

# 中华白海豚雄性生殖系统组织学初步研究

胡雷明<sup>①</sup> 宁曦<sup>①#</sup> 陈加林<sup>②</sup> 翟侃<sup>①</sup> 吴玉萍<sup>①\*</sup>

① 中山大学生命科学院 海洋学院 广州 510275; ② 珠江口中华白海豚国家级自然保护区管理局 珠海 519001

**摘要:**采用组织学和形态学方法研究了中华白海豚(*Sousa chinensis*)的雄性生殖系统。以睾丸和附睾中是否存在精母细胞及精子细胞等作为判断雄性中华白海豚性成熟的标准,通过比较不同个体睾丸和附睾的组织结构特征,发现成熟个体的生精小管和附睾的组织学结构与未成熟个体间存在显著差异。通过测量样本睾丸的2个形态参数:生精小管直径和生精小管的相对面积,得到性成熟个体的生精小管直径为 $(118.3 \pm 12.8) \mu\text{m}$ ,生精小管相对面积为0.52;未成熟个体的生精小管直径 $(47.4 \pm 3.5) \sim (60.3 \pm 6.0) \mu\text{m}$ ,生精小管相对面积为0.27~0.40。

**关键词:**中华白海豚;雄性生殖系统;组织学;形态参数

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)03-109-06

## A Preliminary Study on Histology of Male Genital System of *Sousa chinensis* from the Pearl River Estuary

HU Lei-Ming<sup>①</sup> NING Xi<sup>①#</sup> CHEN Jia-Lin<sup>②</sup> ZHAI Kan<sup>①</sup> WU Yu-Ping<sup>①\*</sup>

① School of Life Sciences, School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275;

② Pearl River Estuary Chinese White Dolphin National Nature Reserve, Zhuhai 519001, China

**Abstract:** The male genital system of *Sousa chinensis* was studied by histological and morphometric techniques. Sexual maturation was defined as the presence of spermatocyte sperm etc. in gonads. Evident difference was found in the histological structure of seminiferous tubules and epididymis between the immature males and mature males. Morphometric analysis showed that the diameter of seminiferous tubules of mature dolphins was  $118.3 \pm 12.8 \mu\text{m}$  and the relative proportion of seminiferous tubules within the testis was 0.52. In immature males, the diameter of seminiferous tubules was between  $47.4 \pm 3.5 \mu\text{m}$  and  $60.3 \pm 6.0 \mu\text{m}$ , and the relative proportion of seminiferous tubules was between 0.27 and 0.40.

**Key words:** *Sousa chinensis*; Male genital system; Histology; Morphometric parameters

中华白海豚(*Sousa chinensis*)在1988年被列为中国I级重点保护野生哺乳动物<sup>[1]</sup>,目前被国际自然保护联盟物种生存委员会(IUCN SSC)列为世界近危(near threatened, NT)的保护动物之一<sup>[2]</sup>。珠江口及周边水域是我国沿海中华白海豚最重要的栖息地,是目前中华白海豚分布数量最多的水域<sup>[3]</sup>,目前生存着约2500头中华白海豚<sup>[4]</sup>。

由于中华白海豚样本稀缺,国内一直缺乏针对其生殖系统组织学和发育学的研究。利用

**基金项目** 国家自然科学基金项目(No. 30870313, 40976082),国家科技支撑计划项目(No. 2011BAC07B05-3),国家海洋局海洋公益性项目(No. 201105011-5),广东省海洋渔业局科技攻关项目(No. A200908F01),香港海洋公园保育基金项目;

\* 通讯作者, E-mail: exwyp@mail.sysu.edu.cn;

**第一作者介绍** 胡雷明,男,硕士研究生;研究方向:海洋生物学; E-mail: zhwyyp@tom.com。

# 同等贡献第一作者:宁曦,女,硕士研究生;研究方向:海洋生物学; E-mail: ningxi76@163.com。

收稿日期:2011-11-25,修回日期:2012-03-01

珠江口水域搁浅死亡的中华白海豚样本,对其雄性生殖系统进行了研究,旨在探讨中华白海豚雄性生殖系统的生长发育特征,为种群增殖和物种保护提供基础资料。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 研究样本来源于 2007 年 12 月至 2010 年 3 月珠江口水域搁浅死亡的 6 头雄性中华白海豚。首先测量其体长、体重等形态学数据,并留取牙齿用于切片以鉴定其年龄,然后解剖并取出生殖系统,经测量后立即浸入 10% 中性福尔马林溶液中固定。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织学研究方法** 样本经 10% 中性福尔马林溶液固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,采用 Leica DSC1 全自动旋转切片机 6~8  $\mu\text{m}$  切片,常规脱蜡, H. E 染色,中性树胶封片,于尼康显微镜下观察其组织学特征。由于个别样本死亡后组织存在不同程度的降解,部分细胞形态结构异常,不利于进行组织学鉴定,因此排除组织降解的样本以保证分析结果的正确性。

