

雄性裸鼹鼠可育个体与不可育个体生殖系统 结构与功能差异初探

余琛琳, 林丽芳, 袁子彦, 赵善民, 汤球, 孙伟, 蔡丽萍, 徐晨, 崔淑芳*

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

【摘要】 目的 观察和分析雄性裸鼹鼠中可育个体和不可育个体生殖系统结构和功能的差异, 初步探索雄性不可育个体不能繁育后代的原因。**方法** 雄性裸鼹鼠可育个体和不可育个体各 5 只, 先采集一侧睾丸和附睾组织, 称重后换算脏器系数; 再采集另一侧睾丸组织, 用中性甲醛溶液进行固定后制备组织切片; 取另一侧附睾用作精子计数、精子活动度的测定; 采集血清测定血清中黄体生成素 (LH) 和睾酮 (T) 浓度。**结果** 与可育个体组相比较, 不可育个体组的睾丸重量下降 ($P < 0.05$), 附睾重量显著下降 ($P < 0.01$), 且睾丸系数和附睾系数均显著下降 ($P < 0.01$); 精子数量显著减少 ($P < 0.01$), 精子活动度也显著减弱 ($P < 0.01$); 血清黄体生成素和睾酮水平均显著降低 ($P < 0.01$); 睾丸组织切片观察显示, 不可育个体各级生精细胞严重脱落, 排列混乱无序, 支持细胞和间质细胞均有减少。**结论** 雄性裸鼹鼠不可育个体生殖系统存在睾丸和附睾萎缩、生精功能下降和性激素分泌减少等现象。

【关键词】 裸鼹鼠; 可育个体; 不可育个体; 雄性生殖系统; 精子发生; 黄体生成素; 睾酮

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0248-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.006

Structural and functional differences of the reproductive system in fertile and infertile male naked mole rats

YU Chen-lin, LIN Li-fang, YUAN Zi-yan, ZHAO Shan-min, TANG Qiu, SUN Wei,
CAI Li-ping, XU Chen, CUI Shu-fang*

(Laboratory Animal Center, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to observe and analyze the differences of reproductive system in fertile and infertile male naked mole rats. **Methods** Five fertile and 5 infertile 2-5-year old male naked mole rats were used in this study. The testis and epididymis on one side were collected, weighted, and measured to get their viscera coefficient. The other side testicle was collected and fixed in neutral formalin solution for histological examination. The other side epididymis was used to examine the sperm count and sperm activity. Serum of the naked mole rats was collected to measure the level of luteinizing hormone (LH) and testosterone (T). **Results** Compared with the fertile group, the testis weight of infertile group was significantly decreased ($P < 0.05$), their epididymis weight, testicular coefficient and the epididymis coefficient were all significantly decreased ($P < 0.01$), all their sperm count and sperm activity and their LH and T levels were significantly decreased ($P < 0.01$ for all). Pathological examination of the testicular tissues of the fertile group showed that many types of spermatogenic cells were seriously detached, the numbers of Sertoli cells and stromal cells were decreased. Mature sperms in the seminiferous tubules were highly decreased in number or even completely disappeared.

【基金项目】 国家科技支撑计划 (No. 2015BAI09B02); 2014 年度军队实验动物专项科研课题 [No. SYDW(2014)005 号]、No. SYDW(2014)007 号] 联合资助。

【作者简介】 余琛琳, 女 (1981 -), 硕士, 讲师。

【通讯作者】 崔淑芳, 教授, Email: youngstar_sf@163.com

Conclusions Compared with the fertile individuals, the reproductive system of infertile male naked mole rats presents structural atrophy and declined function.

[Key words] Naked mole rat; Fertile individuals; Infertile individuals; Reproductive system; Spermatogenesis; Luteinizing hormone; Testosterone

Corresponding author: CUI Shu-fang, Email: youngstar_sf@163.com

裸鼹鼠 (*Heterocephalus glaber*, naked mole rat, NMR) 是一种近年来备受世界各国科研工作者关注的新型实验用动物^[1], 在动物学分类位置上属于哺乳纲、啮齿目、豪猪亚目、滨鼠科、裸鼹鼠属、裸鼹鼠种, 其产于非洲肯尼亚、索马里、埃塞俄比亚等地, 终生生活在地下 2 m 的洞穴中, 以刨取泥土中的植物根茎为食^[2,3]。成年动物体重约为 30 ~ 50 g, 体型较小, 外观全身几乎无毛; 门齿暴露于口腔之外, 用于刨掘泥土和啃食食物; 由于地洞中常年昏暗无光, 其眼睛高度退化, 视力几乎丧失, 体表有 40 多根触毛分布于身体两侧与嘴巴附近, 以感受周围环境。

裸鼹鼠虽为哺乳动物, 其种群却像蚂蚁和蜜蜂等昆虫一样行真社会性生活方式, 野生状态下一个洞穴中常有 300 多只裸鼹鼠共同生活, 其中只有 1 只称为鼠王的雌鼠和 1 ~ 3 只雄鼠能够繁殖后代, 其余皆为工鼠, 工鼠失去生殖能力^[4,5]。在实验室饲养条件下, 当数个裸鼹鼠个体一起繁殖饲养时, 繁育情况也是如此。因此, 本研究拟对雄性裸鼹鼠可育个体和不可育个体的生殖系统的形态结构、精子发生、数目及活力、相关性激素等进行比较研究, 以期初步探索裸鼹鼠雄性不育个体生殖系统方面的缺陷, 为后期繁育提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择本中心饲养的已交配并成功繁育后代的雄性裸鼹鼠 5 只、已交配过但未成功繁育后代的雄性裸鼹鼠 5 只, 年龄范围为 2 ~ 5 年, 各项生理指标均健康正常; 可育个体分别编号为 1 ~ 5 号, 不可育个体分别编号为 6 ~ 10 号。

1.2 裸鼹鼠睾丸和附睾脏器系数的测定

动物称量体重后, 腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠 (注射剂量为 10 mL/kg 体重) 进行麻醉。待动物麻醉完全后 (立即眼眶采血用于性激素的测定), 将其仰卧固定于解剖板上, 首先用 75% 酒精棉球擦拭腹部开口部位进行皮肤消毒, 继而剪开腹壁, 暴露生殖系统。无菌术分离一侧睾丸和附睾立即置于生理盐

水中, 用眼科剪剔除睾丸和附睾周围的结缔组织及脂肪组织^[6,7], 并用生理盐水冲洗干净, 滤纸吸干水分后称量脏器重量, 再根据以下公式计算睾丸及附睾脏器系数:

睾丸脏器系数 (%) = [睾丸重量 (g) / NMR 体重 (g)] × 100%

附睾脏器系数 (%) = [附睾重量 (g) / NMR 体重 (g)] × 100%

1.3 睾丸组织形态学观察

采集裸鼹鼠一侧新鲜睾丸组织, 用生理盐水洗净残余血迹, 并用眼科剪剔除睾丸周围的结缔组织及脂肪组织后, 即刻放入预先备好的 10% 中性福尔马林溶液中进行组织固定。组织固定 24 h 后, 依次浸入 95% 乙醇、无水乙醇溶液进行脱水, 继而依次浸入二甲苯: 无水乙醇 (V: V = 1: 1) 和纯二甲苯溶液中进行透明, 最后将组织进行石蜡包埋, 用于切片、HE 染色后, 显微镜下观察睾丸的组织结构形态。

1.4 精子计数、精子活动度的测定

1.4.1 精子计数

将采集的裸鼹鼠一侧附睾组织置于 1 mL 生理盐水中, 用眼科剪将附睾纵向剪 1 ~ 2 刀, 用吸管轻柔吹打数次, 静止 3 ~ 5 min, 形成精子悬液。然后将精子悬液放入三气培养箱中, 35℃ 恒温孵育 25 ~ 30 min, 让精子能够从附睾组织中充分游离出来。吸取精子悬液 1 滴到血细胞计数板上, 盖上盖玻片, 静置约 2 min 后进行精子计数, 计数 5 个中方格内精子数, 计算精子悬液中精子的数量^[8]。

1.4.2 精子活动度测定

取一滴裸鼹鼠精子悬液置于清洁载玻片上, 静置约 2 min, 按文献方法^[9], 在镜下连续计数 200 个精子中向前活动的精子数, 并进行分级: A 级呈快速、直线向前运动, 表明精子活动很好; B 级呈慢速或迟钝的向前直线运动, 表明精子活动较好; C 级呈向前曲线运动, 表明精子活动力一般; D 级呈不活动或只在原地蠕动, 表明精子活动能力差。按照公式 [精子活动度 (%) = (A + B + C) / (A + B + C + D) × 100%] 推算单侧附睾精子悬液中的精子活动度。

1.5 相关性激素的测定

所有裸鼹鼠麻醉完全后,在采集睾丸和附睾组织前,进行眼眶采血,全血于室温放置 2 h 后于 2 ~ 8℃、1000 r/min 离心 15 min,取上清用放射免疫法进行血清黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和睾酮(testosterone, T)浓度的测定^[10,11]。

