论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1752-03

氟他胺致胚胎期雄性大鼠睾丸毒性的基因表达谱的研究

李 岩[1],张 浩[2],吴德生[2] ([1]遵义医学院预防医学教研室,遵义 563003;[2]四川大学华西公共卫生学院环境卫生学教研室,成都 610041)

提 要:目的 利用基因芯片技术研究雄激素干扰物氟他胺睾丸毒性效应的分子机制。**方法** 对F0亲代母鼠于孕12~17 d皮下注射染毒,于胚胎期20 d解剖孕鼠,取出实验组与对照组雄性胎鼠睾丸,提取mRNA,分别用Cy5和Cy3探针逆转录标记,与Rat 12KcDNA表达谱芯片杂交,荧光扫描分析;另将出生第2天的雄性子代断颈取血清,用睾酮试剂盒测定激素水平。**结果** 芯片结果显示实验组差异表达基因共31条,其中下调基因14条,已知功能基因9条;上调基因17条,已知功能基因7条;一共16条差异表达基因与睾丸组织功能及发育密切相关;且检测睾酮激素水平下降。**结论** 基因芯片技术能够为我们在分子水平上提供氟他胺对胚胎期雄性大鼠睾丸毒性损伤机制的线索。

关键词:氟他胺;睾丸;基因芯片

中图法分类号:R12;R322.64;R994.6 **文献标识码**:A

Gene expression profiles of toxicated fetal rat testis exposed to flutamide

LI Yan[1], ZHANG Hao[2], WU De-sheng[2] ([1]Department of Preventive Medicine; Zunyi Medical College, Zunyi 563003; [2]Department of Environmental Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To study the toxic effect of flutamide (Flu) on testis with DNA chip. Methods Flu was injected subcutaneously at doses of 6.25 mg·kg^{-1}·d^{-1} to 25 F0 rats from gestation day (GD) 12 to 17, and the 25 rats of control group received same doses of normal saline. All 50 pregnant SD rats were sacrificed on GD 20. The cDNA were extracted respectively from fetal testis, then reversely transcribed to cDNA and labeled with cy5 and cy3 fluorescence. Subsequently, cDNA probes were hybridized to the Mouse40S cDNA microarray and fluorescence signals were analyzed. Testosterone level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results Compared with control, a total of 31 identified gene was found to be expressed differently, including 14 down-regulated and 17 up-regulated. Among them, 5 down-regulated and 10 up-regulated genes were unknown in Genbank. ELISA indicated that testosterone levels were decreased in Flu toxic group. **Conclusion** Flu treatment to F0 pregnant rats can damage apparently to the reproductive development of embryonic period male SD rats. The obtained differential genes may provide reference for the molecular mechanism of reproductive development.

Key words: flutamide; testis; DNA chip

环境内分泌干扰物所造成的环境污染是相继煤炭、石油燃料和汽车尾气污染后的第3代新的环境污染物,它对动物和人类的潜在影响和危害,已经日益受到人们的高度关注。近年来的研究表明,环境雄激素干扰物对雄性的生殖发育影响较大[1]。因此,研究胚胎期(gestation days, GD)生殖系统的抗雄激素干扰效应及基因表达谱的改变,对于生殖发育毒效应机制的探索有着重大的意义。本实验研究采用胚胎期20 d大鼠睾丸组织样本,应用基因芯片技术,研究雄激素干扰物氟他胺(flutamide,Flu)对发育睾丸的芯片表达谱改变的影响,从基因水平上探索Flu引起生殖发育毒性的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠130只,雌性90只,雄性40只,体质量230

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30030120);纽约中华医学会资助(2005)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30030120) and Chinese Medical Association of New York (2005)

作者简介:李 岩(1969-),男,湖南省邵阳市人,博士研究生,副教授,主要从事环境毒物的生殖发育毒理方面的研究。电话:(0852)8609551,E-mail:liyan067321@sina.com

通讯作者:吴德生,电话:(028)85540064

收稿日期:2007-01-15;修回日期:2007-03-19

~250 g,由四川大学实验动物中心提供。

1.2　实验方法

1.2.1　剂量分组与染毒　　将 SD 大鼠按雌雄 2∶1合笼交配,次日清晨对雌性大鼠进行阴道涂片检查精子,确定受孕母鼠,为妊娠第 0 天。做基因芯片检测的动物随机分为生理盐水对照组和 Flu 实验组,两组各 25 只孕鼠,从孕 12 ~ 17 d 连续 6 d 每天 8:00 腹部皮下分别注射等量的生理盐水和用生理盐水配制的 Flu 染毒液。做睾酮(testosterone, T)激素水平检测的动物随机分为 1 个生理盐水对照组和 6 个 Flu 实验组,Flu 剂量分别为 4 492.2、4 882.8、5 273.4、5 664.0、6 054.6、6 250 μg/kg,每组 5 只孕鼠,染毒方法同上。

1.2.2　样本采集　　于胚胎期 20 d,解剖 Flu 实验组(6 250 μg/kg)和生理盐水对照组各 25 只孕鼠,在无菌操作台上利用解剖显微镜迅速取出雄性仔鼠双侧睾丸(每个睾丸质量约为1 mg),将之分别放在标记的 RNA 保存液的冻存管中,液氮冻存。样本组织 mRNA 提取和纯化采用美国 Clontech 公司试剂盒。实验组和对照组样本 mRNA 提取质量鉴定各项指标符合实验要求,且 mRNA 与芯片杂交的量以 1 μg 的 mRNA 反转录标记可以得到 30 pmol 左右的荧光探针为标准。另将出生后第 2 天 6 个不同剂量组和生理盐水对照组的 F1 雄性子代断颈取血清,用睾酮试剂盒测定睾酮激素水平。

1.2.3　睾酮激素水平的检测　　用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测不同剂量组睾酮激素水平,具体方法详见说明书。

1.2.4　基因表达谱芯片检测　　Rat 12KcDNA 基因表达谱芯片由上海生物芯片有限公司提供,并用其公司产的探针标记杂交试剂盒,将对照组和 Flu 组 mRNA 分别用 Cy3 和 Cy5 逆转录标记。与该公司生产的 Rat 12KcDNA 表达谱芯片杂交,采用激光共聚焦 Agilent 扫描仪检测。筛选标准以实验组/对照组(Cy5/Cy3)荧光强度比值 >2 判定为基因表达上调,<0.5 为基因表达下调。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验和相关分析。

2　结果

2.1　睾酮激素水平的测定

Flu 各染毒组与对照组做两样本均数比较,除最大无作用剂量 4 492.2 μg/kg 外,其余各剂量组均与对照组有统计学差异(表 1,$P<0.05$)。经直线相关分析,睾酮浓度与 Flu 染毒剂量之间的相关系数 $r = -0.780\ 2$,$t = 2.788\ 7$,$P<0.05$。说明睾酮浓度与 Flu 染毒剂量之间呈负相关,两者具有剂量效应关系。

表 1　不同剂量组出生后第 2 天睾酮浓度的比较

组别	雄性仔鼠	睾酮(ng/ml)
生理盐水对照组	10	2.936 ±0.110
Flu 组(μg/kg)		
4 492.2	10	2.875 ±0.213
4 882.8	10	2.027 ±0.125[a]
5 273.4	10	1.673 ±0.057[a]
5 664.0	10	1.081 ±0.101[a]
6 054.6	10	0.792 ±0.265[a]
6 250.0	10	0.676 ±0.031[a]

a: $P<0.01$,与对照组比较

2.2　对照组与实验组信号强度数据散点图

图 1 中 X、Y 轴分别代表 Cy3 和 Cy5 的荧光强度值,每 1 个数据点代表芯片上 1 个基因点的杂交信号。大多数的点在 Y 值与 X 值的比值(0.5 ~ 2)范围之内,只有少量的散点分布在比值范围之外,表明这些散点基因在两组间可能存在差异表达。

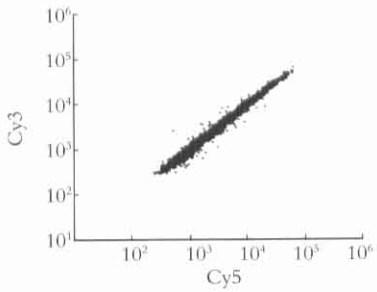


图 1　杂交信号强度散点图

2.3　已知功能的差异表达基因

表 2 结果显示:实验组与对照组比较,有 9 条基因下调(即 Cy5/Cy3 <0.5),有 7 条基因上调(即 Cy5/Cy3 >2.0)。另未知功能差异表达下调基因 5 条与上调基因 10 条并未列出。

表 2　已知功能的差异表达基因

基因库号	名称	比值
NM_032613	LIM 和 SH3 结构域蛋白因子 1	0.447
NM_015766	EB 病毒诱导基因 3	0.483
J05156	细胞色素 P450 侧链裂解酶	0.473
AK007561	肉毒菌酶解物因子 2	0.377
AW521361	YY1 转录因子	0.479
L12458	溶菌酶基因	0.473
L12459	溶菌酶外显子 1-4 亚型基因	0.451
NM_031682	17β-羟基类固醇脱氢酶	0.490
XM_124440	类似钙结合蛋白因子 1	0.452
NM_031971	热休克蛋白 70-1	4.629
Z75029	热休克蛋白 70-2	2.054
NM_021740	α 前胸腺素	4.282
NM_022179	己糖激酶 3	2.06
NM_030995	微管相关蛋白因子 1	2.017
AJ428514	完整线粒体基因组	7.871
NM_031108	核糖体蛋白因子 9	2.676

3　讨论

目前,对于 Flu 是否会在胚胎期干扰生殖系统的发育还缺乏足够的证据,特别是胚胎期生殖系统正处在分化、增殖的关键时期,哪些基因表达会受到 Flu 的影响? 这些有功能差异表达的基因是否会干扰类固醇

代谢？或通过其他的方式干扰生殖系统的正常发育，引起生殖发育的永久性损伤？基于此目的，我们利用基因芯片技术针对胚胎期 20 d 的睾丸组织样本进行检测，观察 Flu 对睾丸早期发育整体基因表达水平的影响，为今后的环境内分泌干扰物对生殖发育毒性的机制研究提供有价值的线索。现将主要的已知功能差异表达基因进行分类讨论。

3.1 Flu 对类固醇代谢相关的基因的影响

在睾酮生成过程中，细胞色素 P450 侧链裂解酶（cholesterol side-chain cleavage enzyme，P450scc）主要催化胆固醇生成孕烯醇酮这一反应，该反应是限速步骤，为关键酶，P450scc 基因下调，影响了间质细胞合成睾酮的第一步。Tsai 等[2]研究证实了 P450scc 活性降低导致合成睾酮水平下降。另在 Schafers 等的研究中表明，大鼠胚胎期间质细胞中 17β-羟基类固醇脱氢酶[hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10，17β-HSD]具有较高的活性。因而两类固醇代谢合成酶活性降低，将导致睾酮分泌不足。实验结果显示，睾酮浓度与 Flu 染毒剂量之间的相关系数为 -0.780 2，经 t 检验，$P<0.05$，具有剂量效应关系。这表明在胚胎期染毒 Flu，能够干扰雄性子代体内睾酮的代谢水平，导致睾酮分泌不足。

3.2 Flu 对细胞凋亡的相关基因的影响

YY1（YY1 transcription factor）、Rac2（RAS-related C3 botulinum substrate 2）基因下调和 α 前胸腺素（prothymosin alpha，Ptma）基因上调。Yao 等[3]实验证明了正常表达的 YY1 能够抑制细胞内 c-Fos、Fas、p53 和 c-myc 等凋亡基因的表达。Carstanjen 等[4]研究证实了 Rac2 可以抑制超氧化物产生，保护细胞不被过氧化物所损伤。Jiang 等[5]研究发现在细胞凋亡形成后能够提高 caspase-9 的活性，而 Ptma 参与抑制细胞凋亡的形成，对 caspase-9 的活性进行负性调控。本次实验结果显示 Flu 不但使睾丸生殖细胞受到超氧化物的袭击，而且促进了睾丸生殖细胞凋亡的发生，影响睾丸的初期发育。

3.3 Flu 对氧化代谢相关的基因的影响

己糖激酶 3（hexokinase 3，Hk3）基因表达上调，提示可能与有氧代谢的 ATP 供能不足有关。完整线粒体基因组（complete mitochondrial genome）上调，提示 Flu 对睾丸生殖细胞在生物氧化链上某些重要酶部分亚基的损伤作用，影响了细胞氧化磷酸化的代谢过程。

3.4 Flu 对信号传递及信号通道相关基因的影响

Vogt 等[6,7]研究证明了 calsyntenin-1 的细胞质区域能结合突触间隙中的 Ca^{2+}。类似钙结合蛋白因子 1 基因下调，提示 Flu 能降低睾丸生殖细胞摄取 Ca^{2+} 的能力，影响了通过 Ca^{2+} 介导的多种信号传递途径。LIM 和 SH3 结构域蛋白因子 1（Lasp1）是指同时含有 LIM 结构域和 SH3 结构域的细胞支架蛋白，Lasp1 借助 LIM 结构域通过对 cAMP 信号传递途径进行调节；借助 SH3 结构域通过 Ras 蛋白的信号传递途径调节酪氨酸激酶介导的信号系统活性。因 Lasp1 下调，提示 Flu 阻碍了 Lasp1 在细胞信号传递、细胞分化和细胞骨架的形成中发挥重要作用。

实验表明，Flu 能够引起睾丸性激素合成下降，并能使睾丸氧化代谢及信号通道的相关基因表达下调或上调，且凋亡增强，表明 Flu 对睾丸的早期发育进行了多方面的干扰。其中主要是通过降低睾丸类固醇代谢合成酶活性，导致 T 分泌不足，从而阻碍了正常的性分化和性发育。

此外，在基因库中登记的 15 条差异表达基因中，有 5 条下调，10 条上调，目前这些基因的功能和定位尚不清楚，因而无法分析其在睾丸发育中的作用机制。我们相信随着这些基因功能的逐步明确，将有助于进一步探讨 Flu 对睾丸生殖发育的损伤机制。

参考文献：

[1] McIntyre B S, Barlow N J, Foster P M. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues[J]. Toxicol Sci, 2001, 62(2): 236-249.

[2] Tsai S C, Lu C C, Lin C S, *et al*. Antisteroidogenic actions of hydrogen peroxide on rat Leydig cells[J]. J Cell Biochem, 2003, 90(6): 1276-1286.

[3] Yao Y L, Yang W M, Seto E. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(17): 5979-5991.

[4] Carstanjen D, Yamauchi A, Koornneef A, *et al*. Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways[J]. J Immunl, 2005, 174(8): 4613-4620.

[5] Jiang X, Kim H E, Shu H, *et al*. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway[J]. Science, 2003, 299(5604): 223-226.

[6] Vogt L, Schrimpf S P, Meskenaite V, *et al*. Calsyntenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(1): 151-166.

[7] 孙黎黎，常 青，梁志青，等. 2，3，7，8-TCCD 对培养乳鼠心肌细胞内游离钙离子浓度影响的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(20)：2048-2050.

（编辑 汪勤俭）