基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0513-03

己烯雌酚干预下围产期小鼠睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达变化

宋晓峰,张德迎,刘 星,吴盛德,邓永继,魏光辉
(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:通过体内、体外实验研究己烯雌酚(Diethylstilbestrol,DES)对 KM 小鼠围产期小鼠睾丸 Leydig 细胞胰岛素样因子 3(Insuliu-like hormone 3,INSL3) mRNA 表达的影响,探讨隐睾发生的可能机制。方法:DES 分别以低、中、高 3 组剂量(1、5、25 μg/L)分别作用于原代培养的胎龄 16 d 小鼠胚胎 Leydig 细胞,应用 RT-PCR 和原位分子杂交技术检测 DES 对睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达水平;DES 分别以低、中、高 3 组剂量[1 μg/(kg·d)、10 μg/(kg·d)、100 μg/(kg·d)]灌胃作用于 GD(Gestation day)12 ~ PND(Postnatal day)3 孕鼠,RT-PCR 检测新生小鼠睾丸 INSL3 mRNA 表达的相对强度,并比较其差异性。结果:DES 改变原代培养的小鼠胚胎 Leydig 细胞和新生小鼠睾丸的形态结构,以中、高剂量组改变尤为明显;体外实验中,DES 中、高剂量组原代 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 表达水平均明显低于对照组($P<0.01$)和 DES 低剂量组($P<0.01$);DES 试验组 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 表达相对强度低于对照组($P<0.01$)。体内实验中,DES 试验组不同时间点的新生鼠睾丸 INSL3 mRNA 表达相对强度均明显低于对照组($P<0.05$,或 $P<0.01$),实验组组间两两比较也有差异($P<0.05$,或 $P<0.01$)。结论:DES 可下调睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达水平,其可能是影响小鼠睾丸引带发育导致隐睾的机制之一。

【关键词】己烯雌酚;胚胎;Leydig 细胞;原位分子杂交;逆转录聚合酶链反应;胰岛素样因子 3
【中国图书分类法分类号】R994.6;Q492.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-27

The change of the mRNA expression of INSL3 gene in perinatal mice leydig cells exposed to diethylstilbestrol in vivo and in vitro

SONG Xiao-feng, et al
(*Department of Urology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the mRNA expression of INSL3 gene in perinatal mice Leydig cells exposed to diethylstilbestrol (DES) in vivo and in vitro. *Methods*: The Leydig cells were isolated from fetal mouse testis and were cultured in DMEM/F12 medium and identified by 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase(3β-HSD). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)and in situ hybridization were used for examination of the expression levels of INSL3 mRNA in primarily cultured Leydig cells incubated with DES(at the dose of 1 μg/L,5 μg/L and 25 μg/L,respectively). Pregnant mice were exposed to DES at the dose of 1,10 or 100 μg/kg body weight per day by gavage from gestation day(GD)12 to postnatal day(PND)3.The expression of INSL3 gene in neonatal mouse testis was investigated by RT-PCR. *Results*: Histological alterations of primarily cultured Leydig cells and neonatal mouse testis exposed to DES were observed. The expression level of INSL3 mRNA in DES treated groups including the primarily cultured Leydig cells and male mouse offspring's testis were lower than those of the control groups. *Conclusion*: DES can downregulate the expression level of INSL3 mRNA in Leydig cells in vitro and in vivo. It may be a possible mechanism that DES interferes with gubernaculum development and cause cryptorchidism.

【Key words】Diethylstilbestrol;Fetus;Leydig cell;In situ hybridization;Reverse hanscriptaie-polymerase chain reaction (RT-PCR); Insulin-like hormone(INSL3)

己烯雌酚(Diethylstilbestrol,DES),是人工合成的非甾体类雌激素,曾经被广泛应用于避孕、预防流产、防治皮肤病等,也作为家禽家畜的催肥剂被混入饲料或注入动物体内,通过蓄积于蛋、肉等器官组织中通过食物链侵袭人体,是一种具有影响机

作者介绍:宋晓峰(1970-),男,博士,
研究方向:环境污染与小儿泌尿生殖系统先天性畸形的相关性。
通讯作者:魏光辉,男,教授,E-mail:ghwei@chcmu.com。
基金项目:国家自然科学基金委资助项目(30371475)。

体内分泌活性的环境内分泌干扰物[1]。研究发现DES可诱导实验动物泌尿生殖系统先天性畸形如隐睾、尿道下裂等[2,3]。本实验拟通过体内体外实验研究 DES 对围产期小鼠睾丸 Leydig 细胞胰岛素样因子 3(Insln-like ftornone 3,INSL3) mRNA 表达的影响，探讨隐睾发病的相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明小鼠由重庆医科大学动物中心提供，合格证号为 SYXK(渝)20070016。孕期计算以成年雌雄小鼠合笼后，雌鼠见阴栓为受孕 0 d。DMEM/F12(Hyclone 公司)，胎牛血清(天津 TBD 公司)，DES、玉米油(美国 Sigma 公司)，二甲亚砜、Trizol (Gibco 公司)，TaqDNA 聚合酶、M-MLV 逆转录酶、dNTP(Promega 公司)，原位杂交试剂盒(博士德公司)，引物：INSL3、β-actin 引物序列应用软件 Primer 自行设计，由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 睾丸 Leydig 细胞的分离、培养、鉴定 取孕 16 d 母鼠子宫内雄性仔鼠睾丸 Leydig 细胞培养、纯化、鉴定，方法见文献[4]。

1.2.2 原位分子杂交检测 分离纯化的胎鼠 Leydig 细胞接种入放有爬片的培养板内，密度 1×10^8 个 /L，培养 72 h 后，换液，培养板孔内加入等量的不同浓度的 DES 二甲亚砜溶液(培养液内药物终浓度分别为 1 μg/L、5 μg/L 和 25 μg/L)，空白对照组不加药，溶剂对照组加入等量的二甲亚砜，二甲亚砜在试验组或对照组中的浓度均不超过 0.1%。每个药物浓度为 1 组，每组作 8 个平行孔，培养 12 h，取出 Leydig 细胞爬片，每组 3 张爬片苏木素－伊红染色(HE)，观察细胞形态变化，余下 5 张采用原位分子杂交技术检测睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达。探针由地高辛标记，按试剂盒说明书操作，以不含探针的杂交液设立阴性对照，阳性细胞胞浆着色呈棕黄色。图像分析测定细胞浆棕黄色染色平均光密度值，反映 INSL3 mRNA 表达的强弱。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 总 RNA 提取：①培养细胞总 RNA 提取：培养瓶中接种入 Leydig 细胞，密度为 1×10^8 个 /L，培养 72 h 后，换液，培养液内加入等量的不同浓度的 DES 二甲亚砜溶液(培养液内药物终浓度分别为 1 μg/L、5 μg/L 和 25 μg/L)，空白对照组不加药，溶剂对照组加入等量的二甲亚砜。每个药物浓度为 1 组，每组 5 个培养瓶，继续培养 12 h，倾去培养液，pH 7.2、0.1 mol/L PBS 液冲洗 2 次，参照 Trizol 说明书一步法分别提取各培养瓶中总 RNA。②新生小鼠睾丸组织总 RNA 提取：把妊娠 12 d 的健康 KM 孕鼠随机分成 5 组：空白对照组、玉米油对照组、DES 1 μg/(kg·d)组、DES 10 μg/(kg·d)组、DES 100 μg/(kg·d)组，每组 10 只。自妊娠期第 12 d(Gestation day，GD12)至分娩后第 3 d(Postnatal day 3，PND 3)，将不同剂量 DES 溶于玉米油中，制成混悬液，用前摇匀。于每日 8AM 灌胃给药，玉米油对照组剂量为玉米油 2 ml/(kg·d)，空白对照组不给药。于生后 5 d、15 d 分别从各组中随机处死 12 只雄性仔鼠，取双侧睾丸，其中每组每个时间点取 2 只小鼠的睾丸 10%甲醛固定，HE 染色，光镜观察，其余睾丸用 Trizol 分别提取总 RNA。③RT-PCR 反应及 PCR 产物检测及半定量测定，方法见文献[5]。

1.2.4 统计学处理 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS12.0 统计软件，多组间均数比较采用方差分析，两组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原代培养的睾丸 Leydig 细胞形态学观察

光镜下贴壁 Leydig 细胞透明，轮廓清楚，呈纤维细胞样生长，3~4 d 完全汇合。细胞爬片 HE 染色及吖啶橙染色荧光显微镜下观察，Leydig 细胞核呈圆形或卵圆形，嗜碱性，位于细胞中央；核仁 1、2 个，位于核的边缘部；其胞质轮廓为多角形，一般有 3、4 个突起。

加入一定浓度 DES 后细胞增殖速度变慢，细胞轮廓变明显，细胞质粗糙，并出现空泡。严重者细胞增殖停止，贴壁细胞脱落，上浮，崩溃溶解。电镜超微结构可见 DES 作用后间质细胞脂滴增多，肿胀坏死(图 1)。

2.2 新生小鼠睾丸组织学观察

光镜下，对照组 PND 5 小鼠生精小管呈实心的索状(性索)，PND15 小鼠部分生精小管开始管腔化，生精细胞层次少，层次清楚，约 3~4 层，细胞结构正常。睾丸间质分布于生精小管之间，比较疏松，Leydig 细胞数量少，散在分布。Leydig 细胞大，核圆形或椭圆形，位于细胞中央(图 2A)。

DES 组睾丸生精小管明显稀疏，排列紊乱，生精上皮层次减少，严重者生精上皮中仅剩 1~2 层，可见唯支持细胞(Sertoli-cell-only，SCO)表现；上皮内支持细胞周围生精细胞减少，睾丸间质组织增生明显，但睾丸间质细胞数量无明显增加(图 2B)。

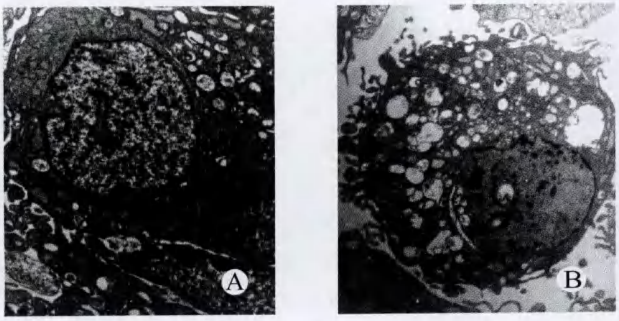
2.3 原代 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达

二甲亚砜溶剂对照组与空白对照组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)；DES 1 μg/L 组平均光密度值比空白对照组低($P<0.05$)；DES 5 μg/L 组、DES 25 μg/L 组与空白对照组、DES 1 μg/L 组比较，平均光密度值显著降低($P<0.01$)(表 1)。

2.4 原代 Leydig 细胞及新生小鼠睾丸 INSL3 mRNA 的表达相对强度

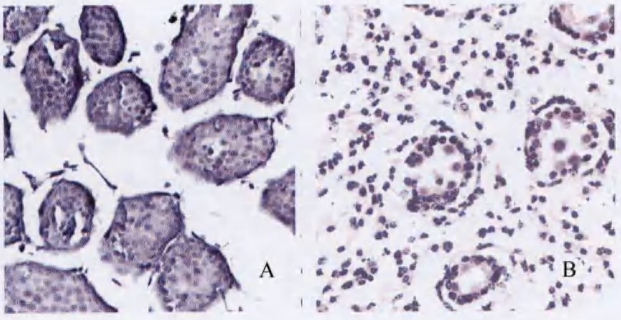
在体外实验中，由表 2 可见，溶剂对照组与空白对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）；各实验组INSL3 mRNA 表达相对强度比空白对照组显著降低（$P<0.01$）；DES 25 μg/L 组与 DES 1 μg/L 组两两比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。提示：在体外，DES 能显著抑制 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达，其效应与剂量密切相关。

如表 3 所示，DES 处理各组的 INSL3 mRNA 的表达相对强度在雄性仔鼠出生早期（PND 5）与空白对照组比较，均明显降低（$P<0.01$），实验组组间两两比较也有差异（$P<0.01$）；在 PND15 时，DES 处理各组与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。



A. 正常的原代小鼠睾丸 Leydig 细胞超微结构（×6 000）　B. DES 100 μg/(kg·d)组睾丸 Leydig 细胞超微结构（×6 000）

图 1　原代培养小鼠睾丸 Leydig 细胞电镜照片



A. 空白对照组小鼠睾丸组织 PND5　B. DES100 μg/(kg·d)组小鼠睾丸组织 PND5

图 2　小鼠睾丸组织结构（HE，×400）

表 1　不同 DES 浓度下原代 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 表达结果（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组 别	平均光密度值
空白对照组	0.122 ± 0.013
溶剂对照组	0.114 ± 0.005
DES 1 μg/L 组	0.108 ± 0.013[a]
DES 5 μg/L 组	0.076 ± 0.005[bc]
DES 25 μg/L 组	0.068 ± 0.008[bc]

注：a：$P<0.05$；b：$P<0.01$ 与空白对照组相比；c：$P<0.01$ 与 DES 1 μg/L 组相比

表 2　原代培养睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 相对表达强度的检测结果（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

组 别	*A* 值
空白对照组	0.982 ± 0.063
溶剂对照组	0.920 ± 0.041
DES 1 μg/L 组	0.812 ± 0.040[a]
DES 5 μg/L 组	0.734 ± 0.091[a]
DES 25 μg/L 组	0.686 ± 0.075[ab]

注：a：$P<0.01$ 与空白对照组相比；b：$P<0.01$ 与 DES 1 μg/L 组相比

表 3　新生小鼠睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 相对表达强度的检测结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组 别	PND 5	PND 15
空白对照组	0.787 ± 0.005	0.835 ± 0.054
玉米油对照组	0.800 ± 0.001	0.849 ± 0.062
DES 1 μg/(kg·d)组	0.672 ± 0.024[b]	0.761 ± 0.030[a]
DES 10 μg/(kg·d)组	0.530 ± 0.023[bd]	0.683 ± 0.036[bc]
DES 100 μg/(kg·d)组	0.354 ± 0.031[bdf]	0.396 ± 0.047[bde]

注：a：$P<0.05$，b：$P<0.01$ 与空白对照组相比；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$ 与 DES 1 μg/(kg·d)组相比；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$ 与 DES 10 μg/(kg·d)组相比

3　讨　论

INSL3 又称为 Leydig 细胞特异性胰岛素样肽或松弛素样因子，在睾丸间质细胞中特异性表达，对动物性分化发育起关键作用。研究表明 INSL3 的表达与隐睾发生密切相关[6]。隐睾是小儿时期最常见的先天性泌尿生殖系统畸型，其发生机制至今未明。研究认为睾丸下降分为经腹腔下降和经腹股沟阴囊下降两个阶段，睾丸引带（Gubernaculum）、颅侧悬韧带（Cranial suspensory ligament，CSL）INSL3 和睾酮分别是整个下降过程中发挥重要作用的解剖因素和内分泌因素。在睾丸下降的两个阶段中，INSL3 主要在经腹腔下降阶段发挥作用，可诱导睾丸引带细胞增生，同时睾酮促进颅侧悬韧带退化，从而促使睾丸从腹腔内移行到腹股沟，进入经腹股沟阴囊下降阶段[7,8]。

本研究体外实验观察到 DES 对原代培养的睾

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0516-05

重组耻垢分枝杆菌联合抗痨药物对鼠结核病治疗作用的探讨

杨晓燕[1,3],杨 春[2,3],何永林[2,3],徐 蕾[2,3]

(重庆医科大学基础医学院 1. 免疫学教研室;2. 病原生物学教研室;3. 神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨携带编码人天然颗粒溶素(Granulysin,GLS)和小鼠 IL-12 基因的重组耻垢分枝杆菌(M.smegmatis,MS)与抗痨药物对结核分枝杆菌感染的协同治疗效果。方法:将结核分枝杆菌 H37Rv 感染的 Balb/c 小鼠 40 只随机分成 4 组。感染 4 周后分别用生理盐水、重组 MS、INH+PZA 和重组 MS 联合 INH+PZA 治疗,于第一次治疗后 3 个月,处死小鼠,检测器官荷菌量、脾淋巴细胞 IFN-γ 和 TNF-α 的分泌水平、血清 IL-12 和 IFN-γ 和肺、脾组织中 GLS 表达,同时观察小鼠肺、脾组织病理改变情况。结果:重组 MS 联合 INH+PZA 治疗组肺、脾组织荷菌量(lg CFU/g)比重组 MS 和 INH+PZA 治疗组显著降低;重组 MS 和 INH+PZA 治疗组肺、脾组织荷菌量比生理盐水组显著降低。重组 MS 组经 PPD 刺激后 IFN-γ 和 TNF-α 分泌水平明显高于其它组。重组 MS 联合 INH+PZA 治疗组和重组 MS 组血清 IL-12 和 IFN-γ 水平明显高于生理盐水组。重组 MS 和 INH+PZA 组病变轻且局限,生理盐水组肺组织病理改变以渗出为主,病变广泛。重组 MS 联合 INH+PZA 治疗组肺组织病变最轻。结论:GLS/IL-12 重组 MS 对小鼠结核病有一定免疫治疗作用;重组 MS 联合临床常用的抗痨药可增强抗结核病的疗效。

【关键词】颗粒溶素;IL-12;重组 MS;结核病;抗痨药

【中国图书分类法分类号】R378.911 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-24

作者介绍:杨晓燕(1963-),女,讲师,

研究方向:结核分枝杆菌的感染与免疫研究。

通讯作者:杨 春,女,教授,E-mail: yangchunim@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400375)。

丸 Leydig 细胞有明显的增殖抑制效应,超微结构显示出细胞毒性作用;原位分子杂交技术和 RT-PCR 检测发现体外各实验组 INSL3 mRNA 表达水平与对照组比较差异有统计学意义,提示 DES 可下调原代培养睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达。

宫内接触 DES 的仔鼠睾丸生精小管、睾丸间质组织均出现不同程度的病理改变,推测 DES 不仅影响睾丸 Leydig 细胞的数量,可能还影响其功能。通过 RT-PCR 检测,各实验组 INSL3 mRNA 表达水平与对照组比较差异有统计学意义,且与 DES 接触剂量相关,提示 DES 通过胎盘或乳汁作用于仔鼠,可有效下调雄性仔鼠 INSL3 mRNA 的表达水平。高剂量组雄性仔鼠在 PND15 时,INSL3 mRNA 表达的相对强度仍明显低于对照组($P<0.01$),表明高剂量DES 对睾丸 Leydig 细胞的损害比较严重,短期难以恢复,甚至可能是不可逆的。

实验结果提示 DES 对 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 表达呈抑制效应,推测 DES 通过下调 INSL3 的表达,间接影响睾丸引带发育,从而导致隐睾发生。

参 考 文 献

[1] 曾北危,姜 平.环境激素[M].北京:化学工业出版社,2005.14-18.

[2] Guzmán C,Zambrano E. Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis[J]. Rev Invest Clin,2007,59(1):73-81.

[3] Storgaard L,Bonde J P,Olsen J.Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies[J]. Reprod Toxicol,2006,21(1):4-15.

[4] 宋晓峰,魏光辉,邓永继.小鼠胚胎睾丸 Leydig 细胞培养、纯化及其功能研究[J]. 中华男科学杂志,2006,12(1):6-9.

[5] 宋晓峰,张德迎,魏光辉,等.邻苯二甲酸二乙基己酯诱发小鼠隐睾与 INSL3 mRNA 表达的相关性研究[J]. 生殖与避孕,2006,26(12):712-716.

[6] Kubota Y,Nef S,Farmer P J,et al. Leydig insulin-like hormone, gubernacular development and testicular descent[J]. J Urol,2001,165(5):1673-1675.

[7] Hutson J M,Hasthorpe S. Abnormalities of testicular descent[J].Cell Tissue Res,2005,322(1):155-158.

[8] Emmen J M,McLuskey A,Adham I M,et al. Hormonal control of gubernaculums development during testis descent:Gubernaculum outg rowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen[J]. Endo crinology,2000,141(12):4720-4727.

(责任编辑:冉明会)