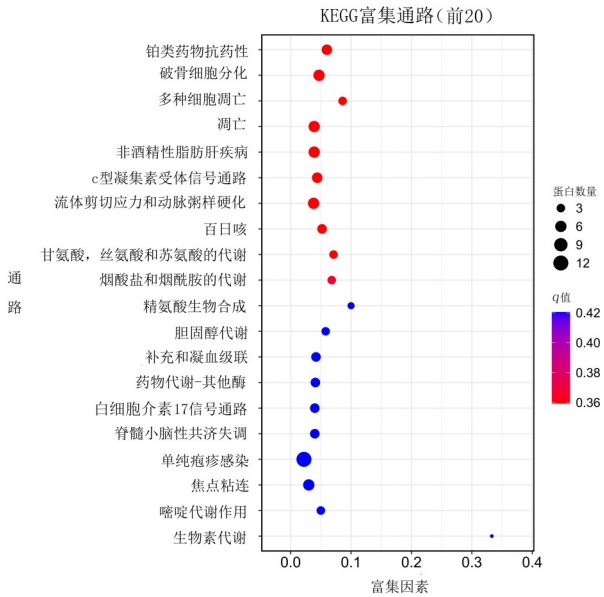


图5 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸转录组学中谱2及谱5的KEGG分析（前20）结果

Figure 5 KEGG analysis of profile 2 and profile 5 in the testis transcriptomics of mice in the control group, BaP group, and YSTLH group (top 20)

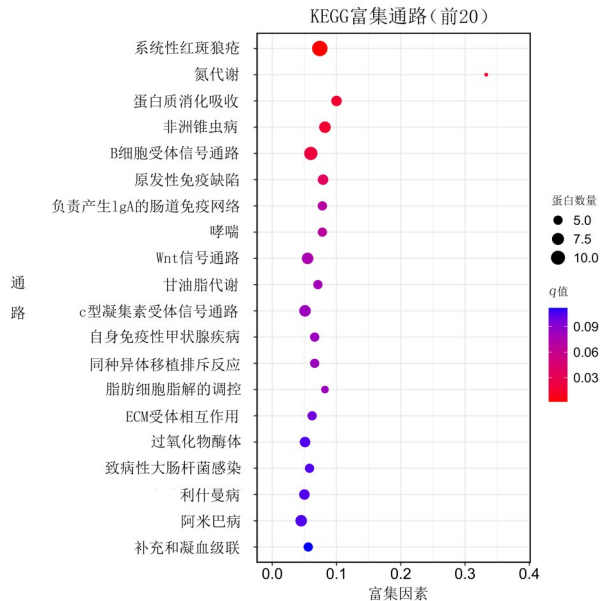


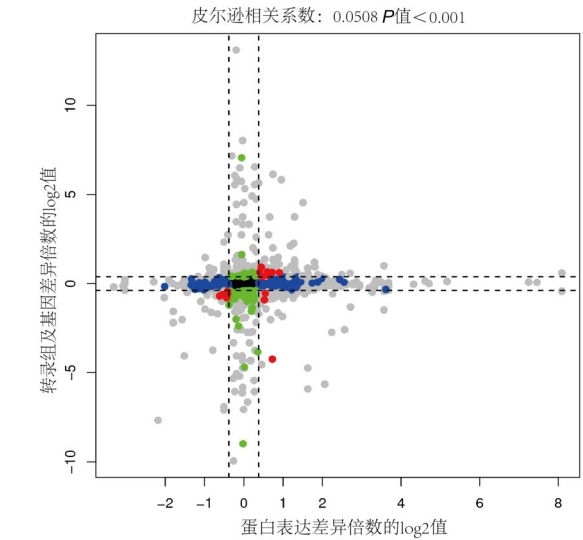
图6 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸蛋白组学中谱2及谱5的KEGG分析（前20）结果

Figure 6 KEGG analysis of profile 2 and profile 5 in the testis proteomics of mice in the control group, BaP group, and YSTLH group (top 20)

2.5 九象限法筛选两组学共同表达基因结果

空白组和模型组的转录组和蛋白组比较（图7），以及模型组和益肾通络方高剂量组的比较（图8）。在九象限图中，共同上调的基因及相应蛋白分布在第三象限（右上象限），共同下调的基因及相

应蛋白分布在第七象限（左下象限）。通过比较图5第三象限和图6第七象限，筛选出模型组上调、益肾通络方高剂量组恢复的基因和蛋白(Hebp1)。通过比较图5第七象限和图6第三象限，筛选出模型组下调和益肾通络方高剂量组恢复的基因和蛋白(Xrcc1、Cyb5r3和Prss45)。



注：每个点代表一个基因或蛋白，黑点代表无差异表达的基因或蛋白，红点代表趋势一致或相反的基因或蛋白，绿点代表基因差异表达但蛋白无差异表达的基因及蛋白，蓝点代表基因无差异表达但蛋白差异表达的基因及蛋白。

图7 空白组与模型组小鼠睾丸转录组学和蛋白组学比较九象限图（Log2）

Figure 7 Nine-quadrant diagram analysis between transcriptomic and proteomic data of the mice testes in the control group and BaP group (Log2)

2.6 Western blot 验证筛选蛋白表达比较

对上述九象限法筛选出的4个基因通过 Western blot检测其蛋白表达情况。表2示，与空白组比较，模型组 Xrcc1 及 Prss45 蛋白表达显著下调 ($P=0.013$ 、 $P=0.018$)。益肾通络方高剂量组 Xrcc1 蛋白表达较模型组显著上调 ($P=0.040$)。

3 讨论

目前现代医学对于精子质量下降及精子 DNA 损伤尚无较好的解决办法。中医学根据其临床特征将其归纳为“无子”范畴,《金匱要略》云:“男子脉浮弱而涩,为无子,精气清冷”。中医理论认为,肾精的充盈对精子的生成、发育和排泄具有决定性作用,如果男子肾中精气不足,则会影响自身生殖功能,所以中医药治疗精子 DNA 损伤多从补肾角度入手。益肾通络方是我团队应用 20 余年的经验方,最早用于治疗精索静脉曲张性不育,具有较好

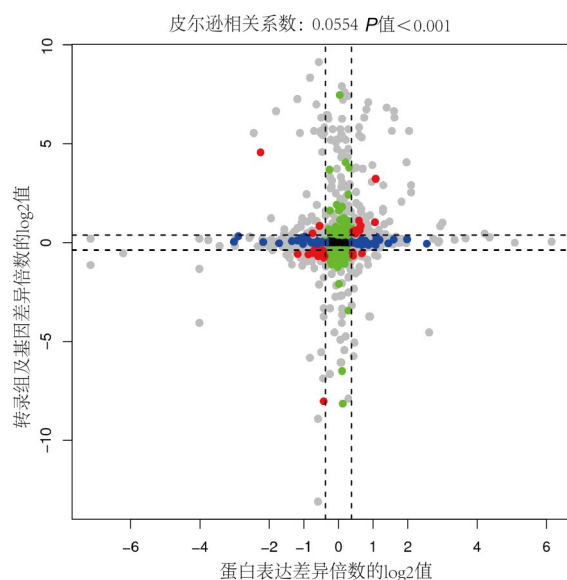
表2 空白组、模型组和益肾通络方高剂量组小鼠睾丸Xrcc1、Cyb5r3、Hebp1和Prss45蛋白相对表达量比较

Table 2 Comparison of the relative protein expression of Xrcc1, Cyb5r3, Hebp1 and Prss45 in the testis of mice in the control group, BaP group and YSTLH group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	Xrcc1	Cyb5r3	Hebp1	Prss45
空白组	3	0.83±0.50	0.62±0.32	0.73±0.42	1.26±0.99
模型组	3	0.50±0.52 ^{a)}	0.65±0.26	0.39±0.32	0.71±0.25 ^{a)}
益肾通络方高剂量组	3	0.82±0.39 ^{b)}	0.55±0.04	0.29±0.07	0.94±0.51

