

# IGF<sub>I</sub> 和 hCG 对山羊睾丸间质细胞 分泌睾酮的影响

曹斌云<sup>1</sup> 李 键<sup>2</sup> 王建辰<sup>2</sup> 朱建楚<sup>3</sup> 康靖全<sup>3</sup>

(1 西北农业大学动物科学系, 2 动物医学系, 3 实验中心, 陕西杨凌 712100)

**摘 要** 采用体外培养山羊睾丸间质细胞的方法, 应用 IGF<sub>I</sub> 和 hCG 进行不同处理, 利用放射免疫分析法 (RIA) 测定睾酮含量。结果表明: ① 30~40 日龄山羊睾丸间质细胞适宜作为体外培养的材料; ② 山羊睾丸间质细胞的敏感性随 hCG 的重复刺激而下降; ③ IGF<sub>I</sub> 能够促进睾酮的分泌 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ); ④ IGF<sub>I</sub> 和 hCG 对睾酮的分泌具有协同促进作用 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。

**关键词** 山羊, 睾丸间质细胞, 睾酮, IGF<sub>I</sub>, hCG

**中图分类号** S827, S814.1

睾丸间质细胞由 Leydig 于 1850 年首先命名并加以描述<sup>[1]</sup>, 它的主要功能是分泌睾酮 (T)。T 是雄性动物的主要性激素, 对生殖乃至生长发育起着重要的调节作用。T 分泌活动受丘脑下部、垂体及自身的反馈调节。80 年代后期, 人们发现除各种生殖激素外, 在睾丸内部还存在着多种因子对雄性生殖活动起着重要的调节作用<sup>[1~8]</sup>。当前, 国内外对这些因子的研究十分活跃, 其中胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factors, IGFs) 就是被广泛关注的因子之一。近年来, 对 IGFs 在雌性生殖生理调控方面研究较多, 对雄性研究甚少<sup>[1~3]</sup>, 而研究 IGF<sub>I</sub> 和 hCG 两者结合对山羊 T 分泌的影响尚未见报道。本试验以间质细胞组织比较发达的公山羊羔为研究对象, 探索 IGF<sub>I</sub> 和 hCG 两者结合对山羊睾丸间质细胞分泌 T 的影响, 为提高雄性动物生殖力的研究和实践提供理论依据。

## 1 材料与方法

**动物与试剂** 试验动物为 30~40 日龄的关中奶山羊公羔, 来源于西北农业大学附近养殖户。试剂包括: IGF<sub>I</sub>、Hepes TCM 199 小牛胸腺 DNA 胶原酶 (华美生物工程公司进口分装); hCG (宁波市激素厂); 睾酮 RIA 测定盒 (中国科学院动物研究所); cAMP RIA 测定盒 (中国原子能研究所); 犊牛血清 (自制)

**仪器与设备** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国进口); 万分之一天平 (1702 型); 连续变倍实体显微镜 (OLYMPUS SZU 型); 研究显微镜 (OLYMPUS BHS 型); 组织倒置显微镜 (OLYMPUS IM T-2 型); 液体闪烁计数器 (FJ-2100 型); 组织超薄切片机 (LKBV 型); 24 孔组织培养板 (丹麦); 荧光分光光度计 (日立 850 型)

**细胞洗涤液** TCM 199 粉为 0.99 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.22 g, Hepes 粉 0.48 g, 丙酮酸钠

收稿日期 1997-12-17

课题来源 国家自然科学基金资助项目

作者简介 曹斌云, 男, 1955 年生, 副教授, 博士

0.02 g,链霉素 0.01 g,青霉素  $16.67 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1}$ .上述试剂溶于 100 mL四蒸水中,调 pH 为 7.4.

胶原酶消化液 胶原酶为 10 mg,溶于 20 mL洗涤液中备用

细胞培养液 将细胞洗涤液各成分扩大 5 倍,另加犊牛血清 50 mL,调 pH 为 7.4

细胞制备及分装 在无菌条件下,将睾丸被膜剥离,在洗涤液中洗涤,然后用剪刀剪碎,用胶原酶消化液在  $36^{\circ}\text{C}$  条件下先后消化 20 及 25 min,消化液用双层铜网筛(上层 200 目,下层 400 目)过滤后离心 ( $1500 \text{ r/min}$ , 5 min) 细胞用培养液稀释到  $1 \times 10^6$  个/mL,台盼兰染色计算细胞存活率( $> 95\%$ ). 分装在 24 孔培养板中,每孔 1 mL 培养液,含  $1 \times 10^6$  个细胞

细胞培养及样品制备 细胞在  $38.5^{\circ}\text{C}$ ,饱和湿度下,培养于 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中. 原代培养 48 h 后,换入 IGF-I ( $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ ) hCG ( $1.667 \sim 50.01 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 的培养液,每处理重复 6 次,每试验重复 4 次. 分别或重复刺激 24, 48, 72 h 结束培养,换出培养液贮于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中备测睾酮.

