

生精细胞凋亡与电离辐射

白求恩医科大学放射生物教研室(长春,130021) 龚守良综述 刘树铮审核

摘要:哺乳动物睾丸精子发生过程中具有自发的生殖细胞死亡现象,这种死亡主要是通过细胞凋亡机制实现的。深入了解睾丸生精细胞凋亡规律,性激素和理化因素对其影响,以及与电离辐射的关系,对揭示生殖细胞凋亡的本质具有重要的生物学和遗传学意义。

关键词: 睾丸 生精细胞 凋亡 电离辐射

自从英国 Kerr J于 1972年首次提出细胞凋亡(apoptosis)的概念以来,人们逐渐认同细胞凋亡是一种由基因调控的自主、有序的死亡过程,在维持机体内环境稳定方面起到非常重要的作用。哺乳动物睾丸精子发生过程中具有自发的生殖细胞死亡现象,这种死亡主要是通过细胞凋亡机制实现的。因此,深入了解睾丸生精细胞凋亡的本质及其在电离辐射作用下的凋亡规律,具有重要的生物学和遗传学意义。

1 生精细胞凋亡的规律

实验资料表明,睾丸精子发生过程中的自发生殖细胞凋亡明显受年龄、精细胞种类及曲细精管生殖上皮周期不同阶段等方面的影响,具有一定的规律性。睾丸的生殖细胞自胚胎的原始细胞就开始发生凋亡。电镜证实,妊娠 13天的胚胎小鼠生精细胞凋亡最高,与原始生殖细胞迁移入性腺的时间一致;出生后 10~13天,当精子发生的第一个波开始及存在有功能活性的精原细胞增生时,出现第二个凋亡高峰^[1]。另有资料报道,出生后 16~28天期间大鼠生精细胞凋亡渐渐增加,为 8日龄的 1.8~2.0倍,成年期凋亡降低^[2];小鼠 8~22日龄生精细胞凋亡高于青年及成年个体^[3],说明随着性的逐渐成熟,其生精细胞也逐渐减少。青春前期大鼠生精细胞的凋亡增加可引起生精子细胞不可逆改变,导致成年期精子发生低下^[4]。

睾丸生精细胞的自发凋亡具有生殖上皮

周期阶段性特点。用细胞凋亡特异性染色方法证明,在大鼠 I~IV和 IX~XIV阶段,曲细精管中减数分裂前的精原细胞和精母细胞有较高的自发凋亡现象^[5];成年大鼠发生在 I和 XII~XIV阶段的生精细胞凋亡的 DNA断片为 VIII阶段的 2倍^[2]。

在精子发生过程中,有半数以上的生精细胞自发凋亡,其中主要是精原细胞和精母细胞,而且精原细胞的凋亡率大于精母细胞^[3],很少发生在精子细胞中^[2,3,5]。精原细胞的凋亡均发生在有丝分裂期间;而精母细胞有些不同,除高发于减数分裂期间(在 X IV阶段)外,细线期、偶线期、尤其是粗线期精母细胞也常发生凋亡^[6]。已知减数分裂前期时间较长,有许多重要的生物学事件发生,因此这一期间出现自发的细胞凋亡,以淘汰在 DNA合成及同源染色体交换遗传物质过程中出现差错的细胞,具有重要遗传学意义。

2 性激素对生精细胞凋亡的影响

促性腺激素(FSH, LH)和雄激素不仅对精子发生过程中的生精细胞增殖起着重要作用,而且也作为存活因子对其凋亡发挥重要影响。Billig等人^[2]用促性腺激素释放激素(GnRH)拮抗剂消除促性腺激素,在 16~32日龄大鼠观察到生精细胞凋亡 DNA断片增加。Sinha-Hikim等人^[7]发现,给成年大鼠 GnRH拮抗剂后 5天(在 VII~VIII阶段)和 7天(在 VII~VIII和 IX~XI阶段)生精细胞凋亡 DNA断片明显增加,14天(在 I、II~IV、V

~ VI和 VII~ X IV阶段)达最高值。

短时间应用雌二醇处理大鼠,抑制促性腺激素分泌,主要增加IV~ X阶段生精细胞凋亡;而垂体切除后消除了促性腺激素,主要增加VII阶段生精细胞凋亡^[8],两者可能通过不同调节机制发生作用。也有人观察到,己烯雌酚主要影响仓鼠初级精母细胞的凋亡^[9]。

用抗FSH抗血清处理的大鼠生精细胞凋亡增加,而且粗线期精母细胞对其处理后FSH的降低非常敏感^[10]。体外观察,FSH可降低大鼠VIII~ IX阶段粗线期精母细胞的凋亡,刺激精原细胞和细线前期精母细胞DNA合成^[11]。实验证实,血清促性腺激素水平,尤其是FSH,对生精细胞凋亡起到重要的调节作用^[2,11],这种调节作用可能是通过Sertoli细胞实现的^[11]。

给成年大鼠甲氧乙酸或其它特异性物质,可选择性破坏Leydig细胞,减少睾丸酮的分泌,降低其血清水平,导致生精细胞凋亡明显增加^[12]。另外发现,野生的仓鼠是在日光照射较长的季节里生育、繁殖,并伴有FSH水平增高;如果给出生后的仓鼠每天光照16小时,照射3周后转移到每天光照8小时的环境,几天后其生精细胞凋亡增加^[13],说明生殖细胞凋亡也受正常生理条件下促性腺激素水平改变的影响。

总之,无论是通过外源还是内源改变性激素水平,如垂体切除给GnRH拮抗剂用FSH和LH特异性抗体或雌激素处理,选择性破坏Leydig细胞分泌睾丸酮,改变性激素生理水平等,均可诱导睾丸的生精细胞凋亡。

3 理化因素对生精细胞凋亡的影响

一些化学物质可直接或间接对生精细胞凋亡发生作用。抗癌药物环磷酰胺、丝裂霉素C和长春新碱可引起大鼠和小鼠生精细胞凋亡^[5,14],阿霉素和etoposide也可诱导大鼠精原细胞和精母细胞凋亡^[15]。2-甲氧乙醇和甲氧乙酸通过钙介导机制诱导精母细胞凋亡;

棉子酚、phosphamidon和1,3-二硝基苯均可诱导大鼠生精细胞凋亡;2,5-HD(2,5-hexanedione)和MEHP[mono-(2-ethylhexyl)-phthalate]二者皆为Sertoli细胞毒性物质,引起生精细胞凋亡,导致睾丸不可逆性损伤^[16];氯化镉破坏睾丸血管,引起大鼠生精细胞凋亡增加,可被金属整合物阻断。

采用急性睾丸缺血、输精管切除或实验性隐睾等方法,可诱导睾丸生精细胞凋亡。将大鼠睾丸扭转以造成局部缺血1或2小时,在扭转后4小时,原位末端标记(TUNEL)的阳性生殖细胞凋亡明显增加,推测可能与活性氧物质有关^[17]。切除仓鼠输精管,暂时地(术后3周)激活生精细胞凋亡,主要涉及XIII~ I阶段分裂的精母细胞^[18]。实验性隐睾,即将睾丸置于腹腔,使之处于热应激状态,主要诱导小鼠精母细胞和精子细胞凋亡,伴有血清睾丸酮水平低下^[19]。实验性隐睾诱导的生殖细胞凋亡主要通过两种途径实现,其一是引起初期凋亡的p53依赖途径,另一是其后凋亡的p53非依赖途径^[20],而与Fas系统可能没有明显的联系^[19]。然而,临床隐睾病人生殖细胞凋亡率却低于正常人^[21],这种与实验性隐睾诱导的生殖细胞凋亡差别的机制还不十分清楚,有待深入的探讨。

4 生精细胞凋亡的基因调控

睾丸的生精细胞凋亡受一系列基因的调控,其中有促进生精细胞凋亡的基因,也有抑制其凋亡的基因。p53基因在精原细胞和精母细胞明显表达,并促进其凋亡,如果p53基因表达受抑,自发的生精细胞凋亡率降低,同时出现巨型多核细胞^[22]。因此,p53在减数分裂前细胞中表达并使之凋亡,这样可有效地选择性淘汰异常的细胞及限制产生过多的生殖细胞。

在高水平表达的Bcl-xL和Bcl-2蛋白的转基因小鼠,睾丸生殖细胞早期的凋亡波的出现受阻,成年时精子发生异常,伴有不

育,说明这两种基因对生精细胞凋亡具有抑制作用。相反, Bax 具有促进睾丸生殖细胞凋亡的作用。生理性早期的生精细胞凋亡波与 Bax 蛋白的暂时高表达是一致的。 $Bcl-xL$ 和 Bax 蛋白 ($Bcl-2$ 在正常的胚胎和未成熟睾丸中表达)在早期凋亡波的生精细胞胞内的平衡(可能受激素的调节)起到关键的作用^[23]。

Fas系统在睾丸精子发生的细胞凋亡中也起到重要调控作用。Fas是一种跨膜受体蛋白,当 Sertoli细胞表达的 Fas L与之结合时,一系列凋亡信号在胞内转导,最终使其凋亡,提示 Sertoli细胞可通过 Fas介导通路在精子发生过程中起到旁分泌的调控作用^[16],而且主要在胚胎期起作用^[1]。

热休克蛋白 70-2(Hsp 70-2)与联会丝复合体构成有关,其基因敲除小鼠在 17天幼龄期精子发生第一个波的粗线期精母细胞凋亡增加,成年期精子细胞和精子缺乏,伴有不育^[3],说明 Hsp 70-2具有抑制生精细胞凋亡的作用。环一磷酸腺苷反应元件调节剂(CREM)对于精子细胞发育很重要,是精子发生特殊阶段的调节物质,在精母细胞成熟阻滞阶段缺少 CREM,其凋亡明显增加,引起睾丸衰竭和不育^[24]。c-myc基因可引起睾丸生精细胞凋亡,其过度表达诱导减数分裂前期初级精母细胞凋亡,并引起 c-myc转基因大鼠的不育^[25]。此外,亲环素 A(cyclophilin A)、周期蛋白-2组织蛋白酶 L(cyclic protein-2/cathepsin L)、NO合酶、骨形态发生蛋白 8B(bone morphogenetic protein 8B, BMP 8B)及 kit配体(一种调节因子)等均与精子发生中生殖细胞凋亡的调控有关。

5 生精细胞凋亡与电离辐射

睾丸生殖细胞对电离辐射非常敏感,低剂量照射即可诱导精原细胞数量的减少(0.03Gy)和精原细胞与精母细胞染色体损伤(0.05Gy)。2和 3Gy X射线照射可分别诱

发小鼠和大鼠生精细胞凋亡的明显增加,这种凋亡开始以精原细胞和减数分裂的精母细胞为主,以后影响至其它生精细胞^[26]。

Hasegawa 等人^[27]用光镜、电镜和 TUNEL方法观察 0.5~5.0Gy γ 射线(剂量率为 1.69 Gy/min)全身照射 8周龄 C57BL/6J小鼠的生精细胞凋亡。实验发现,照射后光镜下 HE染色的睾丸组织精原细胞大多异常(细胞变性),其它种类的细胞少见异常,在 XII~I 阶段有少量的减数分裂细胞。光镜下 HE染色和 TUNEL证实, A₂~B型精原细胞对辐射敏感,细线前期精母细胞具有较大的辐射抗性;电镜下证实, I~IV阶段的 A₄~B型精原细胞对辐射最敏感。照射后出现典型的时程变化,异常的精原细胞 6小时开始增加, 12小时达高峰,然后迅速下降,而且 5.0 Gy较 0.5Gy照射变化明显,在 I~VI和 VII~VIII阶段呈剂量效应关系,但不是直线关系;照射后 12小时精原细胞数开始下降,即从生精上皮丢失。采用 TUNEL方法,其阳性精原细胞明显增加,照射后 12~18小时达高峰,类似于 HE染色的结果;在生殖上皮周期各阶段阳性的精子细胞和 Sertoli细胞及在 VII~VIII阶段阳性的精母细胞相当少;在 I~VI阶段阳性的精母细胞类似于精原细胞时程的变化,但其阳性细胞数少得多。上述结果表明,照射后大多异常的精原细胞与凋亡密切相关,但其形态不太典型,推测可能是不同的细胞类型具有不同形态的凋亡细胞。

为了进一步验证电离辐射诱导精原细胞变性确为凋亡, Hasegawa 等人^[28]又进行了 p53基因缺失小鼠实验。其结果表明, p53缺失小鼠与野生型小鼠(6~8日龄)相反, 0.5或 5.0Gy全身照射(剂量率为 1.69Gy/min)开始 24小时, HE染色变性的或 TUNEL阳性的分化精原细胞数量少,而且在生殖上皮周期的不同阶段精原细胞丢失的也少;由于 p53缺失小鼠受照后细胞凋亡减少,有较多的存活的分化精原细胞分化为后代不同类型

的精细胞,但精原干细胞却分化较少的后代精细胞。上述结果提示,电离辐射所致的 p53 缺失小鼠或野生型小鼠分化精原细胞变性或 TUNEL 阳性确为凋亡,并且依赖于 p53,而辐射抗性较高的精原干细胞不依赖于 p53 另外,还有人观察到, p53 存在于大鼠细线前期~粗线早期精母细胞,电离辐射仅在这些细胞诱导 p53 发生凋亡作用^[29]。看来,电离辐射既可在精原细胞又可在精母细胞通过 p53 途径诱导其凋亡的发生。

参 考 文 献

- 1 Wang RA et al. Biol Reprod, 1998; 58: 1250
- 2 Billig H et al. Endocrinology, 1995; 136: 5
- 3 Mori C et al. Dev Dyn, 1997; 208: 125
- 4 Inaba Y et al. J Urol, 1998; 160: 540
- 5 Cai L et al. Biol Reprod, 1997; 56: 1490
- 6 Blanco-Rodriguez J et al. Cell Prolif, 1996; 29: 13
- 7 Sinha-Hikim AP et al. Biol Reprod, 1997; 57: 1193
- 8 Blanco-Rodriguez J et al. J Reprod Fertil, 1997; 110: 61
- 9 Monclercq D et al. Biol Reprod, 1996; 55: 1368

- 10 Shetty J et al. Endocrinology, 1996; 137: 2179
- 11 Henriksen K et al. Endocrinology, 1996; 137: 2141
- 12 Brinkworth MH et al. J Reprod Fertil, 1995; 105: 25
- 13 Blottner S et al. Theriogenology, 1995; 44: 321
- 14 Nakagawa S et al. Toxicol Appl Pharmacol, 1997; 147: 204
- 15 Sjoblom T et al. Environ Mol Mutagen, 1998; 31: 133
- 16 Lee J et al. Endocrinology, 1997; 138: 2081
- 17 Turner TT et al. Biol Reprod, 1997; 57: 1267
- 18 Lue Y et al. J Androl, 1997; 18: 166
- 19 Ohta Y et al. Acta Anat (Basel), 1996; 157: 195
- 20 Yin Y et al. Biol Reprod, 1998; 58: 492
- 21 Heiskanen P et al. Pediatr Res, 1996; 40: 351
- 22 Stephan H et al. Histochem Cell Biol, 1996; 106: 383
- 23 Rodriguez I et al. EMBO J, 1997; 16: 2262
- 24 Lin WW et al. Fertil Steril, 1998; 69: 533
- 25 Kodaira K et al. Mol Reprod Dev, 1996; 45: 403
- 26 Henriksen K et al. J Androl, 1996; 17: 394
- 27 Hasegawa M et al. Radiat Res, 1997; 147: 457
- 28 Hasegawa M et al. Radiat Res, 1998; 149: 263
- 29 Sjoblom T et al. Oncogene, 1996; 12: 2499

(收稿日期: 1999-02-15)

树突状细胞与紫外线辐射

白求恩医科大学放射生物教研室(长春, 130021) 孙祖玥综述 龚守良审核

摘 要: 近年来,随着树突状细胞(DC)体外培养技术的成熟,人们对其分化发育、亚群分类、体内分布与迁移、对抗原摄取、加工、呈递和与某些疾病的关系等进行了深入研究。DC与免疫激发、免疫抑制、移植免疫、抗感染免疫及自身免疫疾病的发生密切相关。鉴于DC独特的生物学功能及其在免疫应答中的独特地位,使其在免疫中的重要作用越来越受到生物医学界的关注。

关键词: 树突状细胞 免疫 紫外线

树突状细胞(dendritic cell, DC)在本世纪70年代由Steinman和Cohen首次报道,因其在成熟期伸出树突状伪足而得名,是目前发现体内功能最强的抗原呈递细胞(Antigen-presenting cell, APC)。近年来,随着DC体外培养技术的成熟,人们对其分化发育、亚群分类及对抗原摄取、加工、呈递和与某些疾病的关系等进行了深入研究。胸腺DC可能

是T细胞阴性选择的重要参与者,与免疫耐受有关^[1];而外周DC是主要的抗原摄取者,是唯一能激活初始型T细胞(naive T cells)的APC^[2]。DC与免疫激发、免疫抑制、移植免疫、抗感染免疫及自身免疫疾病的发生密切相关,具有独特的生物学功能。使其在免疫应答中的重要作用越来越受到生物医学界的关注。