

棉酚对大鼠血睾屏障的影响

吴熾婉 佟大山 袁 冬 王乃英 宗书东

(国家计划生育委员会科学技术研究所, 北京)

谢 益 宽

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

摘 要

用 30mg/kg 体重的醋酸棉酚喂大白鼠, 从服药的第 3 周, 即发现曲细精管的电位差由 34℃ 时的对照值 $4.75 \pm 1.39\text{mV}$ 降为 $3.63 \pm 0.79\text{mV}$, 并且失去了电位差-温度之间的线性关系。服药至第 5 周时, 硝酸钬可透入基底膜, 进入上皮内和部分支持细胞紧密连接结构; 服药 8 周后, 硝酸钬可透过支持细胞的紧密连接结构, 同时该区排列变为不规则。提示棉酚可导致血睾屏障功能障碍, 从而破坏精子发育环境, 这可能是棉酚抑制精子生成的主要原因之一。

近十余年来, 我国对棉酚的抗精子发生的作用机理, 药理及毒理已经进行了广泛的研究^[1-5]。对睾丸的超微结构的研究表明: 中、晚期的精子细胞对棉酚的作用最敏感, 受害也最严重。

生精细胞的发生过程主要是在曲细精管中完成的。对曲细精管分泌液的化学成分的分析发现, 管内液和血浆的成分相比具有明显的差异^[6,7]。管内具有高浓度的钾和某些氨基酸, 而钠的浓度和一些蛋白质的浓度却很低。管内外浓度差构成了一定的电位差, 通常管内比管外低 $5-7\text{mV}$ ^[8-10]。这种差别证明曲细精管的血睾屏障主要由基底层的类肌细胞和上皮内的支持细胞所构成的。特别是支持细胞之间的紧密连接结构, 使得某些物质不易渗进管腔内部^[11-13]。生精过程对周围环境是非常敏感的, 而血睾屏障的存在显然构成了一个特殊的内环境以适合生精细胞的发育^[10]。

当睾丸受到加热或睾丸滞留在腹腔时, 通常会出现曲细精管的电位去极化现象, 管内外的电阻降低, 支持细胞分泌减少和胞膜通透性增加, 同时导致了精子发育受抑和支持细胞超微结构的改变^[14,15]。

根据精子发生过程要求一定环境以及棉酚可以破坏精子发生的事实, 我们推想: 棉酚之所以抑制精子细胞发育, 可能是棉酚改变血睾屏障, 破坏了精子细胞发育的必要环境而引起的。

本研究应用电生理学和超微结构技术, 以便从功能和结构上对棉酚破坏精子细胞发育的可能机理进行分析。

一、材料和方法

1. 成年 Wistar 大鼠, 体重 200—250 克, 每 10 只一笼饲养, 自由摄食。实验组每日喂服棉酚 30 毫克/公斤体重, 分别于喂服 3 周、5 周和 8 周后供实验之用; 对照组动物喂服等量溶剂。

2. 电生理学研究

动物在戊巴比妥钠 (40mg/kg 体重) 腹腔麻醉下, 取仰卧位, 纵切左或右侧阴囊, 暴露睾丸并置于碗形小浴槽内, 用生理溶液浸泡, 剥去睾丸白膜, 在解剖显微镜下分离曲细精管。浴槽四周用水浴加温, 并根据实验需要调至一定温度。

曲细精管内电位的测量用尖端直径为 1μ 的玻璃微电极, 电极用 3 M 的 KCl 充灌, 并用 Ag/AgCl 电极作为参考和引导电极把玻璃微电极连至 MEZ-8201 型的微电极放大器上。在解剖显微镜的监视下, 用液压式微推进器把电极与曲细精管的长轴成一锐角插入管腔内, 这样可避免电极尖端留在或穿出壁层, 并能记录到稳定的直流电位。记录到的极化电位通过微电极放大器馈入直流放大器, 最后显示在 VC-9 型的示波器上, 电位差可通过记录器记录, 微电极放大器或经摄影测出。

