

- [3] Roldan, A. L. et al., 1990, *EMBO J.*, **9**:467-474.
- [4] Moller, L. B. et al., 1992, *Eur. J. Biochem.*, **208**: 493-500.
- [5] Borglum, A. D. et al., 1992, *Am. J. Hum. Genet.*, **50**: 492-497.
- [6] Ploug, M. et al., 1994, *FEBS Letters*, **349**: 163-168.
- [7] Behrendt, N. et al., 1998, *Fibrinolysis & Proteolysis*, **12**:191-204.
- [8] Gardsvoll, H. et al., 1999, *M. J. Biol. Chem.*, **274**: 37995-38003.
- [9] Behrendt, N. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**: 22885-22894.
- [10] Appella, E. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, **262**: 4437-4440.
- [11] Hoyer-Hansen, G. et al., 2001, *Biochem J.*, **358**: 673-679.
- [12] Borstnar, S. et al., 2002, *Clin Breast Cancer*, **3**:138-146.
- [13] Memarzedeh, S. et al., 2002, *PNAS*, **99**: 10647-10652.
- [14] Wei, Y. et al., 2001, *Molecular Biology of the Cell*, **12**:2975-2986.
- [15] Okumura, Y. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, **277**: 9395-9404.
- [16] Sidenius, N. et al., 2002, *J Biol Chem.*, **277**: 27982-27990.
- [17] Deng, G. et al., 2001, *J Cell Physiol.* **189**: 23-33.
- [18] Wei, Y. et al., 1996, *Science*, **273**: 1551-1555.
- [19] Xue, W. et al., 1997, *Cancer Res.*, **57**: 1682-1689.
- [20] Conese, M. et al., 1995, *J. Cell Biol.*, **131**: 1609-1622.
- [21] Nykjar, A. et al., 1997, *EMBO J.*, **16**: 2610-2620.
- [22] Nykjar, A. et al., 1998, *J. Cell Biol.*, **141**: 815-828.
- [23] Webb, D. J. et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**:7412-7420.
- [24] Ellis, V. et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, **266**: 12752-12758.
- [25] Felez, J. 1998, *Fibrinolysis & Proteolysis*, **12**:183-189.
- [26] Al-Atrash, G. et al., 2002, *Biochem Biophys Res Commun.*, **292**:184-189.
- [27] Li, C. et al., 1995, *Biol. Chem.*, **270**: 30282-30285.
- [28] Simon, D. I. et al., 1996, *Blood*, **88**: 3185-3194.
- [29] Resnati, M. et al., 1996, *EMBO J.*, **15**:1572-1582.
- [30] Yebra, M. et al., 1999, *Exp. Cell Res.*, **250**: 231-240.
- [31] Nguyen, D. H. et al., 1999, *J. Cell Biol.*, **146**: 149-164.
- [32] Qin, L. X. et al., 2002, *World J Gastroenterol.*, **8**: 385-92.
- [33] Gao, W. et al., 2002, *Int J Hematol.*, **75**:434-439.
- [34] Franco, P. et al., 1997, *J. Cell Biol.*, **137**: 779-791.

哺乳动物精子发生过程中的 细胞凋亡及其影响因素

赵 巍 李树峰 严云勤*

(东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

摘要 睾丸生殖细胞凋亡是维持精子发生动态平衡,限制生精上皮生殖细胞数量的一个重要生理机制,受多种因素调控。本文简要叙述精子发生过程中细胞凋亡的激素调节、基因调控及其他理化等因素的影响及其作用机制。

哺乳动物精子发生又称生精过程。在胚胎期间,原始生殖细胞迁移到生殖嵴,经有丝分裂,迅速增殖形成精原干细胞,然后进一步形成精原细胞。性成熟后,一部分精原细胞通过减数分裂依次形成初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞,最后经过变态形成高度分化的精子。1900年,Regand首次认识到精子发生过程中存在着生殖细胞的退化。对大鼠等啮齿目动物的研究表明,生精过程中实际产生的精子数量比理论预测的减少了25%-75%^[1]。

现已证实,睾丸生殖细胞退化是通过细胞凋亡实现的。在精子发生各个阶段,都存在自发性的生精细胞凋亡。但不同时期凋亡细胞的数目有很大差异。例如鼠类睾丸在原始生殖细胞迁移至性腺以及第1次精子发生周期开始,这两阶段存在生精细胞凋亡高峰。原位检测表明,在精子发生过程中主要是精原细胞和精母细胞发生凋亡,而精子细胞的凋亡很

* 通讯作者。E-mail: yanyunqin@sohu.com

少发生。精原细胞特别是A型精原细胞的凋亡是导致精子数少的主要原因,其凋亡均发生在有丝分裂期间。精母细胞的凋亡发生在减数分裂过程中的细线前期、偶线期,特别是粗线期。睾丸就是通过精原细胞不断增殖,同时过量的受到损伤的生精细胞不断地凋亡,来控制精子细胞的数目,维持精子发生的动态平衡。近来研究发现,一些理化等外界因素能诱导睾丸生殖细胞凋亡,激素、凋亡基因等参与调控这一凋亡过程。本文就睾丸生殖细胞凋亡涉及的激素、凋亡基因调控及其他影响因素作一综述。

一、激素

1. 睾酮(testosterone, T)

睾酮又称生精激素,由睾丸间质细胞合成、分泌。大量研究表明,睾酮水平的降低是生精细胞凋亡的重要原因。利用间质细胞毒性物质——乙基二甲基磺酸盐(EDS)处理大鼠,2天后睾丸中检测不到 3β -羟类固醇脱氢酶,8天后凋亡指数增加,长时间EDS处理,粗线期精母细胞和精子细胞的凋亡明显增加^[2]。睾酮是通过与支持细胞合成的雄激素受体(AR)特异结合发挥其生物学效应的。睾酮在精原细胞、精母细胞的发育及精子细胞的变态过程中起作用,较高水平的睾酮对精原细胞的发育是必需的。睾酮有选择地在生精周期VII-VIII阶段起调节作用。抑制睾酮分泌、VII-VIII期的生精细胞首先发生细胞凋亡^[3]。另有研究结果显示,切除大鼠垂体后,睾丸体积明显缩小,精子发生停滞在初级精母细胞阶段,给予大剂量的外源性睾酮可重新诱导精子发生。给予成年大鼠甲氧乙酸选择性破坏间质细胞,睾酮血清水平降低,生精细胞凋亡明显增加^[4]。

2. 促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)

正常精子发生过程需要FSH存在。大量研究表明,FSH是灵长类精子发生启动的主要调节者之一,促卵泡激素被拮抗或其水平降低,都能使生殖细胞发生凋亡。FSH通过支持细胞上其唯一的受体FSHR发挥其作用。陈雪雁^[5]等提取RNA进行斑点杂交发现FSHR mRNA的杂交信号全部位于支持细胞,于XIII-I期最强,VII-VIII期最弱,在II-VI期和IV-VII期处于中等水平。可推测FSH主要作用于XIII-I期,调节精原细胞的分裂和精母细胞的减数分裂过程,决定进入精子形成期的圆形精子细胞的数量。缺乏FSH导致粗线期精母细胞的凋亡。Tesarik^[6]等体外培养生殖细胞和支持细胞发现

FSH和睾酮有作用的交叉点,睾酮可增强FSH对生殖细胞凋亡的调控作用,二者协同作用,共同维持正常的精子发生过程。

3. 促性腺激素释放激素(gonadotrophin-releasing hormone, GnRH)

丘脑下部分泌的GnRH使垂体释放FSH和LH,FSH、LH分别刺激支持细胞和间质细胞作出应答,为精子发生创造微环境。用GnRH拮抗剂处理大鼠,生精周期特异阶段生殖细胞凋亡明显增加。Sinha-Hikim^[7]等人发现,给成年大鼠GnRH拮抗剂后5天(VII-VIII阶段)和7天(VII-VIII和IX-XI阶段)生精细胞凋亡DNA片段明显增加,14天(I、II-IV、V-VI和VII-XIV阶段)达最高值。

二、凋亡基因

1. Fas/FasL

Fas(Apo-1, CD95)是一个跨膜受体蛋白,属于TNFR/NGFR家族,FasL是Fas的配体,属于TNF家族。Fas是凋亡信号受体,Fas与FasL特异结合,使Fas形成三聚体活性形式,然后激活caspases引发细胞凋亡。睾丸内Fas表达于生殖细胞,FasL表达于支持细胞。利用支持细胞毒性的邻苯二甲酸酯[mono-(2-ethylhexyl)phthalate, MEHP],2,5-己二酮(2,5-hexanedione, 2,5-HD)处理睾丸后,Fas、FasL表达上调,诱发睾丸大量生殖细胞凋亡^[8]。Fas基因点突变的小鼠也能正常表达Fas,可能是通过某种补救机制使Fas基因正常表达。实验性隐睾中,Fas的表达水平明显增加。有毒的化学物质作用睾丸使其发生损伤时,支持细胞FasL与生殖细胞Fas的表达同时增加,激活Fas/FasL途径,使生殖细胞凋亡增加^[9]。Nandi^[10]等研究发现,睾酮分泌减少时Fas的表达明显增加,同时细胞凋亡指数升高,生精过程中断。在精子发生过程中支持细胞通过Fas/FasL系统的旁分泌作用调控生殖细胞的数量。

2. Bcl-2 基因家族

Bcl-2基因家族包括凋亡诱导因子BaX、Bak、Bcl-xs、Bad、Bok和凋亡抑制因子Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Mcl等,成员间通过形成同或异二聚体来调节细胞的凋亡。Bcl-w是支持细胞、精原细胞的重要存活因子,但是否发生凋亡与Bax/Bcl-w和Bak/Bcl-w比值有关^[11]。郑航^[12]等对手术诱导的隐睾生殖细胞凋亡增加的研究发现,其Bcl-2表达下调,而Bax表达上调。高表达Bcl-xl和Bcl-2蛋白的转基因小鼠其早期的生殖细胞凋亡波的出现受阻,成年时精

子发生异常,而早期的生精细胞凋亡波与 Bax 蛋白的暂时高表达是一致的。沈凯^[13]等研究表明输精管结扎后凋亡抑制因子 Bcl-2 在精原细胞和精母细胞中表达减少,而 Bax 表达增强,以促进结扎后生精细胞凋亡。Bcl-2/Bax 的比例决定是否发生凋亡。Guo^[14]等发现了 Bcl-2 基因家族新成员——Bcl-G, Bcl-G 基因形成两种蛋白 Bcl-G_L 和 Bcl-G_S, 而 Bcl-G_S mRNA 只在睾丸中存在,很可能是睾丸生殖细胞凋亡特异相关蛋白。

3. 环腺苷酸反应成分调节子(cyclic AMP——responsive element modulator, CREM)

CREM 在减数分裂后精子细胞中高度表达,是 bZIP(亮氨酸拉链/碱性域)转录激活因子,对精子细胞发育很重要,主要在生精周期 VII - VIII 期的圆形精子细胞表达,与精子细胞中调控细胞形态变化的基因激活有关,该基因家族有不同表型,在生殖细胞各阶段中有不同的作用。CREM 基因突变精子发生停滞在精子细胞的早期阶段,精子细胞缺失,生殖细胞凋亡率显著升高,生精过程中断,导致不育^[15]。最近研究结果显示 CREM 基因需要一个组织特异的调节因子——ACT(activator of CREM in testis)来激发它在睾丸中的调控作用^[16]。

4. 孤儿受体(orphan receptor, TR)

孤儿受体包括 TR2 和 TR3 等。最近研究发现,TR2 在生精细胞分化和凋亡中发挥重要作用。研究发现,TR2 主要在精母细胞和圆形精子细胞表达。当隐睾内生精细胞凋亡指数达最大时,TR2 的表达显著降低,同时,TR2 mRNA 表达下降与生精细胞凋亡中的野生型 p53 蛋白提高有关,TR2 基因可能是 p53 信号通路调控生精细胞凋亡中的下游效应基因之一^[17]。TR3 主要在精原细胞和初级精母细胞表达,隐睾手术后,TR3 的表达量明显降低。

5. c-kit/SCF

c-kit 是一种受体酪氨酸激酶,属于血小板源生长因子受体家族,调控血细胞生成及生殖细胞发育。SCF(stem cell factor)是 c-kit 的配体,它支持原始生殖细胞和精原细胞的生长和存活。c-kit 在小鼠的 A 型、中间型和 B 型精原细胞表达,给小鼠注射抗 c-kit 的 ACK2 抗体后,精母细胞和精原细胞的凋亡程度明显增加^[18]。在精子成熟受阻的人睾丸中,间质细胞和 A 型精原细胞的 c-kit 表达水平降低,而间质细胞和 A 型精原细胞凋亡程度升高,结果表明 c-kit 能抑制生殖细胞的凋亡。离体研究发现,SCF 能抑制原始生殖细胞的凋亡。小鼠中 SCF 在支持细胞

表达,能阻止睾丸生殖细胞的凋亡。SCF 对精母细胞和精子细胞的凋亡也有抑制作用,SCF 是生精细胞的重要存活因子^[19]。

三、理化因素对精子发生过程中细胞凋亡的影响

1. 高温

睾丸生殖细胞对温度特别敏感,必须在低于体温 4℃ - 5℃ 的阴囊中才能正常发育,因此实验性隐睾是研究温度对睾丸影响的理想模型,研究发现手术诱导的大鼠隐睾组织学上表现生精上皮显著变薄、早期生殖细胞发育停止,生殖细胞凋亡增加。在隐睾组织中一氧化氮(NO)含量升高与 NOS 活性正相关,提示 NOS、NO 或其代谢产物参与睾丸生殖细胞病理的凋亡的过程。另有研究发现隐睾组织中 Bcl-2、Bax 表达增加,诱导生殖细胞凋亡。Yamamoto^[20]等将大鼠睾丸热(43℃)处理 15 分钟,利用免疫组织化学方法发现,热处理睾丸后 30 分钟内 Bax 从细胞质定位到细胞核周围,Bax 的重分配启动了生殖细胞凋亡。Lue^[21]等对热处理的 SD 大鼠睾丸研究发现,粗线期 I - IV 和 IX - XII,双线期, XIII - XIV 期的精母细胞,及早期(I - IV)精子细胞对热非常敏感,而 VII - VIII 期的生精细胞相对对热不敏感。如果同时注射 GnRH-A 抑制睾酮分泌,发现 VII - VIII 期的生精细胞凋亡增加,提示睾酮在抗热诱导的生殖细胞凋亡过程中有重要作用。高温触发生精细胞凋亡数目增加的机制,可能是因为睾丸温度升高时产生热激活反应,引起睾丸缺血、缺氧及代谢障碍,致使生精细胞发生凋亡。

2. 镉

Yan^[22]等报道,给小鼠一次性腹腔注射二氯化镉(CdCl₂)0.03mol/L/kg48h 后,睾丸细胞及附睾细胞均出现凋亡,如果同时给小鼠注射镉螯合剂则会明显抑制细胞凋亡。研究表明镉可降低血浆中睾酮和睾丸锌水平,从而诱发生精细胞凋亡。体外实验证明,镉对睾丸间质细胞睾酮的合成和分泌功能有损害作用。锌与生殖系统的发育、功能及其细胞凋亡的调控密切相关^[23]。睾丸组织对锌有强烈的依赖性,缺锌时睾丸内蛋白、脂质及核酸的氧化损伤增强,同时由于睾丸 3β-羟类固醇脱氢酶活性降低,造成睾酮合成障碍,导致睾丸生精细胞发生凋亡。另外,锌通过对一系列锌指蛋白活性的调节在生精细胞凋亡过程中起重要作用。

3. 电离辐射

睾丸生殖细胞对电离辐射非常敏感。2 和 3Gy X 射线照射诱发大鼠和小鼠生精细胞凋亡明显增加^[24]。这种凋亡开始以精原细胞和减数分裂的精母细胞为主,以后影响至其他生精细胞。Hasegawa^[25]等人对 p53 基因缺失小鼠进行 X 射线全身照射实验,结果 p53 缺失小鼠照射后细胞凋亡减少。另外有人研究,电离辐射仅在含有 p53 的大鼠细线前期-粗线早期精母细胞发生凋亡作用。提示电离辐射通过 p53 途径阻滞细胞周期诱导生殖细胞凋亡发生。

4. 酒精

长期过度饮酒引起睾丸萎缩和雄性不育。乙醇及其代谢产物(如乙醛等)破坏下丘脑-垂体-性腺轴,不利于睾丸支持细胞的分泌功能,并引起睾丸内的氧化应激。饲喂酒精的大鼠睾丸质量减少,引起形态改变,睾丸内 FasL 的表达增加,睾丸 DNA 碎片增多,p53 mRNA 水平增加,实验结果表明酒精增加精母细胞和精原细胞的凋亡^[26]。Eid^[27]等利用免疫组织化学方法研究发现,在饲喂含有酒精的流体食物的大鼠睾丸中支持细胞的 FasL 表达水平和生殖细胞中 Fas 以及 caspases-3 的表达水平都高于对照组。认为在酒精诱导的睾丸损害而造成的生殖细胞凋亡增加过程中,是通过 Fas 系统的上调而激活 caspases 来实现的。本实验室对三周龄雄鼠连续喂酒精(25%)两个月发现,睾丸体积明显减小,RT-PCR 结果表明,Fas、FasL 表达增加。

5. 可卡因

可卡因对不同年龄段大鼠生精细胞凋亡均有影响,并以青春发育期损害明显。Li^[28]等采用可卡因持续诱导青春期大鼠 90 天,结果发现,可卡因诱导 15 天后即可发生明显的生精细胞凋亡,第 30 天凋亡达到峰值。可卡因通过氧化和水解反应快速代谢,使活性氧(ROS)积聚,ROS 可启动细胞凋亡。可卡因也可能引起睾酮、LH、FSH 等激素水平改变而诱导睾丸细胞凋亡,其详细机制有待进一步研究。

四、结束语

精子发生是相对不分化的精原细胞周期性地发育成熟为高度特化的精子的复杂过程。在这一过程中,由于生殖细胞的减少而丢失的精子数占精子生成总量理论值的 25%—75%,而这种退化是通过细胞凋亡来实现的,涉及多种因素的影响。激素刺激减少是发生生殖细胞凋亡的根本因素,不同的激素

通过不同的第二信使途径调节睾丸生殖细胞凋亡。凋亡诱导基因及凋亡抑制基因表达的产物通过协同或拮抗作用维持一种动态平衡,控制生殖细胞凋亡。环境不良因素成为凋亡信号,激活凋亡途径,使生殖细胞发生凋亡。精子发生过程中生精细胞的凋亡可能有多种调控机制。深入了解生殖细胞凋亡的调控机制,以及调节因子的信号通路及其各通路间的相互联系,将有助于阐明男性不育的分子机制,为治疗男性不育症及开发新的避孕药物提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Billig, H. et al., 1995, *Endocrinology*, **136**:5-12.
- [2] Woolveridge, L. et al., 1999, *Biol Reprod*, **60**:461-470.
- [3] Mclachlan, R. I. et al., 1996, *J Endocrinol*, **148**:1-9.
- [4] Brinkworth, M. H. et al., 1995, *J Reprod Fertil*, **105**:25-33.
- [5] 陈雪雁等, 2001, *解剖学报*, **32**:365-369.
- [6] Tesarik, J. et al., 1996, *Endocrinology*, **137**:2179-2182.
- [7] Sinha Hikim, A. P. et al., 1997, *Biol Reprod*, **57**:1193-1201.
- [8] Lee, J. et al., 1999, *Endocrinology*, **140**:852-858.
- [9] Lee, J. et al., 1997, *Endocrinology*, **138**:2081-2088.
- [10] Nandi, S. et al., 1999, *Biol Reprod*, **61**:70-75.
- [11] Yan, W. et al., 2000, *Mol Endocrinol*, **14**:682-699.
- [12] 郑航等, 2000, *中国男科学杂志*, **14**:81-85.
- [13] 沈凯等, 1999, *生殖与避孕*, **19**:11-16.
- [14] Guo B. et al., 2001, *J Biol Chem*, **276**:2780-2785.
- [15] Sassone-Corsi, P. 1998, *Semin Cell Dev Biol*, **9**:475-482.
- [16] Sassone-Corsi, P. 2000, *Mol Reprod Dev*, **56**:228-229.
- [17] Guo, C. et al., 2000, *China Science Bulletin*, **45**:720-725.
- [18] Feng, H. L. et al., 1999, *Fertil Steril*, **71**:85-89.
- [19] Yan, W. et al., 2000, *J Cell Sci*, **113**:161-168.
- [20] Yamamoto, C. M. et al., 2000, *Biol Reprod*, **63**:1683-1690.
- [21] Lue, Y. H. et al., 1999, *Endocrinology*, **140**:1709-1717.
- [22] Yan, H. et al., 1997, *J Toxicol Environ Health*, **52**:149-168.
- [23] Oteiza, P. I. et al., 1995, *J Nutr*, **125**:823-829.
- [24] Henriksen, K. et al., 1996, *J Androl*, **17**:394-402.
- [25] Hasegawa, M. et al., 1998, *Radiat Res*, **149**:263-270.
- [26] Zhu, Q. et al., 2000, *Alcohol Clin Exp Res*, **24**:1550-1556.
- [27] Eid, N. A. et al., 2002, *Int J Androl*, **25**:159-167.
- [28] Li, H. et al., 1997, *J Urol*, **158**:962-965.