

右归丸减轻雷公藤多苷片致Ⅱ型胶原诱导性关节炎模型大鼠生殖毒性作用及转录组学研究

程生辉¹, 叶田香², 刘宝月², 晋志楠², 时 昆², 霍亚静², 韩毅丽^{2*}, 李会芳^{2*}

1. 山西中医药大学 基础医学院, 山西 晋中 030619

2. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

摘要: **目的** 探讨右归丸对雷公藤多苷(TG)片所致Ⅱ型胶原诱导性关节炎(CIA)模型大鼠生殖毒性减毒作用及其机制。**方法** 采用牛Ⅱ型胶原乙酸溶液和弗氏完全佐剂诱导建立 CIA 大鼠模型, 随机分为对照组、模型组、TG (72 mg·kg⁻¹) 组及右归丸 (3 g·kg⁻¹) + TG (72 mg·kg⁻¹) 组, 连续给药 4 周。实验期间对关节炎指数进行评分, 实验结束时检测血清中雌二醇(E₂)、卵泡刺激素(FSH)和睾酮(T)含量, 检测卵巢和睾丸脏器指数和组织病理学变化, 通过转录组学进行 RNA 测序与差异基因筛选, 并进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析; 采用 Western blotting 法进行关键靶点验证。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠关节炎指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TG 组和右归丸+TG 组显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型组比较, TG 组的 E₂ 和 T 含量显著降低 ($P < 0.05$); 与 TG 组比较, 右归丸+TG 组的 E₂ 和 T 含量显著回升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TG 组卵巢和睾丸组织损伤明显, 表现为卵泡数量减少、颗粒层变薄、精子数量减少等; 与 TG 组比较, 右归丸+TG 组的组织病理损伤显著缓解。卵巢样本 GO 富集分析集中在“女性生殖发育”相关过程, 如 ovulation cycle process (排卵周期过程)、ovulation cycle (排卵周期)、female gonad development (女性性腺发育)、mammalian oogenesis stage (哺乳动物卵子发生阶段); KEGG 富集分析集中在过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)、脂肪酸代谢和转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路。睾丸样本 GO 富集分析集中在“脂肪细胞发育与免疫应答”过程, 如 white fat cell differentiation (白色脂肪细胞分化)、fat cell differentiation (脂肪细胞分化); KEGG 富集分析集中在过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR)、脂肪细胞脂解的调控通路。与模型组比较, TG 组大鼠骨形态发生蛋白 2 (BMP2)、抗缪勒氏管激素 (AMH)、抑制素 A (INHBA)、抑制素 B (INHBB) 和脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$); 与 TG 组比较, 右归丸+TG 组上述蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 右归丸能够显著减轻雷公藤多苷对 CIA 模型大鼠的生殖毒性, 与其能调节 TGF- β 和 PPAR 信号通路密切相关。

关键词: 雷公藤多苷; 右归丸; 生殖毒性; 转录组学; Ⅱ型胶原诱导性关节炎; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 转化生长因子 β

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0098-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.009

Effect of Yougui Pills on attenuating reproductive toxicity induced by Tripterygium Glycosides Tablets in collagen-induced arthritis model rats and its transcriptomic analysis

CHENG Shenghui¹, YE Tianxiang², LIU Baoyue², JIN Zhinan², SHI Kun², HUO Yajing², HAN Yili², LI Huifang²

1. School of Basic Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. School of Chinese Materia Medica and Food Engineering, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To explore the attenuating effect of Yougui Pills on reproductive toxicity in II collagen-induced arthritis (CIA) model rats induced by Tripterygium Glycosides (TG) Tablets and its underlying mechanism. **Methods** A CIA rat model was

收稿日期: 2025-10-11

基金项目: 山西省基础研究计划项目 (20210302123235); 山西中医药大学研究生科研实践创新项目 (X2025KY022)

作者简介: 程生辉 (1979—), 男, 副教授, 研究方向为中西医结合临床基础研究。E-mail: chengsh@sxtcm.edu.cn

*通信作者: 韩毅丽 (1981—), 女, 副教授, 硕士研究生, 主要从事中药活性成分及中药资源开发研究。E-mail: wwdhyl@163.com

李会芳 (1980—), 女, 教授, 博士研究生, 主要从事中药药理及毒理学研究。E-mail: lihuifangzy@sxtcm.edu.cn

established by using type II collagen acetate solution and complete Freund's adjuvant. The rats were randomly divided into the control group, the model group, the TG (72 mg·kg⁻¹) group and the Yougui Pills (3 g·kg⁻¹) + TG (72 mg·kg⁻¹) group, and were continuously administered for 4 weeks. During the experiment, the degree of joint redness and swelling was scored. At the end of the experiment, the contents of estradiol (E₂), follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone (T) in the serum were detected. The organ index and histopathological changes of the ovaries and testes were also examined. RNA sequencing and differential gene screening were performed through transcriptomics, and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted. Western blotting was used to verify the key targets. **Results** Compared with the control group, the arthritis index of the model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the arthritis index of the TG group and the Yougui Pills + TG group was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the contents of E₂ and T in the TG group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the TG group, the contents of E₂ and T in the Yougui Pills + TG group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the TG group showed obvious damage to the ovaries and testes, manifested as a decrease in the number of follicles, thinning of the granulosa layer, and a decrease in the number of sperm. Compared with the TG group, the histopathological damage of the Yougui Pills + TG group was significantly alleviated. The GO enrichment analysis of the ovarian samples was concentrated on the processes related to "female reproductive development", such as ovulation cycle process, ovulation cycle, female gonad development, and mammalian oogenesis stage. The KEGG enrichment analysis was concentrated on the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), fatty acid metabolism, and transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathways. The GO enrichment analysis of the testicular samples was concentrated on the processes of "adipocyte development and immune response", such as white fat cell differentiation and fat cell differentiation. The KEGG enrichment analysis was concentrated on the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR) and the regulation of adipocyte lipolysis pathways. Compared with the model group, the protein expression levels of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), anti-Müllerian hormone (AMH), inhibin A (INHBA), inhibin B (INHBB), and fatty acid binding protein 4 (FABP4) in the TG group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the TG group, the protein expression levels of the above proteins in the Dui Gui Wan + TG group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Yougui Pills can significantly alleviate the reproductive toxicity of TG in CIA model rats, which is closely associated with its regulatory effect on the TGF- β and PPAR signaling pathways.

