

网络出版时间: 2018-1-8 11:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.021.html>

◇预防医学研究◇

镉对小鼠睾丸间质细胞睾酮合成的影响

朱文祥¹, 刘洪茂², 穆柯瀚², 姬艳丽^{1,2}, 徐德祥³

摘要 目的 探讨镉对小鼠睾丸间质细胞睾酮合成的影响。方法 镉处理组采用 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CdCl_2 处理 TM3 细胞, 分别在加入 CdCl_2 4 h 和 8 h 后收集细胞上清液, 对照组 TM3 细胞给予等容积磷酸盐缓冲液(DPBS)。采用 ELISA 法测定细胞上清液中睾酮含量, 采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测睾酮合成关键酶 mRNA 和蛋白表达水平。结果 镉处理组细胞上清液中睾酮含量明显降低($P < 0.01$)。与对照组相比, 镉显著下调 TM3 细胞类固醇激素合成急性调控蛋白(StAR)、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(P450scc) 与 17β -羟类固醇脱氢酶(17β -HSD) mRNA 表达($P < 0.01$), 镉处理组 TM3 细胞 StAR、P450scc、细胞色素 P450_{17 α} -羟化酶(P450_{17 α})、3 β -HSD 与 17β -HSD 的蛋白表达水平也明显降低, 与对照组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 镉抑制小鼠睾丸间质细胞睾酮的分泌, 其原因可能与镉抑制间质细胞部分睾酮合成关键酶 mRNA 和蛋白表达水平有关。

关键词 镉; 睾丸间质细胞; 睾酮; 睾酮合成

中图分类号 R 994.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)01-0100-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.021

镉的男(雄)性生殖毒性作用已经受到越来越多的关注。该课题组前期研究^[1]显示, 非职业人群中男性精液镉浓度与精子质量呈明显负相关性。目前更多的研究^[2-3]证实了这一结论, 即精浆中镉浓度与精子浓度及精子活力呈负相关性, 与畸形精子百分比呈正相关性, 甚至精液中很低浓度的镉都可能通过降低精子质量而引起男性不育。动物实验进一步证明: 镉能够诱导成年雄性大鼠或小鼠出现明显的睾丸损伤、精子数量减少、精子活力下降甚至不

2017-10-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31571557); 2016 年高校优秀中青年骨干人才国外访学研修重点项目(编号: gxfxZD2016039); 安徽医科大学“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¹ 卫生检验与检疫学系, ² 劳动卫生与环境卫生学系, ³ 卫生毒理学系, 合肥 230032

作者简介: 朱文祥, 男, 硕士研究生;

姬艳丽, 女, 博士研究生, 责任作者, E-mail: jiyanlidev@

126.com

育^[4-5]。该课题组前期体内研究结果^[6]也表明, 青春期镉处理能够损害睾丸发育, 抑制睾酮合成。但目前对镉抑制睾酮合成的分子机制尚未阐明。

睾酮是重要的雄激素之一, 主要由睾丸间质细胞合成分泌。该文以小鼠睾丸间质细胞系 TM3 细胞为研究对象, 探讨镉对 TM3 细胞睾酮合成的影响及可能的分子机制, 为科学地评价镉对男(雄)性生殖系统的毒性作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂 氯化镉(CdCl_2) 购自美国 Sigma 公司; 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自美国 Millipore 公司; 化学发光显影试剂盒、细胞培养箱购自美国 Thermo 公司; β -actin、类固醇激素合成急性调控蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(P450 side-chain cleavage enzyme, P450scc)、3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -HSD)、细胞色素 P450_{17 α} -羟化酶(P450_{17 α} -hydroxylase enzyme, P450_{17 α})、 17β -HSD 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 睾酮 ELISA 测定试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司; 18S、StAR、P450scc 和 17β -HSD 特异性引物由上海生工生物工程技术服务公司合成; 等容积磷酸盐缓冲液(dulbecco phosphate-buffered saline, DPBS) 及 DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司; 胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液、马血清及胎牛血清购自江苏碧云天生物技术有限公司; 细胞培养瓶、培养皿和培养板购自美国 Corning 公司; 光学倒置显微镜购自德国 OLYMPUS 公司; 多规格制胶玻璃板、电泳仪和转膜仪购自北京六一生物科技有限公司; Tanon 全自动化学发光显影仪及 Tanon 全自动化学发光图像分析系统购自上海天能科技有限公司; 罗氏 Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 仪及 PCR 仪统计分析软件购自瑞士 Roch 公司; 小鼠睾丸间质细胞系 TM3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 细胞培养和处理 TM3 细胞在 75 cm^2 培养瓶

