

21 世纪高等医学院校教材

(供研究生用)

人类生殖学

主 编 史小林

科学出版社

2001

内 容 简 介

近年来,生殖医学的研究进展很快,为了使教学适应于当前生殖医学的研究进展,我们编写了这本《人类生殖学》教材。

本教材主要由首都医科大学生殖医学研究中心和上海第二医科大学生殖医学中心的专家、教授共同编写。全书共设 13 章,以生殖系统的基础知识为重点,从形态、生理和病理的角度进行了较系统的论述。其内容包括人类性别决定、生殖功能的神经内分泌调控、性激素与性激素受体、生殖免疫、机体内分泌与生殖、不孕、避孕、生殖工程及常用的实验室技术等。本书资料新,其中还包括编写人员近年来的研究成果。

本书的读者对象主要是硕士研究生,也可供从事“生殖医学”的科研人员和教学人员、有关的临床医师、“计划生育”和“优生优育”的医务工作者等参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

人类生殖学/史小林主编.-北京:科学出版社,2001.10

21 世纪高等医学院校教材(供研究生用)

ISBN 7-03-009755-6

I. 人… II. 史… III. 生殖医学-研究生-教材 IV. R339.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 061687 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

•

2001 年 10 月第 一 版 开本: 850×1168 1/16

2001 年 10 月第一次印刷 印张: 25 1/2

印数: 1—3 500 字数: 527 000

定价: 39.90 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

《人类生殖学》编写人员

主 编 史小林

副主编 王春年 翁 静

编著者 (以姓氏笔画为序)

马 唯 王春年 王桂茹 史小林

朱继业 李伟毅 吴明章 高惠宝

诸定寿 翁 静 童明汉

前 言

“生殖健康”，是 1994 年在埃及开罗召开的“世界人口与发展大会”（ICPD）上通过的《世界人口与发展大会行动纲领》后，被正式提出的。

“生殖健康”是贯穿终生的一系列状态、事件和过程。世界卫生组织对“生殖健康”的定义是：“人类生殖过程处于在体格上，精神上和社会上完全健康的状态，而不仅是没有生殖过程的疾病和失常。”国际上“生殖健康”的概念一般包括人类生育、不育和节育；围生和婴幼儿的卫生保健；防治性传播疾病；预防性优生等范畴。近年来由于青春期明显提前，性教育问题也日益受到重视。由此可以概括为“生殖系统及其功能和其所涉及的一切”就是“生殖健康”的内容。

生殖医学的基本任务是实行“计划生育”和维护人类的“生殖健康”。在生殖医学学科中，除妇产科、男科学外，相继产生了生殖形态学，生殖生物学，生殖生理学，生殖内分泌学，生殖免疫学，生殖病理生理学，生殖药理学，生殖毒理学，生殖工程学，围生医学，妇幼保健和妇幼卫生学，性医学等众多学科，此外，还有与遗传优生有关的学科，说明生殖医学的内容在深度和广度上都在不断地扩展。

在科学事业发展中，往往在高度分化中又实现高度结合。生殖医学贯穿于各有关学科之间，促进相互间的联系和渗透，围绕生殖系统、生殖机能、生殖卫生、生殖健康等有关问题而开展的活动已成为新的趋势，并成为了一门非常重要的学科。相对任何其他学科，社会、心理和生理因素在生殖健康中的相互联系也许更为紧密。

20 世纪 60 年代，国际上建立了生殖医学学科。当前世界卫生组织大力倡导“生殖健康”，进一步使生殖医学和生殖健康成为国际性关注的领域。有专家预言，21 世纪“生殖健康”的研究将与生物工程、电子网络成为世界三大热门课题。

在这一形势下，本教材的编者，首都医科大学和上海第二医科大学从事生殖医学研究多年的教授们，为医学生，特别是将从事或正在从事与生殖医学研究有关的硕士研究生编写了这本《人类生殖学》教材，本教材以生殖医学的基础理论为重点，加入了部分临床和研究技术等内容，希望这本教材能有助于生殖医学专业的研究者和医务工作者的学习与工作。限于能力与时间的关系，本教材未能收集更广泛的资料，尚望见谅。

史小林
2001 年 7 月

目 录

前言	
第一章 男性生殖系统的结构与功能	1
第一节 男性生殖系统的功能解剖学	1
一、睾丸	1
二、生殖管道	13
三、附性腺	18
第二节 精子发生、成熟及其调节	19
一、精子发生及其调节	19
二、精子成熟及其调节	29
第三节 精液	32
第二章 女性生殖系统	34
第一节 女性生殖系统的结构与功能	34
一、卵巢	34
二、输卵管	39
三、子宫	41
四、阴道	47
五、外生殖器	48
第二节 妊娠	48
一、精卵运行与精子获能	48
二、透明带	55
三、受精与着床	57
四、胎盘激素	65
附文	71
一、细胞因子、生长因子和黏着蛋白在着床中作用的研究近况	71
二、滋养层发育和机能分化与黏附因子及细胞因子	77
三、胚泡的发育及着床期与子宫内膜的相互作用	83
第三章 性别决定与分化	88
第一节 性别决定及调控	88
一、染色体性别的调控	89
二、表现型性别的调控	89
第二节 性别分化	97
一、原始生殖腺的形成与分化	97
二、睾丸分化	98
三、卵巢的分化	102
四、生殖管道的分化	103
五、外生殖器分化	104
第三节 性别分化异常	104
一、雄激素合成障碍	105
二、雄激素不敏感综合征	106
三、5 α -还原酶缺乏	107
四、MIS 异常	109
五、睾丸对人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 与黄体生成素 (LH) 不反应	109
六、母亲孕期服用含雄激素类药物	109
第四章 生殖功能的神经内分泌调节	110
第一节 神经内分泌调节的概念	110
一、神经分泌细胞的性质	110
二、神经内分泌调节的方式	111
三、下丘脑-垂体-性腺轴的概念	114
第二节 下丘脑-垂体	114
一、下丘脑和垂体的关系	114
二、下丘脑对垂体促性腺激素的调节	117
第三节 中枢神经系统对下丘脑-垂体活动的调节	118
一、中枢神经系统对 GTH 释放的调节	119
二、中枢神经系统对 PRL 释放的调节	120
三、垂体激素的相互调节	121
第四节 睾丸的功能与调节	121
一、精子的发生与调控	121
二、支持细胞的功能与调控	123
三、Leydig 细胞的功能与调控	124
四、睾丸对下丘脑和垂体的反馈作用	137
第五节 卵巢功能的调节	138

一、卵子生成的调节	138	第二节 机体内分泌腺功能异常对生殖的影响	203
二、卵巢甾体激素分泌的调节	141	一、肾上腺皮质与生殖	203
三、卵巢激素对促性腺激素分泌的反馈调节	145	二、甲状腺与生殖功能	207
第五章 性激素与性激素受体	147	三、松果体与生殖	210
第一节 性激素	148	第三节 内分泌异常对生殖的影响	214
一、甾体激素的一般特性	148	一、高雄激素血症	214
二、甾体激素的生化与生理作用	151	二、高催乳素血症	220
第二节 性激素受体	158	第八章 避孕	224
一、激素受体的基本概念	158	第一节 女性避孕	224
二、激素受体	159	一、避孕药	224
第六章 生殖免疫	168	二、避孕针剂	248
第一节 免疫的基本概念和免疫系统	168	三、皮下埋植剂	251
一、免疫器官	168	四、避孕工具	253
二、免疫细胞	170	五、自然避孕法	263
三、免疫分子	174	第二节 男性避孕	269
第二节 男性生殖与免疫	177	一、避孕套避孕	269
一、睾丸与免疫	177	二、体外排精避孕法	272
二、血附睾屏障和黏膜屏障	179	三、会阴尿道压迫避孕法	272
三、免疫细胞	179	四、外用杀精子药物避孕法	273
四、免疫球蛋白	180	第九章 不孕症	275
五、细胞因子	181	第一节 女性不孕	276
第三节 精浆免疫抑制因子	183	一、病因	276
一、精浆的免疫抑制作用	183	二、不孕症检查	284
二、精浆免疫抑制因子特性	184	三、不孕症治疗	285
三、精浆免疫抑制因子的作用机制	186	第二节 男性不育	288
四、精浆免疫抑制因子的生理和病理	187	一、病因	288
第四节 男性不育与免疫	188	二、不育症检查及治疗	290
一、人精子抗原	188	第十章 生殖工程	293
二、抗精子抗体	190	第一节 试管婴儿的培育方法	293
三、抗精子抗体与男性不育	192	一、常规“试管婴儿”培养技术	293
四、抗精子抗体的测定及临床意义	193	二、显微授精	299
第五节 女性生殖与免疫	194	三、着床前遗传病诊断技术	302
一、女性生殖道的免疫保护机制	195	四、传统 IVF-ET 基础上衍生的技术	303
二、精子在女性生殖道免遭攻击的机制	196	五、未成熟卵的体外成熟	303
三、女性不孕与免疫	196	第二节 人工授精	306
四、习惯性流产与免疫异常	197	一、适用的范围	306
第七章 机体内分泌与生殖	200	二、人工授精的治疗程序	306
第一节 生殖器官的发育	200	第三节 精子、卵子和胚胎的冷冻保存	308
一、性激素与生殖器官的发育	200		
二、机体内分泌腺的发育	201		

一、精子的冷冻保存	308	二、细胞凋亡的生物学意义	348
二、胚胎和卵子的冷藏技术	309	第二节 细胞凋亡的应用远景	349
第四节 转基因动物技术的简介	309	一、细胞凋亡与机体稳态	349
一、转移系统的构成	310	二、细胞凋亡与疾病	349
二、技术方法	310	三、肿瘤细胞凋亡的研究	350
第五节 动物克隆技术 (细胞核移植)		四、药物研制开发与细胞凋亡	351
概述	311	第三节 凋亡细胞	352
一、概述	311	一、形态学特征	352
二、哺乳动物细胞核移植 (克隆) 的方法	313	二、生化特征	354
附文 有关干细胞 (stem cell)	315	三、蛋白酶在细胞凋亡中的作用	355
一、小鼠胚胎干细胞的分离培养	315	四、胞浆 Ca^{2+} 与细胞凋亡	355
二、胚胎干细胞的生物学特性与鉴定	316	五、胞浆 pH 的变化及其对细胞凋亡的	
三、干细胞系	317	调控	356
第十一章 性与生殖健康	319	六、线粒体与细胞凋亡	356
第一节 性生理学	319	第四节 女性生殖与细胞凋亡	357
一、性成熟的表现	319	一、女性生殖系统	357
二、性行为与性反应	321	二、黄体细胞凋亡与黄体萎缩	359
三、性功能障碍	326	三、妇科恶性肿瘤与细胞凋亡	360
第二节 性心理学	327	第十三章 生殖医学的实验技术	363
一、性意识的发展	327	一、精子染色技术	363
二、恋爱与婚姻	330	二、精浆生化及微量元素的测定	364
三、性心理的调整与治疗	334	三、精子功能的检测	367
第三节 性社会学	336	四、精液免疫学检测	368
一、性行为的功能	336	五、精子表面标志的检测	370
二、性行为与健康	337	六、精子处理技术	370
三、青少年的性行为	341	附录	376
第四节 人类的优生	343	一、精子染色技术	376
一、遗传学	343	二、精浆生化及微量元素的测定	378
二、畸形学	344	三、精子功能的检测	383
三、环境学	345	四、精液免疫学检测	385
第十二章 细胞凋亡与生殖	347	五、精子表面标志的检测	388
第一节 研究简史	347	六、精子处理技术	388
一、一般历史过程	347		

第一章

男性生殖系统的结构与功能

第一节 男性生殖系统的功能解剖学

一、睾 丸

(一) 睾丸的解剖结构

睾丸(testis)左右各一,呈卵圆形,位于阴囊中。成人的睾丸长约 4.5cm,宽约 2.5cm,厚约 3.0cm,重约 12g。睾丸大小有一定的个体差异。睾丸表面包以睾丸被膜,包括鞘膜脏层、白膜和血管膜三部分。鞘膜脏层是睾丸被膜的最外层,很薄,为浆膜。它与贴附于阴囊壁的鞘膜壁层之间有一很狭小的鞘膜腔,正常时,鞘膜腔内有少量液体,称鞘膜液。鞘膜液具润滑睾丸、减少睾丸活动时的摩擦作用。白膜较厚,由致密结缔组织构成,含有大量的胶原纤维和少量的成纤维细胞。人类白膜有成层分布的平滑肌纤维。白膜在睾丸后缘增厚形成睾丸纵隔。睾丸纵隔形成系列的小隔伸入睾丸实质,将睾丸实质分成 200~300 个锥形睾丸小叶,每个睾丸小叶含有 1~4 条高度弯曲的生精小管。生精小管在近睾丸纵隔处汇合成短而直的直精小管。直精小管进入睾丸纵隔相互吻合,形成睾丸网,最后与输出小管相连通。生精小管之间的疏松结缔组织为睾丸间质,含有能分泌雄激素的间质细胞。血管膜是睾丸被膜的最内层,薄而疏松,与睾丸实质紧密相连,并深入至生精小管之间,难以与睾丸实质剥离。睾丸被膜有支持和容纳睾丸实质的作用。在人类,睾丸被膜有节律的收缩和舒张对睾丸实质有按摩作用,并增加睾丸内压,促使睾丸精子向附睾排放。睾丸被膜的舒缩与神经和温度刺激、前列腺素以及钙离子相关。

睾丸血供来自于睾丸动脉,而睾丸动脉血供主要来源于精索内动脉和输精管动脉,睾丸动脉从睾丸后缘进入睾丸后反复分支;有的通过睾丸纵隔进入睾丸小隔,有的通过白膜和血管膜进入睾丸小隔,然后进入睾丸小叶的间质并形成毛细血管网,分布于生精小管周围,继而先后汇合成管间静脉,白膜静脉和睾丸静脉,最后形成蔓状静脉丛。睾丸静脉表浅,位于阴囊皮下,因此返回至蔓状静脉丛的静脉血

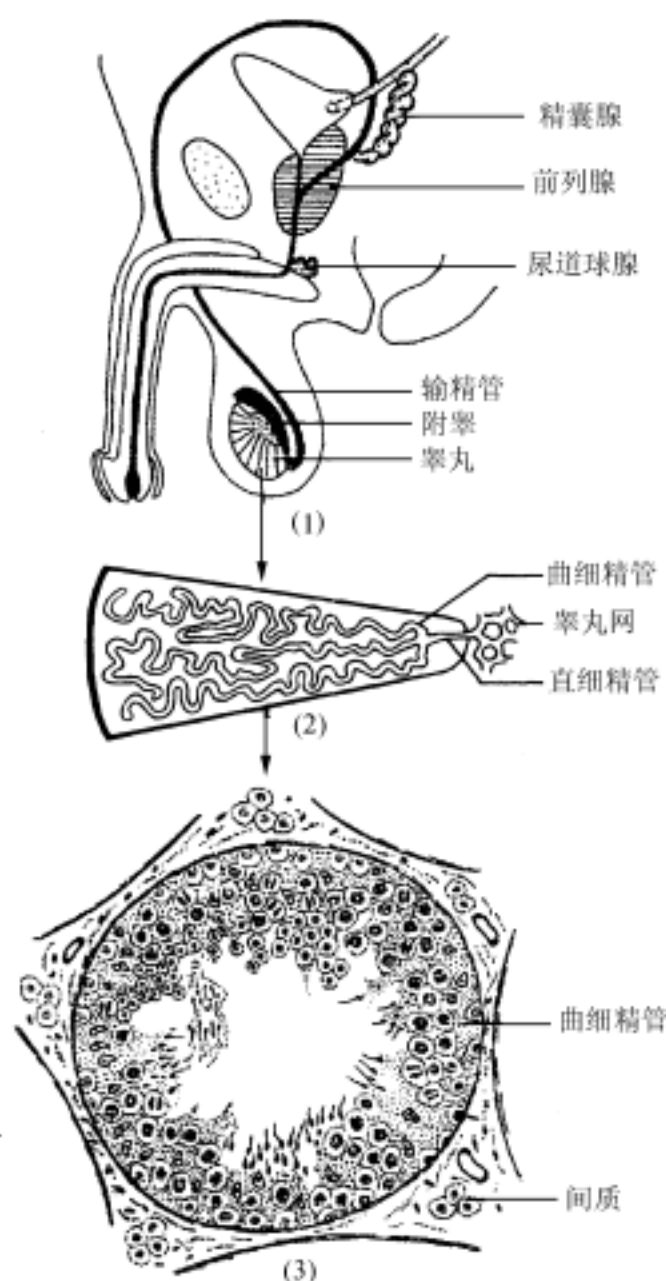


图 1-1 睾丸

250nm。两侧睾丸的生精小管总长度约 500~ 600m 左右。生精小管由界膜围绕,管壁上皮由两类结构和功能不同的细胞组成,一类是生精细胞,包括精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞及精子;另一类是支持细胞。

1. 生精小管界膜

生精小管界膜,也称固有层、管周组织、管周层或边界组织。人类生精小管界膜可分三层:内层为基膜,其厚度呈年龄性递增。基膜向内贴附于支持细胞和精原细胞基底部,有时可见基膜形成的结节状突起伸入生精上皮。基膜主要含有层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、硫酸肝素类糖胺多糖等,邻近肌样细胞的基膜还含有纤维蛋白和I型胶原蛋白。中层为肌样细胞层。肌样细胞呈扁长形,胞质含有两种细丝,为肌动蛋白或类肌动蛋白样物质。基膜层的主要成分由支持细胞和肌样细胞共同分泌、形成。界膜的最外层是淋巴样内皮细胞层。在界膜中还存在少量的巨噬细胞和肥大细胞。

生精小管的界膜有一系列重要功能:

温度接近于阴囊表面温度。蔓状静脉丛与细长弯曲的精索内动脉关系密切,血流在精索内动脉时进行了逆行性热交换,降低了动脉血温度。而睾丸动脉血流速度缓慢,使到达睾丸的动脉血温度更有明显降低。

阴囊皮肤菲薄,缺少皮下脂肪,并有一层平滑肌,称肉膜。阴囊皮肤还富含温度感受器,可对周围环境温度的变化作出积极的应答。当受到冷刺激时,平滑肌收缩,阴囊皮肤形成皱褶,阴囊体积减小,散热减少。当受到热刺激时,平滑肌舒张,阴囊皮肤伸长,有利于散热。同时,阴囊血供丰富,并富含汗腺,温度增高时,阴囊皮肤汗腺汗液排出量增加,增加散热。

由于睾丸血管及阴囊形态结构的上述一系列特点,使阴囊温度低于体温 3℃ 以上,睾丸温度也明显低于体温。这是保证正常精子发生的重要条件之一(图 1-1)。

(二) 生精小管

成人的生精小管(seminiferous tubule)长 30~ 80 cm,直径 150~

(1) 界膜是生精上皮和睾丸间质进行物质交换的通道,是构成血睾屏障的组成部分,对正常精子发生起重要作用。

(2) 基膜的细胞外基质对支持细胞的分化、正常形态结构维持、细胞间紧密连接的形成以及正常功能的行使具有重要调节作用;基膜的细胞外基质还能储存生长因子,这些生长因子在精子发生和雄激素合成过程中发挥调节作用。

(3) 肌样细胞能够收缩,有助于精子向附睾方向输送;如果肌样细胞功能受损,界膜可能发生病理性增厚。

(4) 肌样细胞有旁分泌和自分泌功能。它分泌的肌样细胞刺激支持细胞因子(peritubular modifeyes sertoli,简称 PMods)对支持细胞合成、分泌 ABP、运铁蛋白具有强烈的刺激作用,分泌的其他生长因子如 $TGF\alpha$ 、 $TGF\beta$ 、IGF-1 等和睾丸其他细胞分泌的生长因子,共同构成了一复杂的生长因子网络,对睾丸的功能起局部调节作用。

2. 支持细胞

(1) 支持细胞的形态结构:1865 年,德国人 Enricol Sertoli 首先描述了支持细胞,故支持细胞又称 Sertoli 细胞。在光镜下,支持细胞轮廓不清,核不规则,染色浅,核仁明显。在电镜下,支持细胞呈高度不规则的圆柱形,其基部紧贴生精小管基膜,顶部突向生精小管腔面,侧面和管腔面有许多不规则凹陷,其内镶嵌着各级生精细胞,每个支持细胞大约能与 47 个处于不同发育阶段的生精细胞相接触。

支持细胞核大,多呈细长形,与细胞长轴方向相一致,细胞核多位于细胞底部,有的核凹陷深,呈分叶状,核膜有较多的皱褶。核孔多,核质呈均质状,染色质稀疏,核仁发达。人支持细胞的核仁为复合体结构,由中间的核仁网和两侧致密的核旁小体组成。核仁网,呈 Feulgen 反应阴性;核旁小体,呈 Feulgen 反应阳性。

支持细胞胞质电子密度高于生精细胞,但不同的支持细胞也有差异,因而有人根据胞质电子密度的高低,将支持细胞分为“暗型”和“亮型”两种,其确切意义尚不清楚,可能与细胞的不同功能状态有关。暗型支持细胞在细胞增殖期多见,被认为是增殖型细胞,也有人认为暗型支持细胞是一种变性细胞。支持细胞胞质内基质致密,线粒体多而细长。高尔基体发达,位于核旁,由一些平行扁平囊及小囊泡组成。粗面内质网丰富,多分布于细胞基底部,呈管状。滑面内质网尤其丰富,在细胞基部,滑面内质网常聚集于脂滴周围,形成多个同心圆状的内质网结构,称为环行板层结构;在围绕精子顶体的支持细胞顶部胞质中,滑面内质网平行排列,形成表面小池,可能与精子的释放有关。致密小体多见,并有膜包裹,形态大小各异,可能是溶酶体、自噬体和异噬体。细胞质中还有许多微丝、微管。微丝和微管是细胞骨架,与支持细胞的运动及形态维持有关,并参与支持细胞的信号传导。人支持细胞胞质内还有两种不同的晶体:Lubarsch 晶体和 Spangaro 晶体,前者较大,长 10~ 25nm,宽 2~ 3nm;后者较小,长约 1.5nm,宽约 1nm。晶体的功能目前仍不清楚。支持细胞顶部胞质中常常可见吞噬的精子残余体,基部胞质中有脂滴、糖原等内含物。其含量与支持细胞的功能状态有关,部分脂滴可能是吞噬的残余体分解产物(图 1-2)。

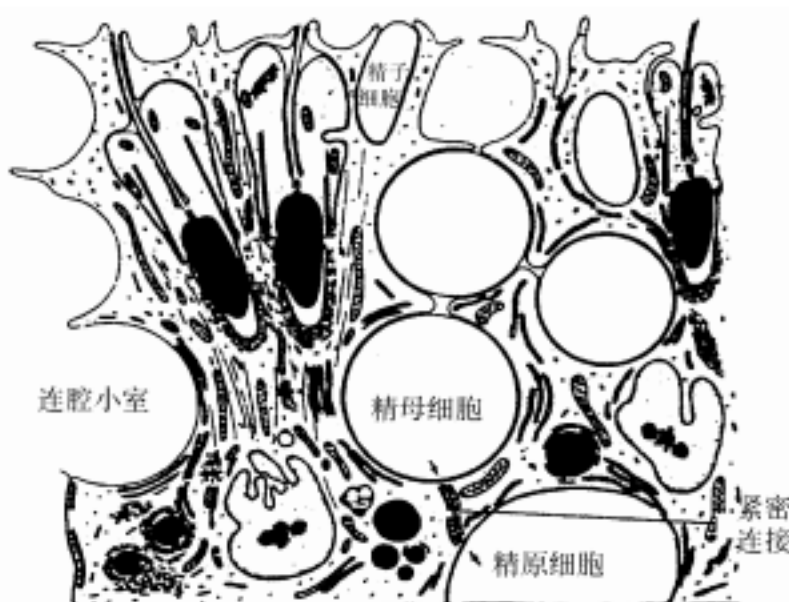


图 1-2 支持细胞超微结构模式图

(2) 支持细胞的发育和成熟:支持细胞有一发育与成熟的过程。青春期前的支持细胞属未成熟型。未成熟型支持细胞有 Sf 型、Sa 型和 Sb 型三种。Sf 型为胚胎型支持细胞,一般在出生后 2 周转化为 Sa 型。1 岁后,Sa 型转化为 Sb 型。至青春期,随着生精小管管腔的出现,Sb 型细胞转化为 Sc 型,即成熟型支持细胞。未成熟型支持细胞呈立方形或矮柱状,核卵圆形,有 1~3 个,凹陷少,界浅,核仁呈核仁网状或致密体,但未形成核仁复合体结构;内质网不丰富,未出现晶体结构;相邻的支持细胞未形成连接复合体,仅为结构简单的指状镶嵌。未成熟型支持细胞具有较强的吞噬能力,并能抑制精原细胞完成减数分裂。至青春期,支持细胞发生一系列成熟变化,出现了具有特征性的形态结构,使睾酮转化为雌激素的芳香化酶逐渐减少;FSH 受体逐渐增多,并开始具有合成雌激素结合蛋白运铁蛋白的能力。成熟型支持细胞无分裂能力。

(3) 支持细胞的功能

1) 支持细胞参与形成血睾屏障(血-生精屏障),创造了相对稳定的生精内环境。相邻的支持细胞在近基底面形成了紧密连接和缝隙连接的连接复合体,对组织液有选择性通透作用,构成了血睾屏障的重要组成部分。电镜观察显示,在支持细胞紧密连接的两侧胞质中存在着与粗面内质网相连续的内质网池,称表面下池(subsurface cisternae),表面下池和紧密连接的胞膜之间有大量相互平行的微丝束,紧密连接、微丝束和表面下池形成了一外形似“三明治”的结构。

支持细胞的连接复合体将生精上皮分隔成基底小室和连腔小室两部分;也有人认为将生精上皮分为基底小室、中间小室和连腔小室三部分。基底小室位于基膜和支持细胞的连接复合体之间,精原细胞和细线前期精母细胞位于其中;连腔小室内有正在发育的其他各级生精细胞(图 1-3)。

基底小室和连腔小室内的微环境是不同的,血循环和淋巴循环中的一些物质可能通过睾丸间质的结缔组织和生精小管的界膜,进入基底小室,与其中的生精细

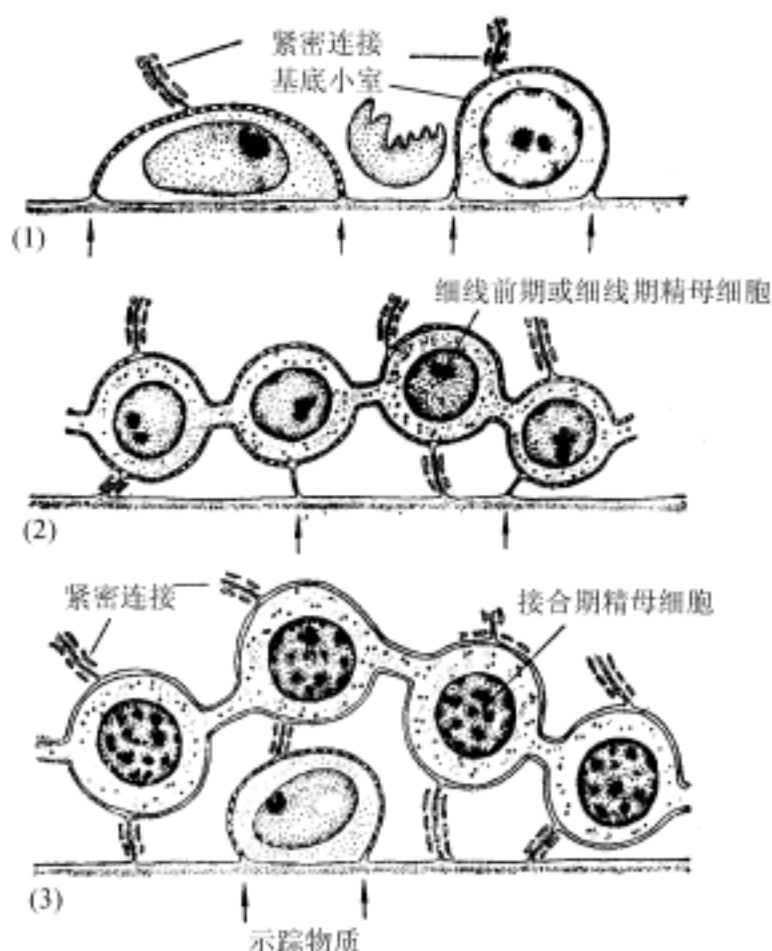


图 1-3 血睾屏障示意图

胞相接触,但为支持细胞的连接复合体所阻挡,不能进入连腔小室。所以,连腔小室与血循环和淋巴循环是分隔开的,这保证了连腔小室内精母细胞的成熟分裂和精子细胞的变态在稳定的微环境中进行,免受循环中有害物质的损害。由于血睾屏障的存在,使基底小室和连腔小室之间维持着一定渗透压梯度,这有利于生精上皮产生的液体向管腔方向排泌。同时,血睾屏障也是有效的免疫屏障。发育中的精母细胞、精子细胞和精子具有特异的自身抗原,正常情况下的血睾屏障阻止这些特异性抗原与机体的免疫系统相接触,因而不会发生免疫反应。即使生殖管道远端的屏障受到破坏,机体对精子抗原发生了自身致敏而产生抗精子抗体,但是循环中的抗精子抗体也不能通过血睾屏障进入连腔小室,故而不能与发育中的生精细胞发生免疫反应。临床上也发现了一些男性血循环中存在抗精子抗体,但他们仍具有生育力。

2) 支持细胞有支持生精细胞和促进生精细胞转位及精子释放的作用。支持细胞是各级生精细胞的支架,支持细胞结构和位置的变化可以影响生精细胞的排列规律和正常发育。支持细胞与各级生精细胞之间形成的连接结构,可能是机体内细胞之间最为复杂的连接。支持细胞不但与生精细胞形成桥粒——缝隙连接、连接复合体,而且各自还能形成一些与对方密切相关的特化性结构。如:在围绕精子细胞顶体和精母细胞的支持细胞形成了一种胞浆特化性复合体(ectoplasmia specialization),它由肌动蛋白丝组成,连接胞膜和内质网池;伸入支持细胞凹陷的一些

精子细胞浆内形成了管泡状结构;此外,还有支持细胞隆突(sertoli cell processes)、精子细胞隆突(spermatids processes)和精子残余体(residual bodies),这些特化结构参与了支持细胞和生精细胞之间的连接、物质转运和信号传导。并且与支持细胞结构一样,这些特化结构也随着生精周期而呈现相应的变化。

大量研究证实,支持细胞的数目及其正常结构和功能,在很大程度上决定了一种动物或某个个体的生精效率。精细胞转位包括精子释放于生精小管管腔,都是在支持细胞作用下完成的。重要依据有:① 精子释放是不同因子直接作用于支持细胞的结果;② 支持细胞能合成分泌纤溶酶原激活因子和其他蛋白水解酶,精母细胞进入连腔小室,精子细胞移位和精子释放都需要这些蛋白水解酶;③ 生精细胞的运动与自身无关,但依赖于支持细胞骨架系统的完整;④ 支持细胞隆突和胞浆特化复合体参与了生精细胞转位和精子释放(图 1-4)。

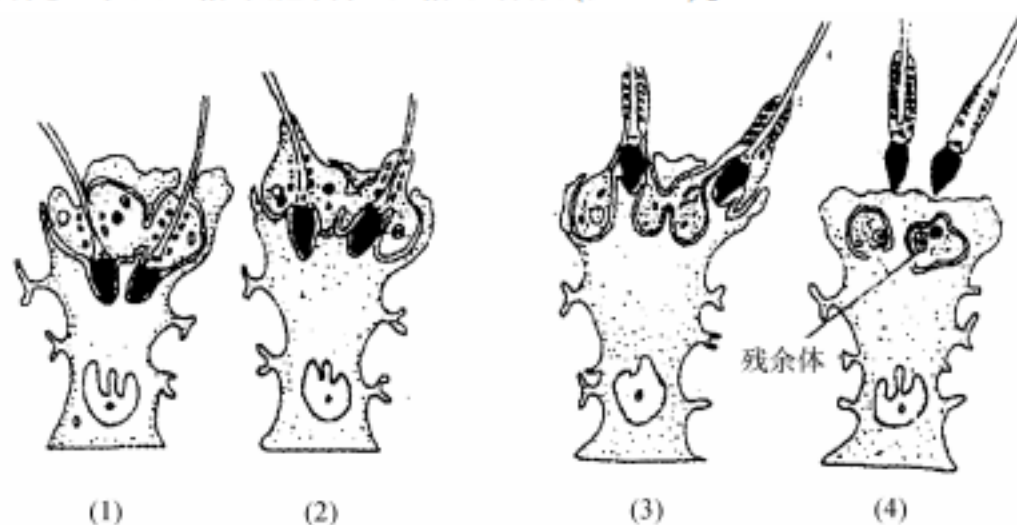


图 1-4 精子排放过程示意图

3) 支持细胞有旺盛的分泌功能。随着分子生物学的进展和支持细胞体外培养体系的完善,对支持细胞的分泌功能有了更广泛的了解,除了生精小管管腔液主要由支持细胞分泌外,支持细胞还能分泌多种物质,按照其功能,可粗略归为以下几类:

a. 转运蛋白类:雄激素结合蛋白(androgen binding protein, ABP)、运铁蛋白(transferrin)、铜蓝蛋白(cerula plasmin)、维生素结合蛋白、硫酸糖蛋白 1 和硫酸糖蛋白 2、 γ -谷氨酰转移酶等属于此类。ABP 与睾酮、脱氢睾酮有高亲和力,与雄激素结合后,可维持生精小管内雄激素的高浓度,形成有利于生精细胞分化、成熟的内环境。同时,它随睾丸液流向附睾,对附睾结构和功能的正常维持有重要意义。而运铁蛋白、铜蓝蛋白、维生素结合蛋白、硫酸糖蛋白 1 和硫酸糖蛋白 2 及 γ -谷氨酰转移酶分别可转运 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 、 Cu^{2+} 、维生素、脂类及氨基酸至生精细胞,参与精子发生。

b. 调节蛋白类:中肾旁管抑制物质(mullerian-inhibiting substance, MIS)是胚胎早期支持细胞分泌的一种蛋白质,它能使中肾旁管退化消失,参与性别分化。成熟型支持细胞能分泌一种分子量为 80kDa 的间质细胞激活蛋白,可促进间质细胞

的功能。

c. 生长因子类:抑制素(inhibin)、激活素(activin)、转化生长因子 α (TGF α 、转化生长因子 β (TGF β)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、白介素-1(IL-1)等,这些生长因子与睾丸其他细胞分泌的生长因子,构成了一睾丸局部生长因子网络。

d. 其他:参与构成生精小管基膜的层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、enactin 和硫酸肝素类糖胺多糖;与支持细胞间、支持细胞与生精细胞间连接有关的细胞黏附分子;参与基膜更新及支持细胞连接复合体开放和关闭的纤溶酶原激活子和抑制子;以及雌激素和可渗透的甾体类物质。

4) 支持细胞有营养生精细胞的作用。因为血睾屏障的存在,连腔小室内生精细胞正常发育所需的营养物质和代谢废物的排出,都必须通过支持细胞转运。生精细胞发育过程中的能源物质如丙酮酸盐、乳酸盐,是支持细胞生成,并通过支持细胞与生精细胞之间的桥粒——缝隙连接供给的。而 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 、 Cu^{2+} 、氨基酸、脂类和各种维生素营养物质也都由支持细胞产生的相应转运蛋白输送给生精细胞。精子发生过程中,大量变性或凋亡的生精细胞、变态时形成的大量残余体、代谢废物,多数都可被支持细胞吞噬、吞饮,而加以消化(图1-5)。

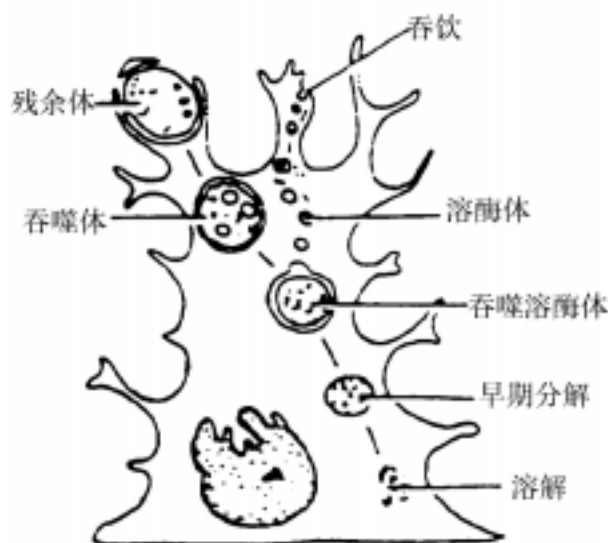


图 1-5 支持细胞吞噬功能示意图

5) 支持细胞有免疫屏障功能。支持细胞能表达 FasL,并有膜结合型和分泌型两种存在形式。FasL 结合于侵入的免疫细胞膜上 Fas 受体,诱导免疫细胞凋亡。所以支持细胞是睾丸作为免疫豁免(immune privilege)的重要物质基础。

3. 生精细胞

生精细胞(spermatogenic cell)包括精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子。青春期启动之前,生精上皮只有支持细胞和精原细胞,其他生精细胞缺如;青春期启动之后,生精细胞不断增殖、分化,形成精子,生精上皮中可见各级生精细胞。将精原细胞增殖、精母细胞减数分裂到精子形成的连续发育过程,称为精子发生(spermatogenesis)(图1-6)。

(1) 精原细胞(spermatogonium):精原细胞是成熟睾丸中最幼稚的生精细胞,位于基底小室,贴附于生精上皮基膜。根据精原细胞核的形态、大小,染色质的染色致密度,核仁的位置及数量,胞质中有无糖原等特点,可将精原细胞分为三型:暗型精原细胞 A (dark type A, Ad)、亮型精原细胞 A (pale type A, Ap) 和 B 型精原细胞 (type B)。Ad 型精原细胞核呈圆形或卵圆形,染色质呈细粒状,染色深,核中常有 1~2 个浅染区,核仁明显,胞质中有糖原、微管及由很多小管组成的 Lubarsch 晶体。每个小管的长度大约为 $3\mu\text{m}$,相互平行,并有致密物质相连形成片层状结构。Ap 型

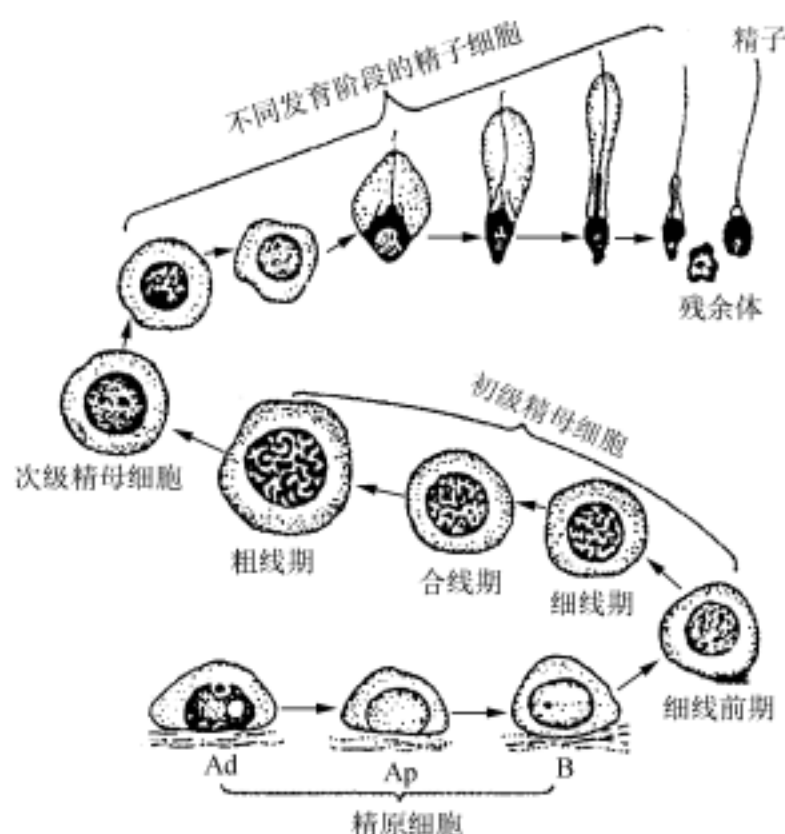


图 1-6 精子发生示意图

精原细胞大而圆,核圆形,染色质呈细颗粒状,染色浅,核膜处有 1~2 个核仁,胞质中无糖原,无微管,无 Lubarsch 晶体,在相邻的 Ap 型精原细胞间有桥粒样结构。在 Ad 型精原细胞中,线粒体常成堆分布,线粒体间有深染的电子致密物质连接。Ap 型精原细胞线粒体单个或成双存在,相互间有致密物质相连。B 型精原细胞为圆形,与生精上皮基膜接触面较小,有时仅有一个狭窄的胞质突起与其接触。核呈球形,染色质呈细颗粒状,大小各异,沿核膜分布或附于核仁,核仁不规则,一般位于核中央,线粒体分散在胞质中。

(2) 精母细胞(spermatocyte):精母细胞位于生精上皮的中层,分为近基底的初级精母细胞和近腔面的次级精母细胞。B 型精原细胞经过数次有丝分裂,分化形成初级精母细胞;初级精母细胞经第一次成熟分裂,形成两个次级精母细胞。初级精母细胞体积较大,直径约 $18\mu\text{m}$,染色体核型为 46,XY,DNA 含量为 $4n$,细胞分裂期分为前、中、后和末期。初级精母细胞分裂前期的染色体变化十分复杂,历时较长。因此,前期依次可分为细线期(leptotene)、偶线期(zygotene)、粗线期(pachytene)、双线期(dipotene)、终变期(diakinesis)。细线期的 DNA 已完成复制,胞核的染色体呈细丝状,每一条染色体均形成双股线。在偶线期,来自两个亲本的同源染色体相互配对,联结在一起,叫联会(synapsis)。联会的结果,是每对同源染色体形成一双价体(bivalent)或联合复合体(synaptonemal complex)。在电镜下,双价体的两侧为两条平行的致密粗线,中间为透亮的细丝,呈三分体结构。粗线期的染色体经螺旋化渐为粗短,每条染色体分裂成两条染色单体,称二分体。这样,每个二价体有 4 条染色单体,称四分体(tetrad);每条染色体的两条染色单体称姐妹染色单体,同源染色体的染色单体称非姐妹染色单体。两条非姐妹染色单体之间有时

存在部分交叉,同源染色体之间发生了片断的互换,具有重要的生物学意义。接着细胞进入双线期,同源染色体之间相互排斥而分离,但发生交叉的部位仍相连,各染色体的交叉数目不一。至终变期,染色体进一步螺旋化而更为粗短,核仁、核膜消失。随后,细胞分裂进入分裂中期,各四分体排列于核中央,形成赤道板,纺锤丝与着丝粒相连。在分裂后期,纺锤丝牵引每个四分体中的一个二分体,随机平均移向细胞两极,即同源染色体发生了分离,但着丝粒并不分裂;进入细胞分裂末期后,各二分体移至细胞两极,染色体解旋,核仁、核膜重新出现,分别形成两个细胞核,胞体一分为二,形成两个次级精母细胞。次级精母细胞的染色体数为 23 条,DNA 含量为 $2n$ 。次级精母细胞形成后,经过或经过短暂的细胞间期,DNA 不进行复制,即进入第二次成熟分裂。第二次成熟分裂时,各二分体的着丝粒分裂,形成两条相当于染色体的单分体(monad),纺锤丝牵引单分体移向细胞两极,形成两个细胞,即精子细胞。由于第一次成熟分裂前期持续时间长,所以在睾丸组织切片上可见到处于不同增殖阶段的初级精母细胞,而次级精母细胞间期短,甚至不存在间期,迅即进行并完成第二次成熟分裂,形成精子细胞,故而睾丸组织切片中难以见到次级精母细胞。

(3) 精子细胞(spermatid):精子细胞靠近管腔,体积较小,直径约 $9\mu\text{m}$,为初级精母细胞的一半。核圆,直径约 $6\mu\text{m}$,相对较大,位于细胞中央,染色体致密。精子细胞染色体 23 条,DNA 含量为 $1n$ 。精子细胞不再分裂,它经过一个结构复杂的变化过程,由球形转变为蝌蚪形的精子,该过程称为精子形成(sperminogenesis)或精子变态。在形态上:哺乳动物的精子形成一般可分为高尔基期、顶帽期、顶体期和成熟期 4 个时期。主要变化有:① 核染色质极度浓缩,核变长并移向细胞一侧,形成精子头部;② 高尔基复合体形成顶体泡,并逐渐增大,凹陷为双层帽状覆盖于核的头侧,成为顶体(acrosome);③ 中心粒迁移至核的尾侧,发出轴丝,随着轴丝长长,精子细胞形成鞭毛;④ 线粒体从膜下聚集于轴丝近侧端周围,形成螺旋形的线粒体鞘;⑤ 在精子核、顶体和轴丝周围仅存有薄层细胞质,多余的细胞质形成残余体,最后脱落,为支持细胞所吞噬或吞饮。根据精子细胞核的形态变化,可将精子细胞分为 4 种类型,即 S_1 型、 S_{b1} 和 S_{b2} 型、 S_c 型、 S_{a1} 和 S_{a2} 型。 S_1 型相当于高尔基期, S_{b1} 和 S_{b2} 型涉及到顶帽期和顶体期; S_c 核进一步变长,在核内出现电子致密颗粒,散在分布,核电子密度深,但在核后区可较清亮; S_{a1} 型染色质颗粒增粗,体积变小, S_{a2} 型已接近成熟,染色质颗粒呈致密的团块(图 1-7)。

(4) 精子(spermatozoon):精子是一种高度分化的细胞。精子形成时,大部分细胞器丢失,核高度浓缩,基因关闭,基本上不表达蛋白质。精子中无核糖体、粗面内质网及高尔基体。正常精子形似蝌蚪,全长 $60\mu\text{m}$ 。光镜下,精子分为头、尾两部分。头部主要由核、顶体及后顶体鞘所组成;尾部又称鞭毛,在电镜下,可看到分为中段、主段和末端,在精子头、尾部之间为精子颈部(图 1-8)。

1) 精子头部:正面观,头部呈卵圆形,侧面观呈梨形,长 $4\sim 5\mu\text{m}$,宽 $2.5\sim 3.5\mu\text{m}$ 。人精子核染色质呈细颗粒状,不像其他哺乳动物成熟精子核的染色质致密

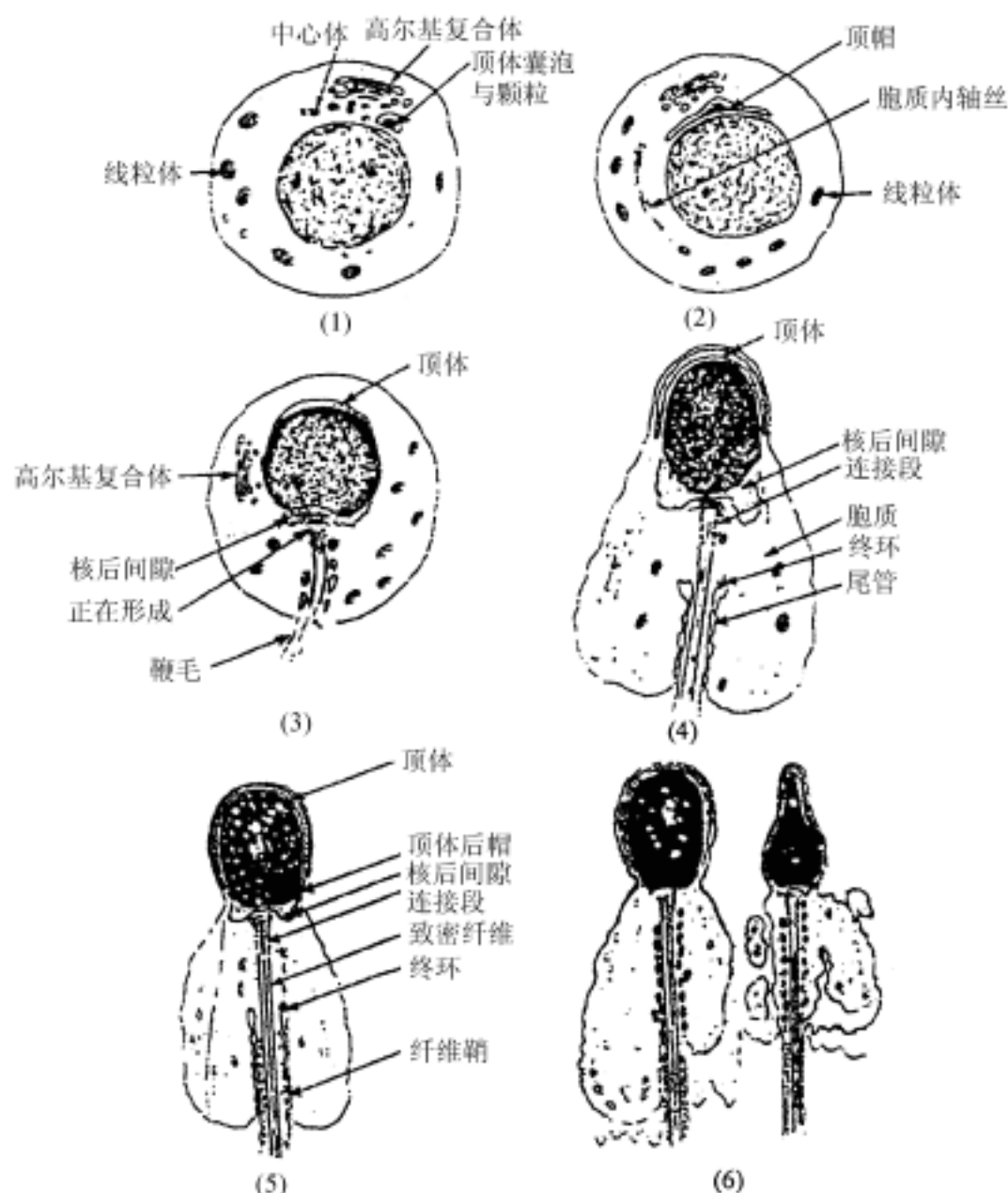


图 1-7 精子细胞的变态及精子细胞类型

均一。此外,浓密的核染色质常有不规则的透亮区,即核内空泡。核膜在形态上可分为三个不同区域:位于核前端的为前核膜或称核膜前区,它覆盖核大部,紧贴染色质并无核孔。核后端是后环或称横带。该部核膜与精子质膜相融合。后环尾侧,核膜脱离核染色质,形成皱褶,并延伸至精子颈部,该核膜称为过剩核膜。过剩核膜与核染色质之间有 40~ 50nm 的间距,称核后间隙。过剩核膜有核孔,孔上有隔膜,内外层核膜增厚。靠近核膜外层有一连续的致密带,称基底板。核膜皱褶反折至核基部形成凹陷,即附着凹,为精子尾部固着头部之处。人精子核富含精氨酸的核蛋白,并富含二硫键,这更有利于精子核的稳定和抗有害因子能力。精子顶体由单层膜包绕,近精子质膜为顶体外膜,与核膜相邻接的称为顶体内膜,两者之间有 20nm 的顶体下间隙。顶体内、外之间,充满着均质状、电子密度中等的顶体内容物,主要为酶系,如顶体素、透明质酸酶、放射冠分散酶、酸性磷酸酶等多种蛋白质和基质水解酶。在精子穿透放射冠和透明带时发挥重要作用。

精子头部的后顶体鞘为顶体后缘与后环之间细胞质特化薄层致密带结构,间

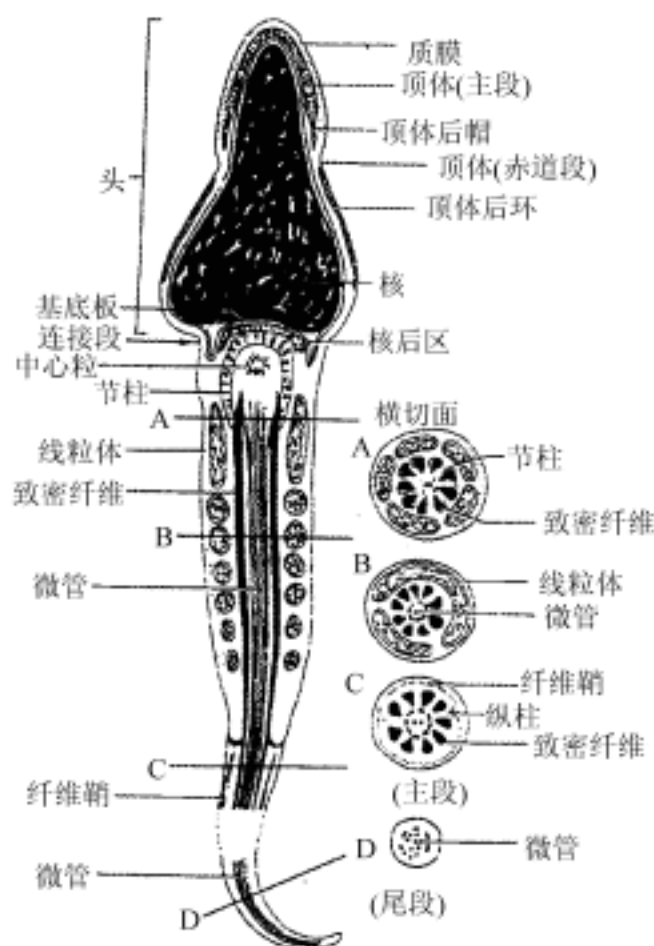


图 1-8 精子断面的模式图

断性伸向精子膜内侧面,使精子膜增厚。根据其形态不同,可分为前区、后区。前区有横纹、细小而有间隔;后区均质。在受精过程中,卵细胞膜特异性识别并结合于后顶体鞘相应部位的精子膜。后顶体鞘缺乏或破坏,可能影响该区域的精子膜,以致影响精卵识别,从而导致男性不育。

2) 精子鞭毛:由贯穿鞭毛全长的“ $9 \times 2 + 2$ ”微管的轴丝、直接包绕轴丝的 9 条外周致密纤维和位于鞭毛主段高度特化的纤维鞘所组成。而为精子功能活动提供能量的线粒体集中而有序地排列于鞭毛中段的线粒体鞘。鞭毛轴丝微管滑动可使精子产生运动。外周致密纤维、纤维鞘都含有丰富的蛋白质,并富含二硫键及 Zn^{2+} ,使二者都具有特殊刚性,对精子有支持、保护作用,并可能对精子前向运动有一定影响力。有人报道,外周致密纤维有 ATP 酶活性区,提示它可能有收缩功能。纤维鞘的特殊附着,可以改变鞭毛的肋柱间隙,使鞭毛产生某种弯曲及摆动。若微管缺失、移位,外周致密纤维、纤维鞘排列无序、无规则增生,都会使精子失去运动能力。

精子鞭毛中段和主段之间有一环形结构,称为终环,它是中、主段的分界标志。终环结构与电子密度相似于纤维鞘。精子终环附着于精子膜,精子运动时,终环能防止线粒体滑向尾端。

精子膜也为液态镶嵌脂质双分子层结构。构成精子膜的膜脂主要有磷脂、中性脂和糖脂三部分。其中,膜脂以磷脂含量最高,占总脂的 70%,磷脂主要有磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺;中性脂主要为甾醇、脂肪酸。而精子膜的蛋白种类繁多,与膜脂

及糖类结合形成脂蛋白和糖蛋白。膜蛋白是实现精子功能的最主要物质。精子膜存在大量的凝集素受体,精子膜的生化特征也有显著的区域性差异。

通常情况下,大部分精子膜表面较光滑,没有粗大颗粒,但近顶体部分,则比较粗糙,主要是精子膜糖蛋白附着了一些细胞衣成分。精子膜表面有一系列标志,一条环状沟将精子头部分成不均等的两部分,即顶体区及顶体后区。顶体区表面不光滑,有凹陷,也有小颗粒,并有一条细线,这条细线将顶体区分为顶体前区及赤道部。精子顶体后区呈扁平的圆锥形,被后环分成两部分。在顶体后区前半部分,有两条体积相等的后环,紧靠顶体的一条后环崎岖不平,这两条后环相当于顶体后板带区。

生精上皮产生的精子释放入生精小管腔,再由直精小管、睾丸网进入附睾。由睾丸释放的精子还不具有运动和受精能力,需要经过附睾成熟,才能获得运动和受精能力。

4. 血睾屏障

广义的血睾屏障由毛细血管管壁、睾丸间质内的结缔组织、生精小管的界膜和支持细胞间的连接复合体四部分组成。狭义的血睾屏障指支持细胞间的连接复合体。血睾屏障对维持正常生精微环境具有关键性作用。详见前述。

(三) 睾丸间质及间质细胞

生精小管之间充填的疏松结缔组织,称为睾丸间质。睾丸间质中,富含血管、淋巴管。除有未分化间质细胞、肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等结缔组织细胞外,还有一种成群分布的间质细胞,又称 Leydig 细胞。

1. 间质细胞形态结构

间质细胞有一发育成熟的过程。成熟的间质细胞胞体较大,呈圆形或多边形。核圆而大,常居中,核仁明显。细胞质嗜酸性,呈细颗粒状。酶组织化学法显示胞质中含有乳酸脱氢酶,3 β -羟甾脱氢酶和 6-硫酸脱氢酶。其中 3 β -羟甾脱氢酶为间质细胞的标志酶。电镜下观察,可见间质细胞具有典型的分泌类固醇类激素的内分泌细胞结构特征。间质细胞的滑面内质网有管状和池状两种形式,一般认为管状滑面内质网功能状态活跃。滑面内质网由相互连接的膜性管道组成,表面积巨大。若一个间质细胞的表面积为 800mm²,而它的滑面内质网表面积可达 4000mm²,为间质细胞表面积的 5 倍。滑面内质网上具有丰富的合成胆固醇酶。线粒体大而丰富,主要是管状嵴,也有少量板状嵴线粒体。胞质中常有脂滴,在脂滴中含有合成类固醇激素所必需的基本物质。胞质内还有微丝、微管、溶酶体及脂褐素等结构。在人的间质细胞中,还有一种特殊的晶体叫 Rinke 晶体。晶体呈多边形,由细丝组成,其化学本质为一种蛋白质。有时在核内也可见到该晶体。晶体的生理功能尚不明了(图 1-9)。

2. 间质细胞的功能

(1) 间质细胞的主要功能是合成雄激素。男性体内 95% 的雄激素是由睾丸间质细胞合成、分泌的。雄激素在胚胎生殖管道及外生殖器性分化、青春期男性生殖

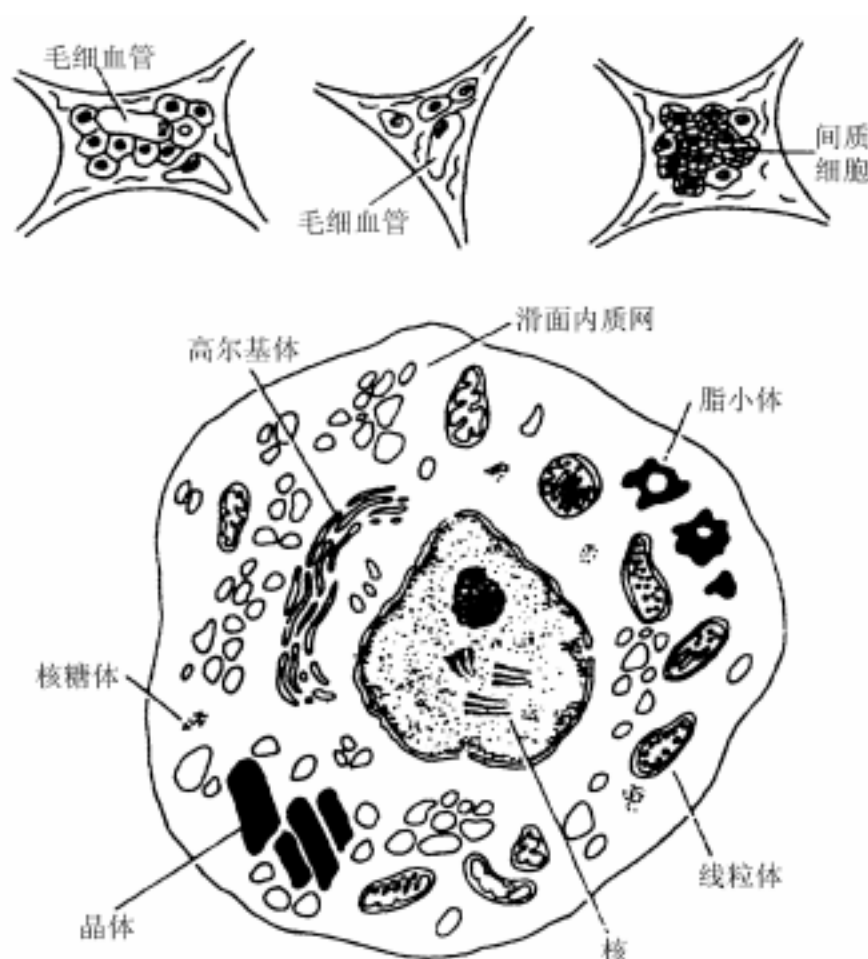


图 1-9 间质细胞的分布及超微结构模式图

系统启动和发育、青春期后、男性生殖功能、性功能及男性第二性征的维持等方面有重要作用(详见第五章)。

(2) 间质细胞还能分泌一些非甾体类激素及生长因子,如 β -内啡肽、前阿片黑皮质素、ACTH、MSH 和 ZGF-1、抑制素等。这些因子对支持细胞和间质细胞自身的分泌功能具有调节作用。

(3) 间质细胞也能分泌少量雌激素。

二、生殖管道

生殖管道包括睾丸内生殖管道和睾丸外生殖管道。前者指直精小管和睾丸网;后者指附睾、输精管和射精管(图 1-10)。

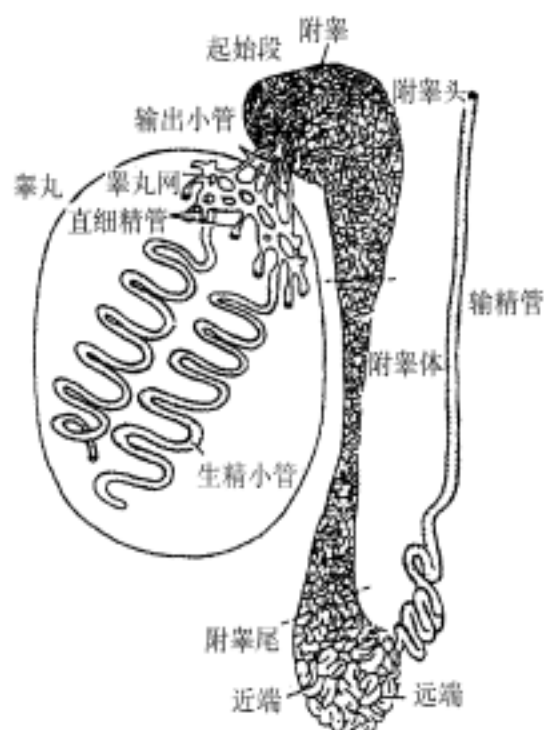


图 1-10 直精小管、睾丸网、输出小管和附睾模式图

(一) 直精小管和睾丸网

直精小管(tubulus rectus)短而直,一端连接生精小管,另一端通连于睾丸网。近睾丸网的直精小管管径为 $30\mu\text{m}$,而近生精小管侧的直精小管呈扩张状态。在生精小管和直精小管移行处可见瓣膜样结构。大量脱落的生精细胞可阻塞直精小管。

直精小管管壁上皮为单层立方或矮柱状,上皮中无生精上皮。直精小管进入睾丸纵隔后,分支相互吻合形成网状管道,称为睾丸网(rete testis)。根据睾丸网的位置,可分为睾丸内、白膜内和白膜外睾丸网。睾丸网与睾丸的输出小管相连续。睾丸网管腔大而不规则,管壁为单层立方上皮。生精小管产生的精子经直精小管和睾丸网随睾丸液一起出睾丸,进入附睾。

(二) 附 睾

1. 附睾形态与结构

附睾(epididymis)可分为头(caput)、体(corpus)和尾(cauda)三部分。头部主要由睾丸输出小管组成,体、尾部由附睾管组成。输出小管是从睾丸网发出的10~15



条弯曲小管,末端通连于附睾管。输出小管上皮由高柱状纤毛细胞及矮柱状细胞相间排列而成,管腔面高低不平,高度不规则,管周由薄层平滑肌包绕。附睾管上皮为假复层柱状上皮,游离面有静纤毛,腔面整齐、规则,管周也有平滑肌(图1-11)。附睾管远端有丰富的肾上腺素能神经末梢分布,最近有报道认为,附睾管也有非肾上腺素能非胆

图1-11 输出小管和附睾管
碱能神经分布。

(1) 附睾各部上皮细胞:大量研究表明,附睾上皮主要含有主细胞、基细胞、顶细胞、狭窄细胞、亮细胞和晕细胞,哺乳动物及人之间种属差异不大。

1) 主细胞(principal cell):附睾各段均有主细胞,但其形态有区域性差异。输出小管主细胞呈高柱、细窄状,游离面微绒毛少,顶端胞质含有较多微丝、微管、糖原和线粒体。有大小不一的囊泡和散在粗面内质网。核上区粗面内质网沿细胞长轴分布于膜下,可见电子密度不一致的多泡体。核下区可见粗面内质网、多核糖体、线粒体及溶酶体。附睾管主细胞相对矮、宽,游离面微绒毛丰富,顶端胞质高尔基体发达,基底面有足样突体与基膜相接触。主细胞有很强的吞饮功能(图1-12,图1-13)。

2) 基细胞(basal cell):分布于附睾各段,位于主细胞基底部之间。与相邻主细胞形成广泛的紧密连接和桥粒连接复合体,其基底面与基膜接触面大。细胞呈扁平

形,核长或圆,电子密度中等,胞质少,染色浅。含有高尔基体、线粒体、少量粗面内质网。沿细胞表面有各级溶酶体,表明基细胞也有吞饮功能。

3) 顶细胞(apical cell):细胞狭长,顶部宽,基部窄,游离面有少量微绒毛。顶部胞质内含有大量线粒体,因而也称富含线粒体细胞,常见于附睾头部。

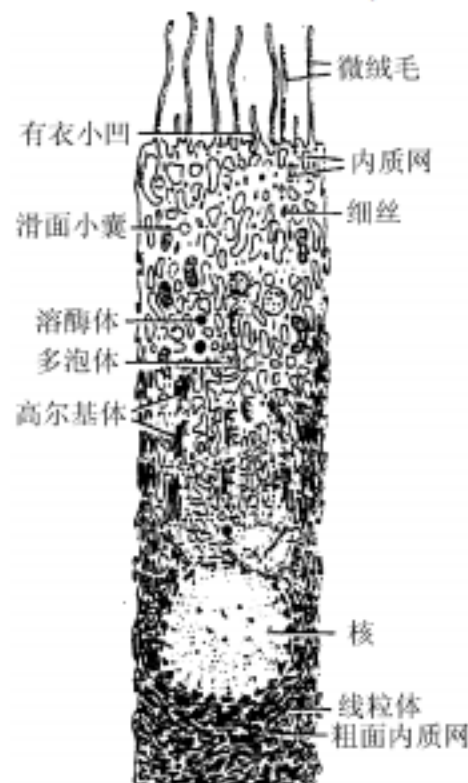


图 1-12 附睾起始段主细胞
超微结构模式图

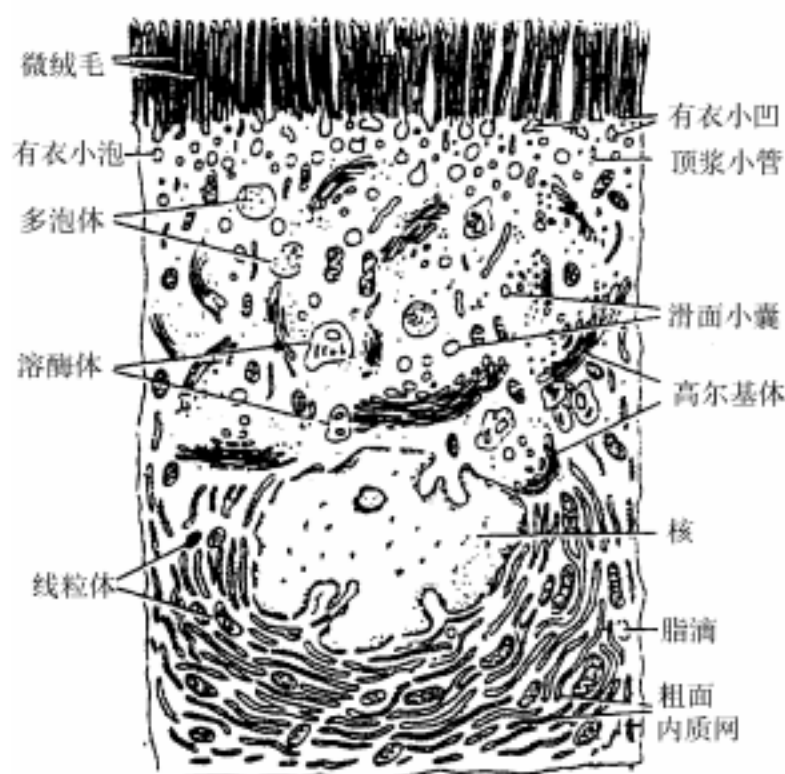


图 1-13 附睾体部主细胞
超微结构模式图

4) 狭窄细胞(narrow cell):高柱状,较其他细胞窄,甲苯胺蓝染色深于主细胞。核长,近游离面。游离面微绒毛少而短,胞质含有丰富的光滑囊泡。核上区有高尔基体及多泡体。线粒体丰富,散见胞质内。基底面窄,贴近基膜。狭窄细胞多见于输出小管,其他部位也有,可能也有吞饮功能。

5) 亮细胞(clear cell):光镜下,亮细胞核圆形,染色浅,核仁明显。以顶部胞质区充满空泡,核上或核下区有许多致密颗粒为特征,电镜下为小囊泡、大空泡、溶酶体以及顶浆小管,空泡内常有膜性成分。亮细胞有较旺盛的吞饮功能,存在于附睾各部。

6) 晕细胞(halo cell):该细胞周围有透亮间隙,故称为晕细胞。可能是从固有膜进入上皮内的淋巴细胞和巨噬细胞,确切功能不清楚。在输精管结扎或输精管阻塞的实验动物和人,其附睾上皮内及附睾腔内巨噬细胞明显增加,并有吞噬精子现象。附睾上皮晕细胞可能是附睾局部免疫屏障。

附睾各部所含的各种细胞比例各不相同,表现出细胞分布上的区域性差异。大鼠附睾上皮组织发生研究表明:主细胞、基细胞和顶细胞均来自于一种柱状细胞,后者由未分化干细胞分化而来。干细胞也可分化为狭窄细胞。分化过程为雄激素依赖。而狭窄细胞在附睾应可分化为亮细胞。

(2) 血附睾屏障(blood-epididymis barrier):血附睾屏障主要为主细胞近腔面

的紧密连接。将硝酸镧注入精索动脉或输精管动脉,可见硝酸镧沿着结缔组织,穿过基膜,出现在附睾上皮主细胞间的间隙中,但为近腔面的主细胞紧密连接所阻隔。血附睾屏障的形成有利于维持附睾腔面与基底面之间各种物质的浓度梯度,维持附睾内环境稳定,并将精子与免疫系统分隔,为精子成熟、储存创造了极为重要的条件。

(3) 收缩鞘(contractile sheath):附睾上皮基膜外存在具有收缩舒张功能的连续结构,称之为收缩鞘。收缩鞘的厚度和结构有区域性差异。输出小管的收缩鞘由3~4个细胞组成,细胞内含有肌丛,细胞排列成螺旋形;附睾管近端收缩鞘类似于输出小管,只是构成收缩鞘的细胞较小,并有成纤维细胞夹杂其中,结构较疏松;附睾管远段的收缩鞘出现平滑肌细胞,比附睾管近端收缩鞘细胞大3倍以上;至附睾尾部,收缩鞘的小型收缩细胞逐渐减少,主要代之以平滑肌细胞,形成内纵、中环和外纵三层平滑肌,并渐为增厚。

2. 附睾功能

附睾是精子移行、成熟和储存的场所,这决定于附睾上皮细胞的重吸收、分泌和浓缩功能。

(1) 重吸收功能:睾丸液与精子一起进入附睾,其中95%睾丸液在睾丸输出小管被重吸收。输出小管游离面、基底面有水通道蛋白、钠泵和氯通道分布,它们参与了对睾丸液的水和电解质的重吸收。

附睾上皮对离子重吸收具有选择作用。在附睾液中,离子成分最显著的变化是 Na^+ 锐减, K^+ 增高, Na^+/K^+ 值,由头、体、尾逐渐降低。

附睾上皮细胞内的顶浆小管参与对附睾液的蛋白质和其他大分子物质重吸收。

(2) 分泌功能:附睾上皮主要是主细胞能向附睾管腔中分泌 K^+ 、肌醇、甘油磷酸胆碱(GPC)、唾液酸等物质。附睾头、体、尾上皮细胞均能合成、分泌GPC,而附睾液GPC浓度自附睾头部至尾部逐渐增加。附睾液以及附睾精子膜所含唾液酸量自附睾头部至尾部渐为升高,这也与附睾上皮细胞分泌唾液酸能力相关。

此外,附睾各段上皮细胞能以高度区域特异性方式合成、分泌各种蛋白质,这些蛋白质对精子成熟、储存极为重要。例如,附睾头、体部上皮细胞分泌一种酸性糖蛋白——前向运动蛋白质,它能结合于附睾精子,与附睾精子前向运动能力的发育密切相关。又如,大鼠附睾头、体部上皮细胞能合成、分泌一种大分子糖蛋白,称制动素,它随附睾液流入附睾尾部,在附睾尾部造成一高浓度的制动素环境,抑制精子运动,使精子以静息状态储存于附睾尾部。兔附睾体部上皮细胞还能分泌顶体稳定因子(ASF),它结合于附睾精子顶体区域,抑制精子顶体反应,有利于精子在附睾内的储存。

附睾上皮细胞还能合成、分泌多种具有重要功能的酶,如糖苷酶、糖基转移酶、血管紧张素转换酶、 γ -谷氨酰转肽酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等。由于这些酶的作用,使精子能在附睾中正常的成熟、储存。

(3) 浓缩功能:附睾上皮能高度浓缩肉毒碱。附睾头部远段和体部上皮细胞能摄取血液肉毒碱并转运至附睾腔,附睾液肉毒碱含量从头部至尾部逐渐增加。附睾精子能摄取附睾液内的肉毒碱,从附睾头部至附睾尾部,精子肉毒碱含量也递增。低浓度肉毒碱刺激精子运动,高浓度肉毒碱则抑制精子运动。

(4) 精子移行、成熟和储存:精子进入附睾后,沿头、体、尾移行,与附睾微环境相互作用,获得了结构和功能的最后成熟,最后到达附睾尾部静息储存,直至射精时排出。精子在附睾中运行时间平均为 10d,但有种属差异。

精子在附睾中的运行与附睾管腔内静水压、附睾管收缩和纤毛作用有关。附睾管内静水压存在明显梯度,附睾头部静水压最小,尾部最高。附睾管还存在低速而有节律的电活动。目前认为,肾上腺素能神经、胆碱能神经、非肾上腺素能非胆碱能神经、催产素在调节附睾管电活动中发挥作用。前列腺素也可能参与调节附睾管运动。

精子成熟后储存于附睾尾部,但长期储存会引起精子衰老,使成熟精子失去运动和受精能力。

(三) 输精管、精索和射精管

输精管是输送精子的管道,上接附睾尾,经腹股沟管进入盆腔,在膀胱底后方和精囊腺排泄管合并成射精管。射精管穿过前列腺,开口于尿道。

精索呈圆索状,起自睾丸上端,经腹股沟管,止于腹股沟管腹环,包括输精管、睾丸动脉、蔓状静脉丛、淋巴管及神经,外面有与腹壁相连续的筋膜及提睾肌纤维。输精管管壁可分为黏膜、肌层和外膜 3 层。黏膜上皮为薄层假复层柱状上皮,固有层有丰富的弹性纤维。肌层很厚,由内纵、中环和外纵排列的平滑肌细胞组成(图 1-14)。在射精时,肌层强有力收缩,可促使精子快速排放。

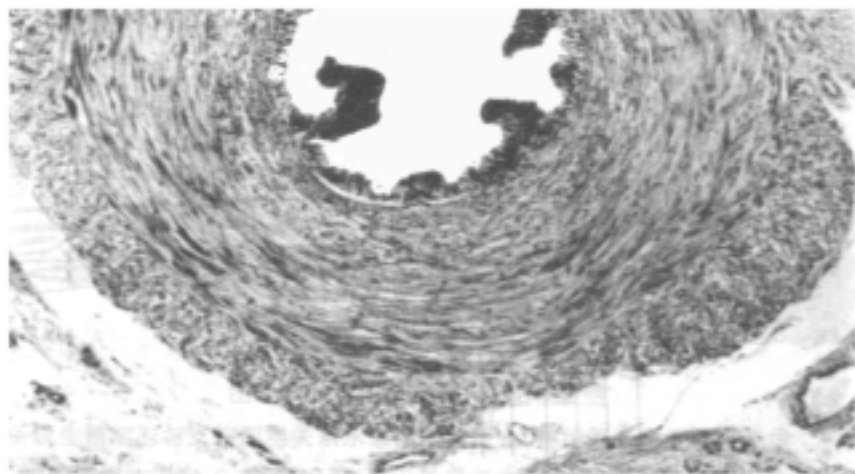


图 1-14 人输精管

输精管和附睾尾部有相类似的神经支配,主要为肾上腺素能神经支配,也有非肾上腺素能非胆碱能神经支配。它们能对肾上腺素或一氧化氮(NO)做出应答,增强输精管收缩,排放精子。

三、附性腺

附性腺包括前列腺、精囊腺和尿道球腺。它们的分泌物构成了精液的精浆的主要部分。

(一) 前列腺

前列腺呈栗形,环绕于尿道起始段。前列腺周围由一层被膜包绕。被膜可分为由内向外的肌层、纤维层和血管层三层。被膜中的结缔组织与平滑肌细胞和前列腺实质中的相应结构相连接。前列腺实质由腺组织和基质组成。

1. 腺组织

腺组织主要由 30~50 个复管泡状腺组成,有 15~30 条导管开口于尿道前列腺部精阜两侧。腺实质可分为黏膜腺、黏膜下腺和主腺三大部分。腺泡上皮由单层扁平、单层立方、单层柱状及假复层柱状上皮构成,腺腔不规则,假复层柱状上皮主要由主细胞和基细胞组成。腺泡腔内可见分泌物凝固而形成的圆形嗜酸性板层状小体,称前列腺凝固体,有时可发生钙化,称前列腺结石,结石常随年龄而增多。

导管上皮为假复层柱状纤毛上皮。在前列腺精阜处,可看到涎黏蛋白分泌细胞、嗜铬细胞和星形小颗粒细胞。

腺实质的基质由结缔组织、平滑肌纤维和弹性纤维组成,各种成分比例随年龄而异。

2. 前列腺功能

前列腺具有外分泌和内分泌功能。成人前列腺持续分泌一种稀薄液体,呈酸性(pH6.5),在射出精液中占 30%。其分泌液中含有高浓度 Zn^{2+} (7.3mg/ml)、柠檬酸盐(7.2~21mg/ml)、酸性磷酸酶、精胺、亚精胺和蛋白质。前列腺分泌的蛋白质含有纤溶酶原及其激活子,可能参与精液液化、精子穿透宫颈黏液。

前列腺还能分泌内啡肽、松弛素、抑制素及内分泌激素。前列腺的结构和功能受雄激素、雌激素的调控。

(二) 精囊腺

1. 精囊腺结构

精囊腺是一对蟠曲的囊状器官。精囊腺由黏膜、肌层和外膜组成。黏膜上皮为假复层柱状上皮或单层柱状上皮,随年龄和激素状态变化,主要由主细胞和基细胞组成,有人也发现有第 3 种扁平细胞存在。黏膜向腔内突起形成高大皱襞,皱襞又彼此融合,将囊腔分隔成不同部分,呈蜂窝状,大大增加了黏膜表面积。肌层为内环外纵两层较薄平滑肌。外膜为薄层结缔组织。

2. 精囊腺功能

精囊腺分泌物占射出精液 60%~70% 左右,射精最后部分为精囊腺分泌物。精囊腺分泌物含有果糖、山梨醇、前列腺素、凝固因子以及去能因子。果糖为精子运动

提供能量,凝固因子参与精液凝固,去能因子有利于稳定获能前精子。

(三) 尿道球腺

尿道球腺是一对复管泡状腺,上皮为单层立方或单层柱状,上皮内富含黏原颗粒。腺体分泌的黏液于射精前排出,以润滑尿道。腺体间质中有平滑肌和少量骨骼肌纤维。

第二节 精子发生、成熟及其调节

青春期,在脑垂体释放的 FSH 和 LH 作用下,睾丸开始产生精子。但离开睾丸的精子并不具备运动能力和生理条件下的受精能力。精子只有在附睾缓慢移行过程中,才逐渐获得了运动能力及受精能力,达到功能上的最终成熟。

一、精子发生及其调节

近年来,分子生物学技术和细胞生物学技术的迅猛发展和广泛应用,极大地推动了精子发生及其机制的研究,取得了诸多突破。

(一) 精子发生的动力学

精子发生是由精原细胞增殖分化形成精子的过程。它主要包括以下三个阶段:①精原细胞增殖阶段:精原细胞经过数次有丝分裂,分化成为精母细胞;②精母细胞成熟分裂阶段:精母细胞经减数分裂形成单倍体精子细胞;③精子细胞变态阶段:精子细胞不再进行细胞分裂,而变态为蝌蚪形的精子。

在生精小管中进行的精子发生,是高度组织化的过程。一般而言,精原细胞位于生精小管基底小室,紧贴基膜,依次向上为精母细胞、精子细胞和精子。所以,精子发生还包括生精细胞经历由生精小管基底面逐渐移向管腔并最后释放精子于管腔的过程,即生精细胞转位。

形态学观察发现,精子发生是一个沿着生精小管的长轴呈现为一定的生精细胞组合的波浪式过程。将处于不同发育阶段的特定生精细胞组合,称为细胞群(cell association);生精小管的同一横切面,由各种不同的生精细胞群组成,称为期(stage);而生精小管的特定部位,先后两次经历同一特定细胞群所需的时程,称为一周期(cycle)(图 1-15)。

同种动物精子发生周期经历的时程为一恒定的常数。在人类,整个精子发生需要 4 个周期,每个周期可分为 6 期,每周期历时 16d,故人的精子发生过程约有 64d。不同种动物之间精子发生周期各不相同(表 1-1)。

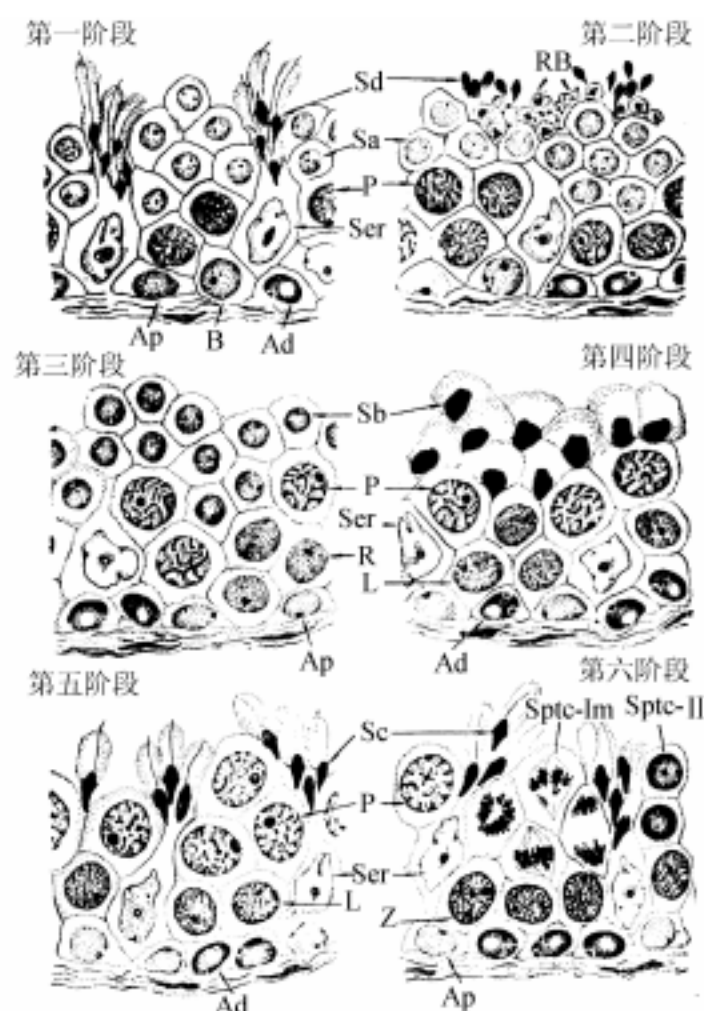


图 1-15 生精周期

Ser. 支持细胞; 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;
R. 间期初级精母细胞; 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; Spte-Im. 分裂期初级精母细胞; Spte-II. 间期次级精母细胞;
Sa, Sb, Sc, Sd. 不同分化时期的精子细胞 RB. 残余小体

表 1-1 几种动物及人的精子发生周期时程

动物	周期时程/d	整个精子发生时程/d
小鼠	8.6	34.5
大鼠	12	48
兔	10.9	47~ 51.8
牛	13.5	54
人	16	70(±)

精子发生始于精原干细胞,按照其生物学特征可将之分为:储备型精原细胞、更新型精原细胞和定向型精原细胞三类。

储备型精原细胞通常处于静止状态,只有在病理因素作用下,更新型精原细胞损耗殆尽,才增殖形成更新型精原细胞和新的储备型精原细胞。机体恢复正常后,储备型精原细胞回复静止状态。更新型精原细胞以不对称分裂方式,一方面自我更新,形成新的更新型精原细胞;另一方面形成更为成熟的定向型精原细胞,而定向型精原细胞继续增殖、分化,直至变态为精子。

关于精原干细胞的增殖,更新方式一直有不同的看法,主要有 Clermont 模式和 Huckins 模式。Clermont 模式认为: Ao 型精原细胞为储备型精原细胞;而 Ad 型精原细胞为更新型精原细胞。一个 Ad 型精原细胞通过第一次有丝分裂产生两个新的 Ad 型精原细胞,其中一个 Ad 为新的更新型精原细胞,另一个 Ad 分裂分化形成两个 Ap 型精原细胞, Ap 型分化为定向型的 B 型精原细胞(图 1-16)。

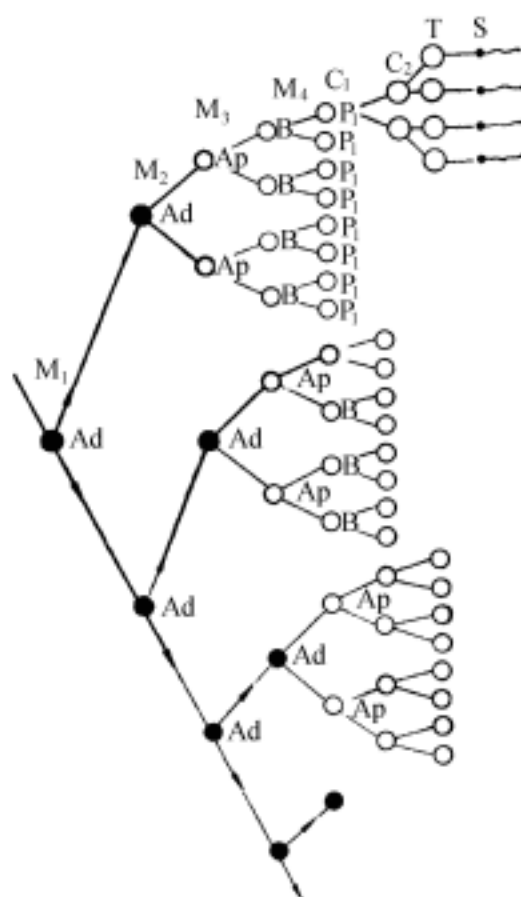


图 1-16 精原细胞增殖分化的 Clermont 模式

Huckins 模式认为: As 精原细胞为储备型精原细胞。更新型精原细胞进行不对称分裂,生成更新型精原细胞和分化型精原细胞,分化型精原细胞经历同步分裂,形成一链状细胞群,继而进一步发育为精母细胞(图 1-17)。

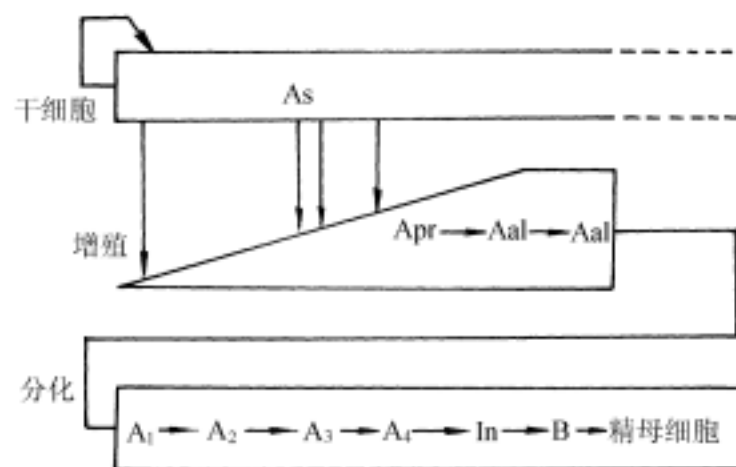


图 1-17 精原细胞增殖分化的 Huckins 模式

近年的研究表明,每种精原细胞都可能三种去向:作为干细胞保留;作为分化、定向型细胞存在;作为死亡细胞自行消失,死亡方式主要为细胞凋亡。那么,精原细胞究竟向哪个方向发展,通过何种机制,受什么调节,精原干细胞何以能以不

对称方式分裂等,都有待于深入的研究和阐明。

(二) 精子发生的调节

精子发生有赖于生精小管完备的微环境和严密完整的全身和睾丸局部调节网络。但就其本质而言,精子发生是在生精调节网络调控下,特异基因在特定的时空秩序上,精密有序地表达和相互作用的结果。已有大量研究表明,精子发生的任何一个发育阶段都伴随着一些特异基因的表达。

1. 精子发生的激素调节

正常的精子发生是在脑垂体释放的 FSH 和间质细胞产生的雄激素调控下进行的。而间质细胞合成分泌雄激素又接受脑垂体释放的 LH 的调节。FSH、LH 和雄激素三者之间作用的相互协调对精子发生十分重要。

FSH、LH 和雄激素是哺乳动物和人精子发生最主要的调节因素,其依据主要有:①性成熟后切除垂体的动物,以及成年男子继发性性腺功能低下患者,精子发生都不能维持,出现无精症和性腺萎缩;补充 FSH 和 LH 后,则可诱发精子发生。②正常成年男子注射庚酸睾酮诱导无精症模型,再补充 hCG、hMG、h-LH 或 h-FSH,若上述药物单独使用能在一定程度上恢复无精症模型精子发生,但不能恢复至治疗前水平;若合并应用 hCG+h-FSH,可完全恢复其精子发生。

现有的资料表明:生精细胞并没有雄激素及 FSH 的受体,而支持细胞含有 FSH 受体和雄激素受体,肌样细胞也有雄激素受体。这说明 FSH、雄激素调控精子发生,主要是通过支持细胞、肌样细胞起作用,而不是直接作用于生精细胞。FSH 与支持细胞膜上的 FSH 受体结合,刺激其产生第二信使 cAMP,从而触发细胞内一系列生理反应,生成雄激素结合蛋白、运铁蛋白等精子发生必需的物质;雄激素结合蛋白与雄激素结合形成复合物,维持睾丸及生精小管内雄激素的高水平,造成有利于精子发生的微环境。

近期研究证实,雄激素是精子发生的最基本因素,但 FSH 对精子发生是否有启动和维持作用,尚存在着争论。有人认为,FSH 对精子发生的启动和维持并不具有基本作用,其主要依据有:① GnRH 抗血清注入大鼠体内,造成大鼠 FSH、LH 全部消失,此时,若给大鼠补充外源性睾酮,发现睾丸能恢复并维持大鼠的精子发生;若予以足够量的睾酮,大鼠产生的精子的质和量,与 FSH、LH 和雄激素联合给予的大鼠产生的精子的质和量基本相同;② FSH 受体基因突变致 FSH 受体功能丧失的纯合子男性病人,虽有不同程度的生精障碍,但睾丸仍能产生正常数量精子并具有生育力。也有人认为,FSH 对精子发生十分重要。以 EDS 破坏垂体切除的大鼠睾丸间质细胞,补充 FSH 能使精子发生至精子变态阶段;在此基础上,再补充少量雄激素,则可使精子发生恢复至正常;这表明,FSH 至少对精子发生的启动有重要作用,而 FSH 和雄激素的协同作用对精子发生就更为重要了。睾丸内雄激素浓度是外周血雄激素浓度的数 10 倍,维持如此高浓度的睾丸内雄激素有何作用? 目前所知甚少;有实验显示,生精细胞可能存在一些膜受体,雄激素可能直接作用于该受体,而不是通常意义上作用于核内受体;也可能是雄激素代谢生成一些

其他甾体小分子,这些甾体小分子再作用于生精细胞膜甾体激素受体,或者是作用于生精细胞核内未知配体的孤儿受体,从而发挥其调控精子发生的功能。

此外,雌激素对精子发生也有调节作用。适量的雌激素对精子发生有刺激作用。如雌二醇能诱导精原细胞增殖分化。而雌激素受体基因敲除(knockout)小鼠精子生成量显著减少,精子发生障碍;但过量的雌激素可能抑制精子发生,如人类生活环境中雌激素摄入量升高是目前造成人精子数目普遍下降的原因之一。

2. 精子发生的睾丸局部调节

哺乳动物的精子发生是在睾丸的生精小管中进行的,生精小管构成了精子发生的微环境。临床发现绝大多数男性不育并非源于男性性腺轴失常,他们有正常的FSH和睾酮水平,故可能为睾丸局部因素所致。尽管睾酮和FSH是精子发生调节的主要因素,但是FSH和睾酮也必须通过睾丸内一系列复杂的调节机制,维持睾丸内最适宜的精子发生微环境,以实现调节精子发生。一方面生精上皮的支持细胞及其胞外基质、细胞黏附分子与生精细胞密切接触,直接调节正常的精子发生;另一方面,在全身和局部因素作用下,睾丸内的细胞通过产生多种因子,在睾丸局部精细地调节精子发生。

(1) 细胞外基质(ECM)及细胞黏附分子(CAMs)与精子发生:细胞外基质由胶原蛋白、蛋白多糖、弹性蛋白和ECM糖蛋白组成。这些组分不仅是细胞支持物,也具有生物活性,介导细胞黏附、增殖分化和运动。CAMs主要有整合素(lectin)、选择素、依赖 Ca^{2+} 粘连素(cadherin)和不依赖 Ca^{2+} 样CAMs(Ig-CAMs)四大家族。其中,整合素、粘连素都由胞外区、跨膜区和胞浆区三部分组成。前者胞浆区通过踝蛋白、辅肌蛋白与肌动蛋白丝连接;后者胞浆区由连环蛋白(catenin)与肌动蛋白丝相连接;胞外区都可与ECM的层黏蛋白、纤黏蛋白和胶原蛋白结合。这样,整合素、连环蛋白的粘连素能协调细胞骨架与ECM的相互作用,介导ECM对细胞的影响,而细胞也可改变整合素、粘连素与ECM或肌动蛋白双向黏着而调节细胞与ECM的粘连。

大量实验证明:生精小管基膜、支持细胞间、支持细胞与生精细胞间有丰富组分的ECM。支持细胞、精母细胞和圆形精原细胞有N-粘连素;支持细胞可表达整合素,精原细胞基底面、变态精子细胞头部也有短暂的整合素表达。半乳糖受体(选择素同源物)、CalTase先表达于支持细胞、精母细胞和精子细胞表面,精子变态时,重新分布至精子顶体区。CalTase和半乳糖受体与精卵识别有关。这提示:整合素、粘连素可能介导生精细胞与胞外基质及支持细胞的黏附,影响生精细胞增殖、分化和迁移。其实,生精细胞转位的本质就是精原细胞与基膜ECM以及其子代细胞与支持细胞之间黏附关系不断调整的过程。显而易见,ECM与CAMs是生精细胞转位的物质基础(图1-18)。

(2) 睾丸内细胞分泌因子与精子发生:近年来,研究者的注意力更集中到精子发生的睾丸内局部调节过程。目前,已知在睾丸内有50种以上的生物活性物质,多数为睾丸内细胞分泌。睾丸内细胞和分泌因子之间旁分泌、自分泌作用,构成了一个十分复杂的精子发生调节网络。

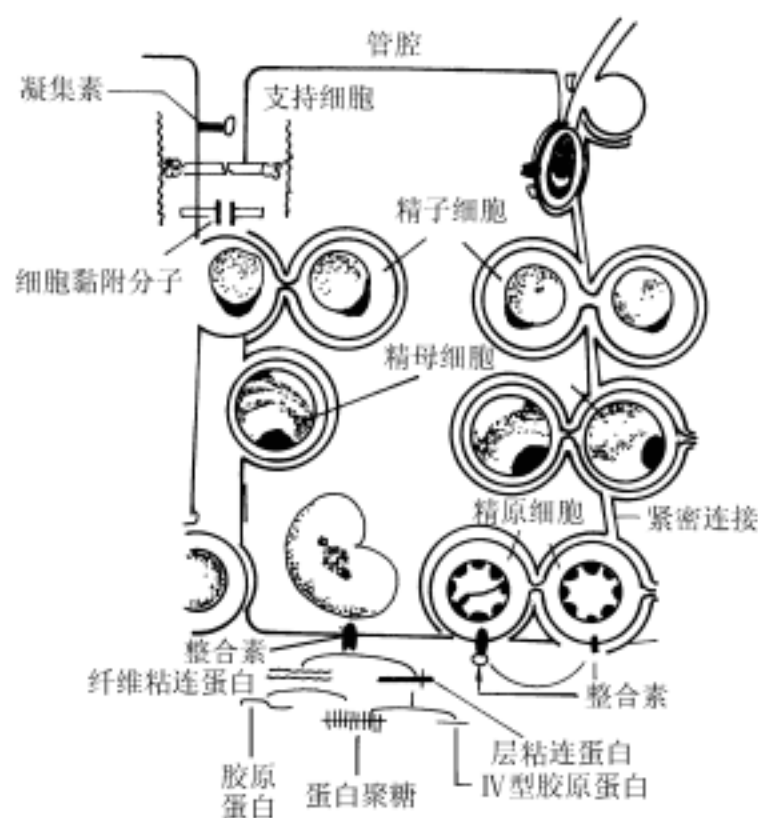


图 1-18 生精细胞转位与细胞黏附因子关系示意图

1) 生长因子类:支持细胞、间质细胞能表达抑制素和激活素,抑制素是异二聚体,有 α 、 β 两个亚单位;激活素是P亚单位的同源二聚体。抑制素、激活素都属于TGF β 家族。它们除了能反馈调节脑垂体释放FSH之外,对精子发生具有旁分泌、自分泌调节作用。已有实验证实,支持细胞分泌抑制素、激活素呈现生精周期特异性。激活素能刺激精原细胞增殖,在粗线期精母细胞、圆形精子细胞有其受体,提示激活素参与它们的发育过程。而生精上皮中粗线期精母细胞缺失,会造成支持细胞抑制素分泌量增加;抑制素分泌量减少会导致变态的精子细胞减少。近期实验发现,发育中的生精细胞也表达抑制素,抑制素对精子发生可能有自分泌调节。

卵巢颗粒细胞能分泌IGF-1,其与卵泡发育、成熟关系密切。睾丸的支持细胞,间质细胞以及初级精母细胞均能合成分泌IGF-1。IGF-1不仅可以通过其受体调节支持细胞和间质细胞的功能,从而影响精子发生,而且对生精细胞分化有直接作用。体内实验证实,睾丸IGF-1浓度与粗线期精母细胞及精子细胞数量显著正相关;同时,支持细胞、肌样细胞能分泌IGF-1结合蛋白,它可适时调节IGF-1的水平。

TGF α 、TGF β 主要由肌样细胞和支持细胞分泌。在其他组织系统中,TGF α 、TGF β 对细胞增殖和分化一般有相反的效应,但TGF α 、TGF β 对肌样细胞都有相似的刺激作用,诱导肌样细胞分泌PMODS,PMODS对支持细胞分泌功能具强烈刺激作用,而TGF α 对支持细胞也有直接的激活效应,这样,TGF α 、TGF β 通过支持细胞,间接调节了精子发生。不仅如此,有资料显示,TGF β 能直接参与精母细胞成熟分裂和精子变态过程。

β -NGF是神经元发育分化的营养因子。初级精母细胞至精子细胞的各级生精

细胞都能表达 NGF, 而支持细胞有 NGF 受体, 这提示 NGF 可能对在精子发生中生精细胞与支持细胞的相互作用发挥影响。体外实验还证实, NGF 能刺激细线前期精母细胞 DNA 的合成, 可能为一减数分裂调节因子。

此外, 增殖型精原细胞、精母细胞和长型精子细胞分泌的 bFGF, 能诱导支持细胞分泌纤溶酶原激活物, 参与生精细胞转位。巨噬细胞、间质细胞分泌 IL-2 过度, 会导致生精障碍和睾丸变性。

2) 其他因子: 间质细胞能合成分泌 POMC, POMC 也可裂解为 ACTH、 α -MSH 和 β -内啡肽。这些因子作用于支持细胞膜上的阿片肽受体, 调节支持细胞功能。 β -内啡肽抑制支持细胞分泌, α -MSH 和 ACTH 可一般地激活支持细胞分泌功能, 但 α -MSH 可抑制支持细胞产生纤溶酶原激活物, 这些都会间接地影响精子发生。有意义的是, 同一细胞分泌的调节肽对同一细胞的效应, 会有不同。支持细胞、粗线期精母细胞和圆形精子细胞表达的脑啡肽, 对生精细胞的分裂、分化也有直接调节作用。

简言之, 精子发生的睾丸局部调控是多因子联合调节的结果。至今有关资料主要来自于体外的分析性研究, 并且大多数实验主要研究单一因子, 而单一因子的作用不能全面而真实地反映其在体内的生理作用。在不同的条件下, 同一种因子可能有刺激效应, 也可能有抑制效应, 因子的量对其功能表现也有重要影响。即因子和功能之间的关系并非一一对应, 而可能为“一因子多能”或“一能多因子”。所以, 每种因子在睾丸局部调节网络中的作用及其对精子发生的功能, 还有待于进一步的研究、证实。

(三) 精子发生的基因调节

1. Y 染色体与精子发生

细胞遗传学研究发现, 原发性少精症或无精症患者常有 Y 染色体长臂缺失, 提示在 Y 染色体长臂上存在一些精子发生必需基因, 称为 AZF (azoospermia factor)。进一步研究表明, Yq11 区至少有 AZFa、AZFb、AZFc3 个基因, 这些基因及其表达产物参与了正常精子发生。

目前已初步证实, AZFb 的候选基因是 RBM, AZFc 的候选基因有 DAZ 和 SPGY。DAZ 与 RBM 在结构上有一序列重复区域, 具体功能不清楚。此外, AZFb 还有一个与果蝇生育基因同源序列。RBM、DAZ/SPGY 编码蛋白都含有 BNA 识别结构域 (BNA-recognition motif), 能特异性结合于 MA, 说明 DAZ/SPGY 和 RBM 及其产物可能对生精细胞的 mRNA 加工、成熟有重要作用。

有资料显示: 常染色体上有 DAZ 和 RBM 的同源基因。RBM 同源基因为 hnRNPG 基因家族。hnRNPG 表达产物 hnRNP 蛋白是细胞内 mRNA 的剪接子, 与 mRNA 加工、成熟有关。DAZ 同源基因为位于第 13 号染色体上的 DAZLA。在已研究的哺乳动物 Y 染色体上, 都存在 RBM 基因, 而无 DAZ/SPGY 基因, 表明 RBM 为高度保守基因。尽管其他动物无 Y-DAZ/SPGY, 但常染色体上有 DAZLA 的同源基因。

RBM 高度特异性地表达于转录活跃期生精细胞,编码蛋白为核内蛋白。若 RBM 不能正常表达,则精子发生停滞于减数分裂早期,而不能进入精子细胞期。DAZ、DAZLA 也特异性表达于生精细胞,定位于胞浆区。这表明 RBM 编码蛋白和 DAZLA/DAZ 蛋白在功能上仍有不同,前者主要为核内 mRNA 的加工,后者可能参与 mRNA 在胞浆中的剪接、储存。DAZLA 基因敲除纯合子小鼠无精子产生,杂合子精子数量明显减少,异常精子数目显著升高。

在小鼠 Y 染色体长臂上也发现 SPY、smy 两个基因与精子发生有密切关系。spy 位于 sxrb 区,候补基因为编码蛋白水解酶的 sby,其为精原细胞增殖必需基因;smy 主要是参与精子头部形成的基因。

2. 原癌基因与精子发生

原癌基因在细胞生长、分裂分化以及凋亡过程中发挥着重要作用。在动物个体发育中,它不但参与体细胞组成的组织器官形成,而且对生殖细胞的形成、发育也有重要作用。在生精细胞的不同发育阶段常有一些原癌基因表达,这些原癌基因主要有四类:①蛋白激酶类(如 c-kit、c-abl、c-mos、c-raf 和 pin-1);②GTP 结合蛋白类(H-ras、K-ras 和 N-ras);③核转录因子(c-fos、c-jun);④Wnt-1。生精细胞的原癌基因表达产物与其他组织细胞一样,对生精细胞的增殖、分化和变态有重要调控作用。

(1) c-kit:c-kit 编码跨膜的酪氨酸激酶受体蛋白,它的配体为 SL 位点基因编码的生长因子 SLF。c-kit 受体和 SLF 在造血过程中发挥重要作用。进一步研究证实,c-kit 受体及其配体 SLF 在精子发生中也有重要功能。c-kit 受体表达于 PGCs 和 A 型精原细胞,进入减数分裂期该基因关闭,而 SLF 表达于支持细胞,胚胎时期主要为膜结合型,性成熟期有膜结合型和可溶性两种形式。c-kit 和/或 SLF 异常,PGCs 增殖、迁移不能进行;精原细胞增殖阻滞并大量凋亡,表明 c-kit 与 SLF 为 PGCs、精原细胞的生存因子。最近研究发现,减数分裂后单倍体精子细胞也能选择性表达一段 c-kit,生成 23kDa 的蛋白质。但该蛋白缺少 c-kit 受体胞外区、跨膜区和蛋白激酶的大部分结构域,可能在精子变态中有作用。

(2) c-abl:初级精母细胞内有 c-abl 8.0kb 和 6.2kb 的转录体,早期精子细胞有 4.7kb 的 c-abl 转录体。4.7kb mRNA 特异性表达于减数分裂后的精子细胞,产生一种 150kDa 的胞浆型丝氨酸蛋白激酶。此时,精子细胞内有一 74kDa 的蛋白质为其作用底物。

(3) c-mos:编码蛋白具有丝氨酸激酶活性;早期精子细胞有丰富的、睾丸特异的 1.7kb 转录产物,但其表达产物 43kDa 蛋白质却以精母细胞最多,精子细胞少见,表现为转录,表达高度依赖于生精细胞的发育阶段。

(4) c-raf:c-raf mRNA 多见于粗线期精母细胞,表达产物为 74kDa 蛋白,可能是 c-abl 蛋白的作用底物。

(5) c-ras:c-ras 基因家族包括 H-ras、K-ras 和 N-ras 3 个成员,编码蛋白为 GTP 结合蛋白。精子发生中,H-ras 表达于精母细胞和精子细胞;K-ras 表达于粗线期精母细胞;N-ras 表达于精子细胞。

(6) *c-fos* (2.2kb)、*c-jun* (2.7kb): 为核内转录因子, 减数分裂期及减数分裂后的精子细胞均有表达。*Wnt-1* 编码蛋白为分泌型因子, 表达于圆形精子细胞, 可结合于胞外基质及细胞表面, 可能是细胞黏附分子或生长因子。

尽管上述原癌基因的大多数在精子发生中的明确功能不清楚, 但就这些原癌基因在生精细胞中, 以不同于体细胞的转录产物, 以及阶段特异性的表达方式而言, 这些原癌基因对生精细胞增殖分化, 尤其是减数分裂及精子变态一定有重要的调节作用, 这还有待于进一步的研究。

3. 与精子发生有关的其他基因

任何因素调控精子发生, 都有生精细胞自身基因基础。精子发生伴随一系列特异基因的阶段性转录、表达。如精原细胞增殖期表达的 *c-kit*, 减数分裂初期的 *BAX*、*HSP70-2*、*dl-3*、*MLH-1* 和 *Pdha-2*, 减数分裂中期的 *pdk-2*、*jsd*、*PMS2*、*ATM* 和 *sperm-1*, 减数分裂后及精子变态时的 *CREM*、*HR6B*、过渡蛋白 (TP)、鱼精蛋白、管蛋白、肌动蛋白、*cydinB*、*int-1* 和 *Pim-1*。反义核苷酸、基因敲除法以及转基因研究方法的应用, 已初步证实了上述基因在精子发生的各个阶段基本作用 (表 1-2)。

表 1-2 精子发生相关基因

基因	突变	表型	精子	主要发现者
<i>c-kit</i>	+ / +	精原细胞凋亡	缺失	Flangan 等, 1990 年
<i>SCF</i>	+ / +	精原细胞凋亡	缺失	Zsedo 等, 1990 年
?	<i>god</i>	支持细胞综合征	缺失	Duncan 等, 1995 年
?	<i>ter</i>	支持细胞综合征	缺失	Noguchi 等, 1995 年
?	<i>jsd</i>	生精障碍	减少	Beatner 等, 1988 年
<i>BAX</i>	+ / +	粗线期生精障碍	减少	Knudson 等, 1995 年
<i>BMP88</i>	+ / +	生精障碍	减少	Zhao 等, 1996 年
<i>HSP70-2</i>	+ / +	减数分裂期生精障碍	减少	Dix 等, 1996 年
<i>CREM</i>	+ / +	粗线期生精障碍	缺失	Nantel 等, 1996 年
<i>MLH-1</i>	+ / +	粗线期生精障碍	缺失	Edelmann 等, 1996 年
<i>ZTM</i>	+ / +	粗线期生精障碍	缺失	Xu 等, 1996 年
<i>RARα</i>	+ / +	生精障碍	减少	Lufkin 等, 1993 年
<i>RARβ</i>	+ / +	生精障碍	减少	Kastner 等, 1996 年
<i>PMS2</i>	+ / +	生精障碍	减少	Baker 等, 1995 年
<i>HR6B</i>	+ / +	生精障碍	减少	Roest 等, 1996 年
<i>dhh</i>	+ / +	生精障碍	减少	Bitgood 等, 1996 年

精子变态时, 圆形精子细胞逐渐分化为蝌蚪形精子, 精子细胞结构重组, 精子核高度浓缩。核浓缩需要有精子细胞表达产物过渡蛋白取代体细胞型的组蛋白, 随后, 过渡蛋白再为鱼精蛋白所取代。鱼精蛋白能中和 DNA 链上的负电荷, 使核高度浓缩、核基因关闭。过渡蛋白、鱼精蛋白基因转录于精子细胞早期, 可能由 *CREM*

(cAMP-response-element-modulation)激活,表达于精子变态时。若过渡蛋白、鱼精蛋白基因转录,表达有异常,核浓缩将不能正常进行。核浓缩还涉及核基质、核骨架的重建。与细胞有丝分裂、减数分裂有关的细胞周期蛋白 B(cyclin B),特异性表达于减数分裂后的精子细胞,而核骨架与核基质许多组分有细胞周期蛋白 B 的作用底物,表明细胞周期蛋白 B 可能参与精子变态时的核骨架变化,调节核浓缩和核包装。

因为精子发生每一发育阶段都有大量基因转录,所以生精细胞内不但有一些特异性转录因子存在,如 *speM-1*、CREM,而且基础转录因子水平也明显高于体细胞。如 TBP mRNA 是体细胞的 40 倍,TBP 蛋白为体细胞约 2.5 倍;TF II b、RNA 聚合酶 II 也显著高于体细胞。

精子变态中期,由于核浓缩后基因关闭,生精细胞转录中止,但在精子变态过程中,仍需要大量蛋白质参与。这些蛋白质只能取自于精子变态前就已适量表达的储存蛋白质,或者取自于精子变态前转录,mRNA 储存至变态时瞬时表达的蛋白质,如鱼精蛋白和过渡蛋白。有实验报道,过渡蛋白、鱼精蛋白瞬时表达的时机对核蛋白转型至为关键。这样,这些蛋白质基因转录后的储存和翻译启动的调节就显得非常重要。RNA 结合蛋白在此过程中起重要作用,如 Y 染色体上的 RBM 编码蛋白、DAZ/SGPY 编码蛋白。

(四) 细胞凋亡与精子发生

早期形态学研究发现,具正常生育力的哺乳动物在精子发生的各个阶段均有大量生精细胞变性,其中以有丝分裂的精原细胞变性为最多,而不同种类动物生精细胞变性比率相对稳定。最近研究证实,睾丸内变性的生精细胞本质上是凋亡。

目前认为,精子数量一方面取决于生精细胞的增殖分化;另一方面可能取决于生精细胞的凋亡。若凋亡过度,则引起少精症甚至无精症;若凋亡不足,则导致多精症。细胞凋亡是一种主动不可逆的细胞生理性自杀行为,是多细胞生物体维持内环境相对稳定的重要机制,完全不同于坏死。细胞凋亡的特征主要有核固缩、胞浆膜发泡、细胞器皱缩、凋亡小体形成以及梯状 DNA 电泳图谱。大量研究表明,细胞内部的基因直接控制着凋亡的发生和发展,如 ICE 家族、*bcl-2* 家族和 TNF-R 家族,这些基因在进化上高度保守;细胞外因素通过信号传导而影响调控基因表达,从而间接调节细胞凋亡。

有关生精细胞凋亡研究,最近才为人们所重视。睾丸支持细胞可表达 FasL,若生精细胞表达 Fas,Fas 迁移至生精细胞膜,FasL 和 Fas 结合,则可导致生精细胞凋亡。增殖中的精原细胞表达的 *c-kit*,未能与支持细胞产生的 SLF 结合,或精原细胞 *c-kit* 不表达,也会造成精原细胞增殖阻滞并凋亡。生理条件下,生精细胞的凋亡使生成的精子比理论上减少 75% 以上。

实验证明,切除脑垂体或予以 GnRH 拮抗剂的小鼠,生精细胞大量凋亡,并以初级精母细胞为最多;X 射线、高温可加剧生精细胞凋亡;化学毒物氯化镉、ME-2 和氯化铅能诱导大量生精细胞凋亡,并且主要是通过破坏支持细胞骨架系统所致。

转基因动物模型和基因敲除动物模型研究,证实一些生精细胞特异基因与生精细胞凋亡有密切关系。 $Bax^{-/-}$ 小鼠减数分裂前的生精细胞大量凋亡,致精子发生完全阻滞;CREM 基因敲除小鼠,凋亡的生精细胞数量增加 10 倍,而对体细胞无任何影响,这也表明 CREM 是生精细胞的特异基因;HSP70²、BMP^{8b} 基因敲除小鼠也有生精细胞凋亡引发的精子发生障碍。

虽然已有日益增多的实验研究生精细胞凋亡,但对生精细胞凋亡过程及机制我们仍然所知甚少。生精细胞为何在精子发生中有 3/4 以上会凋亡?在凋亡过程中,这些生精细胞的基因表达状态发生了什么变化?有哪些特异基因启动,又有哪些特异性基因关闭?支持细胞在其中扮演怎样的角色?等等,都有待于从分子水平上加以阐明。

综上所述,随着精子发生及其调节机制研究向分子水平深入,将会为最终阐明精子发生机制开辟新的途径,并对男性计划生育提供新方向和新思路。

二、精子成熟及其调节

(一) 精子成熟变化

睾丸精子在进入附睾后的运行过程中,通过与附睾微环境复杂的相互作用,逐步获得了运动能力和生理条件下的受精能力,达到了功能上的成熟,并且精子膜、精子结构等也发生了相应的变化。

1. 精子运动能力的发育

附睾精子运动能力的发育是一渐进的过程。上海第二医科大学生殖生物学重点实验室应用计算机辅助精液分析系统(CASA)研究了人、家兔、大鼠和小鼠附睾精子运动能力的发育过程。结果表明,不同种属动物的精子在附睾移行过程中,都由进入附睾时的精子不运动或缓慢、不定向运动,发育至附睾尾部的快速前向运动。尽管精子运动的具体发育过程存在种属差异,但是精子获得并逐渐发展了运动能力的总趋势是一致的。

精子前向运动的获得与附睾分泌的酸性糖蛋白——前向运动蛋白质有密切的关系。我们从具正常生育能力的男子精浆中分离纯化了前向运动蛋白质 FMP-SE1,将其与茶碱和人附睾头部未成熟精子共孵育,结果 FMP 能使附睾头部精子产生前向运动。

附睾精子运动发育涉及因素是多方面的,总结相关研究,概括起来至少包括以下三方面:①精子膜成分的修饰、更新,包括离子通道、膜流动性的改变;功能蛋白质的附着。②精子内信号系统的整合,如精子内 cAMP 水平、pH 和 Ca^{2+} 浓度的升高。③精子能量系统的发育以及代谢途径的变化,包括精子线粒体功能的进一步完善,肉毒碱和 ATP 的积聚等。

近期有报道显示,公牛附睾头部精子 I 型蛋白磷酸酶(PPI)和糖原合成酶激酶 3(GSK3)的活性分别高于附睾尾部运动精子 2 倍和 6 倍,而上述两种酶的抑制剂

能在精子内 cAMP、Ca²⁺ 和 pH 不发生变化情况下,诱导附睾头部精子产生类似于附睾尾部精子的运动。这充分表明,附睾精子运动能力的获得与附睾精子某些蛋白质的可逆性磷酸化也相关。

然而,获得了运动能力的精子仍以静息状态储存于附睾尾部直至射精。这与附睾尾部高浓度肉毒碱、制动素、精子运动抑制因子和特定的离子成分有关。

2. 精子受精能力的发展

早期研究证实,小鼠、羊附睾头部精子不能结合于同种卵细胞透明带,而附睾尾部精子却能较好地结合于透明带。但近期研究显示,获能或洗涤后的小鼠附睾头部精子不但能结合于透明带,而且能产生顶体反应;以附睾头部精子制备的上清液能阻止附睾尾部精子结合于卵透明带。这说明附睾头部精子具有潜在的透明带结合能力,只是这些结合位点或者被遮盖,或者未能集中分布,没有和精子内效应器形成功能统一体;而在附睾成熟过程中,精子的这些结合位点能集中成簇,表面遮盖物被去除。如与精卵识别、结合有关的精子膜蛋白 pH-20、pH-30 和半乳糖酰基转移酶(GT),在附睾头部精子膜上呈散在分布,在附睾尾部精子则已集中成簇于顶体后区;而被认为在顶体反应后,与精子透明带再次结合有关的顶体素、顶体素原也在精子附睾移行过程中,进行了再加工和降解修饰。

3. 精子膜成熟变化

正常情况下,精子膜是精子功能得以实现的物质基础。在附睾移行过程中,精子最主要的成熟变化是精子膜修饰,包括膜通透性及膜荷电性改变、膜蛋白、膜脂和膜糖基的更新、调整。

(1) 膜通透性改变:附睾精子成熟时,精子膜具有排钠吸钾功能,造成精子内 K⁺ 高 Na⁺ 低,引起精子内离子成分改变。同时,精子膜通透性变化也可影响精子酶活力代谢,这些对精子运动的启动和维持有较大的意义。

(2) 精子膜荷电性变化:附睾头、体、尾精子表面负电荷逐渐降低。精子膜表面均带有负电荷,可阻止精子间的相互凝集;而精子膜表面负电荷减少可能是精子膜表面唾液酸丢失的结果。

(3) 精子膜凝集素受体变化:精子膜表面凝集素受体即糖基变化可用其特异性分子探针凝集素检测。如麦芽凝集素(WGA)可特异性结合 N-乙酰葡萄糖胺;蓖麻凝集素(RCA)能与 P-半乳糖专一性结合;大豆凝集素(SBA)可与 N-乙酰半乳糖胺特异性结合;花生凝集素(PNA)也与 P-半乳糖-乙酰半乳糖胺结合。研究结果表明,尽管不同种动物精子膜糖基种类、分布和变化均有差异,但是同一种动物精子膜糖基在附睾成熟过程中都发生了规律性变化。如羊精子成熟过程中,WGA 受体逐渐增多,并主要分布于精子顶体区;RCA 和 PNA 受体逐渐减少;SBA 受体则渐为消失;家兔精子膜 WGA 受体数量在附睾头部高于附睾尾部,并且附睾头部精子膜 WGA 受体主要分布于顶体及顶体后区,附睾尾部精子膜 WGA 受体分布稀疏。

精子膜表面凝集素受体的变化可能有以下 4 种机制:①由于糖基转移酶作用,使凝集素受体转移,原有受体消失,而产生新受体;②糖苷酶、蛋白酶水解精子膜糖

蛋白;③附睾上皮细胞分泌物覆盖凝集素受体,从而使凝集素不能识别之,或者精子膜流动性变化使精子膜糖蛋白重新分布;④精子膜凝集素受体立体构型发生变化,糖基被暴露或被遮盖。

(4) 精子膜脂变化:精子成熟过程中,精子膜脂质变化很大。如山羊精子膜总脂、磷脂和糖脂含量显著减少,而中性脂尤其是胆固醇含量增加,导致胆固醇与磷脂、饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比率均升高。这使精子膜总体流动性降低,稳定性升高。

(5) 精子膜蛋白变化:比较睾丸、附睾各段精子,其膜蛋白发生了深刻的变化。如高分子量蛋白逐渐消失,低分子量蛋白渐为增多;低糖基化转为高糖基化; $-SH$ 氧化为二硫键等。产生这些变化的主要原因在于:①附睾上皮细胞合成分泌的蛋白质附着、掺入精子膜,原有蛋白质丢失或修饰;②附睾液糖苷酶、蛋白酶作用于精子膜蛋白,使其降解;③糖基转移酶使膜蛋白再糖基化。

4. 精子结构变化

附睾头部精子线粒体常常大小不一,基质电子密度较低,至附睾尾部,精子线粒体大小渐趋一致,基质电子密度高,顶体内含物致密度在附睾移行过程中也逐渐升高。

精子在附睾头体尾移行过程中,残余的胞质小滴由精子鞭毛中段逐渐向末端转移,并有可能最后脱落;精子核DNA与核蛋白的结合更趋紧密,核 $-SH$ 也逐渐为二硫键所取代,使精子核结构、功能更为稳定。

应当指出,附睾精子成熟具异质性,只有部分精子能获得运动和受精能力。同时,与精子功能相适应的是精子不同区域成熟变化也具异质性,表现在精子局部膜流动性、膜蛋白构成的不同。而且,成熟精子在附睾尾部储存时间过长,也会失去运动和受精能力。如禁欲时间过长的正常男性,其精子运动率会显著下降。也有实验表明,附睾尾部近端精子受精能力显著高于附睾尾部远端及输精管精子。CASA分析,附睾尾部远端及输精管精子体外孵育2h后,VSL显著下降,孵育4h后,VAP也显著下降;而附睾尾部近端精子VSL、VAP均未发生明显改变。

(二) 精子成熟调节

附睾精子成熟是移行精子与附睾上皮细胞相互作用的结果,涉及多种因子,与附睾上皮细胞在特定的时空秩序下和不同因素作用下,一些特异性基因表达产物与精子间特异性作用有关;同时,附睾上皮细胞重吸收也为精子成熟创造了适宜的内环境。

1. 附睾分泌蛋白区域性转录表达调节

大量研究表明,附睾上皮细胞能向附睾腔内分泌多种特异性蛋白质,这些蛋白质基因转录与表达具有显著的区域性差异。基因的这种区域性表达反映了不同基因功能的差异。如在附睾近段表达的基因可能主要与精子早期成熟有关,而在附睾远段特异性表达的基因则有可能参与精子晚期成熟及精子储存时的功能维持。

目前已知在附睾上皮细胞特异性表达的基因很多,但对基因及其表达产物的

具体明确的功能了解并不多,多为一些推测性结果。如附睾头部上皮表达基因 CREP 在体内其他细胞中主要功能是转运视黄醇至核内,从而调节有关基因表达。这提示它在附睾头部上皮细胞中也可能有相似作用。而 POMC 及其衍生物、Pro-enk 都有可能在附睾中作为旁分泌因子或自分泌因子直接影响精子功能等。

那么,基因区域性表达是如何调节的?有证据表明,附睾各段上皮细胞基因的高度限制性表达可能为转录激活调节。在附睾头端上皮细胞存在一种特异性转录因子 PEA3,它能为 A-raf 基因表达产物激活,而 PEA3 又可特异性作用于 GPX、GGT 基因上游顺式反应元件,调控 GPX、GGT 基因在附睾头部上皮细胞限制性转录与表达;同时,转录也存在起始点选择的调节,从而影响转录本的稳定性和翻译效率。

一些附睾基因表达为雄激素所调控。如在动物去势后,B/C、D/E 和 GPX 基因转录产物 mRNA 迅速减少;补充睾酮后,上述基因 mRNA 能恢复至去势前水平,表明上述基因转录为雄激素调控。而 SGP-2 在附睾头部表达不为雄激素调节,但在附睾体、尾部表达受雄激素调控。

睾丸因子也能调控附睾上皮细胞基因表达。如附睾头部特异性表达基因 CRES、pro-enk,在动物双侧去势后,mRNA 水平迅速降低,但补充睾酮后仍然检测不到;单侧去势后,有睾丸侧附睾头部上皮细胞 mRNA 水平保持正常,而去势侧附睾头部上皮细胞检测不到上述基因的 mRNA。这表明,CRES、pro-enk 基因表达为来自于睾丸的因子调控,而不受雄激素影响。

也有一些基因如 EAP₁、5 α -还原酶表达是在雄激素和睾丸因子共同调节下进行。有实验显示,附睾头部上皮功能可能接受睾丸因子和雄激素的共同作用,早期形态学研究也证实如此。如去势后补充睾酮,并不能阻止附睾头部上皮退化。

2. 附睾重吸收及其调节

附睾结构与生理功能的完整性依赖于附睾起始段输出小管对睾丸液的重吸收。长期以来,研究者一直认为,附睾包括输出小管的结构和功能维持受雄激素调控。但近期一些研究表明,雌激素甚至附睾精子对附睾结构和功能都具有重要调节作用,其主要依据为:①雌激素在输出小管中的浓度要高于女性血浆雌激素浓度数 10 倍,并且输出小管还富含雌激素受体。②输出小管精子含有高活性的 p450 芳香化酶,能将附睾液中的雄激素转化为雌激素。③雌激素受体基因敲除(knockout)小鼠,体内细胞缺乏雌激素受体,导致输出小管对睾丸液重吸收障碍,造成睾丸液集聚于附睾腔。那么,雌激素是如何调控输出小管重吸收呢?我们认为,高浓度存在于输出小管的雌激素,通过调控输出小管上皮细胞的水通道蛋白基因表达,来调节输出小管对水的重吸收;通过调控 Na⁺-K⁺ATPase,来调节输出小管对电解质的重吸收。有关雌激素调控输出小管重吸收的具体机制有待于进一步的研究阐明。

第三节 精 液

精液主要由精浆和精子组成,精浆成分约占 95% 以上。正常精液是睾丸液、附

睾丸液和尿道腺、前列腺、精囊排出的混合物,其中以精囊分泌物为主,占 60%。其次为前列腺成分,占 30%;而附睾、输精管腹壶尿道球腺及尿道腺成分仅占 5%~10%。精浆决定着精液的生化及生理学特性。精浆中含有的很多成分与血浆相同,某些成分的含量差别较大。同时,精浆还含有一些特有成分,如去获能因子、前列腺素及蛋白酶抑制因子等,可直接影响精子的活动度和受精能力。精液中还富含果糖以及一定量的酸性磷酸酶、柠檬酸、肉毒碱和钾、钠、钙、镁等多种无机元素,以及固醇类和性激素等许多物质,均对精子的生成、成熟、运动及受精产生重要影响。有关精液生化等方面的检测将在第十三章详尽介绍。

精子由睾丸产生,在附睾等部位成熟,射精时随附性腺分泌物一同排出,并悬浮于精浆中。成熟的精子在男性生殖道可存活数周,排出体外后在接近正常体温条件下,精子活动一般维持 24~72h,而离体的精子受精能力只有 48h。精子的功能状态,在评价男性生育能力方面更为重要。分析精子的数目和质量,如精液中是否无精子、少精、存活率或活力低下,以及畸形精子增加等病理改变,从而为临床寻找不育的原因和疾病诊断、疗效判定提供客观依据。精液检查证实无精子,还可作为男性输精管结扎手术效果的重要指标。在人工授精过程中,质量优良精子的筛选,也需要通过精液分析加以确定。

(童明汉 吴明章)

第二章

女性生殖系统

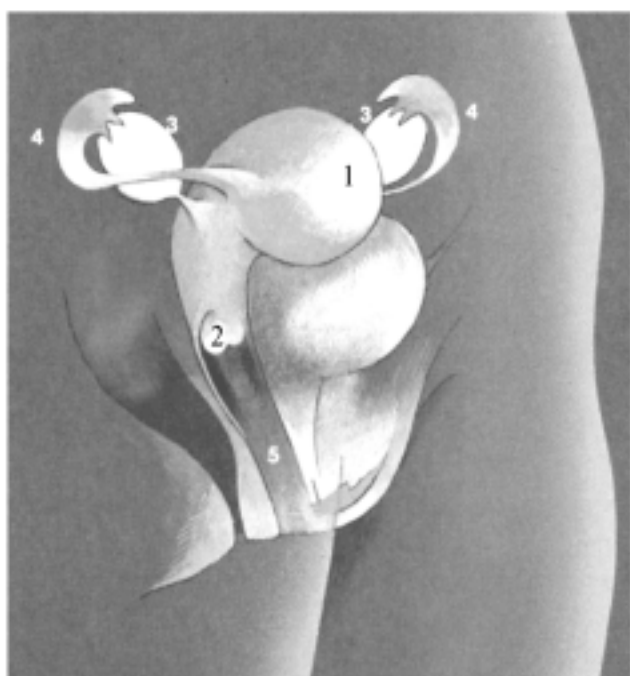


图 2-1 女性内生殖器官的模式图

1. 子宫; 2. 子宫颈; 3. 卵巢; 4. 输卵管; 5. 阴道

女性生殖系统包括主性器官和附属性器官(图 2-1)。卵巢是产生生殖细胞和分泌性激素的主性器官。附属性器官包括子宫、输卵管、阴道、前庭大腺、阴阜、大阴唇、小阴唇、阴蒂与处女膜。

第一节 女性生殖系统的结构与功能

一、卵 巢

卵巢(ovary)呈扁椭圆形,一侧为卵巢门,借卵巢系膜与阔韧带相连,血管、淋巴管和神经由卵巢门进出卵巢(图 2-2)。

卵巢表面覆盖一层与腹膜相连续的单层立方或低柱状的表面上皮,上皮下方为薄层致密结缔组织构成的白膜。卵巢分外周的皮质和中央的髓质。皮质含有不同发育阶段的卵泡。胎龄 20 周时,两侧卵巢约有 700 万个卵泡,随后发生退化闭锁至出生时尚有约 200 万个,到青春期进一步减少到约 50 万个,绝经时仅存几百个(图 2-3,图 2-4,图 2-5)。从青春期开始,每月约有十几个初级卵泡开始发育,但只有 1~2 个能发育成熟而排卵,其他则在不同发育阶段退化闭锁。

卵巢的功能一是产生卵子,二是合成并分泌甾体激素。下丘脑腺垂体系统可调节卵巢的活动,使之发生周期性变化,而卵巢分泌的甾体激素,除使子宫内膜发生周期性变化外,还可调节机体多种组织与器官的生理活动。

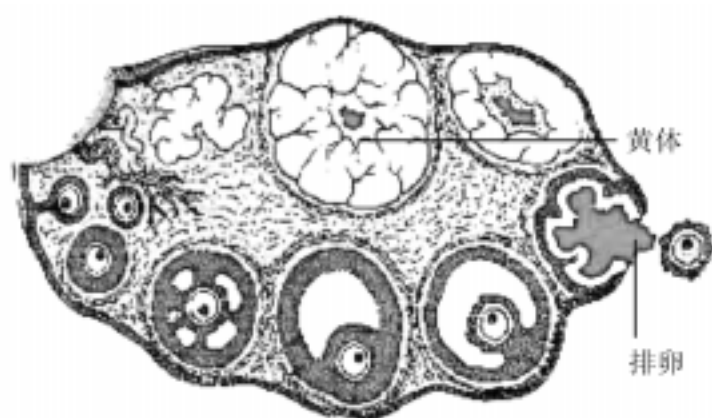


图 2-2 卵巢断面的模式图

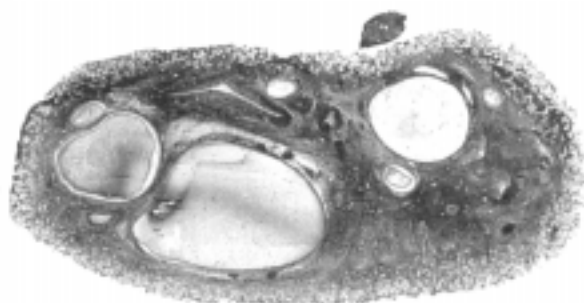


图 2-3 新生儿的卵巢

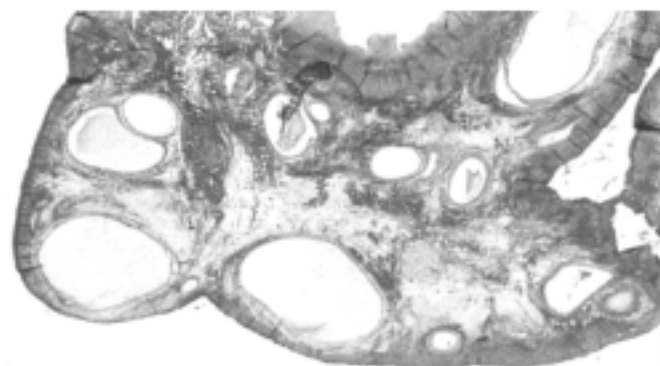


图 2-4 育龄期的卵巢

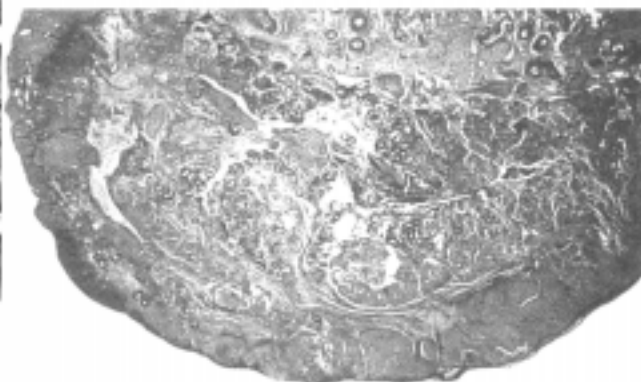


图 2-5 绝经期的卵巢

(一) 卵 泡 期

卵泡期(follicular phase)又称为排卵前期,是卵巢周期的开始阶段。在卵泡期,一些原始卵泡(primordial follicle)开始生长发育成为初级卵泡(primary follicle)。原始卵泡在卵巢中数量最多,位于卵巢的皮质浅层,体积小,直径 $55\sim 75\mu\text{m}$,是处于静止状态的卵泡。卵泡中央是一个初级卵母细胞(primary oocyte),周围是一层扁平的卵泡细胞(图 2-6)。原始卵泡开始生长的表现是卵母细胞体积增大,卵泡细胞由单层扁平形变成立方或柱状(图 2-7),并增殖成多层,细胞内出现颗粒,称为颗粒细胞(granulocyte),分布在卵母细胞周围的颗粒细胞呈柱状,并整齐地排列成一层,称放射冠(corona radiata)(图 2-8)。颗粒细胞和卵母细胞可分泌一种糖蛋白,在卵母细胞与放射冠之间形成一层嗜酸性膜,称透明带(zona pellucida)。卵母细胞与颗粒细胞之间,以及颗粒细胞相互之间靠缝隙连接进行信息传递和物质交换。初级卵泡发育的后期,颗粒细胞上出现了促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)的受体,在此之前卵泡的发育主要受卵巢自身控制,基本不受垂体影响,自此之后卵泡的发育即受垂体促性腺激素的控制。

FSH 可诱发颗粒细胞分泌卵泡液,卵泡液在颗粒细胞间形成小的空隙,并逐渐合并成一个大腔,称卵泡腔(follicular antrum),腔中含有卵泡液,具有卵泡腔的卵泡称为次级卵泡(secondary follicle)(图 2-9)。随着卵泡腔的扩大,卵母细胞居于卵

泡的一侧并与周围的颗粒细胞突向卵泡腔,称卵丘(cumulus oophrus)。其余的颗粒细胞密集排列成数层,构成卵泡壁,称颗粒层(stratum granulosum)。在卵泡周围出现由间质细胞分化形成的结缔组织膜,称卵泡膜(theca folliculi)。卵泡膜分内、外两层,内层有大量具有内分泌功能的细胞,称卵泡膜内层细胞或卵泡膜细胞(theca cells),外层主要由纤维成分组成(图 2-10)。

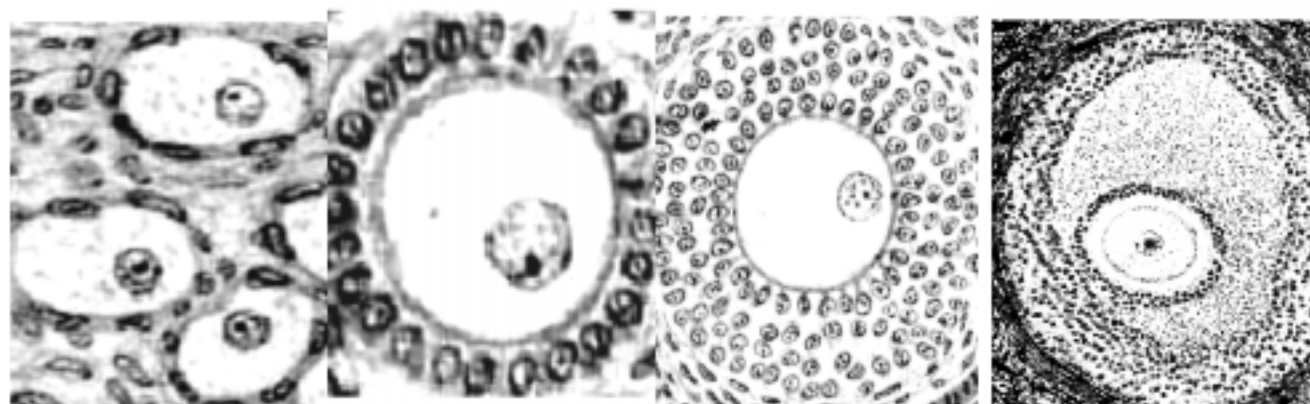


图 2-6 原始卵泡

图 2-7 生长卵泡
(初级卵泡)

图 2-8 生长卵泡
(初级卵泡)

图 2-9 生长卵泡
(次级卵泡)

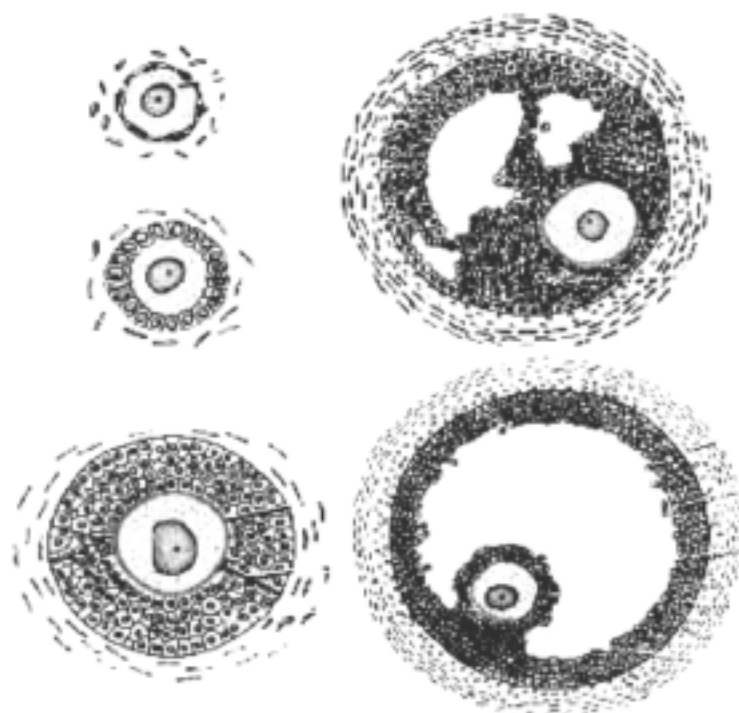


图 2-10 卵泡膜的形成

在雌激素的协同作用下诱发颗粒细胞与内膜细胞上出现黄体生成素(luteinizing hormone, LH)的受体,且数目随卵泡的发育成熟而不断增多,使卵泡对 LH 的敏感性不断提高。在 FSH 与 LH 作用下,卵泡不断产生雌激素,后者可促进卵泡摄取 FSH,但血中雌激素浓度的增高可抑制 FSH 的分泌,致使多数卵泡停止发育而退化闭锁。惟有原来发育得较大的优势卵泡,由于其分泌的雌激素量较多,可使卵泡摄取更多的 FSH,得以继续发育形成成熟卵泡(mature follicle),并分泌雌激素,从而使血中雌激素浓度能继续增加,促进下丘脑垂体的分泌活动,引起

血中 LH 与 FSH 增高,并出现 LH 高峰。人在 LH 高峰后 24h 左右即发生排卵。

(二) 排 卵

在排卵(ovulation)前,初级卵母细胞完成第 1 次减数分裂,产生次级卵母细胞和第 1 极体。次级卵母细胞随即进入第 2 次减数分裂,停止在分裂中期。一般每 28~35d 排卵 1 次,两个卵巢轮流排卵,正常排卵出现在下次月经前的第 14d。多数人每次排 1 个卵,偶尔可排两个卵。即将排卵的卵泡,其颗粒层、卵丘和放射冠细胞间隙增大,卵泡膜内层毛细血管基膜断裂,颗粒层基膜也断裂,血浆及血细胞通过内皮细胞间隙渗出,进入卵泡腔,使卵泡液增多。卵泡突出于卵巢表面,卵泡顶壁局部很薄,缺血形成透明的小斑,卵巢表层上皮成不连续状。卵泡破裂后,排出的卵母细胞及其周围的卵丘细胞黏附于卵巢表面。此时,输卵管伞部与卵巢表面相贴,由于输卵管平滑肌收缩运动和纤毛摆动,在局部形成液体流,将卵吸入输卵管内。

1. 排卵的机制

排卵前,脑垂体分泌的 LH 升高,LH 可促使孕激素分泌增多,后者促使卵巢合成多种酶,使成熟卵泡顶部组织的胶原纤维之间起黏合作用的蛋白多糖变性,卵泡壁张力减低。还可触发排卵有关酶的形成与释放,卵泡液中存在蛋白分解酶、淀粉酶、胶原酶、透明质酸酶等,因此认为排卵是由于上述酶使卵泡壁溶解破裂,引起排卵(图 2-11)。LH 还可促进颗粒细胞合成前列腺素(prostaglandin, PG),在接近排卵时成熟卵泡中 PG 含量呈进

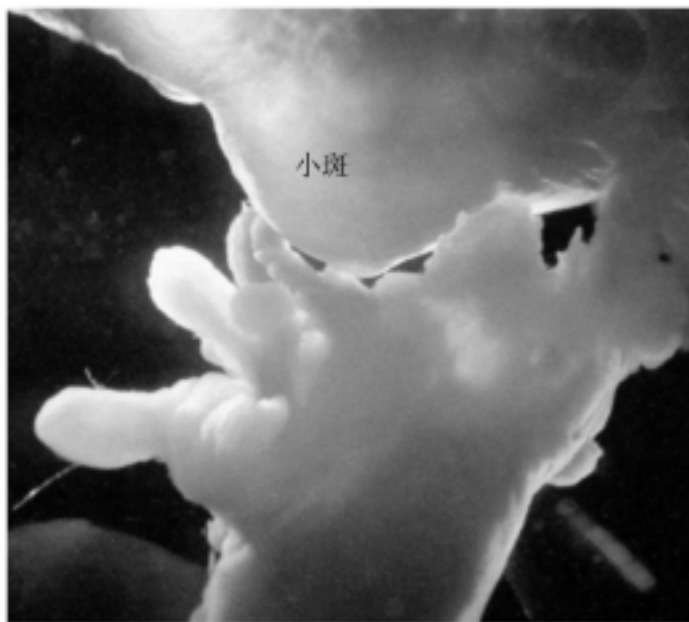


图 2-11 卵巢排卵

行性升高。PGF_{2α}可促进卵泡壁基部及侧面的平滑肌收缩,导致卵泡顶部小斑破裂,于是卵母细胞及其外周的放射冠随卵泡液一起排出。此外,卵巢皮质的基质及卵泡膜外层平滑肌,均有丰富的自主神经(植物神经)纤维及神经末梢,它们对排卵也有促进作用。

2. 排卵的监测

卵巢排卵可用间接方法进行监测。

(1) 基础体温监测:基础体温是指清晨醒后不活动时的体温,在排卵前期一直较低,排卵后即明显增高约 0.2~0.5℃,一直持续到月经来临(图 2-12)。

(2) 宫颈黏液监测:在月经周期的前半期,宫颈不分泌黏液(图 2-13),外阴也十分干燥。此后宫颈分泌少量黏稠而不透明的黏液。到排卵即将发生前,随雌激素高峰的出现,宫颈黏液变得稀薄、透明、清亮,量也增多,称为生育型黏液(图 2-14)。

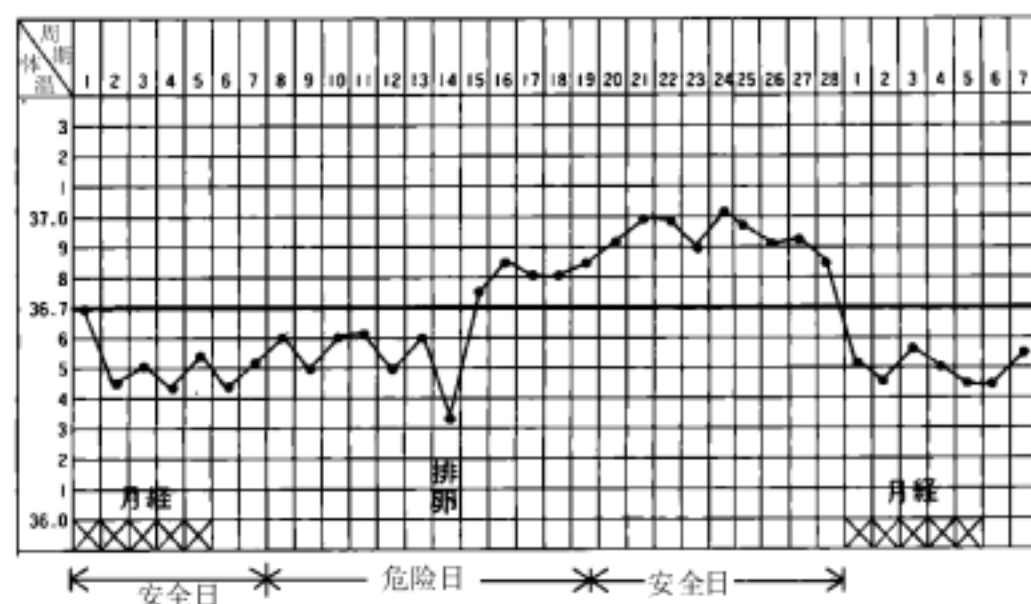


图 2-12 28d 月经周期的基础体温表

生育型黏液停止分泌意味着排卵即将发生。因此,从出现分泌型黏液到停止后的第 3d,是受孕的时期。

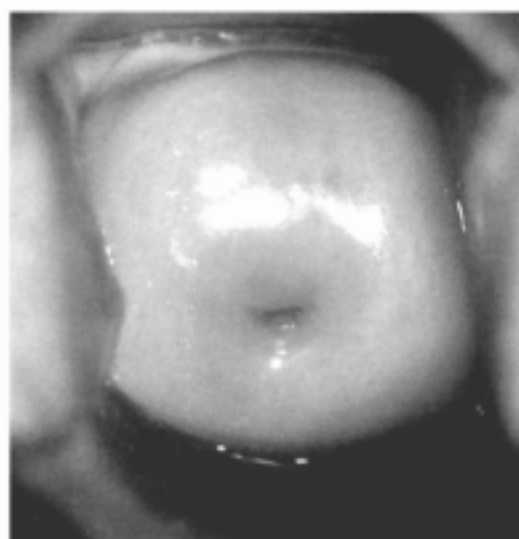


图 2-13 月经周期前半期的宫颈

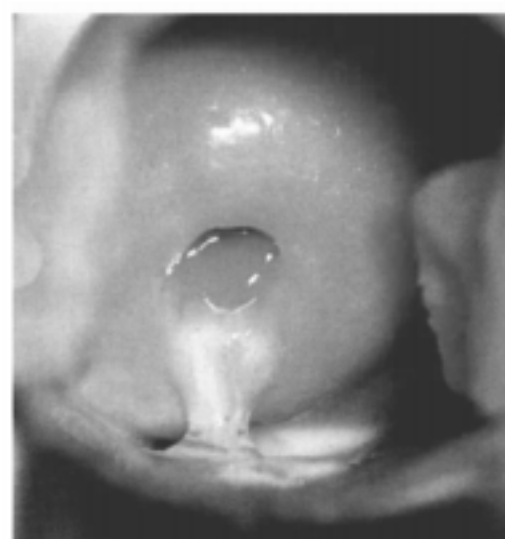


图 2-14 宫颈分泌的生育型黏液

(三) 黄体期

黄体期(luteal phase)又称为排卵后期,卵排出后,残留在卵巢内的卵泡壁塌陷,颗粒细胞与内膜细胞在 LH 作用下分化为黄体细胞而形成黄体(corpus luteum)(图 2-15),黄体能分泌大量孕激素与雌激素,约在排卵后 7~ 8d 为雌激素与孕激素的分泌高峰。排出的卵若未受精,形成的黄体称月经黄体(corpus luteum of menstruation),由于高水平的雌激素与孕激素对下丘脑垂体系统的抑制,LH 与 FSH 分泌减少,月经黄体维持约 10~ 14d 即退变,萎缩。此后,由于血中雌激素与孕激素水平很低,解除了对丘脑垂体系统的抑制,使 FSH 与 LH 分泌又增加,卵巢活动又进入卵泡期,新的卵泡又开始生长发育。卵若受精,则黄体先后在 LH 和胎盘分泌的绒毛膜促性腺激素作用下可持续增长,直径可达 3~ 4cm,形成妊娠黄体

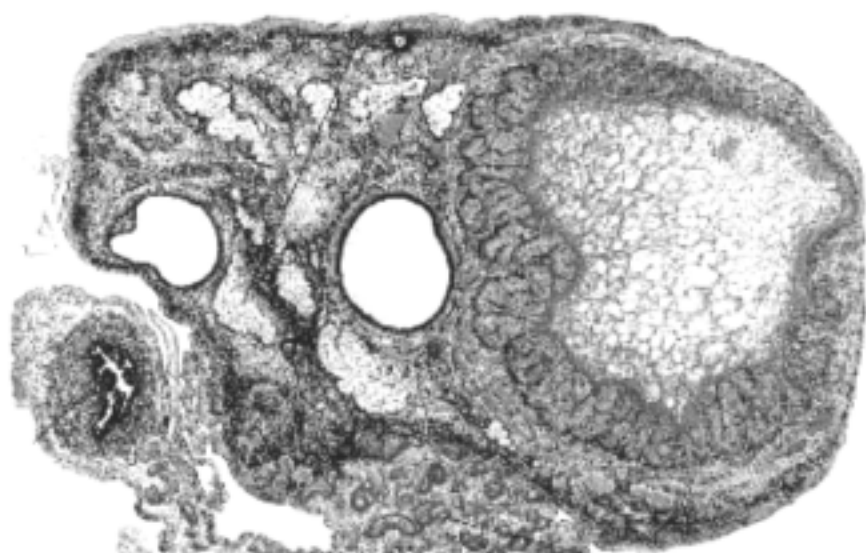


图 2-15 黄体

(corpus luteum of pregnancy), 在妊娠 3 个月后其功能缓慢减退, 由胎盘取代。黄体的主要功能是分泌孕激素及一些雌激素。妊娠黄体还分泌松弛素(relaxin)。

(四) 闭锁卵泡和间质腺

哺乳动物卵巢中的卵泡绝大部分不能发育成熟及排卵, 多在发育的各个阶段逐渐退化, 称闭锁卵泡(atresic follicle)(图 2-16)。原始卵泡退变时卵母细胞皱缩, 核固缩, 细胞自溶后被巨噬细胞吞噬。中等卵泡闭锁时, 卵母细胞自溶, 透明带塌陷, 卵泡壁颗粒细胞和膜内层细胞均不出现黄体化现象。大的囊状卵泡退变时变化较复杂, 退化早期出现含血的结缔组织侵入颗粒层及卵丘, 颗粒层细胞间的连接减少、松散, 细胞进入卵泡腔, 随之卵母细胞退变。随着卵母细胞退化, 卵泡坍塌, 颗粒层变薄逐渐消失, 膜内层细胞保留时间比颗粒细胞长, 胞质内充满脂滴, 细胞体积增大, 形成类似黄体细胞。肥大的膜内层细胞被周围结缔组织分隔成团, 分散于卵巢基质, 称间质腺(interstitial gland)。间质腺细胞结构近似黄体, 胞质内含有丰富的滑面内质网、脂滴及线粒体, 具有分泌甾体激素的功能。

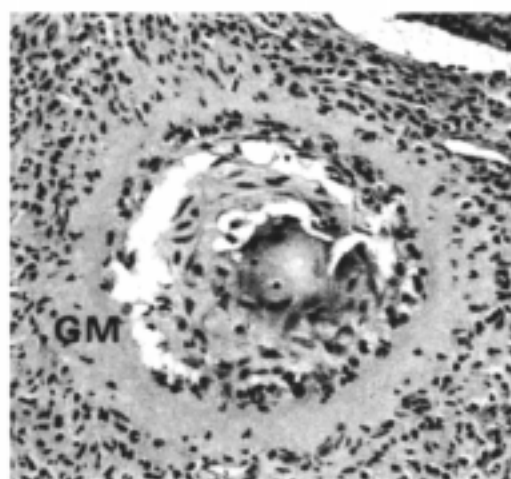


图 2-16 闭锁卵泡

二、输 卵 管

(一) 输卵管的形态与功能

输卵管(oviducts, fallopian tube)左右各一, 分别位于子宫左右侧, 向外平行伸展, 每根长约 8~12cm。输卵管可分段, 分为间质部(位于子宫壁内)、峡部、壶腹部



图 2-17 输卵管外观

及靠近卵巢并在腹腔开口的漏斗部。漏斗周缘有放射状突起,称输卵管伞(图 2-17)。



图 2-18 输卵管壶腹部

输卵管管壁由内向外是黏膜、肌层和浆膜(图 2-18)。黏膜主要由纤毛细胞与分泌细胞构成,纤毛细胞在伞部和壶腹部最多,峡部最少,分泌细胞则越接近峡部越多。输卵管内的纤毛只能向子宫方向摆动,纤毛的活动在摄取卵子与运送卵子、受精卵时发挥作用。分泌细胞在接近排卵时活动加强。肌层由内环外纵两层平滑肌组成。输卵管的活动受多种因素影响,除本身可收缩外,输卵管周围组织的收缩均能影响其活动。输卵管的生理功能主要是摄取卵子,输送卵子、

精子与受精卵。

(二) 输卵管液的生理

输卵管液为透明状,pH7.28~7.70,日分泌量0.1~20ml。因雌激素可促进输卵管液的分泌而孕激素可抑制输卵管液的分泌,故随月经周期而变化,但个体差异很大。输卵管液的成分与血清很相似,但也有血清中没有的物质,如一种分子量为54kDa的蛋白质,称为人输卵管素 I (human oviduction I),因此认为输卵管液主要是血管渗透液与输卵管上皮分泌液的混合物,也可能还混入少量的腹腔液、卵泡液与子宫液。

输卵管液中有些成分与精子存活、受精、受精卵运送、胚胎发育有密切关系。其中人输卵管素 I 可防止精子过早地发生顶体反应,此外输卵管液在排卵后的3~6d内,大部分是流向子宫的,这样就能推动漂浮在输卵管液中的受精卵进入子宫。宫

颈黏膜富含腺体,能分泌黏液,宫颈黏膜不发生周期性脱落,但其分泌物的性质及量有明显的周期性变化。

三、子 宫

(一) 子宫的一般结构

子宫(uterus)为中空的肌性器官,上部为子宫体,顶端为宫底,宫底两侧为子宫角,与输卵管相通。下部为子宫颈,呈上宽下窄的三角形(图 2-19)。子宫颈内腔为梭形,成年妇女约长 3cm,上下各一开口,分别为宫颈内口和宫颈外口。

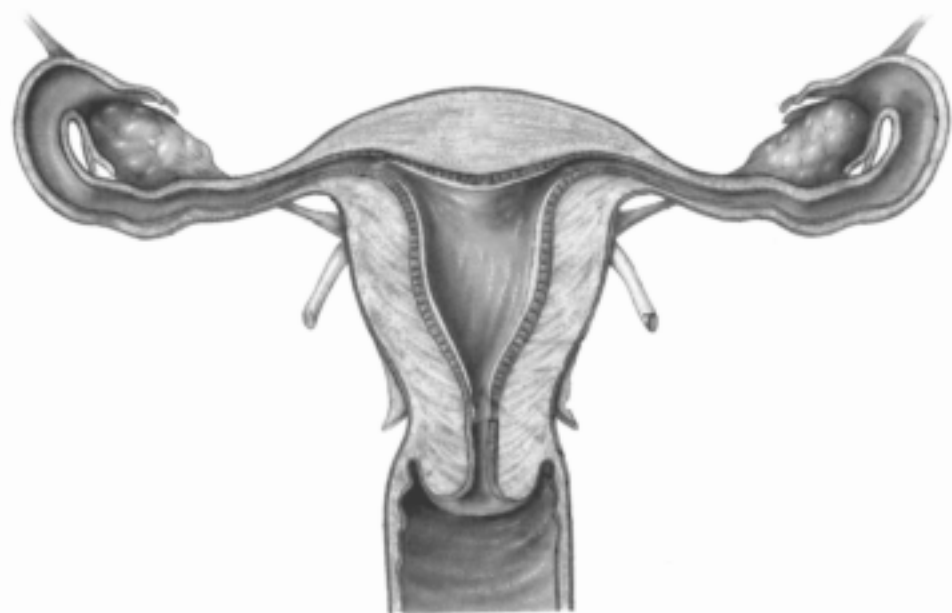


图 2-19 子宫纵断面

子宫体的壁由外向内分为浆膜、肌层和内膜三层(图 2-20)。

1. 外膜

除子宫底和体为浆膜(serous coat)外,其余为结缔组织构成的纤维膜。

2. 肌层

由成束的平滑肌纤维组成,各层肌纤维间互相交织,故分层不明显。子宫平滑肌有 α 与 β 肾上腺素能受体,激发 α 受体能引起收缩,激发 β 受体能引起抑制。 α 与 β 受体的数量受卵巢激素的影响,雌激素可使 α 受体增多,而孕激素可使 β 受体增加。雌激素对子宫平滑肌细胞的分化及保持细胞的正常大小起重要作用,雌激素分泌量减少或消失,平滑肌即萎缩。雌激素对促进细胞生长的作用与肌细胞收缩蛋白及与供能有关酶的合成密切相关。孕激素对妊娠子宫平滑肌的收缩有抑制作用。分娩时子宫肌层的收缩主要是脑垂体分泌的催产素的作用。此外,胎膜释放的大量前列腺素也有促进子宫肌层收缩的作用。

3. 内膜

子宫内膜(endometrium)由单层柱状上皮和固有层组成。子宫底部和体部的内膜固有层分为基底层和功能层。基底层较薄,位于深部,与肌层相邻;功能层较厚,

位于浅部。内膜的周期变化主要发生在功能层,月经期内膜的功能层脱落,由基底层再生进行修复。



图 2-20 子宫壁

(1) 上皮:为单层柱状上皮,由少量纤毛细胞和大量分泌细胞组成。内膜的表面上皮向固有层深陷形成管状子宫腺,腺伸展至内膜基底层。偶尔可穿入肌层浅部。纤毛细胞数量随卵巢激素的周期而变化,子宫内膜增生期,在雌激素作用下,纤毛细胞减少。

表面上皮的纤毛向阴道方向摆动,以推动分泌物的排出,子宫腺的纤毛向腺开口方向摆动,将腺分泌物推送至宫腔。

表面上皮和腺上皮的分泌细胞形态结构相似,但功能层的腺上皮细胞对激素反应最敏感,分泌功能较活跃。

(2) 固有膜:固有层的结缔组织细胞称子宫内膜基质细胞(endometrial stromal cell),与网状纤维和基质等成分构成间质。基质细胞是一种分化较低的细胞,多呈梭形或以突起相连,有合成胶原蛋白的功能。细胞受卵巢激素的影响产生周期性增殖分化。内膜组织中还常见淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞和来自血液的中性粒细胞等。网状纤维构成网架,在子宫腺和螺旋动脉周围形成稠密的网。基质由蛋白多糖和组织液组成。

4. 子宫血管

子宫动脉分支呈斜角穿入子宫壁外侧缘且直达子宫肌中层,在此形成弓形动脉。从弓形动脉发出放射状分支,垂直穿入内膜,在内膜与肌层的交界处,每条小动脉发出一小而直的分支称基底动脉(basilar artery),分布在基底层,不受性激素的影响。小动脉主干从内膜基底层一直延伸至功能层浅

部,并弯曲呈螺旋状,称螺旋动脉(helicine arteries)。螺旋动脉对卵巢激素反应迅速,在孕激素的作用下生长更快,血管变长而粗,并更弯曲。螺旋动脉在内膜浅部形成毛细血管网,毛细血管汇入小静脉,穿越肌层,汇合成子宫静脉(图 2-21)。

子宫是精子抵达输卵管的通道,同时精子在此获能,受孕后为胚胎着床、发育与生长提供场所;分娩时通过平滑肌的收缩,可使胎儿及其附属物娩出。

(二) 子宫内膜的周期性变化

子宫内膜功能层在卵巢激素作用下发生着周而复始的周期性变化,其目的是为受精卵植入作准备。

1. 月经期(menstrual phase)

月经来潮的第一天至出血停止的一段时间称月经期。由于缺乏卵巢激素的支持,腺体萎缩变性,分泌功能减退,内膜间质发生基质降解,水肿减退,螺旋动脉即血流不畅,继而发生节段性、阵发性痉挛,引起内膜缺血缺氧而造成局灶性坏死,细胞内的溶酶体溢入组织,使组织内的某些成分分解,使内膜进一步坏死,并发生脱落(图 2-22)。螺旋动脉痉挛之后又发生阵发性扩张,促使已受损的血管壁被胀破,血液不断溢入组织,并突破内膜表面而溢

