

十足目甲壳动物精子发生过程 顶体形成和细胞核变化*

康现江 王所安

(河北大学生物学系 保定 071002)

关键词 :十足目 精子 顶体 细胞核 碱性蛋白

中图分类号 :Q954.43 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2000)04-35-05

Acrosomal Formation and Nuclear Variation during Spermatogenesis in Decapoda , Crustacea

KANG Xian-Jiang WANG Suo-An

(Department of Biology , Hebei University Baoding 071002 ,China)

Key words : Decapoda ; Spermatozoon ; Acrosome ; Cell nucleus ; Basic protein

十足目甲壳动物精子发生对于细胞学家是一个长期有趣的主体,早期对十足目甲壳动物精子发生的研究结果,往往把无鞭毛的精子细胞器与可运动精子的归为同类。McCroan 使用孚尔根(Feulgen)染色方法观察绿螯虾(*Cambarus viridis*)的精子发生,首次发现在其辐射臂观察到有核物质^[1]。Moses 结合细胞化学方法研究^[2],才对十足目甲壳动物精子发生的认识有了突破性的进展。

电子显微镜的运用,推动了从超微结构水平研究十足目甲壳动物的精子发生。在爬行亚目动物方面作

* 河北省科委重点资助项目(No. 93245501D);

第一作者介绍 康现江,男,35岁,副教授,博士,研究方向:甲壳动物生殖发育及其调控;现工作单位:厦门大学海洋学系,福建厦门 361005;

收稿日期:1999-08-16,修回日期:2000-04-24

了较多的研究工作,如日本绒螯蟹(*Eriocheir japonicus*)^[3]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[4]、日本拟螯虾(*Cambaroides japonicus*)^[5,6]、黄道蟹属的*Cancer borealis*、*C. magister*、*C. productus*和斑纹黄道蟹(*C. irroratus*)^[7]、中华绒螯蟹(*E. sinensis*)^[8]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[9]、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[10]、龙虾(*Enoplometopus occidentalis*)^[11]及一些螯虾等。

随着该方面的研究进展,对游泳亚目动物的精子发生也逐渐关注起来。如对真虾派的褐虾(*Crangon septemspinosa*)^[12]、小长臂虾(*Palaemonetes paludosus*)^[13]、锯额长臂虾(*Palaemon serratus*)^[14]、长额拟对虾(*Parapenaeus longirostris*)^[15]和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[16,17]、以及对虾派的锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)^[18]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[19]、中国对虾(*P. chinensis*)^[20]等的精子发生进行了研究。

精巢内精原细胞增殖和生长后,成为初级精母细胞,每个初级精母细胞经过两次成熟分裂形成四个精细胞,精细胞进一步变态,形成精子。有些种类精子形成后,尚需一个成熟或获能过程方能有受精作用。

精子发生的研究不仅涉及各期生殖细胞的特征,更为关注的是顶体的形成和细胞核的变化。其变化特征在不同类群不尽相同,现将该方面的研究概述如下。

1 顶体的形成

众所周知,在许多动物精子发生过程中,高尔基体的分泌与顶体的形成密切相关^[21]。十足目甲壳动物精子发生过程顶体的来源尚存有争议。在十足目甲壳动物不同种类中,高尔基体的有无以及是否与顶体形成有关尚存有较大分歧。在有些种类精子发生过程中,高尔基体分泌活跃,并参与顶体的形成^[1,16,17,19,22],而Shigekawa等认为在锐脊单肢虾高尔基体的出现与顶体形成无关,有关高尔基体的功能尚不清楚^[18]。我们观察到中国对虾精细胞时期高尔基体周围有大量的线粒体,并且发现有密度较高的颗粒,推测高尔基体分泌颗粒参与顶体的形成^[20]。有些种类精子发生过程中未发现明显的高尔基体^[4,5,7,8,13,22],这些种类顶体的形成也不尽相同。关于十足目甲壳动物高尔基体的存在与功能特征尚需进一步研究。

