基础研究 文章编号：0253-3626（2011）07-0814-04

镉对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白、E-钙黏蛋白表达及血睾屏障的影响

廖晓岗，石之虎，邹 聪，毛胜艳，范京川
（重庆医科大学生命科学研究院，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨镉（Cadmium）对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白、E-钙黏蛋白表达和血睾屏障的影响。方法：21 只 6 周龄雄性 SD 大鼠随机分为单纯镉组（0.1%氯化镉腹腔内注射，1 mg/（kg·bw），每周连续注射 5 d，处理后 1、2、3、4 周取材）和对照组（腹腔内注射等量生理盐水）；镧示踪组和镉加镧组（镉剂量同上，1 周取材），各实验组及对照组均为 3 只动物。取睾丸作光镜免疫组化和图像分析、血睾屏障超微结构及镧示踪观察。结果：波形蛋白阳性产物主要在支持细胞近基室腔的胞浆中表达，并向曲细精管管腔呈辐射状延伸；E-钙黏蛋白阳性产物主要定位于生精上皮近腔室的支持细胞和部分生精细胞胞浆中。镉处理后两种蛋白阳性产物表达的平均光密度值明显降低，支持细胞胞质特化区和紧密连接破坏。镉加镧处理组硝酸镧透过支持细胞紧密连接间隙。结论：镉减弱大鼠睾丸支持细胞波形蛋白和 E-钙黏蛋白的表达，造成支持细胞血睾屏障的损伤。

【关键词】镉；支持细胞；硝酸镧；波形蛋白；E-钙黏蛋白
【中国图书分类法分类号】R322.64 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-21

Effect of the cadmium on the expression of vimentin & E-cadherin in sertoli cell and the ultrastructure of blood-testis barrier in rats

LIAO Xiao-gang, SHI Zhi-hu, ZOU Cong, MAO Sheng-yan, FAN Jing-chuan
(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of the cadmium (Cd) on the expression of vimentin (V) & E-cadherin (E-cad) in Sertoli cell (Sc) and the ultrastructure of blood-testis barrier (BTB) in rats. *Methods*: 21 SD male rats were randomly divided into Cd group (rats of different interval from 1 w to 4 w time were intraperitoneally injected with 0.1% $CdCl_2$, 1 mg/(kg·bw), 5 days a week) and control group (rats were intraperitoneally injected with equal dosage of normal saline); lanthanum nitrate (La) tracing group and Cd+La group. The testes were respectively studied by light, electron microscope and immunohistochemistry of V & E-cad and by semi-quanitatively image analysis. *Results*: The positive product of V was expressed in cytoplasm of Sc, and elongated radially to lumens in seminiferous tubules. But, the positive product of E-cad was localized mainly in cytoplasm of Sc and some spermatogenic cells. After Cd treatment, the average optical density (AOD) of V and E-cad were decreased obviously; the ultrastructure damage of BTB and ectoplasmic specializations (Es) in Sc were observed. The La-tracing showed that tight junction (TJ) of Sc was infiltrated by La in Cd+La group. *Conclusion*: Cd decreases the expression of V and E-cad in Sc and damages BTB of Sc in rats.

【Key words】cadmium; sertoli cells; lanthanum nitrate; vimentin; E-cadherin

作者介绍：廖晓岗（1958-），男，副教授，硕士，
研究方向：生殖生物学与细胞超微病理学。

基金项目：重庆医科大学校级课题基金资助项目（编号：XBYB2008058）。

[J].J Cell Biol, 1996, 133(5): 1123-1137.

[12] Topol L, Jiang X, Choi H, et al. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation[J].J Cell Biol, 2003, 162(5): 899-908.

[13] Liang H, Chen Q, Coles A H, et al. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue[J].Cancer Cell, 2003, 4(5): 349-360.

[14] Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling[J].Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 131-139.

[15] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J].Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[16] Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells[J].Nature, 1999, 398(6726): 422-426.

（责任编辑：冉明会）

镉(Cadmium)是广泛的环境和工业污染毒物，在人体可作用于多个系统和器官，其中生殖系统对镉的毒性较为敏感。支持细胞(Sertoli cell)是生精上皮中唯一与生精细胞相接触的细胞，其参与形成血睾屏障(Blood-testis barrier)，创造稳定的生精内环境。支持细胞的骨架蛋白、支持细胞间和支持细胞与生精细胞间的连接及连接自身表达的相关蛋白对精子发生有重要作用[1-3]。本研究在我们体外实验结果基础上[3]，运用免疫组织化学、生物医学图像自动分析以及常规电镜和镧示踪等方法，进一步探讨镉对在体大鼠睾丸支持细胞波形蛋白、E-钙黏蛋白表达的影响及血睾屏障超微结构的损伤。

1 材料与方法

1.1 动物分组及镉处理

参照文献[4]报道，21 只清洁级 6 周龄雄性 SD 大鼠，平均体重(180.7±2.2) g，由重庆医科大学实验动物中心提供，随机分成单纯镉组(1、2、3、4 周取材)和对照组；镧示踪和镉加镧组(1 周取材)。不同实验及对照组均为 3 只动物。镉处理剂量为 0.1%氯化镉腹腔内注射[1 mg/(kg·bw)，每周连续注射 5 d]，对照组腹腔内注射等量生理盐水；氯化镉系天津市东丽区东大化工厂出品，批号 2000118，分析纯，纯度 99%。0.1%氯化镉配制：100 ml 双蒸水溶解 100 mg 氯化镉。

1.2 硝酸镧灌注

4%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后，切开腹腔暴露腹主动脉，将压力泵针刺入腹主动脉，结扎双侧髂总动脉，同时剪断回流的下腔静脉。调制流量为 20 ml/min，先以生理盐水冲净睾丸内血液，然后换至镧醛溶液，继续灌注约 100 ml 至睾丸发白变硬，切下睾丸放入 4%戊二醛小瓶中继续固定 2 h，其余步骤按常规透射电镜样本制作方法。硝酸镧系重庆博艺化学试剂有限公司出品，批号 20070401。镧醛溶液配制：硝酸镧 4 g，二甲胂酸钠 4.28 g，多聚甲醛 8 g，戊二醛 12 ml(50%)溶入双蒸水 200 ml，pH 调至 7.3~7.5，使终浓度为 2%硝酸镧，0.1 mol/L 二甲胂酸钠，4%多聚甲醛，3%戊二醛。

1.3 石蜡包埋及免疫组化(SP 法)

同上方法麻醉大鼠，手术暴露左侧睾丸，用 1 ml 注射器针尖沿左侧睾丸上部一圈刺数个小孔，白膜下注入固定液(苦味酸:甲醛:冰醋酸，15:5:1)，直至整个睾丸充满为止。固定 20 min 后取下睾丸，用清洁双面刀片迅速横切成约 3 mm 厚睾丸组织块，放入盛有固定液的小瓶中。样本常规脱水、石蜡包埋后作 5 μm 厚连续切片，二甲苯和酒精脱蜡至水处理后用于免疫染色。具体步骤按免疫组化试剂盒说明书操作：波形蛋白采用消化修复抗原，滴加修复液 20 min，用 0.5%TritonX-100 打孔，20 min，3% H_2O_2 室温孵育 15 min，以消除内源性过氧化物酶的活性，磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline，PBS)洗 3 次，正常山羊血清封闭 15 min，倾去血清，滴加小鼠抗大鼠波形蛋白一抗(1:200，购自武汉博士德公司)、4℃湿盒过夜(14 h)，PBS 冲洗，加入羊抗鼠 IgG(购自北京中杉公司)室温下 30 min，加辣根酶标记链酶卵白素工作液，室温下 20 min，PBS 浸洗后 DAB 显色 3 min，常规复染、封片、观察。阴性对照组用 PBS 代替一抗。E-钙黏蛋白采用微波热修复，将组织切片浸入枸橼酸钠微波煮沸 10 min，室温自然冷却。一抗为兔抗鼠 E-钙黏蛋白(1:150，购自武汉博士德公司)，二抗为羊抗兔 IgG(购自北京中杉公司)，其余步骤同上。阴性对照组用 PBS 代替一抗。

1.4 图像分析

光镜下(×400)每组拍摄 15 张免疫组化照片(每只动物随机拍摄 5 视野)。对照及单纯镉处理后不同时间段的波形蛋白、E-钙黏蛋白表达结果共 10 组，150 张照片。用北航 CM2000 生物医学图像分析系统对所摄照片的阳性产物进行平均光密度值分析。

1.5 电镜观察

右侧睾丸白膜下注入 4%戊二醛原位固定 20 min，取下睾丸按常规方法制成约 1 mm^3 组织块，置 4%戊二醛中继续固定 2 h，1%四氧化锇后固定 1 h，常规酒精和丙酮梯度脱水，环氧树脂 618# 包埋、聚合，制备 70 nm 厚超薄切片，醋酸铀和枸橼酸铅染色，H-7500 型电镜观察。

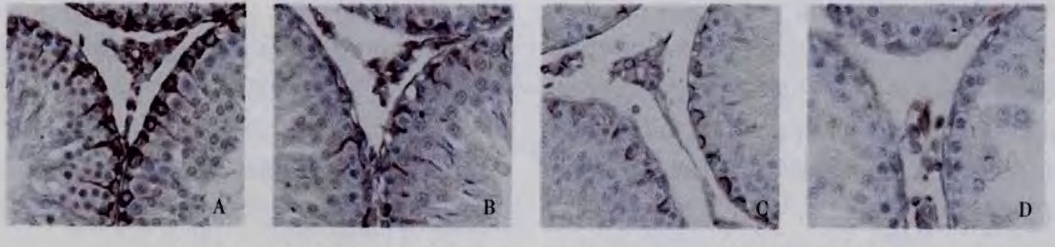
1.6 统计学处理

平均光密度值以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，数据采用 SAS 8.0 统计软件进行方差分析和 LSD 法进行两两比较。

2 结 果

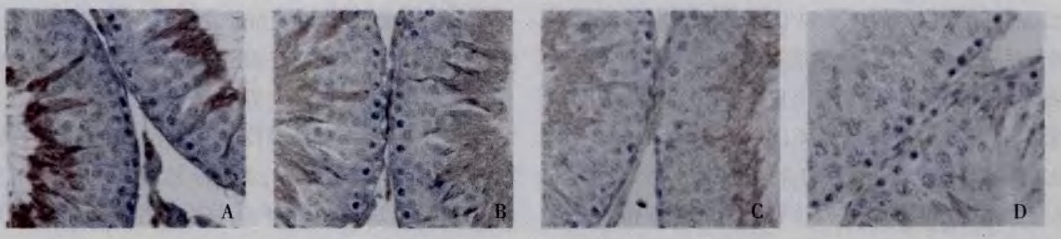
2.1 波形蛋白表达及图像分析

波形蛋白阳性产物为棕黄色，主要在支持细胞靠近基室腔的胞浆中表达，并向曲细精管管腔呈辐射状延伸(图 1A)。



A、B、C、D 分别代表对照组、镉 1 周组、镉 2 周组、镉 4 周组阳性产物表达情况

图 1 曲细精管支持细胞波形蛋白免疫组化染色(SP 法，DAB 显色，Bar=50 μm)



A、B、C、D 分别代表对照组、镉 1 周组、镉 2 周组、镉 4 周组阳性产物表达情况

图 2　曲细精管支持细胞 E- 钙黏蛋白免疫组化染色（SP 法，DAB 显色，Bar=50 μm）

镉处理后 1 周，阳性产物表达明显减弱（图 1B），随着染镉时间延长，呈辐射状延伸的阳性产物变短，甚至消失（图 1C，1D）。波形蛋白表达总模型 F=424.85，P<0.000 1，总模型差异有统计学意义，用 LSD 法进行两两比较发现，波形蛋白的 5 个组间两两均有差异。各组波形蛋白阳性产物平均光密度值变化详见表 1。

2.2　E-钙黏蛋白表达及图像分析

E-钙黏蛋白阳性产物主要定位于曲细精管生精上皮近腔室的支持细胞胞浆和部分生精细胞胞浆中（图 2A），镉处理后 E-钙黏蛋白阳性产物表达亦减弱，且随着染镉时间延长，其表达强度呈进一步下降趋势（图 2B~2D）。E-钙黏蛋白表达总模型 F=468.94，P<0.000 1，总模型差异有统计学意义，用 LSD 法进行两两比较发现，E-钙黏蛋白的 5 个组间两两均有差异。各组 E-钙黏蛋白阳性产物平均光密度值变化详见表 1。

表 1　镉对支持细胞波形蛋白、E- 钙黏蛋白表达的影响

（平均光密度值）（$\bar{x}\pm s$）

组　别	波形蛋白	E-钙黏蛋白
镉 1 周	0.081 ± 0.009	0.079 ± 0.013
镉 2 周	0.068 ± 0.011	0.062 ± 0.019
镉 3 周	0.054 ± 0.010	0.049 ± 0.008
镉 4 周	0.034 ± 0.011	0.024 ± 0.006
对　照	0.189 ± 0.015	0.20 ± 0.011

2.3　电镜观察

常规透射电镜下支持细胞呈不规则锥体形，细胞底部紧贴基底膜，核大，核被膜有较深的凹陷，核内常染色质丰富而均匀，核仁明显（图 3A）。相邻支持细胞或支持细胞与生精细胞之间形成紧密连接，连接处两侧有丰富的内质网和（或）少许高尔基复合体，即特化区（图 3D）。镉处理后 1 周，支持细胞部分线粒体肿胀和少许髓样结构、空泡形成（图 3B），紧密连接间隙局部增宽（图 3E）；处理后 2~4 周，多数线粒体肿胀，局部胞质溶解，核轻度肿胀（图 3C），紧密连接间隙广泛打开，特化区内质网扩张明显（图 3F）。单纯镧示踪观察见高电子密度的硝酸镧进入正常曲细精管生精上皮基底室的间隙后被支持细胞间紧密连接所阻挡（图 3G）。镉加镧处理 1 周后，硝酸镧渗透并沉积在支持细胞间紧密连接处（图 3H），甚至进入曲细精管管腔内（图 3I）。

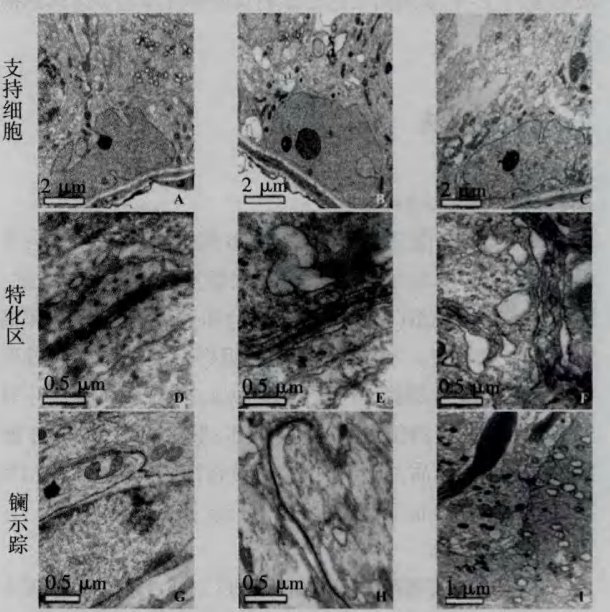


图 3　支持细胞和血睾屏障紧密连接的超微结构图像

3　讨　论

镉对人体的影响具有时效长、危害大、不易降解等特点，并可引起多系统、器官的损害[5]，研究表明睾丸是镉的靶器官，镉能损伤睾丸组织和减少精子发生[6]。

细胞骨架在维持细胞形状，促进细胞的运动和连接以及信号转导方面有着积极作用。支持细胞骨架蛋白，支持细胞之间和支持细胞与生精细胞间的连接及连接自身表达的相关蛋白在形成血睾屏障，创造稳定的生精内环境及为生精细胞提供营养、激素和形状的维持等方面扮演着重要作用。研究表明，波形蛋白具有“锚定”支持细胞的作用，可直接或间接的参与调节血睾屏障[7]，促进支持细胞-生精细胞间的物质和信息交换，精子释放等功能的发挥[8]。E-钙黏蛋白是一种钙离子依赖的并且介导细胞间相互粘附的蛋白分子。其既可通过与自身相同的钙黏蛋白分子结合而发挥作用，也可与微丝、中间丝相连接，形成复合体，锚定于支持细胞骨架上，从而与相邻细胞形成稳定连接。细胞外液中钙离子浓度升高，并在钙离子参与下可激活钙黏蛋白，促进连接形成[9]。

实验结果显示在体大鼠睾丸支持细胞中两种蛋白的阳性产物在定位上有明显差异，波形蛋白阳性产物主要定位于支持细胞靠近基室腔的胞浆中，而 E-钙黏蛋白阳性产物则多定位于曲细精管生精上皮近腔室的支持细胞和部分生精细胞胞浆中。Cyr DG 等[10]报道，E-钙黏蛋白在大鼠睾丸中的表达和定位与年龄相关，出生 14、21、37、42、56、91 d 的大鼠睾丸中，E-钙黏蛋白的表达由强到弱交叉出现，强阳性表达在14 d 和 42 d，弱阳性表达在另外 4 个时间段，而定位则由靠基底部的支持细胞胞浆向精子细胞胞浆过渡。本实验所用大鼠为 42 d 的成年大鼠，E-钙黏蛋白阳性产物主要定位于生精上皮近腔室的支持细胞和生精细胞胞浆中，这与Beardsley A和 Prisco M 等的报道相似[11,12]。我们推测此种定位的不同和变化可能说明 E-钙黏蛋白与血睾屏障功能动态变化有关。

