

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.27.015

# 黄芪甲苷对镉致大鼠睾丸支持细胞相关蛋白表达及 p38MAPK 磷酸化的拮抗作用

毛胜艳,廖晓岗<sup>△</sup>,宁巍,姚志勇,王毅,范京川  
(重庆医科大学生命科学研究院 400016)

**摘要:**目的 探讨镉对培养大鼠睾丸支持细胞相关蛋白表达、p38MAPK 磷酸化及超微结构的影响和黄芪甲苷的保护效应。方法 对照组、镉(50 mol/L)处理组、镉(50 mol/L)加黄芪甲苷(10 mg/L)组的培养支持细胞用于超微结构观察、波形蛋白、E-钙粘蛋白/-环连蛋白免疫组织化学及磷酸化 p38MAPK 检测。结果 镉处理组支持细胞线粒体内室肿胀,脂滴堆积,内质网扩张和(或)空泡化,髓样结构形成,少许支持细胞出现凋亡,镉加黄芪甲苷组支持细胞超微结构改变较镉处理组轻;免疫组织化学显示镉处理组波形蛋白、E-钙粘蛋白及-环连蛋白阳性产物较对照明显减弱( $P < 0.05$ ),镉加黄芪甲苷组阳性产物虽较对照组减少但明显高于镉处理组( $P < 0.05$ );镉处理组支持细胞内磷酸化 P38MAPK 阳性产物表达量较对照组明显增强,且有向细胞核移位趋势,镉加黄芪甲苷组阳性产物表达量明显少于镉处理组( $P < 0.05$ )。结论 镉致大鼠睾丸支持细胞超微结构损伤、细胞骨架蛋白及粘蛋白破坏并增强 P38MAPK 磷酸化;黄芪甲苷可拮抗镉的毒性,其保护效应可能与减少 P38MAPK 的磷酸化等有关。

**关键词:**镉;黄芪甲苷;磷酸化 P38MAPK;支持细胞;相关蛋白表达

中图分类号:R394.6

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)27-3592-04

## Antagonistic effect of astragaloside on cadmium induced expression of related proteins and phosphorylated P38MAPK in rat sertoli cell

Mao Shengyan, Liao Xiaogang<sup>△</sup>, Ning Wei, Yao Zhiyong, Wang Yi, Fan Jingchuan  
(Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To investigate the toxic effect of cadmium(Cd) on the ultrastructure, expression of related protein and the signal molecule phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase(P-P38MAPK) of primary cultured rat sertoli cell(Sc), and the protective effect of astragaloside (A) on it. **Methods** The primary cultured rat Sc were divided into the control group, Cd (50 mol/L) group and Cd(50 mol/L) plus A(10 mg/L) group, they were used for the electron microscope observation and the immunohistochemistry detection of vimentin, E-cadherin, -catenin and P-P38MAPK. **Results** The Sc ultrastructural changes included that the swelled mitochondria, abundant lipid droplets and dilated endoplasmic reticulum were found in the Cd group. Further, apoptosis occurred in some Sc. However these ultrastructure changes above mentioned were slighter in the Cd plus A group; the immunohistochemistry showed that the positive products of vimentin, E-cadherin and -catenin were obviously decreased in the Cd group ( $P < 0.05$ ), and those in the Cd plus A group were higher compared with the Cd group ( $P < 0.05$ ); the expression of P-P38MAPK in cytoplasm was increased in the Cd group, and showed the trend to move from cytoplasm to nucleus, meanwhile, the positive products expression in the Cd plus A group was lower than that in the Cd group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Cadmium can cause the injury of the Sc ultrastructure, damage of cytoskeletal protein and fibronectin, and increase of P-P38MAPK level; astragaloside can antagonize the toxicity of cadmium on Sc, the protective effect maybe related with the decrease of P-P38MAPK in Sc.

