

膳食诱导肥胖小鼠睾丸 JAK2/STAT3 蛋白表达变化研究

柳成荫¹, 刘倩男¹, 赵剑², 翟玲玲¹

1. 中国医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学教研室, 辽宁 沈阳 110122;

2. 沈阳药科大学药理教研室

摘要: **目的** 通过检测膳食诱导肥胖小鼠血清中瘦素水平及睾丸中 JAK2/STAT3 蛋白表达水平变化,探讨睾丸 JAK2/STAT3 通路在肥胖影响雄性生殖中的作用。**方法** 5 周龄的 C57bl/6 雄性小鼠,共 48 只,随机分为对照组 (CON) 12 只和实验组 36 只,对照组予以普通饲料,实验组予以高脂饲料,饲养 19 周后,将实验组小鼠按体重增加分为两组:肥胖倾向组 (DIO) 和肥胖抵抗组 (DIO-R)。采集下腔静脉血,剥离睾丸、睾周脂肪、肾周脂肪并称重记录,采用 ELISA 试剂盒检测血清瘦素,Western blot 检测睾丸中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、蛋白表达量。**结果** DIO 组和 DIO-R 组小鼠肾周脂肪、肾周脂肪系数、睾周脂肪、睾周脂肪系数明显高于对照组 ($P<0.05$),DIO 组和 DIO-R 组小鼠之间上述各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$);DIO 组和 DIO-R 组小鼠血清瘦素显著高于 CON 组 ($P<0.05$),而 DIO 组和 DIO-R 组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$);DIO 组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平显著低于 CON 组 ($P<0.05$),DIO 组小鼠睾丸中 p-JAK2 蛋白表达水平低于 DIO-R 组小鼠 ($P<0.05$),而 p-STAT3 蛋白表达水平同 DIO-R 组小鼠相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

结论 膳食诱导肥胖可导致雄性小鼠血清瘦素水平升高,而睾丸 JAK2/STAT3 蛋白表达降低。

关键词: 肥胖; p-STAT3; p-JAK2; 生殖系统

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1413-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.002

Changes of JAK2/STAT3 protein expression in testis of diet-induced obese mice

LIU Cheng-yin*, LIU Qian-nan, ZHAO Jian, ZHAI Ling-ling

* Department of Child and Maternal Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China

Corresponding author: ZHAI Ling-ling, E-mail: llzhai@cmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To study the effect of JAK2/STAT3 signaling pathway in testis on male reproduction via detecting the serum leptin level and the expression of JAK2/STAT3 protein in testis of the diet-induced obese mice. **Methods** A total of 48 C57bl/6 male mice, 5 weeks old, were randomly divided into the control group ($n=12$) and the experimental group ($n=36$). The control group was fed with standard diet, while the experimental group received high-fat diet. After 19 weeks of feeding, the mice of the experimental group were divided into diet-induced obesity (DIO) group and diet-induced obesity resistance (DIO-R) group by weight gain. Inferior caval vein blood, testis, retroperitoneal fat and epididymal fat were collected and weighted. Serum leptin level was detected by ELISA kit. The protein expression of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 in testis were detected by Western blot. **Results** The absolute weight and relative weight of retroperitoneal and epididymal fat were significantly higher in the DIO group and the DIO-R group than in the control group (all $P<0.05$), but were not significantly different between the DIO group and the DIO-R group (all $P>0.05$). The serum leptin level was significantly higher in the DIO group and the DIO-R group than in the control group ($P<0.05$), but was not significantly different between the DIO group and the DIO-R group ($P>0.05$). The expression of p-JAK2 and p-STAT3 protein was significantly lower in the DIO group than in the control group (both $P<0.05$). The expression of p-JAK2 protein in the DIO group was lower than that in the DIO-R group ($P<0.05$), but there was no statistically significant difference in the expression of p-STAT3 protein between the DIO group and the DIO-R group ($P>0.05$). **Conclusions** Diet-induced obesity can lead to elevated serum leptin level and decreased expression of JAK2/STAT3 protein in testis in male mice.

Key words: obesity; p-STAT3; p-JAK2; reproduction system

基金项目: 国家自然科学基金 (81671515); 辽宁省自然科学基金 (201602710); 辽宁省教育厅科学研究项目 (LK201624)

作者简介: 柳成荫 (1992-), 男, 回族, 辽宁丹东人, 在读研究生, 研究方向: 儿童肥胖与青春期发育。

通信作者: 翟玲玲, E-mail: llzhai@cmu.edu.cn.

目前,肥胖发生率呈上升趋势,已经成为一个突出的公共卫生问题^[1]。肥胖是高血压、糖尿病、心血管疾病的主要危险因素,并证实肥胖对男性生殖系统有一定程度的损伤作用^[2],不利于男童的睾丸和阴茎发育^[3],但肥胖影响雄性生殖功能的机制目前尚不明确。有文献报道瘦素(leptin, LEP)/JAK2/STAT3 信号通路在男性生殖功能有重要的调节作用^[4]。研究发现瘦素受体和 JAK2/STAT3 蛋白在人体和小鼠睾丸中均有表达,可见在性腺水平上 LEP/JAK2/STAT3 通路可能也参与了雄性生殖的调控。肥胖状态下瘦素水平升高,性腺睾丸水平的 JAK2/STAT3 通路的蛋白是如何表达的,目前还缺少相关报道。因此本研究采用高脂饲料喂养 C57bl/6 雄性小鼠建立肥胖动物模型,观察 19 周肥胖小鼠血清中瘦素水平变化,睾丸中 JAK2/STAT3 蛋白表达水平的变化,探讨睾丸中 JAK2/STAT3 蛋白表达水平变化在肥胖影响雄性生殖功能中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 BCA 试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,中国)、STAT3 抗体(Cell Signaling 公司,美国)、p-STAT3 (Cell Signaling 公司,美国)、JAK2 (Cell Signaling 公司,美国)、p-JAK2 (Cell Signaling 公司,美国)、 β -actin 抗体(Cell Signaling 公司,美国)、辣根酶标记兔抗山羊 IgG (中杉金桥,中国)、ECL 化学发光试剂盒(BIO-Rad 公司,美国)等。多功能成像仪(美国 Azure 公司),转膜仪(北京六一仪器厂),电泳仪(北京六一仪器厂)等。

1.2 实验动物与分组 5 周龄的 C57bl/6 雄性小鼠(16 \pm 2)g(中国医科大学动物部提供),室温 19℃~25℃,相对湿度 45%~55%,自然光照。适应性喂养 1 周后,将 48 只小鼠按照体重分为 4 组,每组 12 只,使每组小鼠体重接近。从 4 组中随机选取 1 组作为对照组(CON)12 只予以基础饲料(中国医科大学动物部提供);剩余 3 组作为高脂组 36 只予以高脂饲料^[5],自由进水进食,喂养 19 周。实验结束时,将高脂组小鼠按照体重增加量由高到低排序,按照文献,将体重增长位于上游 1/3(12 只)判定为 DIO 组小鼠,体重增长位于下游 1/3(12 只)判定为 DIO-R 组小鼠,两者之间者舍弃^[6]。

1.3 取材 19 周实验结束后,小鼠麻醉后下腔静脉血,取血后处死,快速取睾丸、睾丸脂肪、肾周脂肪并称重记录。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血清瘦素检测 应用 ELISA 试剂盒检测血清瘦素,实验具体步骤见试剂盒说明书。

1.4.2 蛋白质印迹分析法测睾丸中 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 的蛋白表达 (1)蛋白提取及浓度测定:使用 BCA 试剂盒测定在冰上提取的睾丸中的蛋白质的浓度。(2)蛋白变性:按比例加入 5 \times loading buffer 使蛋白变性。(3)凝胶电泳:12%SDS-PAGE 凝胶电泳每个孔上样量为 8.5 μ l,在 100 V 电压下电泳 90 min。(4)转膜:将电泳凝胶上的蛋白质通过湿转移仪转移到硝酸纤维素(PVDF)膜上,恒压 80 V,90 min。(5)杂交反应:将蛋白质条带放入目的一抗(1:500 稀释)溶液,放置 4℃冰箱过夜。将蛋白质条带放入二抗(1:5 000 稀释)溶液,室温下孵育 60 min。(6)显影:利用 ECL 发光试剂盒对目的条带进行显色。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件处理数据。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,3 组间测量指标差异比较使用单因素方差分析(总体方差齐时,进一步通过 SNK-*q* 检验进行多重比较)或采用 Kruskal-Wallis *H* 检验(当方差不齐时,进一步通过 Nemenyi 法进行多重比较)。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

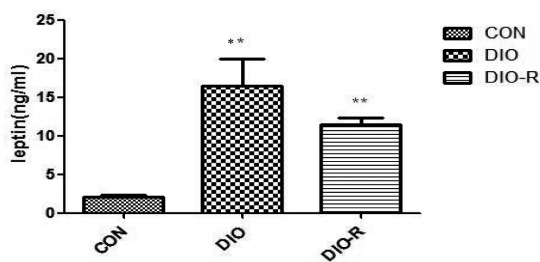
2.1 三组小鼠体重及脂肪含量变化 见表 1。小鼠饲养 19 周后,在体重方面,高脂饮食所导致 DIO 组小鼠体重与 CON 组相比显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$);DIO-R 组小鼠体重与 CON 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。在脂肪含量方面,DIO 组和 DIO-R 组小鼠肾周脂肪、肾周脂肪系数、睾丸脂肪、睾丸脂肪系数明显高于 CON 组($P<0.05$),DIO 组和 DIO-R 组小鼠之间上述各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠体重及脂肪含量变化($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	体重 (g)	肾周脂肪 (g)	肾周脂肪系数 (g/100 g)	睾丸脂肪 (g)	睾丸脂肪系数 (g/100 g)
CON 组	12	24.12 \pm 0.64	0.03 \pm 0.01	0.14 \pm 0.07	0.23 \pm 0.07	0.93 \pm 0.28
DIO 组	12	28.44 \pm 0.79 **	0.15 \pm 0.09 **	0.52 \pm 0.32 **	0.55 \pm 0.18 **	1.92 \pm 0.58 **
DIO-R 组	12	25.13 \pm 0.86	0.12 \pm 0.04 **	0.46 \pm 0.14 **	0.45 \pm 0.07 **	1.72 \pm 0.27 **

注:与 CON 组比较, ** $P<0.05$ 。

2.2 三组小鼠血清瘦素水平比较 见图 1。ELISA 结果显示,DIO 组小鼠血清瘦素水平与 DIO-R 组小鼠血清瘦素水平均高于 CON 组小鼠,且差异有统计学意义($P<0.05$);DIO 组小鼠血清瘦素水平略高于 DIO-R 组小鼠,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

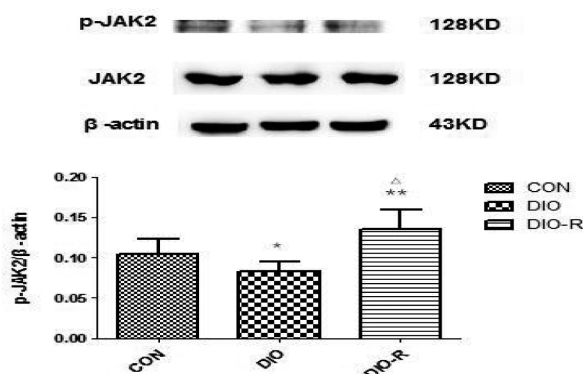


注:与 CON 组比较, ** $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠血清瘦素水平比较

2.3 三组小鼠睾丸中 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 表达水平比较 见图 2。Western blot 结果表明,

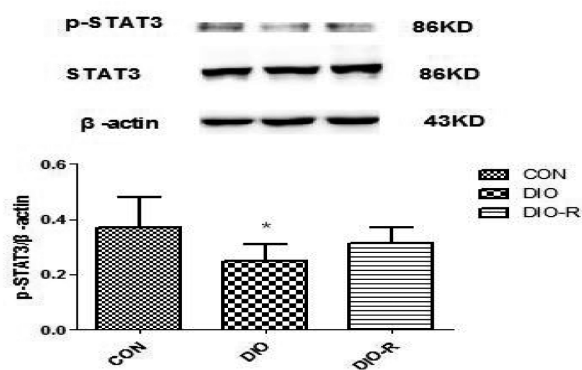
A



注:与 CON 组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.05$; 与 DIO 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠睾丸中 p-JAK2、p-STAT3 表达水平比较

B



3 讨论

近期研究发现,肥胖与脂肪细胞的分泌和代谢功能紊乱有关,可以造成的男性生殖系统功能下降^[7]。肥胖造成的生殖功能的下降受下丘脑-垂体-性腺轴的调控^[8]。瘦素可以通过血睾屏障作用于 JAK2-STAT3 信号通路调节脂肪细胞的代谢并对雄性生殖功能造成损伤^[9]。JAK2 激酶是一种非受体酪氨酸激酶, JAK2 通过与不同受体结合发挥不同作用,如:细胞信号传导和细胞增殖等^[10]。瘦素与瘦素受体结合可激活 JAK2^[11],并使其发生磷酸化反应,信号通过 JAK2/STAT3 信号通路将 STAT3 激活并使其磷酸化。磷酸化 STAT3 活化后产生二聚体,随之进入细胞核内与靶基因的启动子相结合参与基因表达及调节能量平衡等。由此可见,激活磷酸化 STAT3 是瘦素 (LEP)/JAK2/STAT3 信号通路中关键环节。本研究发现与 CON 相比, DIO 组血清瘦素显著增高,提示出现瘦素抵抗现象,与之前的报道相一致^[12],高浓度的血清瘦素对雄性动物的生殖系统有抑制作用。瘦素可以通过 JAK2-STAT3 信号通路影响雄性生殖功能,因此本次检测了睾丸中 JAK2-STAT3 蛋白表达水平,发现 DIO

DIO 组小鼠睾丸中 p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白表达水平同 CON 相比显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DIO-R 组小鼠睾丸中 p-JAK2 蛋白表达水平高于 CON 组小鼠且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DIO-R 组小鼠睾丸中 p-STAT3 蛋白表达水平同 CON 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); DIO 组小鼠睾丸中 p-JAK2 蛋白表达水平低于 DIO-R 组小鼠,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 DIO 组小鼠睾丸中 p-STAT3 蛋白表达水平同 DIO-R 组小鼠相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组小鼠睾丸 STAT3、JAK2 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

组小鼠睾丸中 p-STAT3、p-JAK2 蛋白表达量显著低于 CON 组,该实验结果与 Yi 等^[13]的实验结果相一致。可见肥胖时引起瘦素水平升高,同时睾丸中 JAK2/STAT3 蛋白表达下降,这可能与肥胖引起的雄性生殖功能降低有关。

本次实验结果还发现高脂喂养雄性小鼠部分体重高于对照组,为 DIO 小鼠,部分体重与对照组相当,为 DIO-R 小鼠,此研究结果和 Levin 的结果一致^[6]。2 组小鼠除体重差异有统计学意义外,其他检测到的指标如体脂肪含量、瘦素水平、睾丸中 p-STAT3 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),具体的机制目前还不是很清楚。但注意到高脂饮食后即使没有体重的显著变化,身体内损害还是会存在的,正如一些高脂肪饮食的人群,即使体重没有达到肥胖判定的标准,但身体内的脏器损伤可能已经发生,而且这一部分人由于体重增加的不明显更容易受到忽视,而且国内外目前并无确切指标判定人群中肥胖抵抗,今后此人群应受到关注。

综上所述,肥胖时瘦素水平升高,而睾丸中 JAK2/STAT3 蛋白表达下降,该通路可能影响下丘脑-垂体-睾丸轴,进而对雄性生殖系统造成影响。