Key words: Tripterygium Glycosides Tablets; Yougui Pills; reproductive toxicity; transcriptomics; II collagen-induced arthritis; peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR); transforming growth factor- β (TGF- β)

雷公藤多苷 (TG) 是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.F. 去皮根中提取的总苷, 临床上用于类风湿关节炎、肾病、红斑狼疮等疾病的治疗, 却被报道具有较多的药物不良反应, 主要为肝毒性、肾毒性、生殖及血液系统损害等, 其中生殖毒性的不良反应发生率位居第 2^[1], 极大地限制了其临床运用。雷公藤性凉味苦, 其苦寒之性入肾经引起命门火衰和肾主生殖、肾主藏精等功能障碍, 导致性激素水平低下、卵巢早衰、精子活力低下等生殖毒性。TG 导致的生殖损伤属于中医“肾阳亏虚”的范畴。张昕贤等^[2]发现 TG 致生殖减退模型小鼠可出现体质量下降、弓背蜷缩、行动迟缓、倦怠懒动、反应迟钝、体毛枯萎、嗜睡等一系列类似中医肾阳虚的症状, 且该模型小鼠尿 17 羟皮质醇含量较对照组明显降低, 提示 TG 导致的生殖减退模型是肾阳虚模型。采用温补肾阳的巴戟天、菟丝子等配伍雷公藤后显示出明显减毒作用^[3], 然而作为温补肾阳名方的右归丸未见其对雷公藤

的配伍减毒作用研究。本实验通过建立 II 型胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠模型模拟 TG 的真实临床情境, 选择既高于临床等效剂量又低于急性中毒剂量的 8 倍临床等效剂量作为暴露剂量, 观察 TG 对 CIA 模型大鼠生殖系统的影响, 并联合使用右归丸, 观察其减毒效果并探讨减毒机制, 为雷公藤的临床安全合理用药提供实验参考。

1 材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠, 鼠龄 6~8 周, 体质量 180~200 g, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0011。饲养于山西中医药大学动物房, 室温 (22.5±2.5) °C, 湿度 (50±10) %, 12 h 光照和黑暗循环, 常规饲料喂养, 自由饮水, 实验动物使用许可证号 SYXK (晋) 2020-0006。本研究经山西中医药大学医学伦理委员会批准 (伦理编号 2021DW168)。

1.2 药品及主要试剂

TG 片, 远大医药浙江黄石飞云制药有限公司(批号 20201101); 右归丸, 仲景宛西制药股份有限公司(批号 200841); 牛Ⅱ型胶原, 美国 Chondrex 公司(批号 220554); 弗氏完全佐剂, 美国 Sioma-Aldrich 公司(批号 P2379964); 雌二醇(E_2)、卵泡刺激素(FSH)、睾酮(T)检测试剂盒(批号 230809855、230202385、230618638), 武汉优尔生物商贸有限公司; 脂肪酸结合蛋白 4(FABP4)、抗缪勒管激素(AMH)、抑制素 β A 亚基基因(INHBA)多克隆抗体(批号 12802-1-AP、14461-1-AP、17524-1-AP)、GAPDH 抗体(批号 81640-5-RR)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 PC0020), 北京索莱宝科技有限公司; 抑制素 β B 亚基基因(INHBB)、骨形态发生蛋白-2(BMP-2)抗体均购自南京赛戈巍生物科技有限公司(批号 41064、38107); HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(批号 GB23303), 武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 仪器

Chemray 240 全自动生化分析仪, 深圳雷杜生命科技公司; Epoch 酶标检测仪, BioTeK 公司; ImageQuant LAS 500 生物分子成像仪, 美国 GE 公司; DYY-6D 电泳仪电源、DYCZ-24DN 蛋白电泳仪、DYCZ-40D 转印电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; Eclipse Ci-L 正置白光拍照显微镜, 日本 Nikon 公司。

2 方法

2.1 模型构建

CIA 模型用牛Ⅱ型胶原乙酸溶液和弗氏完全佐剂制备^[4]。首次用等体积牛Ⅱ型胶原醋酸溶液($2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和弗氏完全佐剂乳化, 在大鼠尾根皮下、右足趾散点注射乳化液每只 0.2 mL; 第 7 天, 每只大鼠注射乳化液 0.1 mL 以激发免疫。造模后(即第 1 次免疫后)分别在第 0、7、14、21、28 天对每组大鼠进行关节炎指数(AI)评分, 计算各组大鼠的 AI^[5]。肢体关节肿胀按 0~Ⅳ级评分, 0: 无红肿; I级: 趾关节稍微肿胀; II级: 小趾关节及足跖关节肿胀; III级: 踝关节以下足爪均肿胀; IV级: 包括踝关节在内的全部足爪肿胀。AI 值为四肢肢体关节肿胀评分之和(I 级为 1 分, 总分 16 分), 若 $AI \geq 4$ 则表示造模成功。

2.2 动物分组与给药

将 SD 大鼠(雌雄各半)随机分为对照组、模型

组、TG 组和右归丸+TG 组, 每组 10 只。第 1 次免疫后第 2 天开始给药, 对照组和模型组均给予等体积 0.3%羧甲基纤维素钠溶液, TG 组给予 $72\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TG 羧甲基纤维素钠溶液(临床等效剂量的 8 倍), 右归丸+TG 组在 TG 给药 4 h 后 ig 给予 $3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的右归丸(临床等效剂量), 连续给药 4 周。

2.3 观察大鼠足趾肿胀

实验期间自由饮水, 密切观察大鼠整个给药期间的身体状况, 对大鼠造模后的 AI 进行评分, 并记录大鼠足趾形态变化。

2.4 样本采集与处理

在给药第 28 天取材, 戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉采血, 离心后分离血清, 剥取双侧卵巢、睾丸, 去掉多余的组织和脂肪, 称质量后置于 4%中性甲醛固定液中固定。

