

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00941

雷公藤多甙对小鼠生精功能相关基因 *Herc4*、*Ipo11* 和 *Mrto4* 表达的影响

黄迪¹, 李颀¹, 何立群^{1,2}

1. 上海中医药大学附属曙光医院肾内科, 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203;
2. 上海市高校中医内科 E-研究院(上海中医药大学), 上海 201203

摘要: 文章从影响生精功能相关基因的角度探讨雷公藤多甙抑制小鼠生殖功能的机理, 将小鼠随机分为对照组、雷公藤多甙组, 应用雷公藤多甙灌胃造成雄性小鼠生殖功能障碍, 通过与雌鼠(1:2)合笼观察怀孕率和睾丸组织变化, 并采用基因芯片技术观察小鼠睾丸组织的基因表达。结果发现雷公藤多甙组小鼠较对照组怀孕率明显下降, 尤其是在 8 周后怀孕率为 0。睾丸曲细精管管壁上生精细胞数量减少, 曲细精管内生精细胞部分或全部脱落, 阻塞于管腔内, 并发现有 1 932 条基因表达出现异常, 与生殖相关基因 354 条, 上调 112 条, 下调 242 条。其中有已经公认的与生殖密切相关的基因 *Herc4*、*Ipo11* 和 *Mrto4* 等的表达异常。提示雷公藤多甙引起的小鼠生殖功能障碍与其致生精相关基因的表达异常有关。

关键词: 雷公藤多甙; 小鼠; 基因; 生精

Influence of *Tripterygium wilfordii* on the expression of spermiogenesis related genes *Herc4*, *Ipo11* and *Mrto4* in mice

HUANG Di¹, LI Jie¹, HE Li-Qun^{1, 2}

1. Key Laboratory of Liver and Kidney Disease Syndrome of the Ministry of Education, Department of Nephrology, Shanghai Shuguang Hospital Affiliated with Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. E-Institute of Traditional Chinese Internal Medicine of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai TCM University, Shanghai 201203, China

Abstract: The mechanism of *Tripterygium wilfordii* (GTW) inhibiting productive function was studied in the male mice. The male mice were randomly divided into control group and GTW group. GTW group had been given *Tripterygium wilfordii* for 8 weeks. The pregnancy rate was investigated after the male mice mated with the normal female mice (1 : 2) in one week. Also the pathological changes of the male mice testis were evaluated by the optical microscope and the expression of genes related to reproduction was investigated by Gene Chip Technology 8 weeks later. The results showed pregnancy rate of GTW group was obviously decreased compared with the control mice, and no pregnancy occurred in GTW group at 8 weeks. In the testis tissues of GTW group, the spermatogenic cells in the convoluted seminiferous tubules were obviously decreased and the lumen was obstructed by large deceduous spermatogenic cells. The number of abnormal expression genes in this group was 1 932. Among them, 354 genes were related to reproduction, including 112 up-regulated

收稿日期: 2009-02-09; 修回日期: 2009-04-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助(编号: 30630012)和上海市教育委员会 E-研究院建设计划项目(编号: E03008)资助

作者简介: 黄迪(1968-), 男, 博士, 研究方向: 肾脏病的基础与临床研究。Tel: 021-51328888-7207; E-mail: huangacheng002@163.com

通讯作者: 何立群(1959-), 男, 博士, 博士生导师, 博士后合作导师, 研究方向: 肾脏病的基础与临床研究。Tel: 021-53821650-351;
E-mail: heliqun59@yahoo.com.cn.

and 242 down-regulated genes. Genes *Herc4*, *Ipo11*, and *Mrto4*, which are closely associated with spermiogenesis, were expressed irregularly. The outcome indicates that the inhibitive reproduction of *Tripterygium wilfordii* in the male mice is associated with the abnormal expression of spermiogenesis genes.

Keywords: *Tripterygium wilfordii*; mice; gene; spermiogenesis function

雷公藤多甙由卫矛科雷公藤属植物提取精制而成,在临床治疗中发现其对一些疑难杂症如自身免疫性疾病具有独特的疗效,目前广泛运用于治疗类风湿性关节炎、慢性肾炎、红斑狼疮等几十种疾病。然而其治疗作用下出现的毒副作用却不能忽视,尤其是对生殖系统的损害给患者带来极大的困扰。对于雷公藤多甙引起生殖功能障碍的主要原因,早在 20 世纪 80 年代初,我国学者就已发现口服雷公藤多甙可致男性精子计数下降。给 Wistar 雄性大鼠灌服 8 周后,发现睾丸内的精子细胞及精子减少,曲细精管缘出现病理形态的细胞及多核巨细胞,附管内可见精子断头及脱落细胞,对其他发育阶段的生精细胞及睾丸间质细胞也有影响,说明雷公藤多甙的抗雄性生育活性机制可能与雷公藤多甙对精子细胞的作用有关^[1]。钱叶勇等^[2]通过肾移植大鼠灌服雷公藤多甙 20 d 后,发现睾丸生殖上皮呈退行性变,精子细胞和精子受累最早,精母细胞次之,精原细胞敏感性最低。尽管对雷公藤多甙引起生殖系统的损害已为医学界所公认,而且也有大量的文献报道从性激素水平的变化、抑精作用、睾丸病理形态改变等方面进行了雷公藤抑制生殖功能的机理研究,但是从生精相关基因角度的研究报道并不多见。因此,本研究在细胞基因水平上,尤其是对生殖力关联基因研究雷公藤多甙抑制生殖功能作用靶点,以进一步阐明雷公藤多甙影响生殖功能的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

成年 BALB/C 雄性小鼠,体重 $25 \text{ mg} \pm 3 \text{ mg}$,由上海市中医药大学实验动物中心(SPF 级)提供。动物房温度 $18 \sim 22^\circ\text{C}$,湿度 $50\% \sim 60\%$ 。实验动物许可证号:SYXK(沪)2004-2005。

1.1.2 药物及主要试剂

雷公藤多甙片由江苏美通制药有限公司生产,国药准字 Z32021007 批号:050905,规格:10 mg/片,每片含雷公藤多甙 10 mg。

DEPC 和 L-2-氯苯丙氨酸(Sigma 美国)、Trizol、M-MuLV、Taq 酶(Invitrogen)、Cy3/cy5(Amersham pharmacia Biotech)、逆转录酶(Superscript II)Gibco BRL、Oligo(dt)18 (上海生工生物工程技术有限公司)、dNTP(Promega)。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

将 20 只雄性小鼠随机分为对照组和雷公藤多甙组,每组 10 只。对照组给予 0.5 mL 蒸馏水;雷公藤多甙组将雷公藤多甙片研成粉末加入蒸馏水制成混悬液,雷公藤多甙 30 mg/kg 体重/d,相当于成人剂量 20 倍,每日灌胃一次。每天观察各组小鼠的一般情况。每周观察雄鼠的体重变化,并根据体重调整给药剂量,灌胃 4 周后将各组雄鼠与雌鼠 1:2 合笼 7 d,2 周后将雌性小鼠处死,剖开子宫检查有否胎鼠并观察怀孕率。合笼 7 d 后,雄性小鼠继续灌胃 4 周,再次合笼 7 d 后,处死雄性小鼠迅速摘取睾丸,去除外包膜,放于液氮中保存备检(10 min 内)。另取小鼠睾丸放入 10% 福尔马林固定液中,准备光镜下进行睾丸组织形态观察。雌鼠正常饲养 2 周后处死,剖开子宫检查有否胎鼠并观察怀孕率。

1.2.2 基因测定

1.2.2.1 芯片制备

用载体两端通用引物对 16 000 条全长基因进行 PCR 扩增^[3,4],产物长度为 1 000~3 000 bp,琼脂糖电泳监控 PCR 质量。浓缩后的扩增产物作为靶基因溶解于点样液中,用 Cartesian Pixsys7500 点样仪点在硅烷化玻片上。点样后进行 2 h 水合、室温干燥 30 min,再用 0.2% SDS、水及 0.2% 硼氢化钠溶液处

理 10 min, 晾干备用。

1.2.2.2 探针制备

采用条件优化的一步法抽提雷公藤多甙处理 8 周的小鼠睾丸和正常小鼠睾丸组织总 RNA, 将 RNA 沉淀溶解在 RNase free 的 Milli Q 水中, 测 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 按 Qiagen 公司 Oligotex mRNA spin column 操作进行 RNA 纯化。在 50 μ L 逆转录反应体系中加入 3 μ g mRNA, 逆转录合成及纯化 cDNA 探针, 用 Cy3 dUTP 标记正常组织 mRNA, 用 Cy5 dUTP 标记雷公藤多甙小鼠睾丸组织 mRNA。乙醇沉淀后将 Cy3 dUTP 和 Cy5 dUTP 标记的探针混合溶解在 20 μ L 5 \times SSC+0.2% SDS 杂交液中。

1.2.2.3 杂交和洗涤

将表达谱芯片(由上海博星基因芯片有限责任公司提供)和杂交探针分别做 95 $^{\circ}$ 变性 30 s 和 2 min 后置于杂交舱内, 立即将探针加在基因芯片上, 用杂交密封舱加以密闭, 不留有气泡。于恒温杂交箱内 42 $^{\circ}$ C 杂交 18 h。然后揭开盖玻片, 按顺序用 2 \times SSC+0.2% SDS、0.1 \times SSC+0.2%SDS、0.1 \times SSC 洗涤 10 min, 室温晾干。

1.2.2.4 差异基因检测与生物学信息分析

ScanArray 4000 扫描仪扫描芯片, 得到的 Cy3/Cy5 图像文件通过划格确定杂交点范围, 过滤背景噪声, 提取基因表达的荧光信号强度值。为了避免系统误差, 实验数据进行均一化处理。均一化处理时先依据以下 2 个原则筛选出参与均一化处理的有效基因点: (1) 该基因点的 Cy3、Cy5 信号值皆大于 200, 或者其中之一大于 800; (2) 该基因点的 Cy5 信号值/Cy3 信号值的比值在 0.1~10 之间。用 GenePix Pro 3.0 图像处理软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值, 筛选出比值大于 2 或小于 0.5 的基因点, 所代表的基因在与两种探针杂交时表现出较大的差异, 且上下调趋势一致, 程度相似。

1.2.3 睾丸组织病理观察

雄性小鼠处死后, 迅速摘取睾丸, 去除外包膜, 放入 10%福尔马林固定液中, 在本院肾病研究所进行

组织脱水, 石蜡包埋, 切片、HE 染色, 光镜下观察。

2 结果与分析

2.1 一般状态观察

雷公藤多甙组小鼠 2 周后出现毛发枯槁、无光泽或竖毛。4 周后逐渐加重, 出现弓背蜷缩, 行动迟缓, 嗜睡、倦怠懒动。而对照组小鼠没有上述状态。

2.2 怀孕率观察

分别于灌胃 4 周和 8 周后将各组雄鼠与雌鼠 1: 2 合笼 7 d, 分笼 2 周后观察雌鼠怀孕情况, 结果显示雷公藤多甙灌胃 4 周后雌鼠怀孕率 15%, 较对照组明显下降, 差异显著($P<0.05$), 8 周后雌鼠怀孕率为 0%, 与对照组相比差异极显著($P<0.01$), 说明雷公藤多甙对生殖功能的影响呈时间依赖性(表 1)。

2.3 总 RNA 样品检测结果

从 8 周的雷公藤多甙组小鼠睾丸和对照组小鼠睾丸组织中提取总 RNA 后, 进行 OD 测定, OD_{260}/OD_{280} 是 1.83(1.8~2.0 为合格), 说明所提取的雷公藤多甙组小鼠睾丸和对照组小鼠睾丸组织的总 RNA 完整性好。

2.4 对照组与雷公藤多甙组小鼠的基因表达

分别采用对照组和雷公藤多甙组小鼠睾丸的总 RNA 进行基因的筛选, 对照组睾丸组织表达谱(Cy3)扫描结果与雷公藤多甙小鼠睾丸组织表达谱(Cy5)扫描结果经计算机数据叠加后产生的图像见图 1。该图反映的是每个基因在对照组和雷公藤组小鼠睾丸组织中表达丰度的比值, 反映了雷公藤多甙组小鼠睾丸组织和对照组小鼠睾丸组织间基因表达的差异。图 1 中, 芯片上绝大多数基因在两种组织中的表达丰度是一样的, 但存在少数差异基因点(白色), 其在表达谱芯片上的信号差异大于 2 倍。图 2 是表达变化的基因的强度在二维坐标中的离散情况图示。

