

大麻及其类似物对动物生殖的影响及其作用机制

霍立军 杨增明

(东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

大麻(marijuana 或 marihuana 等,植物学名为 *Cannabis sativa*)含有多种成分,包括大麻素或大麻碱(cannabinol)、大麻醇(cannabinol, CBN)、大麻二酚(cannabidiol, CBD)和(-)- Δ^9 -四氢大麻醇[(-)-tetrahydrocannabinol, (-)-THC], 其中最具有活性的生理成分是(-)-THC, 人工合成的大麻类似物有 HU-210、CP-55940 和 WIN-55212-2。至今为止,已发现的内源性大麻配体有花生四烯酸乙醇胺[arachidylethanolamide (anandamide), ANA]和花生四烯酸甘油(sn-2 arachidonylglycerol, 2-AG)。大麻受体(cannabinoid receptor, CB-R)分为 CB1-R(脑型)和 CB2-R(脾型),均为 G 蛋白偶合型受体并得到克隆,对应的人工合成特异性拮抗剂分别是 SR141716A 和 SR144528^[1-4]。大麻及其类似物具有广泛的生物学作用。在人类,大麻主要引起感知觉改变,时间感和短期记忆障碍、精神放松、镇静等。大剂量则产生运动障碍。在临床上大麻具有镇吐作用、改善肿瘤化疗病人的食欲及降低青光眼内压等。令人们广泛关注的是,大麻是当今社会服用人数最多的毒品,而大麻对哺乳动物包括人类的生殖功能有着严重的干扰作用。经常性吸入或暴露于大麻及其衍生物可严重影响生殖系统的功能,包括胎儿流产、妊娠失败、胚胎发育阻断以及减少精子受精能力等。另外,大麻也能影响母体和胎儿的激素水平,抑制猴子和大鼠排卵等。本文主要就大麻对动物生殖的影响及作用机制作一扼要概述。

一、大麻及其类似物对激素水平的影响

大麻及其类似物[如 ANA 和(-)-THC 等]对大鼠母体激素水平有很大的影响,如减少母体血清中黄体生成素(luteinizing hormone, LH)的水平,而不改变垂体卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)水平;降低母体垂体和血清促乳素(prolactin, PRL)水平;大大降低血清中孕酮(progesterone, P₄)和前列腺素(PGF_{1 α} 和 PGF_{2 α})水平^[5,6]。ANA 和(-)-THC 对生殖激素的影响极为类似。这些影响可能是通过脑型大麻受体而发挥作用的,其作用位点可能在下丘脑和垂体水平,说明 ANA 可能是一种神经传导者或神经调节者^[6]。另外,因为它们都抑制妊娠大鼠血清中 P₄、PGF_{1 α} 和 PGF_{2 α} 水平,这可能是大麻使妊娠期延长的原因之一。大麻也能影响猕猴和小鼠中的激素水平,如显著提高雌二醇(17 β -estradiol, E₂)浓度及降低睾酮浓度等^[7]。

二、大麻及其类似物对子宫生长的影响

研究发现,(-)-THC 或 E₂ 都能以剂量依赖的方式提高卵巢切除或垂体摘除小鼠的子宫湿重,增加 DNA 合成。它们主要作用于子宫腔上皮和腺上皮细胞。但(-)-THC 的作用比 E₂ 弱。(-)-THC 为一种弱的子宫促生长类物质,其作用不是由垂体介导的^[8]。

大麻对雄性激素的水平和精子形成都有抑制作用,这些作用归因于大麻的雌激素本质。一些种类的雌性动物比雄性更易于对大麻作出反应。但关于大麻的雌激素/抗雌激素本质仍所知有限。据报道,大麻对卵巢切除小鼠的子宫1期和2期的雌激素反应有很大的影响。就1期和2期的子宫反应来说,单独注射(-)-THC没有雌激素反应。然而,在妊娠第4天子宫中,(-)-THC起到弱的孕酮作用。如果存在 E_2 ,(-)-THC就起到弱的抗雌激素作用^[8]。这些结果暗示,雌性动物的类固醇激素水平决定了(-)-THC的雌激素/抗雌激素作用。