**Key words:** cadmium; astragaloside; phosphorylated P38MAPK; sertoli cell; expression of related protein

镉为半衰期较长(7~30年)的有毒重金属毒物。当前镉造成的环境污染对人类健康已形成较大威胁<sup>[1]</sup>。前期实验证实镉可损害体外培养睾丸支持细胞,破坏骨架蛋白及损伤细胞超微结构<sup>[2]</sup>, P38MAPK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路的重要分支,它在炎症、细胞应激、凋亡、细胞周期和生长等多种生理和病理过程中起重要作用。实验揭示镉能影响细胞内信号分子 P38MAPK,使其活化而降低细胞活性、扰乱 MAPK 通路的正常传导<sup>[3]</sup>。本研究从细胞超微结构及相关骨架蛋白和粘蛋白以及 P38MAPK 信号通路等方面,探究镉对原代培养大鼠睾丸支持细胞的影响,以及黄芪甲苷对镉毒性的拮抗作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 18 d 龄清洁级健康 SD 大鼠,重庆医科大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK(渝)2002000。DMEM/F12 培养基及胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),V 型胶原酶、胰蛋白酶、Tris-HCl。氯化镉(天津市东大化工厂,批号 2000118,分析纯,纯度为 99%)、黄芪甲苷(上海同田生物技术有限公司,批号 09031621,纯度大于或等于 98.0)、二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司)。兔抗大鼠波形蛋白抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、兔抗大鼠 E-钙粘蛋白抗体、兔抗大鼠-环连蛋白抗体、小鼠抗大鼠 PhosPho-P38MAPK 抗体(碧云天生物技术研究所,江苏)及 SABC 试剂盒(武汉博士德生物

工程有限公司)、DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。Olympus DP70 图像采集系统(日本奥林巴斯公司)。

**1.2 原代培养睾丸支持细胞** 参考 Braghiroli 等<sup>[4]</sup>的方法,选用 18 d 龄 SD 大鼠,无菌操作取睾丸,剪碎,0.25%胰蛋白酶、0.05%V 型胶原酶依次消化,制成单细胞悬液,用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养,37℃、5%CO<sub>2</sub>、高湿度条件下培养 24 h 后,倒掉培养液,加入浓度为 20 mmol/L Tris-HCl 处理溶解生精细胞 3 min,得到纯度近 95%的支持细胞。

**1.3 黄芪甲苷溶液制备** 取 10 mg 黄芪甲苷溶于 0.5 mL DMSO,配成浓度为 20 mg/mL 的贮存液,临用时用 DMEM/F12 培养液倍比稀释,使其终浓度为 10 mg/L(0.05% DMSO)。

**1.4 透射电镜标本制备** 取对数生长期细胞,分别加镉(50 mol/L)(镉处理组)、镉(50 mol/L)+黄芪甲苷(10 mg/L)(镉加黄芪甲苷组),对照组不做任何处理,培养 6 h 后弃培养液,0.25%胰蛋白酶/0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)混合液消化细胞,收集细胞总数大于  $1 \times 10^6$ ,1 200 r/min 离心 10 min,4%戊二醛预固定及 1%锇酸后固定各 2 h,常规透射电镜样品制备,Hitachi-7500 型电镜观察。

**1.5 波形蛋白、E-钙粘连蛋白及-环连蛋白免疫组织化学检测** 对数生长期细胞消化制成  $1 \times 10^5$  单细胞悬液,接种于 24 孔培养板,每孔加 1 mL 细胞悬液,24 h 后弃液,分别加含镉(50 mol/L)、镉(50 mol/L)+黄芪甲苷(10 mg/L)的培养液共培养 6 h,对照组不作任何干预。细胞爬片用 95 乙醇固定 20 min 后用于免疫组织化学染色:3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 15 min,5% BSA 封闭 20 min,滴加兔抗大鼠波形蛋白一抗(1:300),4℃湿盒过夜,PBS 冲洗,加生物素化羊抗兔 IgG 室温下 20 min;PBS 冲洗,滴加试剂 SABC 室温下 20 min;PBS 浸洗后 DAB 显色 5 min,苏木素复染、脱水、封片、观察。阴性对照用 PBS 替代一抗。E-钙粘连蛋白和-环连蛋白免疫组织化学染色步骤与波形蛋白相似,一抗分别为兔抗大鼠 E-钙粘连蛋白(1:150)和兔抗大鼠-环连蛋白(1:200)。阴性对照用 PBS 替代一抗。

