

# 睾丸支持细胞紧密连接的动力学调控

赵 勇, 张远强\*

(第四军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室, 西安 710032)

**摘 要:** 在睾丸精子发生的过程中, 处于细线期和细线前期的精母细胞必须从生精上皮的基底室进入近腔室, 这样形态上发育完全的精子才能在精子释放时进入到生精小管的内腔。显然, 构成血-睾屏障的支持细胞间紧密连接的开放和关闭受到一系列的信号分子的调节。已经发现的对该过程起调控作用的信号分子包括: 转化生长因子 $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ )、闭锁蛋白、PKA、PKC等。现就该领域研究的新进展以及可用于研究紧密连接动力学的一些模型进行综述。

**关键词:** 信号转导; 紧密连接; 精子发生; 睾丸

**中图分类号:** R329    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-9977(2004)02-133-06

睾丸支持细胞即 Sertoli 细胞的立体构型比较复杂, 在形态上呈不规则锥体形, 基部紧贴基膜, 顶部伸达管腔, 侧面和腔面有许多不规则凹陷, 其内镶嵌着各级生精细胞, 相邻的支持细胞侧面近基部的胞膜形成紧密连接, 将生精上皮分为了基底室和近腔室。基底室位于生精上皮基膜和支持细胞紧密连接之间, 内有精原细胞(包括 A 型和 B 型), 近腔室位于紧密连接上方, 与生精小管管腔相通, 内有精母细胞、精子细胞和精子。生精小管和血液之间存在着血睾屏障, 其组成包括间质的毛细血管内皮及其基膜、结缔组织、生精上皮基膜和支持细胞的紧密连接。紧密连接是构成血睾屏障的主要结构。精子发生包括了从精原细胞演变为精子的全部变化过程, 在此过程中 B 型精原细胞发育分化到细线前期和细线期的精母细胞就必须转入近腔室来完成进一步的发育<sup>[1]</sup>。不难看出, 精子发生时生殖细胞穿越生精上皮的运动同紧密连接、黏附连接、和桥粒样连接的结构重建有广泛的联系, 由于精子发生在细胞、生物化学和分子水平上受到不同分子、不同通路的调节。因此, 弄清楚支持细胞紧密连接动力学及在重建过程中的调节机制尤为重要。本文简述了该领域研究的进展以及可用于研究紧密连接动力学的一些模型。

## 1 紧密连接的结构和分子组成

在形态上, 大鼠睾丸内支持细胞间的紧密连接在靠近基膜处形成一个四周连续的密封体。在超薄

切片上, 紧密连接处的相邻细胞膜形成 2~4 个点状融合, 融合处细胞间隙消失, 非融合处有极窄的细胞间隙。利用冰冻蚀刻复-型法并结合透射电镜观察发现, 在紧密连接处的膜内, 蛋白颗粒排成 2~4 条线性结构, 它们又交错成网格, 带状环绕细胞。相邻的细胞连接面上, 这种结构互相吻合, 蛋白颗粒与蛋白颗粒对接, 封闭了细胞间隙。所以紧密连接可阻挡物质进入细胞间隙, 具有屏障作用。迄今为止, 在睾丸内已经发现了三类结构膜蛋白, 它们包括 claudins、闭锁蛋白(occludins)和连接黏附分子 JAMs<sup>[2]</sup>, 并鉴定了一些其他的周围膜蛋白, 如闭合小环蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、ZO-2、菌环蛋白(cingulin)、symplekin 等(见表 1)。它们作为结构成分, 并行行使着信号转导的作用。

### 1.1 闭锁蛋白

闭锁蛋白分子量大小为 65kDa, 是在多种上皮以及大鼠的睾丸内最早鉴定出的紧密连接结构膜蛋白。到目前为止, 除了闭锁蛋白的剪接变体, 在任何的动物中尚没有发现其他的闭锁蛋白相关基因, 该变体命名为闭锁蛋白 1B(occludin-1B)。每一个闭锁蛋白分子都有四个跨膜结构域, 胞质内有一个长的羧基末端和短的氨基末端, 有一个细胞内环和两个细胞外环。第一个细胞外环与细胞间的联