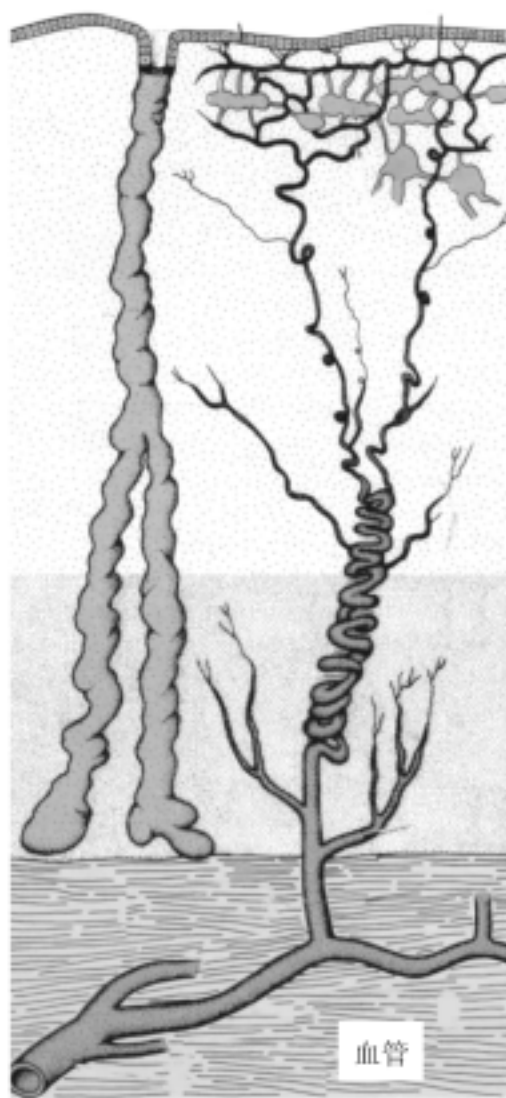


图 2-21 子宫的血管的模式图

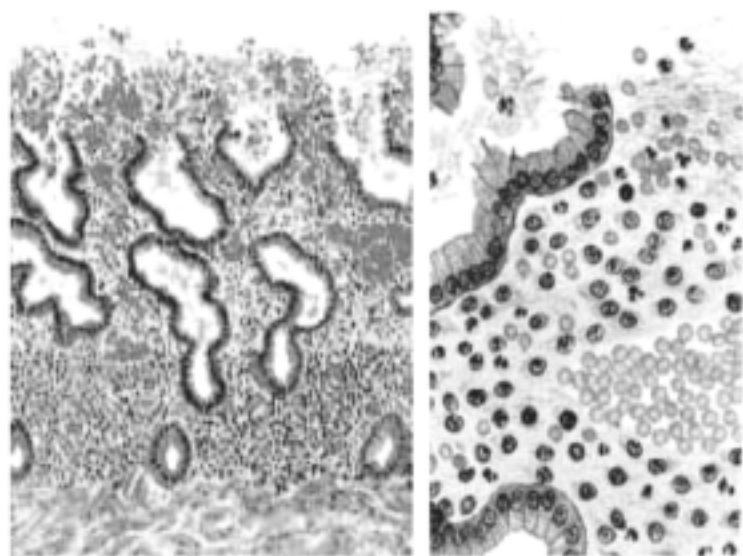


图 2-22 月经期子宫内膜的模式图

入宫腔。坏死的组织不断脱落,直到暴露出基底层。脱落的内膜碎片加上血液一起从阴道流出,即月经。

月经血量与持续天数因人而异,血量为 20~ 100ml 不等,平均为 50ml。持续天数可从 2~ 7d,多数为 3~ 4d。一个月经周期常为 28~ 30d,提前或退后 7d 均属正常范围。

2. 增殖期(proliferative phase)

月经出血停止至卵巢排卵的一段时间。在雌激素作用下,子宫内膜以增殖、生长为主。在月经终止前,约在周期的第 3 天,子宫内膜开始修复,裸露的内膜表面又重新出现了一层上皮。内膜不断增生,内膜间质逐渐出现水肿,子宫腺不断生长,腺腔扩大,腺体变长并出现弯曲。腺上皮内可见糖原颗粒开始蓄积。螺旋动脉也开始增生并有中等程度的盘曲,但不能进入内膜表面的 $1/3$ 。增殖期可分为三个期。

(1) 增殖早期(early proliferative phase):约为周期的第 4~ 7d,子宫内膜厚 1~ 2mm,表面为立方上皮。子宫腺短,直,细且稀疏,上皮细胞低柱状,胞质分化差,细胞器较少。间质致密,基质细胞呈梭形,核大,胞质少(图 2-23)。

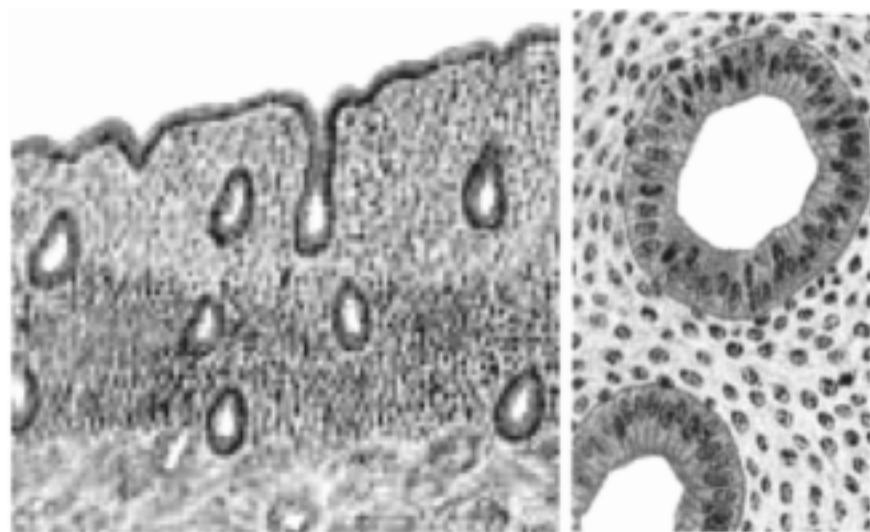


图 2-23 增殖早期子宫内膜的模式图

(2) 增殖中期(midproliferative phase):约为周期的第 8~ 10d,上皮细胞增高,子宫腺增多,伸长并稍有弯曲。核染色加深,示 DNA 合成增加。间质水肿在此期最为明显。

(3) 增殖后期(late proliferative phase):约为周期的第 11~ 14d,子宫腺继续增长且更加弯曲,细胞核位置参差不齐,呈假复层状,间质水肿逐渐消失(图 2-24)。

3. 排卵期(ovulatory)

周期的第 15~ 16d,子宫腺上皮细胞核仍可见残留的假复层状,腺腔扩大,腺细胞分化成熟,电镜下见腺细胞的细胞器明显增多,功能活跃,核下空泡开始可见。在排卵的第 2d,约 50% 以上的腺细胞已可见明显的核下空泡。

4. 分泌期(secretory phase)

为排卵后至月经来潮的一段时间。在黄体分泌的孕激素作用下,子宫内膜进一

步增厚,最终可达 5~ 6mm,这是由于间质水肿和腺体内蓄积分泌物所致。分泌期的子宫内膜腺体更加增长而弯曲,上皮细胞将富含糖原的黏液释放入腺腔。螺旋动脉继续增长以致扩展到内膜表面,管腔扩大,盘曲更为明显。内膜的发育与保持现状需有雌孕激素的支持,此时的性激素是由黄体分泌。如未受精,黄体萎缩,性激素分泌量减少,内膜因得不到激素支持而发生坏死与脱落,即发生月经的一系列变化。整个分泌期可分三个期。

(1) 分泌早期(early secretory phase):约周期的第 17~ 20d,所有的腺上皮细胞可见明显的核下空泡,上皮腺细胞核呈长椭圆形。腺上皮的分泌活动在周期的第 20d 达高峰,分泌早期间质致密(图 2-25)。

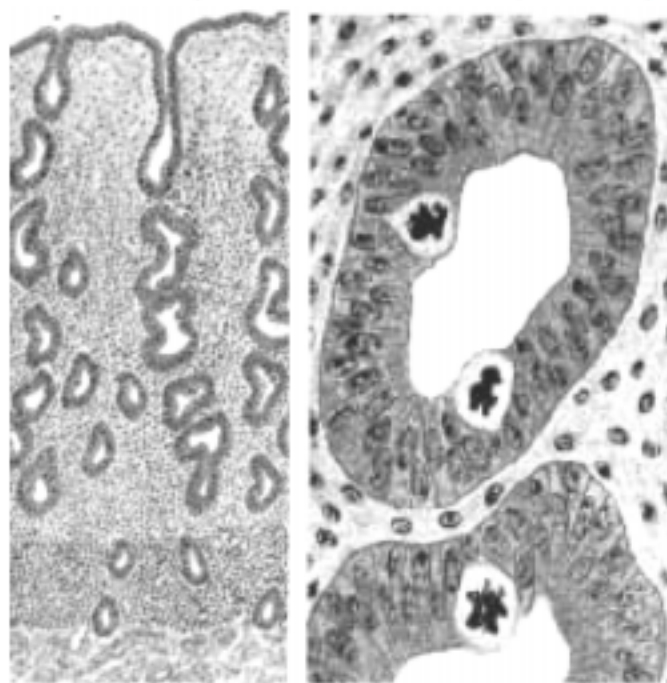


图 2-24 增殖后期的子宫内膜的模式图

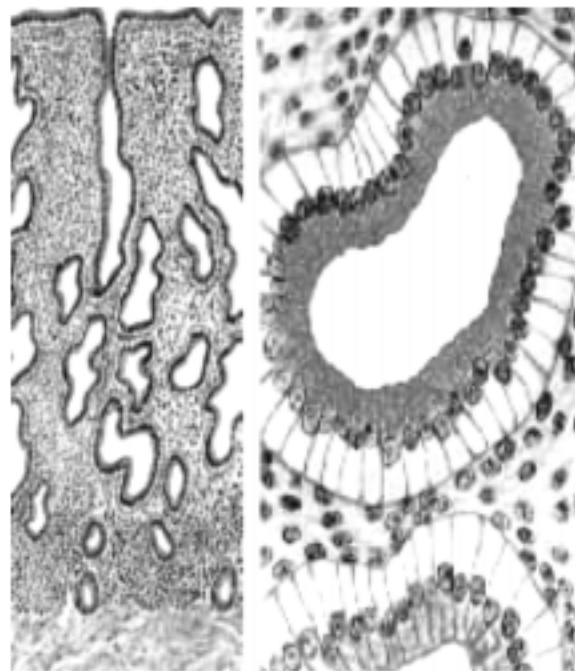


图 2-25 分泌早期的子宫内膜的模式图

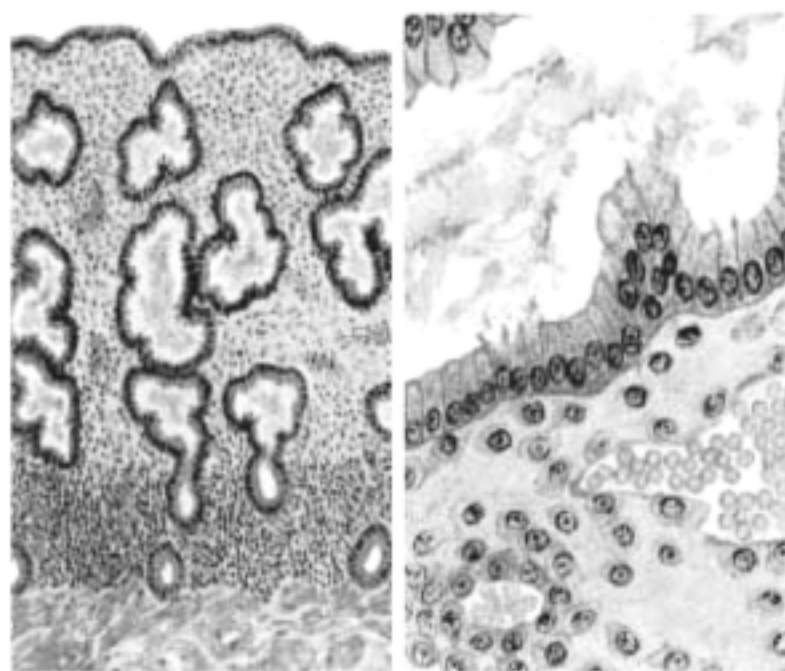


图 2-26 分泌后期的子宫内膜的模式图

(2) 分泌中期(mid-secretory phase):周期的第 21~ 23d,子宫腺上皮细胞分泌增加,腺细胞排泌后上皮低矮,腺腔进一步扩大,呈锯齿状。螺旋动脉增长,且扭曲明显。间质再次出现水肿。

(3) 分泌后期(late secretory phase):周期的第 24~ 26d,子宫腺弯曲增加,螺旋动脉周围部位的基质细胞体积增大变圆,核质多,分化为前蜕膜细胞;与此同时,可见来自血液的中性粒细胞侵入子宫内膜(图 2-26)。

周期的第 27~ 28d 称月经前期(immediately premenstrual phase),此期前蜕膜细胞数量增多,面积增大,白细胞也逐渐增加(图 2-27)。

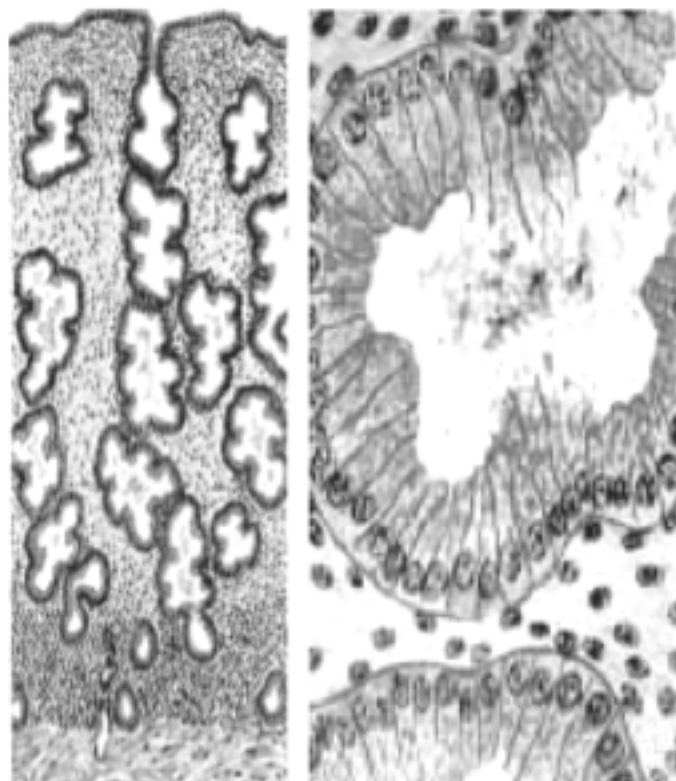


图 2-27 月经前期的子宫内膜的模式图

(三) 宫颈黏液生理

宫颈壁外层为肌层,内层为黏膜。黏膜上皮有许多不规则的皱裂和隐窝,性交时大量精子可主动进入此处暂时储存,以便分批陆续上行子宫。精子在此处存活的很好,找不到不活动或死亡的精子。黏膜上皮有纤毛细胞和分泌细胞,分泌细胞能分泌宫颈黏液到宫颈腔内,纤毛细胞的纤毛向阴道方向做节律性摆动,推动宫颈黏液流入阴道。

1. 宫颈黏液的组成与特点

宫颈黏液主要来自宫颈腺体,也有少量来自子宫内膜、输卵管与卵泡。宫颈黏液的分泌受甾体激素影响,雌激素使宫颈黏液的分泌量增多,并较清亮,孕激素使宫颈黏液分泌量减少,并较黏稠。正常生育妇女每日可分泌宫颈黏液约 20~ 60mg,含水量相对较低。排卵前后,每日分泌可达 700mg,这时含水量最高。宫颈黏液主要是水分和蛋白质,蛋白以黏液型糖蛋白为主,此外,还有一些无机盐。糖蛋白可通过互相连接构成直径大小不同的黏蛋白纤维,这些纤维在宫颈内交织成网状。其网眼

的大小随激素状态而改变,雌激素可使网眼直径变大,孕激素则相反。

2. 宫颈黏液的生理作用

(1) 为精子提供合适的碱性环境:阴道内 pH 值通常为 3~4.5,而精子需在合适的碱性环境下才能较好地活动,排卵期宫颈黏液 pH 值可上升到 8.5。

(2) 阻止精子在非排卵期进入宫腔:雌激素可使宫颈黏液构成的纤维变细,网眼变大,排卵期网眼直径可达 $10\mu\text{m}$,精子易通过。黄体期网眼直径仅 $0.5\sim 2.0\mu\text{m}$,比精子头的直径($3\mu\text{m}$)小,所以精子很难进入宫腔。

(3) 筛选精子:宫颈口的正常精子百分比高于精液,表明活力不强的精子不易穿过宫颈黏液构成的网状结构。宫颈部的纤毛能向阴道方向做节律性摆动,使黏液流向阴道,在此过程中活力较差或死精子可随之被驱回阴道。

(4) 提高能量:精子在女性生殖道内的寿命与宫颈黏液中葡萄糖浓度有关,浓度高时寿命长;反之,则短。排卵时宫颈黏液中葡萄糖浓度最高,故很有利于精子生存。

(5) 保护宫腔免受感染:妊娠时宫颈黏液变得黏稠。黏蛋白纤维交织得非常紧密,网眼极小,较大的细菌不易通过,犹如在宫颈内加上了塞子,可保护宫颈免受感染。

四、阴 道

阴道具有排出月经和生殖道分泌物、娩出胎儿、容纳阴茎进行性交、吸收某些物质及形成酸性环境、防止局部感染等功能。

阴道全长约 10cm,是由黏膜、肌层和外膜构成的肌性管道,富于伸展性,阴道上端包围着子宫颈,下端为阴道口,位于阴道前庭。环绕子宫颈周围的部分称阴道穹窿,可分前、后、左、右四部分,后穹窿较深,性交时精液可储存在此形成精液池(图 2-28)。

阴道内的液体是由阴道上皮的渗出液和宫颈腺体的分泌物组成,还可有少量来自子宫内膜与输卵管的分泌液。这些液体中含有脱落的阴道上皮细胞、血细胞、乳酸杆菌等,医学上称为白带。正常白带量少,无臭无色;如量多,色泽异常,有秽臭,即示有炎症。



图 2-28 阴道的模式图

阴道上皮细胞的成熟过程,受卵巢激素主要是雌激素的影响,因此阴道脱落细胞也有周期性变化。通过检查阴道脱落细胞的形态特征,可预测体内卵巢激素的水平。

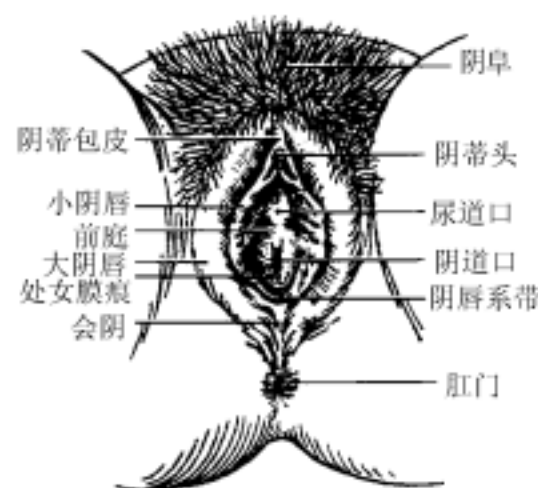


图 2-29 女性外阴

五、外生殖器

女性外生殖器又称为外阴部,包括阴阜,为耻骨联合前方的隆起,皮下脂肪发达,皮肤上长有阴毛;大阴唇,为一对肥厚的皮肤皱襞;左、右小阴唇,在前端互相连接包绕阴蒂,在后端也彼此会合;前庭,为两侧小阴唇间的裂隙,前方有尿道开口。阴道口有一层薄膜,为处女膜,膜中央有一个小裂孔,月经由此孔流出(图 2-29),性交后处女膜破裂。会阴(指肛门与阴道之间的软组织)在分娩时容易撕裂,应注意保护。

第二节 妊 娠

一、精卵运行与精子获能

(一) 精子的运行

精液射出后要经过阴道、宫颈、宫体才能到达输卵管的壶腹部,以便与卵子结合受精。

1. 阴道

一次射精的精液量约 2~ 6ml,每毫升可含 $(20 \sim 200) \times 10^6$ 精子。精液呈碱性,富含果糖,可供精子活动所需的能量,因此精子才具有较好的活动能力。精子进入阴道后,阴道液呈酸性,大部分精子在阴道的酸性环境中死亡,射出的精液量少时就更为明显。精液射出后即存留在后穹窿的精液池中(仰卧位)。

2. 宫颈

宫颈外口通常朝向后穹窿,因此可接触射精后的精液池。排卵前后,宫颈外口直径可由平时的 1mm 扩大到 3mm,宫颈黏液的量多而稀,pH 值显示为碱性,宫颈黏液内黏蛋白纤维变细,纤维交织而成的网状变大,这些均有利于精子由阴道穿透宫颈。精子进入宫颈后,有些活动能力较强的精子很快(1.5~ 3min)即抵宫颈内口,有些则暂存于壁上的隐窝内,然后陆续主动或被动地上行子宫腔。宫颈隐窝内储存的精子越多,到达输卵管的精子即越多,在输卵管内有足够量精子停留的时间即越长,受精机会就越多。精子受精能力一般不超过 48h。

3. 宫体

精子可在 2~3min 内穿过宫颈,除精子自体活动外,还有其他因素可促使精子上行。其因素有可能是精液中的前列腺素引起子宫收缩,收缩后的松弛造成子宫腔内的负压,可将精子吸入宫腔。精子进入宫腔后,可进入内膜腺储存,由此继续上行输卵管,活动能力差的精子可被子宫内的白细胞吞噬。

4. 输卵管

精子从子宫进入输卵管必须通过子宫-输卵管交接处,只有活动能力较强的精子才能进入输卵管,因此交接处可视为精子进入输卵管的屏障。

精子除自身活动外,有三个因素可能与输卵管的运动有关。

(1) 输卵管峡部的节段性收缩。

(2) 峡部分泌细胞多在排卵期分泌增多,加上峡部管腔小,造成峡部的压力高于壶腹部,有利于精子向壶腹部运行。

(3) 输卵管壁上纤毛细胞摆动。

虽射精时进入阴道的精子数以亿计,但在通过女性生殖管道的各个阶段,最后抵达壶腹的精子不超过 200 个。

(二) 精子获能

精子的功能是将其 DNA 传递给卵子;精卵结合即受精是哺乳动物新生命的起点。在生理条件下,精子必须先经过雌性生殖管道并停留一段时间,才具备使卵子受精的能力。Austin 和张明觉将该过程称为精子获能(capacitation)。

精子在附睾移行过程中,经过复杂的膜修饰和结构变化,获得了功能上的成熟,但射出精子并不能立即使卵子受精。现已证实,所有已研究的哺乳动物精子都要经历获能,才能完成受精。获能是一多时相过程,有广义、狭义之分。狭义的获能指精子具有经历顶体反应的能力;广义的获能则包括顶体反应(acrosome reaction, AR)。获能的本质在于暴露精子膜表面卵识别、结合因子,解除对精子顶体反应的抑制,并使精子得以识别卵子并穿入卵内,完成受精。不同种动物,精子获能的精确部位不一样,但多数动物获能主要发生在子宫和输卵管内。

1. 获能精子的结构和功能变化

获能的精子在结构和功能上都发生一系列特异性变化,表现在精子的超活化、精子代谢方式改变和精子膜变化三个方面。

(1) 精子超活化(hyperactivation, HA):在精子获能的最后阶段,精子运动方式不同于附睾成熟精子,发生了明显改变,表现为一种强有力的、尾部呈“鞭打样”(whiplash)的不对称运动,称之为精子超活化。形态学观察,超活化精子以鞭毛弯曲幅度大为特征。计算机辅助精液分析(CASA)技术可以从精子运动的动力学本质来确定超活化精子。按照 CASA 精子运动参数结果分析,超活化主要以 VCL 增加, LIN、STR 降低和 ALH 增加为特点。对于群体精子超活化可以以下列标准界定: $VCL > 100\text{nm/s}$, $LIN < 65$ 和 $ALH > 7.5$ 。

实验观察发现,在黏性低的介质中,超活化精子虽然运动强有力,但非前向性,

不如附睾成熟精子有效;而在黏性高和黏弹性基质中,如聚丙烯酰胺中,超活化精子的运动比附睾成熟精子更具直线化,更为有效。对于精子超活化的生理意义,目前认为可能有以下几方面:

- 1) 精子超活化有利于精子通过输卵管黏稠介质和穿越放射冠的黏弹性基质。
- 2) 增强精子摆脱输卵管上皮的能力,使精子能顺利地输卵管管腔内前行。
- 3) 超活化精子强有力的鞭毛运动赋予精子穿透放射冠和透明带的力学基础。

精子内 Ca^{2+} 浓度升高可能是超活化发生的主要原因。其证据有:① 超活化精子内 Ca^{2+} 浓度显著高于附睾成熟精子,并且 Ca^{2+} 主要集中于精子鞭毛;② 顶体反应后,精子内 Ca^{2+} 浓度进一步升高,超活化精子鞭毛弯曲幅度增大。

(2) 精子代谢变化:精子运动变化必然有相应的精子代谢变化,精子获能后的代谢变化主要表现在以下几方面。

1) 获能精子以葡萄糖为主要能源,具有氧化和无氧糖酵解两种供能方式,能量代谢明显增强。

2) 获能精子酶系及信号系统也发生了变化。精子膜及顶体膜上的腺苷酸环化酶激活,精子内 cAMP 水平升高;磷脂酶激活,膜脂代谢增强,可能生成一些第 2 信使物质,如 IP_3 、DAG 等。

3) 获能精子顶体素原激活为顶体素。

(3) 精子膜变化:获能精子膜在分子水平上发生了一系列有规律的显著性改变,精子膜结构进行重组,包括膜蛋白、糖基和膜脂成分的改变、膜流动性变化等。

1) 获能精子膜蛋白变化:射出精子表面附有雄性生殖管道的分泌蛋白质,其中一些蛋白质可稳定精子膜,如附睾体部分泌的糖蛋白顶体稳定因子,能结合于附睾精子,降低精子顶体区膜蛋白的侧向运动,抑制顶体反应。获能过程中,这些稳定因子被去除,另一些遮盖精卵识别位点的蛋白质也将被丢失;而一些与精卵识别有关的蛋白质或者被暴露或者被重新分布。如精子膜蛋白 pH-20,获能之前位于顶体后区质膜;获能后在 Ca^{2+} 存在条件下, pH-20 簇集于顶体内膜。pH-20 主动位移现象与其在精卵识别中发挥作用相一致。而大鼠精子在附睾成熟过程中,精子膜主要是顶体前区,结合有附睾上皮细胞分泌的 37kDa 糖蛋白 D/E,获能后, D/E 逐渐移向赤道部和顶体后区。

2) 获能精子膜凝集素受体变化:获能过程中,精子膜凝集素受体,尤其是在精子顶体区,发生了显著变化。实验表明,伴刀豆球蛋白 A (Con A) 受体由获能前均匀分布,转变至获能后的成簇分布; WGA 受体由头部移向顶体后区,并逐渐增加;而 PNA 受体逐渐减少。近期有研究发现,人精子顶体区及顶体后区质膜在获能后,有甘露糖结合活性表达,且该活性与精子受精能力高度相关。获能时的精子膜凝集素受体重排,可能为精卵结合创造了条件。

3) 获能精子膜流动性变化:获能后的精子膜流动性有了显著增加,主要是由于获能精子胆固醇成分大量丢失和磷脂代谢活化;此外,获能时能量代谢和脂类代谢活化,会生成大量自由基,适量的自由基也能改变精子膜流动性。

获能精子膜流动性升高有利于精卵结合,表现在以下两个方面:①获能精子膜

流动性有区域性差异,其中以顶体后区膜流动性最大,而该区域被认为是精卵结合区;②精子膜出现高度特异性区域,簇集了一些功能蛋白质和糖基。

此外,获能精子膜分子结构也有所改变,如—SH 进一步氧化为二硫键,唾液酸残基被清除,精子膜表面负电荷明显减少等。

精子获能过程中,膜蛋白、膜凝集素受体分布的有序重建、重排,可能是由于以下原因所致:①精子膜流动性增加,能使糖蛋白易于运动;②蛋白酶、糖苷酶水解使精子膜蛋白降解、丢失;③糖基转移酶、糖苷酶的作用,使凝集素结合位点转移或丢失;④糖蛋白分子立体构型变化,使糖基暴露或遮盖,导致凝集素受体位点变化。

综上所述,精子膜在获能过程中产生了深刻变化,这些变化有重要生理意义:①去除精子膜表面遮盖物,暴露精卵识别位点;②膜通透性变化,有利于 Ca^{2+} 内流,增强精子活力;③降低膜流动性,富集功能蛋白质或糖基,形成高度特异性区域,有利于顶体反应和受精。

获能的本质是暴露精子表面与卵子识别的装置,解除对顶体反应的抑制。男性生殖管道中能产生一种去能因子,当它与精子结合后,即妨碍精卵识别,阻止顶体反应的发生,精卵不能结合,从而使精子丧失受精能力,即去能。去能因子主要是精囊腺分泌的一种糖蛋白,而女性生殖管道中的 β 淀粉酶、 β 葡萄糖苷酸酶、胰蛋白酶及唾液酸酶均可消除去能因子的活性。因此,精子进入女性生殖道后,去能因子可被去除而使精子获能。只有获能的精子才有受精的能力。

2. 顶体反应

顶体反应是获能的结果。精子发生顶体反应时,顶体外膜及其表面精子膜发生多点融合,融合处形成许多膜包囊泡,随之顶体破裂,顶体内容物释放,顶体内膜完全暴露,最终顶体内膜与精子膜融合。

顶体是高尔基体的衍生物,位于精子核前部。顶体内的顶体内含物为多种酶组成的顶体酶复合系统,包括与受精有关的主要酶:透明质酸酶、顶体素、放射冠分散酶、精子神经酰胺酶和酸性磷酸酶。其中以顶体素研究较为透彻、深入。

顶体素为一类丝氨酸蛋白水解酶,人顶体素分子量约为 30kDa,通常以酶原形式结合于顶体内膜,在精子结合于透明带后被活化为顶体素。也有一种观点认为,获能也能使精子顶体素酶原激活,并转移至精子膜表面。顶体素可使透明带分解,以利于精子穿过透明带。宫颈黏液中的抗蛋白酶抑制剂和抗凝血酶可抑制顶体素酶解活性,抑制精子穿过透明带。然而,近期有报道,顶体素基因敲除的小鼠的精子仍能穿透透明带,这表明可能存在其他因子降解透明带。

研究者按顶体反应启动的刺激因素性质,将顶体反应分为自发性顶体反应 (spontaneous acrosome reaction, SAR) 和诱导性顶体反应 (induced acrosome reaction IAR)。自发性顶体反应指精子在获能后,未与卵子接触就已自发性发生了顶体反应;诱导性顶体反应指精子在获能后,与卵相互作用在透明带诱导下,或在体外由诱导剂作用,诱发的顶体反应。

大量研究表明:只有顶体完整的精子才能识别、结合并穿透透明带;在接触透明带之前已发生顶体反应的精子,不能识别、结合透明带,从而失去受精能力。一份

精液中的精子处于不同的成熟状态,或者有一些精子存在结构和功能上的缺陷,使同份精液内的精子不会全部呈现同一时间的获能与顶体反应。显示高水平自发性顶体反应的精液可能受精能力低。但适量的自发性顶体反应对受精是有意义的,也是必需的。自发性顶体反应精子释放的顶体酶系可分散放射冠,使顶体完整的精子能顺利通过放射冠与透明带接触。

3. 获能与顶体反应的调节

精子获能及适时有效的顶体反应是成功受精的前提。尽管国内外对获能和顶体反应从现象到机制进行了多年大量研究,积累了许多有价值的资料,但至今仍未完全阐明。目前多数研究者认为,作为一种细胞生理活动,获能和顶体反应也一样是由于精子外刺激因子作用于精子膜,经膜信号系统介导,触发一系列精子内级联反应的结果。

(1) 获能和顶体反应的影响因素:在生理条件下,获能和顶体反应均发生于雌性生殖管道。雌性生殖管道内的许多成分,如子宫液、输卵管液、卵泡液、放射冠和透明带,都能促进获能和诱导顶体反应。但由于体内研究较为困难,有关资料多由射出精子体外培养时获得。

1) 离子作用:许多离子如 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 和 Zn^{2+} 对精子获能和顶体反应有重要影响。

Ca^{2+} : Ca^{2+} 是细胞第 2 信使,细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]$)的改变是细胞内生理功能实现的重要物质基础,也为多种受体激活后信号传递过程的中心环节。大量研究证实,精子获能与顶体反应有赖于精子内游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高,维持精子有一定水平的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 是获能和顶体反应的关键。

目前,已知许多促进获能和诱导顶体反应的介质都是通过刺激 Ca^{2+} 大量内流,使精子 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高而得以实现的,如肝素、透明带和孕酮。

精子 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高主要是胞外 Ca^{2+} 内流。在精子膜上存在电压依赖性钙通道(VD-CC)。精子膜去极化,可以使 VDCC 开放,致 Ca^{2+} 内流,从而使 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高,促进精子获能和顶体反应。同时,精子膜上也有受体介导钙通道(RDC),受体通过 G 蛋白与钙通道相偶联。如透明带与精子膜相应受体结合后,通过 RDC,刺激 Ca^{2+} 内流,从而诱发顶体反应。G 蛋白激活抑制剂百日咳毒素 PTX 可阻断透明带诱导的精子顶体反应。也有实验表明,精子膜 Ca^{2+} -ATPase 活性被抑制,致 Ca^{2+} 外流减少,在精子获能及顶体反应过程中同样起着重要作用。

最近有报道认为,精子外 Ca^{2+} 内流对获能至关重要,但对诱发精子顶体反应并非必需。如在不含 Ca^{2+} 介质中,PKA 激活剂双丁酰 cAMP(dbcAMP)、PKC 激活剂双丁酰 cGMP(dxGMP)和 PKC 激活剂佛波酯能诱导获能精子的顶体反应。当然,这并非说明精子内 Ca^{2+} 对顶体反应没有意义;相反,维持精子内一定水平 Ca^{2+} 浓度,是诱导顶体反应的必要条件。

一般认为,精子内 Ca^{2+} 主要是通过以下途径发挥作用:①激活 PKC 和磷脂酶 A_2 ,诱发膜脂成分改变,使精子膜能与顶体外膜相融合;② Ca^{2+} 直接结合于顶体外

膜,中和其磷脂极性端负电荷,以利于顶体外膜与精子膜融合;③ Ca^{2+} 作用于膜融合相关蛋白,使其构象变化,而促进精子膜与顶体外膜融合。

Na^+ :对于获能和顶体反应, Na^+ 是不可缺少的。在高 Na^+ 溶液中,获能和发生顶体反应的精子数量及速度都大幅度增加;以 Na^+ 载体莫能菌素 monensin,和精子共孵育,可迅速升高精子内 Na^+ 浓度,加速精子顶体反应的发生,等等。 Na^+ 促进获能和顶体反应的作用机制可能是:①精子内 Na^+ 水平升高造成精子内pH值升高,升高精子内的pH值可促进精子内钙池释放 Ca^{2+} ,使 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上升;②增加 Na^+ 量使溶液离子强度升高,促进精子膜去能因子的丢失,加速精子获能和顶体反应。

K^+ : K^+ 在精子获能和顶体反应中也发挥重要作用。但 K^+ 是作用于获能或/和顶体反应尚不能肯定,而且 K^+ 的作用具有种属差异性。如大鼠、小鼠、仓鼠、人等精子获能和顶体反应依赖于 K^+ 的存在,而豚鼠精子获能和顶体反应不需要 K^+ 。 K^+ 促进获能和诱导顶体反应,可能是由于胞外 K^+ 激活精子质膜上的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶,促进 K^+ 内流,从而加速获能,诱导顶体外膜和精子质膜融合,使精子发生顶体反应。阻断 K^+ 内流的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶抑制剂毒毛旋花苷 G(ouabain)可阻止仓鼠精子顶体反应的发生,而 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶激活剂尼日利亚菌素(nigericin)能促进 K^+ 内流,加速精子发生顶体反应。

pH值:细胞内pH值也是影响细胞生理活动的重要因素。许多介质在诱导获能和顶体反应中,不但有 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,而且有精子内pH值上升。精子内合适的pH值对精子获能和顶体反应的作用可能与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 一样重要。影响精子内pH值的因素有很多,如 HCO_3^- 、 Cl^- 、 H^+ 、 Na^+ 等。

此外, Zn^{2+} 能通过稳定精子膜或直接抑制顶体酶活性而抑制精子获能。

2) 蛋白质、激素和生物活性物质作用:

白蛋白:白蛋白能促进、支持精子获能和顶体反应。所以,多年来白蛋白作为获能不可缺少的物质常规应用于体外模型。多数人认为,白蛋白可能是通过吸附去除精子质膜的胆固醇,降低膜流动性,从而发挥其作用。但也有一种观点认为,并不是白蛋白去除精子质膜的胆固醇,而是转脂蛋白将精子质膜的胆固醇转移至白蛋白,白蛋白是作为胆固醇受体的角色起作用。

孕酮:孕酮促进获能和顶体反应的作用早在1989年就被证实,随后的大量研究表明,孕酮的这种作用效应不是通过其核内受体而是通过其膜受体直接产生的,但与其他顶体反应诱导剂一样,孕酮也触发胞外 Ca^{2+} 大量内流,导致精子内 Ca^{2+} 浓度快速升高。关于孕酮促使 Ca^{2+} 内流的机制尚未完全阐明,有人提示精子膜上有两个与顶体反应相关的孕酮受体:其一,介导 Ca^{2+} 内流;其二,介导 Cl^- 外流。近期的研究显示,精子顶体区质膜存在GABA-A受体 α 亚单位,该亚单位有孕酮结合位点。孕酮作用于精子GABA-A受体后,可触发 Cl^- 外流,而 Cl^- 外流是孕酮诱导精子顶体反应的基本因素之一;同时,孕酮可首先促进精子赤道区 Ca^{2+} 水平迅速增加,随后 Ca^{2+} 被扩散至整个精子头部,而GABA-A受体、 Cl^- 通道阻滞剂能部分抑制孕酮介导的该过程,这表明 Cl^- 外流与 Ca^{2+} 内流有关,可能是 Cl^- 外流导致

精子膜去极化,而膜去极化引发电压依赖性钙通道开放,促使 Ca^{2+} 内流。也有人提示,孕酮可降低膜稳定性,从而促进获能和顶体反应。

体外观察还显示,血小板激活因子 PAF 及其代谢产物溶血性 PAF、催乳素(PRL)、透明质酸、肝素、前列腺素等,对精子获能和顶体反应都有促进作用。

3) 雌性生殖管道的影响因素:雌性生殖管道是精子体内获能和顶体反应的场所。在雌性生殖管道中,有许多生物活性物质包括上述的离子成分、蛋白质都对精子获能和顶体反应有重要作用。

宫颈黏液:以上游法筛选运动精子,再使其穿越宫颈黏液,发现穿越宫颈黏液的精子,经透明带诱导后顶体反应率显著高于未穿越宫颈黏液的运动精子,但二者自发性顶体反应率无显著性差异。这表明宫颈黏液能促进精子获能,但不诱导顶体反应。宫颈黏液中的 Ca^{2+} 、葡萄糖、游离脂肪酸、磷脂在营养精子的同时,也可能与其获能有关。

子宫:子宫腔液内的蛋白质(主要是白蛋白和 γ -球蛋白)、磷脂,可与精子表面的胆固醇结合,这种结合可促进获能,而子宫腔液内的黄体酮可抑制这种作用。

输卵管液和卵泡液:很早人们就发现,输卵管液和卵泡液能促进精子获能,并诱导精子顶体反应,这与它们的离子成分及其内含的孕酮、白蛋白、转脂蛋白、前列腺素、肝素、透明质酸等有关。而输卵管上皮还能分泌一种特异性糖蛋白 OGP, OGP 与公牛精子共孵育,能使公牛精子获能率提高 2 倍,并显著增加获能精子穿卵率。

透明带(ZP₃):目前已证实,纯化的未受精卵透明带在体外能诱导精子顶体反应,但 ZP₁、ZP₂ 没有这种能力。ZP₃ 结合于精子膜相应受体,激活受体偶联 G 蛋白,从而诱发精子顶体反应。蛋白水解酶处理 ZP₃,不影响 ZP₃ 结合精子膜能力,但抑制了 ZP₃ 诱导精子顶体反应的能力,这说明 ZP₃ 结构的完整性是其诱导精子顶体反应的基本条件。

(2) 获能顶体反应与精子信号传导系统:一些生物活性物质,与精子膜受体相识别、结合,通过受体偶联 G 蛋白介导,将信号传递至精子内效应器包括腺苷酸环化酶(AC)-cAMP 途径和磷脂酶 C(PLC)-三磷酸肌醇/二酰甘油(IP₃/DAG)途径,调控精子获能和顶体反应。

1) G 蛋白:G 蛋白即 GTP 结合蛋白,由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成, α 亚基是 G 蛋白的活性部分,为功能亚基,不同的 G 蛋白有不同的亚基,而 β 和 γ 亚基变化不大。哺乳动物和人精子质膜及顶体膜含有 G 蛋白,主要为 G_i 蛋白,也有 G_z 蛋白。前已述及,IP₃ 诱导精子顶体反应,即为 G_i 蛋白偶联受体介导的精子内信号传递过程。

2) AC-cAMP 途径:AC-cAMP 途径调控精子获能和顶体反应的重要证据有:①精子膜含有 AC,获能时伴有精子内 cAMP 水平升高和蛋白质磷酸化增强;②AC 激动剂 forskolin 可提高人精子顶体反应率,而其抑制剂腺苷能降低精子顶体反应率;③外源性 cAMP 类似物 db-cAMP 可诱导精子顶体反应,而蛋白激酶 A 抑制剂 H-8 能阻断 db-cAMP 对顶体反应的诱导作用。

3) PCL-IP₃/DAG 途径 PLC 在信号传导中有重要作用,它有介导许多激素和部分生长因子的作用。PLC 激活可以导致膜磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)水解,进而产生 1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)和二酰甘油(DAG),IP₃ 能使胞内储 Ca²⁺ 系统释放 Ca²⁺, [Ca²⁺]_i 升高,而仍存在于细胞膜中的 DAG 则协同 Ca²⁺ 激活 PKC。

综合文献报道,PLC-IP₃/DAG 途径在精子获能和顶体反应中也起调节作用,其依据有:①精子膜存在 PLC,PLC 在获能和顶体反应中起促进作用;②人、牛精子有 PKC 分布,PKC 的激活依赖于 DAG 和 Ca²⁺,而 PKC 活性与顶体反应率高度正相关;③PKC 激活剂佛波酯(TPA)能促进获能和诱导顶体反应。

综上所述,AC-cAMP 途径和 PLC-IP₃/DAG 途径都在获能和顶体反应中发挥作用,并且有可能存在协同效应。

二、透明带

哺乳动物和人卵透明带(zona pellucida,ZP)是包绕生长卵泡的卵母细胞、卵子、着床前胚胎的一层半透明糖蛋白结构,它对精卵识别、结合、穿透过程以及阻止多精受精和保护着床前胚胎等方面有关键性作用。

1. ZP的结构和生化组成

哺乳动物中研究最多的是小鼠透明带(mZP)。现已知道,mZP 主要由三种糖蛋白组成,按分子量从大至小分别称为 mZP₁ (200kDa)、mZP₂ (120kDa)、mZP₃ (83kDa)。电子显微镜观察发现,透明带是一层具有一定通透性的半透明多孔状结构,小鼠透明带厚约 7nm,三种透明带形成长约 2.5nm 的均匀互连细丝,每条细丝都含有一串念珠样结构,其单体为 ZP₂/ZP₃ 的异二聚体,而细丝再与 ZP₁ 的同源二聚体相互交织成网状结构。

比较不同动物的透明带基因结构,和由此推测的各蛋白质一级结构,可以发现以下信息:①哺乳动物之间的三种透明带 ZP_A、ZP_B、ZP_C,各基因家族的外显子组成、编码区长度和核苷酸序列都高度同源;但同种哺乳动物的 ZP_A、ZP_B、ZP_C 基因之间同源性极少。②各种动物的 ZP_A、ZP_B、ZP_C 蛋白家族都含有数目相近的 O-和 N-连接糖基化位点,跨膜区羧基端有极端疏水区。③透明带基因家族编码区的保守性决定哺乳动物透明带蛋白具有相似的三维结构,但各物种透明带蛋白之间也存在一些同源性较小的、特异性的生物学功能区域。这些区域可能和精卵结合的物种特异性有关(表 2-1)。

原位杂交显示,mZP₁、mZP₂ 和 mZP₃ 仅表达于小鼠卵母细胞,而不表达于卵泡细胞。原始卵泡的卵母细胞可检测到 ZP₂ 的转录产物,而当卵泡开始生长时其卵母细胞能检测到 mZP₁、mZP₂ 和 mZP₃ 的转录产物,至卵泡发育至中等大小时,卵母细胞的三种转录产物达到最高水平;而后,随着卵泡的成熟,卵母细胞的三种转录产物水平同步下降,这表明小鼠透明带基因为协同表达,并且这种表达可能为共同因子所调控。

表 2-1 哺乳动物 ZP 特性

种类	ZP 成分	分子量/kDa	等电点
小鼠	ZP ₁	200/185	4.1
	ZP ₂	120/140	5.2
	ZP ₃	83	4.7
	ZP ₄	205	
大鼠	ZP ₂	119	
	ZP ₃	115	
	ZP ₄	103	
豚鼠	ZP ₂	208	
	ZP ₃	56	
	re ₁	85	
家兔	re ₂	75	
	re ₃	55	
	ZP ₁	82/90	5.3
猪	ZP ₂	61/65	5.4
	ZP ₃	55/55	4.7/5.2
	ZP ₄	21/25	5.6
	ZP ₁	90~110	4.4~4.5
人	ZP ₂	64~78	4.5~4.6
	ZP ₃	57~73	4.2~4.4

2. ZP 的生物学功能

(1) 精卵识别和结合: ZP 是哺乳动物和人精卵特异性识别、结合的重要物质基础。有许多研究表明, ZP₃ 参与了精卵识别、结合, 为精子的第 1 受体。以 ZP₃ 抗体预先处理卵或以 ZP₃ 先处理精子都能有效地阻断精卵相互作用, 具有精子受体活性的 ZP₃ 功能区主要是其糖链部分, 而非肽链部分。在小鼠中, 可能是 m ZP₃ 的 O-连接寡糖链末端的半乳糖残基和 β 链末端 GlcNAc 残基起关键性作用; 在人类, 可能是 ZP₃ 糖链末端甘露糖残基发挥主要作用。有实验表明, 除去 ZP₃ 的 O-连接寡糖链, 会破坏精卵识别功能; 然而去除 ZP₃ 的 N-连接寡糖链, 对精卵识别没有影响。ZP₃ 与精子结合后, 诱导精子发生顶体反应。

(2) 阻止多精受精: 顶体反应的精子能识别、结合于卵 ZP₃, 因此, ZP₂ 被称为精子第 2 受体。当精卵结合后, 皮质颗粒释放糖苷酶及其他蛋白酶, 裂解 ZP₃, 使 ZP₃ 分子空间构象发生变化, 失去了作为精子受体的活性, 使此后的精子不能识别、结合于透明带, 防止了多精受精的发生。

(3) 保护着床前胚胎: 受精后的 ZP 结构仍然完整, 这有利于保护胚胎顺利通过输卵管进入子宫。若 ZP 受损或过早脱落, 则会导致胚胎死亡。进入子宫后, 在化

学性修饰以及胚胎生长的机械性压力共同作用下,使胚胎能从透明带中释放出来,从而有效地着床。

三、受精与着床

(一) 受 精

受精(fertilization)是一复杂而严格有序的生理性过程。广义的受精包括:①精卵识别;②顶体反应;③精卵膜融合;④精卵核融合(图 2-30)。

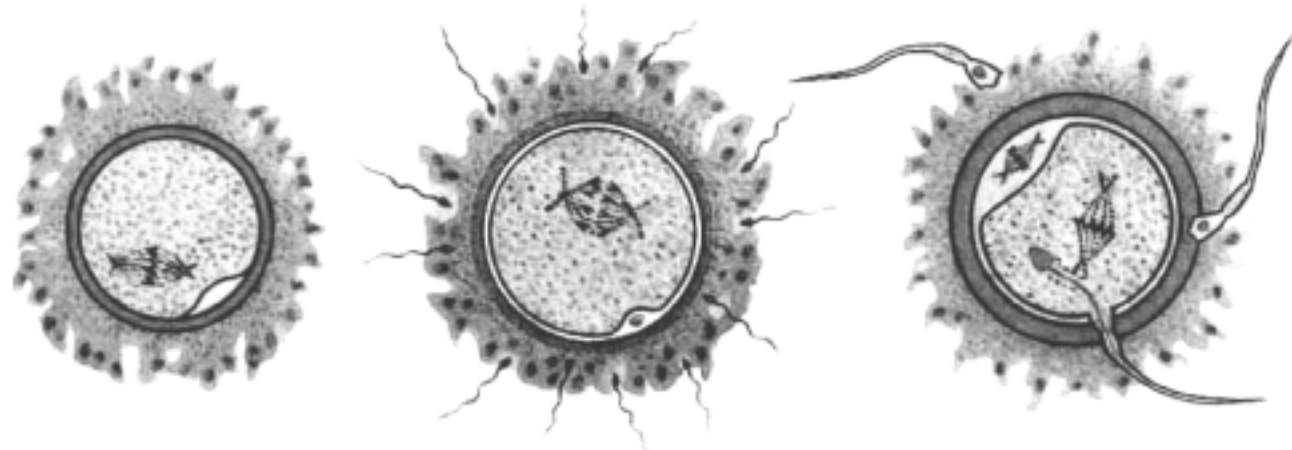


图 2-30 受精过程

卵母细胞成熟到能接受精子穿入时,必须具备两个条件:①卵母细胞内的皮质颗粒(cortical granule)向卵母细胞表面移动,直到紧贴在卵膜下面。②构成卵丘的颗粒细胞能产生一种雄原核生长因子,它通过缝隙连接进入卵母细胞内,只有含有生长因子时,精子穿入后,精子核才能解聚成雄性原核。

1. 精卵识别

受精第 1 步是精子必须识别卵子。虽然精卵识别机制目前尚未完全阐明,但是已有大量实验揭示,精子头部质膜和卵透明带的糖基互补配对是构成同种精卵特异性结合的分子基础。卵透明带含有相应于精子膜表面的糖蛋白受体,即精子受体,主要是 ZP₃(前已详述);而精子膜存在相应于精子受体 ZP₃ 的卵结合蛋白。有关哺乳动物和人精子卵结合蛋白的研究已取得了一些进展。一般认为,精子卵结合蛋白的糖基是精卵识别的重要功能位点,而其多肽部分可能通过调节卵结合蛋白的立体构象,参与精卵识别,尤其在精卵种属特异性识别中发挥作用。这已为单糖或寡糖抑制体外受精的实验所证实,如外源性。α-甲基甘露糖、甘露糖、L-岩藻糖都能抑制大鼠体外精卵结合,这可能是由于这些外源性单糖竞争性结合了精卵表面的内源性糖基。

作为卵结合蛋白,它至少应该具备以下特征:①存在于顶体完整的精子质膜表面,并能结合于 ZP₃;②其抗体处理精子能阻断精卵识别和结合;③不能结合于受精卵的透明带;④基因敲除和转基因研究证实,其为精卵识别所必需。近年来,哺乳动

物精卵识别机制认识较为清楚的是小鼠,有证据表明, β -1,4-半乳糖基转移酶(β -1,4-galactosyl transferase,GT)、SP⁵⁶、p95 可能是小鼠精子卵结合蛋白的候补分子。

(1) GT:GT 广泛表达于体细胞和精子膜表面,它能与含 GlcNAc 末端糖基的糖蛋白结合。1990 年,Miller 等提出了一种小鼠精卵结合模式:获能小鼠精子,通过其膜表面 GT 和 mZP₃ 分子的 GlcNAc 结合,诱发精子发生顶体反应;发生顶体反应的精子与 mZP₂ 结合,并穿透透明带进入卵周隙;最后精卵膜融合,实现精卵核融合(图 2-31)。

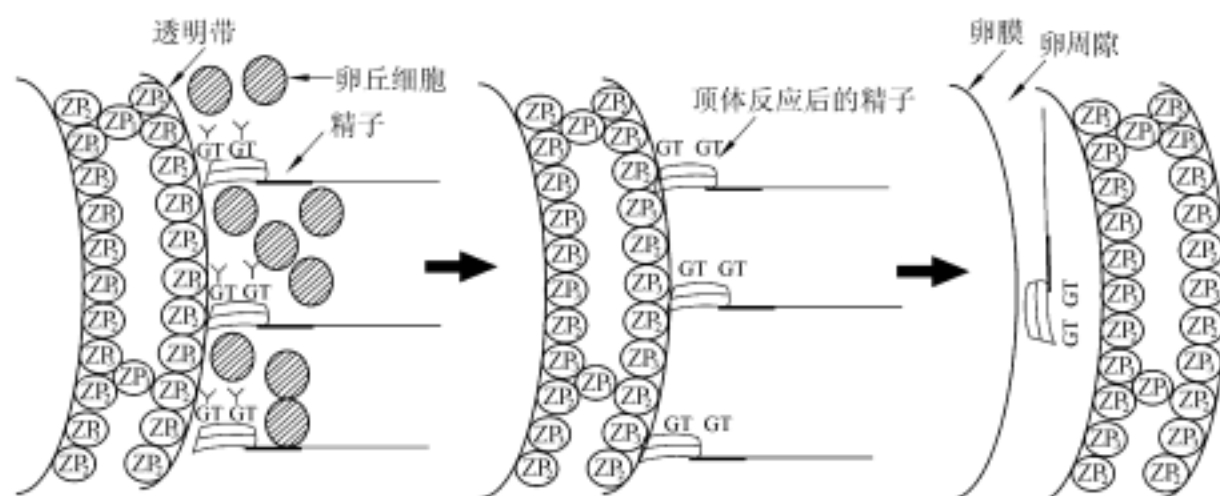


图 2-31 小鼠精卵识别、结合模式图

关于 GT 为卵结合蛋白的主要证据有:①顶体完整精子膜表面有 GT 定位;并且 GT 能选择性识别、结合于 ZP₃,而不与其他透明带分子结合。②小鼠精子受精能力与精子膜表面 GT 活性正相关。③外源性 GT、GT 抑制剂、抗 GT 抗体各自处理精子,都能阻断精卵结合。④抗 GT 抗体结合于精子膜表面 GT 后,能激活 GT 蛋白而诱导精子顶体反应。⑤皮质颗粒释放的 N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶可以修饰 ZP₃ 分子结合 GT 的位点,从而避免多精受精;该酶抑制剂能阻断该效应。但目前对 GT 在精子膜表面的精确定位、种族特异性、组织特异性以及诱导顶体反应的程度等方面还未能阐明。

(2) SP56:采用亲和层析方法,Bleil 等从精子质膜中分离得到了一种能共价结合于 ZP₃O-连接糖基的 56kDa 糖蛋白,命名为 SP56。以下一些证据表明 SP56 参与了精卵识别:①顶体反应前的精子质膜有 SP56 定位,并且 SP56 是外周膜蛋白;顶体反应后的精子质膜没有 SP56 分布。②外源性 SP56 能阻断精卵结合。SP56 的 mRNA 仅存在于精子细胞,为生殖细胞所特有。然而,SP56 作为小鼠卵结合蛋白候补分子仍有许多问题有待于进一步实验证实。如 SP56 是外周膜蛋白,它能否与精子信号系统相联系? SP56 在精卵结合过程中能否启动顶体反应? 抗 SP56 抗体处理精子能否阻断精卵结合? 等等。

(3) p95:p95 是 95kDa 的小鼠精子膜跨膜蛋白,它具有自身磷酸化和使精子内多种底物磷酸化的功能,有酪氨酸激酶活性。认为 p95 是小鼠精子卵结合蛋白的主

要证据有:①ZP₃能结合于p95,并能激活其作为酪氨酸激酶的活性;②ZP₃能使精子膜表面P95分子集中分布,结合后诱导了精子顶体反应;酪氨酸激酶抑制剂能抑制P95活性,并阻断顶体反应的发生;③精子顶体区质膜含有p95;④抗p95抗体能抑制精卵结合等。

2. 顶体反应

获能后的精子解除了对顶体反应的抑制和增加了膜的不稳定性。发生顶体反应时,首先是顶体膜外层与其相贴的精子质膜发生间断融合,接着顶体开始破裂,

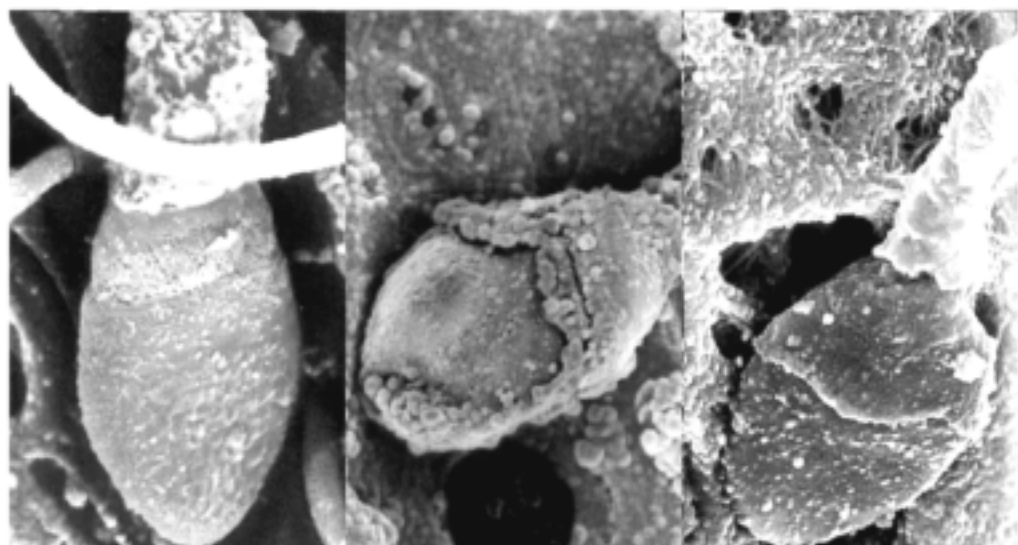


图 2-32 顶体反应

释出顶体酶(图 2-32)。顶体酶是总称,内含多种酶,作用也是多方面的,如透明质酸酶可使卵丘的颗粒细胞松散,放射冠分散酶可使放射冠的颗粒细胞散开,顶体素可在大量钙离子内流时被激活,它可分离透明带。因此,在顶体酶的作用下,精子即可穿过卵丘、放射冠、透明带而进入卵周围间隙(图 2-33),为精卵融合、形成受精卵创造条件。

3. 精卵膜融合

精子穿越透明带,进入卵周隙,随后精子膜与卵膜融合,精卵膜融合的具体过程和分子机制目前仍不十分清楚。体外观察发现,顶体完整的精子虽能结合于卵膜,但精子膜不能与卵膜融合,这说明顶体反应后的精子可能发生了膜表面结构和成分的改变,使精子膜能融合于卵膜。形态学研究表明,顶体反应后暴露的顶体内膜并不与卵膜融合,融合主要发生于精子顶体后膜与卵膜之间。有人认为,精子顶体后膜流动性较大,在顶体反应后,膜表面结构和成分或者发生了

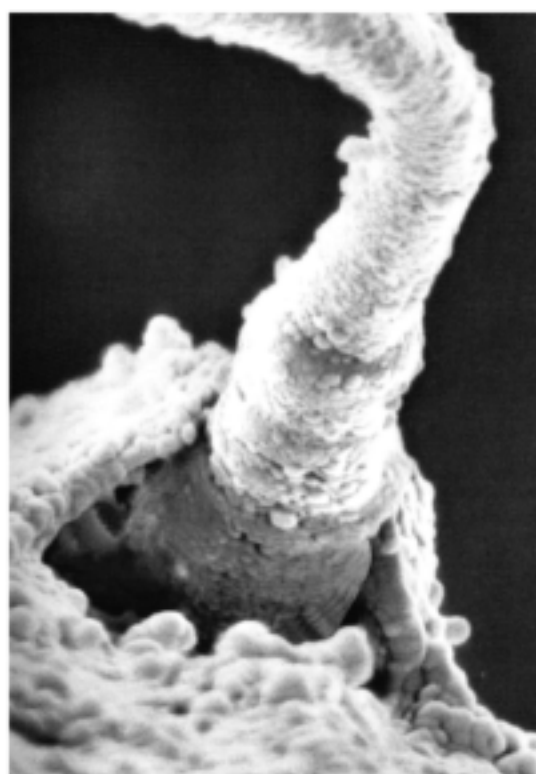


图 2-33 正在进入卵细胞的精子

修饰、再加工;或者有新的融合蛋白分布于其中。

大量研究资料表明,精卵膜融合是精子膜和卵膜表面互补配对的特异性细胞黏附分子介导的过程。如精子膜表面的受精素(fertilin)和卵膜表面的整合素(integrin)。

PH30 是第 1 个被认为受精素的精子膜表面融合蛋白。PH30 是含 α 、 β 两个亚单位的异源二聚体, β 亚单位有 disintegrin 结构域,能特异性结合于整合素,卵膜表面整合素主要为 $\alpha\beta$ 型。

目前认为,PH30 和整合素可能是精卵融合的黏附分子有以下一些证据:
①PH30 位于精子顶体后膜,抗 PH30 抗体抑制精卵膜融合;②外源性 PH30 β 亚位处理卵细胞后,精卵膜不能融合;③表达 $\alpha\beta$ 整合素的细胞能结合于小鼠精子;抗整合素 β 亚单位抗体抑制精卵膜融合;整合素亚单位基因敲除小鼠卵膜与精子膜融合能力下降 75% 等。当然,PH30 和整合素结合如何介导精卵膜融合仍一无所知。

4. 精卵核融合

(1) 卵子活化(activation):精卵膜融合后,精子核进入卵子,解除卵细胞代谢抑制状态,使卵细胞活化,重新进入代谢活跃状态,以形成新的生命个体,该过程称为卵子活化。哺乳动物和人卵子活化最显著的变化包括皮质颗粒释放和第 2 次成熟分裂完成。卵子活化机制是受精后激活磷酸肌醇信号途径,造成卵细胞内游离 Ca^{2+} 水平快速升高,从而激活 PKC,使卵膜去极化,卵细胞内 pH 值升高,使卵细胞激活并维持受精卵的正常发育(图 2-34)。

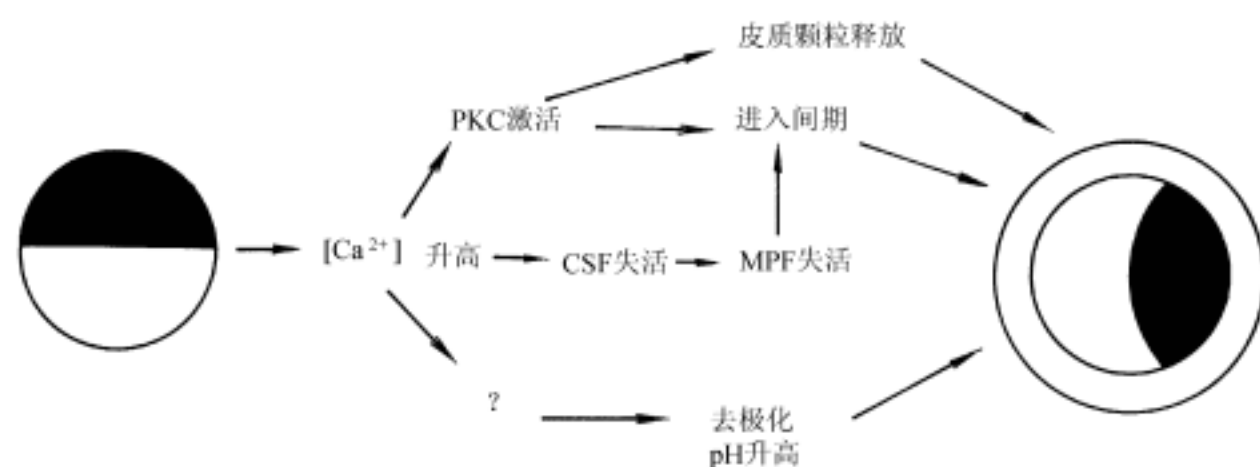


图 2-34 卵子活化机制示意图

皮质颗粒是位于卵膜下的膜被颗粒,含有多种水解酶和糖蛋白。卵子活化后,皮质颗粒边移并以胞吐方式释放。皮质颗粒的水解酶能修饰透明带结构,使透明带不能再与精子结合,即透明带反应;其糖蛋白与卵膜融合,改变了卵膜流动性及其结构,使其不再与精子膜融合,即卵膜阻断。因此,皮质颗粒的释放实际上阻断了多精受精,保证了一个精子与卵细胞受精的单精受精。

哺乳动物卵母细胞受精前处于第 2 次成熟分裂中期,卵子活化后,卵细胞内游

离 Ca^{2+} 浓度升高,导致细胞生长抑制因子(cytostatic factor,CSF)活性消失(CSF 为 *c-mos* 基因产物)。CSF 活性消失,造成 cyclinB 去磷酸化以及降解,随之成熟促进因子(maturation promoting factor,MPF)活性消失,磷酸酶活性增强,去磷酸化反应过程加强,诱导卵母细胞由 M 期向间期方向转化,完成第 2 次成熟分裂(图 2-35)。

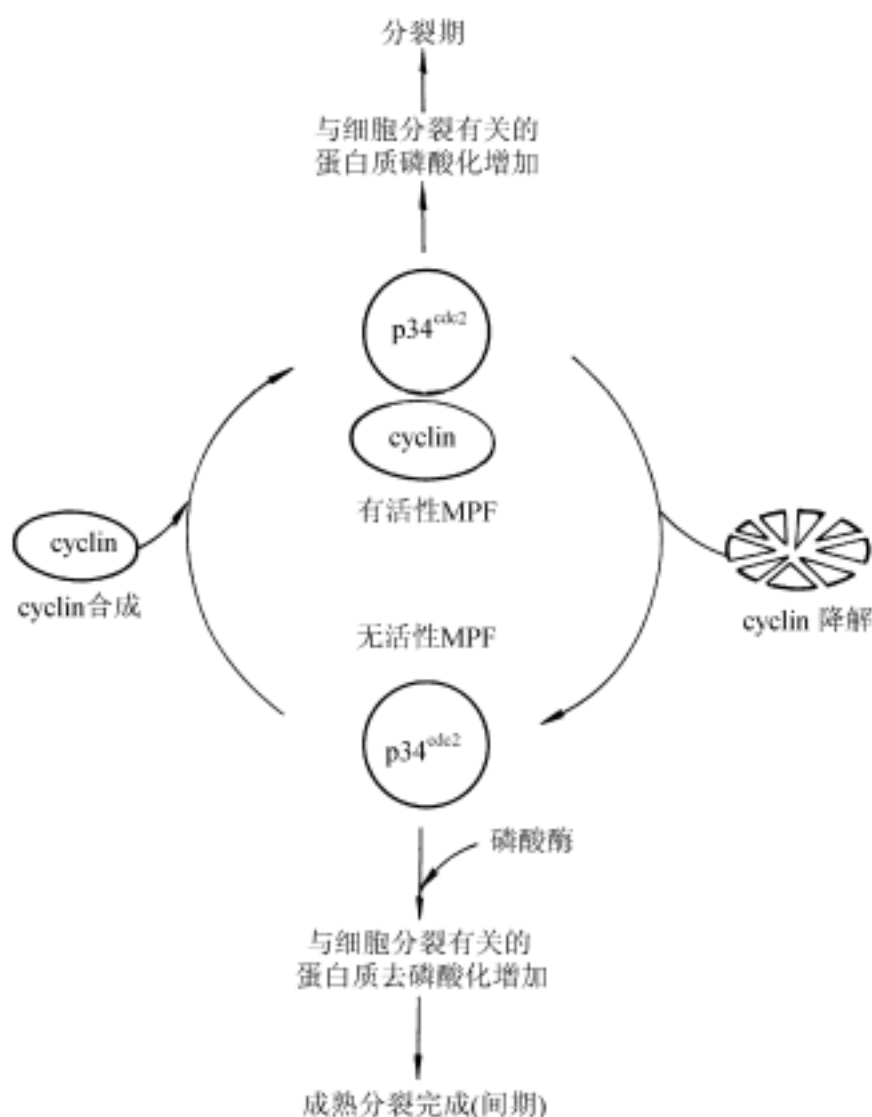


图 2-35 MPF 与卵母细胞第 2 次成熟分裂

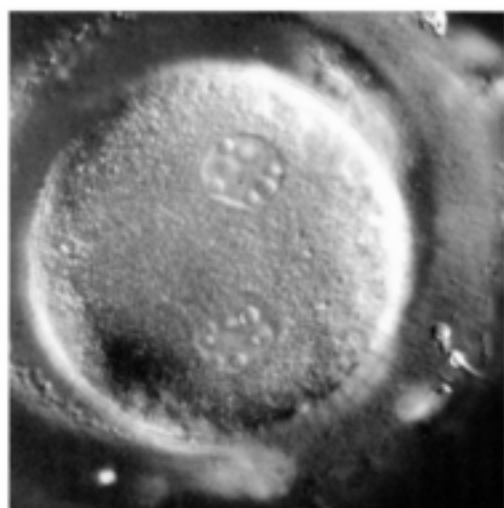


图 2-36 精原核与卵原核



图 2-37 精原核与卵原核的融合

(2) 精卵核融合:受精后,卵母细胞完成第2次成熟分裂,成为成熟卵子,其细胞核即雌原核。而精子核暴露于卵母细胞胞质中,因雌原核生长因子的存在而解聚形成雄原核(图2-36)。在卵母细胞骨架的作用下,雌、雄原核逐步靠近接触,接触部位的原核膜变成指状,相互交错对称并完全融合(图2-37);随后,染色体浓缩,原核膜破裂、消失,精、卵染色体组合于一起,形成了合子染色体组,受精至此结束。

(二) 着床(nidation, 植入 implantation)

着床是指胚泡通过与子宫内膜的相互作用侵入到子宫内膜的过程,孕卵于受精后的第3~4d进入宫腔,并在宫腔内游走2~3d,胚泡从透明带中脱出(图2-38),露出表面的滋养层。胚泡失去了透明带提高了着床能力。胚泡进入子宫腔后,要在子宫腔停留几天,目的是在子宫腔中寻找合适的位置进行侵入。孕卵只有在着床以后才能从母体血中获得充足的营养物质,以满足胚胎发育成足月胎儿的需要。因此,着床是胎生动物妊娠的一个重要环节,也是生殖生理学研究的重要方面。在着床过程中,包含相当复杂的形态学、生理学和生物化学的变化。

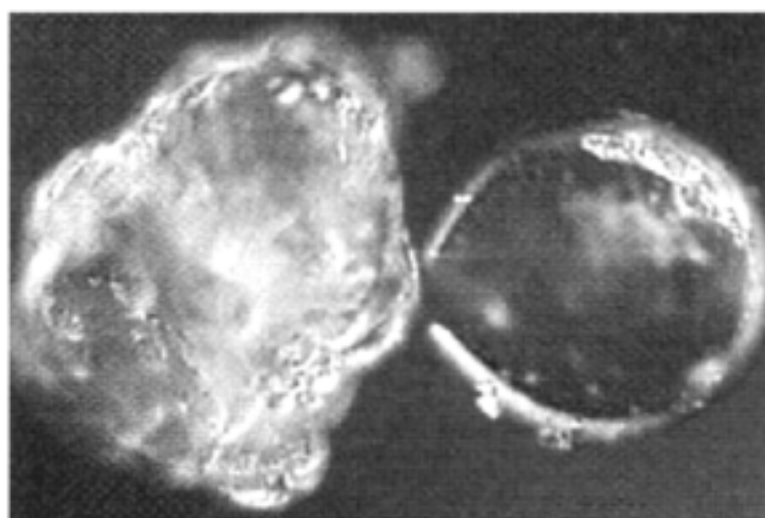


图2-38 胚泡从透明带中脱出

1. 着床的基本过程

着床前子宫内膜在雌激素与孕酮的作用下,发生着变化。主要表现为细胞的增殖、分化和分泌活动的出现和血液供应的增加。排卵后,随子宫内膜的分化,可在电镜下观察到子宫内膜上皮细胞上有许多指状突起,这种指状突起可能使宫腔上皮具有能吸附胚泡于表面的能力。同时,内膜腺体开始分泌一种黏多糖,有供应胚泡营养的作用。间质细胞分化成蜕膜样细胞,为着床后形成胎盘作准备。子宫内膜的血管也随着内膜的增殖而增长,变弯曲呈螺旋状,为胚泡着床做好血液供应的准备。此外,对大鼠的观察显示,如以D0为排卵日(动情期),孕D1-D2为受精卵在输卵管内下降期,在D3下降到子宫腔内,在D4于胚泡所在的局部出现子宫蓝色着色反应,这是因为子宫内膜在雌激素作用下,毛细血管增多、肥大,血管壁通透性增强的缘故。D5在着床部位的内膜表面上皮明显变薄,这种变薄一般认为是内膜上皮对异物的一种反应性现象,并不一定需要胚泡的存在。D6则在上皮基底膜破裂,

滋养层侵入到上皮下。由于植入的刺激和组织溶解时产生组织酶的作用下,内膜进一步增厚,血液供应更为丰富,腺体分泌更加旺盛,基质细胞肥大,胞质含有丰富的糖原颗粒,成为蜕膜细胞,这一系列的变化称蜕膜反应(decidual response)。此时的子宫内膜称蜕膜。一些学者认为,子宫内膜在妊娠后发生的蜕膜变化,是着床的准备状态;另一些学者认为,是内膜对滋养层侵入发生的上皮性防御反应。总之,蜕膜细胞在向受精卵供应营养中起重要的作用。在蜕膜形成后,子宫腔内液的黏蛋白及电解质的浓度增加,对胚泡固定于内膜也起着重要的作用。电镜观察人类蜕膜中有三种不同的细胞:一种是小细胞,属于未分化的细胞;一种中等大小,胞质内含有丰富的糖原及脂类物质;第3种细胞胞质富含核糖体与线粒体。在蜕膜细胞之间可见PAS染色阳性的抗淀粉酶的沉积物,沉积物是在细胞质中形成以后,释放到蜕膜细胞周围的,其作用是保护蜕膜细胞不受滋养层的侵犯。着床前后,子宫内膜的代谢也发生明显改变。排卵后,子宫内膜中糖原、糖蛋白与酸性磷酸酶含量很高,而核蛋白和碱性磷酸酶的含量减少。到胚泡与子宫内膜接触的时候,子宫内膜的代谢发展到高峰。

2. 着床机制

成功的着床有赖于胚泡与母体相互识别,胚泡发育与母体子宫变化的同步以及抑制母体的免疫排斥反应和母体接受性等一系列事件。这些事件又受到母体和胚泡的激素的调控。至今,对于着床过程中一系列重要事件的发生机制及其调控已进行了较为广泛的研究,但是其中许多问题目前还没有完全清楚。

(1) 着床的激素控制:在人类月经周期的卵泡期,雌激素能使子宫内膜上皮和间质增殖;排卵后,形成黄体,由黄体分泌的孕酮及少量雌激素,能引起腺上皮的分泌和间质细胞的蜕膜样变。如妊娠,在合体滋养层细胞分泌的绒毛膜促性腺激素的作用下,卵巢黄体变成妊娠黄体并继续分泌激素,使子宫内膜发生进一步的蜕膜样变,为胚泡着床后的发育提供良好的条件。

近年来,对于人类子宫内膜中甾体激素与其受体的相互作用进行了较为详细的研究。月经期刚一结束,子宫内膜细胞胞质内即出现高浓度的雌激素受体。到内膜增殖期的晚期,雌激素的核受体浓度明显增加。雌激素-受体复合物在核内储留很快就引起依赖于雌激素的核酸和蛋白质的合成,其中包括孕酮受体的合成。排卵后,随血浆孕酮水平升高,在分泌早期,大量胞质的孕酮受体就向胞核转移。一般认为,分泌期早期孕酮受体在核内的长期储留,与随后引起着床所需要的子宫内膜变化有关。但是,孕酮抑制雌激素受体的补充,也抑制其自身受体的补充,因此在分泌晚期的子宫内膜中,受体数量普遍减少。所以,人类着床期分泌内膜的发育是一系列激素的变化以及激素与受体相互作用的结果。在这一系列过程中,开始是月经后胞质中雌激素受体的浓度增加,而以分泌中期时孕酮-受体复合物的核转移告终。

卵巢甾体激素在着床中具有重要作用,而卵巢的功能又受脑垂体和下丘脑的调节,因此,脑垂体和下丘脑也都参与着床过程。

(2) 胚泡在着床中的作用:胚泡是引起子宫内膜着床反应的刺激物,它能使近

处的子宫内膜血管扩张,使间质细胞发生巨大变化,以适应胚泡着床的需要。有人设想胚泡对着床的刺激作用,可能是通过损伤子宫内膜而引起组织酶释放的结果。此外,也有人认为,引起着床反应的刺激物是胚泡分泌的蛋白水解酶,或是胚泡产生的二氧化碳气体。例如,胚泡排出的二氧化碳可转移到子宫内膜,再转移进入子宫的微血管,在胚泡附近形成一个二氧化碳的梯度场,由于碳酸酐酶和孕酮的参与,干扰了碳酸盐和碳酸氢盐的平衡,改变了细胞内环境的酸碱度,从而使基质发生蜕膜反应。其次,二氧化碳的出现,可使滋养层细胞和内膜上皮细胞表面的黏蛋白的黏性升高,因而加固胚泡的黏着。

此外,胚泡不仅是引起内膜发生巨大变化的刺激物,而且胚泡本身还能合成和分泌某些激素。母体的激素环境对于着床过程很重要。胚泡激素虽然量很少,但由于距离短,局部效果比较明显,因而对着床过程十分重要。

人早期胚泡能产生绒毛膜促性腺激素(hCG),在着床开始时就可以从孕妇血中测出hCG,它可以作为胚泡的信息,在母体的妊娠识别中起重要作用,并具有促进和维持妊娠黄体功能的作用。

胚泡也有合成某些甾体激素的能力,现已证明,在多种动物胚泡中,都存在合成甾体激素所需要的酶,如 Δ^5 和 Δ^4 途径中的 3β -羟甾脱氢酶及 17β -羟甾脱氢酶。基于这些证据,Dickman提出了胚泡分泌的雌激素是控制着床的一个必不可少的因素。他认为,对于全子宫和着床局部,着床的准备存在着明显的差异。在预期的着床点处,着床前呈现出一种炎症反应(如毛细血管的通透性增加)。已证明的是,孕酮可以起到抗炎剂的作用,对于全子宫来说,由于孕酮占优势而使着床局部的炎症反应受到抑制。因此,只有降低着床局部的孕酮优势,才有可能出现着床前的炎症反应。而这种拮抗孕酮作用的物质是雌激素。其原因是:①雌激素能降低孕酮的作用;②胚泡含有雌激素后可见局部毛细血管的通透性增加;③着床处子宫中的雌激素浓度高于子宫其他部位;④向妊娠子宫注入雌激素后可见毛细血管的通透性增加;⑤向妊娠子宫中注入抗雌激素(CI-628),可抑制着床,而同时注入 17β -雌二醇则能拮抗这种抑制作用。因此,认为胚泡雌激素是调节着床的一个关键因素。

(3) 子宫接受性与着床:子宫仅仅在一个极短的关键时期才允许胚泡着床,这个时期称为子宫的敏感期或接受期。当子宫处于接受期,子宫内膜发生多种变化。子宫的接受性受到雌激素和孕激素相互作用的调控。

孕酮对于子宫内膜的致敏和接受性是不可缺少的;少量雌激素的作用是使子宫内膜能接受和传递胚泡给予的信息;在雌激素作用的基础上,加上孕酮或同时加上孕酮与少量雌激素时,间质细胞很快出现细胞分裂现象。但这两种激素在含量和作用时间上的变化,又会改变子宫内膜的敏感性。这说明,子宫内膜接受胚泡的时限,不仅取决于卵巢的激素,内膜本身的反应也是一个重要的因素。

卵受精后,在输卵管内按一定的速度运行,同时向母体发出胚泡将进入子宫的信息,并维持黄体的功能,从而使胚泡进入子宫与子宫内膜的着床准备达到同步化,即胚泡在子宫内膜的接受期着床。显然,胚泡发育与子宫内膜的发育的同步是胚泡顺利完成着床过程的关键。

(4) 母体子宫液蛋白与着床: 近年的研究证明, 在着床前后, 子宫液中出现某些特殊蛋白, 并强调这些特殊蛋白对胚泡着床十分重要。其量和质均随卵巢甾体激素的改变而变化。

着床前后的子宫液中含有多种蛋白成分, 其中以子宫球蛋白最为特异, 它又称胚激肽(blastokinin)。实验证明, 胚激肽具有促进胚泡发育, 控制着床时宫腔与滋养层细胞蛋白溶解酶的分泌等作用。

(5) 子宫免疫抑制与着床: 胚泡的着床过程, 可以看做是一个异物物质种植的过程。子宫内膜为何对这个异物能表现出不排斥的现象? 在对于这个问题的研究中发现, 在子宫蜕膜组织中 T 淋巴细胞的数量很少。T 淋巴细胞行使的是细胞免疫功能, 主要作用表现为对异物移植物的排斥。人体妊娠时, 子宫蜕膜组织中的 T 淋巴细胞减少, 可说明妊娠时子宫的蜕膜存在着免疫抑制。

(6) 子宫内膜细胞外基质与着床: 近年来随着对细胞外基质研究的不断深入, 提出了细胞外基质中有很多起着接着作用的蛋白。目前对细胞外基质的研究证明, 它们在细胞增殖、移动、分化和细胞的免疫、肿瘤的转移、神经纤维的生长等方面有重要作用(详细内容见后附的综述)。

因着床过程类似肿瘤的浸润, 同时胚胎的生长也存在着细胞的增殖、移动和分化。所以, 在研究着床的机制时, 也把着重点指向细胞外成分即细胞间质部分。主要观察的有子宫内膜基质中的胶原蛋白(collagen)、纤维粘连蛋白(fibronectin)和层粘连蛋白(laminin)。观察结果发现, 细胞外基质随月经周期有明显的变化。具体表现为, 胶原蛋白与纤维粘连蛋白总量在分泌初期明显减少, 而层粘连蛋白总量在分泌期可见明显的增加。说明层粘连蛋白是胚泡着床时起重要作用的接着分子。

四、胎盘激素

胎盘是个多功能的器官。它将胎儿连于子宫, 并且是母体与子体间营养与代谢产物交换的场所。胎盘是母体与子体多种激素的靶器官, 而其本身也是一个内分泌器官。

(一) 人胎盘的结构

人类的胎盘属于血绒毛膜胎盘, 由胎儿的丛密绒毛膜与母体的基蜕膜紧密结合、共同构成。前者称胎盘的胎儿部, 表面光滑覆盖羊膜; 后者称胎盘的母体部, 表面粗糙。正常足月妊娠胎盘呈圆形或卵圆形, 直径 15~20cm, 平均 18.5cm。厚约 1.0~4.0cm, 平均 2.3cm, 中间厚, 向边缘逐渐变薄, 其周缘与绒毛膜相延续。其平均面积为 300cm^2 , 重量为 450~650g, 平均 500g, 约为足月胎儿体重的 1/7。

在胎盘的垂直切面上(图 2-39), 胎儿面羊膜下为丛密绒毛膜的结缔组织。可见约 40~60 根绒毛干, 而绒毛干又发出许多分支。绒毛干主支的末端发出细胞滋养层柱进入基蜕膜, 借助于细胞滋养层壳固定于子宫基蜕膜上, 称固定绒毛(anchoring villi)。绒毛伸入基蜕膜深部, 侵蚀破坏基蜕膜形成绒毛间隙, 其内充满

母体血,绒毛就浸浴在蜕膜的血池中。相邻的绒毛间隙由未被破坏的蜕膜组织所分隔,这就是胎盘隔(placental septum)。这种分隔是不完全的,故相邻绒毛间隙中的血液可相互沟通。

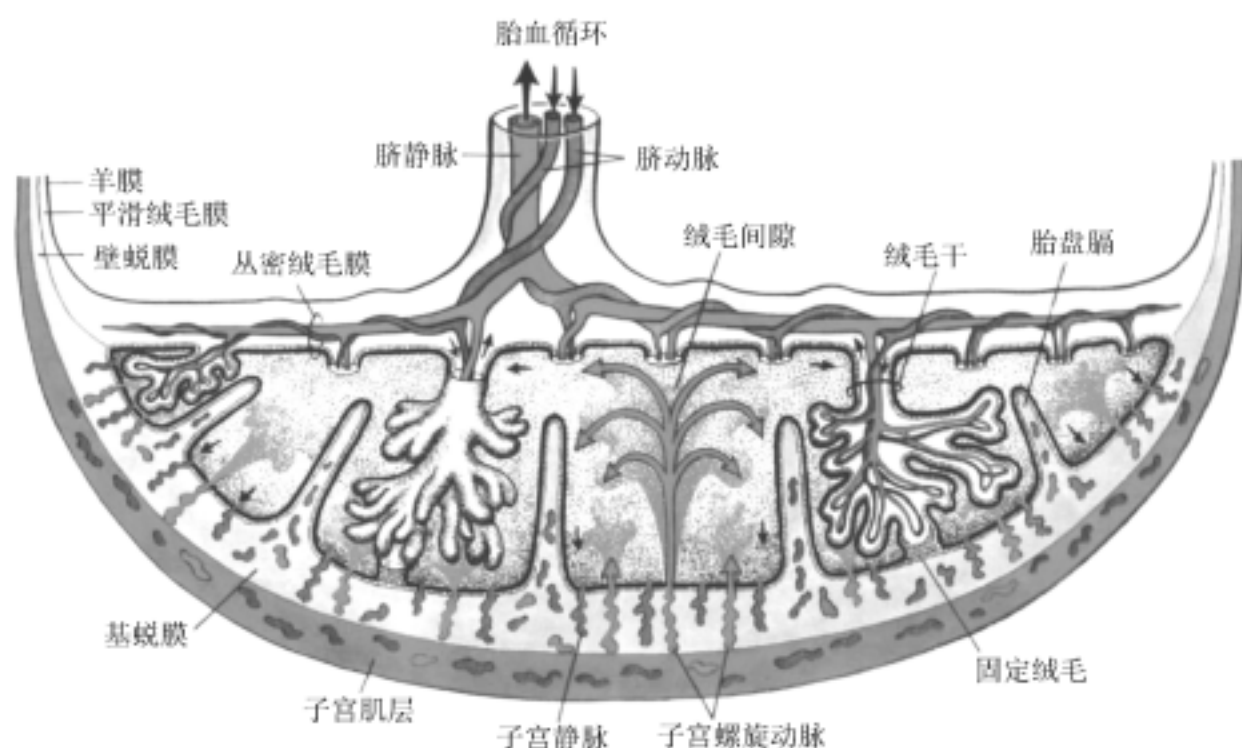


图 2-39 人胎盘结构模式图

(二) 胎盘激素

胎盘可以分泌多种物质,包括垂体激素样的激素、下丘脑激素释放激素样激素及多肽、类固醇激素、生长因子、细胞因子等生物活性物质。

1. 垂体激素样激素

(1) 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG): hCG 大量存在于孕妇的 plasma 和尿中, 是胎盘中最早发现的一种激素。1927 年, Asheim Zondek 从孕妇尿中发现此类激素, 起初认为是有母体垂体产生的, 但以后确认由胎盘产生, 并通过血液循环作用于靶组织, 最终从母体尿中排出。

hCG 是一种糖蛋白,其分子量在 36~ 40kDa 之间,由 α 及 β 两个亚基组成,两个亚基由二硫键连接。其中 α 亚基含有 92 个氨基酸,为非特异性的亚单位,除少量修饰外,与其他促性腺激素(如 LH、FSH、TSH 等)的 α 亚基结构基本相同。不同种属之间 α 亚基也具有相似性,如用来自不同种属的 α 亚基可与同一种 β 亚基相结合。 β 亚基含有 145 个氨基酸,具有特异性。hCG 的 β 亚基与人黄体生成素(LH)的 β 亚基在结构上非常相似,其中有 97 个氨基酸相同(图 2-40)。 β -hCG 在羧基端多出近 30 个氨基酸,该部位具有高度特异性,与 LH 不发生交叉。研究表明,此区域的缺失并不影响亚基间的相互作用或 hCG 与受体的结合。hCG 只有在 α 亚基与 β 亚基通过二硫键组合在一起时,才具有生物学活性,当其分解成两个亚基后便失去了

胎儿滋养层被母体血液中的抗体及免疫活性细胞识别而被排斥,对胎儿有免疫保护作用;体外培养研究发现,hCG 能抑制植物凝集素对淋巴细胞的刺激作用,从而推测具有抑制母体免疫细胞活性的功能,参与抑制母体对胎儿及胎盘组织的免疫排斥作用。

hCG 在临床中有广泛用途,如诱发排卵、治疗某些不育症、作为妊娠及妊娠相关疾病以及滋养层或滋养层肿瘤的诊断指标等。此外, β -hCG 在避孕疫苗的研究中取得了令人鼓舞的进展。

(2) 人胎盘催乳素(human placental lactogen,hPL):又称人绒毛膜生长催乳激素(human chorionic somatomammotropin,hCS)。在 20 世纪 60 年代由多个研究组研究,并从胎盘中分离出来。命名为催乳素是由于其可使假孕兔的乳腺泌乳,但在人此方面作用尚不确定。

hPL 是一种不含糖的单纯蛋白质激素,由 191 个氨基酸组成的单链,其中两个二硫键连接第 53 位与第 165 位和第 182 位与 189 位的胱氨酸。hPL 的分子结构与人垂体的生长激素(human growth hormone,hGH)和催乳激素基本相似,如 191 个氨基酸中有 162 个(85%)与 hGH 的相应位置相同,因此推测它们的基因来源于一个共同的祖先基因。hPL 的编码基因定位与 17 号染色体。

hPL 在妊娠 6 周时就可于母血中检测出来,以后随妊娠的进展和胎儿重量的增加而持续升高,在妊娠 36~37 周时达到高峰并一直维持到分娩;产后则迅速下降,分娩后约 7h 产妇血液中即不能测出。hPL 在母体血液中的含量,与胎盘的重量及胎儿的体重等呈正相关。在分泌高峰时,血中浓度可达 $5\sim 8\mu\text{g/ml}$;多胎妊娠中 hPL 的水平更高,在 4 胎和 5 胎妊娠时可高达 $40\mu\text{g/ml}$ 。足月胎儿血循环及羊水中也可测到 hPL,但低于母血中的浓度。通过免疫荧光技术与胎盘组织离体培养证实,hPL 由胎盘的合体滋养层细胞合成释放。原位杂交研究显示 hPL 的 mRNA 定位于合体滋养层细胞,在整个妊娠过程中,单个合体滋养层细胞中 hPL 的含量变化不明显,但由于合体滋养层细胞总量随妊娠过程而增加,hPL mRNA 在妊娠最后 3 个月比头 1 个月增加约 5 倍。

在整个发育期间,胎儿血中的 hPL 浓度都很低,羊水中浓度较高。妊娠晚期 hPL 在胎盘的产生率为 1g/d 左右,每天分泌达 300mg 之多,血浆中的浓度可高达 10mg/ml ,其半衰期很短,仅 19~30min。hPL 在血液中浓度之高,更新率之快,远远超过其他任何一种蛋白质激素。

hPL 的结构与 hGH 的相似使人们提出它参与母体代谢调节,并影响胚胎生长与代谢。研究表明,hPL 的促生长活性是 hGH 的 3% 左右,但其确实具有 hGH 样的促生长作用,如可使胫骨骨髓生长,体重增加等。此外,具有类似 hCG 的免疫抑制作用,抑制母体对胎儿的排斥等。

在临床上,目前主要用于对一些疾病的诊断,如滋养层细胞疾病和先兆流产等。

(3) 人绒毛膜促甲状腺激素(human chorionic thyrotropin,hCT):hCT 为一种碱性糖蛋白,分子量为 28kDa,是在人胎盘组织中发现的一种类似促甲状腺激素的

物质,其化学结构尚不很明确。hCT 的活性与垂体 TSH 相近,但二者的凝胶电泳行为不同,也不与人 TSH 发生交叉反应。目前对 hCT 的生理功能仍不很清楚,推测胎盘正常分泌的 hCT 可能有刺激母体甲状腺活动和刺激早期胎儿甲状腺生长的作用。

(4) 人绒毛膜促肾上腺皮质激素(human chorionic adrenocorticotrophic hormone, hCATH)及其他 ACTH 相关多肽:早在 20 世纪 50 年代,有人报道在胎盘提取物中有 ACTH 样的活性。但直到 1975 年才由 Genazzani 等证实人胎盘能合成 hCATH,与垂体 ACTH 抗体有交叉反应。在培养滋养层细胞时发现,细胞及培养基内的 ACTH 含量均增高,因此说明 hCATH 是由滋养层细胞合成,研究证实主要在合体滋养层细胞中合成。

利用多种技术证实,人胎盘中除了有 hCATH 外,还有 β 促脂素(β -lipotropin)、 β 内啡肽(β -endorphin)和 α 促黑激素(α -MSH),这四种物质是来源于同一前体糖蛋白。在胎盘中四种物质的比例,与垂体中叶和下丘脑中的比例相似,但不同于垂体前叶中的比例。有人认为,hCATH 是受绒毛滋养层细胞中的促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)刺激而合成和释放。目前有关 hCATH 的生理功能尚不清楚,推测它可能有助于母体和胎儿垂体对抗妊娠和分娩过程中生理性应激的反应。

2. 下丘脑激素释放激素样激素及多肽

(1) 人绒毛膜促性腺激素释放激素(human chorionic gonadotropin releasing hormone, hCGnRH):最早于 1975 年在人胎盘中被发现,主要存在于胎盘的细胞滋养层细胞中,但也有报道在胎盘合体滋养层细胞层中被显示出来。体外培养实验表明,合体滋养层细胞既能释放 hCG-RH,也能合成。其浓度随妊娠时间而增高,妊娠早期绒毛中 hCG-RH 与 hCG 的浓度变化呈平行关系。体内外实验研究表明,hCG-RH 可刺激 LH/hCG 的产生。hCGnRH 刺激体外培养的胎盘绒毛释放 hCG,可能对胚泡着床及维持早期妊娠有重要作用。

(2) 人绒毛膜促甲状腺素释放激素(human chorionic thyrotropin releasing hormone, hCTRH):分别由 Gibbon 等(1975 年)和 Shambaugh 等(1979 年)在人胎盘的提取物中发现。研究发现该物质与下丘脑 TRH 极为相似,但其生物活性和免疫活性仅为人工合成 TRH 的 30% 左右。研究证实,hCTRH 可刺激大鼠 TSH 的释放。hCGnRH 可能参与调节胎儿甲状腺的发育。

(3) 类促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH):人胎盘合成并分泌类 CRH,其免疫特点及生物活性与下丘脑 CRH 相似。胎盘 CRH 可以刺激大鼠垂体细胞产生 ACTH 和 β 内啡肽,同样可促使胎盘产生 ACTH 样物质。研究显示,细胞滋养层和合体滋养层都有 CRH-mRNA 的表达,也有些研究显示,在合体滋养层的表达为主。

(4) 人绒毛膜阿片样肽(human chorionic opiolike peptide, hCOP):研究证实,在妊娠早期或足月胎盘中都存在各种类型的阿片样肽,已从人胎盘绒毛中分离出强啡肽(1-13)、甲硫脑啡肽、亮-脑啡肽和 β 内啡肽等。免疫组化研究结果表明, β 内

啡肽的阳性颗粒主要定位于合体滋养层细胞,其在妊娠早期的含量高于中期和晚期。不同类型阿片样肽功能各异,如人工合成的强啡肽有刺激胎盘绒毛释放 hCG 的作用,而 β -内啡肽则起抑制作用,推测 hCOP 的存在可能与调节胎盘内其他种类多肽激素的合成和分泌有关;还有人认为,可能有减低分娩时疼痛的效应。

人胎盘绒毛中除存在有上述肽类激素外,还有人绒毛膜生长抑制素(human chorionic somatostatin, hCSRIF)、人绒毛膜神经降压素(human chorionic neurotensin, hCNT)、胎盘生长素释放激素(placental growth releasing hormone, PGRH)、神经多肽 Y (neuropeptide Y)、P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、缩胆囊素(CCK)、催产素(OT)、促胃液素、肾素和松弛素等。它们的功能尚需进一步研究。

3. 类固醇激素

(1) 人胎盘雌激素(human placental estrogen, hPE):胎盘能产生多种雌激素,主要是雌酮(estrone, E_1)、17- β -雌二醇(17- β -estradiol, E_2)和雌三醇(estriol, E_3)。hPE 由胎盘的合体滋养层细胞合成与释放。但由于滋养层细胞缺少合成雌激素所必需的酶,而这些酶需由胎儿肾上腺和肝提供,因此 hPE 的合成需要胎儿-胎盘单位的协同作用。所谓胎儿-胎盘单位(feto-placental unit)是指胎儿与胎盘共同组成的一个功能单位,共同完成某种物质的生物合成,仅依靠胎盘自身或胎儿自身是不能完成的。

hPE 中的 E_1 、 E_2 和 E_3 之间的生物合成途径及产生的时间不太相同,故它们在妊娠不同时期出现和增加的程度也有很大差别。 E_1 和 E_2 的生物合成在妊娠初期主要在卵巢,妊娠中、后期则主要通过胎儿-胎盘单位。 E_2 在妊娠后的前 6 周还是由卵巢分泌,从第 7 周起主要由胎盘合成,以后 E_2 上升水平很快,至第 10 周时,已达到月经周期黄体分泌高峰浓度的 7 倍。在妊娠第 9 周以前血中游离 E_3 的浓度极低(低于 50pg/ml 血),至妊娠第 13 周,也仅为 E_2 的 7%。但足月时, E_3 的合成旺盛,此时在孕妇排出的尿中 E_3 的含量可高达 10~ 50mg/24h。在分娩前, E_1 、 E_2 的量比妊娠早期增加 1 倍左右,而 E_3 则增加 54 倍之多。血中的 E_2 主要以游离形式存在,而 E_3 则 90% 左右是以结合形式存在,但它们的半衰期均为 20min。

胎盘产生的雌激素大部分进入母体,刺激子宫内膜和子宫肌纤维进一步增生和肥大,促进其血液供应。妊娠期间雌激素水平不断增高,直至分娩。雌激素可在肝内与葡萄糖醛酸或硫酸盐结合,然后从母尿中排出。排出的雌激素中 80% 是雌三醇,15% 为雌酮,5% 是雌二醇。

(2) 人胎盘孕酮(human placental progesterone, hPP):非妊娠期女性体内的孕酮由卵巢黄体产生,妊娠初期的孕酮也由黄体分泌,但第 6~ 9 周后则主要来自胎盘,并随胎盘的增大而增加。因此,妊娠初期黄体功能不全可造成流产等影响,而在中、晚期,即使切除卵巢也不会影响妊娠的继续进行。

免疫组织化学研究显示,hPP 由胎盘绒毛的合体滋养层细胞合成并释放,不需经胎儿-胎盘单位,合体滋养层细胞内的酶便可将母体胆固醇转化为孕酮。合体滋养层分泌的孕酮约有 90% 进入母体血循环,经肝降解为孕烷二醇(pregnanediol),然后以葡萄糖醛酸孕二醇的形式从尿中排出。10% 的孕酮进入胎儿血循环,分布在各种组织中,并在胎儿肾上腺进行代谢,产生硫酸皮质类固醇。不同组织中孕酮的

半衰期不同,血液中的孕酮较短,约 3~ 6min;在脂肪或体液中的孕酮因逸出较慢,其半衰期可长达 95min。

hPP 的生理作用主要是:①直接作用于子宫平滑肌,抑制其自发收缩,降低子宫肌的电兴奋性,使肌张力降低,有利于血液中的激素及其他物质向胎盘扩散。②妊娠期间协同雌激素及其他激素刺激乳腺生长,抑制腺细胞内乳蛋白的合成。分娩后,孕酮和雌激素急剧下降,在垂体、肾上腺和甲状腺等协同作用下,使乳腺开始泌乳。③对抗醛固酮对肾脏的作用,从而控制孕妇尿中钠的排出。④可调节孕妇的血压,其机制尚不清楚。

(3) 人胎盘雄激素(human placental androgen, hPA):在胎盘雌醇和雌二醇合成过程中,其中间产物雄烯二酮和睾酮也可进入母体血循环。因此,妊娠晚期孕妇血中睾酮与雄烯二酮浓度都比正常妇女高。正常妇女睾酮水平仅为 49ng/100ml,雄烯二酮为 181ng/100ml;而孕妇则分别为 114ng/100ml 和 249ng/100ml。

4. 其他

(1) 滋养层干扰素(trophoblast interferons, IFNT):在对羊和牛的研究中发现,早孕期滋养层细胞分泌的蛋白质具有抗黄体溶解的作用,最初被命名为羊和牛滋养层蛋白-1(oTP 和 bTP-1),进一步的研究表明其与 I 型干扰素有密切关系。这些蛋白不仅在序列上与 I 型干扰素,如 IFN α 非常相似,它们同样具有抗病毒、抗增生和此类细胞因子具有的免疫调节活性。

在人的胎盘绒毛组织中也存在 IFN α 样物质,称为人滋养层干扰素(htIFN)。研究显示,其分子量为 67kDa 左右,具有 IFN α 样免疫反应活性。

(2) 前列腺素(PG):胎盘绒毛体外培养研究发现,人胎盘组织能释放多种前列腺素,如 PGF-2 α 及 13、14 双氢-15 酮-PGF-2 α 、PGE、PGF 和 13、14-双氢-15 酮-PGF。有研究显示,由于绒毛在体外培养时缺少合成 PG 的前体及有关酶,所以在体外培养下 PG 释放量急剧下降。关于胎盘中 PG 的作用,推测可能有刺激胎盘中血管的发育、作为 hCG 产生的一种信息,调节胎盘中蛋白质合成的作用,并对胚泡的着床和妊娠的维持有一定作用。

人类胎盘除能合成和释放上述多种激素外,尚能产生多种类型的生长因子及其他细胞因子,如表皮生长因子、神经生长因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子 β 、肿瘤坏死因子 α ,以及白细胞介素 1、2、6 和白细胞介素 8 等。此外,还有资料表明,在胎盘绒毛组织中还存在着多种神经递质,如去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、5-羟色胺(5-HT)等。由此可见,人胎盘也是一个神经内分泌器官,通过自分泌和旁分泌作用相互调控,形成一个自我调控系统,以维持胎盘的正常功能。

附 文

一、细胞因子、生长因子和黏着蛋白在着床中作用的研究近况

着床是以胚泡与子宫内膜黏着至胚泡完全埋入子宫内膜为止的一个连续复杂的动力生物

学现象。着床机制至今还有许多疑问,因此有必要对近年来有关着床的分子水平研究进行关注。

(一) 细胞因子

对妊娠免疫的研究认为,母体能识别胎儿抗原(父亲抗原及胎盘绒毛细胞特异抗原),并对其发生反应,证明在母儿黏着点上存在着通过细胞因子(cytokine)介导的免疫细胞与子宫内膜细胞及胎盘绒毛细胞间的信息交换和相互制约的机构^[1]。从非妊娠期及随月经周期局部各种细胞因子的变动也反映了着床周边期细胞因子的作用。

子宫内中随月经周期与妊娠发生变动的细胞因子有:白介素 1 (interleukin-1, IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12,巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF),粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF),白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF),干细胞因子(stem cell factor, SCF),肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ), β 转移生长因子(β transforming growth factor, β TGF)等。体外研究及动物实验证明,以上多种细胞因子有促进或抑制子宫内中膜和胎盘绒毛膜细胞增殖与分化的作用,因此被认为是与着床有关的因子。在人类有较强作用的细胞因子有 IL-1 和 LIF。

1. IL-1

子宫内中 IL-1 主要源于巨噬细胞,此外血管内皮细胞也可产生^[2]。分泌期子宫内中 IL-1 增加^[3],与局部分布的巨噬细胞的增加相一致。正常情况下,IL-1 受体的对抗剂(IL-1 receptor antagonist, IL-1ra)制约着血中和组织中 IL-1 的作用。在对血液和子宫内腔液中 IL-1 浓度是否受卵巢激素影响的比较研究中证明,在雌激素水平高而着床率低下子宫内 IL-1 含量也低^[4]。

在小鼠胚胎培养液中加入 IL-1ra,未发现对胚胎发育有影响,但向腹腔内注入 IL-1ra,着床率明显降低。交配后 3d 开始每 12h 向腹腔内注入 IL-1ra,着床率仅为正常对照组的 1/10 以下^[5]。IL-1 在着床过程中的作用机制至今不明,但推测 IL-1 对子宫内中膜间质细胞环氧化酶-2(cyclooxygenase-2)基因的表达有诱导作用^[6],着床期的子宫内中膜中能看到前列腺素量增加,并伴有血管通透性增加。有报道认为,IL-1 可使培养的子宫内中膜间质细胞 IV 型胶原酶的基因表达增加;使金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)及 TIMP-3 基因表达减少^[7]。还有人推测,着床时制约胚胎向子宫深层侵入与细胞外基质也可能产生 IL-1 有关。

IL-1 还有抑制子宫内中膜分化的作用。在黄体激素环境中培养的子宫内中膜间质细胞形态和功能都发生蜕膜样变化,但其变化过程可被 IL-1 抑制。其抑制程度与 IL-1 的浓度有关,IL-1 并不影响子宫间质细胞的增加^[8],因此认为 IL-1 是子宫内中膜间质细胞分化的抑制因子。

人子宫在月经周期的 19~22d 可以接受胚泡着床,因此称此时的子宫对胚泡打开了着床的窗口(implantation window)。从形态上讲,子宫内中的蜕膜样变化在月经周期的第 23d 以后才开始,说明形态观察已有明显蜕膜样变化的时期,子宫内中对胚胎着床已失去了接受能力。将人的绒毛细胞与子宫间质细胞共同培养时,在间质细胞蜕膜化的同时绒毛细胞分泌的 hCG 和 hPL 量降低^[9],说明子宫内中的蜕膜化有调节绒毛细胞功能的作用。着床周边期 IL-1 的作用之一,可能就是防止着床窗口的关闭。

2. 白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)

人子宫内中 LIF 主要由腺上皮细胞产生^[10]。对月经 LIF 基因表达的研究证明,月经周期第 19~25d,子宫内中 LIF 含量上升^[11]。在对人子宫内中膜组织进行器官培养,测定 LIF 分泌浓度的实验证明,正常妇女分泌期比增殖期高,并在胚泡着床时达高峰^[12]。但不孕症妇女子宫内中

LIF 的分泌量低,即使在分泌期也未发现有增加的趋势^[13]。Giess^[14]认为,LIF 基因的突变是导致 LIF 蛋白量或生物活性降低的原因。

LIF 基因缺损的同种纯合体(✓-)雄鼠未发现生育能力低下现象,而同种纯合体(✓-)的雌鼠却完全不孕^[15]。从 LIF 基因缺损同种纯合体的雌鼠体内取出胚胎,移到正常鼠子宫内,便可以着床并维持妊娠^[7]。而从正常鼠中取出胚胎在有 LIF 存在的条件下培养后,将胚胎移入 LIF 基因缺损的雌鼠体内,胚泡不能着床,妊娠不能维持;但如在交配后向腹腔内持续注射 LIF,即使在 LIF 基因缺损的同种纯合体雌鼠体内,胚泡也可发生着床,并维持妊娠^[15]。实验证明,LIF 的缺损不影响雄性的生殖功能和雌性的卵泡发育、排卵和受精过程,而是使子宫方面的异常而影响了胚胎的着床。

LIF 的受体不仅在免疫细胞,而且在胚胎及绒毛细胞中被发现。人子宫内膜局部 LIF 分泌低下,可能与着床障碍密切相关。Sharkey^[16]认为,胚泡着床以后,子宫腺上皮中的 LIF 表达下降,而蜕膜组织中 NK 细胞 LIF 大量表达。Piccinni^[17]进一步的研究认为,LIF 是一种与 T_H2 淋巴细胞相关的细胞因子,是作为一种免疫保护因子发挥其维持妊娠的作用的。

3. 其他细胞因子

现知还有许多细胞因子在着床周边期有变化,这些因子的生理及病理作用值得今后进行探讨,其中 M-CSF 与着床及胚胎发育的关系倍受关注。子宫内膜 M-CSF 主要由间质细胞产生,在黄体激素的作用下随着细胞的分化,分泌量有所增加。分泌期子宫内膜 M-CSF 的基因表达较增殖期明显增加,而在妊娠初期基因表达量更高^[18]。M-CSF 的受体不仅在胎盘绒毛细胞中发现,而且在着床前的胚泡阶段就有表达。这些现象提示,内膜分泌的 M-CSF 可促进与维持着床周边期的胚胎发育。M-CSF 基因缺损 OP/OP 的小鼠,虽有动情周期的异常和卵巢功能异常,但并无着床障碍。因此,推测 M-CSF 中与着床有关的因子可能可以被其他细胞因子所代偿。

对流产小鼠的研究证明,妊娠期子宫内膜 T 淋巴细胞以 T_H2 细胞为优势。而流产的子宫内膜局部 T_H1 细胞明显增加^[19]。此外,人子宫内膜的研究也证明,妊娠成立以后 T_H2 细胞占优势,着床周边期的内膜中 T_H1 细胞因子(IL-1、IL-12、IFN γ)减少,T_H2 细胞因子(IL-4、IL-4)增加^[20]。在流产子宫内膜增加的中性粒细胞由于抗原的刺激及 TNF α 的作用,可分泌 T_H1 细胞因子 IFN γ ^[21]。

(二) 细胞生长因子

胚胎在着床中,细胞生长因子(growth factor,GF)的重要性已被证明。在此仅对功能比较明确的生长因子进行讨论。

1. 表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)

EGF 对小鼠子宫的雌激素有媒介作用。小鼠胚胎在 1 细胞期就有 EGF 受体(EGFR)的表达。妊娠大鼠在胚泡着床前摘除卵巢,如给予孕酮可阻止胚泡着床,此时的胚泡在子宫内呈游走状态,并停止发育,称为迟延着床;但给予雌激素或蛋白合成阻断剂后便可发生着床。如给迟延着床大鼠的子宫内注入 EGF 的同时给予雌激素,也可以发生着床。因此认为,EGF 在着床初期对雌激素有媒介作用^[22]。

2. 转移生长因子 α (transforming growth factor α ,TGF- α)

其 cDNA 的核酸序列与 EGF 的 cDNA 有 30%~40% 的同源性,故 TGF- α 能与 EGFR 结合,因此认为 TGF- α 与 EGF 有相同的作用。TGF- α 是 160 个氨基酸组成的跨膜前体(pro-TGF- α)蛋白,细胞膜上的 pro-TGF α 显示有生物活性。一般前体蛋白的细胞外部分,经蛋白酶解,尚释放出成熟具活性的小分子 TGF- α (50 个氨基酸)。虽然 TGF 在子宫内膜中表达丰富,但子宫内腔

液中未能发现 TGF- α 的表达,故认为人子宫内膜中只有膜型 TGF- α 存在,只能通过与胚泡表面 EGFR 结合,产生接触分泌(juxtacrine)作用,被认为与胚胎着床密切相关^[23]。

3. 角化上皮生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)

KGF 是在人胚胎成纤维细胞的培养液的上清液中发现的角化细胞和上皮细胞特异性活动的生长因子。基因克隆结果证明,属于成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)家族,被命名为 FGF7。KGF 与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的不同在 KGF 是由间质细胞产生分泌的,因此有所必要的信息配制,并对上皮细胞有特异性的作用^[24]。

人子宫内膜 KGF 是由间质细胞表达,而 KGFR 在上皮细胞上表达^[25]。人子宫内膜 KGF 的基因表达量在分泌后期达高峰^[26]。此外,应用 RT-PCR 技术对小鼠着床期胚胎进行 KGF 着床作用分析实验证明:

(1) 在胚胎中未发现 KGF 和 bFGF 的基因表达,而在子宫内膜的间质细胞中被表达。

(2) 在着床期前后, bFGF 受体 bFGFR₁ 和 bFGFR₂ 以及 KGF 的受体 KGFR 在胚泡上均有基因表达。bFGFR₁ 在子宫内膜的上皮和间质细胞中均被表达, bFGFR₂ 在间质细胞中被大量表达。KGFR 的基因只在上皮细胞中表达。

添加 bFGF (100~500 ng/ml) 对胚胎着床的黏附率与扩展率有明显的促进作用。添加 bFGF 使滋养层的扩展(trophoblast spreading, TS)面积明显增加。bFGF (1~100 ng/ml) TS 面积比对照组高 1.3 倍。

KGF 对胚胎的黏附与扩展无明显促进作用,但添加 KGF (1~100 ng/ml) 后,对 TS 面积有增加作用,添加 KGF 100 ng/ml 可使 TS 面积比对照组高 1.8 倍。

此外加入孕激素 50 ng/ml 到子宫内膜中培养 48 h, KGF 也有明显的增加。

(三) 黏着性蛋白(adhesive proteins)

在对先天性无纤维蛋白原(Fg)血症和先天性第 XIII 因子缺损症的妊娠妇女的观察中发现,妊娠第 5 周初或第 5 周末发生异常蜕膜出血,说明可能是因为细胞滋养层壳(cytotrophoblastic shell)、Nitabuch 层(Nitabuch stria; 胎盘发育中的一层纤维蛋白,沿蜕膜表面发生,滋养层与蜕膜在此消失)和蜕膜三者的形成及黏着性蛋白 Fg 和血凝第 XIII 因子的缺乏而造成妊娠障碍,因此认为 Fg 和血凝第 XIII 因子是维持妊娠的必要因子。

1. 黏着性蛋白(Fg, FN 和血凝第 XIII 因子 A)

纤维蛋白原(fibrinogen, Fg): 作为血凝因子被揭示,但 Fg 同样有黏着蛋白的作用。

1) 血凝第 XIII 因子: 存在于血浆、血小板和单核细胞/巨噬细胞中的一种转谷氨酰胺酶(transglutaminase)。血浆第 XIII 因子由 2 个 A 亚单位(XIII_A)和 2 个 S 亚单位(XIII_S)组成。XIII_A 是活化中心, XIII_S 是血浆运送蛋白。血小板和单核细胞/巨噬细胞的 XIII 因子只有 2 个 XIII_A。

2) 纤维粘连蛋白(fibronectin, FN): 与细胞的黏着、发育、游走、分化、增殖等多方面有关, FN 的分子内有纤维蛋白(finrin)、胶原蛋白(collagen)、活性 XIII_A (active XIII_A)、 $\alpha 5 \beta$ 整合素(integrin)等的黏着部位。在人妊娠初期与细胞-基质黏着现象有关的因子在着床部位的分布如下^[27]:

妊娠 5 周着床部位: 妊娠 5 周, 固定绒毛(anchoring villi)的周边, 明显的细胞滋养层壳和 Nitabuch 层的形成还未看见时, Fg 和 FN 在固定绒毛的周围已有大量存在, 而 XIII_A 只在巨噬细胞的局部显示, 未发现 XIII_S 的存在。

妊娠 7~8 周着床部位: 妊娠 7 周, 固定绒毛和 Nitabuch 层开始形成, 到第 8 周大致完成。Fg 和 FN 在 Nitabuch 层存在, XIII_A 分布在形成细胞滋养层壳的绒毛外(extravillous, EV)细胞滋

养层(EV-CTr)的间质中。EV-CTr是指妊娠5周大量细胞贯通滋养层块(trophoblast mass),侵入到深部的蜕膜中的CTr。此处的XIII并不在细胞的局部分布,因此认为可能来源于血浆;XIII未被表达。Nitabuch层以外的部位,特别是蜕膜,黏着蛋白Fg分布在侵入到EV-CTr的血管周围的蜕膜间质;FN分布在EV-CTr侵入部位的蜕膜间质;而XIII分布在EV-CTr未侵入到的蜕膜间质。

2. 黏着蛋白的作用

Acosta^[28]的研究证明, β 整合素在月经周期的22~28d在子宫腔上皮和腺上皮中高表达。Aplin的研究证明,CTr的表面有 $\alpha V \beta$ 整合素^[29],蜕膜细胞表面也有 $\alpha V \beta$ 整合素^[30]和IV型胶原蛋白。母体FN是由子宫内壁的成纤维细胞产生^[27]。含有Fg和FN的胎盘^[31],可促进成纤维细胞和上皮细胞的扩展,因此提出以下推测:Fg、FN和第XIII在细胞滋养层壳形成以后的母儿黏着面中存在,即细胞滋养层和蜕膜的黏着面上,有防止流产的作用,其作用机制可能是作为细胞滋养层壳的锚。

对母儿黏着面机制的设想(图2-41):首先CTr向蜕膜中侵入时,CTr表面的 $\alpha V \beta$ 整合素与局部存在的FN结合。FN与Nitabuch层中的母体Fg结合,此后FN与蜕膜细胞表面的IV型胶原蛋白和 $\alpha V \beta$ 整合素结合,由此完成母儿黏着。母体XIII有进一步加固FN-Fg、FN-IV型胶原结合的作用。

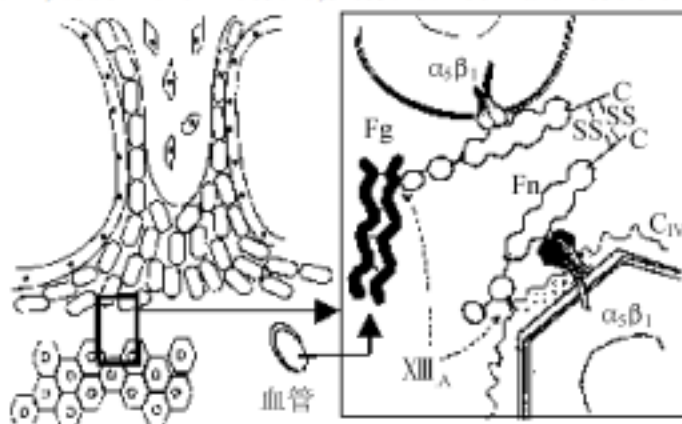


图2-41 母儿黏着面机制的设想

参 考 文 献

- [1] Kanzaki H, Mori T. Immunological regulation of endometrial function: cytokine production in the human endometrium, in molecular and cellular aspects of periimplantation processes. In: Dey SK. Sero Symposium USA, New York:Spring-Verlag. 1995,288~ 299
- [2] Tabibzadeh S, Sun XZ. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. Hum Repro 1992,7: 1214
- [3] Kauma S, Matt D, Strom S, et al. Turner T: Interleukin-1 β (IL-1 β), human leukocyte antigen HLA-D α , and transforming growth factor- β (TGF- β) expression in endometrium, placenta and placental membranes. AM J Obstet Gyneco,1990,1163:1430
- [4] Simon C, Mercader A, Frances A, et al. Hormonal regulation of serum and endometrial IL- α , IL- β and IL- γ : IL-1 endometrial microenvironment of the human embryo at the apposition phase under physiological and supraphysiological steroid level conditions. J Reprod Immunol, 1996,31:165
- [5] Simon C, Frances A, Piquette GN, et al. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra). Endocrinology, 1994,134:521
- [6] Huang JC, Liu DY, Yadollahi S, et al. Interleukin-1 β induces cyclooxygenase-2 gene expression in cultured endometrial stromal cell. J Clin Endocrinol Metab,1998,83:538
- [7] Huang TY, en Y, Irwin JC, et al. Cytokine mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribnucleic acid expression in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab, 1998,83:1721
- [8] Kariya M, Kanzaki H, Takakura K, et al. Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab,1991, 73:1170

- [9] Katsuragawa H, Kanzaki H, Inoue T, et al. Endometrial stromal cell decidualization inhibits human chorionic gonadotrophin and human placental lactogen secretion by co-cultures trophoblasts. *Hum Reprod*, 1995, 10: 3034
- [10] Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium. *Biol Reprod*, 1994, 50: 882
- [11] Senturk LM, Arici A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *AM J reprod Immuno*, 1998, 139: 144
- [12] Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, et al. Expression of nuclear factor kappa B in human endometrium; role in the control of interleukin 6 and leukaemia inhibitory factor production. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(1): 34
- [13] Hambartsoumian E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Mmunol*, Feb; 1998, 39(2): 137
- [14] Giess R, Tanasescu I, Steck T, et al. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol-Hum-Reprod*, 1999, 5(6): 581
- [15] Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992, 359: 76
- [16] Sharkey AM, King A, Clark DE, et al. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod*, 1999, 60(2): 355
- [17] Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochen Soc Trans*, 2000, 29-8(2): 212
- [18] Hatayama H. Progesterone enhance macrophage colony-stimulating factor production in human endometrial stromal cell in vitro. *Endocrinology*, 1994, 135: 1921
- [19] Clark DA. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fg 12 prothombinase. *J Immunol*, 1998, 160: 545
- [20] Lim KJ. Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium *Mol Hum Reprod*, 1998, 4: 77
- [21] Yeaman GR. IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*, 1998, 160: 5145
- [22] Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 55
- [23] Bush MR, Mele JM, Couchman GM, et al. Evidence of juxtacrine signaling for transforming growth factor in human endometrium. *Biol Reprod*, 1998, 59: 1522
- [24] Rubin JS, Osada H, Finch PW, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 802
- [25] Pekonen F, Nyman T, Rutanen EM. Differential expression of keratinocyte growth factor and its receptor in the human uterus. *Mol Cell Endocrinol*, 1993, 95: 43
- [26] Taniguchi F, Harada T, Yoshida S, et al. Paracrine effects of bFGF and KGF on the process of mouse blastocyst implantation. *Mol Reprod Dev*, 1998, 50: 54
- [27] Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, et al. Studies on the role of adhesive proteins in maintaining pregnancy. *Horm Res*, 1998, 50 (Suppl 2): 37
- [28] Acosta AA, Elberger L, Borghi M, et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril*, 2000, 73(4): 788
- [29] Aplin JD, Foden LJ. A cell spreading factor, abundant in human placenta, contains fibronectin and fibrinogen. *J Cell Sci*, 1982, 58: 287

- [30] Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway in vivo. *J Clin Invest*, 1992, 89:210
- [31] Yoshimura Y, Miyakoshi K, Hamatani T, et al. Role of β_1 integrins in human endometrium and decidua during implantation. *Horm Res*, 1998, 50 (Suppl 2):46

二、滋养层发育和机能分化与黏附因子及细胞因子

胚泡着床后侵入蜕膜组织形成强固黏附的同时,迅速分化成绒毛并完成胎盘的的组织构成。绒毛上皮由细胞滋养层、合体细胞滋养层和绒毛外细胞滋养层(extravillous cytotrophoblast)组成。在滋养层细胞增殖与分化和绒毛膜形成的过程中,与性激素、生长因子、癌基因、癌抑制基因、凋亡关联因子、细胞外基质和黏附因子等多种因子的关系密切。在此仅对细胞黏附因子(adherin)及细胞因子(cytokine)与滋养层细胞的发育与机能分化进行讨论。

(一) 滋养层细胞的发育与黏附

细胞黏附分细胞间和细胞与基质间两种。黏附因子不仅是贯通性接着蛋白,而且与细胞内部分,特别是细胞内的支架部分关系密切。细胞间黏附伴有细胞表面的特殊化,即超微结构中有黏附连接(adherence junction)装置,因此能长时间强固地结合并形成组织。黏附因子分为五类,即整合素家族、免疫球蛋白家族、选择素家族、Ca 依赖性黏附素家族和 CD44^[1]。

1. 整合素家族(integrins family)

整合素是在细胞表面发现的细胞外基质的受体,由 α 链与 β 链组成。现至少发现有 10 种 α 链和 8 种 β 链。整合素的 α 链与 β 链是以 1:1 的复合体的形式存在。整合素的细胞内部分与活化的细胞内支架结合,起着传递信息的媒介作用,同时细胞外部分与细胞外基质结合。由于整合素的媒介作用,使细胞发生接触与移动。在着床期子宫内膜上皮细胞中 $\alpha\beta$ 整合素被表达,并只在称为着床窗口(implanting window)的极短时间内,其作用可能是为了与胚胎黏附。Lessey 发现着床障碍的患者 $\alpha\beta$ 整合素的表达极低。因此认为 $\alpha\beta$ 整合素的缺损是着床障碍的主要原因^[2]。

在对整合素的研究中, β 整合素被关注。Sueok 发现妊娠初期蜕膜细胞中有 β 整合素的表达,并利用向培养的子宫内膜间质细胞内加入雌激素,诱导了 β 整合素的表达的实验说明妊娠初期蜕膜细胞 β 整合素的表达依赖雌激素^[3]。Stephens 等使用 β 整合素基因缺损的小鼠做实验,发现胚泡着床后滋养层不发育,并伴有内细胞群形态的改变,因此认为内细胞群的形态形成和细胞的增殖也依赖 β 整合素^[4]。妊娠末期滋养层细胞有 β 整合素的表达,特别在浸润中起主要作用的绒毛外细胞滋养层中 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\beta$ 和 $\alpha\beta$ 整合素被表达^[5]。在子宫内生长延迟(intrauterine growth retardation, IUGR)的胎盘滋养层细胞中 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\beta$ 整合素的表达明显地被抑制^[6],推测可能因免疫反应和细胞与细胞间反应的改变,而影响了胎儿生长。

在子宫内膜间质细胞的体外蜕膜化实验中,只单独给予雌激素时,整合素不被表达,同时加入上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转移生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α)、TGF β 后 $\alpha\beta$ 整合素的表达才被诱导。此外,发现白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α), IL-1 β 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF α)可抑制 $\alpha\beta$ 整合素的表达。因此,整合素的表达可能还受滋养层细胞分泌的细胞因子和生长因子的调节^[7]。

2. 免疫球蛋白家族(immunoglobulin superfamily)

在黏附因子中含有免疫球蛋白样区分子群的称免疫球蛋白家族。免疫球蛋白区相当于 T 淋

巴细胞受体、细胞间黏附因子(intercellular adhesion molecule, ICAM)等。

免疫球蛋白家族与滋养层细胞发育有关的研究有限。Sawa 证明,在大鼠胚胎的滋养层细胞和血管内皮细胞有 C-CAM 的表达^[6]。此外,IUGR 的胎盘中滋养层细胞的血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的表达明显被抑制和 ICAM-3 表达增加。此外,绒毛外滋养层中 ICAM-3 也表现为增加,而 ICAM-1 和 ICAM-2 与正常胎盘间无差异^[8]。免疫球蛋白家族在胎盘滋养层细胞中的表达可能在胎盘生理方面有重要作用。

3. 选择素家族(selectin family)

选择素家族有 L 选择素(白细胞)、E 选择素(血管内皮细胞)和 P 选择素(血管内皮细胞与血小板)三类。

选择素在白细胞向组织内浸润时的运动(rolling)现象中起作用。依赖 L 选择素的黏附和 P 与 E 选择素协调作用,可促进白细胞在内皮细胞上的运动。此后,在整合素家族和免疫球蛋白家族的相互作用下,白细胞与内皮细胞黏附,最后与 Ca 依赖性黏附素相互作用,向内皮外游走^[9]。和白细胞与血管壁的黏附过程一样,选择素与受精卵接近子宫内膜时的运动和黏附过程有关。但 Campbell 的实验发现,L 选择素在 8 细胞期时消失,而 8 细胞期胚并未到达子宫,因此认为推测的机能并不成立^[10]。至今选择素家族与滋养层细胞的发育有结论的研究成果还不足。

4. Ca 依赖性黏附素家族(cadherin family)

已知的有 10 余种,有代表性的是 E-Ca 依赖性黏附素(上皮细胞中表达),N-Ca 依赖性黏附素(神经细胞中表达)和 P-Ca 依赖性黏附素(胎盘中表达)。Ca 依赖性黏附素主要存在于细胞间质的黏附连接装置中。

在 8 细胞期的细胞间结合(compaction)的形成过程中(图 2-42),在 Ca 离子存在的条件下,与 E-Ca 依赖性黏附素有关。E-Ca 依赖性黏附素从 8 细胞期开始在输卵管和子宫内膜中有表达^[11]。

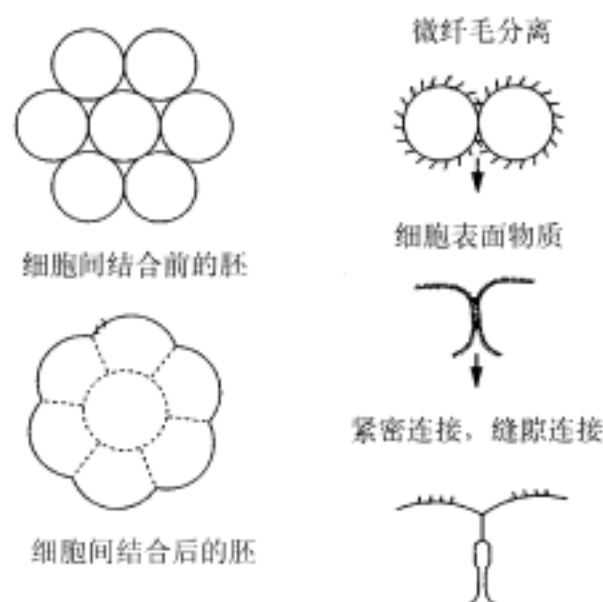


图 2-42 细胞间结合(compaction)的超微结构
(引自北井启胜文章,见文献[11])

E-Ca 依赖性黏附素缺损小鼠的受精卵在细胞间结合的形成过程中,因不能形成滋养外胚层上皮的胚泡腔(trophoblastic cavity),以致在着床期死亡^[12],细胞滋养层融合分化成合体滋养层的过程中,E-Ca 依赖性黏附素被大量表达,分化完成后表达下调^[13]。

P-Ca 依赖性黏附素比 E-Ca 依赖性黏附素的表达晚,在受精后 4、5d 的胚泡中出现,并在胎盘中被广泛表达。Zhou 等认为,滋养层细胞在侵入母体的血管,并替换母体血管内皮细胞之际,内皮细胞上的 E-Ca 依赖性黏附素转变成 VE(血管内皮型)-Ca 依赖性黏附素,此过程发生障碍,常发生妊娠中毒^[14]。

5. CD44

CD44 是单链贯通型膜蛋白,可介导锚蛋白(ankyrin)与细胞支架蛋白结合。人的基因位点在第 11 号染色体的 p13 区。CD44 至少有 20 个外显子(exon)。主要有在白细胞中表达的 80~90kDa 分子类,上皮细胞中表达的 110~160kDa 的分子类,硫酸软骨素共价结合的 200kDa 以上的分子类,作为 CD44 的配体有透明质酸和 I 型和 VI 型胶原蛋白、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等细胞外基质。CD44 作为细胞与细胞、细胞与细胞外基质间的黏附因子向细胞内进行信息运送^[15]。CD44 在着床期子宫内膜和滋养层细胞中存在,之后表达下降。妊娠 8~11 周在滋养层细胞中消失,而在胎盘的间质中被表达。具有浸润能力的绒毛外滋养层有 CD44 的表达^[16]。

(二) 滋养层细胞的机能分化

胚泡与子宫内膜黏附后,滋养层细胞开始向绒毛膜分化,滋养层细胞分化包括浸润能的获得和产生与分泌激素。在浸润能方面,Ca 依赖性黏附素、整合素等细胞黏附因子和以基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)为代表的蛋白分解酶等是重要的。激素的产生与分泌方面,与 EGF、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和巨噬细胞克隆刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)等调节因子关系密切。

1. 滋养层细胞的浸润能

滋养层细胞向子宫内膜的浸润方式与癌类似,不同的是滋养层细胞的浸润是有限的,即限定在妊娠的最初 3 个月。滋养层细胞为了浸润到子宫内膜组织内,必须首先与内膜的细胞和细胞外基质黏附,并除去与其黏附的成分,随后滋养层细胞才能获得浸润能。此过程中滋养层细胞本身产生的细胞黏附因子和蛋白分解酶有关。

(1) 细胞黏附因子:在胚胎发生初期,重要的细胞黏附因子有与细胞间黏附有关的 Ca 依赖性黏附素,细胞与细胞外基质间黏附有关的整合素^[17]。

Ca 依赖性黏附素中研究最多的是 E-Ca 依赖性黏附素,在浸润过程中表达量减少^[18],被认为与滋养层细胞的分化有密切的关系。

浸润过程中,滋养层细胞中被表达的整合素种类是在变化的,在绒毛滋养层细胞,主要是 $\alpha\beta$ 整合素,而在绒毛外滋养层细胞向子宫内膜浸润的同时, $\alpha\beta$ 整合素表达减少,而 $\alpha\beta$ 整合素表达增加,进一步浸润后, $\alpha\beta$ 整合素增加^[19]。因此滋养层细胞的浸润能与整合素的种类有关。

(2) 蛋白分解酶:代表性蛋白分解酶是 MMP,至今有 18 种酶基因被认定。分泌型 MMP 是以无活性的潜在型被分泌,活化时必须切断 propeptide。由滋养层细胞分泌,被活化的 MMP 可制约滋养层细胞的浸润能,其中 MMP-9(明胶酶 B, gelatinase B)的重要性被关注^[20]。MMP-9 由滋养层细胞产生,在妊娠后期减半,这与此时浸润能的低下是一致的。此后,对 MMP-9 基因的启动子区进行的解析,认为 MMP 的活化过程中活化因子的酶是必要的。酶是由滋养层细胞产生的丝氨酸蛋白酶(serine protease)和 MMP 自身,即滋养层细胞可以促进自身的浸润^[20]。

此外,作为抑制 MMP 活化的因子有蜕膜细胞产生的 TGF β 和组织抑制金属蛋白酶(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)^[20]。TGF β 与滋养层细胞的 TGF β 受体结合,抑制 MMP 的表达,促进 TIMP 的产生,因此抑制了滋养层细胞的浸润。现有四种 TIMP 被认定是生理性

MMP 的抑制物,一般 TIMP 过量地存在于组织中,时间性和空间性地限制活化的 MMP 的机能。TIMP 与 MMP 形成 1: 1 的复合体,便抑制了 MMP 的活性。

2. 滋养层细胞激素的分泌

滋养层细胞产生与分泌的激素是滋养层细胞机能分化最好的指标。人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)、人胎盘催乳素(human placental lactogen, hPL)、孕激素(progesterone)等是代表性的机能分化指标。hCG 比 hPL 分化得早,并伴有急速的细胞分化,所以是滋养层细胞机能分化的最好指标。滋养层细胞 hCG 的产生与分泌受多种调节因子的制约。

(1) EGF 对 hCG 产生与分泌的促进:小鼠妊娠时,颌下腺和血中的 EGF 量增加^[21]。摘除颌下腺后,因 EGF 的缺损而发生流产和 IUGR^[22]。在 EGF 受体缺损的小鼠,因胎儿发育和胎盘的形成功能异常,并发生妊娠初期的流产,因此证明 EGF 对妊娠的完成与维持是必需的^[23]。

人的滋养层细胞中 EGF 与 EGF 受体的两种蛋白及 mRNA 表达被确认^[23]。在培养的滋养层细胞中加入 EGF 或抗 EGF 抗体,可看到对 hCG 分泌量的影响,加入 10mg/ml 的 EGF, hCG 分泌量增加($P < 0.05$),加入抗 EGF 抗体, hCG 分泌量减少($P < 0.05$)。结果证明,人的滋养层细胞 EGF/EGF 受体存在自分泌与旁分泌的机构(图 2-43),同时子宫内膜产生的 EGF 也对滋养层细胞产生作用^[24]。

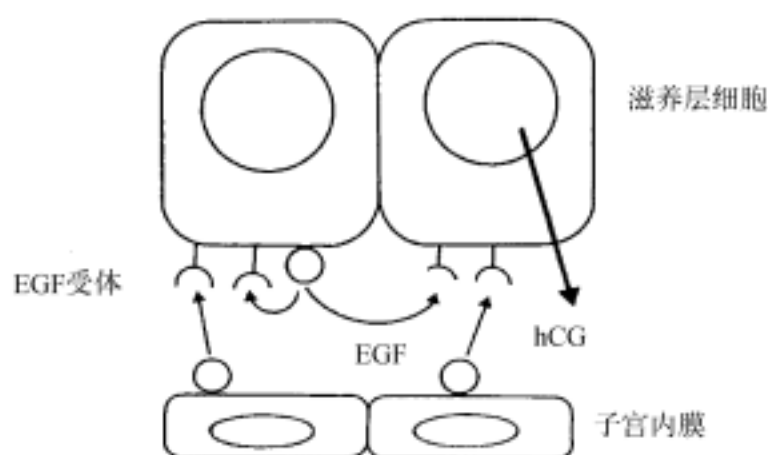


图 2-43 滋养层细胞的 EGF/EGF 受体的自分泌、旁分泌
(引自北井启胜文章,见文献[11])

hCG 的产生与分泌需要结构不同的 hCG α 和 hCG β 两个基因的活化。而在此过程中,EGF 显示了对 hCG α 的活化作用。将 hCG α 启动子与 CAT reporter 连接的基因导入大鼠绒毛膜的 Recho-1 细胞(Recho-1 细胞在培养中有自发进行形态与机能分化的特性,因此是滋养层细胞分化研究中常用的细胞),并向细胞内添加 10mg MEGF,每两日测定 CAT 的活性,结果 EGF 添加组表现为上升,说明 EGF 可促进 hCG α 启动子的活化^[25]。在 EGF 应答区有滋养层特异成分(trophoblast specific element, TSE), GATA 成分和 CAMP 应答成分(CAMP response element, CRE)等转写因子结合部位,因此用去除各种因子的方法解析 EGF 的作用。结果显示,CRE 是 EGF 的功能区(图 2-44)。作为活化机构是与 CRE 结合的 CRE 结合蛋白(CRE-binding protein, CREBP)使 EGF 磷酸化是非常重要的。总之,来源于 EGF 的 CREBP 的磷酸化主要是介导蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)通路^[25]。

(2) LIF 对 hCG 产生与分泌的抑制:小鼠子宫内膜受精后第 4d LIF 表达最强,此外 LIF 缺损的小鼠无论胚胎发育是否良好均发生着床不全。将 LIF 缺损的小鼠胚胎移入正常假孕小鼠子宫内可发生着床,说明 LIF 是小鼠胚胎着床的必要因子^[26]。

人怀孕后月经周期的第 19~ 25d LIF 表达最高,并发现滋养层细胞中有 LIF 受体的存在。

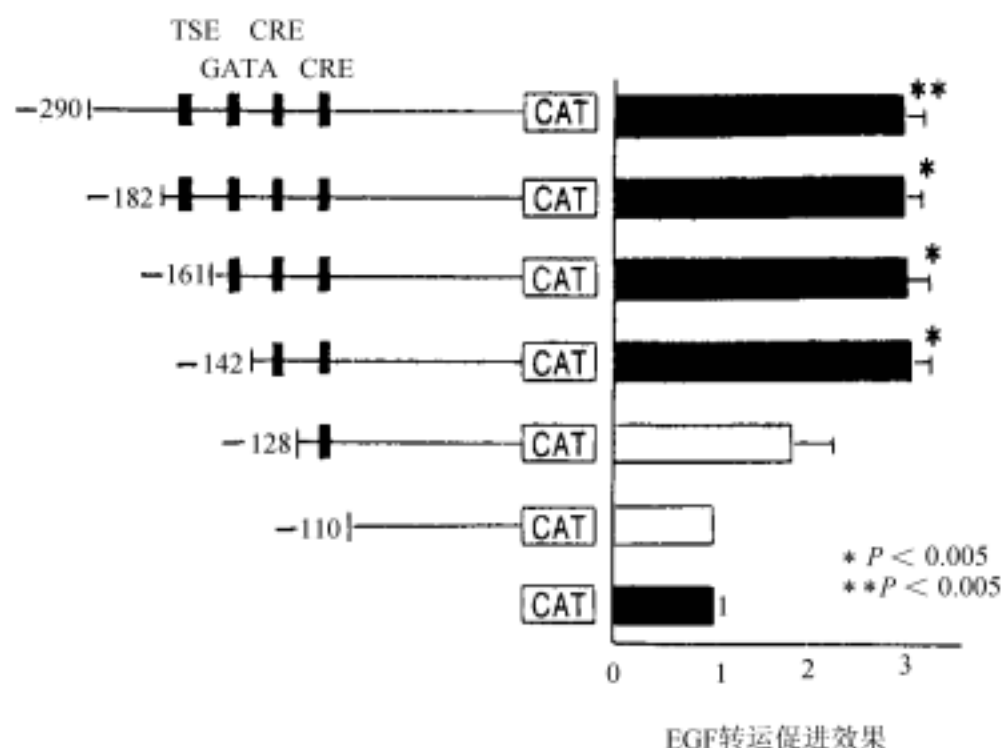


图 2-44 hCG₂ 启动子上的 EGF 应答区的解析

(引自北井启胜文章, 见文献[11])

Senturk 认为, LIF 可能有抑制 hCG 的产生和分泌的作用^[26]。此外, LIF 可促进滋养层细胞产生细胞外基质。总之, LIF 被认为可调节滋养层细胞分化, 有促进着床的作用。

(3) M-CSF 对激素的产生与分泌的促进作用: 小鼠妊娠期子宫内的 M-CSF 比非妊娠期大约增加 1000 倍, 与其一致的是滋养层细胞中 M-CSF 受体的表达也增加, M-CSF 缺损的小鼠发生不孕, 单给与 M-CSF 可恢复妊娠能, 因此认为 M-CSF 对小鼠的胚胎早期发育是重要的, 可能对滋养层细胞的分化有影响作用。

人妊娠时, 血清和羊水中 M-CSF 的浓度上升, 在滋养层细胞中可表达 M-CSF 及其受体。在体外实验中添加 M-CSF, 细胞滋养层细胞向多核细胞形态分化, 并显示了促进 hCG 和 hPL 产生与分泌的作用^[27]。

滋养层细胞分化机制的基因水平的报告不多, 但其中碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix)(bHLH)转录因子的 Hand1 在滋养层细胞分化中是必要的报告值得关注^[28]。总之, 滋养层细胞发育与分化机制方面的研究还有待深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 史小林. 细胞外基质与黏附分子. 中国解剖学报, 1999, 30(2): 189~ 191
- [2] Lessey BA. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. Fertil Steril, 1995, 63(3): 535~ 542
- [3] Sueoka K. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. Fertil Steril, 1997, 67(4): 799~ 811
- [4] Stephens LE. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. Genes Dev, 1995, 9(15): 1883~ 1895
- [5] Divers MJ. Beta 1 integrins in third trimester human placenta: no differential expression in pathological pregnancy. Placenta, 1995, 16(3): 245~ 260

- [6] Sawa H. Spatiotemporal expression of C-CAM in the rat placenta. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45 (7): 1021~ 1034
- [7] Grosskinsky CM. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cell in vitro. *J clin Endocrinol Metab*, 1996, 81 (6): 2047~ 2054
- [8] Zygmunt M. Expression of cell adhesion molecules in the extravillous trophoblast is altered in IUGR. *Am J Reprod Immunol*, 1997, 38(4): 295~ 301
- [9] Ley K. Leukocyte interactions with vascular endothelium, New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol*, 1995, 155(2): 525~ 528
- [10] Campbell S. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Hum Reprod*, 1995, 10(6): 1571~ 1578
- [11] 北井启胜. 胚发生と卵管. 鈴木秋悦編. 体外受精・基礎から臨床まで一. 東京メテikalビュー社. 1995, 46~ 55
- [12] Larue L. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(17): 8263~ 8267
- [13] Coutifaris C. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Develop*, 1991, 113(3): 767~ 777
- [14] Zhou Y. Human Cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: a strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*, 1997, 99(9): 2139~ 2151
- [15] Goshen R. Hyaluronan, CD44 and its variant exons in human trophoblast invasion and placental angiogenesis. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(9): 685~ 691
- [16] Campbell S. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development, *Hum Reprod* 1995, 10(2): 425~ 430
- [17] Damsky C. Extracellular matrix 5: Adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *FASEB J*, 1993, 7(14): 1320~ 1329
- [18] Shim IM. New concepts in trophoblastic growth and differentiation with practical application for the diagnosis of gestational trophoblastic disease. *Verh Dtsch Ges Path*, 1997, 81(2): 266~ 272
- [19] Damsky CH. The solid state environment orchestrates embryonic development and tissue remodeling. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1427~ 1433
- [20] Bischof P. Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation. *Early Pregnancy*, 1997, 3(2): 81~ 95
- [21] Kurachi H. Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland, plasma, and uterine of normal and ovariectomized female mice various reproductive stages. *J Endocrinol*, 1985, 106(2): 197~ 202
- [22] Tsutsumi O. Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, 156(1): 241~ 244
- [23] Sibilio M. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, 1995, 269 (5221): 234~ 238
- [24] Amemiya K. Involvement of epidermal growth factor (EGF)/EGF receptor autocrine and paracrine mechanism in human trophoblast cells: functional differentiation in vitro. *J Endocrinol*, 1994, 143(2): 291~ 301
- [25] Matsumoto K. Human chorionic gonadotropin- α is transcriptionally activated by epidermal growth factor through cAMP response element in trophoblast cells. *J Biol Chem*, 1998, 273(14): 7800~ 7806
- [26] Senturk LM. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *AM J Reprod Immunol*, 1998, 39(2): 144~ 151
- [27] Garcia-Lioret MI. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-1997

CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res*, 1994, 214(1): 46~ 54

- [28] Riley P. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat-Genet*, 1998, 18(3): 271~ 275

三、胚泡的发育及着床期与子宫内膜的相互作用

着床是胚胎与子宫内膜接着并相互作用的一个连续过程,着床成功取决于子宫内膜对胚胎的接受性和与它的调和。着床过程受胚胎发育、胚胎与内膜的接着、内膜间质血管的通透性、着床周围的蜕膜化及绒毛膜的浸润等机制的影响。这些现象除与卵巢激素水平密切相关外,胚胎自身的信息是非常重要的因素,而胚胎的分化、增殖和浸润也与子宫内膜分泌的因子关系密切^[1]。人胚胎着床机制的解析中还有很多不明点,但通过近年分子生物学、细胞生物学的推进,关于胚胎与子宫内膜上皮细胞间横交叉接触(cross-talk)的信息和着床过程中的有关物质被不断发现^[2,3]。这些对胚泡发育及着床机制的讨论将有助于避孕、不孕及优生的研究。

(一) 胚泡的发育

受精卵在性激素的调控下发生卵裂并被运输,在被运输过程中胚泡的发育与自分泌有关,同时也与输卵管和子宫内膜局部发现的多种生长因子(growth factor, GF)有关系,因在胚泡上发现了相应的受体。

1. 胚的发育与上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)

EGF 是 53 个氨基酸组成的分子量为 600kDa 的细胞增殖因子,其作用受雌激素调控,同时 EGF 也影响着雌激素的生理功能。目前在输卵管与子宫内膜中都发现了 EGF^[4],但作用并不十分清楚。

用 EGF 受体基因缺损小鼠进行胚泡着床实验,发现胚泡在着床前^[5]或着床后^[6]死亡。Tsutsumi 将雌性成熟小鼠的颌下腺切除,在 EGF 缺乏状态下观察小鼠的生殖功能,结果排卵、受精及着床均无明显变化,但多发生流产^[7]。如添加 EGF 抗体,流产必然发生,而添加 EGF 流产发生率则下降。因此,认为母体的 EGF 与胚胎初期的发育有密切关系。此外,在初期胚胎中发现了 EGF 受体^[8],说明 EGF 可能起局部性作用。

Morita 将体内发育的胚胎(*vivo* 组),从 2 细胞期开始培养的胚胎(*vitro* 组)和向 *vitro* 组的培养液内添加 EGF 的胚胎(EGF 组),放入假孕小鼠的一侧子宫,观察其着床率,结果 *vitro* 组的胚泡着床率最低,而胚胎的发育程度无明显差异^[9]。这说明在输卵管及子宫内发现的 EGF,对 2 细胞期以后的胚胎有促进分化的作用。

评价胚胎发育状态的常用指标是观察糖的摄取能力^[10],因为初期胚胎发育过程中葡萄糖的利用增大。利用标记了的 2-脱氧葡萄糖 (2-DG) 进行实验,发现小鼠胚胎初期的糖摄取量有 100 倍以上的变化^[11],而体外培养的胚胎糖摄取量明显延迟^[10],在对培养胚胎糖摄取能力与 GF 关系的比较研究发现,糖摄取量除 EGF 外,对其他 GF 无明显反映。在有 EGF 存在的情况下,糖摄取量增加 2 倍,糖摄取量过程葡萄糖转换因子(glucose transporter, GLUT)起重要作用。GLUT 由 500 个氨基酸组成,有 GLUT1、GLUT2、GLUT3、GLUT4 和 GLUT5 五个类型。GLUT 有脏器特异性,一般的脏器 GLUT1 和 GLUT3 较多。初期胚胎在糖摄取量过程中有 GLUT1 的表达^[11],EGF 是否有增加胚泡 GLUT1 的作用,目前还不肯定,但对胚泡 GLUT1 的 mRNA 水平的 RT-PCR 研究表明,添加 EGF 后 GLUT1 增加^[12]。总之,在体外培养状态下,胚泡的糖摄取能力的表达延迟和 GLUT1 基因表达延迟,添加 EGF 后可促进 GLUT1 的表达,因此认为 EGF 可

提高糖的摄取能力,最终促进胚胎的机能分化。当前 EGF 作为抗溃疡药有望在临床使用。将来有望为提高胚泡的着床率而应用于体外受精。

2. 胚的发育与二恶英(TCDD)

TCDD 类因子与最近细胞内的 TCDD 受体或芳香基碳氢化合物受体(aryl hydrocarbon receptor, Ah 受体)结合,有抗雌激素的作用。动物实验证明,TCDD 可造成生殖与胚胎发育的异常^[13],也有学者认为,TCDD 的作用与 EGF 类似^[14]。因在人胚泡液内发现有 TCDD^[15],和初期胚胎中有 Ah 受体^[16],所以认为 TCDD 可能有干扰初期胚胎内分泌的作用。Tsutsumi 向小鼠 2 细胞期的胚胎培养液内添加各种浓度的 TCDD(0.5~100pmol/L),并观察了 24h 后的 8 细胞胚和 48h 后的胚泡,同时计算了胚泡的细胞数,结果添加 TCDD 1~5pmol/L 组,2 细胞期向 8 细胞期的发育明显被抑制^[15],这一作用在 10~100pmol/L 状态时消失,而且发育强于对照组,提示低浓度的 TCDD 对胚胎发育有抑制作用。然而从 2 细胞期向胚泡发育的总数分析,1~5pmol/L 浓度未显示出明显的抑制作用。因为从 8 细胞期的胚向胚泡期发育的过程中,TCDD 显示了促进作用,实验结果说明 TCDD 对胚胎发育的特定时期有抑制作用,而总体为促进作用。为了实验 TCDD 对胚胎发育的直接作用,Tsutsumi 进行了胚泡期细胞核的染色观察,结果形态与对照组无明显区别,而细胞数有明显增加^[15]。说明 TCDD 对初期的胚胎发育有直接作用,至少对 8 细胞期以后的胚有促进细胞增殖与分化的作用。

(二) 胚泡与子宫内膜的相互作用

受精卵在被动运输过程中进行卵裂并形成胚泡。使用体外受精获得的小鼠受精卵能较容易地培养到胚泡期,因此认为这一发育期间,母体环境不是必需的。但最近对于胚胎自分泌和母体输卵管与子宫内膜的旁分泌研究证明,胚胎与输卵管上皮共同培养可促进胚胎的分化与增殖。实际在输卵管与子宫内膜的局部发现多种 GF,而且多数在胚胎上发现了相应的受体。至今在胚泡上已发现 EGF 和白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的受体。在培养液中添加输卵管上皮、子宫内膜上皮分泌的 EGF、转移生长因子(transforming growth factor- α TGF- α)、胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)和肝素结合上皮生长因子样生长因子(heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)等,GF 可以得到促胚胎生长的效果^[3]。近年来,在输卵管和子宫内膜中发现转录因子 Hox α 10,说明母体环境对着床前胚泡的发育和胚泡的着床是必需的^[17]。

1. 胚泡与子宫内膜间的信息

(1)胚向子宫内膜方面的信息:现认为,有来源胚泡并对子宫内膜产生影响的分子存在,例如胚泡产生的 IL-1 可使子宫内膜上皮细胞内的整合素增加^[25];此外,还有 hCG、雌二醇(estradiol)、PG、PAF、IGF 和早孕因子(early pregnancy factor EPF)等^[3]。但确切的作用机制还不是十分清楚。

(2)子宫内膜向胚胎方面的信息:子宫腺上皮细胞分泌的 LIF 是被研究的主要因子之一,用 LIF 缺损小鼠进行的实验证明 LIF 是着床的必需因子。在人类胚泡上发现了 LIF 的受体,在培养液中添加 LIF,胚泡可向上生长^[19];此外,LIF 与滋养层细胞的分化也有密切的关系。

2. 子宫内膜的胚胎接受性的获得

胚泡期子宫必须变为接受期(receptive phase),这一变化如不顺利进行,着床将不能成立。在小鼠受精后数日的孕激素和第 4d 的雌激素分泌是子宫内膜获得接受性。人类分泌期孕激素的作用被重视,而雌激素的作用还不完全明确^[20]。Dey 为了探讨子宫内膜的接受性是否必须有胚泡的条件为条件,使用输精管结扎小鼠进行交配,获得了假孕小鼠并向假孕小鼠子宫内移植胚

泡,结果着床可以成立。在雌激素分泌峰前摘除卵巢,可发生延迟着床,即着床休止状态。如此时给予少量的激素,可使胚泡再活化,子宫内膜获得接受性,最终着床成立。实验证明,孕激素的作用是维持子宫的中期性(neutral phase),此时必须有少量的雌激素才可进入接受期。但为何接受期仅维持 24~36h 还需研究。

3. 胚胎与子宫内膜的接触

小鼠胚泡从输卵管进入子宫时,由于子宫狭小,胚泡很容易与子宫内膜接触。这一现象的本身并不需要胚泡的存在,因整个子宫内膜都发生变化。着床的关键是子宫内膜与胚泡之间的横交叉接触。在接受初期的接触因子作用被揭示^[21],如胚泡表面的选择素配体(ligand)和 Le^xLe^y糖类(carbohydrate);胚泡表面的硫酸乙酰肝素蛋白多糖(haparan sulphate proteoglycan HSPG)和子宫内膜上皮表面发现的硫酸乙酰肝素结合蛋白(Haparan sulphate-binding protein)的相互作用;着床期在子宫内膜上皮中发现的 H1 型糖类(H-type 1 carbohydrate)与后期胚泡的接触等。关于与胚的信息相对应的小鼠子宫内膜上皮的变化,发现接近胚泡的子宫内膜上皮有 HB-EGF 的表达,膜型的 HB-EGF 可能与胚泡表面的 EGF-R、HSPG 之间的接触有关^[22]。位于子宫腺上皮的 Calbindin 9K 对胚泡的信息有减弱作用^[23]。此外,整合素和胚泡与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的相互作用,对着床也是非常重要的^[24]。在接触期,小鼠胚泡上有 $\alpha V \beta$ 整合素的表达和层粘连蛋白(lamin, LN)的受体 $\alpha \beta$ 整合素的增加,与此同时子宫内膜间质中 LN 和胶原蛋白(collagen, CL)增加。在人的接受期子宫内膜上也发现有 $\alpha V \beta$ 和 $\alpha \beta$ 整合素的表达。

4. 血管通透性的增加

胚泡与子宫内膜的相互作用最初可见到的现象是胚泡存在部位内膜血管通透性的亢进。用给小鼠注射色素的方法很容易确认这一与炎症有很多类似点的反映。一些因子,如前列腺素(PG)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)等血管活化物都与这一反应有关。在着床部位 PG 浓度是增高的,使用 PG 合成阻断剂可抑制着床,如同时给予 PG 可产生代偿^[2]。PG 合成酶-环氧化酶(cyclooxygenase-1, COX-1)在子宫内膜的整个上皮细胞中表达,而 COX-2 在胚胎着床部位的子宫内膜上皮及直下的间质细胞中发现,近来用基因缺损的小鼠进行解析确认 COX-2 是着床的必需物^[25]。雌激素有使子宫内的组织胺游离的作用,组织胺可增加着床期的雌激素效率,但血管活化物并不能代替雌激素而诱导接受期。用抗雌激素及核酸和蛋白合成阻断剂,并不使组织胺游离和 PG 合成作用受影响。因此,认为雌激素受体的存在^[2]。在人类 PG 和 PAF 形成正反馈网络(network),白介素-1(interleukin-1, IL-1)、LIF、内皮素-1(endothelin, ET-1)和 EGF 显示了与这一网络的关系,还有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、甲状旁腺素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)、一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, Nos)等血管活化物的作用也正在被研究^[3]。

5. 着床胚周围的蜕膜化

小鼠胚泡着床部位的血管通透性的持续亢进,引发了着床胚周围的子宫内膜间质细胞向蜕膜化增生与分化,这一变化因将胚泡换成异物仍可发生,所以一直认为与胚泡的存在关系不大。但假孕小鼠并不能诱发形成蜕膜,于是认为变化还是由胚泡向子宫内膜的作用引起。在小鼠蜕膜化的细胞和人子宫内膜间质细胞上发现的 COX-2 和 IGF 结合蛋白(IGF binding proteins IGFBPs)被认为是有关因子^[25,26],解析工作正在进行。

6. 滋养层的浸润及其机制

胎盘的形成过程,根据种属的不同而有区别。在小鼠胚泡着床后,滋养外胚层(trophoblast)增殖,形成外胎盘锥(ectoplacental cone)。其最外层分化成滋养层巨细胞(trophoblast giant cell),与母体的蜕膜共同形成接触面(interface),滋养层的特异功能也随之被

调和,如胶原酶 B(gelatinase B)又称基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、 α 整合素、胎盘催乳素 (pregnancy lactogen, PL)、妊娠特异糖蛋白 (pregnancy-specific glycoprotein)等,均随滋养层细胞的形成而增加^[19]。人类滋养层形成绒毛并增殖分化为细胞滋养层后,相互融合形成合体滋养层,同时产生 hCG 和 hPL。细胞滋养层与基底膜分离形成细胞柱 (cell column)的同时向内膜间质中浸润。在此过程中,破坏母体的血管,并与母体血直接接触。滋养层开始分泌 MMP-9^[27]和尿激酶型血浆酶原活化因子 (urokinase-type plasminogen activate, uPA)^[27]等糖蛋白酶,使 ECM 退化。在鼠和人类浸润能力最强的时期为妊娠初期,此期 MMP-9 的分泌量最高。

此外,滋养层与基底膜分离,进一步浸润,首先产生称为抗接触蛋白 (anti-adhesive protein) 的腱生蛋白 (tenascin)。随着浸润的推进,滋养层表面发生了整合素的变化^[28],与此同时滋养层的浸润也被子宫侧的因子抑制,如 TGF β 可抑制 MMP^[29]和蜕膜中发现的组织抑制金属蛋白酶 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)^[30]均可抑制滋养层的浸润。

参 考 文 献

- [1] 堤 治. 生殖医療のすべて, 第 1 章妊娠の成立. 東京: 丸善出版社, 1999. 1~ 23
- [2] Dey SK. Implantation. In: Adashi EY, Rick JA, Rosenwaks Z (eds). Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996. 421~ 434
- [3] Ghosh D, Sengupta J. Recent developments in endocrinology and paraocrinology of blastocyst implantation in the primate. Hum Reprod Update, 1998, 4: 153~ 168
- [4] Morishige K. Menstrual stage-specific expression of epidermal growth factor and transforming growth factor in human oviduct epithelium and their role in early embryogenesis. Endocrinology, 1993, 133: 199~ 207
- [5] Threadgill DW. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. Science, 1995, 269: 230~ 234
- [6] Sibila M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGFreceptor. Science, 1995, 269: 234~ 238
- [7] Tsutsumi O, Oka T. Epidermal growth factor deficiency during pregnancy causes abortion in mice. Am J Obstet Gynecol, 1987, 156: 242~ 244
- [8] Wiley LM. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in murine embryos. Dev Biol, 1992, 149: 247~ 260
- [9] Morita Y. In vitro treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increase the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. Am J Obstet Gynecol, 1994, 171: 406~ 409
- [10] Tsutsumi O. Delayed expression of hexokinase and glucose transporter causes decreased glucose incorporation in mouse embryos developed in vitro. in Perspectives on Assisted Reproduction, ed by. Mor T, Aono T, Tominaga T and Hiroi M. Rome, Ares Sero Symposia. series 1994, 4: 143~ 149
- [11] Morita, Y. Expression and possible function of glucose transporter protein GLUT1 during preimplantation mouse development from oocytes to blastocysts. Biochem. Biophys Res Commun, 1992, 188, 8~ 15
- [12] Morita Y. Glucose transporter GLUT1 mRNA expression in the ontogeny of glucose incorporation in mouse preimplantation embryos. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199: 1525~ 1531
- [13] 堤 治. 内分泌擾乱物質の生殖機能への影響. 産と婦, 1999, 66: 235~ 243
- [14] Peters JM, Wiley LM. Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 134: 214~ 221

- [15] Tsutsumi O. Presence of dioxins in human follicular fluid; their possible stagespecific action on the development of preimplantation mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250:498~ 501
- [16] Madhukar BV. Effects of in vivo-administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81:7407~ 7411
- [17] Benson GV. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice; uterine homrosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development*, 1996, 122:2687~ 2696
- [18] Sinoon C. Embryonic regulation of integrins $\beta\alpha$ and α in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82:2607~ 2616
- [19] Dunlison, GF. Leukemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod*, 1996, 11:191~ 196
- [20] Zegers HF. Altieri E. Luteal estrogen is not required for the establishment of pregnancy in the human. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12:224~ 228
- [21] Cross JC. Implantation and the placenta; key pieces of the development puzzle. *Science*, 1994, 266:1508~ 1518
- [22] Raab G. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development*, 1996, 122:637~ 645
- [23] Tatsumi K. Expression of calcium binding protein D-9K messenger RNA in the mouse uterine endometrium during implantation. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5:153~ 161
- [24] Sueoka K. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. *Fertil Steril*, 1997, 67:199~ 811
- [25] Lin H. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 1997, 91:197~ 208
- [26] Lai YM. Insulin-like growth factor-binding produced by Vero cells, human oviductal cells and human endometrial cells and the role of insulin-like growth factor-binding protein-3 in mouse embryo co-culture systems. *Hum Reprod*, 1996, 11:1281~ 1286
- [27] Behrendsen O. Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development*, 1992, 114:447~ 456
- [28] Damsky C. Extracellular matrix 5: Adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation and placentation. *FASEB J*, 1993, 7:1320~ 1329
- [29] Graham CH. Localization of transforming growth factor- β at the human fetalmaternal interface; role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod*, 1992, 46:561~ 572
- [30] Higuchi T. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells, *Endocrinology*, 1995, 136:4973~ 4981

(史小林 翁 静 童明汉 吴明章)

第三章

性别决定与分化

哺乳类动物和人类胚胎的性决定和性分化是一个不可分割的连续过程，包括三个彼此独立又密切相关的阶段。每一独立的性别分化阶段都受阶段特异因子的控制，按严格规律循序渐进。它包括染色体（遗传）性别、性腺性别和表型性别。在正常情况下，染色体性别调节原始性腺的分化方向，性腺性别又决定了表型性别（内、外生殖道）的分化。性决定是染色体性别的形成和对原始性腺发育的控制，染色体性别的形成在于精子和卵子结合的瞬间，精子的性染色体有两种，即 X 或 Y，而卵子都是 X。如果是 Y 精子受精即形成 XY 男性核型，如果是 X 精子受精即形成 XX 女性核型。染色体性别调节原始性腺的分化有多个基因的参与。性分化是性腺的器官形成过程（由原始性腺分化为睾丸或卵巢），有 50 个以上的基因参与，包括细胞因子、肽类激素、类固醇合成酶和受体基因等。

未分化的性腺原基如果没有睾丸决定基因的主动诱导，有发育为卵巢的固有倾向，生殖管道和尿生殖窦的女性方向分化不依赖于任何一种性激素，缺乏睾丸或睾丸无功能的胎儿都会出现中肾旁（Müller）管的衍生器官子宫和输卵管，卵巢的存在与否并不是必要的条件，因此，表型性别的分化是睾丸分泌的激素介导的。青春期性别特异性第 2 性征的发育将会强化可以一目了然的表型性别表现。

第一节 性别决定及调控

性别是指动物有雌雄之分，人类有男女之别的人类社会学与生物学概念，性别的决定与划分又是以细胞生物学和分子遗传学为基础的极为复杂的生物医学科学的重要内容。Jost 将性别分为三种：①染色体性别；②性腺性别；③表现型性别。染色体性别从精卵融合之时即已确定。如果精卵是异配子相结合而形成 46,XY，其遗传性别为男性。如精卵是同配子相结合而形成 46,XX，则为女性。男性性腺是睾丸，女性为卵巢，并以相应的外生殖器而表现为正常男性或女性。这在正常情况

下是人人皆知的常识。但是,鉴于性分化和人的社会性的复杂性,可出现三种性别的不一致,甚至在三种性别完全一致的情况下也可出现社会性别与科学性别之间的矛盾,因此有人主张人类应有第4种性别,即社会性别(抚养性别或法律性别)。

一、染色体性别的调控

哺乳动物和人类的染色体性别是由性染色体决定的,实际上是由含Y染色体精子在受精的同时决定的。Y染色体是男性性别的决定因子。46,XX虽是正常女性,但X染色体并非性别决定因子,因为无Y染色体的45,X患者是女性表现型,尽管其卵巢发育不全,呈索条状。只有46,XX才是正常女性,并有正常的卵巢功能。反之,47,XXY;48,XXYY;48,XXXY或49,XXXXY各种核型异常的患者都是男性表现型,只是其精子发生出现障碍。这些研究结果说明:①Y染色体是睾丸决定因子,多一条以上的X染色体将导致精子发生障碍但不影响性别;②46,XX是卵巢发育成熟并具有正常卵巢功能的必要条件。

显然,X染色体是卵巢分化与发育正常的决定因素,而不是睾丸决定因子,但X染色体携带众多参与男性性别分化的基因,对男性性别分化起着关键影响。在X顶端同样存在一个“假常染色体”基因片段,它与Y_p顶端的同一片段同源;在X_p的“假常染色体”片段近着丝粒端的众多基因中也有一个锌指蛋白基因,称X锌指蛋白基因(ZFX),其编码的393个氨基酸中有383个同ZFY同源,ZFX能同ZFY探针进行杂交。位于X_p“假常染色体”片段上的这些直接参与男性性别分化的许多基因,可逃避X染色体的灭活而同Y_p的同一片段进行交叉互换。此外,X_q上还有至少150个以上的与男性性别分化无直接相关的X-联基因,但也有AR基因和防止矮小基因,这些基因的异常,往往反映在性别分化异常病的临床表现上。由此可见,Y染色体在性别分化中起睾丸决定作用,是睾丸的“组织者”,而不是性别分化中决定全部男性化的惟一因素。

二、表现型性别的调控

人表现型性别受众多因素的调控与影响。这些因素包括:①Y染色体的睾丸决定因子(TDF);②睾丸分泌的三种激素:睾酮(T)、双氢睾酮(DHT)和抗Müller管激素(AMH);③睾丸自体激素产生细胞的反应性;④三种激素靶细胞或组织的灵敏性与受体的反应性;⑤三种激素合成酶的功能。这些因素中的任何一种出现异常,均可导致相应的性别分化异常表现,影响表现型性别过程的机制,都受到复杂的遗传因素的调控。Y染色体调控原始性腺分化成睾丸;睾丸合成并分泌参与表现型分化的雄激素,可能因位于常染色体上甾体合成酶基因的缺陷而缺乏,如各种先天性肾上腺皮质增生;X染色体上的雄激素受体基因突变而对激素不反应;常染色体或X-联隐性遗传的AMH合成障碍或功能异常等众多因素(表3-1)。

表 3-1 男性表现型的遗传调控

遗传类型	调控机制
Y 染色体	Y 短臂 TDF 决定睾丸分化
X 染色体	靶器官或细胞内雄激素受体
常染色体	雄激素合成酶及 5α 还原酶
隐性遗传	19 号染色体短臂 AMH 基因
(常染色体或 X-隐性遗传)	和 AMH 受体 (AMHR) 的表达

(一) 睾丸决定因子 (TDF)

人 Y 染色体含 5×10^4 kb DNA, 其中 60% 位于其长臂 (Yq 的异染色体区 Yq12); 其短臂 (Yp) 约含 1.3×10^4 kb DNA。迄今为止, Y 染色体已被克隆 200 个 DNA 序列。有人将 Y 染色体人为地分成 7 个间区 (interval), Yp 由远向近端分 3 个间区, Yq 常染色质区为第 5 和第 6, 无精子因子 (AZF) 位于第 6 间区。而异染色质区为第 7 间区。在 XY 染色体短臂最尖端的一个很小的片段称为责任性交换区, 又称“假性常染色体”配对交换区, 不包括在 Y 染色体间区图谱之中。但是, 由于所用的探针不同, 7 个间区的界限可能不一致, 而且随着 Y 基因分离的日益增多, 每个 Y 间区可能按所含的基因而进一步分为更小的片段, 称为亚间区 (subintervals)。最近有人用 30 个常用的 Y-DNA 探针将位于 Yq11 的第 6 间区分为 14 个亚间区, 并对 Yq11 的 14 个亚间区内核型结构异常与一些外阴两性畸形或不育男子的临床表现, 在分子水平上进行了分析, 在基因水平上明确了这些病人的

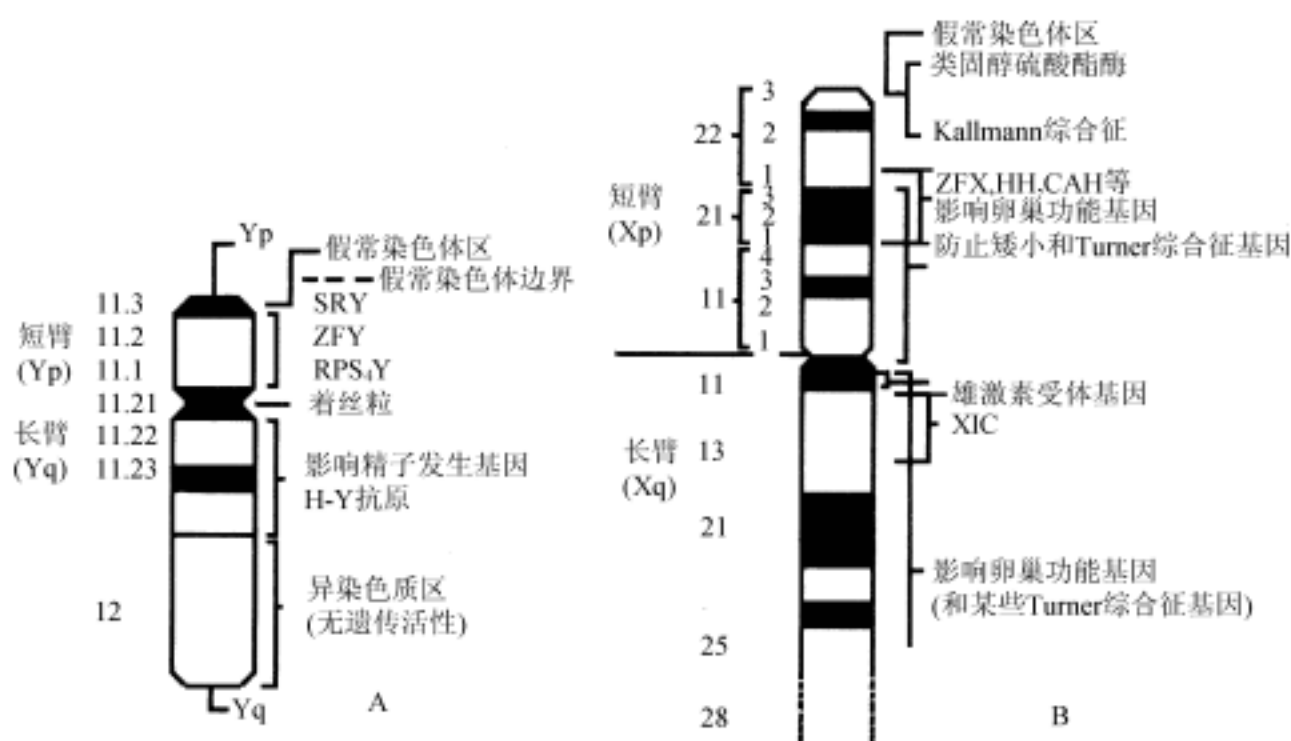


图 3-1 人染色体结构示意图

A. Yp、Yq 及其荧光着色区; B. Xp、Xq 染色体结构

诊断 (图 3-1)。

人及哺乳动物的 Y 染色体有以下显著特点：①Y_p 含 TDF 和其他基因；②正常人 Y_p 大小及长度恒定不变，而 Y_q 的长度则有很大的波动；③Y_q 远端极易被荧光染料奎纳克林(quinacrine)着色而显示若干条荧光亮带，但因 Y_q 长短波动很大，其荧光亮带大小也有很大的波动；④生殖细胞在第 1 次减数分裂之前必须进行 XX (女性) 和 XY (男性) 各两条染色体之间的配对互换。两条 X 染色体之间的配对互换机制与常染色体一样，是在着丝点附近，并在第 1 次减数分裂时分离，形成同源染色体。但 XY 染色体配对互换区不在着丝粒附近，而在 XY 短臂顶端很小的区带上，称为“责任交换区”。XY 染色体此区的 DNA 有极高的均一性，所以又称为“假性常染色体配对互换区”。当 XY 配对互换之后复制的片段被均匀地分开在纺锤体上。每个精母细胞经两次成熟分裂，而遗传物质只复制一次而减少一半，又称减数分裂，故在第 2 次减数分裂时产生 4 个只有 X 或 Y 的单个染色体的精子。其中两个精子含 X 染色体，另两个是 Y 染色体，但在某些情况下，XY 互换可能出现性反转和易位，导致性别分化异常和精子功能异常而不育的个体。例如，在减数分裂过程中，X-Y 配对交换时两条 Y_p 含突变的 Td 片段分别被转移到 X 和 Y 染色体上，结果产生的 4 个精子中有 2 个精子是正常的人 Y 精子，而另两个 Y 和 X 精子却变成含突变基因的 X_{Sxr} 和 Y_{Sxr} 的异常精子。当 4 个精子与相应的卵子结合后则生产 2 个正常的 XX 和 XY 子代及两个均分化为有睾丸的 XX_{Sxr} 和 XY_{Sxr} (图 3-2)。

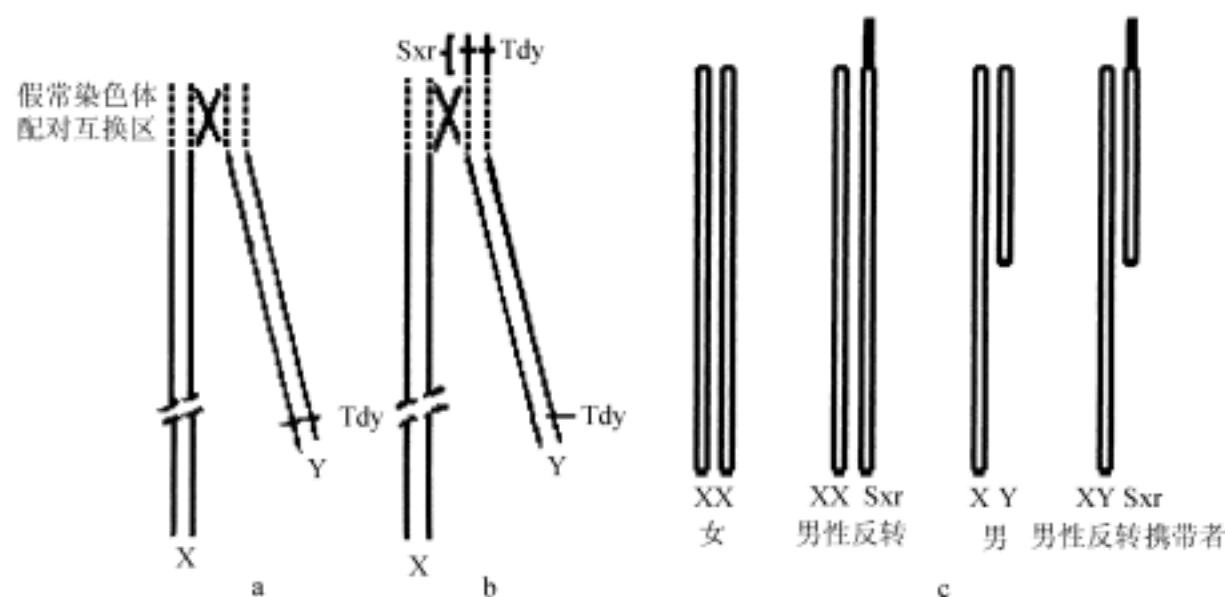


图 3-2 减数分裂时 XY 配对互换与性反转 (Sxr) 的遗传图解

- a. 正常人 XY 配对互换；b. 性反转 (Sxr) 的遗传图解；
c. 性反转 (Sxr) 雄鼠与正常雌鼠交配生产 4 个后裔

原始性腺分化成睾丸或卵巢受 Y 染色体制约早已被公认，但有关 Y 染色体调控性分化的机制，在历史上曾有多种理论的长期争论：

1. 原始性腺的髓质优势决定睾丸分化的学说

按这一理论，原始性腺由形态上截然不同、功能上相互拮抗的两种组织成分组

成。皮质诱导物刺激皮质，抑制髓质而分化为睾丸。自从 1959 年 Y 染色体被证实为睾丸决定因子之后，这一理论演变为 Y 染色体使髓质占优势，从而决定睾丸的分化。无 Y 染色体存在的情况下，皮质占优势，原始性腺分化为卵巢。但这一理论与两种性腺分化的时间过程不同步而相矛盾，睾丸的分化先于卵巢约 6 周左右。

2. 睾丸组织诱导物决定睾丸分化

1973 年，Jost 观察到 1 例男女两性双胞胎儿，其中女孩表现为女假两性畸形，在其卵巢组织中含有生精小管，Müller 管完全萎缩，内、外生殖器官轻度男性化，阴蒂增大。其原因被认为是同其男性双胞胎共享同一血液之故，根据这一观察和上述“优势”学说难以解释睾丸与卵巢分化在时间上不同步的矛盾。Jost 认为，未分化性腺在早期受来自男性基因的“诱导物”通过局部作用机制引起原基组织睾丸化，而睾丸的分化受睾丸内细胞产生的不是雄激素的睾丸组织者（testicular organizer）的控制。

3. 睾丸决定因子

TDF 位于 Y 染色体短臂。1966 年，Jacobs 等在分析人 Y 染色体结构异常的基础上得出结论，负责睾丸分化的基因位于 Yp 上，因为 Yq 荧光片段丢失（Yq-），Yp 等臂染色体 i(Yq) 的异常结构和 Yp 及 Yq 各丢失最远端片段 A、H 而形成的环状染色体（Yr），均不干扰正常睾丸的形成和发育成男性个体（图 3-3）。

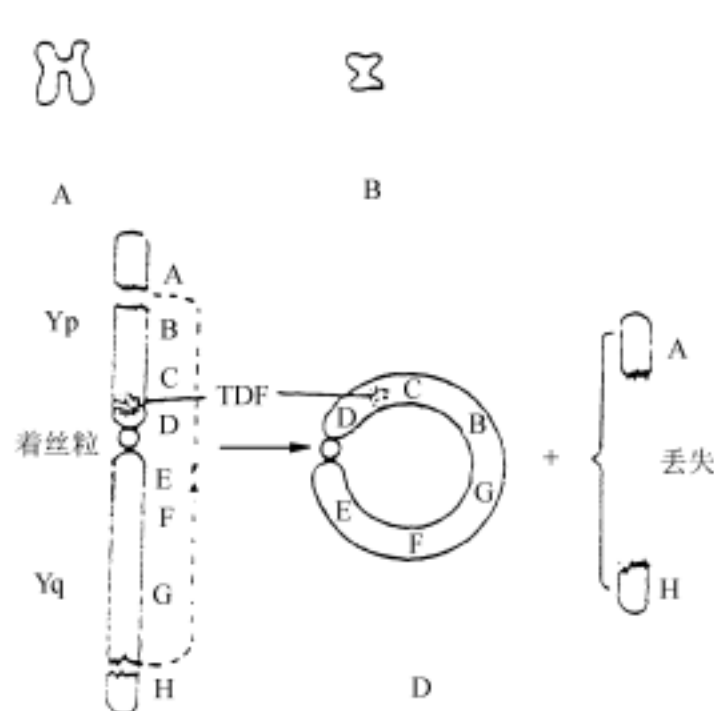


图 3-3 Y 染色体结构异常与 TDF 的关系图解

- A. Y 长臂缺失不影响睾丸分化；B. Y 短臂等臂染色体 i(Yp) 不影响睾丸分化；
 C. Y 长臂等臂染色体 i(Yq) 两端均为荧光染色体阳性的 Yq，无睾丸分化，
 外生殖器女性化；D. Y 环状染色体(Yr)不影响睾丸分化

这是因为上述三种染色体虽然结构异常，但却保留了 TDF，故均分化为有睾丸的男性。然而，若干例 Yq 等臂染色体 i(Y 中因 Yp 缺失) 而失掉 TDF，从而影响了睾丸的分化，并导致外生殖器的女性化。所有的这些事实均支持睾丸决定基

因位于 Y_p 靠近着丝粒。这些分析结果令人信服地表明, 睾丸决定因子位于 Y_p 靠近着丝粒区。但遗憾的是, 对 TDF 的研究此后却偏离了方向。H-Y 抗原被认为是睾丸分化的决定因子或诱导物的理论竟长达 10 多年。

4. H-Y 抗原不是 TDF

H-Y 抗原是一种存在于除前精原细胞及红细胞之外的几乎所有细胞表面的结构蛋白质, 但其受体仅在睾丸内被发现。1955 年, Eichwald 和 Silmsen 将雄性动物皮肤移植给雌性时出现排异现象, 但在雄性之间互相移植却无排异。这是因为雄性细胞表面有一组织相容抗原 (histocompatibility antigen) 并与 Y 染色体共存, 故名曰 H-Y 抗原。

1979 年, Ohno 等人提出, H-Y 抗原是睾丸分化的决定因素。按此理论, H-Y 抗原以类似激素的作用方式, 通过与其睾丸特异受体结合, 直接作用于胚胎生殖嵴, 使其分化为睾丸, 并抑制卵巢的分化。这一理论的主要依据是, 在 46, XY 正常男人和外生殖器有不同程度女性化, 包括完全型睾丸女性化的 XY 男假两性畸形; 46, XX 和 46, XY 或 XX/XY 嵌合体核型的真两性畸形患者, 以及性染色体嵌合体核型的混合型性腺发育不良和有睾丸的 45, X 男性患者, 其血液中 H-Y 抗原水平都是高的, 而且其浓度在 XXYY 的患者比 46, XY 的正常人高 1 倍。所以不论其染色体核型如何, 只要 H-Y 抗原阳性, 原始性腺将分化为睾丸。因此, 长期以来人们将 H-Y 抗原看成是位于 Y 染色体上的睾丸决定因子 (TDF)。但是, 一些 46, XY 有睾丸的小白鼠与人, 其 H-Y 抗原却是阴性。另一方面, 已发现数十例 H-Y 抗原阳性的 46, XY 无性腺综合征患者。这些难以用 H-Y 抗原理论解释的事实, 促使人们越来越对 H-Y 抗原是 TDF 的观点提出疑问。首先人们怀疑, 组织移植时发现的 H-Y 抗原与血清学测定的是否为同一物质。其次, 长期以来人们未能从分子水平证实 H-Y 抗原的分子结构, 尽管最新报道已发现 H-Y 抗原的基因位于 Y_q 的间区 6。靠近 Y_q 的无精子因子 (AZF), 但这一发现尚待 H-Y 抗原分子结构及其生物学作用的证实。总之, 随着 TDF 研究的进展, H-Y 抗原是 TDF 的学说已被放弃。现已证明, TDF 位于 Y_p, 而不在 Y_q。既然 H-Y 抗原基因已被在 Y 染色体上鉴定, 其编码的蛋白质是 Sertoli 细胞分泌, 其受体蛋白仅在睾丸内存在, 所以这一细胞表面具有结构功能的蛋白质必然对男性生殖具有特异性的作用。有人推测, H-Y 抗原可能在生精小管的形成中发挥某种作用。

5. 睾丸决定因子位于 Y_p

1987 年, Page 等在一组染色体为 46, XX, 而表现型为男性的患者中发现他们的 XX 染色体中的一个 X 上携带着来自 Y 染色体 TDF 的新片段。删除分析法表明, 这一决定睾丸分化的片段位于 Y_p 的第一间隔区, 靠近 XY 配对互换区。进一步分析发现, 其中 1 例 XX 男性患者 X 染色体携带的 Y 片段序列却位于 XY 配对互换区之外 1A1 和 1A2 的间隔区之间, 而另 1 例 Y 与常染色体易位的女性患者的染色体恰好缺乏 1A2 和 1B 而成为女性表现型。显然, TDF 必然位于 Y_p 的 1A2, 分离和克隆这一由 140kb DNA 组成的片段含有一个编码锌指蛋白 (zinc finger protein) 的基因 (ZFY)。最可能是 TDF 的基因。但另外 3 例 XX 男性和 1 例 XX

段作为转基因 (transgene) 植入到 XX 小鼠胚胎的基因组中, 结果显示接受转基因的 XX 小鼠发育成雄性表现型, 从而最终证明 Sry 就是 TDF。然而, 最近一例 46, XY 和 SRY 阳性表现型为女性, 伴有多发畸形的无性腺患者的报道与此相左, 提示 SRY 对男性分化的决定作用机制是复杂的, 可能还有非 Y 染色体基因的参与。

(二) 常染色体和 X 染色体基因

除了 SRY 基因外, 还有其他常染色体和 X 染色体基因参与睾丸生成的级联反应。

1. WT-1 基因

Wilms 肿瘤抑制基因, 定位于 11p13, 含 10 个外显子, 在外显子 5 和 7 有两个交互剪切位点, 因而可产生 4 种不同的 mRNA 转录产物。WT-1 是一种转录因子, 在胎儿的肾脏间质和性腺原基以及成人的塞托利 (Sertoli) 细胞和颗粒细胞有表达。WT-1 基因剔除小鼠模型和同型合子突变都会影响肾脏和性腺的发育, 性腺停滞在胚胎早期阶段, 类似 45, X 综合症的条索状性腺, 这些事实证明 WT-1 基因参与了性腺原基的早期分化。

2. SF-1 基因

类固醇生成因子-1 (steroidogenic factor-1) 是一种孤儿核受体, 与甲状腺激素-类固醇-视黄醇受体超家族同源, 对垂体分化、类固醇激素 (细胞色素 p450 基因的组织特异性表达) 和 MIF 合成起关键作用。在胚胎第 9d 小鼠的生殖嵴、类固醇生成细胞、垂体促性腺细胞和下丘脑有表达。基因定位于 9q33, 基因剔除小鼠无论是雄性还是雌性都是雌性表型, 性腺和肾上腺缺如。人类尚无 SF-1 基因缺失的例证。

3. SOX9 基因

含有 SRY 样 HMG 盒的常染色体基因, 定位于 17q24.3~25.1, 在发育中的睾丸有表达, 特别是 Sertoli 细胞, 可能是在睾丸分化级联反应中 SRY 基因作用的下游起关键作用。

4. 9p24 和 10q26.1-ter

46, XY 个体的常染色体 9 短臂缺失和 10 长臂缺失可引起性腺发育不全和两性畸形, 推测在这两个区段存在影响睾丸器官生成的基因, 但是具体的基因尚未被克隆出来。

(三) 卵巢器官生成的相关基因

DSS (dosage-sensitive sex reversal on the X chromosome) 即 X 染色体的剂量敏感性性反转基因, 定位于 Xp21, 160kb, 与 DAX-1 (X 基因 1 的先天性肾上腺发育不全关键区) 基因位点重叠。46, XY 个体 DSS 位点复制可引起性腺发育不全和女性表型 (性反转), 而 DSS 缺失则不影响睾丸的分化。46, XX 个体 DSS 复制卵巢发育不受影响, 上述事实提示 DSS 对卵巢分化可能起重要作用。

此外, 45, X 和 X 短臂或 X 长臂缺失的患者卵巢发育能启动, 但是卵细胞不能进行减数分裂, 没有卵泡形成, 结果卵细胞变性退化, 引起性腺发育不全。说明

从卵细胞的减数分裂到排卵,两条X染色体的存在是必需的,控制卵巢分化的基因存在于两条X染色体上,但是相关基因尚未确定。46,XX型家族性性腺发育不全是常染色体隐性遗传,提示某些常染色体基因对卵原细胞有直接或间接的作用,决定了卵巢的器官生成。促卵泡激素(FSH)受体基因的同型合子失活突变亦可引起卵巢发育不全。

(四) 生殖管道分化的决定因素

如上所述,哺乳动物和人的遗传性别及成熟后的生殖功能,受性染色体和常染色体的调控。男(雄)性的生殖管道和外生殖器的分化与发育,则取决于胚胎睾丸分泌的三种激素及其作用的完整性。Jost在兔胚胎生殖管道未分化之前切除原始性腺,并将含T胶囊埋植在腹腔内,发现去势动物(雄性和雌性)的中肾管(Wolff管)分化为雄性附属性腺,同时出现外生殖器的男性化。这一试验证明,上述两个过程是雄激素依赖或介导的,但Müller管却并不萎缩,用抗雄激素制剂环丙孕酮乙酸酯(cyproterone acetate)对抗雄激素作用导致Wolff系统不分化和严重的外阴两性畸形;然而,Müller管的萎缩却照常进行而不受雄激素的影响。这一试验表明:①睾丸的存在是胚胎早期生殖管道的原基组织分化成男性生殖管道的决定因素;②睾丸分泌的雄激素决定Wolff管和生殖器的正常分化;③睾丸分泌另一种不同于雄激素的活性物质导致Müller管的萎缩,这一活性物质已被确证是抗Müller管激素。

1. Müller管

抗Müller管激素(anti-müllerian hormone, AMH)是睾丸Sertoli细胞分泌的一种糖蛋白激素,其分子量为145kDa。含13.5%的糖类的二聚体,成熟的颗粒细胞也能分泌AMH。牛的AMH已被纯化,编码牛和人的AMH的基因已被克隆,基因位于人第19号染色体短臂的顶端。AMH分子的C端与牛抑制素的 β 亚单位和 β 转化生长因子(TGF- β)有30%的同源性,它们同为TGF- β 大家族的成员。AMH是分泌于局部,只在局部引起Müller管萎缩。如果只有一侧睾丸分泌AMH,而对侧无该激素只引起分泌此激素的一侧Müller管萎缩,对侧不萎缩并分化成输卵管半个子宫和半个阴道上部。在一侧是睾丸,另一侧是卵巢的真两性畸形的Müller管残存综合征患者可见到这类内生殖器分化异常的表现。AMH诱发Müller管萎缩先于T对Wolff管的促分化作用。人胚Müller管萎缩始于第8周并于第9周完成。除此之外,AMH尚有以下三种功能:①体外试验表明,AMH促使胚胎卵巢形态与功能的男性化。胎儿卵巢在AMH作用下分泌T而不是 E_2 。②卵巢颗粒细胞分泌的AMH的功能虽然比较短暂,但它是卵母细胞减数分裂的抑制物,促使胎儿期已开始的卵母细胞减数分裂的终止。③胎儿血中AMH含量临产前最高,产后迅速降低,但在男性生后4~12个月之间血中AMH水平仍高,此后逐渐下降,一直到18岁才下降到测不出的水平。生后AMH仍然很高的生理意义不清,是否有促使睾丸下降的作用,目前仍有不同的观点。

2. 睾酮

Wolff 管的分化和外生殖器的男性化是 T 依赖过程。最近研究表明, 14.5d 的大鼠胚胎能产生 T, 先于胚胎对 LH 反应能力出现之前; 大鼠胚胎睾丸 LH 受体出现于 15.5d, 在 17.5~18.5d 之间 LH 受体显著增多, 与 T 促使 Wolff 管分化的最大效应同时相。但 T 合成的始发机制, 以及对 Wolff 管的分化机制仍不够清楚。有资料指出, T 对附属性腺的原基组织的分化向介于原始性腺的间充质与上皮组织的相互作用。

间充质本身在胚胎及生后具有雄激素受体活性和在胚胎期诱导上皮形态发生和细胞分化。在性别分化的早期 Wolff 管无 5α -还原酶活性, 故其早期的男性化不需要 DHT 的参与, 在前列腺、输精管和精囊腺形成之后才出现 5α -还原酶的活性产物 DHT, 后者在胚胎外生殖器官的分化与发育中起关键作用。

(五) 外生殖器官分化的决定因素

DHT 是雄性外生殖器官分化的决定因素, 它是在泌尿生殖窦和泌尿生殖结节之中的 5α -还原酶作用于 T 的代谢产物, 先天性 5α -还原酶缺陷和抗雄激素综合征患者, 因缺乏 DHT 或对雄激素不敏感, 外生殖器出现不同程度的男假两性畸形或完全的女性表现型。

第二节 性别分化

一、原始生殖腺的形成与分化

原始生殖腺包括生殖上皮、上皮下方的间充质和原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 三大不同部分。前两者来自于胚胎第 5 周时形成的生殖腺嵴 (genital ridge)。人胚第 5 周时, 中胚层的尿生殖嵴中部出现一条纵沟, 将其分为内、外两部分, 内侧部分短而细, 为生殖腺嵴; 外侧部分长而粗, 为中肾嵴。生殖腺嵴的表面上皮增厚称为生殖上皮, 生殖上皮下方即为上皮下方间充质, 二者之间无基膜分隔。生殖腺嵴的生殖上皮向其下方间充质增生形成许多不规则的细胞索, 称为初级性索。PGCs 来源于卵黄囊壁的内胚层细胞。也有人认为, PGCs 来自于迁至卵黄囊壁的原条外胚层细胞。PGCs 是一种大圆形的细胞, 呈嗜碱性。电镜观察, 显示其与早期内、外胚层细胞的结构极为相似。如胞质内含有大量游离核糖体, 而内质网很少, 线粒体大而圆, 但其嵴少见。细胞化学研究发现, PGCs 糖原反应阳性, 碱性磷酸酶反应强阳性, 这使 PGCs 能容易地与周围细胞相区别。

PGCs 能做变形运动。在小鼠胚胎第 8d, 约有 8 个 PGCs 离开卵黄囊, 转位于后肠上皮, 再沿着背系膜迁移至生殖腺嵴。在迁移过程中, PGCs 不断进行有丝分裂, 第 12d 时, 几乎所有 PGCs 迁移完毕, 细胞总数达 20 000~25 000 个。而在人胚第 19~22d, PGCs 开始出现于卵黄囊壁, 于第 25d 沿背系膜陆续向生殖腺嵴方向移动, 于 42d 到达并定居于生殖腺嵴, 为初级性索所包围 (图 3-5)。

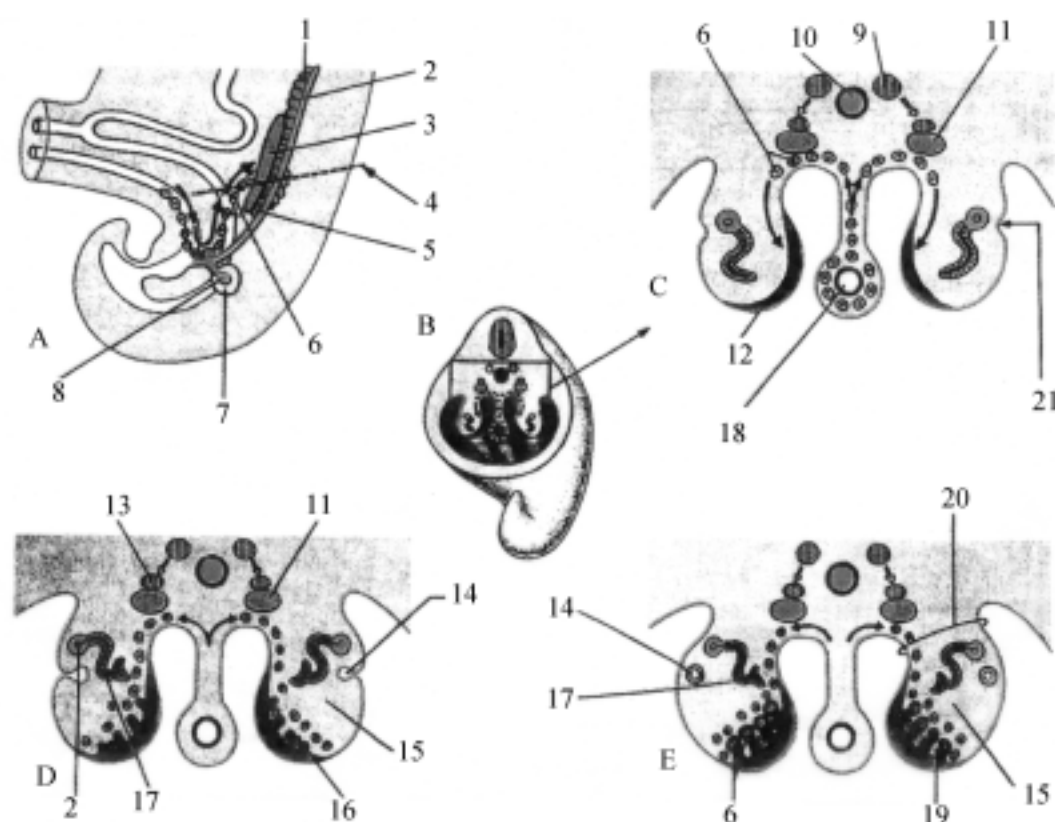


图 3-5 5 周人胚 (示原始生殖细胞迁移)

1. 中肾; 2. 中肾导管; 3. 性腺原基; 4. 图 C 的切面水平; 5. 中肾管;
6. 原始生殖细胞; 7. 生后肾组织; 8. 输尿管芽; 9. 交感神经节; 10. 大动脉;
11. 肾上腺皮质; 12. 生殖嵴; 13. 肾上腺髓质; 14. 中肾旁管; 15. 性腺髓质;
16. 原始性索; 17. 中肾小管; 18. 后肠; 19. 间充质; 20. 尿生殖间膜; 21. 中肾旁管形成部位

那么, PGCs 何以能迁移并最后终止于生殖腺嵴? 又何以会大量增殖呢? 原因可能有二: 其一是肠系膜上皮分泌的纤黏蛋白 (fibronectin) 与 PGCs 表面的整合素 (integrin) 相互作用, 使 PGCs 产生变形运动; 其二为生殖腺嵴能释放一些趋化因子, 吸引 PGCs 迁移并终止于生殖腺嵴。而 PGCs 的大量增殖, 被认为与 C-kit 及其配体 SLF 有关。

二、睾丸分化

1996 年, Jimenez 等提出了解释哺乳动物性别决定的模型。此模型表明单拷贝的活性 DAX-1 能在正常 XX 雌性中阻遏雄性发育途径, 在 XY 雄性中 DAX-1 受到 SRY 基因的作用而失活。同时, 此模型还表明, 在胚胎发育和分化的任何时刻卵巢组织都能分化成为睾丸组织, 这样, 雌性性状的正常发育必须永久地抑制雄性途径基因, 而雄性途径基因的抑制是通过不同的因子来实现。该模型能较为合理地解释了已报道的各种性反转现象, 将哺乳动物性别决定的分子机制研究向前推动了一大步。但哺乳动物性别决定的研究仍有许多问题未能阐明, 如 DAX-1 基因的作用位点未能确定, SRY 基因调节 DAX-1 是否有中间环节还不清楚, 而对雄性决定途径更知之甚少等, 都有待于进一步的深入研究。

人胚第 7 周, 原始生殖腺向睾丸分化时, 初级性索增殖, 并与表面的生殖上皮

分离,而与PGCs结合形成睾丸索。第8周时,生殖上皮与睾丸索之间的间充质形成一层很厚的白膜。白膜的出现是原始生殖腺向睾丸发育的一个重要标志,随着睾丸的不断增大,其与退化的中肾分开,形成了睾丸系膜,白膜的结缔组织在睾丸后缘增厚,形成睾丸纵隔。纵隔内的结缔组织延伸至睾丸索之间,形成睾丸小隔,把睾丸分隔成200多个小叶,每个睾丸小叶内的睾丸索可分化成1~4个细长弯曲的祥状生精小管。纵隔内及其邻近的睾丸索以后发育成睾丸网和直精小管。胚胎时期的生精小管为实心的细胞索,含两类细胞,即有由初级性索分化而来的支持细胞和由PGCs演变的精原细胞;直至性成熟前不久才产生管腔,开始精子发生。生精小管界膜的肌样细胞,在人胚第17周才出现(图3-6)。

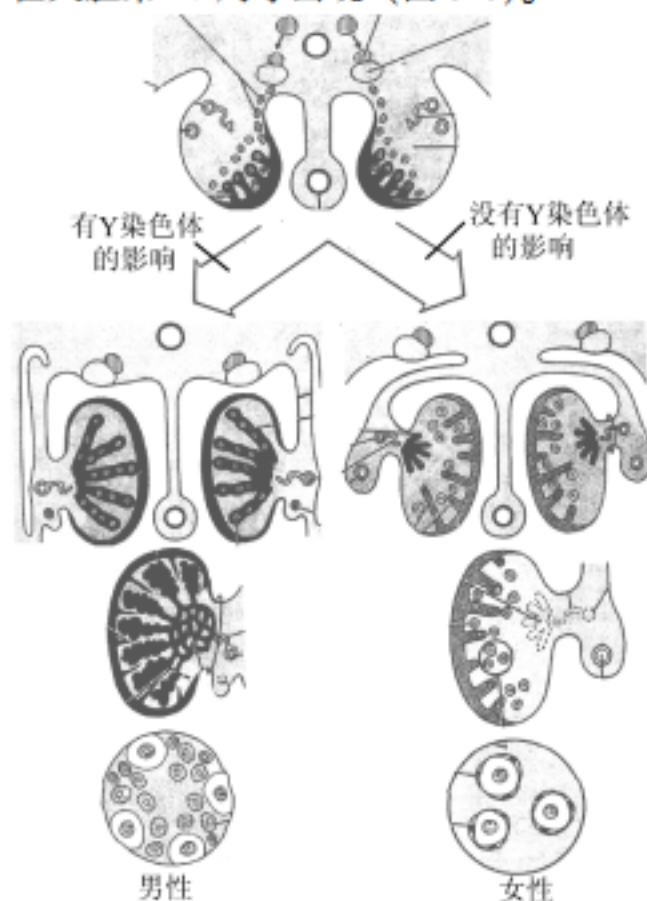


图3-6 性腺(睾丸与卵巢)的分化

分散在生精小管之间的间充质分化为睾丸间质及间质细胞。在hCG的作用下,间质细胞在人胚第8周时出现,并分泌雄激素。此时的间质细胞为分化前型,主要特征是胞质中滑面内质网和线粒体开始增加,而粗面内质网减少。间质细胞的出现标志着睾丸发育的开始。胚胎第9~14周时,转化为分化型间质细胞;15~18周时,睾丸间质细胞发育为成熟型,其数量明显增加,占睾丸体积一半以上,并具有旺盛的合成分泌雄激素能力,形成了胚胎时期雄激素的分泌高峰。随后,间质细胞变性退化。人胚胎间质细胞变性速度缓慢,要低于猴和啮齿类动物。一般在出生后几周,睾丸内几乎见不到间质细胞。胚胎时期间质细胞的变化周期平行于胚胎hCG水平。

睾丸原来位于腹腔的后上方,在以后的胚胎发育过程中,逐渐下降,直至进入阴囊内,此为睾丸下降。睾丸下降可分为两个阶段:人胚第2个月时,睾丸下降约

10个体节；至人胚3个月初，睾丸位置在腹股沟管上口附近，并保持至人胚28周，此为第1阶段。其时，腹膜沿腹股沟管向阴囊方向突出形成一盲囊，即睾丸鞘突(testicular vaginal process)，同时体壁肌肉及筋膜也随之伸入阴囊。随后，睾丸通过腹股沟环，沿着腹股沟管继续下降，越过耻骨缘，多数于人胚7~8个月，少数在出生后1周岁以内进入阴囊，此为第二阶段。由于腹股沟管围绕精索收缩，连接鞘膜腔与腹膜腔的狭窄通道逐渐关闭，一般在出生时或出生后不久便消失。若此通道不能关闭，一部分肠襻可以由此降入阴囊，引起先天性腹股沟疝。若一侧或两侧睾丸在1周岁以内仍未能降入阴囊，停留在腹腔或腹股沟管内，称为腹腔型或腹股沟型隐睾(图3-7)。



图3-7 睾丸的下降

关于睾丸下降的学说有很多，主要包括：①下丘脑、脑垂体和睾丸轴调控睾丸下降；②MIF (Müllerian inhibitory factor, MIF) 及雄激素共同调控睾丸下降；③生殖股核、生殖股神经及降钙素相关肽和睾丸引带轴调控睾丸下降；④胎盘睾丸轴调控睾丸下降；⑤睾丸引带增生和退化调控睾丸下降；⑥腹腔内压力和睾丸鞘突调控睾丸下降；等等。目前，多数学者认为：睾丸下降是机械力量包括睾丸引带的牵拉、腹腔内压力及头侧悬韧带退化和激素共同作用的结果。其中，睾丸引带起关键性作用。

睾丸引带是一种由未分化的间充质组成的长索状结构。其头端连接睾丸及附睾，尾端在睾丸下降之前或早期，位于腹股沟处，与未来的阴囊并无结构上的直接联系；在睾丸下降的中晚期，引带尾端才连接于阴囊深部。由于睾丸鞘突的形成，

睾丸引带被分成三部分：①固有睾丸引带，为鞘突脏层所悬吊，包括腹内和腹外两部分；②鞘膜部分，为引带围绕鞘突壁层的部分；③下鞘突部分，指未被鞘突所侵犯的引带尾端（图 3-8）。

在胚胎发育过程中，可能由于不同激素的阶段作用，睾丸引带经历了增生（out-growth）阶段和退化（regression）阶段两大形态学变化，这些变化对睾丸下降是完全必需的。

（一）睾丸引带增生

在引带发育过程中，由于构成引带的间充质细胞不断分裂增殖，以及

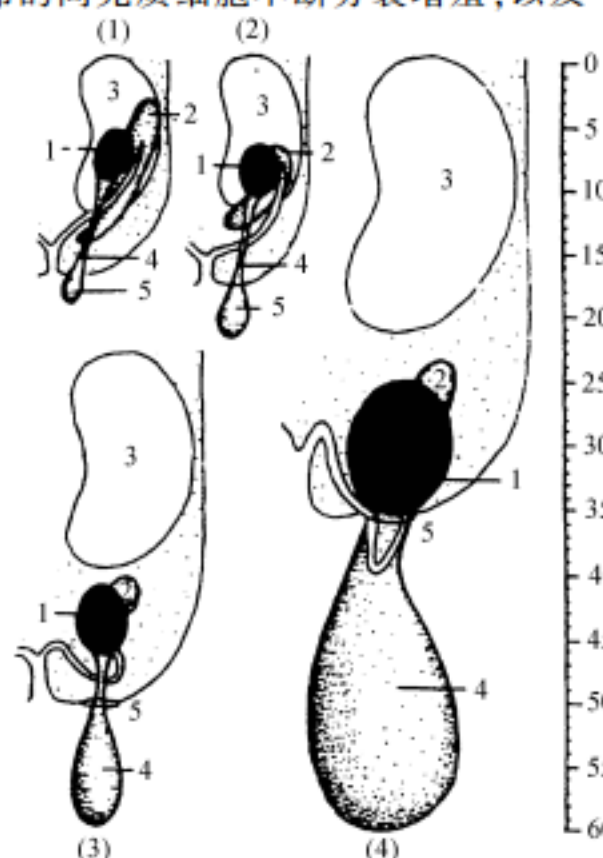


图 3-9 睾丸引带外突增生阶段变化

1. 睾丸；2. 中肾；3. 后肾；
4. 睾丸引带；5. 腹股沟内口

睾丸引带的间充质细胞减少；水解酶增加致透明质酸水解，细胞外基质降解，从而导致睾丸引带退化。退化主要发生于固有睾丸引带及下鞘突部分，并且这两部分最后转化为睾丸固有韧带和附睾韧带。睾丸引带的退化与雄激素有关（图 3-10）。

据此，我们可以假设：睾丸分泌下降素，而下降素可使睾丸引带增生，形成了

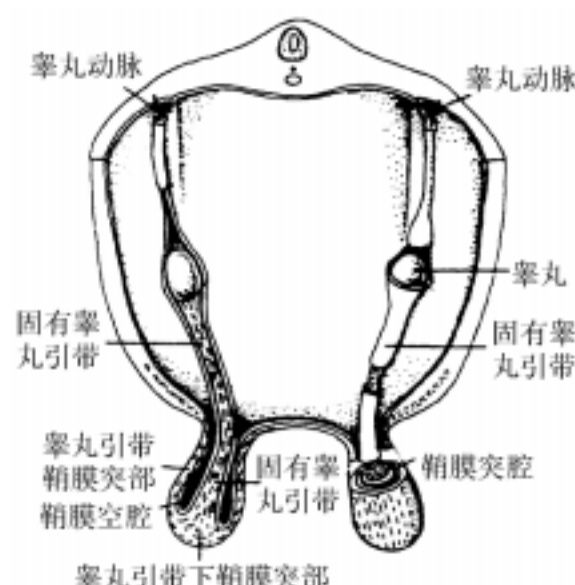


图 3-8 睾丸与睾丸引带

细胞外基质主要是透明质酸类糖胺多糖大量合成、增加，引带逐渐变长，使之越过腹股沟外环而深入至阴囊；同时，引带的直径也在不断扩大。至人胚 24 周时，引带直径已接近睾丸大小，而腹股沟管内固有睾丸引带的直径增加，导致了腹股沟管扩张，为睾丸最后顺利通过准备了有利条件（图 3-9）。

有许多实验表明，雄激素对睾丸引带增生不具调节作用。睾丸分泌的一种低分子量物质下降素（descendin）和雌激素可能调控睾丸引带的增生。下降素的结构不同于目前已知的生长因子，且它的分泌也不依赖于雄激素。下降素可以使睾丸引带的间充质细胞分裂、增殖，刺激引带增生。与下降素相反，雌激素能使引带的细胞外基质减少，抑制引带增生。

（二）睾丸引带退化

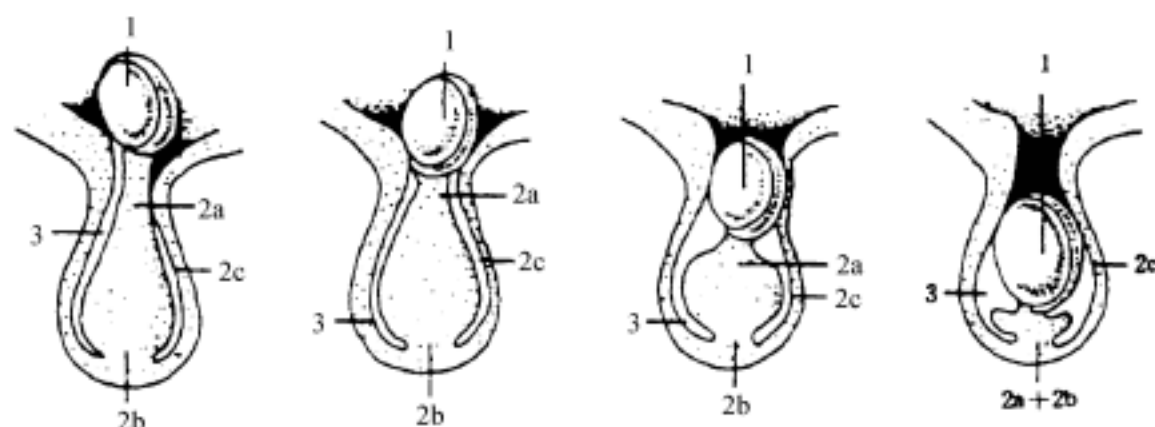


图 3-10 睾丸引带退化的四个阶段

1. 睾丸与附睾；2a. 固有睾丸引带；2b. 睾丸引带下鞘膜突部；
2c. 睾丸引带鞘膜部；3. 鞘膜突腔

男性化的腹股沟管。因为睾丸鞘突的形成，腹腔内压力可由之传递给睾丸引带；睾丸引带便牵引睾丸离开腹腔，进入腹股沟管并使之继续下降。通常的下丘脑、脑垂体和睾丸轴调节间质细胞分泌雄激素，雄激素诱导睾丸引带退化；而引带退化和腹腔内压力增加促使睾丸进一步下降至阴囊。

三、卵巢的分化

在无 Y 染色体的条件下，由于不存在 TDF，生殖腺分化为卵巢。人胚卵巢的分化比睾丸晚 6~7 周。胚胎的性染色体为 XX 时，含有原始生殖细胞的表面上皮增生，向深层间充质内又一次长出许多含有原始生殖细胞的上皮索，称次级性索 (secondary sex cord)。而原来的初级性索则逐渐退化消失。约在第 16 周，次级性索与表面上皮脱离，成为一个个细胞团，即原始卵泡。卵泡中央是原始生殖细胞分化来的卵原细胞，周围是表面上皮分化来的一层扁平的卵泡细胞，其外为间充质分化来的膜细胞。表面上皮与次级性索脱离后，变为单层立方上皮，覆盖在卵巢表面，它和卵巢系膜表面的间皮相连。卵巢分化的第一个标志是第一批卵泡出现于卵巢的中区。男性发育中性腺的生殖细胞均无减数分裂。减数分裂只在青春期时开始，其启动机制不清，但可能受分裂诱导物 (MIS) 与减数分裂抑制物 (MPS) 的相对浓度的调节。不同于男性胚胎的生殖细胞仅有减数分裂，女性胚胎的生殖细胞的首次减数分裂出现于第 3 个月左右，首先是靠中肾附近卵巢中区基底部的卵原细胞进入减数分裂。而位于卵巢周边的生殖细胞直到第 8 个月才进入减数分裂。调节女性胚胎期卵原细胞减数分裂的机制不清，可能同男性一样，受局部产生的 MIS 的启动，但被 MPS 或卵母细胞成熟抑制物 (OMI) 终止于双线期或双染色体期 (diplotene)。尽管生殖细胞被包围在特异的性索或卵泡的过程对产生甾体激素细胞的分化起很大作用，但人、灵长类和其他哺乳动物卵巢合成雌激素的时间有极大的种属差异性。人胚胎卵巢只在妊娠晚期，而灵长类胚胎卵巢在胎龄的第 8 周就出现很高的芳香化酶的活性。

四、生殖管道的分化

人胚第6周时，男、女两性胚胎都有两套生殖管道，即中肾管（又称 Wolff 管）和中肾旁管（又称 Müller 管）。胚胎性分化后，若生殖腺分化为睾丸，则中肾旁管退化，中肾管发育，其头端增长弯曲为附睾管，中段变直成为输精管，尾端形成射精管及精囊腺，而与睾丸相邻的中肾小管演变为睾丸的输出小管。尿生殖窦的中下段形成男性尿道前列腺部及膜部并长出前列腺。若生殖腺分化为卵巢，则中肾管退化，中肾旁管发育形成输卵管、子宫和阴道的一部分（图 3-11）。

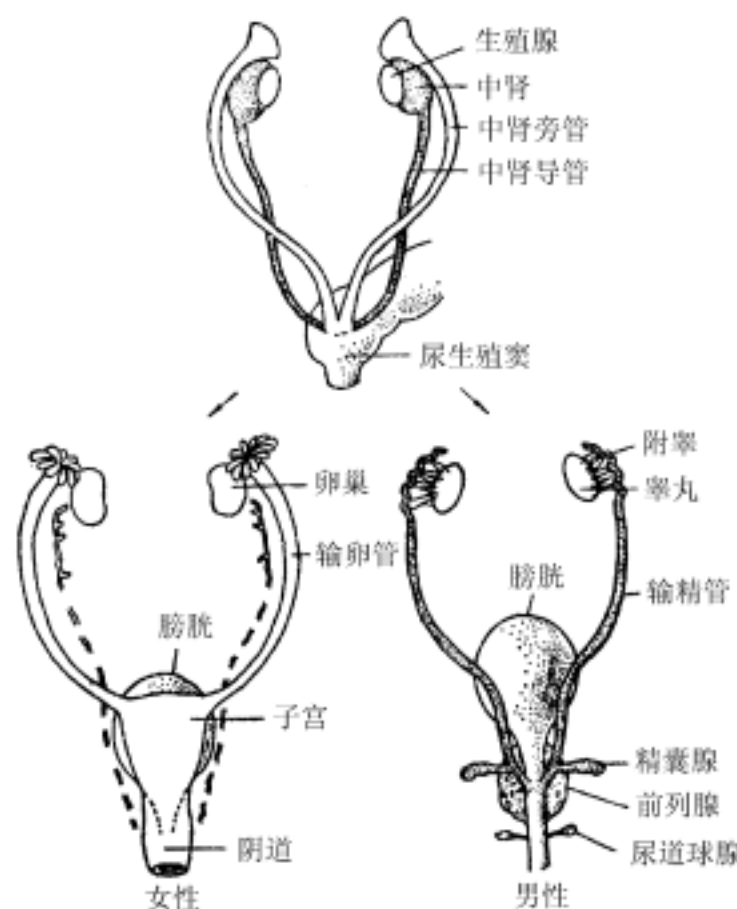


图 3-11 生殖管道的性别分化

在胚胎发育过程中，胚胎生殖管道和外生殖器的自然分化方向是向雌性发育。而生殖导管之所以能向男性分化，关键在于睾丸的存在，以及睾丸能发挥其正常功能。在生理条件下，胚胎睾丸的间质细胞能分泌雄激素，雄激素结合于中肾管、中肾小管的雄激素受体，使它们发育为男性生殖管道；胚胎睾丸的支持细胞可分泌抗中肾旁管激素（也称 MIS、MIF）。胚胎中仅在中肾旁管上存在 MIS 受体，所以，MIS 能通过结合其受体，促使中肾旁管退化。有人认为，SRY 蛋白作为转录因子，可结合于 MIS 基因的调控区，诱导 MIS 基因转录、表达；同时，SRY 蛋白还可结合于细胞色素 P450 芳香化酶基因调节区，抑制其表达，阻止雄激素转化为雌激素。所以，中性期生殖管道的分化也受 SRY 基因的调控。

五、外生殖器分化

人胚第 5 周时,尿生殖窦膜的头侧产生一突起,称为生殖结节 (genital tubercle)。在生殖结节的两侧各发生一个膨大为阴唇阴囊隆起 (labio-scrotal swelling)。在生殖结节的尾侧正中线上有一浅凹,称为尿道沟,沟底覆有尿生殖窦膜,于第 7 周时破裂。在尿道沟的两侧,阴唇阴囊隆起内侧,有一较小的隆起为尿道襞 (urethral folds),此为中性期的外生殖器,至人胚第 6 周时,已完全形成。

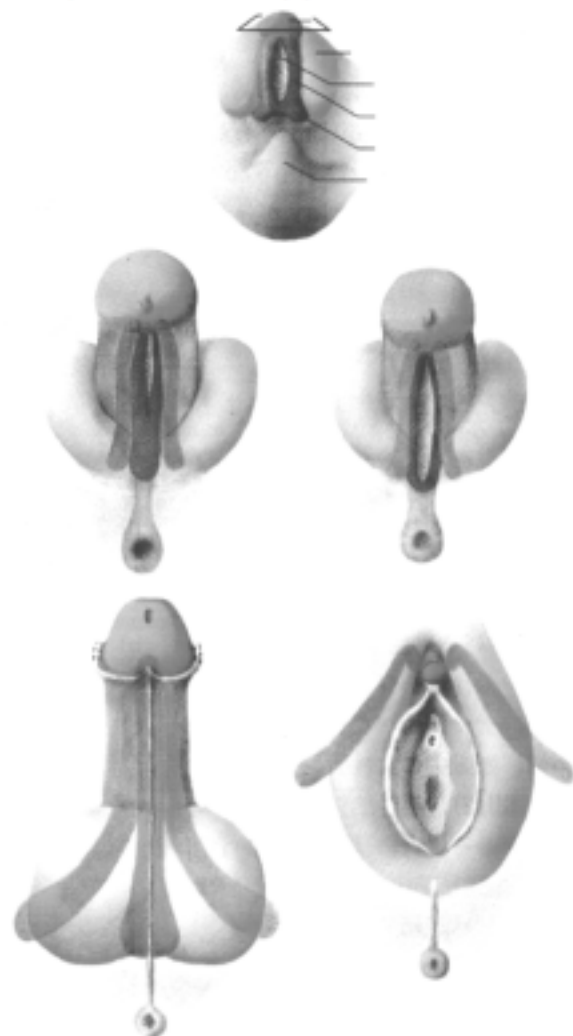


图 3-12 外生殖器发育与分化

人胚第 7 周,睾丸间质细胞分泌的雄激素,经外生殖器原基和尿生殖窦的细胞内高活性的 5α -还原酶的作用,转化为双氢睾酮 (DHT)。在 DHT 作用下,生殖结节伸长为阴茎,生殖结节中的间充质分化形成阴茎海绵体和尿道海绵体。尿道海绵体远端膨大为龟头。尿生殖窦的下段伸入阴茎形成尿道海绵体部并开口于尿道沟。不久,尿道襞由尿道沟近侧逐渐向阴茎远侧融合,并在其表面形成一融合线,即阴茎缝。这样,尿道外口逐渐移向阴茎头,最后移位于龟头顶端。龟头处形成一皮肤反褶,称为包皮。阴唇阴囊隆起移向尾侧,相互靠拢合并,在中线处形成阴囊,阴囊表面留有合并的痕迹,即阴囊缝 (图 3-12)。

若性腺为卵巢,无睾酮分泌,生殖结节分化为阴蒂,生殖皱褶分化为小阴唇,生殖隆突分化为大阴唇。

人胚第 9 周时,尚不能区分性别,至第 10 周时已可分辨性别了。

第三节 性别分化异常

性发育是一个极其复杂的过程,所以性发育异常也是多种多样的,如先天性卵巢发育不全 (Turner 综合征; 45, XO)、先天性睾丸发育不全 (Klinefelter 综合征; 47, XXY)、真两性畸形 (患者同时具睾丸与卵巢)、女性假两性畸形、男性假两性畸形等。本节仅讨论男性假两性畸形。

男性假两性畸形指患者本身是男性,核型为 46, XY, 性腺为睾丸,但却表现

为女性,具有完全或不完全的女性第2性征。本病发病率占有所有新生男婴的 $1/20\,000\sim 1/64\,000$,有明显的遗传倾向,同一家族中可有多人患此病。按其病因不同,本病可分为雄激素合成障碍、雄激素不敏感综合征、 5α -还原酶缺乏及母亲在早孕期服用雄激素制剂。

一、雄激素合成障碍

雄激素由睾丸间质细胞分泌,胆固醇是合成雄激素的原料。人睾丸摄取血浆胆固醇的能力很弱,主要在间质细胞内将脂肪酸经一系列反应合成胆固醇。合成的胆固醇可直接被利用,也可经酯化储存于脂滴中,当需要时,再经脂滴周围的酯酶水解而成胆固醇。

雄激素合成的第1步是胆固醇进入线粒体,这一步有微体(过氧化体)参与,微体内有一种甾体运载蛋白,能将羊毛甾醇转变成胆固醇并将胆固醇送入线粒体。线粒体内含 20α -羟化酶与双裂解酶,将胆固醇转变为孕烯醇酮。由孕烯醇酮形成睾酮有两条途径:

I. 孕烯醇酮 (a) (b) $\rightarrow$ 孕酮 (c) $\rightarrow 17\alpha$ -孕酮 (d) $\rightarrow$ 雄烯二酮 (e) $\rightarrow$ 睾酮

II. 孕烯醇酮 (e) $\rightarrow 17\alpha$ -羟孕烯醇 (d) $\rightarrow$ 脱氢表雄酮 (e) $\rightarrow$ 雄烯二醇 (a) (b) $\rightarrow$ 睾酮

上述反应中先后有5种酶参与,即(a) 3β -羟甾脱氢酶、(b) $\Delta^4\Delta^5$ 异构酶、(c) 17α -羟化酶、(d) $C_{17}C_{20}$ 裂解酶、(e) 17β -羟甾脱氢酶。这些酶主要位于滑面内质网上。

在合成各个环节中,各个酶的缺陷可导致不同程度的合成障碍,越是高位的缺陷,其临床表现也越严重。

1. 20 、 22 裂解酶或 20 -羟化酶

这些酶的缺陷导致胆固醇不能形成孕烯醇酮,大量脂肪堆积在肾上腺与睾丸。患者可有严重的肾上腺功能不全。患者具有女性外阴、女性生殖管道,尿内无 17 -甾酮,此病常引起死亡。

2. 3β -羟甾脱氢酶与 $\Delta^4\Delta^5$ 异构酶缺陷

此二酶缺陷使孕烯醇酮不能形成孕酮,导致睾酮合成障碍,患者外阴部男女难分。这种酶的缺陷也可使醛固酮及皮质醇减少,肾上腺皮质增生,严重可死于失盐危象。患者到发育期出现乳房肥大。

3. 17α -羟化酶缺陷

此酶缺陷阻碍了性激素和皮质醇合成,因此ACTH分泌增加,刺激肾上腺皮质分泌脱氧皮质酮与醛固酮。患者出现高血压与低血钾症状。患者外阴部男女难分,有一个小阴道,发育期身体升高,乳房不发育。

4. 17 、 20 -裂解酶缺陷

如果是完全性缺陷,其症状和 17α -羟化酶缺陷患者相同,但无高血压及低血钾。

5. 17β -羟甾脱氢酶缺陷

此酶缺陷使脱氢表雄酮(DHA)不能转化为雄烯二醇及睾酮,造成DHA堆积。

DHA 是一种弱雄激素, 由于该酶缺陷程度不同而表现不同的男性体态, 阴毛与阴茎也得到相应的发育。

二、雄激素不敏感综合征

雄激素不敏感综合征又名睾丸女性化综合征、雄激素抵抗综合征。在男性假两性畸形中, 睾丸女性化综合征比较常见。此病的原因是由于雄激素受体缺乏或有缺陷。雄激素要发挥作用, 必须在靶器官上有雄激素受体, 若无受体, 虽有雄激素也不能发挥其作用。产生雄激素受体的基因位于 Xq11 ~ 12 染色体上。此基因可发生突变, 突变后就不能产生雄激素受体, 这种突变的基因简称 Tfm。睾丸女性化的染色体组型为 XY (Tfm/Y)。由于睾丸女性患者体内雄激素受体正常, 睾酮 (T) 经芳香化酶的作用转变为雌二醇 (E₂)。在 E₂ 的影响下: 第二性征呈女性表现。睾丸女性化综合征属 X 连锁隐性遗传病, 具有家属遗传特点, 常常同一家族相继发病。睾丸女性化综合征又分为完全型与不完全型两种。

(一) 完全型睾丸女性化综合征

此类病人有睾丸, 但外阴部则与正常女性相同, 阴道比较短, 是盲端。腹腔内无子宫及输卵管。两侧睾丸的位置可在腹腔、腹股沟及大阴唇中, 以腹股沟部为最常见。在显微镜下观察睾丸, 青春期前, 与正常青春期前睾丸相似。青春期后, 生精小管直径较小, 精原细胞稀少。患者两侧乳房肥大, 体型也呈女性样。本病的另一特点是, 没有或有很少阴毛及腋毛, 患者血浆的睾酮与二氢睾酮与正常男性相同。

由于患者外阴部是女性, 在发育前一般不会引起注意, 往往是腹股沟部出现肿块, 在做手术时才发现。在发育期后, 患者常因原发性闭经、不育症求治。

完全型睾丸女性综合征的治疗着眼于性别选择与性腺处理。一般来说, 完全型睾丸女性化综合征作为女性处理比较合适, 睾丸则应切除, 因有恶变机会, 但应在青春期后切除, 因这种睾丸在发育时期能引起女性第二性征, 故应在发育完善后切除。睾丸切除后, 患者常出现类似女性经绝期症状。潮红、乳房缩小、阴道上皮萎缩等, 因此应长期给予雌激素治疗。

(二) 不完全型睾丸女性化综合征

不完全型睾丸女性化综合征指性腺、生殖导管、血浆性激素、促性腺激素、染色体组型、遗传性方式和完全型相同, 但外阴部有不同程度男性化, 伴阴毛及腋毛生长。不完全型睾丸女性化综合征, 根据男性化的程度不同, 有下列几种类型。

1. Lubs综合征

部分中肾管发育, 有性毛, 男性体型, 男性骨骼发育, 外阴倾向于女性。

2. Gilbert-Dreyfus综合征

男性个体, 阴茎小, 尿道下裂, 部分中肾管发育, 乳房肥大。男性化程度为中间性。

3. Reifenstein综合征

男性外阴，阴茎短小，有不同程度尿道下裂，阴囊分叉。发育期乳房肥大，有性毛。这是不完全型睾丸女性化综合征中最常见的一种。

4. Rosewater综合征

男性外阴部及生殖导管，发育期乳房肥大，脂肪分布呈女性样，有性毛。

后两种类型虽呈男性外形，但都不育。不完全型睾丸女性化综合征的治疗比完全型复杂，因其外形变化比较大，如 Reifenstein 综合征及 Rosewater 综合征外阴部几乎完全为男性，一般都当作男孩抚养。这样除纠正尿道下裂，把乳房脂肪及乳腺组织切除，再加雄激素治疗外，无其他措施。Lubs 综合征因外阴部倾向于女性，常作女性抚养，因之治疗以作为女性比较合适，青春期后切除睾丸。

睾丸女性化综合征的原因是由于雄激素受体 (AR) 缺乏或缺陷所致。目前关于 AR 的基础研究颇有进展，已进入分子水平。AR 是一种蛋白质，分子量约为 110kDa，由 919 个氨基酸残基组成，主要存在于核内，可分为雄激素结合区 (ABP)、DNA 结合区 (DBP) 及 N 端 3 个区。雄激素结合区由位于 C 端约 240 个氨基酸残基组成，该区除能与雄激素结合外，还有与热休克蛋白 90 (HSP90) 结合，受体的二聚化等功能。DNA 结合区位于受体的中部，由约 65 个氨基酸残基组成，该区与其他甾体受体高度同源，亦含有两个锌指结构，每个锌指由 4 个半胱氨酸 (Cys) 与中心的 Zn^{2+} 结合而成。锌指直接参与靶细胞中特定 DNA 序列的相互作用。N 端区由 555 个氨基酸残基组成，具有转录激活作用。作为一种配体依赖性转录蛋白，AR 与雄激素结合后，需通过与核中具有增强子性质的特定 DNA 序列-雄激素反应成分 (ARE) 相互作用，调节靶基因的表达，才能产生生物效应。实验表明，在雄激素不敏感综合征中，AR 的改变可以表现为量的缺乏或减少，亦可表现为结构与功能的异常，如与核结合的亲和力改变或其热稳定性降低等。

目前已能用男性外阴部皮肤成纤维细胞来测定 AR。外阴部成纤维细胞是雄激素的靶细胞，其 AR 量为非靶组织皮肤 (如腹部皮肤) 的 2 倍。何立敏等以 [3H] R1881 (一种人工合成的雄激素) 为配体，对外阴部皮肤内成纤维细胞的 AR 进行测定。成纤维细胞在体外易于培养成功并传代，一经培养成功，便可反复使用。作者对正常男性 20 例、完全性睾丸女性化综合征 3 例、Ⅳ度尿道下裂患儿 1 例，进行外阴部皮肤成纤维细胞 AR 与核结合力和热稳定的测定，结果发现睾丸女性化患者，AR 与核的结合力下降。至于热稳定性，当温度低于 42℃ 时，[3H] R1881 与核结合量改变不大；当温度高于 42℃ 时，正常人 AR 与核结合量减少不超过 40%，而睾丸女性化患者减少量高于 40%，表明 AR 呈热不稳定性。

三、 5α -还原酶缺乏

胚胎在向男性分化过程中， 5α -还原酶是个重要的因素， 5α -还原酶是依赖 NADPH (还原型辅酶 II) 辅因子的膜结合酶，高度疏水性，紧密地结合于核与内质网上。睾酮在进入有的靶细胞后，受细胞内 5α -还原酶的作用转变为二氢睾酮

(DHT)。胚胎时,生殖导管与外生殖器各部分的 5α -还原酶的活性高低不同,在中肾管的细胞内, 5α -还原酶的活性极低,几乎没有。在这里,睾酮本身与其受体相结合而起作用,因此中肾管分化为附睾、输精管、精囊等是依赖睾酮本身的作用。在前列腺始基及外生殖器的细胞内, 5α -还原酶活性很高,睾酮转变为 DHT 后,再与其受体结合而起诱导作用。因此,由生殖窦的一部分分化为男性尿道及前列腺,以及外生殖器的男性化是依赖 DHT 的作用。产生 5α -还原酶的基因在常染色体上,这个基因突变可引起 5α -还原酶的缺陷。这种缺陷造成假阴道会阴阴囊型尿道下裂,表现为阴茎像阴蒂,尿道开口于会阴部,有一浅的阴道。中肾管向正常男性分化,即附睾、输精管、射精管与精囊,并开口于尿生殖窦。睾丸在腹股沟或分叉阴囊内。成年患者精液内可有成熟的精子及各类生精细胞。在发育期间出现男性第 2 性征:肌肉发达、声音低沉、乳房不肥大、阴茎增大并能勃起和射精,但前列腺仍不长,面部无须。

Wilson 等把 Lubs、Gilbert-Dreyfus、Reifenstein、Rosewater 这四种不完全型睾丸女性化综合征称为家族性不完全型男性假两性畸形 1 型,而把假阴道会阴阴囊型尿道下裂称为家族性不完全型假两性畸形 2 型。2 型的治疗由于一般多按女孩抚养,故青春期后可将睾丸切除,尿生殖窦切开作阴道成形术。术后给予雌激素替代疗法。何恢绪等曾治同胞 4 人,其中 3 人为 2 型家族性不完全型男性假两性畸形,由于此 3 例自幼作为男孩抚养,双亲拒绝改变性别,且为时嫌晚,故仍维持原性别;阴茎小,尿道成形术难度较大。作者用带血管蒂包皮管正位尿道口成形术,3 例均一次成功。

睾丸内精子发生的维持是依赖雄激素,由于 5α -还原酶在正常睾丸含量低,因此过去一直认为精子发生的维持是睾酮的作用。但最近发现,睾丸内有一定量的 5α -还原酶,因之,染色体组型为 46,XY 的个体,当 5α -还原酶有缺陷时,精子发生的情形如何是值得研究的。

Johnson 等曾对 5 例染色体组型 46,XY,外形女性, 5α -还原酶缺陷的患者进行研究。5 例患者均选择女性,因而做了睾丸截除手术,其中 2 例,睾丸位于大阴唇内,另 3 例位于腹股沟管。对其中 2 例用组织分析法测定精子发生,1 例测定睾丸内 5α -还原酶活性,另对 4 例睾丸测定 DHT 与雄烯二酮。

2 例睾丸组织经光镜及电镜观察,发现生精小管的管径较小,可见精原细胞、初级精母细胞与支持细胞。其中 1 例无成熟精子,另 1 例可见未成熟精子。间质细胞正常。

1 例做睾丸组织内 5α -还原酶测定,未能测出 5α -还原酶活性。4 例进行睾丸组织激素测定。正常人睾酮为 70ng/mg 蛋白质, DHT 为 0.5ng/mg 蛋白质,雄烯二酮 2.5ng/mg 蛋白质。4 例 5α -还原酶缺陷病人为:睾酮较正常人高, DHT 较正常人低,雄烯二酮与正常人一样。作者还做了每日精子/睾丸的测定(采用 Johnson 介绍的方法, Biol. Reprod, 1981, 25: 217),结果其中 2 人无精子,3 人其精子只有正常人的 1/3。

以上结果显示,在 5α -还原酶缺陷病人,睾丸内的生精过程是受到影响的,但

由于这些睾丸位于腹股沟口或大阴唇内,温度可能较高,因此这些睾丸病变是温度过高引起,还是由于 DHT 缺乏所致还需进一步研究。Sanborn 等报道,在大鼠生精小管内的雄激素其结合特性与前列腺相似,属于 DHT 受体性质。如果精子发生需要的雄激素是 DHT,则在生殖系统内,睾酮的靶器官只有胚胎时期的中肾管了。Ito 与 Horton 报道,人睾丸能分泌少量 DHT。Ewing 报道,兔睾丸主要分泌 DHT 与雄烷二酮,其次才是睾酮。

四、MIS 异常

前文已提到,胚胎向男性分化时,生殖导管中的中肾旁管消失,这是由于 MIS 的作用。MIS 的基因位于常染色体或 X 染色体上。如此基因发生突变,MIS 的生物合成就会受到影响。如 MIS 的生物合成发生严重缺陷或出现过晚,错过性器官分化的时间(妊娠 8 周左右),中肾旁管便自动发育成输卵管与子宫。若 MIS 合成尚保留一定水平,则出现中肾旁管残迹——始基子宫与发育欠佳的输卵管,常伴随睾丸下降于腹股沟或阴囊中。此种病人常在隐睾或睾丸女性化手术中发现,术前诊断往往有一定困难,有经验的医生可在检查睾丸时发现,附睾部分有一硬结与附睾不能分开。

五、睾丸对人绒毛膜促性腺激素(hCG) 与黄体生成素(LH)不反应

胚胎间质细胞最初依赖 hCG 的刺激,其后则依靠胎儿 LH 的刺激。睾丸间质细胞缺如、发育不全,或对 hCG、LH 不反应,则造成男性假两性畸形。雄激素不足的程度决定生殖系统畸形的严重性。

六、母亲孕期服用含雄激素类药物

母亲在孕期服用合成孕激素类药物,如乙炔睾酮、炔诺酮、18-甲基炔诺酮、睾酮,或在服避孕药过程中怀孕(原则上应停药 3 个月到半年)均可引起女性胎儿外生殖器呈现男性化改变。女婴常出现阴蒂增大,阴唇融合。此种畸形出生后明显,不随年龄增长而加剧。男性化的程度与用药时间有关,在妊娠前 12 周用药可出现阴唇阴囊隆起融合。阴蒂增大程度与用药时间成正比。

如母亲孕期患含睾丸细胞的卵巢肿瘤或肾上腺皮质肿瘤,能分泌过多的雄激素,亦可引起女婴外阴畸形。

治疗原则应在学龄前施行手术,切除增大的阴蒂,或切开阴唇融合部分。

第四章

生殖功能的神经内分泌调节

生殖是动物维持种族延续的自然过程。生殖的基本过程主要由神经内分泌进行调节,神经内分泌是指神经元向血液循环分泌的概念,在生殖系统中神经内分泌存在于下丘脑。

第一节 神经内分泌调节的概念

神经系统与内分泌系统之间存在着密切的相互关系,神经系统通过多种方式调节内分泌腺的功能,也就是说机体的稳态是通过神经内分泌(neuroendocrine)调节而实现的。神经内分泌系统是由神经系统与内分泌系统构成的信息网络,网络中神经分泌细胞(neurosecretory cell)起着将两个系统联在一起的作用,使神经冲动转化成内分泌信息。内外环境变化产生的刺激由中枢神经系统接受并整合后,其冲动由神经元传到神经分泌细胞,使之释放神经激素入血液循环,从而引起较远距离的效应;此外,各器官的反馈信息(feedback information)也随时对中枢的反应进行校正,以维持机体的稳定,这就构成了严密而复杂的神经内分泌调节。

一、神经分泌细胞的性质

神经分泌细胞是向内分泌细胞分化的神经元。是 E. Scharrer(德国)在 1928 年首先发现,他发现体内某些神经元,除具有一般神经元的结构和功能外还有分泌激素的特征,能将电信息转变为由激素中介的化学信号。同时,我国生理学家朱鹤年在研究美洲袋鼠间脑的形态时,也指出室旁核具有神经分泌的特征。直到 20 世纪 40 年代,这一概念才由 Bargmann 和 Scharrer 使用组织化学研究得以证实,从而导致神经内分泌学的迅猛发展。

近20年来,神经内分泌学的研究表明,神经分泌细胞主要集中在下丘脑的神

经核团内,如视上核、室旁核、视前区、正中隆起等处,而位于下丘脑的垂体是神经激素作用的主要靶器官和中介区。神经分泌细胞的特点是,细胞的树突接受电信号之后,胞体内核周体(perikarya)合成相应的激素或前激素并形成分泌颗粒,然后由轴浆运送到轴突末梢贮存,或立即释放入血液循环,或弥散到细胞间液,对远距离器官或相邻细胞产生影响。下丘脑视上核和室旁核合成缩宫素(oxytocin)和加压素(vasopressin)的细胞就是典型的神经分泌细胞,合成后的激素由神经轴突传到垂体后叶,以颗粒的形式贮存,或释放入血液循环。下丘脑合成与分泌垂体激素释放激素和抑制激素的细胞也属于神经分泌细胞,它们将激素分泌到垂体门脉毛细血管内,进而调节垂体的功能。

神经激素在化学性质上绝大多数是肽类物质,故称为神经肽(neuro-peptide),这类神经分泌细胞也被称为肽能神经元。神经肽的生物合成过程是在与内质网相连的核蛋白体上进行的,然后被运送到高尔基复合体形成原始颗粒。在原始颗粒内的神经肽,通常是无活性的激素原,在颗粒转运和贮存的同时,与神经肽一起被包入颗粒内的特异性肽酶将激素原加工成有活性的激素,有些激素还在颗粒内与其运载蛋白相结合,最终在神经末梢经出胞作用(exocytosis)释放全部颗粒内含物。

二、神经内分泌调节的方式

神经内分泌调节的方式实质可以看做是神经内分泌反射。以家兔排卵为例,当交配使子宫颈受到刺激后,引起子宫颈感受器发出冲动,传至脊髓,上升到高级中枢神经系统,经整合后,信息传达到下丘脑,下丘脑中的神经分泌细胞因兴奋而分泌促垂体神经肽,从而刺激垂体产生促性腺激素(gonadotropic hormone, GTH),经血液循环作用于卵巢,诱发排卵。这一反射调节中,感受器、传入神经与中枢是神经性的,而部分传出通路和效应器则是内分泌性的。其中神经分泌细胞成为联系两大调节系统的纽带。作为纽带的信息传递方式有很大差异,大体可归为如下七种。

1. 神经元的突触传递

一个神经元接受电信号后,在胞体中合成神经递质,并通过轴突将神经递质输送到神经纤维的末端膨大处,即突触前部贮存,需要时,将神经递质释放到突触间隙,对突触后膜产生局部作用,这是神经系统中信息传递的最基本的方式(图 4-1)。

2. 神经分泌细胞的信息传递

通过神经分泌细胞的作用可以将神经系统的电信号转变成化学信息,后者经血



图 4-1 神经元间突触传递

液循环到达远距离的靶器官而产生影响。因此,神经分泌细胞即有神经元的功能,又有内分泌细胞的功能。

3. 内分泌细胞的信息传递

内分泌细胞只能接受化学信号,在胞体内合成,贮存并直接释放进入血液循环,以影响靶组织的功能,这是腺垂体激素作用于全身各组织,器官的主要方式,也是内分泌腺体反馈作用于中枢神经系统的主要方式,由此机体内的调节构成一个完整的信息网络。

4. 细胞间局部的信息传递

细胞间局部的信息传递是指细胞释放某种化学物质之后,通过细胞外液间隙,弥散至邻近的靶细胞的局部信息传递,称旁分泌(paracrine)(图 4-2),所分泌的物质为旁激素,多数为肽类激素。这类激素以局部作用于分泌细胞自身,调节自身的机能状态,这种分泌调节方式称自分泌(autocrine)。

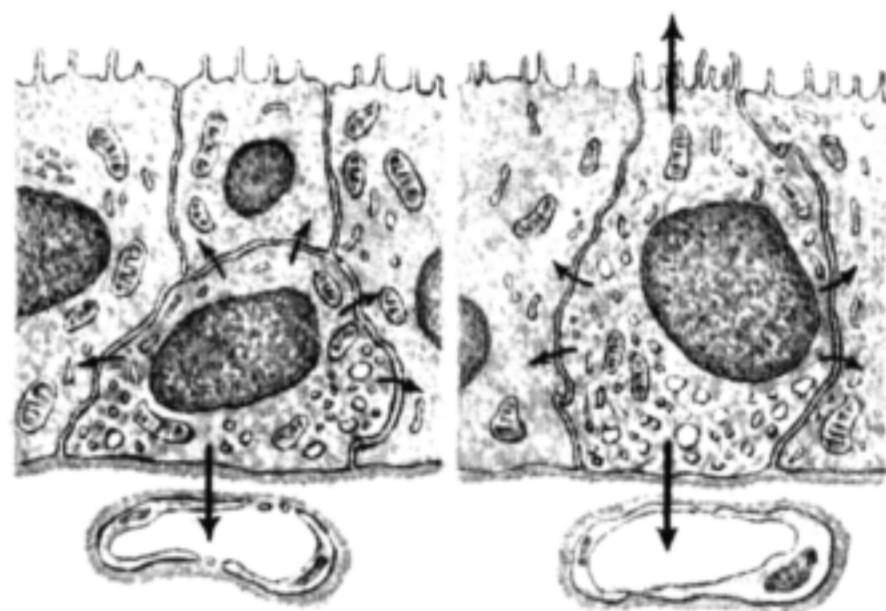


图 4-2 内分泌细胞的旁分泌

5. 细胞与细胞之间信息的直接传递

以上四种信息传递的方式都是间接的,而分布在生殖细胞之间的细胞间桥(intercellular bridge)和缝隙连接(gap junction)(图 4-3)起着直接传递细胞间信息的作用。由于细胞间桥的存在,使细胞信息得以迅速地传递,生殖细胞的周期发育可以同步进行。在具有细胞间桥的滋养细胞和卵母细胞之间存在着电位差,这种电极性所产生的差异导致卵原细胞或分化成卵母细胞或分化成滋养细胞。而颗粒细胞间的缝隙连接,允许一细胞内的 cAMP 传递到另一细胞, cAMP 作为第 2 信使,将前一细胞对促性腺激素的反应转给后一细胞,这样在同一组织内即使不是所有的细胞都直接接受到促性腺激素的刺激,也可以全部发生反应。在卵母细胞发育过程中,卵泡细胞和卵母细胞之间的缝隙连接则是具有营养作用。此外,在胚胎发育过程中,也常可观察到分化细胞之间信息传递通路的终止现象,以示分化成不同组织的各细胞之间的信息传递受阻。

6. 细胞内信息的相互调控

两种或两种以上化学物质共存于同一细胞内,作为神经递质或分泌物而相互制约的现象几乎在所有动物的体内普遍存在,从生理学角度,共存现象增加了神经内分泌调节的精细性和准确性,也使各种激素、受体和第2信使间的关系复杂化。

7. 外激素的信息传递

外激素(pheromone)是由某一个体分泌至体外,而由同种的另一个体所感受,引起后者行为或体内激素改变的化学物质。大部分外激素是一些简单的小分子物质,一般统称为 copulins,它们是由于体内激素对外分泌腺的刺激而分泌的。外分泌可通过神经或神经-内分泌系统引起快速可逆的反应,也可以调节一系列发展持续时间较长的神经内分泌活动。如将几只雌性小鼠合笼,可引起性周期的相互干扰,摘除嗅叶后上述反应缓解,可见这是外激素气味在小鼠间传播引起的。而外来的雄性小鼠的气味可引起雌性小鼠神经内分泌的一系列干扰,导致新妊娠的小鼠妊娠终止。在正常育龄妇女, copulins 在阴道分泌物中的含量随月经周期而变化,在卵泡晚期最多。

各种信息传递物质的作用方式多种多样,神经递质和内分泌激素之间有大量交叉现象,同一种化学物质在身体不同组织可以不同作用方式表现不同的功能,既可作为神经递质也可作为神经激素,内分泌激素或是旁激素发挥各种各样的调节作用。在生殖系统,下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH),已在卵巢与睾丸组织中发现,并具有其独特的调节作用。因此激素不只是必须“经血液循环携带至机体远处组织,发挥生理作用的一类化学物质”,而是可以通过多种途径传递的化学信息。因此 Growthman 认为,神经分泌、内分泌和旁分泌细胞实际上都应归为一个家族,统称调节细胞(regulatory cell),产生的分泌物统称为调节素(regulin)。但目前人们还习惯于“激素”这一名称。

根据激素的化学性质大体可分为两大类:一是多肽类,它们发挥作用时,首先与细胞表面的特异性受体结合;另一类是甾体激素和甲状腺激素,它们与细胞内的受体结合。一般含氮激素(包括肽类、蛋白质和胺类)和受体的相互作用激发细胞内某些介质的生成或浓度发生改变,从而导致一系列激素作用。而第2类激素和受体的结合导致某些特定基因转录的启动或终止,由 mRNA 的翻译产物体现激素的效应。不过近来发现,有些甾体激素和甲状腺激素的作用不是通过影响核内基因活动而产生的,它们可以直接影响蛋白质合成或第2信使的水平,而有些肽类激素也可与细胞内受体发生反应。

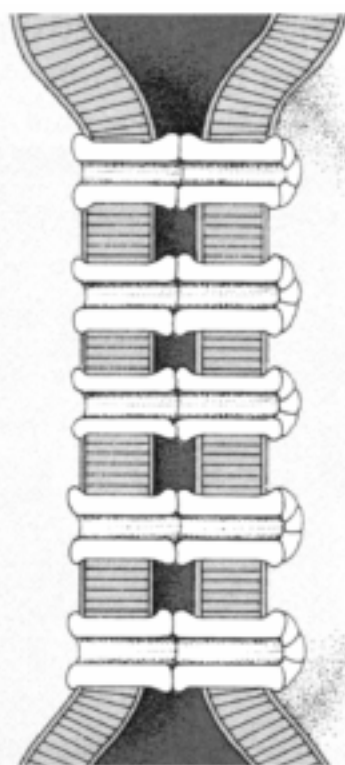


图 4-3 缝隙连接

三、下丘脑-垂体-性腺轴的概念

下丘脑-垂体-性腺(卵巢和睾丸)三级结构形成一个机能中心,使生殖功能活动维持正常,称下丘脑-垂体-性腺轴。轴系统的主线是下丘脑分泌促性腺激素释放激素(GnRH),通过垂体门脉血流到达腺垂体,控制垂体促性腺激素(LH,FSH)的分泌,后者经血液循环到达性腺,调节性腺的活动。相反,性腺分泌的激素也经血液循环到达下丘脑和垂体发挥调节作用;垂体促性腺激素也反作用于下丘脑,这种调节作用称为反馈调节(feedback regulation)。

正常的生殖功能除受性腺轴的调节外,还受各级神经中枢神经递质的调控及效应器官反馈信息的影响。中枢神经递质到下丘脑的信息代表了各种环境因素的影响,如外环境(温度、光照)、紧张状态(疼痛、恐惧和精神因素)和内在节律性(日周期、月周期和季节周期)。外环境集中到下丘脑,然后由下丘脑-垂体-性腺轴系进行表达与执行。

第二节 下丘脑-垂体

一、下丘脑和垂体的关系

(一) 下丘脑

1. 下丘脑的解剖

下丘脑(hypothalamus)位于间脑的最腹面,它包括第3脑室腹侧壁的下部及第3脑室底部的结构。

下丘脑向前向后分为三个区:视上区、结节区与乳头体区。下丘脑含很多神经核,视上区内有室旁核和视上核。结节区内有背内侧核、腹内侧核、后核、穹窿周围核、弓状核,乳头体区内有乳头体内侧核、乳头体外侧与中间核。

2. 下丘脑的组织结构

下丘脑的神经元分为神经分泌型细胞与非神经分泌型细胞。非神经分泌细胞与体温调节、摄食、心血管活动有关;而神经分泌细胞又可分为大型神经分泌细胞与小型神经分泌细胞。

(1) 大型神经分泌细胞:这种细胞体积大,胞质内含有颗粒,颗粒被Gomori法(酸性高锰酸-铬明矾苏木精)染色,故称Gomori阳性颗粒。主要位于视上核、室旁核与核间区,它们的轴突形成无髓纤维走向漏斗。视上核的纤维终止于垂体后叶,而室旁核的纤维只有小部分终止于垂体后叶,大部分终止于正中隆起。

过去认为视上核分泌加压素,室旁核分泌缩宫素(催产素)。后用免疫组织化学方法特异性地染色这两种细胞在视上核与室旁核内均有。最近发现,这两个核内尚有促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)神经元,其神经纤维走向正中隆起与垂体后叶。

(2) 小型神经分泌细胞:小型神经元多位于促垂体区,此区包括结节区和腹内侧区、弓状核、腹内侧核的一部分、视交叉上核等。小型神经分泌细胞的轴突无髓鞘,通向正中隆起的外层,终止于垂体门脉系统的初级毛细血管网附近。神经元分泌肽类激素,经垂体门脉到达腺垂体,可促进或抑制腺垂体中某些激素的释放。

3. 下丘脑分泌的脑肽

下丘脑分泌的脑肽相当多,已确定的下丘脑分泌的激素列于表 4-1 中。与生殖活动有关的是促性腺激素释放激素。GnRH 是一个不含游离氨基与羧基并由 9 种不同类型的氨基酸组成的 10 肽,其氨基酸的序列为:谷-组-色-丝-酪-甘-亮-精-脯-甘-NH₂。在弓状核、腹内侧核、室旁核、视交叉上核及内侧视前核等核团的多肽能神经元中能合成 GnRH,通过轴突终止于正中隆起和垂体柄上方,其神经末梢伸展到下丘脑-门脉血管中。

除下丘脑外,松果体、其他脑区、脊髓液中亦有 GnRH 的分布,在脑外组织如胎盘、肠、胰腺甚至乳汁中亦有它的存在。因 GnRH 首先在下丘脑发现,而且是调节垂体中 LH 和 FSH 的最主要激素,故仍认为是“下丘脑肽类”。

GnRH 的作用是促使腺垂体分泌 FSH 与 LH,但垂体并不是 GnRH 的惟一靶器官,GnRH 也作用于睾丸,在睾丸间质细胞上有 GnRH 受体,GnRH 抑制间质细胞合成睾酮,这个作用是直接的。此外,肝、脾、肾上腺髓质、肺、心肌内均有 GnRH 受体。

表 4-1 下丘脑分泌的激素

下丘脑激素	缩写	结构	主要功能
促甲状腺激素释放激素	TRH	3 肽	促进甲状腺素(TSH)
促性腺激素释放激素 (促黄体生成素释放激素)	GnRH (LHRH)	10 肽	促进催乳素(PRL),黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)
生长激素释放抑制激素 (生长抑素)	GHIH (SRIH)	14 肽	抑制生长激素(GH)和 TSH
生长激素释放激素	GHRH	43 肽	促进 GH
促皮质激素释放激素	CRH	41 肽	促进肾上腺皮质激素(ACTH)和 β -内啡肽
催乳素释放抑制因子	PIF	多巴胺?	抑制催乳素(PRL)
催乳素释放因子	PRF	未定	促进 PRL
卵泡刺激素释放因子	FRF	未定	促进 FSH
促黑素细胞刺激释放因子	MSH-RF	未定	促进黑素细胞刺激素(MSH)
促黑素细胞抑制因子	MSH-IF	未定	抑制 MSH

GnRH 神经元,一方面接受下丘脑以上的中枢(皮质、边缘系统、间脑)神经元所释放的神经递质的调节,如多巴胺与去甲肾上腺素具有兴奋作用。另一方面,GnRH 本身、FSH、LH 和性激素(睾酮与雌二醇)能抑制 GnRH 的释放,即具有负反馈作用。

(二) 垂 体

脑垂体(pituitary)是位于蝶鞍中的椭圆形小体,长约 1cm,宽约 1~ 1.5cm,高约 0.5cm,重约 0.5g。脑垂体由腺垂体和神经垂体两部分组成。神经垂体又分为神经部和漏斗两部分,漏斗与下丘脑相连。腺垂体则分为远侧部、中间部及结节部,中间部与神经部相贴连,结节部围在漏斗部周围。

1. 垂体的组织结构

(1) 腺垂体(adenohypophysis):腺垂体的远侧部是垂体的主要部分,约占垂体的 75%。根据细胞的染色不同,分嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和嫌色细胞三种。

中间部位于远侧部与神经部之间的狭窄部分,在人仅占垂体的 20% 左右。中间部是由一些大小不等的滤泡构成,腔内含有胶质。滤泡周围有一些嫌色细胞和嗜碱性细胞。

结节部呈套状包围着神经垂体和漏斗,漏斗前方较厚,后方较薄或缺如。结节部有丰富的纵行毛细血管,腺细胞沿血管呈条索状排列,细胞较小,主要是嫌色细胞,其间有少量嗜酸性和嗜碱性细胞,这些细胞功能不明。

(2) 神经垂体(neurohypophysis):神经垂体包括漏斗和神经部(漏斗部),具有神经组织的结构特点,有大量的无髓神经纤维。这些纤维的细胞体主要位于视上核,一部分位于室旁核。神经纤维沿漏斗到达神经部,终止于毛细血管附近,神经分泌颗粒沿轴突下降,在末端堆积较多形成赫令体。需要时,神经分泌物释放到周围血液中,因此神经垂体本身是贮存激素的仓库。

2. 腺垂体分泌的激素

腺垂体能通过分泌多种激素,分别调控外周器官的功能,简述如下:

(1) 促卵泡刺激素(FSH)与黄体生成素(LH):FSH 和 LH 是由腺垂体远侧部嗜碱性细胞分泌,FSH 促进女性卵泡成熟及分泌雌激素,促进男性精子形成。LH 促进女性排卵及黄体生成,并促进黄体分泌孕激素,对男性促进间质细胞增生,分泌雄激素。由于它们对男女两性的性腺均有调节作用,而且来源于腺垂体,故又称垂体促性腺激素(GTH)。此外,人胎盘分泌的促性腺激素,称人绒毛膜促性腺激素(hCG)。

(2) 促甲状腺素(TSH):由嗜碱性细胞分泌,刺激甲状腺生长及产生调节能量代谢的甲状腺素。

(3) 促肾上腺皮质激素(ACTH):由嗜碱性细胞分泌,功能是刺激肾上腺皮质(除肾上腺的球状带)的生长和肾上腺皮质激素的产生。

(4) 泌乳素(PRL):由腺垂体远侧部嗜酸性细胞分泌。人一生中的不同时期,血清 PRL 水平不一样。新生儿有较高水平,出生后 1 周以后,降至儿童时期的低水平。在男性,将终生维持在低水平,女性由于雌激素有刺激 PRL 分泌的作用,妊娠、生产后和泌乳期血清 PRL 明显升高。PRL 对乳汁开始分泌和维持分泌具有重要作用。

(5) 生长激素(GH):由嗜酸性细胞分泌,功能是刺激骨骼、肌肉及全身器官的生长和发育。

(6) β -脂肪酸释放激素(β -LPH):作为 β -内啡肽及 β -促黑激素等的前体。 β -内啡肽有镇痛作用,亦与情感与行为有关。

以上各种激素中,促黄体生成素(LH)、促卵泡成熟素(FSH)及促甲状腺激素(TSH)属糖蛋白激素。生长激素(GH)、泌乳素(PRL)属蛋白激素。促肾上腺皮质激素(ACTH)及 β -脂肪酸释放激素(β -LPH)属于类固醇激素。

(三) 下丘脑与腺垂体的联系

下丘脑与腺垂体之间主要通过血管联系,联系它们的血管叫垂体门脉血管。切断动物的垂体柄以阻断下丘脑与腺垂体的血管联系后,外周腺体萎缩、退化;如使门脉血管再通,腺垂体功能也可逐渐恢复。由此可见,腺垂体的功能必须受下丘脑的调控,垂体本身几乎无独立的功能。毁损下丘脑的某一区域,但保留垂体和循环完整,大多数动物的性腺发育不全或萎缩,电刺激下丘脑可使动情期家兔排卵,而直接刺激垂体则不能。

二、下丘脑对垂体促性腺激素的调节

腺垂体促性腺激素(GTH)包括黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH),它们的分泌主要受下丘脑 GnRH 的刺激作用。如果用特异性抗 GnRH 抗体中和内源性 GnRH 的活性,则 GTH 的释放减少,可引起不育和性腺萎缩。说明 GnRH 在维持 LH 和 FSH 的分泌过程中有关键性作用。

但从临床和实验资料中发现,LH 和 FSH 有各自的分泌型,它们对 GnRH 的反应并不总是同步的。因此,有人提出下丘脑还存在单独的卵泡刺激素释放激素,但至今尚未分离提纯。

GnRH 对腺垂体的作用有以下特点:

1. 脉冲式释放

正常情况下,GnRH 的分泌是脉冲式的,从而引起 GTH 的节律性释放。实际证明,垂体需要 GnRH 的脉冲式刺激才能保证对生殖系统的完整调节。GnRH 对垂体的非生理性刺激将使垂体 GTH 细胞对 GnRH 的敏感性下降,即所谓失敏现象(desensitization)。因此,现采用皮下埋置药物的缓释系统,抑制 GTH 的分泌,以达到抗生育的目的。另外,使用便携式自动注射泵,自动控制给药频率,使之符合 GnRH 的生理脉冲,用于治疗男女 GTH 分泌异常的患者。

目前认为,垂体细胞的失敏可能是一种分泌机制的关闭,失敏可能是由于 GnRH 结合到垂体 GTH 细胞后引起细胞表面受体数目减少造成的,而非受体的亲和力下降。GnRH 持续作用可使膜表面的受体不断内移、降解,而合成新受体的速度又较慢,不能及时补齐受体缺额,结果膜表面受体数目越来越少,以至使细胞丧失了对 GnRH 的反应性。

2. 自激作用

当第 1 个 GnRH 脉冲作用后,第 2 脉冲可对本身携带的信号起“放大”作用,使

垂体细胞产生更多的 GTH, 这一效应称为自激作用(self-priming effect)。这一作用与月经周期的时间以及雌激素的反馈作用有关, 在卵泡晚期和 LH 峰出现时最明显, 这是由于在不同时期雌二醇对 GnRH 的脉冲式释放实行正或负反馈调节的结果。

3. 垂体对 GnRH 的反应性

在性周期或月经周期的不同时期, GnRH 对机体的作用也有所不同。实验证明, 雌激素可提高垂体对 GnRH 的反应性。在卵泡初期, 血液中雌激素浓度较低, 垂体对 GnRH 的反应较低, 所以释放出的 LH 的量较少。但随着卵泡的发育成熟, 血液中雌激素的浓度逐渐增高, 垂体对 GnRH 的反应性也随之增高, 释放的 LH 量也显著增多。雌激素增强垂体对 GnRH 的反应性, 可能与增加促性腺激素分泌细胞上的受体数量有关。

第三节 中枢神经系统对下丘脑-垂体活动的调节

下丘脑-垂体分泌促性腺激素的调节生殖功能的作用既受到性激素的正、负反馈调节, 又受到环境因素和神经系统功能状态的影响。

各种中枢神经递质到达下丘脑-垂体调节垂体促性腺激素(GTH)和催乳素(PRL)分泌的作用方式可能有如下三种:

表 4-2 中枢神经递质及肽类激素对 LH、FSH 和 PRL 释放的影响

神经递质	缩写	LH	FSH	PRL	主要作用部位
多巴胺	DA	±	-	-	下丘脑, 正中隆起, 垂体
去甲肾上腺素	NE	± α	-	(±)	下丘脑
		β			
5-羟色胺	5-HT	± R2	0	+	下丘脑, 正中隆起, 垂体
		R1			
乙酰胆碱	Ach	(±)	(±)	-	下丘脑, 正中隆起, 垂体
组胺		(±)	(+)		下丘脑
γ-氨基丁酸	GABA	(±)	0	+	正中隆起
谷氨酸	Glu	+	+	+	下丘脑
内啡肽类	EnP	-	0	+	下丘脑, 垂体
血管活性肠肽	VIP	+	+	+	下丘脑
神经降压素	NT	+	+	-	下丘脑
前列腺	PG	+	+	+	下丘脑
胃泌素		-	-	-	下丘脑
胆囊收缩素-8	CCK-8	-	-	+	下丘脑, 垂体
P 物质	SP	(±)	(±)	-	下丘脑
神经肽 Y	NPY	±	0	0	下丘脑, 垂体
加压素	VP	-	-	0	下丘脑, 垂体
缩宫素	OX	-	-	0	下丘脑, 垂体

注: + : 刺激作用; - : 抑制作用; ± : 双重作用; 0: 无作用或无确切资料; (): 结果矛盾

- (1) 神经元与下丘脑神经分泌细胞的胞体、树突或轴突形成突触联系。
- (2) 神经元轴突向门脉血管中释放分泌物, 对垂体直接发挥调节作用。
- (3) 肽能神经分泌细胞内共存的神经递质对激素分泌的调节作用。

一种神经递质可引起一种或多种丘脑下部激素的分泌, 而一种下丘脑神经分

泌细胞也同时受到多种神经递质的调节。一种神经递质还可因效应细胞上特异性受体的类型不同而产生不同的效应。表 4-2 分别列出了神经递质对 GTH 和 PRL 分泌的调节作用。

一、中枢神经系统对 GTH 释放的调节

(一) 单胺类神经递质

1. 多巴胺(DA)

DA 的作用主要是抑制 LH 和 FSH 的分泌。但调节过程是复杂的,至少有以下四种因素参与这一调节过程:

(1) DA 作用的性质与性激素的环境有密切关系。

(2) DA 的作用取决于 DA 能神经元的激活程度,小剂量 DA 可引起 LH 释放,大剂量则呈抑制作用。

(3) DA 可作用于不同种类的受体。

(4) DA 在脑内可通过多巴胺 β -羟化酶转变成去甲肾上腺素(NE),而 NE 对 GnRH 神经元的活动又有兴奋与抑制的双重作用。

2. 去甲肾上腺素(NE)

NE 神经元与 GnRH 分泌细胞发生兴奋性突触联系,加强 GnRH 细胞的活动,促进 GnRH 释放,进而使血中 LH 和 FSH 水平升高。最近的实验证明,NE 还有抑制 LH 分泌的作用。

3. 5-羟色胺(5-HT)

5-HT 在调节促性腺激素的释放中的作用还不能肯定,资料表明 5-HT 不影响 LH 的基础脉冲式释放,而与近日节律有密切关系。

4. 组胺

一般认为,组胺可以刺激 LH 和 FSH 的分泌。但也有不少矛盾的报道,对人的观察发现,在男性组胺刺激 LH 的基础分泌,而对卵泡早期的女性则是抑制作用。

(二) 乙酰胆碱和氨基酸类神经递质

1. 乙酰胆碱(Ach)

在弓状核和正中隆起内有合成 Ach 的神经元,Ach 对 LH 释放有增加作用。Ach 可能直接对垂体发挥调节作用,而 Ach 的作用受多巴胺系统的调节。此外,也有关于 Ach 可抑制 LH 和 FSH 分泌的报道。

2. γ -氨基丁酸(GABA)

GABA 的作用机制之一可能是在正中隆起突触前抑制 NE 能神经元的活动。GABA 也能抑制下丘脑-垂体-睾丸轴的活动,使睾丸重量降低。

3. 谷氨酸和 N-甲基-DL-天冬氨酸(NMA)

它们都是兴奋性神经递质,可刺激血中 LH 和 FSH 水平迅速升高。谷氨酸和 NMA 的作用是通过垂体以上机制实现的,很可能是由于增加了 LH-RH 神经元的活性。

(三) 肽类物质

近年发现,中枢神经系统有许多神经元可分泌肽类物质,还有许多以前认为属于胃肠道激素的肽类物质在脑内也有。这些生物活性肽统称调节肽。在下丘脑大部分神经分泌细胞没有典型的突触结构,其神经末梢释放的物质不仅作用于临近的突触后膜表面,而且也可以扩散到组织液或血液中,影响较远距离细胞的功能。这些物质是在递质作用的基础上起协助性调制作用的。

1. 内源性阿片肽(EOP)

EOP 包括 β -内啡肽、脑啡肽、强啡肽等。它们对于垂体 GTH 的释放均具有相似的抑制作用。但作用途径还有待研究。

2. 脑啡肽

这类物质既存在于胃肠道,又大量存在于下丘脑内侧基底区、正中隆起和垂体门脉血管中,已知的有,血管活性肠肽(VIP)作用于下丘脑,使垂体 LH、FSH 和 PRL 的释放增加;神经降压素(NT)、P 物质(SP)和血管紧张素 II 也通过下丘脑使血中 LH 和 FSH 水平升高;而胆囊收缩素-8(CCK-8)和胃泌素对 GTH 的分泌是抑制效应。胃泌素对 PRL 的分泌起抑制作用,CCK-8 却是刺激 PRL 分泌。

(四) 前列腺素(PG)

在 GnRH 分泌细胞膜上有 PGE_2 和 $PGF_{2\alpha}$ 受体, PGE_2 可作用于 GnRH 细胞,使细胞内的 GnRH 减少,而释放入血中,增加血中 LH 的含量。另外, PGE_2 还可通过刺激松果体使褪黑激素增加,以间接影响 PRL 和 GTH 的释放。

二、中枢神经系统对 PRL 释放的调节

(一) 单胺类神经递质

1. 多巴胺

DA 通过抑制信号系统和增加细胞内溶酶体的数量与活性,使 PRL 释放量减少。

2. 去甲肾上腺素

实验证明,NE 可抑制 PRL 的释放。但其调节 PRL 分泌所需量很大,所以认为一般情况下 NE 不参与 PRL 的基础分泌的调节。

3. 5-羟色胺和组织胺

5-HT 对 PRL 释放有促进作用,组胺对 PRL 也具有刺激作用,这可能是通过抑制下丘脑多巴胺神经元的活性而实现的。

(二) 乙酰胆碱和氨基酸类递质

1. 乙酰胆碱(Ach)

Ach 抑制 PRL 的释放,这一作用只有在特殊情况下通过 DA 神经元实现。

2. 氨基酸类

γ -氨基丁酸对 PRL 的释放有双重调节作用,在垂体可直接抑制 PRL 的释放,而在下丘脑是强化 PRL 的释放。

(三) 肽类物质

内源性吗啡样肽(EOP)对 PRL 释放产生兴奋作用,其作用途径是减弱 DA 对 PRL 释放的抑制作用。

三、垂体激素的相互调节

(一) 垂体后叶素与 GnRH 和 PRL 释放

缩宫素(OX)通过 OX-受体介导机制抑制 GnRH 的释放,参与 GnRH 生理性分泌的调节,进而控制 LH 的释放。OX 还可抑制 PRL 的分泌,从而影响 PRL 对黄体的维持作用。

(二) PRL 与 GnRH 的关系

PRL 可抑制 LH 释放,而且 GnRH 也可影响 PRL 的分泌。

第四节 睾丸的功能与调节

一、精子的发生与调控

(一) 精子的发生

广义上说,哺乳动物精子发生开始于原始生殖细胞在胚胎期的迁移。在发育早期,原始生殖细胞离开卵黄腔,经后肠到达肠系膜区,在此形成生殖嵴。此后迅速增殖,并与体腔表皮细胞和中肾区 Leydig 细胞相互作用形成睾丸索。在睾丸决定因子的作用下,原始生殖索分化为睾丸。睾丸由间质和生精小管两部分组成。间质中的内含物主要是 Leydig 细胞、巨噬细胞、淋巴管和血管。生精小管中无血管,由支持细胞(Sertoli 细胞)和不同发育期的生精细胞共同组成生精上皮,其外包有基膜和类肌细胞。支持细胞之间在近基膜底部是一种称为紧密连接的结构,由此将生精小管划分为近基膜和近管腔两部分,形成血睾屏障,能阻止生长因子营养物质、某些肽类激素由间质进入生精小管腔。同时,也阻止生精细胞分泌的抗原进入间质受到免疫系统攻击。此外,多数类肌细胞间存在着紧密连接,类肌细胞层与基膜一起构成渗透性屏障,对某些小分子进行过滤,协助维持有效的血睾屏障。血睾屏障的建立使生精小管近管腔部形成不同于血液和淋巴液的特殊环境,是维持生精细胞发育所必需的。一般来说,精子发生是从精原细胞有丝分裂开始到形成外形成熟精子的过程。主要包括三个连续阶段(图 4-4):①减数分裂前阶段:精原干细胞通过有丝分裂形成 2 个子细胞,一个作为精原细胞进入精子发生过程,而另一

个作为精原干细胞贮存起来。进入精子发生过程中的精原细胞通过一系列有丝分裂，产生前细线期精母细胞，该过程发生在血睾屏障之外。② 减数分裂阶段：细胞经细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期发生第 1 次分裂，产生次级精母细胞。后者很快发生第 2 次分裂，产生单倍体圆形精细胞，该过程在生精小管近管腔处发生即已越过血睾屏障。③ 减数分裂后阶段：圆形精细胞经过精子变态形成睾丸成熟精子，释放到生精小管管腔中，这个过程称作精子变态。包括顶体形成；核浓缩；染色体上的组蛋白由鱼精蛋白替代；染色体变成致密的染色质纤维，使核不再具有转录活性；鞭毛的发育；细胞质和细胞器的重组；精子排放等过程。

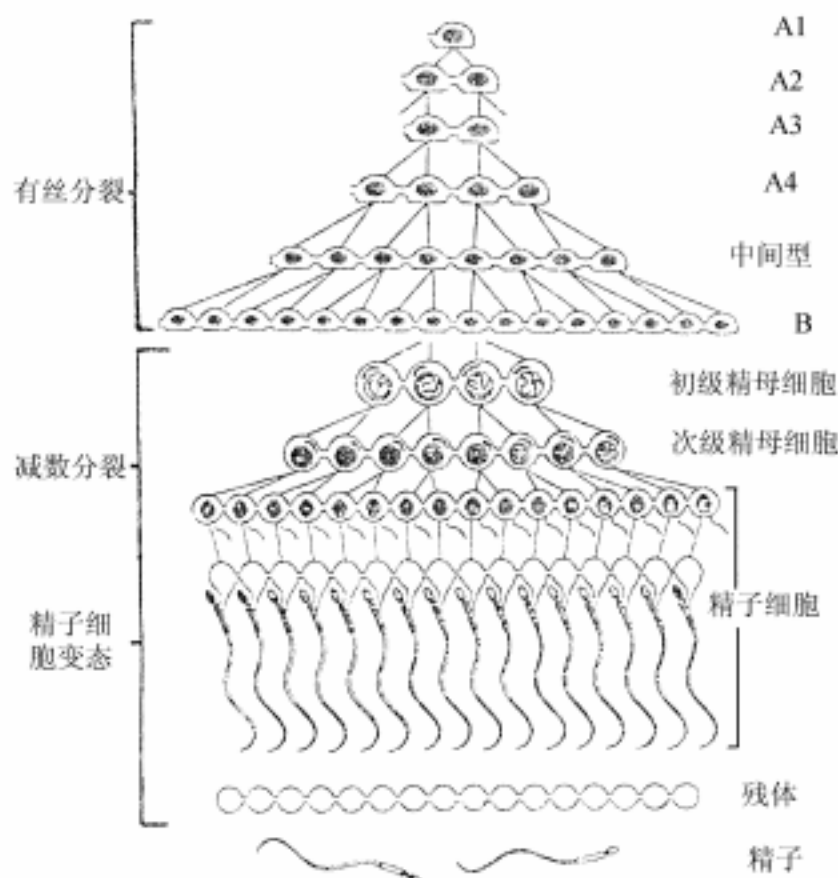


图 4-4 精子发生示意图

生精小管中组成精子发生过程的各种细胞的排列并非随机，而是高度有序。一代生殖细胞与其前后代的生殖细胞在生精上皮中相互交叠，组成一个恒定的生殖细胞混合体，称为细胞组合。一个细胞组合的所有细胞分布于生精上皮的基膜到管腔的各部分。不同细胞组合按一定次序在生精上皮中顺序出现，使精子发生成为一个周期性循环过程。完整的精子发生过程，即从干细胞有丝分裂到睾丸精子形成，需经 4 个生精周期。

众多的研究表明，精子发生效率和下列因素有关：不同种属动物精子发生的效率有较大差异；进入减数分裂前精原细胞进行有丝分裂的次数是决定精子发生效率的一个关键因素；生殖细胞退化是精子发生中的正常现象。生精细胞退化是影响精子发生效率的一个因素，出现退化的生殖细胞包括精原细胞、精母细胞及精细胞。生殖细胞的退化死亡和清除方式是通过凋亡；由于能进入减数分裂的精母细胞数依赖于精原细胞数，精原细胞数是影响精子发生效率的又一个重要因素。FSH 和

抑制素的协同作用能调节进入减数分裂的精原细胞数；另外，维生素 A、激活素及 IL-1 等可能参与精原细胞数的调节。

(二) 精子的发生调控

精子的发生受内分泌和细胞间相互调节 (图 4-5)。FSH、LH 及雄激素在生精过程中都是必需的，缺一不可。FSH 是启动精子发生的最重要的因子。FSH 通过 cAMP 和钙离子信号途径直接调节支持细胞或及生精细胞。FSH 的作用可能是改变支持细胞的结构及功能；产生有利于精子发生的条件，从而启动精子发生。LH 作用于 Leydig 细胞，启动雄激素合成。雄激素是精子发生调节中最为重要的激素，睾丸内类肌细胞和支持细胞是其靶细胞。雄激素分别作用于类肌细胞和支持细胞。作用于前者产生支持细胞调节蛋白，最终以雄激素和支持细胞调节蛋白，实现对支持细胞的双重调节。虽然内分泌激素对精子的发生起重要调节作用，但大多数激素不能穿越血睾屏障，不能直接对精子的发生行使调节作用，它们需睾丸体细胞介导，睾丸内各种体细胞的调节及细胞间相互作用对正常生精过程起重要作用。支持细胞是生精上皮中惟一与生精细胞相接触的细胞，它在精子发生中发挥重要作用。精子的发生是在支持细胞调节下生精细胞程序分化的结果。

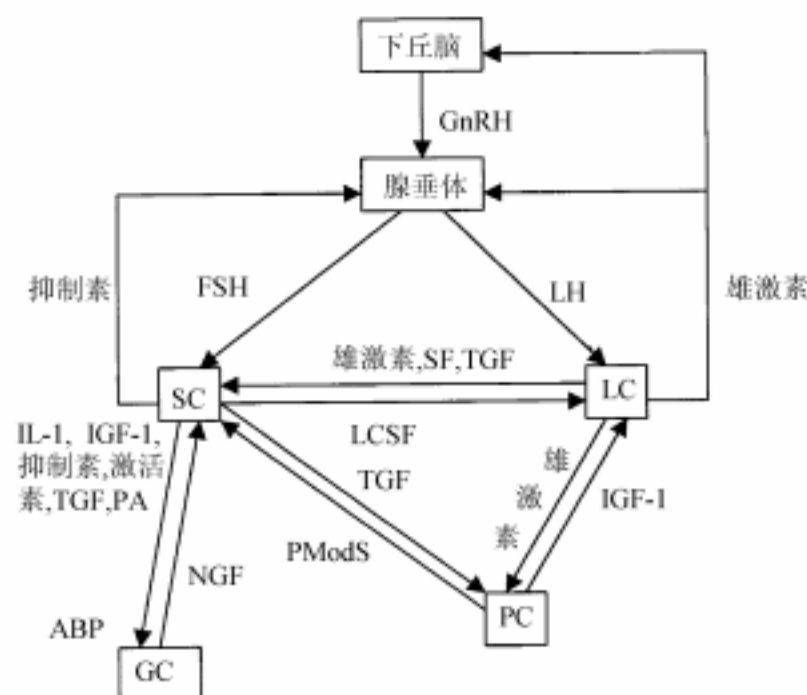


图 4-5 精子发生调节图示

LC: Leydig 细胞; SC: 支持细胞; PC: 类肌细胞; GC: 生精

二、支持细胞的功能与调控

(一) 支持细胞的功能

支持细胞的功能概括以下三个方面。

1. 控制精子发生的微环境

一个支持细胞可同时与多个不同分化阶段的生精细胞接触，为其提供环境支持

作用。由支持细胞形成的血睾屏障的建立为精子发生过程中不同阶段的生精细胞提供相应的微环境。减数分裂前的生精细胞可与体液接触。减数分裂后阶段的生精细胞与体液隔绝。这些细胞的分裂和分化只需要某些特定生长因子。支持细胞分泌的 α -巨球蛋白, 它在体外可刺激许多细胞生长, 并可与许多生长因子特异性结合。

2. 营养作用

减数分裂后的生精细胞与体液隔绝, 不能利用体液中的营养物质, 必须依靠支持细胞作为中介将体液中必要营养物质经加工或直接提供。生精细胞和支持细胞间存在桥粒式缝隙连接, 小分子物质可自由通过这种连接。另外, 有的小分子物质由于低水溶性或是化学反应活性, 不能以自由扩散的方式通过上述连接, 需支持细胞分泌的转运蛋白协助运输, 这些转运蛋白主要有雄激素结合蛋白 (ABP)、转铁蛋白、维 A 酸结合蛋白、视黄醇结合蛋白, 分别运载雄激素, 电子传递链中细胞色素 c 的辅助因子 Fe, 维生素 A 及其衍生物维 A 酸。在能量代谢上, 生精细胞不能利用体液中的葡萄糖, 但能特异表达乳酸脱氢酶, 利用丙酮酸和乳酸作为有效能源, FSH 能促进支持细胞对葡萄糖的摄取, 同时使支持细胞外乳酸和丙酮酸水平升高。

3. 调控作用

FSH、LH、雄激素对精子发生的调控作用最终是通过对支持细胞的调节实现的。cAMP 可能通过紧密连接由支持细胞进入生精细胞, FSH 是惟一能启动支持细胞产生 cAMP 的因子。cAMP 水平受 FSH 调控, FSH 由此而间接调节生精细胞的分裂和分化。Leydig 细胞是 LH 作用的靶细胞, LH 是控制间质中睾酮产生的主要刺激因子。雄激素作用于支持细胞和类肌细胞对精子发生的启动和维持是必须的。成年哺乳动物支持细胞功能受 FSH 调控, 但睾酮起更重要的作用。支持细胞可分泌多种生长因子如 IGF-I, 通过 IGF 受体调节精母细胞减数分裂的 DNA 合成。

(二) 支持细胞的调控

支持细胞的行为受内分泌和旁分泌调节。支持细胞是 FSH 作用的靶细胞, 有两类 FSH 受体, 一类是与 G 蛋白偶联, 一类与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ 离子通道偶联, 不同受体激活后, 可发挥不同的效应。雄激素对支持细胞的调节作用主要通过类肌细胞分泌的支持细胞调节蛋白介导。支持细胞调节蛋白对支持细胞具有广泛的调节作用, 如雄激素结合蛋白 (ABP) 和转铁蛋白的表达以及雌二醇合成。Leydig 细胞分泌激活素, 而支持细胞表达激活素受体, 因此, Leydig 细胞可能通过激活素调节支持细胞。另外, 支持细胞表达低亲和性神经生长因子 (NGF) 受体-LNGFR 和 gp140, NGF 存在于从精原细胞到成熟精子的各分化阶段生精细胞中, 它可能构成从生精细胞到支持细胞的一条重要信息通路。

三、Leydig 细胞的功能与调控

哺乳动物体内的雄激素 95% 由睾丸 Leydig 细胞分泌。肾上腺皮质的网状带仅

分泌少量雄激素。成熟型 Leydig 细胞呈圆形或多边形,核圆居中,核仁明显,异染色质位于核边缘,细胞质嗜酸性(图 4-6)。组织化学法显示胞质中有 3 β -羟甾脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、乳酸脱氢酶等。Leydig 细胞具有分泌类固醇激素的细胞结构特点。滑面内质网较多且有丰富的合成胆固醇的酶,因而滑面内质网的发达程度往往反映 Leydig 细胞合成胆固醇的能力,也反映 Leydig 细胞合成雄激素的功能状态。滑面内质网在胞质中可从一处移向另一处,这种现象可能与转运胆固醇有关。细胞的高尔基复合体发达,虽然在高尔基体区未见分泌颗粒,但细胞受脑垂体促性腺激素刺激后,可见高尔基复合体囊泡膨胀,因而推测高尔基复合体与类固醇激素的合成分泌有关。Leydig 细胞内的线粒体大而丰富,呈多形性,主要是管状嵴线粒体,线粒体基质中富于脂肪酸 β 氧化酶系。细胞质中常有脂滴。一般认为,细胞本身合成的胆固醇或细胞从外界摄取的胆固醇很快被酯化,并以脂滴形式积聚在胞质中。在脂滴周围的胞质中,有可溶性脂肪酶存在。在脂肪酶作用下,脂滴中的胆固醇酯可释放出游离的胆固醇。Leydig 细胞中的脂滴分布、大小和数量不一,脂滴中含有合成类固醇激素所需的基本物质。因此,合成功能活跃的 Leydig 细胞利用脂滴中的物质比较快,脂滴较少,体积也小;反之,合成功能不活跃的 Leydig 细胞,脂滴较多,体积也大。脂滴含量的多少,在一定程度上可作为衡量间质细胞功能的一个形态学指标,但不能仅依据个别或少量细胞中脂滴增多而得出 Leydig 细胞功能障碍的结论。Leydig 细胞表面有微绒毛。相邻 Leydig 细胞间有缝隙连接和桥粒。缝隙连接有利于细胞间某些离子和小分子物质的交换,如 cAMP 就易于通过。滑面内质网与缝隙连接关系密切,在滑面内质网上富含合成类固醇激素的酶,而 cAMP 则能刺激 Leydig 细胞合成类固醇激素。缝隙连接不仅是 Leydig 细胞物质运输的重要通道,而且也是对类固醇激素合成起局部调节作用的信号传递部位。



图 4-6 Leydig 细胞的超微结构模式图

根据 Leydig 细胞的年龄性变化,一般将 Leydig 细胞归纳为以下几个发育阶段:胚胎期 Leydig 细胞,婴幼儿期 Leydig 细胞,青春期前 Leydig 细胞,青春期 Leydig 细胞,成年期 Leydig 细胞以及老年期 Leydig 细胞。某些动物的 Leydig 细胞还存在季节性变化。

根据 Leydig 细胞的年龄性变化,一般将 Leydig 细胞归纳为以下几个发育阶段:胚胎期 Leydig 细胞,婴幼儿期 Leydig 细胞,青春期前 Leydig 细胞,青春期 Leydig 细胞,成年期 Leydig 细胞以及老年期 Leydig 细胞。某些动物的 Leydig 细胞还存在季节性变化。

人胚胎第 8 周,可见分化前型胚胎期 Leydig 细胞,呈长梭形。以后逐步变为圆形或多边形,细胞结构也呈现出合成类固醇激素的活跃状态。胚胎第 9~14 周其转化为分化型 Leydig 细胞。在胚胎第 14~18 周,睾丸 Leydig 细胞发育为胚胎成熟型,形成雄激素分泌的第 1 次高峰。随后,Levdig 细胞变性退化。至第 7 个月,

Leydig 细胞已十分稀少、散在,表现为一种去分化倾向,呈成纤维细胞样状态。出生后, Leydig 细胞进一步退化,称为婴幼儿期 Leydig 细胞。青春期前(2~12岁),睾丸间质中又开始出现未成熟型 Leydig 细胞,这是一种静止型 Leydig 细胞,无合成、分泌雄激素的能力。至青春期,大量成熟型 Leydig 细胞出现,这些 Leydig 细胞不仅具有成年期细胞的形态结构特点,而且细胞内出现丰富的与类固醇激素合成有关的酶,表明 Leydig 细胞已进入合成和分泌类固醇激素的功能时期。此时,体内出现了雄激素分泌的第2次高峰期。在成年期, Leydig 细胞的数量、结构和功能保持相对稳定。对于老年期 Leydig 细胞的变化,虽然有不同的说法,但一般情况下,随着年龄增长, Leydig 细胞发生退行性变,表现为空泡增多,脂滴和色素积聚,细胞数量也逐步减少。成熟型 Leydig 细胞不再分裂,但 LH 能促进 Leydig 细胞数量增多。增加的细胞可能由其他前体细胞分化而来。成熟型 Leydig 细胞和胚胎型 Leydig 细胞存在功能差异,后者胞内 5α -还原酶、芳香化酶活性低,膜 LH 受体无 LH 所致的下调现象,故能生成更多的雄激素。

在雄性哺乳动物体内, Leydig 细胞是合成、分泌睾酮最主要的细胞。睾酮是调节雄性生理最重要的激素,其在不同的发育阶段有不同的作用。胚胎时期,睾酮能诱导胚胎的雄性化,包括刺激雄性生殖道、外生殖器、附性腺分化,并促进脑垂体功能性分化。青春期,睾酮与 FSH 共同启动了精子发生,促进外生殖器和附性腺的发育和成熟,激发雄性第2性征和性功能。成年期,睾酮对维持精子发生、第2性征和性功能是必需的。睾酮分泌不足将会导致一系列雄性生理异常。

(一) Leydig 细胞中睾酮合成调节

传统的观念认为, Leydig 细胞的发生、发育、成熟以及合成、分泌睾酮的功能均受下丘脑-脑垂体-睾丸轴调控,如垂体分泌的 Leydig 细胞刺激素(或黄体生成素, LH)、催乳激素(PRL)和滤泡刺激素(FSH)对 Leydig 细胞中睾酮生成均具有调节作用,其中 LH 是调节 Leydig 细胞合成和分泌睾酮的主要激素。Leydig 细胞膜上有 LH 受体(LHR),它属于 G 蛋白偶联型受体,当 LH 与其结合后,激活腺苷酸环化酶,使 Leydig 细胞内 cAMP 水平升高,触发了细胞内的级联反应,最终导致 Leydig 细胞合成、分泌睾酮并获得分化。在生理条件下, LH 对 Leydig 细胞合成和分泌睾酮有即时效应、营养效应二种调节方式。前者指在短时间内, LH 促使 Leydig 细胞合成和分泌睾酮量增加,其主要机制是:在 LH 作用下, Leydig 细胞骨架发生了有利于胆固醇从贮存部位快速转运至线粒体外膜的变化(图 4-7);胆固醇转运蛋白 StAR、SCP2、PBR 快速合成,使胆固醇加速转运至线粒体内膜上的胆固醇侧链裂解酶(p450SCC),提高了胆固醇转化为孕烯醇酮的速度;同时,睾酮合成过程中的一些重要蛋白质也发生磷酸化。在即时效应之后, LH 对 Leydig 细胞表现为营养效应。研究表明,生理浓度的 LH 对维持 Leydig 细胞 LHR 数量有重要作用,并能调节睾酮合成相关酶的基因表达和其活力,如 LH 能增加 p450SCC、 3β -HSD 的表达量,而 p450 17α -羟化酶依赖于 LH 刺激后的 cAMP 生成等,从而增强 Leydig 细胞合成睾酮的能力。然而,超生理剂量的 LH,则会导致 Leydig 细胞

合成和分泌睾酮障碍。其原因是使 LHR 数量减少或失活,致使睾酮合成发生障碍。有报道称,大剂量 LH 能引起胆固醇侧链裂解酶和细胞色素 p450 系统活力下降,并激活芳香化酶活性,刺激雌二醇生成;雌二醇通过雌激素受体,除能抑制 p450 17α -羟化酶表达外,还合成一种能抑制 p450 17α -羟化酶活性的新蛋白质。PRL 对人的 Leydig 细胞无调节功能,但啮齿类动物的 Leydig 细胞存在 PRL 受体,PRL 能加强 LH 对 Leydig 细胞的效应。胰岛素受体也存在于 Leydig 细胞上,胰岛素能增加 Leydig 细胞膜上的 LH 受体数量和合成睾酮的能力。近年大量研究发现,Leydig 细胞合成和分泌睾酮存在重要的睾丸局部调节机制。体外研究证实,支持细胞在 FSH 作用下,可分泌多种因子

如 IGF-1、抑制素、TGF β 、GnRH,这些因子能刺激 Leydig 细胞产生睾酮,而 ABP 通过结合睾酮,降低间质内睾酮水平,间接促进 Leydig 细胞合成、分泌睾酮。然而,有意义的是支持细胞释放的雌激素、TGF α 又抑制睾酮产生。睾丸内巨噬细胞对 Leydig 细胞的睾酮生成、Leydig 细胞青春期发育以及 Leydig 细胞数量都有复杂的调节作用,这一作用也受 FSH 调节。有报道认为,巨噬细胞可通过释放 NO 抑制 Leydig 细胞中 p450 17α -羟化酶活性而抑制睾酮合成、分泌。Leydig 细胞本身也能分泌一些生长因子和生物活性物质,通过自分泌、接触性分泌方式对 Leydig 细胞发挥调节作用。现已证明,睾丸内 Leydig 细胞、支持细胞、巨噬细胞、肌样细胞和生精细胞能释放多种生长因子和生物活性物质,它们以旁分泌、自分泌和接触性分泌等方式作用于 Leydig 细胞,调控 Leydig 细胞内睾酮合成相关酶的表达或/和活性,从而调节 Leydig 细胞的功能。衰老对 Leydig 细胞合成和分泌睾酮具有明显的影响。生殖功能减退是老年动物和人的神经内分泌变化的主要表现之一。动物和人血浆睾酮水平随年龄的增加显著降低。一般认为,造成这种变化的原因包括:

- ①下丘脑-垂体功能增龄性衰退:老年男性分泌 GnRH 的细胞减少,GnRH 分泌量降低;血浆 LH 水平升高,但 LH 脉冲式分泌振幅下降;造成睾酮水平直线下降。
- ②睾丸自身退化:老年男性 Leydig 细胞对 LH 反应性显著低于青年人,睾酮合成相关酶如 p450 17α -羟化酶表达量以及活性降低,造成 Leydig 细胞功能衰退;老年人睾丸动脉硬化,睾丸组织缺血,加重了 Leydig 细胞功能衰退;同时,老年男性 Leydig 细胞数量显著减少。

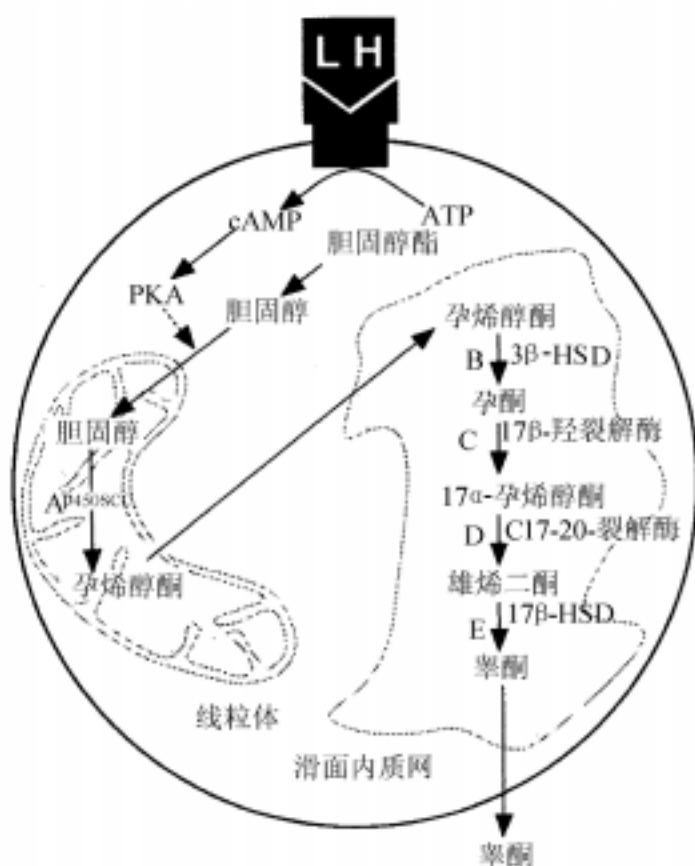


图 4-7 LH 调节性激素合成

(二) 糖皮质激素抑制 Leydig 细胞中睾酮合成

近年来的研究发现,糖皮质激素(大鼠体内是皮质酮)能抑制 Leydig 细胞中睾酮合成。长期处于紧张、焦虑等应激状态,或长期应用糖皮质激素的男性以及 Cushing 征或低血糖的男性患者,其血浆糖皮质激素水平常呈明显升高,并伴有血浆睾酮水平降低,甚至生育力低下,但该个体的 LH 分泌正常。动物实验也显示,处

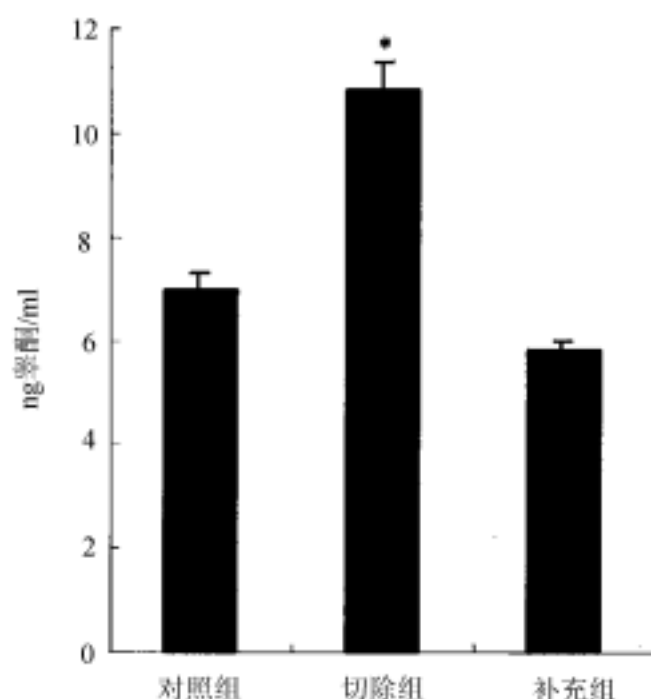


图 4-8 切除大鼠肾上腺后补充皮质酮对血清睾酮水平的影响

* 示 $P < 0.05$

醇侧链裂解酶(p450SCC), 3 β -羟类固醇脱氢酶及 p45017 α -羟化酶, 并且这一抑制机制已在 mRNA 水平得到了进一步证实。

尽管许多体外研究已提示,糖皮质激素直接抑制纯化的 Leydig 细胞中睾酮合成,并且大鼠因紧张而引起的高糖皮质激素血症可导致睾酮水平明显下降。但前者使用的是高浓度糖皮质激素,后者体内糖皮质激素也超过了正常生理浓度。曾有报道,利用去除肾上腺大鼠作为动物模型,观察生理浓度的糖皮质激素是否具有抑制睾酮合成的作用。因为肾上腺是体内糖皮质激素惟一的来源,切除肾上腺后去除糖皮质激素,应当使 Leydig 细胞中睾酮合成增加。研究发现,切除肾上腺后大鼠血清中睾酮水平高于手术对照组及切除后补充皮质酮的大鼠(图 4-8)。切除肾上腺后大鼠和切除后补充皮质酮大鼠血清 LH 水平均无明显变化。提示:在上述二实验组中,由于内源性皮质酮变化而导致的 Leydig 细胞中睾酮生成的变化不依赖于 LH 的存在。此外,切除肾上腺后大鼠其纯化的 Leydig 细胞睾酮生成

ing 征或低血糖的男性患者,其血浆糖皮质激素水平常呈明显升高,并伴有血浆睾酮水平降低,甚至生育力低下,但该个体的 LH 分泌正常。动物实验也显示,处应激状态雄性大鼠的血浆糖皮质激素水平明显升高,其血浆睾酮水平显著降低。新近的研究结果初步解释了多年来已被人们注意到的上述现象:肾上腺皮质分泌的糖皮质激素(大鼠体内是皮质酮)能抑制睾丸 Leydig 细胞中睾酮合成,这是一个经糖皮质激素受体介导的对 Leydig 细胞直接作用的过程,其结果是导致 LH 受体表达减少及睾酮生物合成中一个或几个酶活性降低。已有的研究已表明,糖皮质激素能直接抑制合成代谢中的胆固

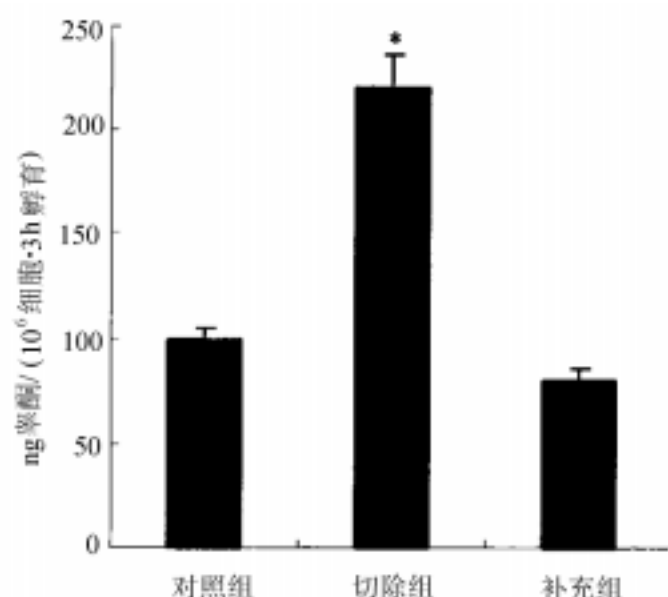


图 4-9 切除大鼠肾上腺后补充皮质酮对 Leydig 细胞合成睾酮的影响

* 示 $P < 0.05$

量比对照组增加 1 倍。但经补充皮质酮后睾酮生成量被抑制到对照组水平 (图 4-9), 提示给切除肾上腺后大鼠补充皮质酮能明显地抑制睾酮生成。上述结果表明, 生理性浓度皮质酮对 Leydig 细胞中睾酮合成行使直接的负性控制。

(三) 糖皮质激素诱导 Leydig 细胞凋亡

机体内睾酮水平, 除了与单个 Leydig 细胞合成、分泌睾酮的能力相关外, 还取决于睾丸内 Leydig 细胞的数量。那么, 糖皮质激素是否还会通过调节 Leydig 细胞的数量以影响体内睾酮水平呢? 在过去的数十年中, 多数国内外学者在研究激素调节 Leydig 细胞功能时, 都将注意力集中于其对 Leydig 细胞中睾酮合成过程的调节; 而对一些影响 Leydig 细胞数量的因素及其调节机制的研究, 包括对 Leydig 细胞增殖、分化和凋亡的调节, 很少见, 甚至未见报道。

细胞凋亡是影响细胞数量的重要因素。大量文献报道, 糖皮质激素能诱导多种类型的细胞凋亡, 如胸腺细胞、淋巴细胞, 但糖皮质激素能否诱导 Leydig 细胞凋亡, 尚不清楚。有研究表明, 在特定因素刺激下, Leydig 细胞也能发生凋亡。如经 EDS (二甲磺酸乙烷, 一种能特异诱导 Leydig 细胞凋亡的物质) 处理或切除垂体的大鼠, 睾丸内 Leydig 细胞发生大量凋亡。所以, 超生理剂量的糖皮质激素 (如机体在应激状态下能产生显著高于生理剂量的糖皮质激素) 也可能通过诱导 Leydig 细胞凋亡, 减少 Leydig 细胞的数量, 最终导致机体的睾酮合成及分泌量降低。曾有过系统地研究糖皮质激素诱导大鼠 Leydig 细胞凋亡的可能性及其作用机制的报道, 该工作是建立在糖皮质激素作用于大鼠 Leydig 细胞体内、外模型的基础上。

用膜联蛋白 (Annexin) 标记细胞, 经流式细胞仪分析和激光共聚焦显微镜检测并结合电镜观察发现, 纯化的青春期和成年期大鼠 Leydig 细胞经同样浓度的糖皮质激素处理后, 其凋亡量显著高于对照组。证实了糖皮质激素能诱导培养的青春期和成年期大鼠 Leydig 细胞凋亡 (图 4-10)。切除大鼠双侧肾上腺, 经腹腔补充皮质酮, 在严格监测血浆皮质酮水平的前提下, 建立经糖皮质激素作用的大鼠 Leydig 细胞在体模型。通过检测多种反映细胞凋亡的指标, 综合评价糖皮质激素对大鼠 Leydig 细胞凋亡的影响。TUNEL 染色法显示, 大鼠经皮质酮处理 12h、24h、48h、72h 后, 睾丸内均可见凋亡的 Leydig 细胞, 并以 24h 时最多, 对照组未见凋亡的 Leydig 细胞。电镜观察见经皮质酮处理后的 Leydig 细胞, 细胞核皱缩, 染色质高度浓缩, 或边移于核膜下, 呈半月状; 或集中于核中央; 细胞质中的内质网扩张, 呈典型的凋亡特征 (图 4-11)。膜联蛋白标记同样显示, 经皮质酮处理 4h 和 24h 后的大鼠, 体内 Leydig 细胞凋亡量显著高于对照组 (图 4-12, 图 4-13)。11 β -羟类固醇脱氢酶 (11 β -HSD, 是 Leydig 细胞的标志性酶之一。该酶在青春期及成年期大鼠 Leydig 细胞中活性较高, 能氧化灭活糖皮质激素, 例如能使有活性皮质酮转变成无活性的 11-脱氢皮质酮) 的免疫荧光染色观察发现, 经皮质酮处理时间越长, 睾丸间质内 Leydig 细胞数量越少, 而巨噬细胞数量却明显增加, 提示: 巨噬细胞参与了对凋亡的 Leydig 细胞吞噬过程。上述结果充分表明在体情况下, 糖皮质激素也能诱导青春期和成年期大鼠 Leydig 细胞凋亡。

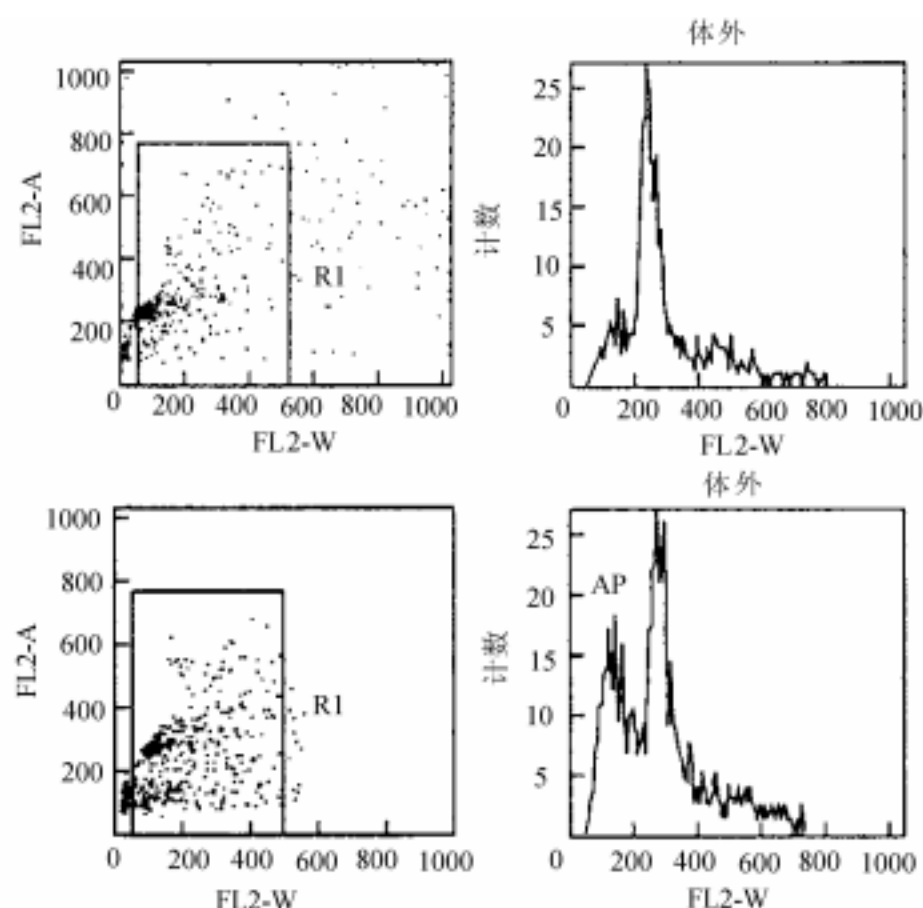


图 4-10 皮质酮诱导培养的大鼠睾丸 Leydig 细胞凋亡处理组细胞凋亡量 36.5% (图中 AP 所示峰型)、对照组细胞凋亡量

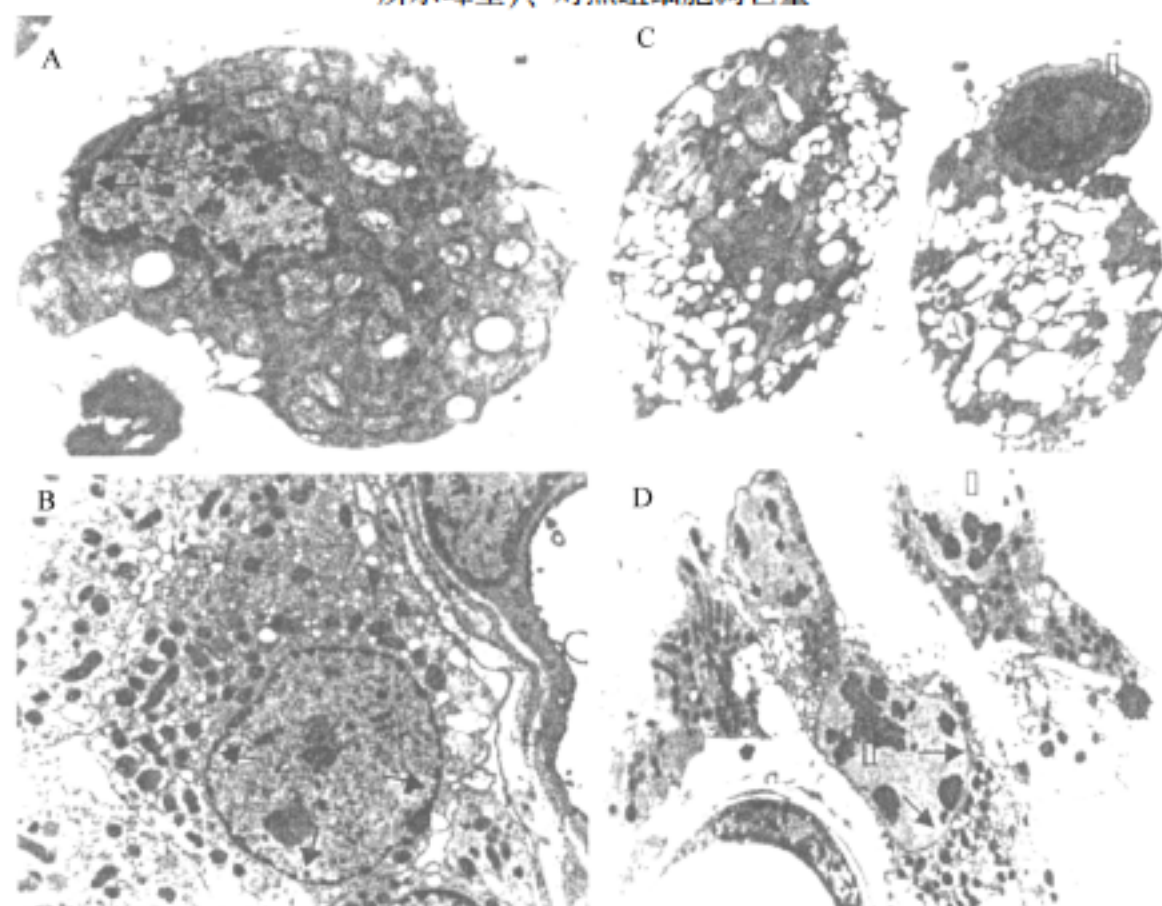


图 4-11 皮质酮诱导的大鼠 Leydig 细胞凋亡电镜照片

A. 对照组 (体外); B. 100nmol/L 皮质酮处理 (体外); C. 对照组 (体内); D. 2.5mg 皮质酮/100g 体重 (体内)

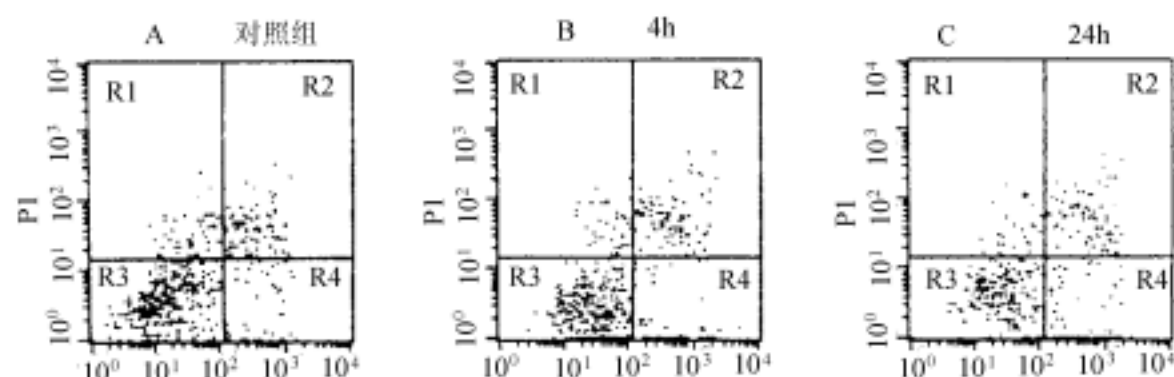


图 4-12 经皮质酮处理 4h 和 24h 的青春期大鼠 Leydig 细胞凋亡流式细胞仪分析

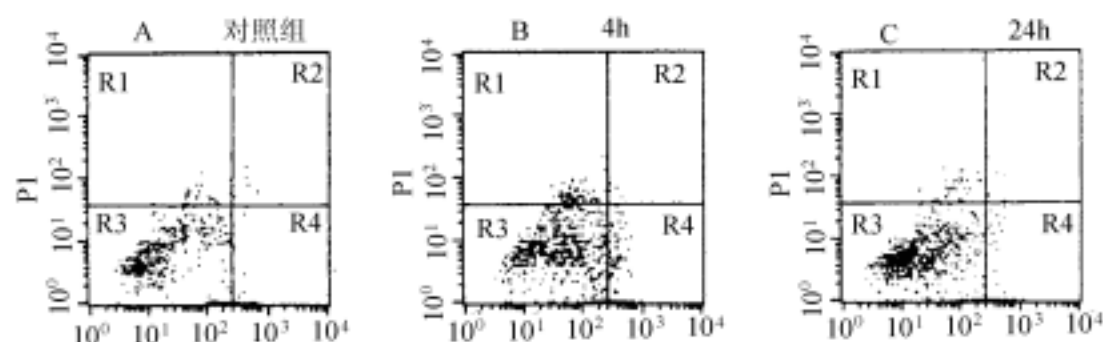


图 4-13 经皮质酮处理 4h 和 24h 的成年期大鼠 Leydig 细胞凋亡流式细胞仪分析

研究表明,超生理剂量的糖皮质激素诱导大鼠 Leydig 细胞凋亡是高糖皮质激素血症造成体内睾酮水平下降的重要原因之一。

(四) Leydig 细胞中 11β -HSD 特性和功能

Funder 和 Edwards (1988) 首先发现,肾脏中 11β -HSD 的活性很高,其功能是氧化灭活糖皮质激素,以阻止肾脏中高浓度糖皮质激素和醛固酮竞争盐皮质激素受体(在肾脏中,盐皮质激素受体对醛固酮和糖皮质激素表现出同等亲和力),由此避免了在肾脏中因高浓度糖皮质激素充当盐皮质激素行使作用而导致临床上严重的高血压症。此后,Phillips (1989) 等在睾丸和纯化的 Leydig 细胞中发现了高活性的 11β -HSD,但不能确定其功能。既然肾上腺皮质分泌的糖皮质激素能抑制睾丸 Leydig 细胞中睾酮合成,并且睾丸 Leydig 细胞和肾脏一样也含有高活性的 11β -HSD,因此提出了如下假设:在 Leydig 细胞中, 11β -HSD 的功能是通过氧化灭活糖皮质激素,控制活性糖皮质激素在细胞内浓度,使之对睾酮合成所行使的抑制作用保持在一个适当范围,但当体内糖皮质激素浓度明显增高,超过了酶发挥作用的阈值,这一控制作用即被破坏,因此,高浓度糖皮质激素可抑制 Leydig 细胞中睾酮合成。故 11β -HSD 是控制糖皮质激素抑制睾酮合成水平的决定因素。该假设的重要意义在于将睾丸 Leydig 细胞中 11β -HSD 功能和糖皮质激素对睾酮合成的抑制作用联系起来,能比较合理地解释生理情况下 Leydig 细胞中的 11β -HSD 如何控制着糖皮质激素浓度,并以此来调节睾酮合成水平。在病理情况下(如情绪紧张和

其他因素引起的高糖皮质激素血症), 这一调节过程又是如何被破坏, 而导致睾酮合成和分泌下降呢?

