DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.08.022

雷公藤多苷对不同年龄段雄鼠毒性损伤的比较

孙昭恒[1],丁樱[1],韩姗姗[1],徐闪闪[2],代彦林[2]
(1.河南中医药大学儿科医学院,河南 郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院儿科医院,河南 郑州 450099)

摘要:目的 比较雷公藤多苷(glycosides of tripterygium wilfordii,GTW)对不同年龄段雄鼠肝脏、血液、生殖系统的毒性损伤。方法 选取3周龄、5周龄、10周龄、8月龄(相当于学龄前期、学龄期、青春期、成人期)SD雄鼠各56只,每个年龄段采用随机数字表法分为空白组和GTW组,GTW组给予12.5 mg/(kg·d)[相当于儿童2 mg/(kg·d)]GTW悬浊液灌胃,空白组给予等量生理盐水灌胃,分别于2、4、8、12周每个年龄段各取7只空白组和GTW组,计算肝脏、睾丸、附睾脏器指数;全自动血液细胞分析仪检测血常规指标;全自动干式生化分析仪检测肝功能指标;ELISA法检测睾酮、促卵泡生成素、促黄体生成素及雌二醇水平;HE染色法观察大鼠肝脏、睾丸、附睾组织病理改变;光学显微镜下计算精子密度和活率;ImajeJ软件统计睾丸生精小管内精原细胞、精母细胞、精子细胞的比例。结果 从肝脏系统来看,各年龄段大鼠在GTW干预期间未出现肝脏指数明显升高,第4周、第8周出现丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶升高($P<0.05$),第12周恢复;肝脏病理形态显示肝脏损伤程度随灌胃时间而加重,而各年龄段之间的损伤程度未见明显差异。从血液系统来看,血小板减少($P<0.05$)最早出现,第12周恢复;5周龄、10周龄大鼠第4周出现白细胞减少($P<0.05$),第12周恢复;血红蛋白减少($P<0.05$)最晚出现,除3周龄大鼠外均在第12周恢复。从生殖系统来看,5周龄、8月龄大鼠于第4周出现睾酮下降($P<0.05$),而后所有大鼠睾酮均下降($P<0.05$);除3周龄大鼠外其余均在第2周出现精子密度下降($P<0.05$),第4周8月龄大鼠最早出现精子密度、活率均下降($P<0.05$);第2周8月龄大鼠最早出现精子细胞比例下降($P<0.05$);睾丸、附睾病理均显示8月龄大鼠损伤较重。结论 ①GTW对不同年龄段大鼠的肝脏损伤无明显差异,但随用药时间而加重;②GTW对血液系统的毒性表现为血常规指标下降的不一致性,且幼鼠较成鼠更不耐受GTW造成的血液损伤。③相对幼鼠,成鼠对GTW的生殖毒性更为敏感。

关键词:雷公藤多苷;毒性;损伤;不同年龄段;比较
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)08-0101-16

Comparison of Glycosides of Leigongteng(Tripterygium wilfordii) on Toxic Damage in Male Rats of Different Ages

SUN Zhaoheng[1],DING Ying[1],HAN Shanshan[1],XU Shanshan[2],DAI Yanlin[2]
(1.College of Pediatric Medicine,Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China;
2.Pediatric Hospital,The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450099,Henan,China)

Abstract:*Objective* To compare the toxic effects of glycosides of Leigongteng(Tripterygium wilfordii)(GTW) on liver,blood and reproductive system in male rats of different ages. *Methods* Fifty-six male Sprague-Dawley(SD) rats aged 3,5 and 10 weeks and 8 months(equivalent to pre-school age,school age,adolescence and adulthood) were selected. The each age group was divided into control group and GTW group by random number table method. The GTW group was given 12.5 mg/(kg·d)[equivalent to 2 mg/(kg·d) for children] GTW suspension,and the control group was given the same amount of normal saline. Seven rats in each age group were taken from the control group and GTW group at 2,4,8 and 12 weeks,respectively,and the organ indexes of liver,testis and epididymis were calculated. Blood routine indexes were detected by automatic blood cell analyzer. Liver function indexes were detected by automatic dry biochemical analyzer. The serum levels of testosterone(T),follicle stimulating hormone(FSH),luteinizing hormone(LH) and estradiol(E2) were detected by ELISA. The histopathological changes of liver,testis and epididymis were observed by HE staining. Sperm density and viability were calculated under light microscope. ImajeJ software counted the proportion of spermatogonia,spermatocytes and spermatids in the seminiferous tubules of the testis. *Re-*

基金项目:国家自然科学基金项目(82205187,82305311);河南省中医学"双一流"创建科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-01);河南中医药大学研究生科研创新项目(2022KYCX018)
作者简介:孙昭恒(1995-),女,河南郑州人,博士在读,研究方向:中医药防治小儿肾脏病。
通讯作者:丁樱(1951-),女,江苏南京人,主任医师、教授,国医大师,国家首批名中医,学士,研究方向:小儿肾脏病。E-mail:dingying3236@sina.com。

sults From the perspective of the liver system, there was no significant increase in liver index in rats of all age groups during GTW intervention. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) increased at the 4th and 8th week ($P < 0.05$), and recovered at the 12th week. The pathological morphology of the liver showed that the degree of liver damage increases with the time of gastric lavage, and there was no significant difference between different age groups. From the perspective of the blood system, a decrease in PLT ($P < 0.05$) appeared earliest and recovered by the 12th week. The rats aged 5 and 10 weeks showed a decrease in white blood cell (WBC) at 4th week ($P < 0.05$) and recovered at 12th week. The decrease in hemoglobin (HB) ($P < 0.05$) appeared the latest and all except for 3 - week - old rats recovered at 12th week. From the perspective of the reproductive system, 5 - week - old and 8 - month - old rats showed a decrease in T at the 4th week ($P < 0.05$), followed by a decrease in T in all rats ($P < 0.05$). Except for 3 - week - old rats, all other rats showed a decrease in sperm density in the second week ($P < 0.05$), while 8 - month - old rats showed the earliest decrease in sperm density and viability in the 4th week ($P < 0.05$). In the second week, 8 - month - old rats showed a decrease in the proportion of sperm cells at the earliest stage ($P < 0.05$). Pathology of the testes and epididymis both showed severe damage in 8 - month - old rats. *Conclusion* ①There was no significant difference in liver damage caused by GTW in rats of different age groups, but it worsened with medication time. ②The toxicity of GTW to the blood system is manifested by inconsistent decreases in blood routine indicators, and young rats are more intolerant to blood damage caused by GTW than adult rats. ③Compared to young rats, adult rats are more sensitive to the reproductive toxicity of GTW.

Keywords: glycosides of Leigongteng (Tripterygium wilfordii); toxicity; damage; different age groups; comparison

雷公藤多苷(glycosides of tripterygium wilfordii, GTW)是具有我国民族自主知识产权、临床使用最多也是疗效最可靠的免疫抑制类中成药,具有抗炎、抑制细胞免疫和体液免疫、抗肿瘤等药理作用[1],被列入类风湿关节炎[2]、狼疮肾炎[3]、紫癜性肾炎[4]等多种免疫疾病的用药指南。课题组承担的"十二五"国家科技支撑项目也发现GTW可有效降低紫癜性肾炎患儿蛋白尿水平[5],然而,研究表明GTW对肝脏、血液、生殖系统具有毒性作用[6],使得GTW在儿童群体中的应用备受争议。然儿童定义为0~18岁以内的所有儿童,年龄跨度大,不同年龄段儿童的器官功能较成人相比各有差异,对GTW的耐受性也各不相同,本研究按照儿童学龄前期、学龄期、青春期、成人期将SD鼠分为4个年龄段组(3周龄、5周龄、10周龄、8月龄),采用GTW临床剂量(折算为大鼠灌胃剂量)干预2、4、8、12周后,综合肝脏、生殖、血液毒性观察GTW对不同年龄段大鼠毒性损伤的差异性,为临床儿科安全合理用药提供指导。

1 材料

1.1 动物

3周龄、5周龄、10周龄、8月龄Sprague - Dawley雄性大鼠各56只,均购自北京华府康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019 - 0008],饲养于河南中医药大学动物实验中心[SYXK(豫)2020 - 0004]。饲养环境温度18~24 ℃,湿度40%~60%,明暗交替时间为12 h,自由饮食。本实验获得河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理号:DWLL202209001)。所有实验程序遵循河南中医药大学实验动物保护和应用条例。

1.2 药物

GTW购自江苏美通制药有限公司(批号:220601,规格:10 mg/片×50片)。

1.3 主要试剂及仪器

睾酮(testosterone, T)、促卵泡生成素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)及雌二醇(estradiol2, E2)ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司(生产批号分别为NM22TLD29764、NM058T8P4862、NM07B4887989及NM0328041734);肝功能冻干试剂盒购自天津微纳芯科技有限公司(生产批号:Z30750)。

迈瑞兽用全自动血液细胞分析仪(型号:BC - 2800vet);瑞士TECAN帝肯酶标仪(型号:Infinite F50);全自动干式生化分析仪(型号:Celercare M5)。

2 方法

2.1 分组及给药

将3周龄、5周龄、10周龄、8月龄大鼠随机分为空白组和GTW组,每组28只,GTW组给予12.5 mg/(kg·d)[相当于儿童2 mg/(kg·d)]GTW悬浊液灌胃,空白组给予等量生理盐水灌胃。

2.2 样本采集

于灌胃2、4、8、12周每个年龄段各取7只空白组和7只GTW组大鼠,禁食不禁水12 h后称取体质量,腹腔注射40 mg/kg戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉取血,1管放置于抗凝管并晃动均匀,剩余血液4 ℃静置30 min后,3000 r/min(离心半径10 cm)离心15 min,吸取上层血清,-80 ℃冻存。

于冰上迅速分离肝脏、右侧睾丸、右侧附睾,称取质量后置于4%多聚甲醛中固定。左侧附睾用于精子密度及活力检测。

2.3 指标检测

2.3.1 肝脏、睾丸、附睾脏器指数 吸水纸拭干脏器表面血液,并置于精密称重仪上称重记录每个脏器的质量,最后计算各脏器指数。脏器指数=脏器质量/大鼠体质量×100%。

2.3.2 血常规、肝功能 取抗凝管中血液2 mL并通过全自动血液细胞分析仪检测白细胞(white blood cell, WBC)、血红蛋白(hemoglobin, HB)、血小板(platelet, PLT)等血常规指标,取血清2 mL并通过全自动干式生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)等肝功能指标。