收稿日期: 2003-07-08; 修回日期: 2003-09-01

国家自然科学基金(No.39870109); 全军医药卫生科研基金(No. 01MA183); 第四军医大学创新基金(No.CX02A001)资助

\* 通讯作者, E-mail: zhangyq@fmmu.edu.cn

表1 睾丸内紧密连接的组成蛋白<sup>[9]</sup>

	分子量(kDa)	作用的对象	结构域
<b>跨膜蛋白</b>			
Occludin 和 occludin-1B	58~82	ZO-1, IG8 抗原	4 个跨膜结构域 2 个细胞外环 1 个细胞内环
Claudins 1,3,4,5,7,8 和 11	23	ZO-1, ZO-2, IG8 抗原, MUPP1	4 个跨膜结构域 2 个细胞外环 1 个细胞内环
JAM-1 和 JAM-2	36~45	Occludin, ZO-1, AF-6, 菌环蛋白 (cingulin), ASIP/PAR-3, ponsin	2 个细胞外免疫球蛋白结构域 1 个跨膜结构域 1 个细胞内结构域
<b>外周蛋白</b>			
ZO-1	210~225	Occludins, claudins, ZO-2, ZO-3, JAMs, ZONAB-A,-B, cingulin, AF-6, 19B1, MAGI-1, JEAP, IG8 抗原	3 PDZ, 1 SH3, 1 GUK
ZO-2	160	Claudin, ZO-1, cingulin	3 PDZ, 1 SH3, 1 GUK
Cingulin(菌环蛋白)	140	JAMs, ZO-1, ZO-2	No PDZ
Symplekin	150	n.k.	No PDZ
<b>囊泡转运蛋白</b>			
PTEN / MMAC	45	MAGI-1, MAGI-2	No PDZ

注: AF-6 指 ALL-1 fusion partner from chromosome 6; ZONAB 指 ZO-1 相关核酸结合蛋白; MAGI 指膜相关性鸟苷酸激酶; JEAP 指连接增强和相关蛋白; PTEN 指从 10 号染色体上剔除的磷酸酶和 *texsin* 类似物; MUPP 指多 PDZ 结构域的蛋白; MMAC 指 mutated in multiple advanced cancer; ASIP 指非典型性 PKC 同型特异性作用蛋白; PAR 指 partitioning defective; PDZ 指 PSD-95/DIG-A/ZO-1; GUK 指鸟苷酸激酶; n.k. 指未知的, 即相互作用的蛋白或它们的相应物还没有在睾丸内鉴定。

系有关, 参与了细胞的黏附功能。第二个细胞外环是紧密连接的建立和其封闭功能所必需的, 从而参与了紧密连接的功能<sup>[3]</sup>。闭锁蛋白在紧密连接中具有独特作用, 例如, 在小猎犬肾上皮细胞(Madin-Darby canine kidney cells, MDCK)中鸡闭锁蛋白的过表达可以提高上皮细胞的跨膜电阻(TER), 使紧密连接更加牢固; 在睾丸内使用作用于闭锁蛋白的第二个细胞外环最外面区域的 22-氨基酸人工肽(NH<sub>2</sub>-GSQIYTICSQFYTPGGTGLYVD-COOH, 即闭锁肽, 作用于大鼠闭锁蛋白第二个细胞外环的 209~230 个残基), 可下调培养的爪蟾卵母细胞和支持细胞<sup>[3]</sup>的跨膜电阻, 并可逆性的阻断精子的发生, 干扰血-(BTB)的功能, 并造成生殖细胞从生精上皮的丢失<sup>[3]</sup>。通过微穿刺技术分析发现, 在仅用睾丸内给予闭锁肽处理的两周内, 采用颈静脉注射示踪剂, 发现 <sup>125</sup>I-BSA(牛血清白蛋白)可以透过 BTB, 其渗漏可以持续 6 周之久<sup>[3]</sup>。随着 BTB 的破坏, 生精细胞不断地从生精上皮丢失, 在经过肽处理过的 27 天内生精小管内基本上就没有精子细胞<sup>[3]</sup>。在处理后的 68 天, 在所有的小管内都发现正常的精子发生, BTB 不再有渗漏<sup>[3]</sup>。另外, 研究还显示在支持细胞紧密连接的组装以及体外模型中, CdCl<sub>2</sub> 诱导的 BTB 破坏后紧密连接屏障的重建都与对闭锁蛋白的诱导有

