

# 睾丸 *Clock* 基因下调后小鼠精子前向运动百分率降低的机制

王禹蒙 成姝婷 后望 骆芷寒 代泽咏 江舟 肖静 汪宇辉 郭慧玲 刘延友

(四川大学华西基础医学与法医学院·国家卫生健康委员会时间生物学重点实验室, 四川 成都 610041)

**【摘要】** 目的 通过对睾丸精子超微结构的观察和实验室前期数据的生物信息学再分析, 探讨睾丸 *Clock* 基因下调使小鼠精子前向运动百分率降低的机制。方法 选取 SPF 级 ICR 雄性小鼠(8 周龄)14 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 6 只, 另 2 只小鼠作为免疫共沉淀实验样本。获取小鼠 *Clock* 基因下调的睾丸组织, 透射电镜观察其中精子的超微结构。结合对实验室前期数据再分析的结果, ELISA 检测睾丸组织中  $\alpha$ -KGDH 的活性, 并以 RT-qPCR 检测睾丸中二氢硫辛酸脱氢酶(DLD)的转录组水平。最后在野生型小鼠睾丸组织中验证 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白的相互作用关系。结果 与对照组相比, 实验组 *Clock* 基因的表达显著降低( $P < 0.001$ ); 实验组睾丸中精子细胞线粒体形态和排列出现异常; 差异蛋白的 GO 和 KEGG 富集分析提示, 实验组精子线粒体中三羧酸循环限速酶  $\alpha$ -KGDH 的亚基构成蛋白之一的 DLD 明显下调 ( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 实验组睾丸  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体( $\alpha$ -KGDH)酶活性明显降低( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 实验组睾丸 *Dld* 基因 mRNA 水平也明显下调( $P < 0.05$ ); 而野生型小鼠睾丸中 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白能够相互作用。结论 睾丸 *Clock* 基因的下调可导致小鼠精子线粒体结构和功能蛋白发生改变, 从而限制了线粒体能量的产出, 最终导致精子前向运动百分率降低。

**【关键词】** 睾丸; *Clock* 基因; 精子前向运动百分率; 线粒体; 能量代谢

**【中图分类号】** R339.2<sup>+</sup>1 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.10.002

## Mechanism of decreasing the percentage of mouse sperm forward motility after down-regulation of the clock gene in the testis

WANG Yumeng, CHENG Shuting, HOU Wang, LUO Zhihan, DAI Zeyong, JIANG Zhou, XIAO Jing,

WANG Yuhui, GUO Huiling, LIU Yanyou

(Health Ministry Key Laboratory of Chronobiology, West China School of Basic Medical Sciences, Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**【Abstract】** **Objective** Through the observation of the ultrastructure of testicular sperm and the bioinformatics re-analysis of preliminary laboratory data, to study the mechanism by which the down-regulation of the testicular *Clock* gene reduces the percentage of forward sperm movement in mouse. **Methods** Twenty male SPF ICR mice (8 weeks old) were randomly divided into experimental group, the control group, with 6 mice in each group, and the other 2 mice were used as the samples of co-immunoprecipitation experiment. Get *Clock* genes in mice testicular tissue, tem observation of the ultrastructure of sperm. The activity of  $\alpha$ -KGDH in the testicular tissue was detected with ELISA, and the transcriptome level of dihydrolipoic acid dehydrogenase (DLD) in the testicular tissue was detected with RT-qPCR. Finally, the interaction between CLOCK protein and DLD protein was verified in testicular tissue of wild-type mice. **Results** The morphology and arrangement of sperm cell mitochondria in the testis of the experimental group were abnormal. The GO and KEGG enrichment analysis of differential proteins indicated that DLD, one of the subunit constituent proteins of the TCA-cycle's rate-limiting enzyme  $\alpha$ -KGDH, was significantly down-regulated in the sperm mitochondria of the experimental group. The  $\alpha$ -KGDH enzyme activity in the testis of the experimental group was significantly reduced. The mRNA level of *Dld*

通信作者: 刘延友, 教授, E-mail: liuyanyou@126.com

引用本文: 王禹蒙, 成姝婷, 后望, 等. 睾丸 *Clock* 基因下调后小鼠精子前向运动百分率降低的机制[J]. 西部医学, 2022, 34(10): 1409-1413, 1419.

DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.10.002

gene in the testis was also significantly down-regulated in the experimental group. And the testis CLOCK protein and DLD protein can interact with each other in the wild type mouse. **Conclusion** Down-regulation of the Clock gene in the testis can lead to changes in the structure and functional protein of mouse sperm mitochondria, which limits the energy output of mitochondria and ultimately leads to a decrease in the percentage of forward sperm movement.

**[Key words]** Testis; Clock gene; Sperm progressive motility rate; Mitochondria; Energy metabolism

近日节律是生物体为适应周期变化的自然环境而产生的重要生理机制<sup>[1]</sup>。研究证明,近日节律系统与包括人类在内的哺乳动物的生殖具有十分密切的关系。为了更好的生存,物种通过漫长的进化将繁殖时间优化在具有温和天气的季节与充足的食物供应期内<sup>[2]</sup>,这需要近日节律系统对昼夜长度变化以及环境温度变化具有精确的检测能力<sup>[3]</sup>。*Clock*(Circadian locomotor output cycles kaput)基因作为一种核心近日钟基因也在男性生殖中具有重要的作用<sup>[4]</sup>。不仅 *Clock* 19/19 突变可导致雄性小鼠生殖力受损,睾丸 *Clock* 基因表达量的下调也可显著降低雄性小鼠的生殖能力<sup>[5-6]</sup>。在本实验室前期研究中,发现特异性敲降小鼠睾丸 *Clock* 基因后,雄鼠子代数量显著减少可能是由于顶体蛋白酶活性降低而引起的受精率低下所致<sup>[7]</sup>。此外,我们还观察到睾丸 *Clock* 基因敲降后小鼠精子的前向运动百分率显著降低。精子的前向运动(Progressive motility, PR)是指精子细胞能够积极地以线性方式或者大直径圆周方式向前运动<sup>[8]</sup>,是反映精子运动能力的一个重要指标,精子颈段或者尾段出现缺陷会导致精子细胞的前向运动能力受损,从而使精子难以突破雌性生殖道内不利的环境<sup>[9]</sup>。作为男性不育的一个可能因素,精子前向运动与 *Clock* 基因的关系研究报道尚少。本研究从小鼠睾丸组织的超微结构和睾丸 *Clock* 基因敲降小鼠精子差异蛋白功能聚类出发,探讨睾丸 *Clock* 基因对精子结构的影响以及可能的调节机制,为今后研究近日节律系统与男性生殖系统的关系提供一些思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 ICR 雄性小鼠(8 周龄)14 只,购自成都达硕实验动物有限公司。所有小鼠随机分为实验组和对照组,每组 6 只,另 2 只小鼠作为免疫共沉淀实验样本。小鼠饲养于 25℃ 12L:12D 的光暗循环箱中,自由进食饮水。正式实验前小鼠先经过一周的环境适应。本研究经过医院伦理委员会审核通过。

1.1.2 实验试剂 *Clock* 干扰质粒和阴性对照质粒(广州复能基因有限公司);细菌质粒提取试剂盒(美国 OMEGA);Polyplusin vivo-jetPEI 体内转染试剂(法国, Polyplus Transferion);*Clock* 敲降 shRNA 慢病毒[云舟生物科技(广州)有限公司];组织 RNA 提

取试剂盒(成都福际生物技术有限公司);RNA 逆转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);小鼠  $\alpha$ -KGDH 酶联反应分析试剂盒(江苏酶免实业有限公司);Protein A+G 磁珠(上海碧云天生物技术有限公司);CLOCK Rabbit mAb(美国, Cell Signaling Technology);CD274 Polyclonal Antibody(爱必信(上海)生物科技有限公司);DLD Polyclonal Antibody(中国, Proteintech Group);电镜固定液(美国, ThermoFisher Scientific);其它试剂为国产分析纯,引物合成于上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 实时荧光定量 PCR 仪(美国, Bio-Rad technologies);超微量紫外-可见光分光光度计 Nanodrop One(美国, ThermoFisher);低温高速台式离心机(德国, Eppendorf);全波长酶标仪(MD, 美国);PCR 仪(杭州博日科技有限公司);微量注射器和手术器械等均为国产。

