

17 β -雌二醇激发鲢早期精子发生的作用机制

宋海霞, 翁幼竹, 方永强

(国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 将雄性幼鲢(*Mugil cephalus*)分为4组, 分别投喂含17 β -雌二醇饲料组、含三苯氧胺(Tamoxifen)饲料组、含17 β -雌二醇和三苯氧胺(Tamoxifen)混合饲料, 以及对照组, 旨在进一步研究17 β -雌二醇对幼鲢精子发生的作用机制。同时, 采用组织学和免疫组织化学方法对17 β -雌二醇影响鲢精巢精子发生及其作用机制进行分析, 结果表明, 雌激素明显促进鲢精原细胞有丝分裂及增殖和精子发生; Tamoxifen组与混合组于实验后30 d取材观察, 两组精巢切片均显示, 雄性鲢精巢发育停滞, 精原细胞坏死、凋亡, Sertoli's细胞形态结构发生改变、数量下降。这进一步证实雌二醇激发精子发生必须经其受体的介导。雌激素受体(ER)在精巢的免疫组织化学定位揭示, ER在雌激素组免疫活性最高, 对照组次之, 混合投喂组免疫活性非常弱, 而Tamoxifen组则显免疫阴性反应, 这为雌激素对鲢精巢的精子发生起着关键作用的论点提供可靠确凿的新证据, 同时表明在鲢早期精子发生中, 一旦雌激素不足或缺失, 精巢的发育质量和生精能力就会受到严重的影响。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1192–1199]

关键词: 鲢; 精子发生; 17 β -雌二醇; 三苯氧胺

中图分类号: Q959; S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1192-08

近10年来, 关于雌激素影响鱼类精子发生及其作用机制已成为研究鱼类精巢发育内分泌调节的新热点^[1-6], 无论是离体或在体实验研究^[4-6], 均已证实雌激素17 β -雌二醇(E₂)对于鱼类早期精子发生是必须的, 它不但能够促进精原细胞的有丝分裂和增殖, 还能促进精子发生^[7]。同时, 研究发现雌激素受体拮抗剂三苯氧胺(Tamoxifen, 简称Tam)具有抑制雌激素的作用。它是通过与雌激素竞争雌激素受体(Estrogen receptor, ER)阻断雌激素和雌激素受体之间的相互作用, 或降低雌激素水平而发挥作用^[8]。Miura等^[4]研究证实, 在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)整个生精过程中始终可检测到血清和精巢组织中E₂及其受体的存在; 在精巢组织体外培养中, 10 pg/mL的E₂足以诱导精巢中干细胞的分裂; 体内埋植E₂同样具有相同的作用, 然而这种作用却会被Tam所抑制。Bouma等^[6]曾利用离体悬浮器官培养系统对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)进行研究, 将浓度为18.3 nmol/L的E₂加入到培养基能明显促进虹鳟间质细胞的增殖, 而预先用雌激素受体拮抗剂处理, 则没有出现这种增殖效应。

目前, 国内有关雌激素影响鱼类精子发生的报道少见, 而应用雌激素受体拮抗剂对雌激素在硬骨鱼类性腺发育的作用机制的研究则更少。本研究以雄性幼鲢为研究对象, 在前期研究E₂对鲢(*Mugil cephalus*)早期精子发生影响的基础上^[7], 借助雌激素受体拮抗剂Tamoxifen来进一步研究雌激素对雄性鲢性腺发育影响的作用机制, 以详细阐述雌激素在精子发生中的作用机制, 旨在为鱼类精子发生的内分泌调控提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

2008年6月中旬从福建龙海海水鱼类养殖场

收稿日期: 2009-12-09; 修订日期: 2010-01-26.

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科 2008011).

