

[药 理]

雷公藤甲素对模式生物雄性秀丽隐杆线虫的生殖毒性作用

阮秦莉^{1,2}, 俞辰亚代^{2,3}, 华永庆^{2,3}, 王 梦², 段金廛^{2,3}

(1. 南京中医药大学医学与生命科学学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 研究中药雷公藤的主要成分之一雷公藤甲素的雄性生殖毒性及其作用机制。**方法** 将 L4 期 *him-5* 雄虫在 0.02、0.2、2.0 mg/L 的雷公藤甲素中处理 48 h。应用杂交试验观察雷公藤甲素对雄虫生育力的作用, 通过观察精细胞形态发育、精细胞活化、精子运动能力, 并应用实时荧光定量 PCR 检测精子发生相关基因的 mRNA 表达水平, 探讨雷公藤甲素雄性生殖毒性的作用机制。**结果** 雷公藤甲素处理 48 h 后, 与溶剂对照组比较, 2.0 mg/L 雷公藤甲素组线虫后代数目显著减少, 0.2、2.0 mg/L 雷公藤甲素组线虫精细胞直径和截面积均显著降低, 精子活化率显著降低、活动精子百分率显著下降。*spe-10* 在 0.02 ~ 2.0 mg/L 雷公藤甲素组、*spe-15* 在 0.2、2.0 mg/L 雷公藤甲素组、*fer-1* 和 *fol-1* 在 2.0 mg/L 雷公藤甲素组均出现表达水平下调的现象。**结论** 雷公藤甲素通过抑制 *him-5* 雄虫精子发生通路相关基因的表达水平, 抑制精细胞形态发育和精子的形态和功能发育, 降低 *him-5* 雄虫的生育力, 提示精子发生损伤是雷公藤甲素发挥生殖毒性作用的重要途径之一。

关键词: 秀丽隐杆线虫; 雷公藤甲素; 精子发生; 生殖毒性

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)05-1009-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.001

Reproductive toxicity of Triptolide on male *Caenorhabditis elegans*, a model organism

RUAN Qin-li^{1,2}, YU Chen-ya-dai^{2,3}, HUA Yong-qing^{2,3}, WANG Meng², DUAN Jin-ao^{2,3}

(1. School of Medicine and Life Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the reproductive toxicity of Triptolide, one of the main components of *Tripterygium wilfordii* Hook. f, on male *Caenorhabditis elegans*, and its potential mechanism. **METHODS** Expose L4 larva of *him-5* nematodes to 48 h 0.02, 0.2, 2.0 mg/L of Triptolide. The effect of Triptolide on the fertility of male *C. elegans* was assessed by crossing test, and the relevant mechanism was explored through measuring spermatids morphology development, spermatids activation, sperm motility and the relative mRNA expression levels of the related spermatogenesis genes. **RESULTS** Compared with the solvent control group, the 48 h Triptolide treatment induced significantly decreased brood size in 2.0 mg/L Triptolide group, significant reduction in spermatid diameter, spermatid cross-sectional area, rates of spermatid activation, rates of motile sperm in 0.2 and 2.0 mg/L Triptolide groups, and decreased expression levels of *spe-10* in 0.02 – 2.0 mg/L Triptolide groups, decreased *spe-15* in 0.2 – 2.0 mg/L Triptolide groups, and decreased *fer-1* and *fol-1* in 2.0 mg/L Triptolide groups as well. **CONCLUSION** Triptolide decreases expression levels of the related genes in spermatogenesis, contributes to an array of indicators inhibition, the spermatids morphology development, the sperm morphology and function development, which leads to decreased fertility of male *C. elegans*. Therefore, spermatogenesis damage is one of the main pathway that Triptolide adversely affects the fertility.