2.5 计算脏器指数

麻醉后快速解剖取出大鼠的卵巢、睾丸, 用天平对各组织进行称量并记录, 计算其脏器指数。

脏器指数 = 脏器质量/体质量

2.6 血清性激素含量检测

取血清, 按照试剂盒的步骤进行操作, 采用全自动生化分析仪检测血清中 E_2 、FSH、T 的含量。

2.7 卵巢、睾丸组织病理学观察

将卵巢、睾丸组织置于 4%中性多聚甲醛中进行固定, 固定后脱水, 石蜡包埋, 冷却后切片, 后续进行苏木精-伊红(HE)染色, 在光镜下进行组织病理学观察。

2.8 转录组测序分析

利用转录组 RNA 测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)测序分析模型组、TG 组、右归丸+TG 组大鼠的卵巢及睾丸样本($n=3$), 提取和检测总 RNA, 文库构建后上机测序。此过程交由华大科技股份有限公司完成。使用 R 语言(v4.3.1)中 DESeq2 包分析组间差异表达基因, 条件为 $|\log_2FC| \geq 1$, $Q \leq 0.05$ 。利用在线工具 Venny 2.1.0 获得各组差异基因的交集, 并将交集差异基因上传至微生信平台绘制火山图, 并进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。

2.9 Western blotting 验证关键靶点

使用裂解液提取卵巢、睾丸总蛋白, BCA 法测定蛋白含量; 蛋白上样量分别为 10、3.7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 经恒压 120 V 电泳 1.5 h 后, 恒流 260 mA 转至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 分别孵育一抗 AMH

(1:1 000)、INHBA(1:1 000)、INHBB(1:1 000)、BMP2(1:1 000)、FABP4(1:5 000), GAPDH(1:10 000), 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次; 加入二抗(1:15 000)室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 暗室压片、显影、定影、洗片、扫描。使用 Image J 软件进行灰度分析。采用卵巢样本检测 AMH、INHBA、INHBB、BMP2 蛋白表达水平, 采用睾丸样本检测 FABP4 蛋白表达水平。

2.10 统计学处理

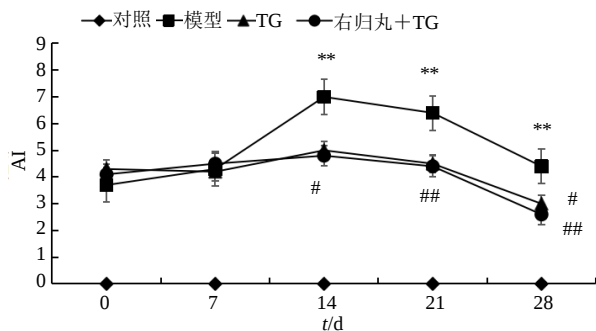
用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析和绘图。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析结合 LSD 检验进行两两比较。

3 结果

3.1 各组大鼠 AI 和足趾形态变化情况

第 1 次免疫后模型组的 AI 逐渐升高, 从给药第 14 天开始, 与对照组相比组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 给药第 21、28 天, TG 组 AI 显著降低, 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 右归丸+TG 组大鼠 AI 在第 14、21、28 天显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 1。

如图 2 所示, 对照组大鼠足趾形态正常; 模型组大鼠足部软组织肿胀明显, 出现涉及整个后爪的严重肿胀及红斑, 后足拖地行走; 与模型组比较,



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 1 各组大鼠 AI ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 1 AI of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



图 2 各组大鼠右足形态变化情况

Fig. 2 Morphological changes in right foot of each group rats

TG 组大鼠足趾轻微肿胀, 脚踝及足部皮肤泛红; 右归丸+TG 组大鼠足趾轻微肿胀, 脚踝及足部皮肤轻微泛红。

3.2 各组大鼠性激素水平和脏器指数的影响

各组间的卵巢指数和 FSH 含量比较, 组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与模型组比较, TG 组的 E_2 和 T 含量显著降低 ($P < 0.05$), 睾丸指数有降低趋势 ($P > 0.05$); 与 TG 组比较, 右归丸+TG 组的睾丸指数有升高趋势 ($P > 0.05$), E_2 和 T 含量均显著升高 ($P < 0.01$), 结果见图 3。

3.3 各组大鼠卵巢和睾丸病理组织形态改变

对照组卵巢、睾丸组织均未见异常。模型组卵巢组织皮质内的卵泡数量少, 偶见卵泡囊状扩张, 颗粒层变薄, 颗粒层细胞脱落; 睾丸小叶内有许多弯曲细长的生精小管, 排列不规则, 局部可见多量生精小管排列疏松, 间隙增宽, 少量生精小管腔内精子数量减少。TG 组可见卵巢组织皮质内的卵泡数量少, 偶见卵泡囊状扩张, 颗粒层变薄, 偶见游离的巨噬细胞浸润, 少量黄体细胞点状坏死, 胞核固缩深染; 睾丸小叶内有许多弯曲细长的生精小管, 排列不规则, 多见生精小管腔内的生精细胞、支持细胞及精子数量明显减少, 多量生精小管的生精细胞及支持细胞排列紊乱。右归丸+TG 组, 卵巢组织中黄体数量丰富, 发育良好, 体积较大, 黄体细胞丰富, 未见明显炎症细胞浸润及纤维化改变; 睾丸小叶内间隙增宽, 生精小管由不同发育阶段的生精细胞和支持细胞组成, 可见精子附于支持细胞上, 间质为生精小管之间的疏松结缔组织, 未见明显的坏死及炎症细胞浸润, 结果见图 4。

3.4 各组大鼠转录组学分析结果

3.4.1 卵巢样本 TG 组 vs 模型组共筛选出 1 025 个差异基因信息, 其中上调基因 744 个, 下调基因 281 个, 右归丸+TG 组 vs TG 组共筛选出 214 个差异基因, 其中上调基因 143 个, 下调基因 71 个; 采用微生信平台^[6]绘制带基因标注的双火山图, 筛选出具有回调趋势的 111 个差异基因; 通过绘制聚类热图来了解各组差异基因表达模式; 采用微生信平台进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析, 见图 5。GO 富集分析集中在“女性生殖发育”相关过程, 如 ovulation cycle process(排卵周期过程)、ovulation cycle(排卵周期)、female gonad development(女性性腺发育)、mammalian oogenesis stage(哺乳动物

