

# 中华蚱蜢精子发生过程中花生凝集素受体的分布与变化

欧阳霞辉<sup>①②</sup> 奚耕思<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup>陕西师范大学生命科学院 西安 710062; <sup>②</sup>西北民族大学生命科学与工程学院 兰州 730030)

**摘要:** 采用生物素标记的花生凝集素(PNA)对中华蚱蜢(*Acrida cinerea*)精子发生过程中细胞质膜的糖蛋白(含有糖基 Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-GalNAC)进行了标记,旨在认识精子发生过程中细胞质膜糖复合物的形成与变化规律,探讨其所具有的功能。结果表明,在中华蚱蜢的精子发生中,精母细胞能够自身合成PNA受体;精子细胞到成熟精子时期,精细胞质膜糖复合物发生了明显的修饰变化,这些变化与精子获得及卵子进行识别、粘附、结合等受精能力密切相关。

**关键词:** 中华蚱蜢;精子发生;糖蛋白;PNA

中图分类号:Q492 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)01-07-05

## Distribution and Changes of PNA-binding Glycoconjugates during Spermatogenesis of *Acrida cinerea*

OUYANG Xia-Hui<sup>①②</sup> XI Geng-Si<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>Life Science College, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062;

<sup>②</sup>College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationality, Lanzhou 730030, China)

**Abstract:** The distribution of PNA-binding glycoconjugates on the plasma membrane of testicular germ cells during spermatogenesis of *Acrida cinerea* was detected by using biotin-labeled PNA. In testis, PNA receptors were firstly observed in the cytoplasm and on the plasma membrane of primary spermatocyte, greatly increased on the plasma membrane of secondary spermatocyte, and then decreased and accumulated in the tail of transforming spermatid. The reaction was also observed in spermatozoa and spermatheca, with stronger staining in the head and weaker staining in the tail. A universal staining pattern was observed on the plasma membrane of sperm cyst cells. The results suggest that PNA receptors are synthesized by spermatogenetic cells at early period and greatly modified during spermatogenesis, which is similar to the changes in other insects and mammals.

**Key words:** *Acrida cinerea*; Spermatogenesis; Glycoconjugates; PNA

凝集素受体是指细胞表面的以糖蛋白或糖脂形式存在的糖复合物,它们是细胞间通信的重要信号分子,糖链的糖基组成和排列顺序、分枝形式以及糖链的长短构成了化学信号传递着生物信息<sup>[1]</sup>。动物的精子和卵子是两类结构及功能均十分特化的细胞,其膜表面存在着多种凝集素受体,它们在配子发生、精卵识别与融合以及受精完成后防止多精穿入的皮层反应等过

程中起着重要作用<sup>[2]</sup>。近年来,借助凝集素能与糖复合物专一结合的特性,采用多种标记方法,对多种哺乳动物精子发生及成熟过程中的

基金项目 陕西省自然科学基金(No.2000SM22);

\* 通讯作者 E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 欧阳霞辉,女,博士研究生,研究方向:昆虫生殖与发育;E-mail: oyxhui316@126.com

收稿日期 2005-05-31,修回日期 2005-11-21

细胞表面凝集素受体研究表明,精子表面的糖复合物出现于精子的发生阶段,在成熟的过程中会发生明显的修饰,并且体外或体内获能时仍有某种程度的改变。有关昆虫精子表面糖复合物的研究也有不少报道<sup>[3]</sup>,但能够比较系统的对昆虫精子发生与形成过程中部分表面糖复合物分布变化的研究仍未见有报道。

本文采用生物素标记的花生凝集素(PNA)对中华蚱蜢(*Acrida cinerea*)精子发生与形成过程中细胞表面糖复合物变化进行了较为系统的观察,并对精巢中和受精囊中的精子表面糖复合物进行了比较,旨在了解其变化规律,对其相应的功能进行一定的探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 实验以直翅目(Orthoptera)剑角蝗科(Acrididae)中华蚱蜢为研究对象,标本分别于2002年8~10月中旬采自陕西省西安市南郊,虫龄为若虫和各期成虫。采回后立即在生理盐水中解剖,分别取出精巢和受精囊,置Bouin's液固定,常规石蜡切片,厚8 $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 凝集素细胞化学

**1.2.1 凝集素** 实验所用生物素标记的花生凝集素购自美国Sigma化学公司,PNA特异结合的糖为半乳糖( $\beta$ 1 $\beta$ )半乳糖酰胺,生物素标记的PNA工作液浓度为25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

**1.2.2 实验过程** 主要原理是:首先使生物素标记的凝集素与组织切片上的凝集素受体结合,然后滴加辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白亲和素(HRP-Streptavidin),使之与生物素结合,通过使标记物显色而显示凝集素受体的所在部位。流程:石蜡切片,常规脱蜡至水;0.1%的胰蛋白酶37 $^{\circ}\text{C}$ 消化10 min,TBS缓冲液洗3次,每次5 min(以下相同);3%过氧化氢封闭内源性酶10 min,TBS洗3次;滴加生物素标记的凝集素25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,TBS洗3次;滴加辣根过氧化物酶标记的亲合素2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用30 min,TBS洗3次;DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色后镜检;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

对照实验采用两种方法(1)用TBS取代生物素标记的PNA工作液(2)单糖竞争抑制法,即在PNA工作液中加入0.2 mol/L D-半乳糖。

**1.3 图像分析** 用HP IA S2100高清晰度彩色图文分析系统,20倍物镜下对精子发生不同时期细胞PNA阳性反应的平均灰度(灰度分级为0~255级,0级为最黑的灰度,255级为最浅的灰度,灰度值愈小表明染色强度愈强)进行定量分析,每一发育时期取5张组织切片,每张切片随机选取6个视野。各组实验数据以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示,采用SPSS统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

## 2 结果

**2.1 精巢中的标记** 以单个精细小管而言,在精子发生的整个过程中,从生殖区到转化区,育精囊细胞膜上始终有不同程度的阳性标记,整个精细小管呈现出网格状外观(图版I:1,7,箭头所示);在精原细胞没有发现阳性标记(图版I:1,箭头所示);而在初级精母细胞的胞质中可见有一强阳性颗粒(箭头所示),胞膜有较强阳性标记(图版I:2);次级精母细胞胞质中无阳性反应,而胞膜有强阳性反应(图版I:3);在早期精细胞质膜上有较强的阳性反应(图版I:4)随着精细胞变形,阳性标记逐渐集中在尾部的某一区域(图版I:5);成熟精子的头部有强阳性反应,而尾部的标记较致(图版I:6)。

**2.2 受精囊中的标记** 受精囊囊壁上皮层分泌细胞的胞质发现有阳性颗粒存在(图版I:8);受精囊内的精子尾部质膜表面仅具有弱阳性反应,而头部有强阳性标记(图版I:9)。

**2.3 对照实验** TBS取代PNA工作液的对照实验结果为阴性(图版I:10);单糖竞争抑制的对照实验结果也为阴性(图版I:11)。

**2.4 图像分析及统计结果** 中华蚱蜢精子发生过程中,不同时期细胞阳性反应的灰度值经方差齐性检验后进行单因素方差分析,不同字母上标代表平均值之间具有显著差异(均为 $P < 0.05$ ) (表1)。

表 1 中华蚱蜢精子发生不同时期 PNA 受体阳性反应程度(  $n = 30$  )Table 1 The degree of PNA receptor positive reaction in different periods in oogenesis of *Acrida cinerea*

