

高脂血症对小鼠睾丸 StAR 和 P450scc 表达的影响及辛伐他汀的干预作用

王慧君^{1,2}, 吕正梅^{1,2}, 戎玉罗³, 王琦^{1,2}, 叶宁宁³, 程媛媛³, 张凯⁴

摘要 目的 探讨高脂血症(HL)影响小鼠睾丸酮合成机制及辛伐他汀(SIMV)的干预作用。方法 18只C57BL/6J雄性小鼠随机均分为3组:HL组、SIMV组和正常对照组(CTRL组);4个月后测血脂、体重;3 β -HSD免疫组化法检测睾丸间质细胞;RT-PCR法和Western blot法检测类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)与细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶(P450scc)的表达。结果 ①HL组和SIMV组体重、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)明显高于CTRL组($P < 0.05$);SIMV组体重和TC比HL组显著下降($P < 0.05$),LDL-C无明显变化。②HL组StAR和P450scc的mRNA与蛋白表达较CTRL组显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);SIMV组较HL组则两者表达均升高($P < 0.01$)。③3 β -HSD免疫组化染色显示各组小鼠睾丸间质细胞数差异无统计学意义。结论 SIMV可以改善HL引起的睾丸间质细胞合成睾酮能力下调。

关键词 睾丸; StAR; P450scc; 高脂血症; 辛伐他汀

中图分类号 R 322.64; R 361.2; R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0711-05

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是多种代谢成分异常聚集的病理状态,主要组分包括超重或肥胖、高血压、高血脂、糖耐量异常和糖尿病、高胰岛素血症伴胰岛素抵抗等。高能高脂饮食摄入过多和运动量过少是MS发生的两大直接诱因^[1-3]。MS会对身体机能的许多方面造成损害,性腺机能减退即是其中之一^[4]。研究^[5-7]表明MS可能通过多种途径导致雄性性腺机能减退:①外周脂肪组织芳香化作用增强,睾酮向雌二醇转化增加;②炎症因子和瘦素分泌增多,使垂体促性腺激素的合成减少或作用减弱;③肥胖抑制雄激素结合球蛋白的合成;

④胰岛素抵抗可能减少促性腺激素的释放等。哺乳动物体内95%的雄激素由睾丸间质细胞(Leydig细胞)合成分泌,类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)和细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶(cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme, P450scc)是调控Leydig细胞睾酮合成的关键蛋白/酶。辛伐他汀(simvastatin, SIMV)为临床常用降脂药物,主要作用是降低总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。有文献^[8]报道, SIMV可改善高胆固醇血症引起的精液质量与雄性生育力下降。该研究采用高脂饮食复制高脂血症(hyperlipidemia, HL)动物模型,观察HL小鼠Leydig细胞StAR和P450scc表达水平的改变,同时分析SIMV处理对高脂饮食小鼠睾酮合成能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 18只C57BL/6J雄性小鼠,6周龄,SPF级,体重19~23g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂与仪器 SIMV购自杭州默沙东有限公司;免疫组化SABC试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;抗3 β -HSD抗体、抗P450scc多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG和山羊抗兔IgG均购自武汉博士德生物公司;抗StAR抗体购自美国CST公司;抗 β -actin抗体购自美国Santa Cruz公司;TRIzol和RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;血脂检测采用日本OLYMPUS AU640全自动生化分析仪;免疫组化染色摄片采用日本OLYMPUS BX51光学显微镜。

1.3 方法

1.3.1 动物分组和饲养 18只C57BL/6J雄性小鼠随机平均分成3组饲养:①HL组给予高脂饲料(1%胆固醇、10%猪油、10%蛋黄粉、20%蔗糖、59%维持料)喂养,制备HL动物模型;②SIMV组给予

2013-12-20 接收

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学研究面上项目(重点)(编号:KJ2013A148);2013年国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:0111015103)

作者单位:安徽医科大学¹组织胚胎学教研室、²分子机能中心实验室、³2012级全科专业,合肥 230032

⁴安徽中医药大学组胚生物学教研室,合肥 230038

作者简介:王慧君,女,硕士研究生;

吕正梅,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: lvzm99@126.com

相同高脂饲料,并以 SIMV 5 mg/(kg·d)灌胃;③正常对照组(CTRL组)给予普通饲料喂养。小鼠均自由摄食、饮水。每周称量小鼠体重,并根据体重调整 SIMV 用量。

1.3.2 血脂测定 4个月实验结束后,摘除小鼠眼球取血,分离血清,检测血脂。

1.3.3 免疫组化染色 迅速打开小鼠腹腔,取出睾丸组织,固定于4%多聚甲醛,石蜡包埋、切片,切片常规脱蜡至水,枸橼酸盐修复,3% H₂O₂孵育阻断内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭;加抗 3β-HSD 抗体(1:50)4℃孵育过夜;生物素标记羊抗兔 IgG 工作液 37℃孵育 1h;免疫组化 SP 工作液 37℃孵育 30min;DAB 显色,苏木精复染后脱水、透明、封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.4 RT-PCR 法检测 取新鲜睾丸组织约 50mg,加 0.5 ml TRIzol 充分匀浆,酚-氯仿法提取组织总 RNA。取 2 μg 总 RNA 反转录获得 cDNA,再进行 PCR 反应。PCR 反应条件为:94℃预变性 3min,94℃变性时间 30s,60℃退火时间 30s,72℃延伸时间 20s,设置循环 30次,72℃延伸时间 10min,4℃终止。引物序列见表 1。PCR 产物于琼脂糖凝胶中电泳,采用凝胶电泳成像分析系统观察、拍照。用 Gel-Pro Analyzer 软件分析目的条带灰度值,以目的条带与 β-actin 条带灰度值的比值表示目的基因 mRNA 的相对含量。

表 1 RT-PCR 的引物序列

基因	引物序列(5'→3')
StAR	F: ACT AAA CTC ACT TGG CTG CTC A R: TGG CGA ACT CTA TCT GGG TCT
P450 _{sc}	F: GGG CAC TTT GGA GTC AGT TTA C R: ATC ACC TCT TGG TTT AGG ACG A
β-actin	F: GAA CCT TCA ACA CCC CAG C R: ATG TCA CGC ACG ATT TCC C

1.3.5 Western blot 法检测 取约 50 mg 睾丸组织,加入 200 μl RIPA 裂解液和 2 μl PMSF 充分匀浆,提取组织总蛋白,Lowry 法测定蛋白浓度并定量。蛋白上样量取约 100 μg,12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白;恒流转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭后 TBST 洗膜;一抗孵育(抗 StAR 抗体按 1:1000 稀释、抗 P450_{sc} 抗体按 1:200 稀释、抗 β-actin 抗体按 1:100 稀释)4℃过夜,37℃孵育二抗(按 1:1000 稀释)1h;常规 TBST 洗膜后 ECL 化学发光 X 线片显影、定影。实验结果拍照并用 Gel-Pro

Analyzer 软件进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS Statistics V17.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 体重和血脂 HL 组和 SIMV 组体重、TC 和 LDL-C 较 CTRL 组均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);SIMV 组体重和 TC 明显低于 HL 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),LDL-C 降低不明显;各组总三酰甘油(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组小鼠体重与血脂比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	血脂(mmol/L)			
		TC	LDL-C	HDL-C	TG
CTRL	32.33 ± 1.97	1.49 ± 0.43	0.17 ± 0.03	1.10 ± 0.44	0.57 ± 0.04
HL	36.33 ± 3.39*	2.38 ± 0.45*	0.45 ± 0.09*	1.75 ± 0.39	0.49 ± 0.19
SIMV	34.00 ± 2.58*#	1.92 ± 0.40*#	0.40 ± 0.04*	1.29 ± 0.27	0.34 ± 0.09
F 值	4.083	5.431	5.747	4.591	8.844

与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$; 与 HL 组比较: # $P < 0.05$

2.2 睾丸 Leydig 细胞 3β-HSD 特异性表达于睾丸组织 Leydig 细胞细胞质中,阳性染色呈棕黄色,生精小管呈阴性反应。每张切片随机选取 10 个 400 倍高倍镜视野,光镜下计数睾丸 Leydig 细胞数,统计分析显示各组小鼠睾丸组织 Leydig 细胞数差异无统计学意义。见图 1、表 3。

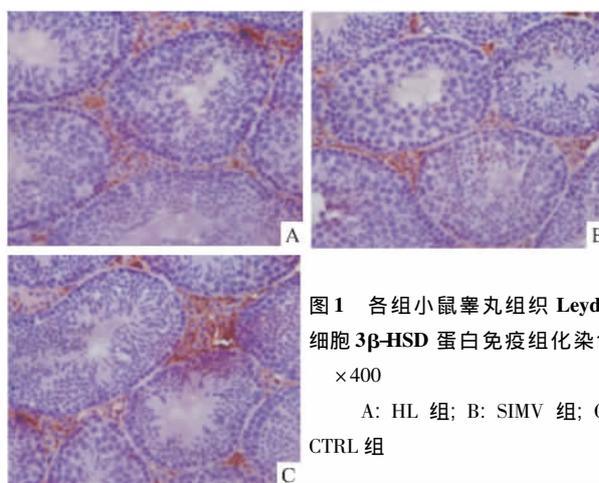


图 1 各组小鼠睾丸组织 Leydig 细胞 3β-HSD 蛋白免疫组化染色 ×400
A: HL 组; B: SIMV 组; C: CTRL 组

表 3 各组小鼠睾丸组织 Leydig 细胞计数均值比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	Leydig 细胞计数均值
CTRL	111.4 ± 2.351
HL	103.8 ± 1.847
SIMV	99.1 ± 2.501

2.3 睾丸组织 StAR 和 P450scc 的 mRNA 表达

HL 组睾丸组织 Leydig 细胞 StAR 和 P450scc 的 mRNA 表达比 CTRL 组降低 ($P < 0.05$) ; 经 SIMV 干预后, StAR 和 P450scc 表达均升高 ($P < 0.01$) , 见图 2。

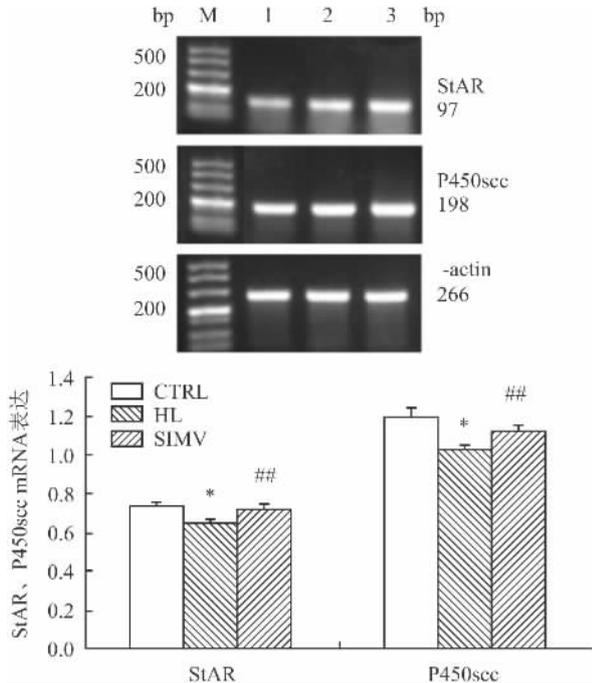


图2 RT-PCR 法检测睾丸组织 StAR 和 P450scc 的 mRNA 水平
M: Marker; 1: HL 组; 2: SIMV 组; 3: CTRL 组
与 CTRL 组比较: * $P < 0.05$; 与 HL 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 睾丸组织 StAR 和 P450scc 的蛋白表达

睾丸组织 Leydig 细胞 StAR 和 P450scc 蛋白表达在 HL 组明显低于 CTRL 组 ($P < 0.01$) ; SIMV 组表达较 HL 组上调 ($P < 0.01$) , 见图 3。

3 讨论

许多临床资料证实肥胖相关的代谢性疾病能引发睾酮水平低下。本课题以高脂饮食建立 HL 小鼠模型, 研究睾丸 Leydig 细胞合成睾酮能力的变化及降脂药 SIMV 处理后对生殖功能的影响。

该研究结果显示, 高脂饮食诱发 HL 小鼠的睾丸组织 StAR 和 P450scc 的 mRNA 与蛋白表达较正常饮食小鼠明显下调; 经 SIMV 处理后, 高脂饮食小鼠 StAR 和 P450scc 的表达则有显著增加。StAR 调节睾丸 Leydig 细胞合成睾酮过程的限速步骤: 胆固醇由线粒体外膜向内膜的转移; P450scc 调控睾酮合成酶促反应的关键步骤: 胆固醇侧链裂解转化为孕烯醇酮。StAR 和 P450scc 表达下调, 表明 HL 可使 Leydig 细胞合成睾酮的能力降低。Yamamoto et

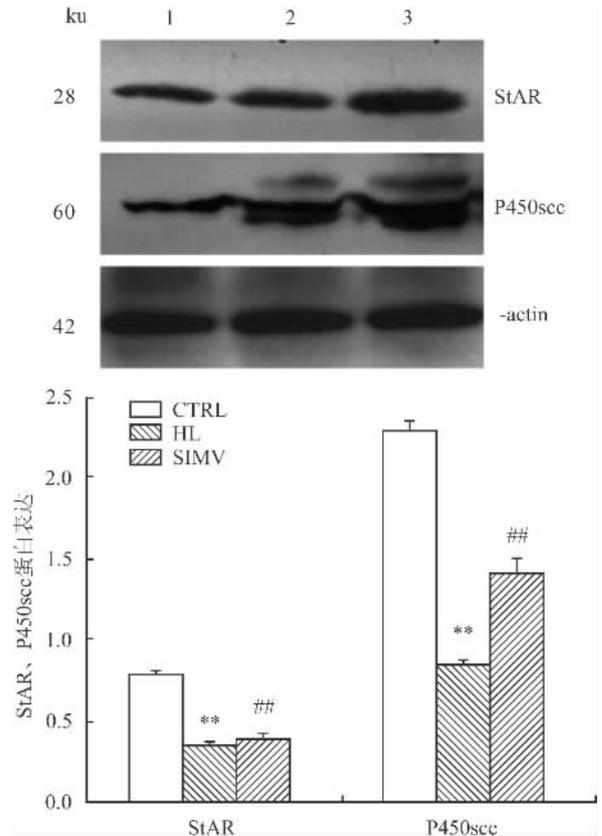


图3 Western blot 法检测睾丸组织 StAR 和 P450scc 的蛋白水平
1: HL 组; 2: SIMV 组; 3: CTRL 组
与 CTRL 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HL 组比较: ## $P < 0.01$

al^[9] 研究指出, HL 可导致精子发生障碍, 部分原因可能由于 Leydig 细胞的分泌功能受到损害。SIMV 可上调 StAR 和 P450scc 的表达, 表明其对高脂饮食小鼠睾丸的睾酮合成障碍具有保护作用。

该研究表明, 高脂饮食小鼠睾丸 Leydig 细胞计数和正常饮食小鼠并无明显差异。因此, HL 小鼠睾丸组织 StAR 和 P450scc 的表达下调不是因为 Leydig 细胞数目有所减少。线粒体结构和功能的完整是 Leydig 细胞正常合成睾酮所必需的条件^[10]。高脂饮食可引起血脂增高, 睾丸局部代谢状态发生改变, 产生过量自由基, 引发睾丸微环境的氧化应激 (OS), 使线粒体 DNA 受到损伤^[6]。课题前期研究^[11]显示, HL 小鼠睾丸 Leydig 细胞的线粒体出现空泡化改变。完整的线粒体膜电位也是 StAR 转运胆固醇所必需的, 而活性氧能够破坏线粒体膜电位的完整性, 继而影响 StAR 的转运效率和睾酮的合成^[12]。

有文献^[8]报道, 抗氧化剂可以显著改善高胆固醇血症引发的精子异常和雄性生育力下降。有研究^[13]表明, 抗氧化剂褪黑素可有效保护 HL 导致的

小鼠睾丸组织超微结构损伤。SIMV 有降脂、降低动脉粥样硬化的风险等功效;同时,长期应用可以改善与高血脂相关的 OS^[14]。研究结果显示,经 SIMV 处理后的高脂饮食小鼠血清 LDL-C 略有降低(种属差异性可能是 LDL-C 降低不明显的原因^[15]),TC 显著下降。因此推测 SIMV 可能通过调节血脂代谢紊乱和改善 OS,减轻 Leydig 细胞线粒体结构和功能的损害,从而保护其合成睾酮的能力,保障精子的正常发生。

SIMV 可能还通过其他的作用机制保护高脂饮食小鼠 Leydig 细胞的睾酮合成能力。肥胖及内脏脂肪组织分泌脂肪因子和激素的增加会促进性腺机能减退的发生^[5]。超重可负反馈调节下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴,使睾酮合成下降。本研究结果表明:SIMV 的干预使高脂饮食小鼠体重增加的趋势得到遏制,从而可能通过减少脂肪组织脂肪因子和激素的分泌,对 HPG 轴的负反馈调控作用进行调节,进而增加 Leydig 细胞的睾酮合成,提高体内的睾酮水平。SIMV 对 HPG 轴的影响也值得进一步研究。

本课题阐明了 HL 导致睾丸 Leydig 细胞合成睾酮能力下降的分子机制及降脂药 SIMV 对高脂饮食小鼠 Leydig 细胞睾酮合成能力的保护作用,这对 HL 及 MS 相关男性生育力下降的预防和治疗具有一定的临床参考意义。

参考文献

- [1] Cornier M A, Dabelea D, Hernandez T L, et al. The metabolic syndrome[J]. *Endocr Rev* 2008, 29(7): 777-822.
- [2] Katcher H I, Hill A M, Lanford J L, et al. Lifestyle approaches and dietary strategies to lower LDL-cholesterol and triglycerides and raise HDL-cholesterol[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2009, 38(1): 45-78.
- [3] Balamurugan G, Shantha A. Effect of Erythrina variegata seed ex-

- tract on hyperlipidemia elicited by high-fat diet in wistar rats[J]. *J Pharm Bioallied Sci* 2010, 2(4): 350-5.
- [4] Guay A T. The emerging link between hypogonadism and metabolic syndrome[J]. *Androl* 2009, 30(4): 370-6.
- [5] Du Plessis S S, Cabler S, McAlister D A, et al. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility[J]. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(3): 153-61.
- [6] Rato L, Alves M G, Dias T R, et al. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters[J]. *Androl*, 2013, 51(3): 495-504.
- [7] Kasturi S S, Tannir J, Brannigan R E. The metabolic syndrome and male infertility[J]. *J Androl* 2008, 29(3): 251-9.
- [8] Shalaby M A, el-Zorba H Y, Kamel G M. Effect of alpha-tocopherol and simvastatin on male fertility in hyper-cholesterolemic rats[J]. *Pharmacol Res* 2004, 50(2): 137-42.
- [9] Yamamoto Y, Shimamoto K, Sofikitis N, et al. Effects of hypercholesterolaemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(6): 1516-21.
- [10] Allen J A, Shankara T, Janus P, et al. Energized, polarized and actively respiring mitochondria are required for acute Leydig cell steroidogenesis[J]. *Endocrinol* 2006, 147(8): 3924-39.
- [11] 张凯,贾雪梅,汪渊,等.高脂饮食对小鼠睾丸超微结构的影响[J]. *安徽医科大学学报* 2008, 43(6): 624-7.
- [12] Diemer T, Allen J A, Hales K H, et al. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis[J]. *Endocrinol* 2003, 144(7): 2882-91.
- [13] 张凯,吕正梅,贾雪梅,等.褪黑素对高脂饮食小鼠睾丸 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(4): 368-71.
- [14] Farah R, Shurtz-Swirski R, Dorlechter F. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients: effect of statins[J]. *Minerva Cardioangiol* 2010, 58(2): 175-81.
- [15] Wang Y X, Martin-McNulty B, Huw L Y, et al. Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E[J]. *Atherosclerosis* 2002, 162(1): 23-31.

Effect of simvastatin on expression of StAR and P450scc in testis of mice with hyperlipidemia

Wang Huijun^{1,2}, Lü Zhengmei^{1,2}, Rong Yuluo³, et al

(¹Dept of Histology and Embryology, ²Central Laboratory of Molecular Function,

³The 2012 General Practice Medicine Specialty, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of hyperlipidemia(HL) on the testosterone synthesis of Leydig cells and the protection conferred by simvastatin(SIMV) treatment. **Methods** Eighteen C57BL/6J male mice were randomly divided into hyperlipidemia group(HL group), simvastatin treatment group(SIMV group) and control group (下转第 720 页)

- zation of the cell membrane and targeting of mitochondria [J]. *Exp Cell Res* 2007, 313(12): 2634–50.
- [7] 李素萍, 秦宜德, 董琼珠, 等. 饲喂乳源免疫调节肽对大鼠生长和免疫的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2005, 40(6): 499–501.
- [8] 顾芳, 秦宜德, 董华胜, 等. 乳源免疫调节肽对小鼠抗氧化和抗疲劳作用研究 [J]. *营养学报* 2006, 28(4): 326–8.
- [9] Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K, et al. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells [J]. *Virus Res* 2000, 66(1): 51–63.
- [10] 张文晓, 秦宜德, 何晓光, 等. 乳铁蛋白抗菌-乳源免疫调节肽的载体构建及在大肠杆菌中的表达和纯化 [J]. *安徽医科大学学报* 2012, 47(6): 641–4.
- [11] Levine D A, Bogomolny F, Yee C J, et al. Frequent mutation of the PI3KCA gene in ovarian and breast cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(8): 2875–8.
- [12] Arboleda M J, Lyons J F, Kabbinnar F F, et al. Overexpression of Akt2 protein kinase beta leads to up-regulation of beta1 integrins increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(2): 196–206.
- [13] Shibuya E K. G₂ cell cycle arrest—a direct link between PKA and Cdc25C [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(1): 39–41.
- [14] Jean C S, Se J J, Fadlo R K, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1): 4000–4.
- [15] Ho Y S, Duh J S, Jeng J H, et al. Griseofulvin potentiates antimetastatic effects of 5-fluorouracil through induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(3): 393–401.

Effect of antibacterial-immunomodulating fusion peptide on proliferation and apoptosis

Tang Yigui, Li Xiaoqin, Liu Chen, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of immunomodulating fusion peptide (AIFP) on human ovarian cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** The ovarian cancer cell proliferation of both the SKOV3 and primary treading with AIFP *in vitro* were assayed by MTT method. Apoptotic ratios of these cells were measured by flow cytometry (FCM) *in vitro*. The mRNAs of genes (Akt, CDC25C and cyclinB1) related to cell apoptosis and proliferation were assayed by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, AIFP had significant effect on inhibiting cell proliferation and promoted its apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which were similar in primary ovarian cancer cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). By RT-PCR analysis, AIFP could significantly decrease the expressions of genes (Akt, CDC25C and cyclinB1) related to cell apoptosis and proliferation in SKOV3 cell line. **Conclusion** AIFP can decrease the proliferation of human ovarian cancer cell and induce their apoptosis. AIFP can down-regulate Akt, CDC25C and cyclinB1 genes expressions, which may affect ovarian cancer cell proliferation and apoptosis.

Key words AIFP; SKOV3; proliferation; apoptosis

(上接第 714 页)

(CTRL group). After 4 months, the body weight and serum lipid profiles were detected. Leydig cells were evaluated by 3 β -HSD immunohistochemical staining. Expressions of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P450 Cholesterol side chain lyase (P450scc) were determined by RT-PCR and Western blot. **Results** The high-fat diet led to a significant increase in body weight, total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in HL group and SIMV group as compared to CTRL group ($P < 0.05$). A significant decrease in body weight and serum TC was noticed in SIMV group in comparison with HL group ($P < 0.05$). The decreased mRNA and protein expressions of testicular StAR and P450scc were observed in hyperlipidemic mice as compared to CTRL group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The StAR and P450scc expressions were significantly improved in SIMV group in comparison with the HL group ($P < 0.01$). There were no significant differences of Leydig cells number among these experimental groups. **Conclusion** SIMV may have a role in protecting Leydig cell function against metabolic damage caused by HL.

Key words testis; StAR; P450scc; hyperlipidemia; simvastatin