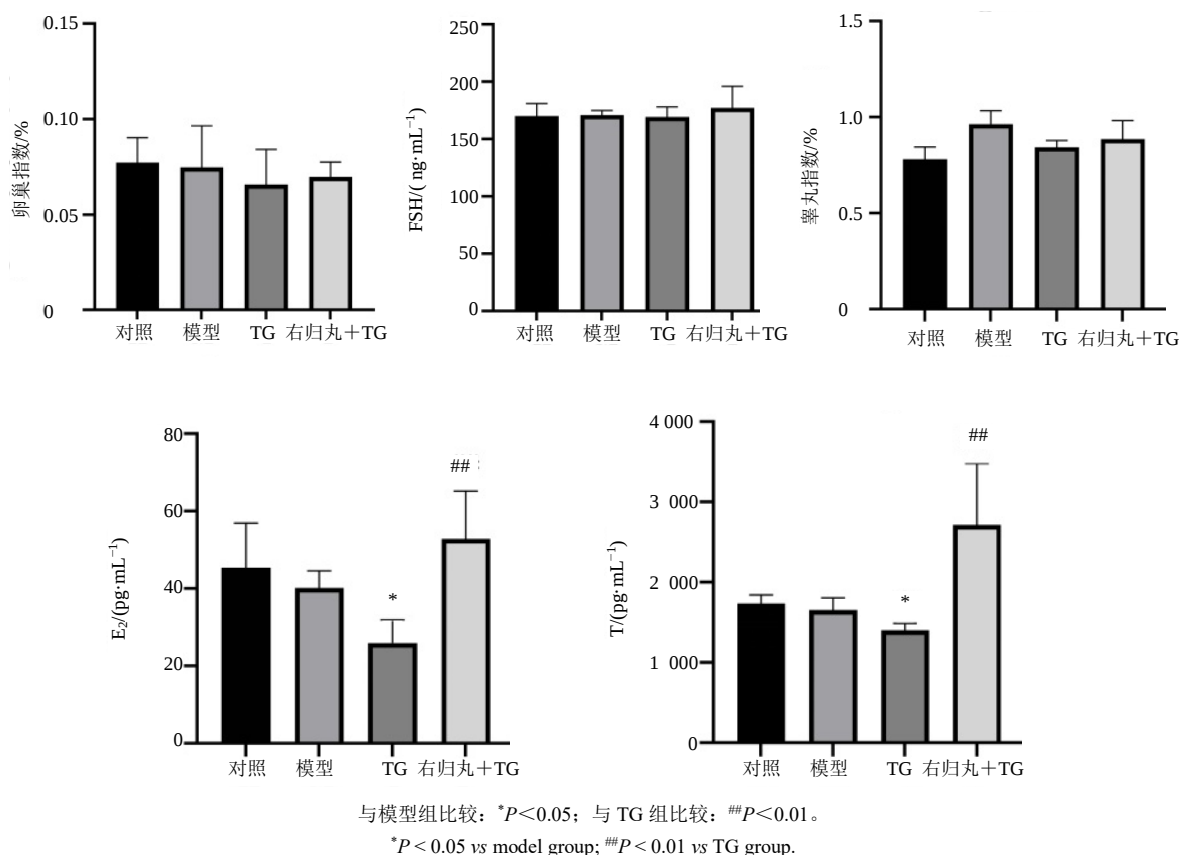


图 3 右归丸对 TG 致 CIA 大鼠生殖系统毒性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Effects of Yougui Pills on reproductive system toxicity in TG-induced CIA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

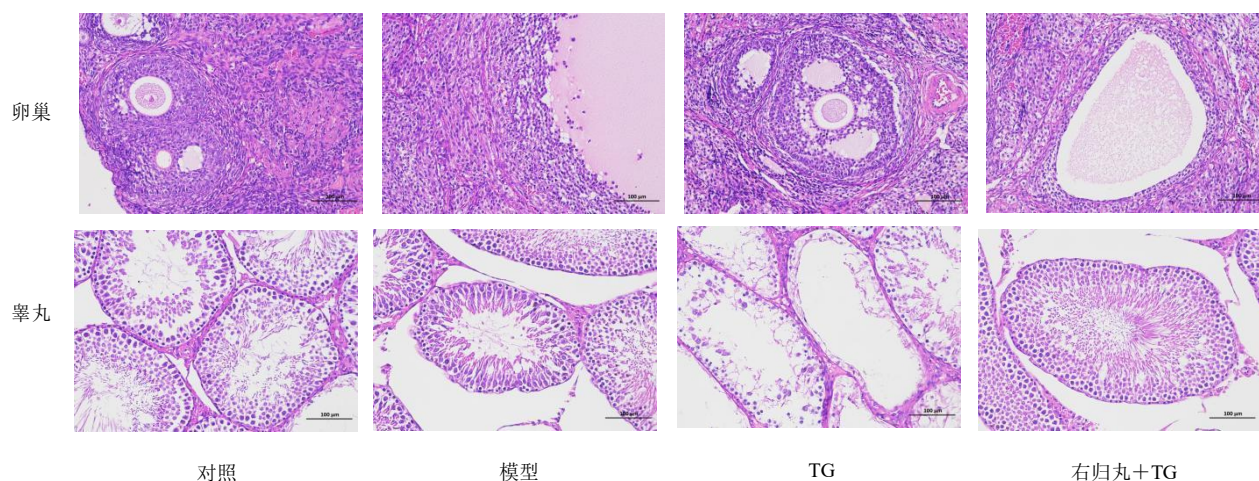
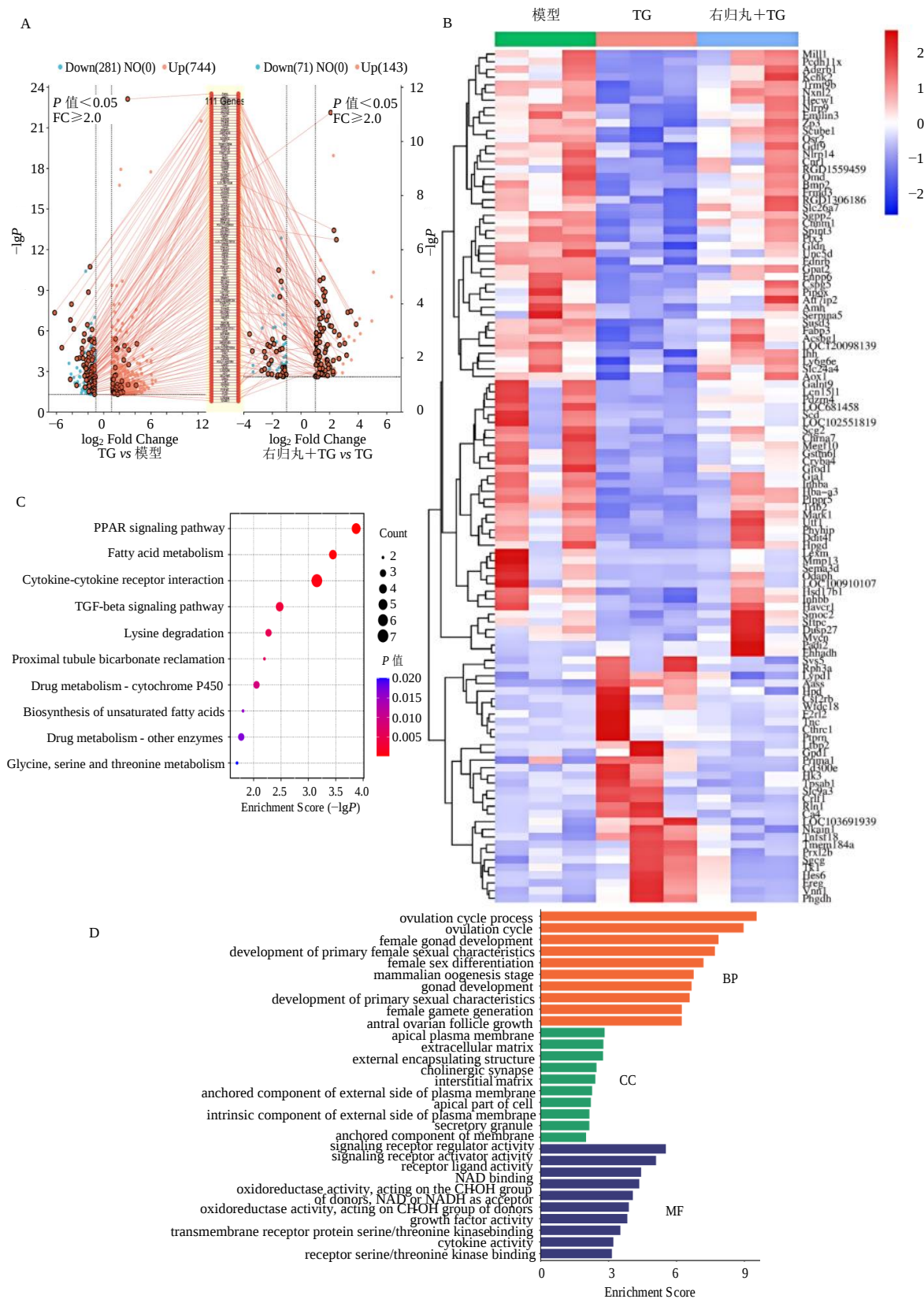


图 4 右归丸对 TG 致 CIA 大鼠卵巢和睾丸病理组织形态改变的影响 ($\times 200$)

Fig. 4 Effects of Yougui Pills on pathological histomorphological changes in ovaries and testes of TG-induced CIA rats ($\times 200$)

卵子发生阶段), 提示目标基因核心参与女性生殖系统的发育、排卵和配子形成等生理过程; KEGG 富集分析集中在过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)、脂肪酸代谢和转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路。

3.4.2 睾丸样本 TG 组 vs 模型组共筛选出 28 个差异基因信息, 其中上调基因 14 个, 下调基因 14 个; 右归丸+TG 组 vs TG 组共筛选出 33 个差异基因, 其中上调基因 19 个, 下调基因 14 个; 采用微生信平台绘制带基因标注的双火山图, 筛选出具有

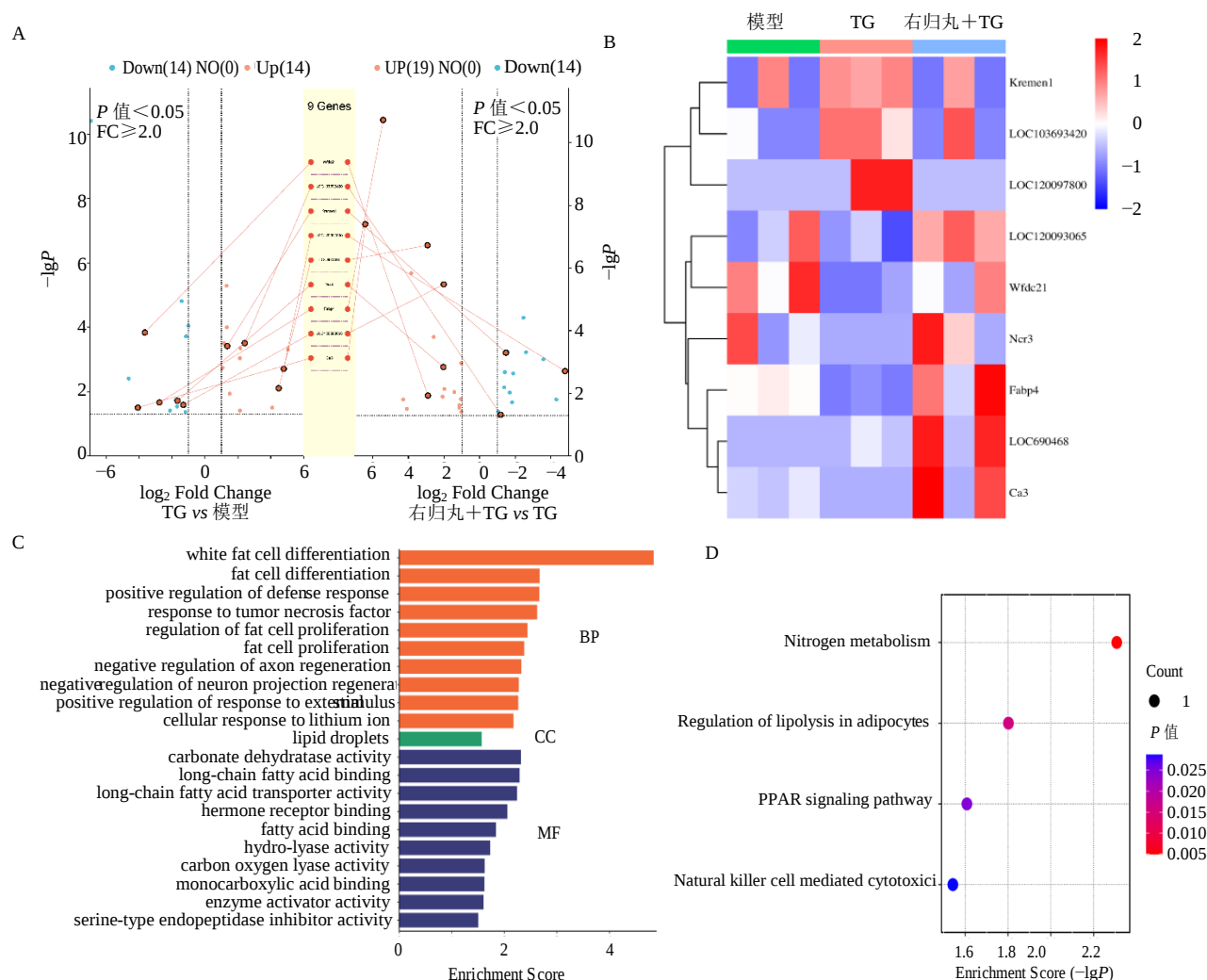


A-带基因的双火山图; B-聚类热图; C-KEGG 富集分析图; D-GO 富集分析图。

A-Volcano plot with genes; B-Cluster heat map; C-KEGG enrichment analysis; D-GO enrichment analysis.

图 5 各组雌性大鼠差异基因表达及富集分析图

Fig. 5 Differential gene expression and enrichment analysis of female rats in each group



A-带基因的火山图; B-聚类热图; C-GO 富集分析图; D-KEGG 富集分析图。
A-Volcano plot with genes; B-Cluster heat map; C-GO enrichment analysis; D-KEGG enrichment analysis.

图 6 各组雄性大鼠差异基因表达及富集分析图

Fig. 6 Differential gene expression and enrichment analysis of male rats in each group

回调趋势的共同差异基因 9 个, 通过绘制聚类热图来了解各组差异基因表达模式; 采用微生信平台进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析, 见图 6。GO 富集分析集中在“脂肪细胞发育与免疫应答”过程如 white fat cell differentiation (白色脂肪细胞分化)、fat cell differentiation (脂肪细胞分化); 睾丸间质细胞合成睾酮依赖脂质(胆固醇为前体), 脂肪细胞分化决定脂质储备和代谢能力, 间接调控睾酮水平; KEGG 富集分析集中在过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR)、脂肪细胞脂解的调控通路。

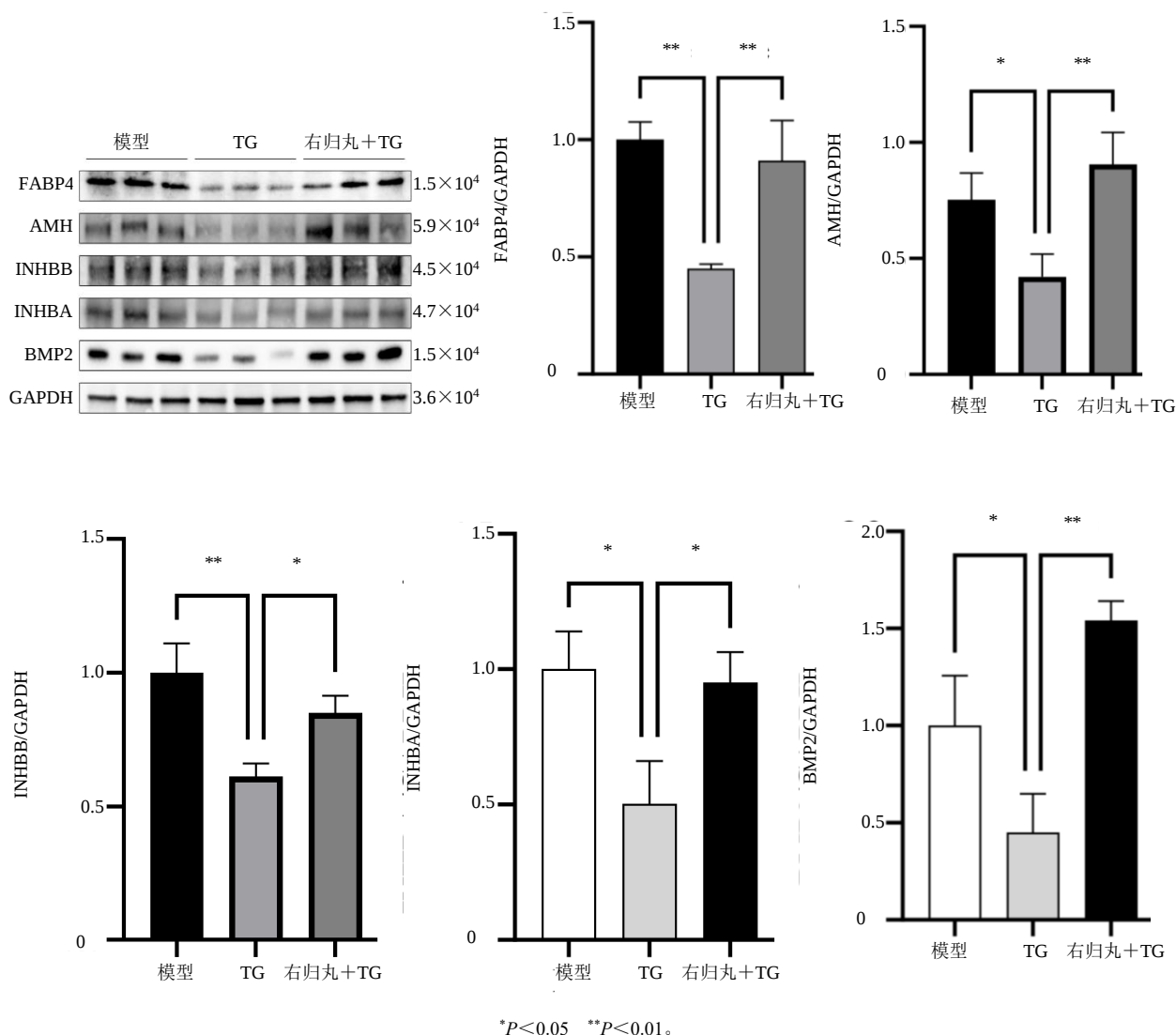
3.5 各组大鼠 FABP4、AMH、INHBA、INHBB、BMP2 蛋白含量的变化