1. 11β -羟甾脱氢酶的特性

Leydig 细胞中存在高活性的 11β -HSD 通过氧化灭活皮质酮 (大鼠体内的糖皮质激素), 使其成为无活性的 11 -脱氢皮质酮, 以此控制着其在细胞内浓度, 使之对睾酮合成所产生的抑制作用保持在一个适当的范围。

已鉴定了 11β -HSD 的两种同工酶, 即 11β -HSD I 和 II 型。I 型同工酶是以 NADP (H) 为优势辅酶的氧化还原酶。首先从肝脏中被纯化, 分子量为 34kDa。II 型从肾脏中被纯化, 分子量约 40kDa。主要以 NAD 为辅酶, 是一催化单向反应的氧化酶。

Phillips 等曾用抗肝 11β -HSD 抗体经免疫荧光法在睾丸组织中检出 11β -HSD 抗原, 提示睾丸组织中存在 I 型 11β -HSD 抗原, 但未用纯化的 Leydig 细胞做进一步工作。Monder 等进一步的工作发现, 在纯化的 Leydig 细胞中含有高活性的 11β -HSD, 其活性是睾丸组织的 8 倍多。从大鼠纯化的 Leydig 细胞中检出分子量为 34kDa 的 I 型 11β -HSD 抗原, 这一结果和从纯化的 Leydig 细胞中检出分子量为 696bp 的 I 型 11β -HSD mRNA 的 RT-PCR 产物具有一致性 (图 4-14, 图 4-15)。进一步的工作还证实: Leydig 细胞中 11β -HSD 和肝脏及其他组织中的 I 型同工酶一样, 也是以 NADP (H) 为优势辅酶的氧化还原酶, 提示 Leydig 细胞中存在和肝组织中一样的 I 型 11β -HSD 同工酶。



图 4-14 Western 印迹检测 Leydig 细胞中 I 型 11β -HSD 抗原蛋白

图 4-15 RT-PCR 检测 Leydig 细胞中 I 型 11β -HSD mRNA

新近的工作进一步表明, 大鼠纯化的活 Leydig 细胞中 11β -HSD 也是催化双向反应的氧化还原酶, 在生理浓度皮质酮时以氧化酶活性为优势 (图 4-16)。这一结果和关于睾丸 Leydig 细胞中 11β -HSD 功能的假设, 即“ 11β -HSD 通过氧化灭活糖皮质激素, 使之免于结合到糖皮质激素受体上, 阻止其对睾酮生成行使抑制作用, 以此调节着 Leydig 细胞中睾酮合成水平”是一致的。

2. 11β -HSD 和糖皮质激素的相互调节作用

新近的研究发现, 切除大鼠肾上腺后导致纯化的活 Leydig 细胞中 11β -HSD 氧化酶活性明显下降, 而这一下降的氧化酶活性可经补充皮质酮得以恢复 (图 4-17)。

这一结果和以 Leydig 细胞匀浆作为测定样品所得到的结果是一致的。已知在大脑和肝脏等其他组织中, 11β -HSD 活性受糖皮质激素调节, 如因长期情绪紧张引起糖皮质激素升高可诱导 11β -HSD 活性, 由此保护了特别容易受过量糖皮质激素损害的神经细胞。此外, 糖皮质激素能增加切除肾上腺后大鼠培养的 Leydig 细胞 11β -HSD 氧化酶活性, 并抑制还原酶活性 (图 4-18)。生理浓度皮质酮维持 11β -HSD 氧化酶活性及糖皮质激素能增加, 切除肾上腺后大鼠培养的

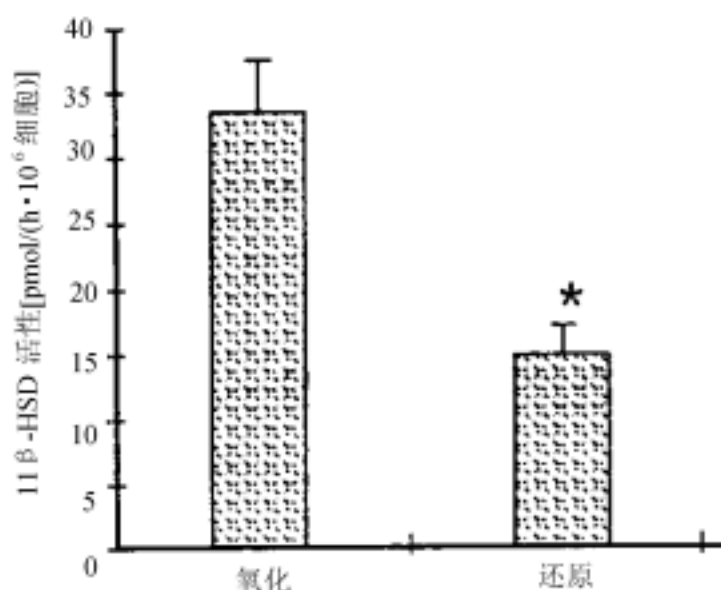


图 4-16 纯化的活化 Leydig 细胞中 11β -HSD 活性
* $P < 0.05$

Leydig 细胞 11β -HSD 氧化酶活性证明, 11β -HSD 氧化酶活性受糖皮质激素调节。同时, 也表明 Leydig 细胞中 11β -HSD 活性和糖皮质激素之间存在密切关系, 因为去除肾上腺皮质后, 氧化酶活性下降, 而不管是在体内或体外条件下, 糖皮质激素均能使下降的氧化酶活性得以恢复或增加, 这一互为因果的关系既表明糖皮质激素能诱导氧化酶活性, 又提示氧化酶活性的表达是由于糖皮质激素代谢的需要, 这又从另一角度进一步证实, Leydig 细胞中 11β -HSD 的功能是氧化灭活糖皮质激素。

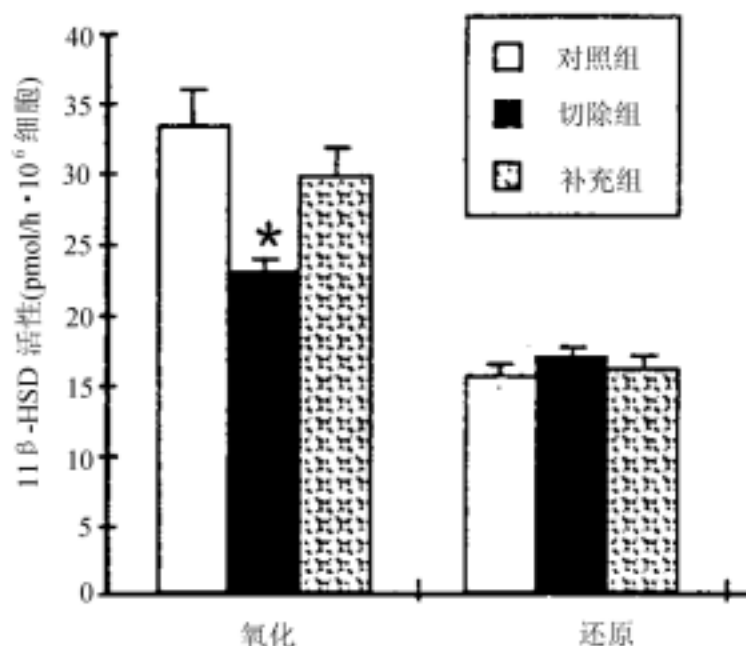


图 4-17 切除肾上腺和切除后补充皮质酮大鼠纯化的 Leydig 细胞中 11β -HSD 活性
* $P < 0.05$

3. 11β -HSD 活性、糖皮质激素浓度及睾酮合成水平三者量的相关性变化

Monder 和 Sakai 等 (1994) 证实, 动物因紧张而引起的高糖皮质激素血症可导致睾酮水平及 11β -HSD 活性出现相应变化, 说明 11β -HSD、糖皮质激素和睾酮

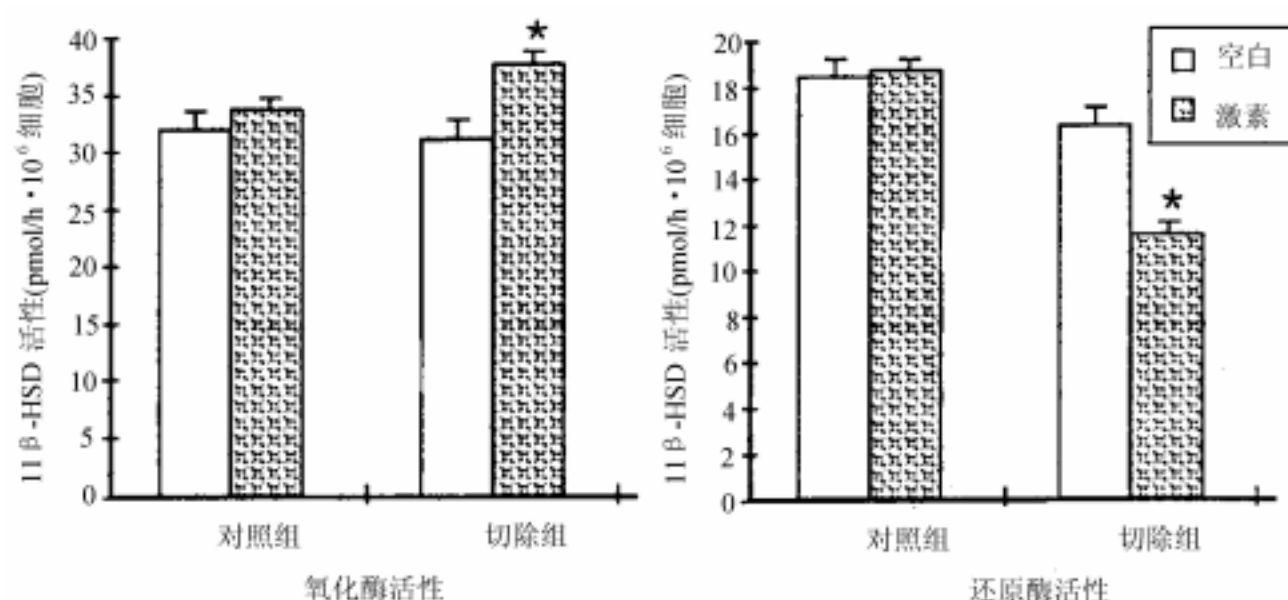


图 4-18 糖皮质激素调节培养的 Leydig 细胞中 11β-HSD 氧化酶和还原酶

• $P < 0.05$

三者之间确实存在密切关系。并且已往的工作均提示：Leydig 细胞中 11β-HSD 活性明显地影响大鼠内源性糖皮质激素浓度及睾酮合成水平。尽管一系列研究结果已表明，11β-HSD 可能通过氧化灭活糖皮质激素控制睾酮合成水平，但已往的研究由于未能选择和建立合适的动物模型，故无法从三者量的变化关系，即 11β-HSD 活性、糖皮质激素浓度及睾酮合成水平三者量的相关性变化上来评价 11β-HSD 的调节作用。如当 11β-HSD 处于不同活性水平时，Leydig 细胞合成睾酮的能力是否确实会出现相应的变化？这一工作恰恰是验证这一假设成立与否的关键。随后的工作正是为了继续这一研究，通过定量地评价 Leydig 细胞中 11β-HSD 活性水平及糖皮质激素浓度对睾酮合成的影响来证实，是 Leydig 细胞中 11β-HSD 通过控制细胞内活性的糖皮质激素浓度决定着其对睾酮合成抑制程度，即从 11β-HSD 活性、糖皮质激素浓度及睾酮合成水平三者量的相关性变化上来证实，大鼠睾丸 Leydig 细胞中 11β-HSD 通过氧化灭活皮质酮控制着细胞内活性的糖皮质激素浓度，并由此决定着其对睾酮合成的抑制程度，以进一步阐明 Leydig 细胞中 11β-HSD 在调节睾酮合成的功能和机制。

采用微量渗透泵作为释放皮质酮的装置。根据所配制浓度不同，可释放出控制剂量（生理浓度）的皮质酮，以满足建立较为理想的动物模型的需要。已有的研究表明，大鼠在应激条件下，其体内皮质酮含量可上升至生理水平的 5~10 倍。为评价 11β-HSD 对高浓度的皮质酮的调节作用，可在短时间内给大鼠补充高浓度皮质酮以便更完整地观察 11β-HSD 调节功能（图 4-19）。

通过测定切除肾上腺大鼠血液中皮质酮和睾酮含量及纯化的 Leydig 细胞中睾酮水平发现，皮质酮浓度和睾酮含量呈负相关。经补充皮质酮后，原已降低的皮质酮水平逐渐得到恢复，6d 左右几乎达到生理水平，与其相对应的是原已升高的睾酮浓度逐渐恢复至正常水平（图 4-20，图 4-21）。血清中 LH 含量不因内源性皮

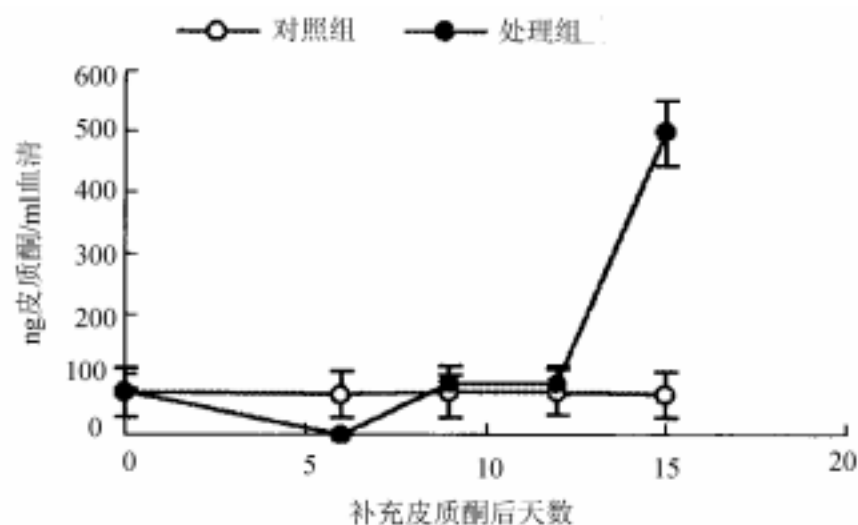


图 4-19 切除大鼠肾上腺和切除后补充皮质酮对血清皮质酮含量的影响

质酮去除有所改变 (图 4-22), 表明肾上腺切除后, 睾酮水平增加是由于 Leydig 细胞中皮质酮浓度降低导致其对睾酮抑制解除引起的, 而不是由于对 LH 刺激所致。上述结果提示, 所采用的方法建立的动物模型是符合要求的。

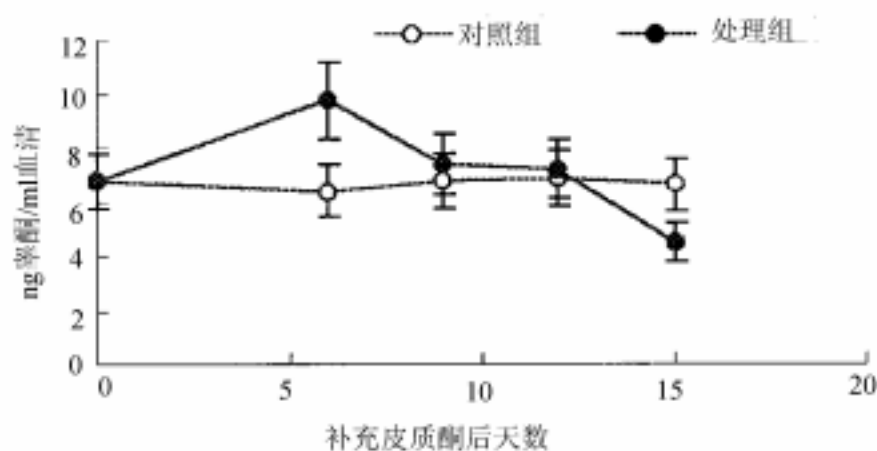


图 4-20 切除大鼠肾上腺和切除后补充皮质酮对血清睾酮含量的影响

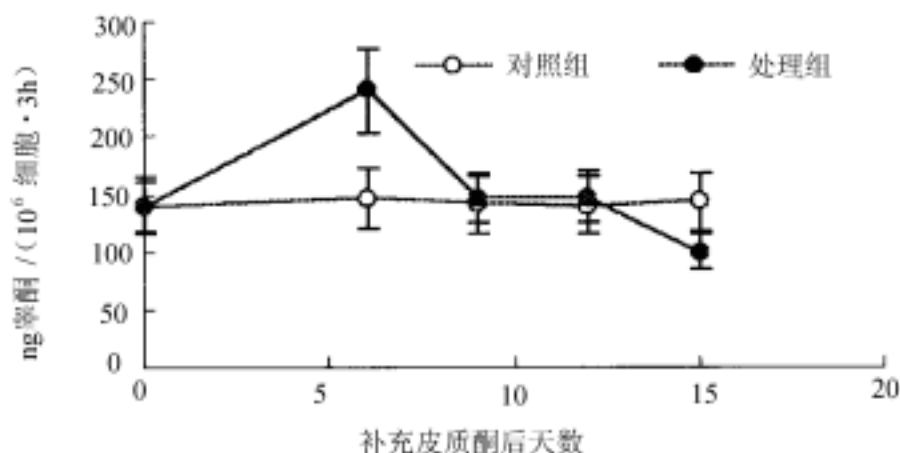


图 4-21 切除大鼠肾上腺和切除后补充皮质酮对 Leydig 细胞合成睾酮的影响

研究结果发现, 随着切除肾上腺大鼠体内的皮质酮浓度逐渐恢复 (上升), 原

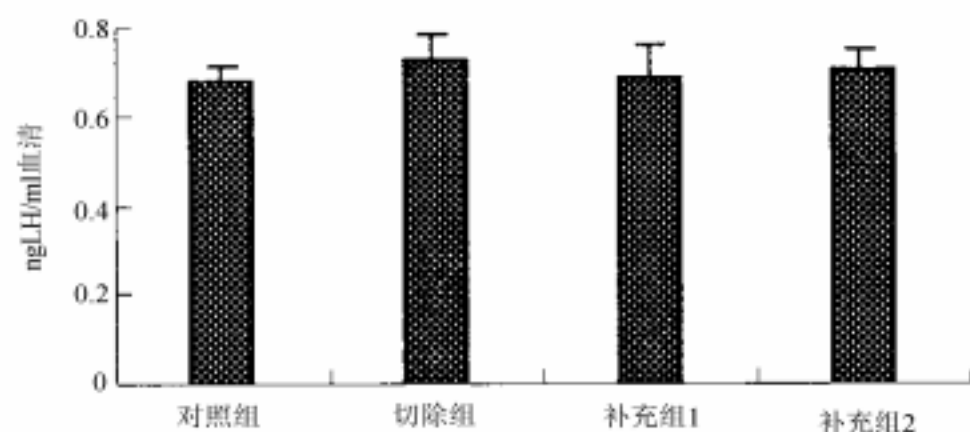


图 4-22 切除大鼠肾上腺和切除后补充皮质酮对血清睾酮含量的影响
补充组 1: 生理浓度皮质酮; 补充组 2: 2.5mg 皮质酮

已降低的 11β -HSD 活性也出现相应的恢复,二者恢复趋势呈正相关(图 4-23)。 11β -HSD 活性的恢复(上升)是皮质酮代谢的需要。随着外源性皮质酮补充的增加,在某一时间段上(如第 9~12d),尽管放射免疫法监测提示,血皮质酮含量可能已超过正常生理水平,但因 11β -HSD 活性的恢复已接近正常水平,故并未出现睾酮合成水平显著下降趋势。提示,逐渐恢复的 11β -HSD 活性具有调节(氧化灭活)Leydig 细胞中皮质酮含量,使细胞内不至于蓄积过量的活性的糖皮质激素,以避免其对睾酮合成产生抑制作用,使体内睾酮水平最终保持在一个正常范围之内。当短时间内给予大鼠补充大剂量的皮质酮后,Leydig 细胞中 11β -HSD 活性并未再次出现显著增加,而睾酮含量却出现显著下降,这一结果有力验证了 Monder 的假设,高浓度的糖皮质激素超过了 11β -HSD 发挥作用的阈值,导致该酶对皮质酮浓度的控制作用被破坏。在以上假设被证实的基础上,提出以下观点应当是成立的:① 11β -HSD 通过控制糖皮质激素浓度调节睾酮合成,是 Leydig 细胞中睾酮合成的局部调节机制;②长期紧张引起的高糖皮质激素可能破坏 11β -HSD 对其控制作用,导致睾酮合成受抑制甚至引起生殖障碍。

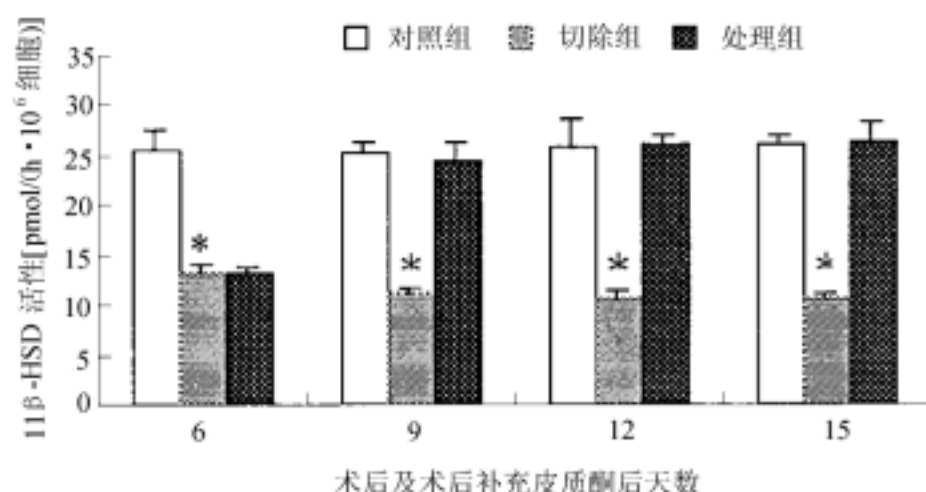


图 4-23 切除大鼠肾上腺和切除后补充皮质酮对分离的活 Leydig 细胞中 11β -HSD 活性的影响

四、睾丸对下丘脑和垂体的反馈作用

睾丸的结构和功能受神经内分泌的调节。下丘脑神经内分泌细胞中的促性腺激素释放激素 (GnRH), 神经元合成、分泌的 GnRH 以脉冲方式释放于垂体门脉系统后, 结合于腺垂体的促性腺激素细胞上 G 蛋白偶联型 GnRH 受体, 促使其合成和分泌促性腺激素 (FSH、LH)。GnRH 释放的脉冲频率和振幅对 FSH、LH 的正常合成和分泌至关重要, GnRH 释放的频率和振幅异常, 将导致 FSH、LH 分泌功能紊乱。FSH 作用于支持细胞, LH 作用于睾丸 Leydig 细胞, 促进睾酮合成。睾酮可作用于类肌细胞和支持细胞, FSH 和睾酮协同调控精子的发生 (图 4-24)。若腺垂体远侧部分分泌过多的 FSH、LH, 会抑制下丘脑 GnRH 分泌, 从而使 FSH、LH 的释放减少, 此为“短环负反馈”。GnRH 可作用于自身细胞, 使其分泌 GnRH 量减少, 此为“超短环负反馈”。另外, 还有睾丸对下丘脑腺垂体分泌激素的“长环负反馈” (图 4-25)。

下丘脑, 腺垂体和睾丸所分泌的激素之间的相互复杂的调控关系构成了下丘脑-腺垂体-睾丸轴。睾丸分泌的睾酮以及睾酮在脑组织细胞内经芳香化后的产物雌二醇抑制下丘脑分泌 GnRH 和腺垂体分泌 FSH、LH, 此为“长环负反馈”。雌激素的负反馈作用主要在垂体水平, 睾酮的负反馈作用主要在下丘脑, 下丘脑的 GnRH 为脉冲式释放。性激素主要是使其脉冲频率降低, 从而使垂体 LH 的分泌减少, 但对 FSH 的影响不大。对 FSH 的负反馈因子主要是睾丸支持细胞生成的抑制素。抑制素分子量为 32kDa, 是一种糖蛋白激素, 两个亚单位由双硫键连接, 分离的亚单位无生物学活性, a 亚单位 18kDa, b 亚单位 14kDa。抑制素有两种类型 (A 和 B), 两型的 a 亚单位相同, b 亚单位 N 端的氨基酸序列有差别。两型都有选择性抑制 FSH 释放的生理特性。在雄性动物, 抑制素的合成部位是支持细胞。抑制素的合成和分泌主要受 FSH 的调节。抑制素抑制 FSH 的释放, 抑制素对 FSH 的调节作用是不完全的, 抑制素和睾酮共同完成了对 FSH 分泌的调节。

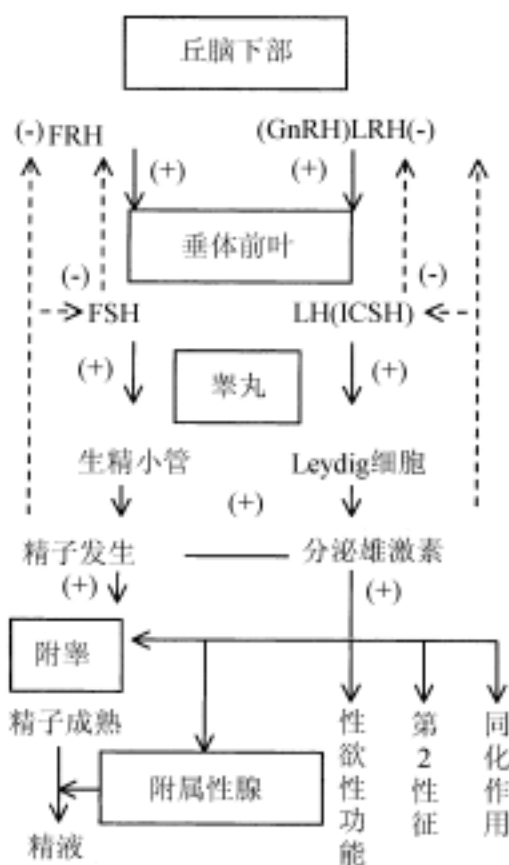


图 4-24 男性生殖活动

GnRH: 促性腺激素释放激素; FRH: 滤泡刺激素释放激素; LRH: 促黄体生成素释放激素; FSH: 滤泡刺激素; LH: 黄体生成素; ICSH: Leydig 细胞刺激素

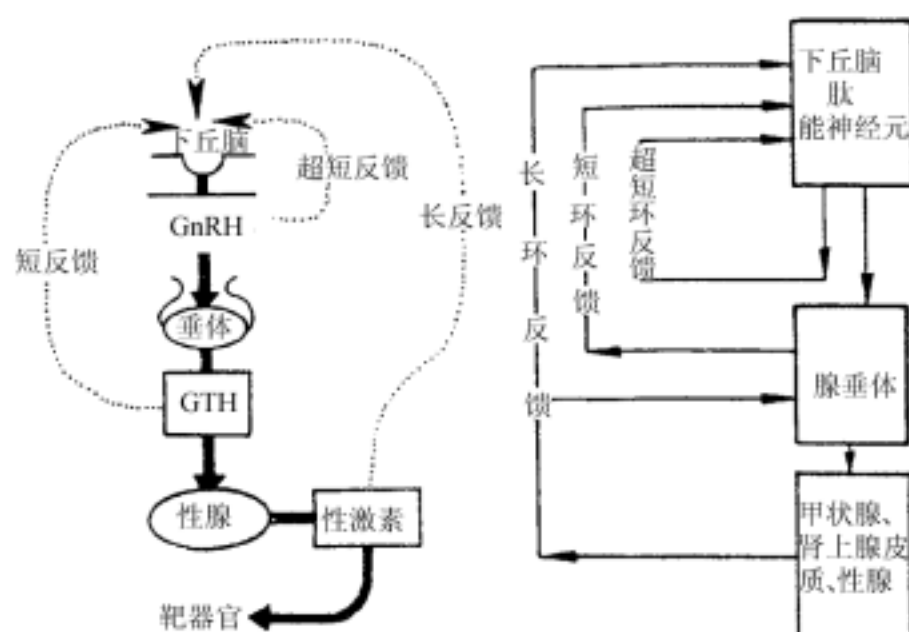


图 4-25 下丘脑-垂体-靶器官系统及其反馈调节的三种形式

第五节 卵巢功能的调节

子宫内膜的周期性变化取决于下丘脑、垂体和卵巢的周期性变化,这种周期性变化称为月经周期。在亚灵长类,则称为动情周期,它们有相同或类似的调节机制。女性生殖功能的另一种不连续性表现在从出生后到青春期卵巢的发育,青春期后的卵巢成熟、性功能活跃和卵巢退化以及绝经期的变化等各个时期。

一、卵子生成的调节

卵泡是卵巢功能单位,它的发育经原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡四个阶段。卵巢中只有 0.1% 的卵泡可以完成发育成熟的全过程,绝大部分则在某一阶段停止发育而闭锁。卵泡是否发育完全的两个主要因素是性激素的浓度和比例,及卵泡表面受体的形成所表现出对促性腺激素的反应性(接受性)。两者之间的协调一致才能使卵泡发育顺序进行。

(一) 卵泡前期

由原始卵泡发育成初级卵泡的时期,称为卵泡前期(follicular antral phase)。原始卵泡在胚胎期已形成,由基膜和一层扁平卵泡细胞包绕卵母细胞组成,这一阶段的卵泡细胞无受体。原始卵泡发育成初级卵泡过程由卵巢本身调节,不受循环激素的控制,去除垂体后这一过程仍可产生。有人认为,原始卵泡的发育是一个连续的、随机的自发性反应。这一阶段,卵母细胞和卵泡的体积均增大,卵母细胞由多层颗粒细胞(granulosa cell)包围,颗粒细胞分泌糖蛋白,在它们和卵母细胞之间形成透明带,同时形成缝隙连接以传递细胞之间的电-化学信息。在数目不断增加的颗

粒细胞之间也出现缝隙连接。随着卵泡的发育和颗粒细胞的分化,细胞膜表面出现 FSH-受体、雌激素受体和睾酮受体,在内膜细胞表面有 LH 受体。卵泡也由无血管的卵巢皮质进入富含血管的髓质部。间质细胞、结缔组织、毛细血管网、神经纤维共同形成卵泡内膜。这使卵泡与血液循环建立起联系,置卵泡于激素的调控之中,对卵泡的进一步发育具有重要的生理意义。

(二) 卵泡期

人卵泡期 (follicular phase) 为 8~12d, 初级卵泡发育成次级卵泡和成熟卵泡。

1. 次级卵泡 (secondary follicle)

在垂体 FSH 和卵巢甾体激素的作用下,颗粒细胞合成和分泌黏多糖,和血浆的主要成分一起进入卵泡,形成卵泡液使卵泡内出现窦腔。FSH 的作用还可诱导颗粒细胞和内膜细胞膜上 LH 受体的形成,受体的数目和敏感性随卵泡成熟而逐渐增加,为排卵前 LH 峰的作用做好准备,而雌激素可促进受体形成。另外,在次级卵泡的颗粒细胞中还分离出催乳素 (PRL) 和前列腺素 (PG) 的受体,它们可能也参与卵泡功能的调节。

2. 成熟卵泡 (mature follicle)

成熟卵泡的卵泡液急剧增加,卵泡腔迅速增大,颗粒细胞停止增殖,颗粒细胞层变薄,卵泡移向卵巢表面并向外突出。这时垂体 GTH 分泌量增多,卵泡细胞膜上的受体数也相应增加,对细胞的刺激加强,细胞内芳香化酶活性提高,雌激素的合成和分泌达高峰。

(三) 排卵前期

在排卵前期 (ovulation after phase) 大量雌激素对下丘脑和垂体产生正反馈效应,使促性腺激素释放增加,进而形成排卵前 LH 峰。LH 分泌高峰使卵泡继续发生一系列结构和功能的改变,尤其是引起卵母细胞开始恢复分裂进程,使未成熟的卵母细胞完成成熟反应,终致排卵。

早在 1935 年, Pincus 等将兔卵母细胞从卵泡中剥离后进行体外培养,证明促性腺激素可使卵母细胞恢复减数分裂进程;同时,观察到成熟卵泡中的卵母细胞在没有 GTH 作用的条件下,可自动成熟,由此提出“卵母细胞可自发性成熟”的概念。因此设想,卵泡内存在某种抑制卵母细胞成熟的因子。20 世纪 50 年代,美籍华人张明珏教授证明了卵泡液内有抑制卵母细胞成熟的成分。目前不少实验正在积极从事分离和纯化抑制因子的工作,利用超滤膜、凝胶层析和电泳等方法,已从猪卵泡液中初步分离出一种小分子多肽,分子量在 1~2kDa 之间,它具有抑制卵母细胞成熟的作用,故称为“卵母细胞成熟抑制因子” (oocyte maturation inhibitor, OMI)。目前认为, OMI 可能由颗粒细胞合成和分泌,因将卵母细胞与颗粒细胞共同培养,卵母细胞的减数分裂即受到抑制。在正常月经周期中, GTH 使卵泡内 OMI 下降和卵泡成熟是一致的。但它的作用机制和 LH 解除这一抑制的机制尚不清楚。然而,无论卵母细胞成熟因子的化学性质如何,只要能使细胞内环腺苷酸 (cAMP) 维持在较高水

平,就可抑制卵母细胞的成熟分裂。正常情况下,卵母细胞中的cAMP可能是通过它与颗粒细胞间的缝隙连接而转运进来。在卵母细胞内也存在合成和分解cAMP的酶系,这一酶系的活性可能就是调节卵母细胞成熟的关键。

(四) 排 卵

排卵(ovulation)是一个多因素参与的复杂过程。过去认为卵泡破裂与其容量和压力变化有关,但近年在动物实验中发现,排卵前卵泡内压并未升高,相反有下降趋势。

在排卵前,卵泡结构发生明显改变:① 卵泡液急剧增多,卵泡膨胀;② 卵泡壁扩张,细胞间质分解;③ 卵泡膜内血管充血,毛细血管通透性增强;④ 甾体激素和前列腺素等含量增加,激活蛋白水解酶。

当卵泡成熟时,卵泡液中许多酶的活性均增加,如蛋白水解酶、淀粉酶、胶原酶、透明质酸酶等,这些酶的激活使卵泡溶解破裂。

1. 促性腺激素和甾体激素的作用

LH可促进卵泡细胞分泌孕酮,在卵泡破裂部位,可促使溶酶体生成,使细胞基膜溶解;加速卵泡细胞内核糖核酸和蛋白质合成,促进“排卵酶”的释放,或是产生纤维蛋白酶原致活物质,使卵泡液中无活性的纤维蛋白酶原变成有活性的纤维蛋白酶,进而催化基底膜和卵泡内膜溶解。

2. 前列腺素的作用

在LH作用下成熟的卵泡可分泌前列腺素,在次级卵泡晚期亦出现了前列腺素受体。在兔交配后8h给予前列腺素合成抑制剂吲哚美辛,可阻断排卵,而注入外源性前列腺素可反转吲哚美辛的抑制作用。因此,认为前列腺素对排卵有重要作用。

3. 卵巢神经和肌样作用

近年来发现,卵泡壁上存在着特殊平滑肌和肾上腺素能以及胆碱能受体,主要分布在成熟卵泡的外膜。这些特殊的平滑肌样细胞的数量随卵泡成熟而不断增加,细胞浆内含有收缩蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白。在卵泡破裂部位还可形成微丝、致密体和吞噬体。在人和哺乳类动物卵巢中,有肾上腺素能和胆碱能神经纤维分布于平滑肌细胞间,神经末梢与肌细胞间的空隙在100~150nm之间。因此推测,在神经的调控下,神经末梢一方面释放递质促使卵泡壁的平滑肌收缩促进排卵;另一方面通过对甾体激素生成的影响间接作用于卵泡。

(五) 黄 体 期

在排卵和黄体形成之前,卵泡细胞增大,LH受体增加,对LH反应性增强,孕酮分泌增多,而对FSH反应性降低。卵泡破裂后,颗粒细胞的超微结构呈明显变化:体积大,胞浆与胞核比例增加,形成大量滑面内质网、管囊状线粒体、类脂质颗粒和高尔基体。

颗粒细胞的黄体化主要受LH的调节,而LH的促黄体化作用与其作用时间和浓度有关。LH对卵巢黄体起着触发作用,无需持续作用;此外,LH必须达到足

够的浓度才能促进颗粒细胞黄体化。成熟卵泡在培养液中可“自动”黄体化,而未成熟的则不能,这可能是由于 LH 的浓度在未成熟卵泡中较低。最近发现,在小卵泡中含有一种肽类物质,能抑制颗粒细胞“自发性”黄体化,也抑制 LH 对这些细胞生成 cAMP 的作用,使 LH 受体减少,被称为黄体化抑制因子 (luteinization inhibitor)。LH 很可能是由于解除了卵巢内抑制因子的作用而表现出促进的效应。

未受精的黄体退化和溶解的机制尚不清,可能是由于前列腺素 F2 α 的作用,也可能是由于缺乏 LH 对黄体的维持作用。另外,黄体内存在的一种肽类物质能抑制 LH 与其受体结合,它只存在于黄体内,在陈旧的黄体中比早期黄体多得多,所以认为它与黄体的寿命和萎缩退化有关,称之为 LH 受体结合抑制因子 (LH receptor binding inhibitor, LH-BI)。

(六) 卵泡闭锁

在每个月经周期中,有 15~20 个原始卵泡开始发育,通常只有一个卵泡能发育成熟至排卵,绝大多数卵泡在中途闭锁和纤维化,成为瘢痕组织。适当浓度的垂体促性腺激素和卵泡细胞的相应受体,是防止卵泡闭锁 (atresic follicle) 的主要因素。性甾体激素对卵泡的生长发育也有影响,尤其是雌激素合成的前体雄激素对卵泡生长有双重作用:当雄激素与雌激素比例增高时,人卵泡呈现闭锁变化,这可能是由于雄激素抑制 FSH 诱导 LH 受体生成的结果。无雄激素作用,FSH 可增加颗粒细胞表面 LH 受体数量;加入雄激素后,受体含量减少。此外,卵巢内还可能存在 FSH 结合抑制因子,一种多肽类局部调节因素,它通过降低 FSH 受体的结合能力,从而大大降低 FSH 的生物效应,表现为降低 LH 受体对 FSH 的反应性和生成 LH 受体能力。可见,任何干扰 LH 受体的因素都可影响卵泡细胞的代谢,进而导致卵泡的闭锁。

二、卵巢甾体激素分泌的调节

卵巢分泌的性激素主要是雌二醇、孕酮以及少量雄激素。排卵的发生将性周期分为两个不同的阶段,即排卵前的卵泡期和排卵后的黄体期 (luteal phase)。卵泡期主要由颗粒细胞分泌雌激素,而黄体期则主要分泌孕激素。

(一) 雌激素合成和分泌的调节

雌激素不仅作用于附性器官,调节其发育和分化;同时,也反馈作用于丘脑-垂体,影响促性腺激素的释放;它还是调节卵泡发育的基本因素。雌激素可促进颗粒细胞缝隙连接的形成,使雌激素受体数量增加,促使细胞增殖;增强 FSH 的作用,加速卵泡腔和 LH 受体的形成。因此,探索雌激素生成的调节十分必要。

1. FSH 和 LH

FSH 是颗粒细胞中芳香化酶活性的主要刺激因子,激活芳香化酶使雄激素转化成雌激素。由于颗粒细胞中缺乏催化孕激素转变成雄激素的酶系,因此雄激素来

源于内膜细胞,而内膜细胞生成雄激素依赖于 LH 的刺激作用。可见,雌激素的合成是在垂体 FSH、LH 双重作用下,由卵泡内膜和颗粒细胞共同完成的,这就是目前广为承认的“双重细胞学说”。在卵泡发育早期,FSH 可使 LH 受体增加,而 LH 却不能增强 FSH 的作用,只能维持 FSH 诱发的雌激素分泌水平,因此认为在卵泡早期,FSH 对颗粒细胞中芳香化酶的激活十分重要。但随着卵泡不断成熟,颗粒细胞表面 FSH 诱发生成的 LH 受体越来越多,所以 LH 的作用也逐渐明显。到排卵前期,单独的 LH 作用不仅可刺激内膜细胞雄激素的生物合成,也可维持颗粒细胞中芳香化酶活性,导致排卵前雌激素高峰的出现。

2. 催乳素 (PRL)

PRL 只能促进孕酮的生成而不能促进芳香化酶活性,可以抑制颗粒细胞雌激素的生成。PRL 还可抑制 LH 和 FSH 诱发的芳香化酶活性。相反,雌激素可以刺激垂体释放 PRL,这样在垂体 PRL 释放和卵巢雌激素生成过程中存在着负反馈调节机制,并可以此解释血中 PRL 水平高时,卵巢雌激素分泌减少的现象。

3. 血管活性肠肽 (VIP)

VIP 这一脑肠肽也具有刺激颗粒细胞生物合成的作用,在卵巢基质的神经末梢中存在 VIP。实验证明,VIP 对卵泡颗粒细胞具有直接调节作用。但 VIP 对颗粒细胞生物合成的刺激作用只是 FSH 的 1/4,并不能刺激 LH 受体的形成。VIP 刺激雌激素生成也是通过 cAMP 增加芳香化酶的活性,对孕酮的刺激作用是先增加孕烯酮的水平,再使之转化成孕酮。

4. 雌激素

雌激素可促进促性腺激素对雌激素生成的刺激作用,也可增强 FSH 预处理的颗粒细胞对 LH 的反应性。可见,雌激素在卵泡微环境中通过超短的正反馈作用,自动调节着本身的生物合成过程。这种“自我增强”的作用,对在众多同时发育的卵泡中维持“优势卵泡”的作用有着重大的意义。根据雌激素的“自我增强”作用现象,有人推测:当某一卵泡发育到能产生足以反馈抑制 FSH 分泌时,其他卵泡由于 FSH 水平较低而终止发育,而“优势卵泡”则可以增强 FSH 的刺激作用,维持其雌激素的正常合成和分泌,使该卵泡能继续发育成熟。

5. 促性腺激素释放激素

GnRH 对颗粒细胞的直接作用主要表现为抑制效应。其作用特点为:① GnRH 及其激动剂不增加细胞内 cAMP 水平,并可刺激磷酸二酯酶(PD)活性,使 cAMP 减少,从而抑制 LH 和 FSH 的作用;② GnRH 可使细胞内钙离子的动员增加;③ GnRH 使细胞中花生四烯酸的生成与释放明显增加,然后促进钙离子的动员。

6. 其他因素

除上述因素外,循环中还有一些生长因子,如上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),血小板衍生的生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)。这几种生长因子作用的共同特点是,激活膜受体上的特异性蛋白激酶,使受体上蛋白质酪氨酸残基磷酸化而发挥调节作用。

卵巢内抑制素 (inhibin) 对卵泡的发育和分泌功能都有调节作用。抑制素特异地作用于腺垂体细胞, 抑制 FSH 的释放, 进而减弱 FSH 对卵巢的作用, 对 LH 的释放几乎无影响。

卵巢颗粒细胞与黄体细胞产生另一种调节蛋白, 称为卵巢调节蛋白 (follicle regulatory protein, FRP), 它不作用于垂体, 而作用于卵巢, 通过抑制芳香化酶与 3β -羟甾体脱氢酶, 减少雌激素和孕酮的生成。

小卵泡中的颗粒细胞还可分泌纤维粘连蛋白 (fibronectin), 它能抑制颗粒细胞对促性腺激素的反应, 加入雌激素, FSH 和胰岛素可使纤维粘连蛋白水平降低。

此外, 颗粒细胞的雌激素生物合成也受到糖皮质激素的影响。在生理情况下, 糖皮质激素对颗粒细胞的功能可能没有调节作用, 只是在应激状态下, 或服用大量可的松类药物时, 糖皮质激素既可作用于丘脑-垂体抑制 GTH 的释放, 也可直接抑制颗粒细胞雌激素的分泌。

(二) 孕激素合成和分泌的调节

在排卵前, 成熟卵泡即可分泌孕酮, 但孕酮的大量合成和释放发生在排卵后的黄体期, 此时颗粒细胞由 FSH 依赖型转变成 LH 依赖的黄体细胞。孕酮在调节受精卵着床和维持妊娠过程中起着关键性作用。而黄体细胞孕酮分泌的调节是极其复杂的, 既受垂体分泌的促性腺激素 (LH、FSH 和 PRL) 和胎盘分泌的绒毛膜促性腺激素 (CG) 等因素的兴奋性调控, 也受 GnRH、PGF₂ α 和其他物质的抑制作用。

1. 刺激孕酮分泌的因素

除已知的垂体促性腺激素 (LH 和 FSH), 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 是主要的孕酮合成和分泌的刺激因素外, 最近又陆续发现催乳素 (PRL)、血管活性肠肽 (VIP)、雄激素 (Androgen)、胰岛素、上皮生长因子 (EGF)、糖皮质激素、肾上腺素等都具有直接或间接的刺激孕酮增加的作用。它们的作用机制基本上都是通过黄体细胞上的特异性受体, 使细胞内 cAMP 水平升高, 最终激活侧链裂解酶 (SCC) 和 3β -羟甾体脱氢酶 (3β -HSD) 的活性, 进而使孕酮和孕烯酮的合成与释放增加, 或是抑制 20α -羟甾体脱氢酶 (20α -HSD)、抑制孕酮降解为 20α -羟孕酮。

催乳素 (PRL) 有维持黄体、延长其存活期的作用, 这一作用可分为三个方面:

(1) 维持黄体细胞膜的完整性及膜内 LH 受体的数量。PGF₂ α 可使黄体细胞膜的磷脂成分发生变化, 增加膜的黏滞性, 掩护 LH 受体, 导致黄体溶解; 而 PRL 则可通过恢复细胞膜的流动性而暴露 LH 受体, 维持黄体细胞对 LH 的反应, 使孕酮生成得以正常进行, PRL 还可抵消大剂量 LH 和 hCG 使黄体细胞膜对 LH/hCG 受体数目减少的现象。

(2) PRL 为黄体细胞的甾体激素生成提供底物, PRL 和 LH 一样, 使促进脂蛋白与细胞膜上的受体结合, 形成脂蛋白-受体复合物, 内移入胞浆, 经溶酶体降解, 释放胆固醇, 供孕酮合成之用。PRL 促使脂蛋白与黄体细胞膜结合的能力较 LH 还

强,同时 PRL 也可增强膜上脂蛋白的受体。

(3) PRL 可诱导多种动物的离体黄体细胞产生孕酮,且呈量效关系。它既可抑制孕酮降解,又可增加孕酮的合成。

2. 抑制孕酮分泌的因素

目前认为,可抑制孕酮分泌的因素有 GnRH 及其类似物,前列腺素及一些卵巢内调节因子 (intra-ovarian regulator)。

(1) GnRH: GnRH 可直接作用于卵巢,抑制其孕酮生成过程,也可抑制 FSH、LH/hCG、PRL 与 β 肾上腺素能受体激动剂所引起的孕酮分泌。其抑制作用表现为 cAMP 生成减少,孕酮合成酶 (3β -羟甾脱氢酶和侧链裂解酶) 的活性降低,而孕酮降解过程中的 20α -羟甾脱氢酶活性升高,因而使孕酮的生成减少。

(2) 前列腺素: 特别是 $PG_{2\alpha}$ 对黄体细胞生成的抑制作用与 GnRH 的作用相似,如两者同时使用,则抑制效应更为明显。

(3) 缩宫素 (oxytocin, OX): 除下丘脑可制造缩宫素外,卵巢也可生成缩宫素。卵巢产生缩宫素的量随生殖周期的变化而波动,人黄体细胞的离体培养实验发现: OX 对 hCG 和 8-溴 cAMP 诱导的孕酮生成过程均起抑制作用;此外,实验还证明,OX 可溶解黄体,在 $PGF_{2\alpha}$ 存在的条件下,OX 的溶黄体作用加强。因此,OX 被认为是卵巢内抑制性调节因子之一。

(4) LH 受体结合抑制因子 (LH receptor binding inhibitor, LHBI): 它是另一个抑制孕酮的卵巢内调节因子,可抑制基础的和 LH 诱导的孕酮分泌,促进黄体萎缩退化。LHBI 明显抑制 hCG 与其受体的结合,对睾丸组织无影响,说明 LHBI 具有组织特异性。

最近几年的研究表明,酪氨酸也可能是一种卵巢内调节 hCG 对黄体细胞孕酮生成作用的因子之一。依据是: ① 酪氨酸含量随卵巢功能状态而变化,未成熟卵巢内极少,成熟后酪氨酸含量增加,排卵后或妊娠期均有显著增多。② 离体黄体细胞培养证明,培养液中酪氨酸含量随培养时间的延长而逐渐增多。③ 放射性核素示踪表明,注入 3H -酪氨酸 5min 后,卵巢的摄取量居肝和肾脏后,为第 3 位,而排卵后卵巢摄取 3H -酪氨酸的量跃居首位。④ 颗粒细胞、黄体细胞和卵泡的培养以及卵巢原位灌流一致表明,酪氨酸具有抑制 hCG 诱导的孕酮生成作用。孕酮减少的同时, cAMP 形成减少, RNA、蛋白质合成与 3β -羟甾脱氢酶受到抑制。⑤ 酪氨酸的作用点在卵巢水平,黄体细胞膜上存在可与酪氨酸特异性结合的位点。由于 hCG 和孕酮对维持早孕起着重要作用,故凡是能抑制孕酮生成的因素,都可能发展成为抗生育药物,其中卵巢内局部调节因子的发展和演变,可能成为最理想的抗生育制剂 (表 4-3)。

表 4-3 卵巢内局部调节因子

名称	缩写	化学性质	产生部位	作用
卵母细胞成熟抑制因子	OMI	多肽	颗粒细胞	抑制卵母细胞成熟
次黄嘌呤	嘌呤		存在于卵泡液	抑制卵母细胞成熟

续表

名称	缩写	化学性质	产生部位	作用
黄体化抑制因子	LI	多肽	存在于卵泡液	抑制颗粒细胞黄体化
LH 结合抑制因子	LHBI	多肽	黄体组织	抑制 LH 诱导孕酮分泌 促进黄体萎缩退化
血液活性肠肽	VIP	多肽		促进雌、孕激素生成
雌激素	E	甾体	卵泡细胞和黄体	对雌激素分泌有自我增强作用
雄激素	A	甾体	卵泡和黄体	促进孕酮分泌合成
抑制素 (inhibin)		多肽	存在于卵泡液	抑制雌激素生成
纤维结合素 (fibronectin)		多肽	颗粒细胞	抑制卵泡对 GTH 的反应
FSH 结合抑制因子	FSHBI	多肽	睾丸和卵泡液中	抑制 FSH 的作用
催产素	OX		大黄体细胞	抑制孕酮生成, 加速黄体退化
酪氨酸	Tyr	氨基酸	黄体细胞	抑制 hCG 诱导的孕酮生成

三、卵巢激素对促性腺激素分泌的反馈调节

卵巢分泌的雌二醇、孕酮等激素对 GTH 的分泌都呈现刺激和抑制, 即正和负反馈效应, 依各自发挥作用的时限、浓度及部位的差异而表现不同效应, 进而调节着雌性生殖活动的周期性节律。

(一) 雌二醇的反馈作用

在卵泡早期, 血浆中低水平的雌二醇对垂体 GTH 的基础分泌呈负反馈调节。如切除动物的卵巢或是绝经期妇女, 则表现为血中 LH 和 FSH 水平增高, 此时若给予小剂量雌二醇, 1h 内即可抑制 LH 和 FSH 的释放。可见, 当雌二醇在血浆循环中的浓度较低时, 对 GTH 分泌表现较迅速的抑制作用。

与此相反, 高浓度的雌二醇的持续作用对 GTH 分泌呈正反馈效应, 排卵前 LH 和 FSH 峰的出现主要是成熟卵泡大量分泌雌二醇的结果。月经周期中期 LH 峰出现的前一天, 血中首先出现明显的雌二醇峰, 如用抗雌二醇血清阻断雌二醇作用, 便可抑制 LH 峰的出现, 从而抑制排卵。

(二) 孕酮的反馈作用

孕酮对 LH 和 FSH 分泌的反馈控制却与雌二醇相反。孕酮的主要作用是在黄体期高浓度情况下, 抑制雌二醇引起的 LH 和 FSH 分泌, 阻断雌二醇的正反馈作用, 使 GTH 分泌维持在较低的基础水平。在黄体期给妇女注射雌二醇也不能出现 LH 峰。然而, 在排卵前孕酮水平较低的时候, 它却表现对 LH 分泌的正反馈效应, 与雌二醇的作用相似, 二者协同作用, 促进 LH 分泌高峰的形成。

孕酮反馈效应的作用部位与雌二醇相似, 在垂体和下丘脑的视前区, 正中隆起

都存在着孕酮结合位点,所以它可以直接作用于垂体改变促性腺激素分泌细胞对 GnRH 的反应性,也可以作用于下丘脑 GnRH 细胞或通过中枢其他递质传递系统改变 GnRH 脉冲释放的频率和幅度,进而控制 GTH 的分泌。

(三) 其他卵巢激素

近年来发现,存在于卵泡液中的抑制素(inhibin)可特异地抑制垂体释放 FSH,而不影响 LH 分泌。随之,从猪的卵泡液中又发现了两种具有刺激 FSH 分泌的蛋白因子,一种被称为卵泡刺激素释放蛋白(FRP),另一种为刺激素(activin)。抑制素和刺激素的发现,还为解释 GnRH 对 LH 和 FSH 释放控制的分离现象提出了新的途径。FSH 和刺激素与 GnRH 作用有许多不同之处:①既刺激 FSH 释放,也刺激 FSH 合成;②不影响 LH 释放;③作用开始时间较 GnRH 晚,作用缓慢;④用 GnRH 受体阻断剂不能阻断 FRP 的作用,说明这种刺激作用不是通过 GnRH 受体实现的。

综上所述,下丘脑弓状核是月经周期神经分泌的调控系统的中枢,产生 GnRH,每隔 1~2h 发出一次脉冲式释放到达腺垂体,引起 GTH 脉冲式分泌。GTH 作用于卵巢,使卵泡开始发育,产生雌二醇,卵泡初期这些雌二醇抑制垂体对 GnRH 的反应性,使 FSH 和 LH 分泌不致过多。随着卵泡发育成熟,在 FSH 和 LH 共同作用下,雌二醇分泌急剧增多,孕酮的分泌也有所增加,当血中雌二醇超过 200ng/ml 的阈值,持续 36h 以上,负反馈作用中断,雌二醇和孕酮使腺垂体对 GnRH 反应迅速增强,触发了排卵前 LH 峰。成熟卵泡在 GHT 峰作用下,排卵,转变成黄体,分泌大量孕酮,孕酮一方面抑制卵巢内的卵泡发育,另一方面抑制垂体 GTH 的释放,直至黄体退化后,孕酮分泌减少,GTH 分泌开始增多,新的卵泡才开始发育,重新开始新的周期。在整个周期中,由于雌激素和孕激素的作用,子宫内膜也出现周期性变化,直至黄体退化,孕激素迅速下降,内膜脱落,子宫出血,即月经出现,成为新周期开始的明显标志。

(高惠宝 史小林)

第五章

性激素与性激素受体

对生殖过程有影响的激素较多,但主要包括性激素 (sex hormones)、垂体和胎盘的促性腺激素 (gonadotropins) 及下丘脑的促性腺素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)。性腺激素调节副性器官的发育及功能;促性腺激素促进性腺发育和分泌性激素;下丘脑的促性腺素释放激素控制垂体促性腺激素的合成和分泌。分泌进入血中的性腺激素和垂体激素,又可以反馈地控制下丘脑促性腺素释放激素及垂体促性腺激素的分泌。生殖内分泌学通常把下丘脑、垂体与性腺之间的这种相互关系,称为下丘脑-垂体-性腺轴。在妊娠期,胎盘合成和分泌的人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG),使黄体转变为妊娠黄体并维持其功能。此外,松果体激素与生殖的关系已日益引起人们的重视。

激素在血液中的浓度很低,但能产生明显的生物学作用,其先决条件是激素可以被靶细胞的接受位点或受体 (receptor) 所识别。受体是一些蛋白质分子,镶嵌在细胞膜的外表面或存在于细胞质内。每种受体由于其分子构型的特点,通常只能和具有某一种特定结构的激素分子结合,这就使具有某种受体的细胞成为某一激素的靶细胞。激素与受体的结合具有特异性,这种特异性的结合使激素的作用具有特异性。激素分子和它相应的受体分子的结合通常比较疏松,结合后还可以分离,受体再与别的同类激素分子结合,继续表现生物学效应。因此,激素对其靶细胞作用的大小,即决定于受体数量和激素与受体的化学亲和力,也决定于周围激素分子的浓度。激素分子和受体结合后,可将信息传递到细胞内部,并引起特异的生物效应。

激素不仅通过与受体结合发挥生物效应,还调节着受体的数量。至少存在三类激素对受体的调节方式:

(1) 自身调节 (autoregulation): 一种激素可改变 (增加或减少) 其自身受体的数量。如雌二醇使自身受体数量增加,而 LH 可降低 LH 受体数量。

(2) 协同调节 (coordination regulation): 指一种甾体激素 (如雌二醇) 与一种蛋白质激素 (如 FSH) 相互作用,改变同一蛋白质激素 (如 FSH) 的受体数量

或不同蛋白质激素(如 LH)的受体的数量。

(3) 异种调节(heteroregulation):一种激素(如 LH)影响着另一种完全不同激素(如 FSH 或催乳素 PRL)受体数量。

激素分子若使受体数量增加,一般称为向上调节(upregulation);若使受体数量减少,则称为向下调节(downregulation)。本章将重点介绍性激素的作用机制以及对受体的调节。

第一节 性激素

性激素包括雌激素(estrogens)、孕激素(progestogens)和雄激素(androgens)三大类。睾丸合成与分泌雄激素和少量雌激素、孕激素。卵巢合成与分泌雌激素、孕激素、少量雄激素和松弛素(relaxin)。除性腺外,胎盘可合成大量雌激素及孕激素,肾上腺皮质可合成少量活性较弱的雌激素及雄激素。

一、甾体激素的一般特性

雄激素、雌激素与孕激素的结构与胆固醇(cholesterol)类似,都具有一个环戊烷多氢菲核,因而又被称为类固醇激素(图 5-1)。

(一) 甾体激素的生物合成

各种甾体激素的合成途径基本上是统一的,只是在不同的组织中,由于酶系统的差异而使其合成的终产物各异。合成甾体激素时可以从乙酸盐开始,先合成胆固醇,也可直接摄取血液中的胆固醇作为合成的原料,胆固醇在线粒体酶的作用下转化为孕烯醇酮。孕烯醇酮是合成孕激素、雄激素和雌激素的前体,孕烯醇酮是 Δ^5 甾体,经 Δ^5 - Δ^4 异构酶的作用形成孕酮(图 5-2)。孕酮为合成雄激素和雌激素的中间体,因此在卵巢、睾丸、肾上腺皮质和胎盘内均有孕酮存在。

1. 雄激素的合成

雄激素可通过两条途径合成:一条称 Δ^5 途径,即以孕烯醇酮为前体,经过一系列酶作用的产物。 Δ^5 途径合成雄激素时,首先在 17α -羟化酶的作用下,在孕烯醇酮第 17 位碳原子增添了 α 羟基,从而变成 17α -羟孕烯醇酮,再经 $17,20$ 碳链裂解酶的作用,将 17 位和 20 位碳原子上的侧链断开,形成去氢表雄甾酮,又在 17β -羟甾醇脱氢酶(17β -HSD)作用下形成雄甾烯二醇。去氢表雄甾酮和雄甾烯二醇都是较弱的雄激素。雄激素合成的另一条途径为 Δ^4 途径,即以 Δ^4 甾体-孕酮为前体,其合成的产物也是 Δ^4 甾体。孕酮在 17α -羟化酶作用下形成 17α -羟孕酮,又经 $17,20$ 碳链裂解酶作用形成雄甾烯二酮,再经 17β -羟甾醇脱氢酶作用后形成活性最强的雄激素——睾酮。 Δ^5 途径的每一步产物均可经 3β -羟甾醇脱氢酶和 Δ^5 - Δ^4 异构酶的作用而形成相当的 Δ^4 产物。在人类以 Δ^5 途径为主。(Δ^4 表示双键位于 C_4 - C_5 之间, Δ^5 表示双键

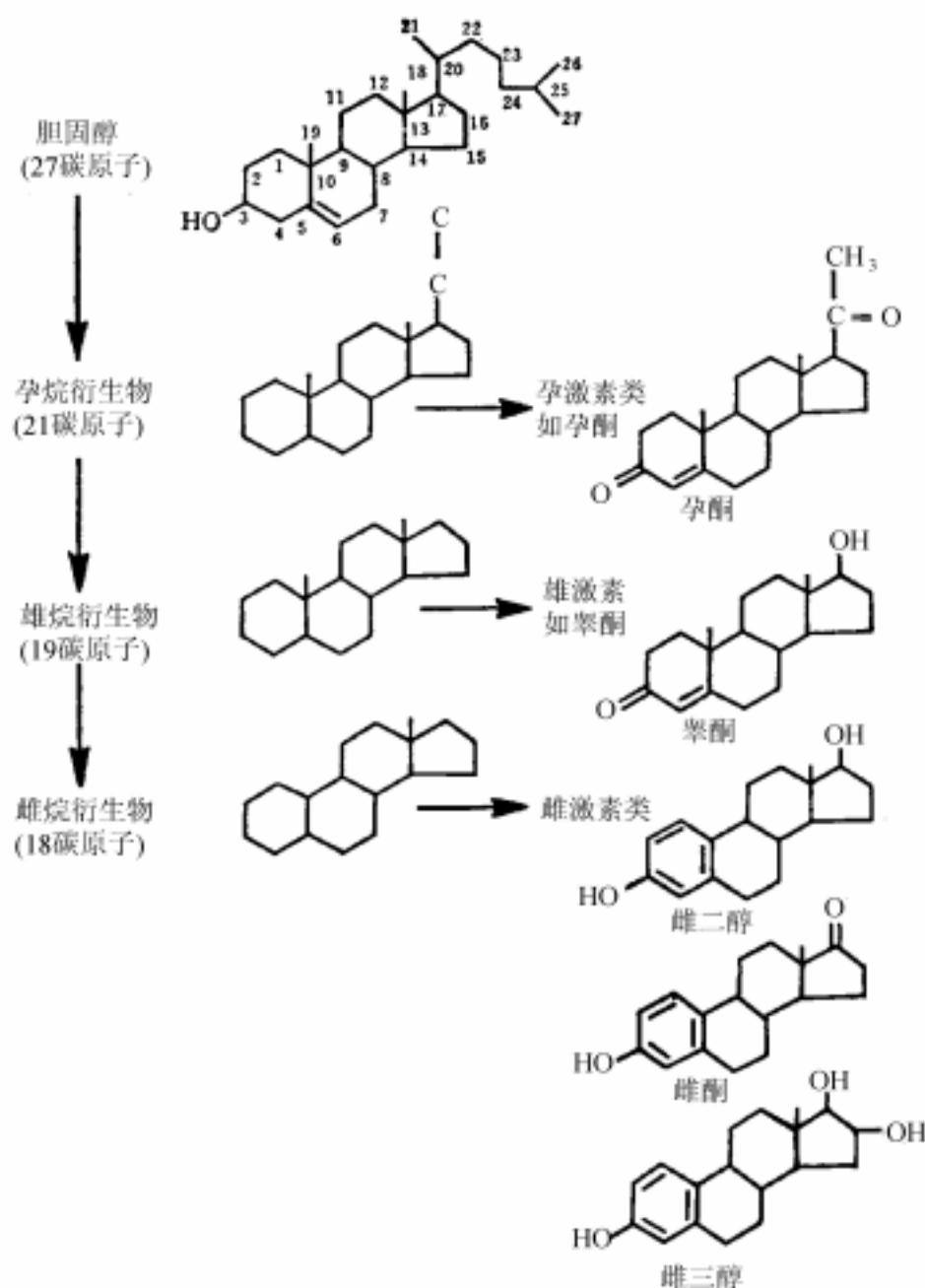


图 5-1 胆固醇和性激素的基本化学结构

位于 C₅₋₆之间)。

雄激素(睾酮)的 95% 是由睾丸合成与分泌的,睾丸间质细胞(Leydig 细胞)是合成睾酮的主要细胞;5% 雄激素由肾上腺和其他组织产生。肾上腺皮质中由于 17 β -羟甾脱氢酶活性弱,产生的睾酮较少。因此,尽管肾上腺皮质能合成雄激素,但切除睾丸后,肾上腺皮质并不能代替睾丸的内分泌功能。青年男子睾酮的分泌有昼夜节律性波动,一般在睡眠时睾酮的分泌量增加,所以血中睾酮含量在早晨醒来时最高,而在傍晚时最低。随着年龄增大,昼夜波动逐渐消失。

2. 雌激素的合成

雌激素是以雄激素即睾酮为前体而合成的。在芳香化酶的作用下,睾酮演化为雌二醇,从雄甾烯二酮转化为雌酮。

人类的雌激素包括雌二醇、雌酮和雌三醇。雌二醇是卵巢成熟卵泡和黄体分

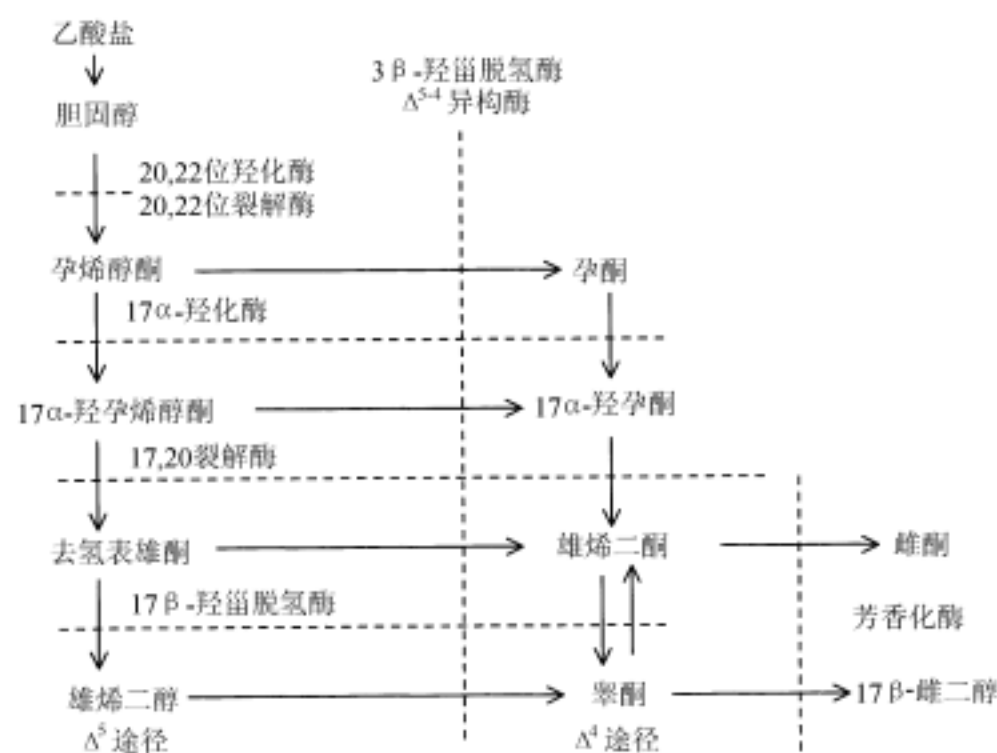


图 5-2 类固醇激素的合成

泌的最主要的雌激素,卵巢只分泌少量的雌酮。肾上腺和睾丸也可分泌少量雌二醇和雌酮。妊娠时胎盘是体内雌激素的主要来源,以产生雌三醇为主,妊娠时血中雌三醇的含量较未孕时高 1000 倍。外周组织如肝脏、脂肪和毛囊等处可以由雌激素的前体生成相当量的雌激素,特别是雌酮。血浆和尿中雌三醇是雌二醇和雌酮在卵巢外的代谢产物。

卵巢的卵泡细胞和黄体细胞都能合成雌激素,卵泡合成雌激素是由卵泡内膜细胞和颗粒细胞共同作用的结果,即所谓的“二细胞学说”是内膜细胞在 LH 作用下合成雄激素,雄激素通过弥散转运至颗粒细胞,颗粒细胞在 FSH 作用下,芳香化酶活性增加,使雄激素转变为雌激素。

3. 孕激素的合成

孕酮是机体内的天然孕激素,它可作为一种独立的激素被分泌入血而发挥作用,也可作为甾体激素合成的中间体。在 LH 高峰出现前夕,颗粒细胞在 LH 的作用下发生黄体化,开始分泌孕酮,但由于颗粒细胞内缺乏 17 α -羟化酶,只能停留在孕酮阶段而不能进一步转化成雄激素和雌激素。但它可以借弥散进入相邻的内膜细胞,在这里的 17 α -羟化酶和其他酶的催化下形成雄激素,然后再进入颗粒细胞内转变成雌激素。

排卵后,在 LH 作用下颗粒细胞和内膜细胞转变为黄体细胞。颗粒黄体细胞合成大量孕酮,内膜细胞提供了 17 α -羟化酶和 17-裂解酶等,可以合成雄激素并转变成雌激素,于是黄体也能分泌较多的雌二醇。

(二) 甾体激素的血中转运及失活

大部分甾体激素在血中以与蛋白结合的形式转运至靶细胞处,游离的仅占 2% ~ 3%。雌激素和雄激素在血液循环中与性激素结合蛋白(TeBG)或白蛋白相结合;孕激素则与白蛋白(90%)或皮质醇结合球蛋白(10%)结合。结合状态下的性激素无生物活性,但可避免激素过快地被破坏和排出。有生物活性的游离激素与无活性的结合激素维持着动态平衡。

甾体激素主要在肝脏内代谢。睾酮转变为作用较弱的雄激素,孕酮代谢产物是孕烷二醇。雌二醇在血中转变成雌酮,这些代谢产物多与葡萄糖醛酸形成盐由尿中排出。

二、甾体激素的生化与生理作用

(一) 雌激素

体内的三种雌激素以雌二醇活性最强,雌酮的活性仅为雌二醇的 10%,雌三醇的活性最弱,仅为雌二醇的 1%。

卵巢的卵泡细胞及黄体细胞都能合成雌激素,卵泡合成雌激素是由泡膜细胞和颗粒细胞共同作用的结果,即泡膜细胞合成雄激素,雄激素作为雌激素的前体在颗粒细胞内的芳香化酶的作用下转变为雌激素。胎盘合体滋养层细胞也能分泌大量的雌激素,但主要是雌三醇。妊娠时血中雌三醇的含量较未妊娠时增高 1000 倍。此外,肾上腺和睾丸的支持细胞也可分泌少量的雌激素。

雌激素对性器官的特殊功能是刺激女性生殖器官的生长和副性征的发育。同时,对机体的代谢、内分泌(如肾上腺皮质和甲状腺)、免疫系统、心血管系统、骨骼的生长和成熟、皮肤等方面也有明显的影响。

1. 对子宫的作用

雌激素促进子宫(包括内膜和平滑肌)的代谢和生长,促进子宫内膜细胞的分裂。在雌激素作用的早期,表现为子宫组织的葡萄糖代谢、磷脂合成增强。RNA 聚合酶活性以及子宫染色质合成 RNA 的模板活性增强,不仅 mRNA 合成增加,而且总 RNA 合成也可能增加。随后,子宫蛋白质合成明显增强,其中包括诱导雌激素受体、孕激素受体和缩宫素受体的生成。与核酸、蛋白质生物合成增加的同时,子宫的多种酶(如鸟氨酸脱羧酶)、tRNA 甲基转移酶、Mg 离子依赖 ATP 酶、丝氨酸醛缩酶和氨基酸激酶等活性也明显增强。子宫细胞对葡萄糖、氨基酸、核苷以及水和钙离子通透性增加,ATP 合成增加。子宫细胞的这些改变,为子宫合成代谢提供了重要的物质基础。此外,在雌激素的作用下还可使子宫组织充血,增加对水的摄取,这可能是由于雌激素诱导组胺释放,促使血管扩张和毛细血管通透性增加的结果。雌激素作用的晚期表现为 RNA 聚合酶活性继续增高,RNA 和蛋白质合成,细胞代谢更为活跃。

(1) 对子宫内膜的作用:雌激素促进子宫内膜细胞分裂,内膜增长变厚,产生

典型的增殖变化。增殖型内膜有修复子宫内膜剥落形成的创面起止血作用,雌激素通过这种作用参与月经后子宫内膜的再生和修复过程。另外,雌激素引起的增殖型内膜还是孕酮将子宫内膜转变为分泌型内膜的先决条件,可为排卵后孕酮使内膜向分泌期转变做好准备。雌激素是子宫内膜周期性变化的内在基础,参与月经周期的形成。

雌激素引发孕酮发挥生物学效应的分子基础是雌激素诱导了孕酮受体的生成。

(2) 对子宫肌的作用:雌激素促进子宫平滑肌细胞的增生肥大,增加肌细胞内肌纤蛋白和肌动蛋白的含量。

雌激素本身对子宫肌可能并无直接的兴奋作用,雌激素增强子宫活动是子宫对催产物质反应性提高和产生了某些子宫兴奋物质的继发结果。可能与雌激素刺激子宫组织,特别是子宫内膜的前列腺素合成和释放,引发缩宫素的作用以及促进子宫肌 α 受体的优势等有关。雌激素增强缩宫素的子宫肌收缩作用,由雌激素提高子宫缩宫素受体的亲和力和受体数量所引起。雌激素有降低溶酶体膜稳定性,直接促进前列腺素合成的作用,不需通过雌激素受体中介。

(3) 对子宫颈的作用:雌激素促进宫颈黏液的生长和腺体分泌。在雌激素作用下,宫颈分泌的黏液量大、稀薄,其中多糖和巯基的含量增加,这种黏液有利于精子穿透。这种黏液干燥后,由于其中的氯化钠结晶析出,而呈现羊齿植物状结晶。检查宫颈黏液羊齿植物状结晶存在的情况,是判断体内雌激素水平的一个简单方法。雌激素还有促进妊娠子宫颈软化的作用。

2. 对阴道的作用

雌激素可促进阴道上皮基底层细胞增生、分化、成熟以及表浅的上皮细胞角化和核致密变化。

雌激素所引起的阴道上皮变化是对细胞的直接作用。

3. 对输卵管的作用

输卵管分泌上皮细胞和纤毛上皮细胞的正常分化和生长有赖于雌激素的存在。适当剂量的雌激素可加速卵子在输卵管的运行。而非生理性的大剂量雌激素,则能使卵子滞留在括约肌样的壶腹-峡部接受区。大剂量雌激素延缓卵子运行,可能是雌激素作为事后避孕药的一个理论依据。

4. 对卵巢的作用

雌激素对卵巢的作用有直接与间接两种。

(1) 直接作用:雌激素对卵巢本身的发育是必需的,卵巢生发上皮的功能以及在皮质各期卵泡的成长和发育均需要雌激素的存在,颗粒细胞和卵泡膜细胞既是分泌产生雌激素的部位,其本身也有雌激素受体,并接受雌激素的影响。

(2) 间接作用:雌激素可以通过下丘脑垂体前叶,发生正反馈和负反馈两个方面的调节作用,可促进或抑制促性腺激素的释放,间接影响卵巢的形态和功能。

正常情况下,雌激素和促性腺激素可协同促进卵的发育。

5. 对垂体促性腺激素分泌的影响

雌激素对垂体前叶促性腺激素的分泌具有负反馈和正反馈两个方面的调节作用。雌激素的反馈作用是快速的,几小时内即可见效应。反馈调节的性质受给药的剂量、时间以及有无其他激素存在等因素的影响。正反馈是物种进化的产物,卵泡期后半期,在内源性雌激素增加的同时给予小剂量的雌激素可产生 LH 高峰。临床以此调整排卵日以及治疗黄体功能不全。通常认为,雌激素对 FSH 并无明显的正反馈作用,不过大剂量的雌激素可以反馈性地使 FSH 分泌减少。卵泡初期连续给予雌激素可抑制后半期 LH 的升高以及排卵前的 LH 高峰,序贯型口服避孕药抑制排卵的原理即出于这种负反馈作用。另外,在整个月经周期中孕酮均抑制 LH 分泌,这一抑制作用可得到雌激素的增强,雌激素和孕激素一起使用,能抑制 FSH 和 LH 的分泌,这是目前广泛使用的复合型避孕药使 LH 处于低水平的原理。

雌激素可直接影响下丘脑 GnRH 的释放量来影响垂体前叶促性腺激素的分泌。另外,在垂体水平对促性腺激素的分泌的调节也有直接作用。

6. 对乳腺的作用

乳腺的发育和泌乳是一系列复杂的生化过程,受到许多因素的调节,总的来说催乳素对乳腺的作用是主要的。但青春期乳腺的发育主要是由于雌激素的刺激,其他激素如糖皮质激素、生长激素、孕激素以及甲状腺素也可起一定的作用。大剂量雌激素有抑制泌乳的作用。

7. 对胚泡着床的作用

胚泡进入子宫并非立即着床,而是要在子宫内游离一段时间。时间长短与雌激素和孕激素的平衡状况密切相关。交配 4d 后去卵巢的大鼠,给予孕酮可长时间维持胚泡游离在宫腔内,但不能着床;一旦给予外源性雌激素,则胚泡着床迅速发生。有人认为,雌激素可能和胚泡结合后作为着床时对子宫的局部信号。近年的研究证明,雌激素可能与孕激素协同作用,促进滋养层细胞水解酶释放,使胚泡的透明带溶解而有助于着床;也可能影响子宫上皮细胞或使上皮细胞自体溶解,有利于滋养层细胞侵入子宫内膜。不过,在人类中的作用还有待于进一步探讨。

8. 对代谢的作用

(1) 蛋白质代谢:雌激素对蛋白质代谢的影响表现促进蛋白质分解的作用;另一方面对肝脏则有蛋白同化作用,刺激多种血浆蛋白的合成。

(2) 脂肪代谢:一般认为,雌激素减少血清胆固醇和胆固醇磷脂之比,可显著地增加 HDL 和减少 LDL 的含量,这可能是生育年龄妇女冠心病率较低的原因,但雌激素治疗冠心病的临床效果却不理想,值得注意。

(3) 糖代谢:雌激素能增强葡萄糖刺激胰岛素分泌的反应,因而使血浆胰岛素水平增加。单纯的雌激素并不影响糖耐量。

9. 对骨骼的作用

雌激素对骨质的成骨细胞有特殊的刺激作用,可促进未成熟小鼠的成骨细胞活性,使骨质变得致密。此外,可加速长骨的成骨中心及骨骼的闭合,因而使骨骼的长度增加受到限制。雌激素能降低破骨细胞活性,减少骨骼重吸收。

(二) 孕激素

孕激素是保证妊娠正常发展的激素,机体内只有天然孕激素即孕酮,其作用主要限于生殖器官。在妊娠期间,孕酮的免疫抑制作用能阻止机体排斥胚胎的作用。卵巢黄体细胞能分泌大量孕酮,卵泡的颗粒细胞和泡膜内层细胞可以分泌少量孕酮。妊娠两个月左右,胎盘开始合成大量孕酮。

1. 对下丘脑-垂体-卵巢轴的作用

正常月经周期的黄体期,黄体分泌雌二醇和孕酮,抑制垂体促性腺激素分泌。若无妊娠发生,则雌二醇、孕酮分泌下降,垂体促性腺激素的分泌又重新出现,导致新周期的开始。

同时给予孕激素和雌激素或给予复合型口服避孕药,则孕激素可增强雌激素抑制垂体对 GnRH 的反应,使促性腺激素合成和分泌的作用受抑制。卵巢卵泡的发育因垂体促性腺激素的合成和分泌的受抑而抑制。同时,由于卵巢卵泡发育受阻,雌二醇峰对垂体促性腺激素分泌的正反馈作用也无从发生,构成了排卵抑制,这是孕激素用于避孕的重要机制之一。

2. 对子宫内膜

在月经周期的黄体期,在雌激素引起的子宫内膜增生变化的基础上,孕激素则进一步促使内膜由增生期向分泌期转化,为受精卵的着床及其后的胚泡的发育作准备。这是孕激素维持妊娠作用的一大因素。孕激素导致分泌期变化包括:

(1) 孕激素使腺上皮细胞的基底部出现核下空泡,这是糖原聚集所致。

(2) 腺体进一步生长与分支,呈螺旋状弯曲,管腔内充满丰富的分泌物。

(3) 内膜基质发生水肿,转变为前蜕膜细胞,螺旋动脉进一步增长,分枝伸展到内膜表面。表层毛细血管也增生扩张,为受精卵的着床创造条件。

长期应用孕激素化合物,可导致内膜的抑制,表现为与上述相反的结果,即腺上皮变性,糖原含量明显降低,中性脂肪沉积;腺体萎缩退化,分支少且弯度变小,呈静止无功能状态,类似早增生期变化,基质中螺旋动脉生长受抑制。这一作用是孕激素抑制增生的子宫内膜及治疗内膜癌的理论基础。

3. 抑制子宫肌收缩和维持妊娠的作用

孕酮能抑制子宫肌的收缩活动,使妊娠子宫处于安静状态,为胚泡着床和发育创造了必要的环境,这是孕酮维持妊娠作用的另一重要因素。

关于孕酮抑制子宫肌收缩的机制可能包括如下几个方面:

(1) 孕酮使子宫肌细胞膜超极化,提高了子宫肌的兴奋阈,降低了子宫肌的兴奋性。

(2) 子宫肌细胞间的缝隙连接是子宫肌收缩活动同步的基础,雌激素有促进作用,而孕激素可抑制细胞间缝隙连接的形成,从而阻止收缩的传播,使子宫收缩活动受阻。

(3) 孕酮可抑制子宫前列腺素的合成及增加前列腺素的代谢失活,从而降低子宫组织中前列腺素的含量。前列腺为强缩宫物质,能直接兴奋子宫平滑肌和提高

子宫平滑肌对缩宫素的敏感性。

(4) 雌激素使子宫肌及肾上腺素能神经突触前膜上 α 受体占优势,使子宫平滑肌对神经刺激的收缩反应加强,而孕酮使子宫肌及肾上腺素能神经突触前膜上的 β 受体占优势,最终导致子宫对神经刺激的抑制作用。

(5) 孕酮有阻止细胞外钙内流及稳定细胞内结合钙的作用。

4. 对输卵管的作用

孕激素使输卵管上皮纤毛细胞和管腔黏液的分泌减少,从而使精子进入输卵管腔的运送率及其存活率均下降。孕激素还能抑制输卵管的收缩活动,使输卵管平滑肌 β 肾上腺素能占优势,输卵管峡部舒张。此外,还能增强输卵管肌肉对前列腺素 E 的反应,使输卵管峡部松弛,以利于受精卵加速进入宫腔。

外源性大剂量孕激素,除能影响精子和卵子在管腔的运行外,还能阻碍受精卵的运行速度,从而导致受精卵的发育与子宫内膜二者不同步,发挥抗生育作用。

5. 对宫颈黏液的作用

宫颈黏液由宫颈内膜上皮细胞产生的分泌物,为一复合的胶冻样黏液,其中 95% 为水分,其余为氯化钠、葡萄糖、血清样蛋白、多种酶和大量糖蛋白纤维。正常育龄妇女宫颈黏液的量及理化性质均随内源性性激素的调节而呈周期性变化,对精子的穿透、通行、获能、到达受精部位均有重要影响。已知雌激素可引起大量透明、稀薄而黏度小、拉丝度大及富有羊齿植物叶状结晶的宫颈黏液,超微结构研究可见其中糖蛋白纤维呈平行状排列,纤维间通道宽,利于精子穿透通行,并获能到达受精部位。而孕激素可使宫颈黏液量减少,黏液中蛋白量增高,从而使宫颈黏液变黏稠,拉丝度变小,羊齿植物叶状结晶消失,出现椭圆小体。超微结构可见糖蛋白纤维相互交叉联结形成浓密的网状物,纤维间通道变窄,不利于精子通行。孕激素的这一改变宫颈黏液的作用是复合型避孕药及单一孕激素避孕药的避孕作用的重要机制之一。

6. 对脂质代谢的影响

不同孕激素化合物生物活性不同,对脂质代谢的影响不同。当单独应用或与低剂量雌激素配伍组成口服避孕药时,对脂质代谢影响明显,它们主要通过两种途径影响体内脂质代谢:

(1) 拮抗雌激素引起的血脂和脂蛋白改变的作用,尤其是拮抗雌激素诱导 HDL-C 增高的作用。已知雌激素可诱导 HDL-C 增高,此为男女性冠心病发生率差异的一个重要原因。

(2) 拮抗雌激素增高血中性激素结合球蛋白(SHBG)的作用。已知雌激素可增高血中 SHBG 的水平。雄激素则反之,可使 SHBG 浓度下降。在正常女性 SHBG 水平高于男性,故血中内源性睾酮几乎均呈结合型,游离型很低,故正常女性无明显雄激素症状,如痤疮、多毛。反之,患有痤疮、多毛症的妇女,可见血中 SHBG 偏低,血游离睾酮量增高现象。

7. 对糖代谢的影响

不同化学结构的孕激素化合物对糖代谢的影响不同。关于孕激素化合物对糖

代谢影响的机制,尚不完全清楚。现认为,孕激素引起糖耐量改变的机制主要可能为:

(1) 增高血游离型肾上腺皮质激素浓度。已知糖皮质激素,在血液中与血皮质激素结合球蛋白(CBG)结合,且此结合型与其释放入血的游离型呈动态平稳状态。已知孕激素与糖皮质激素一样,能与血CBG结合,致使血游离皮质醇量增高。血皮质醇的增高导致糖异生作用增强,糖耐量减退。

(2) 胰岛素受体量的减少。现已证实在胰岛有性激素受体的存在。故提示外源激素可作用于胰岛素内性激素受体,引起胰岛素分泌增加。但在另一方面,已有不少研究提出,外源性孕激素可导致机体肝组织对胰岛素摄取减少,可能为组织对胰岛素的敏感性下降的原因。

目前,孕激素和复方口服避孕药引起胰岛素受体数量减少的事实已被认为是孕激素或复方口服避孕药引起用药妇女糖耐量减退和胰岛素耐受现象的一重要因素。

(三) 雄激素

雄激素(androgens)是一类含19个碳原子的类固醇激素,包括睾酮(testosterone, T)、去氢异雄酮(dehydroepian-drosterone, DHEA)、雄烯二酮(androstenedivne)、双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)等。其中睾酮绝大部分由Leydig细胞合成、分泌,仅少量是由肾上腺皮质网状带细胞合成的去氢异雄酮、雄烯二酮转化来的。在血中,以睾酮生物活性最强,在靶细胞中则是双氢睾酮的活性大于睾酮。双氢睾酮原本不是由体内直接合成,而是由睾酮在其所作用的靶细胞中转化来的。睾酮、双氢睾酮和雄烯二酮的活性比为100: 16: 12。一般活性顺序为:在C₃上,C=O> α-OH> β-OH,在C₁₇上,β-OH> C=O> α-OH。睾酮的C₃上有酮基,在C₁₇有β-OH基,所以活性最强。从结构上看(图5-3),C₁₇上β-OH是产生强大活性所必需的。睾酮和双氢睾酮的C₁₇上都具有β-OH,而去氢异雄酮和雄烯二酮的C₁₇上均为酮基,故活性都很低,而且不能与靶细胞上的雄激素受体结合,必须在外周组织中转变为睾酮才能起作用。如果C₁₇上的β-OH改换成α-OH则无生物活性。睾酮经三种方式发挥作用:与靶组织上的特异性受体结合直接作用;或转化为双氢睾酮发挥作用;或转化为雌激素发挥作用。

Leydig细胞产生的睾酮,在不同的发育阶段有不同作用。在人胚胎期,睾酮能刺激雄性生殖道的分化,促进中肾管发育分化为附睾、输精管和精囊腺。胚胎发育至第13周,外生殖器原基细胞中的5α-还原酶使睾酮转变为双氢睾酮,双氢睾酮决定了前述胚胎结构发育分化为阴茎、阴囊。出生前,睾酮使脑垂体向男性方向发展,完成脑垂体的功能性分化。在青春期,Leydig细胞再次合成分泌大量的雄激素,形成雄激素分泌的第2高峰期,促使青春期的启动和发育,并且在雄激素作用下,睾丸发育,开始有精子发生;附睾发育,保证了精子在附睾中的成熟;附性腺发育,开始有分泌功能;阴茎勃起器官发育,具有勃起和射精功能。此时的男性个体在雄激素作用下,其第2性征也得到了发育。成年期,睾酮分泌稳定,以维持精子发生、男

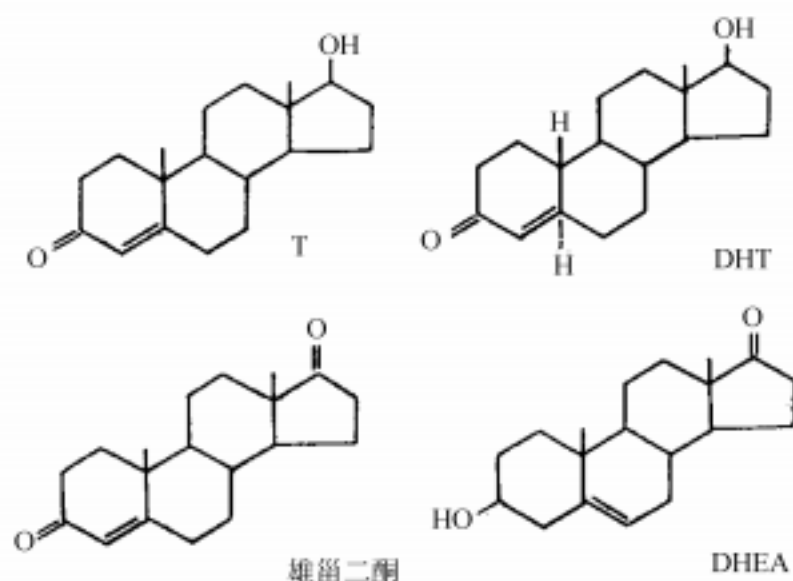


图 5-3 几种雄激素的结构式

T: 睾酮; DHT: 双氢睾酮; DHEA: 去氢异雄酮

性第 2 性征和性功能。此外,雄激素也参与影响机体代谢的活动,包括糖、脂、蛋白质及水盐代谢。雄激素还能影响肝脏多种血浆蛋白质的合成和分泌,刺激肾脏产生促红细胞生成素,间接触发造血干细胞分化为原红细胞。雄激素尤其对骨骼肌肉系统有明显作用,如某些运动员服用类固醇激素等一类违禁药物造成其体形上明显改变就是一例证。

1. 对生殖系统的作用

(1) 刺激生精功能:刺激生精功能是睾酮的主要作用,睾丸内睾酮的浓度比周围循环血中的浓度高 100 倍。曲细精管中生精功能的维持依靠 LH、FSH 和睾酮的相互协调,LH 作用于睾丸间质细胞,促进睾酮的合成,FSH 和睾酮协同作用于生精细胞,使精子发生;同时,作用于支持细胞促进雄激素结合蛋白(androgen binding protein, ABP)的合成和分泌,而间质细胞合成和分泌的睾酮可直接扩散到曲细精管中与 ABP 结合,然后转运到精液和附睾中以维持精子的活力和功能成熟。

(2) 促进胎儿期性器官的发育:胎儿期,胎儿的促性腺激素刺激睾丸的间质细胞分泌雄激素,在雄激素的作用下,胚胎的生殖窦发育为前列腺和尿道;生殖管发育为外生殖器;中肾管发育成附睾、输精管和精囊。动物实验证明,睾酮促进附睾、输精管和精囊腺的形成;而双氢睾酮则促进雄性外生殖器、前列腺和雄性尿道的形成。此外,睾酮还作用于睾丸支持细胞产生副中肾管抑制因子,抑制其发育为女性生殖道。

(3) 促进男性副性征的发育:青春期开始时,下丘脑和垂体前叶对性甾体激素负反馈敏感性降低,促性腺激素分泌增加,使睾丸间质细胞合成睾酮的量增加,从而促进雄性外生殖器的发育,附性器官的发育以及第 2 性征的形成,包括阴毛生长、声音变化、骨骼生长、肌肉发达、性欲和性行为、睾丸内精子的发生和成熟等。实验证明,睾酮以原型直接作用于睾丸、骨骼、肌肉和血细胞形成;而对附性腺的作用

则需转化为双氢睾酮,而对性欲和促性腺激素分泌的调节作用要转化为雌二醇以后才发生。

(4) 诱导中枢神经系统-下丘脑的性分化:新生儿在出生前体内性甾体激素的性质,可决定中枢神经系统下丘脑的分化。成年雄性动物丘脑下部有恒定分泌区,呈持续性分泌 LHRH,激素调节无周期性变化。而雌性动物丘脑下部有恒定分泌区和周期分泌区,激素调节有周期变化。

2. 同化作用

雄激素及同化激素制剂对某些雄激素敏感组织,如骨骼肌、骨、肾等,具有明显促进蛋白质合成代谢作用,即所谓同化作用。雄激素及同化激素制剂的同化作用不通过其内分泌器官,但与食物中摄入适量的白蛋白有关,在低氮摄入时,不能表现出同化作用。

3. 刺激骨髓造血功能

在骨髓造血功能低下时,雄激素能刺激骨髓的造血功能,特别是促进红细胞的生成,该作用可能通过雄激素刺激肾脏分泌红细胞生成素,后者作用于高脂红细胞,使它迅速分化;也可能是雄激素直接刺激骨髓正铁血红蛋白的合成。雄激素仅能少量增加血红蛋白浓度。

4. 其他

雄激素能促进免疫球蛋白的合成,增强机体的免疫功能和抗感染能力;雄激素尚有类似糖皮质激素的抗炎作用;此外,雄激素还有增加远侧肾小管对水、钠的再吸收和保留钙的作用。

第二节 性激素受体

一、激素受体的基本概念

受体(receptor)是具有特异识别配体(ligand)并与之结合而诱导产生一系列生化反应的细胞蛋白,是靶细胞接受生理调节和药物作用的位点。细胞对激素或药物的反应,取决于有无作用物特异的受体存在。

在生理情况下,生物体内甾体激素(steroid hormone, SH)大部分是以蛋白质结合的形式存在,与甾体激素结合的蛋白大体有三类:

(1) 血浆白蛋白,与甾体激素结合的转移性不强,亲和力不高,但结合容量较大。

(2) 血浆中的性激素结合蛋白,具有一定的转移性,亲和力较大。

(3) 受体蛋白,存在于靶细胞中,转移性较强,亲和力较大,但结合容量低。白蛋白和性激素结合球蛋白具有运输、贮存激素的功能,能调节血液中游离甾体激素浓度,只有游离的激素能进入细胞,因而这两类蛋白能调节靶器官激素的供应。在运输过程中,蛋白本身无构型变化,而受体蛋白则不同,当与激素结合后,产生蛋白质构象变化,并连续产生一系列生化改变,完成甾体激素对基因表达的调控。

二、激素受体

激素受体位于细胞的不同部位,与相应的激素结合后,将激素信号转化成一系列细胞内的化学反应,最后表现出激素的生理效应。

根据受体在细胞中的定位,可将其分为三大类。

(1) 膜受体:此种受体又称极性受体,位于靶组织外表面,主要为蛋白质。从激素的化学结构来看,属于此类受体的有多肽、蛋白质激素受体及儿茶酚胺受体,占体内激素受体的 80%。膜结合受体从作用机制分为两类:一类为兴奋腺苷酸环化酶,称为 cAMP 依赖性膜受体,作用于这类受体的激素有促肾上腺皮质激素、降钙素、儿茶酚胺(β -肾上腺素)、胰高血糖素及甲状旁腺素等。另一类是不能兴奋腺苷酸环化酶的,称为 cAMP 不依赖性膜受体,胰岛素、血管紧张素、儿茶酚胺(α -肾上腺素)、生长激素及生长激素释放因子等属于此类。

(2) 细胞内可溶性受体:细胞内可溶性受体又称非极性受体,约占 15%,甾体激素受体属于这一类。它的作用过程是通过细胞可溶性受体。未被结合的甾体激素受体存在于胞液中,激素以弥散方式进入细胞后就与受体迅速结合。然后,“活力”的激素受体复合物转入核内与染色质相结合,染色质上含有供激素受体复合物结合的接受部位。甾体激素反应系统中,细胞核的接受位置较甾体受体为多。因此,即使细胞内全部受体都结合到接受部位上,也达不到饱和状态。

(3) 染色质结合受体:这类受体比较少,仅占 5%。三碘甲腺原氨酸(T_3)、四碘甲腺原氨酸(T_4)属此类,甲状腺素的结合部位位于细胞核中。甲状腺素进入细胞很快,且不为受体的结合所限制。由于受体位于细胞核中,所以没有依赖激素的转移受体到细胞核的过程。最近发现,组蛋白参与了受体的核内定位,它对于保持受体的高亲和力与 T_3 相结合可能也是重要的。

激素受体的生理调节:细胞膜上的受体数目或反应性是可以变化的,它受受体周围生物活性物质,如神经递质、激素及药物等的调节。这种调节可以表现在同类受体,也可以表现在异类受体。

(1) 向下调节或衰减性调节或衰减式调节:受体周围的生物活性物质浓度高时或强大、长期的激动作用时,可使受体数量减少,表现为该受体对该生物活性物质的敏感性降低,出现减敏、去敏、耐受现象或出现因各受体的平衡失调的病理现象。

(2) 向上调节或上增式调节:受体周围的生物活性物质浓度低或强大、长期的阻滞作用时,可使受体数目增加,表现为该受体对该生物活性物质的敏感性增加,出现增敏、高敏性或出现撤药的“反跳”现象。

(3) 同类受体调节与异类受体调节:上述现象根据调节物与受体的关系,可将受体的调节分为同类受体调节与异类受体调节两类。前者的调节物本来就是受体的配体,后者的调节物不是该受体的配体。

(一) 甾体激素受体的共性

所有类固醇激素受体都具有一个独特的、长度为 100~ 500 氨基酸的氨基端,是激活域。DNA 结合域一般位于受体分子的中部,有一个 C4 的锌指基序。羧基端是其激素结合域。各种类固醇激素受体与激素结合之前,其激素结合域对于功能是起抑制作用的。当无激素存在时,糖皮质激素受体锚定于胞质,与一个抑制蛋白复合在一起。在这种状况下,受体不能与靶基因起作用,因此,也不激起转录活动。激素与受体的结合则使受体从胞质的结合中释放出来,得以进入细胞核内,并与 DNA 上的糖皮质激素反应元件相结合,从而发动靶基因活动。其他类固醇激素受体在细胞核内与抑制蛋白结合在一起,而当激素与受体结合后,受体即被释放出来。

甾体激素受体都具有下列共同的特征:

(1) 细胞中可溶性的酸性蛋白:核糖核酸和脱氧核糖核酸酶不能改变甾体激素和受体的结合力。蛋白酶能使受体活性丧失,分离的受体不能透析,遇热不稳定,易变性,—SH 基阻断剂可抑制甾体性激素与受体的结合。

(2) 与配体结合的高亲和力体内有多种激素,而甾体性激素在生理情况下,血中浓度一般为 $10^{-11} \sim 10^{-9} \text{ mol/L}$,受体识别激素依靠高亲和力,以保证这类激素在生理浓度时能完成其生理功能。甾体激素与受体以非共价键结合,这种静电相互作用包括氢键、疏水键及范德华力(van der Waals)等。

(3) 受体结合的特殊性:甾体性激素与受体的多亲和力决定了它与受体结合的专一性,一种受体只能与某一类型激素结合,这种专一性结合是靶器官对激素反应特异性的基础。

(4) 有限的结合容量:甾体性激素与受体结合形成复合物的量与生物效应有关,受体的结合部位有一定限制,因此以不同浓度的配体与一定量的受体样本温育可以得到一条饱和曲线。

(5) 组织特异性:专一受体只存在靶器官中,如雌激素的靶器官有阴道、子宫和乳腺等。

(6) 与生物效应相关:甾体性激素与靶细胞的受体结合后可产生特异的生物效应,如雌激素与子宫雌激素受体结合,可使子宫重量增加。

甾体激素受体研究和应用得较多的是性激素受体(sex hormonereceptor, sex-HR),包括雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和雄激素受体(androgen receptor, HR)。

(二) 类固醇激素受体的作用方式

类固醇激素受体与其配体结合后进一步发挥作用的方式可能有以下三种。

(1) 当激素与其受体结合后,后者被激活。激活后的受体发生功能变化,如构象变化,包括把原先相结合的热激蛋白(HSP)解离,然后把 DNA 结合域暴露,并与激素反应元件或增强子相结合。

(2) 类固醇激素受体高亲和性结合到另一蛋白转录因子上,把本来结合在

DNA 上的复合物从 DNA 链上移开。这个反应是减弱或取消另一转录因子的反应。

(3) 类固醇激素受体与另一类转录因子,如鸡卵清蛋白上游启动子(COUP)竞争 DNA 的结合部位,这时类固醇激素受体的作用是减少另一转录因子的作用,而它本身不具有转录效应。

如上所述,类固醇激素与细胞内受体结合后,激素受体复合物作用于 DNA 的特定部位,改变基因的转录活动,从而产生效应。这一过程一般需时较长,有 RNA 和蛋白质合成的参与,被称为类固醇激素基因组作用机制。此外,类固醇激素对神经元还有快速激活(或抑制)作用的非基因组机制。它可能是通过膜上的类固醇激素受体起作用,因为随着研究的深入,发现越来越多的现象难以用基因组机制解释,如其作用的快速性且能与细胞膜结合等。于是人们怀疑类固醇激素作用还存在着非基因组作用机制,现已有大量资料证明类固醇激素存在着非基因组作用机制。例如,糖皮质激素和大鼠肝细胞膜有高亲和力、低容量的结合;在骨骼肌和心肌细胞,1,25-(OH)₂D₃可快速激活磷脂酶 A₂;醛固酮可在 20min 内使蟾蜍肾远曲小管对钾离子排泄增加,mRNA 转录抑制剂和蛋白质合成抑制剂不影响此效应;孕酮在几秒内使精子内钙升高,将孕酮与牛血清白蛋白偶联后仍有同样作用,表明孕酮是在精子细胞外发挥作用的。尽管已发现了大量非基因作用的现象,但对非基因组作用机制,即类固醇激素和细胞膜的作用及由此导致的膜后信号转导过程还不十分清楚,有关文献报道有许多,但不尽一致。至今人们提出的非基因作用的可能机制有:

(1) 类固醇激素改变了细胞膜的流动性:细胞膜是由脂类构成的,而类固醇激素是脂溶性物质,其完全有可能影响细胞膜的结构和功能。但类固醇激素是增加还是减少膜的流动性,至今文献报道不一致。

(2) 类固醇激素调节质膜上的其他神经递质受体:阿法沙龙(alfaxalone)能增强 GABA(一种中枢神经抑制性递质)的作用,在体外增强 GABA_A 与配体的结合。

(3) 类固醇激素作用于细胞膜上的特异性受体:用放射性核素标记的孕酮和 BSA 在 11 位偶联能与下丘脑基底部分及视前区突触体和纹状体突触体结合,这种结合似乎受雌二醇调节,切除卵巢后 14d 结合减少 80%,给予雌激素则恢复。

(4) 有人甚至提出在同一细胞膜可能存在两种受体,Foresta C 等报道孕酮作用于人精子,能激发快速钙内流,蛋白激酶 C(PKC)抑制剂能抑制此现象。另外,孕酮还激活质膜上钠通道,使钠内流,引起膜快速去极化,此作用不受 PKC 抑制剂影响。此外,人们还对参与类固醇非基因组作用机制的第 2 信使物质进行了深入的研究,取得了不少实验证据,但结论却不尽一致。基本上有以下几种观点:① cAMP 和 cGMP 参与了信号转导;② IP₃ 和 DG 也参与这一过程。类固醇激素通过 G 蛋白激活磷脂酶 C(PLC),产生 IP₃ 和 DG,再引发细胞内钙升高和 PKC 激活以发挥快速调节作用;③ 钙是细胞内重要的第 2 信使物质,众多的类固醇激素对其都有影响。应当指出的是,参与非基因组机制信号转导的第 2 信使物质可以是一种,也可以是几种以上同时起作用,如 cAMP、IP₃、DG、Ca²⁺ 可同时参与信号传递。另外,类固醇激素也可能直接作用于膜上的离子通道发挥快速调节作用,如细胞外使用地塞米松可抑制豚鼠嗜铬细胞由乙酰胆碱引起的内向电流,潜伏期为 50s。

综上所述在这一作用机制中,类固醇激素受体也可经磷酸化调节方式发挥作用。所以,当激素激活了细胞膜受体,或影响了膜结构及功能,从而导致细胞内第2信使变化,也可影响基因转录活动。在这种情况下,我们看到的是类固醇受体的非基因组作用方式。类固醇激素经过不同的作用机制指导着细胞内蛋白质的增加或减少,包括离子通道、神经递质受体、神经肽、生长因子、G蛋白、细胞结构蛋白、各种代谢酶等的增加或减少。

(三) 甾体性激素与受体的相互作用

1. 与胞浆受体结合

甾体性激素经过血流运送到靶器官,通过被转运经靶细胞膜弥散到胞浆中,与相应的受体特异结合。

2. 甾体性激素-受体复合物移入核内

甾体性激素-受体复合物移入核以前,必须先经过“活化”,“活化”步骤是温度依赖性的。经活化后的激素-受体复合物进入核内,与细胞核的接受部位结合,然后才产生作用。

激素-受体复合物和DNA的作用是复杂的,不同类固醇激素作用的方式不尽相同,现以孕酮为例说明这个反应。孕酮的胞浆受体有A和B二个亚单位,孕酮和受体结合后,这种复合物进入细胞核后,孕酮-A亚基和孕酮-B亚基可能有不同的生理作用。一般染色体呈DNA-组蛋白-酸性蛋白三联结合,组蛋白对DNA有阻抑作用。一般认为非组蛋白和DNA形成核上的一个特异的接受位,它和孕酮-B亚基结合;但也有人提出接受位仅为非组蛋白;还有人认为接受点可能是DNA,非组蛋白只不过是决定DNA的正确角度,使它易与孕酮-B亚基结合。孕酮-A亚基虽不与染色质上的接受位结合,但却能和DNA发生非特异结合,这些部分对激素-受体亲和力低,但结合量很大,构成染色质结合机制的主要成分。有人提出,这种非特异结合可以扩大染色质上激素-受体复合物的数量,从而增加它与接受位发生特异结合的机会。孕酮在细胞内发挥作用的过程见图5-4。

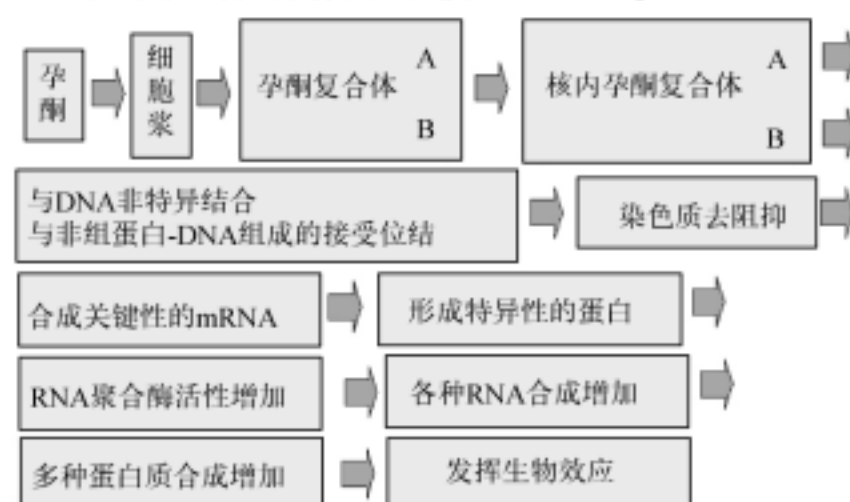


图5-4 孕酮在细胞内发挥作用的过程

(四) 雌激素受体和孕激素受体

1. 子宫 ER 和 PR

(1) 妇女月经周期子宫内膜 ER、PR 的含量:在月经周期不同时期的子宫内膜雌、孕激素受体含量,因受到体内激素水平的影响而有变化。在增生期,雌、孕激素受体均较高,以增生晚期为最高。在分泌期含量均下降,在分泌早期仅胞浆受体明显下降,到分泌晚期胞浆和胞核受体均降到最低(表 5-1)。在增生期,子宫内膜雌、孕激素受体的总量与血浆雌二醇浓度呈正相关。

表 5-1 正常月经周期子宫内膜 ER 和 PR 含量及其在细胞内分布

	ER/ (pmol/mgDNA)				PR/ (pmol/mgDNA)			
	总量	ERc	ERn	ERc/ERn	总量	PRc	PRn	PRc/PRn
增殖早期	1.5	1.1	0.4	2.7	1.4	1.2	0.2	6.0
增殖晚期	1.9	1.0	0.9	1.1	3.5	3.0	0.5	4.8
分泌早期	1.2	0.4	0.8	0.5	1.9	0.9	1.0	0.9
分泌晚期	0.7	0.3	0.4	0.7	0.9	0.7	0.2	3.5

ERc:胞浆雌激素受体; PRc:胞浆孕酮受体; ERn:胞核雌激素受体; PRn:胞核孕酮受体

(2) ER 和 PR 在子宫的分布:子宫不同部位的雌激素含量不尽相同,子宫内膜中的含量高于子宫肌层。在子宫肌层又以子宫底部含量为最高,如作为 100%,则子宫体为 60%~80%,峡部为 40%~60%,子宫颈外口 25%~40%。

(3) 子宫体受体在不同时期中的变化:妇女一生中子宫体内膜受体变化趋势是,增殖期>分泌期>静止期>萎缩期。说明子宫受体水平与体内性激素变化一致。子宫内膜 ER 和 PR 在月经周期中的变化曲线,表明了受体在月经周期的连续变化:ER、PR 受雌激素影响先维持一定水平,此后,随雌激素高峰形成陡峭峰(月经周期第 14~15d),在迅速下降后又伴雌激素水平增高而上升,但上升幅度不如第 1 次大,原因是大量孕激素抑制了 ER、PR 的合成与作用的发挥,故子宫体特别是内膜 ER、PR 在月经周期中的变化,与体内雌、孕激素变化密切相关,呈有规律的周期性变化。更年期 ER 相当于增生晚期,其机制可能为体内雌激素水平下降致游离 ER 增多。但绝经后妇女体内有一种抑制 ER 作用的酶,即使 ER 量增加,子宫内膜仍是萎缩。

子宫体内膜受体不但在不同时期、年龄和月经周期的每天有极大变化,而且在一年中的不同季节也有一定变化:春季最多,夏季急速下降,在秋季降至最低,冬季又开始回升。其变化规律与生殖功能与性功能在不同季节中的变化有相似之处,但在人的确切意义和规律还有待于探讨。

(4) 性激素对子宫受体的调节:

1) 雌激素的调节作用:未成熟的幼小动物或去卵巢动物的子宫中有雌激素受体,因而子宫对雌激素能产生反应。这种受体的存在可能是基因调控,也可能肾上腺皮质分泌的雌激素起一定的作用。表明雌激素可使其受体增加,受体增加有两个

阶段,第1阶段为注射雌激素后4~8h内,可能是进入核中的受体再循环到胞浆中。第2阶段为8~24h,此时雌激素受体可增加1倍以上。雌激素也能使子宫中孕激素受体增加,在离体条件下将雌二醇加到子宫培养液中,经一定时间培养后,子宫孕激素受体含量增加,增加的程度与加入的雌激素量相平行。

2) 孕激素的调节作用:孕酮对雌激素使雌激素受体增加的第1阶段没有影响,但对增加的第2阶段有抑制作用。孕酮抑制雌激素受体再生的作用需一定时间,当受体已进入合成阶段就不再发生影响。孕酮能使子宫孕激素受体减少,该作用与细胞核中雌激素受体减少相平行。此外,孕酮还可以诱导产生一种雌激素受体调节因子(estrogen receptor regulatory factor, ReRF)。ReRF可能是一种磷酸酶或其激活剂。孕酮也可使子宫中孕激素受体减少,这种使孕激素受体减少的作用可能是继发于雌激素受体的下降。

2. 卵巢的性激素受体

卵巢的ER、PR主要分布在卵巢皮质,用免疫组织化学和单克隆抗体等技术,证实颗粒细胞及其发展而成的黄体细胞的ER、PR最丰富。虽然卵巢细胞有ER、PR已被确认,但其含量远远低于子宫,差异较大,而变化幅度小。在月经周期的中后期,受体完全有高于前期的趋势。在孕早期除卵巢膜内层细胞内发现少量的ER、PR外,卵巢各部位(包括黄体细胞)细胞内ER、PR含量和分布与未孕时相同。

在卵巢,ER的作用是促卵泡发育和卵泡腔的形成,使卵泡腔中PR和FSH-R增加,以便FSH-R能发挥使卵泡发育、成熟和促进性激素合成、分泌的作用。雌激素大量合成和分泌,形成雌激素高峰,导致促排卵的LH高峰来临;ER也增加细胞膜上的LH-R含量,提高了卵泡对LH的敏感性,同时ER还增加PG-R的合成量,从激素和受体两方面为排卵做好充分准备。如果ER在卵泡内不足,卵泡的发育、生长、成熟、激素产生和排卵一系列生理活动将会受限。PR可放大某些ER作用,如刺激LH-R的产物合成和促进排卵。但PR的主要作用还在抑制ER作用,使LH-R下降,降低了黄体细胞对LH的敏感性,并逐渐萎缩。AR有对抗ER,加快颗粒细胞、黄体细胞萎缩、死亡的作用。伴随PR含量下降,功能变弱,对ER的抑制解除,雌激素合成和分泌增加,新的卵巢受体周期形成,表现出一个新的月经周期。

3. 输卵管、阴道的性激素受体

多数人认为,输卵管各部分均有胞浆和胞核的ER和PR,其中伞部和壶腹部最高,约为峡部的2倍,间质部ER、PR含量最低。输卵管各层中,黏膜含ER、PR最丰富,无论是纤毛细胞还是非纤毛细胞均含大量ER和PR。肌层有少量的ER、PR分布。总之,输卵管受体水平较低。

分布于输卵管的ER、PR与体内雌、孕激素水平相平行,即有月经周期变化。伞部和壶腹部ER、PR变化规律是:增殖期大于分泌期,排卵期最高,尔后下降,至分泌晚期最低。无论是胞浆和胞核ER、PR均有上述变化趋势,以胞浆ER、PR变化较明显。峡部ER、PR在胞浆的部分可出现明显的周期变化,而胞核部分缺乏这种周期变化。间质部的ER、PR都无月经周期变化。

妊娠期输卵管的ER、PR变化是,胞浆和胞核ER、PR都上升。这一变化的结

果是,使输卵管在妊娠期处于舒张状态。

4. 乳腺的性激素受体

乳腺是多种激素的靶器官,然而激素发挥其生化和生理功能,必须要与其相应受体结合之后才能发挥。采用直接荧光组织化学方法测定正常乳腺组织 ER 和 PR 的分布和含量,发现叶间导管上皮细胞中 60%~70% ER 和 PR 均呈阳性,总导管上皮细胞中只有 20%~30% ER 和 PR 为阳性。此外,分泌状态的腺泡乳腺的 ER 和 PR 并不比静止期增多。

(五) 雄激素受体

雄激素受体(AR)属于核内激素受体超家族,能与雄激素如睾酮及双氢睾酮结合而被活化。然后,雄激素受体结合到靶基因的雄激素反应元件上,充当基因转录的控制器,调控许多与雄性性分化及发育相关的基因。像其他的类固醇激素受体一样,雄激素受体大体也分为四个功能域,即氨基末端转录活化域、DNA 结合域、铰链域及激素结合域(图 5-5)。雄激素受体的 DNA 结合域由 72 个氨基酸组成,它们富含半胱氨酸,能与锌原子形成锌指结构,结合到 DNA 的 HRE 上,指导基因转录,该 DNA 结合域在类固醇激素受体分子中是高度保守的。雄激素受体的 C 端含有雄激素结合域,当睾酮或双氢睾酮与之结合后,将受体构型发生活化的改变,受体结合到靶基因上,调控转录。

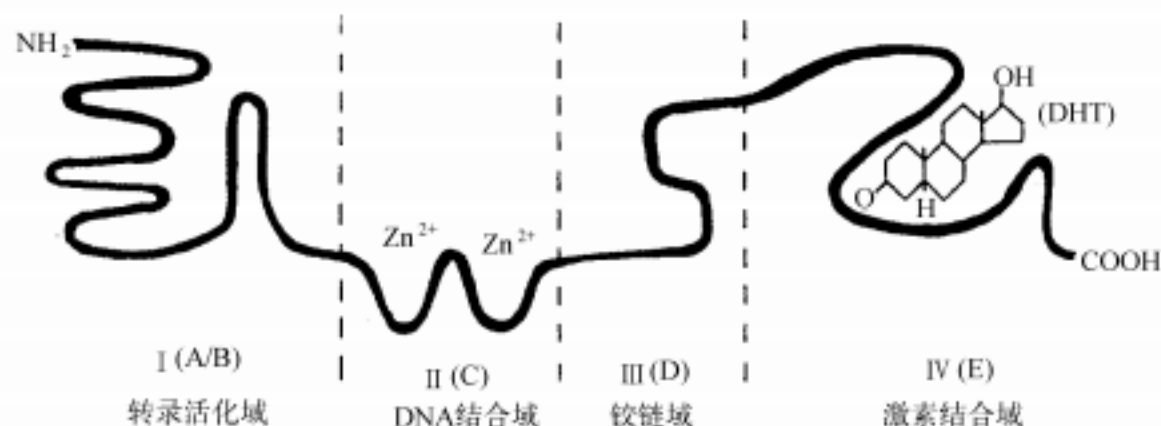


图 5-5 人雄激素受体功能结构域

缺少雄激素时,雄激素受体主要分布在靠近细胞核周围的细胞质中。当补充雄激素后,雄激素受体分布在细胞核中。目前认为,雄激素受体从细胞质进入核内可能是通过一个核信号结合蛋白实现的。在雄激素受体铰链域存在一个核内定位信号,它可能帮助雄激素受体向核内转位,在雄激素受体的其他区域可能还存在另外的核内转位信号。另外,雄激素受体被活化时发生的磷酸化可能使其向核内转移中也有重要作用。

雄激素受体结合雄激素后被活化,它以二聚体形式与靶基因雄激素反应元件 ARE 结合,促进依赖于雄激素、与雄性分化及发育相关基因的转录。ARE 是一个

短的特异性 DNA 序列,即 GGTAnnnTGTTCT,具有增强子性质。此外,雄激素受体还能调节自身的基因转录。除了能与 DNA 上的 ARE 结合外,雄激素-雄激素受体复合体还能结合 RNA,对 mRNA 的加工、转运、利用及其稳定性都有调节作用。雄激素-雄激素受体复合体还能将 RNA 从 DNA 或染色体结构释放出来,允许基因进入下一轮 RNA 的合成。而 RNA 从雄激素-雄激素受体复合体的释放是后者再次与染色质基因结合所必需的。

雄激素受体被活化进入核内后,主要结合到核基质上,核基质可能影响雄激素作用的组织特异性。另外,雄激素-雄激素受体复合体还能促进靶细胞 DNA 的合成及细胞增殖。在睾丸中,支持细胞与类肌细胞中都含有雄激素受体,Leydig 细胞分泌的雄激素能与之结合,影响支持细胞及类肌细胞功能,刺激它们产生一些睾丸内重要的旁分泌因子及肽类物质,调节支持细胞与生精细胞间相互作用,最终维持睾丸正常功能及精子发生。

雄激素受体缺陷系指基因突变所致的雄激素受体缺失、受体减少和受体结构异常。雄激素受体基因突变呈明显的异质性。在雄激素不敏感综合征中,已确定的雄激素受体基因突变型已超过 10 余种,基因突变所造成的雄激素受体类型,可分为受体缺失型、受体结合缺陷型、DNA 结合缺陷型及热不稳定型等。根据临床症状和雄激素受体缺陷程度,可将雄激素不敏感综合征分为雄激素完全性不敏感综合征和部分性不敏感综合征。

1. 完全性不敏感综合征伴有受体联系缺失

(1) 由于受体羧基端雄激素受体基因的缺失,造成了雄激素受体结合区的大段缺失。

(2) 由于外显子 4、6 及 8 的突变,使编码 Trp717、Tyr794、Lys588、Lys882 的密码子,分别变成了终止密码,由此生成的截短受体,又因雄激素联系区大段缺失,故无激素结合能力。

(3) 编码外显子的错位突变,造成单个氨基酸的置换,也可造成雄激素受体结构异常,因而不能和雄激素联系和结合,如外显子 7→Arg^{831→Gln},外显子 6→Arg^{774→Cys},外显子 4→Leu^{676→Pro},外显子 4→ASP^{686→His}。

2. 完全性不敏感综合征伴有受体结合缺陷

在 DNA 结合区中,第 2 锌指结构的外显子的突变,使该部的 Arg^{615→Pro},这种突变的雄激素受体,有一定的结合和亲和能力,但不能激活靶基因,也不能和 DNA 形成一复合结构。编码雄激素结合区外显子 7 突变,使受体的 Val855→Met,这种突变的受体与雄激素的亲和力,只有正常雄激素受体的三分之一。

3. 雄激素不敏感综合征伴有异常的雄激素受体

雄激素不敏感综合征伴有异常的雄激素受体特点是雄激素受体浓度正常,但在某些情况下,表现出结合和亲和力的下降,如外显子 5 的突变,结果使受体的 Tyr761→Gly, Gly→Val。这两种受体在 37℃ 时,特异结合和亲和力正常,但在温度 42℃ 时,特异结合量明显降低,表现出热不稳定型,这已有相应的实验证明。

目前许多雄激素敏感组织包括生殖器官和非生殖器官均已发现有雄激素受体,目前对肌肉中是否存在雄激素受体尚有异议,即使有其与雄激素结合的能力,也远低于性腺和附性腺。

(六) 性激素受体的动力学

性激素对基因的作用主要是诱发新蛋白质的生成,在大多数情况下是各种酶类,从而导致各种生理生化反应。因此,激素与生物效应从受体作用的动力学观点看,取决于激素与受体的亲和力、受体数量以及激素-受体复合物在细胞内停留的时间。

1. 受体的循环与补充

激素与受体结合直到诱导蛋白产生的过程,包括受体的一次利用(循环)。核内激素-受体复合物作用一次之后,受体将从几条途径得到补充:

(1) 部分受体由核内返回胞浆又重新被利用(再循环)。

(2) 新受体分子合成。在循环中有部分受体分子降解,由受体解脱的激素则转化成代谢产物而送出细胞外。

2. 性激素受体的相对特异性

受体的特异性不是绝对的而是相对的。因为机体内性激素的浓度波动较大,特别是为了治疗目的可能远远超过生理水平的剂量,这时受体的特异性将明显降低,激素可与其他激素的受体,甚至“药物”受体发生结合,引起非特异性反应。

3. 性激素受体数量的调节

性激素受体的数量不是固定在一个数值,毫无变化,而是不断受激素本身及其他激素相互作用的调节。同时,受体的数量在不同的生理条件下也有变化。如胚泡进入子宫后,着床前的一段时间里大鼠子宫 E_2 受体含量显著下降,而 P 受体含量达到高峰。这种变化与生理状况相一致,对造成子宫内“静态”环境以利着床很有意义。这表明,细胞受体含量是可调节的。此外,人们发现雌激素可增加子宫孕酮受体含量,给兔注射 $100\mu\text{g}$ 雌二醇 5~10d 可使孕酮受体含量增加 10 倍,这说明孕激素的许多生物学作用只有在雌激素的“允许”作用基础上才能发挥。

给予孕酮可减少细胞浆的孕酮受体的含量,表明孕酮对其本身受体浓度有反馈性调节。激素的生物作用与细胞中受体含量有关。细胞中受体含量受几个因素调节:① 消耗速度;② 合成速度;③ 激素-受体复合物解离后受体的再利用。凡是能影响这三个过程的因素必然会影响激素的生物学作用。

(史小林 高惠宝)

第六章

生殖免疫

免疫作为人体基本功能之一,在抵御自然界各种病原微生物,如病毒、细菌及其有害因子的侵袭中发挥了重要的功能,对于维持机体平衡起了关键作用。同样,作为人体的重要生理功能,免疫在人类生殖功能或生殖活动中亦起着重要作用,其正常或平衡与否直接影响男性(或女性)的生殖功能,从而影响人类的生殖活动。男、女性由于性别的差别,决定了他们的生殖系统结构的差异,以及功能上的差异,同样也表现在男、女性生殖系统免疫(组成和功能上)的差异。这种差异又和人类的生殖功能(或活动)及有关疾病密切相关。

第一节 免疫的基本概念和免疫系统

免疫(immunity)是机体识别和排斥抗原、借以维持机体平衡的一种功能,也是人类基本的生理功能之一。研究证实,在哺乳类和人类体内有一高度发达、完善的能精细调控的免疫系统。人类免疫系统由免疫器官、免疫细胞和免疫分子组成。人类借助于免疫系统,识别自我和“异己”,保护自我,排斥“异己”,行使免疫功能。此处的“异己”,包括所有的病原微生物,如病毒、细菌等,也包括肿瘤细胞等有害因子,这在免疫学上统称为抗原(antigen, Ag)。免疫系统识别和排斥抗原的整个过程,称为免疫应答(immune response)。免疫应答是一柄双刃剑,从本质上应是保护机体,但在某些情况下同样可对机体造成损伤,比如,免疫应答引起的炎症反应以及自身免疫(免疫系统对自身组织成分产生免疫应答)导致的病理状态等。

一、免疫器官

免疫器官是免疫细胞发生、分化和成熟及产生免疫应答的场所。人类的免疫器官根据功能不同,分为中枢免疫器官和外周免疫器官。

(一) 中枢免疫器官

中枢免疫器官又称一级淋巴器官,是淋巴细胞发生、分化和成熟的场所。人类中枢免疫器官包括胸腺和骨髓。

1. 胸腺(thymus)

胸腺是 T 淋巴细胞分化、成熟的场所。

2. 骨髓

骨髓是 B 淋巴细胞分化、成熟的场所。

(二) 外周免疫器官

外周免疫器官又称二级淋巴器官,是成熟的 T、B 淋巴细胞定居及产生免疫应答的场所。外周免疫器官包括淋巴结、脾脏、扁桃体、阑尾、肠道集合淋巴结及黏膜相关淋巴组织(mucosal associated lymphoid tissue, MALT)。在外周免疫器官,T、B 淋巴细胞相对集中、聚集在特定区域,所以把 T 淋巴细胞聚集的部位称为胸腺依赖区(T 淋巴细胞是在胸腺中发育、成熟的),把 B 淋巴细胞聚集的部位称为非胸腺依赖区(B 淋巴细胞是在骨髓中发育、成熟,与胸腺无关)。成熟的 T、B 淋巴细胞在外周免疫器官识别抗原,并介导对抗原的免疫应答。

(三) 黏膜免疫组织

人体是包裹在皮肤和黏膜中的,借此与外界相通。正常成人皮肤表面积约 1.8m^2 ,而黏膜表面积至少为 400m^2 ,远远大于皮肤。人体黏膜免疫组织包括生殖道、消化道、泌尿道、呼吸道等黏膜组织,统称为黏膜相关淋巴组织(MALT)。研究证实,80% 以上的感染和抗原入侵都是通过黏膜组织进入体内的。黏膜免疫系统含有大量的 T、B 淋巴细胞,并产生大量的分泌型 IgA (SIgA),可阻止病原微生物及抗原的入侵,故 SIgA 又有局部抗体之称,在局部免疫中发挥重要作用。黏膜相关淋巴组织内还含有一类特殊细胞-微褶细胞(microfold cell, M 细胞),能捕获抗原,并将抗原转运给免疫细胞,触发黏膜免疫应答(图 6-1)。

男性生殖道(包括女性生殖道)藉黏膜直接和外界相通。因此,黏膜相关淋巴组织的免疫功能直接影响生殖系统的免疫状态,并影响生殖功能。

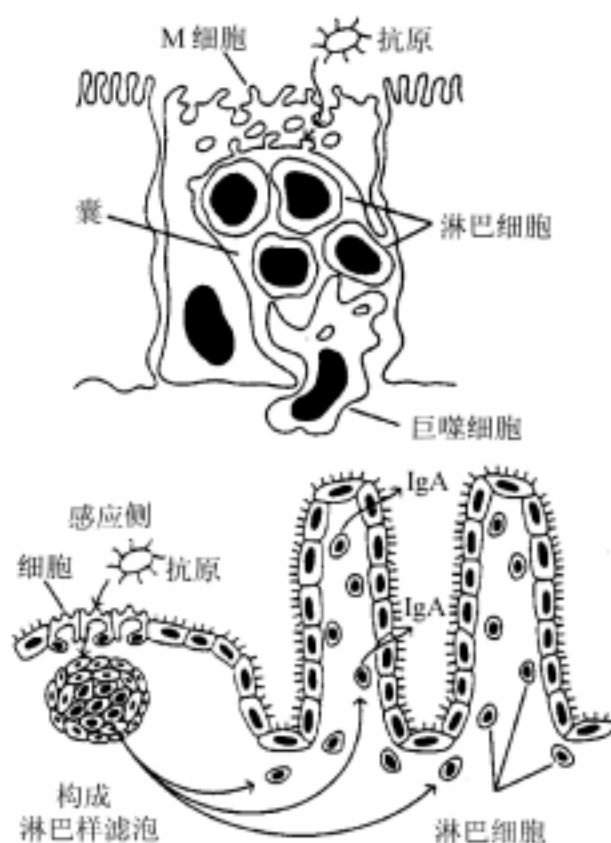


图 6-1 M 细胞和黏膜免疫系统

黏膜直接和外界相通。因此,黏膜相关淋巴组织的免疫功能直接影响生殖系统的免疫

二、免疫细胞

免疫细胞(immunocytes)泛指所有参与免疫应答或与免疫应答有关的细胞,包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、抗原呈递细胞、粒细胞等,其T淋巴细胞、B淋巴细胞表面具有特异性抗原受体,能识别抗原、介导免疫应答,又称免疫活性细胞(Immune competent cell, ICC)。

(一) T 淋巴细胞

T 淋巴细胞(T lymphocyte)简称T细胞,占外周血淋巴细胞总数的65%~70%,其主要功能是介导细胞免疫,也是体内重要的免疫调节细胞。

T细胞在分化、成熟过程中,细胞表面可表达各种膜蛋白,如CD4分子、CD8分子、T细胞抗原受体和CD3分子等。T细胞通过T细胞抗原受体识别抗原,介导免疫应答。

1. T细胞抗原受体

T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)为异二聚体,由 α 链(45~60kDa)、 β 链(45~50kDa)组成,少部分T细胞表达 γ 链和 δ 链。CD3分子由 $\epsilon\gamma$ 、 $\epsilon\delta$ 和 $\zeta\zeta$ (少数为 $\zeta\eta$)六条肽链组成,TCR和CD3分子非共价结合形成TCR-CD3复合体(图6-2)。其中TCR为抗原识别亚单位,能识别、结合抗原;CD3为信号转导亚单位(signal transducing subunits),能将TCR接受的抗原刺激信号通过六条肽链转导至细胞内,促进T细胞的活化。

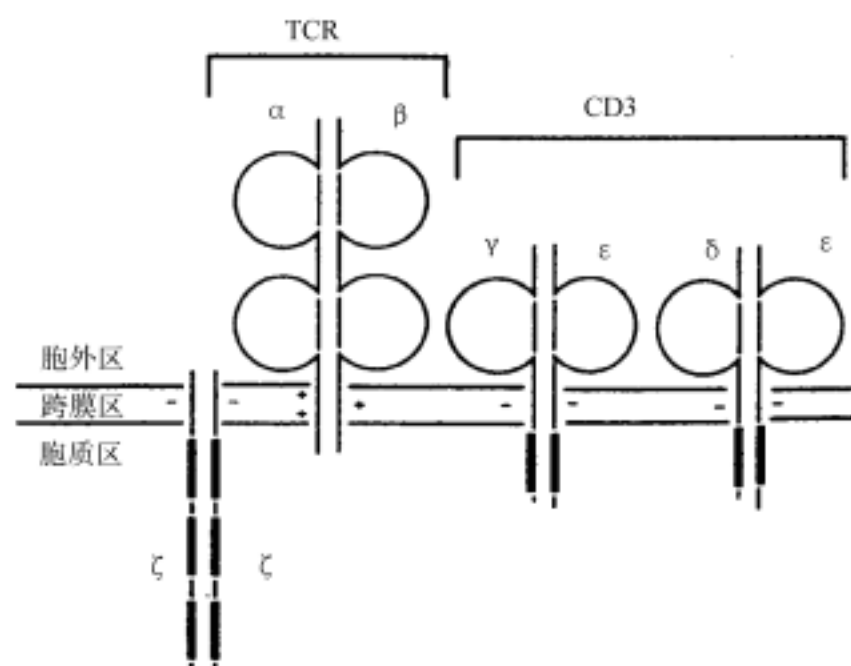


图6-2 TCR-CD3结构

CD分子胞质的长形方框代表免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM),为信号传导所必需

TCR不能直接识别天然的大分子蛋白质抗原,只能识别由抗原呈递细胞加工

并由主要组织相容性抗原呈递的抗原肽(MHC-肽)。近年来发现,T 细胞还能识别由 CD1 分子呈递的脂类抗原(CD1-脂类抗原)。

2. T细胞亚群

T 细胞为异质性群体,不同群体细胞具有不同的表面标志和功能。

(1) $\gamma\delta$ T 细胞和 $\alpha\beta$ T 细胞: $\gamma\delta$ T 细胞的 TCR(TCR1)由 γ 链和 δ 链组成,外周血中仅 5%~10% 的 T 细胞表达 TCR1。 $\gamma\delta$ T 细胞识别由 CD1 分子呈递的非蛋白质(脂类)抗原。对 $\gamma\delta$ T 细胞的功能了解不甚清楚,现认为它主要在黏膜局部免疫中发挥作用。

$\alpha\beta$ T 细胞的 TCR(TCR2)由 α 链和 β 链组成,外周血中 90%~95% 的 T 细胞为 $\alpha\beta$ T 细胞。 $\alpha\beta$ T 细胞只能识别 MHC 呈递的抗原肽。

(2) $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞:外周血中成熟的 T 细胞根据其表面表达 CD4 分子还是 CD8 分子可分为 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞两大亚群。 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞均表达 $\alpha\beta$ TCR(TCR2),其中 $CD4^+$ T 细胞识别由 MHC II 类分子呈递的抗原肽, $CD8^+$ T 细胞识别由 MHC I 类分子呈递的抗原肽。

$CD4^+$ T 细胞在功能上主要属于辅助性 T 细胞(T help cell, T_H 细胞); $CD8^+$ T 细胞在功能上主要属于细胞毒 T 淋巴细胞和抑制性 T 淋巴细胞。

(3) T_H1 细胞和 T_H2 细胞 T_H 细胞根据其分泌细胞因子及功能的不同可进一步分化 T_H1 细胞和 T_H2 细胞。 T_H1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ ,介导细胞免疫; T_H2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10,介导体液免疫。 T_H1 和 T_H2 细胞均由 T_H0 细胞分化而来(图 6-3)。

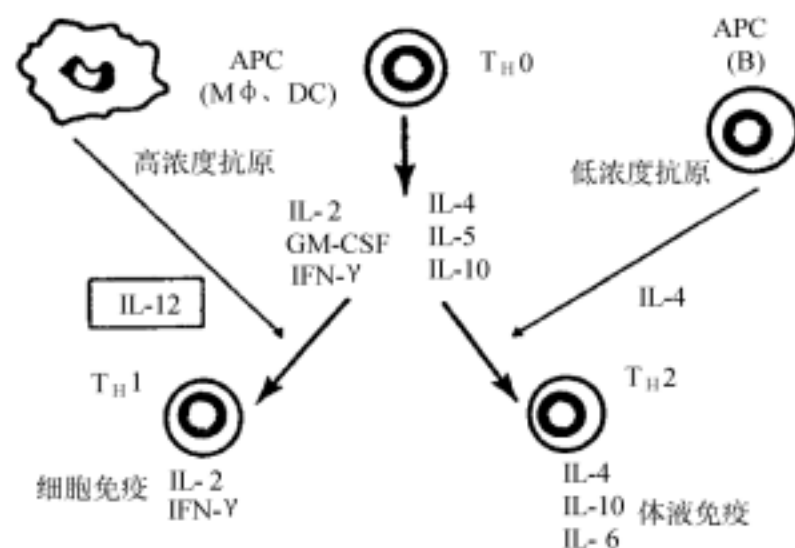


图 6-3 T_H1 、 T_H2 细胞的分化途径及其功能

T_H1 和 T_H2 细胞为一对重要的调节细胞,同时又互为抑制细胞, T_H1 细胞分泌的 IFN- γ 可抑制 T_H2 细胞的分化和功能, T_H2 细胞分泌的 IL-4 可抑制 T_H1 细胞的分化和功能(图 6-3)。因此, T_H1 细胞和 T_H2 细胞的相互平衡与否直接影响机体的免疫功能,且与疾病状态密切相关,亦和人类的生殖密切相关。

(4) 细胞毒 T 淋巴细胞:细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, Tc

或 CTL)为 $CD8^+$ T 细胞,是细胞免疫应答的主要效应细胞,受抗原激活后能特异性杀伤靶细胞,在肿瘤免疫和抗病毒感染的免疫中发挥重要作用。

(5) 抑制性 T 淋巴细胞:抑制性 T 淋巴细胞(suppressor T lymphocyte, Ts)也是 $CD8^+$ T 细胞,对免疫系统具有多方面的抑制作用,为一类负调节细胞。

近年来有学者提出,不存在所谓的 Ts 细胞亚群,但免疫抑制现象在免疫系统和免疫应答中普遍存在。

(二) B 淋巴细胞

B 淋巴细胞(B lymphocyte)简称 B 细胞,占外周血淋巴细胞总数的 20%~25%。B 细胞的主要功能是介导体液免疫,受抗原刺激后,能分泌特异性抗体。B 细胞表达特异性抗原受体,能识别抗原,介导体液免疫应答。

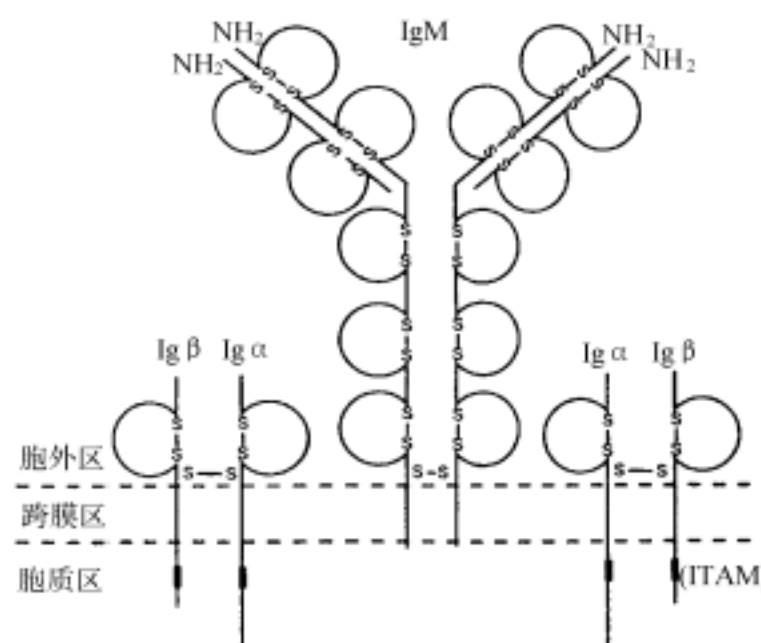


图 6-4 B 细胞抗原受体(BCR-Igα/Igβ)结构示意图

BDR 可以是 IgM 或 IgD。Igα、Igβ 胞质区各有一个免疫受体酪氨酸基序(ITAM),为信号传导所必需

1. B 细胞抗原受体

B 细胞抗原受体(B cell receptor, BCR)本质为膜表面免疫球蛋白(surface membrane immunoglobulin, SmIg),主要包括 SmIgM、SmIgD。BCR 由四条肽链组成,两条相同的重链(H 链)和两条相同的轻链(L 链)组成。BCR 总是与 Igα 链(CD79a)、Igβ 链(CD79b)共同表达在 B 细胞表面,形成 BCR-Igα、Igβ 复合体(图 6-4)。BCR 能特异性识别、结合抗原,Igα、Igβ 则能将 BCR 接受的抗原刺激信号转导致细胞内,促进 B 细胞的活化。

2. B 细胞亚群

B 细胞也是一异质性群体,其功能、表面标志并不完全均一,一般根据 CD5 表达与否,将 B 细胞分为 B1 细胞和 B2 细胞两个亚群。

(1) B1 细胞:为 $CD5^+$ B 细胞,主要识别非蛋白质抗原,如脂多糖。B1 细胞可直接介导对非胸腺依赖抗原的免疫应答。

(2) B2 细胞:为 $CD5^-$ B 细胞,主要识别蛋白质抗原。在 T_H 细胞的辅助下,B2 细胞才能介导对胸腺依赖抗原的免疫应答。

(三) 自然杀伤细胞

自然杀伤细胞(natural killer cell, 简称 NK 细胞)是又一种属于淋巴细胞系(lineage)的细胞群。NK 细胞具有细胞毒效应,无需抗原预先致敏,就能自发杀伤

靶细胞。

NK 细胞来源于骨髓干细胞,在骨髓或胸腺中分化、成熟。NK 细胞占外周血淋巴细胞总数的 5%~10%。NK 细胞的主要功能是参与细胞免疫,在肿瘤免疫、抗病毒感染免疫以及在清除变异细胞中均起重要作用。

人类 NK 细胞表达 CD2、CD16(Fc γ III)、CD56 和 CD69 等表面分子。近年来发现,NK 细胞还表达抑制性受体(killer cell inhibitory receptor, KIR)和激活性受体(killer cell activating receptor, KAR),通过这两类受体调节其杀伤活性。

NK 细胞还能分泌 IFN- γ 等细胞因子,调节免疫应答。

(四) 抗原呈递细胞

抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)是指一类能加工、呈递抗原的细胞。

APC 包括树突细胞(dendritic cell, DC)、巨噬细胞(macrophage, M ϕ)和 B 淋巴细胞。APC 表面组成性表达(constitutive express)高水平的 MHC I 类分子、MHC II 类分子和协同刺激分子,如 B7-1(CD80)、B7-2(CD86)及 CD40。APC 能摄取蛋白质抗原,并将抗原酶解、加工成抗原肽,和细胞内的 MHC I 类、II 类分子形成 MHC-肽复合物,表达在细胞表面,呈递给 T 细胞识别,提供 T 细胞活化的第 1 信号;同时,通过其协同刺激分子提供 T 细胞活化的第 2 信号(协同刺激信号),启动免疫应答。

近来发现,APC 还表达非经典的 MHC I 类分子——CD1 分子,参与脂类抗原的加工、呈递,启动 α δ T 细胞对脂类抗原的免疫应答。

(五) 其他免疫细胞

其他免疫细胞主要包括单核-吞噬细胞、粒细胞、肥大细胞和红细胞、血小板等。

1. 单核-吞噬细胞

单核-吞噬细胞指血液中的单核细胞(monocyte, MC)和组织中的巨噬细胞,表达 Fc γ R 和 CR1(C3b 受体,CD35)等。单核-吞噬细胞具有很强的吞噬能力,能吞噬异物,杀伤和清除细菌、病毒及损伤、衰老的组织细胞,并能杀伤胞内寄生虫和肿瘤细胞。此外,巨噬细胞在抗体介导下可发挥抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC),参与肿瘤免疫和抗病毒免疫;分泌各种细胞因子,参与免疫调节;加工、呈递抗原。

2. 粒细胞

粒细胞(granulocyte)包括中性粒细胞、嗜酸粒细胞和嗜碱粒细胞。中性粒细胞表达 Fc γ R,可吞噬、杀伤病原体等异物;在抗体介导下发挥 ADCC 作用。嗜酸粒细胞,主要参与抗寄生虫感染,并参与 I 型超敏反应。嗜碱粒细胞表达 Fc ϵ R,主要参与 I 型超敏反应。

3. 肥大细胞

肥大细胞(mast cell)主要分布在黏膜或结缔组织中(血液中即嗜碱粒细胞),表面表达 FcR,主要参与 I 型超敏反应。

4. 红细胞和血小板

红细胞和血小板也具有一定的免疫功能。红细胞表达 CR1 和 FcR 等,具有免疫黏附作用,促进吞噬细胞对抗原异物的吞噬,并参与清除循环免疫复合物。此外,红细胞还能分泌细胞因子,参与免疫调节。

血小板表达 FcR,具有免疫黏附作用,参与清除抗原抗体免疫复合物等。

免疫细胞是免疫系统的重要组成部分,直接和抗原作用、相互协同介导免疫应答。T、B 细胞作为免疫活性细胞通过 TCR 和 BCR 识别抗原,介导细胞免疫和体液免疫,是介导特异性免疫的主体细胞。其他免疫细胞在免疫应答中发挥协同作用,辅助 T、B 细胞完成对抗原的识别和免疫应答。

三、免疫分子

免疫分子指由免疫细胞分泌于体液中或表达在细胞表面的各种分子,包括抗体、补体、主要组织相容性抗原、分化抗原和细胞因子等,其主要功能是作为免疫效应分子或参与免疫调节。

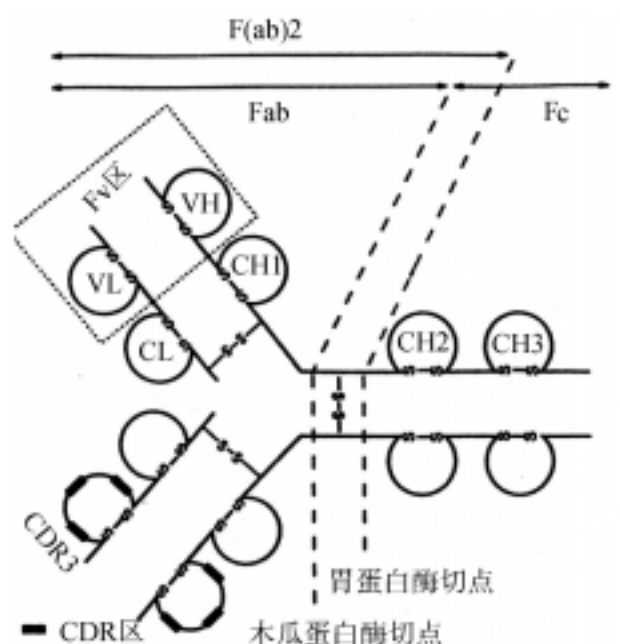


图 6-5 免疫球蛋白(IgG)分子的基本结构及其片段

V_L、C_L 分别代表轻链的 V 区和 C 区;V_H、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3} 分别为重链的 V 区和 C 区的三个结构;F_v 为 V_H+V_L;S-S 为二硫键;……代表酶切位置

(一) 抗 体

抗体(antibody, Ab)是 B 细胞受抗原刺激后分泌的特异性免疫效应分子,本质为球蛋白,故又称免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。抗体分子为四聚体,由两条相同的重链(H 链)和两条相同的轻链(L 链)组成,每条链可分成可变区(V 区)和恒定区(C 区),V 区识别、结合抗原,决定抗体的特异性;C 区介导抗体的其他生物学、免疫学功能。进一步分析表明,L 链和 H 链的 V 区各有三个部位氨基酸的变化特别大,称为超变区,在和抗原结合结构互补,又称互补决定区(CDR),详见图 6-5。CDR 直接决定了抗体的特异性。

抗体经木瓜蛋白酶裂解后,产生 2 个 Fab 段(抗原结合片段)和 1 个 Fc 段(可结合片段),在胃蛋白酶作用下,则产生 1 个大的 F(ab)₂ 段。

抗体分为 IgM、IgG、IgD、IgA、IgE 五大类,是体液免疫的效应分子,其主要生

生物学功能是中和细菌毒素、激活补体、结合细胞、介导 I 型超敏反应、免疫调理、免疫黏附,以及 ADCC 等功能。IgG 和 IgM 是最主要的感染抗体,IgE 主要参与 I 型超敏反应,而 IgM 和 IgD 是 BCR 的主要成分。IgA 可通过黏膜,是黏膜免疫的重要抗体。

(二) 补 体

补体(complement, C)是一组具有酶活性的球蛋白,其基本成分为 C1、C2、C3……C9 等 9 种蛋白质组成,加上旁路因子和调节因子等,一共由 30 余种蛋白质组成。

正常情况下,补体以无活性的酶原形式存在于体内。通过经典或旁路途径活化后,可发挥一系列生物学功能,能溶解细胞、细菌,具有免疫调理和免疫黏附作用,并能中和及溶解病毒、介导炎症反应等。

(三) 主要组织相容性抗原

主要组织相容性抗原由基因——主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)编码,也称为主要组织相容性分子或 MHC 分子。人类的 MHC 称为人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)或 HLA 复合体,其编码的分子即称为 HLA 抗原或 HLA 分子,一般通称为 MHC 分子。MHC 或 HLA 由 I 类、II 类和 III 类基因组成,其编码的分子称为 MHC I 类分子、II 类分子及 III 类分子,与免疫应答密切相关的为 MHC I 类分子和 MHC II 类分子。

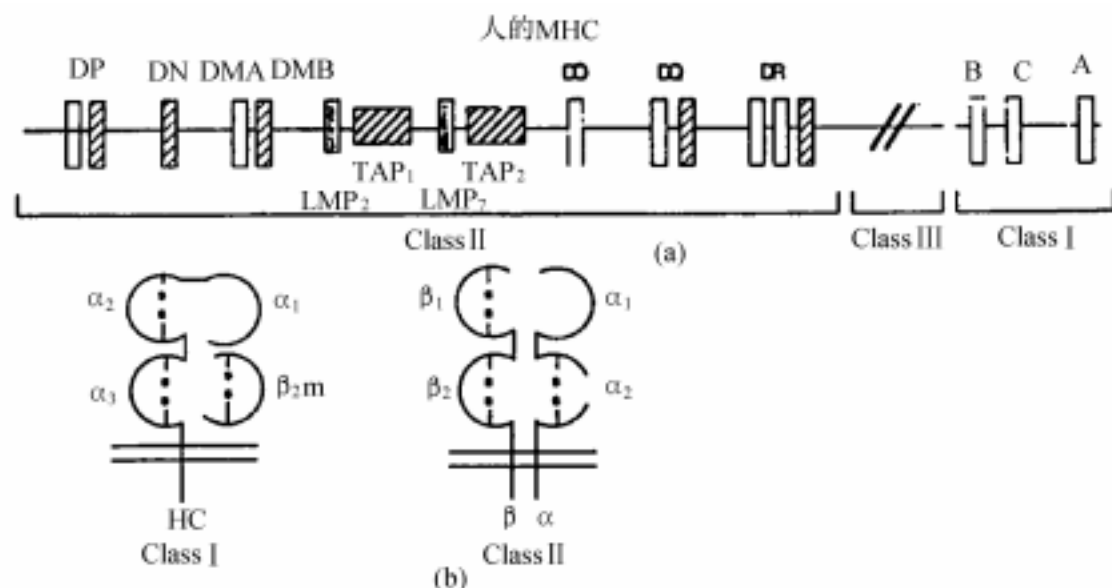


图 6-6 HLA 复合体和 HLA 分子结构

(a)HLA 复合体;(b)HLA 分子

1. 分子结构

MHC I 类分子由 α 链(重链)和 β 链(β 微球蛋白,β_m,即轻链)组成。α 链由 α₁、α₂、α₃ 等三个功能区组成,β 链含 β 功能区。MHC II 类分子也是异二聚体,由 α 链(重链)和 β 链(轻链)组成,各含两个功能,即 α₁、α₂ 和 β₁、β₂ 功能区。无论 MHC I 类

分子还是 MHC II 类分子都可分成四个区:肽结合区、Ig 样区、跨膜区和胞浆区(图 6-6),其中肽结合区是呈递加工过抗原肽的关键区域。

2. 表达

MHC I 类分子表达在有核细胞表面,分布广泛。MHC II 类分子仅表达在抗原呈递细胞(DC、M ϕ 和 B 细胞)及活化的 T 细胞表面。

3. 功能

MHC 分子的主要生物学功能体现在对不同个体的免疫应答的遗传控制上,具体表现为:

(1) 诱导 T 细胞的分化成熟:T 细胞在胸腺中需在 MHC 类分子(I 类分子或 II 类分子)的诱导下才能分化、成熟,最终形成多样性丰富的 T 细胞库(T cell repertoire),赋予个体几乎是无限的识别抗原、应答抗原的能力。

(2) 呈递抗原:T 细胞只能识别 APC 加工的 MHC 分子呈递的抗原肽,其中 MHC I 类分子呈递内源性抗原肽(肿瘤抗原、病毒抗原等)给 CD8⁺ T_H 细胞识别; MHC II 类分子呈递外源性抗原(细菌抗原等)给 CD4⁺ T 细胞识别。MHC 分子通过呈递抗原诱导个体的免疫应答。

(四) 分化抗原

分化抗原是表达在免疫细胞表面各类分子的统称,也称表面抗原或表面分子。分化抗原的表达往往与免疫细胞的谱系、分化、成熟和活化状态及功能有关,在免疫应答中参与抗原识别、细胞的相互作用,细胞的活化、增殖、分化和效应。

分化抗原大多是糖蛋白,往往可作为免疫细胞的表面标志,如 TCR、BCR、MHC 分子、CD3 分子、CD8 分子等。

由于分化抗原种类繁多,目前采用统一的 CD 命名法,将识别细胞表面同一抗原的各种单克隆抗体归为一个分化群(cluster of differentiation),简称 CD,而相应的分化抗原则称为 CD 分子。不同的分化抗原采用不同的序号,如 CD1、CD2……。目前分化抗原分为十三大系列,序号从 CD1 至 CD247。

黏附分子(adhesion molecule)是指一类能介导细胞间相互作用的细胞表面分子,本质为糖蛋白,亦属分化抗原,近年来着重研究其在肿瘤转移、创伤愈合等方面的作用。

(五) 细胞因子

细胞因子(cytokine, CK)是指由免疫细胞分泌的、具有调节功能或效应作用的小分子多肽。一般将由淋巴细胞分泌的称为淋巴因子(lymphokine, LK),由单核细胞分泌的称为单核因子(monokine, MK)。白细胞介素(interleukin, IL),原指由白细胞分泌的因子,现发现除白细胞外,其他细胞亦可分泌,但仍沿用原名。目前发现并正式命名的 IL 有 21 种,从 IL-1 至 IL-21。

重要的细胞因子有 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF、GM-CSF 和 TGF- β 等,上述细胞因子通过细胞因子受体介导,在免疫调节、免疫效应中

发挥重要的作用。

趋化因子(chemokine)是一类对各种白细胞、单核细胞或淋巴细胞具有趋化作用的细胞因子,为分子量 6~ 14kDa 的多肽,可分为 CXC、CC、C 和 CX3C 四个亚群。

趋化因子亦通过其受体——趋化因子受体发挥作用,在免疫调节、免疫细胞增殖、分化等方面发挥重要作用。趋化因子受体 CCR5、CXCR4 为 HIV 感染的协同受体,在 AIDS 的发病中起重要作用。

免疫器官、免疫细胞、免疫分子构成了人体高度发达、完善的免疫系统,人类从而能识别、应答各种抗原,赋予人类在多变的、险恶的环境中的生存优势。这是免疫系统赋予人类最重要的生物学功能。

第二节 男性生殖与免疫

男性生殖系统由睾丸、生殖道、附性腺及外生殖器组成。睾丸是男性生殖系统的主要器官,具有产生精子和分泌男性激素两种功能。生殖道主要包括附睾、输精管和射精管,它们具有促进精子成熟及营养、储存和运输精子的功能。同样,男性生殖道作为机体免疫系统的一部分,亦有一定的免疫功能。

一、睾丸与免疫

睾丸作为重要的男性生殖器,主要功能是参与人类生殖功能,但近年来的研究表明,睾丸与免疫密切相关,睾丸内存在多种免疫细胞,如巨噬细胞和 T 细胞等,同时睾丸局部存在一个复杂的细胞因子网络。现已证实,睾丸中 Sertoli 细胞(支持细胞)在睾丸局部免疫中起着极其重要的作用。

(一) Sertoli 细胞与睾丸局部免疫

1. Sertoli 细胞和血睾屏障

实验证明,在睾丸毛细血管内皮、曲细精管界膜和由支持细胞间的连接复合体形成了一天然屏障,这种复合连接结构称为血睾屏障(blood testis barrier)。血睾屏障的形成、存在,为睾丸——人类男性重要的生殖器官增添了一天然的有效的生理屏障,可阻挡各种病原微生物,如病毒、细菌及其他有害因子进入睾丸,并阻止抗原进入睾丸,防止免疫应答活动的产生,从而有效地保护了人类的基本功能——生殖活动。

2. Sertoli 细胞和细胞因子

Sertoli 细胞具有分泌功能,能分泌雄激素结合蛋白(androgen binding protein, ABP)、抑制素(inhibin)等各类蛋白质因子(表 6-1)。

表 6-1 支持细胞的分泌及其报道

分 泌 物	研 究 者
ABP	Hansson V, 1975
	Ritzen EM, 1981
抑制素 (inhibin)	De Jong FH, 1985
生长因子 (growth factor)	Feig LA, 1983
生长调节素 (somatomedin)	Holmes SD, 1986
	Hall K, 1983
转铁蛋白 (transferrin)	Skinner MK, 1984
血浆铜蓝蛋白 (ceruloplasmin)	Skinner MK, 1983
视黄醇结合蛋白 (retinol binding protein)	Carson DD, 1984
H-Y 抗原	Brunner M, 1984
血纤维蛋白溶酶原激活剂 (plasminogen activator)	Vihko KK, 1984
睾丸白蛋白 (testibumin)	Cheng CY, 1986
FSH-睾酮应答蛋白 (FSH-testosterone responsive protein)	Cheng CY, 1986
睾酮应答蛋白 (testosterone responsive protein)	Cheng CY, 1985

近年来发现, Sertoli 细胞除分泌上述物质和调节、参与睾丸的生殖功能外, 还分泌各种细胞因子, 在睾丸局部形成一细胞因子网络, 调节睾丸的局部免疫功能。

(1) IL-1: 是一重要的细胞因子, 能激活 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞及巨噬细胞等免疫细胞, 介导炎症反应; 同时, IL-1 是重要的内源性致热源, 并有促进伤口愈合等功能。

(2) IL-6: 也是一重要的炎症因子, 能诱导 T 细胞分化、促进 B 细胞产生抗体, 激活 T 细胞、NK 细胞等。

(3) TNF- α : 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor), 具有多种生物学活性, 介导炎症反应, 抗肿瘤作用, 介导肿瘤细胞坏死等; 抗细菌作用, 对各种细菌均有一定的抗菌作用; 促进伤口愈合等。

(4) TGF- β : 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 对各类免疫细胞如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等具有明显的抑制作用, 是免疫系统一负调节因子。

3. Sertoli 细胞和免疫豁免

研究发现, 体内某些重要的关键器官, 如眼睛、大脑、生殖器官 (子宫、卵巢) 等, 正常情况下只有少量的免疫细胞, 在抗原的存在下, 仅产生低水平的免疫活动及较弱的炎症反应, 以保护这些关键组织 (器官) 因免疫活动或炎症反应导致的组织损伤和功能影响。免疫学上将这种特殊的免疫现象称为免疫豁免 (immune privilege), 将上述特定的器官如眼、大脑、睾丸等则称为免疫豁免部位 (immune

privileged site)。大量研究证实,睾丸的免疫豁免是由 Sertoli 细胞维持的。Sertoli 细胞通过表达一种特殊的表面分子——FasL 来维持睾丸局部的免疫豁免。

但要指出的是,免疫豁免现象仅仅是睾丸的生理性保护机制之一,十分重要,但并非绝对。如自身免疫性睾丸炎的发病,可能就是以自身免疫和炎症为主要矛盾,从免疫豁免转向免疫应答。

(二) Leydig 细胞与睾丸局部免疫

在睾丸曲细精管间含有一种间质细胞(interstitial cell),又称 Leydig 细胞,这是一种分泌雄激素的内分泌细胞。近年来发现,Leydig 细胞除调节生殖外,还具有免疫调节作用。Leydig 细胞能分泌 IL-1、IL-6 和 TGF- β ,调节睾丸局部的免疫功能。同时,实验已证实,Leydig 细胞亦可表达 FasL,这很可能和睾丸局部的免疫豁免有关。这样,Leydig 细胞同 Sertoli 细胞一样,在维持睾丸局部的免疫豁免、调节睾丸局部的免疫功能、保护睾丸的生殖功能中均起了重要作用。

二、血附睾屏障和黏膜屏障

附睾分头、体和尾三部分,头部由睾丸输出管组成,体、尾部由附睾管组成。附睾是精子的输送管道和储存场所,也是促进精子成熟的重要器官。此外,附睾上皮细胞间的紧密连接在维持局部适宜的环境起重要作用,能将生殖细胞及精子与机体循环分开,从而形成了所谓的血-附睾屏障。血-附睾屏障同样构成了一天然屏障,可阻止病原微生物(细菌、病毒)或抗原侵袭睾丸,同时可阻止循环中的抗体进入生殖道管腔内,从而避免因免疫应答或炎症反应对局部造成的损伤。

同睾丸一样,附睾亦属黏膜相关淋巴组织(MALT)或黏膜免疫系统。附睾中存在低水平 IgG,含有大量局部抗体——SIgA,能阻止病原微生物、抗原通过黏膜进入睾丸和附睾局部,保护了睾丸、附睾正常的生理功能。

应当指出,血附睾屏障比较薄弱,很多因素如输精管阻塞、附睾感染、各种创伤,均能导致此屏障破坏而引起局部免疫反应。

三、免疫细胞

男性生殖道内存在一定数量的免疫细胞,由于男性生殖道绝大部分由黏膜覆盖,故具有黏膜相关淋巴组织(MALT)或黏膜免疫系统的特征。

1. 微褶细胞

生殖道黏膜存在微褶细胞(M 细胞),微褶细胞腔表面缺乏整齐的刷状缘,很少或几无皱褶,代之以短而少的不规则绒毛为特征。其顶端胞质中有许多线粒体和囊泡,溶酶体很少,有较少的碱性磷酸酶和酯酶,顶端膜的膜内粒子少,缺乏厚的糖衣。M 细胞的核位于基底部,基底面基膜常不连续,胞膜的顶部呈穹隆状突起,穹隆内含有一个或多个或多个淋巴细胞。M 细胞与相邻上皮细胞间有紧密连接,和镶嵌

连接,有时可见较宽的细胞间隙(图 6-1)。M 细胞的主要功能是摄取并转运抗原给穹窿内的淋巴细胞,触发免疫应答。

2. 巨噬细胞

正常人生殖道及睾丸间质内含有大量巨噬细胞,其围绕曲细精管并常与间质细胞群相连,巨噬细胞能吞噬抗原(细菌、病毒或病毒感染细胞)并加工、呈递给 T、B 淋巴细胞,诱发免疫应答,巨噬细胞还可分泌 IL-1 和 TNF- α ,调控间质细胞产生雄激素,参与生殖功能和调节免疫应答。

3. T 淋巴细胞

健康人睾丸网的上皮、固有膜及围绕睾丸网的结缔组织基质中有少量 T 淋巴细胞。其中,CD8⁺ Tc 细胞主要局限于睾丸网上皮内,CD4⁺ Tc 细胞主要存在于围绕睾丸网的结缔组织中。输出小管、附睾、输精管、前列腺和精囊腺内亦可见 T 细胞,其亚类细胞也有类似的分布。T 细胞在生殖道担负免疫调节和介导细胞免疫的功能,同时还可分泌 INF- γ 。INF- γ 可促进巨噬细胞表达 MHC I 类、II 类分子,增强其抗原呈递功能;促进 T 细胞活化,增强局部免疫功能。

4. B 细胞

有报道男性生殖道和睾丸内亦存在 B 细胞,可分泌 SIgA,加强局部的免疫防御功能。

四、免疫球蛋白

生殖道管腔中存在的抗体主要是 IgA,且多以二聚体 SIgA(分泌型 IgA)的形式存在。睾丸液和附睾液内 IgG 的水平相当低。

1. IgA

IgA 占血清总免疫球蛋白(Ig)的 10%~15% 左右,是外分泌液中最主要的抗体,在乳汁、唾液、眼泪及消化道、呼吸道和生殖道的分泌液在黏膜表面大量存在。IgA 以单体(monomer)形式存在,分子量为 160kDa,,但也有二聚体(dimers)、三聚体(trimers)和四聚体(tetramers)。在外分泌液中则主要以二聚体的形式即分泌型 IgA(secretory IgA, SIgA)形式存在(少部分 SIgA 可以四聚体形式存在)。

2. SIgA

SIgA 由两个 IgA 单体:一个 J 链(J chain)和一个所谓的分泌成分(secretory component, SC)或分泌片(secretory piece, SP)组成(图 6-7)。

分泌 SIgA 的浆细胞主要分布于黏膜表面。例如,在小肠,分泌 IgA 的浆细胞数目高达 2.5×10^{10} ,每天人类约分泌 5~15g SIgA 进入黏膜分泌液。

SIgA 在黏膜表面担负重要的效应功能,黏膜是绝大多数病原生物和抗原入侵机体的重要部位,借助于分子的多聚体特性,SIgA 可交联(cross-link)具有多个抗原决定基的大部分抗原。SIgA 与细菌和病毒表面抗原结合后,可阻止其入侵黏膜细胞,从而抑制病毒、细菌的感染。SIgA 和抗原的复合物易被黏膜捕获(entrapped)、

清除。SIgA 成为防御细菌、病毒入侵的一道重要防线,因而被誉为局部抗体(local antibodies)。SIgA 也可进入乳汁,成为新生儿出生第 1 个月内重要的保护神。

当黏膜局部遭受感染或抗原侵袭时,M 细胞就可捕获病原微生物(如细菌、病毒)或抗原并转运至含有 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞的基底面的口袋中(pocket)(图 6-1)。经一系列应答过程,B 细胞被活化,分化成分泌 SIgA 的浆细胞。这种二聚体的抗体被转运至上皮,成为 SIgA 被释放入管腔,在那里抵御各种病原微生物或抗原的入侵。

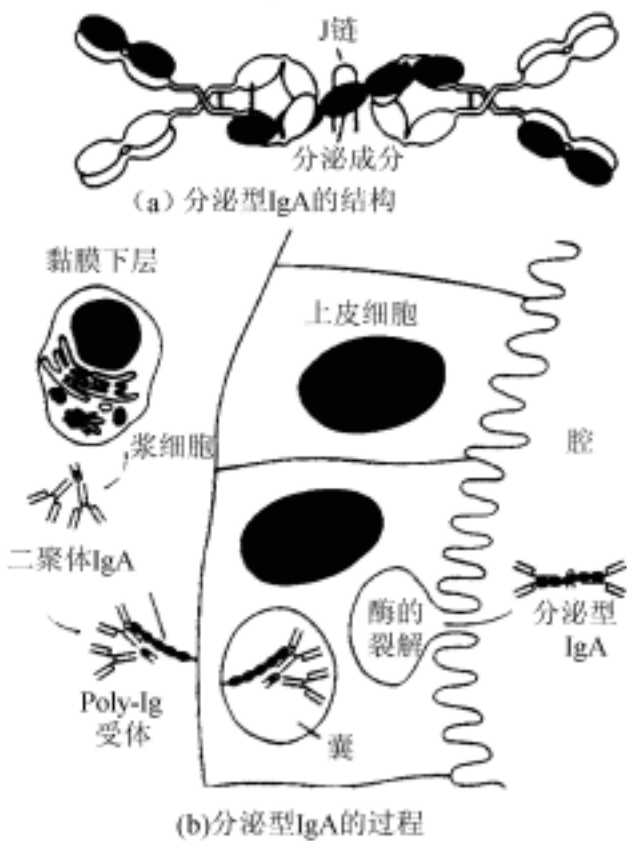


图 6-7 分泌型 IgA (SIgA) 结构和形成

五、细胞因子

男性生殖道特别是睾丸中的 Sertoli 细胞和 Leydig 细胞可产生各类细胞因子,组成了一复杂的细胞因子网络,除参与生殖活动外,亦在局部起免疫调节作用。睾丸内细胞因子来源见表 6-2。

表 6-2 睾丸内细胞因子来源及功能特征

细胞因子	来 源	功能特征
IL-1 α	Sertoli 细胞	刺激生长
IL-1 β	Leydig 细胞	免疫调节
	巨噬细胞	
IL-6	Sertoli 细胞	免疫调节
	Leydig 细胞	
TGF- α	Sertoli 细胞	刺激生长
	Leydig 细胞	
TGF- β	Sertoli 细胞	抑制生长
	Leydig 细胞	免疫调节
TNF- α	精母细胞	参与生殖
	生精细胞	
	早期精子细胞	
	巨噬细胞	
IFN- γ	T 细胞	参与生殖

1. IL-1

IL-1 包括 IL-1 α 和 IL-1 β , 两者在结构上具有一定同源性, 功能基本相似。

睾丸中 IL-1 α 在生殖方面的重要功能是通过作用于 Leydig 细胞(表达 IL-1 α 受体)抑制甾类激素的合成和促进精子发生。IL-1 β 通过作用 Leydig 细胞抑制甾类激素的合成, 而在感染或免疫应答中, 能调节免疫应答, 激活免疫细胞并介导炎症反应。

2. IL-6

睾丸中的 IL-6 主要功能是影响精子发生, 亦可能在生殖道感染时发挥免疫调节作用。

3. 转化生长因子 α (TGF- α)

通过作用于 Sertoli 细胞和 peritubular 细胞, 促进精子发生。

4. TGF- β

通过作用于 Sertoli 细胞和 peritubular 细胞, 促进 Sertoli 合成蛋白多糖, 抑制甾类激素合成。

5. 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

在生殖系统, TNF- α 通过作用于 Sertoli 细胞及 Leydig 细胞发挥调节作用。

(1) TNF- α 对 Sertoli 细胞功能的影响: TNF- α 能与 Sertoli 细胞表面的 TNF- α 受体结合, 抑制 LH 刺激的睾酮(T)的合成, 同时能促进基础睾丸酮的合成, 并抑制 LH 的结合能力; 精母细胞通过分泌 TNF- α , 介导对 Sertoli 细胞功能的调节; TNF- α 是生精过程的旁分泌调节因子。

(2) TNF- α 对 Leydig 细胞功能的影响: TNF- α 抑制 Leydig 细胞中睾酮的生物合成, 并通过作用于下丘脑-垂体-性腺轴, 影响血清 LH 水平, 从而间接影响 Leydig 中睾酮的生物合成。

另外, TNF- α 是睾丸炎等自身免疫性疾病发生的重要细胞因子。

6. γ -干扰素

γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ) 主要由睾丸中的 T 淋巴细胞、巨噬细胞分泌。IFN- γ 可抑制 Leydig 细胞合成睾酮。

1988 年, Hekman 等人首次用 IFN- γ 基因对小鼠生育能力的影响进行了研究, 发现高浓度 IFN- γ 能损害睾丸组织, 诱导抗精子发生, 影响精子生成, 导致雄性不育。另外, IFN- γ 明显抑制精子运动。

在免疫方面, IFN- γ 可激活巨噬细胞、NK 细胞, 促进巨噬细胞吞噬精子, 促进巨噬细胞、B 细胞表达 MHC I、II 类分子, 增强其加工、呈递抗原的能力; 诱导 B 细胞产生抗精子抗体, 导致抗精子的自身免疫应答。

从上叙可以看出, 睾丸中的细胞因子相互作用, 构成了复杂的细胞因子网络, 在介导细胞间的相互作用, 以及在生殖调节中发挥重要作用。

第三节 精浆免疫抑制因子

人的精浆约占射出精液体积的 80%~90%,为睾丸、附睾和附性腺(包括精囊腺、前列腺和尿道球腺)的分泌物及渗出物的混合物,精浆中含有各种与受精有关的成分或因子。精浆中还含有免疫抑制因子,抑制生殖道局部的免疫活动,保护精子不受免疫损害;并抑制女性生殖道对精子的敏感性,保护受精的正常进行。

1984年,英国的 James、Hargreave 及美国的 Alexander 和 Anderson 等发表了有关精浆免疫抑制作用的文献综述,阐明了人精浆的确存在广谱而明显的免疫作用;人精浆中存在具有免疫抑制作用的抑制因子;精浆免疫抑制因子在体内外对各种免疫细胞具有广谱的抑制作用。对人精浆免疫抑制作用的研究,在不育、节育以及性传播疾病等方面具有很大的实际应用价值。

一、精浆的免疫抑制作用

精浆能直接或间接抑制许多免疫细胞的功能,如 T 细胞、NK 细胞与巨噬细胞,亦可抑制细胞因子、抗体和补体的活性。人精浆对免疫细胞的抑制作用,包括抑制免疫细胞的分化、增殖、杀伤活性及吞噬功能等。

(一) 人精浆对免疫细胞的抑制作用

1. 对 T 淋巴细胞的抑制作用

(1) 抑制 T 细胞转化:人精浆能抑制 PHA 诱导的 T 淋巴细胞转化,且与精浆剂量相关。

(2) 对 T 细胞增殖的抑制作用:体外实验发现,精浆能明显抑制 T 细胞的增殖。

(3) 对 T_H 细胞的影响:精浆直肠灌注小鼠,其 T_H 细胞数量下降,提示精浆可直接抑制 T_H 细胞。

(4) 对 T_c 细胞细胞毒活性的抑制作用:人精浆能抑制 T_c 对巨细胞病毒(CMV)感染的靶细胞的杀伤作用。

2. 对 B 淋巴细胞的抑制作用

实验发现,正常人精浆对小鼠 B 细胞产生特异性抗体(溶血空斑试验)有明显抑制作用;与此同时,小鼠血清中特异性抗体的凝集效价亦明显下降。这表明,人精浆对 B 细胞的功能有明显抑制作用。

此外,人精浆对 B 细胞受到抗原刺激后分化为浆细胞并产生抗体的过程,亦具有抑制作用。

3. 对 NK 细胞的抑制作用

细胞毒杀伤试验证实,人精浆在体外可抑制 NK 细胞对靶细胞(^{51}Cr -K562)的杀伤能力;精浆灌注 Balb/C 小鼠直肠,亦可抑制小鼠的 NK 细胞活性。

4. 对巨噬细胞的抑制作用

体外实验发现,人精浆能抑制小鼠巨噬细胞的吞噬百分率及吞噬指数,且与精浆浓度相关;无论是体外还是体内,人精浆均能抑制小鼠巨噬细胞的 EA-花环形成率和 YC-花环形成率,表明人精浆可抑制巨噬细胞表面的 Fc 受体(与巨噬细胞免疫调理和吞噬功能有关)和 C3b 受体(与巨噬细胞的免疫黏附及吞噬功能有关)的功能,且经人精浆作用后,巨噬细胞表面的伪足大大减少,提示精浆能明显抑制巨噬细胞的吞噬功能。

(二) 对补体系统的抑制作用

体外实验证实,人精浆能抑制人血清总补体活性,亦能抑制人血清中补体的溶血活性,且呈明显剂量关系。此外,人精浆可抑制补体旁路途径的激活及 B 因子的裂解。

(三) 对细胞因子的抑制作用

1. 对 IL-2 的影响

IL-2 为一重要细胞因子,主要由 T 细胞产生,是 T 细胞活化、生长必需的细胞因子,在活化 T 细胞、促进 T 细胞功能方面起关键作用。

体外实验发现,人精浆能明显抑制 IL-2 的分泌,即抑制人 T 细胞产生 IL-2。

2. 对 IFN- γ 的抑制作用

人精浆能明显抑制小鼠 T 细胞分泌 IFN- γ 的能力,且明显抑制 IFN- γ 的活性,间接抑制了 IFN- γ 的免疫调节及诱导免疫应答的能力。

3. 对 TNF- α 的抑制作用

人精浆能明显抑制 TNF- α 介导的细胞毒活性。

(四) 对 MHC I 类分子表达的抑制作用

人精浆能抑制 MHC I 类分子在巨噬细胞的表达,即人精浆能间接抑制巨噬细胞抗原呈递功能,从而抑制了免疫应答的启动。

如前所述,人精浆亦能抑制小鼠 T 细胞分泌 IFN- γ 及 IFN- γ 的活性,而 IFN- γ 是诱导 MHC 分子表达的促进因子,精浆抑制 MHC I 类分子的表达很可能与 IFN- γ 的抑制有关。

二、精浆免疫抑制因子特性

精浆中的免疫抑制因子种类繁多,主要来自前列腺、精囊腺等附属性腺。现认为精浆中的免疫抑制物质包括锌复合物、多肽、某些蛋白质和一些蛋白酶和蛋白酶抑制剂等。

1. 锌复合物

高浓度锌和肽、蛋白质的结合物,可以抑制丝裂原诱导的淋巴细胞转化,巨噬

细胞黏附、移动和吞噬活性、多型核白细胞活动等。

2. 多胺(精胺、精脒)

Byrd(1977)等发现,低浓度的精胺或精脒以及它们的反应物,能抑制由 PHA、ConA、PWM 等多种丝裂原诱导的淋巴细胞转化及淋巴细胞增殖,并可抑制致敏 Tc 对靶细胞的杀伤活性。

