

镉暴露大鼠睾丸支持细胞金属硫蛋白表达的时相研究*

任绪义 周 雍 张建鹏 仲 燕 冯伟华** 焦炳华**

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要 啮齿目动物的睾丸较肝脏对镉毒性更为敏感. 为阐明不同组织细胞的镉毒性分子机制, 对镉暴露大鼠睾丸支持细胞与肝脏金属硫蛋白基因(MT)的表达及镉蓄积进行了时相研究. 成年雄性SD大鼠低剂量镉($4.0 \mu\text{mol/kg}$)皮下注射后, 立即进行睾丸支持细胞和肝脏组织的分离. 采用RT-PCR技术分析mRNA, 并用光密度扫描作半定量分析, 蛋白质定量用ELISA方法, 原子分光光度吸收法测定镉浓度. 结果显示: 镉暴露1 h后肝脏MT mRNA即有明显的诱导表达, 3 h达高峰; 支持细胞也有明显的诱导表达, 6 h达高峰. 镉暴露后肝脏MT有明显的诱导表达, 但睾丸支持细胞不但未见MT增加而且还稍有下降. 提示: a. 镉对MT mRNA的诱导表达具有时间依赖性和组织特异性. b. 镉虽然能诱导睾丸MT的转录, 但没有促进其MT的合成, 这可能是睾丸对镉毒性与致癌作用较肝脏更敏感的重要原因.

关键词 金属硫蛋白, 镉, 睾丸支持细胞

学科分类号 R595.202

金属硫蛋白基因(MT)表达不仅具有组织特异性, 还具有细胞特异性^[1], 但目前大多数研究主要以整个睾丸组织而非单型细胞为研究对象, 这往往会掩盖MT基因在特异细胞中的诱导表达活性, 因为支持细胞只占睾丸实体组织的2%~3%. 因此以研究整个睾丸组织而非单个类型细胞为研究对象, 可能是引起争议的重要原因. 另外, MT基因表达还具有时间依赖性. 体外研究发现, 支持细胞和间质细胞中MT的诱导都具有剂量和时间依赖性^[2]. 因此, 镉诱导MT表达的不同结论还可能与不同研究时相有关.

镉诱导MT基因的表达尽管已有大量报道^[3-5], 但大部分镉诱导睾丸MT基因表达的研究资料, 是在急性中毒的镉剂量水平上进行的. 这种条件下的生化改变有可能会掩盖低剂量镉暴露MT基因表达的分子机制. 特别是低剂量镉诱导睾丸支持细胞金属硫蛋白表达的时相变化尚缺乏系统研究. 本文旨在对低剂量镉暴露早期大鼠睾丸支持细胞MT基因表达、MT蓄积以及镉蓄积的时相变化进行研究, 同时以被确证镉可引起MT积累的肝组织为阳性对照, 探讨睾丸组织的镉损伤机理.

1 材料与方法

1.1 实验动物

质量为250~280 g的成年雄性SD大鼠由第二军医大学动物实验中心提供. 镉处理大鼠按 $4 \mu\text{mol/kg}$ 皮下注射, 分别于1 h、3 h、6 h、24 h

二氧化碳麻醉, 迅速取睾丸和肝脏称重后进行镉测定、RNA及MT分析处理. 未处理正常对照大鼠同上. 抽提总RNA的处理组每个时相设3组, 每组3只动物; 镉测定与MT分析设3组, 每组1只动物.

1.2 睾丸支持细胞的分离

根据Welsh等^[6]报道的方法并加以改良. 睾丸支持细胞计数后用于总RNA抽提、镉含量测定或MT蛋白分析. 光学显微镜形态学观察发现, 经胶原酶消化和连续Percoll密度梯度离心得到的支持细胞中均含有其他类型细胞, 纯度为80%~85%.

1.3 镉含量测定

睾丸支持细胞和肝脏组织经 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ 处理后进行镉的原子吸收分光光度测定(检测限度为 10^{-6}g/L). 为防止镉污染, 所用玻璃器具均用酸处理, 并设空白对照.