2.3.3 血清T、FSH、LH、E2含量 严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。在450 nm波长下,读取吸光度值。

2.3.4 肝脏、睾丸、附睾病理学形态 肝脏、睾丸、附睾组织经4%多聚甲醛固定 48 h 后，常规石蜡包埋，连续切片（厚 2 μm）。石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化，苏木素－伊红染色后，再经梯度乙醇、二甲苯脱水透明后，中性树脂封片。光学显微镜观察肝脏、睾丸、附睾组织的病理形态。

2.3.5 精子密度及活率 取左侧附睾尾部（去除脂肪、筋膜）放入盛有 2 mL 预热生理盐水的 EP 管中，用剪刀将附睾组织剪碎（约 80 下），并用移液器吹打数次，37 ℃温浴 5 min 让精子充分游离，用 70 μm 滤网过滤后制成精子混悬液。吸取 20 μL 精子混悬液滴于载玻片上，于 400 倍光学显微镜下随机观察 3 个视野，记录运动的精子数和总精子数，运动的精子/总精子数×100%为精子活率。另取 1 mL 滤液加 4 mL 5% $NaHCO_3$ 溶液固定精子，于细胞计数板上计算精子密度。

2.3.6 睾丸生精细胞计数 将睾丸切片于光学显微镜下放大 100 倍，随机选取 5 个视野取图，使用 ImajeJ 软件统计生精小管内精原细胞、精母细胞、精子细胞的比例，计算平均值并进行分析。

2.4 统计分析

使用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）来表示，正态分布的两组间比较采用两独立样本 t 检验，若方差不齐使用 t' 检验，非正态分布时采用 Wilcoxon 秩和检验，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GTW 对不同年龄段大鼠肝脏、睾丸、附睾脏器指数的影响

对 GTW 干预 4 周后各年龄段大鼠脏器指数进行分析，发现 3 周龄大鼠睾丸、附睾脏器指数均降低（$P<0.05$），如表 1 所示。

对 GTW 干预 8 周后各年龄段大鼠脏器指数进行分析，发现 5 周龄大鼠睾丸指数降低（$P<0.05$），10 周龄、8 月龄大鼠附睾指数降低（$P<0.05$）。

对 GTW 干预 12 周后各年龄段大鼠脏器指数进行分析，发现 5 周龄、8 月龄大鼠睾丸、附睾脏器指数均降低（$P<0.05$）；10 周龄大鼠附睾指数降低（$P<0.05$），如表 2 所示。

3.2 GTW 对不同年龄段大鼠血常规、肝功能的影响

对 GTW 干预 2 周后各年龄段大鼠血常规、肝功能进行分析，发现 5 周龄、10 周龄、8 月龄大鼠 PLT 降低（$P<0.05$），如表 3 所示。

对 GTW 干预 4 周后各年龄段大鼠血常规、肝功能进行分析，发现 5 周龄、10 周龄大鼠 WBC 降低（$P<0.05$）；3 周龄、5 周龄、10 周龄、8 月龄大鼠全部出现 PLT 降低（$P<0.05$）；3 周龄、8 月龄大鼠 ALT、AST 升高（$P<0.05$）；5 周龄、10 周龄大鼠 ALT 升高（$P<0.05$），如表 4 所示。

对 GTW 干预 8 周后各年龄段大鼠血常规、肝功能进行分析，发现 10 周龄大鼠 WBC 降低（$P<0.05$）；3 周龄、5 周龄大鼠 HB 降低（$P<0.05$）；5 周龄、8 月龄大鼠 PLT 降低（$P<0.05$）；3 周龄、5 周龄、10 周龄大鼠 ALT 升高（$P<0.05$），而 8 月龄大鼠 ALT、AST 均升高（$P<0.05$），如表 5 所示。

对 GTW 干预 12 周后各年龄段大鼠血常规、肝功能进行分析，发现 3 周龄大鼠 HB 降低（$P<0.05$）；8 月龄大鼠 AST 升高（$P<0.05$），如表 6 所示。

3.3 GTW 对不同年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量的比较

对 GTW 干预 2 周后各年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量进行分析，发现各项指标差异无统计学意义，如表 7 所示。

对 GTW 干预 4 周后各年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量进行分析，发现 5 周龄、8 月龄大鼠 T 含量降低（$P<0.05$），其余指标差异无统计学意义，如表 8 所示。

对 GTW 干预 8 周后各年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量进行分析，发现 3 周龄、5 周龄、10 周龄、8 月龄大鼠 T 含量全部降低（$P<0.05$），其余指标差异无统计学意义，如表 9 所示。

对 GTW 干预 12 周后各年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含

表 1 雷公藤多苷干预 2 周、4 周后不同年龄段大鼠脏器指数比较（$\bar{x} \pm s$） 单位：%

鼠龄	组别	n	干预 2 周			干预 4 周		
			肝脏指数	睾丸指数	附睾指数	肝脏指数	睾丸指数	附睾指数
3 周龄	空白组	7	4.300±0.243	0.977±0.031	0.147±0.127	3.658±0.332	0.982±0.066	0.242±0.026
	GTW 组	7	4.076±0.146	0.947±0.040	0.148±0.126	3.306±0.151	0.891±0.070	0.197±0.028
	F 值		1.750	0.251	0.140	1.475	0.001	2.619
	P 值		0.058	0.145	0.932	0.094	0.028	0.009
5 周龄	空白组	7	3.648±0.261	0.965±0.058	0.221±0.035	2.917±0.100	0.803±0.108	0.292±0.026
	GTW 组	7	3.482±0.139	0.947±0.055	0.214±0.021	2.823±0.218	0.765±0.130	0.253±0.044
	F 值		5.009	0.243	5.079	1.942	0.064	0.875
	P 值		0.172	0.577	0.664	0.323	0.949	0.067
10 周龄	空白组	7	2.910±0.297	0.727±0.024	0.298±0.021	3.052±0.256	0.694±0.090	0.272±0.030
	GTW 组	7	2.809±0.142	0.783±0.120	0.284±0.042	2.947±0.109	0.781±0.079	0.253±0.045
	F 值		1.892	11.856	3.936	5.405	0.169	1.340
	P 值		0.429	0.275	0.427	0.347	0.078	0.114
8 月龄	空白组	7	2.183±0.215	0.542±0.099	0.214±0.014	2.169±0.111	0.505±0.023	0.198±0.015
	GTW 组	7	2.192±0.166	0.538±0.120	0.215±0.024	2.322±0.242	0.577±0.117	0.183±0.039
	F 值		0.907	0.394	1.885	9.109	5.492	5.586
	P 值		0.930	0.948	0.890	0.164	0.158	0.374

表2 雷公藤多苷干预8周、12周后不同年龄段大鼠脏器指数比较($\bar{x} \pm s$) 单位:%

鼠龄	组别	n	干预8周			干预12周		
			肝脏指数	睾丸指数	附睾指数	肝脏指数	睾丸指数	附睾指数
3周龄	空白组	7	2.916±0.329	0.731±0.161	0.275±0.037	2.421±0.087	0.772±0.089	0.258±0.040
	GTW组	7	2.901±0.198	0.714±0.042	0.259±0.029	2.547±0.162	0.721±0.057	0.244±0.018
	F值		2.789	1.342	0.039	1.017	2.783	4.119
	P值		0.922	0.180	0.391	0.088	0.208	0.377
5周龄	空白组	7	2.364±0.174	0.835±0.091	0.261±0.035	2.422±0.180	0.775±0.057	0.245±0.014
	GTW组	7	2.459±0.150	0.672±0.141	0.242±0.045	2.418±0.090	0.661±0.039	0.206±0.043
	F值		0.277	0.186	0.975	2.988	1.048	2.492
	P值		0.297	0.024	0.399	0.958	<0.01	0.013
10周龄	空白组	7	2.415±0.177	0.789±0.099	0.275±0.020	1.865±0.738	0.714±0.094	0.284±0.024
	GTW组	7	2.323±0.147	0.764±0.042	0.247±0.022	2.096±0.143	0.694±0.089	0.239±0.022
	F值		0.182	1.145	0.564	0.192	0.170	0.209
	P值		0.309	0.553	0.029	0.848	0.702	0.003
8月龄	空白组	7	2.158±0.129	0.672±0.116	0.250	2.282±0.233	0.644±0.050	0.295±0.087
	GTW组	7	2.214±0.524	0.539±0.162	0.173	2.188±0.391	0.428±0.131	0.168±0.027
	F值		6.489	0.583	3.130	2.450	3.130	3.130
	P值		0.793	0.103	0.002	0.595	0.002	0.002

表3 雷公藤多苷干预2周后不同年龄段大鼠血常规、肝肾功指数比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	血常规			肝功能	
			WBC/(10^9/L)	HB/(g/L)	PLT/(10^9/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
3周龄	空白组	7	8.657±3.352	147.857±6.283	1138±103.021	72.571±16.950	178.714±57.812
	GTW组	7	5.571±1.999	152.857±7.537	1087±247.275	61.429±27.934	178.000±63.013
	F值		2.185	1.097	1.853	0.472	0.447
	P值		0.058	0.273	0.064	0.385	0.655
5周龄	空白组	7	8.840±3.682	160.286±10.594	1304±192.527	47.429±5.094	114.571±21.039
	GTW组	7	6.943±1.630	164.143±6.694	917±125.734	66.286±54.218	140.714±53.447
	F值		7.391	0.796	1.283	12.640	4.945
	P值		0.236	0.431	<0.001	0.394	0.264
10周龄	空白组	7	6.843±2.521	174.714±9.232	1213±123.787	57.714±3.946	179.143±26.636
	GTW组	7	5.400±2.226	174.000±9.950	840±137.008	60.000±6.429	153.000±18.403
	F值		0.396	0.487	0.008	0.450	0.395
	P值		0.279	0.892	<0.001	0.653	0.054
8月龄	空白组	7	6.943±1.976	163.857±10.286	1649±296.798	48.000±15.416	149.143±24.259
	GTW组	7	6.929±1.147	150.857±23.270	976±309.041	45.857±18.632	156.714±59.626
	F值		2.970	1.215	2.747	0.704	5.310
	P值		0.987	0.224	0.006	0.482	0.764

量进行分析,发现所有年龄段大鼠T含量全部降低($P<0.05$),其余指标差异无统计学意义,如表10所示。

3.4 GTW对不同年龄段大鼠肝脏、睾丸、附睾病理学形态的影响

3.4.1 GTW对不同年龄段大鼠肝脏病理学形态的影响 空白组小鼠肝脏的肝细胞结构清晰、呈多边形,肝索呈放射状排列,胞质呈紫红色,细胞核大而圆,处于细胞中央;GTW干预2周后,可见各年龄段大鼠肝细胞轻度肿胀、变性,肝窦变窄;GTW干预4周后,可见各年龄段大鼠肝细胞水肿、变性,肝小叶中央静脉及汇管区充满红细胞,肝窦扩张充血,可见点状坏死,见插页XXⅧ图1。

