

# 哺乳动物睾丸细胞间连接的动态调控

蒋洪涛 梁 芳 邵侗雄 朱宝长\*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

**摘要** 精子的发生过程是一个受多种因素(包括由细胞间连接的动态变化所形成的微环境等)精确调控的过程。细胞因子及睾酮以自分泌、旁分泌的形式对该微环境中的细胞连接水平如:生殖细胞穿越血睾屏障(the blood-testis barrier, BTB)的开闭机制等进行调控,从而对精子的发生起到重要调节作用。本文讨论了各种因素对细胞间连接的自分泌、旁分泌调控方式的影响,并简要介绍了“近腔细胞外质特化(apical ectoplasmic specialization, 近腔ES)-BTB-半桥粒/基底膜”功能调控轴模型在生精细胞穿越BTB及精子释放等生精过程中的作用,为人们进一步认识精子发生过程中细胞间联系的功能及其调控提供了新的视角。

**关键词** 睾丸细胞连接; 细胞因子; 睾酮; 自分泌; 旁分泌

精子发生是一个在生殖激素调控下的细胞增殖和分化过程,需要在生精上皮的特殊微环境中进行,虽然睾丸的生精过程是在体内激素的统一协调下完成的,但曲细精管中的生殖细胞和支持细胞却具有各自不同的行为模式和变化周期,这说明生精上皮的活性仅有内分泌调控是不够的,还需要其他的调控机制来补充。

生殖细胞的微环境是其正常活动所必需的,其中最为熟悉的是血睾屏障(the blood-testis barrier, BTB),它主要由支持细胞之间的紧密连接所构成,不论何种原因只要损害了睾丸细胞的紧密连接就会阻碍睾丸的生精过程。精子发生是生殖细胞和支持细胞在曲细精管上皮以上皮波的形式有序而相关联的一系列细胞增殖、分化和变形过程(如大鼠的生精上皮周期分为14期),在此过程中不同细胞或不同发育时段的细胞间常常通过细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、转化生长因子(TGF- $\beta$ 3)和睾酮的局部变化作为旁分泌因素来影响紧密连接的形成,从而根据生殖细胞的发育动态调控BTB的开闭<sup>[1]</sup>。这种开闭既维持了精子发生所必需的微环境,又使原来从基底膜开始增殖的精原干细胞在向精子分化的过程中及时穿越BTB而到达曲细精管管腔,甚至在精子脱离支持细胞被释放到管腔的过程中(VII~VIII期)也起到了重要作用(此时局部的TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 3水平有所升高)<sup>[2]</sup>。因此,关注细胞间连接调控的研究不仅有助于全面了解精子发生过程中的调控机制,

而且也对开发男性避孕药物的临床研究具有前瞻性指导作用,本文将结合本实验室的研究经验向读者展示这些自分泌和旁分泌因子如何在不同的细胞间传递信息并最终影响细胞连接过程的,力求勾画出一个细胞连接调控的局部轮廓。

## 1 睾丸中细胞连接的主要类型

在哺乳动物睾丸中,细胞连接主要分为三类:紧密连接(tight junction, TJ)、间隙连接(gap junction, GJ)和锚定连接(anchoring junction)<sup>[2]</sup>。

TJ是相邻的支持细胞基部两侧细胞膜间形成的连接结构,位于精原细胞靠近管腔的一侧,对物质具有选择通透性,是BTB的重要组成部分。GJ是由相邻细胞膜上的GJ蛋白半通道对接形成的,是支持细胞间以及支持细胞-生殖细胞间的化学信号通道<sup>[3]</sup>,允许相邻细胞之间分子量小于1.2 kDa的分子通过<sup>[4,5]</sup>,对于精子发生过程中的同期化现象具有至关重要的作用。锚定连接是由黏附连接(adheren junction, AJ)、细胞外质特化(ectoplasmic specialization, ES)、管腔复合物(tubulobulbar complex, TBC)、桥粒状连接以及半桥粒五种连接结构组成的<sup>[2]</sup>。其中, AJ包括黏着带和黏着斑,前者位于上皮细胞TJ的下方,通过钙

收稿日期: 2010-09-15 接受日期: 2010-12-01

国家自然科学基金(No.30870934)资助项目

\*通讯作者。Tel: 010-68903623, Fax: 010-68903623, E-mail: baochang@mail.cnu.edu.cn

表1 雄性大鼠的生精上皮中不同连接类型及其功能、相关蛋白

Table 1 Different junction types and their functions, relative proteins in the seminiferous epithelium of adult rat testes

细胞连接类型	紧密连接		锚定连接				间隙连接
	Tight junction	Anchoring junction					
Junction types		黏附连接 Adherens junction	细胞外 质特化 ES	桥粒 Desmosome	官腔复合物 TBC	半桥粒 Hemidesmosome	
Cell-cell types	SCs	SCs, SC-GC	SCs, SC-GC	SCs and SC-GC	SCs and SC-GC	testicular cells and extracellular matrix	SCs and SC-GC, LC
Functions	Regulate paracellular, intramembrane diffusion	Cell adhesion between SCs, SCs and GCs		Withstand mechanical force	Internalize the cytoplasm and junction complexes from the late spermatid and BTB	Attachment of SCs to basement membrane	Mediate intercellular communication, release small molecules into extracellular space
Protein components	Occludin, claudins, JAMs	Cadherins, nectins (-2,3), JAM-C		Connexins, desmoplakins	Cofilin, dynaminIII	Integrins ( $\alpha 6 \beta 1$ )	Connexins
Peripheral adaptors	ZOs, MAGIs	Catenins, afadins, ZO-1		Plakophilins	Dynamins(-2,-3), clathrin	—	ZO-1, drebrin
Cytoskeleton	Actin filament	Actin filament	Actin filament	Intermediate filament	Microtubule, actin filament	Intermediate filament	Actin filament

注释: SC, 支持细胞; GC, 生殖细胞; LC, 间质细胞<sup>[6,7]</sup>。

Notes: SC, Sertoli cell; GC, germ cell; LC, Leydig cell<sup>[6,7]</sup>。

黏着蛋白与肌动蛋白将两个细胞连接而成; 后者则是细胞与细胞外基质的黏着连接。TBC分布于变长中的精子头部和支持细胞之间, 是以肌动蛋白为基底的特化连接结构。

人们已经发现了不同连接类型的组成蛋白, 经过对其相应蛋白的基因敲除或过表达, 其功能性状也正在逐步被解析, 但是要完全了解这些蛋白的具体功能还有很长的路要走。

BTB把生精上皮分为基底室和近腔室, 在生精上皮周期的VIII期, 前细线期精母细胞由基底室穿过BTB进入近腔室进一步发育。BTB主要由紧密连接和锚定连接组成, 近腔ES将长形精子锚定在支持细胞上, 使精子在完全成熟之前能够一直保持与支持细胞在结构和功能方面的密切联系。

## 2 “近腔ES-BTB-基底膜/半桥粒” 功能调控轴对细胞间连接的调控

研究发现, 如果解聚近腔ES上的层粘连蛋白 $\alpha 3$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 3$ 链后, 通过半桥粒的调控会引发BTB的解聚, 说明近腔ES、半桥粒、BTB在生理学上存在着紧密联系<sup>[9]</sup>。

### 2.1 细胞外质特化(ectoplasmic specialization, ES)

ES是夹在内质网囊泡和支持细胞质膜之间的肌动蛋白束, 分为基底ES和近腔ES。基底ES是由分布于相邻支持细胞间质膜上的肌丝与内质网池所形成的连接结构, 与紧密连接共存; 而近腔ES则分布在支持细胞、正在变长的精子和长形精子之间的接触面上<sup>[8,10]</sup>。一旦近腔ES出现, 它就是细胞之间唯一的锚定连接, 一直持续到大鼠精子发生中的VIII期的19阶段(step 19)。