线粒体为能量的提供者,在十足目甲壳动物精子发生过程不同阶段的生殖细胞中变化复杂。这些变化涉及数量、结构和嵴的变化^[8,23]。研究发现在有些种

类线粒体参与顶体的形成,线粒体基质转变为类晶体,参与顶体的形成^[24]等。日本沼虾的高尔基体和线粒体等细胞器一起,形成片层复合体,经聚集融合形成顶体原基。中国对虾精细胞时期,线粒体嵴消失,形成衍生物,其降解的产物参与顶体的形成。

随着研究的不断深入,认识到内质网除作为蛋白质合成场所外,还有其它功能形式,并将其视为细胞中膜系统的一部分。在十足目甲壳动物精子发生过程中,内质网以多种形式存在于生殖细胞中,如环形片层、泡状内质网、大型丝状网和致密片层等。在十足目甲壳动物中,较多种类的内质网参与顶体的形成,有的种类精子发生过程中,细胞质中出现膜片层,与内质网和核膜联系,该膜片层类似高尔基体的作用,参与顶体的形成^[6]。在中华绒螯蟹精子发生过程中,内质网始终以小泡的形式存在,并在精细胞早期,粗面内质网小泡产生的致密圆形颗粒参与顶体的形成,锯缘青蟹从精母细胞到精细胞,细胞质中出现特化的膜系,呈螺旋状和晶格状,形成顶体的一部分。在对虾派的斑节对虾、中国对虾和锐脊单肢虾等精子发生过程中,内质网或内质网小泡同样参与顶体的形成。

在有些种类,细胞核参与顶体的形成,但在这些不同种类之间其形式也不尽相同。锐脊单肢虾精细胞核膜形成一些囊泡,这些囊泡融合形成原顶体囊,其内含物融合后形成原顶体颗粒;日本沼虾在次级精母细胞时期,一些核物质从核孔排出后参与顶体的形成;中国对虾精细胞时期,一些絮状的核物质排出后参与顶体的形成。

顶体的化学组成目前研究尚少,十足目甲壳动物精子顶体有PAS阳性特征,由糖类和蛋白质组成。Tsai和Talbot研究美国海螯蛄(*Homarus americanus*)顶体腔内含有促使精子和卵黄膜接触的蛋白成分^[25]。Chen等对锐脊单肢虾精子的内含物分析表明,精子内含物有类胰蛋白酶溶素(tryptone-like lysin),它可以降解卵黄膜。SDS-PAGE分析表明,精子内含物含有46ku和30ku两种蛋白,分别具有类胰蛋白酶和类氨基肽酶的活性,它们的作用可能与精子溶解卵黄膜进入卵内有关^[26]。溶酶体在日本沼虾精子发生过程中发生规则的变化,一部分溶酶体参与顶体复合物的顶帽及棘突部分的形成,另一部分参与顶体内含物的形成,顶体帽部分的溶酶体所含的酶类属卵膜溶素,它能溶解较厚的卵膜,顶帽和棘突上含有的蛋白质,有利于精卵的进一步识别和融合。该方面尚需结合免疫电镜、生化和分子生物学等技术进一步深入研究,方能进一步阐明其成分和功能。

2 细胞核的变化

十足目甲壳动物从精原细胞到精子形成,细胞核的形态和结构发生了很大变化。精原细胞和精母细胞的细胞核有共同特征,即圆形或椭圆形,染色质块状或颗粒状,块状的染色质分布于核的边缘或核质中,但中国对虾初级精母细胞和次级精母细胞时期,尤其是初级精母细胞晚期,核膜膨大形成一些囊泡,并且核内有一些丝状物进入其内,部分囊泡胞吐排出细胞,这在十足目甲壳动物精子发生过程中是少见的^[20]。精细胞形成精子的过程中,不同种类细胞核的形态结构变化表现出不同的特征,细胞核变化的共同特征包括核膜的降解和丝状或絮状染色质的形成。

爬行亚目精细胞的细胞核形态由椭圆形变为杯状,因此又呈“核杯”,并且核杯外膜间隔一定距离形成突起,又称“核臂”或“辐射臂”,其内为核物质。有的种类辐射臂中具微管^[7],有的种类具微丝^[10]。辐射臂的多少不同种类数目不同,是爬行亚目种属的特征之一。染色质变化表现不尽相同,有的种类精子发生过程中,由浓缩的染色质转变为非浓缩的均匀核质,进而变为细丝状结构^[10];有的种类如黄道蟹(*Cancer crab*)的精子形成过程,染色质由细颗粒状变为网状细丝,也有的种类的染色质到成熟精子一直保持细颗粒状^[27]。染色质常常靠近核膜,密度也较高。在精子发生过程,靠近顶体的核膜常出现裂解,在受精时有助于核物质进入卵子。

在游泳亚目真虾派小长臂虾精子形成过程中,精子尾部通过胞饮作用将一些小泡状结构转入精子,因此在成熟的精子核区存在大量小泡,小泡内无核物质,只是一些含有精英基质的小泡。日本沼虾到成熟精子时也有丝状核和泡状核之分,而在罗氏沼虾到精子成熟时,核物质均匀分布(无泡状核),位于棘突下,在核凸起的区域,核膜通常溶解、不完整^[13,16]。

在对虾派锐脊单肢虾精子发生过程,细胞核也经历了复杂的变化,由精细胞变态为精子,在早期精细胞时期核膜形成一些囊泡,这些囊泡融合形成原顶体囊;染色质经历了浓缩和解聚过程,最后形成细丝状的染色质,在染色质浓缩和解聚的同时,核膜也出现裂解。中国对虾由精细胞变态为精子过程中,染色质也经历了浓缩和解聚,形成细丝状或絮状的染色质,核膜不完整。

有关十足目核物质的生化组成研究尚少,在多数动物精子发生过程中,核内的组蛋白被鱼精蛋白取代,这有助于DNA的稳定。锯齿长臂虾(*Palaemon serra-*

tus)精子不含鱼精蛋白,但染色质生化分析表明,碱性蛋白:DNA=0.94,这种碱性蛋白特性如何,尚不清楚。

总之,十足目甲壳动物精子发生过程中,细胞核经历了较为复杂的变化。发育到成熟精子时的特征为核膜不完整和细丝或絮状的染色质,这些特征对于受精过程有重要作用。精子核膜的降解可能与受精过程有关^[18],核物质的解聚可能与碱性蛋白丢失有关^[7,27~29]。多数动物精子为浓缩核,有利于精子的运动和遗传物质的保护,而十足目动物精子最明显的特征为无鞭毛和非浓缩核。

3 顶体和精子核的碱性蛋白

碱性蛋白在维持染色质结构和功能的完整性上起着关键性作用。在十足目甲壳动物中,细胞核的成分也有不同。少数种类如普通海螵蛸(*Homarus vulgaris*)、美国海螵蛸(*H. americanus*)和挪威海螵蛸(*Nephrops norvegicus*)具有细颗粒状的核物质,与保留碱性组蛋白有关。Chevallier 研究认为变态的精细胞核的组蛋白迁移到细胞质中,并聚集到顶体内层区域,在成熟精子中不与核酸结合的碱性蛋白即位于此^[27]。然而挪威海螵蛸顶体碱性蛋白的起源不同,因为它的精子核并未失去其组蛋白。Bloch 研究了螳螂属的 *Emerita analoga* 早期精细胞,注意到在精细胞的液泡(vacuole)中碱性蛋白含量增多的同时,在核中仍有组氨酸着色,他认为顶体蛋白应在细胞质中合成,新的组蛋白聚集在那里,并在以后某个时间进入细胞核^[30]。Vaughn 等从 *Emerita analoga* 的精子中分离出的碱性蛋白,未测出核蛋白成分,通过聚丙烯酰胺电泳分析,发现含有更类似体细胞的组蛋白成分。他们通过显微分光光度测定评价变态的精细胞核中DNA和蛋白质的比率支持 Chevallier 的意见,因为在核蛋白质降低同时,细胞质碱性蛋白在聚集。进一步通过标记的精氨酸(³H-arginine)和赖氨酸(³H-lysine)注射,并通过放射自显影技术研究发现精子的碱性蛋白为细胞质合成的。

Vaughn 等还发现正在发育的精细胞明显失去一部分核蛋白,精细胞大量的核蛋白质是以体细胞组蛋白形式丢失的。精子发生后期,精子核中组蛋白和鱼精蛋白成分接近于零,然而仍存有一些非碱性蛋白。以体细胞形式丢失组蛋白的同时并不伴随配子式的组蛋白的合成。还发现顶体中的非碱性蛋白(酶)于细胞质中合成,尔后转移到顶体中,并依据在核内体细胞组蛋白失去的同时顶体中碱性蛋白增加,认为存在核-质转移。

研究发现黄道蟹精子顶体的碱性蛋白是在细胞质内合成,而不是细胞核起源的^[7]。刀额新对虾精子顶体具有碱性蛋白,研究发现顶体形成的同时,核内碱性蛋白被抛弃。在锐脊单肢虾的精子核中无碱性蛋白(无组氨酸和精氨酸),目前尚不清楚在精子发生过程中何阶段细胞核碱性蛋白丢失了^[28]。在中国对虾初级精母细胞晚期细胞核膜形成一些囊泡,并且核内一些细丝状物质进入囊泡,同时也观察到一些囊泡排出初级精母细胞,这是否是精子发生过程中碱性蛋白转移的一个形态学证据,尚需进一步研究。

总之,十足目动物精子核为非浓缩核,有关其细胞核碱性蛋白变化和顶体中碱性蛋白的形成研究尚少,从已研究的结果看,顶体中的碱性蛋白有在细胞质中合成的,也有细胞核起源的,其核内碱性蛋白的去向以及受精后精子核的碱性蛋白变化尚未深入认识。该方面的深入研究有助于阐明非浓缩核DNA的保护及其雄性原核构建特征,也会为将外源基因导入雄性原核进行转基因研究提供依据。

致谢 本文得到堵南山教授指导,初稿得到李少菁教授审阅,谨致谢忱。

参 考 文 献

- [1] McCroan J. E. Spermatogenesis of the crayfish, *Cambarus viridis*, with special reference to the golgi material and mitochondria. *Cytologia*, 1940, **11**: 136~155.
- [2] Moses M. J. Studies on nuclei using correlated cytochemical, light and electron microscope techniques. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, **2**(4) Suppl. 397~406.
- [3] Yasuzumi G. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy VII. spermatid differentiation in the crab, *Eriocheir japonicus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, **7**: 73~87.
- [4] Moses M. J. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*) II. description of stages. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, **10**: 301~334.
- [5] Yasuzumi G., G. I. Kaye, G. D. Pappas *et al.* Nuclear and cytoplasmic differentiation in developing sperm of the crayfish, *Cambaroides japonicus*. *Z. Zellforsch.*, 1961, **53**: 141~158.
- [6] Kaye G. I., G. D. Pappas, G. Yasuzumi *et al.* The distribution and form of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis in the crayfish, *Cambaroides japonicus*. *Z. Zellforsch.*, 1961, **53**: 159~171.
- [7] Langreth S. G. Spermatogenesis in cancer crabs. *J. Cell Biol.*, 1969, **43**: 575~603.
- [8] 堵南山, 薛鲁征, 赖伟. 中华绒螯蟹精子的研究 II. 精子发生. 海洋与湖沼, 1988, **19**(1): 71~75.
- [9] 李太武. 三疣梭子蟹精子的发生及超微结构研究. 动物学报, 1995, **41**(1): 41~47.
- [10] 王艺磊, 张子平, 李少菁. 锯缘青蟹精子发生的超微结构. 动物学报, 1997, **43**(3): 249~254.
- [11] Haley S. R. Ultrastructure of spermatogenesis in the Hawaiian red lobster, *Enoplometopus occidentalis* (Randall). *J. Morphol.*, 1986, **190**: 81~92.
- [12] Arsenaault A. L. Changes in the nuclear envelope associated with spermatid differentiation in the shrimp, *Crangon septemspinosa*. *J. Ultrastruct. Res.*, 1984, **8**: 294~308.
- [13] Koehler L. D. A unique case of cytodifferentiation: spermiogenesis of the prawn, *Palaemonetes paludosus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 1979, **69**: 109~120.
- [14] Papanthassiou E., P. E. King. Ultrastructural studies on gamete genesis of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant) II. spermatogenesis. *Acta. Zool. (Stockh)*, 1984, **65**: 33~40.
- [15] Medina A. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Decapoda: Decapoda). comparative aspects among decapods. *Mat. Biol.*, 1994, **119**: 449~460.
- [16] 赵云龙, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾精子发生的研究. 动物学报, 1997, **43**(3): 243~248.
- [17] 杨万喜, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾高尔基体在精子发生过程中的变化. 动物学报, 1998, **44**(4): 377~383.
- [18] Shigekawa K., W. H. Clark, Jr. Spermiogenesis in the marine shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Dev. Growth Differ.*, 1986, **28**(2): 95~112.
- [19] 洪水根, 李祺福, 郭永刚等. 斑节对虾精子发生的超微结构. 动物学报, 1998, **44**(1): 1~4.
- [20] 康现江, 王所安, 堵南山等. 中国对虾精子发生及受精细胞学的研究. 河北大学学报(自然科学版), 1998, **4**(1): 339~401.
- [21] Browder L. W. Development Biology. USA: CBS College Publishing, 1984. 217~429.
- [22] Nath V. Spermatogenesis of the prawn, *Palaemon lamarrei*. *J. Morphol.*, 1937, **61**: 149.
- [23] Kaye J. S. Changes in the fine structure of mitochondria during spermatogenesis. *J. Morphol.*, 1958, **102**: 347~399.
- [24] Meyer G. F. Die parakristallinen Körper in den Spermien-schwänzen von "Drosophila". *Z. Zellforsch.*, 1964, **62**: 762~784.
- [25] Tsai K. L., P. Talbot. Ultrastructure and biochemical

- analysis of the apical cap : a contractile element of the lobster sperm acrosome. *J. Exp. Zool.* ,1994 ,**268** :186 ~ 199.
- [26] Chen ,T. I. , J. D. Green , W. H. Clark , Jr. Sperm penetration of the vitelline envelope of *Sicyonia ingentis* eggs is mediated by a trypsin-like lysin of acrosomal vesicle origin. *Develop. Growth & Differ.* , 1994 ,**36**(3) :259 ~ 273.
- [27] Chevaillier ,P. Contribution a l'etude du complexe ADN-histone dans le spermatozoide du pagure *Eupagurus bernhardus* L.(Crustace Decapode). *J. Microsc.* , 1966 ,**5** : 739.
- [28] Kleve ,M. G. ,A. I. Yudin , W. H. Clark , Jr. Fine structure of the unitellate sperm of the shrimp , *Sicyonia ingentis* (Natantia). *Tissue Cell* ,1980 ,**12**(1) 29 ~ 45.
- [29] Vaughn ,J. C. , J. Charroff , R. Garland *et al.* Changing nuclear histone patterns during development. II . isolation and partial characterization of decapodine from sperm cells of the crab , *Emerita analoga* . *Exp. Cell Res.* , 1969 , **54** 362.
- [30] Bloch ,D. P. Histone differentiation and nuclear activity. *Chromosoma* , 1966 ,**19** 317 ~ 339.