

重金属 Cd 对大鼠睾丸间质瘤细胞 R2C 孕酮合成的影响

卢军利^{1,2}, 孙建霞³, 文罗娜², 白卫滨^{*2}, 焦睿², 欧仕益², 杨勇¹

(1. 四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 暨南大学 食品科学与工程系, 广东 广州 510632; 3. 广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 探讨了 Cd 对体外大鼠睾丸间质瘤细胞 R2C 合成孕酮通路的影响, 用 MTT(噻唑蓝)比色法检测 CdSO₄ 对 R2C 细胞生长抑制率的影响, 通过数据分析, 确定 CdSO₄ 作用于 R2C 细胞的 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 浓度值, 用 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 3 种浓度的 CdSO₄ 溶液培养 R2C 细胞, 再采用碘标放射免疫法、流式细胞分析仪、ROS 检测试剂盒和 Western Blot 法测定 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 对孕酮合成、线粒体膜电位、ROS 和孕酮合成相关蛋白 StAR、CYP11A1 的影响。结果表明, CdSO₄ 可以显著抑制 R2C 细胞的增殖, 且 CdSO₄ 作用于 R2C 细胞的 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 浓度值分别为 (24.93±0.023 5)、(44.80±0.047 9)、(80.51±0.035 7) μmol/L; IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 3 种浓度均能影响 R2C 孕酮合成; CdSO₄ 可以增加 R2C 细胞 ROS 的产生和线粒体膜电位的损伤比率; CdSO₄ 可以下调 StAR、CYP11A1 蛋白的表达, 且对 StAR 蛋白的影响更为显著。重金属 Cd 可刺激 R2C 产生过量的 ROS、下调 StAR、CYP11A1 蛋白的表达, 进而影响线粒体的正常作用以及阻碍孕酮合成通路, 最终影响孕酮的合成。

关键词: 重金属; 睾丸间质细胞; 孕酮; 线粒体膜电位; ROS

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)04—0375—05

Effect of Heavy Metal Cd on Progesterone Biosynthesis of R2C Cells

LU Junli^{1,2}, SUN Jianxia³, WEN Luona², BAI Weibin^{*2}, JIAO Rui², OU Shiyi², YANG Yong¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The effect of heavy metal Cd on progesterone synthesis pathways of R2C Cells were explored in this research, MTT assay was used to select different concentrations (IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅) of CdSO₄. And then R2C cells were stimulated by the three concentrations (IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅) of CdSO₄. Radioimmunoassay (RIA) was used to detect the progesterone biosynthesis. Flow cytometry

收稿日期: 2016-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201340)。

* 通信作者: 白卫滨(1978—), 男, 山东烟台人, 工学博士, 研究员, 主要从事食品营养与毒理安全性评价研究。

E-mail: baiweibin@163.com

引用本文: 卢军利, 孙建霞, 文罗娜, 等. 重金属 Cd 对大鼠睾丸间质瘤细胞 R2C 孕酮合成的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(04): 375-379.

(FCM) assay was used to detect the change in mitochondrial membrane potential (MMP). The reactive oxygen species (ROS) were detected by ROS kit. The expression levels of StAR and CYP11A1 proteins were measured by Western Blot. The results showed that CdSO₄ could inhibit the proliferation of R2C cells, and concentrations of IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅ were (24.93±0.023 5)、(44.80±0.047 9)、(80.51±0.035 7) μmol/L. All of the three concentrations of CdSO₄ (IC₂₅, IC₅₀ and IC₇₅) could inhibit progesterone biosynthesis, improve the production of ROS and increase the damage ratio of mitochondrial membrane. CdSO₄ could also decrease the expression of StAR and CYP11A1. Conclusion: heavy metal Cd could stimulate R2C to produce excessive reactive oxygen species, decrease the level of StAR and CYP11A1, and in turn affect the normal function of mitochondria, ultimately affect the synthesis of progesterone.