关<sup>[4]</sup>。以上的结果共同表明了闭锁蛋白在 BTB 功能的维持和精子发生过程中的重要作用。

## 1.2 Claudins

Claudin 也是在上皮和内皮细胞紧密连接位点处发现的不同于闭锁蛋白的紧密连接结构膜蛋白, 其分子量大约为 23 kDa。每一个 claudin 分子也是由四个跨膜结构域组成, 氨基和羧基末端都在细胞质内。在不同 claudin 分子之间, 第一和第四个跨膜片段以及细胞外环的氨基酸序列具有高度保守性。claudins 的基因家族包括 20 多个成员, 其序列的一致性在 12.5% 到 69.7% 的范围内变动。人们最早从鸡肝内鉴定了 claudin 蛋白家族的两个成员 claudin-1 和 claudin-2<sup>[2]</sup>, 在不具有紧密连接的成纤维细胞内 claudin-1 和 claudin-2 的过表达可以导致细胞间形成与其他上皮细胞紧密连接条带非常相似的紧密连接结构, 这显示出了它们在紧密连接装配中的意义。Claudins 直接作用于紧密连接膜相关蛋白的鸟苷酸激酶同工酶、ZO-1、ZO-2、ZO-3 以及富含 PDZ 结构域的蛋白 -1(MUPP1), 并间接同 AF-6(s-afadin)和菌环蛋白(cingulin)作用。因而 claudins 是紧密连接结构和功能上的重要组成成分<sup>[6]</sup>。在睾丸同时表达的 claudin 分子至少有 claudin-1、3、4、5 和 11 等多种。Claudin-11 是睾丸内支持细胞之间形成紧密

连接的重要的“紧密连接建筑模块”(TJ building block)。在所有的 claudin 蛋白分子中,对 claudin-11 的研究最多。Claudin-11<sup>-/-</sup>小鼠的睾丸支持细胞之间缺乏紧密连接<sup>[7]</sup>,并且没有生育能力,在它们的生精小管内是成簇的有核细胞群,但没有正常的精子发生<sup>[7]</sup>。这显示出了 claudin-11 在精子发生中的意义,也表明 claudin-11 在睾丸内紧密连接屏障的形成和维持上具有重要的作用,但其机制尚待阐明。

### 1.3 连接黏附分子(JAMs)

另外一个紧密连接结构膜蛋白家族为 JAM 家族,至今已经鉴定了三种连接黏附分子(JAM-1, 2 和 3)<sup>[8]</sup>。通过 Northern 印迹分析人们已经在睾丸内鉴定了编码 JAM-1 和 JAM-2 的 mRNA<sup>[7]</sup>,但是尚不知道 JAM-3 是不是在睾丸内也有表达。JAMs 为免疫球蛋白超家族的成员,每个分子都有一个细胞外结构域、单次跨膜结构域和一个短的胞质内的尾,其中细胞外结构域是由两个免疫球蛋白的 V 环组成。JAMs 与其他的一些细胞内紧密连接相关分子有关联,如 ZO-1、AF-6、MUPP1、ASIP/PAR-3 以及菌环蛋白等,表明了连接黏附分子也是组成紧密连接多蛋白复合体的一种重要的成分<sup>[9]</sup>。有研究显示了 JAMs 能够调节中性粒细胞和单核细胞在内皮中的迁移<sup>[8]</sup>,这提示我们应当加强研究其对于处在细线期/细线前期的精母细胞穿越紧密连接时的作用。

