

嘉庚蛸精子形成过程中微管的分布特征及作用分析

俞鹤明 王伟 竺俊全* 杨万喜¹

(宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 宁波 315211;

¹浙江大学生命科学学院精子实验室, 杭州 310058)

摘要 利用免疫荧光-激光共聚焦显微技术及透射电镜技术观察研究了嘉庚蛸精子形成过程中微管的分布特征及其作用。结果表明, 精细胞早期, 核呈圆形或卵圆形, 核内染色质由团块状趋向颗粒状均布、或部分凝集成絮状, 核周无微管套结构、且微管不均匀分布; 精细胞中期, 核呈橄榄形, 核内染色质呈颗粒状或絮状, 微管在核周均匀分布、形成微管套; 精细胞后期, 核呈长梭形, 核内染色质呈纤维状, 微管套紧贴核周; 未成熟精子, 核呈长柱状, 核内染色质致密均布, 微管套仍紧密围绕核周; 成熟精子, 核周微管结构消失。嘉庚蛸精子形成过程中微管结构有一个动态变化过程, 我们认为, 微管套可能在核的形态发生过程中发挥重要作用; 由于微管套只在精细胞核形变过程中存在和起作用, 因此, 微管套可能通过特殊的途径参与核内染色质的浓缩。

关键词 嘉庚蛸; 精子形成; 微管; 超微结构; 免疫荧光

近年来, 头足类软体动物精子顶体及核的形态发生引起了研究者的重视, 已见对 *Sepia officinalis* 精核的形态发生^[1]及 *Eledone* 属和 *Octopus* 属精子顶体及核形成的形态学比较研究^[2,3]。头足类动物精细胞分化形成精子过程中, 核从圆形演变成圆柱形或长螺旋形, 核的形态变化与核周微管的活动密切相关^[2]。微管是由微管蛋白装配成的长管状结构, 是真核生物细胞骨架的主要组成部分, 是依赖于微管的驱动蛋白的运输通道^[4]。在哺乳动物精细胞分化过程中, 微管及微管依赖蛋白参与了精子顶体的发生及核的形态建成^[5,6]; 头足类动物精子发生过程与哺乳动物精子发生过程具有相似性, 研究微管在头足类动物精子发生过程中的分布特征, 对探究微管依赖蛋白在精子发生过程中作用的分子机制具有指导意义。

嘉庚蛸(*Octopus tankahkei*)属头足纲、八腕目、蛸科, 是我国沿海重要的经济头足类软体动物之一。我们已对嘉庚蛸的精子发生和精子的超微结构^[7,8]及精子顶体反应过程的细胞学变化^[9]进行了研究。该物种精细胞分化形成精子过程中核形态变化大, 由早期的圆形或卵圆形核演变成成熟精子的长柱状核^[8]。目前, 嘉庚蛸精子发生过程中核形态变化的分子机制尚未阐明, 处于探索阶段。本研究利用免疫荧光-激光共聚焦显微技术及透射电镜技术观察了嘉庚蛸精细胞分化形成精子过程中微管的分布特征, 探讨了微管在精细胞核形变中的作用, 旨在为微管及微管依赖蛋白参与精子核形态建成的分子机制的研

究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用嘉庚蛸于2008年5月至12月间采自浙江宁波水产品活鲜市场, 个体重20~30 g。

标记细胞内微管蛋白的抗 α -微管蛋白单克隆抗体结合异硫氰酸荧光素(monoclonal anti- α -tubulin conjugate clone DM1A FITC)及细胞核荧光染色液4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)均为Sigma公司产品, 封片用抗荧光猝灭剂购自江苏碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光观察 活体解剖嘉庚蛸取得精巢组织, 用4%多聚甲醛固定12~24 h; 然后将样品放入0.5 mol/L的蔗糖溶液中7~8 h(可在4 °C过夜), 当样品组织在溶液中漂浮后取出, 切成小块, 放入盛有OCT包埋剂的锡纸盒中包埋, 置于-20 °C冰箱中保存; 取出包埋块, 用MICROM HM525型冰冻切片片机进行切片(厚度约7 μ m); 将切片贴于玻片上, 经PBS复水10 min(即将吸附了切片的玻片整个浸没在PBS溶液中)后, 于保湿环境(即将玻片放在垫有滤纸的培养皿中, 四周滴加PBS溶液保湿)下滴加封闭液(6%

