

探索 Sertoli 细胞对去除精原细胞的动态反应

安娜,袁丽芳,王善林,李宗悦,王峰,朱宝长

(首都师范大学 生命科学学院,北京 100048)

【摘要】 目的 探索 Sertoli 细胞对去除小鼠精原细胞后睾丸的动态反应。方法 采用 15、30 和 44 mg/kg 的白消安腹腔注射法建立不同程度去除精原细胞的动物模型,处理后 5 d 和 28 d 时对睾丸进行组织学检测,评价精子发生状态,并运用实时定量荧光 PCR 技术检测这两个时期睾丸 GDNF、PLZF、Nanog 和 GFR α 1 基因 mRNA 的表达量。结果 在白消安处理后第 5 天,GDNF 出现显著升高,且呈剂量依赖趋势,而 PLZF 与 GFR α 1 并无显著变化,睾丸组织学观察亦无明显变化。在白消安处理后 28 d 时,GDNF、PLZF、Nanog、GFR α 1 基因 mRNA 相对表达量均出现大幅度的升高,睾丸组织学切片观察显示随着给药剂量的增加,精子发生受到的损伤愈加严重。结论 Sertoli 细胞早在白消安处理后第 5 天就对精原细胞的变化发生了反应,Sertoli 细胞分泌 GDNF 的能力发生代偿性增加,进而刺激精原干细胞自我更新速度加快,体现在 Nanog 和 PLZF 水平提高,从而实现精子发生的重建。

【关键词】 白消安;精原干细胞;Sertoli 细胞;睾丸;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0007-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.002

Exploration of the dynamic responses of Sertoli cells to depletion of spermatogonial stem cells in mouse testis

AN Na, YUAN Li-fang, WANG Shan-lin, LI Zong-yue, WANG Feng, ZHU Bao-chang

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Objective To explore the dynamic responses of Sertoli cells to depletion of spermatogonial stem cells by busulfan. **Methods** After intraperitoneal injection of 15, 30 or 44 mg/kg busulfan to mice, the spermatogenesis and the expression of GDNF, PLZF, Nanog and GFR α 1 mRNA were assessed by real-time quantitative PCR at 5 and 28 days after the busulfan treatment. **Results** Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was significantly increased and showed a dose-dependent trend at 5 days after busulfan treatment, but no significant difference was seen in the expression of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) and GDNF family receptor α -1 (GFR α 1). The testicular histology also appeared no significant difference at 5 days after busulfan treatment. At 28 days after busulfan treatment, the relative expression levels of GDNF, PLZF, Nanog and GFR α 1 mRNA were drastically increased. Morphological observation showed that spermatogenesis damages became even more severe as the busulfan dose increased. **Conclusions** Sertoli cell response to the depletion of spermatogonia occurs as early as the fifth day after busulfan treatment. Production of GDNF in Sertoli cells shows a compensatory increase, which may stimulate spermatogonial stem cells to accelerate their self-renewal, reflected by the enhancing expression of Nanog and PLZF, and ultimately promote the restoration of spermatogenesis.

【Key words】 Busulfan; Spermatogonial stem cell; Sertoli cell; Testis; Mouse

精原干细胞(SSCs)位于曲细精管基底膜附近,是精子发生过程中各级生殖细胞的基础来源。国内外许多研究都对其功能及调控进行了详细研

究^[1-2],发现 SSCs 的自我更新及分化都受到睾丸微环境(niche)的调控^[3],而对微环境贡献最直接的睾丸细胞应该是支持细胞(Sertoli cell),它在精子发生

【基金项目】 国家自然科学基金(No.30870934)。

【作者简介】 安娜(1988-),女,硕士研究生。研究方向:生殖生物学。E-mail: anna0712201@sohu.com

【通讯作者】 朱宝长,教授,E-mail: baochang@cnu.edu.cn

的整个过程中一直与生殖细胞保持着直接接触,并通过旁分泌方式影响着生殖细胞的自我更新与分化。反过来,去除生殖细胞是否对 Sertoli 细胞造成影响的研究却屈指可数。

临床在使用烷化剂白消安(busulfan)治疗肿瘤的过程中发现它同时可导致男性不育的现象,其损伤主要集中在生殖细胞方面,而且其损伤程度似有剂量依赖性^[4]。由于该药物能够去除睾丸 SSCs 且对 Sertoli 细胞没有损害^[5],许多实验室也常用其处理动物来建立无生殖细胞动物模型^[6]。在临床及实验研究中都观察到,使用白消安后睾丸生殖细胞虽然会表现为严重受损状态,但之后却出现精子发生重建的过程。

众多研究表明,精子发生的重建与 SSCs 的更新、分化与其微环境有很密切的关系^[7-8]。其中 Sertoli 细胞对微环境具有重要的贡献,它能够通过分泌一些生长因子促进 SSCs 的自我更新与分化^[9]。GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) 是一种 Sertoli 细胞分泌的关键生长因子,它通过 GFRα1 (GDNF family receptor α1) 作用于 SSCs,刺激 SSCs 的自我增殖^[10],从而影响到精子发生的重建过程。一些研究表明 SSCs 除了具有 GFRα1 受体外,它还通过 c-RET 途径影响到 PLZF 基因的表达。未分化的 SSCs 还能够表达 Nanog 基因,为我们监控 SSCs 的增殖与分化提供了有用指标。虽然许多研究都集中在微环境对 SSCs 的调控方面^[11],但是,有报告提示睾丸中生殖细胞也可能对 Sertoli 细胞有一定的影响,然而相关研究鲜有报道。因此,本实验分别采用不同剂量的白消安处理动物,造成睾丸 SSCs 不同程度的损伤,然后,在处理 5 d 和 28 d 时监测睾丸精子发生的状态,同时运用实时定量荧光 PCR 技术检测 GDNF、PLZF、Nanog、GFRα1 mRNA 的表达量,旨在探索去除 SSCs 时,Sertoli 细胞所可能表现出的反应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级成年雄性 C57 小鼠 80 只,8~12 周龄,体重均在 22~28 g 之间,购于军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】。饲养在首都师范大学实验动物中心【SYXK(京)2013-0008】。自由饮食取水,室温 22~25℃,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。

1.1.2 主要试剂

白消安、DMSO 均购自美国 Sigma 公司,EasyPure RNA Kit 及 TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 购自全式金公司,SYBR Premix 购于 TaKaRa 公司,引物由上海 Invitrogen 公司合成。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的处理

用 50% DMSO 溶解白消安,配制成 5 mg/mL 的溶液^[5]。80 只小鼠随机分为 4 组,标明对照组、15 mg/kg 组、30 mg/kg 组、44 mg/kg 组,将其按体重分别一次性注入 20 只小鼠的腹腔中。对照组同时注射等体积的 50% DMSO。注射后常规饲养,每日观察小鼠的生活状态。

1.2.2 睾丸组织形态学观察

在白消安处理 5 d 及 28 d 后,颈椎脱臼法处死小鼠,快速取出睾丸,称重后将左侧睾丸放入苦味酸固定液,右侧放入液氮冷冻保存备用。固定 24 h,常规制备石蜡切片,HE 染色。于光学显微镜下观察睾丸组织形态学切片,统计曲细精管直径、生精上皮厚度,每项指标至少统计 100 个曲细精管。

以下为睾丸指数计算公式:

$$\text{睾丸指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{睾丸质量}(\text{mg})}{\text{小鼠体重}(\text{g})}$$

1.2.3 睾丸生精功能的定量评估

采用 Johnsen 评估法评价精子发生的障碍程度。选择每张切片在高倍镜下随机观察 20 个生精小管,其 Johnsen 评分后的平均值作为评价该小鼠精子发生障碍程度的指标^[5]。

1.2.4 Real-time PCR 检测睾丸组织 GDNF、PLZF、Nanog、GFRα1 mRNA 表达

采用全式金公司 EasyPure RNA Kit 提取睾丸总 RNA,各组 RNA 样本 260 nm 与 280 nm 吸光度(A)值的比值(A260/280)均 > 1.8,符合 PCR 试验要求。按 TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书合成 cDNA,加入 SYBR Premix 后进行 PCR 扩增。引物序列见表 1。

1.2.5 免疫荧光标记

在每组处理中随机选取 3 只动物,在睾丸固定前从其上极处前小口取出 3 段曲细精管(1~2 cm)用于整体制片,经多聚甲醛固定后,分别使用 GATA-4 (Santa Cruz-9053) 与 PLZF (Santa Cruz-28319) 作为一抗处理,再使用羊抗兔 (Santa Cruz-2012) 与

羊抗鼠(Santa Cruz-2781)作为二抗做荧光标记,同时使用 DAPI 做背染,于共聚焦显微镜下观察并采集图像。

表 1 PCR 引物及其碱基序列

Tab.1 The PCR primers and their sequences

引物名称 Primers	引物序列 Primer sequences
GDNF	5'-CGGACGGGACTCTAAGATGA-3', 5'-CGTCATCAAACCTGGTCAGGA-3'
PLZF	5'-AACGGTTCCTGGACAGTTG-3', 5'-CCCACACAGCAGACAGAAGA-3'
Nanog	5'-CCAGTGGAGTATCCCAGCAT-3', 5'-GAAGTTATGGAGCCGAGCAG-3'
GFRα1	5'-CAACTTCATGCATATGGCTCTCA-3', 5'-TCTGCTAAAGCACTGGCTTCT-3'
内参 β-actin	5'-GCGTGACATCAAAGAGAAGC-3', 5'-AGGATTCCATACCCAAGAAGG-3'

表 2 白消安处理对睾丸生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of busulfan treatment on the growth of testes

组别 mg/kg Groups	处理时间/d Time after busulfan	体重/g Body weight	睾丸重量/mg Testes weight	睾丸指数/mg/g Testis index
Control	5	23.47 ± 2.82	95.45 ± 7.47	4.08 ± 0.23
15	5	24.67 ± 4.01	99.12 ± 8.12	4.06 ± 0.43
30	5	23.74 ± 2.5	94.6 ± 11.01	4.02 ± 0.62
44	5	22.78 ± 3.38	92.21 ± 16.96	4.06 ± 0.65
Control	28	25.88 ± 1.22	97.45 ± 3.84	3.77 ± 0.32
15	28	24.5 ± 0.99	32.7 ± 1.89**	1.27 ± 0.15**
30	28	27.03 ± 2.37	33.23 ± 1.05**	1.24 ± 0.12**
44	28	26.78 ± 2.30	32.85 ± 1.58**	1.23 ± 0.08**

注:与对照组相比较, ** : $P < 0.01$ 。

Note. ** $P < 0.01$, versus the control group.

2.2 白消安处理对睾丸精子发生障碍程度的定量评估

组织学观察睾丸结构出现了不同程度的损伤,为了对损伤程度量化,本研究使用主观评分法对各组睾丸切片进行了统计分析。结果发

1.2.6 统计学分析

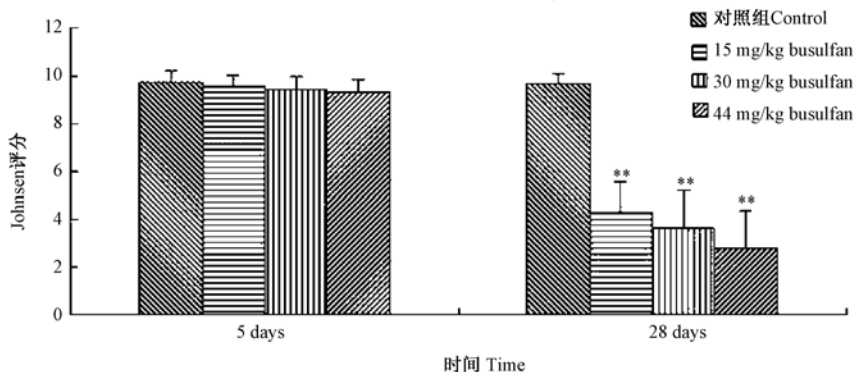
实验结果用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$),不同处理组数据间的差异采用单因素方差分析,以“*”表示差异有显著性($P < 0.05$),“**”表示差异极显著($P < 0.01$)。

2 结果

2.1 白消安处理对睾丸生长的影响

在白消安处理 5 d 时,实验组睾丸重量与对照组相比并无明显差异,通过计算睾丸指数我们看到三个实验组与对照组差异均无显著性($P > 0.05$),说明白消安的作用在此刻尚未在睾丸重量上表现出来;而在白消安处理 28 d 时,实验组睾丸重量与对照组相比,所有剂量组的绝对和相对指标都已经有了很明显的降低($P < 0.01$),且显示出明显的剂量依赖趋势(见表 2)。

现,在注射 5 d 后,15 mg/kg 组、30 mg/kg 组与 44 mg/kg 组均与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$),但在注射后 28 d,15 mg/kg 组、30 mg/kg 组与 44 mg/kg 组均低于对照组,差异极显著($P < 0.01$)。见图 1。



注:与对照组相比较, ** : $P < 0.01$ 。

图 1 白消安处理后 Johnsen 评分的比较

Note. ** $P < 0.01$, versus the control group.

Fig.1 Johnsen's scores after busulfan treatment

2.3 白消安处理对睾丸组织学影响

为了详细了解睾丸在白消安处理不同时间段的功能结构状态,我们选用与睾丸功能紧密相关的指标(曲细精管直径和生精上皮厚度)来反映睾丸的生理状态。结果发现,注射白消安后 5 d,实验组与对照相比曲细精管直径无显著变化($P > 0.05$),但是生精上皮的厚度已经与对照相比有了显著差异($P < 0.05$)。说明白消安对睾丸的影响在第 5 天已经开始了,尽管大多数组织学指标还未反映出明显的变化(见表 3)。

表 3 白消安处理后曲细精管直径及生精上皮厚度比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Changes of seminiferous tubule diameter and seminiferous epithelium thickness in the mouse testes after busulfan treatment

组别 Groups	处理时间/d Time after busulfan	曲细精管 直径/ μm Seminiferous tubule diameter	生精上皮 厚度/ μm Seminiferous epithelium Thickness
对照组 control	5	272.14 \pm 6.36	94.23 \pm 4.35
15 mg/kg	5	264.98 \pm 9.41	88.95 \pm 5.39 *
30 mg/kg	5	267.24 \pm 11.44	88.95 \pm 4.05 *
44 mg/kg	5	266.86 \pm 7.50	88.95 \pm 4.42 *
对照组 control	28	271.38 \pm 7.54	94.98 \pm 4.96
15 mg/kg	28	191.48 \pm 10.63 **	26.00 \pm 6.01 **
30 mg/kg	28	178.28 \pm 7.12 **	23.37 \pm 6.35 **
44 mg/kg	28	165.09 \pm 8.30 **	20.35 \pm 5.39 **

注:与对照组相比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus the control group.

在白消安处理后 5 d 时,实验组所有其他检测指标与对照组相比均无明显区别(图 2,彩插 1)。曲细精管发育成熟,生精上皮细胞层数多、生精上皮较厚,曲细精管直径较大,基底膜完整,各级细胞完好且排列整齐;靠近管腔中央存在许多已成形的精

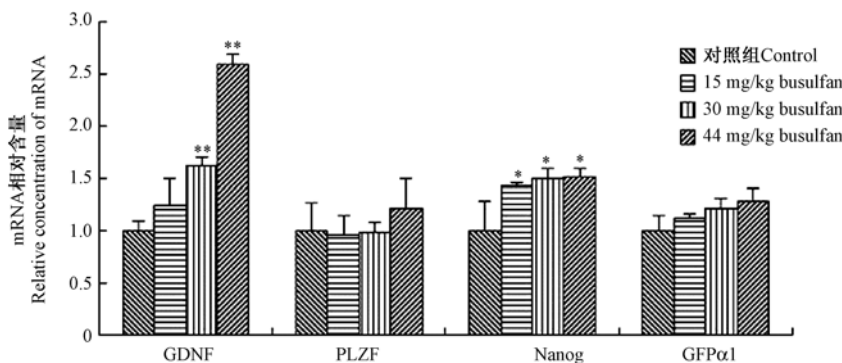
子簇,管腔中有游离的精子,虽在 D、F、H 中可以看到有个别空泡出现,但无显著区别。

白消安处理后 28 d 时,15 mg/kg 实验组曲细精管上皮细胞层数比对照组少,空泡增多,曲细精管中央有少数坏死后脱落的细胞,管腔内有很少量的精子存在。30 mg/kg 实验组的管腔较 15 mg/kg 剂量组则更大,几乎已无精子存在。44 mg/kg 实验组曲细精管内各级生精细胞均已消失,出现大量空泡,没有成形精子,生精上皮只有一层细胞(图 3,彩插 2)。从组织学观察结果可以看出,白消安损伤睾丸精子发生具有明显的剂量依赖性,即剂量越大,对生殖细胞的清除越彻底。当白消安处理后 28 d 时 SSCs 去除较为彻底,尤其是 44 mg/kg 组,表现为精子发生完全阻滞,此时曲细精管内几乎没有精原细胞,所以实验组曲细精管直径与生精上皮的厚度与对照相比都表现出极显著降低。

2.4 睾丸组织中 GDNF、PLZF、Nanog、GFR α 1 mRNA 表达情况

在注射白消安后 5 d 后,GDNF 在各剂量组均出现上升,尤其是 30 mg/kg 组、44 mg/kg 组的变化表现为极显著($P < 0.01$),44 mg/kg 组已经超过了对照组的一倍多。因为 GDNF 是由 Sertoli 细胞所分泌的生长因子,说明 Sertoli 细胞对去除精原细胞非常敏感,而分布于 SSCs 的 GFR α 1 受体却未发生明显的变化($P > 0.05$)。PLZF 与对照相比也无显著变化($P > 0.05$),Nanog 组与对照组比较出现了显著的升高($P < 0.05$),但三个剂量组之间并无显著差异(图 4)。表明使用白消安清除睾丸生殖细胞后,能够显著地刺激 Sertoli 细胞分泌 GDNF。

在注射后 28 d,三个实验组的 GDNF 相对表达



注:与对照组相比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ 。

图 4 注射白消安 5 d 后不同基因 mRNA 表达情况

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus the control group.

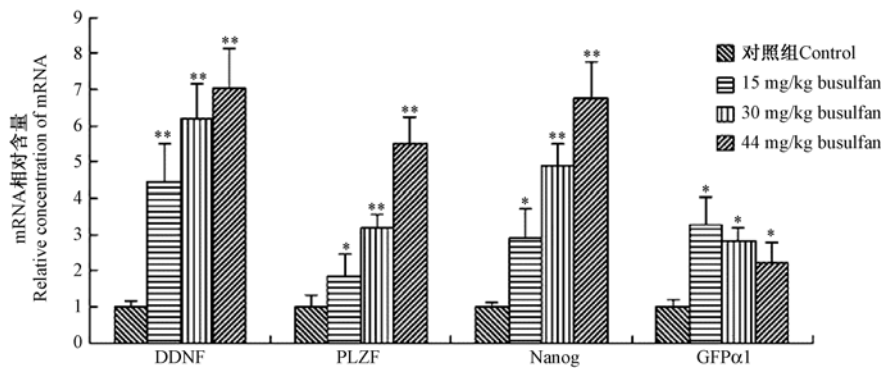
Fig. 4 Expressions of GDNF, PLZF, Nanog, GFR α 1 mRNA at 5 days after busulfan treatment

量依旧表现为强烈的上升趋势,与对照组相比差异有极显著性($P < 0.01$), PLZF 与 Nanog 仅在 SSCs 中表达,它们与对照相比也出现了与 GDNF 类似的升高趋势,因为 GDNF 具有促进 SSCs 增殖的作用,所以推测睾丸中 PLZF 和 Nanog 表达增加可能是 GDNF 所导致的,提示 SSCs 在 GDNF 的作用下已经出现了明显的增殖。而与对照相比,实验组的

GFR α 1 水平也有显著的上升趋势($P < 0.05$),但并没有表现出剂量依赖趋势(图 5)。

2.5 睾丸曲细精管中 Sertoli 细胞的数量变化

在白消安处理 5 d 及 28 d 后,分别对曲细精管做整体切片,使用免疫荧光双标技术检测精原细胞与 Sertoli 细胞的数量,与对照组相比没有发现 Sertoli 细胞数量的明显变化(图 6,彩插 2)。



注:与对照组相比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

图 5 注射白消安 28 d 后不同基因 mRNA 表达情况

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus the control group.

Fig. 5 Expressions of GDNF, PLZF, Nanog and GFR α 1 mRNA at 28 days after busulfan treatment

3 讨论

相较于白消安处理后 28 d 的变化,在处理 5 d 时,实验组小鼠睾丸组织学的影响与对照组相比并无显著变化,我们推测是由于小鼠精子发生周期为 35 d,在白消安注射后 5 d 时,曲细精管内先前已经形成的生精波并未受到白消安的影响,但从白消安注射之后,SSCs 受到损伤,使得新的生精细胞形成受到破坏。因此,在 28 d 时,可以很明显的看到实验组各个指标的变化。

在曲细精管内,SSCs 一边需要自我更新以维持自身数量的稳定,另一边能够在各种因素的调节下增殖分化,使各阶段的生殖细胞最后分化为精子,从而保障睾丸能够持续地产生大量精子,维持雄性的可生育状态。然而,在这种稳态中各种细胞间的调控关系很难被观察到,只有打破这种平衡后才使得它们之间的关系变得易于被观察到。本研究通过使用不同剂量白消安处理形成去除精原细胞的睾丸模型来观察 Sertoli 细胞的反应,发现早在处理后第 5 天就检测到 Sertoli 细胞 GDNF 表达量的显著升高,说明 Sertoli 细胞能够以某种方式得知其所支持的 SSCs 的缺失,且后者缺失越多前者表达 GDNF 的量则越大。虽然此时没有探测到 PLZF 表达量的提

高,但是,Nanog 的表达量却比对照组有了显著的提高(图 4),由于 Nanog 更倾向于在未分化的 SSCs 中表达^[12],显示此时精子发生仅处于 SSCs 的增殖阶段,而 SSCs 的分化还尚未开始,至少在实验所检测的指标中尚未反映出。

GDNF 以旁分泌方式通过 GFR α 1 受体作用于 SSCs,为 SSCs 的增殖提供需要的微环境。类似的现象一直持续到 28 d,而且在此时与对照组相比较,睾丸细胞 PLZF 和 Nanog 的表达均表现为显著升高,进一步印证了 GDNF 的作用。然而,注射白消安后,究竟是由于 SSCs 数量减少,导致 Sertoli 细胞受到反馈调节,引起分泌的 GDNF 显著上升,还是其他方式的调节还需要进一步的严格实验去验证。本实验观察到随着注射白消安剂量的增大、作用时间延长,GDNF 上升的越多,这与 Zohni 的观察结果是一致的^[13]。GFR α 1 是 GDNF 在 SSCs 膜表面的辅助受体,它与 c-Ret 共同构成完整受体介导 Src、Ras、Numb 等胞内信号通路,调控相关基因表达并维持 SSCs 的增殖、自我更新。在白消安处理后 5 d 时,PLZF 的变化并不显著($P > 0.05$),我们推测,这是因为不论是组织学水平还是 mRNA 水平都未能及时探测到精原细胞的细微变化,然而,Sertoli 细胞却能及时感知到精原细胞的变化(方式尚未知),迅速

做出反应,提高自身 GDNF 的分泌水平。28 d 时,白消安对精原细胞的作用在组织学水平被明显的观察到,精子发生彻底被阻滞。此时在高 GDNF 的刺激下,精子发生正在重建,而 SSCs 的自我增殖应该发生在精子发生的早期,故所有实验组 GFR α 1 水平均较对照组有显著提高,由于 GFR α 1 仅在 SSCs 表达,故 GFR α 1 在实验组的提高幅度与白消安剂量呈反比的现象(图 5),可能是因为白消安剂量越高,精原细胞受损越多,能进行自我增殖的细胞基数就越小,所以在相同的增殖时间范围内表现为生殖细胞数量(GFR α 1 水平)与白消安剂量呈反比现象。此外,在 28 d 时 PLZF 有显著的增高,进一步证实了我们的推测,即 Sertoli 细胞分泌的 GDNF 通过 GFR α 1 激活了 SSCs 的 PLZF 表达。在处理 28 d,从组织学指标来看,睾丸结构仍表现出明显的受损状态,而分子生物学检测表明 SSCs 在 Sertoli 细胞分泌的细胞因子的作用下已经增殖了,这与前人研究发现处理后 1~2 个月睾丸精子发生会逐渐恢复的结果基本一致。

形态学研究表明,在曲细精管内,As、Apr、Aal 型精原细胞总共约有 33 万个,而 As 型细胞大约只有 35 000 个^[14],由此可见,睾丸中大部分精原细胞并非 SSCs,而是处在不同分化期的各级生精细胞。Hofmann 等^[9]认为具有真正意义的 SSCs 只是 As 型 SSCs。Nanog 基因是 Chambers 和 Mitsui 等在 2003 年发现的新的多能干细胞标志因子,是维持干细胞自我更新增殖的关键性基因,是全能性或多能性干细胞标志物^[15]。Sami 在 2012 年提出只有 Nanog 才能作为 As 型 SSCs 的标记基因,而 PLZF 只能作为 Aal 型精原细胞的标记基因^[12]。这种假设在本实验中也基本体现出来,在白消安处理 5d 时,各剂量组 Nanog 的表达量已经有所提高,在白消安处理 28 d 时,两者与对照组相比均有显著差异。经过白消安处理后小鼠睾丸内的 As 型 SSCs 表达 Nanog 的能力是否出现了代偿性的增加,还有待于进一步研究。

白消安作为一种常见的化疗药物已在很多癌症患者身上使用,然而男性患者在癌症治疗时所面临着生育能力损害的确是现实存在的,本研究发现 Sertoli 细胞对于去除 SSCs 的反应非常敏感,这在理论上对理解 SSCs 与体细胞间的关系具有显著的生物学意义外,对于指导临床治疗、降低生育风险也表现出可以预见的实际帮助,希望进一步的研究能够让两方面都能受益。

(本文图 2 见彩插 1,图 3、6 见彩插 2)。

参 考 文 献

- [1] Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells [J]. *Curr Opin cell Biol*, 1998, 10:694-701.
- [2] Nakagawa T, Ichikawa R, Yoshida S, et al. Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(2):214-224.
- [3] Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life [J]. *Cell*, 2008, 132(4):598-611.
- [4] Yosuke S, Satoshi K, Shogo I, et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 5) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of busulfan in female rats [J]. *J Toxicol Sci*, 2009, 34(1):65-72.
- [5] 李景平, 郭文彬, 何金参, 等. 应用白消安构建唯支持细胞综合征小鼠动物模型 [J]. *中华男科学杂志* 2013, 19(4):300-305.
- [6] 张茨, 王玲珑, 金化民, 等. 白消安诱导小鼠无精子症模型 [J]. *医学新知杂志*, 2003, 13(4):201-202.
- [7] Ebata KT, Yeh JR, Zhang X, et al. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors in vitro [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317:1319-1329.
- [8] Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF [J]. *Science*, 2000, 287:1489-1493.
- [9] Hofmann MC. GDNF signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 288(1-2):95-103.
- [10] 索丽娟, 胡建宏, 王鹏, 等. GDNF 和 LIF 对小鼠精原干细胞体外增殖的影响 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2012, 40(4):1-7.
- [11] Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis [J]. *Science*, 2007, 317(5845):1722-1726.
- [12] Ventela S, Juho-Antti Makela, Jarmo Kulmala, et al. Identification and regulation of a stage-specific stem cell niche enriched by Nanog-positive spermatogonial stem cells in the mouse testis [J]. *Stem Cells* 2012, 30:1008-1020.
- [13] Zohni K, Zhang X, Tan SL, et al. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice [J]. *Human Reprod*, 2011, 27(1):44-53.
- [14] 王庆忠, 刘慧莲. 昆明白小鼠精原干细胞的体外培养 [J]. *潍坊学院学报*, 2007, 7(6):56-61.
- [15] 赵乐, 纪新强, 刘静, 等. Nanog 基因在卵巢癌和卵巢肿瘤干细胞中的表达及意义 [J]. *现代生物医学进展* 2012, 12(14):2642-2646.

[收稿日期] 2014-03-31