

局部热激对大鼠睾丸生精细胞凋亡与增殖的影响

张婷婷 何萌萌 郭 健 李 悦

摘 要 **目的** 研究局部热激对大鼠睾丸生精细胞凋亡和增殖的动态变化及二者相关性的影响,以探索生精细胞凋亡与增殖的关系。**方法** 36只60天龄雄性Wistar大鼠随机分为对照组(22℃,20min)与热激组(43℃,20min),热激组按睾丸局部处理后1、2、3、4、5天分成5个亚组;采用HE染色分析各组大鼠曲细精管的形态变化;采用TUNEL法检测各组生精细胞凋亡情况;采用免疫组织化学方法(以下简称免疫组化)分析各组大鼠曲细精管Ki-67表达与分布的变化。**结果** HE染色显示,热激后生精细胞逐渐脱落、缺失,至第4天最为严重,而第5天生精细胞有所恢复;TUNEL法检测显示,热激后各组的TUNEL凋亡信号显著增加($P<0.01$),热激2天组达到高峰,热激3~5天组凋亡信号逐渐降低;免疫组化结果显示,热激后各组的Ki67表达显著下降($P<0.01$),热激1天组很少见到Ki67表达,热激2~5天组Ki67表达逐渐增加;比较各组Ki67与TUNEL的比值,发现热激1~2天组二者比值小于1,热激3天组二者比值几乎等于1,热激4天组二者比值大于1。**结论** 睾丸局部热激可导致生精细胞凋亡,生精细胞增殖抑制,热激后早期凋亡过程胜于增殖,热激后期增殖强于凋亡过程,表明凋亡过程的可逆可能在于增殖活性增强。

关键词 热激 生精细胞 凋亡 增殖

中图分类号 Q492.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.008

Effects of Local Exposure to Heat Stress on the Testicular Germ Cell Proliferation and Apoptosis. Zhang Tingting, He Mengmeng, Guo Jian, et al. State Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract Objective To study the relationship between germ cell apoptosis and proliferation, thus to explore how the local exposure to heat stress affect the dynamic change and correlation between testicular germ cell apoptosis and proliferation was investigated. **Methods** Thirty-six male Wistar rats at the age of 60 days were randomly divided into control groups (22℃, 20min) and heat stress group (43℃, 20min), and the heat stress group was further divided into five sub-groups according to time 1 day, 2 days, 3 days, 4 days, 5 days after the testicular local heat stress. HE staining method was adopted to analyze morphological characteristics of seminiferous tubule. The germ cell apoptosis in all groups was examined by means of TUNEL. The immunohistochemical method was used to analyze the Ki67 distribution and expression in seminiferous tubule of all groups. **Results** The HE staining showed that germ cell gradually fell off and started missing after the testicular local heat stress, and the change was the most severe at the fourth day, but in the fifth day the germ cell had a little recovery. The TUNEL results showed that the TUNEL apoptosis signal increased significantly after testicular local heat stress ($P<0.01$) and it reached the peak at the second day. However, this TUNEL apoptosis signal in the 3-5d heat stress groups decreased gradually. The results of the immunohistochemistry showed that the Ki67 expression decreased significantly after the testicular local heat stress ($P<0.01$). The Ki67 expression in the 1d heat stress group was rarely seen, and the Ki67 expression in the 2-5d heat stress groups increased gradually. Compared to the ratio of the Ki67 and TUNEL among groups, it is found that the ratio in the 1-2d heat stress groups was less than 1. The ratio was almost equal to 1 in the 3d heat stress group. the ratio was greater than 1 in the 4d heat stress groups. **Conclusion** The testicular local exposure to heat stress increased testicular germ cell apoptosis and decreased testicular germ cell proliferation. The apoptosis process was superior to proliferation in the early phase after heat stress, but the proliferation was superior to apoptosis process in the late phase after heat stress, which indicated that the reversibility of apoptosis process could be dependent on stronger proliferation.

