

促黄体素、肾上腺素对体外家兔赖氏细胞睾酮分泌的影响

朱宝长* 张 岳 李震钟

(西北农业大学畜牧系)

摘 要

采用胰蛋白酶消化法离解家兔睾丸细胞,研究赖氏细胞在体外短期培养条件下的内分泌学特性。结果表明, LH/HCG能够特异性地促进赖氏细胞分泌睾酮(T),而肾上腺素(E)却显著地拮抗LH/HCG所致的赖氏细胞T生成作用, LRH对赖氏细胞T分泌似无直接作用,茶碱能够有效地提高赖氏细胞对LH反应的灵敏度。

关键词 促黄体素(LH); 肾上腺素(E); 家兔; 赖氏细胞; 睾酮(T)

雄性学研究指出, LH可以刺激其靶细胞——赖氏细胞产生睾酮(T),然而,近来相继有儿茶酚胺对LH靶细胞作用的实验报道, Cooke et al.^[1-3]研究揭示,在某种条件下,肾上腺素(E)或许能够象LH那样刺激赖氏细胞的T分泌。Dufau et al.^[4-6]直接用放射免疫分析法(RIA)和LH/HCG细胞生物学RIA方法测定同一血样时,后者的测定值总要比前者高一些。因为LH细胞生物学测定法是根据LH特异性地刺激赖氏细胞产生T的曲线关系而建立的,因此,如果Cooke et al.的上述研究结果在常规条件下也能成立,那么, Dufau et al.用两种测定方法对同一血样进行测定时,其所得测值的差异就可能与血液中E的存在有关。假设在短期原代细胞培养中, E不能刺激赖氏细胞使T的分泌显著增加,否则, LH细胞生物学测值高于直接RIA测值的现象就可能是由于E的作用所引起,就意味着LH细胞生物学方法特异性的否定。目前,国内尚未见到有关报道。本实验旨在研究赖氏细胞对LH, E反应的内分泌学特性,试图为建立高灵敏度的LH/HCG细胞生物学方法提供一些基本资料。

材料和方法

1. 主要试剂 LH(LP-531-2); 美国 Burns-Biotec; HCG(8401292); 武汉生物试剂厂; 盐酸肾上腺素(830505); 上海第十制药厂; LRH(840222); 上海生物

本文于1986年4月11日收到。

* 八五届硕士研究生。

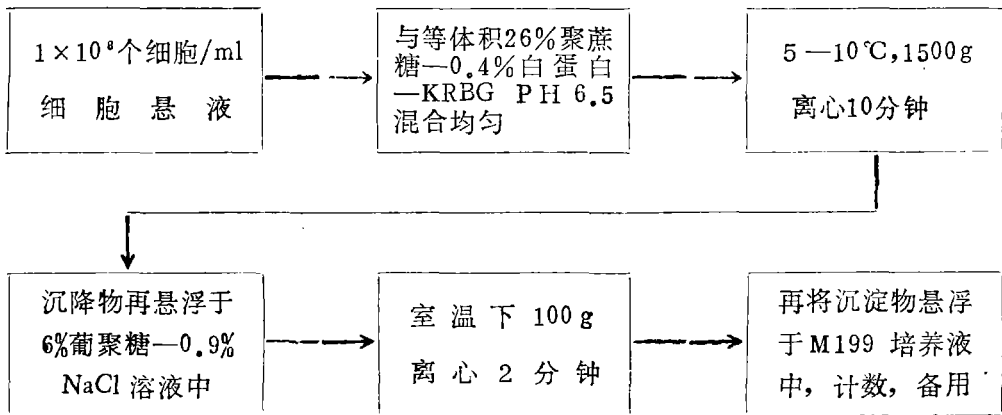
本文承蒙王建辰教授和渊锡藩副教授的热情帮助,特此致谢。

化学制药厂; 胰蛋白酶(810325): 活力1:250, 新疆伊犁地区肉联厂生物制药厂, 聚蔗糖400(820225): 上海化学试剂厂 Pharmacia 进口分装; 牛血清白蛋白(84-07-20): 上海化学试剂厂分装厂 Serva 进口分装; M199 培养粉(5909NS): 日本 Nissui Seiyaku; 茶碱(820206)——上海试剂二厂。睾酮抗体及睾酮标准品购于上海内分泌研究所, 睾酮标记品购于上海原子能研究所。

2. 实验动物 成年雄性家兔, 无生殖系统疾患, 性活动正常, 使用前进行五天以上的饲养观察。

3. 细胞制备 击昏家兔, 立即摘除两侧睾丸置于4℃的D-Hanks液中, 于无菌条件下清洗血污并除去附睾及囊膜, 然后进行剪碎→组织洗涤→酶消化→细胞洗涤→过滤→细胞计数, 最后用M199培养液调整细胞浓度, 台兰(Trypan-blue)染色后镜检, 要求活细胞率大于95%, 备用。

4. 细胞纯化 细胞纯化采用聚蔗糖400密度梯度离心法, 结合 Janszen^[7]和 Conn^[8]报道的方法进行(见细胞纯化流程图), 便可获得纯度大约为60%的赖氏细胞制剂。



细胞纯化流程图

5. 试剂配制 M199 培养液配成后, 再加入青霉素G钾和硫酸链霉素, 使其最终浓度分别为每毫升100国际单位和每毫升100微克。

消化液由0.25%的胰蛋白酶和0.02%的EDTA溶液按2:1体积混合而成。各种激素均以Hanks液稀释。

6. 细胞培养 培养时先将细胞悬液混匀计数, 调整细胞浓度于 1.0×10^6 — 2.0×10^6 个细胞/ml, 再无菌分装到培养瓶中(每瓶1ml), 预孵一小时后等量加入不同激素浓度的培养液, 然后于37℃水浴中振荡培养, 培养时间除注明外均为三小时, 最后经沸水浴15分钟终止反应, 保存于-20℃冰箱中待测。

7. 睾酮测定 睾酮以RIA方法进行测定, 提取率大于96.84%, 回收率大于87.20%, 水空白值小于5.14pg/管, γ 值小于-0.9916, 批内及批间变异分别为5.21%和14.22%。

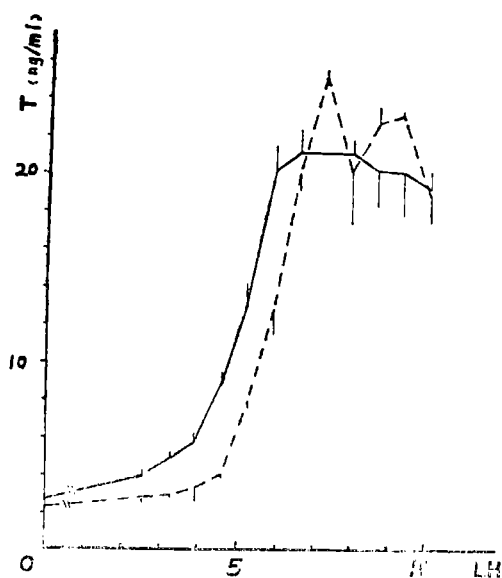


图1 不同剂量LH刺激下睾酮(T)的分泌量

——表示加10mM茶碱组;.....表示未加茶碱组;横坐标为LH浓度的自然对数值;曲线上竖短线表示该点的标准差;每点重复五次。

图2表明在本实验条件下,赖氏细胞在LH和HCG作用下,T分泌量迅速增加,而对E和LRH却无明显反应。因此它支持赖氏细胞在短期培养条件下对激素反应的特异性。

(三) E可以抑制LH、HCG对赖氏细胞T分泌的促进作用

从图2和图3可以看出,单独的LH或HCG能极显著地引起T分泌的增加,而加入不同浓度的E之后,LH或HCG促赖氏细胞T分泌作用就极显著地被削弱,其中E对LH促T生成效应的拮抗作用在不同浓度组间无显著差异,而E对HCG促T生成效应的拮抗作用,则有随E浓度增大而减小的明显趋势(见表1,2)。

(四) 茶碱能增强LH对赖氏细胞T分泌的刺激作用

在细胞培养液中加入10mM的茶碱能使LH—T曲线明显地左移(图1),它表明加入茶碱后能够有效地提高赖氏细胞对LH反应的灵敏度。在图4中,茶碱—T曲线呈

结 果

(一) 赖氏细胞的T分泌量随着LH剂量的增加而增加

从图1可以看出,在培养液中加入或不加入茶碱的两条曲线只是对LH反应的灵敏度不同,而其变化趋势是相似的,在曲线中段,赖氏细胞的T分泌与LH几乎呈线性关系。在本实验条件下,T分泌达峰值时,有茶碱组和无茶碱组,需要的LH相应量分别为 $0.78\mu\text{g/ml}$ 和 $1.56\mu\text{g/ml}$ 。

