

# 恒河猴睾丸间质细胞对支持细胞分泌雌二醇的影响

王训立 谢金东 周建华

福建中医药大学 福州 350108

**摘要:**采用无血清培养的方法,分析了促肾上腺皮质激素皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、cAMP、内啡肽(endorphin)和纳络酮(naloxone)对原代共培养的恒河猴(*Macaca mulatta*)睾丸间质细胞与支持细胞雌二醇分泌水平的影响。结果显示:ACTH、LH、cAMP和纳络酮对原代共培养恒河猴睾丸间质细胞与支持细胞的雌二醇分泌水平具有促进作用,并且这种影响与共培养的间质细胞数量呈线性关系,即共培养的间质细胞数量增加,雌二醇分泌水平亦明显上升;而内啡肽对原代共培养恒河猴睾丸间质细胞与支持细胞的雌二醇分泌水平有明显的抑制作用。研究表明,恒河猴睾丸的间质细胞对支持细胞分泌雌二醇具有调节作用。

**关键词:**恒河猴;间质细胞;支持细胞;雌二醇

**中图分类号:**Q952 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2012)02-31-05

## Influence of Leydig Cells on Estradiol Secretion of Sertoli Cells in Rhesus Monkey

WANG Xun-Li XIE Jin-Dong ZHOU Jian-Hua

*Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China*

**Abstract:** By using serum-free co-culture of Leydig cells and Sertoli cells isolated from Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*), we analyzed the effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), luteinizing hormone (LH), cAMP, endorphin, and naloxone on the secretion of estradiol. We showed that ACTH, LH, cAMP, and naloxone stimulated estradiol production in co-cultured system and this stimulation was enhanced by increased Leydig cells. We also showed that endorphin inhibited estradiol secretion by Leydig cells and Sertoli cells when a certain amount of Leydig cells were present. Thus, these results suggest the amount of Leydig cells may play an important role in estradiol production in Leydig-Sertoli cells co-culture.

**Key words:** Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*); Leydig cells; Sertoli cells; Estradiol

支持细胞(Sertoli cells)是生精小管上皮组织具有重要功能的一种细胞,对生殖细胞有支持作用,同时,支持细胞具有产生雌激素的功能,支持细胞的雌激素合成和分泌受多种因素的影响,既有类固醇类物质,也有非类固醇类物质<sup>[1]</sup>。黄体生成素(luteinizing hormone, LH)刺激睾丸间质细胞(Leydig cells)内睾酮的合成,间质细胞产生的睾酮,促进支持细胞雌激素的

分泌<sup>[2]</sup>。在胆固醇转化成雄激素的过程中,cAMP与蛋白激酶的调节亚基相结合,促进睾酮的合成,调节支持细胞雌激素的分泌<sup>[3]</sup>。非

**基金项目** 福建省科技创新平台项目(No. 2008L0002);

**第一作者介绍** 王训立,男,副研究员;研究方向:实验动物学、生殖生物学;E-mail:wangxunli@139.com。

收稿日期:2011-09-28,修回日期:2012-01-05

类固醇性调节物质如  $\beta$  内啡肽的拮抗物纳络酮和促肾上腺皮质激素等,对支持细胞分泌雌激素功能具有调节作用<sup>[4]</sup>。

在生命科学和医学的研究工程中,非人灵长类动物是人们首选的高等级的实验动物模型,而恒河猴(*Macaca mulatta*)作为一种实验动物现已得到了应用<sup>[5]</sup>。近年来,我们进行了恒河猴睾丸内激素调控的离体研究<sup>[6]</sup>,但间质细胞对支持细胞分泌雌激素的作用还不清楚。因此,在体外共培养的条件下,探讨恒河猴睾丸间质细胞对支持细胞分泌雌激素水平的调节作用,将有利于进一步了解恒河猴睾丸内部的激素调节机理。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂** McCoy's 5a 培养基购于 Gibco 公司;促肾上腺皮质激素( adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、黄体生成素( luteinizing hormone, LH)、cAMP、内啡肽( endorphin)、纳络酮( naloxone)购于 Sigma 公司;雌二醇放射免疫测定药盒为上海原子核研究所的产品。

**1.2 实验动物** 恒河猴由福建省人口和计划生育科学技术研究所提供,实验动物生产许可证号 SCXK(闽)2005-0002,实验动物使用许可证号 SYXK(闽)2005-0015,单笼饲养,经检验符合普通级实验动物标准。

**1.3 间质细胞和支持细胞的分离** (1)间质细胞分离:将取得的睾丸组织,在无菌条件下,剥除白膜,分离出睾丸实质剪碎,用 0.1% BSA-Hepes 溶液混合剪碎的睾丸组织,加入胶原酶( II),在 37℃ 消化 45 min。在尼龙滤网上过滤,离心(1 000 r/min, 5 ~ 8 min)收集细胞。经 BSA 密度梯度重力沉降分离细胞,得到的间质细胞用培养液离心冲洗 3 次。取 20  $\mu$ l 细胞悬液加 20  $\mu$ l Trypan blue 染色。用血球计数板,确定成活的细胞数目,此时得到的支持细胞纯度达 95% 以上<sup>[7]</sup>。(2)支持细胞分离:将取得的睾丸组织,在无菌条件下,剥除白膜,分离出睾丸实质剪碎,用 0.1% BSA-Hepes 溶液混合剪碎的睾丸组织,加入胶原酶( II),在 37℃

消化 45 min。在尼龙滤网上过滤,离心(1 000 r/min, 5 ~ 8 min)收集细胞。经 BSA 密度梯度重力沉降分离细胞,得到的支持细胞用培养液离心冲洗 3 次。取 20  $\mu$ l 细胞悬液加 20  $\mu$ l Trypan blue 染色。用血球计数板,确定成活的细胞数目,此时得到的间质细胞纯度达 95% 以上<sup>[8]</sup>。

**1.4 间质细胞和支持细胞的培养** 细胞培养液由 McCoy's 5a 培养基配制。分离获得的支持细胞按每 1 ml 培养液含  $10^5$  个细胞接种到  $\varnothing 35$  mm 的培养皿中,同时接种间质细胞,间质细胞按每 1 ml 培养液含  $0.5 \times 10^3$ 、 $10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $10^5$  个细胞分别接种。两种共培养的细胞在 5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空气和 37℃ 的条件下培养。每 24 h 更换培养液 1 次。第 1 次更换培养液时,用培养液洗 2 次以去除细胞碎片和内源性激素。

在研究外源因子对共培养细胞的影响时,从接种细胞开始连续用外源因子处理 3 d,每天采集培养液并更换新鲜培养液,煮沸 15 min,冻存于 -20℃ 待测定。同样实验重复 3 次。

**1.5 雌二醇的测定** 培养液中的雌二醇含量采用放射免疫测定法测定。培养液中雌二醇不需提取直接测定,雌二醇抗体稀释度为 1: ( $3 \times 10^4$ ),灵敏度为 3 ~ 7 pg,批内误差是 3.0%,批间误差是 3.8%。

**1.6 统计学处理** 每次实验重复 3 次(SPSS 13.0),实验数据经 *t* 检验求 *P* 值。

## 2 结果

**2.1 促肾上腺皮质激素( ACTH)对雌二醇分泌水平的作用** 在体外连续培养 5 d 后,在 ACTH( $10^{-5}$  mol/L)作用下,支持细胞雌二醇的分泌水平与共培养的间质细胞数量有明显的关系,并出现增加间质细胞共培养的数量,雌二醇的分泌量就增多的趋势,结果如图 1 所示。

**2.2 黄体生成素( LH)对雌二醇分泌水平的作用** 在黄体生成素(100 ng/ml)存在条件下,明显促进了共培养细胞雌二醇的分泌水平,且上升的程度与间质细胞数量相关(图 2)。

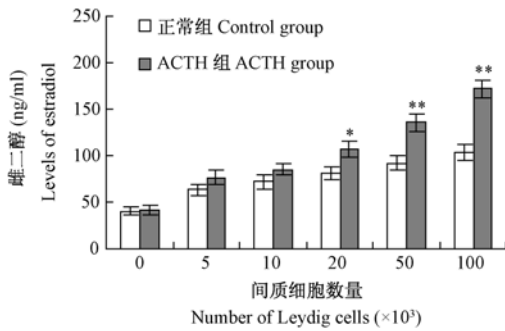


图1 ACTH对共培养的支持细胞雌二醇分泌水平的影响

Fig.1 ACTH affects estradiol secretion level in Leydig-Sertoli cells co-culture

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$   
(平均值  $\pm$  标准差,  $n = 3$ ).

Comparison between control and ACTH, \*  $P < 0.05$ ,  
\*\*  $P < 0.01$  (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

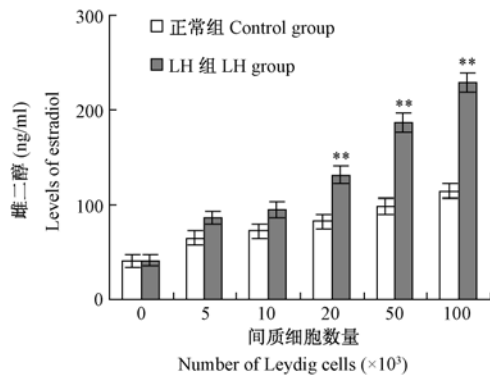


图2 LH对共培养的支持细胞雌二醇分泌水平的影响

Fig.2 LH affects estradiol secretion in Leydig-Sertoli cells co-culture

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$   
(平均值  $\pm$  标准差,  $n = 3$ ).

Comparison between control and LH, \*  $P < 0.05$ ,  
\*\*  $P < 0.01$  (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

**2.3 cAMP对雌二醇分泌水平的作用** 体外共培养的细胞,在连续培养5 d后,加入cAMP ( $10^{-5}$  mol/L),观测对雌二醇分泌水平的影响。在cAMP作用下,分离后的支持细胞与间质细胞共培养,雌二醇分泌水平与共培养的间质细胞的数量有明显的线性关系,以含有 $10^5$ 个共培养的间质细胞组别最为显著(图3)。

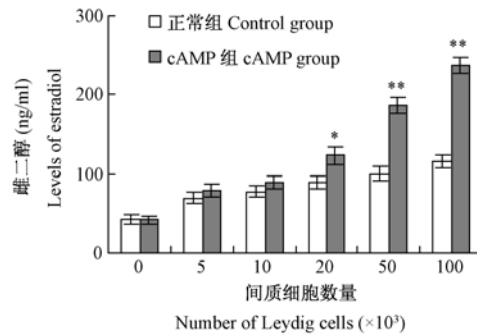


图3 cAMP对共培养的支持细胞雌二醇分泌水平的影响

Fig.3 cAMP affects estradiol secretion in Leydig-Sertoli cells co-culture

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$   
(平均值  $\pm$  标准差,  $n = 3$ ).

Comparison between control and cAMP, \*  $P < 0.05$ ,  
\*\*  $P < 0.01$  (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

**2.4 内啡肽(endorphin)对雌二醇分泌水平的作用** 体外共培养的细胞,经内啡肽( $10^{-7}$  mol/L)处理48 h后,结果发现内啡肽对雌二醇的分泌有明显的抑制作用,雌二醇的分泌量随着共培养的间质细胞的数量增加,出现显著的下降(图4)。

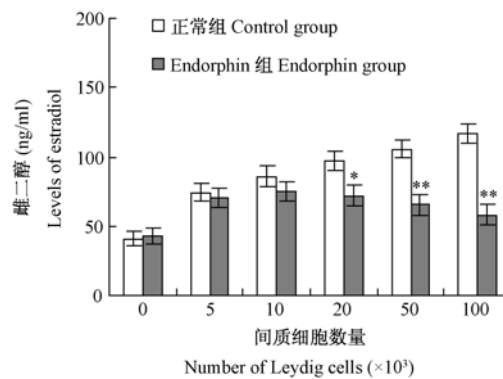


图4 Endorphin对共培养的支持细胞雌二醇分泌水平的影响

Fig.4 Endorphin affects estradiol secretion in Leydig-Sertoli cells co-culture

与正常组比较: \*  $P < 0.05$ ,  
\*\*  $P < 0.01$  (平均值  $\pm$  标准差,  $n = 3$ ).

