

• 基础论著 •

脊髓损伤对睾酮水平和 Leydig 细胞凋亡影响的实验研究

龚永光 杨敏 马艳氏

【摘要】 目的 探讨脊髓损伤诱发低睾酮血症的机制。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 取血清以放射法检测睾酮 (T) 和黄体生成素 (LH) 水平, 以脱氧核糖核酸末端转移酶介导的 dUTP 的缺口末端标记技术 (TUNEL) 原位检测 Leydig 细胞凋亡, 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。结果 术后 14 d, 脊髓损伤组大鼠血清 T 水平较假手术组显著降低 ($P < 0.05$), LH 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$), TUNEL 显示睾丸间质中 Leydig 细胞发生凋亡, 脊髓损伤组凋亡 Leydig 细胞比例 (46%) 显著高于假手术组 (17.67%) ($P < 0.05$)。结论 诱发 Leydig 细胞凋亡可能是脊髓损伤导致低睾酮血症发生的重要机制之一。

【关键词】 脊髓损伤; 细胞凋亡; 低睾酮血症; Leydig 细胞

Influence of spinal cord injury on serum testosterone and leydig cell apoptosis Gong Yongguang, Yang Min, Ma Yanmin. Departments of Urology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 070010, China

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

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism involved in low serum testosterone after spinal cord injury. **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. Radioimmunoassay method (RIA) was used to detect serum testosterone and LH level. TUNEL was applied for *in vivo* detection of apoptotic Leydig cells. Apoptosis of Leydig cells was quantitatively assessed by fluorescence activated cell sorter (FACS). **Results** On day 14 after operation, serum testosterone levels of SCI group were dramatically lower than sham operation group ($P < 0.05$), but its serum LH levels were significantly higher than that of the latter ($P < 0.05$). By TUNEL, apoptotic Leydig cells were found in the interstitial tissue of testis. The incidence of leydig cell apoptosis in SCI group was 46%, significantly higher than that of sham-operation group (17.67%). **Conclusion** Leydig cells undergoing apoptosis are one of the underlying mechanisms for serum low testosterone induced by spinal cord injury.

【Key words】 Spinal cord injuries; Apoptosis; Low serum testosterone; Leydig cell

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是临床常见的一类严重损伤。近年来越来越多的研究发现, 男性脊髓损伤患者面临着一个目前尚未引起足够重视的严重问题就是低睾酮血症, 甚至睾酮缺乏症^[1-3], 但其具体的发生机制目前仍不清楚。

睾丸组织中的 Leydig 细胞是男性体内睾酮的

主要来源, 该细胞的死亡会导致血清睾酮水平的显著下降。本研究通过建立脊髓损伤的动物模型, 观察脊髓损伤后血清睾酮和黄体生成素水平的变化, 并进一步研究脊髓损伤对 Leydig 细胞凋亡的影响, 探索脊髓损伤诱发低睾酮血症的机制。

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 (280±10) g, 由西安交通大学医学院动物中心提供。20 只大鼠随机分为脊髓损伤组 ($n=10$) 与假手术组 ($n=10$)。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.16.015

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、马艳氏); 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

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, T 与 LH 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司, 流式凋亡试剂盒购自 Roche 公司。

3. 脊髓损伤模型建立: 常规麻醉消毒后将大鼠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, 收取血清及睾丸标本。

4. 血清收集及激素测定: 麻醉动物, 取静脉血 3 ml, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液得血清样本, 保存于 -20 °C 冰箱待测。激素测定由西安交通大学医学院第一附属医院核医学科完成。

5. TUNEL 法检测细胞凋亡: 将石蜡组织切片经二甲苯脱蜡, 酒精梯度脱水后, 置于 PBS 中浸洗 5 min, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.3% 双氧水阻断 10 min, 0.1% Triton X-100 冰上穿透 2 min, PBS 浸洗后风干, 滴加 50 μ l 反应液(阴性控制滴加 label solution, 阳性控制用 DNA 酶 I 处理), 置入暗盒, 37 °C 孵育 1 h, PBS 浸洗后风干, 滴加 50 μ l Converter-POD, 37 °C 孵育 30 min; 然后滴加 50 μ l DAB 显色; 最后用明胶封片, 镜下观察。

6. 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 °C 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 \times 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, 所获得细胞采用 3 β -HSD 染

色鉴定, Leydig 细胞在镜下呈特异性蓝色。

7. 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 \times Binding Buffer 缓冲液将细胞稀释为 1 \times 10⁶/ml 的悬液, 将 100 μ 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。

8. 统计学分析: 所有数据采用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理, 定量资料统计描述采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 术后动物的一般情况: 脊髓损伤组大鼠后肢肌力丧失, 全部出现尿潴留, 膀胱按摩可排出肉眼血尿。血尿持续 3~4 d, 后尿液变得清亮。实验期间, 大鼠进食正常, 体重无明显变化。

