

网络出版时间:2015-06-30 13:47

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.08.028

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150630.1347.028.html

白消安注射法建立昆明小鼠精原 干细胞移植受体模型

王菊花^a,解倩倩^a,范彩云^a,方富贵^a,周杰^a,曹鸿国^a,章孝荣^{a,b}

(安徽农业大学 a 动物科技学院,b 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室,安徽 合肥 230036)

【摘要】【目的】通过对 6 周龄昆明小鼠腹腔内单次注射不同剂量的白消安来制作精原干细胞移植受体模型。【方法】将 104 只昆明小鼠随机分成 4 组,分别注射 0 (对照组,注射等量的白消安溶解液二甲亚砜(DMSO)),10,20 和 30 mg/kg 白消安,于注射白消安后 5,7,9,11 和 13 周记录小鼠的死亡数、小鼠睾丸外观体积、小鼠睾丸质量和小鼠体质量,计算睾丸指数;通过组织学观察注射不同剂量白消安后小鼠曲细精管精子的恢复情况,并检测受体小鼠血液中红细胞和白细胞数量的变化。【结果】注射 0(对照组),10,20 和 30 mg/kg 白消安 13 周后,小鼠死亡率分别为 0(0/22),11.54%(3/26),17.86%(5/28)和 89.29%(25/28)。10 mg/kg 白消安组小鼠的睾丸指数在注射后 5,7 和 9 周显著小于对照组($P<0.05$),而在注射后 11 和 13 周,与对照组差异不显著($P>0.05$);在注射后不同时间,对照组和 10 mg/kg 白消安组的睾丸指数均显著高于 20 mg/kg 白消安组($P<0.05$)。在注射白消安 5,7,9,11 和 13 周后,对照组曲细精管上皮无变化;10 和 20 mg/kg 白消安组有完整精子发生的曲细精管占总曲细精管的百分比分别为(49.56±8.23)%, (66.61±6.13)%, (80.24±10.42)%, (93.87±3.23)%, (92.49±4.58)%; (8.73±9.22)%, (9.89±6.39)%, (29.21±12.31)%, (49.64±3.59)% 和 (81.99±4.98)%。受体小鼠红细胞和白细胞数量均随着处理时间及白消安处理剂量的变化而变化。【结论】腹腔内注射 20 mg/kg 白消安小鼠的死亡率、睾丸指数均较低,中空曲细精管数量多,且恢复较慢,适于做精原干细胞移植的受体,合适的移植时间是白消安处理后 5~7 周。

【关键词】 精原干细胞;白消安;昆明小鼠;移植受体模型

【中图分类号】 S865.1⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)08-0051-06

Establishment of transplantation model for spermatogonial stem cells in Kunming mice with busulfan treatment

WANG Ju-hua^a, XIE Qian-qian^a, FAN Cai-yun^a, FANG Fu-gui^a,
ZHOU Jie^a, CAO Hong-guo^a, ZHANG Xiao-rong^{a,b}

(a College of Animal Science and Technology, b Anhui Provincial Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: 【Objective】 Different doses of busulfan were injected to Kunming (KM) mice at age of 6 weeks by intra-abdominal to produce receptor model for transplantation of spermatogonial stem cells. 【Method】 A total of 104 male KM mice were randomly divided into 4 groups and treated with different doses of busulfan (0, 10, 20 and 30 mg/kg body weight). After 5, 7, 9, 11 and 13 weeks, mortality, body weight, testicle weight, the testicular index, the number of seminiferous tubule with spermatogenesis and

【收稿日期】 2014-01-21

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2011AA100307);国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08008-007B)

【作者简介】 王菊花(1975—),女,内蒙古锡盟人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事动物营养生殖生理研究。
E-mail:wjhxh@163.com