1.6 统计学处理

采集的实验数据,均利用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理。所得数据均以(均数 ± 标准差)表示,组间比较采用 *t* 检验,当 *P* < 0.05 时,组间差异

表 1 可育个体与不可育个体的睾丸重量、附睾重量、体重以及睾丸和附睾系数的比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.1 Comparison of the weight of testis, epididymis and body, testicular coefficient, and epididymis coefficient between fertile and infertile naked mole rats					
雄性裸鼹鼠 Male naked mole rats	睾丸重量/g Weight of testis	附睾重量/g Weight of epididymis	体重/g Body weight	睾丸系数/% Testicular coefficient	附睾系数/% Epididymis coefficient
可育个体 Fertile individuals	0.0362 ± 0.0065	0.0018 ± 0.0003	38.6661 ± 3.5168	0.0934 ± 0.0110	0.0046 ± 0.0005
不可育个体 Infertile individuals	0.0265 ± 0.0036 *	0.0011 ± 0.0001 **	35.7804 ± 3.5601	0.0741 ± 0.0079 **	0.0030 ± 0.0003 **

注: * 与可育个体组比较, *P* < 0.05; ** 与可育个体组比较, *P* < 0.01。
Note. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, compared with the fertile group.

2.2 睾丸组织形态学观察

经镜下观察发现,裸鼹鼠可育个体睾丸的被膜光滑完整,曲细精管横切面可观察到各种不同发育阶段的生精细胞,如精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞,而且中间腔隙中有较多成熟精子;生精小管壁上还附着一种不规则的长椎体形细胞,顶部伸向腔面,即为支持细胞;曲细精管外有成群间质细胞,体积较大,呈圆形或椭圆形,核圆形,细胞质嗜酸性(如图 1A 所示)。而不可育个体睾丸的被膜有断裂现象,曲细精管横切面可见其明显萎缩,细胞间出现大量空泡,生精细胞严重脱落,管腔内成

为有统计学意义。

2 结果

2.1 雄性可育个体与不可育个体睾丸和附睾脏器系数比

经比较分析发现,不可育个体的睾丸重量低于可育个体(*P* < 0.05),附睾重量显著低于可育个体,且睾丸系数百分比和附睾系数百分比均显著低于可育个体(*P* < 0.01)(如表 1 所示)。

熟精子明显变少;支持细胞也有脱落现象,只有基膜裸露;曲细精管外间质疏松,间质细胞数量减少(如图 1B 所示)。

2.3 精子计数、精子活动度的测定

经比较分析发现,不可育个体附睾的精子数量显著低于可育个体(*P* < 0.01),同时精子活动度也显著低于可育个体(*P* < 0.01)(如表 2 所示)。

2.4 相关性激素浓度测定

经比较分析发现,不可育个体的血清黄体生成素浓度显著低于可育个体(*P* < 0.01),同时睾酮浓度也显著低于可育个体(*P* < 0.01)(如表 3 所示)。

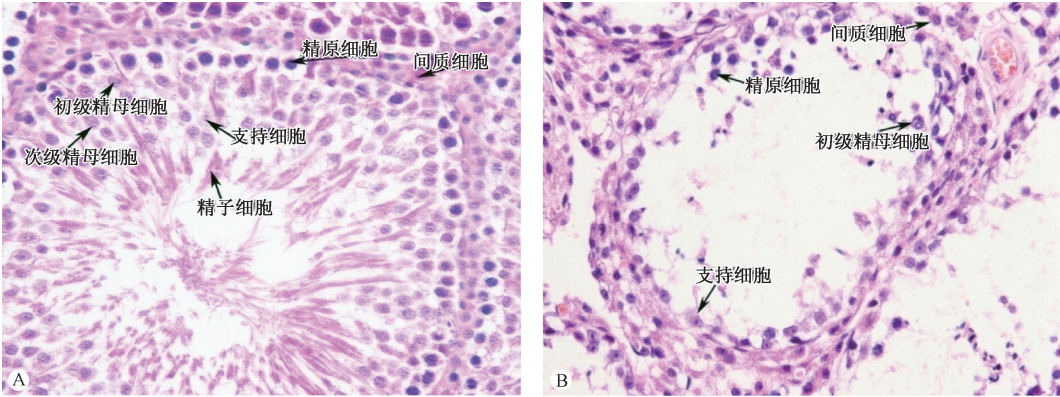


图 1 可育个体 (A) 和不可育个体 (B) 的睾丸曲细精管横切面组织形态(×200)
Fig.1 Histology of the seminiferous tubules of fertile (A) and infertile (B) individuals(×200)

表 2 可育个体与不可育个体的精子计数和精子活动度的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Comparison of the sperm count and sperm activity between fertile and infertile individuals

雄性裸鼯鼠 Male naked mole rats	精子计数 $\times 10^6/\text{mL}$ Sperm count	精子活动度/% Sperm activity
可育个体 Fertile individuals	8.26 $\pm$ 0.137	50.92 $\pm$ 11.79
不可育个体 Infertility individuals	1.80 $\pm$ 0.43 **	10.42 $\pm$ 14.91 **

注: * 与可育个体组比较, $P<0.05$; ** 与可育个体组比较, $P<0.01$ 。
Note. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with the fertile group.

表 3 可育个体与不可育个体的血清黄体生成素和睾酮浓度的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.3 Comparison of serum LH and T levels between the fertile and infertile individuals

雄性裸鼯鼠 Male naked mole rat	黄体生成素 LH mIU/mL	睾酮 T ng/mL
可育个体 Fertile individuals	19.78 $\pm$ 3.32	26.04 $\pm$ 5.50
不可育个体 Infertile individuals	4.56 $\pm$ 0.55 **	5.84 $\pm$ 2.94 **

注: * 与可育个体组比较, $P<0.05$; ** 与可育个体组比较, $P<0.01$ 。
Note. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with the fertile group.

3 讨论

哺乳动物的雄性生殖系统包括睾丸、附睾、输精管以及发达的辅助性腺,其中,睾丸是雄性生殖系统最重要的器官,主要发挥合成与分泌雄性激素、产生精子的功能,在动物的性别分化、个体发育、维持繁育功能等方面均具有极为重要的作用。附睾也是雄性生殖系统中重要的器官,对于精子的成熟、贮存和保护起决定作用^[12]。

中心课题组在前期研究与观察过程中,发现裸鼯鼠雄性生殖系统和其他哺乳动物略有差异:首先其生殖系统包括睾丸组织,全部器官均位于腹腔内,没有像其他雄性动物那样有明显的阴囊存在;其次,其附睾体积非常小,仅仅为一小段细管状结构蜿蜒折叠,附着于睾丸尾部;再者,裸鼯鼠生殖系统未发现精囊腺、前列腺和尿道球腺等辅助性腺。

一般认为脏器系数下降意味着该器官出现了萎缩或退化性变化^[13]。睾丸和附睾是精子生成和成熟的场所,睾丸和附睾组织的重量和脏器系数的变化,一定程度上可以反映其受损或者退化情况。本研究发现,与裸鼯鼠雄性可育个体相比,不可育个体不论是睾丸重量($P<0.05$)、附睾重量($P<0.01$),

还是睾丸脏器系数($P<0.01$)、附睾脏器系数($P<0.01$),均有显著下降,从脏器实质性角度说明,不可育个体的生殖器官确实存在萎缩或退化的现象。

经组织形态学观察发现,不可育个体的生精单位—睾丸曲细精管出现明显的病理变化。首先,不可育个体的各级生精细胞不再有序排列,而是出现大量脱落、萎缩现象,腔隙中成熟精子的数量明显减少。其次,曲细精管基膜上的支持细胞也有脱落和减少现象。而正常的睾丸组织中,支持细胞底部会相互紧贴,参与形成血睾屏障^[14];同时还有分泌运送精子的液体、雄性激素结合蛋白、抑制素、性激素、少量雌性激素,以及营养和支持各级生精细胞的功能^[15],因此一旦支持细胞减少,将会严重影响睾丸的生精作用。第三,曲细精管外的间质细胞数目也有减少,而间质细胞可分泌睾酮,促进精子发生和雄性生殖器官发育^[16],因此,间质细胞数量减少也会影响雄性动物个体的生殖功能。

精液质量分析是评价雄性动物生殖能力常用的方法之一,可以通过精子计数、观测精子活动力等,检测和分析精子的数量和质量,并由此推测雄性动物个体的生育能力。足够数量的精子数是维持雄性动物生育能力的重要前提,在评价雄性机体生殖能力方面,精子计数的差异比其他指标更为敏感,因此是评价雄性生殖能力的重要指标。本研究发现,裸鼯鼠不可育个体精子数目相较于可育个体减少了约 4 倍($P<0.01$),表明不可育个体精子发生过程可能受到了严重的抑制或者损伤。雄性动物的生育能力与其受精能力密切相关,而精子具备很好的活动力,是完成受精过程的基础,因而精子活动度是进行雄性机体育育能力的重要评价指标,同时也是检测精子运动能力以及评价成熟精子功能的重要指标之一^[17]。本研究中发现,裸鼯鼠不可育个体精子活动速度明显低于可育个体($P<0.01$)。由此可见,雄性裸鼯鼠不可育个体,不仅产生的精子数目明显不足,而且活力也不足以完成受精过程。

睾丸的生精过程和各种激素水平的稳定主要通过下丘脑—腺垂体—睾丸轴进行调节^[18]。首先,由下丘脑分泌的促性腺激素释放激素,经由垂体门脉系统直达腺垂体;再作用于腺垂体并促进其合成和分泌卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(LH)。其中,LH 主要作用于间质细胞,可以刺激间质细胞的发育并促进其分泌睾酮(T),因而对雄性生殖系统的发育和维持具有重要

意义。睾酮是睾丸分泌的主要雄性激素之一,也是雄性动物最重要的雄性激素,对维持雄性附属性腺及性器官的成熟具有重要作用。因此,LH 和 T 都是从激素水平评价雄性动物生殖能力的可靠指标。本研究中裸鼯鼠雄性不可育个体 LH 和 T 均显著低于可育个体($P < 0.01$),说明雄性裸鼯鼠不可育个体在生殖系统发育和雄性激素合成与分泌等方面也存在缺陷。

综上所述,本研究从裸鼯鼠雄性生殖系统的脏器系数、组织形态学、精子数量和活动度,以及相关激素水平等几个方面证实,裸鼯鼠不可育个体雄性生殖系统存在组织结构萎缩、功能衰退等现象。与此同时,关于裸鼯鼠雄性个体可育或不可育的相关机制值得深入探讨,本中心也正在相关研究。

参 考 文 献

- [1] 赵善民,崔淑芳. 裸鼯鼠生物学特性的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33 (5): 400 - 405.
- [2] Jarvis JU. Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies [J]. Science, 1981, 212 (4494): 571 - 573.
- [3] Sherman PW, Jennifer J, Richard A. The Biology of the Naked Mole-rat [M]. Princeton University Press, 1992: 433 - 434.
- [4] Faulkes CG, Abbott DH, Jarvis JU. Social suppression of reproduction in male naked mole-rats, *Heterocephalus glaber* [J]. J Reprod Fertil, 1991, 91(2): 593 - 604.
- [5] Faulkes CG, Abbott DH. Social control of reproduction in breeding and non-breeding male naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) [J]. J Reprod Fertil, 1991, 93(2): 427 - 435.
- [6] 徐艺玫,廖力夫,王莹,等. 补光对越冬灰仓鼠体重、主要器官指数及精子数量的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 53 - 57.
- [7] 文端成,戴丽军,彭杰,等. 长爪沙鼠精子的显微结构观察 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(1): 57 - 60.
- [8] 李文娟,王晋. 间歇低氧对小鼠精子生成数量及活力的影响 [J]. 中国继续医学教育, 2015, 18: 82 - 83.
- [9] 李海山,马明月,张玉敏,等. 丙烯腈对小鼠精子生产的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12(6): 333 - 334.
- [10] Faulkes CG, Abbott DH. Evidence that primer pheromones do not cause social suppression of reproduction in male and female naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) [J]. J Reprod Fertil, 1993, 99(1): 225 - 230.
- [11] Faulkes CG, Abbott DH, Jarvis JU. Social suppression of ovarian cyclicity in captive and wild colonies of naked mole-rats, *Heterocephalus glaber* [J]. J Reprod Fert, 1990, 88(2): 559 - 568.
- [12] 谢淑武,马丽,刘向云,等. 度他雄胺对大鼠附睾精子成熟和生育的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 309 - 314.
- [13] 马秀兰,宋淑云,叶建新,等. 对成年大鼠脏器系数的探讨 [J]. 动物学杂志, 1996, 31(3): 25 - 26.
- [14] Lee NP, Cheng CY. Adaptors, junction dynamics, and spermatogenesis [J]. Biol Reprod, 2004, 71(2): 392 - 404.
- [15] Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 186(2): 155 - 157.
- [16] Alexandrova ML, Bochev PG. Reduced extracellular phagocyte oxidative activity, antioxidant level changes and increased oxidative damage in healthy human blood as a function of age [J]. Age (Dordr), 2009, 31(2): 99 - 107.
- [17] Jeong SH, Kim B Y, Kang HG, et al. Effects of butyrate hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats [J]. Toxicology, 2005, 208(1): 49 - 62.
- [18] 姚慧娟,徐嘉兴,马尚清,等. 雌、雄大鼠去势对 HPA 轴分泌功能影响的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 97 - 100.

[收稿日期] 2015-11-15