

染料木黄酮对体外培养乳鼠睾丸组织全基因表达谱的影响^{*}

单靖焱¹, 曾 香¹, 徐 华², 宁艳花¹, 谢雪健¹, 申雨燕¹, 宋 杰¹, 李 云^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 营养食品卫生与毒理学系(成都 610041);

2. 泰山医学院附属医院 营养科(泰安 271000)

【摘要】 目的 利用基因芯片技术研究染料木黄酮(Genistein, Gen)对体外培养的小鼠睾丸组织全基因表达谱的影响,从基因水平分析 Gen 影响睾丸细胞增殖凋亡的作用机制。**方法** 利用旋转通气法体外培养乳鼠睾丸组织,给予 5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 干预,同时设立 DMSO 溶剂对照组。培养 72 h 后提取组织总 RNA,用单标 Agilent 小鼠全基因芯片检测两组睾丸组织基因表达,筛选差异基因,进行基因功能分类。**结果** 与对照组比较,Gen 组筛选出 84 个表达差异有统计学意义的基因($P < 0.05$),其中 47 个基因表达上调,37 个基因表达下调。按差异基因功能富集分析(GO)分类标准进行分类,筛选出有统计学意义的 GO 分类 14 个($P < 0.05$),主要涉及生殖发育、细胞增殖、细胞周期等功能。**结论** 通过全基因芯片检测发现,Gen 主要影响睾丸组织生殖发育、细胞增殖和细胞周期等功能相关基因表达,从而影响精子发生和睾丸细胞的增殖和凋亡,影响睾丸的功能。

【关键词】 全基因表达谱 染料木黄酮 睾丸 体外培养

Effects of Genistein on Whole Genome Expression Profiles of Mice Testes Tissue Cultured *in vitro* SHAN Jing-yan¹, ZENG Xiang¹, XU Hua², NING Yan-hua¹, XIE Xue-jian¹, SHEN Yu-yan¹, SONG Jie¹, LI Yun^{1△}. 1. Department of Nutrition, Food Safety and Toxicology, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Nutrition, the Affiliated hospital of Taishan Medical College, Taian 271000, China

△ Corresponding author, E-mail: liyun_611@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Genistein (Gen) on the whole expression profiles of testes in mice by using the gene chip technology, and analyze the mechanism how Gen exerts testis on gene level. **Methods** The testicular tissues of suckling mice were cultured *in vitro*, and separated into control group and Gen group with the dose of 5 $\mu\text{mol/L}$. After 72 h of culture, we extracted the total RNA and purified it, then detected the gene expression by using Agilent gene array. **Results** Compared with the control, there were 84 genes expressed differently in Gen group, including 47 up-regulated genes and 37 down-regulated genes. We classified these genes as 14 categories in Gen group by GO ($P < 0.05$), including cell proliferation, cell death, the immune system and reproductive development. **Conclusion** The whole gene chip test found that Gen can mainly affect the functions of testes by regulating the expression of gene related to cell development, proliferation and cell cycle function, which can influence the spermatogenesis and change the testis cell proliferation and apoptosis.

【Key words】 Whole genome expression profiles Genistein Testis *in vitro*

染料木黄酮(Genistein, Gen)是一种异黄酮类植物雌激素,也是大豆异黄酮的主要生物活性成分^[1]。有研究报道 Gen 可能干扰雄性生殖发育,对雄性生殖功能产生负面影响^[2]。现有的关于 Gen 对雄性生殖系统的影响及相关机制的研究主要关注生殖器官的形态变化、激素的合成及相关蛋白的表达等方面^[3-5],鲜有从基因层面进行系统分析的研究。因此本实验基于睾丸体外培养模型,研究 Gen 对小鼠睾丸全基因表达谱的影响,从基因水平分析

Gen 对小鼠生殖功能的影响,为进一步研究 Gen 对雄性生殖系统的影响及其机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3~4 日龄 SPF 级健康昆明种雄性乳鼠 12 只,由四川大学实验动物中心提供,动物合格证号 SYXK(川)2009-045。

1.1.2 主要仪器 旋转通气培养装置(本实验室自制);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);安捷伦 2100 生物分析仪、滚动杂交炉(美国 Agilent);NanoDrop ND-2000(美国 Thermo);热循环仪(美

