

睾酮对大鼠再生肝细胞核仁组织区影响的初步研究*

李恩中 宁黔冀** 李超堃

(河南师范大学生命科学院 新乡 453002)

摘要: 以银染核仁组织区 (argyrophil nucleolar organizing regions, AgNORs) 阳性颗粒数为指标, 结合放射免疫技术, 研究了大鼠部分肝切除 (partial hepatectomy, PH) 后, 睾酮对余留肝细胞核仁组织区的影响。结果显示, PH 后 0 ~ 24 h, 各种方式 (假手术、皮下注射芝麻油或睾酮) 处理组, AgNORs 数都下降, 随后持续升高。在 PH 后 48 h 和 72 h, 低剂量 (0.5 mg/kg 体重) 睾酮对 AgNORs 数影响最显著, 都明显高于其它两个睾酮处理组; 中等剂量 (2.5 mg/kg 体重) 和高剂量睾酮 (5 mg/kg 体重) 处理对 AgNORs 数的影响与芝麻油处理组相比都无显著差异, 但均高于假手术组; 假手术后 72 h 的 AgNORs 恢复到术前水平。血清睾酮含量测定显示, 芝麻油处理组 PH 后 0 ~ 48 h 睾酮持续下降, 48 h 后不再下降, 48 h 和 72 h 时的睾酮浓度显著低于假手术组; 低剂量处理, 血清睾酮浓度在 PH 后 0 ~ 24 h 下降, 然后持续上升, 在 48 h、72 h 达到假手术组的 2 ~ 3 倍; 中等剂量和高剂量处理组, 血清睾酮在 PH 后 0 ~ 72 h 持续升高, 是假手术组的 6 ~ 7 倍。以上结果初步表明, 睾酮对 PH 后肝细胞中 AgNORs 的影响有两种情况: (1) 在血清中的浓度是生理水平的 2 ~ 3 倍时, 起促进作用; (2) 6 ~ 7 倍于生理水平时, 基本无作用。

关键词: 大鼠; 部分肝切除; 睾酮; 核仁组织区

中图分类号: Q459, R335.5, Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)06-82-05

Effect of Testosterone on Nucleolar Organizer Regions in Regenerating Hepatocytes in Rat: a Preliminary Study

LI En-Zhong NING Qian-Ji LI Chao-Kun

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The effect of testosterone on nucleolar organizer regions in rat regenerating hepatocytes after partial hepatectomy (PH) was studied by using Argyrophil nucleolar organizing regions (AgNORs) as the end point. The results indicated that the number of AgNORs decreased in both sham-hepatectomized rats and hepatectomized rats treated with testosterone or sesame oil replacement during 0 - 24 h after operation. After 24 h, the number of AgNORs increased constantly. Treatment with exogenous testosterone at a low dose (0.5 mg/kg body weight) had the most remarkable influence on AgNORs number in all groups, and the AgNORs number in low-dose testosterone treated group was significantly higher than that of two testosterone-treated groups at 48 h and 72 h post partial hepatectomy. No significant difference was observed when compared middle- or high-dose (2.5 or 5 mg/kg body weight) testosterone treated group to sesame oil treated group, while the number of AgNORs in all three groups was higher than that of

* 河南省自然科学基金 (No. 2001180009), 河南省高校青年骨干教师资助计划 (2001-95);

** 通讯作者;

第一作者介绍 李恩中, 男, 32 岁, 硕士研究生, 讲师; 研究方向: 哺乳动物内分泌; E-mail: enzhongli@hotmail.com.