收稿日期: 2017-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202981); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心开放课题 (ZDXM-2-7)

作者简介: 阮秦莉 (1977—), 女, 博士, 助理研究员, 从事替代毒理学研究

KEY WORDS: *Caenorhabditis elegans*; Triptolide; spermatogenesis; reproductive toxicity

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f 为卫矛科雷公藤属木质藤本植物, 中医认为其具有清热解毒、祛风通络、舒筋活血、消肿、杀虫止血等功效。长期以来, 临床上广泛用于自身免疫等难治性疾病, 但可产生相当大的毒副作用^[1-2]。雷公藤甲素是从雷公藤中提取得到的环氧二萜内酯类化合物, 为雷公藤的主要活性成分之一, 也是雷公藤多苷片等制剂的主要有效成分^[3]。近年来的药理和临床研究表明其具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等药理作用^[4-6]。但其长期应用可产生各种不良反应, 尤其是抑制男女生殖系统功能, 对男性主要表现为服用药物后精液中精子活性和浓度下降^[7]。而动物实验显示给药后 SD 大鼠生精细胞数量减少, 精子发生受阻或发育停滞等^[8-10], 但有关其损伤作用的分子发生机制尚待进一步研究。

秀丽隐杆线虫(线虫)是目前生命科学领域中应用广泛的一种重要模式动物。自然状态下, 线虫以雌雄同体线虫和雄虫的形式存在, 雄虫自然发生率仅为 0.1%。但 *him-5* (雄虫突变体) 和 *fog-2* (雌虫突变体) 线虫突变体的构建使在线虫中进行杂交试验成为可能^[11-12]。线虫是第一个基因组被完全解析的真核生物, 全基因组编码约 20 000 个基因^[13], 使得可以深入挖掘相应的分子机制。线虫精子发生通路已被阐明, 40 多个与精子发生或受精相关的基因已被分离鉴定^[14-16]。比较分析表明, 线虫在精子形成、精子活化等方面与哺乳动物具有相似性, 部分精子发生基因编码蛋白在线虫和哺乳动物之间具有高度保守性^[17]。提示以线虫作为精子发生毒性试验的受试动物, 构建评价外源性化学物精子毒性的初筛试验, 具有一定的可行性。

本研究以雷公藤甲素为研究对象, 突变体线虫作为受试动物, 通过检测后代数目、精细胞形态和大小、精细胞体外活化能力、精子体外和体内活动能力、精子发生相关基因 mRNA 表达水平, 探讨雷公藤甲素的雄性生殖毒性作用及其作用机制, 以及线虫在药物功能筛选和早期评价中的潜在应用价值。

1 试验仪器与材料

1.1 仪器与设备 Axio ScopeA1 正置荧光显微镜(德国蔡司公司); XTZ-E 连续变倍体视显微镜(上海光学仪器六厂); Nanodrop 1000 Spectropho-

tometer (美国 Thermo scientific 公司); Light Cycler® 96 Real-Time PCR (瑞士 Roche, Swiss 公司)。

1.2 药材与试剂 雷公藤甲素标准品(江苏省食品药品监督检验研究院, 含有量 98% 以上); 莫能星钠、Mito-tracker Red (Invitrogen 公司); 链霉蛋白酶、FSE DNA Green Master (Roche 公司); Hepes、多聚蛋白胨、牛血清白蛋白、Trizol (Sigma-Aldrich 公司); PrimeScript™ RT Master Mix (TaKaRa 公司)。

1.3 实验动物 *him-5* (*e1490*), *fog-2* (*q71*) 两种突变体线虫均来源于秀丽隐杆线虫遗传中心(美国, *Caenorhabditis* Genetic Center)。线虫培养于含有大肠杆菌 OP50 的线虫生长介质琼脂培养基上, 20 ℃ 恒温培养^[18]。按照 Donkin 等^[19]的方法同步化, 获得大量 L4 期线虫, 本研究中所有实验均使用 L4 期 *him-5* 线虫进行药物处理。

