

金鱼精巢的细胞构造与精子的发生和形成*

管汀鹭 黄丹青 黄国屏

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

提 要

利用扫描电镜与透射电镜研究了金鱼精巢的超微结构及精子的发生和形成的特点。结果表明: 1) 金鱼精巢具有叶型结构; 2) 精巢的结构单位是小叶, 小叶间有 Leydig 细胞, 小叶内有許多小囊, 小囊是由生精细胞与 Sertoli 细胞组成的; 3) 高尔基复合体在精子发生过程中始终存在, 其中, 在精母细胞阶段产生大量液泡; 4) 精子的形成分为三个主要阶段。

关键词 精巢, 小叶, 小囊, 精子发生, 精子形成

硬骨鱼的种类极多, 约有 21 000 多种^[1], 虽然其精巢构造因种属不同而异, 但精子发生都是在小囊 (cyst) 内完成的。Billard 根据生殖细胞的排列与发育的特点, 把众多的硬骨鱼精巢结构分为管 (tubular) 型和叶 (lobular) 型^[2]。近来还发现精巢的小叶 (小管) 间存在 Leydig 细胞, 小叶 (小管) 内则有 Sertoli 细胞^[3]。

金鱼 (*Carassius auratus*) 是鲤形目鲤科硬骨鱼 (Cyprinidae), 已对其精子的结构与特性进行了研究。结果表明金鱼精子为初级型, 尾部上有液泡^[4], 在天然受精条件下, 不到 2 min 便失去运动能力^[5]。近来又发现, 精子头部没有顶体, 但却存在液泡^[1], 并在头部细胞质膜内存在晶格状结构^[3]。然而, 至今还不清楚金鱼精巢的结构类型和构成精巢的细胞种类, 以及上述特性在精子发生和形成过程中的由来。为此, 我们结合透射和扫描电镜以及光学显微镜对金鱼精巢结构与精子的发生和形成进行了研究。

材 料 与 方 法

二龄雄性金鱼 (红龙睛) 由本所鱼场提供。

光学显微镜 从金鱼腹部取出整个精巢组织, 用 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋, 连续切片 (10 μm 厚)。苏木精-伊红染色。

透射电镜 从精巢不同部位取出小块组织, 随即用 2% 戊二醛 (0.1 mol/L 二甲胂酸钠缓冲液, pH 7.0) 在室温下固定 0.5—1 h。再按亚铁氰化钾-四氧化钼法固定制

* 国家自然科学基金资助项目。美国洛氏基金会 RF84301 部分资助, 特此致谢。

1988 年 3 月 1 日收到。

样^[2]。另外有一部分组织在戊二醛固定以后按常规方法进行冷冻蚀刻处理^[3]。超薄切片与复型均用 JEM-100S 电镜观察。

扫描电镜 经 2% 戊二醛固定的精巢组织用缓冲液洗涤,脱水至无水乙醇。将样品连同少量乙醇加入一端封口的蜡纸包内,随后将另一端也拧紧,迅速放入液氮中。待温度平衡后,用预冷的小刀将蜡纸连同样品一起击断。把冷冻断裂的样品放在用分子筛处理的无水乙醇中,待温度回升后,临界点干燥。另外,部分未经冷冻断裂的样品在临界点干燥以后,用胶纸轻轻粘去样品的表层而露出内部结构。离子溅射镀金, JSM-T200 扫描电镜观察。

