

· 综述 ·

## 早泄的诊断与治疗进展

北京大学第一医院泌尿外科 (北京 100034) 田龙 袁亦铭 刘武江 辛钟成

早泄是最常见的射精功能障碍之一,其发病率大约占成人男性50%左右,近年来NO-cGMP信号通路在阴茎勃起机制中的发现和选择性PDE<sub>5</sub>抑制剂西地那非(万艾可)的问世,使得勃起功能障碍患者的治疗获得了变革性进展。然而,尽管寻求治疗的早泄患者日渐增多,但是早泄的诊断与治疗仍然相对滞后,本文就该方面的进展作一综述。

### 一、早泄的定义及分类

现代医学对早泄的定义是一个逐步演变的过程,并且目前还没有一个十分准确的定义<sup>[1]</sup>。1970年,Master & Johnson提出早泄的定义为性交时间维持不能使配偶满足的频度高于50%;1974年,Kaplan提出由于男性缺乏随意调节射精的能力,导致不以所愿地到达性高潮为早泄;1984年,DSM-IV-R提出不以所愿地阴茎插入阴道即射精,或在轻微的性刺激下即精为早泄射,Ertekin重新提出Master & Johnson的观点;1997年,Davide提出男女双方中,某一方对射精潜伏期不满意而企图延长射精潜伏期为早泄。我国一些专家曾经提出射精潜伏期1min以内为早泄。笔者等利用中国早泄患者性功能评价表(CIPE)观察到以早泄为主诉的绝大多数患者失去随意控制射精反射功能,射精潜伏期在0~3min(平均 $1.57 \pm 1.15$ )间,显著影响患者配偶双方的性生活满意度,而正常对照为3~35min(平均 $10.16 \pm 9.45$ ),显然,射精潜伏期过短引起夫妻双方性生活满意度降低是早泄患者的主要临床特点<sup>[2]</sup>。早泄的定义不能片面的强调射精潜伏期或配偶满意度来评价,因为相当数目的人虽然射精潜伏期在1~2min,但夫妻双方能够达到满意的性高潮,反之部分患者射精潜伏期在3~5min却不满足于现状,而且长期禁欲后偶而发生射精过早却不能诊断早泄。还要考虑到近30%的女性患有不同程度的性兴奋或性高潮障碍。因此,较全面的早泄定义应考虑到患者控制射精反射的功能、配偶的性功能状态、对生活质量的影 响,以及其发生频度。因此,较全面的早泄定义应当是男性在性生活时,由于随意控制射精的功能降低,持续和反复发生阴茎插入阴道之前或插入阴道就很快射精,或不能有效地维持射精潜伏期以达到夫妻双方满意性生活的常见疾病。早泄定义的不确定性

主要反映了两方面的问题:一是目前早泄的发生机理没有阐述清楚;另外,缺少统一的评估早泄患者的标准以及诊断治疗方法。鉴于此,今年6月将在法国巴黎召开的WHO性功能障碍咨询委员会上,咨询委员会的成员已经达成协议,将对早泄的定义作进一步的讨论修订。

早泄根据发生时间可分为原发性早泄和继发性早泄,前者自从性生活开始就有早泄,占早泄患者的大多数,后者经过一段时间的正常性生活以后发生早泄,多与勃起功能障碍或其他继发性疾病有关。早泄还分为单纯性早泄和混合性早泄,后者常合并不同程度的勃起功能障碍。

目前早泄的病因还不清楚。传统观点认为早泄的原因主要是心理因素<sup>[3]</sup>,可能包括焦虑、紧张、不安心等心理障碍,婚姻危机以及性生活环境等社会因素;但是,近来的研究表明抗抑郁药物对早泄的治疗效果研究,以及阴茎局部生物感觉阈值变化的研究和感觉神经兴奋性的研究结果,提出早泄的原因与射精中枢或感觉区域兴奋性增高导致的神经病理生理学变化的器质性原因有关<sup>[4]</sup>,但还有待于进一步研究。

