



评述

隐睾不育的分子基础

刘以训, 李喜霞

中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

E-mail: liuyx@ioz.ac.cn

收稿日期: 2010-07-12; 接受日期: 2010-08-07

国家自然科学基金重大研究计划(批准号: 2006CB944000)、国家重点基础研究发展计划(批准号: G199055901, 2006CB504001 和 2007CB947502)、国家自然科学基金(批准号: 31071018, 30618005, 30600311 和 30230190)、中国科学院知识创新工程(批准号: KSCX-2-SW-201 和 KSCA2-YW-R-55)和北京市自然科学基金(批准号: 5073032)资助项目

摘要 隐睾症或热局部处理猴和大鼠睾丸, 能引起可逆性生精细胞凋亡, 出现少精或无精现象. 43℃局部热浴猴睾丸可引起精液中精子数量发生可逆性减少. 睾丸支持细胞为生精细胞提供结构支持与营养供给. 生精上皮中支持细胞间以及支持细胞和各级生精细胞间的特殊连接在精子发生中起着至关重要的作用. 本研究发现, 热处理后紧密连接分子, 如 occludin, zonula occludens-1 (ZO-1)在 24~48 h 表达明显下降, 血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)发生了可逆性破坏. 该过程还伴随着 TGF- β 2 和 TGF- β 3 表达增高, p38 MAPK 和 ERK/MAPK 信号通路激活. 由此推测, 热激可能通过引发 TGF- β s 增高, 下调紧密连接相关蛋白的表达, 导致细胞连接减弱, 从而引起 BTB 结构发生可逆性紊乱. 此外, 本文还综述了成年小鼠实验性隐睾睾丸中总基因的表达变化, 成功克隆了几个生理功能显著, 与精子发生特异相关的新基因.

关键词隐睾
精子发生
细胞凋亡
热激
支持细胞
血睾屏障
紧密连接

阴囊温度对于正常的精子发生至关重要, 大多数雄性哺乳动物阴囊内温度要低于腹腔内温度^[1]. 人工隐睾模型或热局部处理睾丸可引起生精细胞(germ cell)凋亡增加, 从而可逆性损害生精上皮^[2,3]. 热诱导生精细胞凋亡通常伴随支持细胞(sertoli cell)形态和功能改变^[4-6]. 然而, 热激引起的少精或无精症以及支持细胞形态和功能变化的具体分子机制还不清楚.

支持细胞是生精小管内唯一与生精细胞直接接触的体细胞, 并为其发育提供必要的结构支持和营养供给^[7,8]. 10~16 日龄大鼠睾丸, 相邻的支持细胞间形成紧密连接, 构成血睾屏障(blood-testis barrier, BTB), 为生精细胞的发育提供特异的保护环境^[9]. 紧密连接(tight junction, TJ)是睾丸内唯一的闭锁连接, 组成紧

密连接的膜蛋白主要有 3 种, Occludins, Claudins 与连接黏附分子(junctional adhesion molecules, JAMs)^[10]. Occludin 在睾丸紧密连接中必不可少, occludin 基因突变可引起雄性不育^[11]. 此外, 有研究报道, 注射一种 occludin 衍生物(第二胞外段合成的多肽)能可逆性破坏 BTB, 影响精子发生^[12]. ZO-1 是一种周边膜蛋白, 其 C 端与 occludin 按 1:1 的比例直接结合, 具有细胞骨架和信号转导功能. 此外, 与其他器官中的屏障不同, BTB 有其自身的特点. 例如, 在血-脑屏障、血-视网膜屏障中, 紧密连接存在于上皮细胞或内皮细胞的顶部, 然后是黏附连接(adherens junctions, AJ). 而在 BTB 中, 紧密连接、黏附连接和桥粒状连接共同存在^[13,14]. BTB 的主要功能之一是选择性透

过生物分子, 调节营养物质和水分出入生精上皮^[15]. 因此, 生物素示踪技术被广泛用于检测 BTB 的功能^[16,17].

睾丸内细胞-细胞连接受多种因素调控. 越来越多的证据显示, 细胞因子在睾丸内细胞连接的调控中起非常重要的作用. 如转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β s 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) α 以时间依赖方式参与由支持细胞和生殖细胞间的特异性连接重构. 据报道, TGF- β 3 可通过激活不同的信号通路对细胞连接的重构发挥不同的功能. 例如, 通过激活 p38 MAPK 和 ERK/MAPK 信号通路, TGF- β 3 能可逆性破坏 BTB 的完整性及支持细胞与生精细胞间的黏附连接^[18,19]. 然而, 如果仅激活 ERK 通路, 那么 TGF- β 3 只破坏支持细胞与生精细胞间的黏附连接^[20]. 此外, TGF- β 2 通过抑制转录水平降低体外培养的支持细胞 JAM-B 的蛋白水平, 促进蛋白质降解来改变细胞间连接蛋白的生物利用率^[21,22]. 本研究组观察到, 热处理睾丸后 TGF- β 3 表达量发生了可逆性增高, 推测它可能参与了紧密连接蛋白的下调和 BTB 结构的破坏^[23]. 并且随着 TGF- β 3 表达的增高, p38 MAPK 信号通路被激活, 从而调节了 BTB 的动态学可逆性改变. 同时, ERK 信号通路也被激活^[23], 说明除紧密连接之外, 支持细胞与生精细胞间的黏附连接也发生了可逆性改变, 进而导致细胞黏附功能的丧失^[24].

另外, 有报道指出, 睾酮(testosterone, T)和促性腺激素(gonadotrophins)也能调控紧密连接^[17,25-27]. 睾酮能上调紧密连接蛋白的表达及改变其定位^[28]. 促性腺激素受到抑制后, 紧密连接蛋白重表达, 定位也发生了变化^[17]. 但是热激是否影响支持细胞与生精细胞间的黏附连接, 导致紧密连接失常, 还需进一步研究证实.

本文综述了近几年来有关“热激”引发精细胞凋亡和支持细胞间相关紧密连接蛋白变化的文献资料, 着重介绍了有关热激诱发分化的支持细胞去分化的分子基础及其调控机制.