作者简介: 宋海霞(1977-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事海洋动物生殖生理方面的研究. Tel: 0592-2195908; E-mail: songhaixia@163.com

购买 200 尾鲢带回实验室, 这些鲢样本为同批野生鱼苗, 经人工养殖 2 个多月后体长为 10.0 cm 左右、体质量 20.5 ~ 22.10 g, 性腺刚开始发育。从中挑选健康的实验鱼, 随机分为雌激素组、Tam 组、混合投喂组和对照组 4 个组, 每组 20 尾。各组分开养殖在小养殖池中, 暂养 1 周待恢复摄食后, 6 月 30 日正式开始药物实验。

1.2 含雌激素及雌激素受体拮抗剂饲料的配制

17 β -雌二醇(Estradiol-17 β , E₂, 美国 Sigma 公司产品)的添加剂量为 15 mg/kg 饲料, 雌激素受体拮抗剂 Tamoxifen(Tam)的添加剂量为 30 mg/kg 饲料。其配制方法是预先将 E₂ 和 Tam 分别溶解在 100%医用酒精中, 然后分别均匀喷在颗粒饲料上, 反复混合均匀, 而对照组投喂饲料仅喷洒不含任何激素的等量酒精。

1.3 饲料的投喂方法

E₂ 组、Tam 组和混合投喂组(E₂+Tam), 每天上午 8:00 左右分别投喂质量为体质量 1%的处理饲料, 待摄食完毕, 15:00 左右再投喂正常饲料, 每天饲料投喂总量不超过体质量的 3%; 混合投喂组先投喂体质量 1%用 Tam 处理过的饲料, 待摄食完毕, 再投喂体质量 1%的含 E₂ 饲料, 15:00 左右再投喂正常饲料; 对照组则与前 3 组每天投喂量相同。4 组实验鱼持续饲养 45 d 之后, 全部改为投饲正常饲料, 60 d 后实验鱼全部处死, 实验结束。

1.4 组织学样品制备

实验开始前先从各组取幼鲢 2 尾, 作为实验前精巢的发育水平对照, 实验开始后每隔 15 d 抽样检查各实验组和对照组鱼性腺发育情况, 每组取 4 尾, 60 d 后将剩余实验鱼全部处死。实验鱼处理前先用丁香酚麻醉, 然后打开腹部仔细分离位于腹腔背面的线状精巢, 一侧精巢放入 Bouin-Hollane 氏液中, 另一侧放入不含醋酸的 Bouin 氏液中, 分别固定 6 ~ 8 h, 系列酒精脱水, Paraplast 包埋, 连续横切片, 切片厚 5 ~ 6 μ m, 分别用于苏木精-伊红染色和免疫组织化学反应, 以观察鲢精巢发育的形态特点和分析激素对其精巢发育的

影响。

1.5 免疫组织化学步骤

切片经脱蜡水化后, 入 3% H₂O₂-甲醇液中 10 min, 以灭活内源性过氧化物酶。按 SABC(抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物)法进行免疫组织化学反应。蒸馏水轻洗后, 在 0.01 mol/L PBS (pH 7.2 ~ 7.4)中浸泡 5 min, 然后滴加 1:10(V/V)的正常山羊血清封闭液, 室温下孵育 10 ~ 20 min, 以减少非特异性染色。滴加第一抗体, 兔抗人雌激素受体抗体(ER, 1:300 稀释, 购自武汉博士德生物公司), 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h。PBS 轻洗后, 滴加 SABC 复合物, 在室温下孵育 30 ~ 40 min, PBS 轻洗, 最后用 3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 10 ~ 20 min, 苏木精复染。对照实验切片采用 PBS 或正常兔血清替代第一抗体进行同步孵育, 染色结果为阴性。

2 结果与分析

2.1 正常鲢早期精巢的形态结构

饲喂含激素饲料前抽样解剖实验组和对照组鲢精巢, 切片观察两组精子发生状况, 结果显示, 各组精巢形态结构和发育水平类似。特点是早期精巢均为线条状, 成对存在, 外被一层薄的结缔组织。切片观察结果表明, 鲢精巢组织结构属典型的叶状结构(Lobular structure), 生殖上皮随结缔组织向内延伸, 把精巢组织分成许多精小叶, 每个精小叶又由多个精小囊组成。在鲢早期精巢, 每个精小囊是由 2 ~ 4 个精原细胞外被结缔组织包裹而成, 有的则由单个精原细胞组成, Sertoli's 细胞在光镜下只能见到细胞核, 为不规则形或半月形, 它包绕在精原细胞周围, 与精原细胞紧密排列。胞囊内可见 2 种不同类型的精原细胞: 一种是原始的精原细胞(Primordial spermatogonia), 或称为 A 型精原细胞, 平时静止不分裂, 胞径 14.94 ~ 19.22 μ m, 核径 8.79 ~ 12.10 μ m, 核膜清晰, 胞质着色差; 另一种是 B 型精原细胞, 靠近生殖上皮, 细胞为椭圆形, 胞径 8.42 ~ 12.35 μ m, 核径 5.10 ~ 7.66 μ m, 经多次分裂后可分化为初级精母

细胞。

2.2 投喂不同饲料 15 d 后各组鲢精巢发育比较

切片观察结果表明, 4 个实验组无显著不同, 其共同特点是: 精巢中生精细胞均为精原细胞, 且尚未开始进行有丝分裂。小囊间的间质组织发达, 间质细胞丰富, HE 染色, 间质细胞的细胞核着色深, 呈卵圆形或长梭形, 光镜下清晰可见, 精小囊之间分界明显。

2.3 投喂不同饲料 30 d 后各组鲢性腺发育比较

实验进行 30 d 后第 2 次取样, 切片显示最突出的特点就是 E₂ 组精巢发育明显快于其他 3 组。反映在精巢中可见多个精原细胞的有丝分裂, 其特征为核仁消失, 低倍镜下核内染色质凝集为一团(图版 I -2), 而其他 3 组中除在对照组个别精原细胞核内观察到有少量的染色质凝集颗粒外(图版 I -1), 其余 2 组均未见有此现象(图版 I -3, 4)。其次在混合投喂组中, 精原细胞出现坏死现象(图版 I -3), 而 Tam 组精巢除坏死细胞外, 精原细胞细胞凋亡现象尤为显著(图版 I -4)。细胞坏死主要表现为核浓缩或溶解成絮状变成一片红染, 细胞轮廓消失, 坏死区域破碎成无结构的或染为淡蓝色的颗粒状物质等现象。细胞凋亡则表现为核固缩, 核内染色质凝集成一团或呈半月形, 染为深蓝色。在 Tam 组, Sertoli's 细胞形态和数量的变化也很显著。正常情况下, 每个精原细胞都有 1~2 个 Sertoli's 细胞所包绕; 而在 Tam 影响下的精原细胞周围, Sertoli's 细胞数量和大小都明显减小, 有的细胞核变为细长线条状或短棒状(图版 I -4), 体积比正常 Sertoli's 细胞缩小了约 1/2, 甚至在有的精原细胞周围已观察不到有 Sertoli's 细胞存在。

2.4 投喂不同饲料 45 d 后各组鲢性腺发育比较

实验进行 45 d 后第 3 次取样, 精巢切片观察显示, 对照组多数精原细胞正处于有丝分裂期(图版 I -5)。在雌激素组的生精小叶中, 可见有初级精母细胞生成, 胞核略小于精原细胞, 但着色较深, 提示精巢发育开始进入小生长期(精巢 II 期); 位于生精小叶之间的间质细胞的数量多(图版 I -6)。混合投喂组精巢较上次取样的细胞坏死程度加剧, 同时也可以观察到凋亡的细胞存在, 其

主要发育特点是: 靠近生殖上皮多个精原细胞出现退变, 表现为胞质空泡化, 有的细胞胞质空泡较大, 有的细胞刚开始出现空泡, 空泡较小, 不同细胞退变程度不一。围绕精原细胞的 Sertoli's 细胞发育差, 也开始出现核空泡化(图版 I -7)。在 Tam 组可见精原细胞, 体积缩小, 细胞平均直径为 6.25~8.34 μm , 核径为 3.10~4.63 μm ; 与正常精原细胞相比, 体积缩小了 1/2 之多。细胞坏死和凋亡程度也更为严重, 排列杂乱无序, 各精小叶之间边界不易区分, 连成一片(图版 I -8)。

2.5 雌激素受体在各组鲢精巢的免疫活性定位

在第 3 次取样的同时, 对各组精巢进行雌激素受体免疫活性定位, 结果显示: ER 免疫活性在各组的表达程度不一。对照组(图版 II -1), ER 免疫活性定位在精原细胞的细胞核, 或者阳性物质沿胞膜分布, 显示中等阳性反应, 染为棕黄色。雌激素组(图版 II -2): ER 定位于精原细胞核和胞质以及个别 Sertoli's 细胞, 显强的免疫阳性反应, 染为棕褐色。混合投喂组: 大多数精原细胞无阳性反应, 少数精原细胞的细胞核呈弱阳性反应(图版 II -3)。Tam 组几乎未见在精原细胞有雌激素受体的免疫活性反应(图版 II -4)。

2.6 实验进行 60 d 后各组鲢性腺发育比较

投喂不同饲料 45 d 后改投正常饲料, 继续投喂 15 d 后取样, 即实验进行 60 d 后最后一次取样, 各组精巢切片观察结果显示: 4 组发育水平各不相同。如对照组精小叶中有许多精原细胞处于旺盛的有丝分裂时期, 并可见少量的初级精母细胞分布在精小叶中; 间质细胞丰富, 串行分布在各精小叶之间(图版 I -9)。雌激素组雄鱼精巢除精小叶边缘具少量的精原细胞外, 还可见由初级精母细胞和次级精母细胞所组成的精小囊结构(图版 I -10)。混合投喂组个别精原细胞进行有丝分裂, 但胞质空泡化现象依然明显, 细胞核内染色质凝集, 被空泡挤压变形, 靠近细胞膜一侧, 表现出细胞凋亡特征, 提示混合组尚未消除 Tam 对精巢发育的影响(图版 I -11)。Tam 组精巢发育明显缓慢, 精小囊内精原细胞发育仍处于精原细胞时期, 除凋亡和坏死细胞外, 正常精原细胞尚未

见有丝分裂现象。Tam 组精巢内精原细胞数量少, 且体积减小为原来的 1/3 ~ 1/2; 局部精小叶结构紊乱, 发生了明显的变形, 细胞层次减少为单层, 有的精原细胞核变为不规则的椭圆形(图版 I -12), 即使已经停止投喂 Tam 15 d, 尚未见 Tam 组的精巢组织有明显的恢复。

3 讨论

3.1 17 β -雌二醇激发鲢早期精子发生的作用机制

宋海霞等^[7]已报道 17 β -雌二醇可促进鲢精原细胞干细胞的增殖分裂和精子发生, 并通过免疫组织化学揭示了雌激素对幼鲢精巢的激发作用是通过雌激素受体的介导。为进一步分析雌激素作用的机制, 笔者查阅了国内外资料, 均未见有人应用雌激素受体拮抗剂 Tamoxifen 和雌激素分别拌在饲料中进行混合投喂(即投喂 E_2 + Tam)以及单投喂 Tam 来进一步揭示雌激素的作用机制。本研究发现并提供证据来证实雌激素诱导精原细胞的有丝分裂和促进精巢发育是通过雌激素受体的介导。实验证据是: (1)投喂含有 E_2 +Tam 的饲料与单投喂含有 Tam 饲料的 2 个实验组, 与对照组和投喂雌激素组相比, 幼鲢精子发生和精巢发育有明显的不同, 从最后 1 次取样切片观察结果分析, 在混合组和 Tam 组均没有观察到精小囊中有发育的初级精母细胞, 而在雌激素组精巢, 则出现了发育和分化的初级精母细胞和次级精母细胞; (2)混合组和 Tam 组精巢中可见细胞坏死和凋亡, 且混合组精巢发育受阻程度不及单独投喂 Tam 的实验组。这就有力地说明 E_2 在幼鲢精巢的生理效应必须通过 ER 的介导, 且由于投喂 ER 拮抗剂 - Tam 阻滞了雌激素的作用, 从而出现上述实验结果。

3.2 Tam 影响鲢精巢发育的作用机理

Tam 如何阻滞内源性雌激素受体的作用, 已有许多报道, 国内外不少学者通过多项实验从受体水平研究其作用机理, 结果表明, Tam 及其代谢产物 4-羟基 Tam 等主要以配体形式与 ER 结合^[9-10], 但它们产生与雌二醇不同的配体-受体复合物, 以致诱导出不同的生物效应^[11]; 邹继

超^[10]认为 Tam 比雌二醇形成的受体复合物在核内滞留时间长, 新受体不能及时补充, 从而抑制胞浆中雌激素受体的循环和更新。卢明等^[12]在对大鼠子宫雌激素受体的竞争性结合作用的一项研究中, 也证实了该结论的正确性, 他们分别对注射 E_2 和同时注射 E_2 和 Tam 两种药物的大鼠子宫 ER 含量进行测定, 发现雌二醇可以诱导 ER 水平升高, 但同时注射 Tam 却可以抑制该作用, 且同时减缓雌二醇与 ER 的结合过程。本研究结果分析认为, Tam 组鲢摄入这种受体拮抗剂后, 雌激素的作用受到阻碍和抑制, 从而导致鲢精巢发育受阻, 对幼鲢精巢 ER 的免疫组织化学定位实验便是最直接的证明: 与对照组和雌激素相比, 投喂 Tam 的 2 个组 ER 的免疫活性, 与雌激素组的强免疫阳性形成显明对比, 混合投喂组在少数精原细胞有较弱的免疫活性, 而在 Tam 组则发生免疫阴性反应就是很好的例证。

3.3 Tam 对鲢精巢形态结构的影响

Tam 对脊椎动物精巢的形态结构可产生严重的影响。如 Urban 等^[13]报道, Tam 会破坏生精上皮和提高不正常形态精子的数目, 从而延缓和阻碍精巢的发育。Urban 等^[14]的实验验证了该结论的正确性。同时证明这种作用还存在剂量依赖性^[14-15]。本研究与上述结果有类似之处, 如投喂含 Tam 饲料的 2 个组的鲢性腺发育与其他 2 个组存在明显的延缓和异常, 且在停喂 2 周的情况下, 仍然没有发现 Tam 的生理作用得到解除或缓解, 且在第 1 次取样到第 3 次取样, 投喂过 Tam 的 2 个实验组生精细胞的受损程度越来越严重, 由此得出结论: Tam 的生理毒害作用不仅存在剂量依赖性, 还存在时间依赖性。

此外, 本研究还观察到 Tam 对间质细胞和 Sertoli's 细胞的影响非常明显, 在对照组和雌激素组中, 间质细胞丰富, 间质组织发达, 把各个精小叶明显的区分开; 而在 Tam 组的精巢中, 间质组织变薄, 精巢内各组织混为一片, 精小叶内细胞排列杂乱无序、不易区分; 在非生殖细胞中, Sertoli's 细胞的数量和体积减少, 形态变化也很显著。但在混合投喂组, 间质组织和 Sertoli's 细

胞变化不大。众所周知, 间质组织中的间质细胞能够产生分泌雄激素, 对下丘脑和垂体分泌起正或负的反馈调节, 以保证生精过程的完成^[16-17]。Sertoli's 细胞可以分泌一种雄激素结合蛋白^[18-19], 携带间质细胞分泌的雄激素, 特异性作用于生精细胞。而一旦 2 种细胞都受到 Tam 的生理毒害作用, 鲢体内辜酮的合成和分泌能力减弱; 则会进一步影响到精巢精子的发生和发育。通过几个实验组的比较, 可以初步判断 Tam 影响组织或者细胞均存在作用剂量和作用时间的差别。目前本研究仅仅是在光镜下的观察进行初步推测, 而 Tam 是否真正影响了 Sertoli's 细胞和间质细胞的微细结构, 则有待于对其进行超微结构观察后才能得出确凿的结论。

参考文献:

- [1] Schulz R W, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2002, 26: 43–56.
- [2] Holdcraft R W, Braun R E. Hormonal regulation of spermatogenesis[J]. *Internat J Androl*, 2004, 27: 335–342.
- [3] Schulz R W, Cavaco J E B, Santos E M, et al. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish[J]. *Compar Biochem Physiol: Part B*, 2001, 129: 407–417.
- [4] Miura T, Miura C, Ohta T, et al. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 264: 230–234.
- [5] Miura T, Miura C. Japanese eel: A model for analysis of spermatogenesis [J]. *Zoolog Sci*, 2001, 18: 1055–1063.
- [6] Bouma J, Cloud J G, Nagler J J. *In vitro* effects of estradiol-17 β on myoid and fibroblastic cell proliferation in the immature rainbow trout testis[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 28: 191–192.
- [7] 宋海霞, 翁幼竹, 方永强. 17 β -雌二醇对鲢鱼早期精子发生的影响及其作用机制[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 712–717.
- [8] 韩明强, 黄韬, 田元. 雌激素水平对三苯氧胺抑制乳腺癌细胞的体外研究[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2005, 12(6): 107–109.
- [9] Etienne M C, Milano G, Fischel J L, et al. Tamoxifen metabolism: pharmacokinetic and *in vitro* study[J]. *Br J Canc*, 1989, 60: 30–35.
- [10] 邹继超. 抗雌激素与雌激素受体的相互作用研究[J]. *中华核医学杂志*, 1983, 3: 23–26.
- [11] Lieberman M E, Gorski J, Jordan V C. An estrogen receptor model to describe the regulation of prolactin synthesis by antiestrogens *in vitro*[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 4741–4745.
- [12] 卢明, 童坦君, 何洛文, 等. 三苯氧胺和雌二醇对大鼠子宫雌激素受体的竞争性结合作用[J]. *生物化学杂志*, 1995, 11(4): 425–429.
- [13] Urban J A, D'Souza U J. Effects of tamoxifen on spermatogenesis and tubular morphology in rats[J]. *Asian J Androl*, 2004, 6(3): 223–226.
- [14] Urban J A, D'Souza U J. Tamoxifen induced multinucleated cells (symplasts) and distortion of seminiferous tubules in rat testis[J]. *Asian J Androl*, 2003, 5(3): 217–220.
- [15] Mandlekar S, Kong A N. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2001, 6: 469–477.
- [16] Crim L W. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones [J]. *Gen Comp Endo*, 1981, 44: 374–381.
- [17] Lo A, Chang J P. *In vitro* application of testosterone potentiates gonadotropin-releasing hormonestimulated gonadotropin-II secretion from cultured goldfish pituitary cells [J]. *Gen Comp Endo*, 1998, 111: 329–338.
- [18] 方永强, 翁幼竹, 周晶, 等. 大黄鱼性早熟的机制: 精巢中间质细胞和足细胞的显微与亚显微结构[J]. *台湾海峡*, 2002, 21(3): 275–278.
- [19] 洪万树, 翁幼竹, 林君卓, 等. 鲢鱼精子发生和形成的超微结构研究[J]. *海洋学报*, 2001, 23(5): 116–121.

Stimulating mechanism of estradiol-17 β in early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*

SONG Haixia, WENG Youzhu, FANG Yongqiang

(The Third Institute of Oceanography of the State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using histology and immunohistochemical methods, the effects and action mechanism of estradiol-17 β (E₂) on early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*, were further investigated. Healthy male juvenile grey mullets were randomly divided into four groups: which were fed with estradiol-17 β , tamoxifen, estradiol-17 β + Tamoxifen and basic diet(control), respectively, for 45 days, then all experimental fish were fed with basic diet for 15days instead, and the experiment were finished. The results showed E₂ could hasten cell division, proliferation and spermatogenesis obviously. But the Tamoxifen group and the mixed group showed the arrest of development, cell necrosis and apoptosis of spermatogonia. Meanwhile, the morphology and quantity were changed in Sertoli's cells after feeding 30 days, which further verified E₂ stimulated spermatogenesis by its receptor mediated. The Estrogen receptor(ER) localization in the early testis of grey mullet showed the immunoreactivity of ER was the highest in E₂ group, the control group took place secondly, the mixed group was the worst, and the Tam group showed immuno-negative. So, the immunohistochemical results further proved that E₂ played a crucial role on inducing spermatogenesis, when it was deficiency or absence, and the development quality and spermatogenic activity would be affected seriously. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1192–1199]

Key words: *Mugil cephalus*; spermatogenesis; estradiol-17 β ; Tamoxifen

图版 I 说明

图版 I - 1 ~ 4 投喂不同饲料 30 d 后各组鲮精巢发育比较

1. 对照组中精原细胞核内凝集的染色质颗粒(箭头), Sertoli's 细胞(白色箭头);
2. 雌激素组, 精原细胞核内染色质凝集(箭头);
3. 混合投喂组, 坏死的精原细胞(箭头);
4. Tam 组, 凋亡的精原细胞(粗箭头), 坏死的精原细胞(箭头), Sertoli's 细胞(白色箭头).

图版 I - 5 ~ 8 投喂不同饲料 45d 后各组鲮鱼精巢发育比较

5. 对照组中精原细胞进行有丝分裂(箭头);
6. 雌激素组, 出现初级精母细胞(箭头), 间质细胞(粗箭头);
7. 混合投喂组, 精原细胞胞质(箭头)和 Sertoli's 细胞胞质(粗箭头)中出现空泡;
8. Tam 组, 细胞坏死和凋亡程度加剧.

图版 I - 9 ~ 12 投喂不同饲料 60d 后各组鲮鱼精巢发育比较

9. 对照组中出现初级精母细胞(箭头), 间质细胞(粗箭头);
10. 雌激素组的初级精母细胞(粗箭头)次级精母细胞(箭头);
11. 混合投喂组, 个别精原细胞进行有丝分裂(箭头), 胞质空泡化细胞多, 细胞核被挤压在一侧;
12. Tam 组, 精小叶变形, 精原细胞数量少, 体积小, 单层排列.

宋海霞等: 17β -雌二醇激发鲮早期精子发生的作用机制

SONG Haixia et al: Stimulating mechanism of estradiol- 17β in early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*

图版 I 投喂不同饲料后各组鲮精巢发育比较(注释见 1197 页)

Plate I Testis comparative development of grey mullet in each experimental group after feeding of different feed

Plate I -1 ~ 4 the testis comparative development of grey mullet in each experimental group after feeding for 30 days

1. chromatin condensation granule in nucleus of spermatogonium (arrow) of control group, Sertoli's cell (white arrow); 2. the chromatin condensation in spermatogonia (arrow) in E_2 group; 3. cell necrosis (arrow) in mixed group; 4. the apoptosis (thick arrow) and necrosis (arrow) in Tam group, Sertoli's cell (white arrow).

Plate I - 5 ~ 8 the testis comparative development of grey mullet in each experimental group after feeding for 45 days

5. the spermatogonia in mitosis (arrow) in control group; 6. the primary spermatocytes (arrow) in E_2 group, the Leydig cell (thick arrow); 7. the vacuoles in cytoplasm of spermatogonium (arrow) and Sertoli's cell (thick arrow); 8. the phenomenon of apoptosis and necrosis became more and more serious in Tam group.

Plate I - 9 ~ 12 the testis comparative development of grey mullet in each experimental group after feeding for 60 days

9. the primary spermatocytes (arrow) in control group, Leydig cells (thick arrow) 10. it could be observed the primary spermatocytes (thick arrow) and secondary spermatocytes (arrow) in E_2 group, 11. a few spermatogonia in mitosis (arrow) in mixed group, some spermatogonia exhibited typical characteristics of apoptosis: the cytoplasm vacuolization, condensation and margination of nuclear chromatin (thick arrow); 12. in Tam group, spermary lobule was distortion, spermatogonia is monolayer (arrow) and its count and volume decreased.

宋海霞等: 17β -雌二醇激发鲮早期精子发生的作用机制

SONG Haixia et al: Stimulating mechanism of estradiol- 17β in early spermatogenesis of grey mullet, *Mugil cephalus*

图版 II 投喂不同饲料 45 d 后各组鲮鱼精巢 ER 定位比较

1.对照组, ER 免疫活性定位在精原细胞的细胞核(箭头)或者沿胞膜分布的胞质(粗箭头); 2.雌激素组, ER 定位于精原细胞胞质和核(箭头), 以及 Sertoli's 细胞核(粗箭头), 显强免疫阳性反应, 3.混合投喂组, 大多数精原细胞无阳性反应, 少数精原细胞的细胞核呈弱阳性反应(箭头); 4.Tam 组, ER 呈免疫阴性反应.

Plate II Testis comparative ER localization of grey mullet in each experimental group after feeding for 45 days

1. ER were localized in the nucleus (arrow) or cytoplasm (thick arrow) of spermatogonia in control group; 2. E_2 group, showing strong immuno-positive reaction to ER antibodies in the nucleus or cytoplasm of spermatogonia (arrow) and Sertoli's nucleus (thick arrow); 3. Feeding group showed weak (arrow) or no immuno-positive reaction to ER antibodies in spermatogonia in mixed group; 4. Tam group showed immuno-negative to ER antibodies.