### 二、射精反射通路及神经生理调节

射精是神经系统调节下射精器官神经生理反射过程,包括泌精、射精和伴随射精过程的强烈性快感(即性高潮)。射精神经反射弧包括神经感受器、传入通路、大脑感觉和大脑运动区、脊髓运动区以及传出通路和效应器、射精器官。

神经感受器包括初级感觉器和次级感受器,前者是外生殖器特别是阴茎头粘膜层内的Krause-Finger小体;后者位于外生殖器(阴茎体部和阴囊),次级感受器的刺激可维持勃起和增加Krause-Finger小体的感觉信息<sup>[5]</sup>。阴茎头感觉信息的传递经过阴部神经(阴茎背神经)的感觉神经纤维传递至S4,然后整合进入脊髓;也可以通过下腹神经丛将感觉刺激传递至脊髓旁的交感神经节。自主神经通路与大脑脊髓通路之间可能存在闭合环路。

位于T12-L2脊柱水平的脊髓泌精中枢负责性刺激后的泌精过程,由交感神经系统调控,传出神经经过腰交感神经节、下腹神经丛、腹下神经、下腹下丛,终止于

效应器膀胱颈、前列腺、精囊和输精管<sup>[6]</sup>。位于 S2-S4 脊柱水平的脊髓运动中枢,由躯体神经系统调控,起源于该中枢的运动神经走行于阴部神经运动支,支配包括尿道海绵体肌和球海绵体肌效应器盆底肌肉。大脑感受中枢和大脑运动中枢位于前脑,包括内侧视前区中部区(MPOA)和下丘脑脑室旁核(PVN)。MPOA 位于下丘脑前部的喙突,是所有雄性脊椎动物调节性交行为的重要结构<sup>[7]</sup>。性兴奋过程中 MPOA 释放的多巴胺可以调控泌精、射精的生理过程<sup>[8]</sup>。MPOA 与腰骶部脊髓运动中枢之间并无神经元联系,中脑水管周围灰质(PAG)和 PBVN 可能起到了信息传递的作用。多巴胺增强泌精和射精的作用是通过作用于 D2 受体完成的,5-羟色胺可以对其抑制。雄性大鼠射精后,下丘脑侧前区(LHA)释放 5-羟色胺,拮抗多巴胺的进一步作用。运动实验表明,LHA 内选择性 5-羟色胺再吸收抑制剂(SSRI)微注射可使交配冲动下降和交配开始后射精延迟<sup>[9]</sup>。因此,SSRI 药物作用于 LHA 可抑制性欲和射精。LHA 内神经元发出神经至腰脊髓,进而控制泌尿生殖反射。来自腹侧髓质的旁巨细胞核(nPGi)也可抑制勃起和射精过程;nPGi 内大约 78% 的下传神经元为 5-羟色胺能神经元<sup>[10]</sup>。nPGi 损伤或脊髓横断将会使抑制勃起和射精作用消失。但是,即使在 nPGi 和脊髓完好情况下,刺激 MPOA 也可引发泌尿生殖反射,说明大脑、脊髓射精中枢的相互调控非常复杂。进一步深入研究射精神经反射通路,将对早泄的原因、病理生理变化以及临床诊断与治疗提供重要基础资料。目前早泄患者阴茎生物感觉阈值的测定、阴茎体感诱发电位及球海绵体反射潜伏期的测定等周围神经领域的研究,以及大脑中枢 5-羟色胺再吸收抑制剂等研究取得了初步的进展。

### 三、早泄的诊断

目前的早泄诊断主要依靠患者主诉,如果能够了解夫妻双方的性生活状况将对早泄的诊断提供重要的依据。笔者认为早泄的诊断应该考虑到射精潜伏期长短和双方性生活满意度、性行为状况。评估早泄患者时,必须考虑影响性兴奋持续时间的因素,如年龄、配偶吸引力或身体状况、近期性活动频度等。还要了解抑郁或人格障碍等精神心理紊乱,排除某些物质直接导致的早泄,如成瘾性药物戒断等。但是这些诊断标准有待于进一步完善。无论如何,早泄诊断需要判定两个主要指标:第一个主要指标为阴茎插入阴道后的射精潜伏期或性交持续时间及射精随意控制能力;第二个主要指标为患者及配偶的性生活满意程度。医生询问患者早泄是否发生在所有情况下或只在某一特定情况下