(二) E和LRH不能直接刺激赖氏细胞分泌T

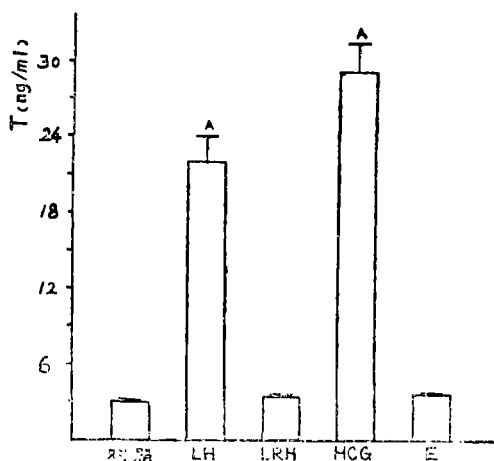


图2 不同激素对赖氏细胞T分泌的影响

柱顶端横线表示标准差,每点重复三次,A表示与对照组比较差异极显著($P < 0.01$)。

抛物线状,说明在T分泌达到峰值之前,茶碱浓度的增大与赖氏细胞对LH的反应性呈正比关系,而超过峰值后则表现出一种高浓度毒性现象,使正比关系转变为反比关系。利用多项式回归进行曲线拟合可得

$$T = 2.119 + 4.907 X - 0.481 X^2 + 0.012 X^3$$

$$\frac{dT}{dX} = 4.907 - 0.962 X + 0.036 X^2$$

令 $\frac{dT}{dX} = 0$

解得 $X_1 = 6.86, X_2 = 19.86$

X_2 与实际情况不符,故舍去,因此,茶碱的最适浓度应为6.86m Mol。

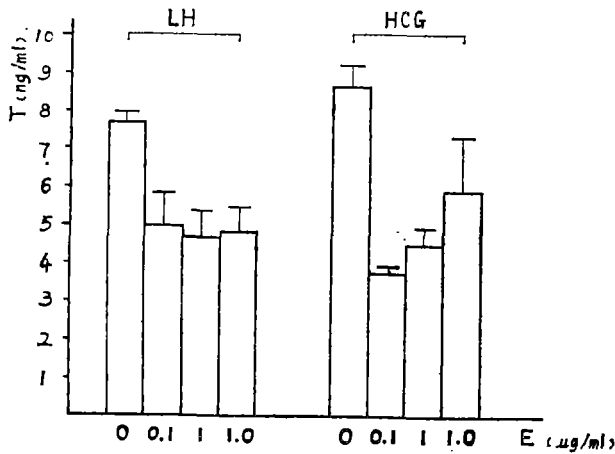


图3 E对LH、HCG刺激赖氏细胞T分泌作用的影响

LH (1μg/ml)和HCG (0.01IU/ml)组中各有四个不同的E浓度处理组。重复三次。

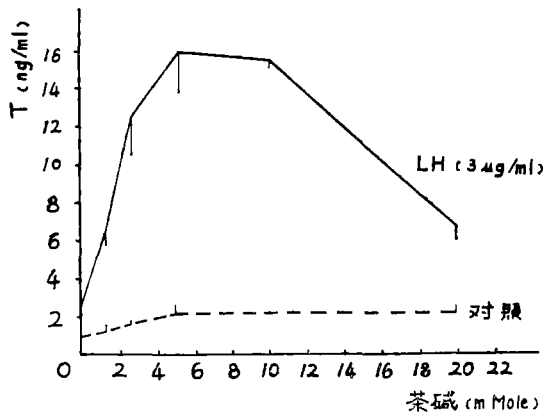


图4 茶碱对LH促赖氏细胞T分泌作用的影响

曲线上竖短线表示该点的标准差,重复三次。

表1 不同处理组T的方差分析表

变异来源	平方和		自 由 度		均 方		F 值	
	L H	HCG	L H	HCG	L H	HCG	L H	HCG
处理间	18.192	42.135	3	3	6.064	14.052	14.754**	25.148**
处理内	3.287	4.998	8	8	0.411	0.625		
总 和	21.480	47.153	11	11				

•• 表示极显著 (P<0.01)。

表2 不同处理组T平均值比较表

X_i (L H)	X_j (HCG)						
		$X_i - 4.682$	$X_j - 3.683$	$X_i - 4.804$	$X_j - 4.472$	$X_i - 5.078$	$X_j - 5.883$
7.679	8.606	2.997**	4.923**	2.875**	4.134**	2.601**	2.723**
5.078	5.883	0.396	2.200**	0.274	1.411		
4.804	4.472	0.122	0.789				
4.682	3.683						

• 表示显著 (P<0.05)；•• 表示极显著 (P<0.01)。

(五) 赖氏细胞对LH反应的时间特性

将培养中的赖氏细胞作为一个系统来考察，加入的LH和赖氏细胞分泌的T则分别作为系统的输入和输出。

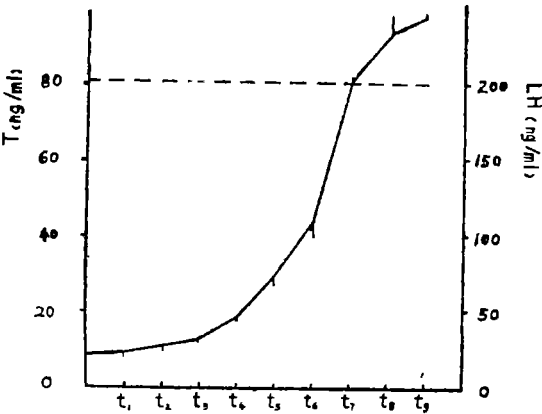


图5 T生成量与恒定LH作用下细胞培养时间的关系

.....LH加入量；——T的分泌量； t_n 为细胞培养的时间； $t_n = 5 \times 2^{n-1}$ 分钟 ($n=1, 2, \dots, 9$)，重复三次。

已知输入函数为阶跃函数

$$LH = \begin{cases} 200 \text{ ng/ml} & t \geq 0 \\ 0 \text{ ng/ml} & t < 0 \end{cases}$$

根据结果对输出量 T 进行曲线拟合处理可得

$$T = \frac{131.81}{1 + 269.97 e^{-0.79n}} \quad (n = 1, 2, \dots, 9)$$

$$\gamma = -0.9965 \quad (P < 0.01).$$

由上可知, 在输入 LH 的作用下, 随着时间的推移, 输出 T 经历了一个缓慢——急躁——再缓慢的变化过程, 最后逐渐向最大值 131.81 ng/ml 逼近。当 $t = 320$ 分钟时, T 分泌量达到半最大值, 该点还是曲线的拐点。

讨 论

酶分散细胞体外培养法是研究细胞内分泌学特性的有效方法, 本实验操作中未观察到胰蛋白酶使细胞丧失对激素产生反应的现象, 说明细胞表面受体功能正常。在进行赖氏细胞纯化时还观察到, 虽然纯化后的赖氏细胞基础 T 分泌和经 LH 刺激后的 T 分泌均有明显的提高, 但是, 它们在纯化前后对不同剂量 LH 的反应差异仍然未改变, 从而提示混入其它类型的细胞并不影响赖氏细胞的内分泌学特性。这一点与 Janszen et al. [7-9] 的报道相似。

实验结果表明, 在体外三小时的原代细胞培养中, E 不能刺激赖氏细胞 T 分泌的显著增加。本结果符合本文开始的假设, 说明 LH 细胞生物学 RIA 方法测值高于直接 RIA 方法的现象不是由血中 E 所引起的, 可能是血中类 LH 活性物的影响。此外, E 对 LH/HCG 的促 T 生成效应具有拮抗作用, 并且这种拮抗作用在 LH 和 HCG 间尚有不同, 原因不明。据报道酪氨酸亦有此作用 [10], 但酪氨酸是否要转变 E 才能发挥作用, 以及 E 究竟在什么条件下才能对 LH 的靶细胞起作用, 还有待于深入研究。

从实验中还可以看出, 适量的茶碱能够提高 LH 对赖氏细胞 T 分泌的刺激作用。茶碱是磷酸二酯酶的抑制剂, 加入茶碱就意味着提高了细胞内 $CAMP$ 的浓度, 这间接地说明了 $CAMP$ 在 LH 对靶细胞作用过程中至少是其介导物之一。

虽然在本实验中 LRH 对赖氏细胞 T 分泌没有直接作用, 但是将它作为结论时还需慎重, 因为 LRH 对赖氏细胞的作用是因动物种类及细胞培养条件不同而异的 [11]。

国内有关 LH 的细胞生物学测定方法的报道较少, 从本实验所得 $LH-T$ 曲线可以清楚地看出, 在本实验条件下, 只需用已知量 LH 标准品作一条 $LH-T$ 标准曲线, 就可能建立一种高灵敏度的 LH 细胞生物学测定方法。众所周知, RIA 方法测定的是免疫学活性, 而且由于其标准抗原要求、抗体制备及放射性防护等问题, 使其应用的广泛性受到了限制。建立 LH/HCG 细胞生物学测定方法, 不仅测值可以代表 LH 的生物学活性, 而且由于赖氏细胞对 LH 的生物学“放大”作用, 还可以提高其灵敏度。因此, 此项测定技术对于生殖生理学和动物繁殖学的研究是一种切实可行的新方法。

从系统的观点考察赖氏细胞内分泌学的动态特性可以看出,虽然输入 LH 浓度的变化是阶跃形式的,但是,输出的 T 分泌量却呈 S 型,这说明该系统具有惯性和滞后性。然而阐明系统的频率响应还需要更精确的实验研究。

参 考 文 献

- [1] Morger, W. H., et al: Effects of forskolin on androgen production by mouse interstitial cells in vitro interactions with luteinizing hormone and isoproterenol, *Biol. Reprod.*, 29, 1983: 932—937.
- [2] Cooke, B. A., et al: Catecholamine stimulation of testosterone production via cyclic AMP in mouse Leydig cells in monolayer culture. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 27, 1982: 221—231.
- [3] Moger, W. H., et al: Catecholamine stimulation of androgen production by mouse interstitial cells in primary culture, *J. Androl.*, 3, 1982: 227—231.
- [4] Dufau, M. L., et al: A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: testosterone production by dispersed Leydig cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39, 1974: 610—613.
- [5] Dufau, M. L., et al: In vitro bioassay of LH in human serum: the rat interstitial cell testosterone (RICT) assay, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42, 1976: 958—996.
- [6] Solano, A. R., et al: Bioassay and radioimmunoassay of serum luteinizing hormone in the male rat, *Endocrinol.*, 105, 1979: 372—381.
- [7] Janszen, F. H. A., et al: Purification and characterization of Leydig cells from rat testes, *J. Endocrinol.*, 70, 1976: 345—359.
- [8] Conn, P. M., et al: Isolation of highly purified Leydig cells by density gradient centrifugation, *Endocrinol.*, 101, 1977: 639—642.
- [9] Schumacher, M., et al: Rapid isolation of mouse Leydig cells by centrifugation in percoll density gradients with complete retention of morphological and biochemical integrity, *FEBS Letters.*, 91(2) 1978: 333—338.
- [10] 倪江等: 酪氨酸对男子血清促性腺激素和睾酮浓度的影响, 《生理学报》, 37(2)1985: 303—306.
- [11] Hunter, M. G., et al: Stimulation and inhibition by LHRH analogues of cultured rat Leydig cell function and lack of effect on mouse Leydig cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 27, 1982: 31—44.

EFFECT OF LH AND EPINEPHRINE ON SECRETION OF TESTOSTERONE BY RABBIT LEYDIG CELL IN VITRO

Zhu Baochang Zhang Yue Li Zhenzhong

(Department of Animal Husbandry, Northwestern Agricultural University)

Abstract

In this experiment the rabbit testis cells were dispersed with trypsin digestive method. Under the short period incubation, the endocrinology character of the Leydig cells was studied in vitro. The results indicated that LH/HCG could specifically stimulate T secretion in Leydig cells; that epinephrine(E) obviously antagonized the effect of LH/HCG on T production; that LRH had not any direct action to T secretion in Leydig cells, and that theophylline could effectively elevate the reaction sensitivity of Leydig cells to LH. It provided base data for establishing the sensitive LH/HCG in vitro bioassay.

Key Words LH, Epinephrine(E); rabbit, Leydig cell, Testosterone(T)