

303/12

## 男性生殖生理及其调控

(综述) 薛礼普

男性生殖器官包括外生殖器和内生殖器两个部分。它们在中枢神经系统、下丘脑、垂体、睾丸性腺轴的内分泌调控下，完成雄性生殖过程。近年来，随着世界人口剧增，计划生育已成为当务之急，雄性生殖的研究也因之迅速发展。下面仅就学科发展趋势及其研究热点与战略意义综述如下。

### 一、睾丸与精子发生

睾丸既是产生精子的器官，又是分泌雄性激素的内分泌器官。这两种功能均接受下丘脑垂体高级生殖中心的调节控制。精子产生于睾丸中盘曲的生精小管（曲细精管）中，而在小管之间的睾丸间质细胞则合成和分泌雄性激素，一方面脑及垂体分泌的激素协同推动和维持生精上皮中精子发生过程；另一方面促进和维持附属性器官及第二性征的发育、成熟和功能的表达，调节男性躯体结构生理特征。青春期前如切除睾丸，将出现躯体发育不全，肌肉、毛发、声带、脂肪代谢和体温女性化；切除垂体则睾丸萎缩。

1. 精子发生与生精上皮周期 精子发生于睾丸曲细精管（生精小管）内由两种类型细胞组成的复层生精上皮（图1）。其中支持细胞为呈不规则长锥形排成单层横贯上皮，而处于不同发育阶段的生精细胞则错落有序地排成5~6层同心圆复层。生精上皮的基底有一层很薄的基膜，在其外面还包有一层含肌样细胞和胶原纤维构成的固有膜。这些细胞的收缩可使曲细精管中的精子和液体流向直小管和睾丸网。它们分泌的细胞外间质ECM能传递信息和介导管周细胞、支持细胞、及间质细胞之间的相互作用。

各级不同发育阶段的生精细胞均与支持细胞紧密接触，并受后者的调节形成排列有序的细胞组合。位于同心圆同一层的细胞处于精子发生的相同发育阶段，为同一世代同步发育而来的细胞。同代细胞之间有细胞连接，进行细胞间物质及信息流通以保证同步发育。通常由5~6层（代）不同发育期生精细胞按固定的配伍形成不同的细胞组合。在精子小管横断面上可看到不同的细胞组合图像，不同动物的细胞组合数目互不相同（图2），人的生精上皮有6种细胞组合（图3），这6种细胞组合图像依次形成连续阶段，周而复始，反映了生精上皮的周期性变化的规律性。从某一细胞组合的出现到这一组合图像的再出现，称为一个生精上皮周期。所经历的时间称为周期时长。周期中每一个细胞组合图像称为一个期相。同种动物的周期时长和每个期相所持续的时间相对恒定，可用 $^3\text{H-TdR}$ 标记予以追踪计算。人的生精上皮一个周期时长为 $16\pm$ 天，从精原细胞发育至变态分化、精子排放约经历4~4.5个生精周期，约需64~72天（亦即为精子在上皮中的发生时长）。精子由睾丸运行至附睾尾端的时长约为二周。各种哺乳动物的生精上皮时长、精母细胞成熟（减数）分裂时长、精子变态时长和精子发生时长等均有种属特异性和比较恒定，这对研究抗生育药物的作用部位、环节、靶细胞类型、作用机理和确定药物起效时间等具有重要的实用价值。

从精原细胞发育为高度分化的单倍体成形精子经过三个阶段：

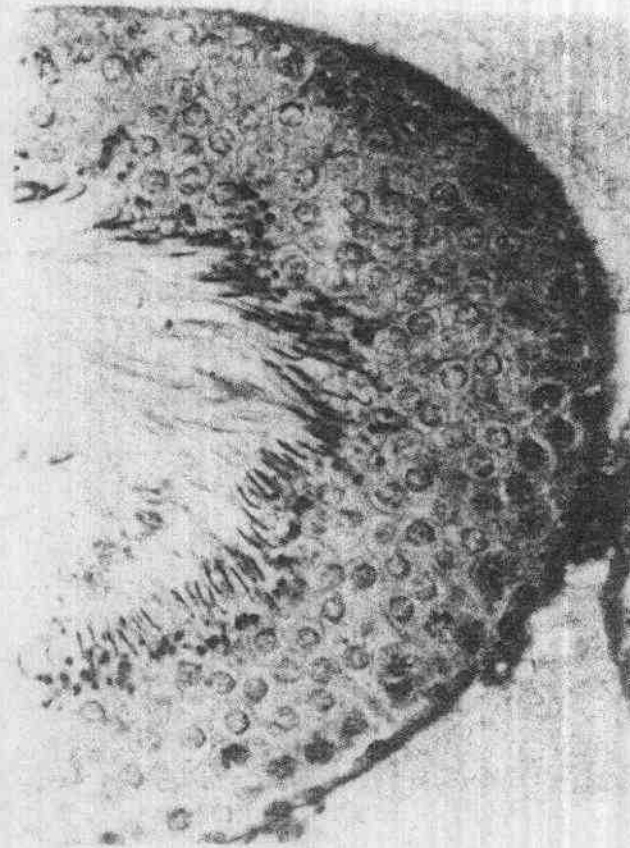


图1 正常生精上皮切面 (pas-hematoxylin 染色)

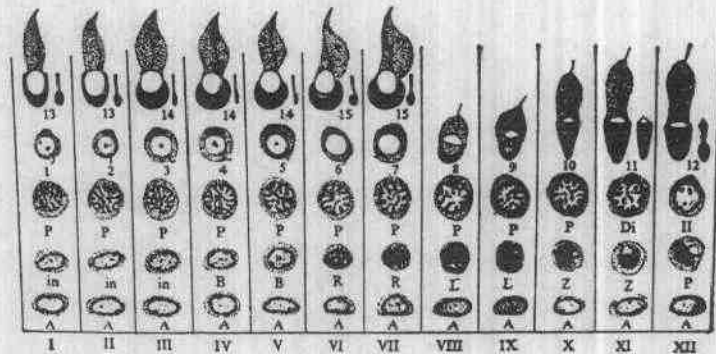


图2 豚鼠生精上皮周期

- A: A型精原细胞, in: 中间型精原细胞  
 B: B型精原细胞, R: 细线前初级精母细胞  
 L: 细线期精母细胞, Z: 合线期精母细胞  
 P: 粗线期精母细胞, Di: 双线期精母细胞  
 I: 次级精母细胞, 1~15 不同分化阶段的精子细胞

