文章编号:1000-5404(2007)19-1883-03

论著

精索静脉曲张对青春期大鼠睾丸生精细胞HIF-1α和Bax表达的影响

吕天兵,苟 欣,余 周,吴 跃 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 研究精索静脉曲张(varicocele, VC)对大鼠睾丸生精细胞低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α、HIF-1α)和Bax表达的影响,探索精索静脉曲张引起不育的机制。**方法** 采用青春期雄性Wistar大鼠复制左侧精索静脉曲张模型,将25只大鼠分为VC组($n=15$)和假手术组(SOG)($n=10$),于术后30 d一并处死,取左侧睾丸,用免疫组化S-P法检测HIF-1α和Bax的表达。**结果** HIF-1α和Bax在VC组左侧睾丸组织中的表达均明显高于SOG组($P<0.05$),二者呈现一定的相关性($r=0.479\ 2$, $P<0.05$)。**结论** 实验性精索静脉曲张可以改变青春期大鼠睾丸组织生精细胞HIF-1α和Bax的表达。

关键词: 精索静脉曲张;生精细胞;凋亡;HIF-1α;Bax
中图法分类号: R322.64; R329.26; R697.24 **文献标识码:** A

Effect of varicocele on expressions of HIF-1α and Bax in germ cells of adolescent rats

LU Tian-bing, GOU Xin, YU Zhou, WU Yue (Department of Urology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effect of varicocele(VC) on the expressions of hypoxia-inducible factor-1α(HIF-1α) and apoptosis-associated gene Bax in germ cells of adolescent rats, and investigate the mechanism of the infertility resulting from varicocele. Methods The varicocele model was established by partial ligation of the left renal vein in adolescent male Wistar rats. A total of 25 rats were randomly divided into 2 groups, namely varicocele group($n=15$) and sham operation group (SOG, $n=10$). All the animals were killed 30 d after operation. The left testis was collected and the expression of HIF-1α and Bax was detected by immunohistochemical method. Results The expression of HIF-1α and Bax in left testis of varicocele group was significantly higher than that of sham operation group($P<0.05$) and positive correlation was found between them ($r=0.479\ 2$, $P<0.05$). Conclusion Experimental varicocele can change the expression of factor-1α(HIF-1α) and apoptosis associated gene Bax in germ cells of adolescent rats.

Key words: varicocele; germ cell; apoptosis; hypoxia-inducible factor-1α; Bax

精索静脉曲张(varicocele, VC)是男性不育的常见原因之一,但其导致不育的病理生理学机制仍不十分清楚。睾丸缺氧被认为是其中的病理损害之一,但以往研究表明,在精索静脉曲张中,通过精索内静脉血测定pH值、氧和二氧化碳分压,并与股静脉血比较没有明显差异[1],也就是说虽然精索静脉曲张时血液淤积,但睾丸局部环境并无确切缺氧的证据。近年来研究表明HIF-1α在缺氧时表达增加,可以作为组织缺氧的标志,同时诱导相关靶基因的表达,其中包含凋亡基因,与凋亡关系密切。同时VC可以促进生殖细胞凋亡,有报道显示在VC中凋亡蛋白Bax表达增加[2]。本实验通过建立大鼠精索静脉曲张模型,对实验组和假手术组大鼠生精细胞中HIF-1α和Bax表达进行研究,探讨精索静脉曲张是否加重生精细胞的缺氧,为低氧学说提供依据,同时研究低氧与凋亡的关系,以加深对VC不育机制的认识。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性Wistar大鼠25只,7周龄,体质量(200±20)g,购于重庆医科大学实验动物中心。分成曲张组(VC)15只和假手术组(SOG)10只,分别在建模后30 d处死。

1.2 实验性精索静脉曲张动物模型的建立

大鼠采用戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔麻醉,曲张组在精索内

作者简介:吕天兵(1975-),男,四川省乐至县人,硕士,主治医师,主要从事男科学方面的研究。电话:13098693338
通讯作者:苟 欣,电话:13101365921, E-mail: gouxincq@163.com
收稿日期:2006-12-28;修回日期:2007-05-16

静脉汇入肾静脉近侧处部分结扎大鼠左肾静脉，采用回形针和左肾静脉同时结扎后退针，试其外径固定到0.5 mm，建立精索静脉曲张模型；对照组只进行左肾静脉分离不予结扎。

1.3 样品采集和制备

在建模30 d后，一并处死VC组和假手术组的所有大鼠。其中VC组在麻醉大鼠后开腹，显露双侧肾脏和精索内静脉，观察到左侧精索静脉曲张且双侧肾脏体积相似者，表明模型建立成功，假手术组均无精索静脉曲张。经腹腔取出双侧睾丸，电子天平分别称其质量，然后对半剖开，用Bouin(包氏液)固定并石蜡包埋，制备连续切片。

1.4 主要试剂和检测方法

兔抗鼠多克隆Bax抗体(sc-526)、链菌素抗生物素蛋白-过氧化酶(S-P)试剂盒、DAB显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；HIF-1α单克隆一抗购自晶美工程生物有限公司。二者检测严格按照说明书进行，均采用微波热修复方法，即组织标本常规脱蜡，用30%的新鲜双氧水灭活内源酶，将切片浸入0.01 mmol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中微波加热至沸腾后断电，间隔5 min，反复3次，冷却后用0.1 mmol/L PBS液冲洗3次后滴加血清封闭后不洗，然后加一抗(Bax的稀释比为1∶100；HIF-1α为1∶20)，在4 ℃冰箱中过夜，用0.1 mmol/L PBS液加生物素标记二抗，余步骤按试剂盒说明书进行操作。最后DAB显色，苏木精复染，中性树胶封固。HIF-1α、Bax阳性结果用计算机图像分析系统对其染色强度和范围进行分析，每张切片选定5个视野(40倍放大)设定基线标准染色强度的判定标准后，以平均光密度为测定指标，HIF-1α以平均光密度超过0.150 0记为阳性表达，Bax则以平均光密度超过0.250 0记为阳性表达。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行χ^2检验、t检验、Fisher精确检验及Spearman相关分析。

2 结果

2.1 HE染色结果

VC组睾丸组织结构损害呈局灶性或弥漫性，以局灶性为多，表现为生精上皮排列紊乱，广泛脱落，管腔生精细胞脱落堵塞，伴有炎性表现(图1)；假手术组则表现为曲细精管内各级生精细胞排列有序形态正常，无明显的病理改变。

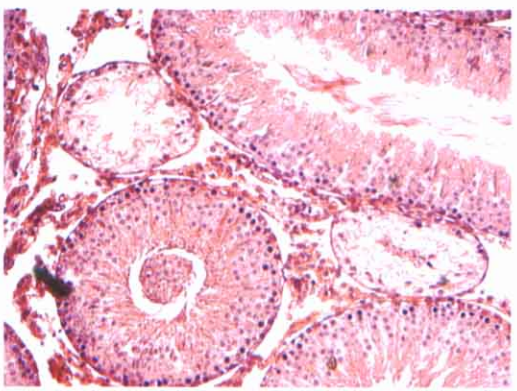


图1 VC组睾丸组织的病理学观察 (HE×200)

2.2 睾丸质量、HIF-1α和Bax的表达

结果见表1。在HIF-1α的表达中，VC组的阳性率为80%，显著高于SOG组40%($P=0.041\ 2$)；其表达主要见于生精细胞的细胞质，以精母细胞明显，也见于曲细精管外周膜细胞的细胞核。曲张组和假手术组各级细胞均见有Bax表达，以精母细胞为主，VC组的阳性率为87%，显著高于SOG组30%($P=0.038$)，阳性细胞表现为细胞质和细胞核内有棕黄色物质分布(图2、3)。在所有的标本中，HIF-1α和Bax表达均为阳性的有13例，HIF-1α表达阳性Bax表达阴性的有3例，HIF-1α表达阴性Bax表达阳性的有3例，二者表达均为阴性的占6例，两指标间存在一定相关性($r=0.479\ 2$，$\chi^2=5.74$，$P<0.05$)。

表1 大鼠睾丸质量、HIF-1α和Bax的表达

组别	例数	左侧睾丸质量(g)	HIF-1α阳性	Bax阳性
VC	15	1.261 2±0.045 6	12	13
SOG	10	1.382 0±0.102 0	4	3
P值		<0.05	<0.05	<0.05

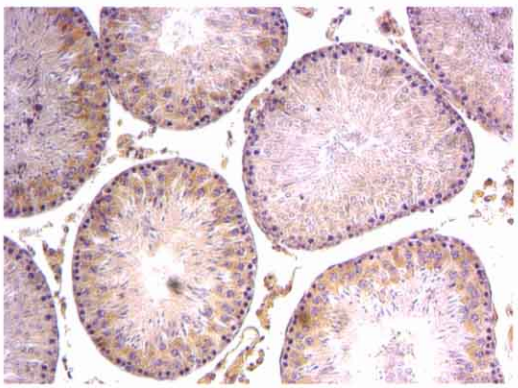


图2 VC组睾丸组织生精细胞中HIF-1α的阳性表达 (S-P×200)

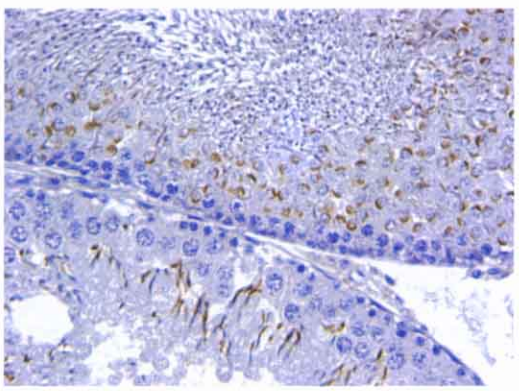


图3 VC组睾丸组织生精细胞中Bax的阳性表达 (S-P×400)

3 讨论

本实验采用的精索静脉曲张动物模型是国内外得到大家认可的成熟模型，从切片光镜观察和大鼠睾丸称量均提示模型建立成功。HIF-1是Semenza等在研究缺氧条件下促红细胞生成素的3′增强子时发现的，它可以上调细胞存活、生长、分化、以及凋亡等基因的表达，特别是在缺氧状态下对氧的平衡起关键作用[3]。它是一种DNA结合蛋白，能够被缺氧诱导产

生，而 HIF-1α 是 HIF-1 的调节及活性亚基，在常氧条件下，HIF-1α 由其结构中的 ODD 控制，通过泛素-蛋白酶体途径迅速降解，几乎检测不到 HIF-1α 蛋白，但在缺氧和肿瘤细胞中，HIF-1α 降解受阻，HIF-1α 在细胞内积聚，并与 HIF-1β 形成二聚体，通过 HIF-1α 的 CTAD 诱导辅激活蛋白 CBP/p300 入核，共同形成大分子复合物，并与缺氧反应基因的 HRE 上的 HIF-1 结合位点（5′-TACGTG-3′）结合，促进缺氧反应基因的转录，引起细胞对缺氧的一系列适应性反应，因此，目前认为 HIF-1α 可以作为组织缺氧的标志[4]，本实验研究在 VC 组中它的表达显著高于 SOG 组，提示在 VC 中存在低氧环境，为 VC 的低氧学说提供了依据，与 Kilinc 等[5]报道一致。同时现有研究表明，细胞凋亡在 VC 中也担当了重要角色，Bcl-2/Bax 基因族是细胞凋亡过程中的一类调节因子，Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的作用，而 Bax 的生理功能与此相反，起促进细胞凋亡的作用[6]。本实验显示在 VC 组中 Bax 的表达显著高于 SOG 组，提示 Bax 参与了 VC 的生精细胞凋亡过程。文献[7]报道在缺氧时 HIF-1α 能够通过稳定野生型 p53 水平抑制 Bcl-2 的表达而上调 Bax 的表达。本实验结果显示在 VC 青春期大鼠睾丸中，HIF-1α 表达和促凋亡基因 Bax 表达都较 SOG 组增高，且二者有一定相关性（$r=0.479\ 2$），提示在 VC 中生精细胞凋亡与低氧微环境可能存在一定关系。

精索静脉曲张因其病理生理机制复杂，目前学说多样，包括低氧和凋亡。本实验显示，青春期实验型 VC 大鼠的睾丸组织存在低氧，也许可以通过上调 Bcl-2/Bax 机制诱导生精细胞凋亡，确切机制仍需进一步研究。

参考文献：

[1] 郭应禄，李宏军. 男性不育症[M]. 北京：人民军医出版社，2003：280－281.

[2] 秦文波，王淑秋，王淑湘，等. 精索静脉曲张大鼠睾丸细胞线粒体钙、Bcl-2/Bax 蛋白表达和细胞凋亡的研究[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(3)：597－599.

[3] Huang L E, Bunn H F. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance[J]. J Biol Chem, 2003, 278(22): 19575－19578.

[4] Hutchison G J, Valentine H R, Loncaster J A, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8405－8412.

[5] Kilinc F, Kayaselcuk F, Aygun C, *et al*. Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in the rat testis[J]. J Urol, 2004, 172(3): 1188－1191.

[6] Swagerty D L Jr., Walling A D, Klein R M. Lactose intolerance[J]. Am Fam Physician, 2002, 65(9): 1845－1850.

[7] Carmeliet P, Dor Y, Herbert J M, *et al*. Role of HIF-1alpha in Hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394(6692): 485－490.

（编辑　邓强庭）

（上接 1876 页）

选择和影响预后。其临床症状无特异性，主要依靠胃镜和上消化道钡餐发现病灶，经病理检查确诊。上消化道钡餐对食管癌有一定诊断价值，但缺乏特异性。它能够发现食管管壁充盈缺损、管腔狭窄，但不能鉴别其性质，尤其对早期食管癌缺乏较好的识别能力。电子胃镜能直观清楚发现食管黏膜粗糙不平、充血糜烂、浅溃疡及肿块，并直接行病检以确诊。近年来，消化内镜技术发展迅速，相继出现一些新的检查手段，如染色和放大内镜。这两种技术对早期食管癌诊断更具优越性，在染色和放大胃镜下进行活检可以进一步提高食管多发癌诊断率。

本组食管多发癌胃镜特点：食管不同部位出现 2 个或 2 个以上癌灶，以 2 处多见，最多 3 处。癌灶间存在正常食管黏膜，有明显界线。病灶有肿块型、溃疡型、全周型、混合型、黏膜糜烂、粗糙及浅溃疡，其形态互相组合或为同一类型，本组以肿块型多见。

值得提出的是，当癌灶为肿块型阻塞管腔时，远端病灶易漏诊（本组有 1 病例漏诊属此类）；或管腔未全阻塞胃镜能勉强通过，但远端病灶较小被近端肿块遮挡或癌灶间距较近不利于镜下观察也易漏诊（本组有 1 病例漏诊属此类）；进镜或退镜速度过快易漏诊食管早期癌或较小癌灶（本组有 1 病例漏诊属此类）。

针对以上漏诊原因，提出以下预防措施：①提高警惕，不能只满足发现 1 个癌灶，应仔细多方位观察食管全段，以防较小病灶被遮盖或人为形成观察盲区造成漏诊。②对浅降起、糜烂、溃疡等可疑病灶，应多块、多方位活检，必要时采用色素或放大内镜协助诊断。③对于胃镜近端癌灶阻塞管腔，应尽量通过狭窄部位仔细观察远端情况，如严重狭窄无法进镜，应结合上消化道钡餐检查协助诊断[2]。④在食管癌切除术中应避免急于求成，注意食管上段的探查，尽可能进行仔细触摸，避免遗漏癌灶[3]。⑤切除食管尽可能较大范围连续切片，避免邻近小原发癌漏诊。

总之，认识本病和提高警惕，并善于总结分析易导致食管多发癌漏诊的各种原因，积极进行预防，是进一步提高胃镜食管多发癌诊断率，防止漏诊的重要措施。

关键词：食管癌；多发；胃镜；病理学

中图法分类号：R735.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄明伟，吴银献. 多发性原发性食管癌的诊断与治疗[J]. 重庆医学，2000，29(4)：336.

[2] 易周成. 食管多发癌的 X 线诊断(附四例报告)[J]. 海南医学，2005，16(1)：81－82.

[3] 钱如祥，甘泉生，李含志，等. 食管癌多发灶的外科治疗[J]. 肿瘤防治研究，1999，26(5)：378－379.

（编辑　王小寒）