

黄芪主要成分对 TGF- β 1 诱导大鼠睾丸 Leydig 细胞系合成雌二醇的影响

李彦荣^{1*}, 刘光炜¹, 赵晶², 李亚军¹

(1. 甘肃中医药大学(定西校区), 甘肃 定西 743000; 2. 定西市人民医院 检验科, 甘肃 定西 743000)

摘要:目的 探讨黄芪主要成分对 TGF- β 1 诱导下大鼠睾丸 Leydig 细胞及该细胞合成雌二醇(E_2)、P450 芳香化酶(P450arom)的影响。方法 将体外培养的 Leydig 细胞分为对照组、模型组(5 ng/mL TGF- β 1 造模)和中药干预3组,在造模后分别用终浓度为 10 和 50 mg/L 黄芪总黄酮、终浓度为 10 和 50 mg/L 黄芪总多糖、终浓度 20 和 100 mg/L 的黄芪总皂苷干预。48 h 后进行细胞爬片,用 ELISA 检测细胞中 E_2 、P450arom 蛋白含量;Imagej-win64 软件计数细胞;用 SPSS 20.0、GraphPad Prism 6.0 对数据进行统计分析。结果 模型组 Leydig 细胞和对照组相比,形态异常,数量减少($P < 0.01$);明显抑制 Leydig 细胞合成 E_2 和 P450arom($P < 0.05$)。黄芪总黄酮、黄芪总皂苷和黄芪总多糖均能够改善 TGF- β 1 诱导下 Leydig 细胞病变,细胞数量明显增多($P < 0.01$),三者均能缓解 TGF- β 1 抑制细胞合成 E_2 的作用,20 mg/L 黄芪总皂苷的效果最显著。结论 黄芪总皂苷是黄芪中减轻 TGF- β 1 抑制睾丸 Leydig 细胞合成 E_2 作用效果最佳的成分。

关键词: 黄芪;睾丸 Leydig 细胞;雌二醇(E_2)

中图分类号:R285.5 文献标志码:A

Effects of main compositions of Astragalus on estradiol synthesizing activating in TGF- β 1-induced rat testicular Leydig cell line

LI Yan-rong^{1*}, LIU Guang-wei¹, ZHAO Jing², LI Ya-jun¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine(Dingxi Campus), Dingxi 743000; 2. Department of Clinical Laboratory, Dingxi People's Hospital, Dingxi 743000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of the main compositions of Astragalus on testicular Leydig cells and their synthesis of estradiol(E_2), P450arom under TGF- β 1 induction. **Methods** Leydig cells were divided into three groups: control group, model group and Chinese herbal medicine intervention group. **Results** Compared with the control group, Leydig cells in the model group showed abnormal morphology and less cells($P < 0.01$). TGF- β 1 significantly inhibited the synthesis of E_2 and P450arom by Leydig cells ($P < 0.05$). Total Astragalus flavone, total Astragalus saponin and total astragalus polysaccharide all resulted in pathological changes of Leydig cells induced by TGF- β 1. Compared with the model group, the number of cells increased significantly ($P < 0.01$) and all of them alleviated the inhibitory effect of TGF- β 1 on the synthesis of E_2 in Leydig cells induced by TGF- β 1, and the effect of concentration of 20 mg/L total saponin of Astragalus was the most significant. **Conclusions** Total Astragalus saponin is the most effective component in Astragalus to exert TGF- β 1 inhibitory effect on E_2 synthesis by Leydig cells.

Key words: Astragalus; Leydig cells of testis; estradiol(E_2)

收稿日期:2019-04-06 修回日期:2020-09-30

基金项目:2018 年度甘肃省高等学校科研项目(2018A-180);甘肃中医药大学定西校区项目(2017XJZD09)

* 通信作者(corresponding author):38746648@qq.com

雄性动物的血清、睾丸网以及精液中都存在着一定浓度的雌激素,而以睾丸网液中的雌激素水平为高,甚至可以达到 250 ng/L,雌激素对雄性生殖系统的正常发育和功能的维持也起着非常重要的作用^[1]。多种因素会导致睾丸损伤,如:镭、射线、高温和氧自由基等,这些因素使睾丸 Leydig 细胞受到损伤,这种损伤影响到精子的生成,导致男性生殖功能障碍,男性不育症患者逐年增多^[2-4]。黄芪是中国传统的中药材,始载于《神农本草经》,为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,味甘、微温,归肺和脾经^[5],具有补中益气,扶正固本之功效。黄芪中主要成分:总黄酮(Astragalus flavone)、总皂苷(Astragalus saponin)及总多糖(Astragalus polysaccharide)对睾丸 Leydig 细胞具有保护作用^[6-9]。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)对大鼠睾丸 Leydig 细胞中雌、雄激素分泌均有明显抑制作用^[10]。本实验探讨在黄芪中哪种成分对损伤睾丸 Leydig 细胞合成雌二醇(estradiol, E_2)作用效果最佳。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及试剂

