

## 苦参总黄酮对醋酸铅诱导小鼠睾丸间质细胞氧化应激的改善作用及对Keap1/Nrf2信号通路的影响

刘玥欣<sup>1</sup>, 来永巍<sup>1</sup>, 王艳春<sup>1</sup>, 徐博<sup>2</sup>, 路倩<sup>1</sup>, 安英<sup>2</sup>, 任旷<sup>1</sup>, 范红艳<sup>1</sup>

(1. 吉林医药学院药学院药理学教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林医药学院基础医学院机能实验室, 吉林 吉林 132013)

**[摘要]** **目的:** 观察苦参总黄酮(SF)对醋酸铅(LA)诱导的小鼠睾丸间质细胞TM3氧化应激的改善作用及其对KELCH样ECH相关蛋白1(Keap1)/细胞中核因子E2相关因子2(Nrf2)信号通路的影响, 探讨SF改善由LA诱导的TM3细胞氧化应激的相关作用机制。**方法:** 利用噻唑蓝(MTT)法检测不同浓度(0、10、20、50和80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) LA和不同浓度(0、12.5、25.0、50.0和80.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) SF分别干预24 h后的TM3细胞存活率; 将TM3细胞随机分为空白对照组、LA组、LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组。除空白对照组外, 其他各组均采用50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LA诱导TM3细胞24 h建立TM3细胞氧化应激模型, 其中LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组TM3细胞再分别给予12.5、25.0和50.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SF。利用MTT法检测TM3细胞存活率; WST-1法和硫代巴比妥酸(TBA)法检测TM3细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平; Western blotting法检测Nrf2、Keap1和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(Caspase-9)蛋白表达水平。**结果:** MTT法检测, 与0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LA组比较, 10、20、50和80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LA组TM3细胞存活率明显降低( $P<0.01$ ); 与0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SF组比较, 12.5、25.0、50.0和80.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SF组TM3细胞存活率明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 与LA组比较, LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组TM3细胞存活率明显升高( $P<0.01$ ); WST-1法和TBA法检测, 与LA组比较, LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组TM3细胞中SOD活性明显升高( $P<0.01$ ), MDA水平明显降低( $P<0.01$ ); Western blotting法检测, 与LA组比较, LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组TM3细胞中Nrf2蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ ), Keap1和Caspase-9蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ )。**结论:** SF对LA诱导TM3细胞氧化应激具有一定改善作用, 并可降低TM3细胞中Keap1蛋白表达水平, 升高TM3细胞中Nrf2蛋白表达水平。

**[关键词]** 苦参总黄酮; 醋酸铅; 睾丸间质细胞; 氧化应激; KELCH样ECH相关蛋白1; 核因子E2相关因子2

**[中图分类号]** R96 **[文献标志码]** A

## Improvement effect of total flavonoids of *Sophora flavescens* on oxidative stress induced by lead acetate in leydig cells in mice and its in effect on Keap1/Nrf2 signaling pathway

LIU Yuexin<sup>1</sup>, LAI Yongwei<sup>1</sup>, WANG Yanchun<sup>1</sup>, XU Bo<sup>2</sup>, LU Qian<sup>1</sup>, AN Ying<sup>2</sup>,

**[收稿日期]** 2023-03-13

**[基金项目]** 吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20210498KJ)

**[作者简介]** 刘玥欣(1991-), 女, 吉林省吉林市人, 讲师, 医学博士, 主要从事神经药理学方面的研究。

**[通信作者]** 范红艳, 教授(E-mail: 583888330@qq.com)

REN Kuang<sup>1</sup>, FAN Hongyan<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jilin University of Medicine, Jilin 132013, China;

2. Functional Laboratory, College of Basic Medical Sciences, Jilin University of Medicine,

Jilin 132013, China)

**ABSTRACT Objective:** To observe the improvement effect of total flavonoids of *Sophora flavescens* (SF) on the oxidative stress in the Leydig's cells TM3 of the mice induced by lead acetate (LA) and their influences on the Keap1/Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway, and to discuss the potential mechanism of the improvement effect of SF on oxidative stress in the LA-induced TM3 cells.

