

L-NAME 对大鼠生精细胞 p53 表达的影响

石金凤¹, 谢远杰¹, 李美香¹, 龙治峰¹, 郑翔¹, 赵国军¹, 杜雅兰¹, 贺丽萍^{2*}

摘要:目的 探讨 NOS 抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)对隐睾下降固定术后生精细胞 p53 表达的影响。方法 将 75 只雄性 SD 大鼠建立单侧隐睾模型。术后 12d 将隐睾组大鼠随机分为假手术组、隐睾固定组、隐睾固定+生理盐水组、隐睾固定+L-NAME 组,建立隐睾下降固定模型。术后分别于腹腔内注射生理盐水或 L-NAME。术后第 12d 于腹腔内给药后 2h 大鼠尾部采血,取血清测定 NO 含量及 NOS 活性。术后第 24d 脱颈椎处死大鼠, TUNEL 原位末端标记法检测各组右侧睾丸生精细胞凋亡,免疫组化检测 p53 的表达。结果 隐睾固定+L-NAME 组血清中 NO 浓度、NOS 活性以及生精细胞凋亡率及 p53 的表达低于隐睾固定组和隐睾固定+生理盐水组 $P<0.05$, 差异有统计学意义,假手术组最低,低于其它各组($P<0.05$), 差异有统计学意义。结论 L-NAME 降低隐睾下降固定后 NO 的产生,降低 p53 的表达,减少生精细胞凋亡,提示 NOS 抑制剂能促进隐睾下降固定术后的睾丸提高生精能力。

关键词: L-NAME; p53; 生精细胞; 凋亡; 隐睾下降固定术

中图分类号: R697+.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)4-418-03

Effect of L-NAME on spermatogenic cell p53 in rats. SHI Jin-feng, XIE Yuan-jie, LI Mei-xiang et al. (Micromorphology Laboratory Center, University of South China, Hengyang 421001, Guangdong, P. R. China.)

Abstract: Objective To investigate the effect of L-NAME on spermatogenic cell p53 in rats with experimental orchidopexy. Methods Seventy-five immature male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: sham operation and cryptorchid. Unilateral cryptorchidism was surgically induced in the rats. On the 12th day after operation, the cryptorchid rats were randomly divided into three groups: orchidopexy, orchidopexy+normal saline, orchidopexy+L-NAME. Unilateral orchidopexy was surgically induced in the rats. The rats of orchidopexy+normal saline group and orchidopexy+L-NAME group were injected intraperitoneally normal saline and L-NAME(50mg/kg), respectively. The blood samples were collected for subsequent detection from the tail after injection two hours on the 12th day. The rats were sacrificed on the 24th days after the second operation. The level of spermatogenic cell apoptosis in testes was evaluated by TUNEL. The protein expression level of p53 in testes were detected by immunohistochemical assay. Results Serum NO concentration and the activity of NOS, the level of spermatogenic cell apoptosis and the protein expression level of p53 in rats with orchidopexy were higher than the rats with orchidopexy+L-NAME and with orchidopexy+normal saline, sham operation(the lowest group). Conclusion L-NAME injection could reduce the serum NO concentration, protein expression level of p53 and spermatogenic cell apoptosis in rats with experimental orchidopexy and it suggests the inhibitor of NOS can promote the enhancement of spermatogenic capability in rats with experimental orchidopexy.

Key words: L-NAME; p53; Spermatogenic cells; Apoptosis; Orchidopexy.

隐睾是最常见的男性性分化紊乱疾病,1 岁时发病率为 0.8%^[1]。目前对隐睾患者主要是尽早采取手术治疗即隐睾固定术,但手术并不能使所有的隐睾患者完全恢复正常的生育能力。我们实验室的前期工作表明,NO 是实验性隐睾生精细胞过度凋亡的重要因素,一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)抑制剂能有效抑制隐睾中生精细胞的凋亡,p53 是一种重要的凋亡促进因子,参与了生精细胞的凋亡过程。在正常组织中,NO 能通过消耗细胞内谷胱甘肽(Glutathione hormone, GSH)来激活 p53 的表达。本实验通过建立