大鼠睾丸 Leydig 细胞系(北京北纳创联生物技术研究院);胎牛血清(上海翊圣生物科技有限公司);胰蛋白酶(YEASEN 公司);RPMI1640 培养基(Hyclone 公司);TGF- β 1 细胞因子(Peprotech 公司);大鼠雌二醇(estradiol, E_2) ELISA 试剂盒、大鼠细胞色素 P450 芳香化酶(P450arom) ELISA 试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司);黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、黄芪总多糖(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 Leydig 细胞的培养及分组处理:用 RPMI1640 完全培养基(90% RPMI1640 基础培养基,10%胎牛血清),在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 培养箱中传代培养睾丸 Leydig 细胞。将细胞分对照组、模型组(5 ng/mL TGF- β 1 造模)和中药干预组。根据参考文献[10]和预实验的结果,将中药干预组分为:低和高剂量黄芪总黄酮组(终浓度为 10 和 50 mg/L);低和高剂量黄芪总皂苷组(终浓度为 20 和 100 mg/L);低和高剂量黄芪总多糖组(终浓度为 10 和 100 mg/L)。

1.2.2 细胞爬片:用血细胞计数板进行细胞计数,

然后按照 5×10^4 个/mL 的浓度稀释细胞,在 6 孔细胞培养板中预先放置好无菌的盖玻片,将稀释好的细胞按每孔 2 mL 接种到 6 孔板中。

1.2.3 ELISA 检测 E_2 、P450arom 及细胞爬片染色:每组细胞加药 48 h 后取出细胞,收集细胞上清液,严格按 ELISA 试剂盒说明书对 E_2 、P450arom 进行检测,细胞爬片用 PBS 洗涤 2 遍,多聚甲醛固定 1/2 h,进行 HE 染色,然后用显微镜观察。

1.2.4 细胞的计数:将细胞放大 200 倍进行观察,每张细胞爬片随机选取 5 个视野,用 Imagej-win64 软件进行细胞计数。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0、GraphPad Prism 6.0 软件进行分析,计量资料用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 黄芪主要成分对睾丸 Leydig 细胞合成 E_2 、P450arom 的影响

和正常组比较,模型组睾丸 Leydig 细胞中的 E_2 含量降低 26.14%, P450arom 蛋白含量降低 50.56%。和模型组比较,黄芪总黄酮(10 和 50 mg/L)、黄芪总皂苷(20 和 100 mg/L)、黄芪总多糖(10 和 50 mg/L)使睾丸 Leydig 细胞中的 E_2 含量分别升高 14.56%、19.77%、37.51%、13.61%、26.03% 和 1.54%, P450arom 含量分别升高 2.50%、27.56%、0.57%、10.74%、27.14% 和 24.23%(表 1)。

表 1 黄芪主要成分对睾丸 Leydig 细胞合成 E_2 、P450arom 的影响

Table 1 Effects of different Astragalus compositions on E_2 and P450arom composition in Leydig cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

group	E_2 / (ng/L)	P450arom/ (pmol/L)
control	67 \pm 11	243 \pm 6
model	49 \pm 5 *	120 \pm 5 *
total Astragalus polysaccharide 10 mg/L	63 \pm 10	153 \pm 13 Δ
total Astragalus polysaccharide 50 mg/L	50 \pm 8	149 \pm 11 Δ
total Astragalus flavone 10 mg/L	57 \pm 13	123 \pm 13
total Astragalus flavone 50 mg/L	59 \pm 7	153 \pm 10 Δ
total Astragalus saponin 20 mg/L	68 \pm 6 Δ	121 \pm 13
total Astragalus saponin 100 mg/L	56 \pm 7	133 \pm 19

* $P < 0.05$ compared with the control; $\Delta P < 0.05$ compared with the model.

