

论著 · 实验研究

雷公藤多苷对青春期大鼠睾丸组织及 c-kit 表达的影响

冷倩¹ 崔瑞琴² 陆彪³

(1. 宁夏医科大学; 2. 宁夏医科大学医学院妇儿教研室; 3. 宁夏医科大学总医院儿科, 宁夏 银川 750004)

[摘要] **目的** 探讨雷公藤多苷对青春期大鼠睾丸组织的近、远期影响及机制。**方法** 5周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 随机分为对照组、小剂量和大剂量雷公藤多苷组 (每组 16 只), 分别给予 1% 羧甲基纤维素钠、雷公藤多苷小剂量 (每日 6 mg/kg) 和大剂量 (每日 12 mg/kg) 灌胃 4 周, 观察停药 24 h 和 4 周后大鼠的睾丸组织学改变及 c-kit 表达。**结果** 停药 24 h, 两个雷公藤多苷组睾丸生精细胞均减少、c-kit 表达下调 ($P < 0.05$); 停药 4 周, 小剂量组各项实验指标与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 大剂量组仍表现为生精上皮萎缩、间质水肿, 睾丸重量、生精细胞 c-kit 表达下降 ($P < 0.01$)。**结论** 雷公藤多苷可导致青春期大鼠睾丸组织损伤, 小剂量引起睾丸组织近期可逆性损伤; 大剂量可致睾丸组织远期损伤, 提示睾丸间质病变可能是雷公藤多苷致青春期大鼠睾丸组织远期损伤的原因之一。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13 (10): 832-836]

[关键词] 雷公藤多苷; 睾丸; C-kit; 青春期大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)10-0832-05

Effects of multi-glycosides of tripterygium wilfordii on histological structures and c-kit expression in testes of pubertal rats

LENG Qian, CUI Rui-Qin, LU Biao. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China (Cui R-Q, Email: cuirq99@sina.com)

Abstract: Objective To study the short- and long-term effects of multi-glycosides of tripterygium wilfordii (GTW) on the histological structures of testes in pubertal rats and possible mechanisms. **Methods** Forty-eight 5-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly intragastrically administered with low-doses GTW (6 g/kg daily) and high-doses GTW (12 mg/kg daily) or 1% sodium carboxymethylcellulose (6 mL/kg, control group) for four weeks. The testes were sampled for detecting histological structures and c-kit expression by immunohistochemistry 24 hrs and four weeks after drug discontinuance. **Results** The number of spermatogenic cells and the expression of c-kit in testes were reduced in the two GTW treatment groups 24 hrs and 4 weeks after drug discontinuance compared with those in the control group ($P < 0.05$). Four weeks after drug discontinuance atrophy and interstitial edema of seminiferous epithelium in testes were observed, and the testis weight and the expression of c-kit in testes were reduced in the high-doses GTW group compared with those in the control group ($P < 0.01$). There were no significant differences in the parameters observed between the low-dose GTW and the control group 4 weeks after drug discontinuance. **Conclusions** GTW has adverse effects on testes in a dose-dependent manner in puberty rats. Low-dose GTW may cause reversible short-term injuries to testis tissues. The damage of the interstitial tissue of testes induced by high-dose GTW may be one of the causes of long-term injuries of testes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (10): 832-836]

Key words: Multi-glycosides of tripterygium wilfordii; Testis; C-kit; Pubertal rats

雷公藤多苷 (multi-glycosides of tripterygium wilfordii) 是从中药植物雷公藤的根芯提取的有效组分, 是目前国内儿科治疗肾脏疾病应用最多的雷公藤制剂, 临床资料显示, 部分性成熟前服用雷公藤多苷的男性到成年期出现了精子减少、活力下降和畸形率增加^[1]。但关于雷公藤多苷对性成熟前生殖功能损伤的研究目前报道较少。干细胞因子受体 (c-kit) 是由原癌基因 *Wlocus* 编码的跨膜酪氨酸激

[收稿日期] 2011-05-30; [修回日期] 2011-07-17
[基金项目] 宁夏医科大学校级科研项目 (XT200805)。
[作者简介] 冷倩, 女, 硕士研究生。
[通信作者] 崔瑞琴, 副教授。

酶受体,在精原细胞的发育和分化过程中起着重要作用,缺乏 c-kit 蛋白时,精原细胞无法分化^[2]。本研究观察雷公藤多苷对青春期大鼠睾丸组织 c-kit 表达的近期、远期变化,探讨雷公藤多苷所致青春期睾丸组织的损伤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

5 周龄清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只,体重(130 ± 10)g (由宁夏医科大学实验动物中心提供);雷公藤多苷片(江苏美通制药有限公司);羧甲基纤维素钠(天津市光复精细化工研究所);兔抗 c-kit 多克隆抗体(北京博奥森公司生产);兔 SP 检测试剂盒 SP-9001(北京中杉金桥生物技术有限公司);BMJ-AⅢ型包埋机(常州中威电子仪器厂);Leica RM2245 型自动切片机(Leica 公司)。

1.2 分组和给药方法

48 只大鼠随机分为对照组(16 只)和实验组(小剂量、大剂量雷公藤多苷组,各 16 只),对照组给予 1% 羧甲基纤维素钠溶液每日 6 mL/kg 灌胃,实验组给予雷公藤多苷,用量依据儿科临床常用剂量:小剂量每日 1 mg/kg 及大剂量每日 2 mg/kg^[3-4],换算为大鼠剂量每日 6 mg/kg 和 12 mg/kg,雷公藤多苷片用前研末,用 1% 羧甲基纤维素钠溶液配制 1 mg/mL 和 2 mg/mL 的混悬剂,以每日 6 mL/kg 给药容积分别给两个实验组大鼠灌胃,每日上午给药 1 次,根据体重每周调整剂量,连续 4 周,分别于末次给药 24 h 和 4 周时,每组随机取 8 只称重后处死,取肾脏组织检测各项指标。

1.3 睾丸组织病理检查

取右侧睾丸准确称重,按脏器系数 = 脏器重(g)/体重(100 g)计算睾丸脏器系数。10% 中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察各组大鼠睾丸组织结构,用 NIS-element 显微成像系统采集图像,IPP 6.0 图像分析软件对每个样本随机选取 5 个曲细精管,计数每个曲细精管的细胞数,求平均值。

1.4 睾丸组织免疫组化

采用 SP 法检测睾丸组织中 c-kit 的表达,石蜡切片脱蜡至水;枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复 15 min;3% H₂O₂ 孵育 15 min;正常羊血清室温封闭 25 min;滴加 c-kit 一抗(1:200)4℃ 过夜;恢复室温 30 min;滴加生物素标记的二抗 37℃ 孵育 30 min;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 37℃

孵育 25 min,以上各步骤间用 0.01 mol/L (pH 7.2 ~ 7.4) PBS 洗 3 次,3 min/次。加 DAB 显色后终止反应,蒸馏水充分洗涤;苏木精衬染 30 s,自来水返蓝 10 min,常规脱水、透明、封片。实验以 0.1 mol/L (pH 7.2 ~ 7.4) PBS 液代替一抗作为阴性对照,光镜下观察,睾丸生精细胞胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞。用 NIS-element 显微成像系统采集图像,每个样本采集图像 1 张,随机选取 5 个曲细精管,用 IPP 6.0 图像分析软件测量每个曲细精管累计光密度(IOD)及面积,并以两者比值计算平均光密度值(AOD)作为 c-kit 表达的强度,取均值为最终结果。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间数据比较采用 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤多苷对睾丸重量及脏器系数的影响

停药 24 h,各组间睾丸重量及脏器系数比较差异无统计学意义。停药 4 周,小剂量组睾丸重量与对照组比较差异无统计学意义,大剂量组睾丸重量较对照组和小剂量组明显降低, ($P < 0.05, P < 0.01$);小剂量组睾丸脏器系数与对照组比较差异无统计学意义,大剂量组睾丸脏器系数较对照组降低($P < 0.05$),与小剂量组比较差异无统计学意义。见表 1 ~ 2。

表 1 停药 24 h 大鼠体重、睾丸重量、睾丸脏器系数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	睾丸重量(g)	睾丸脏器系数
对照组	8	343 ± 34	1.59 ± 0.09	0.47 ± 0.05
小剂量组	8	341 ± 32	1.64 ± 0.10	0.48 ± 0.05
大剂量组	8	316 ± 39	1.53 ± 0.18	0.49 ± 0.05
F 值		1.347	1.388	0.336
P 值		0.282	0.271	0.718

表 2 停药 4 周大鼠体重、睾丸重量、睾丸脏器系数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	睾丸重量(g)	睾丸脏器系数
对照组	8	429 ± 30	1.78 ± 0.13	0.42 ± 0.03
小剂量组	8	439 ± 31	1.59 ± 0.16	0.36 ± 0.03
大剂量组	8	403 ± 55	1.27 ± 0.41 ^{b,c}	0.31 ± 0.09 ^a
F 值		1.707	7.485	6.186
P 值		0.206	0.004	0.008

a:与对照组比较, $P < 0.05$, b:与对照组比较, $P < 0.01$, c:与小剂量组比较, $P < 0.05$

2.2 雷公藤多苷对睾丸组织形态学的影响

如图1所示,光镜下可见,停药24 h时对照组大鼠曲细精管内各级生精细胞排列整齐、紧密,管腔内精子丰富,支持细胞发育良好,间质组织发育正常;小剂量组大鼠各级生精细胞排列略稀疏,支持细胞及间质组织较对照组无明显变化;大剂量组生精细胞排列稀疏,间质细胞较其他两组无明显变化。停药4周,对照组大鼠曲细精管管腔规则,各级生精

细胞排列整齐、紧密,精子丰富,支持细胞发育良好,间质细胞、间质组织发育良好;小剂量组较对照组形态学无明显差别;大剂量组曲细精管明显萎缩,管腔大小不等,管腔内精子、精子细胞消失,精母细胞偶见,精原细胞散在,排列紊乱,支持细胞呈空泡样改变,数量稀少,部分管腔内可见多核巨细胞,睾丸间质水肿,可见淋巴细胞浸润,间质毛细血管管壁增厚,血管腔变窄。

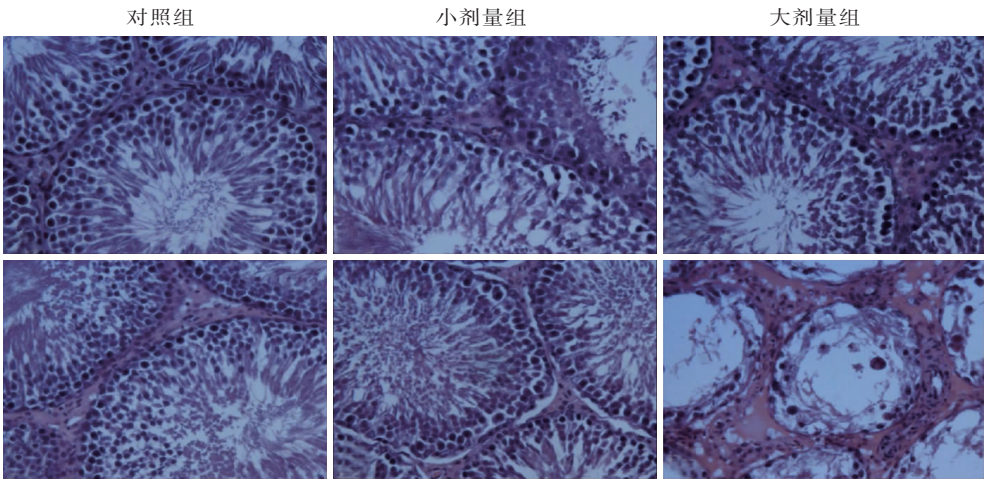


图1 各组大鼠睾丸组织病理学变化(HE,×400) 停药24 h对照组曲细精管内各级生精细胞排列整齐、紧密,管腔内精子丰富,支持细胞发育良好,间质组织发育正常;小剂量组及大剂量组生精细胞排列略稀疏。停药4周对照组曲细精管管腔规则,各级生精细胞排列整齐、紧密,精子丰富,支持细胞发育良好,间质细胞、间质组织发育良好;小剂量组较对照组形态学无明显差别;大剂量组曲细精管明显萎缩,管腔大小不等,管腔内精子、精子细胞消失,精原细胞散在,排列紊乱,支持细胞呈空泡样改变,数量稀少,睾丸间质水肿,可见淋巴细胞浸润,间质毛细血管管壁增厚,血管腔变窄。

