

目 录

一、前言	1
二、棉酚抗生育作用的实验研究	2
1. 棉酚对大鼠抗精子发生作用的细胞学、放射自显影及超微结构的观察	2
2. 棉酚对大鼠抗精子发生作用的组织化学观察	10
3. 棉酚对雄猴抗精子发生作用的研究	17
4. ^{14}C -棉酚在大鼠睾丸亚细胞组分中的定量分布及作用位点的研究	20
5. 棉酚对大鼠精子细胞碱性核蛋白合成与更新的影响	28
6. 醋酸棉酚对大鼠体内及体外生精细胞蛋白质及核酸合成影响的观察	36
7. 醋酸棉酚对大鼠初级精母细胞DNA含量影响的研究	40
8. 醋酸棉酚对大鼠睾丸组织内睾酮受体影响的初步分析	44
9. 棉酚对人类精子乳酸脱氢酶-X的影响	47
10. 棉酚对大鼠睾丸线粒体氧化磷酸化影响的研究	52
11. 棉酚抗精子发生的亚细胞作用位点及其作用机理假说	57
三、 ^{14}C -醋酸棉酚在大鼠体内的药物动力学研究	67
1. 在大鼠体内分布定位的整体及组织放射自显影的动态观察	67
2. 在大鼠体内分布排泄和代谢动态的定量分析	73
四、棉酚毒性毒理的实验研究	84
1. 棉酚对雄猴的心、肝、肾毒性作用的组织化学及电镜观察	84
2. 棉酚对雄猴水盐代谢的影响	90
3. 棉酚对雄猴的胆碱能神经的组织化学观察	95
4. 棉酚对雄猴心肌及心肌乳酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶影响的电子显微镜观察	99
5. 醋酸棉酚对大鼠主要脏器的毒性作用的组织化学观察	102
6. 棉酚对大鼠主要脏器的毒性作用的电子显微镜观察	106
7. 醋酸棉酚对大鼠小鼠的肝脏小肠等组织的DNA RNA及蛋白质合成影响的观察	109
8. 醋酸棉酚对大鼠垂体促性腺细胞及睾丸间质细胞超微结构影响的观察	112
9. 棉酚对大鼠生精上皮支持细胞影响的电子显微镜观察	117
10. 棉酚对离体支持细胞影响的研究	120
11. 醋酸棉酚对大鼠肾上腺皮质超微结构的影响	132
12. 服醋酸棉酚对大鼠 3β 甾体脱氢酶的观察	136
13. 棉酚对儿茶酚胺能神经影响的荧光组织化学观察	137
14. 棉酚对动物腓肠肌影响的电子显微镜观察	139
五、棉酚对钾代谢及低血钾机理的研究	144

1. 棉酚对大鼠 ^{42}K 代谢影响的研究·····	144
2. 棉酚对大鼠豚鼠肾细胞膜 Na-K-ATP 酶影响的研究·····	150
3. 动物 Na-K-ATP 酶活性变化与棉酚相关的研究·····	156
4. 棉酚对大鼠豚鼠肾 Na-K-ATP 酶影响的电子显微镜观察·····	162
六、棉酚对遗传学效应的研究·····	166
1. 棉酚对人外周血淋巴细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换频率影响的研究·····	166
2. 棉酚对小鼠活体精原细胞染色体畸变及姐妹染色单体交换频率影响的研究·····	171
3. 醋酸棉酚对大鼠睾丸精子及肝细胞核内 DNA 含量的影响·····	176
4. 醋酸棉酚对大鼠及猕猴骨髓细胞染色体畸变率的影响·····	180
七、棉酚抗生育作用的临床试验研究·····	183
1. 棉酚对精子影响的电子显微镜观察·····	183
2. 醋酸棉酚对精子影响的细胞学细胞化学及电镜的观察·····	186
3. 棉酚在临床试用中精液脱落细胞的观察·····	189
4. 棉酚对精浆蛋白质影响的聚丙烯酰胺凝胶电泳的研究·····	192
5. 服棉酚前后精浆中前列腺素的定量分析·····	195
6. 服棉酚前后血浆睾丸酮类似物双氢睾丸酮和睾丸酮含量的分析·····	197
7. 服棉酚后血清中促间质细胞生成激素的测定·····	202
八、技术方法·····	205
1. 大鼠睾丸肝脏和肾脏亚细胞组分的分离技术·····	205
2. 一种简化的分离睾丸生精细胞的方法·····	208
3. 亚细胞组分的 ^3H 和 ^{14}C 双标记样品的液体闪烁测量·····	213
九、棉酚抗生育作用的研究 (综述)·····	218

一、前 言

人口问题是世界性三大问题之一。研究人类生殖活动规律,研究控制生育的安全、有效、经济、简便的方法,有计划地控制人类生育和人口的增长率,使之与社会经济发展相适应,是当前全球性关注的一个重要课题。我国人口占全人类的四分之一,随着科学和文化卫生事业的发展,死亡率逐年下降,人口自然增长率则相应上升,计划生育便成为民族的需要和当务之急。十多年来,在降低人口增长率及有关科研方面均取得了一些成果。

棉酚是我国医学科学工作者通过调查研究,发掘祖国医药学遗产,从棉籽及棉根皮中提制的一种男用节育药。通过大量的动物实验和临床试用,已证实棉酚的抗生育效果。它不但为我国提供了可用的男用节育药,受到国际上的普遍重视;而且大大推动了我国生殖与生育调节的基础理论研究。

中国医学科学院基础医学研究所(原实验医学研究所)细胞生物室于1972年开始进行棉酚的科研工作。通过系统的动物实验,肯定了棉酚的抗精子发生作用和抗生育效果。对棉酚的抗生育作用环节、靶细胞、分子水平的作用机理;棉酚在体内的吸收、分布、排泄、代谢和药物动力学规律;对脏器组织的损伤、毒性毒理;对钾代谢的影响——低血钾的可能机制;性激素、性功能;遗传效应以及配合临床在抗生育指标和剂量调节方面进行了比较全面而系统的基础理论研究工作。写成了46篇学术论文,提出了棉酚作用的亚细胞位点和抑制线粒体功能的分子水平的作用机理的假说。为棉酚作为男用节育药的有效性、安全性和可接受性提供了确实的实验证据。

该室在进行棉酚科研工作中使用和建立了一系列细胞生物学方法,其中包括同位素各水平的示踪定位(整体、光学、超微)的放射自显影术;定量的燃烧法、双标记法的液体闪烁测量;组织化学及超微细胞化学;显微分光光度测定、荧光免疫、凝胶电泳、受体探测;生精细胞分离、培养;亚细胞组分的超速离心分离;氧电极法及Warburg法对线粒体呼吸及氧化磷酸化功能的测定……等。这些方法不仅对研究生殖细胞及抗生育作用药物机理有参考价值,也可以作为研究细胞生物学、生殖生理学及细胞药理学等其他学科科研工作的借鉴。为此,将十年来有关棉酚研究的论文汇集成册,以供读者参考。由于时间仓促和水平所限,工作中缺点和错误在所难免,敬请读者批评指正。

二、棉酚抗生育作用的实验研究

1. 棉酚对大鼠抗精子发生作用的 细胞学、放射自显影及超微结构的观察

薛社普 宗书东 苏树芸 吴熹婉 刘毅 周增桦 马希信

男性抗生育药物的研究,已有二十多年的历史。国际上出现过诸如氯代甘油,TEM, Win-18446, ORF-1616 及赛普特龙(cyproterone)等一度认为有苗头的药物,但在动物实验和临床试用中均因出现某些毒性而未能推广。因此,到目前为止,国际上还没有一种安全有效的男用避孕药物。

早在1957年,刘宝善就提出食用棉油节育的倡议^[1]。在60年代,我国医学科学工作者通过广泛的社会调查,发现食用粗制生棉油可以引起男性不育。以后,通过对棉籽和粗制生棉油的分离提纯,并进行大量的动物实验,证明棉酚是棉籽和粗制生棉油中的抗生育有效成分,并已用于临床试验^[2]。但其抗生育作用部位、过程和机制,均有待于了解和阐明。已有资料表明:不同药物和物理因素对生精过程中的不同发育阶段和不同细胞类型有不同的作用途径和对象^[3],而研究它们的作用环节和机理,对于正确评价和选择一种理想的抗生育药物是十分必要的。针对上述问题,对喂服棉酚后的大鼠睾丸生殖上皮和附性腺进行了细胞学、同位素放射自显影示踪和超微结构等方面的实验观察,以了解棉酚造成不育的作用环节,并对其作用意义予以阐述和评价,为临床应用提供理论依据。

材料与方法

实验动物为健康 Wistar 雄性大鼠,平均体重约为 225 克。醋酸棉酚*的配制是先以少量 Tween-80 助溶,再以蒸馏水稀释,以胃管灌喂实验组动物。对照组动物则喂以同量蒸馏水代替药物。

为了验证所用动物对棉酚的抗生育效果,进行了抗生育的实验:实验及对照动物各 10 只,棉酚剂量为 30mg/公斤体重/日 $\times 70$,每隔 10 天与雌鼠合笼交配,以每轮(10 天)雌鼠的妊娠率作为检查抗生育效果的指标。动物于服药 8~16 周分别处死,取心、肝、脾、肺、肾及睾丸、附睾等脏器作病理观察。

1. 细胞损伤动态实验 实验动物分别于口服 30 毫克/公斤体重/日的棉酚剂量后 1, 2, 3, 4 周及大剂量(100 毫克/公斤体重)一次口服后 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 天断头杀死,取睾丸和附睾固定于 Bouin 氏液,用 McManus 的 PAS-苏木精对染法染色,部分标本固定于 carnoy 氏液,用甲绿焦宁染色。睾丸、附睾、精囊、凝固腺和前列腺均在固定前称重,并取主要脏器作病理检查。同条件下相应数量的未服药动物作同样处理作为对照。

* 醋酸棉酚为中国医学科学院药物研究所提供。

电子显微镜样品制备：从上述两批实验（30 毫克/公斤/日）剂量组的部分动物（服药后 3~8 周）中取出睾丸及附睾小块，先固定于 3.8% 戊二醛磷酸缓冲液（pH 7.2~7.4）1~2 小时，再固定于 1% 锇酸戊巴比妥钠缓冲液（pH 7.2~7.4）1~2 小时。脱水后包埋于 618 环氧树脂。超薄切片用 1% 醋酸铀和枸橼酸铅双染色，在 JEM 型电子显微镜观察。

2. 放射自显影 实验动物均为大剂量一次给药（100 毫克/公斤/鼠），于给药后 1~2 小时或取材前 1~2 小时分别作一侧睾丸内注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷（比活性 500 毫居里/mM）20 微居里/睾丸，以示踪 DNA 的合成状态；注射 ^{14}C -赖氨酸（比活性 93.7 毫居里/mM）， ^{14}C -精氨酸（比活性 12 毫居里/mM）或 ^{14}C -亮氨酸（比活性 119.5 毫居里/mM）10~25 微居里/睾丸，以示踪蛋白质的合成状态。注射后 2, 6, 12, 24 小时及 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 天取材。每一时相两只动物和相应数量的未服药而注射同位素的对照动物。动物处死后取出注射同位素一侧的睾丸和附睾作冰冻切片，固定于 Bouin 或 Carnoy 氏液，用 PAS-苏木精法或 Feulgen 法染色，制成放射自显片。另一侧睾丸和附睾固定于 Bouin 氏液作细胞病理学观察。另 8 只动物作一侧睾丸内注射 ^{131}I -白蛋白棉酚（比活性 0.589 微居里/毫克）1.9 微居里/睾丸。同上法取材制成放射自显片观察。

结 果

1. 棉酚的抗生育效果及病理检查 雄鼠连续口服醋酸棉酚 30 毫克/公斤体重/日的剂量，每 10 日为一轮，与雌鼠合笼，检查妊娠率，结果见表 1，从表 1 中可见，所用剂量达到抗生育目的，连续服药 30~40 天后，雌鼠的妊娠率持续下降，其中一组全部不育，另一组半数以上动物不育。服药 50 天（第五轮）后，全部动物达到不育的效果。两组效果上的差别，表明动物对药物反应有明显的个体差异。

表 1 棉酚抗生育实验结果

分 组	实 验	轮次* 动物数	雌 鼠 妊 娠 率 (%)						
			1	2	3	4	5	6	7
对照组	1	5	—	40	60	60	60	80	80
	2	5	—	60	80	80	80	80	60
服药组	1	5	—	60	0	0	0	0	0
	2	5	—	60	60	20	0	0	0

* 每 10 日为一轮。

病理检查 实验动物在服药过程中体重持续增长，与对照组无明显差异。实验终止时病理切片检查心、肝、肺、脾、肾等主要脏器，除偶见轻度炎症反应外，未发现特异性病变。服药组的附属性器官（精囊、前列腺及凝固腺等）的重量与对照组无明显区别，而睾丸重量则有不同程度的下降。服药 12~16 周的动物，睾丸萎缩变小，重量下降明显。

2. 睾丸生精上皮细胞损伤的动态观察

(1) 低剂量（30 毫克/公斤体重/日）连续服药组：追踪喂药后不同时期的生精上皮

损伤,从生精细胞开始出现损伤,到严重破坏,呈现下面一系列细胞损伤的动态变化过程。

喂药一周后,睾丸曲细精管的结构,包括生精上皮的细胞排列、组合及与期相的相关;各级生精细胞、支持细胞和间质组织的形态与染色反应等均与对照组无差异。两周后,各期精子细胞开始出现轻度异常变化:核膜皱缩,核质染色性差,出现小空泡,核帽膨胀或脱位。少数细管的管腔中可见脱落的精子细胞。IX~XIII期相粗线期精母细胞轻度核固缩,核周部分胞质RNA阳性反应增强,呈粗线粒状。其他细胞未见异常。3周后,各期精子细胞均可见不同程度的早期退化的病变特征,其中以7~8期以后精子细胞损伤较明显。出现核固缩或空泡化,核质凝集于核膜上,核膜缘粗糙起嵴,核帽脱位,并见核溶解或裂解性变化(图1,2)。不少变态期中的精子细胞从上皮中脱落,有些管腔中可见脱落的断头、断尾的15期以后的精子细胞片段。IX~XIII期粗线精母细胞呈现核固缩及空泡化。其他各期精母细胞亦开始出现轻度核固缩或染色质浓缩,加深或断裂现象。整个生精上皮细胞排列组合紊乱,疏松,数量减少,上皮变薄(图3)。4周后,大部分曲细精管出现严重损伤,体积缩小、变形,或极度萎缩;大部分生精细胞脱落、消失,残留以支持细胞和精原细胞为主的网架状结构(图4)。少数曲细精管还残存静止期、细线及偶线期精母细胞;有些曲细精管的管腔中可见脱落的早期精子细胞、融合的细胞团块、残粒(图5)和双核或多核的巨细胞,7期以后的精子全部缺如。位于萎缩的曲细精管间的间质组织空间加大,但未见有细胞形态学上的改变。

服药2,3,4周后睾丸曲细精管中生精上皮各型细胞损伤程度及其在生精周期中的分布状态见图6。

(2) 高剂量(100毫克/公斤体重)一次服药组:给药1天后各期精子细胞和晚期粗线期初级精母细胞出现轻度损伤:核轻度固缩或空泡化,精子细胞核帽膨胀或脱位,有些细管出现细胞组合异常,与小剂量组服药两周的早期病变状态相当。服药2~3天后,精子细胞损伤明显,普遍出现核空泡化,核裂解、细胞液化和溶解现象(图7)。精母细胞核固缩或液化,染色体浓缩或断裂。管腔中可见大量脱落细胞。生精上皮细胞组合紊乱,疏松变薄。少数曲细精管甚至大部生精细胞脱落,呈萎缩状态。总的病变与低剂量

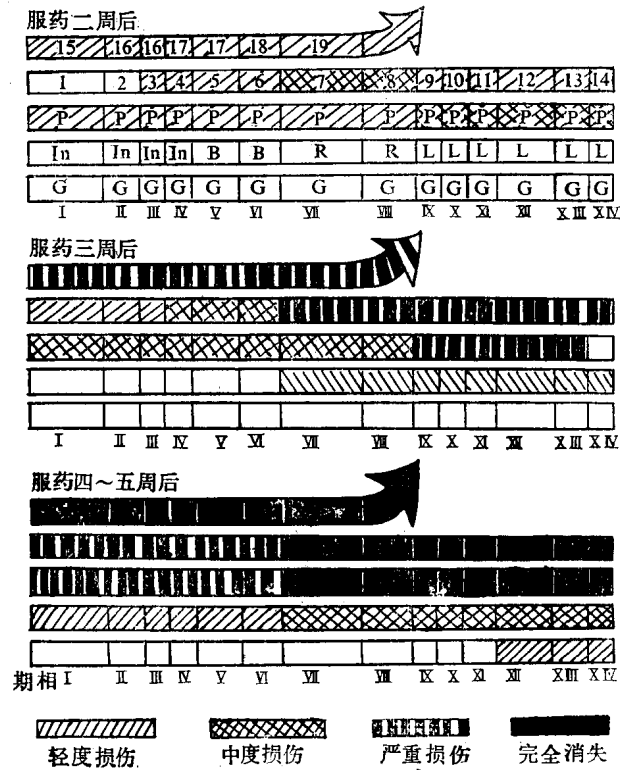


图6 雄性大鼠喂服棉酚(30毫克/公斤体重/日)不同间隔时间后生精细胞的损伤定位及其在生精周期中的分布状态

组第3周状态相似。服药4~7天后,睾丸切片中有半数曲细精管呈现相当于低剂量组服药第4周的严重病变,曲细精管体积缩小、变形和极度萎缩(图8)。9~11天后,切片几乎全部曲细精管均变成以支持细胞为主的空网状结构。

(8) ^{131}I -标记棉酚睾内注射(1.9微居里/1.0毫克/睾丸)组:睾内注射 ^{131}I -白蛋白棉酚16~24小时后,生精上皮各型细胞均出现少量射线颗粒,其中精子细胞和粗线期精母细胞的放射活性最强,射线颗粒浓密,部分这些细胞有核固缩、染色变深、脱落和核裂解。2~4天后,精子细胞和粗线精母细胞退化溶解状态更明显,射线颗粒随解体物或碎裂残片散在分布(图9)。管腔中脱落细胞更多,普遍出现多核巨细胞。5~8天后,半数以上曲细精管萎缩退化,残存以精原细胞和支持细胞为主的网架状结构。

3. 棉酚对生精细胞并合核酸及蛋白质前体物功能活动的影响

(1) 并合 ^3H -胸腺嘧啶核苷(DNA的合成):对照组大鼠睾丸内注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷1~2小时后,曲细精管外周一圈的A型、中间型、B型精原细胞和静止期初级精母细胞的细胞核上均出现并合标记物的射线颗粒(图10)。静止期的初级精母细胞是具有DNA合成功能的最终级或最前列细胞,注射60小时后,最前列标记细胞发育至偶线期精母细胞阶段;13天后发育至另一周期的粗线期精母细胞阶段(图11),完成了为一个为期13天的生精上皮周期。以后随着取材时间的后移,标记最前列细胞逐渐发育至精子细胞阶段和成形的精子而向管腔排放。

大剂量棉酚(100毫克/公斤体重/鼠)一次给药1,3,5,7,9天后,分别于取材前1~2小时作睾内注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷。在各期曲细精管外周一圈的精原细胞和静止期的初级精母细胞均仍和对照组一样出现射线颗粒(图12),表明这些细胞合成DNA的功能并未受到损伤。一次给药1~2小时后,作睾内注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷,注射后2小时所显示的标记细胞类型与对照组无差别。注射6,12,24及48小时后,除精原细胞核有浓密的射线颗粒外,标记的最前列细胞已发育至细线及偶线期初级精母细胞阶段。注射3~5天后,除偶见个别残存的精母前列细胞核有浓密的射线颗粒外,大部分发育至粗线期的精母细胞已呈现细胞溶解或核裂解现象,射线颗粒随核质外溢而散布于上皮和管腔中,失去原有的细胞定位特征(图13)。可见细胞进入粗线期精母细胞阶段后,对棉酚较为敏感,而易遭受破坏。

(2) 并合 ^{14}C 标记氨基酸(蛋白质的合成):对照组大鼠作睾内注射 ^{14}C -亮氨酸、赖氨酸或精氨酸2~6小时后,精原细胞和中期粗线精母细胞均呈现强度的放射活性,其余各级细胞活性微弱(图14)。24小时后,早期初级精母细胞的射线颗粒显见增多。60及96小时以后各期,除上述二级细胞有较高放射活性外,核帽期及顶体期的精子细胞对赖氨酸和亮氨酸的并合明显。射线颗粒分布于细胞质、核周和核帽等区;核伸长期的精子细胞核则只并合 ^{14}C -精氨酸(图15)。

服药组:一次喂服大剂量棉酚(100毫克/公斤/鼠),并作睾内注射 ^{14}C -氨基酸2,6,12及24小时后,生精上皮各级细胞的放射活性均较同期对照组为低。除精原细胞有较多的射线颗粒外,静止期和粗线期精母细胞的活性均下降,其余各级细胞的活性则极为微弱(图16)。2~4天后,除少数残存的精子细胞及粗线精母细胞对赖氨酸尚见少量银颗粒外,大多数精母和精子细胞破损和解体,只在解体物或残片上可见散在的银颗粒(图17)。5天以后各期曲细精管除外围靠基膜一层精原细胞能和支持细胞仍有少量射

线颗粒外,在严重退化解体的生精上皮残片中可见散在的射线颗粒。

4. 电子显微镜观察 正常大鼠精原细胞核大,有电子密度大的染色质块附于核膜上。高尔基复合体不发达,内质网稀疏。静止期初级精母细胞的细胞核染色质稀少,胞浆内的内质网富于小泡,线粒体卵圆形,有环形嵴(图18)。双线期精母细胞核染色质致密,在核边缘可见核内联会体与核膜接触;胞浆中有散在均匀分布的核蛋白体。晚期粗线初级精母细胞核质浓缩,减数分裂前形成染色体,核膜趋于裂解。各期初级精母细胞的高尔基复合体发达,含光滑膜及小泡、小池。早期精子细胞核大,核帽期可见有膜层状结构的核帽,与核膜外层紧接,核帽中央有一团电子密度较大的顶体颗粒(图19)。高尔基复合体发达、显著;胞浆中线粒体散在分布,内质网延伸为小管和小泡的膜层系。9期以后的精子细胞核质致密、伸长,线粒体集中至中段轴丝体周围,排成行列状的螺旋鞘(图19左侧)。接近成熟的精子细胞,与附睾内所见的精子结构大体相同。

喂服棉酚3~4周后,精原细胞超微结构与对照组相同。各期精母细胞出现不同程度的损伤,呈现核膜皱缩,变形,内质网扩张,线粒体空泡化,胞浆基质水肿和积聚退化残留的物质,并往往为支持细胞所吞包。精子细胞亦出现明显的细胞损伤、脱落和细胞溶解图象。核帽期精子细胞核固缩变小,核质粗糙,核膜失去双层结构;核前端的核帽皱缩,断裂;顶体粒和小泡出现模糊不清的退化象征(图20)。顶体期和成熟早期的精子细胞,普遍出现内质网扩张,线粒体肿胀,胞浆滞留,空泡化和环形嵴消失等现象。管腔中变态后期的精子细胞,可见和附睾头部发现的异常精子类似,保留大块残余的胞浆。线粒体集中形成螺旋鞘的过程受阻(图21),有些变态期精子细胞的螺旋鞘变形,线粒体溶解或脱落,粗纤维和轴丝体裸露,包埋在支持细胞中的精子头部后端附近可见有异常的致密体和大量空泡。该处支持细胞胞浆的内质网池明显扩张,并出现较多的颗粒型溶酶体,被吞噬的粗纤维和轴丝体附近亦出现类似的图象。

正常支持细胞以它特有的围裙状细胞质突起支持或包围生精细胞。胞浆内具有发达的内质网,呈小管、小泡或池状,以光滑型为主。线粒体长杆形,有发达的平行嵴(少数线粒体为长圆形或卷曲成圆环形)。此外,还可见到一些张力原纤维、微管、脂滴和溶酶体。棉酚处理后,支持细胞吞噬活动活跃,溶酶体增多,胞浆内可见吞噬的生精细胞残体,并出现基质水肿,线粒体变形、肿胀和出现空泡等变化。当退化的生精细胞消失后,胞浆变得致密,内质网和溶酶体减少,线粒体缩小,张力原纤维增多,说明功能已不活跃。

讨 论

1. 棉酚的作用部位及生精细胞对药物的敏感性 精子发生是一个复杂而有规律性,有周期性和同步发育的过程,对内在体液环境和外因素的反应均非常敏感^[4],不同发育阶段和不同类型的生精细胞对不同有害因素的作用呈现质和量、时间和空间的不同程度的反应和变化。已知电离辐射和氮芥类药物作用于精原细胞^[3,5],高温、人工隐睾和一些药物如二氯乙酰二胺类(Win-18446)作用于初级精母细胞和早期精子细胞^[3,7,8];乙二醇二甲磺酸酯(EDS)作用于精子^[6];赛普特龙^[9,10]和氯代甘醇类^[11]各以不同的作用环节作用于附睾中的精子成熟过程。这表明不同发育阶段的生精细胞对不同的有害因素有不同的敏感性。靶细胞(最敏感细胞)最先遭受损伤和破坏。从这些靶细胞的类型,

可以在它们的发生动力学或生精上皮周期时长的基础上,推算出从用药到开始不育的时间(药物作用的起效期),亦可以停药后恢复生精细胞活动的时长予以判断^[3]。这已是一个普遍的规律。在我们的实验中,大鼠连续口服棉酚(30毫克/公斤体重/日)4~5周后,除少数动物可能由于个体对药物反应的差异而略有延缓(6~7周)外,均失去生育力(表1)。服药2~3周后最初出现形体损伤的精子细胞和粗线期初级精母细胞,呈现核固缩、空泡化、核帽肿胀、脱位,甚至核裂解和细胞溶解等不同程度的病变。连续服药4周后,7~19期精子细胞和Ⅲ期相以后的精母细胞几乎全部溶解、脱落或消失;变态后期精子细胞头、尾断裂,残存各型细胞亦出现不同程度的病变。严重损伤的曲细精管萎缩变形,仅残留以支持细胞和精原细胞为主的网架结构。一次口服大剂量棉酚(100毫克/公斤体重/鼠)后,除引起病变的起效时间较早外,引起睾丸生精上皮损伤的部位,病变顺序和过程与低剂量连续服药组的结果基本一致。表明精子细胞和粗线期初级精母细胞是对棉酚最敏感的细胞类型。睾内注射¹²⁵I-清蛋白棉酚后,也显示在各型生精细胞中以这二级细胞的放射活性最强,退化最早最明显。这些结果表明棉酚对除精原细胞外的各级生精细胞均有损伤作用,而不是专一地作用于某一特定类型的细胞。其损伤范围与剂量累积及服药时间长短有关,而其中以精子细胞和初级精母细胞对药物最敏感,出现损伤最早,破坏程度最严重。按这二级敏感细胞的动力学或生精上皮周期时长推算,理论上作用于精母细胞出现不育的时间应为用药后的6~7周;作用于精子细胞应为3~5周^[3]。这与我们实际上所见在4~5周大部出现不育和少数延至6~7周的时间一致,基本符合于药物引起靶细胞损伤与出现不育时间的相关规律。

大鼠一次口服大剂量棉酚(100毫克/公斤)后引起细胞病变的起效时间提早,表明与药物在细胞内的浓度迅速增至中毒水平有关。从细胞动力学的周期时长推算,敏感细胞出现病变的迟早,对于出现不育的起效期并无影响,而出现病变的部位、过程和顺序则与低剂量组基本一致。可见大剂量(大鼠甚至可耐受一次口服200毫克/公斤的剂量)可以作为急性分析棉酚抗精子发生的一种手段。

2. 棉酚的细胞毒素作用及其可能的作用途径 关于棉酚抑制精子发生的作用是药物对睾丸的直接作用,或间接通过内分泌途径,抑制促性腺激素或睾丸酮的分泌所引起的问题。我们没有对大鼠垂体及其促性腺激素水平进行分析,但睾丸间质细胞的形态和组织化学反应未见异常。大鼠性功能未受影响,依赖于性激素维持的附属性腺(精囊腺、前列腺和凝固腺等)的重量与对照组比较亦无明显差别。在另一报道中,我们曾对28例服药育龄男子血浆睾丸酮类似物和8例血浆双氢睾丸酮和睾丸酮含量进行了测定,发现服药前后的水平均在正常范围内^[1]。其他实验室对睾丸酮和黄体化激素(LH)水平的测定亦得到类似的结果^[2]。表明棉酚并未干扰促性腺激素和睾丸酮的合成与分泌活动。因此通过干扰激素起作用的机理似乎可以排除。从棉酚的作用局限于破坏生精细胞,而并不影响间质组织、附睾、附属性腺和性功能活动的结果来看,可以认为棉酚是一种直接作用于睾丸的抗精子发生药物。它可能通过干扰生精细胞的某些代谢环节而引起抑制精子发生的作用。已知在整个精子发生过程中,出现规律性的核酸和蛋白质合成的不同阶段^[12,13],细胞遭受药物作用后,这些合成过程即被抑制^[14]。我们用同位素标记氨基酸进行蛋白质合成的并合实验,发现在正常大鼠精子发生过程中,精原细胞和减数分裂前的中粗线期的初级精母细胞有一个并合¹⁴C-氨基酸的蛋白质合成峰;精子细胞

在变态早、中期（并合 ^{14}C -赖氨酸）和晚期（以并合 ^{14}C -精氨酸为主）各有一个蛋白质合成峰。服棉酚后，除精原细胞外，精子细胞和粗线期初级精母细胞并合 ^{14}C -氨基酸的活动降减，自显片上射线颗粒明显减少，并伴随细胞的退化溶解。已有报道，棉酚的羰基容易与赖氨酸的 ϵ 氨基起反应，并抑制蛋白质的合成^[15]。给猪喂饲游离棉酚后，可导致血红蛋白量的下降，总血清蛋白量下降20%^[16]。加入葡萄糖后，可以增加生精细胞的赖氨酸并合率，并以此解释糖尿病人并发生精上皮损伤和不育的原因，指出糖代谢与睾丸蛋白质合成之间的密切相关^[17]。这些资料与我们实验中棉酚引起敏感型生精细胞的 ^{14}C -氨基酸并合活动下降，核酸和糖原组化反应减弱的结果基本一致。提示棉酚通过与外源 ^{14}C -赖氨酸或细胞内蛋白质中赖氨酸的 ϵ 氨基起反应，从而降减其并合率，干扰蛋白质合成的可能性。至于精原细胞并合 ^{14}C -氨基酸的活动未受干扰，可能与它们对棉酚的敏感性较低有关。这一现象还可以从它们并合 ^3H -胸腺嘧啶核苷的活动，甚至在曲细精管遭受严重损伤，大部分生精细胞已经脱落消失的情况下，仍保持较高的并合率，而得到进一步的证明。

曾有资料指出，棉酚是一种具有抗氧化作用的细胞代谢毒素，能降减氧化酶的活性^[18]；对呼吸链磷酸化过程起解偶联作用，高浓度时可抑制线粒体的呼吸和ATP酶的活性^[19]；降减红细胞结合氧的能力^[16,20,21]；损伤脑、肝及心肌等对氧依赖性强的器官^[21,23]。在电子显微镜观察中，棉酚对早期精子细胞的作用是引起细胞核固缩、核膜、核帽皱缩和顶体颗粒退化。对变态晚期精子细胞引起异常细胞质的滞留、线粒体肿胀、空泡化、畸形或消失，螺旋鞘线粒体排列紊乱，以至螺旋鞘不能正常形成。这些现象在附睾残留精子中亦可看到。已知螺旋鞘线粒体与精子活动的能源供应有关，是细胞呼吸和能量代谢的细胞器。服棉酚后出现线粒体的明显损伤，意味着它的氧化代谢功能有可能受到干扰。值得注意的是大鼠肝细胞组分中，微粒体和线粒体摄入 ^{14}C -棉酚的量最高^[22]，这是棉酚作用于这二种细胞器的直接证据。微粒体与蛋白质合成有关，而线粒体蛋白质是易与解偶联物质起反应的反应点^[23]。棉酚与蛋白质结合后形成的“棉酚-蛋白质复合体”可导致氧化磷酸化酶系的构型改变，阻断磷酸化过程和影响蛋白质的合成^[19,23]。在我们的实验中，棉酚对生精细胞并合氨基酸的干扰作用和出现线粒体的损伤，是否通过上述类似的作用环节和途径，尚有待进一步研究，予以验证。

摘 要

在服药2~3周后，睾丸生精上皮开始出现细胞损伤，4周后，大部分曲细精管出现严重损伤，严重损伤的曲细精管萎缩变形，精子细胞和中、晚期精母细胞大部退化消失，只残存以支持细胞和精原细胞为主的网状结构。间质细胞和附睾管未见有形态改变，附属性腺亦无变化。

细胞学和并合 ^{14}C -赖氨酸、亮氨酸和精氨酸的放射自显片观察证明精子细胞和精母细胞出现损伤的时间最早，破坏程度最严重，是对棉酚最敏感的生精细胞。电子显微镜下亦可见这两类细胞出现明显的超微结构改变，其中变态晚期精子细胞的线粒体损伤最为明显。精原细胞仍保持并合 ^3H -胸腺嘧啶核苷的能力。表明不同生精细胞对棉酚有不同的敏感性。

参 考 文 献

1. 刘宝善, 将食用棉油来节制生育的刍议, 上海中医药杂志, 1957, 6, 43.
2. 男用节育药全国协作组, 一种新的男性节育药——棉酚, 中华医学杂志, 58 (1975), 8, 455-458.
3. Gomes, W. R., Chemical agents affecting testicular function and male fertility. In *The testis* (Ed. Johnson, et al.), vol. 3, Acad press, N. Y, 1970, 483-545.
4. Loblond, C. P., et al., Spermatogenesis. In *Hormone concerned with conception* (Ed. Hartman), 1963. 1-73.
5. Jackson, H., Antispermatic agents. *Brit. Med. Bull.*, 26 (1970), 79-86.
6. Jackson, H., Comparative effects of some antispermatic chemicals, In *Regulation of mammalian Reproduction*, 1973, 275-276.
7. Coulston, F., Beyler, A. & Drobeck, H. P., The biologic actions of new series of bis (dichloroacetyl) -Diamine, *Tox. Appl. Pharmacol.*, 2 (1960), 715-731.
8. Redoy, K. J. & Svoboda, D. J., Alterations in rat testis due to an antispermatic agents. Light and electron microscopic study, *Arch. Path.* 84 (1967), 376.
9. Prasad, M. R. N. & Rajalakshmi, M., Recent advances in the control male reproductive functions. *International Review of physiology, Reproductive physiology II*, (ed. Greep. R. O.), vol. 13, 1977, 153-199.
10. Roy, S., et al., Effects of cyproterone acetate on reproductive functions i in normal human males, *Contraception*, 14 (1976), 403.
11. Paul, P., Williams, R. P. & Cohen, E., Structure-activity studies with chlorohydrine as orally active male antifertility agents. *Contraception*, 9 (1974), 5, 451-457.
12. Monesi, V., Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse, RNA and protein, *Exptl. Cell Research*, 39 (1965), 197-224.
13. Hilscher, W. & Hilscher, B., Autoradiogrephische untersuchungen uber die kinetic der spermatogeneses der wister ratte, *Z. Zellforsch*, 96 (1969), 625-640.
14. Fox, B. & Fox, M., Biochemical aspects of the actions of drugs on spermatogenesis, *Pharmacol. Rev.*, 19 (1967), I, 21-57.
15. Lyman, G. M., Baliga, B. P. & Slay, M. W., Reactions of proteins with gossypol, *Arch. of biochem & biophys.*, 84 (1959), 486-497.
16. Skutches, C. L. et al., Effect of dietary fye gossypol on blood components and tissue iron in swine and rats, *J. of Nutrition*, 104 (1974). 415-422.
17. Zysk, J. R. et al., Temporay sterility produced in male mice by 5-thio-D-glucose, *J. Reprod. Fert.*, 45 (1975), 69-72.
18. Myers, B. D., et al., Effect of gossypol on some oxidative respiratory enzymes, *Plant physiol.* 41 (1966), 787-791.
19. Abou-Donia, M. B. & Dieckert. J. W., Gossypol:Uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation, *Life Science*, 14 (1974), 10, 1955-1963.
20. Munro, I. C., et al., Biochemical and pathological changes in the heart and liver of rats given brominated cottonseel oil. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 19 (1965), 62.
21. Munro, I. C., et al., Biochemical and pathological changes in rat fed brominated

- cottonseed oil for 80 days, Food. Cosmet. Toxicol., 7 (1969), 25.
22. Abou-Donia, M. B. et al., Gossypol: Subcellular localization and Stimulation of rat liver microsomal oxidases, Toxicol. Appl. Pharmacol, 18 (1971), 507-516.
23. Weinbach, E. C. & Garbus, J., The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein, J. Biol. Chem., 240 (1965), 4, 1811-1819.

