

## 棉酚甲酸对大鼠精母细胞质膜流动性的影响

赵东坡 (山东省中医药研究所, 济南 250011)

赵南明、谢佐平 (清华大学生物科学和技术系, 北京 100084)

孙其坚、聂玉生 (中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

**提要** 用原位电泳和荧光显微光度技术研究了棉酚甲酸对大鼠精母细胞质膜流动性的影响。结果表明, 棉酚甲酸使大鼠精母细胞质膜组分(Con A受体)的侧向扩散系数明显增加。

**关键词** 棉酚甲酸; 原位电泳; 膜流动性; 侧向扩散系数

棉酚对男人和某些动物生精细胞的生长及增殖有特异的抑制作用, 并引起生精细胞胞质和胞核内发生变化<sup>(1-4)</sup>。但棉酚对生精细胞质

膜的影响尚很少报导。本文用原位电泳(*in situ electrophoresis*)方法<sup>(5,6)</sup>, 测量服棉酚甲酸大鼠的初级精母细胞质膜上伴刀豆球蛋白A(Con A)受体的侧向扩散速率(以扩散系数D来表示)。

### 材 料 和 方 法

**大鼠处理及细胞收集** 本所饲养的♂大鼠16只, 体重 $191 \pm SD 10$  g 随机分给药组和对照组, 给药组每日以本所植化组提取的棉酚甲酸70 mg/kg灌胃(ig), 每周ig 6次, 共给33

次, 最后一次 ig 的次日断头取睾丸用 Hanks 液洗涤, 除去血液及包膜, 剪碎后加 5 ml Hanks 液, 用铜网过滤后再用丝绸布过滤。取滤液以 800-1000 rpm 离心 8 min, 沉淀加 5 ml Hanks 液洗涤 3 次。将沉淀的细胞悬浮于 1-2 ml Hanks 液中, 使细胞密度达到  $1.5 \times 10^4/\text{ml}$ 。以台盼蓝染色观察细胞活率在 90% 以上。置 4°C 备用。

**原位电泳** 实验装置如文献<sup>(7,8)</sup>所述。在电泳室的底部涂以 0.14 mg/ml L-赖氨酸溶液, 注入细胞悬液后静置 15 min, 细胞被粘在电泳室的底部。以 Hanks 液洗去未被粘住的细胞, 加以电场后细胞膜上的带电组分即沿膜平面侧向移动。本实验中, 外加电场强度为 14 V/cm, 持续 25 min, 然后测试反扩散过程。电泳室保持  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

**荧光标记** 以异硫氰酸盐标记的伴刀豆球蛋白 A (F-Con A, Vector General Inc, USA) 作荧光探针探测细胞膜组分分子反向扩散过程的快慢。它专一地和膜上的 Con A 受体结合, 形成配体受体复合物。当细胞膜被 F-Con A 标记后, 所形成的配体受体复合物即固定在原来的位置不再沿膜平面扩散。从去掉电场到标记 F-Con A 所间隔的时间称反扩散时间。经过长短不同的反扩散时间, 然后在 4°C 进行荧光标记 15 min, 立即以冷丙酮固定, 并以 80% 的无荧光优质甘油封片, 等待用荧光显微光度计进行测量。

**荧光显微光度计测量** 用西德 OPTON 公司制造的紫外扫描显微分光光度计 (SMP 0.5), 并稍加改装。应用 III RS 落射光照明器, 加上一个 KP 500 作为激发滤片。物镜选用 NEOFLUAR PH<sub>3</sub>40×NA 0.75。激发光源用 XBO 150 W/1 高压氙灯。寻找细胞和聚焦, 在红光照明下用透射光相差显微术完成。测量时再改用落射光照明, 将照明场缩到最小范围, 使只有被测的一个细胞受光照, 以保护未被测量的细胞。在光电倍增管前使用一个圆形可变光栏。测量场控制到直径为 4 μm。

选择结构完整直径在  $16 \pm 2 \mu\text{m}$  的初级精母细胞, 分别测量细胞的向电场负极侧 ( $180^\circ$ ) 和正极侧 ( $0^\circ$ ) 质膜微区的荧光强度, 然后再测量 ( $180^\circ$ ) 和 ( $0^\circ$ ) 侧距离细胞 15 μm 处的背景荧光强度。由光电倍增管收集的这些数据, 通过数字记录器打印记录。每测一个细胞在 20 s 内完成。每一个反扩散数据点测量 50 个细胞。由下列公式求得不对称指数 (A):

