

乌梢蛇精子头部形成的超微结构

张蕾 梁刚* 周艳妮 任耀辉

陕西师范大学生命科学学院 教育部药用资源与天然药物化学重点实验室
西北濒危药材资源开发国家工程实验室 西安 710062

摘要: 为了解乌梢蛇 (*Zaocys dhumnades*) 精子形成的规律,用透射电镜对其头部超微结构进行了观察。结果表明,乌梢蛇精子头部形成可分为4个阶段:阶段 I,前顶体囊泡内的颗粒物质融合形成1个顶体颗粒而发育为顶体囊泡,随着顶体囊泡的增大,在顶体囊泡与核膜之间形成了致密的纤维物质层。阶段 II,顶体囊泡变扁平,顶体颗粒分散在顶体囊泡内,前后囊泡膜逐渐相互融合,形成帽状顶体囊。阶段 III,细胞核离开中心位置移向精子细胞的一极,并在其周围开始有微管聚集,远端中心粒与近端中心粒出现,线粒体和内质网等其他细胞器移向精子细胞的另一极。阶段 IV,细胞核周围汇聚大量微管,随着微管围绕细胞核的直径缩小,细胞核伸长为长卵圆形,同时顶体复合体也发育完成。

关键词: 乌梢蛇;精子头部;精子形成;超微结构

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)05-126-06

The Ultrastructure of Sperm Head Formation in Chinese Rat Snake *Zaocys dhumnades*

ZHANG Lei LIANG Gang* ZHOU Yan-Ni REN Yao-Hui

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University; Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry; National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China, Xi'an 710062, China

Abstract: The ultrastructure of sperm head in Chinese Rat Snake *Zaocys dhumnades* was observed by transmission electron microscopy. According to the changes of the structure of axenomal complex, the typical sperm head formation could be divided into four stages. Stage I, when the preacrosomal vesicle approached the nucleus, the particulate materials in the preacrosomal vesicle came into being an acrosomal granule at the bottom of acrosomal vesicle. As the preacrosome became bigger, the subacrosomal granule changed to fibrous material layer. Stage II, the spermatid acrosomal vesicle flattened and the acrosomal granules dispersed in the acrosome vesicle. The vesicle membrane merged to form a cap-shaped acrosomal vesicle. Stage III, the nucleus moved from the center to the cell pole, and proximal centriole, distal centriole and microtubules appeared. Mitochondria and endoplasmic reticulum moved from the center to the other cell pole. Stage IV, a large number of microtubules gathered around the nucleus. As the diameter of microtubules around the nucleus became smaller, acrosomal complex fully developed.

Key words: *Zaocys dhumnades*; Sperm head; Spermiogenesis; Ultrastructure

* 通讯作者, E-mail: lianggang@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 张蕾,女,硕士研究生;研究方向:动物发育细胞学;E-mail: hknmtt1985@stu.snnu.edu.cn。

收稿日期:2011-01-04,修回日期:2011-05-09

精子形成是精子细胞通过复杂形态变化形成成熟精子的生理过程,是精子发生的最后一环^[1]。由于爬行动物处于特殊的演化地位,其精子在形成过程中所出现的不同结构及其变化,无疑包含较为丰富的系统发生信息,这些信息可为确定动物的分类地位、系统演化和亲缘关系等提供重要依据^[2-3]。国内外已有对鳞类精子形成的超微结构变化积累了比较丰富的资料^[4-10]。乌梢蛇(*Zaocys dhumnades*)为我国特有的常见大型无毒蛇类,分布于我国 21 个省区,在维持农林业生态系统平衡方面具有重要的作用^[11]。本文作者观察了乌梢蛇精子头部形成的超微结构,旨在掌握其精子形成的规律,为进一步探讨爬行动物的亲缘关系及四足动物系统演化等积累基础资料,也为乌梢蛇的人工饲养与繁殖、野生资源的有效保护及合理开发利用等提供理论依据。

