



# 性成熟前食蟹猴生精细胞的发育进程

李学家, 张秀娟, 陈子亮, 季芳, 彭白露, 刘晓明

(广东省昆虫研究所华南灵长类研究开发中心, 广州 510555)

**【摘要】** 目的 阐明性成熟前食蟹猴生精细胞的发育进程。方法 分别采集性成熟前不同年龄(0岁、0.5岁、1岁、1.5岁、2岁、2.5岁、3岁、3.5岁、4岁)食蟹猴辜丸,制作石蜡切片,进行HE染色和PAS/H染色。根据生精细胞的染色特性,分析性成熟前食蟹猴生精细胞的发育进程,并对食蟹猴精原干细胞进行初步鉴定。结果 HE染色结果显示,1岁及以下食蟹猴生精上皮上生精细胞仅有精原干细胞(包括Ad、At及Ap型精原细胞),1.5岁食蟹猴生精上皮上开始出现B型精原细胞,3岁食蟹猴生精上皮上出现精母细胞,4岁食蟹猴生精上皮上出现从精原干细胞到精子的所有生殖细胞。PAS/H染色结果显示,1~2.5岁食蟹猴Ad型精原细胞胞质呈PAS阳性,At型精原细胞胞质呈PAS弱阳性,Ap型精原细胞胞质呈PAS阴性;其他生精细胞及支持细胞胞质呈阴性;0.5岁及以下,3岁及以上食蟹猴生精细胞的胞质PAS/H染色特性与前者存在差异。结论 本文详细阐述了性成熟前食蟹猴生精细胞随年龄增长的渐次性发育模式,并建立了性成熟前食蟹猴精原干细胞原位鉴定的一种新方法,这些研究结果为食蟹猴精原干细胞的其他相关研究奠定了基础。

**【关键词】** 食蟹猴; 生精细胞; 发育进程

**【中图分类号】**S185 R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2011)03-0031-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.008

## The Developmental Process of Spermatogenic Cells in Immature Cynomolgus Monkeys

LI Xue-jia, ZHANG Xiu-juan, CHEN Zi-liang, JI Fang, PENG Bai-lu, LIU Xiao-ming

(South-China Primate Research & Development Center, Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510555, China)

**【Abstract】 Objective** To elucidate the developmental process of spermatogenic cells in immature Cynomolgus monkey. **Method** Testis of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 years old Cynomolgus monkeys were collected, paraffin sections were made, stained with HE and PAS/H (pexiodic acid-schiff/hematoxylin, PAS/H). Based on the staining pattern, the developmental process of spermatogenic cells in immature Cynomolgus monkey was analysed and spermatogonial stem cells were primarily identified. **Result** HE Staining showed spermatogonial stem cells (including dark type A spermatogonia, transitional type A spermatogonia and pale type A spermatogonia) were the only spermatogenic cells in seminiferous epithelium of Cynomolgus monkey at 1 year old and below, Type B spermatogonia emerged at 1.5 years old, spermatocyte emerged at 3 years old, and all types of spermatogenic cells (from spermatogonial stem cells to sperm) were present at 4 years old Cynomolgus monkey. PAS/H staining showed cytoplasm of dark type A spermatogonia as positive, transitional type A spermatogonia as weakly positive, and pale type A spermatogonia as negative, while cytoplasm of sertoli cells and other spermatogenic cells as negative in Cynomolgus monkey between one year old and 2.5 years old. Cytoplasm of spermatogenic cells have a different PAS/H staining pattern in Cynomolgus monkey at 6 months old and below, 3 years old and above. **Conclusion** This article detailedly elucidated the progressive development model of spermatogenic cells with age and established a new method for *in situ* identification spermatogonial stem cells in immature Cynomolgus monkey.

**【基金项目】** 广东省科学院基金(styz2008)。

**【作者简介】** 李学家(1980-),男,助理研究员,研究方向:实验动物学。

**【通讯作者】** 刘晓明(1960-),男,副研究员。E-mail: xemoonliu@hotmail.com。

These results will lay the foundation of spermatogonial stem cells related research in Cynomolgus monkey.

**【Key words】** Cynomolgus monkey; Spermatogenic cells; Developmental process

青春期前男性睾丸内生精细胞的发育进程是研究男性精子发生机制的重要基础,也是精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)法治疗放疗性或化疗性不育的前提之一。目前,在啮齿类小型实验动物,关于其性成熟前不同日龄生精细胞的发育进程已经有详细的研究报道<sup>[1]</sup>,由于啮齿类动物从出生到性成熟的时间跨度较短,加之其在精原细胞组成、增殖及分化模型等诸多方面与人存在一定差异,因此,啮齿类动物不是研究青春期前男性生精细胞发育的理想动物模型,因此,寻找一种理想的实验动物模型来研究其性成熟前生精细胞发育进程,具有重要的理论意义和比较医学价值。食蟹猴作为一种重要的实验动物,与人的关系较为密切,其生精细胞组成、增殖及分化模式与人接近,是青春期前男性生精细胞发育进程研究的理想模型。目前,关于食蟹猴性成熟前不同时期生精细胞发育的研究报道较为零散,尚缺乏系统研究,原因可能是实验材料昂贵、材料的系统收集较困难等。本研究利用本中心丰富的实验动物资源,通过 2 年多时间对实验材料进行了系统的收集和整理,制作了性成熟前不同年龄食蟹猴睾丸组织切片,并通过不同的染色方法对各级生精细胞进行鉴定,进而系统阐述了性成熟前食蟹猴生精细胞的发育进程,本研究的完成不但为食蟹猴 SSCs 的分离、纯化、体外培养、转基因等后续相关研究奠定基础,同时为人类的相关研究提供了重要的比较医学参考资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料:食蟹猴睾丸:1) 疾病死亡猴(5 只,年龄分别为 1 岁、2 岁、2.5 岁、3.5 岁和 4 岁); 2) 意外死亡猴(2 只,年龄分别为 0 岁和 3 岁); 3) 健康猴(2 只,年龄分别为 0.5 岁和 1.5 岁)。三种猴采集睾丸时均须排除其患生殖系统疾病的可能性。处于节约实验成本和动物福利考虑,尽量采集前两种猴的睾丸。

1.1.2 主要药品及试剂:盐酸氯胺酮注射液购自山东方明药物股份有限公司;多聚甲醛购自天津市福晨化学试剂厂;改良苏木精染液、水溶性伊红染液、糖原染色试剂盒购自广州西比格贸易有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、无水乙醇、95% 乙醇、二甲苯

购自广州化学试剂厂。

### 1.2 方法

1.2.1 实验猴年龄的选择及选择依据:食蟹猴性成熟年龄一般为 3~4 岁,因此,选择以下 9 个年龄进行睾丸收集:0 岁、0.5 岁、1 岁、1.5 岁、2 岁、2.5 岁、3 岁、3.5 岁、4 岁。每个年龄的误差允许范围为  $\pm 1$  个月。

1.2.2 睾丸的采集及准备:疾病或意外死亡幼年食蟹猴睾丸可直接采集,用 4% 多聚甲醛溶液 4℃ 过夜固定后备用。幼年健康食蟹猴睾丸的采集方法为:1) 盐酸氯胺酮麻醉(10 mg/kg)动物;2) 确定睾丸位置,进行局部消毒处理;3) 在无菌条件下,剪开睾丸外侧皮肤,拉出睾丸,并尽量分离周围结缔组织;4) 摘除睾丸,并进行结扎止血,局部及全身应用抗生素;5) 睾丸称重,然后置于 4% 多聚甲醛溶液 4℃ 过夜固定后备用。

1.2.3 石蜡切片的制作:固定好的睾丸组织流水冲洗过夜,以完全除去固定剂,然后进行梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后进行切片,切片厚度为 3~5  $\mu\text{m}$ 。具体操作步骤参照相关文献<sup>[2]</sup>进行。

1.2.4 染色方法:本研究采用两种不同的染色方法,一种是 HE 染色,此染色的目的是观察食蟹猴睾丸中各种细胞的形态,具体操作步骤参照相关文献<sup>[2]</sup>进行。另一种为 PAS/H (periodic acid-schiff/hematoxylin, PAS/H) 染色,即过碘酸-雪夫染色(又称糖原染色),苏木精复染细胞核。这一染色的目的是检验食蟹猴精原细胞胞质的染色特征与人是否具有相似性,从而检验这一方法是否可以用于鉴定食蟹猴 SSCs。具体操作步骤按照 PAS/H 染色试剂盒说明书进行。

1.2.5 组织学观察及描述:对全部 9 个年龄段食蟹猴睾丸组织切片(包括 HE 染色切片和 PAS/H 染色切片)进行光镜观察,用尼康数码成像系统对切片进行拍照,详细分析性成熟前食蟹猴生精细胞的组织模式,并对各型精原细胞的形态学特征进行测量和系统描述。

1.2.6 生精细胞发育相关参数的测量方法:SSCs 细胞核直径的测量方法:光镜下分别选择 HE 染色切片中典型的 Ad 型、At 型及 Ap 型精原细胞各 30 个,分别进行细胞核直径的测量。曲细精管直径的测量方法及 SSCs 计数:光镜下每个年龄食蟹猴的

HE 染色切片中随机选取 10 个视野,对视野中的曲细精管横断面的直径进行测量并对横断面上的 SSCs 计数。

1.2.7 数据分析:所有数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $M \pm SD$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 性成熟前食蟹猴精原细胞的形态学特征

光镜下,性成熟前食蟹猴睾丸生精上皮 SSCs 主要分为三类:A 暗型精原细胞(Ad)、A 过渡型精原细胞(At)及 A 亮型精原细胞(Ap)。在 HE 染色石蜡切片中,通过细胞核形态、大小及苏木精染色特性可以将三类 SSCs 区分开来。1) Ad 型精原细胞:细胞核呈球形或卵圆形,直径为  $5.21 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ,细胞核着色深且均匀;2) At 型精原细胞:细胞核呈卵圆形,直径为  $5.96 \pm 0.21 \mu\text{m}$ ,细胞核着色程度中等且均匀。3) Ap 型精原细胞:细胞核呈卵圆形或椭圆形,直径为  $6.90 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ,细胞核在三类 SSCs 中着色最浅且均匀。在 1.5 岁及以上食蟹猴睾丸中还可观察到 B 型精原细胞,细胞核呈卵圆形,细胞直径约为  $7.32 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ,染色质呈粗大颗粒状或团块状,着色较深且在胞核中分布不均。

### 2.2 性成熟前食蟹猴睾丸石蜡切片 H. E 染色结果

新生食蟹猴睾丸曲细精管尚未形成管腔,管直径为  $41.74 \pm 4.07 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分较多,约占视野下总面积的 50%;管内生精细胞为 SSCs (Ad、At 及 Ap),数量较少,约 50% 靠近曲细精管基膜排布,另 50% 位于管中央,SSCs 数量为  $0.85 \pm 0.59$  个/曲细精管横断面。

0.5 岁食蟹猴睾丸曲细精管亦未见管腔形成,管直径为  $42.59 \pm 2.73 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分急剧减少,占视野下总面积的 10% 以下;管内生精细胞组成无变化,绝大多数 SSCs 靠近曲细精管基膜排布,少数位于管中央,SSCs 数量为  $0.90 \pm 0.85$  个/曲细精管横断面(彩插 4 图 A)。

1 岁食蟹猴睾丸曲细精管仅有极少数形成狭窄管腔,管直径为  $42.95 \pm 2.86 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中生精细胞组成及排布模式无明显变化,SSCs 数量略有增加,为  $1.60 \pm 0.73$  个/曲细精管横断面。

1.5 岁食蟹猴睾丸约 80% 曲细精管出现狭窄管腔,管直径为  $43.66 \pm 2.19 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中生精细胞除 SSCs 外,出现少量 B 型精原

细胞;SSCs 在曲细精管中的排布模式无明显变化,而 B 型精原细胞一般位于 SSCs 上层近管腔侧,SSCs 数量略有增加,约为  $1.85 \pm 1.14$  个/曲细精管横断面(彩插 4 图 B)。

2 岁食蟹猴睾丸约 80% 曲细精管出现较为明显的管腔,管直径明显增加,为  $53.94 \pm 1.91 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中 SSCs 及 B 型精原细胞的数量均明显增加,但在曲细精管中的排布模式无明显变化,SSCs 数量为  $2.20 \pm 1.32$  个/曲细精管横断面(彩插 4 图 C)。

2.5 岁食蟹猴睾丸曲细精管管腔发育情况与 2 岁相比无明显变化,管直径稍增加,为  $56.35 \pm 2.92 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中 SSCs 略有减少,为  $2.09 \pm 1.48$  个/曲细精管横断面,B 型精原细胞分化程度增加(彩插 4 图 D)。

3 岁食蟹猴睾丸曲细精管管腔进一步扩大,管直径达  $60.52 \pm 1.78 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中 SSCs 数量与 2.5 岁比较变化不大,为  $2.17 \pm 1.26$  个/曲细精管横断面,B 型精原细胞进一步分化,偶尔可在管腔中发现初级精母细胞,但数量较少。

3.5 岁食蟹猴睾丸曲细精管管腔继续扩大,管直径达  $68.77 \pm 2.50 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中 SSCs 数量略有增加,为  $2.50 \pm 1.26$  个/曲细精管横断面,部分曲细精管中出现处于不同分化阶段的精母细胞(彩插 4 图 E)。

4 岁食蟹猴睾丸曲细精管管腔急剧增加,管直径达  $179.19 \pm 10.70 \mu\text{m}$ ;睾丸间质成分少;曲细精管中 SSCs 数量略有减少,为  $2.20 \pm 1.32$  个/曲细精管横断面;生精上皮已经出现从 SSCs 到精子的全部类型的生精细胞。但由于曲细精管不同位置发育时相的不同步,在某一曲细精管切面上只能看到某几种而不是全部生精细胞(彩插 4 图 F)。

### 2.3 性成熟前食蟹猴睾丸石蜡切片 PAS/H 染色结果

睾丸组织切片 PAS/H 染色结果显示,0 ~ 0.5 岁:Ad 型精原细胞呈 PAS 弱阳性,Ap 型精原细胞均呈 PAS 阴性(彩插 4 图 G);1 岁 ~ 2.5 岁:Ad 型精原细胞胞质呈 PAS 阳性,At 型精原细胞胞质呈 PAS 弱阳性,Ap 型精原细胞胞质呈 PAS 阴性,其他生精细胞及支持细胞胞质呈 PAS 阴性(彩插 4 图 H ~ J)。3 岁及以上:Ad 及 At 型精原细胞胞质呈 PAS 弱阳性或阴性,Ap 型精原细胞胞质呈 PAS 阴性,部

分精子细胞的顶体呈 PAS 阳性,其他细胞胞质呈 PAS 阴性(彩插 4 图 K~L)。

### 3 讨论

性成熟前非人灵长类动物生精细胞的发育进程对人类的相关研究具有重要的理论意义和比较医学价值。Rey 等<sup>[3]</sup>曾对性成熟前不同年龄黑帽悬猴睾丸生精小管进行组织学、形态度量学和功能学研究,从而揭示了黑帽悬猴是研究男性青春期睾丸发育的一个重要动物模型。Simorangkir 等<sup>[4]</sup>在研究恒河猴 A 型精原细胞的增殖模式时,对新生儿期(1~2 日龄)、婴儿期(4~5 月龄)及幼年期(14~17 月龄)恒河猴进行了详细的组织学研究。而作为重要实验动物之一的食蟹猴,在生殖生理等方面与人具有很大的相似性,而其性成熟前睾丸发育的研究报道较为零散,缺乏系统的组织学研究报道。鉴于此,我们对性成熟前食蟹猴生精细胞的发育进程进行了系统的组织学研究,通过 HE 染色,详细阐述了食蟹猴睾丸生精细胞的发育进程,通过 PAS/H 染色,建立了性成熟前食蟹猴 SSCs 原位鉴定的一种新方法。本研究的完成不但为食蟹猴 SSCs 的体外相关研究奠定了基础,对人类的相关研究也具有重要的比较医学价值。

PAS/H 染色法作为一种常规染色方法在非人灵长类动物睾丸生精上皮的组织学研究中被广泛应用<sup>[5-7]</sup>,但作为鉴定非人灵长类动物不同类型精原细胞的方法还未见文献报道。PAS/H 染色主要显示细胞中的糖原类物质,据文献<sup>[8]</sup>报道,Ad 型精原细胞胞质中有糖原,为储备型干细胞(reserve stem cells),而 Ap 型精原细胞胞质中无糖原,为增殖型干细胞(renewing stem cells)。有鉴于此,我们尝试根据各型精原细胞的 PAS/H 染色特性,结合细胞核着色模式及在曲细精管中的空间排布模式,对食蟹猴 SSCs 进行原位鉴定。经研究发现,这一方法可鉴定 2.5 岁及以下食蟹猴睾丸中的 SSCs (Ad/At/Ap 型精原细胞),尤其适合鉴定 1~2.5 岁食蟹猴睾丸中的 Ad 型精原细胞。对于性成熟前不同年龄食蟹猴 SSCs PAS/H 染色结果的差异,我们认为原因可能是:0.5 岁及以下食蟹猴生精细胞发育缓慢,SSCs 处于有丝分裂静息状态,因而呈 PAS 弱阳性或阴性;从 1 岁开始,SSCs 开始发育,并随着年龄的增长,SSCs 发育加快,Ad 型精原细胞进入有丝分裂活跃状态,因为表现出 PAS 阳性;3 岁及以上食蟹猴中

已经出现大量 B 型精原细胞及部分精母细胞,生精细胞的增加主要来源于分化型生精细胞的有丝分裂,此时 SSCs 的有丝分裂趋于缓慢,因而 Ad 型精原细胞表现为 PAS 弱阳性或阴性,在 4 岁及成年食蟹猴睾丸中,精子细胞的顶体表现为 PAS 阳性,与 Dreef 等<sup>[6]</sup>的报道相一致。因此,我们认为,PAS/H 染色法作为 2.5 岁及以下食蟹猴 SSCs 免疫组化原位鉴定的辅助方法是完全可行和有效的。

SSCs 在哺乳动物睾丸生殖细胞中所占的比例极小,据文献报道,在成年小鼠的睾丸中,SSCs 与全部生殖细胞的比例约为 2~3:10000<sup>[9]</sup>。而在幼年动物,尤其是处于幼年某一特定发育阶段的动物,其睾丸中生殖细胞主要是未分化型精原细胞,若在此阶段进行 SSCs 分离及纯化,可以有效地避免其他类型生殖细胞的混杂而获得较高纯度的 SSCs。据文献<sup>[10]</sup>报道,一般小鼠选择生后 7~8 d 的,大鼠用生后 9~10 d 的,兔子用 1 个月以内的,山羊用 2 月龄左右的,狗和牛用 3 月龄以内的较为适宜。而在食蟹猴,还没有关于 SSCs 最佳分离年龄的报道。在本研究中,我们通过对性成熟前不同年龄食蟹猴睾丸切片的详细观察和系统分析后发现,1~1.5 岁食蟹猴睾丸中未分化型精原细胞的比例较大,而分化型生精细胞的比例较小,较适合进行 SSCs 的分离、纯化及体外培养等相关研究。

### 参考文献:

- [1] 张学明,文兴豪,赖良学. 性成熟前小鼠生精细胞的发育过程[J]. 中国兽医学报,2000,20(3):293-297.
- [2] Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques[J]. Stem Cells, 2007, 25:2330-2338.
- [3] Rey RA, Campo SM, Bedecarras P, et al. Is infancy a quiescent period of testicular development? histological, morphometric, and functional study of the seminiferous tubules of the cebus monkey from birth to the end of puberty[J]. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1993, 76:1325-1331.
- [4] Simorangkir DR, Marshall GR, Ehmcke J, et al. Prepubertal expansion of dark and pale type A spermatogonia in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) results from proliferation during infantile and juvenile development in a relatively gonadotropin independent manner[J]. Biology of Reproduction 2005, 73:1109-1115.
- [5] Jahnukainen K, Ehmcke J, Nurmio M, et al. Irradiation causes acute and long-term spermatogonial depletion in cultured and xenotransplanted testicular tissue from juvenile nonhuman primates[J]. Endocrinology, 2007, 148(11):5541-5548.
- [6] Dreef HC, Van Esch E, De Rijk E P. C. T, Spermatogenesis in

- the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*): A practical guide for routine morphological staging [J]. Toxicologic Pathology, 2007, 35(3): 395-404.
- [7] Jahnukainen K, Ehmcke J, Schlatt S. Testicular xenografts: A novel approach to study cytotoxic damage in juvenile primate testis [J]. cancer research 2006 66(7):3813-3818.
- [8] Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man [J]. American Journal of Anatomy, 1963, 112: 35-51.
- [9] Tegelenbosch RA, De Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. Mutation Research, 1993, 290:193-200.
- [10] 何红媛, 夏冬. 精原干细胞的研究进展 [J]. 国外医学遗传学分册 2003 26 (3): 144-147.

(修回日期)2010-08-06

(上接第 30 页)

出 HET-CAM 可以作为 Draize 替代试验的结论, 与本试验的结论一致, 他们得到的产品和原料的体内外试验的相关系数均非常高, 而本试验的统计结果说明, HET-CAM 试验可能更适用于对化学品原料进行眼刺激评估。

HET-CM 图例见彩插 3 图 1 和图 2。

参考文献:

- [1] Draize JH, Woodard G, Calvery HO, et al. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes [J]. Pharmacol Exp Ther, 1944, 82: 377-390.
- [2] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 405: Acute Eye irritation/Corrosion
- [3] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范 2007:112-115.
- [4] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritants.
- [5] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test method for Identifying Ocular Corrosive and Severe Irritants.
- [6] ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol n°96.
- [7] ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol n°47.
- [8] <http://iccvam.niehs.nih.gov>
- [9] 邱璐, 李小林, 刘俊平, 等. 化妆品 SIRC 细胞短时暴露法试验 [J]. 毒理学杂志 2008 22(6):473-476.
- [10] 杨光宇, 杨颖, 杨杏芬, 等. 鸡胚尿囊膜绒毛膜试验替代兔眼刺激试验的研究 [J]. 毒理学杂志 2006 20(6):402-405.
- [11] 廖艳, 王雪, 张立实, 等. 受精鸡卵尿囊膜试验作为眼刺激试验替代方法的研究 [J]. 卫生研究 2004 33(3):279-283.
- [12] 张宏伟, 阮鸿洁, 赵月朝. 鸡胚尿囊膜试验检测化妆品的刺激性 [J]. 中国公共卫生 2004 20(10):1213-1214.

(修回日期)2010-08-10