2. 性激素水平的变化: 术后 14 d, 脊髓损伤组大鼠血清 T 水平较假手术组显著降低 ($P < 0.05$), 其血清 LH 水平较假手术组升高 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 术后 14 d 血清睾酮和黄体生成素水平 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数 | T(ng/ml) | LH(mIU/ml) |
|-------|----|------------------------------|------------------------------|
| 假手术组 | 10 | 8.36 \pm 0.68 | 6.32 \pm 0.33 |
| 脊髓损伤组 | 10 | 4.70 \pm 0.56 ^a | 7.87 \pm 0.31 ^a |

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$

3. TUNEL 法检测 Leydig 凋亡: 术后 14 d 脊髓损伤组大鼠的睾丸间质中大量凋亡的 Leydig 细胞(细胞核呈黄褐色), 而假手术组大鼠的睾丸间质中未发现凋亡的 Leydig 细胞, 见图 1。

4. 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 46% (其中早期凋亡细胞为 10.55%; 晚期凋亡细胞为 35.45%), 显著高于同期假手术组(总的凋亡率为 17.67%, 其中早期凋亡细胞为 9.51%, 晚期凋亡细胞为 8.16%) ($P < 0.05$), 见图 2。

讨 论

脊髓损伤是指脊髓遭受损害并使其主要功能(感觉、运动、反射等)出现障碍的一类严重损伤。脊髓损伤在临床并不少见, 根据 2009 年的资料, 美国每年新增脊髓损伤病例 12 000 例^[4], 中国每年高达 60 000 例^[5]。

近年来随着医疗技术的发展, 脊髓损伤患者 10

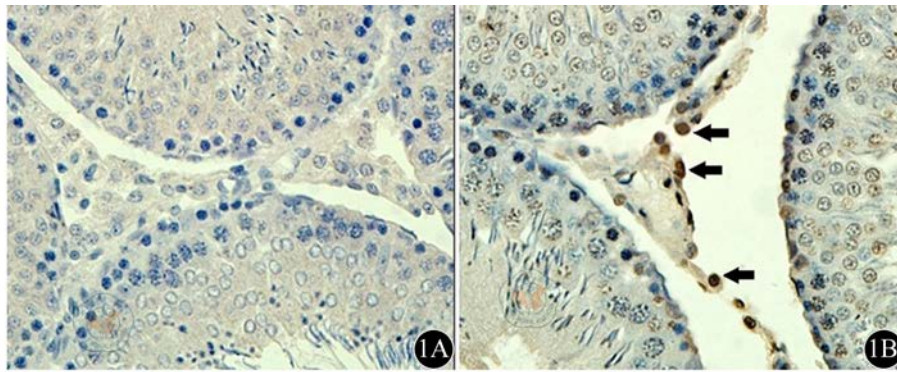


图1 1A: 假手术组大鼠睾丸组织中未见凋亡的Leydig细胞 (DAB染色 ×400); 1B: 箭头所示脊髓损伤组大鼠睾丸组织中较多凋亡的Leydig细胞 (细胞核呈黄褐色, DAB染色 ×400)

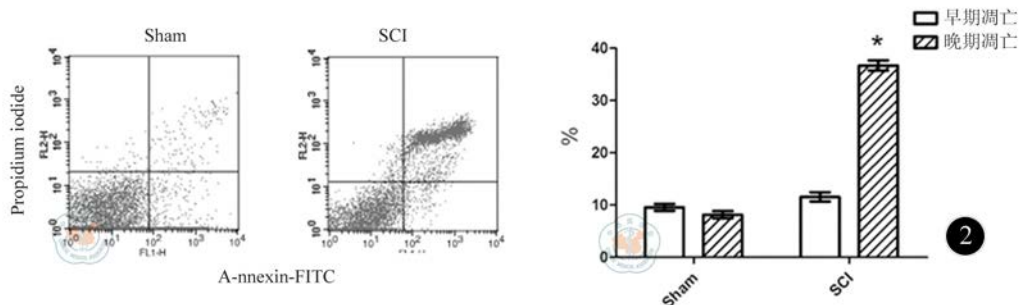


图2 流式细胞仪测定睾丸Leydig细胞凋亡情况 (与假手术组比较, * $P < 0.05$)

年生存率达到 80%^[3]。由于生存率大幅提高, 脊髓损伤患者的远期生活质量受到广泛重视。排尿排便功能障碍、勃起功能障碍、肌肉萎缩、骨质疏松等脊髓损伤后常见的并发症已经为人们所熟知并给予了高度关注。然而近年来越来越多的研究发现, 对男性脊髓损伤患者而言, 他们还面临着另一个目前尚未引起足够重视的严重问题就是低睾酮血症, 甚至睾酮缺乏症^[1-3], 在损伤后 4 个月内其发生率高达 69%^[1], 即使在损伤发生两年以后, 仍有 43% 的患者罹患此症^[3]。众所周知, 睾酮是男性体内最重要的性激素, 它不仅对维持男性第二性征和正常的生育功能、性功能至关重要, 同时该激素还广泛参与其他生理机能的调节, 如促进蛋白质合成代谢、维持机体正氮平衡, 刺激骨髓的造血功能, 特别是红细胞的生成等。因此, 睾酮水平不足或缺乏不仅会导致脊髓损伤男子性欲缺失、勃起障碍和不育, 还会造成低蛋白血症、贫血以及肌肉萎缩、骨质疏松等一系列问题, 对其远期康复效果和生活质量带来严重影响^[1,3]。因此阐明脊髓损伤后低睾酮血症的发生机制并采取有效的措施阻断这一过程对于提高脊髓损伤患者康复效果和改善其生活质量都具有十分重要的意义。