1 热激诱导生精细胞凋亡

精子发生需要适宜的温度, 大多数哺乳动物, 包括人类的睾丸温度低于体温. 用体温或高于体温的温度局部处理睾丸以及隐睾症、精索静脉曲张等均能

导致生精细胞死亡增加^[29-38]. 研究表明, 睾丸内温度每升高 1℃就会抑制 14%的精子生成, 精子数量明显减少^[36]. 据报道, 隐睾模型通过生精细胞凋亡可导致精子数量减少^[38,39]. 猴子单侧隐睾手术后 5 天隐睾睾丸中生精细胞发生凋亡, 10 天后生精细胞大量凋亡, 到 30 天后达到高峰, 2 个月后精子发生逐步恢复正常, 此时几乎检测不到凋亡信号^[40,41].

43℃热处理大鼠睾丸 15 min 或猴睾丸 30 min 后, 由于生精细胞凋亡增加, 导致生精上皮发生可逆性改变^[42,43]. 因此, 43℃局部温浴睾丸被认为是一种安全可逆性抑制精子发生的方法^[3,42]. 值得注意的是, 精母细胞和精子细胞对热最为敏感^[44]. 热激后一些生精细胞内 Bax 表达总量没有变化, 但在生精细胞中的定位发生了改变, 由细胞质转移到了细胞核. 另一方面, 热激后 Bcl-2(一个重要的抗凋亡线粒体蛋白)的表达水平显著增高. Bax 的亚细胞重新定位及 Bcl-2 表达增高表明, Bcl-2 家族参与了热激诱发的生精细胞凋亡过程^[44]. 在体实验证实, 热处理的猴睾丸中, caspase 2^[45], 一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)^[46]和各种热休克蛋白(heat shock protein, HSP)^[47]的变化都是可逆的^[48], 热激后在不同时间内, 它们的表达都恢复到正常水平. 实验数据显示, 在隐睾术后 5 天, 生精细胞发生凋亡早期, HSP70-2 表达几乎不变, 但术后 10 天伴随生精细胞的凋亡丢失, HSP70-2 表达显著降低. 以上结果提示, 在实验性隐睾的早期阶段, HSP70-2 可能没有参与抑制生精细胞凋亡过程, 它不属于热激诱导的生精细胞早期凋亡相关基因^[49]. 另外, 热激后睾丸中 HSP60 蛋白表达明显升高与 Bcl-2 表达增加有关. 因此推测, 隐睾生精上皮细胞中 HSP60 表达的增加可能通过与 Bax 形成复合物, 将 Bcl-2 释放出来, 由此通过线粒体途径促进生精细胞凋亡.

2 热激睾丸引发基因表达改变

为了探讨热激诱导生精细胞凋亡的分子机制, 将成年小鼠实验性隐睾(experimental cryptorchidism, EC)在手术后 1, 4, 7, 14 和 28 天作为实验组, 利用 Affymetrix MOE430A 芯片比较了实验组和未处理组的基因表达情况^[29]. 图 1 显示, 在隐睾手术后 1~28 天, 隐睾中基因数量显著上调或下降. 值得注意的是, 氧化应激增强与其相关基因表达的波动在时间上高

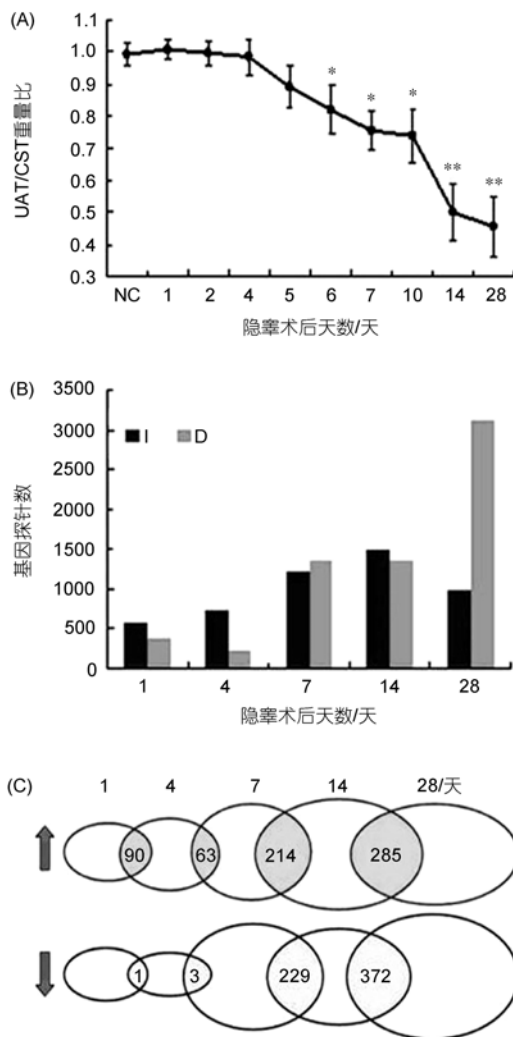


图1 小鼠隐睾睾丸重量及其基因表达模式的变化^[29]

(A) 实验性隐睾(EC)手术后1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 28天的CD-1小鼠单侧腹腔内睾丸(UAT)与对侧阴囊内睾丸(CST)的重量比. NC为正常对照组. 以 $\bar{x} \pm SD$ 表示. * 示与正常对照组相比, $P < 0.05$; ** 示与正常对照组相比, $P < 0.01$; (B) EC后1, 4, 7, 14, 28天, 基因表达显著上调(荧光信号强度比值的对数(SLR) ≥ 1)和下降(SLR ≤ -1)的基因数量. I 示表达上调, D 示表达下降; (C) 图中重叠圈内的数值表示相邻处理组别的基因表达显著改变的探针数目. 每个圈的大小代表各个处理组探针的数目. 向上箭头表示表达上调的探针, 向下箭头表示表达下降的探针

度一致. 在术后第4天隐睾显示出更有效的抗氧化应激能力, 从第5天开始, 抗氧化应激能力突然降低, 到10~14天又逐渐恢复, 28天再次降低. 在隐睾手术后第4天, 隐睾中多基因高表达, 在第5天氧化应激水平上调与第7天基因表达突然下降密切相关. 芯片数据表明, 高水平的活性氧(reactive oxidative species,

ROS)不仅与其直接来源的异常及其功能紊乱相关, 而且与能量代谢的上游生理活动, 如脂质代谢和细胞周期调控的异常相关. 本研究组克隆到一些重要的与精子发生特异相关的新基因, 如顶体形成相关因子(acrosome formation associated factor, Afaf, 一种新型膜相关蛋白)^[50,51], 睾丸特异性钠氢交换蛋白(testis-specific sodium-hydrogen exchanger, tsNHE)^[52,53], 温度相关序列1 & 4(temperature related sequence 1 & 4, Trs1, Trs4)和T6441^[54-57].

Afaf 在圆形精子细胞中大量表达, 并且在顶体形成过程中定位于预形成和形成的顶体部位. 将 Afaf 转染 HeLa 细胞后, 其蛋白主要定位于细胞膜和 EEA1 呈阳性的早期内吞体中, 偶尔也可在细胞核中观察到. 因此推测, 早期内吞体和质膜可能参与了顶体发生^[50]. 利用链球菌溶血素 O 型通透性和体外受精实验, 进一步探讨了 Afaf 抗体对受精和顶体胞吐过程的影响. Afaf 参与了钙触发的顶体胞吐过程, 用 Afaf 抗体处理过的精子能显著抑制精子对卵的穿透力, 从而降低体外受精率^[51]. 因此认为, Afaf 在顶体胞吐过程和受精过程中发挥重要作用.

NHE 可以调节细胞内 pH, 它可能是精子活力和获能的一个关键调节子. tsNHE 定位于精子鞭毛主段区, 预测其包含 12 个跨膜结构域且 C 端无胞内段. 针对跨膜区制备的多克隆抗体处理精子, 显著降低了精子活力、顶体反应和体外受精率. 向精液中加入该抗体, 细胞内 pH 和钙离子浓度均下降^[52]. 为了进一步探讨 tsNHE 抗体对生育率的影响, 将 tsNHE 基因疫苗通过肌肉注射、口服或滴鼻法免疫雌性动物, 免疫后雌鼠产仔数和生育率与对照组相比显著降低. 其 cDNA 疫苗免疫的雌鼠血清或阴道液可特异性识别精子主段并引发精子凝集. 结果显示, 其 tsNHE 抗体能显著抑制体外精子活力和受精^[53]. tsNHE 可能为开发一种新的男性避孕方法提供一个很好的靶点.

Trs4 是一个睾丸特异基因, 对温度变化敏感. 在小鼠睾丸内, Trs4 mRNA 定位在圆形精子细胞, 蛋白主要定位在延长形精子细胞、顶体及成熟精子尾部. 利用酵母双杂交系统, 鉴定出在小鼠睾丸内, *Rshl-2*, *Gstmu1*, *Ddc8* 可与 *Trs4* 相互结合. 进一步研究表明, *Ddc8* 是一个功能未知的新基因, 在小鼠睾丸中与 *Trs4* 的表达类似. *Trs4*, *Ddc8* 和 *Rshl-2* 共同定位于成熟精子的尾部^[57]. 这些结果表明, *Trs4* 可能通过与多种结合蛋白相互作用, 在精子发生的不同阶段, 参与

精子发生和受精过程。

T6441 也是一个人工诱导隐睾后发现的新基因。其 cDNA 包含一个可读框, 编码 149 个氨基酸, 与已报道的基因没有同源性。大鼠睾丸的 *T6441* 基因有 4 个转录本。 *T6441* mRNA 特异定位于精子细胞, 其表达水平在精子发生中呈时间依赖性——Ⅶ到ⅩⅣ期表达最高。 *T6441* 蛋白主要定位在精子细胞的细胞质中, 12~19 期表达最高。 *T6441* 蛋白主要定位于 19 期的精子残留体上^[54], 提示它可能对精子发生中细胞质流动和迁移起重要作用。

已克隆的 4 个基因 *Afaf*, *tsNHE*, *Trs4* 和 *T6441* 都在精子细胞中特异表达, 且与精子的功能, 如顶体反应、获能、精子活力和受精密切相关。局部干扰这些基因的表达不会影响人体健康, 因此它们有望成为研发安全有效的男性避孕药的靶点。

3 热激引发支持细胞受损、影响生精细胞凋亡

支持细胞是生精小管内唯一与生殖细胞直接接触的体细胞, 复杂而精密的精子发生主要依赖于支持细胞。支持细胞的数量决定了生精细胞的数量, 每个支持细胞可与 30~50 个发育不同阶段的生精细胞紧密接触。支持细胞为生精细胞提供结构支持和营养供给。生精上皮中细胞间的黏附连接是精子发生的必要条件。相邻的支持细胞形成紧密连接, 构成 BTB, 为生精细胞的发育提供了一个特异的保护环境。因此生精细胞只依赖于支持细胞提供营养和生长因子。不断发育分化的生精细胞从生精小管底部向管腔移动最终形成成熟的精子。这一系列过程都离不开支持细胞间及支持细胞与生精细胞间广泛的紧密连接, 肌动蛋白相连的黏附连接, 以及与中间纤维相连的桥粒连接。这些连接结构的破坏将抑制精子发生^[58]。

角质纤维蛋白 18(cytokeratin-18, CK-18)可作为鉴定支持细胞成熟状态的标志分子。本研究组证实, CK-18 仅表达于未成熟的猴支持细胞, 而在成年睾丸的支持细胞不表达^[6]。进一步研究表明, 43℃局部温浴睾丸可诱导成年猴支持细胞重新表达 CK-18^[6,59,60] (图 2), 提示热激睾丸可使支持细胞发生去分化, 从而失去支持功能, 导致生精过程终止。43℃热浴体外培养的成熟猴支持细胞同样可通过激活 PKA 依赖的

ERK/MAPK 信号通路诱导 CK-18 的重新表达^[59,60]。以上结果表明, 热激不仅影响生精细胞也影响支持细胞, 从而导致生精细胞凋亡。肝细胞受体类似物(liver receptor homologue 1, LRH-1)是一个核转录因子, 本研究组发现, 它也像 CK-18 一样, 不在成年猴或大鼠支持细胞表达, 而在精细胞中表达。局部温浴这些动物睾丸后, 可诱导 LRH-1 在分化的支持细胞中表达。进一步实验表明, 成年猴或大鼠支持细胞离体下 43℃处理 15 min, LRH-1 重表达和可逆性消失的时间都比 CK-18 早^[61], 推测热激诱导支持细胞去分化可能受核转录因子 LRH-1 的调控。

为了进一步探讨热激对在体支持细胞细胞连接的影响, 检测了几个代表性细胞连接相关分子的表达。如图 3 所示, 热激后 2 天, N-cadherin, β -catenin, ZO-1 以及 vimentin 蛋白显著下降, 随后逐渐恢复。生物素示踪实验(图 4)表明, 在热处理 2 天后的生精小

