

- 199-206.
- [8] Liu, Q. Y., P. R. Walker and M. Sikorska, et al., 1998, *Biochemistry*, **37**:10134-10143.
- [9] Shiokawa D, Tanuma S, 2001, *Biochemistry*, **40**: 143-152.
- [10] Rodriguez AM, Rodin D, Nomura H, et al., 1997, *Genomics*, **42**:507-513.
- [11] Zeng, Z., D. Parmelee, Y. Li, et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**:499-504.
- [12] Baker KP, Baron WF, Henzel WJ, et al., 1998, *Gene*, **215**:281-289.
- [13] Kayalar C, Ord T, Testa MP, et al., 1996, *Proc Natl Acad Sci*, **93**:2234-2238.
- [14] Villa PG, Henzel WJ, Sensenbrenner M, et al., 1998, *J Cell Sci*, **111**:713-722.
- [15] Bareyre FM, Raghupathi R, Saatman KE, et al., 2001, *J Neurochem*, **77**:173-181.
- [16] Gaido, M. L., and Cidlowski, J. A., 1991, *J. Biol. Chem*, **266**:18580-18585.
- [17] Montague, J. W., Gaido, M. L., Cidlowski, J., et al., 1994, *J. Biol. Chem*, **269**:18877-18880.
- [18] Montague, J. W., Hughes Jr., F. M., and Cidlowski, J. J. *Biol. Chem*, 1997; **272**:6677-6884.
- [19] Torriglia A, Courtois Y, Counis MF, et al., 2000, *Ann N Y Acad Sci*, **926**:192-203.
- [20] Yasuda, T., D. Nadano, K. Kishi et al., 1992, *Biochim. Biophys. Acta*, **1119**:185-193.
- [21] Barry, M. A., and Eastman, Arch. Biochem. 1993, *Bio-pHys*, **300**:440-450.
- [22] Torriglia, A., Chaudun, E., Counis, M, F, et al., 1995, *J. Biol. Chem*, **270**:28579-28585.
- [23] Belmokhtar CA, Torriglia A, Counis MF, et al., 2000, *Exp Cell Res*, **254**:99-109.
- [24] Wright SC, Wei QS, Zhong J, et al., 1994, *J Exp Med*, **180**:2113-2123.
- [25] Famulski KS, Macdonald D, Sikora E, et al., 1999, *Cell Death Differ*, **6**:281-289.
- [26] Nagata S, 2000, *Exp Cell Res*, **256**:12-18.
- [27] Enari, M., Sakahira, H., Nagata, S, et al., 1998, *Nature*, **391**:43-45.
- [28] Halenbeck, R., Macdonald, H., Roulston, et al., 1998, *Curr. Biol*, **8**:537-540.
- [29] Liu, X., Zou, H., Wang, X., et al., 1997, *Cell*, **89**:175-184.
- [30] Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. 1999, *J. Biol. Chem*, **274**:15740-15744.
- [31] Mclroy, D., Sakahira, H., Nagata, S, et al., 1999, *Oncogene*, **18**:401-408.
- [32] Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S, 1998, *Nature*, **391**:96-99.
- [33] Liu X, Zou H, Wang X, et al. 1999, *J Biol Chem*, **274**:13836-13840.

## 支持细胞在生精细胞凋亡过程中的重要作用

汪旭莹

(南京大学医学院免疫生物学实验室 南京 210093)

精子的生成过程是一个连续的周期性的过程,这包括二倍体的精原细胞进行一系列的有丝分裂,减数分裂最后分化成为成熟的单倍体精子的过程。支持细胞(Sertoli cell)是生精上皮的一种大细胞,它从管周肌样细胞所处的基底膜延伸出去,直到生精小管的管腔内。它的底部与精原细胞相连,胞质的侧面则形成许多突起将互相联系的生精细胞包围起来,成熟的精子就从这儿释放出去<sup>[1]</sup>。在复杂的动态生精过程中,支持细胞作为精曲小管的重要组成部分指挥着生精细胞的一系列动态过程,包括有丝分裂、减数分裂以及以后的分化。支持细胞通过给生精细胞提供激素、营养以及生理支持来完成它的功能<sup>[2]</sup>。

睾丸内生精细胞的凋亡在成熟的哺乳动物的睾丸中是一种正常的现象。由于生精细胞对支持细胞的绝对依赖关系<sup>[3,4]</sup>,因此支持细胞已经成为研究调节生精细胞凋亡机制的一个重要对象。现在已经证实生精过程中,生精细胞通过生理条件下的凋亡(apoptosis)使它的数量达到刚好能被支持细胞所能承担的范围<sup>[3]</sup>。此外,除了正常生理条件下生精细胞的凋亡外,当用一些有毒物质作用后,比如化学毒物邻苯二甲酸酯(MEHP<sup>[5]</sup>)作用后,或者当促性腺激素和雄激素撤退时<sup>[6]</sup>,或暴露于射线后<sup>[7]</sup>,生精细胞的数量都会显著减少。而生精细胞的增

感谢韩晓冬,侯亚义老师对本文的指导。  
E-mail: hanxd@nju.edu.cn

殖、分化、凋亡是维持生精动态平衡的关键,因此任何一个方面的紊乱都会导致毒物引起的睾丸疾病或肿瘤,所以研究生精细胞的凋亡以及它的调控机制具有重要的意义。现在就这方面的进展作一综述。

## 一、影响生精细胞的几种凋亡机制

在调节凋亡的信号传导过程中有许多促凋亡和抑制凋亡的相关蛋白。现已表明广泛研究的凋亡调节因子——bcl-2 蛋白家族、p53 蛋白以及 caspase-3 的蛋白酶,他们都参与了动态的生精过程和精子的自然凋亡。

### 1. bcl-2 蛋白家族

它包括促凋亡的蛋白(Bax, BAD, Bak, Bik, Bok, Diov, Hrk, BID)和抑制凋亡的蛋白(Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1/A1)。他们分别控制着细胞死亡通路的各个阶段。Furuchi<sup>[8]</sup>和 Rodriguez<sup>[9]</sup>发现过分表达 Bcl-2 的转基因大鼠,会出现精原细胞增生,并且生精细胞凋亡的机会也减少。Bax 缺失的大鼠会导致减数分裂前期生精细胞不正常积累,从而造成生精过程紊乱,以致没有生育能力<sup>[10]</sup>。另外一些 Bcl-w 缺失的大鼠也没有生育能力<sup>[10]</sup>。这些资料都证实了 Bcl-2 蛋白家族的选择性表达对生精过程异常重要。

### 2. 肿瘤抑制蛋白 p53

p53 蛋白和 Bcl-2 蛋白家族一样调控着细胞内的死亡信号途径。许多研究报告证明 p53 在生精细胞的凋亡中起着关键的作用,包括自发性的和损伤诱使的生精细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。缺失 p53 基因的大鼠虽然生长发育正常,也有生育能力,但是在射线作用<sup>[12]</sup>或实验性隐睾后<sup>[13]</sup>表现出生精细胞凋亡的滞后,并且凋亡数目也减少。尽管大多的资料表明 p53 仅调节有丝分裂期的生精细胞的活性来控制细胞凋亡<sup>[12,13]</sup>,近来也有资料表明它也在生精细胞的减数分裂和减数分裂后期起着关键的作用,从而影响细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

### 3. caspase-3 蛋白酶

caspase 是一种活化胞浆的蛋白酶,它是一种死亡蛋白酶,凋亡细胞通过它的数目的增多从而启动凋亡的级联反应。Kumi-Diaka 用 5,7,45-三羟异黄酮(genistein)作用于 TM4 细胞株后<sup>[14]</sup>,同时发现了细胞的凋亡和坏死,并且 caspase-3 的酶活性提高,因此表明在用 genistein 引起的睾丸内生精细胞和支持细胞的凋亡可能包括启动 caspase-3 蛋白激酶这一信号通路的作用。

## 4. Fas/CD95 系统

Fas 信号系统由相互作用的蛋白 Fas(CD95/APO-1)和 FasL(CD95L/APO-1L)组成。Fas 是属于 TNF 受体家族的一种(I型)跨膜蛋白,它广泛地存在于各种组织中。FasL 是 II 型的膜蛋白,它以跨膜和可溶性的分泌形式(sFasL)存在<sup>[15,16]</sup>。sFasL 可以在远距离范围内调控表达 Fas 蛋白的细胞的凋亡。免疫组化的结果证明支持细胞在它们的质膜上表达 FasL,而生精细胞则选择表达 Fas<sup>[17]</sup>。现在已有多种证据证明 Fas 信号系统启动生精细胞的凋亡:1)在混合培养的支持细胞和生精细胞中加入 FasL 的反义核苷酸(阻断了 FasL 的翻译),明显看到生精细胞凋亡数目的减少;2)Fas 和 FasL 的 mRNA 的表达量随着动物年龄的不同而不同,在大鼠中是 16-33 天最多,而此时刚好是大鼠生精细胞凋亡的高峰期;3)加入模拟 FasL 功能的 Fas 的激动剂(一种抗 Fas 的抗体,Jo-2),生精细胞的数目大大减少<sup>[17]</sup>。

此外,在一些有害化合物引起的睾丸损伤中,Fas 系统也与生精细胞的凋亡密切相关。Boekelheide<sup>[18]</sup>用 MEHP 诱使睾丸损伤的实验表明随着生精细胞凋亡数目的增多,Fas 和 FasL 的表达量也提高,并相应达到峰值。而且,Fas 的活性部分 RIP 和 FAP-1 的表达也增多<sup>[18]</sup>。因此,Fas/FasL 是一个重要的旁分泌系统,它不仅影响生精细胞生理条件的凋亡,控制着生精过程的稳态;而且也在有毒物质诱使的睾丸损伤中极大的影响了生精细胞的数目。

目前,由于环境中大量使用雌激素类似物,如壬基酚等化学物质所导致的睾丸损伤很可能就是通过 Fas/FasL 的凋亡途径而影响支持细胞和生精细胞的稳态,因此研究支持细胞的 Fas 表达量可以成为判断凋亡的一个重要依据。

## 二、支持细胞在生精细胞凋亡过程中的关键作用

由于支持细胞构成的生精上皮是生精细胞生长、分裂、分化的绝对环境,因此支持细胞在生精细胞的凋亡过程中起着关键的作用。

目前已在研究中表明支持细胞在生精细胞的凋亡过程中起着关键的作用,包括在自然生理条件下和毒物诱使下的两种凋亡。它主要通过下列三种机制影响着生精细胞的凋亡。

### 1. 支持细胞降低自身对生精细胞的支持能力 (supportive capacity) 从而引起生精细胞的凋亡

由于支持细胞为生精细胞提供了一个生长的环境,因此它的生理支持作用就极大地限制了生精细胞的数量,使生精细胞的数量在能被充分支持的范围内<sup>[19]</sup>。Neeta<sup>[20]</sup>用铅作用于体外混合培养的生精细胞和支持细胞发现从支持细胞脱离的生精细胞的数量随着铅的浓度的升高而增多,并且脱落的生精细胞的活性降低。另外一些化学物质,比如邻苯二甲酸酯等也引起了生精细胞从单层的支持细胞上脱离,但是它作用后,脱离的生精细胞的活性没有显著下降<sup>[22]</sup>,在这一点上它与铅的作用不同。然而目前对生精细胞以何种机制脱离支持细胞仍然存在争议。用铅作用的实验表明,可能是由于铅对生精细胞的直接毒性作用影响了生精细胞的活性,从而使生精细胞从支持细胞上脱离<sup>[19]</sup>。但是 Gray 和 Beaman<sup>[21]</sup>用 MEHP 作用后发现脱离的生精细胞活性并无太大的改变,因此 MEHP 引起的生精细胞脱落可能并非是由于直接对生精细胞作用引起的。所以此项研究可以探讨生精细胞与支持细胞的连接方式,而药物的作用可能是改变了支持细胞或生精细胞的某些锚定蛋白的分泌,从而造成生精细胞的脱离。但是现在可以肯定的是一些化学类毒物通过降低支持细胞对生精细胞的支持营养能力来引起生精细胞数目的减少,导致生精过程的紊乱和最后精子数目的减少。

### 2. 支持细胞通过 Fas 旁分泌系统直接控制生精细胞的凋亡

现在已经证实 Fas 系统是一个重要的旁分泌系统,它通过表达 Fas 和 FasL 来影响生精细胞的数目<sup>[2,4,7]</sup>。这点在上文已经详细叙述了。目前通过免疫组化的技术证实支持细胞在它们的质膜上持续表达 FasL,而生精细胞则有选择性的表达 Fas<sup>[17]</sup>, FasL 和 Fas 的相互作用导致生精细胞选择的凋亡。

另外,值得一提的是 Fas/FasL 还在血-睾屏障的免疫过程中起着关键的作用。FasL 已被证明能够消除具有 Fas 的淋巴细胞<sup>[22]</sup>,现在假想 FasL 使睾丸成为一个免疫特异性的位点:1)它使血-睾屏障内有局部的免疫耐受:促使 Sertoli cell 产生一些自身抗原与淋巴细胞产生的抗精子抗体相结合<sup>[23]</sup>,防止发生自身免疫反应;或者促使 Sertoli cell 产生免疫抑制物质。2)FasL 阻止了具有 Fas 的淋巴细胞的侵入<sup>[24]</sup>。因此支持细胞无论是在生精细胞的凋亡或是在生殖系统的免疫中都是一个极具代表性的

研究对象。

### 3. 支持细胞自身控制表达某些 CDKI 的量影响生精细胞的凋亡

细胞周期的连续进行依赖于一系列的周期蛋白(cyclin)依赖的激酶复合物(CDK)的活性。而 CDK 的活性依赖于结合在 cyclin 上的磷酸化基团以及 CDKI 的存在<sup>[26,27]</sup>。最近有研究发现支持细胞表达的一种 CDKI<sup>[25]</sup>、P27<sup>Kip1</sup> 不仅参与了细胞周期中限制性位点的调控,调控了 G<sub>1</sub>/S 期的过渡,而且在生精细胞的增殖、凋亡中起着重要的调节作用<sup>[20]</sup>。在 P27<sup>Kip1</sup> 基因敲除的大鼠中,观察到了生精过程的紊乱<sup>[28,29]</sup>:1)精子数量的增多;2)出现不正常的前细线期的精子,其中的一些企图进入有丝分裂而不是减数分裂。另外,P27<sup>Kip1</sup> 只在支持细胞中表达,并且在最终分化的支持细胞上表达最多。研究表明,支持细胞在生精过程的支持和调节作用部分依赖于 P27<sup>Kip1</sup> 的表达,而 P27<sup>Kip1</sup> 对于精原细胞的作用是间接的,即通过支持细胞最终作用<sup>[25]</sup>。

尽管这样,P27<sup>Kip1</sup> 在胚胎时期的睾丸发育中的作用似乎是多余的,因为在 P27<sup>Kip1</sup> 敲除的大鼠和野生型的大鼠中,睾丸的组织形态都没有改变<sup>29</sup>。但是在成年大鼠中,P27<sup>Kip1</sup> 似乎就在支持细胞对生精细胞的增殖和凋亡的调控,以及对生精细胞的支持能力上有着重要的作用<sup>[20]</sup>。因此,P27<sup>Kip1</sup> 是否在生长发育中经历了结构变化而改变了它的活性仍不清楚,但显然它在生精细胞的凋亡、增殖中意义重大。

## 三、结 语

支持细胞与生精细胞内的一些普遍凋亡途径如:bcl-2 蛋白家族、p53 蛋白以及 caspase-3 的蛋白酶等的关系仍不清楚。但有可能支持细胞通过某些途径也影响着这些通路,比如说激素、营养物质的分泌、受体介导等。因此支持细胞在生精细胞的凋亡过程中意义重大,是一个有待研究的对象。

生精细胞在睾丸内的凋亡是维持生精稳态的关键,它是受多种因素影响的综合结果,包括已经被广泛研究的凋亡调节因子:bcl-2 蛋白家族,p53 蛋白,caspase-3 蛋白酶,以及 Fas/CD95 系统。而由于支持细胞对生精细胞的重要的营养、支持功能,并且控制了生精细胞的一系列动态过程,包括离开生精上皮的时间,生精细胞的分裂和分化等,因此它在生精细胞的凋亡过程中发挥了关键的作用。另外支持细胞构成的血-睾屏障还在生殖系统起着重要的免疫