收稿日期: 2004-04-20, 修回日期: 2004-09-21

sham-operated rats. The AgNORs number in sham-operated rats at 72 h declined to that at 0 h. Measurement of serum testosterone indicated that testosterone in sesame oil-treated rats declined constantly during 0 - 48 h following PH (from 2.64 ± 1.08 at 0 h to 1.02 ± 1.05 at 48 h), and the concentration was lower than that in sham-operated rats at 48 h and 72 h after hepatectomy. In low-dose-testosterone-treated rats, testosterone concentration decreased during 0 - 24 h after PH, then increased constantly and reached 2 - 3 folds of that of sham-operated animals at 48 h and 72 h. These results suggest that there are two different effects of testosterone on transcriptional activity of regenerating hepatocytes in rat following PH. When the serum testosterone concentration is 2 - 3 times of the physiological level, it facilitates transcriptional activity; while when serum testosterone concentration reaches 6 - 7 times of the physiological level, it has no evident effect on transcriptional activity

Key words: Rat; Partial hepatectomy (PH); Testosterone; Nucleolar organizer regions

近十多年来,很多作者报道了雌激素对肝再生的影响,但有关雄激素对肝作用的研究却远比雌激素少,且观点不一。Christopher等发现,PH和假手术均引起大鼠血清睾酮浓度降低^[1],认为睾酮与肝再生并无多大关系。另有资料表明,雄激素在化学致癌所致肝再生中起允许、辅助等间接作用^[2-4]。还有一种观点认为雄激素对肝再生起促进作用,经去氢表雄酮处理的大鼠,在PH后24h和36h,增殖细胞核抗原(PCNA)明显高于未处理大鼠^[5]。Yamaguchi等也发现,SD大鼠在PH后0~6h,PCNA与外源去氢表雄酮浓度呈正相关^[6]。Ledda-Columbano等的研究结果也表明,生理水平的睾酮能刺激小鼠肝细胞分裂^[7]。核仁组织区相关嗜银蛋白银染颗粒(AgNORs)的多少与细胞转录活性密切相关^[8],广泛应用于肿瘤细胞和正常细胞的鉴别^[9],但用于肝再生研究的报道很少。本文以雄性SD大鼠为材料,以AgNORs为指标,结合放射免疫技术,初步探讨了睾酮对PH后残留肝细胞的影响,为深入揭示雄激素在肝再生过程中的作用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 2月龄雄性SD大鼠(SPF级,体重180~220g,由河南师范大学动物房提供)120只,笼内饲养,自由取食,室内温度(23 ± 2)℃,光照周期12h:12h(7:00 am~7:00 pm光照)。将动物随机分为3组:Ⅰ.处理组(72只);Ⅱ.处理对照组(24只);Ⅲ.假手术对照组(24只)。其中处理组又分为3个小组(24只/组),分别注射0.5、2.5和5.0 mg/kg体重等3种不同剂量的睾酮。

1.2 试剂与仪器 盐酸睾酮(人用,购自上海通用药业股份有限公司);睾酮放射免疫试剂盒(人用,购自北京北方生物技术研究所);其它试剂均为分析纯。 γ -计数器(美国Packard Instrument Company产品)。

1.3 实验方法

部分肝切除:PH按Higgins和Anderson介绍的方法

进行^[10]。处理组的3个小组分别在PH的同时,皮下注射不同剂量的睾酮,每天一次,直至动物被处死;对照组注射芝麻油(40 μ l/只);假手术组不作任何处理,只在腹部切口,轻轻挤出肝脏再放回,然后缝合伤口。各组动物均在手术后的0、24、48、72h分批处死,每批4~6只,去眼球采血,剖腹取肝。处死前禁食12h。所有手术及注射均在8:00 am~10:00 am完成。

血清睾酮含量的测定:将采集的血样放入4℃冰箱静置6h,低温离心后取血清(-20℃保存)。测定前,将试剂盒及血清从冰箱内取出,平衡至室温。按睾酮放射免疫试剂盒说明,采用¹²⁵I放射免疫法, γ -计数器测定血清睾酮含量[测定范围:0.1~20 ng/ml;灵敏度:0.02 ng/ml;精密密度:变异系数(coefficient of variation, CV) < 10%],每个样品重复测定两次,数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示。对数据进行统计学分析,t-检验确定差异的显著性。

