

体内体外培养下飞蝗雄性生殖细胞的分化

王 健 钟 香 臣

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要 在单一 TC199 或 GRACE 培养液中培养的四龄三天东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*) 精小管, 其精子发生只发育至初级精母细胞期, 培养液中添加 10% 小牛血清或飞蝗精巢匀浆液可促使其发育至次级精母细胞期, 添加 10% 分别取自东亚飞蝗蝗蛹、柞蚕蛹及蓖麻蚕蛹的血淋巴可促进其产生约 20% 的精子。蜕皮激素及保幼激素对精子的产生无显著影响。移植培养的精小管在受体飞蝗体内不能发育产生精子, 注射 $20 \mu\text{g/l}$ 虫蜕皮激素可促使其产生大量精子。完整精巢无需注射蜕皮激素即可在受体飞蝗体内发育产生精子。结果表明, 昆虫血淋巴内可能含有促细胞分化类因子, 此(类)因子可能无种属特异性, 外源蜕皮激素可能对精子发生无直接作用, 但精子发生同时需要蜕皮激素和血淋巴因子, 精巢本身可能有自己的蜕皮激素来源。

关键词 东亚飞蝗 精子发生 体外培养 血淋巴 20-羟基蜕皮酮

精子发生是雄性生殖细胞发生、分化、形成精子的过程, 其调节机制及所涉及的调节因素的来源、功能及化学本质尚不明。多数研究局限于鳞翅目昆虫且侧重研究精巢及精子发生整体的变化。其研究结果表明, 两类主要昆虫激素——保幼激素 (JH) 和蜕皮激素均能影响精子发生, 但其作用随虫种和龄期的不同而有变化, 甚至有相互矛盾的结果。因此, 关于激素影响精子发生的作用机理, 目前尚不能做出一个共识的合理解释。精巢本身结构复杂可能妨碍对研究结果的分析。精子发生过程中雄性生殖细胞经历了剧烈的形态变化, 此变化是各类因子作用的必然结果, 因此生殖细胞能较明显地体现各类因子的影响, 分析不同发育期生殖细胞的数量与形态变化, 有助于较细致地研究各类因素的具体作用。

东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis*) 是我国重要农业害虫, 对其生物学已有较深入的研究, 但对其雄性生殖细胞发育分化的研究很少。钟香臣等(1982)对其精子变态过程中核的变化进行了亚显微水平的研究。在激素与生殖的关系方面, 郭鄂(1959)对咽侧体及精巢移植对其发育的影响做过研究。而在精子发生的激素调节方面目前尚未见报道。本实验以东亚飞蝗为材料, 采用体外培养等技术, 重点研究了激素等因素对精母细胞分化及精子形成的影响。

材 料 与 方 法

本实验采用室内繁殖的东亚飞蝗为材料。蝗卵在 30°C 下经 14 天左右孵化成蝗蛹, 蝗蛹以玉米或小麦(冬季)叶为饲料, 在 30°C 光照 12 小时条件下饲养, 其生长期四龄为 5 天, 五龄为 7 天。成虫在养虫箱内饲养, 以玉米或小麦叶为饲料, 24 小时光照, 30°C 条件

下成虫存活一个月以上。实验用虫为四、五龄蝗蛹及成虫。

体外培养 将所需龄期蝗蛹用 70% 的酒精表面消毒,从虫体腹部取出精巢,在无茵昆虫生理盐水 (NaCl 6.8g, CaCl_2 0.2g, KCl 0.2g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, NaHCO_3 0.15g, 葡萄糖 7.7 g, 双蒸水 1000 ml) 及培养液中浸洗 4 次,每次 5 分钟。将精巢分成约 10 条一束的精小管束,每 25—35 只精小管放入一个培养杯中。每杯容积约 600—700 μl , 注入培养液(以 TC199, Gibco Laboratories 及 Grace, KCBiological 培养液为基本培养液,其中分别添加 10%—20% 的小牛血清或精巢匀浆液、昆虫血淋巴)约 300—500 μl , 27℃ 下封口培养 4—8 天。上述操作均在无菌条件下进行,所用器皿均经高压灭菌。