在各种生殖器官中,大麻具有激动剂或拮抗剂的作用,或者根本就无雌激素类的反应。最近的研究表明,(-)-THC处理动物能调节(加强或拮抗)卵巢激素对小鼠子宫生长因子和原癌基因的表达^[8]。也有证据证明,(-)-THC能刺激促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)分泌,增加肾上腺和垂体腺的重量,改变PRL和LH分泌^[8]。这些结果也与(-)-THC充当一种抗雌激素的作用一致。但(-)-THC刺激子宫细胞增殖可能并不是由垂体介导的,因为卵巢切除或垂体摘除的小鼠对(-)-THC的反应相似。注射(-)-THC并不能影响转化生长因子- $\beta_{(1,2,3)}$ (transforming growth factor- β , TGF β)、胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)和C-myc原癌基因在卵巢切除小鼠子宫中的表达。然而,(-)-THC能增强 E_2 诱导TGF- β_2 mRNA的表达,而抑制 E_2 诱导IGF-I和C-myc原癌基因 mRNA的表达^[8]。(-)-THC调节类固醇激素诱导子宫基因表达的机制仍不清楚。

三、大麻及其类似物对精子和受精的影响

在哺乳动物中,大麻对雄性动物的生殖功能有很大的影响,包括减少垂体促性腺激素的分泌量、抑制小鼠睾酮分泌、减少人精子的数目和浓度、减少牛精子的运动能力、破坏精子头部

中段和线粒体膜的超微结构、增加小鼠精子头部和顶体发育异常的数目、抑制受精等。但是,大麻似乎并不影响海胆精子的运动能力,也不破坏精子的线粒体基质和嵴的超微结构。近年来在海胆精子中的研究表明,ANA、WIN-55212-2、CP-55940、CBD、CBN和(-)-THC都能通过减少海胆精子的受精能力来抑制受精。这种抑制作用是通过抑制海胆卵胶衣所触发的精子的顶体反应来实现的。这种抑制作用非常迅速,而且是时间(0-5 min)和剂量(0.1-100 $\mu\text{mol/L}$)依赖型的^[9-14]。

海胆精子中CB-R的存在暗示有内源性大麻存在于精子附近。花生四烯酸代谢物(如PGE₂)和大麻结构有惊人的相似之处,它可能调节着大麻的生物学活性。花生四烯酸及其代谢物在非常广泛的细胞系统中都有激素和第二信使的作用。虽然花生四烯酸是一种与ANA类似的前体物,但它并不能抑制顶体反应,而与乙醇胺在磷脂酶D(phospholipase D, PLD)的催化下生成的ANA却有此作用^[14]。因为ANA和(-)-THC的作用相似,可以推测花生四烯酸衍生物或ANA可能是CB-R的内源性配体。现已证实ANA是一种对猪脑中CB-R有效的内源性配体^[14]。除此以外,现在已鉴定的还有2-AG。

因为 $[H^3]$ CP-55940与脑中和海胆精子中的受体的结合都是饱和的,作用强弱顺序也相同。说明在这两种组织中的CB-R是相似的。另外,人脑型CB-R也在人睾丸中表达^[12]。再加上海胆精子中研究的结果(每个海胆精子中包含 712 ± 122 个高亲和性大麻受体^[11]),推测成熟人精子中也可能含有CB-R。又因为在进化过程中,人、大鼠、狗、豚鼠中的脑型CB-R的氨基酸序列是高度保守的(>97%),大麻与这种受体结合的特异性也是高度保守的^[11,14]。所以,CB-R在人睾丸中的存在可能与大麻对人生殖系统功能的抑制有关。大麻可能以类似的方式直接影响人精子的受精能力。

