

原癌基因 c- kit mRNA 在自身免疫性睾丸炎中的表达及意义

谷保霞¹, 杨冬梓¹, 王文军¹, 陈系古², 莫亚勤¹, 崔光辉²

(中山大学 1. 附属第二医院妇产科生殖中心, 广东 广州 510120; 2. 实验动物中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨原癌基因c- kit mRNA 在自身免疫性睾丸炎中的表达及意义。【方法】建立并分析自身免疫性睾丸炎动物模型: 42 只 BALB/c 小鼠随机分为 6 个实验组和 1 个对照组。6 个实验组小鼠分别给予 KM 小鼠睾丸混悬液皮下注射, 每周 1 次最多者 4 次, 在第 1 次给予抗原注射后 1, 2, 3, 4, 6, 8 周各取一组小鼠的睾丸组织, 用 RT- PCR 检测其c- kit mRNA 的变化。【结果】在第 1 次给予抗原注射后第 1 周开始c- kit mRNA 转录水平开始降低, 第 2 周起明显低于对照组 ($P < 0.05$), 至第 3, 4 周降至最低, 第 6 周逐渐开始恢复, 至第 8 周其水平与对照组相比差异已经没有统计学意义 ($P > 0.05$)。【结论】c- kit 基因与生精功能密切相关, c- kit 基因 mRNA 的低表达可能参与自身免疫性睾丸炎导致不育的发病机制。

关键词: 原癌基因c- kit; 自身免疫性睾丸炎; RT- PCR

中图分类号: R698.2

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006)04- 0419- 04

Expression and Role of Oncogene c- kit mRNA in Development of Experimental Autoimmune Orchitis

GU Bao-xia, YANG Dong-zi, WANG Wen-jun, CHEN Xi-gu, MO Ya-qin, CUI Guang-hui

(1. IVF Center of Department of Gynecology and Obstetrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Experimental Animal Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of oncogene c- kit mRNA and its role in the development of experimental autoimmune orchitis. 【Methods】The models of experimental autoimmune orchitis were established and analyzed: 42 BALB/c mice were divided into 6 experimental groups and 1 control group randomly. The testis homogenates of KM mice were respectively infected subcutaneously in 6 experimental groups every week, 4 times at most. From the first injection on, the testises were excised at 1st, 2nd, 3rd, 4th, 6th, and 8th week, each time 1 group were excised. The expression of c- kit mRNA was examined in the mice by RT- PCR. 【Results】The expression of c- kit mRNA was decreased after the 1st week of first injection with the control group, and from the 2nd week on, the difference was significant ($P < 0.05$) till the 3rd and 4th week it reached to its lowest level. From the 6th week on, it began to come back, and at the 8th week the difference was no significant ($P > 0.05$) with the control group. 【Conclusion】Oncogene c- kit is related with spermatogonial. The down- regulation of c- kit mRNA in experimental autoimmune orchitis might participate in the pathogenesis of infertility.

Key words: oncogene c- kit; experimental autoimmune orchitis; RT- PCR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):419- 422]

原癌基因 c- kit 在造血、配子形成和/或黑素发生方面起重要作用^[1,2], 在造血系统疾病发生中的作用研究较多, 在临床不育症方面的研究文献报道较少见。本文采用半定量逆转录- 聚合酶链反应 (reverse transcription - polymerase chain

reaction, RT- PCR) 的方法, 探讨 c- kit mRNA 在实验性自身免疫性睾丸炎 (experimental autoimmune orchitis, EAO) 不同发病时期中的表达变化和趋势, 希望能为研究免疫性不育的发病机制及防治探索一条新的途径。

收稿日期: 2005-12-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (021853); 广州市科技局基金资助项目 (2002Z3- E0161); 教育部博士点基金资助项目 (200220558078); 留学回国人员基金资助项目 (2002)

作者简介: 谷保霞 (1976-), 女, 河南长葛人, 硕士生, 主治医师; 杨冬梓, 教授, 博导, 通讯作者. E- mail: YangDZ@tm.com

1 材料与方法

1.1 动物模型制备

建模受体采用 42 只性发育成熟 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠, 体质量 20~22 g, 动物质量合格证号: 粤监证字 2004A084。供体采用 40 只性发育成熟清洁级 KM 雄性小鼠, 体质量 35~40 g, 均由中山大学实验动物中心提供。42 只 BALB/c 小鼠随机分为 1 个对照组 (空白对照) 和 6 个实验组, 每组 6 只, 实验 1、2、3、4、5、6 组分别于第 1 次抗原混悬液注射后 1、2、3、4、6、8 周断颈椎法处死小鼠。各实验组小鼠皮下注射 KM 小鼠睾丸混悬液 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 0.1 mL, 每周 1 次最多 4 次, 5、6 组 4 周后不再注射。

1.2 标本取材

动物断颈椎法处死后, 迅速取出一侧睾丸组织置于 EP 管 (经焦磷酸二乙酯处理), 液氮中转运, 保存于 -80 °C 冰箱。

1.3 形态学观察

相应对侧睾丸组织加入 100 mL/L 中性福尔马林固定, 常规脱水, 透明, 浸蜡, 包埋, 切片 5 μm 厚, HE 染色, 光镜下观察, 并进行 Johusen 评分^[3]。

1.4 c-kit mRNA 分析

-actin 作为内对照, 引物序列为: 上游引物 5' gttgggtggagcaaacatcc 3' 和下游引物 5' aagcaatgctgtcaccttcc 3', 扩增片段长度为 232 bp (上海生工有限公司合成)。

1.4.1 组织总 RNA 提取 采用 Tripure 法, RNA 纯度 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0, 琼脂糖凝胶电泳可见 28S、18S 和 5S 三条带, 其中 28S 和 18S 条带亮度比为 2:1 左右。

1.4.2 逆转录反应 采用 MMLV 逆转录酶 (Promega 公司), 反应条件按说明书进行。

1.4.3 聚合酶链反应 反应总体积为 25 μL , 其中 PCR buffer (10 \times) 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , cDNA 合成产物 2 μL , Takara Taq 酶 1.25 U, 以及 20 $\mu\text{mol/L}$ c-kit 上游和下游引物各 1 μL , 引物序列为 5' caccacccatgatcactgtc 3' 和 5' tgggcccttaagtacctg 3', 扩增片段长度为 344 bp (上海生工有限公司合成)。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min 预变性, 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 次循环后, 72 °C 延伸 10 min。

1.4.4 PCR 产物分析 PCR 扩增产物 5 μL 经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (60 V, 80 min), 紫外光透射下观察结果, UVigelstatMw 软件对电泳进行摄像和分析, 计算特异性扩增条带峰度, 分别换算各 c-kit 条带和 -actin 条带峰度比值, 以此峰度比值代表 c-kit mRNA 的表达水平。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异, 采用 SPSS10.0 统计分析软件分析。

2 结果

2.1 EAO 形态学观察及 Johusen 评分

对照组睾丸组织切片可见曲细精管排列整齐, 基膜完整, 生精上皮有 4~5 层细胞, 支持细胞及各级生精细胞排列紧密, 曲细精管管腔中有密集精子, 睾丸间质无充血和水肿, Johusen 评分 10 分。实验组睾丸组织切片可见曲细精管局限性生精上皮脱落, 在精原细胞层与初级精母细胞间发生分离。生精上皮细胞层次渐减少至 2~3 层, 个别曲细精管甚至仅剩余精原细胞层, 初级精母细胞排列紊乱, 细胞分布稀疏, 局部基膜增厚, 曲细精管管腔中有稀疏的精子, 睾丸间质出现水肿, 可见淋巴细胞浸润约 10%~25%, Johusen 评分 3~9 分。至第 3 周起 Johusen 评分的降低差异始有统计

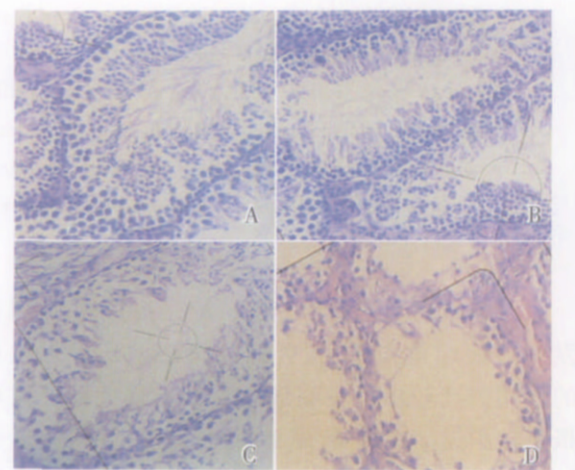


图 1 小鼠睾丸组织病理改变

Fig.1 The pathology for the testitis of mice under light microscope, stained with hematoxylin and eosin

The Johusen score is 10 for A as the control and it is 9, 6, 3 for B, C, D respectively, HE, $\times 100$

学意义 ($P < 0.05$), 至第8周时 Johusen 评分有所增高, 但与对照组相比差异仍有统计学意义 (图 1、2)。

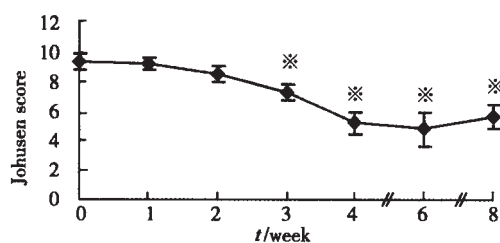


图2 形态学评分变化曲线

Fig.2 The curve for the Johusen score of pathomorphology in different groups
 $P < 0.05$; ANOVA: analysis of variance ($F = 43.148$, $P = 0.000$)

2.2 睾丸组织 c-kit mRNA 检测结果

实验组从第1周开始 c-kit mRNA 转录水平开始降低, 第2周起明显低于对照 ($P < 0.05$), 至第3, 4周降至最低, 以后逐渐开始恢复, 至第8周其水平与对照组相比差异已经没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见图3。

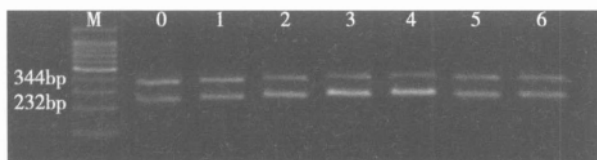


图3 各组小鼠 c-kit 基因 RT-PCR 产物

Fig.3 The electrophoregram for the every group product of c-kit with RT-PCR

M: 100 bp marker, 0: control, 1-6: the experimental group of 1st, 2nd, 3rd, 4th, 6th, 8th week, respectively

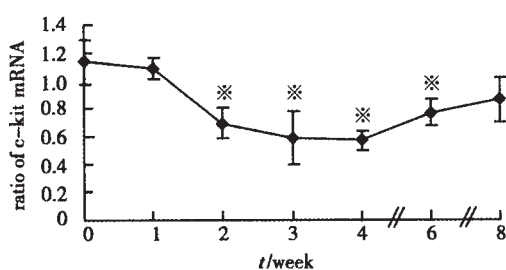


图4 c-kit mRNA 比值变化曲线

Fig.4 Curve for the ratio of c-kit mRNA in different groups
 $P < 0.05$; ANOVA: analysis of variance ($F = 17.526$, $P = 0.000$)

3 讨论

男性不育原因导致的不孕约占不孕症的 30%, Munster 大学生殖医学研究所 7 802 例男性不育患者的分类诊断中, 除特发性不育占 31.7%和精索静脉曲张占 16.6%外, 感染和免疫性因素引起的不育占 13%^[4]。由于反复的生殖系感染, 引起输精管道梗阻及炎症破坏了血睾屏障, 产生抗精子抗体, 多种细胞因子(如白介素, 干扰素以及肝细胞生长因子等)和活性氧的参与以及 Fas/FasL 系统介导的生殖细胞的凋亡^[5]而导致不育, 是目前研究较多的感染引起不育的病理生理机制。而我们的实验在生精细胞发生的分子水平研究反复感染对生殖的影响。

3.1 c-kit 生物学功能及与不育的关系

原癌基因 c-kit 首先发现于小鼠的第 5 染色体及人的第 4 染色体上。小鼠的原癌基因 c-kit 参与发育中及成体中的造血、配子发生和/或黑素发生方面的许多生理和病理事件^[1, 2]。近年来的研究表明在体内 c-kit 基因编码的 c-kit 受体与干细胞因子(stem cell factor, SCF) 特异性结合而发挥重要生理功能。SCF 在睾丸由支持细胞(sertoli cell)分泌, 与 c-kit 受体结合后引起受体二聚化及酪氨酸激酶信号系统传导, 在配子形成过程中起重要作用。而精子的发生是精原细胞在睾丸内环境稳定的情况下的一个生长分化和成熟的连续动态过程, SCF/C-kit 受体系统参与了精原干细胞的增殖与分化。

相关的研究提示: 在睾丸组织中 c-kit 受体不仅在精原细胞的分化过程中阶段性的表达^[6, 7]而且在分泌睾酮的睾丸间质细胞(leydig 细胞)上也有表达。c-kit 的存在可能为精原干细胞进入减数分裂起准备作用^[8]。而在此以前的研究已表明没有有功能的 c-kit 受体的生精细胞是不能进入精子发生过程的^[9]。Suescun 等^[10, 11]的研究认为在 EAO 中, 睾丸间质细胞的数量和功能有显著增加, 提示其 c-kit 表达水平也有增加。

3.2 c-kit mRNA 在 EAO 中表达下降

我们采用 RT-PCR 技术首次对 EAO 的小鼠睾丸组织中的 c-kit mRNA 进行体外逆转录与扩增, 并利用凝胶成像系统对其进行半定量分析, 结果显示正常对照组成年雄性小鼠其睾丸组织 c-kit mRNA 的表达处于相对最高值, 与其精原细胞处于正常分化状态, 生殖功能正常相吻合。而实验组成

年小鼠睾丸组织的 c-kit mRNA 的表达在第 1 次注射抗原后第 1 周即开始逐渐下降 (即实验组的 1, 2, 3, 4 组), 至第 2 周开始表达下降程度始有统计学意义, 于第 3 次和第 4 次注射抗原后 1 周 (即实验组的 3, 4 组) 达最低点, 在停止注射后能渐恢复 (即实验组的 5, 6 组)。国外部分学者也持相同观点, Bozhedomov 等^[12]认为临床上常见的睾丸炎通常是由于 1 次或多次感染后, 造成生精功能障碍, 部分感染病因去除后能恢复生精功能。我们以前的形态学研究也观察到有类似的现象^[13]。本研究 RT-PCR 的结果也同时提示了 c-kit 通过基因表达的变化参与了 EAO 导致不育的发生发展过程: 第 1 次抗原注射后 2 周时, c-kit mRNA 表达水平的变化与对照组相比已经有统计学差异而此时的形态学评分的变化尚无统计学意义, 形态学评分的差异出现统计学意义在第 1 次抗原注射后 3 周时; 说明 EAO 中 c-kit mRNA 水平的变化要早于形态学变化的发生。而对于 c-kit mRNA 表达变化与其蛋白质表达水平的关系研究, 我们正在进行。

综上所述, 免疫原因导致的不育原因之一可能是: 原癌基因 c-kit 在转录水平的暂时下调和/或失活, 从而影响了精原细胞的分化, 也可能是使精原细胞停滞在未分化状态不能进一步分化, 进而影响到初级精母细胞, 次级精母细胞及精子的发生, 在症状上表现为少精或无精而致不育。这可能为我们认识和治疗免疫性不育提供了新的思路。

参考文献:

- [1] GEISSLER E N, RYAN M A, HOUSMAN D E. The dominant- white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto- oncogene[J]. Cell, 1988, 55(1): 185- 192.
- [2] DYM M, JIA M C, DIRAMI G, et al. Expression of c-kit receptor and its autophosphory- lation in immature rat type A spermatogonia [J]. Biol Reprod, 1995, 52(1): 8- 19.
- [3] 吴明章. 男性生殖病理学[M]. 上海: 上海科学普及出版社, 1997: 93.
- [4] 张丽珠. 临床生殖内分泌与不育症[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 136 .
- [5] THEAS S, RIVAL C, LUSTIG L. Germ cell apoptosis in autoimmune orchitis: involvement of the Fas- FasL system [J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 50(2): 166- 176.
- [6] SCHRANS- STASSEN B H, VAN DE KANT H J, DE ROOIJ D G, et al. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia[J]. Endocrinology, 1999, 140(12): 5894- 5900.
- [7] ROSSI P, SETTE C, DOLCI S, et al. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis [J]. J Endocrinol Invest, 2000, 23(9): 609- 615.
- [8] VIGODNER M, LEWIN L M, SHOCHAT L, et al. Spermatogenesis in the golden hamster: the role of c-kit [J]. Mol Reprod Dev, 2001, 60(4): 562- 568.
- [9] BRINSTER R L, ZIMMERMANN J W. Spermatogenesis following male germ- cell transplantation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(24): 11298- 11302.
- [10] SJESCUN M O, CALANDRA R S, LUSTIG L. Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats[J]. J Androl, 1994, 15(5): 442- 448.
- [11] SJESCUN M O, CALANDRA R S, LUSTIG L. Increased testosterone production in vitro by Leydig cells from rats with severe autoimmune orchitis [J]. Int J Androl, 1997, 20(6): 339- 346.
- [12] BOZHEDOMOV V A, TEODOROVICH O V. Epidemiology and causes of autoimmune male infertility [J]. Urologia, 2005(1): 35- 44.
- [13] 王文军, 陈系古, 杨冬梓, 等. BALB/c 鼠自身免疫性睾丸炎动物模型的制作[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(2): 148- 152.

(编辑 张恩健)

更正启事

本刊 2006 年第 27 卷第 3 期第 243 页表 1 和第 244 页表 2 的注 2), 应为: $P > 0.05$, 第 244 页图 4 中片段大小标记“297”应为“250”, 特此更正。