体内移植 以雌雄飞蝗成虫为受体,从腹部侧面开口摘除生殖腺,然后将完整精巢或精小管植入,用石蜡封口。受体飞蝗在 30℃12 小时光照下饲养,5 至 8 天后镜检精巢或精小管发育情况。

激素处理 体外培养中,培养液中各类激素的终浓度分别为:蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, Sigma Chemical Co.) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 保幼激素 (JH-I, Sigma Chemical Co.) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 早熟素 (precocene-I, Sigma Chemical Co.) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 精小管移植实验中,每只虫注射 20 μg 蜕皮激素。

生殖细胞的分类计数 将二只精小管置于载玻片上的生理盐水中,撕破其管壁任生殖细胞溢出,用盖玻片将混均后的细胞压散,在相差显微镜 40×10 倍下用随机法分类计数。每次记录细胞总数为 300—400。重复两次。

结果与分析

对东亚飞蝗精子发生的动态研究表明,次级精母细胞出现于四龄第三天之后(图 1),

本实验取四龄第三天蝗蛹精小管为材料培养 4 天,第四天镜检发育情况。每组实验至少重复三次。

昆虫血淋巴等因素对精子发生的影响 本实验分别研究了小牛血清、蝗虫精巢匀浆液及昆虫血淋巴对雄性生殖细胞发育分化的作用,结果表明,与对照(纯培养液)相比,培养的精小管中出现了约 20% 的次级精母细胞(图 2),相当于四龄第四天之精小管,说明小牛血清可促进精母细胞的发育,

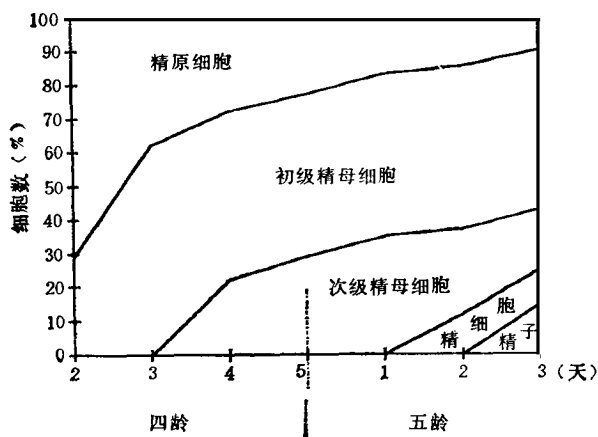


图 1 精小管内各类生殖细胞相对数量的变化

但远未达到体内正常发育程度。精巢匀浆液具有与小牛血清类似的促进作用(图3),次级精母细胞量达 15% 以上,明显高于对照(纯培养液)。但精巢匀浆液亦不能维持其进一步发育的需要。

