

睾酮对雄性精子发生障碍大鼠 CMTM 家族表达的影响

李 刚^{1,2}, 李光艳¹, 吉海杰¹, 赵文杰¹, 楚世峰¹, 陈乃宏^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 内蒙古医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要: 研究睾酮对生精功能障碍大鼠的作用, 以及对 CMTM 家族各蛋白表达的影响。采用棉酚 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和环磷酰胺 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 建立大鼠精子发生障碍模型, 给予丙酸睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 隔日给药, 共 6 次) 后取左侧附睾尾, 收集精子。采用 CASA 图像分析系统对精子进行数量和活力分析, 取睾丸组织采用 HE 染色进行形态学检查, 采用蛋白印记方法 (Western blotting) 对 CMTM 家族各成员进行蛋白水平表达研究。研究发现, 棉酚和环磷酰胺均可使睾丸组织发生明显的病理改变, 降低精子数量和活力, 而睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 具有一定的改善作用。研究 CMTM 家族表达情况发现, 棉酚和环磷酰胺均可降低雄性大鼠睾丸组织中 CMTM4 的表达, 睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可显著提高 CMTM4 表达; 棉酚可显著增加睾丸中 CMTM2 的表达, 给予睾酮后 CMTM2 表达量显著下降, 而环磷酰胺对于 CMTM2 影响不显著; 棉酚和环磷酰胺对于 CKLF1、CMTM3 和 CMTM5 的表达影响不显著, 睾丸组织中未检测到 CMTM6、CMTM7 和 CMTM8 的表达。研究结果表明, 睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的生精作用可能与影响 CMTM 家族个别成员表达有关, 趋化因子 CMTM2 和 CMTM4 可能在精子发生过程具有作用。

关键词: 睾酮; CMTM; 精子发生

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 08-0995-06

Effect of testosterone on the expression of CMTM family of the male spermatogenesis suppression rats

LI Gang^{1,2}, LI Guang-yan¹, JI Hai-jie¹, ZHAO Wen-jie¹, CHU Shi-feng¹, CHEN Nai-hong^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010110, China)

Abstract: This study is to investigate the influence and the expression of CMTM family of testosterone on spermatogenesis suppression in the male rats treated by gossypol and cyclophosphamide. Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were administered to male rats to induce spermatogenesis suppression. Testosterone propionate was administrated at the dose of $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ every other day for 6 times. Sperm was collected from the left caudal epididymis, the count and motility of sperm were analyzed by CASA. Morphological change of testis tissue was observed with HE staining. The expression of CMTM family was examined by Western blotting assay. Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) decreased the count and motility of sperm, and the pathological change of testis tissue was also observed. But, testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) had positive effect. Furthermore, CMTM4 down-expressed remarkably in the gossypol and cyclophosphamide treated rats, the expression of the CMTM4 was up-expressed after testosterone administration. On the contrary, the expression of CMTM2 increased significantly only in gossypol treated male rats, but not in cyclophosphamide treated male rats. The expression of CMTM2 was down-expressed after testosterone administration. However, no obvious change of CMTM2 was observed in cyclophosphamide treated rats. Testosterone did not influence the expression of CKLF1, CMTM3 and CMTM5, the CMTM6, CMTM7 and CMTM8 of CMTM family were not detected in testis tissue. These demonstrated that the

收稿日期: 2010-01-23.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA020501); 内蒙古医学院 2008 年博士启动基金 (NYBQ2008003).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165177, E-mail: chennh@imm.ac.cn

spermatogenesis effect of testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was associated with the expression of CMTM family, and CMTM2 and CMTM4 may take part in the spermatogenesis process.

