

# 睾丸间质细胞在小鼠生精恢复过程中的作用

袁丽芳<sup>1,2</sup>, 安娜<sup>2</sup>, 王善林<sup>2</sup>, 关淑鸾<sup>2</sup>, 王峰<sup>2</sup>, 李宗悦<sup>2</sup>, 朱宝长<sup>2\*</sup>

(1. 上饶师范学院 数学与计算机科学学院 中国江西 上饶 334000;

2. 首都师范大学 生命科学学院, 中国北京 100048)

**摘要:** 研究睾丸间质细胞对小鼠生精恢复过程的作用, 可以为深入理解睾丸精原干细胞与其微环境(体)细胞间的相互关系提供实验证据。选取 8 周龄健康 C57 近交系成年雄性小鼠 60 只, 腹腔注射 22 mg/kg 白消安建立小鼠精子发生受阻模型, 随机分成 1, 2-二甲磺酸乙烷(ethane 1,2-dimethanesulphonate, EDS)处理组、氟他胺处理组和对照组, 每组 20 只, 3 d 后分别给予 EDS 腹腔注射(100 mg/kg)、氟他胺埋植, 对照组仅注射溶剂、埋植空管, 分别在处理后的 1 个月内每周采样, Real-time RT-PCR 检测 CSF1、Gdnf、PLZF 和 Nanog mRNA 表达水平, Gdnf 蛋白水平表达, 并在 4 周时进行睾丸组织 HE 染色, 观察组织学变化并对相关指标进行量化分析。结果表明, 小鼠睾丸间质细胞去除及雄激素受体阻断均能促进睾丸损伤后的生精恢复过程, 但是, 受体阻断的效果更强, 说明间质细胞除了通过雄激素发挥作用外还直接对生精恢复起着一定的促进作用, 这种促进作用可能是通过分泌 CSF1 等细胞因子来实现的。

**关键词:** 间质细胞; 生精恢复; 小鼠; 睾丸

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)01-0006-07

## The Role of Leydig Cell for Restoration of Spermatogenesis in Testis of Mice

YUAN Li-fang<sup>1,2</sup>, AN Na<sup>2</sup>, WANG Shan-lin<sup>2</sup>, GUAN Shu-luan<sup>2</sup>, WANG Feng<sup>2</sup>,  
LI Zong-yue<sup>2</sup>, ZHU Bao-chang<sup>2\*</sup>

(1. College of Mathematics and Computer Science, Shangrao Normal University, Shangrao 334000, Jiangxi, China; 2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** To study the role of Leydig cells in restoration of spermatogenesis in testis of mice, we compared reestablishment of spermatogenesis in testes with ablation of Leydig cells and blockage of androgen receptors for understanding relationship between spermatogonial stem cells and their microenvironment. Total numbers of 60 male mice (C57) were selected at age of 8 weeks old. Spermatogenesis disruption model was made by intraperitoneal injection with busulfan (22 mg/kg BW(body weight)). Then they were randomly divided into 3 groups. Treatments of EDS group (n=20), flutamide group (n=20) and the control group (n=20) were received intraperitoneal injection of ethane 1, 2-dimethanesulphonate(EDS) (100 mg/kg BW), flutamide implantation and vehicle solution, respectively. The expression of CSF1, Gdnf, PLZF and Nanog mRNA were measured by Real-time RT-PCR at 4 weeks after treatment. In addition, the protein expression of GDNF was assayed by Western blot. The histological changes in testicular tissue were observed under microscope with HE staining at 4 weeks. Although both removal of Leydig cells and blockage of androgen receptors could promote restoration of spermatogenesis in testis of mice, we found that androgen receptor blockage gave rise to a stronger effect

收稿日期: 2014-04-02; 修回日期: 2014-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870934)

作者简介: 袁丽芳(1989-), 女, 江西抚州人, 主要从事生殖生物学研究; \* 通讯作者: 朱宝长(1958-), 男, 陕西宝鸡人, 首都师范大学生命科学学院教授, 主要从事生殖生物学研究, Tel: 010-68903623, E-mail: baochang@mail.cnu.edu.cn.

than that of Leydig cell removal, which implies that apart from secreting androgen, Leydig cells also promote spermatogenesis recovery process directly. This may be achieved by secreting cytokine of CSF1 and others.