【通信作者】 章孝荣(1954—),男,安徽枞阳人,教授,博士生导师,主要从事动物繁育及胚胎生物技术。

blood cells were analyzed. 【Result】 The mortalities were 0 (0/22), 11.54% (3/26), 17.86% (5/28) and 89.29% (25/28) for 0, 10, 20 and 30 mg/kg groups, respectively. Testicular indexes in control were significantly higher than in 10 mg/kg group 5, 7, and 9 weeks after busulfan treatment ($P < 0.05$). However, 11 and 13 weeks after busulfan treatment, they were insignificantly different ($P > 0.05$). Regardless of injecting dose, testicular index in 20 mg/kg group were significantly higher than the control and 10 mg/kg group ($P < 0.05$) all the time. Seminiferous epithelia of the control group had no obvious degenerative changes after 5, 7, 9, 11 and 13 weeks. The tubules with complete spermatogenesis were $(49.56 \pm 8.23)\%$, $(66.61 \pm 6.13)\%$, $(80.24 \pm 10.42)\%$, $(93.87 \pm 3.23)\%$ and $(92.49 \pm 4.58)\%$ in 10 mg/kg group. $(8.73 \pm 9.22)\%$, $(9.89 \pm 6.39)\%$, $(29.21 \pm 12.31)\%$, $(49.64 \pm 3.59)\%$ and $(81.99 \pm 4.98)\%$ of seminiferous tubules showed complete spermatogenesis in 20 mg/kg group after 5, 7, 9, 11 and 13 weeks. The number of blood cells changed along with time and dose of busulfan treatment. 【Conclusion】 The optimal dose of busulfan was 20 mg/kg and the most appropriate time for transplantation was 5—7 weeks after busulfan treatment.

Key words: spermatogonial stem cells; busulfan; KM mouse; transplantation model

精原干细胞(SSCs)是一群具有高度自我更新和分化潜能的细胞,是雄性成体内惟一能向子代传递遗传信息的干细胞。SSCs 移植技术可为治疗雄性不育和生产转基因动物开拓新方法^[1]。然而,降低或消除受体内源性生殖细胞是 SSCs 移植成败的关键步骤之一^[2]。目前常采用注射白消安(Busulfan)和辐射处理来消除或降低受体内源性生殖细胞,其中以注射白消安法应用较为普遍^[3-4],这主要是由于白消安不影响细胞 DNA 的合成,仅对细胞有丝分裂周期中的 G1 期有毒性作用,抑制 G1 期后的有丝分裂。当白消安作用于睾丸时,优先作用于 SSCs,在有效地去除睾丸中内源性 SSCs 的同时,又能够保持支持细胞的正常功能,不影响睾丸曲细精管精子发生的微环境,且操作方便^[3]。而辐射处理不具有此优势。目前,尽管已建立了多种小鼠、大鼠睾丸生精细胞移植受体模型^[3-5],但在受体制作过程中,白消安注射剂量往往会随受体动物品种不同而发生变化,昆明鼠是国内广泛使用的小鼠品种,迄今仍不明确其对白消安的敏感程度、合适处理剂量和移植时间。本试验拟通过对 6 周龄昆明(KM)小鼠腹腔单次注射不同剂量白消安的方法,建立无精子症小鼠受体模型,以期为 SSCs 移植、治疗雄性不育和生产转基因动物提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

104 只 6 周龄 KM 小鼠购自南京晓庄兽医学院,小鼠平均体质量为 (17.22 ± 3.41) g/只。白消安(Busulfan)、二甲基亚砷(DMSO),美国 Sigma 公司产品。

1.2 试验方法

将白消安用 DMSO 生理盐水配制成 20 mg/mL 的储备液,备用。将小鼠随机分成 4 组,即对照组及 10, 20 和 30 mg/kg 白消安组,各组小鼠数量分别为 22, 26, 28 和 28 只,根据小鼠体质量,各组小鼠分别腹腔注射 DMSO 生理盐水及 10, 20 和 30 mg/kg 白消安。白消安注射液应置于 37 ℃ 水浴中,防止凝固。腹腔注射后小鼠按常规进行饲养。每天观察并记录小鼠的存活情况。

1.3 样品采集与分析

注射白消安 5, 7, 9, 11 和 13 周后分别记录每组小鼠死亡率,每次每组均通过眼眶下采血处死 3~4 只小鼠,分别采集小鼠睾丸,记录睾丸质量及小鼠体质量,计算睾丸指数 = 单个睾丸质量/体质量 $\times 10\,000$ ^[6]。之后将采集的小鼠睾丸,用质量分数 4% 多聚甲醛溶液固定过夜,常规方法制作 5 μm 厚的石蜡切片,并进行苏木素-伊红染色,统计睾丸中带有完整精子发生的生精小管数量占全部生精小管的百分比^[7]。将采集血样用肝素抗凝处理后,分析血液中白细胞和红细胞数量。

1.4 数据处理

试验数据以“平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm \text{SEMs}$)”表示,采用 SPSS 17.0 软件进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 白消安处理对小鼠死亡率的影响

本研究发现,小鼠的死亡率与白消安剂量呈依赖性增加关系,在注射白消安 13 周后,对照组和 10, 20, 30 mg/kg 白消安组小鼠的死亡率分别为 0

(0/22),11.54%(3/26),17.86%(5/28)和 89.29%(25/28),以注射 30 mg/kg 白消安组死亡率最高。可见 30 mg/kg 白消安对小鼠的致死作用较强,不适宜作为受体模型。故后续试验均不分析 30 mg/kg 白消安组小鼠各项指标的变化。

2.2 白消安处理对小鼠睾丸质量的影响

白消安对小鼠睾丸质量的影响见图 1。

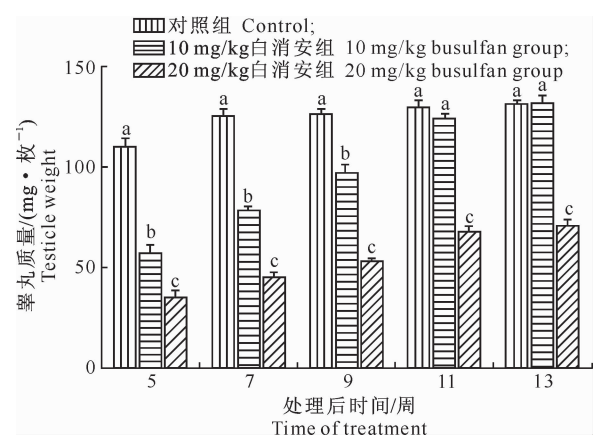


图 1 白消安对小鼠睾丸质量的影响

图柱上标不同小写字母表示同一时间不同组间差异显著($P<0.05$)。下同

Fig.1 Effect of busulfan on weight of mouse testis

Different letters indicate significant difference among different groups at the same time ($P<0.05$). The same below

由图 1 可知,10 mg/kg 白消安组小鼠睾丸质量在注射 5,7 和 9 周后显著低于对照组($P<0.05$);在注射后第 11 和 13 周睾丸质量逐渐恢复正常,与对照组差异不显著($P>0.05$)。20 mg/kg 白消安组小鼠在注射 5,7,9,11 和 13 周后,睾丸质量均显著低于对照组和 10 mg/kg 白消安组($P<0.05$)。10 和 20 mg/kg 白消安组小鼠睾丸质量均随着注射后时间的延长而增加,但 20 mg/kg 白消安组增加缓慢。在注射后 5,7,9 和 11 周后,各组小鼠睾丸质量均表现为对照组>10 mg/kg 白消安组>20 mg/kg 白消安组,即随着白消安剂量的增加睾丸质量减轻。但在注射后 13 周 10 mg/kg 白消安组小鼠睾丸质量与对照组相近,说明 10 mg/kg 白消安组睾丸质量在注射后 13 周恢复正常。

2.3 白消安处理对小鼠睾丸外观体积的影响

由图 2 可知,注射后 5 周的小鼠睾丸的外观体积以对照组最大,10 和 20 mg/kg 白消安组的睾丸外观体积较小,且两组差异不明显;注射后 7 和 9 周睾丸的外观体积表现为对照组>10 mg/kg 白消安组>20 mg/kg 白消安组;注射后 11 和 13 周,10 mg/kg 白消安组小鼠睾丸外观体积与对照组的差异减小,但 20 mg/kg 白消安组小鼠睾丸外观体积仍明显小于对照组和 10 mg/kg 白消安组。



图 2 白消安对小鼠睾丸外观体积的影响

a、b、c、d、e 分别为注射白消安 5,7,9,11 和 13 周各组小鼠睾丸;1~3 分别为对照组及 10 和 20 mg/kg 白消安组

Fig.2 Effect of busulfan on shape of mouse testis

a,b,c,d, and e are testis of mice 5,7,9,11 and 13 after busulfan treatment;1-3 are control, 10 and 20 mg/kg busulfan groups, respectively

2.4 白消安处理对小鼠睾丸指数的影响

睾丸指数可以更加客观地评价白消安处理后小鼠睾丸大小的变化。由表 1 可知,10 mg/kg 白消安组小鼠的睾丸指数在注射后 5,7 和 9 周显著小于对

照组($P<0.05$),而在注射后 11 和 13 周,两组差异不显著($P>0.05$);在注射后不同时间,对照组和 10 mg/kg 组的睾丸指数均显著高于 20 mg/kg 白消安组($P<0.05$)。

表 1 白消安对小鼠睾丸指数的影响($n=8$)

Table 1 Effect of busulfan on mouse testicular index ($n=8$)

组别 Group	处理后时间/周 Time of treatment				
	5	7	9	11	13
对照组 Control	63.1±6.32 a	83.1±7.34 a	78.8±4.16 a	64.5±1.86 a	55.8±5.21 a
10 mg/kg 白消安组 10 mg/kg busulfan group	52.5±3.95 b	51.8±5.33 b	50.1±5.29 b	65.2±4.16 a	61.4±4.26 a
20 mg/kg 白消安组 20 mg/kg busulfan group	35.8±5.23 c	31.2±3.47 c	27.0±3.76 c	34.6±6.22 c	39.1±3.64 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference between the control and experiment groups at the same time ($P<0.05$).

2.5 白消安处理后小鼠睾丸组织学变化

有完整精子发生的曲细精管占整个曲细精管的百分比可以反映白消安处理后睾丸恢复情况,因此可以通过计算每视野下带有完整精子发生的生精小管数量占全部生精小管的百分比,来评价睾丸精子发生的恢复情况。如图 3 所示,在注射白消安 5,7,9,11 和 13 周后,对照组曲细精管上皮无变化,表明精子发生未受干扰(图 3-A1,B1,C1,D1,E1)。10 mg/kg 白消安组在处理 5,7,9,11 和 13 周,带有完整精子发生的曲细精管率分别为 $(49.56 \pm$

$8.23)\%$, $(66.61 \pm 6.13)\%$, $(80.24 \pm 10.42)\%$, $(93.87 \pm 3.23)\%$ 和 $(92.49 \pm 4.58)\%$ (图 3-A2,B2,C2,D2,E2)。而 20 mg/kg 白消安组在处理 5,7,9,11 周,生殖细胞严重枯竭(图 3-A3,B3,C3,D3),在处理 13 周,生殖细胞有所恢复(图 3-E3);在处理 5,7,9,11 和 13 周,带有完整精子发生的曲细精管率分别为 $(8.73 \pm 9.22)\%$, $(9.89 \pm 6.39)\%$, $(29.21 \pm 12.31)\%$, $(49.64 \pm 3.59)\%$ 和 $(81.99 \pm 4.98)\%$ 。

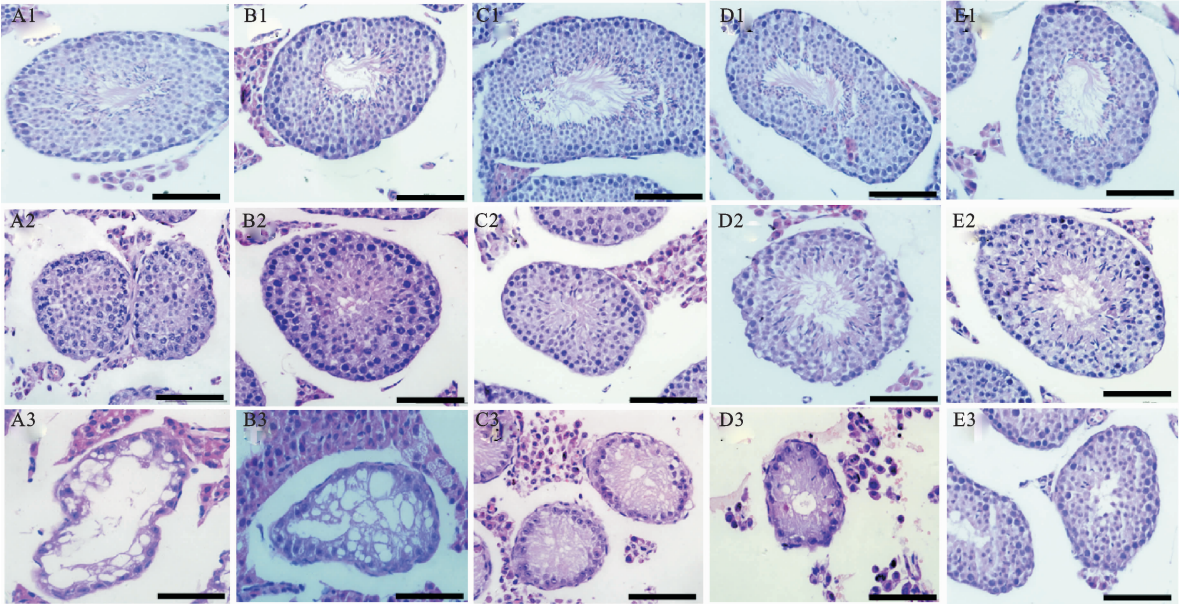


图 3 白消安对小鼠睾丸曲细精管的影响

A1,B1,C1,D1 和 E1 分别表示注射后 5,7,9,11 和 13 周对照组睾丸组织学变化;A2,B2,C2,D2 和 E2 分别表示注射 5,7,9,11 和 13 周后 10 mg/kg 白消安组睾丸组织学变化;A3,B3,C3,D3 和 E3 分别表示注射后 5,7,9,11 和 13 周后 20 mg/kg 白消安组睾丸组织学变化。Bar=100 nm

Fig. 3 Effects of busulfan on histological appearance of testis tissue in mice

A1,B1,C1,D1 and E1 show the testis tissue appearance of the control (0 mg/kg of busulfan) after 5,7,9,11 and 13 weeks, respectively;A2,B2,C2,D2 and E2 show the testis tissue appearance of mice treated with 10 mg/kg of busulfan after 5,7,9,11 and 13 weeks, respectively;A3,B3,C3,D3 and E3 show the testis tissue appearance of mice treated with 20 mg/kg of busulfan after 5,7,9,11 and 13 weeks, respectively. Bar=100 nm

2.6 白消安处理对小鼠红细胞和白细胞数量的影响

由图 4 可知,10 mg/kg 白消安组红细胞数量在处理 5 周与对照组差异不显著($P>0.05$),而在处理 7,9,11 和 13 周均显著低于对照组($P<0.05$);而白细胞数在处理 5 和 9 周与对照组没有显著性差异($P>0.05$),但在处理 7,11 和 13 周显著低于对照组($P<0.05$)。20 mg/kg 白消安组红细胞和白细胞数量在处理 5,7,9,11 和 13 周均显著低于对照组($P<0.05$);而在处理后不同时间

红细胞数量均显著低于 10 mg/kg 白消安组($P<0.05$),白细胞数量仅在处理 5,7 和 9 周与 10 mg/kg 白消安组差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

SSCs 移植技术是治疗雄性不育、生产转基因动物的一种有效手段^[8]。然而,合适受体模型的建立是成功移植的决定性因素。为了提高 SSCs 的移植成功率,需要清除内源性的生殖细胞,从而使移植的 SSCs 易迁移到达生殖上皮的基膜而定居,进而启动

供体的精子发生过程^[9]。一些研究表明,注射 38~40 mg/kg 白消安能完全消除内源性精子的发生过程^[7,10]。在运用白消安处理受体时,同种动物的不同品系对其耐受力不同^[11]。Moisan 等^[12]报道,对 RAG2 小鼠用 25 mg/kg 白消安处理后,死亡率为 12%,用 30 mg/kg 白消安处理后的死亡率为 37%,用 40 和 50 mg/kg 白消安处理后的死亡率约为

50%。在本研究中,随着白消安剂量的增大小鼠的死亡率也在增加,在注射 30 mg/kg 白消安后,KM 小鼠死亡率高达 89.29%。说明 KM 小鼠比其他小鼠对白消安更敏感,这也进一步证实了王永彬等^[13]的研究结果。通过白消安对小鼠的致死情况分析可知,10 和 20 mg/kg 白消安处理的小鼠死亡率较低,可作为 KM 小鼠的处理剂量。

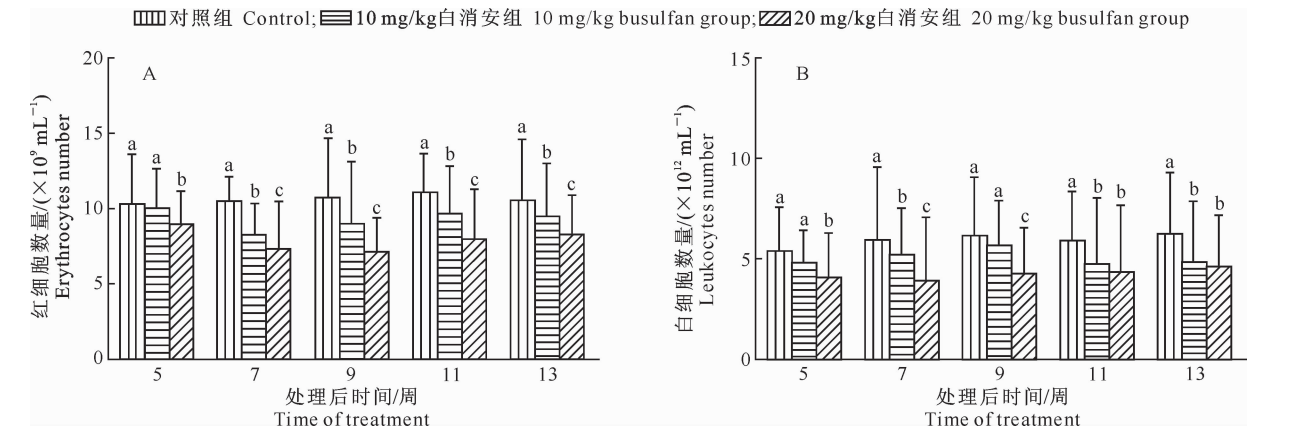


图 4 白消安对小鼠红细胞(A)和白细胞数量(B)的影响
Fig. 4 Effect of busulfan on number of erythrocytes (A) and leukocyte (B)

在本研究中,注射白消安后睾丸发育明显受阻,质量减轻,体积变小。但经过一段时间后,睾丸质量和体积均有所恢复,注射低剂量(10 mg/kg)白消安组的恢复速度快于高剂量组(20 mg/kg)。张伟等^[11]研究表明,以 30 和 40 mg/kg 白消安处理 ICR 小鼠 4 和 8 周后,两组小鼠睾丸质量在处理后相同时间点均显著低于对照组,但处理后 12 周睾丸质量逐渐恢复,与对照组差异均不显著,这与本研究结果相似。

睾丸指数能够更准确地反映不同个体间睾丸的大小。在本试验中,无论注射剂量高低,在注射白消安后 9 周睾丸指数明显下降。孙森^[6]研究表明,白消安处理小鼠 40 d 后睾丸指数明显下降,与本研究结果一致。随着注射后时间的延长,睾丸指数先下降,然后呈上升趋势。而高剂量(20 mg/kg)白消安组睾丸指数恢复速度明显低于低剂量组(10 mg/kg)。由此可说明 20 mg/kg 白消安组可以为外源性 SSCs 在受体睾丸中迁移提供足够的时间。由于 10 mg/kg 白消安处理的受体鼠睾丸中带有完整精子发生的曲细精管率较高,会影响供体生殖细胞向受体睾丸基膜的迁移效率,从而会使移植效率明显降低,故此剂量白消安处理的受体鼠不适宜作为受体模型。Zohni 等^[14]研究表明,无论处理剂量如

何,受体鼠在白消安处理后,曲细精管的恢复随移植时间的延长均表现为先慢后快,最后达到一个平台期,与本研究结果相似。尽管在白消安处理后,受体精子发生恢复的能力受多重因素的影响^[15],但笔者认为,白消安剂量的大小可能是最关键的影响因素。多数研究认为,在白消安处理后至少 4 周可用来作为受体鼠^[3,5],本研究结果表明移植的时间不应超过处理后 9 周,最佳移植时间为处理后 5~7 周。

白消安能引起骨髓微环境破坏从而影响造血细胞的修复,使造血细胞再生能力降低。本研究结果表明,白消安处理后,小鼠血液中白细胞和红细胞数量均有所减少,但经过一段时间后逐渐恢复。血细胞数量随着白消安处理剂量的升高呈剂量依从性降低^[16],说明白消安对小鼠的亚致死性可能是由于贫血和抵抗力下降所致。所以,研究适宜的白消安处理剂量和把握合适的移植时间,在 SSCs 移植的临床应用上具有重要的意义。本研究结果表明,注射 20 mg/kg 白消安小鼠的死亡率较低,且睾丸恢复较慢,可用于精原干细胞移植,最佳移植时间为白消安处理后 5~7 周。

[参考文献]

[1] Ryu B Y,Orwig K E,Oatley J M,et al. Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral

- transduction and transplantation of spermatogonial stem cells [J]. *Journal of Andrology*, 2007, 28(2): 353-360.
- [2] Shinohara T, Kato M, Takehashi M, et al. Rats produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and *in vitro* microinsemination [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(37): 13624-13628.
- [3] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ cell transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11298-11320.
- [4] Jiang F X, Short R V. Male germ cell transplantation in rats: Apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia [J]. *Int J Androl*, 1995, 1(8): 326-330.
- [5] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Miki H, et al. Genetic influences in mouse spermatogonial stem cell self-renewal [J]. *J Reprod Dev*, 2010, 56(1): 145-53.
- [6] 孙 森. 精原及胚胎干细胞在睾丸环境中的增殖与分化 [D]. 北京: 首都师范大学, 2005.
- Sun M. Proliferation and differentiation of spermatogonia and embryonic stem cells in testicular niche [D]. Beijing: Capital Normal University, 2005. (in Chinese)
- [7] Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Morimoto T, et al. Functional assessment of self-renewal activity of male germline stem cells following cytotoxic damage and serial transplantation [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(5): 1801-1807.
- [8] Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2010, 52(3): 303-310.
- [9] Ogawa T, Ohmura M, Ohbo K. The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis [J]. *Int J Hematol*, 2005, 82(5): 381-388.
- [10] Pérez-Crespo M, Pericuesta E, Pérez-Cereales S, et al. Effect of liver growth factor on both testicular regeneration and recovery of spermatogenesis in busulfan-treated mice [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011, 9: 21.
- [11] 张 伟, 夏小雨, 丁 慧, 等. 睾丸生精小管干细胞移植受体模型建立与移植技术改进 [J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(8): 703-707.
- Zhang W, Xiao X Y, Ding H, et al. Establishment of recipient mouse model of stem cell transplantation into testicular seminiferous tubules and improvement of transplantation techniques [J]. *National Journal of Andrology*, 2009, 15(8): 703-707. (in Chinese)
- [12] Moisan A E, Foster R A, Betoeridge K J, et al. Dose-response of RAG2 mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation [J]. *Reproduction*, 2003, 126(2): 205-216.
- [13] 王永彬, 刘国世, 朱士恩, 等. 精原干细胞移植受体鼠模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(11): 27-31.
- Wang Y B, Liu G S, Zhu S E, et al. Model establishment of transplantation of spermatogonial stem cells in mice [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2007, 17(11): 27-31. (in Chinese)
- [14] Zohni K, Zhang X, Tan S L, et al. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice [J]. *Human Reproduction*, 2012, 27(1): 44-53.
- [15] Ehmecke J, Joshi B, Hergenrother S D, et al. Aging does not affect spermatogenic recovery after experimentally induced injury in mice [J]. *Reproduction*, 2007, 133(1): 75-83.
- [16] 林东红, 郭俊英, 黄慧芳, 等. 白消安诱发造血功能障碍小鼠模型的建立及淋巴细胞转化功能的测定 [J]. *福建医科大学学报*, 2002, 36(4): 359-361.
- Lin D H, Guo J Y, Huang H F, et al. A mouse model with hematopoietic stem cells failure induced by myleran and determination of lymphocyte transform function [J]. *Journal of Fujian Medical University*, 2002, 36(4): 359-361. (in Chinese)