四、大麻及其类似物对胚胎发育的作用

大麻及其类似物(WIN-55212-2, CP-55940, (-) Δ^9 -THC、2-AG和ANA)都能以剂量(7-28nmol/L)依赖的方式影响小鼠2-细胞期胚胎的体外发育,超过60%的2-细胞期胚胎不能发育成胚泡^[1,2,3,4]。经大麻类似物处理且继续发育的胚泡,其外围仍有透明带,但滋养外胚层的细胞数目大大减少。这些胚胎发育阻断主要发生在4-、8-细胞或桑葚胚阶段^[4]。但即使用高浓度(28nmol/L)的大麻也不能完全阻断胚胎发育。许多胚胎重新培养在新鲜的培养液后,还能发育成胚泡^[2]。

尽管大麻类似物对小鼠2-细胞期胚胎发育有抑制作用,但它们(ANA、2-AG和WIN-55212-2)都能在同样低浓度(7nmol/L)时促进胚泡生长和加速滋养层分化,但在较高浓度(28nmol/L)时却可以抑制胚泡生长和滋养层分化^[3]。结合大麻对胚胎发育抑制作用的结果,说明大麻对胚胎发育的作用依赖于胚胎所处的阶段和环境大麻水平的不同而不同。

另外,妊娠大鼠第三周每日注射ANA或(-)-THC(0.02mg/kg, ip/天),结果妊娠期大大延长,死胎的频率也增加。胎儿出生后下丘脑-垂体轴的发育也暂时被抑制^[5,6]。妊娠期服用大麻的妇女其胎儿出生时体重、体长和头部大小都显著减小^[7]。结合大麻受体在大鼠胚胎发育不同时期不同部位的表达情况,推测大麻可能对胚胎发育有影响。大鼠在妊娠第8-12天,胎盘窝和母体子宫平滑肌都有CB1-R和CB2-R mRNA表达。在胚胎中,早在妊娠第11天,CB1-R mRNA就在神经管的一些细胞中表达;在胚胎发育后期(妊娠第15-21天),CB2-R mRNA也在中枢神经系统内几个明显区分的结构上表达。在外周神经系统内,如交感神经和副交感神经中枢以及胃和肠的管道中的视网膜和肠的神经中枢中也可发现高水平的CB2-R mRNA。除了神经结构外,两个内分泌

器官甲状腺和肾上腺中也表达高水平的CB1-R和CB2-R mRNA^[15]。总之,CB1-R和CB2-R mRNA在胚胎中区域特异性表达说明这些受体在胚胎发生中有一定的作用。子宫中位点特异性的ANA水平和/或其他内源性大麻可能定点地调节着床过程^[16]。总之,胚胎发育的状态和子宫和/或胚胎中内源性大麻的水平可能是决定早期妊娠期间胚胎发育和着床命运的重要因素。

五、大麻及其类似物对胚胎着床的影响

1. 内源性大麻在小鼠子宫中的表达水平

小鼠子宫ANA水平随着妊娠阶段而变化^[17]。在围着床期子宫中ANA水平明显高于着床期(妊娠第4天)的水平,且非着床位点的ANA水平明显高于着床位点的水平^[16]。

小鼠子宫有合成和降解ANA的酶,已知脂肪酸酰胺水解酶(fatty-acid amide hydrolase, FAAH)是小鼠子宫中ANA的一种水解酶。合成酶和FAAH活性主要定位于子宫微粒体上。消炎痛、苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和花生四烯酸三氟甲基酮(arachidonyl trifluoromethyl keton, ATK)都能抑制ANA合成酶活性,但促进FAAH活性^[17]。在各种组织中,有多种前体和途径来合成ANA。小鼠子宫的ANA由花生四烯酸和乙醇胺羧而成,且不依赖于ATP和CoA。

小鼠妊娠第1-4天时,ANA合成酶和FAAH活性几乎没有变化,而第5天的子宫非接受状态时合成酶活性升高,FAAH活性下降。子宫中着床位点合成酶活性比非着床位点的活性低,FAAH活性恰恰与这种情况相反^[17]。合成酶和FAAH活性随妊娠阶段和着床时子宫区域而变化的现象与子宫中ANA水平的变化是一致的,子宫中FAAH mRNA的较高水平积累出现在妊娠第1-4天,紧接着第5-8天下降。FAAH mRNA主要在妊娠第1-4天的子宫腔上皮和腺上皮细胞中表达。随着着床过程

