

卵泡刺激素和雌激素对体外培养的小鼠精原细胞增殖的影响

张大雷¹ 周玲² 邹挺^{1*} 杨蓓¹ 吴磊¹

(¹南昌大学医学院, 南昌 330006; ²南昌市卫生学校, 南昌 330006)

摘要 利用精原细胞-体细胞体外无血清共培养模型研究了卵泡刺激素(FSH)和17-β雌二醇(E₂)对小鼠A型精原细胞增殖的影响。结果表明:FSH(10 ng/ml)可显著增加精原细胞集落数目,蛋白激酶A(PKA)抑制剂H₈₉可抑制FSH对精原细胞的促增殖作用,说明FSH(10 ng/ml)可通过PKA介导的信号途径促进A型精原细胞增殖。E₂能够促进小鼠A型精原细胞的增殖,而雌激素受体阻断剂他莫西芬(tamoxifen)可抑制E₂的促增殖作用,说明E₂是直接通过雌激素作用与睾丸细胞上受体结合进而调控精原细胞的发育。此外,FSH(10 ng/ml)联合E₂(10⁻⁸~10⁻⁷ mol/L)具有加性效应。

关键词 A型精原细胞; 卵泡刺激素; 17-β雌二醇; 细胞增殖

精子发生是一个复杂的生殖细胞增殖和分化的过程。精原细胞是精子的前体细胞,精原细胞的发育和精子生成的维持需要内分泌及旁分泌信号的精密调控。下丘脑-腺垂体-性腺生殖轴分泌的多种激素,如腺垂体分泌的卵泡刺激素(FSH)和性腺分泌的性激素在精原细胞的发育过程中发挥重要的调节作用。FSH对于启动和维持精子发生具有重要的作用,FSH能够抑制精原细胞分化,刺激精原细胞和支持细胞(Sertoli)的增殖,并促进减数分裂中生殖细胞的发育^[1,2]。而雌激素不仅是卵巢发育所必需的性激素,在雄性生殖调控过程中也起到至关重要的作用,尤其是在早期的精子发生过程中是一种必不可少的激素。雌激素参与Leydig细胞的发育和精子的生成^[3],并能够促进性腺机能减退小鼠的睾丸发育和正常的精子发生^[4]。但雌激素是通过睾丸细胞上的受体直接发挥作用还是通过腺垂体间接发挥作用还不是很清楚。本实验利用生殖细胞-体细胞无血清共培养模型研究FSH和17-β雌二醇(E₂)对小鼠A型精原细胞增殖的影响,以进一步揭示促性腺激素和性激素对精原细胞发育的调控作用。

1 材料与方法

1.1 生殖细胞分离和培养

颈椎脱臼法处死出生后6天的ICR小鼠,取出两侧睾丸,除去被膜,分离曲细精管,经PBS和培养液清洗,反复吹打曲细精管以去除间质细胞。将组织剪碎成小组织块后用1 mg/ml胶原酶在37℃消化。

滤网过滤后,细胞离心洗涤3次后经台盼蓝染料排除法计算细胞活率。培养液为高糖DMEM培养液(Sigma),其中添加1.75 mmol/L HEPES、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml青霉素和100 mg/ml链霉素、10 mg/ml胰岛素、5 mg/ml转铁蛋白和3×10⁻⁸ mol/L亚硒酸钠作为完全培养液(ITS培养液)。细胞按5×10⁴个/孔的密度接种到96孔细胞培养板(Nunc),置于37℃,含5%CO₂的培养箱中培养。

1.2 药物处理

在细胞培养的同时加入FSH(10 ng/ml, OVAGEN™)、腺苷酸环化酶激活剂Forskolin(10⁻⁶ mol/L, Sigma)和蛋白激酶A(PKA)抑制剂H₈₉(10⁻⁷~10⁻⁵ mol/L, Sigma)单独或联合处理细胞。此外,用FSH(10 ng/ml)和E₂(10⁻⁸~10⁻⁶ mol/L, Sigma)单独或联合以及E₂(10⁻⁶ mol/L)联合雌激素受体阻断剂tamoxifen(0.1 mg/ml, Sigma)进行处理。对照组仅添加ITS培养液,每个处理4孔,实验重复3次。

1.3 细胞形态观察

在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁状况以及细胞的增殖和形态变化。细胞培养72 h后,每孔选4个视野用显微数字成像系统(Pixera Pro 150ES)拍照,用图象分析软件Simple PCI(Compix, Inc)统计贴壁的A型精原细胞集落的数目。

收稿日期: 2010-01-19 接受日期: 2010-05-21

国家自然科学基金资助项目(No.30960409)和江西省教育厅资助项目(No.GJJ09112)

* 通讯作者。Tel: 0791-6360586, E-mail: zouttzu@yahoo.com

1.4 精原细胞的 *c-kit* 和 PCNA 免疫细胞化学染色

细胞培养 72 h 后用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 3% H_2O_2 温育 10 min 灭活内源性过氧化物酶。在室温下用山羊血清封闭 20 min 后加入小鼠抗 *c-kit* 或 PCNA 抗体, 4 °C 过夜后滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37 °C 温育 20 min, 使用 DAB 显色试剂盒, 室温显色。细胞显棕红色为阳性细胞。

1.5 数据分析

所得数据采用 SAS(6.12 版本)软件中 GLM 过程进行方差分析及 Duncan's 多重分析比较, 检验误差为 5% 和 1% 水平。

2 结果

2.1 精原细胞培养状态

刚分离的睾丸细胞包含精原细胞和体细胞, 在无血清的 ITS 培养体系中培养 72 h 后 Sertoli 细胞形成平滑的单层平铺在培养板底部, 圆形的 A 型精原细胞形成集落状紧贴在 Sertoli 细胞单层上生长, 而且呈 PCNA 阳性(图 1)。A 型精原细胞进行 *c-kit* 的免疫细胞化学鉴定。结果表明, 精原细胞呈 *c-kit* 染色阳性, Sertoli 细胞基本不着色, 阴性对照生殖细胞和体细胞均不着色(图 1), 此结果与先前的报道一致^[5]。

2.2 FSH 通过 PKA 途径对精原细胞增殖的影响

细胞培养 72 h 后, PKA 的激活剂 Forskolin(10^{-6} mol/L)可刺激 A 型精原细胞的增殖, A 型精原细胞集

落数目显著增加。与对照组相比, FSH(10 ng/ml)显著增加了精原细胞集落的数目($P < 0.05$), 而 PKA 的抑制剂 H_{89} ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L)可显著抑制 FSH 引起的精原细胞增殖, A 型精原细胞的集落数目显著减少($P < 0.05$, 图 2), 单独的 H_{89} 处理对精原细胞的增殖无显著影响。免疫细胞化学结果表明, 与对照组相比, FSH 处理后体细胞的 PKA 阳性染色明显增强(图 1)。

2.3 E_2 对精原细胞增殖的影响

E_2 ($10^{-7} \sim 10^{-6}$ mol/L)显著促进了小鼠 A 型精原细胞的增殖, 精原细胞集落的数目显著增加($P < 0.05$, 图 3)。FSH(10 ng/ml)联合 E_2 ($10^{-8} \sim 10^{-7}$ mol/L)处理呈现加性效应, 精原细胞集落数目显著高于 FSH 或 E_2 单独处理组。此外, tamoxifen (0.1 mg/ml)联合 E_2 (10^{-6} mol/L)处理后, A 型精原细胞集落数目显著低于 E_2 单独处理组($P < 0.05$, 图 4)。与对照组相比, 单独的 tamoxifen 处理对精原细胞增殖没有影响。

3 讨论

多种激素和生长因子都参与了精原细胞发育的调控^[6]。FSH 和睾酮(testosterone, T)对于精子生成是必需的^[7]。T 可刺激精原细胞和 Sertoli 细胞增殖, 能够启动和维持哺乳动物正常的精子生成^[8]。体外研究也表明, FSH 和 T 联合处理能够促进精原细胞的增殖和 Sertoli 细胞的存活, 并促进减数分裂和精子生成^[9]。Sertoli 细胞分泌的信号分子或细胞因子在精原细胞增殖分化的调控中发挥重要作用^[10]。研究表