1.4 RNA抽提

方法参照文献[7].

1.5 PCR引物

寡核苷酸引物由DNA合成仪合成(Worthington biochemical Co). 大鼠MT-1与MT-2上、下游引物序列参照文献[7]. $\beta\text{-actin}$ 上、下游引物序列分别为5'-CCCATTGAACACGGCATTG-

* 国家自然科学基金资助项目(39970631).

** 通讯联系人.

Tel: 021-25070306-8017, Fax: 021-65334344

E-mail: renxuyi2003@163.com

收稿日期: 2003-03-04, 接受日期: 2003-05-28

3'和5'-GGTACGACCAGAGGCATACA-3', 扩增片段长度为 236 bp.

1.6 反转录 PCR 及其产物分析

方法参照文献 [7].

1.7 MT 含量分析

睾丸支持细胞用 10 mmol/L, pH 7.4 的 Tris-HCl 500 μ l 悬浮, 超声破碎 (3×10 s). 18 000 g, 4℃离心 20 min 获得细胞液. 肝脏用相同介质匀浆. 酶联免疫吸附 (ELISA) 测定 MT 含量. 实验操作步骤与 Ruitenber 等^[8]报道的方法类似. 纯化的羊抗鼠 MT IgG 由日本国立环境研究学会环境健康科学部提供.

1.8 统计学分析

镉处理组和对照组数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 数据统计采用方差分析及多组均数差别的多重比较 ($P < 0.05$ 表示有显著性差异).

2 结 果

2.1 镉含量测定

处理后肝脏中镉迅速蓄聚, 与对照组比较差异

显著 ($P < 0.05$, 图 1), 而睾丸支持细胞中则检测不到. 这表明这些细胞中的镉含量可能低于原子吸收分光光度检测限.

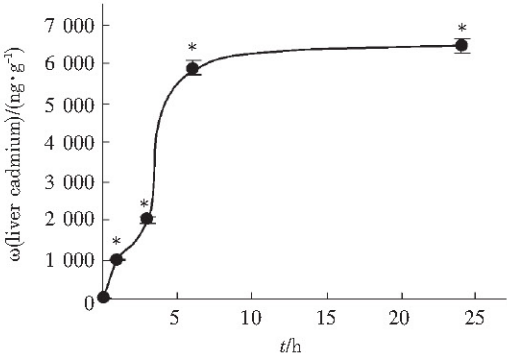


Fig. 1 Time course of Cd accumulation in liver after a single subcutaneous injection of 4 μ mol/kg
The values are ($\bar{x} \pm s$), $n=3$. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) from the respective control. ●—●: liver.

2.2 镉对睾丸支持细胞和肝脏 MTs 转录的影响
应用半定量 RT-PCR 测定 (图 2 和图 3) MT1 与 MT2 基因的转录水平. 半定量 RT-PCR 结果显示:

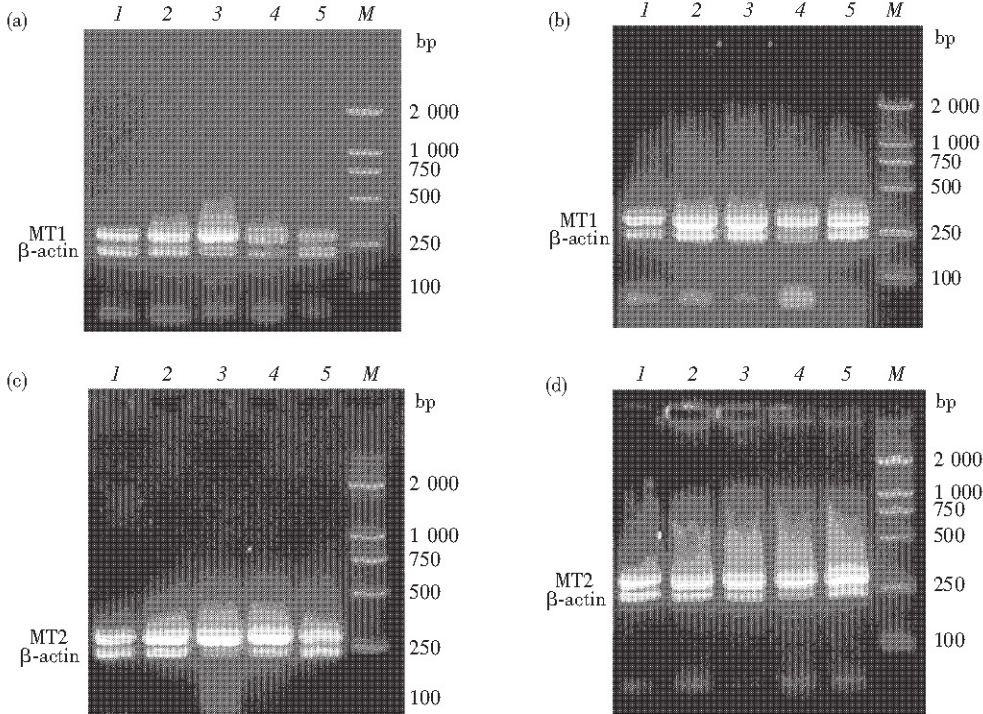


Fig. 2 Electrophoresis pattern of metallothionein gene transcription under different time in testicular sertoli cells and liver of rats treated with cadmium by semi-quantative RT-PCR
(a) MT1 in liver; (b) MT in testicular sertoli cells; (c) MT2 in liver; (d) MT2 in testicular sertoli cells. M: molecular mass marker;
1: 0 h (control); 2: 1 h; 3: 3 h; 4: 6 h; 5: 24 h.

正常生理条件下, 肝脏与睾丸支持细胞中两种 mRNA 亚型都具有较高的基础表达水平; 镉处理 1 h 后肝脏 MT mRNA 即有明显的诱导表达, 3 h 达

高峰; 支持细胞也有明显的诱导表达, 6 h 达高峰. 两者 MT1 mRNA 的变化幅度均低于 MT2 mRNA.

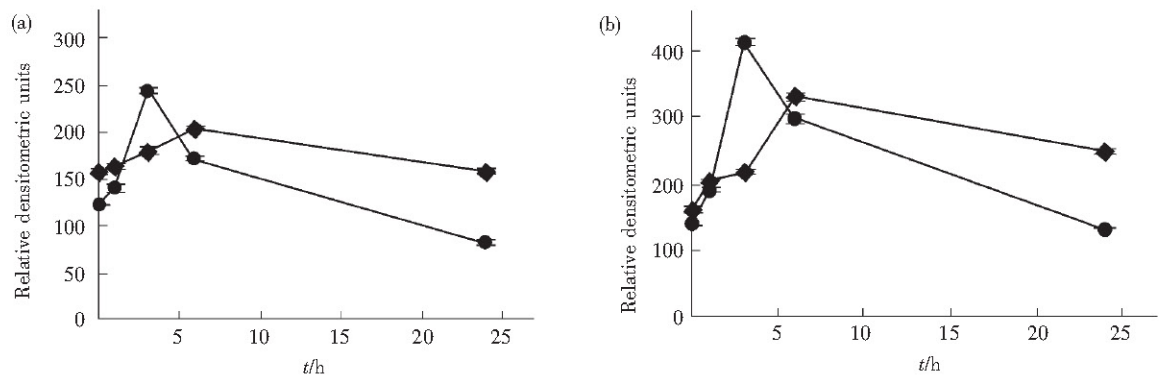


Fig. 3 Densitometric analysis of metallothionein gene transcription by semi-quantative RT-PCR

The values are ($\bar{x} \pm s$) ($n=9$, three treatment replicates with three analyses per replicate). (a) MT1 in liver and testicular sertoli cells; (b) MT2 in liver and testicular sertoli cells. ●—●: liver; ◆—◆: sertoli cell.