作用,因此支持细胞在今后的生殖免疫研究中将是一个极有意义的研究对象。本文着重对影响生精细胞凋亡过程的几种重要的凋亡调节因子以及支持细胞在此过程中所起的关键作用进行了综述。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Pineau C, Dupaix A. et al. , 1999, *Toxicol in Vitro*, **13**: 513 - 520.
- [ 2 ] John H Richburg, 2000, *Toxicol Lett*, **112 - 113**: 79 - 86.
- [ 3 ] Allan D, Harmon B. et al. , 1987, *Cell Prolif*, **25**: 241 - 250.
- [ 4 ] Bartke A. , 1995, *Endocrinology*, **136**: 3 - 4.
- [ 5 ] Boekelheide Kim, Lee Jeongwu, 1998, *Toxicol Lett*, **102 - 103**: 503 - 508.
- [ 6 ] Miething A, 1995, *Cell Tissue Res.* , **267**: 583 - 590.
- [ 7 ] Hasegawa M, Wilson G et al. , 1997, *Radiat Res.* , **147**: 457 - 467.
- [ 8 ] Furuchi T, Masuko K et al. , 1996, *Development* , **122**: 1703 - 1709.
- [ 9 ] Rodriguez I, Ody C et al. , 1997, *EMBO J*, **16**: 2261 - 2270.
- [ 10 ] Knudson CM, Tung K SK, 1995, *Science*, **270**: 96 - 99.
- [ 11 ] Beumer TL, Gademan IS, 1998, *Cell Death Differ* , **5**: 669 - 677.
- [ 12 ] Hasegawa M, Zhang Y, et al. , 1998, *Radiat Res* , **149**: 457 - 467.
- [ 13 ] Yin Y, DeWolf W et al. , 1998, *Biol Reprod* , **58**: 492 - 496.
- [ 14 ] Kumi Diaka, James, Butler et al. , 2000, *Biol. of the Cell*, **92**: 115 - 124.
- [ 15 ] Tanaka M, Itai T et al. , 1995, *Nat Med* , **4**: 1129 - 1135.
- [ 16 ] Kayagaki, N. , Kawasaki, A. 1995, *J. Exp. Med.* , **182**: 1777 - 1783.
- [ 17 ] Lee J, Richburg JH, 1997, *Endocrinology*, **138**: 2081 - 2088.
- [ 18 ] Boekelheide K, Lee J, 1998, *Toxicol Lett* **102 - 103**: 503 - 508.
- [ 19 ] Lee J, Richburg JH et al. , 1999, *Endocrinology*, **140**(2): 852 - 860.
- [ 20 ] Neeta Adhikari, Neelima Sinha et al. , 2000, *Toxicol Lett* , **116**(1): 45 - 49.
- [ 21 ] Gray TJB, Beamand JA, 1984, *Food Ghem Toxicol* , **22** (2): 123 - 131.
- [ 22 ] Alessio D' Alessio, Anna Riccioli, 2001, *Immunology*, **98** (6): 3316 - 3321.
- [ 23 ] De Cesaris, Fillippini P et al. , 1992, *Biochem , Biophys, Res. Commun.* , **186**: 1639 - 1646.
- [ 24 ] Dym M, Fawcett DW, 1970, *Biol Reprod* **3**: 8 - 326.
- [ 25 ] Tim L, Beumr, Hiroaki et al. , 1999, *Endocrinology*, **140**: 1834 - 1840.
- [ 26 ] Haraer JW, Elledge SJ, 1996, *Curr, Opin. Genet. Dev.* , **6**(1): 56 - 64.
- [ 27 ] Fisher RP, 1997, *Curr Opin Genet Dev*, **7**(1): 32 - 38.
- [ 28 ] Fero M, Rivkin M. et al. , 1996, *Cell* , **85**: 733 - 744.
- [ 29 ] Kiyokawa H, Kineman RD, 1996, *Cell* , **85**: 721 - 732.

## 中心蛋白研究进展

贺晓静 梁爱华\*

(山西大学生物工程实验室 太原 030006)

微管组织中心(microtubule-organizing centre, MTOC)是组织真核细胞中微管的数量、方向和极性的部位<sup>[1]</sup>。它在形态上可以分为两种:一种有特殊的结构,如哺乳动物的中心体,酵母中的纺锤极体(Spindle Pole Body, SPB)和藻类中的基体等。另一类无特殊的结构,如一些高等植物的MTOC<sup>[2]</sup>。它们的形态各不相同,但行使类似的功能,可能是由于它们拥有一些类似的组成成分。近年来对微管组织中心的 $\gamma$ -微管蛋白( $\gamma$ -tubulin)和中心蛋白(centrin)研究比较深入,已有可供参考的功能和分子数据。本文主要围绕中心蛋白的一些研究进展来做一介

绍。

### 一、中心蛋白的分类和结构

除原核生物外,对几乎各种生物的中心蛋白的研究都有报道,包括藻类、原生生物、高等植物、酵母、哺乳动物<sup>[3]</sup>。它是一种磷酸蛋白,分子量约20kD。中心蛋白最初是在一种绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中发现的,是与鞭毛的具条纹根(striated root)相连的基体的主要成分。

中心蛋白是一种非常保守的蛋白。根据系统发

\* 联系人。E-mail: aliang@sxu.edu.cn