GTW干预8周后,各年龄段大鼠出现胞质疏松化,有灶状坏死,伴炎细胞浸润;GTW干预12周后,各年龄段大鼠出现肝细胞排列紊乱,肝细胞变性、模糊,有灶状、片状坏死,伴大量炎细胞浸润,肝板破坏,见插页XXIX图2。

3.4.2 GTW对不同年龄段大鼠睾丸病理学形态的影响 空白组大鼠睾丸组织结构清晰,管腔完整,各级生精细胞排列规则,间隙紧密。GTW干预2周后,3周龄、5周龄、10周龄大鼠生精小管形态尚饱满,各级生精细胞排列尚规则,数量无明显变化;8月龄大鼠上皮变薄,各级生精细胞排列紊乱,精子细胞数量减少。GTW干预4周后,3周龄、5周龄、10周龄大鼠上皮变薄,生精细胞排列稍紊乱;8月龄大鼠上皮变薄,生精细胞数量及层次减少,间隙增大,分布散乱,见插页XXX图3。

GTW干预8周后,3周龄、5周龄、10周龄大鼠生精细胞排列疏松,层次不清;8月龄大鼠生精小管基膜破损,形态萎缩,腔隙增宽,生精细胞脱失,可见空泡化。GTW干预12周后,3

表4 雷公藤多苷干预4周后不同年龄段大鼠血常规、肝肾功指数比较($\bar{x}\pm s$)

鼠龄	组别	n	血常规			肝功能	
			WBC/(10^9/L)	HB/(g/L)	PLT/(10^9/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
3周龄	空白组	7	9.329±2.837	158.286±8.159	1206±142.743	54.429±13.624	169.429±57.460
	GTW组	7	6.371±3.668	161.857±3.625	1055±80.035	110.000±12.754	219.143±36.030
	F值		0.259	5.268	3.652	0.467	2.246
	P值		0.117	0.311	0.031	<0.001	0.025
5周龄	空白组	7	9.314±1.497	158.857±8.375	1315±128.021	81.571±67.431	249.429±196.423
	GTW组	7	5.357±1.361	162.571±7.525	1034±171.557	103.000±13.976	257.143±54.819
	F值		0.001	0.010	0.251	2.236	1.342
	P值		<0.001	0.400	0.005	0.025	0.180
10周龄	空白组	7	9.600±2.310	160.286±7.064	1203±102.867	58.286±13.889	176.571±46.335
	GTW组	7	4.800±2.587	168.571±8.284	867±190.415	84.857±23.205	247.286±111.852
	F值		2.747	0.082	3.130	1.791	3.028
	P值		0.006	0.067	0.002	0.023	0.148
8月龄	空白组	7	5.171±0.909	163.143±12.415	1420±235.889	44.286±5.589	116.571±24.110
	GTW组	7	5.300±1.672	167.571±11.163	859±120.369	131.429±57.081	311.429±110.670
	F值		1.538	0.000	2.175	6.849	3.134
	P值		0.861	0.496	<0.001	0.007	0.002

表5 雷公藤多苷干预8周后不同年龄段大鼠血常规、肝肾功指数比较($\bar{x}\pm s$)

鼠龄	组别	n	血常规			肝功能	
			WBC/(10^9/L)	HB/(g/L)	PLT/(10^9/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
3周龄	空白组	7	9.429±2.564	165.286±9.482	1306±266.922	54.429±10.814	189.571±72.092
	GTW组	7	9.300±3.331	146.714±9.768	1080±97.185	78.571±16.430	200.571±61.951
	F值		0.449	0.012	5.228	0.435	0.084
	P值		0.653	0.004	0.070	0.007	0.765
5周龄	空白组	7	9.329±1.387	163.286±10.242	1494±133.366	43.857±9.737	150.143±31.504
	GTW组	7	9.100±3.270	151.286±5.992	1248±436.329	54.143±7.381	135.000±38.588
	F值		12.506	1.237	2.236	0.060	0.324
	P值		0.868	0.020	0.025	0.046	0.437
10周龄	空白组	7	8.929±0.879	160.000±12.315	1143±87.945	45.571±8.979	213.000±35.242
	GTW组	7	6.000±1.661	161.571±7.591	1218±105.832	94.429±28.664	209.857±41.547
	F值		0.766	0.904	0.158	4.759	0.043
	P值		0.001	0.779	0.176	0.001	0.881
8月龄	空白组	7	4.600±1.884	157.571±5.287	1375±226.733	49.857±15.082	116.286±35.008
	GTW组	7	5.443±0.447	154.714±8.400	1131±115.416	78.143±19.377	209.286±42.863
	F值		2.788	1.485	2.619	2.239	2.878
	P值		0.272	0.474	0.009	0.025	0.004

周龄、5周龄、10周龄大鼠管腔上皮萎缩,各级生精细胞排列散乱,可见空泡化;8月龄大鼠睾丸结构严重损伤,生精细胞大量脱失,出现空腔型生精小管,见插页XXXI图4。

3.4.3 GTW对不同年龄段大鼠附睾病理学形态的影响 空白组大鼠附睾管腔充盈,上皮呈假复层柱形排列,间质胶原丰富,管腔内可见大量线性精子。GTW干预2周后,3周龄大鼠管腔体积基本正常,上皮细胞部分尚规则、整齐,腔缘整齐光滑,间质稍水肿;5周龄、10周龄大鼠管腔体积缩小,精子脱落聚集成团,间质水肿;8月龄大鼠管腔内精子减少,间质内充大量粉红色液体。GTW干预4周后,3周龄大鼠管腔体积缩小,管腔内精子脱落聚集成团;5周龄、10周龄大鼠管腔内精子减少,部分管腔空虚;8月龄大鼠管腔上皮细胞排列紊乱,管腔内精子大量减少,偶见管腔断裂,见插页XXXII图5。

GTW干预8周后,3周龄、5周龄、10周龄大鼠管腔体积缩小,精子减少,部分管腔空虚,内充粉红色液体;8月龄大鼠管腔上皮细胞排列紊乱,精子大量减少,大量管腔空虚,部分管腔断裂;GTW干预12周后,3周龄、5周龄、10周龄大鼠管腔体积缩小,精子大量减少,脱落聚集成团,部分管腔空虚;8月龄大鼠管腔上皮细胞排列紊乱,管腔内精子极少,大量管腔空虚,部分管腔断裂,见插页XXXIII图6。

3.5 GTW对不同年龄段大鼠精子密度及活率的影响

对GTW干预2周、4周、8周、12周后各年龄段大鼠精子密度及活率进行分析,发现GTW干预2周后5周龄、10周龄、8月龄大鼠精子密度降低($P<0.05$);GTW干预4周后3周龄、5周龄、10周龄大鼠精子密度降低($P<0.05$),8月龄大鼠精子密度、活率均降低($P<0.05$);GTW干预8周后5周龄大

表 6 雷公藤多苷干预 12 周后不同年龄段大鼠血常规、肝肾功指数比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	血常规			肝功能	
			WBC/(10^9/L)	HB/(g/L)	PLT/(10^9/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
3 周龄	空白组	7	9.257 ± 0.844	162.000 ± 7.616	1934 ± 605.093	57.571 ± 27.397	159.714 ± 52.955
	GTW 组	7	8.429 ± 1.001	154.571 ± 4.237	1356 ± 465.974	49.143 ± 3.437	121.000 ± 16.921
	F 值		0.012	0.705	1.535	11.359	9.564
	P 值		0.120	0.044	0.125	0.435	0.107
5 周龄	空白组	7	9.043 ± 0.683	156.286 ± 7.387	1427 ± 99.047	48.143 ± 10.699	174.429 ± 46.626
	GTW 组	7	9.543 ± 1.557	157.429 ± 6.852	1574 ± 171.868	43.571 ± 3.867	156.429 ± 29.540
	F 值		3.295	0.004	3.914	3.375	3.057
	P 值		0.451	0.769	0.075	0.309	0.405
10 周龄	空白组	7	9.143 ± 0.663	142.286 ± 7.251	1159 ± 141.362	79.286 ± 42.727	154.714 ± 94.704
	GTW 组	7	7.671 ± 2.464	147.429 ± 9.289	1307 ± 226.499	56.857 ± 12.536	133.143 ± 43.364
	F 值		4.018	0.178	0.697	1.221	0.064
	P 值		0.153	0.271	0.168	0.222	0.949
8 月龄	空白组	7	4.929 ± 0.512	150.857 ± 9.907	1367 ± 201.491	70.000 ± 27.791	133.286 ± 20.637
	GTW 组	7	5.143 ± 0.943	152.857 ± 9.008	1257 ± 181.223	66.143 ± 17.837	179.286 ± 53.178
	F 值		1.229	0.036	1.342	0.384	2.056
	P 值		0.607	0.700	0.180	0.701	0.040

表 7 雷公藤多苷干预 2 周后不同年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	E2/(pg/mL)	T/(ng/mL)	FSH/(ng/mL)	LH/(mIU/mL)
3 周龄	空白组	7	140.563 ± 16.188	0.377 ± 0.330	63.050 ± 8.179	10.583 ± 4.627
	GTW 组	7	145.227 ± 46.121	0.170 ± 0.084	68.992 ± 9.553	11.719 ± 1.755
	F 值		0.192	3.731	0.045	2.263
	P 值		0.848	0.133	0.235	0.555
5 周龄	空白组	7	170.067 ± 17.927	0.710 ± 0.214	41.260 ± 9.407	14.044 ± 3.838
	GTW 组	7	157.157 ± 20.324	0.434 ± 0.271	54.026 ± 16.596	12.544 ± 2.184
	F 值		0.064	5.275	2.199	0.192
	P 值		0.949	0.056	0.102	0.848
10 周龄	空白组	7	133.515 ± 39.674	1.341 ± 0.896	39.664 ± 10.381	14.967 ± 4.555
	GTW 组	7	145.485 ± 44.141	1.142 ± 0.137	36.369 ± 7.027	15.657 ± 2.486
	F 值		0.013	0.704	0.958	1.506
	P 值		0.603	0.482	0.338	0.731
8 月龄	空白组	7	157.961 ± 27.384	1.814 ± 0.326	69.275 ± 16.577	12.822 ± 3.527
	GTW 组	7	145.125 ± 25.385	1.599 ± 0.172	82.865 ± 14.155	12.320 ± 2.032
	F 值		0.018	0.174	0.826	3.154
	P 值		0.381	0.147	0.125	0.750

