

MEK 抑制剂U0126对大鼠睾丸移植缺血再灌注损伤的保护作用

姚晓霖¹, 陈昭典¹, 谭付清¹, 陆 意¹, 胡 倩²

(1. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003;

2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310006)

[摘 要] 目的:探讨大鼠睾丸移植缺血再灌注损伤与细胞外信号调节激酶(ERK)表达的关系,以及MEK抑制剂(U0126)对移植睾丸的保护作用。方法:应用谭付清技术建立大鼠原位异体睾丸移植模型,将实验动物分为7组:①正常对照组;②冷灌注对照组;③假手术对照组;和应用谭付清技术建立大鼠原位异体睾丸移植模型的④睾丸移植1组(移植后30 min取材);⑤睾丸移植2组(移植后1周取材);⑥U0126预处理1组(U0126预处理并在移植30 min后取材);⑦U0126预处理2组(U0126预处理并在移植1周后取材)。Western blot法测定移植睾丸ERK1、ERK2、pERK1及pERK2的表达水平,光镜和电镜下观察组织学改变,并应用放免法测定移植受体血清T、FSH、LH值。结果:各对照组间的ERK表达、组织学改变及生殖激素水平均无显著差异($P>0.05$);睾丸移植1组ERK1、ERK2、pERK1及pERK2表达水平明显高于正常对照组($P<0.05$);U0126预处理1组ERK1和ERK2水平较睾丸移植1组无显著差异($P>0.05$),而pERK1和pERK2水平显著低于睾丸移植1组($P<0.05$);U0126预处理1组的组织学改变与正常对照组类似,但明显轻于睾丸移植1组;U0126预处理2组组织学损伤轻于睾丸移植2组,生殖激素水平与正常对照组无明显差异($P>0.05$),但明显高于睾丸移植2组($P<0.01$)。结论:大鼠睾丸移植后植睾ERK1、ERK2、pERK1及pERK2的表达水平明显升高,导致移植睾丸组织结构损伤和生殖激素分泌功能减退;U0126可通过抑制ERK1和ERK2磷酸化,减轻移植睾丸的早期出现的缺血再灌注损伤,短期内保护其生精功能,并维持其生殖激素水平。

[关键词] 睾丸移植;再灌注损伤;疾病模型,动物;细胞外信号调节MAP激酶类/代谢;丝裂原激活蛋白激酶类/代谢;缺血

[中图分类号] R 69 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2009)01-0081-08

Protective effect of MEK inhibitor (U0126) on donor testes from ischemia-reperfusion injury after orthotopic testicular transplantation in rats

YAO Xiao-lin, CHEN Zhao-dian, TAN Fu-qing, LU Yi, HU Qian (*The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China*)

[Abstract] **Objective:** To determine the effect of MEK inhibitor (U0126) on donor testes from

收稿日期:2007-10-22 修回日期:2008-10-20

作者简介:姚晓霖(1980—),男,博士生,主要从事泌尿外科和男科学研究;Email:yx1_lxy@yahoo.com.cn.

通讯作者:陈昭典(1938—),男,教授,主要从事泌尿外科和男科学研究;Email:chenzhaodian@yahoo.com.cn.

ischemia-reperfusion injury after orthotopic testicular transplantation in rats. **Methods:** The rats were divided into 7 groups, Group 1: normal control; Group 2: cold perfusion control; Group 3: sham operation control; Group 4: transplanted for 30 min; Group 5: transplanted for 1 week; Group 6: transplanted for 30 min with pretreatment of U0126; Group 7: transplanted for 1 week with pretreatment of U0126. The orthotopic testicular transplantation model was established with cuff. The levels of ERK1, ERK2, pERK1 and pERK2 of donor testes were evaluated; the change of histology and gonadal hormones were measured as well. **Results:** Group 1, 2 and 3 had no significant differences in all results ($P > 0.05$). The levels of ERK1, ERK2, pERK1 and pERK2 in Group 4 were significantly increased compared with Group 1 ($P < 0.05$), the levels of ERK1 and ERK2 in Group 6 were not different from those of Group 4 ($P > 0.05$), but the levels of pERK1 and pERK2 in Group 6 were lower than those in Group 4 significantly ($P < 0.05$), the histological changes in Group 6 were similar to Group 1 but milder than that in Group 4. The histological injury was more severe in Group 5 than that in Group 7, and the levels of gonadal hormones in Group 5 were lower than those in Group 7 ($P < 0.05$) which remained at the normal levels. **Conclusion:** U0126 has a protective effect on the donor testes in a short period through inhibiting expression of pERK1/2 activated by testicular transplantation.

