

昆明山海棠片致小鼠睾丸损伤模型 TSEG-1 的表达及意义

陈 慧, 杜 伟, 梅小利, 涂如霞, 张 莉, 王天文*

重庆市中药研究院 国家中医药管理局中药药理三级实验室, 重庆 400065

摘要: 本文旨在探讨睾丸特异性表达基因-1 (TSEG-1) 在昆明山海棠片致小鼠睾丸损伤中的表达及意义。将 CD-1 小鼠连续 6 个月给予昆明山海棠片后造成睾丸损伤模型, HE 染色观察睾丸损伤情况, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清睾酮含量, 免疫组化检测睾丸组织半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 的表达, 实时荧光定量 PCR 检测睾丸组织 TSEG-1 的表达。结果表明昆明山海棠片能使 CD-1 小鼠睾丸重量、躯体比指数、脏脑比指数明显降低; 病理学检查显示睾丸被膜下少量曲细精管萎缩, 生精上皮细胞减少或消失; 血清睾酮含量无影响; 免疫组化结果显示 caspase-3 表达明显增加; 实时荧光定量 PCR 检测结果显示 TSEG-1 相对表达量增加。结果提示昆明山海棠片可引起 CD-1 小鼠睾丸受损, 使小鼠 TSEG-1 过表达及生精细胞凋亡增加, 其毒性作用机制可能为通过调控睾丸精母细胞从而抑制精子生成。

关键词: 昆明山海棠片; TSEG-1; 睾酮; 睾丸

中图分类号: R992

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0068-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.010

Expression and significance of TSEG-1 in mouse testis injury model induced by Kunming Shanhaitang tablet

CHEN Hui, DU Wei, MEI Xiao-li, TU Ru-xia, ZHANG Li, WANG Tian-wen*

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chinese Medicine Management
Bureau of the Three Grade Laboratory, Chongqing 400065, China

Abstract: The purpose of this study was to investigate the expression and significance of testicular specific expression gene-1 (TSEG-1) in testicular injury mice induced by Kunming Shanhaitang tablet. CD-1 mice were treated with Kunming Shanhaitang tablet for 6 months to establish a testicular injury model. The testicular injury was observed by HE staining, the content of serum testosterone was detected by ELISA, the expression of caspase-3 in testicular tissue was detected by immunohistochemistry, and the expression of TSEG-1 in testicular tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that Kunming Shanhaitang tablet could significantly reduce the testicular weight, and the ratio index of visceral body and visceral brain in CD-1 mice. Pathological examination showed that a few convoluted seminiferous tubules were atrophied and spermatogenic epithelial cells were reduced or disappeared. Serum testosterone content had no effect. Immunohistochemical results showed that the expression of Caspase-3 was significantly increased. The relative expression of TSEG-1 was increased. The results indicated that Kunming Shanhaitang tablet could induce testis damage, TSEG-1 overexpression and increase the apoptosis of spermatogenic cells in CD-1 mice. The mechanism of its toxicity may inhibit spermatogenesis by regulating testicular spermatocyte.

Key words: Kunming Shanhaitang tablet; TSEG-1; testosterone; testis

睾丸特异性基因 (testis-specific-gene), 是指主要在睾丸组织中表达, 而在机体其他组织中不表达或者极低表达的基因, 主要与睾丸功能有关, 此类基因的正常表达多与睾丸雄激素产生、精子发生有

关^[1]。睾丸特异性表达基因-1 (TSEG-1) 可能参与睾丸发育和精子发生过程中生精细胞死亡机制的调控, TSEG-1 过表达可能启动生精细胞死亡信号, 导致生精细胞的死亡^[2,4]。许多物理因素、化学因素以及某些药物和毒物等均可引起睾丸损伤^[5], 昆明山海棠片为一种可导致动物和人睾丸损伤^[6,7]的中成

药,故本研究旨在探索 TSEG-1 在昆明山海棠片致 CD-1 小鼠睾丸损伤的表达情况及意义。

1 材料与方法

1.1 动物

CD-1 小鼠,SPF 级,雄性,18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。动物实验在重庆市中药研究院中药药理三级实验室进行。

1.2 药物

昆明山海棠片,滇红药业集团玉溪生物制药有限公司生产,批号:20140502,使用时将昆明山海棠片于乳钵中研磨后用纯化水配制为 0.6 g 生药/mL,现配现用。

1.3 试剂

睾酮试剂盒(上海继锦化学科技有限公司);TRzol Reagent(钟鼎生物公司);2×Sybr Green Qpcr Mix(钟鼎生物公司);DEPC(Sigma 公司);Agarose(上海基因公司);SDS(Amresco 公司);兔抗 caspase-3 多克隆抗体(Abcam 公司);兔二步法检测试剂盒(兔增强聚合物法检测系统)(北京中杉金桥生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.4 主要仪器

ST-360 酶标仪(上海科华实验系统有限公司);荧光定量 PCR 仪(BIOER 公司);Allegra 21R 台式高速冷冻离心机(美国 BECKMAN 公司);AR5120 电子天平(美国 AHOMS 公司);M μ LiTemp III 恒温水浴锅、Ofer MV-25 紫外透射仪(美国 Amersham Pharmacia 公司);雪花状制冰机(日本 SANYO 公司);超净工作台(中国苏净集团);ASP300S 组织自动脱水机、HistoCore Arcadia H 石蜡包埋机、RM2235 轮转切片机(德国徕卡有限公司);TR-180 生物组织自动染色机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);CH30 光学显微镜(奥林巴斯株式会社);Mias-2000 病理图像处理系统(四川大学图像处理国家研究所)。

1.5 方法

1.5.1 分组与给药

将 CD-1 小鼠随机分为 2 组,即空白对照组、昆明山海棠片组,每组 3 只,分组当日各组开始灌胃给予相应药物,空白对照组给予纯化水,昆明山海棠片组灌胃给予昆明山海棠片 12.0 g 生药/kg,给药体积为 0.2 mL/10g 体重,每日给药 1 次,连续给药 6 个月。

1.5.2 对血清睾酮含量的影响

小鼠于末次给药次日(24 h 内),眼眶采血,分离血清,采用 ELISA 法测定血清睾酮含量。

1.5.3 对睾丸指数的影响

将采血后小鼠脱颈椎处死,迅速无菌条件下剖取双侧睾丸组织肉眼观察大小情况并称其重量,计算睾丸脏体比、脏脑比指数,左侧睾丸用 4% 的多聚甲醛溶液固定用于组织病理学及免疫组化检查,右侧睾丸低温(-80℃)保存用于 TSEG-1 表达研究。

$$\text{睾丸脏体比指数} = \frac{\text{睾丸重量(g)}}{\text{体重(10 g)}} \times 100\%$$

$$\text{睾丸脏脑比指数} = \frac{\text{睾丸重量(g)}}{\text{脑重量(g)}} \times 100\%$$

1.5.4 对睾丸病理组织学的影响

将用 4% 的多聚甲醛溶液固定的左侧睾丸脱水、浸蜡、包埋,常规病理切片,HE 染色,显微镜下观察睾丸的病理学改变。

1.5.5 免疫组化检测 caspase-3 表达情况

将“1.5.4”项的切片常规二甲苯脱蜡(37℃),梯度乙醇脱水。微波修复组织抗原(切片浸于 PH 9.0 的 Tris-EDTA 抗原修复液中)。PBS 洗 2 min×3 次。加入内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min。PBS 洗 3 min×3 次。滴加一抗(工作液浓度 1:200),4℃孵育过夜。PBS 洗 3 min×4 次。滴加反应增强液,室温孵育 20 min。PBS 洗 3 min×4 次。滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,室温孵育 20 min。PBS 洗 3 min×4 次。加入新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下观察,适时终止。自来水充分冲洗。苏木素复染,盐酸乙醇分化,流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察,拍照。

1.5.6 实时荧光定量 PCR 检测 TSEG-1 表达情况

1.5.6.1 引物设计及合成

引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 The sequence of gene primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
2754TSEG-F	GCGAAGAAGACGGAAAGT
2754TSEG-R	GAGGAATACAGGAGCAGAAG
GAPDH-F	TGTGTCCTCGTGGATCTGA
GAPDH-R	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

1.5.6.2 RNA 提取

RNA 提取步骤依次为:向提前准备好的样品中加入 1 mL TRIzol 试剂(组织块体积不超过 TRIzol 体积的 10%),用移液器反复吹打进行组织匀浆;将上述匀浆液室温放置 5 min,待核酸和蛋白充分解离,每 1 mL TRIzol 试剂用量的匀浆液中加入 0.2 mL 氯仿,盖紧管盖,手动剧烈震荡 15 s,然后室温静置 2~3 min;4 °C 10 000 g,离心 10 min;小心吸取上层无色水相加入到新试管中,同时计算所吸取的水相体积;加入所吸取水相等体积预冷的异丙醇,盖紧管盖,轻轻摇匀;室温静置 10 min,待 RNA 充分沉淀;4 °C 10 000g 离心 10 min;将上清弃除(未丢弃沉淀),每管加入 1 mL 75% 乙醇润洗,盖紧管盖,轻轻晃动离心管,以去除残留的异丙醇和盐分,4 °C 7 500 g 离心 5 min;将上清弃除,打开管盖,将 RNA 沉淀室温挥发不完全干燥;将 RNA 沉淀溶解于适量的无 RNase 水中。

1.5.6.3 RNA 反转录为 cDNA

在 RNase free 的离心管中配制混合液(10 × DNase Buffer 1 μL、模板(RNA)1 μg (< 8 μL)、DNase I 1 μL、RNase free ddH₂O 至 10 μL),移液器轻轻吹打混匀,37 °C,30 min,去除基因组 DNA。

将前述反应液 10 μL 添加 Oligo(dT)18(0.5 μg/μL)1 μL、Random primer(0.1 μg/μL)1 μL、5 × RT Reaction Mix 4 μL、TUREscript H-RTase/RI Mix 0.8 μL、RNase free H₂O to final volume 至 20 μL,25 °C,10 min,42 °C,30 min,85 °C,5 min,将 RNA 反转录成 cDNA。

1.5.6.4 荧光定量 PCR 检测

2 × Sybr Green Qpcr Mix 10 μL、正向引物(10

μM)0.4 μL、反向引物(10 μM)0.4 μL、模板(cDNA)2 μL、ddH₂O 至 20 μL 为反应体系 RT-PCR。94 °C,30 s;94 °C,10 s;60 °C,12 s;72 °C,30 s;循环 45 次,72 °C 单点检测信号,绘制扩增曲线图。95 °C,15 s,60 °C,1 min;95 °C,15 s,连续检测信号,绘制溶解曲线图。每样本 3 次重复,采用 2^{-ΔΔCt} 法对数据进行相对定量分析。

1.5.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间数据采用 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 对血清睾酮含量的影响

昆明山海棠片组睾酮含量与空白对照组组间差异不明显($P \geq 0.05$),提示昆明山海棠片对 CD-1 小鼠睾酮影响不明显。结果见表 2。

表 2 昆明山海棠片对小鼠血清睾酮含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The effects of Kunming Shanhaitang tablet on the serum testosterone in mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	睾酮 Testosterone (pg/mL)
空白对照组 Control	-	31.00 ± 1.61
昆明山海棠片组 Kunming Shanhaitang tablet	12.0	30.71 ± 1.58

2.2 对睾丸指数的影响

与空白对照组比较,昆明山海棠片组 CD-1 小鼠经口染毒昆明山海棠片 6 个月后,给药组小鼠双侧睾丸肉眼观察体积均明显减小,重量明显减轻,脏体比、脏脑比指数亦明显下降 $P < 0.01$,表明昆明山海棠片致 CD-1 小鼠睾丸损伤模型建立成功。结果见表 3。

表 3 昆明山海棠片对小鼠睾丸指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The effects of Kunming Shanhaitang tablet on testis index in mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	体重 Weight (g)	睾丸重量 Testicular weight (g)	脏体比指数 Testis-to- weight ratio (%)	脏脑比指数 Testis-to- brain ratio (%)
空白对照组 Control	-	41.27 ± 2.31	0.273 ± 0.009	6.64 ± 0.53	56.95 ± 1.62
昆明山海棠片组 Kunming Shanhaitang tablet	12.0	36.80 ± 3.37	0.134 ± 0.025 **	3.62 ± 0.50 **	29.12 ± 3.19 **

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,** $P < 0.01$ 。

2.3 病理组织学检查结果

光镜(×400)观察结果显示,空白对照组小鼠睾丸组织结构正常,未见明显病理变化;昆明山海棠片组小鼠睾丸被膜下少量曲细精管萎缩,生精上皮细胞减少或消失。结果见图 1。

2.4 对 caspase-3 表达的影响

结果显示,与空白对照组相比,昆明山海棠片组小鼠睾丸生精上皮细胞 caspase-3 表达明显增加。结果见图 2。

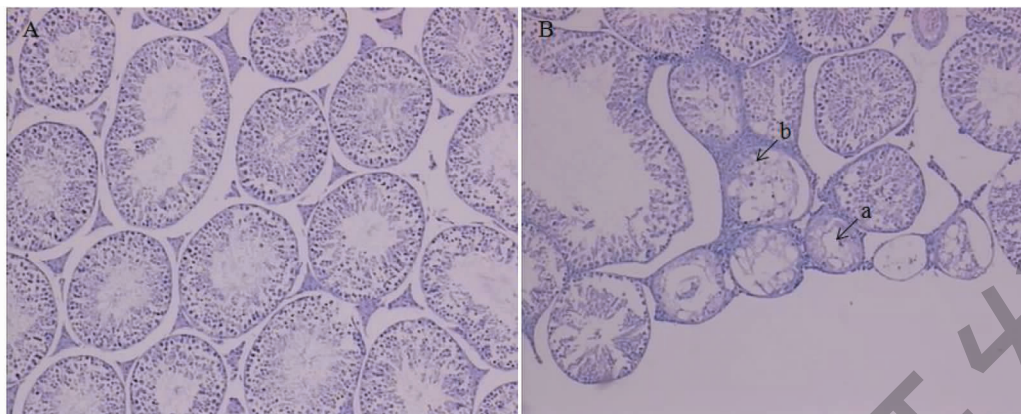


图1 昆明山海棠片对小鼠睾丸组织形态的影响(×400)

Fig. 1 The effects of Kunming Shanhaitang tablet on morphology of testicular tissue of mice(×400)

注:A:空白对照组;B:昆明山海棠片组(下同);a:曲细精管萎缩;b:生精上皮细胞减少。Note:A:Control group;B:Kunming Shanhaitang tablet group(the same below);a:Atrophy of seminiferous tubules;b:Decrease of spermatogenic epithelium cells.

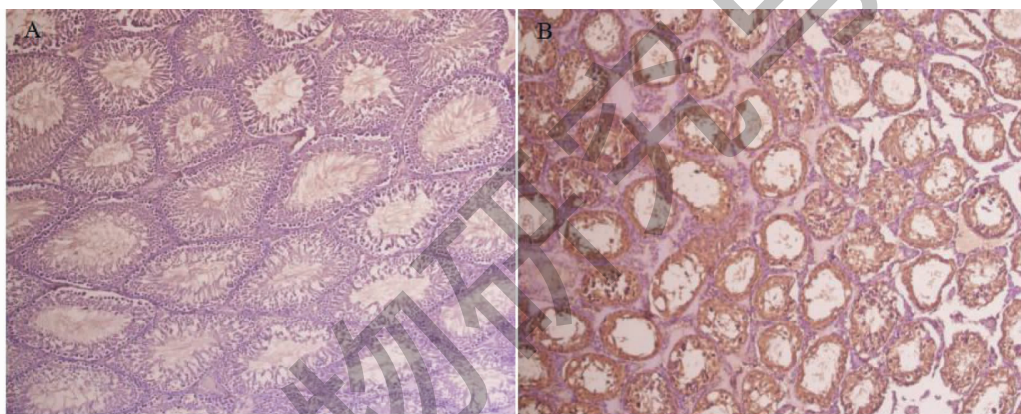


图2 昆明山海棠片对睾丸组织免疫组化的影响(×400)

Fig. 2 The effects of Kunming Shanhaitang tablet on immunohistochemistry observation in testicular tissue(×400)

2.5 对 TSEG-1 相对表达量的影响

由图3可见,昆明山海棠片组小鼠 TSEG-1 相对表达量较空白对照组明显增加,差异有统计学意义,提示连续灌胃昆明山海棠片6个月致 CD-1 小鼠睾丸损伤,TSEG-1 相对表达量增加。

3 讨论

睾丸是产生精子和分泌睾酮的重要器官^[8],睾丸间质细胞是合成雄激素的主要部位,正常间质细胞功能对睾酮的生成有决定性的作用^[9]。黄思行等^[10]病理研究证实昆明山海棠片所导致的睾丸损伤及生精细胞(精母细胞随着剂量和给药时间延长逐渐减少,甚至消失),影响睾丸的生精功能,未见间质细胞损伤。从本研究中昆明山海棠片致睾丸损伤模型来看,昆明山海棠片诱导了睾丸损伤,但未影响睾酮的分泌,与既往研究结果一致。

生精细胞生成精子细胞经历精原细胞分裂、初级精母细胞减数分裂、次级精母细胞减数分裂阶段^[11]。TSEG-1 mRNA 主要表达于精母细胞和精原细胞^[2,3,12],小鼠睾丸 TSEG-1 过表达模型显示生精细胞凋亡显著增加,提示 TSEG-1 可能通过调控生精细胞的死亡,参与精子发生的调控^[13]。Caspase-3 作为半胱氨酸蛋白酶家族一员,是细胞凋亡蛋白级联反应中的下游关键蛋白,被认为是凋亡中的关键调节因子,因此, caspase-3 是凋亡过程主要的指标^[14]。本研究昆明山海棠片组小鼠睾丸组织 TSEG-1 表达与空白对照组相比明显升高,且凋亡相关指标 caspase-3 蛋白表达也明显增加,结合本研究模型的特点,我们认为昆明山海棠片可引起 TSEG-1 过表达,同时引起生精细胞凋亡增加,昆明山海棠片通过调控精母细胞抑制了睾丸精子发生,但其对精母细胞调控机制需进一步研究。

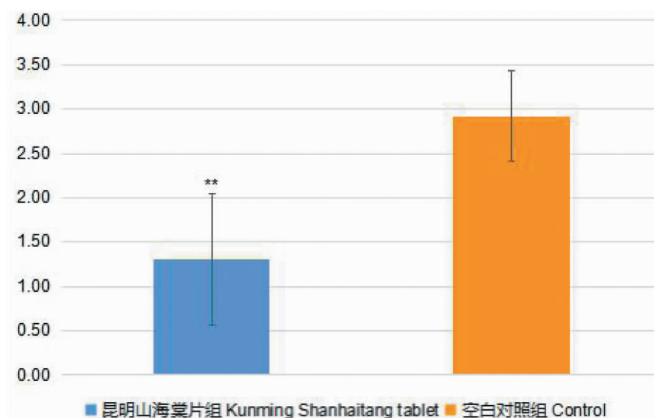


图3 昆明山海棠片对睾丸组织 TSEG-1 表达的影响

Fig. 3 The effects of Kunming Shanhaitang tablet on relative expression of TSEG-1 in testicular tissue
注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$.

参考文献

- Lian J, Wang CL, Wang R, et al. The application of gene knockout and RNA interference technology in testis-specific novel gene research[J]. Henan Med Res(河南医学研究), 2013, 22:309-311.
- Gu C, Tong Q, Zheng L, et al. TSEG-1, a novel member of histone H2A variants, participates in spermatogenesis via promoting apoptosis of spermatogenic cells[J]. Genomics, 2010, 95:278-289.
- Gu CH, Tong QS, Zeng FQ, et al. Cloning and sequence analysis of TSEG-1, a novel gene specifically expressed in mouse testis[J]. Hereditas(遗传), 2008, 30:352-358.
- Gu CH, Zeng FQ, Tong QS, et al. Localization and transcript levels of TSEG-1 in mouse cryptorchidism model[J]. Chin J Exp Surg(中华实验外科杂志), 2010, 27:239-241.
- Tian HY, Li ZX, Xu Y, et al. Effect of goat testis extract on nitric oxide synthase activity in injured Sertoli cells of mice[J]. Chin J Clin Rehabil(中国临床康复), 2006, 10(47): 215-217.
- Hu RB, Chen ZZ, Wen ZJ, et al. Study on general pharmacology and long term toxicity of *Tripterygium hypoglaucum* [J]. Chongqing J Res Chin Drugs Herb(重庆中草药研究), 2000(41):46-48.
- Liu JY, Luo XQ, Huang SX, et al. Effects of *Tripterygium hypoglaucum* on testicular function related enzyme activities in rats[J]. J Toxicol(毒理学杂志), 2011, 25:290-292.
- Wu JW, Gao XY, Wang W, et al. Effect of *Morinda officinalis* How on cyclophosphamide-induced impaired spermatogenesis in rat[J]. Chin J Anat(解剖学杂志), 2016, 39(1):39-42.
- Zhang KC, Li P, Cui LL. Impact of DEHP and DES on gene expression of key enzymes in the synthesis of testosterone of SD rats and the mechanism of cryptorchidism[J]. Chin J Reprod Heal(中国生育健康杂志), 2015, 26(1):33-36.
- Huang SX, Huang WT, Liu JY, et al. Pathological study of testicular injury induced by *Tripterygium hypoglaucum* Hutch (THH) in rats[J]. Reprod Contracep(生殖与避孕), 2011, 31:514-519.
- Zhu H, Cui YG, Zhou ZM. Structural and biological research progress of testicular cells[J]. J Reprod Med(生殖医学杂志), 2014, 23:259-263.
- Gu CH, Tian FY, Li GR, et al. Expression of testis specific expressed gene 1 in ethanol-induced mouse testis injury model and significance[J]. Chin J Exp Surg(中华实验外科杂志), 2014, 31:1530-1532.
- Gu CH, Tian FY, Pu JR, et al. Over-expression of testis-specific expressed gene 1 attenuates the proliferation and induces apoptosis of GC-1spg cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technol; Med Sci(华中科技大学学报:医学英德文版), 2014, 34:535-541.
- Zhao YJ, Yan YY, Li D, et al. Effect of 27nt-miRNA on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2020, 36:1745-1753.