我们的体内、外实验结果均揭示镉可降低大鼠曲细精管支持细胞内波形蛋白和 E-钙黏蛋白的表达，且本研究发现随着染镉时间延长，其表达强度呈逐渐下降趋势，表明波形蛋白、E-钙黏蛋白是镉毒性作用的靶蛋白。Nieminen 等[13]研究认为，波形蛋白对细胞间的连接、跨膜转运及血睾屏障的渗透功能有重要作用。如果波形蛋白丢失，将进一步导致或加重相关细胞黏附分子表达的缺失。血睾屏障是主要由紧密连接构成的通透性屏障，其有序的开放机制保证了精子生成的顺利完成。实验证实随着染镉时间延长，曲细精管内支持细胞超微结构及紧密连接和特化区的破坏呈时间-剂量依赖效应。镧示踪证实金属镧可通过支持细胞的紧密连接间隙，甚至直达曲细精管管腔。LuiW Y[14]等在镉破坏血睾屏障的实验中发现，睾丸中紧密连接蛋白表达水平显著降低，转化生长因子(Transforming growth factor-β，TGF-β)含量上升，并进一步经体外实验验证得出，正常情况下 TGF-β 可通过激活 p38MAPK 路径和 Smad(信号蛋白质)通路来调节紧密连接蛋白表达水平，并进而调节血睾屏障的通透性。而镉致 TGF-β 的含量陡升则可影响紧密连接蛋白的正常表达水平[15]。本实验中镉致支持细胞 E-钙黏蛋白表达下降，紧密连接结构破坏是否与上述机制有关尚不清楚。

本研究证实镉减弱大鼠睾丸支持细胞波形蛋白和 E-钙黏蛋白的表达，导致支持细胞超微结构及血睾屏障的破坏。镉通过下调波形蛋白和 E-钙黏蛋白表达，进而影响支持细胞骨架和血睾屏障结构的具体机制尚有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Liao X, Nobuo T, Nobuhiko O, et al.Immunohistochemical study of serum albumin in normal and cadmium-treated mouse testis organs by "in vivo cryotechnique"[J].Histol Histopathol, 2006, 21(1): 35-40.

[2] Nobuo T, Nobuhiko O, Hisashi Y, et al.Immunohistochemical study of a membrane skeletal molecule, protein 4.1G, in mouse seminiferous tubules[J].Histochem Cell Biol, 2005, 124(3-4): 303-311.

[3] 石之虎，廖晓岗，李庆春，等.镉对培养大鼠睾丸支持细胞的损伤及黄芪的拮抗作用[J].解剖学杂志，2008，31(6)：779-782.

[4] 杨建明，周袁芬，曾祥斌，等.镉所致大鼠性腺和附性腺的组织病理学改变[J].卫生毒理学杂志，2000，14(1)：32-33.

[5] Diao W P, Ni W Z, Ma H Y.Cadmium pollution in paddy soil as affected by different rice(Oryza sativa L.)cultivars[J].Bull Environ Contam Toxicol, 2005, 75(4): 731-738.

[6] Benoff S H, Millan C, Hurley I R, et al.Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium infertile men with left varicocele[J].Hum Reprod, 2004, 19(3): 616-627.

[7] Wang R S, Yeh S, Chen L M, et al.Androgen receptor in sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes[J].Endocrinology, 2006, 147(12): 5624-5633.

[8] Kleymenova E, Swanson C, Boekelhekte K, et al.Exposure in utero to di (n-butyl)phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat sertoli cells and disrupts sertoli cell-gonocyte contact[J].Biol Reprod, 2005, 73(3): 482-490.

[9] Mruk D D, Cheng C Y.Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis[J].Endocr Rev, 2004, 25(5): 747-806.

[10] Cyr D G, Hermo L, Robaire B.Developmental changes in epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin during postnatal epididymal development in the rat[J].Endocrinology, 2005, 132(3): 1115-1124.

[11] Beardsley A, O'Donnell L.Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats[J].Biol Reprod, 2003, 68(3): 1299-1307.

[12] Prisco M, Liguoro A, Ricchiari L, et al.Cadherin in developing and maturing cysts of torpedo marmorata testis[J].Mol Reprod Dev, 2007, 74(2): 242-248.

[13] Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, et al.Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration[J].Nat Cell Biol, 2006, 8(2): 156-162.

[14] Lui W Y, Wong C H, Mruk D D, et al.TGF-beta regates the blood testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP)kinase pathway: an in vivo study[J].Endocrinology, 2003, 14(41): 1139-1142.

[15] Medici D, Hay E D, Goodenough D A.Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition[J].Mol Bioi Cell, 2006, 17(4): 1871-1879.

（责任编辑：关蕴良）