**Key words:** Leydig cells; restoration of spermatogenesis; mice; testis

(*Life Science Research*, 2015, 19(1): 006~012)

在生理条件下, 睾酮对于成年动物的精子发生是不可或缺的, 然而 Ogawa 和 Dobrinski 等在精原干细胞移植研究中相继表明<sup>[1]</sup>, 使用 GnRH 激动剂抑制受体动物睾酮后能显著增加精原干细胞移植后的克隆形成效率, 进而证实促进精原干细胞克隆率就是通过抑制睾酮与受体结合来实现的。因此, 不论何种方法只要抑制了睾酮的作用就能表现出这种促进作用(包括 GnRH 激动剂、受体拮抗剂等), 其作用机理至今仍不完全明了。睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)仅占睾丸细胞总数的 2%~4%, 却是雄性睾丸内所有雄激素的唯一来源。然而, 睾酮是通过受体来发挥作用的, 研究发现睾酮受体仅存在于睾丸体细胞(包括支持细胞、赖氏细胞和管周膜细胞等)上, 生殖细胞本身并没有睾酮受体, 也就是说, 睾酮并不直接作用于生殖细胞, 而是通过睾丸体细胞对生殖细胞施加影响的。有研究表明 Sertoli 细胞可以通过分泌某些细胞因子(如 GDNF、SCF、ERM 等)影响精原干细胞的增殖<sup>[2]</sup>, 然而, 其他睾丸细胞也对精子发生具有一定的贡献, 如赖氏细胞除了分泌睾酮外也能够分泌 CSF1 来影响精原干细胞<sup>[3]</sup>, 但是, LCs 在精子发生受损后的恢复过程中是否发挥作用却仍然不清楚。本研究通过对比去除 LCs 与阻断雄激素的区别来推测睾丸 LCs 缺失在精子发生恢复过程中是否具有雄激素以外的其他作用, 为深入理解睾丸精原干细胞与其微环境(体)细胞间的相互关系提供实验证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

购自军事医学科学院品系为 C57 近交系成年健康雄性小鼠, 饲养在本校动物中心的屏障环境内, 自由饮食, 环境温度为 22~26 °C, 人工光照周期为 12L:12D 自动控制。

### 1.2 主要试剂

白消安(busulfan)、DMSO、MTT 及氟他胺(flutamide)(美国 Sigma 公司), Trizol 及 RT-PCR 试剂盒(德国 TianGen 公司), SYBR Green Assay 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), 引物由上海 Invitrogen 公司

设计合成, Gdnf 抗体(美国 Santa 公司), 一抗  $\beta$ -Actin(鼠源, 中杉公司), EDS 由本实验室合成。

### 1.3 小鼠睾丸损伤模型

8 周龄雄性 C57 小鼠 60 只, 25~32 g, 以溶剂比例(DMSO:水=1:1)配制成 4.4 mg/mL 的溶液, 按 22 mg/kg 体重分别给 60 只小鼠腹腔注射后, 随机分成 EDS 处理组、氟他胺处理组和对对照组 3 组, 每组 20 只。

### 1.4 小鼠 LCs 去除和氟他胺埋植

EDS 处理组在白消安注射 3 d 后腹腔注射 100 mg/kg EDS, 配制方法为称取 200 mg EDS 粉末, 溶于 DMSO:水=1:3 的 10 mL 溶液中; 氟他胺组小鼠颈部皮下埋植两头开口 5 mm 长的硅胶管, 管内填满氟他胺粉末。

### 1.5 睾丸组织形态学观察

EDS 和氟他胺处理 4 周后, 处死小鼠, 取睾丸, 放入苦味酸(Bouin 液)中固定 15 h, 常规制备石蜡切片, HE 染色, 于光学显微镜下观察睾丸组织形态学切片。统计曲细精管直径(seminiferous tubule diameter)、生精上皮厚度(the thickness of seminiferous epithelium)、成型精子头部数(sperm head number)及空泡率(vacuoles rate)等组织形态学指标, 每组中每项指标至少统计 10 个切片, 100 个曲细精管。不规则圆形曲细精管取最小直径值, 生精上皮厚度取垂直和水平方向 4 个生精上皮厚度的平均值, 空泡率=产生空泡的曲细精管个数/总曲细精管数 $\times 100\%$ 。

### 1.6 Real-time RT-PCR 检测睾丸组织 PLZF、Gdnf、Nanog、CSF1 mRNA 表达

采用 Trizol-氯仿抽提总 RNA, 各组 RNA 样本 260 nm 与 280 nm 吸光度(A)值的比值( $A_{260}/A_{280}$ )均 $>1.8$ , 符合 PCR 试验要求。按 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA, 加入 SYBR Green Assay, 反转录混合体系建立完成后, 混匀, 进行下一步 Real time RT-PCR 检测, 本实验用的是 Bio-RAD Real-time RT-PCR 仪, mRNA 水平用 L19 作内对照标准化。基因表达通过各组 Ct 值与对照组 Ct 值间的比值做相对定量分析。各基因的引物及其碱基序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物及其碱基序列  
Table 1 Primers in quantitative Real-time PCR