中贴壁培养,DMEM/F12 培养基含 5% 灭活胎牛血清、2.5% 灭活马血清以及 1% 青霉素 - 链霉素溶液,放到恒温环境 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养加样器接种细胞于 96 孔板中,每板分为 3 组,每组 10 孔,每孔 100 μ l(约 10⁴ 个细胞), 外围一圈孔加 DPBS 或培养液保湿,将 96 孔板置于恒温 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 18 h 后开始染毒,CdCl₂ 染毒剂量为 20 μ mol/L, 对照组加相应体积的 DPBS, 4 h 后收细胞上清液即为镉处理 4 h 组, 再过 4 h 后收对照组和镉处理 8 h 组的细胞上清液, 此处收集的细胞上清液用于 ELISA 实验; 加样器接种细胞于 6 个 90 mm 培养皿中, 每个皿加 10 ml 细胞悬液, 每组 2 个皿的细胞, 置于恒温 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h, 然后更换培养基培养液开始染毒,CdCl₂ 染毒剂量为 20 μ mol/L, 对照组加相应体积的 DPBS 缓冲液, 4 h 后收细胞即为镉处理 4 h 组, 再过 4 h 后收对照组和镉处理 8 h 组的细胞, 此处收集的细胞用于 Western blot 实验; 加样器接种细胞于 12 个 25 cm² 培养瓶中, 每组 4 瓶, 每瓶加 10 ml 细胞悬液, 置于恒温 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h, 待细胞长满后开始染毒 8 h 组和对照组,CdCl₂ 染毒剂量为 20 μ mol/L, 对照组加相应体积的 DPBS 缓冲液, 4 h 后收细胞为镉处理 4 h 组, 再过 4 h 后收对照组和镉处理 8 h 组的细胞, 此处收集的细胞用于 RT-PCR 实验。

1.3 ELISA 法测定细胞上清液中睾酮含量 20 μ mol/L CdCl₂ 处理不同时间(4、8 h) 后收集细胞培养液, 低速常温离心机 1 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液, 置于 -20 °C 冰箱中储存待用。用 ELISA 试剂盒检测细胞上清液中睾酮的含量。具体操作步骤为: 先把睾酮试剂盒从 4 °C 冰箱中取出, 使用前先室温平衡 20 min, 从铝箔袋中取出所需的板条; 20 × 洗涤缓冲液稀释成 1 × 洗涤缓冲液以备使用。在样品孔中加入 10 μ l 细胞上清液和 40 μ l 稀释液; 标准品孔分别加入不同浓度(0、50、100、200、400、800 pg/ml) 的标准品 50 μ l; 空白孔不加。在每个孔中都加入辣根过氧化物酶标记的抗体 100 μ l(除空白孔外), 用封板膜将反应孔封住, 放入 37 °C 恒温箱中孵育 60 min。倒去反应液体, 在干燥的吸水纸上把液体拍干; 在每个孔中再加入 200 μ l 洗涤液洗涤, 如此重复洗涤 5 次; 每孔中分别加入 50 μ l 的底物 A 液和 50 μ l 的底物 B 液, 放入 37 °C 恒温箱中避光孵育 15 min。反应结束后, 在每孔中分别加入 50 μ l 的终止液, 混匀, 利用底物四甲基联苯胺与辣根过氧

化物酶发生反应而呈现蓝色, 再加入终止液, 在酸的作用下最终转变为黄色。反应颜色的深浅程度和细胞上清液中睾酮的含量呈线性关系。在 15 min 内, 用酶标仪(波长 450 nm) 测量各孔的吸光度值, 重复测量 3 次, 每孔的吸光度值取 3 次测量的平均值。在 Excel 表中, 以标准品的浓度作为横坐标, 对应标准品的吸光度值作为纵坐标, 绘制出标准品的标准曲线, 按照曲线方程计算各孔中细胞上清液睾酮的含量。

1.4 RT-PCR 反应 20 μ mol/L CdCl₂ 处理不同时间(4、8 h) 后收集细胞, 倒去培养瓶中的培养液, 用 DPBS 将瓶中的细胞洗 2 ~ 3 遍, 用 TRIzol 裂解液提取细胞总 RNA, 随后用 AMV 法对细胞样品 RNA 进行逆转录, 逆转录合成 cDNA, 置于 -20 °C 或 -80 °C 冰箱中储存待用。扩增反应使用 LightCycler® 480 PCR 仪, 扩增条件为: 95 °C 预变性 10 min, 然后按 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 30 s 的程序进行 45 次循环反应^[7]。末次循环后, 在电脑上进行溶解曲线分析以检测 cDNA 的含量, 按 2^{-ΔΔCT} 法计算目标基因相对比值, 用 18 S 作为实验的内对照。本实验扩增所使用的引物序列如下所示: 18 S 的正向引物: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3'; 反向引物: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'; StAR 的正向引物: 5'-TGTCAAGGAGATCAAGGTCTG-3'; 反向引物: 5'-CGATAGGACCTGGTTGATGAT-3'; P450_{scc} 的正向引物: 5'-AGGTGTAGCTCAGGACT-TCA-3'; 反向引物: 5'-AGGAGGCTATAAAGGACACC-3'; 17 $β$ -HSD 的正向引物: 5'- ATTITACCA-GAGAAGACATCT-3'; 反向引物: 5'- GGGTCAG-CACCTGAATAATG-3'。

1.5 Western blot 检测相关蛋白的表达 20 μ mol/L CdCl₂ 处理不同时间(4、8 h) 后收集细胞, 倒去培养瓶中的培养液, 用 DPBS 将瓶中的细胞洗 2 ~ 3 遍, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 浓度测定试剂盒进行蛋白定量。每孔上 10 ~ 20 μ g 蛋白, 进行垂直电泳(浓缩胶电压 50 V、1 h, 分离胶电压 100 V、1.5 h), 再以平行电泳(电流 200 mA、3.5 h 左右) 的方式将凝胶中的细胞蛋白转移到 PVDF 膜上。转移有蛋白的 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶中 4 °C 封闭过夜。PVDF 膜分别用一抗($β$ -actin: 1 : 4 000, StAR: 1 : 11 000, P450_{scc}: 1 : 1 000, P450_{17α}: 1 : 1 000, 17 $β$ -HSD: 1 : 1 000, 3 $β$ -HSD: 1 : 1 000) 室温孵育 2 ~ 3 h。洗涤后的 PVDF 膜用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG($β$ -actin: 1 : 40 000)、山

羊抗兔 IgG (P450_{17α}: 1:60 000, 17β-HSD: 1:80 000 和 StAR: 1:1 100 000) 以及兔抗山羊 IgG (P450_{SCC}: 1:60 000 及 3β-HSD: 1:120 000) 于摇床上室温孵育 1~2 h。采用 Tanon 化学发光显影仪检测蛋白的表达水平, 采用 Tanon 全自动化学发光图像分析系统分析目的蛋白的灰度值与内参蛋白的灰度值, 目的蛋白的相对表达量的计算公式为: 目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白的灰度值/内参蛋白的灰度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验各组之间的差异有无统计学意义, 组间比较采用比较用 Q 检验 (students-newman-keuls, SNK), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。

2 结果

2.1 镉抑制 TM3 细胞睾酮分泌 为研究镉对 TM3 细胞睾酮分泌的影响, TM3 细胞被给予 20 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂, 分别在加入 CdCl₂ 4 h 和 8 h 后收集细胞上清液, 采用 ELISA 法测定细胞上清液中睾酮含量。实验结果显示: 镉处理 4 h 组和 8 h 组细胞上清液中睾酮含量分别为 (383.3 ± 9.2)、(367.4 ± 6.1) pg/ml, 明显低于对照组睾酮含量 (463.9 ± 13.4) pg/ml ($F = 87.96$, $P < 0.01$)。见图 1。

2.2 镉对 TM3 细胞睾酮合成关键酶 mRNA 表达的影响 为探讨镉处理对 TM3 细胞睾酮合成关键酶 mRNA 表达的影响, TM3 细胞被给予 20 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂, 分别在加入 CdCl₂ 4 h 和 8 h 后收集细胞, 采用 RT-PCR 法检测睾酮合成关键酶 mRNA 表达水平。结果显示, 镉处理组 StAR、P450_{SCC} 与 17β-HSD mRNA 的表达水平均呈下降趋势 (图 2), 镉处理 4 h 组和 8 h 组 StAR、P450_{SCC} 与 17β-HSD mRNA 的表达

