

正常 Wistar 大鼠血睾屏障的建立和棉酚对其影响的研究

杨育州

(中国医学科学院基础医学研究所)

大量实验资料表明哺乳动物睾丸曲细精管中存在一种屏障,该屏障类似于血脑屏障,能选择性阻止血液中某些物质进入管腔中,因此称为血睾屏障(blood-testis barrier)。目前已知分化着的生精细胞(精母细胞和精子细胞)是处在由支持细胞(Sertoli cell)之间的紧密连接所创造的特定的微环境中,而支持细胞之间的紧密连接则是构成血睾屏障主要的形态基础。血睾屏障是支持细胞主要的功能之一,对于保护生精细胞,避免自身免疫反应,维持曲细精管内环境等起着重要的作用。因此对血睾屏障的发生及其与生精细胞分化关系的研究,不仅有助于掌握精子发生的特点,同时对寻找控制男性抗生育药物,也必将提供线索和依据。本实验采用辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)和氯化锂(Lithium chloride)追踪正常和服棉酚后 Wistar 幼鼠血睾屏障建立的时间和观察其生精细胞分化的动态过程,为分析棉酚抗精子发生的机理提供实验资料。

材料和方法

实验动物为刚出生的雄性 Wistar 幼鼠,分别于生后 5、10、15、17、19、21、25、30 和 60 天采用辣根过氧化物酶和氯化锂追踪血睾屏障的形成过程。另有一部分幼鼠于生后第十天和十五天给予灌服醋酸棉酚 2 次,剂量为 100 毫克/公斤体重,然后于末次服药后 4、6、10 和 15 天再采用上述 2 种追踪物质。上述各时相每种追踪法所用动物皆为 2 只,动物总数为 52 只。

(一) 辣根过氧化物酶追踪法 根据动物大小,睾丸间质内注射辣根过氧化物酶溶液 0.025—0.1 毫升[40 毫克辣根过氧化物酶/毫升理格液(Ringer),厂牌西格曼(Sigma)VI 型],

20 分钟后取材,把睾丸切成 1 立方毫米的小块,固定于卡诺斯克氏(Karnovsky's)固定液 3 小时^[3]。用 0.1 克分子二甲砷酸钠缓冲液(pH 7.2)浸洗,然后与 3'3 二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)和双氧水[10 毫升促斯盐酸(Tris-HCl)缓冲液(0.05 克分子,pH 7.6)含有 5 毫克 DAB 和 0.01% 双氧水]反应 10 分钟。蒸馏水洗 3 次,1% 锇酸固定 2 小时后,梯度丙酮脱水,环氧树脂 Epon 812 包埋。1—2 微米切片,不需染色,光学显微镜观察(简称光镜)。

(二) 氯化锂追踪法 先配制高渗的氯化锂溶液(0.75 克分子)。把睾丸切成 1—2 立方毫米小块放入该溶液 3—5 分钟,然后固定于卡诺斯克氏固定液 3 小时。0.1 克分子二甲砷酸钠缓冲液(pH 7.2)洗 2 次,1% 锇酸固定 2 小时后,梯度丙酮脱水,包埋切片均同上述。1% 甲苯胺蓝染色,光镜观察。

结 果

(一) 正常血睾屏障建立和生精细胞分化的追踪 生后 5 天大鼠睾丸切片可见曲细精管为实心索状物,由性原细胞(Gonocyte)和未分化成熟的支持细胞组成。性原细胞胞浆染色较浅,核大而圆,核仁明显。未成熟的支持细胞染色较深,核呈卵圆形,核膜旁有多个异染色质小体(见封 2 图 1,下同)。辣根过氧化物酶追踪可见酶的棕黄色反应物包绕管壁,并分布到管的中心,描出曲细精管全部细胞轮廓(见图 2)。氯化锂溶液处理后,可见曲细精管内细胞层松散,所有细胞均显皱缩,结构消失,核呈染色较深的团块(见图 3)。生后 10 天大鼠曲细精管仍为实心状,此时管壁基底部出现 A 型精原细胞,支持细胞核延长。辣根过氧化物酶及氯化锂追踪图象与

5天大鼠无异。 生后 15、17 和 19 天大鼠曲细精管管腔仍未形成，B 型精原细胞和细线前及细线期精母细胞出现。支持细胞数量增加，核膜弯曲，趋向成熟(见图 4、5)。辣根过氧化物酶及氯化锂追踪图象，除细胞层次增加外，均与上述相同(见图 6)。 在生后 21 天大鼠曲细精管可见大量早期粗线期精母细胞出现，此时管腔形成。辣根过氧化物酶追踪见酶的棕黄色反应物分布在管壁外及管壁内基底部，描出基底部生精细胞轮廓。但辣根过氧化物酶被阻止进一步深入，管腔中心未见有酶的反应物(见图 7)。氯化锂溶液处理后，管壁基底部细胞明显皱缩，而中心处细胞则无缩小现象。 在生后 25、30 和 60 天大鼠曲细精管，生精细胞已由粗线期精母细胞逐渐分化成精子细胞和成熟精子。精原细胞分布于管壁基底部，精母细胞及成熟精子依次排列，层次清楚。支持细胞附着管壁基底膜处，胞浆很大，向内延伸至精子细胞。辣根过氧化物酶追踪图象与 21 天大鼠相同。氯化锂溶液处理后，曲细精管基底部精原细胞和细线期精母细胞明显皱缩，结构消失，并与管壁分离。而支持细胞仍附着于管壁上。粗线期精母细胞和精子细胞及成熟精子排列致密，形态正常(见图 10)。

(二) 棉酚对血睾屏障建立和生精细胞分化影响的观察 停药后 4 天大鼠(即生后 19 天)曲细精管亦已有细线期精母细胞出现，但数量较少。辣根过氧化物酶和氯化锂追踪图象与正常 19 天大鼠相同。 停药后 6、10 和 15 天大鼠曲细精管已由早粗线期精母细胞分化出晚粗线期精母细胞，部分曲细精管可见精子细胞出现，这与正常 21、25 和 30 天大鼠所出现的生精细胞一致(见图 8)。辣根过氧化物酶和氯化锂追踪图象同正常 21 天大鼠(见图 9)。

讨 论

(一) 正常血睾屏障建立和生精细胞分化的关系 人们发现当给予成年动物血管内注射辣根过氧化物酶、氯化锂和硝酸镉等物质时，这些物质能迅速通过睾丸间质中毛细血管壁及曲

细精管壁，但支持细胞间紧密连接所构成的血睾屏障则能有效地阻止其通过。因此认为它们是追踪血睾屏障结构和通透功能变化最有效的示踪物。

支持细胞间的紧密连接划分曲细精管为基底室(Basal compartment)和近管腔室(Adluminal compartment)。基底室位于管壁基底膜与紧密连接之间，包含有精原细胞和细线前及细线期精母细胞。近管腔室位于紧密连接与管腔之间，包含有细线期精母细胞以后的所有生精细胞。紧密连接处的细胞膜相互融合，膜下具有特征性排列的纤维束和内质网。维特尔(Vitale)和吉卢莱(Gilula)等人用辣根过氧化物酶及冰冻蚀刻电镜技术连续观察出生后斯勃拉格-道利(Sprague-Dawley)大鼠功能性血睾屏障和其特征性超微结构出现的时间，发现功能性血睾屏障在生后 16—19 天之间形成，并与支持细胞之间紧密连接所具有的特征性结构的出现，管腔的形成和曲细精管液分泌的时间一致^[2,5]。用辣根过氧化物酶及氯化锂追踪 Wistar 大鼠，发现功能性血睾屏障形成于生后 19—21 天之间。这与文献报道的时间稍有延迟，可能与动物种类或营养条件差异有关。目前认为支持细胞具有调节生精细胞发育和分化的重要作用。作为支持细胞成熟标志之一的血睾屏障的建立，对维持生精细胞减数分裂所需要的特殊内环境，促进生精细胞成熟和释放是必需的。同时还发现在生后 19 天的 Wistar 大鼠，曲细精管已有细线期精母细胞，但功能性血睾屏障仍未建立。而在生后 21 天的大鼠，功能性血睾屏障建立，并可见粗线期精母细胞出现。功能性血睾屏障建立与粗线期精母细胞出现的时间一致。该现象提示精母细胞分化早期和减数分裂的起始无需血睾屏障存在，而分化和减数分裂进一步发展和完成则必需血睾屏障建立。我们的观察结果与迪姆(Dym)和罗塞尔(Russell)等人在成年大鼠和猴子睾丸曲细精管超微结构研究中所发现支持细胞紧密连接划分生精细胞类型的结果一致^[1,4]。一般认为生精细胞的分化受垂体促性腺激素和雄激素的调控。但在生精细胞尚未发

现有促性腺激素 (FSH) 受体蛋白存在, 是否有类固醇激素受体尚有一些争论, 而在支持细胞则发现有大量促性腺激素和类固醇激素受体蛋白。因此推测促性腺激素 (FSH) 和雄激素是作用于支持细胞而调控生精细胞分化的。作为支持细胞主要功能之一的血辜屏障可能起积极的作用。

生精细胞的分化是处在连续的运动之中, 细线期精母细胞分化成粗线期精母细胞及精子细胞必须通过血辜屏障进入近管腔室。因此, 血辜屏障并不是静止的, 不变的, 而是处于一种潜在的运动之中。罗塞尔和迪姆等人发现当细线期精母细胞向管腔方向运动时, 支持细胞之间的紧密连接能够分段开放。细线期精母细胞进入紧密连接中部时, 其下方开放的紧密连接可再重新连合, 形成过渡小室或中间室 (Intermediate compartment)。过渡小室在生精细胞向管腔方向运动中, 可维持血辜屏障的连续性和完整性。一旦过渡小室形成, 细线期精母细胞上方的紧密连接完全打开, 以利其进入近管腔室。生精细胞的运动和紧密连接的开放, 一般发生在大鼠生精周期 VIII—X, 猴子 IX—X。目前认为血辜屏障调节生精细胞的运动和分化。

(二) 棉酚对大鼠血辜屏障建立和生精细胞分化的影响 血辜屏障的建立和生精细胞的分化是受机体内各种因素调节和控制的复杂现象。棉酚是否干扰血辜屏障的正常建立和抑制生精细胞的分化, 对于探讨棉酚的作用机制具有理论和实际的意义。本实验分别在幼鼠生后第十天和十五天灌服棉酚 2 次, 此时正是生精细胞减数分裂起始和血辜屏障建立前夕。已有报道在大鼠一次口服大剂量棉酚 (100 毫克/公斤体重) 4—7 天后, 睾丸生精细胞出现严重损伤。我们认为由于幼鼠灌服棉酚的困难和对药物耐受性的差异, 给动物灌服 2 次大剂量的棉

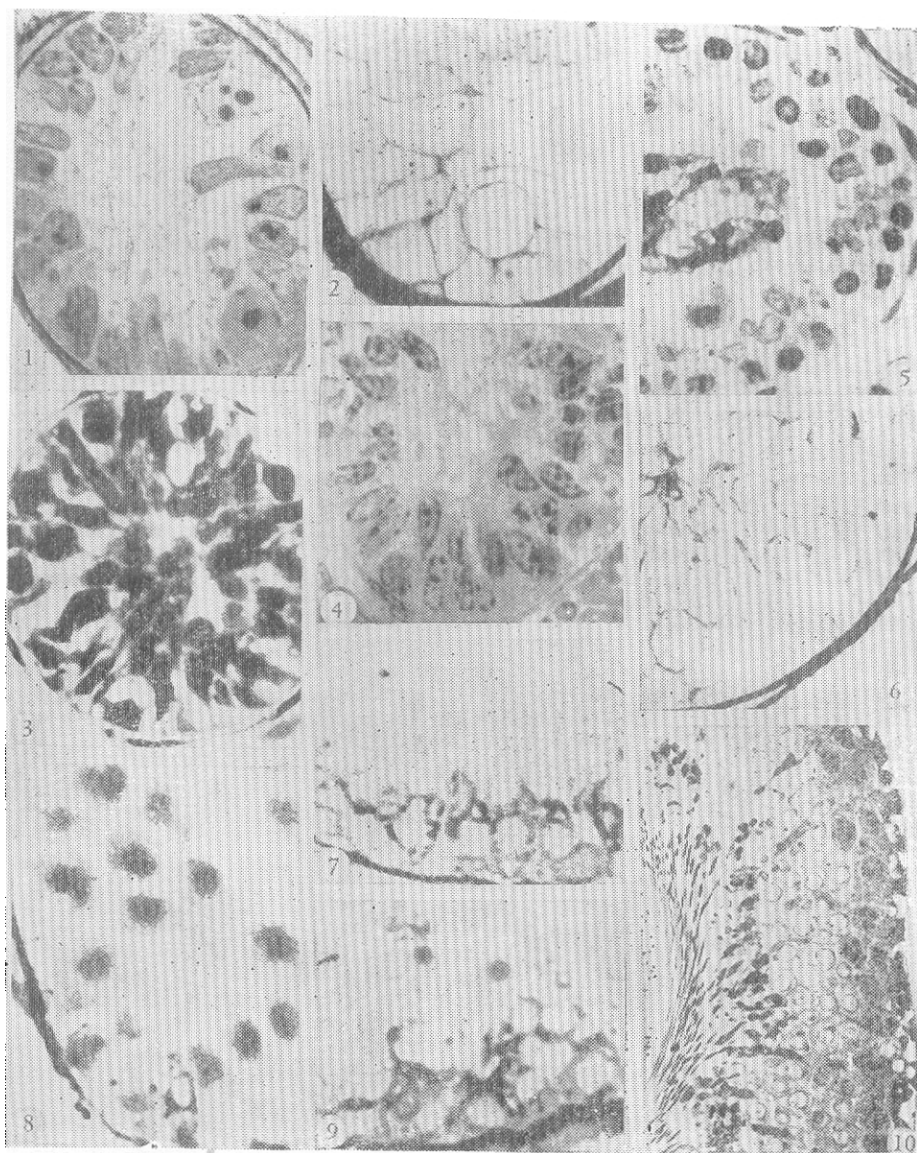
酚是适当的。

我们的实验结果表明棉酚并未延迟和破坏正常血辜屏障建立和早期生精细胞的分化。在停药后 4 天 (即生后 19 天) 的大鼠, 可见辣根过氧化物酶透入管腔中心, 此时曲细精管已出现细线期精母细胞。除细线期精母细胞相对较少外, 追踪图象和生精细胞分化发育阶段与正常 19 天大鼠相同。在停药后 6 天的大鼠, 辣根过氧化物酶和氯化铯溶液均被支持细胞之间的紧密连接所阻止, 而不能进一步深入, 表明此时功能性血辜屏障已形成。管腔中生精细胞亦已分化成粗线期精母细胞, 这与正常 21 天的大鼠血辜屏障的建立和粗线期精母细胞的出现无差异。目前认为大鼠血辜屏障的结构和功能具有较高的稳定性, 对很多病理因素有较强的抵抗力。根据实验结果亦可认为幼年大鼠支持细胞血辜屏障对一定量的棉酚有较强的抵抗力, 血辜屏障的建立和早期生精细胞的分化是不受棉酚影响的, 这可能与细胞对棉酚作用不敏感有关。

参 考 文 献

- [1] Dym, M. and Cavicchia, J. C., 1977: Further observations on the blood testis barrier in monkeys. *Biol. Reprod.* 17: 390—403.
- [2] Gilula, N. B. et al., 1976: The Sertoli cell occluding junction and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Develop. Biol.* 56: 142—168.
- [3] Karnovsky, M. J., 1965: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137A—138A.
- [4] Russell, L., 1977: Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Amer. J. Anat.* 148: 313—328.
- [5] Vitale, R. et al., 1973: The normal development of the blood-testis barrier and the effect of Clomiphene and Estrogen treatment. *Anat. Rec.* 176: 333—344.

更正 本刊 1983 年第 1 期第 61 页“东北虎再生障碍性贫血一例报道”一文, 发稿时由于工作疏忽, 造成前后文重复。本文应在(三)讨论部分结束, 以后则为重复部分, 特此更正, 并向作者和读者致以歉意。



《正常 Wistar 大鼠血睾屏障的建立和棉酚对其影响的研究》一文的附图 (正文见 11 页)

图 1 生后 5 天大鼠曲细精管, 甲苯胺蓝染色 $\times 1000$; 图 2 辣根过氧化物酶追踪生后 5 天大鼠曲细精管, 未染色 $\times 1000$; 图 3 高渗氯化锂溶液追踪生后 5 天大鼠曲细精管, 甲苯胺蓝染色 $\times 1000$; 图 4 生后 15 天大鼠曲细精管, 支持细胞膜延长, 核膜旁有多个异染色质颗粒, 甲苯胺蓝染色 $\times 1000$; 图 5 生后 19 天大鼠曲细精管, B 型精原细胞核呈车轮状。细线期精母细胞核染色深, 较均匀, 管腔未形成, 甲苯胺蓝染色 $\times 1000$; 图 6 辣根过氧化物酶追踪生后 19 天大鼠曲细精管, 未染色 $\times 1000$; 图 7 辣根过氧化物酶追踪生后 21 天大鼠曲细精管, 酶的棕黄色反应物分布于管壁基底部, 仅描出细胞轮廓, 未染色 $\times 1000$; 图 8 停药棉酚后 6 天大鼠曲细精管, 粗线期精母细胞出现, 管腔形成, 甲苯胺蓝染色 $\times 1200$; 图 9 辣根过氧化物酶追踪停药棉酚后 6 天大鼠曲细精管, 酶的棕黄色反应物分布于管壁基底部, 未染色 $\times 1200$; 图 10 高渗氯化锂溶液追踪生后 60 天大鼠曲细精管; 甲苯胺蓝染色 $\times 1000$