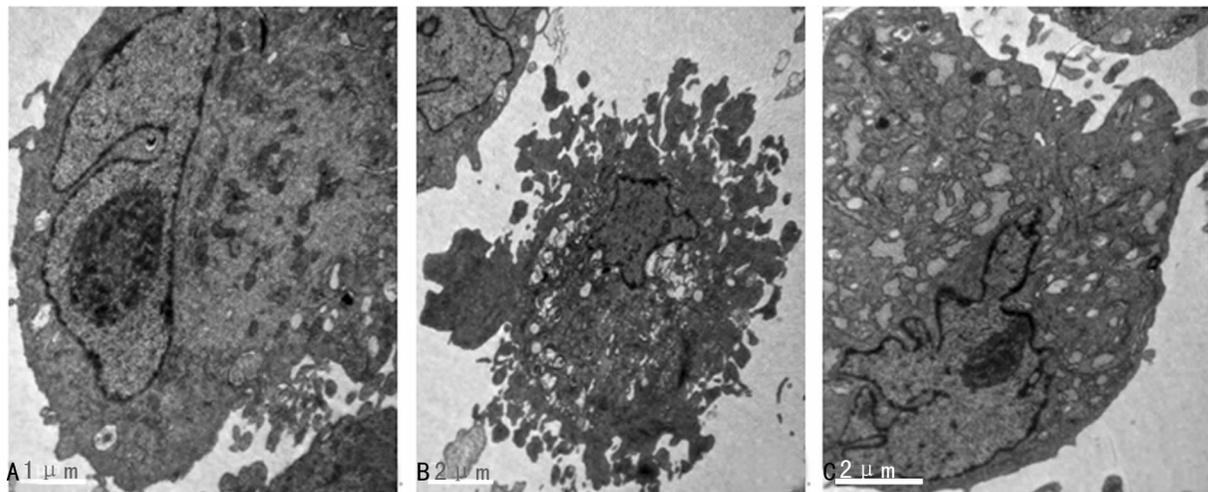
**1.6 磷酸化 P38MAPK 检测** 取上述同样细胞用于 P-P38MAPK 免疫组织化学染色:3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 15 min,5%BSA 封闭 20 min,滴加小鼠抗大鼠 P-P38MAPK 抗体(1:500),4℃湿盒过夜;PBS 冲洗,滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG 室温下 20 min;PBS 冲洗,滴加试剂 SABC 室温下 20 min;PBS 浸洗后,DAB 显色 3 min,苏木素轻度复染、脱水、封片、观察。阴性对照用 PBS 替代一抗。

**1.7 图像分析及统计学处理** 光镜( $\times 400$ )拍摄对照组、镉处理组和镉加黄芪甲苷组的波形蛋白、E-钙粘连蛋白、-环连蛋白及 P-P38MAPK 的免疫组织化学照片。每组随机拍摄 10 个视野,共 12 组 120 张。用北航 BM2000 生物医学图像分析系统对蛋白阳性产物进行平均光密度值分析。采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,相关蛋白阳性产物平均光密度值以  $\bar{x} \pm s$  表示,差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

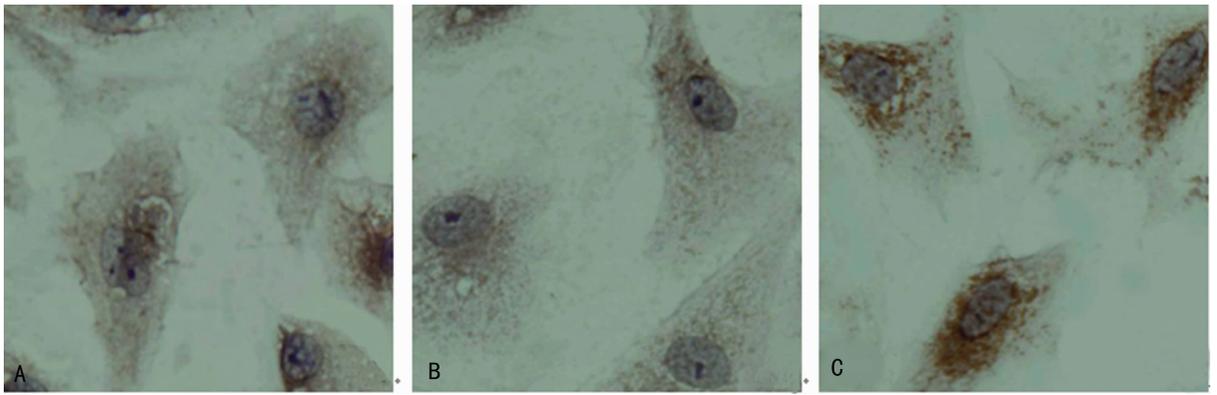
**2.1 电镜观察** 对照组支持细胞核内常染色质丰富,异染色质少,核仁明显可数,核被膜高度反折致核不规则形,胞质内线粒体、高尔基体、内质网和微丝等丰富(图 1A)。镉处理后改变主要为:线粒体内室肿胀,溶酶体增加,核旁脂滴堆积,内质网不同程度扩张和(或)空泡化,髓样结构形成。严重者细胞质电子密度降低,细胞器崩解,核染色质边集、凝聚或溶解,少许细胞出现凋亡(图 1B)。镉加黄芪甲苷(10 mg/L)组支持细胞超微结构改变较镉处理组轻(图 1C)。

