

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.002

来曲唑对睾丸间质细胞系 TM3 增殖、凋亡能力的影响及作用机制

王澍弘¹, 李行¹, 李晶², 李美材¹, 李晓霞¹, 龙腾博¹, 王顺德¹

(重庆三峡中心医院 1. 男性科; 2. 中心实验室, 重庆 404000)

[摘要] 目的: 研究来曲唑(letrozole, LE)对睾丸间质细胞系TM3增殖、凋亡能力和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路的影响。方法: 采用不同浓度的LE(1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理小鼠睾丸间质细胞TM3, 细胞计数(Cell Counting Kit-8, CCK-8)法检测细胞增殖。采用LE(100 $\mu\text{mol/L}$)和MAPK信号通路抑制剂APS-2-79(50 nmol/L)分别单独或联合作用于小鼠睾丸间质细胞TM3 48 h, CCK-8法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western印迹检测MAPK信号通路关键蛋白总细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylation of extracellular regulated protein kinases, p-ERK)的表达。结果: LE浓度在1.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 从作用的第24小时开始, 能够显著促进小鼠睾丸间质细胞TM3($P<0.05$), 具有时间和剂量依赖效应。小鼠睾丸间质细胞TM3培养48 h, LE组细胞的 OD_{450} 值显著高于对照组和LE+APS-2-79组($P<0.05$)。而APS-2-79组的细胞的 OD_{450} 值显著低于对照组($P<0.05$)。LE组细胞凋亡率显著低于对照组和LE+APS-2-79组($P<0.05$)。而APS-2-79组的细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$)。LE组ERK和p-ERK蛋白表达以及p-ERK与ERK比值显著高于对照组和LE+APS-2-79组($P<0.05$); 而APS-2-79组的ERK和p-ERK蛋白表达以及p-ERK与ERK比值显著低于对照组($P<0.05$)。结论: LE能够促进小鼠睾丸间质细胞TM3的增殖, 抑制其凋亡, 其作用机制可能与MAPK信号通路相关。

[关键词] 来曲唑; 增殖; 凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶信号通路

Effect of letrozole on the proliferation and apoptosis of TM3 in mesenchymal cell line of testis and its mechanism

WANG Shuhong¹, LI Hang¹, LI Jing², LI Meicai¹, LI Xiaoxia¹, LONG Tengbo¹, WANG Shunde¹

(1. Department of Andrology; 2. Central Laboratory, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract **Objective:** To study the effect of letrozole (LE) on the proliferation, apoptosis and mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway of interstitial cell line TM3. **Methods:** Testicular mesenchymal cells (TM3) of mice were treated with LE at different concentrations (1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$), and cell proliferation was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8). LE (100 $\mu\text{mol/L}$) and MAPK signal pathway inhibitor APS-2-79 (50 nmol/L)

收稿日期 (Date of reception): 2018-07-13

通信作者 (Corresponding author): 王顺德, Email: 635784196@qq.com

基金项目 (Foundation item): 重庆市卫生和计划生育委员会项目 (2016MSXM114). This work was supported by the Chongqing Health and Family Planning Commission Projects, China (2016MSXM114).

were alone or combined respectively in mouse leydig cells TM3 48 h, CCK-8 method to detect cell proliferation and flow cytometry to detect cell apoptosis, Western blot to test key protein ERK and p-ERK. **Results:** When LE concentration was 1.0–100.0 $\mu\text{mol/L}$, TM3 of mouse testicular stromal cells ($P<0.05$) could be significantly promoted from the 24th h of the effect, with time and dose dependent effect. Mouse testicular mesenchymal cells were cultured for 48 h, and the OD_{450} value of the cells in the LE group was significantly higher than that in the control group and the LE+ APS-2-79 group ($P<0.05$). The OD_{450} value of cells in APS-2-79 group was significantly lower than that of control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of cells in LE group was significantly lower than that in control group and LE+APS-2-79 group ($P<0.05$). The apoptosis rate of cells in APS-2-79 group was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). The expression levels of ERK and p-ERK, the ratio of p-ERK and ERK in the LE group were significantly higher than those in the control group and the LE+APS-2-79 group ($P<0.05$), while the expression levels of ERK and p-ERK, the ratio of p-ERK and ERK in the APS-2-79 group were significantly lower than those in the control group. **Conclusion:** LE can promote the proliferation of mouse testicular interstitial cells TM3 and inhibit its apoptosis, and its mechanism may be related to MAPK signaling pathway.

