

锯缘青蟹皮层反应与受精膜形成研究*

康现江 李少菁 王桂忠 陈锦民

(厦门大学海洋学系 福建 361005)

提要 锯缘青蟹成熟卵子排出时具有两层卵黄膜,卵子排出后形成壳膜,与卵子附着有关。成熟卵子具有两种皮层颗粒,精子入卵后,皮层反应开始,两种皮层颗粒相继胞吐。首先由致密颗粒胞吐,形成一层很薄的膜性结构,接着环形颗粒大量胞吐,其内含物融合,并与外面薄层融合为受精膜。卵子质膜由于皮层颗粒胞吐作用形成镶嵌膜。

关键词 锯缘青蟹,皮层反应,受精膜

皮层反应在许多动物中进行了研究^[1],在十足目甲壳动物中,该方面也进行了一些有关皮层反映的研究^[2]。锯缘青蟹(*Scylla serrata*)是重要的经济蟹类,在其发育生物学方面,在作者实验室进行了精子结构、精子发生^[3]、精子顶体反应离子载体的诱导^①、卵子发生、卵黄发生等研究,而有关其受精生物学方面的研究几近空白,一方面由于材料较难获得,另一方面卵子卵黄丰富,较难制片。作者在获得锯缘青蟹自然受精和人工受精的材料基础上,对其受精过程的显微结构和超微结构进行了较为系统的研究。本文报道了锯缘青蟹的皮层反应,旨在一方面丰富锯缘青蟹乃至十足目甲壳动物受精生物学理论内容;另一方面为其科学化人工育苗及品种改良提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1999年4~6月在云霄县陈岱水产增殖育苗场,选取性腺发育较好的膏蟹,放于80L水体的瓷缸中,水体约60L,充气泵充气,盐度约29,每日喂菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*),对膏蟹进行培育。

1999年8月中旬~10月中旬从厦港农贸市场购买青蟹膏蟹,体长8.0~9.0cm,体宽10.0~11.0cm,体重约300~350g。暂养于水族箱中,水族箱长、宽、高分别为70,50,40cm,水位35cm,水温为24.5~27.5℃,盐度为25.5~26,充气泵用节能电开关控制充气,喂新鲜菲律宾蛤仔,定期换水。水族箱底部铺有1~2cm细砂,将膏蟹一侧眼柄剪去进行诱导其产卵。

1.2 取 样 处 理

待亲蟹产卵时,从排卵孔附近取受精卵放入预先

准备好的烧杯中,间隔30s~1min取样固定处理。

于2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定,酒精系列脱水,环氧树脂618包埋,切片于柠檬酸铀~醋酸铅双重染色,JEM100CX透射电镜观察拍照。

于2.5%戊二醛和1%锇酸双重固定,酒精系列脱水,入丙酮,醋酸异戊酯,HCP-II临界点干燥仪干燥,S-520扫描电镜观察拍照。

2 结 果

2.1 成 熟 卵

锯缘青蟹刚排出的卵子形状不规则,受精后逐渐变为球形(图1-1)。成熟卵表面凹凸不平,与卵内卵黄颗粒有关。刚排出的成熟卵有三层卵膜即外面两层卵黄膜和最内层的卵细胞质膜。外层卵黄膜较薄,厚约0.2μm,电子密度较高;内层卵黄膜较厚,约1.03μm,电子密度较低。两层卵黄膜与质膜之间仍有一薄层絮状物,此时卵细胞质膜虽然有一些凹凸,但基本平滑(图1-2)。成熟卵子内部可分为皮层和内质,成熟卵子皮层厚度较薄,皮层中有一种皮层颗粒(致密颗粒)(图1-2),卵黄颗粒较少,还有内质网囊泡和线粒体等。内质较厚,富含卵黄颗粒和脂滴,卵黄颗粒有两

* 福建省“海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究”项目资助。

电镜制样得到厦门大学电镜室薛茹、陈平和倪子绵老师的帮助,在此一并致谢。

① 王艺磊、张子平、谢芳靖、李少菁。锯缘青蟹顶体反应的研究。

收稿日期:2000-04-24;修回日期:2000-10-17

种即一种电子密度高,另一种电子密度低。另外皮质中还有卵子成熟过程中形成的另一种皮质颗粒(环形颗粒)(图 1-3),以及内质网、线粒体和基质等。

2.2 皮质颗粒

锯缘青蟹卵子产出后具有两种皮质颗粒,其中一种皮质颗粒电子密度高(致密颗粒),外面有一层膜,内含有电子密度高的颗粒,由内质网囊泡合成的小颗粒聚集、融合后形成的(图 1-2)。另一种皮质颗粒(也称环形颗粒)电子密度低,外面有一层薄膜包裹,内含有电子密度高的颗粒。环形颗粒是在卵子发生过程形成的,多散布在内质。在致密颗粒胞吐结束时,环形颗粒大量地迁移到皮质内,其发生与电子密度低的卵黄颗粒有关(图 1-3)。该种卵黄颗粒首先在某些区域聚集成电子密度高的小颗粒,小颗粒之间融合形成较大的颗粒。卵黄颗粒的这些区域由于其成分的聚集,致使其电子密度降低。

2.3 皮质颗粒胞吐及受精膜形成

精子入卵后,皮质反应从精子入卵的位置开始,并迅速波及整个卵子。皮质反应过程涉及多种成分参与。首先卵子皮质中的致密颗粒胞吐出膜,释放其内含物,内含物融合,形成一薄层的膜性结构(图 1-4, 1-5),在此过程,由于皮质颗粒的胞吐作用,质膜形成许多指状突起,这些指状突起断裂后,也参与受精膜的形成(图 1-4)。致密颗粒胞吐结束后,接着第 2 种皮质颗粒(环形颗粒)便开始胞吐,其排出不仅数量大,而且具有“爆发性”,使受精膜迅速加厚(图 1-6, 1-7)。环形颗粒的排出方式一是直接胞吐出膜,另一种为环形颗粒之间发生融合形成一通道,环形颗粒内含物则沿通道释放,由于这种作用,质膜或卵子表面形成一些内裂,使得质膜具有许多深裂或突起。壳膜举起后,皮质反应仍在激烈进行。

由于两种皮质颗粒的胞吐作用以及皮质内的基质的参与,这些成分相互融合,形成受精膜,外面电子密度较高,内面电子密度低,受精膜厚约 $0.3 \mu\text{m}$ (图 1-8)。受精膜表面特征,有一些沟洄,也有一些微孔,与物质进出有关。从组织切片看,受精膜的举起是从某处开始的,逐渐延伸,最后整个受精膜举起。

3 讨论

3.1 受精膜形成

3.1.1 皮质颗粒发生与胞吐

锯缘青蟹成熟卵具有两层卵黄膜,卵子入海水后,形成壳膜,该方面与普通滨蟹(*Carcinus maenas*)成熟卵膜 1a 和 1b 相似,与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)成熟卵三层卵膜外面的两层相似^[2]。受精后,

锯缘青蟹卵子皮质中出现致密颗粒,该种颗粒首先胞吐,形成一薄层结构,该层结构的形成与 Goudeau 1980 年在普通滨蟹中描述的及与 Hirsch 1971 年在尖头蟹(*Libinia emarginata*)描述的 F1 类似。环形颗粒的胞吐不仅快速而且量大,使受精膜很快加厚,该方面的特征与 Goudeau 1980 年在普通滨蟹中描述的及与 Hirsch 1971 年在尖头蟹描述的 F2 形成类似。

有关皮质颗粒的发生,在很多动物中是由内质网和高尔基体参与形成的^[1,2],然而在普通滨蟹中的环形颗粒是由内原性的卵黄发生的。作者在锯缘青蟹中发现,致密颗粒发生与内质网有关,环形颗粒的发生与普通滨蟹相似,与一种电子密度低的卵黄颗粒有关。有关皮质颗粒发生的时间,在十足目不同种类中不尽相同。中华绒螯蟹在卵黄合成和积累基本完成后,皮质颗粒就出现于初级卵母细胞的深部,但颗粒的形成却始于初级卵母细胞合成和集聚之际;在普通滨蟹环形颗粒在卵子发生过程中,出现的时间比较早。Pillai 等 1988 年在锐脊单肢虾(*Sicyonia ingentis*)发现,在卵子排出时没有皮质颗粒,在卵子排出后 30 min 才出现两种皮质颗粒即致密颗粒和环形颗粒,是由高尔基体产生的。在锯缘青蟹,环形颗粒形成的时间较早,由于未观察卵黄发生,所以推测是在卵子发生过程形成的,与中华绒螯蟹和普通滨蟹的类似,而与锐脊单肢虾的不同;致密颗粒是在卵子排出后,由内质网囊泡在皮质中形成的。

皮质颗粒的排出以胞吐方式进行,这是在动物的皮质反应中普遍存在的,锯缘青蟹也同样具有胞吐方式,而且有两种特征,其一是皮质颗粒的膜直接与质膜融合释放其内含物于卵周隙;其二是环形颗粒胞吐时,由于排出量大且迅速,许多颗粒之间膜融合,形成一通道,这些颗粒内含物沿通道排出,这方面的特征是与受精膜很快加厚相对应的。锯缘青蟹皮质颗粒的排出方式除胞吐作用外,尚发现有些皮质颗粒位于卵周隙内,推测与分泌排出的方式有关。

3.1.2 皮质反应机制

皮质颗粒的胞吐机制与 Ca^{2+} 有关^[1,2]。Vacquies 1975 年研究发现,皮质颗粒内含有结合的钙离子,每枚皮质颗粒破裂后所释放的钙离子都可以引发邻近的皮质颗粒的爆裂。

皮质颗粒的胞吐与内分泌细胞释放其内含物及神经递质释放的过程相似。神经递质释放时,首先由于动作电位激活突触后膜钙离子通道,引起钙离子内流,突触内神经递质囊泡膜与突触前膜融合,释放神经递质。在动物受精过程中,精子入卵首先引起卵子质膜电位变化,进一步激活钙离子流动,引起皮质颗

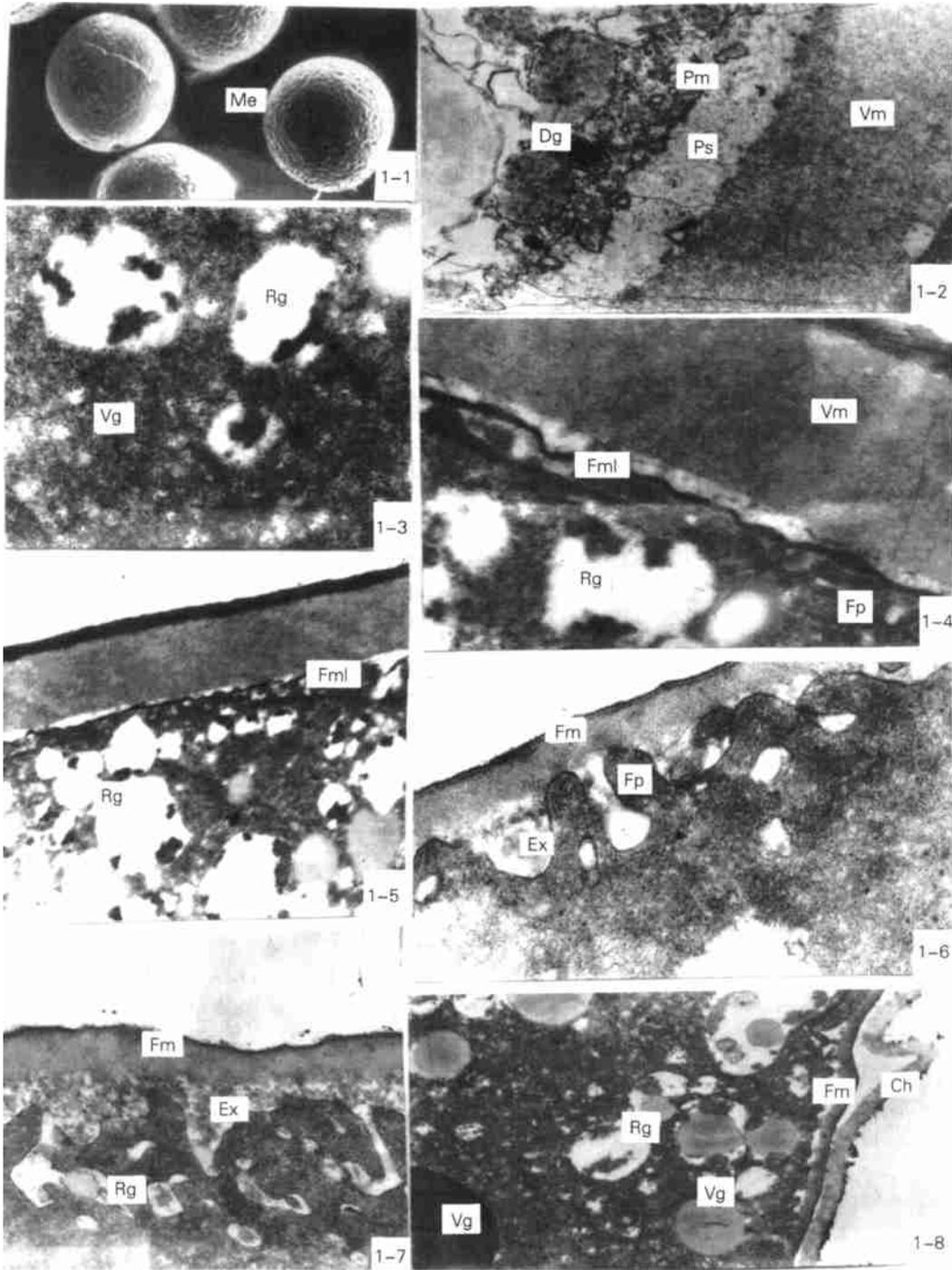


图1 锯缘青蟹皮层反应与受精膜形成

Fig.1 The cortical reaction and fertilization membrane formation in *Scylla serrata*

1-1 示成熟卵子 (×150); 1-2 示致密颗粒, 卵周隙和卵黄膜 (×20 000); 1-3 示环形颗粒和卵黄 (×27 000); 1-4 示致密颗粒胞吐形成早期受精膜薄层 (×27 000); 1-5 示卵黄膜, 早期受精膜和环形颗粒 (×10 000); 1-6 示环形颗粒胞吐 (×40 000); 1-7 示环形颗粒之

间膜融合形成通道,释放其内含物($\times 20\ 000$);1-8 示受精膜,壳膜等($\times 10\ 000$);Ch:壳膜;Dg:致密颗粒;Ex:胞吐作用;Fm:受精膜;Fml:早期受精膜;Fp:指状突起;M:成熟卵;Pm:卵质膜;Ps:卵周隙;Rg:环形颗粒;Vg:卵黄颗粒;Vm:卵黄膜.1-1: Matured eggs;1-2: Dense granules, egg ambient clearance, and vitelline membrane;1-3: Ring granules;1-4: A thin membrane is formed by the dense granules undertaken exocytosis process;1-5: Vitelline membrane, fertilization membrane at the early stage, and ring granules;1-6: Ring granules undertaking exocytosis process;1-7: The membrane between ring granules fused and formed a channel, and released the materials;1-8: Fertilization membrane, chorion membrane, etc. Ch: chorion membrane; Dg: dense granules; Ex: Exocytosis process; Fm: Fertilization membrane; Fml: Fertilization membrane at the early stage; Fp: Fingerlike prominence; M: Matured eggs; Pm: Egg plasma membrane; Rg: Ring granules; Vg: Vitelline granules; Vm: Vitelline membrane

粒膜与卵子质膜融合,并释放其内含物。皮层反应的机制可能与动物很多生理过程的胞吐作用类似,具有较为普遍的生理现象。

3.1.3 受精膜的形成

皮层反应的结果导致受精膜的形成。研究发现,锯缘青蟹受精膜的形成不仅由两种皮层颗粒的胞吐作用,即致密颗粒胞吐形成一薄层,环形颗粒胞吐形成较厚的一层,两层融合为受精膜,与尖头蟹的 F1 和 F2 相似,而且有质膜的指状突起脱落入卵周隙的参与,在环形颗粒胞吐过程中,由于它们之间膜融合形成通道,使得质膜出现许多深裂,并形成质膜指状突起,突起脱落后与皮层颗粒内含物融合,参与受精膜的形成,说明卵子皮层基质也参与受精膜形成。

3.2 受精膜之功能

众所周知,对大多数动物来说,多精进入是有害的且会导致胚胎早期死亡^[4]。受精膜的功能主要是阻扰多精受精,与精子受体失去和膜变硬有关^[1]。在精子入卵过程中,阻扰多精受精有三方面的作用:最早

的作用即精子入卵引起膜电位的变化,使结合的精子失去作用;接着皮层反应导致受精膜的形成,是阻扰多精受精的第二道防线;再者是镶嵌膜,即皮层颗粒胞吐作用使得质膜与皮层颗粒膜融合形成的镶嵌膜,改变了原来质膜的特性,阻碍精子进一步入卵过程。然而在锯缘青蟹,组织切片和电镜观察发现,多精入卵现象较为普遍,其受精膜阻扰多精受精机制如何,有待进一步研究。受精膜除此功能外,还是构成孵化膜的一部分,在锯缘青蟹,受精膜和外面的壳膜共同构成孵化膜,保护胚胎发育,直至幼体破膜而出。

参考文献

- 1 丁汉波,全允栩,黄浙.发育生物学.北京:高等教育出版社出版,1987.39~65
- 2 堵南山,赖伟,姜煥伟.动物学报,1997,43(4):337~343
- 3 王艺磊,张子平,李少菁.动物学报,1997,43(3):249~254
- 4 Miller W. A.(黄秀英等译).发育生物学.北京:高等教育出版社,海德堡:施普林格出版社,1998.111~118

STUDIES ON THE CORTICAL REACTION AND FERTILIZATION MEMBRANE FORMATION IN *Scylla serrata*

KANG Xianjiang LI Shaojing WANG Gui-zhong CHEN Jin-min
(Department of Oceanography, Xiamen University 361005)

Received: Apr. 24, 2000

Key Words: *Scylla serrata*, Cortical reaction, Fertilization membrane

Abstract

The egg at spawning which is related two layers vitelline membrane in *Scylla serrata*, and chorion membrane at postspawning, which is related to the egg attachment. The egg of *S. serrata* had two kinds of cortical granule at the spawning. During the cortical reaction, successively release two morphologically different exudates. At first, the dense granules undertaken exocytosis process, the material released from the granule fused with each other, and formed a thin membrane. Followed by the ring granules undertaken a massive and very fast exocytosis process, the material from the granule fused and formed a thick membrane. The fertilization membrane was formed by the two kinds of cortical granule exocytosis process. The egg plasma become an inlaying membrane. (本文编辑:李本川)