2. 棉酚对大鼠抗精子发生作用的组织化学观察

陈啸梅 张秀兰 韩雪梅 薛社普

精子发生对内外环境的改变均极敏感^[1]。在从睾丸内周期性的各个发育阶段到附睾内完成其生理成熟的过程中,有不少薄弱可攻环节。文献资料表明:影响精子发生的因素,可因其性质而有不同的作用途径和对象^[2],并引起相应的组织化学的改变^[3~9]。本实验着重观察各服药时相(1、2、3、4周)及停药恢复(2~4周)后睾丸的核酸、糖类、脂类、琥珀酸脱氢酶(SDH)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)的组织化学改变,并对精子形态与功能成熟有重要作用的器官——附睾进行了观察,从附睾中精子的组织化学反应,进一步了解棉酚的作用,为阐明抗生育机理提供依据。

材料与方法

实验动物为成年、健康 Wistar 雄性大鼠,体重 180~250 克。实验动物 22 只,对照 12 只。分别于喂药后 1、2、3、4 周取材;其中实验组 8 只动物在喂药 4 周后,手术摘除右侧睾丸及附睾,另一侧作为停药后的恢复实验。同时对亚急性组(12 及 16 周)的动物的睾丸也进行观察。

棉酚*剂量为每日每公斤体重 30 毫克。南京棉酚以 10% 淀粉液制成悬液,用胃针灌喂。每日一次,每次 0.2 毫升。对照动物喂以同样淀粉液。北京棉酚则先用少量 Tween-80 助溶,再加蒸馏水稀释。对照组喂等量蒸馏水。

动物断头后,快速取出睾丸和附睾,在冰浴上剔除脂肪,称重并测量大小,再分别作下列组织化学反应:Feulgen 反应示去氧核糖核酸(DNA),甲绿焦宁法(Brachet)及甲苯胺蓝法示核糖核酸(RNA),PAS (McManus) 示多糖,苏丹黑及油红 O (Lillie) 染色示脂类,碱性磷酸酶(ALP, Gomori),琥珀酸脱氢酶(SDH, Pearson) 及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH, Hess 等)。同时镜检输精管精子活力,判断棉酚的作用。并对附睾、精囊、凝固腺和前列腺等也在固定前称量。部分动物取心、肝、脾、肺及肾等主要脏器作病理检查。

结 果

在喂药过程中,实验动物的体重持续增长,与对照组完全一致。重要脏器未见特异性病变。亚急性组(12 及 16 周)的睾丸重量明显下降,极度萎缩者较多见。服药组的附性器官的重量与对照组无明显差别;停药 2 周与 4 周断头取材的左侧睾丸,与第 4 周手术摘除的右侧睾丸在重量上亦无明显改变。

1. 睾丸

* 南京棉酚为南京药物研究所提供。北京棉酚为中国医学科学院药物研究所提供。

(1) PAS 反应:

对照组: 曲细精管基膜, 精子细胞早期的高氏区, 顶体颗粒、核帽及后期的顶体均为 PAS 强阳性反应, 细胞质为弱阳性反应。到中晚期 (8~16 期) 则为中等反应。精原细胞, 各型初级精母细胞及次级精母细胞均为弱阳性反应。残体无反应。支持细胞的细胞质为中等反应, 间质细胞着色浅, 而血管内皮及成纤维细胞均为强阳性反应。经唾液消化后, 上述各型细胞的 PAS 反应不消失。

根据精子细胞的 PAS 阳性的高尔基氏复合体和顶体帽的发育情况, Leblond 及 Clermont (1952)^[11] 将大鼠睾丸的曲细精管分成 14 期, 各期有不同的细胞组合和发育顺序, 不同世代的生殖细胞的发育彼此密切相关。Ⅶ期的曲细精管较为多见 (彩图 1)。

实验组: 喂药 1~2 周后, 各型细胞的 PAS 反应与对照组无明显差异。4 周后, 曲细精管各级生精细胞的 PAS 反应略有减弱, 与保持正常反应的间质细胞对照明显。支持细胞的反应维持正常。部分Ⅸ~Ⅻ期的曲细精管腔缘仍可见大量未排出的精子, 顶体保持 PAS 强阳性反应 (彩图 2)。有时可见大量死精子堆积, PAS 反应强 (图 22), 典型的各期曲细精管少见。严重萎缩退化的曲细精管, 只余一层支持细胞和少数精原细胞, PAS 反应与对照组相同。此时基膜增厚, 反应深。睾丸间质细胞及成纤维细胞略见增多, 但 PAS 反应未见增强。

停药后 3 周, 曲细精管恢复生精活动, 但各级细胞的 PAS 反应仍然较对照组为弱。停药 4 周后, 各型细胞的 PAS 反应完全恢复正常。

(2) 核糖核酸 (RNA):

对照组的精原细胞, 静止、细线和偶线精母细胞的胞质中含丰富的 RNA, 染色较深; 早期粗线期初级精母细胞染色中等, 到中期时 (Ⅶ, Ⅷ, Ⅸ) RNA 块粒密集染色最深。X 期以后又下降, 在 XIV 期减数分裂时染色呈弥散状态。粗线期精母细胞核仁明显, 在中期显著增大, 着色很深。早、中期精子细胞 RNA 量少, 在上皮中染色最浅, 接近成熟时, 胞质中 RNA 块粒浓集, 染色加深。Ⅶ~Ⅸ期腔缘密集的残体, 富含 RNA, 在曲细精管中染色最深。支持细胞核仁大而着色深, 胞质深度与精子细胞胞质一致 (图 23)。间质细胞 RNA 呈弥散状, 染色较浅。

经核糖核酸酶处理后, 上述各型细胞中的胞质及核仁对焦宁均不着色。

喂服棉酚 1~2 周后, 各级生精细胞中的 RNA 染色反应与对照组基本相同。少数Ⅸ~Ⅻ期的粗线期精母细胞胞质中出现染色鲜红的条粒, 色调类似残体, 在核周一侧呈半月状分布。

3 周后, 各级生精细胞 RNA 染色反应略有减弱。受损伤的粗线期精母细胞的胞体缩小, RNA 块粒浓缩色深。在胞质中出现空泡化的细胞中, RNA 被挤向核周或胞膜一侧, 分布极不均匀。核仁缩小。色深, 有些随核裂解而外移。精子细胞普遍固缩, RNA 块粒不规则状浓缩于核周。靠基膜的一层幼期生精细胞, RNA 染色反应仍较其他各层为深。

4 周后, 上述改变更为普遍。体积缩小的粗线期初级精母细胞 RNA 块高度浓缩至胞体一侧, 染色极深。残存于空网状细管中的细胞, 尤其是融合的多核细胞更为显著。核仁随核的空泡化而移向一侧, 最后解体外移。残存的精子细胞, RNA 弥散、色浅。靠基膜的一圈细胞, 着色变浅, 已失去原有一圈染色最深的特征 (图 24)。

(3) 去氧核糖核酸 (DNA);

Feulgen 染色反应的深浅, 特异地反映细胞核中 DNA 的相对含量。对照组 A 型精原细胞反应弱, 呈浅红色。B 型精原细胞和静止期初级精母细胞核质含 DNA 较多, 染成红色, 附在核膜上的染色质则呈紫红色。粗线期的初级精母细胞核增大, 单位面积的核质及染色体的 DNA 反应较上二级细胞为弱。次级精母细胞染色质较少, 染色较浅, 但较 1~8 期精子细胞的反应略强, 9~11 期精子细胞, 随着胞核体积缩小, DNA 逐渐浓集加深。从 12 期以后, 精核浓缩, 反应最强, 均呈紫红色 (图 25)。

支持细胞和间质细胞的细胞核, DNA 染色反应均较弱, 后者的核膜染色质反应较明显。

甲绿对 DNA 染成蓝绿色, 亦可从染色的深浅而显示细胞核中 DNA 的相对含量。各型细胞的染色结果与上述 Feulgen 反应基本一致。但精子细胞一级的分化更为明显, 1~8 期精子细胞的圆形核呈淡蓝色, 随着核的变长而染色渐深。到 12~16 期时呈深蓝绿色, 到 17~19 期略有减退而呈浅蓝紫色。用甲苯胺蓝染成浅紫色 (图 23)。

实验组在灌喂棉酚 1~2 周后, 各型细胞的 Feulgen 及甲绿染色反应与对照无明显差异。3 周后, 随着生精细胞的损伤与退化过程, 常见精子细胞形成多核细胞的图象 (图 27, 彩图 3), 核裂解 (彩图 3), 有些精子细胞的核质失去染色性, 成为隐约可见的残影细胞 (彩图 3); 部分粗线期精母细胞染色体损伤, 缩小, 染色反应减弱。在 XIV 期曲细精管中, 可见有停滞和染色体固缩的分裂相 (图 26), 但 DNA 反应并未减弱。4 周后改变更明显 (图 27)。

在喂药 3~4 周的 IX~XII 期曲细精管中, 可见管腔缘有未释放或未排出的精子, Feulgen 反应与对照相同 (图 27), 头部为甲绿染成鲜绿色, 甲苯胺蓝染成蓝绿色 (图 24), 和正常活精头部的浅蓝紫色反应不同, 可能是精子死亡或不成熟所显示的染色反应。

停药 2 周及 4 周后, 恢复期中的各型细胞的 DNA 染色反应呈现不同程度的恢复, IX~XII 期的管腔中, 染成绿色的精子仅偶见, 4 周后各型细胞的染色反应基本正常。

(4) 脂类;

对照组: 睾丸曲细精管的脂滴有周期性改变。V~VIII 期时用油红 O (或苏丹黑 B) 染色, 可见红色 (或蓝黑色) 脂滴位于腔缘。随着精子细胞的发育成熟, 由为数较多的细小滴粒汇成较大脂滴。在精子即将释放时成为残体。IX~XI 期时, 大型脂滴为支持细胞吞食, 可见由腔缘逐渐下移而位于基膜, 脂滴面积逐渐变小。数量也明显减少 (图 28)。一般细小脂滴在曲细精管的腔缘多见, 有适量的粗的脂滴在曲细精管基膜附近。间质细胞有适量的中型脂滴。

实验组: 1~2 周后中性脂滴明显增多。3~4 周退化的细胞脂滴更加显著 (图 29)。个别曲细精管中堆积大量死精子等退化残物, 为油红 O (或苏丹黑) 深染。

(5) 琥珀酸脱氢酶 (SDH);

对照组: 近基膜的生精细胞及支持细胞, 显示酶活性的沉淀较丰富。粗线期的初级精母细胞有中等活性, 精子细胞的沉淀细小。即将释放的精子, 沉淀较多。在曲细精管中位于外周的年轻细胞, 酶活性较强, 也形成外周一圈沉淀较多的图象, 间质细胞酶活性较曲细精管内的细胞酶活性更丰富 (图 30)。

实验组: 退变的曲细精管, 酶活性减弱。形态正常的曲细精管, 在近基膜区的细小

沉淀亦较对照略显减少。而间质细胞的酶活性与对照相同,或稍显增强(图31)。

(6) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH);

对照组:曲细精管中几无 G-6-PDH 活性;间质细胞中蓝色沉淀较多,酶活性中等。

实验组:间质细胞的酶活性与对照组相同或稍有增强趋势。

2. 附睾

(1) PAS 反应;

对照组:附睾管的基膜、纤毛、及血管内皮呈 PAS 强阳性反应。附睾管头、尾二部的上皮均为弱阳性反应,体部更弱。

附睾管腔内充满精子及上皮分泌液,呈阳性反应,尾部最强。管腔中有少量脱落的上皮细胞,反应极深。分泌细胞在附睾尾部及头部下段较多,为弱阳性反应,呈细粒网状。糖原以尾部最多,向体部递减,头部最少。管间结缔组织几无糖原分布。

实验组:喂药 1~3 周,附睾各部上皮的 PAS 反应与对照组相同。4 周后各部的 PAS 反应略有减弱,体部及尾部糖原减少。喂药 3~4 周的管腔中的分泌物增多,呈强阳性反应,并可见尾部分泌细胞的全浆分泌活动图象。停药 4 周后,上述改变基本恢复至正常水平。

(2) 核酸及管腔中精子头对甲绿的染色反应;

对照组:附睾头部上皮细胞的核膜明显,染色质少,DNA 量较少。尾部上皮细胞核染色质较粗,核质较多,染色较深。基底细胞染色质多而明显,着色最深。

RNA 在附睾中的分布因各段而不同。在与输出小管接壤处,管腔上皮为高柱状,细胞的基底部只有少量 RNA 小粒。其余各段上皮为柱状或低柱状,其中附睾头部的中段较富于 RNA 小粒块,在核周均匀分布。从头部下段到附睾尾部一般均为弥散染色,块粒较少。部分细胞核仁明显,染色较深。分泌细胞在头部下段和尾部较多,无明显可见的块粒。附睾头部开始部分的管腔中有少量精子,其余各段充满对甲绿染色正常的精子(图 32, 33)。

实验组:喂药 2 周后,附睾各段的 DNA 及 RNA 的染色与对照组无明显差别。管腔中充满染色正常的精子。

3 周后,附睾头部、体部的 RNA 及 DNA 的染色与对照无明显差异。但附睾尾部的上皮细胞核周的 RNA 小条粒增多,核仁 RNA 反应明显。附睾管腔中充满精子,大多头、尾断裂,杂有残体。精子头为甲绿染成鲜绿色(死精子的特征),从附睾头部向尾部递减。在附睾内的输精管中,这种染成绿色的头极少见。

4 周后,附睾头部的开始部分,上皮由高柱状变为柱状或低柱状,细胞中的 RNA 块粒增多,在核周均匀分布。尾部上皮细胞胞质弥散深染,核下富于 RNA 块粒。DNA 除个别附睾头部下段有少数上皮细胞核裂解、消失或失去染色性外,与对照组无差别。各段附睾管腔中充满绿色的精头,而夹杂较多的残体(图 34),Feulgen 反应无明显改变(图 35)。亚急性组睾丸严重萎缩退化时,附睾管腔中空,未见精子。