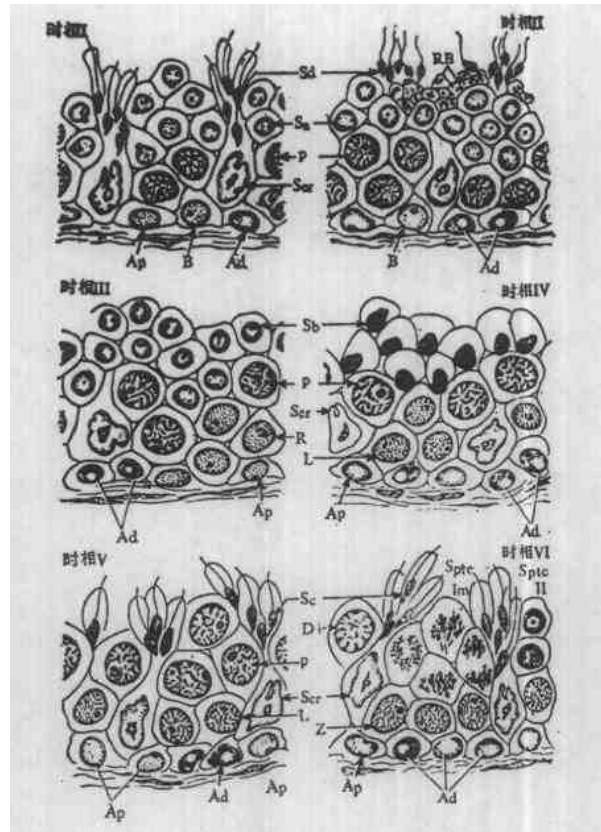


图3 人类生精上皮周期

Ser: 支持细胞, Ad: A型暗精原细胞, Ap: A型亮核精原细胞, B: B型精原细胞, R: 细线前期初级精母细胞, L: 细线期精母细胞, Z: 合线期精母细胞, P: 粗线期精母细胞, Di: 双线期精母细胞, Sptc-Im: 分裂期初级精母细胞, Sptc-I 次级精母细胞, Sa、Sb、Sc、Sd 不同分化期的精子细胞, RB: 残余小体

(1) 精原细胞的分裂增殖、更新精原干细胞和产生精母细胞; (2) 精母细胞的减数分裂, 产生染色体数量减半的精子细胞; (3) 精子细胞进行分化变态过程, 发育为成形的精子, 包括核变长、浓缩成形, 顶体及鞭毛、轴丝的发生, 核蛋白的组型转换, 出现精子特异性乳酸脱氢异构酶 LDH-X (或 C<sub>1</sub>) 以及与精子排放有关的一系列物质改变等 (图 4)。在上述三个阶段发生过程中, 各级细胞在核酸、蛋白质、特异酶、糖元、脂质等代谢状态均呈规律性变化。DNA 在减数分裂前后含量呈倍数改变, 反映了 DNA 和染色体合成、复制的变化规律 (图 2-4)。不育男性核型畸变率高达 20%, 使用抗生育药物也会引起核型异常。这些均可作为检验精子发生和评价药物的指标。在精子细胞变态的过程中, 糖原、脂质及核酸等代谢产物大量随细胞质排弃, 代之以出现精子特异乳酸脱氢酶异构体 (LDH-X) 及六碳糖激酶以适应能量需要。在变态后期, 蛋白质碳酸激酶增多, 出现不断的磷酸化和脱磷酸化, 蛋白质 SH-基向 SS 键转变和核组蛋白中以精氨酸替代赖氨酸为主的核蛋白组型转换等过程, 使核蛋白与 DNA 紧密结合, 形成可抗拒去氧核糖核酸酶的双折光高度浓缩的精核结构, 以保证精子整套基因处于包装和不活跃状态。上述核组蛋白转型失常会导致精子鱼精蛋白合成缺陷性的男性不育。

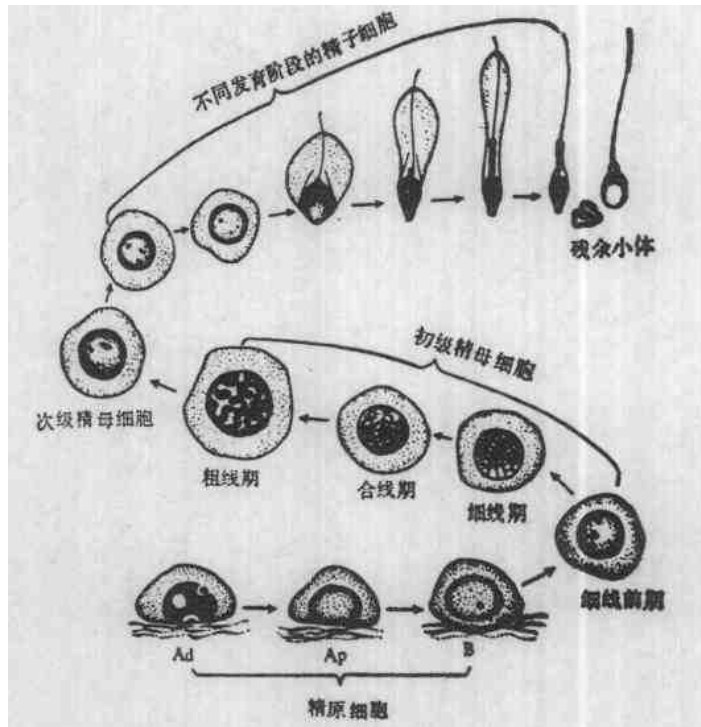


图4 精子发生示意图

Ad: A型暗核精原细胞, Ap: A型亮核精原细胞 B: B型精原细胞

精子发生是一个复杂而有规律有周期和同步发育的过程。从精原细胞的分裂增殖、精母细胞减数分裂到精子细胞变态分化成熟和运行至附睾的漫长过程中，处于相对封闭的内在特异微环境条件下，它们对外来因素非常敏感，其中不少薄弱环节容易受到攻击。寻找和干扰其中的薄弱环节以利于设计节育措施，是目前研究调控男性生殖的重要方向之一。（见本文调控一节）。