1 材料与方 法

观察用乌梢蛇购于陕西省汉阴县某养蛇场,均系雄性性成熟个体。依据本实验室已有的研究结果^[12],在 2009 年 7、8、9 三个月的 10 日选取健康活跃的乌梢蛇各 2 条,共取材 6 条,体重为 (103.67 ± 80.74) g,全长为 (118.4 ± 15.2) cm。用乙醚将乌梢蛇麻醉后,立即取出精巢置于装有冰块的培养皿表面(滴加了少量冷的 2.5% 戊二醛固定液),用新刀片切成约 1 mm^3 小块,分别用 2.5% 戊二醛与 1% 锇酸固定,酒精系列脱水,618 环氧树脂渗透并包埋。LKB2088 超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。日立 H-600 型透射电镜观察并拍照。

2 结 果

乌梢蛇的精子细胞靠近生精小管的腔面,常聚集成团状,细胞界限比较清晰,相邻细胞间有细胞质间桥。早期精子细胞呈圆形(约 $7 \mu\text{m}$);细胞核圆形、较大(约 $3 \mu\text{m}$),位于细胞中央,核膜清晰,染色质呈颗粒状并弥散分布,核仁明显,位于核的中央;在细胞核的周围分布有

圆形管状嵴线粒体;高尔基体发达,在其成熟面附近有大小不一、圆形的小囊泡;在细胞核的一侧还分布有许多圆形的小囊泡(图版 I:1)。依据顶体复合体发育的进程,并参照蔡亚非等对黑眉锦蛇(*Elaphe taeniura*)精子形成^[10]及 Hofling 等对蜥蜴类精子形成的分期^[13],将乌梢蛇精子头部形成划分为以下 4 个阶段。

阶段 I:乌梢蛇精子细胞的高尔基复合体成熟面许多大小不一、圆形的小囊泡相互融合,形成 1 个近似圆形(约 $2 \mu\text{m}$)、没有顶体颗粒的前顶体囊泡,并逐渐向细胞核移动(图版 I:2)。当前顶体囊泡移至核膜时,接触部位的核膜向内凹陷并逐渐加深,同时,前顶体囊泡内的颗粒物质融合成 1 个顶体颗粒,位于顶体囊泡底部、细胞核凹陷的一侧,前顶体囊泡发育成为椭圆形且电子透明的顶体囊泡(图版 I:3)。随着细胞核继续凹陷,核仁消失,顶体囊泡(呈圆形、约 $2 \mu\text{m}$)最终完全陷入核内,到达核直径约 $1/3$ 处停止(图版 I:4)。随后,顶体囊泡逐渐增大、变扁,在顶体囊泡与核膜之间连接处的间隙里,有一薄层颗粒物质(顶体下颗粒 subacrosomal granule)将顶体颗粒与核膜连接起来,形成了致密的纤维物质层,此时,在该处可见由囊泡膜、纤维物质层与核膜共同构成的典型三层膜结构;此外,染色质较均匀的分布在细胞核内,使细胞核的电子密度变高(图版 I:5)。

阶段 II:在乌梢蛇精子细胞的顶体囊泡进一步发育过程中,核膜凹陷消失,细胞核逐渐延长为卵圆形,其前部的染色质凝聚成短丝状的染色质纤维,网眼内核质电子密度低;由于顶体囊泡内胞液的丢失,顶体囊泡进一步变扁平并凹陷,紧贴在细胞核的前部(图版 I:6)。随后,顶体颗粒物质分散在顶体囊泡内,前后囊泡膜逐渐相互融合,形成帽状顶体囊(图版 I:7)。

阶段 III:乌梢蛇精子细胞核逐渐离开中心位置移向细胞的一极,在核周围开始有微管聚集,同时,染色质浓缩呈均质状,电子密度进一步变高;细胞质重新排布,线粒体和内质网等其他细胞器移向精子细胞的另一极;此外,在细胞核附近出现了 1 个呈圆形的致密体(dense

body, 约 $1.5 \mu\text{m}$), 在远离细胞核的一侧还出现了许多圆形的空泡状囊泡(约 $0.3 \mu\text{m}$) (图版 I:7)。远端中心粒与近端中心粒出现, 近端中心粒固着在核陷窝内(图版 I:8)。

