

## · 论 著 ·

## 阿片相关雄激素缺乏症的外周机制及胰岛素样生长因子 1 的治疗作用

黄坚坚<sup>1</sup>, 陈星驰<sup>1</sup>, 崔燕华<sup>1</sup>, 周江平<sup>1</sup>, 南海函<sup>2</sup>, 郝欣蕊<sup>1</sup>, 林 函<sup>1</sup>

[1. 温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院麻醉与围术期医学科, 浙江 温州 325000; 2. 温州医科大学检验医学院(生命科学学院), 浙江 温州 325035]

**摘要:**目的 探讨阿片相关雄激素缺乏症(OPIAD)的外周机制及胰岛素样生长因子 1(IGF1)对 OPIAD 的治疗作用。方法 雄性成年 C57BL/6 小鼠 sc 给予吗啡 5 mg·kg<sup>-1</sup> 或等体积生理盐水, 4 h 后取外周血和睾丸组织。分离雄性成年小鼠睾丸曲细精管组织培养 24 h 后进行以下分组: ① 正常对照组和 IGF1 组(IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>, 孵育 12, 24 和 48 h); ② 正常对照组与阿片 μ 受体激动剂 DAMGO 组(DAMGO 10 μmol·L<sup>-1</sup>, 孵育 48 h); ③ 正常对照组、IGF1 组(IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>, 孵育 48 h)、DAMGO 组(DAMGO 10 μmol·L<sup>-1</sup>, 孵育 48 h) 和 IGF1+DAMGO 组(同时加入 DAMGO 10 μmol·L<sup>-1</sup> 和 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>, 孵育 48 h); 正常对照组、溶剂组(0.01% DMSO, 孵育 24 h)、IGF1 组(IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>, 孵育 24 h)、鬼臼苦素(PPP)组(PPP 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 孵育 24 h) 和 PPP+IGF1 组(PPP 1 μmol·L<sup>-1</sup> 孵育 2 h 后, 加入 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup> 继续培养 24 h)。用超高效液相色谱-串联质谱法检测小鼠血清和睾丸组织及曲细精管组织培养基中的睾酮含量, 用 ELISA 检测小鼠血清和睾丸组织及曲细精管组织培养基中 IGF1 含量, 用荧光定量 PCR 检测曲细精管组织中睾酮合成相关酶 mRNA 水平。结果 小鼠实验中, 吗啡组小鼠血清和睾丸组织中睾酮和 IGF1 含量较正常对照组显著降低 ( $P < 0.05$ )。离体实验中: ① IGF1 孵育 24 和 48 h 组曲细精管培养基中睾酮含量均较相应时间正常对照组明显升高 ( $P < 0.01$ )。② DAMGO 组曲细精管培养基中 IGF1 含量较正常对照组显著降低 ( $P < 0.01$ )。③ 与正常对照组相比, IGF1 组曲细精管培养基中睾酮含量明显升高 ( $P < 0.01$ ), DAMGO 组降低 ( $P < 0.05$ ); IGF1 组和 IGF1+DAMGO 组曲细精管组织中胆固醇合成急性调节蛋白 (*Star*) 和 17β-羟基类固醇脱氢酶 3 (*17βHsd3*) mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), DAMGO 组 3β-羟化类固醇脱氢酶 1 (*3βHsd1*) mRNA 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 DAMGO 组相比, IGF1+DAMGO 组培养基中睾酮含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); IGF1+DAMGO 组曲细精管组织中 *Star* 和 *17βHsd3* mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。PPP+IGF1 组曲细精管培养基中睾酮含量与 IGF1 组相比明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而与 PPP 组相比无明显变化。结论 OPIAD 存在阿片 μ 受体介导的外周机制。IGF1 通过其受体促进睾酮的合成分泌, 可纠正 DAMGO 引起的睾酮合成分泌抑制。

**关键词:** 胰岛素样生长因子 1; 阿片相关雄激素缺乏症; 睾酮

中图分类号: R964, R966

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2021)04-0251-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.04.002

阿片类药物作为世界卫生组织癌痛三阶梯镇痛方案中不可或缺的一部分, 主要用于第二和第三阶梯的治疗<sup>[1]</sup>。近 10 年来, 阿片类药物也广泛应用于慢性非癌性疼痛的治疗。然而, 随着其临床应用的持续增加, 相关不良反应的发生率如阿片相关雄激素缺乏症 (opioid-induced androgen deficiency,

OPIAD) 也持续增加, 主要表现为睾酮水平低下、性欲降低、男性勃起功能障碍、疲劳、情绪低落、潮热和骨质疏松等<sup>[2-3]</sup>。研究发现, 长期使用阿片类药物治疗的慢性疼痛患者会出现 OPIAD<sup>[4]</sup>, 严重影响了男性患者的情绪和生活质量。对于长期使用阿片类药物镇痛并出现 OPIAD 的患者, 睾酮全身替代治疗是主要的治疗方法, 但替代治疗有着诸多禁忌证, 包括前列腺癌、有下尿路症状的良性前列腺增生、血细胞比容 > 50% 和心功能较差者等, 同时也存在相关并发症, 如红细胞增多症、睡眠呼吸暂停、痤疮、少精不育和亚临床前列腺癌等<sup>[5-6]</sup>。目前关于 OPIAD 机制研究主要集中在中枢机制, 涉及外周机

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81471448); 温州市科技局项目 (Y20140656); 温州市科技局项目 (Y20180119)

**作者简介:** 黄坚坚, 硕士研究生, 主要从事麻醉与生殖内分泌研究; 林 函, 博士, 教授, 主要从事麻醉药神经发育毒性的研究。

**通讯作者:** 林 函, E-mail: nanlinhannansh@qq.com

制的研究较少,如能明确 OPIAD 的外周机制,并采用局部用药进行治疗,则能避免替代治疗的不良反应,为 OPIAD 的治疗提供新方法。

离体研究证明,胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF1)在睾酮合成过程中也发挥着重要的作用,能有效改善氟化物引起的睾酮水平下降<sup>[7]</sup>。本研究通过小鼠在体及离体实验,初步探讨 OPIAD 的外周机制及验证 IGF1 治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

90~120 日龄健康雄性 C57BL/6 小鼠,20~30 g,动物许可证:SYXK(浙)2019-0009,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠每笼 4~6 只饲养,温度 23~25℃,相对湿度 40%~50%,光照时间 07:00~19:00,自由饮食饮水。实验动物的使用均获得温州医科大学实验动物管理机构伦理审查许可。

### 1.2 药品、试剂和仪器

阿片 μ 受体激动剂 DAMGO,英国 Tocris 公司;IGF1,美国 PeproTech 公司;IGF1 受体拮抗剂鬼臼苦素(picropodophyllin, PPP),美国 MCE 公司;盐酸吗啡,东北制药集团股份有限公司;DMEM/F12 和青、链霉素,美国 Gibco 公司;7.5% 牛血清白蛋白,北京索莱宝科技有限公司;DMSO,美国 Sigma 公司;Trizol 和引物,美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒,日本 Takara 公司;荧光定量 PCR 试剂盒,德国 Qiagen 公司;乙腈、甲醇和异丙醇(色谱纯),德国 Merck 公司;甲酸,美国 Fisher 公司;睾酮标准品和睾酮-D3,比利时 Acros 公司;IGF1 酶联免疫检测试剂盒,美国 R&D Systems 公司。PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司;超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography mass spectrometry, UPLC-MS) 仪和 Waters Acquity UPLC HSSC18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),美国 Waters 公司;多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司。

### 1.3 小鼠实验

#### 1.3.1 分组、药物处理和样品制备

将 16 只小鼠随机分为正常对照组和吗啡组( $n=8$ ),分别 sc 给予吗啡 5 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[8]</sup>或同体积生理盐水。4 h 后,小鼠麻醉后摘眼球取血,置室温静置 10~20 min,4℃,626×g 离心 20 min,取血清,-40℃保存。收集睾丸,去除睾丸表面的白膜及其他组织,加入 1 mL 预冷的 PBS(pH 7.4),干冰上手

动研磨制成组织匀浆,4℃,626×g 离心 20 min,取上清,-40℃冷冻待测。按照 BCA 试剂盒说明书检测睾丸匀浆总蛋白浓度。

#### 1.3.2 UPLC-MS 法检测小鼠血清和睾丸组织中睾酮含量

用甲醇配制不同浓度的睾酮标准品。分别取 1.3.1 制备的血清、睾丸组织匀浆或睾酮标准品 100 μL,加入 10 μL 内标(睾酮-D<sub>3</sub>样品,10 μg·L<sup>-1</sup>),涡旋 2 min 混匀,随后加入 200 μL 乙腈沉淀蛋白,涡旋 3 min 后 4℃,13 523×g 离心 10 min,取上清进行 UPLC-MS 分析。液相色谱条件如下:色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS C18(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温 30℃,样品室温度 10℃,进样体积 10 μL,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>。流动相:0.1% 甲酸(流动相 A)+乙腈(流动相 B),采用梯度洗脱。质谱条件:电离方式为 ESI<sup>+</sup>,毛细管电压 3 kV,离子源温度 150℃,脱溶剂气温度 500℃,脱溶剂气流量 1000 L·h<sup>-1</sup>,锥孔气流量 50 L·h<sup>-1</sup>,锥孔电压 38 V,碰撞气为氩气,碰撞能量 22 V。洗脱程序:0~1 min, 40%B; 1.1~2.5 min, 40%B~90%B; 2.6~4 min, 90%B~40%B。以相应浓度的标准品与内标峰面积的比值经加权线性回归法得到标准曲线方程,并根据其计算血清和睾丸匀浆样品中的睾酮含量<sup>[9]</sup>。睾丸匀浆中睾酮含量(ng·g<sup>-1</sup>)=睾酮含量(ng·L<sup>-1</sup>)/睾丸匀浆总蛋白含量(g·L<sup>-1</sup>)。

#### 1.3.3 ELISA 检测小鼠血清和睾丸组织中 IGF1 含量

取 1.3.1 制备的血清和睾丸匀浆,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IGF1 含量。睾丸匀浆中 IGF1 含量(μg·g<sup>-1</sup>)=IGF1 含量(μg·L<sup>-1</sup>)/睾丸匀浆总蛋白含量(g·L<sup>-1</sup>)。

### 1.4 小鼠睾丸曲细精管离体培养

#### 1.4.1 组织分离和培养

将雄性 C57BL/6 小鼠处死后在无菌条件下取睾丸,去除睾丸周围的附睾及结缔组织,置于预冷的 DMEM/F12 中,分别经 75% 乙醇浸泡消毒 1 次、PBS 清洗 2 次,随后将睾丸置于装有培养基的玻璃培养皿中,去除外层白膜,分离睾丸组织为长短大致相同的单根曲细精管。在 24 孔板或 48 孔板中分别加入 500 或 300 μL 培养基(DMEM/F12+0.1% BSA),将曲细精管移至培养板中,保证各孔中曲细精管数量相同,置 34℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h,而后进行相应分组和药物处理。于药物处理前分别测定组织培养基中睾酮和 IGF1 的基础含量。实验重复 3 次,每组设 6 复孔。

#### 1.4.2 UPLC-MS 法检测 IGF1 对睾酮合成的时效作用

将睾丸曲细精管分为正常对照组和 IGF1 组,

分别给予生理盐水或 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup> 进行孵育,于孵育 12, 24 或 48 h 后收集培养基,同 1.3.2 检测睾酮含量。以药物处理后的睾酮含量与基础含量的比值表示睾酮相对含量。

#### 1.4.3 ELISA 检测 DAMGO 对 IGF1 合成分泌的影响

将睾丸曲细精管分为正常对照组和 DAMGO 组<sup>[10]</sup>,分别给予生理盐水或 DAMGO 10 μmol·L<sup>-1</sup>,培养 48 h 后收集培养基,同 1.3.3 检测 IGF1 含量。以药物处理后 IGF1 含量与基础含量的比值表示 IGF1 相对含量。

#### 1.4.4 UPLC-MS 法检测 IGF1 对 DAMGO 睾酮合成抑制作用的影响

将睾丸曲细精管分为正常对照组(给予生理盐水)、IGF1 组(加入 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>)、DAMGO 组(加入 DAMGO 10 μmol·L<sup>-1</sup>)和 IGF1+DAMGO 组(同时加入 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>和 DAMGO 10 μmol·L<sup>-1</sup>),培养 48 h 后收集培养上清,同 1.3.2 检测睾酮含量。

#### 1.4.5 荧光定量 RT-PCR 检测睾丸曲细精管组织睾酮合成相关酶 mRNA 表达水平

实验分组和给药同 1.4.4。药物处理后收集曲细精管,Trizol 法提取收集的曲细精管 RNA,并测定其浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书操作,将 RNA 逆转录为 cDNA,随后按照荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书操作,检测睾酮合成相关酶—清道夫受体 B1(scavenger receptor B-1, *Scarb1*)、类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, *Star*)、胆固醇侧链裂解酶(cholesterol side chain cleavage enzyme, *Cyp11a1*)、17α-羟化酶 1(17α-hydroxylase-1, *Cyp17a1*)、3β-羟化类固醇脱氢酶 1(3β-hydroxysteroid dehydrogenase-1, *3βHsd1*)和 17β-羟基类固醇脱氢酶 3(17β-hydroxysteroid dehydrogenase-3, *17βHsd3*) mRNA 水平,引物序列见表 1。荧光定量 RT-PCR 的反应条件:预变性(95℃, 2 min),变性(95℃, 5 s)、退火及延伸(60℃, 10 s),共 40 循环,最后 65℃延伸 5 s。采用双标准曲线法检测样本中各睾酮合成相关酶 mRNA 相对表达水平。

#### 1.4.6 UPLC-MS 法检测 IGF1 促进睾丸曲细精管合成睾酮的受体特异性

将睾丸曲细精管分为正常对照组(给予生理盐水)、溶剂对照组(加入 0.01% DMSO)、PPP 组(加入 IGF1 受体特异性拮抗剂 PPP 1 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[11]</sup>)、IGF1 组(加入 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>)和 PPP+IGF1 组(加入 PPP 1 μmol·L<sup>-1</sup>孵育 2 h 后,再加入 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup>共同培养 24 h),药物处理后收集培养

**Tab.1 Primer sequences of qRT-PCR**

Gene	Primer sequences (5'-3')
<i>Scarb1</i>	F:GCCAGCGTGCTTTTATGA R:CCGTTCCATTTGTCCACC
<i>Star</i>	F:GAAAAGACACGGTCATCACTCA R:CCACCCCTTCAGGTCAATAC
<i>Cyp11a1</i>	F:CCAGGACCCAAGTGTGTTCT R:CCTGATACGAAGCACTTCTCG
<i>3βHsd1</i>	F:GGAGGAGATCAGGGTCCTGG R:CTAGGATGGTCTGCCTGGG
<i>Cyp17a1</i>	F:CCAGGACCCAAGTGTGTTCT R:CCTGATACGAAGCACTTCTCG
<i>17βHsd3</i>	F:ATGAAGAAGACACAACTTGGATTA R:GTTGCTGATGTTGCGTTTG
<i>Rps16</i>	F:AAGTCTTCGGACGCAAGAAA R:TTGCCCAGAAGCAGAACAG

*Scarb1*: scavenger receptor B-1; *Star*: steroidogenic acute regulatory protein; *Cyp11a1*: cholesterol side chain cleavage enzyme; *3βHsd1*: 3-hydroxy-5-steroid dehydrogenase-1; *Cyp17a1*: 17α-hydroxylase-1; *17βHsd3*: 17β-hydroxy steroid dehydrogenase-3; *Rps16*: ribosomal protein small submit 16.

基,同 1.3.2 检测睾酮含量。

#### 1.5 统计学分析

实验结果数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS18.0 统计软件进行数据统计处理分析。IGF1 时效作用实验采用重复测量方差分析,2 组比较采用成组样本 *t* 检验;3 组及以上采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

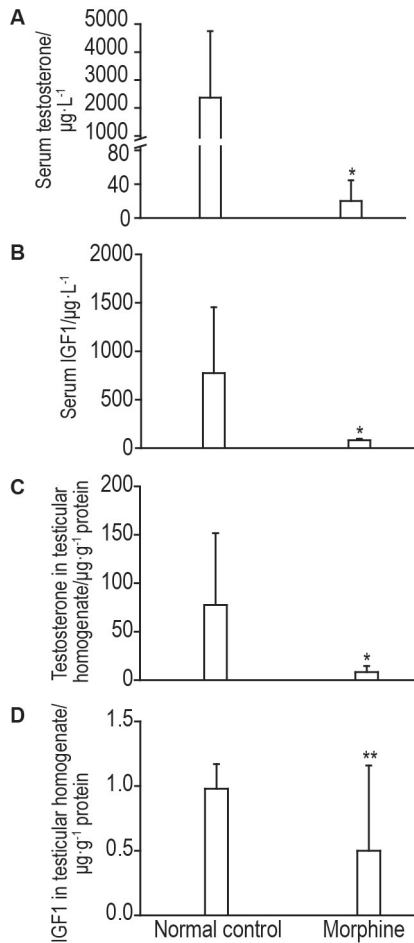
## 2 结果

### 2.1 吗啡对小鼠血清和睾丸组织中睾酮和 IGF1 含量的影响

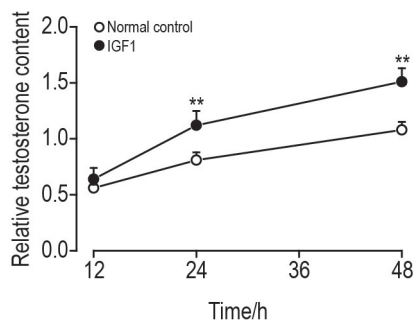
UPLC-MS 和 ELISA 检测结果显示,雄性成年小鼠 sc 给予吗啡 5 mg·kg<sup>-1</sup> 4 h 后,与正常对照组比较,吗啡组小鼠血清和睾丸匀浆中的睾酮含量(图 1A 和 1C)和 IGF1 含量(图 1B 和 1D)均显著下降(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

### 2.2 IGF1 对曲细精管睾酮合成的时效的影响

UPLC-MS 检测结果显示(图 2),与正常对照组相比,离体培养的睾丸曲细精管经 IGF1 100 μg·L<sup>-1</sup> 孵育 12 h 后,IGF1 组培养基中睾酮相对含量无明显变化;而孵育 24 和 48 h 后,IGF1 组培养基中睾酮相对含量明显增加(*P* < 0.01)。



**Fig.1 Contents of testosterone and insulin-like growth factor 1 (IGF1) in serum and testicular homogenate.** C57BL/6 mice were sc given morphine (5 mg·kg<sup>-1</sup>) or saline for 4 h. The testosterone contents of serum (A) and testicular homogenate (C) in mice were measured by ultra performance liquid chromatography mass spectrometry (UPLC-MS), and the IGF1 contents in serum (B) and testicular homogenate (D) were measured by ELISA.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with normal control group.



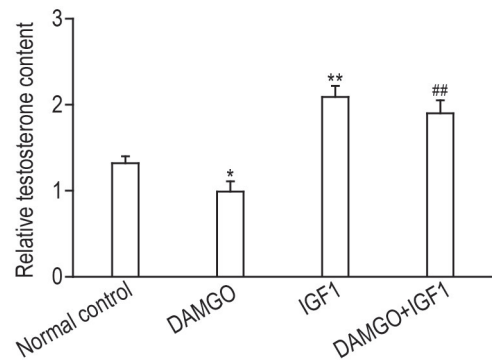
**Fig.2 Effect of different durations of IGF1 treatment on relative testosterone content in seminiferous tubules culture supernatant detected by UPLC-MS.** The seminiferous tubules were isolated from male C57BL/6 mice and treated with IGF1 100 µg·L<sup>-1</sup> for 12, 24 and 48 h. Relative testosterone content was the ratio of testosterone content after drug treatment to the basic content.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*\* $P<0.01$ , compared with normal control group.

### 2.3 DAMGO对曲细精管合成分泌IGF1的影响

ELISA 检测结果显示,与正常对照组(0.57 ± 0.11,  $n=3$ )比较, DAMGO 组培养基中 IGF1 相对含量(0.26 ± 0.01,  $n=3$ )显著降低( $P<0.01$ ),提示 DAMGO 抑制曲细精管合成分泌 IGF1。

### 2.4 IGF1对DAMGO抑制睾酮合成的影响

UPLC-MS 检测结果显示(图 3),与正常对照组相比, IGF1 组离体睾丸曲细精管培养基中睾酮相对含量明显升高( $P<0.01$ ), DAMGO 组培养基中睾酮相对含量降低( $P<0.05$ );与 DAMGO 组相比, IGF1+DAMGO 组培养基中睾酮相对含量显著上升( $P<0.01$ )。



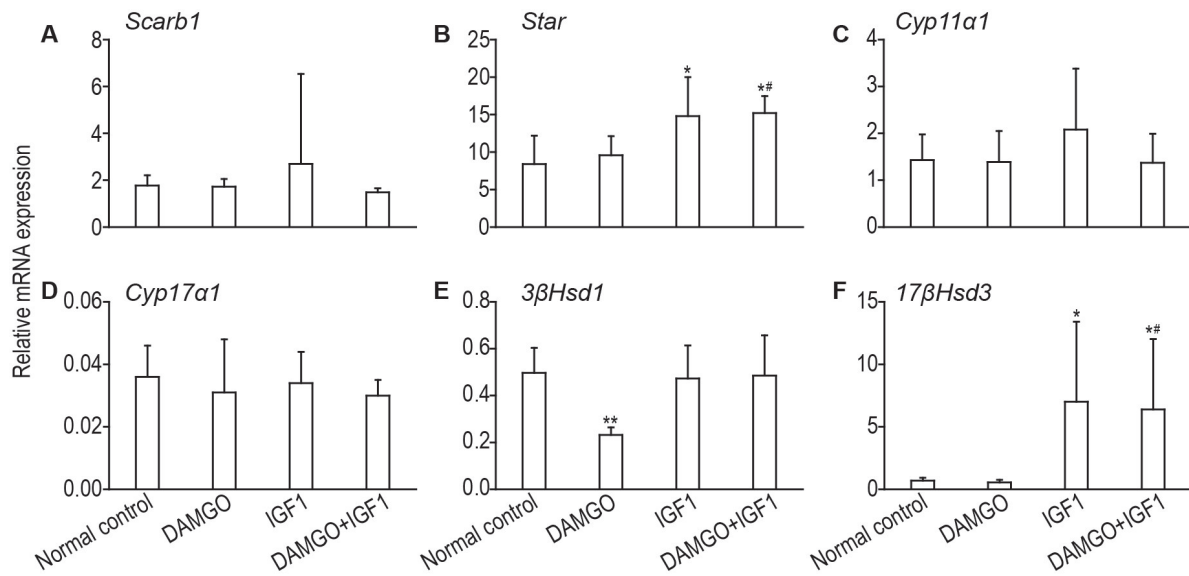
**Fig.3 Effect of IGF1 on relative testosterone content induced by DAMGO detected by UPLC-MS.** The seminiferous tubules were isolated and divided into normal control group, IGF1 group (IGF1 100 µg·L<sup>-1</sup>), DAMGO group (DAMGO 10 µmol·L<sup>-1</sup>) and IGF1+DAMGO group (DAMGO 10 µmol·L<sup>-1</sup> and IGF1 100 µg·L<sup>-1</sup>). Drugs were incubated or co-incubated for 48 h, respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with normal control group; ## $P<0.01$ , compared with DAMGO group.

### 2.5 IGF1及DAMGO处理对离体曲细精管组织中睾酮合成相关酶mRNA水平的影响

荧光定量 RT-PCR 结果(图 4)显示,与正常对照组相比, IGF1 组和 IGF1 + DAMGO 组 *Star* 和 *17βHsd3* mRNA 水平显著增加( $P<0.05$ )(图 4B 和 4F), DAMGO 组 *3βHsd1* mRNA 表达水平明显降低( $P<0.01$ )(图 4E);而与 DAMGO 组相比, IGF1 + DAMGO 组 *Star* 和 *17βHsd3* mRNA 表达显著增加( $P<0.05$ )(图 4B 和 4F);其余各基因表达水平在各组间无明显改变。

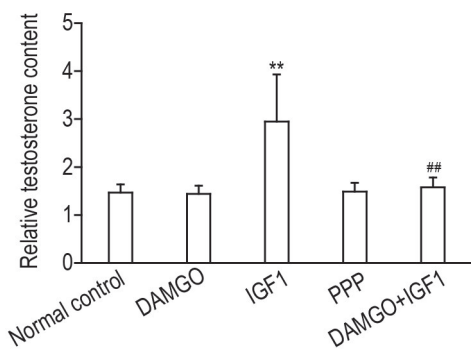
### 2.6 IGF1促进睾丸曲细精管合成睾酮的受体特异性

UPLC-MS 检测结果显示(图 5),离体睾丸曲细精管经 IGF1 和 PPP 单独或联合孵育后,与正常对照组相比, IGF1 组培养上清中睾酮相对含量明显升高( $P<0.01$ );与溶剂对照组相比, PPP 组和 PPP + IGF1 组培养上清中睾酮相对含量无明显变化;与



**Fig.4 Effects of IGF1 and DAMGO on mRNA levels of testosterone synthesis-related enzymes in seminiferous tubule tissue by qPCR.** See Fig.4 for the treatment.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with normal control group; # $P<0.05$ , compared with DAMGO group.

PPP 组相比, PPP+IGF1 组培养上清中睾酮相对含量无明显变化; 与 IGF1 组相比, PPP+IGF1 组培养上清中睾酮相对含量明显降低 ( $P<0.01$ )。



**Fig.5 Effects of IGF1 and picropodophyllin (PPP) on relative testosterone content in culture supernatant of seminiferous tubules detected by UPLC-MS.**

The seminiferous tubules were isolated and divided into normal control group, vehicle group (0.01% DMSO), IGF1 group (IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PPP group (PPP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and PPP+IGF1 group. The PPP+IGF1 group was incubated with PPP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 2 h, then co-incubated with IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h. The other groups were incubated with different drugs or vehicles for 24 h, respectively.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*\* $P<0.01$ , compared with normal control group; ## $P<0.01$ , compared with IGF1 group.

### 3 讨论

阿片类药物主要通过  $\mu$ ,  $\kappa$  和  $\delta$  等阿片受体产生作用<sup>[12]</sup>, 其中阿片  $\mu$  受体作为经典的 G 蛋白偶联受体, 除广泛分布于下丘脑、垂体等中枢神经系统外, 在其他组织细胞中也有分布。较多的研究结果显示, 在人和啮齿类动物睾丸组织中, 成熟的精子、精

原细胞和巨噬细胞等均表达阿片  $\mu$  受体<sup>[13-14]</sup>。另外, Fabbri 等<sup>[15]</sup>发现, 睾丸支持细胞和未成熟的睾丸间质细胞表面表达了大量的阿片  $\mu$  受体, 然而成熟的睾丸间质细胞表面却并不表达阿片  $\mu$  受体。本研究首先通过成年小鼠 sc 给予吗啡, 发现小鼠血清和睾丸匀浆中睾酮和 IGF1 水平均显著下降, 提示吗啡可能通过中枢机制和(或)外周机制抑制睾酮和 IGF1 的分泌。吗啡抑制睾酮合成的中枢机制主要通过下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG) 调控, 阿片类药物可作用于下丘脑  $\mu$  受体, 减少下丘脑释放促性腺激素释放激素, 抑制垂体合成分泌黄体生成素和卵泡刺激素, 或直接作用于垂体的阿片  $\mu$  受体, 减少黄体生成素和卵泡刺激素的分泌, 进而干扰机体睾酮的合成<sup>[16]</sup>。而关于阿片类物质影响睾酮合成分泌的外周机制目前尚未明确, 有研究者发现, 在未成年大鼠睾丸内局部注射脑啡肽可抑制睾酮分泌, 提示阿片类物质可能通过外周机制调控睾酮的合成<sup>[17]</sup>, 但整体动物睾丸内局部注射模型并不能完全排除中枢机制的干扰。本研究采用了离体曲细精管培养模型, 可以相对保留睾丸原有微环境的同时, 避免了 HPG 轴对睾酮合成分泌的中枢调控<sup>[18]</sup>, 有利于 OPIAD 的外周机制探讨及验证 IGF1 外周治疗作用。研究结果发现, 在离体曲细精管模型中, DAMGO 明显抑制睾酮及 IGF1 的合成分泌, 表明 OPIAD 存在相应的外周机制。

IGF1 是一种在分子结构上与胰岛素类似的多肽物质, 主要由肝合成释放<sup>[19]</sup>, 能与 IGF1 受体结

合,在儿童的生长发育和机体的物质合成代谢中起重要调控作用。2005年,美卡舍明(重组人胰岛素样生长因子1)通过美国FDA的批准作为严重原发性IGF1缺乏症治疗药进入临床,但因其全身注射具有较多的不良反应,如缺铁性贫血、淋巴结病、扁桃体肿大、甲状腺肿大和关节痛等,使美卡舍明的临床应用范围变得十分狭窄<sup>[20]</sup>。如果局部注射IGF1对OPIAD具有外周治疗作用,则能避免IGF1全身给药的副作用,开辟新的临床应用前景。目前临床上对于睾丸鞘膜积液等疾病的治疗,也可以使用局部外周注射的方式,通过睾丸鞘膜内注射相应药物,减少细胞浸润和炎性渗出等,同时刺激鞘膜腔形成无菌性粘连,从而治愈鞘膜积液<sup>[21]</sup>。另外,关于局部睾丸透皮给药贴剂的专利也早有报道,如1989年美国Campbell等<sup>[22]</sup>的睾丸透皮给药装置,均提示睾丸外周局部治疗具有很好的可行性及实用性。

在睾丸组织中,IGF1可由睾丸间质细胞、生精细胞及巨噬细胞等合成分泌<sup>[23]</sup>,睾丸内合成分泌的IGF1可通过旁分泌或自分泌作用调控上述3种细胞或其他细胞的功能<sup>[24-25]</sup>。有研究表明,IGF1能明显降低睾丸间质细胞的凋亡率并促进未成熟睾丸间质细胞合成睾酮<sup>[26]</sup>,而将小鼠全身*Igf1*基因敲除后,基因敲除小鼠血清中睾酮水平较野生小鼠明显降低<sup>[27]</sup>。本研究发现,在离体OPIAD模型中,IGF1能逆转DAMGO所引起的睾酮水平降低,提示IGF1在OPIAD治疗方面的重要作用。胰岛素受体、IGF1受体及IGF2受体在睾丸组织中广泛分布,睾丸支持细胞、间质细胞和生殖细胞上均有它们的存在<sup>[28]</sup>,与IGF1有一定的亲和力。本研究结果表明,IGF1可通过睾丸组织中的IGF1受体促进睾丸间质细胞合成睾酮。

另外,睾酮的合成与分泌过程涉及到诸多睾酮合成相关酶类如*Scarb1*,*Star*,*3βHsd1*,*Cyp17α1*,*Cyp11α1*和*17βHsd3*等。有研究表明,IGF1能增加*Star*基因的表达,而当敲除*Igf1*基因后,*Scarb1*,*Star*,*Cyp17α1*,*Cyp11α1*和*17βHsd3* mRNA水平明显降低<sup>[7,29]</sup>。本研究结果也发现,IGF1能显著增强曲细精管组织中*Star*和*17βHsd3* mRNA表达水平,对*Cyp11α1*,*Cyp17α1*,*Scarb1*和*3βHsd1* mRNA水平则无影响。同时,经DAMGO处理后,曲细精管组织中的*3βHsd1* mRNA表达水平明显降低,而*Cyp11α1*,*Cyp17α1*,*Scarb1*,*17βHsd3*和*Star* mRNA表达水平则无明显变化。