2.3 雷公藤多苷对生精细胞计数的影响

停药24 h,小剂量组睾丸生精细胞较对照组明显减少($P<0.05$);大剂量组睾丸生精细胞较对照组及小剂量组均减少(分别 $P<0.01$, $P<0.05$)。停药4周,小剂量组睾丸生精细胞计数与对照组比较差异无统计学意义;大剂量组睾丸生精细胞与对照组和小剂量组相比均明显减少(均 $P<0.01$)。见表3。

表3 各组大鼠生精细胞计数比较 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	停药24 h	停药4周
对照组	8	252±35	225±32
小剂量组	8	229±49 ^a	242±66
大剂量组	8	205±32 ^{b,c}	115±66 ^{b,d}
F值		11.184	39.491
P值		<0.001	<0.001
a:与对照组比较, $P<0.05$; b:与对照组比较, $P<0.01$; c:与小剂量组比较, $P<0.05$; d:与小剂量组比较, $P<0.01$			

2.4 雷公藤多苷对睾丸组织 c-kit 表达的影响

停药24 h,对照组睾丸组织 c-kit 主要表达于初

级精母细胞胞浆及少数精原细胞胞浆;小剂量组睾丸组织 c-kit 表达于初级精母细胞胞浆,少数精原细胞胞浆表达,与对照组相比表达减少,差异有统计学意义($P<0.05$);大剂量组睾丸组织有少量初级精母细胞胞浆表达 c-kit,精原细胞偶见表达,表达量明显低于对照组及小剂量组($P<0.01$)。停药4周,对照组睾丸组织 c-kit 主要表达于初级精母细胞胞浆及少数精原细胞胞浆,与小剂量组比较差异无统计学意义;大剂量组睾丸组织个别精原细胞胞浆有 c-kit 表达,表达量明显低于对照组及小剂量组($P<0.01$)。见表4,图2。

表4 各组睾丸组织 c-kit 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	停药24 h	停药4周
对照组	8	0.027±0.002	0.024±0.003
小剂量组	8	0.024±0.001 ^a	0.024±0.001
大剂量组	8	0.016±0.002 ^{b,c}	0.014±0.003 ^{b,c}
F值		37.582	28.408
P值		<0.001	<0.001
a:与对照组比较, $P<0.05$; b:与对照组比较, $P<0.01$; c:与小剂量组比较, $P<0.01$			

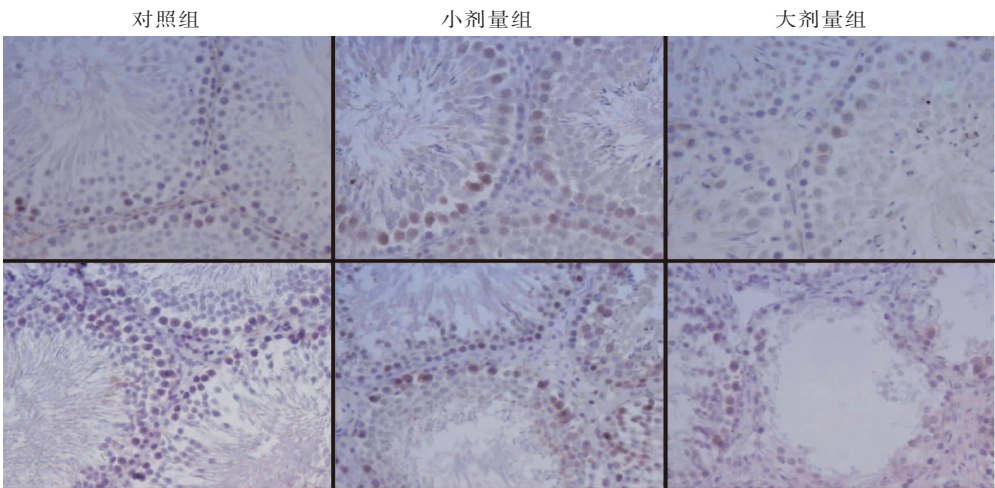


图2 各组大鼠睾丸组织 c-kit 表达(DAB 染色, ×400) 停药 24 h,对照组 c-kit 主要表达于初级精母细胞胞浆及少数精原细胞胞浆;小剂量组 c-kit 表达于初级精母细胞胞浆及少数精原细胞胞浆;大剂量组少量初级精母细胞胞浆表达 c-kit,精原细胞偶见表达。停药 4 周,对照组 c-kit 主要表达于初级精母细胞胞浆及少数精原细胞胞浆;小剂量组 c-kit 表达与对照组无明显差别;大剂量组个别精原细胞胞浆有 c-kit 表达。生精细胞胞浆或胞膜上出现棕黄色颗粒为 c-kit 阳性细胞。

3 讨论

既往研究表明雷公藤多苷长期毒性的靶器官主要为睾丸和附睾,损伤程度与用药剂量、疗程有关,剂量过大或疗程过长可导致成年大鼠附睾内精子畸形、活力下降、数量减少或消失,睾丸曲细精管各级生精细胞减少,曲细精管萎缩、生精上皮退行性变,支持细胞减少^[5]。

本研究根据文献^[6]选择 5 周龄 SD 大鼠作为研究对象,结果显示,停药 24 h 后两个实验组 SD 大鼠睾丸精子、精子细胞减少,其中大剂量组减少更为显著;停药 4 周,小剂量组睾丸损伤有所恢复,而大剂量组睾丸重量、脏器系数明显下降,生精上皮损伤进一步加重,并可见间质炎性病变,表明雷公藤多苷可导致青春期 SD 大鼠睾丸组织损伤,损伤程度与用药剂量有关,这一结果与既往研究一致^[7]。小剂量雷公藤多苷所致损伤发生在近期,主要累及睾丸晚期生精细胞,停药至性成熟后有所恢复;大剂量可致远期损伤,自停药至性成熟后,病变逐渐加重,可累及各级生精细胞,睾丸支持细胞变性、间质受损。

自青春期开始,睾丸内生精过程启动,生精细胞的“源头”—精原细胞分化为各级生精细胞,这是一个非常关键的时期,多种外界理化因素都能阻断这一过程。有研究表明,c-kit 的表达与精原细胞分化有直接关系,是精原细胞走向分化的标志^[8]。本研究观察到,停药 24 h 后,两个雷公藤多苷组生精细胞 c-kit 表达均出现下调,且大剂量组表达下调更为

明显。停药 4 周后,小剂量组 c-kit 表达与对照组比较无明显差异,生精细胞数量也有所恢复,而大剂量组 c-kit 表达及生精细胞计数仍明显低于对照组,提示精原细胞分化持续受抑,下游生精细胞坏死、脱落后精原细胞不能及时分化补充,导致管腔中下游生精细胞缺如。据此推测,精原细胞分化持续受抑也是雷公藤多苷引起睾丸组织远期损伤的原因之一。

本研究发现,停药 4 周后,大剂量组睾丸组织损伤进行性加重,而小剂量组损伤有所恢复,提示给药剂量较大时可能导致雷公藤多苷在组织内蓄积,从而停药后继续产生损伤作用。有体外实验表明,睾丸支持细胞对雷公藤甲素的损伤敏感程度比生精细胞低^[9],本研究结果与之相符。同时本研究发现大剂量组停药 4 周后支持细胞与生精细胞都发生了明显损伤,间质细胞未见明显变化,推测药物的蓄积部位可能集中在支持细胞。