2.2 HE 染色观察睾丸 Leydig 细胞形态

模型组较正常组细胞数量显著减少,细胞呈多种形态,以梭形、多角形细胞为主,核染色较深,核仁不清楚。中药干预组细胞数量明显多于模型组,但少于正常组,胞体呈圆形、多边形、梭形、多角形,以圆形和多边形细胞为主,部分可见核仁(图1)。

2.3 黄芪主要成分对 TGF- β 1 损伤睾丸 Leydig 细胞数量的影响

将 TGF- β 1 作用于模型组 Leydig 细胞后,与模型组、实验组细胞和正常组细胞相比形态异常,数量减少($P < 0.01$)。黄芪总黄酮、黄芪总皂苷、黄芪总

多糖干预后,实验组细胞病变改善明显,和模型组相比,细胞数量明显增多($P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

雄性动物的血清、睾丸网以及精液中都存在着一定浓度的雌激素。雌激素不仅对雌性生殖系统的结构和功能至关重要,对雄性生殖系统的正常发育和功能的维持也同样起着非常重要的作用^[11]。睾丸Leydig细胞占睾丸细胞总数的2%~4%,是睾丸中的内分泌细胞。P450arom 作用于睾丸 Leydig 细胞、支持细胞和生殖细胞。成熟 Leydig 细胞中的

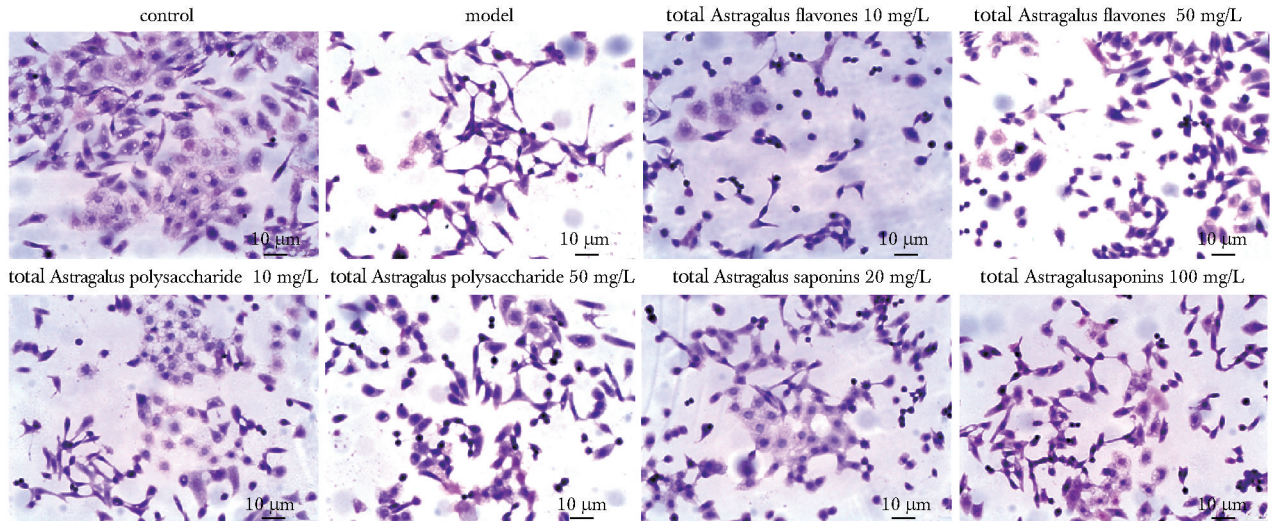


图1 黄芪主要成分对各组细胞形态的影响

Fig 1 Effects of different Astragalus compositions on cellular morphology in each group (HE, $\times 200$)

表2 黄芪主要成分对 TGF- β 1 损伤睾丸 Leydig 细胞的影响

Table 2 Effects of different Astragalus compositions on TGF- β 1-induced Leydig cells numbers in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

group	mean Leydig cells/field
control	350 \pm 29
model	94 \pm 27*
total Astragalus polysaccharide 10 mg/L	189 \pm 37 Δ
total Astragalus polysaccharide 50 mg/L	177 \pm 19 Δ
total Astragalus flavone 10 mg/L	143 \pm 13 Δ
total Astragalus flavone 50 mg/L	246 \pm 18 Δ
total Astragalus of saponin 20 mg/L	199 \pm 39 Δ
total Astragalus of saponin 100 mg/L	194 \pm 32 Δ

* $P < 0.01$ compared with the control; $\Delta P < 0.01$ compared with the model.

P450arom 在绒毛膜促性腺激素诱导将合成的 T 转化成 E_2 ^[10]。当 Leydig 细胞损伤或 P450arom 表达及活性降低时, Leydig 细胞合成 E_2 减少甚至不合成,精子的发生就会受到影响。

临床实践和文献检索发现,黄芪及其主要成分对睾丸和 Leydig 细胞具有保护作用。黄芪总黄酮具有较强的抗辐射作用,能显著提高受致死剂量⁶⁰Co- γ 射线照射小鼠的存活率,降低辐射对小鼠外周血 WBC 和 PLT 及脾脏的损伤作用^[7]。黄芪多糖可能通过清除氧自由基及抗脂质过氧化的机制,减轻大剂量射线对睾丸间质细胞表面的损伤^[7-8]。黄芪总皂苷能够有效降低糖尿病大鼠空腹血糖,能提高身体质量和睾丸指数,提高血清睾酮含量,改善睾丸组织生化指标,改善抗氧化酶活性、降低氧化应激损伤,改善睾丸组织

病变和细胞超微结构改变,提示黄芪总皂苷对糖尿病大鼠睾丸组织具有保护作用^[9,12]。

TGF- β 1 在人睾丸表达的研究表明:TGF- β 1 可表达于人睾丸的间质细胞、支持细胞与生精细胞。TGF- β 1 是一种间质细胞的局部调节因子,通过自分泌和旁分泌方式,在睾丸的发育与成熟和精子发生过程中发挥着重要作用^[13]。TGF- β 1 对大鼠睾丸 Leydig 细胞中雌、雄激素分泌均有明显抑制作用^[10]。

通过文献检索,尚未有黄芪主要成分对损伤睾丸 Leydig 细胞合成 E₂ 作用效果最佳成分的研究报道。本实验采用 TGF- β 1 对体外培养的睾丸

Leydig 细胞进行模型构建,以黄芪总黄酮、黄芪总皂苷和黄芪总多糖分别对 TGF- β 1 损伤的睾丸 Leydig 细胞进行干预。实验发现,三者均能缓解 TGF- β 1 抑制睾丸 Leydig 细胞分泌 E₂、P450arom 的作用,终浓度 20 mg/L 黄芪总皂苷缓解 TGF- β 1 抑制睾丸 Leydig 细胞合成 E₂ 的作用最明显,终浓度 50 mg/L 的黄芪总黄酮缓解 TGF- β 1 抑制睾丸 Leydig 合成 P450arom 的作用最明显;三者均能改善睾丸 Leydig 细胞病变,促进 Leydig 细胞的增殖,20 mg/L 黄芪总皂苷促使 TGF- β 1 诱导下 Leydig 细胞的增殖效果最显著。

参考文献:

- [1] Carreau S. Estrogens-male hormones [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2003, 41: 107-113.
- [2] Gimenes F, Souza RP, Bento JC, *et al.* Male infertility: A public health issue caused by sexually transmitted pathogens [J]. *Nat Rev Urol*, 2014, 11: 672-687.
- [3] Izzo CR, Monteleone PA, Serafini PC. Human reproduction: current status [J]. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 2015, 61: 557-559.
- [4] Schagdarsurengin U, Western P, Steger K, *et al.* Developmental origins of male subfertility: role of infection, inflammation, and environmental factors [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38: 765-781.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283-284.
- [6] 王玲丽, 丰华玲, 杨柯, 等. 黄芪生物学及化学成分研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36: 2581-2585.
- [7] 杨映雪, 陈建业, 费中海, 等. 黄芪总黄酮对辐射损伤小鼠的防护作用研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35: 504-507.
- [8] 张杰. 60Co 射线对大鼠睾丸间质细胞的损伤及黄芪多糖对该损伤防护作用的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2012: 15-16.
- [9] 姚斌伟, 彭瑞云, 高亚兵, 等. 黄芪总苷对微波辐射致大鼠精子损伤的治疗作用研究 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2017, 22: 61-68.
- [10] 刘馒头. TGF- β 1 对大鼠睾丸 Leydig 细胞功能的损伤及 Icariin 的保护效应 [D]. 西安: 第四军医大学, 2013: 24, 33.
- [11] Dobashi M, Fujisawa M, Yamazaki T, *et al.* Distribution of intracellular and extracellular expression of transforming growth factor- β 1 in human testis and their association with spermatogenesis [J]. *Asian J Androl*, 2002, 4: 105-109.
- [12] 武向丽. 黄芪甲苷对实验性糖尿病大鼠睾丸组织的保护作用 [J]. *西部中医药*, 2017, 30: 32-36.
- [13] Zhang YQ, He XZ, Zhang JS, *et al.* Stage-specific localization of transforming growth factor- β 1 and β 3 and their receptors during spermatogenesis in men [J]. *Asian J Androl*, 2004, 6: 105-109.