在本研究中我们成功建立脊髓损伤的大鼠模

型, 在术后 14 d 发现脊髓损伤大鼠血清睾酮水平显著低于假手术组, 这与临床观察结果一致^[3], 进一步证实脊髓损伤会导致低睾酮血症的发生。同时脊髓损伤大鼠血清 LH 水平较假手术组显著升高, 这一结果与此前研究报道也是一致的。

那么, 脊髓损伤后为何会发生低睾酮血症呢? 我们知道, 睾丸组织中的 Leydig 细胞是男性体内最重要的睾酮来源, 其 95% 的睾酮由该细胞合成和分泌, 如果该细胞合成睾酮的能力下降或者其数量减少都会导致血清睾酮水平下降。我们此次的研究结果显示, 脊髓损伤后 LH 的水平显著升高, LH 是 Leydig 细胞功能最重要的正向调节因子, 该激素水平升高会增强 Leydig 细胞的睾酮合成和分泌能力, 显然 Leydig 细胞合成睾酮能力的下降不太可能是脊髓损伤诱发低睾酮血症的根本原因。此前研究发现除了经典的“下丘脑-垂体-性腺”内分泌调控轴外, 大脑中枢神经系统与 Leydig 细胞之间实际还存在着一条独立的神经支配通路, 即“下丘脑-脑干-脊髓-精索神经-Leydig 细胞”通路, 来自于下丘脑的神经信号通过该通路直接下传到 Leydig 细胞, 独立于垂体参与对该细胞睾酮合成功能的调控^[6-7]。为进一步研究该通路对 Leydig 细胞其他生物学行为的影响, 我们曾选择性切断睾丸主要支配神经——

精索上神经和精索下神经以破坏该通路, 结果发现大鼠血清睾酮显著下降, 同时睾丸组织中的 Leydig 细胞大量凋亡, 表明“下丘脑-脑干-脊髓-精索神经-Leydig 细胞”神经通路对 Leydig 细胞的生存具有重要意义^[8]。由于脊髓损伤后这一通路必然会遭到破坏, 并可能进一步诱发 Leydig 细胞凋亡, 因此我们推测这很可能是脊髓损伤后低睾酮血症发生的重要机制。

为证实这一推测, 本研究进一步检测脊髓损伤后 Leydig 细胞的凋亡情况。通过 TUNEL 原位检测技术, 我们观察到脊髓损伤大鼠睾丸组织中出现了大量凋亡的 Leydig 细胞, 而假手术组大鼠睾丸组织中没有发现此类细胞。在使用 Percoll 连续梯度法提取出 Leydig 细胞后, 采用 FACS 定量检测 Leydig 细胞凋亡情况, 我们进一步发现手术组大鼠 Leydig 细胞凋亡率大大高于假手术组, 表明脊髓损伤后 Leydig 细胞发生了显著凋亡。这些研究结果在国内外首次证实脊髓损伤会诱发 Leydig 细胞大量凋亡, 进而显著降低血清睾酮水平。

结合本次研究和此前的研究结果, 我们认为通过破坏“下丘脑-脑干-脊髓-精索神经-Leydig 细胞”神经通路, 进而诱发 Leydig 细胞的凋亡可能是脊髓损伤后低睾酮血症发生的重要机制。这一发现为阐明脊髓损伤后低睾酮血症发生机制提供了重要的

线索, 深入研究脊髓损伤诱发 Leydig 细胞凋亡的分子生物学机制对于降低脊髓损伤后并发症和提高患者的生活质量具有重要的意义。

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, Zirkin BR. Leydig cells: From stem cells to aging[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 306(1/2): 9-16.
- [4] Onose G, Angheliescu A, Muresanu DF, et al. A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2009, 47(10): 716-726.
- [5] Qiu J. China Spinal Cord Injury Network: changes from within[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(7): 606-607.
- [6] Lee S1, Miselis R, Rivier C. Anatomical and functional evidence for a neural hypothalamic-testicular pathway that is independent of the pituitary[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(11): 4447-4454.
- [7] Selvage DJ, Rivier C. Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(2): 594-598.
- [8] Gong YG, Wang YQ, Gu M, et al. Deprivation of testicular innervation induces apoptosis of Leydig cells via Caspase-8-dependent signaling: a novel survival pathway revealed[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 382(1): 165-170.

(收稿日期: 2014-07-07)

(本文编辑: 戚红丹)

龚永光, 杨敏, 马艳民. 脊髓损伤对睾酮水平和 Leydig 细胞凋亡影响的实验研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8(16): 2993-2996.

中 华 临 床 医 师 杂 志