为了避免穿刺而导致曲细精管电位泄漏, 每条曲细精管只作一次记录。

3. 超微结构研究

3 周组的 7 只动物, 其中实验组 4 只, 对照组 3 只; 5 周和 8 周组的动物分别为 20 只, 其中实验组和对照组各半。动物在戊巴比妥钠麻醉下, 经由睾丸动脉先用洛氏液灌洗, 然后再用含有 5% 的硝酸镧洛氏液灌流 (为防止硝酸镧形成沉淀, 洛氏液中除去碳酸氢钠), 由注射式灌流泵控制灌流速度恒定在 0.3ml/m, 时程 40 分钟。然后将睾丸摘出, 取小块组织, 立刻固定于 2.5% 的戊二醛磷酸缓冲液中 30 分钟, 用同样缓冲液洗二次, 再固定于 1% 的锇酸磷酸缓冲液中 1.5 小时。组织经逐级丙酮脱水, 在国产环氧树脂 618 中包埋, 超薄切片, JC-6 电镜观察及照像。

二、结 果

1. 曲细精管的电位差特性

10 只对照大鼠共记录了 115 条曲细精管, 在不同温度下的极化电位, 在 34°C 所测得的电位差为 $4.75 \pm 1.39\text{mV}$, 腔内为负; 在 26 至 40°C 的范围内, 最高极化电位是 13mV, 最低为 1mV, 将不同温度范围内所测得的极化电位值, 经过求相关系数和直线回归方程处理, 表明电位差与温度具有线性关系, 其斜率为 $0.31\text{mV}/^{\circ}\text{C}$, $Q_{10}^{27-37^{\circ}\text{C}}$ 是 2.1, 当温度上升至 42°C 时, 电位反而下降, 对照组大鼠所获得的上述结果与 Gladwell^[10] 所报告的结果相类似 (图 1)。

2. 棉酚对曲细精管电位差的影响

从服用棉酚第 3 周的动物 ($n = 3$) 曲细精管的测定中发现, 曲细精管的极化电位普遍降低, 由对照组的 $4.75 \pm 1.39\text{mV}$ 降至 $3.63 \pm 0.79\text{mV}$ 。从第 5 周 ($n = 3$) 和第 7 周 ($n = 3$) 组的动物所得的结果与第 3 周组没有差异。在这三组动物的 168 条曲细精管的测定中, 最高电位差为 6mV, 最低为 1mV。令人不解的是从 27 至 42°C 的范围内, 电位差和温度之间并没有相关关系。绝大部分管腔电差分布在 2—4mV 的范围内 (图 2)。对同一条曲细精管在不同温度范围内所测得的结果也类似于总体的结果。尽管在服用棉酚后曲细精管的电位差下降, 但在

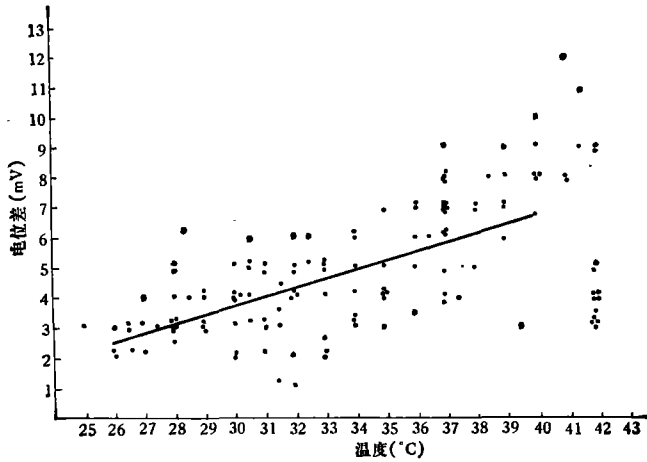


图1 温度对大鼠辜丸曲细精管电位差的影响
(斜线表示 10 只大鼠的 11 只辜丸所得的资料,经回归分析,显示在 26—40°C 的温度范围内,电位差和温度之间的相关关系)

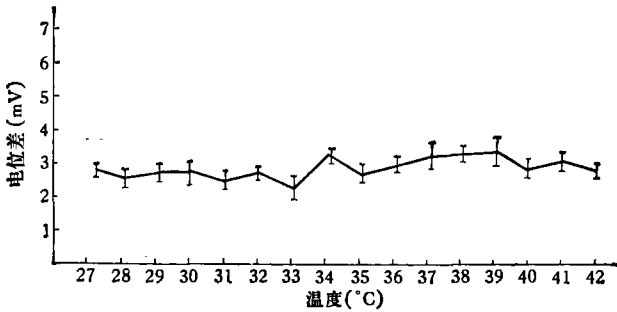


图2 服用棉酚后,曲细精管电位差和温度之间的关系

所有的测量中,并没有发现电位差为零的。说明曲细精管的支持细胞并没有完全丧失维持血辜屏障活动的功能。

在本研究中,我们并没有观察到棉酚对曲细精管电位差影响的动力学过程,似乎服用棉酚的第 3 周,对血辜屏障的影响已达到顶点。

3. 超微结构的观察结果

对照组动物,相邻基层层类肌细胞形成封闭的细胞连接处,可见大部分硝酸镉被排阻于曲细精管之外,只小部分硝酸镉能渗入至上皮内,分布在精原细胞和细线前期初级精母细胞周围的细胞间隙中(图版 I, 1—2)。在靠近曲细精管上皮基底膜处,可观察到支持细胞之间所特有的紧密连接结构,其两侧对称分布着特化的细胞内结构(图版 I, 3)。硝酸镉只到达极短的距离,未能穿透紧密连接(图版 I, 1—3),显示其屏障的完整性。

在服棉酚 3 周的动物中,血辜屏障仍然保持完整,其基底腔室和旁管腔室的结构与对照组相同。

服用棉酚 5 周组的动物中,硝酸镧可透过大部类肌细胞之间封闭的细胞连结,并进入上皮内,分布在精原细胞和细线前期初级精母细胞周围的间隙中。此时可见硝酸镧的沉淀物能够透入支持细胞紧密连接较长的距离(图版 I, 5),但未观察到近腔室的细胞间隙中有硝酸镧的沉淀物(图版 I, 4)。

经过 8 周棉酚处理的动物,硝酸镧已透过大部分精细管的类肌细胞屏障,沉淀物不但围绕着精原细胞,细线前期初级精母细胞之间的细胞间隙中,而且进入到粗线期初级精母细胞之间的空隙中(图版 I, 6; 图版 II, 1); 有些细管受到轻度损伤的动物,支持细胞间的紧密连接形态仍保持完整,但其通透性有所增加(图版 II, 2—3)。受到严重损伤的动物,支持细胞紧密连接结构排列不规则(图版 II, 4),硝酸镧沉淀物已分布旁管腔室细胞之间的间隙中。说明长期服用棉酚可使构成血睾屏障的支持细胞紧密连接结构受到损害。

三、讨 论

1. 本实验结果表明,口服棉酚 3 周对大鼠的曲细精管的电位差产生明显的影响,服药 5 周即可见到支持细胞紧密连接结构松弛,服药 8 周即发现严重损害,硝酸镧透入紧密连接结构的范围增大。表明棉酚对曲细精管血睾屏障的影响先于棉酚的抗生育作用^[2]; 而对血睾屏障的影响首先表现在生理功能的改变,尔后才发生组织学的损害。

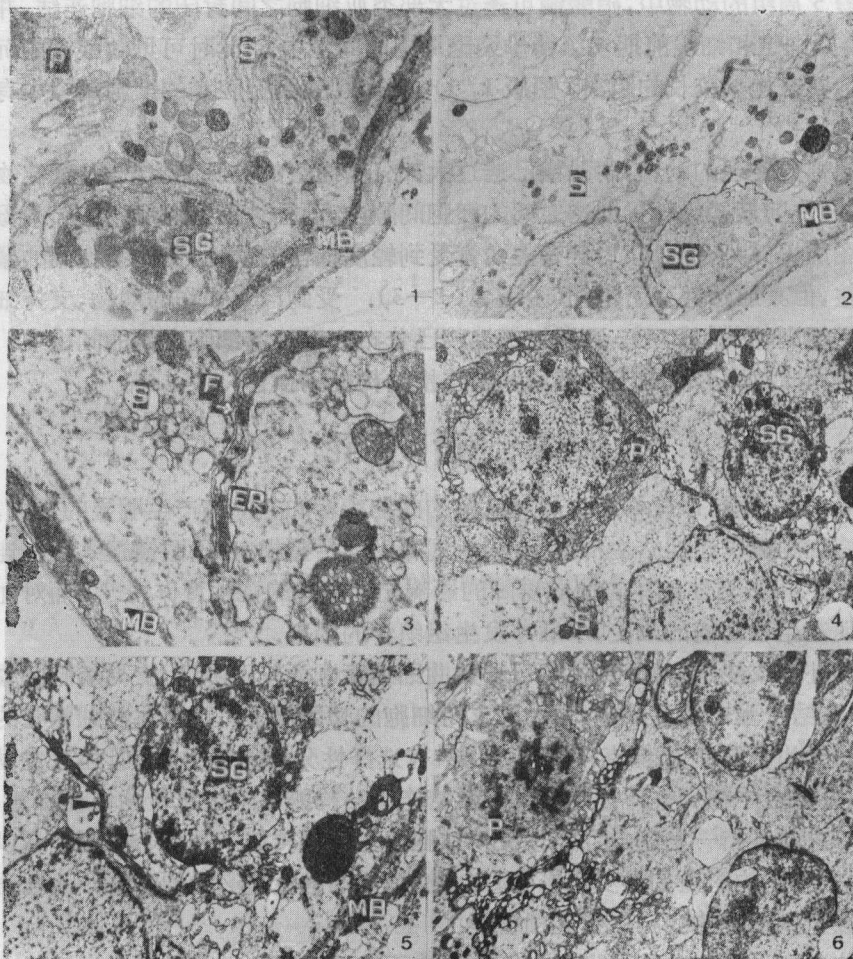
睾丸加热处理或使用隐睾手术,也可导致曲细精管电位差下降^[10],支持细胞的紧密连接结构松弛,雄激素结合蛋白明显减少^[12],说明支持细胞的功能低下。棉酚对曲细精管的作用恰好与上述的作用颇为相似。已知支持细胞不但具有选择性分泌的能力,而且还有主动运转某些离子的功能,以及由于相邻支持细胞之间的紧密连接结构能够阻止离子的被动渗透,因而造成曲细精管内外之间维持一定的电位差。支持细胞的主动运转离子是一个需要能量供应的化学过程。因此,当细胞的能量代谢受到影响时,曲细精管的电位差必然要降低。而恰恰局部加热睾丸常常可以见到细胞的线粒体受到损害^[16]。

