生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001153

氟他胺致大鼠隐睾模型的睾丸组织形态改变及其病理基础

彭金普，张德迎，曹希宁，周 玥，沈炼桔，龙春兰，何大维，林 涛，魏光辉
（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，重庆 400014）

【摘 要】**目的**：研究抗雄激素受体氟他胺（Flutamide，Flu）孕中、晚期诱导子代雄鼠发生隐睾，及其病理组织学损害，探讨其不育的病理学基础，为临床治疗隐睾所致非梗阻性不育提供依据。**方法**：将 20 只 SD（sprague dawley）孕鼠随机分为 Flu 隐睾组（n=10）、正常对照组（*n*=10），Flu 隐睾组于妊娠 12~21 d 给予 Flu 25 mg/（kg·d）皮下注射，正常对照组不予任何处理，取各组出生后第 60 天（postnatal day 60，PND60）的雄性 SD 大鼠睾丸组织（Flu 隐睾组只取隐睾睾丸），HE 染色观察睾丸组织形态学的差异，透射电镜观察睾丸支持细胞间的紧密连接结构，TUNEL 凋亡染色检测生精细胞凋亡情况，取附睾尾进行精子计数及形态观测，免疫组织化学和 Western blot 检测睾丸组织中生殖细胞增殖分化指标视黄酸刺激因子 8（stimulated by retinoic acid gene 8，Stra8）、联会复合体蛋白 3（synaptonemal complex protein 3，SCP3）的表达，采用 Q-PCR 检测 Stra8 基因水平。**结果**：收集正常对照组正常睾丸 30 只与 Flu 隐睾组隐睾睾丸 22 只，HE 染色显示隐睾睾丸管腔明显缩窄、生精细胞发育迟缓且排列紊乱、管腔中央无精子形成；TUNEL 凋亡检测证实隐睾组有大量生精细胞发生凋亡，精子计数结果为隐睾组（1.99 ± 0.13）×10⁸ 个/mL，远低于正常对照组[（5.53 ± 0.17）×10⁸ 个/mL，*P*=0.000]；透射电镜（transmission electron microscope，TEM）可观察到 SD 大鼠隐睾支持细胞间的紧密连接结构疏松；免疫组织化学显示 Stra8 在隐睾组织中表达较正常对照组少，SCP 3 在正常对照组睾丸生精小管的各级生精细胞胞核中均有表达，而在隐睾组睾丸中表达很弱；Western blot 结果显示，Flu 隐睾组 Stra8 蛋白表达量（0.34 ± 0.05）明显低于正常对照组（0.96 ± 0.09），*P*=0.002；Flu 隐睾组 SCP3 蛋白表达量（0.39 ± 0.03）也明显低于正常对照组（0.97 ± 0.07），*P*=0.001。Q-PCR 结果显示，Flu 组 SD 大鼠睾丸组织内 Stra8 mRNA 的表达（0.765 ± 0.015）较正常对照组（1.00 ± 0.01）低，*P*=0.01。**结论**：Flu 诱导的 SD 大鼠隐睾模型中，睾丸呈明显病理形态学改变，支持细胞间紧密连接结构破坏，Stra8 及 SCP3 表达明显下调，生精细胞凋亡增多，精子数量及质量下降，这可能是导致生精细胞发育障碍的重要原因。

【关键词】氟他胺；大鼠；隐睾；睾丸；病理改变
【中图分类号】R726.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-13

Histopathological changes and pathological basis of the cryptorchidtestis in rats by maternal exposure to flutamide

Peng Jinpu, Zhang Deying, Cao Xining, Zhou Yue, Shen Lianju, Long Chunlan, He Dawei, Lin Tao, Wei Guanghui
(*Department of Urology, 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 explore Flutamide(Flu) induced cryptorchidism in pregnant rats and its histopathological changes and pathological basis; to provide references for treating cryptorchidism induced non obstructive infertility. ***Methods***: Totally 20 SD pregnant rats were randomly divided into Flu cryptorchidism group(*n*=10) and normal control group(*n*=10). Flu was given 25 mg/(kg·d) by subcutaneous injection on pregnancy 12 to 21 days in Flu cryptorchidism group; nothing was given normal control group. When male SD rats were 60 days after birth, testis tissue were collected, and testicular histological morphology was observed by HE staining, Tight junction between Sertoli cells was detected by TEM; TUNEL staining was used to detect the apoptosis of spermatogenic cells; cauda epididymal was achieved for sperm count and morphology analysis; protein expressions of Stra8 and SCP3

