

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.22.003

## 茶多酚对铝致大鼠睾丸支持细胞损伤的拮抗作用研究\*

王程强, 欧超燕, 施文祥, 钱波<sup>△</sup>

(桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541004)

**[摘要]** **目的** 探讨茶多酚(TP)对铝暴露大鼠睾丸支持细胞损伤的拮抗作用。**方法** 原代培养大鼠睾丸支持细胞。将细胞分为 0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  (对照组)、400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  (铝暴露组)、40  $\mu\text{g/mL}$  TP + 400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  组(低剂量拮抗组)、160  $\mu\text{g/mL}$  茶多酚 + 400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  组(高剂量拮抗组), 各组用相应的药物处理 24 h。四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组细胞的生长活性; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测抑制素 B(INHB)mRNA 的表达。**结果** 与对照组比较, 铝暴露组的细胞活性、INHB mRNA 表达均明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与铝暴露组比较, 低剂量拮抗组、高剂量拮抗组能够明显提高细胞活性, 差别具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与铝暴露组比较, 高剂量拮抗组能够明显提高 INHB mRNA 表达, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 高剂量 TP 能够拮抗铝对大鼠睾丸支持细胞的损伤。

**[关键词]** 茶多酚; 三氯化铝; 睾丸支持细胞; 抑制素 B**[中图分类号]** R697**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3031-03

## The antagonistic effects of tea polyphenols on damage of rat sertoli cells induced by Aluminum chloride\*

Wang Chengqiang, Ou Chaoyan, Shi Wenxiang, Qian Bo<sup>△</sup>

(School of Public Health, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541004, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the antagonistic effects of tea polyphenols on the damage of sertoli cells of rats induced by Aluminum chloride. **Methods** Rat sertoli cells were cultured, purified and identified. Cells were divided into 0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  (control group), 400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  (Aluminum exposure group) and 40  $\mu\text{g/mL}$  TP + 400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  group (low dose anti group) and 160  $\mu\text{g/mL}$  tea polyphenol + 400  $\mu\text{mol/L}$   $\text{AlCl}_3$  group (high dose of anti group), each group with the corresponding drug treatment for 24 h. MTT method was used to detect the growth activity of the cells in each group, the levels of INHB mRNA expression were measured by RT-PCR. **Results** Compared with the control groups, the cell viability and the level of INHB mRNA expression of Aluminum exposure groups were obviously decreased, there were statistical significant differences ( $P < 0.05$ ). Compared with the Aluminum exposure group, the cell viability of low dose anti group and high dose of anti group was remarkably increased, there were statistical significant differences ( $P < 0.05$ ). Compared with the Aluminum exposure group, the level of INHB mRNA expression of high dose of anti group was remarkably increased, there was statistical significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** High dose of tea polyphenols can enhance the expression of mRNA, increase the cell activity, and antagonism Aluminum on the injury of rat's testis.

**[Key words]** tea polyphenols; Aluminum chloride; sertoli cell; inhibin-B

铝在环境中和人类的生活中广泛存在,且能够在人体里逐渐蓄积,其毒性主要表现为神经系统的损伤。除了神经毒性外,近年来发现铝对生殖系统也有毒性。无论是流行病学研究还是整体动物实验,都证实了铝会对雄性的生殖系统带来损伤。有研究显示,铝暴露将导致雄性小鼠的睾丸、附睾质量减轻,导致精子数量和质量显著下降<sup>[1]</sup>,但是作用机制目前仍不清楚。睾丸支持细胞是睾丸组织中重要的保姆细胞,它能够为精子提供稳定的微环境,为生精提供所需的营养物质与能量,还能分泌大量的生长因子参与生精细胞的分化和成熟,其功能的受损将对精子的生成产生巨大的影响。因此,睾丸支持细胞被认为是评价雄性生殖毒性的重要靶细胞<sup>[2]</sup>。支持细胞所分泌的抑制素 B(INHB)能直接反映其功能状态,一旦生精受到抑制,INHB的水平将发生变化<sup>[3-4]</sup>。目前排铝药物主要是铝螯合剂,但其不良反应多。近年来,患者对于不良反应小的天然药物的需求越来越高,开发出一种不良反应比较小的驱铝药物迫在眉睫<sup>[5]</sup>。茶多酚(TP)是一种天然的强抗氧化剂,可以

预防肿瘤及神经退行性疾病<sup>[6-7]</sup>。但其能否保护铝暴露的睾丸支持细胞,目前未见报道。本研究将探讨 TP 对铝暴露大鼠睾丸支持细胞的保护作用,并初步研究其可能的发生机制。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

**1.1.1 动物** 清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 6 只, 18~22 d, 以体质量 50~55 g 睾丸未降出腹腔为标准。由桂林医学院实验动物中心提供。

**1.1.2 主要仪器与试剂** TP(浙江东方茶叶科技有限公司,  $\geq 95\%$ ), 氯化铝(分析纯, 广州化学试剂厂产品), DMEM/F12 培养液(Gibco 公司), 胎牛血清(武汉谷歌生物有限公司), 四甲基偶氮唑盐(MTT, 美国 Sigma 公司), 胶原酶 I(美国 Sigma 公司), 胰蛋白酶(Difco 公司), 第一链 cDNA 试剂盒和 PCR 试剂盒(北京赛百盛公司), 酶标仪(奥地利 Tecan 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠睾丸支持细胞原代培养**<sup>[8]</sup> 颈椎脱臼法处死大

\* 基金项目: 广西科技厅自然科学基金青年基金一般项目(2012GXNSFBA053120); 广西教育厅高等学校一般资助项目(201203YB121)。作者简介: 王程强(1981-), 讲师, 硕士, 主要从事毒理学的相关研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 805558188@qq.com。

鼠。鼠体置于 75% 乙醇中浸泡 2 min, 然后利用眼科剪在超净工作台中取出大鼠睾丸, 放入含有预冷的 D-Hanks 液的培养皿中。剥除睾丸被膜, 用眼科剪把睾丸实质剪碎成约 1 mm<sup>3</sup> 的碎块。加入 D-Hanks 液, 静置 5 min 后, 冲洗 2 次。采取胰蛋白酶和胶原酶二步法消化组织。将睾丸组织碎块加入 3 mL 0.25% 胰蛋白酶, 37 °C 水浴振荡消化 30 min。加入少量胎牛血清终止消化, 800 r/min 离心 5 min 去上清。加入无血清的培养基, 1 000 r/min 离心 5 min 去上清, 再用 D-Hanks 液洗涤沉淀。再加 2 mL 0.1% 胶原酶 I 液, 37 °C 水浴振荡消化 20 min。取出后放入超净台, 将消化液经 100 目不锈钢筛过滤。加入少量含胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液, 制成细胞悬液。用 0.4% 台盼兰计数活细胞含量, 补充适量含血清培养基, 调节细胞浓度至合适。接种细胞在培养箱中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养。48 h 后弃培养液, 用 D-Hanks 液冲洗, 再用 pH7.4 的 20 mmol/L Tris-HCl 低渗处理 3 min, 以去除精原细胞。

**1.2.2 大鼠睾丸支持细胞的鉴定** 采取 Feulgen 染色法对大鼠睾丸支持细胞进行鉴定<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 实验分组及处理** 本实验采用离体培养 2 d 后的原代细胞进行相关处理, 将细胞分为 0 μmol/L AlCl<sub>3</sub> (对照组)、400 μmol/L AlCl<sub>3</sub> (铝暴露组)、40 μg/mL TP+400 μmol/L AlCl<sub>3</sub> 组 (低剂量拮抗组)、160 μg/mL TP+400 μmol/L AlCl<sub>3</sub> 组 (高剂量拮抗组), 各组用相应的药物处理 24 h。

**1.2.4 MTT 法检测细胞生长活性** 调整细胞密度 5 × 10<sup>5</sup>/mL 接种在 96 孔板中, 每孔 200 μL, 每组设 6 个复孔。于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后, 施加相关处理因素。各组细胞经过相关处理 24 h 后, 加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 继续培养 4 h 后, 弃培养液, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 室温下振荡 10 min, 使结晶物体完全溶解。利用酶标仪在 490 nm 波长下检测各孔的吸光度 (A) 值。实验重复 3 次。

**1.2.5 采取 RT-PCR 法检测大鼠睾丸支持细胞中 INHB mRNA 表达水平** 将培养于 96 孔板的各组细胞经过 24 h 处理后, 加入 Trizol 提取 RNA, 并逆转录 cDNA, 具体步骤严格按照试剂说明书进行。INHB: 上游引物 5'-CTC TGC TGC TGC TCC TTT TG-3', 下游引物 5'-TGG TGG CTG CGT ATG TG-3', 产物片段 361 bp。内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH): 上游引物 5'-GGT GCT GAG TAT GTC GTG GAG T-3', 下游引物 5'-CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA T-3', 产物片段 292 bp。引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以 2 μL cDNA 为模板, 建立 PCR 反应体系 [包括 10 × PCR 缓冲液 5 μL, MgCl<sub>2</sub> 7 μL, 三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 2 μL, 上下游引物各 1 μL, 2 μL cDNA, Taq 酶 1 μL, 灭菌双蒸水 31 μL]。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min; 60 °C 10 min 循环 35 次; 5 μL 用琼脂糖凝胶电泳分离, 采取 Gene Tools 分析条带 A 值, 以 INHB 与 GAPDH 的比值代表其 mRNA 的相对表达量。

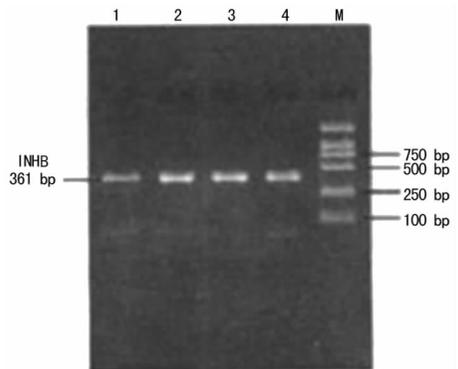
**1.3 统计学处理** 运用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行分析, 采用单因素方差分析, SNK-q 检验运用于各组之间的两两比较, 检验水准 α=0.05, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 茶多酚对铝暴露支持细胞活性的影响** 支持细胞活性铝

暴露组 (0.822 ± 0.028)、低剂量拮抗组 (0.933 ± 0.033)、高剂量拮抗组 (0.950 ± 0.026) 与对照组 (1.008 ± 0.044) 相比较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。低剂量拮抗组、高剂量拮抗组与铝暴露组相比较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。

**2.2 TP 对铝暴露大鼠睾丸支持细胞 INHB mRNA 表达的影响** INHB mRNA 铝暴露组 (0.333 ± 0.022)、低剂量拮抗组 (0.365 ± 0.010)、高剂量拮抗组 (0.412 ± 0.019) 与对照组 (0.452 ± 0.011) 相比较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。高剂量拮抗组与铝暴露组 INHB mRNA 表达相比较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见图 1。



M: DNA 标记物; 1~4: 铝暴露组、对照组、高剂量拮抗组、低剂量拮抗组。

图 1 INHB mRNA RT-PCR 产物电泳结果

## 3 讨论

睾丸是铝雄性生殖毒性最敏感的器官之一。生精功能的障碍和睾酮合成的抑制是铝雄性生殖毒性的主要表现形式。有研究发现, 给小鼠腹腔注射三氯化铝, 随着剂量的增加, 生精细胞和睾丸支持细胞都明显减少<sup>[10]</sup>。铝暴露会导致睾丸组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力下降, 增加丙二醛 (MDA) 的含量<sup>[11]</sup>。铝暴露将产生大量的活性氧化簇, 促进脂质过氧化损伤, 导致精母细胞和精子坏死。正常精子的生成, 都需要睾丸支持细胞。睾丸支持细胞具有保护、营养和支持生精细胞的功能。有研究证实, 卵泡刺激素 (FSH) 能够选择性刺激支持细胞分泌 INHB。FSH 对雌性的生殖影响是巨大的、绝对的<sup>[12]</sup>, 然而对雄性来说, FSH 的影响是比较细微的。如果通过基因敲除法敲除 FSH 基因, 雌性动物不育, 而雄性小鼠却依然可以生育。此外, INHB 和精子浓度有很好的正相关性。铝导致睾丸氧化损伤依然是最主要的机制。有研究表示铝暴露后, 将产生大量的一氧化氮合酶, 从而抑制环磷酸腺苷 (cAMP), 使睾酮的分泌将减少, 导致精子浓度下降。随着 cAMP 活性的下降, 睾丸间质细胞转运胆固醇进入线粒体的量也随之减少<sup>[13]</sup>。

本实验发现, 与对照组比较, 铝暴露组的细胞活性、INHB mRNA 表达均明显下降, 差异有统计学意义 (P<0.05)。INHB 对 FSH 的负反馈作用要强于正反馈。说明支持细胞在受到铝暴露后, 将负反馈降低抑制素的表达, 减少对 FSH 的抑制, 促进 FSH 分泌雄激素结合蛋白 (ABP)。ABP 能与睾酮结合, 从而拮抗铝对支持细胞的损伤效应。

TP 是一类富含酚羟基的化合物, 提供活性氢, 使自由基灭活, 清除自由基过多引起的 DNA 损伤<sup>[14]</sup>。TP 还能抑制诱导型一氧化氮合成酶 mRNA 的表达, 从而阻断一氧化氮的合成<sup>[15]</sup>。而抑制素的转录主要是受到 FSH 刺激的 cAMP 的影

响。本研究发现,TP 能够通过增加抑制素的转录,拮抗铝对睾丸支持细胞的损伤效应,增加睾丸支持细胞活性。其机制可能是提高 cAMP 活性,抑制一氧化氮合酶的产生,从而拮抗铝对睾丸支持细胞的损伤。

#### 参考文献

- [1] Llobet JM, Colomina MT, Sirvent JJ, et al. Reproductive toxicology of Aluminum in male mice[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1995, 25(1): 45-51.
- [2] 高明, 吴南翔, 宋杨, 等. 原代培养大鼠睾丸支持细胞 PCB153 暴露后超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量的时间变化特征[J]. *环境与健康杂志*, 2011, 23(5): 380-382.
- [3] 刘国红, 王翀, 刘宏凯, 等. p, p'-DDE 对大鼠睾丸 Sertoli 细胞雄激素结合蛋白, 转铁蛋白和抑制素 B mRNA 表达的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(2): 104-107.
- [4] 钟先玖, 吴鑫, 周元陵, 等. 丙烯腈对大鼠睾丸中雄激素结合蛋白和抑制素基因表达的影响[J]. *环境与职业医学*, 2005, 22(5): 414-416.
- [5] 苏式兵, 王汝宽, 李梢, 等. 医学发展趋势和前景分析[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2007, 9(1): 112-118.
- [6] 耿文学, 董华进. 茶多酚免疫调节及抗肿瘤的研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2009, 24(3): 315-317.
- [7] 李锐, 杜芳, 乐卫东. 绿茶多酚的神经保护作用[J]. *中国临床神经科学*, 2003, 11(4): 428-431.
- [8] 赵龙坡, 徐铮, 张文, 等. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养,

鉴定与抑制素的表达[J]. *华北国防医药*, 2006, 18(4): 232-234.