		灰度值 Gray value
精原细胞 Spermatogonium		negative
初级精母细胞 Primary spermatocyte	细胞质 Cytoplasm	106.33 <sup>a</sup> ± 3.48
	细胞膜 Cell membrane	125.33 <sup>b</sup> ± 1.45
次级精母细胞 Secondary spermatocyte	细胞膜 Cell membrane	103.67 <sup>a</sup> ± 3.92
变形期精细胞 Elongating spermatid		138.00 <sup>c</sup> ± 1.73
精细胞 Spermatid		160.33 <sup>d</sup> ± 3.04
精巢内精子 Sperm in testis	头部 Head	120.33 <sup>b</sup> ± 1.45
育精囊 Sperm cyst		134.67 <sup>c</sup> ± 3.75
受精囊上皮 Spermatheca epithelium		133.00 <sup>c</sup> ± 3.05
受精囊内精子 Sperm in spermatheca	头部 Head	121.67 <sup>b</sup> ± 1.73

单因素方差分析,不同上标的平均值之间的差异显著,  $P < 0.05$ 。

One-Way ANOVA, Means with different superscripts are statistically different,  $P < 0.05$ 。

### 3 分析与讨论

实验结果表明,在中华蚱蜢的精子发生中,初级精母细胞以上的生精细胞均有半乳糖- $\beta$ -(1 3)-半乳糖酰胺的分布,随着精子发生的进行,其分布呈现出规律性的变化(表 1)。在初级精母细胞胞质中有一强阳性颗粒,质膜呈较强阳性标记,而在次级精母细胞胞质中无阳性反应,但质膜呈强阳性反应,由此推测,PNA 受体可能首先是由初级精母细胞合成,然后转移到质膜上,在次级精母细胞,由于量的积累其质膜出现了强阳性标记。而在该时期,PNA 受体的大量表达可能意味着它与生精细胞的分化和发育有关。有人用单克隆抗体在小鼠精母细胞表面检测到一种分子量为 95 ku 的 WGA 受体,在腹膜内注射单克隆抗体明显引起小鼠精子发生的紊乱,说明这种 WGA 受体在精子发生的早期减数分裂前期起重要作用<sup>[4]</sup>。由此可见,凝集素受体对于精子发生的准确完成非常重要。

在中华蚱蜢的精子细胞中,PNA 标记随着精子细胞变形发生了明显变化。在早期精子细胞,PNA 受体存在于局部细胞膜上,阳性反应程度略低于精母细胞,推测可能是由于细胞分裂引起量的变化。随着精子细胞变形,阳性反应逐渐集中在尾部的某一区域;成熟精子头部的阳性反应较强,但尾部标记较弱,而且受精囊内

与精巢内的精子表面的标记是相同的。可见,精子在变形及成熟过程中质膜 PNA 受体糖蛋白发生了修饰,这种修饰作用在精巢内就已完成,而受精囊壁上皮层分泌细胞胞质中的 PNA 受体可能与保藏精子有关。哺乳动物的精子成熟中生精细胞质膜糖蛋白的修饰机制已比较明确,有关昆虫生精细胞质膜糖蛋白的修饰机制目前并不清楚。中华蚱蜢精子细胞变形中尾部存在的 PNA 受体可能来源于周围细胞,结合在尾部可能与精子的直线运动有关<sup>[3]</sup>。根据成熟精子头部出现强阳性反应,推测 PNA 受体可能与卵子的识别与融合有关,这在双翅目昆虫 *Mosquito culex* 有相似的结果<sup>[5]</sup>,实验也证明人类精子表面的 PNA 受体能够增加膜的渗透性,引发顶体反应<sup>[6]</sup>,而且顶体反应前后 PNA 受体发生了明显变化<sup>[7]</sup>。

育精囊细胞质膜的阳性反应说明它们在整个精子发生过程中可能具有类似于脊椎动物支持细胞的作用。在哺乳类的精子发生中,生精细胞与支持细胞之间形成的血睾屏障有利于保证生精细管内环境的稳定性,避免机体免疫反应对精子发生的破坏<sup>[8]</sup>。糖复合物在精子发生过程生精细胞与支持细胞的粘附中有重要作用,一种形成 N 连接多糖的甘露糖苷酶 II X 的无效,导致 N 连接糖复合物不能形成,引起支持细胞与生殖细胞的粘附失败,生殖细胞早熟导致雄性不育,说明特异的糖复合物对于精子

发生是必需的<sup>[9]</sup>。有关育精囊细胞质膜 PNA 受体的功能还有待进一步的研究。

由以上可知,花生凝集素受体在中华蚱蜢的精子发生中呈现出规律性的变化,这种变化与蟋蟀和哺乳动物的比较有相似之处,尤其在精子发生至次级精母细胞阶段差异较小<sup>[10,11]</sup>。由此表明,不同动物精子表面糖复合物的合成和分布遵循一定的规律,这种变化规律除了与种的特异性有关外,更重要的是与其生理功能密切相关。凝集素受体在受精过程中的作用,在昆虫研究的比较少,要详细地阐明精卵表面各种糖复合物的具体作用和功能,还需进一步广泛深入地研究。

## 参 考 文 献

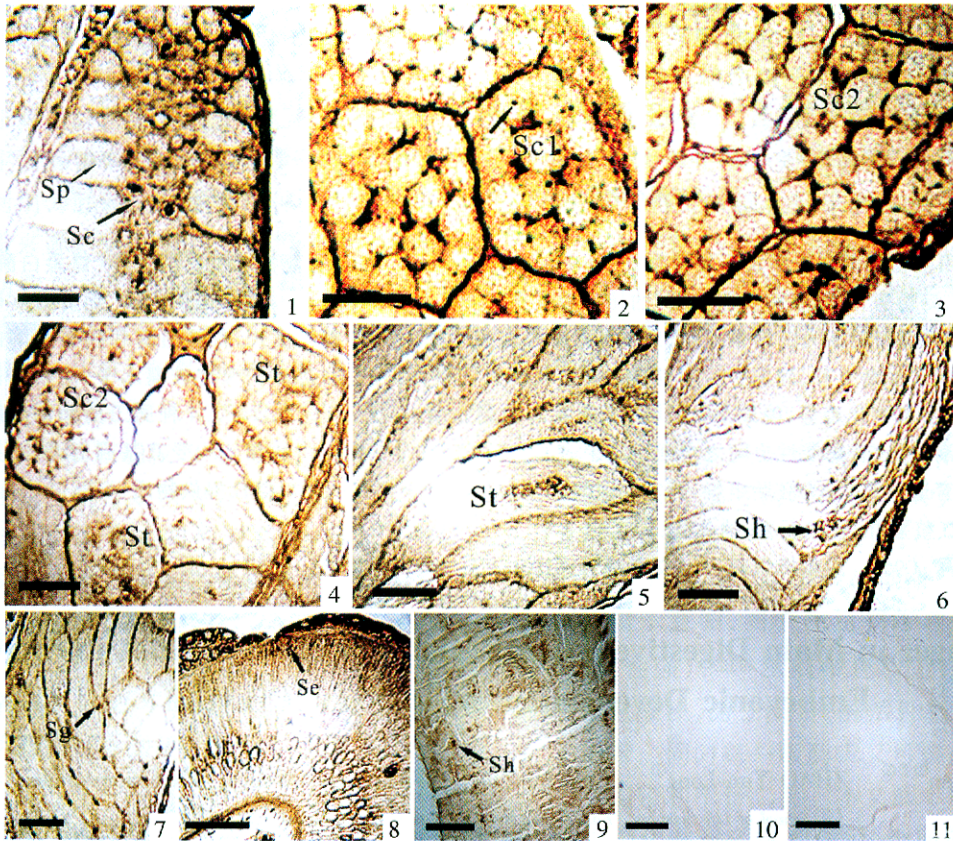
- [ 1 ] 陈晓萍. 糖复合物的生物信息作用. 自然杂志, 2001, 23 (5) 270 ~ 272.
- [ 2 ] 李中奎, 何成强, 李云龙. 糖复合物与发育. 生命的化学, 2001, 21(5) 391 ~ 393.
- [ 3 ] 奚耕思, 杨月红, 郑哲民. 蟋蟀精子表面 LCA 及 ConA 结合糖复合物的分布变化. 动物学报, 2002, 48(1) :125 ~ 130.
- [ 4 ] Koshimizu U, Watanabe D, Sawada K, *et al.* A novel stage-specific differentiation antigen is expressed on mouse testicular germ cells during early meiotic prophase. *Biol Reprod*, 1993, 49(5) 875 ~ 884.
- [ 5 ] Bao S N, Souza W L. Lectin binding sites on head of the spermatozoon of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae). *Histochemistry*, 1992, 98(6) 365 ~ 371.
- [ 6 ] Lassalle B, Testart J. Lectins binding on human sperm surface increase membrane permeability and stimulate acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2(9) 651 ~ 658.
- [ 7 ] Martinez M L, Cabada M O. Assessment of the acrosome reaction in *Bufo arenarum* spermatozoa by immunostaining comparison with other methods. *Zygote*, 1996, 4(3) :181 ~ 190.
- [ 8 ] 杨万喜, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾生精细胞与支持细胞之间的连接关系. 动物学报, 1999, 45(2) :178 ~ 186.
- [ 9 ] Akama T O, Nakagawa H, Sugihara K, *et al.* Germ cell survival through Carbohydrate-mediated interaction with sertoli cells. *Science*, 2002, 295 :53 ~ 54.
- [ 10 ] 邓泽沛, 王家鑫, 孙秀华等. 小鼠精子表面 SBA 结合糖复合物的形成和变化. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, 4(1) 67 ~ 72.
- [ 11 ] Suzuki A C, Nishimura K. Glycoconjugate profiles of insect spermatogenesis: lectin cytochemical analysis of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science*, 1997, 14(3) :455 ~ 467.

欧阳霞辉等:中华蚱蜢精子发生过程中花生凝集素受体的分布与变化

图版 I

OUYANG Xia-Hui *et al.*: Distribution and Changes of PNA-binding Glycoconjugates  
during Spermatogenesis of *Acrida cinerea*

Plate I



1. Bio-PNA 对精原细胞和育精囊细胞的标记; 2. Bio-PNA 对初级精母细胞的标记, 箭头示胞质内强阳性颗粒; 3. Bio-PNA 对次级精母细胞的标记; 4. Bio-PNA 对变形期精细胞的标记; 5. Bio-PNA 对精细胞的标记; 6. Bio-PNA 对精巢内精子的标记; 7. Bio-PNA 对育精囊细胞的标记; 8. Bio-PNA 对受精囊上皮细胞的标记; 9. Bio-PNA 对受精囊内精子的标记; 10. 采用 TBS 取代 PNA 工作液的对照反应; 11. 采用单糖竞争抑制法的对照反应。

Sp: 精原细胞; Sc: 育精囊; Sc1: 初级精母细胞; Sc2: 次级精母细胞; St: 精细胞; Sh: 精子头部; Se: 受精囊上皮细胞的阳性颗粒; Sg: 育精囊细胞上的阳性颗粒; 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ 。

1. Bio-PNA labeling on the spermatogonium and sperm cyst cells; 2. Bio-PNA labeling on the primary spermatocyte, with arrows pointing the strong positive granule; 3. Bio-PNA labeling on the secondary spermatocyte; 4. Bio-PNA labeling on the transforming spermatid; 5. Bio-PNA labeling on the spermatid; 6. Bio-PNA labeling on the sperm in testis; 7. Bio-PNA labeling on the sperm cyst cells; 8. Bio-PNA labeling on the spermatheca epithelium; 9. Bio-PNA labeling on the sperm in spermatheca; 10. Control with TBS replacing PNA; 11. Control of single sugar competition.

Sp: spermatogonium; Sc: sperm cyst; Sc1: primary spermatocyte I; Sc2: secondary spermatocyte II; St: spermatid; Sh: sperm head; Se: positive granules on the spermatheca epithelium; Sg: positive granules on the sperm cyst cells; Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .