

棕色田鼠睾丸和附睾雌激素 α 受体表达的增龄变化

王慧春¹, 邵发道^{1,*}, 廉漪²

(1. 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 应用免疫组织化学方法系统研究了初生(1日龄)到成体(60日龄)5个发育阶段各6只棕色田鼠睾丸和附睾内雌激素受体 α (ER α) 的表达。结果发现: ①在生殖细胞中, 1日龄组幼鼠的生殖母细胞和支持细胞有微弱的 ER α 阳性表达, 10日龄组精原细胞中 ER α 有弱表达, 25日龄组精子细胞出现了较强 ER α 阳性表达, 发育到45日龄时精子细胞 ER α 阳性表达最强, 成体组中各级生精细胞中均有 ER α 阳性表达。②在间质细胞中, 1日龄组间质前体细胞有 ER α 阳性表达, 10日龄表达减弱, 而到25日龄增强, 至45日龄达到峰值, 而成体又减弱。③附睾中, 1日龄附睾上皮细胞有 ER α 阳性表达, 10和25日龄附睾管类肌细胞出现 ER α 阳性表达, 45日龄和成体附睾管上皮细胞和类肌细胞中均有 ER α 阳性表达。上述结果表明, ER α 可能作为一种特异性受体在棕色田鼠睾丸发育过程中影响睾丸间质细胞雄激素的分泌, 进而调节生精过程和精子的发育成熟。

关键词: 棕色田鼠; 睾丸; 附睾; 雌激素受体 α ; 免疫组织化学

中图分类号: Q959.837; Q492 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2005) 04–0435–07

Age-specific Changes in Estrogen Receptors α in Testis and Epididymis of Mandarin Voles (*Microtus mandarinus*)

WANG Hui-chun¹, TAI Fa-dao^{1,*}, LIAN Yi²

(1. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: In order to investigate the age-specific effect of estrogen receptor α (ER α) in testis and epididymis of mandarin voles (*Microtus mandarinus*), the expression of ER α from five age groups [1 (neonatal), 10, 25, 45, and 60 (adult) days of age] was observed using immunohistochemistry. There were several kinds of ER α -immunoreactive cells in the testes and epididymis of normal voles, such as Leydig cells, spermatogenic cells, as well as myoid cells and epithelial cells of the epididymis. The distributions and staining intensity of ER α -immunoreactive cells changed greatly with age. Statistics showed that: the expression of ER α in pros-permatogonium cells and gonocyte was weak in the neonatal vole. The expression of ER α in spermatids appeared at postnatal day 25, as well as day 45 of age. The expression of ER α was detected in every developmental stage of germ cell in the adult vole. The expression of ER α in Leydig cells appeared in the neonatal vole followed by a decrease in intensity at postnatal day but increasing at postnatal day 25. The expression intensities of ER α in Leydig cells peaked at day 45 but decreased in the adult. The expression of ER α in epithelial cells was found in the neonatal vole and was detected in myoid cells at postnatal days 10 and 25. In the epididymes of 45 day old and adult voles, myoid cells and epithelial cells expressed ER α positively. Those results imply a molecular mechanism of ER α action. Specifically, ER α may affect the secretion of androgen in Leydig cells as special receptors during postnatal development and spermatogenesis of mandarin voles.

Key words: Mandarin vole (*Microtus mandarinus*); Testis; Epididymis; Estrogen receptor α ; Immunohistochemistry

