



豚鼠不同部位精子乳酸脱氢酶同工酶 LDH-X 活性的比较*

刘吉祥 赵国印
(武汉军区军医学校)

Blanco^[1]和 Goldberg^[2]首先在青春期后的人睾丸组织和精子中发现乳酸脱氢酶同工酶-LDH-X(LDH-X), 后来相继证明这种同工酶存在于多种哺乳动物和鸟类的成熟睾丸及精子中, 以精子中的含量最高^[3-6], 定位于精子中段线粒体基质中的 LDH-X 占精子总 LDH-X 活性的 41%^[5,7], 可能与精子的代谢有关^[7,8]。LDH-X 的合成受 C 基因位点的控制^[9,9]。一般认为, 检验 LDH-X 活性是判断生精功能的可靠指标^[4,10]。近年来证明 LDH-X 具有种属特异性^[11], 注射纯化的 LDH-X 或抗 LDH-X 血清, 可抑制精子发生和妊娠率的明显下降^[12,13]。棉酚可特异地抑制 LDH-X, 具有明显的抗生育作用, 因而 LDH-X 活性可作为检验精子质量、筛选抗精子药物的敏感指标^[14]。

实验证明, 精子在附睾内成熟过程中, 发生一系列的变化, 但未曾报道 LDH-X 活性的改变。本实验试图用组织化学法观察比较豚鼠睾丸、附睾头、附睾体和输精管内精子线粒体 LDH-X 的活性, 了解其变化规律。

材料和方法

20 只健康成年雄性豚鼠, 断头处死后, 取部分睾丸、附睾头、附睾体(含尾)和输精管, 分别放入含有 5 ml 冷生理盐水容器内, 剪碎, 吸取含有精子的上清液, 2500 rpm 离心 15 分钟, 弃去上清液, 沉淀物(精子)做如下处理。

一、各取少量精子涂片后, 剩余的附睾头和附睾体的精子合为一起(因量少, 下称附睾内精子)称重, 按 0.1 g 沉淀物加 0.2 ml pH 8.6 巴比妥缓冲液稀释, 匀浆并冻融 2 次后, 3500 rpm 离心 25 分钟, 上清液在热处理前和经 65℃处理 15、20、25、30 分钟后, 用琼脂糖凝胶电泳法分离显示 LDH 同工酶, 以验证

LDH-X 的热稳定性。同样以上述方法对含有精子的睾丸和附睾进行处理, 与精子对照。

二、文献报道^[15,16]和上述实验结果(见下文)均证明 LDH-X 具有热稳定性, 根据这一原理, 把各部位的精子涂片经 65℃处理 30 分钟, 将其它同工酶破坏, 保留大部分 LDH-X, 然后按陈啸梅法^[14]在涂片上滴加标准显色液(对照组免去 NAD), 37℃显色 1 小时, 福尔马林钙固定 15 分钟, 蒸馏水洗, 甘油胶封片。油镜下观察 100—300 个精子, 分级记录每个精子的酶反应强度。

结 果

一、含有精子的睾丸和附睾匀浆上清, 经电泳分离, 分别显示出 5 条和 6 条紫蓝色同工酶区带, LDH-X 位于 LDH-3 与 LDH-4 之间。上清经 65℃处理后, LDH-X 显示有热稳定性, 其余绝大部分同工酶均被破坏(图 1、2)。

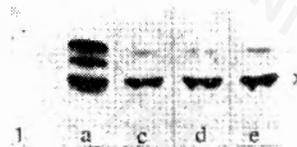


图 1 睾丸 LDH 同工酶谱

a、c、d、e 分别为热处理前和 65℃处理 20、25、30 分钟后的变化



图 2 附睾 LDH 同工酶谱

a、c、d、e 同图 1

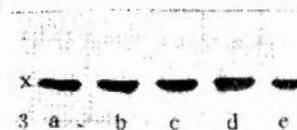


图 3 附睾精子 LDH 同工酶谱

a、c、d、e 同图 1, b 为处理 15 分钟后

附睾精子匀浆上清电泳分离, 仅显示出 1 条“x 带”, 有时 LDH-4、5 隐约可见, 经热处理后消失, 而 LDH-X 失活不明显(图 3)。

* 本文承华中师范学院生物系刘秉正教授和蔡亚娜副教授提供宝贵意见, 特此致谢。

二、为比较各部精子中段线粒体 LDH-X 活性, 根据酶反应强弱分为 5 级。(-)不着色; (+)弥散染色, 或有细粒甲腈沉淀; (++)有较多中等大小的颗粒, 或出现小的斑块; (+++)有较多较大的颗粒, 甲腈沉淀斑块中等大小; (++++)颗粒大、多而染色深, 斑块大。

睾丸内大多数精子为(+), 甲腈沉淀斑块较小接近于颈部(图4); 附睾头和附睾体精子以(++)和(+++)为主(图5、6); 输精管内精子以(++++)和(++++)为主, 斑块近于主段(图7)。



图4 睾丸内精子,
箭头所示破碎
细胞



图5 附睾头精子

参照一般细胞化学积分方法进行半定量, 结果表明, 睾丸内精子 LDH-X 活性较低, 附



图7 输精管内精子

睾头和附睾体内精子其活性明显增强, $P < 0.01$, 差别非常显著, 但附睾头和附睾体内二者差别不显著($P > 0.05$); 输精管内精子 LDH-X 活性进一步增强, 与附睾内精子比较, 差别非常显著($P > 0.01$)。