与模型组相比, TG 组 FABP4、AMH、INHBA、

INHBB、BMP2 蛋白含量显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与 TG 组相比, 右归丸+TG 组 FABP4、AMH、INHBA、INHBB、BMP2 蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。上述蛋白表达趋势与转录组学中 RNA 的组间表达规律基本一致。结果见图 7。

4 讨论

本实验结果表明 CIA 模型可以对大鼠卵巢、睾丸组织产生轻度病理损伤, 导致出现卵巢组织中卵泡数量减少, 颗粒层细胞脱落, 睾丸组织中生精小管排列疏松, 精子数量减少的现象, 这与樊媛芳等^[7]的实验中出现的状况一致; ig TG 后, 损伤更为明显, 除卵泡数量减少、颗粒层变薄外, 还出现了巨噬细胞浸润及黄体细胞点状坏死, 生精细胞排列

图 7 各组 TGF-β 和 PPAR 通路相关蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 7 Expression of TGF-β and PPAR pathway-related proteins in tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

紊乱、精子数量明显减少；同时 TG 组大鼠的 E₂、T 含量显著降低，说明 TG 临床 8 倍等效剂量会导致 CIA 模型大鼠的生殖损伤。樊媛芳^[8]等的研究结果显示 TG 临床 4 倍等效剂量下给药 42 d，虽对 E₂、FSH 均无显著影响，但能显著降低血清中 T 的水平，在本研究中 E₂ 和 T 含量均显著降低，虽然上述研究与本研究的给药剂量不相同，但 T 指标检测结果趋势相吻合。

联合使用右归丸后，可显著升高 E₂ 和 T 的含量；卵巢和睾丸的病理损伤明显减轻，研究表明右归丸能够显著减轻 TG 对 CIA 模型大鼠的生殖毒性，通过上调性激素水平和改善生殖器官病理损伤，发挥保护作用，并且未影响 TG 对 CIA 模型大鼠 AI 的治疗作用。但本研究未设置右归丸单独给

药组，无法明确右归丸自身对生殖系统的确切影响，右归丸的使用剂量也有待进一步筛选和优化。

转录组学结果提示右归丸的卵巢生殖保护作用主要与 PPAR 和 TGF-β 通路有关，其中 TGF-β 通路在雷公藤致卵巢损伤的作用未见报道，因此选择对卵巢样本中 TGF-β 通路中 AMH、INHBA、INHBB、BMP2 蛋白进行验证。睾丸样本的组间差异基因较少，仅对富集到的 PPAR 通路中关键靶点 FABP4 蛋白进行了验证。BMP2、AMH、INHBA、INHBB 都属于 TGF-β 超家族的成员，对卵巢的生殖功能发挥着重要的协调作用。BMP 家族可广泛作用于卵巢生殖细胞，并通过旁/自分泌对卵泡发育进行调节。其中，BMP2 是 BMP 家族活性最高的成员之一，是卵巢颗粒细胞特异性分泌蛋白，在调节哺

乳动物的生长、细胞增殖和分化等方面有着更广泛的生物学功能,尤其在卵泡发育的各个阶段中发挥着重要作用^[9]。有学者研究发现 BMP 信号通路与激活素/TGF- β 通路共同构成复杂的调控网络,并且 BMP 介导的信号通路可能参与调控人卵巢中抑制素的表达,从而影响其复杂的生理功能^[10]。抑制素作为一种由性腺分泌的糖蛋白类激素,在哺乳动物繁殖功能的调控中起着至关重要的作用^[11]。研究表明 INHBA 和 INHBB 在生物学功能上是不一样的,INHBB 在卵泡发育早中期的表达量较高,不同于抑制素 A 在卵泡发育的晚期高度表达^[12]。此外,INHBB 的主要来源可能是输卵管上皮细胞和子宫内膜上皮细胞,在早期胚胎发育阶段发挥关键作用^[13]。INHBA 主要受颗粒细胞功能的影响来进一步调节卵泡发育过程^[14]。因此,推测 INHBA 和 INHBB 参与卵巢中卵泡的调节作用并在雌性动物的繁殖性状发挥了作用。AMH 在调节卵巢功能方面也尤为重要,AMH 是卵泡早期发育阶段的颗粒细胞所生成^[15],但在其他组织不表达或存在较少表达。目前,AMH 的水平已作为评价卵巢储备功能的生物标志物,AMH 的表达量可以灵敏地反映卵巢存活状态及功能变化并反映了卵巢中卵泡的数量和质量,也反映了卵巢受过刺激的不良反应^[16]。综上,BMP2、AMH、INHBA、INHBB 之间的表达量在维持正常的卵巢功能中发挥着关键作用,揭示了 TG 引起的雌性卵巢损伤的具体机制。FABP4 是脂肪细胞特异性脂肪酸结合蛋白,作为上游激活因子,增强 PPAR γ 的活性,调节脂肪生成和脂肪细胞分化,在人类和啮齿动物中,循环 FABP4 水平与三酰甘油、胆固醇和瘦素水平等肥胖危险因素广泛相关^[17-18]。在雄性生殖中,脂质代谢对精子膜结构、能量供应及获能过程至关重要^[19]。有研究发现,肥胖小鼠服用 FABP4 抑制剂对雄性生殖功能具有负性作用,导致总睾酮水平、INHBB 水平及睾丸生精状态约翰逊评分降低以及细胞凋亡 Tunel 评分的升高^[20]。