或只与某一性伙伴性交时发生。选择性早泄可能发生于某一特定情形或与某一性伙伴,常称为获得性早泄。此时,医生应关注患者早泄发生前的一些可能导致早泄发生的生活事件。早泄原因还可能涉及配偶的性功能障碍,如女方可能有性生活恐慌症,以致男方为减少女方的性厌恶和痛苦而快速射精。医生需仔细询问患者夫妻双方的性生活适应状况,以便决定治疗方案。早泄患者常主诉性交时间短,需要与勃起维持功能障碍鉴别,如果经常发生射精前阴茎疲软,应诊断为勃起功能障碍。

笔者等最近研究制定中国早泄患者性功能评价表(CIPE),该评价表涉及性欲、阴茎勃起功能、性生活满意度、射精潜伏期、控制射精困难程度以及自信、焦虑及紧张等心理因素十项问题。研究发现,早泄患者的 CIPE 十项问题总分较正常对照组显著降低, $(P < 0.001)$ ,敏感度与特异度均较好。早泄患者的射精潜伏期、患者性生活满意度、配偶性生活满意度、控制射精困难程度以及焦虑紧张程度与早泄患者性功能显著相关 $(P < 0.001)$ 。CIPE 有利于临床上评估早泄患者性功能并提供比较客观的量化指标,可作为评估治疗早泄药物评估指标,有待于大样本多中心进一步研究。

### 四、早泄患者的辅助检查

尽管一些实验室检查方法应用于早泄患者的辅助检查,但是由于缺少安慰剂对照大样本多中心设计合理的研究结果,目前没有任何一种检查方法具有特异性诊断意义。利用精神心理学分析方法有助于评估早泄患者精神心理状态。有研究报道,使用 SCL-90-R 精神心理卫生检查表对早泄患者和正常对照组进行精神心理个性分析,结果两组之间异常结果无显著差异,但早泄患者表现出精神心理异常趋势。MMPI 等其他精神心理评估方法也用于评估早泄患者,而 Rowland 等报道,心理生理学方法可用于区分正常与早泄患者,但无法评估早泄患者射精功能。

早泄的神经电生理检查可较客观评价射精神经通路常用试验方法有以下 5 种:

1. 阴茎生物感觉阈值测定(Penile biothesiometry)是利用生物感觉阈值测定仪测定阴茎微振动感觉阈值,了解阴茎感觉敏感度的方法。笔者研究发现早泄患者的阴茎生物感觉阈值比正常对照组显著降低,而且局部使用治疗早泄的药物(SS-cream)可显著提高其阈值。

2. 阴茎背神经躯体感觉诱发电位(dorsal never somatosensory evoked potentials, DNSEP)通过刺激阴茎背神经而记录脊柱和头皮(距离大脑皮层 2cm)的体感诱发电位。DNSEP 观察的指标包括感觉阈值

(刺激时最小的可知觉电流强度)、反应潜伏期(反应起始至第一个可重复波峰的距离)以及峰峰值;通过记录脊髓和大脑皮层各不同水平的反应,可得到总传递时间(从阴茎至大脑),外周传递时间(从阴茎至脊柱),中枢传递时间(总时间减去外周传递时间)3个不同的间隔期。笔者等研究发现早泄患者的阴茎头体感诱发电位(GPSEP)潜伏期比正常对照组显著缩短,振幅升高,这些变化局部使用SS-cream后得到改善。这种研究结果提示早泄发病机制可能与阴茎头感觉神经兴奋性增高有关。

