



人类睾丸及附睾的组织化学观察

王一飞 孙广芳 吴恒宝

(上海第二医学院男子计划生育第一研究室)

抗精子发生是男性避孕研究的重要途径之一,精子发生障碍更是男性不育症的常见原因。系统地观察人类睾丸精子发生过程中的组织化学变化,不但有助于了解精子发生过程的代谢特征,还将为避孕药物作用机理的研究以及男性不育症的诊断提供重要的理论依据。

男性激素主要是由睾丸间质细胞产生的,任何男用避孕方法都应以不影响间质细胞机能作为先决条件。采用一整套衡量间质细胞机能的组织化学指标^[1],结合光学显微镜和电子显微镜观察,能更深刻和全面地了解人类睾丸间质细胞的结构与机能。

精子在附睾内成熟,附睾为精子成熟创造了合适的环境。附睾上皮既有分泌机能,也有吸收机能,甚至还有吞噬机能^[2]。用组织化学方法观察附睾各节段上皮细胞的代谢活性,可为附睾生理研究提供参考。

本实验应用十余种组织化学方法对四例正常青壮年男性的睾丸与附睾进行了观察,对这些组织化学反应的机能意义加以简单的讨论。

材料与 方法

四例突然死亡的男性,年龄分别为20、25、25及31岁。经阴囊取其睾丸与附睾组织。右侧睾丸及附睾以Bouin液固定,常规石蜡包埋,切片6 μ ,H.E.染色。左侧睾丸及附睾的一部分以Carnoy液固定,石蜡包埋,切片6 μ ,作核酸及糖类的组织化学染色;另一部分作冰冻切片,进行脂类、巯基和各种酶的显色反应。

所采用的组织化学方法有^[3-5]:DNA:Feulgen法;多糖:PAS及荧光PAS法;以淀粉酶消化法证实糖元;酸性糖蛋白法: PAS加Alcian Blue pH2.5法,以甲基化处理作为对照;巯基Chevrement-Fre-

derick法;脂类:苏丹黑B法;碱性磷酸酶(AKP)Gomori法;酸性磷酸酶(ACP);Gomori法;ATP酶;Wachstein及Meisel法;琥珀酸脱氢酶(SDH);Nachlas法;乳酸脱氢酶(LDH);Seligman法;6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH);Sherman法;非特异性酯酶(NSE);Nachlas及Seligman法。所有显示酶活性的方法均以不加底物作为对照。

结 果

一、核酸

Feulgen法可将DNA染成紫红色。曲细精管中,支持细胞核内有细小而散在分布的Feulgen阳性颗粒,在核仁区周围有一些深染的球形颗粒。Ad型精原细胞核内Feulgen阳性颗粒细小,染色深。Ap型精原细胞核内阳性颗粒染色浅。B型精原细胞核内的阳性颗粒集合成块,大部分靠在核膜上。初级精母细胞核内Feulgen阳性物质成条索状分布,染色深。次级精母细胞核内有许多粗大的Feulgen阳性颗粒。精子细胞核内有细小的阳性颗粒,染色浅,中间也杂有一些粗大的团块。随着精子细胞的变态过程,核内Feulgen阳性物质团集成块,直至形成均质深染的结构。间质细胞核内Feulgen阳性颗粒大部分靠着核膜分布,染色深。附睾管上皮细胞核内有散在分布的Feulgen阳性颗粒,染色浅,与附睾腔内精子核的深紫红色形成明显的对比(见图版1)。

二、多糖

曲细精管的基底膜呈PAS强阳性。精原细胞浆有较强的PAS反应,支持细胞胞浆内有细小的而散在分布的PAS阳性颗粒,但在接近精原细胞及晚期精子细胞处,PAS反应较强。淀粉酶消化后精原细胞及支持细胞中PAS

反应明显减弱,提示有糖元存在。在生精周期第 I、II 时相中,接近成熟的精子细胞呈 PAS 强阳性反应,尤以顶体区为强。间质细胞浆呈中等强度的 PAS 反应,间质血管强阳性。附睾管上皮基膜强阳性,上皮细胞浆内有散在的 PAS 阳性颗粒,近腔面处阳性颗粒粗大,高尔基区颗粒较集中。静止纤毛及细胞的游离缘为 PAS 强阳性。荧光 PAS 法的阳性反应分布与强度和通常 PAS 法相似,金黄色的荧光十分鲜明。

三、酸性糖蛋白

用 Alcian Blue pH2.5 法可将酸性糖蛋白染成蓝色。睾丸内基本阴性,仅睾丸精子呈微弱的阳性反应。附睾管上皮细胞游离缘及静止纤毛呈强阳性反应,附睾管上皮细胞浆内则为阴性(图版 2)。附睾精子与附睾内容物也为阳性。附睾管头段上皮静止纤毛较尾段者反应强,而附睾尾部精子的反应则较头部者为强。若将切片先作甲基化处理(将羧基转变为甲基)再作 Alcian Blue pH2.5 染色,则所有部位的阳性反应均消失。

四、巯基

曲细精管内各级生精细胞呈微弱的阳性反应,而第 I、II 时相中晚期精子细胞呈强阳性反应。睾丸精子巯基反应极强,尤以精子头部为甚。间质细胞也呈巯基阳性反应。附睾精子呈强阳性反应。附睾管上皮细胞核上区有中度的阳性反应。

五、脂类

各级生精细胞内均有脂类,但以精原细胞及早期精母细胞中为多。近曲细精管基底部的支持细胞胞浆内脂类颗粒密集,支持细胞近腔面的胞浆内也有较多的脂类颗粒。第 I、II 时相中,睾丸精子体部及残余体也呈脂类阳性反应。间质细胞胞浆内有较多的脂类颗粒。睾丸输出管上皮细胞浆内脂类反应强,附睾管主细胞核上区有细密的脂类颗粒,附睾管上皮基细胞呈强阳性。

六、碱性磷酸酶(AKP)

精原细胞及早期精母细胞浆内 AKP 反应

很强(图版 3)。支持细胞与各级生精细胞的交界面上也为 AKP 阳性,尤以支持细胞与精原细胞间的界面最强。间质血管强阳性,间质细胞内也有 AKP 阳性反应颗粒。睾丸输出管阴性,附睾管上皮基膜强阳性。

七、酸性磷酸酶(ACP)

曲细精管内 ACP 主要分布于支持细胞胞浆内,近基膜处反应最强。睾丸精子的胞浆小滴及残余体也为强阳性。在精子发生的第 I 与第 II 时相,支持细胞近腔面的胞浆内,ACP 反应很强。间质细胞的胞浆也呈 ACP 强阳性反应。睾丸输出管上皮的核上区 ACP 反应较弱。附睾管上皮的核上区 ACP 强,核周也有许多阳性反应颗粒。附睾管上皮基细胞 ACP 强阳性。

八、ATP 酶

曲细精管基底膜阳性,各级生精细胞弱阳性,而 I、II 时相中接近成熟的精子细胞反应稍强。间质细胞阳性,间质血管强阳性。附睾管上皮基膜阳性,核上区也有阳性反应。

九、琥珀酸脱氢酶(SDH)

各级生精细胞胞浆均有 SDH 反应,其中以精原细胞最强。间质细胞的 SDH 反应极强(图版 4)。睾丸输出管上皮细胞内 SDH 反应很强,尤以核上区为甚(图版 5)。附睾管上皮内 SDH 阳性反应颗粒散在分布,以核上区为多。附睾管上皮基细胞反应强。

十、乳酸脱氢酶(LDH)

各级生精细胞胞浆内均有 LDH 阳性颗粒,其中尤以精原细胞为最多。间质细胞呈 LDH 强阳性反应。睾丸输出管上皮细胞 LDH 反应强,附睾管上皮细胞浆内也有 LDH 阳性反应颗粒,基细胞呈强阳性反应。

十一、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)

各级生精细胞内均有此酶活性,其中以精原细胞为最强。第 I、II 时相中接近成熟的精子细胞反应也稍强。间质细胞呈强阳性反应。睾丸输出管及附睾管上皮反应弱阳性。

十二、非特异性酯酶(NSE)

睾丸间质细胞浆呈 NSE 强阳性反应(图版

6)。曲细精管内支持细胞近基膜处的胞浆内也有较多的阳性反应颗粒，其他部分有散在分布的阳性反应颗粒。附睾管上皮内有散在分布的NSE阳性反应颗粒。

讨 论

精子发生是一个多时相的复杂过程，其中包括精原细胞有丝分裂、精母细胞成熟分裂及精子细胞变态三个阶段。每个阶段均有其特殊的代谢类型。人的精原细胞及早期发育阶段的初级精母细胞中，有很强的AKP与G-6-PDH活性，这两种酶的活性与细胞分裂活动密切相关。精母细胞经过两次成熟分裂以后，核内DNA量减少一半。精子细胞变态过程中有染色质的浓集过程，核的体积也显著缩小，故尽管其DNA量减少，Feulgen反应反见增强^[6]。精子变态过程中，核内的巯基反应也明显增强。精子进入附睾以后，巯基可部分地转变为二硫键，二硫键可使精子结构更趋稳定^[7]。各级生精细胞的能量供应方式也有不同：精原细胞可直接从血糖获取能源，人的精原细胞中还有少量的糖元贮存。精原细胞中SDH及LDH活性强，可见其依靠糖的有氧氧化作为主要供能方式。与精原细胞相比，精母细胞及精子细胞中SDH活性低，目前认为这两类细胞依靠糖酵解供能^[8]。从初级精母细胞开始，胞浆内出现一种精子特有的LDH-X，这种LDH的同功酶与糖的酵解活性密切相关^[9]。如要显示LDH-X需用特殊的底物。人睾丸精子中段有脂类积聚，这些脂类可能作为进入附睾以后的能源^[10]。人的支持细胞内也有少量糖元，支持细胞与各级生精细胞交界面上还有AKP活性，这可能与葡萄糖转送入各级生精细胞有关。精子变态过程中胞浆部分脱落下来成为残余体，残余体内有RNA、PAS阳性物质及脂类。支持细胞可吞噬残余体，我们发现在精子发生的第I与第II时相，支持细胞近腔面的胞浆内有多量脂类，可能是被吞噬的残余体。这些脂类可被送往支持细胞基部的胞浆内，分解后作为甾体产生的原

料^[11]。支持细胞内的ACP活性可能与其吞噬机能有关。许多实验证明，生精障碍时，支持细胞内ACP活性增强，并有脂类堆积。选用这两种组织化学染色也可作为衡量是否有生精障碍的指标^[12]。

人睾丸间质细胞内SDH及LDH活性极强，这表明依靠糖的有氧氧化作为能量供应的方式。人睾丸间质细胞内NSE及G-6-PDH活性很强，此两酶活性与甾体合成密切相关，前者与胆固醇酯的水解有关，后者可供应甾体合成中所需要的还原型辅酶II。间质细胞内也有一些脂类颗粒，当甾体合成障碍时，间质细胞内脂类增加^[13]。我们认为可以用脂类、NSE及G-6-PDH三种组织化学方法衡量人间质细胞的机能^[11]。

精子的成熟取决于附睾上皮细胞提供合适的微环境。附睾上皮可分泌多种物质，其中包括许多糖蛋白^[14]。我们发现人附睾上皮主细胞的高尔基区及静止纤毛为PAS阳性，可能与糖蛋白的分泌有关。用Alcian Blue pH2.5染色，可将静止纤毛染成蓝色，表明静止纤毛表面覆有一层酸性糖蛋白。先将切片作甲基化处理后再采用Alcian Blue染色，静止纤毛不着色。这提示这层酸性糖蛋白中富于涎酸。精子表面也覆有一层涎酸。涎酸是一种含有羧基而带负电荷的糖，是细胞外衣的主要成分之一^[15]。涎酸与附睾内的精子成熟过程密切相关。

参 考 文 献

- [1] 王一飞, 吴竞梅, 倪一玄. 1980. 细胞生物学杂志, 2(4)27—30.
- [2] Hamilton, D. W. 1975. In "Handbook of Physiology section 7 Endocrinology vol. V. Male Reproductive System" p.259-301 Am. Physiol. Soc.
- [3] Lillie, R. D. and Fullmer, H. M. 1976. Histopathologic technic and practical histochemistry McGraw-Hill Book Company.
- [4] Culling, C. F. A. 1974. Handbook of histopathological and histochemical techniques Butterworths.
- [5] Pearse, A. G. E. 1972. Histochemistry:

- Theoretical and Applied 3rd. ed. London.
- [6] Gledhill, B. L. 1970. In "The Testis vol. II" p. 307-353 eds. Johnson, A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L. Academic Press, New York, London.
- [7] Calvin, H. and Bedford, J. M. 1971. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 13,65.
- [8] Free, M. J. 1970. In "The Testis vol. II" p. 125-183 eds. Johnson, A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L. Academic Press, New York, London.
- [9] de Domenech, E. M. et al. 1972. *Biol. Reprod.* 6,136-147.
- [10] Coniglio, J. G. 1977. In "The Testis vol. IV" p. 425-445 eds. Johnson A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L. Academic Press, New York, London.
- [11] Steinberger, A. and Steinberger, E. 1977. The Sertoli cell *Ibid.* p. 371-394.
- [12] Reddy, K. L. and Svoboda, D. J. 1967. *Am. J. Path.* 51,1-18.
- [13] Christensen, A. K. 1975, In "Handbook of Physiology section 7 Endocrinology vol. V. Male Reproductive System" p. 57-94. *Am. Physiol. Soc.*
- [14] Hamilton, D. W. 1972, In "Reproductive Biology" eds. Balin, H. and Glasser, S. p. 268-337 *Excerpta Medica Amsterdam.*
- [15] Sharon, N. et al. 1974. *Scientific American* 5,78-86.

大鼠肝癌 BERH-2 聚核糖体 mRNA 的变化

刘海湖、胡凤祖、贾爱琪、李文裕

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

真核细胞聚核糖体 RNA 包含正在翻译蛋白的 mRNA, 比较肝癌与正常肝聚核糖体 RNA (pRNA) 的异同, 对于了解癌细胞基因转录、翻译的分子过程和调控机理有着重要的意义。对真核细胞 RNA 复杂性的研究很多, 但大多数是对正常细胞 RNA 复杂性的研究, 或对不同类型细胞 RNA 复杂性加以比较。也有人比较了癌与正常细胞 RNA 的复杂性(1-3), 他们多采用分离的单一顺序 DNA 为探针, 进行分子杂交比较, 但胞质的 mRNA 与单一顺序 DNA 杂交只达 2-3% 的杂交率。因此本文报道了按 Grady 等的方法, 从正常大鼠肝的单一顺序 DNA 中进一步用胞质的 RNA 与之杂交, 选出所谓的可表达 DNA (pDNA) 部分, 以此为探针, 进行与 pRNA 过量的分子杂交, 希望提高杂交率, 从而比较了肝癌与正常肝聚核糖体中与正常肝 pDNA 对应的 RNA 的差异, 并测定了用羟基磷灰石分离的杂交分子对 S_1 酶抗性的不同, 进一步证实了这种差异的存在。

材料与 方法

(一) 材料

正常大鼠肝取自成年 Wistar 大鼠。

大鼠肝癌组织取自移植性肝癌 BERH-2 株^[4]。

S_1 酶为 Sigma 产品。其余化学药品为分析纯。

(二) 羟基磷灰石 (HAP) 的制备

参考 Giorgio Bernardi 的作法^[5]。2 升 0.5M $CaCl_2$ 和 2 升 0.5 M Na_2HPO_4 同时匀速 (5 毫升/分) 滴加到盛有 200 毫升 1.0 M $NaCl$ 或 400 毫升水的大烧杯中, 同时搅拌。滴加完后, 静置, 收集沉淀, 用 2000 毫升蒸馏水洗两次, 再用 2000 毫升重蒸水洗两次。沉淀悬浮在 4000 毫升重蒸水中, 边搅拌边加入 100 毫升 40% 的 $NaOH$, 加热至沸 1 小时, 冷却静置, 吸去上清液及沉淀较慢的沉淀物, 沉淀再用水洗, 同样煮沸, 同样吸去上清及沉淀较慢的沉淀物。然后, 将沉淀悬浮在 4000 毫升 0.01 M 磷酸钾盐缓冲液 (KP) 中, pH 6.8, 煮沸, 沉淀再悬浮在 0.01 M KP 中, 煮沸 5 分钟, 每次倾去上清时, 同时倾去沉淀较慢的沉淀物。最后沉淀悬于 0.001 M KP 中, 置 4 °C 冰箱, 保存备用。