

• 基础论著 •

# 脊髓损伤诱发 Leydig 细胞凋亡与 PARP、FAS 基因表达

龚永光 杨敏 马艳民

**【摘要】** 目的 研究切除精索神经对 Leydig 细胞凋亡和 PARP、Fas 基因表达的影响。方法 成年健康 SD 大鼠 20 只, 随机分为假手术组和脊髓损伤组, 手术后 14 d 以 Percoll 连续密度梯度法提取 Leydig 细胞后采用流式细胞仪 (FACS) 定量检测 Leydig 细胞凋亡情况, 以 Western blot 方法检测 Leydig 细胞中 cleaved-PARP、Fas 蛋白的表达。结果 脊髓损伤组凋亡 Leydig 细胞比例 (32.15%) 显著高于假手术组 (12.78%) ( $P < 0.05$ ), 其 Fas 蛋白及 Cleaved-PARP 蛋白的表达水平均显著升高。结论 脊髓损伤诱发 Leydig 细胞凋亡, PARP、Fas 基因参与对该过程的调控。

**【关键词】** 脊髓损伤; 细胞凋亡; leydig 细胞; PARP; Fas

**Apoptosis of Leydig cells triggered by spinal cord injury and expression of PARP and FAS gene**  
Gong Yongguang\*, Yang Min, Ma Yanmin. \*Department of Urology, The First Affiliated Hospital, the Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 070010, China

Corresponding author: Gong Yongguang, Email: gongyg@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore influence of spinal cord injury on leydig cell apoptosis and expression of PARP and Fas gene. **Methods** 20 adult healthy SD rats were randomly divided into sham-operation group and spinal cord injury (SCI) group. The animals were killed on 14 days after operation. Fluorescence activated cell sorter (FACS) was used to quantitatively assess apoptosis of Leydig cells. Western-blot was applied to detect cleaved-PARP and Fas proteins. **Results** On day 14 after operation, the incidence of leydig cell apoptosis in SCI group was 32.15%, significantly higher than that of sham-operation group (12.78%). Cleaved-PARP and Fas proteins were both found dramatically higher in SCI group than sham-operation group. **Conclusion** Spinal cord injury triggers apoptosis of Leydig cells, and PARP and Fas gene are involved in regulation of this process.

**【Key words】** Spinal cord injuries; Apoptosis; Leydig cell; PARP; Fas

临床研究发现脊髓损伤患者常发生低睾酮血症, 甚至睾酮缺乏症, 对患者生理功能和康复造成严重影响<sup>[1-3]</sup>, 但其发生机制尚不清楚。

成年男性体内睾酮主要来源于睾丸组织中的 Leydig 细胞, 本研究通过建立脊髓损伤的大鼠模型, 观察脊髓损伤后 Leydig 细胞凋亡与 PARP、Fas 基因的表达情况, 探讨脊髓损伤后低睾酮血症的发生机制。

## 材料与方法

1. 实验动物与分组: 成年健康雄性 SD 大鼠 20 只, 体重 (265±15) g, 由西安交通大学医学院动物中心提供。20 只大鼠随机分脊髓损伤组 ( $n=10$ ) 与假手术组 ( $n=10$ )。

2. 主要材料: Percoll 细胞分离液购自美国 Pharmacia 公司, Beads 购自美国 sigma 公司, 流式凋亡试剂盒购自 Roche 公司, 兔抗人 Fas 多克隆抗体及兔抗人 PARP 多克隆抗体均购自 Santa Cruz 生物科技公司; IRDye 680RD 标记的山羊抗小鼠二抗及 IRDye 800CW 标记的山羊抗兔二抗均购自美国 LI-COR 公司。

3. 脊髓损伤模型建立: 常规麻醉消毒后将大鼠

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.17.014

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270688)

作者单位: 070010 西安交通大学医学院第一附属医院泌尿外科 (龚永光、马艳民); 绵阳市妇幼保健院麻醉科 (杨敏)

