

# 大鼠睾丸生精小管上皮精子发生周期的 PAS 法判定\*

贺晓舟 张远强\*\* 张金山

(第四军医大学组织学与胚胎学教研室 西安 710032)

**摘要:** 精子发生是一个包含生殖细胞成熟分裂的连续、复杂的动态过程,不同的生精小管,或同一生精小管不同区段的生精细胞的组合、分布均不相同。本文应用 PAS 染色法观察了大鼠睾丸生精小管上皮中各级生精细胞在精子发生过程的形态学变化特点。参照 Clermont 及 Russell 等制定的生精上皮时相的判定标准,根据生精上皮在精子发生过程中的各级生精细胞组合分布特点,把生精上皮分为 X IV 个期。通过观察精子发生过程中生精上皮细胞组合的周期性形态变化特点,对精子发生过程进行精确划分,把精子发生这一连续、复杂的动态过程静止化,具体化,可以更加准确地描述和比较不同影响因素对生精小管上皮中各级生精细胞的组织学、病理学、毒理学变化。

**关键词:** 精子发生;精子形成;生精时相;顶体;大鼠;睾丸

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)04-50-03

## Evaluation of Seminiferous Epithelium Stage in Rat Testis by PAS Staining

HE Xiao-Zhou ZHANG Yuan-Qiang ZHANG Jin-Shan

(Department of Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract:** The purpose of this study is to evaluate the stage of seminiferous epithelium in adult rat testis. The cellular association was defined by the developmental stage of the spermatids, which themselves were characterized by their staining with the PAS (Periodic Acid Schiff) technique. According to the criterion of Clermont and Russell, the developmental stages can be easily identified by this technique. A cycle of the seminiferous epithelium could be divided into 14 periods, each of these periods was found to have a well-defined cell association. By using this technique, researchers can learn the more precise features in rat spermatogenesis.

**Key words:** Spermatogenesis; Spermiogenesis; Spermatogenic stage; Acrosome; Rat; Testis

睾丸是产生精子、分泌雄性激素、维系雄性性征的重要器官。精子发生过程是一个极其复杂的连续过程,精子发生过程既受下丘脑-垂体-睾丸性腺轴调控,也受到睾丸自身分泌的各种细胞因子的调控。生精小管是产生精子的部位,生精小管上皮主要由生精细胞和支持细胞构成。生精细胞(spermatogenic cell)包括精原细胞、初级精母细胞(又分为细线前期、细线期、合线期、粗线期、双线期和终变期精母细胞)、次级精母细胞、精子细胞和精子。从精原细胞到精子形成的连续增殖分化过程,称为精子发生(spermatogenesis),包括精

原细胞增殖、精母细胞成熟分裂和精子形成(spermiogenesis)三个阶段。

在精子发生过程中,生精细胞在生精上皮中的排

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870109, 30370750), 全军医疗卫生科研基金资助项目(No. 01M183);

\*\* 通讯作者, E-mail: zhangyq@fmmu.edu.cn;

第一作者介绍 贺晓舟, 32岁, 男, 讲师, 硕士研究生; 研究方向: 生殖调控机理; E-mail: micro\_he@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2003-09-29, 修回日期: 2004-03-20

列不是杂乱无章,而是严格有序的。处于不同发育阶段的生精细胞形成特定的细胞组合 (cell association) 称生精时相 (spermatogenic stage or stage)。在精子发生过程中,生精小管上皮特定部位的生精时相具有周期性的变化特点,我们把某段生精小管从一个特定的生精时相开始到下一次出现同一种生精时相所经历的过程称为一个生精上皮周期 (seminiferous epithelium cycle or cycle)。

由于精子发生过程的连续性和复杂性,在生精小管上皮中包括了处于不同发育阶段的生精细胞,而且这些生精细胞处于一个连续的转化过程,常规 H. E 染色法并不能准确区分各级生精细胞,而精确的定位描述生精上皮各种生精细胞在精子发生周期中的形态学改变是深入研究睾丸精子发生和调控过程的基础。

根据精子发生过程中生精上皮的细胞组合特征对其进行分期就提供了这样一种准确定位描述生精上皮形态学特征的方法。生精上皮中的精原细胞、初级精母细胞的形态学变化都可以作为分期的依据,但方法较为复杂,且难以辨认。参照 Clermont<sup>[1]</sup> 及 Russell<sup>[2]</sup> 等制定的分期标准,结合我室在生精上皮分期方面的经验,采用过碘酸雪夫试剂染色法 (periodic acid Schiff, PAS) 特异显示精子细胞头部的顶体结构,根据顶体系统和精子细胞发育过程中的形态学变化特点,并结合其它生精细胞的形态特征,对生精上皮进行分期,取得了较好的结果,可以更简便有效地描述生精上皮不同生精时相中各级生精细胞的形态学特征。

## 1 材料与方 法

雄性 SD 大鼠 (第四军医大学动物中心提供) 10 只,体重 250 ~ 300 g,麻醉,处死,取出睾丸, Bouin's 液固定,石蜡包埋,切片 (5  $\mu\text{m}$ )。PAS 法染色<sup>[3]</sup>, Schiff 试剂配制方法: 1 g 碱性品红溶于 200 ml 沸腾的蒸馏水中,待溶液冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ ,加入 1 g 偏重亚硫酸钠溶解后冷却至室温,加入 1 mol/L 盐酸 20 ml,充分摇荡,室温避光 24 h,加新鲜活性炭 2 g 充分摇荡数分钟,滤纸过滤,置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。PAS 染色法简要步骤如下:切片常规脱蜡至水, 0.5% 过碘酸氧化液染色 10 min,水洗, Schiff 试剂染色 10 min,流水冲洗 10 min,铁苏木精复染 1 ~ 2 min,流水冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。油镜观察生精小管横断面并照相。

## 2 结 果

大鼠睾丸生精小管上皮经 PAS-铁苏木精法染色,覆盖于大鼠睾丸精子细胞核膜部的顶体由于含有多糖

类物质,被染成紫红色,铁苏木精复染可以更加清晰分辨各级生精细胞核的结构。根据早期精子细胞顶体系统和精子细胞核的形态变化特点,并结合生精小管不同横断面生精上皮中生精细胞的组合、分布特点,可以把成年大鼠生精小管上皮分为 X IV 期。I 期生精上皮由精原细胞、粗线期精母细胞、圆形精子细胞 (round spermatid) 和变形期精子细胞 (elongating spermatid) 组成,该期看不到典型的顶体系统 (acrosomal system) (图版 I: A); II ~ III 期可发现部分圆形精子细胞近核膜处出现圆形或椭圆形紫红色的顶体泡 (acrosomal vesicle),但尚未完全贴附于核膜上 (图版 I: B); IV 期可观察到圆形精子细胞的顶体泡扁平变为半球形贴附于核膜上,并沿着核膜扩展至 40 $^{\circ}$  左右 (图版 I: C); V 期顶体由附着处沿核膜向两侧延伸,扩展至 95 $^{\circ}$  左右,该期部分精原细胞由 A 型精原细胞增殖为 B 型精原细胞 (图版 I: D); VI 期顶体沿核膜进一步延伸扩展至约 120 $^{\circ}$  (图版 I: E); VII ~ VIII 期开始,可观察到部分精原细胞增殖形成细线前期精母细胞,变形期精子细胞从支持细胞深部胞质陷窝移动到生精小管近腔面的位置,在近管腔面可看到大量精子形成过程中脱落的染色较深的残余胞质体 (residual body) (图版 I: F); 从 IX 期开始生精上皮的精子细胞主要为圆形精子细胞,细线前期精母细胞增殖细线期精母细胞,精子细胞进入变形期,细胞核由圆形变为一侧扁平,出现背、腹面,管腔内较少见到处于变形后期的精子细胞 (elongated spermatid) (图版 I: G); X 期精子细胞核继续变形,两侧扁平,并于精子细胞核头部形成突起尖端 (图版 I: H); XI 期精子细胞核进一步变形为长梭形,精子细胞核背部开始出现弯曲 (图版 I: I); XII ~ XIII 期精子细胞继续变形过程,细胞核进一步浓缩,核物质染色较深,此期粗线期精母细胞发育为双线期精母细胞,体积较粗线期精母细胞为大,细胞核呈圆形或卵圆形,核内物质染色稀疏,着色浅 (图版 I: J); XIV 可观察到处于减数第一次分裂和第二次分裂的各期分裂相,在有些生精小管横断面可观察到次级精母细胞,其形态与圆形精子细胞相似,但体积要比圆形精母细胞大 30% ~ 40% (图版 I: K)。由于 II 和 III 期、VII 和 VIII 期、XII 和 XIII 期之间较难区分,故习惯上一般将它们合并在一起分别称为 II ~ III 期、VII ~ VIII 期和 XII ~ XIII 期。

## 3 讨 论

精子发生是一个及其复杂的过程,要经历细胞增殖、成熟分裂和精子形成三个阶段。I ~ IX 期是精子形成的早期阶段,主要是高尔基复合体参与的顶体颗

粒的形成和贴附于精子细胞核膜形成顶体的过程。Ⅶ~Ⅷ期是精子形成的中期,此期主要特点是最终完成变形过程的精子释放到生精小管管腔。Ⅸ~ⅩⅣ期是精子形成的后期,早期的圆形精子细胞在这段时期进入到变形期。在不同的生精时相,生精上皮的细胞组合差别较大,例如在Ⅸ期末已完成精子的释放,生精上皮内的精子细胞主要是圆形精子细胞,看不到变形期的精子细胞,而在ⅩⅣ期,细胞进行减数分裂,此期的生精上皮内只有变形期的精子细胞,并惟一在此期可见到次级精母细胞和初级精母细胞减数分裂过程中不同的细胞分裂相。

Rannikko<sup>[4]</sup>等根据精子发生过程中单个生精小管不同区段的生精细胞组合在相差显微镜下透光性的不同,采用显微切割(transillumination-assisted microdissection)的方法分离生精周期中不同时相的生精上皮,研究FSH受体在大鼠生精上皮中特定生精时相的表达分布规律及在精子发生过程的作用。Malikov<sup>[5]</sup>等根据生精上皮的各级生精细胞中DNA倍性差异及不同生精细胞大小和颗粒密度的差异,通过流式细胞仪检测生精小管单细胞悬液,可以对生精上皮中各级生精细胞进行精确区分和收集。

与上述的大鼠睾丸生精上皮的分期方法相比,以发育早期的精子细胞形态学特征作为分期标准,通过PAS染色对生精时相划分的方法,可以在原位检测不同生精小管上皮的生精时相,而且操作简便和易于掌握。但是这种分期方法也有一定的局限性,不适用于青春期以前发育过程中大鼠睾丸生精上皮的分期,因为在大鼠的精子发生过程中,圆形精子细胞最初出现于出生后第24~25 d,已完成变形过程的精子细胞最初出现于出生后第36~37 d<sup>[5]</sup>。

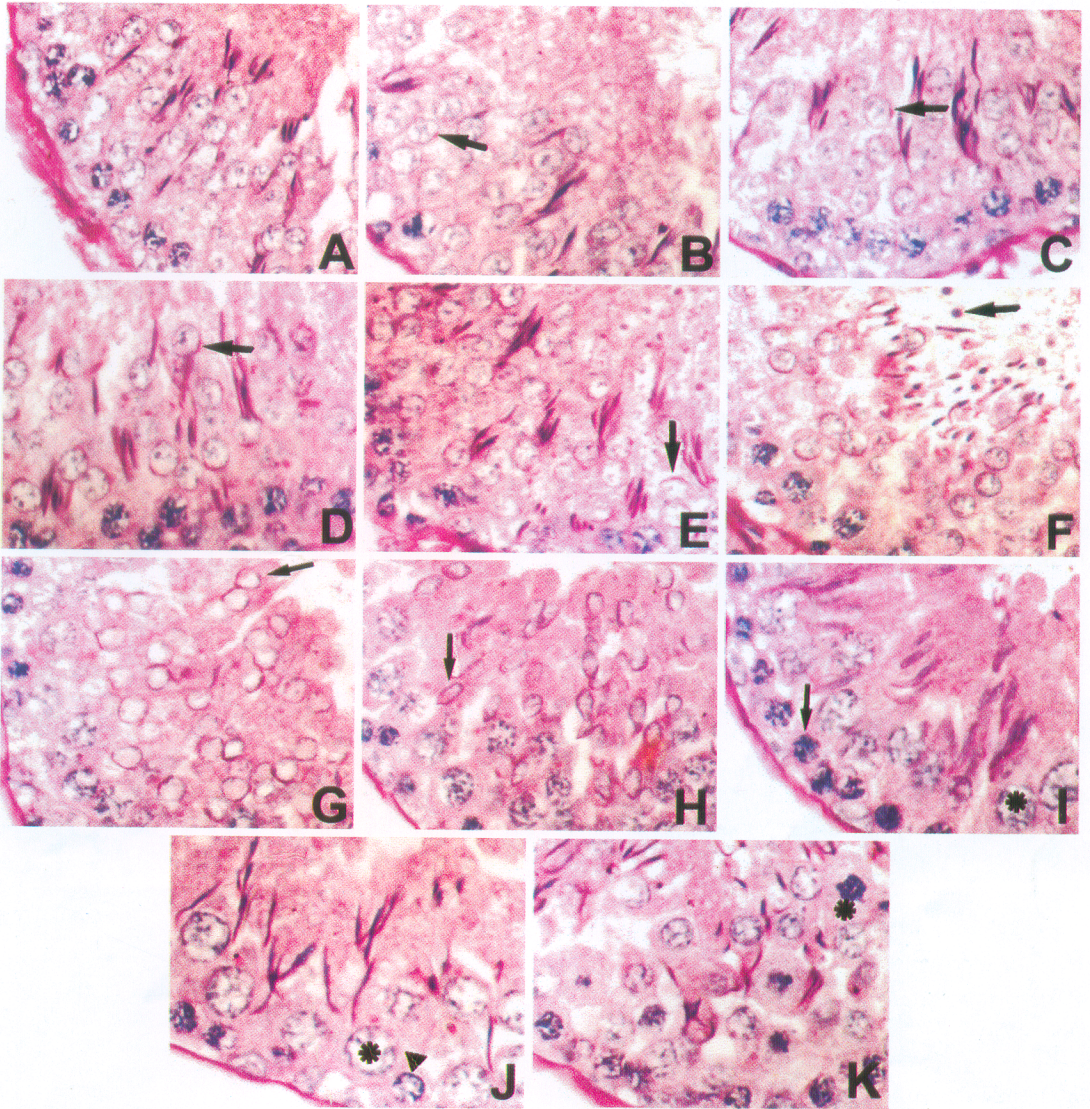
Teerds<sup>[6]</sup>发现转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF $\beta 1$ )主要表达于各级精母细胞和早期的圆形精子细胞,在Ⅶ~Ⅸ期随着圆形精子细胞转变为变形期精子细胞而表达量下降。Xu<sup>[7]</sup>等在研究TGF $\beta$ 胞内信号转导分子Smad2和Smad3在大鼠睾丸生精上皮的期相表达时发现,Smad2和Smad3在生精上皮的各时相均有表达,但在Ⅶ~Ⅷ期表达量最低,说明Smad2和Smad3可能通过介导TGF $\beta$ 和activin的信号转导参与对

精子发生的调控过程。Henriksen<sup>[8]</sup>在电离辐射影响大鼠生精细胞凋亡的实验中发现照射后8 h,Ⅱ~Ⅵ期精原细胞对射线最为敏感,发生的凋亡细胞数量最多;而hanriksen<sup>[8]</sup>在研究正常大鼠发育过程中生精细胞凋亡时,发现Ⅶ~Ⅷ期粗线期精母细胞的凋亡数量要比其它各期增加。

睾丸生精上皮精子发生周期时相的判定,已成为生殖生物学研究领域一种基本的生精上皮结构的分析方法,是进一步研究精子发生组织学、病理学、毒理学改变的基础,并已得到广泛的应用。

## 参 考 文 献

- [1] Clermont Y. The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections. *Rev Canad Biol*, 1957, 16: 451 ~ 462.
- [2] Russell L D. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. USA: Cache River Press, 1990.
- [3] 王伯法, 李玉松, 黄高升等. 病理学技术. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 149 ~ 151.
- [4] Rannikko A, Penttila T L, Zhang F P, et al. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. *J Endocrinol*, 1996, 151(1): 29 ~ 35.
- [5] Mira Malkov, Yonit Fisher, Jeremy Don. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 1998, 59: 84 ~ 92.
- [6] Teerds K J. Localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 during testicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 1993, 48(1): 40 ~ 45.
- [7] Xu J, Beyer A R, Walker W H, et al. Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis. *J Androl*, 2003, 24(2): 192 ~ 200.
- [8] Henriksen K. Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *J Androl*, 1996, 17(4): 394 ~ 402.
- [9] West A, Priante G, Lahdetie J. Stage-specific expression of Gadd45 induced by X-irradiation in rat spermatogenesis. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(1): 29 ~ 39.



A. 生精上皮 I 期, 该期主要由精原细胞、粗线期精母细胞、圆形精子细胞和变形期精子细胞组成, 变形期精子细胞散在分布于生精上皮各层之间, 圆形精子细胞看不到明显顶体泡的结构; B. 生精上皮 II ~ III 期, 顶体泡 (箭头所示) 出现并贴附于圆形精子细胞核膜上; C. 生精上皮 IV 期, 顶体 (箭头所示) 沿核膜扩展, 大约成 30 ~ 45°; D. 生精上皮 V 期, 顶体 (箭头所示) 扩展至 90°左右; E. 生精上皮 VI 期, 顶体 (箭头所示) 沿核膜扩展到 120°左右; F. 生精上皮 VII ~ VIII 期, 此期变形期精子细胞由生精上皮深部移至生精小管近腔面, 在近腔面可见大量精子变形过程中精子细胞脱细胞质形成的深染的残质体 (箭头所示); G. 生精上皮 IX 期, 圆形精子细胞核由中央移到细胞近细胞膜侧 (箭头所示); H. 生精上皮 X 期, 圆形精子细胞开始进入变形期, 可见精子细胞核由圆形变为长棱形、不规则形 (箭头所示); I. 生精上皮 XI 期, 精子细胞进一步变形, 核浓缩。部分精原细胞增殖成为细线期精母细胞 (▲所示), 粗线期精母细胞 (\* 所示) 体积进一步增大。从此期至 XIV 生精上皮中无圆形精子细胞; J. 生精上皮 XIII ~ XIII 期, 主要由精原细胞、合线期精母细胞 (▲所示)、粗线期精母细胞 (\* 所示) 和变形期精子细胞组成; K. 生精上皮 XIV 期, 初级精母细胞开始进行减数分裂, 可见细胞的减数分裂相 (\* 所示)