基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0551-03

ATP50 对生长激素诱导大鼠睾丸间质细胞睾酮分泌的影响

彭 波,王德林
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 ATP50 在 SD 大鼠睾丸 Leydig 细胞中对生长激素(Growth hormone,GH)诱导睾酮合成及生长激素受体功能的影响。方法:采用离体细胞体外孵育法,观察反义 ATP50 寡脱氧核苷酸(Oligo deoxy nucletides,ODN)对 GH 诱导大鼠睾丸 Leydig 细胞分泌睾酮的影响及 GH 受体功能的影响,以睾酮放射免疫试剂盒测定睾酮合成的情况,cAMP 放免试剂盒检测 cAMP 含量来评定 GH 受体的功能,免疫组织化学检测 ATP50 蛋白的表达。结果:反义 ATP50 ODN 呈剂量依赖性抑制 GH 诱导睾丸 Leydig 细胞睾酮的分泌($P<0.05$),同时使 Leydig 细胞中 ATP50 蛋白表达下降,而无义 tat ODN 则没有相应的作用,免疫组织化学显示 ATP50 蛋白阳性颗粒在 Leydig 细胞中中呈密集性分布,表达强度明显高于 GH 组($P<0.05$)。结论:在 SD 大鼠睾丸 Leydig 细胞中,ATP50 可能通过增强 GH 受体的功能,进而刺激 GH 诱导睾酮的合成。提示 ATP50 参与 GH 诱导大鼠睾丸 Leydig 细胞睾酮的分泌过程。

【关键词】ATP50;间质细胞;反义寡脱氧核苷酸;睾酮
【中国图书分类法分类号】Q492.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-10

Effect of ATP50 on GH-induced testosterone secretion in isolated rat Leydig cells

PENG Bo, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of ATP50 on GH-induced testosterone secretion in isolated SD rat Leydig cells. *Methods*: The Leydig cells were treated with ATP50 antisense oligodeoxynucletides(Anti-ODN)in GH group, nonsense tat ODN in control group, cAMP and testosterone in culture medium was detected by radioimmunoassay, expression of ATP50 protein was investigated by immunohistochemistry. *Results*: Antisense ATP50 ODN significantly inhibited GH-induced testosterone secretion of isolated rat Leydig cells in a dose-dependent manner($P<0.05$). At the same time, integral optical density immunostaining of ATP50 protein in Leydig cells was also remarkably reduced. Nonsense tat ODN had no effect on GH-induced testosterone secretion of Leydig cells, integral optical density immunostaining of ATP50 was remarkably more obvious in nonsense tat ODN group than in GH group($P<0.05$). *Conclusion*: These results indicate that ATP50 might closely correlate with GH-reduced testosterone secretion.

【Key words】ATP50; Leydig cells; Anti-oligodeoxynucletides (anti-ODN); Testosterone

随着年龄增长,老年男子血液中睾酮水平逐渐下降[1],这主要是因为睾丸合成雄激素能力降低[2,3]。睾丸 Leydig 细胞合成体内大部分雄激素,因此在机体衰老过程中,Leydig 细胞合成雄激素能力是降低的。研究证实,衰老 Leydig 细胞功能下降主要由细胞自身改变造成,但其具体机制并不清楚[4]。睾丸组织基因表达谱研究发现老年睾丸功能减退和多种基因的差异表达相关,特别是线粒体呼吸链相关基因 ATP50 在老年睾丸组织中表达显著降低[5]。据此推测,线粒体呼吸链相关基因 ATP50 在老年睾丸组织中的缺乏,可能参与了衰老睾丸合成雄激素功能降低的调节过程,但目前对其具体作用机制缺乏深入研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

SN-682 放射免疫 γ 计数器,CMIAS-8 真彩色病理图像

作者介绍:彭 波(1983-),男,硕士。
研究方向:老年男性性激素缺乏。
通讯作者:王德林,男,副教授,E-mail: dlwangws@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2004BB5109);重庆市卫生局科研基金面上项目(032088)。