注: Xrcc1, X线交叉互补修复基因1; Cyb5r3, 细胞色素b5还原酶3; Hebp1, 血红素结合蛋白1; Prss45, 丝氨酸蛋白酶45。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。



注: 每个点代表一个基因或蛋白, 黑点代表无差异表达的基因或蛋白, 红点代表趋势一致或相反的基因或蛋白, 绿点代表基因差异表达但蛋白无差异表达的基因及蛋白, 蓝点代表基因无差异表达但蛋白差异表达的基因及蛋白。

图8 模型组与益肾通络方高剂量组小鼠睾丸转录组学和蛋白组学比较九象限图(Log2)

Figure 8 Nine-quadrant diagram analysis between transcriptomic and proteomic data of the mice testes in the BaP group and YSTLH group (Log2)

的临床疗效^[15]。益肾通络方全方以补肾填精、活血通络立法。方中菟丝子甘平入肾,可补肾填精,鼓动肾气;淫羊藿甘温入肾,补肾助阳;二者共为君药。熟地黄甘微温,温而不燥,入肝肾二经,有滋血补阴生精益髓之效;丹参苦微寒,入血分而擅活血通经,二者共为臣药。水蛭咸苦平,擅于破血逐瘀通经;黄芪甘温,可以益气升阳,又可防丹参、水蛭破血伤正,二者共为佐药。川牛膝性味苦平,活血通经,消肿止痛,可引药下行,直达病所,为使药。诸药合用,共奏补肾填精、活血化瘀通经之效。本研究结果显示,模型组精子DFI明显高于空白组,而益肾通络方高剂量组能显著降低模型小鼠精子DFI,高剂量为临床等效剂量,说明益肾通络方可改善精子DNA损伤。

本研究采用转录组学及蛋白组学对基因及蛋白表达谱进行高通量筛选,能全面筛选出益肾通络方起作用的靶基因。两组学共筛选出1272个DEGs和1309个DEPs。趋势分析筛选出的谱2和谱5主要富集在铂耐药及凋亡等通路。九象限法筛选出Hebp1、Xrcc1、Cyb5r3和Prss45靶基因,经Western blot验证后发现益肾通络方高剂量组小鼠睾丸组织Xrcc1蛋白表达较模型组显著上调。已经有研究显示,Xrcc1基因在睾丸中的表达明显高于其他组织,并参与了男性生殖细胞的生理活动^[16]。由于Xrcc1在维持细胞DNA修复能力方面的重要作用,缺失Xrcc1可能会增加环境暴露对精子DNA损伤的易感性^[17]。因此,Xrcc1可能是益肾通络方改善精子DNA损伤的靶点。

综上所述,益肾通络方可以修复由苯并(a)芘造成的精子DNA损伤,其机制可能与耐药、凋亡等通路及Xrcc1有关。本研究样本量较少,某些数据稍显离散。在今后的研究中,应进一步增加样本量,深入分析益肾通络方修复由苯并(a)芘染毒引起的精子DNA损伤的机制。

参考文献

- [1] CHOY JT, EISENBERG ML. Male infertility as a window to health[J]. Fertil Steril, 2018, 110(5): 810-814.
- [2] 周志辉, 李梅芳. 男性不育症1142例患者精液检验的临床意义分析[J]. 当代医学, 2013, 19(22): 46-47.
- [3] TALEBI AR, VAHIDI S, AFLATOONIAN A, et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions[J]. Andrologia, 2012, 44: 462-470. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01206.
- [4] BRONET F, MARTINEZ E, GAYTAN M, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients[J]. Hum Reprod, 2012, 27(7): 1922-1929.
- [5] 蒋轶伦. 中国城市典型大气污染物的来源、形成机制及其对大气质量和近海生产力的影响[D]. 上海: 复旦大

