



一种新的大鼠隐睾模型的建立

朱 斌^{1,2}, 傅 骞¹, 郝喜娟¹, 杨佳佳¹, 王宏蕾¹, 朱 牧¹, 胡素敏¹

(1 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 北京 100021)

【摘要】 目的 改善大鼠隐睾模型的制作方法, 提高隐睾模型的质量, 并对新模型的稳定性进行研究。**方法** 28 只大鼠随机分为对照组 (ctrl) 和模型组 (modl) 采用模拟失重大鼠模型, 对大鼠进行 3 周尾部悬吊进行造模, 随后模型组大鼠解悬吊恢复 8 周观察该模型的稳定性。**结果** 经过 3 周的尾部悬吊, 模型组所有大鼠睾丸均滑入腹腔, 同时和对照组相比, 睾丸和附睾的重量出现极显著的降低 ($P < 0.01$)。HE 染色发现对照组大鼠睾丸的生精小管结构排列紊乱, 精原细胞消失, 附睾尾中成熟精子消失。经过 8 周的恢复, 大鼠的睾丸及附睾仍未恢复到正常水平 ($P < 0.01$), HE 染色显示其生精小管结构和精原细胞数量并未出现明显的改善。**结论** 尾吊法所建立的大鼠隐睾模型效果稳定, 可以有效模拟大鼠隐睾时的睾丸温度变化情况, 同时对大鼠的伤害较小, 操作比较简单。

【关键词】 隐睾; 睾丸; 附睾尾; 生精小管

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0064-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.05.014

The Exploration of a New Method in Rat Cryptorchidism Model Making

ZHU Bin^{1,2}, FU Qian¹, HAO Xi-juan¹, YANG Jia-jia¹, WANG Hong-lei¹, ZHU Mu¹, HU Su-min¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective In order to improve the method of setting up the model of rat cryptorchidism mode, we explored a new method and also examined its stability. **Method** Twenty-eight male Wistar rats were randomly divided into control (Ctrl) and model (Modl) group. Each rat was kept in a single cage. The Ctrl group can move freely during the experiment. The Modl group was tail-suspended for 3 weeks, and then reloaded for 8 weeks. Rats were sacrificed at the end of 3rd week and 11th week. The testis and epididymis were removed, weighted, then stained by Hematoxylin and Eosin Stainin, and examined under light microscopy. **Results** After 3-week tail-suspending, all rats' testis slipped into enterocoelia. Compared with Ctrl Group, the weight of testis and epididymis were significantly decreased ($P < 0.01$). After 8 weeks recovery, the weight of testis and epididymis did not increase to normal ($P < 0.01$). With morphological examination, we found that after 3 weeks tail-suspending, seminiferous tubules were completely disorder and the spermatogonium were disappeared in the cauda epididymidis. The pathological changes were not improved ($P < 0.01$) at the end of 11th week. **Conclusion** 3-week tail-suspending can simulate the pathological changes of cryptorchidism syndrome. It is much easier to be done than the traditional one. Moreover, this method has less injury on the rat. Therefore, it can be used to set up a new model of cryptorchidism syndrome.

【Key words】 Cryptorchidism; Testis; Epididymidis; Seminiferous tubule

【基金项目】 2006 年教育部优秀人才支持计划 (NCET060124); 2006 年北京市科技新星 (A) 类计划 (2006A49); 国家自然科学基金项目 (30500663); 北京中医药大学自主选题项目 (2009JYB22-JS004); 北京中医药大学创新团队项目 (2011-CXD-04)。

【通讯作者】 胡素敏, E-mail: husm@bucm.edu.cn。

隐睾症是指睾丸下降异常,使睾丸不能降至阴囊而停留在腹膜后腹股沟管或阴囊入口处。隐睾症是男性泌尿生殖系统最常见的先天性畸形,也是成年男性生育力低下甚至不育的主要原因之一,约 5%~10% 的男性不育患者有隐睾史^[1]。动物隐睾模型能够完全模拟先天性的隐睾症,是研究人的隐睾症的很好工具^[2]。传统大鼠隐睾模型,操作繁琐,动物容易发生感染。本课题组前期在应用尾吊模型研究失重性骨质疏松的研究过程中发现,3 周尾吊可以引起大鼠睾丸完全滑入腹腔并造成睾丸和附睾的严重萎缩,可以作为无创模拟大鼠隐睾症的模型。因此在本次实验中,笔者拟通过 3 周尾吊来造成大鼠隐睾,并通过 8 周的解悬吊恢复来观察该模型的稳定性。

1 方法

1.1 动物及分组

Wistar 大鼠,雄性,28 只,体重(150 ± 10)g,鼠龄 6~7 周,北京维通利华实验动物公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2006-009。所有大鼠均饲养在北京中医药大学 SPF 级动物房内(许可证号:SYXK(京)2011-0024),室内相对温度(25 ± 1)℃,相对湿度(60 ± 10)%,保持 12 h 光照/12 h 黑暗交替。适应性饲养 1 周后,根据体重按照随机区组设计将大鼠分为对照组(Ctrl)和模型组(Modl),每组 14 只。所有大鼠均采用悬吊笼单笼饲养。对照组大鼠始终在悬吊笼内自由活动,模型组尾悬吊 3 周后解除悬吊,并自由恢复 8 周。实验观察周期共 11 周。

1.2 造模方法

大鼠尾部无水乙醇脱脂,吹干。以医用胶布从尾根部沿一侧面向远端形成半环,勾挂于悬吊笼横梁所连的铰链上。调整高度使鼠前肢承重,后肢悬空去负荷,鼠体与水平成 30°角;大鼠可 360°活动,自由觅食饮水^[3]。

1.3 取材及测量指标

3 周后两组大鼠解除悬吊,每组随机挑选 7 只,以 10% 水合氯醛 350 mg/kg 体重麻醉大鼠,迅速剥取其左侧睾丸和附睾,称重后将睾丸和附睾尾置于

Boin 氏固定液中,12 h 后进行修块后,继续固定 12 h,常规包埋,脱水。6 μ m 切片(Leica RM2235 切片机),HE 染色,常规光镜观察组织结构改变(OLYMPUS -DP71)。8 周后处死其余全部大鼠,取材、标本处理、及检测指标同前。

2 结果

2.1 大鼠睾丸和附睾肉眼观改变情况

模型组大鼠经 3 周尾部悬吊后,肉眼观察可见其双侧睾丸全部滑回腹腔,剥离出的睾丸直径明显缩短,形态小于正常对照组,而附睾长度则无明显变化。解悬吊自由恢复 8 周后,模型组大鼠的睾丸和附睾仍停留在腹腔,大小、形态无明显改善(彩插 10 图 1)。

2.2 大鼠睾丸及附睾重量改变情况

模型组大鼠经 3 周尾吊,和对照组相比,睾丸和附睾重量出现极显著降低($P < 0.01$),而经过 8 周的恢复后,大鼠的睾丸和附睾的重量虽有一定的增长,但仍显著低于对照组($P < 0.01$)。

2.3 大鼠睾丸和附睾 HE 染色

3 周尾吊后,正常大鼠的睾丸组织中生精小管排列整齐,在每一生精小管内部管腔界限明显,可见不同发育期初级、次级精母细胞排列整齐,管腔中可见大量未成熟的精子。附睾中也存在大量成熟精子(彩插 10 图 2A、B,彩插 9 图 3A、B)。而模型组大鼠睾丸则出现极显著萎缩,生精小管严重萎缩,结构变得不规则,管腔界限模糊不清,同时失去原有各期精子细胞层次,并有核空泡化的现象出现,同时生精上皮层数显著减少,排列松散,特别是次级精母细胞和精子细胞的数量减少明显,初级精母细胞坏死脱落到管腔。附睾尾中无精子的存在(彩插 10 图 2C、D,彩插 9 图 3C、D);经过 8 周的恢复后,对照组睾丸及附睾形态完整,管腔中存在大量精子(彩插 10 图 2E、F,彩插 9 图 3E、F);模型组睾丸及附睾形态未见明显改善,睾丸形态仍未恢复正常,曲细精管内仍然存在大量的空泡样结构,各级精母细胞层次结构混乱,管腔中仅可见少量精原细胞存在;附睾尾中仍无成熟精子(彩插 10 图 2G、H,彩插 9 图 3G、H)。

表 1 尾吊 3 周和恢复 8 周后睾丸及附睾重量的改变
Tab.1 The weight of testis and epididymis after 3 weeks tail-suspending and 8 weeks reloading

	睾丸 (g)		附睾 (g)	
	尾吊 3 周	恢复 8 周	尾吊 3 周	恢复 8 周
对照	1.817 ± 0.121	1.966 ± 0.284	0.509 ± 0.053	0.698 ± 0.055
模型	0.585 ± 0.113 **	0.732 ± 0.102 **	0.264 ± 0.024 **	0.324 ± 0.027 **

注:与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: compared with control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

睾丸位于阴囊中,是产生精子和分泌雄性激素的重要器官,其功能的正常发挥有赖于阴囊提供的稳定的外部环境。哺乳动物产生成熟精子的过程包括睾丸生精小管中的精子发生和附睾内精子的成熟。精子发生对温度变化非常敏感,该过程在比体温低 $1.5 \sim 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的睾丸内进行。只有睾丸保持较低的温度,才能保证生精小管内正常的精子发生;睾丸温度稍微升高,精子发生则遭受破坏。研究发现睾丸温度升高时可产生各种应激反应,超过一定限度时引起睾丸缺血、缺氧及代谢障碍,致使生精细胞发生凋亡^[4]。哺乳类动物的睾丸位于体外的阴囊内,阴囊对温度有特殊的调节能力,可以使睾丸内保持精子发生所需的适宜温度^[5]。研究发现人阴囊的平均温度为 $33.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[6],温度过高或者过低都会导致生精细胞的受损,从而影响生殖系统发育。

隐睾症发生时,睾丸不能降至阴囊而停留在腹膜后腹股沟管或阴囊入口处可以造成睾丸局部温度升高,从而引起睾丸萎缩,生精细胞减少,精子发生过程受阻,最终导致男性不育。

为寻求治疗隐睾症的有效药物,动物隐睾模型成为常用的研究手段。传统隐睾模型的建立是将大鼠睾丸脂肪垫固定在两侧腹壁双侧,然后缝合腹股沟和腹部,从而避免睾丸滑出腹腔。这一手术方法较好地模拟了人隐睾症的发生。但操作繁琐,大鼠容易出现术后感染而造成死亡;同时手术也会造成睾丸和腹腔粘连较重,为取材时剥取睾丸造成困难。

本实验中采用的尾吊大鼠模型,是被广泛应用于地面模拟失重状态的一种动物模型。有研究发现 7 天尾部悬吊大鼠的睾丸重量明显减轻,血清睾酮从 7.1 ± 1.3 降至 $3.8 \pm 0.25\text{ ng/mL}$;组织形态学观察显示,睾丸和附睾的输精管排列紊乱,附睾管

中多核细胞明显增多^[7]。周党侠等发现 28 天尾吊引起大鼠睾丸重量下降,生精小管萎缩,生精上皮层数减少,精子数量减少,畸形率增加,活动率减少以及血清激素紊乱等较明显的生殖系统损害^[8]。汤金等观察发现模拟失重会使雄性大鼠生殖器官睾丸的组织结构发生严重的病理改变,导致睾丸生精上皮不可逆损伤,使睾丸组织分泌表达雄激素受体 (Androgen Receptor, AR) 的功能减退,引起热休克蛋白 (Heat Shock protein70, HSP70) 的过量表达和大量释放,形成细胞外热休克蛋白 (extracellular heat shock protein70, eHSP70),从而造成睾丸实质的严重损伤^[9]。

本实验中,我们也发现,该模型会引起大鼠睾丸滑入腹腔,致使局部温度升高,从而造成睾丸萎缩,生精细胞凋亡;而且大鼠即使在解悬吊 8 周后,睾丸仍停留在腹腔,结构及功能没有恢复。该现象与隐睾症的发生有一定的相似性,且与传统方法相比,采用本方法建立的大鼠隐睾模型有较为明显的优势:尾吊法建立的隐睾模型可以完全避免传统模型感染率、死亡率高以及腹腔粘连等缺点,大鼠无创伤、无感染且稳定性好,能有效提高实验的成功率。因此我们认为,采用大鼠尾吊 3 周的方法,可以建立一种新的动物隐睾模型。

参考文献:

- [1] 赵骥腾,温海涛. 单侧隐睾患者精子形态学变化的研究[J]. 当代医学,2008, 7(14):28-29.
- [2] 刘春霞,张茨,王玲珑,等. 小鼠隐睾模型制作方法的改进[J]. 武汉大学学报(医学版),2006,27(2):200-205.
- [3] 陈杰,马进. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型[J]. 空间科学学报,1993,13(2):159-162.
- [4] 郝丽荣. 睾丸温度升高对男性生殖功能的影响[J]. 中国男科学杂志,2009,23(11):70-72.
- [5] 杨国胜,费正磊,丁德茂. 生精细胞凋亡与激素调控[J]. 国外医学泌尿系统分册,2002,22(6):350-352.
- [6] 郝丽荣. 睾丸温度升高对男性生殖功能的影响[J]. 中国男科学杂志,2009,23(11):70-72.

- [7] J. A. Hadley, J. C. Hall, A. O'Brien, et al. Effects of a simulated microgravity model on cell structure and function in rat testis and epididymis[J]. Journal of Applied Physiology, 1992, 72:748 - 759.
- [8] 周党侠,邱曙东,王志勇,等. 尾悬吊状态对性成熟期雄性大鼠生殖功能的影响[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12: 326 - 329.
- [9] 汤金,余锐萍,汪德生,等. 模拟失重对大鼠睾丸组织结构及 AR 和 HSP70 表达的影响[J]. 科技导报, 2008, 26 (19): 59 - 68.
- [修回日期] 2012-03-19