### 1.4 闭合小环蛋白(ZOs)

ZO-1 是第一个被发现并大量研究的紧密连接周围膜蛋白,其分子量大小为 220kDa,它把紧密连接结构膜蛋白的细胞内结构域同细胞内骨架系统连接在一起,构成稳定的连接系统。后来通过免疫沉积研究在 MDCK 细胞内鉴定了两个相对分子量为 160kDa 和 130kDa 的 ZO-1 样蛋白,它们分别命名为 ZO-2 和 ZO-3。这些蛋白也属于膜相关鸟苷酸激酶蛋白(MAGUK)家族,它们的氮末端序列有高度的同源性,而且都包含了三个 PDZ(PSD-95-Discs Large ZO-1)结构域(PDZ-1, 2, 3),一个 SH3 结构域和一个鸟苷酰激酶样结构域。在这些结构域中,PDZ 结构域直接同多种蛋白的羧基末端相连,如闭锁蛋白、claudin 以及 JAMs<sup>[10]</sup>。在睾丸内人们已经确定了 ZO-1 和 ZO-2 的存在。

## 2 紧密连接动力学的调控

在对其他上皮(如体外的 MDCK 细胞)的研究中,人们虽然还没有完全知晓参与调节紧密连接生

物学发生和紧密连接动力学调节的信号途径或者分子,但近来的研究已经有所突破,鉴定出了可以影响紧密连接动力学的生物分子,这些分子包括 TGF $\beta$ 3、Ca<sup>2+</sup>、磷酸化的紧密连接蛋白、钙调节蛋白(calmodulin)、cAMP 以及 PKA 和 PKC 等。上述已知同紧密连接有关的大多数的信号分子仍有待于在睾丸内进行确定和研究。

### 2.1 细胞因子 TGF $\beta$ 3

已有研究显示在支持细胞紧密连接组装的过程中,TGF $\beta$ 3 在 mRNA 和蛋白质水平都有短暂的下降,添加 TGF $\beta$ 3 到支持细胞的培养基内,可以有效地抑制闭锁蛋白、ZO-1 和 claudin-11 的表达,并进而干扰支持细胞紧密连接屏障<sup>[11]</sup>。同样的添加重组的 TGF $\beta$ 3 也可以干扰体外已形成良好的支持细胞紧密连接屏障。所得结果共同表明了 TGF $\beta$ 3 是在支持细胞紧密连接动力学调节中一个重要的细胞因子。最近研究也显示了 TGF $\beta$ 3 通过 p38-MAPK 途径干扰了支持细胞紧密连接屏障,在体外 p38-MAPK 的一种特异性抑制剂 SB202190 可以有效的中止 TGF $\beta$ 3 诱导的支持细胞紧密连接的分解<sup>[12]</sup>。这些观察结果清楚的显示,如果 TGF- $\beta$ 3 确实可以在体内干扰 BTB,那么睾丸内该细胞因子功能的缺失就可以有效的影响到紧密连接屏障的功能。

### 2.2 蛋白磷酸化作用

紧密连接相关蛋白(TJ-associated protein)的酪氨酸磷酸化在调节紧密连接动力学中具有重要的作用。闭锁蛋白和 ZO-1 均可作为酪氨酸激酶的底物并被磷酸化。而在紧密连接位点发现的闭锁蛋白是被高度磷酸化的<sup>[13]</sup>。在 MDCK 细胞紧密连接屏障的组装过程中,人们也越来越多的检测到闭锁蛋白、ZO-2 和 ZO-3 的磷酸化现象,它们的磷酸化能够被金雀异黄素(genistein)和 PP-2(一种酪氨酸激酶抑制剂)所抑制<sup>[13]</sup>。在小鼠睾丸内,伴随着 BTB 的发展磷酸化的闭锁蛋白的水平也逐渐增加,表明了闭锁蛋白磷酸化的水平同支持细胞紧密连接的组装是相关的。另外大鼠的支持细胞和生精细胞都可以表达大鼠肌管素(myotubularin, rMTM)并且产生 rMTM 蛋白(可能为一种 PTP 即蛋白酪氨酸磷酸酶)<sup>[14]</sup>。在甘油诱导的大鼠睾丸 BTB 的破坏中已经探测到了 rMTM 表达的下降<sup>[14]</sup>。以上结果很有力的支持了蛋白磷酸化在紧密连接动力学调节中扮演着重要的作用这一观点。

