

# 睾酮在北方山溪鲵精巢发育周期中的分布

李亚琳<sup>1,2</sup>, 张育辉<sup>1</sup>

(1 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062;

2 渭南师范学院 化学系, 陕西 渭南 714000)

**[摘要]** 用免疫组织化学方法检测了睾酮(testosterone, T)在北方山溪鲵(*Batrachuperus tibetanus*)精巢发育周期中的变化。结果表明,在北方山溪鲵的精巢中,4月份T定位在次级精原细胞的胞质中;5月份T定位在次级精原细胞的胞核中;6~7月,精母细胞和精子细胞核中呈T阳性反应;8月份,精巢的非成熟区和成熟区散在地出现T的弱阳性位点;9~10月,精巢非成熟区的精原细胞胞质及成熟区精子中有较强的T阳性反应;11月,精原细胞的胞质及精子中的阳性反应减弱。在山溪鲵的生殖周期中,4~11月精巢中始终呈现T阳性反应,而且T的分布呈现出一定的规律性。在4~5月和9~10月,精巢间质细胞和支持细胞中也有T阳性反应。上述结果说明,在山溪鲵精巢中,T对生殖细胞增殖及精子形成起调控作用。

**[关键词]** 北方山溪鲵; 睾酮; 精子发生; 生殖周期

**[中图分类号]** Q959.5<sup>+</sup>2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2006)11-0015-06

雄性动物精子发生过程会受到多种内外界因素的影响,而类固醇激素在精子发生中的作用一直是备受关注的问题。传统观点认为,雄激素对精子发生的进程、细胞的转型等有重要的调节作用,但有关报道多为哺乳类动物,而对两栖动物只是测定血清中的激素水平,对睾酮与精子发生的关系研究很少。在多数有尾两栖类动物的血液中,雄激素分别在春季和秋季各出现1个峰值,例如蝶螈(*Salam andra salam andra*)<sup>[1]</sup>、虎纹钝口螈(*Ambystoma tigrinum*)<sup>[2]</sup>、有肋螈(*Pleurodeles waltl*)<sup>[3]</sup>和理纹欧螈(*Triturus marmoratus*)<sup>[4]</sup>。这些研究表明,雄激素在动物血液中随着生殖季节的变化而呈规律性分布,说明其在生精细胞的发育和生殖行为中起着重要的调节作用。但这些工作均采用放射免疫测定法检测血清的激素含量,未能做到细胞定位;并且血清中激素含量的变化与精巢中激素的变化是否一致,仍需探讨。

北方山溪鲵(*Batrachuperus tibetanus*)为有尾两栖类动物,繁殖时间在春季,其精巢内精原细胞增生有2个高峰期,分别在9~11月和翌年的3~5月,初级精母细胞的成熟分裂期在6月末至7月,7月末到8月是精子形成期<sup>[5]</sup>。在其生殖周期中,精巢的形

态和结构会发生规律性变化。北方山溪鲵季节性繁殖周期的特点提供了研究精子发生与性类固醇激素关系的理想模型。本研究首次用免疫组织化学方法证明北方山溪鲵精巢中睾酮(Testosterone, T)在生殖周期中的分布和定位,分析了T与精巢周期的相关性,并探讨了其在生殖细胞发育成熟过程中的生理功能,可为两栖类生殖内分泌学研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雄性成体北方山溪鲵16尾,体重20~30 g,全长175~260 mm。2002-04~11采自秦岭北坡的溪流中,每月采2尾。

### 1.2 样品制备

剖腹取北方山溪鲵精巢后,置改良Boins液(不含醋酸)中固定10~12 h,系列酒精脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚7 μm。

### 1.3 免疫组织化学反应程序

切片常规脱蜡复水后,用0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)热修复2~3次。再于室温下浸入质量分数3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中10 min以灭活内源性酶。然后按SABC法(Strept Avidin-biotin Complex)进行免疫

〔收稿日期〕 2005-11-25

〔基金项目〕 陕西省自然科学基金项目(2001 SM 26);渭南师范学院基金项目(04YKZ009)

