

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.020.html>

# 氧化应激在镉抑制小鼠睾丸间质细胞睾酮合成中的作用

朱文祥, 刘必勇, 刘洪茂, 穆柯瀚, 姬艳丽, 徐德祥

**摘要** 目的 探讨氧化应激在镉抑制小鼠睾丸间质细胞睾酮合成中的作用。方法 采用  $20 \mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  处理小鼠睾丸间质细胞系 TM3 细胞, 在加入  $\text{CdCl}_2$  4 h 和 8 h 后分别收集细胞和上清液, 等容积磷酸盐缓冲液处理 8 h 为对照组, 采用 ELISA 法检测上清液中睾酮含量, 采用 RT-PCR 法检测血红素加氧酶-1 (HO-1)、超氧化物歧化酶 (SOD1)、SOD2 和 SOD3、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) mRNA 的表达水平, 采用 Western blot 法检测 HO-1 和血红素加氧酶-2 (HO-2) 蛋白的表达水平。结果  $\text{CdCl}_2$  处理 4 h 和 8 h 后的细胞上清液中睾酮的含量明显低于对照组 ( $P < 0.01$ );  $\text{CdCl}_2$  处理组的 SOD1、SOD2、SOD3、GSH-Px、CAT mRNA 与对照组相比表达水平均降低。此外,  $\text{CdCl}_2$  处理组中 HO-1 的 mRNA 表达量与对照相比明显升高; 与此相一致,  $\text{CdCl}_2$  明显诱导 TM3 细胞 HO-1 的蛋白表达, 并具有明显的时间-效应关系 ( $P < 0.01$ ); 结论 镉抑制 TM3 细胞睾酮的合成, 氧化应激可能在其中发挥重要作用。

**关键词** 镉; 睾丸间质细胞; 氧化应激; 睾酮

**中图分类号** R 349.1; R 348.5; R 347.911

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)03-0439-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.020

近年来, 镉的雄性生殖毒性问题受到越来越多的重视, 其生殖毒性作用的主要靶器官是睾丸。镉能引起成年雄性大鼠或小鼠发生明显的睾丸损伤、精子数量和活力降低甚至不育<sup>[1-3]</sup>。睾酮是一种对雄性生殖系统生长和发育都极为重要的雄性激素<sup>[4]</sup>。睾酮合成障碍是引起睾丸损伤以及降低精子质量的一个主要因素。本课题组前期研究<sup>[5-8]</sup>显示, 镉暴露会抑制 TM3 细胞睾酮的合成, 其抑制作用可能与镉下调 TM3 细胞睾酮合成路径中关键酶基因和蛋白的表达有关。但目前对镉通过何种机制

下调睾酮合成酶的表达进而抑制睾酮合成尚未清楚。

镉诱导的雄性生殖毒性与氧化应激密切相关<sup>[9]</sup>。本课题采用 TM3 细胞作为研究对象, 观察镉处理对其睾酮的分泌影响以及氧化应激指标的变化, 探讨氧化应激在镉引起的 TM3 细胞损伤中的作用, 为阐明氧化应激影响男性生殖损伤的机制和指导男性生殖健康提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** TM3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院, 加入 2.5% 胎牛血清(经灭活)、5% 马血清(经灭活)和 1% 双抗溶液的 DMEM/F12 培养基, 并且在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中贴壁培养。

**1.2 化学试剂** 睾酮含量检测 ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购于美国 Millipore 公司; RT 和 PCR 试剂盒购于美国 Promega 公司; 化学物发光增强检测试剂盒购于美国 Pierce 公司;  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体购于北京博奥森科技有限公司; BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 其他未说明生化试剂均购于美国 Sigma 公司。

**1.3 细胞处理** 待培养瓶中的细胞在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养长至瓶底 80%~90% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 充分混匀后制成约  $10^6/\text{ml}$  的细胞悬液。接种一定数目的细胞于培养皿和培养瓶中, 分别于特定处理时间后收集细胞上清液和细胞用于睾酮的含量和氧化应激相关指标的检测。

**1.4 ELISA 法检测睾酮含量** TM3 细胞经  $20 \mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  处理 4 h、8 h 后,  $1\,000 \text{ r/min}$  离心 10 min 后收集上清液, 用 ELISA 法检测睾酮的含量。按照 ELISA 试剂盒说明书检测步骤操作后, 15 min 内用酶标仪在波长 450 nm 处重复测量 3 次各孔的 OD 值, 并取平均值按照曲线方程计算各孔细胞上清液中睾酮的含量。