Key words Heat stress; Germ cell; Apoptosis; Proliferation

精子发生是一个复杂的过程,精原细胞通过连续进行的有丝分裂、减数分裂和细胞分化最终发育为成

熟的精子。大多数哺乳动物的睾丸位于低于体温2~8℃的阴囊内^[1,2]。研究发现,睾丸温度轻微上升即会干扰精子发生,最终导致生精障碍,说明睾丸的温度调节很重要^[3-8]。有研究表明,成年大鼠睾丸暴露在高温(43℃,30min或15min)后导致生精障碍,但研究多选择热激后一段时期内的不同时间节点进行

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273610)

作者单位:100029 北京中医药大学

通讯作者:郭健,教授,电子信箱:guojian323@sina.com

观察,而热激后曲细精管生精细胞在短期内的连续变化尚未见报道^[9]。

Ki-67 蛋白的表达与细胞增殖密切相关。Ki-67 蛋白在细胞周期的活跃阶段(分裂间期的 G₁、S、G₂ 阶段与分裂期)均有表达,但静息期(G₀)却不表达,这使其成为判断细胞增殖活性的可靠标志^[10]。研究发现,高温导致的生精障碍是可逆的,笔者推测这种可逆性可能与增殖活性的变化相关^[9,11]。因此本实验旨在探索生精细胞凋亡和增殖的动态变化以及二者的关系,以揭示生精障碍热激后生精细胞恢复的机制。

材料与方法

1. 主要试剂与仪器:TUNEL 凋亡检测试剂盒(Roche 公司);兔抗大鼠 Ki67 单克隆抗体(ab16667, Abcam 公司);兔超敏二步法免疫组化检测试剂(PV-9001,北京中杉金桥公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司);石蜡切片机(Leica 公司);鼓风干燥箱(DHG-9055A,上海一恒科学仪器有限公司);光学显微镜(Olympus 公司,BX53)。

2. 动物分组处理及取材:36 只 60 天龄雄性 Wistar 大鼠,北京维通利华公司实验动物中心提供[实验动物许可证号:SCXK(京)2012-0001]。随机分为正常对照组与热激组共 6 组,热激组按热处理后 1、2、3、4、5 天随机分成 5 个亚组($n=6$)。适应性饲养 2 天后,大鼠睾丸 43℃(正常对照组 22℃)恒温水浴 20min,分别在处理后 1、2、3、4、5 天摘取睾丸,放入 Modified Davidson's Fluid 固定液中固定^[12]。

3. 主要方法:(1)HE 染色:睾丸组织固定 48h,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片。HE 染色,光镜下观察睾丸组织形态变化。(2)免疫组织化学法检测睾丸组织中 Ki67 的表达:石蜡切片,脱蜡至水,按兔超敏二步法免疫组化法检测蛋白 Ki67。具体步骤按试剂盒说明书进行。判定标准:以细胞核着棕褐色颗粒为 Ki67 阳性表达。光镜下观察、拍照,所有标本均在 Image-Pro Plus V6.0 图像分析系统内在相同的放大倍数下分析,每组选取 3 只大鼠的睾丸组织切片,共计数 15 个视野,计算每个视野平均每个曲细精管 Ki67 的平均阳性个数。(3)TUNEL 法检测细胞凋亡:石蜡切片,脱蜡至水,按 TUNEL 试剂盒(Roche 公司)操作,阴性对照组仅加荧光素标记的 dUTP 液。判定标准:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞。光镜下观察、拍照,所有标本均在 Image-Pro Plus V6.0 图像分析系统内在相同

的放大倍数下分析,每组选取 3 只大鼠的睾丸组织切片,共计数 15 个视野,计数每个视野平均每个曲细精管 TUNEL 阳性个数。

4. 统计学方法:全部实验数据采用 SPSS 21.0 软件系统进行统计学分析。数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布且方差齐的组间比较选择单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 热激后睾丸组织形态变化:光镜下观察,对照组大鼠睾丸各级生精细胞在生精上皮中紧密而有序地排列,曲细精管边界完整清楚(图 1A)。热处理后 1 天,睾丸生精上皮变薄,生精细胞排列松散、彼此分离,少数严重者脱落形成空泡样变化(图 1B)。2 天组,睾丸生精细胞排列紊乱、数量减少,有大量空泡生成,有多核巨细胞形成(图 1C)。3 天组,睾丸生精细胞数量减少,生精细胞层数减少(图 1D)。4 天组,睾丸曲细精管萎缩变形,出现巨大多核巨细胞,生精细胞散乱、脱落形成大量空泡(图 1E)。5 天组,睾丸整体生精细胞仍严重减少,管腔中未见多核巨细胞,部分管腔仅剩支持细胞,但有部分曲细精管开始恢复,管腔内生精细胞数量和层数增加,特别是早期生精细胞,精原细胞和精母细胞增多明显(图 1F)。