两种ES上存在一些黏附连接蛋白复合物, 而外周接头(如cadherin)分布在近腔ES上的支持细胞一侧。在VIII后期, 近腔ES与TBC都开始消失, 精子被释放至管腔<sup>[10]</sup>。

### 2.2 血睾屏障(the blood-testis barrier, BTB)

在哺乳动物睾丸中, 基底TBC与紧密连接、基底ES、间隙连接和桥粒状连接共同组成BTB<sup>[10]</sup>。BTB的有序开放是精子生成的保证, 其中occludins、claudins和黏附连接分子(JAMs)这三类结构膜蛋白在调节BTB的动态开放中发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。体内许多细胞因子和激素, 如TGF- $\beta 3$ 、TNF- $\alpha$ 和睾酮就可以通过这些蛋白水平来调控BTB的动态开

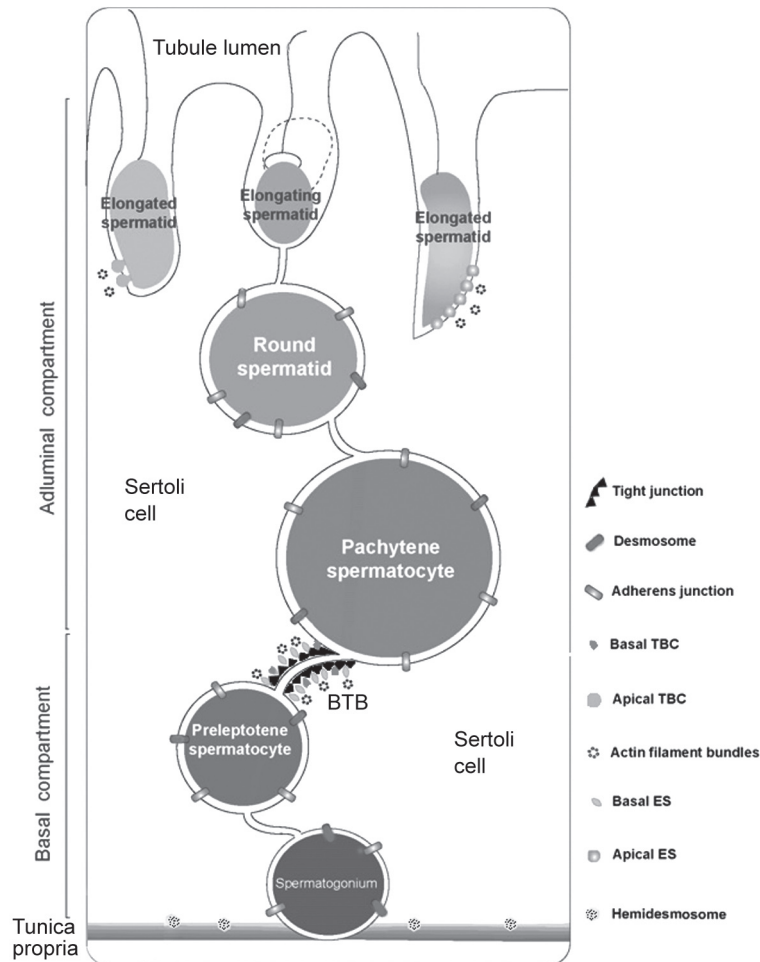


图1 成年雄鼠中不同细胞连接类型及其在生精上皮中的位置分布图<sup>[6]</sup>

Fig.1 Different junction types and their relative location in the seminiferous epithelium of adult rat testes (adapted from<sup>[6]</sup>)

闭<sup>[12,13]</sup>、维持精子发生的正常进行。研究表明<sup>[14,15]</sup>, 辜酮对于BTB完整性的维持至关重要, 它对于BTB的组装有促进作用, 镉诱导的BTB解聚可能引发或继发于黏附连接的分解。

此外, 阿杜丁(Adjudin, 即1-(2,4-二氯苄基)-1H-吡啶-3-碳酰肼)是一种药物, 能够在不影响雄性激素水平的情况下, 通过破坏细胞连接而干扰精子的成熟过程<sup>[1]</sup>。用这种药物处理小鼠后, 其精子数目会降至不育水平, 且其生殖能力在处理停止后也可以恢复, 有望开发为男用避孕药物<sup>[16]</sup>。

### 2.3 半桥粒

半桥粒存在于细胞与细胞外基质间, 是通过细胞膜上的整联蛋白固着于基底膜上的连接方式。最新研究发现, 层粘连蛋白 $\alpha 2$ 链和 $\beta 1$ -整合素是半桥粒的两种组成成分<sup>[9]</sup>。此外, 通过RNAi干扰半桥粒的

$\beta 1$ -整合素功能后, 紧密连接屏障也开始解聚。在紧密连接解聚期间, 可检测到半桥粒上紧密连接相关蛋白(如ErB, 一种表皮生长因子受体变种)和 $\alpha 6 \beta 4$ -整合素的相互作用加强了。这些发现说明在半桥粒和BTB之间存在着一种功能调控关系<sup>[17,18]</sup>。

### 2.4 基底膜

在哺乳动物睾丸中, IV型胶原蛋白和层粘连蛋白组成了基底膜, 它对大分子蛋白等物质具有选择性通透作用。很多被认为与支持细胞、生殖细胞的功能调控有关的蛋白酶、蛋白酶抑制剂、细胞因子和生长因子都可以在基底膜上共存。

### 2.5 “近腔ES-BTB-半桥粒/基底膜”功能调控轴

在曲细精管生精上皮周期的第VIII期, 完成了减数分裂的精细胞又经过了形态变化形成了成熟的精子, 此时的精子仍然通过ES结构与支持细胞保持

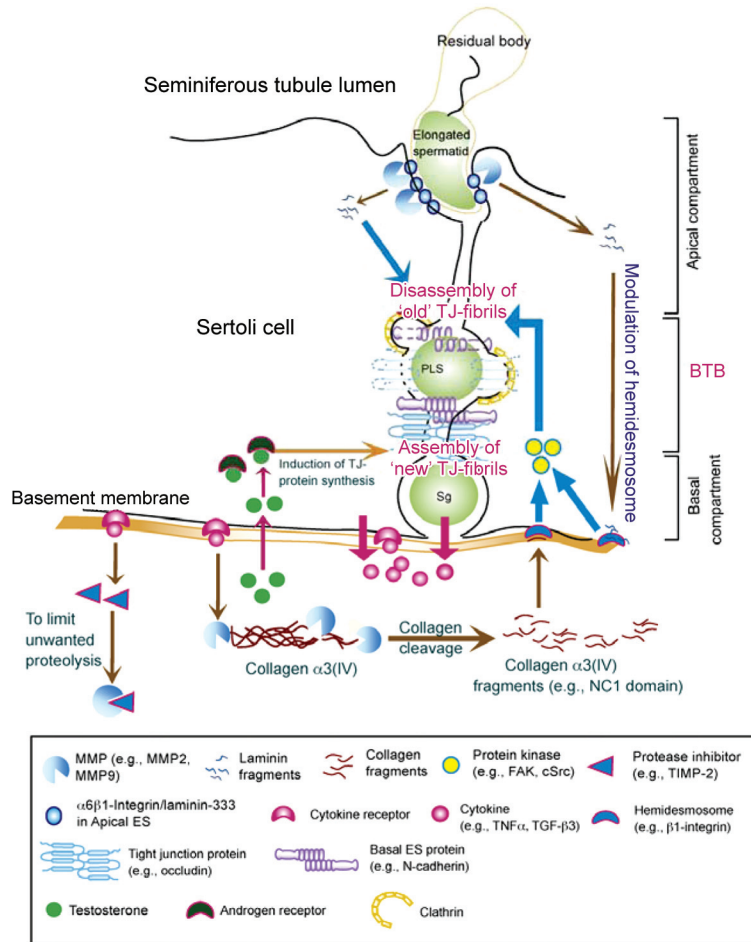


图2 局部“近腔ES-BTB-基底膜/半桥粒”功能调控轴示意图<sup>[8]</sup>

Fig.2 The local “apical ES-BTB-basement membrane/hemidesmosome” regulatory axis<sup>[8]</sup>

