

罗氏沼虾雄性生殖系统的组织化学研究

王玉凤 堵南山 赖伟

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

摘要 本研究用组织化学方法研究了罗氏沼虾雄性生殖系统中主要生物大分子的分布及变化, 并探讨其原因。从精原细胞到精子的发育过程中, DNA 含量变化不大, 只是随细胞核从细胞的中部转到成熟精子的主体部。RNA 的浓度略有降低。蛋白质的含量也有下降, 但精氨酸逐渐生成。在成熟精子主体部前端和棘状部有少量 PAS 阳性物质, 这与前人的研究有很大的不同。输精管和射精管内分泌物呈 PAS 强阳性, HgBpB 反应也呈强阳性, 证明含有大量糖类和蛋白质, 这种环境对精子的生理成熟和维持活力可能有十分重要的意义。

关键词 罗氏沼虾, 组织化学, 雄性, 生殖系统

在甲壳动物十足类雄性生殖系统组织化学方面, 堵南山等^[1,2]曾对中华绒螯蟹的精子做过研究, 陈倬等^[3]报道了长毛对虾的研究结果, Lynn 等^[13]曾对罗氏沼虾精子形态等做过研究。而罗氏沼虾组化方面的研究还未见报道。本研究对罗氏沼虾雄性生殖系统中一些主要的生物大分子进行识别、定位和简单定量, 并探讨含量变化与精子发生的关系。

1 材料与方法

实验用罗氏沼虾于 1994 年 9 月至 1995 年 1 月从上海市长风市场购得, 活体解剖, 迅速取出雄性生殖系统, 切成小块, 用 Bouin 氏液、Carnoy 氏液或中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 切片厚 6-8 微米。

以 Feulgen 反应测脱氧核糖核酸, 对照不经 60℃ 1NHCl 处理。

以甲基绿——派若宁反应测核糖核酸, 对照用 37℃ 1NHCl 处理 3 小时。

过碘酸——Schiff(PAS)反应测中性粘多糖或糖元, 对照以乙酰作用阻断, 再用 KOH 还原及唾液淀粉酶消化。

Alcain——PAS 测中性粘多糖和酸性粘多糖。

汞溴酚蓝(HgBpB)反应测蛋白质。

茚三酮——Schiff 反应示结合性氨基, 对二甲基氨基苯甲醛(P-DMAB)法示色氨酸, 坂口反应测精氨酸。

2 结果

罗氏沼虾雄性生殖系统由精巢、输精管、射精管组成。各部分组织化学反应见表1。

2.1 精巢 精巢外被一层结缔组织膜,有许多生精小管。因精子是分批成熟的,故在生殖季节成熟的精巢中,往往同时有精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和精子。

2.2 输精管 管壁内含有大量用以构成精荚壁的分泌物,管中有许多精子。

2.3 射精管 管中央也有许多精子,管壁内侧及中央含大量粘液,用来构成精荚壁。管壁较厚,除上皮细胞外,还有很厚的肌肉层。其组化反应结果与输精管基本一致。

表1 罗氏沼虾雄性生殖组织化学测定结果

Table 1 Results of histochemical tests on the male reproductive system of *Macrobrachium rosenbergii*

所测物质 Materials	组化方法 Methods	精 巢 Testis						输精管 Vas deferens		射精管 Ejaculatory	
		精原细胞 Sperma- togonia	精母细胞 Sperma- toocytes	精细胞 Sperma- tids	精子 Sperm			分泌物 Secretory materials	管壁 Wall	分泌物 Secretory materials	管壁 Wall
					主体部 Main body	棘状部 Spike	管壁 Wall				
DNA	Feulgen	++	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++
RNA	甲基绿-派若宁 Methyl green - Pyronine	+++	++	+	+	-	+++	-	+++	-	+++
糖类 Glycogen	PAS	-	-	-	+	+	+	+++	+	+++	+
	PAS-乙酰化 PAS-Acetylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PAS-乙酰化-KOH PAS-Digested by saliva	-	-	+	+	+	+++	+	+++	+	+
	Alcian	-	-	-	+	+	+	+++	+	+++	+++
	蛋白质 Protein	+++	+++	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++
-NH	茚三酮-Schiff	+	++	++	+	+	+	+++	++	+++	++
色氨酸 Try	P-DMAB	++	+	+	+	+	-	++	++	++	++
精氨酸 Arg	坂口反应 Sakaguchi	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-