**Methods:** The survival rates of the TM3 cells after treated with various concentrations of LA (0, 10, 20, 50, and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and SF (0, 12.5, 25.0, 50.0, and 80.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h were detected by MTT assay. The TM3 cells were randomly divided into blank control group, LA group, LA + low dose of SF group, LA+middle dose of SF group, and LA+high dose of SF group. Except for blank control group, the TM3 cells in the other groups were induced with 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LA for 24 h to establish the oxidative stress model. The TM3 cells in LA+low dose of SF group, LA+middle dose of SF group, and LA+high dose of SF group were then treated with 12.5, 25.0, and 50.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SF, respectively. The survival rate of the TM3 cells was detected by MTT assay; the activities of superoxide dismutase (SOD) and levels of malondialdehyde (MDA) in the TM3 cells in various groups were detected by WST-1 assay and thiobarbituric acid (TBA) method; the expression levels of Nrf2, Keap1, and Caspase-9 proteins in the TM3 cells in various groups were detected by detected by Western blotting method. **Results:** The MTT assay results showed that compared with 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LA group, the survival rates of the TM3 cells in 10, 20, 50, and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LA groups were decreased ( $P<0.01$ ); compared with 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SF group, the survival rates of the TM3 cells in 12.5, 25.0, 50.0, and 80.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SF groups were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); compared with LA group, the survival rates of the TM3 cells in LA+low dose of SF group, LA+middle dose of SF group, and LA+high dose of SF group were significantly increased ( $P<0.01$ ). The WST-1 assay and TBA method results showed that compared with LA group, the SOD activities and MDA levels in the TM3 cells in LA+low dose of SF group, LA+middle dose of SF group, and LA+high dose of SF group were significantly decreased ( $P<0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with LA group, the expression levels of Nrf2 protein in the TM3 cells in LA+low dose of SF group, LA+middle dose of SF group, and LA+high dose of SF group were increased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of Keap1 and Caspase-9 proteins were decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** SF has certain improvement effect on the oxidative stress in the LA-induced TM3 cells and can reduce the expression level of Keap1 protein and increase the expression level of Nrf2 protein in the TM3 cells.

**KEYWORDS** Sophoral flavones; Lead acetate; Leydig's cell; Oxidative stress; Kelch-like ECH-associated protein 1; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

苦参总黄酮 (sophoral flavones, SF) 是豆科植物苦参干燥根中的一类主要有效成分, 包括二氢黄酮和二氢黄酮醇等<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明: SF具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗疟疾和神经保护等生物活性。SF可通过调节影响精子发育相关的激素和能量代谢酶的水平, 从而对生精障碍模型小鼠产生保护作用, 其作用机制可能与其抗氧化作用有关<sup>[4]</sup>, 但SF是否通过影响KELCH状ECH相关蛋白1

(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) /核因子E2相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路而产生抗氧化应激作用尚未见研究报道。醋酸铅 (lead acetate, LA) 属于化学性质稳定的重金属毒物, LA能够减少细胞内抗氧化酶的活性及抗氧化物质的含量, 从而引起细胞内的氧化损伤, 故LA的毒性与氧化应激及其所致氧化损伤密切相关<sup>[5-6]</sup>。Keap1/Nrf2信号通路是

