

菟丝子黄酮对雷公藤多苷片致生精细胞周期阻滞、凋亡及相关蛋白表达降低的影响

任献青, 郑贵珍, 苏杭, 张霞, 翟文生, 唐进法, 李伟霞, 丁樱*

河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 研究菟丝子黄酮对雷公藤多苷片致大鼠睾丸生精细胞周期阻滞、凋亡及相关蛋白表达降低的影响。方法 SD 雄性大鼠随机分为 5 组: 对照组, 雷公藤多苷片高、低剂量 (12、9 mg/kg) 组, 雷公藤多苷片高、低剂量 (12、9 mg/kg) + 菟丝子黄酮 (生药 100 mg/kg) 组, 每组 6 只。每天 ig 给药 1 次, 连续给药 7 d, 对照组大鼠 ig 给予等体积 0.5% CMC-Na 溶液; 腹主动脉采血, 制备含药血清。通过体外培养大鼠睾丸生精细胞, 给予含药血清干预 24 h, 采用流式细胞仪检测生精细胞周期及凋亡率; 采用 Western blotting 技术检测生精细胞中 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达。结果 与对照组比较, 雷公藤多苷片高剂量组使 G₀/G₁ 期生精细胞百分率显著降低、S 期细胞百分率显著升高 ($P < 0.01$), 低、高剂量组均可显著升高生精细胞凋亡率 ($P < 0.01$); 与等剂量雷公藤多苷片单给药组比较, 配伍菟丝子黄酮后, 显著降低 S 期细胞百分率、生精细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。雷公藤多苷片低、高剂量组均使生精细胞中 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 配伍菟丝子黄酮后显著增加蛋白表达量 ($P < 0.01$)。结论 通过合理配伍菟丝子黄酮可显著改善雷公藤多苷片对生精细胞的损伤作用。

关键词: 雷公藤多苷片; 菟丝子黄酮; 配伍; 生精细胞; 细胞周期; 细胞凋亡; 蛋白表达

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0055-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.009

Influence of flavonoids from *Cuscutae Semen* on cell cycle arrest, apoptosis and protein expression of spermatogenic cells induced by multi-glycoside from *Tripterygium Wilfordii*

REN Xianqing, ZHENG Guizhen, SU Hang, ZHANG Xia, ZHAI Wensheng, TANG Jinfa, LI Weixia, DING Ying

The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the influence and action mechanism of flavonoids from *Cuscutae Semen* (FCS) on the cell cycle, apoptosis and protein expression of spermatogenic cells induced by multi-glycoside from *Tripterygium Wilfordii* (GTW). **Methods** Male SD rats were randomly divided into five groups: control group, GTW high and low dose (12 and 9 mg/kg) group, high and low dose (12, 9 mg/kg) of GTW + FCS (drug 100 mg/kg) group, 6 rats in each group. Drugs was given once a day for 7 d, and control group was given an equal volume of 0.5% CMC-Na solution. The blood was collected from the abdominal aorta in rats of all the groups, and the serum containing the medicine was prepared. Spermatogenic cells of rats were cultured *in vitro*. The influence of serum of GTW and GTW + FCS on cell cycle and apoptosis of spermatogenic cells were detected by flow cytometry; and the protein expression of SCF/c-kit, C-myc and CREW in spermatogenic cells induced by serum of GTW and GTW + FCS were detected by western blotting method. **Results** The percentage of spermatogenic cells in G₀/G₁ phases could be obviously decreased by GTW (12 mg/kg), the percentage of spermatogenic cells in S phase could be obviously increased by GTW (12 mg/kg), and apoptotic rate of spermatogenic cells could be significantly increased by GTW (12 mg/kg and 9 mg/kg, $P < 0.01$). After compatibility with FCS, the inhibitory effect of cell cycle and apoptosis of spermatogenic cells in GTW group could be significantly improved ($P < 0.01$). The protein expression of SCF/c-kit, C-myc and CREM could be significantly decreased by GTW 12 and 9 mg/kg ($P < 0.01$). After compatibility

收稿日期: 2017-08-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273802); 河南省科技攻关计划项目 (132102310245)

第一作者: 任献青, 河南中医药大学第一附属医院 E-mail: 276816164@qq.com

*通信作者: 丁樱, 河南中医药大学第一附属医院 Tel: (0371)66233562 E-mail: ydsys507@126.com

with FCS, the inhibitory effect of protein expression amount of spermatogenic cells in GTW group could be significantly improved ($P < 0.01$). **Conclusion** It indicated that when GTW and its related preparations were used in clinic, the related damage of spermatogenic cells induced by GTW and its related preparations could be improved by reasonable compatibility with FCS.

Key words: multi-glycoside from *Tripterygium Wilfordii*; flavonoids from *Cuscutae Semen*; compatibility; spermatogenic cell; cell cycle; cell apoptosis; protein expression

雷公藤多苷片作为雷公藤提取物制剂, 广泛用于临床, 主要治疗类风湿性关节炎、原发性肾小球肾病、肾病综合征、紫癜性及狼疮性肾炎、红斑狼疮、亚急性及慢性重症肝炎、慢性活动性肝炎等各种免疫相关性疾病^[1]。但其不良反应的发生制约了临床应用, 贾春伶^[2]收集并统计分析 CNKI 中 1994~2004 年有关雷公藤不良反应的文献报道发现, 雷公藤的生殖系统损害率占 6.15%, 提示其生殖系统损害是不容忽视的问题。因此, 探索雷公藤多苷片的生殖系统损害及其机制、如何通过药物配伍降低乃至消除其生殖系统的不良反应成为近年来研究的热点, 其研究也将对临床更安全、合理、有效的使用雷公藤制剂及开发新制剂具有重要指导和科学意义。

前期研究发现, 补肾中药尤其是菟丝子黄酮具有明显干预雷公藤所致生殖系统损害的作用^[3-5], 但相关研究多集中在生殖激素水平, 生殖细胞的形态、数量、凋亡, 生殖器官(睾丸、附睾)的形态等方面, 从蛋白、基因层面探讨其作用机制的研究鲜见报道。研究表明, SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 3 个蛋白对生精细胞的增殖及凋亡起着重要调节作用^[6-9]。本研究采用流式细胞术和蛋白免疫印迹法(Western blotting)观察菟丝子黄酮干预雷公藤多苷片对幼鼠生精细胞周期、凋亡和相关调控蛋白表达的影响, 阐释雷公藤和菟丝子配伍的合理性, 揭示其配伍减毒增效机制, 并为更合理的使用雷公藤制剂和开发新制剂提供参考。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

雷公藤多苷片, 购于河南中医药大学第一附属医院春秋大药房, 每片 10 mg, 产于江苏美通药业有限公司, 批号 130925, 研磨成粉, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制质量浓度 1.8 mg/mL 的雷公藤多苷片的混悬溶液。菟丝子黄酮, 购于陕西昂威生物医药科技有限公司, 粉剂, 黄酮质量分数 10%, 批号 ZL20130815, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制质量浓度 0.02 g/mL (生药浓度) 的溶液(溶液

中芦丁、槲皮素、山奈酚的质量浓度分别为 0.182、0.164、0.155 mg/mL)。

羧甲基纤维素钠(市购); DMEM/F12 培养液(批号 SH30023, 郑州市宝信有限公司); 胎牛血清(批号 120914, 杭州四季青生物工程材料有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, 批号 302A031)、3-(4, 5-二甲基噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑溴化物(MTT, 批号 BY12054), 均购于美国 sigma 公司; 凯基细胞周期检测试剂盒、凯基 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒, 均购于南京凯基有限公司; SCF (H-189) 抗体(批号 sc-9132)、CREM (X-12) 抗体(批号 sc-440)、C-Myc(9E10) 抗体(批号 sc-40), 均购于 Santa Cruz。

1.2 动物

清洁级 3 周龄 SD 雄性大鼠 30 只, 体质量 (50±10) g; 4 周龄 SD 雄性大鼠 5 只, 体质量 100 g 左右, 购于河南省实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2010-0002。

1.3 主要仪器

BCM-1000A 型生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司); 制冰机(日本三洋公司); 恒流稳压电泳仪(北京六一实验仪器厂); X 射线摄影暗盒(广东粤华医疗器械有限公司); 封膜机(温州市江南包装机械厂)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

30 只 3 周龄大鼠随机分为 5 组: 对照组, 雷公藤多苷片高、低剂量(12、9 mg/kg) 组, 高、低剂量(12、9 mg/kg) 雷公藤多苷片+菟丝子黄酮(生药 100 mg/kg) 组, 每组 6 只。每天 ig 给药 1 次, 连续给药 7 d, 对照组大鼠 ig 给予等体积 0.5% CMC-Na 溶液。其中, 配伍给药组先 ig 雷公藤多苷片, 间隔 1 h 再 ig 菟丝子黄酮。

雷公藤多苷片临床推荐剂量为 1.0、1.5 mg/kg, 临床常用剂量为 1.5 mg/kg, 以 1.5 mg/kg 计算大鼠等效剂量为 9 mg/kg。结合预实验和相关文献^[3-5]发

现,雷公藤多苷片的抗生育剂量为 10 mg/kg,故设立 12 mg 组。临床成人常用菟丝子剂量为 9~12 g/d,以 9 g/d 计算大鼠等效剂量为 0.94 g/kg,此为生药剂量,因菟丝子黄酮的质量分数为 10%,为方便 ig 给药,设置剂量 100 mg/kg (以黄酮计)。

5 组大鼠均于最后一天 ig 给药后 2 h, ip 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,3 000 r/min 离心 10 min, 60 °C 水浴灭菌 30 min, 过滤除菌(滤膜孔径为 0.22 μm), 分装, 供细胞培养使用。

2.2 大鼠睾丸生精细胞分离和培养^[10]

取 4 周龄 SD 大鼠 6 只, 颈椎脱臼处死; 取出双侧睾丸, 剥去睾丸表面的白膜及脂肪垫; 撕散睾丸组织, 使精曲小管充分散开; 加入 10 mL 的 IV 型胶原酶(浓度为 1 mg/mL), 置于 37 °C 恒温水浴箱中消化 15 min (期间不断混匀); 加入 3 mL 的 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶, 置于 37 °C 孵育箱中消化 5 min; 经 45 μm (约 340 目) 滤网过滤; 离心, 弃上清。加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 的培养液重悬细胞, 分置于 25、75 cm² 的培养瓶中。置于显微镜下观察, 可见大量圆形、卵圆形细胞, 置于 33 °C 培养箱中培养。

2.3 细胞周期检测

含药血清干预细胞 24 h 后, 取 5 组 75 cm² 培养瓶, 弃去培养液, 用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶 4 mL, 37 °C 消化 3 min, 收集细胞; 将细胞调整为 1×10⁶/mL, 取 1 mL 单细胞悬液, 离心, 弃上清, 加入 70% 冷乙醇 500 μL 固定细胞, 4 °C 保存过夜; 次日, 用 PBS 液洗去固定液, 加入 100 μL RNase, 在 37 °C 水浴箱中水浴 30 min; 加入 400 μL PI 试剂染色, 充分混匀, 于 4 °C 冰箱中避光反应 30 min; 上机检测, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

2.4 细胞凋亡检测

含药血清干预 24 h 后, 取 5 组 75 cm² 培养瓶, 弃去培养液, 用不含 EDTA 的胰蛋白酶 4 mL, 37 °C 消化 3 min, 收集细胞, 将细胞调整为 5×10⁵/mL; 加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL PI, 混匀; 室温、避光、反应 5~15 min; 上流式细胞仪检测, 激发波长 Ex 488 nm; 发射波长 Em 530 nm。

2.5 SCF/c-kit、C-myc、CREM 表达检测

收集含药血清干预 24 h 后的各瓶生精细胞, 加 100 μL 细胞裂解液(含 1 μL PMSF 溶液), 冰上放置 30 min, 期间可震荡数次使裂解充分。裂解完成

后, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中, BCA 蛋白定量检测每组蛋白浓度。准确测量上清体积, 将蛋白样品调整浓度至 9 μg/μL, 加入 5×SDS 蛋白上样缓冲液, 混合均匀, 放入 100 °C 沸水中煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 3 min。

将蛋白样品 10 μL (蛋白量 90 μg) 经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭, 加适量稀释后的一抗(SCF/c-kit、CREM、C-myc 蛋白)(1:1 000, PBST 稀释)密封, 4 °C 过夜, 加适量稀释后的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000, PBST 稀释)室温孵育 2 h。洗膜后显色, 凝胶成像分析系统扫描分析。

2.6 统计方法

数据采用 SPSS 18.0 统计软件分析处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 与对照组比较采用 ANOVA 中的 Dunnett 法、两组间的比较采用 ANOVA 中的 Tukey 法进行统计分析。