阶段IV: 乌梢蛇精子细胞核周围汇聚大量微管, 在横切面上, 这些微管较规律地排列在一起, 环绕在细胞核周围形成环带状结构, 其中, 在环带状结构的内缘与外缘, 这些微管各自排列成比较完整的一圈(图版 I:9); 在纵切面上, 这些微管与细胞核长轴基本平行, 呈直线状, 两侧各有 2~3 排微管(图版 I:8)。随着环带状微管围绕细胞核的直径缩小, 使得细胞核不断伸长, 直至由卵圆形变为长卵圆形; 此后, 细胞核周围的微管和致密体消失, 空泡状囊泡迁移至细胞核的周围形成完整的一圈, 并且在紧贴细胞膜下方出现了许多线粒体, 其中一些线粒体的电子密度较高(图版 I:10~12)。随着细胞核周围空泡状囊泡的消失与线粒体的移动, 顶体复合体逐渐发育完成, 在横切面上呈圆形, 在纵切面上呈帽状(长约 $2.5 \mu\text{m}$), 由前向后依次由顶体囊、穿孔器、顶体下腔和顶体下锥组成。顶体囊位于顶体复合体的外表面, 可分为浅层的皮质和深层的髓质; 穿孔器位于顶体囊的前部内, 与顶体囊之间有一不明显的狭窄腔隙; 顶体下腔是顶体囊与顶体下锥之间电子密度低的区域; 顶体下锥位于顶体囊与细胞核前部之间, 其内侧紧贴在核膜表面, 电子密度高; 此外, 在顶体下锥与核喙之间具有核外电子透亮区(图版 I:13~15)。在顶体复合体发育完成时, 细胞核从前向后可明显地区分为核喙、核肩、核体和核陷窝 4 部分。核喙近似杆状, 前端较细、后端较粗; 核肩是核喙后端的直接延续部分, 属于圆形核肩; 核体呈圆柱状, 与核肩后部的直径基本一致; 在核体后端的中央有一个圆形的核陷窝, 其内镶嵌着近端中心粒(图版 I:13,14)。至此, 乌梢蛇精子头部的发育基本完成。

3 讨论

Giugliano 等指出, 精子超微结构的多态性

可以增加系统发生分析的准确性^[14]。从已有的研究及我们的观察结果看, 四足动物在精子形成过程中, 顶体囊泡与顶体颗粒在不同类群之间存在着较大的差异。Burgos 等和 Rastogi 等分别观察了蟾蜍(*Bufo aereum*)^[15]及墨西哥叶蛙(*Pachymedusa dacnicolor*)^[16]的精子形成过程, 结果表明, 只出现电子透明的顶体囊泡, 而不出现前顶体囊泡与顶体颗粒。爬行动物, 例如蜥蜴(*Lacerta taurica*)^[4]、中国石龙子(*Eumeces chinensis*)^[5]、喙尾蜥(*Tropidurus torquatus*)^[6]、鬣蜥(*Agama adramitana*)^[7]、北草蜥(*Takydromus septentrionalis*)^[8]、赤链蛇(*Dinnodon rufozonatum*)^[9]、黑眉锦蛇^[10]和乌梢蛇, 在精子形成过程中也出现了电子透明的顶体囊泡, 前顶体囊泡中的颗粒物质逐渐融合形成 1 个顶体颗粒。鸟类如白来航鸡(*Gallus gallus domesticus*) 在精子形成中不出现顶体囊泡, 早期精子细胞内的高尔基复合体部位出现 1 个前顶体颗粒, 该颗粒逐渐移动接触核膜并在核前端扩展为半月形的顶体^[17]。较多的资料表明, 在哺乳动物精子形成过程中, 顶体囊泡是由电子致密的物质组成的, 早期精子细胞内的高尔基复合体区出现一些电子致密的前顶体颗粒, 然后逐渐集中形成大的顶体颗粒, 包裹上膜性囊泡后向核移动^[18]。通过对以上结果比较后显示: ①在四足动物精子形成过程中, 爬行动物保留了两栖动物所具有的电子透明的顶体囊泡; 哺乳动物保留了两栖爬行动物的顶体囊泡, 但顶体囊泡由电子透明状演化为电子致密状。而鸟类从古爬行动物分支出来后, 现代鸟类的顶体囊泡已经消失。②在四足动物精子形成过程中, 两栖类没有顶体颗粒, 而爬行类、鸟类和哺乳类等羊膜动物均出现了顶体颗粒。从以上四足动物不同类群在精子形成过程中是否出现顶体囊泡, 以及顶体颗粒、顶体囊泡的形态特征, 不仅说明了顶体囊泡在四足动物各纲之间存在较为明显的差异, 而且也说明顶体颗粒的出现可能是羊膜动物的共同超微结构特征。