收稿日期: 2009-09-30 接受日期: 2010-03-11

浙江省自然科学基金项目(No.Z307536)资助

* 通讯作者。Tel: 0574-87608162, E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn

BSA), 室温下封闭 1 h; 然后用滤纸吸干, 加入抗 α -微管蛋白单克隆抗体结合异硫氰酸荧光素(浓度 1 : 200, 用 6% BSA 稀释), 室温下孵化 1~2 h, 或者在 4 °C 冰箱中过夜; 用 TBST 缓冲溶液(20 mmol/L Tris, pH 7.5, 154 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100)洗 3 次, 每次 10 min, 吸干后加 DAPI 染色细胞核 3 min, 吸干后马上用抗荧光猝灭剂封片, 立即在 LSM 510 激光共聚焦显微镜下观察与摄像。

1.2.2 透射电镜观察 取新鲜嘉庚蛸精巢组织, 切成小块后用 2.5% 的戊二醛固定 1~2 h (4 °C), 然后用 1% 锇酸后固定 1~2 h (4 °C), 乙醇梯度浓度脱水, Spurr 氏环氧树脂渗透、包埋, LKB- II 型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀染色 40 min 后水洗, 再用柠檬酸铅染色 1 min 后, 在 JEM-1200EX 型透射电镜下观察与拍照。

2 结果

2.1 嘉庚蛸精细胞早期微管的分布

免疫荧光观察表明, 嘉庚蛸精细胞早期核(蓝色)呈圆形或卵圆形(图 1a), 直径约 5~6 μm , 微管蛋白在核周围明显表达(绿色), 但尚未形成明显的微管套结构。微管在核周的分布不均匀(图 1b 和图 1c)。

透射电镜观察发现, 精细胞早期胞体不规则形或椭圆形, 细胞质丰富, 线粒体较多, 核内染色质由团块状转向颗粒状或絮状。在核的一端可观察到微管(图 2a 和图 2b)。

2.2 嘉庚蛸精细胞中期微管的分布

免疫荧光观察表明, 嘉庚蛸精细胞中期核已拉长成橄榄形, 核后窝形成(图 1d), 微管蛋白表达比精细胞早期强, 而且微管围绕核周均匀分布、形成微管套(图 1e 和图 1f)。