3. 阴部运动神经诱发电位(Pudendal Motor Evoked Potentials, Pudendal MEPs):运动神经诱发电位(MEPs)用于评价从大脑至靶器官(阴茎球海绵体肌)传出通路(锥体束)功能。应用电磁刺激器刺激大脑运动皮质和骶神经根。放置同心原针状电极记录阴茎球海绵体肌的反应。静止状态下刺激大脑,而后令受试对象盆底肌肉随意收缩(易化作用);骶神经根刺激只在静止状态下实施即可。同样记录第一次可信偏移。通过在2个水平刺激中枢神经系统,可记录3个传递时间:总传递时间(从大脑至靶肌肉),外周传递时间(从脊神经根至靶肌肉),中枢传递时间(总传递时间减去外周传递时间)。在阴茎球海绵体肌上记录的总传递时间约28ms(静止状态)和23ms(受试者随意收缩盆底肌肉),外周传递时间为7ms(骶神经根刺激)<sup>[12]</sup>。

4. 骶反射弧试验:躯体-躯体反射弧(Sacral Reflex Arc Testing: the Somatic-somatic reflex Arc):该试验用以评价阴部神经和骶神经(S<sub>2-4</sub>)的感觉神经和运动神经的功能。通过刺激阴茎背神经,记录阴茎球海绵体肌上的反应。反应通常包含2个偏移,第一个偏移潜伏期为35ms,后一个为80ms<sup>[13]</sup>。

5. 交感神经皮肤反应试验(Sympathetic Skin Responses, SSRs):该试验用以评价生殖器官皮肤交感传出神经的功能。阴茎体部安装2个环状电极,负极安置于阴茎基底部。电刺激右侧正中神经,在手、足、会阴和阴茎记录SSRs。刺激阴茎背神经时,手、足和会阴的SSRs潜伏期为1.40s,2s和1.4s;刺激正中神经,阴茎SSRs潜伏期为1.50s<sup>[14]</sup>。

目前,还没有对早泄特异性的检查方法,研究表明原发性早泄患者的阴茎感觉阈值比正常对照组显著降低<sup>[15,16]</sup>,阴茎感觉神经诱发电位潜伏期较正常对照组明显缩短<sup>[17-19]</sup>,说明早泄患者的阴茎感觉神经兴奋性增高可能是早泄的器质性原因。最近也有研究认为单纯依赖神经电生理检查不能很好的区分原发性早泄<sup>[20]</sup>,但是,该研究的样本量较小,有待于进

一步研究。

另外早泄患者的内分泌功能研究中有些报告与高催乳素血症有关,然而笔者分析结果大多数早泄患者内分泌功能基本在正常范围。

## 五、早泄的治疗

### (一) 心理治疗

始于20世纪70年代,早泄心理治疗主要是指行为疗法,包括终止开始训练、阴茎挤压训练、渐进性感觉集中训练、手淫训练和配偶骑跨阴道内静止训练等。行为疗法要求患者单独重复刺激阴茎直至中等兴奋而停止,如此反复数次后再行射精。这些训练的目的在于使患者掌握在达到中等程度的兴奋后开始降低其兴奋度。这些训练方法应充分取得配偶的理解与配合,夫妻双方应建立合作、亲密和信任的良好关系。Masters和Johnson<sup>[21]</sup>报道行为疗法治疗早泄的成功率为60%~95%,但其它报道差异较大,行为治疗3年后成功率降为25%。由于行为疗法历时较长,医生制定行为治疗方案时应认识早泄发生的心理动力学原因,以使患者能长期坚持,保持其治疗的初衷。

### (二) 早泄的局部药物治疗

使用局部麻醉作用的软膏可降低阴茎头敏感性,有利于延长早泄患者的射精潜伏期<sup>[22]</sup>。使用时,将麻醉软膏涂于阴茎皮肤上并以避孕套裹敷停留30min,则效果更好<sup>[23]</sup>。性交前,应将麻醉软膏洗掉,以防麻醉软膏进入配偶阴道而降低阴道敏感度,副作用包括勃起功能障碍和性高潮障碍等<sup>[24]</sup>。Atan等报道,氟西汀合并局部使用利多卡因软膏治疗早泄较单独使用氟西汀疗效更好,但其研究缺乏安慰剂对照研究。Yilmaz等研究发现,氟西汀治疗早泄可能通过提高阴茎感觉阈值发挥作用,但其对骶诱发电位和皮层感觉诱发电位无明显影响。笔者研制治疗早泄的纯中药提取制剂SS-cream软膏。对于阴茎感觉阈值具有剂量依赖性抑制效用,可用于提高早泄患者阴茎感觉阈值而治疗早泄,该药物除了部分患者轻策局部灼热感外无全身性副作用,对勃起功能和性高潮及配偶没有影响,临床使用安全有效<sup>[25,26]</sup>。

