

·基础研究·

老年雄性大鼠睾丸类固醇合成酶与间质细胞形态的变化

邵迎红 母义明 李明 李江源

【摘要】 目的 通过测定老年雄性SD大鼠睾丸类固醇合成急性调节蛋白(StAR)、17β-羟类固醇脱氢酶(17β-HSD)表达,观察睾丸间质和Leydig细胞结构的变化,探讨老年大鼠性腺功能减退的机制。方法 用人绒毛膜促性腺激素(hCG)连续刺激3月龄和24月龄雄性SD大鼠,测定基础状态 and hCG刺激后血清睾酮(T)、睾丸StAR、17β-HSDⅢmRNA的表达,对不同年龄大鼠睾丸间质和Leydig细胞进行光镜和电镜检查。结果 (1)老年SD大鼠基础状态 and hCG刺激后血清T水平和17β-HSDⅢmRNA的表达显著低于青年大鼠,StAR mRNA表达无明显变化;(2)老年大鼠睾丸间质中成纤维细胞增生明显而Leydig细胞数量减少,并出现退行性改变, hCG刺激8 d后,青年和老年大鼠两组睾丸形态学均无明显变化。结论 雄性大鼠睾丸17β-HSDⅢmRNA表达以及Leydig细胞形态学随着增龄的明显异常可能是老年SD大鼠T合成减少的主要影响因素。

【关键词】 衰老;大鼠;睾丸;睾酮;类固醇合成急性调节蛋白;17β-羟类固醇脱氢酶;形态学

The changes of steroidogenic enzymes and Leydig cell morphology in aged rat testis

SHAO Yinghong, MU Yiming, LI Ming, et al

Department of Geriatric Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the possible mechanisms of decreasing steroidogenic function in the aged rat testes through determining the effects of aging on the steady-state levels of the mRNAs of testicular steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase(17β-HSD), and observing the morphology of the testes in the aged male rats.

Methods The young male rats and old male rats were treated with human chorionic gonadotropin(hCG) continuously for three times and then the rat serum testosterone (T) levels and the mRNA levels of StAR, 17β-HSD Ⅲ were determined respectively by chemiluminescent enzyme immunoassay(CLIA) and RT-PCR. At the same time, the morphology of testis interstitial tissue and Leydig cells were studied under light microscope and electronmicroscope. **Results** (1)The levels of serum T and 17β-HSDⅢ mRNA of aged SD rats decreased significantly before and after hCG stimulation, and the StAR mRNA level in aged testes was similar to that in young testis. (2) The appearance of testis in aged SD rat was gloomy and loose in texture. In contrast to the testis of young rats, the number of fibroblasts in the testis interstitial tissue of the aged rat was significantly increased and the number and the size of Leydig cells were significantly decreased. Leydig cells in aged rats exhibited retrograde changes. The treatment of hCG had no effect on the morphological appearance of Leydig cells in both aged and young rats. **Conclusion** The morphological abnormalities of Leydig cells from aged testis and the reduction in the level of 17β-HSDⅢ are contributive to the age-related hypogonadism.

【Key words】 aging; rat; testis; testosterone; steroidogenic acute regulatory protein; 17β-hydroxysteroid dehydrogenase; morphology

中老年男性性腺功能减退以及伴随的临床表现越来越受到关注。与女性不同,中老年男性性腺功

能减退发生的机制较复杂,目前还不完全明确^[1]。本研究用长期饲养 Sprague-Dawley (SD)大鼠制成自然衰老模型,观察衰老大鼠性腺激素水平、睾丸组织学和睾丸类固醇合成过程的变化,以期探讨衰老对大鼠睾丸功能的影响和机制。

基金项目:国家重点基础研究发展规划(G2000057008)

收稿日期:2005-05-08

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院老年内分泌科(邵迎红);内分泌科(母义明、李明、李江源)

作者简介:邵迎红,女,1969年9月生,吉林省桦甸市人,医学博士,主治医师。Tel:010-66936403

通讯作者:母义明,010-66939841, E-mail: muyiming@301hospital. com. cn

1 材料和方法

1.1 材料 雄性纯系SD大鼠由解放军总医院实验动物中心提供;人绒毛膜促性腺激素(human

chorionic gonadotropin, hCG)购自中国科学院动物研究所,纯度 6000 IU/mg。RNA 提取试剂盒(Trizol)和 SuperScript II 反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。逆转录酶(M-MLV)、*Taq* DNA 聚合酶、Oligo dT、dNTPs 和 Primer-a-gene 试剂盒购自 Promega 公司。³²P-dCTP 购自中国同位素公司。PE9700 全自动 PCR 仪系 PE 公司产品。ACS:180 化学发光分析仪系美国 Chiron 公司产品。H-7000 透射电镜和 BH-2000 显微镜分别由日本日立公司和 Olympus 公司生产。

1.2 动物分组及处理 3月龄 SD 大鼠和 24月龄 SD 大鼠随机分为青年对照组($n=4$)、青年 hCG 组($n=10$)、老年对照组($n=6$)和老年 hCG 处理组($n=10$)。hCG 处理组按 50U/kg 体重肌肉注射,连续 3 次,每次间隔 48h,最后一次注射后 48h 处死大鼠,采血用于激素测定,并迅速分离睾丸组织。

1.3 大鼠睾丸总 RNA 提取和 cDNA 合成 取液氮保存的大鼠睾丸 100 mg,按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA, -80℃ 冻存。取 2μg 睾丸总 RNA,采用 SuperScript II 试剂盒,以 Oligo dT 为引物并根据说明进行反转录合成 cDNA。

1.4 PCR 反应 PCR 扩增类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)的上游/下游引物为 CAACACTCTACAGTACG/CTAGTGTCTAATGACTACTACC(扩增片段长度 777 bp)。扩增 17β-羟类固醇脱氢酶(17β-hydroxysteroid dehydrogenase, 17β-HSD) III 的上游/下游引物为 AITTTACAGAGAAGACATCA /GGGGTCAGCACCTGAATAATG(扩增片段长度 815 bp)。

两者均扩增 18 个循环(94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s 和 72℃ 延伸 45s)。扩增 β-actin 的上游/下游引物为 CCAACTGGCAGCATATGG /TAGGGCAACATAGCACAGC(扩增片段长度 434 bp),扩增 18 个循环(94℃ 变性 20s, 58℃ 退火 20s 和 72℃ 延伸 30s)。

1.5 PCR 产物的 Southern 杂交 取 10μl PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶在碱性液变性后将 DNA 转移至尼龙膜。采用³²P-dCTP 和 Primer-a-gene 试剂盒标记寡核苷酸探针。

各种探针的序列为 StAR: CCCTCAAAGACCAAACCTCACGTGGCTGC; 17β-HSD III: TATCCAGCTGCTGACCCCTTATTCTGTTC; β-actin: AAGCCAAACCGTGAAGATGACCCAGATC。DNA 尼龙膜与标记探针在 45℃ 杂交过夜,经 X 光片显影后测定其灰度,以 β-actin 为内参,用各种 DNA 的灰度与 β-actin 灰度的比值表示其表达量。

万方数据

1.6 激素测定 血清睾酮(testosterone, T)和雌二醇(estradiol, E₂)水平采用化学发光法测定,批内和批间变异系数分别为 5.3% ~ 5.5% 和 5.2% ~ 6.7%。

1.7 大鼠睾丸间质细胞形态学观察 大鼠睾丸组织经 10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察睾丸间质内血管、纤维和 Leydig 细胞的结构。睾丸组织经 3% 戊二醛液固定,常规制作超薄片,用透射电镜对 Leydig 细胞细胞核、线粒体和内质网等超微结构进行观察。

1.8 统计学分析 所有数据均以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 衰老大鼠血清 T 水平、睾丸 StAR、17β-HSD III mRNA 表达的变化 老年组大鼠平均睾酮水平(7.5 ± 2.7) nmol/L 明显低于青年组大鼠(42.7 ± 9.5) nmol/L ($P < 0.05$)。连续 hCG 刺激后,两组的睾酮水平均显著增高,但老年组大鼠(60.1 ± 19.7) nmol/L 仍显著低于青年组(114.2 ± 30.6) nmol/L ($P < 0.01$)。

老年组大鼠 StAR mRNA 表达水平略低于青年组大鼠,分别为(0.86 ± 0.27)和(1.14 ± 0.23)。经 hCG 刺激后,老年组大鼠(1.63 ± 0.31)和青年组大鼠(1.78 ± 0.07) StAR mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.01$),老年组仍略低于青年组,但是没有达到统计学差异(图 1)。

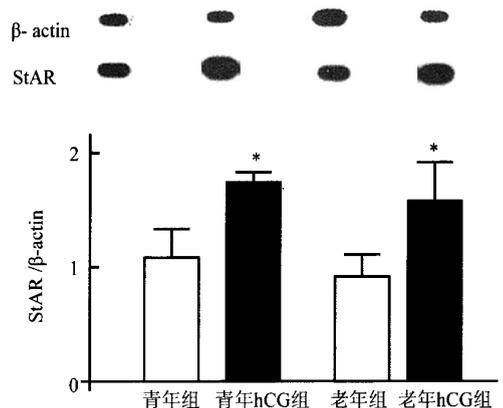


图 1 不同年龄大鼠 hCG 刺激前后睾丸 StAR mRNA 表达水平的变化
与无 hCG 刺激状态下相比, * $P < 0.01$

未经 hCG 刺激的老年大鼠睾丸 17 β -HSD III mRNA水平(0.40 \pm 0.06)与青年组大鼠(1.13 \pm 0.16)相比显著降低($P < 0.01$)。尽管老年大鼠 17 β -HSD III mRNA 水平在 hCG 作用下明显升高(0.66 \pm 0.06),但仍显著低于青年组大鼠刺激后水平(1.87 \pm 0.12)($P < 0.01$),见图 2。

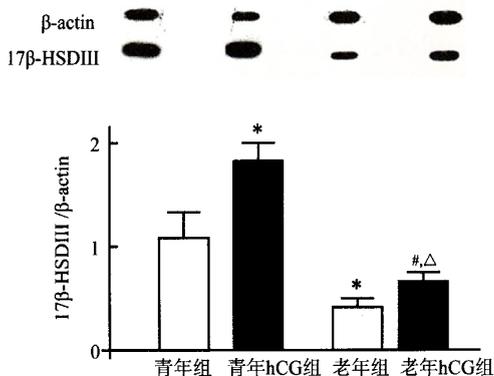


图 2 不同年龄大鼠 hCG 刺激前后睾丸 17-HSD III mRNA 表达水平的变化

与青年大鼠无 hCG 刺激状态比较, * $P < 0.01$;与青年大鼠无 hCG 刺激状态比较, # $P < 0.01$;与老年大鼠无 hCG 刺激状态比较, Δ $P < 0.05$

2.2 老年大鼠组织学的改变 大体标本:与青年大鼠比较,其色泽灰暗,质地也松弛、弹性较差。光镜观察:青年大鼠 Leydig 细胞在间质区中为单个或簇状分布,呈多边形或三角形,细胞较大,胞浆丰富,嗜酸性,着色均匀;细胞核呈圆形或卵圆形,核内染色质均匀分布,核仁明显。老年大鼠 Leydig 细胞排列更紧密,细胞数量较少,梭形成纤维细胞比青年大鼠增多;单个间质细胞变小,胞浆减少、呈颗粒状,细胞核变形、深染,染色质分布不均匀(图 3)。hCG 刺激后,青年和老年大鼠睾丸与各自对照组相比无明显变化。电镜观察:青年大鼠睾丸间质细胞含有丰富的滑面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER)、线粒体、高尔基复合体、少量脂滴和溶酶体;细胞核呈圆形或椭圆形,染色质均匀分布于周边,核仁明显。老年大鼠间质细胞线粒体、滑面内质网减少,线粒体肿胀,板状嵴模糊、消失,内质网扩张,有不同程度的局灶性弥漫性囊泡变性,内质网广泛扩张的细胞呈筛状;脂褐素增多。细胞核核膜内陷,染色质呈斑块状,分布不均匀,核仁消失(图 4)。hCG 作用下虽然血清 T 水平升高,但细胞内结构未见显著变化。

万方数据

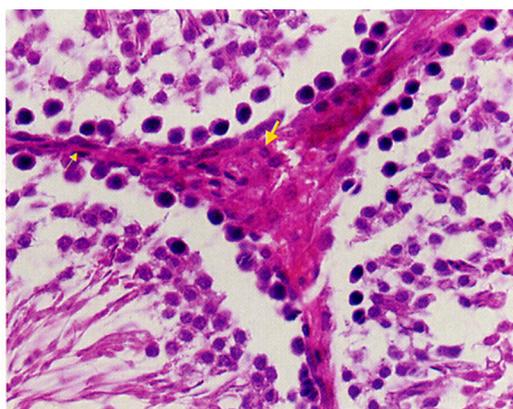


图 3 老年大鼠睾丸间质区的光镜检查(1 \times 400) 间质中成纤维细胞增生,如 \rightarrow 所示, Leydig 细胞减少,细胞缩小,胞浆颗粒状细胞核浓集、深染,染色质分布不均匀, \rightarrow 所示

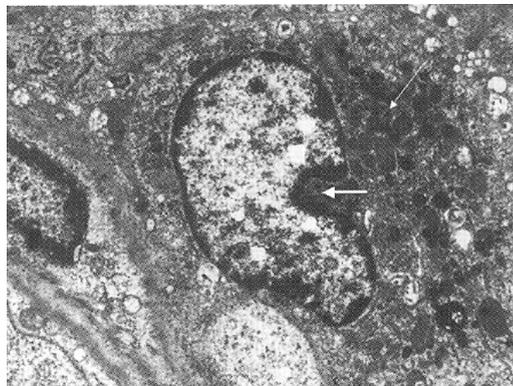


图 4 老年大鼠睾丸 Leydig 细胞的电镜检查(1 \times 5000) Leydig 细胞线粒体肿胀,内质网扩张,局部胞浆呈囊泡状,脂褐质增多, \rightarrow 所示,核膜内陷, \rightarrow 所示

3 讨论

以往研究发现,6月龄 SD 大鼠睾丸即出现衰老现象^[2],增龄使 SD 大鼠^[3]和其他种属大鼠^[4]血清 T 水平进一步下降。本研究显示,hCG 刺激后老年大鼠血清 T 水平明显升高,但仍显著低于青年大鼠水平。老年大鼠血清 T 水平降低的机制尚无定论。有学者认为促黄体激素(luteinizing hormone, LH)分泌减少是其原因之一;但许多研究也证实衰老引起睾丸酮分泌功能减退还存在间质细胞自身的原因^[3]。

研究证实 LH/hCG 通过调节睾丸 Leydig 细胞中

StAR的表达与合成,改变类固醇激素合成的底物——胆固醇与合成酶的结合,从而对T合成发挥重要作用^[3,4],Leers-Sucheta等^[5]发现,hCG刺激体外培养的老年SD大鼠睾丸Leydig细胞,StAR蛋白表达水平明显低于青年大鼠。老年棕色挪威(BN)大鼠睾丸Leydig细胞StAR mRNA和蛋白表达均降低,虽然LH刺激后StAR mRNA和蛋白水平升高,但仍显著低于LH刺激后青年大鼠水平^[4]。然而本研究的结果显示,在基础状态 and hCG刺激后,老年SD大鼠睾丸StAR mRNA水平与青年SD大鼠无显著差异,表明老年雄性SD大鼠血清T水平降低可能并非由于StAR产生减少所致。

17 β -HSD是类固醇激素合成中睾丸所独有的酶,催化睾酮合成的最后一步。近年有研究表明伴随老年BN大鼠间质细胞睾酮合成降低,17 β -HSD活性也明显下降^[6],但未见有关该酶mRNA表达和蛋白合成水平改变的报道。本研究发现老年SD大鼠睾丸17 β -HSD III mRNA水平明显低于青年组大鼠。可见伴随着衰老,雄性大鼠血清睾酮水平降低,睾丸17 β -HSD III水平也显著降低。经连续hCG刺激后,青年组和老年组大鼠17 β -HSD III mRNA含量均显著提高,但老年组大鼠17 β -HSD III mRNA仍未达到青年组水平。提示老年SD大鼠17 β -HSD III对hCG的刺激仍有一定的储备能力,但已经达不到青年大鼠的水平。

文献^[7]报道衰老大鼠睾丸Leydig细胞数量减少。而Leydig细胞大小与睾酮合成的能力呈线性正相关^[8]。本研究显示老年SD大鼠睾丸外观色泽灰暗,质地松弛弹性较差。光镜下观察老年大鼠Leydig细胞数目明显减少,大鼠睾丸Leydig细胞退化,表现为胞浆空泡变性并伴有线粒体和内质网减少,线粒体肿胀,内质网扩张,内质网广泛扩张的细胞呈筛状,同时脂褐质增加,细胞核变形,染色质不均匀。提示衰老大鼠T的减少与Leydig细胞数量与结构变化有关。

综上所述,虽然短期hCG刺激使老年大鼠血清T水平有所升高,但仍未达到青年大鼠水平,老年大

鼠睾丸Leydig细胞的形态学改变并没有明显恢复,提示老年大鼠睾酮合成功能的减退与睾丸Leydig细胞睾酮相关酶和形态学的改变有关。衰老对Leydig细胞的作用机制未明,有人认为在睾丸Leydig细胞内细胞色素P450酶催化类固醇合成的生理过程中产生氧自由基^[9],通过影响类固醇合成酶而抑制Leydig细胞类固醇的产生^[10]。

参考文献

- 1 Culty M, Luo LD, Yao ZX, et al. Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cells. *J Androl*, 2002, 23:439-447.
- 2 Mendis-Handagama SM, Gelber SJ. Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months of age. *Tissue Cell*, 1995, 27: 689-699.
- 3 Chen LH, Hardy MP, Zirkin BR. Age-related decreases in Leydig cell testosterone production are not restored by exposure to LH *in vitro*. *Endocrinology*, 2002, 143:1637-1642.
- 4 Luo LD, Chen HL, Zirkin BR. Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J Androl*, 2001, 22:149-156.
- 5 Leers-Sucheta S, Stocco DM, Azhar S, et al. Down-regulation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in rat Leydig cells: implications for regulation of testosterone production during aging. *Mech Ageing Dev*, 1999, 107:197-203.
- 6 Chen HL, Zirkin BR. Long-term suppression of Leydig cell steroidogenesis prevents Leydig cell aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14877-14881.
- 7 杜育达,李佳睿,黄晶,等.大鼠睾丸衰老及脂质过氧化. *中国老年学杂志*, 2002, 22: 129-130.
- 8 Mendis-Handagama SMLC, Kerr JB, De Kretser DM, et al. Experimental cryptorchidism in the adult mouse: (qualitative and quantitative light microscopic morphology). *J Androl*, 1990, 11: 539-547.
- 9 Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela T, et al. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*, 1996, 137: 105-112.
- 10 Tabatabaie T, Floyd RA. Cellular aging and cell death. New Nork: Wiley-Liss, 1996. 35-49.