**1.5 Western blot 法检测血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和 血红素加氧酶-2 (heme oxygenase-2, HO-2) 蛋白的表达** 镉处理 (4 h、8 h) 后

2018-10-23 接收

**基金项目** 国家自然科学基金(编号: 31571557); 安徽省高等学校自然科学研究一般项目(编号: 12925KJ2017B04); 安徽医科大学首批“青年拔尖人才支持计划”

**作者单位** 安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫系, 合肥 230032

**作者简介** 朱文祥, 男, 硕士研究生;

姬艳丽, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jiyanyanlivede@126.com

收集细胞,刮下贴壁细胞后用 RIPA 裂解液在冰盒上用搅拌器搅拌裂解 5 min,冰上静置裂解 20 min 左右,4 ℃、15 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液(尽量不要吸到底部的沉淀)于 1.5 ml 的离心管,置于冰上。采用 BCA 试剂盒测定裂解液中总蛋白浓度,将蛋白样品用 RIPA 裂解液稀释定量至同一浓度。细胞蛋白样品与 5 × 上样缓冲液按 4 : 1 的比例混合后,在蛋白变性仪上 100 ℃、10 min 进行蛋白变性。加热变性后的细胞总蛋白样品置于 -20 ℃ 或 -80 ℃ 冰箱中储存待用。样品经 SDS-PAGE 电泳、转膜后,采用 5% 脱脂牛奶封闭后的 PVDF 膜分别用一抗 [β-actin(1 : 2 000)、HO-1(1 : 6 000)及 HO-2(1 : 1 000)] 4 ℃ 孵育过夜,之后用抗小鼠或抗兔 IgG [β-actin(1 : 40 000)、HO-1(1 : 50 000及 HO-2(1 : 40 000)] 于摇床上室温孵育 2 h 左右。用含 0.05% Tween-20 的 DPBS 洗涤 3 次(10 min/次),最后再用 DPBS 洗涤 1 次(5 min),之后用 Tanon 显影仪器(化学发光)检测相关蛋白的表达水平。Western blot 结果分析:用内参 β-actin 将目的蛋白的表达水平标准化,将对照组标准化后的比值定为 1。

**1.6 RT-PCR 法检测氧化应激相关 mRNA 的表达** 用 20 μmol/L 镉处理 TM3 细胞 4 h、8 h 后收集细胞提取 RNA 后吸取一定体积的 RNA 样品。随后用 AMV 法对细胞样品 RNA 进行逆转录。使用氧化应激相关 mRNA [SOD1、SOD2、SOD3、GSH-Px、过氧化氢酶(catalase, CAT)] 的引物与样品 RNA 进行扩增反应。使用 LightCycler 480 PCR 仪,扩增条件为:95 ℃ 预变性 10 min,然后按 95 ℃ 变性 15 s、60 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 30 s 的程序进行 45 次循环反应。以 18S 作为内参,使用 LightCycler 480 PCR 仪统计分析软件对所有的实时定量数据进行相对定量分析。见表 1。

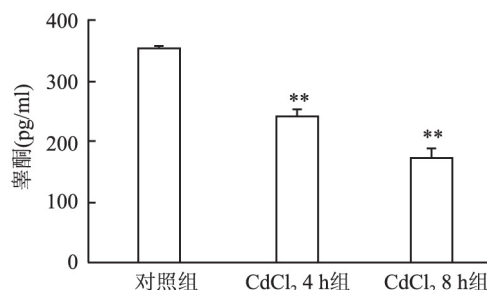
表 1 基因引物序列

| 引物     | 正向引物(5'-3')             | 反向引物(5'-3')              |
|--------|-------------------------|--------------------------|
| HO-1   | AGCCCCACCAAGTTCAAACA    | TGCCAACAGGAAGCTGAGAG     |
| SOD1   | ATGGCGATGAAAGCGGTGTG    | TTACTGCGCAATCCCAATCACTC  |
| SOD2   | ATGTTGTGTCGGGCGGCG      | TCACCTCAAGCTGTGTATCTTTCA |
| SOD3   | ATGTTGGCCTTCTTGTCTACGG  | TTAAGTGTCTTTCACCTCGCTCT  |
| GSH-Px | GCATCCGCTTCCACGACTTCCT  | CCGCTCATCCGGGTCCAACAT    |
| CAT    | GCAGATACCTGTGAAGTGTCCCT | TTACAGGTTAGCTTTTCCCTTCG  |
| 18S    | GTAACCGTTGAACCCCAATT    | CCATCCAATCGGTAGTAGCG     |

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间差异的检验,两组间比较用 Q 检验(Students-Newman-Keuls, SNK),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CdCl<sub>2</sub> 处理对 TM3 细胞睾酮分泌的影响** 实验结果显示: CdCl<sub>2</sub> 处理 TM3 细胞 4 h 和 8 h 后上清液中的睾酮含量明显低于对照组,差异均有统计学意义( $F = 140.8, P < 0.01$ )。见图 1。

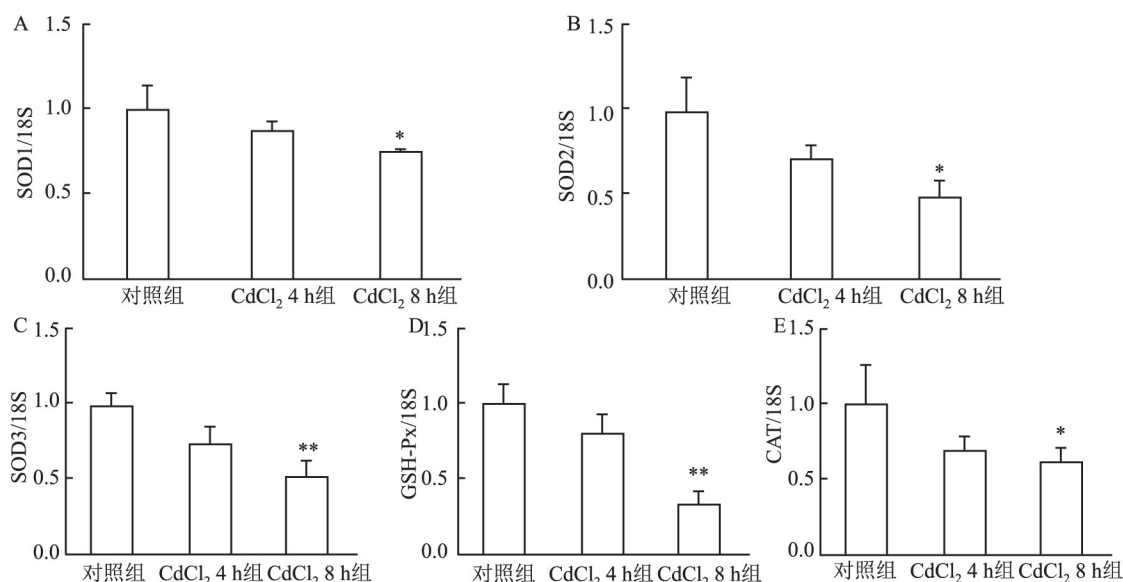
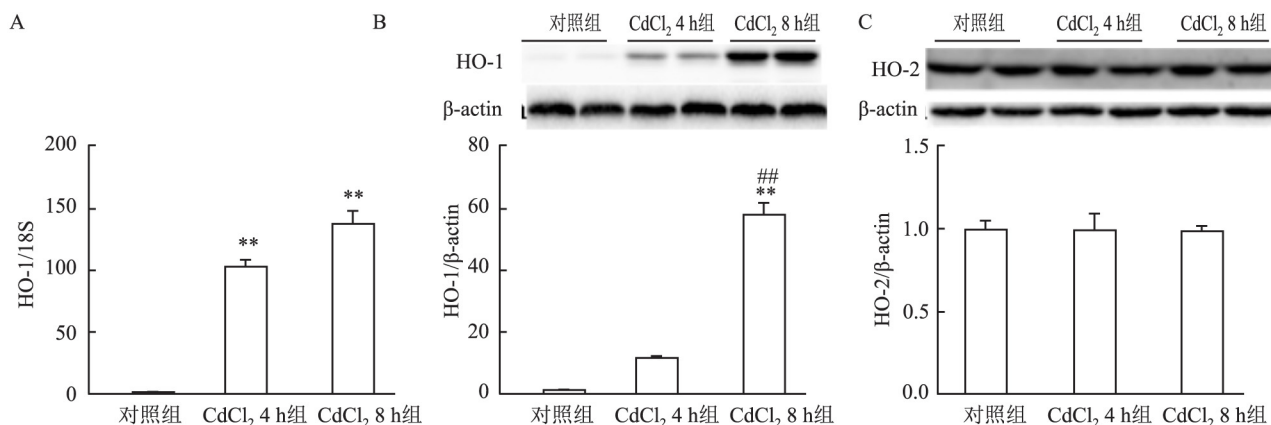
图 1 CdCl<sub>2</sub> 对 TM3 细胞睾酮分泌的影响与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ 

**2.2 CdCl<sub>2</sub> 处理对 TM3 细胞抗氧化酶体系 mRNA 表达的影响** 结果显示, CdCl<sub>2</sub> 处理组 SOD1、SOD2、SOD3、GSH-Px 和 CAT mRNA 的表达水平均呈下降的趋势,其中 CdCl<sub>2</sub> 处理 8 h 组 SOD1、SOD2、SOD3、GSH-Px 及 CAT mRNA 的表达水平与对照组比较均下降,差异均有统计学意义( $F = 12.58、18.89、55.24、91.66、30.32, P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$ )。见图 2。

**2.3 CdCl<sub>2</sub> 处理对 TM3 细胞 HO-1 mRNA 和 HO-1、HO-2 蛋白表达的影响** 与对照组相比, CdCl<sub>2</sub> 处理 TM3 细胞 4 h 后 HO-1 mRNA 的表达量显著上升( $F = 545.20, P < 0.01$ ), TM3 细胞 HO-1 mRNA 的表达在 CdCl<sub>2</sub> 处理 8 h 组中进一步增高(图 3A) ( $F = 545.20, P < 0.01$ ); HO-1 蛋白在 CdCl<sub>2</sub> 处理的 TM3 细胞中被显著诱导表达,并且随着 CdCl<sub>2</sub> 处理时间的增加,这种诱导的作用更加明显(图 3B) ( $F = 588.70, P < 0.01$ ); TM3 细胞中 HO-2 蛋白的表达量与其被 CdCl<sub>2</sub> 染毒前后无明显相关(图 3C)。

## 3 讨论

睾丸间质细胞是睾丸中的内分泌细胞,其主要功能是合成和分泌睾酮。睾酮对男性正常生殖功能的维系尤为重要。动物体内研究<sup>[6]</sup>结果表明,镉能够损害睾丸发育,减少精子发生,其可能与镉抑制睾酮的合成和分泌有关。本课题组采用 TM3 细胞的体外研究表明,镉处理组 TM3 细胞的睾酮含量明显低于对照组,提示其能抑制 TM3 细胞中睾酮的分泌。

图2 CdCl<sub>2</sub> 处理后 TM3 细胞抗氧化相关酶 mRNA 的表达A: SOD1; B: SOD2; C: SOD3; D: GSH-Px; E: CAT; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 图3 CdCl<sub>2</sub> 处理后对 TM3 细胞 HO-1 和 HO-2 表达的影响A: HO-1 mRNA; B: HO-1; C: HO-2; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 4 h 组比较: ##  $P < 0.01$ 

和合成。

许多研究已表明,氧化应激在镉引起的雄性生殖毒性中发挥重要作用。SOD 在机体暴露于氧化应激时可被迅速诱导,能催化超氧化物自由基歧化(或分配)成分子氧和过氧化氢。CAT 是绝大部分需氧生物体中的常见酶,可以将过氧化氢分解成分子氧和水,保护细胞免受氧化损伤<sup>[8]</sup>。在大量研究中,当生物体遭受环境化学物质诱导的氧化应激时,SOD 和 CAT 的活性及其基因的转录会发生改变<sup>[9]</sup>。除 SOD 和 CAT 以外,谷胱甘肽(GSH)是动物中最重要的硫醇化合物,可以保护细胞避免其受氧化损伤<sup>[10]</sup>。本研究显示,镉处理组的 TM3 细胞 SOD1、SOD2、SOD3、GSH-Px 和 CAT mRNA 表达降低。提示镉抑制 TM3 细胞抗氧化酶的表达,使其发生氧化应激并造成损伤,并可能损害其睾酮合成的功能。

HO-1 由 HMOX1 编码,是一种能将血红素降解成一氧化碳(CO),亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )和胆绿素并具有抗凋亡和抗炎的细胞保护性酶,参与各种病理生理过程<sup>[11]</sup>。许多研究提出,HO 系统的活性能提供细胞保护来抵抗氧化应激。HO-1 为诱导型酶,正常情况下体内表达很低,但在应激或炎症发生等情况下,HO-1 被诱导表达以维持机体的内环境稳态<sup>[12-13]</sup>。值得注意的是,HO-1 的诱导并不全是对机体有益的。有研究<sup>[14]</sup>表明 HO-1 的过表达可导致体外和体内模型中的肌肉损伤,导致骨骼肌萎缩,且 HO-1 的缺乏明显减轻了肌肉萎缩。在睾丸组织中,HO-1 在睾丸间质细胞中仅少量表达,而镉应激诱导 TM3 细胞 HO-1 大量表达,提示其可能在其致睾丸的生殖毒性中发挥作用。在 MA-10 Leydig 肿瘤细胞中,HO 同工酶降低了类固醇合成急性调节蛋白

