

隐睾大鼠模型中利用 UCHL-1 评估睾丸损害相关研究

王俊

新疆维吾尔自治区儿童医院 新疆乌鲁木齐

【摘要】目的 探讨小鼠隐睾模型睾丸组织病理变化与血清 UCHL-1 及相关性激素水平之间的关系。**方法** 饲养 ICR 雄性小鼠 50 只，利用随机数字表将大鼠随机分为三组：即假手术组，单侧隐睾组和双侧隐睾组。单侧组与双侧组采取手术方式固定对应睾丸至腹腔内，假手术组打开腹腔后睾丸组织未做特殊处理。取双侧睾丸组织清洗后称重，甲醛溶液浸泡保存。用 ELISA 试剂盒酶联免疫法测量血清激素水平，睾丸组织 HE 染色，光学显微镜下观察依据 Johnsen 评分标准进行评分。**结果** 各组实验鼠体重之间差异均无统计学意义($P<0.05$)。睾丸重量，睾丸体积：单侧组健侧睾丸与患侧睾丸比较、双侧组平均睾丸体积（重量）与假手术组平均睾丸体积（重量）比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。血清 AMH 和 INH-B 浓度。单侧组、双侧组和假手术组血清相关值比较，三组数据差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 隐睾症可引起小鼠睾丸组织功能障碍，可认为血清 UCHL-1 是一种简便、准确的血清标志物，它可以很好地评估隐睾睾丸组织的功能。

【关键词】 隐睾；小鼠；性激素；UCHL-1

Evaluation of testicular damage using UCHL-1 in a rat model of cryptorchidism

Jun Wang

Xinjiang Uygur Autonomous Region Children's Hospital Urumqi, Xinjiang, China

【Abstract】 Objective: To investigate the relationship between the histopathological changes of testis in a mouse cryptorchidism model and the levels of serum UCHL-1 and related sex hormones. **Methods** Fifty ICR male mice were reared, and the rats were randomly divided into three groups using a random number table: sham operation group, unilateral cryptorchidism group and bilateral cryptorchidism group. In the unilateral group and bilateral group, the corresponding testis was surgically fixed into the abdominal cavity, and the testis tissue in the sham operation group was not treated with special treatment after the abdominal cavity was opened. The bilateral testicular tissues were washed, weighed, and immersed in formaldehyde solution for preservation. Serum hormone levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA kit), testicular tissue was stained with HE, observed under a light microscope and scored according to the Johnsen scoring standard. **Results** There was no significant difference in the body weight of the experimental mice in each group ($P<0.05$). Testicular weight, testis volume: There were statistically significant differences between the contralateral testis and the affected testis in the unilateral group, and the average testis volume (weight) in the bilateral group and the sham operation group ($P<0.05$). Serum AMH and INH-B concentrations. Compared with the unilateral group, the bilateral group and the sham operation group, there were statistically significant differences among the three groups ($P<0.05$). **Conclusion** Cryptorchidism can cause testicular tissue dysfunction in mice, and it can be considered that serum UCHL-1 is a simple and accurate serum marker, which can well evaluate the function of testicular tissue in cryptorchidism.

【Keywords】 cryptorchidism; mice; sex hormones; UCHL-1

隐睾是男性生殖系统先天畸形中常见的一种，在中国足月出生儿中的发病率为 2%~5%，早产儿中约为 30%，3 个月时为 1%~2%，6 个月后睾丸下降的

可能性很小^[1]。有研究表明不管治疗与否，单侧隐睾患者成年后无精子症的发生率高达 13%，而未治疗的双侧隐睾患者的无精子症发病率则高达 89%^[2]。血清

AMH、INH-B 只能评估睾丸支持细胞功能，对精母细胞的损伤情况无法评估；而青春期前睾丸体积通常在 1~3 ml，青春期前睾丸体积变化几乎处于静止状态，无射精过程^[3]；泛素是一种存在于大多数真核细胞中的小蛋白，具有高度的进化保守性^[4]，泛素羧基末端水解酶（UCH）就是一类数量很大的蛋白酶家族^[6]，UCH 是一类相对分子量较小的半胱氨酸蛋白酶，它们的主要功能是泛素羧基端所连接小肽或酯类分子水解下来。UCHL1 基因缺失小鼠表现出生精小管萎缩、精原干细胞渐进性增殖减少，表明 UCHL1 在精子发生中发挥重要的作用^[7]。本实验通过建立小鼠隐睾模型，研究其睾丸质量及睾丸组织病理学变化，检测小鼠血清 UCHL-1 水平，探索这种激素变化与隐睾睾丸损伤之间的相关性。

1 资料与方法

实验动物：新疆医科大学动物实验中心采购正常生长的 50 只健康 ICR 雄性小鼠（20 日龄），体重 25~39g，利用随机数字表将大鼠随机分为三组：即假手术组（15 只），单侧隐睾组（15 只），双侧隐睾组（20 只）。

2 主要仪器与试剂

0.3%戊巴比妥钠、整套手术器械、BS-1105 型电子天平（北京赛多科斯天平有限公司）、甲醛、生理盐水、甲硝唑、不同浓度的乙醇溶液（100%、95%、75%）。

3 实验方法

3.1 隐睾模型的建立

所有小鼠进行称重，标号，使用随机数字表法随机分为假手术组（15 只），单侧隐睾组（15 只）及双侧隐睾组（20 只）三组。选取单侧组小鼠和双侧组小鼠，每只小鼠用 0.3%戊巴比妥钠（35mg/kg 腹腔内注射）麻醉，腹部备皮消毒后单侧组在左下腹取 1.5cm 手术切口、双侧组在下腹正中取 2cm 小切口；打开腹腔，轻轻拖出睾丸（单侧组取左侧睾丸、双侧组取双侧睾丸），牵拉至腹腔，剪切引带，缝合固定于腹腔

内，单侧组右侧睾丸不做任何处理，缝合腹部切口关腹（一只双侧组小鼠术中死亡）。假手术组小鼠取左下腹切口，打开腹腔牵拉双侧睾丸组织，但不剪切引带，也不固定，保持双侧睾丸原位，即假手术组。术后第 1d，3d，5d 所有小鼠腹腔注射甲硝唑预防感染。所有小鼠在同样环境下饲养即：12/12h 昼夜交替饲养，环境温度（22±1）℃，湿度为（50±3）%，固定时间给予食物，饮用水。

3.2 取出标本

分别在造模后第 10 天，20 天，30 天分别取假手术组小鼠 5 只、单侧组小鼠 5 只，双侧组小鼠 6 只（第 30 天双侧组小鼠 7 只），测量记录每只小鼠体重。用 0.3%戊巴比妥钠（35mg/kg 腹腔内注射）麻醉，用正中切口进入腹腔，分离腹主动脉采血约 10ml/只，离心（3000r/s 5min）取上清液保存在-80℃冰箱内。取双侧睾丸组织清洗后称重，测量左右、前后及上下径，用 10%甲醛溶液浸泡保存。

3.3 测量血清 UCHL-1 水平，睾丸组织病理学检查

实验中取出血清用小鼠专用 ELISA 试剂盒酶联免疫法测量相应指标，定量结果选择对数-对数立方回归分析模型。睾丸组织用常规石蜡包埋，切片及 HE 染色，光学显微镜下观察依据 Johnsen 评分标准进行评分。

使用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计分析，计量资料均以均数±标准差表示，组间数据的比较采用 t 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

5 结果

5.1 实验鼠体重及睾丸相关参数

实验鼠体重：在不同时间段（术前，术后 10d，术后 20d，术后 30d）测量小鼠体重对比，各组之间差异均无统计学意义（P<0.05），见如表 1。

5.2 实验鼠血清 UCHL-1 水平

单侧组、双侧组和假手术组血清相关值比较，三组数据差异均有统计学意义（P<0.05），其中假手术组血清 UCHL-1 水平最高，双侧组最低，详见表 2。

表 1 各个时间段各组小鼠体重比较（g）

	单侧组	双侧组	假手术组	F	p
术前	30.2±1.69	30.4±1.99	30.2±2.46	0.015	0.985
术后 10d	72.1±5.59	68.9±5.97	72.4±7.11	0.618	0.549
术后 20d	93.2±8.67	86.34±6.57	95.6±8.87	1.511	0.246
术后 30d	156.4±14.19	152.2±12.93	161.3±13.31	1.046	0.373

表 2 三组小鼠血清 AMH、INH-B 浓度

术后天数		10d	20d	30d	
单侧组	UCHL-1 (pmol/L)	15.43±2.45	8.39±2.61	5.98±1.86	F=3.976 p=0.028
双侧组	UCHL-1 (pmol/L)	8.3±2.12	5.25±1.63	4.01±1.24	
假手术组	UCHL-1 (pmol/L)	21.12±4.2	11.44±3.56	13.81±4.29	F=5.025 p=0.012

5.3 实验鼠睾丸组织病理变化

三组睾丸组织 HE 染色 (见图 1) 发现, 单侧组患侧睾丸和双侧组睾丸组织均可见生精细胞凋亡。单侧组患侧睾丸精子数量明显少于自身对照侧睾丸组织, 这一差距在取材时间与造模时间之间间隔较长的小鼠中更明显, 直至有些患侧睾丸生精小管仅可见少数精母细胞。双侧隐睾组的睾丸组织与单侧组患侧睾丸病理变化大致相似。而假手术组隐睾标本发育较好, 可见成熟生精细胞, 可见精子发生过程, 生精小管可见多个精子细胞。在单侧组患侧睾丸的评分明显低于其自身健侧,