2.3 镉对睾丸支持细胞与肝脏 MT 翻译的影响

伴随肝脏镉浓度的增加, MT 明显增加, 镉处理 24 h 后升高 3.9 倍 (图 4); 而睾丸支持细胞 MT 不但没有增加反而稍有下降.

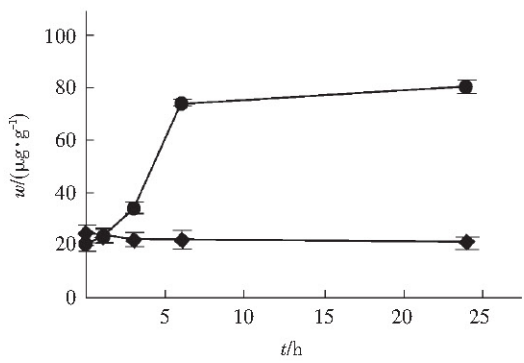


Fig. 4 Metallothionein under different time in liver and testicular sertoli cells of rats treated with cadmium

The values are ($\bar{x} \pm s$) ($n=3$). ●—●: liver; ◆—◆: sertoli cell.

3 讨 论

本文研究结果表明, 正常生理条件下, 睾丸支持细胞确有 MT1 和 MT2 的表达, 这进一步确证了其他以大鼠和小鼠整个睾丸组织为对象的研究结果. 支持细胞 MT1 和 MT2 mRNA 的镉诱导结果也支持用培养的大鼠支持细胞肿瘤株进行镉暴露实验的结论. 但也有学者认为镉诱导后大鼠或小鼠睾丸

组织 MT mRNA 水平下降、没有变化或轻度升高^[5,9]. 这可能与以整个睾丸组织而不是单型细胞为研究对象有关. 此外, MT 在雄性生殖系统中的表达可能还与镉处理剂量和组织取样的时相、实验动物的年龄和生殖状态有关. 目前的研究结果表明: 镉处理 1 h 后肝脏 MT mRNA 即有明显的诱导表达, 3 h 达高峰; 支持细胞也有明显的诱导表达, 6 h 达高峰. 这说明 MT 基因的镉诱导转录不仅具有组织和细胞依赖性, 而且具有时间依赖性. 因此, 研究 mRNA 水平的时间选择差异可能是矛盾结论的另一来源. 另外, 值得注意的是睾丸支持细胞和肝脏 MT1 mRNA 的变化幅度低于 MT2 mRNA, 这可能与 MTs 基因的甲基化程度有关, 因为在鼠的淋巴细胞中 MT 基因的表达与甲基化程度呈负相关^[10]. 研究还发现, 对照组动物睾丸支持细胞具有较高的 MT 蛋白基础水平, 这也支持以前的研究结果即睾丸组织 MT 水平高于其他组织, 如肝脏和肾脏^[11].

镉诱导睾丸支持细胞 MT mRNA 增加, 但不伴有 MT 合成增加的一种可能解释是: 一方面, 虽然 MT mRNA 增加, 但并没有翻译成相应的蛋白质. 另一方面, 睾丸和肝脏细胞 MT mRNA 翻译成 MT 的比例或 MT 降解速率上的差异, 这可能会导致镉诱导睾丸细胞中 MT 基因翻译产物不增加而诱导肝脏中 MT 的增加^[5]. 睾丸支持细胞中 MT mRNA 与 MT 蛋白之间的不平衡提示: 如果调控仅仅是在转

录水平, 那么 mRNA 的增加不应引起蛋白质的减少, 因此 MT 合成的调控很可能在翻译水平^[12].

总之, 我们的研究表明: MT 诱导表达不仅具有组织依赖性, 而且具有时间依赖性. 镉虽然能诱导睾丸支持细胞 MT 的转录, 但未见 MT 相应增加, 其原因有待进一步研究. 由此推测睾丸支持细胞 MT 不能被镉诱导表达, 可能是睾丸对镉毒性与致癌作用较肝脏更敏感的重要原因.