Comparison between control and endorphin, \*  $P < 0.05$ ,  
\*\*  $P < 0.01$ , (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

**2.5 纳络酮 (naloxone) 对雌二醇分泌水平的作用** 纳络酮 ( $10^{-7}$  mol/L) 对共培养的细胞雌二醇的分泌, 产生刺激反应现象, 随着共培养的间质细胞的数量增加, 培养液中雌二醇的分泌水平出现明显的上升 (图 5)。

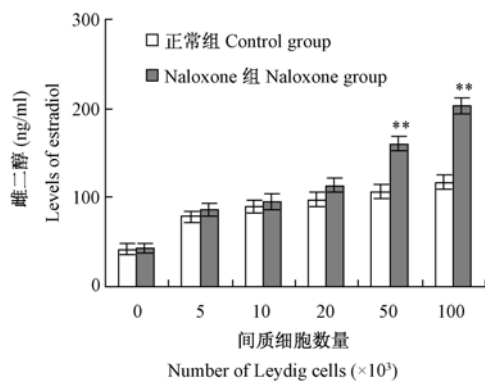


图 5 Naloxone 对共培养的支持细胞雌二醇分泌水平的影响

Fig. 5 Naloxone affects estradiol secretion in Leydig-Sertoli cells co-culture

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  与正常组比较 (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ )。

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , comparison between control and naloxone (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) .

### 3 讨论

非人灵长类动物的促皮质素释放激素 (corticotropin-releasing hormone, CRH) 调节垂体-肾上腺轴活动、控制机体应激功能等<sup>[9]</sup>。促肾上腺皮质激素 (ACTH) 是维持肾上腺正常形态和功能的重要激素, 在 CRH 的作用下, ACTH 在腺垂体内进行合成和分泌, 对间质细胞的睾酮分泌具有调节功能<sup>[10]</sup>。本实验表明, 在离体的情况下, ACTH 促进了睾丸间质细胞睾酮的合成, 引起支持细胞雌二醇的分泌水平明显上升。因此, 促肾上腺皮质激素对支持细胞的雌二醇分泌功能具有促进作用。

丘脑下部释放的促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 通过门脉系统, 进入腺垂体细胞, 引起 LH 和卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 的释放<sup>[11]</sup>。LH 和 FSH 分别维持着间质细胞和支持细胞的正常功能; LH 作用于间质细胞, 促进

了间质细胞对睾酮的合成和分泌; 支持细胞经过芳香化作用, 将睾酮转变为雌激素<sup>[12]</sup>。本实验发现, 增加恒河猴睾丸间质细胞的数量, 提高支持细胞雌二醇分泌水平, 可能是通过 LH 受体表达增加, 引起间质细胞睾酮合成量的增加, 促进支持细胞雌二醇的分泌水平。

在类固醇激素合成过程中, cAMP 与蛋白激酶的结合, 调节类固醇生产酶的表达和羟化酶系催化作用, 影响睾酮或雌激素的合成<sup>[13]</sup>。在非人灵长类动物睾丸组织中, 支持细胞产生的自分泌因子和曲细精管周围肌样细胞产生的旁分泌因子, 具有调节支持细胞合成雄激素结合蛋白和转铁蛋白等<sup>[14]</sup>。本实验表明, cAMP 对恒河猴睾丸支持细胞分泌功能的调节, 可能通过影响睾酮生物合成中一个或几个酶活性, 对支持细胞分泌雌二醇产生作用。