[**Key words**] Testis/transpl; Reperfusion injury; Disease models, animal; Extracellular signal-regulated MAP kinases/metabol; Mitogen-activated protein kinases/metabol; Ischemia

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2009, 38(1):81-88.]

2005年, Minutoli等^[1]发现, 细胞外信号调节激酶ERK1和ERK2在睾丸扭转复位所致的缺血再灌注损伤模型中被激活并表达增加, 应用ERK抑制剂能抑制其表达水平, 明显减轻缺血再灌注损伤。ERK1和ERK2为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)家族成员。MAPKs是哺乳动物细胞内广泛存在的一类丝/苏氨酸蛋白激酶。每种MAPK被特异的MAPK激酶(MAPKK, MEK)通过磷酸化方式激活, 后者又被MAPKK激酶(MAPKKK, MEKK)激活。MAPK信号通路通过这种保守的三级酶促级联反应激活其下游转录因子, 参与基因表达, 细胞增殖、分化、转化及凋亡的调节, 并与炎症、肿瘤及其它多种疾病发生机制密切相关。

睾丸移植同样存在缺血再灌注损伤, 为探讨MEK抑制剂可否减弱移植睾丸的缺血再灌注损伤, 本研究以大鼠同系异体睾丸移植模型为基础, 应用Western blot法, 测定移植睾丸

ERK1与ERK2及pERK1与pERK2的表达水平(ERK系总量, 包含磷酸化了的pERK); 采用放射免疫试剂盒, 检测受体血清睾酮(T)、促卵泡成熟素(FSH)和黄体生成激素(LH)值; 并应用光镜和电镜观察移植睾丸的组织结构变化。探讨ERK1与ERK2和pERK1与pERK2的表达水平与移植睾丸缺血再灌注损伤的关系, 以及MEK抑制剂(U0126)对移植睾丸的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组 选用健康雄性近交系Lewis大鼠55只(北京维通利华实验动物有限公司提供), 体重220~260 g。用分段随机分组方法将大鼠分为7组: ①正常对照组: Lewis大鼠5只, 未做任何处理, 当天上午9时采血, 切取左侧睾丸取材; ②冷灌注对照组: Lewis大鼠5只, 同法切取左侧睾丸, 以4℃睾丸灌注液^[2]冷灌注后, 在4℃高渗枸橼酸盐腺嘌呤(HC-A)

液^[3]中保存 120 min 并取材;③假手术对照组: Lewis 大鼠 5 只,手术游离左侧睾丸后缝合切口,术后 7 天切取左侧睾丸;④睾丸移植 1 组: Lewis 大鼠 10 只(供、受体各 5 只),植睾移植成功血流未开放前静脉注射 U0126 载体溶液二甲亚砜(不含 U0126, 66 μ l/kg 体重),血流开放 30 min 后切取左侧睾丸;⑤睾丸移植 2 组: Lewis 大鼠 10 只(供、受体各 5 只),植睾移植成功血流未开放前静脉注射 U0126 载体溶液二甲亚砜(不含 U0126, 66 μ l/kg 体重),移植后 1 周上午 9 时采血并切取移植睾丸;⑥ U0126 预处理 1 组: Lewis 大鼠 10 只(供、受体各 5 只),植睾移植成功血流未开放前静脉注射 U0126 (1 mg/kg 体重),血流开放 30 min 后切取左侧睾丸;⑦ U0126 预处理 2 组: Lewis 大鼠 10 只(供、受体各 5 只),植睾移植成功血流未开放前静脉注射 U0126 (1 mg/kg 体重),移植后 1 周上午 9 时采血并切取移植睾丸。