2 试验方法

2.1 雷公藤甲素及其溶剂的配制 称取 1.0 mg 雷公藤甲素, 溶于 50.0 μL 二甲基亚砜, 50 ℃ 超声震荡 30 min, 摇匀, 用 M9 溶液配制为 100 mg/L 溶液。用时, 用 M9 溶液依次配制 0.02、0.2、2.0 mg/L 的雷公藤甲素溶液。M9 溶液为线虫试验常用溶液, 配制用磷酸氢二钠 6 g, 磷酸二氢钾 3 g, 氯化钠 5 g, 1 mol/L 硫酸镁 1 mL, 加蒸馏水定容到 1 L, 高压灭菌备用。

2.2 实验分组及药物处理 在表面涂布有 OP50 的直径 3.5 cm 的琼脂培养基上, 加入 200 μL 不同质量浓度雷公藤甲素 (0.02、0.2、2.0 mg/L) 或 M9 溶剂, 使其均匀分布于培养基表面, 并晾干。将 L4 期 *him-5* 线虫随机分为溶剂对照组和雷公藤甲素不同质量浓度组, 分别移入经不同浓度药物处理过的培养基上, 于 20 ℃ 培养箱中分别培养 48 h。

2.3 *him-5* 雄虫的生育力的测定 将 L4 期 *him-5* 雄虫暴露于雷公藤甲素 48 h 后, 将 *him-5* 雄虫和 *fog-2* 雌虫按 3 : 1 的比例挑入一个新的带有 OP50 的 NGM 培养皿, 12 h 后, 将 *fog-2* 雌虫单独挑入一个新的带有 OP50 的 NGM 培养皿。每处理组 30 条 *him-5* 雄虫, 10 条 *fog-2* 雌虫。此后, 每天将 *fog-2* 雌虫单独转入一个新的带有 OP50 的 NGM 培养皿, 持续至 *fog-2* 雌虫不再产卵, 计算每条 *fog-2*

雌虫的总卵数^[11]。

2.4 *him-5* 雄虫精细胞形态和大小的测定 将 *him-5* 雄虫挑到无 OP50 的 NGM 培养皿上爬行 1 min 后,在载玻片上滴 3 ~ 5 μL Sperm Medium (50 mmol/L Hepes, 1 mmol/L MgSO_4 , 25 mmol/L KCl, 45 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl_2) 溶液,挑入 1 条 *him-5* 雄虫,用 1 mL 注射器解剖,从线虫尾部约后 1/3 处将其截断释放精子,盖上盖玻片,指甲油封片^[20],显微镜下观察精细胞的形态和大小。每只线虫至少随机取 5 个视野,计数不少于 200 个精细胞,每组总数不少于 1 000 个,拍照。应用 Image-pro plus 软件分析精细胞大小,每处理组 10 条 *him-5* 雄虫。

2.5 *him-5* 雄虫精细胞体外活化能力的测定 精细胞分离后,指甲油两边封片,显微镜下找到平铺的视野,从盖玻片的开放边缘注入 5 ~ 10 μL 200 $\mu\text{g/mL}$ Pronase^[20], 5 min 后,观察精子活化的程度。以圆形精细胞发育为带有伪足的精子判断为活化成功。随机选取 5 个视野,每个线虫统计 200 个精细胞中活化成功的精细胞,计算精子活化率,每处理组 15 条 *him-5* 雄虫。

2.6 *him-5* 雄虫精子体外活动能力的测定 精细胞分离后,指甲油两边封片,显微镜下找到平铺的视野,从盖玻片的开放边缘注入 500 ng/mL Monensin^[20]。20 min 后,观察精子能动性,计算活动精子百分率,随机选取 5 个视野,每个线虫统计 200 个发育有伪足的精子中具有活动能力的精子数目,以伪足能够摆动作为精子具有活动能力的判断指标,每处理组 15 条 *him-5* 雄虫。