(第5-8天)的进行,这种 FAAH mRNA 的积累逐渐缓慢下来^[18]。

2. 外源性大麻对胚胎着床的抑制作用

从妊娠第2天开始,(-)-THC与细胞色素P450抑制剂共同给药处理小鼠,或只用CP-55940处理后,在第5天检查时,未发现胚胎着床。而(-)-THC的非活性形式(-)-THC和细胞色素P450抑制剂共同处理或只用(-)-THC时对着床没有影响。如果在第5天停止给药处理,第8天杀鼠检查时,发现这些小鼠着床位点或胚泡都没有恢复,说明不是延迟着床,而是着床失败^[2]。因为单独或反复用(-)-THC处理妊娠小鼠并不能干扰着床。在检测血浆和子宫中(-)-THC水平的结果表明,(-)-THC结合细胞色素P450抑制剂处理时,子宫(-)-THC水平比只用(-)-THC处理时高,而血浆(-)-THC水平无明显变化,此时却可抑制着床^[2]。这暗示在早期妊娠期间小鼠中存在着抵抗(-)-THC不利影响的机制。可能是子宫和/或胚胎中有细胞色素P450酶系统将(-)-THC快速代谢为非活性物质,使(-)-THC达不到影响着床的生理水平。事实上,如果大鼠细胞色素P450相关的单氧合酶系统被抑制时,子宫(-)-THC水平确实比只用(-)-THC处理时高^[2]。

另外,CP-55940在无P450抑制剂时就能干扰着床,说明这种化合物在体内不能有效地被P450酶系统代谢。可以推测大麻的生物学效应依赖于它们在靶细胞中的可利用性和转换速度,也依赖于大麻激活受体的程度。在正常情况下,雌性动物能利用子宫中细胞色素P450相连的酶系统保护大麻对早期妊娠的不利影响。已知低水平的ANA与子宫的着床接受态有关,而高水平与着床非接受态有关。所以,(-)-THC对着床的抑制可能是因为(-)-THC使子宫不能达到接受状态^[2,15]。

ANA在着床位点的表达水平低于非着床位点的表达水平说明正在着床的胚泡可能影响子宫中ANA的局部水平。另外,因为环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是PG合成的限

速酶,也能影响大麻的代谢。降解ANA后可产生花生四烯酸,而花生四烯酸是PG合成的底物之一。PG对胚胎发育和着床是很重要的,所以,消炎痛抑制着床的可能原因是它既增加ANA合成酶活性,又抑制其水解酶活性。如抑制COX-2(既是ANA水解酶,同时也是PGE₂合成酶)的活性,最终使PG水平减少,从而抑制着床。ANA可能作为PG的储备物存在于子宫中,这种观点与着床位点较高水平的FAAH活性和PGE₂水平一致。另外,由于血小板激活因子(platelet-activating factor, PAF)能促进COX-2合成PGE₂,大麻对胚胎着床的作用可能也与PAF的作用相关连。总之,胚胎和子宫中的FAAH以及子宫着床位点的COX-2维持着有利于着床起始和正常进行的ANA的最适水平。

六、大麻及其类似物作用的受体和/或非受体介导的信号转导通路

大麻对生殖系统的作用包括受体介导和/或非受体介导的作用。已知CB1-R mRNA在胚胎和子宫中都有表达,CB2-R mRNA在胚胎中也表达^[1]。大麻对雌性动物的作用主要是由CB1-R介导的^[1,19]。因为使用大麻受体拮抗剂和类似物的研究表明,SR141716A(CB1-R拮抗剂)或AM251(CB1-R类似物)都能以剂量依赖的方式阻止大麻的作用,而本身对胚胎发育和着床无任何影响。而SR144528(CB2-R拮抗剂)或AM663(CB2-R类似物)却不能阻止大麻的以上作用^[2,4]。所以,早期妊娠期间小鼠胚胎和子宫中的CB1-R是有生物学活性的,大麻在此时期的作用主要是由CB1-R介导的。而海胆精子中存在的大麻受体可能与已知的大麻受体不同^[9]。另外,大麻对海胆精子的作用可能不仅仅是受体介导的,因为CBD和CBN这些没有生理活性的物质也能相似地影响精子的功能^[13]。大麻可能通过与细胞膜脂和蛋白质成分相互作用,影响细胞功能。所以大麻对