Keywords letrozole; proliferation; apoptosis; mitogen activated protein kinase signaling pathway

目前全世界大约有15%的育龄夫妇存在不育问题, 其中男性因素占不育症病因的50%以上, 且30%~40%的男性不育症通过常规的临床与实验室检查无法明确具体病因, 被归类为特发性男性不育^[1-2]。其病因和治疗方法尚未明确, 治疗困难。目前多采取经验性激素治疗、营养疗法和辅助生殖技术等治疗^[3]。而发展到睾丸生精功能障碍[促卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)>7.6 mU/mL或者病理切片提示生精功能阻滞的严重少精、无精子症患者], 目前对其病因研究相当欠缺, 尚无公认的有效药物和治疗手段。芳香化酶抑制剂近年来被应用于治疗男性特发性不育症^[4], 来曲唑(letrozole, LE)是一种非甾体类强效选择性第三代芳香化酶抑制剂, 为人工合成的茚三唑类衍生物^[5]。睾丸间质细胞产生并分泌睾酮, 以调节生精、全身代谢和第二性征^[6]。本研究主要观察LE对睾丸间质细胞系TM3增殖、凋亡能力的影响, 并检测MAPK信号通路中的相关蛋白, 以期为临床治疗特发性男性不育提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠睾丸间质细胞TM3购自中国科学院上海细胞研究所, LE购自美国MCE公司, 溶解于乙醇中用于后续试验。双缩脲反应法(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒, 电化学发光(electro-chemi-luminescence, ECL)显影剂等购自大连宝生物有限公司。鼠抗细胞外调节蛋白

激酶1(extracellular regulated protein kinases 1, ERK1), Ras单克隆抗体购自英国Abcam公司。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路抑制剂APS-2-79购自Selleck Chemicals美国公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

取小鼠睾丸间质细胞TM3, 调整细胞浓度至 1×10^5 接种于100 mm的细胞培养皿中, 用含150 mg/L L-glutamine, 1.5 g/L NaHCO_3 的DMEM/F-12培养基培养24 h, 然后用含5%马血清和2.5%优质胎牛血清的DMEM/F-12培养基培养, 培养条件为5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, 细胞处于对数期进行后续研究。

1.2.2 CCK-8法检测LE对小鼠睾丸间质细胞TM3增殖能力的影响

取传代一致的对数期小鼠睾丸间质细胞TM3, 调整细胞浓度至 5×10^4 接种于96孔板中, 每组设5个复孔, 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养24 h, 在各组中加入不同浓度(1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)的LE; 对照组加入等体积的乙醇。分别于加药后0, 24, 48, 72, 96 h加入细胞计数(Cell Counting Kit-8, CCK-8)溶液10 μL , 于37 $^\circ\text{C}$ 继续孵育2 h。酶标仪检测450 nm光密度值(OD_{450})。

1.2.3 MAPK信号通路在LE对小鼠睾丸间质细胞TM3增殖能力中的作用

取传代一致的对数期小鼠睾丸间质细胞TM3, 调整细胞浓度至 5×10^4 接种于96孔板中,

每组设5个复孔, 5%CO₂, 于37 °C培养24 h, 然后分组处理: 1)对照组, 2)LE(100 μmol/L)处理组, 3)LE(100 μmol/L)+APS-2-79(50 nmol/L)处理组, 4)APS-2-79(50 nmol/L)处理组, 处理48 h, 加入CCK-8溶液10 μL, 37 °C继续孵育2 h。酶标仪检测OD₄₅₀值。

1.2.4 MAPK 信号通路在 LE 对小鼠睾丸间质细胞 TM3 凋亡能力中的作用

取传代一致的对数期小鼠睾丸间质细胞 TM3, 调整细胞浓度至 1×10^5 接种于96孔板, 每组设5个复孔, 5% CO₂, 37 °C培养24 h, 然后分组处理: 1)对照组, 2)LE(100 μmol/L)处理组, 3)LE(100 μmol/L)+APS-2-79(50 nmol/L)处理组, 4)APS-2-79(50 nmol/L)处理组, 处理48 h, 取各组细胞加入PBS洗涤计数, 调整细胞浓度至 1×10^6 /100 μL, 放入流式管中, 分别加入Annexin PE/7-ADD, 于室温避光孵育15 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡能力, 实验重复3次。

