

网络出版时间: 2019-9-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.020.html>

表皮生长因子对大鼠睾丸间质干细胞增殖和分化的影响研究

张磊¹ 纪洵敏¹ 苏志坚² 唐芮¹ 蒲俏虹¹ 彭拓华¹ 张吉凯¹

摘要 目的 研究表皮生长因子对大鼠睾丸间质干细胞增殖和分化的影响。方法 二甲磺基乙烷单次腹腔注射成年雄性大鼠(75 mg/kg) 7 d后,分离曲细精管,构建曲细精管体外培养模型,进行处理:①表皮生长因子处理24 h,试剂盒进行5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)标记,Image-Pro Plus软件统计分析睾丸间质干细胞增殖情况;②表皮生长因子处理3 d后,换为含LH培养基继续培养至21 d,收集培养基上清液,放射免疫法检测上清液睾酮的分泌情况,同时收集曲细精管提取RNA,荧光定量PCR检测睾酮合成通路相关基因的表达情况,综合分析睾丸间质干细胞在表皮生长因子作用下的分化情况。结果 表皮生长因子能够显著地促进睾丸间质干细胞的增殖;曲细精管培养基上清液的睾酮水平明显上升,并且在睾酮合成通路Star、Cyp11a1和Hsd3b1经过表皮生长因子诱导后,在mRNA水平上均出现了明显的上调,表明睾丸间质干细胞出现了分化。结论 表皮生长因子能够诱导睾丸间质干细胞的大量增殖和向睾丸间质细胞系的分化。

关键词 表皮生长因子; 睾丸间质细胞; 曲细精管; 促黄体生成素

中图分类号 Q 2-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1589-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.019

睾丸间质细胞(leydig cell)是哺乳动物睾丸间

2019-04-16 接收

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(编号: 2015A030310132)

作者单位: ¹广东省生物制品与药物研究所耐药监测室,广州 510440

²暨南大学细胞生物学系,广州 510632

作者简介: 张磊,男,博士,副主任技师,责任作者,E-mail: swz1100@sina.com

质中的一种内分泌细胞,具有合成和分泌睾酮的功能,是男性体内雄激素的最主要来源^[1],具有促进胚胎期生殖器官的分化发育、形成和维持男性第二性征,促使精子发生与成熟,激发性欲,维持性功能以及调节人体的新陈代谢(如蛋白质合成、骨骼生长及红细胞生成等)等极其重要的生理功能^[2]。近几十年来,伴随着全球老龄化问题的加剧,中老年男性部分性激素缺乏综合征引起的社会问题日益突出,而传统的激素治疗方法存在严重不足,因而迫切需要开发全新的生物相容性高的替代治疗方法。在这种形势下,睾丸间质细胞再生分化的研究逐渐成为时下研究的热点。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)于1962年首次在小鼠的颌下腺中发现^[3]。EGF是由53个氨基酸组成的多肽单链,分子量为6 045, EGF的生物学效应是通过与其受体(EGFR)结合而发挥作用的。它是一种促细胞分裂剂,能加速核酸和蛋白质的合成,从而促进多种细胞分裂增殖,并影响细胞的分化^[4]。近年来,研究显示EGF与睾丸间质细胞的增殖分化功能存在密切关系^[5],但是缺乏直接的研究证据,由于睾丸间质细胞株和原代睾丸间质细胞存在的缺陷和不足^[6],该研究采用课题组构建的二甲磺基乙烷(ethylene dimethanesulfonate, EDS)处理曲细精管体外培养模型^[7]来探讨EGF在睾丸间质细胞的再生分化过程中对其增殖和分化的影响,目前国内开展这方面的研究较少,该模型直观地反映了EGF在睾丸间质干细胞再生增殖分化中的作用,为研究EGF在治疗中老年男性部分性激素缺乏综合征中的功能和作用提供了重要的研究基础数

HMGA1 were significantly up-regulated, while the up-regulated expression levels of Akt, P-Akt and HMGA1 were inhibited by the addition of PI3K/AKT pathway inhibitor Wortmannin(0.1 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). The results of Transwell assay showed that compared with the TGF- β 1 treatment group, the number of invasive cells in the TGF- β 1 + siHMGA1 group was significantly increased($P < 0.05$). **Conclusion** HMGA1 expression of HTR-8/SVneo cells may be up-regulated by TGF- β 1 through the PI3K/AKT signaling pathway. TGF- β 1 inhibits human trophoblast HTR-8/SVneo cell invasion by regulating HMGA1 expression.

