

# 补肾中药对雷公藤多苷所致雄性幼鼠生殖损伤的保护作用及最终生育能力的影响

景晓平<sup>1</sup>, 丁樱<sup>2</sup>, 何丽<sup>1\*</sup>

(1. 上海市儿童医院, 上海交通大学附属儿童医院, 上海 200040;

2. 河南中医学院第一附属医院儿科, 郑州 450008)

**[摘要]** **目的:**探讨雷公藤多苷(glycosides of *Tripterygium wilfordii*, GTW)对雄性幼鼠生殖损伤和损伤后最终生育能力的影响及补肾中药(菟丝子黄酮、六味地黄丸)的保护作用。**方法:**①生殖损伤研究:3~4周龄SD雄性幼鼠48只,随机分为4组:空白组(CMC-Na)、雷公藤多苷组( $9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )单独ig,六味组(六味地黄丸 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +GTW $9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),黄酮组(菟丝子黄酮 $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ +GTW $9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )混合ig,持续12周后,处死取一侧睾丸、附睾立即称质量,计算脏器指数,称重后放入固定液中保存,待观察睾丸组织形态学改变;②生育能力研究:成年大鼠100只,每组25只,分组喂养方法同上,持续12周后,将所有大鼠分笼喂养,每笼1只,按照1:1比例放入成年雌性大鼠1只,分3次合笼,每次合笼时间为15d,合笼后观察雌鼠受孕率、仔鼠离乳存活率、仔鼠生长发育情况。**结果:**雷公藤多苷对睾丸病理组织生精细胞肿胀变性,精原细胞、精母细胞、精子细胞明显减少,菟丝子黄酮、六味地黄丸能明显减轻这种损伤;用药12周后雄性幼鼠体重、睾丸质量、睾丸指数、附睾质量、附睾指数与空白组相比无显著性差异( $P>0.05$ );每次合笼后受孕率、离乳存活率、幼鼠的生长发育与空白组相比无显著性差异。**结论:**雷公藤多苷对雄性幼鼠生殖系统的损伤是可逆的,对睾丸的病理组织损伤是可以恢复的,补肾中药具有保护这种病理组织损伤作用;雷公藤多苷对最终的生育能力没有影响,对幼仔生长发育没有影响。

**[关键词]** 雷公藤多苷; 雄性幼鼠; 生殖损伤; 生育能力; 补肾中药

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0230-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013200230

## Juvenile Male Rats Reproductive Damage by Glycosides of *Tripterygium wilfordii* and Its Protection Role Bushen Chinese Herbs and Observation Finals Fertility of Male Rats

JING Xiao-ping<sup>1</sup>, DING Ying<sup>2</sup>, HE Li<sup>1\*</sup>

(1. Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China;

2. First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** The research that the juvenile male rats reproductive damage and injury fertility was impacted by glycosides of *Tripterygium wilfordii* (GWP) and its protection role Bushen Chinese herbs (Cuscutae Semen flavone, Liuwei Dihuang wan). **Method:** The first part of reproductive damage and histopathological study group: 3-4 week-old SD 48 male rats were randomly divided into 4 groups: control group, GTW, Liuwei Dihuang Wan group, Cuscutae Semen flavone group. After 12 weeks, rats were sacrificed, testicle, epididymis immediately weighed to calculate the viscera index, weighed and placed in fixative save, morphological changes of testicular tissue to be seen; part II: cage all rats fed one per cage, an adult female rats were placed in accordance with the ratio of 1:1. Three times in the same cage, each co-cage time is 15 days, the

**[收稿日期]** 20130519(009)

**[基金项目]** 上海市自然科学基金项目(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:xiaopingdoctor@126.com

**[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:021-62475103, E-mail:heli29@126.com

pregnancy rate of mated females observed after pups weaning survival, growth and development of offspring.

**Result:** GTW can make testicular germ cell swelling and degeneration, can make spermatogonia, spermatocytes, sperm cells decreased significantly. Cuscutae Semen flavone, Liuwei Dihuang wan can significantly reduce this damage; after 12 weeks with GWP fed male pups: weight, testicular weight, testicular index, epididymal weight, epididymal index indicators blank group comparison showed no significant difference. Each mated conception rates, weaning survival, growth and development of the pups in each group comparison showed no significant difference.