1.2.5 Western 印迹检测 MAPK 信号通路总 ERK 和 p-ERK 的表达

收集1.2.3步骤处理的各组细胞, 然后加入裂解蛋白酶进行总蛋白提取。采用BCA试剂盒检测蛋白浓度, 调整浓度, 上样进行电泳, 结束后于4 °C转膜, 5%BSA封闭2 h, 加入一抗(鼠抗 ERK1/2, p-ERK)、二抗(羊抗鼠IgG)于37 °C孵育2 h, ECL显影后扫描, 蛋白相对表达量经内参校正后经Quantity-One软件分析, GAPDH作为内参。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析, 绘图采用GraphPad Prism 5.0, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LE 对小鼠睾丸间质细胞 TM3 增殖能力的影响

在培养24, 48, 72, 96 h后, 1, 10, 100, 1 000 μmol/L LE组细胞中的OD₄₅₀值均显著高于对照组($P < 0.05$), 且当LE浓度在1~100 μmol/L时, OD₄₅₀值随着LE浓度的增加而不断升高; 同一浓度下与0 h比较, OD₄₅₀值在24, 48, 72, 96 h均显著升高($P < 0.05$; 图1)。而100, 1 000 μmol/L对小鼠睾丸间质细胞TM3增殖能力影响差别不大, 后续研究选用LE浓度为100 μmol/L。

2.2 MAPK 信号通路在 LE 对小鼠睾丸间质细胞 TM3 增殖能力中的作用

小鼠睾丸间质细胞TM3培养48 h, LE组细胞OD₄₅₀值显著高于对照组和LE+APS-2-79组($P < 0.05$)。而APS-2-79组的细胞的OD₄₅₀值显著低于对照组($P < 0.05$, 图2)。提示MAPK信号通路参与小鼠睾丸间质细胞TM3的增殖过程, 且LE调节小鼠睾丸间质细胞TM3有可能是通过MAPK信号通路完成的。

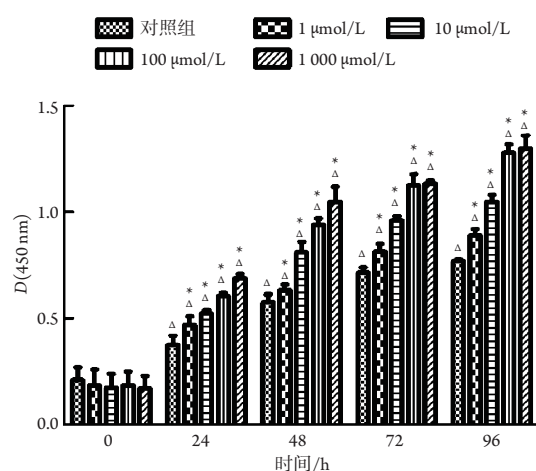


图1 LE对小鼠睾丸间质细胞TM3增殖能力的影响

Figure 1 Effect of LE on TM3 proliferation of mouse testicular mesenchymal cells

同一时间下, 与对照组比较, $*P < 0.05$; 同一浓度下, 与0 h比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

At the same time, compared with the control group, $*P < 0.05$; at the same concentration, compared with 0 h, $^{\Delta}P < 0.05$.

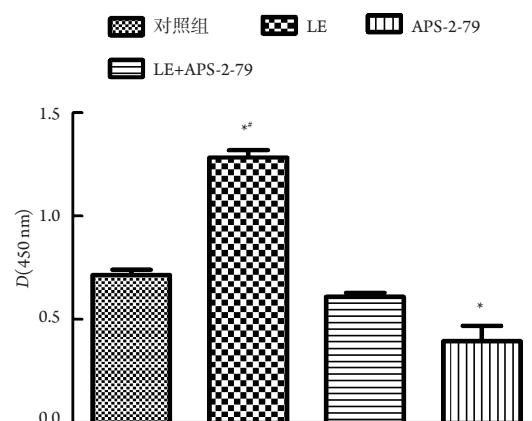


图2 LE和APS-2-79对小鼠睾丸间质细胞TM3增殖能力的作用

Figure 2 Effect of LE and APS-2-79 on TM3 proliferation of mouse testicular interstitial cells

与对照组相比, $*P < 0.05$; 与LE+APS-2-79组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

Compared with the control group, $*P < 0.05$; compared with the LE+APS-2-79 group, $^{\#}P < 0.05$.

2.3 MAPK 信号通路在 LE 对小鼠睾丸间质细胞 TM3 凋亡能力中的作用

LE 组细胞的凋亡率显著低于对照组和 LE+APS-2-79 组 ($P < 0.05$)。而 APS-2-79 组的细胞的凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图3)。

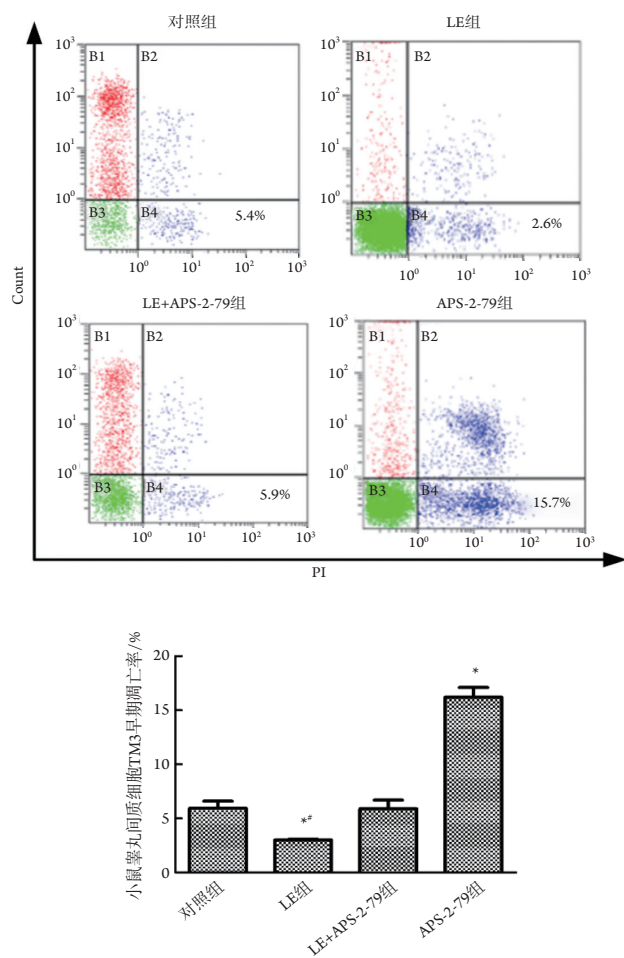


图3 LE和APS-2-79对小鼠睾丸间质细胞TM3凋亡能力的作用

Figure 3 Effect of LE and APS-2-79 on TM3 apoptosis of mouse testicular interstitial cells

与对照组相比, $*P < 0.05$; 与 LE+APS-2-79 组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

Compared with the control group, $*P < 0.05$; compared with the LE+APS-2-79 group, $^{\#}P < 0.05$.

2.4 LE 对 MAPK 信号通路总 ERK 和 p-ERK 水平以及 p-ERK 与 ERK 比值的影响

LE 组 ERK 和磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylation of extracellular regulated protein kinases, p-ERK) 蛋白表达以及 p-ERK 与 ERK 比值显

著高于对照组和 LE+APS-2-79 组 ($P < 0.05$), 而 APS-2-79 组的 ERK 和 p-ERK 蛋白表达水平以及 p-ERK 与 ERK 比值显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图4)。

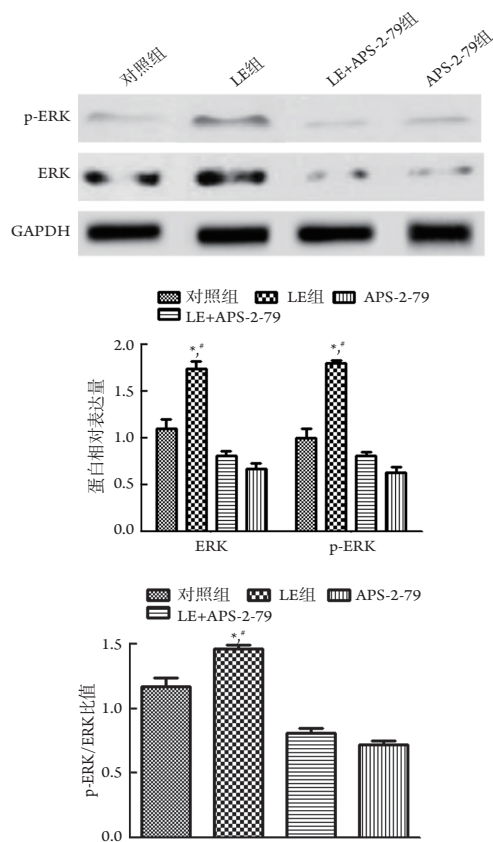


图4 LE调控小鼠睾丸间质细胞TM3增殖和凋亡过程中对MAPK信号通路相关蛋白总ERK和p-ERK水平以及p-ERK与ERK比值的影响

Figure 4 Effect of LE on total ERK and p-ERK levels and p-ERK and ERK ratio of MAPK signaling pathway related proteins during TM3 proliferation and apoptosis of mouse interstitial cells

与对照组比较, $*P < 0.05$; 与 LE+APS-2-79 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

Compared with the control group, $*P < 0.05$; compared with the LE+APS-2-79 group, $^{\#}P < 0.05$.

3 讨论

男性特发性不育是一种复杂的疾病, 主要由遗传因素和后天条件结合导致。精子的发生也是一个复杂的细胞过程, 主要分为3个阶段, 第一阶段是精原细胞增殖分裂期, 指精原细胞经过有丝增殖, 1个精原细胞增殖为64个, 此时成为初级精母细胞; 第二阶段是精母细胞减数分裂为精子细胞,

1个初级精母细胞经过减数分裂为2个次级精母细胞,每个次级精母细胞只携带原来染色体数目的一半;第三阶段是精子形成阶段,在上述细胞分裂的同时,继续发育,在形态上发生了复杂变化而成为有头有尾的精子,并进入管腔内。在这个过程中,精子的数量直接影响男性生育。精原体异常导致少生精、弱生精和精子异常^[7]。因此,如何扩大精子数量是男性不育症研究的一个重要课题。

2013年欧洲泌尿外科学会男性不育症诊疗指南^[8]推荐经验性治疗药物“抗雌激素药物”和“芳香化酶抑制剂”。抗雌激素药物(如雌激素受体调节剂他莫昔芬和克罗米芬)可提高睾丸内的T水平,刺激FSH的分泌,并促进精子发生,但因其同时也会升高雌激素水平而不利于精子生成,该类药物的疗效存在争议^[9]。芳香化酶抑制剂近年来逐渐被应用于治疗男性特发性不育症,期望降低这类患者生殖系统中的雌激素效应,尤其是减少雌激素对下丘脑-垂体-性腺(hypothalamus-pituitary-gonad, HPG)轴的反馈性抑制效应^[10]。LE作为芳香化酶抑制剂,Patry等^[11]在2009年首次采用LE治疗1例31岁的特发性非梗阻性无精子症患者。睾丸生精细胞凋亡受一系列基因的调控,包括促生精细胞凋亡的基因和抑制其凋亡的基因;同时睾丸间质细胞能够调节生精。Henriksen等^[12]将间质细胞的毒物二甲基磺基乙烷注射入成熟大鼠体内,结果显示间质细胞缺乏会导致生精细胞大量凋亡。本研究以小鼠睾丸间质细胞TM3作为研究对象,采用不同浓度(1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)的LE进行处理,结果显示:LE组细胞中的OD₄₅₀值均显著高于对照组($P < 0.05$),且当LE浓度在1~100 $\mu\text{mol/L}$ 时,OD₄₅₀值随着LE浓度的增加而不断升高,提示LE能够促进睾丸间质细胞的增殖。MAPK是一个高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,在增殖、分化、运动性、应激反应、凋亡和存活等基本细胞过程中发挥作用^[13]。有学者^[14]发现LE能够通过调节MAPK信号通路来抑制乳腺癌细胞MCF-7的增殖。本研究通过将LE和MAPK信号通路抑制剂APS-2-79分别单独或联合同时处理小鼠睾丸间质细胞TM3,结果显示:APS-2-79能够抑制LE对小鼠睾丸间质细胞TM3的增殖作用,促进其凋亡,且LE能够促进MAPK信号通路中关键蛋白ERK1和Ras蛋白的表达,提示LE调节小鼠睾丸间质细胞TM3增殖和凋亡的作用是通过MAPK信号通路实现的。

综上所述,LE能够促进小鼠睾丸间质细胞TM3的增殖,抑制其凋亡,其作用机制可能与

MAPK信号通路相关。本研究为临床诊断和治疗男性特发不育提供了新的靶点。

参考文献

- Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 660-680.
- Hamilton JA, Cissen M, Brandes M, et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system[J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(5): 1110-1121.
- Carrell DT, Aston KI, Oliva R, et al. The “omics” of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 363(1): 295-312.
- Chehab M, Madala A, Trussell JC. On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(3): 595-604.
- 白双勇, 王剑松, 赵庆华. 重组人生长激素联合来曲唑治疗肥胖男性少弱精子症疗效分析[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(3): 280-282.
BAI Shuangyong, WANG Jiansong, ZHAO Qinghua. Analysis of curative effect of recombinant human growth hormone combined with letrozole in the treatment of obese male oligospermia and asthenospermia[J]. *National Journal of Andrology*, 2015, 21(3): 280-282.
- 梁龙龙, 潘志强, 王晓敏, 等. 蛇床子素对TM3小鼠睾丸间质细胞增殖及雄激素合成与分泌的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 45-49.
LIANG Longlong, PAN Zhiqiang, WANG Xiaomin, et al. Effects of serpentine on proliferation of testicular interstitial cells and androgen synthesis and secretion in TM3 mice[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2017, 33(3): 45-49.
- 熊臣, 周游, 王慧, 等. GSTM1, GSTT1 基因多态性与亚洲男性特发性不育症易感性相关性Meta分析[J]. *中国性科学*, 2017, 26(8): 108-113.
XIONG Chen, ZHOU You, WANG Hui, et al. Correlation of the glutathione S-transferase gene polymorphism (GSTM1 and GSTT1) and the Asian male idiopathic infertility: a meta-analysis[J]. *The Chinese Journal of Human Sexuality*, 2017, 26(8): 108-113.
- 欧阳斌, 赵玉, 耿强. 《欧洲泌尿外科学会男性不育症诊疗指南(2013年版)》解读[J]. *生殖与避孕*, 2015, 35(1): 9-14.
OUYANG Bin, ZHAO Yu, GENG Qiang. Introduction to European Association of Urology (EAU) male infertility guidelines (2013)[J]. *Reproduction and Contraception*, 2015, 35(1): 9-14.
- 曾勇, 宋明哲, 赵明, 等. 性激素负反馈作用在男性不育诊疗中的应用[J]. *生殖医学杂志*, 2017, 26(8): 743-748.

- ZENG Yong, SONG Mingzhe, ZHAO Ming, et al. Application of negative feedback effect of sex hormones in male infertility diagnosis and treatment[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2017, 26(8): 743-748.
10. 杨瑞杰, 王新帅, 冯莹莹, 等. 绝经后激素受体阳性乳腺癌患者应用雌激素调节剂与第三代芳香化酶抑制剂疗效及安全性的Meta分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2017, 17(6): 669-676.
YANG Ruijie, WANG Xinshuai, FENG Yingying, et al. Meta-analysis of the efficacy and safety of estrogen modulator and third-generation aromatase inhibitor for post-menopausal hormone receptor positive breast cancer patients[J]. *Chinese Journal of Evidence-based Medicine*, 2017, 17(6): 669-676.
 11. Patry G, Jarvi K, Grober ED, et al. Use of the aromatase inhibitor letrozole to treat male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(2): 829.
 12. Henriksen K, Karsdal MA, Martin TJ. Osteoclast-derived coupling factors in bone remodeling[J]. *Calcif Tissue Int*, 2014, 94(1): 88-97.
 13. 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK信号通路研究进展[J]. *中国医药科学*, 2011, 1(8): 32-34.
CHEN Jianyong, WANG Cong, WANG Juan, et al. Research progress of MAPK signaling pathway[J]. *China Medicine and Pharmacy*, 2011, 1(8): 32-34.
 14. 曾子君, 赵坤婷, 廖宁. 来曲唑联合同期或序贯放疗对MCF-7细胞放射敏感性的影响[J]. *海南医学院学报*, 2013, 19(1): 53-57.
ZENG Zijun, ZHAO Shenting, LIAO Ning. Effects of letrozole combined with concurrent or sequential radiotherapy on the radiosensitivity of MCF-7 cells[J]. *Journal of Hainan Medical College*, 2013, 19(1): 53-57.

本文引用: 王澍弘, 李行, 李晶, 李美材, 李晓霞, 龙腾博, 王顺德. 来曲唑对睾丸间质细胞系TM3增殖、凋亡能力的影响及作用机制[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(10): 2063-2068. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.002

Cite this article as: WANG Shuhong, LI Hang, LI Jing, LI Meicai, LI Xiaoxia, LONG Tengbo, WANG Shunde. Effect of letrozole on the proliferation and apoptosis of TM3 in mesenchymal cell line of testis and its mechanism[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(10): 2063-2068. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.002