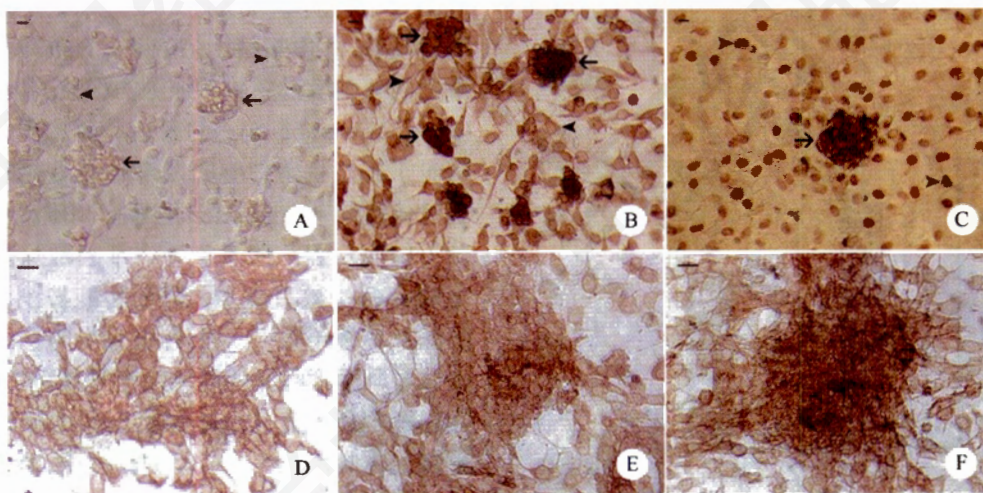


Fig.1 Immunocytochemical staining of *c-kit*, PCNA and PKA in spermatogonial cells and Sertoli cells

A: negative *c-kit* staining; B: positive *c-kit* staining; C: positive PCNA staining ($\times 200$, scale bar, 10 μm); D: negative PKA staining; E: positive PKA staining in control; F: positive PKA staining in FSH (10 ng/ml) group ($\times 400$, scale bar, 20 μm). Arrowheads: type A spermatogonial cells; arrows: Sertoli cells.

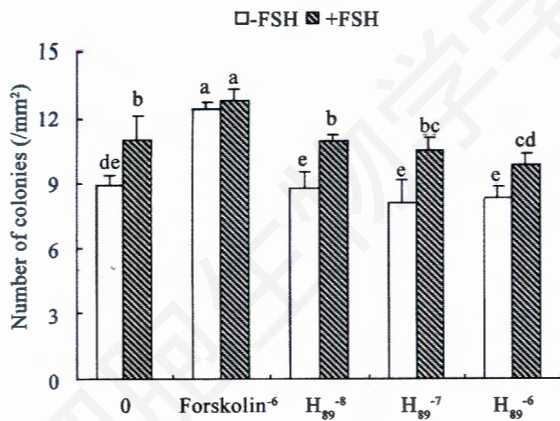


Fig.2 Effects of FSH, forskolin and H₉₉ on type A spermatogonial proliferation

Values represent mean±SD (n=4). Bars with different letters are statistically different ($P < 0.05$).

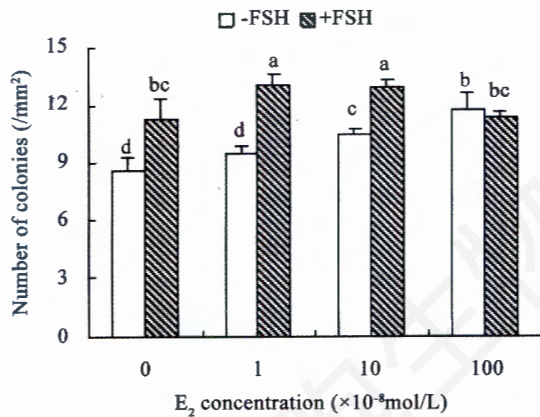


Fig.3 Effects of E₂ and FSH on type A spermatogonial proliferation

Values represent mean±SD (n=4). Bars with different letters are statistically different ($P < 0.05$).

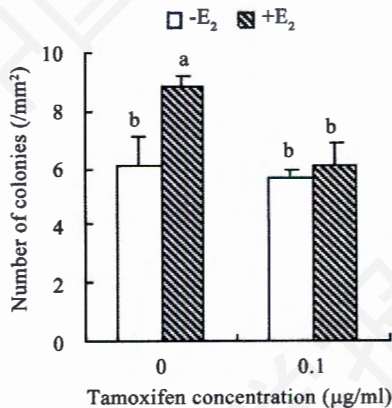


Fig.4 Effects of Tamoxifen and E₂ on type A spermatogonial proliferation

Values represent mean±SD (n=4). Bars with different letters are statistically different ($P < 0.05$).

明, 三维软凝胶培养体系和体细胞共培养精原干细胞可模拟体内的微环境维持精原干细胞的生长分化^[11], 生殖细胞 - Sertoli 细胞 - 细胞外基质三维培养体系可用于评价睾丸生殖细胞的发育毒性^[12]。FSH 作用靶点为 Sertoli 细胞, FSH 与其受体结合后调控 Sertoli 细胞的功能, 从而间接调控精子的发生。FSH 能够启动性未成熟动物精子生成, 并显著增加 Sertoli 细胞和 Ap 型精原细胞的数目, 睾丸的重量和体积也明显增加^[8], FSH 受体基因敲除的小鼠睾丸重量和睾酮水平均降低^[13]。FSH 可通过 PKA 途径激活脂肪酸酰胺水解酶, 从而调控 Sertoli 细胞的增殖^[14]。Mi 等^[15]研究也表明, FSH 能够促进睾丸生殖细胞的增殖, 其作用可能是通过 Sertoli 细胞的旁分泌作用上调 *c-kit* 的表达实现的。在本实验中, 腺苷酸环化酶激活剂 Forskolin 可显著促进 A 型精原细胞的增殖, PKA 的选择性抑制剂 H₉₉ 可抑制 Forskolin 引起的精原细胞增殖, 这一结果表明 Forskolin 能够增加细胞内 cAMP 的水平, 从而激活 PKA 信号传导途径调控小鼠 A 型精原细胞的增殖。此外, FSH (10 ng/ml) 可明显增加体细胞 PKA 的表达, 并能够显著促进 A 型精原细胞的增殖, 而 FSH 的促增殖效应可被 H₉₉ 所抑制, 提示 FSH 可通过 cAMP/PKA 介导的信号途径作用于 Sertoli 细胞, 并通过 Sertoli 细胞的旁分泌作用促进小鼠 A 型精原细胞的增殖。

许多研究表明雌激素对雄性生殖细胞的发育也具有重要的作用。雌激素能够有效的抑制体外培养的人类睾丸生殖细胞凋亡^[16], 保护精子 DNA 损伤^[17] 并促进胎儿的睾丸发育。雌激素缺乏能够导致精原细胞减少, 并影响精子生成^[18]。Han 等^[19]研究表明雌激素能够刺激鼠胚胎干细胞的增殖, 并增加原癌基因 (*c-fos*, *c-jun* 和 *c-myc*) 的表达。雌激素受体介导的过程对于雄性生殖细胞的发育起着重要的作用。雌激素受体阻断剂 tamoxifen 能够抑制雌激素诱导的鼠胚胎干细胞增殖。雌激素受体基因敲除能够影响精子生成。精子数目减少, 精子功能被削弱, 精子活性降低并导致不育^[20]。也有研究表明功能性的雄激素受体对雌激素刺激的睾丸发育是必需的, 雄性激素受体阻断剂能显著抑制雌激素引起的睾丸重量增加和生精上皮的增殖^[4]。在本实验中, E₂ 能够促进小鼠 A 型精原细胞的增殖, 而 tamoxifen 可显著抑制 E₂ 的促增殖作用, 这说明 E₂ 是通过雌激素样作用与其受体结合进而调控精原细胞的发育。此外, FSH (10 ng/ml) 联合 E₂ (10⁻⁸~10⁻⁷ mol/L) 具有加性效应。这些结果可

为激素调控的性腺发育提供理论依据,但是多种激素之间的协同作用对精原细胞发育的调控还需要进一步研究。

参考文献(References)