3 结果

3.1 对生精细胞周期的影响

如图 1、表 1 所示, 与对照组比较, 雷公藤多苷片高、低剂量组均可使 G₀/G₁、G₂/M 期的生精细胞百分率降低、S 期百分率升高, 其中高剂量组对 G₀/G₁ 期百分率的降低、S 期百分率的升高作用具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与雷公藤多苷片 12 mg/kg 剂量组比较, 雷公藤多苷片 12 mg/kg + 菟丝子黄酮升高 G₀/G₁、G₂/M 期生精细胞百分率, 但均无统计学意义, 降低 S 期生精细胞百分率, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3.2 对生精细胞凋亡的影响

与对照组比较, 雷公藤多苷片低、高剂量组均可使生精细胞凋亡率显著升高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与等剂量雷公藤多苷片单给药组比较, 配伍菟丝子黄酮显著降低生精细胞凋亡率, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见图 1 和表 1。

3.3 对生精细胞 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达的影响

与对照组比较, 雷公藤多苷片低、高剂量组均显著降低大鼠生精细胞中 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。与等剂量雷公藤多苷片单给药组比较, 雷公藤多苷片低、高剂量+菟丝子黄酮显著升高 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见表 2 和图 2。

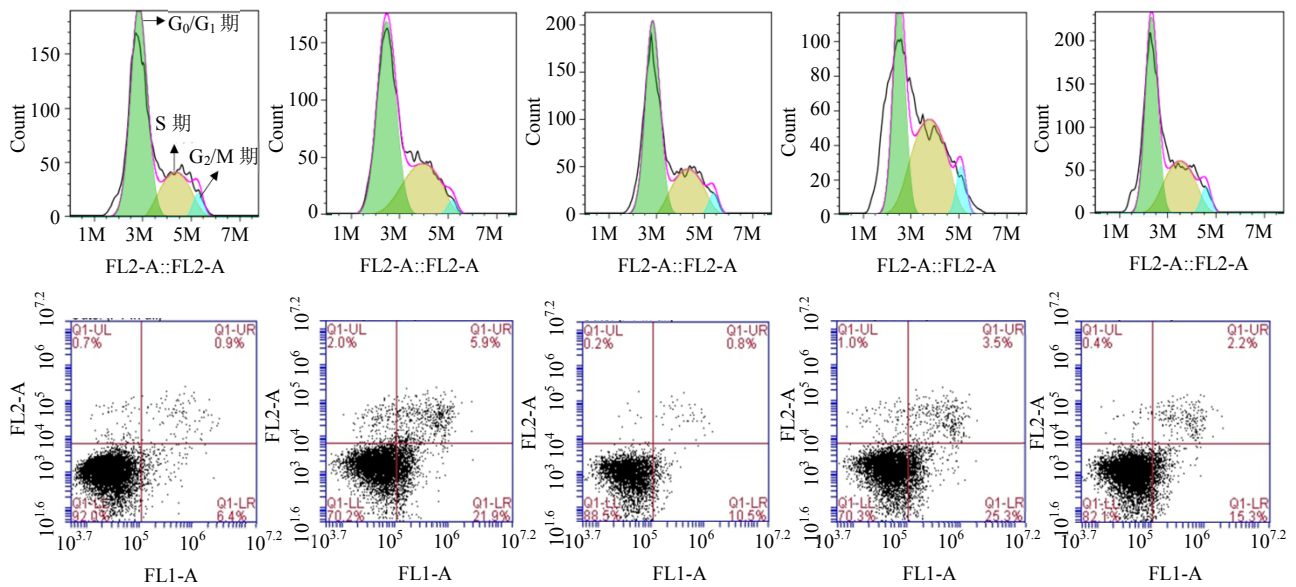


图 1 菟丝子黄酮对雷公藤多苷片所致生精细胞周期和凋亡的影响

Fig. 1 Influence about the FCS on cell cycle and apoptosis of spermatogenic cells induced by GTW

