论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504089

促红细胞生成素促进胚胎期氟他胺诱导隐睾生殖发育的实验研究

扶溢瑶,何大维,曾广平,康 青,刘 星,魏光辉 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,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)

[摘要] **目的** 探讨促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)是否具有促进胚胎期氟他胺(flutamide,Flu)诱导隐睾生殖细胞发育的生物效应。**方法** 氟他胺诱导后的SD仔鼠出生后按随机数字表法分为3组:Flu组($n=36$)、Flu+EPO组($n=42$)和Flu+PBS组($n=32$),正常饲养的SD仔鼠分为正常对照组($n=40$)及EPO组($n=16$);Flu组和正常对照组常规饲养,Flu+EPO组、EPO组及Flu+PBS组于出生后(postnatal day,PD)1~7 d隔天腹腔注射1 000 U/kg外源性EPO或同等体积的PBS。出生后25 d统计隐睾发生率及睾丸脏器系数,观察睾丸组织学变化,统计生殖指数,测量曲细精管横截面积和直径,免疫组织化学法检测睾丸间隙连接蛋白Connexin43在睾丸组织中的表达。**结果** Flu+EPO组隐睾发生率为38.1%(16/42),较Flu组[55.6%(20/36)]及Flu+PBS组[53.1%(17/32)]降低,Flu+EPO隐睾组生精上皮细胞数量、睾丸脏器系数、生殖指数、平均曲细精管面积及直径均明显大于Flu组($P<0.01$,$P<0.05$),且与正常对照组差异无统计学意义。EPO能够促进Connexin43蛋白在隐睾组织中的正常表达。**结论** 外源性EPO可以降低胚胎期Flu暴露后隐睾发生率,促进隐睾生殖细胞发育。

[关键词] 促红细胞生成素;氟他胺;隐睾;生殖细胞

[中图法分类号] R-332;R697.22;R977 [文献标志码] A

Erythropoietin promotes reproductive development rat offsprings of flutamide-induced cryptorchidism in embryonic stage

Fu Yiyao, He Dawei, Zeng Guangping, Kang Qing, Liu Xing, Wei Guanghui (Department of Urology, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the biological effect of erythropoietin (EPO) on promoting the germ cell development in cryptorchidism induced by flutamide (Flu) in embryonic stage. **Methods** Flu-induced rat offsprings were randomly divided into 3 groups: Flu group ($n=36$), Flu+EPO group ($n=42$), and Flu+PBS group ($n=32$). Normal newborn rats were divided into control group ($n=40$) and EPO group ($n=16$). The Flu group and control group received conventional breeding, while the Flu+EPO group, EPO group, and Flu+PBS group were treated with 1 000 U/(kg·d) recombinant rat erythropoietin (RrEPO) by intraperitoneal injection on postnatal day (PD) 1, PD 3, PD 5 and PD 7 or an equal volume of PBS. The incidence of cryptorchidism, organ index of testis, and reproduction index were evaluated. The testicular histology, and the area and diameter of seminiferous tubules were observed. And the expression of testis

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170556)

[通信作者] 何大维,E-mail:dw.he@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1513.028.html(2015-11-18)

Connexin43 was detected by immunohistochemistry. **Results** The incidence of cryptorchidism in the Flu + EPO group was 38.1% (16/42), which was lower than 55.6% (20/36) in the Flu group and 53.1% (17/32) in the Flu + PBS group. The germ cell number, organ index, reproduction index, and area and diameter of seminiferous tubules were greater in the Flu + EPO group than the Flu group ($P<0.01$, $P<0.05$), but there was no significant difference compared with the control group ($P>0.05$). RrEPO promoted normal expression of Connexin43 protein in the testis of the Flu-induced cryptorchidism. **Conclusion** The incidence of Flu-induced cryptorchidism can be decreased by RrEPO treatment after birth. EPO may contribute to promoting the germ cell development after cryptorchidism.