* 国家自然科学基金(No. 81072309)资助

△ 通信作者, E-mail: liyun_611@163.com

国 Bio-Rad);安捷伦微阵列扫描仪(美国 Agilent);PCR 仪(美国 Bio-Rad)。

1.1.3 主要试剂 Gen(美国 Sigma);RNA 提取试剂盒(美国 OMEGA);RNA 纯化试剂盒、DNase 消化试剂盒(均购自德国 QIAGEN);单标 Agilent 小鼠全基因 4×44K 芯片(design ID:014868)、DNA 扩增标记试剂盒、基因表达杂交试剂盒、基因表达冲洗试剂盒(均购自美国 Agilent)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 实验分两个批次进行,每批次 6 只动物,分别用于睾丸组织细胞增殖功能分析和总 RNA 的提取,每个批次均设立 DMSO 溶剂对照组和 5 μmol/L Gen 组,每组 3 个培养瓶。Gen 由 DMSO 溶解后冷冻保存备用,培养时加入相应剂量的 Gen 和 DMSO 至各组培养液,使两组培养液中 DMSO 体积分数为 0.1%。

1.2.2 小鼠睾丸组织体外培养 采用旋转通气培养法体外培养小鼠睾丸组织^[6],将实验动物颈椎脱臼处死后,无菌条件下取出双侧睾丸,去除周围组织后每个睾丸切分成 4~6 块同等大小的睾丸组织块,装入含有 5 mL DMEM/F12 培养基的培养瓶内,每个培养瓶中放 8~10 个睾丸组织块,通混合气体(O₂ 450 mL/L, CO₂ 50 mL/L, N₂ 500 mL/L) 1 min,然后置于旋转装置上在恒温培养箱中培养 72 h,旋转装置转速为 30 r/min,培养温度为 34 ℃。每 24 h 换一次培养液,并通气 1 min。

1.2.3 睾丸组织细胞增殖功能分析(BrdU 掺入法) 培养结束前 3 h 在培养基中加入储存液,培养结束后,收集睾丸组织,利用免疫组化的方法显示增殖细胞,结合苏木素双重染色后,在光镜下观察细胞的增殖情况。每组切片随机选取 10 个不重复高倍镜视野(100 倍),分别计数生精细胞和支持细胞 BrdU 阳性细胞数,分别计算每组平均增殖细胞数即阳性细胞数,用于评价两组睾丸组织细胞的增殖情况。

1.2.4 睾丸组织总 RNA 的提取和质检 将培养 72 h 后的睾丸组织用去酶 PBS 漂洗,采用离心柱法提取总 RNA,用安捷伦 2100 生物分析仪质检总 RNA 样品,质控标准见表 1。

表 1 安捷伦 2100 生物分析仪 RNA 质控标准

Table 1 RNA quality control standards of Agilent 2100 Bioanalyzer

Quality control standard	2100 RIN	28S/18S
Up to standard	≥7.0	≥0.7
Partial degradation (1)	≥7.0	<0.7
Partial degradation (2)	≥6.0,<7.0	—
Degradation	<6.0	—

1.2.5 睾丸组织基因表达谱芯片的检测

1.2.5.1 芯片的选择 单标 Agilent 小鼠全基因 4×44K 芯片(design ID:014868),共有 6 个标本。

1.2.5.2 基因芯片检测步骤 采用 RNA 纯化试剂盒和 DNase 消化试剂盒纯化总 RNA, NanoDrop ND-2000 定量并经安捷伦 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性(总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处吸光度值的比值)。质检合格后,按照试剂盒说明书将总 RNA 反转录成双链 cDNA,再用荧光标记 cDNA。将标记好的 cDNA 和芯片杂交,清洗后以安捷伦微阵列扫描仪扫描原始图像,并用 Feature Extraction software 10.7 提取原始数据,最后采用 Gene Spring Software 11.0 进行全基因表达的数据分析。

1.2.5.3 基因芯片实验的质控 采用变异系数(CV)和检出率(DR)对芯片实验结果进行质控,以保证实验结果的可靠性和稳定性。

Agilent 表达谱芯片实验通常采用 CV 和 DR 两个指标进行质控,以保证实验结果的可靠性和稳定性。CV 值为标准偏差与平均值之比,用百分数表示。CV 值通过两组数据之间的比较分析来判断该体系是否稳定。在 Agilent 表达谱芯片实验中,用重复探针点(10 次重复)信号的 CV 值来计算芯片的稳定性和技术的稳定性,根据不同的芯片,这样的探针点从 10 到 100 个不等。芯片 DR 为检出点总数与全部探针数的比值。