Key words: testosterone; CMTM; spermatogenesis

男性不育是一种较为复杂的临床综合征,其发病率近年来有上升的趋势,约占育龄夫妇的 10%~12%^[1]。这类疾病的发病原因众多,其中睾丸功能障碍所致不育是男性不育中常见而棘手的病因,其主要临床表现为原因不明的少精子症和无精子症^[2]。男性生殖系统的生理特点,使得任何生理和病理环境的改变都可能造成男性生殖功能的损伤,男性精子活力以及数量减少等直接影响到能否顺利完成受孕过程。睾酮 (testosterone, T) 作为体内的重要激素之一,对于男性性功能的维持、精子的生成以及男性生育功能维持具有重要的作用^[3, 4]。睾酮通过与睾酮受体结合,使得睾酮受体从热休克蛋白解离后转入细胞核,通过结合特异的雄激素反应元件,调节相应的基因表达^[4]。临床中睾酮含量的检测通常作为男性不育检测的指标之一。对于睾酮补充疗法对精子生成影响的观点存在很大分歧,但是低剂量对于精子活力和数量的促进作用在一些实验中被证实^[5, 6]。宋博等^[7]报道在临床应用,外源性小剂量睾酮被用于治疗弱精症患者,可以提高精子活力。

CMTM (CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing family) 是介于经典趋化因子和 4 次跨膜蛋白之间的一个新的蛋白质家族。在人类,这一家族成员由 9 个基因编码,即 CKLF 和 CMTM1-8^[8]。研究发现, CMTM 家族成员参与体内一些重要的生理及致病过程,可以诱导肿瘤细胞凋亡^[9, 10], 影响骨骼肌的分化^[11], 参与哮喘发病过程、特异性皮炎以及风湿性关节炎等免疫系统疾病^[12-16]。CKLF1 在神经系统发育过程中具有重要作用^[17], 以 CKLF1 为靶点可建立体外抗哮喘药物筛选模型^[18], 作者发现 CMTM 家族在生殖系统中亦具有重要的作用。文献^[19, 20]报道, CMTM 家族个别成员可能与精子的成熟与分泌等生理过程或病理过程有关。但是,睾酮对于 CMTM 家族表达的影响未见报道。

本研究采用棉酚 (gossypol, GY) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide, CS) 建立雄性大鼠生殖功能障碍模型,观察给予适当剂量的睾酮对于 CMTM 家族各成员表达情况的影响,希望在 CMTM 家族中发现可能参与精子生成的相关蛋白。

材料与方法

药品和试剂 CMTM 家族各成员 (CKLF1、CMTM2、CMTM3、CMTM4、CMTM5、CMTM6、CMTM7、CMTM8) 抗体由北京大学人类疾病基因研究中心韩文玲教授惠赠,其中 CMTM7 为单克隆抗体,其他均为多克隆抗体。Triton-X100、EGTA 和蛋白酶抑制剂 (PMSF、Aprotinin 和 Leupeptin) 均购自 Sigma 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司; HRP 标记的羊抗兔抗体以及 HRP 标记的羊抗鼠抗体为进口试剂,由北京中杉金桥生物技术有限公司分装; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 超敏发光液购自普利莱公司; 其他试剂均为市售分析纯。棉酚由中国医学科学院药物研究所提供 (纯度>95%), 溶于精制食用油中。丙酸睾酮注射液购自上海通用药业股份有限公司 (批号: 060901)。环磷酰胺注射液为江苏恒瑞医药股份有限公司产品 (批号: 06052621)。

实验动物 清洁级 Wistar 大鼠 (雄性), 体重 (220 ± 10) g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供,合格证号: SCXK (京)-2005-0013。动物饲养于中国医学科学院药物研究所实验动物中心,自由饮水摄食, 12 h 明暗交替照明。

精子生成障碍动物模型的建立 实验动物按照随机的原则分为 5 组: 空白组、棉酚模型组、环磷酰胺模型组、睾酮+棉酚组以及睾酮+环磷酰胺组。棉酚模型组参照凌庆枝法^[21]给药并加以改进。口服给予棉酚 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 隔天 1 次, 共 2 周; 环磷酰胺模型组参考刘志敏法^[22]给药, 腹腔注射环磷酰胺 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每天给药 1 次, 共给药 10 天。睾酮+棉酚组在造模开始隔日给药 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 皮下注射), 共给药 6 次; 睾酮+环磷酰胺组在造模开始隔日给药 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 皮下注射), 共给药 6 次。