Keywords: heavy metal, R2C, progesterone, mitochondrial membrane potential, ROS

重金属镉可以通过食物链进入体内, 分布到全身各个器官, 重金属镉会对肾、肝、肺、心血管、睾丸等系统产生一系列损伤。且镉的半衰期长达 15~30 年。由于镉容易在体内蓄积, 所以一些动物性食品中镉含量较高, 浓度可达几十至数百倍^[1-3]。

重金属镉对雄性和雌性的生殖系统都有损害作用, 但雄性生殖系统对镉的敏感性要高于雌性生殖系统, 动物雄性生殖器官睾丸是重金属染毒受损严重的靶器官之一, 除了对雄性性腺发育有不良影响外, 镉还对睾丸和附睾也有毒副作用^[4]。目前, 重金属 Cd 的雄性毒性研究主要集中在动物实验上, 而对体外睾丸间质细胞研究较少, 损伤机理不是很明确。且对重金属暴露的睾丸间质细胞毒性损伤的研究主要是集中于对睾酮生成途径中相关酶的影响^[5], 孕酮是合成睾酮的前体物质, 作者通过 CdSO₄ 对 R2C 细胞孕酮合成通路的影响, 探讨重金属镉引起的雄性生殖毒性机制, 为重金属 Cd 的食品安全评估提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

R2C 细胞: 购自 CCTCC; CdSO₄ (纯度为 98%) : 百灵威公司产品; F-12 basic (1 X) 培养液、胎牛血清 (FBS)、胰酶、马血清: 美国 Gibco 公司产品; MTT、DMSO: 美国 Amresco 公司产品; I¹²⁵ 孕酮放射免疫分析药盒: 北京北方生物技术研究所以产品; 活性氧检测试剂盒: 碧云天生物技术研究所以产品; StAR 兔抗大鼠抗体 Cell Signaling Technology; CYP11A1 兔抗大鼠抗体 Cell Signaling Technology; GAPDH 兔抗大

鼠抗体 proteintech。

CO₂ 培养箱: 美国 Thermo 公司产品; 流式分析仪: 美国 BD 公司产品; 酶标仪: 美国 Thermo 公司产品; GC-1200 γ 放射免疫计数仪: 安徽中科中佳公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 Cd 对 R2C 细胞增殖的影响 将对数期的 R2C 细胞用胰酶消化、离心、重悬、计数, 接种于 96 孔板中, 每孔 8 000 个细胞, 每个浓度组设置 3 个复孔。在细胞培养箱中培养 24 h, 吸弃孔内培养基, 加入用完全培养基稀释的 CdSO₄ 溶液, 使每组 CdSO₄ 作用浓度分别为 0、10、20、40、80、160 μmol/L, 并设有空白组 (不含细胞)。CdSO₄ 作用 24 h 后, 避光加入加噻唑蓝 (MTT) 溶液, 每孔 20 μL, 细胞培养箱中孵育 4 h, 吸弃孔内液体, 避光加入 DMSO 溶解蓝紫色甲瓟结晶, 每孔 150 μL, 脱色摇床上摇匀 10 min, 使沉淀充分溶解, 490 nm 波长下测定 OD 值。

用 SPSS 软件分析得出 Cd 作用于 R2C 细胞的 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 浓度值。

1.2.2 放射免疫 (radioimmunoassay, RIA) 检测 Cd 对 R2C 细胞合成孕酮的影响 将对数期的 R2C 细胞用胰酶消化、离心、重悬、计数, 接种到 6 孔板中, 每孔 4×10⁵ 个细胞, 培养基 2 mL, 在细胞培养箱中培养 24 h, 吸弃孔内培养基, 加入浓度分别为 IC₂₅、IC₅₀ 和 IC₇₅ 的 CdSO₄ 溶液, 继续培养 24 h, 吸取上清, 按照碘 [¹²⁵I] 孕酮放射免疫分析药盒进行测定孕酮合成量。

1.2.3 流式细胞分析仪 (FCM) 检测 Cd 对 R2C 细

胞线粒体膜电位(MMP)的影响 将对数期的 R2C 细胞用胰酶消化、离心、重悬、计数,接种到 6 孔板中,每孔 4×10^5 个细胞,培养基 2 mL,细胞培养箱中培养 24 h,弃去孔内培养基,加入浓度分别为 IC_{25} 、 IC_{50} 和 IC_{75} 的 $CdSO_4$ 溶液,继续培养 24 h,吸弃孔内培养基,胰酶消化,400 g 离心 5 min,按照线粒体膜电位检测试剂盒进行 JC-1 染色,用流式细胞分析仪进行检测,每个样品采集 10^4 个细胞。