3. 妊娠相关蛋白 A

精浆中存在一种在生物化学、免疫学及免疫抑制特性上和妊娠相关蛋白 A 类似的蛋白质,其分子量为 720kDa,该物质能明显抑制丝裂原诱导的淋巴细胞转化。

4. 转谷氨酰胺酶和子宫球蛋白

转谷氨酰胺酶和子宫球蛋白均来自前列腺。动物模型证实,两者参与了对精子抗原的抑制作用,且高浓度转谷氨酰胺酶与机体免疫缺陷有关。

5. 94 kDa 的 Fc 受体结合蛋白

精浆中含有分子量为 94kDa 的 Fc 受体结合蛋白,可能来自前列腺。该蛋白能影响抗体介导的杀伤作用和巨噬细胞的吞噬活性。94kDa 的 Fc 受体结合蛋白能特异结合到抗体的 Fc 段而抑制抗体的活性。另外,94kDa 的 Fc 受体结合蛋白可抑制抗体与精子结合,因而很可能是调节女性生殖道免疫应答、保护精子免遭破坏的保护性因子。

6. 传递蛋白

传递蛋白可抑制补体活性,当精子离开附睾尾部时,传递蛋白能黏附到精子表面,降低或遮盖精子的抗原性。

7. PGE₂

精浆中含有高浓度的前列腺素(prostaglandin, PG)。PGE₂ 为一免疫抑制剂。精浆中含大量 PGE₂,能抑制丝裂原诱导的淋巴细胞转化,并对细胞免疫和体液免疫均有抑制作用。

8. 前列腺小体

前列腺小体(prostasome)为细胞器大小的颗粒,直径 200nm,来源于前列腺。前列腺小体能抑制巨噬细胞的摄取、吞噬功能。

9. 酸性磷酸酶

酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP),在人精浆中活性极高,长期以来人们对如此高活性的 ACP 存在于精浆中的生理意义一直不解。1989 年, Mukhopadhyay 报道,人精浆 ACP 可抑制中性粒细胞及 NK 细胞活性,引起了人们的注意。随后研究证实,精浆 ACP 可抑制巨噬细胞、NK 细胞活性,抑制淋巴细胞转化,抑制补体活性,抑制 MHC II 类分子的表达;抑制巨噬细胞分泌 TNF- α ;抑制 T 细胞产生 IL-2、IFN- γ ;抑制 B 细胞产生特异性抗体等。精浆 ACP 具有强烈而广泛的免疫抑制效应,很可能是精浆免疫抑制因子的主要成分之一。

综上所述,精浆中存在多种具有免疫抑制作用的因子,其分子量大小不一,理化性质各异,成分复杂,具有广谱的免疫抑制作用。有些因子对某些免疫成分、细胞功能具有抑制作用;有些则不然,彼此之间可能具有协同作用。但正如多数研究者

所认为的那样,人类精浆的免疫抑制作用不能简单的认为仅仅是由某一特定物质/因子引起的,而是一种现象,它是由多种物质所产生的,并有待进一步研究、证实。

三、精浆免疫抑制因子的作用机制

精浆中的免疫抑制因子的抑制作用是多方面的,其机制也极其复杂,至今未能阐明。其可能机制如下:

1. 遮蔽精子表面的抗原

精浆免疫抑制因子通过结合或黏附在精子表面,遮蔽精子表面的抗原决定簇,以降低或影响精子抗原性,抑制生殖道局部对精子的免疫应答,保护受精卵免受母体排斥。

2. 改变精子抗原性

精浆成分及精浆免疫抑制因子可改变精子的抗原性,如可能通过某些蛋白酶的作用,或直接作用于精子,引起精子表面抗原发生构象变化,从而改变精子的抗原性,影响了免疫活性细胞对精子(表面抗原)的识别。如精浆中的谷酰胺转移酶可与精子表面 β 微球蛋白(β_m)或 β_m 类似物相互作用,谷酰胺转移酶可催化精浆内的多胺,如精胺或其衍生物间的交联。

3. 直接抑制免疫系统

精浆免疫抑制因子可直接抑制免疫细胞、免疫分子(如抗体和补体)的生物功能,抑制其对自身抗原或同种异体抗原的识别和处理能力。影响上述细胞的分化、增殖。

(1) 抑制巨噬细胞对抗原的加工、呈递:精浆免疫抑制因子可抑制巨噬细胞的吞噬活性,从而抑制巨噬细胞对抗原的加工、呈递能力,无法有效启动免疫系统对抗原的免疫应答。同时,精浆免疫抑制因子亦抑制了巨噬细胞对抗原的吞噬、清除。

(2) 抑制抗原呈递分子——MHC 分子的表达:实验证实,精浆免疫抑制因子可抑制巨噬细胞表达 MHC I 类分子,从而抑制了其加工、呈递能力。

(3) 干扰 T 淋巴细胞对抗原的识别:精浆免疫抑制因子可以遮蔽 T 细胞抗原受体(TCR)或丝裂原受体,影响 T 细胞对抗原的识别、活化;抑制 T 细胞对丝裂原的增殖反应。

(4) 抑制免疫细胞的杀伤活性:精浆免疫抑制因子可抑制 Tc 和 NK 细胞的杀伤活性,可能和其干扰 Tc 对抗原的识别、影响 NK 细胞的活性有关。

(5) 抑制抗体的产生及抗体的活性:实验发现,精浆免疫抑制因子可抑制 B 细胞产生抗体,干扰 B 细胞对抗原的识别,进而抑制了抗体的产生。同时,精浆免疫抑制因子可黏附或结合到抗体分子表面与抗体的 Fc 段结合,改变或影响抗体构象,抑制抗体的生物活性。

(6) 抑制补体的活性:精浆免疫抑制因子可抑制补体的活性——溶解靶细胞的能力,并发现精浆免疫抑制因子可降解补体成分,如 C1 和 C3。

(7) 抑制细胞因子的产生:实验证实,精浆免疫抑制因子可抑制细胞因子的产

生,如 IL-1、IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 等。同时精浆免疫抑制因子可抑制细胞因子受体的表达,进一步抑制了细胞因子活性的发挥。

四、精浆免疫抑制因子的生理和病理

精浆在人类的生殖活动中有重要的生理意义,主要是参与受精过程。例如,精浆作为一种运送精子的介质;精浆中的一些重要成分如酶、果糖、脂类、蛋白质、有机物及无机离子等有助于精子穿越宫颈黏液,参与精子获能;为精子运动提供营养物质,参与精液的凝固、液化等。但近年来的研究提示,人们对精浆在生殖运动中的重要性的了解远远不够,精浆的重要功能很可能是人类生殖活动的基础。

(一) 精浆免疫抑制因子的生理意义

精子作为一种自身抗原(隐蔽抗原),正常情况下与自身免疫系统处于隔绝状态,置于多重免疫和生理因素的保护下,其中精浆免疫抑制因子(包括精浆本身)起了重要作用。精浆免疫抑制因子通过结合或黏附到精子表面,削弱遮蔽或修饰精子的抗原性,阻止免疫系统对精子产生免疫应答。从而防止精子在男性生殖道遭到免疫识别、攻击;同时,由于精浆免疫抑制因子的作用,抑制了生殖道局部的免疫系统;免疫细胞、抗体、补体和细胞因子的活性,进一步保护了精子在男性生殖道的存活,完成生殖功能。

与此同时,在男女结合过程中,伴随着受精,精浆免疫抑制因子大量进入女性生殖道,通过起生理性的抑制作用,进一步保护精子在女性生殖道内的正常存活、运行、受精以及受精卵和胚胎在体内的正常发育。

同样,若男性精浆中缺乏免疫抑制因子或量和活性的异常(降低),致使男性生殖道局部的免疫功能异常——病理性亢进(相对正常情况下的生理性的低应答状态而言),导致免疫系统对精子产生免疫应答,生成抗精子抗体以致有可能引起免疫不育;同样,女性亦可对精子(对女性而言,精子是一同种异体抗原)产生过敏反应,也会产生抗精子抗体。临床上某些原因不明的不育患者,其精浆中免疫抑制因子的质或量的缺陷,可能是导致某些免疫不育的真正原因。

另一方面,如人为降低或干扰精浆免疫抑制因子的生理性保护作用,有可能找到一条新的避孕途径。

如上所述,精浆免疫抑制因子在人类生殖活动中起到了重要的生理性的保护作用,保证了人类生殖活动的正常进行。

(二) 精浆免疫抑制作用的病理意义

由于精浆免疫抑制因子对生殖道局部的免疫系统(免疫细胞、抗体、补体和细胞因子等)具有广谱而明显的抑制作用,因而在发挥生理性的保护作用的同时,也抑制了男性生殖道局部的免疫功能,使之抗病能力有所下降,易于遭受生殖道病原微生物如淋球菌、梅毒螺旋体的侵袭,可促进性病的传播;同样,一些与性传播疾病

有关的病毒,如 HIV、疱疹病毒及巨细胞病毒均能长期存在于男性生殖道内,成为潜在的危險。近年来,引起人们尤为注意的是精浆中的免疫抑制因子可能与 AIDS 的发病有关。研究发现,HIV 可以存在于人附睾的 CD4⁺ T_H 细胞中而逃避免疫攻击,存在于精液或血液中的 HIV 感染人体以后是否致病,还受精浆免疫抑制因子的影响。AIDS 的易感性与机体免疫状况密切相关,当机体免疫功能正常时,可抑制 HIV 的增殖与复制;反之,机体易遭受 HIV 的侵袭。精浆免疫抑制因子所导致的免疫抑制状态有利于 HIV 的感染、激发潜伏的 HIV 的侵袭。在动物实验中模拟同性恋方式,在小鼠直肠灌注精浆免疫抑制因子,可明显抑制 NK 细胞和 T_c 的杀伤活性。

正常情况下精浆成分(包括精浆免疫抑制因子)不易于透过女性泌尿生殖道的管壁而被吸收。但是如果女性泌尿生殖道以外的部分与精浆过多接触可引起全身性的反应,特别是该处已有外伤,精浆(包括免疫抑制因子)就很容易进入血循环。同性恋者由于肛交而损伤直肠黏膜,HIV 与精浆免疫抑制因子同时经受损的直肠黏膜进入机体,可加速 AIDS 的发病和发展。一项令人信服的数据表明,同性恋男子 AIDS 的发病率高达 71%,而异性性交妇女为 1%。当然,有关精浆免疫抑制因子与 HIV 感染和 AIDS 的发病的相关性,还有待临床和动物实验进一步研究证实。

精浆免疫抑制因子亦和生殖道肿瘤的发生有关。由于女性生殖道多次接触精浆(包括精浆免疫抑制因子),导致局部免疫功能受抑,抗肿瘤能力下降,故易患子宫颈癌,而男性则易患前列腺癌。

第四节 男性不育与免疫

男性不育是当前医学研究的一个热点,导致男性不育的因素很多,其中免疫与男性不育密切相关。大量研究证实,在男性不育患者中,有相当一部分病人是和免疫相关,即由免疫导致的免疫不育。在免疫不育中,起主要作用的是精子抗原和抗精子抗体。

一、人精子抗原

精子作为一大分子的同种异体抗原,结构复杂,种类繁多,至少有 100 多种。精子抗原可分为表面抗原、核抗原、胞浆抗原等;精子特异性抗原、精子非特异性抗原;生育相关的精子抗原及生育非相关的精子抗原等。但至今未发现与不育有关的特异性精子抗原,由于精子抗原结构复杂性,功能上的不确定性,加之缺乏有效的分离、纯化手段,精子抗原的研究进展缓慢。现将有关精子抗原作一简述。

1. FA-1

FA-1(fertilization antigen-1)是一种精子膜抗原,主要位于顶体后区及精子中部与尾部。FA-1 单体分子量为 23kDa,存在种间交叉反应。用 FA-1 免疫,血清中可出现抗 FA-1 抗体,明显抑制生育力。抗 FA-1 单抗或多抗可抑制鼠体外受精的

精子的穿卵能力,并可抑制哺乳类动物受精,但不引起精子凝集及制动。动物实验证实,FA-1可诱导体液免疫和细胞免疫,由此损伤精子及胚胎。另外发现,抗FA-1抗体可抑制人精子与去透明带的卵的融合,并可抑制人精子的顶体反应及精子获能。研究发现,抗精子抗体阳性的不育妇女宫颈黏液及血清中存在IgG及IgA类抗FA-1抗体,阳性率达50%~80%。

2. FA-2

FA-2(fertilization antigen-2)为精子膜抗原,位于精子顶体区域,也可同时出现在赤道区。FA-2分子量为95kDa,哺乳类动物间有广泛交叉反应。抗FA-2抗体可抑制人精子穿卵,亦可明显抑制精子获能及顶体反应。FA-2的确切作用有待进一步研究证实。

3. LDH-C4

LDH-C4为乳酸脱氢酶同工酶,分子量140kDa,由4个亚单位组成,种间有交叉反应,LDH-C4主要位于精子胞浆、线粒体、尾中段及成熟精子的胞浆膜上,参与生物氧化供能。抗LDH-C4抗体能与精子结合,引起精子凝集。抗LDH-C4抗体影响生育的机制可能与其使受精失败及植入前胚胎质量较差有关。但亦有学者认为,LDH-C4作为胞浆内抗原,在免疫不育中作用不大。

4. SP-10

SP-10(sperm protein-10)位于成熟精子顶体内,分布于顶体外膜内面及顶体内膜外面。人SP-10分子量为18~34kDa,主要多肽抗原分子量为29kDa,个体间无差异。人SP-10与其他灵长类(狒狒、猕猴)及猪精子的SP-10有交叉反应,人SP-10具有多态性。抗SP-10单抗可抑制精子穿卵,目前尚不清楚SP-10在免疫不育中的作用。

5. PH-20

PH-20位于精子胞浆膜上,顶体反应后出现于顶体内膜上。豚鼠PH-20的分子量为64kDa,人与豚鼠间有交叉反应。PH-20参与精卵结合。在体外,抗PH-20抗体可抑制豚鼠精子与透明带结合。用PH-20免疫动物或用抗PH-20血清注射均可导致不育。但免疫不育病人血清中似乎不存在抗PH-20抗体。

6. RAS

RAS(rabbit sperm membrane auto antigens)位于成熟精子顶体后部,为一非酶性的凝集素样蛋白。RAS分子量为14~18kDa,易形成聚合物,存在有限的种族间交叉反应。RAS通过与透明带的糖基结合,起到凝集素样作用,促进精子与卵子结合。抗RAS单抗或多抗在体内外均可抑制受精,并抑制人精子穿卵能力。目前,尚不清楚免疫不育患者血清中是否存在抗RAS抗体。

7. MSA-63

MSA-63(mouse sperm antigen-63)位于获能精子的顶体,顶体反应后脱落。MSA-63分子量为200~300kDa,根据其pI不同可分为五组。不同种间的MSA-63存在广泛交叉反应,MSA-63具有多态性。抗MSA-63单抗或抗血清可抑制鼠的体外受精及人的精子穿透去透明带的仓鼠卵试验。免疫不育患者血清中尚未发现抗

MSA-63 抗体。

8. CS-1

CS-1(cleavage signal-1)位于精子膜上,分子量约为 14~ 18kDa,种间有广泛交叉反应,推测认为 CS-1 由精子带入卵子,作为卵裂的初始信号,或作为激活精子所必需的离子通道,促进初始卵裂。免疫不育患者血清中存在抗 CS-1 抗体。

9. STX-10

STX-10(sperm/trophoblast cross-reacting antigen)位于人精子顶体内,天然状态下以聚合物形式存在,亚单位为分子量 75kDa 的糖蛋白。抗 STX-10 单抗可明显抑制人精子的穿卵能力。STX-10 可能在受精及胚胎发育中起重要作用。

10. PH-30

PH-30 为精子膜抗原,本质为糖蛋白,位于成熟精子头的后部,分子量约为 75kDa。抗 PH-30 多抗并不抑制精卵结合,但能显著抑制两者膜的融合。

11. CPK

CPK(creatine phosphokinase)位于精子内,分子量 80kDa,参与精子成熟,不育男性精子 CPK 活性明显高于生育男性。

12. MPP

MPP(membrane phosphotyrosin protein)分子量约为 94kDa。其单抗能显著抑制人精子接触和穿透去透明带仓鼠卵。

13. GA-1

GA-1(germ cell antigen-1)系精子膜蛋白,哺乳动物间有交叉反应,抗 GA-1 抗体不抑制精卵互相作用、顶体反应及精子运动,但能影响受精后的胚胎发育。

14. M-29

M-29(mouse-29 antigen)位于精子赤道部,亚单位分子量为 60kDa,抗 M-29 单抗在体内外均可抑制受精,其作用部位可能在卵浆膜,与精卵融合有关。

15. C-my protein

位于顶体区,分子量为 62~ 64kDa,其单抗能抑制人精子穿卵能力和鼠的体外受精,抑制精子运动。

另外,还有甘露糖-配基受体(mannose-ligand receptor)等精子抗原。上述精子抗原,它们在生殖活动中各担负相应功能,且与不育、不孕或多或少关联。因此,寻找抗生育作用确切的特异性精子抗原,成为这领域的重要课题。精子抗原的研究,将对受精机制的阐明,对避孕和不育的研究起着关键的决定性的作用,有待进一步研究、探索。

二、抗精子抗体

正常生理情况下,精子对男性自身而言,为一隐蔽抗原,与免疫系统处于隔绝状态,加上在各种生理性保护机制作用下,免疫系统不会对自身精子产生免疫应答。但在某些病理情况,破坏了上述平衡与保护机制,男性可对自身精子产生自身

抗体——抗精子抗体。

对女性而言,精子则为一种同种异体抗原。男女结合过程中,女性多次反复接受精子的刺激,同样在生理性保护机制作用下,女性免疫系统亦不会对同种异体抗原——精子发生免疫应答。但在某些病理情况下,女性亦可产生抗精子抗体。

(一) 男性抗精子抗体的产生

1. 生理屏障的破坏

正常情况下,精子位于生殖管腔中,在生殖道黏膜、血睾屏障等保护下,精子无法穿过生殖道黏膜、管腔壁进入血液。当由化学、物理或感染造成上述生理屏障的损伤、破坏,均可导致精子这一隐蔽的自身抗原突破生理屏障,进入血液,触发抗自身的免疫应答,产生抗精子抗体。临床上常见的病因有:输精管结扎术、输精管吻合术、输精管和生殖道损伤、睾丸损伤、隐睾症、生殖道感染及精索静脉曲张等,上述原因皆会造成精子(抗原)进入血液,引发免疫应答。临床统计发现,隐睾症病人中的66%为抗精子抗体阳性,精索损伤者37.5%~58%抗精子抗体阳性,输精管结扎后抗精子抗体的阳性率更高达50%~58%。

2. 感染导致的抗精子抗体的产生

感染所引起的不育越来越受到人们的重视,其中有相当一部分感染所致的不育患者可出现抗精子抗体。研究发现,某些细菌表面和人精子存在共同抗原,由此产生交叉反应,导致抗精子抗体的产生。研究发现,溶脲脲原体(男性生殖道常见感染菌)、铜绿假单胞菌、大肠杆菌和肺炎球菌与人精子有交叉抗原,是上述细菌感染产生抗精子抗体的一个重要原因。

3. 精浆免疫抑制因子的异常

精浆免疫抑制因子具有封闭精子抗原及抑制生殖道局部免疫反应的作用,起到对精子及生殖活动的生理性保护作用。而精浆免疫抑制因子质或量的改变或异常,均可破坏这种平衡。上海第二医科大学上海市免疫研究所生殖免疫室在以往的工作中发现,免疫不育患者(抗精子抗体阳性)精浆免疫抑制因子的含量明显低于正常人。

4. 生殖道局部免疫功能的异常

正常情况下,生殖道局部特别是睾丸处于免疫豁免状态,仅维持低水平的免疫活动,这对保证正常的生殖活动是一种极其重要的保护机制。在某些病理情况下,如感染,上述免疫豁免机制遭到破坏,大量免疫细胞入侵,免疫功能病理性亢进,诱发对精子的自身应答,导致抗精子抗体的产生。已有学者研究证实,生殖道局部感染时,T淋巴细胞数目明显增加,且巨噬细胞吞噬活性大大增强,加强对精子抗原的吞噬、加工、呈递,诱发抗精子抗体的产生。

5. 异常的性活动

同性恋者因肛交往往引起直肠黏膜机械性损伤,促使精子进入血液,诱发抗精子的免疫应答。同时,精浆免疫抑制因子随精子进入血液,抑制同性恋性伙伴的免疫功能,进一步诱发抗精子抗体的产生。

(二) 女性抗精子抗体的产生

在女性,对于阴道黏膜完整者,一般不产生抗精子抗体。阴道黏膜损伤与抗精子抗体的形成有关。阴道黏膜上皮损伤,精子可通过损伤处进入女性体内,诱发抗精子的免疫应答。同样,精浆免疫抑制因子亦随精子经阴道破损处进入女性体内,抑制免疫功能,加剧抗精子抗体的产生。临床研究发现,性生活粗暴者往往易损伤女性阴道黏膜,易诱发抗精子抗体,另外,子宫颈糜烂者,因局部炎症,损伤黏膜,亦易产生抗精子抗体。此外,阴道细菌感染者也易产生抗精子抗体。

三、抗精子抗体与男性不育

抗精子抗体与免疫不育密切相关,已被大量临床及实验室研究所证实。抗精子抗体可结合在精子不同部位(图 6-8),其对生殖的影响是多方面的,其总的后果是影响精子功能,干扰受精。

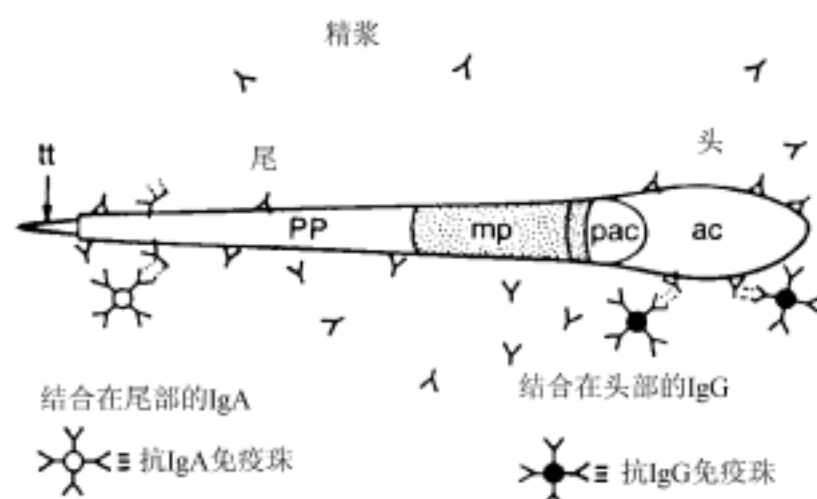


图 6-8 精子和抗精子抗体

tt:尾部末端;PP:尾部中端;MP:中端;pac:顶体后;ac:顶体

1. 影响精子活力及抑制精子穿透宫颈黏液

抗精子抗体结合精子,导致精子凝集,致使精子活力下降,运动受阻,并降低精子的存活率。同时,精子被抗精子抗体结合后,其穿透宫颈黏液的能力明显受抑。因此,抗精子抗体可通过降低精子活力、存活率及抑制精子穿越宫颈黏液而减少受孕机会。研究发现,IgA 类抗精子抗体可明显阻碍精子穿越宫颈黏液而降低生育力,而 IgG 类抗精子抗体与精子凝集、精子制动的关系较为密切。

2. 抑制精子获能、顶体反应及受孕

抗精子抗体结合精子后,抑制精子的获能、顶体反应,并减少获能后的顶体反应率。在获能和顶体反应时,抗精子抗体从空间结构及生物学上干扰受精过程。

3. 影响精子酶的活力和抑制透明带和放射冠的分散作用

精子在女性生殖道内获能后,可产生顶体反应并释放顶体内含物,包括:①顶

体蛋白酶(acrosin):能促进精子穿过透明带及精卵结合。②精子透明质酸酶:能使卵丘(放射冠)分散。体外实验证明,抗精子抗体能抑制田鼠和兔精子对透明带和放射冠的分散作用。

4. 封闭顶体膜上的抗原位点和抑制精子对透明带的附着与穿透

某些妇女的卵泡液或卵丘间质中存在的抗精子抗体可以干扰受精过程。

5. 影响精子与卵子的结合

抗精子抗体能封闭顶体后区的 Con A 受体位点,阻断 Con A 受体的暴露,干扰 Con A 受体与卵膜结合,抑制精卵结合。此外,抗精子抗体可降低受精卵的存活。

6. 影响胚胎的发育

影响胚胎发育的可能的原因是,早期胚胎在其发育过程中可暂时获得各种抗原,其中某些抗原与精子蛋白和畸胎瘤有交叉免疫反应性。在抗精子抗体阳性的妇女中,可见到流产或胚胎吸收。

7. 抗精子抗体的免疫学效应

抗精子抗体与精子结合形成抗原抗体复合物,可介导一系列免疫学效应,影响生殖。

(1) 激活补体:IgG 类、IgM 类抗精子抗体与精子结合后,可通过经典途径激活补体;凝集的 IgA 类抗精子抗体可通过旁路途径激活补体。活化的补体可溶解精子,介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC),激活巨噬细胞、NK 细胞等效应细胞杀伤精子。

(2) 形成抗原抗体免疫复合物:抗精子抗体与精子结合后形成抗原抗体免疫复合物(immune complex, IC),其中中等大小、可溶性的 IC 可沉积在特定部位造成组织损伤,如在免疫性睾丸病患者的曲细精管中往往有 IC 的沉积。

综上所述,抗精子抗体对精子及生殖的影响是多方面的。三类抗精子抗体中,IgA 类抗精子抗体的主要作用是抑制精子的穿透力;IgG 类抗精子抗体的主要作用是活化补体、活化免疫细胞,介导 ADCC、杀伤精子、引起组织损伤;IgM 类抗精子抗体除同 IgG 抗精子抗体有相同的影响外,还能抑制精子获能、顶体反应,影响精子穿透透明带,抑制精卵结合。

四、抗精子抗体的测定及临床意义

(一) 抗精子抗体的测定

抗精子抗体在免疫不育中的意义日益受到人们重视,为某些免疫不育不孕的临床研究提供一个有效的实验室指标。抗精子抗体检测方法有精子凝集试验(sperm agglutination test)、混合凝集试验(mixed agglutination reaction)、精子制动试验(sperm immobilization test)、间接免疫荧光试验、放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)、免疫珠结合试验(immunobead binding test, IBT)和酶联免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等。目前以后两种方法最为常用,且市场有成套试剂盒供应,结果可靠,易于推广。

(二) 抗精子抗体的临床意义

抗精子抗体存在于血清、精浆、子宫颈黏液等体液中,亦存在于精子表面(与精子表面抗原结合),目前主要检测体液中的抗精子抗体。人抗精子抗体主要有三个亚类:IgG、IgA 和 IgM。首先出现的是 IgM 类抗精子抗体,随后转为 IgG 类抗精子抗体,且可长期存在。血清中的以 IgG (或 IgM)类抗精子抗体为主。局部体液(如精浆、子宫颈黏液)中以 IgA 为主,且更具意义,故精浆、子宫颈黏液中抗精子抗体的存在比血清更有临床意义。但精浆、子宫颈黏液阳性率明显低于血清。大量研究表明,免疫不育夫妇抗精子抗体的阳性率为 5%~25% (国外 10%~30%),其中精浆阳性率为 10%~15%,血清为 8%~13%。其中不育男性血清阳性率 IgA 为 18.9%、IgG 为 12.6%;精子表面阳性率 IgA 为 13.4%、IgG 为 15.0%;不育妇女子宫颈黏液 IgA 为 1.8%、IgG 为 8.8%。上海第二医科大学上海生殖医学研究培训中心从 1993 年 5 月至 1998 年 10 月对免疫不育患者抗精子抗体的检测结果见表 6-3。

表 6-3 免疫不育患者抗精子抗体检测结果

标 本	N	IgG		IgA		IgM	
		n	%	n	%	%	n
血 清	2638	504	19.10	329	12.47	521	19.74
精 浆	1721	76	4.40	155	9.0	13	< 1.0
宫颈黏液	383	37	9.70	64	16.71	8	2.0

从表 1 数据可以看出:①血清阳性率大于精浆,且以 IgG 类和 IgM 类抗精子抗体为主;②精浆和宫颈黏液中以 IgA 类抗精子抗体为主。上述结果与国内外有关报道相似。三类(IgG、IgA、IgM)抗精子抗体在免疫不育中各起不同作用(详见前述)。

目前抗精子抗体检测的临床意义主要是:①某些免疫不育患者的辅助诊断指标;②临床疗效考核指标,如避孕套疗法、精子洗涤法、免疫抑制剂治疗等,见效者往往伴有抗精子抗体转阴或滴度下降;③病情监测;④预后判断。抗精子抗体滴度高、持续时间长往往和疗效差、预后不佳密切相关。需要指出的是,正常生育男性亦有 2% 的抗精子抗体阳性率,部分正常女性亦可出现抗精子抗体,这在分析结果时一定要注意,加以区别。需要提醒的是,抗精子抗体并非一特异、绝对的指标,而是一相对的辅助的参考指标,这点还需广大临床医生及科研人员注意。

第五节 女性生殖与免疫

女性生殖道是一个与体外相通的开放系统,因此,为避免病原微生物的感染,必须要求局部有强大的免疫保护功能。然而,性交活动又可视作为一个反复注入同

种异体抗原(精子)的过程,同样“十月怀胎”过程中亦是一个不断接受异体抗原刺激的过程。人在漫长的进化过程中,已成为高级生物,为了整个人类种的繁衍,女性生殖道(器官)已进化形成一独特的保护机制,能识别、排斥各种抗原而不排斥精子及胎儿,以保证整个生殖活动的进行。同时,女性生殖系统受神经内分泌的控制,具有明显的周期性变化,这也可引起局部免疫功能的周期性变化,故研究女性生殖道局部的免疫机能已成为生殖免疫领域的主要领域之一。

一、女性生殖道的免疫保护机制

同男性生殖道一样,女性生殖道局部免疫系统也属于黏膜免疫系统。其特点是生殖道黏膜表面含有大量 SIgA,发挥局部免疫防御作用;此外,含少量 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞,维持生理水平的免疫活动,保护女性生殖道免遭病原微生物等抗原的侵袭。

1. 阴道

阴道直接和外界相同,易受病原微生物感染及异物(抗原)侵袭。阴道分泌液及黏膜表面富含 IgG 和 SIgA,主要功能是介导抗病原微生物的免疫。亦可产生抗精子抗体,使精子凝集或制动,影响生育。

2. 子宫颈

子宫颈表面和宫颈黏液中含大量 IgG、IgM 和 IgA(以 SIgA 为主)。排卵期免疫球蛋白的含量下降,有利精子穿过黏液。

3. 子宫

研究发现,女性子宫内存在 IgG、IgA 和 IgM,并有补体 C3 存在。子宫内亦可出现抗精子抗体,抑制受精作用。另外,发现子宫内有子宫球蛋白和谷氨酰胺转移酶,可与微球蛋白交联,掩盖精子及胚胎细胞表面的移植抗原,使母体 T 细胞无法识别胚胎,从而保证了胚胎的正常发育。

4. 输卵管

输卵管液中有 IgG、IgA 和少量 IgM。全身免疫及生殖道局部免疫对输卵管中抗体水平影响较少。

5. 免疫细胞

女性生殖道内含有各类免疫细胞,如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞等。其中 T 淋巴细胞存在不同亚类,如 T_c 、 T_H1 和 T_H2 细胞等,在维持局部免疫功能中起重要作用,亦参与人类的生殖活动。正常生育妇女生殖道中 T_H1 细胞低于 T_H2 ,保证了妊娠的正常进行,而某些习惯性流产妇女, T_H1 细胞远远大于 T_H2 细胞,不利于妊娠的进行。

6. 细胞因子

女性生殖道存在大量细胞因子,彼此相互作用、相互协调,维持局部生理平衡,保护生殖活动的进行,其中 IL-1 可促进卵泡生成、增殖和成熟;IFN- γ 和 TGF- β 可促进滋养层细胞分化;TNF- α 促进排卵;CSF-1 可促进滋养层细胞分裂。

7. 免疫豁免现象

一般认为,同男性睾丸一样,女性生殖道也是一免疫豁免区,一般不产生明显或强烈的免疫活动,以保护受精、胚胎成熟等整个生殖活动。反之,则会影响生殖功能,如巨噬细胞活性过高会增强对精子的吞噬、破坏;补体一旦活化后,则可对精子产生细胞毒作用;抗精子抗体存在可使精子凝集,阻碍精子穿过宫颈黏液,并干扰精子获能等。而免疫豁免的存在,为生殖功能提供了一种生理性的保护机制。

二、精子在女性生殖道免遭攻击的机制

精子对女性生殖道局部免疫系统是一强烈的同种异体抗原,但正常情况下,女性生殖道局部的T、B淋巴细胞并不对精子抗原识别产生排斥应答,反而保护精卵结合,完成整个受精、胚胎发育等生殖活动。对精子免遭女性生殖道免疫系统攻击的机制众说纷纭,但一般认为,可能存在以下机制。

1. 生理屏障的保护作用

女性阴道属于免疫系统,完整的黏膜阻止精子进入机体、引发强烈的免疫应答,某些病理情况,如阴道黏膜损伤、破坏等,精子进入血液,引发抗精子的免疫应答,产生抗精子抗体,影响精子功能。

2. 免疫豁免的保护作用

如前所述,女性生殖道亦属于免疫豁免区,正常情况下维持低水平的免疫活动,保护精子不受攻击、排斥。

3. 免疫细胞的保护作用

T_H1细胞介导细胞免疫,可活化T_C细胞、NK细胞、巨噬细胞等,对精子产生细胞毒作用。研究发现,正常情况下,生殖道内T_H1细胞远远小于T_H2细胞。T_H1细胞与T_H2细胞的低比值,保护了精子在正常生殖道的正常功能。

NK细胞是免疫系统重要的细胞毒效应细胞,能杀伤靶细胞。研究发现,胎盘滋养层细胞表达非经典的HLA-E和HLA-G分子。NK细胞的KIR可识别、结合HLA-E和HLA-G分子,抑制其杀伤活性。故认为NK细胞在维持母胎界面平衡、正常的生殖活动中亦起重要的作用。

4. 精浆免疫抑制因子的保护作用

男女性结合时,大量免疫抑制因子随精液一同进入女性生殖道,抑制T、B淋巴细胞活性,抑制巨噬细胞、NK细胞及补体的活性,保护精子免遭免疫攻击。

三、女性不孕与免疫

引起女性不孕的原因错综复杂,至今未能完全了解,其中相当一部分和免疫密切相关,即由免疫异常引起的不孕。下面就较为常见的抗精子抗体和子宫内膜异位症引起的免疫不孕作一简单讨论。

1. 抗精子抗体和女性不孕

不少不孕女性往往可见其生殖道局部免疫异常,而抗精子抗体往往与此有关。由于女性生殖道免疫异常(包括精浆免疫抑制因子异常)导致对进入阴道的精子产生强烈的抗精子免疫应答,少数女性对精子过敏,产生过敏反应(IgE 介导),结果均可导致抗精子抗体的产生(见本章第四节)。抗精子抗体作用于精子产生一系列病理过程:①干扰受精,凝集精子,影响精子活力和存活率,抑制精子穿卵能力,影响精卵结合;②激活巨噬细胞、NK 细胞,吞噬、杀伤精子;③活化补体,直接损伤精子并介导 ADCC 破坏精子等。因此,在部分不孕妇女中,其血清或宫颈黏液中可出现抗精子抗体,包括 IgG、IgA 和 IgM,统计表明,不孕妇女宫颈黏液中抗精子抗体的阳性率 IgA 为 1.8%、IgG 为 8.8%。故临床上抗精子抗体监测可作为部分免疫不孕妇女的辅助诊断指标。

2. 子宫内膜异位症和女性不孕

子宫内膜异位症(简称内异症)是妇女的常见病,发病率为 4%~17%,其中不孕率高达 30%~40%,内异症病因复杂,至今未能完全阐明,但和免疫密切相关,有免疫因素参与,是一种自身免疫病。

内异症患者常伴有免疫异常,产生自身免疫。研究发现:①内异症患者外周血 T、B 淋巴细胞活性增高,产生抗子宫内膜抗体;②NK 细胞活性降低,清除子宫内膜细胞的能力下降,促进内异症发生。③患者巨噬细胞活性增加,可大量吞噬精子,与不孕直接相关;④细胞因子异常如 IL-1 含量升高,IL-6、TNF 活性增强,影响 T、B 淋巴细胞功能;⑤子宫内膜组织中可见到补体沉积。

上述免疫异常导致女性产生抗子宫内膜抗体。研究证实,抗子宫内膜抗体是内异症妇女不孕高发生率的原因之一。据报道,内异症患者血清抗子宫内膜抗体检出率为 50%~80%,上海第二医科大学上海生殖医学研究培训中心的检出率为 60%。故抗子宫内膜抗体检测可作为内异症患者的无创伤性辅助诊断指标。

目前子宫内膜抗体检测最常用的方法是 ELISA 法,市场上有成套试剂盒,易于推广。

近年来研究发现,T_H 细胞型别与女性不孕密切相关。T_H2 有利于妊娠,正常妊娠妇女 T_H2 细胞远远多于 T_H1 细胞。反之,在习惯性流产病人则以 T_H1 细胞为主。其详细机制有待进一步研究、证实。

四、习惯性流产与免疫异常

习惯性流产发病率为 0.4%~1%,近代生殖免疫学研究表明,习惯性流产除常见的染色体、生殖道解剖和内分泌异常外,相当一部分与免疫有关。概括起来讲,习惯性流产人群中免疫因素可分为两大类:①自身免疫病,其中 35% 患者与自身抗体特别是抗心磷脂抗体有关;②同种免疫病,约 65% 可能是患者对胎儿父系抗原呈低反应性有关。

(一) 自身抗体与习惯性流产

近 30 年来,人们开始认识到习惯性流产与自身免疫有关,并日益受到重视,且取得了许多突破性的进展。1985 年,Lockshin 等人提出自身抗体和习惯性流产密切相关,这一结果引起了生殖免疫学家的极大关注。近年来,已发现一些自身抗体如抗 DNA 抗体、抗 ENA 抗体、抗组蛋白抗体、狼疮抗凝物和抗心磷脂抗体有关,其中尤以抗心磷脂抗体关系最为密切。

1. 狼疮抗凝物与习惯性流产

在习惯性流产病人中,狼疮凝集物(lupus anticoagulant, LA)的阳性率报道不尽相同,差异较大,约为 5%~50%,这可能和检测方法有关。正常无并发症的妊娠,LA 阳性率低于 5%,且均为 LA 的一过性增高。

免疫病理检查发现,某些 LA 阳性妇女的胎盘发育极差,镜下可见基底板部分呈坏死性的蜕膜血管病变,蜕膜血管内膜增厚,纤维素样坏死,急性粥样硬化,管腔内出血。但上述病理变化并非 LA 所特异。

2. 抗心磷脂抗体与习惯性流产

目前认为,抗心磷脂抗体(anticardiolipin antibodies, ACA)与习惯性流产最为密切,阳性率约为 15%。另一方面,ACA 妇女约有 80% 的流产率,即使妊娠成功也伴有宫内发育迟缓、胎盘早剥、早产以及早期严重的妊娠高血压症。现认为 ACA 可通过影响血液、损伤血管内皮、活化血小板和作用于其他辅助因子,使子宫蜕膜血管血栓形成,造成胎盘缺血而死亡,最后发生流产。

ACA 主要为 IgG 类和 IgM 类自身抗体,检测常用方法为 ELISA,市场上有试剂盒供应,便于推广。故目前认为,ACA 的检测可作为习惯性流产的一个预测指标或作为一种检测高危妇女的方法。

(二) T_H 细胞与习惯性流产

近年来 T_H 细胞及其分泌的细胞因子在妊娠的变化及作用受到人们的关注。正常妊娠时,T_H1/T_H2 型细胞因子比值下降,母体免疫反应偏向 T_H2 型,而偏离 T_H1 型。在习惯性流产病人中 T_H1/T_H2 型细胞因子比值上升,母体免疫反应呈相反变化。胎儿对母体免疫系统而言,是一同种异体抗原,正常生理情况下,母体免疫系统对胎儿以免疫保护和营养为主,不发生免疫杀伤或排斥,即所谓的母体对胎儿的免疫耐受或母胎免疫平衡。如果这种耐受或平衡遭到破坏,胎儿就可能遭到排斥、损伤。

T_H1 和 T_H2 细胞是免疫系统一对重要的调节细胞,在维持、调节机体免疫功能及母胎免疫平衡中起了关键作用。T_H1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 等 T_H1 型细胞因子,介导细胞免疫;T_H2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 等 T_H2 型细胞因子,介导体液免疫。Hill 等人研究证实,习惯性流产患者 T_H1 型细胞因子浓度明显增高,T_H2 型细胞因子浓度明显下降。证明了 T_H1 细胞因子对胎盘有害,

不利于妊娠;Th2型细胞因子是母体对滋养细胞的正常反应,有利于妊娠;Th1型细胞因子在习惯性流产中起重要作用。Th1型细胞因子通过直接或间接激活巨噬细胞、NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞(Tc)等多种细胞毒性细胞影响妊娠。IFN- γ 能吸引巨噬细胞到胎盘部位,加强抗原呈递细胞表达MHC分子和B7分子,加强细胞毒作用,损伤滋养层细胞,引发流产;阻碍胎盘着床及发育;阻断蜕膜细胞产生粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),后者能诱导滋养层细胞分化及生长起重要作用。TNF- α 能诱导滋养层细胞凋亡,促使胎盘血管血栓形成,诱发宫缩,使已着床的胚胎坏死、排出。IFN- γ 能增强TNF- α 对滋养层细胞的破坏,两者相加作用更明显。IL-2则能激活Tc,进一步加强细胞毒作用。

妊娠是一种Th2现象,Th2型细胞是通过Th2型细胞因子的产生来维持妊娠;而习惯性流产则相反,因Th2型细胞因子不足、Th1/Th2细胞(因子)比值升高导致发病。可见,Th1、Th2型细胞因子间的平衡对妊娠至关重要。因而有学者提出,通过加入Th2型细胞因子或抗Th1型细胞因子制剂,来人为干预、调整体内Th1/Th2型细胞因子比值、纠正习惯性流产患者的免疫平衡状态,达到预防、治疗习惯性流产的目的。同样,临床上亦可通过检测患者的Th1/Th2型细胞(因子)比值,作为习惯性流产的诊断、疗效考核及预后判断的辅助检测指标。

(李伟毅)

第七章

机体内分泌与生殖

内分泌系统(endocrine system)是由内分泌腺和散在于各器官系统中的内分泌细胞组成,它与神经系统相辅相成,共同调节机体的生长发育和代谢,维持着机体内环境的稳定,影响着行为并控制着生殖。由于内分泌系统是通过分泌激素进入血液循环对机体的靶器官进行调节,因此在其对生殖系统的发育和功能的调控上就显得更为重要。

第一节 生殖器官的发育

一、性激素与生殖器官的发育

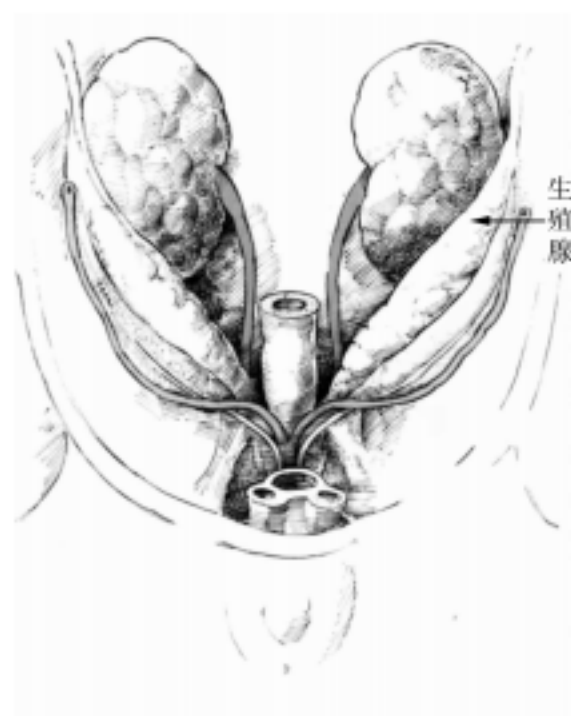


图 7-1 8 周胚胎的生殖腺

生殖器官发育的始基是胚胎间介中胚层的中肾管(mesonephric duct, 又称 Wolff 管)和中肾旁管(paramesonephric duct, 又称 Müller 管)。男性胎儿 8~9 周时睾丸间质细胞开始分泌睾酮,使中肾管发育成附睾、输精管和精囊腺。同时,睾丸支持细胞分泌米勒(Müller)管抑制因子(MIF),抑制中肾旁管发育,故中肾旁管于胚胎 3 个月时退化。女性胎儿体内因无睾酮及米勒管抑制因子,所以中肾管于第 10 周时退化,而中肾旁管顶端不融合部分则发育成输卵管;尾端融合部分发育分化成子宫和阴道的上 2/3 始基,由其形成子宫腺体及上皮,间充质形成内膜基质与肌层,中肾管一部分形成卵巢冠和卵巢旁体。尿生殖窦背侧壁的米勒结节增

生,中间腔化形成阴道的一部分。

外生殖器的发生,在第9周前为不能分辨性别的未分化期。胚胎第4周时,从泄殖腔膜的腹侧发生尿生殖结节,继之在泄殖腔膜两侧发生尿生殖隆突和尿生殖褶。若胎儿为男性,睾酮经5 α -还原酶转化成双氢睾酮,在其作用下未分化的尿生殖结节发育成阴茎体,尿生殖隆突发育成阴囊。女性胎儿无睾酮的作用,尿生殖结节自然发育成阴蒂,尿生殖褶发育成小阴唇,尿生殖隆突则发育成大阴唇(图7-1,图7-2和图7-3)。

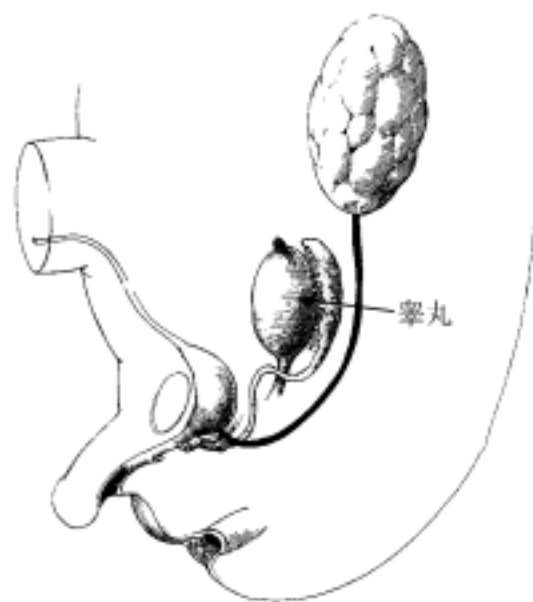


图 7-2 3个月男胎的泌尿生殖系统

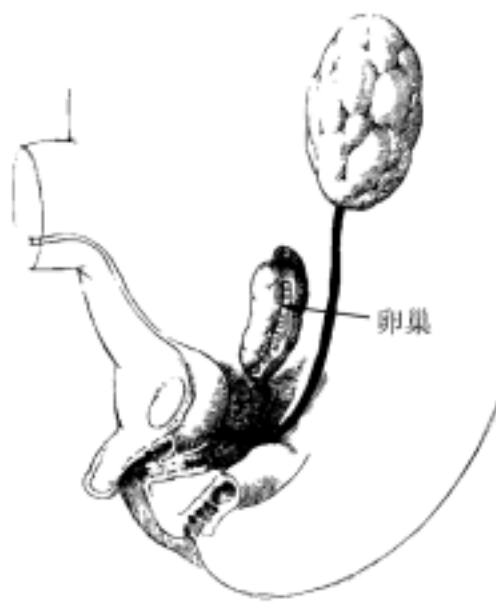


图 7-3 3个月女胎的泌尿生殖系统

二、机体内分泌腺的发育

1. 脑垂体的发育与性腺发育的关系

脑垂体由两种不同的组织形成,前叶腺垂体来自颅颊囊(Rathke pouch),后叶神经垂体来自间脑底部漏斗(图7-4,图7-5)。胚胎第3周时,颅颊囊从原始口腔顶开始向脑部生长,第5周时其延长部与漏斗接触,第6周时颅颊囊与口腔的联系消失,细胞增生,其前壁形成腺垂体的远侧部,包围漏斗柄的部分为结节部。垂体前叶的细胞类型于胚胎第8~10周时可以辨别。垂体前叶所产生的各种激素,在胎儿12周时可以从细胞中提取出来,到20周时才进入胎儿血液,所以在胎儿20周以后才可在血中测定出来。故在胎儿最初的3个月,性腺和肾上腺的发育可能是受胎盘激素的影响。当胎儿到4~6个月时,垂体前叶激素分泌增多,垂体门脉系统也发育完善,促性腺激素增加

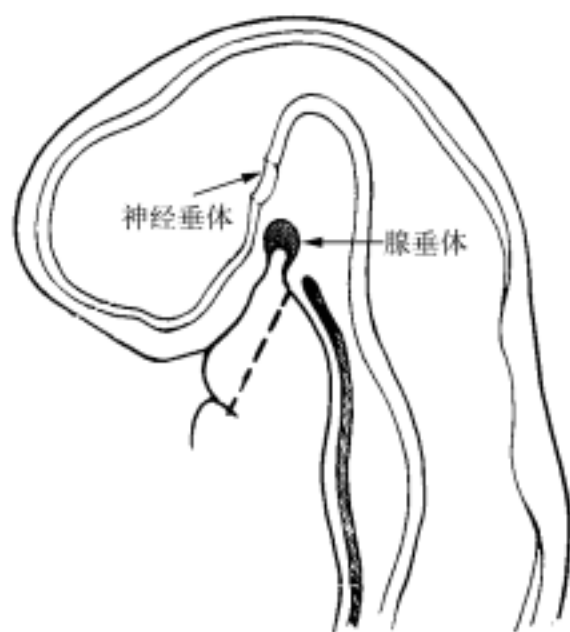


图 7-4 垂体的发生(1)

并进入胎儿血液,性腺的负反馈机制成熟,此时下丘脑虽已有促性腺激素释放激素,但水平甚低。在胎儿期的最后3个月反馈系统发育成熟,开始调控下丘脑的释放激素。

胎儿垂体后叶激素如加压素与催产素,在胎儿12~18周时可以从垂体后叶中提取出来,含量逐渐增高,直达足月。无反馈控制。



图 7-5 垂体的发生(2)

2. 松果体的发育与性腺发育的关系

松果体(pineal body)又名脑上腺(epiphysis cerebri)。胚胎第7周时由间脑顶部正中向上方伸出,呈小突起状,即松果体的原基。松果体的主细胞也称松果体细胞。成年人松果体呈扁圆锥形,位于上丘脑,以细柄与间脑顶部的后端相连。松果体的腺实质由松果体细胞与神经胶质细胞组成,两种细胞均有细长的突起。松果体细胞合成并释放两种激素,即吲哚类和多肽类。吲哚类中最主要的是褪黑素(melatonin),它以5-羟色胺为前体。褪黑素有抑制性腺的功能。切除动物的松果体后,性腺的重量增加,并使幼年动物发生性早熟。

松果体另一种重要激素为多肽类,从牛松果体提出的一种多肽类激素称为精氨酸血管毒素(arginine vasotoxin, AVT),具有抗利尿、催产及抑制性腺生长的作用。曾经有人给以不同的命名,如抗卵巢素(anovulin)、松果体抗促性腺激素物质(pineal antigonadotropic material)和游离褪黑素(free melatonin)。

3. 肾上腺的发育

胎儿肾上腺皮质于4~6周时发生于体腔背部的中胚层,无论从解剖结构上或功能上均与成年人不同,8~9周时胎儿肾上腺皮质中已含有合成皮质激素所必需的酶。当胎儿7~9周时,垂体开始产生促肾上腺皮质激素,可调节肾上腺皮质激素的产生。在胎儿4~6个月时,肾上腺皮质增长,主要是其中的胎儿带,并可产生糖皮质激素、盐皮质激素、雄激素及雌激素,此时的外层仍处在相对未分化状态。在胎儿25周时,成年网状带发生,并产生类固醇激素。胎儿带的退化在出生后数月内完成。胎盘所产生的孕酮,是胎儿肾上腺生产皮质醇和醛固酮的主要前体。

肾上腺髓质发生于胚胎的外胚层,组织细胞为嗜铬细胞。

4. 甲状腺的发育

胚胎第4周时在第1~2咽囊的正中线腹侧出现甲状腺囊,此囊发育成甲状

腺。原始甲状腺细胞从咽底移行而来,胚胎第7周时甲状腺移行到一定的部位,甲状舌管萎缩(图7-6)。在以后的7周中,甲状腺的细胞分化并建立分泌功能。在10~11周时在腺体的组织内出现甲状腺素(T_4),14周时在胎血清中可测出三碘甲状腺原氨酸(T_3)、 T_4 及促甲状腺素(TSH)。在正常情况下,不论TSH或甲状腺素均不能通过胎盘组织,故胎儿的甲状腺素是靠自己的甲状腺供给,胎儿的垂体-甲状腺轴的功能与母亲的垂体-甲状腺轴无关。若母亲患有甲状腺功能亢进(简称甲亢),抗甲状腺药物,包括带放射性的碘,都可以自由通过胎盘。因此患甲亢的母亲妊娠期用抗甲状腺药物治疗,可以分娩出甲状腺功能减退的新生儿。

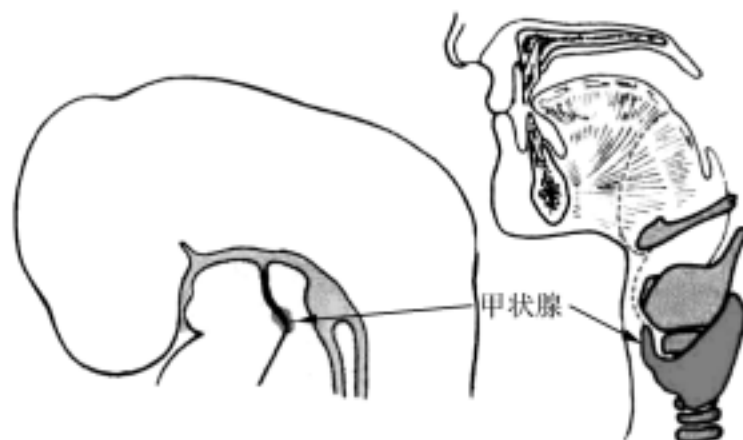


图7-6 甲状腺的发生

另外,虽然母亲的促甲状腺素不能进入胎体,但是患有甲亢的母亲可以通过胎盘传递人特异性促甲状腺免疫球蛋白(human-specific thyroid stimulator immunoglobulin, HTSI),而分娩出突眼甲亢的孩子。HTSI可以长期存留在患过甲亢的母体内。因此,妊娠时应考虑到HTSI转递的可能性。

第二节 机体内分泌腺功能异常对生殖的影响

一、肾上腺皮质与生殖

肾上腺位于肾脏上端,左右各一,腺体呈三角形,分皮质和髓质两部分(图7-7)。髓质由交感神经细胞衍化而来。而肾上腺皮质根据其结构形态和功能可分为球状带、束状带和网状带。球状带分泌醛固酮,受肾素-血管紧张素系统调节;束状带主要分泌糖皮质激素(皮质醇);网状带主要合成雄激素和少量雌、孕激素。束状带和网状带的分泌功能受垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)的调节,糖皮质激素对ACTH产生反馈作用。分泌水平低落时,ACTH分泌增加;分泌量高时,抑制ACTH的分泌。

ACTH虽不是生殖功能调节轴的主要环节,但它对性功能和生育产生直接而密切的影响。肾上腺皮质功能失常,常伴生殖系统功能的变异。

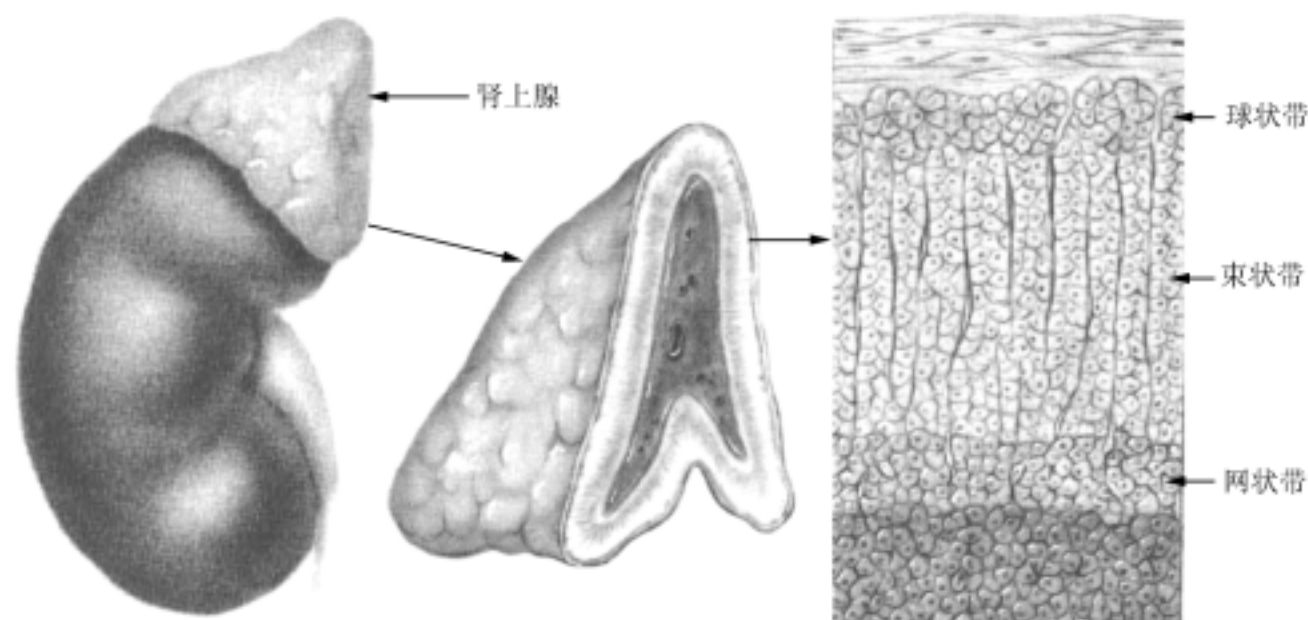


图 7-7 肾上腺大体解剖和组织切面的模式图

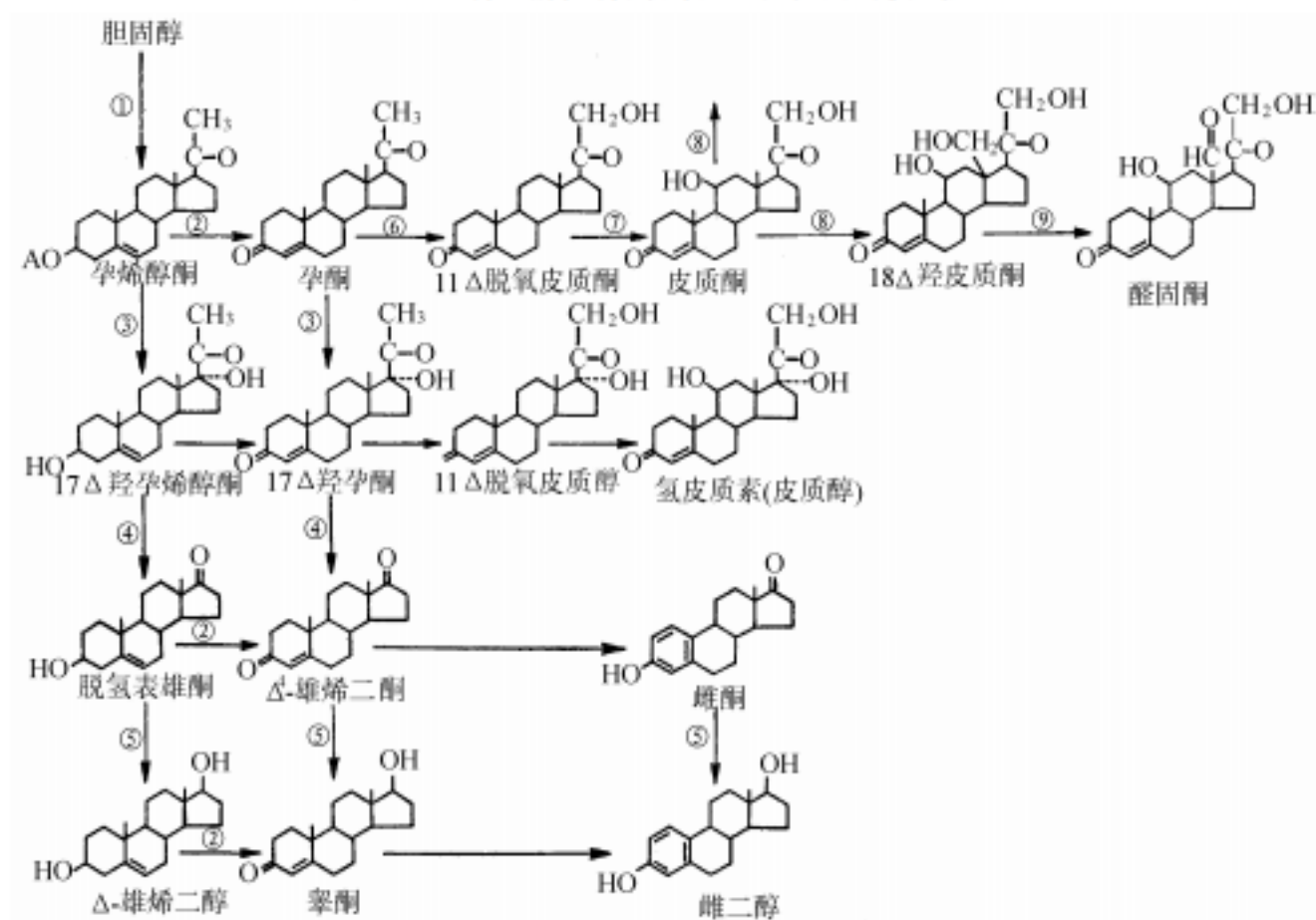


图 7-8 正常肾上腺皮质的生物合成

①20,22-裂解酶;②3 β -羟甾脱氢酶;③17 α -羟化酶;④17,20-裂解酶;⑤17-酮类固醇还原酶;
⑥21-羟化酶;⑦11 β -羟化酶;⑧18-羟化酶;⑨18-氧化酶

1. 先天性肾上腺皮质增生症

先天性肾上腺皮质增生症,主要因肾上腺皮质中某些激素合成酶先天性缺陷所导致的疾病。因皮质中各种激素的合成可以进行到一定程度,但至酶缺陷的环节时功能阻断,不能正常前进,于是环节后应合成的激素匮乏而环节前所合成的激素

积聚,实际上先天性肾上腺皮质增生症可涉及 5 种酶缺陷。正常肾上腺皮质的生物合成途径见图 7-8。

(1) 21-羟化酶缺陷:

1) 发生率:此症是最常见的一种类型,约占先天性肾上腺皮质增生症总患者的 90% ~ 95%,故称这类病症为典型肾上腺皮质增生症。

2) 临床表现:缺陷如较轻,皮质醇的水平虽低仍可能不产生明显症状。但 21-羟化酶作用环节前已合成的黄体酮和 17α -羟孕酮即有积聚,且不断衍化为雄激素,过量的雄激素运至血液循环导致女婴男性化和男孩早发育。



图 7-9 21-羟化酶缺陷(外阴男性化)

女性胎儿在 46,XX 染色体构成情况下,卵巢和内生殖器形成正常,但肾上腺源的过量雄激素作用抑制外生殖器正常发育,使其男性化。阴蒂增生长大,生殖泌尿道可能融合成泌尿生殖窦或形成尿道下裂,小阴唇下段会合如阴囊(但内无睾丸)(图 7-9)。过高的雄激素抑制垂体促性腺素分泌,少女的卵巢不发育造成原发闭经,但雄激素可直接作用长骨使其提早生长,少女较同龄儿高,但雄激素持续作用使长骨骨髓提前愈合,导致患者成人时较一般妇女矮而壮实(图 7-10)。

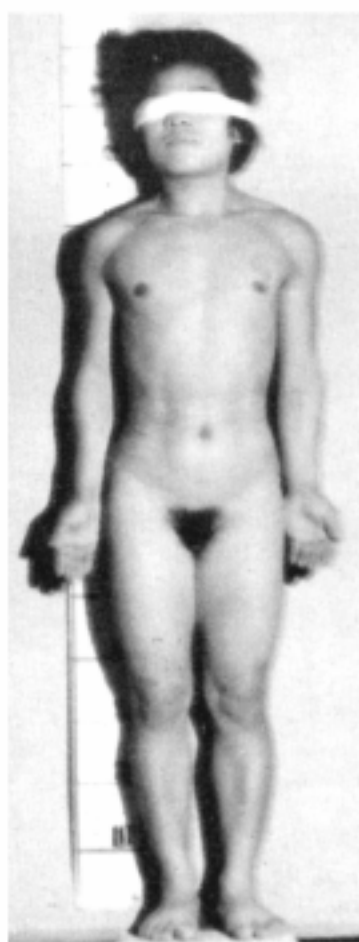


图 7-10 21-羟化酶缺陷
(男性体形,无性腺发育)

男性胎儿的生殖器官形态无变异,但幼时在雄激素的作用下性器官提前发育,身体生长也提早,高于同龄儿,但最终矮于一般成人。在雄激素对垂体的促性腺激素分泌抑制下,睾丸功能低落,生精功能也受抑制。

21-羟化酶的缺陷既影响皮质酮的合成,也影响醛固酮的合成。醛固酮缺少可降低肾小管回收钠离子的功能而导致血钠低落、血钾升高的症候。如果缺陷程度严重,新生儿即可有呕吐、脱水、休克,甚至 2 周内死亡,称“失盐性肾上腺皮质增生症”。

此外,有些患者早期可能无异常表现,而是在儿童的生长发育中或达青春期时,女孩骤然男性化,男孩则性发育加速并过度。这种病有时被称为获得性或继发性肾上腺皮质增生症,也称为迟发性肾上腺皮质增生症。

3) 遗传因子:先天性 21-羟化酶缺陷为常染色体的单基因隐性遗传病,调节基因位于第 6 号染色体的短臂,接近人相容性抗原(HLA)的位置。

4) 实验室诊断:

a. 血激素测定:①皮质激素:可能呈正常的低值或更低;② 17α -羟孕酮(为 21-羟化酶作用环节前积聚物质):显著升高,甚至可达正常值的数百倍;③醛固酮:此激素改变后有时难以测定,则可借助于肾素值;④肾素:醛固酮值低落时,肾素水平即增高。肾素/醛固酮的比值也升高。

b. 血钠减少,血钾升高。

c. 尿激素测定:17-羟类固醇低落,反映皮质醇水平低;17-酮类固醇升高,反映雄激素合成过多,代谢产物也增多。孕三醇高水平,为 17α -羟孕酮的代谢产物。

(2) 11-羟化酶缺陷:21-羟化酶以外的其他 4 种酶缺乏所引起的病症发病率总和不满 10%。

11-羟化酶使 11-脱氧皮质酮转化为皮质酮,并使 11-脱氧皮质醇转化为皮质醇。患病时,皮质醇不足对 ACTH 的反馈抑制减弱,ACTH 的继续增加导致脱氧皮质醇的严重积聚,同时 21-羟化酶作用前的黄体酮和 17α -羟孕酮也过多积聚,这些物质不断转化为雄激素,雄激素水平的持续升高使女性型外阴男性化变。另外,脱氧皮质酮不能转化为皮质酮,也就不能进一步转化为醛固酮。但是,脱氧皮质酮本身也具类似醛固酮的钠、钾代谢调节作用。因此,当它积聚过多时也引起血内高钠低钾和高血压症候,而此种高血压症多在儿童期即开始表现,病情严重时会影响中枢神经系统,甚至导致死亡。

11-羟化酶缺陷也是一种隐性遗传性疾病,它的调节基因位于第 8 对染色体的长臂上,不与 HLA 联系,故与 21-羟化酶缺陷不同。

1) 实验室诊断:除临床症候外,实验室测定显示:

a. 尿液:脱氧皮质酮和脱氧皮质醇的四氢代谢产物(如 30-羟基、 5β -氢的四氢皮质醇等为主的代谢物)值升高;如做 ACTH 刺激测验,则测定值更高,数百倍于正常值;尿 17 酮类固醇值明显升高。

b. 血醛固酮和肾素呈低水平。

c. 血钠可正常,血钾可能正常或降低。

d. 血雄激素如雄烯二酮、睾酮水平升高。

2) 治疗:一般给予皮质醇制剂,以抑制过高的 ACTH 分泌和过多脱氧皮质酮积聚。治疗时需注意剂量,尤其对幼童不可过度,以防出现醛固酮功能不足。

(3) 3β -羟甾脱氢酶缺陷:此酶缺陷极少见。患者因酶缺陷致黄体酮、 17α -羟孕酮、雄烯二酮和睾酮的合成和代谢受阻, 17 -羟孕烯醇酮和脱氢表雄酮积聚,由于脱氢表雄酮为较弱的雄激素,故女性患者的男性化程度轻。但是男性患者则因雄激素功能不足,致性发育欠缺,甚至形成尿道下裂。根据酶缺陷的程度也可表现其他激素合成欠缺的症候,如皮质醇、皮质酮、醛固酮的不足等。此症的基因尚未获得定位,但已确认与 HLA 无关联。

治疗:给予皮质醇制剂以抑制 ACTH 的过度分泌,减轻雄激素的积聚和影响;同时,根据病情严重程度,对其他激素的不足予以补充。

(4) 17α -羟化酶缺陷:发生率最低,它的缺陷妨碍孕烯醇酮转化为 17α -羟孕烯醇酮,黄体酮转化为 17α -羟孕酮,于是雌、孕激素和皮质醇均难合成,患者性发育受

阻,女性呈原发性闭经。但此酶的缺陷并不阻碍黄体酮转换成皮质酮和醛固酮,后两者积聚可引起血压升高和低钾,严重者可危及生命。此酶的调节基因位于第 10 对染色体。

治疗:此症也以皮质醇制剂的补充为治疗方法,以抑制 ACTH 过量分泌。

(5) 胆固醇裂解酶缺陷:此酶缺陷将致卵巢和肾上腺皮质的类固醇激素合成受阻,胎儿无性发育,新生儿多于婴幼儿期因肾上腺皮质功能缺乏而死亡。

此酶的调节基因位于第 15 对染色体。

总之,以上情况反映先天性肾上腺皮质增生症,及其激素的合成酶缺陷可引起月经不调、无排卵、停经、闭经、不孕和不同程度的男性化等症候,也可致多囊卵巢综合征样病情,应当注意鉴别。

2. 肾上腺皮质功能亢进症

肾上腺皮质功能亢进,一般指皮质醇分泌过多所造成的病理症候。

(1) 病因:ACTH 分泌过多导致肾上腺皮质激素分泌过多而致病。但是,过多的 ACTH 既可自垂体本身的腺瘤所分泌,又可由于下丘脑促 ACTH 释放因子(CRH)分泌的 5-羟色胺作用过强所致。因为使用血清素抑制剂能使部分患者病情缓解。此类病情又称库欣(柯兴)病。除 ACTH 引起糖皮质激素分泌过多外,肾上腺皮质细胞瘤或癌也可引起库欣样病情。

(2) 临床表现:ACTH 分泌过高者,GnRH 分泌脉冲频率减少,幅度降低,促性腺素功能减退。但 ACTH 高引起雄激素合成增多,转化为雌激素量也增高,两者又协同反馈性抑制垂体的性功能调节轴,引起持续性月经失调或闭经。男性则表现为性欲减退、阳痿、性功能低落。糖皮质激素分泌亢进则改变脂代谢,致动脉粥样硬化、肥胖、满月脸、心血管系统疾病和高血压;蛋白质代谢异常致皮肤变薄且呈紫斑、紫纹等,此外伴有糖尿病。约半数患者可能发生精神紊乱症候,如幻觉、焦虑失眠,甚至发生抑郁性精神病。

(3) 治疗:上述症候相似的病症,病因并不相同,治前必须明确诊断,进行相应的治疗。

二、甲状腺与生殖功能

甲状腺滤泡内生成两种甲状腺激素,均为酪氨酸碘化物,分别为 3,5,3'-三碘甲状腺原氨酸(3,5,3'-triiodothyronine, T_3) 和 3,5,3',5'-四碘甲状腺原氨酸(3,5,3',5'-tetraiodothyronine, T_4), T_4 又称甲状腺素。 T_3 和 T_4 结构相似,但 T_3 生理作用比 T_4 强 5 倍; T_4 可转化为 T_3 ,可能为 T_3 的前身,故 T_4 也是一激素原。甲状腺内还有无生物活性的含碘化合物,如一碘酪氨酸、二碘酪氨酸和反 T_3 (rT_3)等,为甲状腺激素的前身和代谢产物。 rT_3 是 T_4 在外周组织中脱碘而生成,是 T_4 的代谢产物(图 7-11,图 7-12)。

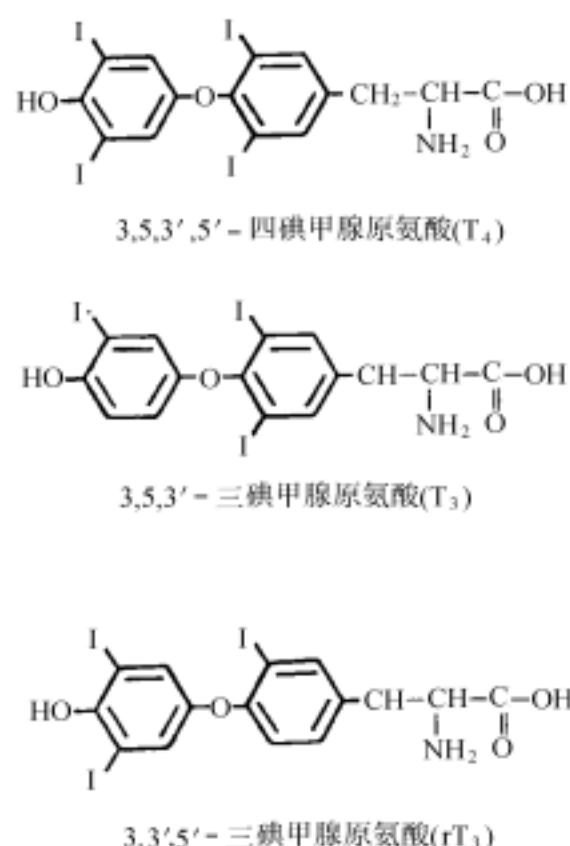


图 7-11 甲状腺素的化学结构

T_3 、 T_4 在甲状腺内与甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, TGB) 结合,在促甲状腺素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 的作用下, TGB 经蛋白酶水解,使 T_3 、 T_4 游离,由细胞中释放入血。血中 T_3 、 T_4 大部分呈结合状态。血液中有 3 种与甲状腺激素结合的蛋白质,即甲状腺素结合球蛋白 (thyroxine binding globulin, TBG), 约 75% 与甲状腺激素结合;其次为甲状腺素结合前白蛋白 (thyroxine-binding prealbumin, TBPA) 约 15% 与甲状腺素结合;其余 10% 与白蛋白结合。循环中的甲状腺激素 99% 以上呈结合状态,游离的 T_3 和 T_4 < 1%, 只有游离的 T_3 、 T_4 方有激素的生理作用。雌激素可刺激肝脏合成 TBG, 增加循环中 TBG 的浓度。结合的和游离的甲状腺激素处在动态平衡状态。甲状腺的生理功能涉及全身的代谢功能,与脑、心、肺的功能密切相关,性腺亦受其影响。甲状腺

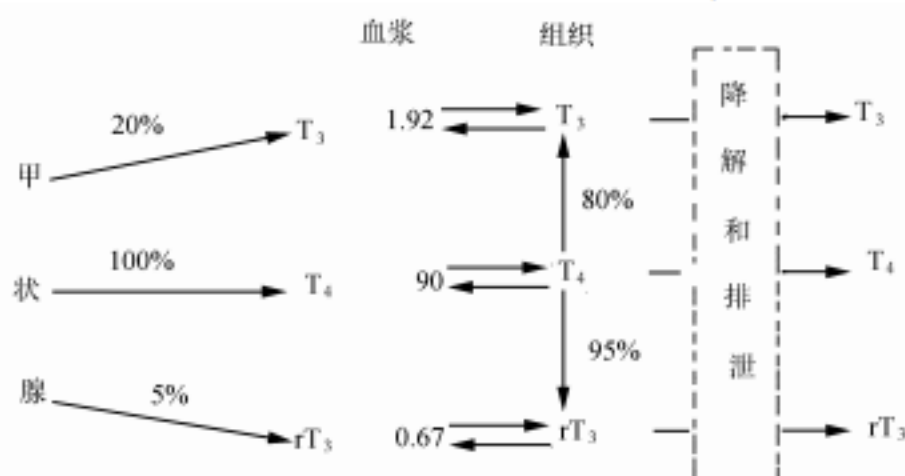


图 7-12 正常人 T_3 、 T_4 和 rT_3 的来源与含量

功能亢进或减退均影响女性生殖功能,孕期发生甲状腺疾病更有其特殊性。

1. 甲状腺功能减退症

甲状腺功能减退症简称甲减,系甲状腺激素合成分泌或生物效应不足所致。按发病年龄可分为呆小病(胎儿或新生儿期)、幼年型和成年型。按病因分为原发性、继发性和周围性三类。

原发性甲减中有:

(1) 甲状腺素缺乏性甲减:① 由甲状腺手术后或放射性 ^{131}I 治疗后所致;② 甲状腺生长发育缺陷;③ 特发性,由自身免疫引起,可检出抗甲状腺抗体。

(2) 甲状腺肿性甲减:系甲状腺激素合成过程障碍,失代偿时则甲减。常见原

因有慢性淋巴细胞性甲状腺炎、桥本病、缺碘、遗传性或药物性等。

继发性甲减系下丘脑-垂体病变所致。周围性甲减系遗传性受体功能障碍或缺如所致。

成年期以前发病者除生长不良、智力差(不同程度)外,且有性发育障碍、青春期延迟,有时可见背部毛发增多,成人期患病则出现月经紊乱,以月经过多为常见,因疾病早期无特异性表现,常感乏力、畏寒、纳差、少汗、便秘和嗓音粗哑,故在月经过多患者中做TSH试验可发现不少早期甲减者。尚发现甲减者伴经前综合征,应予以重视,病情重时有闭经、性欲减退、阴毛脱落,尚有黏液水肿面容等众多系统功能低下的表现。

2. 甲状腺功能亢进症

甲亢,女性多于男性,以20~40岁多见。甲状腺激素分泌过多所致,常是多系统出现病理变化,起病缓慢,常有精神创伤史。

(1) 临床表现:临床表现为新陈代谢增加,神经、心血管系统功能亢进和甲状腺肿大。病因众多,以突眼性甲状腺肿最常见。甲状腺激素分泌过多时,可导致生殖生理功能紊乱,如月经周期缩短或延长,月经量减少,甚至闭经。对生殖能力的影响不一,有的无排卵,有的虽有月经异常但仍有排卵,甚至能受孕。因此,对闭经者应考虑有妊娠的可能。

(2) 内分泌的变化:据实验研究有如下发现,血液中雌激素增加,在月经的周期中均比正常时高2~3倍,血中SHBG增加,17 β -雌二醇的代谢清除率降低,此可能是17 β -雌二醇与GHBG结合增加所致。在卵泡期或黄体期的LH平均水平均比正常人高2~3倍;在月经规则的甲亢者LH峰值稍低于正常人;闭经者无LH峰性分泌,亦无排卵。尚发现甲亢时雄激素增加,睾酮和雄烯二酮升高,睾酮代谢清除率降低,而雄烯二酮代谢清除率不变;雄烯二酮转化为雌酮和睾酮转化为雌二醇的转化率均增加。

3. 甲状腺疾病与妊娠

妊娠后的生理变化明显,甲状腺功能与新陈代谢密切相关,故非仅为妊娠的需要,且受妊娠后生殖激素变化的影响。因此,妊娠期甲状腺功能变化明显,而甲状腺功能异常也影响妊娠。

(1) 妊娠期甲状腺功能的改变:妊娠后雌激素水平日增,促使肝脏中甲状腺结合球蛋白(TBG)合成,血清TBG升高。为了稳定血中FT₄水平,甲状腺释放出大量T₄,故血中总T₄浓度升高,而FT₄在正常范围。此外T₄的转换率正常,hCG与TSH的 α 亚单位相同,虽hCG的TSH样生物活性仅是TSH的1/4000,但妊娠早期hCG明显升高,可使甲状腺的FT₃、FT₄轻度升高,妊娠晚期则降至正常范围或正常低值。妊娠期碘经胎盘排出,且肾小球滤过率增加,但肾小管对碘重吸收降低,使血中无机碘减少,母体相对缺碘,因而甲状腺释放碘以维持碘的平衡。可见甲状腺吸¹³¹I率增高,高峰值前移,有类似甲亢表现。故妊娠期甲状腺增大,甲状腺细胞增生,若缺碘则导致代谢性甲状腺肿大,因此妊娠期应增加碘的摄入。

(2) 妊娠合并甲亢:较少见,其中以突眼性甲状腺肿最常见,诊断明确后,病情并不难控制。妊娠早期症状有轻度加重,随妊娠的进展,甲亢有所缓解,此可能与妊娠期免疫功能抑制有关。但妊娠合并轻、中度甲亢时诊断比较困难,因妊娠后的生理变化会出现类似甲亢的临床表现,因此临床警惕性至关重要,例如,严重的持续呕吐就应与甲亢作鉴别。当疑有甲亢时应测 T_3 。 T_3 升高,而 $TSH < 0.3mU/L$ 时为甲亢的有力证据, $T_4 > 193.5nmol/L$ 时亦提示为甲亢。轻度甲亢时可休息,加强营养,不一定用药物治疗,但必须密切观察。中、重度者应进行治疗,以防止病情发展,甚至因分娩、手术产或感染而激发甲状腺危象。药物治疗时以控制 FT_4 在正常范围的高限为宜,对胎儿的甲状腺功能最适合。应慎防导致胎儿甲状腺肿或甲减。妊娠期放射性碘治疗应列为禁忌。若无法进行药物治疗,可在妊娠中期做甲状腺切除术。轻、中度甲亢一般不影响妊娠,能否导致妊娠高血压综合征或胎儿畸形,尚未见确切的研究报道。

(3) 妊娠合并甲减:很少见。甲减时常有排卵障碍,且流产、死胎和胎儿畸形发生率较高。 TSH 升高为原发性甲减的主要诊断依据,一经诊断应立即进行替代治疗。

三、松果体与生殖

1. 松果体的发生与解剖

松果体是由来源于第3脑室的变形管膜细胞形成的具有分泌功能的器官。其外观呈扁平锥形,状似松果,体积小,重量约 100~150mg,借一短而细的柄与间脑顶部相连并向第3脑室突出,无血脑屏障。松果体的组织成分主要是松果体细胞(pinealocyte),直接受来自交感神经元的神经末梢所支配,具有生物合成的功能。松果体在出生后与中枢神经的联系即消失,代之以主要来自颈上交感神经节的神经纤维。

2. 松果体功能

早年只有少数关于松果体与男孩的性早熟和青春期发育异常的报道,常被人们认为是一个遗迹而被忽视。19世纪50年代末期,对松果体功能的探讨持续而迅速地展开,发现松果体主要是由松果体细胞分泌褪黑素(melatonin, MEL),尚有神经肽类物质如加压素、肾素血管紧张素、ACTH 和其他与前阿片类黑色皮质素(proopiomelanocortin, POMC)有关的肽类。至于肽类的作用尚不清楚,但褪黑素在人类的重要性则已被确定。现认识到松果体与其他腺体不同,它是一个神经内分泌转能器,将从交感神经所接受到的神经信号转换为褪黑素,分泌到达机体的有关部位。

(1) 褪黑素的合成:褪黑素的结构为 *N*-乙酰-5-甲氧基色胺,在松果体细胞内将来自血循环的基质(substrate)色胺酸合成为 5-羟色胺,再经两种酶的作用,首先由 *N*-乙酰转移酶(*N*-acetyltransferase, NAT)将 5-羟色胺乙酰化,后经羟化吲哚-*O*-甲基转移酶(hydroxyindole-*O*-methyltransferase, HIOMT)将吲哚环甲基化而

合成褪黑素。

褪黑素每天的节律性分泌是受“暗-光”变化的调控,黑暗诱发其分泌而光照则抑制其分泌。环境信息(光照信息)是经过神经通道而进入松果体。这通道若被阻断,能使松果体随“光-暗”变化的节律性活动消失。

现已证明,松果体细胞的活动是受中枢神经通过去甲肾上腺素的调控,细胞内 NAT 的活动决定褪黑素的分泌节律,而 HIOMT 的活动则决定褪黑素升高的幅度。

在松果体细胞膜上的 β -肾上腺能受体,具有 24h 节律性变化,受体的数量由傍晚开始增多,午夜达最高峰,下半夜由于“降调节”,受体的数量逐渐下降。

(2) 褪黑素的代谢:褪黑素属亲脂类物质,从细胞渗出进入血循环迅速扩散到其他体液,包括唾液、脑脊液、精液、卵泡液和羊水。测定褪黑素的血浓度能反映松果体的生理活动。褪黑素在肝脏代谢成羟化型,大部分与硫酸结合,约 1% 以原型由尿中排出,大部分以 6-羟化褪黑素硫酸盐形式排出。

(3) 褪黑素受体:机体内许多组织都具有褪黑素受体,如大脑、视网膜、性腺和子宫。最近在人脑、垂体用 ^{125}I 对褪黑素的研究已发现褪黑素最明显的结合部位是下丘脑的上交叉神经核,在垂体的结节部(pars tuberalis)则无此受体。

3. 褪黑素的作用

(1) 褪黑素与生殖功能:松果体被认为是产生抑制性腺功能的物质褪黑素的腺体。动物实验证明:①松果体的各种破坏性肿瘤伴随着性早熟,去松果体或调节光照时间能加强鼠类的卵巢功能;②外源性的褪黑素能抑制几种啮齿类动物的卵巢功能;③某些季节性繁殖的动物,春夏季日照时间长则繁殖生育旺盛,秋冬季日照时间短则繁殖生育能力被抑制。实验提示,褪黑素是通过改变 GnRH 的脉冲频率来调节产生 LH 脉冲的神经元,从而决定其季节性生殖状态,说明光照控制作用是在大脑,而不是直接作用于垂体。

在人类也观察到某些地区的出生率有季节性的差异,特别是季节性光照差别较大的地区如北极地区以及瑞典和芬兰。不同强度的光照可迅速抑制夜间褪黑素的升高。给予 atenolol,一种 β -肾上腺能受体阻断剂能完全抑制褪黑素的产生,证明人类“光-暗”周期的调节也与其他哺乳类动物相同,光的信息是通过 β -肾上腺能途径。褪黑素可能也参与人类 H-P-O 轴的成熟过程。但有事实说明,褪黑素对生殖功能的控制不是完全必要的,因鼠类去松果体数周后,能恢复正常生殖功能。

1) 褪黑素与青春期:对各种资料的综合,比较一致的意见为:

- a. 出生后 1~3 个月松果体分泌的褪黑素水平低,无昼夜节律。
- b. 约 3 个月后松果体分泌褪黑素出现昼夜差异,血褪黑素水平升高,特别是夜间。
- c. 出生后第 1 年或第 2 年后血褪黑素明显下降,特别是夜间,如 2 岁时夜间水平为 1300pmol/L ,6 岁为 900pmol/L ,10 岁 $< 450\text{pmol/L}$;
- d. 随儿童期年龄的增长,松果体分泌褪黑素的量出现明显的昼夜节律,但分泌量并不随着年龄而变化;

e. 血褪黑素水平的下降与松果体的产量及青春期无关,而与人体的体块指数(body mass index)增加有关,即松果体产生褪黑素的量不变而由于人体体块指数的增加,导致血褪黑素的下降。

f. 血中褪黑素水平继续明显下降到性发育成熟为止。

g. 自成年后到老年与儿童不同,血褪黑素水平呈现缓慢、持续下降,其与人体体块无关,而是由于松果体分泌量的缓慢减少,成年人随着年龄的增长,褪黑素的昼夜分泌差别也减少。

青春期是从婴儿、儿童期的性发育不成熟,到成年人性发育成熟的突变时期。在中枢从 H-P-O 轴不活跃的平衡状态到 H-P-O 轴再度活跃的另一个平衡状态,一般认为导致转变的机制是属于下丘脑对性激素敏感度的改变。在松果体及其分泌物褪黑素的研究工作中,首先发现褪黑素具有抗促性腺素的作用,松果体在出生时即开始分泌褪黑素,且浓度高,足以抑制出生时即已成熟的 GnRH 脉冲神经元。成年后随着年龄的增加,与体块指数负相关的褪黑素血浓度逐渐下降,它的抑制作用也随着减弱。当褪黑素的血浓度达临界量(约 500pmol/L)时,即失去其抑制作用, GnRH 脉冲神经元再度活跃,导致性发育和性功能的成熟。综合以上对松果体和褪黑素的研究报道,提示褪黑素血浓度的变化与性成熟过程相符,因此褪黑素有参与导致青春期启动的可能性。1986 年 Gupta 等报道,性早熟儿童的血褪黑素水平低,而性延迟儿童的褪黑素水平高,与上述观点相符。Sizoneoko 等提出肾上腺功能初现通过褪黑素变化促使青春期成熟,但对正常和青春期失调儿童的研究中,夜间褪黑素的分泌模式与肾上腺功能初现的临床征象无关。另有对灵长类动物去松果体而不影响青春期发育的报道,故也不支持此观点。可见,褪黑素与青春期的成熟启动机制的关系,尚有待大量的理论和临床的研究来阐明其可信性。

2) 褪黑素与月经周期:青春期后,随着性成熟,褪黑素的分泌维持在较稳定的昼夜节律水平上。其分泌量随着年龄逐渐缓慢地下降,到老年时其昼夜差异也减少。许多关于褪黑素在月经周期中变化的研究报道结果很不一致,甚至互相矛盾。Berga 等(1990)严格地选择具有正常排卵功能的妇女,测定 FSH、LH、E₂、P 作为月经周期分期的基础,测定早、晚卵泡期和早、晚黄体期褪黑素的昼夜分泌水平(日间每小时、夜间每 30 分钟一次),结果为日间水平约等于或低于 43pmol/L,夜间平均水平为 170~ 220pmol/L。因此,认为具有正常排卵功能的女性,虽在月经周期的 4 个阶段中有明显的性激素波动,而褪黑素的昼夜分泌节律则无明显的变化,说明褪黑素的分泌模式不受性激素波动的影响,但仍存在着因褪黑素昼夜节律分泌的改变可能影响下丘脑 GnRH 脉冲元从而影响月经周期。

在 1982 年, Walker 等试图在大白鼠的实验中探讨 LH 峰与光照的短暂关系是否受松果体分泌褪黑素的影响。如果在大白鼠的动情前期延长光照时间,会推迟褪黑素的合成时间,可使 LH 峰终止的时间延迟,然而光照期虽然延长,若在原来暗期开始的时间如 19 时给予褪黑素, LH 峰期可正常终止;如果给予褪黑素的时间提早在 13 时或 17 时,则分别导致 LH 降期的受阻或提前终止。有报道,褪黑素能阻断 5-羟色胺受体,而 5-羟色胺能启动 LH 峰期。若用一种 5-羟色胺受体激动剂喹哌嗪

(quipazine)可对抗褪黑素的抑制作用。例如,在 16 时给予褪黑素的前 30min 即 15:30 给予喹哌嗪,可阻断褪黑素的作用,若在给予褪黑素之后 30min,再给予喹哌嗪,则可使 LH 水平部分恢复。因此,褪黑素对 LH 峰期的抑制作用是其作用于大脑含 5-羟色胺神经元的结果。

3) 褪黑素对卵巢功能的直接作用:大多数的研究资料都证明,褪黑素对生殖功能的影响是通过垂体和中枢神经系统,由于抑制垂体对 GnRH 的反应或直接抑制下丘脑 GnRH 脉冲。但褪黑素也能直接作用于卵巢。猫与鼠的卵巢比其他器官更能吸取³H 褪黑素。仓鼠、大白鼠和人的卵巢内皆具有褪黑素受体,与褪黑素的结合都超过其他器官。诱发周期和自然月经周期的卵泡液中都含有较高浓度的褪黑素,约 3 倍于血清褪黑素的水平,说明卵巢具有褪黑素作用的条件。

有些报道认为,褪黑素能直接调节卵巢的类固醇合成,但在具体实验中又出现许多相互矛盾的结果。Brzezinski 等在人体外受精(IVF)卵泡液中提取的黄素化颗粒细胞培养基中,观察褪黑素对合成孕酮和 17- β 雌二醇的影响,提示褪黑素对雌激素的合成无影响,也不影响孕酮的基础产量,但增强黄素化颗粒细胞对 hCG 的反应,并认为生理量的褪黑素可能参与黄体功能的调节作用,而异常水平的褪黑素可能改变卵巢功能。另有报道,褪黑素能抑制 hCG 对兔子卵泡的刺激作用。此外,尚有证据说明褪黑素能影响依赖雌激素生长的肿瘤,在培养基中生理浓度的褪黑素能抑制人的乳腺癌细胞,从而估计褪黑素有可能直接抑制卵泡的增生。褪黑素强化黄素化颗粒细胞对 hCG 的反应,以调节类固醇的合成如产生孕酮。褪黑素与儿茶酚胺的作用相似,如某种 β -肾上腺能激动剂、去甲肾上腺素等具有增强 hCG 的刺激作用而自己则没有刺激作用,因此儿茶酚胺和褪黑素可能是通过同样的受体刺激腺苷酸环化酶。今后若能观察到自然月经周期的卵泡液中褪黑素的水平和它对类固醇合成及卵母细胞成熟的直接作用,将有助于对褪黑素参与调节卵巢功能意义的理解。

4) 褪黑素与中枢性性腺功能低下:Berga 等(1988)和 Drzezinski 等各自对促性腺激素低下、性腺功能低下的不育者作褪黑素测定,发现夜间峰值与对照组相比分别为 $712 \pm 100 \text{ pmol/L}$: $314 \pm 110 \text{ pmol/L}$ 和 $698 \pm 168 \text{ pmol/L}$: $358 \pm 34 \text{ pmol/L}$ 。提示这些不育者的夜间褪黑素水平明显高于具有正常生育功能者。若夜间褪黑素水平 $> 500 \text{ pmol/L}$ 达数小时之久,则可能抑制 GnRH 脉冲元,从而干扰卵巢功能,说明褪黑素可能引起生殖功能的病理状态。

(2) 褪黑素与其他肽类激素:有征象提示褪黑素与 PRL 的分泌呈正相关,在鼠类给予褪黑素后 1h 血 PRL 上升;在有些高催乳素血症,褪黑素水平也高。至于褪黑素如何影响 PRL 的机制尚不清楚,可能是通过抑制下丘脑多巴胺的释放,或作用于中枢神经通过 5-羟色胺诱发的神经传递。

近年关于人松果体与阿片类肽分泌之间关系的研究报道显示,给予外源性阿片制剂后血褪黑素水平上升,血 β 内啡肽水平下降,提示内源性阿片与松果体之间可能存在反馈作用。

第三节 内分泌异常对生殖的影响

一、高雄激素血症

雄激素是女性生殖生理过程中一种非常重要的激素,是卵泡合成雌激素的前体。但当雄激素过多时,则引起痤疮、多毛、月经过少,甚至闭经而影响生殖功能,此外尚与肥胖、糖代谢和脂代谢有关。

1. 正常女性雄激素

(1) 雄激素的来源:女性体内雄激素的合成主要在卵巢和肾上腺,此外有部分在外周组织中合成,称腺外合成。

1) 卵巢:卵巢中的卵泡、黄体 and 间质均能合成雄激素,由其中的泡膜细胞、泡膜黄体细胞和泡膜间质细胞合成(图 7-13)。



图 7-13 卵巢中雄激素的合成途径

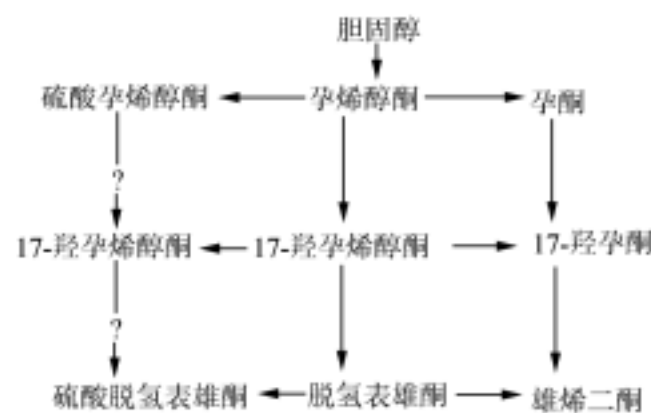


图 7-14 肾上腺中雄激素的合成途径

卵巢主要合成睾酮,0.1mg/d 和雄烯二酮(Δ^4 -A)1~2mg/d。尚有脱氢表雄酮(DHEA)<1mg/d,主要由间质细胞合成。绝经后卵巢静脉中雄激素高于动脉中的含量,也提示由卵巢间质所分泌。

卵巢中的雄激素合成主要受 LH 调节,LH 与卵泡膜细胞上的受体结合,激活酶活性,合成雄激素。

2) 肾上腺:雄激素的合成在束状带和网状带,主要合成硫酸脱氢表雄酮(DHEA-S)6~24mg/d 和脱氢表雄酮<1mg/d。DHEA-S 主要由 DHEA 磺酰化而来,由硫酸孕烯醇酮而来者甚少(图 7-14),雄烯二酮合成量为 1mg/d。生理情况下肾上腺仅分泌少量睾酮。肾上腺中雄激素的合成受 ACTH 的调节。

3) 腺外合成:主要为雄激素之间的转化或雌激素与雄激素之间的转化,故又称腺外转化。转化的部位有肝、肺、肌肉、脂肪、毛囊和皮脂腺等处,以脂肪和肌肉为主要转化部位,雌酮和脱氢表雄酮转化为雄烯二酮;雄烯二酮和脱氢表雄酮转化为睾酮,睾酮和雄烯二酮在皮肤中经 5- α 还原酶转化为双氢睾酮(表 7-1)。

表 7-1 女性雄激素的来源

雄激素	内分泌腺/%		腺外转化/%				
	卵巢	肾上腺	睾酮	雄烯二酮	硫酸脱氢表雄酮	脱氢表雄酮	雄烯二醇
睾酮	25	25	-	50	-	极少量	-
雄烯二酮	50	50	-	-	-	极少量	-
脱氢表雄酮	20	50	-	-	30	-	-
硫酸脱氢表雄酮	-	90	-	-	-	10	-
双氢睾酮	-	-	15	60	-		

(2) 雄激素水平和代谢:女性体内雄激素有三个来源,曾认为月经周期中有相应的雄激素分泌,但大多认为月经周期中无大的变化,血中水平虽有变化,但相对稳定(表 7-2)。

表 7-2 月经周期中血浆雄激素水平

雄激素	均值	范围
睾酮(nmol/L)	1.215(0.35ng/ml)	0.520~ 1.907(0.15~ 0.55ng/ml)
雄烯二酮(nmol/L)	4.886(1.4ng/ml)	2.443~ 12.215(0.7~ 3.5ng/ml)
脱氢表雄酮(nmol/L)	14.57(4.2ng/ml)	9.37~ 27.07(2.7~ 7.8ng/ml)
硫酸脱氢表雄酮(mol/L)	4.320(1.6g/ml)	2.160~ 9.180(0.8~ 3.4g/ml)

女性睾酮的合成总量为 0.35mg/d,其中直接由卵巢分泌的为 0.1mg/d;由腺外合成,来自雄烯二酮的为 0.2mg/d,来自脱氢表雄酮的为 0.05mg/d。因卵巢分泌的雄烯二酮与肾上腺所分泌的量相仿,故可说睾酮的 2/3 来自卵巢,因此将睾酮作为卵巢雄激素的标记。硫酸脱氢表雄酮 95% 由肾上腺合成,因此将其作为肾上腺雄激素的标记。

睾酮中仅少量代谢为睾酮葡萄糖苷酸(testosterone glucoronide),主要代谢成雄烯二酮,再以雄酮(androsterone)与葡萄糖苷酸结合,再经尿排出;而 DHEA、DHEA-S 和 Δ^4 -A 均代谢为雄酮,最终代谢物均由尿液排出。因代谢物为 17-酮类固醇(17-KS),故尿中 17-KS 的量主要代表 DHEA-S 的量,反映肾上腺素来源的雄激素的情况。双氢睾酮经 β -酮类固醇脱氢酶还原成 3 α -雄烷二醇,再与葡萄糖苷酸根结合成雄烷二醇葡萄糖苷酸(3 α -diol-G),由尿中排出(图 7-15)。故尿中 3 α -diol-G 的量能很准确地反映在外周转化成双氢睾酮的情况。因此,将 3 α -diol-G 作为腺外合成雄激素的标记。

(3) 雄激素的生物活性:女性体内的雄烯二酮和 DHEA 均为作用较弱的雄激素,雄烯二酮的作用仅为睾酮的 10%~ 20%,DHEA 的作用为睾酮的 5%。以睾酮和双氢睾酮最具生物活性,双氢睾酮的生物活性为睾酮的 2~ 3 倍。循环中的睾酮,约 85% 与性激素结合球蛋白(SHBG)相结合,10%~ 15% 与白蛋白结合,仅 1%~ 2% 的睾酮呈游离状态,称游离睾酮。结合状态的睾酮不具生物活性,仅有游离状态

的睾酮具有生物活性。SHBG 在肝脏中合成,雄激素和肥胖时可降低 SHBG 的浓度,雌激素和地塞米松能升高 SHBG 浓度,故上述因素和肝脏功能状况直接影响 SHBG 的浓度。SHBG 浓度的高低影响游离睾酮的浓度,从而影响其发挥雄激素的生物效应。为此有报道认为,“游离雄激素指数”(free androgen index) $T(nmol/L)/SHBG(nmol/L)$ 比体内的睾酮值更能反映雄激素活性。但雄激素必须与细胞的雄激素受体结合后方能作用于靶细胞发挥其生物效应,故雄激素受体也是影响雄激素生物效应的一个重要因素。

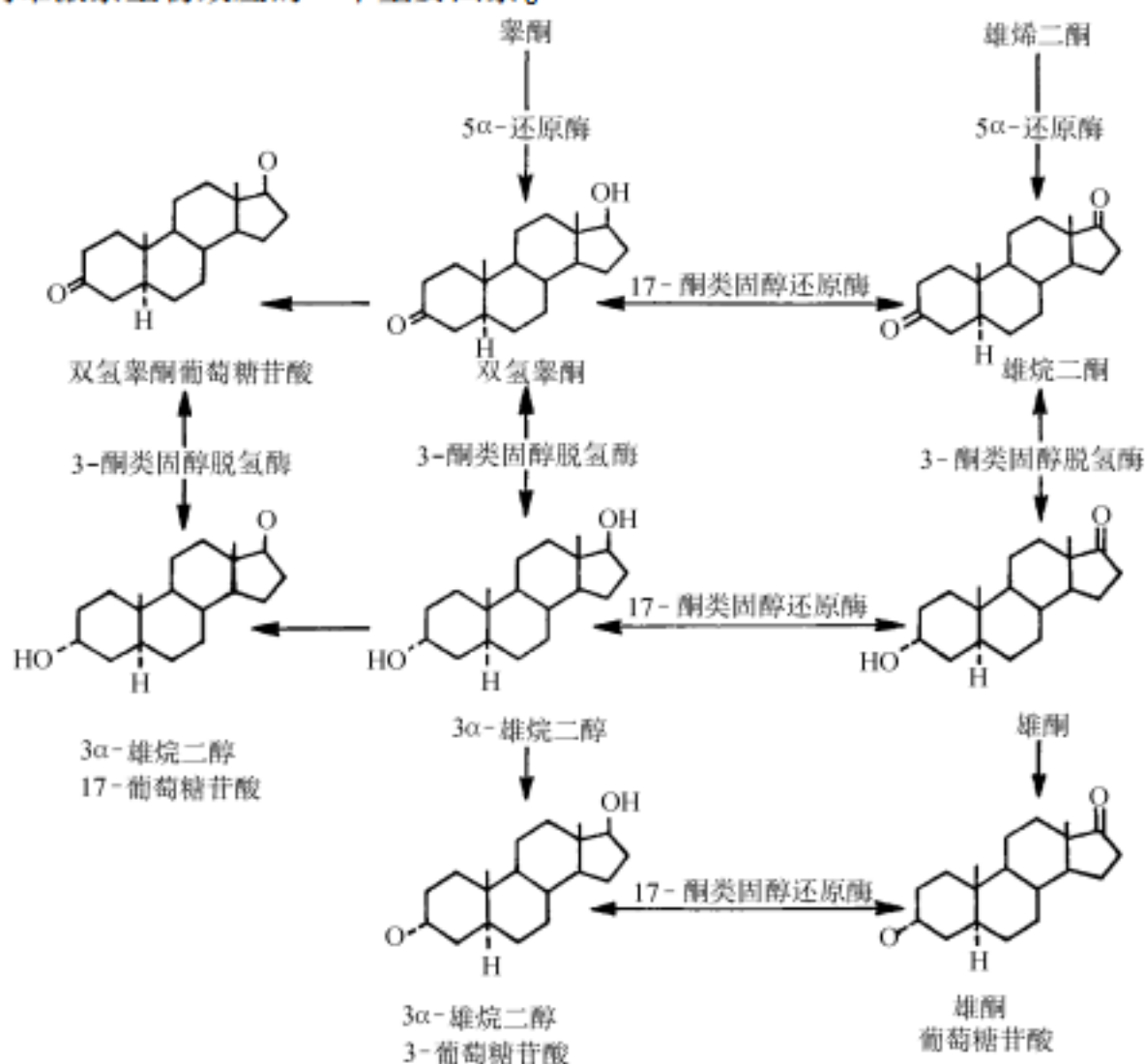


图 7-15 雄激素的分解代谢

2. 高雄激素血症的病理生理

(1) 多毛:毛囊皮脂腺单元是毛发和皮脂的源地,均受雄激素的影响。人体的毛发有不同的类型,分为毫毛和恒毛。毫毛细软、无髓且色淡;恒毛粗、有髓且有色。毛发的生长期可分为生长期(初期)、退化期(中期)和静止期(终期)。毛发的生长受生长激素和雄激素的影响,生长激素使毫毛成为恒毛。但并非所有毛发都受雄激素影响,只有性毛方受雄激素影响。在其影响下性毛可以从毫毛成为恒毛,或从恒毛成为毫毛(例如男性型秃顶)。一旦从毫毛成为恒毛,则今后不论激素的状况如何,仍为此型。对雄激素起生物效应的毛发为性毛。受性激素影响不大的毛发为非性

毛,如眉毛、睫毛、头发(颞部除外)、前臂和下肢处毛发。除阴毛和耻毛外,其他的性毛往往分布在躯体的中线,如面、胸和腹部。不同部位的毛囊对激素反应的阈值不一,如耻骨联合处阈值较低,对雄烯二酮和睾酮易有生物效应;腋毛则阈值较高。典型男性毛发分布的部位如唇、耳、胸、耻部三角区等处阈值高,对正常女性的雄激素水平无反应。对毛囊最具生物活性的雄激素是在腺外合成的双氢睾酮,即由睾酮经 5α -还原酶的还原作用而来。当体内双氢睾酮升高时,即使睾酮正常时亦会导致多毛。一般认为,女性出现多毛而无男性化征象时睾酮水平在 5.205nmol/L (150ng/dl) 以下。

(2) 肥胖:高雄激素血症常与肥胖伴存,关系密切,现知脂肪组织是类固醇激素的一个重要代谢场所。脂肪组织中的芳香化酶将外周循环中的雄激素转化为 E_1 和 E_2 。研究证实,雄烯二酮转化为 E_1 的量与脂肪组织的总量明显相关;血浆中 E_1 和 E_2 的浓度也与脂肪量密切相关,可见脂肪组织中存在高度活性的腺外转化。高雄激素血症时 SHBG 的浓度下降,使游离 E_2 增加。脂肪组织中有雌激素受体,雌激素使脂肪生长和脂肪细胞分裂,且控制三酰甘油的贮藏。循环中 E_1 增加,作用于中枢促使 LH 释放增加,循环中升高的 LH 作用于卵巢泡膜细胞,使睾酮合成增加,成一不良循环。雄激素具有控制脂肪细胞的脂肪分解作用,通过促进 α -肾上腺素能抗脂肪分解作用,导致脂肪积聚。

近年按脂肪组织的分布对肥胖进行分类,分为女性型和男性型。雌激素与孕激素协同使脂肪分布于股和臀部,而雄激素使脂肪分布于腹部和内脏,已公认女性呈现男性型肥胖时与高雄激素血症密切相关。

1) 女性型肥胖:指脂肪集聚在股和臀部,体态似一梨形。此型时主要是贮藏脂肪组织对胰岛素敏感,脂代谢异常。此型肥胖常见于女性,又称下身肥胖(lower body obesity, LBO)。

2) 男性型肥胖:指脂肪集聚在腹壁和内脏—肠系膜部位,体态似苹果。此型时脂肪组织对儿茶酚胺类分解脂肪的作用敏感,对胰岛素对抗分解脂肪的作用不敏感,因此更易输出三酰甘油,常伴有高胰岛素血症、糖耐量异常和糖尿病。雄激素合成增加,性激素结合球蛋白水平下降,从而游离睾酮和雌二醇增加。尚发现易有脂代谢异常、高血压和心血管疾病,此型肥胖常见于男性,又称上身肥胖(upper body obesity, UBO)。

据报道,一组月经正常、无多毛的男性型肥胖妇女,其雄激素生成与对胰岛素敏感性和肝脏胰岛素清除间接相关,与胰岛素合成无关。尚发现男性型肥胖的女性雄激素水平升高,血糖和胰岛素升高,拮抗胰岛素和心血管危险因素(胆固醇、LDL 升高和血压升高)增加。在一组手术减肥的病人中发现,术后 DHEA 的水平未变,但睾酮水平下降 2 倍,提示内脏脂肪组织中可能存在着雄激素的转化。

(3) 月经失调:肥胖女性常有月经闭止或月经稀发,早已被临床重视。近年肥胖与高雄激素的关系逐渐阐明,提示女性雄激素过高时影响月经周期,甚至生殖功能。

雄激素过高时在卵巢干扰卵泡的正常发育,可使卵泡发育停滞。雄激素过高时

还易在脂肪组织中转化为雌酮,使雌酮水平升高,与雌二醇的比例失调,既影响卵泡的正常生长,又导致对中枢的反馈异常。常引起中枢分泌 LH 增加,FSH 与 LH 失调,不但影响卵泡的生长,而且 LH 又促使卵巢合成雄激素,成一恶性循环。雄激素升高可使性激素结合球蛋白的水平下降,使游离雄激素和游离雌二醇增加,这又导致正常月经周期时性激素的平衡失调,势必影响卵泡的正常生长、成熟和排卵。因此,高雄激素血症时往往导致月经失调,如无排卵月经、功能性子宫出血(无排卵型)、继发闭经或黄体功能不全。

(4) 高胰岛素血症:早在 1921 年,Achard 等报道了高雄激素和高胰岛素的肥胖女性病例。多囊卵巢综合征时往往出现雄激素与胰岛素升高伴存,可谓妇产科领域的典型病例。

高雄激素和高胰岛素的发病机制现有三种假说:高雄激素血症引起高胰岛素血症;高胰岛素血症引起高雄激素血症;两者由某一未知因素引起。

雄激素引起胰岛素和糖代谢异常的机制未明,但用雄激素治疗时,曾发生高胰岛素和糖耐量异常。据报道,多囊卵巢综合征时空腹胰岛素和雄烯二酮、胰岛素和睾酮呈正相关,葡萄糖激发的胰岛素水平和睾酮水平呈正相关。实验研究发现,在鼠的肝细胞中,睾酮抑制胰岛素的结合和清除。因此,理论上提示睾酮可导致高胰岛素血症。近年来报道在肥胖女性,无论有无多囊卵巢综合征,其睾酮水平与胰岛素基值和葡萄糖激发的胰岛素值直接相关;睾酮水平与胰岛素对抗程度以及对红细胞和 T 淋巴细胞与胰岛素结合和降解的损害程度直接相关。近年发现,脱氢表雄酮增加对胰岛素的敏感性与睾酮的作用相反,但更多的临床和实验资料显示,高雄激素并不引起高胰岛素血症,如在多囊卵巢综合征者用 GnRH 激动剂或醋酸环丙氯地孕酮使循环中雄激素下降,但高胰岛素血症却无改善。较多的研究报道,支持高胰岛素血症导致高雄激素血症,如多囊卵巢综合征者给予大量胰岛素后引起循环中雄烯二酮或睾酮升高(各报道不一)。在一葡萄糖激发试验的研究中发现,激发后胰岛素、雄烯二酮、睾酮和双氢睾酮均明显增加。另有报道,在高雄激素和高胰岛素的肥胖女性节食后胰岛素和雄激素均降低,此提示体重减轻后导致胰岛素下降,从而减少卵巢中雄激素合成。实验研究证实,胰岛素可使卵巢间质合成雄激素,从而导致高雄激素血症,其可直接作用或经过与 IGF-I 受体结合起作用。近年发现,基因突变导致高胰岛素血症,提示雄激素高是继发的。

近 20 年来发现,高雄激素、高胰岛素时可伴有黑棘皮症,称高雄激素-抗胰岛素-黑棘皮综合征(hyperandrogenism-insulin resistance-acanthosis nigricans syndrome,HAIR-AN 综合征)。黑棘皮产生的原因未明,可能与胰岛素、IGF-I、表皮生长因子和睾酮等有关,HAIR-AN 综合征的主要病变是拮抗胰岛素,代偿性高胰岛素血症,伴存的高 LH 水平促使卵巢间质和泡膜细胞合成雄激素。故本综合征中大部分病例的高雄激素为卵巢合成。黑棘皮症是重度高胰岛素和重度高雄激素时的皮肤病变,组织学显示角化过度、表皮乳头瘤病和着色过深。

HAIR-AN 综合征的病因未明,但已发现拮抗胰岛素与两个因素有关:其一为遗传因素,即胰岛素受体的基因突变干扰了受体的功能。不同个体的基因突变部位

可不同,遗传方式为显性或隐性。遗传因素引起的高胰岛素血症,即拮抗胰岛素,称为A型。另一引起胰岛素对抗的因素为自体免疫,即机体产生的胰岛素受体的自身抗体与胰岛素受体结合,从而阻断了胰岛素与受体结合,无法发挥生物活性。此种免疫异常为获得性,称B型,常与免疫性疾病伴存,如系统性红斑狼疮、胆汁性肝硬化等。

(5) 脂代谢异常:性激素对脂代谢的影响不一,雄激素增加肝脂肪酶的活性,引起高密度脂蛋白的降解,使血清高密度脂蛋白的水平降低。雄激素增加肝脂肪酶活性而加强了极低密度脂蛋白的分解代谢,使低密度脂蛋白的血浆水平增加,雄激素还有加强从肝脏中动员三酰甘油的作用。

高雄激素血症时常导致腹部和内脏脂肪增加,而高浓度的睾酮使该部位的脂肪分解,血浆中游离脂肪酸增加。有研究报道,腹部肥胖者门静脉中游离脂肪酸的浓度比股、臀部肥胖者高20~40倍。高浓度的游离脂肪酸抑制了高密度脂蛋白中胆固醇的酯化,降低了高密度脂蛋白将胆固醇从外周转运到肝脏的转运效能;游离脂肪酸增高使肝脏极低密度脂蛋白的合成增加,最终导致血清胆固醇和三酰甘油的升高。血中游离脂肪酸升高还导致葡萄糖转运减少,且抑制肝脏对胰岛素的清除。已有大量事实证明,高胰岛素血症会导致高密度脂蛋白降低,极低密度脂蛋白增加,可见高雄激素血症和高胰岛素血症对脂代谢异常的恶性循环作用。

3. 临床表现

(1) 多毛:指女性体表和面部生长出的恒毛过多。女性多毛大多由雄激素过多引起,性毛的毛囊皮脂腺单元对雄激素敏感,尤其是双氢睾酮,故高雄激素血症引起的多毛主要表现为性毛过多。另一种多毛表现为全身柔毛增加,尤其在四肢部位,可见于肾上腺皮质醇增多症。性毛过多时可伴有脂溢和痤疮。

(2) 月经失调:雄激素过高常干扰卵泡的生长成熟,而无排卵,虽可出现多种月经异常,但以月经稀发、月经过少和闭经最常见。

(3) 肥胖:指身体的脂肪过量。超重是指体重超过理想的标准。肥胖时必然体重增加,但超重者不一定是肥胖,因此应区别肥胖和超重。理论上测定躯体的密度是测定脂肪量的最准确方法,但临床不适用。现西方国家大多用体块指数计算图(body mass index nomogram, BMI)法作测定,其结果与密度测定法接近。

脂肪组织主要由脂肪细胞组成,平均含脂肪80%,水18%和蛋白质2%。每一脂肪细胞的含脂量约0.6 μ g,肥胖时含脂量可增加1倍。正常人全身脂肪细胞总数为 $26.8 \pm 1.8 \times 10^9$,肥胖时可增加2~3倍。婴儿期和围青春期中肥胖常为脂肪细胞增生和脂肪细胞肥大并存,而成人肥胖主要是脂肪细胞肥大,当重度肥胖且病程较久时,可伴有脂肪细胞增生。

现知肥胖者因脂肪分布的部位不同,其对代谢的影响不同,危害不一,腰围与臀围比例(waist hip ratio, WHR)能区别男性型肥胖或女性型肥胖。

(4) 男性化:当雄激素水平升高,睾酮水平 $\geq 6.94 \text{ nmol/L}$ (200 ng/dl)时则出现男性化。失去女性体态,肌肉增加,尤其是两肩部肌肉增加似男性,两颞部头发脱落呈颞部秃顶。声调低沉,喉结突出似男性,阴蒂呈不同程度的增大,有时性欲增加。

(5) 黑棘皮症:为皮肤呈褐黑色、稍凸出的苔样变,扪诊觉柔软。颈、腋、乳房下、腹股沟皱褶处、两大腿内侧近外阴处均为好发部位。有时黑棘皮表面出现皮垂。黑棘皮症是明显胰岛素对抗和重度高雄激素血症的外在表现,但也可能是恶性病变的表现。最常见的恶性病变是腺癌,以胃癌最常见。有作者认为,高雄激素女性中5%有黑棘皮症,胰岛素对抗的年轻女性中黑棘皮症不到30%。

二、高催乳素血症

高催乳素血症(hyperprolactinemia)是一种下丘脑-垂体-性腺轴功能失调的疾病,以血中催乳素升高为其主要表现,可以由多种原因而引起,部分是病理性的,另一部分则为功能失调。

1. 催乳素的化学结构与调节功能

催乳素(prolactin, PRL)是垂体前叶分泌的一种多肽蛋白激素,具有促进乳汁分泌的功能。最早在1928年,Stricker与Grueter从牛垂体组织提取到一种能催乳汁分泌的物质。1931年,Riddle与Braucher提出在鸽的corp囊中也有促乳汁分泌的因素。后来,化学分析手段的发展,从人、猪、马、兔、猫、鱼、羊等垂体中都可分离、提取到这种物质,其化学结构为198个氨基酸。直至1970年建立了高灵敏度的、专一性强的放射免疫测定法后,才发现生长激素也有催乳作用,其结构与PRL十分相似,但免疫学反应不同,其差别就是3个二硫键。1981年克隆了PRL的基因,此基因在人类第6号染色体上,正常垂体中催乳细胞占总细胞数的20%,垂体中所含的PRL仅为生长激素的1/100,因此过去对它缺乏认识。

近年来,有作者提到人类PRL的特异性,有些人血中PRL含量很高,却没有乳汁分泌;相反,另一些人血中PRL略有升高,则有明显的溢乳现象。现知血中PRL的分子结构有各种不同形态,它们的生物活性各异:①“小”PRL:分子量为22kDa,单节型激素,具有高亲和性与高生物活性;②“大”PRL:分子量为50kDa,为二节或三节型结构,它与PRL受体的结合力差,属低亲和性、低生物活性,但在血液循环中它可以“脱开”,转化成单节型“小”PRL,故又可表现出类似“小”PRL的生物特性;③“大大”PRL:分子量更大,为100kDa,与受体结合力差,属低亲和性;④异型PRL:分子量为25kDa,比“小”PRL的免疫反应差,但是大量存在于血浆中。

PRL在生理情况下受下丘脑的调节,下丘脑中释放的多巴胺抑制垂体分泌过多的PRL,所以妇女在一般情况下是无乳汁分泌的,只有在分娩后才有乳汁分泌,多巴胺与PRL之间又有短反馈。通过旁分泌的自身调节,促催乳细胞分泌的刺激物质与抑制物质一般认为有以下几种:

(1) 催乳素抑制因子(PIF):

1) 多巴胺:分泌多巴胺的神经元位于弓状核内,其轴突终末于中央突起部外层,目前已公认多巴胺可能是一种生理的PRL抑制因子,如果垂体门脉系统中的多巴胺水平下降20%,血浆中PRL的含量即上升20倍,在垂体前叶催乳细胞上发现有多巴胺受体,实验动物给予多巴胺类似物可显示PRL释放被抑制的现象。

2) γ -氨基丁酸(γ -amino-butyric acid, GABA):这是一种非多巴胺类的 PRL 抑制素,也可从下丘脑组织中提取出来,垂体前叶泌乳细胞上有 GABA 受体,体外试验中也显示高水平 GABA 可抑制 PRL 的分泌,其有效量比多巴胺大 10 倍,它的合成还需要中央突起部位的 L-谷氨酸盐脱羧酶(L-glutamate decarboxylase)的参与,故 GABA 不可能在垂体门脉循环中找到。

(2) 催乳素释放因子(PRF):PRF 分泌的神经元存在的部位、化学结构均不太清楚,影响 PRF 分泌的可能有以下因素:

1) 促甲状腺素释放激素(TRH):TRH 除了有促甲状腺素的释放功能外,还能够刺激垂体催乳细胞分泌 PRL,同时在催乳细胞上存在 TRH 的受体,但是 PRL 分泌量的多少不完全与 TRH 量相平行。

2) 影响血管的肠多肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP):VIP 是从小肠中分离出来的一种物质,在下丘脑与其他组织中的浓度很高,1979 年发现,垂体门脉血中的 VIP 浓度比周围血高 19 倍。在体外培养的实验中,低浓度的 VIP 即可导致 PRL 分泌和催乳细胞内 cAMP 增加。

3) 血管紧张素 II(angiotensin II):无论在体内或体外实验中均可显示血管紧张素 II 作用于特殊的受体,有 PRL 素释放时,当接受血管紧张素 II 拮抗物即阻断这种作用。血管紧张素使 PRL 分泌增加的作用比 TRH 强,作用快,10min 即达到高峰。

4) 其他:神经递质也参与 PRL 分泌活动,例如,5-羟色胺不依赖多巴胺而使 PRL 释放,也可能是阻断垂体前叶多巴胺受体,从而减弱或消除了多巴胺抑制 PRL 的作用。内源性阿片类(endogenous opioids),可通过多巴胺系统的抑制而使 PRL 释放增多。组胺(histamine)通过与组胺 1(H_1)受体与组胺 2(H_2)受体而分别产生刺激或抑制 PRL 作用。神经肽(三肽)与 P 物质(substance P)均有刺激 PRL 释放的功能。

2. 催乳素的生理功能

(1) 调节渗透作用:在脊椎动物中 PRL 有控制水与电解质平衡作用,经前期紧张症的妇女血中 PRL 在经前明显升高,故有水分潴留与水肿等症状。

(2) 调节羊水成分与容量:羊水中 PRL 浓度随妊娠月份增大而逐步升高,在孕中期含量最高,并发现在高离子溶液中 PRL 浓度低时可增加胎儿细胞外液的量与钠离子的浓度,在低离子溶液中 PRL 低时则减少胎儿细胞外液的量与钠离子浓度,加入高浓度 PRL 后则不发生上述现象,因此有保护胎儿的作用。

(3) 对乳腺的作用:乳腺组织来自内胚层,PRL 是促使乳腺小泡系统成熟与生成乳汁的重要激素。

3. 催乳素的正常值

人类生殖各期中 PRL 的变化较大,正常值低于 $25\mu\text{g/L}$ 。

(1) 胎儿期的 PRL:孕 16~19 周胎龄的胎儿 PRL 为 $53\pm 16\mu\text{g/L}$,20~34 周时为 $230\pm 30\mu\text{g/L}$,35~40 周时为 $371\pm 7\mu\text{g/L}$ 。

(2) 新生儿期第 1 周 PRL 值较高,约 $100\mu\text{g/L}$,4 周以后逐渐下降,3~12 个月

时 PRL 已降到 $10\mu\text{g/L}$ 。

(3) 发育期:女孩发育后 PRL 略有上升,可能与雌激素出现有关,在月经周期中,PRL 值有昼夜波动,卵泡期与黄体期相仿,没有明显的排卵前高峰。也有报道称,黄体期的 PRL 略高于卵泡期,PRL 血中值在 $25\mu\text{g/L}$ 内。

(4) 妊娠期:孕 8 周血中 PRL 值仍为 $20\mu\text{g/L}$,但蜕膜中 PRL 值较高。随着孕期的增加,PRL 值也逐渐上升,至足月妊娠达 $120\mu\text{g/L}$,分娩后血中 PRL 仍维持在较高水平,无哺乳的妇女产后 2 周 PRL 值下降,哺乳者经常吸吮刺激 PRL 下降较缓慢。

(5) 绝经期:PRL 值在 1 年内为 $10.09 \pm 5.68\mu\text{g/L}$,10 年以上为 $8.50 \pm 5.86\mu\text{g/L}$ 。

4. 生理性催乳素升高的原因

(1) 夜间睡眠时血中 PRL 值最高,每 10~60min 一次脉冲,初醒 1h 后 PRL 即下降,每天上午 9:00~10:00 的血中 PRL 最低。

(2) 饮食:高蛋白饮食可使 PRL 升高。

(3) 运动与精神应激时 PRL 值会升高。

(4) 性交时、刺激乳头、胸部创伤以及大手术麻醉后可使 PRL 升高。

一般妇女血中 PRL 值的变异很大,约 0~ $30\mu\text{g/L}$ 。Kleinberg 报道为 1~ $25\mu\text{g/L}$,也有报道正常月经的妇女 PRL 为 5~ $27\mu\text{g/L}$ 。

5. 高催乳素血症的病因

(1) 非垂体肿瘤性情况:① 功能性(自发性)高催乳素血症;② 药物性:如卵巢类固醇激素、西咪替丁、抗癫痫药、抗忧郁药、利血平等;③ 原发性甲状腺功能减退;④ 肾上腺功能减退;⑤ 肾功能衰竭;⑥ 胸壁创伤、疱疹与手术。

(2) 与垂体窝有关的情况:① 催乳细胞瘤;② 肢端肥大症;③ 空蝶鞍;④ 原发性甲状腺功能低下伴有促甲状腺细胞增生;⑤ 非分泌性垂体肿瘤;⑥ 颅咽管瘤;⑦ 多发性内分泌肿瘤、大脑瘤;⑧ 继发转移病灶。

(3) 其他:① 淋巴组织样垂体炎(lymphoid hypophysitis);② 结核病;③ 类肉瘤病(sarcoidosis);④ 组织细胞增生症(histiocytosis);⑤ 垂体柄创伤;⑥ 异位分泌:支气管癌、肾上腺样瘤(hypernephroma)。

6. 高催乳素血症的症状

(1) 溢乳:高 PRL 促使催乳细胞分泌亢进,在非妊娠与哺乳期出现溢乳,或断奶数月仍有乳汁分泌。轻者须挤压乳房才有乳液溢出,重者自觉内衣有乳渍,分泌的乳汁可以似清水状、初乳样微黄或呈乳白色液体,其性状与正常乳汁相仿。

(2) 闭经:垂体催乳细胞分泌亢进,随着旁分泌作用常表现为垂体促性腺分泌功能减退,所以卵巢合成类固醇激素的功能也减少,出现低促性腺与低性腺功能的闭经。高催乳素血症患者可以表现为月经稀发,随后闭经,常经检查时才发现有乳汁溢出,临床上亦称闭经溢乳综合征。但有一些患者仅有闭经而无溢乳,血中 PRL 是升高的,可能这种 PRL 的分子结构不属于小 PRL 型,故不出现促使乳汁分泌功能。

(3) 头痛、头胀:部分高催乳素血症患者是由于垂体催乳细胞肿瘤而引起,当肿瘤直径小于 10mm 时称微腺瘤,一般无明显头痛、头胀症状,如催乳细胞瘤的直径大于 10mm(巨腺瘤)时,能表现头痛与头胀。

(4) 视野缺损:肿瘤压迫视交叉神经,可以出现视野缺损的症状。

(5) 不孕:轻度高 PRL 者仍可以排卵,基础体温显示卵泡期延长,黄体期缩短,孕酮水平低下,导致黄体功能不全的表现,因此不容易怀孕,即使受精也不容易着床,常出现临床前流产或化学妊娠。

(史小林 翁 静)

第八章

避 孕

避孕是指用科学的方法使妇女暂时不受孕。避孕的原理,主要在于控制以下几个环节:①抑制精子、卵子的产生。②阻止精子与卵子的结合。③使子宫内环境不利于精子获能、生存以及不适宜受精卵的着床和生长。

第一节 女性避孕

女性常用的避孕方法有避孕药、子宫内节育器、阴道隔膜和杀精子剂等。

一、避 孕 药

服用避孕药达到避孕作用,往往影响到有关生育过程的几个环节。避孕药的作用原理尚在研究,目前所知有以下几点:

- (1) 抑制卵巢排卵功能。
- (2) 子宫内膜生长发育受到抑制或分泌发生障碍,不适宜受精卵着床与成长。
- (3) 从子宫受体水平干扰孕酮作用。
- (4) 使宫颈黏液性质改变,不利于精子穿透。

(5) 输卵管蠕动的改变,使受精卵提早或延迟进入官腔,造成子宫内膜变化与受精卵的发育在时间上不能同步,干扰受精卵的着床。所谓同步,系指第6d的受精卵,一定要种到受精后第5~6d的子宫内膜里才能发育,如果两者在时间上不一致,即称为不同步。不同药物,不同剂量,不同配伍,不同给药途径,其避孕环节亦不相同。

(一) 简 史

口服避孕药在临床应用已有30余年。1930年从黄体中分离出孕激素,它是一种甾体激素,1937年证实在不同动物使用纯粹的甾体激素后均能抑制排卵。1940

年首次人工合成孕激素(黄体酮)获得成功,肌注有效,口服效果极差。同年 Sturgis 及 Albright 证实了周期性应用雌激素,在临床上能抑制排卵。1944 年,由 Ehrenfein 合成第一个 19-去甲基甾体激素。1950 年前后,各种性激素及其衍生物纷纷合成。有根本意义的是,1956 年,美国 Pincus Djerassi 及 Colton 等人分别报道合成了 19-去甲基睾酮类孕激素炔诺酮和异炔诺酮。1956 年,美国 Pincus 及中国张明觉对人工合成孕激素衍生物进行研究,证实口服具有强的孕激素样活性及避孕作用;并进一步比较几种衍生物的孕激素活性及避孕有效剂量。1957 年,口服避孕药开始在临床应用,1958 年取得重要进展。每日服 1 片连续 22d,停药后即来月经,月经第 5d 再接着服药。当时发现如果只服孕激素甾体,则突破性出血发生率较高,为了控制突破性出血,避孕药中加进了雌激素类化合物,结果提高了避孕效果。1960 年,很多国家将其用于避孕。1960 年,我国以薯蓣皂素为原料试制成功孕激素类药物甲孕酮。1961 年,我国黄鸣龙合成甲地孕酮。1963 年试制成功炔诺酮。现在我国生产的孕激素类避孕药尚有甲孕酮、甲地孕酮、氯地孕酮、18-甲基炔诺酮等。雌激素类药物有炔雌醇(乙炔雌二醇)、乙炔雌二醇三甲醚、戊酸雌二醇、炔雌醚等。目前世界上应用甾体避孕药的人数为 1 亿人,占各种避孕措施之首位,发达国家应用甾体避孕药者占其育龄妇女的 10%~30%,1988 年上海应用避孕药占 10%。20 世纪末安全的口服避孕药、改良的长效避孕针、含药阴道环、皮下埋植剂等的研制成功,对控制人口起到更大作用。随着甾体避孕药的广泛应用,对深入研究甾体激素类化合物的结构与功能、药理、毒理、内分泌代谢遗传效应以及生殖生理、生化免疫等多方面提出要求,也促进和带动了一些学科的发展,多年来甾体避孕药的进展如下。

1. 降低剂量(以最小剂量达到避孕效果)

我国生产的复方炔诺酮片,开始时每片含炔诺酮 2.5mg,炔雌醇 0.05mg(全剂量复方炔诺酮片)。复方甲地孕酮片每片含有甲地孕酮 4mg,炔雌醇 0.05mg(全剂量复方甲地孕酮片)。1966 年将全剂量的复方炔诺酮片与复方甲地孕酮片中炔诺酮与甲地孕酮的剂量皆降低 1/2,并皆配伍炔雌醇 0.0375mg,分别称 1/2 剂量复方炔诺酮片和复方甲地孕酮避孕片,其避孕效果好,药物副作用也下降。1967 年全国会议进行鉴定,随后又将炔诺酮与甲地孕酮降为原剂量的 1/4,并分别配伍炔雌醇 0.035mg,前者简称口服避孕片 1 号(1/4 剂量复方炔诺酮片),后者称口服避孕片 2 号(1/4 剂量复方甲地孕酮片),其避孕效果好,副作用明显降低,1969 年经第二次全国会议鉴定后推广应用。1977 年又进一步降低药物剂量,推广应用复方炔诺酮 1/8 量口服避孕片,内含炔诺酮 0.3mg 与炔雌醇 0.035mg。近年来又推广应用复方低剂量左旋 18-甲基炔诺酮(LNG),内含 LNG 0.15mg 与炔雌醇 0.03mg, LNG 的孕激素活性明显强于炔诺酮。

近年来国外亦相继推广应用减量口服避孕药,为复方左旋 18-甲基炔诺酮片,剂量与国内相同。还有三相避孕药,内含 LNG 与炔雌醇,根据自然月经周期甾体激素的波动规律性,于服药的 21d 疗程内,服 3 种不同剂量,每 1 剂量分别连服 6、5 及 10d,每月服用孕激素的总量降为 1.925mg,比常规复方 LNG 片减少剂量约 40%,因而对高密度脂蛋白胆固醇的影响减少,对血管硬化起到保护性作用,避孕

效果亦良好。

1969 年开始在我国临床试用三种长效口服避孕药:复方 18-甲基炔诺酮月服片(含炔雌醚 3mg 和 18-甲基炔诺酮 12mg);复方炔雌醚月服片(含炔雌醚 3mg 和 氯地孕酮 15mg);复方 16-次甲基氯地孕酮月服片(含炔雌醚 3mg 和 16-次甲基氯地孕酮 12mg),有效率达 98% 国际妇女年。1977 年开始减量,3 种片剂都将炔雌醚降为 2~ 2.5mg,孕激素剂量也适当减少或改变配伍,减少了不良反应,避孕效果仍达 89.1%~ 96% 国际妇女年。

1974 年国内推广应用的复方庚炔诺酮(炔诺酮庚酸酯)长效避孕针,已将其中庚炔诺酮剂量由 80mg 降为 50mg,戊酸雌二醇剂量 5mg,经Ⅲ期临床试验,避孕效果不变。

2. 合成新的孕激素

具有强孕激素活性及抗雌激素作用而无雄激素活性,抑制排卵作用很强,可减少用药剂量及副作用。最近研究出的新型孕激素主要是 18-甲基炔诺酮的衍生物,称为第 3 代合成孕激素,如去氧孕烯(desogestrel)、孕二烯酮(gestodene)、诺孕酯(norgestimate)即具有上述特点,现已制成复方口服避孕片。商品名为 Marvelon,每片含去氧孕烯 0.15mg 与炔雌醇 0.03mg;商品名为 Femodeve,每片含孕二烯酮 75 μ g,炔雌醇 30 μ g;商品名 Cilest,每片含诺孕酯 250 μ g,炔雌醇 30 μ g。新型孕激素具有的受体选择指数(孕激素/雄激素比例)很接近或高于自然孕酮,其孕激素活性强于 18-甲基炔诺酮,抑制垂体促性腺激素分泌及排卵作用强,对脂代谢影响低于 18-甲基炔诺酮,服药者血中高密度与低密度胆固醇的比值较高,故不增加缺血性心脏病的发生率,还可能有保护性作用。由于该药可使血中性激素结合球蛋白(SHBG)保持高水平,较多的 SHBG 可与游离的内源性雄激素相结合,使原先由于雄激素所引起的症状消失。

3. 改变用药途径及剂型达到缓慢恒定释放微量避孕药

各种缓释系统如皮下埋植剂、阴道药环、含药宫内节育器、含药宫颈管内节育器、长效混悬剂和微囊剂避孕针等的研制成功,既可达到长效作用,又可减少每日释放药物剂量,提高了安全性。例如,含左旋 18-甲基炔诺酮阴道环,每日释放 20 μ g;国外生产的皮下埋植剂 Norplant,国内生产的皮下埋植避孕剂Ⅰ型、Ⅱ型,开始时每日释放左旋 18-甲基炔诺酮 80 μ g,16~ 18 个月后下降至 30 μ g。我国生产的新甲地孕酮避孕针,将药物做成微粒结晶及微囊型,进行缓慢释放,使每月用药剂量由 50mg 分别减到 25mg 及 15mg,避孕效果好。近年来研制可降解的皮下埋植物,其甾体避孕药的载体可随药物释放而缓慢吸收,不需取出。

4. 研究新的探亲避孕药、事后片及催经止孕剂等

如双炔失碳酯(53 号探亲避孕药)、醋炔诺酮酚,可供探亲时应用,单独应用左旋 18-甲基炔诺酮或与炔雌醇合用的事后片。20 世纪 80 年代初发现,抗孕激素的甾体激素-米非司酮,与黄体酮受体有很强的结合力,从子宫受体水平干扰孕酮作用,它是一种不具有孕激素活性、雌激素活性、抗雌激素及雄激素活性,而具有抗孕酮活性的激素,具有事后避孕、催经止孕及抗早孕作用。孕 7 周内的抗早孕过程需

与前列腺素序贯应用。小剂量米非司酮每日口服 2mg,可抑制排卵,可能会发展成新型避孕药。非甾体避孕药如黄体生成素释放激素(LHRH)也正在研究成为抗生育药物。干扰孕酮合成的甾体药物环氧司坦(epostane)已合成并通过鉴定,对事后避孕及催经止孕可能有良好前景。

5. 研究哺乳期应用的甾体避孕药

哺乳期服复方甾体避孕药,对乳汁质量与分泌量有些影响,而且药物可经乳汁被婴儿吸收。现正在研究不经乳腺的甾体激素;孕酮及甾体药物 ST-1435 具有以上特点,后者避孕效果高,无雄激素活性,经口服能迅速代谢分解,很少吸收,制成皮下埋植剂,如 Nestorone TM,适合哺乳期应用。

(二) 甾体激素避孕药的种类及其生物活性特点

人体性激素(包括雌激素、孕激素、睾丸酮等)其结构与胆固醇相似,故称类固醇物质,又称甾体,其结构是以 A、B、C 3 个苯环及 1 个 D 戊环组成,每个碳原子都有一定序号,因各序号所带基团不同,就成为具有不同性质的甾体物质。

1. 甾体激素避孕药的种类

我国目前常用的口服避孕药,就是人工合成的甾体化合物,可分为两大类,第 1 类为人工合成孕激素,第 2 类为人工合成雌激素。

(1) 常用人工合成孕激素;又可分为两大类。

1) 19-去甲基睾丸酮衍生物:在睾丸酮第 19 碳原子上的甲基去掉,即形成 19-去甲基睾丸酮。19-去甲基睾丸酮的雄激素作用较睾丸酮明显减低,但却具有孕激素样作用,因此可作为避孕药应用,常用的有以下几种。

19-去甲基睾丸酮的 17 碳原子上加乙炔基,即组成 17 α -乙炔-19-去甲基睾丸酮,或称炔诺酮;炔诺酮的 17 碳原子上经过乙酰化即组成醋炔诺酮;17 碳原子接上庚酸酯后组成炔诺酮庚酸酯;炔诺酮的 18 碳原子上加上一个甲基即组成 18-甲基炔诺酮;根据旋光性发现了左旋 18-甲基炔诺酮(LNG);炔诺酮的 3 位碳原子上酮基还原成羟基即为炔诺醇;炔诺酮 3 位及 17 位碳原子上乙酰化即组成双醋炔诺醇;在醋炔诺酮 3 位上具有环戊醚即组成醋炔诺醇环戊醚醋炔醚。这些化合物虽然在生物学特性上相互有一些差别,它们的一般活性颇类似,双醋炔诺醇、18-甲基炔诺酮、去氧孕烯等的作用较强;醋炔诺醇环戊醚有中长效作用,炔诺酮庚酸酯具有长效作用,根据炔诺酮类分子结构上 3 个重要位点的置换可影响其孕激素的作用强度及雄激素特性,主要为 18 位的甲基、11 位亚甲基及 15 位的双链,由此开发了第 3 代新型孕激素,对孕激素受体有很强的亲和力而雄激素受体亲和力微弱。睾酮及 19-去甲基睾丸酮衍生物的结构式如图 8-1。

2) 17 α -羰基黄体酮衍生物:黄体酮本身口服效力极差,然而 17 α -羰基黄体酮口服时却具有强的孕激素样作用。在 17 α -羰基黄体酮的 6 位碳原子上加上甲基即组成甲孕酮;在 6 和 7 位碳原子之间增加一双链则成为甲地孕酮;6 位碳原子上甲基换成氯,即组成氯地孕酮;在 17 位碳原子上羟基用己酸酯来代替,即组成己酸孕酮。除己酸孕酮属长效作用仅供肌内注射外,其余 4 种皆属短效,可口服或肌内注

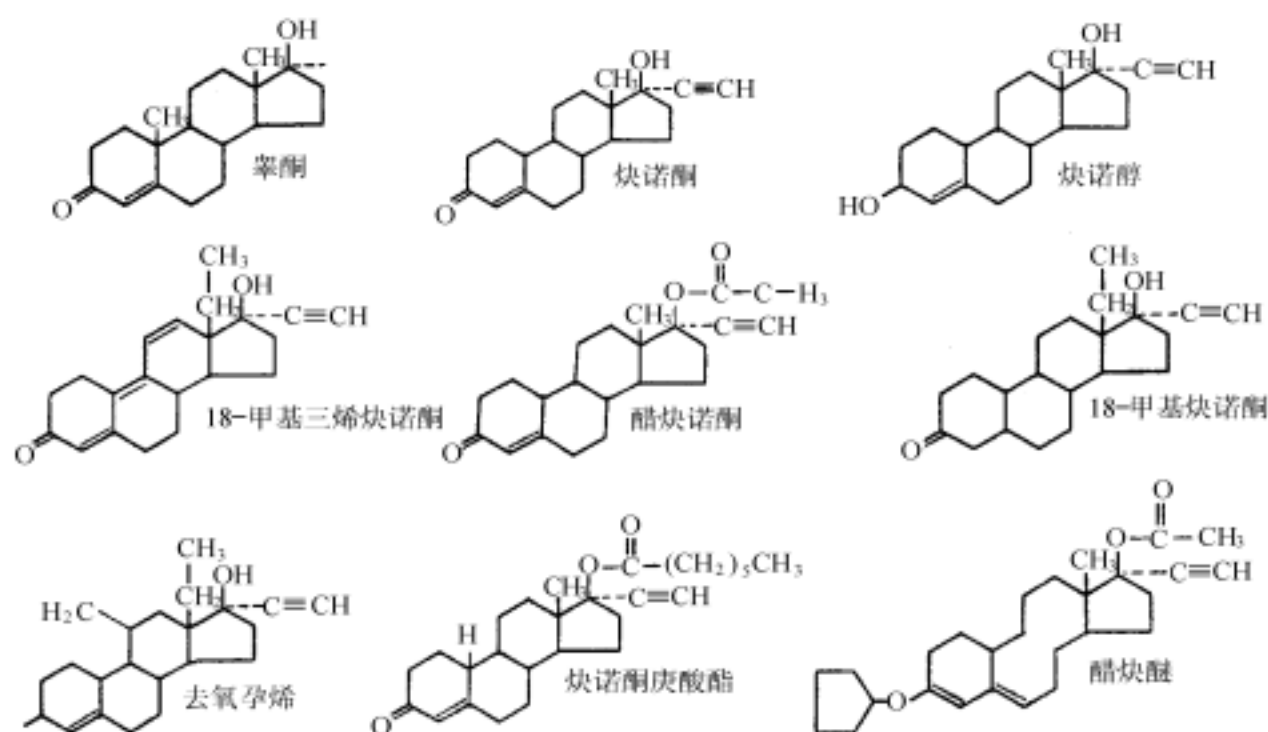


图 8-1 孕酮及 19-去甲基孕酮的衍生物的结构式

射。黄体酮及 17 α -羧基黄体酮衍生物的结构式如图 8-2。

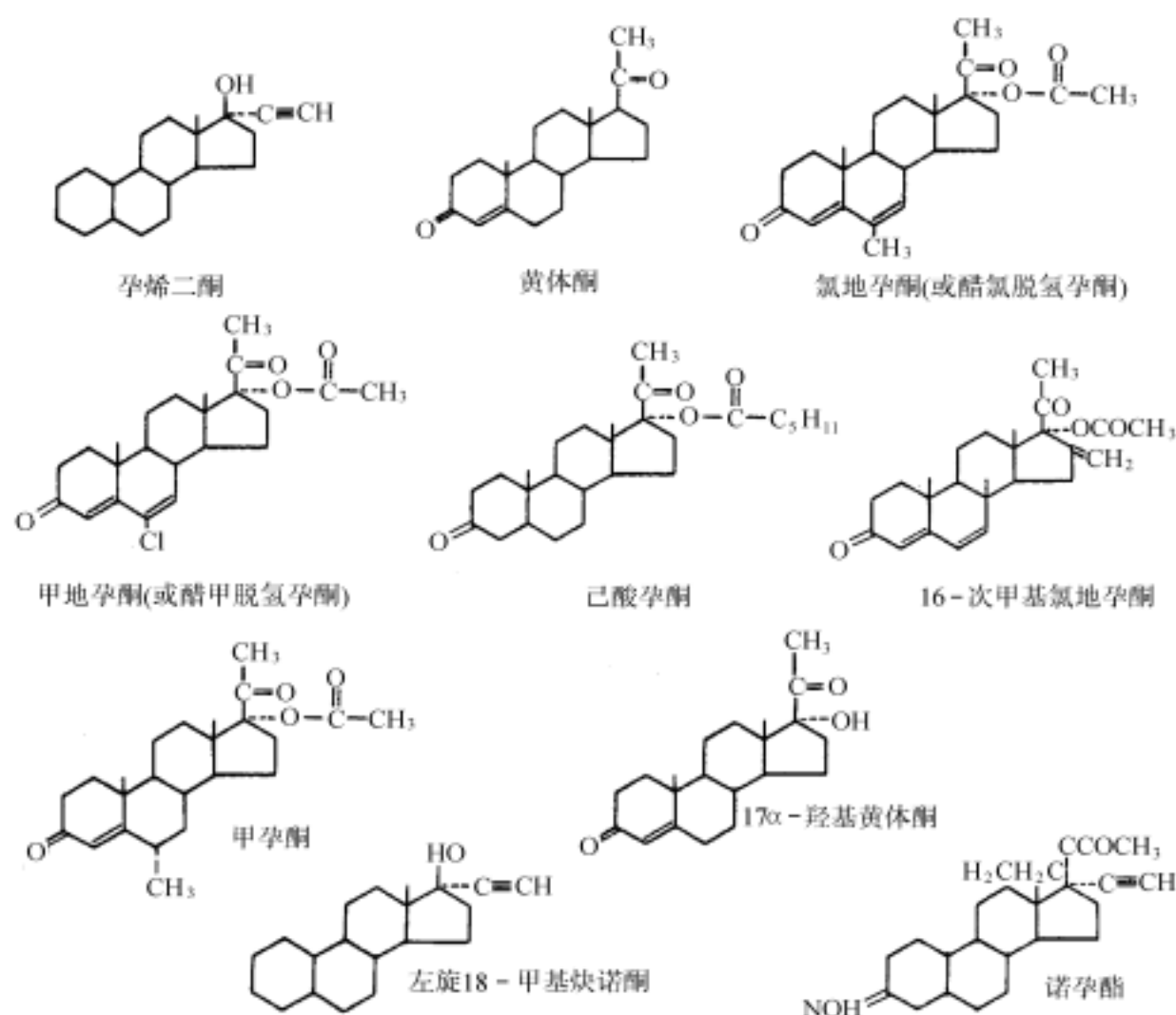


图 8-2 黄体酮及 17 α -羟基黄体酮衍生物的结构式

3) 国产几种孕激素类甾体避孕药的激素活性比较:

a. 孕激素活性:通过动物(兔)试验,测出国产常用甾体类避孕药的激素活性,均具孕激素样作用,但有差异。17 α -羧基黄体酮衍生物如甲地孕酮、氯地孕酮、甲孕酮、己酸孕酮等使子宫内膜转化作用较好,并均有维持妊娠作用。19-去甲基睾酮衍生物对子宫内膜转化作用较弱。炔诺酮维持妊娠作用极微弱。新型孕激素的孕激素样作用强,与孕酮受体亲和力高。孕激素效应的顺序为:孕烯二醇(GSD)> 左旋18-甲基炔诺酮(LNG)> 去氧孕烯(DG)> 诺孕酮(NGM)(表8-1)。

表 8-1 6 种合成孕激素的生物活性比较

	雌激素 活性	抗雌激素 活性	雄激素 活性	促蛋白质 合成作用	内膜转 化作用	维持妊 娠作用	抗排卵 作用
甲地孕酮	-	+	-	-	++	+	+
氯地孕酮	-	±	-	-	++	+	+
甲孕酮	-	±	±	±	+	+	+
炔诺酮	±	±	+	±	+	-	+
18-甲基炔诺酮	±	±	±	±	+		++
18-甲基三烯炔诺酮	±	±	±	±	+		++

b. 雌激素活性:小白鼠实验证明炔诺酮、18-甲基炔诺酮及18-甲基三烯炔诺酮的雌激素活性微弱。17 α -羧基黄体酮衍生物如氯地孕酮、甲地孕酮、甲孕酮及己酸孕酮未呈现雌激素活性。从大鼠试验测出,口服炔诺酮的雌激素活性为炔雌醇三甲醚的2%。

c. 抗雌激素作用:切除卵巢的小白鼠试验证明,几种国产避孕药皆具有一定的抗雌激素活性,己酸孕酮无抗雌激素作用。新型孕激素有抗雌激素作用。

d. 雄激素及促蛋白质同化作用:利用未成熟雄性大白鼠进行试验,发现氯地孕酮、甲地孕酮未呈现雄激素及促蛋白质合成作用,甲孕酮具有微弱的雄激素活性,炔诺酮具有较弱的雄激素活性,己酸孕酮及新型孕激素(左旋18-甲基炔诺酮等)未呈现雄激素作用。

(2) 常用的人工合成雌激素:炔雌醇的3位碳原子上换1个甲氧基,即组成炔雌醇三甲醚;如在17位碳原子上戊酸化,组成戊酸雌二醇;如在3位碳原子上换一个环戊醚,组成环戊醚乙炔雌二醇。

炔雌醇及炔雌醇三甲醚供口服,皮下注射亦有效,属短效,前者效力稍强于后者,后者作用同己烯雌酚,炔雌醇的效力较己烯雌酚强10~20倍。环戊醚乙炔雌二醇供口服,亦可肌肉注射,戊酸雌二醇仅供肌肉注射,为长效雌激素。它们的构造式如图8-3。

此外尚有A环失碳的甾体化合物双炔失碳酯,简称“53”号探亲避孕药片,1967年由上海医药工业研究合成。用幼年雌性大鼠子宫增重为指标,“53”号探亲避孕药的雌激素活性为炔雌醇的1/36。无孕激素活性,但小剂量“53”号避孕药有协同孕激

素的作用,而大剂量则拮抗之。

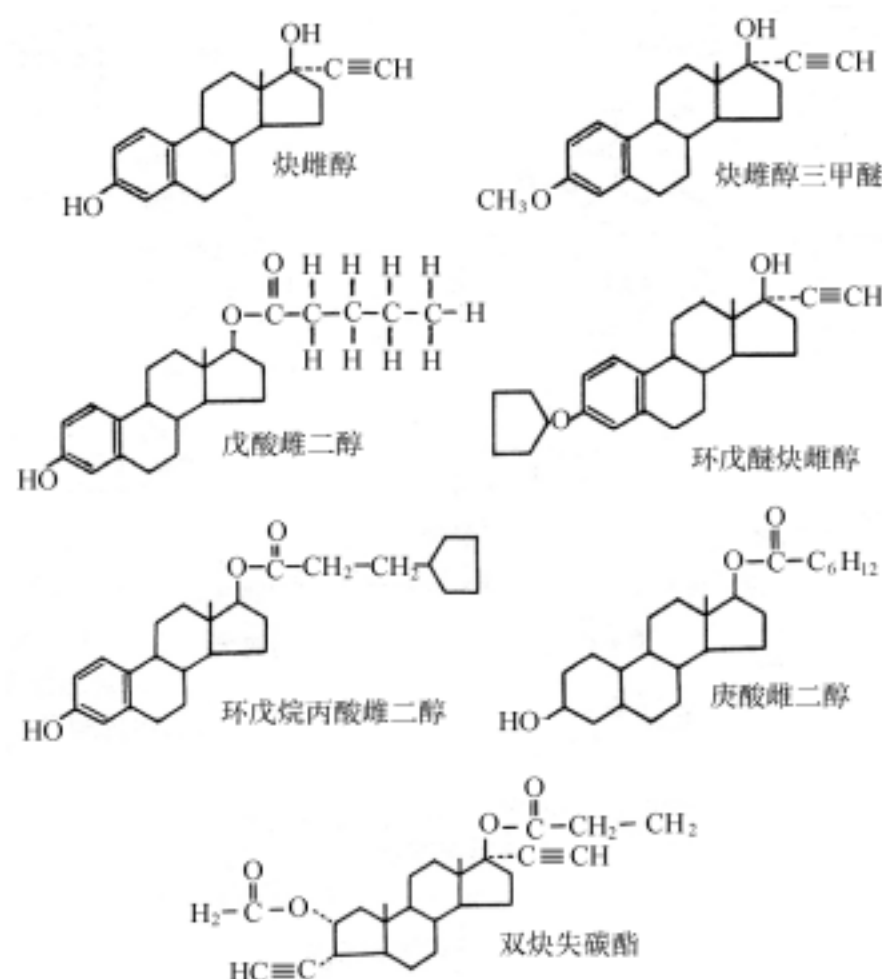


图 8-3 雌激素及其衍生物的结构式

2. 甾体激素避孕药引起的子宫内膜变化

在激素避孕药的影响下,会引起子宫内膜的失常变化,这种内膜不适宜受精卵着床,因此成为避孕的重要环节。而激素避孕药可引发部分妇女的月经紊乱,这一副作用具体的发生部位也是子宫内膜。因此对内膜的观察,可以为估计某一种避孕药的可靠性、避孕原理及月经紊乱的原因等提供一定的资料。

激素避孕药引起子宫内膜的变化,一方面是由于这种外源性激素对内膜直接作用的结果;另一方面是外源性激素通过影响内源性激素而间接作用于子宫内膜的结果。

目前应用的激素避孕药,主要属雌激素与孕激素这两类激素。

外源性雌激素对子宫内膜的作用与内源性雌激素的作用相似,它的基本作用是增强子宫内膜的合成代谢,从而促使内膜生长。但外源性雌激素在作为避孕药的剂量下,大多有抑制下丘脑的作用,使内源性雌激素降低。当给予适当量的外源性雌激素时,它替代内源性雌激素作用,使内膜能有较好的生长;当给予过多的外源性雌激素,内膜会发生增生过长;使用较小剂量仍具有抑制下丘脑的作用,使内源性雌激素减少,而外源性激素的量又不足以替代内源性雌激素促进内膜生长时,表现为内膜的生长受到抑制。

外源性孕激素对子宫内膜的作用亦与内源性孕激素的作用相似,它们的基本

作用是促使内膜分化,抑制内膜生长,但是由于外源性孕激素使用时间上一般与内源性的不同,以致内膜发生与正常完全不同的图像。在未服药情况下,内源性孕激素都是在内膜已经长得很好的基础上作用的,它能使内膜很好的分化,充分的发育,有旺盛的分泌;而作为避孕的外源性孕激素,一般应用于月经周期的开始阶段,此时内膜的生长还刚开始,即受到外源性孕激素直接与间接的抑制作用,内膜的生长就停顿或迟缓。又由于外源性孕激素的分化作用,它使这种刚开始生长的内膜即已发育、分泌,使内膜发生了早熟。这种早熟的内膜除了分泌较差外,也容易早衰。但当外源性孕激素用于周期的后半期,如探亲药用于后半期时和序贯 10: 15 服药法的内膜,因为都已有很好的生长基础,所以可有与正常相似的分泌晚期子宫内膜。由此可见激素避孕药引起的内膜变化,是与避孕药开始作用时的内膜的基础状态是十分有关的。外源性孕激素引起间质的蜕膜前转化的程度与剂量成正比,剂量大,蜕膜前转化就出现得早,并且显著。

孕-雌激素混合使用时,内膜变化因孕-雌激素比例不同而异。一般适量的雌激素可使内膜有较好的生长,但因孕激素有强烈的抑制雌激素的作用,所以内膜主要还是表现为孕激素类避孕药的作用,间质的水肿及蜕膜前转化常较单纯使用孕激素为显著。

目前激素避孕药的品种很多,但都属于雌、孕激素的衍生物,所以他们引起的内膜变化,基本上表现为孕激素或雌激素的变化,即使有些差别亦是大同小异。而衍生物活性的强弱、转化程度、作用时间的长短及剂量大小等因素,对内膜的影响较大。一般剂量越大,内膜发生显著变化的比率就越高(表 8-2)。又如在前半周期中孕激素应用的剂量越大,内膜腺体的抑制越严重,腺体的分泌发生得就越早,腺体的衰竭亦越早,间质的水肿就较显著,间质细胞的蜕膜前转化亦开始得早而显著,有时可达到蜕膜的程度。

表 8-2 不同剂量的醋酸炔醚对内膜的抑制率

内膜变化	剂量/ μg			
	200	300	400	500
受抑制内膜	5%	17%	16%	30%
正常分泌内膜	69%	48%	42%	38%

不同类型的激素避孕药所引起的内膜变化可有不同的特点。使用同一类型的激素避孕药的妇女,其内膜变化基本上具有共同的特点,但是由于激素避孕药不但直接作用于内膜,而且还作用于下丘脑-垂体-卵巢轴对外源性激素的反应不同,所以内源性激素产生亦不相同。由于内源性激素产生的不同,必然引起内膜的准备基础不同和内源性激素与外源性激素比例上的变化,这种变化实际上等于避孕药配伍上发生了变化。内膜的准备基础不同和内源性与外源性激素比例上的变化,就使服用同一种类型的避孕药妇女的内膜有不同的变化。所以同一种类型的激素避孕药所引起的内膜变化特点,又因个体差异而可有程度上的不同,个别妇女甚至有质

的不同。如果大剂量作用较强的激素避孕药对内源性激素的产生起了压倒优势的抑制作用,这时个体差异的表现就不明显,内膜的变化就较一致。小剂量、作用较弱和释放较缓慢的激素避孕药对内源性激素的产生,没有占压倒优势,所以个体差异表现就较明显,内膜的变化较不一致。例如,有的妇女长期使用激素避孕药,其内膜依然和正常相似,有的妇女用了一个周期的小剂量避孕药,内膜就发生显著的抑制,甚至萎缩。由于激素避孕药对下丘脑-垂体-卵巢轴及内膜的影响有积累作用,所以长期用药的内膜变化就比较显著,特别是连续给药或长效药,例如长效孕激素就比较容易引起内膜萎缩。

(1) 目前国内外较常用的激素避孕药所引起的内膜变化:

1) 复方孕-雌激素短效服药法的子宫内膜变化的基本特点:

a. 内膜的生长发育受到不同程度的抑制,内膜较薄,腺体小,分布稀疏。腺体的弯曲度与锯齿状较弱,腺上皮细胞小而低,胞浆淡染,核分裂减少或消失。细胞器少而发育差。

b. 腺体早熟:在服药后 48~72h 即可出现核下空泡,即分泌早期图像。随即很快进入分泌高潮,但其高潮一般均较正常为差。

c. 腺体早衰:在服药后 10d 左右,腺体分泌即可有衰竭现象出现,表现为分泌物干涸,腺上皮胞浆泡沫状消退,胞浆减少。以后腺体逐渐萎缩变小,甚至其直径仅有 20 μm 。由于胞浆泡沫状消退,故部分腺体呈增殖早期图像。

d. 间质迅速出现水肿并持续至停药后,间质细胞的生长与核分裂亦受到一定程度的抑制,所以早期间质疏松,细胞较小,核分裂少,随着时间延长,间质细胞虽有增多,但分布稀密不均。前蜕膜转化约出现于服药后第 10d,如果药中所含孕激素剂量较大,则蜕膜前转化出现得更早,且显著而弥漫。

e. 螺旋动脉的发育受到抑制,基底动脉壁可有增厚,小静脉常显著扩张。

f. 表层上皮一般变化不多,但当腺体衰竭或萎缩得很明显的时候,表层上皮亦出现衰竭萎缩,变成立方形,甚至扁平。

g. 内膜各处反应的不均匀程度较正常显著,尤其在周期的开始阶段。

2) 序贯服药法的内膜变化的基本特点:序贯服药法的内膜生长、发育与分泌较好,与正常有些相似。

a. 在第一阶段单纯雌激素的作用下,内膜逐渐生长至增殖晚期图像。如第一阶段所用的雌激素应用的时间较长,剂量较大,内膜可有生长过度的现象。

b. 在第 2 阶段雌、孕激素共同作用下,内膜有分化现象出现,它表现为腺体扩大、弯曲、分泌等现象。其程度与服用孕激素的剂量与时间长短有关。使用序贯 15:5 或 10:10 服药法,其内膜一般最后仅能到达分泌早期状态,使用序贯 10:15 服药法,虽分泌可较明显,但一般不易达到正常分泌晚期那样旺盛。

c. 间质水肿较为常见,其程度不一。蜕膜前转化及螺旋动脉的发育一般稍差。

d. 由于个体的差异,少数妇女的内膜可有增生过长,个别妇女之内膜则有生长发育欠佳甚至萎缩。

3) 长效孕激素避孕法的内膜变化的基本特点:1 个月 1 针或 3 个月 1 针的长

效孕激素所引起的内膜变化,基本与复方孕-雌激素避孕法相似,但有下列不同点。

a. 在第1周期中,因药效发挥较慢,所以内膜抑制得较轻,腺体的分泌现象亦出现得较迟。

b. 在第2周期中,刚修复的内膜即已受到体内剩余的长效孕激素的作用,所以刚刚新的腺体已有分泌现象,腺体小而直间质细胞在前半周期即可有蜕膜前转化。

c. 有时腺体的分泌可不经核下空泡而直接进入分泌阶段。分泌衰竭现象发生得较迟。

d. 长期使用,内膜发育较不一致,有的内膜分泌仍较好。因孕素持续地长期抑制垂体、卵巢与内膜,使大多数内膜的抑制现象较复方孕-雌激素服药法严重,并较多发生萎缩。萎缩的内膜基本上与一般老年性萎缩内膜相似,腺体瘦而圆、直,有时仍可伴有分泌,间质细胞小而稀少,有时呈纤维状,或有轻度的蜕膜前转化。

4) 低剂量孕激素服药法的内膜变化的基本特点:

a. 低剂量孕激素周期性服用法:如每日服氯地孕酮 0.5mg,73% 妇女的内膜呈正常分泌期图像,15.6% 妇女的内膜呈增殖期图像,11.0% 妇女的内膜腺体分泌较差或呈静止期图像。

b. 低剂量孕激素连续服用法(不中断地每日服氯地孕酮 0.5mg):内膜的抑制现象较周期性服用低剂量孕激素者显著。内膜呈正常分泌期图像的仅有 16.6%,呈增殖期图像的有 20.2%;分泌较差或呈静止期图像的则高达 63.1%。

周期性服用低剂量孕激素者,第1周期与第4周期的内膜相比较,其差别不大;连续服用者,第1周期内膜呈静止图像的为 22.9%,服至第4周期则增加至 45.5%。

5) 不定时口服孕激素(如甲地孕酮探亲药)的内膜变化的基本特点:

a. 月经前半周期服药者,多数内膜的生长受到不同程度的抑制,腺体分泌提早,分泌的程度亦较差。在月经前半周期服药时间越早,服药日数越多,内膜的变化越显著。

b. 月经后半周期服药者,内膜大多呈正常分泌图像,少数内膜生长亦受到抑制,分泌程度较差。月经后半期服药,内膜发育分泌较差者,常伴有孕二醇水平降低,此可能因药物抑制了黄体功能所致。

(2) 停药后内膜的变化:

1) 停用激素避孕药后,子宫内膜大多在停药后6个月内恢复正常,即使已经发生萎缩的内膜,亦大都在比较短的时间内恢复正常。

2) 一般用药周期愈少,内膜恢复较快,用药周期愈多,恢复较慢。

3) 用药方法不同,内膜恢复时间亦不相同,例如序贯服药法的恢复比复方孕-雌激素服药法快,复方短效服药法的恢复又比长效针剂快;剂量小的又比剂量大的为快。

4) 仅有极少数的妇女停药后,萎缩的内膜长时间不能恢复。少数子宫内膜亦有发生增生过长,或有浆细胞浸润。但停药后引起的内膜增生过长大都为暂时性的。

5) 停药后内膜的恢复一般较排卵的恢复稍迟。

(3) 出血与闭经的子宫内膜变化:

1) 使用激素避孕药所引起的月经大都属于撤退性出血。撤退性出血的内膜变化与正常月经期的内膜不同,又因所用之药不同而异。撤退性出血的内膜,一般较薄(大剂量治疗功能性出血者例外),常成片,内膜各区的退行性变化较一致,间质中炎症细胞浸润较少,静脉淤血、血栓形成均较少。

孕激素类药物等引起的撤退性出血,其内膜间质细胞肥大较显著且较弥漫。腺体衰竭萎缩得较显著。

长效2个月以上的孕激素引起每月1次的内膜撤退性剥落,它是因为内源性雌激素周期性波动,或内膜发育到一定程度时所发生的激素相对不足所致。

低剂量或不定期用药的“月经期”内膜剥落,可以是撤退性出血,亦可以是排卵后发生的月经期子宫内膜。

2) 大多数妇女应用激素避孕药后,月经量有不同程度的减少。子宫内膜生长和螺旋动脉的发育相应地有不同程度的抑制,这种情况在长效孕激素针剂中更为明显。但是也有内膜生长与螺旋动脉的发育都抑制得很显著,而月经量并未减少的现象,说明内膜的生长与螺旋动脉发育的抑制与经量有关,但非根本的原因。

3) 不规则阴道出血,当阴道流血量少时,子宫内膜可保持完整,大部分区域的腺体及间质继续生长或分泌,仅有个别腺体的上皮或小区域的间质有变性、萎缩。间质中有弥漫的红细胞浸润,或上皮下血肿形成。无炎性细胞或仅有少量炎性细胞浸润。当阴道出血量较多时,内膜组织破碎显著,但其细胞结构仍较完整,不似撤退性出血时所表现的整片内膜变性坏死。

4) 应用长效孕激素所引起经期延长的子宫内膜变化,可为不规则脱落,或再生修复不佳之出血内膜。

5) 激素避孕药可以引起下丘脑-垂体功能持续的抑制而发生闭经,此时内膜严重萎缩,处于静止状态,但少数亦可呈增殖期图像,甚至正常分泌期图像,后者是因为取内膜之时,已值月经行将恢复之际。

雌激素类激素避孕药引起的闭经,其内膜往往呈滤泡持续图像,但极少数可因内膜细胞的受体长期受雌激素影响后,质与量发生反常的变化而发生萎缩如哺乳期子宫内膜。

闭经还可以是避孕失败的结果,在这种情况下诊断妊娠的标准要求比较严格。需有发育分泌旺盛的腺体,典型的蜕膜,发育良好的螺旋动脉可怀疑妊娠。当有滋养层成分或蜕膜有纤维蛋白性坏死时才可确诊。如果虽然间质细胞有蜕膜样变,而腺体发育较差,又无其他妊娠反应,则系激素避孕药所引起的变化。但当大剂量孕激素类避孕药用于月经后半周期时,内膜的变化与真正的妊娠期子宫内膜极相似,故下诊断时需慎重对待。

(4) 激素避孕药与子宫内膜癌的关系:比较一致的看法是孕-雌混合激素避孕药由于其孕激素的抑制及转化作用发生内膜癌的危险反较不服药的为少,而序贯疗法因所用雌激素较多发生内膜癌的危险似有一些增加。

(5) 观察激素避孕药引起的内膜变化的方法和注意点:

1) 虽然单独的一个内膜标本亦能看出一些激素避孕药对内膜的影响,但是要
对某一种激素避孕药引起的内膜变化有比较透彻的了解,就应该有计划地取材,这
种计划视所用方法不同而异。

如需了解内膜变化的发育过程,则应系统取材。首先需规定剂量与开始用药日
期,一般最好能凑成两个完整的周期的内膜。第1个周期从用药后第1日开始,第2
个周期从经净后开始,按日取子宫内膜。

在摸索有效剂量或最佳用药开始日期,可变动剂量或用药开始日期,而取内膜
日期需统一,以资比较。排卵第9日(标准日期第22d)的内膜对估计能否着床有十
分重要的意义。应用避孕药后月经失调,在出血时,有时亦能为研究失调原因提供
一定的线索。

2) 子宫内膜应取自子宫体正中、前后壁,长1cm即可,但不宜太浅。

3) 在观察激素避孕药所引起的内膜变化时,必须很好了解所用药的化学结
构、活性、剂量、配伍、转化及在体内存留的时间。特别要了解该内膜取自第几个周
期的第几日,用药后第几日取内膜后第几日来经。取内膜前有无出血,用药后第几
日出血,出血几日,出血的量多少,此外尽可能配合排卵的估计,包括基础体温及内
分泌测定的结果,这样才能比较正确地解释子宫内膜的变化。

3. 复方孕-雌激素避孕药对机体的影响

(1) 停药后月经、排卵功能及生育力的恢复:每次用药剂量愈大,停药后月经、
排卵功能及生育力恢复愈慢。

停服口服避孕药1、2号后,99%左右妇女于2~3个月内月经及排卵功能恢复
正常。服药半年以内者,停药后第1、2周期出现雌、孕激素曲线水平高于服药前,呈
反跳现象。停药后妊娠力迅速恢复。极少数人表现为月经稀少或闭经。

应用每月注射1针的复方长效避孕针,有67%~95%于停药1个月转经,约
50%在停药后1~2月排卵功能恢复。

应用每2个月注射1针的庚炔诺酮避孕针,有92%在停药后第1个月恢复月
经,个别妇女发生闭经。停药后1个月内18%恢复排卵;停药2个月,恢复排卵率达
60%。停药3个月内妊娠约27%,6个月、1年、2年累计妊娠率分别约37%、48%及
68%。

应用每3个月注射1针的甲孕酮自然转经率最慢,停药后6个月内有50%,1
年内有75%,18个月内有85%左右转经。停药后5个月内受孕者占5%~10%,15
个月时累计受孕率为75%,24个月时累计受孕率为95%。用药时间愈长,月经及生
育力的恢复愈慢。

(2) 与子代健康的关系:迄今甾体激素口服避孕药是否可能引起母体染色体
畸变、自然流产、畸胎和先天性畸形等问题,尚无定论。一种认为应用较低剂量的复
方口服避孕药不会引起致突变、致畸胎等有害作用;另一种认为长期服用甾体避孕
药的妇女,在停药后的6个月内怀孕,自然流产儿染色体畸变有增加的倾向,特别
在妊娠早期,因误服或因诊断、治疗等的需要,服用激素避孕药者,其后代可能出现

遗传学效应,如自然流产、先天性畸形等。我国曾对应用口服避孕药 1 号妇女及对对照组进行外周血淋巴细胞培养,分析其姊妹染色单体互换率,未发现致突变及致癌效应。另外,对停用口服避孕药 1 号及 2 号半年内受孕妇女,要求人工流产者的胚胎组织进行姊妹染色单体交换(SCE)试验,未发现有致突变现象。停用复方或单纯庚炔诺酮避孕针后 3 个月内妊娠妇女分娩 35 例新生儿进行检查,无 1 例畸形。沈阳等人(1986 年)对注射复方己酸孕酮针 3~123 个月,及注射复方甲地孕酮避孕针 12~66 个月,进行注药前后自身对照 SCE 试验,均未引起 SCE 频率显著增加。对停用避孕针 1 号后妇女分娩的 37 例新生儿进行随访,未发现畸形。为了安全,甾体避孕药及女性激素不宜用以治疗先兆流产及做妊娠试验。停用口服避孕药后,最好在半年后怀孕。另有报道孕妇服雌激素有可能致女婴发生阴道肿瘤。

(3) 对肝、胆的影响:较大剂量的孕激素与雌激素对少数人可引起暂时性肝功能减退,表现为谷-丙转氨酶、胆红素、碱性磷酸酶增高及磺溴酞钠滞留。其发生率还与孕激素的种类有关。1966~1971 年上海市曾对服用全剂量、半剂量及 1/4 剂量口服避孕片 1 号、2 号进行肝功能测定。发现 1 号药全剂量组,谷-丙转氨酶增高占 19.5%,半量组为 3%,1/4 剂量组基本正常。另外,对服复方醋炔诺酮(每片含醋炔诺酮 4mg,炔雌醇 0.05mg)、复方甲孕酮(每片含甲孕酮 8mg,炔雌醇 0.05mg),及复方氯地孕酮(内含氯地孕酮 2mg,炔雌醇 0.05mg)者,测定谷-丙转氨酶,发现只有复方醋炔诺酮组升高,占 30.8%。大多数人在停药 15~45d 内肝功能恢复正常。以上资料说明 19-去甲基甾丸酮类激素中,在 17 碳原子的 2 位置上有乙炔基的药物,有些可产生暂时性、可逆性肝功能损害。如剂量降低到一定程度,对肝功能基本无影响。服复方去氧孕烯 1 年者,肝功能无明显改变。

对服复方炔诺酮后发生黄疸的妇女做肝脏活检,显微镜下见到肝小管及肝细胞内胆汁淤积,有不同程度退行性变及坏死,停药后可恢复。此情况易发生于曾患妊娠期胆汁淤积的妇女。

上海市对应用避孕针 1 号 2 年以上的 593 人,进行肝功能检查,未超过正常人的发病率。浙江省对应用复方庚炔诺酮避孕针 1.5~3 年的 652 例妇女进行肝功能检查,谷-丙转氨酶升高者占 3.52%。512 例注射庚炔诺酮避孕针 1.5~3 年的妇女,肝功能检查结果与复方庚炔诺酮针相似。为了避免增加对已患肝病者的影响,急、慢性肝炎者以不用避孕药为宜。发达国家中服避孕药患良性肝细胞腺瘤的相对危险性有所增加,但仍是一个罕见的并发症。在发展中国家尚未见报道。

英国前瞻性研究指出,服复方口服避孕药 2 年中,胆石症发生率逐渐增高,4~5 年后约为正常人的 2 倍。主要由于雌激素引起胆汁成分的改变及胆固醇饱和度降低所致。

(4) 与癌的关系:1971 年上海市对普查对象进行分析,用口服避孕片 1 号、2 号的有 10 549 人(其中 758 人服药时间在 5 年以上),未服药者 81 354 人,两组中乳房癌的发生率分别为 0.19‰与 0.01‰;两组中患子宫颈癌者分别为 0.09‰与 0.66‰。两组宫颈癌与乳房癌的发病率无明显差别。

浙江省对 1 443 例使用复方庚炔诺酮及单纯庚炔诺酮避孕针 1~3 年的妇女进

行检查,仅发现1例在使用复方庚炔诺酮避孕针第7针时,患乳房癌前期病变,经病理切片证实,术后10年情况良好。使用复方庚炔诺酮避孕针0.25~3年的妇女1008例及单纯庚炔诺酮针616例,未发现患宫颈癌者。使用新复方甲地孕酮避孕针妇女142名及使用复方甲地孕酮微囊避孕针妇女147例,在用药后1~2年检查,未发现患乳房及宫颈癌者。应用长效甲孕酮,亦不增加宫颈癌与乳房癌的发生率。患宫颈间变者,最好不应用避孕药。

现有多份报道,临床上在一定条件下,孕激素还有不同程度的抑制良性乳腺病、乳腺癌及子宫内膜癌的作用;复方避孕药能减少乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌发病率。国外研究中避孕药对乳腺癌和宫颈癌的关系尚无定论。和垂体肿瘤无关。

(5) 与高血压的关系:国外报道血压正常妇女,长期应用复方口服避孕药可引起少数人收缩压与舒张压稍升高,但仅有极少数人血压明显增高,为可逆性,绝大多数于停药后可恢复正常。20世纪70年代认为,血压增高主要是由于雌激素所引起,并与剂量成正比,每日服用剂量低于 $50\mu\text{g}$,高血压发生率明显减少;80年代初期发现孕激素是主要危险因素(如炔诺酮),血压增高与服药时间长短成正比;与服药者年龄(40岁以上)及原有高血压或妊娠时曾有高血压史者有关,种族之间亦有差异。我国曾对长期应用口服避孕药1号、2号、注射避孕针1号、复方庚炔诺酮、单纯庚炔诺酮针及复方甲地孕酮微囊避孕针者进行随访,高血压发生率并不高于自然发生率,个别妇女在用药期间血压有暂时性升高,停药后多能恢复正常。用药者应定期测量血压,有高血压史者,宜在医生指导下使用。药物引起的高血压,主要是由于避孕药刺激肝脏合成较多的肾素底物(血管紧张素原),从而引起肾素-血管紧张素-醛固酮的活动增加有关。但由于肾脏负反馈机制存在,可使血浆肾素活性降低,因此大多数服药者的血压是正常的。缺乏负反馈调节者,才是导致血压升高的原因之一。雌激素还可直接作用于肾小管,产生水、钠潴留,进而使细胞外液量增加,导致循环血量及心排血量增加,当心排血量增加持续存在,使血管平滑肌受到过度牵拉,产生血流的自动调节现象,血管收缩,外周阻力增加,使血压升高。另外,甾体激素避孕药引起交感神经系统活性增加,动脉血压增高者往往伴随血浆中多巴胺 β -羟化酶活性增高。甾体避孕药引起的高血压,在肾脏功能损害的基础上更易发生。总之,避孕药引起高血压的机制,还待进一步探讨。

(6) 与血栓栓塞的关系:1961年以来,Jordan等人报道应用口服避孕药者中有发生血栓栓塞与血栓静脉炎的病例,引起广泛重视。1978年,英国皇家普通医师协会对2300例服药妇女的前瞻性研究,发现下肢深、浅静脉血栓症分别增加4与2.5倍左右。1970年,Inman等报道复方雌、孕激素中雌激素食量与血栓栓塞的发生率有关。因而,英国药物安全委员会提出,避孕药制剂中每片雌激素含量不应超过 $50\mu\text{g}$ 。1974年,Bottiger等报道将避孕药内雌激素含量降为 $50\mu\text{g}$ 或 $30\mu\text{g}$,血栓栓塞病降低30%。1986年,国际计划生育联合会曾在日本召开的国际性医学咨询专门研究会议上提出,在发达国家中,服口服避孕药者死于血栓栓塞病者高于不服药者,主要死于肺栓塞。雌激素对特殊的血凝因素有不利作用,促进血凝过程的进行,因此,减低雌激素剂量,明显降低了发病率。现认为该病的发生主要与吸烟、年

龄、糖尿病、高血压及家庭因素、肥胖等有关。我国自应用口服避孕药 20 年以来,罕见这方面临床报道。可能与我国避孕药片内雌激素含量较低、妇女吸烟及肥胖者较少等因素有关。

1986 年, Mammen 提出不同看法, 他指出用标准化, 新的检查方法后, 服用避孕药期间, 血液处于高凝状态的结论已被推翻。Hugo 报道在服用小剂量避孕药之际, 溶解的纤维蛋白、纤维肽 A、抗血栓Ⅲ及 FCBⅢ均无变化, 这方面有待进一步研究。

微型口服避孕药及单纯含孕激素避孕针与静脉血栓栓塞形成无关。

1986 年, 上海市对注射复方甲地孕酮避孕针妇女进行血液凝固、抗凝固、纤维蛋白溶解系统及血小板功能的研究, 发现用药后血液中某些促凝血因子增高, 血小板聚集性也增高, 但也伴有纤溶活性增强, 提示机体凝血机制呈现新的调节平衡状态, 对使用者无致血栓栓塞症之虑。

为防止血栓栓塞性并发症, 宜注意以下几点:

- 1) 服药妇女年龄不宜过大。
- 2) 无血栓栓塞、严重静脉曲张、静脉炎及高血压、糖尿病、肥胖等先驱因素。
- 3) 服药期间禁烟、定期随访。选择性大手术前 2 周停用避孕药, 术后 4 周再开始服用, 或改用其他有效避孕措施。

(7) 心肌梗死: 在发达国家中服避孕药妇女如伴有一个或多个危险因素, 如年过 40 岁、正在吸烟、患高血压、糖尿病、高脂血症, 死亡率有所增加。此可能与高剂量避孕药有关。目前常用的低剂量避孕药与心肌梗死的关系有待进一步研究。1985 年, 丁怀翌对上海市 10 所医院急性心肌梗死患者进行调查, 未发现正在服避孕药病例。此可能与我国自 1969 年即推广微型口服避孕药、妇女吸烟、患高血压与糖尿病者少于国外有关。

(8) 对代谢的影响:

1) 糖代谢: 应用每月注射 1 次的新复方甲地孕酮、甲孕酮及复方甲地孕酮微囊避孕针对葡萄糖耐量试验仅有轻微影响。长期服用口服避孕药 1 号、2 号的妇女, 空腹血糖基本正常, 葡萄糖耐量试验暂时性轻度降低占 15%~0%, 停药后可恢复正常, 一般无临床症状, 血浆胰岛素反应性增加, 说明组织利用葡萄糖的能力降低, 与糖尿病不同。甾体避孕药对糖代谢的影响, 主要与孕激素的成分及剂量有关, 以 18-基炔诺酮的影响最为明显, 并与剂量成正比。雌激素不是主要因素, 现认为系孕激素与雌激素协同作用的后果。

糖耐量减退的发生率与不同药物的配伍、剂量及个体情况有关。避孕药引起糖代谢改变的机制是综合性的, 迄今尚未完全明了, 可能与生长激素与游离皮质激素的增加、胰岛素受体的减少有关。前两种改变主要由雌激素所致, 第 3 种改变主要由于孕激素所引起, 因此认为糖尿病、隐性糖尿病、糖耐量异常及有妊娠期糖尿病史等对象, 不宜应用甾体避孕药进行避孕。有巨大儿分娩史者, 应在用药前采用糖耐量测定, 进行筛选。有心血管疾病者, 应忌用甾体类激素, 因糖代谢紊乱也是增加心血管疾病的危险因子。

2) 对脂类代谢的影响:通常根据脂蛋白的密度不同,将脂类分为四种,即高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)即 β 脂蛋白、极低密度脂蛋白(VLDL)即前 β 脂蛋白及乳糜微粒(CM)。LDL的主要任务是将胆固醇运输到外围细胞,用于膜的生物合成,剩余部分返回肝脏,经肝细胞 LDL 受体纳入细胞,进行分解。一旦在某种条件下,如营养内胆固醇含量过高,则外围细胞 LDL 受体密度下降,血浆内 LDL-胆固醇含量增加,从而其中部分胆固醇可能与动脉壁的巨噬细胞结合,导致动脉硬化,增加心肌梗死发生的危险性。HDL 具有使胆固醇脂自巨噬细胞返回肝脏,加以分解,故被称为冠状血管病变的保护因子。HDL 的主要成分为载脂蛋白 A₁(ApoA₁),LDL 的主要成分为载脂蛋白 B(ApoB)。

雌激素可使三酰甘油及 HDL 升高,并与剂量呈正比。19-甲基睾酮类孕激素如炔诺酮,18-甲基炔诺酮因具有雄激素活性,与雄激素受体相结合,使 HDL-胆固醇 ApoA₁ 下降,使 LDL、ApoB 上升,这种变化能增加动脉粥样变化的危险性。17 α -孕酮类不具有雄激素样作用,在剂量适当时,对脂代谢影响较小。在低剂量复方口服避孕药,可使其处于相对平衡状态。去氧孕烯、诺孕酯及孕二烯酮等新型孕激素与孕激素受体的结合与天然孕酮相似或高于天然孕酮,不具有雄激素作用,对脂代谢无不良影响,表现为升高 HDL、ApoA₁,降低 LDL、ApoB,并可使缺血性心脏病的危险性下降。释放低剂量 LNG 阴道环(20 μ g/d),对血脂无明显影响。

我国资料,长期应用口服避孕药 1 号、2 号者,胆固醇增高占 8%~10%。

国内外多数资料都证实低剂量复方口服避孕药并不增加动脉粥样变。在慎重选择服药对象情况下,并不增加 LDL-胆固醇水平或降低 HDL 水平。

国内注射新复方甲地孕酮、复方甲地孕酮微囊避孕针 1 年后、复方庚炔诺酮及单纯庚炔诺酮避孕针 1.5~3 年的妇女,对脂类代谢无明显影响。国外注射甲孕酮避孕针对血清三酰甘油及胆固醇水平无影响,但血浆高密度脂蛋白有轻度下降。

3) 色氨酸代谢:服复方避孕药的妇女,抑郁症发生率较采用其他避孕方法为高,既往有抑郁症或经前紧张症病史者,用药后更易发生,可能由于避孕药干扰色氨酸和磷酸吡多醛代谢,改变脑胺代谢有关。

4) 对维生素代谢的影响:服复方避孕药后可能使血浆维生素 A 浓度增加,但未达到中毒水平。亦可使维生素 B₆ 缺乏,可能与甾体避孕药所致糖耐量损害有关。血浆叶酸浓度降低,可能是减少吸收或增加叶酸的清除,少数报道在服药期间发生巨红细胞贫血。血浆中维生素 B₁₂ 浓度降低,可能是药物以某种方式增加组织对维生素 B₁₂ 的亲合性,改变它的分布。

4. 甾体避孕药的其他作用

(1) 有益作用:服避孕药时,对妇女健康有益之处表现为可以预防与降低某些疾病的发生率,如:①减少月经量,降低缺铁性贫血;②服口服避孕药较未服药者患盆腔炎发生率降低 50%~70%;③预防异位妊娠;④减少子宫内膜癌危险性 50%;⑤减少卵巢上皮癌;⑥预防良性乳腺疾病如纤维囊性病和纤维瘤;⑦减少类风湿性关节炎。

(2) 治疗作用:

1) 治疗妇科疾病

- a. 功能性子宫出血:可起到止血、调整周期和促排卵作用。
- b. 月经量增多:可按常规服用口服避孕药。青春期妇女,可用雌、孕激素序贯疗法。中年妇女可用雌孕激素合并周期疗法,连服 22d。
- c. 痛经:服法同上,可明显降低发生率。
- d. 子宫内膜异位症:可减轻或消除症状,缓解病情。
- e. 治疗经前期紧张征:服用孕激素类甾体避孕药。

2) 对某些由于雄激素所引起的皮肤病有一定治疗作用:如痤疮、皮脂溢出、多毛等,应用雌激素治疗有一定效果。银屑病(牛皮癣)用长效雌激素——复方炔雌醚全量片有一定效果。

(3) 甾体避孕药与其他药物的相互作用:即两种或两种以上药物合并或先后序贯使用时相互影响,使药物作用增强或减弱,作用发生的快慢或作用时间的延长或缩短。

1) 影响甾体避孕药避孕效果的药物:

a. 利福平:是强酶诱导剂,能诱导肝脏微粒体酶,加速口服避孕药中雌、孕激素的代谢。它可使炔诺酮半衰期从 $6.2 \pm 1.7\text{h}$ 降为 $3.2 \pm 1.0\text{h}$,使炔雌醇半衰期从 $6.5 \pm 2.9\text{h}$ 降到 $2.9 \pm 1.7\text{h}$,也就使以上两激素血浆浓度明显下降,从而降低避孕效果,并可使妇女在服避孕药期间发生不规则出血,故服利福平者,不宜应用口服避孕药避孕。

b. 抗癫痫药:如苯巴比妥、苯妥英钠、扑米酮、卡马西平、乙琥胺等是肝脏微粒体的诱导剂,促进避孕药的代谢,使血浆炔雌醇浓度下降,产生突破性出血,并可使性激素球蛋白的结合力增加 28%,使血浆游离孕激素浓度下降。它对避孕药作用的影响较利福平为轻,可能引起避孕失败,宜改用其他避孕措施。

c. 镇痛药与抗焦虑药:非那西汀或吡唑酮等镇痛剂,甲丙氨酯(眠尔通)、氯氮(利眠宁)等抗焦虑药,亦可能是微粒体酶的诱导剂,从而加速避孕药的代谢速度,降低避孕效果,宜改用其他方法避孕。

d. 维生素 C:理论上具有抑制微粒体酶系统作用的药物,可降低从体内清除口服避孕药的作用,从而提高避孕效果。每日服维生素 C 1g,可提高血浆炔雌醇浓度。由于炔雌醇与维生素 C 都是与胃肠黏膜上硫酸盐结合后进行代谢的。当维生素 C 存在时,就可在胃肠黏膜上与硫酸盐进行竞争性结合,使炔雌醇与硫酸盐的结合降低,使血浆内炔雌醇浓度增加,生物效应增加,提高其效力。

e. 抗生素:动物试验,先服氨苄西林,可干扰炔雌醇的肝肠循环,但在人类血浆炔雌醇浓度并未下降。对血促卵泡成熟激素、孕酮及左旋 18-甲基炔诺酮水平无影响。

2) 甾体避孕药对其他药物的影响:

a. 降压药:口服甾体避孕药可增加血浆中血管紧张素原,因而可能降低降压药的治疗效果。

b. 抗凝血药:抗凝血药主要通过抑制维生素 K 依赖性凝血因子的合成,发挥抗

凝血作用。而甾体避孕药可使以上凝血因子浓度增加,因而降低了抗凝血药的效果。

c. 抗抑郁药:甾体避孕药可降低丙米嗪(米帕明)的抗抑郁作用,由于前者可抑制丙米嗪的代谢。

如果需服以上药物的妇女,最好不服甾体避孕药。

(三) 长效口服避孕药

每月口服1次的长效口服避孕药可以减少每天服药的麻烦,口服1次可避孕1个月。理想的长效口服避孕药是用长效雌激素配伍速效强力的孕激素。前者具抗生育作用,而后者用以防止内膜增生,使之转化为分泌改变后脱落,引起撤退性出血,模拟正常月经。长效雌激素主要为环戊醚炔雌醇,简称炔雌醚(CEE),口服吸收后储存于脂肪组织中缓慢释放,发挥长效作用。

1. 发展及进展

1967年,Greenblatt首先报告口服长效避孕药。1969年,Maqueo-topete发表了长效口服避孕药的报告并附有临床试用结果。1969年在北京、上海和天津研制了3种长效口服避孕药:CEE3~3.3mg,分别配伍18-甲基炔诺酮12mg,氯地孕酮15mg或16-次甲基氯地孕酮10mg。3种制剂效果相似,以复方18-甲基炔诺酮使用较多。自1969年至1976年期间共有43373名妇女服用,共347178月经周期、有效率为98.296%妇女年。同时进行了药代动力学和安全性的研究。动物试验显示炔雌醚在胃肠道中半衰期为13h。口服后半小时可吸收,4h达峰值,以后渐下降,21d后血中仍可测出。各器官中以脂肪组织含量最高,主要由尿及粪排泄。由于药物不良反应及妊娠率的问题影响可接受性。近年的研究多在配伍剂量及服用方法方面,主要的改进是减量,CEE由3mg减为2mg。孕激素仍保持12mg或采用每片含氯地孕酮6mg及18-甲基炔诺酮6mg,以发挥两种孕激素协同作用的优点。减量药减少了不良反应,提高了安全性,成为受欢迎的有效避孕方法。

2. 种类、剂量和效果

长效口服避孕药的种类、剂量和效果见表8-3。

表8-3 长效口服避孕药

名 称	成分剂量/(mg/支)	有效率/(%)
复方炔雌醚月服片	炔雌醚(3.3) 氯地孕酮(15)	98.0
复方地孕酮月服片	16-次甲基炔雌醚(32.5) 16-次甲基氯地孕酮(12)	98.0
甲孕环酯避孕片(复方孕素1号)	炔雌醚(0.25) 甲地孕酮环戊烷丙酸酯(50)	99.0
复方炔雌醚·氯地孕酮·混旋18-甲基炔诺酮月服片(简称“三合一”月服片)	炔雌醚(2) 氯地孕酮(6) 混旋18-甲基炔诺酮(6)	96.8

3. 服法

(1) 复方 18-甲基炔诺酮月服片:第 1 片于月经来潮第 5d 中午服用,第 2 片于月经第 25d 服用,以后按第 2 片服药时间每月服药或每隔 28d 服 1 片。在服药头 3 个月内,每次加服长效雌激素 1 片,每片含炔雌醚 0.3mg。

(2) 复方 16-次甲基氯地孕酮:第 1 片于月经第 5d,隔 20d 服第 2 片,再隔 20d 服第 3 片。以后每隔 28d 服 1 片。

(3) 复方炔雌醚月服片:第 1 片于月经第 5d,隔 20d 后服第 2 片,以后每隔 30d 服 1 片。

(4) 三合一长效口服片:第 1 片于月经第 5d,隔 5d 服第 2 片。第 1 片服药日期为以后每月的服药时间。

(四) 常用短效口服避孕药

1. 概况

利用合成的雌、孕激素作为口服避孕药已有 40 余年的历史。1956 年,美国 Pincus 等人首次用合成的异炔诺酮在波多黎各进行了临床试验。1960 年,美国药物食品管理局通过了第一种口服避孕药 Enovid-10。由于其避孕效果近于 100%,所以很快在世界各国普遍采用。此后,对口服避孕药进行了有关机制、不良反应处理、安全性和可接受性等方面的研究。我国在 1960 年开始研制短效口服避孕药,于 1963 年仿制成功,包括炔诺酮、甲地孕酮、甲孕酮和氯地孕酮配合炔雌醇的 4 种口服避孕药,并开展临床效果和作用机制的研究。

1965 年,对短效口服避孕药,即 1/2 量的复方炔诺酮片和复方甲地孕酮片作了鉴定。在研究改进工艺流程和降低成本的同时,逐步扩大临床试用,并探索最低有效剂量。

1968 年,上海鉴定通过 1/4 剂量复方炔诺酮(避孕片 I 号)及复方甲地孕酮(避孕片 II 号),并于 1969 年,向全国推广使用。1969 年,北京合成了 18-甲基炔诺酮,增加了一种新的短效口服避孕药。此药剂量小,不良反应少。

1977 年,鉴定了 1/8 剂量的复方炔诺酮片,还改进了药物的剂型,有糖衣片、滴丸和纸型片等。我国研制的低剂量片在保证满意避孕效果的同时,明显减少了不良反应,在国际上是首创,比国外的低剂量片早 7~8 年。

近年来,在短效口服避孕药方面的研究,着重于服药妇女的长期安全性研究以及短效口服避孕药中孕激素的研究。第 3 代孕激素,例如地索高诺酮、孕烯二酮、炔炔诺酮和炔雌醇配伍的短效口服避孕药,它们具有剂量小而且不影响身体代谢的特点。

2. 种类、成分、剂量和剂型

短效口服避孕药多数为雌激素和孕激素的复方制剂,少数为孕激素单方制剂。其中孕激素成分可分为 19-去甲基睾酮和 17 α -羟基孕酮衍生物两大类。前者为炔诺酮、18-甲基炔诺酮、去氧炔诺酮、醋炔诺酮、18-甲基三烯炔诺酮、地索高诺酮。后者主要是甲地孕酮、氯地孕酮。其中雌激素成分为乙炔雌二醇和炔雌醇-三甲醚。上述

的孕激素和雌激素成分,可有不同的配伍方式和用法,分为传统的合并制剂、序贯用法、单纯孕激素制剂和三相制剂等。

(1) 合并制剂:我国常用的短效口服避孕药大多为雌、孕激素合并制剂。该制剂因所含甾体激素的剂量较小,代谢及排泄较快,故须每天服用;漏服后会避孕失效。其剂型有片剂、膜剂、滴丸三种(表 8-4)。

表 8-4 常用短效口服避孕药

药 名	成 分	剂量(mg)	剂 型	用 法
复方炔雌酮(口服避孕药 I 号)	炔雌酮	0.6	糖衣片	月经第 5d 起服每日 1 片× 22d
	炔雌醇	0.035		
复方炔诺酮膜(口服避孕药 I 号)	炔雌酮	0.6	纸膜型	月经第 5d 起服每日 1 小格× 22d
	炔雌醇	0.035		
复方炔诺酮片·330 (口服避孕药 I 号·330)	炔诺酮	0.3	糖衣片	月经第 5d 起服每 日 1 片× 22d
	炔雌醇	0.03		
复方 18-甲基炔诺酮片	18-甲基炔诺酮	0.3	糖衣片	月经第 5d 起服每 日 1 片× 22d
	炔雌醇	0.03		
复方左旋 18-甲基炔诺酮滴丸	左旋 18-甲基炔诺酮	0.15	糖衣片	月经第 5d 起服每 日 1 片× 22d
	炔雌醇	0.03		
复方醋酸甲地孕酮片(Ⅱ号)	甲地孕酮	1	糖衣片	月经第 5d 起服每 日 1 片× 22d
	炔雌醇	0.035		
复方甲地孕酮膜	甲地孕酮	1	纸膜型	月经第 5d 起服每日 1 小格× 22d
	炔雌醇	0.035		
口服避孕药 0 号	炔诺酮	0.3	糖衣片	月经第 5d 起服每日 1 片× 22d
	醋酸甲地孕酮	0.5		
	炔雌醇	0.3		
口服避孕药膜 0 号	炔诺酮	0.3	纸膜型	月经第 5d 起服每日 1 小格× 22d
	醋酸甲地孕酮	0.5		
	炔雌醇	0.3		

(2) 三相制剂:国外新近发展了相型短效避孕药,有双相及三相两种;我国现有 1 种,左旋 18-甲基炔诺酮和炔雌醇合并的三相制剂。三相制剂雌激素和孕激素含量比较接近正常月经周期时两种激素的体内水平比例,即早期时两种激素用量均低、中期雌激素用量较高,后半期孕激素量增高,雌激素量降低。第一相给药 6d,每天炔雌醇 30 μ g 和左旋 18-甲基炔诺酮 50 μ g;第二相给药 5d,含量分别调整为 40 μ g 和 75 μ g;第三相给药 10d,再分别调整为 30 μ g 和 125 μ g。

3. 服法和注意事项

(1) 服法:在月经周期第 5d 开始,每日服 1 片,连续服 22 片。每天服药的时间要相对固定,最好在晚饭后或睡前服,以减轻恶心、头晕等反应。如有漏服,12h 内

需补服 1 片。

(2) 注意事项:

1) 为避免或减少不良反应,每天服药最好在晚饭后或睡前、养成固定时间服药的习惯。如有时在早上服,有时在晚上服,这种不规则服药可使体内药物浓度不能保持在相对稳定的水平,同时也容易漏服。

2) 哺乳期妇女应在分娩 6 个月后开始服药。哺乳未转经需服药者,要排除妊娠;可任选 1 天开始服药。人工流产或自然流产后可待转经的第 5d 开始服药。

3) 药片宜保持干燥,避免受潮受热,若有受潮退色变质或糖衣磨损,影响药量不能服用。

4) 如准备生育,要停药半年后妊娠。在此期间,改用外用避孕药具。

5) 服药 1 个月可避孕 1 个月。如停止服药,必须采用其他避孕措施。

6) 对第 1 次服用避孕药的妇女,应详细询问病史和并作体格检查。严格掌握适应证和禁忌证。

7) 长期服药者应定期进行乳房、盆腔检查及宫颈防癌涂片检查。

8) 服药期间改用其他节育方法时,如绝育、放置宫内节育器等,需将该周期的药物按时服完。不应中途停药,否则会造成月经周期紊乱。

9) 40 岁以上的妇女应停止服用甾体类激素避孕药;吸烟的人最好不用避孕药,或到 35 岁左右就停用。

10) 短效口服避孕药必须在身体内保持一定的浓度才有作用。患病时,如腹泻、输液治疗可以加快药物的排泄。体内药量少了可以发生突破性出血或妊娠,所以有以上情况时,可增加药量或加用避孕套等方法达到避孕目的。

4. 影响避孕效果的药物

口服甾体避孕药和其他药物可能有相互影响,因而一般不宜与此换药物同时服用。此时应适当调整用药量,或改用其他避孕方法。在服甾体类激素避孕药的同时如果使用利福平、青霉素、氯霉素、甲硝唑(灭滴灵)、苯妥英钠、苯巴比妥、灰黄霉素、退热药、呋喃胺类药物可降低避孕药物效果(表 8-5),发生突破性出血或妊娠。在患病服药期间至病愈后 2 周内,必须加大避孕药的量。必要时加用后备的方法,如避孕套、外用避孕药等。

表 8-5 口服避孕药和其他药物的相互影响-对避孕药的影响

	药物类型	影 响	机 制
抗菌药物	氨苄西林	降低避孕药效果	抑制肠道细菌生长,干扰甾体类激素结合物分解,减少肠肝循环
	广谱抗生素	突破性出血	
	利福平	突破性出血	诱导肝药酶,促进避孕药代谢。
催 眠	苯巴比妥	降低避孕药效果	诱导肝药酶,促进避孕药肝内代谢
抗惊厥药	苯妥英钠	突破性出血	
解热镇痛药	氨基比林		
	非那西丁	突破性出血	促进避孕药代谢

加强避孕作用和副作用的药物,如三环类抗抑郁药(丙米嗪)与口服避孕药同时服用,一方面可加强避孕药的作用和副作用,另一方面加强抗抑郁药效果。其机制为两类药物在肝脏内竞争共同的代谢酶。

甾体类避孕药可影响其他药物的效果,在服甾体类激素避孕药的同时,如果使用降压药、抗凝剂及降糖剂,可降低这些药物的作用(表 8-6)。

表 8-6 口服避孕药对其他药物的影响

药物类型		影 响	机 制
降压药		降低降压药作用	避孕药增加血浆血管紧张素原
抗凝剂		降低抗凝剂疗效	避孕药增加凝血因子 E、W、X
降血糖剂	胰岛素及口服降血糖药	降低控制糖尿病的疗效	减退糖耐量,减弱胰岛素作用

5. 国外新近发展的孕激素

目前国外新近发展的孕激素有地索高诺酮(desogestrel, DG)、孕烯二酮(gestodene, GSD)及炔诺酮(norgestimate, NGM),它们与过去的 19-去甲睾酮类孕激素相比,具有更强的孕激素活性,而没有明显的雄激素作用。当与炔雌醇合用时,既不影响糖代谢,对脂代谢亦无影响或有利于降低血管栓塞发生的危险。它们与炔雌醇合用组成多种短效避孕药。

(1) 地索高诺酮:首先由欧加农公司研制成功,它主要起作用的是活性代谢产物 3-酮地索高诺酮。

常用的有 marvon (每片含炔雌醇 $30\mu\text{g}$ 及地索高诺酮 $150\mu\text{g}$)、mercilon (每片含炔雌醇 $20\mu\text{g}$ 及地索高诺酮 $150\mu\text{g}$)。亦有双相片 oridol 问世,为炔雌醇 $40\mu\text{g}$ 合并地索高诺酮 $425\mu\text{g}$ 共 7d,继以炔雌醇 $30\mu\text{g}$ 合并地索高诺酮 $125\mu\text{g}$ 共 14d。

(2) 孕烯二酮:孕激素类避孕药孕烯二酮系左旋 18-甲基炔诺酮前体,具有很强的孕激素活性,故可用较小剂量。它具有强的抗雌激素作用,而且是迄今惟一具有抗醛固酮活性的孕激素,与天然孕酮相似。孕烯二酮不同于地索高诺酮,它本身具有生物活性,不需经肝脏转化为活性代谢物。广泛的临床试验表明,孕烯二酮 $75\mu\text{g}$,炔雌醇 $30\mu\text{g}$ 组成单相避孕药(Femodene)效果好,对月经周期影响小,不良反应少。新近亦有三相片问世,为炔雌醇 $30\mu\text{g}$ 合并孕烯二酮 $50\mu\text{g}$ 共 6d,继以炔雌醇 $40\mu\text{g}$ 合并孕烯二酮 $70\mu\text{g}$ 共 5d;最后服用炔雌醇, $30\mu\text{g}$ 合并孕烯二酮 $100\mu\text{g}$ 共 10d。

(3) 炔诺酮:炔诺酮是一种具有很强的孕激素受体亲和力,而雄激素受体亲和力微弱的合成孕激素。NGM 与 DG、GSD 比较,他们和孕激素受体亲和力从高到低依次为:NGM > 天然孕酮 > DG > GSD > LNG。常用的药物有 cilest,每片含炔雌醇 $35\mu\text{g}$ 及炔诺酮 $250\mu\text{g}$ 。

(五) 探亲避孕药

探亲避孕药是我国根据实际需要所发展的避孕药物,它适用于不经常同居的夫妇。在探亲时由女性口服避孕。其主要优点是使用时间上不受月经周期的限制,在月经周期的任何 1 天开始服用都能发挥其避孕作用,而且效果甚好。另外,服用后 1 天即可发生避孕效果。缺点是可能引起月经紊乱。常见的探亲避孕药种类见表 8-7。

表 8-7 常见的探亲避孕药

名 称	成分及含量/mg	服 法	有效率/(%)
探亲片 1 号	甲地孕酮 2	同房前 10h 服 1 片,以后每晚服 1 片,探亲结束第 2d 上午加服 1 片	99.6
炔诺酮探亲片	炔诺酮 5	探亲前 1~10 或 15d 服 1 片,14d 后改服短效避孕片 1 号或 2 号	99.5~99.8
双炔失碳酯 (抗孕 53 号)	双炔失碳酯 7.5 咖啡因 30 维生素 B ₆ 30	房事后服 1 片,每天最多服 1 片,每月至少服完 12 片。服药间隔最长 3~4d。如探亲未结束已服满 12 片,以后每次房事后仍需服 1 片。如未服满 12 片,仍需每天服 1 片,至服足 12 片为止	99.0
探亲片 (R2323)	三烯高诺酮 3	当天上午及晚间各服 1 片,以后每隔 3d 服 1 片	99.8

(六) 事后避孕药

事后避孕药是指妇女在未用避孕措施下性交后,或某次避孕失效后,几小时或几天内立即采用的防止妊娠措施。目前采用的方法多属于性交后紧急措施。如果长期反复使用,可能引起月经紊乱,甚至产生全身的不良反应。

追溯往史,早在公元前 1500 年,古埃及就有事后避孕法的记载;口服或阴道给药,多为科学知识与巫法相结合的民间土方,其中阴道冲洗法曾盛行一时。现今常用的方法有:①雌激素;②雌、孕激素合并应用;③孕激素;④达那唑(丹那唑)(danazol);⑤米非司酮等。

1. 雌激素

20 世纪 60 年代初就开始了雌激素作为事后避孕药的研究,证实动物交配后给予大量雌激素可达到抗生育的目的。1964 年,Haspek 首先在临床应用大量雌激素作为事后药取得成功。此后,各种天然的、合成的均被广泛应用。

(1) 药物名称、剂量和服法(表 8-8)。

表 8-8 事后避孕药

成 分	剂量/(mg/d)	服 法
乙炔雌二醇	2~ 5	同房后 72h 以内,开始服药,连续服用 5d
己烯雌酚	50(25× 2)	同房后 72h 以内,开始服药,连续服用 5d
双烯雌酚	2~ 5	事后 1 片,以后每日 1 片,直至服满 10mg

(2) 作用机制:已知孕卵着床时,雌、孕激素的比例甚为重要。大剂量的雌激素破坏了这种平衡,孕卵不易着床。大量雌激素使子宫内膜间质与腺体不同步,改变了输卵管的蠕动,干扰受精卵的正常通行。

(3) 不良反应:恶心、呕吐、乳房胀痛及不规则阴道出血等发生的比例很高,甚至个别病例有发生肺水肿的报道,大大限制了其在临床上的推广应用。且大剂量雌激素和血管栓塞性疾病之间有一定的相关,因此,这种方法未得到普遍的推广。

2. 雌、孕激素合并应用

1977 年, Yuzpe 报道了在房事后 72h 内,开始给妇女服用乙炔雌二醇 100 μ g, 配伍 18-甲基炔诺酮 1.0mg, 12h 后重复给药 1 次。作者曾收集 608 例,其中 152 例房事发生在月经周期中期,结果仅有 1 例失败。他在 1982 年又对该方法进行了多中心临床研究,预期妊娠数下降 84%。它的作用机制可能为多环节的,但主要为子宫内膜的改变。从雌、孕激素配伍用药的剂量与单用雌激素相比,雌激素剂量从原来的高剂量下降到 1/125,服药天数由 5d 减少到 1d,不良反应发生率明显降低,而顺应性却明显增加。由于避孕效果尚好,它在英、美、加拿大等国广泛使用。但是,亦有研究者认为雌、孕激素合并应用效果不稳定,甚至低于高剂量雌激素法。

3. 孕激素

(1) 临床效果:1982 年,匈牙利 Seregely 应用左旋 18-甲基炔诺酮(LNG) 0.75mg/次,在房事后 48h 以内开始应用,每月 4 片。世界卫生组织于 1990 年报道将 LNG 用于事后避孕的研究并与雌、孕激素合并应用进行比较。LNG 组为房事后 48h 给予口服 LNG 0.75mg, 12h 后重复给药 1 次。结果 LNG 组失败率为 2.9%,而合并用药组为 3.5%。

(2) 作用机制:LNG 的避孕机制是一个综合作用,它可以抑制排卵、抑制黄体功能,使子宫内膜不易为受精卵着床,宫颈黏液不易为精子穿透。

(3) 不良反应:恶心、呕吐、头晕等不良反应不但低于雌激素组,而且还低于合并(雌、孕激素)用药组,但主要问题为月经周期缩短,突破性出血或点滴出血。而且, LNG 有一定的雄激素活性,故能降低血内高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), HDL-C 的降低将增加心血管疾病的发生率。

4. 达那唑

(1) 临床效果:Rowland 等于 1982 年首次报道应用达那唑(danazol)作为紧急事后避孕药。在房事后 120h 内给对象服药 400mg, 12h 后重复给药 1 次。50 例中有 3 例失败。Colombo 比较 800mg 与 1200mg 房事 73h 内服用的避孕效果,高剂量组

失败率为 0.9%, 优于低剂量组的 2.5%。

Zaliani 等于 1984~1988 年间对达那唑进行了大规模的临床试验, 比较达那唑 400mg $\times$ 2 次及 400mg $\times$ 3 次, 每次间隔 12h, 在房事后 72h 内开始服药, 其妊娠率前者为 1.71%, 后者为 0.82%。

(2) 作用机制: 达那唑化学名为 2,3-异 唑-17 α -乙炔睾酮, 为乙炔睾酮类化合物。对垂体促性腺激素有抑制作用, 能抑制性腺及肾上腺中甾体合成酶的活性。有雄激素和抗孕激素的效果, 能影响黄体合成孕酮的功能。其避孕作用的主要环节是针对子宫内膜以阻止着床。临床上多年来用于治疗子宫内膜异位症及功能性子宫出血。

(3) 不良反应: 不论恶心、呕吐均较雌、孕激素合并用药法为低, 短期应用亦不影响月经周期及经期, 但长期使用可能出现闭经。

5. 米非司酮

(1) 临床效果: 它是一种作用于受体水平的新型抗孕激素药物, 近年来亦试用于紧急事后避孕, 1992 年, Glasier 对 167 例妇女房事发生于预期排卵前后 3d 内, 在 72h 内给予米非司酮 600mg 1 次, 结果无 1 例出现妊娠。Webb 同年做了米非司酮、达那唑和雌、孕激素合并用药的 3 种紧急事后避孕药的比较性研究。米非司酮于性交后 72h 内服用 1 次, 结果米非司酮组无 1 例发生妊娠, 而预期发生妊娠数为 11.7, 显示了该药的特出效果。1993 年, 瑞典的 Gemzell 在 LH 峰的 2d 后给予 200mg 米非司酮, 157 个有排卵周期的妇女仅有 1 例妊娠, 而这些妇女至少有 124 个周期有排卵前后 3d 内性交史。目前需要建立简便、可靠、及价廉的监测排卵方法才能使这种避孕方法成为现实。

(2) 作用机制: 抗孕激素能延迟分泌期子宫内膜, 并影响受精卵的植入, 早期应用时能抑制排卵及卵泡发育。新近的研究显示, 对卵巢的作用是通过下丘脑及脑垂体。

(3) 不良反应: 服用米非司酮者不良反应如恶心、呕吐的发生率明显低于雌、孕激素的几种避孕法; 而月经延迟的发生率则明显增加, 达 42% 之多。延迟范围为 4~63d, 尤以卵泡期为甚。在黄体期用药者月经往往准时来潮, 但突破性出血发生率较高。

紧急事后避孕方法的研究工作近年来得到国内、外的重视。除药物外, 在 7~10d 内还可以使用带铜 IUD, 它不但引起子宫内膜的改变, 并可通过激发内腺素直接影响早期胚胎的发育。

二、避孕针剂

1. 概述

长效避孕针是 20 世纪 60 年代发展起来的甾体激素避孕剂。由于其使用方便, 效果可靠, 避免了口服给药的缺点, 成为当前常用的女用避孕措施。制剂类型有油剂; 微晶混悬液及微球微囊类, 原理皆为药物储存于局部, 缓慢释放后吸收维持长

效作用。目前全世界已有 3 000 万以上妇女使用,我国育龄妇女使用率为 2.5%。国内外可供临床使用的避孕针有 16 种,包括单纯孕激素 7 种、单纯雌激素 1 种及雌孕激素复合剂 8 种。长效避孕针的优点是:

- (1) 避孕效果超过 98% 妇女年。
- (2) 给药方法简单,由医务人员掌握可以及时了解用药后的效果和不良反应。
- (3) 肌肉注射避免了口服给药的首过效应及胃肠道不良反应。
- (4) 单纯孕激素避孕针可用于雌激素禁忌的对象及哺乳期。

2. 国内应用的避孕针

- (1) 种类、成分及有效率见表 8-9。

表 8-9 国内常用的避孕针

名 称	成分剂量/(mg/支)	有效率/(%)
复方己酸孕酮避孕针(1号避孕针)	己酸孕酮(250) 辅药·戊酸雌二醇(5)	98.25
复方炔诺酮庚酸酯 1号(浙长 1号针)	炔诺酮庚酸酯(80) 戊酸雌二醇(5)	99.8
复方甲地孕酮避孕针(7300 或美尔伊)	甲地孕酮(25) 辅药·17 β -雌二醇(3.5)	99.6
复方炔诺酮庚酸酯 2号(浙长 2号针)	炔诺酮庚酸酯(200) 辅药·环戊醚炔雌醇(0.5)	99.1
减量复方庚炔诺酮避孕针 1号	庚炔诺酮(50) 辅药·戊酸雌二醇(5)	99.8
减量复方庚炔诺酮避孕针 2号	庚炔诺酮(60) 辅药·戊酸雌二醇(5)	99.8
甲孕酮避孕针(DMPA)	甲孕酮(150)	96.4~100
复方甲孕酮避孕针	甲孕酮(25) 环戊烷丙酸炔雌二醇(5)	99.49

- (2) 给药方法:

1) 复方己酸孕酮避孕针(避孕针 1号):第 1次在月经第 5d 肌肉注射 2支,或在月经第 5 及第 10d 各注射 1支,以后在每次月经第 10~12d 注射 1支。如发生闭经,在排除妊娠后每隔 28d 注射 1支。

2) 复方炔诺酮庚酸酯(浙长 1号针):与避孕针 1号相同。

3) 复方甲地孕酮避孕针(7 300 或美尔伊):第 1次于月经第 5d 和第 12d 各肌注 1支,以后每次月经第 10~12d 肌注 1支。

4) 复方炔诺酮庚酸酯(浙长 2号针):第 1次于月经第 5d 肌注 1支,以后每隔 2个月肌注 1支。

5) 减量复方庚炔诺酮避孕针 1号及 2号:首次于月经第 5d 肌注 2支,或于经期第 5 及 10d 各肌注 1支,以后每月月经第 10~12d 注射 1支,或每隔 30d 注射 1支。

6) 甲孕酮避孕针(DMPA):首次于月经第4、5d肌注,以后每90d注射1次。

7) 复方甲孕酮避孕针:首次于月经第5d注射,以后每隔30d注射1支。

3. 国外应用的避孕针

(1) 单孕激素类:

1) 醋酸甲孕酮微晶混悬注射液(DMPA):商品名为 Depo-provera 由 Upjohn 药厂生产,主要成分为醋酸甲孕酮(MPA)。于1958年合成,1960年临床试用于治疗子宫内膜异位症等,1985年被WHO列入免费药品范围,1992年10月FDA批准用于避孕。目前90多个国家近1000万人使用,包括药品管理十分严格的国家如瑞典、法国、德国、新西兰、英国等,是美国惟一的避孕针。印尼、泰国、巴基斯坦、斯里兰卡等国应用广泛。

a. 临床药理学:醋酸甲孕酮的生物活性与天然孕酮十分接近,比 17α -羟孕酮活性高6~10倍,没有雌激素或雄激素样作用,在体内与孕酮受体结合有高度特异性。肌肉注射后缓慢释放吸收,6d可达峰值,20d以内维持血药浓度 $15\sim 25\mu\text{g}$ 。抑制排卵作用维持14周,体内无蓄积作用。大部分由粪排泄,约40%由尿排泄。

b. 避孕效果:12个月的避孕失败率为0%~0.2%妇女年,与皮下埋植及女性绝育术效果相似。

c. 用法:每支含MPA 150mg。于月经周期开始的5d以内深部肌肉注射,每3个月或12周注射1次。如延期至14周以上未注射,必须排除妊娠后再注射。每年常规随访检查1次;特殊情况下可于月经中期给药(如探亲较长时间)。首先需确定未孕,给药1周内应同时加用避孕套等保护措施;准备妊娠时,先停药1年,改用其他避孕措施。

2) 炔诺酮庚酸酯注射液(NET-EN):商品名 Noristerat 为 Schering 药厂生产;每支含量200mg,2个月($60\pm 14\text{d}$)注射1次,避孕失败率 $0.1\sim 0.22/100$ 妇女年。对脂代谢的影响较DMPA明显,HDL-C降低20%,载脂蛋白 A_1 (ApoA₁)降低8%,这些变化幅度较小而且对血凝无不良影响,因此不增加心血管病危险。不规则阴道出血的发生率较DMPA常见。其余两者相似。WHO专题组对两种孕激素正进行深入研究。

(2) 复方雌孕激素避孕针:每月肌注1次的复方庚炔诺酮(HRP102)及复方醋酸甲孕酮(HRF112)长效避孕针目前国际上应用广泛,具有高效、简便、月经类型正常等优点,已成为WHO推荐使用的方法。

1) 种类、给药方法及效果:见表8-10。

表8-10 国外复方雄孕激素避孕针

种 类	成 分	给 药 方 法	效果/(%)
复方庚炔诺酮长效避孕针	庚炔诺酮 50mg		
(Mesigyna, HRP102)	戊酸雌二醇 5mg	月经5d内1支	99.7
复方醋酸甲孕酮长效避孕针	醋酸甲孕酮 25mg	以后 $30\pm 3\text{d}$ 注射1支	
(cyclofem, HRP112)	环戊丙酸雌二醇 5mg		

2) 不良反应:

a. 月经改变:出血及闭经 HRP102 约 1.0%, HRP112 约 7.0%, 使用 1 年因出血停用率分别为 13.9% 及 19.1%。1 年后 HRP102 组 85% 月经正常, HRP112 组 70% 月经正常。

b. 体重增加:两组使用 1 年,体重增加约 1kg。

3) 安全性:糖耐量负荷试验轻度改变、基础血糖水平正常,糖尿病患者及糖尿病倾向者忌用。用药期血胆红素增高,停药 3 个月未恢复,提示药物影响胆汁分泌,因此黄疸病史者忌用。生育力恢复慢,停药 6 个月血药仍可测得,一般 1 年后恢复生育力。

4) 优缺点:优点为长效、高效、可逆、方便、月经类型正常。缺点为肌注后血药浓度上升快、陡峭高峰、浓度过高使肝脏负担重;影响糖代谢、糖耐量下降;有不规则阴道出血;生育力恢复较慢。

三、皮下埋植剂

(一) 概 况

由于甾体避孕药口服或注射的缺点,促使人们探索新的剂型及给药途径。近年来设计缓释系统,利用某种装置,控制药物释放,使体内浓度恒定地维持在最低有效水平,一次给药可长期避孕并减低不良反应;缓释系统用于眼科及心血管疾病的治疗已有多年历史。用于避孕为 1967 年 Segal 和 Croxatto 首先提出,以不溶性多聚双甲基硅橡胶为载体,在其中填充药物埋植于皮下,缓慢释放。经试验硅橡胶可以释放脂溶性药物。第 1 个临床试验在智利进行,硅胶管中装入醋酸氯地孕酮,两端用医用黏合剂封闭,埋藏于皮下。动物实验中发现有毒性而中止。1970 年至 1978 年在印度、巴西等地使用甲地孕酮,埋植管的数目从 1 根到 6 根,证实使用多根管子可达到抗生育浓度。1975 年在炔诺酮、三烯炔诺酮(R2010)及左旋 18-甲基炔诺酮(LNG)3 种药物研究中,选择 LNG 较理想,产生了目前的 Norplant。由世界人口理事会(ICCR)主持的皮下埋植剂历经 20 年研究成功。1984 年,WHO 专家评审结论为:Norplant 是安全、高效、长效、可逆的避孕剂;至今已有 18 个国家正式批准上市,50 个国家引进。1990 年 12 月美国 FDA 批准上市。我国于 1984 年引进 1989 年卫生部正式批准使用。至今已有 23 个省市开展临床研究工作,并已投入生产,沈阳产品为皮下埋植避孕剂 I 型,上海生产 II 型。近年来新型皮下埋植剂相继问世。

(二) 左旋炔诺孕酮硅胶棒(国外商品名为 Norplant)

1. 构造及释放率

Norplant 的控制系统材料为非生物降解型、甾体药物为 LNG。

(1) 左旋炔诺孕酮硅胶棒皮下埋植剂 I 型(Norplant):辽宁沈阳产品为 I 型,商品名 Cla 长效埋植避孕剂。硅橡胶细管,长 34mm,直径 2.4mm。每管装 LNG 36mg,两端以医用黏合剂封闭。6 根为一组,LNG 总剂量 216mg。埋植后早期每日

释放 68 μg , 渐下降, 1 年末每日释放 40 μg , 5 年末每日释放 30 μg 。5 年后释放量下降, 不能保证有效地防止妊娠。目前规定有效期为 5 年, 5 年以上尚有 1~2 年的安全使用期。实际据释放率测算, 6 年释放 LNG 总量 90mg, 每年释放量低于原始量的 10%, 其寿命约可维持 10 年。

血药浓度开始为 0.68ng/ml, 24 个月后为 0.37ng/ml, 5 年内维持 0.35ng/ml。LNG 半衰期为 18h。我国测试 1 年内血药浓度 0.92ng/ml, 每日释放 49 μg , 取出后 LNG 在血液中数天内消失。

(2) 同前名称 II 型(Norplant): 上海产品为 II 型, 商品名为 SIno-plant 长效埋植剂。将 LNG 与硅橡胶混匀制成芯棒, 外包一层硅胶膜, 每根含 LNG 75mg (国外含 70mg)。硅橡胶棒长 44mm, 直径 2.4mm, 2 根为一组, 总剂量 150mg。埋植早期血药浓度为 0.87ng/ml, 24 个月后为 0.49ng/ml, 平均每天释放 23 μg 。无爆破效应, 释放稳定为零级释放。

两种剂型皆以氧化乙烯气体消毒, 包装于加热封闭的塑料小袋内, 使用时剪开小袋即可。

2. 作用机制

(1) 抑制排卵: 血 LH 峰受抑制, E_2 水平有升高, 显示有卵泡活性。约 40% 使用者血孕酮可达到排卵水平 10nmol/L 以上, 但低于正常周期, 显示黄体不健, 提示 50% 的使用者抑制排卵。

(2) 宫颈黏液改变: 黏液稠、量少、拉丝度 $4.1 \pm 2.3\text{cm}$, 无典型结晶, 不利于精子穿透。

(3) 子宫内膜生长受抑制: 50% 使用者子宫内膜生长不良或呈不规则分泌反应; LNG 通过以上多环节发挥避孕作用。

3. 适应证及禁忌证

(1) 适应证:

1) 健康育龄妇女, 年龄 < 40 岁, 已婚已生育过一个健康的孩子, 夫妇自愿使用, 并能定期随访者。

2) 哺乳期: 哺乳期使用, 孕激素通过乳汁传递给婴儿的剂量大约是母亲使用剂量的 1‰~0.5‰, 对婴儿生长发育未受影响。

3) 适用于使用宫内节育器失败、口服避孕药不良反应重、对绝育手术有顾虑者。

4) 生殖道畸形不宜用宫内节育器者。

5) 流产后可立即使用。

6) 对雌激素禁忌者。

(2) 禁忌证:

1) 妊娠或可疑妊娠者。

2) 活动性肝病、黄疸或曾患妊娠肝病、妊娠瘙痒或妊娠疱疹者。

3) 乳腺肿瘤。

4) 糖尿病及糖尿病素质者(糖尿病家族史、巨大儿分娩史、糖耐量异常等)。

- 5) 高血压。
- 6) 血栓栓塞性疾病。
- 7) 严重头痛或偏头痛。
- 8) 不明原因的阴道不规则出血。
- 9) 抑郁症。
- 10) 体重超过 70kg 者。

11) 慢性病需长期服用利福平、巴比妥、保泰松类药物者暂不宜使用,因药物致肝酶活跃、降低避孕药效果。

4. 避孕效果及续用率

是评价节育方法的两项重要指标。

(1) 妊娠率:我国资料第 1 年妊娠率 0.1%,第 2 年为 0.2%,5 年累积妊娠率 0.6%~1.4%,低于人口理事会报道的 2.4%,妊娠率低于口服避孕药或宫内节育器。

1) 妊娠率与体重的关系:体重 > 70kg 者 5 年妊娠率达 7%,体重 < 50kg 者为 0.3%。

2) 妊娠率与年龄关系:25 岁以下的 5 年妊娠率为 3%;35~40 岁组 5 年妊娠率 0.7%。

3) 宫外孕发生率:我国资料为 0.09‰/妇女年。最早于埋植后 7 个月发生,多数于埋植后 40 个月以后发生。据北京地区调查,宫外孕在总体人群中发病率为 0.52‰/妇女年,说明使用皮下埋植剂不增加宫外孕的危险性。

(2) 可逆性:埋植后 24h 发挥避孕作用,取出后 24 小时失去避孕作用。血液中 LNG 于取出后 96h 清除。国外报道生育力恢复良好,取出后 1 个月受孕率 20%、3 个月 50%、1 年 86%、2 年 93%。我国报道有人取出当月受孕。

(3) 续用率:12 个月续用率 96.5%~97.01%,24 个月 86.2%。

四、避孕工具

(一) 阴道避孕环

阴道黏膜能有效地吸收类固醇。1970 年, Mishell 等人首次报告了临床应用。Upjohn 药厂生产的甲孕酮阴道环,1972 年以来经 WHO 人类生殖研究特别规划署研究认为是能恒定零级释放的低剂量孕激素系统,足以避孕而不一定抑制排卵。近 20 年来,阴道药环的研究及应用发展较快,是妇女乐于接受的一种避孕措施。其优点为:

- (1) 环内所含药物释放后经阴道黏膜上皮吸收可避免肝肠首过效应;
- (2) 在阴道局部持续释放小剂量的有效药物对全身影响小;
- (3) 放置及取出方便;
- (4) 性生活时间不受限制,优于阴道杀精剂。

1. 甲硅环

(1) 构造及效果:空心硅橡胶环形管内置入药芯棒。环周外直径 40mm,断面直径 4mm,壁厚 0.8mm。内含甲地孕酮 250mg。放置于阴道深部,每天释放 130 μ g。有效期 1 年,避孕有效率 97.85%。

(2) 作用机制及药代动力学:应用阴道药环第 1d 血药浓度为 2 398 μ g/ml,第 4d 为 2 993 μ g/ml,第 5~80d 为 2 500 μ g/ml,即 1~4d 达峰值,以后处于平台水平。使用后 FSH、LH、E₂ 两个峰及 P 峰均出现,但低于使用前。子宫内膜腺体数量减少、腺腔小、分泌物少、出现核下空泡、呈现混合型子宫内膜或分泌不良型内膜。组织化学表现内膜腺细胞糖原含量下降、碱性磷酸酶下降、酸性磷酸酶上升、溶酶体上升,说明甲地孕酮抑制生殖激素并影响子宫内膜正常发育宫颈黏液黏稠,阻止精子穿过及影响受精卵着床为主要避孕环节。

(3) 不良反应及处理:

1) 出血:少数人在使用初期出现不规则阴道出血(以点滴出血多见)。月经量减少或闭经,一般不需治疗,必要时加服炔雌醇片。

2) 脱落:蹲位排便时容易脱出,发现后立即洗净再放入。如经常脱落应在排便前取出,便后再放入。一个月内反复脱落 5~6 次者不宜用阴道药环。

3) 头晕、恶心:表现轻微,不需处理或用抗副反应片。

4) 阴道分泌物:硅橡胶组织相容性好,不引起局部刺激。国产阴道药环较国外产品小,对阴道壁无压迫作用。少数妇女主诉阴道分泌物增加,可能与原有的阴道炎症有关,可坐浴、局部用消炎药。

5) 性生活:阴道药环体积小,一般不影响性生活。少数男方主诉性生活有异物感,可自行取出。房事后立即放入,不宜间隔时间过长,以免药物中断而避孕失败。

(4) 安全性:甲地孕酮对糖代谢的影响较 19-去甲基睾酮类孕激素影响小,糖耐量试验变化不大,胰岛素轻度增高;甲地孕酮为短效避孕片 2 号的主要成分,目前已减量为原始的 1/4 量每日剂量 1mg,而阴道药环每日释放 130 μ g,更为安全。

2. 其他阴道环

(1) 18-甲基炔诺酮阴道环:为上海 20 世纪 80 年代研制的药环。结构与甲硅环相似,外直径 45mm,横切面直径 4.5mm。药芯含 18-甲基炔诺酮 35mg,每天释放 20 μ g。有效期 1 年,有效率 99% 以上。1 年妊娠率 1% 左右,脱落率 3%。

(2) 左旋 18-甲基炔诺酮阴道环:结构为芯型,外包一层硅橡胶膜,环直径 55mm、横切面直径 9mm。内载荷 LNG 6mg,每日释放 20 μ g,有效期 3 个月。有效率 96.3%,脱落率 4.6%。

(3) LNG+ E₂ 阴道环:由人口理事会研制,环内载荷 LNG 97~140mg, E₂ 46~66mg,释放率平均每日 LNG 250~300 μ g、E₂ 160~180 μ g。每个月经周期使用 3 周,经期取出 1 周,1 年妊娠率 0.7%~1.8%。因出血、脱落、影响性生活、阴道分泌物变化等停用率 23%。

(二) 宫内节育器

1. 简史

现代的宫内节育器是由古代的避孕器发展而来,在古代阿拉伯和土耳其,人们在骆驼的子宫内放入小石子来防止沙漠途中受孕。1909年,波兰的 Richard Richter 第一个报道了宫内节育器用于人类避孕,他设计的宫内节育器用蚕肠丝绕成环形,用带缺口的探针置入宫腔内。在产后12周放置,有感染或妊娠可疑者禁用。多数妇女放置后无不良感觉,具有长效、取出容易、取出后即恢复生育力、妊娠后的母婴均正常的优点。他的经验受到当时习惯势力的压制未能发展。1923年, Kari Pust 报道了类似的技术,他用三股蚕肠丝绕成环形并带有银丝绕着的尾部,其末端连一玻璃圆盘,据报道曾应用453例无失败,但尾部成为上行性感染的桥梁而受到反对。20年代末,德国的 Ernst Grafenberg(格氏)应用环形节育器的工作,在第七次国际生育控制等会议上作了报告,并于1930年发表。同时有伦敦的 Norma Haire,哥本哈根的 Leunbach 均报道了临床应用宫内节育器的良好结果。格氏最初应用的蚕肠丝环与 Richter 的相似,以后绕有银丝,最后单用金属丝绕成螺旋形的弹簧圆环(为铜、镍及锌等合金),经600名妇女应用,仅1.6%妊娠。汉堡的 Manes 得到同样的结果。格氏的经验曾鼓舞了很多人来进行宫内节育器的工作。1934年,日本的 Ota 在日本妇产科杂志上报道应用塑料环(太田环)的初步结果,日本医生开始接受这种方法。由于当时抗生素尚未发现,节育器的放置增加了感染的危险,很快受到欧洲医生的反对。1936年,日本政府也禁止使用宫内节育器,节育器的发展再次受阻。1959年, Oppenheimer 在以色列, Ishihama 在日本同时报道了宫内节育器临床应用的良好效果而无严重的并发症,宫内节育器又重新引起重视。1962年,人口理事会在纽约组织了第一次宫内节育器的国际性会议,美国、以色列、德国、日本、智利和其他国家均报道了应用宫内节育器的经验,其中美国的 Margulis 首次设计了应用生物惰性塑料做成含钼的盘香圈(margulis coil),可以拉成直条,用较小直径的套管式放置器,便于放入宫腔,依靠塑料的成塑性自动恢复原形; Jack Lippes 第1个设计带有双股尾丝的蛇形曲(lippes loop),含有钼剂,便于检查和取出而并不增加上行性的感染。1962年,国际会议后,人口理事会建立了“合作统计项目(co-operative statistics program, CSP)”,开始对宫内节育器进行了全面评价。1964年举行第二次国际性会议,宫内节育器的研制和应用已很广泛。1968年,在 Christopher Tietze 指导下, CSP 研究了不同类型的节育器,包括蛇形曲 A、B、C、D 型,盘香圈,大、小弓形(birnberg bows),不锈钢环,双圈 T 以及其他类型的节育器,并首次采用生命表法统计分析了约有27 000名放置者,470 000余使用月的效果和安全性。证明节育器是一种安全有效的节育方法,而且认为在各种不同类型和不同时间放置的节育器中尚无一种特别好或突出差的类型。以后生命表法成为国际上统一估价节育器效果的统计方法。到1969年有关节育器的设计、临床应用的经验和避孕机制的研究等文献已达千余篇。1968年, Howard Tatum 研究了子宫动力学,子宫腔的形态受子宫收缩而改变,使倒三角形变为近似 T 形的空隙,从而设计出 T

形节育器,减少了脱落。Davis 根据子宫腔不同平面所测得的径线,设计出盾形节育器(dalkonshield)。同期智利的 Zipper 在小动物实验中发现铜、锌等金属盐有明显的抗生育作用。1969 年, Tatum 和 Zipper 合作,比较 T 形节育器和带铜丝 T 形节育器的临床效果,证明铜能增加避孕作用。继之以节育器为载体,应用硅橡胶为释放系统加入孕激素药物,增加了避孕效果,并减少了月经出血量,于 20 世纪 70 年代初其临床效果相继报道。带铜或激素等活性物质的节育器称为活性节育器,也被称为第 2 代节育器。1974 年,联合国人口委员会在开罗召开第 3 次宫内节育器国际会议,会上统一了名称,把惰性节育器可称为“无药节育器”,活性节育器也称为“带药节育器”。20 世纪 80 年代的产品,多数在 T 形支架上增加铜的表面积,如 TCu220C、TCu380A、Multiload250、375、NovaT 等,以延长使用寿命,增加避孕效果。近年来,比利时的 Wildmeech 研究认为节育器的出血、疼痛和支架的存在有关,现已研制出没有支架的固定于宫底肌层的悬挂式节育器,如 FlexigardIUD(或 Cu Fix)等。

早在 20 世纪 30 年代末,格氏环已传入中国,但未得到推广。1957 年日本医学代表团带入太田塑料环、不锈钢圆环(简称金属单环)和橡胶叉,先后在北京和上海试用。1958 年,我国江俊孙报道 500 例应用格氏环 1~15 年的临床结果,介绍了放置器械、手术步骤、注意事项和副作用,并探讨了避孕机制。报道中的带器妊娠率为 4.5%,脱落占 14.1%。1959 年通过上述三种节育器的临床试用,以金属单环出血反应最小,效果较好,正式由上海市生产金属单环并推广。1960 年后全国推广金属单环,并进行大量的临床观察、探讨放置时间、存放期限、副作用防治及长期安全性的研究等。1960~1966 年除金属单环外,全国各地试制了不同材料、不同形态的多种节育器,并进行临床观察,如上海不锈钢单粗环、单细环、双环及镍铬合金单粗环和双环、仿盘香圈;天津麻花环;北京混合环和广东节育花等。1972 年起,北京、上海试用智利带铜 T 形节育器。1973 年,浙江首次仿制带铜 T 形节育器,继之上海研制成带铜 T 形、V 形节育器并得到推广,其他有带铜金属单环(上海)、硅橡胶盾形(四川)、不锈钢宫腔形(四川)及钢塑混合环(北京)等。20 世纪 80 年代研制的带铜节育器有带铜宫腔形节育器、全塑铜环、硅铜等。带有止血药物的节育器也已问世,我国首创了药铜合用的节育器如药铜环 165、活性 V 形节育器(均带铜和吲哚美辛)和吲哚美辛 V Cu200 等。其他正在研制的有记忆合金节育器、带磁性、孕激素(孕酮或 18-甲基炔诺酮)或孕激素和铜的 IUD 等节育器。

20 世纪 60 和 70 年代重点研制新的宫内节育器和避孕机制的研究,并对放置时期和存放年限进行了探索。80 和 90 年代,除新节育器研制外,并着重减少副作用和长期安全性的研究。

30 余年来,宫内节育器重新得到发展和改进,但仍有失败而妊娠、脱落、出血、疼痛和长期安全性等问题,有待继续研究和改进。但宫内节育器已被证明是安全、有效、简便、经济、不影响性生活,而且是可逆的方法,在世界范围内占有重要地位。当前全世界约有 8 000 万妇女使用,其中我国占 70% 以上。我国已婚育龄妇女中应用节育器者达 40% 以上,日本为 7%,其他亚洲地区为 3%~24%、非洲 3%~

10%、拉丁美洲及加勒比海为 0%~20%、中东及北非为 1%~22%、北美 7%~8%、东欧 0%~21%、西欧为 9%~39%。

2. 各种宫内节育器的性能

宫内节育器的类型众多,其避孕效果国内一般采用按例数计算的简单统计法,或按使用妇女月计算法(Pearl's),近 10 余年来已逐步应用国际上统一的生命表统计法。这个方法使各种资料可以相互比较。用生命表统计临床效果,常以其妊娠率、脱落率、因症取出率、非因症取出率及继续存放率来表示,并用年(月)累计净率(net rate)来观察 1 种节育器的事件率(events rate),用年累计粗率(gross rate)来比较 2 种或 2 种以上节育器或 1 种节育器在两个不同阶段或不同地区的事件率。

(1) 目前应用较多的节育器的类型及其改进:宫内节育器的种类很多,按其材料性能可分为两大类,一类为惰性节育器,用惰性材料制成;另一类为活性节育器,即在惰性节育器上带有活性物质,如铜、锌、吡啶美辛等,置入体内后能释放活性物质,以提高避孕效果或起到防治出血的目的。

按其结构可分为封闭式和开放式两类:封闭式如环形、V 形和宫腔形等四周封闭中间留有空隙。开放式如 T 形、Y 形、蛇形等。由于惰性节育器的带器妊娠率高,自 1990 年起已逐步停止生产,以活性节育器取代之。现按我国使用不同 IUD 的先后顺序介绍:

1) 带铜金属单环:金属单环,于 1960 年开始在我国推广,含铜金属单环曾应用于 1974~1990 年间。

a. 材料:0.3mm 不锈钢丝(1 铬 18 镍 9 钛),属惰性材料。

b. 形状:单环形,用 0.30mm 直径的不锈钢丝绕成直径 0.4cm 的螺旋形弹簧条后对接成圆环。带铜金属单环的外形与金属单环相似,在不锈钢丝的弹簧圈内穿有铜丝绕成的螺旋簧,表面积 200mm^2 。

c. 重量:400~650mg,支撑力 84~94g。

d. 型号:按其外径分为 18、20、21、22、23、24 共 6 种大小。

e. 临床效果:根据国际和平妇幼保健院对 6 250 例放置金属单环的妇女进行定期随访 15 年,按生命表法统计,其净累计带器妊娠率:1 年时为 2.35%、5 年时为 4.91%、15 年时为 5.51%;净累计脱落率于 1、5、15 年时各为 13.74%、17.64%、18.42%;因症取出率各为 6.43%、19.10%、21.74%;非因症取出率各为 5.85%、28.30%、47.81%;继续存放率各为 71.63%、30.08% 和 6.52%。

又根据同期使用带铜金属单环和金属单环的比较,放置 2 年时,带铜的妊娠率为 2.85%,明显低于金属单环(7.90%),但脱落率仍较高达 19% 以上。

f. 存放期限:国内对金属单环的存放期限做了系统的研究,从临床效果、副作用、宫颈癌细胞、子宫内膜组织学和金属单环的质量等方面进行了定期检查。1978 和 1983 年两次全国计划生育技术经验交流会上共有 22 万左右放置者的资料,存放 10 年以上者 8 600 余例,其中 15 年以上者 6 500 余例,未见癌发病率的增高。15 年以上子宫内膜病理检查 900 余例和 20 年左右子宫内膜电镜检查近 20 例均未见明显癌前期改变;金属单环质量检查钢丝强力符合冶金部标准,金相分析和扫描电

镜检查与新环相似。杨秉炎等经系统研究结果说明如放置后临床情况良好,可安全存放 20 年以上。

g. 特点:不锈钢丝材料化学性能稳定,在机体内不变质,可长期放置;便于消毒及 X 线透视或超声检查;放置和取出简便。但其近期妊娠率和脱落率较高,继续存放率较低,现已停止生产,将被其他活性节育器取代。

2) 硅 V Cu200 节育器(简称硅 V Cu):20 世纪 70 年代初我国自行设计,研制成的第 1 种活性节育器,于 1976 年推广(上海生产)。

a. 材料和构型:不锈钢丝、1.2mm 直径的硅橡胶管、0.35mm 直径铜丝和 0.21mm 黑色尼龙尾丝。

b. 形状:呈 V 字形。由三层组成,内为钢丝做成 V 形支架,两横臂中间为中心扣,可有 0.5cm 可塑性。其外有硅橡胶套管,在横臂及斜边上各绕有一段铜丝,铜表面积 200mm^2 。尾丝原缚结于中心扣处,现改为缚结于下端。

c. 重量:约 266mg。

d. 型号:按其横径的 mm 数分为 24、26、28 共三型。

e. 临床效果:根据上海市宫内节育器协作组随访 2 752 例,按生命表统计 1 年时净累计妊娠率为 0.26/100 妇女,脱落率 2.28/100 妇女,因症取出率 4.21/100 妇女,非因症取出率 3.96/100 妇女,继续存放率为 89.29/100 妇女;5 年时分别为 1.97/100 妇女、4.25/100 妇女、19.49/100 妇女、15.29/100 妇女及 69.06/100 妇女。

f. 存放期限:根据铜溶蚀情况建议放置 5~8 年。时间过长尼龙丝有断裂趋向。

g. 特点:V 形节育器适应宫腔形态,中心扣的可塑性也能适应子宫收缩,脱落率低;铜的存在又增加避孕效果;放置和取出以及随访均较简便,但点滴或不规则出血偏多。

3) 带铜 T 形节育器:

a. T Cu200:材料和构型:聚乙烯 T 型支架,含铜 30% 左右,纵臂上绕有 0.2cm 直径铜丝。表面积 200mm^2 ,双股尾丝。智利 T Cu200 横臂×纵臂为(32×36)mm。上海带铜 T 形节育器(简称上 T)的横臂两端呈圆珠状,以防止刺入子宫肌层。分为 26 及 28 型,宽度×长度各为(26×29)mm 和(28×31)mm。浙江 T 形节育器曾应用 3 种:为 T 形、Y 形和菱形,分大、中、小三型。重量约 175mg。

临床效果:智利 T Cu200 放置 1 年的续用率为(68.7~83.2)/100 妇女,2 年时妊娠率(1.3~3.2)/100 妇女,脱落率(4.3~10.2)/100 妇女,因症取出率(3.1~28.3)/100 妇女,续用率(42.8~69.4)/100 妇女。根据国际和平妇幼保健院对上海 T 形节育器 865 例随访 7 年的资料,按生命表统计,1 年的净累计妊娠率为 1.51/100 妇女,脱落率 5.61/100 妇女,因症取出率 9.22/100 妇女,非因症取出率 3.62/100 妇女,继续存放率 80.04/100 妇女;5 年时各为 4.84/100 妇女、7.61/100 妇女、22.51/100 妇女、35.94/100 妇女及 29.10/100 妇女。浙江带铜 T 形节育器,根据浙江省协作组资料(1975 年 5 月)随访 2 590 例,放置 10~34 个月,按 Pearl 公式计算带器妊娠为 2.36/100 妇女年,脱落 3.14/100 妇女年,因症取出 4.44/100 妇女年。

存放期限:塑料支架存在老化问题,5年以上取器时发现铜丝溶蚀脱落,个别横臂断裂,建议存放5年左右为宜。

特点:T形宫内节育器适合宫腔收缩时形态,横臂两端可埋入内膜起固定作用,不易脱落;铜提高避孕效果;便于放置和取出,存放期限5年左右。

b. T Cu220C:大号系20世纪80年代由国外引进,小号为国内生产。

材料和构型:聚乙烯含钼T形支架,大号T Cu220C两侧横臂上各有1个铜套,纵臂上有5个铜套,铜表面积为 220mm^2 ,横径和纵径各为32mm和36mm;小号节育器横和纵径各为28mm和32mm。有蓝色或白色双股尾丝。

临床效果:国内外报道妊娠率均较低,放置1年时在 $0\% \sim 2\%$,脱落率差别较大,为 $3.7\% \sim 8\%$,因症取出率为 $2\% \sim 15\%$,继续存放率为 $71\% \sim 94\%$ 。世界卫生组织多中心研究结果放置11年时分别为 $(5.58 \pm 0.83)/100$ 妇女、 $(12.20 \pm 1.15)/100$ 妇女、 $(33.90 \pm 1.82)/100$ 妇女、 $(21.72 \pm 1.11)/100$ 妇女。

c. 存放期限:10~15年。

d. 特点:临床效果好,妊娠率和脱落率均低,但出血和疼痛副作用较多,放、取和随访均简便。

3) T Cu380A 和 T Cu380Ag:前者为国外引进产品,后者尚在研究中。

a. 材料和构型:聚乙烯T形支架,横臂上各有一铜套,纵臂上绕有铜丝,铜表面积 380mm^2 。T Cu380Ag的铜丝带有银心,不易因铜融蚀而脱落,可延长放置时间,尚无产品。横臂 $\times$ 纵臂为 $(32 \times 36)\text{mm}$ 。

b. 临床效果:世界卫生组织多中心研究,11年时妊娠率为 $(2.13 \pm 0.53)/100$ 妇女、脱落率 $(11.46 \pm 1.15)/100$ 妇女、因症取出率 $(35.55 \pm 1.76)/100$ 妇女和继续存放率 $(21.78 \pm 1.11)/100$ 妇女。

c. 存放年限:10年以上。

d. 特点:带器妊娠包括宫外孕发生率甚低,继续存放率高,可长期存放。但2年内出血不良反应偏高。

4) 药铜环165:80年代我国研制成功。首创铜-吡啶美辛-不锈钢相结合的金属环,由高支撑力金单环发展而来。

a. 材料和构型:用0.35mm直径的不锈钢丝绕成的弹簧圆环,外形与金属单环相似,高支撑力约165g。在螺旋簧中交替加有铜丝簧和混有吡啶美辛的硅橡胶条各2条,铜丝表面积 200mm^2 ,吡啶美辛10mg。按环外径分为20mm、21mm、22mm 3种。

b. 临床效果:药铜环经全国临床多中心试验,应用1000例,定期随访结果,妊娠率1年时仅0.53%,2年时为1.19%,5年时为3.24%,出血率较低,继续存放率1年时达92.2%,2年时为89%,5年时近80%。

c. 特点:妊娠率低,放取技术与金属单环相似易于推广,可以长期放置。脱落率明显低于金属单环。因支撑力较高,放、取时宜扩张宫颈口。

5) 带铜宫腔型节育器(简称宫铜IUD):80年代后期我国重庆研制成功,由宫腔形节育器发展而来。

a. 材料和构型:材料用不锈钢丝,0.3mm 直径。系金属单环经热处理加工成等腰三角形,近似宫腔形态。在宫型节育器的螺旋簧内分段加入 6 节铜丝簧,表面积 $200 \sim 300\text{mm}^2$ 。分 GQ20、22 和 24 共 3 种型号,其横径 $\times$ 纵径分别为 $18\text{mm} \times 20\text{mm}$ 、 $20\text{mm} \times 22\text{mm}$ 及 $22\text{mm} \times 24\text{mm}$ 。

b. 临床效果:根据重庆报道,带铜宫形节育器放置 1 083 例,放置 1 年时妊娠率为 1.78%、脱落率 1.85%、因症取出率为 2.06%。

c. 特点:节育器形态适于宫腔、增强对子宫收缩的阻抗,脱落率低,但出血不良反应偏高。放置时需扩张宫颈口。可长期放置。

6) 全塑铜环 250:我国北京于 20 世纪 80 年代研制成功,由钢塑环发展而来。

a. 材料和构型:全塑铜环是聚乙烯塑料胎芯圈内连一个立柱,一端相连,另一端游离,周围外绕不锈钢丝,在立柱上绕有铜丝 250mm^2 表面积。支撑力为 160g 左右。分为 20、21、22、23 共四种型号。

b. 临床效果:北京报道全塑铜环 250 临床应用 1 154 例,放置 1 年时妊娠率为 1.4%、脱落率 0.79%、因症取出率 3.14%、继续存放率为 93.8%。

c. 特点:全塑铜环支撑力高,脱落率明显低于金属单环。全塑铜环效果好,但出血副作用比金属单环稍高。放、取时需扩张宫颈口。

7) 活性 γ 形节育器:为 1991 年研制成功的上海产品。

a. 材料和构型:由 3 层组成,最内层由 0.30mm 不锈钢丝做成 γ 形支架,中层绕有铜丝,表面积 $200 \sim 300\text{mm}^2$,外层套有不锈钢丝弹簧,中间扎住使两侧横臂不会弹开,该处和两端有吡啶美辛硅橡胶包住,吡啶美辛含量 20~25mg。

b. 临床效果:经全国 14 所医院多中心研究试用 2 423 例,随访 2 年,效果较满意。第 1 年继续存放率为 98%,第 2 年为 96% 以上,妊娠率、脱落率、因症取出率均在 2% 以下。其中 1 000 例已随访 5 年,继续存放率仍达 88% 以上,明显高于对照组 TCu220C。月经失血量测定,比放置前减少 17%~25%。

c. 存放年限:预期可放置 10 年以上。

d. 特点:属国内第一种带铜带药的节育器,并以不锈钢为主要材料。 γ 形适于宫腔,脱落率甚低,带铜和消炎痛药物,效果好,并减少月经血量,预期可长期放置。必要时放置需扩宫颈口达 6 号以上。因带有吡啶美辛药物不耐高温高压,已用气体消毒包装。如遇消毒期满或包装破损,不能高压消毒或浸泡消毒,需重新用射线或气体消毒。

8) 母体乐铜节育器(Multiload-Cu250 及 MLCu375):我国已引进并生产。

a. 材料与构型:聚乙烯伞形支架,两外侧缘呈齿状,具有一定可塑性,纵臂上绕有铜丝 250 或 375mm^2 表面积。有标准型、大、小和短型 4 种。宽 13~25mm,长 25~36mm。黑或蓝色双股尾丝。

b. 临床效果:放置 1 年的妊娠率 $(0.5 \sim 0.8)/100$ 妇女,脱落率 $(1.2 \sim 7.5)/100$ 妇女,出血和疼痛而取出率 $(2.3 \sim 7.4)/100$ 妇女,继续存放率 $(76.7 \sim 94.4)/100$ 妇女。2 年时各为 $(1.1 \sim 4.0)/100$ 妇女, $(1.2 \sim 2.9)/100$ 妇女, $(3.8 \sim 12.6)/100$ 妇女和 $89.5/100$ 妇女。

c. 有效期:5 年左右。

d. 特点:放取简便,效果好,疼痛不良反应较 TCu 为少,较适于哺乳期子宫。

9) 可塑性铜套节育器(nexigard Cu330,或 CuFix):由比利时研制。以表面积为 330 的 6 个铜套串在 1 条尼龙线上,上下端铜套模压固定在线上,使中间铜套不能上下移动;尼龙线距上端铜套 1cm 处有一小结,下端作为尾丝。用特制的放置器放置。放置器为带有小叉的直针,下端有针柄和保护器,针可穿过铜套内芯,把小叉叉住尼龙线结,线的尾端扣在针柄的保护器上。放置时,把带有 IUD 的放置器置入子宫腔,抵达子宫底正中后,放开保护器,把针连同尼龙线结一并穿入子宫底肌层,退出针头,尼龙线结即固定在肌层内。保护器能限制针的深入,不超过 1cm,可防止子宫穿孔。据报道 380 余例,1 年时脱落率为 0.9%,妊娠率仅 0.3%。由于缺少支架,而且可塑,因此对子宫内膜的压迫损伤少,因此出血和疼痛的副作用少。是目前最新设计的一种节育器。用于人工流产后或产时放置的 IUD,在线结下有一可生物降解的锥形体,有利于短期内固定于宫底肌层内。

(2) 国内曾用的节育器:国内曾用的宫内节育器种类很多,多数为惰性节育器,例如太田式塑料环、优生环、节育花、混合环、硅橡胶盾形节育器、盘香圈、橡胶叉、双环、麻花环、金属 V 形节育器、浙江 T 形、菱形、Y 形节育器等。

(3) 国内曾经或正在研究的节育器:种类较多,列举如下:蝶铜节育器(辽宁),输卵管间质部弹力节育器(沈阳),V 形磁性节育器(上海)——节育器上带有磁片代替铜丝,带孕激素钥匙形节育器(上海)——带甲地孕酮或 18-甲基炔诺酮,记忆合金节育器(上海)——由特种记忆合金钢材制成,硅铜花(上海)-铜丝模压在硅橡胶内呈花瓣状,硅酮环(北京)——铜粉混于硅橡胶内,棉酚优生型节育器简称硅棉环(北京)——硅橡胶中混有棉酚,吡啶美辛-V Cu200 节育器(上海)——外形与硅 V Cu200,钩铜 IUD,带铜和 18-甲基炔诺酮 NovaT 形 IUD(武汉和天津)等相似。

(4) 国外其他宫内节育器:

1) 蛇形曲(lippes loop):1962 年成为商品,是第 1 种最广泛应用于发展中国家(除中国外)的标准型。由聚乙烯制成,分 4 型。宽 22.2~30.0mm,长 26.2~27.5mm,带有不同颜色的双股尾丝可鉴别其大小。可以拉成直条用套管式放置器放置。为惰性节育器,美国已停产,以带铜 T 形节育器代替。

2) 双圈 T(Saf-T coil):1965 年成为商品,曾在世界范围内应用(除中国)。为惰性节育器,已停产。

3) 铜 7(Cu7):1974 年起应用于澳大利亚、墨西哥、美国及欧洲。其径线小,放置器细,特别适于未产妇放置。存放期限短,现已停产。

4) 诺佛 T(NovaT 或 Novagard):1979 年商品化,大多用于欧洲及加拿大、南非等。含钽聚乙烯支架,纵臂上绕有银心的铜丝 200mm² 表面积。宽和长均为 32mm。白色双股尼龙尾丝。

a. 临床效果:放置 1~4 年的妊娠率(0.7~2.2)/100 妇女,脱落率(4.2~7.0)/100 妇女,因出血和疼痛取出率(10.5~22.9)/100 妇女,继续存放率为(77.8~43.2)/100 妇女。

b. 有效期:10 年左右。

5) 释放甾体激素的宫内节育器:以宫内节育器为载体使甾体药物通过释放系统在宫腔内缓慢释放,作用于局部子宫内膜,全身不良反应少,所需药物剂量比口服避孕药更小。目前有释放黄体酮或左旋 18-甲基炔诺酮的节育器(简称 18-甲节育器)正在试用。

a. 带孕酮节育器(progestasert, IUD):1976 年已商品化。美、原西德、新西兰、英国、意大利、法国等均有应用,我国无此产品。由乙烯醋酸乙烯共聚物制成,横臂为实质性,纵臂内腔装有黄体酮 38mg 于硅油基质中通过管壁每日释放 65 μ g。节育器宽 32mm,长 36mm,有黑色双股尾丝。

临床效果:放置 1 年时妊娠率 1.9~ 2.5/100 妇女,脱落率 3.1~ 7.5/100 妇女,因出血或疼痛取出率 9.7~ 12.1/100 妇女。

有效期:12~ 18 个月。在已报道的比较性试验中,其妊娠和继续存放率与 Nova-T、TCu200、Cu7 相似。其最大优点是明显减少月经失血量,增加血清铁的水平,并可能改善痛经。但增加经期延长和点滴出血的发生率,因此而取出率高于其他节育器。

b. 宫内释放 LNG 节育器:为了改进 IUD 性能,研制含不同孕激素的 IUD,减少脱落的危险、减少阴道出血量。

目前应用含 LNG 的 IUD,具有缓慢释放药物,剂量低,避孕有效率高的优点。开始研制的每日释放 LNG2 μ g,由于宫外孕危险性增加 7 倍而停止试验。目前应用的 LNG-20-IUD、每日释放 LNG20 μ g, IUD 外形为 Nova-T 形态,纵臂上附有硅酮胶囊,含 LNG52mg,使用期限 5~ 8 年、1 年妊娠率 0%~ 0.2%,脱落率 3%。因症取出率 5%,主要因不规则阴道出血,其次因闭经及头痛。

妇女主诉经期延长而不适者占 10.7%,较左旋炔诺孕酮硅胶棒使用者少。月经改变是由于子宫局部释放 LNG 浓度高,使子宫内膜对雌激素不敏感,并非下丘脑-垂体-卵巢轴功能失调。如能做好咨询工作,妇女有较好的耐受性。其他不良反应少。因 LNG 释放量低,极少发生痤疮、乳房胀、情绪变化等。对体重、血压、脂代谢、糖代谢的影响不明显。LNG-20-IUD 使用中未发现宫外孕,盆腔感染发生率亦下降。

LNG-20-IUD 放置较困难,因纵臂较粗,放置人员需经培训,未发现取器困难。

LNG-IUD 是一种安全、有效的避孕工具,能减少月经量、减轻痛经、取出后迅速恢复月经及生育力,具有口服避孕药、IUD 和埋植剂三者的优点。月经改变的缺点有待进一步研究解决。

c. 宫颈内释放 LNG 节育器(LNG-IUD):形状同 Nova T IUD,横臂长 14mm,纵臂上包有一层含 LNG 的硅胶层。LNG 剂量 40mg。每日释放 LNG20 μ g。月经干净后放置,最迟不晚于月经第 7 天。故入宫腔后向下牵拉,使横臂置于颈管内口,纵臂在颈管内。30% 发生月经紊乱,15% 闭经。其优点为易放置、安全、穿孔少、嵌顿少、疼痛减少。闭经少于 LNG-IUD,未产妇可以使用。缺点为脱落率高,比 LNG-IUD 高 1 倍。

3. 宫内节育器的避孕原理

宫内节育器虽已广泛应用 30 余年,但其精确的避孕机制仍不十分明了。通过大量的动物实验来研究避孕的原理受到很大的局限性,由于不同动物放置节育器的避孕机制不同,不仅解剖上而且在生殖和内分泌系统方面均有差别。动物实验中,有的抑制精子运行、有的抑制着床、有的干扰黄体功能,都不能直接说明节育器在人体内的作用。

在人类目前广泛接受的理论是节育器不抑制排卵,由于宫内节育器压迫局部子宫内膜,机械性的损伤使内膜中性粒细胞浸润和生化改变而达到避孕作用。所有不带药的宫内节育器和带铜的节育器均刺激引起子宫内膜无菌性炎症和异物反应。在节育器放置后,中性粒细胞即出现在子宫内膜及子宫液中,继之出现异物巨细胞、单核细胞和巨噬细胞,这些细胞或其溶解产物,改变子宫腔和输卵管液,损害配子或受精卵存活,降低精子和卵子结合的机会,阻碍受精。

带铜节育器引起子宫内膜的炎症反应更明显。铜能干扰子宫内膜的酶系统,铜离子减低内膜分泌期中碱性磷酸酶和碳酸酐酶和透明质酸酶的活性,而这些酶是着床的必要条件;铜又干扰子宫内膜对雌激素的吸收,并增加子宫肌的收缩而防止着床;铜离子改变宫颈黏液的生化组成,因而可能影响精子活动、获能或存活。

近 10 年来已有数项研究发现,带铜节育器后,从腹腔和(或)生殖道的不同节段回收精子,发现精子在生殖道上段缺如或很少;也发现放置宫内节育器的妇女,子宫腔内无卵子,输卵管内找到卵子的机会也较少。因此认为节育器抗生育作用,可能干扰着床外,更可能发生在子宫外,影响受精前的过程。

含孕激素的节育器干扰子宫内膜的周期,使子宫内具有较高的孕激素水平,雌激素水平相对低下而不利于着床,或可能干扰精子的输送和获能。每日释放 $65\mu\text{g}$ 的孕酮节育器似不影响排卵,血浆中也不能测得。而人工合成作用较强的孕激素如左旋 18-甲基炔诺酮节育器,有时能抑制排卵,因而能增加节育器的避孕效果。

其他如节育器分开双例子宫内膜而阻碍受精卵着床、节育器导致前列腺素释放以及引起激素受体的改变及免疫作用等理论均有待进一步证实。

五、自然避孕法

自然计划生育(naturalfamily planning, NFP)的研究源于 20 世纪 30 年代 Ogi-no 及 Knaus 的工作,即所谓节律避孕法或日历节律法,简单地用以往月经周期的平均天数推算可孕期及不孕期。1962 年, Hartman 结合精子及卵子的存活时间改进了推算方法,称为安全期法。具体是将妇女过去连续 12 个正常周期中最短周期的天数减去 18 作为可孕期的第 1d,将最长周期的天数减去 11 作为可孕期的最后 1d。对于大多月经周期规则的妇女,周期天数的改变为 26~31d,因此其可孕期为月经周期的第 8d 至 20d。有人认为如将最短周期减去 20 作为可孕期的第 1d,则成功率将有所增加。无论日历节律或安全期法,其最大缺点在于根据过去的事实来推测今天将要发生的情况,因此失败率高达 20%;而且本法未经严格的对比研究,故不

推荐应用。自然计划生育这个名词是在 1971 年前后才普遍应用,简单地说 NFP 为不用任何药具,仅利用月经周期中交替出现的不孕期及可孕期来调节生育;本法不属于单纯避孕的范畴,它在一定程度上既可避免怀孕(仅于不孕期同房),也可促进怀孕(主要在可孕期,特别是可孕峰日同房)。为避孕目的而实施自然计划生育,可称为周期性禁欲或自然避孕法。世界卫生组织对周期性禁欲的定义为:“在月经周期的可孕期,夫妻双方自愿不进行性交以避孕。”有人提出,自然避孕法并不自然,周期性禁欲本身即违背自然规律。这显然是不对的,所谓“自然”不是指性生活,而是指通过观察和体会月经周期中各项自然的生理变化,以确定不孕期、可孕期两个时相。也有人认为,虽自然避孕法在理论上站得住脚,但需夫妇双方的密切配合,因此在实际生活中不易推广。然而不少有识之士已认识到本法的重要性,因为确实有一部分人不适宜用药、具避孕,例如对药、具的副作用比较严重者和因宗教原因禁用药、具者,自然避孕法不失为可供选用的有效避孕方法。此外,药、具避孕法归根结底是干扰了生理过程,即使无明显副作用,也多少会对机体产生某些影响,终究不如顺应自然周期的改变来避孕那样全无不良反应。因此,不少国家的计划生育规划已包括自然避孕法(如美、巴西、阿根廷、爱尔兰、赞比亚),另一些国家已开始资助自然避孕法的工作(如澳大利亚、加拿大、法、英、毛利求斯、新几内亚、卢旺达);此外,一些与人口有关的重要国际组织和国家机关、组织也支持自然避孕法的活动。如世界卫生组织(WHO)、联合国人口活动基金(UNFPA)、国际家庭保健组织(FHI)、美国国际发展署(AID)、美国国家卫生研究院(NIH)、美国人口委员会(PC)等。

(一) 基本生理学

1. 排卵

排卵是受精的要素,在排卵期同房可促进怀孕,否则可避免怀孕。理论上可孕期应从排卵期 72h 延续至其后 48h,这是基于精子及卵子在女性生殖道中的功能有效存活最长期限(分别为 72h 和 24h)而设定的。虽然对女性生殖的研究已日趋深入,今要知道排卵确已发生,只有两个直接指标,即受孕或在生殖道收集到卵子。下述监测卵的方法均系一些间接依据,但已达到科研和临床需要的相对精确性。

(1) 血中 LH 峰:诱发排卵的主要事件为血中 LH 峰。已知排卵出现于血中 LH 开始明显上升后 24~ 56(平均 32)h,或 LH 峰后 8~ 40(平均 16.5)h,这是所有间接依据中提示排卵的最佳指标。此外,也可用简易方法半定量测定尿中 LH 来评价峰值。

(2) 唾液中雌二醇(E_2)峰:垂体促性腺细胞存在 E_2 受体,高浓度的 E_2 诱导这些细胞的 GnRH 受体增加而促进其对 GnRH 的敏感性,从而触发 LH 峰值。在人,优势滤泡从周期第 7d 开始分泌 E_2 ,然后逐渐升高并达到触发 LH 峰的浓度(E_2 阈浓度为 600pmol/L,并至少维持 50h)LH 峰是在垂体水平被诱导的,GnRH 的频率和量似乎均未有所改变;可以认为 GnRH 只起到“允诺”(permissive)作用,即在 E_2

的诱导下。仅仅 GnRH 的存在(原来水平)即可触发 LH 峰。监测唾液中 E_2 峰值可推定排卵的时间。一般认为, E_2 明显升高后 85h(中位数)或峰值后 24h 可见排卵。

(3) 尿中雌酮-3-葡萄糖苷酸(E_1 -3-G)峰: E_1 -3-G 为 E_2 在尿中的代谢产物, 其与排卵的时间关系同上。

(4) 血中 FSH 峰: FSH 峰与 LH 峰基本一致, 监测血中 FSH 峰也可获知排卵的信息。一般认为, FSH 开始升高后 21.1h 或峰值后 15h 出现排卵。

(5) 血及唾液中孕酮升高: 孕酮加强 E_2 的正反馈效应, 其升高也可预示排卵。LH 峰前 24~48h, 猕猴卵巢静脉中孕酮水平增高; 妇女在 LH 峰当天, 血中孕酮增高。一般认为, 血及唾液孕酮在排卵前 7、8h 明显升高。

(6) 尿中孕酮代谢物孕烷二醇 3 α -葡萄糖苷酸(Pa-3a-G)升高。

(7) 超声监测优势滤泡直径一般认为, LH 峰前、后 1d 内滤泡直径达最大值, 随即从超声图像中消失。根据滤泡直径预测排卵并不十分精确, 应探寻指示滤泡成熟的其他指标, 如卵丘的状态等。

2. 宫颈黏液的周期性改变

宫颈黏液是一种水性凝胶, 由高黏度及低黏度两种成分组成。高黏度成分主要是黏蛋白组成的大分子网络系统, 是决定黏液流变学性质的组分; 低黏度成分则由电解质、低分子有机化合物(葡萄糖、氨基酸)及可溶性蛋白质组成。在月经周期的各阶段, 黏液随体内雌、孕激素水平的变化而有明显不同。E 型又称雌激素型, 黏液甚稀薄, 不含细胞, 纯净时可形成棕棕榈叶状羊齿形结晶, 其大分子链排列成具有宽大间隙的凝胶结构, 可容许精子通行。G 型又称孕激素型, 黏液十分黏稠, 为大分子致密网络结构所形成的凝胶团, 精子无法穿透。E 型黏液还可区分为 ES(串线状)及 EL(条块状)黏液。ES 为三种黏液中最稀薄者, 呈水样, 可自由流出阴道外, 它在宫颈管形成串线状胶束结构, 串线之间为可供精子游动的小管道, 将精子导向宫腔或宫颈隐窝。ES 还起到营养及保护精子的作用。EL 比 ES 略黏稠, 但比 G 型要稀得多, 它在宫颈管形成作为 ES 支架的直径约 0.1mm 的椭圆形条块状结构。EL 黏液可捕获及排除低质量精子。ES 比 EL 出现稍迟, 或许是由于分泌 ES 细胞对雌激素的反应性较弱之故, 也可能除了雌激素外, 此项细胞尚需要另外一个迄今尚不清楚的因子激活。滤泡期中当雌激素水平逐渐升高时, 宫颈即分泌 EL 型黏液, 以至充满宫颈管, 排卵前几天内及排卵当天, 宫颈上部被激活而分泌 ES 型黏液, 此水样黏液可沿 EL 条块的间歇向下流至整个宫颈。排卵后, ES 及 EL 型黏液迅速消失, 代之以宫颈管下部所分泌的 G 型黏液。

在排卵期, ES 型黏液占宫颈管上段黏液的 35% 以及宫颈管下段的 10%, EL 型占上段的 60%~65% 和下段的 85%; 此时 G 型黏液只占上段的 1%~2% 和下段的 5%。在黄体期, 97% 的宫颈管黏液为 G 型。相差显微镜观察表明, 雌激素期的黏液被展开后, 树枝状结晶排列成小管道。但未展开时仅见典型的羊齿状结晶; 排卵后, 宫颈黏液的此二现象均消失。在滤泡期, 宫颈黏液稀薄, 可流出阴道口, 妇女本人也能觉察。Billings 及 Flyon 等表明, 开始觉察外阴有黏液后平均 3.5~6.2d 可见 LH 峰, 而每日黏液排出量超过 0.1ml 时, 即说明排卵期已开始。

1991年, Odeblad 描述了 P 型宫颈黏液, 它只存在于峰日。在峰前、后 1~2d, P 黏液只占宫颈黏液总量的 1%~2%。它的分泌可能是由于峰日血中去甲肾上腺素浓度增高之故。P 黏液为紧接峡部的宫颈最上端所分泌, 它含有高浓度的 K^+ , 可促进精子运动; 此外, P 黏液也能捕获及排除低质量的精子。综上所述, 宫颈黏液起到以下作用:

- (1) 生物阀门: 雌激素化时阀门开启, 不然宫颈就被封闭, 精子无法通过。
- (2) 精子过滤: 捕获及排除运动力较弱的低质量精子。
- (3) 精子营养及刺激。

3. 精子存活时限

精子的功能性存活时限, 特别是在女性生殖道内的存活时限, 对于自然计划生育是一个至关重要的问题。一般认为, 在阴道内精子只能存活 4h, 且所有精子均于 48h 内消失; 宫颈管内精子可存活 72h。精子在宫颈管内的运转与激素周期有关; 对于高度雌激素化的宫颈黏液, 精子可在 5~15min 内进入宫颈隐窝。Odeblad 曾用微吸管吸出隐窝内 EL 黏液中的不活动精子, 将其放回 ES 黏液中, 精子可重新获得活动力; 但对于这些精子的授精能力是否受到影响, 则未见介绍。一般认为, 精子可在隐窝中存留, 并在此后的 2~3d 内不断被释出。

临床研究表明, 在雌激素开始上升前同房, 不大可能导致怀孕, 而在雌激素时相, 即使在可孕峰日前 5d 之久同房也可导致怀孕。所谓可孕峰日是指出现 E 型黏液的最后 1d, 这一天常与排卵相吻合。由于可孕峰日与排卵可有 $\pm 48h$ 的差距, 因此假若精子的功能寿命按通常认识的 72h, 仍有可能在峰日前 5d 同房而造成怀孕。对精子存活的确切时限, 尚无统一的意见。

(二) 自然避孕方法

1. 基础体温法

1905年, Vande Velde 即认为基础体温(BBT)的变动与排卵有关。排卵时 BBT 升高是由于孕酮的升温作用, 一般血浆孕酮水平达 $4ng/ml$, BBT 即明显升高; 只要血、尿孕酮(或代谢物)值保持在上述浓度, BBT 将维持高水平。温度上升的幅度 $0.2\sim 0.5^{\circ}C$, 通常是在排卵期 24h 内突然上升的, 有时上升前可有轻微下降。BBT 明显上升的定义为: 基础体温在 24h 内上升至比前 6d 的水平至少高 $0.2^{\circ}C$ 。Marshall 观察了 1088 个具有双相温度特征的月经周期, 表明至少在 80% 的周期中, 可见温度上升 $0.2^{\circ}C$ 或更多; 于 10% 的周期, 升温前有一暂时性降温。排卵时的升温也可能是渐进的或阶梯状的, 即在几天内达到最高升温。在此种情况, 只要连续 3d 的 BBT 高于以前的均值, 即可认为排卵已经发生。卵子受精后, 温度即居高不下。BBT 应于晨间睡醒后(起床前)立即测量, 以保证生理状态接近基础水平。已发展了一种专门用于测量 BBT 改变的“排卵体温计”及表格, 此表格的分度已加以扩大, 易于鉴定和记录微小的温度升降。温度可自口腔、腋下、阴道或直肠测量, 只是每天应测自同一部位。记录表格的形式亦甚为重要, 表格纵坐标 $0.1^{\circ}C$ 的长度应等于横坐标 2d 的长度, 就较易辨认温度的变化。如在排卵前体温读数的上限划一

横线,贯穿整个表格,可使 BBT 的变动显得更为突出。必须注意,BBT 表格的可靠性与测定和记录体温的方法是否精确有关。VoIIman 分析了 621 名妇女的 20 672 周期,表明在短周期(少于 17d),57.1% 的 BBT 曲线为单相性的(无中期上升),当周期天数增加时,单相曲线的发生率随之下降。24d 周期时为 5.8%,25~32d 周期时仅 1.4%~4.8%。当周期延长至 33d 以上时,单相曲线的发生率又趋上升,至 60d 或更长周期时,可升至 41.3%。单相曲线的发生与年龄密切相关,初潮期时为 55.7%,青春期时已明显下降,成熟妇女降至 2% 左右(23~29 岁时仅 1.2%),而绝经前期又上升至 34%。

BBT 变动应与 LH 峰相吻合,一般认为,如见到 3 次 BBT 高于上限横线 0.2 度或更多,则表明排卵后不孕期已经开始。但研究表明,BBT 升高可早在 LH 峰前 2d 或迟至 LH 峰后 3d 发生。Hilger 及 Baiky 观察了 24 位妇女的 66 个周期,表明 95% 的 BBT 变动发生于预计排卵日前、后 3d,而其余 5% 达 $\pm 5d$ 。此外,在 3% 的周期,虽血中孕激素水平已超过 16ng/ml,但 BBT 曲线仍为单相性;另外 4.2% 的周期,并未见孕激素升高,BBT 曲线却呈双相性。临床经验表明,甚至在 BBT 升高前 9d 同房,亦有可能怀孕。可见 BBT 变动与排卵的时间关系并不恒定,单纯以 BBT 作为指标来避孕或助孕并不理想,特别是那些无法确定可孕期开始于何日。如将 BBT 升高 4d 后作为不孕期,则避孕效果还是可以的,但在周期较长或无排卵周期时,要求禁欲的时间过长恐不易为人们所接受。

2. 症状-体温法

症状-体温(sympto-thermal)法依据于大多妇女在排卵期可有以下症状:

(1) 小腹不适及疼痛,并可伸展至一例或两侧大腿内侧。此症状一般仅 1 天上下,可能是由于雌激素作用于子宫或输卵管肌肉的结果。

(2) 经间出血:多在雌激素峰时出现,偶较多,可类似月经。

(3) 宫颈改变:宫颈上升(有时手指长度不易触及),并从软骨样硬度变成柔软如嘴唇;宫颈口略张开,分泌多量清澈黏液,其拉丝性及羊齿状结晶于排卵前 1、2d 最明显。

(4) 其他:外阴软性肿胀和腹股沟淋巴结肿大、压痛,排卵侧往往比较明显;窦性心率不齐(由于血中去甲肾上腺素增加之故)。

以上症状中,宫颈口张开及黏液分泌增多甚为恒定,而其他症状的出现率仅 50%。将 BBT 与这些症状(主要为黏液的质和量)结合起来判断可孕期及不孕期相当准确;避孕(助孕)效果也是不错的;一般可将开始觉察有黏液时(ES 流至外阴)作为可孕期的第 1d,而将黏液峰日(清澈、稀薄黏液的最后 1d)后 4d 或 BBT 升高后 3d(以迟者为准),作为可孕的最后 1d。如黏液表现与 BBT 改变有矛盾时,以前者为准。

3. 宫颈黏液法

宫颈黏液法也称比林斯排卵法(Billings ovulation Method)。20 世纪 70 年代早期,比林斯就主张以宫颈黏液作为监测排卵的单一指标;并将之运用于自然计划生育。宫颈黏液月经周期中血激素水平的准确信号,雌激素促进 E 型(可孕型)黏液分

泌。LH 峰前 1d, E 黏液分泌最多, 拉丝性最强; LH 峰当日 E 黏液的羊齿状结晶和精子穿透率最高; 而黏度和细胞含量最低。

已表明可孕型黏液首现于外阴标志着可孕期的开始, 外阴有黏液存在的最后 1d 为可孕峰日(最易受孕日); 一般与排卵同步。可孕峰日后的第 4d 为不孕期的开始。

Insler 等制订了宫颈黏液特点的评分制; 这是一个监护排卵的良好辅助方法; 已广泛用于妇科临床。Billings 的贡献在于指导妇女如何在外阴(不必在宫颈口)评价宫颈黏液, 并以之来确定可孕期和不孕期。外阴有稀薄黏液时, 妇女可感知局部润湿、滑溜; 不然就感到干燥(无黏液)或黏滞(少量膜片状黏稠黏液)。外阴的感觉是妇女判断黏液的主要信息, 当然也可用指尖或手纸接触外阴, 观察黏液的存在与否及其性状(稀薄或黏稠、拉丝性等)。

可孕期是从外阴润湿感第 1d 至外阴润湿感最后 1d 再加 3d。周期的其余日子(除月经期外), 外阴感到干燥、黏滞, 为不孕期。不孕期无论干燥或黏滞, 均应前后无变化(分别指为基本不孕型干燥及基本不孕型黏滞)。有时干燥几天后出现少量黏稠黏液(黏滞感), 可表示可孕期的临近或开始, 应按可孕期的规则对待。可孕型稀薄黏液只在妇女直立时才流至外阴; 因此评价外阴黏液应于直立至少 30min 后进行; 早晨起床前的观察并不可靠, 此时即使感觉不到黏液也不应同房。此外, 在排卵前不孕期(早期干燥日), 以隔天同房隔天评价黏液为宜, 以免将精液或同房时的阴道分泌物误认为是稀薄的宫颈黏液。月经期不应同房, 因经血会掩盖可能提前出现的黏液。

青春期、哺乳期及绝经期前均可用宫颈黏液法来判断可孕期及不孕期, 遵循同样的黏液规则; 同时也可用 BBT 作为辅佐手段。在这些阶段, 在长期无黏液后可出现断续的滤泡发育而出现可孕型黏液。“青春期时周期不规则”, 在妇龄(有月经的年限)1.1 岁时, 一般不排卵, 但可有一定程度的卵泡发育, 血清孕酮不超过 1ng/ml ; BBT 曲线 55% 呈单向性。妇龄 1.5 岁时可见排卵, 但黄体期甚短(4~8d), 血孕酮 $2.2\sim 2.7\text{ng/ml}$ 。2.9 岁时黄体期延长, 血孕酮升至超过 5ng/ml 。妇龄 5 岁时黄体期进一步延长, 但仍有 22% BBT 曲线呈单相。

妇女哺乳时, 卵巢功能受到抑制, 但即使完全以母乳喂养, 也不可能长期不排卵。卫生组织认为, 哺乳妇女早在产后 5 周即可怀孕。95% 的哺乳妇女在产后首吹月经前都曾出现可孕型黏液, 因此也可借此监测可孕期的来临。哺乳妇女因卵巢功能抑制, 可发生退行性阴道炎。阴道炎的分泌物也甚稀薄, 但呈灰色; 且不造成润滑感, 应与宫颈黏液相区别。

绝经前 4~5 年月经变得不规则, 生育力也降低。妇女在妇龄 35 岁时, BBT 曲线 10% 呈单相性, 妇龄 40~45 岁时增加至 34%。35~40 岁妇龄者有些周期不排卵, 有些周期是排卵的(BBT 改变)。但即便在排卵周期, 黏液甚少, 且可无滑润感, 拉丝性也不佳, 有些夫妻在此期间同房并不易受孕, 说明这些妇女的黏液状态与雌激素水平不相一致。这是由于在绝经期前, 雌二醇水平下降而雌酮升高, 故总的雌激素水平甚高而无可孕型黏液。

只要严格按照要求进行用比林斯排卵法避孕时不但效果比较好,而且适用于有生育力妇女的所有生理阶段。此法也可帮助正常或低生育力夫妇获得子嗣;据介绍,集中在可孕峰日前、后同房,即使 75% 的妇女在 2.76 个周期内怀孕。

第二节 男性避孕

男子避孕目前常用的方法主要是使用避孕套。在一时无避孕药具时,也有采用体外排精和会阴尿道压迫法避孕。外用杀精子药物避孕法,无论从杀精子药物的筛选研究,还是从临床应用方面都与男性有关,因此也在本章作扼要阐述。近年来,男子避孕药的研究也取得一定进展,但尚未能在临床推广应用。避孕方法必须具有对健康无害、效果可靠、不影响性生活、简便、经济等原则。

一、避孕套避孕

避孕套又叫阴茎套,通常是由乳胶橡皮薄膜制成的套子,性交时套在阴茎上,使射精时精液排在套内,阻止精液流到女子的阴道里,达到避孕的目的。这种用具使用方法简单,效果良好,是目前常用的男子避孕方法之一。

从 20 世纪 30 年代到 50 年代,世界各国有 1/2~2/3 育龄男女采用避孕套或联合应用其他避孕措施避孕。日本是应用避孕套最多的国家,据 1959 年统计,每对夫妇所选择的各种节育方法中,避孕套占 58.3%。60 年代以后,随着女用口服避孕药的问世,宫内节育器及绝育方法的广泛应用,许多国家根据育龄夫妇的具体情况,采用综合性避孕措施。但避孕套避孕具有独特的优点,使有些国家工具避孕率仍居首位,如日本 1969 年避孕套的应用率占 68.1%,1977 年占 78.9%。其他国家避孕套应用率较低,瑞典占 38%,英国占 28%,美国占 14%。

80 年代以来,随着艾滋病和性病的蔓延,采用避孕套避孕更受各界推荐及深受各界阶层的欢迎。人们逐步认识到推广使用和正确使用避孕套是预防艾滋病和性病的一种简便而有效的方法。

1. 发展史

早在 17 世纪后叶,英国皇家医师已用鱼皮制成阴茎套。18 世纪以来,欧美已开始采用阴茎套避孕及预防性传播性疾病。19 世纪后叶,欧美已开始制成橡胶阴茎套。第二次世界大战前有人采用羔羊或鲨鱼的盲肠进行脱脂手续,制成生物材料性质的阴茎套。第二次世界大战以后,世界各国对阴茎套的制作进行了多方面的改进,美国食物和药物部门加强了避孕套质量的控制,1949 年订出了正规规格,1957 年进行修订,严格限制质量上的缺点,有缺点的避孕套所占比例从 40 年代的 5%,下降到 1957 年 1%,到 1968 年又下降到 0.25%。由于改进了各式乳胶型号与生产的工艺流程,实现了自动化电击穿孔安全性试验来检查微小渗漏以代替充水和充气试验方法。在无尘、恒温 and 恒定温度的环境中进行自动化干燥,以避免灰尘黏附而引起针孔样损害,使避孕套质量更好。60 年代中期,干燥的硅油滑润剂被推广应

用,可提高性感,并降低避孕套撕裂的机会,密闭的金属铂片包装,减少了乳胶的老化,延长了避孕套使用寿命,可使避孕套保存 5 年而不受损坏。80 年代避孕套的花样品种不断增加,厚度、形状、颜色、隔离剂等方面都有不少改进,增强了性感,提高了使用率。

我国的阴茎套生产经历了一个从无到有,从小到大,从品种单一到品种齐全的过程,而且从卫生条件、生产工艺、电击试验、机械密封包装等方面不断改进,质量不断提高。1981 年上海乳胶厂试制成功透明避孕套,拌粉用石松粉和甲基硅油代替滑石粉做隔离剂,把阴茎套前端储精囊容量由原来 3.2ml 减少到 1.8ml,可改善性感。青岛橡胶厂近年来制成罗纹型、铁蹄型、超薄型避孕套颇受欢迎。

我国目前有上海、青岛、天津、大连、沈阳、广州、桂林 7 个乳胶工厂生产避孕套自动化生产线 14 条,年产避孕套已达 8 亿~9 亿只。

2. 避孕效果及其优缺点

避孕套避孕的效果,在英国一组调查中失败率为 2.6/100 妇女年,另一组加用其他避孕方法,其失败率为 3.1~4.8/100 妇女年。以上是对使用避孕套有经验的使用者,理论上统计的结果,对没有经验的试用者,据有人统计失败率高达 11~28/100 妇女年。国内上海国际和平妇幼保健院曾对 767 例使用避孕套的对象进行调查,其中 437 例单独使用避孕套避孕 3 年以上,248 例使用达 5 年以上避孕率达 94.4%。失败的原因主要是使用不当。

避孕套避孕的优点主要有:

(1) 方法简单无不良后果,不要医疗指导和监督。

(2) 适用于各种类型育龄夫妇,对新婚,或探亲,或因工作关系而夫妻同居机会较少对象,以及哺乳期妇女和其他不宜服避孕药的人更为适宜。对其他育龄夫妇只要方法掌握正确可长期使用。

(3) 为了防止滴虫及其他性病的传染与再感染,使用避孕套避孕有其独特的优点。

(4) 有些早泄男性采用避孕套避孕可减低阴茎头的敏感度,使性交时间得以延长,可使夫妇性生活得到和谐。

(5) 避孕套是一种外用避孕工具,全无男性不良反应。

在避孕套使用过程中也存在一些问题,譬如,有些人认为避孕套使用会使感觉迟钝,而且每次房事都必须使用而感到麻烦,也有极少数人对乳胶过敏,使用后局部有轻度红肿瘙痒现象。避孕套使用不当还可造成避孕失败,失败原因几乎都由于避孕套的破裂和漏泄造成,因此,在房事后取出避孕套应仔细检查若发现有精液漏出,应在 72h 内用 1 次事后避孕药以防止受孕。

3. 使用方法

虽然避孕套的使用方法简单,但仍有因使用不当而造成避孕失败者,正确的使用方法应为:

(1) 避孕套的选择:避孕套有大、中、小 3 种规格,直径分别为 35mm、33mm、31mm,使用前应选择适当规格,太大容易滑脱而落入阴道内,太小则产生不适感。

一般先以中号试用,如感不适,再换大号或小号。

(2) 使用前用吹气法检查,有无破损,发现漏气就不能使用。

(3) 每次性交前就戴上,不要等到射精前才用,因为射精前常有少量精子随分泌物排出。

(4) 戴前先用手捏瘪前端小囊,挤出囊内空气,放在阴茎头上,顺卷边往上推,直至阴茎根部。

(5) 戴套后在避孕套外层涂些避孕药膏,以增加润滑,避免干涩摩擦而破裂。

(6) 射精后,在阴茎尚未完全软缩前,按住套子上口与阴茎一起拔出,以免精子外溢或套子滑落。

4. 使用失败的原因及处理方法

有些人使用避孕套避孕后又怀孕了,这主要是没有正确地掌握使用方法。常见的使用失败的原因如下:

(1) 使用前没有仔细检查避孕套有无破损,射精后精液从套的破口处流入阴道。

(2) 射精后没有及时按住避孕套上口,连同阴茎及时退出阴道。男性射精后阴茎就很快软缩,这样在阴茎和避孕套之间就会出现空隙,若不及时抽出阴茎,则在避孕套内的精液就会沿阴茎与避孕套之间隙流出,进入阴道而引起怀孕。

(3) 没有在性交前就戴上避孕套,有些使用者认为开始性交时可不戴套待快射精前才开始使用,致使在射精前男性尿道排出的少许分泌物,这些分泌物中也会含有精子,进入女性阴道,用这种方法避孕也会造成失败。

(4) 选择避孕套规格不当,如选用的避孕套过大,这不仅可使射精后精液沿避孕套和阴茎之间隙向外流出,而且在性交结束拔出阴茎时会使避孕套掉入阴道,这样避孕套就没有起到阻止精液进入阴道的作用。如避孕套掉入阴道,除及时用手将避孕套取出以防存留过长造成感染,还必须采用灌洗或立即把避孕药膏挤入阴道内等补救措施。

(5) 性交后如发现避孕套破损或有精液流入阴道,女方应立即坐起,让精液流出,并应马上清洗会阴、阴道。有条件的可以进行阴道灌洗即用干净温开水冲洗阴道。如无灌洗条件,可用干净纱布蘸上淡醋水擦洗阴道以杀死阴道内残存的精子,并应使用外用避孕药膏和服用 53 号抗孕药片。

5. 避孕套的推广应用

避孕套避孕方法简单,易行,安全可靠,优点很多,一般情况下对男女双方都没有副作用。然而,为何许多育龄夫妇仍然缺乏使用避孕套的主动性呢?原因之一是人们认为戴上避孕套会降低性快感,其实,男性的性反应包括性兴奋期、持续期、性高潮期及消退期等过程。戴避孕套后使性刺激感觉稍差,但能延长性交时间,使性高潮较慢到来,而男性这四个过程仍然是正常的,射精的出现,使男性同样可达到性满足,尤其是近来发展的薄型避孕套使性感基本上不会受到影响。经常戴避孕套避孕的夫妇随着时间的推移也会慢慢习惯,对性欲没有影响。原因之二是有人错误地认为使用避孕套后精液不能进入阴道会造成“阴阳不合”,进而影响夫妻感情,这

是没有科学根据的,进入阴道的精液,只有为数极少的一部分精子穿过子宫颈而进入子宫腔,而大部分留在阴道内的精液都流出阴道外,即使进入宫腔内的精子如无受孕,也会失去活动能力,逐渐破坏,吸收。男性的精液和精子对女性来说是一种异性蛋白,具有抗原性,有些妇女多接触精液,在身体内会产生一种抵抗精子的抗体,这就是通常说的免疫反应。因此经常采用避孕套避孕不但不会造成“阴阳不合”,也不会影响性欲和性功能,而且在预防感染,性疾病的交叉感染以及避免引起免疫性反应都有肯定作用。

6. 避孕套保存方法

橡胶制品在空气中,阳光和温热的作用下易于变质,应保存在避光阴凉处,并避免与樟脑等药物接触,国产避孕套储藏在阴凉干燥处,储存期可达1年半。

二、体外排精避孕法

体外排精避孕法是指射精前将阴茎抽出阴道,将精液排出体外。方法虽然简便,但必须在男女双方对正常性功能有充分理解的基础上进行,而且双方要密切配合,否则会使部分精液漏在阴道内而使避孕失败。实际上在排精前排出的尿道分泌物已含有少量精子,因此该避孕法只能在没有避孕工具时,作为临时的避孕措施。

体外排精避孕法是一种最古老而普遍采用的避孕方法,欧洲有些民族约有2/3采用这种方法避孕,1985年在澳大利亚,仍有1/5采用这种方法。

体外排精避孕法的优点是简便,经济,不需要医药管理。其缺点是在某种意义上不太符合生理,需要有很好的自我控制能力,否则不但难以达到性和谐,还可造成避孕失败。某些男性由于这种方法引起精神压力可导致阳痿,特别是在泄精过快的对象易发生阳痿;也可引起不射精,因此许多男性从生理或心理上不能接受体外排精法避孕,因此,体外排精避孕法只适用于能很好掌握该项方法的夫妇使用。假如能配合安全期避孕法使用,即在安全期采用体外排精法,在妇女排卵期用避孕套等工具避孕,效果就更可靠。

三、会阴尿道压迫避孕法

会阴尿道压迫避孕法是指临射精前,立即用手指强力压迫会阴部尿道,阻止精液自尿道排出,达到避孕目的。

根据男子生殖器官的解剖,由输精管壶腹和精囊汇合而成的射精管,最后开口到前列腺部尿道。而男性尿道又可分为前列腺部尿道、膜部尿道、球部尿道及阴茎部尿道四部分。球膜部尿道处于耻骨联合和会阴部之间,因此要掌握好在性交至即将射精时,用手指在会阴部向耻骨方向紧压球部尿道,使尿道管腔闭合。这样,射精时精液向尿道前方射出受阻而逆行排入膀胱。性交后排尿时,进入膀胱的精液就连同尿液一起排出体外。据部分使用者体会,该方法简便易行,只要掌握适当,避孕效果可靠,甚至有长期采用该法避孕者。

但该方法在某种程度上不太符合生理要求,我们知道,男性射精过程分三步完成:第一步附睾尾部、输精管及附属性腺相继收缩,将精子和精浆驱入前列腺部尿道,组成精液;第二步是膀胱颈部肌肉收缩,阻止精液逆行排入膀胱;第三步随着会阴肌肉及阴茎的收缩,将尿道内精液有节律地从尿道口喷射而出。而会阴尿道压迫避孕法,是用机械方法阻止精液向外排出,迫使精液逆流入膀胱,若压迫力量不够,或压迫部位不适当,仍可使部分精液从尿道排出而使避孕失败。另外,假如男性患有前列腺疾病,采用这种避孕方法势必将含有细菌的精液排入膀胱,发生性交后的尿频、尿急等尿路刺激症状。而且假如使用该方法避孕的夫妇对性生理解剖知识缺乏,造成精神负担,还会因心理因素造成性功能障碍。因此,这种避孕方法,只适用于没有生殖道感染,而且夫妇对该避孕方法充分理解基础上,作为暂时应用的避孕措施。

四、外用杀精子药物避孕法

外用避孕药早为人们重视。1856年 Koller 首次发现某种有机药物具有杀精子作用之后,研究人员对杀精子药物就进行了大量筛选,至 1964 年,经国际计划生育联合会正式批准使用的就有 23 种。

随着女用口服避孕药和宫内节育器的广泛应用,杀精子药物的应用,因避孕效果较差而受到一定影响。20 世纪 60 年代以后,随着外用杀精子药剂型和应用方法的改进,使用不需要医务人员的特别指导和监督,也没有全身不良反应,尚能受到不少育龄夫妇的选用。目前临床常用的外用杀精子药除了胶冻、片剂、栓剂之外,含杀精子剂的阴道海绵栓,缓慢释放雌孕激素的阴道环也相继问世,并开始临床使用。对这类外用避孕药的要求,临床试用前的检测标准,临床试验的程序,药物质量控制以及安全性评价等方面也都进行了系统性研究。

1. 外用避孕药的要求

外用避孕药必须具备杀精效果好,对人体健康无害,用法简单等要求。

(1) 可靠性:由于要求少量药物能杀灭整份射出的精子,因此药物必须具有良好的溶解性能。性交前放入阴道的药物很快溶解并分布在子宫颈口,阴道黏膜表面及黏膜皱襞凹陷部位,这种溶解后的药物应该具有一定的黏性,当身体各种位置变动时(如坐、立、行走等)都不致流出,也不为性生活时阴道和子宫颈的分泌物而影响其杀精的效果。外用避孕药还应具有一定的稳定性,一般状态下应可长期保存而不改变性能。

(2) 对人体健康无害:由于避孕药物是供健康人经常使用,因此要求它对男女性器官无局部刺激作用,能保持阴道原有的正常生理状态,极少改变阴道酸碱度,也不杀伤阴道内正常存在的非致病性阴道杆菌而引起病理性细菌或霉菌生长,药物吸收后对心、肝、肾等重要脏器无害,也不会发生溶血作用以及产生内分泌方面和性欲、性功能方面的变化,药物长期使用无致癌作用,也不会引起局部炎症反应,停用后即可恢复生育力,对新生子女不会产生遗传学方面的变化。

(3) 实用性:外用避孕药应无特殊气味,药物玷污衬裤时应易于洗去。还要求包装简便,容易保藏,携带方便,用法简单。应用避孕药后不会增加或减少阴道分泌物而影响性生活。

(王桂茹 翁 静 史小林)

第九章

不孕症

不孕症,通常指婚后两年、同居、有正常性生活,未采取任何避孕措施而未曾受孕者。对于女性,不孕是指不能怀孕;不育是指虽有怀孕但不足月分娩,均以流产、死胎等为结局,无存活婴儿者,如怀孕后流产、异位妊娠、早产,故有孕产之称。但对男性来讲统称不育症。

不孕症及不育症还可根据以前是否妊娠分为原发性和继发性不孕。原发性不孕是指婚后有正常性生活,同居两年未避孕却从未妊娠者。继发性不孕指曾有过妊娠,而后未避孕两年不孕者。不孕症又分绝对不孕和相对不孕。绝对不孕是指夫妇一方有先天或后天解剖生理的缺陷,无法纠正而不能妊娠者。而相对不孕是指夫妇一方因某种因素阻碍受孕,或使生育能力降低,导致暂时不孕,如该因素得到纠正,仍有受孕可能。

有关不孕症的诊断的年限,国外的多项调查显示,生育力正常的夫妇不避孕1年内的妊娠率为80%~90%,2年的妊娠率为93%~95%;北医大与国家计划生育研究所的调查显示,北京地区婚后1年的妊娠率为94.8%,两年为98%。上海纺织系统的资料表明,婚后1年初孕率为87.7%,婚后2年初孕率为94.6%,婚后3年初孕率为1.9%,故将不孕症定为婚后两年不怀孕。但婚后1年不孕应引起注意,可查找原因。世界卫生组织1995年编写的《不孕夫妇标准检查与诊断手册》中规定,不孕的诊断的年限定为1年并逐渐得到了妇产科学界的认同。

不孕带给患者的痛苦是巨大的。从来自全国各地不孕症患者的6300封来信分析(1988~1992),其内容反映出不孕症患者的社会心态、伦理观念及对不育症的社会舆论,所有患者都盼子心切。33.7%认为无孩子的家庭是不完善的,46.3%致成心理压抑,13.0%夫妇关系受到影响,从而导致将离婚或已离婚的占2.8%。患者从不同角度诉说自己精神痛苦的占22.7%;十分痛苦的为5.7%;无法生存想自杀的有7.6%。患者的家庭成员也有反应,如蔑视不孕症患者的有8.4%,责怪的有4.5%。老年人盼孙心切的有8.4%,认为家庭不幸的有4.2%。而这些蔑视和责怪

往往不公正的指向女方。社会舆论也有 33.7% 认为不孕是家庭的缺陷, 2.5% 歧视这样的家庭。很多患者诉说自己所忍受的伤心、痛苦、绝望和耻辱。说明中国人的生育伦理观受封建、陈旧观念影响较深, 并没有随着经济基础的变化而发生转变。不育症患者, 特别是女性患者受落后思想的影响和束缚, 痛不欲生, 处于精神和社会舆论的折磨之中。家庭是社会的一单元, 家庭不和睦, 社会也就增加不安宁因素。25% 的患者表示“不惜一切代价治疗不育症”, 这是一种迫切愿望的反映。另外, 对 625 例不育妇女和其中 425 例妇女的丈夫进行心理咨询调查资料, 说明 80% 以上夫妇承受着不育所致的各种心理压力, 特别是文化水平低的不育妇女心理压力更大。12.0% ~ 15.0% 夫妇性生活受到影响, 7% ~ 8% 婚姻关系恶化, 8.6% 因不育而家庭关系紧张。约 30% 表示不育检查和治疗过程本身亦带来一定的精神紧张和心理负担。

各个国家的不育发病率不同, 病因也不同。如印度的不育发病率为 9%, 而喀麦隆为 45%。分析其病因, 发现感染不育, 特别是性传播性疾病引起女性不育起到重要作用, 非洲某些国家的某些地区性传播性疾病的发病率几乎相当于发达国家的 10 倍。关于男女不育病因分析, 在发达国家单独女方病因不育占 31%, 单独男方病因不育占 22%, 双方原因占 21%, 不明原因占 14%, 以后怀孕占 12%; 而发展中国家单独女方病因不育为 37%、单独男方病因不育占 8%、双方原因占 35%、不明原因占 5% 和以后怀孕占 15%。

第一节 女性不孕

一、病 因

导致女性不孕的病因包括: 卵子产生异常、输卵管因素、子宫问题、免疫方面因素以及不明原因。

(一) 卵子产生异常

卵子产生异常是引起不孕的常见原因, 不排卵常伴闭经或月经过少。造成卵子产生异常的原因可以分卵巢因素、垂体因素、下丘脑因素及其他内分泌腺功能异常。在所有不孕症中, 女性内分泌的问题占 20% ~ 40%, 持续不排卵有 15% ~ 25%, 稀发排卵为 8% ~ 10%, 不恰当排卵如小卵泡排卵、多囊卵巢综合征、高催乳素血症等为 15% ~ 20%, 黄素化卵泡不破裂综合征(LUFS)为 3.5% ~ 29%。

1. 卵巢性无排卵

(1) Turner 综合征: 因性染色体异常引起, 缺少一个 X 染色体或其分化不完全。染色体核型为 45,XO, 有阴道, 有子宫, 但无卵巢。表现为原发性闭经及第二性征发育不良。患者身材矮小, 常有盾胸、后发际低、肘外翻、腭高耳低、鱼样嘴等临床特征。

Swyer 综合征, 即单纯性腺发育不良, 体格发育无异常, 主要表现为条索状性

腺及原发性闭经。染色体的核型为 46XY;性腺为索条状,但有子宫和阴道,即米勒管有发育。由于 Y 染色体存在,患者在 10~20 岁时发生性腺母细胞瘤或无性细胞瘤的危险增高,诊断确定后应立即切除条索状性腺。以上二者的社会性别为女性,必须行赠卵体外受精-胚胎移植才能怀孕。

(2) 卵巢功能早衰:凡妇女在 40 岁以前绝经者,称为卵巢功能早衰。卵巢萎缩、卵巢小,其内卵泡多已消失,雌激素水平低下而促性腺激素浓度升高,常伴有更年期的症状,表现为继发性闭经。可能由病毒感染引起,卵巢萎缩、卵泡缺乏;亦可能由自身免疫疾病引起,如慢性淋巴细胞性甲状腺炎、类风湿性关节炎等,发生自身免疫性卵巢炎。总发生率 10%,是 10% 继发闭经的原因。

(3) 多囊卵巢综合征(PCOS):是引起不排卵性不孕的主要原因。多囊卵巢(PCO)与多囊卵巢综合征(PCOS)是两个不同的概念,前者是表现为卵巢呈多囊性改变,而无临床症状及血激素的改变。PCOS 是由于 LH/FSH 比率高于正常;雄激素产生过多,主要为雄烯二酮和睾酮;雌激素主要是雌酮增加所致。PCOS 的典型临床表现:① 月经失调:主要是闭经(继发性),闭经前常有月经稀发或月经过少;② 不孕:月经失调和持续性无排卵从而导致不孕;③ 多毛、油脂性皮肤及痤疮:体内雄激素过多;肥胖:是由于雄激素过多和未结合睾酮比例增加引起,亦与雌激素的长期刺激有关;④ 双侧卵巢增大。

发病原因尚未阐明,可能由于青春期最先建立的肾上腺功能异常,雄激素分泌过多,影响下丘脑-垂体-卵巢轴;或因环境、精神因素影响促性腺激素释放激素脉冲式释放,继而再影响促性腺激素脉冲式释放;或因卵巢分泌雌激素异常,不能建立正常的反馈,影响 FSH 和 LH 分泌,不能产生排卵前 LH 释放高峰,故无排卵。此外,也有认为与某些酶的缺乏或遗传因素有关。多囊卵巢者雄激素分泌过多,并促使毛发增生,部分雄激素转换为雌激素可促进脂肪增多。

诊断标准:① 月经异常;② 血 LH/FSH > 2~3 或 T 高;③ B 超可见卵巢体积增大,卵巢四周或散在多个囊性卵泡,>10 个,其直径要在 2~8mm 之间,间质回声增强。从严格诊断标准,应具备以上三项异常,方可诊断为 PCOS。

(4) 黄素化未破裂卵泡(luteinized unruptured follicle, LUF)综合征:指有黄体形成、卵泡颗粒细胞黄素化,但成熟卵细胞不能排出的综合征。经 BBT、宫颈黏液等检测都显示卵泡成熟,但 B 超跟踪及腹腔镜检查均未见排卵征象。LUF 或称卵母细胞滞留综合征(ORS),目前相当常见,可连续数周期发生,也可个别周期发生,不明原因的不孕症中有报道可高达 40%。目前病因不清,可能与氯米芬促排卵有关,亦可能与子宫内膜异位症有关,但因果关系不明。LUF 的卵泡发育不同于正常排卵的卵泡,生长速度比较快,LH 峰后卵泡急剧增长,并可持续长大,最大可以达到直径 8cm,直到下次月经来潮,在 B 超下可以观察到。LUF 没有特殊的临床表现,月经周期正常,基础体温呈双向,宫颈黏液的改变也为正常,子宫内膜有分泌期的改变,但发育较迟缓,黄体期亦较短。

激素变化的特点:卵泡早期,黄体期 FSH 均高,排卵后下降需 4~5d。LH 峰低且较正常排卵者出现晚,E₂ 显著增高,排卵前峰值与 LH 同天出现。P 较低 PRL 亦

有增高趋势,雄烯二酮升高。

2. 垂体性无排卵

(1) 希恩综合征(Sheehan syndrome):由于产后大出血伴有休克时,使垂体缺血坏死,尤以腺垂体为敏感,促性腺激素分泌细胞发生坏死,随之出现垂体功能减退和闭经。此病不但促性腺激素减少,还可同时影响促甲状腺素及促肾上腺皮质激素的分泌,但影响的程度可不同,而产生不同的临床表现。如果主要影响促性腺激素的分泌则临床主要表现为闭经、第2性征及生殖道萎缩;如果三者同样受影响,则还可出现消瘦、怕冷、乏力、低血压、低血糖、毛发脱落等。

(2) 垂体肿瘤:位于蝶鞍内的垂体前叶的肿瘤,有些肿瘤因体积增大压迫分泌细胞,使促性腺激素分泌减少,因而产生闭经及性功能减退等症状。催乳素细胞的肿瘤可引起闭经泌乳综合征。常见的为微腺瘤,直径<7mm,亦可见巨大腺瘤,发生高PRL、闭经、溢乳、无排卵。

(3) 垂体促性腺激素功能低下:表现为闭经及FSH和LH低,PRL正常, E_2 低。

3. 下丘脑性无排卵

多为继发性闭经,可有精神因素、营养不良或消化性疾病、药物抑制综合征以及闭经泌乳综合征。

(1) 精神因素:过度精神紧张或使用镇静剂不当,可以扰乱中枢神经与丘脑下部的功能,从而影响丘脑下部-脑垂体-卵巢的内分泌轴功能,往往先表现卵巢功能的障碍,然后发生卵泡成熟障碍而致闭经,如假孕的表现。

精神厌食症也是一种精神因素所致的丘脑下部功能紊乱。患者厌食,严重消瘦和闭经,FSH和LH水平低落。

(2) 营养不良或消瘦性疾病:影响丘脑下部的垂体促性腺激素与生长激素的合成与分泌,从而导致闭经。

(3) 体重过重或过轻:体重过重或过轻不但影响激素分泌,还可改变激素的外周代谢过程而致无排卵。青春发育期体重增加达到48.5kg左右,脂肪占体重的17%方有月经初潮,脂肪占22%时方能发生规则的排卵周期。如果体重减少10%~15%,脂肪消耗1/3时将发生闭经。6%的体重不足者发生不孕。而肥胖者比正常体重者发生闭经高4~5倍;体重过重,不排卵性月经次数增加,月经过少,不孕的发生率增加。

(4) 少数妇女在注射长效避孕针或口服避孕药后,可表现为促性腺激素的抑制和继发闭经。但这种抑制是可逆的,停药3~6个月自然恢复。

(5) 高催乳素血症:是以继发闭经、持续泌乳、不孕为特征的一种内分泌失调疾病,伴有血中催乳素(PRL)升高与卵巢功能减退。PRL由垂体前叶分泌,有拮抗促性腺激素作用,阻断卵巢组织对促性腺激素的正常反应。还可能直接作用于卵巢中的 β -羟甾脱氢酶,影响孕酮合成,并通过与 α -还原酶的作用抑制雌激素,促进雄激素形成,使雌/雄比例下降,抑制卵泡发育。垂体分泌PRL是脉冲式的,有昼夜节律变化,入睡后增高,醒前达高峰,醒后逐渐下降,非睡眠处于较低水平,饭后血清

PRL 升高。因此测定以上午 10~11 时为宜。正常情况,丘脑下部通过抑制作用调节垂体的生乳激素分泌;脑组织中的多巴胺有抑制垂体分泌生乳激素的作用。如果丘脑下部生乳素抑制因子(PIF)或多巴胺减低可致异常泌乳,泌乳素升高导致促性腺激素释放激素(GnRH)减少,卵巢功能低下。

发病原因:① 药物性:雌激素类药物可使泌乳素升高;利血平、西咪替丁等干扰多巴胺的合成、代谢、阻断多巴胺与其受体结合,使其不能发挥血 PRL 的作用,也可使血 PRL 升高。② 垂体肿瘤:这时最重要的原因,患高催乳素血症闭经的病人,约 1/3 患垂体肿瘤。单纯溢乳无月经改变,几乎无垂体肿瘤,应查血 PRL。垂体泌乳细胞瘤,使血中 PRL 升高;脑垂体其他肿瘤压迫门脉系统,阻断下丘脑与垂体之间的通道,使多巴胺不能到达垂体前叶,血 PRL 升高。

高泌乳素分泌导致性腺功能低下的机制:① 泌乳素升高抑制下丘脑促性腺激素释放激素的合成与释放。LH 与 FH 水平下降,无脉冲分泌,卵泡因而不能发育。② 泌乳素升高抑制雌激素对下丘脑、脑垂体的正反馈作用,降低垂体对 GnRH 的敏感性。③ 泌乳素升高直接影响卵巢的甾体激素合成能力,造成雌、孕激素不足。

4. 甲状腺功能异常性无排卵

较重的甲状腺功能亢进或功能低下者,反馈引起甲状腺素释放激素、催乳素分泌异常,导致月经稀少及不排卵。常见于慢性甲状腺炎及先天性甲状腺发育不全等,多表现为闭经、月经紊乱和不孕。

5. 肾上腺功能异常

肾上腺与性腺在胚胎发育期均由体腔上皮的囊胚层发育而来,均能分泌甾体激素,两腺体在功能上存在着相互影响和制约。

(1) 肾上腺皮质功能亢进:见于肾上腺皮质肿病或肾上腺皮质增生过长,缺乏 21-或 11-羟化酶,可导致多雄激素血症,抑制下丘脑和垂体的促性腺激素,致男性化和无排卵。

(2) 肾上腺皮质功能减低:肾上腺皮质激素减少,可反馈使促肾上腺皮质激素增加,激发促卵泡激素 FSH 增加,影响正常排卵周期的变化,造成功能性子宫出血、痛经等,持续发展,垂体功能下降,卵巢萎缩,晚期可发生卵巢早衰和闭经。

6. 黄体功能的不足

根据近年来的调查,约有 10%~40% 的不孕症和反复流产是黄体功能不足(LPD)所致。特点为排卵后至下次月经来潮时间小于 12d,即为黄体期过短;若持续时间正常,但体温上升幅度 $<0.3^{\circ}\text{C}$,可能是黄体发育不良,孕酮分泌不足;若基础体温虽为正常,但下降缓慢,可能是黄体萎缩过程延长,导致子宫内膜不规则脱落。黄体功能异常可引起反复流产,典型的双相 BBT 标准为:① 高温期与低温期相差 $>0.3^{\circ}\text{C}$;② 高温相波动幅度 $<0.1^{\circ}\text{C}$;③ 移行期 $<3\text{d}$ 。如果其中一项异常即有 LPD 可疑。导致黄体功能低下的原因有:

(1) 卵泡发育和黄体形成缺陷:正常卵泡发育过程中与 E_2 、FSH、LH 分泌有关,如卵泡未充分发育后的小卵泡排卵后,黄体发育不良,血液孕激素低落致子宫内膜发育迟缓如分泌不足可导致黄体功能不足。

(2) 血清垂体催乳素高:催乳素抑制下丘脑垂体促性腺激素分泌,亦可能直接作用于卵巢,使卵泡发育不良和黄体功能不全。

(3) 子宫内膜受体的问题:如 PR 低,即使 P 水平正常也不能使子宫内膜对 P 起正常反应,即所谓的假性黄体功能不全。

(4) 子宫内膜异位症:子宫内膜异位症患者的腹腔液明显增多,吞噬细胞数增多而造成前列腺素含量高,可影响卵泡成熟,导致黄体功能不足。

(5) 其他:氯米芬或 hCG 诱发排卵治疗反应不足,或形成 LUF、高雄激素血症、神经内分泌因素等,皆可导致黄体功能缺陷。

目前较准确的诊断方法是按照 Noyes 分期。子宫内膜组织相与月经期相差 > 2d 为异常。子宫内膜在不同周期表现也不一样。同一患者两个连续周期完全符合者仅占 4%,而完全不符合的 40%。因此应检查至少 2 个周期,在黄体期的前半期取内膜结果可能较后半期更准确。

此外,如腮腺炎、卵巢肿瘤、卵巢功能衰竭或放射线的影响都可引起不孕。

(二) 输卵管因素

输卵管因素是不孕症最常见的因素,占不孕症的 20% ~ 32.8%。输卵管具有运送精子、摄取卵子及把受精卵运送到子宫腔的作用。任何因素影响这些功能时,均可导致不孕。如:输卵管发育不全(过度细长弯曲)、输卵管炎症(淋球菌、结核)引起伞端闭锁或输卵管黏膜破坏,使输卵管闭锁。此外,阑尾炎或产后、术后所引起的继发感染,导致输卵管堵塞而发生不孕。近年来输卵管不孕有增长的趋势,日本长田等报道输卵管性不孕占不孕症的 29.9%。我国分析数字为 20% ~ 33%,输卵管不通的日益增加,可能与性传播疾病有关,还与子宫操作,盆腔结核有关。北医三院对 85 例不孕症患者腹腔镜检查结果见表 9-1。

表 9-1 不孕症患者腹腔镜检查结果

症 状	原 因	比 例/(%)
输卵管完全不通者	盆腔结核	75
	子宫内膜异位症	12.5
	非特异性盆腔炎	12.5
通而不畅	盆腔结核	41.67
	子宫内膜异位症	33.33
	非特异性盆腔炎	25
盆腔有粘连者	盆腔结核	46.67
	子宫内膜异位症	26.67
	非特异性盆腔炎	26.67

1. 输卵管结核

文献报道盆腔结核中输卵管结核占 100%,子宫内膜结核占 74%。生殖器结核

不孕原因:① 由于输卵管黏膜破坏与粘连,常使管腔阻塞;② 或因输卵管周围粘连,有时管腔尚保持部分通畅,但黏膜纤毛被破坏,输卵管僵直、蠕动受限,丧失其运输功能;③ 子宫内膜受到结核病灶的破坏也可致不孕。在原发性不孕患者中生殖器结核常为主要原因之一。

2. 非特异性盆腔感染

近年来报道支原体感染,临床症状可不明显,但造成输卵管上皮损害,此类轻度盆腔感染是不孕症的重要因素。北医三院复习 559 例输卵管不通的不孕症进行 IVF-ET,继发不孕 218 例中 47.5% (103/218)曾有过宫腔内妊娠,其中有过人工流产者占 34.9% (76/103),中期引产史者占 1.8% (4/103)。这些患者的输卵管病变较盆腔结核为轻。有的输卵管外观正常,只是管腔内部梗阻,或因输卵管卵巢性包块、输卵管伞端和周围组织粘连、输卵管积水等。

3. 子宫内膜异位症

正常妇女不孕率为 15%,内膜异位症患者可高达 40%。重度子宫内膜异位症患者不育的原因可能与盆腔内器官和组织广泛粘连和输卵管蠕动减弱,以致影响卵子的排出、摄取和受精卵的运行有关。

子宫内膜异位症引起不孕的原因有多种解释:

(1) 机械因素:重度内膜异位广泛粘连引起不孕,轻度患者不孕有人认为是输卵管系膜和卵巢间肌纤维松弛而影响摄取卵子功能所致。

(2) 自身免疫学说:异位内膜上皮可作为一种抗原引起自身免疫反应,刺激组织和腹腔液内产生免疫球蛋白和 C3 补体,排斥受精卵,也激活大量的吞噬细胞吞噬精子和激活磷脂酶,加速磷脂花生四烯酸和前列腺素产生而致不孕。

(3) PG 学说:多数作者测量腹腔液中 $PGF_{2\alpha}$ 或 $PGF_{2\alpha}M$ 明显增高,因而影响输卵管的蠕动及卵子摄取功能和运行,性激素合成,黄体溶解以及排卵和胎儿胎盘单位功能等因素而导致不孕或流产。

(4) 内分泌因素:内膜异位不孕者常有黄体功能不足。有人观察到从峰后孕酮上升有延迟,内膜只有 36% 与 LH 时间相符。故功能黄体酮显著缩小而致不孕。

4. 输卵管结扎或绝育术

术后引起输卵管积水属常见,但浆膜下组织受损可能更严重,成为输卵管复通术后影响功能的因素。积水引起管腔黏膜变薄,皱襞间距增大,上皮细胞变短,纤毛减少、缺失;这些都可能是炎症的后果,非感染因子致成。绝育术后输卵管近端组织和细胞的病变与绝育时间长短有关,因此绝育术后时间越长,复通成功率越低。

为了今后输卵管复通手术成功,绝育术应以破坏 2~4cm 的峡部或峡部及壶腹部最好。吻合后输卵管长度是术后妊娠的重要因素,至少不少于 4cm,少于 3cm 者无妊娠希望。北京妇产医院术后输卵管长 7~12cm 者宫内妊娠率 93.9%,长 5~6cm 者妊娠率为 67%。

5. 宫外孕术后

二次宫外孕切除双侧输卵管病例要求 IVF-ET 患者并不少见,一般曾有一侧输卵管妊娠史者,对侧输卵管也常不通。另外切除输卵管时应将全长切除,剩下的

一段还可造成日后的输卵管妊娠。近年来提倡保守治疗,不切除输卵管并保持其通畅。

输卵管的其他病变,如:发育不全、过度细长弯曲、管壁肌肉收缩功能减弱、上皮纤毛蠕动减退,输卵管炎使伞端封闭、破坏了输卵管内膜上皮组织等均可导致不孕。

(三) 子宫问题

子宫问题不一定引起受孕困难,而常是妊娠流产。

(1) 子宫畸形:子宫发育不良、双角子宫、单角子宫、子宫中隔、双子宫等可能影响孕卵着床或着床后发育,又可能造成子宫张力不足,而影响精子上行速度。有资料显示,子宫畸形在妇女中是 1/700,子宫畸形影响受孕、影响着床或易引起流产。此外还有先天无子宫畸形。

(2) 子宫肌瘤:肌瘤大小、位置的不同,或导致不孕或孕后流产。

(3) 子宫内膜息肉或炎症:二者会影响胚胎着床。

(4) 子宫粘连:粘连影响受孕或流产。

(四) 子宫颈因素

精子进入阴道后,在阴道内作短暂停留,即进入宫颈管,穿透宫颈黏液进入宫腔,继而到达输卵管壶腹部受精。宫颈管是整个女性生殖道中,免疫活性最强的部分,宫颈黏液中含有免疫球蛋白,对精子所携带的抗原可以发生免疫反应而制动精子。此外,宫颈黏液又可对精子起免疫保护作用,使之免受排斥和被吞噬,宫颈黏液还可对精子提供能量,有利于精子获能。除此之外,宫颈黏液还可起防御性过滤作用,防止细菌及质量欠佳的精子进入宫腔。宫腔黏液的免疫性能受卵巢雌激素的调节而起周期性变化。因此,当宫颈黏液与精子之间的相互作用失常,即可导致不孕,其发病率占 5%~10%。子宫颈病变引起黏液的量和性质的改变,如:子宫颈炎、重度糜烂时,宫颈分泌物变黏稠,阻碍精子上行。而炎症严重者可引起宫颈管粘连。另外,当子宫体后倒使宫颈朝上,可能也影响精子进入宫颈口减少受孕机会。

(五) 盆腔炎

子宫内膜炎不利于孕卵着床,并可造成宫腔粘连与卵巢周围炎影响卵巢功能,导致月经不调,排卵功能障碍;盆腔粘连造成卵子运送障碍或卵泡黄素化不破裂综合征,而造成不孕。

(六) 阴道问题

先天无阴道,阴道横膈,处女膜无孔或过厚、坚韧,阴道受损后粘连瘢痕狭窄,都可能影响性交或阻碍精子进入。外阴阴道炎影响性交,其脓性分泌物改变了阴道 pH,影响精子存活及运动。

(七) 免疫功能异常

在不孕原因不明者中,现认为多数为免疫性不孕,亦即由于生殖系统抗原(如精子、精浆、卵透明带、卵巢内产生甾体激素的细胞)的自身免疫或同种免疫所引起,这些特异性抗原引起免疫反应,产生相应的抗体,阻碍精子与卵子结合及受精,而致不孕。

Burnet^[1]提出的“抗体形成细胞系选择”学说认为在胎生期已接触的组织被识别为自身成分,一般不产生抗体反应,但以后产生的组织则视为非自身成分,而产生免疫反应。因此在青春期才开始出现的精子,对男性是一种自身抗原,对女性则是同种异体抗原,皆可产生抗原抗体反应,而卵透明带等对女性也能作自身免疫的抗原。

1. 抗精子抗体

正常男人因血睾屏障的保护,不产生抗体。当精道阻塞、睾丸外伤、高温、过冷、炎症等刺激破坏血睾屏障时则可产生抗精子抗体,可使精子凝集,活动力丧失,而致不孕;正常女性生殖道内有巨噬细胞,能识别或吞噬精子,可减少精子接触抗体生成组织,平时不足以引起免疫反应,但当女性生殖道损伤、感染时,改变黏膜通透性,增强抗原的吸收,使血液中产生可检出的抗精子抗体。

另一个重要因素是精子对生殖道局部的免疫作用使局部抗体浓度升高,如宫颈、子宫、输卵管中存在抗体,也足以导致不孕。抗精子抗体还可能作用于孕卵或胚胎,造成不育。

2. 自身免疫性疾病

自身免疫性卵巢炎表现为体液免疫和细胞免疫功能过强,抗卵巢抗体滴度高,包括抗透明带抗体、抗颗粒细胞抗体等,活性T淋巴细胞增加,卵巢内卵泡成熟障碍,闭锁卵泡增多,大量淋巴细胞浸润,造成卵巢功能衰竭。可见于慢性淋巴细胞性甲状腺炎或类风湿性关节炎等患者。

3. 组织相容性抗原

对白细胞抗原(HLA)的研究,发现有特殊不相容现象,男性含有HLA的精子被女性吸收后产生HLA抗体,抗体含量高者可导致不孕。

4. 子宫内膜异位症

(1) 盆腔液中巨噬细胞增加并产生白细胞介素-1、(interlukin-1),可能吞噬精子,并对胚胎有毒性作用。

(2) 抗子宫内膜抗体:在补体的参与下与子宫内膜腺体产生免疫反应,损害内膜功能,影响着床。

(3) 抗卵巢抗体:影响卵巢功能。另外由于前列腺素或卵巢周围组织粘连等综合因素造成不排卵,黄体功能不足和IUF,还可能由于黄体萎缩不全,持续至下一周期影响卵泡,过早黄素化而不孕。

另外,卵泡着床异常也可造成女性不育。

二、不孕症检查

诊断不孕症,至少需明确以下几点:

- (1) 是男方不育还是女方不育,或双方都患有不育疾病。
- (2) 是属绝对不育,还是相对不育。
- (3) 是原发不育,还是继发不育。

1. 询问病史

(1) 个人史:包括双方年龄、详细的生长发育史、以及患病史,询问儿童时期是否患过结核、腮腺炎等,有无手术史,有无精神打击,用过哪类药。

(2) 婚姻史:是否近亲婚配,夫妇双方是否有先天性遗传性疾病。曾否结婚及生育,婚后曾否采用避孕措施,避孕方法和日期。

(3) 性生活情况:由于缺乏性生活知识或性交时采用滑润剂可造成射精障碍或精子损害。长期禁欲或性交次数过多,也可使精子质量下降,而导致不育。

(4) 月经史:初潮时间,规律否,末次月经。

(5) 家族史:询问父母身体健康情况,是否近亲婚配,有否先天性遗传性疾病的家谱。母亲是否有小产、流产、死胎和堕胎史以及兄弟姐妹的健康、生育情况等。通过家庭史的询问,为诊断影响生育力的先天性遗传性疾病提供线索。

2. 检查

(1) 大体:除常规大体检查外,特别注意:营养情况、体态、体型、体重指数(kg/m^2)、挤压乳房有无乳汁分泌、甲状腺等。

(2) 妇科检查:处女膜、阴道宫颈、子宫、附件详细情况。

(3) 临床试验检查:

1) 基础体温:正常月经周期大多为 28d 左右,月经周期长短的差异主要由于卵泡期的长短。排卵一般都在周期第 14d,黄体期应持续 $14 \pm 2\text{d}$ 。在月经后及卵泡期基础体温比较低(36.6°C 以下),排卵后体温上升 $0.3 \sim 0.5^\circ\text{C}$,一直持续至经前 1~2d 或月经的第 1d,体温又降至原来的水平。排卵后体温上升是由于卵巢排卵后有黄体形成,产生的孕酮作用于下丘脑体温调节中枢,有致热作用而使体温上升,即双相曲线。正常排卵妇女,体温升高应持续 12~14d,若短于 11d,表示黄体发育不健全,若无排卵,基础体温无上升和改变,而呈单相曲线。

2) 子宫内膜活体检查:月经来潮 12~24h 内取子宫内膜做组织学检查,应看出晚期分泌期变化,表明是雌孕激素的影响,曾有过排卵。

3) 子宫颈黏液的改变:子宫颈黏液主要由子宫颈腺体产生,宫颈黏液的每天分泌量为 20~60ml,黏液呈碱性,pH 值在 7~8.5,排卵期黏液清亮,有利于精子的穿透。一般在月经周期的第 8~10d,涂片上开始出现结晶,排卵期体内雌激素水平达高峰,涂片出现典型的羊齿状结晶。排卵后结晶逐渐减少,一般至 22d,结晶就不再出现。结晶的多少与羊齿的完整与否可提示体内雌激素水平。孕激素可出现排列成行的椭圆体。一般于月经的第 8~9d,12~14d,17~19d,22~23d 各取标本观察

变化。

4) 血激素的测定:

a. 雌激素的测定。

b. 孕激素的测定。

c. 垂体促性腺激素的测定:月经周期中FSH正常值为5~20U/L,LH为5~25U/L。若LH>40U/L,提示卵巢功能衰竭;若LH>25U/L,高度怀疑为多囊卵巢;若FSH、LH均<5U/L,提示垂体功能减退,病变可能在垂体或下丘脑。

d. 催乳激素的测定:正常值为0~20g/L,PRL>25g/L时称高催乳素血症。

5) 连续B超监测卵泡发育及排卵:阴道B超探头接近盆腔器官,不需充盈膀胱,可以准确地观察卵泡发育、子宫内膜厚度及特点。一般于月经周期第8d开始,优势卵泡直径接近18~22mm排卵,卵泡消失,盆腔内出现液体,优势卵泡不破裂而突然增大,可能既是LUFS。如逐步缩小既是卵泡闭锁。