停药恢复 2 周后,各段 RNA 的染色较对照组略深,核下区的块粒明显。附睾头部管腔中染色正常的精子较多,尾部则为头部染成绿色精子所充斥。

停药恢复 3 周后,附睾各段上皮细胞中的 RNA 染色反应大体与对照组相同。附睾

头部管腔中染色正常的精子增多,尾部仍为头部染成绿色的精子所填充。

停药4周后,附睾管各段上皮的RNA分布状态完全恢复正常。管腔中精子的染色反应亦多趋于正常,仅在附睾尾部及近端输精管段尚有为数较多的绿色精子头。

各段附睾管内精子对甲绿的染色反应见表1。头、尾断裂的死精子头部均染成绿色,正常精子着浅蓝紫色。取输精管精子镜检,凡精子头为甲绿染成浅蓝紫色的富于活力,并有假凝集现象,而染成绿色的精头则不能活动。

(3) 碱性磷酸酶(ALP):对照组的附睾管基膜,毛细血管内皮,附睾头部上段的小管密集区和尾部的近端输精管的肌层等的ALP活性均较高,其他区段呈中等阳性反应。喂棉酚后的各实验时相未见明显改变(图36)。

(4) 琥珀酸脱氢酶(SDH):对照组的附睾头部上段开始部分,只在上皮的远端有少量蓝色双甲腈沉淀,基部极少。以下各段的酶活性从头向尾部递增。尾部的蓝色沉淀较多,酶活性较强。喂服棉酚后的实验组附睾,酶活性一般均稍有减退;长期服药组睾丸严重萎缩者,附睾的酶活性更低。

讨 论

多种因素(包括药物)可使睾丸的精子生成停滞,或影响附性器官的正常生理功能,使精子的生理成熟受抑,失去受精能力,导致不育。显效的抗生育作用最常见的形态特征为睾丸萎缩。引起睾丸萎缩的原因极多,一般病变是曲细精管生精上皮的细胞由腔缘逐向基膜脱落^[4],并有相应的细胞学改变。导致睾丸损伤的原因不同,受累的类型也各异。有些因素影响精子细胞的变态成熟^[11],有些使用于早期的初级精母细胞^[12],而有些则损伤年轻的生精细胞^[13]。已有报导,正常生精周期各型细胞中核酸^[14],酶^[15]及脂类^[8]的分布状态、染色深度,与特异周期及特异细胞的功能状态有关,因此可以根据这些组织化学的改变,来分析某种因素引起细胞损伤的性质及对生精作用的影响。大鼠服棉酚3周后可见精子细胞和粗线期的初级精母细胞的RNA染色减弱或出现不均的染色粗粒;DNA浓缩、减弱或核中空而完全失去染色性。以后累及幼期的生精细胞,正常近基膜的一圈焦宁深染的细胞着色减退,并伴随以显示SDH活性的甲腈沉淀的减少,和中性脂滴的增多等。这些都是细胞功能改变的标志。核酸是细胞增殖、生长及分化过程中的蛋白质合成的重要指标之一,而精子细胞的蛋白质合成是变态过程中所必需^[16]。已有报导烷化类药物可抑制精子细胞的核酸合成而使细胞遭受损伤^[5]。与我们实验中所见的精子细胞,和粗线期初级精母细胞核酸染色减弱和消失的结果一致。提示与变态过程中蛋白质合成受到阻抑可能有关。当然也不能排除由于细胞中毒所引起的后果。近基膜的生精细胞SDH活性略显减弱,沉淀变粗,可能和棉酚的抗氧化作用有关^[17]。此外如中性脂滴的增加,也是曲细精管早期退变的特征^[3,18]。根据生精细胞的核酸染色结果,大鼠服棉酚后,发育中的精子细胞和粗线期精母细胞损伤较早,与放射自显影及超微结构的观察一致^[10]。

甲绿是显示高聚DNA的染料^[19]。精子细胞在变态过程中,细胞核对甲绿呈现不同的染色反应。1~14期精子细胞由浅蓝色向蓝绿色递增,在即将释放前(17~19期),改为浅蓝紫色。头尾断裂的死精子则均染成鲜绿色。因此可根据精头的染色反应来区分死、活精子。正常附睾各段管腔中的精子染色正常(浅蓝紫色),喂服棉酚2周后,管腔中亦

充满染色正常的精子。3周后，附睾腔中的精子大多头、尾断裂，精子头部染成鲜绿色。这种死精子从附睾头部向尾部递减；4周后，各段附睾管完全充满绿色的精子头。停药恢复2周后，附睾头部管腔多为正常染色的精子，尾部则完全为绿色的死精子。恢复4周后，除附睾尾部及近端输精管中尚残存少量绿色精子头的死精子外，其余各段均为正常染色的活精子，与输精管的精子镜检的结果完全相符（表1）。

表1 死精子在睾丸、附睾和输精管内的分布及其与甲绿染色反应的关系

组别	睾丸内曲细精管	附睾头部	附睾体部	附睾尾部	近端输精管	输精管精子镜检
对照	活精子，浅蓝紫色	活精子，浅蓝紫色	活精子，浅蓝紫色	活精子，浅蓝紫色	活精子，浅蓝紫色	活精子，有假凝集现象
实验二周	同上	同上	同上	同上	同上	同上
实验三周	死精子，断裂，绿色	死精子多，绿色，偶见活精子	绿色的死精子与浅蓝紫色的活精子混杂	浅蓝紫色的活精子多，偶见绿色死精子	浅蓝紫色的活精子多，偶见绿色死精子	同上
实验四周	同上	死精子，断裂，绿色	死精子，断裂，绿色	死精子，断裂，绿色	死精子断裂，呈绿色，偶见浅蓝紫色的活精子	死精子，断裂，无假凝集现象
实验二周	活精子，呈浅蓝紫色	浅蓝紫色的活精子多，少数绿色死精子	绿色的死精子多，浅蓝紫色的活精子少	死精子，断裂，呈绿色	死精子，断裂，呈绿色	同上
实验四周	同上	同上	浅蓝紫色的活精子多，绿色的死精子少	绿色的死精子多，浅蓝紫色的活精子少	绿色的死精子多，偶见浅蓝紫色的活精子	同上

从上述睾丸曲细精管中精子头的染色反应，个别曲细精管中大量死精子堆积，以及在附睾管中活精子死精子的分布状态来看，棉酚的作用部位显然在睾丸而不在附睾。虽然棉酚对附睾上皮也可引起一些组织化学改变，但和睾丸生精上皮比较是极其轻微的。至于棉酚是否通过抑制促性腺激素的分泌而影响副性器官的生理功能，或通过激素途径间接导致生精上皮的损伤。我们的实验动物的间质细胞的形态及G-6-PDH活性均和对照类似，反映了雄激素的合成功能无明显改变。附性器官的重量，附睾管上皮的核酸^[20]，及基膜的ALP^[21]组织化学反应均与对照组无异。因此通过激素起作用的途径似乎可以排除。

大鼠服棉酚4周后，在Ⅵ~Ⅷ期的曲细精管中可见为甲绿染成鲜绿色的精子头，显示了延缓释放的图象。这些精子的胞质中有少量残体存在，提示棉酚可能影响支持细胞的功能。此外二种不同染色的精子头，Feulgen反应无区别，可能因为Feulgen反应的水解过程中，碱性蛋白已被提取，不影响DNA的显色反应；而甲绿染色不去除碱性蛋白，可能由于蛋白质（碱性蛋白）组成上的不同而造成染色上的差异。这些都有待今后进一步探讨。

结 论

1. 成年Wistar雄性大鼠按每日每公斤体重30毫克的剂量连续灌喂棉酚3或4周后，可见睾丸生精上皮出现不同程度的细胞损伤，4~5周以后不能形成正常精子，失去生育力。