从上述的事实说明,血睾屏障与支持细胞的正常活动,特别是能量代谢活动有密切的关系。

2. 服用棉酚的大鼠,除曲细精管的电位差降低外,而且电位差不随温度的改变而改变。不受棉酚作用的支持细胞,由于它的选择性分泌和主动运转某些离子的能力,更兼紧密连接结构是完整的,因此,在一定范围内,曲细精管的电位差与细胞的温度成一定的线性关系。 $Q_{10}^{27-37^{\circ}\text{C}}$ 为 2.1, 暗示电位差与胞内的化学反应有关。

棉酚不但使支持细胞的生理功能受到影响,而且紧密连接结构也受到损害。因此,离子的被动渗透作用必然增强,特别是一些低分子量的离子,更易通过紧密连接结构。纵然随着温度的上升可使细胞的代谢活动有所增强,但离子的渗透作用也可因温度升高而加快。这可能是服用棉酚后曲细精管失去电位差-温度线性关系的原因。

考虑到棉酚对曲细精管血睾屏障的影响先于棉酚抗生育效果的出现,局部加热睾丸,结扎输精管,或用睾丸提取物注射等手段皆可使血睾屏障受到相同的影响,特别是类肌细胞闭合的细胞接触透过性增加,支持细胞紧密连接结构松弛,并随后产生精子发育障碍^[14,15,17,18]。上述的结果提示棉酚可引起支持细胞生理功能障碍和结构损害,从而破坏精子变态发育的环境,这可能是棉酚影响精子细胞发育的主要因素之一。



1. 8 周组对照大鼠曲细精管上皮细胞电子显微镜照片，支持细胞和精原细胞排列在基底膜上，硝酸铈透过类肌细胞，并充满精原细胞周围的间隙中，而粗线期初级精母细胞周围的间隙缺少硝酸铈沉淀，被排阻在支持细胞紧密连接结构之外。

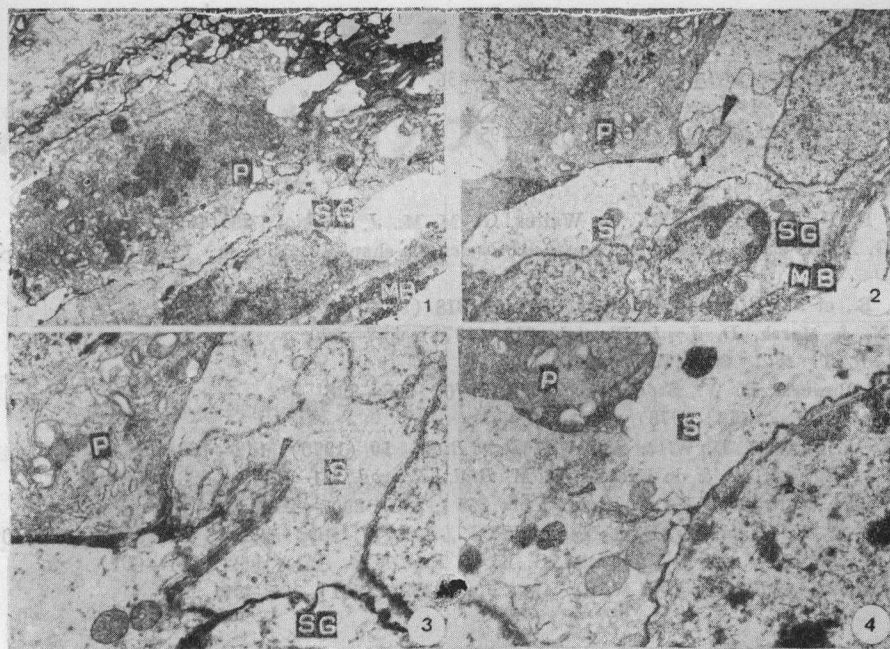
MB 为基底膜，S 为支持细胞，SG 为精原细胞，P 为粗线期初级精母细胞。箭头所指者为支持细胞紧密连接结构。×2140

2. 5 周组对照大鼠曲细精管上皮细胞电子显微镜照片 ×2550。

3. 对照大鼠曲细精管上皮内血睾屏障的超微结构图。在支持细胞的紧密连接结构两侧对称分布着一些纤维和内织网膜与池。F 为纤维；ER 为内织网膜。×6600

4, 5. 大鼠喂服棉酚 5 周后，睾丸曲细精管上皮细胞电子显微镜照片。箭头示支持细胞紧密连接结构出现硝酸铈沉淀颗粒。4×1620；5×2340

6. 大鼠服用棉酚 8 周后，精细管上皮细胞电子显微镜照片。硝酸铈透过类肌细胞层，大量进入近腔室，显示严重损伤状态。×1860



1. 同图版 I, 6.

2, 3. 大鼠服用棉酚 8 周后, 曲细精管上皮细胞电子显微镜照片, 支持细胞间的紧密连接结构未见严重损伤, 但硝酸钾的通透性增加. 2×1620 ; 3×2700

4. 大鼠服用棉酚 8 周后, 曲细精管上皮细胞电子显微镜照片, 示有的支持细胞紧密连接结构排列不规则. $\times 2700$

参 考 文 献

- [1] 戴荣禧、庞诗宜、刘正廉, 实验生物学报, **11**(1978), 27—36.
- [2] 薛社普等, 中国科学, 1979, 9:915—923.
- [3] 吴熹婉、宗书东、薛社普, 解剖学报, **10**(1979), 92—95
- [4] 薛社普等, 同上, 80—87.
- [5] 吴熹婉等, 同上, **12**(1981), 289—292.
- [6] Setchell, B. P., Voglmayr, J. K. & Waites, G. M. M., *J. Physiol.*, **200**(1969), 73—85.
- [7] Waites, G. M. H. et al., *Advances in the Biosciences*, chap. 10, Vioweg: Pergamon, 1973, pp. 101—116.
- [8] Tuck, R. R., et al., *Pflugers Ach. Ges. Physiol.*, **318** (1970), 225—245.
- [9] Levine, N. & Marsh, D. J., *J. Physiol.*, **213** (1971), 557—570.
- [10] Gladwell, R. T., *ibid.*, **263** (1977), 111—121.
- [11] Dym, M. & Pawcett, D. W., *Biol. Repoord.*, **3** (1970), 308—326.
- [12] Dym, M., *Anat Res.*, **173** (1973), 639—659.
- [13] Gilula, N. B., Fawcett, D. W. & Aoki, A., *Dev. Biol.*, **50** (1976), 142—168.
- [14] Kerr, J. B., Rich, K. A. & de Kretser, D. M., *Biol. Reprod.*, **21** (1979), 823—838.
- [15] Nakamura, M. & Hall, P. F., *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 2907—2913.
- [16] Blackshaw, A. W., Hamilton, D. & Massey, P. F., *Aust. J. Biol. Sci.*, **26** (1973), 1395—1407.
- [17] Freund, J., Lipton, M. M. & Thompson, G. E., *J. Exp. Med.*, **101** (1953), 591—601.
- [18] Pelletier, R. M. & Nemiřovsky, M. S., *Anat. Rec.*, **199** (1981), 197—211.