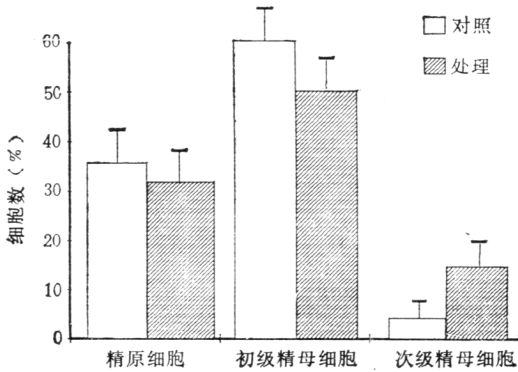


图 2 小牛血清对体外培养精小管精子发生的作用

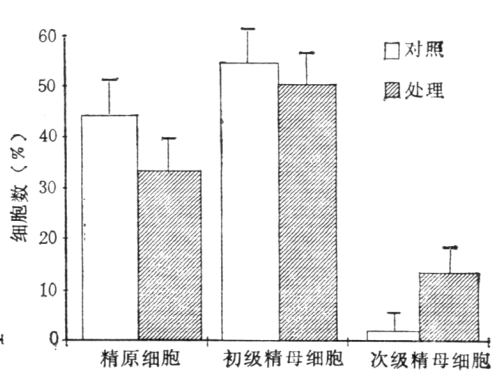


图 3 精巢匀浆液对体外培养精小管精子发生的作用

由于绝大部分昆虫生长因子或促生长物质存在于昆虫体内运输系统血淋巴中 (Ferkovich 等, 1991)。本实验采用了分别取自二目三种的不同虫态的血淋巴 (柞蚕 *Anthe-raea pernyi* 蛹、蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 蛹和东亚飞蝗蝗蛹)。图 4 为四龄第四天蝗蛹精小管培养 6 天后的结果。培养液中加入有 10% 的血淋巴。

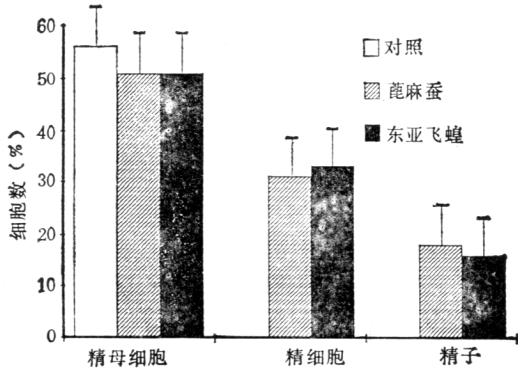


图 4 昆虫血淋巴对体外培养精小管精子发生的作用

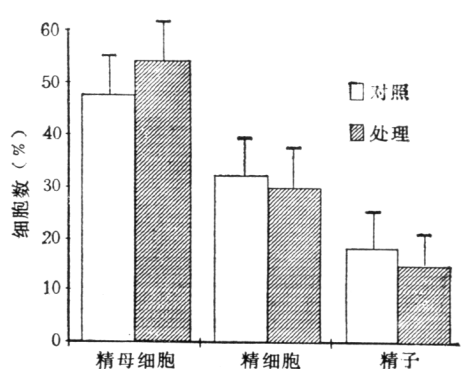


图 5 血淋巴 + JH 对体外培养精小管精子发生的作用

在加有血淋巴的培养液中所有精小管均发育产生了精子，其相对数量达 15% 以上，相当于正常体内发育五龄第三天的精小管状况，表明昆虫血淋巴成份不但足以维持精原细胞生长至次级精母细胞，还可满足精细胞分化的需要。

与体内发育所不同的是精母细胞数目高于精子数目 (体内发育的精小管内两者数目大体相同)，可能是由于精母细胞分裂活动增快所致。

三种不同来源的昆虫血淋巴作用大体相同，无显著差异。

激素对精子发生的影响 本实验研究了蜕皮激素、保幼激素和早熟素对精母细胞及精细胞发育的影响。没有发现保幼激素和早熟素对生殖细胞发育有显著促进或抑制作用

(图 5), 它们似乎与精子发生关系不大。或许是四龄蝗蛹的精子发生期对这类激素 不敏感 (Koepe, 1985)。

体外培养实验中蜕皮激素对精母细胞发育也无显著作用 (图 6,7), 考虑到体外培养中所添加的昆虫血淋巴内可能含有蜕皮激素而掩盖了外源激素的作用, 而蝗虫成虫体内含有极少量蜕皮激素 (Hagedorn, 1985; Bodnaryk, 1986), 而且其中绝大部分在生殖腺内 (Lagueux 等, 1977), 因此本实验以摘除生殖腺的雌雄蝗成虫为受体进行了体 外移植实验。

