

邓伟,金亮子,奎秀莹,等. 树鼩睾丸间质细胞的分离培养及寨卡病毒感染特性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (6): 48-54.

Deng W, Jin LZ, Kui XY, et al. Isolation and culture of Leydig cells from tree shrews and studies on the characteristics of Zika virus infection [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 48-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.007

树鼩睾丸间质细胞的分离培养及寨卡病毒感染特性的研究

邓伟^{1,2},金亮子^{1,3},奎秀莹¹,王文广¹,李娜¹,全品芬¹,代解杰^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所,昆明 650031;2. 云南大学生命科学学院,昆明 650091;
3. 昆明医科大学,昆明 650500)

【摘要】 目的 建立树鼩原代睾丸间质细胞分离培养方法,探究寨卡病毒(Zika virus,Zikv)对该细胞的感染特性,为 Zikv 感染导致的睾丸损伤及不育提供研究基础。**方法** 3 月龄的雄性树鼩 0.4 mL 3%戊巴比妥钠麻醉处死后采集睾丸,采用 IV 胶原酶和胰蛋白酶联合消化法获得单细胞悬液,通过 percoll 密度梯度离心结合差异贴壁法对细胞进行纯化,3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -HSD)对细胞荧光染色鉴定,ELISA 检测细胞分泌睾酮的能力;用 Zikv 感染树鼩睾丸间质细胞,并用对寨卡病毒易感的非洲绿猴肾细胞(Vero)作为对比参照,测定感染不同时间点的细胞及其培养上清液中病毒载量,镜下观察细胞病变,ELISA 检测睾酮含量。**结果** 分离培养的睾丸间质细胞经 3 β -HSD 鉴定阳性率高达 98%以上,且增殖迅速,能够连续分泌睾酮,第 4 代睾丸间质细胞在 0~24 h 和 24~48 h 睾酮分泌量分别为 1.253 ng/mL 和 1.163 ng/mL;用 Zikv 感染树鼩睾丸间质细胞,6 h 内病毒拷贝数可达 2.15 $\times 10^5$ copies/mL,且感染 48 h 后基本丧失睾酮分泌能力,感染第 3 天可见明显的细胞病变。**结论** 成功建立树鼩睾丸间质细胞的分离培养方法,Zikv 可感染树鼩睾丸间质细胞并能导致该细胞睾酮分泌功能缺失,为 Zikv 入侵生殖系统机制研究提供基础。

【关键词】 树鼩;睾丸间质细胞;3 β -HSD;睾酮水平;Zikv

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0048-07

Isolation and culture of Leydig cells from tree shrews and studies on the characteristics of Zika virus infection

DENG Wei^{1,2}, JIN Liangzi^{1,3}, KUI Xiuying¹, WANG Wenguang¹, LI Na¹, TONG Pinfen¹, DAI Jiejie^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650031, China. 2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091.
3. Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To establish a method for the isolation and culture of primary Leydig cells in tree shrew, to explore the infection characteristics of Zika virus (Zikv) on these cells, and to provide a basis for research on the damage and sterility of testis caused by Zikv infection. **Methods** A 3-month-old male tree shrew was sacrificed with 0.4 mL of 3% sodium pentobarbital anesthetized and the testis was collected. A single-cell suspension was obtained by combined digestion

[基金项目] 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);昆明市科技创新团队(2019-1-R-24483)。

[作者简介] 邓伟(1996—),男,硕士研究生,研究方向:病原生物学。E-mail: 1639817334@qq.com

[通信作者] 代解杰(1961—),男,研究员,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立与应用研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

with collagenase IV and trypsin. After purification, cells were identified by fluorescent staining with 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and the ability of cells to secrete testosterone was detected by ELISA. Tree shrew Leydig cells were infected with Zikv, as were kidney cells from African green monkeys susceptible to Zika virus for comparison. The viral loads in the cells and their culture supernatants at different time points of infection were determined, cytopathic changes were observed under a microscope, and testosterone content was determined by ELISA. **Results** The positive rate of isolated and cultured Leydig cells identified by 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase was as high as 98%. They proliferated rapidly and continuously secreted testosterone. The forth-generation Leydig cells secreted 1.253 and 1.163 ng/mL testosterone at 0~24 h and 24~48 h, respectively. Upon infection of Leydig cells of tree shrew with Zikv, the virus copy number reached 2.15 $\times 10^5$ copies/mL within 6 h, the cells' ability to secrete testosterone was basically lost after 48 h of infection, and cytopathic effects were seen on the third day of infection. **Conclusions** A method for isolating and culturing Leydig cells from tree shrew was successfully established. The findings showed that Zikv could infect Leydig cells of tree shrew and lead to the loss of their testosterone secretion function, providing a basis for research on the mechanism by which Zikv affects the reproductive system.

【Keywords】 tree shrew; Leydig cell; 3 β -HSD; testosterone level; Zikv

寨卡病毒(Zika virus, Zikv)为单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒的一种,研究表明 Zikv 感染可导致睾丸发生炎症,引起睾丸内部结构受损及细胞大量死亡^[1],对男性生殖健康带来潜在威胁。研究发现 Zikv 感染可导致小鼠睾丸间质充血、睾酮水平下降、睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)产生大量炎症因子及趋化因子,说明 LCs 与 Zikv 感染睾丸密切相关,但具体感染机制尚不明确。

LCs 主要分布于生精小管之间,是睾丸主要细胞类型之一^[2],在毒理学、药理学及生殖遗传学等研究方面具有十分重要的应用意义,是睾丸中唯一能够分泌睾酮的细胞^[3],可促进精子的发生和男性生殖器官发育,以及维持第二性征和性功能,大约 95% 的雄性激素由其分泌^[4]。研究发现 LCs 数量缺少会导致雄性激素缺乏^[5],体外分离培养纯度高、活性强的 LCs 可更好的研究其相关机制和特性。

LCs 占睾丸细胞总数的 2%~4%^[6],数量较少且纯化难度较大,目前对于 LCs 的分离培养主要有机械分离法^[7]、组织块贴壁法^[8]、酶消化法^[9]、percoll 密度梯度离心法^[10]等几种方法,机械分离法对细胞损伤较大,组织块贴壁法杂细胞太多且周期较长,percoll 密度梯度离心法得到的细胞仍存在其他杂细胞,并且采用单一方法难以实现 LCs 分离培养。

树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)在生理、生化、新陈代谢、解剖结构以及基因组^[11]等生物学特性比啮齿类更接近于非人灵长类,已广泛应用于人类疾病模型的研究,包括病毒感染模型^[12]、肿瘤模型^[13]、呼吸系统疾病模型^[14]和神经系统疾病模型^[15]等。本文旨在参考其他动物 LCs 培养与纯化

方法的基础上,采用酶消化、percoll 密度梯度离心及差异贴壁等分离纯化方式结合,建立树鼩 LCs 原代培养和纯化方法,为利用树鼩开展相关研究提供新的实验材料;通过 Zikv 对 LCs 的感染特性研究,建立 Zikv 感染的睾丸细胞模型,为研究 Zikv 感染雄性生殖系统的相关研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

2 只 3 月龄普通级雄性滇西亚种树鼩,体重 95~110 g,由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心饲养繁殖[SCXK(滇)K2018-0002];所有实验均在中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心进行[SYXK(滇)K2018-0002],本实验经中国医学科学院医学生物学研究所审批(DWSP202008014),并遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

1.1.2 病毒株

Zikv GZ01 株,由军事医学科学院秦成峰教授馈赠。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(FBS,以色列 Biological Industries);IV 型胶原酶(北京索莱宝);PBS(美国 Hyclone);0.25% trypsin-EDTA 胰蛋白酶、青-链霉素(美国 Gibco);无血清冻存液(美国 Cyagen);Testosterone ELISA kit(上海碧云天);3 β -HSD 小鼠单克隆 IgG 抗体(Santacruz);荧光标记的羊抗鼠 IgG(英国 Abcam);病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp® Viral RNA Mini Kit(德国 Qiagen);One

Step Prime Script™ RT-PCR Kit(日本 TaKaRa)。生物安全柜和 CO₂ 恒温培养箱(美国 Forma);台式高速离心机(美国 Beckman);细胞计数仪(美国 Bio-Rad);倒置荧光相差显微镜(日本 Nikon)。

1.3 实验方法

1.3.1 树鼩 LCs 分离、纯化

取 3 月龄的雄性树鼩,腹腔注射 0.4 mL 3%戊巴比妥钠麻醉处死后,无菌取出睾丸,75%乙醇中浸泡 20 s,取出后用 PBS 冲洗两遍去乙醇。移入 Heraguard ECO 超净工作台,用眼科剪和镊子去除睾丸的白膜、附睾及血管,小心取出睾丸实质组织,置于装有 D-Hanks 液的无菌培养皿中,洗涤 2 遍。用眼科剪将其剪碎后转入离心管内。加入 1 mg/mL IV 胶原酶,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 30 min,1000 r/min 离心 5 min,加入 0.25%胰酶消化 10 min 后,用含血清的培养基终止消化,吸管吹打混匀,将细胞悬液放入 40 目细胞筛网中过滤,使之分散成单个细胞。收集到 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 DMEM/F12 培养液重悬细胞,重复离心 1 次。

纯化方法采用 percoll 密度梯度离心法^[16]:将分离得到的细胞悬液加于不同密度梯度的 Percoll 分离液上,从分离管底部向上密度依次为 60%、37%、26%、21%,4℃、3000 r/min 离心 30 min。收集 37%和 60%之间的细胞,后用 DMEM/F12 培养液稀释,再将悬液以 1500 r/min 离心 10 min,沉淀加入含胎牛血清的培养液,摇匀得细胞悬液。将分离纯化得到的细胞悬液计数,后稀释成每毫升 1×10^6 个浓度的细胞悬液,接种于培养瓶或培养板中 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,培养基配方为 DMEM/F12 培养基加 10% FBS、1%青-链霉素。此时细胞中还含有少量支持细胞和其他杂细胞,根据间质细胞和支持细胞贴壁时间不同,在传代后 6 h 更换培养液以去除杂细胞达到纯化目的,第 2 代和第 3 代的细胞仍按此步骤进一步纯化。

1.3.2 树鼩 LCs 免疫荧光鉴定

间质细胞鉴定采用 3 β -羟类固醇脱氢酶(3 β -HSD)鉴定法^[17]。将纯化后的第 3 代细胞接种在 24 孔板中,待细胞长满 70%~80%时,吸去培养基,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min,加入 0.5% Triton X-100 室温孵育 20 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;5%山羊血清封闭 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min,加入稀释好的鼠源性 3 β -HSD 一抗(稀释比例 1:50),同时设置对照孔(加 PBS),4℃孵育过夜,将孔板用

PBS 清洗 3 次,每次 3 min;避光条件下加入羊抗鼠荧光二抗(1:400)室温孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,每次 3 min;加入 DAPI 染色液孵育 2 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min,置于荧光显微镜下拍照观察。

1.3.3 树鼩 LCs 增殖曲线测定

将纯化后的第 3 代 LCs 消化成细胞悬液,按每孔 1×10^5 个接种于 48 孔板,设置 1~7 d 共 7 个组,每组设置 2 个副孔,从接种时间起每隔 24 h 吸去培养液并消化计数,取平均值,以培养时间为横坐标、细胞密度为纵坐标绘制增殖曲线。

1.3.4 树鼩 LCs 分泌睾酮水平测定

采用 Testosterone ELISA kit 检测睾酮水平,将培养第 4 代至第 7 代的 LCs 按 1×10^5 个每孔接种于 12 孔板的培养皿上,之后每 24 h 更换培养液,分别在培养 24、48 h 后收取培养液,每个时间点收取 3 个样本测定睾酮含量,取平均值。

1.3.5 寨卡病毒感染实验

将对数生长期的第 3 代树鼩 LCs 用 0.25%胰蛋白酶消化重悬,以密度为每毫升 1×10^5 个每孔接种于 24 孔板内,24 h 后将寨卡病毒(滴度 1×10^6 copies/mL)以 MOI=1 感染细胞,在感染后 2、6、12、24、36、48、72 和 96 h 时间点收集细胞和上清液,QIAamp® Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取核酸,RT-qPCR 检测病毒载量,显微镜下观察细胞形态变化,并以对寨卡病毒易感的 Vero 细胞按相同步骤作对比实验。

感染细胞后睾酮水平测定:以上述方法感染细胞 2 h 后,PBS 洗掉未吸附的病毒,添加 1 mL 细胞培养液,分别在 12、24、36、48 h 收集感染组和对照组培养液(不同时间段感染组和对照组样品收集均为相应的同一个孔,每个时间点收取 3 个样本),同时补加 1 mL 培养液,竞争法酶联免疫吸附测定检测睾酮水平,取平均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理。数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两两独立样本的 *t* 检验分析。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

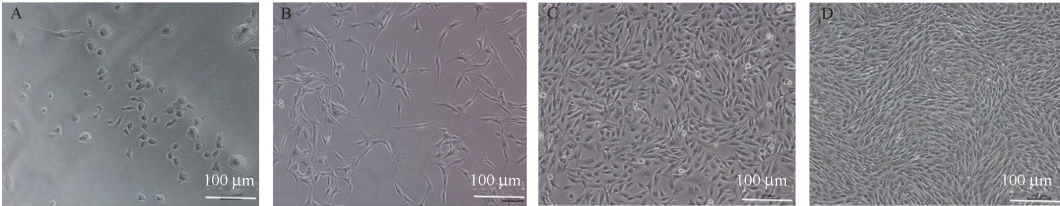
2 结果

2.1 树鼩 LCs 形态学观察和鉴定

经 percoll 密度梯度离心分离后的细胞 6 h 后开始贴壁,呈不规则的形态,培养至第 3 天后细胞开始长出触角(图 1A),培养至 7 d 进行第 1 次传代,待传代细胞培养 6 h 后换液,去除未贴壁的杂细胞;传至第 3 代后细胞活性开始增高,能够快速增殖,细胞

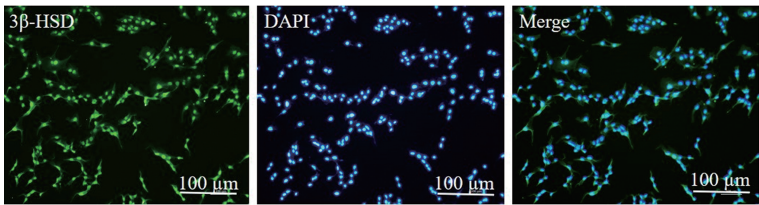
呈典型的拉网状(图 1B),之后根据密度 1 : 3~5 传代即可。传至第 6 代后,细胞形态略微有点变化,细胞长度稍微变短,宽度增加,但仍有触角伸出(图 1C)。随着细胞数量的增多,细胞间的界限和触角不在明显,从无序状变为纹理状(图 1D),细胞可稳定传至 15 代以上。

细胞鉴定:3 β -羟类固醇脱氢酶是睾酮合成的关键酶之一,是公认的 LCs 鉴定指标。3 β -HSD 免疫荧光鉴定显示,细胞均为阳性表达,证明所分离培养的细胞为 LCs,且细胞纯度高达 98% 以上,见图 2。



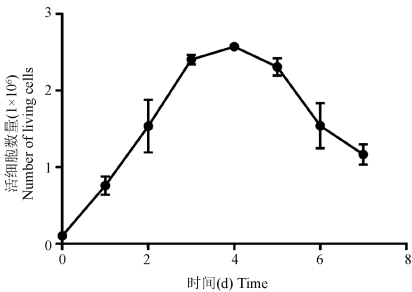
注:A:LCs 培养第 3 天;B:培养第 3 代;C:培养第 6 代;D:培养第 15 代。
图 1 树鼯睾丸间质细胞形态学观察
Note. A, 3rd day of LCs culture. B, 3rd generation of culture. C, 6th generation of culture, D, 15th generation of culture.

Figure 1 Morphological observation of Leydig cells in tree shrew



注:3 β -HSD:3 β -羟类固醇脱氢酶;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚;Merge:3 β -HSD 和 DAPI 的结合。
图 2 树鼯睾丸间质细胞 3 β -HSD 免疫荧光鉴定
Note. 3 β -HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole. Merge, Combination of 3 β -HSD and DAPI.

Figure 2 3 β -HSD Immunofluorescence Identification of Leydig cells in tree shrew



注:LCs 接种后第 0、1、2、3、4、5、6、7 天的细胞数量。
图 3 树鼯睾丸间质细胞增殖曲线
Note. Number of cells on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 after LCs inoculation.

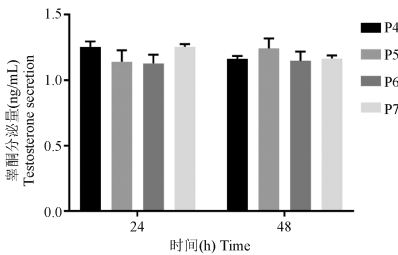
Figure 3 Tree shrew testicular Leydig cells proliferation curve

2.2 树鼯 LCs 增殖曲线的测定

睾丸间质细胞生长曲线结果显示,在培养前 3 d 增殖迅速,活力较强,为对数增长期,3~5 d 为增殖平台期。提示可选择第 3 天的细胞进行后续实验,见图 3。

2.3 树鼯 LCs 分泌睾酮活性检测

酶联免疫吸附测定法检测结果显示,第 4 代至第 7 代的 LCs 在培养 48 h 内能够分泌睾酮,分泌量在 1.1~1.3 ng/mL 左右,说明分离的 LCs 具有持续分泌睾酮的能力,见图 4。



注:P4、P5、P6、P7 分别表示树鼯 LCs 第 4 代、第 5 代、第 6 代和第 7 代。第 4 代至第 7 代 LCs 在 0~24 h 和 24~48 h 内睾酮分泌量的比较。

图 4 不同代次树鼯睾丸间质细胞睾酮分泌能力测定

Note. P4, P5, P6, and P7 represent the 4th, 5th, 6th and 7th generations of tree shrew LCs, respectively. Comparison of testosterone secretion in 0~24 h and 24~48 h from the 4th generation to the 7th generation LCs.

Figure 4 Determination of testosterone secretion capacity of tree shrew LCs at different passages

2.4 树鼩 LCs 感染寨卡病毒后形态学观察

感染结果表明,36 h 时 LCs 已经大量病变,96 h 几乎观察不到活细胞,而 96 h 时对照组细胞形态正常;Vero 细胞在感染 96 h 后才能观察到轻微的细胞病变,初步说明 LCs 比 Vero 更易感染 Zikv,见图 5。

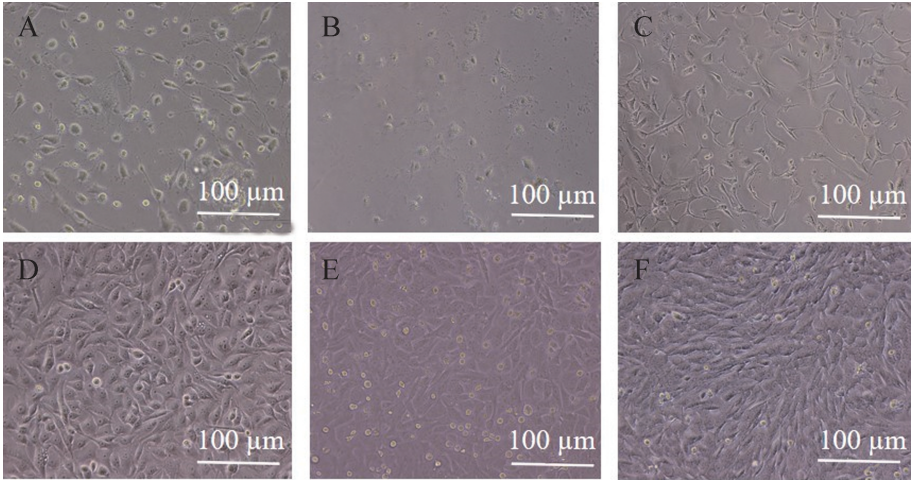
2.5 细胞和上清液病毒载量测定

RT-qPCR 结果表明,感染 2 h 后 LCs 细胞中病毒载量可达 1.93×10^5 copies/mL,且 6 h 内持续上升到峰值 2.15×10^5 copies/mL,36 h 后由于细胞死亡裂解病毒载量逐渐下降,细胞上清液中病毒载量在感染 12 h 后迅速上升,在 48 h 后达到峰值 1.3×10^5 copies/mL;Vero 细胞在感染 36 h 后细胞中病毒载量才开始增加,到 96 h 病毒载量仍在上升,但病

毒拷贝数小于同期的 LCs,表明 Zikv 能够在 LCs 中迅速增殖并释放出子代病毒,见图 6。

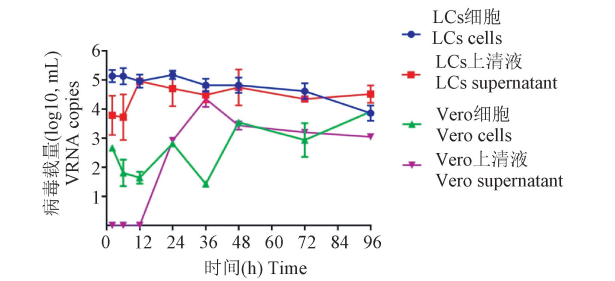
2.6 Zikv 感染树鼩睾丸间质细胞睾酮分泌能力测定

ELISA 睾酮水平测定结果显示,正常培养的 LCs 在前 36 h 内,其睾酮分泌量为 1.168~1.352 ng/mL,而感染寨卡病毒 36 h 内细胞睾酮分泌量为 1.051~1.156 ng/mL,略低于正常培养的细胞,并且在感染 36~48 h 内睾酮分泌量下降到 0.122 ng/mL,而正常培养的细胞仍然具有正常分泌睾酮的能力,分泌量为 1.133 ng/mL。并且细胞数量测定结果显示,感染组和对照组的活细胞数量在测定时间内无显著差异,表明 Zikv 感染树鼩 LCs 能够使其睾酮分泌能力下降甚至缺失,见图 7、8。



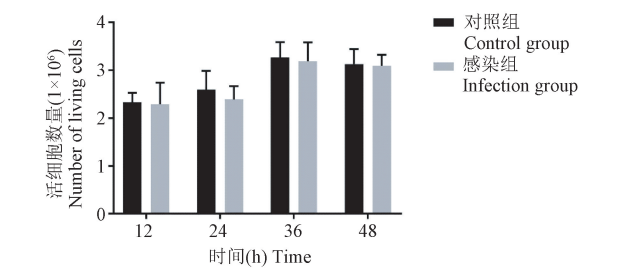
注:A,LCs 感染寨卡病毒 36 h;B,LCs 感染 96 h;C,LCs 96 h 对照组;D:Vero 感染寨卡病毒 36 h;E:Vero 感染 96 h;F:Vero 96 h 对照组。
图 5 寨卡感染树鼩睾丸间质细胞和 Vero 细胞后形态学观察
Note. A, LCs were infected with Zikv for 36 h. B, LCs infected for 96 h. C, LCs 96 h control group. D, Vero infected with Zikv for 36 h. E, Vero infection 96 h. F, Vero 96 h control group.

Figure 5 Morphological observation of testicular Leydig cells and Vero cells in tree shrews infected by Zikv



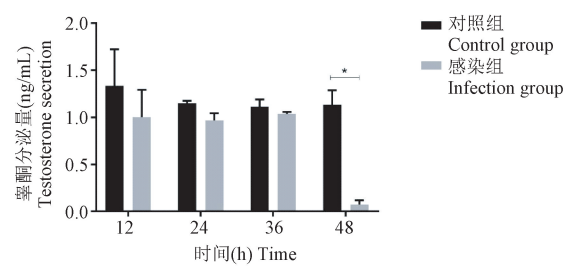
注:LCs 和 Vero 在感染 Zikv 后 2、6、12、24、36、48、72、96 h 细胞和上清中病毒载量。
图 6 寨卡病毒感染睾丸间质细胞和 Vero 细胞后病毒增殖曲线
Note. Viral loads in cells and supernatants of LCs and Vero at 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after infection with Zikv.

Figure 6 Virus proliferation curve after Zikv infection of testicular Leydig cells and Vero cells



注:LCs 在感染 Zikv 后 12、24、36、48 h 活细胞数量与正常对照组的比较。
图 7 感染组与对照组活细胞数量的测定
Note. Comparison of the number of viable cells of LCs with the normal control group at 12, 24, 36 and 48 h after infection with Zikv.

Figure 7 Determination of the number of viable cells in the infected group and the control group



注:LCs 在感染 Zikv 后 0~12、12~24、24~36、36~48 h 睾酮分泌含量。与正常对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 8 细胞感染后睾酮水平测定

Note. Comparison of testosterone secretion content of LCs at 0~12, 12~24, 24~36, 36~48 h after infection with Zikv. Compared with the normal control group, * $P<0.05$.

Figure 8 Determination of testosterone levels after cell infection

3 讨论

Zikv 不仅能够感染神经系统,研究表明睾丸也是 Zikv 感染的主要靶器官,Zikv 病毒能够在睾丸中大量增殖和复制,引起睾丸结构破坏及大量细胞死亡,从而导致雄性性功能受损。本实验利用分离培养的树鼯 LCs 作为 Zikv 感染的细胞模型,研究其感染特性,为探讨 Zikv 入侵雄性生殖系统的作用机制提供基础。

树鼯睾丸中 LCs 的数量稀少,其分离纯化方法尤为关键。实验使用 3~4 月龄的树鼯作为实验材料,这段时期正处于树鼯的青春期,细胞活力旺盛,具备良好的睾酮分泌能力;其次,此时树鼯的睾丸白膜,血管易分离,能有效去除原代培养中成纤维细胞和血管内皮细胞污染,更容易成功分离细胞。

传统的 percoll 密度梯度法虽然能够去除大部分杂细胞,但仍然有支持细胞存在,本研究多次实验发现在支持细胞和 LCs 共同培养时,支持细胞为优势细胞,单一的 percoll 密度梯度法虽然能够成功得到大部分 LCs,但培养后期纯度逐渐降低,差异贴壁法能够有效去除杂细胞而达到进一步纯化目的。本实验通过 percoll 密度梯度离心得到较为纯化的 LCs,根据 LCs 和支持细胞的贴壁速率不同,睾丸间质细胞先贴壁^[18],待原代细胞培养 6~7 d 时可进行第 1 次差速贴壁纯化,在传代 6 h 后换一次液去除还没贴壁的细胞,按此操作传至第 3 代后基本无杂细胞,并且活力旺盛,增殖迅速,3 β -HSD 免疫荧光鉴定细胞结果表明纯度高达 98%。此外,酶联免疫吸附测定结果表明所得到的 LCs 具备连续分泌睾酮能力,与 Risberidge 等^[19]报道的结果一致。

本实验结合 Percoll 密度梯度离心和差速贴壁法对 LCs 进行纯化,此方法与传统的 Percoll 密度梯度纯化方法相比更能达到纯化目的,有效去除了杂细胞,使 LCs 在培养过程有效避免了优势贴壁细胞(支持细胞)的排挤,实现了 LCs 的长期培养;培养基采用 DMEM/F12 培养基加 10% FBS、1%青-链霉素,该培养基配制方法简单,与传统的 LCs 培养基相比无需添加生长因子及其他成分,节约了培养时间和成本。

临床资料表明 Zikv 可感染男性生殖系统中的多个器官并长期潜伏,其中睾丸是主要的靶器官,有研究人员曾以人类睾丸组织进行 Zikv 感染实验,但因多方面原因导致该项研究失败。目前用于 Zikv 研究的动物模型主要有小鼠、鸡胚、恒河猴、树鼯等,鸡胚与人类结构相差甚远,恒河猴是较为理想的实验动物,但在恒河猴感染 Zikv 的研究主要集中在神经系统方面,当前关于 Zikv 感染睾丸的研究主要以小鼠为主,但小鼠大多需要干扰素拮抗处理后才能成功感染 Zikv。研究表明树鼯对 Zikv 易感,且不需要拮抗处理,在 Zikv 感染树鼯的研究中发现病毒能够在睾丸中大量复制,免疫组化实验结果表明 Zikv 主要集中在 LCs^[20],但未进一步在细胞水平上进行验证。

多项研究表明 LCs 是 Zikv 感染的主要靶细胞^[21],Zikv 感染免疫缺陷型小鼠可导致雄性小鼠睾丸萎缩、LCs 数量减少、睾酮水平及与睾酮产生相关的基因表达水平下降,阻碍精子成熟、睾丸萎缩;Zikv 也能够体外培养的小鼠 LCs 中高效复制。本实验首次使用 Zikv 感染树鼯 LCs,发现 6 h 内病毒迅速增殖和复制,36 h 后细胞开始大量死亡,证明树鼯 LCs 对 Zikv 易感;ELISA 结果表明感染后能导致 LCs 睾酮分泌能力下降甚至缺失。这些实验结果与已报道的 Zikv 感染睾丸的研究结论相辅证,提示 Zikv 感染 LCs 可能是引起睾丸损伤及不育的主要原因之一,表明树鼯 LCs 可作为 Zikv 感染的体外细胞模型。

综上所述,本实验采用两步酶消化、percoll 密度梯度离心结合差速贴壁法能够获得产量高、活性强、可连续传代和稳定增殖的树鼯 LCs,为树鼯 LCs 体外分离培养进行了实验性探索,成功建立树鼯 LCs 体外分离培养方法;并利用寨卡病毒感染树鼯 LCs,定量检测病毒增殖情况和睾酮分泌水平,证明 Zikv 可成功感染树鼯 LCs,可建立寨卡病毒感染树鼯间质细胞模型,为寨卡病毒感染导致雄性睾丸损伤及不育的致病机制提供研究基础。

参考文献:

- [1] Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice [J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1511–1524.
- [2] Lacombe A, Lelievre V, Roselli CE, et al. Delayed testicular aging in pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) null mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(10): 3793–3798.
- [3] Dobashi M, Fujisawa M, Yamazaki T, et al. Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by exogenous nitric oxide occurs independently of steroidogenic acute regulatory protein (star) mRNA [J]. *Arch Androl*, 2001, 47(3): 203–209.
- [4] Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, et al. Testosterone and spermatogenesis. Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules [J]. *J Androl*, 1992, 13(2): 172–184.
- [5] Neaves WB, Johnson L, Porter JC, et al. Leydig cell cytoplasmic mass, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59(4): 756–763.
- [6] 刘建中, 郭海彬, 邓春华, 等. 大鼠睾丸 Leydig 细胞的培养和鉴定 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(1): 14–17.
- [7] 黄洋, 靳辉, 曹霞, 等. 一种简便的机械法分离绵羊睾丸间质细胞的研究 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2014, 2(5): 13–14, 36.
- [8] 卿利娟, 魏泓, 李婧, 等. 仔猪睾丸间质细胞培养方法的比较 [J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(11): 29–31, 35.
- [9] 李阳, 王宇, 程康, 等. 低浓度 II、IV 型胶原酶联合消化法分离幼年 SD 大鼠睾丸间质细胞 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2017, 11(14): 2033–2037.
- [10] 谢天承, 许云飞. 小鼠睾丸间质细胞分离培养方法的研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(4): 569–572.
- [11] Fan Y, Ye MS, Zhang JY, et al. Chromosomal level assembly and population sequencing of the Chinese tree shrew genome [J]. *Zool Res*, 2019, 40(6): 506–521.
- [12] Yan RQ, Su JJ, Huang DR, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122(5): 283–288.
- [13] Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2012, 33(1): 55–59.
- [14] 周顺长, 吴健鸿, 张景辉, 等. 香烟烟雾暴露对中国树鼩 CXCR4、MHC-1、TNF- α 、MCP mRNA 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2011, 40(4): 463–467.
- [15] 张志成, 袁圆, 王璇, 等. 帕金森疾病动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(5): 21–27.
- [16] Li D, Sekhon P, Barr KJ, et al. Connexins and steroidogenesis in mouse Leydig cells [J]. *Can J Physiol Pharm*, 2013, 91(2): 157–164.
- [17] El-Alfy M, Luu-The V, Huang XF, et al. Localization of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(3): 1481–1491.
- [18] 宋晓峰, 魏光辉, 邓永继, 等. 小鼠胚胎睾丸 Leydig 细胞培养、纯化及其功能研究 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(1): 6–9.
- [19] Risbridger GP, Hedger MP. Adult rat Leydig cell cultures: minimum requirements for maintenance of luteinizing hormone responsiveness and testosterone production [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 83(2–3): 125–132.
- [20] 张莉. 寨卡病毒在云南的发生风险及树鼩动物模型的建立 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
- [21] 杨威, 盛子洋, 吴艳花, 等. 寨卡病毒与男性(雄性)生殖健康 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(6): 545–551.

[收稿日期] 2022-02-10