[**Key words**] flutamide; cryptorchidism; erythropoietin; germ cell development

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170556). Corresponding author: He Dawei, E-mail: dw.he@163.com

隐睾是常见的泌尿生殖系统先天畸形,其最严重的并发症是不育及癌变。目前对隐睾最主要治疗方法为手术治疗,虽然此法能达到解剖学复位,但术后不育及癌变的风险仍较高[1-2]。近年来,研究证实促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)可通过旁分泌功能促进生殖细胞发育[3-4]。但EPO是否具有恢复胚胎性隐睾所致的生殖细胞丢失,目前尚不清楚。我们前期采用雄激素受体阻断剂氟他胺(flutamide,Flu)建立胚胎性隐睾模型,与临床隐睾分子病理学改变具有一致性[5]。本研究进一步在出生后予外源性EPO干预,评估外源性EPO是否具有促进胚胎性隐睾生殖发育的生物效应,以期为进一步临床应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

20只孕12 d的SPF级SD孕鼠购自重庆医科大学动物实验中心[许可证号:SCXK(渝)2012-0001]。Flu(F9397)购自Sigma公司,玉米油(F1309033)购自阿拉丁公司,重组大鼠EPO(1306-RE)购自R&D公司,兔来源Connexin43(ab11370)一抗购自abcam公司,山羊抗兔二抗试剂盒(SP-9001)、DAB染色试剂盒(ZLI-9017)购自北京中杉公司;固定液mDF(modified davidson's fluid)(30%福尔马林溶液、15%无水乙醇、5%冰醋酸、50%双蒸水)、0.01 mol/L磷酸盐缓冲液PBS由实验室自行配制,10%水合氯醛。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药 15只妊娠12~21 d的SD孕鼠皮下注射25 mg/(kg·d) Flu,仔鼠(共116只,其中雌鼠61只,雄鼠55只)出生后按随机数字表法分为3组,Flu组:经Flu诱导后,常规饲养;Flu + EPO组:于出生后(postnatal day, PD)1~7 d隔天腹腔注射1 000 U/kg外源性EPO;Flu + PBS组:PD1~7 d隔天腹腔注射同等体积的PBS。5只SD孕鼠常规饲养,仔鼠(共57只,其中雌鼠29只,雄鼠28只)出生后随机分组为2组,正常对照组:常规饲养SD孕鼠所生仔鼠,出生后常规饲养;EPO组:常规饲养SD孕鼠所生仔鼠,PD1~7隔天腹腔注射1 000 U/kg外源性EPO。PD10去雌留雄,PD25时统计各组仔鼠隐睾发生率及体质量,并在10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉下,开腹将睾丸从阴囊内取出,用滤纸吸去血液后称质量,计算睾丸脏器系数[睾丸质量(mg)/体质量(g)]。

1.2.2 组织学观察 睾丸组织mDF固定液中固定24 h[6],常规脱水,石蜡包埋,切成4 μm厚的切片,HE染色观察生殖细胞发育程度,每个睾丸组织随机选取5个视野,每个视野选取4个曲细精管横截面,用NIS软件测其平均曲细精管面积(mean seminjferous tubular area, MSTA)及平均曲细精管直径(mean seminiferous tubular diameters, MSTD),同时计算生殖指数(生殖细胞数/支持细胞数)。

1.2.3 免疫组织化学染色 石腊包埋标本连续切片,切片厚4 μm。采用S-P两步法:加一抗Connexin43(1∶2 000)工作液4 ℃冰箱孵育过夜,滴加二抗工作液(按说明书操作),DAB显色,苏木精复染。PBS代替一抗作为阴性对照。显微镜观察免疫组化结果,棕黄色为阳性表达,定性观察Connexin43蛋白在睾丸组织中的表达。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计数资料采用χ^2检验,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,采用方差分析及LSD检验。

2 结果

2.1 各组隐睾发生率

Flu + EPO组的隐睾发生率明显小于Flu组,但

2组差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 PD25各组隐睾发生率[侧(%)]

组别	n	非隐睾	隐睾
Flu+EPO组	42	26(61.9)	16(38.1)
Flu组	36	16(44.4)	20(55.6)
Flu+PBS组	32	15(46.9)	17(53.1)
正常对照组	40	40(100.0)	0
EPO组	16	16(100.0)	0

2.2 各组睾丸脏器系数

PD25时,Flu非隐睾组睾丸脏器系数与正常对照组比较,Flu+EPO非隐睾组与正常对照组及Flu非隐睾组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。Flu隐睾组睾丸脏器系数明显小于非隐睾组及正常对照组($P<0.01$),Flu+EPO隐睾组睾丸脏器系数高于Flu隐睾组($P<0.01$),与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$,表2)。

表2 PD25各组睾丸脏器系数(‰,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	睾丸脏器系数
Flu+EPO组		
非隐睾组	16	$3.489\ 7\pm0.206\ 3^{b}$
隐睾组	14	$3.288\ 5\pm0.183\ 2^{b}$
Flu组		
非隐睾组	7	$3.421\ 9\pm0.232\ 9^{b}$
隐睾组	7	$2.936\ 6\pm0.124\ 0^{a}$
Flu+PBS组		
非隐睾组	6	$3.437\ 5\pm0.195\ 3^{b}$
隐睾组	9	$2.917\ 8\pm0.274\ 6^{a}$
EPO组	6	$3.455\ 0\pm0.140\ 4^{b}$
正常对照组	6	$3.463\ 3\pm0.192\ 7$

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与Flu隐睾组比较

2.3 各组生殖指数、平均曲细精管面积及平均曲细精管直径

PD25时,Flu非隐睾组生殖指数、MSTA及MSTD与正常对照组比较,Flu+EPO非隐睾组与正常对照组及Flu非隐睾组之间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。Flu隐睾组生殖指数、MSTA及MSTD明显小于正常对照组及Flu非隐睾组($P<0.01$),Flu+EPO隐睾组生殖指数、MSTA及MSTD均大于Flu隐睾组($P<0.01$),与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$,表3)。

表3 PD25各组生殖指数、MSTA及MSTD($\bar{x}\pm s$)

组别	n	生殖指数(G/S,%)	MSTA($\times10^{3}\ \mu m^{2}$)	MSTD(μm)
Flu+EPO组				
非隐睾组	8	2.80 ± 0.14^{d}	6.70 ± 0.39^{d}	93.02 ± 3.86^{d}
隐睾组	8	2.74 ± 0.39^{c}	6.94 ± 0.86^{d}	93.76 ± 5.76^{d}
Flu组				
非隐睾组	7	2.61 ± 0.10^{c}	6.97 ± 0.34^{d}	94.01 ± 2.55^{d}
隐睾组	8	2.23 ± 0.43^{a}	5.62 ± 0.30^{a}	84.52 ± 2.25^{a}
Flu+PBS组				
非隐睾组	6	2.69 ± 0.15^{c}	6.76 ± 0.26^{d}	92.70 ± 1.75^{d}
隐睾组	6	2.26 ± 0.43^{b}	5.55 ± 0.32^{a}	83.94 ± 2.46^{a}
EPO组	6	2.77 ± 0.28^{c}	7.06 ± 0.60^{d}	94.86 ± 4.29^{d}
正常对照组	6	2.86 ± 0.55	7.38 ± 1.01	96.81 ± 6.57

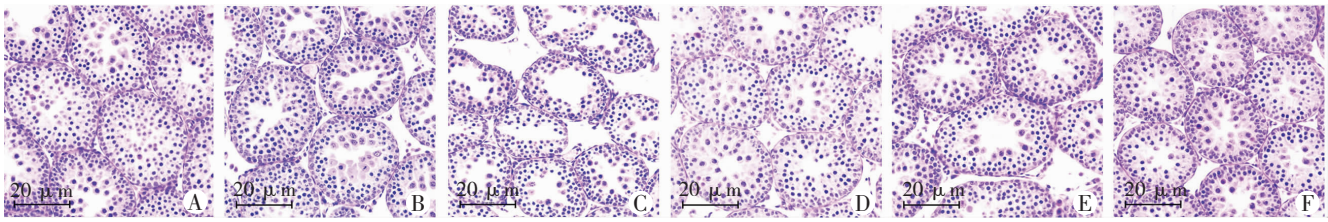
a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与正常对照组比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与Flu隐睾组比较

2.4 各组组织学改变

PD25时,与正常对照组(图1A)及Flu非隐睾组(图1B)比较,Flu隐睾组(图1C)生精上皮细胞明显减少,Flu+EPO隐睾组(图1D)生精上皮细胞与正常对照组(图1A)及Flu+EPO非隐睾组(图1E)比较无明显差异。

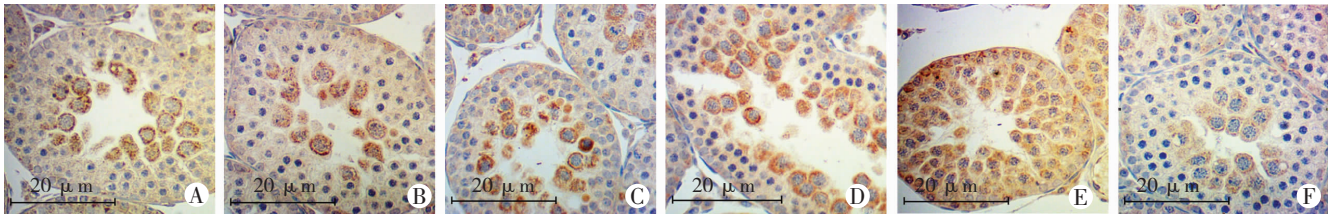
2.5 各组Connexin43蛋白的表达

正常对照组(图2A)、EPO组(图2B)、Flu非隐睾组(图2C)及Flu+EPO非隐睾组(图2D)睾丸生精小管基底膜精原细胞层基本上无Connexin43蛋白分布。而在Flu隐睾组(图2E),Connexin43在基底膜精原细胞层异常分布,EPO(图2F)干预后Connexin43蛋白分布与正常对照组比较无明显差异。



A:正常对照组;B:Flu非隐睾组;C:Flu隐睾组;D:Flu+EPO隐睾组;E:Flu+EPO非隐睾组;F:EPO组

图1 PD25时各组睾丸组织学形态 (HE ×200)



A:正常对照组;B:EPO 组;C:Flu 非隐睾组;D:Flu + EPO 非隐睾组;E:Flu 隐睾组;F:Flu + EPO 隐睾组

图 2 PD25 时各组睾丸组织 Connexin43 蛋白表达 (S-P ×400)

3 讨论

隐睾患者不育的主要原因之一是生殖细胞丢失。研究表明,1 岁前,未降睾丸组织生精小管内的生殖细胞数量仍较多,1 岁以后逐渐少于同龄的正常睾丸组织[1,7],因此,隐睾患儿应该尽早得到治疗。有学者尝试用 HCG 及 LHRH 等药物对隐睾患儿进行治疗,然而外源性 HCG 及 LHRH 可促进血浆 FSH 及 LH 升高,却抑制睾丸内睾酮分泌[8-10],并且存在早熟、阴茎发育异常、甚至睾丸萎缩或骨骺早闭等副作用,且其疗效仍有争议[11]。近年来,有许多研究证实睾丸组织内有 EPO 受体(EPOR)表达[12],且外源性 EPO 可直接作用于睾丸间质细胞,并在不影响外周血睾酮水平的情况下促进睾丸组织内睾酮水平的升高[13-15]。

本研究中,胚胎期使用 Flu 建立的 SD 大鼠隐睾模型组,除了生精上皮细胞减少之外,睾丸脏器系数、生殖指数、平均曲细精管面积及平均曲细精管直径均明显小于正常对照组及非隐睾组($P<0.01$)。对 Flu 诱导的 SD 大鼠出生后予 EPO 干预,隐睾发生率为 38.1% (16/42),较未干预组 55.6% (20/36) 低,提示早期外源性 EPO 的应用可以降低隐睾的发生率。Flu + EPO 隐睾组睾丸脏器系数与正常对照组及非隐睾组间差异无统计学意义($P>0.05$),证实 EPO 对隐睾组织具有生物学效应。组织学观察结果显示:Flu + EPO 隐睾组的生精上皮细胞与正常对照组及非隐睾组比较无明显差异,同时,生殖指数及生精小管管腔大小也与正常对照组及非隐睾组差异无统计学差异($P>0.05$),提示 Flu 诱导的 SD 大鼠经 EPO 干预后,PD25 时,尽管仍有部分睾丸未降至阴囊,但其生殖潜能比未干预的隐睾组有明显提高,其作用机制可能与 EPO 通过促进局部组织睾酮的分泌减少生殖细胞的丢失有关。本研究中,正常饲养的 SD 大鼠腹腔注射外源性 EPO 后,睾丸组织与正常对照组无明显差异,提示外源性 EPO 对正常的睾丸组织无明显副作用。

Connexin43 是 Sertoli 细胞(Sc)间、Sc 与生殖细胞间的一种连接蛋白,与血睾屏障的形成及 Sc 的分化成熟有关[16-18]。出生后,随着时间的推移,Sc 逐渐成熟和血睾屏障的进一步形成,正常睾丸组织内 Connexin43 的表达从生精小管基底层逐渐向近腔室转移[18]。正常 SD 大鼠 PD25 时,Sc 分化成熟、正常血睾屏障已形成[19-20],Connexin43 表达于近生精小管管腔,Flu 诱导的隐睾组织内 Connexin43 蛋白在生精小管基底膜精原细胞层阳性表达,而 Flu + EPO 隐睾组与正常对照组及非隐睾组表达情况一致,均为近管腔表达。说明 EPO 能够维持 Connexin43 蛋白在隐睾组织中正常表达,提示 EPO 具有促进隐睾 Sc 成熟的作用。

本研究证实了外源性 EPO 具有促进 SD 大鼠胚胎性隐睾生殖潜能及维持隐睾组织 Connexin43 蛋白正常表达的作用。本实验仅在体内环境完成,EPO 对隐睾具有生物效应的深层机制尚不清楚,本课题组将结合体外实验进行进一步研究。

参考文献:

[1] Hutson J M, Li R, Southwell B R, *et al*. Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2013, 3: 176.

[2] 李彦锋, 靳凤烁, 方玉华, 等. 69 例睾丸肿瘤的治疗和临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(12): 1201-1203.

[3] David R B, Sjaastad O V, Blom A K, *et al*. Ontogeny of erythropoietin receptor mRNA expression in various tissues of the foetal and the neonatal pig[J]. Domest Anim Endocrinol, 2005, 29(3): 556-563.

[4] Foresta C, Mioni R, Bordon P, *et al*. Erythropoietin and testicular steroidogenesis: the role of second messengers[J]. Eur J Endocrinol, 1995, 132(1): 103-108.

[5] 马超, 何大维, 赵丹, 等. 三种胚胎期药物诱导大鼠隐睾模型的神经细胞黏附分子(NCAM)表达比较[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(9): 575-581.

[6] Latendresse J R, Warbrittion A R, Jonassen H, *et al*. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid [J]. Toxicol Pathol, 2002, 30(4): 524 - 533.

[7] Huff D S, Hadziselimovic F, Snyder H R 3rd, *et al*. Early postnatal testicular maldevelopment in cryptorchidism[J]. J Urol, 1991, 146(2 (Pt 2)): 624 - 626.

[8] Cortes D, Thorup J, Lindenberg S, *et al*. Infertility despite surgery for cryptorchidism in childhood can be classified by patients with normal or elevated follicle-stimulating hormone and identified at orchidopexy[J]. BJU Int, 2003, 91(7): 670 - 674.

[9] Hadziselimovic F, Herzog B. Importance of early postnatal germ cell maturation for fertility of cryptorchid males[J]. Horm Res, 2001, 55(1): 6 - 10.

[10] 冯科, 张翠莲, 李杭生, 等. 生殖激素水平和睾丸体积对非梗阻性无精症患者精子存在的预测价值[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(1): 69 - 73.

[11] Abaci A, Catli G, Anik A, *et al*. Epidemiology, classification and management of undescended testes: does medication have value in its treatment? [J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2013, 5(2): 65 - 72.

[12] Rossert J, Eckardt K U. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2005, 20(6): 1025 - 1028.

[13] Foresta C, Mioni R, Bordon P, *et al*. Erythropoietin stimulates testosterone production in man[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78(3): 753 - 756.

[14] Mioni R, Gottardello F, Bordon P, *et al*. Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells[J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1992, 127(5): 459 - 465.

[15] Cortes D, Visfeldt J, Thorup J M. Erythropoietin may reduce the risk of germ cell loss in boys with cryptorchidism [J]. Horm Res, 2001, 55(1): 41 - 45.

[16] Giese S, Hossain H, Markmann M, *et al*. Sertoli-cell-specific knockout of connexin 43 leads to multiple alterations in testicular gene expression in prepubertal mice[J]. Dis Model Mech, 2012, 5(6): 895 - 913.

[17] Cheng C Y, Mruk D D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(1): 16 - 64.

[18] 赵丹, 何大维, 马超, 等. 胚胎期氟他胺暴露对睾丸Connexin43基因表达的影响[J]. 中华小儿外科杂志, 2011, 32(12): 928 - 932.

[19] Mruk D D, Cheng C Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis[J]. Endocr Rev, 2004, 25(5): 747 - 806.

[20] van-Haaster L H, de-Rooij D G. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat [J]. Biol Reprod, 1993, 49(6): 1229 - 1235.

(**收稿**:2015-04-17;**修回**:2015-06-16)

(编辑 龙 亮)