$$A = (I_{180^\circ} - I_{0^\circ}) / (I_{180^\circ} + I_{0^\circ})$$

$I_{180^\circ}$  = 细胞向电场负极侧膜微区的荧光强度。

$I_{0^\circ}$  = 细胞向电场正极侧膜微区的荧光强度。

$I_{180^\circ}$ 、 $I_{0^\circ}$  均为减掉背景荧光后的值。

根据各反扩散时间内的不对称指数, 结合电场强度和细胞半径等有关数据, 可计算出  $D^{(9)}$ 。

## 结 果

在细胞不加电场只作 F-Con A 标记时, 细胞质膜上的荧光呈均匀的环状分布 (图 1 a, 见图版 2)。在加电场 ( $\sim 14 \text{ V/cm}$ ) 25 min 后, 立即标记 F-Con A, 则在细胞质膜向电场的负极侧 ( $180^\circ$ ) 聚集较强的荧光, 如新月形, 而细胞向电场的正极侧 ( $0^\circ$ ) 荧光微弱, 细胞质膜两侧的荧光强度呈明显的不对称分布 (图 1 b)。在去掉电场后, 间隔不同的反扩散时间再标记 F-Con A, 膜上荧光的不对称分布即随着反扩散时间的延长而逐渐变得不明显。反扩散 30 min 时, 细胞膜的荧光又基本恢复到加电场前的均匀分布状态 (图 1 c)。说明在外加电场不是过强或过久的条件下, 细胞膜上的 Con A 受体向电场负极侧聚集的现象是可逆的。使用荧光显微光度计, 测量不同反扩散时间的细胞膜  $180^\circ$  和  $0^\circ$  两点的荧光强度, 然后计算出各个反扩散时间的不对称指数 "A", 结果见图 2 (见图版 2)。Con A 受体反扩散的速度, 由不对称指数的逐步下降来表示, 根

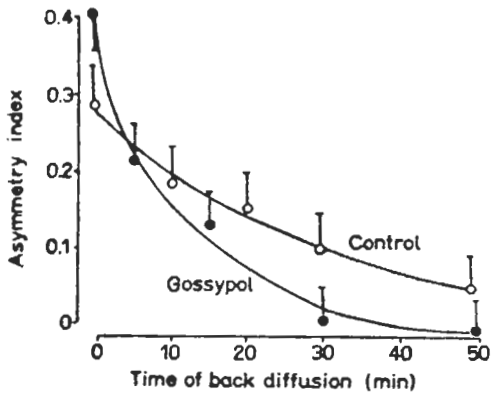


Fig 2. Back diffusion of field-induced accumulation of Con A receptors. 50 cells/point,  $\bar{x} \pm SD$ .

据上述实验结果, 经过理论计算和拟合, 我们得到初级精母细胞质膜上 Con A 受体沿膜平面流动的  $D$  为:

棉酚甲酸(gossypol)组  $5.6 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$   
对照(control)组  $2.2 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$

结果表明, 由于棉酚甲酸的作用, 精母细胞质膜上 Con A 受体沿膜平面的扩散系数明显增加,  $D$  值约为对照组的 2—2.5 倍。

各级生精细胞经 F-Con A 标记后, Con A 受体的数量及分布情况: 初级精母细胞荧光最强, 精子细胞及精子的荧光较弱, 精子头及颈部荧光较尾部强。在电场作用下, 除精子外各细胞的 Con A 受体都有向电场负极侧聚集的趋势。因精子太小且不规则, 故不能辨认 Con A 受体有无向负极侧聚集。用药组细胞的荧光强度和对照组比较, 在显微镜下看不出明显的不同。

## 讨 论

实验结果证明, 棉酚甲酸不但引起生精细胞胞质和胞核内发生改变, 对细胞质膜的动态性质也有影响, 至于是否细胞膜改变后影响细胞内容物或相反, 尚有待进一步深入研究。

细胞膜上的许多大分子物质可以沿膜平面进行远距离扩散。用 F-Con A 作为荧光探针,

观察 Con A 受体在质膜上的分布及扩散, 在研究细胞膜的流动性中已被广泛采用。细胞在外加电场后, 引起质膜 Con A 受体重新分布, 然后作 F-Con A 标记和荧光显微光度计测量, 测出单个细胞表面的荧光强度分布, 并确定 Con A 受体在电场的扰动下的不对称分布和反扩散的速度, 是研究质膜流动性的一个比较新颖的定量方法。

在对棉酚的研究中发现它能引起大鼠睾丸组织内出现巨核初级精母细胞和多核巨大细胞, 说明细胞的分裂被干扰。假若此种改变是由于胞质内微管和微丝的结构及功能发生改变所引起, 而微管和微丝又对质膜上的受体蛋白的分布和运动起着控制与调节作用, 故推想巨核细胞和多核巨大细胞的出现可能和质膜的流动性增强有一定的联系。

关于棉酚甲酸引起初级精母细胞质膜流动性增强的机理可能和以下因素有关: 1. 棉酚甲酸为脂溶性化合物, 它和细胞质膜接触后改变了质膜上分子排列的有序性; 2. 棉酚首先影响了生精细胞的脂质代谢, 进一步改变了膜的流动性; 3. 和受体蛋白相联系的细胞骨架结构功能失调。

## 参 考 文 献

- 1 男性节育药全国协作组. 中华医学杂志 1978; 58: 455
- 2 薛社普、宗书东、苏树芸, 等. 中国科学 1979; (9): 915
- 3 王迺功、雷海鹏. 中华医学杂志 1979; 59: 402
- 4 顾芝萍. 生殖与避孕 1983; 3(1): 8
- 5 Poo MM, Poo WJH, Lam JW. *J Cell Biol* 1978; 76: 483
- 6 Poo MM, Lam JW, Orida N. *Biophys J* 1979; 26: 1
- 7 Poo M.M. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1981; 10: 245
- 8 Nie YS, Feng YB, Tan MQ, Zhao NM, Zhao DP. *Mol Cryst Liq Cryst* 1983; 97: 317
- 9 赵南明、蒲慕明. 清华大学学报 1983; 23: 47

*Acta Pharmacologica Sinica* 1986 Jan; 7 (1) : 72-75

## EFFECT OF GOSSYPOL FORMIC ACID ON FLUIDITY OF SPERMATOCYTE PLASMA MEMBRANE OF RAT

ZHAO Dong-po

(*Inst Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Shandong, Jinan 250011*)

ZHAO Nan-ming, XIE Zuo-ping

(*Inst Modern Biology and Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084*)

SUN Qi-jian, Nie Yu-sheng

(*Inst Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100080*)

**ABSTRACT** *In situ* electrophoresis is a newly developed method to measure the lateral diffusion of cell membrane components. In the present study, the effect of gossypol formic acid on the fluidity of spermatocyte plasma membrane of rat was investigated by the techniques of *in situ* electrophoresis and microfluorimetry. The lateral diffusion coef-

ficient of spermatocyte membrane components (Con A receptors) of rat was increased obviously by gossypol formic acid.

**KEY WORDS** gossypol formic acid; *in situ* electrophoresis; membrane fluidity; lateral diffusion coefficient

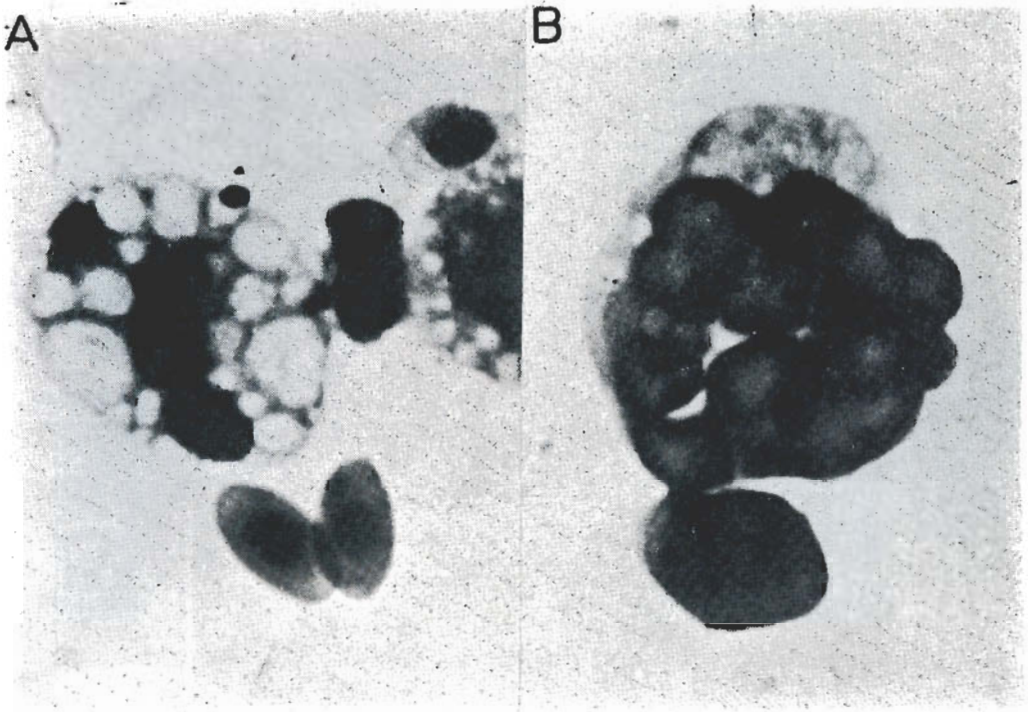


Fig 1. Micrograph of peritoneal macrophages from mice with (A) or without (B) iv FCE 50 ml/kg,  $\times 330$ . (A) Many vesicles but only one CRBC in cytoplasm. (B) Numerous CRBC pushed the nucleus aside.

(See p 60)



Fig 1. Fluorescent micrographs of F-Con A in the spermatocyte plasma membrane of rat ( $\times 1200$ ). A) Before exposure to the electric field; B) Exposed to the electric field for 25 min; C) Back-diffusion 30 min after exposure to the field.

(See p 73)