维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0334-04

环磷酰胺对睾丸组织中 SCF 表达的影响及意义

代江涛,李旭良,魏光辉,林 涛,何大维,刘俊宏,李禄生

(重庆医科大学儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:通过环磷酰胺对大鼠睾丸组织中干细胞因子的表达及增殖指数影响的研究,以探讨环磷酰胺所致生精功能损害的原因。方法:选取 9 天龄雄性 Wistar 大鼠,腹腔注射大、中、小剂量的环磷酰胺后 24h、4w、8w 分别采集睾丸标本,应用 RT-PCR 技术检测睾丸组织中 SCF 的表达,同时光镜下计数 4w 时睾丸组织的增殖指数。结果:(1)对照组随年龄的增加,睾丸组织中分泌型干细胞因子表达无显著差异($P>0.05$),膜型干细胞因子均有显著增加($P<0.05$)。(2)同一时期各实验组和对照组比较,分泌型干细胞因子表达无显著差异($P>0.05$),但膜型干细胞因子表达均有显著降低($P<0.05$);同一时期各实验组间比较,随环磷酰胺剂量增加,膜型干细胞因子表达有显著降低($P<0.05$)。(3) 同一剂量三个时期比较,各实验组分泌型干细胞因子无显著差异($P>0.05$);膜型干细胞因子比较,大剂量组中无显著差异($P>0.05$),中、小剂量组中 24h 较 4w、8w 均有显著降低($P<0.05$),4w 与 8w 比较无显著差异($P>0.05$)。(4) 增殖指数检测,4w 时各实验组与对照组比较,均有显著降低($P<0.01$),并与剂量负相关。结论:本研究结果提示由于环磷酰胺的毒性作用,导致了睾丸组织中膜型干细胞因子表达下调,进而影响增殖指数降低,这可能即是临床上环磷酰胺使用后产生不同程度生精功能障碍的原因之一。

【关键词】环磷酰胺;干细胞因子;增殖指数;生精功能

【中国图书分类法分类号】R698+.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-02-20

Expression of stem cell factor of testes was effected by cytoxan

DAI Jiangtao, et al

(*Department of Prediatric Urology, Children' s Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To assess the effect of cytoxan results on testes by the expression of stem cell factor (SCF) and repopulation index of testes in rats. *Methods*: 9d male Wistar rats were injected intraperitoneally with cytoxan of large, medium, small doses. After 24h, 4w, 8w, SCF was detected by RT-PCR and repopulation index in 4w was counted by microscop of testes in rats. *Results*: (1) With increase of age, soluble SCF (sSCF) of control groups was not significantly different ($P>0.05$), but transmembrane SCF (mSCF) of control groups were significantly increased ($P<0.05$). (2) Expression of SCF of experimental groups and control groups were compared with at the same period, sSCF were not significantly different ($P>0.05$), but mSCF decreased significantly ($P<0.05$), as in each experimental groups. (3) SCF were compared with same dose at three periods in experimental groups, sSCF were not significantly different ($P>0.05$), mSCF of large doses groups were not significantly different ($P>0.05$), mSCF of medium and small doses group in 24h were significantly lower than that of 4w and 8w,that of 4w and that of 8w was not significantly different ($P>0.05$). (4) Repopulation index of experimental groups in 4w were significantly lower than that of control groups ($P<0.05$), meanwhile, it was negatively correlated with doses. *Conclusions*: The toxicity of cytoxan can reduce the expression of mSCF of testes in Wistar rat, which resulted in decrease of repopulation index , it maybe one of the effect that cytoxan injuried seminiferous function.

