

衡量间质细胞机能的组织化学指标

王一飞 吴竞梅 倪一玄

[上海第二医学院组织胚胎学教研组]

在抗精子发生药物和方法的研究中,除抗精子发生效应外,关键的问题是该药物或方法是否影响间质细胞的雄激素合成和分泌功能。这也是检验该药物能否使用的重要条件之一。

用放射免疫法测定血浆内雄激素水平,是了解间质细胞功能的一个生化方法,虽测量精确,但操作比较麻烦,而且激素含量有昼夜变化^[1],须作平行对照才能得出正确的结果。

在光学显微镜和电子显微镜下,观察间质细胞的形态结构变化,也只能间接推测其功能状况。

用组织化学方法,检查间质细胞中某些重要的代谢物或酶类,可直接观察留体合成的功能状态。因此,有必要根据对间质细胞的细胞和亚细胞生物学研究,选择一套全面而又比较方便的组织化学指标,以衡量间质细胞的功能。组织化学方法兼有形态学及生物化学研究的特点,故它具有定位和定性的优点。在观察形态结构的同时,可对细胞的组成及代谢进行细致的分析,从而对其机能状态可以得到一个较为完整的概念。然而,组织化学方法不能作精确的定量分析,所得出的结论常是描述性的。故而组织化学方法应与生物化学定量分析相结合、取长补短。对间质细胞研究来说,组织化学研究与放射免疫测定可以相辅相承,以期更为客观,全面而精确地进行综合分析研究。

男性体内的雄激素主要有四种:睾酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮和雄酮,四者的比例为100:16:12:10。因此主要的雄激素是睾酮^[2]。男性血浆中95%的睾酮是由睾丸间质细胞合

成的,其余5%来自肾上腺皮质网状带。此外支持细胞和曲细精管的其他成分也产生少量的雄激素。

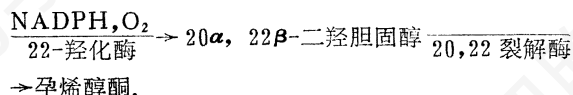
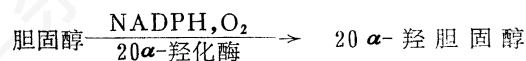
间质细胞中雄激素的生物合成的细胞及亚细胞生物学的研究结果可概述如下:

一、胆固醇的来源

胆固醇是合成甾酮的主要原料。睾丸从血浆中摄取胆固醇的能力很弱。睾丸中大部分的胆固醇是间质细胞就地合成的。脂肪酸是合成胆固醇的主要原料,它可来自血中游离脂肪酸,也可由间质细胞脂滴中的中性脂肪水解而形成。在间质细胞中,脂肪酸经一系列的反应,合成胆固醇。合成的胆固醇可直接被利用,也可先酯化而贮存于间质细胞的脂滴中,以后再经脂滴周围的酯酶水解成胆固醇,作为雄激素合成的原料。

二、胆固醇转化为孕烯醇酮

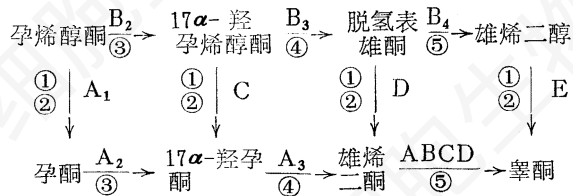
反应过程如下:



反应需要还原型辅酶Ⅱ(NADPH),也需要侧链降解的酶系统,包括20 α -羟化酶,22 α -羟化酶和20,22裂解酶。在肾上腺皮质中,这些酶定位于线粒体的内膜和嵴上,推测在睾丸间质细胞中也定位于线粒体嵴上。上述反应是类固醇合成的限速步骤^[3,4,5]。

三、孕烯醇酮转化为睾酮

反应过程可概括如下:



在上图中,在大鼠睾丸间质细胞内,以A途径为主,称为孕酮途径;但在人及狗的睾丸间质细胞中,BCDE的中间产物的浓度比A途径高。后者称脱氢表雄酮途径^[3,4,5]。

上列反应需要五种酶参加:① 3β-羟甾脱氢酶(简称3β-HSD),② Δ⁵-Δ⁴异构酶,③ 17α-羟化酶,④ C₁₇-C₂₁裂解酶,⑤ 17β-羟甾脱氢酶(17β-HSD)。

在大鼠睾丸间质细胞中,这些酶定位于微粒体(内质网)上。

现将这些酶的作用分述如下:

1. 3β-HSD

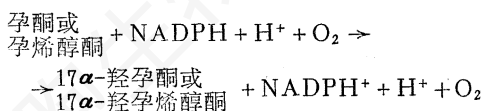
此酶处于类固醇合成的关键地位。需要辅酶I(NAD⁺)为辅助因子。本身无底物特异性,但与相应的Δ⁵-Δ⁴异构酶结合,构成许多底物特异的酶系。

2. Δ⁵-Δ⁴异构酶

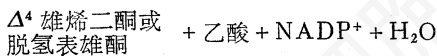
使Δ⁵-3-酮类固醇转化为Δ⁴-3-酮类固醇。

3. 17α-羟化酶

此酶需要还原型辅酶I和分子氧,催化下列不可逆反应



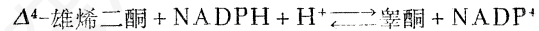
4. C₁₇-C₂₁裂解酶



此反应也需要NADPH和O₂。

5. 17β-HSD

此酶催化下列可逆反应,平衡常数是pH依赖性的,

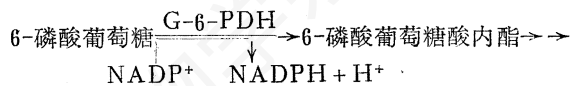


在室温下,pH为7.4时,反应向右(即睾酮)方向进行。

四、NADPH和6-磷酸葡萄糖脱氢酶在类固醇合成中的地位

由上述过程可知,20α羟化,22羟化,17-α羟化,C₁₇-C₂₀裂解和17β脱氢等过程均需要NADPH为辅助因子。缺乏NADPH会使类固醇合成发生障碍。

在睾丸间质细胞中,NADPH的一个主要来源是糖的氧化旁路(即磷酸戊糖通路)。



氧化旁路

6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)是氧化旁路开始时一个重要的酶,因此G-6-PDH活力可表示NADPH的供应情况,也可作为间质细胞功能的指标。

根据以上原理,我们选用了以下七个组织化学方法,作为衡量间质细胞功能的指标^[6],似能较全面地反映其雄激素合成的功能。这些指

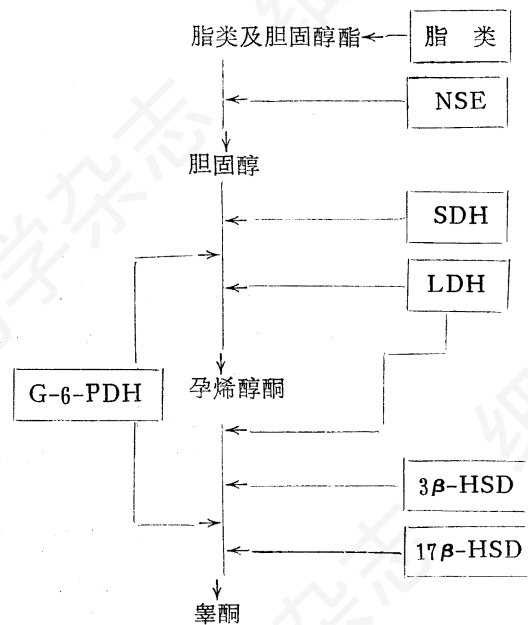


图1 反映间质细胞功能的组织化学指标作用点

标的作用环节,可用以下简图表示之(见图1)。

(1) 脂类; (2) 非特异性酯酶(NSE); (3) 乳酸脱氢酶(LDH); (4) 琥珀酸脱氢酶(SDH); (5) 3β -羟甾脱氢酶(3β -HSD); (6) 17β -羟甾脱氢酶(17β -HSD); (7) 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH)。

下面对这些组织化学指标的原理及意义作简略的探讨。

(一) 反映甾体合成的原料——胆固醇的指标

1. 脂 类

间质细胞中的脂滴主要是由中性脂肪和胆固醇酯组成的。两者均为合成胆固醇的原料。间质细胞中的脂类随动物种类、年龄、季节等变化,且与甾体(即类固醇)合成活动有密切关系。例如,切除垂体后,类固醇合成障碍,脂类可在间质细胞中堆积,注射 LH 后,脂类堆积减少,表示类固醇合成恢复正常。因此,用组织化学方法显示间质细胞脂滴的数量、大小与分布,可间接反映间质细胞的功能^[3,7]。

2. 非特异性酯酶(NSE)

胆固醇的水解是在脂滴周围的酯酶催化下进行的。因此,酯酶的活力,可间接反映间质细胞的功能。用不同的组织化学方法在睾丸中能显示出两类不同的酯酶活性(Aldridge 分类法)。

(1) B型酯酶 主要存在于间质细胞中,它是对有机磷抑制剂敏感的酯酶(能被 $10^{-8}M$ 的 E_{600} 抑制),用同时偶氮偶联法在冰冻切片上,用 α -萘酚醋酸酯作为底物,以固兰B(Fast Blue B)作偶联剂,最容易显示出来。切除垂体后,或药物、物理因子等影响间质细胞功能时,此酶活性显著减少。显然,这种酯酶直接与类固醇合成有关^[8,9,10]。

(2) C型酯酶 主要存在于 Sertoli 细胞和间质的少数细胞(可能是吞噬细胞)中。它是有机磷抗性酯酶(耐 E_{600})。在福尔马林固定的切片中,用吲哚酚醋酸酯作为底物,以固兰B