参 考 文 献

- 1 Vasconcelos M H, Tam S C, Hesketh J E, *et al.* Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, **182** (2): 91~97
- 2 Wang S H, Chen J H, Lin L Y. Functional integrity of metallothionein genes in testicular cell lines. *J Cell Biochem*, 1994, **55** (4): 486~495
- 3 Liu J, Corton G, Dix D J, *et al.* Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, **176** (1): 1~9
- 4 Valverde M, Fortoul T I, Diaz-Barriga F, *et al.* Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis*, 2000, **15** (2): 109~114
- 5 Zhou T, Zhou G, Song W, *et al.* Cadmium-induced apoptosis and

- changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology*, 1999, **142** (1): 1~13
- 6 Welsh M J, Wiebe J P. Rat sertoli cells: A rapid method for obtaining viable cells. *Endocrinology*, 1975, **96** (3): 618~624
 - 7 任绪义, 周 雅, 张建鹏, 等. 镉中毒大鼠睾丸与肝脏金属硫蛋白表达的时相研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 811~815
 - Ren X Y, Zhou Y, Zhang J P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 811~815
 - 8 Ruitenberg E J, Steerenberg P A, Brosi B J M, *et al.* Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in conventionally raised pigs. *J Immunol/Linol Methods*, 1976, **10** (1): 67~83
 - 9 Shiraishi N, Waalkes M P. Enhancement of metallothionein gene expression in male Wistar (WF/NCr) rats by treatment with calmodulin inhibitors: potential role of calcium regulatory pathway in metallothionein induction. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, **125** (1): 97~103
 - 10 Compere S J, Palmiter R D. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells. *Cell*, 1981, **25** (1): 233~240
 - 11 Cyr D G, Dufresne J, Pillet S, *et al.* Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *J Androl*, 2001, **22** (1): 124~135
 - 12 Vasconcelos M H, Tam S C, Beattie J H, *et al.* Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms. *Biochem J*, 1996, **315** (2): 665~671

Metallothionein Gene Expression Under Different Time in Testicular Sertoli Cells of Rats Treated With Cadmium*

REN Xu-Yi**, ZHOU Yong, ZHANG Jian-Peng, ZHONG Yan, FENG Wei-Hua, JIAO Bing-Hua

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract The rodent testes are generally more susceptible to cadmium (Cd)-induced toxicity than the liver. In order to clarify the molecular mechanism underlying tissue and cell differences in Cd sensitivity, metallothionein (MT) gene expression, MT protein accumulation, and Cd retention were compared under different time in freshly isolated testicular sertoli cells and liver of rats treated with Cd. Adult male Sprague-Dawley rats received a s. c. injection of 4.0 $\mu\text{mol/kg}$ and 0 h (control), 1 h, 3 h, 6 h, or 24 h later, tissue were sampled and testicular sertoli cells were isolated. MT1 and MT2 mRNA levels were determined by semi-quantitative RT-PCR analysis followed by densitometry scanning, and MT was estimated by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Cadmium content was determined by atomic absorption spectrophotometry. The results demonstrated that both isoform mRNA: MT1 and MT2 were increased after Cd treatment in liver and peaked at 3h, followed by a decline, in contrast, the mRNA levels in sertoli cells peaked at 6h. Cd exposure substantially increased hepatic MT, but did not increase MT translation in sertoli cells. These results indicate that: (1) metallothionein mRNA expression is tissue- and time-dependent; (2) the inability to induce the metal-detoxifying MT-protein in response to Cd, might account for higher susceptibility of testes to Cd toxicity and carcinogenesis relative to liver.

Key words metallothionein, cadmium, testicular sertoli cells

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (39970631).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070306-8017, Fax: 86-21-65334344, E-mail: renxuyi2003@163.com