透射电镜观察发现, 精细胞中期胞体及核已明显拉长, 核后窝明显凹入, 核内染色质呈颗粒状或絮状, 核周微管排列整齐(图 2c 和图 2d)。

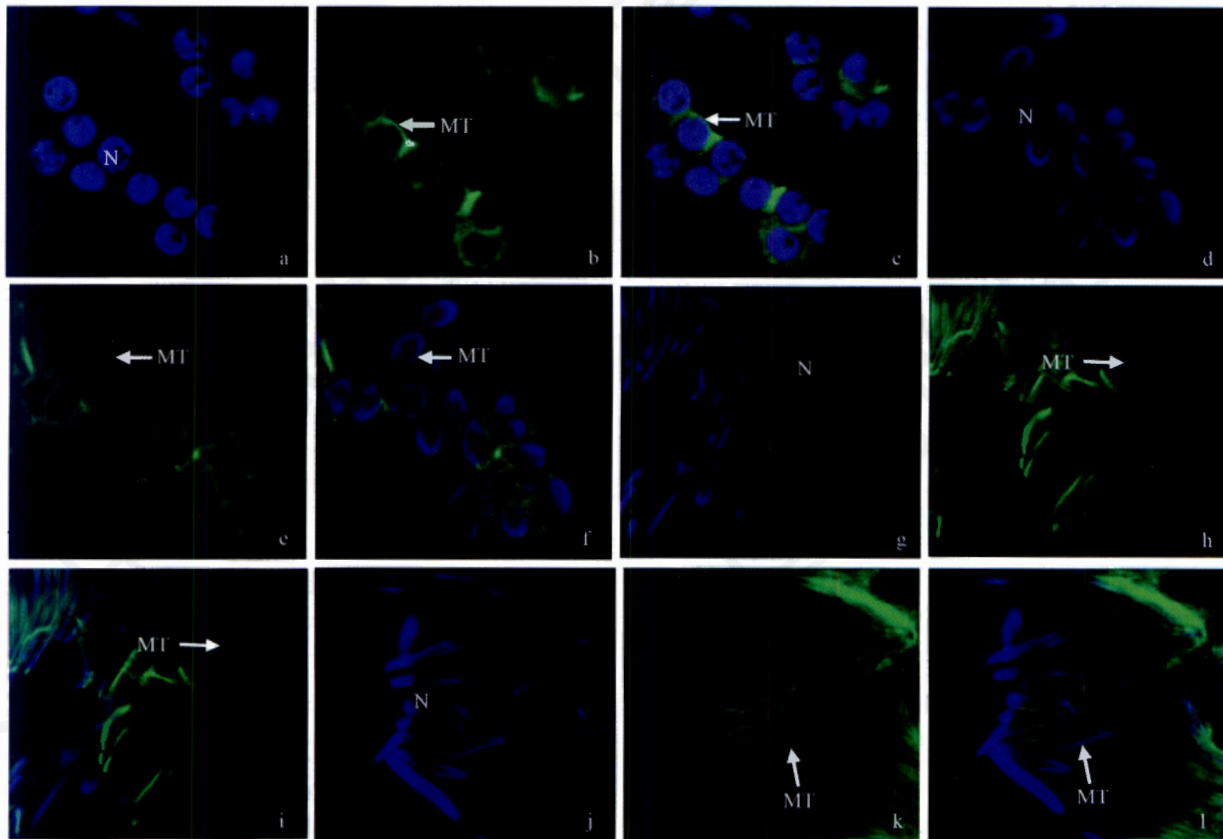


Fig.1 Immunofluorescence analysis of microtubule distribution during *Octopus tankahkeei* spermiogenesis

a: early spermatid stage, showing the nucleus (1 000 \times); b: early spermatid stage, showing microtubules (1 000 \times); c: merge of a and b (1 000 \times); d: middle spermatid stage, showing the nucleus (1 000 \times); e: middle spermatid stage, showing microtubules (1 000 \times); f: merge of d and e (1 000 \times); g: late spermatid stage, showing the nucleus (1 000 \times); h: late spermatid stage, showing microtubules (1 000 \times); i: merge of g and h (1 000 \times); j: immature sperm, showing the nucleus (1 000 \times); k: immature sperm, showing microtubules (1 000 \times); l: merge of j and k (1 000 \times). MT: microtubules; N: nucleus.

2.3 嘉庚蛸精细胞后期微管的分布

免疫荧光观察表明, 嘉庚蛸精细胞后期核变成细长梭形(图 1g), 微管蛋白表达强, 微管形成的微管套紧紧围绕在核的周围(图 1h 和图 1i)。

透射电镜观察发现, 精细胞后期胞体及核继续延伸拉长, 核内沟形成, 核内染色质呈纤维状, 微管紧靠核外周排列(图 2e 和图 2f)。

2.4 嘉庚蛸精子形成后微管的分布

免疫荧光观察表明, 嘉庚蛸未成熟精子核变成细长柱状(图 1j), 微管蛋白表达仍较强, 核周的微管套仍清晰可见(图 1k 和图 1l)。

透射电镜观察发现, 未成熟精子核呈长柱状, 核内染色质已凝集成高电子密度的均质, 核周微管排列

整齐(图 2g 和图 2h)。成熟精子核周微管消失(图 2i)。

3 讨论

精细胞分化形成精子过程中, 微管系统发挥重要作用^[10]。自 20 世纪七十年代起, 哺乳类动物精子发生过程中由微管组成的微管套结构及其功能的探讨受到了有关研究者的重视^[11-14], 形态学和分子生物学研究表明, 微管套不仅可能参与精子顶体的生物发生^[5,12], 而且可能参与精核的形态建成^[6,13-15]。头足类软体动物的精子发生过程中, 精细胞内也具有形态典型的微管套结构, 微管可能与精子头部的形成相关。Gimenez-Bonafé 等^[2]和 Ribes 等^[3]在亚显微水平上对头足纲八腕目动物 *Eledone cirrhosa* 和 *Octopus*

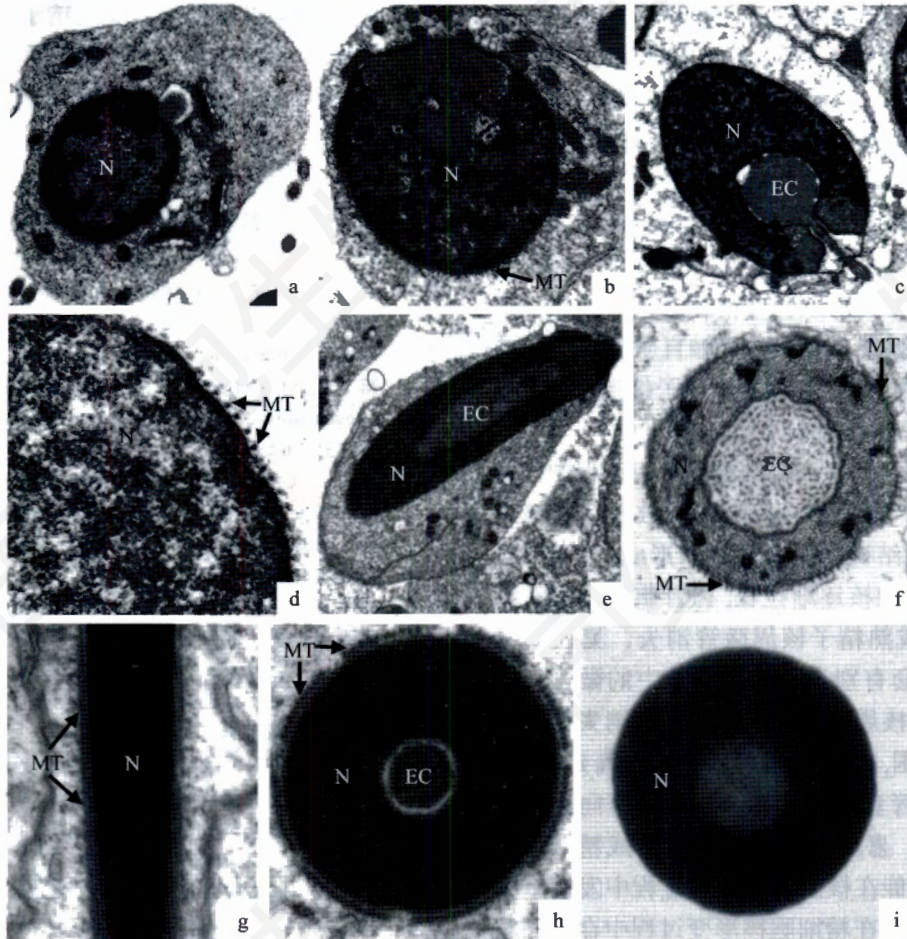


Fig.2 Ultrastructural observation on microtubules distribution during *Octopus tankahkeei* spermiogenesis

a: early spermatid stage, showing the nucleus (5 000×); b: early spermatid stage, showing the nucleus and microtubules (8 000×); c: longitudinal section of middle spermatid stage, showing the nucleus (6 000×); d: transverse section of middle spermatid stage, showing the nucleus and microtubules (40 000×); e: longitudinal section of late spermatid stage, showing the nucleus (5 000×); f: transverse section of late spermatid stage, showing the nucleus and microtubules (15 000×); g: longitudinal section of immature sperm, showing the nucleus and microtubules (15 000×); h: transverse section of immature sperm, showing the nucleus and microtubules (45 000×); i: transverse section of mature sperm, showing the nucleus (45 000×). EC: endonuclear channel; MT: microtubules; N: nucleus.

vulgaris 精子顶体及核的形态发生进行了研究, 两物种精细胞核从圆形演变成圆柱形过程中, 微管在精细胞核周围螺旋形盘绕, 微管的收缩作用促进精细胞核发生形变; *Octopus vulgaris* 精细胞核由圆形演变成柱形后, 微管移离核周于细胞质中; 而 *Eledone cirrhosa* 精细胞核由圆形演变成柱形后, 微管进一步收缩, 不仅使精细胞核拉长并螺旋化, 而且还造成顶体的螺旋, 精子形成后头部呈长钻头状, 微管结构消失。Martinez-Soler 等^[1]研究了头足纲十腕目动物 *Sepia officinalis* 精子核的形态发生, 认为精子形成过程中精细胞核由圆形演变为柱状是核内染色质和核周微管共同作用的结果。叶素兰等^[16]对十腕目曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)精子形成过程的超微结构的观察发现, 精细胞核开始拉长时核周微管出现, 沿核的长方向排列、不均匀分布, 随着微管的收缩, 精细胞核拉长而发生稍稍弯曲, 成熟精子核成稍弯曲的长柱状。郭睿等^[17]利用免疫荧光 FITC/DAPI 共染技术研究分析了小鼠精细胞变态成形过程中微管套结构变化及其作用, 微管套在圆形精细胞核变形和延伸的起始阶段形成, 并随着精细胞核的浓缩和变长逐渐向精细胞尾部移位, 直至精子变态成形后消失, 微管套结构的形成和消失与精细胞核的浓缩及延伸同步, 其形态变化和位置的改变与精细胞核形态学变化吻合, 由于微管套始终与核紧密接触直至核的形变过程结束, 由此认为微管套是引导精子细胞核浓缩、变形、延伸的重要结构。

本研究, 我们观察了嘉庚蛸精子形成过程中微管结构的动态变化。精细胞早期, 微管散布在近核周的细胞质中, 典型结构的微管套尚未形成, 随着精子形成的行进, 精细胞核逐渐拉长, 微管整齐排列在核周形成微管套, 成熟精子核周微管消失。嘉庚蛸精细胞核周的微管套有别于小鼠精细胞中的微管套结构, 嘉庚蛸精细胞核周微管套从形成后到消失前都紧紧围绕在核的周围, 并且随精细胞核拉长而延伸, 而小鼠精细胞中微管套结构随精细胞的发育向后部移动^[17]。我们认为, 嘉庚蛸精细胞分化形成精子过程中, 微管套结构可能在核的形态发生过程中发挥重要作用; 由于微管套只在精细胞核形变过程中存在和起作用, 因此, 微管套可能通过特殊的途径参与核内染色质的浓缩。但对于嘉庚蛸精子形成过程中核和微管套之间如何联系以及核内染色质浓缩的动力, 还有待于进一步的研究。

Kierszenbaum^[18,19]进行了小鼠精细胞内微管及其

相关分子蛋白的研究, 认为精细胞核周围短暂出现的细胞骨架——微管套结构导致了核的浓缩、延伸, 并且和微管有关的微丝等肌动蛋白共同构成了精细胞核表面的运输通道, 参与了鞭毛和轴丝的发生。Yang 等^[15,6]研究认为, 某种在微管上运动的驱动蛋白不仅参与了大鼠精子顶体的形成, 还结合核孔复合体蛋白, 共同参与了精细胞核形态的变化过程。Hogveen 等^[20]研究发现, 在微管上运动的 KIF17b 驱动蛋白在精巢中的含量过高时, 精子激活因子 ACT (activator of CREM in testis) 就不能正常地与应答元件结合蛋白 CREM (cAMP responsive element modulator) 相互作用, 从而阻止了精细胞的正常发育; 如果某些调节微管的基因出现缺陷或者缺失, 就会导致微管套结构的异常, 产生畸形精子。若能阐明微管及其相关蛋白的特性和功能, 将有可能揭示精细胞核形态变化的机制。我们在研究嘉庚蛸精子顶体反应过程中, 发现了顶体锥的存在以及精核的囊泡化现象^[9], 这种现象是否和本文发现的微管套密切相关值得今后进一步研究。

参考文献 (References)