1.2.5.4 差异基因筛选标准 根据倍数差异(fold change,FC)和显著性差异 P 值筛选差异基因。FC 即将待比较的两个标准化以后的信号相除所得的值。FC≥2(表示基因表达上调)或者 FC≤0.5(表示基因表达下调)即为差异基因;P 值设定阈值为 0.05。以对照组芯片中标准化后的信号值为横坐标,以 Gen 干预组芯片中标准化后的信号值为纵坐标,绘制散点图;以 log₂(FC)为横坐标,以 P 值的负对数 -lg(P) 为纵坐标(P 值由芯片组间 t 检验得到),绘制火山图;对比两组样品数据分布的集中趋势和差异。

1.3 统计学方法

采用 SBC Analysis System(SAS 系统)中统计学部分进行分析,组内数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gen 对睾丸组织细胞增殖的影响

对照组睾丸组织细胞增殖情况良好,生精细胞、

支持细胞均存在增殖现象;与对照组比较,Gen 组生精细胞和支持细胞增殖数量增加,其中支持细胞增殖差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1 和表 2。

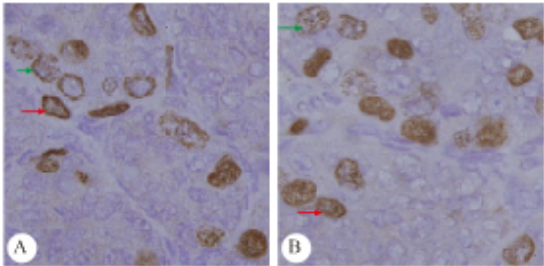


图 1 Gen 对睾丸组织细胞增殖的影响。免疫组化染色 $\times 100$
Fig 1 The effect of Gen on cell proliferation of testicular tissue. Immunohistochemical staining $\times 100$
A: Control group; B: Gen group; Green arrow: Gonocytes; Red arrow: Sertoli cell

表 2 Gen 对小鼠睾丸组织细胞增殖数的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 2 The effect of Gen on the number of cell proliferation in testicular tissue ($\bar{x}\pm s$)

Cell type	Control group	Gen group
Gonocytes	6.157 9 $\pm$ 0.802 2	6.2326 $\pm$ 2.961 3
Sertoli cells	9.531 4 $\pm$ 1.888 0	14.354 8 $\pm$ 2.637 3 $\triangle$

$\triangle P<0.05$, vs. control group

2.2 Gen 对睾丸组织全基因表达谱的影响

2.2.1 睾丸组织总 RNA 质检分析结果 6 个样本 A_{260}/A_{280} 比值均在 2.0~2.1 之间,可认为各 RNA 样品不存在污染,纯度合格;根据 Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 质控标准各样本 2100 RIN ≥ 7.0 , 28S/18S ≥ 0.7 ,可判定各样品合格。如图 2 所示,

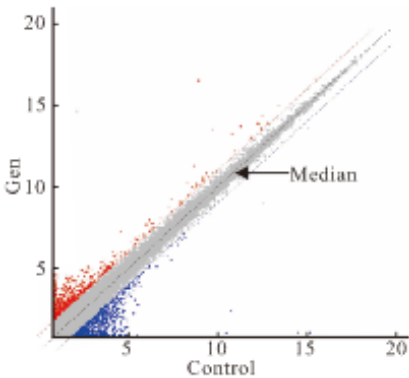


图 2 单荧光基因芯片原始数据标准化后绘制的散点图
Fig 2 Scatter plot drawn after standardizing the original data of gene chips
Median line of the graph: FC = 1; Red points: FC ≥ 2 ; Blue points: FC ≤ 0.5 . FC: Fold change

与标准梯带相比,各 RNA 样品电泳色谱图中只存在 5S、18S、28S rRNA 3 个峰,无其他杂峰,说明本研究的 RNA 质量和浓度均合格,可进行后期表达谱芯片的检测。

2.2.2 表达谱芯片质控结果 由表 3 可见,各样本 CV 值均在 5.3% 左右,样本间差异无统计学意义($P>0.05$),说明该基因表达谱芯片体系稳定性好。