为偶联剂,最容易显示出来。当精子头部被 Sertoli 细胞包围阶段,此酶活力最强。在垂体切除后显示此酶活力的细胞数量(无论在曲细精管还是在间质中)大大增加。此酶可能与吞噬功能有关。我们选用非特异性酯酶中显示 B 型酯酶的方法作为衡量间质细胞功能的指标。

(二) 反映能量供应的指标

(1) LDH 催化丙酮酸 $\rightleftharpoons$ 乳酸的可逆反应,反映糖的分解代谢情况及控制有氧氧化与酵解的比例。LDH 活性与能量供应有密切的关系,而合成类固醇的过程是需能量供应的。因此,LDH 活性可反映间质细胞功能情况。在正常大鼠和小鼠间质细胞中,LDH 活性很强,而在类固醇合成障碍时,LDH 活性下降。

(2) SDH 此酶反映三羧酸循环情况。在组织化学中,是表示线粒体功能的敏感指标。我们已经知道:(a) 胆固醇 $\rightarrow$ 孕烯醇酮是在线粒体中进行的;(b) 琥珀酸脱氢后的逆向电子传递生成 NADH,再转为 NADPH,也是 NADPH 的来源之一;(c) 类固醇合成中需要能量。因此,SDH 可作为反映间质细胞功能,特别是胆固醇 $\rightarrow$ 孕烯醇酮这步的指标。在正常大鼠间质细胞中,SDH 活力甚强,类固醇合成障碍时,SDH 活性下降^[8,11]。

(三) 反映孕烯醇酮 $\rightarrow$ 睾酮的指标

1. 3β -羟甾脱氢酶 用标准底物(孕烯醇酮或脱氢表雄酮)此酶在大鼠间质细胞中可显示出中等——强度活性。在类固醇激素合成障碍时(例如垂体切除,营养不良,注射睾酮以抑制 LH 的分泌等情况下),此酶活力显著减弱,是比较敏感的指标。

2. 17β -羟甾脱氢酶 此酶也可催化 17β -雌二醇与雌酮间的转化反应,因此可用雌二醇作底物。其结果与意义同 3β -HSD^[8,11]。

(四) 反映 NADPH 供应的指标

可选用 G-6-PDH。在大鼠间质细胞中,

表 1 衡量睾丸间质细胞的组织化学指标及意义

指 标	正常间质细胞	甾体合成障碍时	意 义
脂 类	随物种,年龄,季节而不同	增 多	原料不能利用
NSE	强	减 弱	胆固醇酯水解减少
LDH	强	减 弱	酵解障碍
SDH	强	减 弱	线粒体指标,反映胆固醇→孕烯醇酮障碍
3 β -HSD	中~强	减 弱	孕烯醇酮→睾酮障碍
17 β -HSD	中	减 弱	同 上
G-6-PDH	强	减 弱	NADPH 供应减少

此酶显示强活力。在类固醇合成障碍时,活力下降。

我们选用的组织化学指标及其意义可归纳如表 1。

我们曾采用以上这些组织化学方法观察家兔睾丸局部加热以后间质细胞的机能状态。我们观察到,睾丸局部加热以后,精子发生受到迅速而强烈的干扰。然而间质细胞的形状结构与数量未见明显改变,组织化学研究表明间质细胞合成甾体机能并不受加热影响,部分实验动物间质细胞内的某些酶活性反而比对照组增强^[12]。在实践中我们感到,这套指标在间质细胞研究中有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Nankin, H. K. and Troen, P. (1976) Endocrine profiles in idiopathic oligozoospermic men. In "Human semen and fertility regulation in men" ed. by Hafez, E. S. E. C. V. Mosby Company.
- [2] 上海第一医学院主编(1979)医用生物化学,

人民卫生出版社出版 p. 583—586.

- [3] Christensen, A. K. (1975) Leydig Cell In "Handbook of physiology Sec. 7, 5:57—94.
- [4] Eik-Nes, K. S. (1975) Biosynthesis and secretion of testicular steroids Ibid. p. 95—116.
- [5] Hall, P. F. (1970) *Biochemistry* 2:2—73.
- [6] 吴竞梅、王一飞, (1979), 睾丸细胞内几种脱氢酶的显示 (待发表资料).
- [7] Jonson, A. D. (1970) *Biochemistry* 2: 193—258.
- [8] Blachshaw, A. W. (1970) Histochemical localization of testicular enzymes. Ibid. p. 73—123.
- [9] Niemi, M. Härkönen, M. and Ikonen, M. (1966) *Endocrinology* 79:294—300.
- [10] Pearse, A. G. E. (1972) *Histochemistry Theoretical and Applied* 3rd. edn. J. and A. Churchill Ltd. London.
- [11] Niemi, M. and Ikonen, M. (1962) *Endocrinology* 70:167—174.
- [12] 朱继业等(1979)睾丸局部透热后,家兔睾丸精子发生与间质细胞组织学与组织化学观察(待发表).