1.2 大鼠睾丸移植模型的制作 模型制作参照谭付清等^[4]报道的大鼠原位异体睾丸移植方法,在显微镜下进行操作。将供鼠左侧睾丸连同与睾丸动、静脉相连的腹主动脉和左髂总经脉一并截取。以丝线结扎截取的左髂总静脉段的远断端,左髂总静脉段近断端的管腔外套上 Cuff 管后,将血管袖套状翻转于 Cuff 管上,并以丝线环扎之,然后将其嵌入切开的受鼠的左髂总静脉内后,外用丝线环扎之;将供鼠的腹主动脉段修剪成以左睾丸动脉汇入口为中心的圆形补片,间断缝合于暂时阻断血流后切开的受体腹主动脉上。然后,端端吻合受、供体输精管,摘除受鼠双侧睾丸,在缝合供、受体睾丸引带后,将供睾纳入受体阴囊内,两层关腹。整个手术过程约 3 h,其中植睾热缺血时间约 2 min,冷缺血时间约 2 h。术后未采用任何免疫抑制剂。

1.3 标本的采集与制作 每只睾丸标本分成 3 部分:第一部分置液氮速冻, -80℃ 保存,供 Western blot 检测;第二部分置入 4℃ 的 2.5% 戊二醛中固定,供电镜检查;第三部分由 Bouins 液固定,石蜡包埋,供光镜病理学检查。血液标本于上午 9 时采取,经离心后取上清, -20℃ 保存,供生殖激素检测。

1.4 ERK 和 p-ERK1 表达水平检测 兔抗鼠

ERK1/2 多克隆抗体和兔抗鼠 pERK1/2 多克隆抗体均购于 Chemicon 公司,二抗 HRP 购于 KPL 公司。采用 Western blot 法,分别测定正常对照组、冷灌注对照组、假手术对照组、睾丸移植 1 组以及 U0126 预处理 1 组的 ERK1、ERK2、pERK1 及 pERK2 表达水平。ERK1、ERK2 表达条带灰度值和内参照表达条带灰度值的比值,作为 ERK1 与 ERK2 表达水平; pERK1、pERK2 表达条带灰度值和内参照表达条带灰度值的比值,作为 pERK1 与 pERK2 表达水平;并分别计算 pERK1/ERK1 比值和 pERK2/ERK2 比值。

1.5 生殖激素测定和组织学观察 应用放射免疫试剂盒检测血清 T、FSH 和 LH 水平,HE 染色法光镜下观察植睾的形态学变化,电镜下观察植睾的超微结构变化。

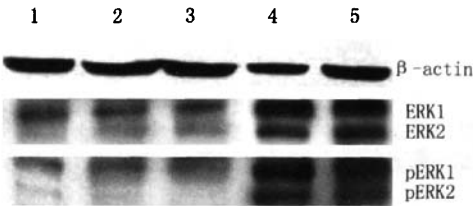
1.6 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS V 13.0 统计软件分析处理。多组样本均数采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 ERK1、ERK2、pERK1 及 pERK2 的表达水平 正常对照组、冷灌注对照组和假手术对照组 ERK1、ERK2、pERK1 及 pERK2 的表达水平均无显著性差异 ($P > 0.05$);睾丸移植 1 组 ERK1、ERK2、pERK1 及 pERK2 的表达水平均明显高于正常对照组 (ERK1: 0.258 ± 0.029 vs 0.159 ± 0.034 , $P < 0.01$; ERK2: 0.528 ± 0.066 vs 0.387 ± 0.068 , $P < 0.01$; pERK1: 0.180 ± 0.026 vs 0.129 ± 0.039 , $P < 0.05$; pERK2: 0.473 ± 0.036 vs 0.319 ± 0.045 , $P < 0.01$),而 pERK1/ERK1 比值及 pERK2/ERK2 比值与正常对照组无明显差异 ($P > 0.05$); U0126 预处理 1 组 ERK1 与 ERK2 表达水平也较正常对照组显著升高 (ERK1: 0.261 ± 0.041 vs 0.159 ± 0.034 , $P < 0.05$; ERK2: 0.497 ± 0.041 vs 0.387 ± 0.068 , $P < 0.05$),而与睾丸移植 1 组比较无显著差异 ($P > 0.05$);其 pERK1 与 pERK2 表达水平与睾丸移植 1 组相比明显降低,尤 pERK2 下降更显著 (pERK1: 0.136 ± 0.024 vs 0.180 ± 0.026 , $P < 0.05$;