讨 论

Goldberg^[16]用 65℃处理 LDH 同工酶, 发现 LDH-5、LDH-1 和 LDH-X 的半衰期分别为 9、10 和 43 分钟, 说明后者具有热稳定性。本实验进一步验证了这一特性, 并根据这一特性, 用 65℃处理豚鼠精子涂片, 将其它同工酶破坏, 保留大部分 LDH-X, 然后再进行组化染色。此法简便、特异性强。

睾丸中的精子必须在附睾中再经过一段时间的发育才能达到功能上的成熟, 在成熟过程中, 精子发生超微结构、生理生化等方面的变化。本文通过比较睾丸、附睾和输精管内精子中段 LDH-X 活性发现, 上述各部位精子中 LDH-X 活性依次逐渐增强。一般认为, 精子在附睾内成熟, 依赖于附睾的正常内环境, 特别是附睾管腔中的甘油磷酸胆碱(glycerophosphoryl choline)、涎酸(sialic acid)和肉碱(carnitine)这三种物质的正常浓度以及一定水平的雄性激素^[17], 输精管内精子 LDH-X 活性进一步增强, 可能是这些物质继续作用的结果。

参 考 文 献

- [1] Blanco, A. et al., 1963, *Science*, 139:601-602.
- [2] Goldberg, E., 1963, *Science*, 139:602-603.

- [3] Goldberg, E., 1975, *Acta. End. Suppl*, 78 (194):202—222.
- [4] Blackshaw, A. W., 1973, *J. Reprod. Fert Suppl*, 18:55—64.
- [5] Montamat, E. E. et al., 1976, *Exp. Cell. Res*, 103:241—245.
- [6] Blanco, A. et al., 1964, *J. Exp. Zool*, 156: 137—152.
- [7] Clausen, J., 1969, *Biochem J*, 111:207—218.
- [8] Blanco, A. et al., 1976, *Biochem J*, 153: 165—172.
- [9] Zinkham, W. H. et al., 1963, *Science*, 142: 1303—1304.
- [10] Hodgen, G. D. et al., 1973, *Endo*, 93(4): 985—989.
- [11] 周孝瑚等, 1984, 生殖与避孕, 4(2):29—32.
- [12] Wellerson., R., et al., 1974, *Int. J. Fertil*, 19:65—72.
- [13] Lerum, J. E. et al., 1974, *Bio Reprod*, 11: 108—115.
- [14] 陈啸梅等, 1983, 中国医学科学院学报, 5(4):223—226.
- [15] Hawtrey, C. O. et al., 1970, *J Exp Zool*, 174:173—186.
- [16] Goldberg, E., 1972, *J. Biol. Chem*, 247(7): 2044—2048.
- [17] 上海第一医学院, 1978, 组织胚胎学, 人民卫生出版社, 229.

杨树叶细胞“壁旁体”的亚微结构

黄金生 樊汝汶
(南京林学院)

在植物材料的电子显微图像中经常可以观察到一些囊、泡状膜结构^[1,2,3]。R. Marchant 和 A. W. Robards (1968) 综合了以不同植物为材料, 使用不同固定液、脱水剂、包埋技术所得到的资料, 认为这些结构是真实的, 并且普遍地存在于植物细胞中。他们提出了“壁旁体”(paramural body) 这个通用术语^[1]。壁旁体包括了与质膜结合的多种形态的囊、泡状膜结构。对于这些结构的功能和发育还缺乏足够的研究。我们在杨树成熟叶的电镜观察中, 经常发现与壁旁体有关的囊、泡状膜结构存在。本文将描述这些结构的亚微形态, 并结合前人的工作对其功能进行讨论。

材料和方法

实验材料为美洲黑杨 [*Populus deltoides* Bartr. var. *deltoides* cv. "Lux" (ex. 1—69/55)] 的成熟叶片, 于 10 月中旬采自南京林学院校园。样品取自顶端第 4—10 片叶中部侧小脉处。叶片小块经 4% 戊二醛和 1% 锇酸(均用 0.1 M, pH 7.3 的磷酸缓冲液配制) 双固定。戊二醛预固定 5 小时, 锇酸后固定 2 小时。包埋于 Epon 812。超薄切片经常规轴、铅双染色, 在 H-600 型电镜下观察与拍片。

观察结果

经电镜观察叶片细胞亚微结构保持良好, 各种细胞器形态正常, 仅叶绿体内类脂球数目多体积大, 显出组织开始衰老的特征。在叶肉细胞和小脉薄壁细胞中都可观察到与质膜有关的囊、泡状结构, 尤其在小脉的薄壁细胞中这些结构更是丰富。其亚微形态主要有三种: 多泡体、质膜内陷成袋状和质膜与胞壁间的单个小泡。

(一) 多泡体

由单层膜包着大小不同的小泡组成。所观察到的多泡体有些悬浮在细胞质中, 甚至可以在细胞质深处靠近液泡。多数多泡体则靠近质膜。当多泡体与质膜相联时, 其外膜与质膜显出融合的状态(图版图 1)。在叶肉细胞中多次见到多泡体出现在接近或恰好对向细胞壁的纹孔(图版图 1、2)。有些多泡体与质膜相结合, 联接处多泡体外膜与质膜均消失, 可以观察到多泡体内小泡向质膜外释放(图版图 3), 表现出外排现象(exocytosis)。

(二) 质膜内陷成袋状

质膜向细胞质内陷入, 在成袋状的膜内可