- Allan CM, Garcia A, Spaliviero J, Zhang FP, Jimenez M, Huhtaniemi I, *et al.* Complete sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology* 2004; 145(4): 1587-93.
- Meachem SJ, Stanton PG, Schlatt S. Follicle-stimulating hormone regulates both sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited djungarian hamster testis. *Biol Reprod* 2005; 72(5): 1187-93.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, *et al.* A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390: 509-12.
- Baines H, Nwagwu MO, Furneaux EC, Stewart J, Kerr JB, Mayhew TM, *et al.* Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse: role of androgens. *Reproduction* 2005; 130: 643-54.
- 张大雷, 米玉玲, 王凯明, 曾卫东, 张才乔. 卵泡刺激素和表皮生长因子对小鼠精原细胞增殖的影响. *细胞生物学杂志* 2007; 29: 565-8.
- 王凯明, 张大雷, 米玉玲, 曾卫东, 张才乔. 表皮生长因子和前列腺素 E₁ 对小鼠精原细胞增殖的促进作用. *细胞生物学杂志* 2008; 30: 537-40.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PJ, de Kretser DM, Pratis K, *et al.* Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 149-79.
- Arslan M, Weinbauer GF, Schlatt S, Shahab M, Nieschlag E. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate. *J Endocrinol* 1993; 136: 235-43.
- Sa R, Neves R, Fernandes S, Alves C, Carvalho F, Silva J, *et al.* Cytological and expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulating hormone and testosterone during cocultures of the normal human seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2008; 79(5): 962-75.
- 司蕾, 张学明, 岳占斌, 李子义, 李德雪. 睾丸支持细胞对精原干细胞发育的调节. *细胞生物学杂志* 2008; 30: 479-82.
- Stukenborg JB, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E. Co-culture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional Soft-Agar-Culture-System. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(9): 521-9.
- Yu X, Hong S, Moreira EG, Faustman EM. Improving *in vitro* Sertoli cell/Gonocyte co-culture model for assessing male reproductive toxicity: lessons learned from comparisons of cytotoxicity versus genomic responses to phthalates. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 239(3): 325-36.
- Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) Mouse. *Biol Reprod* 2000; 62: 1146-59.
- Rossi G, Gasperi V, Paro R, Barsacchi D, Cecconi S, Maccarrone M. Follicle-stimulating hormone activates fatty acid amide hydrolase by protein kinase A and aromatase-dependent pathways in mouse primary sertoli cells. *Endocrinology* 2007; 148: 1431-9.
- Mi Y, Zhang C, Xie M, Zeng W. Effects of follicle-stimulating hormone and androgen on proliferation of cultured testicular germ cells of embryonic chickens. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 138: 237-46.
- Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(5): 2057-67.
- Meeker JD, Singh NP, Hauser R. Serum concentrations of estradiol and free T4 are inversely correlated with sperm DNA damage in men from an infertility clinic. *Androl* 2008; 29(4): 379-88.
- Albrecht ED, Lane MV, Marshall GR, Merchenthaler I, Simorangkir DR, Pohl CR, *et al.* Estrogen promotes germ cell and seminiferous tubule development in the baboon fetal testis. *Biol Reprod* 2009; 81(2): 406-14.
- Han HJ, Heo JS, Lee YJ. Estradiol-17 β stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(4): 1067-75.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, *et al.* Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996; 137: 4796-805.

Effects of Follicle-stimulating Hormone and Estrogen on Proliferation of Mouse Spermatogonial Cells *in vitro*

Da-Lei Zhang¹, Ling Zhou², Ting Zou^{1*}, Bei Yang¹, Lei Wu¹

(¹Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²Nanchang Medical School, Nanchang 330006, China)

Abstract The serum-free spermatogonium-somatic cell coculture model was used to evaluate the effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and epidermal 17 β -estradiol (E₂) on proliferation of mouse type A spermatogonial cells. Results showed that FSH (10 ng/ml) significantly increased spermatogonial colony number and the proliferating effect was blocked by PKA inhibitor H₈₉. These results suggested that FSH stimulated the proliferation of mouse spermatogonia involving activation of PKA signaling pathway. E₂ (10⁻⁷~10⁻⁶ mol/L) promoted proliferation of type A spermatogonia and the promoting effect of E₂ was inhibited estrogen receptor antagonist tamoxifen (0.1 mg/mL). These results indicated that E₂ exerted direct estrogenic action to regulate spermatogonial development via estrogen receptors expressed in the testis. Furthermore, FSH (10 ng/ml) could synergize with E₂ (10⁻⁸~10⁻⁷ mol/L) to promote spermatogonial proliferation.

Key words type A spermatogonial cell; follicle-stimulating hormone; 17 β -estradiol; proliferation

Received: January 19, 2010 Accepted: May 21, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30960409) and Jiangxi Department of Education (No.GJJ09112)

*Corresponding author. Tel: 86-791-6360586, E-mail: zouttzu@yahoo.com