2. 热激后睾丸组织中生精细胞凋亡情况:TUNEL 阳性细胞细胞核中有棕黄色颗粒,正常对照组曲细精管中很少见到凋亡细胞(图 2A)。热激后生精细胞凋亡逐渐增多,第 2 天凋亡信号最强(表 1),且主要定位在初级精母细胞(图 2B、图 2C)。随后开始逐渐降低,热激第 3 天和第 4 天的曲细精管内可见凋亡的巨核细胞(图 2D、图 2E)。

3. 热激后睾丸组织中 Ki67 表达情况:光镜下观察细胞核着棕褐色颗粒为 Ki67 阳性表达,主要定位于精原细胞和精母细胞。正常对照组曲细精管中 Ki67 高表达(图 3A)。热激 1 天组,曲细精管基本无 Ki67 表达(图 3B)。热激后 2~5 天,曲细精管内 Ki67 表达开始增加,第 5 天时 Ki67 表达显著增多(图 3C~图 3F)。

4. 热激后各组 TUNEL 与 Ki67 及其比值的变化:热激 1 天后 TUNEL 凋亡阳性量明显增加,热激 2 天后达到高峰,随后开始下调。与正常对照组比较,各热激组 TUNEL 凋亡阳性量差异均有统计学意义($P < 0.01$)。正常对照组的 Ki67 高表达,热激后各组的 Ki67 阳性表达量显著低于正常对照组($P < 0.01$);但

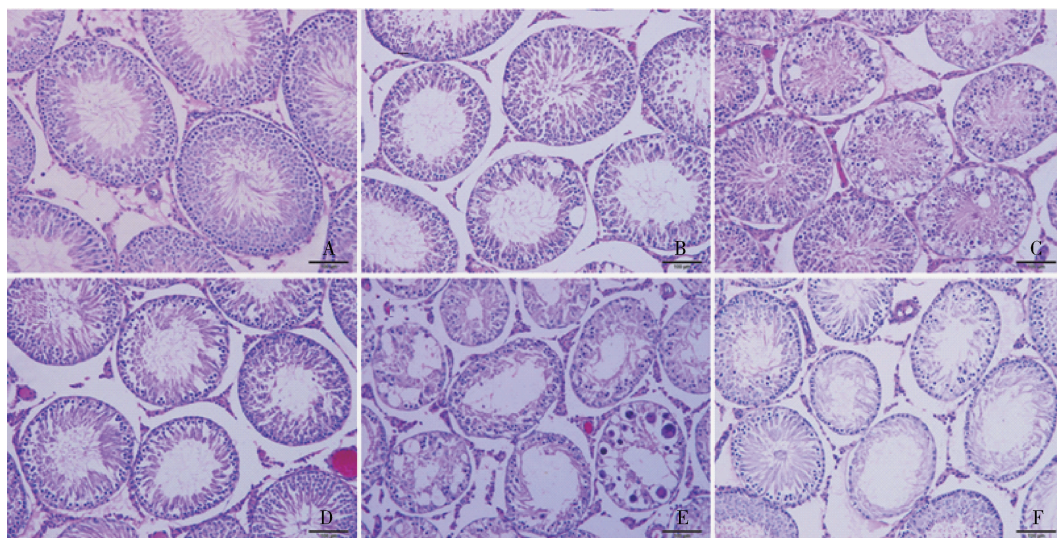


图1 各组大鼠睾丸组织形态学变化比较(HE, 10 × 20)

A. 对照组; B. 1 天组; C. 2 天组; D. 3 天组; E. 4 天组; F. 5 天组

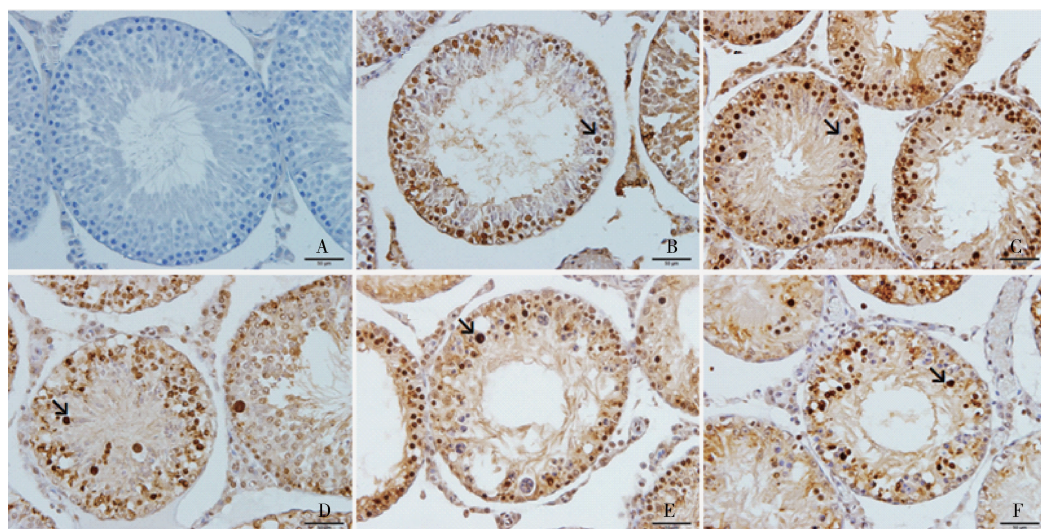


图2 各组生精细胞凋亡情况(DAB, 10 × 40)

A. 对照组; B. 1 天组; C. 2 天组; D. 3 天组; E. 4 天组; F. 5 天组

与热激后 1 天相比,热激后 2~5 天 Ki67 阳性表达量逐渐增加,但直至第 5 天仍未达到正常组水平;从各组 Ki67 与 TUNEL 的比值来看,正常组比值高达 74 倍,表明正常时生精细胞以增殖为主,少有凋亡。热激后比值显著下降($P < 0.01$),热激 1~2 天组二者比值小于 1,说明凋亡显著大于增殖;热激 3 天组二者比值几乎等于 1,说明凋亡与增殖过程基本相等;热激 4 天组二者比值大于 1,至 5 天组增殖达到凋亡的 3.06 倍,说明增殖趋势大于凋亡(表 1)。

讨 论

睾丸局部高温被世界卫生组织公认为对男性生

殖能力有强大破坏作用的因素之一,是男性不育的重要危险因素。生殖细胞高度活跃的有丝分裂活动,使它们更容易受到热激^[13]。高温诱发了以精母细胞为主的各级生精细胞的凋亡,从而使得精子发生过程障碍。但既往研究主要集中在热激后一段时间内生精细胞的变化,观察间隔时间长,因此不能捕捉到曲细精管内生精细胞在热激后早期连续的变化过程。本实验研究了雄性大鼠热激后 1~5 天内生精细胞的连续变化,发现正常大鼠曲细精管内生精细胞增殖活跃,热激后第 1~2 天期生精细胞凋亡明显,增殖受到明显抑制;热激后第 4 天开始生精细胞增殖活性增

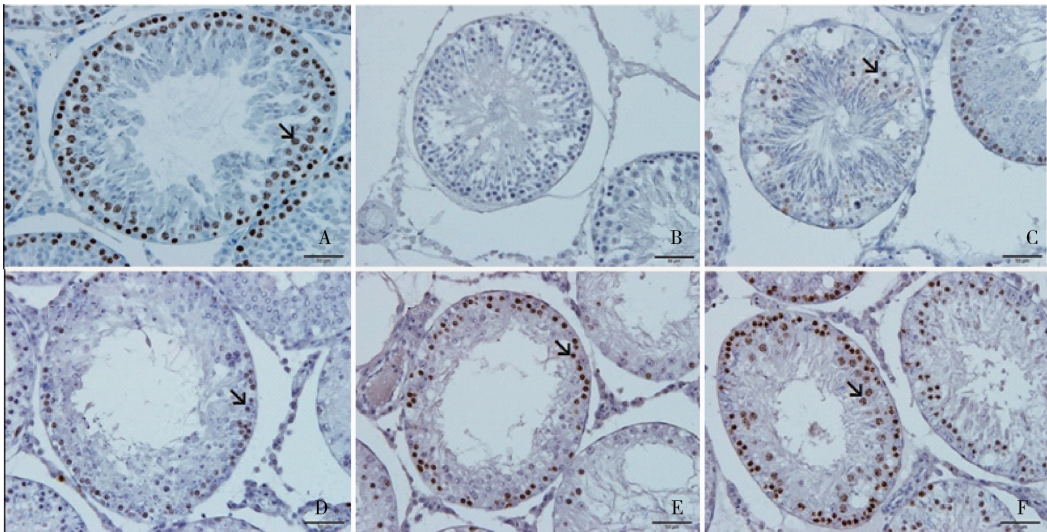


图3 热激对各组大鼠睾丸组织 Ki-67 表达分布的影响(免疫组化,10×40)
A. 对照组;B. 1 天组;C. 2 天组;D. 3 天组;E. 4 天组;F. 5 天组