**1.2.2 形态学测量方法** 生精小管直径测量:参照 Clarke<sup>[5]</sup> 测量抹香鲸 (*Physeter macrocephalus*) 生精小管管径的方法,即从视野中选取 10 个近圆形的生精小管,于相互垂直方向分别进行测量,再求其平均值。

生精小管相对面积的测量:在 10 $\times$ 4 倍显微镜视野下用 25 $\times$ 25 目镜网格测微尺随机将视野内睾丸实质分为 625 个方格,若方格内生精小管的面积占方格总面积的 50% 以上则认为是一个生精小管小格,将生精小管小格总数和方格总数的比值作为睾丸内生精小管相对面积。

**1.2.3 统计分析方法** 统计数据用平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。使用 SPSS 16.0 统计分析软件。得到睾丸内生精小管的相对面积和生精小管直径的平均值、标准误差以及它们之间的相关性分析,同时分别对体长与生精小管直径和生精小管相对面积进行相关性分析。

## 2 结果

雄性生殖系统包括睾丸、生殖管道、附属腺体和外生殖器。雄性中华白海豚生殖裂位于肛门与脐之间约 2/3 处,距脐孔较近。

**2.1 睾丸的形态结构** 睾丸是实质性器官,位于腹腔肾的后下方,呈长椭圆形。睾丸表面光滑,外层覆盖着一层鞘膜,鞘膜的厚度为 0.43~0.95 mm,随着海豚的生长发育,鞘膜的厚度逐渐增加。

**2.2 睾丸的组织结构** 睾丸由一层厚的致密结缔组织被膜包裹,睾丸被膜由鞘膜、白膜和血管膜三部分组成(图版 I:1)。白膜将睾丸分割成锥形体的睾丸小叶。每个小叶内有细长盘曲的生精小管(图版 I:2),生精小管的管内壁由生精上皮构成。精原细胞位于生精上皮的基膜上,体积大、形状圆,直径约为 8  $\mu\text{m}$ ,可观察到染色质。初级精母细胞与其他类型生精细胞相比体积最大,直径约为 9  $\mu\text{m}$ ,细胞核染色深,染色体分布不均匀,核形状不规则。次级精母细胞体积较小,直径约为 5~6  $\mu\text{m}$ ,细胞核呈圆形,染色深。精子头部为扁椭圆形,由于其尾部细长,在光学显微镜下难以观察到尾部末端,因此目前未能直接测量精子总长度。在光镜下使用测微尺测得中华白海豚的精子头部长度约为 3.5~4.0  $\mu\text{m}$ 。

**2.3 附睾的组织学特征** 附睾是睾丸的附属结构,紧贴睾丸的下侧,于睾丸的长轴方向分布,是一条狭长的多管道器官,分头、体和尾三部分。附睾头与睾丸前端连接,附睾头主要由睾丸输出管组成,附睾体和附睾尾主要由附睾管组成。睾丸产生的精子通过附睾头送到附睾管中。

输出小管由高柱状纤毛细胞群和低柱状纤毛细胞群围成。有明显的上皮基膜,其外具有薄层平滑肌细胞(图版 I:3)。附睾管主要分布于附睾中远离睾丸的一侧。所有附睾管由致密结缔组织包围。在切片中常发现 2 个或多个附睾管并排在一起,由一共同的致密结缔组织管包裹。各个致密组织之间被附睾内的另一种结

缔组织分隔。管内壁的柱状上皮伸入管腔,部分相互连接将附睾管腔分隔。成熟个体的附睾管大小不一,且形状不规则。管腔内壁多褶皱,管壁的致密结缔组织伸入官腔中形成脊状结构,部分伸入管腔中的脊相互连接将管腔分隔成2个或多个区域。管壁上皮由柱状上皮构成。附睾管储存精子,睾丸产生的精子在此处进行活化。在成熟个体的附睾管腔中可发现大量精子(图版 I:4)。

