

早期糖尿病小鼠睾丸中睾酮合成关键酶的变化

张羽飞, 张春雷, 刘勇, 孟娜娜, 赵晓光, 陶晶, 李厚忠*
牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011

摘要: 目的 建立小鼠 1 型糖尿病模型, 研究糖尿病早期时睾丸中睾酮合成关键酶的变化。方法 雄性成年鼠 20 只, 随机分为对照组 10 只、糖尿病模型组 10 只。通过 ip 链脲佐菌素 (150 mg/kg) 制备糖尿病模型, 成功制备糖尿病模型后 4 周处死小鼠, 取血清和睾丸组织备用。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测睾丸组织中促黄体生成素受体 (LHR)、类固醇激素合成灵敏调节蛋白 (StAR)、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶 (P450scc)、3 β -羟基类固醇脱氢酶 VI 型 (3 β -HSD6)、17 α -羟基化酶/17, 20-裂解酶 I 型 (P450c17a1) 及 17 β -羟基类固醇脱氢酶 III 型 (17 β -HSD3) 相应 mRNA (*Lhcgr*、*Star*、*Cyp11a1*、*Hsd3b6*、*Cyp17a1* 和 *Hsd17b3*) 含量, 酶联免疫吸附法测定血清中睾酮和黄体生成素 (LH) 含量、睾丸组织中 3 β -HSD1、P450c17a1 及 17 β -HSD3 酶活性。结果 与对照组比较, 4 周糖尿病小鼠血清中睾酮和 LH 含量显著降低 ($P < 0.05$); 睾丸组织的 *Lhcgr*、*Star*、*Cyp11a1*、*Hsd3b6*、*Cyp17a1* 和 *Hsd17b3* mRNA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001); 3 β -HSD1、P450c17a1 及 17 β -HSD3 酶活性显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 早期糖尿病小鼠睾丸中睾酮合成关键酶的表达显著降低。

关键词: 糖尿病; 睾丸; 睾酮; 类固醇合成酶; 黄体生成素

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)09-1285-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.09.017

Changes of key enzymes involved in testosterone synthesis in testes of early diabetic mice

ZHANG Yu-fei, Zhang Chun-lei, LIU Yong, MENG Na-na, ZHAO Xiao-guang, TAO Jing, LI Hou-zhong
Mudanjiang Medical University, Heilongjiang 157011, China

Abstract: Objective Type 1 diabetes mice model was established to investigate the changes of key enzymes involved in testosterone synthesis in testes of early diabetic mice. **Methods** Totally 20 male C57 mice were randomly divided into two groups: control and diabetic groups, and the diabetes mice were ip administered with a single dose of 150 mg/kg Streptozotocin. Four weeks after confirmation of diabetic model, the serum and testis were collected for further study. The qRT-PCR method was used to measure the expression of LHR and steroidogenesis synthetase StAR, P450scc, 3 β -HSD6, P450c17a1, and 17 β -HSD3 mRNA. ELISA assay was performed to measure the levels of testosterone and luteinizing hormone (LH) in serum, and the enzymatic activities of 3 β -HSD1, 1P450c17 and 17 β -HSD3 in testis tissue. **Results** Compared to control group, the levels of testosterone and LH of diabetic group declined significantly ($P < 0.05$) after four weeks. The mRNA levels of LHR, StAR, CYP11a1, Hsd3b6, CYP17a1 and Hsd17b3, and enzymatic activities of 3 β -HSD6, P450c17 and 17 β -HSD3 were also decreased significantly compared with control group ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001). **Conclusion** Expression of key enzymes of testosterone synthesis in testis of early diabetic mice decreases significantly.

Key words: diabetes; testis; testosterone; steroidogenesis synthetase; luteinizing hormone

近年来, 随着生活水平逐渐提高, 糖尿病的疾病率在全球范围内急剧上升, 根据国际糖尿病联合会调查发现, 全世界约有 4.15 亿人患有糖尿病, 预

计到 2040 年, 这一数字将增加到 6.426 万^[1]。糖尿病已经成为威胁人类健康的重要疾病之一, 且其产生的并发症严重影响着患者的身心健康和生活质量。

收稿日期: 2017-03-24

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LC201440); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目 (UNPYSCT-2015110); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201410229019); 牡丹江市科学技术计划项目 (Z2015s0038)

