

生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000344

转化生长因子 $\beta 1$ 在环磷酰胺导致大鼠生精细胞凋亡中的表达及意义代江涛¹, 李旭良², 吴 春¹, 魏光辉², 林 涛², 何大维²

(重庆医科大学儿童医院 1. 胸心外科; 2. 泌尿外科; 儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:初步探讨环磷酰胺(cytoxan, CTX)导致生精细胞凋亡中睾丸组织内转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factors $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)的表达及意义。**方法:**将 CTX 作用于 9 d 龄雄性 Wistar 大鼠, 用药后 24 h、4 周、8 周实验组和对照组分别取材 10 只, 采用 TUNEL 法检测生精细胞凋亡, 采用 RT-PCR 技术检测睾丸组织中 TGF- $\beta 1$ 表达。**结果:**(1)用药后 24 h 实验组较对照组生精细胞凋亡无明显差异($F_{\text{组间}}=1.25, P=0.924$), TGF- $\beta 1$ -mRNA 表达无明显差异($F_{\text{组间}}=1.59, P=0.339$)。(2)用药后 4 周、8 周实验组生精细胞凋亡较对照组明显增多($F_{\text{组间}}=126.73, P=0.005$), 实验组 TGF- $\beta 1$ -mRNA 表达明显大于对照组($F_{\text{组间}}=32.86, P=0.007$)。**结论:**CTX 可增加生精细胞凋亡, 且伴有 TGF- $\beta 1$ 表达明显增加, 提示 CTX 引起 TGF- $\beta 1$ 表达增加可能导致生精细胞凋亡增多。

【关键词】环磷酰胺; 生精细胞; 凋亡; 转化生长因子- $\beta 1$

【中图分类号】R726

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-18

Expression and significance of transforming growth factor- $\beta 1$ in the apoptosis of rat spermatogenic cells induced by cytoxanDai Jiangtao¹, Li Xuliang², Wu Chun¹, Wei Guanghui², Lin Tao², He Dawei²

(1. Department of Cardiothoracic Surgery; 2. Department of Pediatric Urinary Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To preliminarily assess the expression and significance of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in the apoptosis of rat spermatogenic cells induced by cytoxan. **Methods:** Cytoxan was applied for male Wistar rats aged 9 d. After 24 h, 4 weeks and 8 weeks, apoptosis of spermatogonia was counted severally by TUNEL and TGF- $\beta 1$ was detected severally by RT-PCR in testes of 10 rats in experimental group and control group. **Results:** (1) There was no difference in the apoptosis of spermatogenic cell and TGF- $\beta 1$ expression between control group and experimental group at 24 h after the treatment at 24 h after the treatment. ($F_{\text{between groups}}=1.25, P=0.924$) ($F_{\text{between groups}}=1.59, P=0.339$) (2) Apoptosis of spermatogenic cell and TGF- $\beta 1$ expression were significantly increased in experimental groups than in control group ($F_{\text{between groups}}=126.73, P=0.005$) ($F_{\text{between groups}}=32.86, P=0.007$). **Conclusion:** Cytoxan not only increases apoptosis of spermatogenic cell in testes, but also results in elevated expression of TGF- $\beta 1$ of testes in rat, indicating that increased expression of TGF- $\beta 1$ in testes will lead to increased apoptosis of spermatogenic cell in testes.

【Key words】cytoxan; spermatogenic cell; apoptosis; transforming growth factor- $\beta 1$

在精子发生的过程中, 存在生精细胞的主动凋亡, 但有研究也证实: 化疗药物导致生精细胞凋亡较生理情况下增加^[1], 其机制目前尚未明确。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factors $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是一组多效能细胞因子, 具有调节细胞增殖、凋亡等生物学活性, 在睾丸组织中 TGF- $\beta 1$ 是否参与化