结 果

金鱼精巢呈乳白色,位于体内两侧,一般为长形,从中部延伸至腹腔尾端合并成 Y 形,汇合成很短的输精管。精巢外部覆有外膜。断裂后的精巢内部用扫描电镜观察,可见有许多单元,1 个单元即为 1 个小叶(图版 I: 1)。每个小叶内部存在着许多大小不等的生精细胞团和精子。并且在小叶之间可见到间质组织及其中的间质细胞(图版 I: 2)。用透射电镜观察精巢的超薄切片,则发现精巢可分为 3 层结构。最外层为类肌细胞(Myoid cell)层,类肌细胞的细胞核通常为椭圆形。细胞之间的深色致密带是以紧密连接、中间连接以及桥粘为序排列的连接复合体(图版 I: 3)。类肌细胞的特点是细胞质内,特别是在细胞核的四周都有成束的细丝存在,在质膜附近以及细胞质内则存在有许多吞饮小泡(图版 I: 4)。第 2 层为结缔组织,主要是呈梭形的成纤维细胞。它的细胞核内有核仁,核质分布比较均匀,但在核膜下方比较密集。在高倍时可见到细胞质内含有多种细胞器。在第 1、2 层之间存在胶原纤维和弹性纤维。这两层细胞一起构成外膜。精巢的第 3 层也即实体部分,是由包含着生殖细胞的小叶以及小叶之间的间质组成的。每个小叶外层被基膜和边界细胞(Boundary cell)包绕(图版 I: 3)。小叶之间存在着间质,主要是由内皮细胞包围的微血管(血管内可见有血细胞)及其附近的 Leydig 细胞和成纤维细胞构成。典型的 Leydig 细胞内含有极其丰富的光滑内质网和有管泡状内嵴的线粒体(图版 I: 5),它们往往是成群地存在(图版 I: 2)。每个小叶又是由许多小囊组成的(图版 I: 3)。每个小囊的外面是单层的 Sertoli 细胞,其特征是细胞质内充满了大小不等的脂滴。小囊内部挤满了处在同一发育阶段的生精细胞群:精原细胞、精母细胞和精子细胞。当生精细胞在小囊内发育为成熟精子时,小囊便破裂。如果有多个小囊内的生精细胞都发育为精子,则彼此因界限消失而互相连成一片(图版 I: 6)。

金鱼精子的发生经过精原细胞、精母细胞、精子细胞,最后发育为成熟精子。精原细胞在形态上可分为两种,它们的大小与结构特征都很相似,仅在电子致密度上有差异(图版 I: 3)。精原细胞的特点是体积较大,细胞直径一般为 15—20 μm ,细胞核形很不规则,核内常可见有核仁,在细胞核附近存在致密团块,通称为拟染色质小体(Chromatoid body),上面附着了许多线粒体。细胞质内有丰富的膜层结构,高尔基复合体常常很大,但四周缺少分泌液泡(图版 I: 7)。此外,在一些切片上,还可见到质膜附近有成对的中心粒,并有许多散在的微管。精原细胞另一个特点是细胞膜上相对均匀地分布着许多核

膜孔(图版 I: 8)。

精原细胞经过有丝分裂后形成初级精母细胞。一方面细胞体积缩小, 细胞直径大约为 $7-10\ \mu\text{m}$ 。另一方面细胞内部的结构发生了明显的变化。表现为 4 个方面: 1) 细胞核形由不规则形变为椭圆形或圆形(图版 I: 9, II: 10); 细胞核膜上核膜孔仅在少数几处集中, 而大部分区域核膜孔消失(图版 I: 9); 2) 拟染色质小体数量减少, 线粒体内嵴增多, 基质致密, 较均匀地分布在核的四周(图版 II: 10); 3) 高尔基复合体发育为典型的形状, 四周存在大量的液泡(图版 II: 11); 4) 中心粒向细胞内移动, 位于高尔基复合体附近, 其中的一个中心粒已开始长出很短的轴丝, 并在它的端部附有小囊(图版 II: 10, 11)。此外, 细胞质内, 特别是靠近中心粒的地方常可见到有微管(图版 II: 11)。当初级精母细胞经历第一次成熟分裂后, 便形成次级精母细胞, 这时细胞内的线粒体与拟染色质小体数量减少, 高尔基复合体的体积也缩小, 细胞器逐渐向两极集中。细胞迅速完成第二次成熟分裂而形成精子细胞。

从精子细胞发育为精子大致将经历 3 个主要的阶段, 即早期、中期和后期阶段。早期的精子细胞直径约为 $4-5\ \mu\text{m}$, 细胞核内染色质开始浓缩, 细胞器逐渐集中, 细胞之间存在明显的细胞间桥(图版 II: 12)。当细胞核内的染色质进一步浓缩, 细胞质的体积也进一步缩小便进入中期阶段; 此时近心中心粒向细胞核方向迁移, 致使细胞核出现内陷, 远心中心粒则长出鞭毛并开始向外延伸; 线粒体向中心粒方向迁移, 并沿鞭毛两侧排列, 构成颈部; 高尔基复合体移近质膜, 由它产生的液泡, 部分留在颈部, 部分迁向轴丝(图版 II: 13); 细胞核膜上的核膜孔逐渐集中(图版 II: 15)。精子细胞分化至后期阶段时, 细胞核的大部分染色质都已浓缩, 但在少数区域内部分染色质并未浓缩而形成核泡(图版 II: 14); 鞭毛继续不断向外延伸, 长得很长。此外, 核膜孔向靠近颈部的核后区域集中; 细胞质膜内的蛋白颗粒在头部某些区域开始出现规则排列, 成为晶核并逐渐扩大。当精子细胞间的细胞间桥完全消失时, 便形成成熟精子。成熟精子头部直径为 $2\ \mu\text{m}$, 在它特定区域的质膜内存在较大面积的晶格状结构; 核膜孔密集在核后区(图版 II: 16)。此外, 头部局部区域还保留着一些小液泡(图版 II: 17)。并且精子颈部仍然有高尔基复合体存在(图版 II: 18)。

讨 论

结构类型 硬骨鱼的精巢结构因其种类繁多而远比哺乳类动物的睾丸结构变化大^[9]。Billard 根据生殖细胞的发育特征把硬骨鱼精巢分为管型和叶型^[9]。管型精巢的特点是: 精原细胞存在于管的顶端, 在发育过程中, 小囊细胞将向输出管方向迁移, 同时便发生分化; 因而成熟精子只存在靠近输出管的部位。叶型精巢的特点是: 精原细胞存在于小叶的边缘处, 在分化过程中, 小囊细胞将向中央的管腔部位移动, 一旦发育为成熟精子, 便被释放进中央的腔内, 然后再流入输出管中。因此, 成熟精子只在小叶的中央部位和输出管内存在。

本文对金鱼精巢结构的研究表明, 不仅精原细胞可以存在于小叶的各处, 而且成熟精子也可以存在于小叶的各处, 也即成熟精子不是只在靠近输出管部位才形成。因此我们

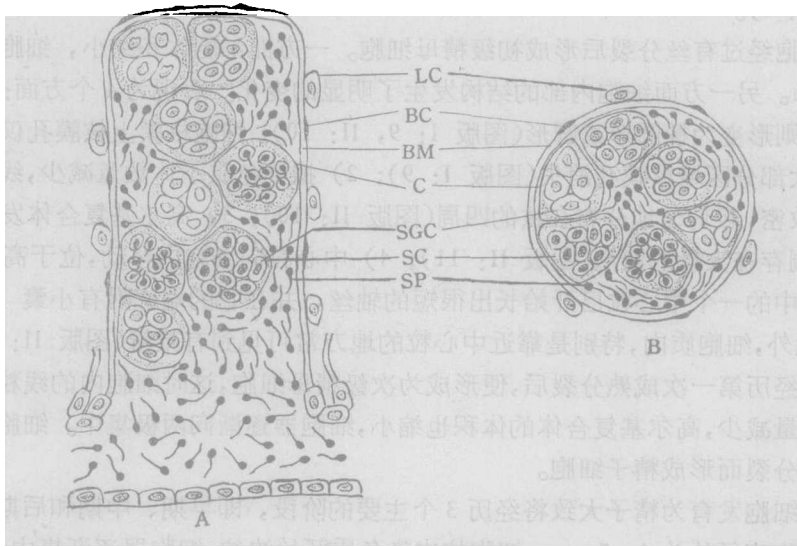


图1 金鱼精巢小叶的结构模式图

Fig. 1 Schematic illustration of testicular lobule in goldfish

A: 纵切面 (Longitudinal), B: 横切面 (Cross), LC: 间质细胞 (Leydig's cell), BC: 边界细胞 (boundary cell), BM: 基膜 (basal membrane), C: 小囊 (cyst), SGC: 生精细胞 (spermatogenic cell), SC: Sertoli 细胞 (Sertoli cells), SP: 精子 (sperm)

认为金鱼的精巢结构与 Billard 提出的叶型结构十分相似。然而另一方面, 由于在离小叶边界不远的区域内可见到有成熟精子, 或者在同一小叶的不同部位可以同时见到几堆精子(图版 1: 2), 这说明金鱼精巢与典型的叶型结构不尽相同, 其小叶内不存在固定的中央管腔, 生精细胞在发育过程中不必向中央部位迁移, 而是在原位进行发育。当发育为成熟精子后, 小囊自行破裂, 精子便顺着小囊间隙流向小叶基部, 再流向输出管。图 1 是我们根据观察与上述分析后提出的金鱼精巢小叶的结构模式图。

细胞构造 金鱼精巢的细胞构造与其他种类的硬骨鱼以及哺乳动物的睾丸相似, 即都是由体细胞与生殖细胞组成的。体细胞包括类肌细胞、成纤维细胞、间质内各种细胞、边界细胞与 Sertoli 细胞。生殖细胞则包括精原细胞、精母细胞、精子细胞和成熟精子。类肌细胞与结缔组织成纤维细胞共同构成精巢的外膜, 主要起保护作用。间质除了有微血管与成纤维细胞外, 还存在着数量众多的 Leydig 细胞。由于 Leydig 细胞的超微结构特征与其它各种能产生类固醇激素细胞的超微结构特征^[1]完全一致, 因而认为金鱼的 Leydig 细胞也具有产生激素的功能。边界细胞与基膜构成精巢的基本结构单位——小叶的被膜, 在它的细胞质中常可见到大量的细丝, 估计在排精时可起收缩作用。小叶内的结构单位是小囊, 小囊外面有单层 Sertoli 细胞, 而在分化为成熟精子时, 小囊便破裂。已知金鱼的 Sertoli 细胞与哺乳动物的 Sertoli 细胞^[13]类似, 都具有支持、营养、吞噬、产生激素与维持血-辜屏障等多种作用。然而目前还不了解当小囊破裂时, Sertoli 细胞间的连接是如何断裂的, 并且在小囊破裂后 Sertoli 细胞的命运是什么。

精子的发生和形成 金鱼精子的发生是经过精原细胞, 精母细胞和精子细胞, 最后发育为成熟精子。本研究表明金鱼精子发生和精子形成有如下几个特点: 1) 精巢内存在

两种精原细胞,这与其他动物睾丸的情况类似,即其中一种精原细胞作为干细胞,它只能进行有丝分裂,但不发生进一步分化,因而可以维持精巢内的精原细胞数量;而另一种精原细胞则分化为精母细胞^[12]。2) 金鱼的精子头部没有顶体,但是却有液泡^[1]。液泡的来源可能有两种,一种可能是,高尔基复合体活性在初级精母细胞阶段明显增高,四周聚集了大量的液泡(图版 II: 11)。已经观察到在精子形成过程中,部分液泡会向尾部迁移并聚集在轴丝四周^[2],而不发生迁移的液泡则构成头部液泡结构。另一种可能是,在精子发生过程中,随着细胞核体积逐渐缩小或当核内排出某种物质,部分连有核孔的核膜将会脱落下来,在细胞质内形成膜片层结构,有些便被保留在头部。3) 在精子发生过程中,核膜孔的分布出现很大的变化。在精原细胞时期,核膜孔是相对稀疏地分布在整个细胞核膜上(图版 I: 8),当分化为精母细胞时,大部分核膜上没有核膜孔,核膜孔集聚在几片不连续的区域上(图版 I: 9)。而在最后形成精子时,核膜孔集中存在靠近颈部的核后区域上(图版 II: 16)。目前还不清楚核膜孔的这种重新排列所具有的功能和意义,也不清楚在细胞质中那些与聚集核膜孔对应区域内的活性是否发生了特殊的改变。4) 精子形成可分为3个主要阶段,其变化特征各不相同。早期阶段的变化主要表现在染色质开始浓缩,细胞质与细胞器逐渐向一处集中。中期阶段的变化是: 当细胞质与细胞器进一步向一处集中,则与之相对部位的质膜与核膜间隙缩小,从而使头、颈部初步成形;而远心中心粒长出的轴丝不断向细胞外延伸,从而形成鞭毛。后期阶段头、颈、尾三部分基本定形,细胞核内染色质几乎完全浓缩,只留下少数部位形成核泡;此外,头中部细胞质膜的膜内蛋白颗粒出现规则排列,构成精子头部的晶格区。

目前对集中存在的核膜孔,核内的核泡以及头部质膜内的晶格状结构的生理意义均不了解,有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 管汀鹭, 1988. 金鱼精子头部的液泡. 科学通报, 9: 719—720.
- [2] 管汀鹭, 1988. 金鱼精子鞭毛发生的特点. 动物学报, 34: 189—191.
- [3] 管汀鹭, 1990. 金鱼精子质膜和核膜的区域特异性. 实验生物学报, 23: 19—26.
- [4] Baccetti, B. and Afzelius, B. A., 1976. The biology of the sperm cell. Karger, Basel.
- [5] Billard, B., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Develop.*, 26: 877—920.
- [6] Fribourgh, J. H., McClendon, D. E., and Soloff, L., 1970. Ultrastructure of goldfish, *Carassius auratus*, spermatozoa. *Copeia*, 2: 274—279.
- [7] Gilkey, J. C., 1981. Mechanism of fertilization in fishes. *Amer. Zool.*, 21: 359—375.
- [8] Grier, H. J., 1975. Aspects of germinal cyst and sperm development in *Poecilia latipinna* (Teleostei): Poeciliidae. *J. Morph.*, 146: 229—250.
- [9] Grier, H. J., 1981. Cellular organization of testis and spermatogenesis in teleost fishes. *Amer. Zool.*, 21: 345—357.
- [10] Guan, Tinglu, 1986. Structural changes in goldfish sperm after release into water. In: "Proc. International Minisymposium on Developmental Biology. IDB. Beijing. pp. 74—76.
- [11] Guraya, S. S., 1976. Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testis of nonmammalian vertebrates. *Int. Rev. Cytol.*, 47: 99—136.
- [12] Karp, G. and Berrill, N. J., 1981. Development. pp. 100—116. McGraw-Hill Inc. USA.
- [13] Plöen, L. and Ritzen, M., 1984. Fine structure feature of Sertoli cells. In: "Ultrastructure of Reproduction". pp. 67—74. J. V. Blerkom ed. Martinus Nijhoff publishers. Boston.

CELLULAR ORGANIZATION OF THE TESTIS, SPERMATOGENESIS AND SPERMIOGENESIS IN GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS*)

Guan Tinglu Huang Danqing and Huang Guoping

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract

Scanning and transmission electron microscopy was used to study the ultrastructure of testis as well as spermatogenesis and spermiogenesis in goldfish, *Carassius auratus*.

The results have shown that goldfish testis consists of somatic cells and germinal cells. The testis has lobular type of organization. The somatic cells in the testis are: myoid cells and fibroblast cells which constitute membrane sheath; cells constituting the interstitium including Leydig cells located between the lobules and Sertoli cells surrounding the cysts. The germinal cells are: spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The cyst cells develop *in situ* during spermatogenesis.

The following features were observed during spermatogenesis and spermiogenesis: 1) Golgi complexes exist at each differentiation stage; their derivatives may be important sources of sperm vesicles. 2). Nuclear pores undergo striking rearrangement at different stages. 3) Spermiogenesis can be divided into 3 stages.

Key words Testis, Lobule, Cyst, Spermatogenesis, Spermiogenesis