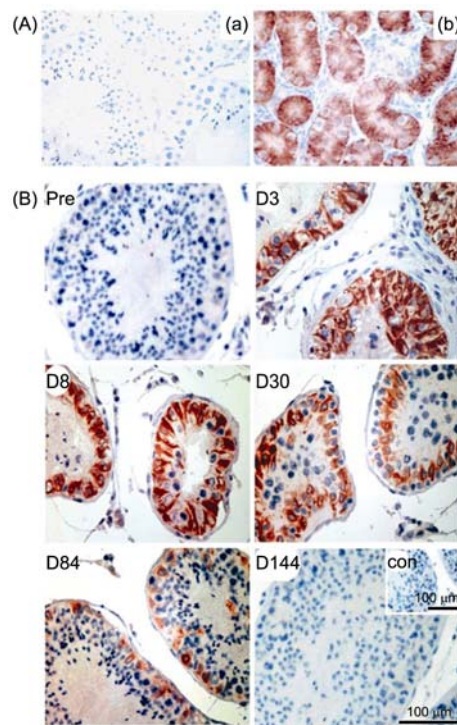


图 2 猴子睾丸中 CK-18 的免疫组织化学染色^[6]

(A) CK-18 在成年猴睾丸(a)和幼猴睾丸(b)中的定位, 显示 CK-18 仅在未成熟的支持细胞中表达; (B) 成年猴睾丸 43℃热处理前及处理第 3, 8, 30, 84, 144 天后, CK-18 的免疫组织化学染色结果, 红色示 CK-18 在支持细胞中呈阳性, 蓝色示背景颜色; con 示不加一抗的阴性对照

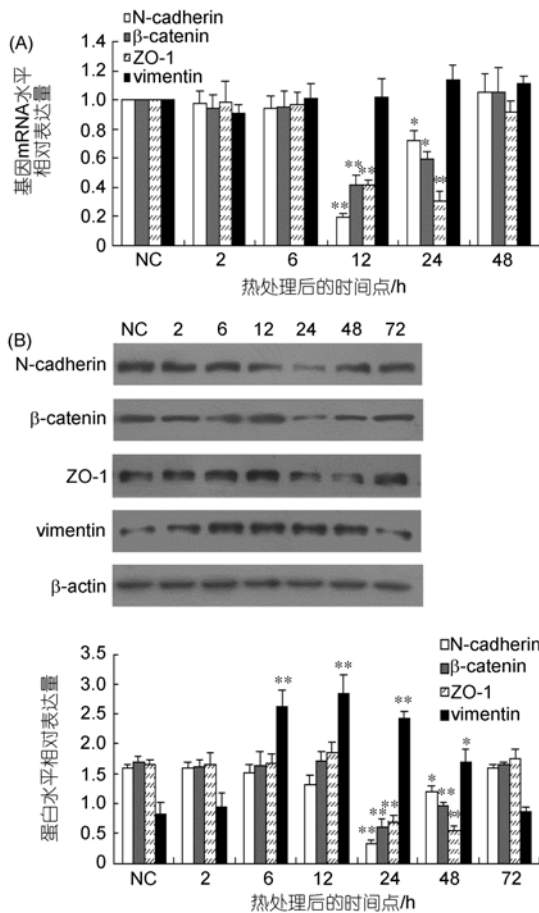


图 3 43°C 热处理支持细胞后不同时间点 N-cadherin, β-catenin, ZO-1 和 vimentin 的 mRNA 及蛋白表达水平分析^[59]

(A) RT-PCR 检测结果. NC 表示未处理组; 2, 6, 12, 24, 48 h 分别表示热处理完成后不同时间收集细胞. 各处理组相对 mRNA 浓度用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算, 对照组浓度为 1; (B) Western blot 检测结果. 分析目的蛋白条带与内参 β-actin 条带的灰度比值, 数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示 ($n=3$).

* 示与对照组相比, $P<0.05$; ** 示与对照组相比, $P<0.01$

管管腔中发现有生物素存在, 但在对照组中没有检测到生物素, 提示热激破坏了 BTB 的通透性. 在热处理 10 天后 BTB 完整性又得到可逆性恢复. 对热激影响生育能力的交配实验表明, 在热激 23~27 天后, 雄性小鼠生育能力明显降低, 到 42~46 天后, 生育能力和生精小管的形态又可逆性恢复(图 5).

有证据表明, 雄激素受体(androgen receptor, AR)在支持细胞成熟前开始表达, 可作为支持细胞成熟的标志分子. Wilms' 肿瘤基因 1(Wilms' tumour gene 1, WT1)在支持细胞分化的各个时期始终稳定表达.

AR 和 WT1 在精子发生过程中必不可少^[62-64].

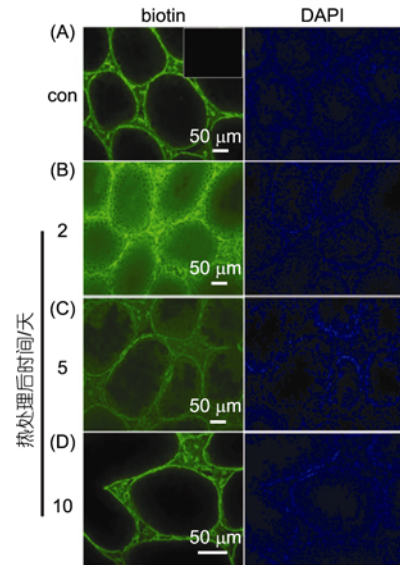


图 4 热处理使成年小鼠 BTB 通透性可逆性增加

向睾丸生精小管间注射生物素, 细胞核用 DAPI 标记. (A) 正常组小鼠注射的生物素不能进入生精小管; (B) 向热处理后 2 天的睾丸内注射生物素 30 min 后, 生物素渗透入生精小管; (C) 热处理 5 天仍有部分生物素能渗透入生精小管中; (D) 热处理后 10 天 BTB 通透性又恢复到正常水平

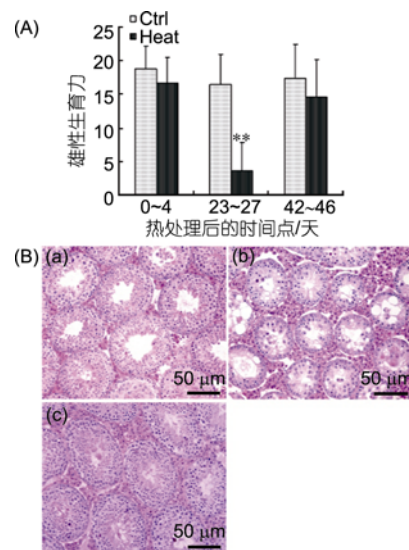


图 5 局部热处理睾丸后生育率恢复^[23]

(A) 43°C 热处理 30 min 后选择不同的时间间隔, 统计雄鼠的生育力, 正常雄鼠为对照组. 在热处理后的不同时间间隔内, 每只雄鼠与 2 只正常雌鼠连续合笼共养 4 天, 5 天交配期过后分笼. 数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示 ($n=3$). ** 示与对照组相比, $P<0.01$; (B) 石蜡切片 HE 染色. (a) 对照组睾丸正常的精子发生; (b) 热处理 10 天后精子发生被破坏; (c) 热处理 40 天后精子发生恢复正常

AR 在 小 鼠 生 精 周 期 VII~VIII 期 表 达 最 高, 此 时 为 减 数 分 裂 前 精 母 细 胞 从 生 精 小 管 基 底 部 移 到 管 腔 部, 此 时 新 的 BTB 形 成^[65]. AR 对 黏 附 连 接 和 紧 密 连 接 的 调 控 都 很 重 要. 特 异 敲 除 小 鼠 支 持 细 胞 AR, 细 胞 连 接 相 关 分 子 的 表 达 显 著 降 低, 但 波 形 蛋 白 表 达 增 加^[66], 这 与 本 实 验 室 先 前 研 究 结 果 相 似^[59]. WT1 是 一 个 核 转 录 因 子, 自 胚 胎 期 至 成 年 期 的 支 持 细 胞 始 终 表 达 WT1^[67]. 性 别 决 定 前, 敲 除 WT1 可 使 生 殖 脊 消 失; 性 别 决 定 后 特 异 敲 除 支 持 细 胞 中 的 WT1 可 导 致 发 育 中 的 生 精 小 管 异 常, 生 精 细 胞 退 行 性 丢 失^[68]. 出 生 后 用 组 织 特 异 的 RNA 干 扰 方 法 抑 制 支 持 细 胞 中 WT1 的 表 达, 会 造 成 黏 附 连 接 相 关 基 因 表 达 失 调, 黏 附 连 接 丢 失 以 及 精 细 胞 调 亡 增 加^[69]. 由 此 看 来, WT1 对 精

子 发 生 必 不 可 少.

本 研 究 组 前 期 实 验 结 果 同 时 表 明, 热 激 后 AR 和 WT1 在 支 持 细 胞 中 的 表 达 显 著 下 降^[59]. 如 图 6 显 示, 热 处 理 15 min 后 二 者 的 蛋 白 水 平 大 幅 下 降, 热 处 理 30 min 蛋 白 表 达 消 失^[59]. 由 此 推 测, AR 和 WT1 蛋 白 在 热 处 理 很 短 时 间 内 消 失 的 现 象 可 能 是 通 过 某 些 机 制 或 蛋 白 酶 快 速 降 解 所 致. 热 处 理 人 前 列 腺 癌 细 胞 发 现, AR 蛋 白 也 出 现 类 似 情 况^[70]. AR 和 WT1 表 达 消 失 提 示, 支 持 细 胞 功 能 发 生 了 剧 烈 变 化^[59], 但 其 作 用 机 制 尚 不 清 楚. 在 成 人 隐 睾 辜 丸 中, 支 持 细 胞 表 达 AR 的 强 弱 可 反 映 出 所 在 生 精 小 管 发 育 的 成 熟 程 度. 支 持 细 胞 AR 表 达 的 缺 失 与 精 小 管 精 子 发 生 缺 失 相 关. 基 于 AR 和 WT1 基 因 在 精 子 发 生 中 的 重 要 性 推 测,

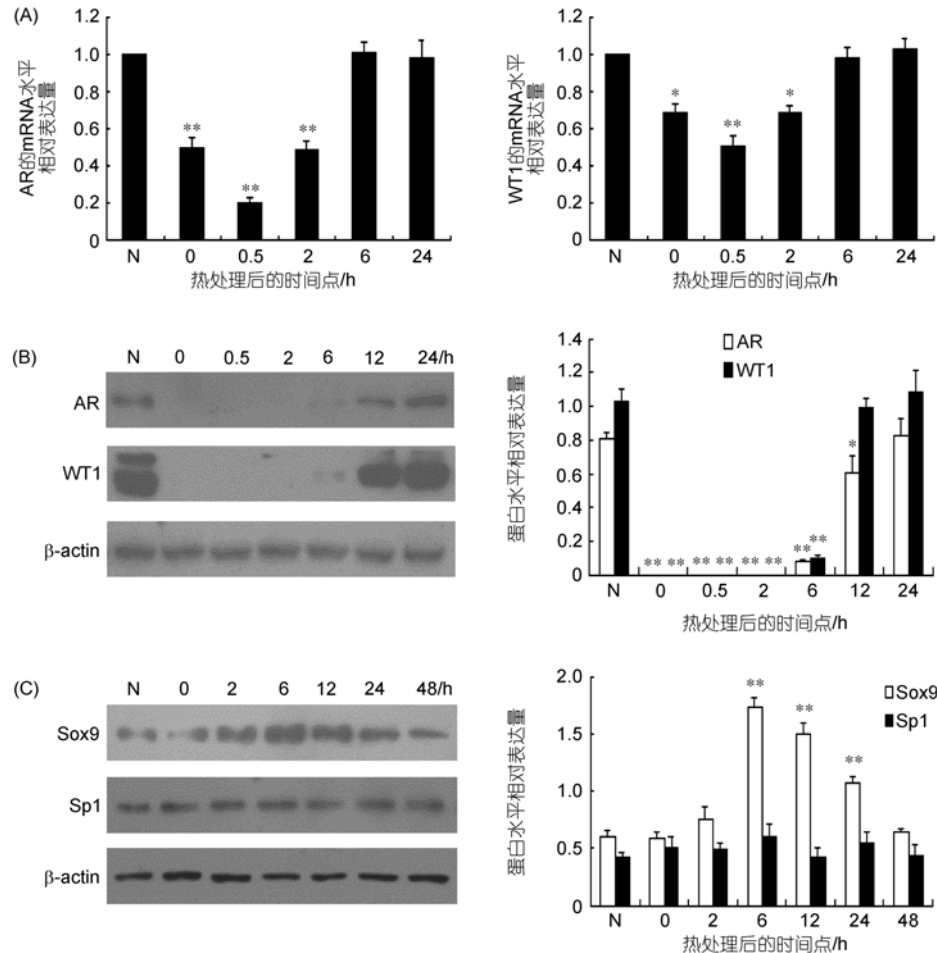


图 6 43℃热处理 30 min 支持细胞中 AR 和 WT1 的表达显著降低^[59]

N 表示未处理组, 0 h 表示热激后立即取材; 0.5~48 h 表示热激后的各时间点. (A) AR 和 WT1 的 RT-PCR 检测. 各处理组相对 mRNA 浓度用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算, 对照组浓度为 1; (B) AR 和 WT1 的 Western blot 检测; (C) Sox9 和 Sp1 的 Western blot 检测. (B)和(C)中, 分析目的蛋白条带与内参 β -actin 条带的灰度比值. 数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示($n=3$). * 示与对照组相比, $P<0.05$; ** 示与对照组相比, $P<0.01$

热激引起支持细胞内 AR 和 WT1 表达的可逆性消失可能是引发支持细胞去分化, 继而诱发精细胞凋亡的一个重要原因^[59]. Meng 等人^[16]指出, 支持细胞特异敲除 AR 能够增加 BTB 的通透性, 这意味着 AR 可能参与了热诱导的细胞连接紊乱的调控过程. 本研究组也证实了热激后生物素扩散到生精小管腔中, 表明 BTB 功能遭到破坏.

文献报道, TGF- β s 和 TNF α 以一种时间特异性方式由睾丸支持细胞和生殖细胞所分泌, 它们可以

在转录水平、转录后水平和翻译后水平调控细胞连接的重构^[15,18,19,71]. 本研究组发现, 热激可引起睾丸内 TGF- β 3 mRNA 表达可逆性增高(图 7(A)). 有证据表明, TGF- β 3 通过下调相关膜蛋白, 如 occludins 和 N-cadherins 的表达来调节 BTB 及黏附连接的解聚. 它可以通过激活不同的信号通路对不同连接结构的解聚产生重要影响. TGF- β 3 通过激活 p38 和 ERK 信号通路, 引起生精上皮中 BTB 和支持细胞与生精细胞间黏附连接的破坏^[15]. 热激引起睾丸

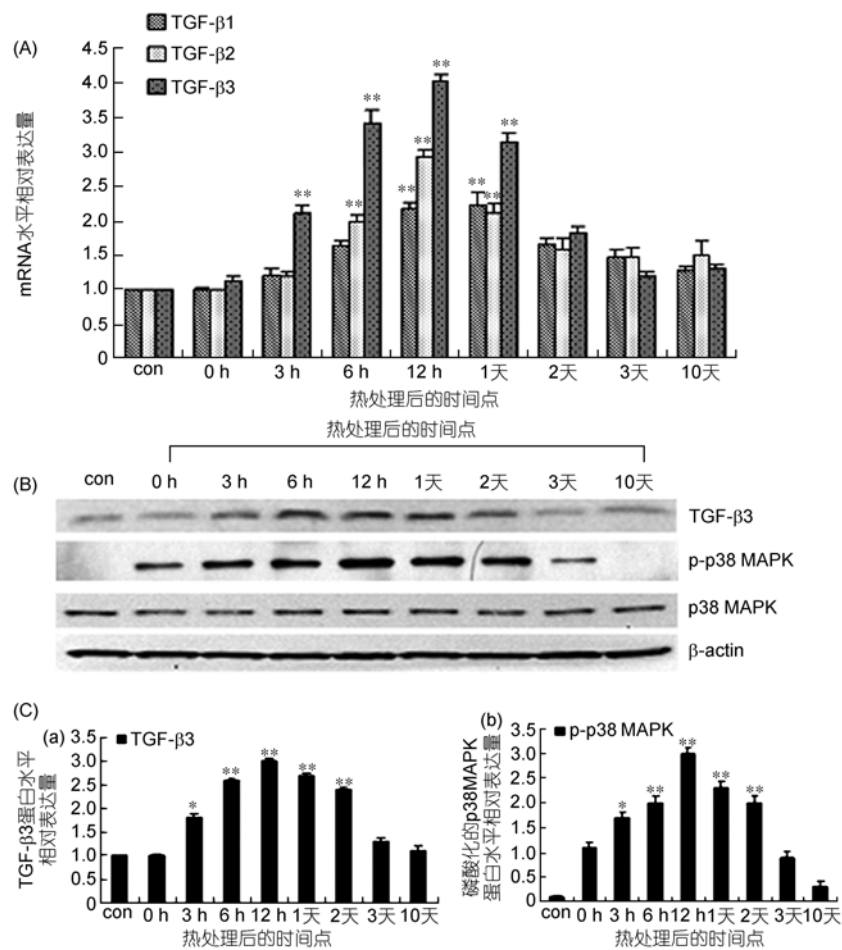


图 7 热处理前后睾丸中 TGF- β s 的表达及 p38 MAPK 通路的活化分析^[23]

(A) 实时定量 PCR 检测 TGF- β 1,2,3 mRNA 相对浓度, 各处理组相对 mRNA 浓度用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算, 对照组浓度为 1; (B) Western blot 检测热处理后睾丸中各蛋白表达水平的变化. β -actin 为内参基因; (C) Western blot 定量分析. (a) TGF- β 3 条带与内参条带的灰度相对比值, 对照组设为 1; (b) p38 MAPK 磷酸化水平分析, 磷酸化的 p38 MAPK 蛋白条带与总 p38 MAPK 蛋白条带的灰度相对比值, 对照组设为 1. 数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示 ($n=3$). con 表示未处理组; * 示与对照组相比, $P<0.05$; ** 示与对照组相比, $P<0.01$

内 TGF- β 3 表达可逆性增高可能与紧密连接相关蛋白的表达下调和 BTB 的破坏有关。然而, 伴随热激向睾丸内注射 TGF- β 拮抗剂可以部分阻止热诱导的 BTB 破坏^[23]。同时, 检测到热激后 TGF- β s 蛋白的表达升高和 p38 MAPK 通路的激活(图 7(B)和(C))。结果提示, TGF- β s 可能是热激导致紧密连接破坏的一个调节子。