pERK2: 0.251 ± 0.022 vs 0.473 ± 0.036 , $P < 0.01$), 其pERK1/ERK1 比值和pERK2/ERK2 比值均明显低于睾丸移植 1 组(pERK1/ERK1 比值: 0.482 ± 0.060 vs 0.699 ± 0.060 , $P < 0.01$; pERK2/ERK2 比值: 0.525 ± 0.045 vs 0.877 ± 0.103 , $P < 0.01$) 及正常对照组(pERK1/ERK1 比值: 0.482 ± 0.060 vs 0.690 ± 0.078 , $P < 0.01$; pERK2/ERK2 比值: 0.525 ± 0.045 vs 0.798 ± 0.093 , $P < 0.01$)。见图 1、表 1、表 2。

2.2 组织学观察结果 正常大鼠睾丸组织切片 HE 染色在光镜下: 曲细精管分布密集, 管腔形态规则; 管腔内可见支持细胞和各个不同成



1. 正常对照组; 2. 冷灌注对照组; 3. 假手术对照组; 4. 睾丸移植 1 组; 5. U0126 预处理 1 组

图 1 5 组 ERK1、ERK2、pERK1、pERK2 以及 β -actin 的 Western blot 检测结果

Fig. 1 Western blot results of ERK1, ERK2, pERK1, pERK2 and β -actin of 5 groups

表 1 5 组间 ERK1、ERK2、pERK1 及 pERK2 条带灰度相对值的比较

Table 1 Comparison of expression levels of ERK1/2, pERK1/2 among 5 groups				
$(\bar{x} \pm s, n=5)$				
组 别	ERK1	ERK2	pERK1	pERK2
正常对照组	0.159 ± 0.034	0.387 ± 0.068	0.129 ± 0.039	0.319 ± 0.045
冷灌注对照组	0.147 ± 0.026	0.394 ± 0.054	0.113 ± 0.018	0.327 ± 0.065
假手术对照组	0.148 ± 0.022	0.399 ± 0.069	0.099 ± 0.016	0.295 ± 0.065
睾丸移植 1 组	$0.258 \pm 0.029^*$	$0.528 \pm 0.066^*$	$0.180 \pm 0.026^*$	$0.473 \pm 0.036^*$
U0126 预处理 1 组	$0.261 \pm 0.041^*$	$0.497 \pm 0.041^*$	$0.136 \pm 0.024^\Delta$	$0.251 \pm 0.022^\Delta$
F	27.11	8.324	7.21	14.29
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与正常对照组比较, $^*P < 0.05$, $^*P < 0.01$; 与睾丸移植 1 组比较, $^\Delta P < 0.05$, $^\Delta P < 0.01$

表 2 5 组间 pERK1/ERK1 比值和 pERK2/ERK2 比值的比较

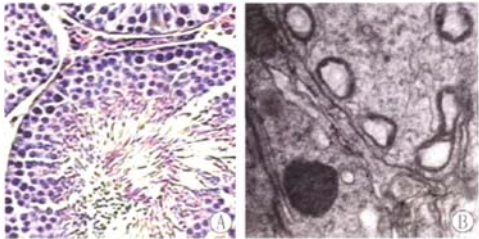
Table 2 Comparison of ratio of pERK to ERK among 5 groups		
$(\bar{x} \pm s, n=5)$		
组 别	pERK1/ERK1	pERK2/ERK2
正常对照组	0.690 ± 0.078	0.798 ± 0.093
冷灌注对照组	0.650 ± 0.055	0.815 ± 0.085
假手术对照组	0.664 ± 0.082	0.783 ± 0.123
睾丸移植 1 组	0.699 ± 0.060	0.877 ± 0.103
U0126 预处理 1 组	$0.482 \pm 0.060^{*\Delta}$	$0.525 \pm 0.045^{*\Delta}$
F	8.57	10.63
P	<0.01	<0.01

与正常对照组比较, $^*P < 0.01$; 与睾丸移植 1 组比较, $^\Delta P < 0.01$

熟阶段的生精细胞, 排列紧密, 层次清晰; 管周间隙内可见成群分布的圆形或多边形间质细胞。电镜下观察: 曲细精管生精上皮层次分明, 自基膜向管腔依次分布精原细胞、精母细胞、精