雌激素对于雄性生殖系统的正常发育和功能是
必不可少的。雌激素的作用机制主要是通过雌激素

受体 α (ER α) 来调节生殖系统的正常发育。转基因动物实验显示, ER α 基因敲除 (ER α KO) 的雄性

* 收稿日期: 2005–01–11; 接受日期: 2005–05–20

基金项目: 教育部科学技术重点项目 (03149); 国家自然科学基金资助项目 (30200026); 陕西师范大学重点项目

* 通讯作者 (Corresponding), E-mail: taifadao@snnu.edu.cn

小鼠睾丸明显小于野生型鼠,且曲细精管上皮变薄,精子数量和动物交配次数减少,生殖能力下降(Eddy et al, 1996)。说明雌激素受体在雄性生殖中的作用明显。1993年, ER α KO 雄性小鼠就被用于评价输出小管液体重吸收情况(Lubahn et al, 1993)。1996年研究发现, ER α KO 雄性小鼠不能生育,虽然睾丸在青春前期是正常的,但在出生 20~40 d 后开始异常,到第 150 天时,睾丸已经萎缩,附睾精子数减少并且异常(Eddy et al, 1996), Hess et al (2001b) 认为内源性雌激素的作用机制之一是通过 ER α 来调节睾丸输出小管和附睾头部睾网液的重吸收。尽管已有少数关于 ER α 分布定位的形态学的报道,但是结果颇不一致,有的认为 ER α 只在间质细胞中有表达,有的却认为在生殖细胞中也有分布(O'donnell et al, 2001)。大鼠和小鼠的实验证明间质细胞中有 ER α 的表达(Fisher et al, 1997; Pelletier & Mohamed, 2000; Pelletier et al, 2000; Saunders et al, 2001),而在灵长类中的表达结果却不一致。Fisher et al (1997) 发现在一些非人灵长类睾丸间质细胞中有 ER α 分布,但在 West & Brenner (1990) 和 Saunders et al (2001) 的研究中却没有发现。可见不同研究者的研究结果存在较大分歧。棕色田鼠(*Microtus mandarinus*)属仓鼠科田鼠亚科田鼠属,营地下生活,在我国分布于陕西、山西、河南、内蒙古、河北、安徽、山东、江苏北部及东北地区,国外主要分布于俄罗斯、蒙古等地。它们主要生活于农田果园,对农作物及果树造成很大的危害,是一类危害极大的害鼠。有关田鼠睾丸和附睾雌激素受体表达的研究目前尚未见报道。本实验利用免疫组化技术观察了雌激素受体(ER α)在棕色田鼠睾丸和附睾中的表达定位,并系统观察了其发育过程中的表达规律,以期阐明雌激素受体(ER α)在雄性睾丸附睾的调控作用提供依据,并为从激素角度防治害鼠开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 动物取材与切片制备

棕色田鼠捕自河南省灵宝市程村,饲养于陕西师范大学动物饲养房的塑料饲养笼(0.4 m × 0.28 m × 0.15 m)中,巢材为棉花,垫料为木屑。室温(23 ± 1)℃,光照周期 12L:12D(光照时间 07:00—19:00),食物、饮水充足。实验鼠分别为出生后 1(24 h)、10、25、45 和 60 日龄(成体)共

5 组,每组选用动物 6 只。称重后用 4 mg/mL 戊巴比妥钠麻醉(1 mg/100 g 体重),4%的多聚甲醛灌注固定后摘取睾丸附睾,固定于改良 Bouin's 液中,常规脱水透明,石蜡包埋,制成 6 μm 的连续切片,切片裱于覆有多聚赖氨酸的载玻片上恒温箱烤干。

1.2 免疫细胞化学染色

切片脱蜡复水后,用 1% 甲醇-过氧化氢液孵育 20 min 以封闭内源性过氧化物酶,然后进行热修复抗原,用武汉博士德生物工程公司提供的 SABC 试剂盒中的抗原修复液在室温条件下修复抗原 10 min,经山羊血清于 37℃ 孵育 30 min 后,加入 ER α 兔抗多克隆抗体(1:100,博士德)置于 4℃ 冰箱过夜,再加入生物素化羊抗兔 IgG 二抗,37℃ 处理 30 min,最后加入试剂盒中的 SABC 孵育 30 min,经 DAB(博士德)显色镜下控制,蒸馏水充分冲洗终止反应,以上各步间均用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。然后按常规脱水、透明、中性树胶封片,光镜观察。对照组用 0.01 mol/L 的 PBS 替代一抗进行免疫细胞化学染色,其他步骤同实验组。

1.3 图像分析

用 Qwin V₃ 图像分析系统(Lecia)对不同发育阶段大鼠睾丸 ER α 的免疫组织化学结果进行灰度测试。每个材料随机选取 3 张切片,每张切片随机选取 6 个视野测试 10 个阳性细胞的灰度值取其灰度平均值,即每组共测出 18 个数据,用 SPSS10.0 for Windows 进行统计学分析。所测数据符合正态分布,经 Bartlett 检验,方差齐性后,ANOVA 双尾检测。根据平均值 ± 标准差绘制统计表。

2 结果

免疫细胞化学染色结果中的 ER α 阳性细胞,其阳性颗粒为浅黄色至棕黄色,在胞质或胞核内表达。

2.1 生殖细胞

从出生到成体 ER α 在生精上皮中表达不一,变化明显。1 日龄组生殖母细胞、支持细胞中偶有弱阳性表达(图 1)。随着细胞的分裂分化,10 日龄幼鼠生精小管中的生殖细胞主要为精原细胞,呈弱阳性表达(图 2);25 日龄,生精小管中出现完好管腔,未发育成熟的精子细胞的胞核中出现阳性表达(图 3);45 日龄,出现各级生殖细胞,但是精子很少见,ER α 阳性表达主要呈现于精子细胞中

(图 4)。随着生殖细胞的发育, 性成熟完成, 此时生殖上皮中包含了各级生精细胞, 生精小管管腔中形成大量的精子, $ER\alpha$ 在各级生精细胞中均有表达: 精子中阳性表达最强 (图 5), 其平均灰度值为 129.80 ± 7.90 (表 1); 其次是精母细胞和精子细胞; 精原细胞表达最弱, 其平均灰度值为 144.56 ± 6.58 (表 1)。此外在 45 日龄幼鼠睾丸的肌样细胞中也偶有表达。对照组结果均呈阴性表达 (图 6)。

表 1 不同发育阶段的棕色田鼠睾丸生殖细胞 $ER\alpha$ 阳性表达

Tab. 1 Positive expression of $ER\alpha$ in germ cells of mandarin voles testis during postnatal development

年龄 (日龄) Age (postnatal days)	$ER\alpha$ 阳性细胞的灰度值 Grey scale of $ER\alpha$ positive cells (mean \pm SD)			
	(前) 精原细胞 Spermatogonium	精母细胞 Gonocyte	精子细胞 Spermatid	精子 Germ cell
1	0	0	0	0
10	170.39 ± 4.29	0	0	0
25	-	-	118.30 ± 8.58	0
45	-	-	100.32 ± 7.21	0
60 (成体 Adult)	144.56 ± 6.58	137.53 ± 6.06	132.19 ± 6.47	129.80 ± 7.90

- 表示 $ER\alpha$ 阴性反应 (Representing $ER\alpha$ negative reaction)

表 2 不同发育阶段的棕色田鼠睾丸间质细胞 $ER\alpha$ 阳性表达

Tab. 2 Positive expression of $ER\alpha$ in Leydig cells of mandarin voles testis during postnatal development

年龄 (日龄) Age (postnatal days)	$ER\alpha$ 阳性睾丸间质细胞灰度值 Grey scale of $ER\alpha$ positive Leydig cells (mean \pm SD)
1	104.93 ± 7.76^A
10	139.19 ± 3.68^B
25	102.99 ± 3.91^C
45	79.90 ± 3.28^D
60 (成体 Adult)	120.02 ± 8.74^E

同列上标字母不同的平均数间差异极显著 (ANOVA 方差分析检验: $n = 6, P < 0.001$)

Means with different superscript letters are significantly different in the same column (ANOVA test: $n = 6, P < 0.001$).

2.3 附 睾

由于附睾在发育过程中变化较大, 所以 $ER\alpha$ 在附睾中的表达也有明显的不同。1 日龄组附睾的附睾头、附睾体、附睾尾阳性反应微弱, 主要在附睾上皮细胞中出现 (图 7); 10 和 25 日龄组, 附睾头与附睾体尾的表达变化明显, $ER\alpha$ 在附睾头附睾管周围的连接组织以及平滑肌细胞中呈阳性表达 (图 8—9), 而在附睾体和附睾尾见于构成管壁的类型肌

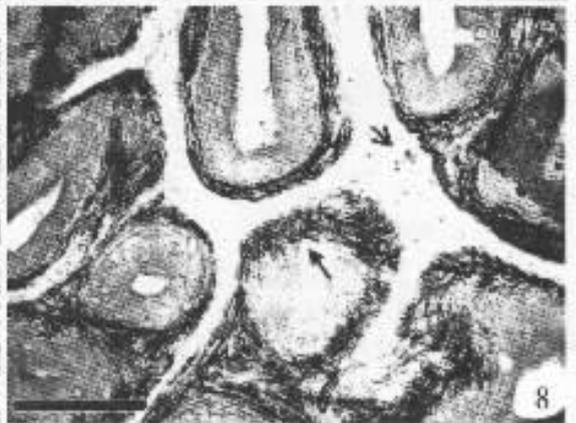
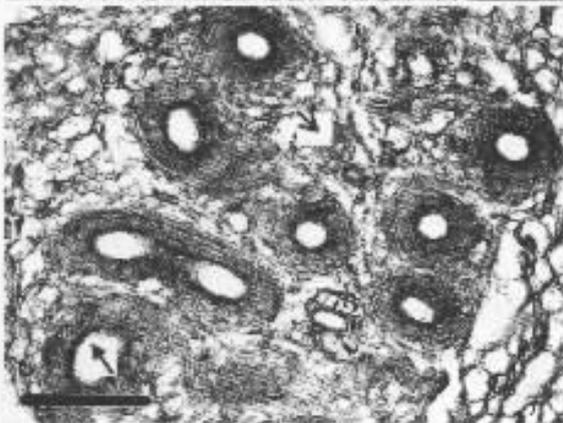
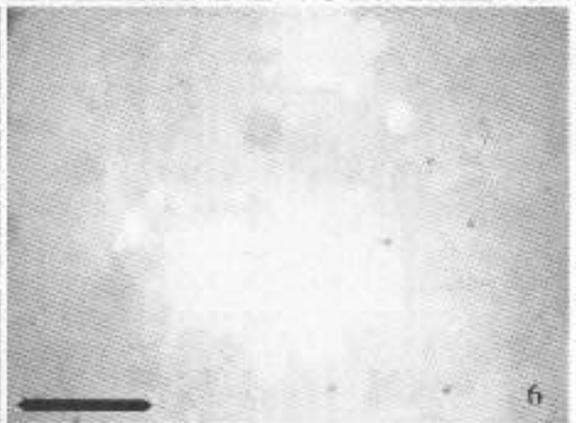
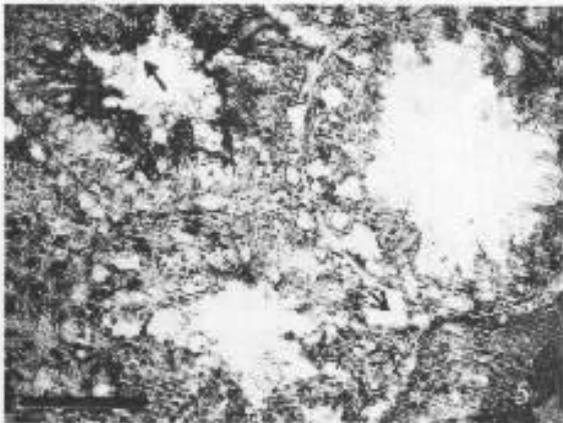
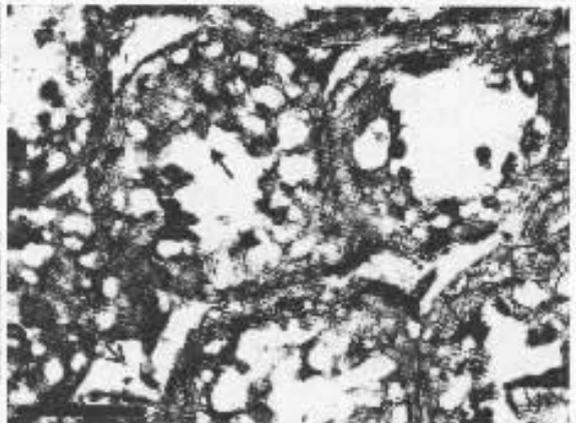
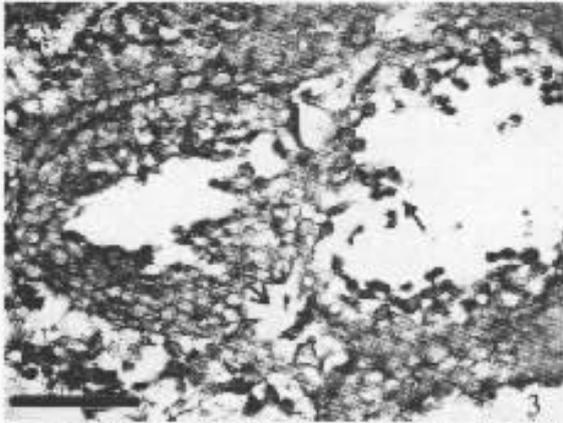
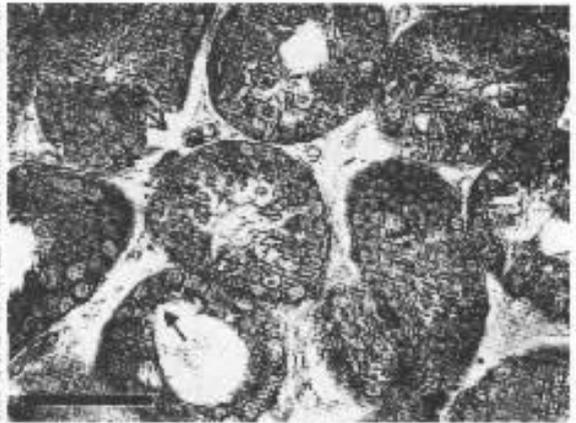
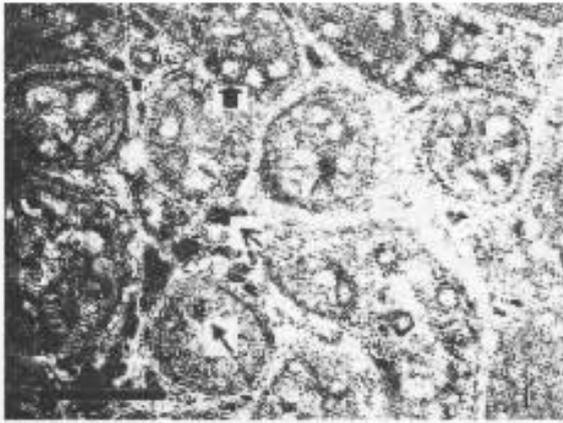
2.2 间质细胞

从出生到性成熟间质细胞均呈 $ER\alpha$ 阳性表达, 只是表达强度随日龄的增加变化明显。1 日龄阳性反应强度显著高于 10 日龄 (图 1—2); 10 日龄阳性反应最弱, 且极显著低于 25 日龄 (图 2—3); 45 日龄阳性反应最强 (图 4); 之后阳性反应又减弱, 60 日龄的阳性反应仅比 10 日龄的略高 (图 5) (表 2)。

细胞, 整个附睾中管间连接组织均没有阳性反应; 45 日龄组在附睾体上皮细胞和管周的类型肌细胞中见有 $ER\alpha$ 阳性表达 (图 10); 成体附睾头管周围的连接组织未见阳性反应, 只有平滑肌细胞呈间断性阳性表达; 附睾体和尾部、附睾管类型肌细胞和构成管壁的一些上皮细胞有阳性反应 (图 11)。对照组附睾各部均为阴性反应 (图 12)。

3 讨 论

在棕色田鼠睾丸的整个发育过程中, 从幼体到成体 $ER\alpha$ 的表达主要集中于间质细胞, 与现有大部分文献报道结果一致: Rago et al (2004) 在幼体猪睾丸中利用免疫组化发现 $ER\alpha$ 在间质细胞中表达; Fisher et al (1997) 也报道新生大鼠和绒猴的间质细胞中分布有 $ER\alpha$; Pelletier et al (2000) 利用免疫组化和原位杂交显示在大鼠间质细胞中有 $ER\alpha$ 和 $ER\alpha$ mRNA 的表达。同样, 在小鼠、猫、狗睾丸间质细胞中也含有 $ER\alpha$ (Zhou et al, 2002; Sar & Welsch, 2000; Nie et al, 2002)。然而, 灵长类睾丸间质细胞是否有 $ER\alpha$ 表达和存在尚有争议。有研究表明, 一些非人灵长类间质细胞 $ER\alpha$ 免疫染色阳性 (Fisher et al, 1997), 人间质细胞 $ER\alpha$ 免疫染色也



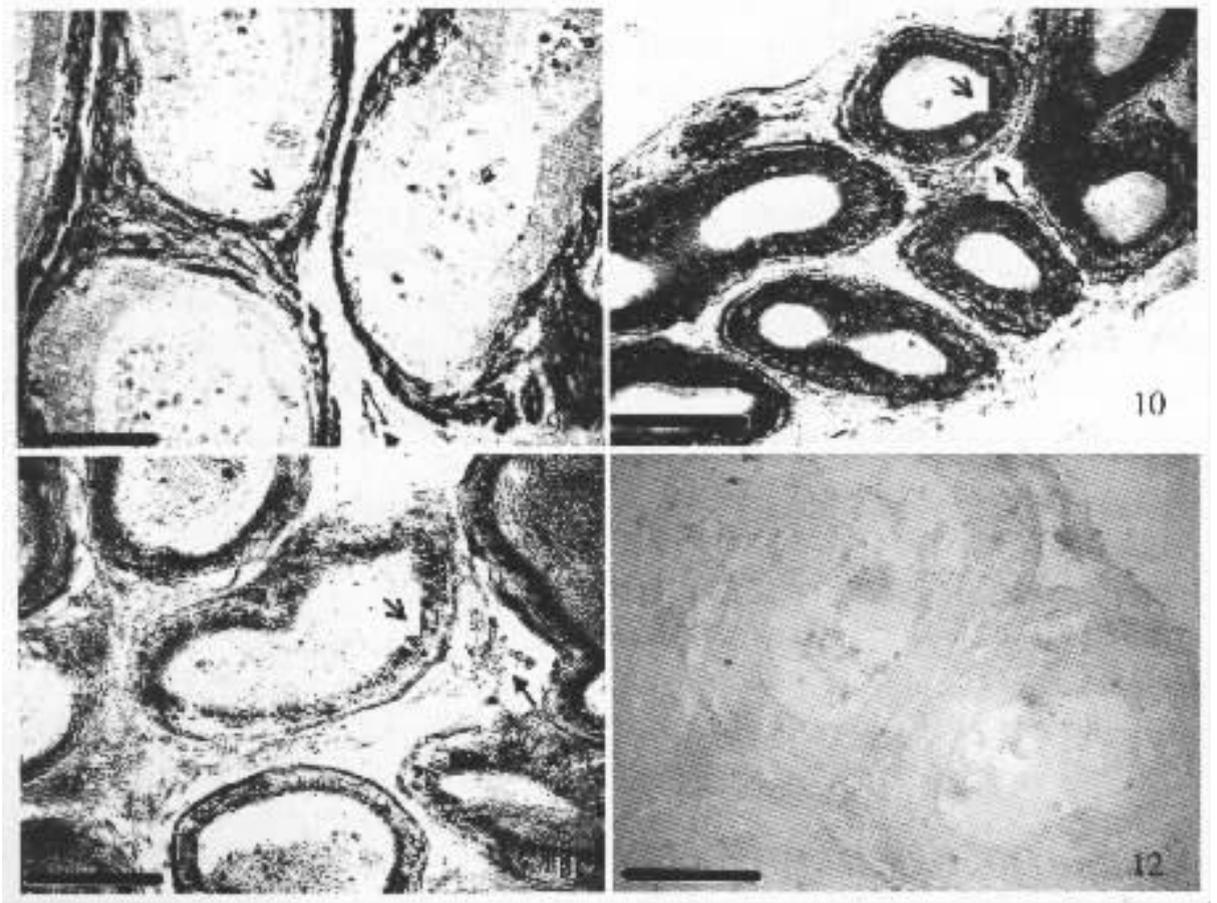


图 1—12 棕色田鼠睾丸和附睾中雌激素受体 α 的表达

Figs. 1 - 12 Expression of estrogen receptors α in testis and epididymes of mandarin voles

标尺长度均为 $10\ \mu\text{m}$ (Bar scale = $10\ \mu\text{m}$)

1. 初生组, 示 ER α 阳性表达的间质区细胞 (→), 生殖母细胞 (↪) 和支持细胞 (↑) [Showing ER α positive Leydig cell (→), gonocyte cell (↪) and sertoli cell (↑) at birth];
2. 10 日龄组, 示 ER α 阳性表达的间质区细胞 (→) 和精原细胞 (↪) [Showing ER α positive Leydig cell (→) and spermatogonium (↪) on 10 d];
3. 25 日龄组, 示 ER α 阳性表达的间质细胞 (→) 和中精子细胞 (↪) [Showing ER α positive Leydig cell (→) and spermatid (↪) on 25 d];
4. 45 日龄组, 示 ER α 阳性表达的间质细胞 (→) 和精子细胞 (↪) [Showing ER α positive Leydig cell (→) and spermatid (↪) on 45 d];
5. 成体组, 示 ER α 阳性表达的间质细胞 (→) 和精子 (↪) [Showing ER α positive Leydig cell (→) and sperm (↪) in adult];
6. 示睾丸阴性对照 (Showing negative of testis);
7. 初生组, 示 ER α 阳性表达的附睾上皮细胞 (→) [Showing ER α positive epithelial cells (→) at birth];
8. 10 日龄组, 示 ER α 阳性表达的附睾上皮细胞 (→) 阴性的连接组织 (↪) [Showing ER α positive epithelial cells (→) and negative connective tissue cells (↪) on 10 d];
9. 25 日龄组, 示 ER α 阳性表达的附睾上皮细胞 (→) 和连接组织细胞 (↪) [Showing ER α positive epithelial cells (→) and connective tissue cells (↪) on 25 d];
10. 45 日龄组, 示 ER α 阳性表达附睾上皮细胞 (→) 和连接组织细胞 (↪) [Showing ER α positive epithelial cells (→) and connective tissue cells (↪) on 45 d];
11. 成体组, 示 ER α 阳性表达附睾上皮细胞 (→) 和阴性连接组织 (↪) [Showing ER α positive epithelial cells (→) and negative connective tissue cells (↪) in adult];
12. 示附睾 ER α 阴性对照 [Showing negative of epididymis]

是阳性 (Pelletier & Mohamed, 2000); 但其他关于人类 (Saunders et al, 2001) 及非人灵长类 (Saunders et al, 2001; West & Brenner, 1990) 睾丸间质

细胞 ER α 免疫染色研究却未得出阳性结果。本实验显示, 从初生组到成体睾丸间质细胞中均有 ER α 的表达, 且随着发育阶段的不同而不同。由此可以

推测在棕色田鼠性成熟过程中 ER α 介导雌激素调节睾丸间质细胞的发育,同时也可能作为一种特异性受体影响间质细胞中雄激素的合成与分泌。在睾丸间质细胞的发育过程中,本实验首次发现 45 日龄鼠睾丸间质细胞 ER α 表达最强,其具体作用机制还有待于进一步的研究。已有研究表明,大鼠在出生第五天注射雌二醇后,到 60 日龄时睾丸中没有成熟的间质细胞,说明性成熟前大鼠间质细胞的发育受雌二醇的抑制 (Abney, 1999)。但本实验发现,棕色田鼠 25、45 日龄时,即性成熟前睾丸生精小管内未发育成熟的精子细胞中出现阳性表达,一直持续到性成熟。之前还未见类似报道。从实验结果推测,ER α 可能介导雌激素促进生殖细胞的发育,这对生殖细胞的分化、发育有重要的作用,但具体的作用机制还有待于进一步的研究。实验同时显示,在性成熟的雄性个体睾丸生精小管内,各级生精细胞均有不同程度 ER α 阳性表达。Pelletier et al (2000) 利用免疫组化和原位杂交发现,在大鼠精子细胞和次级精母细胞中有 ER α 和 ER α mRNA 的表达。Penttinen et al (2000) 对人睾丸的研究显示,ER α 在减数分裂早期的生殖细胞 (偶线期和早粗线期的初级精母细胞) 和早期的长形精子细胞中强烈表达。也有报道认为 ER α 在大鼠睾丸中的表达占主要地位 (Kuiper et al, 1997)。根据 ER α 在棕色田鼠睾丸生殖细胞中的表达结果推测,雌激素可能直接影响精子发生。也有证据表明,雌激素在睾丸中不仅间接影响生精小管中生殖细胞的发育,而且直接影响精子的发生,抑制生精细胞的的凋亡 (Penttinen et al, 2000)。啮齿类的精子发生在一定程度上受雌激素调控,即睾丸中生殖干细胞的数量和精子的成熟 (Li et al, 1997; Shetty et al, 1997)。对上述诸多关于 ER α 在睾丸分布和定位研究结果相互矛盾的现象 (这种现象在利用免疫组化技术检测时更为明显) O'donnell et al (2001) 认为,主要的原因是不同抗体的应用,因为这些抗体可以和 ER α 分子不同的区域结合,还可以检测到

不同的表位 (epitopes), 抗体的专一性不强; 另外, 组织固定、抗原修复、抗体稀释和抗体检测方法的不同, 也会影响抗体结合抗原的能力。当然也可能存在种属差异。

ER α 在成体附睾中的表达已有报道, 显示 ER α mRNA 在一些物种的附睾中有表达, 但是免疫组化的结果却不一致。并有报道认为附睾中阳性反应主要在基质细胞, 但是猫和猕猴的表达显示了区域细胞特异性, 主要表达于附睾头起始段的基细胞。在猫是整个附睾中主细胞为阳性表达, 但是狗却只是弱阳性或阴性表达 (Nie et al, 2002)。大鼠和小鼠附睾有 ER α 存在, 但含量较低 (Sar & Welsch, 2000)。灵长类输出小管无纤毛上皮细胞含有 ER α (Saunders et al, 2001)。我们的实验显示, 在棕色田鼠成体及不同发育阶段的附睾管上皮细胞和连接组织中, ER α 都有不同程度的表达。ER α 基因敲除 (ER α KO) 雄性小鼠实验证实, 雌激素可以通过影响睾丸中输出小管的形态结构来间接影响睾丸的发育和精子发生 (Hess et al, 2000)。当然, 对于 ER α 在附睾中的功能还知之甚少, 但是基于 ER α KO 雄性生殖管道形态结构的畸变不难推断, 雌激素对生殖道上皮细胞的形态有着重要的作用 (Nakai et al, 2001), 并有证据表明 ER α 对于附睾的发育有着重要的影响 (Hess et al, 1997a, 2000)。雌激素可以通过影响输出小管附睾的重吸收功能间接地影响生精小管, 从而引发睾丸萎缩 (Hess, 2000; Hess et al, 1997b, 2001a)。也有证据表明, 雌激素对于输出小管内液体重吸收和离子的转运有着重要的作用 (Lee et al, 2000; Zhou et al, 2001; Hess et al, 2001b)。由此推测, 雌激素对于附睾的发育有重要作用, 同时附睾中精子的储存和成熟也受 ER α 介导的雌激素的调控; 雌激素通过影响附睾的功能间接影响睾丸生精小管内的精子发生。但对于雌激素及其受体在附睾上皮细胞中的具体定位和作用还有待于进一步的研究。

参考文献:

- Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review [J]. *Steroids*, **64**: 610 - 617.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and

- infertility [J]. *Endocrinology*, **137**: 4796 - 4805.
- Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, Fraser HM, Sharpe RM. 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood [J]. *Journal of Endocrinology*, **153** (3): 485 - 495.

- Hess RA. 2000. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract [J]. *Reviews of Reproduction* , **5** : 84 - 92.
- Hess RA , Gist DH , Bunick D , Lubahn DB , Farrell A , Bahr J , Cooke PS , Greene GL. 1997a. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the efferent ducts of the adult male rat reproductive tract [J]. *Androl.* , **18** : 602 - 611.
- Hess RA , Dunick D , Lee KH , Bahr J , Taylor JA , Korach KS , Lubahn DB. 1997b. A role for oestrogen in the male reproductive system [J]. *Nature* , **390** : 509 - 512.
- Hess RA , Bunick D , Lubahn DB , Zhou Q , Bouma J. 2000. Morphological changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor α knockout mice [J]. *Journal of Andrology* , **21** (1) : 107 - 121.
- Hess RA , Bunick D , Bahr J. 2001a. Oestrogen , its receptors and function in the male reproductive tract : A review [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.* , **178** : 29 - 38.
- Hess RA , Zhou Q , Nie R , Oliveira C , Cho H , Nakai M , Carnes K. 2001b. Estrogen and epididymal function [J]. *Reprod. Fertil.* , **13** (11) : 273 - 283.
- Kuiper GG , Carlsson B , Grandien K , Enmark E , Haggblad J , Nilsson S , Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β [J]. *Endocrinology* , **138** : 863 - 870.
- Lee Ki-Ho , Hess RA , Bahr JM , Lubahn DB , Taylor J , Bunick D. 2000. Estrogen receptor- α has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules [J]. *Biology of Reproduction* , **63** : 1873 - 1880.
- Li H , Papadopoulos V , Vidic B , Dym M , Culty M. 1997. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol : Identification of signaling mechanisms involved [J]. *Endocrinology* , **138** : 1289 - 1298.
- Lubahn DB , Moyer JS , Golding TS , Couse JE , Korach KS , Smithies O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene [J]. *Proc. Natl. Acad. Set. USA* , **90** : 11162 - 11166.
- Nakai M , Bouma J , Nie R , Zhou Q , Carnes K , Lubahn DB , Hess RA. 2001. Morphological analysis of endocytosis in efferent ductules of estrogen receptor- α knockout male mouse [J]. *The Anatomical Record.* , **263** : 10 - 18.
- Nie R , Zhou Q , Jassim E , Saunders PTK , Hess RA. 2002. Differential expression estrogen receptors α and β in the reproductive tracts of adult male dogs and cats [J]. *Biology of Reproduction* , **66** : 1161 - 1168.
- O'donnell L , Robertson KM , Jones ME , Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis [J]. *Endocrine Reviews* , **22** (3) : 289 - 318.
- Pelletier G , Mohamed El-Alfy. 2000. Immunocytochemical : Localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , **85** (12) : 4835 - 4840.
- Pelletier G , Labrie C , Labrie F. 2000. Localization of oestrogen receptor α oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs [J]. *Endocrinology* , **165** : 359 - 370.
- Pentikainen V , Erkkila K , Suomalainen L , Parvinen M , Dunkel L. 2000. Estradiol acts as a germcell survival factor in the human testis in vitro [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , **85** (5) : 2057 - 2067.
- Rago V , Maggiolini M , Vivacqua A , Palma A , Carpion A. 2004. Differential expression of estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in testis of mature and immature pigs [J]. *Anat. Rec.* , **281A** (2) : 1234 - 1239.
- Sar M , Welsch F. 2000. Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis [J]. *Andrologia* , **32** : 295 - 301.
- Saunders PTK , Sharpe RM , Williams K , Macpherson S , Urquart H , Irvine DS , Millar MR. 2001. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates [J]. *Molecular Human Reproduction* , **7** (3) : 227 - 236.
- Shetty G , Krishnamurthy H , Krishnamurthy HN , Bhatnagar S , Moudgal RN. 1997. Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates [J]. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* , **61** : 157 - 166.
- West NB , Brenner RM. 1990. Estrogen receptor in the ductuli efferentes , epididymis , and testis of rhesus and cynomolgus macaques [J]. *Biology of Reproduction* , **42** : 533 - 538.
- Zhou Q , Clarke L , Nie R , Carnes K , Li WL , Lien YHH , Verkman A , Lubahn D , Fisher JS , Katzenellenbogen BS , Hess RA. 2001. Estrogen action and male fertility : Roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproduction tract function [J]. *PNAS* , **98** (24) : 14132 - 14137.
- Zhou Q , Nie R , Prins GS , Saunders PTK , Katzenellenbogen BS , Hess RA. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract [J]. *Journal of Andrology* , **23** (6) : 870 - 881.