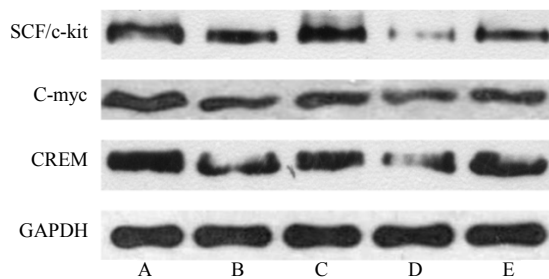
表 1 菟丝子黄酮对雷公藤多苷片所致生精细胞周期和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Influence about FCS on cell cycle and apoptosis of spermatogenic cells induced by GTW ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	G ₀ /G ₁ /%	S 期/%	G ₂ /M 期/%	凋亡率/%
对照	—	52.26±7.17	28.67±4.81	17.72±7.62	4.58±2.10
雷公藤多苷片	9	40.97±6.41	35.45±3.94	11.26±5.62	16.83±2.74*
	12	33.65±9.12*	44.02±6.04*	11.44±5.07	29.80±8.89*
雷公藤多苷片+菟丝子黄酮	9 + 100	49.69±8.55	28.65±5.23	14.33±4.26	6.25±1.67 [#]
	12 + 100	45.71±11.14	30.35±5.95 ^{##}	16.32±7.64	7.13±3.99 ^{##}

与对照组比较: *P<0.01; 与等剂量雷公藤多苷片组比较: [#]P<0.01

*P<0.01 vs control group; [#]P<0.01 vs GTW at the sme dose



A: 对照组; B: 雷公藤多苷片 9 mg/kg; C: 雷公藤多苷片 9 mg/kg + 菟丝子黄酮 100 mg/kg; D: 雷公藤多苷片 12 mg/kg; E: 雷公藤多苷片 12 mg/kg + 菟丝子黄酮 100 mg/kg。

A: control group; B: GTW 9 mg/kg; C: GTW 9 mg/kg + FCS 100 mg/kg; D: GTW 12 mg/kg; E: GTW 12 mg/kg + FCS 100 mg/kg.

图 2 菟丝子黄酮对雷公藤多苷片致生精细胞 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of FCS on the protein expression of SCF/c-kit, C-myc and CREM in spermatogenic cells induced by GTW

4 讨论

细胞周期是一个有序进行的过程, 细胞经过 G₁-S-G₂-M 各期而完成其增殖。当细胞在生命活动过程中出现无法修复的严重 DNA 损伤时, 细胞周期被不可逆的阻滞, 细胞即走向凋亡^[11]。菟丝子黄酮干预雷公藤多苷片致大鼠生精细胞周期的实验结果表明, 雷公藤多苷片 9 和 12 mg/kg 剂量组均可一定程度抑制大鼠生精细胞的分裂, 其中 12 mg/kg 剂量组抑制作用更明显。雷公藤多苷片配伍菟丝子黄酮在一定程度上改善雷公藤多苷片对生精细胞周期的抑制作用。

细胞凋亡又称程序性死亡, 正常情况下, 生精细胞的凋亡, 控制了精子细胞的数目。然而过度凋亡造成生精细胞数量减少, 许多生殖疾病都与生精细胞的凋亡变化有关^[12]。本实验结果表明, 雷公藤

表 2 菟丝子黄酮对雷公藤多苷片致生精细胞 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
 Table 2 Influence of FCS on protein expression of SCF/c-kit, C-myc and CREM in spermatogenic cells induced by GTW ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SCF/c-kit/GAPDH	C-myc/GAPDH	CREM/GAPDH
对照	—	1.00±0.06	0.99±0.81	0.98±0.10
雷公藤多苷片	9	0.40±0.09*	0.61±0.13*	0.39±0.13*
	12	0.14±0.06*	0.16±0.82*	0.09±0.09*
雷公藤多苷片+菟丝子黄酮	9 + 100	0.89±0.17 [#]	1.00±0.55 [#]	0.80±0.10 [#]
	12 + 100	0.67±0.16 [#]	0.69±0.10 [#]	0.54±0.10 [#]

与对照组比较: **P*<0.01; 与等剂量雷公藤多苷片组比较: [#]*P*<0.01
[#]*P*<0.01 vs control group; [#]*P*<0.01 vs GTW at the sme dose

多苷 9、12 mg/kg 剂量组均可显著增加生精细胞的凋亡率, 其中 12 mg/kg 剂量组促进生精细胞凋亡的作用更强; 雷公藤多苷片配伍菟丝子黄酮后, 则可显著改善雷公藤多苷片对生精细胞的促凋亡作用, 与文献结果相一致^[13]。