Key words high mobility group A1; HTR-8/SVneo; transforming growth factor- β 1

据和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 SD 大鼠(约 150 g)购自广东省实验动物中心; EDS 由中山大学化工学院庞冀燕老师合成; 睾酮放射免疫分析药盒购自北京北方生物技术研究所; EGF 购自美国 RD 公司; 胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(insulin-transferrin-sodium selenium ,ITS ,I1884) 和促黄体生成素(luteinizing hormone ,LH ,L9773) 购自美国 Sigma 公司; Click-iT® Edu HCS Assays(C10350) 购自美国 Invitrogen 公司; DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司; 24 孔板(3156) 购自美国 Corning 公司; 荧光定量 PCR 仪、荧光染料 SsoAdvanced™ SYBR® Green(172-5261) 以及 DNA 合成试剂盒 iScript cDNA Synthesis(170-8890) 均购自美国 Bio-Rad 公司; RNA 抽提试剂盒 RNeasy® Plus Mini Kit(74134) 购自德国 QIAGEN 公司; 本实验所有引物由华大基因合成。

1.2 方法

1.2.1 曲细精管体外模型的构建 参照文献^[8], 雄性 SD 大鼠实验前 7 d 腹腔注射 EDS(75 mg/kg) , CO₂ 处死后, 将睾丸取出, 置于冰冷的 D-PBS 中, 剪除被膜, 血管与曲细精管剥离, 将曲细精管分离成单根, 于 DMEM/F12 培养基中(0.1% BSA 和 ITS) 34 °C、5% CO₂ 的条件下培养过夜。

1.2.2 细胞增殖实验 按照 1.2.1 中的方法提取分离大鼠曲细精管, 构建曲细精管体外培养模型。次日, 将曲细精管分至 24 孔板, 加入细胞因子处理曲细精管, 分组为 ITS 组(DMEM/F12 培养基中加入 0.1% BSA 和 ITS) 、LH 组(ITS 组加入 LH ,LH 终浓度为 10 ng/ml) 、EGF100 组(ITS 组加入 EGF ,EGF 终浓度为 100 ng/ml) 和 EGF10 组(ITS 组加入 EGF ,EGF 终浓度为 10 ng/ml) ,处理 24 h 后, Click-iT® Edu HCS Assays 试剂盒进行 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine ,EdU) 染色, 具体操作说明参照试剂盒说明书。

1.2.3 细胞分化实验 按照 1.2.1 中的方法提取分离大鼠曲细精管, 构建曲细精管体外培养模型。次日, 将曲细精管分至 24 孔板, 加入细胞因子处理, EGF 的浓度为 100 ng/ml、10 ng/ml ,LH 浓度为 10 ng/ml ,处理时间为 72 h ,而后将含有细胞因子的培养基更换为含 LH 的培养基继续培养至 21 d ,每 3.5 d 更换 1 次培养基, 收集第 14 天和第 21 天的培养基上清液待测睾酮, 收集第 14 天和第 21 天样品提

取 RNA 荧光定量 PCR 检测睾酮合成通路上相关酶的表达情况, 基因引物序列见表 1。

表 1 各基因的引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
Star	F: CCCAAATGTCAAGGAAATCA R: AGGCATCTCCCCAAAGTG
Cyp11a1	F: AAGTATCCGTGATGTGGGG R: TCATACAGTGTGCGCTTTTCT
Hsd3b1	F: CCCTGCTCTACTGGCTTGC R: TCTGCTTGGCTTCCTCCC
Hsd17b3	F: AACAGTTCCTCCTTTCCGTG R: AATGAATAGGCTTTCCCGAT
Srd5a1	F: TCACCAGAGCGAAGCAGC R: CTAAAGCACAAATGGAATCACTAT
Rps16	F: AAGTCTTCGGACGCAAGAAA R: TTGCCAGAGAAGCAGAACAG

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行分析, 多组间比较采用方差分析(ANOVA) ,两组之间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGF 对大鼠睾丸间质干细胞促增殖作用 EdU 染色方法检测大鼠睾丸间质干细胞的增殖情况, 结果见图 1, 在经过 LH 和 EGF 处理 24 h 后, 在曲细精管的表面出现了大量的纺锤形的、EdU 标记的细胞。与 ITS 组比较, LH 组能够显著促进睾丸间质细胞的大量增殖($t = 10.35$, $P < 0.0001$) , EGF100 组能够显著促进睾丸间质干细胞的增殖($t = 12.61$, $P < 0.01$) ,而 EGF10 组虽然也能显著促进睾丸间质干细胞的增殖($t = 6.51$, $P < 0.01$) ,但是与 EGF100 组比较, 其作用效果明显要弱。EGF 能够促进睾丸间质干细胞的增殖, 并且其作用效果呈现出一定的剂量依赖性。

2.2 EGF 对大鼠睾丸间质干细胞促分化作用 检测睾丸间质细胞分化的重要指标-睾酮的分泌情况, 从图 2 中可以看出, 经过 3 d 的 EGF 处理后, 换为含 LH 的培养基继续培养至 21 d ,与 ITS 组比较, EGF100 组能够显著地促进睾酮的产生($t = 6.05$, $P < 0.01$) ,EGF10 组也能够显著地促进睾酮的产生($t = 3.46$, $P < 0.01$) ,表明 EGF 能够诱导睾丸间质干细胞向睾丸间质细胞方向的分化, 而 LH 组则没有明显地促进睾酮的产生($t = 0.85$, $P < 0.01$) 。

2.3 睾酮合成过程中几个关键基因的表达情况 如图 3 所示, EGF 诱导 3 d 后, 加入含有 1 ng/ml LH 的培养基继续培养 11 d ,实验结果显示, EGF 能够

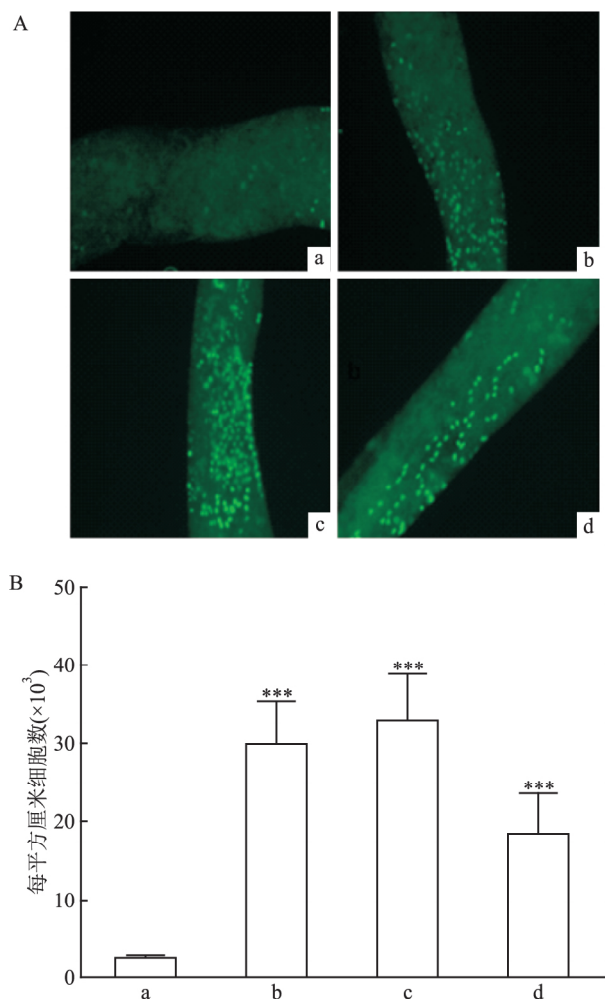


图1 曲细精管的EdU染色

A: EdU染色×100; B: 增殖细胞数的统计分析; a: ITS组; b: LH组; c: EGF100组; d: EGF10组; 与ITS组比较: *** $P < 0.001$

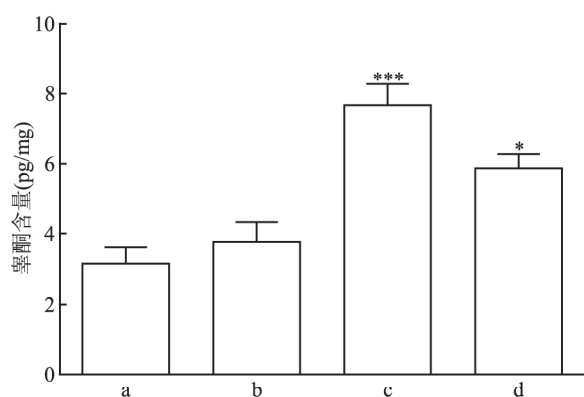


图2 曲细精管培养21 d时培养基上清液中睾酮的分泌情况

a: ITS组; b: LH组; c: EGF100组; d: EGF10组; 与ITS组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

影响几个基因在 mRNA 水平的表达。对于 Star 基因,与 ITS 组比较,LH 组能够显著促进 Star 基因的表达($P = 0.0005$),EGF100 组和 EGF10 组也能显

著促进该基因的表达($P = 0.0006$ 、 0.0005),并且与 LH 组比较,EGF100 组的诱导表达作用要明显更强($P = 0.0003$);对于 Hsd3b1 基因,EGF 的诱导表达的作用与 Star 基因相似,与 ITS 组比较,LH 组、EGF100 组和 EGF10 组均能显著地促进 Hsd3b1 基因的表达($P = 0.0001$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$),并且与 LH 组比较,EGF100 组的诱导表达作用要更强($P = 0.0133$);位于细胞线粒体上的 Cyp11a1 基因在睾丸间质细胞的分化是一个非常明显的标志物,在睾酮合成过程中也是非常重要的一个中间酶,与 ITS 组比较,EGF100 组能够明显促进 Cyp11a1 基因的表达($P < 0.0001$),并且与 LH 组比较,其诱导表达要明显更强($P = 0.0002$);作为睾丸间质细胞从睾丸间质祖细胞阶段向未成熟睾丸间质细胞阶段分化的典型标志物基因 Hsd17b3 与前几个基因的表达存在差异,与 ITS 组比较,EGF100 组和 EGF10 组均没有明显的诱导表达作用($P = 0.8990$ 、 $P = 0.3617$);对于 Srd5a1 基因,与 ITS 组比较,EGF100 组和 EGF10 组具有明显的诱导表达作用($P = 0.0003$ 、 $P = 0.0071$)。

3 讨论

成熟睾丸间质细胞的分化主要包括四个阶段:睾丸间质干细胞、睾丸间质祖细胞、未成熟睾丸间质细胞和成熟睾丸间质细胞^[9]。研究^[10]显示,从出生后 7 d 的雄性大鼠睾丸内能够分离到睾丸间质干细胞,并且这些细胞主要位于曲细精管的表面。在成年大鼠睾丸内,成年的睾丸间质细胞一旦成熟,将不会再增殖分化。然而,当成年睾丸间质细胞被特异性的抑制剂 EDS 杀死后,新的睾丸间质细胞就会生成^[11]。

大量研究^[12]显示 EGF 能够显著地影响睾丸间质细胞分泌睾酮的能力。但是 EGF 对大鼠睾丸间质干细胞增殖分化的影响少有报道。在本研究所构建的曲细精管体外培养模型中,EGF 能够显著地促进睾丸间质干细胞分化过程中 Star、Hsd3b1、Cyp11a1 和 Hsd17b3 等几个关键基因的表达,表明其具有明显地促分化作用,这与研究中睾酮的检测情况是一致的。促增殖作用方面,100 ng/ml 和 10 ng/ml EGF 均能显著地诱导 EdU 标记阳性的睾丸间质干细胞的增殖,但是在曲细精管培养体系中,出现增殖的不止睾丸间质干细胞,还包括精原细胞和精细胞系的多种细胞,精原细胞和精细胞系的细胞形态及其所处位置均与睾丸间质干细胞不同。

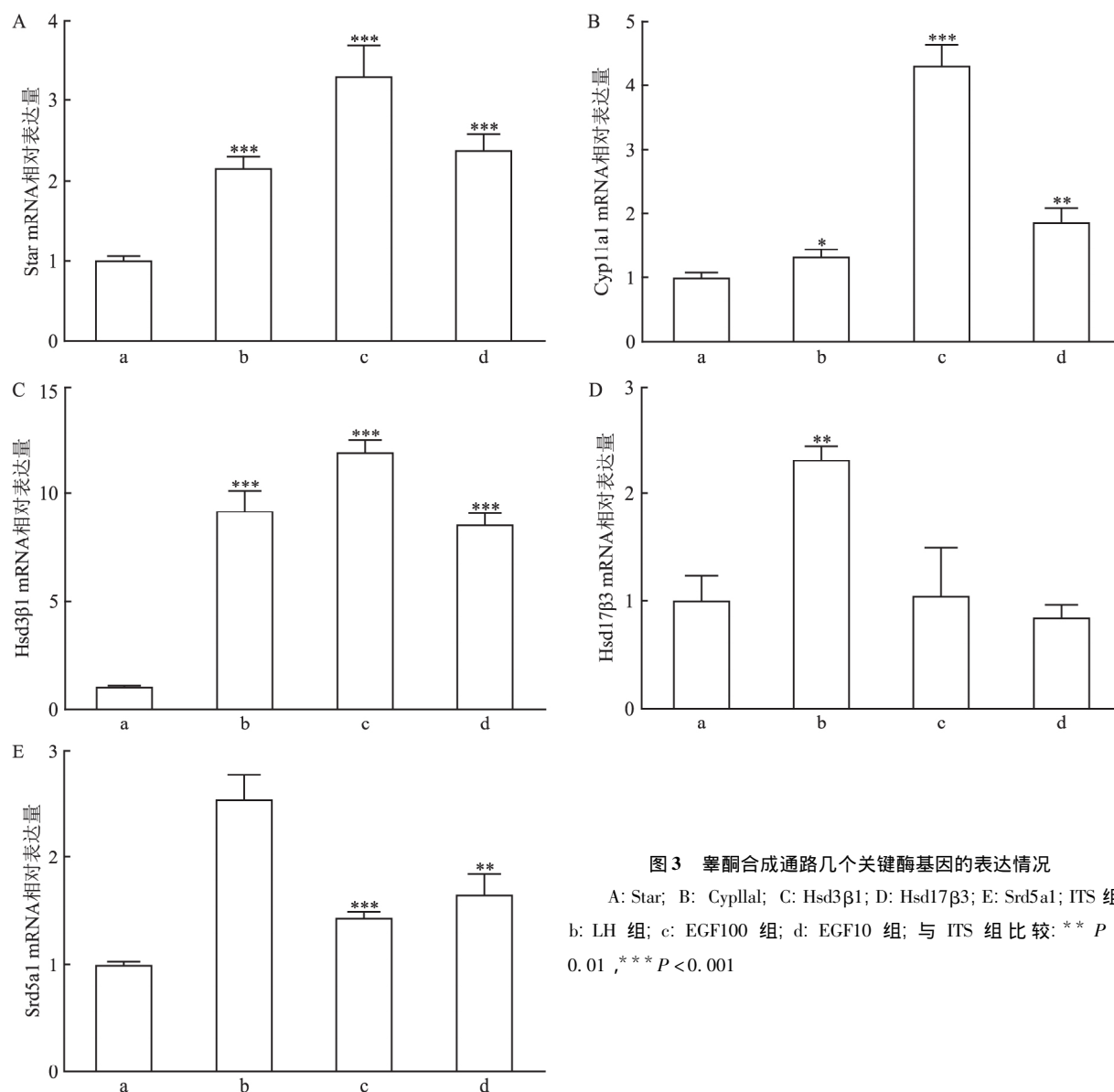


图3 睾酮合成通路几个关键酶基因的表达情况

A: Star; B: Cyp11a1; C: Hsd3β1; D: Hsd17β3; E: Srd5a1; ITS 组; b: LH 组; c: EGF100 组; d: EGF10 组; 与 ITS 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

本研究首次在体外组织培养体系中证实了 EGF 的直接促增殖和促分化作用,近几年,许多研究结果也间接证明了 EGF 对睾丸间质细胞的作用。Pan et al^[5]通过运用 RT-PCR、Western blot 和免疫组化技术研究发现 EGF 和 EGFR 在牦牛睾丸的发育精子生成过程中发挥着十分重要的作用; Tamada et al^[13]研究发现犬类睾丸中 EGF 及其受体主要在曲细精管上表达,并且在 mRNA 水平上随着年龄的增加 EGF 受体逐渐减少而 EGF 没有显著变化,表明 EGF 及其受体在犬类睾丸发育过程中发挥作用; He et al^[14]研究显示,新生的公羊驼睾丸并没有 EGF 表达,而到了青春期、性成熟期,睾丸中 EGF 在生精细胞、支持细胞、间质细胞才有明显表达;宋卫儒等^[15]研究发现,EGF 在食蟹猴睾丸不同发育阶段的表达存在差异,以新生猴期最低,而后各个发育时期

EGF 表达量升高。

综上所述,利用曲细精管体外培养模型,本研究在 mRNA 水平和酶学水平均直接证明了 EGF 对睾丸间质干细胞的作用,这些实验数据将为治疗中老年男性雄激素部分缺乏综合征(PADAM)提供非常重要的线索,即可将 EGF 作为治疗 PADAM 的候选药物,开发生物源性雄激素补充药物或睾丸间质细胞再生替代等全新的治疗方法。

参考文献

- [1] Li X, Wang Z, Jiang Z, et al. Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(10): 2666-71.
- [2] Chen H, Wang Y, Ge R, et al. Leydig cell stem cells: identification, proliferation and differentiation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 445: 65-73.

- [3] Yan Y C, Sun Y P, Zhang M L. Testis epidermal growth factor and spermatogenesis[J]. *Arch Androl* ,1998 ,40(2) : 133 – 46.
- [4] 于军桥,邵继春,曾政光. 表皮生长因子及其受体对雄性生殖系统的影响[J]. *中华男科学* ,2001 ,7(5) : 321 – 3.
- [5] Pan Y, Cui Y, Yu S, et al. The expression of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) during post-natal testes development in the yak[J]. *Reprod Domest Anim* ,2014 ,49(6) : 970 – 6.
- [6] Stanley E, Lin C Y, Jin S, et al. Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells[J]. *Endocrinology* , 2012 ,153(10) : 5002 – 10.
- [7] 张磊,张齐好,苏志坚,等. 二甲磺基乙烷处理生精小管体外培养模型的建立[J]. *上海交通大学学报(医学版)* ,2015 ,35(3) : 327 – 32.
- [8] Zhang L, Wang H, Yang Y, et al. NGF induces adult stem Leydig cells to proliferate and differentiate during Leydig cell regeneration[J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2013 ,436(2) : 300 – 5.
- [9] Ge R S, Dong Q, Sottas C M, et al. In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation and lineage-specific development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2006 ,103(8) : 2719 – 24.
- [10] Li X, Wang Z, Jiang Z, et al. Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2016 ,113(10) : 2666 – 71.
- [11] Chen H, Wang Y, Ge R, et al. Leydig cell stem cells: identification, proliferation and differentiation[J]. *Mol Cell Endocrinol* , 2016 ,445: 65.
- [12] Verhoeven G, Cailleau J. Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells[J]. *Mol Cell Endocrinol* , 1986 ,47(1) : 99 – 106.
- [13] Tamada H, Takemoto K, Tominaga M, et al. Expression and localization of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in the canine testis[J]. *J Reprod Develop* ,2015 ,29(6) : 495 – 504.
- [14] He J, Dong C, You R, et al. Localization of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) during postnatal testis development in the alpaca (*Lama pacos*) [J]. *Anim Reprod Sci* ,2009 , 116(1) : 155 – 61.
- [15] 宋卫儒,梁季鸿,梁世坤,等. 表皮生长因子在食蟹猴睾丸不同发育阶段表达的研究[J]. *山东医药* ,2010 ,50(48) : 32 – 3.

Effect of epidermal growth factor on proliferation and differentiation of rat Leydig cells

Zhang Lei¹, Ji Xunmin¹, Su Zhijian², et al

(¹Dept of Resistance Surveillance Guangdong Provincial Institute of Biological Products and Materia Medica, Guangzhou 510440; ²Dept of Cell Biology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Objective To study the effect of epidermal growth factor (EGF) on the proliferation and differentiation of rat Leydig cells. **Methods** The male rats were treated 1 week prior to the beginning of experimentation with ethane dimethanesulfonate (EDS, 75 mg/kg body weight, by i. p. injection). We used the established organ culture model of rat seminiferous tubules to examine the regulation of EGF during SLC proliferation using EdU staining after incubated for 24 h; We examined the regulation of EGF during SLC differentiation in organ culture model of rat seminiferous tubules, the EGF group was incubated for 3 days and then treated with DMEM/F12-TS media containing LH for up to 21 days and the culture media from the seminiferous tubules were collected and testosterone concentrations in the media were measured using I^{125} -based RIA; Real-time PCR was performed to examine mRNA levels of steroidogenic genes and the transcription factor Star in seminiferous tubules after treatment with EGF and LH. **Results** EGF significantly promoted the proliferation of stem Leydig cells and also induced steroidogenic enzyme gene expression and EGF promoted testosterone production in seminiferous tubules *in vitro*. **Conclusion** EGF is capable of inducing massive proliferation of testicular mesenchymal stem cells and differentiation into Leydig cells. **Key words** epidermal growth factor; Leydig cells; seminiferous tubules; luteinizing hormone