

# 几种哺乳动物睾丸精子发生的激光流动细胞分析研究

夏佩瑜\*, 石学耕、杨祐俐、董赛珍\*, 史桂英、洪祖惠、王勇、王一飞\*

(上海第二医学院组织胚胎学教研组\*, 生物物理教研组)

在男性生殖生物学及男性计划生育研究中经常需要对动物或人睾丸的精子发生状态进行评价,用组织学方法观察睾丸切片只能对精子发生状态作定性或半定量的估计<sup>[1,2]</sup>,我们曾用 QTM-720 型自动图象分析仪对七种哺乳动物及人睾丸进行定量组织学观察<sup>[3]</sup>,也对服用棉子油以后不育患者的睾丸作了定量研究<sup>[4]</sup>,这种方法能对生精细胞及间质组织作总的测定,但无法了解精子发生过程中各级生精细胞之间的比例关系,故有一定的局限性。另外,进行睾丸切片观察需杀死动物,不能作连续动态观察。临床上不育症的研究主要用精液常规分析及睾丸活组织检查,很难精确地了解精子发生的障碍程度。

应用激光流动细胞分析技术可以快速而精确地分析各种细胞内的 DNA 含量,已开始应用于细胞周期的动力学分析及肿瘤生物学研究<sup>[5]</sup>,近年来也逐步用于生精细胞的分析<sup>[6,7]</sup>。

我们应用本院生物物理教研组制作的 LXJ 型激光流动细胞分析仪,对五种哺乳动物的睾丸生精细胞进行了定量研究,本文报道研究结果,并对此技术在男性生殖生物学及男性计划生育研究中的应用前景加以讨论。

## 材料与方 法

取 Wistar 种系大鼠 7 只,非近交系大鼠 9 只, C57BL 系小鼠 10 只,金山县灰色种家兔 9 只,金色田鼠 5 只,非近交系豚鼠 9 只。急性处死后,取出睾丸及附睾组织称重,取附睾对侧中部的睾丸组织,一部分置入 Bouin 氏液固定,常规石蜡包埋,切片, H.E. 染色,观察精子发生状态;另一部分用酶消化法制成睾丸细胞悬液,具体方法可参见文献<sup>[8]</sup>主要步骤如下:

去睾丸的被膜及血管,用 Hank 氏液洗

↓  
胶原酶消化(25 $\mu$ /ml, 33 $^{\circ}$ C 振荡 30 分钟)

↓  
Hank 氏液洗 2 次

↓  
0.25%胰蛋白酶消化, 30 分钟

↓  
用 60 $\mu$ m 不锈钢网过滤

↓  
滤过细胞悬液离心(500 转/分 $\times$ 10 分钟)

↓  
Hank 氏液洗,离心 2 次

↓  
DNA 酶(1 $\mu$ g/ml)消化、洗涤

↓  
调整细胞浓度达  $1 \times 10^7$ /ml

将细胞悬液充分混匀,吸取 0.2ml,加入 5ml 冰冷的含 0.1% Triton, 0.3M NaCl 的 0.01N 甘氨酸氢氧化钠缓冲液(pH10.0)。然后依次加入 200 $\mu$ g/ml 的溴化乙锭 Ethidium Bromide(EB)染液(BDH)0.1ml 及 10mg/ml RNA 酶(中国科学院上海生物化学研究所)Tris 液 0.2ml。混匀置于暗处 4 $^{\circ}$ C 10 分钟,再置于室温下 5—10 分钟,取一滴在荧光显微镜下检查,若细胞核呈明亮的橙红色荧光,即可上机分析。

我院试制的 LXJ 型激光流动细胞分析仪用氩离子激光作为激发光源,波长 4880 $\text{\AA}$ ,光电倍增管前放置一块 6100 $\text{\AA}$  干涉滤色片(半波宽为 110 $\text{\AA}$ )及两块 5800 $\text{\AA}$  长通滤色片,可阻挡 4880 $\text{\AA}$  的散射光,并允许 6100 $\text{\AA}$  的荧光信号通过。实验结果用阻尼最小二乘法拟合程序在 CROMEMCO Z-80 微型计算机处理得出 1N, 2N, 4N 等各类细胞占群体的比例数。

## 结 果

一、以 N<sub>81</sub> Wistar 大鼠的分析结果为例,测定结果及直方图如下。

1N: 65.02%    2N: 3.81%

4N: 13.40%    S: 12.77%

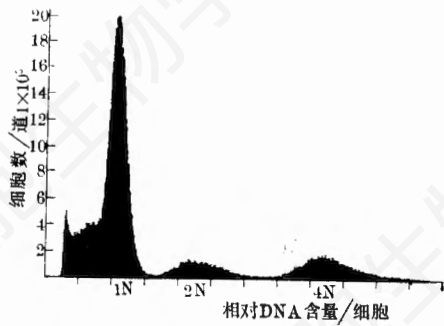


图1 №1 Wistar 大鼠分析结果

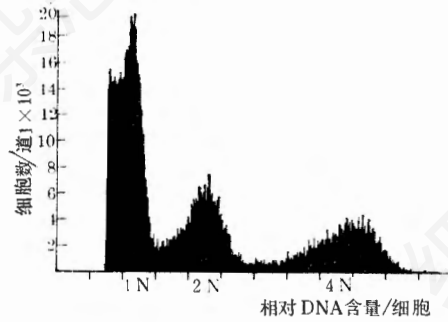


图2 不育大鼠的测试结果

在1N峰的左侧还有不规则的峰波，这是由于精子形态不规则，在测试中造成1N峰部

分向左延伸的结果。

二、各组测定的结果见下表：

物种	例数	1N%arcsin√		2N%arcsin√		S%arcsin√		4N%arcsin√		1N/4N	4N/2N	1N/2N
Wistar大鼠	7	67.35	55.15 ±1.96	11.49	19.81 ±1.99	6.53	14.80 ±4.40	14.02	21.99 ±2.79	5.00 ±1.25	1.26 ±0.34	6.01 ±1.15
杂种大鼠	9	64.74	53.57 ±2.26	16.50	23.97 ±1.08	—	—	18.66	25.59 ±2.47	3.47 ±1.38	1.13 ±0.64	7.84 ±1.25
C57BL小鼠	10	72.75	58.53 ±2.90	11.13	19.49 ±2.01	—	—	15.96	23.55 ±3.15	4.86 ±1.74	1.43 ±0.78	6.73 ±1.55
金山灰兔	9	71.07	57.46 ±3.19	19.83	26.44 ±3.31	—	—	8.98	17.44 ±1.41	7.91 ±1.56	0.45 ±1.12	3.58 ±1.28
金山田鼠	5	67.04	54.96 ±3.33	11.52	19.84 ±2.60	4.90	12.79 ±1.56	16.22	23.75 ±3.79	4.46 ±1.74	1.47 ±0.54	6.07 ±1.82
豚鼠	9	69.16	56.29 ±2.11	13.35	21.34 ±2.67	3.97	10.91 ±3.95	13.48	21.48 ±1.86	5.27 ±0.99	1.00 ±1.87	5.18 ±1.47

1N: C57BL 小鼠 > 金山灰兔 > 豚鼠 > Wistar 大鼠 > 金色田鼠 > 杂种大鼠

2N: 金山灰兔 > 杂种大鼠 > 豚鼠 > 金色田鼠 > Wistar 大鼠 > C57BL 小鼠

4N: 杂种大鼠 > 金色田鼠 > C57BL 小鼠 > Wistar 大鼠 > 豚鼠 > 金山灰兔

在实验中我们对先天不育的大鼠及小鼠各一个也用此技术进行了测定。组织学观察表明这些动物睾丸内有明显生精障碍。定量测试结果如下：

	1N(%)	2N(%)	S(%)	4N(%)
C57BL 小鼠	72.75	11.13	—	15.96
不育小鼠	55.79	10.89	2.97	30.33
Wistar 大鼠	67.35	11.49	6.53	14.02
不育大鼠	44.73	27.33	6.76	21.18