6) 输卵管通畅试验:

a. 经宫腔通液:在月经周期反复行输卵管通液术,为期3个月左右。所用液体包括庆大霉素8万U,地塞米松5mg,注射用水20ml。通液术一方面了解输卵管是否通畅,另一方面也可起到轻度粘连疏通的作用。但通液的结果不够客观,可以作为初筛。Salomy报告40例患者应用该办法,32%妊娠。

b. 输卵管碘油造影:在X线透视下进行,先注入40%碘化油5ml,如未见输卵管充盈,等待3~5min后继续注入造影剂5ml及摄片,并在24h后在摄片1次,以了解造影剂在盆腔内弥散的情况。故造影不仅能了解输卵管是否通畅,且可知输卵管的阻塞部位。子宫输卵管碘油造影可显示子宫和输卵管内部结构、形态、结节串珠状,卷曲增粗、僵直、积水等。X线片还可供他人参考分析,如碘油最后虽有弥散,但弥散局限表明盆腔内有粘连,或伞断增大表明伞部有阻力粘连,水油珠表明输卵管内有积水。

c. 腹腔镜:用于上述检查均未见异常者,仍未受孕,可作腹腔镜进一步了解盆腔情况。近20年来,腹腔镜检查已广泛应用于不孕症的诊断与治疗。在腹腔镜下可以观察到盆腔微小病灶,可直视输卵管有无粘连,通液时管腔是否通畅。其方法是在腹腔镜直视下,经宫口注入稀释的亚甲蓝液20ml,通畅者注入亚甲蓝液无阻力,即见亚甲蓝液自伞端流出;通而不畅者推液时有轻度阻力,输卵管先膨大,屈曲,再见亚甲蓝液从伞端流出;不通者推液阻力大,未见亚甲蓝液自伞端流出,而从宫颈口漏出。在腹腔镜下亦能行粘连分解术、输卵管造口术。腹腔镜检查能估价卵巢功能,同时进行卵巢活检行病理检查;可取卵行体外授精。对于发现的微小子宫内膜异位灶也可在直视下行异位灶电灼术或电切术。

三、不孕症治疗

引起不孕的原因虽然很多,但首先要增强体质和增进健康,纠正营养不良和贫血,戒烟,不饮酒,积极治疗内科疾病,掌握性知识。学会计算排卵期,预测排卵期性

交(即排卵前 2~3d 或排卵或 24h),可用排卵试纸试验排卵日期,性交次数适度,以增加受孕机会。

1. 内分泌性不孕的治疗

促排卵治疗常应用于女方不排卵的不孕症或用于正常排卵妇女在进行助孕技术超排卵刺激周期。在应用促排卵治疗前必须明确输卵管情况并除外男方因素。促排卵药物有多种,作用在下丘脑-垂体-卵巢轴的不同水平,并通过不同机制产生效应。

(1) 克罗米酚(CC):其结构与己烯雌酚相似,与下丘脑和脑垂体的内源性的雌激素受体相竞争,解除对垂体分泌促性腺激素的抑制,促进 FSH 和 LH 的分泌,从而诱发排卵,排卵多发生在停药 7d 左右。用法:自然月经或人工诱发月经周期第 5d 开始,用 50mg/d 共 5d,应用 3 个周期后无排卵可加大剂量 100mg~150mg/d 共 5d。用药量的增加与病人的激素水平无关,而与病人的体重明显相关。大剂量应用时应注意卵巢过度刺激症(OSSH)的发生。如果高剂量 CC 治疗 3 个周期无排卵,可认为 CC 无效。用药期间应作基础体温测定,如能应用 B 超监测卵泡发育更能够确定是否排卵,当卵泡直径达到 20mm 时,要肌肉注射 hCG 5 000~10 000IU 以诱发排卵更有益于获得妊娠的机会。尽管 CC 促排卵的排卵率很高,平均 80%,但妊娠率仅有 40%,而自然流产率高达 10%~33%。妊娠率低的原因:CC 有抗雌激素作用,影响子宫颈黏液的清亮度,使之变为黏稠,精子不易穿入;也会影响子宫内膜对激素的反应,降低了雌孕激素受体的含量导致黄体功能不全,不利于胚胎的着床;加用超声监测后了解到 LUFS 也是 CC 高排卵低妊娠率的原因之一,和自然周期比较用 CC 后 LUFS 的发生率 10%~31%。在排卵前后加用戊酸雌二醇或者倍美力以改善子宫颈黏液的质量及增加内膜厚度及结构,以利于精子的进入。高雄激素血症者可应用泼尼松 5mg 晚上服,降低肾上腺的雄激素的水平,改善卵泡对促性腺激素的反应性,提高 CC 的促排卵效果(夜间服用泼尼松的原因:抑制夜间促肾上腺皮质激素 ACTH 的脉冲时的分泌,从而降低晚上雄激素主要是雄烯二酮的水平)。3 个月起作用。

(2) 人类绝经期促性腺激素(hMG):每支含有 FSH、LH 各 75IU。此药适用于低的促性腺激素的病人,对多囊卵巢综合征患者不是最适用。因为 PCOS 患者更趋向于发生 OHSS。用法:月经周期第 3~7d 给 CC50mg/d,月经周期的第 7d 肌注 hMG 每天 1 支,然后根据 B 超监测卵泡发育情况调整 hMG 的用量,当卵泡的直径到达 18~20mm 时肌注 hCG 5 000~10 000IU 诱导排卵,36~38h 后进行助孕手术或 hCG 注射日及后两日自然性交。排卵率为 60%~95%,妊娠率 58%~72%,多胎妊娠率为 10%~30%,OHSS 发生率 10%~50%。当有 3 个卵泡发育时,应停用 hCG,以避免 OHSS 发生(表 9-2)。

(3) 促卵泡生长激素(FSH):FSH 在卵泡期可促进卵泡生长,从理论上单纯 FSH 促进排卵会取得更好的疗效,因为在排卵前只需要少量的 LH,如果 LH 水平过高可致妊娠失败或流产。因此,近年来促排卵治疗的趋势是多用 FSH,在后几天根据情况加用 hMG。常规用药:适用于 hMG 治疗失败的病人,小剂量 FSH 渐增方

案,即初次剂量是每天1支,持续8~14d后若无反应,每日加用半支,可以发现FSH的阈值,以达到单卵泡发育,减少多卵泡发育及OHSS的发生。

(4) 促性腺激素释放激素(GnRH):由于hMG易发生OHSS,流产率仍然很高,许多学者开始研究应用GnRH类似物(GnRH-a)。GnRH-a是一种九肽类似物,开始应用时可以使FSH、LH释放增加,持续应用可抑制LH的峰,避免卵细胞过早黄素化,与hMG合用,促使卵泡发育,改善卵细胞的质量,提高妊娠率。用法:长效GnRH-a3.75mg肌肉注射每月1次,3~6个月。

表 9-2 CC和 hMG 临床效果比较

药物	排卵率/(%)	妊娠率/(%)	OHSS 率/(%)	LUFS 率/(%)
CC	65	37	0	31
hMG	87.5	12	50	37.5
CC/hMG	85	35	10	10

(5) 流产的预防:不孕症患者治疗后妊娠流产率高,特别是PCOS的病人,应用hCG治疗可以降低其流产率。hCG对PCOS病人预防流产的原因可能由于外源性hCG在受体水平起竞争抑制剂的作用,与LH受体结合抑制异常升高的LH从而降低流产率(表9-3)。

表 9-3 LH与流产

	LH< 10IU	LH> 10IU
例数	147	46
妊娠率(%)	88	67
流产率(%)	12	65

2. 补充黄体分泌功能

适用于黄体功能不全。于月经周期第2d开始每天肌肉注射黄体酮10~20mg,连续5d。

3. 输卵管性不孕的治疗

(1) 保守治疗:对结核、淋球菌、非特异性感染及部分子宫内膜异位症可用相应的药物治疗。

(2) 输卵管的手术治疗:显微外科是60年代发展形成的新技术,1967年瑞典首先应用于妇科临床,北京妇产医院1979年开始应用显微外科技术吻合输卵管。

1) 输卵管吻合术:包括间质部与峡部或壶腹部吻合,峡部与峡部或壶腹部吻合,壶腹部与壶腹部吻合,以及各种混合性吻合术。手术成功率以绝育术复通者为最高,为50%~90%,北京妇产医院对行输卵管吻合术512例术后达2年以上随访,宫内妊娠260例占82.81%,2例宫外孕占0.64%。宫外孕术后均又妊娠。充分显示了显微外科技术在输卵管吻合手术的应用价值。

2) 输卵管植入术:包括输卵管峡部植入和壶腹部植入宫腔,多用于输卵管近端闭锁。手术成功率(妊娠率)为10%~15%。

3) 造口术:用于输卵管远端闭锁,直接闭锁口按解剖位置放射形切口或袖口外翻术,成功率(妊娠率)为 5%~30%。

4) 输卵管粘连分离术:手术成功率 41%~91%。

5) 其他整形术:① 内膜异位病灶电凝术;② 输卵管系膜内卵巢冠囊肿切除术;③ 取输卵管夹和套环。

3)、4)、5)均可在腹腔镜下手术,优点很多。

(3) 辅助生殖技术:(详见第十章生殖工程)。

第二节 男性不育

一、病 因

男性不育症不是一种独立的疾病,而是很多疾病或因素造成的结果。多种原因可导致男性不育,如影响精子的发生和成熟,导致精子质和/或量的异常;影响附属性腺,导致精液的性状异常;生殖管道的异常,使精液不能正常排入女性生殖道。

(一) 先天性疾病

1. 生殖腺异常

如真两性畸形、男性假两性畸形、先天性无睾症等,多由于基因突变引起。因精子无法正常产生,属于绝对不孕,不可能生育。

先天性睾丸发育不全(Klinefelter 综合征,47,XXY)又称细精管发育障碍症,表现为青春发育延迟,睾丸小,约 80%有男性女性化表现,部分患者阴茎能勃起,有些能射精,但精液中没有精子。

隐睾症的发病因素很复杂,常常与其他先天性异常或染色体异常有关。因此,一部分单侧隐睾,也伴有对侧睾丸损害而造成不育。

2. 生殖管道的异常

如尿道上裂、尿道下裂、输精管不发育,有时伴有附睾不发育和精囊缺如,发病原理不清楚,可能与基因突变影响胎儿时期中肾管的发育有关。

(二) 感染性疾病

多种感染性疾病可累及生殖系统。青春期患腮腺炎约 20% 伴发睾丸炎,大约 70% 是单侧的,其中 50% 病人出现某种程度睾丸萎缩,造成生精障碍。大约 90% 精液不液化者有过前列腺炎史,如尿频、尿急、尿痛,会阴部胀痛不适,尿道流白色黏液及血精史。泌尿生殖系统结核、淋病可造成输精管道梗阻或直接损害睾丸功能,而引起无精子症。生殖系统真菌感染,可使精液中淀粉酶含量很低而透明质酸酶活跃,引起不育。近年来研究发现支原体引起生殖道感染能造成不育。

(三) 创伤性疾病和手术

睾丸、附睾及输精管受到过损伤或施行修补术、隐睾固定术、精索静脉曲张手术、鞘膜积液手术等,这些手术可能损伤睾丸和睾丸血管,引起睾丸萎缩。损伤输精管,可造成输精管梗阻。腰交感神经切断术,膀胱、前列腺和直肠的手术等,可造成射精障碍,如逆行射精等。

(四) 内分泌疾病

由垂体前叶和下丘脑病变而引起的生长激素(GH)和促性腺激素释放激素(GnRH)分泌异常,如巨人症、生长激素缺乏性侏儒症、肢端肥大症、成人腺垂体功能减退症等,都可引起性腺功能低下。

肾上腺疾病,如库欣综合征(Cushing syndrome)、艾迪生病(Addison disease)以及先天性肾上腺增生症,出现男性假性青春期早熟,都可造成睾丸生精功能障碍。

胰岛B细胞病变导致胰岛素分泌缺乏或不足的糖尿病患者,其糖代谢紊乱也可累及睾丸生精过程。由于患者有神经病变和动脉硬化等合并症,约50%糖尿病人可伴有阳痿。

甲状腺功能亢进及减退,也可出现睾丸生精障碍。

(五) 免疫因素

睾丸、附属性腺以及生殖道分泌物都具有抗原性,在一定条件下,机体可对这些抗原产生免疫反应,其中以针对精子抗原产生的抗精子与不育关系最为密切。

(六) 环境因素

有很多化学药物可影响睾丸生精功能,因职业环境、生活习惯及服用药物时常接触有害化学药物,可导致精子的异常。

如铅、砷、锌、铝、苯胺等工业危害,硝基呋喃妥因、雌激素和雄激素、烷化剂、环磷酰胺等;治疗高血压药物,如螺内酯、利尿剂、胍乙啶、利血平;治疗精神病药物,以及烟酒嗜好等。产棉区男子经常食用粗制生棉籽油,由于棉籽油中含有棉酚,有强力抑制睾丸生精作用,而引起睾丸生精障碍。饮食营养中蛋白质缺乏,以及维生素A、维生素B、维生素C缺乏,长期患有慢性病(如肝硬化、慢性肾功能衰竭),营养障碍或代谢产物的体内滞留,都可影响睾丸生精功能。

接触放射性物质,无论是诊断性、治疗性或职业性接触,均可影响睾丸生精功能。睾丸受2-Gy放射线,可导致少精症;持续21个月,多次分剂量照射比单剂量照射影响大;长期过量的放射线接触,可导致永久不育。经常热浴及高温环境工作,有些患者喜穿紧身衣裤,使睾丸贴近腹股沟部,都可由于长期干扰阴囊调节温度的功能,使睾丸受到较高温度的影响出现生精障碍。

(七) 其 他

其他如遗尿症,特别是持续到青春后期仍有遗尿者,应考虑病人膀胱和前列腺神经调节发生异常,这类病人可能存在逆行性射精。如怀疑此病,应嘱患者手淫后检查尿液内是否存在大量活动精子。

二、不育症检查及治疗

(一) 检 查

诊断男性不育症,需排除女方不孕的可能。经检查确认女方具有正常生育力而不育原因属于男方者,则应查明引起男性不育的确切病因,以便针对病因采用有效的治疗措施。

男性不育症的检查和诊断方法一般有详细询问病史,体格检查、实验室检查、X线检查、造影、睾丸活组织检查、免疫学检查、细胞遗传学(实验室)检查及内分泌检查等。

1. 全身检查

除一般的体检内容外,还要了解体毛分布情况,以及皮肤是干而粗糙(男性型)还是滋润而皮下脂肪丰富(女性型);检查体态和外形,有无男性女性化和男性乳房发育等表现。当男性内分泌功能紊乱时,可出现相应的体征。

2. 生殖器官的检查

一般宜处直立位进行,检查包括有无生殖器官畸形,睾丸的位置、坚度、大小,附睾、输精管有无结节或缺如,阴囊内有无精索静脉曲张、鞘膜积液等。

(1) 阴茎的检查:包括阴茎的大小,有无畸形等。应该注意阴茎的大小有明显个体差异,不要把初看起来阴茎较小或由于肥胖或阴囊肿胀而显得阴茎较小就下“小阴茎”的诊断。阴茎海绵体内纤维硬化又称阴茎硬结症,在阴茎勃起或性交时呈弯曲状态,疼痛而造成性交困难,甚至导致性功能障碍。包皮过长特别是包茎,引起尿道外口针孔样狭窄,可造成射精困难。尿道下裂、尿道上裂和膀胱外翻,由于阴茎弯曲不发育和尿道开口异常,可造成性交困难和精液外漏。

(2) 阴囊及腹股沟部位检查:有无手术瘢痕及结核或其他炎症后形成的窦道瘢痕遗迹。阴囊是否有异常肿块(如睾丸鞘膜积液和精索静脉曲张)和阴囊橡皮肿。

(3) 睾丸检查:测量睾丸大小对男子生育力的估价有重要意义。软的睾丸通常伴有精子发生下降,软而小的睾丸常提示预后不良。睾丸的大小,可用睾丸体积测定模型作比拟法进行测量。

精索静脉曲张也可使睾丸周围温度升高,且由于睾丸缺氧及受到精索静脉返流血液中毒性物质的影响,引起睾丸变小而软。鞘膜积液对生育力也有一定影响。小的睾丸鞘膜积液,可在检查时被忽视,鞘膜积液可引起睾丸温度升高而损害睾丸的精子发生。

成年人隐睾症往往使睾丸曲细精管上皮严重损害,而且隐睾恶变的发病率高,

因此必须在青春发育期前及早作隐睾整复固定术。

(4) 附睾病变:由于附睾炎症、结核或先天性发育不良,可引起附睾管阻塞而造成少精症和无精症,检查时可发现在梗阻的近侧(附睾头部)饱胀、肿大、表面光滑,系为附睾管扩大所致。

(5) 肛指检查:为检查前列腺大小、硬度,有否硬结、结石及其他前列腺病变,可做直肠肛指检查。性功能低下的病例,前列腺较小,但质地一致。慢性前列腺炎患者,前列腺可增大、正常或缩小,但质地不一,正常精囊在肛检时不能扪及,慢性炎症时可扪及精囊肿大并做前列腺按摩液检查得到证实。

3. 精液分析

精液分析对男子生育力的估计能得出重要的依据。有关精液分析等见第十三章。

4. 睾丸活组织检查

睾丸活检可以鉴别阻塞性无精症与因睾丸发育不全或睾丸萎缩而丧失生精能力的无精症。前者睾丸曲细精管的生精功能基本完好,而后者睾丸曲细精管生精功能严重障碍。

5. 其他检查

男性不育症的诊断主要依赖病史、体检、精液分析、睾丸活检等。但为了查明影响生育的病因以及病变部位和环节,还必须结合以上检查,并根据不同病例对象,选择做输精管放射线、内分泌、细胞遗传学、免疫学、细菌学以及放射性核素、Doppler 超声仪、超声波、电子显微镜检查等。参考各种检查资料,进行综合分析,得出正确的诊断。

(二) 治 疗

经各项诊断检查明确男性不育病因后,需进一步判断是否能用确切治疗措施恢复男方的生育力,还是迄今为止尚无有效措施使损坏的男性生育力恢复。针对不同病因给予治疗。

1. 不育夫妇双方共同治疗

(1) 绝对不育男性:如不射精症、无精子症等,在男方进行治疗前也应对女方检查生育力。

(2) 男性生育力降低:如特发性或继发性少精症,精子活力低下症和畸形精子增多症,根据 WHO 多中心临床研究,约 26% 女配偶也同时存在生育问题。

2. 非手术治疗

(1) 预防性措施:为了防止以后引起男性不育应着重注意以下几点:①预防性传播性疾病。②睾丸下降不完全者,应在儿童期作出相应处理。③安全的工作环境,避免对睾丸有害因子及化学物品的接触。④采用有损睾丸功能的治疗,包括某些药物如肿瘤化疗等,在用药前将病人的精液作冷藏。

(2) 治疗性措施:可归纳为特异性、半特异性和非特异性 3 种。

1) 特异性治疗:当引起不育的病因的诊断达到相对正确情况下,可采用针对

病因的特异性治疗措施,这种治疗往往可达到较好效果。如用hCG、hMG或促性腺激素释放激素替代性治疗促性腺激素分泌低下引起的睾丸功能低下症,这些病例表现为青春期不发育,通过治疗,不但出现第二性征发育,并可出现睾丸功能恢复,使他们的配偶获得怀孕。

内分泌系统的其他疾病引起的不育,如生长激素缺乏症、库欣综合征、肾上腺皮质增生症,垂体分泌催乳素肿瘤和糖尿病等,虽然也可采用特异治疗而恢复生育力,但一般说来,这些情况很少见,治疗也不甚满意。

2) 半特异性治疗:虽然存在一些合理的治疗方法,但由于对这些疾病引起不育的病理了解不够,其治疗效果尚不能完全证实。最重要的治疗方法是抗生素治疗男性附属性腺炎症,以及对抗精子抗体阳性的免疫不育采用免疫抑制剂治疗。男性附属性腺炎症与不育之间关系尚存在争议,这是由于对非致病性感染和病理性感染之间往往难以区分,而且有些致病微生物如尿素衣原体和支原体的培养很困难。然而许多报道证明,抗生素治疗附属性腺炎症引起不育得到良好效果。对输精管通畅而无感染的抗精子抗体阳性病例,可采用免疫抑制疗法,文献报道,大剂量甾体激素治疗可提高怀孕率,目前尚属临床试用阶段。

3) 非特异性治疗:大量的特发性少精子症和精子活动率低下症病人的病因尚不能得到确切诊断。虽然有很多经验性的治疗方法,但不能肯定这些方法的确切疗效。

3. 手术治疗

(1) 提高睾丸精子发生:两种最广泛的手术是精索内静脉高位结扎术和隐睾固定术。

(2) 解除输精管的梗阻:常用输精管附睾吻合术来治疗完全性或部分性梗阻,以期在扩张的附睾管和输精管之间形成瘻管;手术中应用手术显微镜下做低位的附睾和输精管侧端吻合可减少吻合口的狭窄。对梗阻范围广泛的可种植人工精液囊肿,然后抽刺囊肿内精液做人工授精。

(3) 辅助生殖:主要有人工授精技术、体外受精技术和配子输卵管内移植术以及单精子卵浆内注射受精技术等(详见第十章生殖工程)。

(王桂茹 马唯翁 静)

第十章

生殖工程

生殖工程(reproductive engineering)是近 20 余年发展起来的以体外受精-胚胎移植为中心的一系列技术方法及理论,使人们能更深入地了解受精及人体胚胎发育的机制,并为不孕、不育症以及预防遗传病提供新的途径。近年来一系列新技术在生殖领域得到应用,如低温生物学技术、基因工程技术、转基因技术和核移植技术,使生殖工程领域的发展非常迅速,引人关注。

第一节 试管婴儿的培育方法

1978 年 7 月 25 日,世界上第一例试管婴儿路易丝·布朗(Louise Brown)在英国剑桥诞生,开创了体外受精治疗不孕症新的里程碑,随后,印度,澳大利亚及美国等地也陆续有试管婴儿的问世。我国台湾省于 1985 年首例试管婴儿获得成功;大陆首例试管婴儿于 1988 年 3 月在北医三院诞生。

“试管婴儿”是医学上又一大奇迹,20 年来这项新技术得到不断的改进和提高,除了常规“试管婴儿”培育技术以外,又出现了卵浆内单精子注射以及胚胎着床前遗传病诊断技术。国内经常用第 1,第 2 和第 3 代“试管婴儿”来指应用上述技术而诞生的婴儿。

一、常规“试管婴儿”培养技术

常规“试管婴儿”培养技术,即第 1 代“试管婴儿”的培养技术,包括体外授精(in vitro fertilization, IVF)及胚胎移植(embryo transfer, ET)两个主要步骤,即在体外让卵子与精子结合形成受精卵,在体外继续培养发育到一定时期(如 8 细胞期左右),再将胚胎重新移植到母亲子宫中,继续发育生长直至足月分娩。目前,IVF 的成功率较高,达 85%~90%,但 ET 不易存活,一般成功率在 20%~30%。有些中心成功率很高,ET 成功率可达 50% 左右。

要进行 IVF-ET,首先要对病人进行全面检查,确定是否为适应者。对适应证者进行 IVF-ET,主要包括卵子收集,精子的准备,体外人工受精与培养,胚胎移植等。

(一) 主要适应证和禁忌证

1. 适应证

(1) 输卵管病变所致不孕症:可以是先天性的输卵管缺如或梗阻,也可因盆腔炎导致的输卵管阻塞、积水、输卵管周围粘连或输卵管壁炎症增厚而丧失蠕动能力的患者。这类不孕症是 IVF 技术最适宜的患者,因为患者的卵巢,卵细胞,子宫都正常。

此外,对于女性输卵管结扎术后子女发生意外,或经吻管术失败者,可利用 IVF-ET 技术再生育孩子,因此减轻许多育龄妇女做绝育手术的“后顾之忧”,绝育的概念也相对化了。从绝育的可逆性来说,IVF 技术有助于计划生育工作的开展。

(2) 子宫内膜异位症:造成不孕的原因目前不十分清楚。

(3) 男性轻度少精症或弱精症。

(4) 治疗部分由于免疫因素所致的特发性不孕症。

(5) 妇女的原发不孕,无排卵性月经及黄体化卵泡未破裂综合征。

(6) 子宫颈病变:阻碍精子的进入。

(7) 夫妇双方中有一方生殖细胞完全缺如所致的不育症:现在许多国家 IVF-ET 技术已商品化,建立了精子库、卵子库和胚胎库,分别出卖健康优良的精子、卵子与胚胎。这样,如果夫妻双方有一方的生殖细胞缺如,或由于患有某些遗传疾病而不愿用自己的生殖细胞就可以购买所需的生殖细胞,利用 IVF 技术而解决不孕症问题。

(8) 子宫发育异常或缺如所致不孕症:子宫先天发育异常或由于患病(如子宫肌瘤等)在生育前已将子宫切除的妇女,在 IVF-ET 技术出现以前是不可能有自己的孩子的。但现在对这类病人,国外采用 IVF-ET 技术将病人的卵子取出,与其丈夫的精子在体外受精和培养,然后将胚胎移植到另一个育龄妇女的子宫内,也就是代孕。利用此法获得的孩子就是所谓的异体“试管婴儿”,或“代孕”。我国目前禁止代孕行为。

(9) 选择性生育:选择性生育即是人为地控制后代的性别。目前可以人为地将 X 型精子和 Y 型精子分离开,用分离所得的精子进行 IVF-ET 就可得到预期性别的胎儿。此方法能防止性连锁遗传病患儿的产生,在不影响性别比例的情况下,可有条件地进行。

2. 主要禁忌证

IVF-ET 最初只是用于输卵管病变造成的不孕症,但近来其适应证逐渐扩大而禁忌证相对减少。需要考虑的有:

(1) 年龄:一般主张 40 岁以上的妇女不适于做 IVF,因为即使妊娠,流产率很高,而且畸形率也因年龄的增大而明显增加。但有不少 40 岁以上不孕症患者甚至已经绝经妇女用 IVF 技术成功地分娩出正常婴儿的报道,因此年龄限制只是相对

的。

(2) 过度肥胖者。

(3) 高催乳素血症造成的不孕症。

(4) 严重的盆腔粘连者:因无法进行腹腔镜检查和采卵而并列为禁忌证,但由于目前可采用超声引导下卵泡穿刺术,这类患者也不是绝对的禁忌。

对不孕症夫妇要通过全面检查(女方生殖器检查,盆腔B超,诊刮,病检子宫内膜,子宫输卵管造影,基础体温,性激素测定,阴道清洁度,抗精子抗体,肝功,HIV测定等;男方的生殖器检查,精液综合分析;男女双方染色体检查等),综合病人情况,决定是否可进行IVF-ET。

(二) 卵子的收集

1. 获得可受精卵的方法

(1) 自然周期法:即不采用任何药物来影响妇女的自然周期,只是用测定血清 E_2 水平及做宫颈黏液评估来检测排卵日期,并用超声波检查,定位卵泡及其大小。之后,再测定血中的LH水平,在预期排卵时行手术采卵。世界上第一例试管婴儿就是采用自然周期法获得可受精卵的。

由于遵循自然周期,所以此法的优点是不影响体内的内分泌环境,但缺点是每1周期只有1个可受精的卵供采集。采卵时间不能人为控制,监测方法也较复杂,不适用于治疗大量患者。由于只有1个可供受精的卵,成功率很低。

(2) 药物诱发超数排卵法:目前国际上的IVF中心广泛地使用药物诱发超数排卵法,从而改变妇女生理状况下仅有一个成熟卵排出的状况。相对于自然排卵,人工诱发超数排卵有能掌握并随意控制排卵时间并且1次可获得多个可受精的卵细胞的优点。

超数排卵的缺点是可能导致黄体功能不足,卵的异常机会增多。因卵泡发育不足,导致卵子质量下降,从而影响受精率与妊娠率。此外,有发生卵巢过度刺激综合征的危险,重度卵巢过度刺激综合征患者若处理不当,甚至危及生命。

在探索超控促排卵方案的过程中,经历了以hMG、FSH、高纯度FSH及最近的重组FSH为主的过程,后两者能获得更为满意的有效卵子及更高的妊娠率。

(3) 诱发排卵的常用药物及其作用机制:

1) 克罗米酚(clomiphene citrate, CC)(氯 酚胺柠檬酸盐)CC的作用原理:CC的立体构型与雌激素相似,它与雌激素竞争靶细胞上的受体。CC与受体结合不能产生雌激素的作用,从而导致靶细胞对雌激素不敏感。CC与雌激素受体的结合封闭了下丘脑-垂体-卵巢轴之间正常调节,使下丘脑和腺垂体不能正确感受血中 E_2 的真实水平,从而排除雌激素对下丘脑和腺垂体的负反馈效应。雌激素不足的假象会激发LH-RH的释放以及随后垂体FSH和LH大量分泌,FSH可刺激更多的卵泡生长发育,LH增多可使卵泡产生比正常周期更高水平的雌激素。CC对下丘脑,垂体雌激素受体的占居是在一个相当的时间内,当CC引起升高的促性腺激素刺激卵泡发育至排卵前阶段时,下丘脑已不受CC的影响,并能够感受正确的甾体激素

的信号,此时排卵过程又受下丘脑-垂体-卵巢轴程度内源性反馈机制的调节。因此,在诱发排卵的过程中,CC 主要发挥促进性腺激素大量释放的作用,构成一种起始动力,促进卵泡发育。

CC 优点:价格便宜,出现严重过度刺激的风险也较少。缺点:诱发的发育卵泡数目较少,对宫颈黏液及子宫内膜有抗雌激素作用。

2) 人绝经期促性腺激素(human menopausal gonadotropin, hMG): hMG 是从绝经期妇女的尿中提取出来的,含有等量的 FSH 和 LH 活性,能诱发多个卵泡同时生长发育,较低剂量也可能出现 6~8 个以上的卵泡,构成超数激发效应。其作用原理是利用外源性高水平促性腺激素的作用使经优选并获得最后成熟的卵泡数超过单卵限额。由于超生理剂量的外源性促性腺激素的作用会阻断内源性 LH 峰的出现,应用 hMG 诱发超数排卵要用 hCG 促卵泡的最后成熟。

hMG 的优点是:效果比 CC 好,无抗雌激素作用,ET 后妊娠率高,流产率低。缺点是:使月经周期中的黄体期缩短,会引起过度刺激征,药价也较贵,此外,它同时含有 FSH 和 LH。

3) 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG):是否应用 hCG 有不同的意见。无论用什么药物诱发排卵,都要有个体化,根据体内的激素水平和超声观察卵泡发育情况决定用药的时间和剂量。

4) 促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a):由于 hMG 并不是一种单一的制剂,其中的较高的 LH 浓度有可能导致雄激素的产生过多和异常卵泡的形成(如导致卵母细胞过早衰退,影响体外受精或受精卵的植入)。为了降低内源性 LH 水平,采取 GnRH-a 下调垂体功能。

5) 卵泡刺激素(FSH): FSH 是卵泡发育所需,刺激颗粒细胞的增生,诱发颗粒细胞类固醇的生成,并启动 LH 受体的基因表达。而卵泡发育仅需很少量的 LH。高度纯化的卵泡刺激素(FSH-HP)制剂的效用很强,与其他治疗方案相比,会有更多的卵母细胞和胚胎产生,并有更高的植入率和受孕率。

2. 采卵的方法

经历了开腹取卵术(早被摒弃),经腹腔镜取卵术和经阴道 B 超导引取卵术三个阶段。

(1) 腹腔镜手术采卵:在腹腔镜直视下进行采卵是较早用于 IVF-ET 的采卵方法,也是准确度较高的。即麻醉后,将腹腔镜在脐下方刺入,用 CO₂ 充胀腹腔后,将取卵针刺入卵巢表面鼓出的成熟卵泡,抽取卵泡液及卵子。

(2) 超声波导向采卵:根据超声波检测仪中显示的卵泡图像进行卵泡穿刺采卵。与腹腔镜手术法相比,此法不需要全身麻醉及人工气腹,创伤较小。

无论用何种方法取卵,及时收取成熟度合适的卵子最为关键,也比较困难。

3. 卵子成熟度的判定

从理论上讲,成熟卵子在排卵前已完成第 1 次成熟分裂,第一极体的排出是卵成熟的最重要的标志。然而,采集到的卵细胞外包着卵丘和大量黏液,在解剖镜下常无法看清有无极体存在,因而不能以此来判定其成熟度。各国学者根据自己的工

作经验,总结出评估卵细胞成熟度的一些方法如下。

(1) 根据卵丘细胞的伸展度。

(2) 根据卵泡的大小判断卵泡的成熟度:这种方法不可靠。

(3) 根据卵丘细胞的脂肪颗粒:有人发现随着卵的成熟,卵丘细胞中的脂肪颗粒增加,当含脂肪颗粒的卵丘细胞 $> 50\%$,表示卵已成熟,如卵丘细胞中出现空泡则表明卵已过熟。

(4) 根据卵泡液中的蛋白成分:抗 α -胰蛋白酶 $> 8\text{mg/dl}$, IgG/纤维蛋白质比值 < 2 时表示卵已成熟。

(5) 根据卵泡液中雌、孕激素的水平。

(6) 根据卵-放射冠-卵丘复合体(oocyte-cumulus-complexes, OCCCs)的特点来判断卵的成熟度,此方法是北京医科大学刘斌教授最先采用的。

1) 成熟型 OCCCs:黏液团的直径达 $3.0\sim 5.0\text{mm}$ 或更大些,卵丘细胞多且伸展,细胞之间的距离大,放射冠细胞分散,透明带明显可见,经常可以见到在卵周隙中有第一极体;

2) 未成熟型 OCCCs:整个复合体体积很小,黏液团的直径仅为 $1.0\sim 1.5\text{mm}$,具有紧密的放射冠和几层卵丘细胞,解剖镜下看不清透明带的轮廓;

3) 中间型 OCCCs:形态介于上述两者之间,黏液团直径在 $2.0\sim 3.0\text{mm}$ 之间,放射冠细胞较分散,可见透明带。

(三) 精子的准备

1. 精液的采集

一般主要用新鲜精子。不管是用丈夫精子还是其他供者精子,选择高质量精子是取得成功的又一关键。在施行采卵手术的当天,应试者的丈夫或供精者要到医院按要求采集精液。在取精前禁欲 $4\sim 5\text{d}$,多用手淫法,应注意手部及阴茎部清洁,并收集全程精液,特别是射精时的第一部分精液,因其中常含较高浓度的精子。

2. 精液分析

在进行人工授精前应对精液进行详细的检查,包括形态学、细菌学、免疫学以及细胞遗传的检查等,需要计算精子数,活精子比例,测精子活动力及精子穿透试验。

关于精子受精能力的评价,目前有如下指标:①保持直线性前向运动能力的精子受精能力强;②正常精子多且少有畸形,受精能力强;③去透明带金色田鼠卵的精子穿透试验阳性者,受精力强。

3. 精液的加工处理

取得精液后,需要对精液进行一系列处理,其目的是:①清洗精子;②去掉精浆;③增强精子的活力;④使精子具有在体外与卵子结合的能力,即精子获能。

取得的精液置于室温下 $0.5\sim 1\text{h}$,待完全液化后用精子洗液(SW液或Earle培养液)冲洗。经离心后去除上清液,然后加适量的培养液在 CO_2 箱中孵育 50min ,使精子游动,处在最上层的精子就是已获能的精子。

(四) 体外授精及体外培养

体外人工授精与体外培养需要有成熟的卵细胞,一定数量和质量精子及最适宜的环境条件。

1. 孵育卵细胞

孵育的目的是促使卵细胞在体外进一步成熟,孵育的时间依卵-冠-丘复合体的成熟度而定,成熟的 OCCCs 在获取卵后孵育 6~10h,而不成熟的 OCCCs 则要孵育 24~36h,甚至 48h 直至成熟再授精。

2. 检查精子的活力

镜下计数活精子。

3. 人工受精的模拟试验

在培养盒中无卵的情况下,加一滴精液,观察精子群的活动状况,并估算应加多少精液进行人工受精。

4. 人工受精

向孵育好的卵细胞中加入适量的精液(含活动的精子 50 000~100 000 个精子),之后送入 CO₂ 箱内孵育。

5. 换液

在人工授精后 14~16h 后观察,若见卵细胞中有雄原核和雌原核,在卵周隙有第二极体,则表明已形成受精卵,人工授精成功。需要把受精卵移到生长液(GM)中,继续培养使其卵裂并发育,以便适时施行胚胎移植。

在胚胎移植前还要进行胚胎发育的评估:发育正常的胚胎应是卵裂球大小均匀,形状一致,饱满并占据了透明带内的大部分空间,卵裂的速度均衡。

(五) 胚胎移植与妊娠监护

ET 是“试管婴儿”试验程序中的最后一步,也是重要的一关。

1. 胚胎移植

第 1 例“试管婴儿”是移植了一个 8 个卵裂球期的胚卵,以后有的是在 16 个卵裂球期移植的,还有主张 2~4 个卵裂球期移植,目前移植的最适胚龄尚无定论。移植胚胎的数目也是有争议的问题。实验表明,单个胚胎移植造成的妊娠机会比多个胚胎要少,一般以 2~4 个为宜。移植时用聚四氟乙烯特制的移植管,接到 Tb 注射器上。

2. 妊娠监护

胚胎移植后的监测十分重要。目前使用最多的仍为放射免疫测定。一般在胚胎移植后第 6d,血清中的 β -hCG 开始升高,8d 后尿中 hCG 也会升高。胚胎移植后第 10,12,14d 测尿中 β -hCG,如阳性则可认为已妊娠。术后 3 周可用超声检查胚囊的位置;5 周已可测定胚胎大小及胎心搏动。

3. 影响 ET 的因素

目前认为造成移植失败可有以下 3 个原因:① 在移植时母体子宫内膜与胚卵

的发育处于不同步状态,或宫内激素、体液因素不足,不能使子宫接受胚胎;② 穿刺取卵时黄体受损伤,而使黄体功能不足;③ 移植过程中胚卵损伤或子宫内膜损伤,因而胚卵将随宫腔液体一起流出。

4. 提高受精率、卵裂率、早期胚胎率

关键在于不断提高体外配子及胚胎培养技术。共培养技术能够提高体外受精率、胚胎质量及妊娠率,其在辅助生殖中的应用是非常有益的。所谓共培养,是指在卵子和精子体外受精后,置于有一定浓度共培养细胞生长的条件培养基中共同培养。共培养细胞种类很多,主要分为二类:自体细胞和异体细胞,如子宫内膜细胞、颗粒细胞、输卵管上皮细胞等。各种方法均有其局限性,应结合不孕症类型选择相应有效的共培养技术。最近一项研究表明,输卵管上皮细胞的共培养技术能有效提高男性因素所致不孕的体外受精率,而对输卵管因素及不明原因不孕者的体外受精率无明显作用,认为可能与共培养改善受损精子的功能有关。

(六) “试管婴儿”的成功率与畸形发生率

1. 成功率

一般体外受精率达 85% ~ 90%;卵裂率(体外培养成功率为)80%;而经胚胎移植后的妊娠率仅 20% ~ 25%。

2. 畸形发生率

“试管婴儿”的诞生引起举世震动,同时随着数量的增多,人们也担心经过体外这么多环节的处理,过这么多道“关”而出生的婴儿,畸形发生率会不会很高。法国的统计资料表明,从 1987~ 1991 年总计出生的 6 248 例“试管婴儿”,有某种畸形的新生儿 187 例,占总数的 2.8%,这与自然妊娠分娩的新生儿的畸形发生率相当。

二、显微授精

常规 IVF-ET 技术用于治疗男性不育已有 10 多年的历史,但其受精率明显低于其他因素引起的不育,这是该技术应用于临床以来所遇的难题之一。借助显微操作,辅助精卵结合、受精的一系列助孕技术是近年来辅助生殖技术的发展热点。

透明带在精卵识别、结合和穿过程以及阻止多精子进入卵子内和保护着床前胚胎方面都起着重要作用。显微授精技术的主要目标就是透明带。显微授精技术包括透明带钻孔技术、透明带部分切除(partial zona dissection, PZD)、透明带下授精(subzonal insemination, SUSI)及卵胞浆内单精子显微注射(ICSI)。早期采用透明带钻孔或 PZD 进行体外受精,进一步采用 SUSI,并均在 1988 年获得成功。但上述方法有很大的局限性,受精率较低,且要求一定数目活动力较好的精子,多精受精亦无法控制。1992 年,Palermo 等首先报道了胞(卵)浆内单精子注射(intra cytoplasmic sperm injection, ICSI)婴儿诞生。从此,为不孕不育尤其是男性不育的治疗开辟了广阔前景。迄今,世界上已有 20 多个国家有成功报道。我国首例 ICSI 在中山医科大学获得成功,于 1996 年 10 月 3 日诞生。

卵胞浆内精子注射是指用显微操作技术将单个精子注入卵胞浆内的过程,具有单精受精率高、多精受精率低、不受精子浓度形态影响等特点,其成功率超越了传统的体外受精 IVF 及其他显微授精技术,在治疗不孕症,尤其是男性不育中取得了引人注目的进展。

1. 适应证

(1) 严重精子质量异常患者:根据 WHO 和 Kruger 诊断标准,正常质量的精液必须具备以下 3 个标准:精子浓度 $> 20 \times 10^6/\text{ml}$; 前向运动精子 $> 40\%$; 正常形态精子 $> 14\%$ 。如果活动精子浓度 $< 1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 或活动精子总数 $< 1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 则受精难以成功。活动精子浓度 $< 0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 属于严重精子质量异常,无法进行常规体外受精。

(2) 既往常规 IVF 失败患者。

(3) 严重的抗精子抗体患者。

(4) 无精症患者:在男性不育中约 10% 患者为无精症。无精症可分为输精管阻塞性无精和非阻塞性无精症。对于前者,通过显微外科手术行睾丸或附睾活检可得睾丸精子或附睾精子。非阻塞性无精症是由于生殖细胞发育停滞而致无精,精子发育可停滞在精子细胞,初级精母细胞,次级精母细胞甚至精原细胞水平。为了解决非阻塞性无精症患者不孕的难题,有人考虑在体外培养初级精母细胞,使其发育到精子水平,但在高等动物尚未成功。因而有人尝试将精子细胞甚至更原始的生殖细胞直接进行 ICSI,期望得到正常受精和妊娠。如 1997 年日本有人报道对 9 例无精子症患者用晚期精子细胞性胞浆内注射,结果有 3 例患者配偶临床妊娠。非精子胞浆内授精技术无疑给无精子症患者带来了希望。

(5) 未成熟卵以及冷冻保存的卵母细胞:使用促排卵药物得到的卵母细胞并非都是成熟期的卵母细胞,而未成熟的卵细胞在体外培养 24~36h 一般都能发育成熟。但动物实验表明,体外培养成熟的卵母细胞常因透明带变硬而影响授精。在卵母细胞冷冻保存过程中也出现这一现象,因此,对体外培养成熟的卵细胞以及冷冻保存后的卵细胞可直接行 ICSI,跨越透明带这一屏障,提高受精率。

(6) 常规 IVF 失败后未受精卵母细胞:某些患者由于精子质量异常导致常规 IVF 失败。对于这些病人可在发现 IVF 失败后立即对未受精的卵母细胞行 ICSI。国外有成功妊娠并产下健康婴儿的报道。

2. ICSI的操作

(1) 促排卵和卵子的采集。

(2) 卵子在体外培养。

(3) 精子采集及处理。

以上步骤基本同如常规 IVF-ET。

(4) 显微注射:

1) 精子制动:在注射精子前首先要进行精子的制动,目的是通过制动使精子细胞膜破裂,精子被注入胞浆后,卵胞浆内某些因子通过破损的精子膜进入精子胞浆激活精子,同时精子胞浆中的活化因子进入卵胞浆激活卵子,另外精子制动还能

避免精子在降低黏度的卵胞浆中恢复活性,因精子尾的活动破坏细胞器。

主要的方法是在 ICSI 前选形态正常、有活力的精子,用显微注射针压其尾部中点并迅速划过,使其尾部制动。

2) 卵胞浆内精子注入:固定针吸住卵子,注射针以尾至头顺序吸入精子后刺入卵胞质中,轻轻吸入少许卵胞质后,将吸入的卵胞质与精子一起注入卵胞质中,退出注射针。

3) 放开卵细胞。

4) 二氧化碳培养箱培养 16~24h。

ICSI 的精卵结合过程较正常受精要快,精子注入 6h, 33% 出现原核, 6~20h, 89%~91% 出现原核。

3. 影响 ICSI 成功率的主要因素

ICSI 成功与否主要看其受精、卵裂以及妊娠率,影响的因素较多,除了技术本身外,精子、卵子状态及卵子的激活等也都直接影响其成功。

(1) 显微操作技术对 ICSI 的影响:操作的熟练及准确性对 ICSI 成功与否有极大的影响。如精子注射入卵胞浆前必须完全制动、精子真正注入卵胞浆并不被逐出、操作中应避免对卵子的损伤。卵子在培养箱外暴露时间越短越好,显微操作过程最好不超过 5min。技术熟练是 ICSI 成功的前提,目前 ICSI 受精率及卵裂率的提高根本上是由于技术的提高。

(2) 精子状态对 ICSI 结果的影响:精子是在睾丸及附睾中发生和变态而形成的,不同发育时期的生精细胞其成熟度不同,因此受精潜力也有所不同。以前通常是用成熟精子授精,显微授精使附睾及睾丸中的精子也具有了使成熟卵子受精的能力。已经有用附睾及睾丸中精子进行 ICSI 娩出健康婴儿的报道。

统计分析显示:正常精液的精子 ICSI 后受精能力最高,非阻塞性无精症患者睾丸精子受精能力最低,而不同质量的异常精液及阻塞性无精症患者附睾及睾丸精子在受精及妊娠率上无显著性差异。造成这些差异的原因可能是 ICSI 所用精子尽管形态上正常,但其结构上可能存在不足之处,引起受精失败。

(3) 卵子对 ICSI 结果的影响:

1) 卵子的状态:文献报道 ICSI 所用卵子是处在第二次成熟分裂中期(M II 期)的成熟卵子,镜下可见第 1 极体,只有用出现第 1 极体的成熟卵子做 ICSI 才能获得满意的受精、卵裂及妊娠率。由于目前多采用促超排卵方案,使卵子的成熟度受到影响,从而影响 ICSI 后受精、卵裂的结果。另外,妇女年龄对 ICSI 结果有显著影响,大于 36 岁的妇女做 ICSI 后,其卵子存活率、胚胎移植率及妊娠率均明显低于 36 岁以下组的妇女,说明妇女年龄影响卵子质量,从而影响 ICSI 结果。

2) 卵子激活:卵子激活是一个复杂的生理过程,是以形成雌雄原核、放出第 2 极体为标志并最终启动卵子代谢的一系列变化。ICSI 越过精卵膜融合,直接将精子注入胞浆,其卵子激活过程有别于自然受精。一般认为,ICSI 时注射针穿刺卵膜及注射精子前胞浆回吸对卵子的机械刺激及注入精子的生物刺激,两者共同作用引发 Ca^{2+} 释放从而激活卵子。回吸卵胞浆对卵子的激活作用目前遇到争议。

4. ICSI的风险和出生缺陷

ICSI 因具有其他辅助技术无法比拟的优点而被广泛应用。但 ICSI 包括两类风险:一类与 ICSI 操作无关,另一类则与 ICSI 操作有关。前者指 IVF 通常的风险,如卵巢过度刺激综合征、多胎妊娠、异位妊娠等;后者指 ICSI 将未经自然受精过程选择的精子直接注入卵母细胞,而少精、弱精,无精患者通常伴有基因缺陷,有可能将这些缺陷传给下一代。另外,ICSI 操作过程可能将外源 DNA 或污染颗粒注入卵母细胞胞浆内。尽管目前 ICSI 出生的婴儿整体畸形率与自然妊娠及常规 IVF 出生的婴儿基本相同,但在进行 ICSI 前,仍要非常仔细地进行检查。由于 ICSI 应用于人类不足 10 年的时间,许多问题如生育方面的问题尚需进一步随访。

三、着床前遗传病诊断技术

着床前遗传病诊断技术(preimplantation genetic diagnosis, PGD)是指对植入以前的胚进行诊断,排除遗传疾病的一项新技术。当子代处在可遗传的遗传异常危险中时,可应用 PGD 对胚进行筛查,应用此项技术诞生的试管婴儿被称为第 3 代试管婴儿。在 PGD 应用之前,主要是应用绒毛活检或羊膜穿刺进行产前筛查以尽早发现染色体遗传异常,但此时胚胎或胎儿已在母体内形成。显然植入前异常胚的筛查能极大地减少患者的精神压力。

着床前遗传学诊断是避免遗传病儿出生、达到优生目的的重要手段。PGD 可适用于不同时期,常用于下列 3 个时期:

1. 受精前

将受精前卵子的第 1 极体作为活检材料,取出第一极体做 PGD 并不影响卵子受精和正常发育,但是由于其只能间接地反映母体单方面的遗传缺陷,可靠性相对较差。

2. 卵裂期

不同时期的卵裂球接受活检的能力不同。现大多数学者主张,对受精后第 3d 6~8 细胞阶段的卵裂球进行活检比较适宜。有研究表明,人类胚胎经活检取出卵裂球并不影响其在体外继续发育成囊胚的能力。但是,胎儿是由内细胞团衍生而来,而卵裂球活检导致内细胞团的减少。所以,尚须考虑 PGD 对着床后胚胎的影响。

3. 囊胚期

对滋养层细胞活检可取得较多的细胞供遗传学诊断,增加了诊断的可靠性。但在实际应用中,只有 25%~50% 受精卵在体外发育到囊胚期,给诊断带来一定困难。

操作时用机械、化学或激光等方法除去部分透明带后即可获得活检标本,包括受精前、后卵子的第 1 或第 2 极体、各发育阶段胚胎的 1 个或 2 个卵裂球或囊胚的胚外滋养层的一组细胞。用一内径 5~40 μm 的光滑活检工具通过透明带的开孔移去活检组织进行 PGD。目前,PGD 方法主要有两种:聚合酶链反应(PCR)和荧光

原位杂交(FISH)。PCR 可以利用微量 DNA 进行基因扩增,从而对某些遗传病作出基因诊断。FISH 是利用荧光标记探针检测多种染色体异常的一种方法。目前,PGD 还可以用于检测包括先天愚型、血友病和胆囊纤维症等遗传性疾病。美国报道了利用 PGD 技术排除家族癌症遗传基因的婴儿的诞生。

四、传统 IVF-ET 基础上衍生的技术

1. 配子(gamete intrafallopian transfer,GIFT)或合子(zygote intrafallopian transfer,ZIFT)输卵管内移植术

即将人工获得的精子和卵子在体外进行加工处理,之后将精子和卵子再直接输入正常的受精部位——输卵管。

GIFT 与传统的 IVF 有许多相似之处,也有明显的区别;GIFT 的应试者输卵管必须是通畅的,至少一侧是通畅的,精子在体外的时间大大缩短,由 2d 缩短至 2~3h;GIFT 移植的是精子和卵子,而不是胚胎;精、卵注入输卵管内,而不是通过阴道注入宫腔。

在 GIFT 的基础上,又创立了 ZIFT,就是把受精卵移入输卵管内。

GIFT 的适应证广,患者有女性的常见不孕症,也有男性的;成功率高;流产率也高(平均 4 例中有 1 例);多胞胎率也高(平均 4 例妊娠者中就有 1 例为多胞胎)。

2. 子宫直肠陷凹内卵子、精子移植术

将卵子、精子从阴道后穹窿送入直肠子宫陷凹,再由输卵管吸入卵子、精子,受精卵进入宫腔、着床而妊娠的方法,简称 POST。

子宫直肠陷凹是腹膜腔的最低位置,在大多数情况下,输卵管的伞端可垂入子宫直肠陷凹,子宫后倾者更是如此,所以,在此处移植卵子、精子,为输卵管的吸取精卵创造了条件。

POST 适用于:① 配偶精子缺乏活力;② 人工授精失败原因不明的不孕症;③ 年龄大于 35 岁;④ 月经周期 26~35d;⑤ 有排卵者;⑥ 盆腔组织及输卵管正常;⑦ 子宫输卵管造影正常。

POST 的花费比 GIFT 少;手术时间短,因而易于掌握。

五、未成熟卵的体外成熟

在进行体外受精-胚胎移植治疗时,超促排卵可使妇女在同一个周期产生多个成熟和不成熟的卵子,卵子的成熟度直接影响受精率、卵裂率和妊娠率。未成熟卵的体外成熟的研究一方面可以提高 IVF-ET 的成功率,另一方面,可以开拓新的获得卵的途径。

(一) 培养基

目前,应用于卵子体外成熟培养基中,除含 15%~20% 血清的基本培养液,如:

人类输卵管液(HTF), Ham F10 培养液或 Earle 氏平衡盐液等外, 还包括以下几种成分:

1. FSH 和 LH

Borges 等发现, 在基本培养液中加入 0.075IU/ml FSH 和 0.5IU/ml LH, 可使 60.5% 的第 1 次分裂前期(PI 期)卵到达 M II 期, 而不含 FSH/LH 组只使 49.5% 的卵达到成熟。但 FSH/LH 对 MI 期卵的效果不明显。

2. 卵泡液(FF)

有的研究者在培养液中加入体积分数 50% 的卵泡液, 但卵泡液是促进还是抑制卵子的成熟还存在争议。支持者认为 FF 中含有卵子生长发育所必需的激素成分及营养物质; 反对者则认为 FF 中含有二种称为卵子成熟抑制因子的物质, 对卵子的成熟不利。

3. 颗粒细胞的联合培养

用排卵前卵泡中获得的黄素化颗粒细胞与未成熟卵进行联合培养(co-culture), 可使 76% 的卵子获得成熟, 而未用联合培养组的成熟率只有 35%; 而且, 进行联合培养者成熟后的受精率也大大提高(54% 与 20%)。

4. E 和 P

将未成熟卵母细胞与颗粒细胞联合培养, 发现在 FSH 存在的情况下, E_2 分泌增加。因此认为在进行未成熟卵的体外培养时, 可以不添加 E_2 。在培养液中加或不加 P 对卵子的体外成熟没有任何影响, 但会使卵黄膜的不稳定性增加。已经发现, 在加了 P 的培养液中培养的卵子的破损率大大增加, 可能是长时间用 P 培养使膜发生了生化改变。

5. 葡萄糖和丙酮酸

葡萄糖和丙酮酸是在卵子发育成熟过程中提供能量的物质。在培养液中加入高浓度的葡萄糖或丙酮酸(1mmol/L), 就会发现 GV 期卵的成熟率提高, 而且培养液中丙酮酸的利用率也提高。进一步研究发现, 对于 GV 期卵, 培养的前 3 个小时内, 主要消耗葡萄糖; 而在 GV 破裂后, 丙酮酸的利用率却开始上升。实际上, 丙酮酸和葡萄糖也是通过调节其他物质的代谢, 如蛋白质和脂类的合成, 或作为抗氧化剂, 来影响卵子的成熟的。

6. 其他

Gomez 等发现: 在培养液中加入表皮生长因子和胰岛素样生长因子 I 可以提高卵子的成熟率。另外, Khatir 等发现卵泡液中含有的 22kDa 和 25kDa 的蛋白成分在闭锁卵泡中含量较低。这些蛋白成分是否对卵子的成熟有影响目前还不清楚。

体外成熟培养的时间依据原来卵的成熟程度而定。对于从自然周期取得的未成熟卵来说, 一般要经过 32~48h 的培养, 才能有 80% 以上的卵子获得成熟, 44~54h 后才能进行体外受精。

(二) 影响未成熟卵体外成熟的因素

1. 患者年龄

在各年龄组中, 随年龄的增加, 从每个卵巢中获取的卵子数目下降。但是, 从

34~39岁妇女的卵巢中取到的卵子体外成熟的成功率最高。这是因为<33岁的妇女如果需要切除卵巢,则说明其病变较严重,所以影响到了从这样的卵巢中取到的卵子体外成熟率。另外,也不能排除卵成熟能力随年龄增长确实能够增加的可能性。

2. 取卵时间

在月经周期的增生期和分泌期,从每一个卵巢中取到的卵子的体外成熟率没有差别,但增生期的取卵数目较多。

3. 卵子质量

通过各种方法取得的未成熟卵本身的质量也直接影响到其体外成熟率及受精率。Wood等证明,质量优良、形态良好的卵的成熟率和受精率均高于质量欠佳的卵子。

4. 卵子来源

Barnes等发现,取自月经周期不规律的多囊卵巢病人的未成熟卵的成熟、受精及卵裂能力均大大低于取自月经周期规律者。这可能与多囊卵巢病人的卵泡中雄激素水平较高有关,也可能只与卵子大小有关,因为较小卵子的生长发育能力不如较大卵子。

(三) 未成熟卵培养的应用前景

1. 从刺激周期的卵巢中得到的未成熟卵

已经有许多生殖医学中心报道了从刺激周期的卵巢中得到未成熟卵后,经体外成熟、受精及胚胎移植,获得了妊娠成功。

2. 从未刺激的卵巢中得到的未成熟卵

1991年Cha等首次报道了从未刺激周期的卵巢中取到未成熟卵并获得妊娠,从而为一些卵巢早衰的妇女生育后代带来希望。

3. 从PCO患者的卵巢中取到的未成熟卵

Trouson等1994报道了从PCO患者的卵巢中取得未成熟卵进行体外成熟培养取得成功妊娠的经验。Cha等进行了该方面的研究。从27个未刺激的不排卵PCO病人中共取到未成熟卵258个。经48h的体外成熟培养,55.8%获得成熟,用显微授精技术使80%的卵子受精。有25例患者得以胚胎移植,其中3例获得妊娠。

4. 未成熟卵的冷冻保存

虽然已经有了关于MⅡ期卵冻存成功的报道,但人类卵子冻存的研究尚处于初期阶段。MⅡ期卵子的纺锤体对于温度的变化极为敏感,因此极易出现非整倍体畸形。另外,有人提出冻融会使皮质颗粒过早释放,导致透明带“变硬”,阻止了精子的穿入。而未成熟卵的冻存是女性配子保存的另一可能的途径。Toth等证明未成熟的人卵可以进行冻存并在融解后继续成熟至MⅡ期,其冻融后存活率为15.6%,但成熟率较高,为58.3%。

总之,有关未成熟卵体外成熟的研究尚处于初期,还有许多未知点有待人们去探索和研究,但其意义是重大的,具有广阔的应用前景,是生殖医学领域又一重要

的研究方向。

第二节 人工授精

人工授精是用非性交的方法,将精液置入女性生殖管道内,使精子和卵子自然结合,以达到妊娠目的的一种辅助生育技术。人工授精是解决男性不育症的有效方法。根据所采用的精液来源不同,又可分为丈夫精液人工授精(AIH)及供者精液人工授精(AID);按操作方法可分子宫内授精,及近年来出现的新方法——输卵管内精液灌注等。

一、适用的范围

1. AIH 的适应证

(1) 精液正常,但因生殖器及性功能异常不能进行正常性交者,如尿道下裂,尿道上裂,早泄和逆向射精者。

(2) 精子质量异常:如精子数量少或精子成活率低等。

(3) 不明原因性不育。

2. AID 的适应证

(1) 无精症或严重死精与少精症。

(2) 不可逆性输精管绝育术后。

(3) 男方有遗传缺陷。

3. 接受人工授精妇女的条件

无论是 AIH 还是 AID,接受人工授精的妇女必须具备以下条件:有规则的月经周期,有正常的排卵,输卵管必须通畅,生殖器官无严重疾患。

4. AID 供精者的选择

在选择 AID 供者时,显然应挑选体力及智力俱佳的已婚育的青壮年男性,应仔细检查其精液质量,排除一切遗传病及性传播性疾病的可能性。要求供方与受方不相识,还应兼顾供者的血型、身高、肤色及头发颜色等是否与患者丈夫的相近。

二、人工授精的治疗程序

(一) 精液的采集和处理

禁欲 3~5d,用“手淫法”将全部精液直接射入已预热至室温的清洁消毒的玻璃容器,保存在一定的温度范围内(不低于 20℃,不高于 40℃)。在 1h 左右使用,使用前进行精液常规检查。

不射精症者手淫法不行时,可用电按摩器采集精液。逆行性射精者,也就是射精时,精液不从尿道射出而逆流到膀胱内。采精前每 4h 服碳酸氢钠 1g,使尿的 pH 达到 7.3~7.7 时,经导尿排空膀胱;再用 5% 葡萄糖林格溶液冲洗膀胱,最后留

3~5ml 于膀胱内;继而采用“手淫法”排精,排精后立即排出膀胱内容物于消毒玻璃容器内,然后离心浓缩至 1ml 立即进行人工授精。

精液量及精子数少的患者,可采集几次精液加以浓缩后进行人工授精;精液量多而精子数少者可用分步射精法,也就是分段采集精液,采用第一部分精液进行 AIH。因为第一部分精液由尿道球腺及前列腺的分泌物和睾丸附睾和输精管的产物组成,所以这部分精子密度最高,约占精子总数的 90% 以上。但精液量较少,约 0.7ml。

精液不液化者,在授精前用糜蛋白酶或胰蛋白酶,使之液化后进行 AIH。

精子活力差者,可加咖啡因,在精液中的终浓度为 7.2mmol/L ,将此混悬液进行人工授精。咖啡因能提高精子活动力,增加单位时间内进入宫颈黏液的精子数,并提高精子的受精能力,不损伤精子本身等作用。咖啡因的作用机制有些学者认为,可能是增加 cAMP 的含量而有利受精过程。

(二) 人工授精的方法

1. 子宫人工授精

根据将精子注入的部位不同,可分以下几种方法:

(1) 宫腔内授精(IUI)法:是借助导管,将处理过的精子直接送入宫腔,使精子与卵子自然结合。由于避免了不良的宫颈因素对精子游动的影响,缩短了精子游动的距离。精子体外处理过程中提高了精子的活力,从而增加了受孕机会。可采用夫精或供者精液进行。

IUI 的适应证为不明原因不孕症、男性因素、无排卵、宫颈因素、免疫因素和子宫内膜异位症。条件是必须至少有一侧输卵管通畅。

IUI 的并发症主要为无菌操作不严时可致宫腔内感染、诱导排卵引发多胎妊娠及卵巢过度刺激综合征。用 hCG 诱导排卵后,当超声显示直径 $> 14\text{mm}$ 的卵泡超过 3h,多胎妊娠的危险增加,可选择用镇静剂后在阴道超声引导下穿刺抽吸多余的卵泡,且当日即可行 IUI。

(2) 宫颈管内授精法:将精液注入宫颈内。此法是人工授精中最常用的方法。

(3) 阴道内授精法:将精液注入子宫颈周围。

(4) 宫颈杯内授精法:宫颈盖上宫颈杯,将精液注入杯内,杯留放 24h,此法适用于少精症患者。

2. 输卵管内精液灌注(FSP)

FSP 是一种人工授精的新方法。原理是:用一定的装置封闭子宫颈口后,向子宫腔内注入 4ml 处理过的精子悬液,利用子宫腔压力,使输卵管内口张开,精子悬液进入输卵管内。FSP 在理论上具有优于其他人工授精方法的一些特点,且在临床不孕症治疗研究中取得了一些进展。但目前还不能对其疗效是否优于传统的方法下一个肯定的结论。

第三节 精子、卵子和胚胎的冷冻保存

一、精子的冷冻保存

人类精子冷冻保存的历史最早可追溯到 1776 年, Spallanzani 将人精液埋在冰雪中(0°C 以下), 复温后发现有部分精子存活。100 多年后, 在 1886 年 Mouteyzza 成功地将人精子冻存于 -15°C , 并且第一次提出“精子库”的概念。1938 年至 1945 年间, 人们不断地摸索更理想的冷冻方法。其中 Hoagland 和 Pricus 在 1942 年用快速冷冻法将人精液储存于液态氮中(-196°C), 复温后得到精子有 20%~40% 的存活率, 最高时可达 67%。随着对于冷冻损伤、冷冻保护机制的研究, 人们认识到, 冷冻对细胞的伤害在于降温或复温的温度转换过程。

1949 年, Polge 在家禽精子冷冻保存时偶然发现甘油具有保护作用, 使人们开始意识到冷冻保护剂的重要性, 从此人类精子冷冻保存也进入了新的时代。1953~1954 年间, Sherman 和 Bunge 用甘油做冷冻保护剂, 将在干冰(-79°C)内储存 3 个月的冷冻精液用于临床人工授精, 生出了 25 个婴儿, 从而证明了冷冻-复温后的人类精子能够正常受精, 受精卵可正常发育。10 年后, 即于 1963 年 Sherman 报道了将人精子成功地冻存于液氮(-196°C)的方法, 此法简便有效, 直至目前仍是广泛使用的方法。此后, 许多国家相继建立起精子库, 并在临床进行应用。研究显示用冷冻精液人工授精受孕率稍低于新鲜精液受孕率, 而自然流产率及婴儿先天异常率, 与自然妊娠相比无明显差异。

精子的冷冻保存主要应用于: ① 治疗男性不育: 官方资料显示, 育龄妇女中有 10% 患有不育症, 其中 1/3 是由于男性不育造成的。用冷冻精液人工授精治疗男性不育是一种有效的方法; ② 优生服务: 如男方患有某些遗传性疾病, 为使其下一代免受遗传性疾病的危害, 可提供他人健康精液。也可对那些接触放射线、有害物质的工作人员预先储备其健康时的精液, 以保证他们的后代的健康; ③ 为计划生育国策提供保险: 如为那些自愿进行输精管结扎手术的人于结扎前冷冻储存部分精液, 一旦需要再生孩子时可以提供使用。

人精液的冷冻保存(Kolon et al, 1992)方法:

- (1) 人节欲 2~3d 后采精。
- (2) 采得的精液在 37°C 液化, 然后进行常规检查。
- (3) $600g$ 离心 10min。
- (4) 去除一半体积的上清液, 再加入 TES 和 Tris (TEST)-蛋黄缓冲液至原体积。
- (5) 加入甘油, 使其终浓度为 6% (V/V)。
- (6) 分装精液入 0.5ml 冻存细管, 封闭。置 15ml 离心管中放入 37°C 水浴锅平衡 30min。
- (7) 再将离心管放入装有 37°C 水的烧杯中, 然后将烧杯放入 4°C 冰箱, 约

90min 后冷却至 4℃。

(8) 取出精液细管,置液氮蒸气层 10~15min 后再浸入液氮液体中。

(9) 复苏方案:从液氮中取出精液细管,室温下放置 30min 使其融化,然后置 37℃ 平衡 15min。

二、胚胎和卵子的冷藏技术

在应用超排卵方案的 IVF-ET 治疗中,所获得的卵子通常多于一次胚胎移植所需数量,因此就有剩余胚胎和卵子需冷冻保存。

目前,有关胚胎冷藏的研究较多。从 1983 年 Trounson 等首次报道用冷冻胚胎移植并获得妊娠成功以来,人类胚胎冷藏技术不断完善。各地 IVF 中心相继有成功报道。Chen 等在 1986 年首次报道人卵子置于 -196℃ 冷藏,经 IVF-ET 后足月分娩。此后报道极少,总体而言,卵子冷藏技术尚处于实验阶段。冻存胚胎而不冻存卵子的原因主要有以下几方面:多数有关冻存的理论和技术是关于胚胎的;移植冻融胚胎的妊娠率高于移植冻融卵子再受精的胚胎的妊娠率;成熟卵子分裂中期的纺锤体较易受冻存的损伤。

因此,冷藏的焦点主要是胚胎,关于卵子(包括不成熟卵子)冷冻保存技术也在不断探索之中。据报道,在 IVF-ET 技术的基础上引入胚胎冷藏技术后,妊娠率由 20% 上升到 28%,一次治疗周期成功率增加 40%。

在进行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗时,超促排卵可使妇女在同一个周期产生多个成熟和不成熟的卵子。卵子的成熟度直接关系到卵子的受精率、卵裂率及妊娠率。因此,人们进行了大量的研究,力求探索出卵子成熟的机制及其影响因素,从而能够成功地完成未成熟卵的体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)过程。有的科学家独辟蹊径,在自然周期将多囊卵巢病人的未成熟卵取出体外,进行体外成熟、受精及胚胎移植,获得了成功的妊娠。这样,既免除了病人的痛苦及过度刺激的危险,也节省了医疗费用,减轻了患者的负担。

在此基础上,人们考虑到在冷冻保存成熟卵子时,其第 2 次减数分裂中期(metaphase II, M II 期)的纺锤体极易受到冷冻的伤害,就用纺锤体还未形成前的第 1 次减数分裂中期(metaphase I, M I 期)的未成熟卵进行冷冻保存研究,并已取得初步的成功。而且,这还为即将面临卵巢去势(手术切除,化疗,放疗)的患者提供了一种保存生育力的途径;这无疑也扩大了卵子的来源,为建立“卵子库”展示了更广阔的前景。

第四节 转基因动物技术的简介

转基因动物是指以实验方法导入的外源基因在其染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。培育转基因动物中最重要的手段就是转基因技术(transgene technology),该研究始于 20 世纪 70 年代,此后迅速发展。

一、转移系统的构成

在体外基因转移中,供体 DNA、受体细胞和基因载体系统构成了转移系统的三大要素。

(1) 供体 DNA:即目的基因,要求其纯度高。

(2) 受体细胞:必须处于旺盛生长状况或具有充分的活力,同时选定培养基的适宜 pH 值,使用优质犊牛或胎牛血清。

(3) 载体系统:在适当载体上携带标志基因有利于转移 DNA 的筛选。常用的载体系统包括:PSV 系列、PRSV 系列、PCD 及可诱导启动子载体等。

二、技术方法

目前,转基因的技术方法很多,有物理的、化学的及生物的,按外源基因导入细胞的方法概括起来可以分为以下四大类:

(1) 融合法:包括细胞融合、脂质体介导融合、原生质体介导融合、微细胞融合、鬼影红细胞融合等。

(2) 化学法:包括 DNA-磷酸钙共沉淀法、DEAE-葡聚糖法、染色体介导法。

(3) 物理法:包括显微注射法、电脉冲法、细胞冻存法。

(4) 病毒感染法:包括重组 RNA 病毒感染、重组 DNA 病毒感染等。

现常用的主要方法有显微注射法、逆转录病毒感染法、胚胎干细胞法与精子载体法。

1. 显微注射法(microinjection)

显微注射法是使用最早、最广泛、目前最为有效的方法。其所具有的优点是:

① 基因的转移率高,整合效率可达 30%。② 可直接用不含有原核载体 DNA 片段的外源基因进行转移。③ 外源基因的长度不受限制,可达 100kb。④ 常能得到纯系动物。⑤ 实验周期相对较短。

与此同时,一些不足也限制了这一技术的应用:① 需要昂贵精密的设备、显微注射操作复杂、需专门技术人员。② 导入外源基因拷贝数无法控制,常为多拷贝,最可达数百个。③ 常导致插入位点附近宿主 DNA 大片段缺失、重组等突变,可造成动物严重的生理缺陷。尽管如此,由于直接对基因进行操作,整合率较高,因而仍是目前建立转基因动物极为重要的方法。

2. 反转录病毒感染法

是将目的基因重组至反转录病毒载体上,制成高滴度病毒颗粒,人为感染着床前或着床后胚胎,也可直接将胚胎与能释放反转录病毒的单层培养细胞共育以达到感染目的。通过病毒 DNA 插入宿主 DNA 的机制,将外源目的基因整合到宿主基因组,呈单一位点单拷贝整合,整合率高,以及插入位点克隆分析较容易等都是反转录病毒感染法的优点。

但借助于这种反转录病毒进行基因转移时,由于其天然基因组中含致癌基因,故须对这类病毒基因组进行改造以确保安全。要求改造后的反转录病毒保留部分复制功能,病毒蛋白的表达功能可由助手病毒或助手细胞系提供。此外,反转录病毒作为载体还应具有将 RNA 包装成病毒颗粒的序列。同时改造成的反转录病毒应将病毒 RNA 拷贝成 DNA。以重组反转录病毒为载体能把目标基因精确而高效地整合到被感染细胞的基因组中,插入到特定染色体位点的是病毒单基因组拷贝,除在整合位点寄主 DNA 序列发生短片段重复外,并不导致寄主基因组的重排,反转录病毒在大部分细胞中感染和表达效率均较高。而且此法操作简便,无需特别昂贵的仪器设备,故此法目前较为普遍的使用。

3. 胚胎干细胞法

胚胎干细胞是从早期胚胎的内细胞团获取细胞经过体外培养建立起来的多潜能细胞系。它具有胚胎细胞相似的形态特征及分化特性。将一种动物的胚胎干细胞注入另一种动物的早期胚胎内,产生嵌合体转基因动物。胚胎干细胞已被公认是转基因动物、细胞核移植、基因治疗等研究领域的一种新试验材料,具有广泛的应用前景。

4. 精子载体法

将成熟的精子与外源 DNA 进行预培养之后,使精子有能力携带外源 DNA 进入卵子中,使之受精,并使外源 DNA 整合于染色体中。这一技术在构思上,对于大动物转基因研究具有相当重要的意义。

第五节 动物克隆技术(细胞核移植)概述

一、概 述

1. 什么是克隆

1997年2月,英国权威刊物《Nature》刊登了罗斯林研究所关于克隆绵羊“多莉”(Dolly)的论文,引来了全世界的关注,一时间“克隆”也成了一个空前普及的科学名词。

“克隆”是英文单词 clone 的音译,本意是指通过无性形式由单个细胞产生的,和亲代非常相像的单个动物后代。动物克隆是指由一个动物经无性繁殖或孤雌生殖而产生的多个后代。克隆的所有成员的遗传组成都是完全相同的。由于自然的哺乳动物克隆的发生率极低,因而人们开始探索用人工的方法研究高等动物克隆。细胞核移植是产生克隆动物的有效方法,所以人们往往把它称为动物克隆技术。

细胞核移植(nuclear transplantation or nuclear transfer)是指将发育不同时期胚胎或成体动物细胞核经显微手术和细胞融合的方法移植到去核卵母细胞中,或将体细胞的核直接注入去核卵母细胞质中,重新组成胚胎并使之发育直到产生子代。

细胞核移植是研究个体发生(胚胎发育)过程中细胞核和细胞质各自的作用以及他们两者相互作用的一种比较合理的方法。克隆技术之所以引人关注,是因为

其在医疗卫生,畜牧业方面有深远意义。治疗性克隆将为那些目前无法根治的疾病,如糖尿病,帕金森症等带来希望。

2. 克隆研究大事记

(1) 1938 年:德国科学家 Spemann 首次提出动物细胞克隆的设想。

(2) 1952 年:美国学者 R. Briggs 和 T. King 首先在青蛙身上进行克隆实验。

(3) 1970 年:克隆青蛙实验取得突破,J. Gurden 培育的核移植青蛙卵发育成了蝌蚪,但是在开始进食以后死亡。

(4) 1981 年:科学家进行克隆鼠实验,据称,用鼠胚胎细胞培育出了发育正常的鼠。

(5) 1984 年:第 1 只胚胎克隆羊诞生。Willadsen 报告用取自羊早期胚胎(8~16 细胞期)细胞核克隆出活产羊。此后其他科学工作者对牛、猪、山羊、兔、猕猴等动物进行克隆实验。

(6) 1994 年:用发育到 120 个细胞阶段的胚胎克隆牛获得成功。

(7) 1997 年:英国罗斯林研究所宣布克隆羊培育成功。Wilmot 等用取自 1 只 6 岁成年羊的乳腺细胞培育成功克隆羊“多莉”(图 10-1)。



图 10-1 克隆绵羊“多莉”



图 10-2 克隆猴“泰特拉”

(8) 1998 年 2 月 23 日:英国 PPL 医疗公司宣布,该公司克隆出一头牛犊“弗逊先生”。

(9) 1998 年 7 月 5 日:日本科学家宣布,他们利用成年动物体细胞克隆的两头牛犊诞生。

(10) 1998 年 7 月 22 日:采用一种新克隆技术,用成年鼠的体细胞成功地培育出 3 代共 50 多只克隆鼠,这是人类第一次用克隆动物克隆出克隆动物。

(11) 1999 年 5 月 31 日:美国夏威夷大学的科学家,利用成年体细胞克隆出第一只雄性老鼠。

(12) 1999 年 5 月 31 日,美国以夏威夷大学科学家杨向中为首的研究小组利

用一头 13 岁高龄的母牛耳朵上取出的细胞克隆出小牛。

(13) 2000 年 1 月 3 日:杨向中用体外长期培养后的公牛耳皮细胞成功克隆出了 6 头牛犊。

(14) 2000 年 1 月:美国克隆猴成功,这只恒河猴名为“泰特拉”(图 10-2)。

(15) 2000 年 3 月 14 日:英国 PPL 公司培育出 5 只克隆猪,是人类首次培育出克隆猪。

(16) 2001 年 1 月 27 日:美国和意大利的两位科学家宣布将联手尝试克隆人。

我国相关方面的研究:早在 1963 年,童第周等首次报道了鱼类细胞核移植,利用其自制的显微注射器成功地在金鱼身上进行了细胞核移植,在国际上首创研究移核鱼和培育鱼类新品种的新方法。20 世纪 70 年代,童第周提出了对哺乳动物进行核移植的设想。到目前在我国至少已经克隆出鼠、兔、猪、牛、羊 5 种哺乳动物,在克隆技术上位于世界先进水平。

二、哺乳动物细胞核移植(克隆)的方法

(一) 重构卵的形成

形成重构卵涉及供体细胞和受体细胞。

1. 供体细胞和受体细胞的选择和处理

(1) 供体细胞:即细胞核的来源细胞(即被克隆的对象),主要有 3 类:早期胚胎细胞、干细胞和体细胞。

获取的细胞经体外处理后在 CO_2 培养箱中培养,传代 3~8 代的后可用于核移植。核移植操作前 3~5d,将培养基中的血清浓度降至 0.5%,使细胞进入并停止于 G_0 期(也称静息期),使染色体不再复制。这样,处于不活跃状态的遗传物质有利于细胞核移入卵细胞质后,重新启动基因表达程序。也有人认为降低血清浓度并非必需。

(2) 受体细胞:即提供去除核后的细胞质的细胞,包括摘除细胞核的 M II 期卵母细胞、受精卵和融合后的 2 细胞胚胎的细胞质,均曾被用作受体细胞。但大量实验表明,M II 期卵母细胞适用于所有的供体核,因此目前基本上都采用去核的 M II 期卵母细胞作为受体胞质。

2. 细胞核的移植

包括受体细胞核的去除和供体细胞核移入,可以分两步进行,也可以一步完成。

(1) 受体细胞核的去除:用切口针切开透明带,切开部分约占整个卵母细胞透明带周长的 $1/4 \sim 1/5$ 。然后用平头吸管自切口处插入,连同第 1 极体及其下方的约 $1/4 \sim 1/3$ 胞质去掉。将去核卵移到含 10% FCS 无 Ca、Mg 离子的 M2 液中, 37°C 培养,之后把供体核移入。也可以在去核后立刻把供体核移入。

(2) 移核:按供体核移入部位的不同分为带下移植和胞质内注射。

1) 带下移植:将核供体卵裂球或细胞,放在操作滴中,用注射针吸入后移到去

核卵母细胞的卵周隙(一般沿去核时留下的口进入),并使供体细胞与卵质膜接触。

2) 胞质内注射:胞质内注射时,要求注射针很细,一般内径为 $5\sim 8\mu\text{m}$,甚至更细。先用注射针将供体细胞的质膜捅破,再将细胞核直接注入卵质内。操作的环境温度为 17°C 左右时有利于注射细胞的恢复和成活。而且胞质内注射后通常还须进行激活处理。

3. 细胞融合

经带下核移植操作的卵子需进行融合处理使供体核进入到受体细胞质中,形成重构卵。融合方法有化学融合(利用聚乙二醇处理而导致细胞融合)、病毒融合(用仙台病毒融合细胞)及电融合3类。目前广为使用的是电融合,除完成细胞融合外,电刺激还有激活卵母细胞的作用。

电融合是通过外加脉冲电场来改变细胞膜的通透性,从而促进膜内外物质的交换。当细胞之间存在紧密接触,电击可使膜接触区形成的孔洞贯穿,导致细胞融合。

常用电融合液有 0.27mol/L 蔗糖液、甘露醇溶液(100ml 中含甘露醇 5.470mg , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.246mg 和 CaCl_2 0.549mg)和 Zimmermann 液等。

融合时将待融合卵先经融合液处理后移入电融合槽中。用人工或交流电使待融合卵定位。电刺激后,尽快把重构卵移出,于新鲜培养液中洗3次后,培养 $20\sim 30\text{min}$ 检查融合情况。检查方法有:① 观察供体细胞和受体细胞的接触面是否已消失。供体核是否已进入卵母细胞中,这是最明确的证据;② 采用 Hoechst 33342 染色,荧光下观察供体核物质是否进入受体胞质中;③ 检查透明带下卵周隙是否存在退化或被损坏的供体细胞碎片。

(二) 重构卵的活化处理

一般电融合完成后,卵子因电刺激而被激活。但也有的核移植重构卵还需要进一步充分的激活才能发育。这类卵子在电融合完成后或胞质内注射后,还需给予进一步的激活处理。核移植中常用的活化处理方式有化学激活和电激活两类。应用较多的化学激活剂有 7% 乙醇、离子霉素、A23187、6-DMAP、星形孢菌素(staurosporine)、 SrCl_2 等。

(三) 移核胚的体外培养及胚胎移植

移核后的重构卵需要在体外培养一段时间以观察其发育能力。当胚胎发育到一定时期后(桑葚胚或囊胚期)进行移植,可将移核胚移入输卵管或子宫,以期产生克隆动物(图 10-3)。

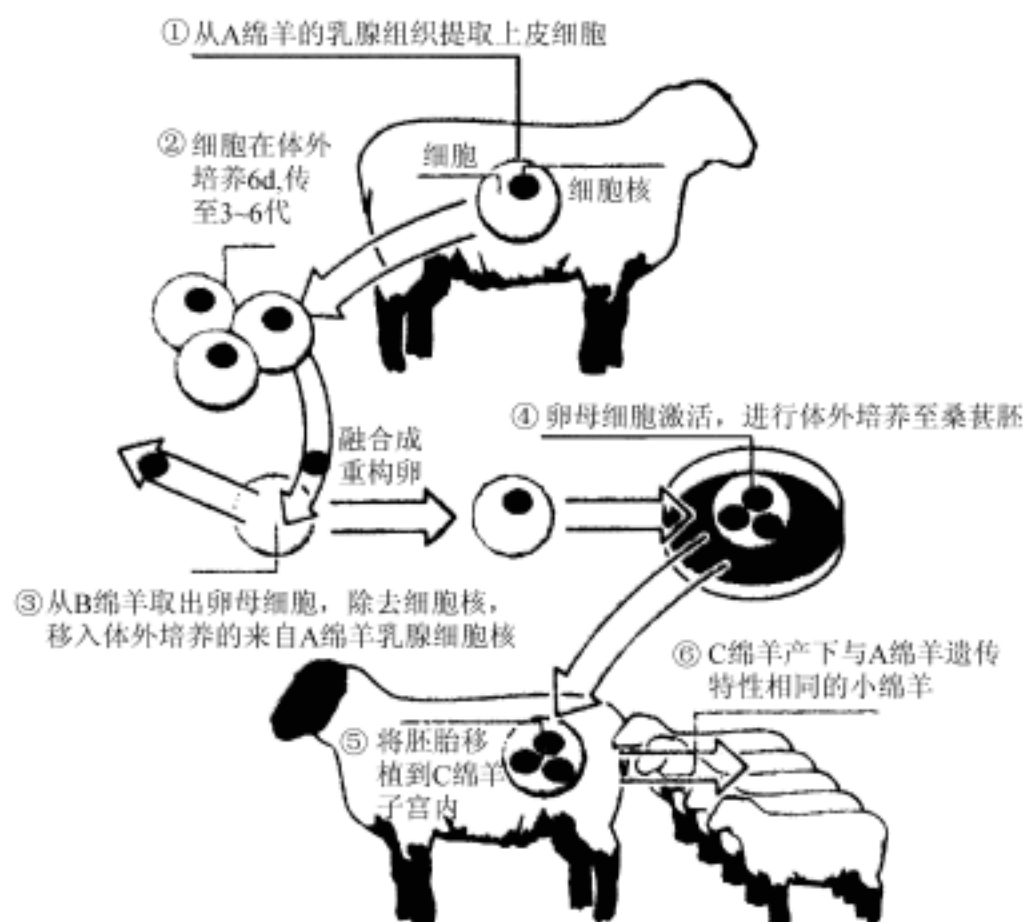


图 10-3 克隆绵羊“多莉”形成的简要流程图

附文 有关干细胞(stem cell)

干细胞是在生长和发育中起“主干”作用的细胞,具有自我更新、高度增殖和多向分化的潜能。按照分化潜能的不同,干细胞主要分为三类:全能干细胞、多能干细胞和专能干细胞。

受精卵是最原始的全能干细胞,其继续增殖分化的产物,如早期胚胎卵裂球、内细胞团的细胞,是具有自我更新和发育全能性的全能胚胎性干细胞,即胚胎干细胞(embryonal stem cell, ES)。胚胎干细胞基本特性是发育全能性,能分化为属于外胚层、中胚层和内胚层范畴的各种分化细胞,甚至参与个体发育,故又有人称为万能细胞。胚胎干细胞主要 ES 作为正常的 2 倍体细胞含有该生物体的全部遗传信息。因此,其在生物学及医学方面都有极其广泛的应用前景,主要有以下几点:① ES 可用于生物体的克隆;② ES 还可用于转基因动物的生产;③ ES 的研究有利于弄清组织的分化过程及其功能,为药物的研制和测试提供了新的模型;④ 可用于人体器官的移植、白血病的治疗等。

最新研究显示,干细胞不但存在于胚胎,在成体内的多种组织器官内也有干细胞,如骨髓及外周血的造血干细胞,神经干细胞,上皮干细胞等。

一、小鼠胚胎干细胞的分离培养

(一) 自囊胚分离胚胎干细胞

可选用正常的交配后 3.5d 的囊胚或“发育迟缓”的囊胚。“发育迟缓”的囊胚通常是在卵巢切除后 4~6d 时采集。两组囊胚的培养步骤是一样的,惟一的区别在于第 1 次分离的时间,因为“发

育迟缓”的囊胚发育会慢一些。

1. 材料与设备

(1) 囊胚

(2) M₂ 培养液或 Dulbecco 改良 Eagle 培养液(DMEM) 加 10% 血清和 25mmol/L HEPES (pH 7.4)。

(3) 10mm 组织培养皿[(4×10)mm 圆盘最理想]。

(4) 饲养细胞[STO 或小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)]。

(5) 胚胎干细胞培养基(DMEM)加 4500mg/l 葡萄糖,加或不加丙酮酸钠。

(6) 细的巴氏吸管。

(7) 去钙、镁离子的磷酸缓冲液(PBS)。

(8) 0.25% 胰蛋白酶/0.2% EDTA 液(用 PBS 或相似的缓冲液配)。一些实验室用 0.5% 胰蛋白酶。

(9) 清亮的石蜡油。

(10) 含血清的培养基。

2. 步骤

(1) 用 M₂ 培养液或加 10% 血清和 25mmol/L HEPES(pH 7.4)的 DMEM 液将胚胎从子宫角冲出,分别放入 10mm 组织培养皿,培养皿中有事先准备好的饲养细胞(STO 或 MEFs) 以及 1ml ES 细胞培养液。最初的胚胎培养也可以在没有饲养细胞的 ES 培养液微滴中进行孵育,培养液微滴上覆盖清亮的石蜡油。培养 1~2d 后胚胎自透明带中孵出,通过滋养层细胞的迁移贴附于培养皿表面。在胚胎贴壁后不久,内细胞团(ICM)变得相当清晰,在随后的 2d 内可见其迅速的生长。通常 1~2d 后,ICM 扩展到相当的程度。不过,一组中的胚胎可能存在很大的差异,因此,每天对胚胎进行分别的观察是必要的。

(2) 当 ICM 分化的细胞团达到一定程度时(一般在培养后 4~5d 可达到),用细巴氏吸管的封闭端,自滋养层细胞片中将其取出。已经出现内胚层外层的细胞团表明分化得太多了,所以很少能产生 ES 细胞。用去钙、镁离子的 PBS 洗涤细胞 2 次,用细的吸管将细胞转移到含 0.25% 胰蛋白酶/0.2% EDTA 的 PBS(或类似的缓冲液)微滴中(在石蜡油覆盖下)。

(3) 在 37℃ 下孵育微滴 3~4min,将另一根细吸管中吸入含血清的培养液(吸管末端的直径不能大于细胞团)。用吸有液体的吸管轻轻吹打微滴,使 ES 细胞团变为 3~4 个细胞的小团(注:不建议将 ICM 分化的细胞团吹打呈单细胞悬液)。

(4) 将吹打后的微滴内容物转入新的有饲养细胞的 10 mm 组织培养皿,每天检查每一培养皿。一般 2d 后,各种细胞集落开始出现,并将呈现以下几种不同的形态之一:① 滋养层样细胞;② 上皮样细胞;③ 内胚层样细胞;④ 干细胞样细胞。

二、胚胎干细胞的生物学特性与鉴定

1. 形态结构

体外培养的 ES 细胞不论在饲养层细胞上或缺饲养层而添加所需生长因子的特定条件下,圆形或卵圆形细胞均呈单层或多层密集堆积而形成岛状或巢状群体生长状态。将这种岛状或巢状的群体细胞克隆挑出,用胰蛋白酶轻度消化后,接种于新的饲养层或特定的条件培养液中。分散的 ES 细胞又重新长出岛状或巢状克隆。组成克隆的细胞彼此界限不清楚,粘连性强。若撤除饲养层则 ES 或 EG 细胞克隆虽然彼此也依然黏附聚集成团,但呈悬浮状态,细胞界限也较清楚。

这时,细胞团已形成自发分化的拟胚体(embryoid body)。

2. 胚胎阶段特异性细胞表面抗原 SSEA-1 抗原的表达

早期胚胎细胞表面均表达胚胎阶段特异性细胞表面抗原 SSEA-1(stage specific embryonic antigen-1,SSEA-1)。因此,常用单克隆抗体 SSEA-1 检测 ES,阳性者为发育全能性干细胞。

3. 碱性磷酸酶的表达

早期胚胎的干细胞中 ALP 活性较高,而在已分化的细胞中活性明显降低。ES 和 EG 细胞活性较高。

4. 端粒酶

人 ES 细胞的端粒酶活性很高,而分化细胞一般难以检测到其活性。

5. 转录因子 OCT-4

OCT-4 基因表达:OCT-4 是一种发育全能性标志基因。在小鼠胚胎发育早期,生殖细胞谱系以及体外培养的多能干细胞都特异性表达 OCT-4 基因。因此,常用 OCT-4 抗体检测 ES 细胞中的 OCT-4 的表达,而分化细胞则无 OCT-4 表达。

6. 高度分化潜能

(1) 体外分化:将 ES 细胞接种于缺乏饲养层细胞的琼脂平板上,细胞黏附成团,形成拟胚体。拟胚体最外层分化为较大细胞组成的内胚层样结构。中间为未分化的干细胞。继续培养,拟胚体增大,内部出现囊腔,形成囊状胚体。囊腔和早期分化出的内胚层之间的细胞发育成类外胚层,为一层上皮样细胞,这样的结构可持续存在 3 周左右。若把刚形成的拟胚体移至无琼脂层的培养皿中贴壁生长,则可见拟胚体中间的细胞团保持着干细胞生长特征,而其周边细胞逐渐自发分化为多种不同类型的细胞。有上皮细胞、成纤维细胞等,细胞类型随培养条件和细胞密度而改变。

(2) 体内分化:在 Balb/c-nu 裸鼠腋下接种 ES 细胞。2~3 周取出瘤块,切片可观到瘤块类似畸胎瘤,除大量干细胞巢和间质细胞外,还包括神经管、腺管、上皮组织软骨和肌肉等多种类型的分化细胞。

三、干细胞系

从 20 世纪 60~70 年代开始,经过近 40 年各国科学家的努力,先后建立了小鼠胚胎性癌细胞(embryonal carcinoma cell,简称 EC 细胞)、人胚胎干细胞(enbryonic stem cell,简称 ES 细胞)和胚胎生殖细胞(embryonic germ cell,简称 EG 细胞)三个模型(细胞系)。这将对哺乳动物发育和细胞分化的研究起着重大的推动作用,特别是为临床细胞治疗和组织器官工程开辟了良好的前景。

1. EC 细胞系

是恶性畸胎瘤干细胞(teratocarcinoma stem cell),具有恶性生长并显示类似胚胎细胞发育全能或多能双重性质。在 20 世纪 70~80 年代间,EC 细胞常被用于研究哺乳类发育和遗传的模型,通过各诱导分化因子和条件,成功地诱导出神经细胞、肌肉细胞、软骨细胞和上皮细胞等包括三个胚层在内的各种类型分化细胞。由于 EC 细胞具有包括核形异常等某些恶性肿瘤特性,因此作为研究正常细胞分化的模型并不理想。

2. ES 细胞系

20 世纪 80 年代初,从小鼠胚胎的内细胞团(inter cell mass,ICM)或桑葚分离建立了具有发育全能性的 ES 细胞系。近年来在牛、猪、猴等大动物建立了 ES 细胞系。1998 年成功地建立了人

类 ES 细胞系,为细胞、组织和器官工程的研究开创了新的前景。

3. EG 细胞系

异位移植 12. 5dpc(days post coitum)胚胎生殖嵴至肾被膜下,能诱发产生含有大量 EC 细胞和各类分化细胞的恶性畸胎瘤,表明胚胎生殖嵴中的原始生殖细胞具有发育全能性。因此研究者从小鼠包括人的胚胎生殖嵴中分离培养出类似 ES 细胞的 EG 细胞系。

(翁 静)

第十一章

性与生殖健康

“生殖健康”这一词已被科学家、医生和消费群体使用了多年,但直到 1994 年在埃及开罗召开的“世界人口与发展大会(ICPD)”上由 178 个国家通过的《世界人口与发展大会行动纲领》后,才被广泛接受。

生殖健康不只是生殖系统或生殖过程没有疾病或不适,而是指贯穿终生的一系列状态、事件和过程。保障生命和威胁的状态共同组成了生殖健康。相对任何健康状况,社会、心理和生理因素在生殖健康中的相互联系显得更为紧密。

第一节 性生理学

从性幼稚状态和不能生育的儿童,转变为性成熟的青年,这一发育过程称性成熟过程,也称青春期,经过青春期的发育,人体中发育最晚的性器官也变得成熟起来,并开始具有了生育能力。青春期的开始年龄、发育速度及成熟年龄有很大的个体差异,并可能有地域或民族差异。一般规律是女孩比男孩早两年发育。国际上通用的青春期年龄是 10~ 19 岁。

青春期发生许多生理变化,除性器官显著发育外,最明显的改变是出现身体的快速生长(常称作生长突增)和副性征的发育。伴随这些生理变化,在心理和行为上也会出现明显的改变。青春期中发生的这一系列变化都和性腺激素的分泌增加有直接关系,而性腺激素分泌的增加又是在下丘脑、垂体、性腺以及肾上腺皮质间的相互作用下实现的。

一、性成熟的表现

青春期发育的特殊表现在形态、功能、性器官、第 2 性征等方面发生的巨大变化,尤其是生殖系统在青春期的迅速发育,并逐渐达到成熟。

(一) 青春期的—般变化

1. 形态变化

青春期身体增加非常明显,少的每年增高 6~ 8cm,多的可达 10~ 12cm(青春前期,每年增高 3~ 5cm)。一般女性长到 18 岁左右,骨化才完成,体形才算定局。多数女孩在身高激增高峰后一年开始月经初潮,月经初潮后增长速度逐渐慢下来。一般青春期的体重每年增长 5~ 6kg,多可达 8~ 10kg。女孩要比男孩长的矮些,轻些。9~ 10 岁是女孩的激增阶段,这一阶段女孩一般比同龄的男孩高。14 岁左右,男孩的身高体重又超过同年龄的女孩,而且差距越来越大,最后形成成年男子身体较高,肩部较宽,而成年女子身体丰满,臀部较宽的不同体态。

2. 生理功能

以肺活量与握力为代表,随着年龄的增加而上升,但到青春期肺活量增大很快,10 岁儿童的肺活量为 1 400ml,到青春期 14~ 15 岁时,就增加到 2 500ml,20 岁左右的青年可达到 4 800ml 左右。

3. 神经系统的变化

进入青春期后,脑、神经的功能就迅速完善,神经细胞进一步分化和成熟,思考和理解能力进一步加强,对事物的反应能力提高,能掌握较广泛的知识技能,脑的记忆能力得到加强,能较连贯、有条理地记事。由于青春期生长发育快,脑的兴奋性比较大,情绪容易激动,也容易疲劳,必须予以注意。

(二) 性发育

青春期阶段,由于体内性激素的作用,男性开始变声,喉结突出,长出胡须、腋毛和阴毛,这些外貌变化称“第 2 性征”。性器官(包括睾丸、附睾、精囊、前列腺及阴茎)在 10 岁以前发育很慢,到了青春期开始加快,平均 14 岁时出现第 1 次遗精。性发育开始约有 1/2 的男孩乳房也发育,有时仅一侧,有时两侧都有,乳头突出,乳晕下有硬块,触之有痛感,数月后即消失,这是正常现象。女性第 2 性征的发育以乳房最早,在 10~ 12 岁之间乳晕增大,以后乳房逐渐增大,乳头突出,骨盆变大,皮下脂肪增厚,腋毛和阴毛相继长出。第 2 性征伴随着性器官的发育,大多数女孩在 12 岁左右有月经。

1. 下丘脑-垂体-性腺轴的成熟

青春期开始后,在中枢神经系统的影响下,下丘脑-垂体功能逐渐成熟,下丘脑分泌的 GnRH 量的增加,促进腺垂体合成和释放 FSH 和 LH。随着 FSH 和 LH 分泌量的逐渐增加,就引起了青春期的一系列变化。因此可以说下丘脑-垂体的分泌增加,对青春期的生理变化起着启动的作用。

下丘脑-垂体分泌功能的成熟,不仅和性腺激素的反馈调节有关,还受中枢神经系统其他部位的控制和调节。青春期的开始伴有血浆促性腺激素的显著增加和波动,这是下丘脑-垂体分泌机制对低浓度性腺的负反馈作用敏感性下降的结果。在儿童期,下丘脑-垂体的分泌功能,对性腺激素的负反馈作用的敏感性较高,低水

平的性腺激素就可抑制下丘脑 GnRH 的分泌,使垂体促性腺激素的分泌维持在低水平,这又决定了性腺激素低水平的分泌。临近青春期,由于下丘脑对性腺激素负反馈作用的敏感性开始降低,结果 GnRH 和垂体促性腺激素的分泌增加,于是刺激性腺发育并使性腺激素的分泌增加,因而出现了青春期的一系列变化。由于下丘脑对性腺激素的敏感性下降,促性腺激素开始在较高的水平释放,因而促性腺激素分泌增加,并刺激其他靶器官发育。

2. 青春期的内分泌变化

青春期开始,促性腺激素的分泌除显著增加外,另一特点是分泌呈现明显的昼夜波动。这种波动与睡眠有关,当睡眠时促性腺激素出现脉冲式的释放高峰。

男孩的青春期可能主要是垂体 LH 的分泌增加引起,LH 的分泌增加促进睾丸体积增大,随之睾丸间质细胞分泌的睾酮量也增加。

女孩青春期的出现主要是由于 FSH 的分泌增加,而 LH 升高则出现较晚。卵巢对水平逐渐增高的 FSH 发生反应,增加雌二醇的分泌,当雌二醇的水平足以刺激乳腺发育时,就进入了青春期。以后雌二醇继续升高,当它达到一定的水平,并对 FSH 的分泌产生抑制性影响时,它本身的分泌也继之下降。于是引起子宫撤退性出血,出现月经初潮。

3. 肾上腺皮质的作用

不论男女儿童,肾上腺皮质分泌的雄激素自 7~8 岁开始均逐渐增加,直到 13~15 岁。

肾上腺皮质功能的初现约发生于性腺发育前 2 年,人们设想,肾上腺皮质分泌的雄激素可能对青春期的发动有影响,但尚无实验证据。临床可见性功能不全的人,在青春期年龄仍能生长阴毛和腋毛,而肾上腺皮质不足的女性,则几乎没有阴毛和腋毛,可见女性青春期的阴毛与腋毛的发育与肾上腺皮质的功能有关。

二、性行为与性反应

人体受到精神上或肉体上的性刺激,性器官和其他部位就会出现一系列生理变化,称为性兴奋。性行为是指在性兴奋的基础上,两性发生性器官的接触或结合即性交的过程,或虽无性接触,但与性器官有联系的活动(如性自慰等)。

(一) 性兴奋的反应

1. 男性性兴奋

男性性兴奋反应除心理上的性感活动外,主要表现是阴茎勃起和射精。

(1) 阴茎勃起:男性在受到性刺激发生兴奋时,阴茎可迅速胀大、变硬并挺伸起来,这一现象称为勃起。勃起是在神经控制下,由于阴茎发生了血流动力学的变化而形成的一种生理现象。阴茎勃起是维持男性性功能的重要环节之一。

1) 阴茎勃起的组织结构和血流特征:阴茎内部由三条长柱状海绵体构成,即背侧的两条阴茎海绵体和腹侧的一条尿道海绵体组成。两条阴茎海绵体平行排列,

并紧密结合形成勃起组织的主体,尿道海绵体较细,有尿道从中穿过,其前端形成阴茎头。海绵体的内部主要有含有大量血窦的组织构成,海绵体外均包有坚硬的纤维膜,称为白膜。白膜结构坚韧,有限制海绵体及血窦过分扩张的作用。一般情况下,流入血窦的血液很少,血窦呈裂隙状,海绵体柔软状。当血窦充血时,阴茎即变粗变硬形成勃起。在两条阴茎海绵体间的中隔上有缝隙状的孔,使二者的血窦可相互沟通。但阴茎头没有白膜和腔隙,仅含致密的静脉丛,因此勃起时比较柔软,不像阴茎体那样坚硬。

阴茎的血流供应,来源于阴茎背动脉和阴茎深动脉。背动脉在阴茎背面走行于筋膜和白膜之间;深动脉从阴茎脚进入,经阴茎海绵体走向阴茎前端,并在中途形成许多穿过小梁的弯曲分支,称螺旋动脉。这些动脉的内膜含有平滑肌纤维形成的纵嵴,阴茎松弛时,内膜嵴可阻止血流进入海绵体,当勃起时螺旋动脉展开,内膜嵴变平,血流可直接注入海绵窦内。

2) 勃起原理:勃起的形成与消退,实际上都是血液流入与流出阴茎的动力学变化引起的。勃起发生时,阴茎内动脉的血流量比松弛时要增大许多倍,根据阴茎的大小,其容量约可增大 80~ 200ml。

勃起的发生在血流动力学方面主要由 3 种因素引起:①动脉血流增加,这是引起勃起的主导性因素;②静脉回流受阻,这对维持勃起有重要作用;③血管内的特殊结构(动脉内膜嵴和静脉瓣)决定勃起时血流分布。

(2) 射精:射精是男性发生性高潮的主要特征。精液由阴茎射出体外称为射精。射精是通过生殖管道各部分协调的动作来完成的。包括 3 个生理过程:

1) 因附睾、输精管的平滑肌按一定顺序收缩,将精子由附睾压至尿道,在此精子与前列腺、精囊腺的分泌物精浆混合。

2) 膀胱括约肌收缩,封闭了膀胱与尿道的通路,以防止精子进入膀胱或尿液进入尿道。

3) 将后尿道的精液经尿道外口射出体外,这是靠阴茎基部的坐骨海绵体肌和海绵体的收缩实现的。

射精过程中由于上述有关肌肉的节律性收缩,可使男子感到一种强烈的快感,因而使兴奋达到高潮。在射精时如以上收缩顺序发生紊乱或膀胱括约肌未同时收缩,精子则可能进入膀胱而不由尿道射出,这叫逆行射精。

射精完全是一种反射动作,传入冲动来源于阴茎头,由阴部神经传入。基本中枢位于脊髓下部胸腰部,因而在一些较高位脊髓横断的病人,仍能完成射精动作。所以射精是由腹下神经和阴部神经共同支配的反射活动。

中枢神经系统的高级部位对射精反射有明显的控制和调节作用,目前认为,射精活动受脑内儿茶酚胺和 5-羟色胺系统调节,前者为射精的激活系统,后者为抑制系统,正常的射精活动有赖于这两个系统的协调。

2. 女性性兴奋

女性性兴奋反应主要是阴道润滑外阴,阴蒂勃起和出现性高潮。

(1) 阴道润滑作用和高潮平台:女性在受到性刺激后,阴道开始渗出一一种稀薄

的黏性液体。这些液体是由血管滤出的,阴道壁上有丰富的血管网,在性兴奋时,阴道壁的血管充血,因而导致液体的滤出。滤出的液体可由阴道流至外阴部,使外阴湿润,其作用是润滑阴道和外阴部,以利性交的进行。

由于阴道外 1/3 部发生显著充血,结果可使阴道口缩窄,阴道的这一反应称为“高潮平台”。在阴道口收缩的同时,阴道内 2/3 部分却发生扩张,同时宫颈和子宫体抬高,因而内段阴道反而变得宽松,有利于性交的进行和精液的容纳。

(2) 阴蒂勃起:女性的阴蒂在发生上和功能上和男性的阴茎类似,神经支配也基本相同。阴蒂是女性的性感受器,阴蒂尤其是阴蒂头上有丰富的感觉神经末梢,通常认为是女性性器官中最为敏感的部位。在性兴奋时,阴蒂可因充血而发生膨胀,勃起,使阴蒂的敏感性升高。刺激阴蒂不仅能使性兴奋加强,而且可使女性达到性高潮和获得性快感。

(3) 性高潮:当外阴部和阴道,主要外 1/3 受到的刺激达到一定程度后,可使女性性器官出现一种类似男性射精时的极度兴奋状态,即性高潮。此时,阴道、会阴及骨盆的肌肉会突然出现不可控制的节律性收缩,同时出现一些全身性反应。

阴蒂的兴奋与性高潮有密切关系,单独对阴蒂进行机械性刺激可引发性高潮。但阴蒂对性高潮的发生并非不可缺少的因素,因为在阴蒂切除的女性,有的性高潮不再来临,但有的可自然地发生性高潮。

性高潮的神经调节机制尚不清楚,但心理因素对女性性高潮的来临有明显影响。女性的情绪不佳或对环境感到不安时,性反应往往可降至为零,即不出现性兴奋或不会达到性高潮。据调查,女性一生从未体验或很少出现性高潮的人并不在少数。其原因大多不是器质性障碍,而是因心理性因素或缺乏性知识所致。

女性性高潮不易出现的另一原因,和女性性器官的神经分布有关。女性性器官对机械性刺激的敏感度以阴蒂最高,小阴唇次之,然后是阴道前庭和大阴唇,而阴道的感觉神经分布却不丰富,因此对机械性刺激的感受性也迟钝。

(二) 性反应周期

Masters 等将性兴奋的过程分为四个阶段:兴奋期、平台期、高潮期和消退期。虽这种划分是人为的,而且存在着个体间、时间间和环境间的差异,但仍有助于理解和分析性活动过程中体内出现的生理学变化。

性活动过程中,由兴奋到平台中段,一般是性器官自结合之前的互相爱抚阶段,也是双方进行感情交融阶段;平台后期和高潮期通常是发生在性器官结合的过程中;消退期为性器官脱离结合阶段。

性活动过程中性反应的周期变化可用反应曲线来表示,由曲线可知,男女的性反应有明显的不同,男性的每个性反应过程大体相同,即兴奋期和平台期后必然出现一个高潮期(射精),然后迅速进入消退期。而女性的性反应却非常复杂多变,如兴奋期可像男性那样迅速,也可十分迟缓,或停顿,因而可以两段或三段的形式发展到平台期。平台期也可像男性那样平稳发展,也可在波动中数次接近或达到高潮期。女性在一次活动过程中,即可体验到数次性高峰和性快感,也可不出现性高

潮,而由平台期进入消退期。

1. 兴奋期

(1) 男性:阴茎勃起,阴囊皮肤开始变得平滑,并向上提而变得扁平,此外因提睾肌收缩,使精索缩短、睾丸提升并因充血而开始增大。

(2) 女性:阴道出现润滑,阴道壁变厚,大阴唇变得扁平、膨起;阴道内 2/3 扩张,宫颈和子宫体抬高;阴蒂开始充血、膨胀。

2. 持续期(又称平台期、高涨期)

进入兴奋期后,如有效刺激仍然存在并能进一步强化,在性高潮来到之前即表现为平台期的变化。平台期的持续时间差异很大,早泄的男子,这一期可十分短暂;也有异常延长迟迟不发生射精的情况。在女性,平台期的时间差别更大,一般短的平台期可预示一个也特别强的性高潮。

(1) 男性:阴茎头直径增加并因静脉充血而颜色变深;睾丸进一步充血变大,此外尿道口有少量黏液流出,这是尿道球腺的分泌物,可对尿道和阴茎头有润滑作用。

(2) 女性:阴道外三分之一出现高潮平台,但阴道润滑作用有所减弱,阴道内 2/3 进一步扩张,阴茎和子宫体充分抬高;大阴唇因充血而颜色加深,称“性皮肤”变色,前庭大腺分泌黏液;在本期,阴蒂发生收缩反应,阴蒂头和体均向耻骨联合退缩,由于阴唇充血,使阴蒂难以看出,但其敏感性并未降低,对其周围的刺激,仍可提高其兴奋性并促使性高潮来临。

3. 性高潮期

在平台期的基础上,如性刺激已经强化,即可触发性高潮的来临。

男性高潮期的主要特征是射精。射精开始时,由于附睾、输精管、射精管、精囊腺和前列腺的顺序收缩,可使男子首先感到一种即将射精的紧迫感,接着由于阴茎和会阴部肌肉的节律性收缩,将精液射至体外。

女性的性高潮以子宫、阴道和会阴部的肌肉发生节律性收缩为特征。

4. 消退期

男性在性生活中一旦进入高潮而发生射精后,随之进入消退期,并立即出现一个性反应的不应期阶段。此时对性刺激不再发生任何反应,因而也不能再继续维持原先的兴奋状态。处在不应期的男性,一时间性欲完全消失,并在一段时间内不能出现性兴奋和发生勃起,因此男性在一次性生活过程中只能出现一次性高潮和发生一次射精。不应期的持续时间,一般为 30min 左右,但有个体差异,与年龄也密切相关,年龄越大不应期越长。

女性高潮期后因无不应期阶段,所以一次性生活中具有反复出现性高潮的潜能。

(三) 激素与性功能

内分泌引起的性功能和性行为方面的变化,有两种情况,一种直接影响垂体-性腺或垂体-肾上腺的功能,因而导致性行为的改变;另一种由于对整体功能的影

响,如糖尿病,因血管和植物神经功能的失调而引起勃起功能的失调。

1. 雄激素与男性性行为

雄激素与阴茎的自发性勃起有关,但与性刺激引起的勃起似乎关系不大。因为性刺激引起的勃起过程主要是在中枢神经系统的参与和控制下完成的。总之较明确的看法是,雄激素与性欲有关,而与性生活中的勃起关系不大。

2. 性激素与女性性行为

女性的性行为受生理状况、社会与心理因素、夫妻关系等的影响,并有一定的个体差异。月经周期中性行为的变化与各种激素的关系尚不清楚,仅就有关资料简介如下:

(1) 雌激素:对女性可能有刺激性欲的作用,性欲的维持则不能缺少雄激素的存在。但月经正常的女性中,未发现血浆雌二醇水平与性行为有明显相关性。可较近的研究显示,每日口服 50 μ g 乙炔雌二醇,可使绝经期妇女的性欲、性高潮的频率和阴道润滑作用均有提高。雌激素与雄激素混合使用对维持绝经妇女的性行为方面也常常是有效的。

(2) 孕激素:孕激素可能有抗动情作用,这可以解释在经前期(黄体晚期)由于孕激素的下降,性欲有一定程度增高的现象。

(3) 雄激素:有报道认为睾酮水平在排卵前后达到较高峰值的女性,在整个月经周期性活动的频率,比相应的睾酮水平较低的女性要高。另有人发现,睾酮水平高的女子,阴道对性刺激的敏感性较高。

外源性雄激素对卵巢和子宫被切除而提前绝经的妇女,可加强其性欲的强度和性幻想的频率,但这是在使用大剂量雄激素后产生的。

有人认为雄激素对女性的主要作用可能是对性的启动,而不是对性行为的本身。其启动作用可能是通过提高靶器官对性刺激的敏感性,并使这些器官作好接受刺激的准备而实现的。

3. 催乳素对性行为的影响

催乳素对男女两性的性功能及性行为均有明显的影响。在男性高催乳素血症(多由垂体瘤以及精神抑制药引起)可致性欲下降,阳痿和射精困难,也发现有女型乳房、溢乳、肥胖、多脂、体毛减少及小睾丸等现象。在女性,高催乳血症可引起月经失调、溢乳和不育,但性功能的障碍并不多见。

根据实验推测,催乳素可能是通过抑制 GnRH 分泌而起作用的。此外睾丸间质细胞上存在催乳素受体,所以催乳素对睾丸间质细胞的影响,可致睾酮水平的下降。

4. 外激素

许多动物的性行为 and 嗅觉有关。这种具有性吸引力的化学性联系媒介,称为外激素(pheromone)。动物的外激素是易挥发的脂肪酸降解产物,可对嗅中枢起抑制作用。在人类,嗅脑已进化为嗅球,但最近有报道,外激素在人类中也是存在的。因而推测,外激素对人类的性活动可能也有一定的影响。但尽管如此,在中枢神经系统和精神活动高度发达的人类,外激素在性活动中不可能起多大的作用。

三、性功能障碍

因男性性功能是一个复杂的生理过程,可分为性欲、阴茎勃起、性交射精、情欲高潮、勃起消退等几个环节。这些过程不仅需要神经系统、血管系统、内分泌系统及生殖器官的协同作用,而且还要有健康的精神心理状态才能正常进行。如上述任何环节发生故障,就会影响性生活的顺利完成,通常统称为性功能障碍,男性性功能障碍是男性性行为 and 性感觉的障碍,常表现为性生理反应的反常或缺失。性功能障碍常见的情况有:

1. 性欲障碍

性欲方面的障碍主要有性欲减退、性厌恶和性欲亢进 3 种。其原因可由于器质性异常,也可由于心因性异常,常伴有其他性功能障碍,因而不能达到和谐的性关系。

2. 勃起障碍

最为常见,可分为两种:一是阳痿,即男性不能达到和保持足以维持性交的勃起,可以是精神性,也可是器质性。二是阴茎异常勃起,是指阴茎持续勃起,并可产生疼痛,常为器质性。

3. 性交疼痛

常见女性,但也可发生于男性。常因器质性异常(如包茎、阴茎损伤)所致,但多数病例是精神性的,即当龟头受接触时产生恐惧反应而引起的。

4. 射精障碍

可以指射精时间上的障碍,如早泄、延迟射精。由于个体差异,所以除了性交前即已射精之外,究竟提早多少或延迟多少才算不正常,往往很难确定。

也可以指射精过程本身发生障碍,如不射精、逆行射精。二者的区别是:前者无性欲高潮,也无精液射出;后者是虽有性欲高潮,但无精液射出,精液逆行射入膀胱,可由性交后尿液检查是否有精子来鉴别。

其他较少见的尚有,溢精,即精液不是射出而是点滴流出因而也无性欲高潮。血精,精液中含有大量红细胞。脓精,精液中含有大量白细胞,频繁遗精或滑精者。

消退期中发生的障碍,严格讲不属于性功能障碍的范围,而是对性接触和性交的态度问题。这些人常在性欲高潮后感到不愉快或激怒与烦躁。

5. 感觉障碍

感觉障碍为性功能障碍的原因之一,常见的有:

(1) 痛性勃起:勃起的疼痛常见于纤维性海绵体炎或阴茎异常勃起,也可发生于包皮炎或龟头炎患者。

(2) 痛性射精:可发生于精囊炎或前列腺炎患者,也可是功能性异常。

(3) 外生殖器的感觉异常:大多是无感觉或异常感觉。常是特发性,或继发于已知疾病或损伤,无特殊治疗。

(4) 性欲高潮的感觉减退:这种病人的检查大多正常,性欲高潮的感觉性质常

由心理因素决定,应行心理治疗。

以上男性性功能障碍的分类其病因可分为器质性或精神性两种。按发生时间来分,可分为原发性,即第1次性接触即已存在的障碍;继发性,即性功能障碍发生前至少已有过1次以上正常的性接触者。有些性功能障碍常发生于特定环境,如阳痿有时发生于企图性交时,而在色情联想或手淫时并不发生,则称之为境遇性性功能障碍。

第二节 性心理学

像人的许多行为一样,人的性行为不像动物那么单纯,人的生物性渗透着社会性。动物性行为的目的是生殖,保持物种的连续性。而人的性行为与生殖已产生分化,发展出有性快感与性爱,使得人的性行为有着较动物性行为更深刻、更丰富的内容。

一、性意识的发展

随着性的生理成熟,人有一个性的逐步认识过程和性意识的发展过程,也就是说有一个性的心理发展过程。

婴儿生殖器官的外部特征十分明显,所以在出生时性别便得到确认,因此称之为第1性征。人类生殖系统的发育与其他哺育动物的进程相比较,有较长的孩提时期。在孩提时期里,人在生理上获得成熟的同时,受教育、学文化,获得社会成熟和心理成熟。

(一) 性心理发展阶段

由于第1性征十分明显,每个人通过与他人的交往和对自身的了解,很早就知道自己男是男是女。这种对性别差异的初步认识是性意识发展的基点。

1. 婴儿期(出生至2岁)

婴儿主要是通过口和身体与外界交流的。得到温暖和得到食物,就能得到满足。称由嘴巴与外界交流并获得快感的阶段为口欲期。这是性快感和性爱发展的先驱。如果婴儿与母亲的沟通发生困难,缺少依恋对象,婴儿就会不安,而且这种不安将深深印在心里,影响他的行为,影响心理发展。

2. 童年初期(2~5岁)

1岁半左右语言开始迅速发展,通过言语交流,儿童接受社会规范的社会化过程也就开始。

对2~5岁的儿童而言,“排便训练”是儿童安全感、道德感和自我意识的一个质的飞跃。通过“排便训练”儿童对性器官有了认识。由于排便方式的不同;男女性别差异也开始影响到了具体的行为。这时,儿童对性别的认识处于表面化的不稳定的状态。如果儿童能够顺利地通过这一时期,对性别角色的认同也会有大的发展。

这时儿童通过游戏获得的肉体亲近感和安全感对将来与异性的交往有潜在的关联。

3. 童年后期(5~ 11 岁)

游戏是儿童活动的主题,也是儿童社会交往的重要方式。5岁以后,儿童与同龄人的关系开始得到发展,并进一步强化了儿童的性别认同。这个时期,他们能够通过电影、电视、连环画等大众传媒和日常观察,进一步了解成人世界、包括性、男女关系等。

4. 青春初期(12~ 15 岁)

青春期的到来是以第2性征的出现为标志。这个时期大约是从12岁开始,但因人而异;男女之间也有差别。男子的第2性征包括长出体毛(胡须、腋毛、阴毛)、变声;阴茎和睾丸的发育、精液的分泌(射精、泄精)、骨骼变硬、肌肉发达,出现男性特有气味等。女子第2性征包括长出体毛(腋毛、阴毛)、子宫及卵巢的发育、月经的开始(初潮)、乳房的隆起、骨盆的增大、皮下脂肪的增加,出现女性特有的气味等。

青春期是一个充满矛盾的时期。青春期的矛盾表现在以下三个方面:

(1) 由于成熟的早或迟,影响了儿童的角色认同,他们常因为自己与伙伴身体上的差异增大而羞怯。

(2) 由于身体各部分发育快慢不一致,身体功能暂时失衡,自我意识的发展不稳定,情绪动荡不安。

(3) 生理成熟与心理成熟之间的差距加大,甚至导致心理失衡。

青春初期,性意识的发展经历了两个阶段。第1个阶段是性的反感阶段。发生在自己身上的生理变化,使青少年产生了对性的不安、害羞和反感。他们对异性态度冷淡、不合作、对立情绪增强,异性间的交往频率急剧下降。第2个阶段是向往长者阶段。处于青春初期的少男少女性意识已被唤醒;但同龄人的角色认同、社会认知的发展都处于较低级的水平,心理不够成熟,所以他们往往对同龄人缺乏兴趣。他们往往将爱慕的眼光投向长者、英雄、歌星等心目中完美的偶像。他们关心这些爱慕对象的一言一行;尤其渴望与心目中的偶像进行精神交流,而肉体的接触却不受重视。这种对年长异性的爱慕,是这个时期出现的正常现象。这种行为称为“牛犊恋”,不久就会随着个体心理的成熟而自然消退。这种恋情往往是单相思,有可能激励青少年追求上进,追求自我完善。但是,如果长期处于这种状态,就会妨碍与同龄人的交往,妨碍心理的正常发展。

5. 青春后期(16~ 18 岁)

随着年龄增长,青年已能正确对待生理反应,自我意识也更完善。他们的独立意识、成人意识已达到与成人相接近的程度。这时,青年对年长者的兴趣已经减退,对年龄和经历相当的异性对象比较注意。

青春后期,性成熟已经完成,而社会成熟却远远滞后。这时,青年还缺乏独立生活的能力,学习的过程仍在继续,并是生活的中心内容,结婚、建立家庭还是十分遥远的事。在这一时期,青年的性心理的发展最为丰富多彩,但也最容易出问题。心理学家将这个时期称为“心理危险期”。

6. 青年期与成年早期(18~ 35 岁)

在青年期和成年早期,婚姻使浪漫的、不公开的性关系合法化。个体在这个时期,体能、创造力处于巅峰状态,是人发挥全部潜力而富有成果的时期。这个时期,个体的自我意识变得稳定,他们对自己的价值和能力充满信心,积极参加社会生活,与周围人建立和睦而亲密的关系。在两性交往中更注重理解、和谐和情感的共享。婚姻与家庭已是他们较为现实的奋斗目标。婚姻或固定配偶关系的确立,性行为的要求已能得到满足,性的魅力和性行为也促进了性技巧的完善。性和谐的问题、性适应的问题,以及由婚姻引发的系列家庭矛盾就变得突出了,是这一时期的主要矛盾和应当妥善解决的问题。

(二) 两性角色的自我认同

人性别角色的形成和发展过程经历了从性别身份确认到性别角色的不断发展和完善两个不同的阶段。性别角色的自我认同虽然是从对生理特征的外观认知开始的,但社会生活环境对它起着导向的作用。在早期社会化过程中这种导向作用十分明显。

孩子还未出生,父母就按照传统的性别角色价值观,对孩子的性别抱着期望。这种价值观决定了抚养孩子的方式。如男孩与女孩的衣着打扮不同,所玩的玩具种类也不同。女孩的衣着鲜艳,多玩娃娃、花之类的玩具;而男孩多玩枪炮、汽车之类的玩具。在活动方面,父母允许男孩有较大的活动范围和自主性,对女孩则给以较多的限制和保护。在个性教养方面,鼓励男孩勇敢好胜,要求女孩文静整洁。父母的这些价值取向,在长期的社会化过程中慢慢为子女所接受,形成与之相似的态度体系和习惯化行为方式。

儿童社会化的主要内容是饮食起居等生活习惯的养成,大小便习惯的形成对生理性别的确认和社会性别差异的分化有着重要意义。儿童在成人的教化下,知道自己是男孩或女孩,但他们相互之间并未从对方身上看出这种差异,或者说是并未意识到这种差异。由于男女大小便方式的不同,儿童对这一行为的观察和适应,才知道自己与他人的相同或不同的地方。他们逐渐由接受性别身份,到理解性别身份,最后对性别进行归类,形成比较稳固的性别角色观念。

儿童对性别角色的认同对适应社会生活具有重要意义。随着社会化的发展和自我意识的发展,这种认同由生理因素转向社会因素,由外在的物质形态转向内在的心理特征,由肤浅的衣着打扮、表情动作,转向深层的个性品质。这种由生理自我向社会自我,再向心理自我发展的过程就是个体对性别角色自我认同的过程,也是一个主体人格的形成过程。

在个体性别角色自我认同的过程中,如果社会环境(主要是家庭环境)的特殊导向会给儿童性别角色认同带来障碍,严重的甚至产生性角色畸形。导致性别角色认同障碍的社会原因有:

- (1) 父母对儿童异性行为的鼓励。
- (2) 父母对男孩的过度保护,对女孩的忽视。

(3) 在社会交往中缺少与同性同龄人的交往。

(4) 缺少认同、模仿的同性形象。这些儿童的穿着和行为都像异性,如果这种情形继续发展,就会形成一种性格、性别角色的自我认同发生倒错。然后再加以纠正就比较困难,也会给这类角色倒错者的身心带来极大的痛苦。

(三) 两性角色的发展

性别角色的自我认同是个体性别角色发展的内在动力。在自我认同的基础上,在自我意识和社会认知的作用下,个体会对自身的发展提出新的要求和期望,追求性别角色的完善,从而形成区别于其他人的性别角色特征。这种区别于其他人的性别角色特征主要体现在下述几个方面:①价值取向的不同;②成就动机的不同;③个人偏好和态度不同。

二、恋爱与婚姻

1. 恋爱

恋爱是个体性亲近行为的自然发展。青春期的性亲近行为的对象是广泛的,容易变换,交往的目的只是为了满足性好奇,增加对异性的了解。由于性的进一步发育和成熟,青年对异性的好奇逐渐变成一种需求,进而对特定的异性产生爱慕之情。恋爱中的青年,大部分已摆脱了青春期的性交往的冲动与冒失,将感情专注到某一特定的异性对象。他们往往将恋爱视作结婚的前奏和必由之路。

从两性交往的进程角度恋爱可分为初恋和热恋。

初恋有两种提法,一种是指恋爱之初这个阶段;更常见的提法是指第1次对异性产生爱慕之情,并得到对方回应的行为。对任何人而言,初恋都是人生极其珍贵的一页,成功或失败都对个人的心理有较为深刻的影响。

初恋一般具有下列几种特征:

(1) 纯真:初涉爱河的人容易把爱恋的对象理想化。爱恋的欢愉把周围的一切事物都美化了,人们很少去考虑金钱、地位等感情之外的其他因素。

(2) 新奇:初恋者内心往往长时间为这种体验所兴奋和激动,充满了好奇、幻想和喜悦。

(3) 含蓄:初恋者往往不善于或是羞于表达自己的情感。他们往往用展示自己的特长、品德,强调自己对对象的关怀来表达感情。在公开场合,他们很少表现出过分的亲昵行为,而是用表情、言语的理解,心领神会地交流感情。但是,由于经验缺乏、社会成熟不够,初恋也容易受到挫折,使人消沉、失望、陷入极度的痛苦。

人们在恋爱对象的选择上具有某种固定的模式,它们以心目中的意中人来衡量对方,如衡量对方是否有魅力,是否善良,是否有才华。但男女双方选择恋爱对象的模式是有差异的。男方主要看中女方性情柔和、感情细腻、形象娇美,举止得体;女方主要看中男方充满生活热情、心地善良、宽容风趣,对形态也有一定的要求。相对而言,女方的择偶标准高于男方,尤其在事业成功方面要求较高,男方一般不

太强调女方的学识和心理成熟水平,有“郎才女貌”的现象。如果男女双方的择偶标准非常吻合,就可能“一见钟情”。

热恋是爱情日益成熟的标志。经过男女双方初恋的相互了解和考察,他的思想渐渐合拍,感情高度相融,双方的交流自然而通畅,关系也得到周围人或家庭的默许。热恋之中的男女更多地向对方袒露自己的情感,有利于双方的相互理解和信任,但一些个性弱点也会表现出来,一些客观的困难也对双方感情的发展产生困扰。

2. 爱情

对正处于热恋之中的人来说,浪漫的爱情是自然而然地产生的,但是热情纯粹是文化的产物,是生命本能审美的升华。在现代社会,爱情是建立在男女平等关系的基础上,亲密、理解、伴侣、支持、分享是爱情的要素。爱情是意志行为,是自我独立、自我完善的意志抉择;爱情是维持配偶长期稳定关系的基础。

婚姻的建立如果以爱情为前提只是有了一个美好的开始。爱情建立在男女双方亲密、理解、支持、平等之上,而不是建立在物质生活和处理日常事务之上。在漫长的婚姻生活中,男女双方生活是否能和谐,和爱情是两回事。爱情中的男女由于只注意到笼罩对方的理想光环,而忽视了现实生活中的困难。所以,爱情,尤其是由一见钟情所产生的爱情,往往导致错误的判断。

3. 两性适应与两性交流

男女双方的心理差异是很明显的,这些差异表现在生理特征、性格特征、社会行为特征上。差异的出现以生理特征为自然前提,但主要是社会化的结果,是通过社会化产生社会认知、自我意识,形成性别角色观念的结果。影响性别差异的先天因素通常在个体发展过程中轻易地被人为的后天社会因素所取代。社会因素对个体的影响具有很大的不确定性,由此造成了个体性心理的巨大差异。这些差异主要反映在:

(1) 对两性关系理解的差异。两性关系是美好的,还是丑恶的,不同的人所持的观点也有不同;

(2) 性别偏见。如对异性认知、态度和情绪的偏见;

(3) 两性交往价值观的差异。不同的个体对恋爱、婚姻、子女、家庭的观念都存在区别;

(4) 两性交流中的行为习惯差异,这不仅包括日常生活的习惯,也包括性行为习惯。

两性的心理有明显的差异,两性交往中的心理适应和情感 and 思想交流的重要性也越来越为人们所重视。

两性交流的第一步是恋人们应以诚相待。真诚是两性交往和交流的基点,虚伪的态度只能蒙蔽一时。诚实并非是指初恋时就向对方讲明一切,而是指对待对方的态度及处理问题的态度要坦诚。男女双方真诚相待,就能建立一种信任的关系,也便于了解对方的长处和不足,而更重要的是能促进双方的关系自然而然地向前发展。虚假和虚荣是情感交流的壁垒。在以诚相待的同时,恋人们需走出的第2步是

宽容对方,不要对对方的过去斤斤计较。金无足赤,人无完人。由于受的教育不同,生活习惯不同,异性交往中会出现种种意料不到的矛盾,这些矛盾极易造成情感裂痕。如果恋人们持有宽容的态度,对出现种种意料不到的情况有了心理上的准备,就能体谅对方的某些过失,容忍对方的某些缺点。但是宽容并不是迁就对方,不应以过度压抑自己的情感来求得暂时的和谐。宽容也不是回避矛盾,即是在双方情感交融的情形下,创造一个共同面对问题、分析问题和处理问题的氛围。两性的适应应迈出的第3步是加强思想交流和言语沟通。恋人们思想交流和言语沟通是相互关心、相互支持的重要性。其重要程度往往超过了生活上的关心和关怀。语言交流包括言语的交流,也包括体态语言的交流。恋人们讲点情话,相互拥抱、爱抚;亲吻,甚至只是关注对方,都不仅可以表达自己的炽热情感,而且让双方都深深沉浸在由此而产生的欢愉之中,在精神上和情感上得到满足。

相互协调,相互适应是恋人们达到心理相容的重要条件。这种恋人间相互协调和适应首先表现对自己性格和生活习惯的调整,以利于相容。调整包含有借恋人的相容改正一些缺点和坏习惯的意思,且求得恋人们性格上的互补。其次,相互协调还表现在培养和加强双方的共同兴趣。性格特征和生活习惯的调整只为心理相容提供了可能性,心理相容往往是在培养和加强共同兴趣,培养共同情感的过程中达到的。

两性适应和两性交流有利于解决恋爱中的自尊与自责这对矛盾。爱情已使恋爱双方进入了对方的情感世界,也极易给对方的人格带来伤害。这种伤害最为突出的是对自尊的伤害。如,无意或有意地在人前抬高自己、贬低对方,或为了保全面子不顾方式、场合地斥责对方,或过分干涉对方的生活,限制对方的业余爱好。两性适应和两性交流还要强调心理上平等,不将自己的意志强加给对方,还得克服自己的性别偏见,多考虑付出,减少对对方的占有感和依赖感。

4. 婚姻与家庭

对现代人而言,婚姻是两个独立自由人的结合。结婚后爱情将会出现新的变化,变炽热为冷静,变浪漫为实际,由剧烈波动变为相对平稳。

相对于恋爱而言,人们缔结婚姻的动机是复杂的,爱情是主要的动机之一,但有些人并不是最主要的动机。结婚的动机主要有五种:

- (1) 性爱动机:被异性的性魅力所强烈吸引;
- (2) 爱情动机:男女双方出于相互之间真挚、纯洁的互爱感情而结婚;
- (3) 财物动机:为了追求婚后舒适优裕的物质生活,看中了对方的财产;
- (4) 地位和荣誉动机:出于被异性的文化教养、工作和地位、家庭背景等因素的吸引而结婚;

(5) 被迫动机:受命于父母或他人的干涉或威逼,被迫地与对方结婚。健康的婚姻是建立在真正的爱情动机基础上的。现代社会婚后生活的幸福与痛苦,与婚姻动机是密切联系的。在婚姻生活中,各种动机是交织在一起的,它们共同起作用。健康的婚姻仅有爱情是不够的,在婚姻生活中爱情也不时面临着考验。

恋人关系只要得到恋爱双方的认同就可成立,而婚姻是一种由法律确定的关

系。它在给男女双方一定的权利和保护的同时,也赋予他们一定的责任和义务。婚姻将两个人的命运连在一起,同呼吸、共患难。因此,婚姻生活是理智的,夫妻双方必须对共同生活的各种关系进行重新认识。

婚姻面临的第1个问题是对性生活的态度和性行为适应。虽然婚姻保证了夫妻性行为的合法性,但是夫妻双方的性观念差异、性生理的差异、情感交流的不同步,以及性行为方式的差异,会给夫妻生活蒙上一层阴影。

婚姻面临的第2个问题是由恋人之间之爱向夫妻之间之爱转变。婚前婚后爱的心理动力会出现一些变化,如果人们对这种变化没有准备,认为浪漫的爱情能像婚前一样发展,往往会出现情感反复,甚至出现情感危机。

恋爱过程中,男方往往扮演主动的角色,承受着冲动和压力,也为了爱情发展付出更多的精力。女方所处的心理位置是被动的;但也由此决定了在恋爱过程中的某种优势,心理压力较小。结婚以后,正常的性满足使男方主动性和压力得到了缓解,而女方对爱和性的渴望使原先的心理优势逐渐丧失。这个变化对恋爱过程中固定下来的行为模式是强烈的冲击。夫妻双方对婚姻生活必须再适应,恋人之间之爱应向夫妻之间之爱转变。

婚姻面临的第3个问题是情感的再开拓。婚姻生活所赋予人们的责任使家庭琐事占去了许多生活空间和时间。如果夫妻双方在处理这些家庭琐事的时候,忽视了情感的交流,也会带来婚姻危机。夫妻的爱情生活需要新的内容,情感交流的停滞就是倒退。长期处于这种状态,夫妻关系就会出现潜在的危险。要消除这种危险,夫妻两方得面对生活问题,不能消极地回避或逃避。不要用感情来惩罚对方,这样做最后是惩罚自己。进一步保持志趣的一致性和心理相容性,进一步完善心理的互补是夫妻之间之爱向前发展的关键。婚外恋行为是对夫妻之间之爱缺乏信心的表现。

爱情具有指向性和排他性,所以往往与嫉妒和猜疑相伴而生。无端的猜疑和嫉妒往往是感情危机的原因。夫妻之间相互信赖、相互尊重,相互谅解和相互沟通才能使爱情天长日久。家庭的产生以婚姻为前提,经历了下述3个阶段。

第1阶段从结婚到第一个孩子出生夫妻适应家庭生活并为新成员的到来做准备。这个阶段需要适应和调节,问题比较多。夫妻双方应该了解,合法性行为的作用主要是增加双方的和谐而不是为了生育,必须为婚后行为调节留出必要的时间,为孩子的出生做好物质和心理上的准备。

第2个阶段是从子女出生到长大离家这个阶段。在当代,科技的发展使生育能得到有效的控制;人们更多是主动的而不是被动的承担为人父母的责任与义务。生儿育女主要是为了满足自身的情感需要。但是,孩子的出生必然会给婚姻和家庭带来紧张和压力。经济负担的加重和家务劳动的增加导致心理的紧张和夫妻情感交流的缺乏。孩子的出现使情感交流有了新的方向,容易忽视原有的夫妻交流,使已有的行为模式受到挑战。孩子的出生也为夫妻情感交流注入了新内容,为两方共同志趣提供了新的生长点,有利于深化夫妻关系。在第2阶段,如第1阶段遗留的问题没有得到解决,那么出现冲突的危害性更大;如果夫妇关系在第2阶段得到深化那么往往能够维系终身。

第3阶段是从子女成家立业到家庭的解体,这个阶段一般是从50岁左右开始到一个伴侣去世为止。子女成家立业之后,家庭的压力减轻了许多,但夫妻双方多年为维系家庭生活的内容也减少了许多,产生了心理上的“空落”感。同时,进入更年期、老年期功能上的变化也为夫妻生活带来了新的课题。在这一时期,人们的精力不如从前,性冲动的强度也不如从前,但夫妻双方的依恋在生活中的作用却更加明显。长期的婚姻生活有欢笑也有苦涩,有冲突也有解决矛盾后的轻松,共同的生活已使夫妻在情感上和人格上形成了一个共生体,短暂的分离就可能会引起不适、焦虑,甚至导致身心疾病。因此,老年人对丧偶的适应是比较困难的。丧偶带来的情感缺乏、孤独和心理上的动荡不安,是损害老年人身心健康的重要因素。

三、性心理的调整与治疗

在我国,长期存在重文化教育不重视性教育,重视文化知识传递而忽视性知识传递,重人的一般心理和行为发展而回避性心理和性行为发展的研究。长期以来,对性一直披着一层神秘色彩。然而,性是回避不了的。作为个人人格和社会人格的一个重要方面,性一直影响着人的生活,影响着文化与艺术的发展,影响着文明的传递。只有正视和研究它,才能使性对文明的正面效应得到充分的体现,才能解决由它引起的社会问题和心理问题。

性误区的出现有几个来源,一是人们接受的性知识不科学、不系统;二是人们对性的偏见;三是人们对性的恐惧;四是对性行为的功能不甚了解。常见的性适应误区有恋爱过程中的误区和性行为中的误区。恋爱过程中的误区主要有男女交往恐惧、独身、恋爱癖、单相思等。性行为的误区主要有性与爱的分离、性交过程中的心理障碍。

1. 男女交往恐惧

在我国,完成基础教育前男女的交往是不受鼓励的,进入社会以后,男女交往中的心理压力剧增,会引发男女交往恐惧的现象。产生这种现象的原因有许多,个人经验中最早的影响因素是爱的缺失。清教徒式家庭里的孩子、失败婚姻家庭中的孩子,由于得不到充分的爱,他们在最初的男女交往中往往茫然无措,对异性交往有一种悲剧性的预期。受到家长溺爱的孩子也容易产生男女交往恐惧,是因为他们只习惯于接受他人的爱,而不考虑给人爱的责任心,不懂得爱的交换价值。男女交往恐惧往往造成个体人格的自我封闭和内心的极度焦虑,他们渴望爱却又不知如何得到爱。

2. 独身

有些人不愿意恋爱、不愿意组成家庭。社会习俗常视这些独身者为怪人。通过对独身者的行为分析可以发现,这些人并非天生无情,而往往是因为太多情反受其累。他们中有一些是爱情悲剧的剧中人;另一些人对爱过于理想化,在等待不可能出现的意中人;还有一些人是将情感投置于某种信仰而独善其身。如果独身者能始终保持自我统一感,那么独身也是一种生活方式,无可厚非。但是如果因此而成为

个性怪癖、不适应社会就需要加以纠正。独身者希望改变自己,首先要做到的是开放自我。不论独身者用多少理由来解释自己的行为,但回避爱情即意味着软弱和胆怯。开放自我就是全身心地体验生活、感受生活,消除与他人尤其是与异性交往的不适应感。其次是纠正原有的偏执观念。如“平庸的爱情是毫无价值的”,“如与他结合(假想中的情侣),我就是最幸福的人,否则毫无幸福可言”。找出思维中的非理性特征,逐步加以改变,并调整自我的位置。独身带来的种种苦恼是可以得到解决的。

3. 恋爱癖

有恋爱癖的人不断地恋爱,不断地更换恋爱的对象,但对婚姻有着莫名的恐惧。恋爱癖是一种性心理变态,是强迫型的心理障碍,或是自恋型人格障碍、戏剧性人格障碍的表现。通过精神分析可以知道,恋爱癖的强迫行为是对性交往失败恐惧的一种补偿,他们往往有很强的自我中心意识和表现欲望,尽力表现自己的优越感来掩盖自卑,却又害怕承担责任。恋爱癖产生的心理症结是对真诚、纯洁的爱的恐惧,认为自己不配或不敢去追求理想、深刻的爱。如果他们将这个深蕴的心理症结挖掘出来加以重构,这种不正常的恋爱行为就得到改进。

4. 单相思

对异性对象的单相思是正常性思慕的表现,但沉浸在这种状态中不能自拔就是一种性心理失调。单相思是痛苦的,爱情得不到表白,得不到回报,单靠想象来维持对异性的爱恋。单相思是非理性化的,其苦恼来自行为的怯懦和不切实际的幻想。

精神分析理论认为,单相思是爱欲集中于某个人的结果。这种爱欲的淤积导致了心理的失衡。将淤积的爱欲分流、外化,是单相思者走向正确道路的开始。如找个值得信任的人倾吐自己想法,一方面缓解自己的焦虑,另一方面劝导、安慰和寻找新的解决方式都有利于爱欲的释放和分流。多参加活动,培养新的兴趣和爱好,重建自信与自尊,克服怯懦,也是缓解单相思症状的积极方法。

5. 性与爱的分离

性行为不是简单的生理冲动,与人的心理活动密不可分的。夫妻间的性爱是灵与肉的统一。一对夫妻只有柏拉图式的心灵之爱,排斥性行为,婚姻生活不会美满。如果夫妻之间只有性行为,只追求性欲的满足,忽视心理的沟通和情感的交流,婚姻生活也不会美满;夫妻以爱主宰性,以性刺激爱。如果性行为与爱情分离开来;就会使婚姻生活进入误区。

如果夫妻有一方认为性行为是下流、淫秽的行为,表现自己的性欲望是件可耻的事,他们的婚姻生活就会出现性行为与爱情分离。他们中就会出现性冷淡、阳痿、早泄等症状,性接触匆匆忙忙,性欲和情感都得不到满足。

如果夫妻中有一方或双方认为性行为就是追求最大的性快感,那么他们的情感交流会遇到很大的障碍,性行为也不会和谐。持有这种想法的夫妻在性交采用什么姿势、持续多长时间、如何使对方达到性高潮等问题上花费过多的时间和精力,心理紧张和焦虑加重,缺乏自信、对自己的能力产生怀疑。他们可能因此追求性快感而达不到性快感,而且有的还得让对方认为自己产生了性快感。身心十分疲惫,

随之而来的就是性行为的不和谐,夫妻双方的怨恨和误会也会不断滋生。

美满的性生活是性与爱的和谐与统一。情感的交流应该先行,性的欢娱也是爱情生活的重要部分;追求性生活的和谐与满足,而不只是刻意达到性高潮;对对方的性要求、性差异要理解,寻求使双方获得满足的性技巧;要坦诚交流性体验,克服罪恶感。注意到了以上几个方面,婚姻中性生活就不会驶入误区,即使驶入误区的也能很快迷途知返。

6. 性交过程中的心理障碍

性行为习惯,尤其是性交习惯的获得与其他行为习惯的获得不同,它不仅缺乏准备和训练,而且得靠个体自己摸索。性交过程中的心理障碍主要有恐惧、焦虑、紧张和情感障碍。

性交过程中的恐惧一来自自己的罪恶感与羞耻感,这与教养有关,二来自对性交后果,如结婚、怀孕的恐惧,害怕承担责任。恐惧使性生活不和谐,就会缺乏激情与创造性,造成性冷淡、阳痿、早泄或不射精等性行为障碍。

焦虑和紧张也影响性行为的质量。与恐惧不同的是,焦虑和紧张往往找不出具体的原因。几乎所有的性功能障碍都与焦虑和紧张有关。

情感障碍是由性伴侣心理障碍引发的性行为障碍。如夫妻感情不和谐会导致性行为的不和谐。这种行为障碍可能是由以下几种情形引发的。

(1) 夫妻的其他矛盾反映到性行为上,性伴侣以性行为作为惩罚对方的手段。如,粗暴的性行为、拒绝性行为、敷衍的性行为等;

(2) 性伴侣将心理的障碍产生的原因归结为性行为不和谐,从而回避性行为。

(3) 以自我为中心,而不顾性伴侣是否性唤起。情感障碍往往造成性伴侣情感的封闭;有可能使双方的各种关系都濒临危险。

第三节 性社会学

一、性行为的功 能

1. 生殖

性行为最基本的功能是生儿育女,从而达到维持种族繁衍、保存和延续的目的。对许多低等动物而言,这是性行为惟一的功能。人类的性行为一方面保证了人类的生存与发展,另一方面无节制的性行为又导致了人口过度增长的危机。此外,性交还可能导致性传播疾病,特别是新近出现的艾滋病(AIDS)在全球范围内的散播与流行,致使人类不得不采取措施予以预防。计划生育与性病艾滋病的防治已成为对性行为之不良结果进行干预的两大领域,借此达到既控制人口数量,又提高人口素质的目标。

2. 满足性欲

性行为另一重要功能在于满足性生理和性心理的需要——这是本能的需要。正常状态的成人性欲总是保持在一定的水平上。人类的性欲受到性激素的调控,并

受个人生理状态及周围环境的影响。性欲是性行为发生的动力和基础。然而性欲的满足可不通过与异性的直接性行为而得以实现,某些人可以通过窥阴、露阴、甚至玩弄生殖器(即自慰)获得一定程度的性满足。性欲的满足也可不通过两性生殖器的直接交合得以实现,口-生殖器的接触在人类性行为中的表现也已经得到证实。也有不以满足性欲为目的性行为,即给异性或同性提供性交机会以此获得某种好处(金钱或物质等)的性行为——“卖淫”,包括妓女和男妓现象。许多学者,将手淫列为自我满足的一种安全性行为,即既能实现性欲满足,又能避免染上性病(特别是艾滋病)。

二、性行为与健康

1. 健康性行为

正常情况下,如果一个人身体健康,精神愉快,没有什么大的生理和心理上的忧虑,那么性的意识、欲望和冲动也会处于良好的状态。然而,并非每个身体健康的成人都能享有健康和谐的性生活。性与健康有着多方面的联系,因为性欲、性冲动受到各种不良健康状况的影响,这些状况包括忧虑、恐惧及各种心理创伤、疾病、以及各种慢性疾患。临床上常可见到性抑郁及性冷淡者,就是以健康不佳等为由逃避性生活的。这种状态成为习惯就会反过来影响性欲的唤醒和性冲动的激发。有时人由于工作负担重之故而压抑自己,从而导致夫妇中的另一方也成为无辜的受害者。此外对身体健康的过分要求,也有被当作逃避性生活的借口。

人类性欲望的强弱有很大的个体差异,不能盲目规定应有多少或只能有多少性行为,即性行为方式和频率均应因人而异,以自己力所能及为度。虽然没有证据表现性交会对身体方面产生直接益处,但夫妇之间享有和谐的性生活对个人、家庭和社会无疑是很有益处的。同样地,缺少性交不利于健康的说法也并非无懈可击,因为有的人偶尔性交一两次就会感到相当满足。因此,健康的性生活应是在各种健康状态下,心理上的满足和身体上的适应的同时体现。另一重要之点是性交双方还要考虑性行为的后果和社会责任。患了急性疾病的人可能不会考虑性生活的问题,如对于刚接受阴道手术、疝手术、子宫切除术或患有性病的人,医生会建议在一定时间内禁止性交。妇女产后一段时期及有流产史的妇女在妊娠初期不应性交。而许多残疾人和慢性病患者则可以过性生活。一般而言,心脏病和高血压等均会影响性生活,但也并非绝对,这要取决于个体总的健康状况,只要性生活的方式不超过身体的适应程度,就不会妨碍个人健康。

对大多已婚男女来说,要在较长的一段时期内完全禁止性生活是难以做到的,这样会引起他们心理紧张、内分泌失调及其他不适。如果身体不适,性行为不一定非要采用插入式的性交方式。如由于某种心理或健康的原因而不宜性交,相互之间的性行为可以是亲热、爱抚、拥抱,或者采用手淫、口淫等方式。事实上只有极少数的人需要完全禁止性生活。某些年轻人在做性游戏的过程中因为好奇而经常尝试一些冒险行为,但要注意:

(1) 口交时女方绝不要吹胀阴茎,以免伤害阴茎及导致尿道感染。

(2) 要把肛门插入或其他形式的肛门性行为与阴道性行为截然分开,以免导致难以医治的感染。因为直肠黏膜容易破损,肛交还会增加艾滋病病毒(HIV)感染的危险性。

(3) 不要服用任何所谓的能激发性欲的“春药”或食物,因为使用“春药”,不仅浪费钱财,而且会严重损坏身体。

(4) 男性绝对不要往女性阴道里吹气,以免空气灌入腹腔造成气栓,乃至意外死亡。

(5) 绝对不要把真空吸尘器放在阴茎上,也不要淋浴水龙头对着阴道强冲,因为任何东西由压力推入阴道都会伤害输卵管。

正常的性生活应是非常安全的、几乎没有什么人会因力所能及的性生活而致身体受损。

2. 安全的性行为

(1) 定义:安全的性(safer sex)主要包括预防性传播疾病(包括艾滋病)、避免意外怀孕、以及避免各种危险的性行为。

(2) 降低感染危险策略:

1) 禁欲:如果一个人不想有性关系,甚至连手淫也不要,这既没有错误也没有什么不正常。当一个人选择过独身生活时,不应被看成性关系问题上的失败者,或认为他(她)失去了性的需要,或不再具有吸引力。选择独身或禁欲可以有一段完全属于自己的时间。但对于某些人来说,禁欲的选择是基于对 AIDS 的恐惧,则完全是一种被迫的状态。当然,禁欲是避免感染 AIDS 和 STD 的一种方式。禁欲可不必担心怀孕及与避孕使用相关的对健康的危害,从某种角度看禁欲可以从感情上也可从机体上对一个人起些保护作用。

如果是因为惧怕染上 AIDS 而要禁欲,切记不要使人感到对性关系的需求有突然消失的感觉。禁欲是预防感染的一种选择,但对多数人来说是无法做到的,事实上也是不必要的。为了预防 HIV 感染,无须放弃各种形式的性行为,有许多可以享有安全性行为的方法。

2) 忠于单一的性伴侣:单一的性关系对某些人来说,意味着一生之中只有一个性伴侣;而对另一些人来说却意味着在相互保持性关系期间,互相忠贞。基于此,一个先后有过数次性关系的人也可认为自己是忠于单一性伴的。由于感染 HIV 到发展成 AIDS 有一个很长的潜伏期;处于这种关系的人仍会使自己处于感染的危险之中。如果一个人或其配偶已经被感染且又采用可导致病原体传播的性交方式,即使处于单一的性关系也免不了将 HIV 或 STD 传给对方。

一个人如果他(她)自己以及配偶自 20 世纪 70 年代以来就处于单一的性关系中,而且任何一方从未与他人共用静脉吸毒,也没有接受过输血,这样就绝无感染 HIV 的危险。如果任何一方曾经与某个第三者有过非安全的性行为(unsafe sex),或因其他原因经历过感染的危险,那么就有被感染的可能;因此,在情况不明之时,想当然地认为自己处于单一的性关系因而是“安全的”,有时候却是已处在危险之

中了。终身保持单一的性关系是绝对安全的,遗憾的是有些人却做不到。

3) 尽量减少性伴数:有人坚信,只有性乱交的人士才会得 AIDS 或其他 STD。尽管对性乱交(promiscuous sexuality)含义的理解相差甚大,但性伴愈多,感染 HIV 的机会也愈大是无疑的。但与不同性伴之间保持安全的性交也是可能的。感染危险的高低完全取决于男女双方采取何种性行为方式,以及性活动中是否采用防护措施。严格地讲,如果不行使安全的性行为,即便减少性伴数也不能显著地降低感染的危险性。只要其中一个性伴为病毒感染者,就会传给他人。

4) 慎选性伴:在 AIDS 流行年代,早期一直提倡的策略之一就是杜绝与 AIDS 高危人群诸如男性同性恋和双性恋者、滥用药物(吸毒)者、血友病人、以及卖淫嫖娼人员等发生性关系。然而今天对于高危人群的这种概念,有时反而会起误导作用,如认为不与他们认为的高危人群进行性交,就不会染上 HIV。这里要特别强调的是,降低感染危险性的惟一方法是遵循“安全的性行为”的原则。

5) 未充分了解对象之前,切勿性交:简单地追问性伴的性生活史并不足以保证不会感染 HIV。在实践中常常推崇信任性伴对你的诚实这种原则,但事实往往相反,性伴有时会觉得羞愧,有时感到尴尬,或者担心说了真话会影响到正常性关系、甚至丧失性交的机会。如果性伴认为只有说谎才能达到性交,或以性换取金钱,在这种情况下,就存在很高感染危险。

6) 坚持使用避孕套:安全性行为并非仅指避孕套的使用。但在性交(特别是插入式的性交)过程中,使用避孕套能使性交更加安全。然而阴道性交时使用避孕套也并非绝对安全,因为使用不当,不全程使用,或性交中滑脱等情形时有发生。特别要强调的是,避孕套确实能够降低 HIV 和大多数 STD 的传播危险,并在某种程度上对宫颈癌起预防作用。避孕套是为阴道性交而设计的,因此肛交时避孕套的保护作用会大打折扣。肛交中避孕套很容易因磨擦而破裂。

以上所列举的降低感染危险的方法和策略并非十全十美,某些策略对大多数人来说是难以做到的。有没有一些方法,既使人们处于安全境地,又享有性的乐趣呢?无保护的阴道性交,会使妇女处于非意愿怀孕的危险之中;无保护的阴道交或肛交会使得男女双方均处于感染 STD(包括 HIV)的危险之中。当今仍然存在性暴力事件,当妇女被迫发生性行为时,往往存在极大感染的危险性。

即使一个人完全停止了性交,也可采用其他一些刺激方式获得性的满足,如抚摸、爱抚、互相手淫等这些均是安全的性行为。人们学会了这些安全的做爱方法,可减轻插入式性交所造成的怀孕及染病的精神负担。因为如果认为妇女对性总是充满渴望,或只要有性交机会就会沉湎忘怀,那就大错特错了。有很多妇女在性活动中即使没有阴茎的插入也会感到十分愉悦,甚至比直接的性交还要欢欣。这不应被看做心态或行为的反常。同样,男人们有时候也更喜欢身体的摩擦、爱抚、按摩,勿须性交也能达到性的满足;性交只是享受性生活的方式之一。人类除了阴茎和阴道等性器官之外,手指、嘴唇及身体的其他部位具有不同程度的性敏感性。

坚持安全的性行为,既可获得性满足,又可避免怀孕、预防 HIV 及其他 STD 的感染。男女双方在享受满意的性生活的同时,要对行为之后果负责,即对个人、家

庭乃至社会都负有责任。安全的性还意味着,人们在稳定的性关系中能够自信地表达自己的性欲望和性冲动,同时在自己不想性交的时候,可以自信地说“不”。如果你能对你配偶这么说,那就实现了安全性行为的重要方面。在现实生活中,妇女在性活动中往往处于被动或从属的地位,要使她们平等地讨论性关系,坦然地表达性需要,以及主动避免妊娠及 STD 感染危险等诸方面,尚有社会、文化、生理和心理等方面的诸多障碍;

(3) “安全的性”的指导原则:“安全的性”的指导原则(guidelines for safer sex)需要强调的是:安全的性准则,仅仅是相对比较安全的(safer),而非绝对安全的(completely safe)。除了绝对禁欲,人们无法百分之百地避免通过性途径而传播疾病。但如果坚持遵守这些原则,毫无疑问地会大大降低感染的危险性。世界卫生组织(WHO)及其他国际组织推出的安全的性行为准则包括:

1) 禁欲是惟一绝对安全的。

2) 忠于单一的性伴侣(配偶):如果保持专一的一夫一妻制的性关系,感染 STD 的可能性相对就少多了。如果配偶双方,只对其中一方有性关系,而且双方均无 STD/AIDS,那么,选择任何方式的性生活均是安全的。

3) 控制性伴侣的人数:在人一生的生活历程中,性伴侣越少,感染 STD/AIDS 的危险性也就越低;

4) 避免危险性行为:除非你能完全确定你的伴侣未曾染上任何一种性传播疾病,否则最好避免危险的性行为。最危险的性行为莫过于没有保护的肛交及阴道性交。如果此时性交是不可避免的,则要使用男性避孕套及杀精子剂。如果可能,也可使用女性避孕套(阴道套)。

倘若对性伴侣的健康状况不明(即不能确定是否感染 STDs),最好不要行口交(口对性器官的性行为),或拳指性交,以及用口舌舔或伸入对方的肛门,任何会接触到性伴侣血液、精液、阴道分泌物、尿、粪及唾液的行为都属高危的。AIDS 病毒及其他 STD 的病原均能穿过口腔黏膜、阴道与肛门直肠黏膜以及皮肤上微小的伤口或磨损裂痕。

5) 充分了解性伴侣情况:对性伴侣的其他性伴知道得愈多愈好,切记,不可相信一面之词;多项研究显示,人们在回答自己有多少性伴侣时通常会撒谎,而且往往是尽量低报数字。一项调查指出,47%的男性和 42%的女性说出的性伴侣数比实际拥有数要少得多。研究人员还发现,人们在回答同性恋、嫖妓,或使用非法药物等方面也特别容易说谎。

6) 别人一般不会告诉你他们真正的性行为:美国一项对一般人群的研究显示,1/3 的男性在青春期以后,至少有一次与其他男性发生性行为的经验。三项关于男性同性恋的报告指出,62%~79%的男性同性恋者也与异性发生性行为。另有四项研究报道 15%~26%的男性同性恋与女性结婚。美国金赛研究所最近的一篇报告说,74%的同性恋女性,在 8 岁以后至少有一次与异性发生性行为的经验。国内一些研究也显示性行为的巨大转变,高危性行为有上升趋势。一项针对大学生的调查发现,15%~20%的大学生在其 21 岁生日之前有过至少 1 次异性性交,在有

婚前性行为的女生中,50%怀孕1次。国内个别沿海城市的研究报告指出,大学生中婚前性交的发生率增长十分快,有的高达50%以上。新近一项对性病病人的深入访谈研究显示,性病病人中80%拥有2个以上的性伙伴。然而,无论在大学生中,还是性病病人中,避孕套的使用率已低到令人吃惊的程度。

7) 一般性的相互爱抚行为及肌肤接触(不包括阴道、肛门或口腔直接接触精液或阴道分泌物与黏膜或皮肤破损处接触),都属较为安全的性行为。

8) 精液或阴道分泌物仅接触到健康且无破损的皮肤,互相爱抚及自慰,也属既兴奋又较安全的行为。艾滋病病毒及大部分STD病原体都是在显微镜下才能得到,它们若要进入人体,并不需要一个大到肉眼看得到的裂缝。

9) 配偶双方一起沐浴、洗澡是颇具乐趣而且较为安全的行为。只要精液或阴道分泌物不触到有破损的皮肤,均是安全的性行为。

10) 亲密的聊天及分享性幻想,既有趣又安全。相互爱抚、拥抱及按摩也是有趣且较安全的性行为,只要双方没有皮肤、口腔或嘴唇的创伤或裂痕,便可愉快地进行。

三、青少年的性行为

男女的性成熟是从青春初期开始的。性成熟的机制尚有不少争论,但其初始时间和进展过程受遗传及营养和环境等因素的影响。个人的身体状况和情感环境也会对性成熟造成影响。在性成熟前1~2年内,机体的内分泌出现变化,这种变化直接影响着男女青少年的行为。有充分的证据表明,男女的性成熟期在时间上有差别,女孩子发育的时间比男孩子约早2岁,而且发育的速度也较快。青春初期女孩在11~13岁,男孩在12~14岁,被认为是少年男女理解自身变化和萌发性行为的阶段,也是从童年期逐渐过渡到成年期的始点。青春中后期女孩子在17~18岁开始,到20~21岁结束,男孩子在18~20岁开始,一般到23~25岁左右结束。此时男女的性的发育已趋完成,虽然性的表现形式通常仍是手淫,但已进入到异性恋的阶段。

年轻男女在发展异性关系的阶段,很大程度上取决于个人的性体验及建立关系的特殊目的。在这个阶段的异性关系,很可能完全是柏拉图式的精神恋爱或友谊关系。青少年的各种异性关系,最终或多或少要出现某种形式的性行为,哪怕仅仅是接吻。这个年龄段的年轻男女性冲动非常强烈,但双方都在性压抑、性恐惧感的自我意识中试图相互了解。

常见的青少年性行为方式:

1. 手淫

人们对手淫问题的争论由来已久,有人认为手淫是一种“正常”的行为,也有人认为是一种“异常”的行为。即使在当今社会的各种文化中,手淫也被大多看做是罪恶的、耻辱的、有害的行为。已有充分的证据表明,青少年最初的性体验往往来自于自身的自慰行为——手淫,手淫被认为是性行为的初始方式。手淫的合理之处至少

在于:手淫把性冲动集中在生殖器上,这对于性冲动异常强烈的青少年来说,它能使性冲动得以顺利地宣泄,而不必利用别人(这对未婚青少年来说,显得更为重要)。手淫还是青少年自我发现和逐渐了解自己的身体和情感的一种方式。因此,只要不过于频繁,手淫是有利于青少年个体身心健康发展的。

2. 约会

青少年在发展异性关系的过程中,约会是必不可少的。它使男女双方实现相互了解,乃至最终发展成婚姻伴侣关系。许多研究表明,到了十七八岁,绝大多数的青少年都已经开始约会,女孩子约会的年龄比男孩子来得早。不过此时的男女关系,更多地属于异性间的友谊,而非谈恋爱。

3. 接吻

大多数青少年最初的异性间的性体验是接吻;Schofield 对接吻下了如下定义:一种至少带有轻微性兴奋成分的两性共同完成的行为。单用嘴唇匆匆在异性的脸颊上啄一下是不算接吻的。深吻(舌对舌的吻)更充满性的含义。许多青少年已开始约会,但并非都能体验到这种接吻。

4. 爱抚

任何形式的没有性交的性接触都叫做爱抚。青春后期的男女对自己的性别有了明确的认识,因而对异性产生了感情吸引或性吸引。男女开始相互约会,产生接触异性躯体的冲动,从接吻、拥抱、相互抚摸中分享性的体验并从中获得快感。青年男女坠入爱河,尽情接吻时;男孩往往会主动抚摸女孩的身体,女孩子则通常要控制这种行为。但到了一定的程度女孩将允许男方隔着衣物的抚摸,但她喜欢的仅是温柔的触碰和揉摸。相互之间性器官的接触,对年轻男女来说可能是非常愉快的,但必须考虑到性交所面临的全部危险(包括怀孕和染上性病)。

5. 婚前性关系

出于宗教、道德观念、文化传统等方面的原因,对婚前性交这种现象的“认同”与“反感”一直存在相当复杂的争论。然而,婚前性关系在世界各地均是一种比较普遍的现象,其发生的原因是复杂和多样性的。这里无意论证婚前性交的“对”与“错”。一些对当代大学生的研究显示,1~4 年级本科学生中,承认已有性交经验者占 15%~20%,个别研究报告比例高达 60%~70%。高年级的性经历发生率比低年级要高。在有婚前性交体验的青年女性中,50% 报告至少怀孕 1 次,且无一例外地以人工流产而终止。这对青少年的身心健康和事业发展构成了巨大的威胁,新近 1 次对性病病人的回顾调查报道,调查人群中近 90% 有过婚前性体验,其中 8.6% 的病人,首次性交就建立在金钱买卖关系上。他们报告的首次性交年龄的提前也反映了年轻时代开放的性观念,男性平均为 21.7 岁,女性为 21.2 岁。从医学意义上讲,婚前性行为的主要后果是青少年妊娠和感染性病,均会对青年男女的身心健康构成极大危害。因而需在青少年中开展适时、适宜、适度的性教育,帮助他们掌握正确的和足够的性知识,性病防治知识,树立正确的道德观和爱情观,促进性文明和性健康。可以开展必要的避孕知识教育,以减少婚前妊娠和婚前人工流产,确保青少年身心的健康发展。