微管是细胞质内的重要骨架之一, 广泛存在于各种动物细胞中, 细胞的形态变化以及胞

质内物质的运输等均依赖于微管^[19]。一般认为,在精子头部的形成过程中,染色质的变化是导致精子细胞核延长的原因之一^[20],而微管的存在可能是导致精子细胞核延长的另一个重要原因^[8],然而,有关微管是存在于精子细胞内还是存在于支持细胞内,目前有两种不同的观察结果:①Nagano 在研究家鸡的精子细胞超微结构后首先提出了核套(manchette)的概念,该文指出核套是由许多精致的小管所组成的^[21]。MeIntosh 等在进一步观察家鸡精子细胞变态过程后提出了微管系统的概念,认为微管系统与精子的形态建成有关^[22]。鸡在精子形成过程中,精子细胞核周围出现了环形核套微管^[22]。美洲鸵鸟(*Albisceus americans*)在精子细胞变态时,精子细胞核周围先形成环形核套,后出现纵行核套,而且在两种形式核套之间还发现过渡的斜行核套^[22]。我们观察到乌梢蛇在精子形成过程中,精子细胞核周围汇聚了大量的微管,在横切面上,这些微管较规律地排列在一起,形成环带状结构并环绕在细胞核的周围(图版 I: 7,9);在纵切面上,这些微管与精子细胞核长轴基本平行,两侧各有 2~3 排的微管(图版 I: 8);随着环带状微管围绕细胞核的直径缩小,使得细胞核不断伸长,直至由卵圆形变为长卵圆形。②蔡亚非等在观察了赤链蛇精子头部形成后指出,正在形成的精子被支持细胞质突起所包围,在顶体复合体后部支持细胞质突起内可见有纵行的直微管围绕着精子核膜的外周^[9]。蔡亚非等还观察到,黑眉锦蛇在阶段 IV 时精子头部被支持细胞质突起所包围,在支持细胞质突起内可见许多纵行微管围绕着精子头部,待支持细胞质突起退化,头部外周仍有纵行微管环绕^[10]。刘永章等指出,北草蜥在精子形成时,精子细胞头部被支持细胞质突起所包围,在支持细胞质内可见许多纵行微管,即所谓的核套围绕着精子细胞头部^[8]。哺乳动物如大鼠(*Rattus norvegicus*)在精子头部形成过程中,支持细胞的微管围绕长形精子细胞分布,微管对于生精细胞的变形和迁移有着重要的作用^[23]。综上所述,在精子头部的形成过程中,