- Martinez-Soler F, Kurtz K, Chiva M. Sperm nucleomorphogenesis in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Tissue Cell* 2007; 39(2): 99-108.
- Gimenez-Bonafé P, Ribes E, Zamora MJ, Kasinsky HE, Chiva M. Evolution of octopod sperm I: Comparison of nuclear morphogenesis in *Eledone* and *Octopus*. *Mol Reprod Dev* 2002; 62(3): 357-62.
- Ribes E, Gimenez-Bonafé P, Zamora MJ, Gonzalez A, Kasinsky H, Chiva M. Evolution of octopod sperm II: Comparison of acrosomal morphogenesis in *Eledone* and *Octopus*. *Mol Reprod Dev* 2002; 62(3): 363-7.
- 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学, 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2007, 280-9.
- Yang WX, Sperry AO. C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod* 2003; 69(5): 1719-29.
- Yang WX, Holly J, Sperry AO. The molecular motor KIFC1 associates with a complex containing nucleoporin NUP62 that is regulated during development and by the small GTPase RAN. *Biol Reprod* 2006; 74(4): 684-90.
- Zhu JQ, Yang WX, You ZJ, Jiao HF. The ultrastructure of the spermatozoon of *Octopus Tankahkeei*. *J Shellfish Res* 2005; 24(4): 1203-7.
- 竺俊全, 杨万喜, 尤仲杰, 王武, 焦海峰. 嘉庚蛸精子发生的超微结构. *水产学报* 2006; 30(2): 161-9.
- Li Z, Zhu JQ, Yang WX. Acrosome reaction in *Octopus tankahkeei* induced by calcium ionophore A23187 and a possible role of the acrosomal screw. *Micron* 2010; 41: 39-46.
- Tachibana M, Terada Y, Murakawa H, Murakami T, Yaegashi

- N, Okamura K. Dynamic changes in the cytoskeleton during human spermiogenesis. *Fertil Steril* 2005; 84 suppl 2: 1241-8.
- 11 Dym M, Cavicchia CJ. Functional morphology of the testis. *Biol Reprod* 1978; 18(1): 1-15.
- 12 Kurohmaru M, Kobayashiv H, Hattori S, Nishida T, Hayashi Y. Spermatogenesis and ultrastructure of a peculiar acrosomal formation in the musk shrew, *Suncus murinus*. *J Anat* 1994; 185(Pt 3): 503-9.
- 13 Mackinnon EA, Abraham JP. The manchette in Stage 14 rat spermatids: A possible structural relationship with the redundant nuclear envelope. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1972; 124(1): 1-11.
- 14 Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am J Anat* 1991; 192(2): 97-120.
- 15 Fouquet JP, Kann ML, Souès S, Melki R. ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis. *J Cell Sci* 2000; 113(Pt5): 877-86.
- 16 叶素兰, 吴常文, 余治平. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)精子形成的超微结构. *海洋与湖沼* 2008; 39(3): 269-75.
- 17 郭睿, 闫萍, 李喜霞, 张栋. 小鼠精子细胞变态形成过程中 manchette 的免疫荧光染色分析. *解剖学报* 2008; 39(6): 881-5.
- 18 Kierszenbaum AL. Spermatid manchette: plugging proteins to zero into the sperm tail. *Mol Reprod Dev* 2001; 59(4): 347-9.
- 19 Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 2004; 67(4): 271-84.
- 20 Hogeveen KN, Sassone-Corsi P. Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. *Hum Fertil* 2006; 9(2): 73-9.

Analysis on Dynamic Distribution and Function of Microtubule during *Octopus tankahkeei* Spermiogenesis

He-Ming Yu, Wei Wang, Jun-Quan Zhu*, Wan-Xi Yang¹

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology by the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

¹The Sperm Laboratory, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Immunofluorescence-based laser confocal microscopy and transmission electron microscopy were employed to study the dynamic distribution and potential function of microtubule during spermiogenesis in *Octopus tankahkeei*. At early spermatid stage, a round or oval nucleus was observed, chromatin changed from conglomeration to granule, and then it became flocculent. No microtubular structure-manchette was found, and the microtubules exhibited an uneven perinuclear distribution. At middle spermatid stage, the nucleus was olive-like in shape, the chromatin became to condense and granular or flocculent structure could be found in the nucleus, manchette was formed which surrounded the nucleus. At late spermatid stage, the nucleus showed a long shuttle-like shape, the chromatin became fibrillar, and manchette were tightly attached to the nucleus periphery. Before the mature sperm was formed, the nucleus was a long cylindrical in shape, the chromatin was highly condensed and homogeneously distributed, and the manchette still closely associated with the nucleus. In mature sperm, no manchette was found. We propose that the nuclear morphogenesis during *Octopus tankahkeei* spermiogenesis is conducted by the special microtubular structure-manchette; because the manchette only appear during spermiogenesis, it may have functions during chromatin condensation.

Key words *Octopus tankahkeei*; spermiogenesis; microtubules; ultrastructure; immunofluorescence

Received: September 30, 2009

Accepted: March 11, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Z307536)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87608162, E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn