

# 去精索上神经(SSN)和精索下神经(ISN)对大鼠睾丸发育和精子发生的影响

霍书英<sup>1\*</sup>, 马爱进<sup>2</sup>, 武现军<sup>1</sup>, 李玉荣<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; 2. 中国标准化研究院, 北京 100088)

**摘要:** 本试验旨在研究睾丸神经是否参与调控睾丸的发育和精子的发生过程。大鼠出生后 10 d (Postnatal day 10, PD10) 切断睾丸精索上神经(Superior spermatic nerve, SSN)和精索下神经(Inferior spermatic nerve, ISN), 然后分别在 PD25 和 PD50 时取样分析。结果显示: 睾丸去神经不影响 PD25 时睾丸质量和睾丸大小( $P < 0.05$ ), 但使 PD50 时的睾丸质量和睾丸尺寸极显著减小, 附睾尾精子数极显著降低( $P < 0.01$ )。增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)免疫组织化学染色显示睾丸去神经不影响 PD25 时生殖细胞的增殖, 但却影响 PD50 时生殖细胞的增殖。另外 RT-PCR 结果显示睾丸去神经明显降低 PD25 时睾丸  $3\beta$ -羟胆固醇脱氢酶 1( $3\beta$ -hydroxy sterol dehydrogenase 1,  $3\beta$ -HSD1)mRNA 的表达( $P < 0.05$ ), 并明显抑制 PD50 时  $3\beta$ -HSD1 和雄激素结合蛋白(Androgen binding protein, ABP)mRNA 表达( $P < 0.01$ )以及黄体生成素受体(Luteinizing hormone receptor, LHR)和卵泡刺激素受体(Follicle stimulating hormone receptor, FSHR)mRNA 表达( $P < 0.05$ )。结果表明, 支配睾丸的神经 SSN 和 ISN 主要影响睾丸下降后以及青春期睾丸曲细精管的发育和精子的发生。

**关键词:** 睾丸去神经; 细胞增殖; 曲细精管发育; 精子发生

中图分类号: R697.22

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)02-0260-07

## Effects of Denervation of SSN and ISN on Testicular Development and Spermatogenesis in Rat

HUO Shu-ying<sup>1\*</sup>, MA Ai-jin<sup>2</sup>, WU Xian-jun<sup>1</sup>, LI Yu-rong<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China; 2. China National Institute of Standardization, Beijing 100088, China)

**Abstract:** The experiment was conducted to reveal whether the superior spermatic nerve (SSN) and the inferior spermatic nerve (ISN) were involved in regulating testicular development and spermatogenesis. The present study was thus designed to transect the SSN and ISN of rats on PD10 and then analyzed changes on PD25 and PD50. The results demonstrated that testicular denervation have no obvious influence to testis mass on PD25 ( $P < 0.05$ ), but significantly reduced testis mass, cauda epididymal sperm counts on PD50 ( $P < 0.01$ ). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry staining proved that the denervation had no influence on the proliferation of germ cells on PD25, but obviously inhibited the proliferation on PD50. In addition, RT-PCR results showed that testis denervation significantly decreased testis  $3\beta$ -hydroxy sterol dehydrogenase 1 ( $3\beta$ -HSD1) on PD25 ( $P < 0.05$ ) and significantly decreased testis  $3\beta$ -HSD1 and androgen binding protein (ABP) mRNA levels ( $P < 0.01$ ), luteinizing hormone receptor (LHR) and follicle stimulating hormone receptor (FSHR) mRNA levels on PD50 ( $P < 0.05$ ). These results suggest that the testicular nerve supply plays an important role in supporting semi-

收稿日期: 2010-07-07

作者简介: 霍书英(1974-), 女, 河北灵寿人, 讲师, 博士, 主要从事动物生理学教学和神经内分泌研究

\* 通讯作者: 霍书英, Tel: 0312-7528344, E-mail: huoshuying@163.com

niferous tubule development and spermatogenesis after testis descend to scrotum.

**Key words:** testicular denervation; cell proliferation; seminiferous tubule development; spermatogenesis

内分泌调节早已被公认为睾丸功能的主要调节机制。但研究发现存在于睾丸被膜、间质及血管系统中丰富的神经纤维对睾丸活动也具有非常重要的生理调节功能。支配睾丸的精索上神经(Superior spermatic nerve, SSN)起源于肠系膜和肾丛沿睾丸动脉进入睾丸;而精索下神经(Inferior spermatic nerve, ISN)起源于盆神经丛和肠系膜下神经丛通过睾丸后悬韧带进入睾丸下极<sup>[1-2]</sup>。

研究发现切断睾丸双侧 SSN,不仅大鼠在应急状态时睾酮分泌增加受到抑制,而且还伴随睾丸 LH 受体数目的下降<sup>[3-5]</sup>。电刺激 SSN 血液睾酮浓度增加而且精索静脉去甲肾上腺素输出也增加<sup>[6]</sup>,而电刺激 ISN 对睾酮分泌和睾丸血流没有明显的影响<sup>[6]</sup>,切除 ISN 也不会影响精子的发生<sup>[7]</sup>。若双切睾丸的 SSN 和 ISN 不仅导致生殖细胞和间质细胞凋亡而且使血清睾酮浓度降低、LH 水平升高<sup>[8-9]</sup>。可见精索神经对睾丸生理功能具有很重要的调控作用,但大多数研究的是精索神经对成年期睾丸功能的影响,至于出生后在睾丸发育过程中 SSN 和 ISN 发挥怎样的调控作用国内外文献报道的很少。

睾丸间质细胞和支持细胞的分化增殖发生在出生后 15 d 左右,睾丸下降发生在 25 d 左右<sup>[10-12]</sup>。本试验从大鼠出生后 10 d 切断睾丸的 SSN 和 ISN,研究睾丸神经是否参与调控发育期睾丸细胞的分化增殖,曲细精管的发育以及精子的发生过程。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及动物模型的建立

1.1.1 动物分组 出生 10 d 的 Wistar 雄性大鼠 30 只,随机分为 2 组:A 组 20 只,左侧睾丸切除 SSN 和 ISN,右侧假手术对照;B 组 10 只,空白对照。

1.1.2 动物模型建立 将大鼠固定,用戊巴比妥钠( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{BW}$ )腹腔注射麻醉,解剖显微镜下分离与左精索动脉伴行的 SSN,切掉一段神经纤维;暴露左侧睾丸后悬韧带,切断 ISN,同法分离右侧 SSN 和 ISN 但不予切断,作为假手术对照<sup>[5]</sup>;空白对照组不做任何处理与手术组大鼠同条件分笼饲养。

### 1.2 标本采集及试验项目

1.2.1 标本采集 分别于大鼠 PD25 和 PD50 时麻醉处死,取出睾丸,称重,测量睾丸长径后将每侧睾丸切分为两部分。一部分快速放入液氮冷冻;一部分放入 4% 多聚甲醛室温下固定,石蜡包埋。

用相对睾丸质量(睾丸净质量/体质量)和相对睾丸尺寸(睾丸长径/体质量)来评价去神经对睾丸质量和睾丸大小的影响<sup>[13]</sup>。

1.2.2 精子计数 剥离出一侧附睾尾,将其剪碎,用 5 mL 生理盐水稀释悬液精子<sup>[14-15]</sup>。精子计数的方法与红细胞计数方法一致:

计数室每小方格的体积: $1/4\ 000\ \text{mm}^3$ 。

精子数目 = 5 个中方格中的精子数 /  $5 \times 4\ 000 \times$  稀释倍数  $\times 10^6$  (个  $\cdot \text{L}^{-1}$ )。

1.2.3 睾丸形态学分析 包埋好的睾丸组织块  $5\ \mu\text{m}$  厚连续切片,苏木精-伊红染色,显微镜下观察曲细精管的形态和大小。

1.2.4 去神经对细胞增殖的影响 脱蜡,水化,灭活内源性过氧化物酶,后用微波加热进行抗原修复,用 10% 的羊血清封闭非特异性抗原,然后加入 1:2 000 稀释的增殖细胞核抗原(PCNA)鼠源单克隆抗体(Sigma-Aldrich, St Louis, MO),4 °C 孵育过夜,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。二抗使用生物素标记的羊抗鼠 IgG (GAMB, 1:150, Zymed, San Francisco, CA),室温孵育 3 h。三抗使用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(SP-HRP, 1:150, Zymed, San Francisco, CA),室温孵育 2 h,用  $0.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DAB(Sigma-Aldrich)显色 5 min,苏木精复染,显微镜下观察并拍片。