作者介绍：彭金普，Email：pink-floyd@foxmail.com，研究方向：儿童泌尿生殖发育与畸形研究。
通信作者：张德迎，Email：dzdy199@126.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81100415）；教育部博士点基金资助项目（编号：20115503120009）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1702.058.html（2017-01-03）

were detected by immunohistochemistry and Western blot; mRNA expression of Stra8 was examined through Q-PCR. ***Results***: Thirty normal testis and 22 undescended testis were collected. HE images showed the cryptorchid testis lumen decreased and narrowed significantly; spermatogenic cell retardated and arranged in disorder; no sperm formed in central lumen. The tight junctions of Sertoli-germ cells were abnormal in cryptorchid testis. TUNEL apoptosis and sperm count with morphology observation results showed that there are a large number of spermatogenic cells apoptosis; the number of sperm of cryptorchidism group was decreased compared with that in normal group (P=0.000)[$(1.99 \pm 0.13) \times 10^8$ cell/mL vs. $(5.53 \pm 0.17) \times 10^8$ cell/mL]. The protein expressions of Stra8 and SCP3 were significantly lower in the cryptorchid testicular tissue than in the normal control group. Q-PCR showed that mRNA expression of Stra8 was significantly lower in cryptorchidism group than in the normal group[(0.765 ± 0.015) vs. (1.00 ± 0.01)], P=0.010. ***Conclusion***: In SD rat cryptorchidism model induced by Flu, there is an obvious pathological change in the testis, the tight junctions between Sertoli cells are destroyed, expression of Stra8 and SCP3 is significantly decreased, which may be very important during the process of spermatogenic impairment in cryptorchidism.

【Key words】flutamide; rat; cryptorchidism; testis; histopathological change

隐睾是儿童最常见的泌尿生殖系统先天畸形之一，在足月男婴中发病率达 3%~4%[1]，随着社会的发展、环境理化因子污染的加剧，以及雌激素、抗雄激素的作用，隐睾的发生率呈逐年上升的趋势[2]。隐睾的治疗方法比较成熟，但仍存在男性不育等主要远期并发症。研究显示，单侧隐睾患者有 38%存在少精子症，而 25%双侧隐睾患者存在无精子症，不孕率高达 60%~100%[3]，隐睾已成为男性不育的重要原因之一。隐睾的病因和睾丸受损的机制尚不明确，目前认为是遗传和环境因素共同作用的结果[4]。有研究证实，Flu 可阻断胚胎期雄性激素效果、影响睾丸发育、抑制睾丸下降[5]。本研究采用 Flu 诱导 SD 大鼠隐睾模型，研究其病理改变，为研究隐睾所致男性不育奠定基础，为临床研究相关治疗方案提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂

分析纯氟他胺(Sigma, F9397)，玉米油(阿拉丁)，Stra8 兔来源一抗(Abcam, ab49602)，SCP3 兔来源一抗(Abcam, ab85621)，山羊抗兔二抗检测试剂盒(中杉金桥公司，PV-6001)，TUNEL 凋亡试剂盒(Roche, 11684817910)，RNA 快速提取试剂盒(百泰克生物技术有限公司)，RNA 反转录试剂盒(TaKaRa, DRR037S)，总蛋白提取试剂盒(KeyGEN)，SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(Beyotime)，ECL 检测试剂盒(Millpore)，Stra8 引物序列(上海生工生物公司合成)。

1.2 实验动物的分组及给药

SD 大鼠购于重庆医科大学实验动物中心，动物合格证号：SYXK(渝)2011-0001。质量 280~310 g，饲养于重庆医科大学附属儿童医院动物中心，饲养温度为 20 ℃~25 ℃，相对湿度为 40%~60%。饲养至成年后，按雌比雄 1:1 的比例合笼，合笼后每日晨 8 点观察有无阴栓，有阴栓雌鼠则分笼喂养，记为妊娠 0 d(GD 0)。20 只孕鼠随机分为 2 组：① Flu 组，10 只，孕 11~19 d，每日晨 8 点皮下注射玉米油配制的抗雄激素类药物 Flu 25 mg/kg；②空白对照组，10 只，常规饲养，不给任何药物或试剂。根据 Van 等[6]标准，PND20 观察雄性仔鼠的总数量、隐睾仔鼠的数量，计算隐睾发生率。分别取正常及隐睾 PND60 仔鼠睾丸组织进行石蜡包埋，切片(4 μm)用于 HE、免疫组化染色及凋亡检测。另取部分 PND60 睾丸置液氮中保存，用于 Western blot 及 qRT-PCR 实验。

1.3 HE 染色观察睾丸形态组织学

将各组睾丸组织切片作 HE 染色，观察其形态组织学差异。

1.4 透射电镜观察睾丸组织超微结构

将大鼠睾丸标本切成小块(1 mm × 1 mm × 1 mm)，3%戊二醛固定 1 h 后 PBS 冲洗 3 次，再将标本放入 1%OsO_4 固定 1 h，经乙醇脱水及环氧树脂包埋处理后制成超薄切片(50 nm)进行染色，在透射电镜(飞利浦 TECNAI 10，美国)下观察睾丸紧密连接结构。

1.5 TUNEL 凋亡染色检测生精细胞凋亡

参照罗氏公司的 TUNEL 凋亡试剂盒说明书进行，将准备好的石蜡切片进行二甲苯脱蜡，酒精梯度脱水，蒸馏水缓慢冲洗后室温下自然干燥。再将切片放入 250 mL 柠檬酸(0.1 mol/L, pH6.0, 10.505 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$+500 mL H_2O)中微波加热至沸腾，静置 5 min 后加入 100 mL ddH_2O，15 min 将切片取出，10%山羊血清(0.5%BSA)滴于标本上，37°C 下封闭 15 min；将 TUNEL 试剂充分混匀、离心后滴加至标本，37°C 孵育 1 h；PBS 反复清洗 10 min × 3 次，采用抗荧光淬灭剂封片后荧光显微镜下观察摄像。

1.6 精子计数及形态观察

1.6.1 精子采集 分别取正常对照组的正常睾丸附睾尾及

隐睾组的隐睾侧附睾尾各 10 只，置于 37 ℃预热的培养皿中，用眼科剪沿纵向剪成碎块，其中一组培养皿加入 37 ℃预热的 PBS 溶液 10 mL，制成 1 号精子悬液用于精子计数，另一组培养皿则加入 PBS 溶液 1 mL，制成 2 号精子悬液用于精子形态学观察。然后放于 37 ℃恒温水浴中孵育 10 min，待精子充分游离。

1.6.2 精子计数 采用血细胞计数板计数附睾尾精子密度。①用血细胞计数吸管吸取 10 μL 1 号精子悬液，填充至血细胞计数板的计数池内；②将计数板静置于铺有湿布的盒子中 15 min，使所有精子沉淀于计数板的同一焦面上；③于低倍镜（10×）下找到计数板中心的方格，选择精子分布均匀的计数池，再转换成高倍镜（40×）进行计数。在高倍镜下对中央大方格的 4 个中方格内的精子进行计数（即 4 个角上的 4 个格）。为避免遗漏或重复，应按一定顺序进行计数；计数时，若精子头在双线的最上或最左侧，则计入；而精子头在双线最下或最右侧，则不计入；计算公式为：四个格子总精子数×50 000×100 个/mL[7]。

1.6.3 精子形态学观察 ①取 10 μL 2 号精子悬液制成精子涂片，室温自然干燥；②99%甲醇固定 5 min，晾干；③涂片于 2%伊红染液中染色 1 h，用蒸馏水轻轻冲洗，晾干，封片；④在光学显微镜下观察精子形态。

1.7 免疫组织化学检测

按 SP 法试剂盒说明书操作，对各组大鼠睾丸组织石蜡切片进行免疫组织化学检测，兔抗大鼠 Stra8 及 SCP3 抗体浓度为 1∶1 000，在光学显微镜控制下进行 DAB 显色。阴性对照采用 PBS 代替一抗，苏木素适当复染，出现的棕黄色为 Stra8 及 SCP3 阳性。

