

基于“异类相制”的雷公藤复方 对小鼠精母细胞凋亡及凋亡蛋白表达的影响

赵莉, 袁玉丽, 周玲玲, 周学平*
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的:探讨雷公藤复方单体成分对小鼠精母细胞凋亡及凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3) 表达的影响。方法:建立体外培养小鼠精母细胞体系, 实验分为空白组, 雷公藤甲素 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 雷公藤甲素 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 梓醇 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 雷公藤甲素 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 三七总皂苷 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 雷公藤甲素 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 草酸铵 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 雷公藤甲素 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 青藤碱 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。流式细胞仪测定药物作用 24 h 后精母细胞凋亡率, Western blot 测定精母细胞 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达情况。结果:梓醇、三七总皂苷可减轻雷公藤甲素对小鼠精母细胞凋亡的诱导作用, 与雷公藤甲素比较有明显差异 ($P < 0.05$), 草酸铵和青藤碱组与雷公藤甲素组相比无明显差异;雷公藤甲素促使 Bax, Caspase-3 蛋白表达上调, Bcl-2 蛋白表达下调, 与正常比较差异显著 ($P < 0.01$), 雷公藤甲素配伍梓醇、三七总皂苷后 Bax, Caspase-3 蛋白表达下调, Bcl-2 蛋白表达上调, 与雷公藤甲素比较较有明显差异 ($P < 0.05$)。而配伍草酸铵及青藤碱则差异不明显。结论:雷公藤甲素可引起精母细胞凋亡, 并通过 Bax/Bcl-2, Caspase-3 系统启动精母细胞凋亡。而雷公藤复方组成中其他药物组分可不同程度抑制雷公藤甲素引起的精母细胞凋亡, 减轻其雄性生殖毒性。

[关键词] 雷公藤; 精母细胞; 凋亡; 凋亡蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0122-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020122

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151210.1445.026.html>

[网络出版时间] 2015-12-10 14:45

Effects of Compound Tripterygii Radix et Rhizoma on Apoptosis Spermatocytes and Expression of Apoptotic Proteins Based on ‘Heterogeneous Phase System’

ZHAO Li, YUAN Yu-li, ZHOU Ling-ling, ZHOU Xue-ping*
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of compound Tripterygii Radix et Rhizoma on spermatocytes apoptosis in mice and their expression of apoptosis-related Bax, Bcl-2, and Caspase-3. **Method:** *In vitro* culture system for mice spermatocytes was established. The mice were divided into blank group, triptolide $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, triptolide $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + catalpol $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, triptolide $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + panax notoginseng saponins $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, triptolide $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + oxalate $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group, triptolide $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sinomenine $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group. Flow cytometry was used to detect the spermatocytes apoptosis rate after 24 h drug treatment, Western blot assay was done to determine the protein expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in spermatocytes. **Result:** Catalpol and Panax notoginseng saponions could reduce the induction effect of triptolide on apoptosis in mouse spermatocytes, with significant differences ($P < 0.05$) compared with triptolide group, but there was no significant difference between ammonium oxalate, Sinomenine group and triptolide group. Triptolide induced increase in Bax, Caspase-3 protein expression, decrease in Bcl-2 protein expression, with significant

[收稿日期] 20150204(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072749)

[第一作者] 赵莉, 硕士, 从事治疗风湿病中药研究工作, Tel:18252070021, E-mail:zhaoli62681961@163.com

[通讯作者] *周学平, 博士, 教授, 从事中医内科学风湿病治疗及研究工作, Tel:025-85811642, E-mail:zxp@njutem.edu.cn

difference with blank group ($P < 0.01$). After combination of triptolide with catalpol and panax notoginseng saponins, Bax, Caspase-3 protein expression was reduced, while Bcl-2 protein expression was increased, with significant difference compared with triptolide group ($P < 0.05$). The combination of triptolide with ammonium oxalate and Sinomenine did not make significant difference. **Conclusion:** Triptolide can cause spermatocytes apoptosis through Bax/Bcl-2, and Caspase-3 system. The other drug components in compound in Tripterygii Radix et Rhizoma can inhibited apoptosis in spermatocytes to varying degrees, and reduce its reproductive toxicity.