第四节 人类的优生

优生一词是由英国科学家高尔顿于 1883 年首次提出的,其原意是“健康的遗传”,是指出生的孩子从父母那里获得了健康的遗传素质,从而在体力和智力等方面是优良的。

从根本上讲,人口素质关系到国家和民族的盛衰,人口素质由多种因素决定的,概括起来是两方面:一是先天素质;一是后天素质。前者是生的问题,后者是养和教的问题。前者是基础,后者是条件。因此,人口的出生质量在某种意义上讲对人口素质起决定性作用。

早期的优生运动主要是采取一些社会性措施,比如禁止患有某些严重遗传性疾病的人结婚,或强制性绝育,流产等。20 世纪 50 年代以后,由于细胞遗传学、细胞生物学、分子生物学、分子遗传学、人类遗传学、医学遗传学的迅速发展,以及与优生有关的其他新技术的出现和应用,于是在 20 世纪 90 年代形成了以“遗传咨询,产前诊断和选择性流产”相结合的优生措施,人们把这一新进展称为“新优生学”。新优生学的研究范围很广泛,但概括起来仍不外预防性优生学和促进性优生学两个方面。目前我国推行的优生政策,如开展产前诊断和优生咨询等都属于预防性优生学的范畴。

与人口素质相关的学科有很多,如人口学、遗传学、妇产科学、儿科学、妇幼保健、性科学、医药学、致畸学,等等。

一、遗传学

1. 遗传学与优生学的关系

这是与人口素质密切相关的一门学科,是优生优育学的科学理论基础。遗传学的研究成果直接影响着优生优育学的发展。

所谓遗传是指生物通过增殖以保证生命世代连续的一种现象,也就是亲代的各种身体素质在子代身上的遗留和保存。上一代不仅可以把健康的素质传给下一代,也可以将各种遗传性疾病传给下一代,这就是造成人口身体素质低的直接原因。防止和治疗遗传性疾病正是优生优育学的根本任务。

2. 遗传性疾病及其特点

有关遗传的基本规律等内容在遗传学中有充分的介绍,这里就不多说了,只提一下遗传病的一些问题。遗传性疾病是指由于遗传物质的改变(如基因突变和染色体畸变)而导致的疾病,并按一定方式在一个家系中垂直分布,具有先天性、终身性和家族性。

3. 遗传病与优生的关系

遗传病的种类很多,严重地威胁着人类的健康,是影响人口素质的重要因素。此外,某些遗传缺陷、某些体力与智力方面的问题,也与优生密切相关。如聋哑、智

力低下、精神病、先天畸形等均与遗传有关。近年来对肿瘤的流行病学等方面的研究表明,肿瘤的发病情况与遗传有密切的关系。

4. 遗传病的防治原则

由于遗传病与人口素质有密切关系,对遗传病的防治就十分重要。

贯彻预防为主方针,避免生出遗传缺陷的患儿以降低遗传病的发病率是一种最可靠而切实可行的办法。这些办法包括:避免近亲结婚,检出携带者,防止症状发生,对孕妇进行产前检查诊断等。治疗方面采取饮食控制疗法、药物疗法、酶的补给、替代,近年来基因工程治疗的探索和研究正在进行,其前景令人鼓舞。

二、畸形学

畸形学(teratology)是研究胚胎在结构和功能上产生缺陷的临床表现,发病原因,致病机制以及预防的科学。

1. 人类先天畸形的病因

人类先天畸形的病因可以概括为遗传病因和非遗传病因两大类。迄今为止对人类先天畸形病因的研究表明,环境因素引起的先天畸形约占 10%;遗传因素引起的约占 20%;绝大多数的先天畸形(70%)的病因至今尚难确定,可能为综合因素所致。

(1) 遗传因素:包括染色体的畸变和基因突变致畸两类。

(2) 环境因素:包括生物因素、物理化学因素等。

2. 胚胎发育的敏感期

生物、物理化学或机械性致畸因素对胚胎的致畸作用,取决于胚胎发育的时期。受精后的第 1~2 周,胚卵主要是进行分裂增殖,致畸因素作用后出现两种状况:或只是杀伤少量的细胞,而其他细胞照常分裂增生,代偿能力强,使整个胚卵继续发育;或整个胚卵死亡而夭折。第 3~5 周是胚胎发育的强分化期,在此期间细胞进行分化,形成各器官系统,因此对致畸因素最敏感,称为敏感期。

3. 先天缺陷

(1) 先天缺陷的含义:先天畸形包括外表的和内脏的畸形。除那些形态结构方面的异常外,人们还发现有的新生儿表现出功能障碍、代谢异常或痴呆。目前人们用“先天缺陷”(congenital defects)作为先天性结构畸形、功能缺陷以及先天性代谢障碍的总称。可见先天缺陷所含范围更加广泛。

(2) 先天缺陷的种类:可有不同的分类方法。

1) 按缺陷的性质分:

a. 结构畸形:如唇裂等。

b. 功能低下:如先天愚型。

c. 代谢障碍:如苯丙酮尿症。

2) 按影响大小分:

a. 重要畸形:指那些致残,并可致死且确实严重影响患者的生活和工作的畸

形。如先天性心脏病、脊柱裂等。

b. 次要(或小)畸形:指相对影响较小的畸形。如大舌等。

(3) 先天缺陷的预防:主要要对先天缺陷的病因有所了解,利用已有的科学知识,积极主动地进行预防。

- 1) 一级预防:加强优生的宣传教育,重视妇女保健等。
- 2) 产前诊断及选择性终止妊娠。
- 3) 新生儿筛检。
- 4) 认真开展优生的科学研究和培训工作。

三、环境学

人类赖以生存的外界环境中存在着各种物质,外界环境中的物质往往具有各种复杂的构成而形成不同的环境状态,并对人的健康产生一定的影响。

对一个生活在母体内的胚体(即胚胎和胎儿)来说,外环境主要是指宫内环境而言。宫内环境对胚胎或胎儿的发育有直接影响,从优生学的角度考虑应该予以注意。影响胎体宫内发育的环境因素包括外源性环境因素、母体因素和胎盘因素。

1. 环境因素与先天缺陷

在前面我们曾提到过,先天缺陷的病因之一就是环境因素的作用。母体于妊娠期间接触高量的放射线、感染风疹病毒、接触有致畸作用的化学物质,都可导致胚胎发育异常。

近年来,父亲受物理、化学因素影响而导致子代先天缺陷的发生已有多篇报道,这可能与接触的环境因素对生殖细胞具有致突变作用有关。

2. 环境因素对胚胎和胎儿发育的影响

(1) 妊娠前阶段(配子发生至受精):当环境因素具有亲性腺作用时,可影响精子的生成或卵子的发育,或使生殖细胞发生基因突变或染色体畸变,结果可导致不孕。或因受精卵发育异常而影响着床。如胚泡已着床,则可影响胚胎发育。或引起胚胎死亡而流产,或生出有先天缺陷的婴儿。

(2) 妊娠后阶段:在妊娠后的不同阶段,外界环境中的有害因素所致的影响有所不同。如胚期对致畸的因素的感受性最强,易受有致畸作用的环境因素的影响,易发生先天缺陷。而胎儿期,因器官分化已基本完成,所以随着妊娠月数的增加,对致畸的敏感性逐渐下降,但此时期生殖器官的分化尚未完成,中枢神经系统仍在继续分化,所以仍有可能出现形态上的异常。

3. 环境质量与优生

人类生存地区的环境可分为原生环境和次生环境。原生环境就是指自然形成的环境条件,它主要取决于地质条件,如有的地区因地质性原因缺碘,则水和农作物也缺碘,就会影响长期居住在这一地区的居民的健康。次生环境则是指人为的原因导致生存条件的改变,如随着工业的发展,能量的利用,生活和生产中的废弃物大量投入环境,人为地造成环境污染,直接或间接地危害着人们的健康。最为典型

的例子有:

(1) 地方性克汀病:由于孕期母体缺碘,以至胎儿甲状腺发育不全,出现甲状腺功能减退,影响大脑的发育,出现呆小症。

(2) 水体甲基汞污染致先天性水俣病:这是 1953 年开始,日本九州水俣湾一家氮肥公司将含甲基汞的废水排放到水中,从而导致附近居民中毒。先天性水俣病是由于母体于孕期摄入了甲基汞,通过胎盘进入胎体而引起的先天性甲基汞中毒。主要临床表现为中枢神经系统障碍。

以上两个例子分别是原生环境及次生环境质量差导致的先天缺陷。从而影响人口质量。由此可见,人类的优生与其所处的环境有很密切的关系。应注意改善和保护我们的生活环境。

4. 职业因素与优生

由于从事的工农业生产劳动,职业分工的不同,在各职业中所接触的各种因素对劳动者的健康和机能状态也有影响。有些因素则可直接影响到人的生育能力以及下一代的素质。如,铅对男性生殖功能具有影响,可致精子数目减少,精子畸变;汞可经胎盘进入胎儿血循环,其中以甲基汞毒性最大并有致畸作用。

我国的现行人口政策的核心是控制人口数量,提高人口素质。职业优生的关键问题在于防止职业危害对胚胎及胎儿发育的不利影响。

(史小林 诸定寿)

第十二章

细胞凋亡与生殖

细胞凋亡(apoptosis)或程序化细胞死亡(programmed cell death,PCD),是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡过程。目前,细胞自发退化死亡现象有种种命名。较为常用的是程序化细胞死亡(PCD),最初用于胚胎发育方面。胚胎分化过程中特定部位的细胞自发退化死亡是由于该部位的细胞内基因按一定程序表达的结果,又称基因指令性细胞死亡(gene directed cell death)、生理性细胞死亡(physiological cell death)、自然发生细胞死亡(naturally occurring cell death)、细胞舍生(cell suicide)、凋亡或细胞凋亡(apoptosis)等。“凋亡”一词来自希腊语 apo,意为“分离”,ptosis 指花瓣或树叶的脱落,这两个词组合而成,意指细胞凋亡的形态类似花瓣或树叶的凋落。

近年来,由于实验模型和检测方法的完善,细胞凋亡的研究突飞猛进,获得了重大突破,并受到生物学、医学各个领域的普遍关注,进入 20 世纪 90 年代后,已成为细胞生物学、免疫学、肿瘤学等学科的研究热点之一。细胞凋亡参与机体许多病理生理过程,如胸腺选择、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、巨噬细胞和 T 淋巴细胞介导的细胞毒性作用、自身免疫性疾病、缺血再灌注损伤及衰老过程等。

第一节 研究简史

一、一般历史过程

早在半个世纪前,人们就观察到在人体的发生、生长、发育以及衰老过程中,一直伴随着组织细胞的生理性自发退化死亡现象,并发现这种细胞死亡受其内部某些特定基因操纵,但作为一个形态学过程,生理性自发退化死亡现象也见于程序死亡之外的病理状态中。1965 年,发育生物学家 Lockshin 和 Williams 首先提出了 PCD 一词,用于描述蛾的发育过程,认为随着成年蛾的出现,其幼虫死亡是

一种发育调节性死亡(development-regulated death)。至1972年,Kerr等首次提出了细胞凋亡的概念,从形态学角度描述细胞的生理死亡,并认为这是维持组织细胞动力学平衡的一种基本生物学现象,可能具有十分重要的生物学意义。1977年,人们注意到在生理或病理性刺激条件下,淋巴细胞发育过程中的凋亡现象。1980年,Wyllie研究胸腺细胞在糖皮质激素作用下引致的细胞凋亡变化,总结并建立了细胞凋亡的共同形态学特征,包括核固缩和DNA降解成寡核苷酸片段等;其后的研究进一步发现并证实细胞凋亡与其DNA被内切核酸酶裂解成许多仅有180碱基对的小片段有关。自此,细胞凋亡的研究成为生物医学的研究热点之一,随着细胞生物学、遗传学、分子生物学等发展,对细胞凋亡的本质有逐步深入的揭示。

20世纪80年代中期至今,利用反向生物学,在分子生物学水平上开始研究PCD的启动和发展机制,并发现了一些与PCD发生相关的基因及信号传递物质。1991年,Ellis首先发现了线虫体内Ced-3、4两个基因与PCD的发生密切相关,随后逐渐发现了多种参与PCD的正相调节基因和负相调节基因,前者包括Ced-2、p53、c-myc、Fas、糖皮质激素受体及白细胞介素1 β 转化(ICE)等基因,后者则有Ced-9、bcl-2、p53等基因;科学家在研究PCD发生过程中基因表达变化的同时,亦注意到信号传递物质对PCD的调控作用。1989年,Owen及其研究小组在研究胸腺细胞阴性选择过程中,发现T细胞受体(TCR)与自身抗原相互作用与未成熟T细胞的PCD发生有关,并在体外证实刺激CD3分子可诱导未成熟T细胞PCD的发生。这是由于CD3与分子TCR信号传递有关。另外,PKA信号传递途径参与PCD的正相调节;而PKC信号传递途径则参与PCD的负相调节。

二、细胞凋亡的生物学意义

随着对细胞凋亡研究的深入开展,大量的实验资料表明:PCD是维持人体正常生理过程和功能活动所必须的,因而具有重大的生物学意义,主要表现在以下几方面:

(1) PCD在生物界普遍存在。

(2) PCD是多细胞生物生命活动过程中不可缺少的组成内容,是其借以存活的需要,因而贯穿于全部寿命周期中,无论是低等还是高等动物都是如此。

(3) PCD是生物在进化过程中形成的细胞死亡方式。PCD的作用主要包括以下几个方面:

- 1) 清除没有用的细胞,这种细胞大多在发育早期阶段死亡。
- 2) 清除多余细胞,因在发育过程中某些细胞产生过多。
- 3) 清除发育不正常的细胞。
- 4) 清除已完成任务的细胞。
- 5) 清除有害的细胞。

第二节 细胞凋亡的应用远景

一、细胞凋亡与机体稳态

细胞是组成机体的基本单位。在机体发育成熟的过程中,形成了一些在形态和功能上各不相同的细胞群,它们组成了不同的组织器官。各种组织器官的协调合作,完成生命的各种功能。新陈代谢是生命最基本的特征,即细胞凋亡与细胞产生一样都是机体自然的生理过程,组成机体的细胞不但需要不断地与环境进行物质、信息和能量的交换,而且这些细胞本身也处在不断的更新中。这种更新是以细胞数量上的恒定为前提的,因此是一种动态平衡状态。显然,各种细胞数量上稳定,不但保证了机体各组织器官具有形态学上的稳定性,同时也是机体生理功能或内环境稳定的必要条件。机体不同组织的细胞更新速度不同:血细胞是更新最快的细胞之一;此外,生殖细胞也是更新很快的细胞;而神经细胞的更新能力则极弱。大多数神经元终生存活,不进行更新。不同细胞的更新率不同是与其功能相适应的。为了有效地完成机体的免疫功能,淋巴细胞就必须不断更新。每种细胞的更新速度(也即其生命期)是机体在长期进化过程中获得的。没有这种细胞生理性死亡,细胞更新就不可能发生,因此,细胞产生与细胞凋亡之间的平衡是机体稳态的基本条件,它们的平衡一旦破坏,就会导致疾病的产生。

二、细胞凋亡与疾病

长期以来,生命科学研究的重点是细胞增殖(或产生),以及活细胞的功能及其调节。建立在现代生命科学基础上的医学,也主要通过认识活细胞的产生及存活状态,或其调节障碍来理解疾病的发生机制,设计疾病的预防和治疗的方法。例如,肿瘤一向被认为是一种细胞恶性增殖的疾病。肿瘤生物学研究了许多致使细胞癌变的因素,并从信号传导、基因突变及表达的调控等各方面研究了细胞癌变的机制,取得了很大的进展,这些研究的指向都是癌细胞无限增殖的机制,基于这些认识,在临床上长期以来也主要从杀死活跃增生的癌细胞的角度来治疗肿瘤的。

研究细胞死亡有很长的历史,但主要是研究致病因子引起的细胞“意外”死亡,即坏死。但在生命过程中,更经常进行着的是细胞生理死亡。20世纪80年代后期,免疫学的研究证明,在胸腺中细胞大量死亡是一种选择性地去除自身反应T细胞的过程,因此在自身耐受的形成和防止自身免疫疾病的发生上具有重要作用。组织形态学检查发现,这些自身反应T细胞排除的过程具有典型的细胞凋亡的特点。显然,如果这种凋亡过程受阻,自身反应T细胞的排除就不完全,其结果就是产生自身免疫病。因此细胞生理性死亡,即凋亡就被赋予了特别重要的意义。以前生命科学只重视了细胞如何“活”,而忽略了细胞如何自然地“死”,因而似乎丢失了生命的“另一半”的研究。因为生命本身就是生与死的对立统一。20世纪90年代以来,细

胞凋亡的研究被推到了生命科学的前沿,形成了一个涉及生物医学各个领域的研究高潮。其结果是对细胞凋亡的形态学、细胞内生化变化、调控凋亡的基因、引起细胞凋亡的各种因素及与一些疾病的关系等积累了大量的资料。

三、肿瘤细胞凋亡的研究

早在1967年,Iversen等就提出肿瘤不仅可看作是一种细胞生长较其来源组织生长更快的组织,也可看做是一种细胞死亡率大大减少的组织。1984年,Columbon的研究小组发现肝肿瘤组织中存在PCD的现象,其后人们开始深入研究多种癌基因与PCD发生的关系。近年肿瘤领域中PCD的研究主要集中在以下几个方面:

1. 肿瘤发生过程中凋亡的意义

肿瘤发生过程中的PCD、凋亡现象将有利于从细胞死亡角度考察肿瘤的形成。

2. PCD与细胞周期

细胞增殖与PCD的关系是凋亡细胞离开了正常有丝分裂轨道,走向死亡。对于PCD启动与细胞周期时相的关系尚有不同的观点,一些作者以为,PCD只发生于G₀/G₁期,而大部分作者认为PCD是多点启动的,可源于细胞周期的任何时相。

3. PCD与信号转导

信号转导通路的阐明将对肿瘤的防治产生巨大影响。

4. PCD与肿瘤生长

PCD与增殖是一对并存的矛盾,正常状况是二者维持动态平衡,癌前病变和肿瘤的增生与凋亡失调有关。

几年前人们在研究恶性肿瘤生长因素时注意力集中在细胞内部控制细胞分裂的通路,设想可能由于该过程发生肿瘤时失控,从而引起肿瘤细胞无限增生,但从增生现象做出的推测存在一定的片面性。从系统的观点出发,恶性肿瘤的发生及增长,不只是由细胞分裂分化这一要素造成的,而细胞死亡要素可能也涉及其中。研究表明,细胞也有控制其何时死亡的通路,在恶性肿瘤中,细胞的死亡通路可能受到抑制,致使细胞寿命延长。

基于“癌症是应该发生凋亡的细胞群未发生凋亡的结果”的认识,许多学者发现了肿瘤细胞凋亡的例子。前列腺癌在机体雄激素水平降低时将会出现大片的癌细胞凋亡,从而抑制了前列腺癌的生长。乳腺癌时,雌激素的变化亦会影响肿瘤的消退。

细胞凋亡机制在肿瘤的发病机制中具有一定的作用。实验性肝癌发病机制研究发现,早期的癌前肝细胞凋亡活动比正常时增多,尽管细胞复制活动也增加,但是由于凋亡清除癌前细胞的作用,细胞动力学仍保持平衡,病灶不出现净增长。在促癌期,许多促动因素,例如苯巴比妥,抑制了癌前病灶的细胞凋亡,导致病灶增大及肿瘤生长的加速,这个过程并不像过去所想象的需要细胞复制能力增强,这时,如果取消促动因素,将会导致癌前病灶的大片细胞凋亡。在肿瘤发展的晚期,细胞

凋亡现象依然存在,Ken 发现晚期恶性肿瘤病灶的周边部位存在着明显的细胞凋亡现象。恶性肿瘤细胞凋亡研究不仅对认识肿瘤发病机制有积极意义,而且在肿瘤治疗及预后评价方面具有重要意义。对于激素依赖性肿瘤,降低体内的趋向性激素水平有助于肿瘤的消退,这种肿瘤消退是由于肿瘤细胞凋亡活动增加造成的。放射线可以直接损伤细胞的 DNA,在肿瘤的治疗后,肿瘤细胞基因的稳定性受到破坏,肿瘤细胞凋亡活动增加,从而造成肿瘤细胞内的某些基因或酶损伤,导致肿瘤细胞凋亡。加热诱发肿瘤凋亡,为肿瘤的热疗提供了理论依据。肿瘤的预后与肿瘤的细胞动力学有密切关系,而肿瘤的细胞动力学平衡是由细胞增殖与细胞凋亡共同维持的。因此,研究肿瘤细胞凋亡活动,可以为肿瘤的预后判断提供新的线索。有关文献表明,肺癌细胞凋亡活动与其预后有密切关系。

四、药物研制开发与细胞凋亡

目前药物开发改变了以往广泛筛选的方式。人们从病理过程的分子机制所包含的事件顺序中找出各种事件的本质、因果关系以及所造成的细胞损伤与失调的地位;或者通过研究正常生理过程中起作用的因子来寻找新药,或者针对某一病理环节来设计药物。这种寻找新药的途径是基于这样一个事实:肿瘤、心脑血管病、慢性炎症、免疫系统疾病,这些威胁性最大的疾病都是以细胞损伤和细胞失控为关键环节的慢性病。所以细胞保护和细胞调节药物比杀伤药物的前景要广阔的多。

利用细胞凋亡的相关基因研究,开展基因治疗、研究开发基因治疗。细胞凋亡的相关基因有:细胞遗传学相关基因,与细胞死亡相关的癌基因、抑癌基因、病毒基因。在诸多的相关基因研究中,目前对癌基因、抑癌基因的研究颇多,且富有成果,可以作为代表,开展基因治疗研究。在以细胞凋亡研究为主体的基因治疗药物研究中,似乎要突破专一基因的研究,而应兼顾其他相关基因的研究,走一条基因协同的途径。例如,癌基因与抑癌基因的结合用于治疗肿瘤(或其他疾病)似乎比单纯的癌基因或抑癌基因更加有效。注意细胞调控研究,也许能发现某些改变凋亡程序或干预凋亡程序的基因产物,达到调节细胞凋亡周期或增加细胞凋亡期的不稳定平衡性,最大限度地避免或减少疾病因素的干扰。从抑制、调节异常;基因表达或各种前体的代谢过程设计新药,可进一步提高药物的选择性与有效性。

利用细胞凋亡的生化机制开展生物制剂研究开发生物制品。细胞凋亡的酶学机制为人们所认识。一个常见的生化标志是钙、镁依赖性核酸内切酶的激活,该酶可将 DNA 降解为典型的阶梯形带图谱。RNA、蛋白合成抑制剂能阻抑长寿淋巴细胞凋亡而对短寿的中性粒细胞则增加其凋亡速度。许多细胞在凋亡早期即出现细胞浆离子钙的持续升高,从而激活了有助于细胞凋亡结构改变的隐性酶。

利用细胞凋亡研究中细胞因子或细胞保护因子开发新药。不同的细胞因子对不同的细胞具有不同作用,有的抑制细胞凋亡。目前研究较多的有:白细胞介素(IL-1、IL-2、IL-4 等)、肿瘤死亡因子、集落刺激因子等。动物和人体的细胞保护因子中有多数是肽类和酶类,应用反向生物学、分子生物学等高新技术在提示疾病规

律的同时,利用它们本身或模拟物及模拟系统可以打开一个防治多种疾病的新药研究领域。

细胞凋亡研究中注重无机离子、无机化合物的研究可开发出新药。无机离子、无机化合物在人体内发挥细胞保护及调节作用,它们在病理过程中参与导致细胞损伤与失控的反应。细胞凋亡的酶学机制中就有无机钙、镁、锌离子的参与。因此,从中可能寻找到“稳定细胞凋亡过程及调节过程”的无机离子或无机化合物系统。该无机系统可能参与组成细胞凋亡之生化微环境的“缓冲系统”,并可能起到稳定或趋向失衡作用。故通过对它们的深入研究,从中亦可能开发出新的药物。

参与细胞凋亡的受体的研究,开发受体激动性或拮抗性药物。在细胞凋亡的研究中,人们对受体的认识与在一般生理、药理学中对受体的认识是有所区别的。这种差异性表现在细胞凋亡中受体的作用与细胞死亡、增殖有关,所以这类研究受体的结局是保护细胞凋亡调节细胞膜。故可以从细胞凋亡研究中开发出新型的受体药物,在受体水平或受体传递环节上切断或干扰细胞凋亡过程或细胞凋亡调节过程,从而阻断疾病的发生、发展某一环节,达到治疗或预防疾病的目的。

第三节 凋亡细胞

机体内细胞死亡通常分为两类:一类是细胞的坏死(necrosis)。物理性或化学性的损害因子及缺氧与营养不良等均导致细胞坏死。坏死细胞的胞膜通透性增高,致使细胞肿胀,细胞器变形或肿大,早期核无明显形态学变化,最后细胞溶解破裂,溶酶体酶泄漏,并常引起炎症反应;在愈合过程中常伴随组织器官的纤维化,形成瘢痕。另一类为细胞凋亡。细胞凋亡是通过细胞内固有的生理、生化反应或某种酶的活化导致细胞死亡,因而是具有生理性和选择性的。凋亡的细胞散在于正常组织细胞中,无炎症反应,不遗留瘢痕。死亡的细胞碎片很快被巨噬细胞或邻近细胞清除。不影响其他细胞的正常功能。目前已证明,既往所提及的细胞坏死中也可观察到有大量细胞的凋亡现象。因此可以说凋亡现象广泛存在于生物机体中,是对机体的发育生长极为有利的生物现象。

一、形态学特征

凋亡细胞的形态学特征表现力核固缩、胞质浓缩、细胞体急剧变小、细胞骨架解体。其中胞核变化最为显著。

1. 核的变化

(1) 染色质凝聚:核 DNA 在核小体连接处断裂成核小体片段,并向核膜下或中央部异染色质区聚集形成浓缩的染色质块,在电镜下呈高电子密度。凋亡细胞中染色质块聚集于核膜下,称边聚;或聚集于核中央部,称中聚。边聚的染色质块使胞核呈新月状、“八”字形、花瓣状或环状等,而染色质块中聚则使胞核呈眼球状。异染色质丰富,常染色质少的细胞核,在凋亡早期染色质呈现为高度浓缩的致密核(黑

洞样核)。染色质聚集部以外的低电子密度区为透明区,是由于核孔变大从而导致其通透性增大,细胞质中水分不断渗入而造成。

(2) 核碎片(核残块):由于透明区不断扩大,染色质进一步聚集,核纤维层的断裂消失,核膜在核膜孔处断裂,两断端向内包裹将聚集的染色质块分割,形成若干个核碎片,其中含有少量的透明区。而个别的黑洞样核变得更致密,仍保持原状,不被分隔。

2. 胞质的变化

(1) 胞质浓缩:由于脱水细胞质明显浓缩(约为原细胞大小的 70%)是凋亡细胞形态学变化的第 2 大特征。

(2) 细胞器:在凋亡过程中除线粒体及内质网外,多数细胞器无明显改变。

1) 线粒体:较为敏感,凋亡早期个别细胞内线粒体变大,嵴增多,表现为线粒体增殖,接着,增殖线粒体空泡化。生化证明线粒体细胞色素 c 向胞质逸出是细胞凋亡早期常发生的一种现象,并认为线粒体内细胞色素 c 的逸出与细胞凋亡有密切关系,共聚焦显微镜观察证实,凋亡细胞线粒体膜电位下降。

2) 内质网:多数情况下凋亡细胞内的内质网腔扩大。增殖的内质网在凋亡细胞形成自噬体过程中提供包裹膜,与细胞的自噬性凋亡有密切关系。

3) 细胞骨架:凋亡细胞的细胞骨架也发生显著的改变,并与膜形态的改变有关,原来疏松、有序的结构变得致密和紊乱,其主要组成成分肌球蛋白和肌凝蛋白的表达受到显著的抑制,含量明显减少。细胞骨架的改变不仅仅是细胞凋亡的后果,它还影响到凋亡的过程。这一点可以从两个实验得到证实。一方面一些能与细胞骨架组成成分结合,干扰其功能的药物,如长春新碱或秋水仙素等,可以诱使细胞出现细胞凋亡的典型改变;另一方面用佛波脂等促进细胞骨架有序化的药物,可以有效的抑制这些药物诱导的细胞凋亡。

3. 细胞膜

凋亡的细胞失去原有的特定形状,如微绒毛、细胞突起及细胞表面皱褶的消失。细胞靠胞膜表面张力使其变成表面平滑的球形,不易被损伤,而且对表面活性剂有很强的抵抗能力,细胞膜活性、渗透性改变不明显,内容物难以逸出。共聚焦显微镜证明凋亡细胞细胞膜电位下降,膜流动性降低。另外细胞膜上新出现了一些生物大分子如磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)和血小板结合蛋白(thrombospondin)等物质,这些分子的出现与凋亡细胞的清除有关。有一些生物大分子则从凋亡细胞的膜上消失,如某些与细胞间连接有关的蛋白质,有些糖蛋白的侧链被降解,暴露出的成分可能介导了吞噬细胞和凋亡细胞的结合,从而有利于凋亡细胞的清除。

4. 凋亡小体的形成

凋亡小体形成通过以下两种方式:

(1) 通过发芽脱落机制:凋亡细胞内聚集的染色质块,经核碎裂形成大小不等的染色质块(核碎片),然后整个细胞通过发芽(by budding)、起泡(by zeiosis)等方式形成一个球形的突起,并在其根部绞窄而脱落形成一些大小不等,内含胞质、细

胞器及核碎片的膜包小体,即凋亡小体(apoptotic body)。或通过分隔机制:在凋亡细胞内由内质网分隔成大小不等的分隔区,靠近细胞膜端的分隔膜与细胞膜融合并脱落形成凋亡小体。

(2) 通过自噬体形成机制:凋亡细胞内线粒体、内质网等细胞器和其他胞质成分一起被内质网膜包裹形成自噬体,并与凋亡细胞膜融合后,自噬体排出细胞外成为凋亡小体。有些细胞在凋亡过程中并不通过上述方式形成若干个凋亡小体,而仅仅发生核固缩和胞质浓缩,成为单个致密结构,也被称为凋亡小体。

二、生化特征

细胞凋亡时生化方面的变化是复杂、多样的,至今尚不能确定哪一种变化是细胞凋亡过程所特有的。

1. 染色质片断化和内源性核酸酶

1980年,Wyllie报道,胸腺细胞发生凋亡时,其DNA琼脂糖凝胶电泳呈特征性“梯状(ladder)”条带。研究表明,梯状条带是凋亡细胞DNA片段化(fragmentation)的结果,内源性核酸内切酶(endonuclease)将核小体间的连接DNA降解,形成长度为180~200bp整数倍的寡聚核苷酸片段,组蛋白和其他核内蛋白质不降解,核基质也不改变。由于大部分细胞凋亡出现DNA梯状条带,而细胞坏死时DNA随意断裂为长度不一的片段,琼脂糖凝胶电泳呈“弥散状(smear)”,因此尽管后来发现并不是所有的凋亡细胞都出现DNA梯状条带,仍把这一现象看做是细胞凋亡的生化特征。形成梯状条带的内源性核酸内切酶有多种,常见的有核酸内切酶I(DNase I)、核酸内切酶II(DNase II)、Nuc-18等。

(1) DNase I:分子量为32~37kDa, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖性,并且可能需要辅助因子,因为纯化的DNase I不能产生DNA梯状条带,但和核基质或血清孵育后,可恢复其DNA断裂活性。DNase I的最适pH是7.5(5.5~9.0)。其抑制剂有: Zn^{2+} 、乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙基焦磷酸盐(diethylpyrocarbonate, DEPC)和肌动蛋白。DNase I分布于细胞的内质网和核周的高尔基复合体内,对其如何进入细胞核发挥作用仍不清楚。

(2) DNase II:分子量为29kDa,在细胞的溶酶体和细胞核内均发现有DNase II。DNase II为 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 非依赖性,纯化的DNase II能使中国仓鼠卵细胞(chinese hamster ovary cell, CHO细胞)核出现DNA梯状条带。DNase II的最适pH 5.5(3.0~7.0),需在低pH条件下激活。Rebollo等报道,胞浆酸化足以激活DNase II。DNase II的抑制剂有N-溴琥珀酰胺(N-bromosuccinamide, NBC), ATA (aurintricarboxylic acid)。 Zn^{2+} 不能抑制其活性,但 Zn^{2+} 可抑制胞浆酸化,从而影响DNase II裂解DNA。

(3) Nuc-18: Nuc-18是从凋亡胸腺细胞核中发现的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖性、分子量为18kDa的中性核酸内切酶。此外, Ribeiro报道了一种取自脾细胞核,分子量为27kDa的核酸酶,其最适pH是8.0, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖性,可被 Zn^{2+} 抑制。还从除去

IL-2 诱导凋亡的 CTLL-2 细胞中发现了分别称作 nuc-40 和 nuc-58 的中性脱氧核糖核酸酶。

三、蛋白酶在细胞凋亡中的作用

在细胞凋亡的始动和发生发展过程中,是由多种蛋白酶(protease)控制不同凋亡阶段的凋亡事件。细胞凋亡可能是蛋白酶级联切割的过程,抑制蛋白酶活性的因素也抑制细胞凋亡的发生。因而有人提出,蛋白酶的作用是细胞凋亡机制的核心部分。调控细胞凋亡的蛋白酶有多种,如:

1. ICE 蛋白家族

多种与 ICE 和 ced-3 结构相似的同系物在细胞凋亡中起类似 ICE 和 ced-3 结构类似作用,这些同系物和 ICE 一起被称为 ICE 蛋白家族。对 ICE 蛋白家族各成员的具体作用还不十分清楚,但都是由大小亚基组成的复合体,具有相似的催化位点。

2. 粒酶或分裂素

免疫细胞如杀伤细胞,通过胞吐作用释放穿孔素和多种丝氨酸蛋白酶介导靶细胞凋亡,这些丝氨酸蛋白酶被称作粒酶(granzyme)。粒酶 A(granzyme A)有胰蛋白酶的活性,可裂解 Lys-X 键和 Arg-X 键;粒酶 B(granzyme B)及其在大鼠淋巴细胞中的类似物分裂素-2(fragmentin-2)则可分解 Asp-X 键。粒酶/分裂素的细胞内底物仍不清楚。不过有人试图构建一种含粒酶基因的细胞株,通过调节构建细胞分泌粒酶介导细胞凋亡。

3. calpain

calpain 是一种 Ca^{2+} 依赖性中性蛋白酶,与细胞凋亡时细胞膜和细胞骨架的变化相关。地塞米松诱导胸腺细胞凋亡时,在形态学变化和 DNA 片段出现之前,细胞内的 calpain 活性升高,并且 calpain 抑制剂可抑制电离辐射和地塞米松诱导的细胞凋亡。Sarin 用 calpain 抑制剂抑制 HIV 感染 T 细胞凋亡,从而使之恢复缺陷型免疫反应,这提示 calpain 抑制剂可能会在 HIV 感染的治疗中发挥作用。

四、胞浆 Ca^{2+} 与细胞凋亡

早在 1977 年,Kaiser 等报道,用糖皮质激素诱导细胞凋亡伴随有胞浆 Ca^{2+} 升高。随后,越来越多的实验结果证实了胞浆 Ca^{2+} 与细胞凋亡关系密切。Mcconkey 认为通过 Ca^{2+} 两条途径诱导细胞凋亡。一是胞内 Ca^{2+} 库释放,胞外 Ca^{2+} 内流促使胞浆 Ca^{2+} 持续升高,作为凋亡信号启动细胞凋亡;二是 Ca^{2+} 的释放打破了细胞内结构的稳定,使得细胞凋亡效应系统的关键成分开始和细胞结构正常时不能接触到的基质接触,从而触发细胞凋亡。胞浆 Ca^{2+} 浓度升高或分布改变(redistribution)诱发细胞凋亡变化的作用方式主要有如下几种:信号转导方式、激活蛋白酶方式、激活核酸内切酶方式、激活转谷氨酰胺酶(transglutaminase)方式等。最近有人提

出,多种细胞凋亡转导信号中,可能存在一种中心信号,既是凋亡信号转导分子,又是凋亡-效应分子, Ca^{2+} 很可能就是这种中心信号。为此,人们开始了 Ca^{2+} 和凋亡诱导因子及其他凋亡信号间的相互关系的研究。

五、胞浆 pH 的变化及其对细胞凋亡的调控

细胞内氢离子和钙离子一样,其浓度的稳定对维持生命活动都是至关重要的。自发现 Ca^{2+} 在细胞凋亡中起重要作用后,近来又证明了胞浆 pH ($[\text{pH}]_i$) 的变化影响细胞凋亡。首先细胞凋亡伴随 $[\text{pH}]_i$ 降低,胞浆酸化影响细胞凋亡。用拓扑异构酶 II (topoisomerase II) 抑制剂 etoposide 诱导 HL-60 细胞凋亡时,胞浆酸化。除去 IL-2 后, $[\text{pH}]_i$ 降低的 CTLL-2 细胞凋亡。紫外线、抗 Fas 抗体诱导 Jurkat 细胞凋亡时,先使 $[\text{pH}]_i$ 降低。并且,胞浆碱化抑制细胞凋亡,如 G 蛋白异戊烯化抑制剂 lovastatin 介导的细胞凋亡由于胞浆碱化而受到抑制。 $[\text{pH}]_i$ 降低或是由于介导物引起胞浆 Ca^{2+} 升高,细胞通过 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换或 Ca^{2+} -ATP 酶把 Ca^{2+} 泵入细胞器或泵出细胞时将质子作为平衡离子泵入细胞内造成;是由于凋亡细胞糖酵解作用加强,酸性代谢产物增多之故;或是由于凋亡细胞膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白作用引起。甚至有人提出凋亡细胞 $[\text{pH}]_i$ 下降可能和溶酶体酶激活相关。不过 Na^+/H^+ 反向转运蛋白可能在凋亡细胞胞浆酸化中起主要作用,因为细胞凋亡时其功能不发生明显改变,只是凋亡引起的去磷酸化,使其作用设置点(setpoint)发生了变化;造成其 Na^+/H^+ 反向转运加强,胞浆酸化。

胞浆酸化主要是通过激活酸性 DNase II 启动细胞凋亡。 $[\text{pH}]_i$ 降低也增强了一些酸性功能蛋白,如转谷氨酰胺酶、酸性鞘磷脂酶、gelsolin 等在细胞凋亡过程中的作用; $[\text{pH}]_i$ 降低还可能通过减弱细胞的呼吸爆发作用,生成与细胞凋亡相关的活性氧(reactive oxygen species, ROS)减少,影响细胞凋亡。但是,有些实验结果显示,胞浆碱化也可能促进细胞凋亡。一是从 HL-60 细胞和其他髓样淋巴细胞分离得到的核酸内切酶的最适 pH 为碱性;二是钙离子载体 Br-A 23187 使 HL-60 细胞凋亡时, $[\text{pH}]_i$ 升高。Tsao 等报道体外培养的胸腺细胞凋亡时,发生胞浆碱化。

Br-A 23187 诱导 $[\text{pH}]_i$ 升高是由于 Na^+/H^+ 反向转运蛋白被激活造成的。而体外培养胸腺细胞凋亡时伴随发生的胞浆碱化则是通过 Na^+/H^+ 反向转运蛋白、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 伴随运输蛋白和 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换蛋白共同作用实现。

胞浆碱化与很多细胞功能的启动相关。在细胞凋亡时, $[\text{pH}]_i$ 升高激活了碱性核酸内切酶,启动凋亡过程。非常有趣的是,我们用共聚焦显微镜观察到,用地塞米松诱导巨噬细胞凋亡时, $[\text{pH}]_i$ 先是急速升高,之后缓慢降低,胞浆逐渐酸化。结合他人的实验结果,我们猜测,胞浆碱化可能和细胞凋亡的启动相关,而胞浆酸化则可能是细胞凋亡的必然结果。

六、线粒体与细胞凋亡

以前认为胞核才是凋亡的主要目标,现在发现,细胞凋亡有胞核和胞质两条途

径,细胞凋亡时细胞器也发生变化,溶酶体增多,内质网和线粒体增殖并区域化,线粒体内膜磷脂减少。特别明显的是,线粒体发生一系列与细胞凋亡密切相关的变化:

(1) 细胞凋亡时,线粒体呼吸链受损,使细胞生成 ATP 减少,导致细胞死亡。

(2) 线粒体是细胞 ROS 主要来源之一,ROS 是细胞凋亡的信使分子和效应分子,凋亡刺激使线粒体生成的 ROS 增多,促进了细胞凋亡。

(3) 多种凋亡诱导因子可使细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)降低。粒体膜电位是线粒体发挥功能所必须,线粒体膜电位受损影响其功能,导致细胞凋亡。

(4) 进一步研究表明,凋亡诱导因子使线粒体通透性升高(permeability transition,PT):PT 孔,即线粒体膜上的巨型通道(megachannel)开放,线粒体膜的通透性增大到可通过分子量小于1 500Da的大分子,线粒体膜两侧的离子自由分布,线粒体膜电位的迅速下降和电子传递与呼吸链解偶联,造成细胞凋亡。Zamzami 证实了 PT 是细胞凋亡早期的决定性变化。Kroemer 总结,凋亡因子使线粒体发生 PT,造成线粒体膜电位和生物合成破坏,细胞的能量代谢受损,氧化呼吸链解偶联,线粒体内 Ca^{2+} 释放,细胞内 ROS 增多,谷胱甘肽减少,从而激活核酸内切酶、蛋白酶,使细胞内 Ca^{2+} 分布改变,细胞发生凋亡。

以上事实说明,线粒体通过其通透性升高影响细胞凋亡。Bossy-Wetzel 认为,线粒体参与了细胞凋亡过程的调控和实施。此外,与凋亡密切相关的 bcl-2 家族分布在细胞内膜系统,其中线粒体外膜上分布最多。线粒体膜上的 bcl-2 多位于 PT 孔处,具有抑制线粒体通透性变化的能力,并通过此途径抑制细胞凋亡。有人证实,bcl-2 可阻止线粒体通透性升高的下游事件:如 bcl-2 防止 L929 细胞线粒体膜电位下降;bcl-2 高表达引起细胞内 ATP 从 DP 比率增高;bcl-2 抑制线粒体释放细胞色素 C。因而,Kroemer 提出,线粒体调控细胞凋亡。不过,要作出这样的断言还需检测 bcl-2 是否抑制和细胞凋亡发生密切相关的其他线粒体通透性增高下游事件,包括线粒体 Ca^{2+} 释放、蛋白酶和核酸内切酶激活等。

第四节 女性生殖与细胞凋亡

妇产科学界非常重视细胞凋亡在妇产科领域的研究,这些研究较多地集中在女性生殖及妇科恶性肿瘤两个方面。

一、女性生殖系统

1. 卵泡的发育及内分泌调节

新生儿的卵巢内约有 200 万个卵细胞,月经初潮时只剩下 40 万个,而妇女一生仅有 400 个左右的卵泡发育成熟并排卵。其余的卵泡在不同的年代陷于闭锁,绝经后妇女的卵巢内已几乎无卵泡存在。

卵泡是以卵细胞为核心,同其周围的颗粒细胞及卵泡膜细胞共同构成。卵细胞须经减数分裂由初级卵母细胞成为次级卵母细胞,相应的卵泡由原始卵泡到生长卵泡再成熟卵泡而排卵,释放出次级卵母细胞(卵子)。此后的残留在卵巢中的卵泡成分形成黄体,继而黄体萎缩形成白体,完成一个完整的卵巢周期性变化。

卵泡的发育由内分泌激素调节及自分泌、旁分泌调节。丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)、垂体分泌的卵泡刺激素(FSH)与黄体生成素(LH)、颗粒细胞分泌的雌激素(E)、孕激素(P)形成内分泌轴,优选优势卵泡发育成熟。另外在卵泡的发育过程中尚有自分泌、旁分泌因子的调节;这些因子包括 EGF、bFGF、IGF-1、GH、IL-1 β 等。

2. 颗粒细胞凋亡与卵泡闭锁

在卵巢,不间断的卵泡发育(卵泡发育不同时期)展示了一种选择性的生理性细胞死亡过程,大多数卵泡最终闭锁消失,仅有少数的卵泡发育成熟并排卵。虽然卵泡闭锁发生的基本机制目前还不完全清楚,但越来越多的研究表明细胞凋亡是卵泡闭锁的根本原因,颗粒细胞凋亡触发了卵泡闭锁。早在 20 世纪 70 年代, Hay 等利用电镜观察羊的卵泡,发现闭锁卵泡早期颗粒细胞层,继之为卵泡膜细胞层出现细胞凋亡的特征性形态学改变。Francis 从小鼠闭锁卵泡颗粒细胞中提取的 DNA 片段在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳上是典型的“梯状”带,第 1 次用分子生物学的方法证明了闭锁卵泡中颗粒细胞凋亡的存在。近来的研究表明(动物实验),卵泡发育不同阶段颗粒细胞发生凋亡的敏感性不同,直径 4~8mm 的卵泡的颗粒细胞最易发生凋亡。下列因素与颗粒细胞的凋亡相关:

(1) 相关基因

1) 抑癌基因 p53 具有阻止细胞由 G₁ 期向 S 期转变的功能。DNA 的损伤可以引起 p53 蛋白表达增加,能够在 DNA 合成前修复操作。如果这种损伤扩大,继续增加的 p53 蛋白触发细胞凋亡。p53 在未成熟小鼠卵泡中有表达,凋亡卵泡中 p53RNA 的水平显著增加,Tilly 用免疫生化定位进一步提示,小鼠卵巢中 p53 蛋白基本上限于闭锁卵泡凋亡的颗粒细胞核上。

2) WT-1(Wilms tumor type 1)抑癌基因是 Wilms 肿瘤易感基因。最初认为肾脏是产生 WT-1 mRNA 的主要器官,近来发现卵巢子宫的 WT-1 mRNA 水平明显高于肾脏,并有转基因小鼠患有生殖腺性不孕的报道,提示 WT-1 在胚胎性腺发生中起着关键作用。通过 mRNA 杂交组化方法证明小鼠卵巢中颗粒细胞是 WT-1 mRNA 最主要的表达场所。Tilly 利用 Northern blot 方法分析未成年小鼠卵巢发现有 3 种 WT-1 mRNA。WT-1 的功能,可能是协同 p53 发挥作用,增强 p53 基因在颗粒细胞中的作用。WT-1 可能还具有抑制几种编码生长因子及其受体的转录功能,如 EGF、 α FGF、bFGF 和 IGF-1 等,直接调节这些促进细胞增殖的生长因子及其受体的表达,导致细胞凋亡。

3) bcl-2 基因家族是许多生理或病理性细胞凋亡的关键性调节因素。目前认为细胞凋亡的发生是由死亡抑制基因(bcl-2, bcl-x1)与死亡诱发基因(bax, bcl-xs)之间的比率所决定的。在所有被检组织中均有 bcl-2 基因家族的表达,特别是在子宫

和性腺中 bax 和 bcl-2 mRNA 水平最高。研究发现,鸟的成熟卵泡中颗粒细胞 bcl-2 和 bcl-x1 的蛋白水平高于未成熟而闭锁的卵泡。体外无血清培养的颗粒细胞,在其增殖或凋亡的过程中,基因表达产物变化显著,而 bcl-2 和 bcl-x1 变化幅度相对较小,bax 基因在影响颗粒细胞生存(低 bax)和凋亡(高 bax)过程中起决定作用。有文献进一步表明鸡卵泡发育的不同时期,颗粒细胞发生凋亡的敏感程度与 bcl-x1 表达的多少有关,直径为 4~8mm 的卵泡颗粒细胞最易发生凋亡而导致卵泡闭锁,在此期颗粒细胞几乎检测不到死亡抑制基因 bcl-x1 的表达产物,而在成熟卵泡中颗粒细胞的 bcl-x1 产物最多。

4) Fas 基因:其基因产物 Apo/CD95,属于肿瘤坏死因子(TNF)和神经生长因子受体家族中的一种跨膜蛋白,它与其自然配体 31kDa 的 II 型膜蛋白相结合所产生的信号,能诱发各种淋巴细胞和癌细胞发生凋亡。已经证明人颗粒细胞上存在着 Fas 抗原 mRNA,应用 Fas 抗原的单克隆抗体能诱发颗粒细胞发生凋亡。Hakuno 使用免疫组化方法在小鼠闭锁卵泡颗粒细胞中检测到 Fas 抗原,无论是健康或闭锁卵泡中的卵母细胞上均有 Fas 抗原配体(FasL)的存在,卵母细胞具有诱导表达 Fas 抗原的颗粒细胞凋亡的能力,从而证明了表达 FasL 的细胞促使表达 Fas 抗原的细胞发生凋亡。

(2) 卵巢内分泌与旁分泌及内分泌调节:促性腺激素和卵巢内分泌、旁分泌产生的生物大分子在颗粒细胞凋亡及卵泡闭锁中发挥着重要作用。研究证明促性腺激素(FSH、LH)和几种生长因子(EGF、bFGF、IGF-1、GH)及细胞因子(IL-1 β)等能有效地抑制体外培养的预排卵泡中颗粒细胞凋亡的发生。Chun 等研究表明,在取易发生凋亡的窦前期卵泡,它们抑制凋亡和卵泡闭锁的能力明显不同,以 FSH 为最强,IGF-1 次之,LH、bFGF、activin(激活素)较低,这可能与此期各种因子的受体表达的多少有关。Chun 进一步的研究表明 IGF 结合蛋白(IGFBPs)在一定程度上降低了 FSH 抑制颗粒细胞发生凋亡的能力。

(3) 细胞间连接:哺乳动物颗粒细胞间连接存在两种形式,间隙连接与黏合连接。Anderson 等的研究证明在体外培养中只有大颗粒细胞发生凋亡,单个的颗粒细胞凋亡的发生率为聚合细胞的 2 倍,因此认为细胞间的连续可以阻止颗粒细胞凋亡。间隙连接可以调节细胞间的 cAMP 水平或其他信使,继而影响细胞间活力。而黏合连接是由颗粒细胞表达的嗜同种的 N-钙黏附素(N-cadherin)形成,这种连接能不断的产生阻止颗粒细胞凋亡的信号。孕酮诱导颗粒细胞的聚合,继而抑制颗粒细胞凋亡的发生。

二、黄体细胞凋亡与黄体萎缩

成熟卵泡排卵后,其剩余颗粒细胞黄素化,形成黄体细胞,并分泌孕激素(P)。在未受孕者,黄体则发生退行性变,因而孕激素水平降低,使子宫内膜剥脱形成月经,黄体的退行性变正是通过黄体细胞的凋亡来实现的。已经证明在黄体细胞上有 Fas 抗原 mRNA,应用 Fas 抗原的单克隆抗体,可以诱发黄体细胞凋亡的发生。一

般认为 Fas、c-myc 等基因表达的增加促进了黄体细胞凋亡的发生。TNF 与 INF- γ 合并应用可明显促进黄体细胞凋亡,bFGF 能抑制黄体细胞凋亡的发生。

在正常育龄女性,每个月经周期,都有一个卵泡发育成熟而排卵,这是生殖的基础,而其他卵泡停止在窦前期或因颗粒细胞发生凋亡而闭锁。发育成熟的卵泡即为优势卵泡,而优选优势卵泡的过程是由 FSH 来完成的。Chun 等认为,FSH 能够有效地抑制窦前期卵泡和预排卵卵泡颗粒细胞的凋亡,在前者是选择优势卵泡的过程,而后者,可能通过抑制颗粒细胞凋亡而避免卵泡未破裂黄素化的发生。

无排卵是女性不孕症常见的原因,如多囊卵巢综合征(PCOS)患者。在 PCOS 患者的卵泡中,发现有明显的 IGFBPS 的增高,而 IGFBPS 可以对抗 FSH 对颗粒细胞发生凋亡的抑制作用,这可能是不排卵的基础。卵巢早衰的发病机制尚不清楚,有人认为,可能与凋亡的异常发生有关。

在临床上,常用的促排卵治疗即是通过增加内源性或外源性的 FSH 来实现的,特别是采用配子移植或试管婴儿(IVF-ET)等助孕技术时,更是需要多个卵泡发育成熟,克罗米芬是雌激素受体拮抗剂,通过抑制雌激素对垂体的下丘脑的反馈抑制而增加垂体内源性 FSH 的分泌。外源性的 FSH 有人绝经期促性腺激素(hMG),纯 FSH(metrodin)和重组的 FSH(rFSH)等。大量的 FSH 通过抑制各期卵泡颗粒细胞凋亡的发生,使多个卵泡发育成熟。

三、妇科恶性肿瘤与细胞凋亡

随着细胞凋亡这一领域的研究的不断深入,细胞凋亡与各种疾病之间的关系越来越为人们所重视,尤其是与肿瘤的发生和发展之间的关系,国内外一些学者对妇科恶性肿瘤与细胞凋亡的关系,从肿瘤的发生、治疗及预后判断等多方面进行了探索性研究。

1. 妇科恶性肿瘤的发生与细胞凋亡

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤,已经证实宫颈癌发生与人乳头状瘤病毒(HPV)感染有直接的关系。两种高危的 HPV16、HPV18 可以缓解肿瘤细胞的频繁凋亡;HPV16/18E6 与抑癌基因 p53 结合,可以很快引起 p53 基因变性,阻止野生型 p53 刺激导致的细胞凋亡。与宫颈癌的发生发展有密切关系的 HPV 染色体组,可以激活 c-myc 基因使 p53 发生变性,从而抑制细胞凋亡。这可能就是 HPV 诱发宫颈癌的机制之一。

正常卵巢细胞存在着凋亡现象,前列腺素可诱导卵巢表面细胞发生凋亡。Ackerman 认为,卵巢细胞发生凋亡可能不仅限于卵巢上皮,是从表面开始并向内部发展的;在某些条件下,卵巢不发生凋亡,相反发生恶性转化,形成恶性肿瘤。多数上皮来源的卵巢肿瘤,可能是在排卵过程受损伤而引起恶性转化所致。Vikhan-shaya 等在卵巢细胞系中检出野生型 p53 的表达,也可由此推测卵巢癌的发生与细胞凋亡的关系。

利用免疫组化的方法,观察卵巢上皮浆液性肿瘤中 bcl-2 基因产物的分布,结

果在交界性浆液性囊腺癌和恶性浆液性囊腺癌中 bcl-2 阳性表达率明显高于浆液性囊腺癌,而正常卵巢组织未见阳性表达,bcl-2 表达与浆液性囊腺癌的发生有关,且与癌组织的分化程度有关,随细胞分化程度由高到低,bcl-2 阳性表达逐渐增高,而 bcl-2 为抗凋亡基因,从另一方面推测卵巢癌的发生与细胞凋亡相关。

2. 妇科恶性肿瘤的治疗与细胞凋亡

(1) 化疗药物引起肿瘤细胞凋亡:顺铂是卵巢癌化疗中最常用的化疗药物。已知卵巢癌细胞株 CH1 对顺铂敏感,在体外培养的 CH1 细胞中加入不同浓度的顺铂,可诱导细胞发生凋亡,并出现时间和剂量依赖性。Meyn 等对种植在小鼠体内卵巢腺癌 OCa-1 给予不同浓度的顺铂,结果同样发现了细胞凋亡的存在,在顺铂注入体内后数小时即有明显的细胞凋亡的征象出现,而且在数天的过程中,始终有凋亡现象存在。近来有关环磷酰胺、紫杉醇等卵巢癌常用化疗药物的抗肿瘤机制的研究中,同样显示细胞凋亡在其中起着十分重要的作用。

Meyn 等对种植在裸鼠体的 OCa-1 用不同剂量的环磷酰胺治疗,用药后 10~18h,细胞凋亡达峰值,此后逐渐减少。量效关系表明低剂量时即引起显著的细胞凋亡,剂量达一定程度后凋亡的发生率趋于稳定。

(2) 放射线引起的肿瘤细胞凋亡:1991 年 Stephen 等发现 γ 射线照射后 6h 约 20% 的肿瘤细胞发生特征性的细胞凋亡;照射后 24~96h,肿瘤细胞继续发生凋亡并出现进行性细胞坏死。Stephen 等在后续的研究中探索 3Y 照射诱导 OCa-1 细胞凋亡的时效关系及量效关系,发现照射后 3~5h 出现细胞凋亡的峰值;量效上,2.5Gy 照射后凋亡最大发生率为 20%,2.5Gy 照射凋亡的最大发生率为 30%;照射剂量在 7.5Gy 以上时,细胞凋亡的发生率趋于稳定。

(3) 生物治疗引起肿瘤细胞凋亡:Manchester 等在研究肿瘤坏死因子(TNF)对(ME-180)人宫颈癌细胞株的影响时发现,TNF 对 ME-180 有细胞毒性作用,同时他们还检测到 DNA 的裂解片段,并发现有一过性 c-myc 基因表达的增强,因而认为 TNF 对肿瘤细胞的毒性作用是通过凋亡来实现的。Gottlieb 等在研究 TNF- α 对卵巢癌细胞的作用时也发现,在 TNF- α 诱导细胞凋亡的同时,还检测出 p53 基因表达的增强,两者有明显的剂量相关关系。

研究转化生长因子(TGF β)对人卵巢癌细胞系于 HO-8910 作用中发现,TGF β 能促进 HO-8910 细胞转化,并停滞于 G₀/G₁ 期,而当细胞发生凋亡时,G₀/G₁ 期的细胞比例下降,因此凋亡可能发生于 G₀/G₁ 时相。同时,HO-8910 细胞接受 TGF β 调控信息后,cAMP 含量的提高,也可能是细胞凋亡发生的一个直接启动因素。Havrilesky 在研究中发现 TNF 可以抑制正常卵巢上皮和 OVCA420 细胞株的生长,但只在 OVCA420 中发现了凋亡的发生,提示恶性细胞较正常细胞对凋亡更敏感。

(4) 内分泌治疗与细胞凋亡:妇科一些恶性肿瘤均与内分泌激素有相关关系。Kleinman 等发现促性腺激素(GnRH)的拮抗剂 SB-75 对有些人子宫内腺癌细胞株的生长有直接的抑制作用,这一抑制作用与凋亡有关。Ackerman 在人卵巢癌 OVCAR-3 这一对 GnRH 敏感的细胞株中加入 GnRH 抗体的抗血清,也抑制了细

胞株的生长,并找到了细胞凋亡的证据。

3. 妇科恶性肿瘤预后的评估与细胞凋亡

妇科恶性肿瘤预后的评估是临床医生关心的重点问题之一,现在细胞凋亡也开始被引用对患者预后评估的研究中。Funlly等对大量的正常宫颈上皮,不典型增生,原位癌和浸润癌组织细胞凋亡和生长的研究显示,随着细胞向恶性转变,细胞凋亡的水平呈下降的趋势,也就是说细胞凋亡水平低,其恶性程度越高。Wheeler等对21~87岁的44位Ib期宫颈癌患者在放疗前行活组织检查,来评估她们细胞凋亡的基础水平,并在放疗后进行平均长达101个月的随访,结果显示细胞凋亡的基础水平高的患者较水平低的患者预后要好。他们认为这一结论可以推广到对其他恶性肿瘤的分析上。

(史小林)

第十三章

生殖医学的实验技术

一、精子染色技术

精子形态是由多基因决定的,当影响精子形成的基因发生突变时,可形成畸形精子。故精子形态观察在研究不育症病因与诊断以及有害因素对生殖细胞的致突变性有重要意义。通过精子染色技术,可以方便地区分正常形态精子和畸形精子,有助于精子形态学的分类。目前精子染色方法较多。普通染色方法有吉姆萨染色、瑞氏染色、伊红-苯胺黑染色以及 HE 染色等。其中吉姆萨染色和 HE 染色较为常用,方法简便、快速,但不易与白细胞、未成熟细胞、前列腺上皮细胞、组织细胞等相鉴别。一般认为,改良巴氏染色法,显色效果佳,精子形态容易辨认,但操作麻烦,耗费时间。Diff-Quik 法,是在白细胞染色基础上改良的常规快速染色法。此法操作简便,精子形态清晰,可显示出淡紫色的顶体区和深紫色的顶体后区、中段及尾区。

精子细胞化学染色技术,为研究精子的化学成分及功能活性提供了可能。精子细胞化学染色能更精确地确定精子缺陷的程度。通过细胞化学染色对精子多种酶活性进行观察。这些酶包括过氧化酶、酸性磷酸酶、琥珀酸脱氢酶以及糖原和核糖核酸等成分,并发现此类酶的分布与变化在正常人与不育者中是不同的。琥珀酸脱氢酶存在于所有形态正常的活动精子中,并具有高度的酶活性,经细胞化学染色显示粗大的蓝紫色颗粒,而且在精子顶体区及体部汇集成致密块。在精子发生时,此酶活性随细胞成熟而增加,在其胞浆各部位上显示为粗大蓝紫色颗粒,常成堆汇成很粗的巨块。精液检查具有过氧化酶活性的细胞,常见有白细胞。成熟的中性粒细胞表现有明显的过氧化酶活性,显示粗大、金黄褐色颗粒充满整个细胞。而活动精子、未成熟精细胞则无过氧化酶活性。据此,二者可以识别。

酸性磷酸酶见于活动精子中,于头尖部可见赤橙色单一粗大颗粒,精子发生细胞内见到的这种颗粒,比成熟精子上的颗粒更鲜艳。成熟中性粒细胞虽有酸性磷酸酶活性,但颗粒颜色深染。

糖原在精子发生细胞中较丰富,整个胞浆充满樱桃红色的糖原颗粒。精母细胞胞浆及核内皆有糖原,而幼稚的精细胞糖原则明显减少,仅见有糖原痕迹。成熟的活动精子糖原已消失。中性粒细胞也可观察到明显的糖原反应,且同时伴有过氧化酶染色阳性,故可与精子相鉴别。

核糖核酸随精子的成熟而递减,在精子发生细胞则含有大量核糖核酸。精原细胞胞浆被玫瑰色的核糖核酸所充满,幼稚精子的玫瑰色仍鲜明,成熟精子的核糖核酸仅含微量,其颜色已较浅淡。中性粒细胞中无核糖核酸。

二、精浆生化及微量元素的测定

正常精浆是前列腺、附睾、精囊等附性腺分泌液的混合物,其中水分大约占90%。化学成分主要由以下物质组成:①糖类:如果糖、葡萄糖、半乳糖和甘露糖等。②脂类:如胆固醇、睾酮与前列腺素等脂肪酸衍生物。③蛋白质:有免疫球蛋白、蛋白酶抑制剂,去获能因子、抗糜蛋白酶和抗胰蛋白酶等,还含有酸性磷酸酶、透明质酸酶、糖苷酶、二胺氧化酶、纤维蛋白酶原激活因子和胰凝乳蛋白酶(使精液凝块液化)等酶蛋白。④肽类激素:主要有FSH、LH、PRL等。⑤氨基酸:包括精氨酸、赖氨酸及谷氨酸等20余种。⑥胺类:主要含有精氨、亚精氨、精氨素等。⑦有机酸、碱,如柠檬酸、碳酸、乳酸和肉毒碱等。⑧无机离子,如锌、硒、锰、镁、钙、铜、钾、钠、氯等多种元素。精液中钙、镁浓度很低、钾和钠是主要的阳离子,精子中钾的浓度高于精浆,钠离子则相反,钾离子对精子的存活有一定影响。由此可见,精浆化学成分十分复杂,许多化合物的浓度明显高于组织液和其他体液。因此,精浆的生化 and 生理学特性,对精子的活力及生理功能有重要影响。

检测精浆及精子中的某些生化成分,可以了解睾丸及附属性腺分泌功能。很多化合物的变化与男性生育有密切关系,对不育男子的诊断、治疗及病因分析均有重要的临床意义。

精浆中富含果糖,是由血液葡萄糖经精囊转变而来的。精囊分泌的果糖是精子能量的主要来源。其含量高低直接影响到精子的活力。睾酮的水平影响精囊果糖的分泌,雄性激素不足可造成果糖含量降低。这表明精浆果糖含量能间接反映睾丸间质细胞分泌睾酮的功能。临床上,先天性精囊缺如,果糖测定为阴性。精囊炎时,果糖含量降低,可用于鉴别单纯性输精管阻塞所致的无精症和输精管、精囊发育不良引起的无精症。为此,检测精浆果糖可作为精囊分泌功能的指标。

肉毒碱主要由附睾分泌,其次是精囊。肝脏是肉毒碱合成的主要场所。精浆中肉毒碱分为游离肉毒碱和乙酰肉毒碱两种,精浆肉毒碱含量几乎高于血浆10倍。附睾中含高浓度的肉毒碱,这可能和精子在附睾成熟时所需的能量来源有关。检测精浆中肉毒碱含量可了解附睾和精囊的功能。

柠檬酸来自前列腺,以精浆含量为高,其作用是结合钙离子,通过与钙离子结合,而调节精浆钙离子的浓度,并影响射精后精液凝固与液化过程,对精子活力及透明质酸酶的活性也起重要作用。精浆柠檬酸含量与睾酮水平相关,检测精浆柠檬

酸含量可帮助判断雄激素分泌状态及评价前列腺的功能。

精液的前列腺素由精囊腺等腺体产生。精液中前列腺素含量很高,并与男性生育有关,通过对精液前列腺素 E(PGE)和前列腺素 F(PGF)含量测定证实,不育患者的精液 PGE 含量显著低于正常人。精液含有的固醇类和性腺激素,如睾酮的水平与精子活性高低无明显关系,但发现精液过少患者的血液中含量则明显降低。有关 LH 对精子生成也有影响,其含量一般高于血浆 3 倍,而催乳素则高于血浆 5 倍。FSH 和 hCG 的水平较血浆为低。

甘油磷酸胆碱主要由附睾分泌,并受雄激素调控,对精子的作用目前尚不清楚。但可据此分析附睾的功能。精子中各种酶类,如乳酸脱氢酶, α -糖苷酶、顶体酶,精浆含有的胃蛋白酶原、纤维蛋白酶原激活因子、胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶抑制因子以及精液中各种无机元素,包括微量元素的分析,对于客观判定睾丸生精功能、附属性腺分泌功能和精子质量都是很有意义的。

乳酸脱氢酶同工酶 X(LDH-X)存在于睾丸初级精母细胞、精子细胞、精子以及精浆中,以精子的含量最高,约占 LDH-X 总量的 80%~90%。LDH-X 是精子糖代谢所必需的酶,为精子在生殖道运动提供充足能源。显然,LDH-X 与精子的生成、代谢、获能以至受精有密切关系。LDH-X 对于睾丸组织和精子细胞具有组织特异性。睾丸萎缩患者 LDH-X 相应降低或消失,精子发生缺陷时则无 LDH-X 形成。少精或无精者可致 LDH-X 活性降低,但精液检查正常的不育患者,也可能因 LDH-X 活性下降而引起不育。有研究证明,LDH 总活性与生殖功能无明显关系,而 LDH-X 相对活性却有显著的相关性。由此,LDH-X 活性检测可作为诊断男性不育有价值的指标。测定 LDH-X 活性多用电泳分离结合扫描法。也可利用 2-酮基乙酮作为酶催化反应的底物,直接检测精浆 LDH-X 的活性,其方法简便、快速、准确,更适合临床应用。

精浆中酸性磷酸酶产生于前列腺,男性血清中存在的酸性磷酸酶大部分来自前列腺,其含量以前列腺最为丰富。酸性磷酸酶广泛存在于机体各组织细胞中,而精浆中的含量则高于任何组织和体液,是法医学鉴定精液的最敏感的方法。酸性磷酸酶通过磷酸化过程水解精液中的磷酸胆碱、磷酸甘油及核苷酸等物质,直接影响精子的活力和代谢。前列腺炎患者精浆酸性磷酸酶含量降低,而前列腺肥大或早期前列腺恶性肿瘤的患者,其含量增高。检测精浆酸性磷酸酶可提供前列腺功能的信息,有助于前列腺疾病的诊断。

顶体酶存在于精子顶体内膜及赤道部膜上,通常以无活性形式存在,当精子头部进入卵透明带时,顶体酶原才被活化为顶体酶。此酶是受精过程中不可缺少的一种中性蛋白水解酶,其作用类似胰蛋白酶。它能水解卵透明带糖蛋白,使精子穿过卵丘后再穿过透明带,最终与卵子融合,它不能使激肽酶游离,能促进精子的运动。目前认为顶体酶活力不足,可能导致不育。临床对男性不育精子顶体酶活性进行测定,可以估计精子活力及其受精能力。

精液中性 α -糖苷酶主要由附睾分泌。其活力受雄性激素水平的影响,在一定程度上可反映附睾的功能。而附睾分泌糖苷酶的功能的改变,可能是不育的 1 个原

因。临床发现输精管结扎后,该酶活力显著降低。因此,测定精浆中性 α -糖苷酶活力对于鉴别输精管阻塞和睾丸生精障碍所致的无精症有一定意义。

人体存在的各种无机元素虽然含量甚微,但对生命活动的作用却十分重要。在机体代谢过程中,无机元素各自以独特的方式参与体内高度的化合过程和分解过程,彼此间有着协调、拮抗和置换等作用。它们的作用形式和蛋白质、酶、维生素以及激素等有密切关系,因而对机体各组织和细胞的发育、代谢等一系列生理过程产生重要影响。精液中微量元素的变化直接涉及到性激素的分泌、精细胞的生成与代谢。某些元素的代谢紊乱可导致不育。

现已肯定,人体生殖内分泌系统的功能活动需要锌、锰、镁、铜、铁、钾、钠等多种元素的参与,其中锌与脑垂体功能的关系尤为密切,将直接影响垂体促性腺激素的释放,对维持下丘脑-垂体-性腺轴的协调起不可忽视的作用。锌缺乏能明显抑制促性腺激素的释放,从而引起性腺发育不良,长期缺锌会直接干扰垂体的反馈机制。锌还可使血浆睾酮和双氢睾酮浓度升高,而雄激素的变化又可影响到前列腺组织中锌的水平,锌对前列腺结构和功能也有一定作用。垂体、甲状腺、卵巢等腺体的功能活动也受锌、锰与硒元素的影响。铜则直接影响垂体释放性激素、促甲状腺素和肾上腺皮质激素以及儿茶酚胺的合成。而铁过多往往使性腺及生殖器官发育不良,造成性功能紊乱;第2性征发育不全。锰过少,可导致性功能障碍,使性欲减退。

精浆中各种无机元素对精子的活力、活率都将带来影响。不少学者对锌的代谢,锌与前列腺功能及生殖功能的作用的研究发现,锌直接参与精子生成、成熟、激活和获能过程,对精子活力、代谢及其稳定性都具有重要作用。锌具有延缓精子膜的脂质氧化,维持胞膜结构的完整性和稳定性,从而使精子保持良好的活动力。锌及其氧化物能有效地抑制精子的酵解和氧化,使精子活动减慢。精子通过吸收精浆中的锌与胞核染色质的硫基结合,以防止染色质过快解聚,促进精卵结合,锌还能改变睾丸的生精速度,对精子的代谢有重要影响。据观察精子密度的增加常伴有锌、镁含量升高,锌能够增高精子数量。已清楚睾丸、前列腺、附睾组织中富含元素锌,尤其是精液和精子中含量更高,可见锌是调节生育的重要因子。

通过铜对男性生殖器官的研究证实,铜可抑制精子的氧化酵解过程,使精子活动降低。正常人和不育男子精液中铜离子有明显差异,铜含量与精子密度无直接关系,但过量的铜有直接杀精作用。Pleban 研究指出,铁与精子数量有关,铁过多可导致睾丸曲细精管固有膜中出现大量铁粒沉积,阻碍睾丸的生精功能,致使精子生成受到干扰。新近的研究证实锰缺乏可干扰鼠和家兔精子的成熟,曲细精管出现退行性变,引起精子数量减少,使动物不育。

临床也观察到锌、锰、硒、铁等元素的缺乏,是不育的原因之一。Battersby 肯定精液质量与精浆中锌、铜、锰密切相关,锌不足可引起生育力下降、生殖器官发育不良(如睾丸萎缩)等,最终导致少精、弱精或死精而造成不育。最近发现不育原因还与铁、锰明显降低有关,并证实精液铁含量与锌呈正相关,但铁过量对生育是不利的,慢性铁中毒患者,其生殖器发育不全,这是过多的铁对睾丸损伤的结果。锰与硒等元素与不育的研究报道不多;有人认为缺锰和铁均可引起畸形,硒多也可致畸

形。已发现不育男子精液锰含量减少,锰太少不仅涉及到精子数量的降低,而且还影响到精子的活动力。Behne 提到男性生殖过程还与精液中硒含量有一定关系。精液中硒含量一方面决定于精浆中前列腺分泌物的状态,同时也取决于精子的数量。通过铜对不育影响的探索,证明正常生育男子和不育男性精液中铜离子的改变不同。不育者精液铜含量通常较高,而抑制精子的活动,导致精子活力下降,且明显影响到精子的存活率,使精子穿透宫颈黏液的能力显著降低,并可能干扰孕卵着床。虽然铜对生育的确切功能还有待阐明,但高浓度铜离子的抗生育作用已得到肯定。

三、精子功能的检测

精子功能的检测对于研究精子在体内外的运行、受精能力以及原因不明不育男子的诊治皆有重要的临床实用价值。近年来,体外受精及胚胎移植已取得重要成果,目前已成为治疗男女不育的重要手段,从而促进了人类精子功能检测技术的进展。以往对精子受精能力的评价,主要通过常规精液分析(如精子数量、活率、活力等),由于个体精液存在着很大的自身差异,而且即使常规检查正常者,也可能存在受精能力低下。因此,只靠常规检查很难对精子的受精状况作出客观的判断。

近些年对男子生育能力的检查,以人精子-去透明带金黄地鼠卵穿透试验较为理想,这方面的研究,最初由 Yanaqimachi 报道,其后, Wolf、Margalioth 和 Mahadevan 的研究资料更为详尽。他们的工作提示,以该项穿透试验来衡量人精子的生育力是非常有用和有效的,因为他们发现正常生育男性的精子,对无透明带仓鼠卵细胞的穿透率,较生育力弱或不育者为高,并证明穿透试验或人体外授精结果与精子数量无相关性。然而,人精子的受精能力与体外受精成功率有密切联系。这表明此项试验,对判定精子的获能,顶体反应以及体外受精能力有着重要的生物学意义。临床可将精子的较高穿透率,作为人工授精的特异指标。已知,去除卵丘和透明带的金黄地鼠卵细胞,无种属特异性,故而异种动物的卵子可用于人精子的穿透试验。在有条件时,也可直接以人的成熟卵细胞,在不除去透明带情况下,进行人精子穿透试验。

体内穿透试验,又称为性交后试验,是检测宫颈因素不孕的一种定性方法。据此,可了解性交后一定时间内精子在女性生殖道运行和存活情况。当在宫颈黏液中发现一定数量的活精子,表明不育的原因可能并非由宫颈因素所致。如果未发现精子,即性交后试验阴性者,应多方面寻找原因,如是否不射精或精子在阴道内滞留等。对正常生育妇女而言,若实验时间选择不当(月经周期过早或过迟进行实验)也会出现阴性结果,对排卵不正常的妇女,性交后试验须重复多次进行,并结合体外实验来确定。性交后试验需要准确预测排卵期,试验最好在接近排卵期进行,可根据 BBT、宫颈黏液性状及阴道细胞学检查等项指标推测排卵时间。

体外试验,多以宫颈黏液穿透试验观察精子和宫颈黏液的相互作用,主要包括玻片试验、精子-宫颈黏液接触试验及毛细管穿透试验。这些试验均需要人宫颈黏液作为介质。近年报道人精子易穿透牛宫颈黏液,并认为可以此代替人宫颈黏液。

但研究不育症,目前还是主张采用人宫颈黏液较为可靠。玻片试验是通过在玻片上宫颈黏液与精液接触形成的界面,观察进入黏液中的精子数及活动状态,可作为一种定量方法,检测精子的穿透率。精液-宫颈黏液接触试验,是以精液与宫颈黏液形成的混合物观察活动精子的百分率,目的是检测宫颈黏液或精子自身存在的抗精子抗体,方法简单,可与玻片试验一起列为精子功能检测常规。毛细管精子穿透试验虽然操作复杂,然而这种检查方法可以客观地观察精子的穿透能力,而且还可了解宫颈黏液、精浆与精子相互作用的变化,由此可能发现影响精子运动和穿透能力的精液或宫颈黏液的免疫因素及其病理改变。

精子运动轨迹试验,首先由 Kamidono 报道,用来推测男性生育力。精子活率及运动速度可通过客观图像及数据处理获得,对于分析精子的活动状态有一定意义。此法需要在摄影显微镜下进行,操作有一定难度。用于速度试验可直接用普通显微镜观察,通过计算而得到精子运动速度的数据,方法较简便易行,可作为常规精液分析的辅助指标。

四、精液免疫学检测

现已发现多种精子特异抗原,有来自输精管和附属性腺的精子膜抗原以及位于精子表面和顶体内的乳酸脱氢酶 C₄、乳酸脱氢酶 X、顶体酶、透明质酸酶等。在精浆与精子表面还存在有血型抗原(ABO 抗原系统)、组织相容性抗原(HLA)与分化抗原。在人血清、乳汁、唾液、阴道、宫颈分泌物和胚胎、胎盘、卵巢、脑组织、肿瘤、淋巴细胞等组织与细胞以及细菌(如脑炎杆菌、绿脓杆菌)等均含有与精子交叉的抗原。显然,精子的抗原成分很复杂,随着生殖免疫学的发展,可能还会发现更多的抗原。有关精子的抗原作用很早就有人进行研究,并发现精子有较强的抗原性,能引起自身、同种或生殖道局部的免疫反应,可诱发特异性抗体产生。近年对精子免疫的研究不断深入,加深了对免疫不育机制的认识,已经揭示抗精子抗体 AsAb 是不育的重要免疫因素。

正常情况下由于男性生殖道存在牢固的血睾屏障,将精子抗原与机体免疫系统隔离,因而不会发生抗精子自身免疫。正常女性生殖道与精子接触后,虽有少量的精子经阴道黏膜、子宫内膜等部位吸收,降解,但不致使体内产生相应抗体,这表明女性生殖道也存在着免疫屏障的保护作用。现认为可能精浆中存在的免疫抑制因子,吸附于精子表面,致使精子与女性免疫活性细胞相遇时,同时与精子抗原和免疫抑制因子两种物质接触,从而干扰了免疫活性

细胞的识别和反应的能力。当生殖系统炎症、阻塞、免疫系统遭到破坏等病理改变时,精浆中可能缺乏免疫抑制物,由此导致自身或同种 AsAb 的产生,并诱导发生细胞免疫反应,使精子在生殖道运行、受精乃至着床过程中都可能受致敏了细胞的攻击。存在于血清或生殖道分泌液中的 AsAb,可抑制精子的活动,干扰精子的运行,阻碍精子穿透及精卵结合,使受精发生障碍。即或已受精,也可能影响发育中的胚胎,而造成免疫性流产。

存在于生殖道局部的 AsAb,对受孕过程有不同程度的干扰。而血清含有的抗体,只有在其抗体水平较高时,才可能诱发不育。因自身或同种精子免疫所诱导的 AsAb,由于同种对精子抗原反应较强,因此所致抗体滴度往往较高,对生育的干扰更为严重。而抗体结合在精子表面的部位和数量对受精则起着决定性作用。多认为头部抗体将影响精子与透明带结合,尾部抗体则仅对在女性生殖道运行的精子造成干扰。因此,抗体只有与精子头部结合才会阻碍受精。

尽管免疫不育的原因十分复杂,但 AsAb 对人类生育的干扰是肯定的;男女双方都可因 AsAb 导致不育。根据文献报道,约 25% 不明原因的不孕夫妇可能由 AsAb 所引起。不孕妇女 AsAb 阳性者,其受孕率显著降低。我们的病例观察证实,不孕夫妇 AsAb 阳性占 25%~30%,可见 AsAb 与不育密切相关。这表明检测 AsAb 对免疫不孕的诊断、疗效判定及其病因学研究有着重要临床意义。

目前检测 AsAb 有多种实验方法。根据凝集反应而建立的玻片凝集试验、明胶凝集试验和微量板凝集试验可以检出 IgG 或 IgM 等抗体类型,呈现多种凝集形式。头对头凝集主要为 IgG、IgM 参与,尾对尾凝集多由 IgM 所致,头对尾或尾尖对尾尖凝集多由 IgG 引起,而混合型凝集是由 IgG 和 IgM 引起。有的文献指出测定头对头凝集抗体,玻片法与试管法较为敏感,微量板法则多用于尾对尾凝集抗体。精子制动试验被认为是一种特异的方法,由于精子制动抗体与不育关系更为密切,所以此法对临床诊断意义较大。

间接免疫荧光法(IF)不仅用于检测不孕夫妇血清或宫颈黏液 AsAb,还可应用在精子抗原的定位与分布的研究。Kolk 采用胰酶二硫苏糖醇处理精子,造成精子头肿胀,再进行 IF 测定,以便对精子头部抗原特征进行研究,同时以这种改进后的 IF 对 AsAb 检测的敏感性及其抗体阳性率均有明显提高。

Donders 等人建立的改良酶联免疫吸附法,利用带正电荷的聚氯乙烯板直接吸附精子,克服了以往聚苯乙烯板以戊二醛固定精子,有可能使精子抗原变性的弊端。但因为需要新鲜精子包被,实际使用仍不方便。人 AsAb 的酶免疫吸附方法,以亲和层析技术提纯的人精子膜抗原直接包被处理,效果良好。

混合凝集试验是将结合有 IgG 或 IgA 的羊红细胞或聚丙烯酰胺珠与待检精子混合,然后与抗球蛋白试剂作用所致的凝集反应。可以判定精子表面黏附的抗体,还能够确认 Ig 类型。Pretorius 首创的免疫珠试验,先制备兔抗人免疫球蛋白珠(1B),再用抗 IgG-1B,抗 IgA-1B,抗 IgM-1B 检测待检样品。结果证实抗 IgG-1B 与精子头部(顶体)结合,而抗 IgA-1B 结合于精子尾部(主段)。该两种方法均可准确地判定抗体结合在精子表面的部位,故可作为体外受精治疗前的常规检测方法,以排除免疫因素对受精的干扰。

近年 Hald 等报道应用免疫吸印法检测血清 AsAb,首先由 SDS-PAGE 提纯精子多肽抗原并将这种抗原经 SDS 凝胶转移到醋酸纤维膜上,之后再依次与待检样品、抗人 IgG-酶标记物作用,然后经底物反应,用扫描仪测定抗体含量,由此可精确地测知精子多肽抗体的水平。

检测精子抗原对 T 淋巴细胞的免疫反应,主要用白细胞黏附抑制试验及白细

胞移动抑制试验。借此可了解由于精子抗原的刺激而致敏的 T 淋巴细胞在全身和生殖道局部的免疫状态,有助于研究细胞免疫与不育的关系。

总之,随着免疫技术的进步,新的检测方法会不断涌现,由此将深化对免疫不育的认识,并进一步促进生殖免疫学的进展。

五、精子表面标志的检测

有关精子膜凝集素受体与不育关系的研究日渐受到重视。由于凝集素可与细胞表面相应受体中的糖基专一性结合,因而以外源性凝集素作为精子膜表面糖基的探针,研究精子表面糖链结构的特征及该糖基在精子膜受体与精子识别中所起的作用,将进一步加深对精子表面标志的了解。目前已知细胞膜表面的糖萼,即由糖蛋白及糖脂的寡糖链构成的糖基的变化,直接影响到细胞膜结构与功能。近年来大量的研究表明,正常分化发育程度不同的精细胞,其表面存在数种不同的糖基末端及糖链,细胞在分化发育过程中其相应受体的分布与变化,是与环境中某些因子的刺激及基因表达的调控密切相关的。而且此类效应细胞的产生最先由位于细胞表面的受体、抗原等表面物质所介导。此表面物质主要为一类糖复合物,如含糖链结构的糖蛋白和糖脂等。很多研究者发现精子在成熟、获能过程中,其表面糖基出现一系列变化。有人用荧光素与酶标记的伴刀豆球蛋白 A (ConA) 研究小鼠、大鼠及家兔等动物精子膜表面受体的定位,证实 ConA 受体分布主要集中在精子顶体膜上。用麦芽凝集素(WGA)、大豆凝集素(SBA)及 ConA 检测人精子相应凝集素受体,结果表明三种凝集素皆可引起正常人精子凝集反应。以后陆续发现人精子顶体区域还存在豌豆凝集素(PSL)、花生凝集素(PNA)、蓖麻凝集素(RcA1)以及稻胚凝集素(RGL)等多种凝集素受体。通过扫描电镜可观察到凝集素受体的分布并不均一, WGA 受体多集中于精子尾部, ConA 受体以头部居多, SBA 受体分布则较均一,在精子顶体后区也检出有一定量的 WGA 及 ConA 受体。抗精子膜抗体可导致膜表面 WGA 受体缺失,经洗涤去除抗体的精子膜 WGA 受体可重现。这表明抗精子膜抗体可遮盖 WGA 受体,提示 WGA 受体缺失可由免疫学因素所致,并可能引起男性不育。

检测外源性凝集素引起的精子凝集反应的方法,已由过去的定性或半定量检测发展到以荧光和酶标记的外源性凝集素技术测定凝集素受体。用同位素标记的方法也可直接测定凝集素受体的数目,但仅适用于有同位素设备的实验室。分光光度法可准确定量人精子凝集素受体的数目和功能,较为简便、快速,有一定的临床实用价值。

六、精子处理技术

(一) 精子染色体制备技术

现代遗传学研究揭示了性染色体在性分化发育中起重要作用,而人的生精细

胞发育也受到正常染色体基因组的控制。发生畸变或突变的性染色体及其相应基因,可引起性分化异常。性染色体和常染色体异常导致的生精障碍是某些无精或少精症的直接原因。据调查染色体异常大约占男性不育的 2.2%,高出正常人的 5 倍。由此可见,检查性染色体及性单倍染色体对探讨男性不育病因的重要性。通常临床对不育病人可通过简便的口腔黏膜性染色质,即 X 小体检查,以证实是否有性染色体异常,再进行体细胞染色体检查,进一步观察血淋巴细胞培养的染色体改变的情况。性染色体畸变引起的性分化障碍,临床多表现为男性性腺发育不良,如先天性睾丸发育不全综合征(染色体多为 47,XXY),多 Y 综合征(XYY 综合征)、多 X 多 Y 综合征(XXYY 综合征),男性假两性畸形及混合性性腺发育不全等。而基因突变同样可出现性分化异常,导致真假两性畸形、性早熟、性发育延迟和性发育不全等疾病。

多少年来,对生殖细胞遗传物质的研究,主要是通过不成熟生殖细胞染色体观察。由于精子染色体高度凝集浓缩于精子头部,其结构不同于体细胞染色体,因此,精子染色体的制备难度较大,对精子染色体一直难以直接显现。

1978 年,Rudark 首次报道了人精子单倍染色体制备方法,从而解决了生殖医学、生殖生物学、生殖遗传学以及男性学等学科对男性配子研究的困难。Rudark 制备人精子单倍染色体的技术,是通过精卵穿透试验进行的。通过金黄地鼠卵中的解凝激活因子激活精子头内 DNA,使精子头 DNA 松弛折叠形成中期染色体,最终使精子单倍染色体得以显示。但技术条件要求高;操作难度大,而且存在染色体不易分散、形态模糊、易多精受精等缺憾。其后 Brandriff(1985)及 Kamiguchi(1986)对该方法加以改进,但单倍染色体显带问题并未解决,进而不能准确地判断染色体排序和畸变的程度。经过众多学者的努力,分析人精子染色体的 Q 显带技术得以建立,然而 Q 显带需要较高的费用,实际使用有一定困难。为此,Benet(1986)、Sele(1987)先后发表了人精子染色体的 G 显带和 R 显带方法。目前,国外精子染色体的制备已发展成 Q、C、G 和 R 四种显带方法,其中 G 显带操作简便,易于推广。

由于人精子单倍染色体制备方法及其显带技术的不断完备,近年有关正常男性精子染色体核型分析,为自然性畸变的研究提供了许多信息资料。从体细胞染色体畸变者,特别平衡易位患者的精子染色体重排的研究中,已了解到患者精子染色体畸变情况及其子代出现的畸变类型。目前,人精子单倍染色体制备技术已应用于男性少精症等患者精子染色体的诊断、辐射与药物对精子染色体的影响、中老年精子染色体畸变的研究以及连锁遗传病的预防等。并已成为人工授精中质量优良、高活力精子筛选及 X、Y 精子分离等科研工作不可缺少的检测工具。

(二) 精子冷冻技术

精子冷冻已有 200 余年的历史,最初人们偶然发现存放于冰雪中的精子仍能存活。此后,很多实验证实低温可延长精子的保存期限。20 世纪 30 年代起,对精子冷冻技术的研究更加深入,学者们发现在 -79°C 、 -196°C 和 -269°C 下冷冻的精子可保持其活力。但由于当时的条件限制,低温冷冻的精子大多死亡。因此,难以达

到实际应用。随着现代低温生物学及其相关学科的发展,以甘油为冷冻保护剂(cryoprotective medium, CPM)的发现和液氮冷冻精子技术的问世,使精子冷冻的研究获得了突破性进展,为精子冷冻的临床应用奠定了坚实的基础。自1960年美国首创精子库迄今,精子冷冻保存受到空前重视,低温冷冻技术日趋完备。目前,许多国家已建有精子库。80年代初我国在湖南、青岛等地建立了精子库,冷冻精液已作为人工授精的重要手段。近年精液冷冻方法已发展有多种,超低温冷冻设备及检测工具更加先进,少数国家已实现了精液冷冻程序的微机控制及精子检测手段的自动化。精液冷冻在医学、生物学、畜牧业等许多领域正在得到广泛应用。

根据低温生物学的理论,低温冻储的精子细胞内所含的水分,在冷冻和解冻过程中,出现一系列复杂的理化变化,无CPM冻储的精子细胞内水分遇冷后形成的冰核与冰晶所造成的化学改变及机械损害是不可逆的,精子由于发生膨胀、破裂,最终导致死亡。因此,阻止精子细胞内冰晶的形成,对保护精子的生命至关重要。事实上,冻储精液中部分精子细胞内冰晶的发生,即使在有CPM的情况下也不可能完全避免。现认为冰晶发生于0℃至-60℃冰晶温度带内,因此,精子冷冻时应快速越过冰晶温度带,以减轻冰晶化对精子结构与功能的损伤。处于超低温状态下的精子细胞内水分子运动随温度骤降而显著减弱,故难以形成冰晶。在-130℃下的精子,其细胞内水分子运动停止,无结晶出现,而呈坚硬均匀的玻璃态,从而阻止了其脱水作用,使细胞结构与功能得以保护,因此精子在超低温静息状态下才能存活。而处于复温过程中的精子容易发生蛋白质变性、类脂氧化和代谢紊乱等异常改变。可见掌握适宜的复温条件对复苏后精子存活率的提高也是重要的。一般说来,精子的活动与其自身所含能量有关,由于精子对外来能源很少能够利用,离体后自身能量在运动中消耗殆尽,精子的运动亦随着终止。大量研究证实,低温可减少或停止精子的运动,自身能量不再被耗损,使精子结构与功能得到保护。因此,低温冷冻可长期保存精子。

既往的研究表明,CPM对减少以至避免精子在冷冻—解冻过程的损伤起着关键性的作用。如果没有CPM的保护,冷冻的精子是难以存活的。CPM在保护冷冻精子的生理功能的完整性方面是不缺少的。近年人类精液CPM已由单一甘油发展成多种复合型的CPM。目前已很少单独使用甘油作为CPM,已证实甘油能导致精子超微结构的损伤,严重影响冻融后精子的功能。因此降低CPM中甘油的浓度,对精子有保护效果。近年发展的一种无甘油CPM,可同样有效地保护冷冻的精液。G-Y-C型CPM目前应用较普遍,它的特点是CPM成分简单,易配制,而且有较好的冷冻保护效果。G-Y-C型CPM以含有卵黄为其特征,但以卵黄作为CPM的成分,存在病毒感染原和过敏原的潜在危险,为了安全地保存人类精液,许多学者建议少采用含卵黄的CPM,于是一种无卵黄型CPM随之出现。T-G型CPM是近些年冷冻保存精液使用的一种无卵黄型CPM,特点为不含非人体蛋白,可临时配制,储存时间长,可达3个月以上,其次,T-G各成分可进行质量控制。由于T-G型CPM不含卵黄,消除了可能的病毒感染和过敏性,从而提高了CPM临床应用的安全性。不少报告证实,使用T-G的临床效果优于G-Y-C型CPM。临床使用的T-G

型 CPM 与精液的稀释比一般为 1: 1~ 1: 2, 甘油浓度降至 7.5%, 且不含 Hepes。TEST-G-Y-C 型 CPM 是在含有甘油与卵黄基础上制成的两性离子缓冲系统溶液。据 Prins 和 Weidel 报道, 用此型 CPM 冷冻精液。TES-Tris 缓冲系统能结合游离的 H^+ 和 OH^- , 从而促进溶液和精子的脱水过程。解冻后精子的活力很强, 在宫颈黏液中可达到最大的穿透距离, 然而对去透明带地鼠卵的穿卵率未见增加。新近研究的 TEST-Y-C 型 CPM 不含有甘油, 其他成分与 TEST-G-Y-C 型基本相似。电镜证实用无甘油的 TEST-Y-C 型 CPM 冷冻保存的精子, 其超微结构很少受到损伤, 但冷冻精子的复苏率、运动力、穿透能力都比其他类型的 CPM 差。因此, TEST-Y-C 的冷冻保护效果还有待深入观察。至于 TEST-G-Y-C 型和 TEST-Y-C 型 CPM 的配制方法较其他类型 CPM 复杂, 卵黄仍是 CPM 主要成分, 尚需使用渗透压计, 而一般实验室无此种设备, 所以, 实际应用有一定困难。

最近的研究发现, 加有二硫苏糖醇或细胞色素 c、ATP、HSA 的 G-Y-C 型 CPM, 能显著提高精子的复苏率, 而添加血管松弛素的 CPM 可用于精液的快速冷冻。国内也有人试用蜂蜜制成无卵黄的甘油-蜂蜜 CPM 保存冷冻的精液, 证实是可行的。

如何提高精液冻融后的质量, 不仅涉及到 CPM 的保护作用, 而且降温方式和速度的控制也是重要的一环。精液冷冻储存一般分为快速降温 and 分段变速降温(即缓冻法)二类。速冻法主要是让精子迅速渡过散热期, 以便减少精子内、外冰晶的形成, 不致使精子细胞的体积胀大和细胞内、外溶液中电解质浓度增高, 从而减轻精子膜的损伤, 但达到冰冻点时, 易发生冷休克, 精子伪生化反应及代谢活动都会发生改变, 并直接影响复苏后精子的活力和受精能力。缓冻法有减少精子冷休克及冰晶形成的作用, 降温速度对精子损伤较轻微。

(三) 精子优选技术

在生殖医学中人工授精(AI)、体外受精-胚胎移植(IVF-ET)等优生工程作为治疗各种男女不育和防止严重遗传病后代出生的重要手段已经引起医学界的关注。优生工程也为促进生殖生理、遗传及生物学等多学科的发展展示了广阔的前景。近年 IVF-ET 技术得到了更多的进步, 并日趋完善。在我国(1988 年)已成功地应用体外受精供胚移植, 诞生了首例试管婴儿, 标志着这一领域国内近年研究已获得重要进展。由于 IVF-ET 离不开昂贵的设备和复杂的技术, 且需要较大的耗资, 因此目前 IVF-ET 只能在一定范围内开展。而人工授精(包括阴道内授精、宫颈管授精、及宫腔内授精)技术较为简便, 可直接在临床操作。近年随着精子库的建立, 人们已越来越多地采用冷冻精液进行人工授精, 在不具备冷冻条件的基层医院, 利用新鲜精液人工授精也得到普遍使用。

人工授精最重要的工作是对供精液的优选和丈夫精液的处理。多年来许多学者就这方面的研究进行了不懈的努力。精液洗涤技术是最早被用来改善精液性状的方法。Davajan(1983 年)和 Goldfarb(1984 年)等人将精子通过获能及洗涤处理, 然后用于人工授精, 使受孕率提高。其机制如 Witkin(1983 年)和 Colni(1983 年)所

指出的,精浆中含有抑制受精的因子及较多的前列腺素(可引起子宫痉挛而致腹痛),并可能存在 AsAb 以及免疫黏附物等。因此,他们主张洗涤精液,尽量去除精浆,经离心处理,精浆与精子得以分离,并使精子达到浓缩的目的,以提高精子密度。利用这种方法治疗某些少精不育患者更具有实际意义。还有作者报道采用分段射精法,收集第一部分精液进行人工授精,表明大量活动精子存在于第 1 段精液中,而且精子密度较高,虽然有一定的个体差异,但仍不失为治疗不育症的一种方法。Allen(1985)等采用游泳法分离精子,使活动精子与不动精子分离,可获得高活力精子;而 Harris 提出的终端开口试管法则与游泳法相近。采用玻璃毛纤维柱法可以清除精液内碎片、死精及凝集精子,据此可提高正常活动精子的密度。对于因精子运动无力所致的弱精症,可结合上述分离洗涤技术,并在精液内加入咖啡因等药物,从而增强精子的活力。目前认为以洗涤和离心技术,结合游泳法等分离手段,可获得高活力的精子,效果较单一方法好。

对精子优选技术的研究不断深入,新的精子分离方法相继推出。随着人血清白蛋白柱法、离子交换法、凝胶过滤法及密度梯度离心法的应用,不但对高活力的精子能够达到较理想的优选,而且还可以使 X、Y 精子获得高纯度的分离。后者的实际意义已不仅限于提高人工授精的成功率,更重要的是使对子代性别的选择与控制成为可能。有关此类分离方法,将在 X、Y 精子分离技术章节中详细阐述。

目前国内采用洗涤技术和游泳法收集高活力精子,进行宫腔内 AID 或 AIH 已有报道,相信由于精子洗涤与分离技术的不断改进,精子的优选也将成为人工授精的治疗手段之一。

(四) X、Y 精子分离技术

现代科学较清楚揭示了精子在决定性别上的重要作用。自 20 世纪初以来,科学家们对早期胚胎性别控制及性别鉴定进行了广泛的研究。很早就有人设想对 X、Y 精子进行分离,尽管当时已提出某些精子分离方法,但由于没有找到鉴别 X、Y 精子的可靠手段,控制子代性别的研究并未获得预期效果。60 年代末期,Casperson 首创喹吖因荧光染色鉴别 Y 染色体,使含 F 小体的精子,即 Y 精子得到确认。从而使 X、Y 精子的分离及性别控制获得了突破性进展。

应用电泳法分离 X、Y 精子,最初由 Schrode(1941)报道。其后, Gordon(1957)、Macpherson(1959)与 Vesselivovitch(1961)等人分别对牛精子进行电泳分离,并用分离后的精子做人工授精,其子代性别比率各家报告不一。在此基础上, Bhattacharya 利用沉降技术结合电泳法分离 X、Y 精子,结果表明电泳后阳极端主要为 Y 精子,占 71%,阴极端 70.6% 为 X 精子。James(1982)利用对流电泳分离人精子获得成功。近年,押尾茂使用无载体电泳分离, Y 精子达 80% 以上。许多的实验研究显示,电泳法分离 X、Y 精子有一定的实用价值。

通过凝胶过滤法分离 X、Y 精子,其中 X 精子得率高达 95.3%。Steen(1982)、Achmoelja 和 Quinlivan(1982)先后运用此法分离得到富含 X 精子,精子活率也明显提高。Stephen(1984)对此法进一步改进,用分离获得的 X 精子行人工授精,受孕

率为 67%, 出生女婴占 70%。凝胶过滤后的精子密度低于原精液样品, 但可提供足够人工授精所需要的精子数。目前采用此法分离 X、Y 精子的报道较多, 临床初步应用提示是一种有效的分离 X、Y 精子的方法。

蛋白梯度离心法分离 X、Y 精子, 方法简便, 应用较普遍。Ericsson(1973)用不同浓度 BSA 柱分离获得 80% 的 Y 精子, 其活率达 90.96%。Paul(1979)、Beernink(1982)及 Stephen(1984)采用单层柱法、双层柱法及多层柱法, 分离得到了优质的 Y 精子。Burstain(1985)通过 4 层蛋白梯度分离的 Y 精子占 77.4%, 活率为 92%~100%, 经去透明带金黄地鼠卵穿透试验, 结果穿透率为 100%, 提示分离后的精子受精能力增强。

1977 年, Padma 报道了 Ficoll 梯度离心法分离 X、Y 精子, 分别获得 76.9% 的 Y 精子与 80.6% 的 X 精子。尔后, Satorn(1983)通过 Ficoll 梯度离心得到富含 X 和 Y 的精子。兼子、押尾(1987)采用此法分离的 X 精子高达 95%~98%。

应用离子交换法、毫孔过滤法、玻璃棉过滤法以及免疫抗体法分离 X、Y 精子均有文献报道。由于这些方法都存在一定的不足, 个别方法对精子有损伤, 致使受精能力下降, 有些方法则不能够满意地重复。因此, X、Y 精子分离的方法学研究仍然十分必要。

总之, X、Y 精子分离在畜牧业上应用较多, 用于家畜良种的培育与繁殖, 已经取得可喜的社会效益和可观的经济效益。对于人类分离 X、Y 精子的目的在于有效地控制伴性遗传病的发生, 有利于人类的优生优育, 对提高人口素质有深远的社会意义。

(王春年)

附 录

一、精子染色技术

(一) 改良巴氏染色(Papanicolaou stain)

1. 试剂

(1) 苏木精染液:①称取硫酸铝铵 16g 于适量蒸馏水中加温助溶。②苏木精 0.8g 加入 95% 乙醇 8ml 使之溶解,并与硫酸铝铵溶液混合。③混合液加热至 95℃时,缓慢加入氧化汞 0.6g,搅拌助溶。④然后置低温水浴中冷却、过滤。⑤移入棕色瓶内室温放置 48h,最后加蒸馏水 160ml,再次过滤。

(2) 橙黄 G 染液:

1) 储存液:橙黄 G 结晶 5g 加入 50ml 蒸馏水使溶,以 95% 乙醇稀释至 1 000ml。

2) 应用液:将磷钨酸 0.015g 溶于储存液 100ml 中,装入棕色瓶内。用前过滤。室温可保存 2~3 个月。

(3) 伊红复合染液:

1) 储存液:伊红 Y、俾士麦棕和亮绿 SF 各 10g,各溶于 100ml 蒸馏水中。

2) 应用液:取伊红 Y、俾士麦棕及亮绿 SF 储存液,分别为 25ml、5ml 与 6.25ml,加入 95% 乙醇至 1000ml,最后加 2g 磷钨酸和 0.25ml 饱和碳酸锂溶液,混匀后置于棕色瓶中,临用前过滤。室温可存放 2~3 个月。

(4) 脱色液:

1) 50%、70%、80%、95% 与 99.5% 乙醇。

2) 二甲苯。

3) 酸性乙醇溶液:99.5% 乙醇 300ml,浓盐酸 2ml,用蒸馏水稀释至 1 000ml。

2. 步骤

(1) 精子涂片:将完全液化的新鲜精液充分混匀后吸取 0.1ml 置于小试管内,与 1.9ml 生理盐水混合,振摇使均匀。用尖滴管吸取精子悬液滴于洁净玻片上(如精液中精子过多可增加稀释倍数,或用 1 块载玻片将其一端置于精滴前方,随后稍向后移,触及少许精液,使精子悬液在两玻片间分布均匀。对少精症,可直接取精液涂片或离心取其沉渣涂片),室温干燥。用 95% 乙醇、乙醚混合液(1:1)固定 10min。

(2) 染色程序:①将精液涂片依次用 80%、70% 与 50% 乙醇各浸 10 次,再以蒸馏水浸 10 次。②酸性乙醇浸 2 次,流水洗 3~5min。③依次以 50%、70%、80% 和 95% 乙醇浸 10 次。④橙黄 G 液染 2min,用 95% 乙醇(双缸)浸 10 次。⑤用伊红复合液染 5 分钟,分别以 95% 乙醇(三缸)浸 5 次,99.5% 乙醇浸 2min,再以二甲苯(3 缸)每缸浸 1min,最后封固、镜检。

3. 临床意义

改良巴氏法能清晰显示核染色质,精子形态容易观察,适用于精子细胞、不成熟精细胞的染色。

(二) 勃-利染色(Bryan-Leishman stain)

1. 试剂

(1) 勃氏染液:伊红黄 0.5g,固绿 FC 0.5g、茶酚黄 S 0.5g 溶于 1% 冰醋酸 500ml 中,用前过滤。

(2) 利氏染液:

1) 储存液:伊红亚甲蓝 0.5g 溶于纯甲醇 300ml 中充分混合,置于棕色瓶内;室温避光放置 1 周使其老化,再于 37℃ 温箱中放 48h,随后置阴凉避光处,临用前过滤,可保存 1 个月。瑞氏染液可代用。

2) 应用液:将储存液 50ml 与 pH6.8 PBS 150ml 混合。用前过滤。

3) 乙醇甲醛溶液(pH7.0):37% 甲醛 10ml 与 95% 乙醇 90ml 混合,同时加入醋酸钙 0.05g。

4) α -萘酚: α -萘酚 1g 溶于 40% 乙醇 100ml 中,临用前加入 3% H_2O_2 0.2ml。室温可存放 3d。

5) 焦宁 Y:焦宁 Y 0.1g,苯胺 4ml 与 40% 乙醇 96ml 混合备用。

6) 柠檬酸钠缓冲液(pH7.5):柠檬酸钠 7g 溶于 100ml 生理盐水中。

2. 步骤

(1) 精液制片见改良巴氏染色法。

(2) 染色程序:①10% 乙醇甲醛固定 1min(每次更换新液),随后转入 80%、70% 与 50% 乙醇中各作用 5min(每 3 次更换)。② α -萘酚液作用 4min(每次更换),流水缓慢冲洗 5min。③焦宁 Y 液作用 4min(每周更换),缓流水浸 3 次(每次约 1s),柠檬酸钠缓冲液浸 3min(每次更换),再以蒸馏水浸 1min(每次更换)。④勃氏染液染 15min(每 3 次更换),1% 醋酸浸 2 次,缓流水洗 1min。⑤利氏染液染 30min(每次更换),缓流水浸 1~2 次,随后空气干燥,封固后镜检。

3. 临床意义

此法染色效果比较满意。对正常精子和畸形精子的着色均较清楚。尤其用于头部异常精子的观察。

(三) 精子顶体染色

1. 原理

吉姆萨染液中含有亚甲蓝和伊红两种染料,在一定 pH 下,其有色离子作用于细胞,使细胞结构根据其嗜色特性,选择性地吸附所需染料而着色。

2. 试剂

(1) 瑞氏染液:0.1g 瑞氏染料于乳钵中,边研磨边加入甲醇使之溶解,然后装入棕色瓶内,未溶解部分继续加入甲醇研磨至完全溶解。最后补充甲醇至 60ml。至少室温存放 1 周方可使用。

(2) 吉姆萨染液:

1) 吉姆萨储存液:吉姆萨粉 0.75g,纯净甘油 50ml。甲醇 50ml。用甘油溶解染料,置于 60℃ 水浴 24h,时常振摇,最后加入甲醇混匀即可。

2) 吉姆萨应用液:1 份吉姆萨染液与 15 份 PB 混合即可。

3. 步骤

(1) 精液常规检查后涂片,自然干燥,甲醇固定 5~10min。

(2) 用混合染色液(瑞氏染液 9 份、吉姆萨储液 1 份)染 5min。

(3) 流水冲洗,晾干后油镜检查,计数 200 个精子。

(4) 结果判定,精子顶体分为 4 种类型。I 型:顶体完整、精子外形正常、着色均匀,顶体边缘整齐,可见赤道板。II 型:顶体轻度膨胀,顶体膜疏松膨大。III 型:顶体破坏,顶体膜严重膨胀破损,着色浅、边缘不整。IV 型:顶体全部脱落、核裸露。除 I 型外,均为顶体不完整。

(5) 计算:

$$\text{顶体完整率}(\%) = \frac{\text{顶体完整的精子数}}{\text{精子总数}} \times 100\%$$

4. 临床意义

生育男性精子顶体完整率为 $(90.5 \pm 6.1)\%$,不育男性为 $(84.8 \pm 11.3)\%$ 。

(四) 正甲苯胺蓝过氧化物酶法

1. 原理

当细胞存在过氧化物酶活性时,它可将 H_2O_2 分解,产生新生态的氧,使无色的正甲苯胺被氧化成蓝色的甲苯胺盐,后者进而形成棕色物使细胞着色。

2. 试剂

(1) 饱和 NH_4Cl 溶液(25g/100ml)。

(2) 5% Na_2EDTA 磷酸盐缓冲溶液(pH6.0)。

(3) 正甲苯胺溶液(0.025%)。

(4) 30% H_2O_2 。

(5) 应用液:1 液与 2 液各 1ml,3 液 9ml,4 液 1 滴混匀。此溶液当天配制。

3. 步骤

(1) 新鲜精液 0.1ml 与应用液 0.9ml 混和之。振摇 2min。

(2) 室温静置 30min,再次振摇。取 1 滴涂片,晾干、镜检。

(3) 结果:呈棕色细胞为过氧化物酶阳性,不着色为阴性。

4. 临床意义

未成熟生精细胞与白细胞未经染色较难辨别,染色后生精细胞过氧化物酶呈阴性,白细胞过氧化物酶则呈阳性反应。

二、精浆生化及微量元素的测定

(一) 精浆生化物质的测定

I. 果糖定量测定(fructose quantitative assay)——间苯二酚法

1. 原理

精浆果糖在 90℃ 酸性环境下与间苯二酚一起共温生成红色化合物,其产物的深浅与果糖含量成正比,可用比色法进行测定。

2. 试剂

(1) 5% ZnSO_4 。

(2) 0.15mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 。

(3) 0.1% 间苯二酚(用 95% 乙醇配制)。

(4) 30% HCl 。

(5) 0.2% 果糖标准储液。

(6) 果糖标准应用液: 储液 5ml, 蒸馏水加至 100ml, 果糖最终浓度为 0.1mg/ml。

3. 步骤

(1) 液化的精液以 3 500r/min, 离心 10min, 分离收集精浆按附表 1 操作。

附表 1 分离收集精浆操作方法

试 剂	标准管	测定管	空白管
蒸馏水	1.0	2.9	3.0
糖应用液	2.0	—	—
精 浆	—	0.1	—
5% ZnSO ₄	0.5	0.5	0.5
0.15mol/L Ba(OH) ₂	0.5	0.5	0.5
充分混匀, 于沸水中煮 1min, 经 3 500r/min 离心 15min, 吸取上清液			
上清液	1.0	1.0	1.0
0.1% 间苯二酚	1.0	1.0	1.0
30% HCl	3.0	3.0	3.0

(2) 混合均匀, 90℃ 水浴保温 10min, 呈显色反应(红色)。取出室温冷却, 用 721 分光光度计 410nm 处读取光密度值。以空白调零点。

(3) 结果计算:

$$\text{精浆果糖 mg/dl} = \frac{\text{测定管}}{\text{标准管}} \times 0.1 \times 2 \frac{1}{0.1} = \frac{\text{测定管}}{\text{标准管}} \times 2$$

4. 临床意义

正常人精浆果糖含量为 69~ 535mg/dl。输精管或精囊发育不良所致的无精症, 果糖 0~ 微量。单纯输精管阻塞性无精症果糖含量正常。

II. 精浆肉毒碱测定(carnitine assay)

1. 原理

肉毒碱和乙酰辅酶 A (CoA-S-Ae) 反应, 在肉毒碱酰基转移酶催化下生成乙酰肉毒碱和辅酶 A (Co-A)。Co-A 经 DTNB 作用形成黄色产物, 其颜色深浅与 Co-A 含量成正比。

2. 试剂

(1) 0.1mol/L (pH 7.5) Tris-HCl。

(2) Tris-HCl、DTNB、Co-A 混合液。含 0.1mol/L pH 7.5 Tris-HCl, 0.1 μmol/L DTNB (5,5'-二硫-2-硝基苯甲酸) 和 0.1 μmol/L Co-A。

(3) 氯仿-异丁醇混合液(2: 1)。

3. 步骤

(1) 95% 乙醇 0.5ml, 精浆 0.1ml 混匀, 室温作用 2h, 以 8 000g 离心 10min。上清液置 40℃ 减压蒸发干燥。

(2) 在上述管中加入蒸馏水 2.0ml, 氯仿-异丁醇混合液 3.0ml, 混合 5min, 8 000g 离心 10min。取上清液减压蒸发近干燥。

(3) 另一试管加入 Tris-HCl、DTNB、Co-A 混合液 0.9ml,同时加上述肉毒碱悬液,混匀再加肉毒碱酰基转移酶(每 mg 蛋白质中酶活性为 $8\mu\text{M}$) $0.1\mu\text{g}$, 35°C 作用 30min。实验用蒸馏水作空白对照。

(4) 待测有色溶液于 412nm 处比色。

(5) 计算:制备 $0.01\sim 0.08\mu\text{mol/L}$ 肉毒碱标准系列溶液,从绘成的标准曲线上查得样品中肉毒碱的含量。

4. 临床意义

正常生育力男性精浆肉毒碱含量为 $239.56\pm 105.59\mu\text{mol/L}$ 。现认为精浆肉毒碱含量和果糖含量的变化,常反映附睾、精囊的功能。一般精浆肉毒碱及果糖含量正常,表明附睾、精囊功能正常;当肉毒碱含量高于正常的 50%,而果糖含量降低,则提示精囊功能障碍,附睾功能正常;肉毒碱占正常含量的 50% 左右,果糖含量正常,说明附睾功能障碍,精囊功能正常或输精管阻塞;而肉毒碱含量急剧下降,果糖含量亦减少,显示精囊、附睾功能均发生障碍。此外,肉毒碱含量还与精子活力有关。

Ⅲ. 精液环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)测定

1. 原理

将放射性核素标记的抗原和待测未标记抗原与相应抗体作用,在抗原过量的条件下,两种抗原与抗体竞争结合,然后分离游离和结合的抗原并测定其放射活性从而求出待测抗原的量。

2. 试剂

(1) 抗血清($10\mu\text{l/瓶}$),临用时用 0.2% 人血清白蛋白-醋酸缓冲液稀释成 1: 20 000。

(2) [^3H -2.8]3',5'-cAMP(amershan),比放射性 45Ci/mmol ($1\text{Ci}=3.7\times 10^{10}\text{Bq}$),放射性浓度 1mCi/ml 。用 50% 乙醇稀释 4 倍为 $1\mu\text{Ci}/4\mu\text{l}$ 。测定时经乙酰化后用醋酸缓冲液稀释成 $1\mu\text{Ci}/12\text{ml}$ 。

(3) 标准 cAMP(德国产品)经紫外分析按克分子消光系数计算含量,用 50% 乙醇稀释成每瓶含 $60\text{pmol}/50\mu\text{l}$, -20°C 冻存。工作液用醋酸缓冲液稀释至 $1\text{pmol}/100\mu\text{l}$ 。

(4) 乙酰化试剂:三乙胺、醋酐为 2: 1 混匀,新鲜配制。

3. 步骤

(1) 精液处理:新鲜精液常规检查后分离收集精子和精浆。将精浆与 1mol/L HClO_4 以 2: 1 混匀, $15\ 000g$ 4°C 离心 20min,吸取上清液,调 pH 至 7.0。精子用 PBS 洗涤 3 次,每次 $800g$ 离心 15min,调整精子密度为 $(0.5\sim 15)\times 10^5/\text{ml}$,加入 1/2 体积的 1mol/L HClO_4 (精子悬液体积: HClO_4 体积= 2: 1)用匀浆器匀浆,再以 $1\ 200g$ 4°C 离心 20min,吸取上清液待测。

(2) cAMP 测定:按附表 2 在冰浴中操作。

附表 2 cAMP 测定操作方法

	NSB	零标准管	标准管/($1\text{pmol}/100\mu\text{l}$)				样品管
			0.1	0.2	0.5	1.0	
醋酸缓冲液	200	100	90	80	50	—	50
标准/样品	—	—	10	20	50	100	50
乙酰化试剂	4	4	4	4	4	4	4
^3H -cAMP	100	100	100	100	100	100	100
抗血清	—	100	100	100	100	100	100

依次加样后混匀,置 4℃作用 4~18h。每管加入冷 PB 1ml,随即用微孔滤膜以 53.2kPa (400mmHg)减压抽滤,再用 PB 5ml 清洗试管及滤膜 2 次,滤膜置 80℃烘烤 30min 后浸入 5ml 闪烁液中测量,要求相对误差 < 5%,按常法作图,求得样品内 cAMP 含量。

4. 临床意义

Gray 测定精子内 cAMP 含量为 $10\text{pmol}/10^8$ 精子;精浆 cAMP 含量为 30~130nmol/ml。蒋宁等测定 51 例正常人精子内 cAMP 含量为 $9.03 \pm 0.60\text{pmol}/10^8$ 精子,其中 15 例精浆含量为 $14.21 \pm 2.33\text{nmol}/\text{ml}$ 。据研究精子于附睾内成熟并获得运动能力,而 cAMP 在其中起重要作用,外源性 cAMP 可使附睾内无运动能力的精子产生运动,这表明 cAMP 对精子运动、获能和顶体反应是不可缺少的。因此,观察不育男性精子和精浆 cAMP 的变化,可能作为不育症临床诊断的检测项目。

(二) 精浆酶的测定

I. 精浆中性 α -葡萄糖苷酶测定

1. 试剂

- (1) 0.1mol/L 磷酸缓冲液,其中含十二烷基硫酸钠(SDS),可抑制 α -葡萄糖苷酶酸性同工酶。
- (2) 5g/L 对硝基苯酚 α -D-吡喃葡萄糖苷(*P*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside,PNPG)。
- (3) 1mol/L castanospermine,可抑制 α -葡萄糖苷酶。
- (4) 5mol/L 的对硝基苯酚(PNP),用于标准曲线的制作。

2. 步骤

- (1) 实验管:将待测精浆 10 μ l 加到含 100 μ l PNPG 的试管内。
- (2) 精浆对照管:将待测精浆 10 μ l 加到含 100 μ l PNPG 和 1mol/L castanospermine 5 μ l 的试管内。
- (3) 空白对照管:加 10 μ l 双蒸水到含 100 μ l PNPG 的试管内。
- (4) 振摇各管后,将各管均放入 37℃水浴中孵育 4h,孵育结束后,每管均加 1ml 0.1mol/L Na_2CO_3 振摇后,每管各取 250 μ l 加到 96 孔板内,同时配制 PNP 标准液,也加入 96 孔板,用 Sigma 960 酶标仪在 405nm 波长处测各孔吸光度。
- (5) 结果计算:以在 37℃时,每 min 产生 1 μ l mol/L PNP 作为一个单位。精浆中性 α -葡萄糖苷酶活性 = $A/S \times F$ (mU/ml)。

A:等于总吸光度减去平均精浆对照管吸光度。

S:标准曲线的斜率。

F:等于总体积单位 $\div$ 标本体积单位 $\div$ 240min=0.46。

3. 临床意义

1998 年王春年报道精浆中性 α -葡萄糖苷酶的正常值为 23.31 ± 15.31 mU/ml。精浆中性 α -葡萄糖苷酶主要由附睾产生,前列腺可产生酸性 α -葡萄糖苷酶。因此,以往测定的精浆总 α -葡萄糖苷酶的含量的意义就有一定的局限性;可作为附睾的功能指标以及无创伤性了解输精道通畅情况的指标。

II. 精浆酸性磷酸酶(acid phosphatase,ACP)测定

1. 原理

在酸性条件下,精浆酸性磷酸酶催化对硝基苯酚磷酸酯,使其水解释放出对硝基苯酚,后者在碱性环境中生成黄色化合物,可用比色法测定其含量。

2. 试剂

(1) 0.09mol/L pH4.8 柠檬酸缓冲液。

(2) 5.5mmol/L 对硝基苯酚磷酸二钠(临用时以 0.09mol/L 柠檬酸缓冲液按 1: 1 稀释,作为基质液)。

(3) 0.1mol/L NaOH 溶液。

3. 步骤

(1) 完全液化之精液,以常速离心分离精浆,用 0.9% NaCl 1: 10 000 稀释。将 0.1ml 基质液,37℃ 预温 5min 后与稀释精浆 0.2ml 混匀,37℃ 保温 30min。同时以 0.9% NaCl 作为空白对照。

(2) 快速加入 0.1mol/L NaOH 5ml 混匀,显色。在 410nm 处测光密度。

(3) 结果计算:将 10μmol/ml 对硝基苯酚标准储液用 0.02mol/L NaOH 稀释为 10~100μmol/ml 浓度,绘制成标准曲线,根据光密度值在标准曲线上求出产物浓度 μmol/ml,并以下式计算酶的活性。

$$\text{IU/ml} = \frac{\text{产物浓度}(\mu\text{mol/ml}) \times 6.2 \times \text{精浆稀释倍数}}{30 \times 0.2 \times 1000}$$

4. 临床意义

精浆 ACP 正常值为 80~ 1000IU/ml。前列腺炎时,ACP 下降,而良性前列腺肥大、前列腺癌精浆 ACP 则增高。

(三) 精浆微量元素的测定

略。

(四) 精液脂质过氧化物检测

I. 精液 SOD 测定(改良邻苯三酚法)

1. 原理

邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化,并在自氧化过程中释放出超氧游离基(O_2^-)产生有色中间产物。而 SOD 可催化 O_2^- 与 H^+ 结合生成 O_2 和 H_2O_2 ,由此阻止中间物的积累,通过计算求出 SOD 的活性。

2. 试剂

(1) 95% 乙醇-氯仿混合液(1: 1, V/V)。

(2) 100mol/L pH8.2 Tris-二甲胍酸钠缓冲液(内含 2mol/L 二乙基三氨基五乙酸)。以 200mol/L Tris-二甲胍酸钠 50ml(内含 4mol/L 二乙基三氨基五乙酸)加 200mmol/L HCl 22.38ml,再用双蒸水稀释至 100ml。

(3) Triton X-100 溶液。

(4) 硝基氮蓝四唑(NBT)溶液。

(5) 7.0mmol/L 邻苯三酚应用液。用 10mmol/L HCl 配制 4℃ 保存。

(6) SOD 纯酶标准品

3. 步骤

(1) 以手淫法或取精器排精,收集精液于洁净、干燥塑料杯中。观察精液液化时间及精液常规分析。离心分离精子和精浆,吸取精浆置于 -20℃ 保存。

(2) 测定时取精浆 0.05ml 加入双蒸馏水 0.4ml 混匀后再加乙醇-氯仿混合液 0.2ml, 振荡抽提 5min。按附表 3 程序加入试剂。

附表 3 改良邻苯三酚法试剂加入程序

试 剂	测定管/ml	空白管/ml
SOD 粗提液	0.1	
双蒸水	0.4	0.5
缓冲液	1.0	1.0
Triton X-100	0.2	0.2
NBT 溶液	0.5	0.5

混匀, 置 35℃ 水浴 20min。再加入邻苯三酚应用液 20 μ l, 准确计时作用 6.5min。随即加甲酸缓冲液 0.5ml 终止反应。倒入比色杯中, 空白管调“0”。用 570nm 波长测定 OD 值。另取 0.1ml SOD 粗提液用 KCN 液处理, 再按前述步骤测定, 计算得非 CuZn-SOD 的干扰物相应含量, 使其从样品 SOD 含量中去除。

(3) 结果计算:

$$\text{抑制率(I)} = \left[1 - \frac{\text{样品 OD}}{\text{空白 OD}} \right] \times 100\%$$

结果由 I 在 SOD 标准曲线上得样品 SOD 浓度, 其含量以每毫升精浆所含标准 SOD 酶的微克数表示(μ g/ml)。

4. 临床意义

据报道精浆中 CuZn-SOD 含量远较血浆为高。测定结果显示生育男子和不育男子精浆中 CuZn-SOD 含量往往随精子密度上升而增加, 并亦随精子活动度增加而升高。而不育患者的精子计数在 $(60 \sim 100) \times 10^6$ 个/ml 时, 其精浆 SOD 含量大多正常。结果不育组 CuZn-SOD 含量为 $11.3 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$ 生育组为 $11.8 \pm 2.5 \mu\text{g/ml}$ 。研究还发现无精、少精症病人精浆 SOD 以及 Zn 含量均降低。可见 SOD 含量或活性和精子质与量有关。

三、精子功能的检测

(一) 人精子穿去透明带仓鼠卵试验(hamster egg sperm penetration test)

1. 试剂

BWW 液(Biggers, whitten and whittingham solution)

(1) 储备液: 见附表 4。

附表 4 储备液

储 备 液		BWW 应用液	(100ml 储备液加)
NaCl	5.540g/L	NaHCO ₃	210mg
KCl	0.356g/L	Glucose	100mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.250g/L	乳酸钠	0.37ml
KH ₂ PO ₄	0.162g/L	丙酮酸钠	3mg

续表

储备液		BWW 应用液	(100ml 储备液加)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294g/L	白蛋白	350mg
Phenol red	1.0m/L	青霉素	10 000 单位
		硫酸链霉素	10mg
		HEPES	20mmol/L

(2) 1.0g/L 透明质酸酶,用前以 BWW 配制。

(3) 1.0g/L 胰蛋白酶,用前以 BWW 配制。

(4) 甲醇-冰醋酸-水溶液(4: 1: 0.75)

(5) 低渗液,0.075mol/L 氯化钾和 1% 枸橼酸钠(3: 2)

2. 步骤

(1) 精液处理:37℃水浴液化后,用 3 倍容积 BWW 洗涤精子 3 次(600g× 5min),弃除上清液。精子小球用含 3% HAS 的 BWW 1ml 将精子重新悬浮。置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 4~ 5h,使精子获能。然后用 BWW 将精子的浓度调节为 10× 10⁶/ml。

(2) 卵子采集:取 10~ 12 周龄的雌性金黄地鼠,先观察 1~ 2 个性周期。以阴道口出现白色分泌物为周期第 1d,当日上午腹腔注入 20~ 50 单位孕马血清促性腺激素(pregnant mares serum gonadotrophin,PMSG),从而促进卵泡发育,增加成熟卵泡的数量。56h 后再注入人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin,hCG)30~ 50 单位诱发排卵。注射后 16~ 18h 处死动物,剖腹,切断输卵管伞端,取出卵巢浸于 BWW 培养液中。在解剖镜下用解剖针从伞部插入刺破卵泡,冲洗卵泡腔,使附有卵丘的卵子进入培养液内。每只超排卵的金黄地鼠可获得 40~ 60 个卵子。将带卵丘的卵子移至含有透明质酸酶(1.0g/L)的 BWW 培养液中,室温作用 10min,使卵丘细胞分散,再用 BWW 培养液洗涤 2 次。取无卵丘的卵子用胰蛋白酶作用,立即镜下观察,可见透明带在 1min 左右很快溶解。经酶消化去除透明带的卵子,用 BWW 洗涤 2 次,以清除残留的胰蛋白酶。

(3) 精卵授精:含有获能精子的获能液(精子数为 10× 10⁶/ml)400μl 与 50~ 70 个去透明带的卵子一起移到无菌受精小皿(1.8cm× 1.8cm)内,加盖置 37℃ 5% CO₂ 中受精 3h。吸出卵子用 BWW 培养液洗 3 次,除掉黏附的精子 and 卵子表面附着物,加入低渗液,37℃ 低渗作用 5min。再以固定液处理 3~ 5min,吸出卵子滴于洁净玻片上(玻片背面有划圈标志),待固定液自然散开、晾干。

(4) 结果观察:相差显微镜下可见受精卵胞浆内含有肿大的精子头(去透明带卵可被多个精子穿透),相对应的卵细胞膜上则附有精子尾。胞浆内出现的精子头呈清亮区。也可用 0.25% 乙酰卡红或 0.3% 乙酰间苯二酚蓝染色 15~ 20min,精子头部被染成黑色斑块。

(5) 计算:ZSPT 结果以卵子受精率(卵子被精子穿透的百分率又称精子穿透率)和受精指数(穿透卵子的精子总数与卵子总数之比)表示。

$$\text{卵子受精率} = \frac{\text{受精卵子数}}{\text{卵子总数}} \times 100\%$$

3. 临床意义

正常人精子受精率> 10%,不育男性则< 10%。部分不育者精子穿透率也较高,但每卵穿透的精子数很少,因此确定精子受精指数更有意义。生育男性精子受精指数最低标准为每卵穿透数为 5。低于 5 说明生育力下降。少精、弱精症精子受精指数往往低下。ZSPT 作为检测精子的受

精能力,获能及顶体反应的方法,有其重要的应用价值。

四、精液免疫学检测

(一) 精浆免疫抑制因子(DF₂)测定(双抗体夹心 ELISA 法)

1. 原理

在包被有抗体的固相载体上,加入待检样品,其相应抗原即结合到固相抗体上,洗去未结合的抗原。已结合在固相抗体上的抗原再与酶标抗体作用,使之形成抗体-抗原-酶标抗体复合物。然后洗涤除去未结合的游离酶标抗体,最终加入相应底物,此时固相化的酶催化底物反应生成有色产物,通过测定显色产物的程度,即可测知待检抗原的含量。

2. 试剂

- (1) 包被液:0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液。
- (2) 稀释液:0.02mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(含 0.05% Tween-20)。
- (3) 洗涤液:0.02mol/L pH7.4 Tris-Tween 溶液。
- (4) 底物溶液:0.1mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(上液 10ml 底物溶液中含邻苯二胺 4mg,3% H₂O₂ 0.5ml)。

(5) DF₂ 制备:将正常人精浆在 4℃ 15 000g 高速离心 1h,吸取上清液在 0.05mol pH7.4 PB 溶液中透析 24h,然后通过葡聚糖凝胶 G100 层析柱及 DEAE 纤维素柱层析分离提取。

(6) 抗 DF₂ 抗体:由 DF₂ 免疫新西兰大白兔制得,再经 DEAE 纤维素柱层析提纯。

(7) DF₂ 标准参考品,用时稀释成浓度为 1、2、5、10、25、50、100 与 200μg/ml。

(8) 抗 DF₂-HRP 结合物,采用过碘酸钠法制备,工作浓度 1:1200。

3. 步骤

(1) 将 40 孔微量反应板用抗体包被后,各孔依次加入待检精浆和 DF₂ 标准参考品 100μl,37℃ 温育 90min,洗涤 3 次。

(2) 每孔加酶标抗体 100μl,同上温育洗涤。

(3) 加底物溶液 100μl/空,37℃ 作用 30min,以 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,在 490nm 处测其吸光值(A)。以 DF₂ 标准浓度的对数为横坐标,A 为纵坐标绘制标准曲线,由此可查得标本中 DF₂ 的含量。

4. 临床意义

正常男性精浆中 DF₂ 含量为 0.2~3.45mg/ml,平均为(1.32±0.72)mg/ml。

检测精浆 DF₂ 水平,可为免疫不育以及性病的研究提供有价值的资料。

(二) 精浆 IgG、IgA、IgM 与 IgE 测定(双抗体夹心 ELISA 法)

1. 原理

见精浆 DF₂ 测定。

2. 试剂

- (1) 抗人 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体。
- (2) 人 IgG、IgA、IgM 与 IgE 标准。
- (3) 人 IgG、IgA、IgM 和 IgE 的酶标记 McAb。
- (4) 其余试剂同 DF₂ 的测定。

3. 步骤

基本过程同精浆 DF₂ 的测定法,先用抗人免疫球蛋白血清包被微量反应板,再加入待检精浆与之反应,洗涤后加入酶结合物,温育、洗涤,再与底物反应,显色者表明待检样品中含有对酶标记的 Ig 类单抗的特异 Ig 成分,据此可确定精浆中 Ig 类的含量。

4. 临床意义

正常男性精浆中 IgG、IgA 和 IgM 含量各为 $(28.6 \pm 16.7) \mu\text{g/ml}$ 、 $(90.3 \pm 57.7) \mu\text{g/ml}$ 与 $(2.3 \pm 1.9) \mu\text{g/ml}$, IgE 含量极低。不育男性三者分别为 $(30.8 \pm 19.2) \mu\text{g/ml}$ 、 $(96.5 \pm 41.78) \mu\text{g/ml}$ 和 $(2.1 \pm 1.8) \mu\text{g/ml}$;而精子抗体阳性者 IgM 为 $(4.1 \pm 4) \mu\text{g/ml}$ 。正常人精浆中分泌 IgA 含量很低,而生殖器炎症患者,分泌 IgA 含量增高,可能对生育有一定干扰。

(三) 混合凝集反应(mixed agglutination reaction, MAR)

1. 原理

先制备吸附有人 IgG 的乳胶颗粒或绵羊红细胞,然后将精液与包被的乳胶粒一起作用,再与抗人 IgG 抗血清反应;如果精子包被有 AsAb,可形成活动的精子与乳胶粒的混合凝集物。反之,乳胶粒则互相黏着成团。

2. 试剂

(1) 人 IgG 包被的乳胶颗粒或绵羊红细胞。

(2) 抗人 IgG 抗血清。

3. 步骤

(1) 在载玻片上并排加 1 滴新鲜精液,1 滴包被的乳胶颗粒和 1 滴抗人 IgG 抗血清。

(2) 用玻片尖先将精液与包被的乳胶颗粒混合,再与抗人 IgG 抗血清混匀,然后盖上盖玻片。

(3) 分别于 2min 至 10min 时,用光学或相差显微镜($400\times$)观察。

4. 结果判定

大量的活动精子黏附在乳胶颗粒周围,甚至形成大块凝团,说明精子表面存在 AsAb。活动精子黏着乳胶颗粒的程度,开始是一些活动精子周围黏着几个或一串乳胶颗粒来回游动,逐渐凝块越来越大,相互黏附的精子团只能原地摆动。如果精子在乳胶颗粒之间自由游动,表明精子无 AsAb,可见乳胶颗粒相互黏附成团成堆。计数黏附有乳胶颗粒的活动精子百分率。

阴性:偶见混合凝集,吸附有乳胶颗粒的活动精子 $< 10\%$ 。

阳性:黏到乳胶颗粒上的活动精子占 $10\% \sim 90\%$ 。

强阳性:活动的精子黏附于乳胶颗粒 $> 90\%$,并形成典型的混合凝集块。

5. 临床意义

$10\% \sim 40\%$ 活动精子黏附在乳胶颗粒上,为可疑免疫性不育, $> 40\%$ 精子黏附有乳胶颗粒,可诊断免疫性不育。

(四) 免疫珠试验(immunobead test, IBT)

1. 原理

精子表面含有 AsAb 时,可吸附于抗人 IgG、IgA 或 IgM 免疫珠上。据此,可检测其抗体类型。

2. 试剂

(1) Baker 液。

(2) 羊抗人 IgG、IgA 和 IgM 免疫珠。

(3) 致敏绵羊红细胞。

3. 步骤

A. 直接法:检测精子表面 AsAb。

(1) 分别取 3 份新鲜待检精液,各 1 滴,依次与 1 滴最适稀释度的羊抗人 IgG、IgA 和 IgM 免疫珠混匀,加盖玻片。

(2) 置温盒中 1h,镜下(400×)观察。

B. 间接法:用于检测精浆、血清或宫颈黏液中 AsAb。

(1) 新鲜绵羊红细胞用 PBS(pH7.4)洗 3 次,配成 4% 红细胞悬液,加入合适浓度的人 IgG,在搅拌下滴加等体积的戊二醛,置室温作用 15min,再用 PBS 洗 3 次,恢复至原细胞浓度。

(2) 将直接法证实阴性的正常精液(存活率>70%),用 Tyrode 液将精子数调整为 $(20 \sim 50) \times 10^6/\text{ml}$ 。

(3) 待测灭活血清与精子悬液各 50 μl 混合液,37℃ 水浴温育 1h,使正常精子被样品中可能存在的 AsAb 致敏。随后,用 Tyrode 液洗 2 次。

(4) 在载玻片上,先后加血清处理后的精子悬液、羊抗人 IgG 血清及 4% 致敏红细胞各 1 滴,混匀后加盖玻片,用光学显微镜(400×)观察。

(5) 结果免疫珠黏附的活动精子 72% 为阳性。

4. 临床意义

一般认为,50% 以上的活动精子与免疫珠结合,将导致精子穿透宫颈黏液的能力明显下降。IBT 可确定 AsAb 类型及结合部位。此法不育妇女 AsAb 阳性率为 27.4%,生育夫妇皆为阴性。

(五) 白细胞黏附抑制试验(leukocyte adherence inhibition test LAIT)

1. 原理

正常人外周血液中的白细胞具有黏附于玻璃或塑料表面的特性,当与精子抗原作用后,被致敏的淋巴细胞黏附能力明显受到抑制。其机制可能是抗原使致敏淋巴细胞释放一种黏附抑制因子。

2. 试剂

(1) Hanks 液。

(2) RPMI-1640 培养液。

(3) 泛影葡胺-聚蔗糖分离液。

3. 步骤

(1) 精子抗原处理:取常规检查正常的人精液(精子密度 $60 \times 10^6/\text{ml}$,精子活动率>70%,精子活力良或较好)0.5ml,用 Hanks 液洗涤 3 次,每次 1 000 r/min ,离心 15min,弃上清。用 1 640 培养液将精子浓度调整为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。

(2) 白细胞分离:取受检者外周静脉抗凝血 3ml,与 Hanks 液等倍稀释。用 2ml Percoll 液密度梯度离心,1 500 r/min ,离心 10min。吸出分离液界面的白细胞层,以 Hanks 液反复洗涤 3 次,同上离心,弃去上清。用 1640 培养液将白细胞悬液调至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

(3) 黏附前计数:取 0.25ml 白细胞悬液与等量 Hanks 液混匀,取其 0.1ml 加白细胞稀释液 0.1ml。计算计数器上 10 大格白细胞总数,作为黏附前计数。

(4) 温育:于 3 支试管中分别加入精子悬液、1:10 旧结核菌素和 Hanks 液各 0.25ml,然后,每管加入白细胞悬液 0.25ml 混合均匀,依次作为实验管、阳性对照和阴性对照管。将试管置于 37℃ 水浴箱中温育,每 5min 轻摇 1 次,作用 30min。

(5) 白细胞贴壁黏附:将试管内液体流至试管的 4/5 处。置于 37℃ 温箱温育 1h。

(6) 黏附后计数:取出试管直立混匀,吸出 0.1ml 白细胞悬液与白细胞稀释液 0.1ml 混匀,按前法计数,计算黏附百分率。

(7) 结果计算:

$$\text{黏附率} = 100 - \left[\frac{\text{黏附后计数} - \text{精子中白细胞}}{\text{黏附前计数}} \times 100 \right]$$

$$\text{白细胞黏附抑制指数} = \left[1 - \frac{\text{加抗原黏附率}}{\text{不加抗原黏附率}} \right] \times 100\%$$

4. 临床意义

正常人白细胞黏附抑制指数 < 10%, 大于 10% 为阳性。男性不育及输精管绝育术后可产生对精子抗原的细胞免疫反应。

五、精子表面标志的检测

荧光染色法(fluorescence staining assay)

1. 原理

精子表面含有凝集素受体可与相应凝集素发生特异性反应,当含有 ConA 受体的精子与 FITC-Con-A 作用后,可使精子呈现荧光。

2. 试剂

(1) Tyrode 液(见后)。

(2) 异硫氰酸荧光素盐标记的伴刀豆蛋白 A (FITC-ConA), 临用时配成 1mg/ml 浓度。

3. 步骤

(1) 在 1ml 新鲜液化的精液中加入 4~5 倍体积的 Tyrode 液,使之充分混匀。以 1 500r/min 离心 10min,如此洗涤 3 次,最终制成 10^7 个/ml 的精子悬液。

(2) 在载玻片上滴加 2 滴精子悬液制成涂片,室温自然干燥。

(3) 滴加 2 滴 FITC-ConA 染液,置 37℃ 孵育 15min。取出覆以盖玻片,用荧光显微镜观察。

(4) 结果:精子膜表面 ConA 受体分布主要集中于精子头部顶体区,正常精子标记阳性率 > 95%。

六、精子处理技术

(一) 精子染色体制备技术

I. 睾丸精子染色体制备

1. 原理

对睾丸组织和精液中(如某些少精症含有多量原始生精细胞)处于减数分裂阶段的生精细胞,经低渗、固定处理,气干制片,最后通过显带方法获得减数分裂染色体的核型。

2. 试剂

(1) 植物血凝素:10ml 培养液加 10mg 即可。

(2) RPMI 1640 培养液。

(3) 肝素:每支 2ml,含肝素 12 500U。取 1ml 加无菌生理盐水 10.15ml,调至浓度至 500U/ml,每瓶分装 0.15ml,4℃ 保存。

(4) 秋水仙素:称取 1mg 加生理盐水 125ml,浓度为 $8\mu\text{g}/\text{ml}$,置 4°C 备用。

(5) $1/15\text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液。

(6) 低渗液:称取 5.6g KCl 溶于 1 000ml 双蒸水中即可。

(7) 甲醇:冰醋酸固定液(3: 1)

3. 步骤

(1) 将睾丸组织以 1% 枸橼酸钠低渗溶液洗涤,并用细镊剥掉生精小管鞘,洗涤后的生精小管移入含有 1% 枸橼酸钠溶液培养皿内,然后用细镊将生精小管逐根轻轻拉直。

(2) 生精小管再移至另一含 1% 枸橼酸钠溶液 20ml 的培养皿中低渗处理。每次洗涤时间在 5min 左右。

(3) 用细镊子钳住数根生精小管置于玻片上,并反复钳起 3~ 4 次,除去枸橼酸钠液体,随即放入固定液内固定 15min 后制片。

(4) 从固定液中取出生精小管移入含有 0.5ml% 冰醋酸的小离心管中,待生精小管变成透明,叩击管壁数下使生精细胞与冰醋酸混匀,取出精小管弃之。

(5) 用吸管吸取悬液 1 滴置于预先加热的洁净载玻片上,再将原滴悬液吸回,重滴在玻片的另端,重复 3~ 4 次,弃去生精小管残余液体,并制片。

(6) 精液染色体制备:

1) 在液化精液中加入 $25\mu\text{g}$ 秋水仙素, 37°C 水浴作用 30min。再加入等量的 0.075mol/L KCl 溶液混匀,室温沉淀 30min,弃去黏液。收集上清液 $1\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min。

2) 于沉淀物中再加 KCl 8ml 处理 30min,同上离心,弃上清液。

3) 加固定液 8ml, 4°C 固定 2h,如此重复固定数次直至透明。

4) 最后加少许新配制固定液制成细胞悬液,用火焰法气干制片。

II. 精子单倍染色体制备(sperm haploid chromosome preparation)

1. 原理

精子穿透金黄地鼠卵后,借卵中的解凝激活因子作用于人精子头部的 DNA,以秋水仙碱阻止原核融合和纺锤丝形成,经低渗、固定、老化等过程,获得人精子单倍染色体显带核型。

2. 试剂

(1) 精子获能液。

(2) 受精后培养液。

(3) $500\mu\text{mol/L}$ 钙离子载体 Ca-ionophore A23187 溶液:10mg A23187 溶于 DMSO 19.12ml 中。然后按 0.025ml、0.05ml 及 0.075ml 分装于 5ml 小瓶中。以上避光配制。原液 -20°C 避光冻存,可保持活性 3 个月。此液的作用是加速精子获能。

(4) 鬼臼毒素-长春新碱溶液:称取 1mg 鬼臼毒素用少量 DMSO 溶解,加蒸馏水至 5ml, 4°C 保存。取 0.1ml 原液加蒸馏水 4.9ml,最终浓度为 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 。长春新碱浓度和配制法与鬼臼毒素相同。用时两液各取 0.1ml 与受精后培养液 1.8ml 混匀。在培养皿内加入混合液 0.5ml,受精后培养液 1.5ml,鬼臼毒素与长春新碱最终浓度各为 $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(5) 低渗液:0.075% KCl 和 1% 枸橼酸钠,临用前以 3: 2 配制。

(6) 固定液:固定液 A,甲醇、冰醋酸、蒸馏水(5: 1: 2.5)混合液;固定液 B,甲醇、冰醋酸(3: 1)混合液。固定液 C,甲醇、冰醋酸、蒸馏水(3: 3: 1)混合液,

(7) 4% 吉姆萨工作液, $1/15\text{mol/L}$ PBS 配制。

3. 步骤

(1) 卵子的制备见 ZSPT。

(2) 精子的制备:

1) 手淫法采精,射出的精液置 37℃ 30min 使其充分液化。

2) 取 10 支试管,每管加入 2ml BWW 液,然后将液化精液均量加到 10 支试管底部,37℃ 5% CO₂ 中静置 1h。收集含有高活力精子的上层液,600g 离心 5min,上清液弃之,再用 BWW 液 5ml 洗 1 次。

(3) 精子获能:

1) 精子沉粒中加入含 10 μ mol/L/ml A 23187 的 BWW 液 5ml 作用 10min,洗涤 1 次。用少量 BWW 获能液制成高浓度的精子悬液。

2) 在 1 个培养皿(35mm $\times$ 12mm 内)分别制备 1 个获能液滴和 2 个受精液滴(液滴量各为 0.05ml),其上覆盖石蜡油,起到防止水分丢失和固定液滴的作用,置 37℃ CO₂ 培养箱中备用。

3) 精子悬液加到获能液滴内,CO₂ 培养箱中获能 4h。若无 A23187,可用 BWW 获能液稀释精子至 1 $\times$ 10⁷/ml,含有精子的试管成 20°角置于 CO₂ 培养箱中获能 18~ 24h。收集数个试管中的精子悬液,去除沉积于管壁上不活动和死亡的精子,然后 600g 离心 5min,上清液弃之,再用少量获能液将精子调整为浓度较高的悬液,取其 0.1ml 置于培养皿中便成 1 个液滴,并用含 0.3% HSA 的 BWW 液制成两个受精液滴,操作见(2)步骤。

(4) 受精:

1) 解剖镜下用微细管吸取卵子移至 1 个受精液滴中,再吸取精子悬液内高活力的精子加到含卵子的液滴内,精子密度为 1 $\times$ 10⁷/ml。置 37℃ CO₂ 培养箱中。

2) 不断观察卵子表面附着的精子数,待大部分卵表面附有 20~ 30 个精子后,吸出加至另 1 个受精液滴内。精子密度为(1~ 10) $\times$ 10⁴/ml。孵育 2h,其间见到卵子在液滴中旋转者,受精效果最佳。

(5) 受精后培养:

1) 在培养皿(35mm $\times$ 12mm)内加入 1.5ml BWW 培养液,覆以石蜡油,预温至 37℃。

2) 含受精卵的液滴用卵子培养液洗涤 2 次,吸取受精卵转移到上述培养皿中(卵子易相互黏着,应彼此分开)CO₂ 培养箱放置 4h。

3) 加入 0.05 μ g/ml 的鬼臼毒素,长春新碱溶液(此步骤能防止核融合并阻断纺锤体形成)继续培养 11h。

(6) 染色体制片:

1) 低渗:吸取培养后的受精卵(取卵前都先吸少许低渗液)加至 37℃ 预热的低渗液中,处理 20~ 40min。

2) 固定:低渗后的卵子移至固定液 A 中,作用 5~ 7min,每次处理的卵子为 10~ 15 个。此时卵子体积增大,颜色则由初固定时棕褐色转成白色,即刻吸出滴于载玻片上(滴片前用固定液洗片 1 次)。使随卵吸出的固定液 A 在玻片上展开,再用固定液 B 缓缓覆盖卵子(先慢慢在其表面上熏),将卵子再次固定,牢牢贴附在玻片上,然后以固定液 B 作用 5min,制片再转入固定液 C 中处理 1min。从固定液 C 中小心缓慢取出,温湿空气吹干,由此可得分散良好的精子染色体。最后用吉姆萨液染色 30min,镜检。

III. 染色体分带制备

(i) G 显带

1. 试剂

(1) pH7.0 ICN 液:NaCl 0.8g,Na₂HPO₄· 12H₂O 0.3g,KH₂PO₄ 0.02g 蒸馏水加至 100ml。

(2) 0.04% 胰酶溶液。

(3) 4% 吉姆萨染色;用前以 pH7.0 0.015mol/L PBS 1: 20 稀释。

2. 显带过程

(1) 染色体制片后放室温老化 1 周,再置 60℃ 烤箱内烘烤 2 天。

(2) 将 0.04% 胰酶液 50ml 以 3% Tris 液调 pH 至 7.2~ 7.4,移至玻璃缸内,37℃ 水浴预热 15~ 30min。

(3) 烤过的制片于胰酶液中消化 2~ 3min。

(4) 取出立即用生理盐水洗 2 次。

(5) 用吉姆萨液染色 20min。

(6) 蒸馏水冲洗,晾干、镜检。

(ii) C 显带

1. 试剂

(1) 0.2 N HCl 溶液。

(2) 5% Ba(OH)₂ 溶液。

(3) 5% 吉姆萨染液。

2. 显带过程

(1) 染色体制片置室温 3~ 14d,分带时将标本用 HCl 溶液处理 60~ 80min。片龄短 HCl 处理时间相应缩短;反之适当延长。

(2) 蒸馏水冲洗后浸入已预热至 60℃ 的 Ba(OH)₂ 溶液中 5~ 10min。

(3) 蒸馏水冲洗。移入 60℃ 2× SSC 液中孵育 30min。

(4) 水洗,吉姆萨液染色 10~ 20min。

(5) 水洗,自然干燥、镜检。

3. 临床意义

不育男性的染色体核型分析表明,染色体异常主要见有非整倍体,易位及结构重排。无精症患者染色体异常率高达 15.38%,显著高于其他男性不育者。G、C 显带技术可帮助识别染色体的着丝点及次缢痕(1、9 与 16 号染色体),对男性不育染色体异常的诊断有意义。

(二) 精子冷冻技术

1. 冷冻机制

精子的冷冻储存机制十分复杂。一般认为精子在液氮(- 196℃)及适宜的 CPM 条件下,能避免自身结构和功能的损伤,并使精子代谢活动完全停止,以生命的休眠状态静息保存,而在一定的环境中又可使精子复活。

2. 冷冻保护剂类型

(1) 单一甘油型:人类精液的冷冻保存,最早使用的是单纯甘油,作为精液 CPM 的最终浓度为 5%~ 10%。具体做法:于精液中缓慢加入甘油,速度为 1~ 1.5 滴/min,边加边轻轻摇动,混合均匀;然后置室温 15min,使甘油渗入精子内,起到冷冻保护效果。研究表明甘油加入速度过快,可能引起精子内渗透压改变,细胞出现皱褶、死亡。甘油最终浓度为 7.5%~ 10%,相当于 1 滴甘油/10~ 14 滴精液。其他各型 CPM 均按此法制备 CPM-精液混合液。

(2) 甘油-卵黄-柠檬酸钠型(G-Y-C 型):G-Y-C 型为复合型 CPM。配制方法:甘油 14%,卵黄 20%,5% 葡萄糖与 2.9% 柠檬酸钠混合液(V/V,2: 3)66%、甘氨酸 20mg/ml,青霉素 1 000U/ml,链霉素 0.5mg/ml。用 1.3% 重碳酸钠调 pH 至 7.2~ 7.4。

(3) 改良 Tyrode 液-甘油型(T-G 型): T-G 型是一类无卵黄的 CPM, 以改良 Tyrode 液为基液组成。配法: NaCl 100mmol/L, KCl 5.365mmol/L, CaCl₂·2H₂O 2.721mmol/L, MgCl₂·6H₂O 0.492 mmol/L, NaH₂PO₄·2H₂O 0.321mmol/L, NaHCO₃ 30.949mmol/L, Hepes (N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙基磺酸) 20mmol/L, 乳酸钠 12.856mmol/L, 蔗糖 50mmol/L, 甘氨酸 133.21mmol/L, 葡萄糖 5.506mmol/L, 甘油 15% (V/V), HSA 4g/L。pH 为 6.5~7.0。

(4) TES-Tris-甘油-卵黄-柠檬酸钠型(TEST-G-Y-C 型): 这是一类具两性离子缓冲系统的 CPM。制法: ①配制 TEST 基液, 325mmol/L 的 TES (N-三羟甲基-2-氨基乙烷磺酸) 和 Tris (三羟甲基氨基甲烷) 溶液, 再将两液相互滴定为 pH7.0 即可; ②TEST 48%, 卵黄 20%, 325mmol/L 柠檬酸钠 30%, 325mmol/L 的果糖 2%, 甘油 6%, pH 为 7.0。

(5) TES-Tris-卵黄-柠檬酸钠型(TEST-Y-C 型): TEST-Y-C 型为无甘油的具两性离子缓冲系统的 CPM。配法: 325mmol/L TEST (pH7.0) 70%, 卵黄 17.5%、325mmol/L 柠檬酸钠 12.5%, pH 为 7.0。

3. 精子超低温冷冻程序

A 速冻(quick freezing)法

(1) 精液收集与筛选: 采集的精液放于洁净器皿内及时送检, 精液液化后观察精子密度、活率、活力与畸形率(或受精能力)。尽可能选择质量好的精液, 要求冻存精子密度 $> 6 \times 10^7/\text{ml}$, 畸形率 $< 30\%$, 活动率 $> 70\%$, 活力为 a~b 级。

(2) 液化精液测其容量: 室温下将 CPM 以每分钟 1 滴速度加到精液中, 轻轻振荡使精子与甘油混匀, 静置 15min。精子密度 $4 \sim 6 \times 10^7/\text{ml}$, 精液与保护剂体积比为 2:1, 精子密度 $6 \times 10^7/\text{ml}$ 则为 1:1。

(3) 分装与初冻: 取药用安瓿(中性硬质硅酸盐玻璃), 割除瓶口多余部分, 用水冲洗, 然后以蒸馏水清洗, 高压灭菌后即可使用。用不带针头的注射器吸取精液混合液, 每支安瓿分装 1ml, 用无毒塑料帽封闭, 置冰水内或移至 4℃ 预冷 10min。

(4) 液氮蒸气冷冻: 将经过预冷的精液安瓿移入小纱布袋中, 缓慢放入液氮罐内, 即刻悬吊于液氮面上 2cm 处冷冻 10min。预先用 1 支有刻度的玻璃棒慢慢向液氮罐内插入, 使棒端同液氮面接触, 其罐口平面相对于玻璃棒上的厘米数即为液氮面至罐口的距离, 将该长度减去 2cm, 即是向罐内悬吊布袋所需的吊线长度。然后按其长度量取吊线, 以止血钳夹住吊线作为标记。

(5) 冷冻储存: 装有混合精液的安瓿, 经液氮蒸气冷冻后, 松开吊线上的止血钳, 将纱布袋浸入液氮底部冻存。

(6) 复苏与结果判定: 解冻前将小纱袋提到罐口, 用镊子取出安瓿, 于室温或 37℃ 水浴中解冻。复苏后立即进行镜检, 观察精子存活情况。按下式计算精子存活率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{冻后精子活动率}}{\text{冻前精子活动率}} \times 100$$

临床以精子活率 $> 30\%$, 存活率 $> 60\%$ 作为使用标准。

B 缓冻(slow freezing SF)法

(1) 混合精液分装同速冻法, 继之将精液标本置普通冰箱缓慢降至 2~4℃, 作用 40min。

(2) 以 5~7℃/min 速率, 使精子从 4℃ 降至 -30℃。

(3) 再将精子在 2min 内以 8~10℃/min 的速率降至 -80℃。

(4) 最后完全浸于液氮中冻存。

简易速冻(simplified quick freezing)法: 将混合精液分装于安瓿内, 将其悬用于液氮蒸气中 8min, 然后浸于液氮内。

生物冷冻机慢速降温(slow freezing with biological refrigerator)法:基本过程同缓冻法,使用生物冷冻机等速降温冷冻精液,经 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的慢速降温冷冻,从室温降至 5°C ,再以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率快速进入液氮,从 0°C 降至 -80°C ,达到 -80°C 时立即浸入液氮中。

(三) 精子优选技术

I. 洗涤法(washing method)

1. 原理

精液通过洗涤离心处理,可洗去精浆,以消除抑制受精的因素,同时可提高精子密度,从而增加受精机会。

2. 材料与试剂

(1) Tyrode 液:Ham F10 培养液(F10 9.8g, NaCl 3.0g,加双蒸水至1000ml,用前以 NaHCO_3 调 pH 至 7.2~7.5,渗透压为 380mmol/L)。

(2) 刻度离心管(20ml)。

(3) 普通离心机。

3. 步骤

(1) 以手淫法无菌采集精液,置 37°C 20~30min,待精液完全液化后移至锥形离心管内,加入3倍体积的 Tyrod 液轻轻翻转混匀。

(2) 精子混合液以 $500g$,离心 7~8min,上清液弃之,下层精子再次以 3ml 洗涤液重新混悬,同上离心除去上清液。

(3) 离心后将精子沉淀层悬浮于 0.3ml Ham F10 培养液中,进行精子常规检查,并将精子调整至人工授精所需浓度备用。

II. 游泳法(swim up method)

1. 原理

将精液与培养液分层重叠在一起培养,其间高活力的精子可游入培养液中以有效地从精液中分离得到大量运动良好的精子。

2. 材料与试剂

(1) Tyrode 液(有条件时采用 F10 培养液)。

(2) 玻璃试管(5ml)。

3. 步骤

(1) 取数支无菌玻璃试管,各管依次加入 2ml Tyrode 液,于每支试管底部缓慢注入 0.5ml 充分液化的新鲜精液,使精液和培养液形成清晰的界面。

(2) 将试管倾斜 30° 角, 37°C 静置培养 1h,其间活动精子可自行游入培养液中。

(3) 用吸管仔细吸除试管底部的精液,合并上清液于另一离心管中。

(4) 以 $500g$,离心 5min,除去上清液再用 Tyrode 液洗涤离心 1 次,沉淀物加入适量培养液制成精子悬液,并调整至所需浓度。

III. 密度梯度离心法(density gradient centrifugation method)

1. 原理

精子在不同浓度 percoll 溶液中,在离心力作用下,由于其自身的密度差异,而停留在不同密

度的液面上,从而达到分离的目的。

2. 材料与试剂

(1) Percoll (Pharmacia, Sweden), 0.85% NaCl。

(2) Ham F-10 溶液, Giemsa 染液。

(3) 0.1% 人血清白蛋白(HSA), 锥形离心管(15ml), 尼龙网(260 目)。

3. 步骤

(1) 精液收集:嘱采精者禁欲 3~5d,以手淫法采集精液即刻送检。精液分析按 WHO 推荐的标准,将精子活动度分为 4 级。

(2) Percoll 梯度液制备:取 percoll 90g 溶于生理盐水 100ml 中,随后用 pH 7.4 的 F-10 溶液依次配制成 40%、50%、60%、70%、80% 与 90% 等渗 percoll 液。自离心管底部起由浓到稀地加入上述溶液 1.5ml,切勿破坏梯度间界面,使之形成不连续密度梯度柱。

(3) 密度梯度分离:液化新鲜精液以 F-10 溶液 4~6 倍稀释,混合后用 260 目尼龙网过滤。取滤过精液加到密度梯度柱上,以 1200r/min 离心 15min。小心吸取各梯度界面的精子移至各自的试管中。各取 1 滴作精子涂片,进行 Giemsa 染色,镜下观察精子形态。同时取 90% 液层的精子,用 F-10 溶液洗涤 1 次,再以 F-10 溶液(含 0.1% HSA)调整精子数为 $(20\sim 50)\times 10^6$ ml,即可用于人工授精。

(四) X、Y 精子分离

I. 电泳分离(electrophoretic isolation)法

1. 原理

X、Y-精子表面存在电荷差异,由于精子所带电荷不同,在直流电场中可各自向不同的电极方向迁移。

2. 材料与试剂

(1) 电泳用溶液,0.85% NaCl(W/V)。

(2) Tyrode 液。

(3) 0.05% 喹吖因氮碱染色液。

(4) 尼龙网(40 μ m)。

(5) 电泳装置:电泳室(1.2cm $\times$ 1.2cm $\times$ 1.8cm)由 2mm 厚有机玻璃板构成,左右各 1 个,中间用 U 型管连接。电泳室各自以白金丝电极与直流电源联结。电泳用溶液为 pH 6.5 的生理盐水。

3. 步骤

(1) 人精液收集与洗涤:禁欲 4d 以上用手淫法采集精液,放置室温 30min 使之液化,用血细胞计数器计数精子的密度和活率。取精液分析正常的精液(精子数 6×10^6 /ml,活动率 80% 以上),以 2 倍量的 Tyrode 液稀释,用 40 μ m 尼龙网过滤,除去精液凝块及杂物,收集过滤的精子备用。

(2) 电泳分离:将精子悬液以 250g,离心 6min,上清液弃之,在精子沉粒中加入生理盐水(预热至 36 $^{\circ}$ C)3ml 使之混悬。于两侧电泳室内各加 1ml 精子悬液,盐桥上则加 0.7ml。然后 20 $^{\circ}$ C 中电泳 30min。电泳池的二极间产生的有效电场强度为 2.3V,稳电流为 180~230mA。

(3) 荧光染色:电泳结束分别于两极吸取精液涂片,用甲醇冰醋酸液(3:1)固定 30min,随后滴加 0.005% 阿的平液染色 20min,用 pH6.5 生理盐水反复冲洗 3 次。在荧光显微镜(激发滤片 BG12;屏障滤片 0-565)下观察。Y 精子头部中央呈现荧光点的即为 F 小体阳性,X 精子则无 F

小体。镜下每份标本计数 500 个精子,由此得出 Y 精子的比率。

(4) 分离结果:电泳法分离 X、Y 精子后,位于阳极端 X 精子为 $90.36 \pm 6.87\%$,阴极端 X 精子占 $43.48 \pm 18.92\%$ 。由此可见,使用电泳可从阳极侧分离到富含 X 精子。

(5) 临床应用:利用电泳法分离 X 精子,获得率很高。方法较为稳定,操作简便。有利于雌性子代的选择。

II. 常用溶液的制备

1. 精子营养液(sperm nutrition solution)

精子营养液见附表 5。

附表 5 精子营养液

Tyrode 液 (Tyrode Solution, pH7.45~7.55)		Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水 (Dulbecco Phosphate Buffer Saline)		Baker 液 (Baker Solution)	
NaCl	5.79g	KH ₂ PO ₄	0.2g	葡萄糖	3g
KCl	0.399g	Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2.9g	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	0.46g
CaCl ₂	0.309g	NaCl	8.0g	NaCl	0.2g
MgCl ₂	0.099g	KCl	0.2g	KH ₂ PO ₄	0.01g
乳酸钠	2.2ml	加双蒸馏水至	1 000ml	加双蒸馏水至	100ml
NaH ₂ PO ₄	0.049g				
葡萄糖	0.999g				
丙酮酸钠	1.036g				
NaHCO ₃	1g				
HSA	1.5g				
酚红	0.01g				
加双蒸馏水至	1 000ml				

2. Hank液(Hank solution)

(1) 含钙、镁离子的 Hank 储存液(stock solution):见附表 6。

附表 6 含钙、镁离子的 Hank 液

A 液(10 倍原液)		B 液(10 倍原液)	
葡萄糖	10.0g	CaCl ₂ •2H ₂ O	1.86g
KH ₂ PO ₄	0.6g	KCl	4.00g
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	3.58g	NaCl	80.00g
0.5% 酚红	20ml	MgCl ₂	1.04g
加双蒸馏水至	1 000ml	MgSO ₄ •7H ₂ O	2.0g
		加双蒸馏水至	1 000ml

注:应用液(work solution):A 液 100ml, B 液 100ml, 双蒸馏水 800ml, 使用前可按需要调整酸碱度

(2) 无钙、镁离子 Hank 液: 见附表 7。

附表 7 无钙、镁离子 Hank 液

储 存 液		应 用 液	
NaCl	80.00g	储液	100ml
KCl	4.0g	双蒸水	900ml
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.6g	临用前按要求调整酸碱度	
KH ₂ PO ₄	0.6g		
葡萄糖	10.0g		
双蒸馏水稀释至	1000ml		
以上各试剂依次溶解,最后补足至全量			

3. Eagle液(Eagle solution)

Eagle 液见附表 8。

附表 8 Eagle液

CaCl ₂ ·2H ₂ O	
NaCl	6.8g
KCl	0.4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.14g
葡萄糖	1.0g
双蒸馏水稀释至	1 000ml

上述各种溶液配制后过滤、高压灭菌,分装后置 4℃ 储存。

4. 精子培养液(sperm incubative solution)

(1) Ham F-10 培养液(Ham F-10 solution): 称取 F-10 粉剂 0.984g 溶于 100ml 三重蒸馏水中,培养前再加入谷胺酰胺 2.92mg,无菌抽滤。

(2) M 199 培养液(M 199 solution): 称取 M 199 粉剂 0.99g 溶于三重蒸馏水 1 000ml 中,进行细胞培养时另加谷胺酰胺 29.2mg,无菌抽滤,4℃ 保存。

(王春年)