核仁组织区的统计:采用核仁组织区(nucleolar organizing regions, NORs)银染色法^[9]。将所取肝脏按常规石蜡切片方法固定、洗涤、包埋、切片(片厚7 μ m),每隔20张取1张,用银染一步法显示核仁组织区(黑色颗粒),染色方法为:二甲苯脱蜡、复水后入酸化液(36%冰醋酸:无水乙醇=1:3)酸化6min,蒸馏水冲洗3~4次,然后入胶银工作液(2g明胶加入到1%甲酸配成2%溶液,临用前与50%硝酸银溶液1:2混合)室温避光反应30min,5%硫代硫酸钠水溶液脱色1~2min,蒸馏水冲洗3次,梯度酒精脱水后封片。40倍镜检,统计细胞核内AgNORs数目。统计方法:随机选取几个肝小叶,从中央静脉到门管区连续选择进行视野统计。各时期的材料都统计600个细胞核,并以“颗粒数/细胞核”表示。所有数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,U检验对数据进行统计学分析。

2 结 果

2.1 大鼠PH后血清睾酮的变化 应用放射免疫分析

方法测定了各组大鼠在 PH 后不同时间血清中的睾酮浓度,结果显示(图 1):芝麻油处理组睾酮含量在 PH 后 0~48 h 持续下降,由 2.46 ± 1.08 (0 h) 下降到 0.51 ± 0.49 (48 h),到 72 h (0.80 ± 0.75) 已略有回升;假手术后睾酮浓度略有变化,变化范围为 1.86 (0 h) ~ 3.35 ng/ml (72 h),并无统计学意义。芝麻油处理组与假手术组相比,前者下降幅度明显大于后者;尤其在 48 h 和 72 h 时,芝麻油处理组血清睾酮含量明显低于假手术组 ($P < 0.05$),说明 PH 可导致血清睾酮下降。

不同剂量的外源睾酮处理后,血清睾酮含量的变化趋势略有不同。低剂量 (0.5 mg/kg 体重) 时,血清睾酮浓度在 PH 后 0~24 h 下降,之后持续上升,在 48 h 和 72 h 分别达到 4.31 ± 1.08 和 7.86 ± 1.31 ,显著高于假手术组和芝麻油处理组 ($P < 0.05$),达到假手术组的 2~3 倍;中等剂量 (2.5 mg/kg 体重) 和高剂量 (5 mg/kg 体重) 处理后,血清睾酮含量在 PH 后 0~72 h 持续升高,在 48 h 和 72 h 时,分别达到 15.03 ± 0.91 和 19.69 ± 1.21 ,明显高于假手术组和芝麻油处理组 ($P < 0.01$),是假手术组的 6~7 倍。

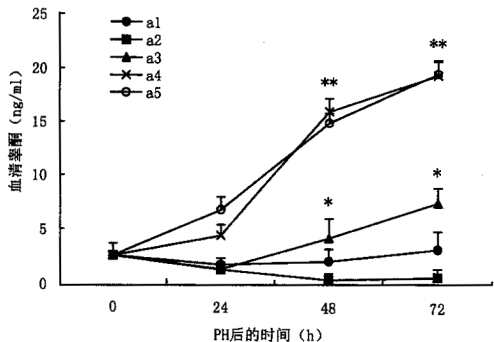


图 1 PH 后不同时间,大鼠血清睾酮含量的变化

a1: 假手术; a2: 芝麻油; a3: 0.5 mg/kg 体重睾酮;
 a4: 2.5 mg/kg 体重睾酮; a5: 5 mg/kg 体重睾酮。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 均与同一时刻的 a1 相比。

2.2 睾酮对核仁组织区的影响 银染一步法显示核仁组织区,PH 后 48 h,各组大鼠 AgNORs 颗粒的染色见图版 I。AgNORs 的统计结果显示(图 2);各组变化趋势相仿,即 PH 后 24 h 下降到最低点,之后持续升高。假手术组在 72 h 时恢复到术前水平;芝麻油处理组在 PH 后 48 h 和 72 h 显著高于假手术组 ($P < 0.05$)。

低剂量睾酮处理组在 PH 后 48 h、72 h, AgNORs (分别为 3.19 ± 1.50 和 3.65 ± 1.46) 都明显高于相应的芝麻油处理组 (2.72 ± 1.32 和 3.22 ± 1.43) ($P < 0.05$);而中等剂量处理组,48 h、72 h 时与芝麻油处理组无差别;高剂量睾酮处理组,在 48 h (2.80 ± 1.16) 略高于芝麻油处

理组,在 72 h (3.13 ± 1.35) 略低于芝麻油处理组,但均无统计学意义。

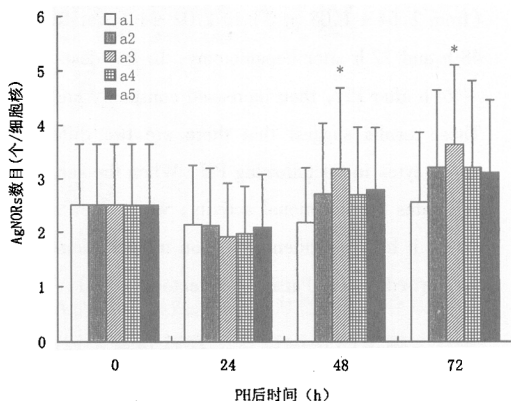


图 2 PH 后不同时间,各组 AgNORs 数目的变化

a1: 假手术; a2: 芝麻油; a3: 0.5 mg/kg 体重睾酮;
 a4: 2.5 mg/kg 体重睾酮; a5: 5 mg/kg 体重睾酮。
 除假手术组之外,每组各点都显著差别于其前一时间点 ($P < 0.05$), * $P < 0.01$ 分别在 48 h 和 72 h 与 a2 相比。

3 讨论

目前,一些研究结果均显示 PH 会导致血清睾酮下降^[1,4,11],所以采取外源注射同时测定血清睾酮水平方法,研究 PH 后肝再生与血清睾酮的关系。本文结果也显示 PH 会导致血清睾酮下降(图 1: a2)。但 2.5 mg/kg 体重和 5.0 mg/kg 体重的外源睾酮处理后,血清睾酮浓度在 PH 后却持续升高,是由于高剂量睾酮处理引起体内睾酮大幅度提高,从而掩盖了由 PH 导致的睾酮浓度下降。睾酮对肝再生的影响十分复杂,Christopher 等研究发现,雄性 Wistar 大鼠在 PH 和假手术后,血清睾酮浓度都降低,但无显著性差异^[1],认为睾酮与肝再生无多大关系;Francavilla 等的工作显示,PH 后 SD 大鼠血清睾酮下降,直到 72 h 仍显著低于 0 h,认为睾酮对肝再生不起促进作用^[11];有人发现外源去氢表雄酮处理可显著提高 PH 后 SD 大鼠 PCNA 的表达率^[5,6],显示雄激素对肝再生有促进作用。

用于肝再生研究的指标有多种,本文采用的是核仁组织区银染显色法。该法所染色的是核仁组织区内与 rDNA 转录有关的一种酸性蛋白^[12],AgNORs 越多,提示该蛋白的活性越高,单位细胞核内嗜银颗粒 (AgNORs/细胞核) 的多少就反映了 rDNA 转录活性的高低,与细胞的增殖有关^[8]。在肿瘤研究中,常用于鉴别肿瘤的恶性程度或用于区别肿瘤与正常组织^[9,13,14]。肝脏大部切除后的代偿性再生与细胞瘤变相似——都引起细胞增殖。因此,AgNORs 也可作肝脏再生的指标。

在手术过程中,既有剖腹手术,又有 PH 手术,为排除剖腹手术的影响,以假手术作为正常对照组。手术后 0~72 h,假手术组血清睾酮含量在 1.86~3.35 ng/ml 之间变动,但各点并无显著差异,认为此即大鼠血清睾酮的生理变动范围,而且也说明剖腹手术对血清睾酮水平影响不大。而 PH 后,芝麻油注射组血清睾酮下降,48 h、72 h 都低于生理水平(即假手术组血清睾酮含量)($P < 0.05$),说明这是 PH 手术引起的,该结果与 Franvilla 等的相同^[11]。

本文结果显示,外源注射不同剂量睾酮,虽然每组大鼠血清睾酮含量的变化与其相应的 AgNORs 数目的变化趋势基本一致,但在 PH 后 48 h 及 72 h,低剂量处理组血清睾酮含量(是生理剂量的 2~3 倍)显著低于另两个睾酮处理组的血清睾酮水平(6~7 倍于生理剂量),而其 AgNORs 数目却明显高于它们,且明显高于芝麻油注射组,显示略高于生理剂量(即 $P < 0.05$)时,睾酮对肝细胞的转录活性起促进作用;在 PH 后各时间点,中等剂量和高剂量睾酮处理组之间相比 AgNORs 均无显著不同,与芝麻油注射组相比也无明显差异,提示该浓度的睾酮对肝细胞的转录活性基本无作用。以上结果初步表明,睾酮对 PH 后余留肝细胞转录活性的影响分二种情况:(1)在血清中的浓度达到生理水平的 2~3 倍时,起促进作用;(2)6~7 倍于生理水平时,基本无作用。

睾酮对肝再生的影响十分复杂,对其作用机制的研究报道较少。有资料表明,去氢表雄酮可作为过氧化物酶体增殖因子引起肝细胞 DNA 复制^[5];另外,体内睾酮可以转化为雌激素,所以可能通过雌激素对肝再生起间接作用。至于通过何种机制影响余留肝细胞转录活性还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Christopher L, Michael M, Geoffrey C F. Effect of liver regeneration on hepatic cytochrome P450 isozymes and serum sex steroids in the male rat. *Gastroenterology*, 1989, **96**(3): 864~872.
- [2] Warwick G P. Metabolism of liver carcinogens and other factors

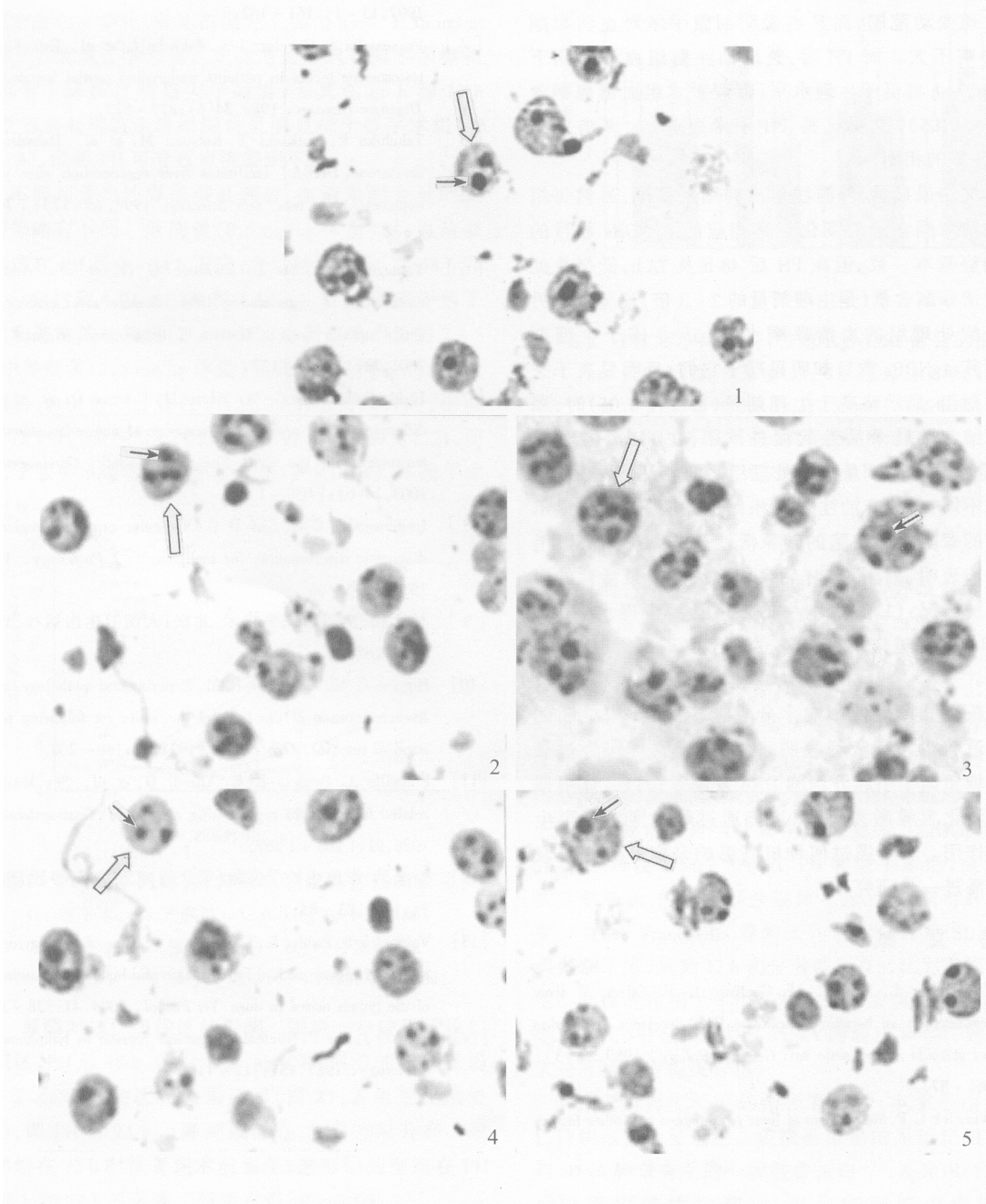
- influencing liver cancer induction. In: *Liver Cancer*. Lyon: International Agency For Research on Cancer, 1971, 121~157.
- [3] 曾民德, 萧树东. 肝脏与内分泌. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 13~14, 161~162.
- [4] Francavilla A, Gavalerr J S, Makiwka L, et al. Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy. *Digestive Diseases*, 1989, **34**(6): 818~822.
- [5] Takehiko K, Katsuaki T, Katsumi M, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) facilitates liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Life Sciences*, 1999, **65**(17): 1747~1756.
- [6] Yamaguchi M, Yu L, El-Assal O N, et al. Androgen metabolism in regenerating liver of male rats: evidence for active uptake and utilization of testosterone. *Hepatol Res*, 2001, **20**(1): 114~127.
- [7] Ledda-Columbano G M, Pibiri M, Concas D, et al. Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP. *Carcinogenesis*, 2003, **24**(6): 1059~1065.
- [8] Underwood J C E, Giri D D. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathology*, 1988, **155**(2): 95~96.
- [9] 杜卓民. 实用组织学技术. 北京: 人民卫生出版社, 1998, 260~262.
- [10] Higgins G M, Anderson R M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931, **12**: 186~202.
- [11] Franvilla A, Patricia K E, Alfredi D, et al. Sex hormone-related functions in regenerating male liver. *Gastroenterology*, 1986, **91**: 1263~1267.
- [12] 杨汉民. 细胞生物学实验(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1993, 83~85.
- [13] Vajdovich P, Psáder R, Tóth Z A, et al. Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Vet Pathol*, 2004, **41**: 338~345.
- [14] Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathology*, 1987, **151**: 111~118.

李恩中等: 睾酮对大鼠再生肝细胞核仁组织区影响的初步研究

图版 I

LI En-Zhong *et al.*: Effect of Testosterone on Nucleolar Organizer Regions in Regenerating Hepatocytes in Rat: A Preliminary Study

Plate I



PH 后 48 h 各处理组大鼠再生肝细胞 AgNORs。图中空心箭头所指为细胞核, 实心箭头所指为 AgNORs

- 1. 假手术组 PH 后 48 h AgNORs(实心箭头) × 200;
- 2. 芝麻油注射组 PH 后 48 h AgNORs(实心箭头) × 200;
- 3. 低剂量睾酮(0.5 mg/kg 体重)PH 后 48 h AgNORs(实心箭头) × 200;
- 4. 中等剂量睾酮(2.5 mg/kg 体重)PH 后 48 h AgNORs(实心箭头) × 200;
- 5. 高剂量睾酮(5.0 mg/kg 体重)PH 后 48 h AgNORs(实心箭头) × 200