**2.4 输精管** 输精管是附睾管的直接延伸,为肌性管道。输精管从附睾尾端开始,末端进入前列腺。对输精管的组织切片观察,管壁由黏膜层、肌层和外膜组成。外膜为疏松结缔组织。

**2.5 前列腺** 前列腺位于膀胱后端,尿道起始处,是一个实质性的器官。前列腺外部由疏松结缔组织包被,被膜未伸入腺实质。腺实质由多个近圆形腺泡组成。腺泡内壁无腺泡上皮,腔内有大量胞核深染细胞。腺泡周围实质内没有发现肌肉组织和结缔组织。

**2.6 阴茎的结构** 阴茎始于腰骨中间的阴茎脚,阴茎在腹腔内向左呈“乙”状弯曲,阴茎头呈尖圆锥形。在一般情况下包皮囊关闭,阴茎完全收缩于体内。

阴茎表皮为复层扁平上皮,上皮内为致密结缔组织。阴茎中部为阴茎海绵体,其内部细胞之间有空泡状结构。中部下侧为尿道,尿道为管状结构,与周围组织结构有差异。尿道壁主要由结缔组织构成,没有发现肌肉层。尿道内壁上皮为复层柱状上皮。

**2.7 雄性生殖系统发育特征** 通过组织学方法观察睾丸或附睾切片中是否存在精子,将睾

丸和附睾中发现精子的2头雄性中华白海豚判定为性成熟个体,另外4头雄性中华白海豚的睾丸和附睾中没有发现精子被判定为未成熟个体。

比较性成熟与未成熟个体睾丸和附睾的组织学特征,发现存在显著差异:虽然未成熟海豚的体长和体重不断增加,但是与生殖相关的参数如生精小管的直径等却变化不大(47.4 ~ 60.3  $\mu\text{m}$ ),未成熟个体的生精小管直径较窄,生精上皮细胞层数较少,生精上皮中只有精原细胞和支持细胞。生精小管之间存在大量睾丸间质(图版 I:5,6)。附睾发育不足,附睾管内壁平滑,无脊状结构,管腔中没有精子和基质。而成熟个体的生精小管直径明显增大,生精上皮多层,依次分布着精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞和正在发育的精子。由于生精小管增大,睾丸间质的面积相对减少。附睾管增大,管内壁有脊状结构,管腔内存在精子和基质(图版 I:7,8)。

比较成熟和未成熟雄性中华白海豚的体长、体重、生精小管直径及睾丸内生精小管相对面积(表1),未成熟个体体长小于或等于213 cm,体重小于或等于116 kg,生精小管的直径在(47.4  $\pm$  3.5) ~ (60.3  $\pm$  6.0)  $\mu\text{m}$  之间( $n = 10$ ),生精小管相对面积介于0.27 ~ 0.40之间。成熟个体体长大于等于233 cm,体重大于等于155 kg,编号为ZH-29的性成熟个体的生精小管直径为118.3  $\mu\text{m}$ ,生精小管相对面积1.07。编号ZH-28的成熟睾丸样本由于组织降解严重,其组织结构不适于形态学测量,此样本的数据缺失。

表1 中华白海豚样本参数

Table 1 Parameters from six male *Sousa chinensis*

| 样本编号<br>No. | 年龄 Age<br>(Year) | 体长(cm)<br>Body length | 体重(kg)<br>Body weight | 生精小管直径( $\mu\text{m}$ )<br>Tubular diameter | 生精小管相对面积<br>Relative area of seminiferous tubule |
|-------------|------------------|-----------------------|-----------------------|---|--|
| ZH-20       | 4.0              | 213.0                 | 116                   | 57.2 $\pm$ 4.9                              | 0.40   |
| ZH-24       | —                | 187.0                 | 95                    | 58.2 $\pm$ 6.9                              | 0.33   |
| ZH-26       | 0.5              | 162.5                 | 54                    | 47.4 $\pm$ 3.5                              | 0.27   |
| ZH-28*      | 23.0             | 236.0                 | 155                   | —   | —  |
| ZH-29*      | 6.5              | 233.0                 | 161                   | 118.3 $\pm$ 12.8                            | 1.07   |
| ZH-36       | 2.0              | 191.0                 | 96                    | 60.3 $\pm$ 6.0                              | 0.34   |

“—”:数据缺失;“\*”:性成熟个体。“-”:No data;“\*”:Mature dolphin.

对体长、生精小管直径等形态学参数进行统计学分析发现,雄性中华白海豚生精小管直径和生精小管相对面积为显著相关关系(Pearson 相关系数  $r = 0.947$ ,  $P = 0.014$ ,  $n = 5$ )。体长与生精小管直径相关性显著(Pearson 相关系数  $r = 0.920$ ,  $P = 0.027$ ,  $n = 5$ ),与睾丸内生精小管相对面积存在极显著关系(Pearson 相关系数  $r = 0.975$ ,  $P = 0.005$ ,  $n = 5$ )。这说明年龄和体长与生殖系统发育状况直接相关。

### 3 讨论

国外学者对鲸豚生殖系统结构进行了比较细致的研究,如对鼠海豚(*Phocoena phocoena*)生殖系统的组织学研究<sup>[6]</sup>。Plön<sup>[7]</sup>对19种海洋哺乳动物的精子超微结构进行了比较。Shoichi等<sup>[8]</sup>研究了10种鲸豚精子的外部形态结构,发现精子的形态结构存在种间差异。Amy等<sup>[9]</sup>探索灰白海豚(*Sousa plumbea*)的精子亚显微结构,得到灰白海豚的精子头部长度在3.9~4.6  $\mu\text{m}$ 之间,这与本文在光镜下测得的中华白海豚精子头部长度相近。国内有学者对其他水生哺乳动物,如江豚(*Neophocaena phocaenoides*)和白暨豚(*Lipotes vexillifer*)的生殖系统组织学进行了研究<sup>[10-14]</sup>。但目前尚未发现有关中华白海豚生殖系统组织学的研究报告。而且,不同种属的海豚其生长发育存在个体差异,年龄或者体长相等的个体不一定具有相同的发育状况。

早期研究通常参照体长和年龄的数值来判断中华白海豚性成熟与否。Jefferson<sup>[15]</sup>认为雄性中华白海豚性成熟体长应大于190 cm,年龄在8.5岁和9.0岁之间,但是缺少相应的组织学研究结果作为依据。本研究中的两头性成熟样本的搁浅日期分别在2009年3月和4月间,每年4~8月是中华白海豚的繁殖高峰期,也是雄性中华白海豚生精活动期。可以确定体长233 cm的雄性中华白海豚ZH-29已经性成熟。而体长为213 cm的ZH-20个体的搁浅日期为2007年12月,而其生精小管内仅发现精原细胞和支持细胞,没有发现发育的各级生精细胞,

并且其生精小管的直径与体长187 cm的ZH-24和191 cm的ZH-36 2头个体的相近,却与成熟个体ZH-29存在显著差异,因此可以判断该个体仍未性成熟。Karakosta等<sup>[16]</sup>通过对睾丸的组织学研究将生精小管直径和生精小管相对面积比与年龄、体长等形态学参数结合起来,对鼠海豚的不同生长发育时期进行了划分,并认为通过鉴定睾丸内是否存在精母细胞及精子细胞判断鼠海豚的性成熟与否是可靠的。因此根据本文现有结果,雄性中华白海豚性成熟体长应大于213 cm。已知的性成熟个体(ZH-29)最小体长为233 cm,其年龄为6.5岁。

Neuenhagen等<sup>[17]</sup>对白腰斑纹海豚(*Lagenorhynchus acutus*)雄性生殖系统组织和形态测量的研究表明,体长、体重等参数在未成熟个体和成熟个体间有部分重叠,但是生精小管直径和生精小管相对面积有显著区别。本研究通过对中华白海豚生精小管直径、生精小管相对面积以及体长3个参数,两两进行相关性分析,得到的结果显示中华白海豚年龄和体长与其生殖发育状况直接相关。因此,生精小管直径和生精小管相对面积可以作为判断雄性中华白海豚性成熟的参考指标。

**致谢** 在采样和样本处理中获得林文治先生、陈希先生、高峰先生、王英库先生和周瑞春女士等的支持与协助,在此表示感谢。

### 参 考 文 献

- [1] 韩家波,马志强,王丕烈,等. 黄海北部发现的中华白海豚 I. 外形和内脏器官的测定结果. 水产科学,2003,22(6): 18-20.
- [2] Chen T, Qiu Y S, Jia X P, et al. Distribution and group dynamics of Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in the western Pearl River Estuary, China. Mammalian Biology, 2011, 76(1): 93-96.
- [3] 王丕烈. 中国鲸类. 香港: 香港海洋企业有限公司, 1999: 210-217.
- [4] Chen T, Qiu Y S, Hung S K, et al. Distribution, abundance, and individual movements of Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) in the Pearl River Estuary. Mammalia Biology, 2010, 74(2): 117-125.