本研究采用IGF1对OPIAD进行外周治疗的方法,未见文献报道。然而本研究依旧存在些许不足

之处,如睾丸组织中各类细胞上是否存在阿片 $\mu$ 受体,阿片类药物以及IGF1具体作用于睾丸中何种细胞上的受体产生相应的生物学效应,其他类型的阿片受体是否参与OPIAD的外周机制,这些是后续研究应解决的关键性问题。

综上所述,在整体动物和离体组织培养实验均表明,OPIAD存在中枢和外周2种机制。阿片类药物直接作用于睾丸组织上的阿片 $\mu$ 受体,抑制*3βHsd1*等睾酮合成相关酶mRNA表达,减少睾酮和IGF1的合成分泌,IGF1能直接通过睾丸组织中的IGF1受体,促进*Star*和*17βHsd3* mRNA表达,从而对OPIAD产生相应的治疗作用。

#### 参考文献:

- [1] Gebhart GF, Schmidt RF. *Encyclopedia of Pain*[M]. Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013:4274-4274.
- [2] Rubinstein AL, Carpenter DM, Minkoff JR. Hypogonadism in men with chronic pain linked to the use of long-acting rather than short-acting opioids[J]. *Clin J Pain*, 2013, 29(10): 840-845.
- [3] Abs R, Verhelst J, Maeyaert J, et al. Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids[J]. *J Clin Endocr Metab*, 2000, 85(6):2215-2222.
- [4] Cicero T, Bell R, Wiest W, et al. Function of the male sex organs in heroin and methadone users[J]. *New Engl J Med*, 1975, 292(17):882-887.
- [5] Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, et al. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline[J]. *J Clin Endocr Metab*, 2006, 91(6): 1995-2010.
- [6] Rhoden EL, Morgentaler A. Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring[J]. *New Engl J Med*, 2004, 350(5):482-492.
- [7] Yu Y, Han Y, Niu R, et al. Ameliorative effect of VE, IGF-I, and hCG on the fluoride-induced testosterone release suppression in mice Leydig cells[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 181(1):95-103.
- [8] Farahimanesh S, Karimi S, Haghparast A. Role of orexin-1 receptors in the dorsal hippocampus (CA1 region) in expression and extinction of the morphine-induced conditioned place preference in the rats[J]. *Peptides*, 2018, 101: 25-31.
- [9] Vamathevan V, Murby E J. Accurate analysis of testosterone in human serum using a heart-cutting 2D-UPLC-MS/MS procedure[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1038:49-56.

- [10] Soltanineghad M, Roshan-milani S, Saboory E, *et al*. Opioid-mediated Sertoli cells apoptosis is involved in testicular homeostasis and/or reproductive dysfunction[J]. *Bratisl Med J*, 2019, 120(4):277-283.
- [11] Colon E, Svechnikov KV, Carlsson-skwirut C, *et al*. Stimulation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells evoked by interleukin-1 $\alpha$  is potentiated by growth hormone and insulin-like growth factors[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 221-230.
- [12] Kieffer BL, GavÉriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout[J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 66(5):285-306.
- [13] Filipczak-Bryniarska I, Nazimek K, Nowak B, *et al*. In contrast to morphine, buprenorphine enhances macrophage-induced humoral immunity and, as oxycodone, slightly suppresses the effector phase of cell-mediated immune response in mice[J]. *Int J Immunopharmacol*, 2017, 54:344-353.
- [14] Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, *et al*. Expression and localization of  $\delta$ -,  $\kappa$ -, and  $\mu$ -opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility [J]. *J Clin Endocr Metab*, 2006, 91(12):4969-4975.
- [15] Fabbri A, Tsai-Morris CH, Luna S, *et al*. Opiate receptors are present in the rat testis. Identification and localization in Sertoli cells[J]. *Endocrinology*, 1985, 117(6):2544-2546.
- [16] Antony T, Alzaharani SY, El-Ghaiesh SH. Opioid-induced hypogonadism: pathophysiology, clinical and therapeutics review[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(5):741-750.
- [17] Gerendai I, Nemeskeri, Csernus V. Intratesticular injection of [ $\alpha$ -met<sup>2</sup>-pro<sup>5</sup>] enkephalinamide suppresses testosterone secretion of the testis of immature rat [J]. *Regul Peptides*, 1990, 27(1):107-115.
- [18] Stanley E, Lin CY, Jin S, *et al*. Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(10):5002-5010.
- [19] Sjögren K, Liu JL, Blad K, *et al*. Liver-derived insulin-like growth factor I(IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 7088-7092.
- [20] Keating GM. Mecasermin[J]. *Biodrugs*, 2008, 22(3): 177-188.
- [21] Low LS, Nair SM, Davies AJW, *et al*. Aspiration and sclerotherapy of hydroceles and spermatoceles/epididymal cysts with 100% alcohol[J]. *Anz J Surg*, 2019, 90:57-61.
- [22] Campbell PS, Patricia S, Eckenhoff JB, *et al*. Transdermal drug delivery device:US,4867982[P]. 1989-09-19.
- [23] Griffeth RJ, Bianda V, Nef S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function[J/OL]. *Basic Clin Androl*, 2014, 24:12 [2020-03-20]. <http://www.bacandrology.com/content/24/1/12>. Doi:10.1186/2051-4190-24-12.
- [24] Pitetti JL, Calvel P, Zimmermann C, *et al*. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(5): 814-827.
- [25] Sriraman V, Rao VS, Sairam MR, *et al*. Effect of deprivation of LH on Leydig cell proliferation: involvement of PCNA, cyclin D3 and IGF-1[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 162(1):113-120.
- [26] Eugenia C, Farasat Z, Magnus A, *et al*. Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(1):128-139.
- [27] Hu GX, Lin H, Chen GR, *et al*. Deletion of the IGF1 gene: suppressive effects on adult Leydig cell development[J]. *J Androl*, 2010, 31(4): 379-387.
- [28] Neirijnck Y, Kuhne F, Mayere C, *et al*. The tumor suppressor PTEN regulates negatively sertoli cell proliferation, testis size, and sperm production *in vivo* [J]. *Endocrinology*, 2018, 160(2): 387-398.
- [29] Wang GM, O'Shaughnessy PJ, Chubb C, *et al*. Effects of insulin-like growth factor 1 on steroidogenic enzyme expression levels in mouse Leydig cells[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(11): 5058-5064.

## Peripheral mechanism of opioid-induced androgen deficiency and therapeutic effect of insulin-like growth factor 1

HUANG Jian-jian<sup>1</sup>, CHEN Xing-chi<sup>1</sup>, CUI Yan-hua<sup>1</sup>, ZHOU Jiang-ping<sup>1</sup>, NAN Hai-han<sup>2</sup>, HAO Xin-rui<sup>1</sup>, LIN Han<sup>1</sup>

[1. Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital, the Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 2. School of Laboratory Medicine (School of Life Sciences), Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China]

**Abstract: OBJECTIVE** To investigate the peripheral mechanism of opioid-induced androgen deficiency

ciency (OPIAD) and the therapeutic effect of insulin-like growth factor 1 (IGF1) against OPIAD. **METHODS** C57BL/6 male adult mice were sc injected with morphine ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and saline before the serum and testicular tissue were collected after 4 h. The seminiferous tubules of adult male mice were isolated and cultured for 24 h, and then divided into different groups for the following experiments: ① Normal control and IGF1 group (incubated with IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 12, 24 or 48 h). ② Normal control and DAMGO group (incubated with DAMGO  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 48 h). ③ Normal control, IGF1 group (incubated with IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 48 h), DAMGO group (incubated with DAMGO  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 48 h) and IGF1+DAMGO group (co-incubated with DAMGO  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 48 h). ④ Normal control, vehicle (incubated with 0.01% DMSO for 24 h), IGF1 (incubated with IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h), picro-podophyllin (PPP) (incubated with PPP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h) and PPP+ IGF1 (incubated with PPP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 2 h, then co-incubated with IGF1  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h) group. Testosterone contents in the serum and testicular homogenate of mice and the culture supernatant of seminiferous tubules were measured by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS). IGF1 contents in the serum and testicular homogenate of mice and the culture supernatant of seminiferous tubules were measured by ELISA assay. The mRNA levels of testosterone synthesis-related enzymes in seminiferous tubules were measured by qRT-PCR. **RESULTS** *In vivo*: Compared to normal control group, the contents of testosterone and IGF1 in the serum and testicular homogenate of mice in morphine groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). *In vitro*: Compared to normal control group, the testosterone contents in the culture supernatant of seminiferous tubules were increased in IGF1 24 h- and 48 h-incubation groups ( $P < 0.01$ ). Compared to normal control group, the IGF1 contents in the culture supernatant of seminiferous tubules were decreased in DAMGO group ( $P < 0.01$ ). Compared to normal control group, the testosterone content in the culture supernatant of seminiferous tubules was increased significantly in IGF1 group ( $P < 0.01$ ) but decreased in DAMGO group ( $P < 0.05$ ). The mRNA levels of *Star* and *17 $\beta$ Hsd3* in tissue of seminiferous tubules were enhanced in IGF1 group and IGF1+DAMGO group ( $P < 0.05$ ), but *3 $\beta$ Hsd1* mRNA levels were inhibited in DAMGO group ( $P < 0.01$ ). Compared with DAMGO group, the testosterone content in the culture supernatant of seminiferous tubules was increased significantly in IGF1+DAMGO group ( $P < 0.01$ ), and the mRNA levels of *Star* and *17 $\beta$ Hsd3* in tissue of seminiferous tubules were enhanced in IGF1+DAMGO group ( $P < 0.05$ ). Compared with IGF1 group, the testosterone content was decreased in IGF1+PPP group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in concentrations of testosterone between PPP group and IGF1+PPP group. **CONCLUSION** The peripheral mechanism mediated by  $\mu$  receptor is involved in OPIAD. IGF1 can promote the synthesis and secretion of testosterone through IGF1 receptor, and alleviate the inhibition of the synthesis and secretion of testosterone caused by DAMGO.

**Key words:** insulin-like growth factor 1; opioid-induced androgen deficiency; testosterone

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (81471448); Science and Technology Bureau Project of Wenzhou (Y20140656); and Science and Technology Bureau Project of Wenzhou (Y20180119)

**Corresponding author:** LIN Han, E-mail: nanlinhannansh@qq.com

(收稿日期: 2020-03-30 接受日期: 2020-08-20)

(本文编辑: 赵楠)