注: +++ 强阳性 Most positive; ++ 较强阳性 More positive; + 阳性 Positive; - 阴性 Negative。

3 讨论

3.1 核酸 在精子发生过程中,DNA 的含量变化不大,罗氏沼虾精子的核属非浓缩型,与其它典型的十足目精子相似,但其分布有所变化。在精原细胞期,较大的细胞核内 DNA 均匀分布,但在成熟精子中,DNA 集中在基部,而棘状部中则无。作者认为,精子核在主体部。Rytex 等认为,十足目精子非浓缩型核是一种裸露的 DNA,类似于细菌和线粒体、叶绿体中所发现的 DNA^[12]。

胞质中 RNA 的反应由精原细胞的强阳性到精子成熟期的弱阳性。这是因为在精原细胞和精母细胞内有 RNA 的合成,但到后期变态时细胞质高度退化,RNA 的量大大减少,只靠精子发生早期产生并储存的稳定的 RNA 来翻译、合成精子成形所必需的蛋白质。

精巢、输精管及射精管的壁上皮细胞是同源细胞,精原细胞是由壁上皮细胞所分生的,所以它们也含有较多的 DNA 和 RNA,这些细胞生物学意义相同,仅为分泌与支持作用。

3.2 蛋白质与氨基酸 在精子发生过程中,蛋白质反应的阳性由强到略弱,变化不大。Vaughn 等^[15]曾报道过 *Emerita analoga* 的精子发生伴随着重要的核蛋白,主要是核体细胞型的组蛋白的丢失,到精子发生后期,核组蛋白和鱼精蛋白含量几乎完全消失,而一些非碱性蛋白却仍然存在。就在核体细胞型组蛋白丢失的同时,碱性蛋白在顶体处出现,这似乎表明,在精子分化时,核体细胞型组蛋白转到顶体处了。Chevallier 也认为,精细胞发育过程中,细胞核的组蛋白移入细胞质,并集聚在顶体内^[7]。

罗氏沼虾精子棘状部含有蛋白质,而 Feulgen 反应为阴性,即不含核物质,这和爬行亚目的臂是不同的,爬行亚目的精子臂是核的延伸物,Feulgen 反应呈阳性^[1,12]。

碱性蛋白存在于某些十足类中,但在另外一些种类中又缺失,这可能种类不同及结构和功能上的差别有关。由此可见,在十足类精子发育过程中,蛋白质的量变化不大,而其性质和分布却有很大变化。壁细胞中蛋白质含量较多,分泌物中含量也较多,是否对成熟或未成熟的雄性生殖细胞具有保护、营养及支持作用还有待进一步证实。精氨酸是精子成熟的标志,只有精子的基部阳性较强,其它组织中皆无。

3.3 糖类 动物的精子是一类结构和功能都十分特化的细胞,其膜表面存在多种糖蛋白、糖脂或糖复合物,作为凝集素受体,它们的变化与精子获得和卵子进行识别、粘附以及结合等受精能力密切相关^[4]。不象哺乳动物,其精子在睾丸内的发生阶段已出现糖复合物^[10],罗氏沼虾在精子发生前期并无糖出现,直到精子成熟时才在基部前端检测出少量糖类。Koehler 也发现在 *Palaemonetes paludosus* 精子的核中也出现含 PAS 阳性物质的颗粒,并认为其具顶体的功能,因为当精子受到刺激时,这些颗粒就会释放出内含物^[11]。但林勤武、洪水根、Clark 等分别证明了锐脊单肢虾、中国对虾、长毛对虾精子的棘状部是顶体复合体的一部分,在棘状部基部含顶体颗粒和顶体膜囊^[5,6,8]。Pochon—Masson 认为长臂虾 *Palaemon elegans* 的精子棘状部也是顶体,细胞化学试验证明 PAS 反应阳性。而据我们的试验,罗氏沼虾棘状部 PAS 反应略呈阳性,这与 Lynn 的结果^[13]很不相同。在我们做的精卵受精试验中,也是主体部先附于卵子表面,但后来是由棘状部先进入卵子的(另文发表),所以作者认为主体部糖蛋白对精卵识别、粘附起着重要的作用,但并不能说明该部就是顶体的位置。