2.7 *him-5* 雄虫精子体内活动能力的测定 *fog-2* 是秀丽隐杆线虫的一种雌性突变体,此种突变体不产生精子,所以纳精囊内没有精子。Mito-tracker red 线粒体荧光探针标记的精子在荧光显微镜下呈现淡淡的红光,探针标记成功的 *him-5* 雄虫与 *fog-2* 雌虫成功交配后, *him-5* 雄虫的精子会从 *fog-2* 雌虫的阴户向纳精囊爬行,最后停留在纳精囊等待与 *fog-2* 雌虫排出的卵细胞进行受精,所以荧光显微镜下观察交配后 4 h 后标记精子在 *fog-2* 雌虫所处的位置可以判断精子在线虫体内的运动能力。将 100 $\mu\text{g/mL}$ Mito-tracker red 均匀涂布在 3.5 cm 带有 OP50 的 NGM 培养基上,将暴露后的 *him-5* 雄虫挑入上述培养皿,20 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日清晨,将标记后的 *him-5* 雄虫和 *fog-2* 雌虫按 3 : 1 的比例挑入一个新的带有 OP50 的 NGM 培养基,4 h 后,仅将

fog-2 雌虫挑入一个新的带有 OP50 的 NGM 培养基,4 h 后,观察精子在 *fog-2* 雌虫体内的位置^[21]。每处理组 30 条 *him-5* 雄虫,10 条 *fog-2* 雌虫。

2.8 *him-5* 雄虫精子发生相关基因 mRNA 表达水平的测定 取约 6 000 个 *him-5* 雄虫,以 Trizol 法提取 RNA 后,逆转录为 cDNA,按照 cDNA 2 μL , FSE DNA Green Master 12.5 μL , primer forward 1.0 μL , primer reverse 1.0 μL , H_2O 8.5 μL 的构成配成 25 μL 体系,在荧光实时定量 PCR 上以 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s,特异退火温度 30 s 采集荧光信号,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 延伸。并做熔解曲线。目的基因 *spe-10* 基因正向引物 TTTTATTGTCGCGGAGTGT,反向引物 CGATGACTGCGAACTTTGAG; *fer-1* 基因正向引物 AATGGATGGAATGCTGTTGGTC,反向引物 AACGCTTTCTGAAGTTGTG-GTG; *fol-1* 基因正向引物 TCCATTCCTCACTCCGTTTCTA,反向引物 GCATCTGCCATACTCCTT-TACC; *spe-15* 基因正向引物 GGAGTTTGGATGTCGCTGGTTT,反向引物 GCTCTCTGGGTGAAATGTTGGA; 内参基因 β -actin 正向引物 ATGTGTGACGACGAGGTT,反向引物 GAAGCACTTGC GGTTGAAC。每个样品做 3 个平行。以比较域值法测定目的基因相对表达水平^[22],以内参做均一化处理,实验组和对照组的 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的}} - \text{Ct}_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{处理组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{模型组}}$,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \pm \text{S. D}$ 反映处理组与模型组目的基因表达的差异(倍数)。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异;实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),在方差齐时两组间比较采用 LSD 法,在方差不齐时两组间比较采用 Dunnett's 法;精细胞体外活化能力测定试验和精子体外活动能力试验的实验组与对照组间比较采用卡方检验。

3 结果

3.1 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫生育力的影响 *him-5* 雄虫经不同质量浓度雷公藤甲素处理 48 h 后,与溶剂对照组比较,与 2.0 mg/L 雷公藤甲素组 *him-5* 雄虫交配后的 *fog-2* 雌虫后代数目显著减少($P < 0.05$,表 1)。

3.2 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精细胞形态发育的影响 *him-5* 雄虫经不同质量浓度雷公藤甲素处理 48 h 后,与溶剂对照组比较,0.2、2.0 mg/L 雷公藤甲素组 *him-5* 雄虫精细胞直径和截面积均显著降低($P < 0.05$,表 2)。

表 1 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫生育力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n(him-5) = 30$, $n(fog-2) = 10$)