2. 支持细胞 支持细胞 (sertoli cell) 是生殖上皮中的非生殖细胞，是精子发育、营养、代谢、移位、排放和免疫的血睾屏障。它形成许多凹窝及胞质突，包嵌生精细胞，因而与生精细胞紧密接触，是精子发育的基地，并随精子发生的周期而呈现相应的周期变化。细胞的一端附着于曲细精管的基底膜，胞体横贯上皮迤直伸向管腔。核呈卵圆形与管壁垂直，染色质细，着色浅，核仁明显，由一个大的真核仁 (plasmosome) 和 2~3 个所谓随体染色质小核仁 (satellite karyosome) 组成。胞质内含丰富的内质网、溶酶体、脂滴、各种形状的致密小体和高尔基体，在细胞顶部有纵向排列的微管和微丝，棒状线粒体。在人类还可见到称为 Charcot-Bottcher 类晶状体的特殊标志。支持细胞的功能是多方面的，由于各级生精细胞均嵌入于支持细胞中，在精子发生过程中起着多环节调节作用。除最基本的为各级生精细胞提供营养、保育、支持、和合适的微环境，吞噬生精过程中的代谢产物之外，本身还形成血睾屏障，分泌曲细精管液，合成雄性激素结合蛋白 (ABP)、抑制素 (inhibin) 和激动素 (activin)；支持细胞本身含有 FSH 和雄激素受体，以调节激素代谢和生精细胞的周期性分化、成熟、排放活动等。相邻支持细胞胞膜在一定部位粘连形成紧密连接，构成血睾屏障，可阻止单倍体精子细胞产生的抗原物质通过，防止产生自身免疫反应。紧密连接将生精上皮分隔

为基底室和近腔室，各分泌不同的微环境液为各自的生精细胞的变态创造合适的条件。抑制素和激动素分别抑制和刺激垂体 FSH 的分泌，具有负或正的反馈调节作用。支持细胞还含有可转变  $C_{21}$  类固醇为睾酮的羟化酶和转变睾酮为雌激素的芳香化酶等，具有合成激素的功能。胚胎期支持细胞分泌 Jost-X 因子，是导致男性胚胎 Muller 管退化和抑制 Muller 管发育的抑制因子。由于支持细胞对精子发生的多功能作用，干扰其中任何一个过程均有可能导致生精障碍。因此，近年来研究支持细胞的形态和功能，通过体外培养体系、微环境分析，从血睾屏障、生殖激素受体、减数分裂因子、成熟精子排放机制等方面探索男性生殖途径已成为国际上的焦点研究课题之一。近年来发现 sertoli 精子排放期 (VI-VII 期相) 大量分泌纤溶酶原激活因子 PA (plasminogen activator)，分泌量较其它期相高 100 倍 (Russell 1977, Lacroix et al 1981)，认为与精子的释放有关。通过 PA 水解酶的作用，还可周期性地调节精原及精母细胞在生精上皮内的迁移，(通过支持细胞紧密连接的周期性开放面依次迁移)。这为干扰该环节达到不育提供了线索，也是我国亟待开发的项目。

精子发生的最大事件是由体细胞型双倍体 DNA 的精原细胞通过精母细胞阶段的减数(成熟)分裂发育成为单倍体 DNA 的精子细胞(生殖细胞型特征)。这是分辨生殖细胞与体细胞的分水岭。在睾丸的生精上皮中，则以支持细胞紧密连接形成的隔膜将之分开。隔膜将生精上皮分隔为靠临曲细精管腔的近腔室和面向细管基底膜的基底室。双倍体的精原细胞和初级精母细胞位居基底室，而单倍体的次级精母细胞和精子细胞则位居近腔室。该隔膜形成血睾屏障，一方面阻止二个腔室的抗原物质通过，以防产生自身免疫反应；另一方面保证二个腔室各自形成不同的微环境，以适应各自不同生精细胞发生的条件。精原细胞核中的 DNA 均含有与体细胞类似的以赖氨酸为主结合的组蛋白(histone)，即其核蛋白主要含富于赖氨酸的组蛋白： $H_1$ ， $H_{2a}$ ， $H_{2b}$ ， $H_3$ ， $H_4$ 。在精原细胞发育为初级精母细胞和开始减数分裂期间，核中组蛋白开始转变为睾丸类型的组蛋白。其中  $H_1$  转变为  $TH_1$  (或称  $X_1$ )， $H_{2b}$  转变为  $TH_{2b}$  (或称  $X_3$ )。同时出现特异的乳酸脱氢同工酶 LDH-X (或称 LDH- $C_4$ )。该时精母细胞也由基底室移入近腔室进行减数分裂。减数分裂后形成单倍体的圆形精子细胞，核组蛋白含精氨酸成分增高，取代含赖氨酸的体细胞型组蛋白。圆形精子细胞生长时， $X_1$  和  $X_3$  型组蛋白进一步变成 TP1、TP2 及 TP3。到变态的终末分化期，核蛋白组型为以精氨酸和胱氨酸，半胱氨酸为主的精子特异核蛋白 TP3 及  $S_1$  并最终定型为成熟精子的鱼精蛋白(protamine)为主的精核蛋白  $S_1$ 。上述核内染色质和 DNA 结合的组蛋白逐步被精核 protamine 取代而形成精子特异核蛋白和染色质的过程称为精核蛋白取代过程(histone protamine replacement reaction, HPRR)。这种单倍体精子核蛋白的染色质分子结构属线形排列模式，与体细胞染色质是核小体串珠状结构不同(Ward 1992)。人类和小鼠及猴等哺乳类动物的精核蛋白类型相似，均属富含精氨酸和半胱氨酸的碱性蛋白。已有资料表明，精子核蛋白 protamine 含量过低或缺失与不育有关。人类精子变态过程中 HPRR 精核蛋白基因表达异常能导致不育。表明 HPRR 是精子发生过程中的一个薄弱环节，干扰这一环节可能为男性节育提供新的途径。

在精核蛋白转型的同时，生殖激素通过 cAMP 途径，引发核蛋白发生一系列磷酸化和脱磷酸化过程。磷酸化调动核蛋白与 DNA 结合，而脱磷酸化则使核蛋白紧密结合和浓缩。其中所含的精氨酸型蛋白可抑制 DNA 转录和复制。精子头部核蛋白的浓缩也是抑制精子 DNA 中基因转录和表达的一种包装过程。这期间，核蛋白中的半胱氨酸组分(SH 基)也不断进行双硫键(SH $\rightarrow$ SS)的转换反应，对精核结构浓缩起进一步的作用。

从上述精子发生的生化事件,可提出一些值得深入研究的问题:(1)如何由精原细胞的普通有丝分裂转变为精母细胞的减数分裂,与各自所处的支持细胞腔室微环境有何种相关?抑为性激素激发特异基因表达的结果?(2)减数分裂初期出现精子特异乳酸脱氢酶 LDH-X ( $C_4$ ),是否该酶为减数分裂的特异性酶?(3)发生过程中由富含赖氨酸的体细胞型组蛋白转变为富含精氨酸为主的精子细胞特异类型组蛋白的替换反应与它们之由双倍体 DNA 转变为单倍体的减数分裂同是导致生殖细胞终末分化的重要生化事件,二者之间有无互为因果关系?是否有一生殖细胞分化基因组在主宰这一事件?均属值得探讨的课题。

## 二、附睾生理

附睾为连接睾丸的排精和精子生理成熟的管道,由盘曲的头、体、尾三部组成,外披三层与睾丸连续的被膜(鞘膜、白膜、血管膜),上皮为假复层柱状,主要由主细胞和基细胞组成,游离面有纤毛,又因细胞类型比例的不同而区分为功能不同的区段。头段为睾丸液重吸收及精子胞质小滴等脱落物质代谢的部位;体段和尾段分泌多种特殊物质和附睾液,对雄激素水平的改变非常敏感,为精子的生理成熟提供条件。尾段 pH 低,含氧少,是保持精子处于静息状态的特殊环境,为精子的良好储存库。附睾上皮细胞膜彼此粘连亦可和支持细胞类似形成紧密连接的血附睾屏障,将附睾微环境与体液分隔,以防止发生自身免疫。各段附睾液的化学性质成分不同,头段含 KCl 及谷氨酸盐浓度较高,自此向尾段逐渐减少;体段和尾段含甘油磷酸胆碱,肉毒碱,涎酸糖蛋白和固醇类等物质,可能与抑制精子代谢活动,促进生理成熟有关。精子到达附睾后,吸收附睾上皮细胞分泌液,自身合成能源 ATP 和增强代谢活性,逐渐获得活动和受精能力。有报道附睾上皮分泌的特异性蛋白(如前向运动蛋白 FMP 及磷酸二酯酶)和钙离子条件是调节精子轴丝产生鞭毛式运动的重要因素。附睾头段分泌液中含有高浓度的唾液酸糖苷转移酶,可将唾液酸转移到精子表面与糖链结合(称为唾液酸化过程 sialylation),将精子表面特异抗原(尤其顶体抗原)覆盖,使其处于不活动(去能因子作用)状态。直至以后与附睾尾段分泌液中的唾液酸苷酶接触后,将唾液酸去除(称为去唾液酸化过程 desialylation),才获得受精能力的“获能”。故精子表面膜在附睾内的成熟过程中出现明显的唾液酸化(sialylation)和去唾液酸化(desialylation)的获能过程。表面膜本身的流动性、SH 基及凝集素(ConA、WGA、E 及四环素)受体等随过程而发生动态的质、量变化,其规律及作用尚有待于阐明。从睾丸和附睾头段取出的精子不能使卵子受精,只有到达尾段的精子才有主动运动和受精的能力。尾段管壁较头、体段为厚,增加了纵行和斜行肌层,在交感神经兴奋和射精时可作强烈收缩而将储存的精子排出。精子由睾丸运行至附睾的时间因动物品种而异,人、猴、大鼠、豚鼠为 2 周,兔和小鼠为一周。储存在附睾尾部的精子存活期在牛、羊为 30~45 日,兔和豚鼠为 55~70 日,人约 1~2 个月,蝙蝠则达数月。长期禁欲的人排出的精子畸形率和死亡率均较高,与畸形胎的产生有关。

附睾由于是睾丸后精子发生处于最后生理成熟阶段的管道,是干扰和中断精子成熟发生的最理想靶了器官,因而是目前国际上企图通过调控精子生理成熟环节,干扰精子运动能力以达到抗生育目的的一个极受重视的焦点研究领域。

## 三、睾丸的内分泌功能及性激素调节体系

睾丸的另一个重要生理功能是它的间质细胞(Leydig 细胞)合成和分泌雄性激素,以促

进男性性器官和第二性征的发育、成熟和维持正常男性功能，并与垂体促性腺激素协同影响曲细精管的精子发生过程。间质细胞的数量有年龄变化，青春期数量开始增多，壮年期达高峰，老年期下降，因此计算“间质细胞指数”可反映血液中睾酮水平。人类睾丸间质细胞病患者，血液中睾酮水平异常增高。间质细胞内含有类固醇羟化酶、脱氢酶、羟基类固醇脱氢酶 (hydroxyl-steroid DH)，侧链分裂酶和异构酶 (isomerase) 等一系列合成甾体激素的酶系。其中  $C_{20-22}$  侧链分裂酶可将存在于睾丸组织中的类固醇转变为孕烯醇酮，再经上述  $3\beta$ -羟基类固醇脱氢酶和异构酶等依次转变为孕酮、雄烯二酮、去氢异酮及睾酮。正常男子每天睾酮分泌量约为 6~10mg (血浆或尿测定)，早、晚水平不同。连续 43 天抽取血液测量表明呈脉冲式上下波动状态，称之为脉冲或瀑布式分泌。

睾丸的内分泌功能受上级生殖轴系激素的调节。男性生殖活动存在着“丘脑下部-垂体-生殖腺-附性器官”的生殖轴调节体系 (图 5)，轴系中各个环节相互作用和制约，任何一个环节损伤或缺陷均可导致生殖异常或功能消失。FSH 和 ICSH (LH) 或催乳素与 LH 的协同作用可使睾酮水平上升。 $^{131}I$  标记 LH 后用荧光抗体法可显示 LH 定位于间质细胞而不进入曲细精管，标记 FSH 则相反。HCG 可促进类固醇转变为孕烯醇酮，静注 HCG 60 分钟内睾酮水平增高 3 倍，临床上应用此法作为检查睾丸功能的指标之一。表明老年人反应降低，不育症患者 (如 Klinefelter 综合征)、肌无力症、性腺低能症和间质细胞缺少症等则几无反应。FSH 有加强曲细精管物质代谢和始动生精细胞分裂的作用，而对精子细胞的变态和成熟，则必需有 ICSH (LH) 及睾酮的协同作用才能完成。FSH 刺激 Sertoli 细胞产生 ABP，与睾酮结合，使局部睾酮水平增高，有利于精子发生、成熟和支持细胞本身的活动。

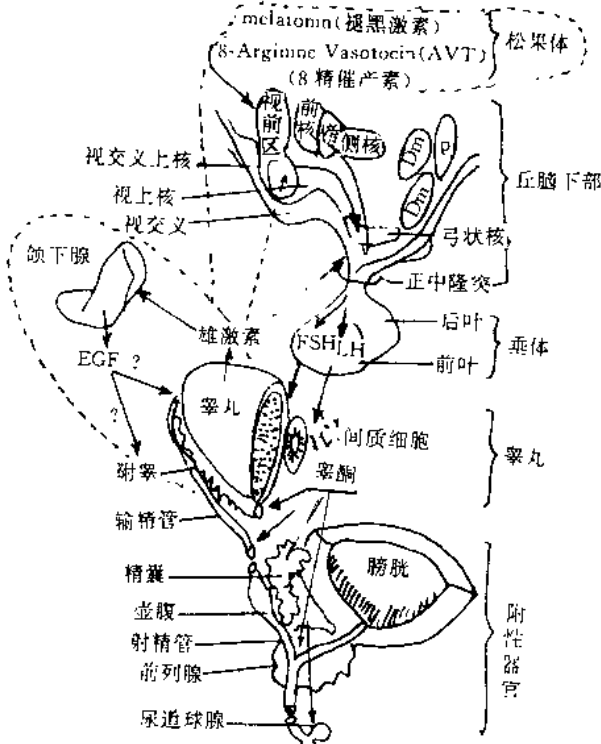


图 5 生殖性腺轴系图

近年来还发现存在上级的“垂体-丘脑下部-边缘系统”的调节体系(图5)。垂体通过促性腺激素控制睾丸的功能活动,而本身则受丘脑下部分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)的调节。丘脑下部视交叉上核和弓状核合成和分泌LH-RH,旁室核分泌FSH-RH。GnRH储存于正中隆突,其分泌和释放活动接受丘脑下部“周期调节中枢”、“分泌紧张中枢”和高级神经的协调。分泌的物质沿门脉系统毛细血管网传至垂体前叶,促进有关的细胞合成和分泌促性腺激素。丘脑下部上下方的边缘系统也参与这一协调过程,其中杏仁核可抑制促性腺激素的分泌,切断杏仁核-下丘脑束(终纹),可导致分泌过多,松果体亦有同样作用。相反,边缘系的海马区可促进这些激素的分泌,破坏海马则分泌受抑。情绪、视、嗅、触觉和应激等外界条件也可通过高级神经影响受体的分泌活动。另一方面,上述各个环节之间都存在一系列的反馈调节机制。血液中雄性激素到达一定水平后可通过体液途径反馈至垂体、正中隆突和视交叉上核,以抑制有关激素的分泌和释放。不育患者血液中雄激素水平低,缺乏反馈过程时,血液中的FSH和LH浓度异常增高;垂体内储存的GH激素过多时,亦可反馈至丘脑下部、正中隆突以进行调节。

除LH、FSH外,催乳素、去甲肾上腺素(NE),多巴胺,5-羟色胺,脑啡呔与内啡呔均可能对GnRH的分泌有直接或间接的效应。从性腺组织提取的抑制素已知可抑制垂体FSH和诱导cGMP的释放。抑制素在精浆中含量与精子数量呈正比,而与血浆中FSH含量呈负相关。测定血浆中抑制素水平可作为判定生精上皮功能的指标。

性激素调节精子发生以及性腺轴系各个环节之间的调节体系,虽然有许多薄弱环节可作为控制男性生育的研究依据。利用类固醇激素(雄激素、雌激素和孕激素等)及其化合物抑制LH和FSH的合成和分泌,阻断间质细胞的内分泌活动,或封闭激素受体等已大量试用作为节育措施;利用非甾体类具有抑制垂体功能的化合物(如Clomiphene, ICI-33828, 二溴化乙烯等)、抗雄性药物(如Cyproterone,  $\beta$ -去甲17 $\alpha$ -甲基睾酮及氯地孕酮等)以及抑制间质细胞药物(如Amphenone, methyl-onedianidine等)的动物及临床抗生育试验均在过去30多年中不同程度地进行过研究,但它们不是干扰性功能,便是毒副作用太大而未能应用于实践。如何通过性激素调节达到男性节育,仍然是今后在其基本理论研究中找出一条合理途径的重要研究课题。我国国产棉酚是非固醇类抗精子发生的男性节育药,虽然会对少数人引起低钾症,但仍然值得进一步研究。

#### 四、精浆分析和精子细胞学检测

精子从生精上皮释放后沿曲细精管管腔依次经过睾丸网管-输出细管-附睾管-壶腹-射精管-尿道等运行及排出。各段管道均分泌不同的液体孵育和运输精子,这些液体即汇集形成精浆。在各段插入小导管收集液体分检、阻断或结扎管道等是目前男性避孕所采用的一些措施。在我国,输精管结扎和粘堵已广泛试用于农村,但术后对生殖功能及可能引起的免疫反应尚有待研究。应用“分段射精精浆分析法”分段收集精液进行分析,能准确地反映各个附属性腺的功能状态,为临床诊断提供有价值的依据。临床上的“果糖-柠檬酸”综合分析颠倒顺序性射精不育及药物导致射精顺序异常的研究已引起重视。果糖和前列腺素来源于精囊,柠檬酸来源于前列腺,二者分泌量均与睾酮水平呈正相关,故二者的含量亦可作为鉴定雄激素含量的可靠指标。酸性磷酸酶及前列腺素是前列腺的另两种主要分泌物,前者是法医鉴定精液的最敏感指标之一。精液成分的生化分析对于评定精液质量及附属性腺功能无疑是必需的。



精子细胞学是对射出的成熟精子的形态、结构与功能进行细胞学研究的一个领域。包括对精子细胞器、染色质、膜结构和特异部位特异酶定位、精子运动、获能、畸形、病理和脱落细胞的研究等，是评价精子和精液的重要指标。精子顶体含有透明质酸酶、蛋白酶、脂酶、神经氨酸苷酶、酸性磷酸酶、磷脂酶、芳香基硫酸脂酶、B-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、胶原酶及顶体素（acrosin）等，位于顶体膜和基质内，顶体反应时释放，故与受精过程有关，顶体结构和酶系异常是男性不育的病因之一。精子中段富含琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、ATP酶辅酶及特异性乳酸脱氢酶等酶系，精子尾部含有可传导化学能的ATP酶系，与精子运动能力、类型、爬高等能源转运有关。超比例畸形精子、染色体畸变等是反映生精过程受损程度的检验指标。

精子获能是指精子在女性生殖道中经过生理生化改变而获得与卵子结合的受精能力。在进入雌性生殖道之前，精子外披有“去获能因子”的物质，这些物质在进入雌性生殖道后被去除而获能（Yanagimachi以BWW液处理精子后，放入有人体白蛋白BWW液中温育6小时亦可使之在体外获能）。获能过程中精子膜蛋白分子结构包括膜受体、活动性、通透性，尤其顶体膜均发生了明显改变。但这一过程是可逆的，与精液糖蛋白接触后又可“去获能”。