### (三) 早泄的中枢作用药物

目前5-羟色胺重吸收抑制剂(SSRTs)对早泄的治疗效果受到人们的重视。抗抑郁药物对性功能的副作用早已在30年前就被人们所提及,这些药物大多通过抑制5-羟色胺(5-HT)重吸收而增加神经突触中核递质浓度,其副作用包括引起患者性高潮缺失或射精延迟。1973年Eaton首先给无心理疾患的早泄患者服氯丙咪治疗早泄。其它可能用于治疗早泄的药物还包括氟西汀、帕罗西汀、舍曲林和氯丙咪嗪,这些药

物的确切作用正在研究之中。SSRIs 长期治疗早泄效果尚无研究,但其已作为治疗早泄的常规药物,并且在最近临床研究中发现其疗效比较确定<sup>[27]</sup>。另一方面,某些精神类药物或勃起功能障碍等病理生理状况,可造成继发性早泄,所以要首先排除或治疗这些异常情况。例如,当患者勃起硬度足够,勃起时间较短时,可通过服用西地那非或局部应用血管药物改善勃起时间,即可治疗早泄,而不用使用 SSRIs。Walch 等发现 fluoxetine 对健康正常男性的射精潜伏期和精液参并无明显影响<sup>[28]</sup>。某研究发现,抗抑郁药 Seroxat 治疗早泄效果较好,但患者服药后可出现性欲降低、便秘、口干、失眠和皮肤瘙痒等副作用。也有研究发现,在性生活之前单次服用 SSRIs 类药物,可以显著改善症状,并且减少由于长期服药所造成的副作用。

其他可能对早泄有疗效的药物有单胺氧化酶抑制剂(MAOIs)主要用于神经性或非典型性抑郁症的治疗。此类药物可提高肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺水平。MAOIs 对性功能有副作用,发生率 20%~40%。据报道苯乙肼、苯环丙胺、isocarbazid 会导致射精延迟和抑制。许多苯并二氮卓类药物用于治疗广泛性焦虑症和惊恐发作时,在某些患者可抑制射精功能,其可能提高了大脑 GA-BA ( $\gamma$ -氨基丁酸)水平。此类药物包括安定、氯羟去甲安定、氯甲西洋、替马西洋、氟硝基安定、氟西洋、硝基安定、甲氨二氮卓和阿普唑仑。可卡因作为一种成瘾性药物,可通过阻断中枢单胺类物质传递而兴奋中枢神经系统,并引起射精延迟<sup>[29]</sup>。

近来部分研究表明早泄合并不同程度勃起功能障碍患者服用西地那非能够延长射精潜伏期,其本身对射精功能没有明显效果,但可能与通过增强勃起功能以及获得积压信感有关。临床报道发现,对于合并 ED 的早泄患者,服用 SSRIs 的同时服用万艾可有助于改善早泄患者的症状<sup>[30]</sup>,但会轻微地增加其副作用<sup>[31]</sup>。