〔作者简介〕 李亚琳(1972-),女,陕西渭南人,讲师,在读博士,主要从事两栖动物生殖与发育研究。

〔通讯作者〕 张育辉(1956-),男,陕西兴平人,教授,主要从事两栖动物生殖与发育研究。

组织化学反应。每组试验均设对照,对照用PBS代替第一抗体进行孵育,各组均为免疫阴性反应。

2 结果与分析

在4月份北方山溪鲵的精巢中,T定位在次级精原细胞(SPG II)胞质中(图版1)。5月份,当SPG II将分化为初级精母细胞(SPC)时,T定位在其胞核中(图版2)。T在4月和5月精巢的间质细胞(LC)和支持细胞(SC)中也有阳性反应(图版2,3)。6月和7月,精巢的精母细胞(SPC)核和精子细胞(SPD)核中呈T阳性反应(图版4,5)。8月,精巢的非成熟区(Immature Region)和成熟区(Mature Region)散在地出现一些阳性位点,但反应很弱(图版6)。9~10月,精巢增生区远端的SPG胞质中有较强的T阳性

反应,成熟区的LC,SC及精子(SPZ)中也有阳性反应(图版7,8,9)。11月,在增生区SPG的胞质及成熟区的SPZ中,T仍有较弱的阳性反应(图版10,11),而在LC中呈阴性。在4~11月的北方山溪鲵精巢中,非成熟区内的初级精原细胞(SPG I)核,始终呈现T阳性反应(图版12,8);在同一个SPG I的分裂相中,也可以看到其核中的阳性反应物(图版13)。而对照始终呈T阴性反应(图版14)。

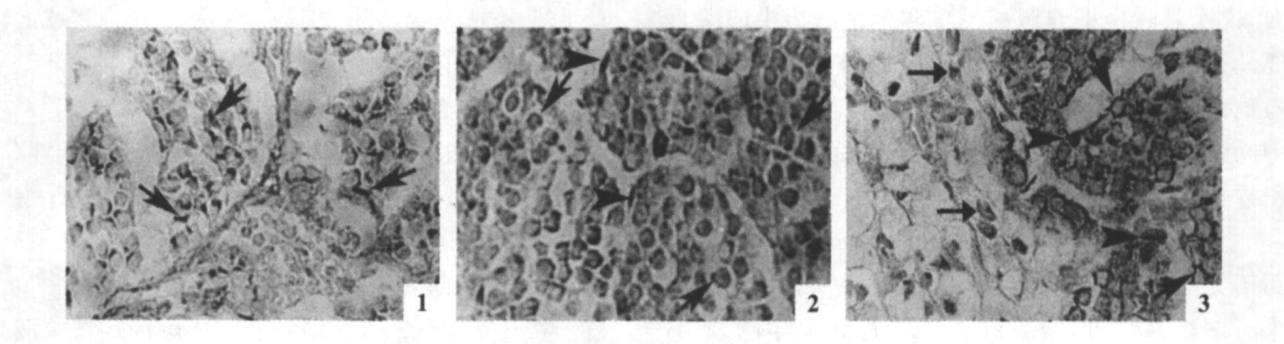
由表1可知,在精子发生过程中,T从SPG II的胞质转移到胞核,并且一直存在于SPC和SPD的核中。T在从胞质到胞核的转移过程中,常常在核膜周围形成一个帽状的强阳性反应位点。在4~5月及9~10月的LC及SC中,T也有阳性反应。

表1 睾酮在北方山溪鲵精巢中的免疫细胞化学定位

Table 1 Localization of testosterone immunoreactivity in the testis of *B atrachuperus tibetanus* during the annual cycle

月份 Month	初级精原细胞 SPG I	次级精原细胞 SPG II	精母细胞 SPC	精子细胞 SPD	精子 SPZ	间质细胞 LC	支持细胞 SC
4	Np(++)	Cp(++)				Np(++)	Np(++)
5	Np(++)	Np(++)				Np(++)	Np(++)
6	Np(++)		Np(++)			-	-
7	Np(++)			Np(++)		-	-
8	Np(+)	Cp(+)				-	-
9	Np(++)	Cp(++)			++	Np(++)	Np(++)
10	Np(++)	Cp(++)			++	Np(++)	Np(++)
11	Np(+)	Cp(+)			+	-	-

注: Cp. 胞质; Np. 核质; ++. 较强阳性反应; +. 弱阳性反应; -. 阴性反应。  
Note: Cp. Cytoplasm; Np. Nucleoplasm; ++. medium immunopositive reaction; +. weak immunopositive reaction; -. negative reaction

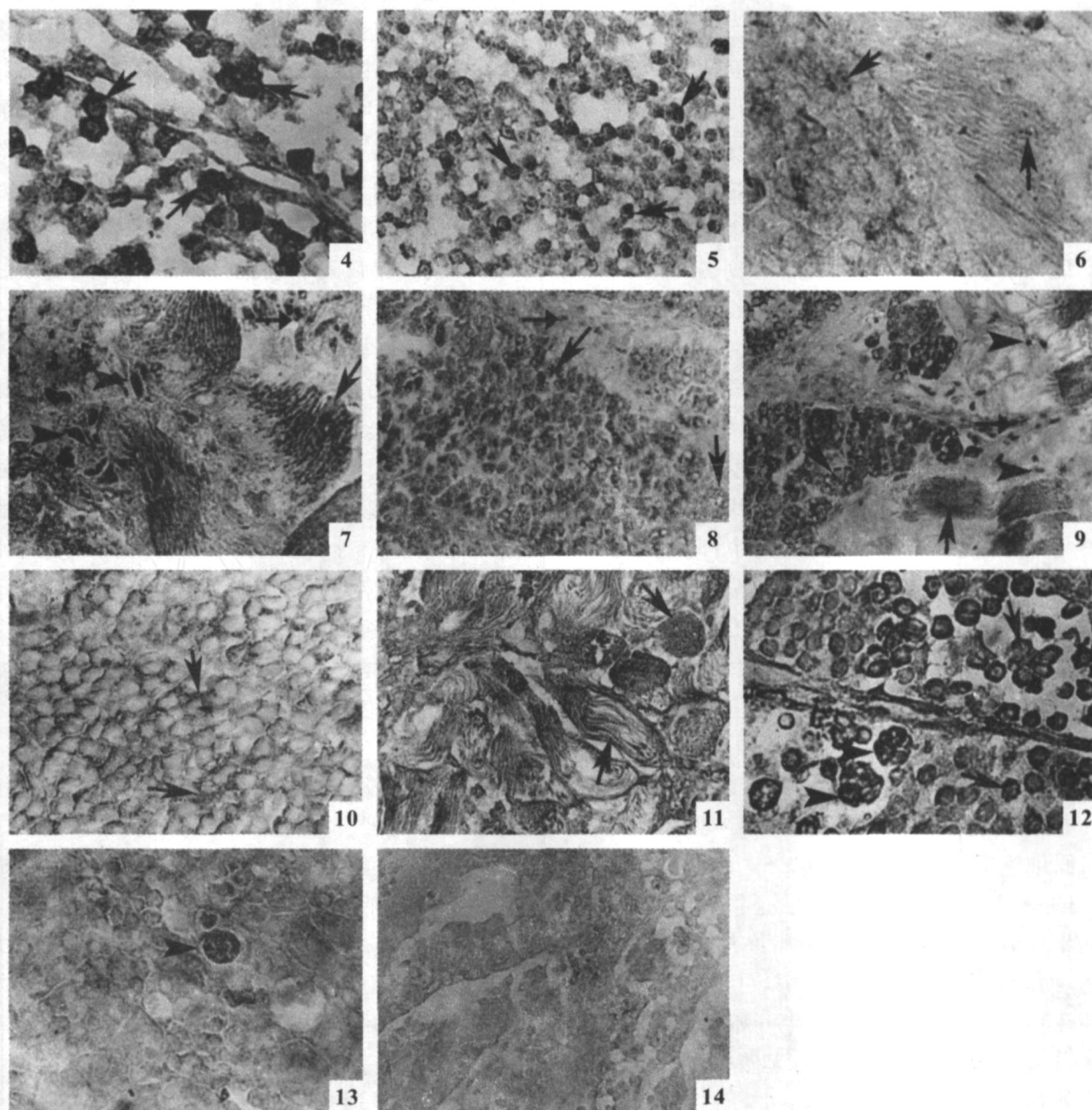


图版1~3 山溪鲵精巢中睾酮(T)的免疫组织化学观察结果

1. 4月份的北方山溪鲵精巢中,T定位在次级精原细胞胞质中(×316); 2. 4月份非成熟区的初级精原细胞核中呈现阳性反应,分裂相中阳性反应加强(×316); 3. 4月份精巢的间质细胞和支持细胞为阳性反应(×316)

Plate 1- 3 Results for immunohistochemistry of testosterone (T) in the testis of the stream salamander *B atrachuperus tibetanus*

1. The testis in Apr, testosterone was presented in the cytoplasm of secondary spermatogonia (×316); 2. In Apr, T positive reactivity was detected in the nuclear of primary spermatogoni, the reactivity was stronger when the cells divided (×316); 3. Leydig cells and sertoli cells reacted positively in Apr (×316)



图版 4~ 14 山溪鲵精巢中辜酮(T)的免疫组织化学观察结果

4 6 月, 精母细胞核中呈阳性反应( $\times 316$ ); 5 7 月, 精子细胞核中呈阳性反应( $\times 316$ ); 6 8 月, 精巢的非成熟区和成熟区散在地出现一些弱阳性位点( $\times 316$ ); 7 9 月, 成熟区的间质细胞、支持细胞及精子中有阳性反应( $\times 316$ ); 8 9 月, 非成熟区的初级精原细胞核及远端精原细胞胞质中呈阳性反应( $\times 158$ ); 9 10 月, 精巢非成熟区远端的精原细胞胞质呈阳性反应, 成熟区的间质细胞、支持细胞及精子中也有阳性反应( $\times 316$ ); 10 11 月, 在非成熟区精原细胞的胞质中有较弱的阳性反应, 而在间质细胞中呈阴性( $\times 316$ ); 11 11 月, 在成熟区的SPZ中, T仍有较弱的阳性反应( $\times 316$ ); 12 4 月份非成熟区的初级精原细胞核中呈现阳性反应, 分裂相中阳性反应加强( $\times 316$ ); 13 同一个初级精原细胞的分裂相为阳性反应( $\times 316$ ); 14 对照片呈阴性( $\times 316$ )

Plate 4- 14 Result for immunohistochemistry of testosterone (T) in the testis of the stream salamander *B. atrachuperus tibetanus*

4 T positive reactivity was detected in the nuclear of spermatocyte during Jun ( $\times 316$ ); 5 In Jul, T positive reactivity was detected in the nuclear of spermatid ( $\times 316$ ); 6 In Aug, there were T slight positive reaction dots scattered in immature region and mature region ( $\times 316$ ); 7 In Sep, T was presented in Leydig cells and Sertoli cells and spermatozoa in mature region ( $\times 316$ ); 8 In Sep, T was detected in the nuclear of SPGI and cytoplasm of SPG of the far end in immature region ( $\times 158$ ); 9 In Oct, T were detected in cytoplasm of SPG of the far end in immature region, Leydig cells, sertoli cells and spermatozoa in mature region ( $\times 316$ ); 10 In Nov, weak positive reactivity was in the cytoplasm of SPG in immature region; LC were negative reaction ( $\times 316$ ); 12 In Apr, T positive reactivity was detected in the nuclear of primary spermatogoni, the reactivity was stronger when the cells were dividing ( $\times 316$ ); 11 In Nov, there was slight positive reaction in SPZ in mature region ( $\times 316$ ); 13 A blastomere of SPG I was positive reactivity ( $\times 316$ ); 14 Control slide was negative reaction ( $\times 316$ )

## 3 讨论

### 3.1 雄激素在精子发生中的作用

一般认为,雄激素主要由间质细胞产生,是精子发生所必需的。Garnier<sup>[3]</sup>对有肋螈(*Pleurodeles waltl*)的研究表明,在3月雄激素含量最低时,其精子生成活动减弱甚至退化;而在秋季雄激素含量最高时,精子生成活动增强。对食用蛙(*Rana esculenta*)的研究也表明,血液中雄激素浓度的季节改变与精巢的年发生和退化周期明显相关<sup>[6]</sup>。

近年来,一些试验证据对精子生成的雄激素依赖性产生了怀疑<sup>[1,2,7]</sup>。如对虎纹钝口螈的研究表明,其精子生成活动在春季开始,而此时的雄激素水平却相当低<sup>[2]</sup>。Lazard<sup>[7]</sup>对钝口螈(*Ambystoma axolotl*)的研究也证明,在精巢的发育中,间质细胞和支持细胞内均没有与类固醇合成相关酶的组化反应,对其他一些非哺乳类动物的研究也表明,在年生殖周期中,精子的发生与间质细胞的发育在时间上是分开的<sup>[8]</sup>。Specker等<sup>[1]</sup>报道,食用蛙精原细胞的增殖发生在血浆中雄激素浓度最低的季节,所以认为雄激素对精原细胞的增殖起阻止作用。Specker等<sup>[1]</sup>也曾报道,睾酮对精子发生的影响作用主要是抑制精原细胞的增殖。

本试验用免疫组织化学方法证明,在山溪鲵精巢活动期间,精巢的SPGI核中始终都有T的阳性反应物,而且在SPGI的分裂相中,可以看到其核中的阳性反应。这说明当精子发生开始,即SPGI进行增殖分裂时,雄激素在其核内起着促进分裂的作用。另外在SPGII,SPC及SPD中,始终有T阳性反应,说明T在精原细胞的发生及生殖细胞的转型过程中始终起着调节作用。这一结果说明,在两栖动物,至少是北方山溪鲵的精巢中,也存在像哺乳动物那样的睾酮调控精子发生机制。本试验结果支持传统观点,认为雄激素是脊椎动物精子发生中不可缺少的,是调节精子发生的重要激素。

### 3.2 雄激素合成及其与精子发生的关系

前人采用放射免疫测定法对雄性蟾蜍<sup>[9]</sup>、蝾螈<sup>[1]</sup>、虎纹钝口螈<sup>[2]</sup>、有肋螈<sup>[3]</sup>和食用蛙<sup>[10]</sup>等的试验表明,两栖动物体内的T含量(血液和精巢中的T水平变化基本一致)随生殖周期而呈现出规律性的波动。

本试验用免疫组织化学方法证明,在每年4~5月和9~10月,山溪鲵精巢中精子发生处于高峰时期,T的阳性反应强烈,在精巢中的含量最高。此时,

腺组织也充分发育,LC合成并分泌T。这一结果说明,山溪鲵精巢中T的分布与精巢结构的周期性变化一致,T与精子发生存在密切的相关性。该结果与Frail等<sup>[4]</sup>用免疫组织化学方法对蝾螈检测的结果相同,即精巢中雄激素阳性细胞在春季和秋季最高而在冬季最低。该结果也与用放射免疫测定法测得的血液中T含量相符<sup>[1,3]</sup>。

一般认为,间质细胞是雄激素合成的最主要部位,在间质细胞内有典型的内分泌细胞特征,但对于支持细胞是否具有类固醇激素分泌功能仍有争论<sup>[4,11]</sup>。然而在支持细胞内也有一些典型类固醇分泌细胞的形态特征,如大量的滑面内质网、脂滴、发达的高尔基体以及大量溶酶体的存在。方永强<sup>[12]</sup>在对文昌鱼精巢的研究中提出,其精巢支持细胞所具有的形态学特征与间质细胞类似,提示支持细胞可能参与了性腺类固醇激素的合成。离体培养5~20d的小鼠支持细胞,用卵泡刺激素(FSH)刺激会产生大量的雌二醇<sup>[13]</sup>。生化研究也表明,在一些鱼类、两栖类的足细胞中,存在一些合成类固醇激素的酶,并且在细胞的内部有一些管状嵴结构的线粒体、滑面内质网和脂滴等结构,但这些细胞器较间质细胞中相应的细胞器发育得要差一些。支持细胞的这些超微结构特征和组织化学证据,说明其具有合成类固醇激素的基础。

本试验表明,在精子生成的高峰期,SC中大量聚集着T,暗示在这个时期SC自身可以合成雄激素,即与间质细胞协同,均可合成类固醇激素。T在SC中的大量表达也提示,T可能并不直接作用于生精细胞,而是通过SC的介导对精子的转型发挥调节作用,即通过旁分泌作用参与调节生殖细胞的进一步发育<sup>[14]</sup>。T在SC和LC中的周期性分布说明,这2种细胞互相协作,通过相同或不同的途径共同调控精子的发生。

### 3.3 生殖细胞中的雄激素转移

雄激素属于类固醇类脂溶性信息分子,进入细胞后通过激活其核内的雄激素受体而发挥作用,活化的雄激素受体即与DNA特定部位的雄激素反应元件相结合,从而引起DNA转录,产生一系列生理效应。

本试验T阳性反应的特点是在生殖周期中,当SPGII将转变成SPC时,其阳性位点从SPG的胞质转移到胞核中,并且一直存在于SPC和SPD的核中。这种现象可用雄激素的作用方式来解释:T在4~5月份由LC生成后,先在生殖细胞的胞质中储

存,然后转移到核中与雄激素受体结合而发挥作用,诱导SPC的成熟分裂和精子的形成;而在秋季因没有成熟分裂,所以T的阳性位点一直存在于精原细胞质中,直到12月~翌年2月份血清中的雄激素水平降到最低。

在本研究中,9~11月,T在变态后的SPZ头部呈现阳性反应,说明T有可能直接参与SPZ进一步成熟的调节,维持成熟精子在精巢中的存在。8月份,T在精巢中有微弱的阳性反应,说明此时精巢中的T含量较低。

由本研究结果可知,雄激素对于北方山溪鲵精子发生的调节作用主要表现在:存在于初级精原细胞中,启动整个生精过程的开始,其中的雄激素可能是间质细胞以前合成并储存在细胞中的,而此时血

浆中的雄激素水平还很低。随后,间质细胞成熟,产生大量雄激素释放到血液中并储存在次级精原细胞内,此时血浆中的雄激素水平达到高峰,次级精原细胞质中的雄激素阳性反应也最强。当次级精原细胞转变成初级精母细胞时,雄激素便从胞质转移到胞核,促进生殖细胞转型,并一直存在于生殖细胞核中,促进精子细胞的变态和精子的进一步成熟。

精子发生是一个极其复杂的生理过程,雄激素在发挥作用的过程中,会受到其受体与分裂增殖相关的基因、细胞周期蛋白、物理因子及内分泌系统等因素的精细调控和影响,各种因素的相互作用错综复杂,共同促成了这一复杂的生理事件。因此,在精子发生过程中,有关各种因子的关系以及具体调控机制还有待深入研究。