- 学, 2011.
- [6]贾小花. 太原市大气气溶胶 PM_{2.5} 中有机物的现状分析[D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [7]韩雪. 重庆及三峡库区多环芳烃和邻苯二甲酸酯类物质环境暴露对男性生殖器损害的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2011.
- [8]JENG HA, YORDT D, DAVIS S, et al. Assessment of alteration of reproductive system in vivo induced by sub-chronic exposure to Benzo(a)pyrene via oral administration [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30(1): 1-8.
- [9]门波, 孙自学, 王祖龙, 等. 益肾通络方治疗特发性弱精子症 80 例[J]. *中医研究*, 2014, 27(3): 22-24.
- [10]赵士忠, 张宸铭, 王祖龙, 等. 益肾通络方对苯并(a)芘致大鼠精子 DNA 损伤的修复机制[J]. *中华男科学杂志*, 2022, 28(4): 326-331.
- [11]张昊, 王祖龙, 王诗琦. 基于 BER 通路探讨益肾通络方对苯并(a)芘致精子 DNA 损伤的修复机制[J]. *中华男科学杂志*, 2021, 27(12): 1109-1112.
- [12]MEIER MJ, O'BRIEN JM, BEAL MA, et al. In Utero exposure to increases mutation burden in the soma and sperm of adult mice[J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125(1): 82-88.
- [13]NAIR AB, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human[J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27-31.
- [14]EVENSON DP. The sperm chromatin structure assay (SCSA (®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility[J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 169: 56-75. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.
- [15]孙自学, 门波, 曹永贺, 等. 益肾通络方联合手术治疗精索静脉曲张性不育 27 例[J]. *中医研究*, 2007, 20(3): 33-35.
- [16]SINGH V, MOHANTY SK, VERMA P, et al. XRCC1 deficiency correlates with increased DNA damage and male infertility [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 839: 1-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.01.004.
- [17]ZHAO WS, QUANSAH E, YUAN M, et al. Region-specific gene expression in the epididymis of Yak [J]. *Theriogenology*, 2019, 139: 132-146. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.006.

Multi-omic Study on Effect of *Yishen Tongluo Formula* (益肾通络方) on Testicular Target Gene in Benzo (a) pyrene-induced Sperm DNA Damage Model Mice

ZHAO Lina^{1,2}, ZHANG Chenming¹, MA Sicheng¹, SUN Zixue², MEN Bo²

1. The Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046; 2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Yishen Tongluo Formula* (益肾通络方, YSTL) on sperm DNA damage and the possible mechanism. **Methods** Forty ICR mice were randomly divided into control group, model group, YSTL low-dose (YSTLL), medium-dose (YSTLM) and high-dose (YSTLH) group, with 8 mice in each group. Except for the control group, mice were given 100 mg/(kg·d) of Benzo(a)pyrene (BaP) to replicate the sperm DNA damage model. The three YSTL groups were modeled in the morning, while received the decoction of YSTL at the dose of 5.95, 11.89 and 23.78 g/(kg·d) by gavage respectively in YSTLL, YSTLM and YSTLH groups; the control group and model group received 0.1 ml/10 g of normal saline by gavage; the administration lasted for 8 weeks in all groups. The sperm DNA fragmentation index (DFI) was detected. Transcriptome and proteome analysis were performed according to DFI results. Trend analysis, GO and KEGG analysis were performed based on the two omics results. The target genes of YSTL were screened out by nine quadrant method and verified by Western blotting. **Results** The DFI of the model group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). Compared to that in the model group, the DFI significantly decreased in the YSTLH group ($P < 0.01$), while there was not significant difference in the YSTLL and YSTLM groups ($P > 0.05$). Therefore, the transcriptome and proteome analysis were performed in the control group, model group, and YSTLH group. A total of 1272 differential expressed genes (DEGs) and 1309 differential expressed proteins (DEPs) were screened out. Eight trend types were screened out; as profile 2 was the gene/protein which was down-regulated in the model group and restored after the intervention of YSTL, and profile 5 was the one up-regulated in the model group and restored after the intervention of YSTL. Profile 2 and 5 were selected for further analysis. GO analysis showed that development process, intracellular part and molecular function regulation ranked first in the biological processes, cellular components and molecular function categories, respectively. The top five KEGG-enriched pathways of genes of profile 2 and profile 5 were platinum drug resistance, osteoclast differentiation, various cell apoptosis, apoptosis, and nonalcoholic fatty liver disease, while proteins were mainly enriched in systemic lupus erythematosus, nitrogen metabolism, protein digestion and absorption, African trypanosomiasis and B cell receptor signaling pathway. X-ray cross complementation repair gene 1 (Xrcc1), cytochrome b5 reductase 3 (Cyb5r3), hemopexin 1 (Hebp1), and serine protease 45 (Prss45) were screened out by the nine-quadrant method, and significant decreases were found of Xrcc1 and Prss45 protein expression in the testis of