疗药物导致生精细胞的凋亡, 尚缺乏足够实验证据。本实验拟检测环磷酰胺(cytoxan, CTX)使用后大鼠生精细胞的凋亡及 TGF- $\beta 1$ 的表达, 以探讨 TGF- $\beta 1$ 在 CTX 导致生精细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、饲养环境与试剂

1.1.1 实验动物 据文献^[2]大鼠与人类睾丸发育时期的对应关系, 9 d 龄大鼠曲细精管内仅有精原细胞和 sertoli 细胞, 5

作者介绍: 代江涛, Email: daijiangtao2001@aliyun.cn,

研究方向: 化疗对生精功能损害的机理及保护。

通信作者: 李旭良, Email: lixuliang2003@aliyun.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000344.html>

周龄相当于青春期时期,9 周龄相当于成年时期,选取 9 d 龄雄性 Wistar 大鼠共 60 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 CTX:江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号:H32020857。蛋白酶 K:Sigma 公司。TUNEL 凋亡检测试剂盒:Roche 公司。Trizol、MLLV 逆转录酶、Taq 酶、RNasin、OligodT (15)、dNTPs 购自 Promega 公司,据文献及 Primer Premier 5.0 引物设计软件系统综合分析^[3],TGF- β 1 引物 1 序列:5'-TG-AGTGGCTGTCTTTTGACG-3',TGF- β 1 引物 2 序列:5'-AC-TTCCAACCCAGGTCCTTC-3';Rat 的内参照 β -actin 引物 1:5'-AGGGGCCGGAATCGTCATACT-3',Rat 的内参照 β -actin 引物 2:5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3',由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 实验方法

将动物 60 只按随机数字表法随机分为 2 组,实验组和对照组各 30 只。对照组:腹腔注射生理盐水 0.2 ml。CTX 实验组:根据动物与人的剂量换算公式^[4],选用 0.1 g/kg,腹腔注射,用药后 24 h、4 周、8 周每组分别随机处死 10 只取睾丸。

TUNEL 法检测生精细胞的凋亡。左侧睾丸 Bouin 液固定,常规石蜡包埋,切片,石蜡切片常规脱蜡,0.01 mol/L PBS 洗片 5 min $\times$ 2 次;蛋白酶 K 溶液 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min;0.01 mol/L PBS 洗片 5 min $\times$ 2 次;在冰上用含 0.1% TritonX-100 的 0.1% 枸橼酸钠溶液透化处理 2 min;0.01 mol/L PBS 洗片 5 min $\times$ 1 次;室温下,用 3% H_2O_2 浸泡玻片 20 min;0.01 mol/L PBS 洗片 5 min $\times$ 2 次;加 20 μ l TUNEL 反应混合液(酶溶液与标记液按 1:9 混合),37 $^{\circ}$ C 60 min;0.01 mol/L PBS 洗片 5 min $\times$ 3 次;加 20 μ l Coverter-POD,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min;0.01 mol/L PBS 洗片 5 min $\times$ 3 次;室温下,加 50~100 μ l DAB 显色 10~15 min;蒸馏水冲洗;苏木精轻度复染;脱水,封片。

结果判断:胞核呈棕黄色为阳性细胞,光镜下随机选取 10 个高倍视野,计数各视野阳性细胞数。

右侧睾丸组织。总 RNA 提取:取睾丸组织 50~100 mg,加入 1 ml Trizol 试剂提取。cDNA 制备:DEPC 水 4 μ l, OligodT (15) 1 μ l,总 RNA 5 μ l,滴加石蜡油防挥发,72 $^{\circ}$ C $\times$ 10 min,然后加 5 $\times$ 缓冲液 4 μ l,DEPC 水 2.5 μ l,4 $\times$ dNTP (10 mmol/L) 2 μ l,MLLV 逆转录酶 1 μ l,RNasin 0.5 μ l,42 $^{\circ}$ C $\times$ 1 h 进行逆转录 PCR 反应;10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ l,4 $\times$ dNTPs (10 mmol/L) 2 μ l,cDNA 4 μ l,Taq 酶 (5 μ l/L) 0.3 μ l,引物 1:1 μ l,引物 2:1 μ l,加 DEPC 水至 25 μ l,按 42 $^{\circ}$ C 30 min、94 $^{\circ}$ C 5 min、94 $^{\circ}$ C~58 $^{\circ}$ C~72 $^{\circ}$ C 各 1 min 循环,取 35 个循环,以 β -actin 为内对照。PCR 产物半定量分析:PCR 产物于 1.5% 琼脂凝胶上电泳 10~15 min,显影 10 min,紫外灯下观察,350 bp 代表 TGF- β 1,624 bp 代表 β -actin,结果拍照储存,Quantity-One 软件图像分析,以 β -actin 光密度测定值标化 TGF- β 1 的光密度值,得到各组的 TGF- β 1 的相对含量。

1.3 统计分析

采用 SPSS 软件进行统计学处理。实验数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用重复测量两因素多水平分析 (Huynh-Feldt 校正),检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 用药 24 h、4 周、8 周后各组间生精细胞凋亡数的检测
见表 1。用药 24 h 后实验组和对照组曲细精管内凋亡细

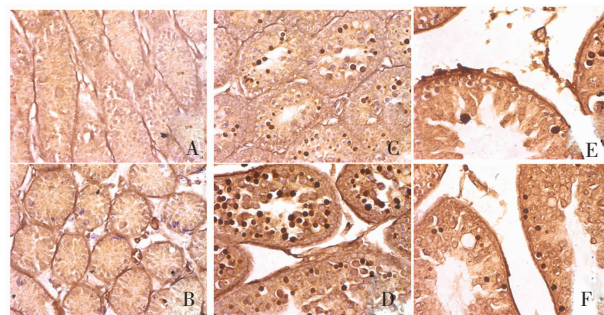
胞少见,2 组间差异无统计学意义 ($F_{\text{组间}}=1.25, P=0.924$),而用药后 4 周、8 周实验组较对照组生精细胞凋亡明显增多 ($F_{\text{组间}}=126.73, P=0.005$),主要发生在精原细胞和精母细胞阶段;实验组 3 个时期比较,用药后 3 个时间段生精细胞的凋亡均有明显差异 ($F_{\text{时间}}=132.24, P=0.005$)。大鼠睾丸生精细胞的凋亡在不同的时间有差异 ($F_{\text{交互}}=24.87, P=0.007$)。

表 1 用药后 24 h、4 周、8 周对照组与实验组生精细胞凋亡数 (个/HP, $\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab.1 Apoptosis of spermatogenic cell in control group and experimental group after 24 h, 4 weeks and 8 weeks (unit/HP, $\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	24h	4周	8周
对照组	0.43 $\pm$ 0.04	15.26 $\pm$ 1.58	7.54 $\pm$ 3.30
实验组	0.43 $\pm$ 0.32 ^a	35.62 $\pm$ 4.49 ^{b,c}	23.71 $\pm$ 3.09 ^{b,c}

注:a,实验组与对照组比较, $P>0.05, F_{\text{组间}}=1.25$; b,实验组与对照组比较, $P<0.01, F_{\text{组间}}=126.73$; c,实验组 24 h、4 周、8 周两两比较, $P<0.01, F_{\text{时间}}=132.24$



A、C、E 分别是 24 h、4 周、8 周时对照组;

B、D、F 分别是 24 h、4 周、8 周实验组

图 1 生精细胞凋亡 (TUNEL, 400 $\times$)

Fig.1 Apoptosis of spermatogenic cell (TUNEL, 400 $\times$)

2.2 用药后 24 h、4 周、8 周各组间睾丸组织 TGF- β 1-mRNA 的比较

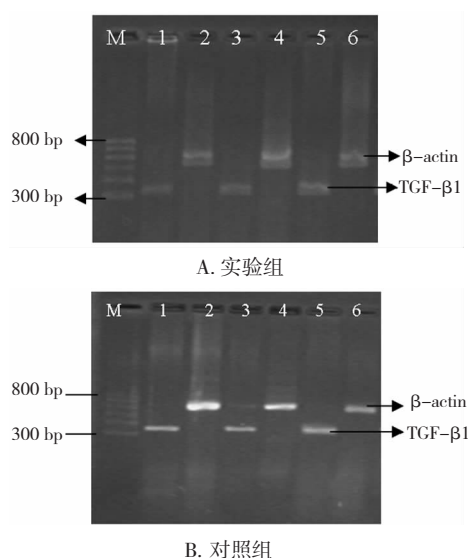
见表 2。用药后 24 h 实验组与对照组睾丸组织 TGF- β 1-mRNA 表达的比较,差异无统计学意义 ($F_{\text{组间}}=1.59, P=0.339$),用药后 4 周、8 周实验组较对照组 TGF- β 1-mRNA 表达均有明显增加 ($F_{\text{组间}}=32.86, P=0.007$)。实验组 3 个时期比较,用药后 3 个时间段睾丸中 TGF- β 1-mRNA 的表达有明显差异 ($F_{\text{时间}}=66.75, P=0.002$),大鼠睾丸组织 TGF- β 1-mRNA 的表达在不同的时间有明显差异 ($F_{\text{交互}}=18.12, P=0.009$)。

表 2 用药后 24 h、4 周、8 周实验组与对照组睾丸组织 TGF- β 1-mRNA 的相对含量

Tab.2 Relative content of TGF- β 1-mRNA in testes in experimental group and control group after 24 h, 4 weeks and 8 weeks

组别	24 h (10 只)	4周 (10 只)	8周 (10 只)
对照组	0.385 $\pm$ 0.006	0.405 $\pm$ 0.005	0.418 $\pm$ 0.003
实验组	0.424 $\pm$ 0.003 ^a	0.438 $\pm$ 0.005 ^{b,c}	0.455 $\pm$ 0.008 ^{b,c}

注:a,用药后 24 h 实验组与正常组比较, $F_{\text{组间}}=1.59, P>0.05$; b,用药后 4 周、8 周实验组与正常组比较, $F_{\text{组间}}=32.86, P<0.01$; c,实验组 24 h、4 周、8 周两两比较, $F_{\text{时间}}=66.75, P<0.01$



M. Marker; 1, 3, 5. 用药后 24 h、4 周、8 周睾丸中 TGF- β 1-mRNA 的表达; 2, 4, 6. 用药后 24 h、4 周、8 周睾丸中对应的 β -actin

图 2 用药后 24 h、4 周、8 周及睾丸组织 TGF- β 1-mRNA 的表达
Fig.2 Expression of TGF- β 1-mRNA in testes after 24 h, 4 weeks and 8 weeks in experimental and

3 讨论

精子发生是精原细胞经历增殖、分化、减数分裂等的一项精密复杂过程。正常生理情况下,精子发生过程中存在生精细胞凋亡现象,机体通过凋亡维持精子数量的动态平衡。研究已表明,正常成年男性睾丸中成熟精子数量比预计生成的精子数量减少 20%~75%^[5]。但在某些病理情况下,如化疗时,精子发生的动态平衡被打破,生精细胞过度凋亡,影响精子形成的数量,严重者将导致不育。已有研究表明,化疗药物对生精细胞过度凋亡影响的程度与化疗药物类型、剂量、用药时间、是否联合化疗等有关^[6]。

TGF- β 1 是一类多功能调节细胞发育、凋亡的多肽生长因子,它的生物学效应具有两面性。已有的研究表明,在 TGF- β 1 介导的细胞凋亡中,Smad (small mothers against dpp) 蛋白起重要的作用,TGF- β 1 特异地识别 Smad2、3 的 MH2 结构域上 L3 环,使 Smad2、3 上苏氨酸残基磷酸化,后者与 Smad4 结合,形成异三聚体并转位至细胞核内,直接与 DNA 接合,抑制细胞周期关联蛋白 CDK4/cyclinD 及下游 CDK2/cyclinE 复合体的活性,阻止 G1→S 移行,抑制增殖,促进凋亡^[7]。TGF- β 1 也可作用 caspase-8、caspase-3,引发 caspase 级联反应,裂解特异性底物及激活内源性核酸酶,使细胞表现出典型的凋亡形

态学和生物学特征^[8]。

CTX 为临床应用广泛的化疗药物,已证实对生精功能有显著的损害^[9]。本实验选用 CTX 作用于 9 d 龄大鼠,选择的 3 个时期代表了用药后早期、青春期至成年时期,可以反映 CTX 对生精功能早期和后期的影响。本研究发现,用药后 24 h 内 CTX 对精原细胞的急性损伤不明显,实验组凋亡细胞与正常组比较无统计学差异,而在用药后至青春期和成年时期,实验组生精细胞的凋亡较正常组有显著增加,表明 CTX 对精原细胞的早期影响不明显,但对精原细胞的发育有远期影响,提示 CTX 对精原细胞的直接损害可能相对不敏感以及 CTX 产生的促凋亡因素早期可能未产生,而后期已有促凋亡因素产生。但成年时生精细胞凋亡较青春期减少提示 CTX 导致生精功能损害有部分恢复的可能。

同时,本研究也发现,用药后 24 h 实验组中 TGF- β 1 的表达与正常组比较,无统计学差异,但在用药后 4 周和 8 周时期,实验组 TGF- β 1 的表达较正常组增加,TGF- β 1 表达改变的特点与生精细胞凋亡检测结果的趋势一致,提示 TGF- β 1 可能参与了 CTX 导致生精细胞的凋亡。但实验组 3 个时期 TGF- β 1 表达随时间增加有显著增多,这与生精细胞的凋亡趋势有不同,究其原因,可能是 CTX 导致生精功能损害已有部分恢复,睾丸组织中可能有抑制凋亡的因素产生,它可拮抗 TGF- β 1 的促凋亡作用,目前在 CTX 致睾丸损害的后期抑制凋亡的因素有待进一步研究。

有人研究发现^[9-10],睾丸组织中抑制凋亡的因子 Bcl-2 在 CTX 导致生精细胞凋亡中有明显下调,说明抑制凋亡因子的减少也导致了生精细胞凋亡增加。结合本研究的结果,提示 CTX 导致生精细胞凋亡增多可能是促凋亡因子增加和抑制凋亡因子减少的共同结果,减少促凋亡因子的生成和增加抑制凋亡因子可能对因化疗导致的生精功能损害有保护作用。

参 考 文 献

- [1] Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy[J]. Human Reproduction Update, 2001, 27(4): 363-369.
- [2] Gomez F, Manalo S, Dallman MF. Androgen-sensitive changes in regulation of restraint-induced adrenocorticotropin secretion between early and late puberty in male rats[J]. Endocrinology, 2004, 145(1): 59-70.
- [3] 龚作炯, 宋仕铃, 阮 鹏, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂对肝纤维化大鼠 TGF- β 1, TGF-R II, Smad3、7 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(5): 1133-1135.

生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000377

626例严重生精障碍男性染色体和无精子因子的研究分析

何海洪¹, 周后钢², 陈艳清¹, 姚万有¹, 杨秀珠¹

(1. 广东省东莞市塘厦医院检验科, 东莞 523721; 2. 湖南省妇幼保健院检验科, 长沙 410008)

【摘要】目的:分析严重生精障碍男性的染色体异常和无精子因子(azoospermia factor, AZF)的特点。**方法:**采用 G 显带技术分析染色体核型,应用多重 PCR 技术检测 AZF 微缺失。**结果:**在 443 例无精症与 183 例严重少精症患者中,79 例染色体出现异常(12.62%),其中无精子组 68 例(15.35%),严重少精组 11 例(6.01%)。同时,在严重少精组中发现 1 个未经报道的易位核型 46,XY,t(4;8)(q35;q22)。Y 染色体 AZF 微缺失 68 例(10.86%),其中无精子组和严重少精子组发生率分别为 11.51%和 9.29%。在 AZF 微缺失中,以 AZFc 缺失最为常见,其次是 AZFb 和 AZFd 缺失,构成比分别为 41.18%、20.59%与 10.29%。在 68 例 Y 染色体微缺失中,14 例合并染色体异常,无精子组和严重少精子组分别为 10 例和 4 例。**结论:**遗传异常是严重生精障碍患者的重要病因,在行辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)前,需要进行染色体和 Y 染色体的微缺失检测,以减低父代异常基因遗传给后代的风险。

【关键词】男性;染色体异常;无精子因子;辅助生殖技术

【中图分类号】R698.2;R394

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-14-01

Chromosome and azoospermia factor in 626 males with severely impaired spermatogenesis

He Haihong¹, Zhou Hougang², Chen Yanqing¹, Yao Wanyou¹, Yang Xiuzhu¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Tangxia Hospital of Dongguan; 2. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Hunan)

【Abstract】Objective: To analyze the features of chromosomal abnormalities and azoospermia factor (AZF) of males with severely impaired spermatogenesis. **Methods:** G-banding and multi-PCR method were used to analyze the karyotypes of chromosome and AZF microdeletions respectively. **Results:** In 443 cases of azoospermia and 183 cases of severe oligozoospermia, 79 cases (12.62%) of chromosomal abnormalities were found; 68 cases (15.35%) in azoospermia group and 11 cases (6.01%) in severe oligozoospermia group. Meanwhile, the translocation karyotype 46,XY,t(4;8)(q35;q22) in severe oligozoospermia group was firstly reported. There were 68 cases (10.86%) of Y chromosome AZF microdeletions, accounting for 11.51% and 9.29% in azoospermia group and severe oligozoospermia group respectively. The deletion type AZFc was the most common, followed by AZFb and AZFd; the constituent ratio of the three types were 41.18%, 20.59%, 10.29%, respectively. In 68 cases of Y chromosome microdeletions, 14 cases complicated with chromosomal abnormalities (10 cases in azoospermia group and 4 cases in severe oligozoospermia group). **Conclusion:** Genetic abnormality is important for patients with severely impaired spermatogenesis. Detection chromosome abnormality and Y chromosome microdeletions is necessary before applying assisted reproductive technology in order to decrease the risk of abnormal gene inherited from the father.

【Key words】 male; chromosomal abnormalities; azoospermia factor; assisted reproductive technology

【Key words】 male; chromosomal abnormalities; azoospermia factor; assisted reproductive technology

【Key words】 male; chromosomal abnormalities; azoospermia factor; assisted reproductive technology

[4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验设计及统计学分析[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 198-201.

[5] Stephan H, Polzar B, Rauch, et al. Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis[J]. Histochem Cell Biol, 1996(106): 383-393.

[6] 龚永光, 李旭良, 魏光辉, 等. 长春新碱、更生霉素对发育未成熟睾丸影响的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2002, 23(5): 454-456.

[7] Hu PP, Shen X, Huang D, et al. The MEK pathway is required for stimulation of p21WAF1/CIP1 by transforming growth factor-beta[J]. J Biol Chem, 1999, 274(50): 35381-35387.

[8] Henguttner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.

[9] Lisa Kenney, Laufer MR, Grant FD, et al. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood[J]. Cancer, 2001(91): 613-621.

[10] 岳丽琴, 李旭良, 魏光辉, 等. 环磷酰胺对不同发育时期睾丸生精细胞毒性损伤的动物实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(1): 38-41.

(责任编辑: 冉明会)