

乙醇导致小鼠生精细胞慢性损伤与 FasL 表达的关系

章劲夫 桂亚平 胡佳华^{1*}

(同济大学附属同济医院泌尿外科, 上海 200065;

¹中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 为研究乙醇摄入导致睾丸组织生精细胞慢性损伤的机制, 采用野生型(WT)小鼠和广泛表达人 Fas 配体(Fas ligand, FasL)的转基因型(TG)小鼠分别用 20% (V/V)乙醇喂养 12 周, 应用苏木精-伊红(HE)染色、RT-PCR 和 Western 印迹检测等方法观察了乙醇处理后小鼠生精细胞损伤和 FasL 表达的变化。HE 染色结果显示乙醇喂养后, 野生型鼠睾丸组织形态基本正常, 而转基因鼠曲细精管有明显退行性上皮空泡化现象; RT-PCR 和 Western 印迹检测结果显示乙醇喂养 12 周的 WT 小鼠和 TG 小鼠睾丸 FasL 表达高于对照组(普通饮用水喂养 12 周), 两组各自相比有统计学意义($P < 0.05$)。研究提示 FasL 可能参与乙醇摄入引起的睾丸组织生精细胞慢性损伤过程, 其作用机制可能是启动 Fas/FasL 调控生精细胞凋亡。

关键词 Fas 配体; 乙醇; 细胞凋亡; 睾丸; 转基因小鼠

众所周知, 乙醇滥用是世界性的问题。长期乙醇摄入能导致睾丸畸形、女性化乃至不育, 组织形态学观察发现这些病人睾丸组织曲细精管直径显著下降, 生精细胞数量减少^[1]。许多科学家对这种损伤机制进行了研究。新近研究表明, 在许多毒物介导的睾丸组织生精细胞凋亡的研究中, 都发现 Fas 配体(Fas ligand, FasL)的升高^[2]。因此我们推测 Fas 系统可能是该过程的一个重要调节因素, 同时, 许多研究也表明细胞凋亡是乙醇损伤各种组织的机制之一。Zhu 等^[3]首次证明了乙醇可诱导睾丸组织生精细胞凋亡增加, 同时初步检测了一些凋亡相关基因如 *bcl-2*、*p53* 和 *FasL* 的表达。但目前, 乙醇引起睾丸组织损伤的机制仍不十分清楚。为探讨乙醇摄入导致睾丸组织生精细胞慢性损伤的机制, 我们实验室建立了广泛表达人 FasL 的转基因小鼠模型。利用广泛表达人 FasL 的转基因小鼠模型, 我们实验室已报道了 FasL 参与急性乙醇引起小鼠睾丸组织生精细胞凋亡的过程^[4]。现进一步对慢性乙醇处理后 FasL 转基因小鼠生精细胞损伤及凋亡的状况进行研究观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 FasL 转基因小鼠由中科院上海生化细胞所构建, FasL 转基因小鼠生殖系统 FasL 高表达见文献^[5], 实验中所用的小鼠均为 3~4 月龄雄性小鼠, TG 代表 FasL 转基因小鼠, WT 指对应的野生型小鼠;

兔抗人 FasL 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体购于加拿大 Santa Cruz 公司。

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司, RT-PCR 试剂盒(按操作说明进行)购自上海华舜生物工程公司, DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司。PCR 及其引物合成由中科院上海生化细胞所基因工程组合成: 按文献设计人 *FasL* 上、下游引物^[1], 见表 1。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养 所有小鼠用塑料笼饲养(每笼小于 4 只), 并保证其能自由取得食物和水, 房间温度维持在(22±2) °C 伴有光照及黑暗 12 h 节律。对照组(WT 和 TG)用普通饮用水喂养, 实验组(WT 和 TG)用 20% (V/V)乙醇溶液取代普通饮用水给小鼠连续喂养 12 周(84 天), 于此期间任何时候小鼠都可饮用乙醇溶液, 于 12 周结束时处死动物并取得睾丸, 每一次实验至少有 3 只小鼠作重复。

1.2.2 形态学观察 睾丸用 4% 多聚甲醛(含 0.1 mol/L PBS)固定, 组织梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后石蜡包埋, 制备 7 μm 石蜡切片, 常规苏木精-伊红(HE)染色, 莱卡显微镜下形态学观察。

1.2.3 RT-PCR 检测小鼠睾丸组织 FasL mRNA 水平变化 颈椎脱臼法处死动物取得睾丸组织, 按上海

收稿日期: 2008-12-19 接受日期: 2009-06-29

* 通讯作者。Tel: 021-54921392, Fax: 021-56050502, E-mail:

jinfuzhang@yahoo.com.cn

Table 1 Selected PCR primers for *FasL*

| Product | | Primer sequence |
|----------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| <i>FasL</i> ⁽¹⁾ | Upstream primer | 5'-ACTGAATTCTGACTCACCAGCTGCCATGC-3' |
| | Downstream primer | 5'-ATCCTCGAGCTATTAGACTTATATAAGCCG-3' |
| <i>GAPDH</i> | Upstream primer | 5'-ACGACCCCTTCATTGACC-3' |
| | Downstream primer | 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3' |

华舜生物工程公司 RT-PCR 试剂盒(按操作说明进行), 常规制胶电泳。PCR 反应条件: 94 °C 60 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s, 30 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 Western 印迹检测小鼠睾丸组织 *FasL* 表达改变 颈椎脱臼法处死动物取得睾丸组织, 样品用 20 倍速体积蛋白质抽提液(Pierce 公司试剂盒), 10 000 r/min 离心 min 得到蛋白质溶液。BSA 作为标准样品, 用 Pierce 公司试剂盒测定每个样品的蛋白质浓度。取等量蛋白质与上样缓冲液混合后 100 °C 煮沸 5 min。10% SDS-PAGE 胶分离后, 电泳转移至硝酸纤维素膜。膜用 5% 脱脂牛奶(TBST 稀释)封闭 1h 后, 1:100 兔抗 *FasL*, 于 4 °C 过夜。辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 作为二抗。每两步间用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 最后用 DAB 显色蛋白质条带, 使用 Axioplan 2 imaging 显微图象分析系统对条带强度进行分析得出半定量数据。

1.3 统计学方法

采用 SAS 统计软件进行分组比较 *t* 检验, 以 $P > 0.05$ 为差异无统计学意义, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察

实验组和对照组的睾丸石蜡切片用常规苏木精-伊红染色后(图 1), 普通饮用水喂养的 WT 和 TG 小鼠形态很接近, 与正常形态没有太大的差异, 但在 TG 小鼠的某些区域, 睾丸组织空腔变大并伴有少量空泡样, 这一结果与我们实验室以前曾经报道的一致^[5]。在慢性乙醇处理后, WT 小鼠睾丸组织形态仍较为正常, 而 TG 小鼠睾丸生精层受到很大损伤, 很多区域可看到退行性上皮空泡样。

2.2 慢性乙醇处理后睾丸组织 *FasL* mRNA 表达水平上升

应用 RT-PCR 方法对各组小鼠睾丸 *FasL* 表达进行检测, 采用 Axioplan 2 imaging 显微图象分析系统对 RT-PCR 结果条带强度进行分析得出半定量数据。

普通饮用水喂养 12 周的 WT 小鼠睾丸见一条大小为 876 bp 的 *FasL* 条带很弱, 强度为 32.36 ± 3.54 (图 2A), 普通饮用水喂养 12 周的 TG 小鼠睾丸 *FasL* 条带强度为 96.71 ± 4.12 (图 2B); 乙醇喂养 12 周的 WT 小鼠和 TG 小鼠睾丸 *FasL* 条带强度分别为 153.12 ± 4.61 和 187.82 ± 4.51 (图 2C、图 2D)。两组各自相比有统计

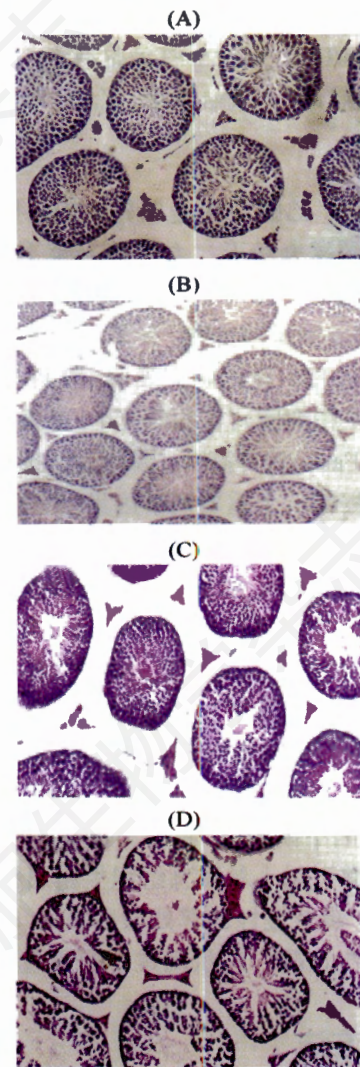


Fig.1 Representative photomicrographs of HE-stained testis cross sections from control and ethanol-exposed mice (WT and TG)

A: WT+ saline; B: TG+ saline; C: WT+ ethanol; D: TG+ ethanol. WT: wild type mice; TG: transgenic mice.

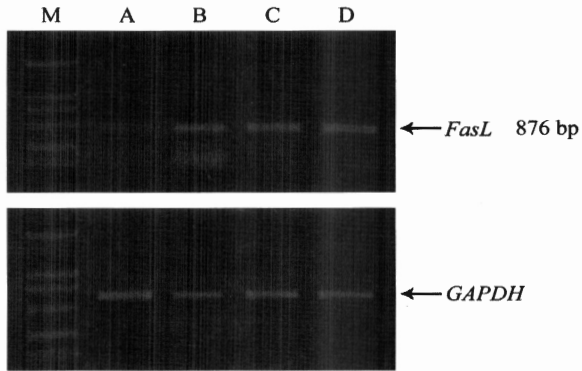


Fig.2 The expression changes of FasL mRNA in the testis (WT and TG) by RT-PCR

A: WT+ saline; B: TG+ saline; C: WT+ethanol; D: TG+ethanol. WT: wild type mice; TG: transgenic mice.

学意义($P<0.05$)。说明乙醇的干预可引起小鼠睾丸组织 FasL mRNA 水平上升。

2.3 慢性乙醇处理后睾丸组织 FasL 表达升高

应用 Western 印迹方法对各组小鼠睾丸 FasL 表达进行检测, 采用 Axioplan 2 imaging 显微图象分析系统对 Western 印迹结果条带强度进行分析得出半定量数据。FasL 内参对照(marker)分子量为 31 kDa 的 FasL 条带强度为 210 ± 5.76 (图 3B); 普通饮用水喂养 12 周的 WT 小鼠睾丸 31 kDa 的 FasL 条带很弱, 强度为 18.53 ± 2.93 (图 3A); 乙醇喂养 12 周 WT 小鼠睾丸 FasL 条带强度为 120.83 ± 7.46 (图 3D)。普通饮用水喂养 12 周的 TG 小鼠睾丸可检测到一条较清 31kDa 的 FasL 条带, 强度为 40.32 ± 4.193 (图 3C); 乙醇喂养 12 周的 TG 小鼠睾丸 FasL 条带强度为 170.37 ± 6.51 (图 3E); 两组各自相比有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

哺乳动物中, 睾丸组织生精细胞凋亡在生精细胞生成过程中起重要作用^[6,7], 过多的、遗传突变及意外损伤的生精细胞都需要通过凋亡来及时得以清除, 不论是经睾丸毒物处理的实验动物, 还是睾丸损伤或某些病理条件下的人类自身, 都可以观察到凋亡生精细胞的增多^[8~11]。凋亡是一种不损伤周围组织的快速清除过程。自发的或毒物介导的睾丸组织生精细胞发生凋亡的机制是当今许多研究的热点。最近研究表明 Fas-FasL 系统可能参与了这一调控^[12]。FasL (FasL/CD95L) 是一分子量为 31 kDa 的 II 型膜蛋白, 隶属于肿瘤坏死因子(TNF)家族。对淋巴系统的研究表明, FasL 通过与 Fas 的结合启动细胞凋亡。Fas (CD95/APO-1) 是一种 I 型膜蛋白, 隶属于肿瘤坏死因

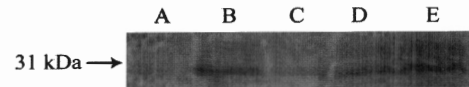


Fig.3 The expression of FasL in the testes (WT and TG) after ethanol exposure by Western blot

A: WT; B: marker; C: TG; D: WT+ethanol; E: TG+ethanol. WT: wild type mice; TG: transgenic mice.

子(TNF)/神经生长因子(NGF)家族, 广泛分布于体内各个组织。在啮齿类动物中, Sertoli 细胞持续表达 FasL, 而 Fas 则分布于部分生精细胞上。由于人和鼠 FasL 的同源性高达 76.7%, 而且人 Fas/FasL 和鼠 Fas/FasL 交叉反应的效率一致^[13], 因此, 我们用广泛表达人 FasL 的转基因小鼠来研究 FasL 在慢性乙醇介导的睾丸组织生精细胞损伤中的作用。

Eid 等^[12]报道了慢性乙醇喂养小鼠 12 周后引起生精细胞凋亡, 而 Fas 系统可能参与了这一过程。目前, 尚未见报道 FasL 介导慢性乙醇摄入引起的睾丸组织生精细胞损伤直接证据的较深入研究。本研究结果显示: 慢性乙醇干预即乙醇喂养 12 周后, FasL 转基因鼠的某些区域, 组织形态学观察可以看到睾丸组织空腔扩大并伴随有空泡样组织损伤改变。应用 RT-PCR 和 Western 印迹方法对各组小鼠睾丸组织 FasL 表达进行检测, 提示慢性乙醇处理后的转基因小鼠睾丸组织 FasL 表达在 mRNA 水平和蛋白质水平比普通饮用水喂养小鼠明显升高, 并且相比有统计学意义($P<0.05$)。

这些结果提示乙醇对小鼠睾丸的损伤可能是由 FasL 过量表达后调控细胞凋亡引起的。我们用过量表达 FasL 的转基因小鼠直接证明了 FasL 参与了慢性乙醇介导的睾丸组织损伤这一过程, 推测慢性乙醇摄入后引起 FasL 表达升高而启动 Fas/Fas 系统, 从而可能通过调控诱导生精细胞凋亡最终导致睾丸组织生精细胞损伤。另外, 我们还发现乙醇喂养 12 周的转基因小鼠睾丸组织曲细精管很多地方可以看到退行性上皮空泡样, 说明 FasL 的表达变化可能与睾丸组织对乙醇的敏感性密切相关, 提示 FasL 的表达有可能可作为评估乙醇对组织损伤能力的一个重要指标。

参考文献(References)

- [1] Van Thiel DH, Gavalier JS, Eagon PK, *et al.* Alcohol and sexual function, *Pharmacol Biochem Behav*, 1980, 13(suppl 1): 125-129
- [2] Richburg JH, Nañez A, Williams LR, *et al.* Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice

- that express a nonfunctional form of Fas ligand, *Endocrinology*, 2000, 141(2): 787-793
- [3] Zhu Q, Meisinger J, Emanuele NV, *et al.* Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes, *Alcohol Clin Exp Res*, 2000, 24(10): 1550-1556
- [4] Hu JH, Jiang J, Ma YH, *et al.* Enhancement of germ cell apoptosis induced by ethanol in transgenic mice overexpressing Fas ligand, *Cell Res*, 2003, 13(5): 361-367
- [5] Ma YH, Hu JH, Zhou XG, *et al.* γ -aminobutyric acid transporter (GAT1) overexpression in mouse affects the testicular morphology, *Cell Res*, 2000, 10(1): 59-69
- [6] Bartke A. Apoptosis of male germ cells, a generalized or cell type-specific phenomenon, *Endocrinology*, 1995, 136(1): 3-4
- [7] Billig H, Furuta I, Rivier C, *et al.* Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages, *Endocrinology*, 1995, 136(1): 5-12
- [8] Blanchard K, Allard E, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2, 5-hexanedione-induced testicular injury, *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 137(2): 141-148
- [9] Park JD, Habeebu SS, Klaassen CD. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague-Dawley rats, *Toxicology*, 2002, 171(2-3): 105-115
- [10] Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons L. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility, *J Urol*, 1998, 160(3 Pt 2): 1158-1160
- [11] Feng H, Sandlow J, Sparks A, *et al.* Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes, *Fertil Steril*, 1999, 71(1): 85-89
- [12] Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, *et al.* Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity, *Int Immunol*, 1994, 6(10): 1567-1574

Relation of the Chronic Damage of Testicular Germ Cells and Its Fas Ligand Expression Induced by Ethanol

Jin-Fu Zhang, Ya-Ping Gui, Jia-Hua Hu^{1*}

(Department of Urology, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China; ¹Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract To explore the mechanisms of chronic damage of testicular germ cells induced by chronic ethanol on the transgenic mice ubiquitously expressing human FasL, both wild type (WT) mice and transgenic (TG) mice were fed with ethanol (20% V/V) for 12 weeks. The histological changes of testicular germ cells were assessed by HE dying, and the Fas ligand (FasL) expression was detected using RT-PCR and Western blot. The result showed that there was a degenerative change in epithelial component of the tubules in TG mice whereas a normal shape in that of WT mice after a chronic ethanol feeding for both, and the FasL was up-regulated in the testis of ethanol-treated TG and WT mice compared with corresponding vehicle-treated control mice ($P < 0.05$) after a 12-week treatment. These evidences suggest that the up-regulation of FasL may be involved in the chronic damage of testicular germ cells induced by chronic ethanol, and Fas/FasL could act as a regulator for the apoptosis of testicular germ cells.

Key words Fas ligand; ethanol; apoptosis; testes; transgenic mouse

Received: December 19, 2009 Accepted: June 29, 2009

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921392, Fax: 86-21-56050502, E-mail: jinfuzhang@yahoo.com.cn