子细胞和精子, 形态规则; 支持细胞紧贴基膜, 胞突伸至腔面, 包绕各级生精细胞, 相邻支持细胞的胞突彼此形成紧密连接, 成为构成血睾屏障的主要结构(图 2)。冷灌注对照组和假手术对

照组的光镜和电镜下形态与上述描述近似。



A:曲细精管管腔内支持细胞和各个不同成熟阶段的生精细胞排列紧密,层次清晰;管周间隙内成群分布的圆形或多边形间质细胞。B:支持细胞胞突伸至腔面,相邻支持细胞的胞突彼此形成紧密连接,层次清晰且完整

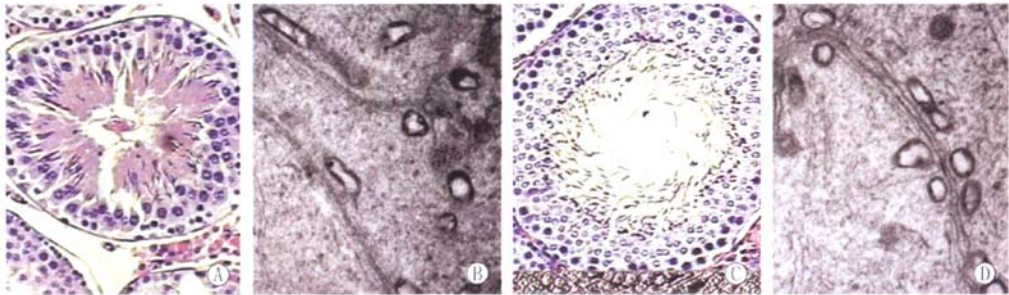
图2 正常对照组睾丸组织光镜及电镜图
Fig. 2 Histology of normal testis under light microscope and electron microscope

睾丸移植1组的睾丸标本在光镜下:曲细精管管腔内各级生精细胞层次仍分明,支持细胞未见变形肿胀,各级细胞间排列疏松。电镜下曲细精管基膜完整,各级生精细胞形态规则,细胞间距变大,支持细胞间的紧密连接未见断裂(图3A、3B)。U0126 预处理1组光镜及电镜下形态与正常组类似(图3C、3D)。

睾丸移植2组睾丸移植后一周,光镜下仅

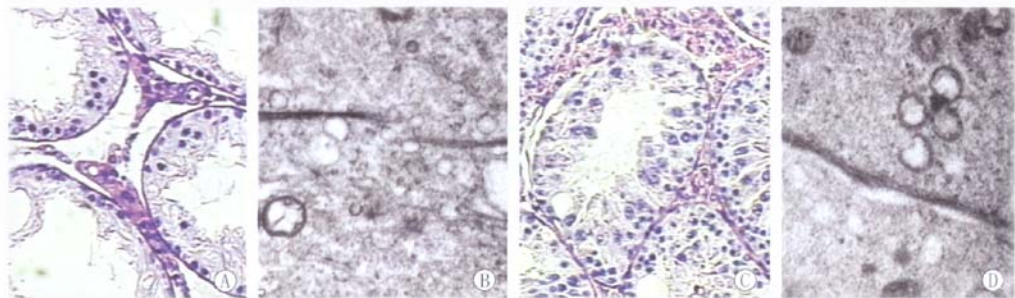
见少量精原细胞和精母细胞,偶见精子细胞,未见成熟精子,支持细胞移位明显,数量减少,间质细胞数量减少,大量炎性细胞浸润;电镜下曲细精管基膜仍完整,但支持细胞间紧密连接层次不清且多处断裂(图4A、4B)。U0126 预处理2组显示,以U0126 预处理的移植睾丸,一周后其曲细精管内仍可见各级生精细胞,但层次略紊乱,支持细胞数量减少,并向腔面移位,部分精原细胞、精母细胞脱落入管腔中央;间质细胞数量略减少但形态规则,排列紧密,间质内可见炎性细胞浸润;电镜下曲细精管基膜完整,各级生精细胞形态尚规则,支持细胞间的紧密连接未出现断裂(图4C、4D)。