- [9] 韩晓冬, 龚朕, 屠志刚, 等. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养与鉴定[J]. *解剖学报*, 2005, 36(6): 682-684.
- [10] 崔慧慧, 白晓琴, 李莉, 等. 三氯化铝暴露致雄性小鼠生殖细胞的遗传毒性[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(1): 68-70.
- [11] 徐华雷, 刘萍, 郝丽娜, 等. 铝螯合剂对染铝大鼠睾丸抗氧化系统及必需元素的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(4): 290-292.
- [12] Gassei K, Schlatt S, Ehmcke J. De novo morphogenesis of seminiferous tubules from dissociated immature rat testicular cells in xenografts[J]. *J Androl*, 2006, 27(4): 611-618.
- [13] Guo CH, Lin CY, Yeh MS, et al. Aluminum-induced suppression of testosterone through nitric oxide production in male mice[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, 19(1): 33-40.
- [14] 张军, 张敬, 石红军, 等. 茶多酚对紫外线引起的 DNA 损伤的保护作用[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2004, 25(2): 91-92.
- [15] 刘英莉, 张艳淑, 王广增. 茶多酚联合维生素 C、维生素 E 对染尘大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 损伤的保护实验研究[J]. *中国职业医学*, 2000, 27(5): 21-22.

(收稿日期: 2016-02-15 修回日期: 2016-04-20)

(上接第 3030 页)

ALP 水平略高于 G 组, 估计与 Ala-Gln 代谢过程中产生的丙氨酸作为另一种氨基酸来源参与细胞生长有关。

综上所述, Ala-Gln 可以提高人类黏膜成纤维细胞的 ALP 和细胞蛋白水平, 促进细胞生长, 提高细胞活性, 当 Ala-Gln 浓度过高或过低可影响细胞持续生长, 以 1/2 倍推荐浓度(即 Ala-Gln 浓度为 16.5 mg/mL)时细胞生长情况最好。

#### 参考文献

- [1] Babae N, Baradaran M, Mohamadi H, et al. Therapeutic effects of Zataria Multiflora essential oil on recurrent oral aphthous lesion[J]. *Dent Res J (Isfahan)*, 2015, 12(5): 456-460.
- [2] Tarakji B, Gazal G, Al-Maweri SA, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of recurrent aphthous stomatitis for dental practitioners[J]. *J Int Oral Health*, 2015, 7(5): 74-80.
- [3] 刘寿荣, 黄文豹. 谷氨酰胺对急性肝功能不全大鼠的防治作用[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2015, 22(6): 508-510.
- [4] Pradelli L, Povero M, Muscaritoli M, et al. Updated cost-effectiveness analysis of supplemental glutamine for parenteral nutrition of intensive-care patients[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2015, 69(5): 546-551.
- [5] Stehle P, Kuhn KS. Glutamine: An obligatory parenteral nutrition substrate in critical care therapy[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 545467.

- [6] Jakopin M. Murabutide revisited; a review of its pleiotropic biological effects[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(16): 2068-2079.
- [7] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 66.
- [8] 王春, 向学熔, 杨鑫, 等. 盐酸小檗碱抑制人类黏膜成纤维细胞炎症反应的初步实验研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10): 1222-1223.
- [9] 张优琴, 江春霞, 王智巍, 等. 复发性口腔溃疡的临床治疗进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(35): 5030-5032.
- [10] Kalaev VN, Artiukhov VG, Nechaeva MS. Micronucleus test of human oral buccal epithelium; problems, progress and prospects[J]. *Tsitol Genet*, 2014, 48(6): 62-80.
- [11] 薛雅蓉, 庄重, 刘智慧. 设计利用现代科学仪器紧跟科学前沿的细胞生物学实验[J]. *实验技术与管理*, 2013, 30(6): 163-166.
- [12] Ivanov KP. Modern medical problems of energy exchange in humans[J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2013, 6(1): 56-59.
- [13] Bishop N. Clinical management of hypophosphatasia[J]. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2015, 12(2): 170-173.
- [14] 黄剑峰, 王佳鸣, 崔磊. 氨对人表皮角质细胞生长和代谢的影响[J]. *中国医药生物技术*, 2007, 2(2): 123-129.

(收稿日期: 2016-02-08 修回日期: 2016-03-15)