1.8 Western blot

分别取每组雄性仔鼠睾丸组织 100 mg，按照凯基总蛋白提取试剂盒说明书要求进行裂解。在低温离心机中将组织提取物以 1 000 r/min 离心 5 min，BCA 法测定蛋白浓度。将总蛋白加入上样缓冲液中煮 5 min 至完全变性，在 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）中进行电泳，然后电转到硝酸纤维素膜上。用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液将硝酸纤维素膜于室温封闭 1 h，然后分别加入 Stra8、SCP3 一抗（1∶1 000），4℃过夜，次日用 TBST 冲洗 3 次，每次 5 min，然后加入山羊抗兔二抗（1∶2 000），1 h 后用 TBST 冲洗 5 min×3 次，最后进行 ECL 发光、拍照及灰度值测定。

1.9 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测 Stra8 mRNA 表达

按组织 RNA 提取试剂盒说明书要求提取仔代雄鼠睾丸总 RNA，采用紫外分光光度计对 RNA 浓度进行测定，鉴定 RNA 的纯度。采用 β-actin 作为内参，应用软件 Primer 5.0 设计出 Stra8 和内参 β-actin 的引物序列：Stra8 上游引物：5'-AGCACAGCACCTTCTCGG-3'；下游引物：5'-AAGCTCGCC-ACATCAAAA-3'；预计产物片段大小为 160 bp；内参 β-actin 上游引物：5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'；下游引物：5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'；预计产物片段大小为 150 bp，引物由生工生物工程（上海）有限公司合成。Stra8 反应条件如下：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 20 s，54 ℃退火 15 s，60 ℃延伸 30 s，共 40 个循环。每个样本重复实验 3 次。根据荧光定量 PCR 得到的 Stra8 和 β-actin 的 Ct 值，计算 $2^{-\Delta Q}$ 来表示 Stra8 基因的相对表达量。

1.10 统计学方法

所有实验数据均采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）或率（%）表示，应用 SPSS 17.0 软件对各组数据进行统计学分析。组间比较采用 t 及卡方检验，检验水准 α=0.05。

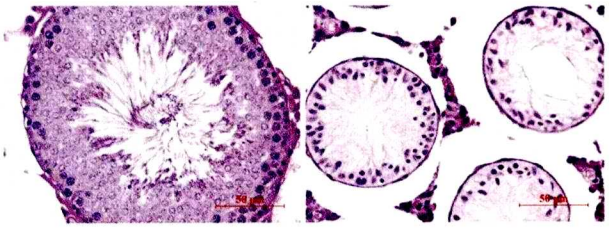
2 结 果

2.1 隐睾发生率

正常对照组和 Flu 隐睾组孕鼠产子总数分别为 98 只和 93 只，其中雄性子鼠数分别为 48 和 42 只，Flu 组成功诱导出隐睾模型，其隐睾发生率为 42.86%（18/42），其中单侧隐睾发生率为 33.33%（14/42），双侧隐睾发生率为 9.52%（4/42）。正常对照组隐睾发生率为 4.17%（2/48），均为单侧隐睾。

2.2 睾丸组织形态学差异

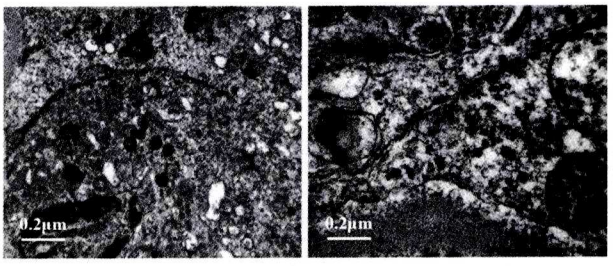
HE 结果显示 Flu 隐睾组睾丸曲细精管管腔明显缩窄，管腔间隙变大，各级生精细胞排列紊乱、数目减少，且发育迟缓，未见精子细胞，管腔中央无絮状精子形成（图 1）。透射电镜发现：正常对照组睾丸支持细胞间的紧密连接完整，但隐睾组睾丸紧密连接结构消失，支持细胞之间出现缝隙（图2）。



A. 正常对照组　　B. Flu 隐睾组

图 1 PND60 SD 大鼠睾丸组织学形态（HE，400×）

Fig.1 male rat's testicular histology expression(PND60，400×)



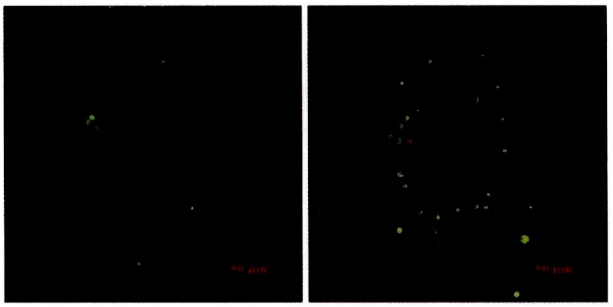
A. 正常对照组　　B. Flu 隐睾组

图 2 PND60 大鼠睾丸支持细胞间的紧密连接结构（透射电镜，50 000×）

Fig.2 Tight junctions，between Sertoli cells，was detected by TEM(PND60，50 000×)

2.3 生精细胞凋亡

通过 TUNEL 法检测各组子代 SD 大鼠睾丸内的生精细胞凋亡情况，结果显示，在正常对照组中仅有少数生精细胞发生凋亡，而在 Flu 隐睾组中可见大量生精细胞凋亡(图 3)。



A. 正常对照组　　B. Flu 隐睾组

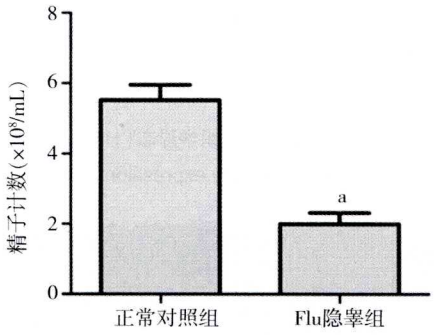
注：图中红色箭头所指绿色荧光即为凋亡的生殖细胞，可见 Flu 隐睾组睾丸组织中大量生殖细胞发生凋亡

图 3　PND60 SD 大鼠睾丸内生殖细胞凋亡的情况(PND60,400×)

Fig.3　The apoptosis of germ cells in the testis (PND60,400×)

2.4 精子计数及形态学观察

分别取正常对照组的正常睾丸附睾尾及隐睾组的隐睾侧附睾尾各 10 只进行精子计数，精子计数结果为正常对照组(5.53 ± 0.17)$\times 10^8$ 个/mL，隐睾组(1.99 ± 0.13)$\times 10^8$ 个/mL，两组间存在显著性统计学差异(t=28.452，P=0.000)，如图 4所示；对大鼠精子进行光学显微镜观察其形态后发现，隐睾组精子密度明显下降，且其精子畸形数目较多(包括断头、短尾、双头畸形等)，如图 5 所示，可见隐睾组精子数量及质量远低于正常对照组。



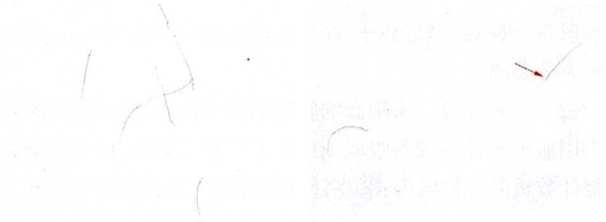
a：与正常对照组比较，P<0.05

图 4　精子计数

Fig.4　Sperm Count

2.5 Stra8 及 SCP3 在隐睾睾丸组织中的表达及定位

通过免疫组化检测各组子代大鼠睾丸中 Stra8 及 SCP3 的蛋白表达水平及位置，结果显示在正常对照组 SD 大鼠睾丸内有大量 Stra8 蛋白表达，主要位于未分化的精原细胞细胞质，Flu 隐睾组 Stra8 的表达明显下调，散在表达于精原细胞质(图 6)。SCP3 在正常对照组中广泛高表达于正在分化的精原细胞胞核中，在 Flu 隐睾组中呈低表达，散在表达于形态异常的生精细胞胞质(图 7)。

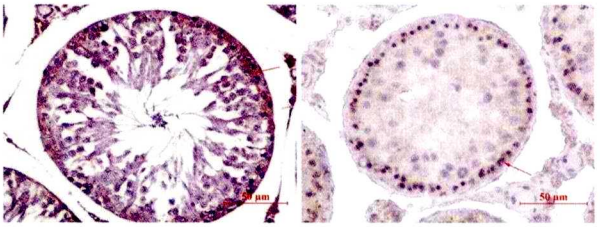


A. 正常对照组　　B. Flu 隐睾组

注：图示正常对照组精子密度明显大于隐睾组，且正常对照组精子形态基本完整（头、体、尾），而隐睾组则存在断头等畸形现象

图 5　精子形态学观察(200×)

Fig.5　Sperm morphology（200×）

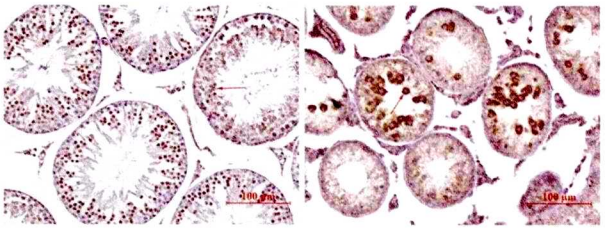


A. 正常对照组　　B. Flu 隐睾组

注：正常对照组，图中红色箭头所指棕黄色为 Stra8 蛋白的表达，大量见于未分化的生精细胞胞质；Flu 隐睾组，图中红色箭头所指棕黄色为 Stra8 表达，可见表达量较正常对照组明显下调，散在表达于精原细胞胞质

图 6　PND60 SD 大鼠睾丸内 Stra8 的表达（SP,400×）

Fig.6　Male rat's Stra8 expression（PND60,SP,400×）



A. 正常对照组　　B. Flu 隐睾组

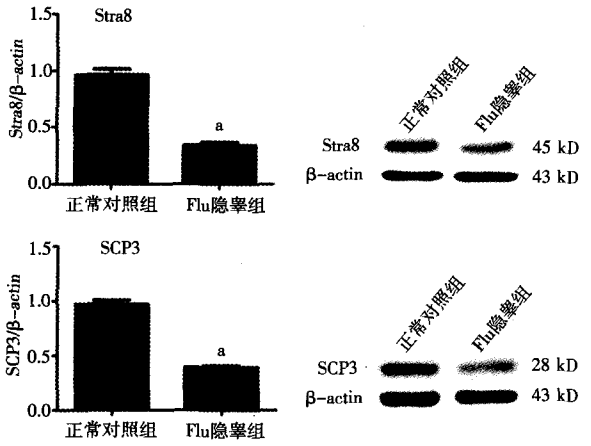
注：正常对照组，图中红色箭头所指棕黄色为 SCP3 蛋白表达，大量表达于正在分化的精原细胞胞核中；Flu 隐睾组，图中红色箭头所指棕黄色为 SCP3 蛋白表达，可见散在表达于生精小管管腔中部生精细胞胞质

图 7　PND60 SD 大鼠睾丸内 SCP3 的表达（SP,200×）

Fig.7　Male rat's SCP3 expression（PND60,SP,200×）

Western blot 检测各组 10 只子代雄鼠睾丸中 Stra8 及 SCP3 的蛋白水平，结果显示在 Flu 隐睾组中 Stra8 及 SCP3蛋白表达明显下调(图 8)。应用 Image J 软件对条带进行灰度

值半定量分析，采用目标蛋白灰度值/β-actin 灰度值的方式进行定量，结果显示 Flu 隐睾组 Stra8 蛋白灰度值（0.34 ± 0.05）明显低于正常对照组（0.96 ± 0.09）（t=10.563，P=0.002）；同样 Flu 隐睾组 SCP3 蛋白灰度值（0.39 ± 0.03）也明显低于正常对照组（0.97 ± 0.07）（t=14.002，P=0.001）。



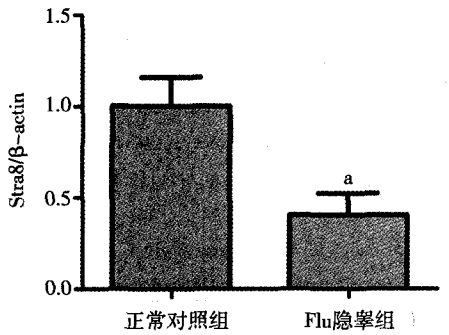
a：与正常对照组比较，P < 0.05

图 8　大鼠睾丸内 Stra8、SCP3 蛋白的表达及半定量分析

Fig.8　Male rat's Stra8, SCP3 expression and Semi-quantitative analysis

2.6　隐睾大鼠睾丸组织中 Stra8 mRNA 表达情况

qRT-PCR 检测在各组 10 只子代雄鼠睾丸中 Stra8 及 SCP3 mRNA 表达水平，结果显示，Flu 隐睾组睾丸组织中 Stra8 mRNA 的表达（0.765 ± 0.015）较对照组（1.00 ± 0.01）低（t=22.578，P=0.010），如图 9 所示。



a：与正常对照组比较，P < 0.05

图 9　PND60 SD 大鼠睾丸内 Stra8 基因的表达情况（PND60）

Fig.9　Male rat's Stra8 mRNA expression (PND60)

3　讨　论

男性不育或生育能力下降是隐睾的常见并发症，隐睾已成为男性不育的重要原因之一。研究隐睾的病理组织学变化对理解隐睾导致生精细胞发育障碍及研究其导致非梗阻性男性不育的治疗方案具有重要意义。

以往观察到的隐睾睾丸病理形态学变化大都来自临床活检[8]，然而组织来源的局限性使得完整地反映睾丸组织病变的全貌受到限制，因此建立 SD 大鼠隐睾模型，观察隐睾睾丸的病理形态学改变可提高对隐睾睾丸组织病变的认识。本研究采用 Flu 孕期给药，并且给药时间点选择在雄鼠生殖系统发育的关键时期，同时也是 Flu 生殖毒性作用的敏感期，成功诱导出隐睾仔鼠。SD 大鼠隐睾模型发现：隐睾睾丸出现明显的病理学改变，生精小管出现萎缩，生精细胞层次少而稀疏，甚至生精细胞脱落到管腔；生精上皮出现间质细胞、多核细胞异常增生，与既往报道病理活检结果相符[9]，本实验选择PND60 大鼠睾丸作为远后期或晚后期的病理变化，使得隐睾对生殖功能的危害，能得到客观和全面的反映，以重视隐睾早发现、早治疗这一基本原则。可在此基础上进行新生及胚胎期病理学研究及生殖损害防治研究。

睾丸内生精微环境对精原细胞分化及精子形成十分重要，而这种环境的保持依赖于血睾屏障的存在，血睾屏障结构和功能的完整性对于精子发生、成熟至关重要，紧密连接结构是血睾屏障的重要组成部分[10]。本研究透射电镜结果显示，SD 隐睾大鼠其紧密连接遭到破坏，提示其血睾屏障不完整，可能导致精子逸出而发生自身免疫反应，同时某些大分子物质经血管和淋巴进入生精上皮，破坏生精微环境，使生精出现障碍。

人类精子始于原始生殖细胞，精子从发生至成熟要经历 5 个重要环节[11]：①原始生殖细胞转化为生殖母细胞（gonocyte，妊娠 8 周）；②生殖母细胞转化为胎儿期精原干细胞（SSCs，小于妊娠 15 周）；③胎儿期 SSCs 转化为 Ad 型精原细胞（生后 2~3 个月），并终生维持；④第一次减数分裂出现初级精母细胞（4~5 岁）；⑤成熟精子出现（青春期）。除 SSCs 分化为 Ad 型精原细胞阶段发生障碍以外，无法进入或通过减数分裂阶段也是隐睾导致不育的重要原因[12]。本实验在观察病理变化的同时，还检测了睾丸组织内 Stra8、SCP3 的表达情况，旨在研究阻止隐睾生精细胞通过减数分裂过程的原因，为进一步研究预防性治疗隐睾性不育奠定实验基础。

Stra8 已被公认为减数分裂的启动基因，它的上

调在生殖细胞从有丝分裂向减数分裂转换过程中是必需的[13-14]。免疫组化分析表明 Stra8 蛋白主要定位于细胞质[15]。Stra8 基因敲除的雄性幼年小鼠精原细胞并没有表现出减数分裂前期的形态学特征，也不表达减数分裂期间染色体重组和联会的特征分子，无法启动精原细胞减数分裂，导致精子生成障碍[16]。另一项研究也证明，Stra8 的缺失可导致精母细胞停留于减数分裂前期的 DNA 复制阶段，最终无法生成精子[17]。SCP3 是雄性生殖细胞进行减数分裂期间联会复合体的形成所必需的重要组成部分，主要表达于分化中的精原细胞细胞核中[18]，在哺乳动物生殖细胞减数分裂中具有重要功能。Sliva 等[19]研究显示，SCP3 是生精细胞减数分裂的标志基因，主要在定向分化和终末分化阶段起作用，与减数分裂和精子的发生密切相关。SCP3 基因的变异将直接导致无精症，Miyatomo 等[20]研究发现，SCP3 基因杂合性缺失的患者，其减数分裂过程会受阻，导致精子无法成熟。这些证据进一步表明，SCP3 蛋白作为减数分裂的特异性标志蛋白，是精子发生过程中不可或缺的关键因子。

本研究通过 Flu 成功诱导 SD 大鼠隐睾模型，证实隐睾睾丸呈现明显病理形态学改变，支持细胞间紧密连接结构破坏，生精细胞凋亡增多，精子数量及质量下降，这可能是导致其生殖发育产生障碍的重要原因。Stra8 及 SCP3 表达明显下调，但其少量表达可能也是隐睾睾丸少量精子赖以生成的基础。若能采取有效方式恢复隐睾睾丸遭到破坏的生精微环境，促进其 Stra8、SCP3 表达，可能是修复其生精损害的有效手段，必将为隐睾生精障碍的预防性治疗带来新的希望。

参 考 文 献

[1] Kolon TF, Herndon CD, Baker LA, et al. Evaluation and treatment of cryptorchidism: AUA guideline[J]. J Urol, 2014, 192(2): 337-345.

[2] Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility[J]. Curr Opin Genet Dev, 2014, 26: 79-88.

[3] La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, et al. Cryptorchidism and its long-term complications[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2009, 13(5): 351-356.

[4] Kurahashi N, Kasai S, Saijo Y, et al. Exposure to endocrine disrupting chemicals and human health: a review of epidemiological studies focused on hypospadias and cryptorchidism[J]. Nihon Eiseigaku Zasshi, 2005, 60(1): 15-22.

[5] Okur H, Muhtaroglu S, Bozkurt A, et al. Effects of prenatal flutamide on testicular development, androgen production and fertility in rats[J]. Urol Int, 2006, 76(2): 130-133.

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

[7] Parhizkar S, Yusoff MJ, Dollah MA. Effect of phaleria macrocarpa on sperm characteristics in adult rats[J]. Adv Pharm Bull, 2013, 3(2): 345-352.

[8] Moretti E, Di Cairano G, Capitani S, et al. Cryptorchidism and semen quality: a TEM and molecular study[J]. J Androl, 2007, 28(1): 194-199.

[9] Bergh A, Söder O. Studies of cryptorchidism in experimental animal models[J]. Acta Paediatr, 2007, 96(5): 617-621.

[10] Pérez CV, Theas MS, Jacobo PV, et al. Dual role of immune cells in the testis: protective or pathogenic for germ cells[J]. Spermatogenesis, 2013, 3(1): e23870.

[11] Huff DS, Fenig DM, Canning DA, et al. Abnormal germ cell development in cryptorchidism[J]. Horm Res, 2001, 55(1): 11-17.

[12] Zhang RD, Wen XH, Kong LS, et al. A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis[J]. Reproduction, 2002, 124(1): 95-105.

[13] Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, et al. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 19): 3233-3242.

[14] Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, et al. Retinoic acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20249.

[15] Giuili G, Tomljenovic A, Labrecque N, et al. Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state[J]. EMBO Rep, 2002, 3(8): 753-759.

[16] Ohta K, Lin Y, Hogg N, et al. Direct effects of retinoic acid on entry of fetal male germ cells into meiosis in mice[J]. Biol Reprod, 2010, 83(6): 1056-1063.

[17] Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, et al. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis[J]. Endocrinology, 2006, 147(1): 96-110.

[18] 郭 睿，崔慧林，赵 虹，等. SCP3 在小鼠精母细胞核内的表达及定位[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2008，18(1)：84-88.

[19] Silva C, Wood JR, Salvador L, et al. Expression profile of male germ cell-associated genes in mouse embryonic stem cell cultures treated with all-trans retinoic acid and testosterone[J]. Mol Reprod Dev, 2009, 76(1): 11-21.

[20] Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3[J]. Lancet, 2003, 362(9397): 1714-1719.

（责任编辑：冉明会）