双侧组与假手术组对比评分明显低于假手术组。差异均有统计学意义 (P<0.05), 见表 3, 4。

表 3 睾丸组织 Johnsen 评分 1

	患侧	健侧	t	p
单侧组	5.1±0.59	8.3±0.38	-25.787	0

表 4 睾丸组织 Johnsen 评分 2

	双侧组	假手术组	t	p
平均评分	4.4±0.49	9.6±0.59	-12.81	0

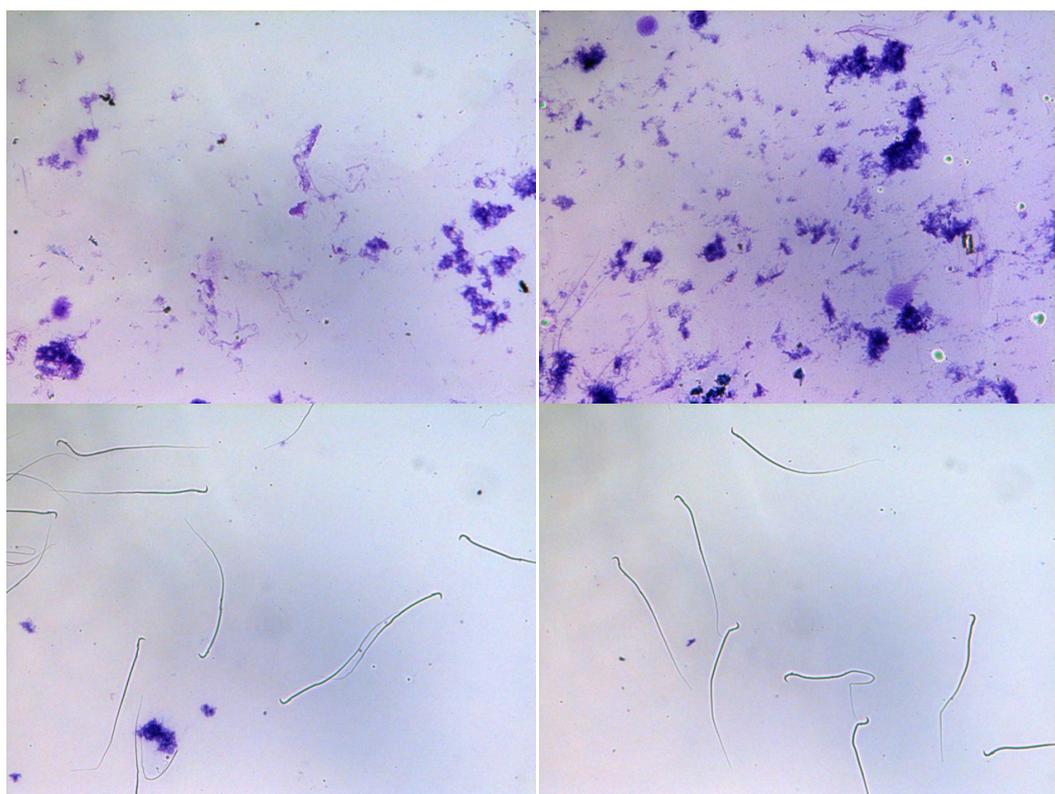


图 1 睾丸组织 HE 染色

6 讨论

泛素 (ubiquitin) 是一种存在于大多数真核细胞中的小蛋白, 具有高度的进化保守性^[4]。泛素可通过泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶 (E2)、泛素蛋白连接酶 (E3) 这 3 种酶的作用。结合到靶蛋白上, 使靶蛋白泛素化^[5], 进而通过泛素-蛋白酶体降解途径将泛素化靶蛋白质

分解为较小的多肽和氨基酸。去泛素化酶 (DUB) 则可以将泛素从其结合的底物上水解下来, 使其可以再结合到新的靶蛋白。泛素羧基末端水解酶 (UCH) 就是一类数量很大的蛋白酶家族^[6]。UCH 是一类相对分子量较小的半胱氨酸蛋白酶, 它们的主要功能是泛素羧基末端所连接小肽或酯类分子水解下来。在 8 日龄和

16 日龄的小鼠睾丸中, UCHL1 出现在精原细胞, 在 30 日龄小鼠和成年小鼠的睾丸中, UCHL1 表达在精原细胞和支持细胞中^[8]。

我们研究中三组小鼠体重在各时期体重变化无差异, 说明在同样环境中增长无差异性。而睾丸重量及睾丸体积等参数中单侧组小鼠患侧与健侧睾丸之间有差异, 说明在造模成功、造模后患侧睾丸因较高温度环境的影响发育比健侧睾丸明显下降, 这一差距同样在双侧组和假手术组的平均睾丸参数中也可得到。形态学上表现得睾丸萎缩病理学上是睾丸生殖细胞的凋亡所导致的, 这一病理改变可直接影响生育功能^[9]。为了更好地确定这一病例改变我们从处死小鼠后取出双侧睾丸组织进行病理评分 (Johnsen 评分) 可见在单侧组患侧睾丸的评分明显低于其自身对照侧, 双侧组与假手术组对比评分明显低于假手术组。说明在单侧组患侧睾丸及双侧组双侧睾丸组织不仅是体积和质量上与正常发育的睾丸有差异, 在病理改变上也有明显的差异性, 睾丸质量和体积的差异性也如此。这一规律在临床上也是完全公认的, 隐睾病史越长患儿患侧睾丸组织萎缩程度越高^[10]。

我们在实验小鼠处死时从腹主动脉取出血液标本进行 UCHL-1 激素水平的检测, 三组小鼠两种激素水平数据对比后发现双侧组两种激素水平最低, 假手术组水平最高。这一差异性跟睾丸参数及病理评分完全符合。不管是小鼠还是人类患儿单侧隐睾病例两种激素水平高于双侧隐睾者, 这可能与单侧隐睾组健侧睾丸的代偿作用有关。而在本研究中取出睾丸组织病理检查发现双侧组中睾丸组织评分非常低, 严重影响了睾丸的正常发育, 单侧组次之, 假手术组几乎是正常发育状态, 这可以对应三组血清激素水平的差异性。我们可以得出血清 UCHL-1 激素水平可以间接的标志着睾丸发育状态, 可以评估青春期前隐睾患儿睾丸功能。

综上所述, 血清 UCHL-1 是一种简便、准确的血清标志物, 它可以很好地评估隐睾睾丸组织的功能。虽然睾丸组织的病理检查是最准确的评估方式, 但是隐睾患儿无法常规行睾丸组织活检, 所以需要创伤性小的检测方式来替代睾丸组织活检。隐睾患儿睾丸功能血清标志物需要进一步研究并提供准确的激素水平参考范围, 可以改善隐睾患儿生育功能等远期预后。

参考文献

[1] 毛长坤, 曹永胜, 彭博, 等. 睾丸切除术在小儿发育不良隐睾手术治疗中的应用 [J]. 中华实用儿科临床杂

志, 2017, 32(23): 1803-5.

- [2] 魏仪. 自噬在环境内分泌干扰物致睾丸发育异常和功能障碍中的作用及机制研究 [D]. 重庆医科大学, 2018.
- [3] 郑新民, 张林超, 杨志伟, 李世文. 单侧隐睾大鼠对侧睾丸的损害与 Bcl-2 和 Bax 基因表达 [A]. 中华医学会男科学分会. 中华医学会第八次全国男科学学术会议论文集 [C]. 中华医学会男科学分会, 2007: 1.
- [4] 郑新民, 杨奇盛, 杨志伟, 李世文, 胡礼泉. 生殖股神经对单侧隐睾大鼠睾丸引带雄激素受体和雌激素受体的影响 [A]. 中华医学会男科学分会. 中华医学会第八次全国男科学学术会议论文集 [C]. 中华医学会男科学分会, 2007: 1.
- [5] 张林超, 郑新民, 杨志伟, 李世文. 单侧隐睾大鼠对侧睾丸的损害与 Bcl-2 和 Bax 基因表达 [J]. 中华男科学杂志, 2006(04): 352-354.
- [6] 周宇. 视黄酸在重塑隐睾睾丸生精功能中的作用及机制研究 [D]. 重庆医科大学, 2021.
- [7] Devi L, Pawar RM, Makala H. Conserved expression of ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1) in mammalian testes. *Indian J Exp Biol*. 2015, 53(5): 305-12.
- [8] 程冬, 郑新民, 李世文, 杨志伟, 胡礼泉. 实验性隐睾大鼠的抗精子自身免疫研究 [J]. 中国男科学杂志, 2003, (01): 34-36.
- [9] Ashley RA, Barthold JS, Kolon TF. Cryptorchidism: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Urol Clin North Am* 2010; 37(2): 183-193
- [10] Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A, et al. Altered distribution of Sertoli cell vimentin and increased apoptosis in cryptorchid rats. *JPediatr Surg* 2002; 37(4): 648-652

收稿日期: 2022 年 4 月 24 日

出刊日期: 2022 年 6 月 30 日

引用本文: 王俊, 隐睾大鼠模型中利用 UCHL-1 评估睾丸损害相关研究 [J]. 国际临床研究杂志, 2022, 6(4): 68-71.

DOI: 10.12208/j.ijcr.20220159

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS