

我国哺乳动物精子超微结构 的研究进展 (综述)

杨 智

(吉林省农科院畜牧分院繁殖室)

目前,我国人工授精技术已近普及,以至于在生物工程领域中也占有相当的地位。然而,发现和利用这一技术,却是在18世纪后期,由意大利的生物学家 Spallanzani 教授,首先利用哺乳动物进行人工授精试验成功的。据传说,早在14世纪阿拉伯人做过马的人工授精,但迄今为止还没有充分地证据来证明,当时对精子在动物繁殖上的意义和受精,获能的机制了解甚微。以后随着精子生理学研究的迅速进展,研究出了在体外利用配制的液体保存精子等方法。人类从发现利用人工授精技术至实现精子的体外保存,用了将近一个多世纪的漫长时间。

人工授精技术做为家畜改良的手段,是在本世纪初才开始的,即1907年由苏联的 Ivanov 教授首先提出的。随着科学技术的发展和研究手段的完善,关于猪、马、牛、羊和鸡的人工授精的研究进展相当显著。相继发现了适合精子在体外长期保存的稀释液和在超低温下保存的冷冻保护液,为长期保存精子和进一步研究精液的生理生化特性、精子的形态特征奠定了基础。

自从 Folge 等发现精子活力与受胎率有一定的关系后,精子活力至目前为止仍做为鉴定精液品质、估价精子受胎率的一项重要指标。但冷冻后精子活力与受胎率不相关。如精子活力不低,受胎率却较低。而有时精子活力不高,受胎率却相对较高。鉴于此种现象,人们就重视了对精子形态和结构的研究。1960年 Healey 在研究冷冻对精子超微结构的影响时,阐述了不同畜种之间,精子超微结构变化存在着差异。1964年 Seucke 等证实了精子顶体形态学的改变对评定冷冻精液受胎率有着重要的意义。所以,精液的品质迫切需要一种较准确的评定方法,来预测其受胎率的高低,进而来指导生产实践。

关于精液品质的鉴定,一般多在光学显微镜下观察精子密度、精子活力和顶体的完整率。这些仅仅是简易的方法,如果进行深入的研究,还应借助于比光镜分辨率更高的电子显微镜。在电子显微镜下观察精子的微细结构,可以进一步检验不同技术措施对精子结构的影响。为评定精液品质,提供更为可靠的理论依据,并以此来推算与受胎率的相关性。

我国对哺乳动物精子超微结构的研究,大约在70年代后期,由中国农科院新疆化学研究所和新疆农垦总局畜牧兽医研究所共同做的“绵羊精子顶体超微结构的变化与夏配不返情率的关系”研究。从此拉开了我国在该领域研究的帷幕。特别是80年代,我国先后对牛、羊、驴、猪、兔、大熊猫、金绒豹等动物精子的超微结构进行研究观察。本文仅对上述动物精子的超微结构做一综述,供参考。

一、水牛

60年代以来，水牛的冷冻精液的研究虽然已有成绩，但应用于生产还不甚广泛。其主要原因可能是水牛精子的抗冷冻休克及解冻能力较差的缘故。

通过用电子显微镜观察到，在水牛原精中精子细胞膜以及二层顶体膜的波状起皱，顶体肿胀，细胞膜破裂，顶体内容物丢失，顶体整个脱离等现象。但“空泡化”过程不明显。无论在原精或冷后精子，都可以观察到精子头部的的基本结构。

在冻精中观察到顶体肿胀的各种形态，包括一种类似“结节状”精子（Knobbed Spermatozoa）的顶体肿胀，及顶体外膜形成空泡，内容物丧失的现象。另外还观察到整个顶体，也许包括细胞膜在内，同时完成“空泡化”过程的图像。

从冻精的尾部中段横断面上，可看到细胞膜的波状起皱，膨胀成泡状与破裂，以及线粒体浓缩苍白的现象。但中心纤丝和内、外纤丝的基本结构未受损害。

二、绵羊

我国绵羊冷冻精液的研究是从1974年开始的，1976年组织了全国绵羊精液冷冻技术科研协作组进行协作攻关。在研究绵羊精液冷冻技术的同时，也逐步开展了精子超微结构的研究。关于哺乳动物精子超微结构的研究，在我国是以绵羊首先开始的。对绵羊精子的研究，主要是以电子显微镜负染法、电子显微镜超薄切片法观察其超微结构。试验了烷基聚醇醚非离子表面活性剂对绵羊精子的效应。

由电子显微镜观察得出，绵羊精子在冷冻和解冻过程中，精子顶体相继遭到不同程度的破坏。由类脂及蛋白分子镶嵌组成的细胞膜中的类脂蛋白遭到破坏，从而使细胞膜原有的构型发生改变，使细胞膜由肿胀、畸形和膜翻卷到最终顶体全部脱落。从图像还显示出，冷冻精子损害的另一个部位是线粒体，在精子尾部中段线粒体的内膜上，几乎集中了精细胞呼吸链的全部酶系统，它通过呼吸作用为精子提供能量。当线粒体受损害时，其中的酶就向精液中逸失，使细胞呼吸链的酶系统失调，精子能量来源断绝，在雌性生殖道内，没有足够能量前进，失掉与卵子结合的能力。这就是冷冻精液比新鲜精液受孕率低的原因之一。

利用烷基聚醇醚非离子表面活性剂处理过的精子，通过电镜观察随着药物浓度的增加，精子顶体完整率逐渐下降，当浓度在万分之三至千分之三之间时，降低幅度较大。精子顶体损坏率伴随着浓度的升高而增加。

超薄切片法和负染法的观察结果基本上相同。精子顶体完整率随着药物浓度的增加而降低。药物浓度从万分之三到千分之三时，其顶体完整率从32.43%下降到0.71%，全脱顶体从11.71%增加到68.57%。在观察中还看到，药物从万分之三到千分之三之间时，精子的顶体脱落变化较大（9.79%~68.57%）。

经万分之三浓度的药物处理后的绵羊精子，顶体外膜起皱，内外膜融合，顶体内含物非常稀疏，顶体体积明显增大，顶体内出现空腔。有时还可看到顶体外层皱折，出现部分空泡化和肿胀。

千分之三浓度药物处理后的绵羊精子，顶体各层膜均已裂开，仅在赤道板上保留顶体内膜的残余。经百分之三浓度处理过的精子，绝大多数的顶体完全脱落，只剩下一个核膜

包裹着的核。精子在药物作用下，受损害较显著的另一部位是线粒体。

三、猪

猪精液的体外保存，经过许多试验和研究，至今经过适当处理和冷冻后，已能在超低温中长期保存。几十年来关于冷冻和冷休克对精子影响机理的研究，虽然积累了大量的资料，但是如何提高猪精子的耐冻性仍未能顺利解决。

利用电子显微镜对猪精子冷冻前后的观察研究揭示，解冻后精子的主要损伤部位在顶体。冻后精子质膜严重膨大、破裂，顶体外膜肿胀形成小泡，顶体内容物丢失。

对正常猪精子的电子显微镜观察可以清楚地看到均匀的核，由核向外依次分别覆盖着核膜，顶体内膜，顶体层，顶体外膜以及质膜、头部前端可见小弯刀状的顶脊，顶体后部可见由顶体外膜和内膜连接形成的赤道带。再向后可见质膜内核膜外的核后帽。颈部和尾部的的基本结构也清晰易辨。

解冻后精子的电镜观察，证实了光镜的观察结果。损伤变化以顶体居首，主要变化表现为，质膜严重膨大或破裂，甚至完全脱落。顶体外膜膨大或形成空泡，空泡间形成大小不等的孔道，顶体内容物丢失。在精子头的后部变化较小，即使有质膜和顶体外膜严重损伤破坏，顶体内容物丢失，但赤道带仍然基本上保持完整。核后帽处基本上度化不大。在核后帽还可观察到排列整齐的小管状结构。尾部质膜也发生膨大或破裂。由此可见冷冻后猪精子的质膜受到严重的损伤。

四、驴

关于驴精液的研究，特别是驴精子在液态和冷冻保存后，超微结构变化，迄今我国仅有一例报告。据该报告研究结果阐明，精子头部矢切面，可见电子密度较高的核，核内物质均匀致密，由核向外依次为核膜和核膜紧贴的顶体内膜，顶体层，顶体外膜和顶体外膜相平行而紧贴的原生质膜。在头部的最前端可见小的突起为顶体嵴。在顶体之后，可见由顶体外膜、顶体、顶体内膜共同连接形成的环状条带“赤道极”。还可见植入窝、颈、中段、主段和末段。

据电子显微镜观察，驴精子顶体嵴不如牛、羊精子的顶体嵴那么厚和弯曲。正常顶体、外膜和原生质膜相互平行，均光滑，二层膜之间无空腔。在中段切面可见到内、外圈纤丝，外圈粗，内圈细，中心有一对纤丝明显可辨。在横切和纵切面上，均可清晰地看到线粒体。驴精子的线粒体与牛、兔的精子线粒体不同，驴的线粒体呈圆形，体积大小近似。但在横切面上沿长轴两端有两对和长轴垂直的线粒体，较长，约为短轴两端线粒体的2~3倍。

试验所观察到的驴精子顶体和线粒体损伤与绵羊精子超微结构的研究基本相似。但是不论鲜精和冻精，驴精子顶体完整率比绵羊高。并且在试验中也未见到一个顶体完全脱落的精子。精子顶体膜翻卷的比例仅占2.2%，比绵羊（10.59%）低。造成这种差异的主要原因，是驴精子膜的结构不同于绵羊。这可能是因驴精子膜成分和膜表面的电荷分布均比绵羊精子膜优越。这“膜电荷均匀分布”和“胆固醇、磷脂、脂肪酸比值”均优于绵羊的规律。

试验中还观察到, 驴精子冻后活力虽然高达0.45级, 但顶体完整率却低于在室温保有44小时, 精子活力仅在0.15级的液态精子。以此推断: (1) 活力这一指标对冷冻精液来说, 既不能反映精子遭到冷冻刺激后顶体损伤的程度, 也不能预测受胎率; (2) 冷冻精液的品质鉴定, 应以顶体完整率为指标, 这远比评定精子的活力有意义。

五、兔

近几年来, 我国对精子超微结构的研究日趋增多, 据所掌握的资料来看, 大多数学者都是利用透射电子显微镜研究精子的超微结构的。但利用扫描电子显微镜和冰冻蚀刻法观冷冻前后家兔精子超微结构的研究还不多见。1985年江苏省农科院畜牧兽医研究所首次发表了“扫描和冰冻蚀刻法观察冷冻前后家兔精子超微结构的变化”的研究报告。

研究阐明, 兔精子冷冻后, 顶体赤道段及其附近首先出现肿胀, 其头部质膜, 顶体膜特别易于破裂和部分脱落, 而顶体肿胀向前方突出的现象不常见。据冰冻蚀刻复型膜观所见, 正常兔精子头部质膜PF面, 依其颗粒多少可划分为较光滑的顶脊区; 颗粒最多呈疏密相间散在分布的中央扁平区和颗粒稀少的核后帽区; 并在头部基部, 由较粗大颗粒组成的索状物, 呈平行或斜行排列环绕周围。不同平行劈裂的核内染色质大多为有规则平行排列的索状结构, 仅近基结部有杂乱排列的现象。经冷冻后, 顶脊区质膜PF面颗粒增加, 中央区首先出现块状隆起, 继而核后帽前区出现小长方型隆起, 颗粒增加。头基部索状物颗粒有分散现象, 并向前部迁移。此外, 兔精子的颈部及相邻的中段常出现局部严重肿胀和质膜破损。

关于哺乳动物精子超微结构的研究, 除上述几种动物外, 还有人、大熊猫、金绒豹。关于野生动物精子的研究, 在我国尚处在初级阶段, 还有许多问题没有明确, 有待我们进一步去研究。

笔者认为, 我国关于哺乳动物精子的超微结构的研究, 今后要对以下几个方面进行深入研究, 以推动该领域的发展: (1) 不同稀释液和冷冻保护液对精子超微结构的影响; (2) 不同甘油或二甲基亚砷浓度对精子超微结构的影响; (3) 不同的冷冻初始温度对精子超微结构的影响; (4) 不同的降温速度对精子超微结构的影响; (5) 对现在已经推广应用人工授精的畜禽和正在研究人工授精的畜禽精子的超微结构进行系列化研究; (6) 开展对野生动物精子超微结构的研究, 为加速野生动物的人工养殖提供可靠的理论依据。

通过采用电子显微镜对精子的观察研究, 为进一步阐明精子的特性提供可靠的依据; 并且有可能对精子在体外保存液和冷冻保护液的改进和突破起到重大的推动作用。降低精子在体外保存时所造成的损伤, 更有利于精液的体外保存, 对精子库的建立和应用将起到不可忽视的作用。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院新疆化学研究所电镜组等: 《畜牧兽医学报》, 1980, Vol.11, N.1, 9~11.
- [2] 吕兆启等: 《中国农业科学》, 1981, No.6, 81~88.
- [3] 吕兆启等: 《畜牧兽医学报》, 1982, Vol.13, No.1 95~101. 1982, Vol.13, No.4.

(下转第94页)

二、大豆子粒中低聚糖含量间的相关关系

大豆子粒中棉籽糖、水苏糖及低聚糖含量间的简单相关列于表4。由表中可以看出，低聚糖含量与棉籽糖含量和水苏糖含量呈极显著正相关，相关系数分别为0.2504**和0.8946**棉籽糖含量与水苏糖含量呈极显著正相关，相关系数为0.2925**。

表4 大豆子粒中低聚糖含量间的简单相关

	棉籽糖	水苏糖
低聚糖	0.2504**	0.8946**
棉籽糖		0.2925**

注: $d_f = 181$ ** 为 $\alpha = 0.01$ 水平显著。

以上相关关系表明，棉籽糖含量和水苏糖含量愈高，低聚糖总含量亦高；棉籽糖含量愈高，水苏糖含量亦高，反之亦然。这些相关关系为大豆的品质育种提供了很好的参考依据。由于棉籽糖含量与水苏糖含量呈正相关，只要选择其中任一种糖分含量较低的品种，它的低聚糖总含量就会随之降低。

结 语

随着人们生活水平的不断提高及大豆市场变化的要求，人们对大豆的品质要求愈来愈严。以降低大豆子粒中低聚糖含量为育种目标的品质育种应引起足够的重视。本文分析的181份大豆品种的低聚糖含量，虽然数量不多，但它却代表了吉林省不同地区的大豆类型。这些结果表明，吉林省大豆品种资源中低聚糖含量具有一定的选择潜力和利用价值，有待于进一步研究。

参 考 文 献

- (1) 吉林省农科院等:《东北地区大豆品种资源鉴定与评价》，1987。
- (2) Hymowitz, T. et al. Relationship Between the Content of oil, Protein, and Sugar in Soybean Seed, *Agronomy Journal*, 1972(64): 613-616.
- (3) Openshaw, S.J. and H.H. Hadley. Selection to Modify Sugar Content of Soybean Seeds *Crop Science*, 1981(21): 805-808.

(上接第70页)

241~245. 1982, Vol. 13, No. 3, 162~166.

- (4) 董军等:《江苏农学院学报》, 1983, 4, (2): 64.
- (5) 许康朴等:《南京农学院学报》, 1983, No. 2, 70~85.
- (6) 刘铁铮等:《南京农学院学报》, 1983, No. 3, 69~80.
- (7) 郑中华:《电子显微学报》, 1984, 4.
- (8) 戴杏庭:《辽宁畜牧兽医》, 1984, 1, 7~11.
- (9) 杜忠涛:《山东农业大学学报》, 1985, No. 1~2 32~45.
- (10) 王前:《陕西农业科学》, 1985, (1), 1~5.
- (11) 张忠诚:《北京农业大学学报》, 1985, Vol. 11, No. 1, 101~108.
- (12) 朱启铨等:《解剖学报》, 1985, Vol. 8, No. 2, 196~199.
- (13) 王益鑫等:《生殖与避孕》, 1985, Vol. 5, No. 3, 57~58.
- (14) 刘铁铮等:《南京农业大学学报》, 1985, No. 4, 86~93.