

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.12.002
文章编号: 1005-8982(2020)12-0007-06

视黄酸对隐睾生精细胞增殖分化及减数分裂的作用及其机制研究

王婷¹, 黄永汉², 杨画³, 黄娟华², 徐杰伟², 张清学¹

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院 生殖医学中心 广东 广州 510030; 2. 佛山市第一人民医院 生殖医学中心 广东 佛山 528000; 3. 佛山科学技术学院 医药工程学院 广东 佛山 528225)

摘要: **目的** 探讨视黄酸对隐睾生精细胞增殖分化及减数分裂的作用及其机制。**方法** 将30只SD孕鼠随机分为3组, 每组10只, 取子代雄鼠进行研究。对照组常规饲养不给任何药物或试剂; 模型组采用雄激素拮抗剂氟他胺(Flu)复制隐睾大鼠模型; 干预组在模型组基础上, 在子代雄鼠生精细胞发育时期予以视黄酸干预。采用TUNEL法检测生精细胞的凋亡, 免疫组织化学法观察睾丸组织中c-Kit、Stra8、Scp3蛋白的表达, qRT-PCR检测睾丸组织中Stra8、c-Kit、Scp3 mRNA的表达, Western blotting检测睾丸组织中Stra8、Scp3、c-Kit和PLZF蛋白的表达。**结果** 免疫组织化学结果显示, 对照组和干预组中可见大量精子细胞排列整齐; 而模型组睾丸各级生精细胞数目减少、排列紊乱, 且曲细精管管腔缩窄。TUNEL检测结果显示, 与对照组和干预组比较, 模型组可见大量生精细胞凋亡。对照组和干预组凋亡指数低于模型组($P < 0.05$)。对照组和干预组Stra8、c-Kit、Scp3 mRNA和蛋白相对表达量高于模型组($P < 0.05$)。对照组和干预组PLZF蛋白相对表达量高于模型组($P < 0.05$)。**结论** 视黄酸促进生精细胞发育的作用机制可能与调控隐睾生精细胞增殖分化及减数分裂有关, 可一定程度上恢复隐睾大鼠的生殖功能。

关键词: 隐睾; 生精细胞; 视黄酸; 氟他胺; 增殖; 分化; 减数分裂

中图分类号: R697.22

文献标识码: A

Effects of retinoic acid on the proliferation, differentiation and meiosis of spermatogenic cells in cryptorchidism and its mechanism

Ting Wang¹, Yong-han Huang², Hua Yang³, Juan-hua Huang², Jie-wei Xu², Qing-xue Zhang¹
(1. Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Reproductive Medicine Center, Guangzhou Guangdong 510030, China; 2. Reproductive Medicine Center, the First People's Hospital of Foshan, Foshan Guangdong 528000, China; 3. School of Pharmaceutical Engineering, Foshan University of Science and Technology, Foshan, Guangdong 528225, China)

Abstract: Objective To study the effect of retinoic acid (RA) on the proliferation, differentiation and meiosis of spermatogenic cells in cryptorchidism and its mechanism. **Methods** The offspring of male SD rats were used for the study. The normal control group did not receive any drugs or reagents, Flu cryptorchidism group was induced by androgen antagonist flutamide (Flu), RA intervention group was given retinoic acid intervention during spermatogenic cell development. The spermatogenic cell apoptosis was detected by TUNEL; the expression of Stra8, Scp3 and c-Kit protein in testis tissue was observed by immunohistochemistry; the mRNA levels of Stra8, c-Kit and PLZF in

收稿日期: 2020-01-23

[通信作者] 张清学, Tel: 13602797433

testicular tissue were detected by RT-qPCR; the expression of Stra8, Scp3, c-Kit and PLZF protein in testicular tissue was detected by Western blotting. **Results** Pathological examination showed that a large number of sperm cells were found in the normal control group and RA intervention group, and the germ cells in all layers were arranged regularly. However, the number of germ cells at all levels in the testis of Flu cryptorchidism group was reduced and disordered, and the lumen of seminiferous tubules was significantly narrowed. TUNEL assay showed that a large number of spermatogenic cells were apoptosis in flu cryptorchidism group compared with normal control group and RA intervention group. Compared with the flu model group, the apoptosis index of the control group and RA intervention group was lower ($P < 0.05$). Compared with the flu cryptorchidism group, the expression levels of Stra8, c-Kit, Scp3 mRNA and protein were higher in the control group and RA intervention group ($P < 0.05$). Compared with the flu cryptorchidism group, the PLZF protein expression level in the control group and RA intervention group was higher ($P < 0.05$). **Conclusions** The mechanism of retinoic acid promoting spermatogenic cell development may be related to regulating the meiotic differentiation and proliferation of cryptorchidism spermatogenic cells, which restores the reproductive function of cryptorchidism rats to a certain extent.

Keywords: cryptorchidism; spermatogenic cells; retinoic acid; flutamide; proliferation; differentiation; meiosis

隐睾是最常见的男性生殖系统先天畸形之一，又称睾丸下降不全。隐睾周围温度比阴囊内高 2 ~ 3℃，会导致生精细胞过度凋亡，从而影响生育。隐睾在足月男婴中发病率达 3% ~ 4%^[1]，随着环境污染加剧，食物中各种性激素的滥用，隐睾发病率逐年上升^[2]。研究显示，隐睾是男性不育的重要原因之一^[3]。在睾丸下降过程中，任何环节出现问题都可能导致隐睾，具体机制尚不清楚，目前有内分泌学说、解剖学说、雄激素受体、遗传因素及环境中的危险因素等多种解释^[4]。有文献报道，氟他胺（Flutamide, Flu）能影响睾丸发育，抑制睾丸下降，其机制可能与阻断胚胎期雄性激素有关^[5-5]。本研究采用 Flu 诱导 SD 大鼠，复制隐睾模型，探讨视黄酸对隐睾生精细胞增殖分化及减数分裂的作用及其机制，为男性不育奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择 210 ~ 230 g SPF 级 SD 大鼠 60 只，购自北京华阜康生物科技股份有限公司，动物许可证号：SCXK（京）2014-0004，单位许可证号：SYXK（冀）2014-0062。大鼠在佛山科学技术学院动物实验中心饲养，饲养室温度控制在 22 ~ 25℃，相对湿度 60% ~ 70%，室内每天通风换气 1、2 次。大鼠适应性喂养 7 d 后，将雌雄大鼠按 1 : 1 合笼，每日观察雌鼠的阴栓。对阴栓脱落雌鼠分笼喂养并标记为妊娠 0 d（30 只 SD 孕鼠均怀孕）。所有操作均按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验分组

将 30 只 SD 孕鼠随机分为对照组、模型组、干

预组，每组 10 只。模型组大鼠孕 12 ~ 20 d 皮下注射 Flu 25 mg/（kg · d）（玉米油配制）。干预组在模型组基础上，其子代雄鼠出生后第 1 ~ 10 天及第 28 ~ 30 天皮下注射视黄酸 1 mg/（kg · d）（玉米油配制）。对照组常规饲养不给任何药物或试剂。每组取 10 只子代雄鼠进行研究。

1.3 主要试剂与仪器

Stra8、Scp3、c-Kit、PLZF 兔多克隆抗体（美国 BD 公司，批号分别为 orb131626、562530、555714 和 3032695），BCA 试剂盒（北京诺博莱德科技有限公司，批号：P1511），DAB 显色试剂盒（福州中杉金桥生物技术有限公司，批号：ZLI-9031），TUNEL System 试剂盒（美国 Promega 公司，批号：230684），分析纯 Flu（美国 Sigma 公司，批号：20160225），RNA 逆转录试剂盒（日本 TaKaRa 公司，批号：D6110A）。PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成，SP5 激光共聚焦显微镜（德国 Leica 公司），ABI9700RT-PCR 扩增仪（美国 ABI 公司）。

1.4 实验方法

1.4.1 睾丸标本采集 手术收集 3 组子代雄性大鼠睾丸，将睾丸用生理盐水洗净后切成数份，一份放置于液氮中保存；另一份在 4% 多聚甲醛中固定。

1.4.2 大鼠睾丸组织 HE 染色 将各组睾丸组织用 4% 多聚甲醛固定，脱水后石蜡包埋，切片行 HE 染色，观察其组织学形态差异。

1.4.3 TUNEL 法 取相应的睾丸组织玻片常规脱蜡水化，按照 TUNEL System 试剂盒说明书进行操作，在荧光显微镜下观察摄像。每张切片随机选取 5 个视野进行观察，计算凋亡指数。凋亡指数 = 视野内阳性细

胞数 / 视野内总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.4.4 免疫组织化学法 取大鼠睾丸组织标本,采用免疫组织化学 SP 二步法进行检测。组织经 4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片、脱蜡、水化,加热修复, H_2O_2 封闭,滴加适量稀释的大鼠 c-Kit、Stra8、Scp3 抗体, $4^\circ C$ 过夜, PBS 冲洗,加入生物素标记二抗室温孵育, DAB 显色,封片后显微镜下观察。蛋白阳性反应呈棕色。

1.4.5 qRT-PCR 采用 Trizol 法提取大鼠睾丸组织总 RNA,用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA 模板,反应体系配制及反应条件严格按照试剂盒说明书进行操作。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应,实验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Stra8、c-Kit、Scp3 mRNA 相对表达量。

1.4.6 Western blotting 提取大鼠睾丸组织总蛋白,经 BCA 法蛋白定量后上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,取出聚偏二氟乙烯膜,丽春红染液,封闭 2 h。分别加入一抗稀释液,漂洗,加入二抗孵育 2 h 后, Tris-HCl 缓冲盐溶液漂洗,最后显影。用 Image J 软件分析蛋白条带灰度,以目的蛋白条带灰度值与

β -actin 内参条带灰度值的比值表示 Stra8、c-Kit、Scp3、PLZF 蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法

数据处理采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用方差分析,两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 隐睾和合并畸形情况

模型组和干预组隐睾大鼠模型复制成功,睾丸均位于腹股沟区。模型组单侧隐睾 6 例,双侧隐睾 4 例,均合并尿道下裂。干预组单侧隐睾 5 例,双侧隐睾 5 例,8 例合并尿道下裂。

2.2 大鼠睾丸组织学形态差异

与对照组相比,模型组睾丸各级生精细胞数目减少、排列紊乱;管腔中央无絮状精子形成,且曲细精管管腔间隙变大,管腔明显缩窄。对照组和干预组中发现大量精子细胞及絮状精子,且各层生精细胞排列整齐。见图 1。

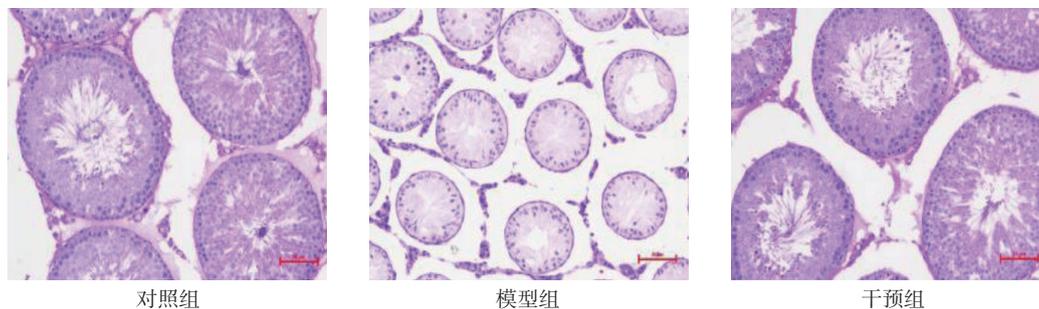


图 1 3 组子代大鼠睾丸组织学形态 (HE 染色 $\times 400$)

2.3 生精细胞凋亡情况

TUNEL 法检测结果显示,模型组可见大量生精细胞凋亡,而对照组和干预组生精细胞凋亡数较少(见图 2)。对照组、模型组、干预组凋亡指数分别为 (0.10 ± 0.09) 、 (0.25 ± 0.11) 和 (0.11 ± 0.08) ,经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 8.678, P = 0.000$);对照组和干预组低于模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 睾丸组织中 c-Kit、Stra8、Scp3 蛋白的表达

与对照组相比,模型组 c-Kit、Stra8、Scp3 蛋白表达水平下降,而干预组视黄酸干预后 c-Kit、Stra8、Scp3 蛋白表达较模型组上升,趋于正常。见图 3。

2.5 3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、c-Kit、Scp3 mRNA 相对表达量比较

3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、c-Kit、Scp3 mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);对照组和干预组高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.6 3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、c-Kit、Scp3、PLZF 蛋白相对表达量比较

3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、c-Kit、Scp3、PLZF 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);对照组和干预组高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 4。

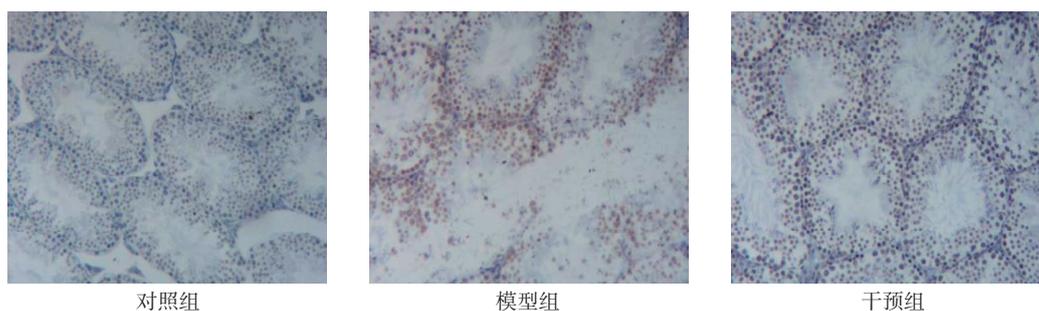


图 2 3 组大鼠出生后 30 d 睾丸内生精细胞凋亡情况 (TUNEL×400)

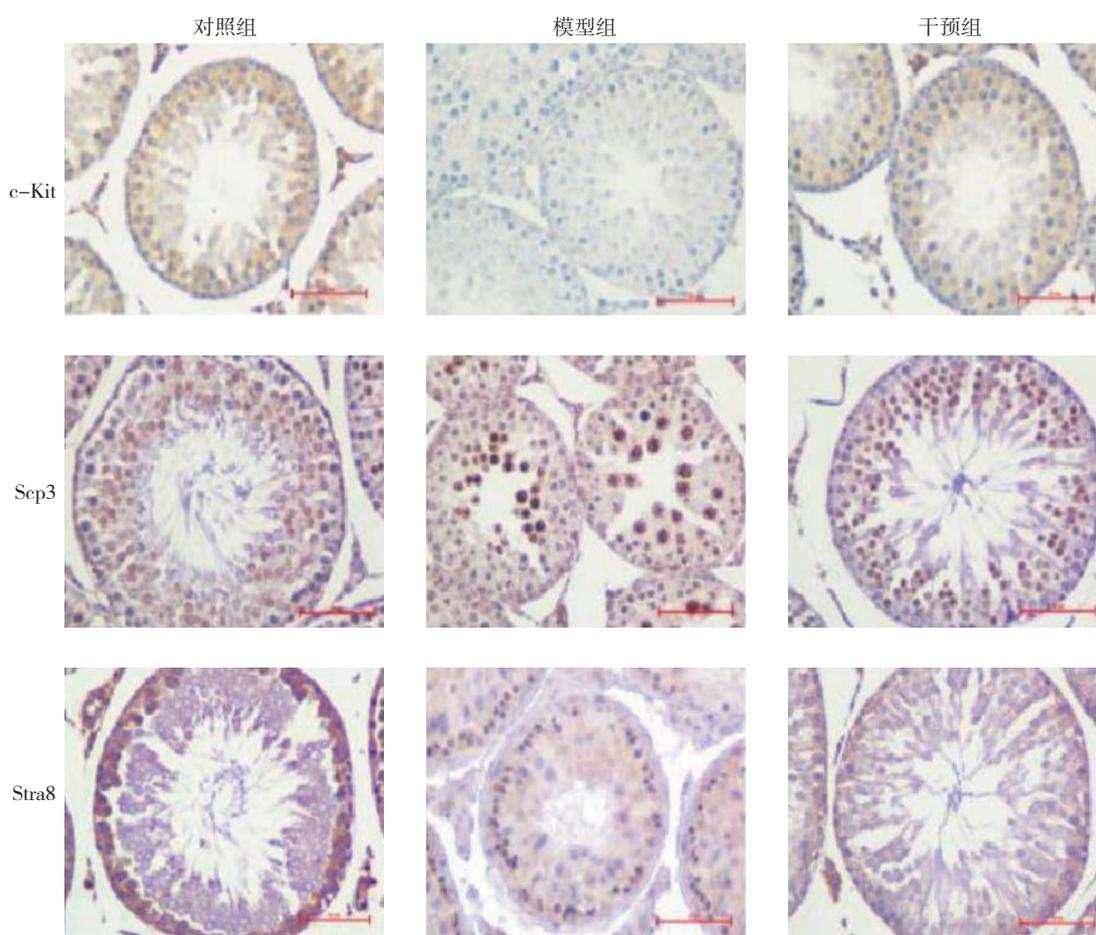


图 3 3 组大鼠睾丸组织中 c-Kit、Stra8、Scp3 蛋白的表达 (免疫组织化学染色 ×400)

表 1 3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、c-Kit、Scp3 mRNA 相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	c-Kit mRNA	Scp3 mRNA	Stra8 mRNA
对照组	1.00 ± 0.02 [†]	1.00 ± 0.01 [†]	1.00 ± 0.02 [†]
模型组	0.58 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.38 ± 0.01
干预组	0.84 ± 0.02 [†]	0.75 ± 0.03 [†]	0.77 ± 0.02 [†]
F 值	2.407	2.533	2.337
P 值	0.021	0.017	0.027

注: †与模型组比较, P < 0.05。

表 2 3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、c-Kit、Scp3、PLZF 蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	c-Kit 蛋白	Scp3 蛋白	Stra8 蛋白	PLZF 蛋白
对照组	0.94 ± 0.12 [†]	1.22 ± 0.16 [†]	1.13 ± 0.15 [†]	1.06 ± 0.16 [†]
模型组	0.41 ± 0.10	0.32 ± 0.07	0.28 ± 0.05	0.41 ± 0.10
干预组	0.78 ± 0.11 [†]	0.82 ± 0.13 [†]	1.05 ± 0.16 [†]	0.88 ± 0.11 [†]
F 值	4.326	11.547	7.643	8.924
P 值	0.044	0.037	0.031	0.028

注: †与模型组比较, P < 0.05。

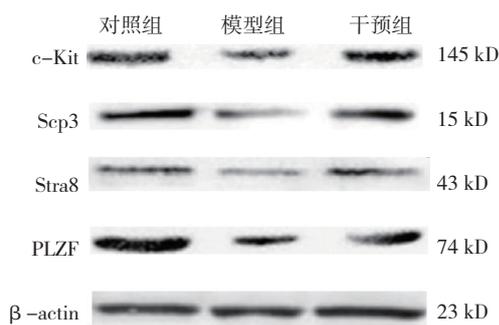


图 4 3 组大鼠睾丸组织中 Stra8、Scp3、c-Kit、PLZF 蛋白的表达

3 讨论

隐睾常见并发症包括不育及生育力下降。研究隐睾的病理学变化及隐睾中生精细胞的增殖分化, 对治疗男性不育有重要意义。许多隐睾的研究来自于临床活检^[6], 但来源的限制使研究并不能完整地反映睾丸组织病变情况。所以本研究采用 Flu 孕期给药, 成功复制子代隐睾大鼠。视黄酸在生精过程中发挥重要作用, 其作为维生素 A 的活性代谢产物, 参与精子形成的各个阶段调控。因此, 本研究采用视黄酸作为干预剂, 明确视黄酸是否能够调控隐睾生精细胞增殖分化及减数分裂。

本研究中, 模型组大鼠睾丸组织形态学改变明显。HE 染色结果显示, 模型组睾丸各级生精细胞数目减少、排列紊乱; 管腔中央无絮状精子形成, 且曲细精管管腔间隙变大、管腔明显缩窄, 与既往报道相符^[7]。而对照组和干预组中发现大量精子细胞及絮状精子, 且各层生精细胞排列整齐。TUNEL 检测结果显示, 与对照组相比, 模型组中可见大量生精细胞凋亡。与模型组相比, 干预组生精细胞凋亡指数大幅下降, 与 HE 染色结果基本一致, 证实隐睾睾丸出现明显病理改变, 生精细胞凋亡增多, 支持细胞间的紧密结构被破坏, 精子数量下降, 这可能是产生生育障碍的重要原因, 而视黄酸能够恢复隐睾睾丸的生精环境, 抑制生精细胞凋亡。

精原干细胞的分裂具有不对称性, 在分化同时自我复制, 这样的增殖和分化是生精过程不断持续的基础, 但这个过程受到很多因子的调控。目前研究比较多的是 Stra8、Scp3、c-Kit 和 PLZF, 其中 Stra8、Scp3 是减数分裂的关键因子, c-Kit、PLZF 与增殖分化关系密切。Stra8 是视黄酸的目标基因, 被认为是减数分裂的启动基因, 其在生精细胞从有丝分裂向减数分

裂转换过程中表达上调^[8-9]。有报道指出, 精母细胞在 Stra8 缺失情况下将停留在 DNA 复制阶段, 减数分裂无法启动, 导致精子形成障碍^[10]。Scp3 是生精细胞减数分裂的标志基因, 参与染色体联会复合体的组成^[11]。据研究报告, Scp3 基因变异可能导致无精症^[12]。PLZF 在精原干细胞增殖过程中发挥重要作用^[13-15], 参与精原干细胞的自我复制, 维持其数量。c-Kit 在精原细胞分化过程中与其配体 SCF 一起发挥重要作用^[16-18], 其表达水平反映精原细胞分化活动的强弱。本研究中免疫组织化学和 qRT-PCR 反应结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠睾丸组织中 c-Kit、Stra8、Scp3 蛋白和 mRNA 相对表达量降低, 而视黄酸干预后大鼠睾丸组织中 c-Kit、Stra8、Scp3 蛋白和 mRNA 相对表达量升高, 趋于正常水平; Western blotting 检测结果显示, 模型组 Stra8、Scp3、c-Kit 及 PLZF 蛋白相对表达量低于对照组和干预组, 与免疫组织化学和 qRT-PCR 反应结果基本一致。隐睾组织中 Stra8、Scp3 蛋白和 mRNA 表达减少, 提示隐睾减数分裂被终止, 无法继续进行; 在补充视黄酸后 Stra8、Scp3 表达上升, 提示视黄酸能恢复隐睾减数分裂。隐睾组织中 PLZF 蛋白、c-Kit 蛋白和 mRNA 表达下调, 表明隐睾精原细胞的增殖、分化出现问题, 而视黄酸干预后其蛋白表达上调, 与对照组差异不大, 说明视黄酸能促进精原细胞增殖、分化。

综上所述, 本研究通过隐睾大鼠模型, 证实睾丸病理结构的改变可能是其生殖障碍的重要原因。模型组睾丸生精细胞的增殖分化和减数分裂能力较对照组明显下降, 而视黄酸干预后 Stra8、Scp3、c-Kit、PLZF 蛋白及 Stra8、Scp3、c-Kit mRNA 表达水平上升, 提示视黄酸能促进生精细胞发育, 为隐睾生精障碍的预防、治疗带来希望。

参 考 文 献:

- [1] KUIRI-HÄNNINEN T, KOSKENNIEMI J, DUNKEL L, et al. Postnatal testicular activity in healthy boys and boys with cryptorchidism[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 489-597.
- [2] 中华医学会小儿外科学分会泌尿外科学组. 隐睾诊疗专家共识[J]. 中华小儿外科杂志, 2018, 39(7): 484-487.
- [3] DOCAMPO M J, HADZISELIMOVIC F. Molecular pathology of cryptorchidism-induced infertility[J]. Sex Dev, 2015, 9(5): 269-278.
- [4] KOMAROWSKA M, SZYMAŃSKA B, OŁDAK Ł, et al. Plasma level of laminin 5 and collagen IV in cryptorchidism[J]. Adv Med

- Sci, 2020, 65(1): 176-181.
- [5] WANG Y J, CHEN L, ZHANG Q L, et al. Transscrotal transverse incision for the treatment of middle and low cryptorchidism in children: experience from 796 cases[J]. BMC Surg, 2020, 20(1): 51-59.
- [6] GHAZARIAN A A, TRABERT B, GRAUBARD B, et al. Placental weight and risk of cryptorchidism and hypospadias in the collaborative perinatal project[J]. Am J Epidemiol, 2018, 187(7): 1354-1361.
- [7] WEI Y, ZHOU Y, TANG X L, et al. Testicular developmental impairment caused by flutamide-induced and DEHP-induced cryptorchid rat models is mediated by excessive apoptosis and deficient autophagy[J]. Toxicol Mech Methods, 2018, 28(7): 507-519.
- [8] 谢慧, 龚小雯, 李小勇, 等. 维甲酸诱导精原干细胞分化过程中 DNA 甲基转移酶表达研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(6): 2572-2578.
- [9] DAGUIA ZAMBE J C, ZHAI Y, ZHOU Z, et al. miR-19b-3p induces cell proliferation and reduces heterochromatin-mediated senescence through PLZF in goat male germline stem cells[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(6): 4652-4665.
- [10] 马仕昆, 郭佳倩, 郑哲, 等. Stra8 在精子发生中的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(14): 2500-2525.
- [11] YUE M, FAN X, LIU Y, et al. Effects of body temperature on the expression and localization of meiosis-related proteins STRA8 and SCP3 in boar testes[J]. Acta Histochem, 2019, 121(6): 718-723.
- [12] 张炜, 张思仲, 阿周存. 联合复合体——原发无精症发病中的重要角色 [J]. 遗传, 2006, 28(2): 231-235.
- [13] KOUBI M, POPLINEAU M, VERNEREY J, et al. Regulation of the positive transcriptional effect of PLZF through a non-canonical EZH2 activity[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 20(460): 3339-3350.
- [14] SHARMA M, SRIVASTAVA A, FAIRFIELD H E, et al. Identification of EOMES-expressing spermatogonial stem cells and their regulation by PLZF[J]. eLife, 2019, DOI: 10.7554/eLife.43352.
- [15] AZIZI H, KORUJI M, SKUTELLA T. Comparison of PLZF gene expression between pluripotent stem cells and testicular germ cells[J]. Cell J, 2020, 22(1): 60-65.
- [16] NASIRIKHAH A, ZHANDI M, SHAKERI M, et al. Dietary Guanidinoacetic acid modulates testicular histology and expression of c-Kit and STRA8 genes in roosters[J]. Theriogenology, 2019, 130: 140-145.
- [17] LEE R, LEE W Y, PARK H J, et al. Stage-specific expression of DDX4 and c-Kit at different developmental stages of the porcine testis[J]. Anim Reprod Sci, 2018, 190: 18-26.
- [18] ORISS T B, KRISHNAMOORTHY N, RAY P, et al. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014, 14(1): 7-12.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 王婷, 黄永汉, 杨画, 等. 视黄酸对隐睾生精细胞增殖分化及减数分裂的作用及其机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(12): 7-12.