分析系统。

1.2 主要试剂

生长激素(Growth hormone,GH)购自日本山田株式会社,睾酮放射免疫分析药盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司,ATP50 蛋白免疫组织化学染色试剂盒,兔抗鼠 ATP50 蛋白抗体购自美国 Santa Cruz 公司,T4DNA 多聚酶购自 Promega 公司,限制性内切酶(*BamH* Ⅰ,*EcoR* Ⅰ)购自晶美生物,反义 ATP50 ODN 序列及无义 tat ODN 序列设计:根据文献[6]在 GenBank 数据库中选取 ATP50(OSCP)(D13127.gi:286245),通过 Primer5.0 软件设计反义 ATP50 ODN 序列及无义 tat ODN 序列分别为:5'-CTGTACTCTGCTGCGTC-TAAGC-3';5'-CCCTAGTTGGTCAGCTAGC-3',由上海生物工程中心合成,DMEM/F12 培养基购自 invitrogen 公司,标准胎牛血清购自 TBD 公司,雄性成年 SD 大鼠由重庆医科大学动物中心提供。

1.3 实验动物及大鼠间质细胞的分离与培养

选用成年雄性 SD 大鼠,体重(280 ± 20) g,颈椎脱臼处死,迅速取出睾丸,去掉睾丸被膜,按流程[7]迅速分离间质细胞,然后将纯化的间质细胞用 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 1.0×10^6 个 /ml 并分装,每组 6 份,孵育 4 h 后取出。离心,取上清液置于 -20℃待测睾酮;细胞沉淀涂于玻片上。

1.4 测试方法

本实验设实验组与对照组,实验组由不同浓度反义 ATP50 ODN 与睾丸间质细胞培养液组成;对照组由浓度为 1.0 μmol/L 无义 tat ODN 与睾丸间质细胞培养液组成。睾酮用放射免疫分析法(RIA)测定,将不同浓度反义 ATP50 ODN 和浓度为 12×10^{-3} IU/ml GH 共同孵育 4 h,收集上清液用放射免疫分析法测定睾酮含量。细胞内 ATP50 呼吸链相关蛋白用免疫组织化学方法测定,细胞涂片上有 ATP50 呼吸链相关蛋白的部位呈现棕黄色,用病理图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 检测各组细胞涂片中 ATP50 蛋白积分光密度(Integral optical density,IOD)值。

1.5 统计处理

实验数据用 mean ± SD 表示,用统计软件 SPSS 15.0 进行统计处理,计量指标满足条件用方差分析统计,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 离体间质细胞功能评价

通过以下三方面来评价离体间质细胞功能,建立实验动物细胞模型。

2.1.1 台盼蓝排斥试验 采用红细胞计数法,检测其活力为 91.05%±3.8%(n=10)。

2.1.2 离体大鼠间质细胞睾酮基础分泌量的时效关系 将 1×10^6 个/ml 睾丸间质细胞分别培养 0、1、2、3、4、5 h 后取出测定基础状态下睾酮分泌量。离体间质细胞的睾酮基础分泌量随培养时间 (5 h 内)延长而明显增加,二者成线性关系(r=0.945,$P<0.05$)。培养至 4 h 时睾酮分泌量达高峰,再延长培养时间,睾酮分泌量与培养至 4 h 睾酮分泌量相比,未见有明显统计学差异。

2.1.3 GH 对离体大鼠间质细胞睾酮分泌的量效关系 将不同浓度 GH(0.37×10^{-3}~24×10^{-3} IU/ml)分别加入培养管,孵育 4 h,观察不同浓度 GH 对睾酮分泌量的影响。结果表明,随着加入培养管中 GH 浓度升高,睾酮分泌量逐渐增加,两者成明显线性关系(r=0.861,$P<0.01$)。当 GH 浓度达 12×10^{-3} IU/ml 时,间质细胞睾酮分泌量达高峰,再增加 GH 浓度,睾酮分泌量与 12×10^{-3} IU/ml 浓度时睾酮分泌量相比,未见有统计学差异。

2.2 Leydig 细胞中不同浓度 ATP50 对 GH 诱导大鼠间质细胞睾酮分泌的影响

将不同浓度反义 ATP50 ODN 和浓度为 12×10^{-3} IU/ml GH 共同孵育 4 h,以观察不同浓度 ATP50 对 GH 诱导离体间质细胞睾酮分泌的影响。结果发现在无义 tat ODN 对照组中,睾酮水平相对于 GH 刺激前显著升高;而在试验组(反义 ATP50 ODN)中,随着 ATP50 ODN 剂量增加,睾酮水平逐渐降低($P<0.05$,与对照组的细胞刺激相比较)(表 1)。提示 ATP50 ODN 可以抑制 Leydig 细胞内睾酮合成。

表 1 不同浓度反义 ATP50 ODN 对 GH 诱导大鼠睾丸间质细胞睾酮分泌的影响

反义 ATP50 ODN(μmol/L)	睾酮分泌量(nmol/L)
0.00	121.44±7.08
0.05	68.77±5.23*
0.10	65.54±2.67*
0.20	57.38±2.47*
0.40	54.24±3.98*
无义 tat ODN 1.0	118.09±6.91

n=5,与对照组(无义 tat ODN)比较 *$P<0.05$

2.3 Leydig 细胞中不同浓度 ATP50 对 GH 受体功能的影响

将不同浓度反义 ATP50 ODN 和相同浓度 GH (12×10^{-3} IU/ml)共同孵育 4 h,以通过观察第二信使环磷酸腺苷(cAMP)含量变化来检测 ATP50 对 GH 受体功能的影响。结果发现在无义 tat ODN 对照组中,cAMP 水平相对于 GH 刺激前显著升高;而在实验组中细胞与不同浓度 ATP50 ODN 共同孵育后,GH 刺激引起的 cAMP 升高被抑制,抑制呈剂量依赖性($P<0.05$,与对照组的细胞刺激相比较)(表 2)。提示 ATP50 ODN 可抑制 cAMP 的生成,从而抑制GH

受体功能。

2.4 ATP50 呼吸链相关基因蛋白的表达情况

与无义 tat ODN 对照组相比，反义 ATP50 ODN 组中 ATP50 蛋白表达强度明显低于对照组，两者差异有显著性（$P<0.05$）（表 3），在反义 ATP50 ODN 组中可见棕黄色 ATP50 阳性蛋白颗粒散在分布于睾丸 Leydig 细胞质内，ATP50 蛋白表达降低（图 1）；tat ODN 对照组则见 ATP50 阳性蛋白颗粒在睾丸 Leydig 细胞中呈密集性分布（图 2）。

表 2 不同浓度反义 ATP50 ODN 对大鼠睾丸间质细胞中 cAMP分泌的影响

反义 ATP50 ODN(μ mol/L)	环磷酸腺苷(pmol/10^6 个)
0.00	42.76 ± 4.91
0.05	25.87 ± 2.09*
0.10	20.13 ± 1.32*
0.20	12.56 ± 2.28*
0.40	10.78 ± 1.59*
无义 tat ODN1.0	41.73 ± 3.08

n=5，与对照组（无义 tat ODN）比较 *$P<0.05$

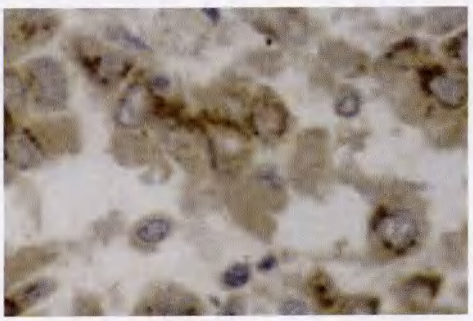


图 1 试验组（反义 ATP50 ODN 组）睾丸 Leydig 细胞 ATP50 基因表达（SP，×400）

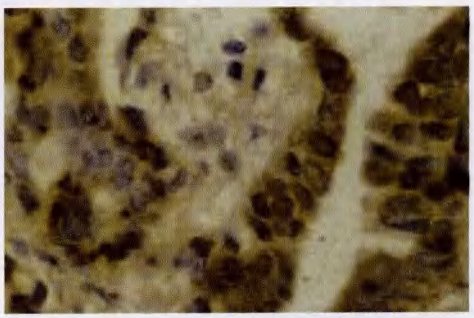


图 2 对照组（无义 tat ODN 组）睾丸 Leydig 细胞 ATP50 基因表达（SP，×400）

表 3 ATP50 蛋白颗粒在反义 ATP50 ODN 组与无义 tat ODN 组的差异表达

测量项目	反义 ATP50 ODN(0.4 μ mol/L)		无义 tatODN(1.0 μ mol/L)	
	感光区域	光密度值	感光区域	光密度值
最小测量值	10.67 ± 1.05	3.77 ± 0.82	10.00 ± 1.18	3.36 ± 0.76
最大测量值	91.46 ± 2.51*	87.00 ± 6.59*	229.00 ± 8.75	410.25 ± 5.43
平均测量值	90.87 ± 3.78*	84.00 ± 3.42*	228.00 ± 4.13	409.51 ± 4.85
测量范围	41.13 ± 1.32*	64.98 ± 3.08*	75.58 ± 2.42	139.13 ± 1.47
测量值总和	640.32 ± 7.54	274 ± 3.72	1 911.00 ± 10.08	640.72 ± 7.16

n=5，与对照组（无义 tat ODN）比较 *$P<0.05$

3 讨 论

ATP50 为 ATP 合成酶寡霉素敏感的给体蛋白（Oligomycin sensitivity conferral protein，OSCP）亚单位的主要构成成分，位于人染色体 21q22.I–q22.2，1995 年通过外显子俘获[8]，在人脑和骨骼肌被克隆。ATP 合成酶由 F1 和 F0 两部分组成，其中 F0 部分位于线粒体膜内负责完成质子的跨膜转运，F1 部分则突入到线粒体膜内侧，含有接触反应位点[9]，参与调节 ATP 合成或者水解过程。在 F1 和 F0 之间则是由两部分共同组成的柄部，它不但从结构上相互连接 F1 和 F0，而且将质子转运与 ATP 合成偶连，其功能十分重要。F0 的亚基 F6b 以及 OSCP 亚单位参与组成柄部结构[10]，因此，ATP50 对于维持 ATP 酶的结构与功能具有十分重要的意义，但目前对 ATP50 在 Leydig 细胞中的表达基本为定位研究，而对 ATP50在睾丸 Leydig 细胞合成睾酮中的作用还缺乏相应的定量研究。

本实验采用反义 18 聚 ATP50 ODN 研究 Leydig 细胞中 ATP50 对 GH 诱导睾酮生成的影响及其作用机制。结果显示，在 SD 大鼠睾丸无义 tat ODN 对照组 Leydig 细胞中，GH 刺激后睾酮水平显著升高，而在反义 ATP50 ODN 试验组中，免疫细胞化学显示 ATP50 被抑制，随着反义 ATP50 ODN 剂量增加，睾酮水平逐渐降低。提示 ATP50 对 GH(12×10^{-3} IU/ml，4 h）诱导睾酮分泌有促进作用。在 SD 大鼠睾丸无义 tat ODN 对照组 Leydig 细胞中，GH 刺激后，cAMP 水平显著升高，而细胞与不同浓度反义 ATP50 ODN 共同孵育后，ATP50 被抑制，GH 刺激引起的 cAMP

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0554-04

siRNA 干扰对乳腺癌(MCF-7)ATX 表达和侵袭力的影响

顾海涛,王继见,李 洋,杨 成
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究针对自分泌运动因子(Autotaxin,ATX)的小干扰 RNA(Small interfering RNA,siRNA)对人乳腺癌细胞 ATX 基因表达的影响,探讨 RNA 干扰技术治疗乳腺癌的前景。方法:参考人黑色素瘤 ENPP2 基因序列,设计合成 ATX-siRNA 及随机阴性对照。在阳离子脂质体的介导下转染人乳腺癌细胞 MCF-7,转染后 48 h 收集细胞,用半定量 RT-PCR 和 western blot 检测转染后 ATX mRNA 和 ATX 蛋白的表达,体外实验测定肿瘤细胞穿透 matrigel 的能力。结果:体外合成的 siRNA 在转染乳腺癌细胞 48 h 后 ATX mRNA 和蛋白表达降低,转染 48 h 后测定乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭力明显降低($P<0.01$)。结论:ATX-siRNA 能有效抑制人乳腺癌细胞株 ATX 基因和蛋白的表达,降低人乳腺癌细胞的侵袭力。

【关键词】小干扰 RNA;人乳腺癌细胞 MCF-7;自分泌运动因子;乳腺肿瘤
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-26

作者介绍:顾海涛(1982-),男,硕士,
研究方向:乳腺肿瘤。
通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:Wangjj1963@163.com。
基金项目:重庆市教委课题(KJ080305)。

升高也被抑制,且呈剂量依赖性。据此我们分析,在 GH 诱导睾酮分泌过程中,ATP50 可能通过作用于 GH 受体从而影响睾酮的分泌。ATP50 与间质细胞上的特异性受体结合后,在 G 蛋白的介导下激活腺苷酸环化酶,使 ATP 转变成 cAMP,cAMP 使无活性的 PKA 激活。当 PKA 的催化亚基进入细胞核内后,可催化 CREB 磷酸化,动员胆固醇进入线粒体内膜,启动呼吸链活动,线粒体通过氧化呼吸提供 Leydig 细胞代谢的能量,从而促进睾酮合成[11,12];当 ATP50 缺乏时,特异性 GH 受体不能充分结合 ATP50,从而使 G 蛋白介导的腺苷酸环化酶激活过程受抑制,ATP 不能正常转变成 cAMP,引起 cAMP 缺乏,无活性 PKA 不能正常激活,CREB 磷酸化相应被抑制,胆固醇进入线粒体内膜活动受阻,最终使线粒体呼吸链被抑制,从而导致睾酮分泌减少。这些结果提示,ATP50 的表达可能是影响睾丸间质 Leydig 细胞睾酮分泌十分关键的环节之一,为后续老年男性雄激素部分缺乏综合征的研究提供了一定的理论基础,但在老年男性睾丸间质细胞中 ATP50 表达降低的原因与机制尚不清楚,有待于将来更进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Lunenfeld B. Aging men challenges ahead[J]. Asian J Androl,2001,3(3):161-168.
[2] 刘 刚,辛钟成,田 龙,等. Atp50 和 coxⅤⅡa 在大鼠 Leydig 细胞钟的表达与鉴定[J]. 中华男科学杂志,2006,20(6):9-12.
[3] Stocco,DM. Recent advances in the role of StAR[J]. Rev Reprod,2003,3(2): 82-85.
[4] Vickery LE. Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems[J]. Steroids,2004,6(2): 124-127.
[5] Hermann M,Berger P. Hormone replacement in the aging male[J]. Exp Fenrontol,1999,34(8):923-933.
[6] 辛钟成,刘武江,田 龙,等.老年人睾丸组织退化的基因表达谱研究[J]. 北京大学学报:医学版,2003,35(4):364-368.
[7] Neaver W B,Johnson L,Porter J C,et al. Leydig cell numbers,daily sperm production and serum gonadotrop in levels in aging men[J]. J clin Endocrinol Metab,1984,59(4): 963-969.
[8] Chen H,Liu I,Luo L,et al. Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate restores the ability of aged Leydig cells to produce testosterone at the high levels characteristic of young cells[J]. Endocrinology,2004,145(10): 4441-4446.
[9] 邓春华. 老年大鼠睾丸间质细胞结构和功能变化的实验研究[J]. 中华男科学,2005,11(10):740-743.
[10] Hales D B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis[J]. J Reprod Immunol,2002,57(1-2):3-18.
[11] 章振保,蔡崇岳,田生平,等. 衰老雄性大鼠睾丸组织脂质过氧化与睾酮水平和 bcl-2 基因表达的研究[J]. 中华男科学杂志,2007,13(1): 46-49.
[12] Stocco D M. Starting to understand cholesterol transfer[J]. Nat Struct Biol,2000,7(6): 445-447.

(责任编辑:关蕴良)