1.2.4 荧光酶标仪检测 CP 对 R2C 细胞的 ROS 水平影响 将对数期的 R2C 细胞用胰酶消化、离心、重悬、计数,接种到 96 孔板中,每孔 10 000 个细胞。细胞培养箱中培养 24 h,吸弃孔内培养基,每孔加入 30 μ L DCFH-DA 溶液(无血清培养基稀释),细胞培养箱中孵育 20 min,无血清 F12 培养基洗 3 遍,将孔内残留探针清洗干净,加入分别含 IC_{25} 、 IC_{50} 和 IC_{75} 浓度 $CdSO_4$ 的培养基,荧光酶标仪检测。激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,逐时间点检测 Cd 作用前后荧光的强弱变化。

1.2.5 Western Blot 检测 Cd 对 R2C 细胞孕酮合成相关蛋白 Star 和 CYP11A1 表达的影响 漩涡震荡 15 s,冰浴 45 s,重复操作 1 h,4 $^{\circ}C$ 离心 30 min,取上清。测定试剂盒检测样品蛋白浓度,制样,然后进行 SDS 电泳、转膜、免疫杂交、显影。ImageJ 软件分析结果。

1.2.6 数据处理 通过 SPSS 软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析结果,检验水平为 $p < 0.05$ 时为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 Cd 对 R2C 细胞的生长抑制作用

$CdSO_4$ 作用 24 h 后,R2C 细胞生长受到抑制,由表 1 可以看出,重金属 Cd 能够抑制 R2C 细胞的生长,且 Cd 浓度越高,细胞的生长抑制率越大,呈现剂量依赖性,当 $CdSO_4$ 浓度达到 160 μ mol/L 时,细胞抑制率高达 95%,通过 SPSS 软件分析得出 Cd 对 R2C 细胞的 IC_{25} 、 IC_{50} 、 IC_{75} 浓度值分别为 $(24.93 \pm 0.023 5)$ 、 $(44.80 \pm 0.047 9)$ 、 $(80.51 \pm 0.035 7)$ μ mol/L。

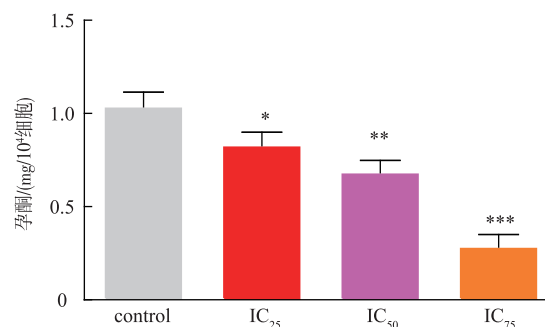
2.2 Cd 对 R2C 细胞孕酮合成的影响

在维持正常的雄性生理功能过程中,睾酮起到至关重要的作用^[6],R2C 细胞由于缺少表达合成睾酮的相关酶,最终生成孕酮,而孕酮是睾酮合成的前体物质,所以通过检测孕酮水平可以反映雄性激

素的变化^[7]。由孕酮检测结果可以看出, IC_{25} 、 IC_{50} 、 IC_{75} 3 浓度组 $CdSO_4$ 均对孕酮合成有影响。 $CdSO_4$ 溶液浓度越高,孕酮合成量越少,当浓度值达到 IC_{75} 值时,孕酮合成量下降为对照组的 40%。

表 1 不同浓度 $CdSO_4$ 对 R2C 细胞生长抑制率的影响
Table 1 Inhibitory effect of $CdSO_4$ on the growth of R2C cells

$CdSO_4$ 浓度/ μ mol/L	$A_{490\text{ nm}}$	抑制率/%
0	$0.83 \pm 0.048 7$	0
10	$0.75 \pm 0.025 3$	9.43
20	$0.72 \pm 0.019 6$	14.08
40	$0.48 \pm 0.039 7$	45.23
80	$0.29 \pm 0.028 6$	70.79
160	$0.09 \pm 0.005 3$	95.26



Mean $\pm$ SD, $n = 3$. * $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control. *** $p < 0.001$ vs. control

图 1 不同浓度 $CdSO_4$ 对 R2C 孕酮合成的影响

Fig. 1 Effect of $CdSO_4$ on progesterone production of R2C cells

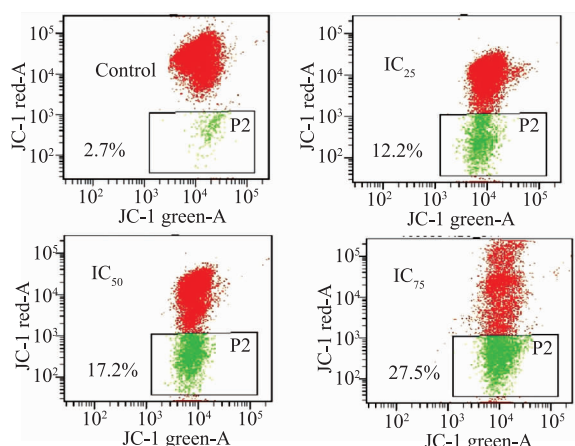
2.3 Cd 对 R2C 线粒体膜电位的影响

流式细胞分析仪检测 $CdSO_4$ 浓度为 IC_{25} 、 IC_{50} 、 IC_{75} 暴露 24 h 后对 R2C 细胞 MMP 的影响。通过 JC-1 染料对 R2C 细胞进行染色,红色荧光部分为细胞内正常 MMP 区域,绿色荧光为细胞内 MMP 降低的部分。结果显示,与对照组相比, IC_{25} 、 IC_{50} 、 IC_{75} 作用浓度均对 R2C 细胞 MMP 有所影响,且随着浓度的增大,线粒体膜电位损伤的比例越大(图 2(a))。数据分析表明:与正常组相比,浓度为 IC_{25} 时,线粒体膜电位显著下降,损伤严重, IC_{75} 值时,线粒体膜电位损伤比率达 33%(图 2(b))。

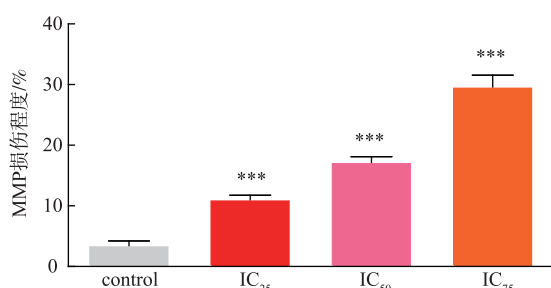
2.4 Cd 对 R2C 产生 ROS 的影响

氧化损伤是重金属雄性毒性的重要损伤学说之一^[8],而各种自由基中,氧自由基(ROS),最为主要,图 3 显示, $CdSO_4$ 刺激 R2C 细胞 2、4、8 h 时,ROS 产生量均有显著提高,4 h 时最为明显,且随着