SCF/c-kit 蛋白对生殖细胞增殖、分化、减数分裂和细胞凋亡均有重要的调控作用^[14]。C-myc 是一个与细胞增殖、分化、转化和凋亡均相关的调节因子, 可使雄性大鼠睾丸的生精过程停滞于初级精母细胞的减数分裂阶段, 且使不育大鼠初级精母细胞的 DNA 凋亡片段增加^[15-16]。CREM 是 cAMP 信号途径中的一个主要成分, CREM 在体内广泛表达, 但在睾丸组织的表达比其他任何组织高 100 倍, 且在精子发生过程中特别是减数分裂后期发挥至关重要的作用^[17-18]。本实验结果表明, 雷公藤多苷片 9、12 mg/kg 剂量组均可使生精细胞中 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达显著降低, 其中雷公藤多苷片 12 mg/kg 剂量使其降低的更为显著; 但与菟丝子黄酮配伍后, 可使降低的蛋白表达均显著升高, 且雷公藤多苷片 9 mg/kg 剂量组配伍菟丝子黄酮后可使生精细胞中 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达趋近于对照组。

雷公藤多苷片抑制生精细胞周期分裂, 增加生精细胞的凋亡率, 降低生精细胞中 SCF/c-kit、C-myc 和 CREM 蛋白表达; 但配伍菟丝子黄酮后, 可改善雷公藤多苷片对生精细胞周期、凋亡和相关蛋白的损伤作用, 说明菟丝子黄酮主要通过通过对生精细胞周期、凋亡和相关蛋白的调节作用来干预雷公藤多苷片造成的生精细胞损伤。提示, 临床上可通过配伍菟丝子黄酮来改善雷公藤及其相关制剂造成的生殖系统损害, 为临床更合理、安全、有效使用雷公藤及相关制剂提供实验支撑。

参考文献

- [1] 赵小梅, 刘歆颖, 续 畅, 等. 基于 LC-MS 代谢组学的雷公藤多苷致肝毒性生物标志物的初步筛查 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(19): 3851-3858.
- [2] 贾春伶. 雷公藤不良反应的文献调查与分析 [J]. 北京中医, 2006, 25(1): 45-48.
- [3] 景晓平, 何 丽. 菟丝子黄酮对雷公藤多苷所致生殖损伤的雄性幼鼠睾丸组织中表皮生长因子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1884-1886.
- [4] 景晓平, 崔瑞琴, 程伟伟, 等. 菟丝子黄酮干预雷公藤多苷所致雄性幼鼠生殖损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 113-117.
- [5] 李振彬, 王志强, 宫彩霞. 雷公藤及其制剂的生殖损伤及中医药防治研究现状 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1067-1070.
- [6] 刘光伟, 龚守良. SCF/c-kit 系统对生精细胞发育的调控作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2002, 28(5): 561-563.
- [7] Chandran U, Indu S, Kumar A T R, et al. Expression of Cnnm1 and Its Association with stemness, cell cycle, and differentiation in spermatogenic cells in mouse testis [J]. Biol Reprod, 2016, 95(1): 7.
- [8] 王随心, 张玉华, 李向阳, 等. 生精细胞凋亡相关基因 [J]. 生命的化学, 2011, 31(3): 389-394.
- [9] 俞建军. 精索静脉曲张大鼠睾丸 HSP60、CREM 表达的改变及与生精功能损害的相关性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [10] 张晓丽, 高英茂, 赵舒武, 等. 新生小鼠精原细胞分离和纯化的实验研究 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2005, 43(8): 674-677.
- [11] 张 丽, 高 兰, 颜晓静, 等. 不同方法炮制甘遂对 LO2 细胞周期与凋亡的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 825-830.
- [12] Shaha C. Modulators of spermatogenic cell survival [J]. Soc Reprod Fertil Suppl, 2006, 63(Suppl): 173-186.

- [13] 刘立新, 张羽男, 张楠楠, 等. 雷公藤多苷致体外幼鼠睾丸生精细胞凋亡的初步研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2010, 33(4): 8-9.
- [14] Rossi P, Sette C, Dolci S, et al. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis [J]. *J Endocrinol Invest*, 2000, 23(9): 609-615.
- [15] Hirabayashi M, Kodaira K, Takahashi R I, et al. Transgene expression in mammary glands of newborn rats [J]. *Mol Reprod Dev*, 1996, 43(2): 145-149.
- [16] Kuchino Y, Asai A, Kitanaka C. Myc-mediated apoptosis [J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 1996, 16: 104-129.
- [17] Krausz C, Sassone-Corsi P. Genetic control of spermiogenesis: insights from the CREM gene and implications for human infertility [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(1): 64-71.
- [18] Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2176-2178.