作者简介: 张羽飞 (1981-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为内分泌生殖。E-mail: yu-feizhang@foxmail.com

*通信作者 李厚忠 (1979-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为药理学。E-mail: 376270417@qq.com

虽然目前研究较为透彻的是2型糖尿病,但是1型糖尿病发病率逐年递增,并且常在35岁以前发病,即青年发病型糖尿病,约占糖尿病的10%,受到了越来越多的重视。随着各种检测技术的日益更新及研究的不断深入,糖尿病对生殖系统的损伤机制备受关注,其中主要涉及激素、细胞和分子水平的调节障碍^[2-3]。因此,研究糖尿病对生殖系统的影响及其病理机制,对糖尿病患者生殖系统疾病的预防、诊断和治疗都有重要的临床意义。研究表明,糖尿病大鼠性功能障碍的直接原因与持续高血糖引起的细胞代谢异常、氧化应激有关,其发病可能是由于自主神经功能障碍、糖尿病微血管病变、下丘脑对垂体-性腺轴调控障碍等^[4-6]。链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病类似1型糖尿病,在短时间内胰岛细胞被大量破坏,导致血糖急速上升,造成Leydig细胞损伤,本实验以下丘脑-垂体-睾丸轴为中心,通过测定糖尿病小鼠血清中睾酮、黄体生成素(LH)含量,睾丸组织中类固醇合成关键酶的mRNA水平及相关酶活性,研究短期糖尿病状态下睾丸雄激素合成关键酶水平变化情况。

1 材料

1.1 实验动物

20只8周龄雄性C57BL/6小鼠,体质量23~25g,购自北京维通利华动物公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2015-0001;饲养于牡丹江医学院SPF级动物实验中心,温度为(22±2)℃,相对湿度为40%~50%,光照/黑暗比12h/12h。实验期间,动物可自由饮水、摄食。

1.2 主要试剂

链脲佐菌素(STZ, Sigma公司); RNA提取试剂盒试剂(美国 invitrogen 公司); ELISA检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司); 逆转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒(美国 Promega 公司); PCR引物(上海生物工程有限公司)。

1.3 主要仪器

One touch II 血糖仪(美国强生公司); NanoDrop2000(美国 Agilen 公司); 实时定量PCR仪(ABI7900HT, 美国 ABI 公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型建立

参照本课题组的造模经验^[7],将实验鼠按照体质量随机分为糖尿病模型组和对照组,每组10只。

糖尿病模型组小鼠经单次 ip STZ (150 mg/kg) 制作1型糖尿病动物模型,同时对照组单次 ip 等量枸橼酸钠溶液。48 h 后,经尾静脉采血,用 One touch II 血糖仪检测随机血糖,若血糖水平超过 16.7 mmol/L,即确认建模成功^[6]。造模成功4周后,处死小鼠,收集血清及睾丸组织,并记录动物体质量及睾丸质量。

2.2 血清及睾丸内睾酮水平测定

取全血,3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清置-80℃冰箱保存,酶联免疫吸附(ELISA)法测定 LH 和睾酮水平,具体操作按照试剂盒说明书进行。

2.3 睾丸组织总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

取睾丸组织去除血污后,按照 TRIzol 试剂说明书的步骤,逐步提取出各组睾丸组织中的总 RNA,用 Nanodrop 2000 仪器测定 RNA 浓度并确保其吸光度值(A₂₆₀)/A₂₈₀在1.8~2.2,液氮保存。根据 RNA 反转录试剂盒,将 RNA 反转录为 cDNA (反应体系为 10 μL),-20℃保存。

促黄体生成素受体(LHR)、类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(P450scc)、3β-羟基类固醇脱氢酶 I 型(3β-HSD6)、17α-羟基化酶/17, 20-裂解酶 I 型(P450c17a1)和 17β-羟基类固醇脱氢酶 III 型(17β-HSD3)分别由 *Lhcgr*、*Star*、*Cyp11a1*、*Hsd3b6*、*Cyp17a1* 和 *Hsd17b3* 基因编码,采用 qRT-PCR 检测上述 mRNA 表达水平,内参为 *Rps16*。PCR 引物由上海生物工程有限公司设计合成,具体引物序列信息见表 1。反应体系为 25 μL,反应条件为:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,40 个循环。mRNA 的相对表达量采用标准曲线法进行分析,每个样本设 3 个复孔。