表 1 各组睾丸组织 Ki67 和 TUNEL 及其 比值变化 (n = 15, $\bar{x} \pm s$)			
组别	Ki67	TUNEL	Ki67 /TUNEL
对照组	83.473 ± 6.579	0.043 ± 0.090	74.067 ± 154.79
1 天组	0.281 ± 0.091 *	22.829 ± 2.271 *	0.013 ± 0.004 *
2 天组	16.969 ± 3.983 *	35.318 ± 4.810 *	0.481 ± 0.096 *
3 天组	24.707 ± 3.313 *	26.421 ± 2.899 *	0.947 ± 0.177 *
4 天组	29.480 ± 4.098 *	20.471 ± 2.031 *	1.448 ± 0.203 *
5 天组	55.797 ± 10.046 *	18.181 ± 2.104 *	3.067 ± 0.457 *

与对照组比较, * P < 0.01

加,而凋亡信号减弱,导致了曲细精管生精过程开始恢复。

从 HE 染色结果观察,曲细精管内生精细胞的脱落、缺失,甚至整个曲细精管内只留有支持细胞的形态,在热激后第 4 天最严重,第 5 天部分曲细精管内已有少量生精细胞生成。而采用 TUNEL 法检测发现,正常对照组中偶发 TUNEL 信号,表明正常的生精过程中也存在少量生精细胞的自发凋亡。热激后各组的 TUNEL 信号显著增加,第 2 天达到高峰,随后第 3~5 天凋亡信号逐渐减少。TUNEL 是利用细胞凋亡时染色体 DNA 双链断裂产生大量的 3'-OH 末端标记检测,因此先有细胞 DNA 的断裂,之后才会有整个生精细胞的缺失,导致曲细精管形态的变化结果滞后于 TUNEL 检测。

笔者以往研究发现,雄性大鼠睾丸热激后 Hsp70 瞬间高表达,提示 Hsp70 在热激凋亡的早期中发挥重要作用^[14]。本实验中热激后 TUNEL 信号增加,在第 2 天达到峰值,这可能与热休克蛋白 Hsp70 的高表达

有关。课题组另外一项研究结果提示,热激后导致的生精细胞凋亡与线粒体凋亡通路中 Bcl-2 与 Bax 的变化有关^[14]。因此笔者推测在本实验中生精细胞凋亡出现先增加后减弱的变化趋势,可能与高表达的 Hsp70 诱导下,导致 Bcl-2/Bax 增加,以对抗热激产生的凋亡有关。

Ki67 是一种增殖细胞相关的核抗原,与有丝分裂密切相关,为细胞增殖的标志物^[10]。本研究发现,正常组 Ki67 高表达,表明正常的生精细胞处于一个从精母细胞到精子细胞连续分裂增殖活跃的过程。热激后各组的 Ki67 表达显著下降,低于正常组。热激 1 天组难以见到 Ki67 表达,热激 2~5 天组 Ki67 表达逐渐增加,说明热激后在生精细胞凋亡的同时,生精细胞已经开始恢复增殖活性,但显著弱于凋亡的力量,因此形态上仍以生精细胞脱落为主。热激后第 4、5 天,Ki67 表达显著增高,特别是热激后 5 天组部分曲细精管已有 1~2 层生精细胞有 Ki67 表达,主要集中在早期的精原细胞和精母细胞,表明新的生精周期已经开始。这也解决了课题组以前研究中的一个困惑,即曲细精管内少量的生精细胞并不是热激后正经历凋亡残存的细胞,而是从生精上皮重新生发的具有增殖活性正常的生精细胞。

为了进一步探讨热激后生精细胞的凋亡与增殖之间的关系,本实验比较了各组平均每个曲细精管内 Ki67 与 TUNEL 的比值,发现热激 1~2 天组二者比值小于 1,说明凋亡显著大于增殖;热激 3 天组二者比值几乎等于 1,说明凋亡与增殖过程基本相等;热

激 4 天组二者比值大于 1, 说明增殖开始大于凋亡, 虽然仍然有凋亡的细胞, 但生精细胞的恢复已经占上风。结合本课题其他研究结果可以看出, 凋亡过程从热激后可以一直持续至第 15 天, 逐渐减缓趋弱, 时间周期较长^[15]。而增殖的细胞从热激后 1 天就开始有, 至第 3 天则超过凋亡细胞的数量, 直至生精周期完全恢复。

综上所述, 本研究通过连续观察热激后 1~5 天内曲细精管内生精细胞的凋亡与增殖的变化, 发现热激等高温造成的生精障碍与生精细胞凋亡有关, 同时生精细胞的增殖受到抑制进一步加剧了生精障碍。热激导致生精细胞凋亡的过程是可逆的, 本实验结果提示这种可逆性与生精细胞增殖活性的增强密切相关, 因此在预防和治疗高温造成男性生精障碍时, 可以通过加强促增殖方面的干预, 以加快凋亡细胞的恢复。

参考文献

- Harrison R, Weiner J. Abdomino - testicular temperature gradients [J]. J Physiol, 1948, 18:256 - 262
- Ivell R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum [J]. Reprod Boil Endocrinol, 2007, 5:15
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, *et al.* Single exposure to heat induces stage - specific germ cell apoptosis in rats; role of intratesticular testosterone on stage specificity [J]. Endocrinology, 1999, 140:1709 - 1717
- Jung A, Eberl M, Schill WB. Improvement of semen quality by nocturnal scrotal cooling and moderate behavioural change to reduce genital heat stress in men with oligoasthenoteratozoospermia [J]. Reproduction, 2001, 121:595 - 603
- Jung A, Schill WB, Schuppe HC. Genital heat stress in men of barren couples: a prospective evaluation by means of a questionnaire [J]. Andrologia, 2002, 34:349 - 355
- Lue YH, Lasley BL, Laughlin LS, *et al.* Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) [J]. J Androl, 2002, 23:799 - 805
- Paul C, Melton DW, Saunders PT. Do heat stress and deficits in DNA repair pathways have a negative impact on male fertility? [J]. Mol Hum Reprod, 2008, 14(1):1 - 8
- Paul C, Murray AA, Spears N, *et al.* A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice [J]. Reproduction, 2008, 136:73 - 84
- Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study [J]. Toxicology and Industrial Health, 2013, 29(2):99 - 113
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki - 67 protein: from the known and the unknown [J]. J Cell Physiol, 2000, 182(3):311 - 322
- Pei Y, Wu Y, Cao J, *et al.* Effects of chronic heat stress on the reproductive capacity of male Rex rabbits [J]. Livest Sci, 2012, 146(1):13 - 21
- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, *et al.* Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid [J]. Toxicologic Pathology, 2002, 30(4):524 - 533
- Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG. Studies on men's health and fertility [M]. New York: Springer Science, 2012, 149 - 178
- 何萌萌, 张婷婷, 马杰, 等. 热应激对大鼠睾丸影响的研究 [J]. 中日友好医院学报, 2015, 29(2):92 - 95
- 王丽君, 何萌萌, 朱春燕, 等. 热应激对大鼠睾丸 HSPs mRNA 表达的影响 [J]. 现代生物医学研究进展, 2015, 15(22):4201 - 4204
(收稿日期:2015 - 07 - 09)
(修回日期:2015 - 07 - 21)
- Thompson AM, Martin KA, Rzuwido EM. Resveratrol induces vascular smooth muscle cell differentiation through stimulation of SirT1 and AMPK [J]. PLoS One, 2014, 9(1):e85495
- Song R, Li WQ, Dou JL, *et al.* Resveratrol reduces inflammatory cytokines via inhibiting nuclear factor - kappaB and mitogen - activated protein kinase signal pathway in a rabbit atherosclerosis model [J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2013, 41(10):866 - 869
- Sun C, Zhang F, Ge X, *et al.* SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin - resistant conditions by repressing PTP1B [J]. Cell Metab, 2007, 6(4):307 - 319
(收稿日期:2015 - 03 - 04)
(修回日期:2015 - 03 - 09)
- Zhang Y, Liu Y, Wang T, *et al.* Resveratrol, a natural ingredient of grape skin: antiarrhythmic efficacy and ionic mechanisms [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(4):1192 - 1199
- Dong W, Wang X, Bi S, *et al.* Inhibitory effects of resveratrol on foam cell formation are mediated through monocyte chemotactic protein - 1 and lipid metabolism - related proteins [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(5):1161 - 1168
- Tomayko EJ, Cachia AJ, Chung HR, *et al.* Resveratrol supplementation reduces aortic atherosclerosis and calcification and attenuates loss of aerobic capacity in a mouse model of uremia [J]. J Med Food, 2014, 17(2):278 - 283

(上接第 10 页)