在间质细胞产生非类固醇性调节物质中有内啡肽受体, 内啡肽与受体结合后, 间质细胞内 LH 的分泌量减少, 从而使间质细胞合成睾酮减少<sup>[15]</sup>。而人注射脑啡肽或内啡肽可抑制 CRH 和 GnRH 的释放, 降低了 ACTH 和 LH 分泌水平; 而阿片拮抗剂纳络酮则有促进 CRH 和 GnRH 释放的作用, 增加了 ACTH 和 LH 分泌水平<sup>[16]</sup>。本实验表明, 内啡肽对恒河猴睾丸支持细胞的分泌功能具有抑制作用; 而纳络酮作用方式与内啡肽相反, 纳络酮对支持细胞的分泌功能具有促进作用。推测其作用机制可能是, 内啡肽作用于间质细胞以后, 干扰间质细胞刺激受体与间质细胞刺激素结合, 从而影响间质细胞产生雄激素, 构成了局部调节的反馈机制。

### 参 考 文 献

- [1] Robert W H, Robert E B. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*, 2004, 131(2): 459-467.
- [2] Bucay N, Yebra M, Cirulli V, et al. A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. *Cell & Molecular Biology*, 2009, 27(1): 68-77.

- [ 3 ] 上官芳芳,史小林. 睾丸支持细胞的功能及其应用的探讨. 解剖学报,2002,33(4): 446-448.
- [ 4 ] Barsoum I B, Bingham N C, Parker K L, et al. Activation of the Hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal Leydig cells and female pseudohermaphroditism. *Developmental Biology*,2009,329(1): 96-103.
- [ 5 ] Isaac J R, Skinner S, Elliot R, et al. Transplantation of neonatal porcine islets and Sertoli cells into nonimmunosuppressed nonhuman primates. *Transplantation Proceedings*,2005,37(1): 487-488.
- [ 6 ] Wang X L. Effect of Estradiol on testosterone secretion in cultured Leydig cells of rhesus monkey. *Development & Reproduction Biology*,2001,S1: 18.
- [ 7 ] 王训立,庄临之,李荣皓,等. 恒河猴睾丸内激素调控的离体研究 I. 恒河猴睾丸 Leydig 细胞的离体培养及激素分泌的研究. *中国实验动物学报*,1998,6(1): 56-60.
- [ 8 ] 王训立,庄临之,李荣皓,等. 恒河猴睾丸内激素调控的离体研究 II. 恒河猴睾丸 Sertoli 细胞的离体培养及激素分泌的研究. *中国实验动物学报*,1998,6(2): 48-53.
- [ 9 ] Jørgensen N, Meyts E R, Main K M, et al. Testicular dysgenesis syndrome comprises some but not all cases of hypospadias and impaired spermatogenesis. *International Journal of Andrology*,2010,33(2): 298-303.
- [ 10 ] Meeker J D, Calafat A M, Hauser R. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. *Environmental Science & Technology*,2010,44(4): 1458-1463.
- [ 11 ] Claus R, Lacorn M, Welter H, et al. Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase 2 in Sertoli cells of boar testes. *Molecular and Cell Endocrinology*,2007,272(1/2): 86-92.
- [ 12 ] Laurich V M, Trbovich A M, O'Neill F H, et al. Müllerian inhibiting substance blocks the protein kinase A-induced expression of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub> lyase mRNA in a mouse Leydig cell line independent of cAMP responsive element binding protein phosphorylation. *Endocrinology*,2002,143(9): 3351-3360.
- [ 13 ] 王训立,李荣皓,庄临之,等. 恒河猴睾丸内激素调控的离体研究 III. 雌激素对恒河猴睾丸 Leydig 细胞睾酮分泌的影响. *中国实验动物学报*,2001,9(3): 189-192.
- [ 14 ] Nayernia K, Lee J H, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Laboratory Investigation*,2006,86(7): 654-663.
- [ 15 ] Lee H M, Oh B C, Lim D P, et al. Role of complement regulatory proteins in the survival of murine allo-transplanted Sertoli cells. *Journal of Korean Medical Science*,2007,22(2): 277-282.
- [ 16 ] Johnson L, Thompson D L Jr, Varner D D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*,2008,105(1/2): 23-51.