通讯作者: 龚永光, Email: gongyg@medmail.com.cn

俯卧位固定于鼠板上,沿背中线切口(自胸5至腰2),依次划开皮肤、筋膜、肌肉后暴露脊柱,眼科剪剪去棘上韧带及棘间韧带,暴露胸9至胸11段棘突;用血管钳夹住胸9棘突并提起,咬去胸10棘突暴露胸10椎板,随后暴露分离脊髓并用眼科剪剪断约0.5 cm。明胶海绵填充椎管,无菌处理并缝合切口。观察大鼠后肢肌力消失、鼠尾瘫痪并发生尿潴留,判断模型制作成功。假手术组仅仅切开椎管而不剪断脊髓,其他处理同手术组。术后,给予青霉素肌肉注射(8万IU/d)一周以预防感染。每日定时膀胱按压排尿两次。术后14 d结束实验,收取睾丸标本。

4. Leydig 细胞提取:采用 Percoll 连续密度梯度法提取 Leydig 细胞。主要步骤为:(1)消化:将4~6只睾丸放于含0.5 mg/ml的IV型胶原酶中,于37℃水浴箱中以60~80 r/min 频率震荡消化30 min。消化完全后用滤网将细胞悬液过滤并离心获得细胞;(2)Percoll 分离液配置:将15.5 ml Percoll 缓冲液与19 ml Percoll 等渗液混匀;(3)离心:将细胞轻轻加至配置好的 Percoll 液上,于 Beckman 水平离心机上 17 750×g 离心 40 min,对照管中加入密度指示剂(Beads);(4)获取细胞:离心后,根据 Beads 条带位置吸取目的细胞层,用 PBS 洗涤 2 遍以去除 Percoll 液,最后获得的 Leydig 细胞以  $\beta$ -HSD 染色鉴定,阳性细胞在镜下呈特异性蓝色。

5. FACS 检测细胞凋亡:将提取 Leydig 细胞用冷的 PBS 缓冲液洗两次,再用 1×Binding Buffer 缓冲液将细胞稀释为  $1 \times 10^6$ /ml 的悬液,将 100  $\mu$ l 细胞悬液移入 Falcon 管中,加入 Annexin V 及 PI 试剂(阴性对照不加),轻轻混匀,避光室温孵育 15 min,最后用流式细胞仪检测。

6. Western blot 法检测 Fas 蛋白和 cleaved-PARP:获取睾丸组织中 Leydig 细胞后提取细胞总蛋白溶解液,采用 Bradford 法进行蛋白质浓度测定;配置 10%的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 30  $\mu$ g 蛋白,100 V 电泳分离约 1.5 h,之后将蛋白转至硝酸纤维素膜上。脱脂奶粉溶液(50 g/L)室温封闭 2 h 后,加入兔抗人 Fas mAb 多克隆抗体,兔抗人 PARP mAb 多克隆抗体(均为 1:500 稀释),4℃孵育过夜, TBST 洗膜,加山羊抗兔(IRDye 800CW 标记)二抗(1:15 000 稀释)。以  $\beta$ -actin 作为内参照。室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜, Odyssey 双色红外激光成像系统成像,通过

Bandscan 软件分析 Fas 蛋白和 cleaved-PARP 的相对表达值。

7. 统计学分析:计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析,两组间比较用 Student's *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 结 果

1. 术后动物一般表现:手术后,大鼠双侧后肢肌力丧失,同时出现尿潴留,每天行膀胱按摩可发现其排出肉眼血尿。血尿持续约 3~4 d。实验期间,大鼠饮食良好,体重无明显变化。

2. FACS 定量检测 Leydig 细胞凋亡:术后 14 d 脊髓损伤组 Leydig 细胞凋亡率为 32.15% (其中早期凋亡细胞为 5.70%; 晚期凋亡细胞为 26.45%), 显著高于同期假手术组(总的凋亡率为 12.78%, 其中早期凋亡细胞为 6.90%, 晚期凋亡细胞为 5.88%), 见图 1。

3. Leydig 细胞 Fas 蛋白表达和 PARP 裂解情况:术后 14 d, 相对于假手术组, 脊髓损伤组 Fas 蛋白表达水平显著升高, PARP 出现明显剪切条带, cleaved-PARP 蛋白含量显著高于假手术组, 见图 2。

## 讨 论

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指临床常见的一类神经系统的严重损伤。各国学者对脊髓损伤患者后期的各种并发症及相应的康复治疗相继展开了大量研究,其中排尿排便功能障碍、勃起功能障碍以及体温失调等脊髓损伤后常见的并发症已经为人们所熟知并进行了大量研究。然而近年来越来越多的研究发现,男性脊髓损伤患者常常发生低睾酮血症,甚至睾酮缺乏症<sup>[1-3]</sup>,对其生活质量和远期康复效果带来严重影响,但其发生机制不明确。

睾丸组织中的 Leydig 细胞是男性体内雄激素的重要来源,如果该细胞发生非正常死亡(如凋亡),则会导致血清睾酮水平的显著下降。本研究建立脊髓损伤的大鼠模型,在损伤后第 14 天提取睾丸组织 Leydig 细胞并采用流式细胞术检测该细胞凋亡的情况,结果发现脊髓损伤组 Leydig 细胞凋亡比例远远高于假手术组。为进一步对该结果进行验证,我们检测了 PARP 蛋白的表达。PARP 蛋白是存在于多数真核细胞中的一个多功能蛋白质翻

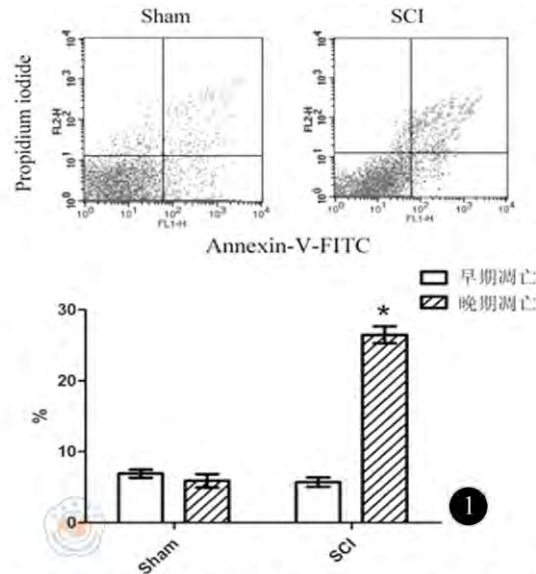


图1 流式细胞仪测定睾丸Leydig细胞凋亡情况 (与假手术组比较, \* $P < 0.05$ )

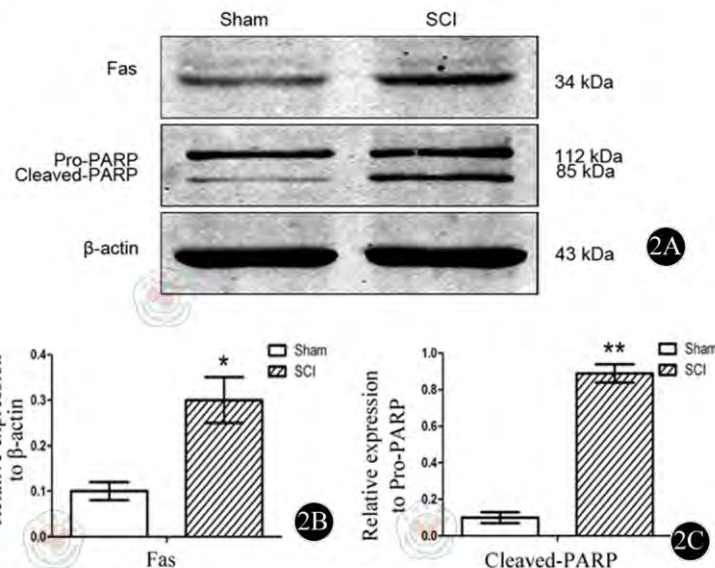


图2 Western blot检测Leydig细胞Fas蛋白和cleaved-PARP (2B,2C为Fas蛋白和cleaved-PARP的相对表达值, 与假手术组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

译后修饰酶,它定位于细胞核内,是细胞凋亡核心成员 caspase 3 的主要切割底物,其被剪切是细胞凋亡的重要标志<sup>[4]</sup>。本研究发现脊髓损伤大鼠 Leydig 细胞中 PARP 的全长片段减弱, Cleaved-PARP 含量较假手术组明显增高,出现裂解激活,说明脊髓损伤诱发了 Leydig 细胞显著凋亡。上述实验结果在国内外首次证实,诱发 Leydig 细胞凋亡是脊髓损伤后低睾酮血症发生的重要机制。

Leydig 细胞凋亡是一个多基因参与调控的过程,其中 Fas 基因的作用尤其备受关注。该基因属于凋亡诱导基因,在人类其位于第 10 号染色体长

臂上,在大鼠位于第 19 号染色体,该基因编码 Fas 蛋白, Fas 蛋白位于细胞膜表面,属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体基因超家族,当其配体(FasL)结合后就会启动 Caspase 家族的一系列级联反应,诱发细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。研究发现一些化学物质(如二甲磺基乙烷)及大剂量的糖皮质激素均能诱发 Leydig 凋亡,其凋亡诱导效应主要通过激活 Fas/FasL 受体系统实现<sup>[7-8]</sup>。为探讨脊髓损伤诱发 Leydig 细胞凋亡的基因调控机制,本研究提取脊髓损伤大鼠 Leydig 细胞并对其 Fas 蛋白的表达进行研究,结果发现这些细胞中 Fas 蛋白的表达水

平较假手术组显著升高,表明脊髓损伤后 Fas 基因被激活并参与诱发 leydig 细胞凋亡的过程。

本研究于国内外首次发现脊髓损伤将诱发 Leydig 细胞凋亡,并证实 Leydig 细胞凋亡与 Fas 基因激活密切相关,这对于深入认识脊髓损伤后低睾酮血症的发生机制具有重要的意义。

参 考 文 献

[1] Schopp LH, Clark M, Mazurek MO, et al. Testosterone levels among men with spinal cord injury admitted to inpatient rehabilitation[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2006, 85(8): 678-684; quiz 685-687.

[2] Durga A, Sepahpanah F, Regozzi M, et al. Prevalence of testosterone deficiency after spinal cord injury[J]. PM R, 2011, 3(10): 929-932.

[3] Chen H, Ge RS, Zirkkin BR. Leydig cells: From stem cells to aging[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 306(1/2): 9-16.

[4] 朱楠袁, 张积森, 袁荆珏, 等. MicroRNA-199a-3p对人骨肉瘤细

胞凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2014, 24: 159-162.

[5] Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis[J]. Dermatol Clin, 2007, 25(4): 487-501.

[6] Thorburn A. Death receptor-induced cell killing[J]. Cell Signal, 2004, 16(2): 139-144.

[7] Taylor MF, de Boer-Brouwer M, Woolveridge I, et al. Leydig Cell Apoptosis after the Administration of Ethane Dimethanesulfonate to the Adult Male Rat Is a Fas-Mediated Process[J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3797-3804.

[8] Gao HB, Tong MH, Hu YQ, et al. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 199(1/2): 153-163.

(收稿日期: 2014-07-17)

(本文编辑: 戚红丹)

龚永光, 杨敏, 马艳民. 脊髓损伤诱发 Leydig 细胞凋亡与 PARP、FAS 基因表达 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(17): 3133-3136.