### 1.2 实验方法

1.2.1 获得质粒转染后睾丸样本 本实验采用脂质体包裹质粒后注射到睾丸的瞬时转染方法得到睾丸 *Clock* 基因下调的小鼠模型,由于该干扰质粒敲降效果在注射转染后第 3 d 达到峰值,故在第 3 d 获取睾丸样本。使用腹腔注射 4% 水合氯醛方式麻醉小鼠,每只小鼠注射 10% 水合氯醛 200  $\mu$ L,按照 Polyplus in vivo-jetPEI 体内转染试剂说明书,分别将 *Clock* 干扰质粒和阴性对照质粒的质粒-脂质体混合物用微量注射器注射入两组小鼠双侧睾丸中。继续饲养 3 d 后,颈椎脱臼法处死小鼠,撕开小鼠腹部皮肤后摘取双侧睾丸。去除睾丸鞘膜及白膜后即刻切取一侧睾丸中段放入室温的电镜固定液,将剩余的睾丸组织-80℃ 冷冻保存待检。

1.2.2 透射电镜检查 睾丸组织在电镜固定液中 30 min 后,将变硬的组织取出用手术刀切为薄片,再次放入电镜固定液中 4℃ 固定 3 h。装有睾丸样本的容器采用冰袋冷藏运输的方式送至武汉塞维爾生物科技有限公司完成制片和透射电镜扫描成像。

1.2.3 小鼠 *Clock* 基因下调睾丸的精子蛋白组 数据再分析实验室前期曾对小鼠 *Clock* 基因下调睾丸的精子进行了蛋白组检测,我们将其差异表达基因(DEGs)数据导入 DAVID 在线分析工具(<https://da->

vid.ncifcrf.gov/summary.jsp) 进行 GO 和 KEGG 的功能富集分析,其中 GO 包括 BP(生物学功能)、CC(细胞组分)和 MF(分子功能)。所得结果按照假阳性率(FDR)<0.001 进行筛选。根据筛选结果选择关键基因进行后续验证。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 每只雄鼠样本取出约 100 mg -80℃ 冷冻的睾丸组织,液氮冷冻研磨成粉,并用组织 RNA 提取试剂盒按提取组织总 RNA。使用 Nanodrop One 检测总 RNA 的浓度与纯度,并以 RNA 逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA。使用 RT-qPCR 试剂盒对睾丸中的 *Clock* 基因和 *Dld* 基因表达量进行检测。实时荧光定量 PCR 仪系统设置如下:95℃ 5 min 预变性;95℃ 10sec/60℃ 30sec 循环反应(共 40 个循环);仪器默认程序采集溶解曲线。引物序列如下: *Clock*Forward: ATGGTGTTCACCGTAAGCTGTAG, *Clock*Reverse: CTCGCGTTACCA GGAAGCAT; *Dld* Forward: CGATGGCAGCACTCAGGTTA, *Dld* Reverse: CTGAACCCAGTTCCACA CCA; *Gapdh*Forward: TGCGACTTCAACAGCAAC TC, *Gapdh*Reverse: ATGTAGGCAATGAGGTCCAC。

1.2.5 酶联免疫吸附测定(ELISA) 每只雄鼠样本取出约 1 g -80℃ 冷冻的睾丸组织,加入 9 mL PBS 缓冲液在冰上进行匀浆;转移匀浆液至离心管中,4℃ 2500 rpm 离心 20 min,去除上清液,收集沉淀;用 PBS 缓冲液洗涤沉淀 3 次后,在冰上使用超声破碎仪进行细胞破碎(设置工作 2 s,冷却 30 s),破碎后液体在 4℃ 2500 rpm 离心 20 min,收集上清液用于  $\alpha$ -KGDH 活性的 ELISA 检测。按照小鼠  $\alpha$ -KGDH 酶联反应分析试剂盒说明书步骤进行上样、加酶、洗涤显色等操作,并以酶标仪 450 nm 波长测量吸光度。每个样本设置 3 复孔。

1.2.6 免疫共沉淀 将冷冻于 -80℃ 的雄鼠睾丸组织样本取出约 500 mg,液氮冷冻研磨后,加入 600  $\mu$ L RIPA:PMSF=100:1 蛋白裂解液裂解组织并收集裂解液。将 Protein A+G 磁珠解冻并取两管各 20  $\mu$ L,分别使用 1 $\times$ TBS 清洗 3 次。将 500  $\mu$ L CLOCK Rabbit mAb 抗体工作液和 500  $\mu$ L CD274 Polyclonal Antibody 抗体工作液分别与两管 20  $\mu$ L 磁珠悬液混合,分别标记为“CLOCK”与“IgG”。将蛋白裂解液与“IgG”标记的磁珠-抗体混和液共同 4℃ 孵育 1 h,磁性分离后取上清液。然后将上清液再与“CLOCK”标记的磁珠抗体混合液共同 4℃ 孵育过夜。孵育完成后将混合液 95℃ 水浴加热 5 min 后磁性分离,取上清液使用 DLD Polyclonal Antibody 进行 Western blot 实验以定性检测样本中是否存在 DLD 蛋白。

1.3 统计学分析 本研究采用 DAVID 在线工具对差异基因进行基因本和信号通路富集分析。其他数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 *t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 实验组睾丸 *Clock* 基因被有效敲降 通过 RT-qPCR,以 *Gapdh* 为内参检测实验组和对照组雄鼠睾丸组织中 *Clock* 基因的 mRNA 表达量。与对照组相比,实验组 *Clock* 基因的表达显著降低( $P<0.001$ ),说明我们获取的实验组雄鼠睾丸组织中的 *Clock* 基因在 mRNA 水平被成功降低了,见图 1。

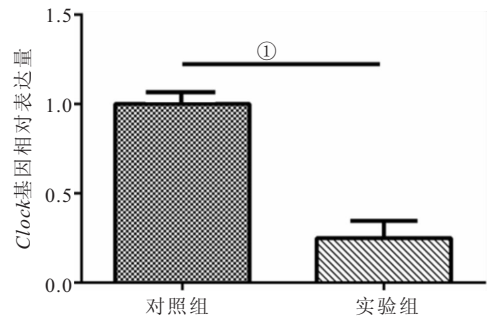


图 1 实验组与对照组睾丸组织 *Clock* 基因相对表达量

Figure 1 Clock gene relatively expression in testis tissues of the experimental group and the control group

注:与实验组比较,① $P<0.01$

2.2 实验组精子超微结构中线粒体出现异常对于透射电镜所展示出的两组睾丸切片组织中的超微结构,发现位于精子尾部中段的线粒体结构有异。实验组睾丸精子中多处线粒体之间出现较大间隙(见图 2A),且有双层排布现象(见图 2C),这些线粒体大小不均,有部分甚至出现明显固缩现象(见图 2B、图 2C);而对照组精子线粒体结构及排布未见明显异常(见图 2D)。两组睾丸组织中精子尾部轴丝的“9+2”微管结构均未见异常。

2.3 DEGs 的功能注释再分析结果 利用本实验室前期检测所得的小鼠 *Clock* 基因下调睾丸的精子蛋白组数据进行了生物信息学再分析。通过 DAVID 在线功能注释工具,我们将筛选出的差异蛋白的 DEGs 显著富集聚类到了 5 条 CC 条目(见图 3A)和 3 条 BP 条目(见图 3B)中,MF 则未能富集到条目。DEGs 在 8 条 KEGG 条目中显著富集(见图 3C),包括:氨基酸生物合成(Biosynthesis of amino acids)、碳代谢(Carbon metabolism)、抗生素生物合成(Biosynthesis of antibiotics)、代谢通路(Metabolic pathways)、乙醛酸盐与双羧酸代谢(Glyoxylate and dicarboxylate metabolism)、丙酮酸代谢(Pyruvate metabolism)、柠檬酸循环(TCA cycle)和糖酵解/糖异生(Glycolysis/Gluco-

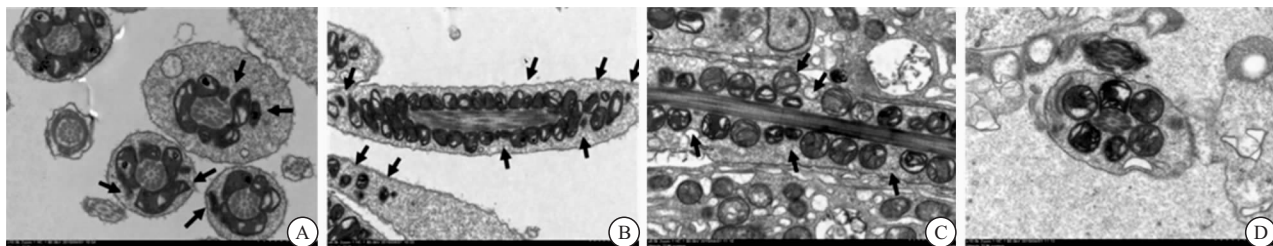


图 2 实验组与对照组小鼠睾丸精子尾部中段电镜图

Figure 2 Electron micrographs of the middle part of the sperm tail of the testis of mouse in the experimental group and the control group

neogenesis)。在富集程度最显著的 TCA 循环通路中,我们选择关键差异蛋白 DLD 作后续验证。

水平进行了检测。相对于对照组小鼠,实验组的 *Dld* 基因表达量也出现了明显的降低( $P < 0.05$ ),见图 4。

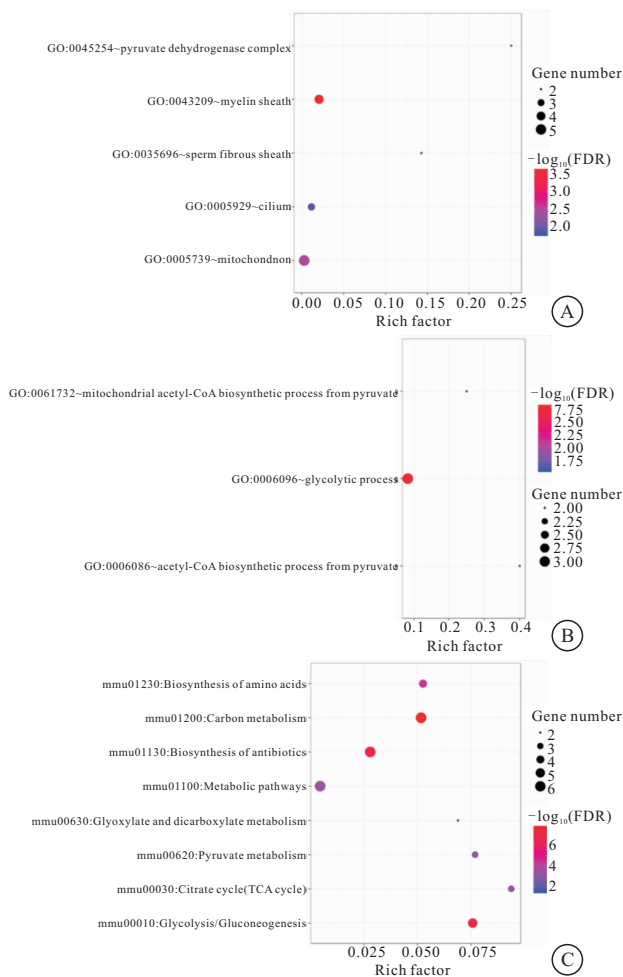


图 3 DEGs GO CC BP KEGG Pathway 富集气泡图(FDR<0.001)  
Figure 3 DEGs GO CC BP KEGG Pathway enrichment bubble chart

2.4 两组睾丸  $\alpha$ -KGDH 酶活性比较 由于 DLD 为  $\alpha$ -KGDH 的关键亚基,通过 ELISA 检测,测量了两组小鼠睾丸组织中的  $\alpha$ -KGDH 活性。实验组小鼠睾丸组织样本中的  $\alpha$ -KGDH 活性( $24.263 \pm 2.933$ )U/L 与对照组( $29.666 \pm 4.505$ )U/L 比较显著降低( $P < 0.05$ )。

2.5 两组睾丸 *Dld* 基因 mRNA 水平比较 通过 RT-qPCR,对两组小鼠睾丸组织中 *Dld* 基因 mRNA

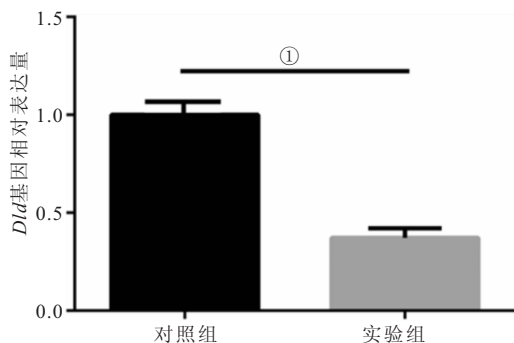


图 4 实验组与对照组睾丸组织 *Dld* 基因相对表达量  
Figure 4 *Dld* gene relative expression in testis tissues of the experimental group and the control group

注:与实验组比较,① $P < 0.05$

2.6 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白能够相互作用 在小鼠睾丸组织样本 CLOCK 蛋白沉淀产物中检测到了 DLD 蛋白存在,说明 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白存在相互作用,见图 5。

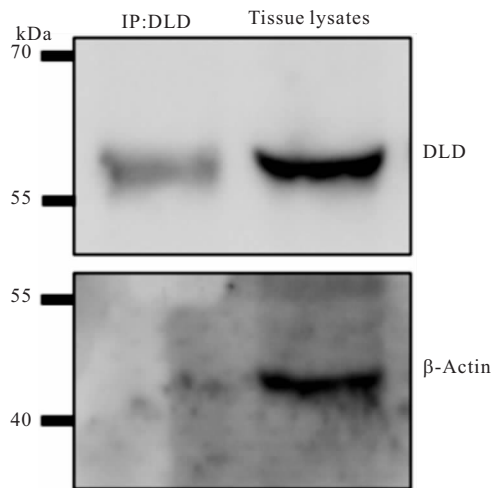


图 5 小鼠睾丸组织 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白 Co-IP 结果  
Figure 5 Results of CLOCK protein and DLD protein Co-IP in mouse testis tissue

### 3 讨论

本实验室前期研究发现,敲降雄性小鼠睾丸

*Clock* 基因不仅会因其精子顶体蛋白酶活性减弱而导致受精率降低,其精子的前向运动百分率也受到了影响<sup>[10]</sup>。前向运动率过低的精子活动能力较弱,可能导致精子难以完成正常的受精作用,从而在一方面导致不育的发生<sup>[11]</sup>。支持精子活动的能量由 ATP 提供,精子内的 ATP 由糖酵解和氧化磷酸化形成。糖酵解主要发生部位位于精子尾部鞭毛,但供能较少。大部分 ATP 的产生均由尾部中段线粒体中的氧化磷酸化产生<sup>[12-13]</sup>,有研究人员推测,具有更大体积尾部中段的精子具有更高的线粒体密度,这可以使精子的运动能力提升<sup>[14]</sup>。由此可推测,精子颈部及尾部的结构变化均可能导致能量代谢的异常,于是我们通过透射电镜观察以求证实 *Clock* 基因低表达对精子结构可能造成的影响。

本实验在使用 siRNA 干扰质粒下调小鼠睾丸 *Clock* 基因的表达后,以透射电镜的方法对该组小鼠的睾丸组织超微结构进行了观察。结果发现,该组睾丸组织内精子细胞的线粒体结构出现异常,主要表现为精子尾部中段的线粒体排列混乱、部分线粒体出现双层排列、空泡化和萎缩,线粒体腔内有凋亡小体形成。线粒体是为精子供能的主要细胞器,精子细胞中大约 15%~22% 的总体积被线粒体占据<sup>[15]</sup>。精子线粒体功能的缺陷会严重损害精子所需的能量产生,并且可能是弱精子症的潜在原因<sup>[16]</sup>。

为了研究睾丸 *Clock* 基因低表达引起睾丸内精子线粒体结构和排列发生异常的原因,将实验室前期研究所得的睾丸 *Clock* 基因敲降小鼠的精子蛋白组数据进行了再挖掘。将这些数据的 DEGs 整理后通过 DAVID 在线分析工具进行了 GO 和 KEGG 条目的聚类富集,并以  $FDR < 0.001$  对富集结果进行了筛选。结果发现,这些 DEGs 的细胞组分大多来自精子纤维鞘、纤毛、线粒体等,这与我们电镜结果显示的精子超微结构异常相符,而 BP 的结果提示这些 DEGs 可能会影响到糖代谢,这也就提示了该线粒体可能不仅存在结构的异常,其功能可能受到了影响。KEGG 的富集结果更是强烈提示三羧酸循环的信号通路存在异常,因此我们查看了参与此信号通路的 DEGs,结果发现了三羧酸循环限速酶之一的  $\alpha$ -KGDH 复合体的一个亚基组成蛋白 DLD。 $\alpha$ -KGDH 作为物质与能量代谢中十分重要的一个酶复合体,其在 TCA 循环与氨基酸代谢中均起着关键调控的作用<sup>[17-19]</sup>。另外由于在 TCA 循环中  $\alpha$ -KGDH 能将酮戊二酸在  $NAD^+$  与 CoA 的作用下催化为琥珀酰 CoA<sup>[20-21]</sup>,由此也对表观遗传中蛋白质琥珀酰化具有关键的调节作用。推测 *Clock* 基因可能是通过对  $\alpha$ -KGDH 酶活性的调节而影

响线粒体的代谢产能的。接下来,检测了实验组小鼠睾丸中  $\alpha$ -KGDH 的酶活性,发现确实比对照组出现了明显的降低。我们又在实验组小鼠睾丸组织中验证了 *Dld* 基因转录本水平的降低,这与前期蛋白组结果数据中 DLD 的变化趋势相一致。因此,*Clock* 基因很可能可以通过对 *Dld* 基因转录的调节而影响 DLD 蛋白的表达量。那么,*Clock* 基因是否还能够影响 DLD 蛋白的功能呢?为此,我们还以免疫共沉淀的方法研究了 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白的相互作用。结果表明 CLOCK 蛋白与 DLD 蛋白在自然情况下确实存在相互作用。

#### 4 结论

睾丸 *Clock* 基因对于精子线粒体的形态及功能有着重要的调节作用。睾丸 *Clock* 基因的下调会导致精子线粒体超微结构的异常,并通过调节 DLD 蛋白表达量和功能的调节影响  $\alpha$ -KGDH 的酶活性,最终导致小鼠精子因线粒体三羧酸循环异常而出现前向运动百分率降低。

#### 【参考文献】

- [1] HUANG W, RAMSEY K M, MARCHEVA B, *et al.* Circadian rhythms, sleep, and metabolism[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6):2133-2141.
- [2] BODEN M J, KENNAWAY D J. Circadian rhythms and reproduction[J]. *Reproduction*, 2006, 132: 379-392.
- [3] HUANG Z P, CUI L W, SCOTT M B, *et al.* Seasonality of reproduction of wild black-and-white snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Mt. Lasha, Yunnan, China[J]. *Primates*, 2012, 53(3): 237-245.
- [4] DOLATSHAD H, DAVIS F C, JOHNSON M H. Circadian clock genes in reproductive tissues and the developing conceptus[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(1):1-9.
- [5] EASTON A, ARBUZOVA J, TUREK F W. The circadian Clock mutation increases exploratory activity and escape-seeking behavior[J]. *Genes Brain Behav*, 2003, 2(1):11-19.
- [6] 何焯,成姝婷,梁鑫,等. *Clock* 基因对雄性小鼠生殖功能影响[J]. *四川生理科学杂志*, 2010, 32(01):3-5.
- [7] 梁鑫,成姝婷,王正荣,等. *Clock* 基因对精子顶体酶的影响[J]. *中国男科学杂志*, 2015, 29(11):3-7, 22.
- [8] 谷翊群译,世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011. 1.
- [9] GARCÍA-VÁZQUEZ F A, HERNÁNDEZ-CARAVACA I, Y-ÁNEZ-QUINTANA W, *et al.* Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination[J]. *Theriogenology*, 2015, 84(4):566-574.
- [10] 王誉雅,程方岩,成丽琴. 干扰睾丸 *Clock* 基因对小鼠体外受精的影响[J]. *科技视界*, 2014(25):8, 87.
- [11] 王家雄,沈海燕,刘彩钊,等. 精子质量参数与体外受精结局的相关性[J]. *临床检验杂志*, 2021, 39(4):275-277.

- arrest-specific transcript 5 alleviates renal fibrosis in diabetic nephropathy by downregulating matrix metalloproteinase 9 through recruitment of enhancer of zeste homolog 2[J]. The FASEB Journal, 2020, 34(2):2703-2714.
- [2] WANG R, XUE A, ZHENG W, *et al.* Elevated serum preptin concentrations in patients with diabetic nephropathy[J]. Journal of Investigative Medicine, 2019, 67(7):1048.
- [3] CHEN M B, WANG H, CUI W Y, *et al.* Effect of SGLT inhibitors on weight and lipid metabolism at 24 weeks of treatment in patients with diabetes mellitus: A systematic review and network meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100(6):e24593.
- [4] DONG J, DING L, WANG L, *et al.* Effects of bradykinin on proliferation, apoptosis, and cycle of glomerular mesangial cells via the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway[J]. Turkish journal of biology, 2021, 45(1):17-25.
- [5] CHAUDHARI S, SHOTORBANI P Y, TAO Y, *et al.* Inhibition of interleukin-6 on matrix protein production by glomerular mesangial cells and its pathway involved[J]. American journal of physiology. Renal physiology, 2020, 318(6):671-679.
- [6] 方伟. 人参皂苷干预糖尿病及其并发症研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(5):125-127.
- [7] 李贵明, 李燕. 人参皂苷药理作用研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(8):1024-1027.
- [8] 吴胜斌, 王应灯. 人参皂甙 Rg3 对糖尿病肾病大鼠肾组织 Bax 和 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白表达及肾细胞凋亡的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(1):5-8.
- [9] 李晓强, 隋峰, 王洋, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路在肿瘤中的双重作用及其与耐药性的关系[J]. 生物技术通讯, 2019, 30(6):827-832.
- [10] HUANG K, ZHAO X. USP9X prevents AGEs-induced upregulation of FN and TGF- $\beta$ 1 through activating Nrf2-ARE pathway in rat glomerular mesangial cells[J]. Experimental Cell Research, 2020, 393(2):112100.
- [11] TAN Y M, GAO Y, TEO G, *et al.* Plasma Metabolome and Lipidome Associations with Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy[J]. Metabolites, 2021, 11(4):228.
- [12] 曲萌, 侯勤龙, 翁诗雅, 等. 玉米须多糖对高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖及炎症因子表达的影响[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2020, 21(4):461-465.
- [13] 袁佳蕾, 陈钦开. 人参皂甙 Rg3 抗肿瘤机制的研究进展[J]. 南昌大学学报医学版, 2019, 59(5):96-98.
- [14] 唐俊, 左满花. 人参皂苷 Rg3 对糖尿病肾脏疾病大鼠氧化应激和凋亡的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 10(25):70-73.
- [15] 冀凯, 杜世豪, 李新, 等. 人参皂苷 Rg3 抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞过度增殖、炎症反应和 PTX3 的表达[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2020, 33(1):55-62.
- [16] 郑忠道, 曹春, 姚全. 人参皂苷调控转化生长因子- $\beta$  信号通路的作用机制[J]. 世界中医药, 2019, 14(3):766-770.
- [17] 吴胜斌, 王应灯. 人参皂苷 Rg1 对肾间质纤维化大鼠肾组织肝细胞生长因子及转化生长因子- $\beta$ 1 的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(5):422-425.
- [18] 王蕾蕾, 高学敏, 贾岚, 等. 青钱柳对 2 型糖尿病大鼠早期肾损伤标志物以及氧化应激的影响[J]. 环球中医药, 2020, 13(3):9-13.
- [19] HSIEH A R, HUANG Y C, YANG Y F, *et al.* Lack of association of genetic variants for diabetic retinopathy in Taiwanese patients with diabetic nephropathy[J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2020, 8(1):e000727.
- [20] 赵颖丹, 张天嵩, 马骏, 等. 黄芪甲苷通过调控 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路减轻 PM2.5 诱导的肾小管上皮细胞氧化损伤[J]. 安徽中医学院学报, 2020, 39(2):69-75.

(收稿日期:2021-09-05;修回日期:2022-06-03;编辑:王小菊)

(上接第 1413 页)

- [12] TOURMENTE M, VILLAR-MOYA P, RIAL E, *et al.* Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species[J]. J Biol Chem, 2015, 290(33):20613-20626.
- [13] MALO A F, GOMENDIO M, GARDE J, *et al.* Sperm design and sperm function[J]. Biol Lett, 2006, 2(2):246-249.
- [14] M JANDERSON, JNYHOLT A F. Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals[J]. Dixson, 2005, 267(2), 135-140.
- [15] VERTIKA S, SINGH K K, RAJENDER S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - An update[J]. Mitochondrion, 2020, 54:26-40.
- [16] DURAIRAJANAYAGAM D, SINGH D, AGARWAL A, *et al.* Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction[J]. Andrologia, 2021, 53(1):e13666.
- [17] FERNIE A R, CARRARI F, SWEETLOVE L J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport[J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(3):254-261.
- [18] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):102.
- [19] JORDAN F, NEMERIA N, GERFEN G. Human 2-Oxoglutarate Dehydrogenase and 2-Oxoacid Dehydrogenase Both Generate Superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a Side Reaction and Each Could Contribute to Oxidative Stress in Mitochondria[J]. Neurochem Res, 2019, 44(10):2325-2335.
- [20] TRETTER L, ADAM-VIZI V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1464):2335-2345.
- [21] YANG Y, GIBSON G E. Succinylation Links Metabolism to Protein Functions[J]. Neurochem Res, 2019, 44(10):2346-2359.

(收稿日期:2021-11-12;修回日期:2022-04-20;编辑:王小菊)