**2.2 波形蛋白、E-钙粘连蛋白及-环连蛋白的表达** 对照组波形蛋白呈棕黄色阳性反应,产物环绕胞核成网状,少数阳性产物贯穿胞核(图 2A)。镉处理组阳性产物表达较对照组明显减弱。镉加黄芪甲苷组反应产物表达虽较对照组弱,但较镉处理组明显增多( $P < 0.05$ )。对照组无特异性染色。E-钙粘连蛋白及-环连蛋白反应产物均为棕黄色,定位于细胞质内(图 2B、C)。各组阳性产物表达结果均与波形蛋白类似。对照组无特异性染色。各组图像分析结果见表 1。



A: 对照组; B: 镉处理组; C: 镉加黄芪甲苷组。

图 1 原代培养大鼠支持细胞透射电镜图像



A: 波形蛋白; B: E-钙粘连蛋白; C: 环连蛋白。

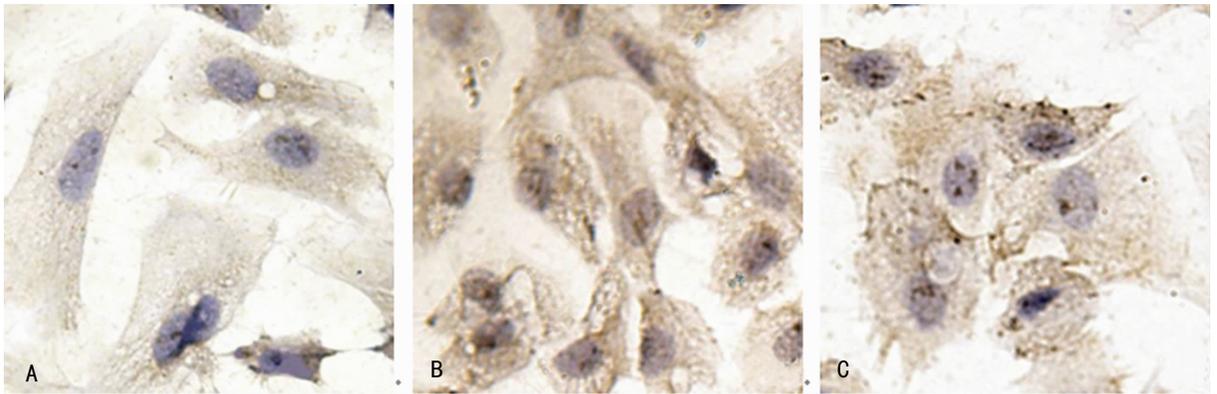
图 2 原代培养大鼠支持细胞相关蛋白免疫组织化学染色( $\times 400$ 倍), SABC法, DAB显色

表 1 各组波形蛋白、E-钙粘连蛋白及环连蛋白表达  
(平均光密度值,  $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	波形蛋白	E-钙粘连蛋白	-环连蛋白
对照组	0.077 $\pm$ 0.015	0.069 $\pm$ 0.011	0.095 $\pm$ 0.020
镉处理组	0.032 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>	0.029 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	0.047 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>
镉加黄芪甲苷组	0.048 $\pm$ 0.013 <sup>ab</sup>	0.045 $\pm$ 0.012 <sup>ab</sup>	0.068 $\pm$ 0.010 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与镉处理组比较。