### 2.3 cAMP、Ca<sup>2+</sup>、蛋白酶和蛋白酶抑制剂

低剂量(4~20 $\mu\text{M}$ )的双丁酰环磷腺苷(dibutyryl cAMP)可以刺激体外睾丸支持细胞紧密连接屏障的组装,然而大剂量(100~500 $\mu\text{M}$ )情况下又可以干扰紧密连接屏障,表明睾丸内紧密连接动力学受到cAMP的调节。细胞内cAMP水平改变的诱发因素尚不清楚,而且细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的丢失同样可以干扰体外支持细胞紧密连接屏障,重新增加 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度可以快速的封闭紧密连接屏障。新近的研究已经有力的表明PKA和PKC在调节支持细胞紧密连接动力学中扮演有重要的角色。例如,在体外的研究中已经证明了PKA的抑制剂、PKC的抑制剂以及D-erythro-鞘氨醇(一种PKC和钙调蛋白共同的抑制剂)可以调节支持细胞紧密连接屏障的组装和维护<sup>[15]</sup>。其他的研究也显示出了蛋白酶和蛋白酶抑制剂在支持细胞紧密连接屏障功能中的作用。睾丸内大量的蛋白酶和蛋白酶抑制剂在支持细胞、生精细胞甚或两者内都有表达和分泌它们中的一些在调节睾丸内紧密连接动力学中具有重要的意义,如蛋白C抑制剂(PCI)和一些金属蛋白酶的抑制剂等<sup>[15]</sup>。PCI<sup>-/-</sup>的雄性小鼠不能生育,该不育症显然是因为睾丸内的蛋白水解活性没有受到抑制,导致了支持细胞紧密连接屏障的破坏,并进而影响到了精子发生<sup>[15]</sup>。

### 3 研究睾丸内紧密连接动力学的模型

我们对睾丸中紧密连接动力学的理解之所以很少,主要是源于缺少研究这方面的合适的在体和离体模型。近来细胞生物学、生物化学、免疫学和分子生物学方面的进展弥补了这方面的不足,这里简要概括一些已经建立的用于紧密连接动力学方面研究的模型。但模型中BTB的破坏和恢复机制都不是非常的清楚,仍有待于进一步的研究。

#### 3.1 离体(体外)模型

采用Matrigel包被的二室型培养器皿体外培养的支持细胞已经用于研究紧密连接通透性屏障的调节和生物学性状将近有二十年,该经典模型近来又用在了鉴定一些调节支持细胞紧密连接动力学相关的目标基因上,如闭锁蛋白、claudin-11、ZO-1、 $\alpha 2$  巨球蛋白基因以及其他的一些相关基因。在该模型中,睾丸支持细胞在以Matrigel为底物的化学修饰的无血清培养基(例如,F12/Dulbecco修饰的Eagle培养基)上培养,使细胞之间建立紧密连接,并形成在一个在形态上和细胞行为上同体内很相似的上皮,如能够极性分泌多种支持细胞产物。利用该

体外模型的研究还表明了TGF $\beta 3$ 干扰支持细胞紧密连接通透性屏障,可能是通过p38-MAPK的信号通路作为下游信号转导通路<sup>[12]</sup>来调节闭锁蛋白和ZO-1的基因表达<sup>[11]</sup>而起作用的。另外,该体外培养系统也可以用于鉴定在调节紧密连接动力学上具有重要生理意义的分子,如人们已经发现了睾丸酮、cAMP和蛋白酶抑制剂<sup>[16]</sup>是支持细胞紧密连接动力学重要的调节因子。随同测量支持细胞的跨膜电阻(TER)一起<sup>[3,11,16]</sup>,并协同利用其他如异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖、<sup>3</sup>H-菊糖、<sup>125</sup>I-BSA等的限制性扩散技术,该模型可以对紧密连接屏障的动力学进行定量的评估。

#### 3.2 在体(体内)模型

现在研究睾丸支持细胞紧密连接动力学已经有在体的模型可以利用,虽然它们中的一些最初并不是为了研究连接动力学而建造的,例如老龄化模型和隐睾/睾丸炎模型,但随后的一些研究已经证明了模型中的情形均同BTB功能的改变有关。

**3.2.1 CdCl<sub>2</sub>模型** 在二十世纪的早期人们就已经知晓了镉毒性和镉诱导的睾丸内BTB和血管内皮紧密连接的损坏。后续的研究表明了无论在体内或者体外镉都可以导致支持细胞紧密连接屏障的损坏<sup>[4]</sup>。小剂量时,镉就可以导致大鼠精子释放的障碍。免疫荧光共聚焦显微镜研究表明,在按每公斤体重给予1mg CdCl<sub>2</sub>后的24小时内,支持细胞紧密连接相关微丝的结构破坏主要发生在曲细精管周期的第VIII期,而支持细胞中第VIII期以前各期的微丝束以及管周的肌样细胞并不受CdCl<sub>2</sub>处理的影响<sup>[17]</sup>。该结果因而表明,在第VIII期支持细胞内的微丝束为CdCl<sub>2</sub>作用的首要目标。故而,该模型是一个研究BTB动力学的有用的模型,尤其是用于研究紧密连接相关微丝在紧密连接功能中的作用<sup>[4,17]</sup>。已经明确E-钙黏着素(认为是黏附连接结构膜蛋白的一种)为CdCl<sub>2</sub>在其他的体外上皮细胞中的首要作用对象,CdCl<sub>2</sub>诱导的BTB的破坏可能继发于黏附连接(AJ)的分解,所以该模型对研究睾丸内AJ和TJ在生理上和功能上的关系来说是相当有意义的,特别是因为在AJ和TJ之间存在着交互作用(cross-talk)。该模型的缺点是镉诱导的BTB损坏是不可逆的<sup>[17]</sup>,这就对BTB恢复过程中的目标基因改变的评估造成困难。

**3.2.2 甘油模型** 当在大鼠、兔子、松鼠、猴子等的睾丸内给予一定量的甘油时,它们的精子发生可以长时间的中止,而对Leydig细胞类固醇激素

的生成、血清 FSH、LH 和睾丸酮的水平, 和第二性征并不起明显作用<sup>[18]</sup>。最近的荧光共聚焦显微镜研究发现甘油处理后大鼠的生精上皮内闭锁蛋白、肌动蛋白丝和微管构成的网络被破坏, 这表明了这些分子可能是甘油的作用目标。然而, 甘油利用什么样的信号途径来影响在 BTB 中闭锁蛋白构成的紧密连接带并不清楚。同样, 甘油诱导的 BTB 的损坏也是不可逆的<sup>[18]</sup>, 这使人们在评估紧密连接重建上有所困难。

**3.2.3 闭锁肽(Occludin peptide)模型** 按照每个睾丸 1.5~10mg 的剂量, 一次性给予成年大鼠睾丸内闭锁肽处理, 可以造成生精上皮内生殖细胞的可逆性缺失<sup>[3]</sup>。对闭锁肽处理过的睾丸进行形态学分析, 发现处理后的 8~16 天精子发生后期的生殖细胞, 如已经长形的精子细胞, 开始从上皮内缺失<sup>[3]</sup>, 第 27 天时, 大量的生殖细胞已经在几乎所有的曲细精管内缺失, 另外, 生精小管发生典型的萎缩, 同仅给予赋形剂或者肌管蛋白样人工肽的对照组相比, 管径缩小在 20%~30% 左右<sup>[3]</sup>。在给予闭锁肽 27 天后, 生殖细胞逐渐于生精上皮内出现。第 47 天的时候, 在检查的所有小管内中精母细胞均清晰可见, 第 68 天时, 处理组同对照组大鼠的生精小管在形态上没有任何区别, 这表明已经完全恢复。

在 40 天内, 睾丸几乎可以完全恢复说明精原细胞并没有被闭锁肽破坏。通过颈静脉注射 <sup>125</sup>I-BSA, 微穿刺技术定量睾丸液内或者生精小管液内的 <sup>125</sup>I-BSA 的量可以发现闭锁肽诱导的生殖细胞的丢失也伴有可逆性的 BTB 的损坏<sup>[3]</sup>。组织学分析也发现, BTB 恢复的同时伴有了生精上皮中精子发生的再现<sup>[3]</sup>。该肽显然是通过干扰相邻的支持细胞紧密连接位点两个闭锁蛋白分子之间的相互作用来起作用, 并进一步分解 BTB 的。当它被代谢或者清除掉后 BTB 重新封闭。这些结果清楚的显示闭锁肽诱导的 BTB 的可逆性损伤是研究 BTB 动态变化非常有用的模型。它可以用来在 BTB 的破坏和重建中评估其他的目标基因的变化, 并适用于鉴定对 BTB 重建至关重要的分子或者通路。

**3.2.4 隐睾和睾丸炎模型** 一些男性不育的病例是由于隐睾和睾丸炎造成的。隐睾使精子发生受损, 睾丸内支持细胞和睾丸间质(Leydig)细胞的增值和分化的缺乏。由于睾丸内分化成熟的支持细胞在数量上缺乏, 受影响的雄性显示出了 BTB 发育的缺陷, 生精上皮内紧密连接带的数量较少, 精子发

生亦不正常<sup>[19]</sup>。患有隐睾症雄性的生精小管上皮基底膜异常增厚, 意味着 BTB 功能的改变可能继发于基底膜的破坏。当采用 Freund's 佐剂下的睾丸组织匀浆或乳化的精子免疫小鼠、豚鼠(或者两者)后可诱导实验性睾丸炎, 并可以诱导出无精子发生(Aspermatogenesis)现象。利用硝酸镧法检测可以发现, 这种睾丸炎导致的无精子发生现象也伴有 BTB 的分解, 且发现镧沉积于曲细精管内支持细胞和炎症细胞之间。睾丸炎和隐睾诱导的 BTB 的损伤显然也是不可逆的<sup>[20]</sup>。同样导致 BTB 损坏的分子机制也不清楚, 例如, 并不清楚 BTB 的损坏时细胞因子是激活还是抑制, 是不是紧密连接的三类结构膜蛋白在功能上有交替。

### 3.3 前景

上述模型对于理解紧密连接的生物学性状和调节是非常重要的。例如利用体外模型来评估支持细胞紧密连接组装时目标基因表达的改变, 已经发现该过程同时伴有了 TGF $\beta$ 3 在蛋白和 mRNA 水平的短暂下降<sup>[11]</sup>。在紧密连接组装时, 向支持细胞培养基中加入重组的 TGF $\beta$ 3 可以干扰紧密连接屏障的组装, 并具有计量依存效应, 同时还可以抑制支持细胞对闭锁蛋白和 ZO-1 短暂的诱导。在对体内和体外模型生理相关性的研究中, 发现 CdCl<sub>2</sub> 诱导的 BTB 的损坏同睾丸内 TGF $\beta$ 3 在蛋白和 mRNA 水平的升高有关; 同时, 闭锁肽诱导的 BTB 裂解后的重组伴有睾丸内 TGF $\beta$ 3 在 mRNA 水平上的下降。这不仅支持了体外模型研究的在体生理意义和相关性, 而且清楚的表明了 TGF $\beta$ 3 是支持细胞紧密连接动力学的一个重要的调节因子<sup>[11]</sup>。但利这些模型进行的机制性研究给发展新型男性避孕上带来了新的曙光, 即可以通过扰乱 BTB 的功能来中止精子发生。

### 参 考 文 献

- [1] CHENG C Y, MRUK D D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82: 825 - 874.
- [2] FURUSE M, FUJITA K, HIRAGI K, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141: 1539 - 1550.
- [3] CHUNG N P, MRUK D, MOM 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 [J]. *Biol-Reprod*, 2001, 65(5): 1340 - 1351.
- [4] 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?[J]. *Endocrinology*, 2001, **142**(5): 1878 – 1888.
- [5] LI J C, CHENG C Y. The inter-Sertoli tight junction permeability barrier is regulated by the interplay of protein phosphatases and kinases: an *in vitro* study [J]. *J Androl*, 2001, **22**(5): 847 – 856.
- [6] HEISKALA M, PETERSON P A, YANG Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport [J]. *Traffic*, 2001, **2**: 92 – 98.
- [7] GOW A, SOUTHWOOD C M, LI J S, *et al.* CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice [J]. *Cell*, 1999, **99**: 649 – 659.
- [8] AURRAND-LIONS M, DUNCAN L, BALLESTREM C, *et al.* JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 2733 – 2741.
- [9] LUI W Y, MRUK D, LEE W M, *et al.* Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2003, **68**(4): 1087 – 1097.
- [10] HASKINS J, GU L, WITTCHEN E S, *et al.* ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin [J]. *J Cell Biol*, 1998, **141**: 199 – 208.
- [11] LUI W Y, LEE W M, CHENG C Y. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11 [J]. *Endocrinology*, 2001, **142**(5): 1865 – 1877.
- [12] LUI W Y, LEE W M, CHENG C Y. Transforming growth factor-beta3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Biol Reprod*, 2003, **68**(5): 1597 – 1612.
- [13] TSUKAMOTO T, NIGAM S K. Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction protein [J]. *Am J Physiol*, 1999, **276**: F737 – F750.
- [14] LI J C H, LEE W M, MRUK D, *et al.* Regulation of Sertoli cell myotubularin (rMTM) expression by germ cells *in vitro* [J]. *J Androl*, 2001, **22**: 266 – 277.
- [15] UHRIN P, DEWERCHIN M, HILPERT M, *et al.* Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility [J]. *J Clin Invest*, 2000, **106**: 1531 – 1539.
- [16] OKANLAWON A, DYM M. Effect of chloroquine on the formation of tight junctions in cultured immature rat Sertoli cell [J]. *J Androl*, 1996, **17**: 249 – 255.
- [17] HEW K W, HEATH G L, JIWA A H, *et al.* Cadmium *in vivo* causes disruption of tight junction in the rat Sertoli cells [J]. *Biol Reprod*, 1993, **49**: 840 – 849.
- [18] ENG F, WIEBE J P, ALIMA L H. Long-term alterations in the permeability of the blood-testis barrier following a single intratesticular injection of dilute aqueous glycerol [J]. *J Androl*, 1994, **15**: 311 – 317.
- [19] PINART E, SANCHO S, BRIZ M D, *et al.* Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism [J]. *J Morphol*, 2000, **244**: 190 – 202.
- [20] NISTAL M, RIESTRA M L, PANIAGUA R. Focal orchitis in undescended testes: discussion of pathogenetic mechanisms of tubular atrophy [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, **126**: 64 – 69.

## The Regulation of Sertoli Cell Tight Junction Dynamics in Spermatogenesis

ZHAO Yong, ZHANG Yuan Qiang\*

(Department of Histology and Embryology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract:** During spermatogenesis, developing leptotene and preleptotene spermatocytes must translocate from the basal to the adluminal compartment of the seminiferous epithelium so that fully developed spermatids can be released to the tubular lumen at spermiation. Obviously, the opening and closing of the inter-Sertoli tight junctions that constitute the blood-testis barrier are regulated by an array of signal molecules. Transforming growth factor  $\beta$ 3 (TGF $\beta$ 3), occludin, protein kinase A and protein kinase C have been found to be relative to the regulation. This review summarizes some of the recent advances and reviews several models that can be used to study TJ dynamics.

**Key words:** signal transduction; tight junction; spermatogenesis; testis

This work is supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39870109), the Military Medical Research Foundation (No.01MA183) and the Fourth Military Medical University Innovation Foundation (No.CX02A001)

\*Corresponding author, E-mail: zhangyq@fmmu.edu.cn