罗氏沼虾输精管上皮细胞的分泌物是构成精荚壁的主要成分,它含有中性粘多糖、酸性粘多糖和蛋白质,可能是以糖蛋白的形式存在。这类物质也存在于其它甲壳动物的输精管中^[8],至于它的功能,人们提到粘着精子、化学和生物的防护、可能的营养作用等^[9]。但它对精子的生理成熟等方面的影响似乎是更值得探讨的问题。Koehler 发现成熟的精子核中的 PAS 阳性颗粒明显地是从输精管腔中通过胞饮作用而形成的^[11],Veselsky 等认为,在哺乳动物,当精子通过附睾管时,精子表面有些糖蛋白可能丢失,而附睾管分泌物中的一些糖蛋白被整合到精子膜表面特异的区域上,成为精子的一部分^[16]。

在精子的发生、发育和成熟的过程中,不仅进行了与精卵结合相关的膜糖蛋白合成,其分布特性也为精卵识别、结合和融合等步骤作了相应的准备。

参 考 文 献

- [1] 堵南山等,1987. 中华绒螯蟹精子的研究 I. 精子的形态及超微结构. 海洋与湖沼, 18(2): 119-125.
- [2] 堵南山等,1987. 中华绒螯蟹精子顶体反应的研究. 动物学报, 33(1): 8-13.

- [3] 陈依等, 1986. 中国毛虾生殖系统的组织学和组织化学. 甲壳动物学论文集(第一辑): 158 - 164.
- [4] 陈吉龙等, 1994. 发育生物学进展, 23 - 28. 高等教育出版社(北京)。
- [5] 林勤武等, 1991. 中国对虾精子的形态结构、生理功能的研究 I. 精子的超微结构. 海洋与湖沼, 22(5): 397 - 401.
- [6] 洪水根等, 1993. 长毛对虾精子发生的研究: 精子的形态结构. 动物学报, 39, (3): 239 - 242.
- [7] Chevaillier, 1996. Contribution a l'etude du complexe ADN - histone dans le spermatozoïde du pagure *Eupagurus bernhardus* L. (crustace Decapode). J. Microsc., 5: 739 - 758.
- [8] Clark, W. H., Jr., M. G. Kleve, A. I. Yudin, 1981. An acrosome reaction in natantian shrimp. J. Exp. Zool., 218: 279 - 291.
- [9] Johnson, P. T., 1980. Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus* - A model for the Decapoda. 5 - 15. New York Praeger.
- [10] Klint M et al., 1987. Boar sperm surface glycoproteins: isolation, location, and temporal expression during spermatogenesis. Gamete Research, 17: 173 - 190.
- [11] Koehler, L. D. 1979. A unique case of cytodifferentiation: Spermiogenesis of the prawn, *Palaemonetes paludosus*. J. Ultrastruct. Res, 69: 109 - 120.
- [12] Langreth, S. G., 1969. Spermiogenesis in Cancer crabs. J. Cell Biol., 43: 575 - 603.
- [13] Lynn, J. W., Clark, Jr., 1983. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol. Bull., 164: 459 - 470.
- [14] Pochon - Masson, J., 1969. Infrastructure du spermatozoïde de *Palaemon elegans*. Arch. Zool. Exp. Gen., 110: 363 - 372.
- [15] Vaughn, J. C., and Thomson, L. A., 1972. A kinetic study of DNA and basic protein metabolism during spermatogenesis in the sand crab *Emerita analoga*. J. Cell Biol., 52, 322 - 337.
- [16] Veselsky L et al., 1992. Binding of a 15kD glycoprotein from spermatozoa of boars to surface of zona pellucida and cumulus oophorus cells. J. Reprod Fert., 96: 593 - 602.

A HISTOCHEMICAL STUDY ON THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF *MACROBRACHIUM ROSENBERCH*

Wang Yufeng Du Nanshan Lai Wei

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai, 200062)

ABSTRACT The male reproductive system of *Macrobrachium rosenbergii* was studied by histochemical techniques to demonstrate the distribution of nucleic acids, carbohydrates, proteins and some amino acids in it. In the course of spermatogenesis, the location of DNA moved together with the nucleus from the center of the original cell to the base of mature sperm, its quantitative change was not distinct. The content of RNA and proteins decreased. At the top of the base and the spike of the mature sperm, PAS - reaction was a little positive, which was different from the results reported by other researchers. The secretory material from vasa deferentia and ejaculatory duct showing PAS positive and HgBpB reaction positive confirmed that a great deal of glycogen and protein existed in the secretory material. This could be a very important condition for sperms to get physiological maturation and keep activity.

KEYWORDS *Macrobrachium rosenbergii*, Histochemistry, Male, Reproductive system