Cd 浓度的升高,ROS 产生的量也相应增多。由于 ROS 的产生速度非常快,所以 Cd 作用 8 h 时 ROS 产生量有所下降。



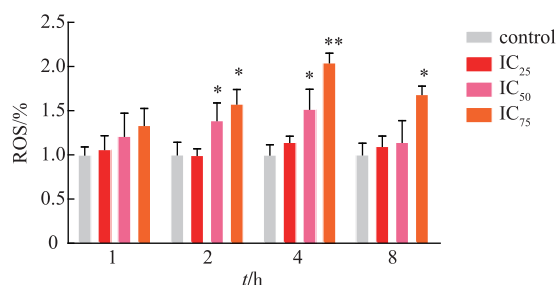
(a)FCM检测不同浓度CdSO₄对R2C细胞MMP的影响



(b)FCM检测不同浓度CdSO₄对R2C细胞MMP的影响

图2 不同浓度Cd对R2C细胞MMP的影响

Fig. 2 Effects of CdSO₄ on MMP changes of R2C cells



Mean $\pm$ SD, $n = 3$, * $p < 0.05$ vs. control ** $p < 0.01$ vs. control

图3 不同浓度Cd对R2C产生ROS的影响

Fig. 3 Effects of Cd on ROS in R2C cells

2.5 Cd R2C 细胞孕酮合成相关基因 StAR、CYP11A1 蛋白表达的影响

Western Blot 实验结果显示:重金属 Cd 可以抑制 StAR、CYP11A1 蛋白的表达量,且 StAR 蛋白的表达量随 Cd 浓度的升高而下降,与对照组相比,IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 浓度作用组的 StAR 蛋白的表达量均有显著性差异。而与对照组相比,只有 IC₇₅ 作用浓

度可以明显抑制 CYP11A1 蛋白的表达,说明 Cd 对 StAR 蛋白的影响更为显著,结果见图 4-6。

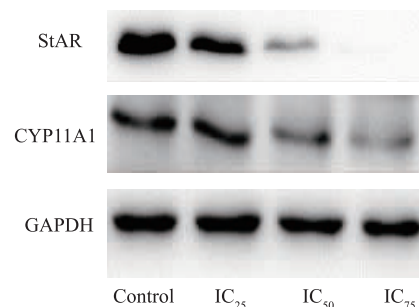


图4 Western blot 检测不同浓度 Cd 对 R2C 细胞 StAR 和 CYP11A1 蛋白的影响

Fig. 4 Effects of Cd on StAR and CYP11A1 expressions by Western blot

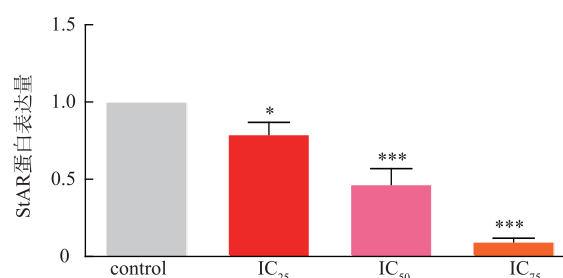


图5 Western blot 检测不同浓度 Cd 对 R2C 细胞 StAR 蛋白的影响

Fig. 5 Effects of Cd on StAR and CYP11A1 expressions by Western blot

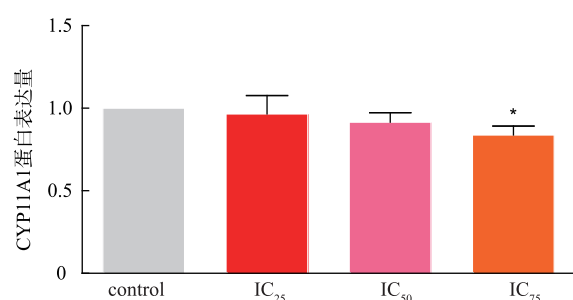


图6 Western blot 检测不同浓度 Cd 对 R2C 细胞 StAR 和 CYP11A1 蛋白的影响

Fig. 6 Effects of Cd on StAR and CYP11A1 expressions by Western blot

3 讨论

动物实验证明,镉可以损伤曲精小管中的生殖细胞,并且镉刺激浓度微量的提高即可引起睾丸损伤的大幅加重^[9],体外实验研究重金属暴露的睾丸

间质细胞毒性损伤主要是集中于对睾酮生成途径中相关酶的影响,镉通过氧化损伤途径对睾丸间质细胞孕酮合成能力的影响没有相关报道,作者通过体外实验,研究了 Cd 雄性毒性作用。结果显示,金属 Cd 可以显著降低 R2C 细胞的活性,且浓度越大,作用越强。ROS 是体内重要的一种自由基,ROS 在机体内保持平衡状态下,有抗菌、消炎等重要作用,但当平衡被打破,会造成生物膜的脂质氧化损伤,从而引起酶、蛋白等氧化损伤,最终导致对身体机能的损害^[10-12]。通过测定在 Cd 的作用下 R2C 细胞中 ROS 的产生量,发现 Cd 能够使细胞中 ROS 显著提高,随着 Cd 浓度的升高,产生的 ROS 的量也显著升高,线粒体损伤比率也显著升高,这是由于 ROS 的主要产生部位是线粒体的呼吸链,Cd 刺激 R2C 细胞产生过多的 ROS,使线粒体 DNA、基质中

的酶受到 ROS 攻击而损伤^[13],从而影响线粒体膜电位的正常作用。StAR 蛋白和 CYP11A1 蛋白是整个孕酮合成通路中的关键点,实验结果证明,重金属 Cd 明显降低 StAR 和 CYP11A1 蛋白表达量,StAR 蛋白表达量的下降减弱了胆固醇转运至线粒体基质内,CYP11A1 蛋白表达量的下降减少了线粒体中孕烯醇酮的合成,从而降低了孕酮的合成。孕酮检测结果对此进行了验证,浓度为 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 的 Cd 刺激 R2C 细胞 24 h 后,与对照组相比,各 CdSO₄ 作用组的 R2C 细胞孕酮量都显著降低,且有统计学意义。总之,Cd 刺激对体外培养的 R2C 细胞产生大量的 ROS,进而影响线粒体正常功能和 StAR、CYP11A1 的表达,从而阻碍胆固醇的正常转运和孕酮生成中间物质孕烯醇酮的生成,最终降低 R2C 细胞孕酮合成量。

参考文献:

- [1] KONG Qinghu, CHEN Yunying, WU Jianmin, et al. The combination of cadmium and cadmium and zinc in rats [J]. **Journal of Zhejiang Academy of Medical Sciences**, 2001(45): 8-10. (in Chinese)
- [2] ZHANG Wenchang, LI Huangyuan, WANG Zhangjing, et al. Study on the comparison about toxicity of cadmium to the female gonad and kidney in rats [J]. **Chinese Journal of Public Health**, 2002, 18(6): 693-694. (in Chinese)
- [3] BUCKKO G W, HESS N J, KENNE M A. Cadmium mutagenicity and human muclotide excision repair protein XAP:CD, EXAFS and (1)H/ (15)N-N MR spectroscopic studies on the zinc (II)-and cadmium (II)-associated minimal DNA-binding domain(M98-FZ19) [J]. **Carcinogenesis**, 2000, 21(5): 1051-1057.
- [4] TAM P P, LIU W K. Gonadal development and fertility of mice treated prenatally with cadmium during the early organogenesis stages [J]. **Teratology**, 1985, 32(3): 453-462.
- [5] CHENG J, FU J L, ZHOU Z C. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory(StAR) protein expression [J]. **Toxicology**, 2003, 187(2-3): 139-148.
- [6] MIDZAK A S, CHEN H, PAPADOPOULOS V, et al. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis [J]. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2009, 299(1): 23-31.
- [7] ZOU Feiyan, BAI Shun, BAI Weibing, et al. Effects of 3-monochloropropane-1, 2-diol on the cell growth in rat leydig tumor cells R2C [J]. **Journal of Food science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 569-573. (in Chinese)
- [8] CHENG J, FU J L, ZHOU Z C. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory(StAR) protein expression [J]. **Toxicology**, 2003, 187(2-3): 139-148.
- [9] DE SOUZA P S F, DIAMANTE M A, DOLDER H. Testis response to low doses of Cadmium in Wistarrats [J]. **Int J Exp Pathol**, 2010, 91(2): 125-131.
- [10] FORTES G B, ALVES L S, DE OLIVEIRA R, et al. Heme induces programmed necrosis on Macrophages through autocrine TNF and ROS production [J]. **Blood**, 2012, 119: 2368-2375.
- [11] TABET F, LAMBERT G, CUESTA T L F, et al. Lipid-free apolipoprotein A-I and Discoidal reconstituted high-density lipoproteins differentially inhibit glucose-induced oxidative stress in human macrophages [J]. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2011, 31: 1192-1200.
- [12] ERDEMIR F, ATILGAN D, MARKOC F, et al. The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters [J]. **Actas Urol Esp**, 2012, 36(3): 153-159.
- [13] AMARAL A, LOURENCO B, MARQUES M, et al. Mitochondria functionality and sperm quality [J]. **Reproduction**, 2013, 146(5): 163-174.