关键词 早泄 诊断 治疗

中图法分类号 R 698

### 参 考 文 献

- Rowland DL, Coper SE, Schneider M. *Arch Sex Behav* 2001; 30(3): 235-253
- Xin ZC, Fu J, Tian L, et al. *AJA* 2002; 4(3 Suppl): 59-60
- Strassberg DS, Kelly MP, Carroll C, et al. *Arch Sex Behav* 1987; 16(4): 327-336
- Waldinger MD. *J Urol* 2002; 168(6): 2359-2367
- Jannini EA, Simonelli C, Lenzi A. *J Endocrinol Invest* 2002; 25(11): 1006-1019
- Sato K, Kihara K. *Micros Res Techniq* 1998; 42: 390-397
- Knobil E, Neill JD editors. *Physiology of Reproduction*. 2ed. New York: Raven Press, 1994: 68
- Hull EM, Du J, Lorrain DS, et al. *J Neurosci* 1995; 15: 7465-7471
- Lorrain DS, Matuszewich L, Friedman R, et al. *J Neurosci* 1997; 17: 9361-9366
- Marson L, Mckenna KE. *Brain Res* 1994; 638: 103-108
- Opsomer RJ, Guerit JM, Wese FX, et al. *J Urol* 1986; 135: 1216-1218
- Opsomer RJ, Caramia MD, Zarola F, et al. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1989; 74: 260-270
- Nordling J, Meyhoff HH. *J Urol* 1979; 122: 352-355
- Opsomer RJ, Boccasena P, Traversa R, et al. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1996; 101: 25-31
- Xin ZC, Chung WS, Choi YD, et al. *J Urol* 1996; 156: 979-981
- Rowland DL, Haensel SM, Blom JHM, et al. *J Sex Marit Ther* 1993; 19: 189-197
- Colpi GM, Fanciullacci F, Beretta G, et al. *Andrologia* 1986; 18: 583-586
- Fanciullacci F, Colpi GM, Beretta G, et al. *Andrologia* 1988; 20: 326-330
- Xin ZC, Chol YD, Rha KH, et al. *J Urol* 1996; 451-455
- Perretti A, Catalano A, Mirone V, et al. *Urology* 2003; 61(3): 623-628
- Master WH, Johnson VE editors. *Human sexual inadequacy*. Boston: Little Brown Co, 1970: 88
- Atikeler MK, Gecit I, Senol FA. *Andrologia* 2002; 34(6): 356-359
- Berkovitch M, Keresteci AG, Koren G. *J Urol* 1995; 154: 1360-1361
- Sahin H, Bircan MK. *J Urol* 1996; 156: 1783-1784
- Xin ZC, Choi YD, Seong DH, et al. *Yonsei Med J* 1995; 36: 397-403
- Xin ZC, Choi YD, Lee SH, et al. *Yonsei Med J* 1997; 38: 91-95
- Atmace M, Kuloglu M, Tezcan E, et al. *Int J Impot Res* 2002; 14(6): 502-505
- Kara H, Aydin S, Agargun MY, et al. *J Urol* 1996; 156:

- 1631-1632  
29 Brindley GS, Scott GI, Hendry WF. *Br J Urol* 1986; 58: 721-723  
30 Chen J, Mabweesh NJ, Matzkin H, *et al. Urology* 2003; 61(1): 197-200  
31 Salonia A, Maga T, Colombo, *et al. J Urol* 2002; 168 (6): 2486-2489  
(2003-06-12收稿)

## 精原干细胞移植研究进展\*

重庆第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科 (重庆 400042) 李彦锋 综述

北京大学第一医院泌尿外科研究所

郭应禄 李晓红 审校

在非灵长类哺乳动物睾丸中,  $A_s(A_{single})$  型精原细胞是精子发生的干细胞<sup>[1]</sup>。在  $A_s$  型精原细胞分裂的基础上, 其子代细胞彼此分开变为两个新的干细胞, 或者仍停留在一起, 成为通过细胞间桥连接的  $A_{pr}(A_{paired})$  型精原细胞。 $A_{pr}$  精原细胞是精子发生谱系中的第一代细胞, 它将进入分化旁路, 进一步发展为 4, 8, 16 细胞的链状  $A_{al}(A_{aligned})$  型精原细胞。 $A_{al}$  精原细胞分化为  $A_1$  型精原细胞 这是第一代分化型精原细胞。这些分化型精原细胞经过一系列的 6 次分裂, 通过  $A_2$ 、 $A_3$ 、 $A_4$ 、中间型 (In) 和 B 型精原细胞, 最后在有丝分裂后期演变为初级精母细胞。

从1994年起出现的精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC)移植技术为SSC的研究提供了新的推动力, 并已成为一种对其进行生物和功能鉴定的新策略<sup>[2, 3]</sup>。该技术相关的SSC处理和受者睾丸准备主要包括: 第一, 进行干细胞分离或可能的纯化。第二, 进行干细胞的长期冰冻保存。第三, 进行SSC较长时间的培养, 从而对SSC进行基因转染和随后稳定转染细胞的筛选 这样可以移植基因转染后的SSC至实验动物。第四, 在动物研究中 完全去除受者睾丸内源性干细胞。第五, 将干细胞移植于受者睾丸内。在鼠中 现在已经开发了多种不同的技术方式进行SSC移植。本文总结了近年在SSC移植相关技术方面的发展状况和应用前景。

1. 精原细胞的分离和纯化 睾丸生殖细胞的分离须去除睾丸白膜 机械性剪切为碎块并行酶学消化分离。Meistrich等早期联合应用胰蛋白酶和DNase I进行鼠生殖细胞的分离。与单纯机械分离相比, 胰蛋白酶的消化和所释放的DNA的水解作用的结合, 可使生殖细胞产生较少的损伤和较高的活细胞产量。之后, Barcellona和Meistrich报道了一种两步酶消化方法, 该方法是在去除白膜后, 将剪切为小块的睾丸组织首先在胶原酶内孵育, 消化基底膜和分散间质细胞, 但并不使曲精小管分离为碎片, 接着, 小管在

胰蛋白酶和DNase中进行分离, 成为单个分散的生殖细胞群。这一温和的分离步骤可导致较少细胞损伤和较少粘性, 因而一直被广泛应用。从维生素A缺乏(VAD)成年大鼠睾丸中分离A型精原细胞的方法是在胶原酶和透明质酸酶孵育后 接着再用胰蛋白酶+胶原酶+透明质酸酶消化。该方法获得的细胞悬液含有25%~35%的A型精原细胞。这一方法略做修改后(延长孵育时间)也可成功用于未成年公牛(5~7个月大小)睾丸分离精原细胞, 获得含有约30%的A型精原细胞悬液 这与从VAD大鼠和小鼠睾丸中所获得的结果非常相似。目前从人和啮齿动物睾丸细胞悬液中纯化精原细胞的方法包括: 速度沉淀, Percoll梯度液平衡密度离心和离心淘洗等。当然 纯化精原细胞的有效性不但依赖于分离技术, 而且依赖于这些细胞在睾丸内及在睾丸细胞悬液内的相对丰度。细胞计数研究显示: C3H: 101 F1 杂交小鼠的SSC ( $A_s$ 型精原细胞) 数占未分化型精原细胞组成的10.6%, 占有所有精原细胞的1.25%, 占有所有生殖细胞的0.03%。因此, 要纯化SSC或精原细胞 应用不含各级生殖细胞成分的睾丸进行分离更为有利。Bellve等应用年幼小鼠进行分离成功获得了超过90%的纯A型精原细胞, 而Morena等从年幼大鼠睾丸中制备了约85%的纯A型精原细胞。最近, Dirami等<sup>[4]</sup>描述了应用80d大小猪睾丸通过速度沉淀并用差异性粘附方法清除所含的粘附于培养瓶的Sertoli细胞, 获得95%~98%纯化的A型精原细胞。应用公牛睾丸获得的睾丸细胞悬液含有约30%的A型精原细胞, 接着通过差异性粘附可使A型精原细胞的百分率提高至约45% 而且应用不连续Percoll梯度离心后, A型精原细胞纯度可达到约80%。该研究结果显示: 应用5个月大小的公牛可获得最好的结果, 随着年龄的增加, 更多分化型生殖细胞出现时, 制备物的纯度随之降低。年幼动物制备的细胞悬液含有未分化型精原细胞, 同时含有更多分化型  $A_1$ - $A_4$  型精

\* 本课题受国家自然科学基金资助, 项目号为30200093