2.3 磷酸化 P38MAPK 蛋白的表达 对照组 P-P38MAPK 的免疫反应产物为棕褐色, 均匀或成点状分布于细胞质及核周(图 3A)。镉处理组表达产物增多, 且多数细胞核内均出现阳性产物的表达(图 3B)。镉加黄芪甲苷组阳性产物虽多于对照组但明显少于镉处理组(图 3C)。各组图像分析检测结果见表 2。



A: 对照组; B: 镉组; C: 镉加黄芪甲苷组。

图 3 原代培养大鼠支持细胞磷酸化-P38MAPK 免疫组织化学染色( $\times 400$ 倍), SABC法, DAB显色。

表 2 镉及镉加黄芪甲苷对支持细胞 P-P38MAPK 表达的影响(平均光密度值,  $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量	P-P38MAPK
对照组	—	0.028 $\pm$ 0.004
镉处理组	50 mol/L	0.073 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>
镉加黄芪甲苷组	50 mol/L+10 mg/L	0.042 $\pm$ 0.006 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与镉处理组比较。—: 此项无数据。

### 3 讨 论

睾丸支持细胞内多种细胞骨架与血睾屏障的功能密切相关<sup>[5]</sup>, 波形蛋白系主要的骨架蛋白, 其两端分别与外层核被膜和细胞质膜结合, 与支持、生精细胞间的物质和信息交流、精子释放关系密切<sup>[6-7]</sup>。钙依赖性黏附蛋白家族亚型之一的 E-钙粘连蛋白通过-环连蛋白与微丝、中间丝连接形成复合体, 锚定于细胞骨架上, 使相邻细胞间形成稳定连接, 为支持细胞参与

血睾屏障提供必要条件<sup>[8]</sup>。

黄芪为具有多种药效成分的复合物, 能保护心血管, 增强免疫力, 促进造血、保肝等<sup>[9]</sup>。黄芪甲苷系黄芪皂甙类单体, 目前认为其具有抗氧化<sup>[10]</sup>、抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>、调控基因表达<sup>[12]</sup>等功效。初步研究表明黄芪能抑制镉对生殖细胞的遗传毒性, 拮抗镉对大鼠精子发生的破坏作用<sup>[13]</sup>。但是黄芪甲苷能否拮抗镉对睾丸支持细胞的损伤及其作用机制尚无深入研究。本研究提示波形蛋白、E-钙粘连蛋白和-环连蛋白均为镉毒性的靶蛋白, 镉使相关蛋白表达减少, 分布改变。黄芪甲苷明显拮抗镉致支持细胞相关蛋白表达减少的影响。有实验证实镉处理后波形蛋白的减少与其自身降解有关, 推测波形蛋白与热休克蛋白的结合可能会减少波形蛋白的降解<sup>[14]</sup>。镉致 E-钙粘连蛋白和-环连蛋白减少则与细胞内钙离子浓度增高有关<sup>[15]</sup>, 钙离子浓度增高可影响细胞内多种信号传导, 其中之一就是激活金属蛋白使 E-钙粘连蛋白降解, E-钙粘连蛋白及-环连蛋白复合体解离, 且-环连蛋白在脱离复合体后降解增加, 并从细胞膜位置渐渐移至细胞质中。本研究中黄芪甲苷减少了镉致 E-钙

粘连蛋白和-环连蛋白的降解,其机制可能与减少钙离子的内流或者增加了细胞内的钙离子外流有关,作者前期的实验结果支持这一观点。此外超微结构观察提示,镉作用后膜性结构细胞器损伤严重,这与镉对生物膜的氧化损伤有关。镉加黄芪甲苷处理后,明显减少细胞肿胀溶解坏死和抑制凋亡的发生。

P38MAPK 的磷酸化程度检测显示,对照组 P-P38MAPK 仅有微量表达;镉处理组明显增多,且阳性产物有向核内位移趋势;镉加黄芪甲苷组阳性产物较镉处理组明显减少。MAPK 为细胞内主要信息传递系统之一,其在基因表达调控和细胞功能活动中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。P38MAPK 在凋亡、细胞因子产生、转录调节及细胞骨架识别中起关键作用。实验提示镉致 P38MAPK 磷酸化增加的同时肾小球系膜细胞凋亡率升高,说明磷酸化 P38MAPK 确实可促使细胞发生凋亡<sup>[17]</sup>,而本研究电镜观察镉作用 6 h 后即可见到支持细胞凋亡。有报道称镉中毒可破坏血睾屏障的紧密连接,镉使支持细胞 TGF-3 表达增加,TGF-3 调控 P38MAPK 磷酸化增加,并减少了紧密连接中重要的蛋白 occludin 的表达<sup>[18]</sup>。本实验结果提示在 P-P38MAPK 增加的同时,波形蛋白、E-钙粘连蛋白、-环连蛋白均减少,故推测镉导致波形蛋白、E-钙粘连蛋白、-环连蛋白的减少亦与 P38MAPK 磷酸化有关。而黄芪甲苷亦可能通过对 P38MAPK 磷酸化的抑制作用,从而拮抗镉对大鼠睾丸支持细胞的损害。

#### 参考文献:

[1] Satarug S, Garrett SH, Sens MA, et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes[J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(2):182-190.

[2] 石之虎, 廖晓岗, 李庆春, 等. 镉对培养大鼠睾丸支持细胞的损伤及黄芪的拮抗作用[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(6): 779-782.

[3] Rigon AP, Cordova FM, Oliveira CS, et al. Neurotoxicity of Cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for P38 MAPK[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(4):727-734.

[4] Braghiroli L, Silvestrini B, Sorrentino C, et al. Regulation of alpha2-macroglobulin expression in rat Sertoli cells and hepatocytes by germ cells in vitro[J]. Biol Reprod, 1998, 59(1):111-123.

[5] 石之虎, 廖晓岗. 支持细胞骨架与血睾屏障的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(2):124-127.

[6] Wang RS, Yeh S, Chen LM, et al. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes[J]. Endocrinology, 2006, 147(12):5624-5633.

[7] Klymenova E, Swanson C, Boekelheide K, et al. Ex-

posure in utero to di(n-butyl) Phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact[J]. Biol Reprod, 2005, 73(3):482-490.

- [8] Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis[J]. Endocr Rev, 2004, 25(5):747-806.
- [9] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3):232-234.
- [10] 李丽, 陶辉宇, 陈杰斌, 等. 黄芪甲苷保护阿霉素心肌损伤的抗氧化机制研究[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(1):58-61.
- [11] 王曦, 石钰, Viennet C, 等. 黄芪甲苷对人皮肤成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华医学美容美容杂志, 2006, 12(2):93-97.
- [12] 张川, 柳润辉, 李慧梁, 等. 黄芪甲苷对大鼠心肌基因表达谱的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2):172-175.
- [13] 梁培育, 李浩勇, 彭晓晖, 等. 黄芪注射液对镉诱导大鼠精子畸形的拮抗作用[J]. 中华男科学, 2004, 10(1):42-45, 48.
- [14] Lee JS, Zhang MH, Yun EK, et al. Heat shock protein 27 interacts with vimentin and prevents insolubilization of vimentin subunits induced by cadmium[J]. Exp Mol Med, 2005, 37(5):427-435.
- [15] Ito K, Okamoto I, Araki N, et al. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts[J]. Oncogene, 1999, 18(50):7080-7090.
- [16] 孟晓明, 黄艳, 李俊. 丝裂原活化蛋白激酶亚族 P38 信号转导通路及慢性支气管炎的关系[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(7):849-852.
- [17] Ravanti L, Toriseva M, Penttinen R, et al. Expression of human collagenase-3 (MMP-13) by fetal skin fibroblasts is induced by transforming growth factor-beta via P38 mitogen-activated protein kinase[J]. FASEB J, 2001, 15(6):1098.
- [18] Lui WY, Wong CH, Mruk DD, et al. TGF-beta3 regulates the blood-testis barrier dynamics via the P38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway: an in vivo study[J]. Endocrinology, 2003, 144(4):1139-1142.

(收稿日期:2014-03-25 修回日期:2014-06-04)