文章编号:1000-5404(2007)01-0065-03

论著

低氧对大鼠睾丸支持细胞形态结构与存活率的影响

吕伟宏,田怀军 (第三军医大学高原军事医学系高原军队卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨低氧对体外培养大鼠睾丸支持细胞的影响。**方法** 应用大鼠睾丸支持细胞与生精细胞共培养系统,观察低氧条件下支持细胞的存活数,考马斯亮蓝染色后细胞骨架变化以及生精细胞脱落数。**结果** 在低氧条件下,支持细胞存活率显著降低,支持细胞细胞骨架出现松弛、回缩等现象;脱落生精细胞数随低氧时间的延长而增加,有明显时间-效应关系。**结论** 低氧可引起大鼠睾丸支持细胞形态结构及功能的损伤。

关键词:低氧;支持细胞;细胞骨架
中图法分类号:R322.64;R329.24;R364.4 **文献标识码**:A

Effects of hypoxia on morphology and survival of rat Sertoli cells

LU Wei-hong, TIAN Huai-jun (Department of High Altitude Military Hygiene, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of hypoxia on cultured rat Sertoli cells *in vitro*. Methods In a Sertoli-germ cells co-culture system, the effect of hypoxia on the morphological characteristics of Sertoli cells were observed, including the number of Sertoli cells, the cytoskeleton changes after Coomassie brilliant blue staining and the detachment of germ cells. Results The loosing and retracting of cytoskeleton in Sertoli cells was found. Both survival rate of Sertoli cells and detachment of germ cells showed time-response relation. Conclusion Hypoxia damages Sertoli cells.

Key words: hypoxia; Sertoli cell; skeleton

研究证实,低氧是影响男性生殖功能的重要因素,积极研究缺氧对生殖机能的影响及其机制,以寻求改善及防治方案,有利于保护该环境下生活和工作人群的生殖健康,提高生活质量。已有研究表明,低氧影响生精细胞的发育及精子的产生[1,2],显著抑制了精子数量和活力。支持细胞是生精上皮中唯一与生精细胞相接触的细胞,在精子的发生中发挥重要作用。任何影响支持细胞发育、损伤支持细胞功能的因素都将会对精子发生产生严重影响。本实验以支持细胞和生精细胞体外共培养系统为实验对象,研究低氧对支持细胞的影响,为进一步探讨低氧对雄性生殖系统的影响机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

16~22日龄SPF级雄性SD大鼠6只,体质量100~130 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 主要设备试剂

DMEM/F12培养基(Hyclone公司),胎牛血清(民海生物),胰蛋白酶(1:250,Amersco公司),胶原酶Ⅰ(Sigma公司),考马斯亮蓝G250(Biomol公司)。

1.3 支持细胞分离与培养

参照金向阳等[3]介绍的方法并略作改进:颈椎脱臼法处死大鼠,无菌取出睾丸,D-Hanks液清洗后去除被膜,将精曲小管剪成1 mm^3碎块,0.25%胰蛋白酶(3 ml/只)34 ℃水浴振荡消化20~30 min,至组织碎块变成线索状。加入少许血清终止消化,1 000 r/min离心5 min,共3次。用0.1%胶原酶Ⅰ(3 ml/只大鼠)34 ℃水浴振荡消化20~30 min,经100目滤网过滤,滤液800 r/min离心5 min,共3次。培养液悬浮细胞,吹打均匀,0.4%台盼蓝染色计数细胞成活率大于95%。用含10%血清培养液调整细胞浓度,接种于24孔培养板。在34 ℃5% CO_2培养箱中培养24 h,Feulgen染色法鉴定支持细胞。随后分为常氧和低氧2个组。常氧组置5% CO_2培养箱中,低氧组置于三气培养箱中,34 ℃,5% CO_2,5% O_2条件下,分别培养6、12、24、48 h。

1.4 细胞计数

细胞经低氧培养后,滴加数滴胰酶消化1 min,加入0.4%台盼蓝染液在倒置显微镜下计数约200个细胞,计数存活细胞。

1.5 支持细胞细胞骨架染色

细胞经低氧条件培养后,从培养皿中取出细胞盖片,进行考马斯亮蓝染色[4],观察细胞骨架的变化。

作者简介:吕伟宏(1975-),女,山东省栖霞县人,硕士研究生,医师,主要从事环境卫生学方面的研究。电话:13452872553,E-mail:lwh8586@126.com

收稿日期:2006-01-20;修回日期:2006-03-21

1.6 生精细胞脱落计数

细胞低氧培养后，按时点收集各孔培养液进行细胞计数，以6孔的平均脱落细胞数计。

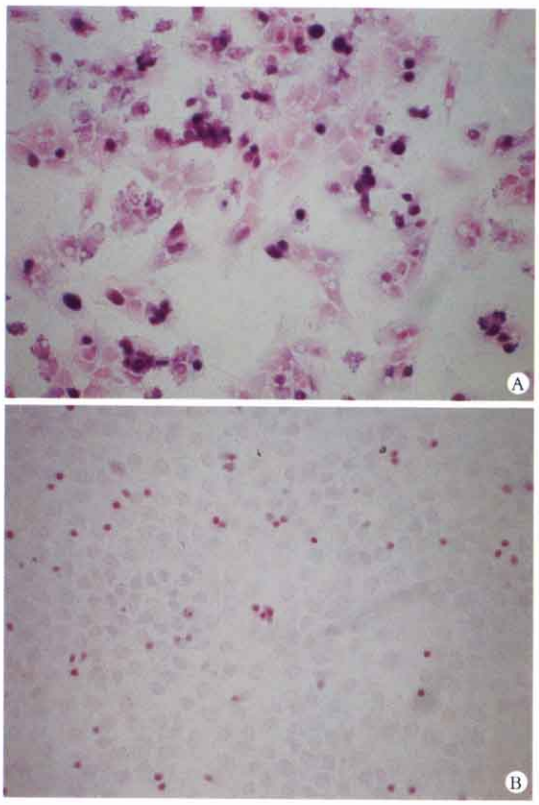
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 12.0统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 离体培养的支持细胞形态观察

光镜下观察到刚接种的支持细胞体积较小，细胞质呈圆形或椭圆形，折光性强。24 h贴壁后，形态由圆形椭圆形逐渐变为不规则的多角形，折光性减弱，核仁明显，见图1A。经Feulgen染色可见到特异的卫星核小体。见图1B。



A：HE染色；B：Feulgen染色

图1 培养24 h大鼠睾丸支持细胞的形态观察 （×200）

2.2 细胞存活数

低氧培养6、12、24、48 h后，支持细胞存活数随着培养时间的延长而明显减少。在12 h，低氧组与常氧组相比差别显著（$P<0.05$），24、48 h与常氧组和低氧6 h差别非常显著（$P<0.05$，$P<0.01$），见表1。

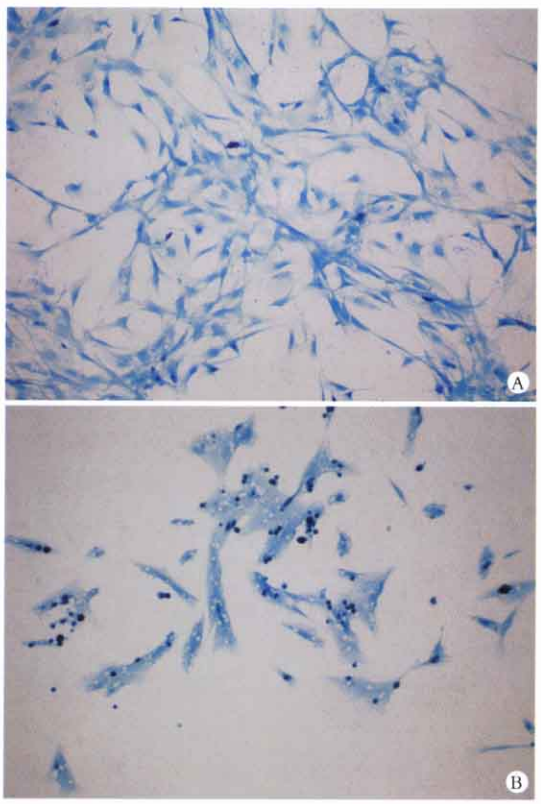
表1 不同时间低氧对支持细胞存活数的影响（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
常氧组	196.833±1.169	195.666±2.250	195.000±1.789	193.667±1.211
低氧组	195.333±1.211	190.333±2.503[b]	182.500±2.168[ac]	161.500±1.870[ac]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与常氧组比较；c：$P<0.05$，与低氧6 h比较

2.3 细胞骨架观察

考马斯亮蓝染色显示，常氧组培养片中，淡染的支持细胞生长均匀，自然伸展并相互连接，细胞骨架以纵向为主分布均匀（图2A）。低氧组细胞质骨架逐渐松弛回缩，乃至断裂、消失，分布紊乱，生精细胞脱落，并随培养时间的延长而加重（图2B）。



A：常氧；B：低氧

图2 培养48 h支持细胞细胞骨架的形态观察 （考马斯亮蓝×200）

2.4 脱落生精细胞计数

脱落生精细胞数随低氧培养时间的延长而增加。24 h与48 h时低氧组与常氧组比较有显著性差异（$P<0.05$），见表2。

表2 不同时间低氧对脱落生精细胞数的影响（$\times 10^4$/ml）（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	6 h	12 h	24 h	48 h
常氧组	6.583±0.465	8.042±0.332	15.083±0.342	18.083±0.342
低氧组	7.125±0.379	12.875±0.542[a]	24.958±0.401[ab]	36.125±0.737[ab]

a：$P<0.01$，与常氧组比较；b：$P<0.05$，与低氧6 h比较

3 讨论

研究证实，低氧是影响男性生殖功能的重要因素[5,6]。低氧对男性生殖机能的影响表现在多个方面。对生殖细胞的形态结构，生殖内分泌，生殖系统生化代谢，以及精子发生成熟释放等均有影响。生精细

胞生长发育和转化以及精子的数量和质量是评价男性生殖功能的一个重要方面。已有研究表明，低氧影响生精细胞的发育和精子的发生，显著抑制了精子数量和活力，并可观察到各级生精细胞减少及排列紊乱。这些结果表明，精子的产生释放过程受到干扰。精子发生是一个极其复杂和精细的过程，该过程受多种因素的调节，其中睾丸支持细胞发挥着重要的作用。

支持细胞是生精上皮中唯一与生精细胞相接触的细胞，除对生精细胞起支持和营养作用外，还能分泌多种物质，包括转运蛋白类、调节蛋白类、生长因子类、类固醇类以及其他一些活性因子，这些物质在精子发生过程中起着重要的调控作用[7,8]。另外支持相邻细胞形成血睾屏障的重要组成部分，可阻止血液中很多有害物质进入生精小管以保护减数分裂后生精细胞不受外来毒物的侵袭。精子的发生是在支持细胞调节下生精细胞程序分化的结果，任何损害支持细胞活性或功能的因素势必对精子发生产生影响。

本研究结果显示，在低氧培养条件下，支持细胞的存活数下降，并随时间延长而明显降低，与常氧组相比有显著差别。支持细胞数量减少，必然会导致其对生精作用的减弱。考马斯亮蓝显示支持细胞细胞骨架在低氧条件下受到损害，并随时间延长而加重。同时，低氧引起生精细胞脱落，与常氧组相比，脱落的生精细胞数明显增多，亦随培养时间延长而加重，在 12、24、48 h 组均有显著差异。此结果与骨架改变相一致，表明支持细胞对生精细胞的支持作用明显降低。

活的真核细胞中，骨架系统与细胞运动、形态维持、细胞内物质转运、细胞产物的分泌、细胞分裂时的染色体运动有关。对支持细胞细胞骨架的研究揭示：支持细胞为高度不对称性细胞，其内微管丰富呈纵向分布，微管破坏时细胞趋于变圆或接近对称形状。支持细胞的微丝也很丰富，这些结构与生精细胞周期中的形状变化又重要关系。由于支持细胞对各级生精细胞有广泛接触并提供营养、激素和形状的支持，其骨架的破坏势必导致生精细胞的脱落。多项研究表明支持细胞结构破坏与生精细胞脱落有相关关系，与本研究结果一致[9]。鉴于支持细胞在精子发生过程中所具有的重要作用，低氧所致支持细胞数量减少及细胞骨架损害将会直接影响到生精细胞的数量和质量并最终影响精子的发生。

本研究结果显示，低氧对支持细胞的损害是其对精子发生产生影响的机制之一，为进一步探讨高原低氧环境影响男性生殖功能的机制提供了依据。

参考文献：

[1] Heath D, Williams D R. Man at high altitude[M]. 2nd ed. London and New York: Churchill Livingston, 1981: 255 - 267.

[2] Garcia-Hjarles M A. Sperm count and seminal biochemistry of high altitude inhabitants and patients with chronic altitude sickness[J]. Arch Biol Med Exp (Santiago), 1989, 22(1): 61 - 67.

[3] 金向阳，高　鹏，常元勋，等. 大鼠睾丸支持细胞和间质细胞分离和培养方法的研究[J]. 卫生毒理学杂志，1996，10(1)：54 - 55.

[4] 鄂　征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995：153 - 155.

[5] Vitzthum V J. The home team advantage: reproduction in women indigenous to high altitude[J]. J Exp Biol, 2001, 204(Pt 18): 3141 - 3150.

[6] 马　勇，张西洲，刁　斌，等. 高原边防军人婚姻质量调查与分析[J]. 高原医学杂志，2001，11(1)：28 - 30.

[7] Griswold M D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis[J]. Biol Reprod, 1995, 52(2): 211 - 216.

[8] Meehan T, Schlatt S, O'bryan M K, *et al*. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH[J]. Dev Biol, 2000, 220(2): 225 - 237.

[9] Russell L D, Wong V. Three dimensional reconstruction of a rat Stage V Sertoli cell: size, configuration, and general relationships to germ cell[J]. J Androl, 1981, 2: 24 - 25.

（编辑　王小寒）

《第三军医大学学报》的总被引频次和影响因子持续升高

2006 版中国科技期刊引证报告（核心版）的数据显示，《第三军医大学学报》2005 年度的总被引频次为 1477 次（2004 年度为 1226 次），位列 1652 种统计源期刊的 116 位；影响因子为 0.381（2004 年度为 0.333），位列 1652 种统计源期刊的 642 位。在 42 种医科大学学报中，《第三军医大学学报》的总被引频次位列第二，影响因子位列第九。