讨 论

对各组正常动物睾丸细胞悬液涂片进行观

察，间质细胞只占2%以下，故可认为睾丸细胞悬液中几乎全部为曲细精管内的细胞。曲细精管内主要包括 Sertoli 细胞与各级生精细胞，若以细胞内的 DNA 含量进行分类，可分以下几种：

1N 细胞：精子细胞，睾丸精子；

2N 细胞：Sertoli 细胞，G<sub>1</sub> 期精原细胞，细线前期初级精母细胞，次级精母细胞；

S 期(2N-4N)细胞：S 期精原细胞，细线前期初级精母细胞；

4N 细胞：G<sub>2</sub> 期精原细胞，细线期，合线期，粗线期，双线期初级精母细胞。

大体来说，1N 可代表变态期精子细胞的数目，4N 代表精母细胞数目，而 2N 主要反映精原细胞的比例。

文献上报道过大鼠及小鼠睾丸用激光流动细胞分析仪测得 1N 细胞约占 70—75%，而人类睾丸中 1N 细胞只占 40%<sup>[6]</sup>，这表明各种动物的正常精子发生过程中，1N、2N 与 4N 细胞的比例是不同的，至今未见对各种动物睾丸生精细胞比例比较研究的系统报道。本实验观察了六种品系哺乳动物睾丸内 1N、2N 与 4N 细胞的相对比值，发现对每一种动物来说，此比值是较为恒定的，各种动物的比值之间有所差异。这些数据为今后进行男性生殖生物学与男性计划生育研究提供了重要的依据。

我们也观察了二例先天不育动物睾丸的精子发生状态，常规组织学观察发现精子发生有明显障碍，但无法进行定量描述，用激光流动细胞分析技术获得了各类细胞相对比例的精确数据，如再结合组织形态观察，可对精子发生状态作出更为客观和科学的评价。

近年来，在临床不育症研究，尤其是少精症和无精症的诊断疗效评价和预后估测中已开始采用激光流动细胞分析技术<sup>[9-10]</sup>，在男性避孕药研究中，也有人以激光流动细胞分析代替睾丸活检。我们认为运用本方法研究睾丸精子发生有如下优点：(1) 把定性的描述过渡到定量研究，可进行数理统计，使实验结果的科学性大大提高。(2) 不必杀死动物，也不必手术取出人的睾丸组织，可采用穿刺的方法取得样本进行测试，并可在实验前后多次穿刺，以得到精子发生变化的动态概念。

然而，此仪器价值较昂贵，样品制备及测试也不算太方便。

总之，运用此法可对精子发生障碍的性质和程度以及抗精子发生药物的效果作出客观、精确的评价，在男性生殖生物学及男性计划生育研究中有其应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] Skakkebaek N. E. and Heller C. G.: 1973 *J. Reprod. Fertil.* 32:379.
- [2] 王一飞、朱继业、吴明章, 1980, 生殖与避孕 创刊号 1(1)25.
- [3] 王一飞、吴明章等, 1983, 解剖学报(印刷中).
- [4] 王一飞、吴明章等, 1982, 生殖与避孕, 2(4)22.
- [5] Vindelov L. L.: 1977, *Virchows Arch Abt. B Cell Path.* 23: 227.
- [6] Clausen O. P. F., Purvis K and Hansson V: 1978, "Endocrine Approach to Male Contraception", eds. Hansson V. et al., p. 5(3), Scriptor, Copenhagen.
- [7] Clausen O. P. F. and Abyholm T: 1980, *Fertil. Steril.* 34:369.
- [8] Clausen O. P. F., Purvis K and Hansson V: 1977, *Biol. Reprod.* 17: 555.
- [9] Hofmann N, Otto F. J., Hettwer H and Oldiges: 1981, "Fortschritte der Fertilitätsforschung", eds. Schirren C, Mettler L, Semmk, Bd 8:185. Berlin, Gross Verlag.
- [10] Frenndl G, Hofmann N, Otto F. J. and Hettwer H: 1981, "Advances in Diagnosis and Treatment of Infertility", eds. Insler V and Betteudorf G, p. 375—383, New York Elsevier North Holland.