精子顶体反应是精子获能后在穿透卵丘、放射冠和透明带期间所发生的顶体形态生理不可逆反应。顶体是精子核前端的膜性帽状结构，分顶体帽区、体区及赤道板区，在其外、内膜之间有顶体腔，其中基质含有多种水解酶。顶体反应时精子质膜与其下方的顶体外膜出现多处融合，形成许多膜性小囊泡和间隙管道。在穿经卵丘和卵冠时，从间隙中释放出透明质酸酶以溶解卵丘细胞间质；穿透卵子透明带时则放出顶体腔或囊泡中的顶体素（含胰酶样蛋白水解酶），基质内酶系亦大量释放，顶体外膜最后破裂，内膜于是完全暴露。顶体内膜据认为是“识别装置”，它与卵子透明带互相识别（透明带上有精子识别受体），穿透透明带后，内膜与卵子质膜融合，是精子受精穿卵的关键步骤。干扰精子获能和顶体反应作为避孕措施的研究，已有不少的报导，但尚无突破。值得指出的是体外人工受精及试管婴儿领域已广泛利用了精子获能及顶体反应的研究成就，获得了明显的科技和社会效益。

## 五、男性生殖调控的基础理论研究

人口爆增问题是全球性三大问题之一。研究人类生殖活动规律，生殖生理和控制生育的安全，有效，经济，简便的方法措施，有计划控制人类生殖、生育和人口增长率，使之与经济发展相适应，是当前国际性关注的重大问题之一。

世界上第一代口服避孕药是50年代末期Pincus和张明觉根据妇女月经周期性激素水平变化而设计的。自此以后，避孕药具和一系列计划生育措施问世，包括80年代被广泛应用的节育药RU486，都是生殖生物学基础理论研究成果转化用于节育实践的实例。说明基础理论研究的重要意义。最近世界卫生组织（WHO）、联合国人口基金会、以及美国一些基金会（如Rockefeller, Ford及Mellon等基金会）等机构在总结过去和展望21世纪未来的文告中指出生殖生物学将面临三项改革：（1）重视生殖生物学基础理论研究，运用现代分子生物学和细胞生物学的科技于这一领域以开拓新路；（2）重视男性生殖生物学和男性避孕的研究，增强男性参与的意识。可见世界人口爆增问题的解决希望又重新回到基础理论研究和加强男性学研究的共识上。目前国际上尚无可推广应用的安全有效的男用节育药或理想的节育手段，应用现代分子生物学和细胞生物学知识从复杂而规律有序的精子发生、成熟分化过程和基因程

序性表达的调节体系中探索薄弱环节, 开发节育新途径, 是增强男性半边天参与节育和控制人口增长策略的重要措施。

精子发生的全过程在睾丸和附睾内完成, 从精原细胞增殖开始, 通过普通有丝分裂和精母细胞减数分裂, 由双倍体变为单倍体的精子细胞, 在通过由圆形伸长变形的一系列核蛋白替换转型、精核浓缩包装、顶体、轴丝和鞭毛形成以及同步排放至附睾内成熟分化的漫长过程中, 许多环节包括不同因素对不同基因在时、空间程序上精确有序地表达和相互作用机理等至今还不甚了解。其中几个关键性问题, 例如是否存在减数分裂因子始动相关基因导致由精原细胞的有丝分裂转变为精母细胞的减数分裂? 是否存在精子细胞变态分化因子以始动精子分化基因家族的程序性表达, 引致精子细胞核伸长的核质骨架体系和精核高度浓缩相关的核蛋白转型, SH 向 SS 基转变和特异乳酸脱氢酶表达等复杂生化事件与功能形态分化过程? 支持细胞如何调节紧密连接(血睾屏障)的破开与重建关闭, 以维持生精微环境和细胞在上皮内依次迁移及同步发育? 如何调控与其紧密嵌合接触的生精细胞发生过程中的程序性基因表达时序? 这些都是国际上有待解决的前沿课题。弄清其中关键环节, 不但对突破生殖生物学发展有重要学术意义, 而且有可能从中探索和 design 新的节育措施, 因而是国际上重点开展的人类生殖基础研究项目。

根据目前零星的资料, 精子发生不同阶段伴随着一些特定基因的依次表达。从分子水平看, 精子发生和成熟分化过程是一系列特定基因程序性表达的过程。已有资料表明用原位杂交方法已在人 Y 染色体长臂上分离出与精子发生相关的 YRRM 基因家族, 其微缺失可导致无精或少精不育(AZF 无精基因), 另一在 Y 染色体上的 SPY 位点认为与精原细胞(A 型)的生存与增殖有关。在减数分裂阶段, 已检测到 db-3、Pdha-2、Pgk-2、ferT 及 meg-1 等相关基因的表达, 以及可能在该期生精细胞中表达的 DNA 结合蛋白 C<sub>3</sub>P<sub>4</sub>。值得注意的是最近发现在精母细胞粗线期开始表达的雌激素“孤儿受体基因组”(orphan receptor genome), 其中 RTR 受体基因在睾丸中转录 7.4 和 2.3Kb 的 mRNA, 后者只在精母细胞中表达, 而 TR<sub>1</sub>, TR<sub>2</sub> 以及 GCNF (germ cell nuclear factor) 等孤儿受体 mRNA 则只定位于 VI-VIII 期减数分裂后的圆形精子细胞中, 表明孤儿受体基因与减数分裂本身及其以后的精子细胞成熟分化可能密切相关。早在 90 年代初期已有报道从人 Y 染色体短臂上检测到精子细胞变态分化有关的 TSPY 基因位点, 精蛋白-1,  $\alpha$ -微管蛋白和 ZIP-37 等基因和与精子排放有关的 Y<sub>353B</sub> 基因等。这些与减数分裂及变态分化相关基因目前均处于起步和探索阶段。鉴定, 筛选和克隆这些基因, 对于了解精子发生、成熟分裂、分化变态的分子机理及其调控十分重要。寻找薄弱环节, 阻断基因表达以中断精子的功能发育, 未尝不是男子节育的分子控制新途径。

精子变态过程是精子成熟分化的重要环节。圆形的精子细胞须经过伸长变态的复杂过程(图 4, 6), 涉及细胞核和附于核上的顶体的延伸, 核蛋白的转型、染色质的浓缩包装, 核骨架及细胞骨架-中心体(粒)体系的演变, 轴丝、鞭毛和精尾成形分化等一系列与形态互为相关的程序性基因表达的复杂变化。精子核蛋白通过连续的磷酸化和去磷酸化过程, 组蛋白-精核蛋白(鱼精蛋白)取代反应(Histone-Protamine Replacement reaction, HPRR)改变精核染色质的分子结构而高度浓缩。小鼠睾丸过渡型编码核蛋白(mTP<sub>1</sub>)、精核蛋白 mP<sub>1</sub> 和 mP<sub>2</sub> 等基因均在减数分裂后的变态期精子细胞中表达。其中 P<sub>2</sub> 精核蛋白富含精氨酸和半胱氨酸比较重要, 人的 P<sub>2</sub> 型精核蛋白基因表达异常可导致男性不育。表明 HPRR 是精子发生过程中可供利用的一个薄弱环节。单倍体的精子细胞骨架体系在精子变态过程中如何组构还不清楚, 仅

有的报道表明骨架微丝 actin 基因 mRNA 转录随变态分化而递减,微管  $\alpha$ -tubular 则在核染色质浓缩的同时,围绕核周盘转而与核伸长有关。起锚定细胞核位置的 vimentin 中间丝骨架和可能与核伸长及传导信息密切相关的核骨架 NM-L-IF 体系在变态过程中的改变则尚未有报道。在精子细胞伸长过程中,微管纤维聚集成束沿顶体后环伸向尾端,形成尾管 (manchette),是否与核伸长有关?中心体变态过程中,其近端的中心粒巧妙地镶嵌于核后窝,而远端中心粒则伸出轴丝形成鞭毛和向后延伸的中轴,其演变及形成的衍生物尚有待于追踪。干扰中心粒体系的定位表达,有可能终止精子细胞的变态伸长。由 9 条致密纤维形成的节柱,以及由线粒体形成的螺旋状线粒体鞘,均与精子成形有关,其来源与机理尚不清楚。其中许多环节,包括诸如生殖激素、泛素 (ubiquitin),和支持细胞提供的微环境因素等对于上述事件的变化,以及基因表达的时空程序影响作用至今还不很了解。有待深入研究,弄清其中的相关环节,才有可能从中予以调控。

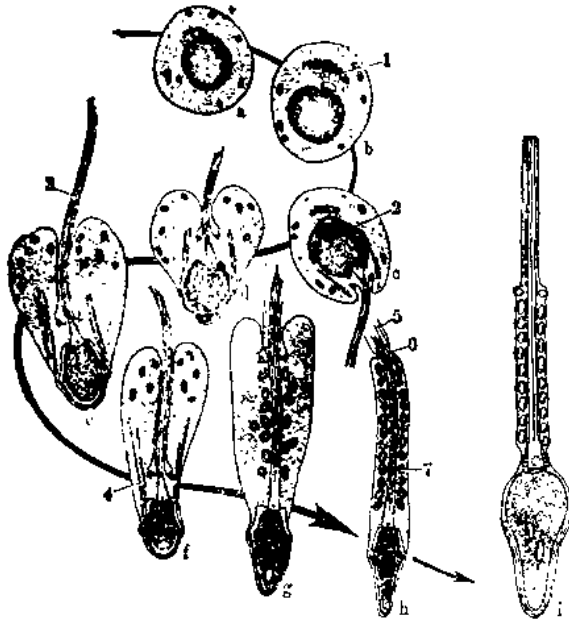


图 6 人精子细胞变态图解

1. 高尔基体 2. 顶体 3. 鞭毛 4. 尾管 5. 纤维鞘 6. 尾环 7. 线粒体鞘

支持细胞是精子发生的微环境,各级生精细胞均与支持细胞建立紧密嵌合接触结构的形态功能关系。相邻支持细胞以其紧密连接将生精上皮分隔为基底室和近腔室二个绝然不同的微环境。所形成的血睾屏障可阻止大分子物质如抗原或雄激素结合蛋白的通过以保证管腔内的激素水平,和防止产生自身免疫反应。生精细胞只有进入近管腔室微环境中才能进行减数分裂和变态分化。已知支持细胞能分泌多种蛋白质 (如转铁蛋白,硫酸糖蛋白,雄性激素结合蛋白 ABP,维生素 A 结合蛋白,蛋白酶,泛素 (ubiquitin),纤溶酶原蛋白,抑制蛋白以及各种神经体液因素等)和细胞因子 (如激动素/抑制素,纤溶酶原激活因子 PA 及其抑制因子 PAI,睾丸素 testin 1 和 2 等),它们的分泌呈周期依赖性表达,而形成各期相生精细胞发育所需的特定微环境。精子发生在生精上皮中出现下列四个重要环节,无一不与支持细胞的微环境密切相关:(1) 精母细胞减数分裂的微环境条件因素;(2) 初级精母细胞周期性地由基

底室通过血睾屏障迁入近管腔室的条件因素；(3) 单倍体精子细胞进行变态分化，引起核蛋白连续替代转型，浓缩包装以及中心体-骨架蛋白体系对精子形态塑造的微环境因素；(4) 变态后期精子脱离生精上皮进入管腔的排放 (spermiation) 和残体排弃的生化机理。也就是说，支持细胞对于精子发生、变态分化过程中的基因程序性表达起着关键性的调节作用。但是其微环境及局部因子如何按时空关系进行调动基因的表达与关闭的精细调节过程，有待于深入的基础理论研究，才有可能揭开其中的奥秘，为探索男性抗生育方法提供依据。

支持细胞的上述功能活动受生殖激素的调控，一方面是下丘脑-性腺轴系的调控，另一方面是睾丸的局部调控。支持细胞含有 FSH 及雄激素等相关激素的受体，通过受体始动支持细胞的分泌功能，转运激素至各级生精细胞以启动相关基因表达，促进生精细胞的增殖、分化和变态成熟。支持细胞和睾丸间质细胞 (leydig cells) 之间在激素局部调节上起重要作用，它们在不同促性腺激素作用下，通过各自的分泌和细胞因子相互作用，以维持睾丸内的激素正常水平。leydig 细胞合成和分泌睾酮局部作用于支持细胞以影响其微环境的维持，而支持细胞分泌的 activin/inhibin 等细胞因子可影响 leydig 细胞及轴系激素的分泌水平。这两种细胞的相互作用已知可影响 PA/PAI-1 系统的表达。它们之间还可通过自分泌和旁分泌 (autocrine-paracrine) 调节机制发挥作用。深入研究它们的作用相关机理，从中予以阻断，有可能导致产生新的抗生育措施。另一种值得注意的细胞成分是睾丸支持细胞和管周细胞所分泌的细胞外间质 ECM。其中包括各型胶原膜层连接蛋白 (LN)，纤维连接蛋白 (FN) 等，它们不仅参与固有膜的构成，而且具有活跃的生物活性，积极参与细胞的迁移、粘附、传递信息，介导细胞之间与大分子之间的相互作用。有报道附睾 ECM 对精子成熟和获能可能有关，精子膜上赤道纤维连接蛋白 (equatorial fibronectin band, EFB) 如果缺损，可能失去与卵子结合的能力。ECM 成分作为生精细胞附着的基质，不仅在生精细胞增殖、分化和成熟变态过程中起介导作用，是很值得探索的问题。

