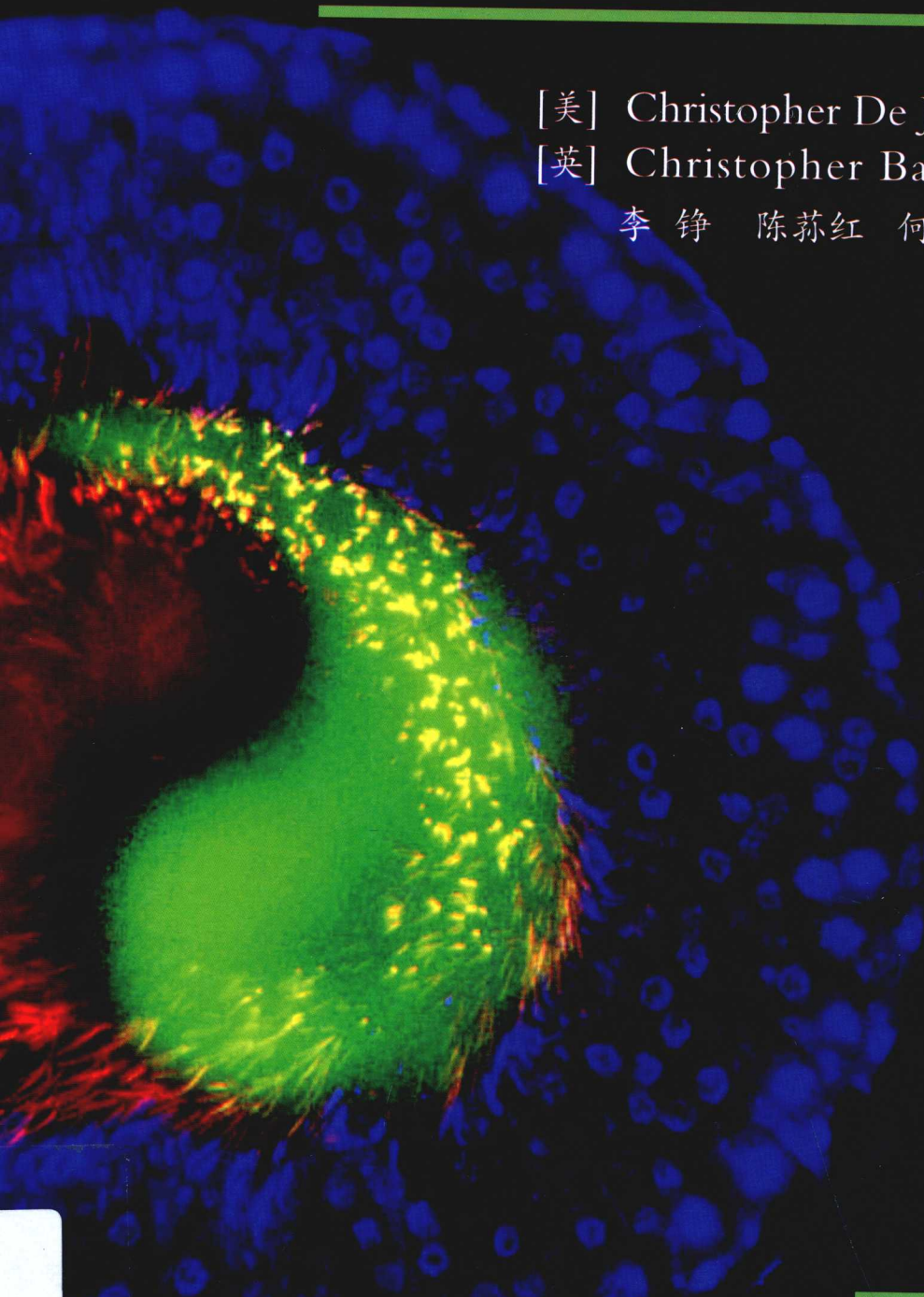


精子细胞

生成 成熟 受精 再生

[美] Christopher De Jonge 编
[英] Christopher Barratt

李 铮 陈荪红 何祖平 主译



上海科学技术文献出版社
Shanghai Scientific and Technological Literature Press

CAMBRIDGE

精子细胞

生成 成熟 受精 再生

[美]Christopher J. De Jonge

[英]Christopher L. R. Barratt 编

李 铮 陈荪红 何祖平 主译

图书在版编目 (CIP) 数据

精子细胞: 生成 成熟 受精 再生 / (美) Christopher J. De Jonge 等编;
李铮, 陈荪红, 何祖平译. —上海: 上海科学技术文献出版社, 2014.4
书名原文: The sperm cell
ISBN 978-7-5439-6083-1

I . ① 精… II . ① C…②李…③陈…④何… III . ①精子—研究 IV .
① R321.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 308208 号

The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration

This is a Simplified Chinese edition of the following title(s) published by Cambridge University Press:

The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration 9780521853972
© Cambridge University Press 2006

This Simplified Chinese edition for the People's Republic of China (excluding Hong Kong, Macau and Taiwan) is published by arrangement with the Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

© Cambridge University Press and Shanghai Scientific & Technological Literature Press Co., Ltd.
2014

This Simplified Chinese edition is authorized for sale in the People's Republic of China (excluding Hong Kong, Macau and Taiwan) only. Unauthorised export of this Simplified Chinese edition is a violation of the Copyright Act. No part of this publication may be reproduced or distributed by any means, or stored in a database or retrieval system, without the prior written permission of Cambridge University Press and Shanghai Scientific & Technological Literature Press Co., Ltd.

版权所有 • 翻印必究
图字: 09-2012-272

责任编辑: 张 军
封面设计: 徐 利

精子细胞——生成 成熟 受精 再生

[美] Christopher J. De Jonge [英] Christopher L. R. Barratt 编

李 铮 陈荪红 何祖平 主译

出版发行: 上海科学技术文献出版社

地 址: 上海市长乐路 746 号

邮政编码: 200040

经 销: 全国新华书店

印 刷: 上海中华商务联合印刷有限公司

开 本: 787×1092 1/16

印 张: 17.75

播 页: 6

字 数: 399 000

版 次: 2014 年 4 月第 1 版 2014 年 4 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5439-6083-1

定 价: 100.00 元

<http://www.sstlp.com>

主 译：李 铮 陈荪红 何祖平

其他参译人员：

卢 慧 公跃华 刘宇飞 郭成志 田汝辉

朱 勇 朱晶晶 朱子珏 汪小波 朱晓斌

马 猛 陈 浩 杨 施 李 朋 王洪华

前 言

过去 10 年,人们更加重视人类雄性配子的研究。很多独特、具有启发性的人类精子特征得到鉴定,人们对其发生、成熟和功能诸方面有了更深刻的诠释。但近 8 年来,尚未出版一本全面论述精子的专著。本书将着重阐述人类精子,但在相关数据缺乏时,借鉴动物研究结果加以讨论。

人们一直认为精子结构对受精成功有十分重要的影响,但现在发现它在受精后的生命活动中,发挥更加重要的作用。精子基因组的组成及其结构的准确性,深刻地影响受精、胚胎发生和胎儿出生后的存活。本书部分章节详尽介绍了功能完整和失调的精子基因组的复杂性。

在某种程度上,人们一直认为精子是典型的单细胞,也就是说精子的细胞膜、细胞器和代谢活动相互关联。但是新的研究证明,精子具有一些独特特征,即精子细胞内有相对独立的部分,各部分生理功能和生化功能可相互分离。本书的一些章节在这方面提供了非常有趣的启示。

本书封面中,“阴阳”图像构成了显微照片的核心,象征本书副标题:生成、成熟、受精和再生。事实上,基因组和蛋白质组时代昭示着新的精子研究时代已经到来,许多令人惊叹的结果不断被人发现。本书最后一章详细阐述了精子的产生,同时阐述了如何从胚胎干细胞再生精子。

我们衷心希望这本充满启发性的书,能够成为初涉该领域的医学工作者、医学生,或具备丰富经验的研究者们学习和研究的基石。在这个令人激动的研究领域,卓越而生气勃勃的研究活动正在不断开展,我们相信这本书将为这些研究活动提供重要资料,同时也是这些活动的真实写照。

Christopher De Jonge
Christopher L. R. Barratt

目 录

第一章	哺乳动物的精子发生和精子结构:解剖学分析和组成分析	1
第二章	精子染色质稳定性及损伤易感性与其结构的关系	24
第三章	从基因组学与蛋白质组学角度探讨精子发生与功能	38
第四章	精子在附睾中成熟	57
第五章	精子运动的调控	85
第六章	获能的调节	106
第七章	活性氧:是敌是友	132
第八章	评价精子的质量:精子-透明带结合实验	150
第九章	遗传学:基本的科学视角	168
第十章	性染色体异常与男性不育:临床观点	204
第十一章	男性生殖细胞的表观遗传:DNA 甲基化对妊娠结局的重要作用	219
第十二章	DAZ 基因家族和胚胎干细胞向人类生殖细胞发育	253
附:	彩图插页	277

哺乳动物的精子发生和精子结构： 解剖学分析和组成分析

Peter Sutovsky^{1, 2}, Gaurishankar Manandhar¹

美国哥伦比亚特区密苏里-哥伦比亚大学动物科学部¹/妇产科学系²

借助数学模型得到的详尽理论分析显示,有性生殖是一种效率低下的生育方式,其低效主要在于雄性子代产生。对于大多数有性物种,雌性个体赋予其后代能量和资源。相比之下,雄性个体提供的是仅仅承载遗传基因的精子,并不提供其他资源。

《生命的进化》. 主编 Linda Gamlin 和 Gail Vanes. 牛津大学出版社, 纽约, 1987

1.1 引言

上述观点认为雄性个体在受精过程中,仅仅为胚胎染色体贡献一半遗传信息。这种论断尽管被普遍接受,也只是大众科普的一般理解,但事实并非如此。设立本章的目的不仅要抛砖引玉,引出本著作其他 11 个章节,更在于阐明雄性生殖细胞(即精子)为合子形成与胚胎发育发挥更加关键的作用。通过研究复杂而令人着迷的精子发生过程,将阐明父方所贡献的独一无二资源是如何形成的。在这本论著中,我们采用非传统方法,研究精子发生过程和精子结构,重点研究父方在受精过程中做出的贡献,这样的论述也可以说是一场男性虚荣心的演绎。因此,我们研究的重心主要集中在精子发生后期。在此过程中,类似体细胞形状的圆形单倍体精子细胞,转变为具有特殊功能的精子。精子几乎不含细胞质,能前向运动,在输卵管环境中与卵子结合受精。在后续的受精和受精卵发育过程中,这个看起来赤裸的精子不仅为受精卵提供了父方基因,也提供了中心体、细胞核周物质,甚至也可能提供了信使核糖核酸(mRNA),诱发卵母细胞激活,从而激活储存在卵质内的母方因子。雄性生殖细胞和雌性生殖细胞的差异,使产生的雄性配子和雌性配子承载的细胞器和分子,正好互补而无重叠。这些物质独一无二,而其他类型细胞并不具备。配子发生过程,有选择地去除了某些特定细胞器,同时吸收其他细胞器,从而产生了可以相互兼容的雄性配子和雌性配子。这两种配子在受精过程中相互结合,产生可以发育成新个体的合子。结果,卵母细胞细胞质成倍扩大,以储存 mRNA、多种蛋白及其他分子,其为卵母细胞向胚胎细胞转变之前合子存活及胚胎基因组完全激活所必需。与之相反,精子丧失了大部分细胞质和细胞器,具备运动能力,可在离开雄性生殖系统后存活并完成生命活动(图 1.1)。

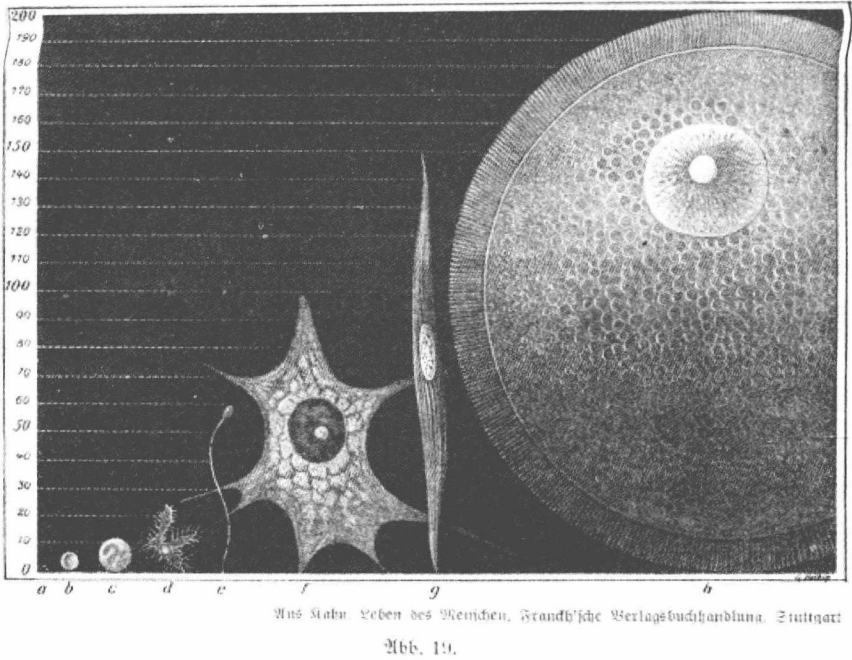


图 1.1 细胞大小对比图

摘自 20 世纪早期书本的图片资料，比较精子和卵母细胞的大小。雄性生殖细胞和雌性生殖细胞的分化产生了具有高度特化的配子，任何其他类型细胞都不具有这些特性。通过选择性地去除或吸收一些特定细胞器使精子和卵母细胞内的物质互补，最终在受精时形成能发育成新个体的合子。出自 Wolf F(1928)。

出于章节形式和版面限制，本章节不打算全面阐述哺乳动物精子发生和精子结构方面的知识，推荐读者参阅一些与这个话题相关的优秀专著(如 Fawcett, 1975; Barth 和 Oko, 1989; Russell 等, 1990; Hess 和 Moore, 1993; de Kretser 和 Kerr, 1994)。

1.2 哺乳动物精子的结构和功能

为了全面理解哺乳类动物精子的生物发生机制(如精子发生和精子形成)，我们有必要简要回顾哺乳动物精子的亚细胞结构和功能(Fawcett 等, 1975)。精子(图 1.2)由精子头部和精子尾部(也称鞭毛)组成。精子头部和尾部均被精子质膜覆盖。啮齿动物的精子头部呈钩状(镰刀状)，有蹄类动物、食肉动物和灵长类动物的精子头部呈椭圆梨形或小勺状(匙状)。有蹄类动物精子和啮齿类动物精子的主要区别在于后者完全没有中心体和中心粒，而前者只具有一个由近端中心粒缩减的中心体形式。在精子头部和尾部的其他一般特征上，所有哺乳动物结构相同，见下文(1.2.1)所述。

1.2.1 精子头部

由内而外分析，精子头部内有一细胞核，核上的脱氧核糖核酸(DNA)高度致密，与之相连的组蛋白在精子形成过程中部分被替换为鱼精蛋白。鱼精蛋白为带正电的 DNA 蛋白，可将高度浓缩的精子细胞核，改变成紧密的流体力学形状，使精子具有活

力,能穿透卵细胞的透明带以及细胞膜(Brewer 等,2002; Dadoune, 2003)。细胞核外覆盖了缩减的核膜(nuclear envelope, NE),原先的核孔复合体(nuclear pore complexes, NPC)在精子形成过程中丢失。不过某些物种的精子细胞核底部,可发现残余的带有 NPC 的核膜(Ho 和 Suarez, 2003)。核周鞘(perinuclear theca, PT)为细胞核提供保护,有时也叫做“核周基质”,即由二硫键稳定的结构蛋白和其他各种蛋白分子构成的硬壳(Okó, 1995)。部分蛋白在受精过程中从 PT 液中流出,并进入卵母细胞质,发挥信号传导作用。精子 PT 可分为三区段,分别与精子头部三大主要区段相呼应,在受精过程中发挥独特的作用:

(1) 顶体下层位于精子头部的顶体段之下,以固定顶体。顶体为由高尔基体衍生的囊泡,在精子头部半球外形成帽状物,内有蛋白酶及精子与卵母细胞透明带结合所需的受体。顶体内膜(inner acrosomal membrane, IAM)和顶体外膜(outer acrosomal membrane, OAM)分开,两膜之间有致密的顶体基质,基质内含有分解透明带(ZP)并产生受精间隙所必需的蛋白酶(Gerton, 2002; Yoshinaga 和 Toshimori, 2003)。顶体下的核周基质与 IAM 融合,并有可能使 IAM 上的受体分子保持稳定,以保证顶体胞吐后精子头部和卵子透明带第二次结合。在受精过程中, IAM 仍清晰可见,但 OAM 在由精子质膜/OAM 复合体与 ZP3 蛋白结合而诱导发生的顶体胞吐中囊泡化, ZP3 蛋白就是卵子透明带上的精子受体(图 1.2)。

(2) 赤道段为由 PT、OAM 和 IAM 的折叠复合物,内含精子头部开始与卵子质膜即卵膜结合所需的受体分子。一旦精子穿透透明带,到达卵周隙,精子头部和卵子质膜即卵膜就开始结合。一些与精子-卵膜结合相关的受体分子,如赤道段/MN9 (Toshimori 等,1992),出现在这个区段。

(3) 有观点认为,精子 PT 的顶体尾鞘(postacrosomal sheath, PAS)含有信号蛋白复合物,统称为 SOAF,或精子携带物或卵母细胞活化因子(Sutovsky 等人评论,2003)。精子头部和卵膜融合后,一些 SOAF 分子分散在卵质内,触发信号通路,从而导致卵母细胞激活,并引发合子发育,其他从 PAS 释放出来的分子则可能与精子细胞核转化为雄原核有关。

1.2.2 精子鞭毛

基于鞭毛轴丝内独特的 9+2 微管排列方式,精子尾部或精子鞭毛为精子运动提供动力。9+2 微管排列方式是指外周有 9 对对称排列的微管双联体,其间由动力蛋白相互连接,双联体与 2 对中央微管呈横向辐式连接。9 条外周致密纤维与双联体平行,为鞭毛运动提供灵活而有力的支持。拓扑学观点认为,精子尾部可分成四大主要区段,其内部结构相同,即以微管为基础的轴丝,与外部 9 根密集纤维平行,但外部结构不同。从近端到远端,这些区段分别为:

(1) 连接段由 9 条有条纹的结构或称节柱组成,节柱是其他鞭毛区段的外周密集纤维在此区段的直接延续。9 条节柱内包在致密的漏斗状结构外面。除了啮齿类动物,大多数哺乳动物的漏斗状结构包含了精子(近端)中心粒,为早期单倍体生精细胞中含两个中心粒的中心体的残留物。如后文所述,精子形成过程中两个中心粒是否完全降解

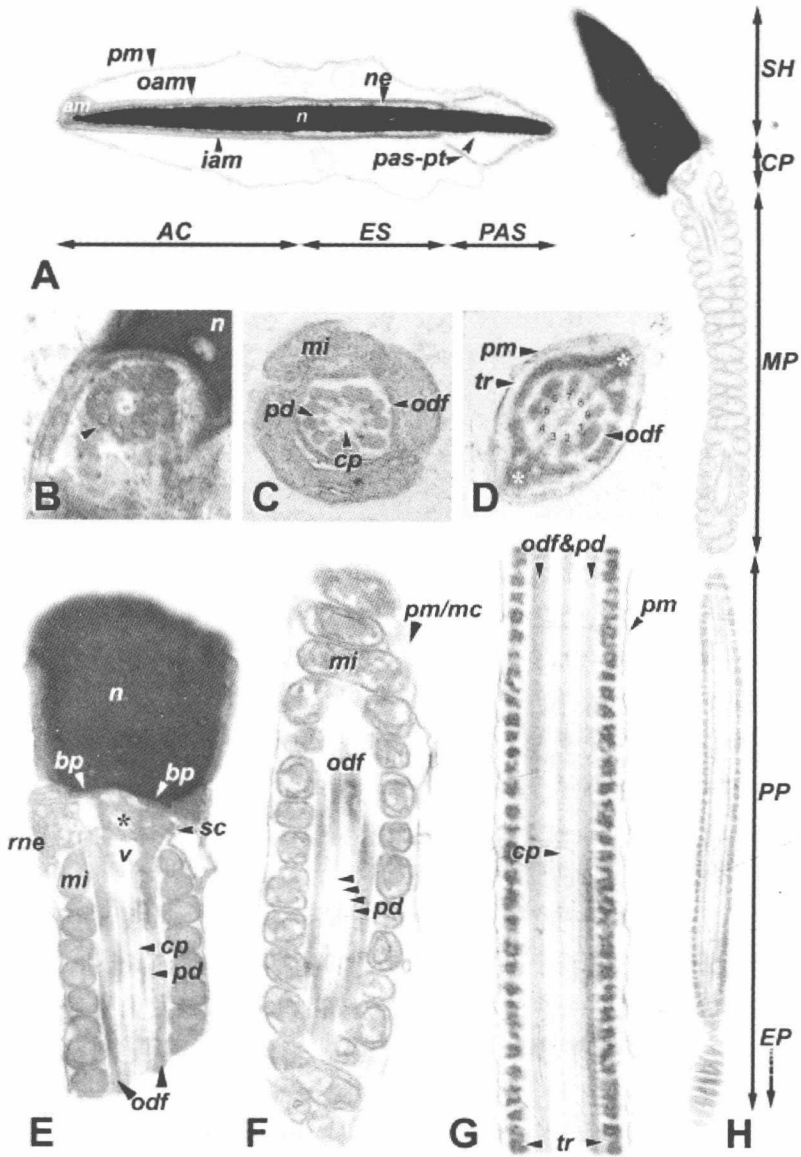


图 1.2 哺乳动物精子的精细结构

(A)透射电子显微镜下的波状精子膜，清晰可见哺乳动物精子头部的矢状切面，覆盖了赤道段(ES)、部分顶体区域(AC)和顶体后鞘(PAS)。精子头部覆盖了质膜(pm)。在AC区，pm与oam紧密相连形成顶体帽，顶体基质(am)与iam重叠。AC区iam和ne之间的狭窄区域充满了PT，精子头部其他区段的pm和ne之间也充满了PT，图中所示的是顶体后鞘段(pas-pt)。精核(n)贯穿了精子头部的3个区段。(B~G)精子尾部颈段(B, E)，中段(C, F)和主段(D, G)的横切面和纵切面。颈段(B, E)可见近端中心粒(E; *)，由9根微管三联体(B; 箭头)组成，还有一个由远端中心粒在精子形成过程中降解留下的穹窿。不过小鼠的精子横切面未见近端中心粒和远端中心粒，两者都在精子形成过程中降解。条纹状的节柱(sc)包围近端中心粒，节柱是外周致密纤维(odf)的直接延伸。与ODF平行的是鞭毛轴丝的外周微管二联体(pd)，以1对中央微管对(cp)为中心。颈段结构覆盖了多余的核膜(rne)，可在紧邻线粒体鞘的第1个线粒体(mi)处发现。中段(C, F)被精子线粒体螺旋结构包围，该段的鞭毛轴丝由9根odf、9对外周微管对(pd)和1对中央微管对(cp)组成。该鞭毛轴丝排列结构延伸至主段末端(D, G)，不过包围在外周的是由2条纵向纤维柱组成的纤维鞘(*在D中)，该纤维柱与odf #3和odf #8平行。odf序号已在D图按逆时针方向标明。2条纵向纤维柱之间通过横向的肋柱(tr)相连，肋柱存在于整个纤维鞘中。精子尾部的所有区段都覆盖了质膜(pm)。精子尾部通过植入窝的基板(bp)与精子头部中段相连。一般精子结构可分为五大主要部分，精子头部(SH)，精子尾部颈段(CP)、中段(MP)，主段(PP)和尾端(EP)。

是啮齿类动物区别于有蹄类动物、食肉动物和灵长类动物的标志。基板将连接段的近端和精子头部的植入窝连接在一起。

(2) 中段覆盖了线粒体鞘,由 75~100 个精子线粒体呈螺线排列而成,为精子鞭毛运动提供能量。每个精子线粒体都携带了多个父方线粒体基因拷贝。也许由于精子成熟和受精过程中遇到的诱发氧化应激反应,这些父方线粒体 DNA(mtDNA),在受精卵中受到靶向性水解(Sutovsky 等,2004b)。

(3) 主段和中段被环隔开。环,也叫 Jensen 环,位于线粒体鞘远端,是由密集物质组成的横向环。主段外覆盖有保护性的纤维鞘支架,该支架由 2 根与外周密集纤维 3 号和 8 号平行的纵向柱组成(见图 1.2D),两边都有一系列横肋连接。纤维鞘为精子轴丝提供支持,同时纤维鞘内的蛋白亦保证在受精前获能和超激活所必需的蛋白激酶处于隔离状态(Eddy 等,2003)。

(4) 末段包含了轴丝双联体、外周密集纤维末段和纤维鞘末段。

1.3 精子发生

通过精子发生,能够维持每天释放已完全分化的精子数量,不同种类的真兽亚纲哺乳动物的每日精子释放量不同。人类日释放约 2 亿个精子,而公牛日释放 20 亿~30 亿个。大量精子的形成需要有独特的生精上皮结构来维持,是一套自给式系统,并与血液系统完全隔绝,只允许选择性地吸收旁分泌因子。生殖系统和生殖细胞系的独特之处在于它们相对沉寂,且在青春期之前尚未完全分化。

1.3.1 生殖细胞迁移和生精上皮的形成

早在受精后第 7.5 日,小鼠的精子发生就已打下基础。此时,原始生殖细胞(PGC)从内胚层向后肠迁移(Clark 和 Eddy, 1975)。一旦原始生殖细胞迁移到生殖嵴,生精索开始形成,并最终形成生精小管(Byskov 和 Hoyer, 1994)。完全分化的睾丸内有 12~20 根生精小管,每根生精小管高度屈曲盘绕,两端均连接在睾丸纵隔内的睾丸网上。出生时,PGC 有丝分裂停止,生精小管内的 PGC 亦分化为处于有丝分裂沉寂阶段的 A 型精原细胞,直到临近青春期才重新开始进行有丝分裂(图 1.3)。临近青春期,促性腺激素增加,诱导 A 型精原细胞进行大量有丝分裂,同时睾丸下降,A 型精原细胞转变为 B 型精原细胞,B 型精原细胞开始进入减数分裂。为了维持足够的精子数量,精原干细胞不断增殖。所以 A 型精原细胞既可增殖也可分化。真兽亚纲哺乳动物在育龄期内以每天约数以亿计的数量持续不断地产生精子。细胞程序性死亡或细胞凋亡也许能保证如此大量的细胞增殖和分化所需的质量控制(Sinha-Hikim 和 Swerdloff, 1999)。

1.3.2 生精上皮和血睾屏障的结构

生精小管的独特结构使生精上皮既允许流入必需的营养物,又通过血睾屏障使其避免来自自身的免疫攻击。生精小管外层为基膜(basement membrane, BM)包绕,A 型精原细胞紧密地贴附在基膜上,而 B 型精原细胞有时只有很少部分与基膜接触。

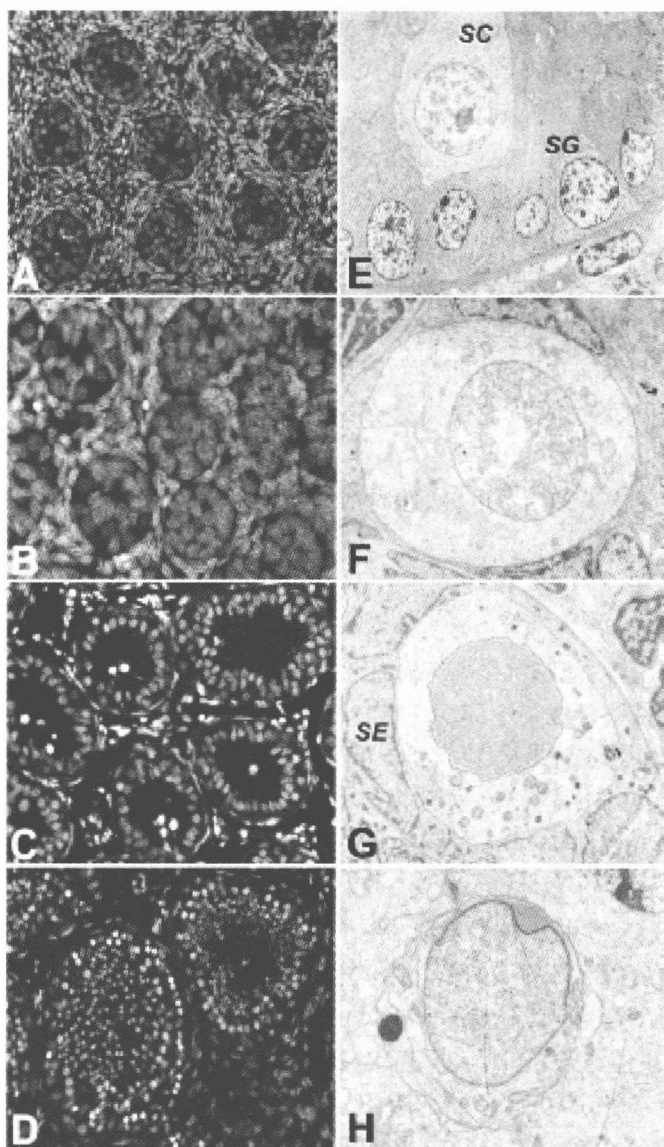


图 1.3 猕猴精子发生的组织学和超微结构研究

胎猴睾丸(A, B, E)可见大量基质细胞;生精小管管壁细胞主要为精原细胞(SG);偶见前细线期精母细胞(SC),少有支持细胞。幼猴睾丸(C, F, G)内有增粗的生精小管,偶见前细线期精母细胞(F, G)被 SG 和支持细胞包围(G, SE)。成年猴睾丸内有粗大的生精小管,可见生精周期各个期(D),也包括单倍体精子细胞(H)。图 A~D 描绘荧光显微镜荧光染料 DAPI 与细胞 DNA 结合的睾丸组织截面。图 E~H 描绘睾丸超薄切片在透射电子显微镜下的结构。尸检组织标本由 Oregon 全国灵长类动物研究中心惠赠,该中心位于美国俄勒冈州的 Beaverton。

这部分区室内还有支持细胞的基部,故称作基底小室。初级精母细胞穿越血睾屏障,进入近腔小室,在此处完成减数分裂并形成精子。血睾屏障由相邻支持细胞之间细胞连接形成(Johnson 和 Boekelheide, 2002a, b)。这种选择性的、半渗透性的屏障防止免疫细胞渗透生精上皮内腔,故此处是免疫豁免区。这样的结构避免精子表面抗原与抗体结合,从而保证其在精子成熟、变形和受精等过程中的功能。

1.3.3 生精上皮的生精周期

生精上皮周期是指精子发生过程的某一次的细胞组合到下一次出现同样的细胞组合的所经历的时程(Barth 和 Oko, 1989),或某个特定的生精上皮区段上的一系列完整有序的细胞组合(也叫期)(Russell 等, 1990)。区段指的是某个细胞组合所在的生精小管区域。根据生精上皮周期某期在单个生精小管截面上出现的生精细胞类型(图1.4),不同的作者均观察到啮齿类动物的生精上皮周期分 12~14 期,食肉类动物分 8 期,有蹄类动物分 12 期,灵长类动物的分 6~12 期。人类睾丸的生精上皮周期分 6 个期,和大多数动物不同的是,在人类生精小管的一个切面中可观察到 3 个不同的期。每个切面可清晰地分为 3 块楔形区域,每块区域上的细胞组合相应地对应了精子发生的某一期。不同的期用罗马数字序号 I~VI 表示(其他物种分 I~XVI 期)。Barth 和 Oko (1989)认为精原细胞由 4 种 A 型精原细胞(A_0 , A_1 , A_2 , A_3)、一种中间型精原细胞和两种 B 型(B_1 和 B_2)精原细胞组成。精母细胞可分为前细线期、细线期、偶线期和粗线期初级精母细胞及次级精母细胞,其分类依据为精母细胞所在生精小管位置以及生精细胞核内的异染色质和联会复合体所反映出的减数分裂前期进展。根据精子附属结构

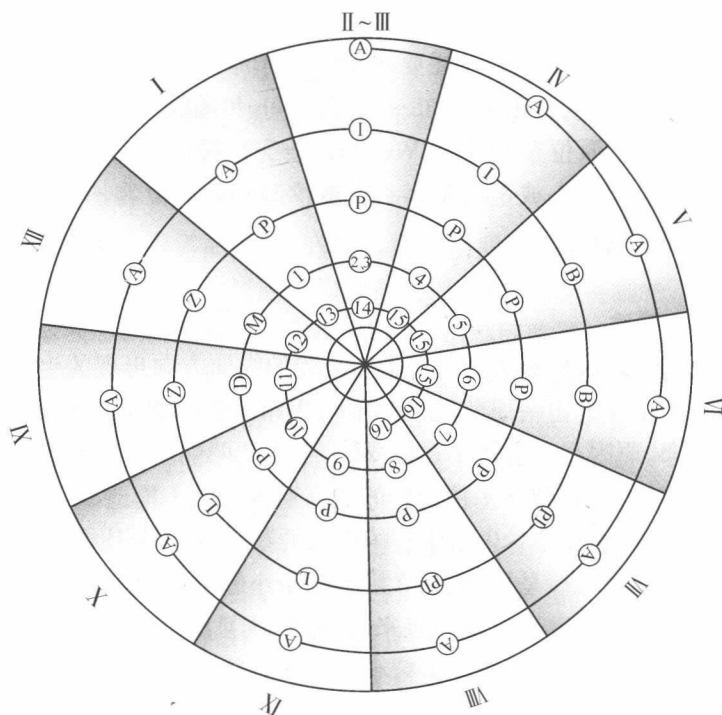


图 1.4 以小鼠为例生精上皮周期图示

12 期(I~XII)中每期都有其特定的单倍体细胞和双倍体细胞组合,从圆周向圆心发展。圆周代表基底室,圆心代表生精小管官腔横切面。A=A 型 SG;I=中间型 SG;B=B 型 SG;Pl=前细线期精母细胞;L=细线期精母细胞;Z=偶线期精母细胞;P=粗线期精母细胞;D=双线期;M=正在减数分裂的精母细胞,其染色质已完全浓缩。阿拉伯数字 1~16 指的是单倍体精子细胞在精子形成时历经的 1~16 步。普遍认为图中所画的所有期都有精原干细胞出现。每期的时间跨度因物种而异,以大鼠为例,最短的期为 7 小时(期 IX, X, XI),最长的期为 58 小时(期 VIII)(Russell 等, 1990)。

形成的进展程度及精子细胞质残余体的脱落程度,将精子发生时单倍体生精细胞的发生细分为 14~19 步。每个特定的精子发生期,都能在所在的生精小管区段截面上找到单倍体生精细胞和双倍体生精细胞的精确组合。例如,小鼠生精细胞周期第Ⅵ期中可见 B 型精原细胞、粗线期精母细胞、第 6 步圆形精细胞组合及第 15 步长型精子细胞形成的组合。为了帮助识别不同期,有必要指出的是,小鼠的生精细胞周期第Ⅱ~Ⅷ期中含有 5 种细胞类型,包括一个处于第 1~7 步的精子细胞和一个处于第 13~16 步的长型精子细胞。同时,Ⅰ期和Ⅸ~Ⅻ期仅含 4 种细胞类型,包括精原细胞、精母细胞和长型精子细胞(图 1.4)。关于小鼠、大鼠和犬的具体生精上皮分期可参看 Russell 等人的论作(1990)。公牛的精子发生过程中,Ⅰ~Ⅵ期包含了 5 种细胞类型,Ⅶ~Ⅻ期包含了 4 种细胞类型,Barth 和 Oko 的论作中有具体描述(1989)。

从基膜到生精小管腔面,精原细胞、精母细胞和精子细胞依次排列,这种独特的生精上皮结构是在出生后发育中逐步形成。因此在新生的哺乳动物生精小管中,只能找到支持细胞、精原细胞和前细线期精母细胞。后期的精母细胞(细线期、偶线期和粗线期精母细胞和正在分裂的精母细胞)和精子细胞只能在围青春期睾丸和成年睾丸中找到(见图 1.3)。精子细胞的这种有序排列方式极大地有利于我们了解精子蛋白的表达谱。例如,为了研究某个特定蛋白存在于哪个生精周期,有必要从所有适合的生精细胞周期中提取蛋白质或 mRNA。不需要花大量的时间和精力来分离成年睾丸中各种不同的生精细胞,你只需在幼仔出生到 35~42 天期间,每周收集啮齿动物睾丸组织,并分别用 Southern 杂交法、原位杂交法和 Western 杂交法检测所有收集到的睾丸细胞溶解物,得到被研究的 mRNA 或蛋白质第一次被检测到的提取物,然后进行差异性研究分析得到最终结果。

1.3.4 生精上皮的生精波

生精上皮的生精波可定义为沿着生精小管的纵向方向出现的生精周期连续各期的细胞组合。生精上皮的生精周期进程并不与生精小管的纵向延伸同步,而是以特有的生精波方式分布,原因在于生精小管呈襻形,小管的两端均开口于睾丸网。在生精小管两端,生精上皮区段的排列从生精周期的最高期依次向Ⅰ期递减,两端的生精周期分别向中间递减,故必定会在襻状生精小管的中间的某个区段共用一个期。例如,假如从显示为生精小管的某个区段是Ⅻ期,那么沿着生精小管可依次发现Ⅺ期,Ⅹ期,Ⅸ期,直到出现显示为Ⅰ期的横截面。从这一点来说,这种从Ⅻ期开始的递减顺序会不断重复出现,但是在一些生精波发生调整的生精小管特殊区段里,这一普遍规律将发生逆转。这意味着在生精波发生调整的区段,其两侧的期以升序排列(如Ⅻ,Ⅺ,Ⅹ,Ⅸ,Ⅷ而不是Ⅻ,Ⅺ,Ⅹ,Ⅸ,Ⅷ)。这一点确保了生精小管上的所有期均匀分布,保证每天排放的成熟精子数量持续而稳定。

1.3.5 精子发生的增殖期和减数分裂期

精子发生需要雄性生殖细胞不断分化和增殖。精原干细胞和精原细胞持续不断地进行有丝分裂,即精子发生的增殖期,保证了细胞增殖。由此可知生殖细胞有两种

不同的命运,要么通过有丝分裂自我复制,要么进入减数分裂,整套染色体减半,最终分化成精子。后者即精子发生的减数分裂期。从时间上说,这两个时期既可以看作相互伴随发生(每个生精小管区段含有4~5种生精细胞,因此在生精小管中同时发生着细胞增殖和分化),也可以看作先后相继发生(时间上而言,每个生殖细胞先经历增殖期再进入减数分裂期)。空间上而言,增殖期发生在营养丰富的基底室,而细胞分化发生于近腔小室里,由于血睾屏障的存在,这些分化细胞将不会受到免疫细胞的攻击。

1.3.6 精子发生的单倍体期:精子形成和精子排放

单倍体期在精子发生过程中显得特别不同,这一时期类似体细胞的生殖细胞获得独特的精子附属结构,有了这个结构这些细胞才能脱离生精小管,获得受精能力,通过雌性生殖系统,最终与卵母细胞受精。精子发生的最后部分可分为精子形成期和精子排放期。精子形成期也叫精子细胞延长期,此时单倍体精子细胞长出精子附属结构;在精子排放期,生殖细胞内残余的细胞质被丢弃,完全分化的精子脱离生精小管。根据单个精子附属结构的形成和精子细胞核的凝聚过程,精子形成可分为不同的步,分别用阿拉伯数字表示。大鼠的精子发生分为19步,小鼠的16步,有蹄类动物和灵长类动物14步,食肉动物12步。根据顶体形成过程,Okó和Barth(1989)将公牛的精子形成分为高尔基期(1~3步),顶体帽期(4~7步),顶体期(8~12步)和成熟期(13和14步)。

精子形成过程中,形似体细胞的圆形单倍体精子细胞转变为高度分化的精子,这些精子在附睾中成熟后获得前向运动能力,在与输卵管液和输卵管上皮细胞相互作用后获得受精能力。这是一个广泛的细胞重塑过程,因此在那些独特、转瞬即逝或长期存在的精子附属结构形成的同时,伴随着某些精子细胞细胞器的改变、减少或完全退化。在精子发生早期的最后一次转录和翻译期间,很多组成性基因和生殖细胞特异基因的转录、翻译和翻译后水平需要发生改变(Kleene等,1993; Eddy, 2002; Dadoune等, 2004)。从细胞器水平上说,精子附属结构的形成,包括高尔基复合体衍生成为顶体帽/顶体(Moreno等,2000),精子细胞质并入精子头部骨架、形成核周鞘(Okó, 1995),以及形成带有外周密集纤维和纤维鞘的精子鞭毛轴丝(Okó, 1998)。通过移除组蛋白,精子头部发生变形,精子核高度浓缩。组蛋白依次由转换蛋白和鱼精蛋白代替(Meistrich等,2003)。伴随发生的是,由两个并列垂直中心粒和微管-中心粒周围物质晕圈组成的精子细胞中心体变为仅成熟精子具有的单个近端中心粒,并固着于核底部的浅窝中(Sutovsky等,1999a)。一旦远端中心粒形成鞭毛的微管双联体后就会降解(Manandhar等,1998)。小鼠的近端中心粒和远端中心粒在精子发生过程中都会降解(Manandhar等,1998)。大约一半的精子细胞线粒体在精子发生过程中被丢弃,而留下的线粒体的外膜得到强化,称线粒体胶囊(Cataldo等,1996),并被重新排列成螺旋状线粒体鞘。和中心体、线粒体的变化方式相似,在精子细胞形成过程中,精子核膜(NE)退化,而不是完全消失,但核孔复合体(NPC)在精子延长过程中消失(Sutovsky等,1999b)。

《构建是为了摧毁》(*Construction for the Sake of Destruction*, Glickman 和 Chiechanover, 2002)是在描述精子形成过程方面写得最恰当的一本书,对蛋白水解泛素系统进行了广泛的综述。精子形成过程中,许多细胞器和蛋白质循环利用,为发育中的精子附属结构提供空间和生长物质。泛素依赖性的蛋白质水解对精子发生过程至关重要。泛素是种进化上有一定保守性的伴侣蛋白,与其他蛋白共价结合,通过多亚基蛋白酶——26S 蛋白酶体标记其他蛋白酶的水解降解。泛素与底物连接以及后续多泛素链的形成都需要泛素活化酶 E1、泛素载体 E2 和各种底物特异性连接酶(E3 和 E4)共同作用。底物泛素化后的蛋白酶体降解与多聚泛素链的释放同时发生,泛素单体是多聚泛素链在 C 端水解酶作用下重新产生的。泛素系统和蛋白酶体亚基在雄性生殖细胞系各期都有表达(Agell 和 Mezquita, 1988; Wing 等, 1996; Baarends 等, 1999; Wojcik 等, 2000)。特别值得一提的是,泛素化和蛋白酶体降解有助于精子细胞延长(Kierszenbaum, 2002; Escalier 等, 2003),通过转基因小鼠睾丸内泛素-C 启动子启动绿色荧光蛋白表达的实验证实了这一点(彩图 1E)。在精子发生的延长期,若除去与泛素系统相关酶的基因,会引起男性不育(Baarends 等, 2003; Escalier 等, 2003; Kwon 等, 2003)。已知的泛素化精子细胞底物包括组蛋白 H2A 和 H3(Chen 等, 1998; Baarends 等, 1999),在精子细胞核中被鱼精细胞替代后发生降解。精子线粒体膜蛋白抑制素的泛素化(Thompson 等, 2003)可视为判断父方线粒体在受精后是否降解的识别信号。该期可能出现的其他泛素底物结合物有核仁核糖核蛋白和从精细胞核膜上脱落下来的核孔复合体蛋白和核孔蛋白(Sutovsky 等, 1999b)。

有些独特的结构和分子只在精子形成过程中短暂出现,一旦精子完全分化便消失。这些结构和分子包括:

(1) 过渡蛋白(TP1, TP2),即精子细胞核内与 DNA 结合的组蛋白转化为鱼精蛋白时出现的过渡性蛋白(Meistrich 等, 2003)。

(2) 前顶体颗粒,由高尔基体在精子形成第 1~3 步产生,最终与精子核的头端相邻,形成早期的顶体颗粒,之后成为顶体帽(图 1.5)。

(3) 尾部流苏(彩图 1A),即第 7~12 步的(小鼠)精子细胞早期赤道板周围出现的由微管成核组成的面纱状物质。

有观点认为微管轴提供的机械力把精子细胞核塑造为精子核,并将精子细胞胞质中新合成的蛋白运输到精子顶体尾鞘(PAS),并储存在核周鞘(PT)。拟染色体指的是在胞质叶内发现的一团功能未知的致密均质体。微管轴和拟染色体内都有蛋白酶体,因此都可能是精子细胞延长过程中精子细胞核和 NE 上的蛋白质脱落后降解和储存的场所(Kierszenbaum, 2002; Haraguchi 等, 2005)。

精子形成过程中,生殖细胞自始至终通过细胞连接与支持细胞相连,而生殖细胞之间则以胞质桥的形式彼此相连。精子发生的最后期为精子排放,此时完全分化的精子相互分离,从生精上皮的顶端表面脱离,经过生精小管内腔到达睾丸网(Guraya, 1995)。此时胞质叶以残余体形式脱落,而保留的少量精子胞质(称为胞质小滴,简称为 CD)缠绕在精子尾部颈段周围。精子经过睾丸网和输出小管的过程中,残余体被睾丸

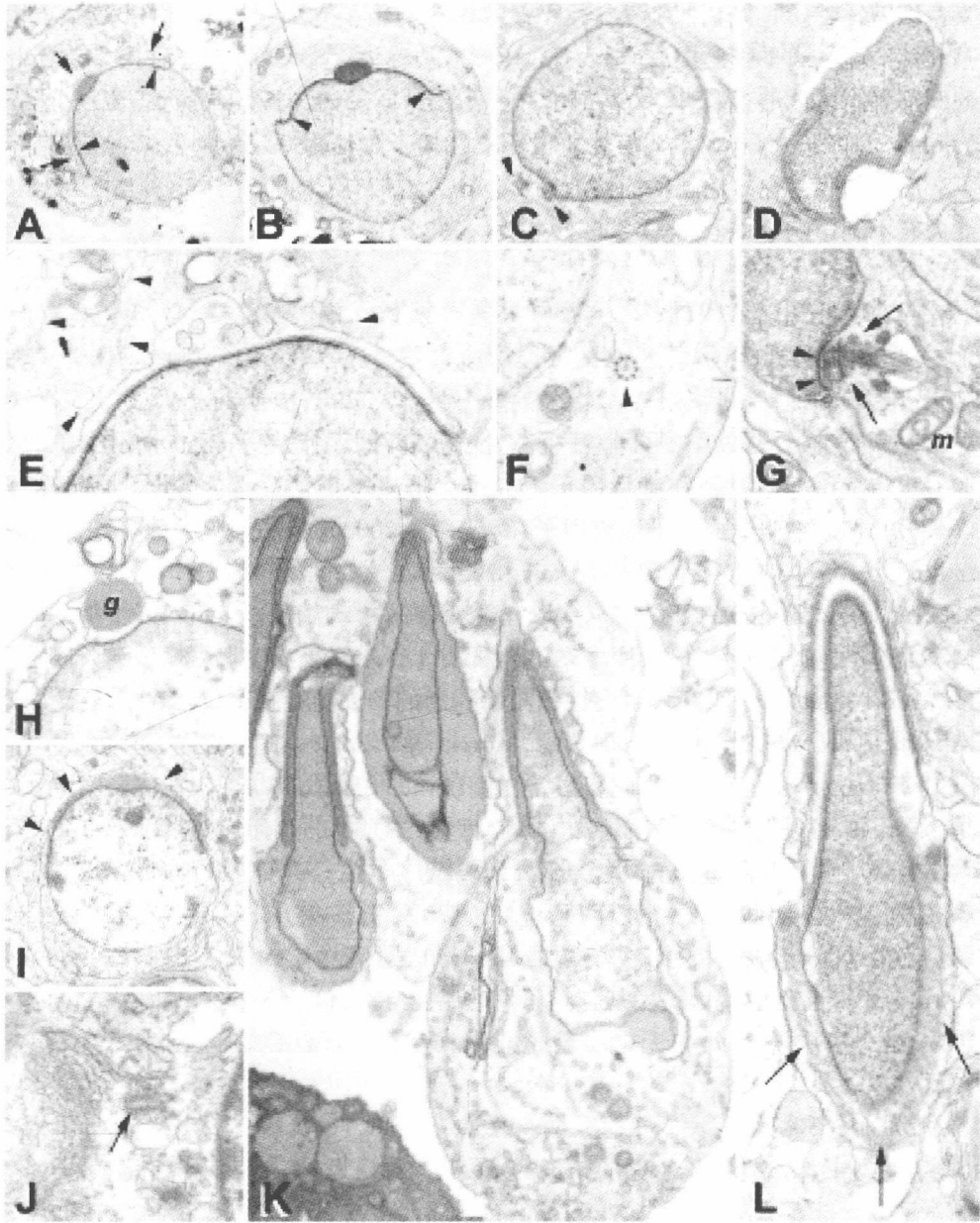


图 1.5 精子形成过程中精子附属结构的发生

透射电镜下观察猕猴(A~G)和公牛(H~L)睾丸的结构。(A, B)第5~6步精子细胞中的顶体帽(箭头)呈飘散的锯齿状。顶体帽下的黑色的一层为顶体下新生的PT(箭头所示)。(C)第7步精子细胞核后端植入新生的精子尾巴(箭头所示)。(D)第9~10步精子细胞的染色质凝聚。期间发生了组蛋白-鱼精蛋白的交换。(E)第3步精子细胞的顶体帽。在此切片顶体未见颗粒捕获高尔基小囊泡和高尔基扁平膜囊(箭头)的现象,高尔基小囊泡和高尔基扁平膜囊可产生顶体帽膜。(F)第6~7步精子细胞中带有9+2双联管的新生的鞭毛轴丝(箭头)横截面。此期ODF和纤维鞘尚未形成。(G)第12步精子细胞中,具有明显基板(箭头)和新生颈段结构(箭头)的新生颈段。线粒体(m)已开始向将出现线粒体鞘的位置移动。(H)第3步精子细胞,原顶体颗粒(g)依附在精子核凹陷区域。(I)第8步精子细胞具有明显的顶体帽,顶体帽几乎延伸到精细胞核的赤道段。注意毗邻顶体帽外表面处有一个扁平的滑面内质网膜囊(箭头)。(J)第3~4步精子细胞的细胞质中有一个中心粒(箭头)。该中心粒将成为鞭毛轴丝微管发生聚合作用的成核中心。(K)第11步精子细胞。染色质的不均匀凝聚可能是睾丸异常的病理学信号。(L)第10步精子细胞出现明显尾部流苏结构(箭头)。