鼠精子密度降低($P < 0.05$),3 周龄、10 周龄、8 月龄大鼠精子密度、活率均降低($P < 0.05$);GTW 干预 12 周后所有年龄段大鼠精子密度、活率全部降低($P < 0.05$),如表 11 所示。

3.6 GTW 对不同年龄段大鼠睾丸各级生精细胞比例的影响

对 GTW 干预 2 周、4 周后各年龄段大鼠睾丸各级生精细胞的比例进行分析,发现 GTW 干预 2 周后 10 周龄大鼠精原细胞比例升高($P < 0.05$);8 月龄大鼠精母细胞比例升高,精子细胞比例降低($P < 0.05$)。GTW 干预 4 周后 10 周龄大鼠精原细胞比例升高,精子细胞比例降低($P < 0.05$);8 月龄大鼠精母细胞比例升高,精子细胞比例降低($P < 0.05$),如表 12 所示。

对 GTW 干预 8 周、12 周后各年龄段大鼠睾丸各级生精细胞的比例进行分析,发现 GTW 干预 8 周后 3 周龄大鼠精原细胞比例升高($P < 0.05$);5 周龄大鼠精母细胞比例升高($P < 0.05$);10 周龄大鼠精原细胞比例升高,精子细胞比例降低($P < 0.05$);8 月龄大鼠精原细胞、精母细胞比例升高,精子细胞比例降低($P < 0.05$)。GTW 干预 12 周后 3 周龄、5 周龄大鼠精原细胞比例升高($P < 0.05$);10 周龄、8 月龄大鼠精原细胞、精母细胞比例升高,精子细胞比例降低($P < 0.05$),如表 13 所示。

4 讨论

GTW 在儿童紫癜性肾炎、狼疮肾炎、IgA 肾病等肾脏疾病中应用广泛[7],然而其安全性尚存争议。研究表明[8] GTW 对于儿童的不良反应近期以血液、肝脏系统为主,远期以生殖系统为主。然而不同年龄段机体生长发育程度不同,导致靶器官对毒性的应答存在差异[9],这种差异正是当前 GTW 毒性相关研究所缺乏的。基于此,本研究以不同年龄段大鼠为对象,采用儿童紫癜性肾炎的临床剂量[10]进行折算,选取肝脏系统、血液系统、生殖系统毒性变化作为评价指标,旨在明确 GTW 对不

表 8 雷公藤多苷干预 4 周后不同年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	E2/(pg/mL)	T/(ng/mL)	FSH/(ng/mL)	LH/(mIU/mL)
3 周龄	空白组	7	160.776 ±23.738	1.840 ±1.489	52.972 ±12.988	11.937 ±4.664
	GTW 组	7	162.431 ±23.330	0.792 ±0.258	51.877 ±6.681	10.928 ±1.717
	F 值		0.192	1.215	2.375	10.785
	P 值		0.848	0.224	0.856	0.499
5 周龄	空白组	7	211.559 ±31.340	1.302 ±0.496	63.406 ±12.263	15.937 ±7.652
	GTW 组	7	182.035 ±23.051	0.813 ±1.258	69.042 ±8.077	9.498 ±4.873
	F 值		1.030	5.473	0.923	1.597
	P 值		0.068	0.040	0.330	0.110
10 周龄	空白组	7	149.695 ±36.291	1.326 ±0.417	53.171 ±16.341	14.993 ±4.336
	GTW 组	7	156.674 ±17.627	1.058 ±0.484	48.522 ±4.507	10.855 ±3.652
	F 值		3.634	1.086	5.296	1.853
	P 值		0.655	0.227	0.482	0.064
8 月龄	空白组	7	168.174 ±41.112	1.521 ±0.515	72.361 ±11.333	11.468 ±2.788
	GTW 组	7	159.555 ±17.850	1.029 ±0.247	67.215 ±16.517	9.160 ±1.354
	F 值		7.421	1.213	0.220	0.539
	P 值		0.620	0.042	0.510	0.072

表 9 雷公藤多苷干预 8 周后不同年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	E2/(pg/mL)	T/(ng/mL)	FSH/(ng/mL)	LH/(mIU/mL)
3 周龄	空白组	7	200.794 ±34.389	1.860 ±1.463	48.570 ±19.434	13.007 ±6.464
	GTW 组	7	174.526 ±26.871	0.579 ±0.500	63.520 ±7.104	8.415 ±1.766
	F 值		0.712	2.236	5.086	3.364
	P 值		0.137	0.025	0.080	0.095
5 周龄	空白组	7	167.465 ±49.510	2.622 ±0.925	58.253 ±10.572	11.938 ±2.452
	GTW 组	7	174.812 ±32.357	0.385 ±0.225	66.864 ±7.173	10.092 ±3.881
	F 值		3.076	8.648	0.688	1.469
	P 值		0.748	<0.001	0.100	0.142
10 周龄	空白组	7	174.750 ±20.131	1.128 ±0.428	57.476 ±10.228	13.789 ±1.740
	GTW 组	7	172.027 ±27.923	0.442 ±0.167	63.235 ±2.671	12.175 ±2.062
	F 值		0.064	4.698	3.659	0.001
	P 值		0.949	0.002	0.175	0.139
8 月龄	空白组	7	178.642 ±50.295	1.544 ±0.571	61.679 ±20.902	12.745 ±1.151
	GTW 组	7	164.206 ±30.573	0.507 ±0.183	67.778 ±10.450	13.154 ±3.253
	F 值		2.492	9.565	2.983	9.593
	P 值		0.529	0.001	0.524	0.759

同年龄段雄鼠毒性损伤的差异性。

从肝脏系统来看,各年龄段大鼠在 GTW 干预期间未出现肝脏指数明显升高,且均于第 4 周、第 8 周出现 ALT、AST 升高($P<0.05$),第 12 周恢复;同时,肝脏病理形态表明各年龄段大鼠在灌胃期间出现不同程度的肝脏损伤,其程度随灌胃时间而加重,而各年龄段之间损伤程度未见明显差异。李红刚等[11]整理了使用 GTW 的 683 例病人,发现 110 例出现肝损伤,年龄跨度为 3~70 岁,提示 GTW 的肝毒性损伤与患者年龄无明显相关性,与本研究结果一致。同时,本研究发现在未进行其他干预的情况下,大鼠肝酶可恢复,这可能与药物耐受性有关,例如,异烟肼治疗潜伏性结核病导致约 20% 的患者 ALT 轻度升高,然而即使在继续使用异烟肼的情况下,许多患者产生了耐受性并出现了 ALT 水平的下降[12]。也可能与肝脏的自我修复能力有关,有研究[13]显示在肝脏无菌性损伤模型中,恒定自然杀伤 T 细胞分泌白细胞介素 -4,将炎症单核细胞转化为修复表型,诱导肝细胞再生,然而,若反复刺激持续存在,招募的先天免疫细胞可能最终导致损伤而不是修复,这也导致各年龄段大鼠肝脏病理损伤程度随灌胃时间变长而加重。值得注意的是,药物性肝损伤有时会表现为轻度的肝酶升高,即肝酶升高程度不能简单等同于肝脏损伤程度[14]。研究表明,GTW 导致的肝脏损伤主要与雷公藤甲素诱导的氧化应激相关:高水平活性氧和活性氮抑制细胞膜上的钠泵、ATP 酶和钙泵活性,导致线粒体膜电位降低和凋亡因子 Caspase -3 的释放,造成肝细胞损伤[15]。也有体外实验证明,雷公藤甲素可诱导永生化人肝细胞 L02 产生细胞毒作用,导致线粒体功能障碍,增加自噬通量[16]。同时,GTW 中的雷公藤红素作为细胞色素 P450 酶的抑制剂,可加重雷公藤甲素的肝毒性,这也解释了为何 GTW 肝脏毒性与剂量密切相关。总之,GTW 中的雷公藤红素和雷公藤甲素通过降低细胞存活率、增强细胞应激、降低基质金属蛋白酶、增加乳酸脱氢酶和活性氧水平,损伤大鼠

表 10 雷公藤多苷干预 12 周后不同年龄段大鼠血清 T、FSH、LH、E2 含量比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	E2/(pg/mL)	T/(ng/mL)	FSH/(ng/mL)	LH/(mIU/mL)
3 周龄	空白组	7	161.830 ± 22.584	2.433 ± 0.649	62.224 ± 9.816	14.487 ± 3.296
	GTW 组	7	153.105 ± 19.462	0.557 ± 0.212	64.607 ± 3.659	12.095 ± 1.593
	F 值		2.862	11.513	6.783	6.633
	P 值		0.364	< 0.001	0.558	0.109
5 周龄	空白组	7	160.310 ± 25.113	1.395 ± 0.594	60.649 ± 8.259	14.546 ± 2.426
	GTW 组	7	140.314 ± 15.726	0.610 ± 0.130	63.201 ± 4.967	12.824 ± 3.354
	F 值		2.135	5.402	2.620	0.846
	P 值		0.099	0.005	0.468	0.293
10 周龄	空白组	7	170.794 ± 32.508	1.621 ± 0.381	51.136 ± 18.223	14.863 ± 4.396
	GTW 组	7	160.035 ± 26.328	0.615 ± 0.149	64.256 ± 4.228	12.531 ± 2.514
	F 值		0.447	7.695	6.512	3.725
	P 值		0.655	< 0.001	0.088	0.247
8 月龄	空白组	7	181.820 ± 54.850	1.889 ± 0.596	59.349 ± 10.916	12.232 ± 4.761
	GTW 组	7	173.888 ± 34.269	0.393 ± 0.058	67.279 ± 6.338	12.947 ± 2.385
	F 值		1.355	3.130	2.136	1.214
	P 值		0.751	0.002	0.122	0.225

表 11 雷公藤多苷干预 2 周、4 周、8 周、12 周后不同年龄段大鼠精子密度及活率比较($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	干预 2 周		干预 4 周		干预 8 周		干预 12 周	
			密度/(个×10^7/mL)	活率/(%)	密度/(个×10^7/mL)	活率/(%)	密度/(个×10^7/mL)	活率/(%)	密度/(个×10^7/mL)	活率/(%)
3 周龄	空白组	7	0.014 ± 0.024	0.000 ± 0.000	1.736 ± 0.463	13.234 ± 2.265	5.243 ± 0.506	23.484 ± 3.333	7.900 ± 0.755	20.620 ± 2.036
	GTW 组	7	0.021 ± 0.027	0.000 ± 0.000	1.029 ± 0.356	13.669 ± 3.571	4.443 ± 0.578	19.048 ± 3.583	4.579 ± 1.042	6.195 ± 5.762
	F 值		0.537	0.000	0.113	2.193	1.983	0.019	0.421	4.556
	P 值		0.591	1.000	0.008	0.790	0.047	0.034	< 0.001	< 0.001
5 周龄	空白组	7	1.664 ± 0.234	13.896 ± 1.083	4.879 ± 0.274	21.292 ± 3.527	6.529 ± 0.550	22.998 ± 4.158	8.971 ± 0.697	22.257 ± 4.666
	GTW 组	7	1.286 ± 0.294	13.951 ± 1.187	2.650 ± 1.034	18.769 ± 2.671	4.171 ± 1.382	17.832 ± 8.538	3.564 ± 1.282	1.622 ± 1.942
	F 值		0.002	0.289	5.628	0.526	2.236	1.174	2.594	1.493
	P 值		0.021	0.930	< 0.001	0.157	0.025	0.176	< 0.001	< 0.001
10 周龄	空白组	7	6.214 ± 0.507	22.133 ± 2.307	6.950 ± 0.382	17.282 ± 2.152	9.071 ± 0.492	25.139 ± 6.243	8.514 ± 0.861	22.227 ± 5.535
	GTW 组	7	3.764 ± 0.471	16.412 ± 7.736	3.386 ± 0.530	13.736 ± 7.488	4.093 ± 1.181	15.156 ± 3.680	4.793 ± 1.738	9.088 ± 7.267
	F 值		0.075	3.095	1.167	4.832	7.307	2.619	3.714	0.582
	P 值		< 0.001	0.085	< 0.001	0.252	< 0.001	0.009	< 0.001	0.003
8 月龄	空白组	7	6.593 ± 0.709	20.832 ± 3.122	6.379 ± 0.897	26.429 ± 4.128	5.671 ± 0.788	29.434 ± 1.842	5.986 ± 0.656	22.745 ± 3.206
	GTW 组	7	3.336 ± 0.951	20.514 ± 6.804	3.136 ± 0.966	17.311 ± 7.296	2.879 ± 0.674	12.961 ± 6.873	2.500 ± 1.036	5.758 ± 8.842
	F 值		1.381	6.441	0.571	5.686	0.254	5.863	1.080	3.006
	P 值		< 0.001	0.912	< 0.001	0.014	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003

肝细胞[17-18]

从血液系统来看,各年龄段大鼠首先出现 PLT 减少($P < 0.05$),第 12 周在未停药情况下 PLT 均可恢复;5 周龄、10 周龄大鼠于干预 4 周出现 WBC 减少($P < 0.05$),同样于第 12 周恢复;HB 减少($P < 0.05$)最晚出现,除 3 周龄大鼠其余均在第 12 周恢复。GTW 的血液毒性表现为血常规指标下降的不一致性,有动物研究[19]发现小剂量雷公藤可引起 WBC 减少,进一步增加剂量又引起 RBC 减少,同样证实了这一点。本实验可以看出,GTW 干预期间 3 周龄、5 周龄、10 周龄大鼠均出现不同程度的 WBC 减少,而 8 月龄大鼠未曾出现,且截至第 12 周只有 3 周龄大鼠 HB 未恢复,表明幼鼠较成鼠更不耐受 GTW 造成的血液损伤,有研究分析了 GTW 用药者发生的血液系统不良事件,发现儿童 HB 减少率明显高于成人[20],另有研究观察应用雷公藤制剂治疗类风湿关节炎的 271 例患者,发现年龄越大血液系统不良反应发生率越小,可能与机体的内分泌功能及免疫功能下降有关[21]。而 GTW 的血液毒性,可能与异常免疫损伤造血干(祖)细胞相关:有学者发现 GTW 所致血液毒性患者的骨髓 T 淋巴细胞增多,$CD8^+$ T 淋巴细胞集落增高,$CD4^+$ T 淋巴细胞减少,$CD4^+$ T/$CD8^+$ T 降低,T 淋巴细胞处于激活状态[22],表明机体出现免疫紊乱,另有研究表明 GTW 中的雷公藤红素可以显著调节成年小鼠外周血、骨髓、脾和腹腔中的干细胞、祖细胞和完全分化细胞群的数量,其潜在机制与核转录因子 -κB 信号通路有关[23]。

从生殖系统来看,5 周龄、8 月龄大鼠于第 4 周出现 T 下降($P < 0.05$),而第 8 周、第 12 周所有大鼠 T 均下降($P < 0.05$);从精子密度、活率看,GTW 灌胃 2 周时除 3 周龄大鼠外,其余均出现精子密度下降($P < 0.05$),而 GTW 灌胃 4 周时 8 月龄大鼠精子密度、活率均下降($P < 0.05$);从各级生精细胞比例

表 12 雷公藤多苷干预 2 周、4 周后不同年龄段大鼠各级生精细胞比例($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	干预 2 周			干预 4 周		
			精原细胞	精母细胞	精子细胞	精原细胞	精母细胞	精子细胞
3 周龄	空白组	7	0.236 ± 0.016	0.276 ± 0.024	0.488 ± 0.028	0.167 ± 0.014	0.220 ± 0.015	0.614 ± 0.017
	GTW 组	7	0.227 ± 0.032	0.269 ± 0.042	0.504 ± 0.044	0.179 ± 0.009	0.213 ± 0.016	0.608 ± 0.022
	F 值		5.953	0.905	1.141	1.107	0.001	0.921
	P 值		0.519	0.716	0.434	0.068	0.429	0.588
5 周龄	空白组	7	0.150 ± 0.010	0.212 ± 0.014	0.638 ± 0.023	0.141 ± 0.011	0.188 ± 0.008	0.671 ± 0.016
	GTW 组	7	0.171 ± 0.030	0.229 ± 0.055	0.600 ± 0.075	0.164 ± 0.027	0.194 ± 0.023	0.642 ± 0.040
	F 值		10.902	6.288	9.709	2.432	3.963	4.395
	P 值		0.122	0.461	0.244	0.058	0.549	0.105
10 周龄	空白组	7	0.145 ± 0.010	0.193 ± 0.009	0.662 ± 0.016	0.145 ± 0.012	0.194 ± 0.005	0.661 ± 0.015
	GTW 组	7	0.170 ± 0.026	0.202 ± 0.025	0.628 ± 0.040	0.195 ± 0.041	0.201 ± 0.020	0.605 ± 0.057
	F 值		1.800	3.889	1.257	3.003	13.445	2.619
	P 值		0.039	0.404	0.062	0.003	0.466	0.009
8 月龄	空白组	7	0.141 ± 0.013	0.192 ± 0.016	0.665 ± 0.019	0.153 ± 0.009	0.184 ± 0.014	0.662 ± 0.018
	GTW 组	7	0.155 ± 0.016	0.215 ± 0.012	0.631 ± 0.021	0.170 ± 0.023	0.216 ± 0.034	0.614 ± 0.049
	F 值		1.725	0.366	0.068	8.008	2.683	1.163
	P 值		0.085	0.013	0.006	0.115	0.045	0.032

表 13 雷公藤多苷干预 8 周、12 周后不同年龄段大鼠各级生精细胞比例($\bar{x} \pm s$)

鼠龄	组别	n	干预 8 周			干预 12 周		
			精原细胞	精母细胞	精子细胞	精原细胞	精母细胞	精子细胞
3 周龄	空白组	7	0.157 ± 0.016	0.191 ± 0.011	0.652 ± 0.026	0.140 ± 0.010	0.192 ± 0.011	0.668 ± 0.015
	GTW 组	7	0.193 ± 0.033	0.199 ± 0.043	0.613 ± 0.072	0.196 ± 0.058	0.209 ± 0.025	0.595 ± 0.079
	F 值		2.254	7.497	6.582	7.938	6.722	12.181
	P 值		0.023	0.631	0.213	0.042	0.136	0.050
5 周龄	空白组	7	0.150 ± 0.016	0.190 ± 0.014	0.660 ± 0.022	0.151 ± 0.011	0.198 ± 0.009	0.652 ± 0.019
	GTW 组	7	0.252 ± 0.167	0.247 ± 0.046	0.500 ± 0.197	0.223 ± 0.041	0.194 ± 0.062	0.583 ± 0.010
	F 值		4.148	6.807	4.257	3.130	11.779	9.137
	P 值		0.135	0.016	0.055	0.002	0.869	0.121
10 周龄	空白组	7	0.145 ± 0.012	0.194 ± 0.005	0.661 ± 0.015	0.155 ± 0.009	0.191 ± 0.022	0.655 ± 0.021
	GTW 组	7	0.195 ± 0.041	0.201 ± 0.020	0.605 ± 0.057	0.219 ± 0.030	0.241 ± 0.045	0.535 ± 0.059
	F 值		5.119	13.445	10.142	5.938	5.761	10.327
	P 值		0.017	0.466	0.040	0.001	0.026	0.001
8 月龄	空白组	7	0.126 ± 0.008	0.201 ± 0.017	0.673 ± 0.014	0.159 ± 0.020	0.192 ± 0.013	0.650 ± 0.030
	GTW 组	7	0.253 ± 0.134	0.255 ± 0.020	0.493 ± 0.142	0.256 ± 0.101	0.253 ± 0.028	0.491 ± 0.116
	F 值		9.369	0.107	10.926	8.734	2.076	3.003
	P 值		0.047	<0.001	0.015	0.044	<0.001	0.003

来看,8 月龄大鼠在灌胃 2 周即出现精子细胞比例下降($P < 0.05$),结合睾丸、附睾病理变化,可发现相对幼鼠,GTW 对成鼠的生殖损伤更为敏感,这种原因可能与 GTW 的生殖损伤机制相关。正常情况下,精原细胞通过支持细胞、间质细胞及其他多种体细胞的共同调控,逐渐分化为初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子[24],而 GTW 的生殖毒性涉及多种机制,首先,GTW 及其主要成分可通过多种途径诱发睾丸内细胞凋亡,例如雷公藤甲素可激活大鼠睾丸间质细胞线粒体的凋亡通路,诱导的大鼠睾丸间质细胞凋亡[25-26],也可通过激活 Caspase 家族的下游通路来诱导生精细胞[27]凋亡,尽管细胞凋亡在精原干细胞、睾丸支持细胞、间质细胞及精母细胞中均会出现[28],但不同生精细胞对于 GTW 毒性的敏感性不同,修晓宇[29]采用 γ-H2AX 免疫组化染色区分不同阶段初级精母细胞,发现细线期初级精母细胞可能是对雷公藤甲素毒性最敏感靶细胞,本研究也发现,GTW 干预后各周龄大鼠的各级生精细胞出现精子细胞比例降低、精原细胞比例升高的现象,同样说明了 GTW 对于生精细胞毒性的差异性。幼鼠性腺发育尚未完全,睾丸生精细胞多为上游未分化的精原细胞,可能造成 GTW 毒性的敏感性低于成熟大鼠。其次,GTW 还可通过抑制琥珀酸脱氢酶、酸性磷酸酶、乳酸脱氢酶和腺苷三磷酸酶等睾丸组织相关酶的活性[30-31]以及降低抑制素 B[32]、T[33]等睾丸相关激素的分泌,从而抑制大鼠生精能力、生精过程和精子运动,降低精子数量和活力,而幼鼠自身生精能力尚不完全,少见成熟精子,因此受 GTW 生殖毒性的影响较小。然而,本研究结果表明,随着幼鼠年龄的增长和 GTW 干预时间增加,幼鼠仍会出现精子细胞比例、精子数量/活力降低等生殖损伤表现,提示临床

仍应注意 GTW 疗程和剂量的把控。

本研究首次探究临床剂量的 GTW 对不同年龄段大鼠肝脏、血液、生殖系统损伤的差异性，为 GTW 针对不同年龄段的安全应用提供了一定参考价值。然而，本研究每组样本量较少，评价指标不够全面，且没有将病理状态的影响考虑在内，后期拟在扩大样本量的同时，引入病症结合模型，全面评价各系统损伤变化。

参考文献

[1] ZHANG Y Q, MAO X, LI W J, et al. *Tripterygium wilfordii*: an inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment[J]. Med Res Rev, 2021, 41(3): 1337 - 1374.

[2] 林娜, 姜泉, 刘维, 等. 雷公藤多苷/雷公藤片治疗类风湿关节炎用药指南[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17): 4149 - 4153.

[3] 中国狼疮肾炎诊断和治疗指南编写组. 中国狼疮肾炎诊断和治疗指南[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(44): 3441 - 3455.

[4] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(二): 紫癜性肾炎的诊治循证指南(试行)[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(12): 911 - 913.

[5] 丁樱, 翟文生, 任献青, 等. 中医阶梯方案治疗儿童过敏性紫癜性肾炎的多中心临床研究[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(4): 456 - 466.

[6] DU X, NYAGBLORDZRO M, AN L J, et al. Pharmacokinetic and toxicological characteristics of tripterigium glycosides and their derivatives[J]. Curr Drug Metab, 2018, 19(7): 605 - 627.

[7] 代彦林, 丁樱, 韩姗姗, 等. 双补丸干预雷公藤多苷致生殖损伤的作用及代谢组学分析[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(4): 467 - 475.

[8] JIANG M, HAN S S, ZHANG X, et al. Long - term effect of *Tripterygium* Glycosides Tablets combined with traditional Chinese medicine on adulthood fertility[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2019, 44(16): 3558 - 3561.

[9] 方志娥, 李承贤, 柏兆方, 等. 马兜铃酸致肝癌的客观性研究与思考[J]. 中国药物警戒, 2024, 21(1): 20 - 24.

[10] DING Y, ZHANG X, REN X Q, et al. Traditional Chinese medicine versus regular therapy in Henoch - Schönlein *Purpura* nephritis in children: study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2019, 20(1): 538.

[11] 李红刚, 纪伟, 苏建明, 等. 雷公藤多苷片的肝毒性及增效减毒的文献研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 415 - 418.

[12] 尹一杰. 有机阴离子转运多肽 SLCO1B3 基因的调控机制研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2021.

[13] HOSSAIN M, KUBES P. Innate immune cells orchestrate the repair of sterile injury in the liver and beyond[J]. Eur J Immunol, 2019, 49(6): 831 - 841.

[14] HAYASHI P H, FONTANA R J. Clinical features, diagnosis, and natural history of drug - induced liver injury[J]. Semin Liver Dis, 2014, 34(2): 134 - 144.

[15] ZHAO J Q, ZHANG F L, XIAO X L, et al. *Tripterygium hypoglaucum* (lévl.) hutch and its main bioactive components: recent advances in pharmacological activity, pharmacokinetics and potential toxicity[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 715359.

[16] HASNAT M, YUAN Z Q, NAVEED M, et al. Drp1 - associated mitochondrial dysfunction and mitochondrial autophagy: a novel mechanism in triptolide - induced hepatotoxicity[J]. Cell Biol Toxicol, 2019, 35(3): 267 - 280.

[17] JIN C H, HE X, ZHANG F L, et al. Inhibitory mechanisms of celastrol on human liver cytochrome P450 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 and 3A4[J]. Xenobiotica, 2015, 45(7): 571 - 577.

[18] JIN C H, WU Z J, WANG L L, et al. CYP450s - activity relations of celastrol to interact with triptolide reveal the reasons of hepatotoxicity of *Tripterygium wilfordii*[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2162.

[19] 韦登明, 黄光照. 雷公藤及其单体的药理和毒理病理学研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(12): 894 - 897.

[20] 李志霞, 马冬梅, 杨兴华, 等. 雷公藤用药者血液系统不良事件发生率的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 339 - 345.

[21] 郑肖庆, 丁樱, 徐闪闪, 等. 雷公藤血液毒性机制及防治的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(4): 175 - 179.

[22] 张玉萌, 朱丽萍. 雷公藤制剂致肝毒性、生殖毒性和血液系统毒性不良反应回顾性分析[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(3): 173 - 176.

[23] ZHANG Y Q, MAO X, LI W J, et al. *Tripterygium wilfordii*: an inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment[J]. Med Res Rev, 2021, 41(3): 1337 - 1374.

[24] EISENBERG M L, ESTEVES S C, LAMB D J, et al. Male infertility[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9(1): 49.

[25] LV L Y, CHANG Y J, LI Y Q, et al. Triptolide induces leydig cell apoptosis by disrupting mitochondrial dynamics in rats[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 616803.

[26] 黄郑隽, 彭华毅, 阙慧卿, 等. 雷公藤内酯醇对雄性大鼠生殖毒性的机制研究(Ⅱ)[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(6): 566 - 569.

[27] 李博怿. 五味子甲素通过 SCF/c - kit 信号通路调控少、弱精子症大鼠模型精子凋亡作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

[28] 戈佳辰. 雷公藤多苷片生殖毒性成分及作用机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2023.

[29] 修晓宇, 刘永珍, 陆姮磊, 等. 雷公藤甲素致小鼠睾丸精母细胞损伤的敏感靶细胞群研究[J]. 中国药学杂志, 2020, 55(12): 990 - 995.

[30] MA B, QI H H, LI J, et al. Triptolide disrupts fatty acids and peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR) levels in male mice testes followed by testicular injury: a GC - MS based metabolomics study[J]. Toxicology, 2015, 336: 84 - 95.

[31] SINGLA N, CHALLANA S. Reproductive toxicity of triptolide in male house rat, *Rattus rattus*[J]. Sci World J, 2014, 2014: 879405.

[32] PAN Z K, GAO Y X, LIU S, et al. Wu - Zi - *Yan* - Zong - Wan protects mouse blood - testis barrier from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. multiglycoside - induced disruption by regulating proinflammatory cytokines[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114440.

[33] JING X P, CHENG W W, GUO S, et al. Toxic effects of *Tripterygium wilfordii* Hook F on the reproductive system of adolescent male rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 1338 - 1345.

雷公藤多苷对不同年龄段雄鼠毒性损伤的比较

（正文见 101－110 页）

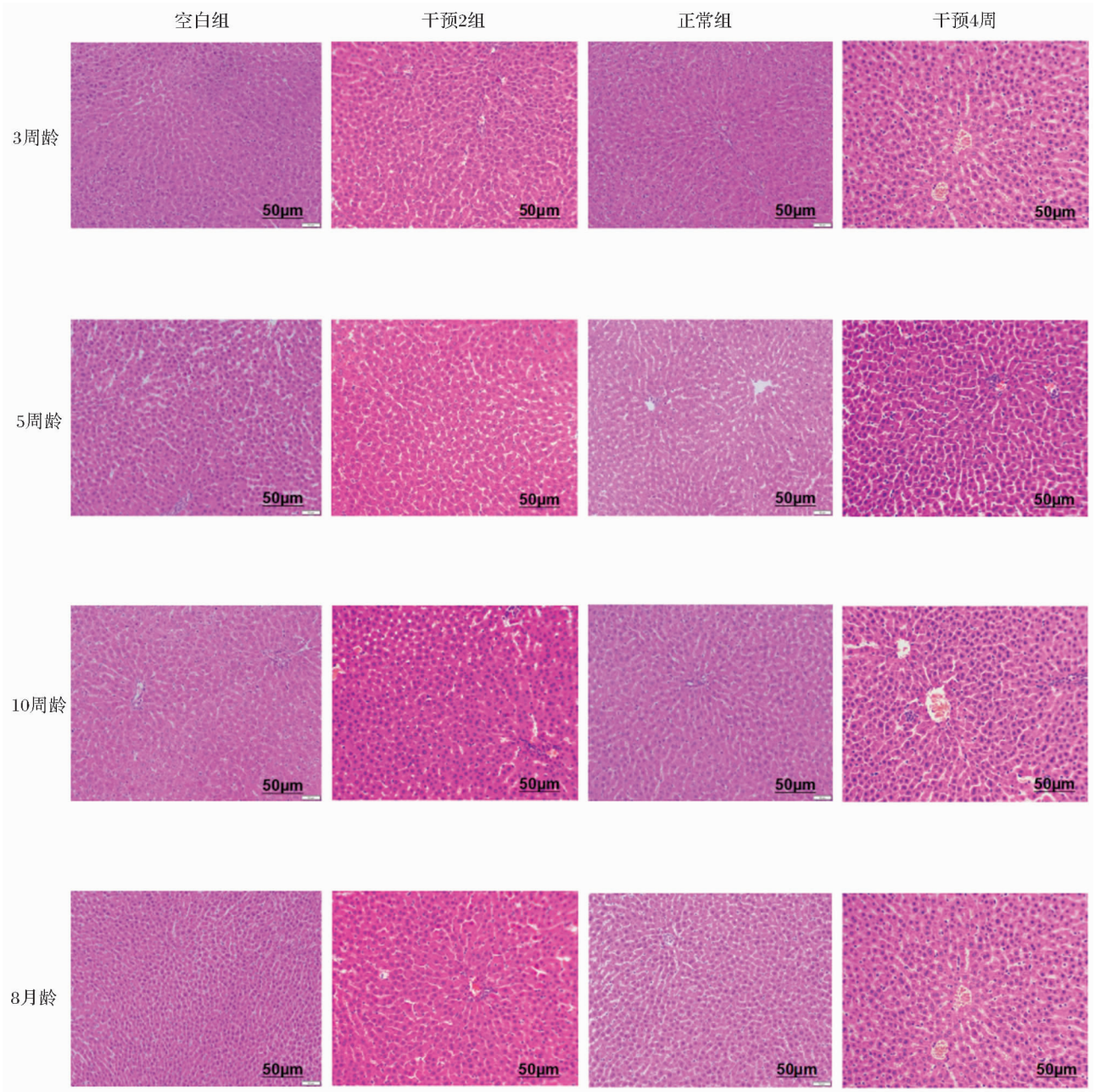


图 1　GTW 干预 2 周、4 周对不同年龄段大鼠肝脏病理学形态的影响（HE 染色，×100）

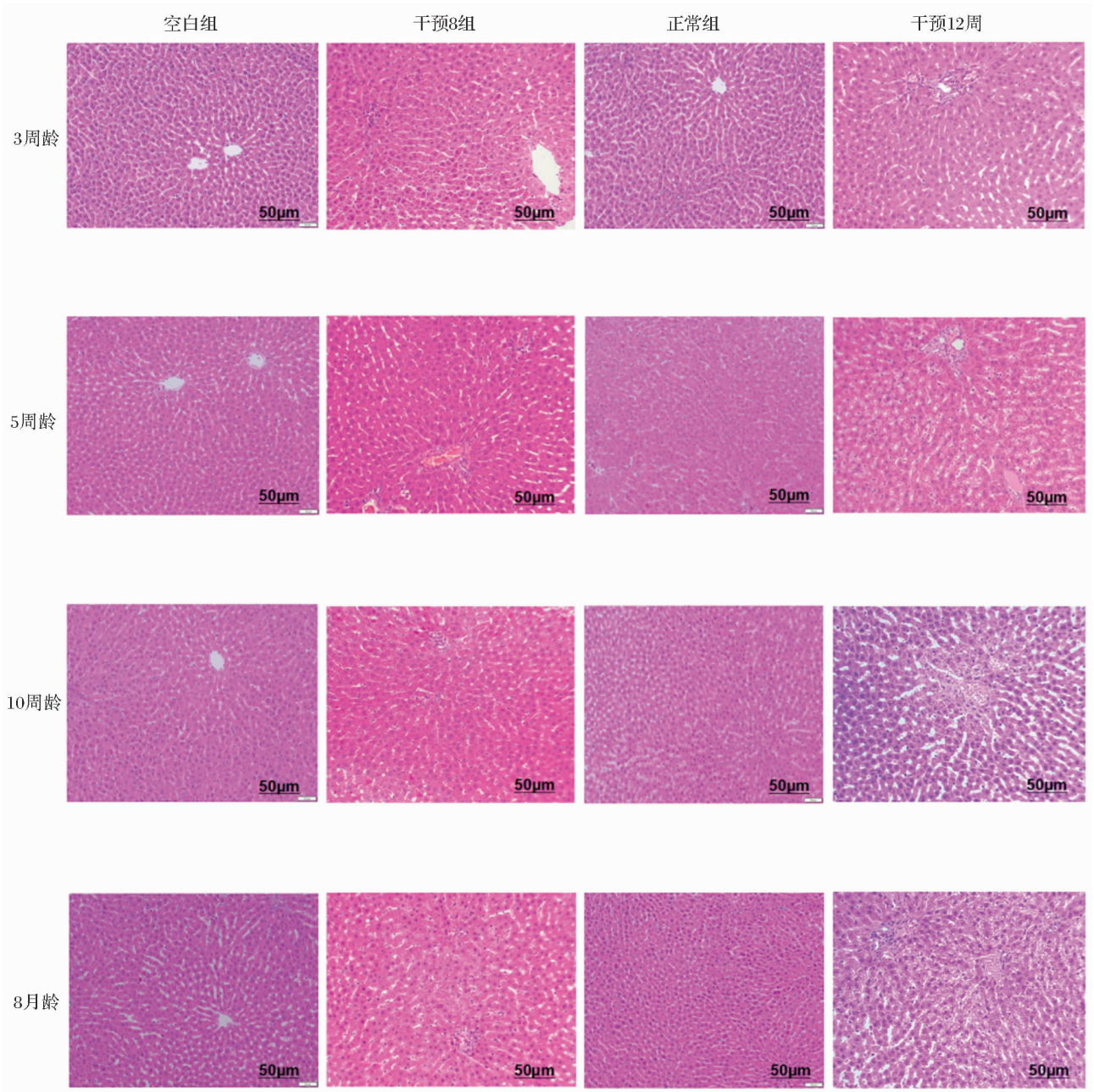


图 2 GTW 干预 8 周、12 周对不同年龄段大鼠肝脏病理学形态的影响(HE 染色, ×100)

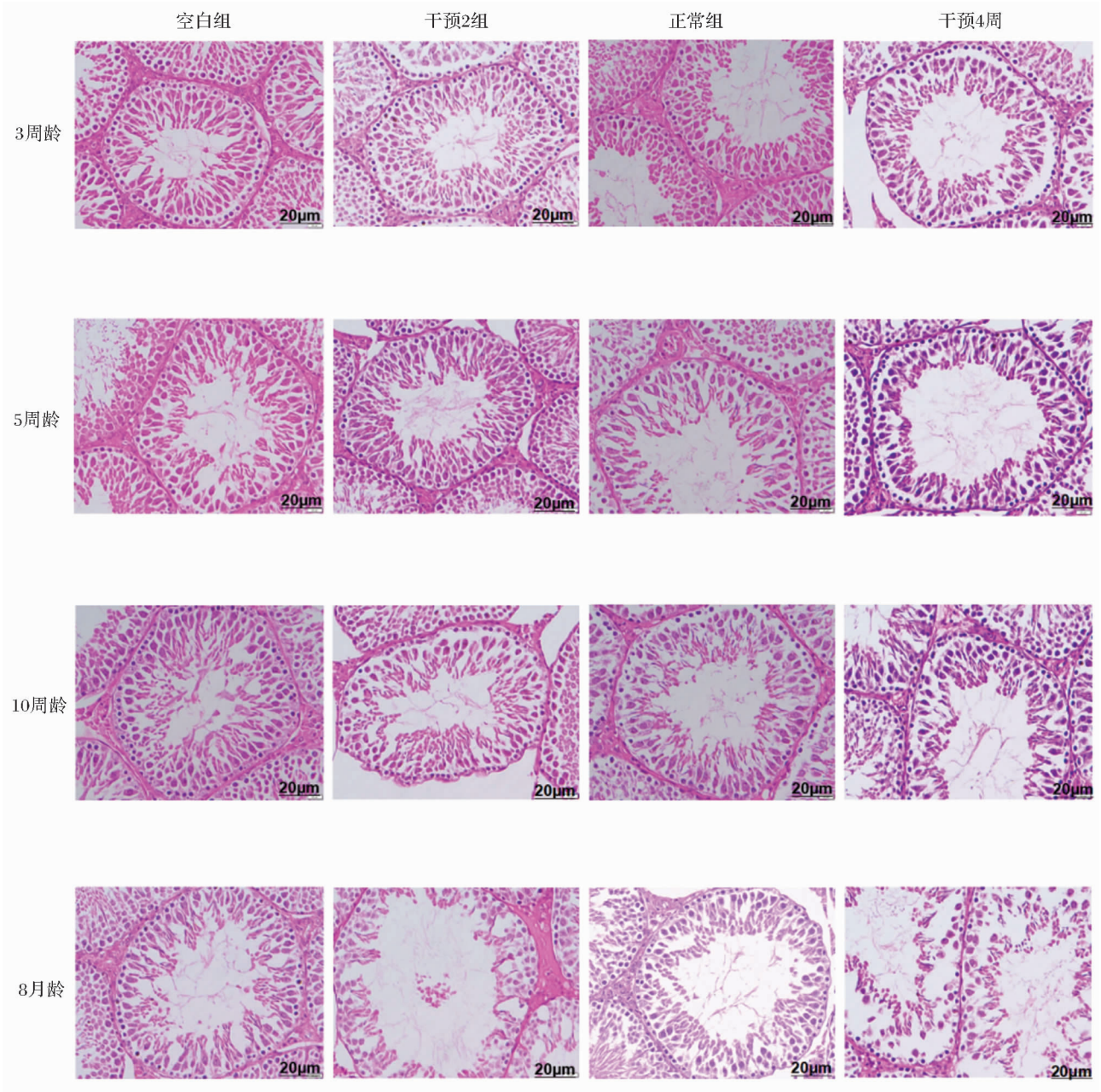


图 3 GTW 干预 2 周、4 周对不同年龄段大鼠睾丸病理学形态的影响(HE 染色, ×100)

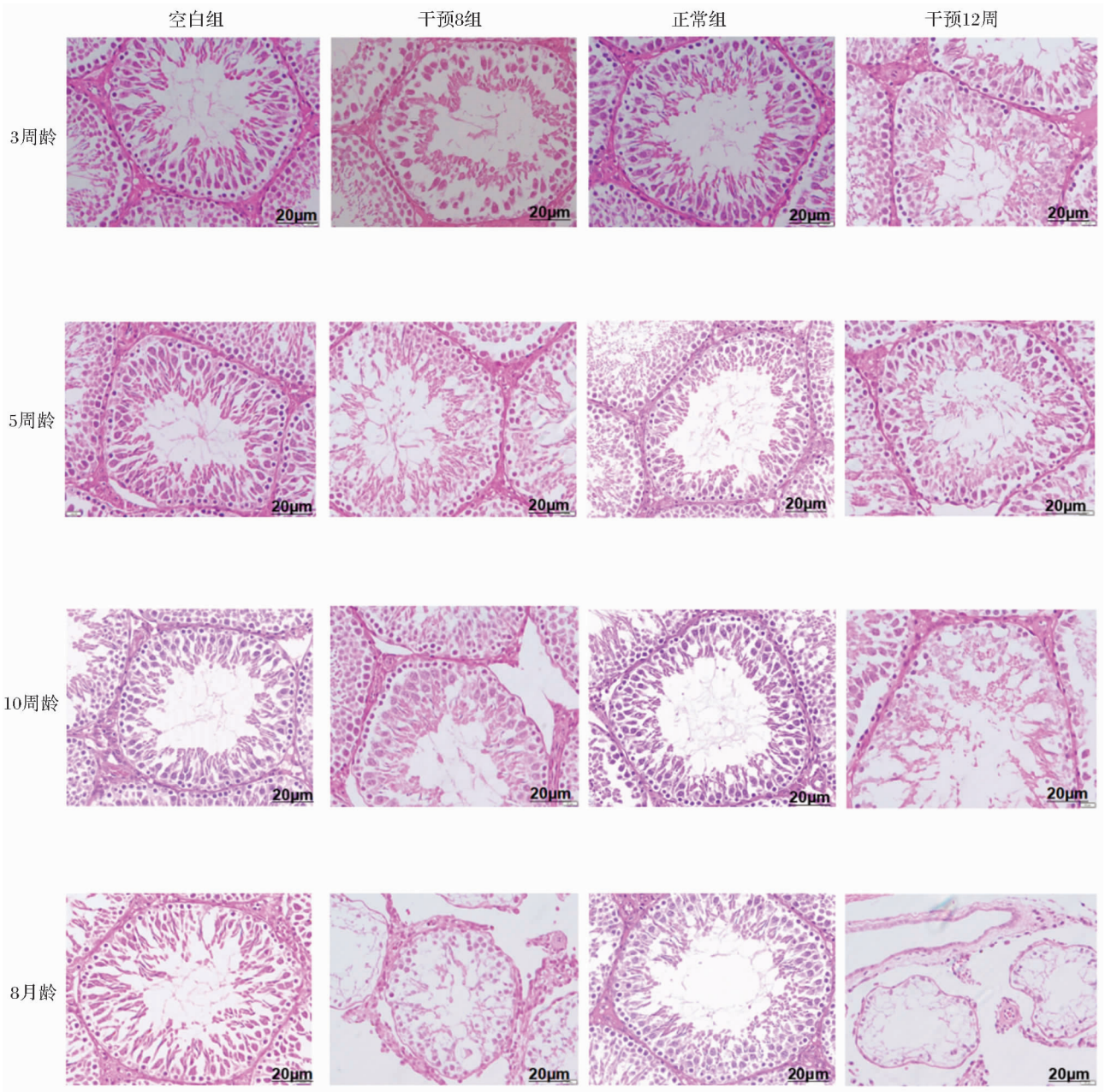


图 4　GTW 干预 8 周、12 周对不同年龄段大鼠睾丸病理学形态的影响(HE 染色，×100)

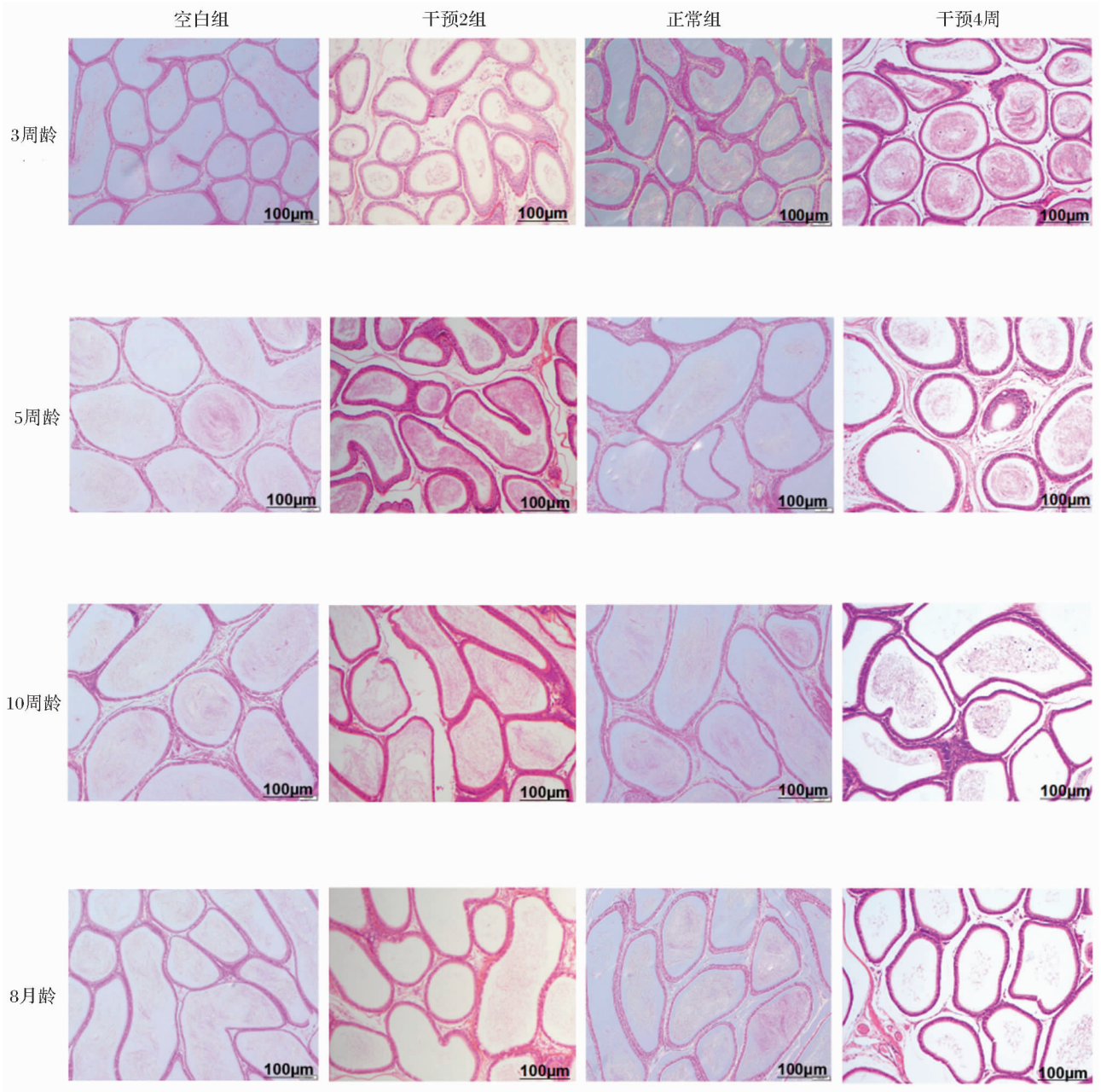


图 5 GTW 干预 2 周、4 周对不同年龄段大鼠附睾病理学形态的影响(HE 染色, ×100)

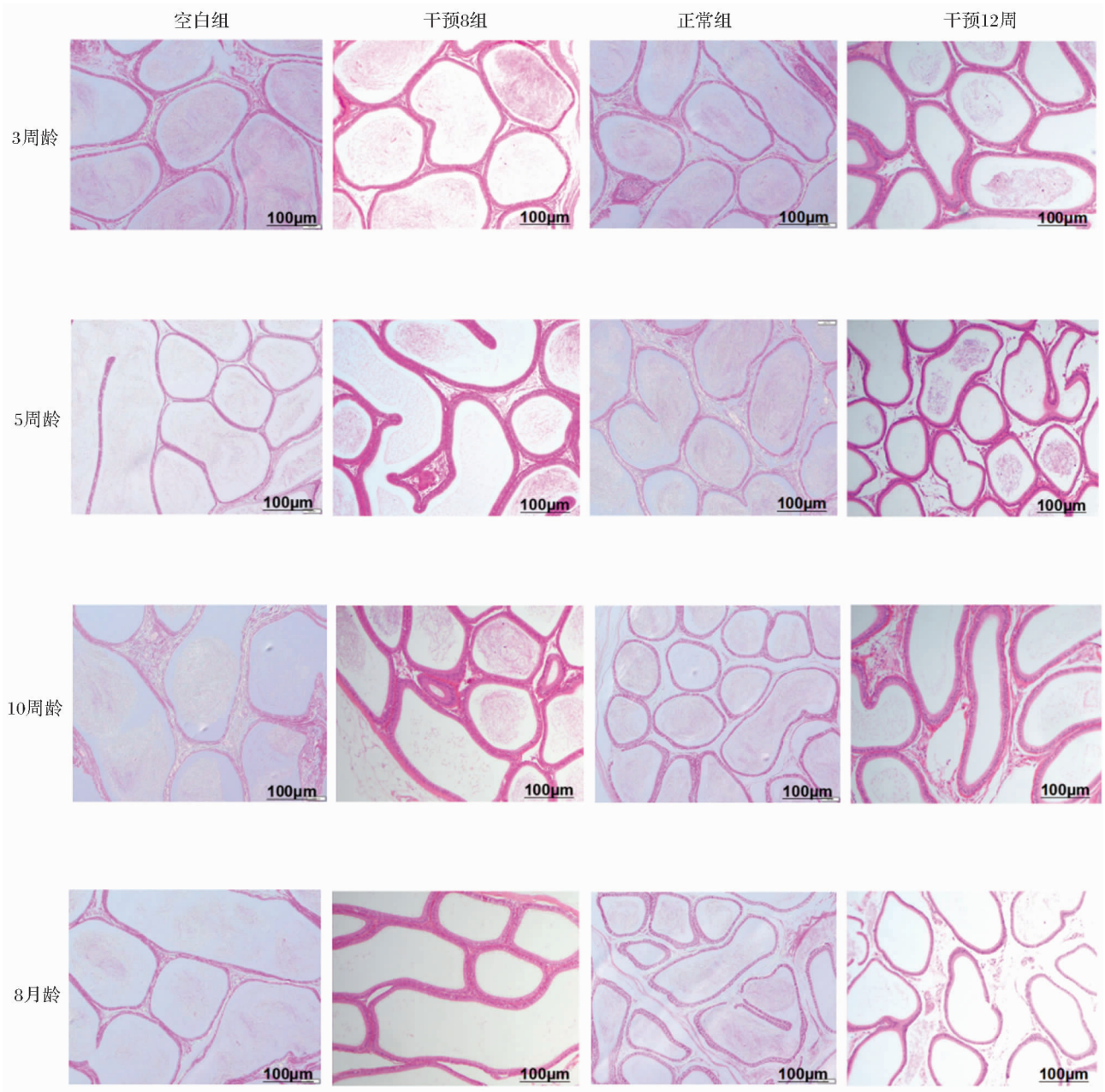


图 6 GTW 干预 8 周、12 周对不同年龄段大鼠附睾病理学形态的影响(HE 染色, ×100)