2.4 睾丸组织总蛋白的提取及酶学检测

取睾丸样品,裂解提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度。应用相应 ELISA 试剂盒检测 3β-HSD6、P450c17a1 和 17β-HSD3 酶活性,具体操作按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法

数据处理和图表绘制采用 Graphpad Prism 5.0 软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本之间比较用 *t*-test。

3 结果

3.1 小鼠体质量、睾丸质量和血糖变化

实验前,2组小鼠体质量、血糖无明显差异。

表1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因	引物	序列 (5'-3')	基因	引物	序列 (5'-3')
<i>Lhcgr</i>	正向引物	AGAGTGATTCCCTGGAAAGGA	<i>Hsd3b6</i>	正向引物	GGAGGAGATCAGGGTCCTGG
	反向引物	TCATCCCTTGAAAGCATTC		反向引物	CTAGGATGGTCTGCCTGGG
<i>Star</i>	正向引物	TGTCAAGGAGATCAAGGTCCTG	<i>Cyp17a1</i>	正向引物	TGGCTTTCCTGGTGCACAATC
	反向引物	CGATAGGACCTGGTTGATGAT		反向引物	TGAAAGTTGGTGTTCGGCTGA
<i>Cyp11a1</i>	正向引物	AAGTATCCGTGATGTGGG	<i>Hsd17b3</i>	正向引物	ATGAAGAAGACACAACTTGTT
	反向引物	TCATACAGTGTGCGCTTTTCT		反向引物	GCTGATGTTGCGTTTG
Rps16	正向引物	CGTGCTTGTGCTCGGAGCTA			
	反向引物	GCTCCTTGCCCAGAAGCAA			

糖尿病模型组小鼠呈明显多饮、多食、多尿症状，并伴有不同程度精神萎靡，对照组小鼠状况良好，2组小鼠均无死亡。造模成功4周后，与对照组比较，糖尿病模型组小鼠的血糖显著升高 ($P < 0.05$)；体质量减少，但差异不显著；睾丸质量则无差别。表明1型糖尿病小鼠模型建立成功。结果见表2。

3.2 血清睾酮及LH水平检测

与对照组比较，糖尿病模型组小鼠血清内睾酮及LH浓度均显著降低 ($P < 0.05$)，结果见表2。

3.3 qRT-PCR 检测结果

与对照组比较，糖尿病模型组 *Lhcgr*、*Star*、*Cyp11a1*、*Hsd3b6*、*Cyp17a1* 和 *Hsd17b3* mRNA 水平急剧降低，差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.001)。见图1。

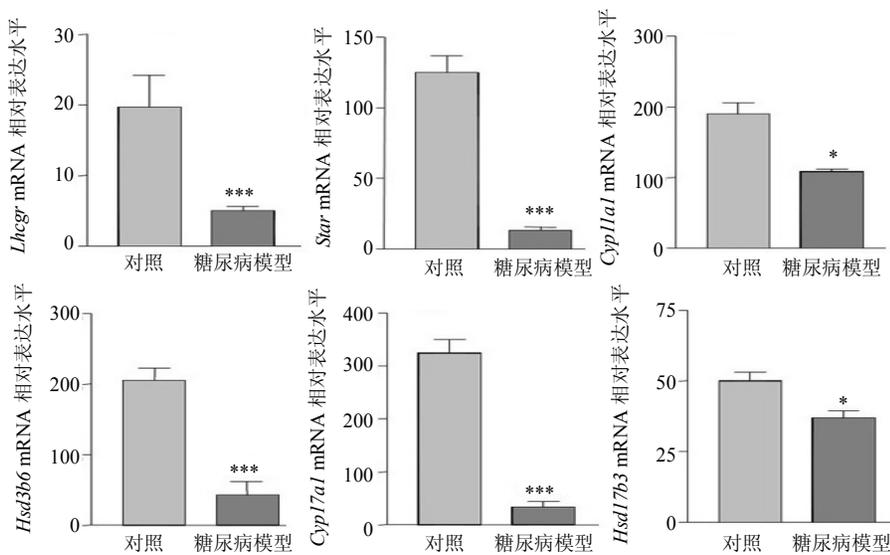
表2 小鼠体质量、血糖、睾丸质量及血清睾酮、LH水平检测 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Body weight, blood glucose, testis quality, testosterone and LH levels in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体质量/g	血糖/(mmol·L ⁻¹)	睾丸质量/g	睾酮/(μg·L ⁻¹)	LH/(μg·L ⁻¹)
对照	24.98±0.30	7.0±0.6	1.36±0.7	2.18±0.66	2.38±0.76
糖尿病模型	19.83±0.850	20.9±4.1*	1.30±0.71	0.72±0.09*	0.92±0.11*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.05$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.05$ vs control group

图1 两组小鼠睾丸组织中睾酮合成关键酶基因的相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Relative expression levels of genes in testis tissues of mice in two groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 酶学检测结果

酶学检测结果显示：与对照组比较，糖尿病组

3β -HSD6、 17β -HSD3 和 P450c17a1 酶活性降低，差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见图 2。

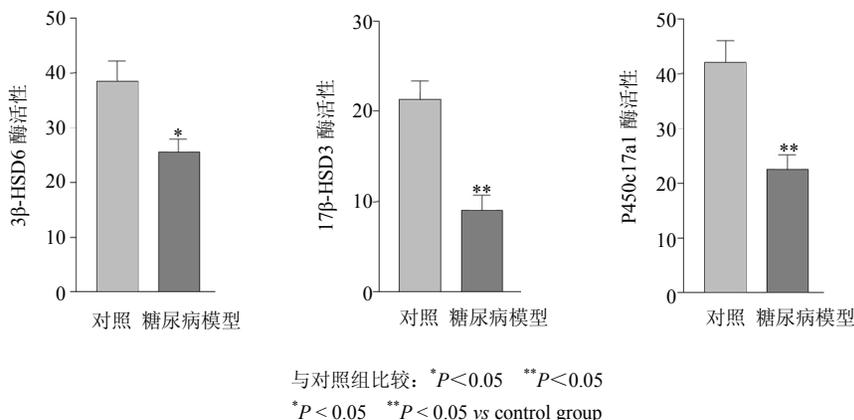


图 2 两组小鼠睾丸组织 3β -HSD6、 17β -HSD3、P450c17a1 酶的活性表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Expression of 3β -HSD6, 17β -HSD3 and P450c17a1 in testis tissues of mice in two groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

糖尿病是一组以高血糖为特征的常见内分泌代谢性疾病，高血糖引发的并发症可累及到全身多种器官，随着糖尿病发病率的逐年上升及年轻化趋势，糖尿病并发的生殖系统损伤也引起了人们极大的关注。Leydig 细胞主要存在于雄性哺乳动物睾丸组织中，占睾丸细胞数量的 2%~4%，是体内合成睾酮的一类非常重要内分泌细胞，其分泌的睾酮占血浆睾酮的 95%，对于雄性的生育能力及第二性征的维持极为重要。有研究证实，Leydig 细胞合成和分泌睾酮的活动受下丘脑-垂体-性腺轴的调控，且下丘脑调节腺垂体分泌的 LH 是 Leydig 细胞合成睾酮的必要条件^[1, 4, 6]。在这个过程中，LH 需与 Leydig 细胞膜上特异受体 LHR 结合，动员胆固醇进入线粒体内膜，完成 Leydig 细胞合成分泌睾酮的系列过程^[7-8]。因此，LHR 结构、数量及功能的完整，也是影响睾酮合成和分泌的一个重要条件。本实验中发现糖尿病组大鼠血 LH、睾酮水平明显低于正常组大鼠，LHR mRNA 表达降低。正常生理状态下，睾酮水平降低可以反馈性地使 LH 分泌增加，而在糖尿病小鼠中未检测到 LH 升高，提示 LH 的减低可能是糖尿病对垂体及其以上功能直接影响的结果，表明糖尿病对垂体-睾丸轴功能有损伤作用。陈锡文等^[9]认为其机制可能为：糖尿病时，糖基化终末产物大量形成，其通过增加体内氧自由基，脂质过氧化增强，氧自由基清除能力下降，对垂体-睾丸轴造成了直接的损伤。

有研究表明，糖尿病能够破坏 Leydig 细胞的结构和功能。糖尿病鼠睾丸 Leydig 细胞出现线粒体肿胀变形、排列紊乱、嵴断裂、结构不清，滑面内质网减少及扩张，Leydig 细胞数量减少，胞浆脂滴增多等现象^[9-10]。在本实验中，对成模 4 周的糖尿病小鼠的研究发现，糖尿病小鼠 Leydig 细胞中的 CYP11a1、Hsd3b6、CYP17a1 和 Hsd17b3 的 mRNA 水平较对照组降低。酶活性测定实验也发现， 3β -HSD6、P450c17a1、 17β -HSD 酶的活性均降低 ($P < 0.05$)。结果与报道的形态学变化相呼应。类固醇合成相关酶的表达在类固醇合成的晚期发挥关键作用，位于线粒体膜上 P450scc 被认为是睾酮合成的限速步骤，它主要是将转入线粒体内的胆固醇转化为孕烯醇酮，孕烯醇酮在 3β -HSD 作用下羟化和侧链裂解形成孕酮，后者再经 p450c17a1 进一步催化生成雄烯二酮，后者在 17β -HSD 的作用下，最终生成睾酮^[12-14]。本实验的研究结果说明糖尿病状态下 Leydig 细胞内合成睾酮的能力及其合成睾酮的关键基因和蛋白合成表达过程中信息传递受损^[10-11]。

除了催化反应的酶活性下降外，底物减少也使产物的生成下降。胆固醇是 Leydig 细胞合成睾酮的原料，需要从线粒体外膜转移至内膜才能参与雄激素合成。尽管该胆固醇转运的机制仍不清楚，但可以肯定 StAR 参与了该转运过程，这一过程被认为是睾酮合成起始限速步骤^[15]。本实验结果显示：糖尿病组小鼠 Leydig 细胞 StAR mRNA 表达低于正常组大鼠 ($P < 0.05$)，说明糖尿病状态下 StAR 的活

性受到了影响,胆固醇的转运因而受到抑制,最终导致睾酮合成降低。

综上所述,糖尿病4周时,小鼠血清中睾酮及LH水平降低,睾丸组织Leydig细胞中,LHR、StAR、CYP11a1、Hsd3b6、CYP17a1和Hsd17b3 mRNA表达降低及 3β -HSD6、P450c171和 17β -HSD3酶活性受到抑制,表明早期的糖尿病状态即对小鼠下丘脑-垂体-睾丸轴功能有损伤作用。

参考文献

- [1] Tang Q, Li X, Song P, et al. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future [J]. *Drug Dis Ther*, 2015, 9(6): 380-385.
- [2] Pontes D A, Fernandes G S, Piffer R C, et al. Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: the role of testosterone [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(1): 130-138.
- [3] 余召辉, 高海馨, 赵宗仁, 等. 糖尿病对雄性生殖系统损伤机制的研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2016, (04): 297-300.
- [4] 施颖芸, 孙宜, 万盛, 等. 糖尿病对生殖系统的影响 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2014, 33(2): 144-148.
- [5] Gur S, Peak T C, Kadowitz P J, et al. Review of erectile dysfunction in diabetic animal models [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2014, 10(1): 61-73.
- [6] Kizilay F, Gali H E, Serefoglu E C. Diabetes and Sexuality [J]. *Sex Med Rev*, 2017, 5(1): 45-51.
- [7] 张羽飞, 王学勇, 李厚忠, 等. 链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠心肌组织中 microRNA 的表达 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2014(03): 255-258.
- [8] Ge R S, Dong Q, Sottas C M, et al. In search of rat stem Leydig cells: identification isolation, and lineage-specific development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2719-2724.
- [9] 陈锡文, 吴晓焯, 方周溪, 等. 实验性2型糖尿病大鼠睾丸Leydig细胞形态和睾酮合成功能的改变 [J]. *温州医学院学报*, 2008(04): 317-320.
- [10] 其其格, 张宝林, 乌云, 等. 实验性糖尿病大鼠睾丸超微结构变化 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2007, 39(7): 777-779.
- [11] Pontes D A, Fernandes G S, Piffer R C, et al. Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: the role testosterone [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(1): 130-138.
- [12] Payne A H, Hales D B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(6): 947-970.
- [13] Luu-The V. Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 137: 176-182.
- [14] Tremblay J J. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells [J]. *Steroids*, 2015, 103: 3-10.
- [15] Wang Q, Qi X, Tang H, et al. Molecular identification of StAR and 3β HSD1 and characterization in response to GnIH stimulation in protogynous hermaphroditic grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2017, 206: 26-34.