综上所述, 43℃ 局部温浴睾丸能够可逆性损坏生精上皮中紧密连接的结构和完整性, 降低紧密连接相关蛋白的表达。根据上述资料提出, 热激影响成年动物睾丸支持细胞去分化, 从而诱发精子发生的分子调控途径(图 8)。

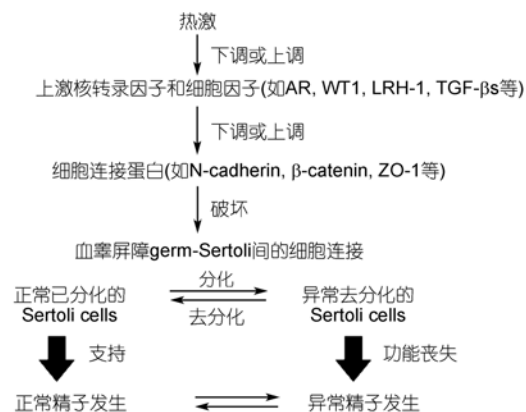


图 8 热处理诱导支持细胞从成年分化状态向幼年未分化状态发生可逆转变的系统性调控示意图

致谢 感谢中国科学院动物研究所张学森、蔡环、陈敏、郭健、周新昌、穆小民、李因传、郭彩霞、胡晓倩、胡召元、韩小兵、邹如今和宋欣欣对本文实验数据提供的帮助。

参考文献

- 1 Danno S, Itoh K, Matsuda T, et al. Decreased expression of mouse rbm3, a cold-shock protein, in sertoli cells of cryptorchid testis. *Am J Pathol*, 2000, 156: 1685—1692
- 2 Hikim A P, Lue Y, Yamamoto C M, et al. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology*, 2003, 144: 3167—3175
- 3 Lue Y H, Hikim A P, Swerdloff R S, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 1999, 140: 1709—1717
- 4 Kerr J B, Rich K A, Kretser D M D. Effects of experimental cryptorchidism on the ultrastructure and function of the sertoli-cell and peritubular tissue of the rat testis. *Biol Reprod*, 1979, 21: 823—838
- 5 Zhang Z H, Hu Z Y, Song X X, et al. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism. *Int J Androl*, 2004, 27: 234—239
- 6 Zhang X S, Zhang Z H, Jin X, et al. Dedifferentiation of adult monkey sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. *Endocrinology*, 2006, 147: 1237—1245
- 7 Griswold M D. Interactions between germ cells and sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*, 1995, 52: 211—216
- 8 Skinner M K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev*, 1991, 12: 45—77
- 9 Dym M, Fawcett D W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 1970, 3: 308—326
- 10 Mruk D D, Cheng C Y. Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev*, 2004, 25: 747—806
- 11 Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 4131—4142
- 12 Chung N P, Mruk D, Mo M Y, et al. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly *in vivo*. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1340—1351
- 13 Bart J, Groen H J, van der Graaf W T, et al. An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol*, 2002, 3: 357—363
- 14 Pelletier R M, Byers S W. The blood-testis barrier and sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech*, 1992, 20: 3—33
- 15 Lui W Y, Mruk D, Lee W M, et al. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1087—1097

- 16 Meng J, Holdcraft R W, Shima J E, et al. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 16696—16700
- 17 Tarulli G A, Meachem S J, Schlatt S, et al. Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult djungarian hamster *in vivo*. *Reproduction*, 2008, 135: 867—877
- 18 Lui W Y, Lee W M, Cheng C Y. Tgf-betas: their role in testicular function and sertoli cell tight junction dynamics. *Int J Androl*, 2003, 26: 147—160
- 19 Lui W Y, Wong C H, Mruk D D, et al. Tgf-beta3 regulates the blood-testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (map)kinase pathway: an *in vivo* study. *Endocrinology*, 2003, 144: 1139—1142
- 20 Xia W, Mruk D D, Lee W M, et al. Differential interactions between transforming growth factor- β 3/T β R1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and sertoli-germ cell adhesion. *J Biol Chem*, 2006, 281: 16799—16813
- 21 Wang Y, Lui W Y. Opposite effects of interleukin-1 α and transforming growth factor- β 2 induce stage-specific regulation of junctional adhesion molecule-b gene in sertoli cells. *Endocrinology*, 2009, 150: 2404—2412
- 22 Yan H H, Mruk D D, Lee W M, et al. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in sertoli cells. *FASEB J*, 2008, 22: 1945—1959
- 23 Cai H, Ren Y, Li X X, et al. Scrotal heat stress causes a transient alteration of tight junction-associated molecules and induction of TGF β s expression. *Int J Androl*, 2010, Jul 14. [Epub ahead of print]
- 24 Wong C H, Mruk D D, Lui W Y, et al. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an *in vivo* study. *J Cell Sci*, 2004, 117: 783—798
- 25 Kaitu'u-Lino T J, Sluka P, Foo C F, et al. Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat sertoli cells *in vitro*. *Reproduction*, 2007, 133: 1169—1179
- 26 Sluka P, O'Donnell L, Bartles J R, et al. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat sertoli cells *in vitro* and *in vivo*. *J Endocrinol*, 2006, 189: 381—395
- 27 Tarulli G A, Stanton P G, Lerchl A, et al. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the djungarian hamster: effect of fsh on proliferation and junction protein organization. *Biol Reprod*, 2006, 74: 798—806
- 28 Chung N P, Cheng C Y. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable *in vitro* model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*, 2001, 142: 1878—1888
- 29 Li Y C, Hu X Q, Xiao L J, et al. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism. *Front Biosci*, 2006, 11: 2465—2482
- 30 Kormano M. Development of the rectum-testis temperature difference in the post-natal rat. *J Reprod Fertil*, 1967, 14: 427—437
- 31 Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl*, 1995, 18: 169—184
- 32 Davis J R, Firlit C F. The germinal epithelium of cryptorchid testes experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*, 1966, 17: 187—200
- 33 Wang R, Chang J S, Zhou X M, et al. Varicocele in the rat: a new experimental model. Effect on histology, ultrastructure and temperature of the testis and the epididymis. *Urol Res*, 1991, 19: 319—322
- 34 Lue Y H, Lasley B L, Laughlin L S, et al. Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Androl*, 2002, 23: 799—805
- 35 Dada R, Gupta N P, Kucheria K. Spermatogenic arrest in men with testicular hyperthermia. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2003, Suppl 1: 235—243
- 36 Wang C, McDonald V, Leung A, et al. Effect of increased scrotal temperature on sperm production in normal men. *Fertil Steril*, 1997, 6: 334—339
- 37 Venkatachalam P S, Ramanathan K S. Effect of moderate heat on the testes of rats and monkeys. *J Reprod Fertil*, 1962, 4: 51—56
- 38 Jones T M, Anderson W, Fang V S, et al. Experimental cryptorchidism in adult male rats: histological and hormonal sequelae. *Anat Rec*, 1977, 189: 1—27
- 39 Hezmall H P, Lipshultz L I. Cryptorchidism and infertility. *Urol Clin North Am*, 1982, 9: 361—369
- 40 Setchell B P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil*, 1998, 114: 179—194
- 41 Kandeel F R, Swerdloff R S. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. *Fertil Steril*, 1988, 49: 1—23
- 42 Zhang X S, Lue Y H, Guo S H, et al. Expression of HSP105 and HSP60 during germ cell apoptosis in the heat-treated testes of adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Front Biosci*, 2005, 10: 3110—3121
- 43 Lue Y, Wang C, Liu Y X, et al. Transient testicular warming enhances the suppressive effect of testosterone on spermatogenesis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91: 539—545
- 44 Zhang Z H, Jin X, Zhang X S, et al. Bcl-2 and Bax are involved in experimental cryptorchidism-induced testicular germ cell apoptosis in rhesus monkey. *Contraception*, 2003, 68: 297—301

- 45 Johnson C, Jia Y, Wang C, et al. Role of caspase 2 in apoptotic signaling in primate and murine germ cells. *Biol Reprod*, 2008, 79: 806—814
- 46 Guo J, Jia Y, Tao S X, et al. Expression of nitric oxide synthase during germ cell apoptosis in testis of cynomolgus monkey after testosterone and heat treatment. *J Androl*, 2009, 30: 190—199
- 47 Chen M, Yuan J X, Shi Y Q, et al. Effect of 43 degrees treatment on expression of heat shock proteins 105, 70 and 60 in cultured monkey Sertoli cells. *Asian J Androl*, 2008, 10: 474—485
- 48 Jia Y, Hikim A P, Lue Y H, et al. Signaling pathways for germ cell death in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) induced by mild testicular hyperthermia and exogenous testosterone treatment. *Biol Reprod*, 2007, 77: 83—92
- 49 Zhou X C, Han X B, Hu Z Y, et al. Expression of Hsp70-2 in unilateral cryptorchid testis of rhesus monkey during germ cell apoptosis. *Endocrine*, 2001, 16: 89—95
- 50 Li Y C, Hu X Q, Zhang K Y, et al. Afaf, a novel vesicle membrane protein, is related to acrosome formation in murine testis. *FEBS Lett*, 2006, 580: 4266—4273
- 51 Hu X Q, Ji S Y, Li Y C, et al. Acrosome formation-associated factor is involved in fertilization. *Fertil Steril*, 2010, 93: 1482—1492
- 52 Liu T, Huang J C, Lu C L, et al. Immunization with a DNA vaccine of testis-specific sodium-hydrogen exchanger by oral feeding or nasal instillation reduces fertility in female mice. *Fertil Steril*, 2010, 93: 1556—1566
- 53 Liu T, Huang J C, Zuo W L, et al. A novel testis-specific Na⁺/H⁺ exchanger is involved in sperm motility and fertility. *Front Biosci*, 2010, 2: 566—581
- 54 Song X X, Li Y C, Shi Y Q, et al. Cloning and characterization of a novel spermiogenesis-related gene, T6441, in rat testis. *Front Biosci*, 2006, 11: 143—150
- 55 Guo C X, Tang T S, Mu X M, et al. Cloning of novel temperature-related expressed sequence tags in rat testis during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258: 401—406
- 56 Han X B, Zhou X C, Hu Z Y, et al. Cloning and characterization of temperature-related gene TRS1. *Arch Androl*, 2002, 48: 273—280
- 57 Shi Y Q, Li Y C, Hu X Q, et al. Male germ cell-specific protein Trs4 binds to multiple proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388: 583—588
- 58 Cheng C Y, Mruk D D. Cell junction dynamics in the testis: sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev*, 2002, 82: 825—874
- 59 Chen M, Cai H, Yang J L, et al. Effect of heat stress on expression of junction-associated molecules and upstream factors androgen receptor and Wilms' tumor 1 in monkey sertoli cells. *Endocrinology*, 2008, 149: 4871—4882
- 60 Zhang X S, Zhang Z H, Guo S H, et al. Activation of extracellular signal-related kinases 1 and 2 in Sertoli cells in experimentally cryptorchid rhesus monkeys. *Asian J Androl*, 2006, 8: 265—272
- 61 Guo J, Tao S X, Chen M, et al. Heat treatment induces liver receptor homolog-1 expression in monkey and rat Sertoli cells. *Endocrinology*, 2007, 148: 1255—1265
- 62 Tan K A, De Gendt K, Atanassova N, et al. The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*, 2005, 146: 2674—2683
- 63 Scharnhorst V, van der Eb A J, Jochemsen A G. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, 2001, 273: 141—161
- 64 Lim H N, Hughes I A, Hawkins J R. Clinical and molecular evidence for the role of androgens and WT1 in testis descent. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 185: 43—50
- 65 Vornberger W, Prins G, Musto N A, et al. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 1994, 134: 2307—2316
- 66 Furuse M, Itoh M, Hirase T, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 1994, 127: 1617—1626
- 67 Armstrong J F, Pritchard-Jones K, Bickmore W A, et al. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev*, 1993, 40: 85—97
- 68 Gao F, Maiti S, Alam N, et al. The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11987—11992
- 69 Rao M K, Pham J, Imam J S, et al. Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev*, 2006, 20: 147—152
- 70 Pajonk F, van Ophoven A, McBride W H. Hyperthermia-induced proteasome inhibition and loss of androgen receptor expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2005, 65: 4836—4843
- 71 Li M W, Xia W, Mruk D D, et al. Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol*, 2006, 190: 313—329