**Conclusion:** GTW damage to the reproductive system is reversible; pathological damage to reproductive organs can be restored; Bushen Chinese herbs can fight TWP caused reproductive damage; no effect on the fertility of the late cubs growth and development is not impact.

[**Key words**] glycosides of *Tripterygium wilfordii*; male juvenile rats; reproductive damage; fertility; Bushen Chinese medicine

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. F 系卫茅科雷公藤属植物,又名水莽草、黄藤、断肠草等,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)。现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<sup>[1]</sup>。雷公藤多苷(glycosides of *Tripterygium 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。对于儿科临床来说,小儿处于生殖发育的关键时间,其生殖细胞生长发育较快,同时又处于不成熟时期,此时使用 GTW 所造成的生殖损伤是否容易修复,是否具有可逆性,目前尚不清楚<sup>[2]</sup>。因此研究使用雷公藤多苷引起的生殖损伤是否可逆,对最终的生育能力、对子代是否也有损伤是亟待需要阐明的问题。本课题组在临床实践中发现补肾中药菟丝子及中成药六味地黄丸在保护 GTW 所致生殖损伤中有较好疗效,故在观察使用 GTW 所致雄性幼鼠生殖损伤和损伤后最终生育能力的情况时,选取纯度较高的菟丝子提取物菟丝子黄酮和六味地黄丸灌服幼鼠以观察补肾中药的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SD 大鼠 148 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 SXCK(沪)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,每 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提供,含量 90%,批号 20070914),六味地黄丸(河南宛西制药有限公司,批号 070621)。甲醛、无水乙醇分析纯、二甲苯分析纯、Bouin 液(苦味酸 75 mL,40% 甲醛 25 mL,冰乙酸 5 mL)。

**1.3 仪器** DR-HW-1 型电热恒温水浴箱(北京西城区医疗器械厂),BCD-239SK 型 Haier 小王子冰箱(中国青岛),GTWL-16G 型台式高速离心机(北京现代高科),EG1150H 型自动包埋机(德国 Leica 公司),RM2245 型石蜡切片机(德国 Leica 公司),CX410 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),DFC420C 图像采集系统(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药**<sup>[3]</sup> 3~4 周龄 SD 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。①生殖损伤研究:幼鼠 48 只,将其随机分为 4 组:空白组灌服 0.5% 羧甲基纤维素钠,5 mL·kg<sup>-1</sup> ig,每日 1 次。多苷组:雷公藤多苷药粉,使用时用 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<sup>-1</sup> ig,每日 1 次。六味组:雷公藤多苷加六味地黄丸(雷公藤多苷用量同上,六味地黄丸粉碎后研细面,灌胃前使用 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<sup>-1</sup> ig,每日 1 次)。黄酮组:雷公藤多苷加菟丝子黄酮(雷公藤多苷用量同上,菟丝子黄酮粉使用 0.5% CMC-Na 配制成每 0.5 mL 含黄酮 0.01 g 的溶液,每次 5 mL·kg<sup>-1</sup> ig,每日 1 次)。实验期间每周称重 1 次,调整给药量。②生育能力研究:100 只,每组 25 只,分组喂养方法同上。

**2.2 睾丸组织病理变化** 将睾丸组织放入 Bouin 固定液中固定 1 周后取出,置 70% 乙醇中洗脱 Bouin 液,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制作切片,每个标本制备睾丸组织切片 1 张,苏木素-伊红(HE)染色。

**2.3 各组大鼠体重、睾丸及附睾质量、指数** 在给药 12 周后,于末次给药 1 h 后称重,断头处死取一

侧睾丸、附睾立即称质量,计算脏器指数。

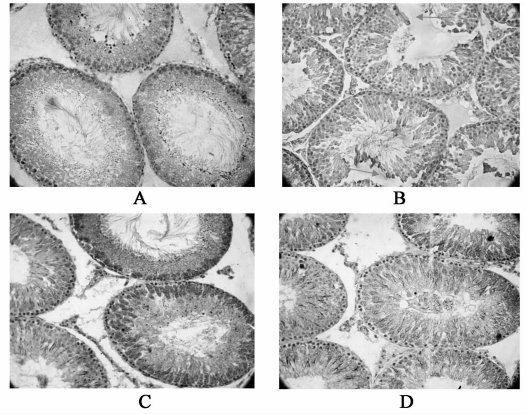
**2.4 观察生殖损伤后大鼠的生育能力** 分 3 次合笼,于末次给药 1 h 后,将所有观察大鼠分笼喂养,每笼 1 只,按照 1:1 比例放入成年雌性大鼠 1 只,15 d 后取出雄性大鼠配对单独喂养(大鼠的性动周期为 3~5 d,故可经历 3~5 个周期),每次合笼后观察雌鼠有无受孕、产仔率、幼鼠存活率、幼鼠生长发育等情况。

**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。率的比较采用四格表检验。以  $P < 0.05$  为具有显著性意义。

### 3 结果

**3.1 用药 12 周后对大鼠睾丸组织病理的影响** 多苷组大鼠睾丸曲细精管腔内上皮变薄,细胞层次紊乱,精原细胞、精母细胞明显减少,精子细胞及精子减少更加明显,生精细胞肿胀变性,偶见间质轻度水肿;六味组大鼠睾丸曲细精管上皮略变薄,细胞层次尚分明,精原细胞、精母细胞、精子细胞均有所减少,但减少程度均不如多苷组明显;黄酮组大鼠睾丸曲细精管上皮略变薄,细胞层次尚分明,精原细胞、精母细胞、精子细胞均有所减少,但减少程度均不如多

苷组明显(图 1)。



A. 空白组;B. 多苷组;C. 六味组;D. 黄酮组

图 1 用药 12 周后对大鼠睾丸组织病理的影响( $\times 400$ )

**3.2 用药 12 周后各组大鼠体重、睾丸及附睾质量、指数的变化** 雷公藤多苷对大鼠体重、睾丸及附睾质量、指数没有影响,组间比较差异无统计学意义(表 1)。

**3.3 用药 12 周后生殖损伤后雄性合笼的雌性大鼠的生育能力** 雄鼠 3 次合笼后雌鼠生育情况、受孕率、产仔数、离乳存活率,组间比较差异无统计学意义(表 2)。

表 1 用药 12 周后各组大鼠体重、睾丸及附睾质量、指数( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mL·kg <sup>-1</sup>	体重/g	睾丸质量/g	睾丸指数	附睾质量/g	附睾指数
空白	5	501.89 ± 37.84	1.834 ± 0.141	0.360 ± 0.024	0.830 ± 0.142	0.168 ± 0.039
多苷	5	446.19 ± 66.02	1.663 ± 0.112	0.379 ± 0.051	0.609 ± 0.195	0.136 ± 0.033
六味(GTW + 六位地黄丸粉)	10	463.51 ± 60.46	1.768 ± 0.202	0.385 ± 0.046	0.696 ± 0.181	0.152 ± 0.042
黄酮(GTW + 菟丝子黄酮粉)	10	486.47 ± 58.40	1.860 ± 0.121	0.387 ± 0.046	0.638 ± 0.068	0.134 ± 0.026

表 2 用药 12 周后生殖损伤后与雄性合笼的雌性大鼠的生育能力( $\bar{x} \pm s, n = 25$ )

合笼次数	组别	剂量 /mL·kg <sup>-1</sup>	受孕数 /只	受孕率 /%	产仔数量 /只	离乳存活数量 /只	离乳存活率 /%
1	空白	5	17	81	191	180	94
	多苷	5	15	68	145	138	95
	六味(GTW + 六位地黄丸粉)	10	18	85	206	177	86
	黄酮(GTW + 菟丝子黄酮粉)	10	18	85	209	197	94
2	空白	5	18	81	205	194	95
	多苷	5	20	90	201	194	96
	六味(GTW + 六位地黄丸粉)	10	20	95	236	207	87
	黄酮(GTW + 菟丝子黄酮粉)	10	21	100	256	242	94
3	空白	5	21	100	245	234	96
	多苷	5	21	95	233	218	94
	六味(GTW + 六位地黄丸粉)	10	20	95	236	207	87
	黄酮(GTW + 菟丝子黄酮粉)	10	21	100	256	242	94

## 4 讨论

就目前对雷公藤多苷生殖毒性作用的动物实验研究多采用大剂量雷公藤多苷作用于成年后大鼠和小鼠,观察实验动物的精子、睾丸以及卵巢等的变化,或是了解其相关调节因子的变化,发现雷公藤多苷对其有一定的影响<sup>[4-10]</sup>。但这类实验不足之处是:很难反应临床药理剂量下对生殖器官的影响<sup>[11]</sup>。因此本课题模拟儿科临床用药,观察幼鼠使用雷公藤多苷后到成年期对性腺的损伤情况,观察使用雷公藤多苷后实验动物最终生育能力、生育后的幼仔情况。

本研究大鼠在从幼年期开始用药 12 周后已到成年期,雷公藤多苷对大鼠体重、睾丸质量、睾丸指数、附睾质量、附睾指数等指标有轻微降低,但经统计学分析没有差异性,说明在外在形态上没有明显影响。但多苷组睾丸组织病理有一定程度的破坏,睾丸曲细精管腔内上皮变薄,细胞层次紊乱,精原细胞、精母细胞明显减少,精子细胞及精子减少更加明显,生精细胞肿胀变性,说明了雷公藤多苷可导致睾丸组织在病理结构的损伤。补肾中药黄酮组、六味组睾丸组织病理改变均较多苷组为轻,说明菟丝子黄酮、六味地黄丸可以保护雷公藤多苷所致的生殖损伤。这与国内一些学者研究补肾中药能拮抗雷公藤多苷生殖损伤作用一致<sup>[12-13]</sup>。

目前对雷公藤多苷所致的生殖损伤能否恢复,对最终的生育能力是否有影响已成为专家学者争论的焦点。所以在本次研究中观察病理组织等分子生物学指标的同时,也同步观察雷公藤多苷用药 12 周后对生育能力的影响,共进行 3 次合笼,既雌雄合笼 15 d 后即雌雄分开,未受孕的再分笼 15 d,然后再次合笼 15 d。观察配对雌鼠的受孕、生育、幼仔情况(观察 21 d,因幼仔 3 周后可以断乳存活)。经 3 次合笼后,空白组全部生育结束,多苷组有 1 只未孕,六味组 1 只未孕。虽然合笼结束,但本课题组后来仍然对剩余 2 只进行了观察,可喜的是剩余 2 只也全部生育。每次合笼后受孕数、受孕率、产仔数量雷公藤多苷组在数值上虽有降低,但统计学分析没有差异性。

本次实验观察幼仔出生体重、生长发育、死亡情况经统计学分析没有差异性。本次实验发现有 2 只畸形幼鼠,1 只为无尾巴,1 只大鼠右眼睛缺失没有可比性,未发现大量致残和畸形的幼鼠,幼鼠生长发

育良好,死亡只数很少,无可比性,提示雷公藤多苷对子代没有显著影响。

本次实验所得结果未进行重复实验,本课题组将继续在这方面进行探索,实验数据仅供参考。

## [参考文献]

- [1] 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.
- [2] 景晓平. 菟丝子黄酮,六味地黄丸干预 GTW 所致雄性幼鼠生殖损伤的实验研究[D]. 上海:上海中医药大学,2009:.
- [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] 杨建一,高宝珍,李莉,等. 雷公藤多苷对雄性小鼠生殖细胞毒性的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20(5):393.
- [5] 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, 28(3):207.
- [6] 吴克明,谌婕,熊巍,等. 雷公藤多苷对雌性小鼠生殖功能影响的实验研究[J]. 中医研究, 2007, 20(4):28.
- [7] 景晓平,何丽. 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中 P450sc $\alpha$  的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):219.
- [8] 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 Smad4 mRNA 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12):3149.
- [9] 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.
- [10] 水光兴,万毅刚,蒋春明,等. 雷公藤及其活性成分药效学和药理学研究的若干进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4):515.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 高丽,聂中标,闰润红,等. 归脾汤含药血清对雷公藤醇提取物致骨髓细胞凋亡的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):156.

[责任编辑 邹晓翠]