[**Key words**] Tripterygii Radix et Rhizoma; spermatocytes; apoptosis; apoptotic proteins

中药雷公藤味苦、辛,性寒,归肝、肾经,有大毒。雷公藤具有祛风除湿,活血通络,消肿止痛等功效,常用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫系统疾病,疗效显著。但其毒副作用及不良反应也日益受到重视,其中以雄性生殖毒性最为显著,可导致男性生育能力下降,睾丸发育不全,精子减少,精子畸形,精子活力下降^[1]。近年来研究发现一系列单味中药(肉苁蓉^[2]、熟地黄^[3]、菟丝子^[4]等)及中药组方均可以减轻雷公藤成分的毒性,但大部分研究从整体方向着手,且未见有突出的从中医方剂配伍特色的研究成果。

本实验研究所涉及的雷公藤复方是周仲瑛教授长期临床经验总结的治疗类风湿关节炎的经验方,临床实践证明雷公藤通过与具有不同功效的地黄(养阴清热)、青风藤(祛风除湿)、僵蚕(化痰散结)、三七(活血化瘀)配伍,以制约其毒烈偏颇之性,从而减轻或消除服用雷公藤所致的毒性,课题组从中提炼出“异类相制”的配伍减毒原则^[5]。本实验以在雄性生殖系统中具有重要地位的精母细胞为研究对象,采用体外研究方法,使用中药单体成分作用于细胞,通过采用流式细胞术,Western blot,探讨雷公藤复方配伍减轻雷公藤雄性生殖毒性的作用机制。

1 材料

1.1 细胞 小鼠精母细胞(CRL-2196, ATCC 细胞株,北京中原公司)。

1.2 药物及试剂 雷公藤甲素、梓醇、三七总皂苷(中国食品药品监督管理局,批号分别为 0774-9904, 111726-200601, 110745-200415),草酸铵、青藤碱(南京泽郎药品生物制品有限公司,经四谱检测,含量不低于 98%,批号分别为 2012104, 2012216)。DMEM 完全培养液,胎牛血清,双抗(美国 Gibco 公司,批号分别为 1181331, 130620, B1505A), PBS(武汉博士德生物工程有限公司,批号 AR0030),胰蛋白酶,牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司,批号分别为 9002-7-7, 738328), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(江苏碧云天公司,批号 13A075), PVDF 膜(美

国 Millipore 公司),批号 ISE014001),脱脂奶粉(光明乳业股份有限公司,批号 20131208),聚山梨酯-20(上海久化化学有限公司,批号 20121117), B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3)兔抗鼠多克隆抗体(武汉博士德生物制剂有限公司,批号 abcam98-410, abcam56-137, abcam21-620)。

1.3 仪器 CHK-213 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), DKZ-21610 型恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司), TS25 型 WS 型低温高速离心机(德国 Hettich 公司), FacsCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司), Mini Protean 3 Cell 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), Gel Doc™ XR 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), TS-2 型摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 精母细胞的传代培养 将细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的完全 DMEM 培养液于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内培养,小鼠精母细胞呈单层贴壁生长。待细胞长满培养瓶底,吸掉旧培养液,加入 PBS 洗涤 1 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶 1 mL,消化细胞,于倒置显微镜下观察,当细胞将要分离而呈现圆粒状时,吸去胰蛋白酶溶液,加入新的完全 DMEM 培养液吹打瓶壁上的细胞并混合均匀,依稀释比例转移至新的培养瓶中继续培养。