Tab. 1 Effects of Triptolide on fertility of *him-5* *C. elegans* ($\bar{x} \pm s$, $n(him-5) = 30$, $n(fog-2) = 10$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	后代数目/个
溶剂对照组	—	442 ± 34
雷公藤甲素低剂量组	0.02	412 ± 62
雷公藤甲素中剂量组	0.2	385 ± 58
雷公藤甲素高剂量组	2.0	334 ± 29 *

注:与溶剂对照组比较, * $P < 0.05$

表 2 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精细胞形态发育的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n(him-5) = 10$)

Tab. 2 Effects of Triptolide on spermatids morphology development of *him-5* *C. elegans* ($\bar{x} \pm s$, $n(him-5) = 10$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	精细胞直径/ μm	精细胞截面积/ μm ²
溶剂对照组	—	5.85 ± 0.33	27.01 ± 3.10
雷公藤甲素低剂量组	0.02	5.62 ± 0.39	24.96 ± 3.03
雷公藤甲素中剂量组	0.2	5.35 ± 0.38 *	22.61 ± 3.02 *
雷公藤甲素高剂量组	2.0	5.30 ± 0.41 *	22.01 ± 3.08 *

注:与溶剂对照组比较, * $P < 0.05$

3.3 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精细胞体外活化的影响 精细胞分离后, 体外用 pronase 可进行体外活化, 精细胞发育成为具有伪足的精子。体外活化试验结果显示 0.2 mg/L 和 2.0 mg/L 雷公藤甲素组线虫精细胞活化率与溶剂对照组相比有显著性降低 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精子活化和体外活动力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n(him-5) = 15$)

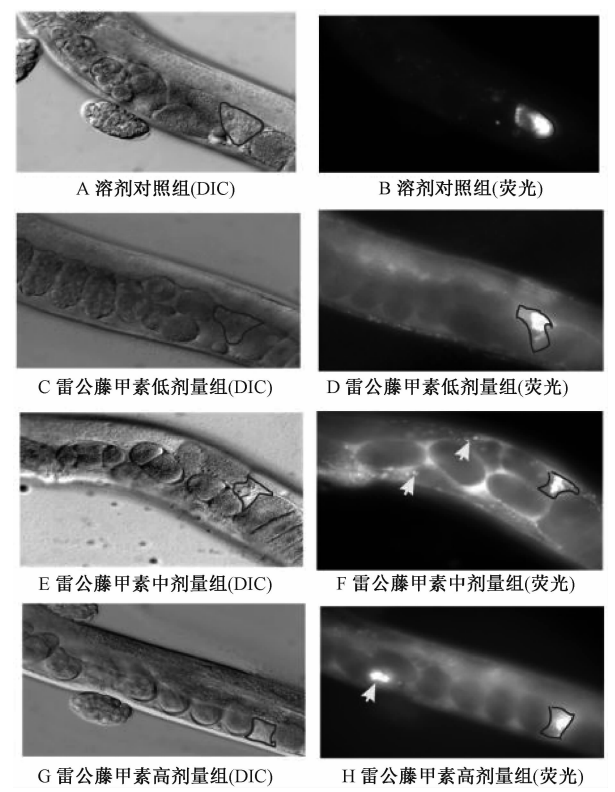
Tab. 3 Effects of Triptolide on sperm activation and sperm motility in vitro of *him-5* *C. elegans* ($\bar{x} \pm s$, $n(him-5) = 15$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	精子活化率/%	活动精子率/%
溶剂对照组	—	71.2 ± 3.6	61.5 ± 3.0
雷公藤甲素低剂量组	0.02	73.4 ± 4.1	65.9 ± 2.5
雷公藤甲素中剂量组	0.2	62.1 ± 3.5 *	55.4 ± 4.1 *
雷公藤甲素高剂量组	2.0	57.9 ± 3.7 *	48.3 ± 5.2 *