无论是支持细胞内的微管,还是精子细胞内核周围的微管,它们确是导致精子细胞核延长的重要原因之一。

参 考 文 献

- [1] Courtens J L, Depeiges A. Spermiogenesis of *Lacerta vivipara*. *Journal of Ultrastructure Research*, 1985, 90 (2): 203 - 220.
- [2] Baccetti B, Afzelius B A. The biology of the sperm cell. *Monographs in Developmental Biology*, 1976, (10): 1 - 254.
- [3] Baccetti B. The evolution of the acrosomal complex // Fawcett W D, Bedford M J. *The Spermatozoon*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1979: 305 - 329.
- [4] Butler R D, Gabri M S. Structure and development of the sperm head in the lizard *Podarcis (= Lacerta) taurica*. *Journal of Ultrastructure Research*, 1984, 88(3): 261 - 274.
- [5] 胡健饶, 陈汉民, 张永普, 等. 中国石龙子精子形成的超微结构研究. *激光生物学报*, 2007, 16(4): 449 - 454.
- [6] Cruz-Landim C, Cruz-Höfling M A. Electron microscope study of lizard spermiogenesis in *Tropidurus torquatus*. *Caryologia*, 1977, 30: 151 - 162.
- [7] Dehlawi G Y, Ismail M F, Hamdi S A, et al. Ultrastructure of spermiogenesis of saudian reptiles. 6. The sperm head differentiation in *Agama adramitana*. *Archives of Andrology*, 1992, 28(3): 223 - 234.
- [8] 刘永章, 张永普, 方周溪. 北草蜥精子形成的超微结构研究. *解剖学报*, 2005, 36(4): 436 - 441.
- [9] 蔡亚非, 唐剑云, 潘鸿春, 等. 赤链蛇(*Dinnodon rufozonatum*)精子头部形成的电镜研究. *解剖学报*, 1997, 28(1): 94 - 97.
- [10] 蔡亚非, 李君, 陈壁辉. 黑眉锦蛇(*Elaphe taeniura*)精子形成的电镜观察. *安徽师范大学学报: 自然科学版*, 1998, 21(1): 42 - 49.
- [11] 赵尔宓. 中国蛇类. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2006: 287 - 288.
- [12] 梁刚, 周艳妮, 王琼霞. 乌梢蛇精巢显微结构的年周期变化. *动物学杂志*, 2008, 43(2): 116 - 122.
- [13] Cruz-Höfling M A, Cruz-Landim C. The fine structure of nuclei during spermiogenesis in the lizard *Tropidurus torquatus*. *Cytologia*, 1978, 43(1): 61 - 68.
- [14] Giugliano L G, Teixeira R D, Colli G R, et al. Ultrastructure of spermatozoa of the lizard *Ameiva ameiva*, with considerations on Polymorphism within the family

- Teiidae (Squamata). *Morph*, 2002, 253(3): 264–271.
- [15] Burgos M H, Fawcett D W. An electron microscopic study of spermatid differentiation in the lizard toad *Bufo aerenarum*. *Hensel J Biochem Biophysiol Cytol*, 1956, 2(2): 223–240.
- [16] Rastogi R K, Bagnara J T, Lela L, et al. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis; a light and ultrasonic study. *Morphol*, 1988, 197(3): 277–302.
- [17] Gunawardana V K, Scott M G. Ultrastructural studies on the differentiation of spermatids in the domestic fowl. *Journal of Anatomy*, 1977, 124(3): 741–755.
- [18] Fawcett D W. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, 1975, 44: 394–436.
- [19] 俞鹤明, 王伟, 竺俊全, 等. 嘉庚蛸精子形成过程中微管的分布特征及作用分析. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(2): 51–255.
- [20] Yasuzumi G. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. *Int Rev Cytol*, 1974, 37(1): 53–119.
- [21] Nagano T. Observations on the fine structure of the developing spermatid in the domestic chicken. *J Cell Biol*, 1962, 14(2): 193–205.
- [22] McIntosh J R, Porter K R. Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J Cell Biol*, 1967, 35(1): 153–175.
- [23] Show M D, Anway M D, Folmer J S, et al. Reduced intratesticular testosterone concentration alters the polymerization state of the sertoli cell intermediate filament cytoskeleton by degradation of vimentin. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5530–5536.

图 版 说 明

1. 早期的精子细胞(标尺 = 1 μm , $\times 6\ 000$); 2. 示前顶体囊泡(标尺 = 1 μm , $\times 8\ 000$); 3. 示顶体囊泡中的顶体颗粒(标尺 = 1 μm , $\times 8\ 000$); 4. 示顶体囊泡陷入核中(标尺 = 1 μm , $\times 4\ 000$); 5. 示纤维物质层(标尺 = 0.5 μm , $\times 17\ 000$); 6. 示帽状顶体囊(标尺 = 0.5 μm , $\times 17\ 000$); 7. 示致密体和囊泡(标尺 = 0.5 μm , $\times 12\ 000$); 8. 微管纵切面(标尺 = 0.2 μm , $\times 35\ 000$); 9. 微管横切面(标尺 = 0.2 μm , $\times 50\ 000$); 10. 横切面上的囊泡(标尺 = 1 μm , $\times 6\ 000$); 11. 示线粒体(标尺 = 1 μm , $\times 8\ 000$); 12. 示线粒体和囊泡(标尺 = 0.5 μm , $\times 12\ 000$); 13. 示核陷窝、近端中心粒和远端中心粒(标尺 = 0.3 μm , $\times 30\ 000$); 14. 头部纵切(标尺 = 0.3 μm , $\times 20\ 000$); 15. 头部横切(标尺 = 0.1 μm , $\times 60\ 000$)。

Explanation of Plate

1. Spermatid (bar = 1 μm , $\times 6\ 000$); 2. Showing preacrosomal vesicle (bar = 1 μm , $\times 8\ 000$); 3. Showing acrosomal granule in the acrosomal vesicle (bar = 1 μm , $\times 8\ 000$); 4. Showing acrosomal vesicle fall into the nucleus (bar = 1 μm , $\times 4\ 000$); 5. Showing fibrous material layer (bar = 0.5 μm , $\times 17\ 000$); 6. Showing cap-shaped acrosomal vesicle (bar = 0.5 μm , $\times 17\ 000$); 7. Showing dense body and vesicle (bar = 0.5 μm , $\times 12\ 000$); 8. Showing longitudinal section of microtubules (bar = 0.2 μm , $\times 35\ 000$); 9. Showing cross section of microtubules (bar = 0.2 μm , $\times 50\ 000$); 10. Showing cross section of vesicle (bar = 1 μm , $\times 6\ 000$); 11. Showing mitochondria (bar = 1 μm , $\times 8\ 000$); 12. Showing mitochondria and vesicle (bar = 0.5 μm , $\times 12\ 000$); 13. Showing nuclear fossa, proximal centriole and distal centriole (bar = 0.3 μm , $\times 30\ 000$); 14. Longitudinal section of sperm head (bar = 0.3 μm , $\times 20\ 000$); 15. Cross section of sperm head (bar = 0.1 μm , $\times 60\ 000$).

ag: 顶体颗粒; av: 顶体囊泡; Ca: 踝状突; co: 皮质; dc: 远端中心粒; et: 核前电子透亮区; fml: 纤维物质层; fs: 纤维鞘; Gi: 高尔基复合体; db: 致密体; M: 微管; me: 髓质; Mi: 线粒体; N: 细胞核; nf: 核陷窝; nr: 核喙; ns: 核肩; p: 穿孔器; pc: 近端中心粒; pv: 前顶体囊泡; sc: 顶体下锥; ss: 顶体下腔; v: 囊泡。

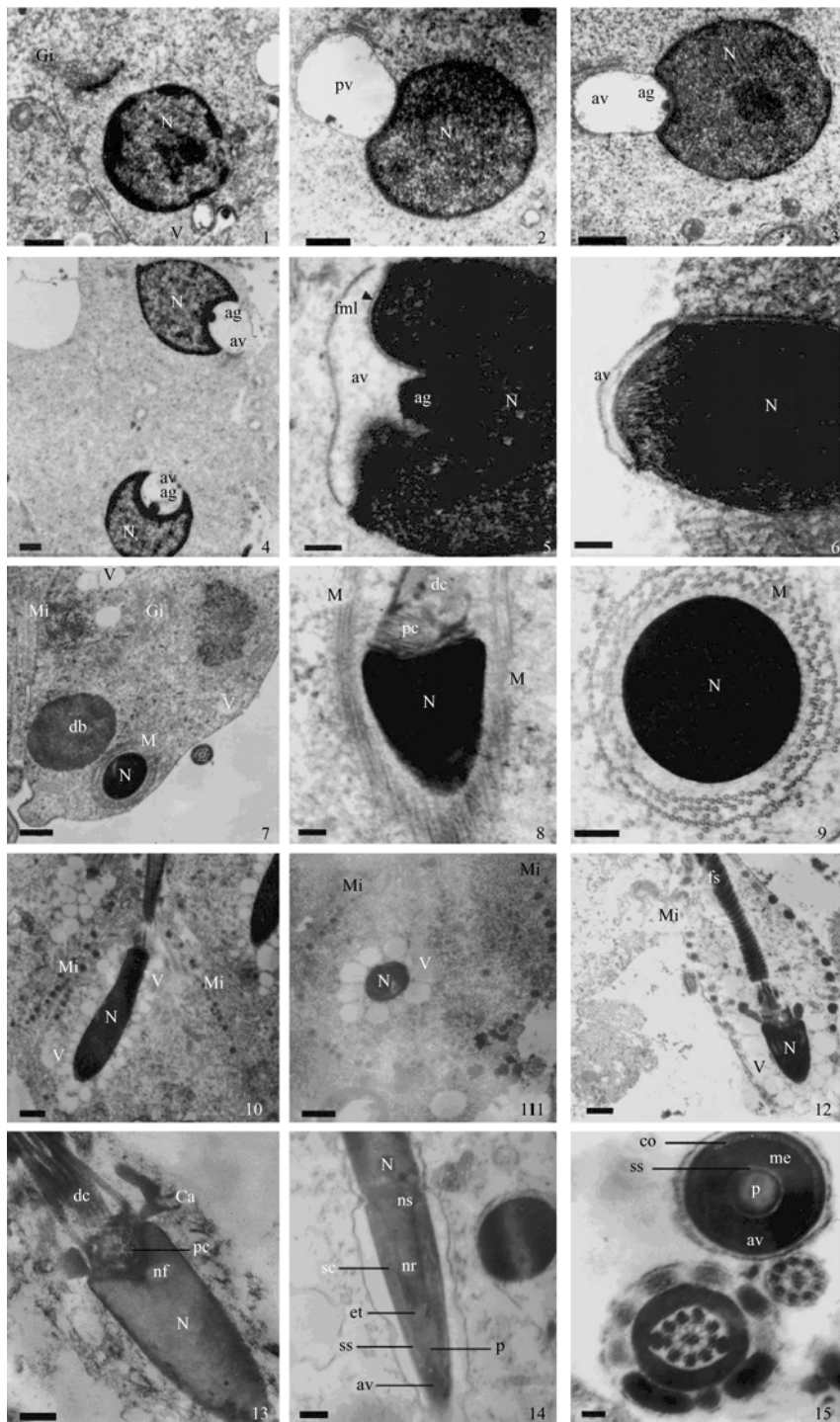
ag: Acrosomal granule; av: Acrosomal vesicle; Ca: Capitulum; co: Cortex; dc: Distal centriole; et: Epinuclear electron-lucent zone; fml: Fibrous material layer; fs: Fibrous sheath; Gi: Golgi complex; db: Dense body; M: Microtubules; me: Medull; Mi: Mitochondria; N: Nucleus; nf: Nuclear fossa; nr: Nuclear rostrum; ns: Nuclear shoulders; p: Perforatorium; pc: Proximal centriole; pv: Proacrosomal vesicle; sc: Subacrosomal cone; ss: Subacrosomal space; v: Vesicle.

张 蕾等:乌梢蛇精子头部形成的超微结构

图版 I

ZHANG Lei *et al.* : The Ultrastructure of Sperm Head Formation in Chinese Rat Snake *Zaocys dhumnades*

Plate I



图版说明见文后