### [参考文献]

- [1] Specker J L, Moore F L. Annual cycle of plasma androgens and testicular composition in the rough-skinned newt, *Taricha granulosa* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1980, 42(3): 297-303.
- [2] Norris D O, Norman M F, Pancak M K, et al. Seasonal variations in spermatogenesis, testicular weights, vasa deferentia, and androgen levels in neotenic male tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 60(1): 51-57.
- [3] Garnier D H. Androgen and estrogen levels in the plasma of *Pleurodeles Walti*, Michah, during the annual cycle [J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 58(3): 376-385.
- [4] Frail B, Paniagua R, Rodriguez M C, et al. Annual changes in the number, testosterone content and ultrastructure of glandular tissue cells of the testis in the marbled newt *Triturus marmoratus* [J]. J Anat, 1989, 167: 85-94.
- [5] 王宏元, 张育辉. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化[J]. 动物学研究, 2004, 25(6): 484-490.
- [6] D'Istria M, Delrio G, Botte V, et al. Radioimmunoassay of testosterone, 17- $\beta$ oestradiol and oestrone in the male and female plasma of *Rana esculenta* during sexual cycle [J]. Steroids lipids Res, 1974, 5: 42-48.
- [7] Lazard L. Steroidogenesis in axolotl testis. Histochemistry of two major enzymes related to cell type, spermatogenesis, and substrate [J]. Gen Comp Endocrinol, 1979, 39(3): 381-387.
- [8] Callard I P, Callard G V, Lance V, et al. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates [J]. Biol Reprod, 1978, 18(1): 16-43.
- [9] Itoh M, Inoue M, Ishii S. Annual cycle of pituitary and plasma gonadotropins and plasma sex steroids in a wild population of the toad, *Bufo japonicus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1990, 78(2): 242-253.
- [10] Fasano S, Minucci S, Di Matteo L, et al. Intratesticular feedback mechanisms in the regulation of steroid profiles in the frog, *Rana esculenta* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1989, 75(3): 335-345.
- [11] Asahina K, Suzuki K, Aida K, et al. Relationship between the structures and steroidogenic function of the testes of the Urohaze-goby (*Glossogobius olivaceus*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 57(2): 281-292.
- [12] 方永强. 文昌鱼sertoli细胞超微结构的进一步研究[J]. 动物学报, 1991, 37(2): 123-125.
- [13] Callard G V, Canick J A, Pudney J. Estrogen synthesis in leydig cells: structural-functional correlations in *neotoma testis* [J]. Biol Reprod, 1980, 23(2): 461-479.
- [14] 陈雪雁, 陈实平. 雄激素受体和卵泡刺激素受体在成年大鼠睾丸中的期依赖性表达[J]. 解剖学报, 2001, 32(4): 365-369.

## Localization of testosterone in the testis of the stream salamander *Batrachuperus tibetanus* during the annual reproductive cycle

LI Ya-lin<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu-hui<sup>1</sup>

(1 College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

2 Chemistry Department, Weinan Teacher College, Weinan, Shaanxi 714000, China)

**Abstract:** Location of testosterone (T) in testis of *Batrachuperus tibetanus* was examined by

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

immunohistochemistry. The results were as follows: testosterone was presented in the cytoplasm of spermatogonia (SPG) in April. It was detected in the nuclear of SPG in May when SPG would become primary spermatocyte (SPC). During Jun-Jul, T positive reactivity was also detected in the nuclear of spermatocyte (SPC) and spermatid (SPD). In Aug, there were T slight positive reaction dots scattered in the immature region and mature region. In Sep-Oct, T was presented in the cytoplasm of SPG in immature region and spermatozoa (SPZ) in mature region. T positive reactivity weakened in the cytoplasm of SPG and SPZ in Nov. During the annual reproductive cycle, T positive location always presented in the certain part in the testis. T was also detected in Leydig cells (LC) and Sertoli cells (SC) of the testis during Apr-May and Sep-Oct. The result shows that testosterone disperses periodically and regularly in testis of *Batrachuperus tibetanus* and it plays an regulative role in proliferation of germ cell and spermatogenesis.

**Key words:** *Batrachuperus tibetanus*; testosterone; spermatogenesis; annual reproductive cycle

---

(上接第14页)

**Abstract ID:** 1671-9387(2006)11-0011-CA

## Study on polymorphisms of part sequence of intron 5 and exon 6 of bovine *UCP3* gene

LI Qiu-ling<sup>1</sup>, XU Shang-zhong<sup>2</sup>, ZAN Lin-sen<sup>1</sup>, GAO Xue<sup>2</sup>,  
ZHANG Zheng-feng<sup>1</sup>, REN Hong-yan<sup>2</sup>, CHEN Jin-bao<sup>2</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Take Chinese Simmental, Angus and Heiford as experiment materials, a pair of primers for the part of intron 5 and exon 6 of uncoupling protein 3 gene were designed. The polymorphisms were analyzed by PCR-SSCP and DNA sequencing. The results showed that allele B was the predominance allele in these three populations, genotype AA was the predominance genotype in Chinese Simmental and Angus and it was AB in Heiford. There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) in *UCP3* locus of both Chinese Simmental and Heiford, while significant differences existed in Angus. Analysis of polymorphisms index showed the polymorphism of the locus was moderate in Chinese Simmental and Heiford and high in Angus.

**Key words:** bovine; *UCP3*; SNPs; genotype; allele