精子样本的采集以及活力分析 动物麻醉后, 打开腹腔取附睾。找到附睾尾剪开后, 将附睾尾置于提前预温 37°C 的生理盐水中 (3 mL), 静置 5 min 待精子充分游出后, 充分混悬并对精子活力进行检测。检测采用计算机辅助精子质量分析系统 (CASA) 对精子质量 (精子数量、精子活力等) 进行综合测评。

精子活力分级标准: A 级, 指快速前向运动的精子; B 级, 指慢或呆滞地前向运动的精子; C 级, 指非

前向运动的精子; D 级, 指不动的精子。

睾丸组织 HE 染色 取大鼠附睾后, 迅速找到并取得左侧睾丸组织, 用 4% 甲醛溶液固定, 24 h 后更换 4% 甲醛固定液继续固定 24 h, 进行 HE 染色, 在光镜下进行观察。

Western blotting 检测 将大鼠右侧睾丸组织置于提前预冷的 RIPA 裂解液中 [50 mmol·L⁻¹ Tris (pH 7.4), 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 10% 甘油, 50 mmol·L⁻¹ NaF, 1 mmol·L⁻¹ Na₃VO₄, 1 mmol·L⁻¹ NaF], 经研磨后裂解 30 min, 以 12 000×*g* 离心 10 min 收集上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取各组样品 30 μg 上样, 用 15% SDS-PAGE 进行电泳。电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉常温下封闭 1 h, 分别滴加 CMTM 家族各一抗 (1:100, 4 °C 过夜) 以及 HRP 标记的二抗 (CMTM7 对应的二抗为羊抗鼠 IgG, 其他均加入羊抗兔 IgG 1:5 000, 常温孵育 1 h), 设 actin 作为内参, 使用 TBST (10 mmol·L⁻¹ Tris, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6) 洗膜后, 采用 ECL 化学发光法进行观察, 图像采用 Science Lab 2005 Image Guage (V3.0) 软件进行灰度扫描。

统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间的差异比较用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析。

结果

1 睾酮对雄性大鼠精子数量和活力的影响

棉酚和环磷酰胺可以引起精子生成障碍, 与空白组比较显著降低精子数量和活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 1 及图 1A1、A2、B1、B2。大鼠皮下注

射睾酮 (5 mg·kg⁻¹) 能够显著提高棉酚和环磷酰胺模型组中的精子数量和活力, 对于棉酚以及环磷酰胺所致的雄性大鼠精子数量降低具有显著提高作用, 其中对于活力较高的 A+B 级精子百分率具有显著提高作用 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 1 C1、C2。

Table 1 Effect of testosterone on sperm count and motility in male rats. $n = 15$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs GY group; & $P < 0.05$ vs CS group. GY: Gossypol; T: Testosterone; CS: Cyclophosphamide

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Sperm count (×10 ⁶ /mL)	The percent of (A+B) motile sperm/%	The percent of (A+B) class/%
Control		151 ± 17	56 ± 7	38 ± 6
GY	50	105 ± 22**	42 ± 8*	26 ± 5*
GY+T	5	131 ± 20#	53 ± 4#	35 ± 4#
CS	20	94 ± 31**	31 ± 5**	20 ± 6**
CS+T	5	121 ± 19&	44 ± 4&	30 ± 4&

2 睾酮对睾丸组织形态学的影响

随机选取各组睾丸组织经 HE 染色后发现, 正常雄性大鼠的睾丸组织中生精小管排列整齐, 在每一生精小管内部管腔界限明显, 可见不同发育期初级、次级以及精子细胞排列整齐 (图 2A1、A2); 给予棉酚和环磷酰胺后可以导致大鼠睾丸组织发生显著病理改变, 生精小管内结构紊乱, 管腔界限模糊不清, 同时失去原有各期精子细胞层次, 并有核空泡化的现象出现, 在管腔内有脱落的细胞和少量精子存在 (图 2B1、B2)。在给予睾酮 (5 mg·kg⁻¹) 后有不同程度的缓解作用, 使破坏的细胞层次得以恢复, 管腔界限也逐渐变得清晰 (图 2C1、C2), 同时可见管腔内有少量完整的精子细胞存在。

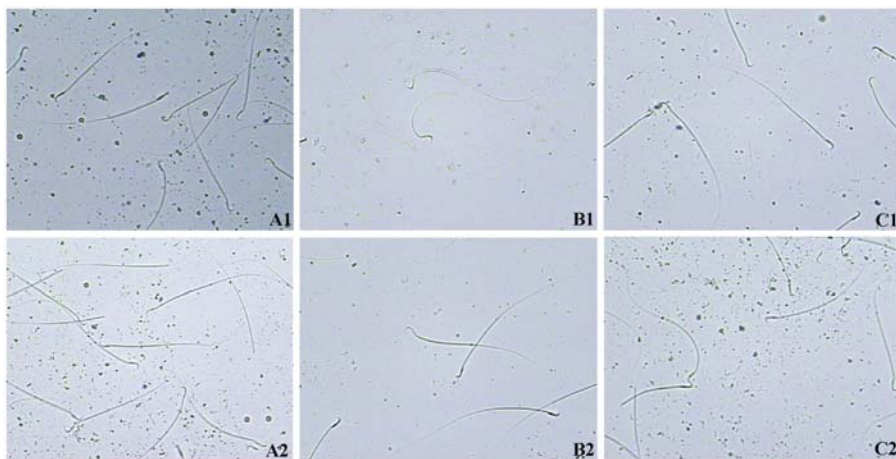


Figure 1 The sperm count of male rats observed under optical microscope. The testosterone could improve the count and motility of sperm in male spermatogenesis suppression rats treated with gossypol or cyclophosphamide. A1, A2: Control; B1: Gossypol (50 mg·kg⁻¹); B2: Cyclophosphamide (20 mg·kg⁻¹); C1: Gossypol (50 mg·kg⁻¹) + testosterone (5 mg·kg⁻¹); C2: Cyclophosphamide (20 mg·kg⁻¹) + testosterone (5 mg·kg⁻¹). (Magnification, 200×)

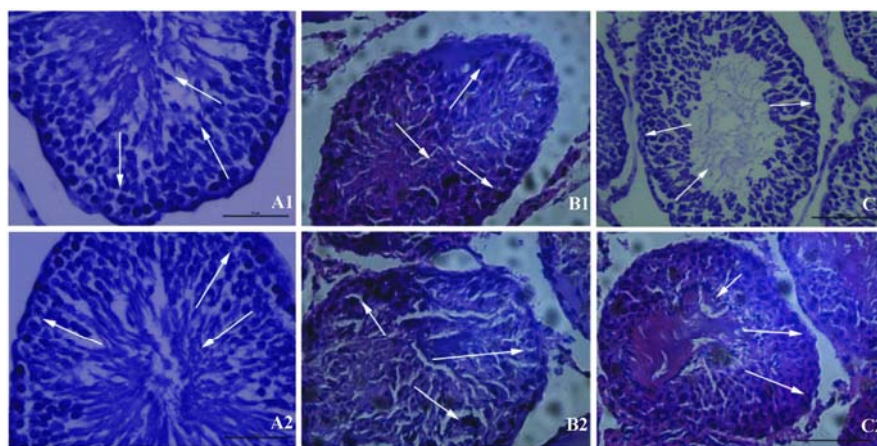


Figure 2 The HE staining of testis tissue. Great morphological change was observed in testis tissue of male rats treated with gossypol or cyclophosphamide. But, the testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) improved this morphological change in testis tissue of male rats, see the white arrow. A1, A2: Control; B1: Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); B2: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); C1: Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); C2: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). (Magnification, $400\times$)

3 睾酮对 CMTM 家族各成员表达的影响

大鼠睾丸组织 Western blotting 检测结果显示, 睾酮对于 CMTM 家族中个别成员表达具有显著影响。大鼠分别给予棉酚 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和环磷酰胺 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后, CMTM4 的表达显著低于空白组, 给予睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后则可以显著升高 CMTM4 表达 ($P < 0.05$), 见图 3。CMTM2 的表达情况却不完全相同, 给予棉酚 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后 CMTM2 表达显著升

高, 而睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 可以显著降低 CMTM2 的表达 ($P < 0.05$), 给予环磷酰胺 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和睾酮 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后表达变化并不显著 (图 4)。CKLF1、CMTM3、CMTM5 表达检测发现, 雄性大鼠在给予棉酚 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和环磷酰胺 ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后变化并不显著, 在给予睾酮后对于 CKLF1、CMTM3、CMTM5 表达亦没有显著性影响 (图 5A、B、C)。而在大鼠睾丸组织未检测到 CMTM6、CMTM7、CMTM8 的蛋白表达 (图 5D、E、F)。

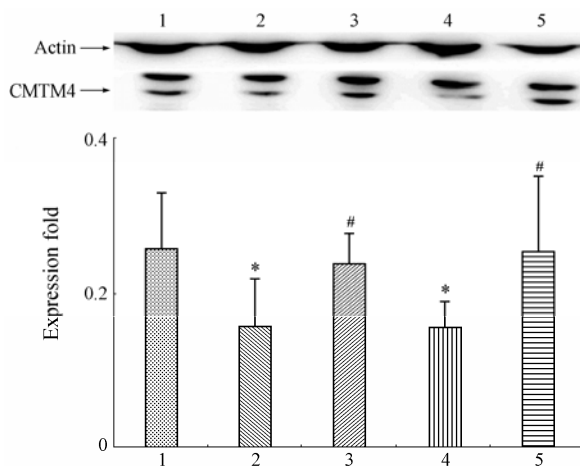


Figure 3 Effect of testosterone on CMTM4 in testis tissue of male rats detected with Western blotting. The testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was administrated to male rats after treated gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The testis tissue was extracted and subjected to Western blotting analysis. Arrow points to the CMTM4 protein band. Bars represent the scanned values for CMTM4/values for actin. Lane 1: Control; Lane 2: Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); Lane 3: Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); Lane 4: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); Lane 5: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). * $P < 0.05$ vs control group (1); # $P < 0.05$ vs gossypol group (2)

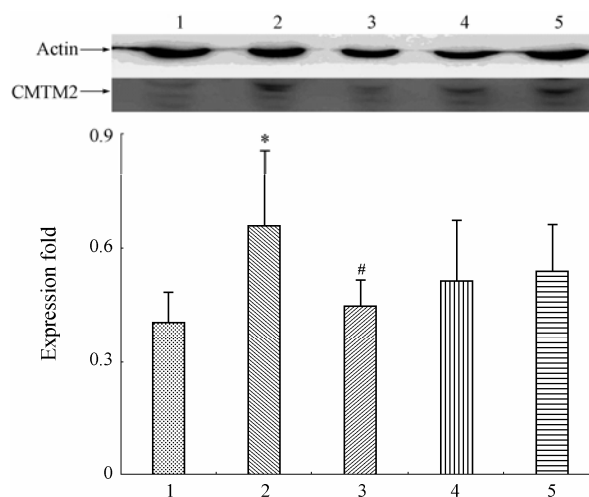


Figure 4 Effect of testosterone on CMTM2 in testis tissue of male rats detected with Western blotting. Arrow points to the CMTM2 protein band. Bars represent the scanned values for CMTM2/values for actin. Lane 1: Control; Lane 2: Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); Lane 3: Gossypol ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); Lane 4: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); Lane 5: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). * $P < 0.05$ vs control group (1); # $P < 0.05$ vs gossypol group (2)

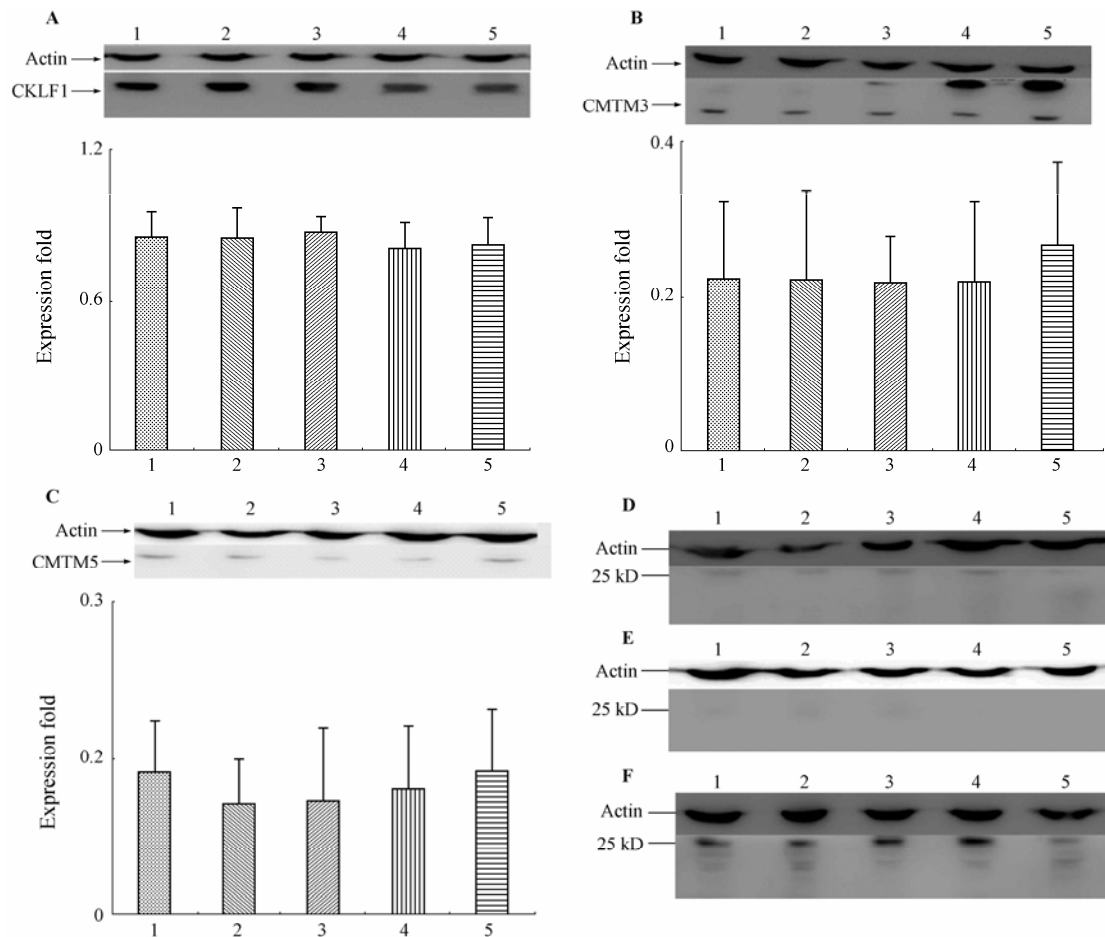


Figure 5 Effect of testosterone on CKLF1 (A), CMTM3 (B), CMTM5 (C), CMTM6 (D), CMTM7 (E) and CMTM8 (F) in testis tissue of male rats detected with Western blotting. Lane 1: Control; Lane 2: Gossypol ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); Lane 3: Gossypol ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); Lane 4: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); Lane 5: Cyclophosphamide ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + testosterone ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

讨论

本研究采用 Western blotting 检测睾酮对于 CMTM 家族在雄性生殖功能障碍大鼠中的影响, 采用的 CMTM 抗体均由北京大学人类疾病基因研究中心提供, 实验开始前对各抗体的有效性均进行了体外验证, 通过对 HEK293ET 细胞进行瞬转后提取总蛋白进行 Western blotting 检测, 发现 CMTM 各抗体均有很好的适用性。

