

补肾中药对雷公藤多苷所致生殖损伤雄性幼鼠
血清睾酮及睾丸组织 P450_{scc} 的影响

景晓平,何丽*

(上海市儿童医院,上海交通大学附属儿童医院,上海 200040)

[摘要] **目的:**研究雷公藤多苷(glycosides of *Tripterygium wilfordii*,GTW)对幼年雄性大鼠血清睾酮及睾丸组织中睾酮生成酶细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(cyto-chrome P450 side chain cleavage,P450_{scc})的影响以及补肾中药(菟丝子黄酮、六味地黄丸)对其损伤的干预作用。**方法:**3~4 周龄 SD 雄性幼鼠 48 只,随机分为 4 组:空白组(CMC-Na)、多苷组(9 mg·kg⁻¹·d⁻¹)单独 ig,六味组(六味地黄丸 1 g·kg⁻¹·d⁻¹+GTW 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹),黄酮组(菟丝子黄酮 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹+GTW 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹)混合 ig,持续给药 12 周后,处死大鼠留取血清和睾丸组织,采用放免法检测血清睾酮浓度;采用 RT-PCR 和 Western blot 检测睾丸组织中 p450_{scc} 在基因和蛋白水平的表达。**结果:**GTW 组与空白组相比可以明显降低血清睾酮($P<0.01$);六味组与多苷组相比可以明显提高血清睾酮($P<0.05$);在蛋白水平 GTW 与空白组相比可以明显降低睾丸组织 P450_{scc}($P<0.05$);在基因水平 GTW 组与其他组比较无显著性差异。**结论:**GTW 对幼年大鼠生殖系统有一定损伤作用;六味地黄丸可以通过提高雄鼠血清睾酮水平而达到保护生殖损伤的作用。

[关键词] 六味地黄丸;菟丝子黄酮;雷公藤多苷;雄性幼鼠;睾酮;睾丸组织;细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0242-04
[doi] 10.11653/syfy2013110242

On the Glycosides of *Tripterygium wilfordii* Caused Reproductive Damage
Male Juvenil Rats Serum Testosterone and Testicular Tissue P450_{scc} and the
Prevention Effect of Bushen Chinese Herbs

JING Xiao-ping, HE Li*

(Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong
University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** The research that the juvenile male juvenil rats serum testosterone and testicular tissue (cyto-chrome P450 side chain cleavage, P450_{scc}) was impacted by *Tripterygium wilfordii* glycosides (GTW) and its intervention role Bushen Chinese herbs (flavonoids from *Cuscuta chinensis*, Liuwei Dihuang Wan). **Method:** SD 3-4 week-old 48 male rats were randomly divided into 4 groups: control group (CMC-Na), GTW (9 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Liuwei Dihuang Wan Group (Liuwei Dihuang Wan 1 g·kg⁻¹·d⁻¹+GTW 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹), flavonoids from *C. chinensis* group (flavonoids from *C. chinensis* 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹+GTW 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹). After 12 weeks, rats were sacrificed, the blood serum was collected from the rats for the determination of serum testosterone; specimens of testicular tissue for the detection of P450_{scc} in the expression of the gene and protein level by two experimental methods using RT-PCR and Western blot. **Result:** GTW can significantly decrease serum testosterone values, GTW group and blank group comparison there is a significant difference ($P<0.01$),

[收稿日期] 20130106(003)
[基金项目] 上海市自然科学基金(12ZR1425700)
[第一作者] 景晓平,博士,主治医师,从事中医药治疗小儿肾脏疾病研究,Tel:021-62474880,E-mail:xiaoping158@yahoo.com.cn
[通讯作者] *何丽,博士,副主任医师,从事中医药治疗呼吸系统疾病研究,Tel:021-62475130,E-mail:heli29@126.com

Liuwei group with GTW group can significantly increase serum testosterone values, Liuwei group and GTW group comparison GTW group have significant significant difference ($P < 0.05$); GTW at the protein level can significantly decrease the testicular tissue P450_{scc} value, GTW group P450_{scc} protein expression values were lower than other groups, GTW group and blank group comparison have significant difference ($P < 0.05$); GTW cannot reduce the testicular tissue P450_{scc} value at the genetic level, GTW group and other groups showed no significant difference. **Conclusion:** Prompted GTW certain inhibitory effect on the reproductive system of male juvenil rats; prompted Liuwei Dihuang Wan can significantly improve male rats serum testosterone levels and achieve the role of protecting reproductive damage.

[**Key words**] Liuwei Dihuang Wan; flavonoids from *Guscuta Chinensis*; GTW; male juvenile rats; testosterone; testicular tissue; cyto-chrome P450 side chain cleavage

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. F 系卫茅科雷公藤属植物,我国共有 3 个品种,即雷公藤、昆明山海棠和东北雷公藤(又称黑蔓)^[1]。现代已从雷公藤中分离出雷公藤红素、雷公藤甲素等 70 多种成分^[2]。雷公藤多苷(glycosides of *T. wilfordii*, GTW)是从植物雷公藤根芯部提取的一种有效组分,是目前治疗儿科肾脏疾病治疗的重要药物之一,但其不良反应,特别是生殖系统损伤受到广泛关注,也成为限制其临床应用的主要问题。中药在逆转 GTW 所致生殖损伤中有较好疗效。睾丸间质(leydig)细胞合成和分泌雄激素,它是男性生殖系统发生、分化和成熟的基础。睾酮(T)是男性生殖过程中关键的雄激素,睾酮生成酶又影响着睾酮的生成。在睾酮生成过程中,细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(cytochrome P450 side chain cleavage, P450_{scc})是睾酮生成重要的限速酶。雷公藤多苷是否能影响睾酮及睾酮生成酶,目前国内外未见报道。本课题旨在观察 GTW 对雄性幼鼠血清睾酮及睾丸组织中 P450_{scc} 的基因及蛋白影响,以及补肾中药的干预作用。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 48 只,雄性,3~4 周龄,清洁级,体重(50 ± 10)g,由河南省实验动物中心提供,许可证号 0001993。

1.2 药物与试剂 雷公藤多苷(GTW)药粉(江苏美通制药有限公司,批号 080525,1 g 药粉相当于生粉制剂 1 g),菟丝子黄酮(陕西昂威生物医药科技有限公司,纯度 90%,批号 20070914),六味地黄丸(河南宛西制药有限公司,批号 070621)。睾酮(T)放免试剂盒(深圳拉尔文生物公司提供,批号 071205),100 bp DNA Ladder,DL2 000 DNA Ladder, P450_{scc} mRNA 引物合成, GAPDH 引物合成(北京赛百盛生物工程公司),P450_{scc} 一抗(美国 Ilipore 公司),琼脂糖,DEPC(北京 Solarbio 公司),TRIZOL

Reagent(Invitrogen 公司),RNA 反转录试剂盒(大连宝生物公司),PCR 扩增试剂盒(天根公司)。

1.3 仪器 CR22G 低温高速离心机(日立公司),PCR 梯度扩增仪(德国 Biometra 公司),DU64 型分光光度计,DYY-8C 型电泳仪,DYCP-31A 水平电泳槽(北京六一仪器厂),TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),垂直电泳槽,电转移槽, Gel doc 2000 TM 凝胶图像分析仪(Bio-RAD),台式高速离心机型号 GTWL-16G(北京现代高科)。

2 方法

2.1 动物分组及给药^[3] 雄性幼鼠,22℃~26℃ 的清洁级动物室中,自由进食饮水,适应 1 周后,将其随机分为 4 组:空白组 0.5% 羧甲基纤维素钠 5 mL·kg⁻¹ig,每日 1 次。多苷组:GTW 多苷药粉 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹,用时用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)液配制成每 0.5 mL 含生药 0.9 mg 的混悬溶液,每次 5 mL·kg⁻¹ig,每日 1 次。六味组:GTW 多苷加六味地黄丸(GTW 多苷 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹,六味地黄丸 1 g·kg⁻¹·d⁻¹(六味地黄丸用高速万能粉碎机粉碎,灌胃用 0.5% CMC-Na 配制成 0.5 mL 含生药 0.1 g 的混悬液,每次 5 mL·kg⁻¹ig,每日 1 次)。黄酮组:黄酮组(菟丝子黄酮 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹ + GTW 9 mg·kg⁻¹·d⁻¹)混合 ig。灌服时 GTW 与其他药物间隔 1 h,实验期间每周称体重 1 次,调整给药量。

2.2 血清 T 浓度检测 在给药 12 周后,于末次给药 1 h 后称重,断头处死取血 3~5 mL,置于清洁的塑料试管中,静置,待血液凝固后离心,取血清放置于 -70℃ 低温冰箱保存,血清由 -70℃ 冰箱中取出,温水融化,取 0.5 mL 待测样本进行测定。根据各对照品的相应浓度测定值绘制反应标准曲线,计算机根据待测样品浓度计算出待测样本 T。

2.3 睾丸组织 P450_{scc} mRNA 检测 睾丸组织总 RNA 的提取:将标本从液氮中取出,称取 3 g 睾丸组

织加 1 mL trizol 的比例,匀浆提取组织总 RNA。用紫外分光光度计 Bradford 法测取总 RNA 的浓度。目的基因第一链 cDNA 的合成:取 4.0 μg 提取的 RNA,用第一链 cDNA 合成试剂盒反转录成 cDNA。P450_{sec} 上游引物为 5'-CGCTCAGTGCTGGTCAAA-3',下游引物(5,3):5'-TCTGGTAGACGGCGTCGA-3',扩增产物 688 bp。GAPDH 上游引物为 5'-TCACTCAAGATTGTCAGC-3',下游引物为 5'-AG-ATCCACGACGGACACA-3',扩增产物 308 bp。用 PCR 扩增试剂盒扩增,25 μL 的反应体系。P450_{sec} 的反应条件:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变 30 sec,54 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,循环 30 次,最后一个循环结束后 72 ℃ 延伸 5 min。 β -actin 的反应条件:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 30 sec,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,循环 30 次,最后一个循环结束后 72 ℃ 延伸 5 min。结果分析:对结果采用半定量计算,分别以每例标本 GAPDH 与 P450_{sec} 的光吸收峰值之比,作为该例标本目的基因的相对表达量。

2.4 睾丸组织 P450_{sec} 蛋白检测 Western blot 法检查各组 P450_{sec} 蛋白表达的情况。收集睾丸组织裂解产物 4 ℃,12 000 × g,离心 15 min,取上清,行 SDS-PAGE 胶电泳,用湿转法将蛋白转印到 PVDF

膜上。30 g/LBSA 封闭后,加入一抗(4 ℃ 过夜)。TBST 漂洗 3 次,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h。化学发光反应。扫描,进行图像分析。结果用 Gene Genius 分析系统做灰度分析,分别计算目的抗体/ β -actin 值。

2.5 统计学处理 实验数据用 SPSS 13.0 软件包分析。统计学处理结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为具有显著性意义。

3 结果

3.1 对血清睾酮水平的影响 雷公藤多苷可使大鼠血清睾酮水平明显降低,与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$);六味组可使损伤大鼠血清睾酮值明显升高,与多苷组比较 $P < 0.05$ 。见表 1。

3.2 对大鼠睾丸组织 P450_{sec} mRNA 水平的影响 空白组和其他 3 组睾丸组织中均有 P450_{sec} mRNA 表达。黄酮组可以明显提高 P450_{sec} mRNA 表达,黄酮组与多苷组、六味组、空白组比较有显著性差异($P < 0.01$)。多苷组、空白组、六味组比较无显著性差异。见表 1,图 1。

3.3 对大鼠睾丸组织 P450_{sec} 蛋白表达水平的影响 多苷组可以明显降低 P450_{sec} 蛋白表达,与空白组比较有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1,图 2。

表 1 用药 12 周后各组血清睾酮,睾丸组织 P450_{sec} mRNA 和蛋白相对表达量的变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	T /mg·L ⁻¹	P450 _{sec} mRNA/GAPDH	P450 _{sec} 蛋白/ β -actin
空白	-	6.04 ± 1.53	0.46 ± 0.11	0.98 ± 0.12
GTW	9	2.27 ± 1.02 ²⁾	0.60 ± 0.14	0.51 ± 0.18 ¹⁾
GTW + 六味地黄丸	9 + 1 000	4.31 ± 2.72 ³⁾	0.55 ± 0.15	0.76 ± 0.19
GTW + 菟丝子黄酮	9 + 100	3.24 ± 2.10	0.94 ± 0.08 ⁴⁾	0.68 ± 0.17

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 GTW 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

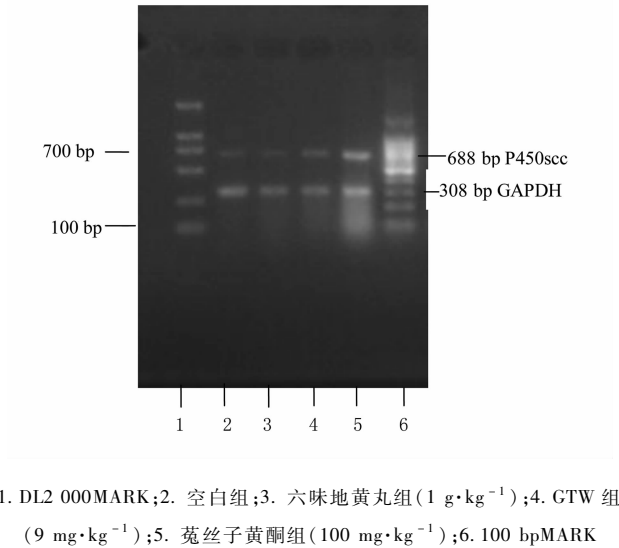


图 1 用药 12 周后各组睾丸组织 P450_{sec} mRNA 表达

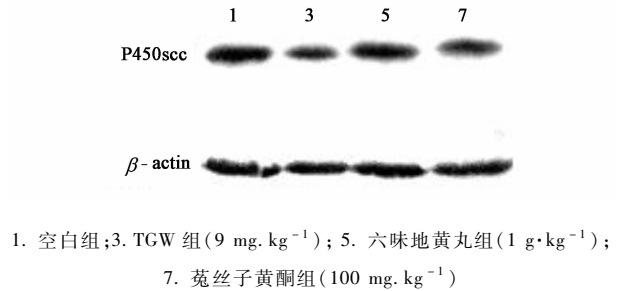


图 2 用药 12 周后各组睾丸组织 P450_{sec} 蛋白表达

4 讨论

雷公藤属卫矛科木质藤本植物,是雷公藤根芯部分的水氯仿提取物,其生物活性由多种成分(二萜类、三萜类、生物碱)协同作用产生^[4-5]。现代研究^[6-10]显示其具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤和抗生育作用,是儿科肾脏疾病临床重要药物之一。其自身免疫治疗剂量明显高于其有效抗生育阈剂量,说明

雷公藤在发挥免疫抑制作用的同时,不可避免地影响到生殖功能,这就严重制约了其在儿科临床的应用。如何能在发挥雷公藤多苷疗效的同时,保护其生殖损伤是目前临床科研的一大难点。T 水平的变化在一定程度上能反映出睾丸间质细胞的损伤情况。在睾酮生成过程中,细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(P450_{sc})是类固醇合成的一个限速酶,最终转化为睾酮。本研究主要观察补肾中药对 GTW 所致生长发育期雄性幼鼠血清 T 及睾酮生成酶 P450_{sc} 的影响,进而观察补肾中药的保护作用。

据文献研究大多选用滋补阴精、温补肾阳的方法来对抗雷公藤导致的雄性生殖损伤^[11]。笔者曾参与的课题组相关人员在前期的工作中对雷公藤多苷的生殖病理损伤及补肾中药的保护作用已做了有益的探索^[12-17],本实验采用 3~4 周龄大鼠尚处于生殖发育期^[3],此研究模拟小儿科临床用药时间。前期的临床课题研究剂量为 1.5 mg·kg⁻¹,因此本研究按照每日 1.5 mg·kg⁻¹作为人的常用剂量,计算出幼鼠灌服剂量。

在本实验中,发现应用 GTW 可使大鼠血清睾酮水平明显降低。此研究结果与国内俞晶华^[18]等研究血清睾酮基本一致。本研究还发现 GTW 组 P450_{sc} 蛋白的表达值低于其他组,这些均揭示 GTW 对雄性幼鼠的生殖系统有一定的损伤作用。六味地黄丸组可以提高大鼠血清 T 水平,提示六味地黄丸可以提高血清睾酮值而起到保护生殖损伤作用。本次实验也发现 GTW 在基因水平没有降低 P450_{sc} 的表达,而在蛋白水平可以明显下调 P450_{sc} 的表达,突显疾病与蛋白质相关性^[19]。

本实验在补肾中药对雄性幼鼠生殖系统的睾酮、睾酮生成酶的研究,只是在基因与蛋白方面研究初探,得出的结果有待进一步验证,本课题组将在睾酮生成酶的各环节进行更多点,更深入研究。

[参考文献]

[1] 李德平,翟华强,曹炜,等. 雷公藤的药性文献回顾及其作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(17):299.

[2] 柴智,周文静,高丽,等. 雷公藤肝毒性及其作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):243.

[3] 苗明三,刘方洲,金树兴,等. 实用动物和动物实验技

术[M]. 北京:中国中医药出版社,1997:143.

[4] 杨涓,董江川,韩冰. 雷公藤多苷对女性生殖内分泌系统的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006,20(5):437.

[5] 王笑笑,李斌,肖经纬. 男性生殖内分泌系统调节的研究进展[J]. 毒理学杂志, 2007,21(6):6501.

[6] 李春庆,孙伟,邵家德,等. 雷公藤减毒研究述评[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(10):263.

[7] 张昕贤,黄迪,何立群,等. 雷公藤多苷诱导小鼠睾丸生殖相关基因异常表达及补肾中药的干预作用[J]. 中华男科学杂志, 2012,18(5):466.

[8] 马哲,梁茂新,张颖. 中药雷公藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011,7(3):157.

[9] 李德平,翟华强,曹炜,等. 雷公藤的药性文献回顾及其作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(13):299.

[10] 张秋萍,田振,刘志宏,等. 雷公藤多苷片的抗炎作用及体内药效动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(13):122.

[11] 李春庆,孙伟,邵家德,等. 雷公藤减毒研究述评[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(10):243.

[12] 崔瑞琴,丁樱. 雷公藤多苷致雌性幼鼠卵巢损伤及可逆性研究[J]. 毒理学杂志, 2008,22(4):303.

[13] 崔瑞琴,丁樱. 雷公藤多苷致雌性幼鼠雌激素及其受体表达的影响[J]. 宁夏医学杂志, 2009,31(5):391.

[14] 崔瑞琴,丁樱. 菟丝子黄精颗粒剂对雷公藤多苷所致生殖损伤雌鼠卵巢损伤及 smad4mRNA 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009,20(12):3149.

[15] 任献青. 菟丝子黄酮、六味地黄丸干预 GTW 所致雄性幼鼠睾丸组织及生育能力损伤的实验研究[C]. 泰宁. 第五届全国雷公藤学术会议, 2008:250.

[16] 冷倩,崔瑞琴,陆彪. 雷公藤多苷对青春期大鼠睾丸组织及 c-kit 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2011,13(10):832.

[17] 丁樱,马腾,杨晓青,等. 临床高剂量雷公藤多苷对幼年大鼠生育能力的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012,32(1):61.

[18] 俞晶华,卞慧敏,张启春. 补天育麟颗粒对雷公藤多苷致大鼠不育症模型的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2007,23(5):313.

[19] Anderson L, Seihamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver [J]. Electrophoresis, 1997,18,533.

[责任编辑 聂淑琴]