- [ 5 ] Clarke R. Sperm whales of the Azores. *Discovery Reports*, 1956, 28: 273 - 298.
- [ 6 ] Honma Y, Ushiki T, Hashizume H, et al. Histological observations on the reproductive organs of harbor porpoises *Phocoena phocoena* incidentally caught in a set net installed off Usujiri, southern Hokkaido. *Fisheries Science*, 2004, 70(1): 94 - 99.
- [ 7 ] Plön S B. A review of spermatozoan morphology in Cetacea with new data for the genus *Kogia*. *Journal of Zoology*, 2006, 269(4): 466 - 473.
- [ 8 ] Kita S, Yoshioka M, Kashiwagi M, et al. Comparative external morphology of cetacean spermatozoa. *Fisheries Science*, 2001, 67(3): 482 - 492.
- [ 9 ] Meisner A D, Klaus A V, O' Leary M A. Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *Journal of Morphology*, 2005, 263(2): 179 - 202.
- [ 10 ] 陈佩薰, 刘仁俊, 林克杰. 白暨豚的生殖和生殖系统. *海洋与湖沼*, 1982, 13(4): 331 - 339.
- [ 11 ] 郝玉江, 王丁, 张先锋. 长江江豚繁殖生物学研究概述. *兽类学报*, 2006, 26(2): 191 - 200.
- [ 12 ] 姜新发. 长江江豚精巢发育和组织学特征的研究. *水生生物学报*, 1998, 22(4): 341 - 345.
- [ 13 ] 李海燕. 长江江豚生殖系统组织学研究. 武汉: 中国科学院水生生物研究所博士学位论文, 2010: 27 - 70.
- [ 14 ] 张先锋. 江豚的年龄鉴定、生长和生殖的研究. *水生生物学报*, 1992, 16(4): 289 - 298.
- [ 15 ] Jefferson T A. Population biology of the indo-pacific hump-backed dolphin in Hong Kong waters. *Wildlife Monographs*, 2000, (144): 1 - 65.
- [ 16 ] Karakosta C V, Jepson P D, Ohira H, et al. Testicular and ovarian development in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Zoology*, 1999, 249(1): 111 - 121.
- [ 17 ] Neuenhagen C, Hartmann M G, Greven H. Histology and morphometrics of testes of the white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) in bycatch samples from the northeastern Atlantic. *Mammalian Biology*, 2007, 72(5): 283 - 298.

## 图 版 说 明

1. 睾丸(ZH-20) × 40; 2. 生精小管(ZH-20) × 400; 3. 附睾(ZH-28) × 100; 4. 附睾管(ZH-28) × 1 000; 5. 未成熟的睾丸 × 200; 只有精原细胞和支持细胞的生精小管及大量分布的睾丸间质; 6. 成熟的睾丸 × 200; 正在产生精子的生精小管和相对较少的睾丸间质; 7. 未成熟的附睾 × 200; 附睾管内没有发现精子; 8. 成熟的附睾 × 200; 附睾管内有基质和精子。

## Explanation of Plate

1. Testis (ZH-20) × 40; 2. Seminiferous tubules (ZH-20) × 400; 3. Epididymis (ZH-28) × 100; 4. Epididymal duct (ZH-28) × 1 000; 5. Immature testis × 200; note tubules containing spermatogonia, supporting cells and abundant connective tissue; 6. Mature testis × 200; note spermatogenesis in tubules and less connective tissue; 7. Immature epididymis × 200; note absence of spermatozoa; 8. Mature epididymis × 200; note existence of stroma and spermatozoa in epididymal duct.

tv: 鞘膜; ta: 白膜; tva: 血管膜; st: 生精小管; fm: 平滑肌细胞; ed: 附睾管; sp: 精子; sc: 支持细胞; ct: 结缔组织。

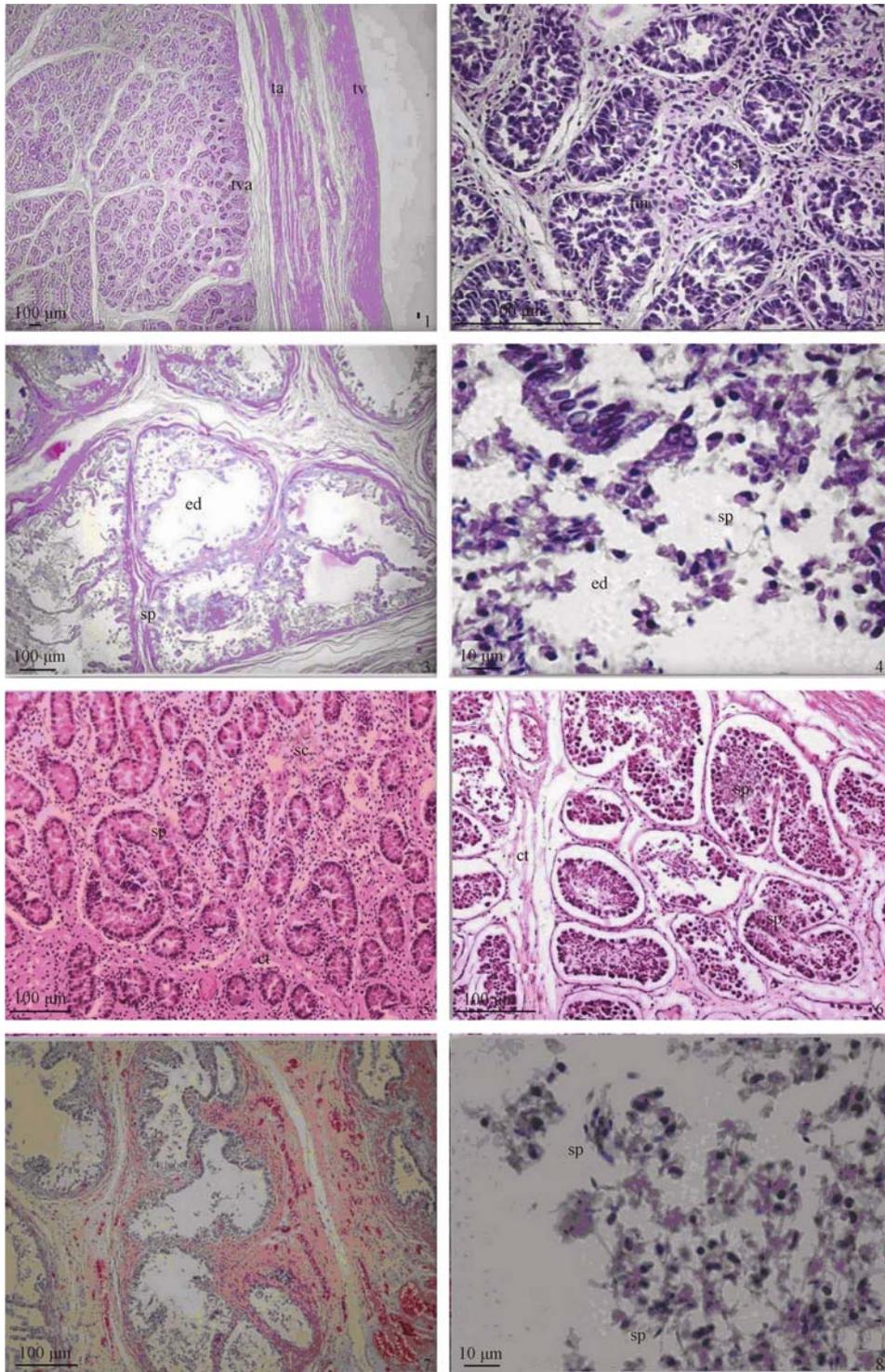
tv: Tunica vaginalis; ta: Tunica albuginea; tva: Tunica vasculosa; st: Seminiferous tubules; fm: Flattened myoid cells; ed: Epididymal duct; sp: Spermatozoa; sc: Supporting cells; ct: Connective tissue.

胡雷明等:中华白海豚雄性生殖系统组织学初步研究

图版 I

HU Lei-Ming *et al.*: A Preliminary Study on Histology of Male Genital System of *Sousa chinensis* from the Pearl River Estuary

Plate I



图版说明见文后