棉酚和环磷酰胺是常用的导致精子生成障碍工具药物。棉酚具有抗生育作用, 采用的棉酚剂量与凌庆枝等^[21]报道的剂量不一致, 这可能与检测时精子稀释倍数以及检测精子活力的方法有关。动物实验结果表明, 棉酚导致生殖功能障碍的药理作用机制是通过破坏雄性睾丸细精管的生精上皮细胞, 从而导致精子数量的减少, 直至无精子^[23]。同时棉酚也可以作用于细胞器线粒体, 通过抑制线粒体功能而抑制精子生成^[24]。环磷酰胺是一种氮芥类抗肿瘤药物, 据报道环磷酰胺治疗可引起男性患者的精子减少症和

无精子症, 其机制与环磷酰胺作用于 DNA、RNA 以及蛋白质有关, 从而导致精子生成障碍^[25]。

睾酮作为体内重要的雄激素对于精子生成的影响存在很大的争议, 但是, 普遍认为小剂量具有促进精子生成的作用, 而大剂量则表现出抑制作用, 有研究报道将适当剂量睾酮作为促进精子发生的阳性对照药^[26, 27]。实验中发现, 适当剂量睾酮对于棉酚和环磷酰胺所引起的精子数量减少、活力降低以及睾丸组织病理性改变均具有一定的改善作用, 能够显著提高精子数量以及活力, 对睾丸组织的病理性改变具有一定改善作用。通过睾酮对于 CMTM 家族表达情况的研究发现, 在 CMTM 家族中治疗前后变化最为明显的是 CMTM4, 棉酚以及环磷酰胺均使 CMTM4 的表达降低, 给予睾酮后使 CMTM4 表达恢复正常; CMTM2 仅在棉酚模型组中发生显著变化, 使得 CMTM2 表达升高, 而给予睾酮后降低, 环磷酰胺模型组中的变化不显著; 在睾丸组织中检测到了 CKLF1、CMTM3 以及 CMTM5 的表达, 但并未发现显著变化;

CMTM6、CMTM7、CMTM8 在睾丸组织中并未有表达, 而由于 CMTM1 抗体的原因未能对其进行检测。

总之, 实验中对于精子生成障碍分别从不同途径建立模型, 研究了适当剂量睾酮对于精子活力和数量的影响, 同时睾酮的这种改善作用可能有 CMTM 家族个别成员的参与, 发现 CMTM2 以及 CMTM4 的表达量具有显著差异。鉴于 CMTM 家族迄今为止广泛参与生理或病理过程, 因此可以推断 CMTM2 和 CMTM4 可能参与精子发生过程, 可能作为治疗精子发生障碍的潜在的药物开发靶点。

References

- [1] Ma XN. Modern Sexual Medicine (现代性医学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Military Medical Press, 2004: 348.
- [2] Regadera J, Martinez-Garcia F, Paniagua R, et al. Androgen insensitivity syndrome: an immunohistochemical, ultrastructural, and morphometric study [J]. Arch Pathol Lab Med, 1999, 123: 225–234.
- [3] McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man [J]. Recent Prog Horm Res, 2002, 57: 149–179.
- [4] Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis [J]. Steroids, 2009, 74: 602–607.
- [5] Tong JS, Wang XH, Cui YG, et al. The effect of different doses testosterone undecanoate on spermatogenesis in rats [J]. Nat J Androl (中华男科学杂志), 2000, 6: 89–91.
- [6] Zhang KY, Guo XN, Zhang W, et al. Effect of different doses methyltestosterone on spermatogenesis in mice [J]. China J Mod Med (中国现代医学杂志), 2008, 18: 2468–2470.
- [7] Song B, Zhu H, Long Y, et al. The report of therapy of 41 asthenospermia with low dose testosterone undecanoate [J]. J Clin Urol (临床泌尿外科杂志), 2009, 24: 408–410.
- [8] Zhu BM, Li T, Zhou YL, et al. CMTM1-v17, a new potential corepressor of androgen receptor [J]. J Peking Univ (Health Sci) (北京大学学报 医学版), 2007, 39: 388–393.
- [9] Guo X, Li T, Wang Y, et al. CMTM5 induces apoptosis of pancreatic cancer cells and has synergistic effects with TNF- α [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387: 139–142.
- [10] Wang Y, Li J, Cui Y, et al. CMTM3, located at the critical tumor suppressor locus 16q22.1, is silenced by CpG methylation in carcinomas and inhibits tumor cell growth through inducing apoptosis [J]. Cancer Res, 2009, 69: 5194–5201.
- [11] Han WL, Rui M, Zhang YM, et al. Stimulatory effect of chemokine-like factor 1 (CKLF1) on the growth of bone marrow cells [J]. Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报), 2001, 23: 119–122.
- [12] Han WL, Ding P, Xu M, et al. Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1–8 (CKLFSF1–8) by in silico cloning and experimental validation [J]. Genomics, 2003, 81: 609–617.
- [13] Han W, Lou Y, Tang J, et al. Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity [J]. Biochem J, 2001, 357: 127–135.
- [14] Li T, Zhong J, Chen Y, et al. Expression of chemokine-like factor 1 is upregulated during T lymphocyte activation [J]. Life Sci, 2006, 79: 519–524.
- [15] Tan YX, Han WL, Chen YY, et al. Chemokine-like factor 1, a novel cytokine, contributes to airway damage, remodeling and pulmonary fibrosis [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117: 1123–1129.
- [16] Wang Y, Zhang Y, Han WL, et al. Two C-terminal peptides of human CKLF1 interact with the chemokine receptor CCR4 [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40: 909–919.
- [17] Wang ZZ, Li G, Chen XY. Chemokine-like factor 1, a novel cytokine, induces nerve cell migration through the non-extracellular Ca^{2+} -dependent tyrosine kinases pathway [J]. Brain Res, 2010, 1308: 24–34.
- [18] Li G, Wang DM, Sun MN. Discovery and optimization of novel 3-piperazinylcoumarin antagonist of chemokine-like factor 1 with oral antiasthma activity in mice [J]. J Med Chem, 2010, 53: 1741–1754.
- [19] Zhong WD, Zeng GQ, Cai BY, et al. Pathological changes in seminiferous tubules in infertility rats induced by chemokine-like factor I [J]. Chin J Exp Surg (中华实验外科杂志), 2003, 20: 1027.
- [20] Liu DZ, Yin CH, Zhang YM, et al. Human CMTM2/CKLFSF2 enhances the ligand-induced transactivation of the androgen receptor [J]. Chin Sci Bull, 2009, 54: 1050–1057.
- [21] Lin QZ, Ao ZH, Xu HY, et al. The influence of liuwei dihuang decoction on the spermatogenic disorder model rats and its serum NO [J]. J New Chin Med (新中医), 2004, 36: 76–78.
- [22] Liu ZM, Shen GQ, Pan TJ. Changes in IGF-I and bFGF in testis and epididymis of rats with oligozoospermia or azoospermia induced by cyclophosphamide [J]. Mil Med J South China (华南国防医学杂志), 2007, 21: 26–27.
- [23] Cao J, Fei RR, Zhao YH, et al. A study on the effects of gossypol acetate on fertility of male mice [J]. Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报), 2000, 22: 220–222.
- [24] Ni M, Yuan H. Investigation progress about animal reproductive toxicity of gossypol [J]. China Anim Husb Vet Med (中国畜牧兽医), 2008, 35: 144–145.
- [25] Chen A, Sun HX, Xiong AJ. The effects of cyclophosphamide on spermatogenesis in mice [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan (湖南中医学院学报), 2000, 22: 2–3.
- [26] Ni Y, Chen WY, Li CB. Study on pharmacodynamics of Bushen Qiangjin granules [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2006, 23: 268–271.
- [27] Ding P, Liang YJ, Liu J. Effect of Morinda officinalis oligosaccharides on sperm product in mice [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2008, 43: 1467–1470.