水平,并且氯化血红素处理抑制了胆固醇向孕烯醇酮的转化<sup>[3]</sup>。本研究结果表明,HO-1 在镉诱导的 TM3 细胞中明显表达并可能参与了睾酮分泌的抑制过程。

### 参考文献

- [1] Wu H M, Lin-Tan D T, Wang M L, et al. Cadmium level in seminal plasma may affect the pregnancy rate for patients undergoing infertility evaluation and treatment [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25(4): 481–4.
- [2] El-Demerdash F M, Yousef M I, Kedwany F S, et al. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 1563–71.
- [3] Monsefi M, Alaei S, Moradshahi A, et al. Cadmium - induced infertility in male mice [J]. *Environ Toxicol*, 2010, 25(1): 94–102.
- [4] Traish A M, Goldstein I, Kim N N. Testosterone and erectile function: from basic research to a new clinical paradigm for managing men with androgen insufficiency and erectile dysfunction [J]. *Eur Urol*, 2007, 52(1): 54–70.
- [5] 朱文祥,刘洪茂,穆柯瀚,等. 镉对小鼠睾丸间质细胞睾酮合成的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 100–4.
- [6] Ji Y L, Wang H, Liu P, et al. Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, 29(2): 176–83.
- [7] Khanna S, Mitra S, Lakhera P C, et al. N-acetylcysteine effectively mitigates cadmium-induced oxidative damage and cell death in Leydig cells *in vitro* [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2016, 39(1): 74–80.
- [8] Chelikani P, Fita I, Loewen P C. Diversity of structures and properties among catalases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 192–208.
- [9] Miao W, Jin Y, Lin X, et al. Differential expression of the main polycyclic aromatic hydrocarbon responsive genes in the extrahepatic tissues of mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37: 885–94.
- [10] Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants [J]. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2017, 14(2): 209–16.
- [11] Podkalicka P, Mucha O, Józkowicz A, et al. Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and targets [J]. *Wspolczesna-Onkol*, 2018, 22(1): 23–32.
- [12] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221–47.
- [13] Soares M P, Bach F H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(2): 50–8.
- [14] Kang J, Jeong M G, Oh S, et al. A FoxO1-dependent, but NRF2-independent induction of heme oxygenase-1 during muscle atrophy [J]. *FEBS Letters*, 2016, 588(1): 79–85.
- [15] Piotrkowski B, Monz N C M, Pagotto R M, et al. Effects of heme oxygenase isozymes on Leydig cells steroidogenesis [J]. *J Endocrinol*, 2009, 203(1): 155–65.

## Effects of oxidative stress on cadmium-inhibited testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells

Zhu Wenxiang, Liu Biyong, Liu Hongmao, et al

(School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effects of oxidative stress on testosterone biosynthesis inhibited by cadmium in mouse Leydig cells. **Methods** TM3 cells were treated with 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ , and collected the cell and the culture supernatant fluid in 4 h and 8 h after  $\text{CdCl}_2$  exposure. Testosterone was detected by ELISA assay. The expression of heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase 2 (SOD2), superoxide dismutase 3 (SOD3), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) mRNA were detected by RT-PCR. The expression levels of HO-1 and heme oxygenase-2 (HO-2) proteins were examined by Western blot. **Results** TM3 cells were incubated with 20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  for 4 h or 8 h. The testosterone levels in the culture supernatant fluid were significantly lower in Cd-exposure groups ( $P < 0.01$ ) than that in the control group. The mRNA expression of SOD1, SOD2, SOD3, GSH-Px and CAT were all decreased compared with the control group. Cadmium up-regulated significantly the expression of HO-1 mRNA in TM3 cells ( $P < 0.01$ ). Correspondingly, the protein expression of HO-1 was increased markedly in time-effect course in Cd-exposure group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Cadmium inhibits the synthesis of testosterone in TM3 cells, and oxidative stress may play an important role of testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells.

**Key words** cadmium; Leydig cells; oxidative stress; testosterone