2.3 生殖激素测定结果 睾丸移植2组大鼠血清T、LH、FSH 值较正常组低,且存在显著性差异($T:1.451 \pm 0.327$ vs 4.381 ± 0.169 , $P < 0.01$; $LH:1.533 \pm 0.398$ vs 4.031 ± 0.413 , $P < 0.01$; $FSH:0.945 \pm 0.124$ vs 2.748 ± 0.443 , $P < 0.01$);U0126 预处理2组大鼠血清T 值较正常组稍低,而LH、FSH 较正常值稍高,但均无显著性差异($P > 0.05$),而较睾丸移植2组T、LH、FSH 均明显升高,且存在显著性差异($T:4.115 \pm 0.237$ vs 1.451 ± 0.327 , $P < 0.01$; $LH:4.588 \pm 0.338$ vs 1.533 ± 0.398 , $P < 0.01$; $FSH:3.221 \pm 0.510$ vs 0.945 ± 0.124 , $P < 0.01$)。见表3。



A:曲细精管管腔内各级生精细胞层次仍分明,各级细胞间排列疏松。B:曲细精管基膜完整,支持细胞间的紧密连接未见断裂。C:曲细精管管腔内可见支持细胞和各个不同成熟阶段的生精细胞,排列紧密,层次清晰;管周间隙内可见成群分布的圆形或多边形间质细胞。D:支持细胞间紧密连接层次清晰且完整,未见断裂

图3 睾丸移植1组和U0126 预处理1组睾丸组织光镜图(A、C)及电镜图(B、D)
Fig. 3 Histology of the transplanted testes in Group 4 and Group 5 under light microscope(A, C) and electron microscope(B,D)



A: 仅见少量精原细胞和精母细胞, 偶见精子细胞, 未见成熟精子, 支持细胞移位明显, 数量减少, 间质细胞数量减少。B: 支持细胞间紧密连接层次不清且多处断裂。C: 曲细精管内可见各级生精细胞, 但层次略紊乱, 支持细胞数量减少, 并向腔面移位, 部分精原细胞、精母细胞脱落入管腔中央; 间质细胞数量略减少但形态规则, 排列紧密。D: 支持细胞间的紧密连接层次欠清晰, 但未出现断裂

图 4 睾丸移植 2 组和 U0126 预处理 2 组睾丸组织光镜图(A、C)及电镜图(B、D)

Fig. 4 Histology of the transplanted testes in Group 6 and Group 7 under light microscope(A, C) and electron microscope(B, D)

表 3 3 组间 T、FSH、LH 测定值比较

Table 3 Comparison of gonadal hormone levels among 3 groups

($\bar{x} \pm s, n=5$)				
组 别	处理时间/d	T/(nmol · L ⁻¹)	FSH/(nmol · L ⁻¹)	LH/(nmol · L ⁻¹)
正常对照组	1	4.381±0.169	2.748±0.443	4.031±0.413
睾丸移植 2 组	7	1.451±0.327*	0.945±0.124*	1.533±0.398*
U0126 预处理 2 组	7	4.115±0.237 [▲]	3.221±0.510 [▲]	4.588±0.338 [▲]
F		123.35	36.49	76.16
P		<0.01	<0.01	<0.01

与正常对照组比较, * $P<0.01$; 与睾丸移植 2 组比较, [▲] $P<0.01$

3 讨 论

早年睾丸移植动物模型均采用大型动物, 如狗、猪等。采用大动物建立睾丸移植动物模型存在以下缺陷: 体形大, 饲养不方便; 研究费用较高; 手术时麻醉要求高, 多数需专业麻醉人员等。而小型动物又因血管较细、血管吻合技术要求高等不足, 鲜有人采用。2003 年谭付清等^[4]采用大鼠建立睾丸移植模型成功, 解决了以往睾丸移植模型建立所遇到的问题, 同时为睾丸移植的基础及临床研究开辟了新的道路。本研究即以谭付清等建立的大鼠睾丸移植模型为基础, 进行了相关研究。