精子功能的抑制作用可能包含着受体和/或非受体介导的作用。总之,大麻受体在调节细胞功能中起着普遍而关键的重要作用。精子中的大麻受体可能是一个家族,必须严格比较海胆精子与其他哺乳动物组织中大麻受体的不同特性。

大麻受体的激活影响着多种细胞内信号途径,如抑制腺苷酸环化酶活性从而降低细胞内的 cAMP 水平、减少 Ca^{2+} 内流、激活黏着斑激酶 FAK (focal adhesion kinase, FAK) 和促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、激活磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2 , PLA₂) 等。CB1-R 激活能抑制 Q 型和 N 型 Ca^{2+} 通道,并激活 K^+ 通道;CB2-R 激活似乎对 K^+ 或 Ca^{2+} 的细胞水平无影响^[3]。这些大麻激活受体后引起的信号转导通路对细胞具有非常广泛的信号调节作用,都不利于顶体反应发生时的信号通路,而子宫对非同种异体移植胚胎的接受性的局部免疫调节、合子基因组激活、胚泡扩展、细胞极化和胚胎致密化以及从桑葚胚向胚泡转化等都与 cAMP 的 Ca^{2+} 的信号转导途径有关。另外,大麻作用激活的花生四烯酸级链反应产生许多生物学调节作用很强的产物,如白霉毒素、前列腺素和白三烯^[10,13]。这些生物活性物质可能对胚胎发育和着床以及精子功能也都是很重要的,大麻对生殖过程的一部分作用可能就是由这些生物活性物质介导的。花生四烯酸来源的代谢物可能调节受精过程中配子的相互作用。现已证实,当提前与海胆精子孵育时,花生四烯酸乙醇胺、油酸乙醇胺、以及亚油酸乙醇胺都能阻止受精,但不饱和脂肪酸(C14-C20)的衍生物却无此作用^[9]。来源于精子中磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 和 PLD 的生化调节物也可能涉及对受精的抑制作用^[13]。

总之,内源性大麻受体信号转导通路的严密调节对胚胎发育和着床以及精子功能都是很重要的,可能参与了对着床窗口的调节,以使胚胎和子宫同步化。而受精卵至胚泡阶段的发育

和子宫分化到接受状态的同步化对着床过程是至关重要的。

摘 要

大麻是当前社会服用人数最多的毒品,其最有生理活性的成分是(-)-四氢大麻醇。大麻对哺乳动物生殖功能有一定的生物学作用。在雄性动物中直接抑制精子功能、减少性激素的分泌、阻止精子的顶体反应等。在雌性动物中,大麻作用依赖于大麻水平和胚胎发育所处阶段的不同而不同。低浓度的大麻对胚胎发育和着床是有益的,而高浓度则对胚胎发育和着床有抑制作用,与子宫对胚胎着床的非接受性有关。大麻在生殖系统中的作用主要是通过 CB1-R 来实现的。

参 考 文 献

- [1] Paria, B. C. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**:9460-9464.
- [2] Paria, B. C. et al., 1998, *Biol. Reprod.*, **58**:1490-1495.
- [3] Wang, J. et al., 1999, *Biol. Reprod.*, **60**:839-844.
- [4] Yang, Z. M. et al., 1996, *Biol. Reprod.*, **55**:756-761.
- [5] Wenger, T. et al., 1997, *Life. Science.*, **60**:2361-2371.
- [6] Wenger, T. et al., 1999, *Life Science.*, **65**:695-701.
- [7] Ricardo, H. A. et al., 1986, *J. Repro. Med.*, **31**(12):1071-1081.
- [8] Paria, B. C. et al., 1994, *Life Science.*, **55**:729-734.
- [9] Berdyshev, E. V. 1999, *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **12**:327-330.
- [10] Chang, M. C. et al., 1991, *Mol. Reprod. Dev.*, **29**:60-71.
- [11] Chang, M. C. et al., 1993, *Mol. Reprod. Dev.*, **36**:507-516.
- [12] Gerard, C. M. et al., 1991, *Biochem. J.*, **279**:129-134.
- [13] Schuel, H. et al., 1991, *Pharmacology Biochemistry and Behavior.*, **40**:609-615.
- [14] Schuel, H. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. Acad. USA.*, **91**:7678-7682.
- [15] Buckley, N. E. et al., 1998, *Neuroscience.*, **82**:1131-1149.
- [16] Schmid, P. C. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. A-*