表 1 各组致雌鼠怀孕率表

组别	雄鼠(雌鼠)	4 周		8 周	
		怀孕数(只)	怀孕率(%)	怀孕数(只)	怀孕率(%)
对照组	10(20)	12	60	13	65
雷公藤多甙组	10(20)	3	15 #	0	0 # #

注: # 与对照组比较 $P<0.05$; # # 与对照组比较 $P<0.01$ 。雌雄比例 2: 1, 10 只雄鼠与 20 只雌鼠合笼。

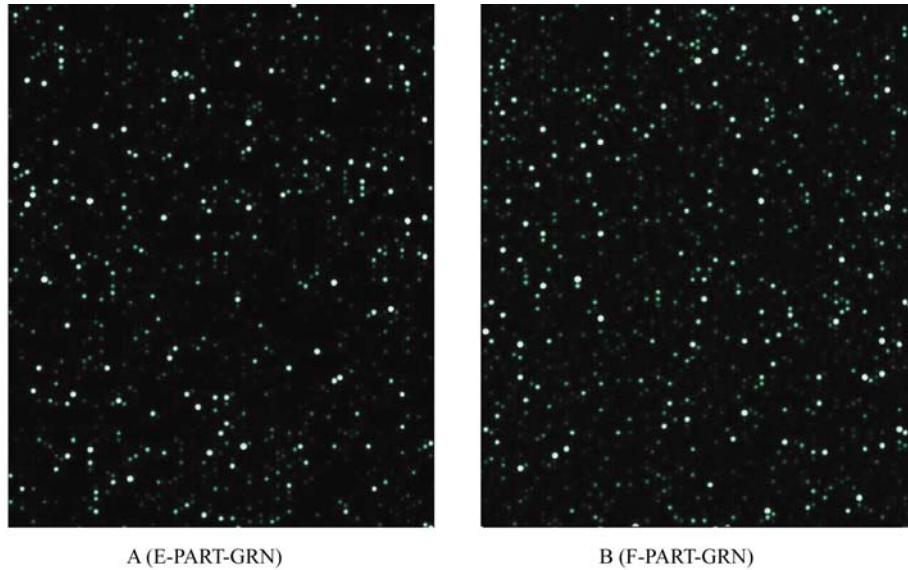


图 1 基因位点荧光扫描图

A: E-PART-GRN (生物芯片微阵列的点阵图)为 CY3 荧光扫描对照组小鼠睾丸组织基因表达的点阵图;

B: F-PART-GRN (生物芯片微阵列的点阵图)为 CY5 荧光扫描雷公藤多甙组小鼠睾丸组织基因表达的点阵图。

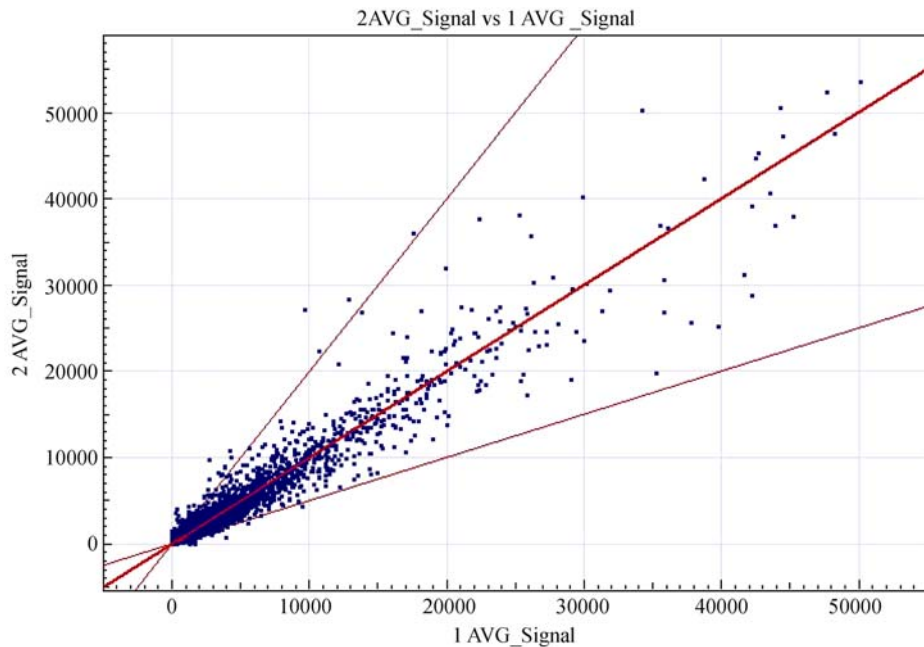


图 2 RG (基因丰度比)散点图

中分射线是正常组睾丸组织表达的基因丰度状态的数值, 上红线为与正常睾丸组织 2 倍的基因丰度状态的数值, 下红线为与正常睾丸组织 0.5 倍的基因丰度状态的数值, 蓝点为雷公藤多甙组睾丸组织基因的异常表达丰度比数值, 离中分射线越远表达差异越显著。

2.5 与雷公藤多甙引起生殖相关基因改变的生物信息学分析

生物信息学分析发现有差异表达的基因 1 932 条, 占基因总数(16 000 条)的 12.08%, 其中属于生殖相关基因 354 条(2.21%), 表达上调的有 112 条(平均 ratio 值为 3.08), 表达下调的有 242 条(平均 ratio

值为 0.30)。主要异常表达的生殖相关基因有:

a. *Herc4* 基因: 位于染色体的 10B4 位点, 是 E3 泛素连接酶, 它在所有组织中都有表达, 但在睾丸中表达最高, 尤其是在精子形成时高表达。b. *Mrto4* 基因: 位于染色体 4D3 位点, 它可以在精子形成过程中调整一些特殊的 mRNAs 多聚腺苷酸化和脱腺苷化。c. *Ipo11*

基因: 位于染色体的 13 D2.1 位点, 它可以调节睾丸中 *TSLC1/IGSF4* 来影响精子形成的。

目前在我国已经发现的与生殖疾病相关基因 782 条, 我们发现雷公藤多甙使其中的 354 条发生了上调或下调改变, 这些基因表达的改变会引起生殖功能的障碍, 发生不育症和不孕症, 例如: *Herc4*、*Ipo11* 和 *Mrto4* 三个主要表达于睾丸的基因下调, 可以导致生精能力下降, 从而引起雄性小鼠不育症。

2.6 睾丸组织病理观察

光镜观察结果显示, 对照组小鼠 Leydig 细胞在曲细精管间呈簇状分布, 多呈菱形, 细胞大, 胞浆丰富; 细胞核呈圆形或卵圆形, 核内染色质呈均匀分布(图 3, A 和 B)。雷公藤多甙组小鼠曲细精管管壁上生精细胞数量减少, 少量曲细精管可见紧靠基膜的支持细胞及精原细胞, 曲细精管内生精细胞部分或全部脱落, 阻塞于管腔内, 或生精细胞排列紊乱(图 3C)。雷公藤多甙组小鼠 Leydig 细胞仍呈簇分布于间质区, 细胞数目无明显减少, 细胞多呈圆形或卵圆形且较对照组缩小, 胞浆量尚无减少, 细胞核无明显皱缩, 染色质浓集, 深染(图 3D)。

3 讨论

近 20 年来, 随着马兜铃酸肾损害被发现, 中草药毒性作用的研究受到国内外医学界的广泛关注, 而中药的毒性作用发生恰恰是由于中药的不合理使用造成的, 因此对中药药物功能作用的准确把握和计量合理运用就会造福人类。

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook.F.), 又名黄藤、黄藤木、黄腊藤、断肠草等, 为卫矛科雷公藤属植物的根、叶及花, 产于中国南部地区, 其药用部分多用去二层皮的根木质部。雷公藤多甙由卫矛科雷公藤属植物雷公藤去二层皮的根木质部提取精制而成。具有抗炎、抗免疫、抗生育、抗肿瘤、抗菌活性。雷公藤中已分离出 70 多种化学单体, 其中以二萜内酯为主要活性成分。在治疗风湿性关节炎、慢性肾炎蛋白尿等方面已显示出显著的临床疗效, 然而它引起不育不孕等的副作用也限制了它在临床上更广泛的应用, 因此从基因角度研究雷公藤引起生育功能减退的机理对于临床预防副作用的出现及更好的发挥治疗作用具有重要的指导意义和应用价值。

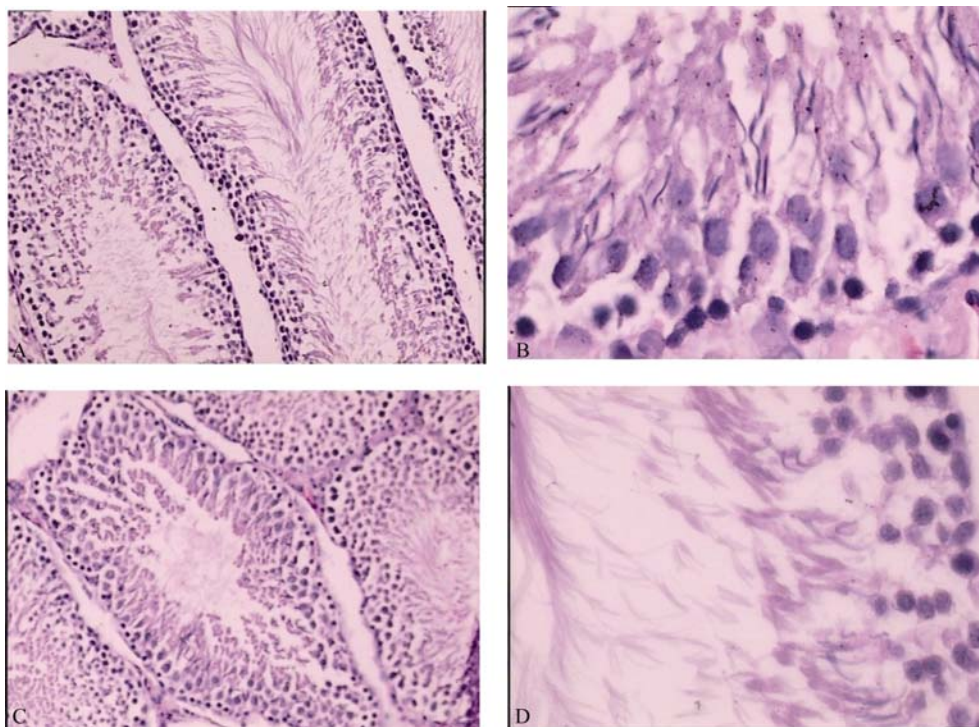


图 3 小鼠睾丸病理图(HE 染色)

A: 对照组小鼠曲精管低倍图(10×10); B: 对照组小鼠曲精管高倍图(40×10); C: 雷公藤多甙组小鼠曲精管低倍图(40×10); D: 雷公藤多甙组小鼠曲精管高倍图 (40×10)。

以往对雷公藤多甙引起生殖功能障碍的研究主要集中于生殖激素(性激素、肾上腺皮质激素)水平,生殖细胞(精子细胞、生精细胞、原始精原细胞和 Sertoli 细胞)的形态、数量和凋亡^[5],生殖器官(睾丸、附睾)的形态^[4]等方面,虽然可以部分解释其发生机理,但是从细胞基因的角度探讨其分子生物学基础鲜见报道。人类所有疾病发生都与遗传有关,基因是带有表达性状信息的密码,疾病的发生发展与相关的基因异常密切相关。人类发现许多重要的与生殖相关的基因^[6],已经明确的大约有 1 700 多个,其中 *Herc4*、*Mrto4* 和 *Ipo11* 等基因与精子产生及功能表达密切相关。*Herc4* 位于染色体的 10B4 位点^[7],是 E3 泛素连接酶。在哺乳动物的生殖过程中,雄性哺乳动物精子的成熟必须在广泛的重塑和消耗大量的蜂窝细胞和蛋白质的基础上进行,细胞器必须依赖泛素蛋白酶体这一途径。*Mrto4* 基因位于染色体 4D3 位点^[8],它可以在精子形成过程中调整一些特殊的 mRNAs 多聚腺苷酸化和脱腺苷化。*Ipo11* 基因位于染色体的 13D2.1 位点^[9],是影响 *TSLC1/IGSF4* 表达的重要基因, *TSLC1/IGSF4* 可使生精细胞从间歇的精原细胞到粗线早期的精母细胞和从精子在第七阶段的细胞或更高阶段开始到 Sertoli 细胞的成熟阶段。因此这些基因在精子形成过程中通过所表达的蛋白质与各种 RNA 结合,调控着精子发生过程,对维持雄性生殖功能十分重要^[10,11],其缺失、易位、上调或下调等改变都会影响正常的精子发生过程,而有些基因即使是微小缺失也会严重影响精子的发生、成熟及功能缺失。

我们从雷公藤多甙干预的小鼠模型中提取睾丸组织,运用生物芯片技术对 16 000 个基因进行了筛选,发现有差异表达的基因 1 932 条,其中属于生殖相关基因 354 条, *Herc4*、*Mrto4* 和 *Ipo11* 基因表达明显下调。由于生殖相关基因表达的异常升高或减弱,都会对生殖细胞的生理功能产生很大影响,出现一系列严重后果,导致不育的发生和发展。因此,本研究结果发现灌服雷公藤多甙雄鼠致雌鼠怀孕率明显下降,与对照组比较有显著性差异,并发现 8 周后的小鼠睾丸组织与对照组相比,曲细精管管壁上生精细胞数量减少,曲细精管内生精细胞部分或全部脱落,阻塞于管腔内,或生精细胞排列紊乱, Leydig 细胞多呈圆形或卵圆形且较对照组缩小。

本研究结果说明雷公藤多甙导致生殖障碍和辜

丸组织病理改变的重要原因可能与辜丸组织中这 354 个生殖相关基因特别是 *Herc4*、*Ipo11* 和 *Mrto4* 的异常表达有关,为临床研制新药防治雷公藤对男性生殖系统损害提供了新的治疗靶点。

由于本研究还处于对雷公藤多甙引起生殖功能障碍的基因变化的初步研究阶段,如何引起这些基因表达变化以及这些基因改变是怎样通过合成的蛋白质发挥作用的还需要进一步深入研究。

参考文献(References):

- [1] 张彬. 雷公藤多甙(GTW)抗雄性生育活性的研究. 中国现代医学杂志, 2002, 12(4): 16-17.
- [2] 钱叶勇, 石炳毅, 梁春泉, 李宁, 史迎春, 夏加明. 雷公藤多甙对肾移植受体生殖器官的影响作用. 中华泌尿外科杂志, 2002, 23(4): 209-211.
- [3] LI J S, Nie J, Chen G, Gong YQ, Jiang K, Yang GH, Liu L, Wang JJ. Gene expression profile of pulmonary tissues in different phases of lung is chemia-reperfusion injury in rats. *J Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci)*, 2007, 27(5): 564-570. [DOI](#)
- [4] Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature*, 2008, 453(7194): 544-547. [DOI](#)
- [5] 张才田, 王雪松, 胡雪玲, 崔毓桂, 董建孙, 王兴海. 雷公藤多甙抑制大鼠精子发生的研究. 生殖医学杂志, 2008, 4(17): 118-122.
- [6] 王小荣, 邓剑霞, 李津津. 染色体多态性与临床效应及生殖关系的探究. 遗传, 2007, 29(11): 1362-1366.
- [7] Rodriguez CI, Stewart CL. Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. *Dev Biol*, 2007, 312(2): 501-508. [DOI](#)
- [8] Meijer HA, Bushell M, Hill K, Gant TW, Willis AE, Jones P, de Moor CH. A novel method for poly (A) fractionation reveals a large population of mRNAs with a short poly(A) tail in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(19): e132. [DOI](#)
- [9] Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(9): 3610-3624. [DOI](#)
- [10] Bhasin S, Ma K, de Kretser DM. Y-chromosome microdeletions and male infertility. *Ann Med*, 1997, 29(4): 261-263. [DOI](#)
- [11] 唐艳平, 刘秀生, 刘媛, 杨真荣, 陈燕, 熊承良. t(14;21)平衡易位携带者体细胞和生殖细胞的细胞遗传学研究. 遗传学报, 2006, 33(6): 488-494.