表 3 各表达谱芯片的变异系数和检出率
Table 3 The CV and DR of each expression profile chip

Index	Control group			Gen group		
	1	2	3	4	5	6
CV/%	5.46	5.26	5.82	5.09	5.50	5.33
DR/%	69.19	64.91	64.97	70.20	68.40	65.95

2.2.3 差异表达基因 结果显示(图 2 和图 3), Gen 组小鼠睾丸全基因组表达谱与对照组存在明显差异,共筛选出 84 个表达差异基因($P<0.05$),其中 47 个表达上调基因,37 个表达下调基因。部分表达差异基因见表 4。

2.2.4 差异基因功能富集分析(GO 分析) 将 Gen 组差异基因进行基因功能富集分析,按 GO 分类标准进行分类,筛选出有统计学意义的 GO 分类 14 个($P<0.05$),主要涉及细胞增殖、细胞周期、内源性刺激应答、转录因子活性、免疫调节等功能。与雄性生殖相关的功能见表 5。

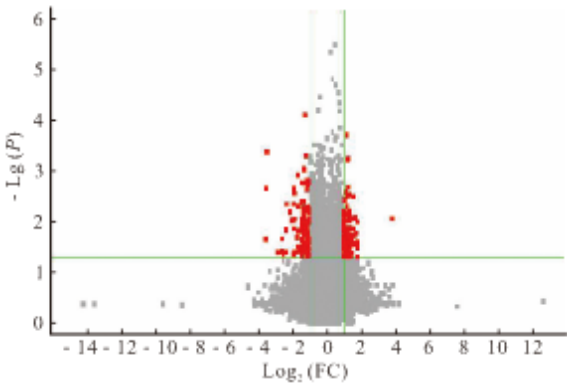


图 3 火山图
Fig 3 Volcano plot (Red points: $P<0.05$ and $FC\geq 2$)
FC: Fold change

3 讨论

睾丸发育过程是一个紧密调节的过程,包括间质细胞、支持细胞和生精细胞的增殖和分化。3~4 日龄起生精细胞开始有丝分裂,并由生精小管中心向基膜转移,支持细胞持续增殖,15 d 减慢,18 d 结

表 4 Gen 处理后小鼠睾丸组织部分表达差异基因 ($P<0.05$ 且 $FC\geq 2$ or ≤ 0.5)

Gene ID	Symbol	P	FC	Description	Down/up regulated
15368	<i>Hmox1</i>	0.008 4	14.079 3	Heme oxygenase (decycling) 1	Up
72289	<i>Malat1</i>	0.032 3	3.562 1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	Up
15382	<i>Hnrnpa1</i>	0.010 1	3.463 7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Up
26987	<i>Eif4e2</i>	0.016 6	3.297 6	Eukaryotic translation initiation factor 4E member 2	Up
219022	<i>Ttc5</i>	0.008 3	3.177 6	Tetratricopeptide repeat domain 5	Up
74637	<i>Shpk</i>	0.003 2	2.981 5	Sedoheptulokinase	Up
54139	<i>Irf6</i>	0.027 2	2.915 6	Interferon regulatory factor 6	Up
13496	<i>Arid3a</i>	0.041 6	2.788 4	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)	Up
72252	1700022A21 <i>Rik</i>	0.020 5	2.645 6	RIKEN cDNA 1700022A21 gene	Up
20899	<i>Stra8</i>	0.020 9	2.634 9	Stimulated by retinoic acid gene 8	Up
269643	<i>Ppp2r2c</i>	0.009 2	2.603 4	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR52), gamma isoform	Up
11833	<i>Aqp8</i>	0.003 0	2.585 1	Aquaporin 8	Up
56043	<i>Akr1e1</i>	0.006 1	0.389 8	Aldo-keto reductase family 1, member E1	Down
12848	<i>Cops2</i>	0.008 9	0.370 0	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 2 (Arabidopsis thaliana)	Down
12566	<i>Cdk2</i>	0.001 7	0.364 8	Cyclin-dependent kinase 2	Down
74747	<i>Ddit4</i>	0.004 2	0.357 7	DNA-damage-inducible transcript 4	Down
252864	<i>Dusp15</i>	0.0044	0.263 0	Dual specificity phosphatase-like 15	Down
330908	<i>Opcml</i>	0.009 6	0.255 8	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	Down
258293	<i>Olfra437</i>	0.040 7	0.142 0	Olfactory receptor 437	Down
667433	EG667433	0.022 1	0.084 9	Predicted gene, EG667433	Down

FC: Fold change

表 5 Gen 组部分 GO 分类小鼠睾丸表达差异基因

Gene ID	Symbol	Description and functional categories	Fold change
Reproduction			
20850	<i>Stat5a</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A	2.251 7
20899	<i>Stra8</i>	stimulated by retinoic acid gene 8	2.634 9
252868	<i>Od f4</i>	outer dense fiber of sperm tails 4	2.055 3
Cell proliferation			
12566	<i>Cdk2</i>	cyclin-dependent kinase 2	0.364 8
12848	<i>Cops2</i>	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 2 (Arabidopsis thaliana)	0.370 0
13835	<i>Epha1</i>	Eph receptor A1	2.351 9
15368	<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	14.079 3
20850	<i>Stat5a</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A	2.251 7
20852	<i>Stat6</i>	Signal transducer and activator of transcription 6	0.463 9
54139	<i>Irf6</i>	Interferon regulatory factor 6	2.915 6
74747	<i>Ddit4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	0.357 7
Cell death			
12845	<i>Comp</i>	Cartilage oligomeric matrix	2.073 4
15368	<i>Hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	14.079 3
19099	<i>Mapk8ip1</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	0.414 2
20850	<i>Stat5a</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A	2.251 7
74747	<i>Ddit4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	0.357 7

束,成年小鼠支持细胞的最终数量就取决于胚胎期到青春期的发育^[7]。同时婴幼儿期机体组织器官生长发育尚未完善,生物学屏障尚未完全建立,是外源性化合物对机体造成影响的敏感期,例如阜阳奶粉事件、三聚氰胺事件、铅中毒。因而推测该阶段是

Gen 对睾丸影响的关键阶段之一,选用 3~4 日龄这一时间点可以更容易观察到 Gen 对支持细胞等细胞的影响,从而更好的研究 Gen 对小鼠睾丸基因的影响及机制。

睾丸支持细胞对生殖细胞具有支持和营养作

用,同时还具有构成血睾屏障、形成睾丸内微环境、调节精子的发生、吞噬细胞残体、产生类固醇类物质及分泌多种相关蛋白调节生殖功能^[8]。本研究在细胞培养液中加入 Gen 后,支持细胞显著增殖,有研究报道 Gen 对大鼠支持细胞没有影响,但可改变相关蛋白 mRNA 的表达^[9]。可能是由于本研究采用睾丸组织培养,而前者采用支持细胞培养,睾丸组织各种细胞之间存在相互作用,可以影响睾丸的功能,也可能是由于所选用动物日龄和种属不同,所代表的生长阶段不同,对 Gen 的敏感性不同。

本研究通过全基因芯片检测筛选出 Gen 组和对照组共有 84 个表达差异基因,表明 Gen 可以影响大鼠睾丸组织基因表达。EUSTACHE 等^[10]研究发现大鼠从胚胎期到成年期持续低水平暴露 Gen 会使睾丸组织基因的表达发生改变,与本研究结论一致。本研究还将差异基因按 GO 分类标准进行分类,筛选出的显著性基因功能条目主要涉及生殖功能、细胞增殖和细胞凋亡等。

Stat5a、*Stra8*、*Odf4* 等基因主要与生殖功能有关。研究表明 *Stra8* 基因可促进生殖细胞启动减数分裂^[11],该基因表达异常可导致精子生成障碍;*Odf4* 基因是睾丸特异基因,在成熟精子尾部的外周致密纤维上表达^[12],其异常表达与某些肿瘤有关,如前列腺癌。此外,CHAUHAN 等^[13]研究发现 *Cdk2* 的催化活性是细胞减数分裂所必需的,也有研究表明 *Hmox1* 表达下降与精子发生障碍有关^[14]。本研究中 *Stra8*、*Odf4*、*Hmox1* 基因表达上调,*Cdk2* 表达下调,提示 Gen 可以影响生殖细胞减数分裂过程,影响精子形成。

Cdk2、*Cops2*、*Epha1*、*Hmox1*、*Stat5a*、*Stat6*、*Irf6*、*Ddit4*、*Comp*、*Mapk8ip1* 等基因与细胞增殖和凋亡有关。其中,*Epha1*、*Comp*、*Ddit4*、*Stat5a*、*Stat6* 和 *Cops2* 基因在睾丸组织中的表达均有文献报道^[15-19]。有研究发现 *Mapk8ip1* 编码的 IB1/JIP-1 在精细胞、卵母细胞和胚胎发育的各个阶段均能检测到,*Mapk8ip1* 基因敲除可导致小鼠囊胚着床前死亡^[20];也有文献报道 SIP 可使 *Hmox1* 基因表达升高,激活 Nrf2,从而减轻环磷酸胺诱导的睾丸损伤^[21]。本研究中 *Epha1*、*Hmox1*、*Stat5a* 表达上调,*Cops2*、*Stat6*、*Ddit4*、*Mapk8ip1* 表达下调,这些基因均可在睾丸组织或者精子中检测到,据此推测与睾丸发育和生殖功能有关。但 *Irf6* 基因的研究多集中于唇腭裂和腭翼状颌肉综合征^[22],在睾丸组织中的表达及意义尚未见报道,具有重要研究价

值。

Gen 可以调节睾丸组织中与生殖发育、细胞增殖和凋亡等有关的基因的表达。其中,Gen 可能通过调节 *Stra8*、*Odf4*、*Cdk2* 和 *Hmox1* 等基因的表达,调节生精细胞的减数分裂和精子的形成,从而影响睾丸的功能,这些基因可能是 Gen 主要作用靶点,有望成为评价生殖内分泌干扰物的生物标志物。

参 考 文 献

- [1] SETCHELL KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68 (6 Suppl): 1333S-1346S.
- [2] CEDERROTH CR, AUGER J, ZIMMERMANN C, *et al*. Soy, phyto-oestrogens and male reproductive function: a review. *Int J Androl*, 2010, 33(2): 304-316.
- [3] 曲绍娟, 印德娇, 刘运夏, 等. 大豆异黄酮调节小鼠睾丸类固醇生成酶和蛋白表达的机制研究. *现代预防医学*, 2016, 43 (2): 317-320.
- [4] 代晓曼, 郭小虎, 安秀峰, 等. 大豆异黄酮对不同时序子代雄性大鼠生殖性状及 ER- β 受体表达的影响. *中华男科学杂志*, 2012, 18(10): 915-919.
- [5] BALL ER, CANIGLIA MK, WILCOX JL, *et al*. Effects of genistein in the maternal diet on reproductive development and spatial learning in male rats. *Horm Behav*, 2010, 57(3): 313-322.
- [6] 刘 艺, 朱彦锋, 高志斌, 等. 旋转通气培养法建立小鼠睾丸体外培养模型. *南方医科大学学报*, 2015, 35(1): 66-71.
- [7] MCGUINNESS MP, ORTH JM. Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats *in vivo* and *in vitro*. *Anatomical Record*, 1992, 233(4): 527-537.
- [8] 韩姐丽, 邢 新, 王晓云. 睾丸支持细胞与间质细胞的相互作用. *医学综述*, 2008, 14(17): 2567-2570.
- [9] 印德娇, 朱彦锋, 刘林夕, 等. 大豆异黄酮对大鼠睾丸支持细胞的影响. *中南大学学报(医学版)*, 2014, 39(6): 598-604.
- [10] EUSTACHE F. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(8): 1272-1279.
- [11] 郭晓强, 蔡志明. 视黄酸激活基因 *Stra8* 对生殖细胞减数分裂起始的调节作用. *生命的化学*, 2009(2): 275-278.
- [12] GHAFOURI-FARD S, GHAFOURI-FARD S, MODARRESSI MH. Expression of splice variants of cancer-testis genes ODF3 and ODF4 in the testis of a prostate cancer patient. *Genet Mol Res*, 2012, 11(4): 3642-3648.
- [13] CHAUHAN S, DIRIL MK, LEE JH, *et al*. *Cdk2* catalytic activity is essential for meiotic cell division *in vivo*. *Biochem J*, 2016, 473(18): 2783-2798.
- [14] 池 艳, 毛向明, 张欣宗, 等. 无精子症和生精功能正常者睾丸组织中血红素加氧酶的表达与差异性研究. *中华男科学杂志*, 2011(8): 712-716.