水平与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($F = 18.86, 50.34, 6.20$, $P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$)。

2.3 镉对 TM3 细胞睾酮合成关键酶蛋白表达的影响 为探讨镉对 TM3 细胞睾酮合成通路关键酶蛋白表达的影响, TM3 细胞被给予 20 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂, 分别在加入 CdCl₂ 4 h 和 8 h 后收集细胞, 采用 Western blot 法检测睾酮合成关键酶蛋白的表达水平。结果显示: 与对照组相比, 镉明显抑制 TM3 细胞 StAR、P450_{SCC} 与 P450_{17α} 的蛋白表达, 并且随镉处理时间的延长, 抑制作用更加明显 ($F = 180.86$, $P < 0.01$; $F = 22.34$, $P < 0.01$; $F = 46.87$, $P < 0.01$) (图 3A、B、D)。此外, 镉处理 4 h 组和 8 h 组 TM3 细胞 3β-HSD 与 17β-HSD 的蛋白表达水平也明显降低 ($F = 36.91, 92.34$, $P < 0.01$) (图 3C、E)。

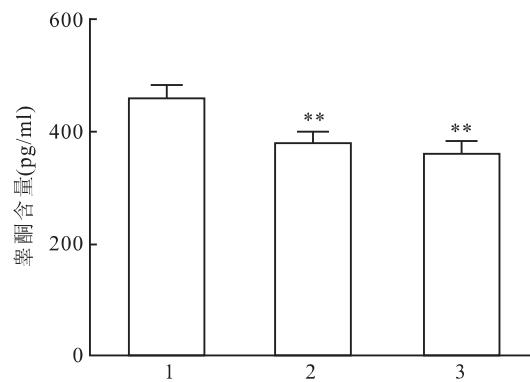


图 1 CdCl₂ 对 TM3 细胞睾酮分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

1: 对照组; 2: 镉处理 4 h 组; 3: 镉处理 8 h 组; 与对照组比较:
** $P < 0.01$

3 讨论

睾酮属于类固醇激素, 主要由睾丸间质细胞合成和分泌^[8], 是雄激素的一种。睾酮对雄性生殖系

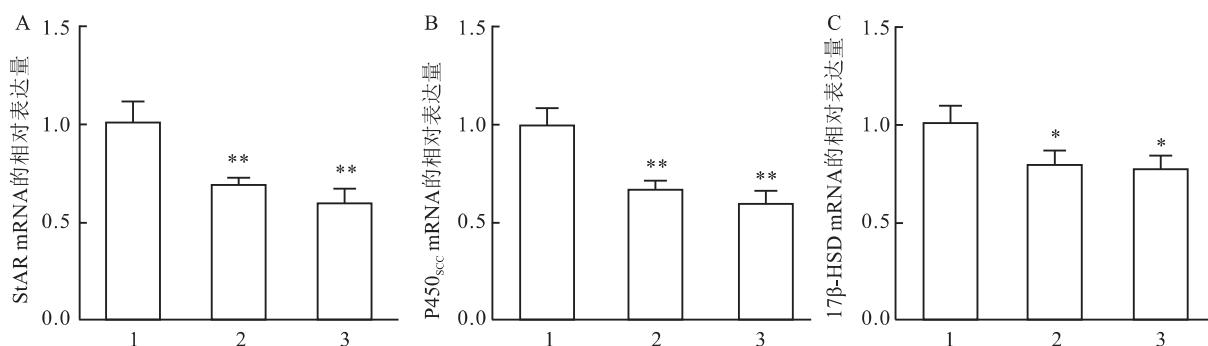
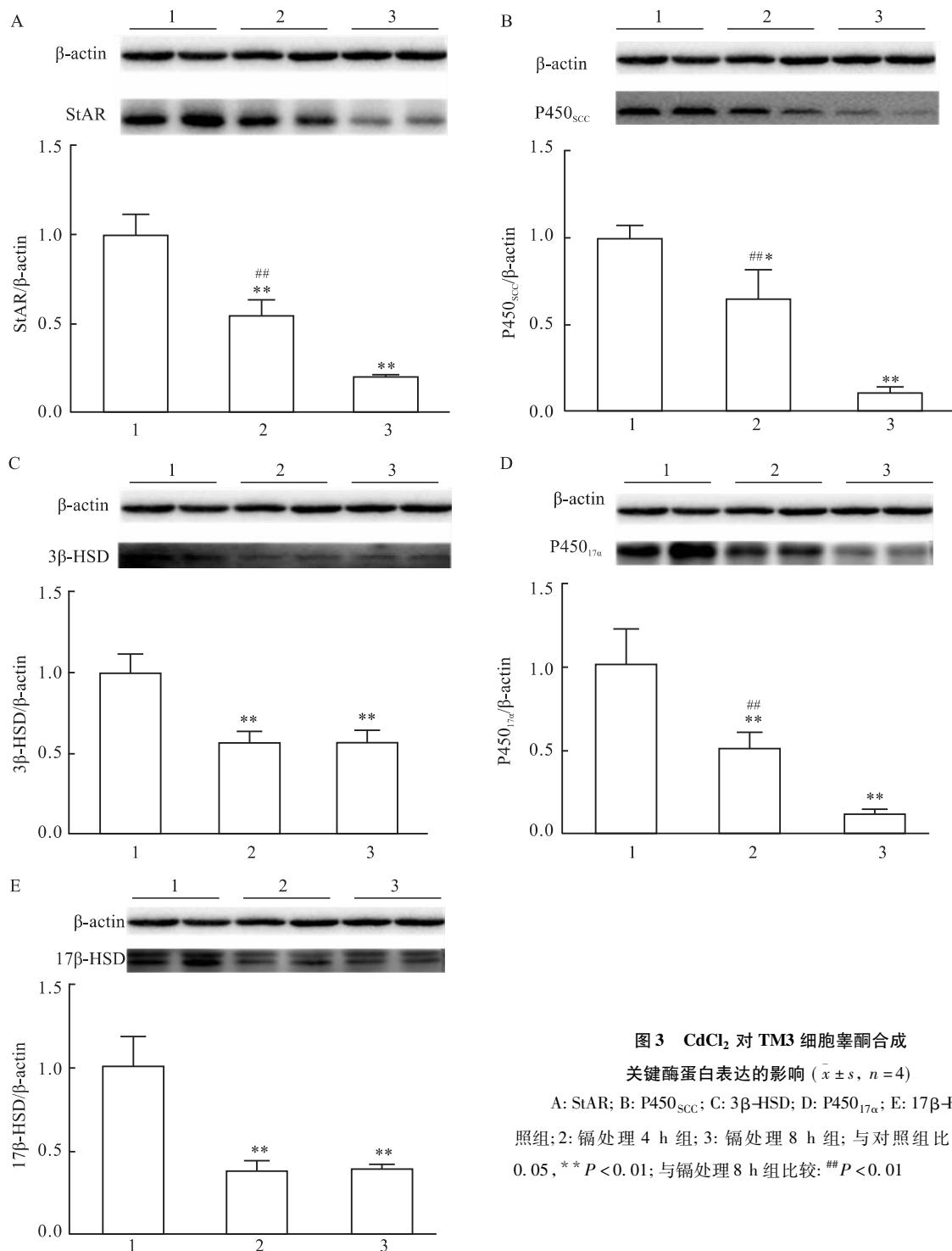


图 2 CdCl₂ 对 TM3 细胞睾酮合成关键酶 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

A: StAR; B: P450_{SCC}; C: 17β-HSD; 1: 对照组; 2: 镉处理 4 h 组; 3: 镉处理 8 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 CdCl₂ 对 TM3 细胞睾酮合成关键酶蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

A: StAR; B: P450_{SCC}; C: 3β-HSD; D: P450_{17α}; E: 17β-HSD; 1: 对照组; 2: 镉处理 4 h 组; 3: 镉处理 8 h 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与镉处理 8 h 组比较: ## $P < 0.01$

统的生长发育起至关重要的作用,如刺激雄性外生殖器官及内生殖器官发育成熟,促进精子的生成和发育,维持雄性第二性征等。本课题组体内研究^[6]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。本研究结果表明,镉处理组 TM3 细胞睾酮含量明显低于对照组,提示镉能抑制小鼠睾丸间质细胞合成和分泌睾