the model group than the control group through Western blotting verification ($P < 0.05$). The expression of Xrcc1 in the YSTLH group was significantly up-regulated compared to the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** YSTL can repair sperm DNA damage caused by BaP exposure. The mechanism may be related to the pathways of drug resistance and apoptosis, as well as Xrcc1.

Keywords sperm; DNA damage; Yishen Tongluo Formula (益肾通络方); Benzo(a)pyrene; transcriptomics; proteomics

(收稿日期: 2022-08-28; 修回日期: 2022-12-23)

[编辑: 邓媛]

· 信 息 窗 ·

《中医杂志》2019—2022 年优秀学术论文评选揭晓

为贯彻落实习近平总书记关于办好一流学术期刊的重要指示,更好地发挥学术期刊的服务和引领作用,促进一流期刊建设,推动中医药事业高质量发展,《中医杂志》组织开展了 2019—2022 年优秀论文遴选活动。经过影响力指标初评遴选、编辑部评分及两轮专家评分推荐,最终确定 50 篇入选论文,其中特等奖 1 篇,一等奖 5 篇,二等奖 8 篇,三等奖 16 篇,优秀奖 20 篇(完整名单详见官网和微信公众号,按照发表时间排序)。

特等奖(1 篇)

1. 对中医药发展规律及特点的传承与创新认识. 黄璐琦. 2022, 63(17): 1601-1606.

一等奖(5 篇)

1. 中医体质与疾病相关性临床研究的方法学挑战和设计实施建议. 罗辉, 王琦. 2020, 61(1): 20-26.

2. 新型冠状病毒肺炎中医临床特征与辨证治疗初探. 王玉光, 齐文升, 马家驹, 阮连国, 卢幼然, 李旭成, 赵昕, 张忠德, 刘清泉. 2020, 61(4): 281-285.

3. 试析从寒疫论治新型冠状病毒肺炎. 范逸品, 王燕平, 张华敏, 王永炎. 2020, 61(5): 369-374.

4. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略. 仝小林, 李修洋, 赵林华, 李青伟, 杨映映, 林轶群, 丁齐又, 雷烨, 王强, 宋斌, 刘文科, 沈仕伟, 朱向东, 黄飞剑, 周毅德. 2020, 61(6): 465-470, 553.

5. 从湿毒疫论治新型冠状病毒肺炎. 郑文科, 张俊华, 杨丰文, 黄明, 苗青, 齐文升, 王玉光, 刘清泉, 张伯礼. 2020, 61(12): 1024-1028.

二等奖(8 篇)

1. “火郁发之”探微. 王靖怡, 高嘉良, 王阶. 2019, 60(13): 1081-1084.

2. 冠心病中医证候地域性特征的临床流行病学调查. 毕颖斐, 王贤良, 赵志强, 侯雅竹, 毛静远, 张伯礼. 2020, 61(5): 418-422, 461.

3. “清肺排毒汤”快速有效治疗新型冠状病毒肺炎的中医理论分析. 薛伯寿, 姚魁武, 薛燕星. 2020, 61(6): 461-462.

4. 姜良铎从“气不摄津”认识新型冠状病毒肺炎. 杨华升, 王兰. 2020, 61(7): 560-563, 593.

5. 中医肿瘤癌毒病机辨证体系的创建. 程海波, 李柳, 周学平, 叶放, 吴勉华. 2020, 61(20): 1767-1770.