【Key words】Cytoxan; Stem cell factor; Repopulation index; Seminiferous function

已有研究证实,sertoli 细胞分泌的干细胞因子(Stem Cell Factor, SCF)对生精细胞的增殖分化有重要的作用[1-3],同时也有人证实环磷酰胺(Cytoxan, CTX)可导致精原细胞不能增殖分化[4,5],但两者是否有关尚无报道。本研究旨在检测使用不同剂量 CTX 后睾丸组织中可溶型 SCF(soluble SCF, sSCF)及膜型 SCF(transmembrane SCF, mSCF)的表达变化及其与增殖指数间的关系,以探讨 SCF 是否与 CTX 所致精原细胞不能增殖分化有关。

作者介绍:代江涛(1977-),男,博士,
主要研究方向:化疗对生精功能损害的机理及保护。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 实验动物、饲养环境与试剂

实验动物 选用曲细精管内仅有 A 型精原细胞和 sertoli 细胞的 9 天龄雄性 Wistar 大鼠[6]，体重约 18g ± 2g，共 72 只，随机分为 4 组，每组 18 只，由母鼠喂养，由重庆医科大学实验动物中心提供。

试剂 CTX：江苏恒瑞医药股份有限公司生产。MMLV 逆转录酶、Taq 酶、RNAsin、OligodT (15) 购自 Promega 公司。SCF 引物 1 序列：5′-ACTTG GATTAT CA CT TG CA TTTATC-3′，SCF 引物 2 序列：5′ - C T T C CAGTATAAGGCTCCAAAA GC-3′；Rat 的内参照 β-actin 引物 1：5′-AGGGGCCG-GACTCGTCATACT-3′，Rat 的内参照 β-actin 引物 2：5′-A CACT GT GC CC ATCTACGAGG-3′，由上海生工工程生物有限公司合成。

1.2 实验方法

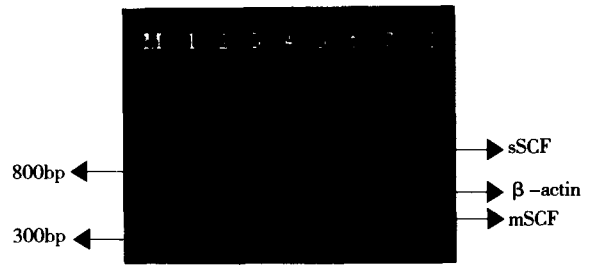
1.2.1 给药方法 对照组：腹腔注射 NS 0.2 ml，实验组：CTX 剂量根据人的常用剂量，按照动物与人的剂量换算公式[7]：实验组分大剂量组（100mg/kg），中剂量组（75mg/kg，相当于婴儿临床常用量），小剂量组（50mg/kg），腹腔注射，用药后 24h、4w、8w 随机处死 6 只，左侧睾丸组织采用两步法 RT-PCR 分别检测 sSCF 及 mSCF 表达。将 4w 时取出的右侧睾丸固定于 Bouin′s 液中。

1.2.2 总 RNA 提取及逆转录 取睾丸组织 50 ~ 100mg，Trizol 提取总 RNA。逆转录合成 cDNA：DEPC 水 4μl，OligodT（15）1μl，总 RNA 5μl，72℃ × 10min，然后加 5 × buffer 4μl，DEPC 水 2.5μl，4 × dNTP（10mmol/L）2μl，MMLV 逆转录酶 1μl，RNAsin 0.5μl，42℃ × 1h。

1.2.3 PCR 反应 10 × buffer 2.5μl，4 × dNTPs（10mmol/L）0.5μl，cDNA 4μl，Taq 酶（5μl/L）0.3μl，引物 1：0.5μl，引物 2：0.5μl，加 DEPC 水至 25μl，按 42℃ 30min、94℃ 5min、94℃，58℃，72℃各 1min 循环，取 35 个循环，以 β-actin 为相应的内对照。

PCR 产物半定量分析：PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳，紫外灯下观察，出现 605bp 和 689bp 分别代表 mSCF 和 sSCF，624bp 代表 β-actin，结果拍照储存（24h、4w、8w 的 SCF 表达分别见图 1、2、3），Quantity-One 软件图像分析，以 β-actin 光密度测定值标化 sSCF 和 mSCF 的光密度值，得到各组的 sSCF 和 mSCF 的相对含量。