1.2.5 RT-PCR 检测去神经对睾丸  $3\beta\text{-HSD1}$ 、 $LHR$ 、 $FSHR$  和  $ABP$  mRNA 表达的影响 液氮研磨组织,100 mg 粉末加入 1 mL Trizol 提取总 RNA,用 Oligo(dT)合成 cDNA 第一条链,特异性引物用于 PCR。取  $2\ \mu\text{L}$  的反转录产物 cDNA 加至 PCR 反应体系中。反应条件:94 °C 5 min;然后进入 35 个循环,每个循环包括 94 °C 变性 30 s,不同退火温度退火 30 s,72 °C 延伸 30 s;循环后 72 °C 延伸 10 min。 $GAPDH$  作为内参,引物序列和退火温度见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature	参考文献 Reference
$\beta$ 3HSD-1	F: ACTGCAGGAGGTCAGAGCT R: GCCAGTAACACACAGAATACC	565	55	[16]
LHR	F: AGAGTGATTCCCTGGAAAGGA R: TCATCCCTTGGAAAGCATTC	273	52	[17]
FSHR	F: TCTTCACGGACTTTCTCTGC R: TCTTGTAATCTGGGCTTGC	234	54	[18]
ABP	F: ACCCACGCAGAATTCAGTCTC R: CAGGCAGAAGGAAGCAGAAGA	399	55	[19]
GAPDH	F: AAACCCATCACCATCTTCCAG R: AGGGGCCATCCACAGTCTTCT	361	54	[20]

F 正向引物;R 反向引物

F. Forward; R. Reverse

1.2.6 统计分析 所有试验均重复 3 次以上,数据均用平均值±标准差(mean±s. e. m)表示。数据差异显著性采用 SPSS 软件分析, $P < 0.05$  则差异显著。PCR 产物电泳条带的光密度值用软件(Alphamager 2200 software)分析。GAPDH 作为内参,目标基因的相对灰度值用与内参的比值来表示。

## 2 结果

### 2.1 睾丸去神经对 25 d 和 50 d 睾丸质量和睾丸大小的影响

由图 1 可以看出,睾丸去神经不影响 PD25 时睾丸的质量和大小,但使 PD50 时的睾丸质量和睾丸大小极显著降低( $P < 0.01$ )。去神经组相对睾丸质量( $(0.56 \pm 0.03) \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )与对照组( $(6.20 \pm 0.38) \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )相比降低了 11 倍。而相对睾丸大小(CON:  $(10.11 \pm 0.186) \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; SSN + ISN:  $(4.90 \pm 0.21) \text{ cm} \cdot \text{kg}^{-1}$ )降低了 2 倍。结果表明 SSN 和 ISN 对睾丸下降后发育为成熟睾丸具有非常重要的影响。

### 2.2 去神经对 50 d 睾丸曲细精管和附睾尾精子数的影响

睾丸去神经导致 PD50 时睾丸曲细精管发育异常,曲细精管形状不规则,生精上皮排列无序,很少有成熟的精子细胞在异常的曲细精管中存在,大部分曲细精管空泡化(图 2a)。

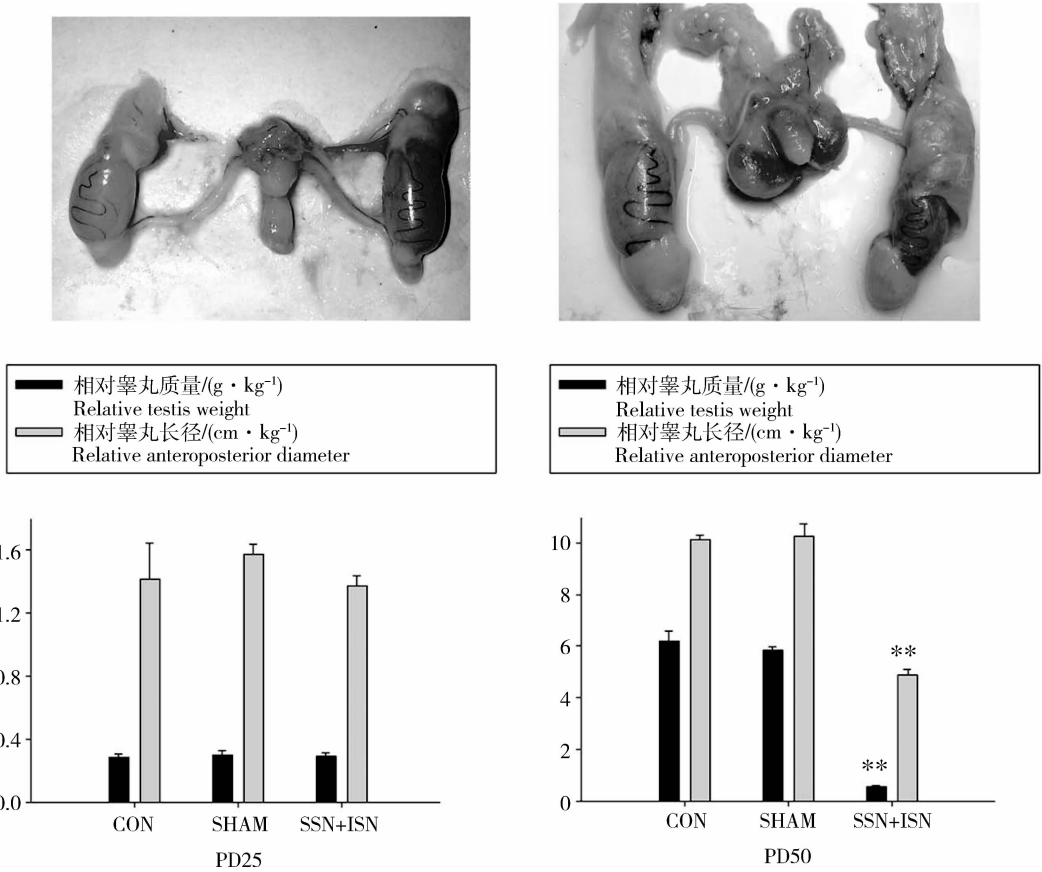
另外睾丸去神经也严重影响了附睾尾精子数量,统计结果显示去神经组附睾尾精子数( $(23.91 \pm 10.30) \times 10^6 \cdot \text{g}^{-1}$ )与空白对照组( $(286.4 \pm 5.51) \times 10^7 \cdot \text{g}^{-1}$ )相比极显著降低( $P < 0.01$ )(图 2b)。结果表明睾丸去神经严重影响了睾丸下降后曲细精管的正常发育和精子的发生。

### 2.3 去神经对睾丸生殖细胞增殖的影响

睾丸去神经不影响 PD25 时曲细精管生精上皮生殖细胞的增殖,但明显影响了 PD50 时生殖细胞的正常增殖(图 3)。PD50 时假手术对照组 PCNA 阳性生殖细胞在生精上皮上呈规则的同圆心状排列,而去神经组睾丸 PCNA 阳性生殖细胞凌乱排列而且空泡化的曲细精管上皮没有阳性生殖细胞表达。说明睾丸去神经严重影响了 PD50 时睾丸正常的生精过程。

### 2.4 去神经对睾丸 $\beta$ 3-HSD1、LHR、FSHR 和 ABP mRNA 表达的影响

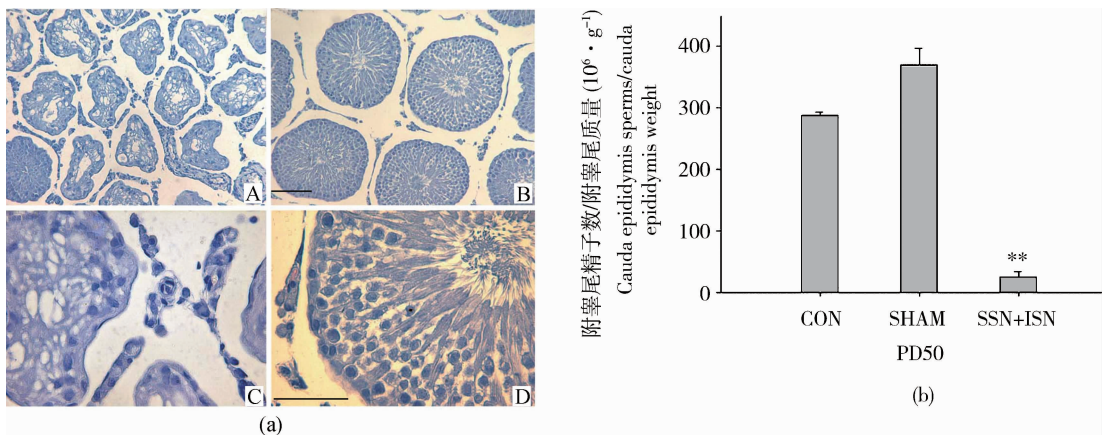
RT-PCR 结果(图 4)显示睾丸去神经显著影响了 PD25 时  $\beta$ 3-HSD1 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),极显著降低了 PD50 时睾丸  $\beta$ 3-HSD1、ABP mRNA 表达( $P < 0.01$ ),显著降低了 LHR 和 FSHR mRNA 在睾丸的表达( $P < 0.05$ )。说明睾丸 SSN 和 ISN 调控睾丸发育过程中  $\beta$ 3-HSD1、ABP、LHR 和 FSHR mRNA 表达。



\*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.01$ ), CON. 空白对照组; SHAM. 假手术对照组; SSN+ISN. SSN 和 ISN 切除组  
 Asterisks show the significance levels of comparisons between CON, SHAM and S+I groups. \*\*  $P < 0.01$ . CON, intact control group; SHAM, a sham operation group; SSN+ISN, group with bilateral surgical removal of both SSN and ISN.

图 1 大鼠 PD25 和 PD50 时的 CON、SHAM 和 SSN+ISN 组相对睾丸质量和相对睾丸直径

Fig. 1 Relative testis weight and relative testis anteroposterior diameter of CON, SHAM and SSN+ISN groups on PD25 and PD50



a) 出生后 50 d 时 SHAM 和 SSN+ISN 组睾丸曲细精管横切片的 HE 染色图, b) 出生后 50 d 时 CON、SHAM 和 SSN+ISN 3 组平均每克附睾尾精子数

B 和 D 图为假手术对照组睾丸, A 和 C 图为 SSN+ISN 组睾丸, (C 和 D 图为 A 和 B 图的局部放大), 标尺代表 50 μm。

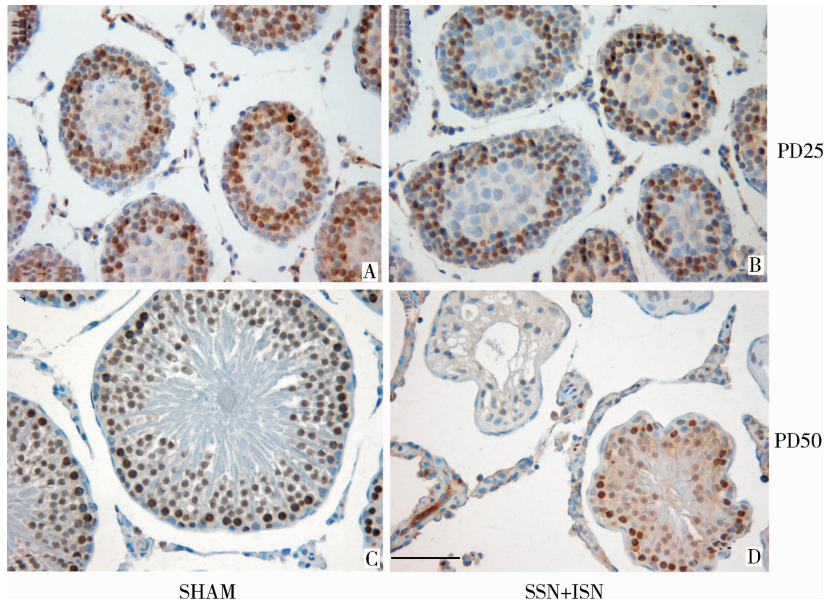
\*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.01$ ). CON. 空白对照组; SHAM. 假手术对照组; SSN+ISN. SSN 和 ISN 切除组

a) Seminiferous tubule cross-sections of SHAM and SSN+ISN groups on PD50 stained with HE. b) The numbers of sperm per g in the cauda epididymis of CON, SHAM and SSN+ISN groups on PD50

B and D are SHAM testis on PD50. A and C are SSN+ISN testis on PD50 (C and D are amplified from A and B). Bar = 50 μm. \*\*  $P < 0.01$ . CON, intact control; SHAM, sham operated control; SSN+ISN, bilateral surgical removal of both SSN and ISN

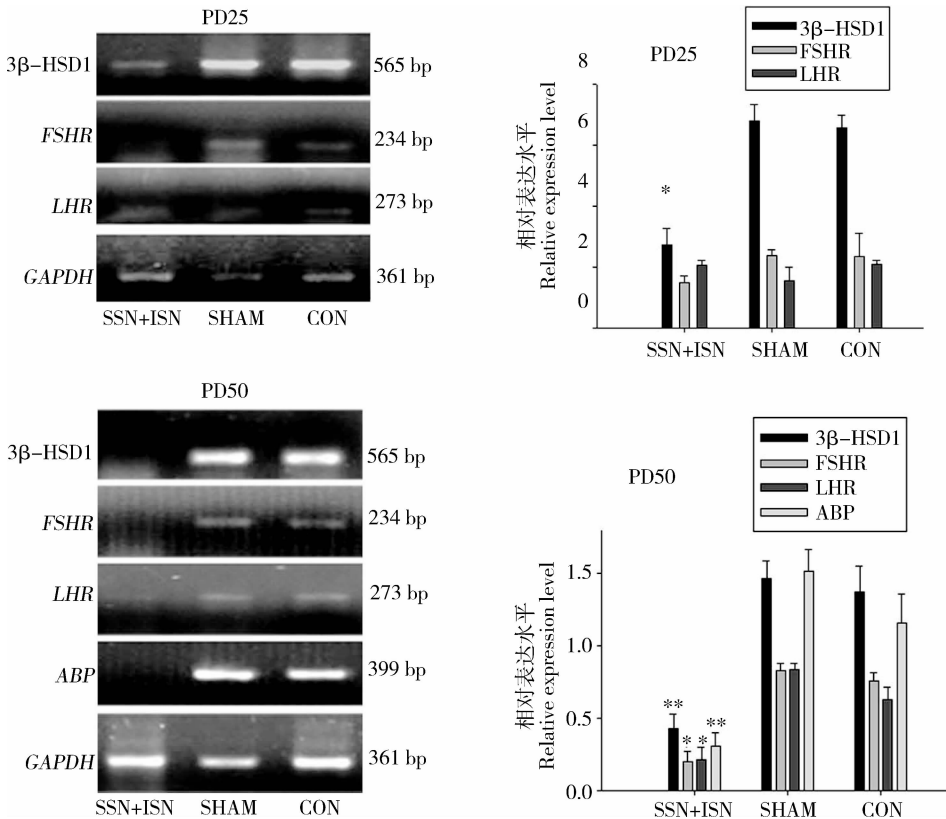
图 2 出生后 50 d 时 HE 染色结果与每克附睾尾精子数

Fig. 2 Results of HE and the numbers of sperm per g on PD50



A 图和 C 图分别来自 PD25 和 PD50 时假手术对照组睾丸, B 图和 D 图为 PD25 和 PD50 时 SSN+ISN 切神经组睾丸, 标尺代表 50  $\mu\text{m}$ 。SHAM. 假手术对照组; SSN+ISN. SSN 和 ISN 切除组  
A and C are SHAM testis on PD25 and PD50, B and D are SSN+ISN testis on PD25 and PD50. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . SHAM. sham operated control; SSN+ISN. bilateral surgical removal of both SSN and ISN

图 3 SHAM 和 SSN+ISN 切神经组出生后 25 d 和 50 d 睾丸曲细精管 PCNA 阳性生殖细胞免疫组化图  
Fig. 3 Immunolocalization of PCNA-labeled germ cells in seminiferous tubules of the SHAM and SSN+ISN groups on PD25 and PD50



N = 3-5, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . CON. 空白对照组; SHAM. 假手术对照组; SSN+ISN. SSN 和 ISN 切除组  
N = 3-5 per group; \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ . CON, an intact control group; SHAM. sham operation group; SSN+ISN group. bilateral surgical removal of both SSN and ISN

图 4 SSN+ISN, SHAM 和 CON 3 组睾丸 PD25 和 PD50 时 3β-HSD1、ABP、LHR 和 FSHR mRNAs 的表达  
Fig. 4 Expression levels of 3β-HSD1, ABP, LHR and FSHR mRNAs in the SSN+ISN, SHAM and CON groups on PD25 and PD50

### 3 讨 论

大鼠出生后 10 d 睾丸去神经显著影响了睾丸曲细精管的正常发育和精子的发生,以及  $3\beta$ -HSD1、ABP、LHR 和 FSHR mRNA 的正常表达。说明在整个睾丸发育过程中支配睾丸的 SSN 和 ISN 发挥着非常重要的作用,尤其是睾丸下降后,SSN 和 ISN 参与调控睾丸曲细精管发育、精子发生的作用更为明显。

非常令人惊奇的是出生后 10 d 睾丸去神经不影响 PD25 时睾丸质量和睾丸大小,但使 PD50 时睾丸质量和睾丸大小极显著降低。说明睾丸下降前,睾丸神经并非睾丸发育的关键调控因素,尤其是去神经后睾丸依然能完成下降过程,说明这一时期睾丸的发育以及睾丸下降过程雄激素、降钙素基因相关肽(CGRP)、睾丸 Leydig 细胞胰岛素样因子(INSL3)等发挥重要的作用<sup>[21-22]</sup>。睾丸下降后,没有睾丸神经的支配,曲细精管发育异常,空泡化,生精上皮生殖细胞排列紊乱,很少有成熟的精子细胞存在。说明睾丸神经在睾丸发育成熟的这一时期发挥了至关重要的调控作用。失去神经支配睾丸的脉管系统很难通过改变血流来调节睾丸温度以适应外界环境的变化<sup>[23]</sup>,另外睾丸神经对睾丸发育具有长期慢性的营养作用<sup>[7]</sup>。有人报道双切成年大鼠睾丸精索神经对睾丸质量、精子发生和血液睾酮浓度没有显著的影响<sup>[24]</sup>。进一步说明睾丸神经对发育期睾丸的发育和精子发生的调控作用比成年期更重要。

切神经后导致附睾尾精子数急剧降低,说明曲细精管精子的发生过程发生异常,我们通过 PCNA 免疫染色<sup>[25]</sup>发现切神经后影响了睾丸生精上皮精原细胞和初级精母细胞向精子细胞的发育,从而影响了附睾尾成熟精子的数量。

虽然出生后 10 d 睾丸去神经不影响 PD25 时睾丸质量和睾丸大小,但 RT-PCR 结果显示已显著影响了睾丸  $3\beta$ -HSD1 mRNA 表达。大鼠间质细胞的分化增殖发生在 15 d 左右,而  $3\beta$ -HSD 酶的表达是间质细胞分化的一个重要标志<sup>[12]</sup>。所以 10 d 睾丸去神经已显著影响了睾丸间质细胞的分化,从而必然会影响到成年期睾丸功能性间质细胞的数量。而我们 PD50 时睾丸的 RT-PCR 结果也证明了这一点,切神经组睾丸  $3\beta$ -HSD1 mRNA 表达极显著降低,说明 10 d 睾丸切神经严重影响了成年期睾丸的间质细胞睾酮分泌功能。另外 PD50 时切神经组睾

丸 ABP、LHR 和 FSHR mRNA 的表达也显著降低,LH 和 FSH 通过与睾丸上其相应受体结合分别调节间质细胞类固醇激素的合成和精子的发生过程<sup>[26-27]</sup>,ABP 对于维持曲细精管中高浓度的雄激素水平和精子发生具有重要作用。睾丸去神经严重影响了成年期睾丸 ABP、LHR 和 FSHR mRNA 的正常表达,从而影响了 FSH 和 LH 以及雄激素对睾丸正常发育和精子发生的调控,从而导致成年期睾丸曲细精管发育异常和精子发生障碍。

### 4 结 论

睾丸神经通过影响雄激素生成关键酶的合成以及一些内分泌激素受体的表达,参与调控睾丸下降后以及青春期曲细精管的发育和精子的发生过程,但睾丸神经与内分泌激素之间的相互作用机制还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] KUNTZ A, MORRIS R E. Components and distribution of the spermatic nerves and the nerves of the vas deferens [J]. *J Comp Neuro*, 1946, 85: 33-44.
- [2] ZHU B C, CHIOCCHIO S R, SUBURO A M, et al. Monoaminergic and peptidergic contributions of the superior and the inferior spermatic nerves to the innervation of the testis in the rat [J]. *J Androl*, 1995, 16: 248-258.
- [3] FRANKEL A I, MOCK E J, CHAPMAN J C. Hypophysectomy and hemivasectomy can inhibit the testicular hemicastration response of the mature rat [J]. *Biol Reprod*, 1984, 30: 804-808.
- [4] DAMBER J E. The effect of guanethidine treatment on testicular blood flow and testosterone production in rats [J]. *Experientia*, 1990, 46: 486-487.
- [5] CAMPOS M B, CHIOCCHIO S R, CALANDRA R S, et al. Effect of bilateral denervation of the immature rat testis on testicular gonadotropin receptors and in vitro androgen production [J]. *Neuroendocrinology*, 1993, 57: 189-194.
- [6] DAMBER J E, JANSON P O. The effects of LH, adrenaline and noradrenaline on testicular blood flow and plasma testosterone concentrations in anaesthetized rats [J]. *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 1978, 88: 390-396.
- [7] CHOW S H, GIGLIO W, ANESETTI R, et al. The effects of testicular denervation on spermatogenesis in



- the Sprague-Dawley rat [J]. *Neuroendocrinology*, 2000, 72: 37-45.
- [8] GONG Y G, YANG Y R, ZHANG W, et al. Apoptosis in male germ cells induced by testicular denervation [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2006, 12: 968-973.
- [9] GONG Y G, WANG Y Q, GU M, et al. Deprivation of testicular innervation induces apoptosis of Leydig cells via caspase-8-dependent signaling: A novel survival pathway revealed [J]. *Biochem Biophys Co*, 2009, 382: 165-170.
- [10] HAIDER S G. Cell biology of Leydig cells in the testis [J]. *Int Rev Cytol*, 2004, 233: 181-241.
- [11] GE R S, DONG Q, SOTTAS C M, et al. In search of rat stem Leydig cells: Identification, isolation, and lineage-specific development [J]. *PNAS*, 2006, 103: 2719-2724.
- [12] TEERDS K J, RIJNTJES E, VELDHUIZEN-TSOERKAN M B, et al. The development of rat Leydig cell progenitors *in vitro*: how essential is luteinizing hormone? [J]. *J Endocrinol*, 2007, 194: 579-593.
- [13] YAVASOGLU A, KARAASLAN M A, UYANIKGIL Y, et al. Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 60: 391-396.
- [14] OISHI S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40: 1807-1813.
- [15] AKIHIKO H, SHOZO S, MICHIO F, et al. Effect of tacrolimus on the cauda epididymis in rats: Analysis of epididymal biochemical markers or antioxidant defense enzymes [J]. *Toxicology*, 2008, 243: 23-30.
- [16] AKINGBEMI B T, GE R, ROSENFELD C S, et al. Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell [J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 84-93.
- [17] BAGNA B, NARENDER K, RUSSELL M K, et al. Estrogen receptor- $\beta$  expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1747-1755.
- [18] LEE W S, YOON S J, YOON T K, et al. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary [J]. *Mole Reprod Develop*, 2004, 69(2): 159-163.
- [19] WANG Y M, SULLIVAN P M, PETRUSZ P, et al. The androgen-binding protein gene is expressed in CD1 mouse testis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1989, 63: 85-92.
- [20] TAKASHI U, MASAYUKI K, SHINJI T, et al. Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes [J]. *Brain Res*, 1999, 823: 226-230.
- [21] EMMEN J M, MCLUSKEY A, ADHAM I M, et al. Hormonal control of gubernaculum development during testis descent: gubernaculum outgrowth *in vitro* requires both insulin-like factor and androgen [J]. *Endocrinology*, 2000, 141: 4720-4727.
- [22] VIGUERAS R M, MORENO-MENDOZA N, REYES G. Androgen receptor and calcitonin gene-related peptide in neurons of the genitofemoral nerve during testicular descent induced with human chorionic gonadotropin [J]. *Arch Med Res*, 2003, 34: 166-170.
- [23] FREE M J. Blood supply to the testis and its role in local exchange and transport of hormones [M]. In: Johnson AD and Gomes WR (eds.). *The Testis*, Vol 4, New York: Academic Press, 1977: 39-90.
- [24] FRANKEL A I, RYAN E L. Testicular innervation is necessary for the response of plasma testosterone levels to acute stress [J]. *Biol Reprod*, 1981, 24: 491-495.
- [25] SCHLATT S, WEINBAUER G F. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes [J]. *Int J Androl*, 1994, 17: 214-222.
- [26] MENDIS-HANDAGAMA S M, WATKINS P A, GELBER S J, et al. The effect of chronic luteinizing hormone treatment on adult rat Leydig cells [J]. *Tissue Cell*, 1998, 30: 64-73.
- [27] MEACHEM S J, WREFORD N G, STANTON P G, et al. Follicle-stimulating hormone is required for the initial phase of spermatogenic restoration in adult rats following gonadotrophin suppression [J]. *J Androl*, 1998, 19: 725-735.