(下转第 731 页)

- Metab, 2013,98(5):2153-2159.
- [7] KRIEGER CC, PLACE RF, BEVILACQUA C, *et al.* Thyrotropin/IGF-1 receptor crosstalk in Graves' ophthalmopathy pathogenesis. J Clin Endocrinol Metab, 2016,101(6):2340-2347.
- [8] TSUI S, NAIK V, HOA N, *et al.* Evidence for an association between thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor 1 receptors: a tale of two antigens implicated in Graves' disease. J Immunol, 2008, 181(6): 4397-4405.
- [9] ZHANG L, GRENNAN-JONES F, LANE C, *et al.* Adipose tissue depot-specific differences in the regulation of hyaluronan production of relevance to Graves' orbitopathy. J Clin Endocrinol Metab, 2012,97(2):653-662.
- [10] 何为民, 罗清礼, 曾继红. 地塞米松对甲状腺相关眼病眼眶成纤维细胞 ICAM-1 表达的影响. 四川大学学报(医学版), 2007,38(1):113-115.
- [11] SMITH TJ, HEGEDÜS L, DOUGLAS RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012,26(3):291-302.
- [12] PRITCHARD J, HAN R, HORST N, *et al.* Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. J Immunol, 2003,170(12):6348-6354.
- [13] KRIEGER CC, NEUMANN S, PLACE RF, *et al.* Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobulins. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(3): 1071-1077.
- [14] DRIESSEN GJ, IJSPEERT H, WENTINK M, *et al.* Increased PI3K/Akt activity and deregulated humoral immune response in human PTEN deficiency. J Allergy Clin Immunol, 2016,138(6):1744-1747.
- [15] LI B, SMITH TJ. PI3K/AKT pathway mediates induction of IL-1RA by TSH in fibrocytes: modulation by PTEN. J Clin Endocrinol Metab, 2014,99(9):3363-3372.
- [16] GHATAK S, MISRA S, NORRIS RA, *et al.* Periostin induces intracellular cross-talk between kinases and hyaluronan in atrioventricular valvulogenesis. J Biol Chem, 2014,289(12):8545-8561.
- [17] KUMAR S, IYER S, BAUER H, *et al.* A stimulatory thyrotropin receptor antibody enhances hyaluronic acid synthesis in graves' orbital fibroblasts: inhibition by an IGF-I receptor blocking antibody. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(5):1681-1687.

(2017-03-14 收稿, 2017-07-13 修回)

编辑 沈 进

(上接第 709 页)

- [15] HAFNER C, SCHMITZ G, MEYER S, *et al.* Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. Clin Chem, 2004,50(3):490-499.
- [16] KIPNES JR, XU L, HAN F, *et al.* Molecular cloning and expression patterns of mouse cartilage oligomeric matrix protein gene. Osteoarthritis Cartilage, 2000,8(3):236-239.
- [17] LACHANCE C, LECLERC P. Mediators of the Jak/STAT signaling pathway in human spermatozoa. Biol Reprod, 2011, 85(85):1222-1231.
- [18] LEELATANAWIT R, UAWISETWATHANA U, KLINBUNGA S, *et al.* A cDNA microarray, UniShrimpChip, for identification of genes relevant to testicular development in the black tiger shrimp (Penaeus monodon). BMC Mol Biol, 2010,2(15):1-16.
- [19] NOTINI AJ, MCCLIVE PJ, MEACHEM SJ, *et al.* Redd1 is a novel marker of testis development but is not required for normal male reproduction. Sex Dev, 2012,6(5):223-230.
- [20] VAISHNAV M, MACFARLANE M, DICKENS M. Disassembly of the JIP1/JNK molecular scaffold by caspase-3-mediated cleavage of JIP1 during apoptosis. Exp Cell Res, 2011,317(7):1028-1039.
- [21] LE X, LUO P, GU Y, *et al.* Squid ink polysaccharide reduces cyclophosphamide-induced testicular damage via Nrf2/ARE activation pathway in mice. Iran J Basic Med Sci, 2015,18(8):827-831.
- [22] VIEIRA AR, COOPER ME, MARAZITA ML, *et al.* Interferon regulatory factor 6 (IRF6), is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. Am J Med Genet A, 2007,143A(17):2075-2078.

(2016-12-27 收稿, 2017-03-21 修回)

编辑 汤 洁