细胞参与并调节抗氧化应激反应的主要信号通路,影响Keap1/Nrf2信号通路能够增加细胞内抗氧化反应基因表达水平,降低含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(cysteiny aspartate specific proteinase-9, Caspase-9)的活化,从而减少细胞凋亡<sup>[7-9]</sup>。本研究通过构建LA诱导的小鼠睾丸间质细胞TM3氧化应激模型<sup>[10-12]</sup>,探讨SF对LA诱导的TM3细胞氧化应激的改善作用,为SF的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** TM3细胞购自中国细胞资源库;SF(纯度>80%) (西安草翠芯生物科技有限公司),LA(上海希格玛高技术有限公司),高糖DMEM培养基、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、双抗和胰蛋白酶(美国Gibco公司),噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium, MTT)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),Keap1抗体、Nrf2抗体和Caspase-9抗体及全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、5×蛋白上样缓冲液、凝胶制备试剂盒、彩虹245广谱蛋白Marker以及ECL化学发光法检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),电泳液、转膜液、缓冲液、封闭液、一抗稀释液和二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);二氧化碳培养箱(型号:311)和酶标仪(型号:SUNERGY-HTX)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],倒置显微镜(型号:CKX4,日本Olympus公司),电泳仪、电转仪和电泳槽(型号:BE6085,美国Bio-Rad公司),凝胶成像仪(型号:Alliance Q9,英国UVItec公司)。

**1.2 TM3细胞培养** 将TM3细胞放置于10% FBS+1%双抗+DMEM高糖培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的恒温密闭培养箱中进行常规培养并传代。

**1.3 MTT法检测LA和SF分别诱导的TM3细胞存活率** 选取生长状态良好、呈对数生长期的TM3细胞,分为0、10、20、50和80μmol·L<sup>-1</sup>LA组以及0、12.5、25.0、50.0和80.0mg·L<sup>-1</sup>SF组。按照每孔8×10<sup>3</sup>个细胞的密度将细胞混悬液接种于96孔细胞培养板上,待培养密度至80%,各组分别给予不同浓度LA和SF,继续培养24h。加入

20% MTT继续培养4h,弃去上清液,加入150μL DMSO振荡10min,用酶标仪在490nm处检测吸光度(A)值。细胞存活率=[(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)]×100%。

**1.4 TM3细胞氧化应激模型的制备及分组** 选取生长状态良好、呈对数生长期的TM3细胞,分为空白对照组、LA组、LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组。除空白对照组外,其他各组均采用50μmol·L<sup>-1</sup>LA诱导TM3细胞24h建立TM3细胞氧化应激模型,其中LA+低剂量SF组、LA+中剂量SF组和LA+高剂量SF组再分别给予12.5、25.0和50.0mg·L<sup>-1</sup>SF,置于培养箱中培养24h<sup>[13-14]</sup>。

**1.5 MTT法检测各组TM3细胞存活率** 利用MTT法检测“1.4”中TM3细胞存活率,具体操作方法参照“1.3”。

**1.6 WST-1法和硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法检测各组细胞中SOD活性及MDA水平** 各组TM3细胞经药物处理后,分别加入200μL细胞裂解液在冰上裂解30min,再次12000r·min<sup>-1</sup>离心10min,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒使用说明书要求对TM3细胞进行定量检测,按照试剂盒说明书要求检测TM3细胞中SOD活性和MDA水平。根据试剂盒说明书中公式计算SOD活性和MDA水平:SOD抑制率=[(对照组A值-空白组A值)-(测定组A值-空白组A值)]/(对照组A值-空白组A值)×100%;SOD活性(U·mg<sup>-1</sup>)=SOD抑制率/50%×反应体系稀释倍数(0.24L/0.02L)×样本测试前稀释倍数。MDA水平(μmol·g<sup>-1</sup>)=[(测定组A值-空白组A值)/(标准品组A值-空白组A值)]×标准品浓度/样本蛋白浓度。