Primer name	Primer sequence
Gdnf F	5'-CGGACGGGACTCTAAGATGA-3'
Gdnf R	5'-CGTCATCAAACCTGGTCAGGA-3'
PLZF F	5'-AACGGTTCCTGGACAGTTG-3'
PLZF R	5'-CCCACACAGCAGACAGAAGA-3'
Nanog F	5'-CCAGTGGAGTATCCCAGCAT-3'
Nanog R	5'-GAAGTTATGGAGCGGAGCAG-3'
CSF1 F	5'-GCAGCTGTAAAACTAATGTGATCTTAATC-3'
CSF1 R	5'-ATGAGGACAGACAGGTGGAAGTCCAGTAATGAAG-3'
L19 F	5'-GGACAGACTCTTGATGATCTC-3'
L19 R	5'-CTGAAGGTCAAAGGAATGTG-3'

### 1.7 MTT 法探究不同浓度 EDS 对 Helas 细胞的损伤

取对数生长期的 Helas 细胞,以  $1 \times 10^5/\text{mL}$  的密度接种于 96 孔板,培养箱培养 24 h 后加入终浓度为 0.1 mg/mL、1 mg/mL、10 mg/mL、100 mg/mL、1 000 mg/mL 直至饱和浓度的 EDS,每组 6 个复孔。继续培养 24 h 后于倒置显微镜下观察细胞形态变化,每孔弃旧液培养,并加入 20  $\mu\text{L}$ 、5 g/L 的 MTT 原液和 180  $\mu\text{L}$  无血清培养基,放入培养箱继续培养,4 h 后弃去培养液并加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,待沉淀溶解酶标仪测定 570 nm 波长的吸光度值。

### 1.8 Western-Blot 检测睾丸组织 Gdnf 的蛋白表达

TRIzol 法提取蛋白质,Bradford 法测定 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 的对照组、EDS 组和氟他胺组共 15 个蛋白样的蛋白浓度,配制 12% 的分离胶及 5% 浓缩胶,运用 Bio-RAD 的标准电泳装置电泳后转至 PVDF 膜,1gBSA 加上 20  $\mu\text{L}$  PBST 室温封闭 1 h,1:1 000 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,1:2 000 二抗室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,将膜取出加显影液 A、B,按照 0.5 mL A、0.5 mL B、4 mL 水的配制方法,按操作程序进行曝光处理,曝光时间为 2~5 s。用 GAPDH 进行蛋白检测。条带进行图像分析,测定灰度值,用  $\beta$ -Actin 作内参来比较各组 Gdnf 的相对表达差异。

### 1.9 统计学分析

实验结果用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间两两比较采用 T 显著性检验;显著性差异,与对照组相比较,a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ ;与 EDS 组比,c:  $P < 0.01$ , d:  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

使用白消安(22 mg/kg BW)处理成年小鼠可以部分地去除睾丸内的精原干细胞,使睾丸精子发生受阻,表现为睾丸质量下降,曲细精管直径、

曲细精管上皮厚度、精子数目显著下降,生精上皮空泡率上升,但是之后将逐渐恢复,本研究将白消安处理后的小鼠随机分为 3 组,分别使用 EDS、flutamide 和载体溶剂处理,采样观察睾丸组织学变化和组织内不同细胞因子的变化。

### 2.1 小鼠睾丸组织曲细精管直径、生精上皮厚度、成型精子头部数及空泡率比较

EDS 及氟他胺处理 4 周后,EDS 和氟他胺处理组睾丸曲细精管直径、生精上皮厚度、成型精子头部数均显著大于对照组 ( $P < 0.01$ ),而空泡率则显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。但是,EDS 和氟他胺组间差异不显著(见表 2),说明使用 EDS 去除赖氏细胞与使用氟他胺阻断雄激素受体在曲细精管中精子发生恢复中所起到的作用基本相似。此外,通过睾丸组织学切片观察发现,EDS 及氟他胺处理 4 周后,EDS(图 1C、G)及氟他胺(图 1D、H)处理组曲细精管内各级生精细胞排列紧密,生精上皮厚度正常,管腔内可见大量成熟精子,提示此时小鼠精子发生恢复程度较高,而对照组曲细精管空泡率明显,生精上皮厚度变薄,管腔内成熟精子较少。说明使用 EDS 去除赖氏细胞与使用氟他胺阻断雄激素受体都能促进睾丸损伤小鼠的生精恢复。

### 2.2 小鼠睾丸组织中 Gdnf、Nanog、PLZF mRNA 表达情况

EDS 及氟他胺处理 4 周后,Real-time RT-PCR 结果显示,EDS 和氟他胺处理组睾丸组织中 Gdnf、Nanog、PLZF mRNA 的表达量均显著高于对照组(图 2),Gdnf 是由 Sertoli 细胞分泌的细胞因子,它能够通过受体作用于睾丸精原干细胞,促进后者的自我更新,从而促进睾丸精子发生恢复。本实验在处理 4 周不仅发现 EDS 和氟他胺组均显著高于对照组,而且发现氟他胺组显著高于 EDS 组,尤其是 PLZF 的表达在氟他胺组的水平近 4 倍于 EDS 组,由于氟他胺的使用仅在睾酮受

表 2 小鼠睾丸曲细精管几项组织形态学指标比较

Table 2 Comparison of several morphological indicators in somniferous tubule of the mouse testis

Group	Seminiferous tubule diameter/ $\mu\text{m}$	The thickness of seminiferous epithelium/ $\mu\text{m}$	Sperm head number	Vacuoles rate/(%)
Control	135.28 $\pm$ 4.87	24.33 $\pm$ 4.05	15.50 $\pm$ 5.61	72.43 $\pm$ 0.669
EDS	171.28 $\pm$ 4.04 <sup>a</sup>	50.67 $\pm$ 5.49 <sup>a</sup>	36.50 $\pm$ 5.68 <sup>a</sup>	5.31 $\pm$ 2.612 <sup>a</sup>
Flutamide	166.86 $\pm$ 4.20 <sup>a</sup>	49.82 $\pm$ 4.79 <sup>a</sup>	33.00 $\pm$ 5.06 <sup>a</sup>	5.87 $\pm$ 1.778 <sup>a</sup>

注:表中字母 a 表示该数据与对照组相比差异显著( $P<0.01$ )。

Notes: The letter "a" indicates a significant difference compared with control group ( $P<0.01$ ).

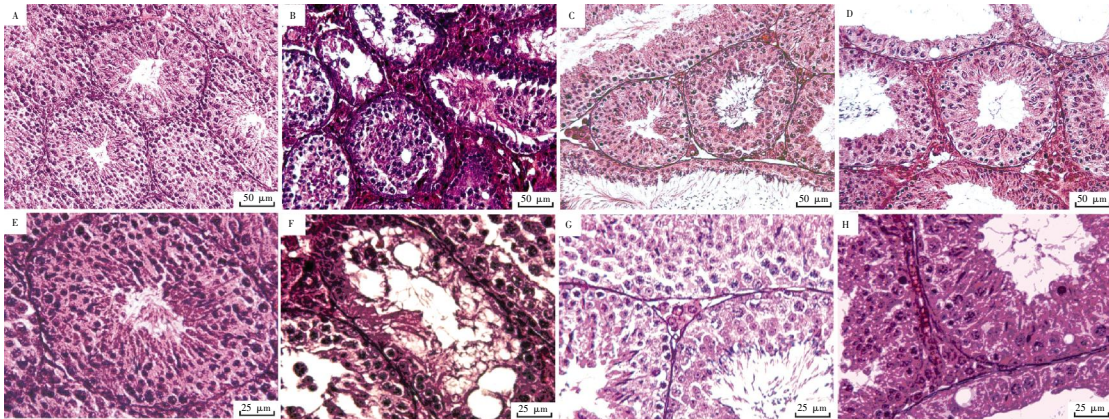


图 1 小鼠睾丸组织学切片(A、B、C、D;HE×200;E、F、G、H;HE×400)

(A)、(E)未经任何处理正常小鼠;(B)、(F)对照组(只注射白消安);(C)、(G)EDS组(白消安+EDS);(D)、(H)氟他胺组(白消安+氟他胺)

Fig.1 Morphological sections of the mouse testis(A, B, C, D; HE×200; E, F, G, H; HE×400)

(A), (E) Untreated with busulfan; (B), (F) Control group (only treated with busulfan); (C), (G) EDS group (busulfan + EDS); (D), (H) Flutamide group (busulfan + Flutamide)

体水平阻碍其作用,并不影响 LCs 的其他功能,而 EDS 的使用则因为诱导赖氏细胞凋亡而表现为既导致雄激素水平下降又影响赖氏细胞的功能(包括其可能的细胞因子分泌),故推测 EDS 组与氟他胺组之间的差异主要体现在赖氏细胞的功能上,EDS 处理除了阻断睾酮的作用外还可能同时阻断了其他对精原干细胞有促进作用的因子。Nanog 与 PLZF 都是由精原干细胞来源的细胞因子,两者在睾丸中的表达量与对照组相比都有显著的增加,且表现为氟他胺组高于 EDS 组,说明抑制睾酮可以显著刺激精原干细胞的增殖,而且仅抑制睾酮比仅抑制睾酮又同时去除赖氏细胞的效果更好。考虑到睾酮受体仅在体细胞分布,而 Gdnf 来源于 Sertoli 细胞的情况,对比各处理组 Gdnf 的表达趋势,提示抑制睾酮对生精恢复的作用可能是通过 Gdnf 来实现的。

### 2.3 小鼠睾丸组织 CSF1 在处理后的 mRNA 表达情况

EDS 及氟他胺处理后 1 月内每周采样,Real-time RT-PCR 结果显示,EDS 处理组睾丸组织 CSF1 mRNA 的表达量均低于对照组(1 w、2 w、3

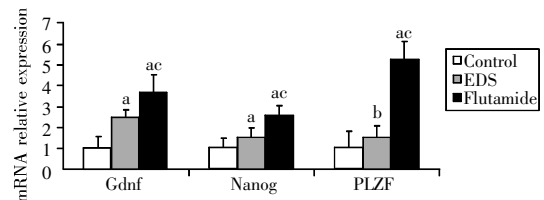


图 2 不同处理组小鼠睾丸组织中 Gdnf、Nanog、PLZF mRNA 表达情况

图中 a、b、c 表示显著性差异。a:与对照组相比  $P<0.01$ ;b:与对照组相比  $P<0.05$ ;c:与 EDS 组比  $P<0.01$ 。

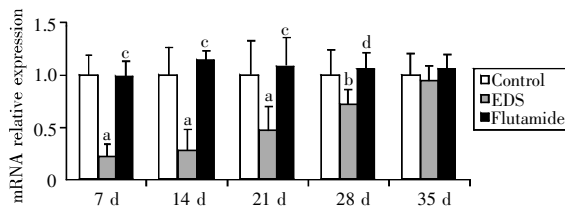
Fig.2 Expressions of Gdnf, Nanog and PLZF mRNA in the mouse testis

The letters above each bar mean a significant difference compared with control (a:  $P<0.01$ ; b:  $P<0.05$ ) and EDS(c:  $P<0.01$ ).

w  $P<0.01$ , 4 w  $P<0.05$ );氟他胺与对照相比差异不大(见图 3),EDS 导致赖氏细胞凋亡,但是,一个月后则逐渐恢复,此处虽然 EDS 处理引起了细胞凋亡,但是由赖氏细胞分泌的 CSF1 的表达在处理一周下降最为明显,之后逐渐恢复,与赖氏细胞的变化趋势相似,这表明 CSF1 表达与赖氏细胞的存在数量基本一致。

### 2.4 Western-blot 检测睾丸组织 Gdnf 的蛋白表达情况

Gdnf 的蛋白表达量在处理后的 21~35 d,EDS

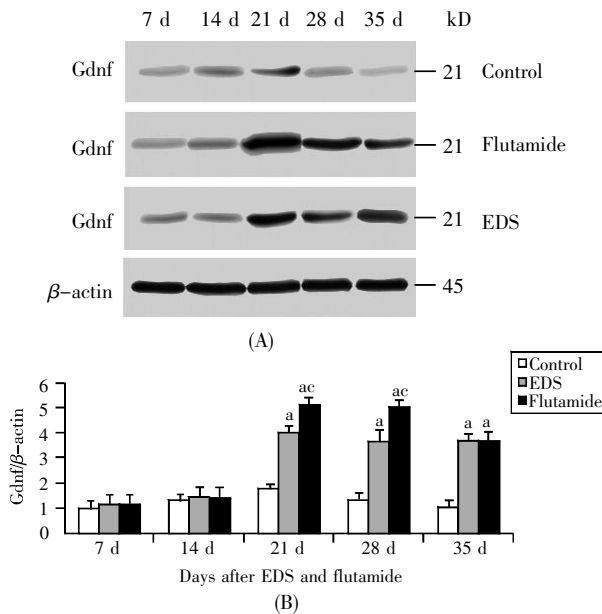


**图3** 小鼠睾丸处理后不同时间 CSF1 mRNA 表达情况  
图中 a、b、c、d 表示显著性差异。a: 与对照组相比  $P < 0.01$ ; b: 与对照组相比  $P < 0.05$ ; c: 与 EDS 组比  $P < 0.01$ ; d: 与 EDS 组比  $P < 0.05$ 。

**Fig.3** Expressions of CSF1 mRNA in the mouse testis of different time

The letters above each bar mean a significant difference compared with control (a:  $P < 0.01$ ; b:  $P < 0.05$ ) and EDS(c:  $P < 0.01$ ; d:  $P < 0.05$ ).

和氟他胺组均显著高于对照组( $P < 0.01$ ) (图 4), 也验证了两种处理方式降低睾酮均能促进精子发生的恢复, EDS 组与氟他胺组比较, 氟他胺组显著高于 EDS 组(21 d,  $P < 0.01$ ; 28 d,  $P < 0.01$ ), 说明去除赖氏细胞抑制睾酮后蛋白表达不如仅抑制睾酮的蛋白表达高, 这与 4 w 时, mRNA 表达趋势相符, 也进一步说明赖氏细胞对生精恢复有贡献。



**图4** EDS 和氟他胺对 Gdnf 在睾丸组织相对表达量的影响

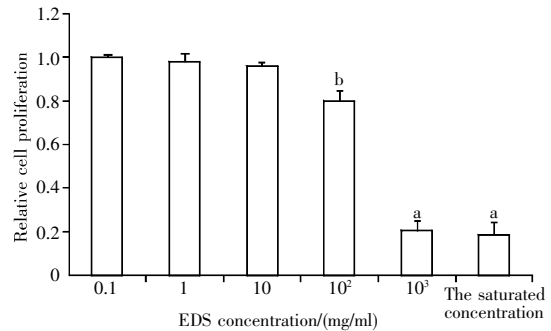
(A) Gdnf 蛋白质相对表达量; (B) Gdnf mRNA 相对表达量  
**Fig.4** Effects of EDS and flutamide on relative expressions of Gdnf in testes of mice.

(A) Protein expressions of Gdnf in testes of mice; (B) mRNA expressions of Gdnf in testes of mice

**2.5 MTT 法探究不同浓度 EDS 对 Helas 细胞的损伤作用**

为了探究 EDS 是否存在某种非特异性作用, 本研究特使用体外培养的 Helas 细胞作为对象,

将本实验小鼠腹腔注射 EDS 浓度 (100 mg/kg) 换算为整体循环浓度为 0.1 mg/mL, 并以此为起始浓度, 浓梯度为 0.1、1、10、100、1 000 mg/mL 增加直至 EDS 的饱和浓度 (10 000 mg/mL), 以相对细胞增殖数代表细胞存活率, 结果表明, 10 mg/mL 及以下 EDS 浓度 Helas 细胞存活率与对照相比差异不大, 高于 1 000 mg/mL 的 EDS 浓度开始对细胞增殖有明显的抑制作用 (见图 5), 这说明低浓度的 EDS 并未出现非特异性细胞毒性, 也表明本实验所使用的 EDS 浓度是安全的。



**图5** 不同浓度 EDS 处理 Helas 细胞的相对增殖数

**Fig.5** The relative cell proliferation of Helas cells under different EDS concentration

**3 讨论**

睾丸曲细精管由 Sertoli 细胞与发育状态不同的生殖细胞组成, Sertoli 细胞不仅为生殖细胞提供发育所需的营养物质与适当环境, 同时也通过分泌细胞因子对生殖细胞的发育进行调控, LCs 是曲细精管间质中分泌睾酮最重要的内分泌细胞, 它对于雄性的生育能力及第二性征的维持至关重要。在精原干细胞移植研究中, 人们发现抑制睾酮能够提高精原干细胞移植后的成功率<sup>[1]</sup>, 后来发现该作用是通过睾酮受体发挥作用的<sup>[4]</sup>, 此外, 在睾丸生精过程受损后的恢复过程中, 抑制睾酮同样有利于精子发生的恢复<sup>[5]</sup>。

此后还有人发现睾丸中除了 Sertoli 细胞外, 赖氏细胞也对精子发生具有重要的作用, 然而并未有明确的证据显示赖氏细胞是如何参与精子发生恢复的。本研究通过实验对 EDS 组和氟他胺组进行比较研究, 从而阐明抑制睾酮, 间质细胞对于受损精子的恢复具有的重要作用。

本实验结果显示, 不同处理后 4 周采样, 分别研究 Nanog 与 PLZF 基因的表达量, 以期代表精原干细胞的恢复状态, 可以看到 Nanog 的表达量与 Gdnf 基本相似 (图 2), 但是, 因为没有进行免疫组

化标记,尚不能看出二者的显著区别。而 PLZF 和 Nanog 在氟他胺组的表达显著地高于 EDS 组,说明 EDS 组的促进作用不如氟他胺组,与我们的假说基本吻合,因此推测,在受损睾丸生精恢复过程中 LCs 具有除了雄激素以外的贡献,Gdnf 的蛋白表达情况也验证了这一点。Gdnf 是由 Sertoli 细胞分泌的细胞因子,它能够通过其受体而作用于精原干细胞,促进其自我更新,因而参与精子发生重建过程,氟他胺和 EDS 处理都能够使 Sertoli 细胞表达 Gdnf 的能力增强,但是氟他胺处理组的作用更强,也说明本研究在组织学水平观察到氟他胺和 EDS 处理对睾丸受损后恢复的刺激作用都有可能是通过影响 Sertoli 细胞分泌 Gdnf,进而刺激精原干细胞增殖来实现的,尽管还不能完全排除其他机制的参与,如刺激精原干细胞各阶段的分化过程。

虽然用 EDS 去除赖氏细胞和用氟他胺阻断受体都能够达到阻止睾酮作用的目的,表现对睾丸精子恢复具有一定促进作用,但是,前者在去除赖氏细胞的同时也将赖氏细胞可能的其他分泌物也一同去除了,而后者在不干扰睾酮水平的情况下仅仅阻断了睾酮通过受体的作用途径。如果赖氏细胞分泌的细胞因子在生精过程恢复中具有一定的作用,那么,在 EDS 组中就应该表现为促进作用的抵消或减弱,否则就表明 LCs 没有雄激素以外明显的作用,从 Nonog、PLZF、GDNF 及 CSF1 表达等方面观察,本研究结果都显示 EDS 组低于氟他胺组的现象,故表明 LCs 在此发挥着雄激素以外的作用。CSF1 是目前已知由赖氏细胞分泌的细胞因子<sup>6</sup>,其主要作用是促进精原干细胞的增殖,在本实验中 CSF1 的表达随着 EDS 所诱导的赖氏细胞凋亡而急剧下降,随后有逐步升高的趋势,这种模式与前人报道基本一致,但是,CSF1 的降低并未在受损睾丸精子发生恢复过程中的组织学指标里表现出来(表 2),可能存在两方面的原因:第一,可能是由于组织学检验的灵敏度相对较低,从而导致没有甄别出;第二,可能是抑制睾酮所出现的促进生精恢复的作用是通过其他途径起作用的。本研究组织学采样点仅设在处理后 4 周,其他时间点则不得而知,LC 除了 CSF1 以外的功能尚不清楚,还需要进一步深入研究才能最终理解其作用。

EDS 是一种睾丸间质细胞特异性凋亡诱导剂,能杀死睾丸 LCs。不少研究者对其特性进行了

研究,结果表明对大鼠一次性腹腔注射 EDS(75 mg/kg)3 d 后,LCs 开始凋亡,1 周后体内睾酮降至最低,8 周后恢复注射前水平<sup>17,8)</sup>,同样,还有研究证明了 EDS 对小鼠也有类似的作用,但其效果不如大鼠敏感<sup>9)</sup>,为保障去除 LCs 的有效性,实验证明所采用的剂量(100 mg/kg EDS)高于大鼠的常用剂量。另外,既然 CSF1 是间质细胞表达的,那么 EDS 处理后,CSF1 mRNA 表达量应与间质细胞数量保持一致,本试验中 CSF1 mRNA 的表达量均低于对照组(1 w、2 w、3 w  $P < 0.01$ ,4 w  $P < 0.05$ ),氟他胺与对照相比差异不大,说明这个浓度的 EDS 对于去除小鼠 LCs 是有效的。

为了进一步验证 EDS 本身是否对小鼠除赖氏细胞外的其他细胞造成毒性或损伤,本研究通过 MTT 法将不同浓度的 EDS 作用于体外培养的 Helas 细胞,结果发现本实验浓度的 EDS 并未出现非特异性细胞抑制作用,而高于本实验百倍以上的浓度才开始显示出 Helas 细胞的存活率的下降趋势。因此,排除了本实验中 EDS 本身的毒性对其他细胞作用的可能性。

目前精原干细胞的表面标志并未在业界达成一致,其中,PLZF 是转录抑制因子 POZ 家族成员之一,仅在早期未分化的精原细胞中表达,是精原干细胞自我更新的必需因子<sup>10)</sup>,常用于精原干细胞的富集和纯化。Nanog 是在干细胞表达的另一个基因<sup>11)</sup>,有报道称 Nanog 仅在表达 PLZF 的部分精原干细胞中表达<sup>12)</sup>,提示在标记精原干细胞方面 Nanog 的特异性更强,但是本实验并未观察到更有意义的区别。

白消安是一种烷化剂,能够在体内非特异性地消除干细胞,包括生殖干细胞,临床上常用于肿瘤治疗,而在治疗过程中常伴随着生育力的下降<sup>13)</sup>。因此,本研究在实践中对于恢复精子发生的临床治疗具有一定的参考价值,同时,为在理论上重新认识干细胞与微环境(niche)的关系也提供了新的思路。精原干细胞的增殖受到其微环境的精确调控,虽然 niche 的组成目前还不完全清楚,有人认为 niche 就应该是与精原干细胞直接接触的 Sertoli 细胞,也有人认为 niche 应该包括所有对其调控有影响的细胞,而本研究发现赖氏细胞也对 niche 有一定的贡献,提示人们在认识 niche 的过程中应该将眼光放得更宽些,也可能它比人们想象中的更复杂,而这一问题的解决可能对研究各种干细胞与 niche 间关系都有着积极的生物学意义。

## 参考文献 (References):

- [1] OGAWA T, DOBRINSKI I, AVARBARBOCK M R, *et al.* Leuprolide, a gonadotropin releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes[J]. *Tissue Cell*, 1998, 30(5):583–588.
- [2] OATLEY J M, AVARBARBOCK M R, TELARANTA A I, *et al.* Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 2006, 103(25):9524–9529.
- [3] 李玲玲, 刘洋, 金波. 精原干细胞微环境的生物学特性[J]. *中华男科学杂志*(LI L L, LIU Y, JIN B. Biological characteristics of spermatogonial stem cell microenvironment[J]. *National Journal of Andrology*, 2012, 18(4): 359–363.
- [4] WAYNE C M, SUTTON K, WILKINSON M F. Expression of the *pem* homeobox gene in Sertoli cells increases the frequency of adjacent germ cells with deoxyribonucleic acid strand breaks[J]. *Endocrinology* 2002, 143(11): 4875–4885.
- [5] MEISTRICH M L, WILSON G, HUHTANIEMI I. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis[J]. *Cancer Research*, 1999, 59(15): 3557–3560.
- [6] OATLEY J M, OATLEY M J, AVARBOCK M R, *et al.* Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal[J]. *Development*, 2009, 136(7): 1191–1199.
- [7] KERR J B, DONACHIE K, ROMMERTS F F G. Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells *in vivo*: A new method for the study of seminiferous tubular– interstitial tissue interaction[J]. *Cell and Tissue Research*, 1985, 242(1): 145–156.
- [8] MORRIS A J, TAYLOR M F, MORRIS I D. Leydig cell apoptosis in response to ethane dimethanesulphonate after both *in vivo* and *in vitro* treatment[J]. *Andrology*, 1997, 18(3): 274–280.
- [9] 吴利平, 韩亚娟, 朱航, 等. EDS 诱导小鼠睾丸间质细胞 TM3 凋亡中 NDRG2 的表达及意义[J]. *西安交通大学学报(医学版)*(WU L P, HAN Y J, ZHU H, *et al.* Expression of NDRG2 gene in the EDS-induced apoptosis model of mouse Leydig cell TM3[J]. *Journal of Xian Jiao Tong University* (Medical Sciences), 2012, 3(6): 715–718.
- [10] KRETZMANN N A, CHIELA E, MATTE U, *et al.* N-acetylcysteine improves antitumoural response of interferon alpha by NF- $\kappa$ B down regulation in liver cancer cells[J]. *Comparative Hepatology*, 2012, 11(1): 4.
- [11] HART A H, HARTLEY L, LBRAHIM M, *et al.* Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human[J]. *Developmental Dynamics*, 2004, 230(1): 187–198.
- [12] ZOHNI K, ZHANG X, TAN S L, *et al.* The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice[J]. *Human Reproduction*, 2012, 27(1): 44–53.
- [13] 李景平, 郭文彬, 何金参, 等. 应用白消安构建唯支持细胞综合征小鼠动物模型[J]. *中华男科学杂志*(LI Jing-ping, GUO Wen-bin, HE Jin-sen, *et al.* Applications of busulfan to build mouse Sertoli cells only models[J]. *National Journal of Andrology*, 2013, 19(4): 300–305.

## 《生命科学研究》2015 年封面插图说明

2015 年《生命科学研究》封面左上角的插图是“2013 国际科学与工程可视化挑战赛”的冠军作品《看不见的珊瑚流》，表现的是由两个珊瑚水螅体引起的水流活动。这张图片叠加了两张分别耗时 90 分钟的图片，图中金色和蓝色的条纹表示水流，粉红色和紫色的部分是珊瑚水螅体，后者的来回运动可以将生物体的排泄物清除，并将食物带到触手附近。

(DOI: 10.1126/science.343.6171.600)