含量测定 用 RIA 法测定睾酮含量.

统计分析 用非配对  $t$  检验法判定差异的显著性

## 2 结果与分析

### 2.1 不同日龄山羊睾丸间质细胞的分离与培养效果

为了选择适宜的试验动物,分别比较了 20~60 日龄山羊的睾丸间质细胞的分离难易程度,细胞数量和原代培养时间. 结果表明,年龄越大,睾丸组织越难剪碎,睾丸组织消化所用的胶原酶越多,消化时间越长,在细胞中混入的各类生殖细胞也越多. 在间质细胞数量上,20,30 和 40 日龄山羊的数量接近 ( $2 \times 10^7$  /mL 左右),而 50 日龄后各类细胞混杂,较难区分. 经原代培养表明,20 日龄的山羊睾丸间质细胞半数存活时间为 48 h,30 日龄为 68 h,40 日龄为 74 h,50 日龄为 80 h. 可见,年龄越大的山羊,其间质细胞体外培养时间越长.

### 2.2 hCG 刺激山羊睾丸间质细胞分泌 T 的敏感性

经原代培养的细胞第一次用  $1.667 \sim 50.01 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1}$  的 hCG 处理,48 h 后换培养液,第二次继续用 hCG 处理 48 h,其结果如表 1 所示. 试验结果表明,细胞对 hCG 的

表 1 山羊睾丸间质细胞对 hCG 的刺激反应

hCG 用量 $\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$	第一次刺激 T 含量 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	第二次刺激 T 含量 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )
0	126.1 ± 31.4	17.32 ± 8.41
1.67	578.3 ± 39.7	24.63 ± 7.64
5.001	876.4 ± 92.8 *	24.78 ± 6.68
16.67	1218.2 ± 78.8 *	129.12 ± 20.43
50.01	1429.6 ± 314.2 *	367.54 ± 19.58 *

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

第一次刺激反应非常敏感. 当 hCG 的剂量仅达到  $1.667 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$  后,处理组就比对照组显著增加 T 的分泌 ( $P < 0.05$ ),当 hCG 剂量达到  $50.01 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$  后,处理

组比对照组多分泌 T 的差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ) 且这种 T 含量的增加与 hCG 处理的剂量呈明显的正相关趋势。但第二次用 hCG 处理培养细胞后, 细胞反应的敏感性迅速下降, 只有当 hCG 剂量达到  $1.667 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$  时, 才能使 T 含量明显增加 ( $P < 0.05$ )。因而, 以后的试验结果均以第一次刺激所测的结果为准。

### 2.3 IGF-I 刺激山羊睾丸间质细胞分泌 T 的含量变化

用  $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IGF-I 处理体外培养细胞的结果如表 2 所示。从表 2 可见, 低剂量的 IGF-I 对山羊睾丸间质细胞的刺激不敏感, 只有当 IGF-I 的含量达到  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时才能刺激 T 含量增加。在 IGF-I 含量达到  $5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 处理组分泌 T 与对照组相比差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ); IGF-I 达到  $50 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。IGF-I 用量与 T 水平的变化呈正相关。当 IGF-I 含量为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 处理组 T 的分泌量为对照组的 1.42 倍, 当 IGF-I 含量为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 处理组的 T 分泌量为对照组的 2.0 倍。

表 2 IGF-I 刺激山羊睾丸间质细胞分泌 T 的剂量效应

IGF-I 用量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	T 水平 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	IGF-I 用量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	T 水平 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )
0	1108.4 ± 179.3	10	1724.5 ± 152.2
1	1378.1 ± 182.8	50	2172.8 ± 176.4 *
5	1569.7 ± 212.4	100	2548.5 ± 319.7 *

### 2.4 IGF-I 与 hCG 组合对山羊间质细胞分泌 T 的影响

IGF-I 与 hCG 的不同处理在刺激山羊睾丸间质细胞分泌 T 方面的相互作用见表 3。从试验结果可见, IGF-I 可刺激山羊间质细胞经 hCG 诱导的 T 分泌,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IGF-I 在  $16.67 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$  hCG 存在的条件下, 间质细胞分泌睾酮的能力是单独使用  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  IGF-I 的 2.6 倍, 是单独使用  $16.67 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$  hCG 的 2.2 倍。用 IGF-I 和 hCG 组合对山羊间质细胞进行处理, 其处理组分泌 T 的作用比对照组及二者单独使用均有极显著差异 ( $P < 0.005$ )。

表 3 不同处理的 IGF-I 与 hCG 对睾酮分泌的影响

培养体系		T 含量 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	培养体系		T 含量 ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )
hCG ( $\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$ )	IGF-I ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )		hCG ( $\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$ )	IGF-I ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
0	0	148.3 ± 41.4	0	100	1013.7 ± 283.9 *
16.67	0	1179.1 ± 243.6 *	16.67	100	2637.4 ± 328.6 **

注: \* \* \*  $P < 0.005$ .

## 3 讨论

### 3.1 试验动物的可靠性

本试验分别观察分离和培养了 20, 30, 40, 50, 60 日龄山羊公羔的睾丸间质细胞, 确定了睾丸易于取得, 组织易于分散, 间质细胞易于分离, 培养存活时间较长的 30~40 日龄山羊公羔的睾丸细胞作为培养对象。此时睾丸间质细胞数目最多, 功能较强, 而曲精细管仅初步形成, 尚无完整管腔, 仅有精原细胞, 是研究睾丸间质细胞功能调节的较好时机。若改

成大龄公羊,不仅睾丸组织难以消化,而且由于睾丸内部存在的细胞间复杂的调节网络,睾丸内支持细胞、各个发育时期的生精细胞、管周细胞都可能对间质细胞的功能造成影响。其产生的多种局部因子都有可能加强和削弱 IGF-I 或 hCG 的作用,造成较大的基础实验误差,影响试验结果的可靠性。

### 3.2 山羊间质细胞对外源性 hCG 的敏感性

试验结果表明,山羊睾丸间质细胞在体外对 hCG 是敏感的,这种敏感性随外源激素的重复刺激而下降。这种现象出现在许多激素的调节过程中,可能是由于激素与细胞膜上受体的亲和力下降或是由于腺苷酸环化酶体系对于 LH/hCG 的刺激脱敏造成的<sup>[11,13]</sup>。另外,细胞在酶的消化过程中膜蛋白的破坏也能引起上述现象<sup>[14]</sup>。根据这些试验结果,在本研究中有关外源 IGF-I 或与 hCG 结合调节睾酮分泌的处理均以原代培养后第一次刺激的结果为准,从而提高了试验结果的可比性。

### 3.3 IGF-I 对山羊间质细胞睾酮分泌的影响

本试验用  $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IGF-I 刺激体外培养的山羊间质细胞,发现  $5 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IGF-I 均可刺激间质细胞分泌睾酮,且  $5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  IGF-I 就达到了显著水准 ( $P < 0.05$ ),而  $50 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  达到了极显著水准 ( $P < 0.01$ )。这一结果与 Griswold 等 (1995) 在大鼠上的研究相似。本试验结果可以证明,IGF-I 能够促进山羊睾丸间质细胞睾酮的产生。其间质细胞分泌睾酮的作用具有明显的剂量依赖关系,即随着 IGF-I 用量的增加而睾酮的分泌量增多。关于 IGF-I 的准确作用途径有待进一步深入研究。

### 3.4 IGF-I 对 hCG 诱导的山羊间质细胞睾酮分泌的影响

本试验在培养体系中加入一定量  $16.67 \mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{s})^{-1}$  的 hCG 后,T 分泌量是单独使用同量的 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) IGF-I 的 2.6 倍,是对照组的 17.8 倍。这一试验结果与 Saez 等 (1991) 在小鼠试验中的结果相似,说明 IGF-I 极显著地促进了 hCG 刺激的山羊间质细胞睾酮的产生<sup>[6]</sup>。IGF-I 和 hCG 调节山羊间质细胞的可能机理是,这两类物质都属于多肽类,一方面,hCG 可刺激间质细胞产生 IGF-I,另一方面,IGF-I 又可使间质细胞上 hCG (LH) 受体数目增多,使间质细胞对 hCG 的敏感性加强。两方面作用的相加效应引起细胞内 cAMP 的形成。细胞质内 cAMP 水平的增加,可以直接激活间质细胞内某些酶,促使与合成睾酮有关的一些特殊酶的合成增多,从而使山羊间质细胞合成睾酮的水平增加。