**1.7 Western blotting法检测各组细胞中Keap1、Nrf2和Caspase-9蛋白表达水平** 按照全蛋白提取试剂盒说明书要求提取细胞蛋白,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书要求测定细胞蛋白表达水平,摇匀后100℃水浴加热10min,置于-80℃超低温冰箱保存、备用。按照SDS-PAGE凝胶制备试剂盒要求制备胶板,上样后,电泳(浓缩胶:90V,分离胶:110V)、转膜(110V、60min)、清洗(缓冲液:每次5min、清洗3次)、封闭(脱脂牛奶:1h)、加入一抗(Keap1、Nrf2和

Caspase-9: 4 °C、24 h)、加入二抗 (HRP: 1 h)、清洗 (缓冲液: 每次 5 min、清洗 3 次)、显色 (按照 ECL 化学发光法检测试剂盒要求配制显色液), 置于凝胶成像仪中成像, 利用 Image J 图像处理软件对蛋白条带进行分析。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参照蛋白条带灰度值。

**1.8 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。各组 TM3 细胞存活率, 细胞中 SOD 活性和 MDA 水平及 Keap1、Nrf2 和 Caspase-9 蛋白表达水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 LA 诱导的 TM3 细胞存活率** 与  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  LA 组 ( $100.00\% \pm 0.01\%$ ) 比较, 10、20、50 和  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  LA 组 TM3 细胞存活率 ( $73.90\% \pm 0.03\%$ 、 $66.91\% \pm 0.02\%$ 、 $57.78\% \pm 0.03\%$  和  $39.13\% \pm 0.02\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ )。其中  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  LA 组细胞存活率下降至 ( $57.78 \pm 0.03$ )%, 该浓度是存活率下降近半数时的抑制浓度, 可用来衡量药物对细胞的毒性或者细胞对药物的耐受能力, 故本实验选用  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  LA 作为后续实验浓度。

**2.2 SF 诱导的 TM3 细胞存活率** 与  $0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  SF 组 ( $100.00\% \pm 0.01\%$ ) 比较, 12.5、25.0、50.0 和  $80.0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  SF 组 TM3 细胞存活率 ( $99.13\% \pm 0.01\%$ 、 $98.90\% \pm 0.01\%$ 、 $97.58\% \pm 0.02\%$  和  $72.73\% \pm 0.05\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

**2.3 各组 TM3 细胞存活率** 与空白对照组 ( $100.00\% \pm 0.01\%$ ) 比较, LA 组细胞存活率 ( $56.50\% \pm 0.01\%$ ) 明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 LA 组比较, LA+低剂量 SF 组、LA+中剂量 SF 组和 LA+高剂量 SF 组细胞存活率 ( $60.90\% \pm 0.02\%$ 、 $66.98\% \pm 0.02\%$  和  $77.50\% \pm 0.02\%$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。

**2.4 各组 TM3 细胞中 SOD 活性和 MDA 水平** 与空白对照组比较, LA 组 TM3 细胞中 SOD 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ), MDA 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 LA 组比较, LA+低剂量 SF 组、LA+中剂量 SF 组和 LA+高剂量 SF 组 TM3 细胞中 SOD 活性明显升高 ( $P < 0.01$ ), MDA 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

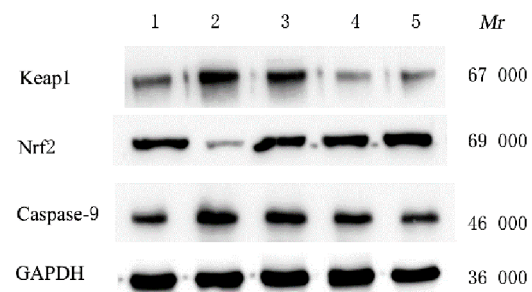
表 1 各组 TM3 细胞中 SOD 活性和 MDA 水平

Tab. 1 Activities of SOD and levels of MDA in TM3 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Activity of SOD [ $\lambda_B / (\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ ]	Level of MDA [ $m_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$ ]
Control	$40.03 \pm 0.19$	$0.10 \pm 0.04$
LA	$35.41 \pm 0.71^*$	$0.35 \pm 0.01^*$
LA + low dose of SF	$36.55 \pm 0.13^\Delta$	$0.32 \pm 0.01^\Delta$
LA + middle dose of SF	$37.48 \pm 0.09^\Delta$	$0.27 \pm 0.02^\Delta$
LA + high dose of SF	$38.68 \pm 0.09^\Delta$	$0.14 \pm 0.01^\Delta$

\* $P < 0.01$  vs control group;  $^\Delta P < 0.01$  vs LA group.

**2.5 各组 TM3 细胞中 Keap1、Nrf2 和 Caspase-9 蛋白表达水平** 与空白对照组比较, LA 组 TM3 细胞中 Nrf2 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), Keap1 和 Caspase-9 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 LA 组比较, LA+低剂量 SF 组、LA+中剂量 SF 组和 LA+高剂量 SF 组细胞中 Nrf2 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), Keap1 和 Caspase-9 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图 1 和表 2。



Lane 1: Control group; Lane 2: LA group; Lane 3: LA + low dose of SF group; Lane 4: LA + middle dose of SF group; Lane 5: LA + high dose of SF group.

图 1 各组 TM3 细胞中 Keap1、Nrf2 和 Caspase-9 蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of expressions of Keap1, Nrf2, and Caspase-9 proteins in TM3 cells in various groups

## 3 讨论

睾丸生精小管之间分布的疏松结缔组织称为睾丸间质或间质组织, 在间质中有一种合成雄激素的内分泌细胞称为睾丸间质细胞, 能够合成分泌雄性激素, 促进精子的发生和男性生殖器官发育, 以及维持第二性征和性功能<sup>[15-16]</sup>。LA 是生活中应用广泛、具有毒性的化工原料, 可作为制备各种铅盐、抗污涂料、水质防护剂、颜料填充剂、涂料干燥

剂、纤维染色剂以及重金属氰化过程的溶剂等<sup>[17]</sup>, 而LA长期蓄积在环境中, 会严重危害人体健康。研究<sup>[18-20]</sup>表明: LA能够使小鼠精子密度和精子活

力明显下降, 精子畸形率增高, 导致小鼠睾丸受损影响其生殖功能。

表2 各组TM3细胞中Keap1、Nrf2和Caspase-9蛋白表达水平

Tab. 2 Expression levels of Keap1, Nrf2, and, Caspase-9 proteins in TM3 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Keap1 protein	Nrf2 protein	Caspase-9 protein
Control	0.27±0.01	2.57±0.09	0.30±0.01
LA	0.57±0.02*	1.58±0.11*	0.60±0.01*
LA+low dose of SF	0.45±0.02 <sup>△△</sup>	1.60±0.22	0.49±0.02 <sup>△△</sup>
LA+middle dose of SF	0.18±0.01 <sup>△△</sup>	1.87±0.12 <sup>△</sup>	0.38±0.02 <sup>△△</sup>
LA+high dose of SF	0.13±0.01 <sup>△△</sup>	2.42±0.23 <sup>△△</sup>	0.30±0.02 <sup>△△</sup>

\* $P<0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$  vs LA group.

中药材苦参是豆科植物苦参的干燥根, 具有清热燥湿、利尿和祛风杀虫等功效, 含多种生物碱和多种黄酮类化合物<sup>[1-3]</sup>。SF作为其活性成分之一, 主要包括二氢黄酮和二氢黄酮醇类化合物<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[21]</sup>表明: SF可明显改善前列腺增生模型大鼠血清中促黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)和双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)水平, 减轻大鼠前列腺和精囊腺质量, 对良性前列腺增生具有明显改善作用。研究<sup>[4, 13]</sup>结果显示: SF对LA所致雄性小鼠睾丸损伤有一定的保护作用, 可以影响与其精子发育相关的激素及能量代谢酶的含量, 但其具体机制尚不明确。本研究采用LA诱导TM3细胞构建TM3细胞氧化应激模型, 结果表明: 12.5~50.0 mg·L<sup>-1</sup> SF可以改善由LA引起的TM3细胞存活率的降低, 且随着SF的浓度升高, TM3细胞增殖作用加强。

SOD是机体内天然存在的超氧自由基清除因子, 具有抗氧化和抗衰老作用, 能够消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质<sup>[22-23]</sup>。研究<sup>[24]</sup>表明: SOD基因表达水平升高, 能够使晚期凋亡的TM3细胞明显减少。干扰抗氧化酶SOD活性, 能够引起脂质过氧化物MDA在体内蓄积, 升高氧自由基含量, 诱导TM3细胞发生氧化应激反应, 加剧细胞损伤<sup>[25]</sup>。本研究结果显示: 12.5~50.0 mg·L<sup>-1</sup> SF能够使LA诱导的TM3细胞中SOD活性升高, MDA水平降低, 调节TM3细胞在氧化应激过程中引起的异常指标的变化。

Keap1/Nrf2信号通路在生理状态下, Keap1可通过泛素化降解Nrf2。而当活性氧产生与清除的平

衡被破坏时, Keap1则会失活, 导致Nrf2清除受阻, 引起Nrf2的过度蓄积和激活, 并转位到细胞核中, 调节抗氧化应激相关基因的表达<sup>[7-8]</sup>。Caspase-9是存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶, 参与细胞的生长、分化与凋亡调节<sup>[26-27]</sup>。研究<sup>[28]</sup>表明: Caspase-9表达受到Keap1/Nrf2信号通路的调控, 当Keap1/Nrf2信号通路表达受阻, 会引起Caspase-9蛋白表达水平升高, 诱导生殖细胞出现凋亡。本研究结果显示: 12.5~50.0 mg·L<sup>-1</sup> SF能够使LA诱导的TM3细胞中Nrf2蛋白表达水平明显升高, Keap1和Caspase-9蛋白表达水平明显降低, 改善由LA诱导的TM3细胞产生的氧化应激。

综上所述, SF可以改善由LA诱导的TM3细胞所引起的细胞存活率的降低, 能够使TM3细胞中SOD活性升高, MDA水平降低, 对TM3细胞出现的氧化应激具有改善作用, 提示SF对LA诱导的TM3细胞氧化应激的改善作用可能与影响Keap1/Nrf2信号通路有关。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

范红艳、任旷和王艳春负责论文的整体设计, 刘玥欣负责论文的撰写, 来永巍、路倩、徐博和安英负责论文的统计学分析。

#### [参考文献]

- [1] 熊乐乐, 张静, 邓维. 苦参的主要成分及质谱裂解规律研究进展[J]. 药品评价, 2022, 19(13): 823-829.
- [2] 宁娜, 韩建军, 李广平, 等. 苦参总黄酮提取工艺研

- 究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(5): 90, 92.
- [3] 马雪宁, 杨素清, 张君成, 等. 苦参药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(1): 152-156.
- [4] 范红艳, 任 旷, 沈 楠, 等. 苦参总黄酮对醋酸铅所致雄性小鼠生精障碍的影响[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(1): 18-22.
- [5] 周 蓉, 徐雅虹, 陈闽东, 等. HO-1对醋酸铅诱导肾小管上皮细胞氧化应激的保护机制[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(1): 12-16.
- [6] 任晓慧. 铅致原代培养大鼠皮质神经细胞氧化应激损伤及JWA mRNA表达改变[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [7] 梁新妹, 王云平, 李 丹, 等. Keap1-Nrf2信号通路在机体氧化应激损伤防护中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2022, 19(35): 40-44.
- [8] 曾婷婷, 李学智, 唐成林, 等. 电针对睾酮低下老年大鼠Keap1-Nrf2/ARE信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(11): 1359-1364.
- [9] ZHAO G F, WANG Y, LAI Z Y, et al. Echinacoside protects against dysfunction of spermatogenesis through the MAPK signaling pathway[J]. *Reprod Sci*, 2022, 29(5): 1586-1596.
- [10] 王 莺. 松果菊苷治疗大鼠生精功能障碍的疗效和机制研究[D]. 延吉: 延边大学, 2020.
- [11] 刘 茜. PGC-1 $\alpha$ 在铅致睾丸支持细胞氧化应激与能量代谢中的作用[D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [12] ZHOU L, WANG S S, CAO L N, et al. Lead acetate induces apoptosis in Leydig cells by activating PPAR $\gamma$ /caspase-3/PARP pathway[J]. *Int J Environ Health Res*, 2021, 31(1): 34-44.
- [13] 范红艳, 任 旷, 王艳春, 等. 苦参总黄酮对醋酸铅诱导雄性小鼠睾丸损伤的影响[J]. 中药材, 2014, 37(12): 2279-2281.
- [14] 时金玲. 醋酸铅对体外培养小鼠睾丸间质细胞的毒性作用及凋亡机理的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- [15] 朱清玉, 郭乐薇, 刘红羽, 等. 睾丸间质细胞睾酮合成机制的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(5): 28-33.
- [16] ROYCHOUDHURY S, CHAKRABORTY S, CHOUDHURY A P, et al. Environmental factors-induced oxidative stress: hormonal and molecular pathway disruptions in hypogonadism and erectile dysfunction[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(6): 837.
- [17] 陕 光, 张孝斌, 杨嗣星. 维生素C和B<sub>1</sub>对铅致小鼠睾丸损伤保护作用研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(4): 394-400.
- [18] ALYAMI N M, ALMEER R, ALYAMI H M. Protective effects of *Asparagus officinalis* (asparagus) against lead toxicity in mice[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(7): 18718-18730.
- [19] ZHENG X Q, WEI Y X, CHEN J D, et al. Difenoconazole exposure induces retinoic acid signaling dysregulation and testicular injury in mice testes[J]. *Toxics*, 2023, 11(4): 328.
- [20] 赵东海, 赵贵芳, 马 帅, 等. 松果菊苷对醋酸铅致生精功能损伤小鼠的治疗作用[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(6): 83-86.
- [21] 汪兴生, 解光艳, 史学礼, 等. 苦参总黄酮对良性前列腺增生模型大鼠生殖内分泌的影响[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 169-170.
- [22] 赵 莹, 游普云, 盛誉妍, 等. 四种生物活性肽对顺铂所致小鼠肾毒性和骨髓抑制毒性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2023, 58(3): 341-345.
- [23] 陈 琰, 胡文慧, 李兴元, 等. 氰戊菊酯对大鼠睾丸Leydig细胞睾酮合成的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(4): 403-410.
- [24] 李 娇. 自噬/Nrf2信号通路在锰致睾丸间质细胞氧化损伤中的相互调控机制研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [25] 许晴雨, 许静怡, 蔡沛蓉, 等. 去乙酰化酶SIRT1在玉米赤霉烯酮致小鼠睾丸间质细胞氧化损伤中的调控作用[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(8): 63-68.
- [26] LAPCIK P, VESELA B, POTESIL D, et al. DiaPASEF proteotype analysis indicates changes in cell growth and metabolic switch induced by caspase-9 inhibition in chondrogenic cells[J]. *Proteomics*, 2023, 23(11): e2200408.
- [27] HOSSEINI A, POURHEIDAR E, RAJABIAN A, et al. Linalool attenuated ischemic injury in PC12 cells through inhibition of caspase-3 and caspase-9 during apoptosis[J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(1): 249-260.
- [28] 何 刘, 李 慧, 周厚继, 等. 槲皮素通过影响Nrf2-Keap1信号通路减缓镉中毒大鼠的生殖机能损伤[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(5): 1037-1046.