注:与溶剂对照组比较, * $P < 0.05$

3.4 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精子活动能力的影响 Mito-tracker red 染色试验结果显示, 在交配后 4 h, 溶剂对照组 *him-5* 雄虫的精子均都到达了交配后 *fog-2* 雌虫的纳精囊, 而 0.02 mg/L 和 0.2 mg/L 雷公藤甲素组 *him-5* 雄虫的精子部分到达了交配后 *fog-2* 雌虫的纳精囊, 还有一部分位于阴户和纳精囊之间。而 2.0 mg/L 雷公藤甲素组 *him-5* 雄虫的精子部分到达了交配后 *fog-2* 雌虫的纳精囊, 还有一部分位于阴户和纳精囊之间, 在阴户附近还

有一些精子 (图 1)。



注: 黑色框线画出的是纳精囊, 白色箭头指向的是纳精囊外的精子。DIC (Differential Interference Contrast Microscope), 微分干涉相差显微镜。

图 1 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫体内精子活动能力的影响
Fig. 1 Effects of Triptolide on sperm motility in vivo of *him-5* *C. elegans*

him-5 雄虫精子体外活动能力试验结果显示, 与溶剂对照组相比, 0.2、2.0 mg/L 雷公藤甲素组线虫活动精子百分率显著下降 ($P < 0.05$, 表 3)。

3.5 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精子发生相关基因 mRNA 表达水平的影响 雷公藤甲素对 4 个精子发生相关基因表达水平的影响如表 3 所示, 与溶剂对照组相比, 各药物处理组 *spe-10* 基因的相对表达水平均显著下降 ($P < 0.05$); 0.2、2.0 mg/L 雷公藤甲素组线虫 *spe-15* 基因的相对表达水平显著下降 ($P < 0.05$); 2.0 mg/L 雷公藤甲素组线虫 *fer-1* 和 *fol-1* 基因的相对表达水平显著下降 ($P < 0.05$, 表 4)。

4 讨论

生殖毒性是毒理学研究的一个重点领域。目前, 以哺乳动物为模式动物, 对雄性生殖毒性的研究方法主要包括繁殖实验和精子畸形实验。经典的生殖毒理学试验从多方面检测外源性化学物质可能具有的生殖毒性, 获取资料全面, 但同时存在试验

表 4 雷公藤甲素对 *him-5* 雄虫精子发生相关基因 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of Triptolide on the expression levels of genes related to spermatogenesis of *him-5 C. elegans* ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对表达水平			
		<i>spe-10</i>	<i>spe-15</i>	<i>fer-1</i>	<i>folt-1</i>
溶剂对照组	—	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.27
雷公藤甲素低剂量组	0.02	0.21 ± 0.12 *	0.94 ± 0.14	1.20 ± 0.61	0.80 ± 0.10
雷公藤甲素中剂量组	0.2	0.18 ± 0.03 *	0.49 ± 0.08 *	0.85 ± 0.26	0.75 ± 0.08
雷公藤甲素高剂量组	2.0	0.14 ± 0.06 *	0.24 ± 0.13 *	0.31 ± 0.08 *	0.30 ± 0.13 *

注:与溶剂对照组比较,* $P < 0.05$

周期长,动物造价高等缺陷。目前,在毒理学研究中,秉承“减少、优化、替代”的3R原则,很多发达国家致力于发展毒理学替代法,常采用体外培养或使用低等动物进行研究,但哺乳动物生殖周期的复杂性制约了生殖毒理学替代法的快速发展。近年,体外细胞培养技术以敏感性高的优点在评价外源性化学物生殖毒性中有关生精细胞能量代谢和雄激素分泌毒性作用方面,发挥了重要作用,但有关精子毒性替代方法的构建尚不多见。本研究采用组织结构简单、遗传背景清晰的秀丽隐杆线虫研究雷公藤甲素的雄性生殖毒性及其作用机制。

本研究中,*him-5*雄虫与*fog-2*雌虫的杂交试验结果显示随雷公藤甲素给药浓度的增高,与*him-5*雄虫交配的*fog-2*雌虫后代数目逐渐减少,在2.0 mg/L给药组显著下降,提示雄性生殖系统是雷公藤甲素作用的靶器官之一,睾丸的生精功能可能受损。