本研究发现右归丸可以显著改善 TG 导致的生殖损伤,转录组学分析及 Western blotting 实验结果表明右归丸可以上调 TG 导致的 BMP2、AMH、INHBA、INHBB 和 FABP4 的基因和蛋白水平降低,从而发挥生殖保护作用。本研究揭示了右归丸对 TG 生殖毒性的减毒作用和部分作用机制,为 TG 的临床安全用药提供了重要实验依据,证实右归丸作为温补肾阳经典方剂在配伍使用中的安全性与有

效性,为其与雷公藤制剂临床联合用药提供了科学参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙萍萍,张天娇,许可嘉,等.雷公藤及其制剂临床不良反应分布特点随机对照试验的系统评价[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(9):1899-1905.
Sun P P, Zhang T J, Xu K J, et al. Clinical adverse reaction distribution features of *Tripterygium wilfordii* and its preparations: A systematic review of randomized controlled trials [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2015, 17(9): 1899-1905.
- [2] 张昕贤,张新志,林日阳,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.
Zhang X X, Zhang X Z, Lin R Y, et al. Study on the intervention of reproductive function in GTW induced mice by Chinese herbs with the hormone changes [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2012, 14(2): 37-40.
- [3] 徐颖,樊媛芳,赵元,等.近40年雷公藤生殖毒性研究概述[J].中国中药杂志,2019,44(16):3406-3414.
Xu Y, Fan Y F, Zhao Y, et al. Overview of reproductive toxicity studies on *Tripterygium wilfordii* in recent 40 years [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(16): 3406-3414.
- [4] 王璿,尹葳,蔡雪阳,等.基于 SOCS1/STAT3 信号通路探究红禾麻乙酸乙酯部位对 II 型胶原诱导关节炎大鼠的影响[J].中成药,2023,45(7):2364-2367.
Wang J, Yin W, Cai X Y, et al. Based on SOCS1/STAT3 signaling pathway, the effect of ethyl acetate fraction of red sesame on type II collagen-induced arthritis rats was explored [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(7): 2364-2367.
- [5] 马帅,佟继铭,梅爱敏,等.赤菴根总皂苷对 CIA 模型大鼠的治疗作用及对 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达的影响[J].中药药理与临床,2017,33(4):70-74.
Ma S, Tong J M, Mei A M, et al. The study of saponins from *Thladiantha dubia* Root (TSTR) on CIA rats and effect on CD4⁺, CD8⁺ T lymphocyte expression [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2017, 33(4): 70-74.
- [6] Tang D D, Chen M J, Huang X H, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing [J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0294236.
- [7] 樊媛芳,徐颖,苏晓慧,等.雷公藤多苷片对 II 型胶原诱导性关节炎雄性大鼠生殖毒性的影响[J].中国中药杂志,2020,45(4):755-763.
Fan Y F, Xu Y, Su X H, et al. Effect of Tripterygium

- Glycosides Tablets on reproductive toxicity in male rats with II type collagen induced arthritis [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(4): 755-763.
- [8] 樊媛芳, 徐颖, 苏晓慧, 等. 雷公藤多苷片对II型胶原诱导性关节炎雌性大鼠生殖毒性的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3486-3493.
- Fan Y F, Xu Y, Su X H, et al. Effect of Tripterygium Glycosides Tablets on reproductive toxicity in female rats with II type collagen induced arthritis [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(16): 3486-3493.
- [9] 徐业芬, 李齐发, 李二林, 等. 湖羊 *BMP2*、*BMP4*、*BMP6* 和 *BMP7* 基因 mRNA 表达水平与排卵数关系的研究 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(10): 3655-3661.
- Xu Y F, Li Q F, Li E L, et al. Relationship between the *BMP2*, *BMP4*, *BMP6* and *BMP7* gene expression and ovulation number in hu sheep [J]. *Sci Agric Sin*, 2009, 42(10): 3655-3661.
- [10] Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, et al. Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin beta (β)-subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3): 1254-1261.
- [11] 马继福, 巴合提·博代, 贾昊天, 等. 抑制素对促卵泡素作用机制的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(1): 37-41, 126-127.
- Ma J F, Bakhet B D, Jia H T, et al. Research progress on the mechanism of inhibin on follicle-stimulating hormone [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2023(1): 37-41, 126-127.
- [12] 涂飞. miR-26b 和 miR-34a 靶向 HAS2、INHBB 对猪卵巢颗粒细胞凋亡的调控研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- Tu F. Regulation of miR-26b and miR-34a targeting HAS2 and INHBB on apoptosis of porcine ovarian granulosa cells [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [13] Refaat B, Ledger W. The expression of activins, their type II receptors and follistatin in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in pseudo-pregnancy [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(12): 3346-3354.
- [14] 程佳瑞. miR-29c-5p 通过靶向 INHBA 调控水牛卵泡颗粒细胞功能状态的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- Cheng J R. miR-29c-5p regulates the functional state of buffalo ovarian granulosa cells by targeting INHBA [D]. Nanning: Guangxi University, 2023.
- [15] Broer S L, Broekmans F J M, Laven J S E, et al. Anti-Müllerian hormone: Ovarian reserve testing and its potential clinical implications [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(5): 688-701.
- [16] Dewailly D, Andersen C Y, Balen A, et al. The physiology and clinical utility of anti-mullerian hormone in women [J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(3): 370-385.
- [17] Hotamisligil G S, Bernlohr D A. Metabolic functions of FABPs: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(10): 592-605.
- [18] Baar R A, Dingfelder C S, Smith L A, et al. Investigation of *in vivo* fatty acid metabolism in AFABP/aP2^{-/-} mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(1): E187-E193.
- [19] Olia Bagheri F, Alizadeh A, Sadighi Gilani M A, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in the regulation of fatty acid metabolism related gene expressions in testis of men with impaired spermatogenesis [J]. *Reprod Biol*, 2021, 21(4): 100543.
- [20] Balci T, Kocabas R, Cuce G, et al. Inhibition of fatty acid binding protein 4 in obese male mice adversely affects reproductive parameters [J]. *J Reprod Infertil*, 2021, 22(1): 16-22.

[责任编辑 兰新新]