

# 体外培养小鼠生精细胞的形态学研究<sup>1</sup>

江中良, 李青旺, 张明涛, 李文焯, 帅春晓, 程磊  
西北农林科技大学动物科技学院 11 # 陕西 杨凌 712100

E-mail: [jiangzhongliang73@yahoo.com.cn](mailto:jiangzhongliang73@yahoo.com.cn)

**摘要:** 利用姬姆萨原液和瑞-姬染色法对 30-35 日龄小鼠精液和睾丸组织培养后的生精细胞和精子进行形态学鉴定。结果表明, 用姬姆萨原液染色精子形态清晰, 细胞膜边缘清楚, 呈紫红色, 未成熟精子的染色程度浅于成熟精子; 另外, 姬姆萨原液也可以替代其它混合染料。睾丸组织经培养后, 用姬姆萨原液染色, 生精细胞形态清晰, 细胞核呈颗粒状, 开始呈现深紫红色, 胞质粉红色且带有蓝色背景, 颜色较深, 过一定时间后, 颜色变浅; 瑞-姬染色生精细胞形态完整清晰, 细胞核、核仁、胞质分别呈现不同颜色。

**关键词:** 生精细胞; 体外培养; 形态学; 细精管

生精细胞包括精原细胞、各级精母细胞和精子细胞, 其中精原细胞包括 A 型精原细胞和 B 型精原细胞, 前者作为人体内唯一可自我更新的干细胞, 逐渐受到科学家的重视<sup>[1-3]</sup>。而 A 型精原细胞发育成为成熟精子的过程仍存在许多问题, 包括精子发生的基因调控, 精原细胞增殖分化的启动和调控, 干细胞状态的维持及自我更新的方式等<sup>[4, 5]</sup>。生精细胞培养可用于人类男性生殖生理及精子发生, 调控机制及治疗精子发生阻滞的患者; 对精子发生机制的进一步阐明; 可促进各种类型的精子微注射<sup>[6]</sup>, 也可以促进动物转基因技术的发展及珍稀野生动物繁殖和濒危物种的保护<sup>[7]</sup>等。随着细胞培养技术的发展, 人们可直接对所培养的细胞进行观察处理。因此, 生精细胞体外成熟培养的研究已越来越重要, 各国学者为之作了大量的努力。本研究通过对小鼠精液、细精管中生精细胞和精子的染色, 及细精管组织培养方面的研究, 以期今后的应用提供一定的数据和理论基础。

## 1. 材料和方法:

### 1.1 实验动物选择

小白鼠购自第四军医大学实验动物中心, 昆明系 30-35 日龄, 健康状况良好, 生殖系统发育成熟。

### 1.2 仪器、设备与试剂

电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), 相差显微镜及显微镜温控仪 (南京凯尔医疗器械有限公司), 恒温水浴锅, CO<sub>2</sub>培养箱等。

DMEM, 谷氨酰胺 (GIBCO), 新生牛血清 (北京元亨圣马生物技术研究所), PBS, D-Hankes, Vc (天津市登峰化学试剂厂), 注射用青霉素钠 (哈药集团制药总厂), 注射用硫酸链霉素 (大连美罗大药厂), 瑞-姬染液, 三蒸水等。

<sup>1</sup>基金项目: 西北农林科技大学青年专项基金: 小鼠生精细胞体外成熟培养 (05ZR104)。

### 1.3 PBS 液与培养液

PBS液由KCl 0.2043g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2019g, NaCl 8.0g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.8620g配成, 用三蒸水定容至 1000ml; 生精细胞培养液由谷胺酰胺 36mg, Vc0.1g, 青霉素 100 单位/ml, 链霉素 100IU/ml, 新生牛血清 10ml配成, DMEM定容至 100ml。

### 1.4 染色液

姬姆萨原液配制: 取姬姆萨染料 1g, 甘油 66ml, 甲醇 66ml, 先将姬姆萨染料置于研钵中, 加入少量甘油后仔细研磨 30min, 再将全部甘油 (60℃) 倒入混匀, 置 60℃恒温中继续溶解 2h, 然后加入 60℃的甲醇, 混匀后密封保存于棕色瓶中, 两周后使用。

磷酸盐缓冲液配制: 取 $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.25g及 $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.55g置于 100ml容量瓶中, 加入 30 ml蒸馏水, 摇匀, 三蒸水定容至 100ml (现用现配)。

瑞一姬染液: 按姬姆萨染液 30%, 瑞士染液 70%混合而成。

### 1.5 生精细胞、精子和细精管的形态学观察

颈椎脱臼处死小白鼠, 取出睾丸、附睾, 放入培养皿, 剪开附睾, 用含有一定 PBS 液的注射器冲洗附睾, 得到含有一定浓度精子和生精细胞的悬液, 用滴管吸取 1~2 滴悬液滴到载玻片上, 分别用姬姆萨原液和瑞一姬染液进行染色, 自来水冲洗, 晾干, 镜检; 将取出的睾丸放入盛有 PBS 液的培养皿, 取下睾丸外膜, 剪开睾丸, 用针分离细精管, 挑出一个细精管, 拉伸平放在载玻片上, 分别用姬姆萨原液和瑞一姬液染液染色, 制片, 自来水冲洗, 晾干, 镜检。

### 1.6 睾丸细精管组织培养

用颈椎致死小白鼠, 放到 75%酒精中浸泡 5min, 解剖取出睾丸, 放入PBS液中取下睾丸外膜, 剪碎至 1-4mm放入培养皿中加入培养液, 放入 $\text{CO}_2$ 培养箱中, 在 34℃, 5% $\text{CO}_2$ 下培养, 两天后, 用滴管在细精管组织附近取出一滴培养液, 滴到载玻片上, 分别用姬姆萨原液和瑞一姬染色, 镜检。

## 2 结果与分析

### 2.1 精液中生精细胞和精子形态学观察

用吸管吸取精液悬液后滴在载玻片上, 按推片法将精液推成薄片, 晾干, 分别用姬姆萨原液和瑞一姬染液染色, 自来水冲洗, 晾干, 镜检, 结果如图 1, 2 所示:

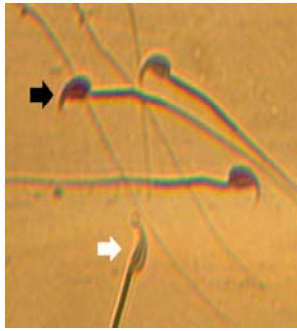


图 1: 姬姆萨原液染色后的精子, 黑箭头

子,

所指染色深, 白箭头所指染色浅 (400×)

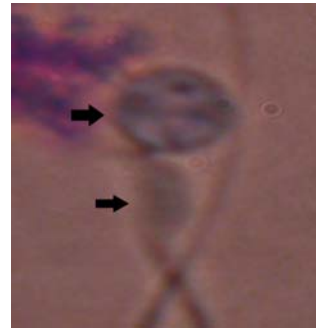


图 2: 瑞一姬染液染色后的生精细胞和精

子上为生精细胞, 下为精子 (400×)

如图 1 所示, 用姬姆萨原液染色, 黑箭头所指精子着色程度深, 呈紫红色, 胞质背景呈浅紫红色, 精子形态完整清晰, 细胞膜边缘清晰, 顶体和头部界限不明显, 顶体染色较浅, 中间有一条染色较深的线状物, 基部染色较深, 在有线粒体环绕的尾部染色也成紫红色, 白箭头所示染色浅, 是未成熟精子。图 2 所示上为生精细胞, 可以看到生精细胞清晰的细胞核呈颗粒状, 胞质成灰色, 细胞膜边缘清晰, 细胞形态完整, 呈圆形, 明显比精子大。下为精子, 精子结构完整, 细胞膜边缘不清晰, 胞质背景成灰色, 中部有一染色深区域, 尾部富含线粒体部位染色较深。

### 2.2 睾丸组织中细精管与生精细胞观察。

将培养后的细精管拉长并平放在载玻片上, 分别用姬姆萨原液和瑞一姬染液染色, 观察细精管中生精细胞的发育, 结果如图 3——8 所示。

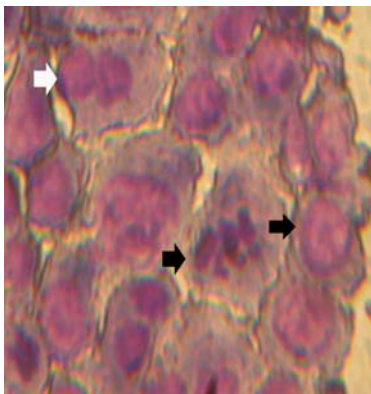


图 3: 姬姆萨原液染色后细精管组织中的生精细胞 (400×)

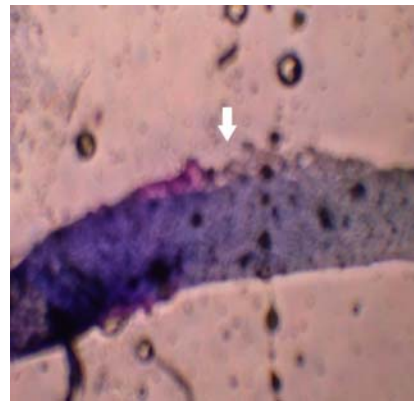


图 4: 姬姆萨原液染色后的细精管 (100×)

图 3 中白箭头所示细胞形态完整清晰, 胞核大而圆, 处于分裂期, 细胞膜清晰。左黑箭头所示为管中的生精细胞, 形态完整, 细胞膜边缘清晰, 细胞呈圆形, 细胞核呈明显的细小颗粒状, 呈浅紫红色。右边黑箭头所指细胞形态完整清晰, 细胞膜边缘清楚, 胞质背景清亮, 胞质较少, 细胞呈圆形, 细胞核大而圆, 染色深。图 4 中白色箭头所示细精管, 左边成深蓝

紫色，中间呈紫红色，右边呈灰色浅蓝色。

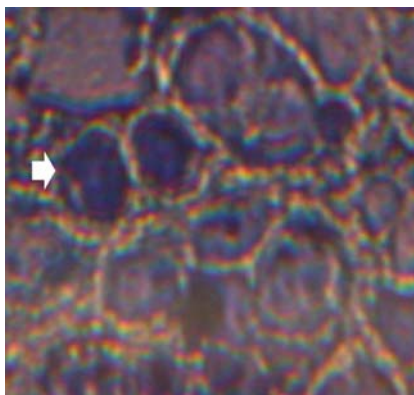
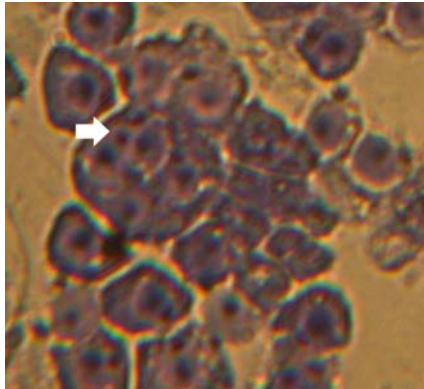


图 5：瑞-姬染色细精管组织中颗粒状生精细胞（400×） 图（6）瑞-姬染色细精管组织圆形生精细胞（400×）

图 5 中箭头所示为颗粒状生精细胞，细胞膜边缘清楚，胞质背景清晰，呈灰色，细胞核呈细小颗粒状，白箭头所指正方向呈深蓝紫色小颗粒状为核仁。图 6 中箭头所指细胞为圆形生精细胞，形态完整清晰，胞质少，背景清晰，细胞核大而圆，呈深蓝色。

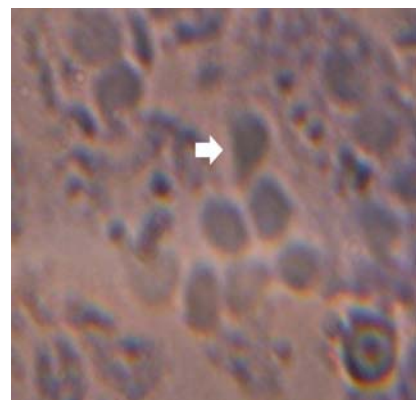
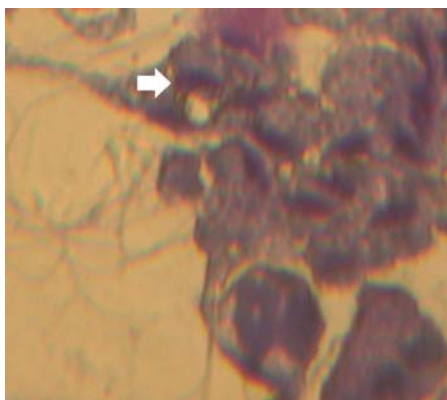


图 7：姬姆萨原液染色后变形期精子细胞（400×） 图 8：瑞-姬染色后变形期精子细胞（400×）

图7中箭头所指细胞,胞质灰色,细胞核染色深,已经延长,核质分明,细胞膜边缘清楚,从图中可以看出头尾在逐渐分离,推断这是处于变形期的精子细胞。图8中箭头所指细胞,其形态最小,整体染色较浅,细胞形态完整清晰,细胞膜边缘清晰,也能看到该细胞正在延长,处于变形期。

### 3 讨论

#### 3.1 精液中生精细胞及精子形态学观察

试验表明:用姬姆萨原液染色精子的特征是形态清楚,细胞膜边缘清晰,顶体和头部界限不明显,顶体染色较浅,中间有一条染色较深的线状物,基部染色较深,在有线粒体环绕的尾部染色较深。据吕柏尧(1994, 1995)<sup>[7, 9, 10]</sup>报道,用煌绿-瑞-姬混合染料2-3滴,对精子和生精细胞进行染色,精子和生精细胞形态完整、清晰;生精细胞胞浆依成熟度呈绿蓝色至青色,着色程度由深至浅,与本试验结果相同(图1中白箭头)。用瑞-姬染液对生精细胞染色,细胞核呈颗粒状,胞质成灰色,细胞膜边缘清晰,细胞形态完整,呈圆形,明显比精子大。精子形态完整,细胞膜边缘不清晰,胞质背景成灰色,中部有一染色稍深区域,尾部富含线粒体部位染色较深,但是比姬姆萨原液稍模糊,与王咏梅等(1999),薛庆善(1995),张卓然(2001)等<sup>[8, 11, 12]</sup>用瑞-姬染色的报道基本相同。本试验用姬姆萨原液也看到精子及生精细胞有不同染色,表明姬姆萨原液与煌绿-瑞-姬染液有相同的结果,在染色的清晰程度上与煌绿-瑞-姬混合染料相同而与瑞-姬染液相比则更加清晰。因此,本试验认为,姬姆萨原液可以用于精子和生精细胞的染色且能取得理想结果。

#### 3.2 睾丸组织中细精管及生精细胞观察

对睾丸组织中细精管经培养后用姬姆萨原液及瑞-姬染色法观察生精细胞形态,结果表明生精细胞形态完整,清晰,细胞膜边缘清晰,圆形,胞质清亮,细胞核呈明显的细小颗粒状,染色深。据报道精原细胞胞体小,呈圆形或椭圆形,胞核大而圆,染色深,胞质清亮<sup>[13]</sup>,与图3右黑箭头和图5所指类似。初级精母细胞,大而圆,胞核大而圆,多处于分裂时期,有明显的分裂相,与图3白箭头和图6所指类似。Larry Johnson等<sup>[14]</sup>报道人类睾丸用含2%戊二醛0.1mol/L甲次砷酸盐缓冲液灌注入动脉血管,然后植入环氧树脂,切成20 $\mu$ m片段,认为A型精原细胞细胞核大小均一,染色质呈细小颗粒和一个或多个核仁,B型精原细胞比A型精原细胞小,核仁远离细胞核核膜,细胞核不清晰。

图4所示细精管,左边成深蓝紫色,中间呈紫红色,右边呈灰色浅蓝色。由于在精子发生周期中,曲细精管不同节段,不同发育时期生精细胞的细胞组合和排列层次是不同的,不同时期的细胞组合,在同一部位循环出现,周而复始<sup>[15, 16]</sup>。据报道,煌绿-瑞-姬染液染色后生精细胞可根据生精细胞的成熟度染成不同的颜色<sup>[17]</sup>,由此可以推出细精管有不同染色,而这里用姬姆萨原液,是否验证了精子发生周期,有待进一步研究。



次级精母细胞存在时间很短, 就很快进行第二次分裂<sup>[18]</sup>, 因此比较难观察, 其形态特征: 细胞小, 呈圆形, 胞核大而圆, 染色浅, 不见核仁。细胞高低不等, 界限不清楚。胞核较大, 呈卵圆形或三角形, 着色浅, 有 1—2 个明显的核仁, 常有数个精子的头部嵌附于细胞的顶端, 细胞周围也有发育阶段的生精细胞附着。图 7、8 箭头所示明显小于生精细胞, 符合精子细胞形态特点, 且细胞有延长的趋势, 属于变形期的精细胞, 这与 Larry Johnson 等在人类研究上的描述类似<sup>[14]</sup>。

## 4 结论

4.1 用姬姆萨原液染色精子形态清晰, 细胞膜边缘清楚, 呈紫红色, 部分精子呈浅绿色, 未成熟精子的染色程度浅于成熟精子; 另外, 姬姆萨原液也可以替代煌绿—瑞—姬混合染料。

4.2 瑞—姬染色生精细胞形态完整清晰, 细胞核清晰, 着红色, 呈颗粒状, 核仁清晰, 着浅蓝色, 保质分明, 着浅灰色; 用姬姆萨原液染色, 生精细胞形态清晰, 细胞核呈颗粒状, 开始时呈现深紫红色, 胞质粉红色且有点蓝色背景, 整个组织颜色较深, 过一定时间后, 整个组织颜色变浅。

## 参考文献

- [1] 黄宇烽, 徐建平, 吕柏尧等. 精液中生精细胞 5 种染色方法的探讨与评价 [J]. 解剖学报, 1995, 26 (3): 329-332.
- [2] 朱培元, 黄宇烽, 沙家豪. 哺乳动物睾丸生精细胞的体外培养[J]. 医学研究生学报, 2001, 14(5): 449.
- [3] 周亚东, 林敏, 王燕熔等. 小鼠睾丸组织培养时间及温度对精子生成影响的观察 [J]. 南京医科大学学报, 1998, 18 (5): 407-409.
- [4] 黄厚今, 王瑞淑, 徐维光等. 用均匀设计方法优化 Sertoli-germ 细胞培养条件的研究[J]. 中国公共卫生学报. 1999, 18(2):72-74.
- [5] 王晟, 秦达念. 生精细胞培养的现状和展望 [J]. 汕头大学医学院学报, 2003, 16(1):42-44.
- [6] 内蒙古农业大学, 安徽农业大学. 家畜解剖学及组织胚胎学 (第二版) [M]. 中国农业出版社, 2000.
- [7] 吕柏尧. 介绍一种新的精子和生精细胞染色方法 [J]. 浙江医学, 1995, 17(3), 186-
- [8] 王咏梅, 黄宇烽. 顶体及生精细胞两种染色方法的比较与评价 [J]. 中国公共卫生学报. 1999, 18(2):56.
- [9] 吕柏尧, 黄宇烽. 精子形态和生精细胞五种染色方法探讨和评价 [J]. 临床检验杂志, 1994, 12 增刊, 222-224
- [10] 吕柏尧, 黄宇烽, 徐建平等. 精液中生精细胞 5 种染色方法的探讨与评价 [J]. 解剖学报, 1995, 26(3):329-332
- [11] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京. 科学出版社. 2001
- [12] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海. 上海科学技术出版社. 2004
- [13] 杨延飞, 张涌. 山羊精原干细胞体外培养分化[J]. 细胞生物学杂志. 2005, (27): 221-224
- [14] Larry Johnson, Christophe Staub, William B. Neaves et al Human Reproduction [J]. 2001, Vol.16, No.8pp.1575-1582.
- [15]. Clifton RJ, O'Donnell L, Robertson DM. Pachytene spermatocytes in co-culture inhibit rat Sertoli cell synthesis of inhibin beta B-subunit and inhibin B but not the inhibin alpha-subunit [J]. J Endocrinol, 2002, 172(3):565-574

- [16] Cremades N, Bemabeu R, Barros A, et al., in vitro maturation of round spermatids using coculture on vero cells. Hum Reprod, 2004, 14; 1287-1293.
- [17] Meng X, Lindahl M, Hyvnen ME, et al., Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by NF [J]. Science, 2002, 287(5457); 1489-1493.
- [18] Clifton RJ, O'Donnell L, Robertson DM. Pachytene spermatocytes in co-culture inhibit rat Sertoli cell synthesis of inhibin beta B-subunit and inhibin B but not the inhibin  $\alpha$ -subunit [J]. Endocrinol, 2002, 172 (3) : 565-574

## Study of the Mouse Spermatogenic Morphology on *in vitro* Culture

Zhong-liang Jiang, Qing-wang Li, Wen-ye Li; Ming-tao Zhang, Chun-xiao Shuai,  
Lei Cheng

(College of Animal Science-Technology, North-West A&F University, Yang ling, Shan  
Xi, 712100)

### Abstract

Spermatozoa and spermatogenic cell in the semen and testicle cultured were identified by dyeing with original liquid of Giemsa and Wright- Giemsa liquid. The results were shown: the morphologic of spermatozoa was clear, clarity and mauve by original liquid of Giemsa; the stained extent of spermatozoa was deeper than immaturity and original liquid of Giemsa could substitute other blend dyestuff. After cultured, the morphologic of spermatogenic cell in testicle was clear and the nucleolus was stained granule by original liquid of Giemsa; it was deep mauve, the cytoplasm was pink with blue background at first, after a while, the color was fleet. The morphologic of spermatogenic cell was integrity and clarity by Wright- Giemsa liquid and shown different color in karyon, nucleolus and cytoplasm.

**Keywords:** *Spermatogenic cell; In vitro culture; Morphologic; Seminiferous tubules*

### 作者简介:

江中良, 男, 贵州遵义人, 1973 年生, 在读博士, 讲师, 主要从事动物繁殖与生物技术方面的教学与科研工作。

李青旺, 男, 陕西米脂人, 1956 年生, 教授, 博导, 主要从事动物繁殖与生物技术方面的教学与科研工作。