

基于 Nrf2 介导的睾丸抗氧化防御探究女贞子及其酒制品对雷公藤多苷致生殖毒性的减毒机制

王倩¹, 王君明^{1,2,3,4*}, 张月月^{1,2}, 巫晓慧^{1,2}, 王彦娟^{1,2}, 弓明珠^{1,2}, 何庆文^{1,2}, 秦玲玉¹, 杜晨杰¹, 李琬莹¹

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046
2. 郑州市中药安全与功效提升工程研究中心, 河南 郑州 450046
3. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046
4. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 探究女贞子 *Ligustri Lucidi Fructus* 及其酒制品对雷公藤多苷致生殖毒性的减毒作用差异, 并基于核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 介导的睾丸抗氧化防御探究其减毒机制。方法 ICR 小鼠连续 28 d ig 雷公藤多苷 (40 mg/kg), 同时 ig 女贞子或其酒制品进行干预。采用试剂盒检测血清中睾酮和睾丸组织中氧化应激相关指标的水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察睾丸组织病理变化; 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测睾丸组织 Nrf2、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸醌脱氢酶 1 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1, NQO1) 蛋白及 mRNA 表达。结果 雷公藤多苷致小鼠睾丸生精小管结构松散, 生精细胞层次减少, 成熟精子数量显著减少, 睾酮水平显著降低 ($P < 0.01$), 睾丸脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平显著升高 ($P < 0.01$); 女贞子 (1、2 g/kg) 能够显著抑制上述指标异常 ($P < 0.05$ 、0.01), 且女贞子 (2 g/kg) 还能够显著提升抗氧化酶活性 ($P < 0.05$ 、0.01); 女贞子酒制品 (1、2 g/kg) 均能够显著抑制上述指标异常 ($P < 0.01$), 且女贞子酒制品 (2 g/kg) 能够更全面地逆转氧化应激失衡 ($P < 0.01$), 相同剂量下女贞子酒制品的减毒效果明显优于其生品 ($P < 0.05$ 、0.01)。机制分析发现, 雷公藤多苷显著下调小鼠睾丸组织 Nrf2 及其下游分子 HO-1、NQO1 的表达 ($P < 0.01$), 而女贞子及其酒制品 (1、2 g/kg) 能够显著上调 Nrf2 及其下游分子 HO-1、NQO1 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 其中女贞子酒制品的作用显著优于女贞子 ($P < 0.01$)。结论 女贞子及其酒制品均能够减轻雷公藤多苷引起的睾丸生殖毒性, 且酒制品的减毒效果显著优于生品, 其机制可能与增强 Nrf2 介导的睾丸抗氧化防御相关。

关键词: 女贞子; 酒制; 生殖毒性; Nrf2; 氧化应激; 特女贞苷; 红景天苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2614-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.016

Mechanism of *Ligustri Lucidi Fructus* with its wine-processed product on attenuating *Tripterygium wilfordii* polycoride-induced reproductive toxicity based on Nrf2-mediated testicular antioxidant defense

WANG Qian¹, WANG Junming^{1,2,3,4}, ZHANG Yueyue^{1,2}, WU Xiaohui^{1,2}, WANG Yanmei^{1,2}, GONG Mingzhu^{1,2}, HE Qingwen^{1,2}, QIN Lingyu¹, DU Chenjie¹, LI Wanying¹

1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. Zhengzhou Engineering Research Center for Safety and Efficacy Enhancement of Chinese Materia Medica, Zhengzhou 450046, China
3. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province & Ministry of Education of P. R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

收稿日期: 2025-11-12

基金项目: 中原科技创新领军人才项目 (254200510005); 河南省高校科技创新团队支持计划项目 (26IRTSTHN020); 河南省自然科学基金青年科学基金项目 (252300423825); 河南中医药大学 2024 年度研究生科研创新类项目 (2024KYCX035)

作者简介: 王倩 (2001—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药功效机制与安全性评价研究。E-mail: qianwang0223@163.com

*通信作者: 王君明 (1980—), 男, 博士生导师, 博士后合作导师, 主要从事中药功效机制与安全性评价研究。

Tel: (0371)65962746 E-mail: mjw98_2010@163.com

4. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao in Henan Province, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To explore the differential attenuation effects of Nüzhenzi (*Ligustri Lucidi Fructus*) and its wine-processed product on *Tripterygium wilfordii* polycoride (TWP)-induced reproductive toxicity, and to investigate its attenuation mechanism based on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) mediated testicular antioxidant defense. **Methods** ICR mice were ig TWP (40 mg/kg) for 28 d, and intervention was also given with *Ligustri Lucidi Fructus* or its wine-processed products. Reagent kits were used to detect the levels of testosterone in serum and oxidative stress-related indicators in testicular tissue. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in testicular tissue. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA expressions of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone dehydrogenase 1 (NQO1) in testicular tissue. **Results** TWP caused a loose structure of seminiferous tubules in testes of mice, a decrease in level of spermatogenic cells, a significant reduction in number of mature sperm, a significant decrease in testosterone levels ($P < 0.01$), and a significant increase in the level of malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation product in testes ($P < 0.01$). *Ligustri Lucidi Fructus* (1, 2 g/kg) could significantly inhibit the abnormal indicators mentioned above ($P < 0.05, 0.01$), and *Ligustri Lucidi Fructus* (2 g/kg) could also significantly enhance the activity of antioxidant enzymes ($P < 0.05, 0.01$). *Ligustri Lucidi Fructus* wine-processed products (1, 2 g/kg) could significantly inhibit the abnormal indicators mentioned above ($P < 0.01$), and *Ligustri Lucidi Fructus* wine-processed products (2 g/kg) could more comprehensively reverse oxidative stress imbalance ($P < 0.01$). At the same dose, the detoxification effect of *Ligustri Lucidi Fructus* wine-processed products was significantly better than that of their raw products ($P < 0.05, 0.01$). Mechanism analysis revealed that TWP significantly down-regulated the expressions of Nrf2 and its downstream molecules HO-1 and NQO1 in testicular tissue of mice ($P < 0.01$), while *Ligustri Lucidi Fructus* and its wine-processed products (1, 2 g/kg) significantly up-regulated the expressions of Nrf2 and its downstream molecules HO-1 and NQO1 ($P < 0.05, 0.01$), with *Ligustri Lucidi Fructus* wine-processed products showing a significantly better effect than *Ligustri Lucidi Fructus* ($P < 0.01$). **Conclusion** *Ligustri Lucidi Fructus* and its wine-processed products could alleviate the testicular reproductive toxicity caused by TWP, and the detoxification effect of wine-processed products is significantly better than that of raw products. The mechanism may be related to enhancing Nrf2 mediated testicular antioxidant defense.

Key words: *Ligustri Lucidi Fructus*; wine processing; reproductive toxicity; Nrf2; oxidative stress; specneuzhenide; salidroside

雷公藤多苷作为一种高效免疫抑制剂,在风湿性关节炎、肾炎等自身免疫性疾病的治疗中具有重要价值^[1]。然而,其临床应用却受限于严重的多器官毒性,尤其是生殖毒性最为突出,可引起性欲减退、睾丸和卵巢功能损伤等^[2-4]。数据挖掘发现,临床中存在雷公藤多苷与女贞子制剂联用的情况,这契合了中医“配伍减毒”的理论思想。女贞子 *Ligustri Lucidi Fructus* 作为滋补肝肾之要药,具有“补益肝肾、清热明目”之功,其酒制品更可增强滋补效力,契合雷公藤多苷所致肝肾精血耗伤的病机。

现代药理学研究表明,氧化应激是雷公藤多苷生殖毒性的核心机制。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 作为细胞抗氧化防御系统的关键调节因子,在维持睾丸氧化还原稳态中发挥核心作用^[5-6]。在生理状态下, Nrf2 存在于胞质中;在氧化应激条件下, Nrf2 转位入核,调控下游 II 相解毒酶和抗氧化蛋白基因的转录^[7]。研究表明, Nrf2 通路激活可减轻睾丸

支持细胞和间质细胞的氧化损伤^[8]。然而,女贞子对雷公藤多苷减毒的机制和作用靶点以及女贞子生品与其酒制品减毒效果的差异及其机制尚未有研究报道。本研究旨在考察女贞子及其酒制品对雷公藤多苷致生殖毒性的减毒作用差异,并基于 Nrf2 介导的睾丸抗氧化防御探究其减毒机制,以期雷公藤多苷联用女贞子的安全用药提供临床前实验支撑。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 60 只,体质量 16~18 g, 4~5 周龄,购自山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产合格证号 SCXK (鲁) 20220006。小鼠饲养于河南中医药大学实验动物中心屏障环境,温度 (23±2) °C,相对湿度 (50±10) %, 12 h/12 h 光暗循环,自由进食饮水,实验前适应性饲养 1 周。动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 DWLL202212019)。

1.2 药材

女贞子饮片(产地河南,批号 20240523),经河南中医药大学谢小龙教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait.的干燥成熟果实。

1.3 药品与试剂

雷公藤多苷片(国药准字 Z34021048,批号 221107)购自宿州亿帆药业有限公司;黄酒(批号 20211230)浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司;羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na,批号 170624)购自河南郑州派尼化学试剂厂;多聚甲醛固定液、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液套装(批号分别为 GP2403301、CR2410157)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;小鼠睾酮试剂盒(批号 m1001948)购自上海酶联生物科技有限公司;考马斯亮蓝法蛋白测试盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)和过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(批号分别为 20250804、20250807、20250726、20250807、20250712、20250805)购自南京建成生物工程研究所;4×蛋白质上样缓冲液、RIPA 组织/细胞裂解液(批号分别为 20241129、20250901)购自北京索莱宝科技有限公司;核蛋白与胞质蛋白抽提试剂盒、Nrf2 抗体、核纤层蛋白 B1(Lamin B1)抗体、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体、HRP 标记的兔抗 IgG 二抗(批号分别为 20036525、00126482、00170022、00121492、20001626)购自武汉三鹰生物技术有限公司;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸醌脱氢酶 1(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1, NQO1)抗体(批号 43145)购自美国 GeneTex 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 F000301)购自 Selleck 公司;Nrf2、HO-1、NQO1 和 β -actin 引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计并合成。

1.4 仪器

Donatello 型脱水机(意大利 DIAPATH 公司);JB-P5 型包埋机、JB-L5 型冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);BX53 型显微镜(日本奥林巴斯

公司);DK-8D 型水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);UPR-II-10T 型优普超纯水机(四川优普超纯科技有限公司);TGL-16M 型低温高速离心机(常州金坛良友仪器有限公司);EPOCH2 型酶标仪(美国 BioTek 公司);JX-FSTPRP-48 型全自动样品快速研仪(上海净信实业发展有限公司);Tanon EPS 600 型电泳仪、Tanon-5200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);Trans-Blot Turbo 型全能型半干转印系统(美国伯乐公司);NanoDrop One 型超微量核酸蛋白测定仪、StepOnePlus 型实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 女贞子酒制品的制备

参考炮制方法并稍作优化,取净女贞子 100 g,加入黄酒 20 g 拌匀,闷润 2 h,使黄酒充分渗入药材内部,随后将药材置容器内密闭隔水蒸制 8 h,阴干,即得。

2.2 女贞子及女贞子酒制品水煎液的制备

分别称取女贞子、女贞子酒制品各 30 g,加 10 倍量水浸泡 30 min,武火煮沸后文火煎煮 25 min,滤过;药渣再加 9 倍量水,同法煎煮 25 min 后滤过,合并 2 次滤液后置于水浴锅上浸干,冷却后计算得率,女贞子得率为 19.9%,女贞子酒制品得率为 22.6%。经检测生女贞子中特女贞苷质量分数为 7.33 mg/g,女贞子酒制品中红景天苷质量分数为 17.85 mg/g,符合《中国药典》2025 年版对女贞子及女贞子酒制品中指标成分的限量规定。

2.3 动物分组、造模、给药及取材

将 60 只小鼠按体质量随机分为对照组、模型组及女贞子低、高剂量(1、2 g/kg^[9-10])组和女贞子酒制品低、高剂量(1、2 g/kg)组,每组 10 只。除对照组外,其余各组小鼠每日上午 ig 雷公藤多苷混悬液(40 mg/kg^[11],以 0.5% CMC-Na 配制),对照组 ig 等体积的 0.5% CMC-Na。每日下午,各给药组 ig 女贞子或女贞子酒制品水煎液(20 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的 CMC-Na。每日造模与给药间隔 6 h 以上,连续给药 28 d。末次给药后禁食不禁水 12 h,小鼠取血后立即采用颈椎脱臼法处死,于冰台上迅速剥离各组睾丸,用锡箔纸包裹后置于-80 °C 冰箱保存。

2.4 HE 染色观察睾丸病理学变化

小鼠睾丸浸泡于 4%多聚甲醛固定液中 24 h,

石蜡包埋，切成 4 μm 薄片。切片脱蜡入水，进行 HE 染色，脱水封片后在光学显微镜下观察组织形态结构变化。

2.5 睾酮水平检测

取各组小鼠血液样品，室温静置 2 h 后，以 3 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。按照试剂盒说明书检测血清中睾酮水平。

2.6 Western blotting 检测睾丸 Nrf2 及 HO-1、NQO1 蛋白表达

分别采用核蛋白与胞质蛋白抽提试剂盒、RIPA 裂解液提取睾丸核蛋白和总蛋白后，使用 BCA 法测定样本蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，分别加入 Nrf2 (1:5 000)、HO-1 (1:5 000)、NQO1 (1:2 000)、Lamin B1 (1:5 000)、GAPDH (1:10 000) 抗体，4 ℃ 孵育过夜；洗膜后，加入二抗 (1:5 000)，室温孵育 1 h；洗膜后，加入 ECL 化学发光试剂，置于化学发光成像系统中成像，使用 Tanon 图像分析系统对蛋白条带可视化并进行定量。

2.7 qRT-PCR 检测睾丸 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达

按照试剂盒说明书提取小鼠睾丸中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Nrf2</i>	F: AGTCGCTTGCCCTGGATATC R: GAACAGCGGTAGTATCAGCCA
<i>HO-1</i>	F: AACTTTCAGAAGGGTCAGGTGTC R: CTCCTCAGGGAAGTAGAGTGGG
<i>NQO1</i>	F: GCGAGAAGAGCCCTGATTGT R: AGATGACTCGGAAGGATACTGAAA
<i>β-actin</i>	F: GTGACGTTGACATCCGTAAAGA R: GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC

2.8 睾丸氧化应激指标检测

取各组小鼠睾丸组织，制成 10% 的匀浆液，2 500 r/min 离心 10 min，取上清液，采用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白浓度。按照试剂盒说明书检测睾丸中 MDA、SOD、GSH、GST、CAT 水平。

2.9 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析，方差齐时采用最小显著性差异法 (LSD)，

方差不齐时采用 Dunnett's T3 法。两组数据相关性采用皮尔逊相关性系数检验，若 $|r| \geq 0.8$ 时，认为 2 变量间存在极高度相关性； $0.6 \leq |r| < 0.8$ ，认为 2 变量存在高度相关性； $0.4 \leq |r| < 0.6$ ，认为 2 变量存在中度相关性； $0.2 \leq |r| < 0.4$ ，可认为 2 变量存在低度相关性； $|r| < 0.2$ ，认为 2 变量基本不相关^[12]。

3 结果

3.1 女贞子及其酒制品改善雷公藤多苷所致睾丸病理损伤

如图 1 所示，对照组小鼠睾丸生精小管结构完整，生精细胞层次丰富，管腔内可见大量成熟精子。与对照组比较，模型组小鼠睾丸出现典型毒性病理改变，表现为生精小管结构松散，生精细胞层次减少及成熟精子数量显著减少。与模型组比较，女贞子 (1、2 g/kg) 仅能轻度改善生精小管结构松散，且剂量相关性的改善效果不显著；女贞子酒制品 (1 g/kg) 使生精小管结构趋于完整，成熟精子数量增加，女贞子酒制品 (2 g/kg) 的改善作用最为显著，表现为睾丸生精小管结构更加完整，生精细胞层次丰富，管腔内成熟精子数量增加，睾丸结构基本恢复正常；同剂量下，女贞子酒制品改善效果优于女贞子。综上，女贞子及其酒制品均能不同程度地改

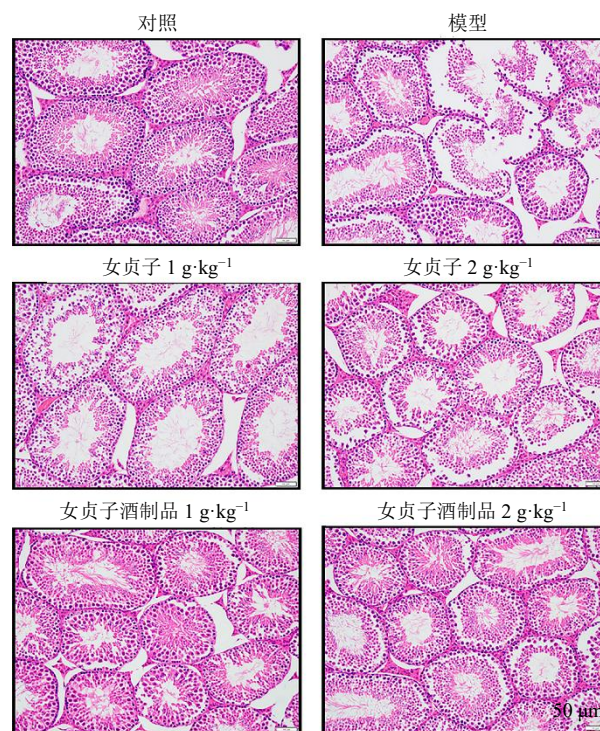


图 1 各组小鼠睾丸 HE 染色图 (×200)

Fig. 1 HE staining of testicular of mice in each group (×200)

善上述病理损伤，且酒制品改善效果最佳，呈剂量相关性。

3.2 女贞子及其酒制品改善雷公藤多苷所致睾丸损伤

如表 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中睾酮水平显著降低 ($P < 0.01$)，睾丸组织中脂质过氧化物 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，女贞子 (1 g/kg) 仅能改善 MDA 水平的异常升高 ($P < 0.05$)；女贞子 (2 g/kg) 使 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$)，睾酮水平显著升高 ($P < 0.05$)；女贞子酒制品 (1、2 g/kg) 能够显著抑制睾酮水平

表 2 各组小鼠血清中睾酮及睾丸中 MDA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Levels of testosterone in serum and MDA in testicular of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	睾酮/(ng·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	19.56 ± 1.05	2.10 ± 0.41
模型	—	2.10 ± 0.40**	5.01 ± 1.34**
女贞子	1	2.61 ± 0.44	4.30 ± 0.53 [#]
	2	2.81 ± 0.41 [#]	3.85 ± 0.50 ^{##}
女贞子酒制品	1	3.11 ± 0.29 ^{##}	2.82 ± 0.61 ^{##} ▼▼
	2	3.45 ± 0.61 ^{##} ▼	2.13 ± 0.68 ^{##} ▼▼■

与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ；与同剂量女贞子组比较：▼ $P < 0.05$ ▼▼ $P < 0.01$ ；与同药材低剂量组比较：■ $P < 0.05$ ■■ $P < 0.01$ ，下表同。

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ▼ $P < 0.05$ ▼▼ $P < 0.01$ vs same-dose *Ligustri Lucidi Fructus* group; ■ $P < 0.05$ ■■ $P < 0.01$ vs low-dose crude drug group, same as below tables.

以及 MDA 水平的异常表达 ($P < 0.01$)，其中以女贞子酒制品 (2 g/kg) 改善效果最佳 ($P < 0.05$)。进一步比较显示，在相同剂量下，女贞子酒制品对睾丸水平的改善作用均显著优于女贞子 ($P < 0.05$ 、 0.01)。综合分析表明，各给药组干预后均能不同程度地逆转上述指标的异常表达。女贞子酒制品尤其是高剂量组，对睾丸损伤相关指标具有最为突出的改善作用。

3.3 女贞子及其酒制品激活 Nrf2 通路改善雷公藤多苷所致生殖毒性

如图 2 和表 3、4 所示，与对照组比较，模型组小鼠睾丸组织中 Nrf2 核蛋白及 mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$)，其下游靶基因 HO-1 与 NQO1 的蛋白和 mRNA 表达水平也显著下调 ($P < 0.01$)。与模型组比较，女贞子 (1 g/kg) 仅能上调 Nrf2 mRNA、HO-1 蛋白及 mRNA、NQO1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)，女贞子 (2 g/kg) 能显著上调 Nrf2 mRNA、HO-1、NQO1 蛋白及 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)；而女贞子酒制品 (1、2 g/kg) 均能够显著上调 Nrf2 核蛋白及 mRNA 的表达水平 ($P < 0.01$)，其下游靶基因 HO-1、NQO1 的蛋白及 mRNA 水平也显著上调 ($P < 0.01$)，其中女贞子酒制品 (2 g/kg) 作用更显著。在相同剂量下，女贞子酒制品对 Nrf2 信号通路的调控作用显著优于女贞子 ($P < 0.01$)。上述结果提示，女贞子酒制品能够通过更有效地激活睾丸组织 Nrf2 信号通路及其下游抗氧化基因，在分子层面发挥更显著的抗氧化保护作用。

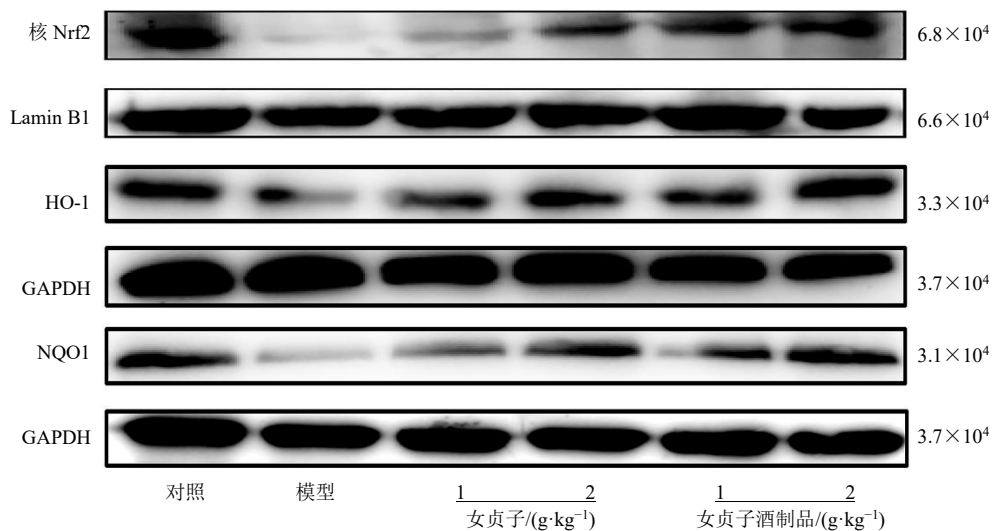


图 2 各组小鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达

Fig. 2 Expressions of Nrf2, HO-1 and NQO1 protein in testicular of mice in each group

表3 各组小鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Nrf2, HO-1 and NQO1 protein expressions in testicular tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Nrf2/Lamin B1	HO-1/GAPDH	NQO1/GAPDH
对照	—	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03
模型	—	0.25 ± 0.04**	0.32 ± 0.03**	0.21 ± 0.01**
女贞子	1	0.28 ± 0.05	0.38 ± 0.01#	0.33 ± 0.01##
	2	0.36 ± 0.07	0.55 ± 0.01###	0.43 ± 0.01###
女贞子酒制品	1	0.52 ± 0.03###▼▼	0.75 ± 0.06###▼▼	0.51 ± 0.01###▼▼
	2	0.72 ± 0.05###▼▼■	0.91 ± 0.01###▼▼■	0.92 ± 0.03###▼▼■

表4 各组小鼠睾丸组织 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Nrf2, HO-1 and NQO1 mRNA expressions in testicular tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Nrf2 mRNA相对表达量	HO-1 mRNA相对表达量	NQO1 mRNA相对表达量
对照	—	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.02
模型	—	0.39 ± 0.01**	0.27 ± 0.03**	0.38 ± 0.01**
女贞子	1	0.44 ± 0.02#	0.35 ± 0.03#	0.40 ± 0.01
	2	0.50 ± 0.03###	0.41 ± 0.01##	0.45 ± 0.02###
女贞子酒制品	1	0.63 ± 0.04###▼▼	0.56 ± 0.02###▼▼	0.76 ± 0.01###▼▼
	2	0.88 ± 0.01###▼▼■	0.76 ± 0.06###▼▼■	0.95 ± 0.03###▼▼■

3.4 女贞子及其酒制品调节氧化应激失衡改善雷公藤多苷所致生殖毒性

如表5所示,与对照组比较,模型组小鼠睾丸组织中SOD、GSH、GST、CAT水平显著降低($P < 0.01$),提示发生严重氧化应激,表现为氧化防御系统功能受损。与模型组比较,女贞子(1 g/kg)仅能改善小鼠睾丸组织中SOD、GST水平的异常降低($P < 0.05$),女贞子(2 g/kg)能改善SOD、GST、CAT水平的异常降低($P < 0.05, 0.01$);而女贞子酒制品(1、2 g/kg)能够显著升高睾丸组织中SOD、

GSH、GST、CAT水平($P < 0.01$),其中以女贞子酒制品(2 g/kg)改善效果最佳($P < 0.05, 0.01$)。在相同剂量下,女贞子酒制品对上述氧化应激指标的改善作用均显著优于女贞子($P < 0.05, 0.01$)。进一步皮尔逊相关性分析(图3)显示,血清中睾酮水平与睾丸组织中SOD、GSH、GST、CAT水平均呈显著正相关(r 值分别为0.826、0.964、0.911、0.937, $P < 0.01$)。上述结果表明,女贞子酒制品可能通过有效调控睾丸的氧化应激状态,进而发挥其减毒作用。

表5 各组小鼠睾丸氧化应激指标比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Comparison of oxidative stress indicators in testicular tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)	GST/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
对照	—	88.28 ± 5.77	1.83 ± 0.28	76.36 ± 8.54	51.74 ± 3.66
模型	—	43.42 ± 3.16**	0.39 ± 0.06**	29.38 ± 3.41**	17.86 ± 1.37**
女贞子	1	47.73 ± 5.04#	0.46 ± 0.07	33.60 ± 2.75#	20.50 ± 3.25
	2	48.56 ± 4.20#	0.48 ± 0.04	35.26 ± 1.73##	21.49 ± 1.43#
女贞子酒制品	1	59.65 ± 4.70###▼▼	0.59 ± 0.05###▼	41.49 ± 2.95###▼▼	25.77 ± 2.78###▼▼
	2	69.64 ± 4.71###▼▼■	0.72 ± 0.09###▼▼■	48.63 ± 4.22###▼▼■	28.38 ± 5.19###▼▼

4 讨论

本研究基于中医药理论,系统探究女贞子及其酒制品对雷公藤多苷致多器官毒性的减毒作用。发现女贞子尤其是其酒制品,可显著缓解雷公藤多苷引起的多器官损伤,而其优势在生殖系统保护方面尤为突出,其增效机制与更有效地激活睾丸组织Nrf2通路、逆转机体氧化应激失衡密切相关。本研究构建了“毒性表征-药效干预-机制探索”的完整证

据体系。研究发现,尽管女贞子对肝、肾组织具有一定保护趋势,但其对睾丸组织病理结构与睾酮水平的改善作用最为显著。究其原因,与中医“肾主生殖”“肝经络阴器”的理论相契合,雷公藤多苷通过耗伤肝肾精血影响生殖功能,而女贞子则通过“滋补肝肾”之功实现对生殖毒性的针对性缓解,从而促使研究聚焦于生殖系统。

国内外多项研究证实,氧化应激是睾丸毒性发

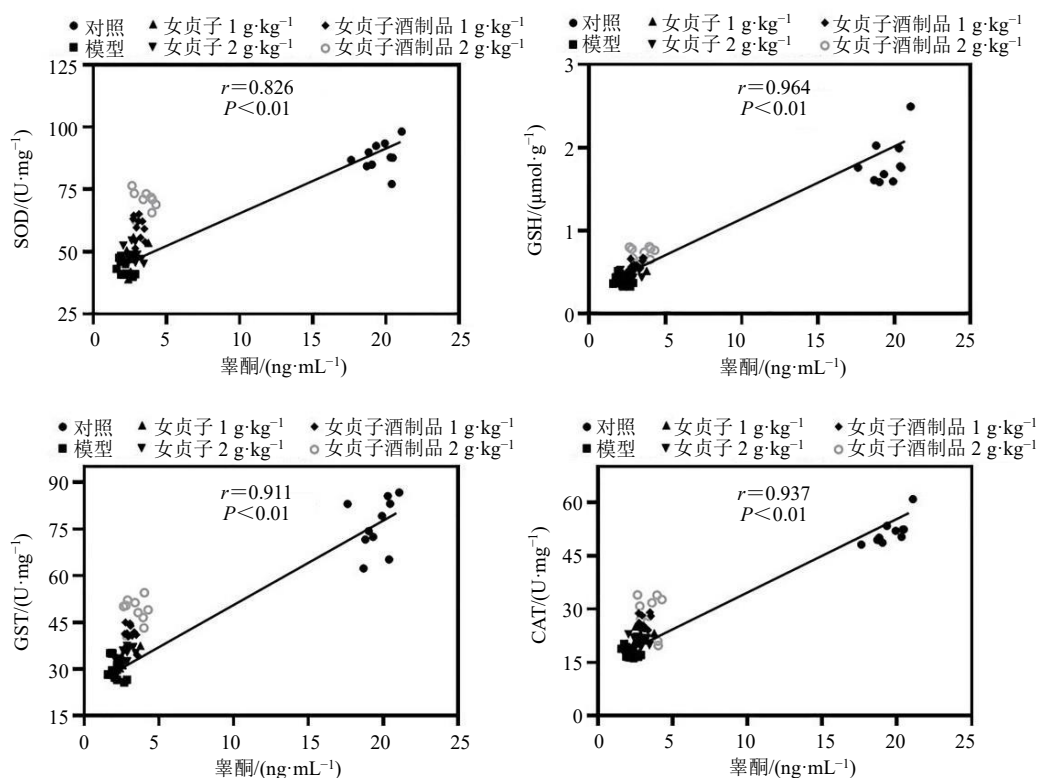


图3 血清中睾酮水平与睾丸组织 SOD、GSH、GST、CAT 水平的相关性分析

Fig. 3 Correlation analysis of testosterone level in serum with levels of SOD, GSH, GST and CAT in testicular tissue

生的关键机制^[13-14]。核转录因子 Nrf2 作为细胞抗氧化防御的核心环节，在维持组织氧化还原稳态中起关键作用^[15]。Nrf2 在生理状态下存在于胞质中，在氧化应激刺激下，Nrf2 转位入核，启动抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 调控的下游抗氧化基因表达^[16]。本研究显示，雷公藤多苷可致睾丸组织中 MDA 水平显著升高，SOD、GSH、GST、CAT 等关键抗氧化酶活性明显降低，并伴随 Nrf2 核蛋白表达及其下游基因 HO-1、NQO1 蛋白及转录水平的抑制，提示雷公藤多苷可诱导睾丸组织发生严重氧化应激失衡，这与氧化应激作为雷公藤多苷核心毒性机制的观点相符^[17-18]。相关性分析进一步显示睾酮水平与氧化应激指标密切相关，表明氧化应激损伤与睾丸功能障碍存在直接关联。

本研究发现酒制女贞子在所有观察指标上都呈现出优于生品的改善效果，证明了酒制的增效作用。这一结果与现有研究相符，有研究表明女贞子炮制后活性成分含量及药效均发生变化，例如醋制女贞子中红景天苷和齐墩果酸含量增高^[19]，这为酒制增效提供了化学物质基础。酒制增效的科学内涵在于从化学物质基础到生物学效应的系统优化。首先，化学层面，文献证实酒制可促进女贞子中特女

贞苷等成分转化为活性更强的苷元，并增加红景天苷、羟基酪醇等抗氧化成分的溶出，这构成了增效的物质前提^[20-21]。其次，药效层面，证实了酒制品在多脏器保护中，对生殖毒性展现出优势疗效。最终，在机制层面，发现女贞子酒制品能更高效地激活睾丸组织 Nrf2 信号轴，从分子水平上将炮制引发的化学变化与最终药效优势相联系，为“酒制增效”提供有力机制解释。

研究表明，Nrf2 信号通路的激活对睾丸细胞具有重要保护作用。在支持细胞中，Nrf2 通路的激活可减轻热应激和脂多糖诱导的氧化损伤^[22-23]。在间质细胞中，褪黑素通过激活沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) /Nrf2 通路减轻顺铂诱导的氧化应激和睾酮合成功能障碍^[24]。本研究进一步证实，女贞子酒制品能特异性促进睾丸组织 Nrf2 蛋白核转位，并显著下调下游抗氧化基因 HO-1 和 NQO1 蛋白及转录水平，这一作用显著优于同剂量生品。HO-1 和 NQO1 作为 Nrf2 通路的关键下游靶基因，分别在血红素代谢和醌类物质解毒中发挥重要作用，它们的上调进一步增强了细胞的抗氧化能力。

综上，本研究通过系统筛选锁定生殖系统作为

酒制增效的优势靶点,并深入揭示了 Nrf2 通路在其中的核心作用。不仅为女贞子“酒制增效”的传统理论提供了现代药理学依据,也为基于炮制工艺优化中药减毒效价的研究提供了新颖的思路与方法借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 崔东晓, 乐世俊, 徐顶巧, 等. 雷公藤多苷及其主要活性成分抑制类风湿性关节炎的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6913-6921.
- [2] Ge J C, Qian Q, Gao Y H, *et al.* Toxic effects of *Tripterygium* glycoside tablets on the reproductive system of male rats by metabolomics, cytotoxicity, and molecular docking [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154813.
- [3] Zhu Y T, Zhang J C, Liu Q N, *et al.* Semen *Cuscutae-Fructus Lycii* attenuates *Tripterygium* glycosides-induced spermatogenesis dysfunction by inhibiting oxidative stress-mediated ferroptosis via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156221.
- [4] 刘鹏, 邢易, 郭权磊, 等. 温经汤调控活化转录因子 6/转录因子 C/EBP 同源蛋白通路抑制内质网应激改善卵巢储备功能下降模型的机制研究 [J]. 中草药, 2025, 56(1): 121-132.
- [5] 李泉洋, 许佳艺, 蒲筱斌, 等. 基于 Nrf2 信号通路改善少弱精子症的中药及其复方研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6809-6822.
- [6] Zhang Z L, Cheng J Y, Yang L, *et al.* The role of ferroptosis mediated by Bmal1/Nrf2 in nicotine-induced injury of BTB integrity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 200: 26-35.
- [7] 林艳凤, 郑志远, 陈滢, 等. NRF2 核易位激活 SLC7A11 并抑制 SAS 诱导的 AML 细胞铁死亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(7): 1289-1299.
- [8] Yang H, Ding L Y, Xu B, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide alleviates ferroptosis in Sertoli cells through NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway and ameliorates DEHP-induced male reproductive damage in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282(Pt 5): 137241.
- [9] 闵愈, 袁德培, 胡玉萍, 等. 二至丸干预去卵巢骨质疏松大鼠骨重建的效应及机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(2): 215-220.
- [10] Qin X Y, Wei Q, An R, *et al.* Regulation of bone and fat balance by *Fructus Ligustri Lucidi* in ovariectomized mice [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 391-403.
- [11] 管斯琪, 何军琴, 王景尚, 等. 雷公藤多苷对小鼠生殖毒性机制的转录组学研究 [J]. 中国性科学, 2021, 30(11): 1-5.
- [12] 王丹阳, 和悦, 杨涵雯, 等. 8-OHdG、IL-6 与糖尿病肾脏病相关性临床研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(7): 589-592.
- [13] Wang L P, Li A Q, Liu Y H, *et al.* Genistein protects against acetaminophen-induced liver toxicity through augmentation of SIRT1 with induction of Nrf2 signalling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(1): 90-97.
- [14] 段海丽, 陈豫凤, 张长城, 等. 基于 Notch1/HES1 通路探讨淫羊藿苷对衰老小鼠睾丸支持细胞胶质细胞源性神经营养因子表达的影响 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6620-6631.
- [15] Dai X Z, Yan X Q, Wintergerst K A, *et al.* Nrf2: Redox and metabolic regulator of stem cell state and function [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(2): 185-200.
- [16] O'Rourke S A, Shanley L C, Dunne A. The Nrf2-HO-1 system and inflammaging [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1457010.
- [17] Liang S J, Yin Y Q, Zhang Z Z, *et al.* Moxibustion prevents *Tripterygium* glycoside-induced oligoasthenoteratozoospermia in rats via reduced oxidative stress and modulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Aging*, 2024, 16(3): 2141-2160.
- [18] 金航宇, 任则学, 徐军, 等. 葛根解肌汤通过调节 Nrf2/HO-1/GPX4 途径治疗糖尿病肾病小鼠的机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2025, 36(16): 3052-3056.
- [19] 李焕茹, 朱泓锦, 冯志毅, 等. 女贞子及不同炮制品指纹图谱对比研究 [J]. 中药材, 2022, 45(7): 1601-1605.
- [20] Jiang J, Zhao B X, Ma Y W, *et al.* Capture the superior anti-osteoporotic innovative multi-component complex from *Ligustri Lucidi Fructus* based on component recombination strategy [J]. *Phytomedicine*, 2025, 146: 157116.
- [21] 张浩杰, 李焕茹, 冯志毅, 等. 女贞子与酒女贞子 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3871-3876.
- [22] Khan M Z, Khan A, Huang B J, *et al.* Bioactive compounds protect mammalian reproductive cells from xenobiotics and heat stress-induced oxidative distress via Nrf2 signaling activation: A narrative review [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(5): 597.
- [23] 谢志强, 胡靖文, 曾九僧, 等. 基于 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路研究逍遥散拆方药队挥发油部位对脂多糖致抑郁样模型小鼠的作用及机制 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2283-2291.
- [24] Moradi M, Goodarzi N, Faramarzi A, *et al.* Melatonin protects rats testes against bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced toxicity via mitigating nitro-oxidative stress and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111481.

[责任编辑 李亚楠]