2.2 精母细胞形态观察 用倒置显微镜观察精母细胞形态。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 实验分为 6 组,分别为空白组、雷公藤甲素组、雷公藤甲素 + 梓醇剂量组、雷公藤甲素 + 三七总皂苷剂量组、雷公藤甲素 + 草酸铵剂量组、雷公藤甲素 + 青藤碱剂量组。根据前期实验结果选取雷公藤甲素剂量为 3.5 mg·L⁻¹,梓醇剂量为 3 mg·L⁻¹,三七总皂苷剂量为 12 mg·L⁻¹,草酸铵剂量为 1.5 mg·L⁻¹,青藤碱剂量为 0.75 mg·L⁻¹。取对数生长期细胞,以含 DMEM 制备细胞悬液,调整细胞密度至 1 × 10⁵ 个/mL,每孔 2

mL 加入 6 孔板,将细胞于 37 ℃,5% CO₂ 孵育箱中培养 12 h。加入不同药物浓度的梓醇、三七总皂苷、草酸铵、青藤碱预处理,置 37 ℃,5% CO₂ 条件下培养 8 h,其后分别加入雷公藤甲素,培养 24 h 后收集培养液,PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,加入适量胰酶细胞消化液(可含有 EDTA)消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,吸除胰酶细胞消化液。加入收集的细胞培养液,稍混匀,转移到离心管内,于低温离心机中 4 ℃ 下 1 000 ~ 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞,再次 1 000 ~ 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,避光反应 15 min,随即进行流式细胞仪检测。

2.4 Western blot 测定 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达 取对数生长期精母细胞分别给予不同药物浓度的梓醇、三七总皂苷、草酸铵、青藤碱预处理(药物剂量同 2.3 项),置 37 ℃,5% CO₂ 条件下培养 8 h,其后分别加入雷公藤甲素(药物剂量同 2.3 项),培养 24 h 后吸去培养液,提取总蛋白,并用分光光度计检测其浓度。样本蛋白进行电泳、转膜 1 ~ 2 h,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。一抗 4 ℃ 孵育过夜,一抗稀释浓度:一抗 Bcl-2 抗体(1:1 000),Bax 抗体(1:1 000),Caspase-3 抗体(1:800)。二抗室温孵育 1 ~ 2 h,二抗稀释浓度:与牛血清白蛋白(BSA)结合的二抗(1:5 000)。然后用 PBST(由聚山梨酯-20 0.5 mL,20 × PBS 50 mL 加入蒸馏水至 1 000 mL 配成)充分洗膜,漂洗 5 次,每次 5 min。按 0.1 mL·cm⁻² 显影液计算用量,将显影液加于 PVDF 膜上,室温放置 1 min。用保鲜膜将膜包好(尽量避免气泡)。暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 射线胶片上曝光,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直至出现最佳条带。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析和 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对精母细胞凋亡的影响 采用 FITC/PI 双染,流式分析仪检测各组精母细胞凋亡,分别采用梓醇、三七总皂苷、草酸铵和青藤碱预处理 8 h 后给予雷公藤甲素,作用 24 h 后,梓醇、三七总皂苷可减轻雷公藤甲素对精母细胞凋亡的诱导作用,与雷公藤甲素比较,雷公藤甲素配伍梓醇及雷公藤配伍三七总皂苷组精母细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$),配伍草酸铵及青藤碱组与雷公藤甲素组相比精母细胞凋

亡率无明显差异。见表 1。

表 1 不同药物组分配伍对精母细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of compatibility of different components on apoptotic rate of spermatocytes($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	凋亡率 /%
空白	-	8.43 ± 0.26
雷公藤甲素	3.5	51.97 ± 0.62 ²⁾
雷公藤甲素 + 梓醇	3.5 + 3	31.95 ± 0.61 ⁴⁾
雷公藤甲素 + 三七总皂苷	3.5 + 12	43.29 ± 0.97 ³⁾
雷公藤甲素 + 草酸铵	3.5 + 1.5	50.46 ± 0.71
雷公藤甲素 + 青藤碱	3.5 + 0.75	49.83 ± 1.05

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与雷公藤甲素比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (图 1 ~ 3 同)。

3.2 对 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 雷公藤甲素组 Bax, Caspase-3 蛋白表达上调,Bcl-2 蛋白表达下调,与空白组比较较差异显著($P < 0.01$),雷公藤甲素配伍梓醇及雷公藤甲素配伍三七总皂苷组 Bax, Caspase-3 蛋白表达下调,Bcl-2 蛋白表达上调,与雷公藤甲素比较较有明显差异($P < 0.05$)。而配伍草酸铵及青藤碱组 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达差异不明显。见图 1 ~ 3。

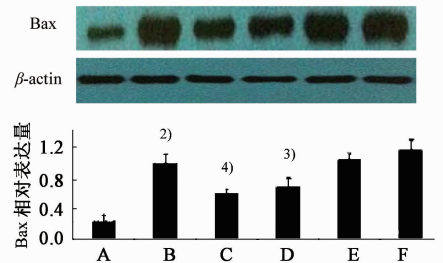


图 1 不同药物组分配伍雷公藤甲素对 Bax 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of different drug combination components of triptolide on expression of Bax ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

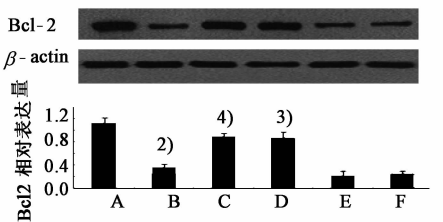


图 2 不同药物组分配伍雷公藤甲素对 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of different drug combination components of triptolide on expression of Bcl-2 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

雷公藤的雄性生殖毒性首次报道指出男性患者服用雷公藤后出现少精子及死精子现象^[6]。动物

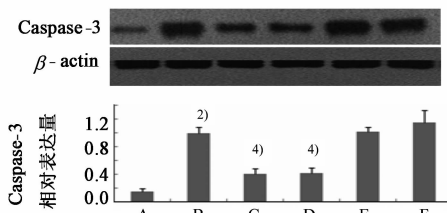


图 3 不同药物组分配伍对 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effect of different drug combination components of triptolide on expression of Caspase-3 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

实验也发现雷公藤可影响精子生成,造成精子数减少,精子畸形率增加,从而影响雄性生殖功能^[7]。随后对其药理作用和化学成分的研究发现,雷公藤中含有多种化学成分,并从中提取出具有抗生育的 6 种双萜环氧化物:雷公藤内酯、雷公藤羟内酯、雷醇内酯、雷公藤氯内酯醇、儿羟基雷公藤内酯及 T7/19^[8]。其中研究发现雷公藤甲素是雷公藤中活性最高的环氧二萜内酯化合物,也是雷公藤引起毒副作用的主要成分^[9]。

雄性生殖中占有重要地位的当属精子发生,主要是通过各级精母细胞减数分裂后形成精子细胞。有研究表明雷公藤可诱导精母细胞 Bax 基因的表达,进一步影响精子形成过程,结果提示促进睾丸组织生精细胞和精子细胞的凋亡可能是其生殖毒性的主要原因之一^[10]。Bcl-2 家族基因在细胞凋亡过程中起着重要作用,其中 Bcl-2, Bax 作为一对调节细胞凋亡的基因受到特别关注。Bcl-2 抑制细胞的凋亡, Bax 则促进细胞的凋亡^[11]。其可进一步激活半胱天冬氨酸蛋白酶系 Caspases, 从而引起细胞凋亡^[12]。Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者,当 Caspase 被活化后,它可将细胞内的重要蛋白降解,包括一些细胞内关键的底物,然后底物降解引起细胞凋亡^[13],致使精母细胞凋亡增加,生成精子细胞数量减少。本实验通过流式细胞术证明梓醇及三七总皂苷可在一定程度上减少雷公藤甲素引起的精母细胞凋亡,而草酸胺及青藤碱相关作用稍逊。Western blot 证实雷公藤甲素可使 Bax, Caspase-3 蛋白表达上调, Bcl-2 蛋白表达下调,即可促进凋亡蛋白表达,进一步引起精母细胞凋亡增多,而配伍使用梓醇及三七总皂苷后上述情况得到逆转,即梓醇、三七总皂苷可抑制雷公藤甲素引起的凋亡相关蛋白表达上调,从而减少精母细胞凋亡,草酸胺及青藤碱蛋白表达与雷公藤甲素组相比无明显差异,即草酸胺、青藤碱不能抑制雷公藤甲素所致凋亡蛋白表达上调,对雷公藤甲素所引起的精母细胞凋亡无保护。

综上所述,梓醇、三七总皂苷可减轻雷公藤甲素对于精母细胞的损伤,草酸胺、青藤碱基本无此作用。根据“异类相制”减毒原理,配伍不同性味、不同功效的药物使用时可起到一定的减毒效应。地黄、三七味偏甘,效偏补益;僵蚕、青风藤同雷公藤味均偏辛,效偏散邪。地黄、三七针对于雷公藤“异类相制”主要属于“扶正制毒”范畴。而本实验从精母细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达方面说明地黄、三七可减轻雷公藤的雄性生殖毒性,而抑制细胞凋亡从中医方面分析也归为“扶正”范畴,也证明了“异类相制”减毒理论的合理性及科学性。

[参考文献]

- [1] 覃俏峰. 雷公藤的不良反应及中药配伍减毒分析[J]. 中国当代医药, 2011, 18(10): 96-97.
- [2] 李颖, 黄迪, 何立群. 雷公藤多苷对小鼠生育的影响及肉苁蓉干预作用的研究[J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(6): 569-572.
- [3] 张昕贤, 张新志, 何立群, 等. 从内分泌激素改变研究补肾中药对雷公藤小鼠生殖功能的干预作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(2): 37-40.
- [4] 马腾, 丁樱. 菟丝子黄酮对雷公藤多苷损伤雄性幼鼠睾丸组织凋亡相关蛋白 Bcl-2 和蛋白 Bax 表达的影响[J]. 中医学报, 2011, 26(11): 1342-1344.
- [5] 周学平, 周玲玲, 王旭. 基于“异类相制”理论探讨中药复方的配伍减毒作用[J]. 中医杂志, 2013, 54(4): 271-273.
- [6] Matlin S A, Belenguer A, Stacey V E, et al. Male antifertility compounds from Tripterygium Wilfordii Hook [J]. Contraception, 1993, 47(4): 387-400.
- [7] 袁玉丽, 周学平. 雷公藤生殖毒性研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(10): 2997-3000.
- [8] Zhen Q S, Ye X, Wei Z J. Recent progress in research on Tripterygium: a male antifertility plant [J]. Contraception, 1995, 51(2): 121-129.
- [9] 刘明星, 董静, 杨亚江, 等. 雷公藤甲素的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 170-174.
- [10] 吴建元, 肖玉玲, 丁虹, 等. 雷公藤片对小鼠睾丸组织的毒性作用及其分子机制研究[J]. 中药材, 2005, 33(3): 207-210.
- [11] Yu X, Kubota H, Wang R, et al. Involvement of Bcl-2 family genes and fas signaling system in primary and secondary male germ cell apoptosis induced by 2-bromopropene in rat [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 184(1): 35-42.
- [12] Theas M S, Rival C, Dietrich S J, et al. Death receptor and mitochondrial pathways are involved in germ cell apoptosis in an experimental model of autoimmune orchitis[J]. Hum Reprod, 2006, 21(7): 1734-1742.
- [13] 李引乾, 王会, 王广彬, 等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(17): 73-78.

[责任编辑 周冰冰]