随着青春期生精过程的启动,睾丸体积增长,曲细精管面积扩大,生精细胞数量显著增多^[10],此时间质血管也相应增多^[11],血流量增加,为生精细胞大量增殖提供充足的物质条件。本研究观察到,停药 4 周后大剂量组大鼠睾丸间质毛细血管壁增厚,管腔变窄,间质水肿,提示存在微循环障碍,推测睾丸组织微循环障碍导致组织缺血缺氧、供需失调可能也是雷公藤多苷致睾丸组织远期损伤的因素之一。

另外,本研究发现大剂量组停药 4 周后睾丸组织出现明显病变,但管腔内仍有一定数量的精原细胞和支持细胞,且存在生精细胞 c-kit 表达,提示生

精功能也许还有恢复的可能,有待于在今后的研究中进一步观察。

[参 考 文 献]

[1] 张维真,王淑华. 雷公藤、瘤可宁对肾病患者性腺功能的远期影响[J]. 中国中西医结合杂志,1996,16(2):113-114.

[2] 白杨,叶哲伟,曾甫清. 大鼠睾丸中 c-kit 的表达特点与精原干细胞的分化[J]. 中华男科杂志,2007,13(1):69-70.

[3] 周光太,邓正华,黄善文. 雷公藤总苷对肾病型紫癜性肾炎患儿糖皮质激素受体的影响及其临床意义[J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(17):1315-1316.

[4] 李莹莹,任献青. 改良双倍剂量雷公藤多甙治疗紫癜性肾炎[J]. 实用儿科临床杂志,2002,17(4):362-363.

[5] 张才田,王雪松,胡雪玲,崔毓桂,童建孙,王兴海. 雷公藤多甙抑制大鼠精子发生的研究[J]. 生殖医学杂志,2008,17(2):118-122.

[6] McCormick CM, Mathews IZ. HPA function in adolescence: role

of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2007, 86(2):220-233.

[7] 杨建一,高宝珍,李莉,王文琄,郭红刚,边思成. 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):393-397.

[8] 白杨,夏伟,叶哲伟,曾甫清. 精原细胞分化过程中 c-kit mRNA 和蛋白的表达[J]. 华中科技大学学报,2008,37(5):627-629.

[9] 张晶璇,邱云良,王鹏,徐湘婷,马璟,杨继红. 雷公藤甲素 SD 大鼠睾丸毒性体外试验研究[J]. 云南农业大学学报,2007,22(1):74-78.

[10] 张健,李健,王晓云,孙烨,牛丽静,段相林. 大鼠生精小管体视学及 PCNA、凋亡表达的发育变化研究[J]. 解剖学报,2002,33(6):617-620.

[11] 康友敏,张健,段相林. 大鼠睾丸微血管变化的定量研究[J]. 中国老年学杂志,2003,23(4):252-254.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

欢迎订阅《国际儿科学杂志》

《国际儿科学杂志》(原刊名国外医学儿科学分册)是中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办的国家级儿科学专业学术期刊,为中国科技论文统计源期刊,中国科技类核心期刊。曾荣获卫生部首届全国医药卫生优秀期刊二等奖、中华医学会系列杂志优秀期刊三等奖。主要栏目有综述、述评、论著等。报道内容涉及儿科各专业,是国内专门介绍国内外儿科学界最新进展的国家级医学学术期刊之一,综述为本刊特色栏目,均为国内医学院校、科研单位、研究所、教学医院的研究生导师及高年资临床医生撰写,所刊文章基本代表国内外近 10 年来,特别是近 5 年儿科学术发展水平,为临床医生提供儿科学疾病诊治最新进展,为儿科科研人员确定科研课题提供最前沿的参考信息。

杂志为大 16 开本,双月刊,单月 26 日出版,国内外公开发行,刊号为 CN21-1529/R,ISSN1673-4408。每期定价 10 元,全年 60 元。通过邮局发行,邮发代号 8-73。也可随时汇款至《国际儿科学杂志》编辑部,汇款时,请填写收件人的姓名、详细地址、邮编及所订杂志的期号和册数,不另寄邮费。

联系地址:沈阳市和平区三好街 36 号 邮编:110004
电话:024-23845727,024-96615 转 13719 传真:024-23845727 E-mail:ekfcbjb@yahoo.com.cn

《国际儿科学杂志》编辑部