隐睾下降固定模型,观察 L-NAME 对隐睾下降固定后生精细胞 p53 表达的影响,探讨隐睾固定术后生精细胞凋亡中 NO 与 p53 的关系。为从 NO 途径治疗由于生精细胞凋亡导致的不育和提高隐睾患者术后生育力提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 为 75 只 SD 雄性健康大鼠(15 日龄,由湖南农业大学实验动物部提供)。

1.1.2 试剂 NO 检测试剂盒、NOS 检测试剂盒(南

基金项目:衡阳市科技局项目(No.2011KJ5)

作者单位:1.南华大学组织学与胚胎学教研室,湖南 衡阳 421001;2.湖南师范大学医学院组织学与胚胎学教研室,湖南 长沙 410006

作者简介:石金凤(1977~),女,汉族,硕士,实验师,现从事生殖生物学方面的研究。

* 通讯作者 E-mail: liping0124@sohu.com

京建成生物工程公司)。TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自福州迈新生物工程公司。兔抗 p53、p63 单克隆抗体,免疫组化 SP 试剂盒(中杉金桥试剂公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立与处理 实验动物喂养 7d 后建立右侧隐睾模型。术后 12d 将隐睾组大鼠随机分为假手术组(15 只) 隐睾固定组、隐睾固定 + 生理盐水组、隐睾固定 +L- NAME 组(60 只),建立隐睾固定模型。术后第 24d 脱颈椎处死大鼠,取血清及双侧睾丸。

1.2.2 NO 含量及 NOS 活性检测 用硝酸还原酶法检测血清 NO 含量,采用化学比色法测定睾丸组织中 NOS 活性,操作方法按说明书进行。

1.2.3 TUNEL 法检测生精细胞凋亡 按照试剂盒说明书操作,光镜下胞核着棕黄色者为阳性细胞,即凋亡细胞。每个睾丸组织切片观察 10 个生精小管横断面,平均每个生精小管横断面的凋亡细胞数即为凋亡指数(Apoptosis Index, AI)。

1.2.4 免疫组化 SP 法检测 p53 蛋白 免疫组化 SP 法(操作步骤按 SP 试剂盒说明书),应用 GSM 图象处理系统计算阳性细胞平均灰度值(颜色越深,灰度值越小)。

1.3 统计处理 实验数据采用 SPSS10.0 进行统计,统计学分析采用 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

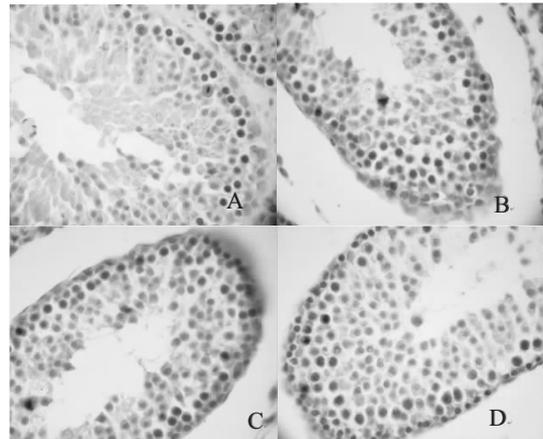
2 结果

2.1 NO 含量及 NOS 活性检测 隐睾固定组 NO 浓度 (60.59± 4.33)μ mol/L、NOS 活性 (27.62± 0.56) U/ml 和隐睾固定 + 生理盐水组大鼠血清 NO 浓度 (62.98± 4.01)μ mol/L、NOS 活性 (28.63± 0.57)U/ml 均较假手术组 NO 浓度(38.70± 5.65)μ mol/L 和 NOS 活性(16.53± 0.26)U/ml 和隐睾固定 +L- NAME 组 NO 浓度(40.16± 3.29)μ mol/L 和 NOS 活性(16.78± 0.47) U/ml 高(P<0.05);而隐睾固定 +L- NAME 组又高于假手术组(P<0.05)。

2.2 TUNEL 法对生精细胞凋亡的检测 如图 1 所示, A 组睾丸内均可见到胞核为棕黄色的凋亡的生精细胞,包括初级精母细胞和精原细胞,隐睾固定组 (14.58± 2.98)%和隐睾固定 + 生理盐水组 (15.45± 3.56)%睾丸生精小管内出现大量凋亡细胞,明显高于隐睾固定 +L- NAME 组 (9.68± 3.87)%和假手术组 (2.06± 1.02)% (P<0.05)。

2.3 免疫组化检测 p53 蛋白表达 如图 2 所示,免疫组化显示 p53 表达在生精小管的各级生精细胞胞质中,尤其是在精母细胞胞质。图中可见 p53 在隐睾

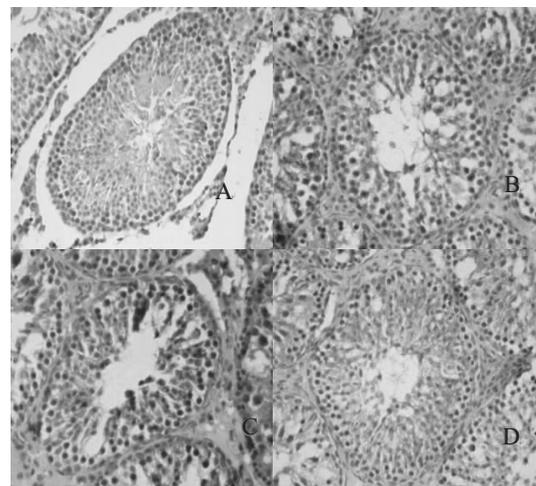
固定 +L- NAME 组(109.76± 9.16)中的表达比隐睾固定组 (97.96± 6.98) 和隐睾固定 + 生理盐水组 (98.06± 11.30)要弱而比假手术组(127.40± 16.59)要强,间质细胞中也有 p53 表达。



A: 假手术组 B: 隐睾固定组 C: 隐睾组 + 生理盐水组 D: 隐睾固定 +L- NAME 组
A: sham operation B: orchidopexy C: orchidopexy+normal saline D: orchidopexy+L- NAME

图 1 TUNEL 法对生精细胞凋亡的检测(× 400)

Fig 1 Spermatogenic cell apoptosis in testes measured by TUNEL (× 400)



A: 假手术组 B: 隐睾固定组 C: 隐睾组 + 生理盐水组 D: 隐睾固定 +L- NAME 组 A sham operation B orchidopexy C: orchidopexy+normal saline D orchidopexy + L- NAME

图 2 免疫组化 SP 法检测 p53 蛋白表达(× 400)

Fig2 The expression of p53 in tests measured by immunohistochemical assay(× 400)

3 讨论

NO 的作用效应是双向的,低浓度 NO 对很多组织器官起保护作用,而高浓度 NO 则促进细胞凋亡。NOS 广泛存在于睾丸、附睾、输精管等组织中[2]。我们的前期研究发现 NO 浓度升高是隐睾睾丸生精细胞凋亡增加的重要原因。

p53 基因是一种促凋亡基因,与细胞的生长、分化和死亡密切相关。在睾丸中 p53 也介导生精细胞的分裂和凋亡 p53 蛋白对温度敏感,温度改变时易发生点突变^[3]。p53 主要表达在各级生精细胞胞质中,尤其是在精母细胞胞质。

据许多文献报道,NO 诱导各种细胞产生凋亡的实验中 p53、Bcl-2 及 caspase-3 均显示变化。在 SNAP 与血管平滑肌细胞共同培养并导致凋亡的实验中发现 p53 的表达迅速升高并在 24h 后达到峰值,Bcl-2 的表达则在 12h 后开始降低。有研究表明在 NO 调节 p53 表达的过程中,谷胱甘肽发挥了中介作用,谷胱甘肽—主要是还原型谷胱甘肽,是细胞内的抗氧化剂,可保护细胞不受氧自由基的伤害,有研究者用 LPS 和 SNP 提供内源性和外源性 NO,并在它对血管平滑肌(VSM)影响的研究中发现,NO 在诱导血管平滑肌细胞凋亡的同时,还显著降低细胞内的还原型谷胱甘肽浓度(下降约 40%),但 p53 的 mRNA 水平升高。当加入谷胱甘肽单乙酯—一种可自由进入细胞的还原型谷胱甘肽,则胞内 GSH 水平升高(比对照组高 1 倍以上),并且能阻止 NO 对 p53 表达的诱导和 VSM 的凋亡^[4]。Wakulich 等用多种方法诱导 NO 并与小鼠胃粘膜共培养,发现 NO 引起的细胞死亡伴随着 GSH 的消耗和活性氧代谢物的增加,而在小鼠体内用 Buthionine sulfoximine 处理或在体外用 Diethylmaleate 处理则减少 GSH 存储进而加剧 NO 导致的细胞死亡并提高了氧化产物的量^[5]。从实验中似乎可以得到这样一种模式:NO 消耗胞内 GSH,而 GSH 的减少又导致 p53 的激活。NO 活泼的化学性质在这种模式中发挥了作用—它和它的代谢产物都是较强的氧化剂,正是它们耗尽了还原型的 GSH。

本实验研究结果发现 隐睾固定 + 生理盐水及隐睾固定组血清中 NO 浓度、NOS 活性以及生精细胞凋亡率最高,隐睾固定 +L-NAME 组则高于假手术组而低于隐睾固定 + 生理盐水及隐睾固定组。免疫组化检测发现 p53 表达在生精细胞胞质中,在隐睾固定 +L-NAME 组中的表达比隐睾固定 + 生理盐水及隐睾固定组弱,在假手术组中最弱。说明隐睾下降固定后 NOS 活性降低但仍比正常高,局部高浓度的 NO 刺激 p53 的表达,引起生精细胞凋亡增加。L-NAME 能通过减少 NO 的产生降低 p53 的表达,减少生精细胞的凋亡。p53 的高表达是导致生精细胞仍然过度凋亡的重要原因。这为临床隐睾患者术后生育力的研究提供了新的实验依据。

参考文献:

- [1] Yutaka K, Tomomoto I, Kohei Y, et al. Oral Administration of Tetrahydrobiopterin Attenuates Testicular Damage by Reducing Nitric Oxide Synthase Activity in a Cryptorchid Mouse Model [J]. *Androl*, Mar 2008 (29): 153 - 163.
- [2] Burnett AL, Ricker DD, Tillman SL, et al. Localization of Nitric Oxide Synthase in the reproductive organs of the male rat [J]. *Biol Reprod*, 1995, 52(1): 1-7.
- [3] Lin M, Andreas S, Dawid W, et al. Hsp90 Regulates the Activity of Wild Type p53 under Physiological and Elevated Temperatures [J]. *Biol. Chem*, Nov 2004 (279): 48846-48854.
- [4] Cook T, Wang ZF, Alber S, et al. Nitric Oxide and Ionizing Radiation Synergistically Promote Apoptosis and Growth Inhibition of Cancer by Activating p53 [J]. *Cancer Res*, Nov 2004 (64): 8015- 8021.
- [5] Aquilano K, Baldelli S, Cardaci S, et al. Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells [J]. *Cell Sci*, Apr 2011 (124): 1043-1054.

收稿日期 2011-12-06 编辑 谢永慧

(上接第 417 页)

(周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 重庆: 科学技术出版社重庆分社, 1987.)

- [9] Lu YM, He L, Wu WY, et al. Surveillance and analysis of drug-resistant *Staphylococcus aureus* in Shenzhen [J]. *Journal of Guangdong Medical college*, 2004, 20(5): 463-465. (In Chinese). (卢月梅, 何林, 吴伟元, 等. 深圳地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性监测与分析[J]. *广东医学院学报*, 2004, 20(5): 463-465.)
- [10] Li HY, Pan KY, Wu XQ, et al. Change and treatment strategies of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Chin Physician*, 2005, 7(9): 1272-1273. (In Chinese) (李红玉, 潘昆贻, 伍锡泉, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药变

迁及治疗对策[J]. *中国医师杂志*, 2005 (9): 1272-1273.)

- [11] Zuo GY, Wang LJ, Zhao JF, et al. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *J Ethnopharmacology* 2008, (120): 287-290.
- [12] Zuo GY, Meng FY, Hao XY, et al. Antibacterial Alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (Papaveraceae) against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2008, 11(4): 90-94.

收稿日期 2012-02-15 编辑 邢翀