从以上分析表明,IGF-I 和 hCG 单独或两者结合都能促进山羊睾丸间质细胞 T 的分泌,这一结果与 Mather (1982)、Manduit (1992)、夏国良等 (1995)、张家骅等 (1997) 应用催乳素、白细胞介素这类含氮类激素 (因子) 处理大鼠、绵羊和仔猪睾丸间质细胞调节 T 分泌变化的结果不同,而与 FSH LH 调节雄性动物睾丸间质细胞分泌 T 的机理相似<sup>[10,11,13,14,1]</sup>。可见,含氮类激素 (因子) 调节 T 分泌的机理并非一种固定模式,因而,研究含氮类特定生长因子或细胞因子对 T 分泌的调节机理具有特殊意义。

## 参 考 文 献

1 王建辰主编. 家畜生殖内分泌. 北京: 中国农业出版社, 1993.

- 2 Yuan W, Lucy M G. Effect of growth hormone, prolactin, insulin-like growth factors, and gonadotropins on progesterone secretion by porcine luteal cells. *J Anim Sci*, **1996**, **74** 866- 872
- 3 Wise T, kilandt J. Effect of porcine somatotropin on circulating testosterone concentration in boars and mechanism of action. *J Anim Sci*, **1996**, **74** 3001- 3011
- 4 Griswold M D. Interactions between germ cells and sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*, **1995**, **52** 211- 216
- 5 Spiterl-Gerch J, Nieschlag E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fert*, **1993**, **98** 1- 14
- 6 Saez J M, Arallet O. Cell-cell communication in the testis. *Horm Res*, **1991**, **36** 104- 115
- 7 Harvey M B, Kaye P L. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-I through the insulin receptor. *Mol Repros Dev*, **1991**, **29** 253
- 8 Schams D, Koll R. IGF-I Stimulates oxytocin and Progesterone Production by bovine granulosa cell in culture. *J Endocr*, **1988**, **116** 97
- 9 Monniaux D, Pisselet C. Control of proliferation of ovine granulosa cell by IGF-I and FSH in vitro. *Bio Reprod*, **1992**, **46** 109- 119
- 10 Mather J P. Regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured porcine leydig cells. *Endocrinology*, **1982**, **110** 933- 940
- 11 Manduit C, chauvin M A. Interleukin-1 $\alpha$  as potent inhibitor of gonadotropin action in porcine leydig cells. *Bio Reprod*, **1992**, **46** 1119- 1126
- 12 Rappaport M S, Smith E P. IGF-I inhibits aromatization induced by FSH in rat sertoli cell culture. *Bio Reprod*, **1996**, **54** 446- 452
- 13 夏国良, 庄临之, 杨传任. 催乳素调节绵羊睾丸间质细胞睾酮分泌机制的研究. *畜牧兽医学报*, **1995**, **26**(5): 385- 390
- 14 曹斌云. IGF-I 调节奶牛乳腺细胞泌乳机理的假设. *黄牛杂志*, **1995**(4): 50- 51

## Effects of IGF-I and hCG on Testosterone Secretion in Cultured Goat Leydig Cells

**Cao Binyun Li Jian Wang Jianchen Zhou Jianchou Kang Jingquan**

*(Department of Animal Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)*

**Abstract** With the method of in vitro goat leydig cell culture and different treatments of IGF-I and hCG, the contents of testosterone have been determined by RIA. The results showed that (1) Leydig cells from 30~ 40-day-old goats are appropriate materials for in vitro study. (2) The goat Leydig cell was sensitive to hCG stimulation on testosterone production, but the sensitivity declined with the repeated hCG treatments. (3) IGF-I enhanced both basal and hCG-induced testosterone secretion ( $P < 0.05$ ~  $P < 0.01$ ). (4) hCG and IGF-I had accelerative function to testosterone secretion ( $P < 0.05$ ~  $P < 0.01$ ).

**Key words** goat, leydig cell, testosterone, IGF-I, hCG