酮。

睾丸间质细胞在合成睾酮时要经过一系列酶促反应:首先胆固醇通过位于睾丸间质细胞线粒体外膜上的线粒体外膜上 StAR 转运至线粒体内膜;在线粒体内膜细胞色素 P450_{SCC} 的催化下,胆固醇被转化为孕烯醇酮;后者被转运至滑面内质网,一方面在 3β-HSD 作用下被转化为睾酮,另一方面其被

P450_{17α} 催化为 17-羟孕酮和雄烯二酮; 最后雄烯二酮在 17β-HSD 作用下生成睾酮。外源化学物影响上述任一环节均可能对睾酮合成和分泌产生损害作用。本实验研究了镉处理对 TM3 细胞睾酮合成关键酶的影响。实验结果表明, 镉处理组 TM3 细胞的 StAR、P450scc、3β-HSD、P450_{17α} 和 17β-HSD 蛋白的表达水平与对照组比降低, 且镉处理组 TM3 细胞的 StAR、P450scc 和 17β-HSD mRNA 的表达水平与对照组比也降低。

综上所述, 镉处理可能抑制了 TM3 细胞睾酮合成通路中关键酶 mRNA 和蛋白的合成, 直接造成睾酮的分泌降低, 睾酮分泌的减少又会影响到男(雄)性的生育功能。然而目前对镉通过何种分子机制下调睾酮合成酶 mRNA 和蛋白的表达进而抑制睾酮合成仍不清楚, 尚需要开展进一步的研究。

参考文献

- [1] Xu D X, Shen H M, Zhu Q X, et al. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma [J]. *Environ Toxicol*, 2010, 25(1): 94–102.
- [2] Rani A, Kumar A, Lal A, et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review [J]. *Int J Environ Health Res*, 2014, 24(4): 378–99.
- [3] Pant N, Kumar G, Upadhyay A D, et al. Correlation between lead and cadmium concentration and semen quality [J]. *Andrologia*, 2015, 47(8): 887–91.
- [4] Siu E R, Mruk D D, Porto C S, et al. Cadmium-induced testicular injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238(3): 240–9.
- [5] Monsefi M, Alaei S, Moradshahi A, et al. Cadmium-induced infertility in male mice [J]. *Environ Toxicol*, 2010, 25(1): 94–102.
- [6] Ji Y L, Wang H, Zhao X F, et al. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 124(2): 446–59.
- [7] 冷银芝, 李应配, 罗时猛, 等. 双酚 A 对小鼠 3T3-L1 前脂细胞分化的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(9): 1281–5.
- [8] Chen H, Ge R S, Zirkin B R. Leydig cells: From stem cells to aging [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 306(1–2): 9–16.

Effects of cadmium on testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells

Zhu Wenxiang¹, Liu Hongmao², Mu Kehan², et al

(¹Dept of Inspection and Quarantine Health, ²Dept of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effects of cadmium on testosterone biosynthesis in mouse testicular Leydig cells.

Methods M3 cells (mouse Leydig cell line) TM3 cell in cadmium group were incubated with 20 μmol/L CdCl₂, the cells and the culture supernatant fluid were collected at 4 h and 8 h after cadmium exposure. TM3 cells in the control group were treated with Dulbecco phosphate-buffered saline (DPBS). The testosterone level was measured by ELISA, the mRNA and protein of expression levels of some testosterone biosynthetic enzymes were measured by RT-PCR and Western blot. **Results** Cadmium exposure significantly decreased testosterone level in the culture supernatant fluid ($P < 0.01$). Compared with the control group, Cadmium markedly reduced the mRNA expression levels of steroidogenic acute regulatory protein (StAR), P450 side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}) and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) ($P < 0.01$). Moreover, the protein expression levels of StAR, P450_{scc}, P450_{17α}-hydroxylase enzyme (P450_{17α}) 3β-HSD and 17β-HSD were also downregulated in cadmium group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Cadmium could impair steroidogenesis in mouse Leydig cells, the decreased testosterone might partially contribute to the inhibition to some key enzymes for testosterone biosynthesis.

Key words cadmium; Leydig cell; testosterone; testosterone biosynthesis