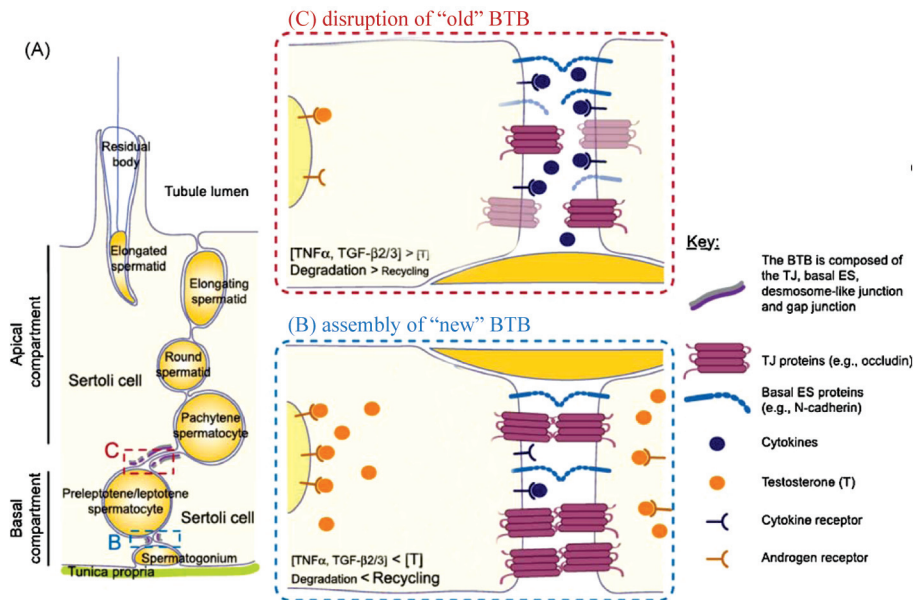


图3 睾酮和TNF-α、TGF-βs在生精上皮中的连接动力学调控研究图<sup>[7]</sup>

Fig.3 The interplay of testosterone and cytokines (TNFα and TGF-βs) in the regulation of junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis<sup>[7]</sup>



密切的联系,在精子即将释放到管腔时,通过激活MMP-2或MMP-9使近腔ES中的 $\alpha6\beta1$ -整合素/层粘连蛋白-333黏附复合物解聚,一方面导致成熟精子脱离支持细胞进入管腔中,另一方面该复合物解聚释放出层粘连蛋白片段,该片段可以直接作用于临近的BTB上,促使其解聚,此时如果使用特定的抗体将近腔ES的层粘连蛋白功能进行封闭,可以观察到精子顶体从管腔脱落,BTB重新组装<sup>[9]</sup>。

同时,ES解聚所形成的层粘连蛋白片段还可以通过细胞内转运到达基底膜,并与存在于基底膜和支持细胞之间的半桥粒发生作用,激活蛋白激酶,进而通过降低BTB上整合蛋白的稳定水平促进BTB的解聚。

此外,由生精细胞分泌的TNF- $\alpha$ 还可以诱导支持细胞基质的金属蛋白酶-9(MMP-9)生成并促进酶原的激活,与基底膜的组分之一骨胶原蛋白 $\alpha3$ (IV)链上的片段(如NC1区域)发生作用。与层粘连蛋白类似,通过半桥粒、蛋白激酶一起作用促进BTB解聚<sup>[9]</sup>,使前细线期初级精母细胞得以穿越BTB向近腔室迁移(图2),尽管在此过程中的因果关系尚有争论,但是BTB的打开确是该迁移的前提条件。这样从曲细精管横截面上看,近腔ES发生解聚时释放层粘连蛋白片段可以作为局部因子作用于其支持细胞间形成的BTB,到达基底膜与半桥粒结合,它们在功能上相互连接,犹如一个功能调控单位而被称为调控轴。

有趣的是,除了这些层粘连片段能通过降低半桥粒中 $\beta1$ 整合素水平间接地调控BTB以外,局部睾酮水平的提高能够通过紧密连接蛋白(如occludin)的合成来促进BTB的组装,通过某种未知机制,来自生精细胞的TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta3$ 能在初级精母细胞穿越BTB过程中对“旧”及“新”的BTB起到不同的调节作用(见下文)。

### 3 生殖细胞因子和间质细胞睾酮对睾丸细胞连接的局部调控

研究发现,源自生殖细胞的TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ 可作为旁分泌因素诱导与其相邻的支持细胞间连接的解聚,比如经TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta3$ 处理后,用FITC标记的菊糖作为示踪剂,经静脉注射后,能到达曲细精管的近腔室部分,而对照组中的示踪剂却止于紧密连接处,只分布于基底膜部分,说明BTB发生了解聚<sup>[20,21]</sup>。

TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta3$ 在支持细胞中也有表达,二者作为旁分泌因素引起BTB解聚。TNF- $\alpha$ 通过“近腔ES-BTB-半桥粒/基底膜功能调控轴”来促进BTB解聚(图2);TGF- $\beta2$ 和- $\beta3$ 可以与存在于支持细胞和生殖细胞中的受体结合,通过p38-MAPK信号途径下调BTB上的蛋白occludin、JAM-A和N-cadherin的水平来诱导其对BTB的解聚<sup>[20-22]</sup>。

如果人为降低睾酮水平,会导致VIII期的精子从近腔ES上脱离,也可能与激活FAK磷酸化有关<sup>[23]</sup>。如果睾酮受体(AR)的表达受抑制,通过ES锚定在支持细胞上的成熟精子也无法释放到管腔中去<sup>[24,25]</sup>。

用化学方法处理雄鼠睾丸,将紧密连接打开之后,支持细胞两侧的电阻(TER)显著下降,之后再用电阻处理,又可以观察到整合蛋白claudin-11、claudin-1、claudin-3的mRNA表达水平出现不同程度的上升,同时监测到TER逐渐回升,说明紧密连接逐渐恢复,BTB开始组装<sup>[17,26]</sup>。

在精母细胞穿越免疫屏障的过程中,TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta2$ 和TGF- $\beta3$ 与睾酮共同作用在连接结构上,不同的是,前述细胞因子促进BTB的解聚而睾酮是促进BTB组装的。当睾酮的作用处于优势时,“新”BTB组装;当上述细胞因子处于优势时,则“旧”BTB解聚。睾丸中持续存在的睾酮高水平保障了曲细精管BTB的完整性(图3B),但是当前细线期精母细胞穿越BTB时分泌大量的细胞因子(如TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ),使精母细胞近腔侧的BTB解聚(图3C)<sup>[20,21]</sup>。

## 4 结语

本文简要描述了成年雄性睾丸中常见的细胞连接类型,并介绍了调控这些细胞连接所提出的近腔-ES-BTB-半桥粒/基底膜功能调控轴模型,解释了睾酮和一些细胞因子以旁分泌和自分泌方式影响血睾屏障,进而影响精子发生的具体过程,使人们对睾丸曲细精管上皮周期的细胞间作用机理和生殖细胞从基底膜穿越血睾屏障到达管腔的机理有了一定的认识。然而,包括文中细胞因子和睾酮的作用细节在内的许多问题尚未明确,结合本实验室使用电镜示踪技术以及支持细胞两极电阻方面的研究经验,我们认为该模型既不是第一个也不可能是最后一个解释睾丸各种细胞间相互作用机理的模型,需要多学科不懈的努力或许还要新技术的出现才能逐步理清其机理细节。

**参考文献(References)**

- 1 Yan HH, Cheng CY. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(33): 11722-7.
- 2 Lee NP, Wong EW, Mruk DD, Cheng CY. Testicular cell junction: A novel target for male contraception. *Curr Med Chem* 2009; 16(7): 906-15.
- 3 Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003; 83: 1359-400.
- 4 Hervé JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D, Duffy HS. Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog Biophys Mol Biol* 2007; 94: 29-65.
- 5 Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* 2007; 94: 120-43.
- 6 Lui WY, Cheng CY. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis-A molecular and biochemical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 299-311.
- 7 Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: An emerging concept of regulation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 329-38.
- 8 Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 315: 49-56.
- 9 Yan HH, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Cheng CY. An auto-crine axis in the testis that coordinates spermiation and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(26): 8950-5.
- 10 Wong EW, Mruk DD, Cheng CY. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochimica Biophysica Acta* 2008; 1778: 692-708.
- 11 Cheng CY. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Mol Mechanis Spermat* 2009; 636: 212-33.
- 12 Wong CH, Cheng CY. The blood-testis barrier: Its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2005; 71: 263-96.
- 13 Siu ER, Wong EW, Mruk DD, Sze KL, Porto CA, Cheng CY. An occludin-focal adhesion kinase protein complex at the blood-testis barrier: A study using the cadmium model. *Endocr Rev* 2009; 30: 3336-44.
- 14 Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16696-70.
- 15 Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, *et al.* Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junction complex formation in mouse testes. *Endocr Rev* 2006; 147: 5624-33.
- 16 Kaitu'u-Lino TJ, Sluka P, Foo CF, Stanton PG. Claudin-11 expression and localisation is regulated by androgens in rat Sertoli cells *in vitro*. *Reproduction* 2007; 133:1169-79.
- 17 Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825-74.
- 18 Mruk DD, Cheng CY. 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.
- 19 Siu MK, Cheng CY. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis. *Bio Essays* 2004; 26: 978-92.
- 20 Xia WL, Wong EW, Mruk DD, Cheng CY. TGF- $\beta$ 3 and TNF $\alpha$  perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. *Dev Biol* 2009; 327: 48-61.
- 21 Yan HH, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 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: 1945-59.
- 22 Holdcraft RW, Braun RE. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 2004; 131: 459-67.
- 23 Walker H. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 2009; 74: 602-7.
- 24 Su LL, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Differential effects of testosterone and TGF- $\beta$ 3 on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the bloodtestis barrier. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2945-60.
- 25 Walker WH. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Phil Trans R Soc* 2010; 365: 1557-69.
- 26 Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(46): 16696-700.

## The Regulation of Cell Junction Dynamics in the Mammalian Testis

Hong-Tao Jiang, Fang Liang, Zhu-Xiong Shao, Bao-Chang Zhu\*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**Abstract** Spermatogenesis is a complex biochemical event, including dynamic change of cell junctions. This review illustrated the effects of cytokines and testosterone on cell junctions in the microenvironment of germ cell via paracrine regulation, including the maintaining of BTB and the moving of germ cell from basal compartment to apical compartment. The intricate role of cytokines and testosterone in regulating the transit of primary spermatocytes through the BTB has been discussed. We described herein an apical ES-BTB-hemidesmosome axis for local regulation within the seminiferous tubles. This may open a new research window for investigation in the field to tackle the functional regulation of spermatogenesis.

**Key words** testicular cell junctions; cytokines; testosterone; autocrine; paracrine

---

Received: September 15, 2010    Accepted: December 1, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30870934)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-68903623, Fax: 86-10-68903623, E-mail: baochang@mail.cnu.edu.cn