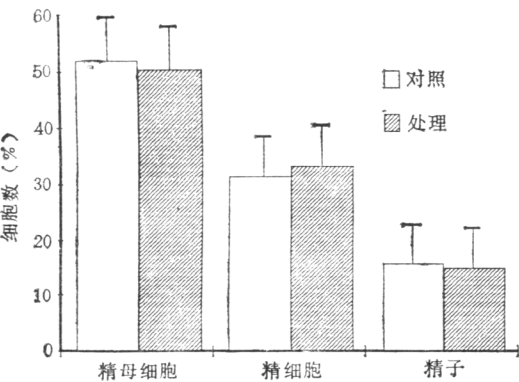


图 6 血淋巴+蜕皮激素对体外培养精小管精子发生的作用

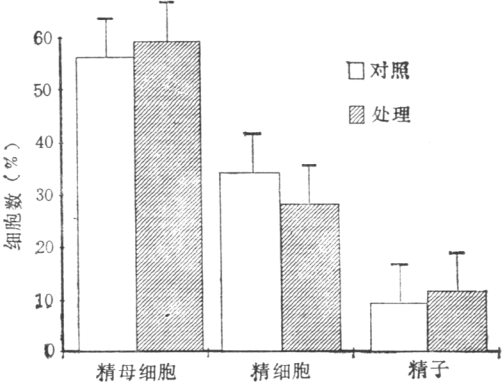


图 7 血淋巴+蜕皮激素对体外培养精巢精子发生的作用

结果(表 1)表明,精小管在受体飞蝗体内没有发育,注射蜕皮激素后,精小管可恢复发育并产生精子。分别取自三龄三天、四龄三天和五龄零天(即四龄五天)蝗蛹的精小管均有同样结果。说明在极低水平蜕皮激素环境下精小管不能发育,精细胞的产生与分化

表 1 体内移植精小管及精巢的发育

移植材料	供体虫龄	受体虫数	移植天数	死亡数	注射数	发育数	发育率
精小管	四龄三天	8	8	2	0	0	0
	四龄三天	6	8	1	5	4	80%
	五龄零天	6	6	1	0	0	0
	五龄零天	2	6	0	2	2	100%
	三龄三天	6	8	1	0	0	0
精小管*	四龄三天	9	8	2	0	5	71%
	三龄三天	5	8	2	0	3	100%
精巢	四龄三天	5	8	1	0	4	100%
	五龄零天	3	8	0	0	3	100%
	三龄三天	4	8	0	0	4	100%

*: 移植后立即注射激素 (20μg/虫),其它为移植三天后注射。
受体虫为去势的雌雄飞蝗成虫

必需蜕皮激素。精小管本身不能分泌足以满足其发育需要的蜕皮激素。完整精巢在所有移植实验中均能正常发育产生精细胞和精子,且这一发育不受移植精巢虫龄的限制,说明精巢发育可能可以不受血淋巴中蜕皮激素滴度的影响,其本身可能有能力分泌蜕皮激素并满足自身发育的需要。而且三龄、四龄及五龄蝗蛹之精巢可能均有此分泌能力。此结果与前人实验结果吻合(Koolman, 1979; Shimizu 等, 1985; Loeb 等, 1982、1984、1987、1988)。

讨 论

1. 蜕皮激素对雄性生殖细胞发育的影响

移植实验结果表明,在蜕皮激素含量极低的飞蝗成虫体内,精小管没有发育,当注入外源蜕皮激素后精小管恢复发育并产生了成熟精子。这种现象并不因虫龄不同而改变,因此可以认为精细胞分化乃至精子发生都需要有蜕皮激素参与,当其它发育条件满足后,蜕皮激素的不足能限制精子发生。这是滞育或长期静止状态的昆虫无成熟精子产生的原因之一,也是昆虫控制其精子发生的一种途径。大量实验表明,在滞育期昆虫的血淋巴中蜕皮激素含量极低,Meola 和 Adkisson (1977) 发现去除前胸腺的滞育蛹即使放回合适环境也不会从滞育中解脱出来,说明蜕皮激素对解除滞育有一定的作用。麻蝇的滞育蛹中蜕皮激素含量低(Walker 和 Denlinger, 1980),注射蜕皮激素可以打破滞育(Browning, 1981),而打破滞育后可促进精子发生,说明在一定情况下蜕皮激素可用来调节精子发生的进程。在东亚飞蝗这类生活史无滞育现象的昆虫中,蜕皮激素也可能有类似作用。本实验发现,当饲养温度较低时,由于有效积温不够,蝗虫发育迟缓,而龄期加长。同时发现精子发生也相应延迟,精小管内有大量零散颗粒,估计是细胞解体所致。细胞解体是滞育期昆虫防止成熟精子产生的方式之一,因此可以认为这可能是蜕皮激素滴度较低的结果,这还需测定这种状态下血淋巴中蜕皮激素滴度来加以证实。

2. 昆虫血淋巴成份对雄性生殖细胞发育的影响

当培养液中加入一定量的昆虫血淋巴成份后,培养的生殖细胞可以发育分化直至产生精子,说明血淋巴中存在一种或一类能促进精子发生的因素,它很可能属于大分子因子(macromolecular factor)类(Schmidt 和 Williams, 1953),有不少实验研究其可能的功能和来源(Landureau 和 Szollosi, 1974; Shimizu, 1978, 1985; Loeb 等, 1982、1984; Friedlaender, 1989),其化学本质不明,从其热不稳定性来看,类似于蛋白类。我们曾把 100℃ 加热 10 分钟的血淋巴上清加入培养液,发现它已丧失促进精子发生的能力,精小管内无精细胞产生,说明这类因子是精子发生所必需的。Kambysellis 等(1971a、b)认为它是促进精子发生的直接作用者。由此可以认为,昆虫体内正常精子发生必需血淋巴因子和蜕皮激素两种因素,并可通过分别调节两因素的滴度来分别调节精子发生进程。

参 考 文 献

- 钟香臣等 1982 昆虫精子发生的电镜观察 I: 蝗虫精细胞核的演变。动物学集刊,第二集,第 157—161 页。
郭 鄂 1959 东亚飞蝗成虫生殖腺的相互移植。科学记录 3: 457—60。
Bodnaryk, R. P. 1986 Ecdysteroid hormone levels in the pupa of the bertha armyworm *Mamestra configurata* Wlk. during spermatogenesis. *J. Insect Physiol.* 32(11):931—5.

- Browning, T. O. 1981 Ecdysteroids and diapause in pupae of *Heliothis punetigger*. *J. Insect Physiol.* 27:715—9.
- Ferkovich, S. M. et al. 1991 Stimulation of embryonic development in *Microplitis croceipes* (Braconidae) in cell culture media preconditioned with a fat body cell line derived from a nonpermissive host, gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem Physiol.* 18:169—75.
- Friedlander, M. 1989 20-hydroxyecdysone induces glycogen accumulation within the testicular sheath during in vitro spermatogenesis renewal in diapausing codling moth (*Cydia pomonella*) *J. Insect Physiol.* 35:29—39.
- Hagedorn, H. H. 1985 The role of ecdysteroids in reproduction. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 8:205—262. Ed. by G. A. Kerbat and L. I. Gilbert
- Kambysellis, M. & C. M. Williams 1971a In vitro development of insect tissues I. A macromolecular factor prerequisite for silkworm spermatogenesis. *Biol. Bull.* 141:527—540.
- Kambysellis, M. & C. M. Williams 1971b In vitro development of insect tissues II. The role of ecdysone in the spermatogenesis of silkworm. *Biol. Bull.* 141:541—52.
- Koepppe, J. K. 1985 The role of juvenile hormone in reproduction. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 8:165—203. Ed. by G. A. Kerbat and L. I. Gilbert
- Koolman, J., K. Scheller & D. Bodenstern 1979 Ecdysteroids in the adult male blowfly, *Calliphora vicina*. *Experientia* 35:134—5.
- Lagueux M., M. Hirn & J. A. Hoffmann 1977 Ecdysone during development in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 23:109—20.
- Landureau, J.C. & A. Szollosi 1974 Demonstration, par la methode de culture in vitro, du role des hemocytes dans la spermatogenese d'un insecte. *C. R. Acad. Sci. Paris. D.* 278:3359—62.
- Loeb, M. J., C. W. Woods, E. P. Brandt & A. B. Borkovel 1982 Larval testes of the tobacco budworm: a new source of insect ecdysteroids. *Science* 218:896—8.
- Loeb, M. J., E. P. Brandt & M. T. Birnbaum 1984 Ecdysteroids production by testes of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, from last larval instar to adult. *J. Insect Physiol.* 30:375—81.
- Loeb, M. J. et al. 1987 An ecdysiotropic factor from brain of the *Heliothis virescens* induces testes to produce immunodetectable ecdysteroid in vitro. *J. Exp. Zool.* 243:275—82.
- Loeb, M. J., E. P. Brandt, C. W. Woods & R. A. Bell 1988 Secretion of ecdysteroid by sheaths of testes of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and its regulation by testis ecdysiotropin. *J. Exp. Zool.* 248:94—100.
- Meola, R. W., & P. C. Adkisson 1977 Release of prothoracicotropic hormone and potentiation of developmental ability during diapause in the bollworm, *Heliothis zea*. *J. Insect Physiol.* 23:683—8.
- Schmidt, E. L., & C. M. Williams 1953 Physiology of insect diapause V. Assay of the growth and differentiation hormone of Lepidoptera by the method of tissue culture. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 105:174—87.
- Shimizu, T. 1978 Hormonal effects on cultivated insect tissues IV. The role of testis in spermatogenesis of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, in vitro. *Appl. Entomol. Zool.* 13:278—82.
- Shimizu, T. et al. 1985 In vitro analyses of spermiogenesis and testicular ecdysteroids in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: noctuidae) *Appl. Entomol. Zool.* 20:56—61.
- Walker, G. P., & D. C. Denlinger 1980 Juvenile hormone and moulting hormone titres in diapause and nondiapause destined flesh flies. *J. Insect Physiol.* 26:661—4.

IN VITRO AND IN VIVO DIFFERENTIATION OF MALE GERM CELLS IN THE LOCUST *LOCUSTA MIGRATORIA MANILENSIS*

WANG JIAN ZHONG XIANG-CHEN

(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

It was observed that testicular follicles from day 3 fourth instar nymph of the Oriental migratory locust *Locusta migratoria manilensis* cultured in TC199 or Grace's media were arrested at the stage of spermatocyte I. Addition of 10% FBS or locust testis homogenate could promote development to the stage of spermatocyte II. When cultured in media with 10% hemolymph from either the nymph of *L. migratoria manilensis* or the pupa of *Antheraea pernyi* or *Philosamia cynthia ricini*, the follicles developed with massive production of spermatids and 20% sperms. Application of 20-hydroxyecdysone (20-E) and JH-I had no effect on the development in the latter case. Testicular follicles of day 3 third instar nymph, day 3 fourth instar nymph and day 0 fifth instar nymph implanted into male or female adult locusts ceased development, which was promptly recovered by injection of 20-E. By implantation, intact testis could proceed spermatogenesis and produce sperms spontaneously within 8 days without injection of ecdysone. These results indicate that the insect hemolymph contains factor(s) that can promote the differentiation of spermatids and spermatogenesis, and the factor(s) seems to be non-species specific. The effect of ecdysteroid might not be direct, but spermatogenesis and normal differentiation of spermatids need both ecdysteroid and hemolymph factor(s), and the intact testis might have its own source of ecdysone.

Key words *Locusta migratoria manilensis*——spermatogenesis——hemolymph——20-hydroxyecdysone