温度是精子发生的一个重要条件因素，隐睾患者精子发生受阻，最敏感的是减数分裂初期细胞和变态早期精子细胞，有趣的是隐睾往往伴随出现生精细胞的程序性死亡或凋亡 (apoptosis) 现象。因此通过隐睾手段研究生精细胞凋亡及其基因表达调控的关系，可能有意外的收获。

附睾是精子成熟 (功能性成熟) 的最后场所，附睾管不同区段细胞分泌不同的蛋白质和因子，在沿头段下行至尾段的过程中调节不同区段精子的成熟，使其获得具有自身运动的能力。研究附睾精子成熟因子及其分子机理，早就成为国际上的研究重点，并公认干扰精子成熟可能是一种最为理想的男性节育途径。

总的说来，男性生殖调控目前应重点放在下列三个方面进行细胞生物学和分子生物学的基础理论研究：

(1) 精子发生过程中生精细胞增殖分裂 (重点减数分裂)、变态分化时序中核蛋白和主要细胞器演变等重要环节的研究以及特异基因表达的检测、筛选和克隆；

(2) 支持细胞微环境和与间质细胞之间形成的睾丸内局部激素调节体系调控精子发生和变态分化过程的细胞及分子生物学机理研究；

(3) 附睾精子成熟的分子机理研究。

研究精子发生和成熟分化机制的难度是众所周知的，由于在生精上皮中生精细胞与支持细胞紧密镶嵌，分析它们之间的相互关系，尤其分子水平的功能相关极难找到确切的定量和

定位的分辨方法和指标。这是过去未能在这些领域取得进展的原因之一。近年来,随着高科技的迅速发展,在形态学领域出现二种可以在组织和细胞水平的原位上进行分子及基因表达水平的定位和定量的检测方法,分别称为分子原位杂交(in situ hybridization)和原位-PCR技术。男性生殖调控的研究,利用这些形态结合分子杂交技术,相信会在这一领域作出贡献。

### 参 考 文 献

1. Weiss, L. & Greep, R. O.. Histology. 4th Edition. New York. McGraw-Hill Book Company Inc, 1977, 979--1038.
2. Johnson, M. H. & Everitt, B. J.. Essential Reproduction. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1980, 33—63, 97—142.
3. 李肇特、薛社普. 组织学与胚胎学. 中国医学百科全书. 上海科学技术出版社, 1986, 163—170, 196—198.
4. 高英茂、张汇泉. 男性生殖系统. 上海第一医学院主编, “组织学”. 人民卫生出版社, 1981, 875—912.
5. Clermont, Y.. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat; A revised model for the renewal of spermatogonia. Amer. J. Anat., 1962, 111: 111.
6. Clermont, Y.. The cycle of the seminiferous epithelium in men. Amer. J. Anat., 1963, 112: 35.
7. Dym, M. & Fawcett, D. W.. the blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod., 1970, 3: 308.
8. Setchell, B. P.. Secretion of the testis and the epididymis. J. Reprod. Fert. Suppl., 1973, 20: 1.
9. Meistrich, M. L. et al. Control of synthesis of specific gene products during spermatogenesis, in “Cell Differentiation and Neoplasia”, edited by Grady F. New York. Saunders, Raven press, 1978, 403—412.
10. Mann, T. & Lutwak-Mann, C.. The Male Reproductive Function and Semen. New York. Springer Inc., 1981.
11. Kun Ma et al. Towards the molecular localization of the AZF locus: Mapping of microdeletion in azoospermia men within 14 subintervals of interval 6 of the Y chromosome. Human Molecular Genetics, 1992, 1 (1): 29—33.
12. Kun Ma et al. A Y chromosome gene family with RNA binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. Cell, 1993, 75: 1287—1295.
13. Sutcliff, M. J. et al. Analysis of the testis of H-Y negative *xosxr<sup>b</sup>* mice suggests that the spermatogenesis gene (SPY) acts during the differentiation of the spermatogonia. Development, 1989, 107: 373—380.
14. Zhang, Y. L. et al. Identification of an androgen induced C<sub>3</sub>P<sub>4</sub> DNA binding protein in the cytosol of rat ventral prostate. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 195 (2): 710—716.
15. Don, J. et al. Developmentally regulated expression during gametogenesis of murine gene *meg-1* suggests a role in meiosis. Mol. Reprod. Develop., 1994, 38: 16—23.
16. Chen, F. et al. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF): expressed during germ cell development. Mol. Endocrinol, 1994, 8: 1436—1444.
17. Arneman, J. et al. Cloning and sequence analysis of a human Y chromosome derived testicular cDNA. TSPY. Genomics, 1991, 11: 108—114.
18. Zhang, J. S. et al. Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. Human Mol. Genet., 1992, 1: 717—726.
19. Bishop, C. E. and Hatat, D. Molecular cloning and sequence analysis of a mouse Y chromosome RNA transcript expressed in the testis. Nucl. Acids Res., 1987, 15: 2959—2969.

20. Olive, R. & Dixon, G. E. Vertebrate protamine gene and the histone to protamine replacement reaction. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Bio.*, 1991, 40 : 25--29.
21. Ward, W. S. et al. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.*, 1991, 44 : 569—574.
22. Norman, B. et al. In situ localization of mRNAs coding for mouse testicular structural genes. *Exp. Cell Res.*, 1987, 173 : 274—281.
23. De Yebra, Y. et al. Complete selective absence of protamine-2 in human. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268 : 10553—10557.
24. 费仁仁、薛社普,等. 人类精子核蛋白的研究——100例不育病人精子碱性蛋白的分析. *解剖学报*, 1996, 27 (3) : 1—4.
25. Trasler, J. M. et al. DNA methylation and demethylation events during meiotic prophase in the mouse testis. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, 10 (4) : 1828—1834.
26. Liu, Y. X. et al. Hormone regulation tissue type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-I in cultured monkey sertoli cells. *Mol. Human Reprod.*, 1995, 10 (3) : 719- 729.
27. 薛社普、梁德才、刘裕. 男用节育药棉酚的实验研究. 人民卫生出版社, 1983, 218—226.