线虫精子发生减数分裂,而精细胞是减数分裂的终点,其形态改变可以反映外源性化学物对精子发育减数分裂期的影响。在精子活化期,精细胞经过活化发育为具有运动能力的精子,正常精子依靠伪足的摆动进行阿米巴样运动。结果显示给药48 h后,与对照组相比,0.2、2.0 mg/L雷公藤甲素给药组线虫的精细胞直径和截面积均显著降低,精子活化率和活动精子率均显著降低,提示雷公藤甲素对减数分裂期精细胞形态发生具有损伤作用,还会导致精子伪足的形态发育和功能发育受损,降低精子运动能力,使成功到达纳精囊的精子数量减少,最终导致后代数目的降低。

在雷公藤甲素给药导致线虫精细胞形态发生和精子运动受损的基础上,根据在哺乳动物基因组有同源基因的原则,本研究在明确鉴定的40余个线虫精子发生基因中筛选出精细胞形态发生基因*spe-10*和*spe-15*、精子运动基因*fer-1*、精子数量基因*folt-1*,通过观察其mRNA表达水平的变化,探讨雷公藤甲素的雄性生殖毒性作用机制。

*spe-10*和*spe-15*基因参与精细胞的形态发育过程,*spe-10*突变体线虫使得纤维体-膜细胞器(Fibrous body-membranous organelles,FB-MOs)的FB外膜过早解聚导致FB留在残余体内,形成比正常精细胞小的精细胞^[23-24]。而*spe-15*突变体线虫会造成胞质组分在精细胞和残余体中异常分布^[25]。试验结果显示*spe-10*基因的表达自0.02 mg/L雷公藤素给药水平显著性降低,而*spe-15*基因在0.2、2.0 mg/L剂量组显著降低,与精细胞直径和面积的变化趋势具有一致性,提示雷公藤甲素可能通过下调*spe-10*和*spe-15*的表达,干扰FB-MOs的发育和胞质组分在精细胞和残余体中的分配,使精细胞形态发生受阻。

*Fer-1*突变体线虫的精细胞在精子活化过程中MO不能和细胞膜融合,精子形成短的伪足,不能进行正常的运动^[16,26-27]。*Folt-1*编码蛋白参与叶酸体内转运以及线虫对外源性叶酸的摄取。*Folt-1*突变体线虫功能正常的精子数量显著减少^[28-29]。试验结果显示*fer-1*和*folt-1*基因表达水平在2.0 mg/L剂量组显著降低,提示雷公藤甲素可能通过下调*fer-1*的表达,抑制精子活化过程中MO与细胞膜的融合,导致线虫伪足发育受阻,降低精子运动能力;通过下调*folt-1*的表达,抑制线虫体内叶酸的摄取和转运,导致功能正常的精子数量减少。

综上,雷公藤甲素通过下调*him-5*雄虫精子发生通路上*spe-10*、*spe-15*、*fer-1*、*folt-1*基因的表达水平,使精细胞直径和面积降低、精子活化率和活动精子百分率降低,到达纳精囊的精子数量降低,说明雷公藤甲素通过抑制精细胞形态发育和精子形态发育和功能发育,降低*him-5*雄虫的生育力,提示精子发生损伤是雷公藤甲素发挥生殖毒性作用的重要途径之一。

参考文献:

[1] 苏维广,孟江.雷公藤的临床应用[J].中国临床实用医学,2007,1(1):58-60.

- [2] 高 慧, 李巧芬. 雷公藤制剂致性腺损害的研究进展[J]. 国医论坛, 2007, 22(1): 55-56.
- [3] 吕燮余, 马鹏程, 张崇璞, 等. 雷公藤中雷公藤内脂醇(T4)的分离与结构测定[J]. 中国医学科学院学报, 1990, 12(3): 157-161.
- [4] Chen B J. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F[J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(3): 253-265.
- [5] Phillips P A, Dudeja V, McCarroll J A, *et al.* Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9407-9416.
- [6] Xu X, Xiong M, Xu Y, *et al.* Triptolide attenuates idiopathic pneumonia syndrome in a mouse bone marrow transplantation model by down-regulation of IL-17[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 704-709.
- [7] 钱绍祯, 胡延忠, 童建孙, 等. 雷公藤对男性生殖影响的研究[J]. 男性学杂志, 1989, 3(3): 129-131.
- [8] Huynh P N, Hikim A P, Wang C, *et al.* Long-time effects of Triptolide on spermatogenesis, epididymal sperm function, and fertility in male rats[J]. *J Androl*, 2000, 21(5): 689-699.
- [9] 张晶璇, 邱云良, 王 鹏, 等. 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] 李 凡, 彭弋峰, 方 祥, 等. 雷公藤甲素对雄性大鼠附睾功能与精子动力学参数的影响[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(6): 498-500.
- [11] Chatterjee I, Richmond A, Putiri E, *et al.* The *Caenorhabditis elegans* *spe-38* gene encodes a novel four-pass integral membrane protein required for sperm function at fertilization[J]. *Development*, 2005, 132(12): 2795-2808.
- [12] Schedl T, Kimble J. *fog-2*, a Germ-Line-Specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1988, 119(1): 43-61.
- [13] The *C. elegans* sequencing consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*; a platform for investigating biology[J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2012-2018.
- [14] L'Hernault S W. The genetics and cell biology of spermatogenesis in the nematode *C. elegans* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 306(1-2): 59-65.
- [15] Nelson G A, Ward S. Vesicle fusion, pseudopod extension and amoeboid motility are induced in nematode spermatids by the ionophore monensin[J]. *Cell*, 1980, 19(2): 457-464.
- [16] Ward S, Argon Y, Nelson G A. Sperm morphogenesis in wild-type and fertilization-defective mutants of *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Cell Biol*, 1981, 91(1): 26-44.
- [17] Chu D S, Liu H B, Nix P, *et al.* Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors[J]. *Nature*, 2006, 443(7107): 101-105.
- [18] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94.
- [19] Donkin S G, Williams P L. Influence of developmental stage, salts and food presence on various end points using *Caenorhabditis elegans* for aquatic toxicity testing [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14(12): 2139-2147.
- [20] L' Hernault S W, Roberts T M. Cell biology of nematode sperm[J]. *Methods Cell Biol*, 1995, 48: 273-301.
- [21] Kubagawal H M, Watts J L, Corrigan C, *et al.* Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment *in vivo*[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(10): 1143-1148.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Shakes D C, Ward S. Mutations that disrupt the morphogenesis and localization of a sperm-specific organelle in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Dev Biol*, 1989, 134(2): 307-316.
- [24] Gleason E J, Lindsey W C, Kroft T L, *et al.* *spe-10* encodes a DHHC-CRD zinc-finger membrane protein required for endoplasmic reticulum/Golgi membrane morphogenesis during *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis[J]. *Genetics*, 2006, 172(1): 145-158.
- [25] Kelleher J F, Mandell M A, Moulder G, *et al.* Myosin VI is required for asymmetric segregation of cellular components during *C. elegans* spermatogenesis [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(23): 1489-1496.
- [26] Roberts T M, Ward S. Centripetal flow of pseudopodial surface components could propel the amoeboid movement of *Caenorhabditis elegans* spermatozoa [J]. *J Cell Biol*, 1982, 92(1): 132-138.
- [27] Achanzar W E, Ward S. A nematode gene required for sperm vesicle fusion[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(Pt9): 1073-1081.
- [28] Balamurugan K, Ashokkumar B, Moussaif M, *et al.* Cloning and functional characterization of a folate transporter from the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(2): 670-681.
- [29] Austin M U, Liao W S, Balamurugan K, *et al.* Knockout of the folate transporter *folt-1* causes germline and somatic defects in *C. elegans* [J]. *BMC Dev Biol*, 2010, 10(1): 46.