1.2.4 增殖指数测定 据文献[8]，大鼠精原干细胞经历 4w 的增殖分化后成为分化型生精细胞，此时检测其增殖指数即可反映精原细胞的增殖分化状况。因此本研究亦将 4w 时右侧睾丸固定于 Bouin′s 液中的标本石腊包埋，切片，HE 染色，镜下记数增殖指数。（判定标准：以含 3 个以上已达到 B 型精原细胞以上的各级生精细胞作为可增殖的曲细精管，除以检测计数 200 个曲细精管作为增殖指数）



M：Marker

1、3、5、7：大、中、小、对照组的表达水平

2、4、6、8：对应的 β-actin 表达条带

图 1 SCF 在用药后 24h 表达电泳图

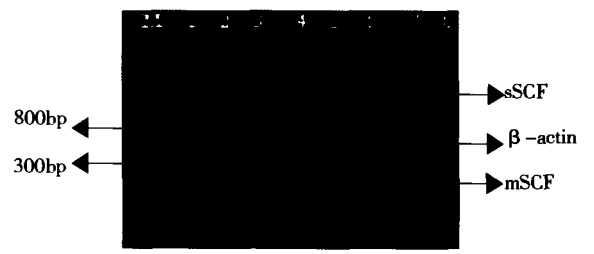


M：Marker

1、3、5、7：大、中、小、对照组的表达水平

2、4、6、8：对应的 β-actin 表达条带

图 2 SCF 在用药后 4w 表达电泳图



M：Marker

1、3、5、7：大、中、小、对照组的表达水平

2、4、6、8：对应的 β-actin 表达条带

图 3 SCF 在用药后 8w 表达电泳图

1.3 统计分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 for windows 软件建立数据库，One-Way ANOVA 及 Independent-Samples T test 分析，同一时期和同一剂量组间两两比较，检验水准为 $P<0.05$ 为具有显著的统计学意义。

2 结 果

对照组随年龄的增加，睾丸组织中 sSCF 表达逐渐增多，但无显著差异（$P>0.05$），而 mSCF 表达确有显著增加（$P<0.05$）（见表 1）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

相同时期各实验组和对照组比较，实验组虽随剂量的增加，sSCF、mSCF 均有逐渐减少的趋势，但 sSCF 无显著差异（$P>0.05$），而 mSCF 均有显著降低（$P<0.05$），且各实验组随剂量增加，mSCF 表达有显著降低的趋势（$P<0.05$），表明 CTX 可减少睾丸组织中 mSCF 的表达，并与剂量成负相关（见表 1）。

同一剂量三个时期比较，各实验组 sSCF 无显著差异（$P>0.05$），而在 mSCF 中，大剂量组中三个时期无显著差异（$P>0.05$），中、小剂量组中用药后 4w、8w 虽仍明显低于对照组（$P<0.05$），但其表达可见逐渐升高的趋势，说明大剂量 CTX 已造成不可逆转的损害，而中、小剂量可部分恢复，提示 CTX 对睾丸组织的损害与 CTX 的剂量成正相关（见表 1）。

增殖指数检测：用药后 4w 各实验组与对照组比较，均有显著降低（$P<0.01$），各实验组比较也随剂量的增加有显著降低（$P<0.01$），表明其增殖指数与剂量呈负相关（见表 2）。

表 2 用药后 4w 时各组间增殖指数数据（$\bar{x}\pm s$）

分组	增殖指数
大剂量组	0.148 ± 0.032*
中剂量组	0.377 ± 0.038*
小剂量组	0.518 ± 0.033*
NS	0.995 ± 0.008*

注：*：各组间两两比较，$P<0.01$

3 讨 论

CTX 为细胞毒性药物，因其疗效肯定，故至今临床仍广泛应用。但 CTX 在治疗疾病的同时，也对正常的生精功能有毒性损害，严重者将导致不育[4,5]。Lisa[5]等回顾观察了 17 名在儿童时期接受过 CTX 治疗的成年人，10 人精子数量减少，5 人精子活力降低，2 人基本正常，但这 2 人 CTX 用量较小。近年来还有研究证实[4]，细胞毒性药物在导致生精细胞过度凋亡的同时，仍可“幸存”部分精原细胞，但“幸存”的精原细胞不能继续增殖分化形成精子，从而导致精子生成减少或无精，说明 CTX 不但导致了精原细胞的急性损害，也对精原细胞有远期影响。

SCF 在睾丸组织中由 sertoli 细胞分泌，由于蛋白水解酶酶切位点不同，而将 SCF 分为 sSCF 和 mSCF 两类，sSCF 含有一个 84bp 的外显子 6，而 mSCF 没有。已有研究证实[9]，sSCF 主要在造血系统中起作用，促进骨髓造血细胞的增殖、分化、成熟。而在睾丸组织中，mSCF 介导生精细胞粘附到支持细胞，通过 PI3K/P70S6K 途径诱导精原细胞由 G1 期→S 期迅速过度，促进精原细胞增殖分化，减少精原细胞过度凋亡[1,3]，并且 mSCF 对 Leydig 细胞的存活及其前体细胞的增殖也有重要作用[10]。Allard 等[2]给予大鼠睾丸 sertoli 细胞损害物 2,5- 己二酮后，发现睾丸组织中 mSCF 表达减少，并出现睾丸萎缩，曲细精管内仅剩 sertoli 细胞和精原细胞的结果，而 CTX 等细胞毒性药物是否对睾丸组织中 SCF 表达有影响并影响生精功能尚未见报道。

本研究选用 9 天龄雄性 wistar 大鼠，此时其曲细精管内仅有 A 型精原细胞和 sertoli 细胞，同时根据大鼠精原细胞发育的时间过程[6,8]，用药后 4w、8w 分别是原始 A 型精原细胞发育至分化型精原细胞的时期和成熟精子的时期，因而本实验选择的三个时期不但可以了解 CTX 对精原细胞增殖分化的影响，而且可观察 CTX 对睾丸组织中 SCF 表达的近

表 1 用药后 24h、4w、8w 各组间 sSCF、mSCF 数据（$\bar{x}\pm s$）

剂量	24 h		4 w		8 w	
(mg/kg)	sSCF	mSCF	sSCF	mSCF	sSCF	mSCF
100	0.386 ± 0.026	0.398 ± 0.008▲●	0.400 ± 0.015	0.405 ± 0.005▲●	0.404 ± 0.008	0.405 ± 0.006▲●
75	0.393 ± 0.027	0.409 ± 0.007▲●▼	0.404 ± 0.011	0.427 ± 0.007▲●	0.409 ± 0.010	0.437 ± 0.010▲●
50	0.403 ± 0.024	0.421 ± 0.004▲●▼	0.407 ± 0.006	0.443 ± 0.012▲●	0.411 ± 0.008	0.451 ± 0.010▲●
对照组	0.404 ± 0.018	0.439 ± 0.012*	0.410 ± 0.008	0.488 ± 0.017*	0.414 ± 0.008	0.526 ± 0.009*

注：（1）*：对照组睾丸组织中 mSCF 比较，$P<0.05$；（2）▲：同一时期实验组和对照组 mSCF 比较，$P<0.05$；●：同一时期实验组间 mSCF 比较，$P<0.05$；（3）▼：同一剂量 3 个时期中、小剂量组中 24h 与 4w、8w 比较，$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

期和远期改变。结果发现，在生理情况下，随年龄的增加，睾丸组织中 mSCF 的表达有显著增加（$P<0.05$），sSCF 的表达虽无显著差异（$P>0.05$），但也随年龄增加有升高的趋势，表明随生育力的逐渐旺盛，睾丸组织中 SCF 表达也在逐渐增多，说明生精功能的增强与 SCF 表达增多有密切的关系。同一时期各实验组和对照组比较发现，实验组随 CTX 剂量增加，mSCF 均有显著降低（$P<0.05$），且随 CTX 剂量增加，mSCF 的减少也有显著性意义（见表 1），说明 CTX 可减少睾丸组织中 mSCF 的表达，且与剂量成负相关。同时，在同一剂量实验组中使用 CTX 后的各个时期比较中发现，大剂量组中三个时期的 mSCF 始终保持在较低水平，而中、小剂量组中 mSCF 在用药 24h 后的两个时期虽仍明显低于对照组（$P<0.05$），但其表达有逐渐升高的趋势，提示中、小剂量 CTX 使用后有部分恢复的可能，而大剂量 CTX 造成损害将是不可逆转的，也就是说，CTX 的临床常用量即可导致睾丸组织中 mSCF 表达减少，但后期可部分恢复 mSCF 的表达，而大剂量的使用 CTX 将对 mSCF 的表达导致长期的损害。

对生精功能能力的检测常用的直接指标包括精液中精子计数[4]、Johnsen′s 评分[11]、增殖指数[8]等。但由于大鼠的精液不易收集，很难直接计数精子，同时 Johnsen′s 评分不能直接反映精原细胞的增殖分化情况，所以本实验选用国内外学者目前公认的增殖指数指标来计数精原细胞发育至多少分化型的生精细胞比率，直接反映精原细胞的增殖分化能力[4,8]。本研究结果发现，随 CTX 剂量的增加，其增殖指数有显著降低的趋势（$P<0.01$），最终导致精子生成减少或无精，而且也发现增殖指数的变化与 mSCF 的下降的趋势一致。因此，本研究的结果提示 CTX 造成精原细胞细胞增殖分化减少和 mSCF 表达减少有关。

Blanchard 等发现[12]，2,5- 己二酮导致大鼠生精功能损害后，给予外源性 GnRH 可使睾丸内 mSCF 表达上调，大鼠的生精功能部分恢复。因此，本研究证实 CTX 导致睾丸组织 mSCF 表达减少有重要的临床意义，如果在化疗时上调睾丸组织中 mSCF 的表达或给予外源性的 mSCF，就有可能促进“幸存”的精原细胞增殖分化，增加精子发生的数量，恢复生精功能，但这尚需进一步研究。

（通讯作者：李旭良，博士生导师，重庆医科大学儿童医院泌尿外科，400014　电话：023-63876974）

参 考 文 献

[1] Marziali G, Lazzaro D, Sorrentino V. Binding of germ cells to mutant Sld sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the c-kit ligand[J]. Dev Biol, 1993;157(1):182-190.

[2] Allard EK, Blanchard KT, Boekelheide K. Exogenous stem cell factor compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5-hexanedione induced testicular atrophy in rats[J]. Biol Reprod,1996;55(1):185-193.

[3] Feng LX, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia[J]. J Biol Chem,2000;275(33): 25572 -25576.

[4] Meistrich ML, Shetty G. Suppression of testosterone stimulates recovery of spermatogenesis after cancer treatment [J]. Int J Androl, 2003;26:141-146.

[5] 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.

[6] 贾孟春，张亦清，刘德瑜，等.从大鼠不同生精细胞筛选精子发生过程中阶段特异表达基 [J]. 中华男科学，2000;6(4):219-223.

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

[8] Meistrich ML,Gene W, Huhtaniemi Ilpo, et al. Hormonal treatment after cytotoxic therapy stimulates recovery of spermatogenesis[J].Cancer Res,1999;9: 3357-3360.

[9] Andrews RG, Knitter GH, Bartelmez SH,et al. Recombinant human stem cell factor,a c-kit ligand, stimulates hematopoiesis in primates[J]. Blood,1991;78:1975-1980.

[10] Yan W, Kero J, Huthtaniemi I, et al. Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-Kit system in Leydig cell development[J].Dev Biol, 2000;227:169-182.

[11] Salman TF, Adkins ES, Fonkalsrud EW. Morphologic effects of unilateral Cryptorchidism on the contralateral descended testis[J]. J Pediatr Surg,1988;23:139.

[12] Blanchard Kt, Lee J, Boekelheide KL.A gonadotropin-releasing hormone agonist, reestablishes spermatogenesis after 2,5-hexanedione-induced irreversible testicular injury in the rat, resulting in normalized stem cell factor expression[J].Endocrinology, 1998; 139: 236 -244.