6. 从浊毒理论的建立与应用谈中医学创新与发展. 李佃贵. 2020, 61(22): 1938-1940.

7. 脾胃病治疗中的“调中复衡”理论. 张北华, 张泰, 王凤云, 王萍, 马祥雪, 尹晓岚, 唐旭东. 2021, 62(9): 737-742.

8. 中医湿证与微炎症状态的相关性探讨. 陈雪吟, 康福琴, 杨丽虹, 何敏, 刘少南, 何怡瀚, 邓雪仪, 张蕾, 毛炜, 郭新峰. 2021, 62(21): 1841-1845, 1854.

三等奖(16 篇)

1. 中医药辅助治疗 600 例老年非小细胞肺癌患者的生存分析. 辛晓丽, 姜怡, 沈丽萍, 刘苓霜. 2019, 60(1): 31-35, 46.

2. 针刺联合三阶梯药物止痛法治疗癌性疼痛 40 例临床观察. 惠建荣, 张楠, 李煜, 鹿苗苗, 赵娟, 裴建, 傅勤慧, 刘保廷, 王院春. 2019, 60(2): 146-149.

3. 真实世界研究与中医临床疗效评价. 符宇, 邵明义, 燕树勋, 赵瑞霞, 余海滨, 崔伟峰, 王宇. 2019, 60(7): 546-550.

4. 近 20 年中药治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期组方用药规律文献研究. 李国栋, 牛洁, 吴志松, 龙杞, 焦扬. 2019, 60(7): 614-618.

5. 中药防感香囊对成人流行性感冒预防效果的随机对照预试验. 李立, 张弛, 崔鑫, 赵振宇, 许可, 李建良, 蓝怡, 刘佳妮, 闫世艳, 赵静. 2019, 60(20): 1747-1750.

6. 中医药治疗心血管疾病研究述评. 毛静远, 赵志强, 王贤良, 毕颖斐, 张伯礼. 2019, 60(21): 1801-1805.

7. 慢性阻塞性肺疾病中医分期分级防治策略. 李建生, 余学庆. 2019, 60(22): 1895-1899.

8. 梁晓春补益脾肾、活血泄浊治疗糖尿病肾病肾功能不全经验. 吴群励, 杨丹. 2020, 61(1): 17-19.

9. 辨证论治临床疗效评价的新思路、新方法与新策略. 刘保廷, 何丽云, 周雪忠, 张润顺. 2020, 61(2): 93-97.

10. 新型冠状病毒肺炎的中医认识与思考. 苗青, 丛晓东, 王冰, 王玉光, 张忠德. 2020, 61(4): 286-288.

11. 慢性萎缩性胃炎患者中医证候分型与癌变风险的相关性. 杨洋, 瞿先侯, 杨敏, 王欣, 孟曼, 魏玮. 2020, 61(4): 319-324.

12. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎作用的相关性. 刘清泉, 夏文广, 安长青, 李旭成, 王玉光, 苗青, 杨丰文, 张伯礼. 2020, 61(6): 463-464.

13. 脉络学说指导下的吴以岭防治冠心病心绞痛学术观点. 秘红英, 李红蓉, 赵齐飞, 房会文, 魏聪. 2020, 61(7): 573-577.

14. 中医综合治疗方案维持治疗晚期非小细胞肺癌的多中心、大样本、前瞻性队列研究. 王学谦, 侯炜, 郑佳彬, 林丽珠, 张洪亮, 解英, 蒋益兰, 李平, 王沈玉, 舒琦瑾, 王维, 李建柱, 李戈, 张美英, 林洪生. 2020, 61(8): 690-694.

15. 路志正从阴火论治干燥综合征经验. 程增玉, 徐浩东, 鹿枫韬, 唐晓颇. 2022, 63(6): 516-520.

16. 中医四诊智能化现状及关键技术探讨. 李红岩, 李灿, 郎许峰, 杨涛, 周作建, 战丽彬. 2022, 63(12): 1101-1108.