cad. USA., 94:4188-4192.

[17] Paria, B. C. et al., 1996, *Mol. Reprod. Dev.*, 45: 183-192.

[18] Paria, B. C. et al., 1999, *Biol. Reprod.*, 60: 1151-

1157.

[19] Das, S. K. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. Acad. USA.*, 92: 4332-4336.

高等植物的性别与性别决定机制

王晓梅* 陈瑞阳

(南开大学生物系 天津 300071)

自然界中,有性繁殖是生物繁殖的主要形式,是生物遗传物质交换、变异以及多样性的主要来源,它导致了大多数真核生物性器官及两性异型的进化。围绕性别进化和性别决定机制问题,已进行了许多研究,主要集中在两个方面:一、生物为什么出现性别、有性繁殖在自然界的分布为什么如此广泛;二、非常复杂的性别系统是如何进化的^[1]。

一个多世纪前,生物学家就提出了这样的问题:生物的性别是如何开始的?为什么分布如此广泛?但对该问题至今没有一个满意的答案。因为自然界首先出现的是无性繁殖的生物,而且仅就繁殖而言,有性繁殖需要遗传物质的交换与重组、配子的产生,受精、合子的形成以及来自父母双方遗传物质的重组等,此过程比无性繁殖复杂得多,但自然界中高等的真核生物却是有性繁殖占主导地位。在低等的脊椎动物中虽有孤雌生殖和近亲繁育,但它们只占物种的很小一部分,并且孤雌生殖常常导致该物种的快速灭绝^[2]。事实上,也没有一个大的分类群体几乎完全由孤雌生殖的物种组成。对于有性繁殖广布于自然界的现象大多数生物学家认为:有性繁殖由于遗传物质的重组,促进了遗传变异和为生物个体提供了表型变异,使生物的进化速率更快,这就保证该物种能在一个复杂、变化的生物环境中存活下来,而且更能适应环境变化,使物种得以延续,因此生物在进化过程中出现了性别,并且有性生殖成为绝大多数生物繁殖的主要方式,而在某些低等的脊椎动物、无脊椎动物和有花植物中存在的孤雌生

殖现象可能是独立进化的^[3]。

人类在农业生产实践中,早在三千多年前就知道植物有性别差异,但对植物性别的科学认识却远远落后于此,并落后于动物。真正认识植物的性别问题,是在17世纪末。Camerarius发现桑树在附近无雄株时,雌株只能形成败育的种子。他由此获得启发,进而用一年生出蕨(*Mercurialis annua*)及其他的植物进行雌株隔离试验,得到同样的结论,写就“植物的性”的著名论文。并于1694年出版了《关于植物的性别通信》一书,总结了有关植物的性问题,确认了植物性别的存在^[4]。

一、植物的性多态现象及性染色体

1. 植物的性多态现象

与动物相同,植物在漫长的进化过程中出现了性别,两性间存在着性差异,具有专门的雌性和雄性性器官,但植物性别间的差异不象动物那样明显,植物的性别差异主要表现在花器官,并无明显的第二性征^[5];并且,与动物界普遍为雌雄异体的现象相反,植物界以两性花(hermaphrodite)物种最为普遍。在调查的120 000种被子植物中,72%的物种为两性花植物^[6],而雌雄单性现象在显花植物中并不普遍,仅分别有4%和7%的被子植物为严格的雌雄单性异株(dioecious)或雌雄单性同株(mo-

* 天津农学院定向培养博士研究生。