3.1 U0126 减轻植睾缺血再灌注损伤的机理

ERK 在多种缺血再灌注模型中被激活并表达增加^[5-7]。在睾丸扭转复位所致的缺血再灌注损伤模型中, ERK 同样被激活并表达增加, 且以再灌注 30 min 时最明显, 而应用 ERK 抑制剂能抑制其表达水平, 并明显减轻缺血再灌注损伤^[1]。睾丸移植本身即是一个缺血再灌注损伤过程。为探讨移植睾丸缺血再灌注过程中 ERK 表达水平的变化及 MEK 抑制剂是否可通过抑制 ERK 表达减轻植睾缺血再灌注损伤, 本实验以大鼠原位异体睾丸移植模型为基础, 研究睾丸移植再灌注 30 min 后植睾组织中 ERK1、ERK2、pERK1 及 pERK2 表达水平的变化与植睾缺血再灌注损伤的关系。实验结果显示, 正常对照组、冷灌注对照组和假手术对照组的

ERK1、ERK2、pERK1及pERK2表达水平无显著性差异,说明不存在缺血再灌注过程时,睾丸中ERK1、ERK2、pERK1及pERK2不被激活;睾丸移植1组的ERK1、ERK2、pERK1及pERK2表达水平均明显高于正常对照组,而pERK1/ERK1比值及pERK2/ERK2比值与正常对照组无显著差异,说明缺血再灌注过程分别激活ERK1、ERK2、pERK1及pERK2的表达,并且成比例增长,故pERK1/ERK1的比值及pERK2/ERK2的比值并没有增加;U0126预处理1组的ERK1与ERK2表达水平虽较正常对照组显著升高,但与睾丸移植1组相比无显著差异,而pERK1与pERK2表达水平较睾丸移植1组明显降低($P < 0.05$),尤其是pERK2表达水平较pERK1水平下降得更为显著($P < 0.01$);pERK1/ERK1比值和pERK2/ERK2比值亦显著低于睾丸移植1组及正常对照组。可以看出,MEK抑制剂U0126虽不能抑制ERK1与ERK2的表达增加,但能明显抑制pERK1与pERK2的表达,同时U0126对pERK2的抑制效果强于pERK1。对应组织学改变,睾丸移植1组各级生精细胞排列疏松,细胞间距变大,U0126预处理后,细胞排列紧密,组织损伤较睾丸移植1组明显减轻。综合上述结果表明:睾丸移植缺血再灌注损伤能引起ERK1、ERK2、pERK1及pERK2的激活及表达增加,因同比例增加,故不改变pERK1/ERK1比值及pERK2/ERK2比值;在移植睾丸再灌注前,静脉注射U0126能显著抑制血流再灌注过程所引起的pERK1与pERK2的表达,尤其抑制pERK2的表达更为显著,同时还可降低pERK1/ERK1比值和pERK2/ERK2比值;U0126不能抑制ERK1与ERK2的表达,说明U0126并不影响ERK1与ERK2的合成,而是抑制ERK1与ERK2的磷酸化过程,从而减轻移植睾丸组织的损伤。因此,我们认为pERK1与pERK2表达水平是检测睾丸移植缺血再灌注损伤的指标,pERK1与pERK2表达水平越高,移植睾丸损伤越严重,尤pERK2较pERK1更为敏感;MEK抑制剂U0126可通过抑制ERK1与ERK2的磷酸化减轻睾丸缺血再灌注损伤。王知秋等^[8]报道,静脉注射U0126可抑制

小鼠脑缺血模型中ERK1与ERK2的磷酸化,从而抑制pERK1与pERK2的表达,减轻脑组织损伤,此结果与本研究结果相符合。

3.2 睾丸移植冷缺血时间的安全窗 睾丸移植的缺血再灌注过程又有其特殊性,即存在冷缺血时间。把冷缺血时间控制在多长范围内才能避免引起植睾的不可逆损伤,不同的研究有不同的发现。Attaran等^[9]研究认为,同种睾丸移植供睾冷缺血时间超过2h效果就不理想。Goldstein等^[10]研究认为,大鼠睾丸90min冷缺血的组织学变化与热缺血20~30min相似,并认为低温对缺血所致的损害并不具有完全的保护作用。睾丸保存液的选择也是其中不容忽视的一环。1995年,祝青冈等^[11]采用不灌洗法低温保存尸睾,发现在4℃的H-CA液中保存不超过80h,尸睾发生的组织学改变为可逆性改变。本研究中,热缺血时间约2min,冷缺血时间约2h,冷保存液采用4℃的H-CA液,实验结果显示:冷灌注对照组植睾和正常对照组与假手术对照组的光镜、电镜下形态学改变,及ERK1与ERK2和pERK1与pERK2表达水平相比较无统计学方面的明显差异($P > 0.05$)。该结果说明,睾丸移植将冷缺血时间控制在2h内是相对安全的,可避免植睾发生不可逆损伤。

3.3 U0126对植睾生精功能的保护作用 为研究U0126预处理在短期内对植睾生精功能的影响,我们将睾丸移植2组和U0126预处理2组进行比较,结果显示:睾丸移植2组镜下睾丸仅见少量精原细胞和精母细胞,偶见精子细胞,未见成熟精子,支持细胞移位明显,数量减少,大量炎性细胞浸润,支持细胞间紧密连接层次不清且多处断裂。而U0126预处理2组镜下仍可见各级生精细胞,数量略减少,形态尚规则,支持细胞间紧密连接未出现断裂;生殖激素测定也显示睾丸移植2组大鼠的血清T、LH、FSH值较正常组低,且存在显著性差异,而U0126预处理2组大鼠血清T、LH、FSH较睾丸移植2组显著升高,而与正常对照组无显著性差异。上述结果表明,U0126预处理能在短期(1周)内减轻移植睾丸缺血再灌注损伤,并维持其生殖激素水平,但长期效果尚需进一步研究探索。

References:

- [1] MINUTOLI L, ANTONUCCIO P, ROMEO C, et al. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase in the development of testicular ischemia-reperfusion injury [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(4): 730-736.
- [2] TAN Fu-qin, CHEN Zhao-dian, LI Jian-hui(谭付清, 陈昭典, 李建辉). Establishment of orthotopic testicular transplantation model in rats with cuff preparation [J]. *National Journal of Androlog* (中华男科学杂志), 2005, 11(8): 594-597. (in Chinese)
- [3] ZHU Qing guo, GAO Zhi-zhong, LIN Xin, et al (祝青国, 高治忠, 林欣, 等). Clinical understanding of orthotopic testicular transplantation [J]. *Chinese Journal of Organ Transplantation* (中华器官移植杂志), 1999, 20(4): 252. (in Chinese)
- [4] TAN Fu-qin, CHEN Zhao-dian, JIANG Guo-ping, et al (谭付清, 陈昭典, 蒋国平, 等). Establishment of orthotopic testicular transplantation model in rats [J]. *Chinese Journal of Microsurgery* (中华显微外科杂志), 2003, 26(1): 48-49. (in Chinese)
- [5] AN W, YANG J, AO Y. Metallothionein mediates cardioprotection of isoliquiritigenin against ischemia-reperfusion through JAK2/STAT3 activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(11): 1431-1437.
- [6] WANG Z F, TANG L L, YAN H, et al. Effects of huperzine A on memory deficits and neurotrophic factors production after transient cerebral ischemia and reperfusion in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 83(4): 603-611.
- [7] ZUO Z, WANG Y, HUANG Y. Isoflurane preconditioning protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against in vitro simulated ischemia-reperfusion through the activation of extracellular signal-regulated kinases pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1-3): 84-91.
- [8] WANG Zhi-qiu, CHEN Xian-cheng, YANG Guo-yuan, et al (王知秋, 陈衍城, 杨国源, 等). MEK inhibitor's effects on interrupting the activation of ERK pathway and synthesis of IL-1 β mRNA in rat after cerebral ischemia [J]. *Fudan University Journal of Medical Sciences* (复旦学报: 医学版), 2004, 31(2): 119-123. (in Chinese)
- [9] ATTARAN S E, HODGES C V, CRARY L S, et al. Technique for testicular transplants [J]. *Invest Urol*, 1966, 3(4): 39.
- [10] GOLDSTEIN M, PHILIPS D M, SUNDARAM K, et al. Microsurgical transplantation of testes in isogenic rats: method and function [J]. *Biol Reprod*, 1983, 28(4): 971.
- [11] ZHU Qing-guo, GAO Zhi-zhong, ZHANG Chun-ying, et al (祝青国, 高治忠, 张春影, 等). Morphology study of cold conserved human testes from dead body without perfusion [J]. *Dialysis and Artificial Organs* (透析与人工器官), 1995, 6(1): 22-24. (in Chinese)

[责任编辑 张荣连]