

# 长毛对虾卵子发生的研究

## II. 卵黄发生\*

洪水根

(厦门大学细胞生物学研究室, 361005)

**提要** 自1985—1988年, 每年4、5月间取厦门海区捕捞的长毛对虾雌虾卵巢为材料, 应用光镜和电镜技术并结合细胞化学方法, 研究长毛对虾的卵黄发生。结果表明, 卵黄粒在卵黄发生的卵母细胞核外围的卵质中最早出现; 卵黄粒的形成有多种途径, 最先参与卵黄粒形成的细胞器是线粒体; 随后高尔基液泡、内质网膜囊、溶酶体及核糖体等细胞组分参与了卵黄粒的形成。还讨论了滤泡细胞与卵黄蛋白来源之间的关系。

**关键词** 对虾 卵黄发生 卵黄粒

本研究的第一部分报道了长毛对虾的卵子发生过程, 这个过程可划分为卵原细胞、卵黄发生前的和卵黄发生的卵母细胞三个时期<sup>[1]</sup>。本文着重讨论卵黄发生的卵母细胞如何酿造形成卵黄粒, 为将来胚胎发育储备营养物质的过程。

### 一、材料和方法

自1985—1988年, 每年4、5月间取在厦门海区捕捞的长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 的不同成熟度的雌虾卵巢作为实验材料。

光镜样品用 Hollande-Bouin 固定液, H. E 染色作一般细胞形态观察; 用 Da Fano 硝酸银浸染法显示高尔基体; 用 Helly 固定液, Altmann 染色法显示线粒体; 以 Carnoy 固定液、PAS 反应显示糖类; 用汞-溴酚蓝法显示中性蛋白质, 碱性快绿法 (pH = 8.0—8.1) 显示碱性蛋白质, 酸性快绿法 (pH = 4.0—4.1) 显示酸性蛋白质。

透射电镜样品, 用 3.8% 戊二醛固定 3h, 以 0.1mol/L (pH = 7.2) 磷酸缓冲液洗涤三次, 入 1% OsO<sub>4</sub> 后固定 2h, 酒精系列脱水, 618 环氧树脂包埋, 超薄切片经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, JEM-100CXII 透射电镜观察、摄影。

扫描电镜样品固定方法与透射电镜样品相同, 酒精系列脱水后, 入醋酸异戊酯, 经临界点干燥, 真空喷镀白金, 日立 S-450 型扫描电镜观察、摄影。

### 二、观察和讨论

#### 1. 线粒体是最先参与卵黄粒形成的细胞器

长毛对虾卵子属中黄卵(图版 I: 1-Y)。光镜和电镜观察显示, 卵母细胞进入卵黄发

\* 国家自然科学基金资助项目, 项目编号 39170407  
接受日期: 1991年7月12日。

生阶段,卵质中的线粒体数量迅速增加,尤其在卵核的周围更为密集,并率先参与卵黄粒的形成。而且,第一批的卵黄粒是在核膜外围的卵质中出现(图版 I:2-Y)。起初,部分线粒体的嵴变短变少,在基质中出现电子密度较高的蛋白质沉淀物(图版 I:3箭头)。随着蛋白质进一步沉积,线粒体基质中的电子密度越来越高,整个线粒体逐渐演变为卵黄粒。图版 I:4,5 显示卵黄蛋白在线粒体沉积的过程。其中几个由线粒体演变而成的卵黄粒,在已经基本蛋白质化的基质中尚可看到线粒体嵴的痕迹(空心箭头),外膜还保留双膜结构(细箭头)。

卵黄粒由线粒体直接演变而成的途径在鲎<sup>[4]</sup>、文昌鱼<sup>[1]</sup>、牡蛎<sup>[3]</sup>等种类都曾观察到。Favard 等应用电镜连续切片观察扁卷螺的卵黄发生<sup>[11]</sup>,对这种形成方式给予有力的支持。

卵黄发生后期,大部分线粒体演变为卵黄粒,仅存一小部分于卵黄粒之间维系卵母细胞的呼吸代谢(图版 IV:23-M)。

### 2. 高尔基液泡是参与卵黄粒形成的主要细胞组分

卵黄发生早期,卵母细胞高尔基体代谢活跃,形成大量高尔基液泡并分散在卵质中(图版 II:6,7-GV)。随后,卵黄蛋白开始在高尔基液泡中沉降(图版 II:9-Y)。与此同时,一部分高尔基液泡为脂类物质所沉积,形成电子密度较浅、均质的脂肪粒(图版 II:8,9-L)。

卵黄粒这种形成方式也是普遍存在的<sup>[1,3,4,9]</sup>。众所周知,高尔基体是细胞分泌颗粒酿造、浓缩、加工、运输的场所,并且还具有合成糖蛋白和脂蛋白的功能<sup>[2]</sup>,因此在卵母细胞中,由高尔基液泡形成的卵黄粒主要成分为糖蛋白和脂蛋白<sup>[2,7]</sup>。

借助于细胞化学知道,脂肪粒原先具有丰富的磷脂,而在较晚的阶段,中性脂肪(甘油三磷酸酯)开始取得优势,成熟的卵母细胞的脂肪粒几乎完全由饱和的脂肪和脂肪酸所组成<sup>[9]</sup>。

### 3. 内质网膜囊积极参与卵黄粒的形成

卵黄发生初期,卵质出现很多形状较不规则的粗糙型内质网膜囊(图版 II:10-RER)。随着卵黄发生,这些膜囊中逐渐形成一些电子密度高卵黄蛋白的沉淀物(图版 II:11,12 箭头),逐渐变成卵黄粒(图版 II:13-Y)。

这种卵黄粒与由高尔基液泡形成的卵黄粒有明显的不同。首先内质网膜囊形状均为不规则的粗糙型囊泡,而高尔基液泡一般为近球形。其次,卵黄蛋白一般先在高尔基液泡中心位置沉积,随后沿离心的方向扩散到整个液泡;而在内质网膜囊中,卵黄蛋白出现的位置较无规则,一般先在膜囊的边沿部位沉积。第三,内质网膜囊分布一般较为松散,高尔基液泡在卵质中则呈密集排列。这些都可以从形态上将它们加以区别。

卵黄粒这种形成方式,几乎在所有动物类群中均有报道<sup>[1,3,4,9]</sup>。本文作者曾以中国鲎为材料,观察到铁蛋白在内质网膜囊沉积形成卵黄粒的过程<sup>[6]</sup>。

粗糙型的内质网除了参与卵黄粒的形成外,也参与脂肪粒的形成。图版 IV:22 示一堆环状粗糙型内质网中间部分,几个脂肪粒正在形成(箭头和 L 所示)。

### 4. 溶酶体参与卵黄粒形成是长毛对虾卵黄发生的一大特点

长毛对虾卵母细胞卵质中一个显著的特点是,溶酶体数量多(图版 III:14-Ly)。在

卵黄发生期间,这些溶酶体也参与卵黄粒形成。起初,卵质中的溶酶体吞噬多种细胞组分,形成许多髓样结构(图版 III: 15,16-Ly)。图版 III: 15 示一个溶酶体正在吞噬线粒体,形成髓样结构。这些髓样结构中的许多膜性成分逐渐为溶酶体内的水解酶消化为细小颗粒,电子密度不断增大(图版 III:17-Ly),随后演变为卵黄粒(图版 III: 18,19-Y)。图版 III: 18 示一个由溶酶体演变形成的卵黄粒,其中留有一团电子密度很高的膜性成分尚未被完全消化(空心箭头),而其他部分已呈均匀细颗粒状分布。

卵黄粒这种形成方式较少见到报道。Busson-Mabillot 曾利用带阴离子的铁蛋白注射入鲑鱼的卵母细胞,观察到铁蛋白在溶酶体沉积形成卵黄粒的过程,为卵黄粒这种形成方式提供有力的证据<sup>[10]</sup>。

### 5. 卵黄粒直接在卵质中形成

以上提及的卵黄粒都是在由膜性结构提供的容器中形成的。在长毛对虾的卵母细胞中,还有一种卵黄粒,它是直接由卵质中卵黄蛋白浓缩聚集形成的(图版 III: 20,21)。卵黄发生的卵母细胞卵质中,游离的核糖体极为丰富(图版 III: 20,21-R),卵质呈强的嗜碱性。核糖体是合成蛋白质的场所,当卵质的卵黄蛋白达到一定的浓度,这些卵黄蛋白就在卵质中沉积,形成电子密度很高的细颗粒(图版 III:20 箭头)。这些浓缩的蛋白质细颗粒互相聚集在一起形成较大的卵黄蛋白小球(图版 III:20 空心箭头)。这些蛋白小球再进一步汇聚为更大的圆球状的卵黄粒(图版 III:21-Y)。这种方式形成的卵黄粒外无膜囊包裹,这是与其他方式形成的卵黄粒显著不同之处。长毛对虾卵母细胞卵黄粒的形成,除了上述几种方式,还与卵母细胞一种特有的细胞器——环形片层的结构有关<sup>[8]</sup>。卵黄发生后期,除了卵母细胞的皮质外周和粘液泡部位之外,卵质的其余部分,多为卵黄粒和脂肪粒所充满(图版 IV:23-Y,-L)。卵黄粒和脂肪粒之间除了尚存留一些线粒体之外,很少看到其他有代谢活性的细胞组分(图版 IV: 23-M)。卵黄粒在核周围的分布密度要比卵外围部分大(图版 I:1-Y)。图版 IV:24 示卵质中的卵黄粒(Y)要比粘液泡(MV)周围的卵黄粒(箭头所指)粗大。卵黄粒的直径约为 1—3 $\mu\text{m}$ 。

### 6. 滤泡细胞与卵黄发生的关系

卵黄粒的形成和积累是卵母细胞最重要、有特色的代谢活动,也是与精母细胞最大的区别之一。卵黄发生期间,在短期内,卵质形成积累大量的卵黄粒、脂肪粒等营养物质。所需要的原料一是依靠卵母细胞本身合成,另一个是细胞外的来源<sup>[9]</sup>。卵母细胞卵质中大量核糖体是合成卵黄蛋白的场所,也是卵黄蛋白一个重要的细胞内来源。另外,长毛对虾卵子的形成属滤泡型:卵母细胞外围有一层发达的滤泡细胞(图版 IV: 25-FC)。卵黄发生期间,滤泡细胞有十分发达的粗糙型内质网(图版 IV:25-RER),说明它是一种合成和分泌作用十分旺盛的细胞。而在卵黄发生后期,滤泡细胞退化萎缩为一薄层,紧贴在卵母细胞外周成为一层滤泡膜<sup>[9]</sup>。这就提示,卵黄发生期间,卵黄蛋白的细胞外来源是依靠滤泡细胞提供的。

综上所述,长毛对虾卵黄粒的形成的途径及各细胞器之间的关系可用图 1 表示。

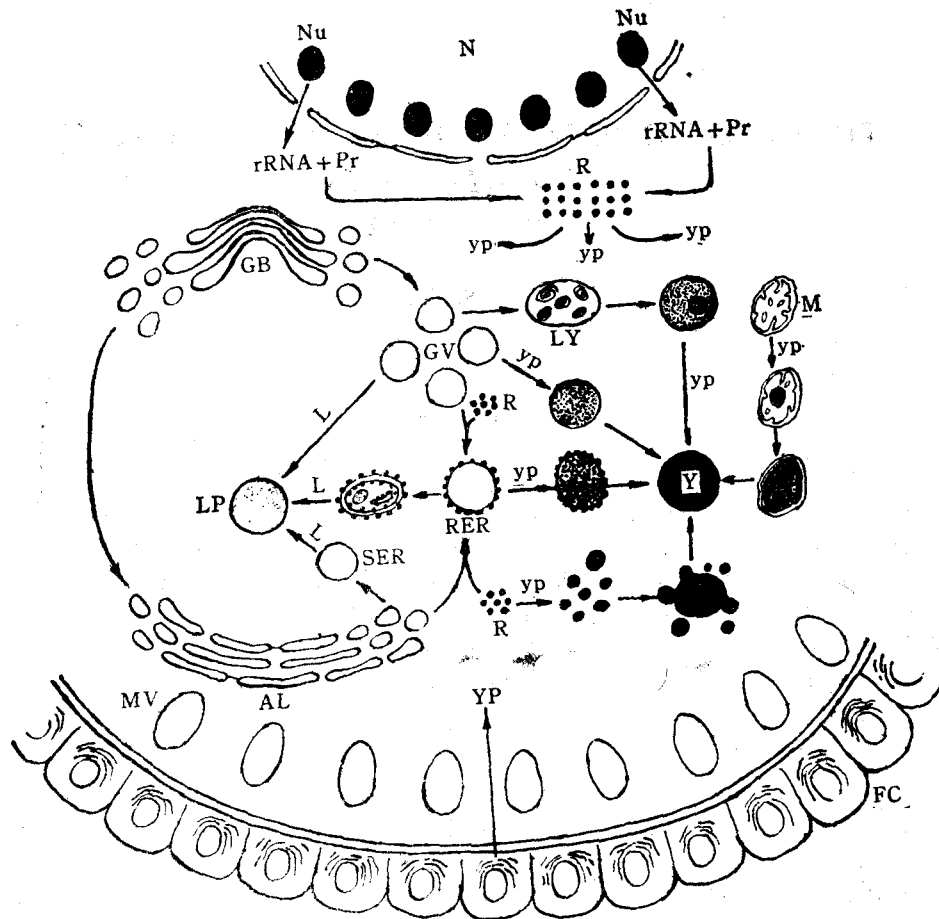


图1 长毛对虾卵黄粒形成的途径及几种细胞器之间相互关系

Fig. 1 Schematic drawing of ways that yolk granules form and relationship between its several organelles in prawn *Penaeus penicillatus*.

AL 为环形片层; LP 为脂肪粒; Nu 为核仁; P<sub>r</sub> 为核糖体蛋白质; rRNA 为核糖体 RNA; SER 为平滑型内质网; YP(yp) 为卵黄蛋白。其他符号同图版 I—IV。

### 参 考 文 献

- [1] 王德海等, 1987, 厦门文昌鱼卵母细胞细胞器与卵黄发生关系的初步研究, 厦门大学学报(自然科学版), 26(5): 615—619.
- [2] 汪德耀等, 1988, 普通细胞生物学, 上海科学技术出版社, 133—178.
- [3] 林加涵等, 1983, 僧帽牡蛎卵母细胞卵黄发生的超微结构研究, 厦门大学学报(自然科学版), 22(3): 356—363.
- [4] 洪水根等, 1987, 蟹的卵黄发生, 海洋与湖沼, 18(3): 286—290.
- [5] 洪水根等, 1988, 长毛对虾卵子发生的研究 I. 卵子发生过程, 海洋与湖沼, 19(4): 301—306.
- [6] 洪水根等, 1989, 中国鲎卵黄粒形成铁蛋白标记的研究, 中国细胞生物学学会第四次会议论文摘要汇编, 中国细胞生物学学会, 72.
- [7] 洪水根等, 1990, 长毛对虾卵子发生的细胞化学研究, 海洋学报, 12(2): 231—235.
- [8] 洪水根等, 1991, 长毛对虾卵母细胞环形片层的研究, 厦门大学学报(自然科学版), 30(1): 84—85.
- [9] 瑞温, C.(李汝祺等译), 1965, 卵子发生, 科学出版社, 91—108.
- [10] Busson-Mabillot, S., 1984, Endosome transfer yolk proteins to lysosomes in the vitellogenic oocyte of the trout, *Biol. Cell*, 51: 53—66.

- [11] Favard, P. et al., 1958, Origine et ultrastructure de plaquettes vitellines de la planorbe, *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, **47**: 211.

## STUDIES ON OOGENESIS IN PRAWN *PENAEUS* *PENICILLIATUS* II. VITELLOGENESIS

Hóng Shuigen

(Laboratory of Cell Biology, Xiamen University, 361005)

### ABSTRACT

Vitellogenesis in *P. penicillatus* was investigated by using Xiamen sea area female prawn *P. penicillatus* as experimental, with light and electron microscope and cytochemical methods, the results show that yolk granules first appear in ooplasm at the nucleus periphery of the vitellogenic oocyte and that yolk granules are formed through several ways:

1. Mitochondria are the organelles that are the first involved in the formation of yolk granules. By the vitellogenic stage, the number of mitochondria in ooplasm of the oocytes has increased greatly. First, the mitochondrial cristae become shorter and fewer in some mitochondria, then protein precipitates high in electron density emerge in the mitochondrial matrix, finally, all the mitochondria are developed into yolk granules.

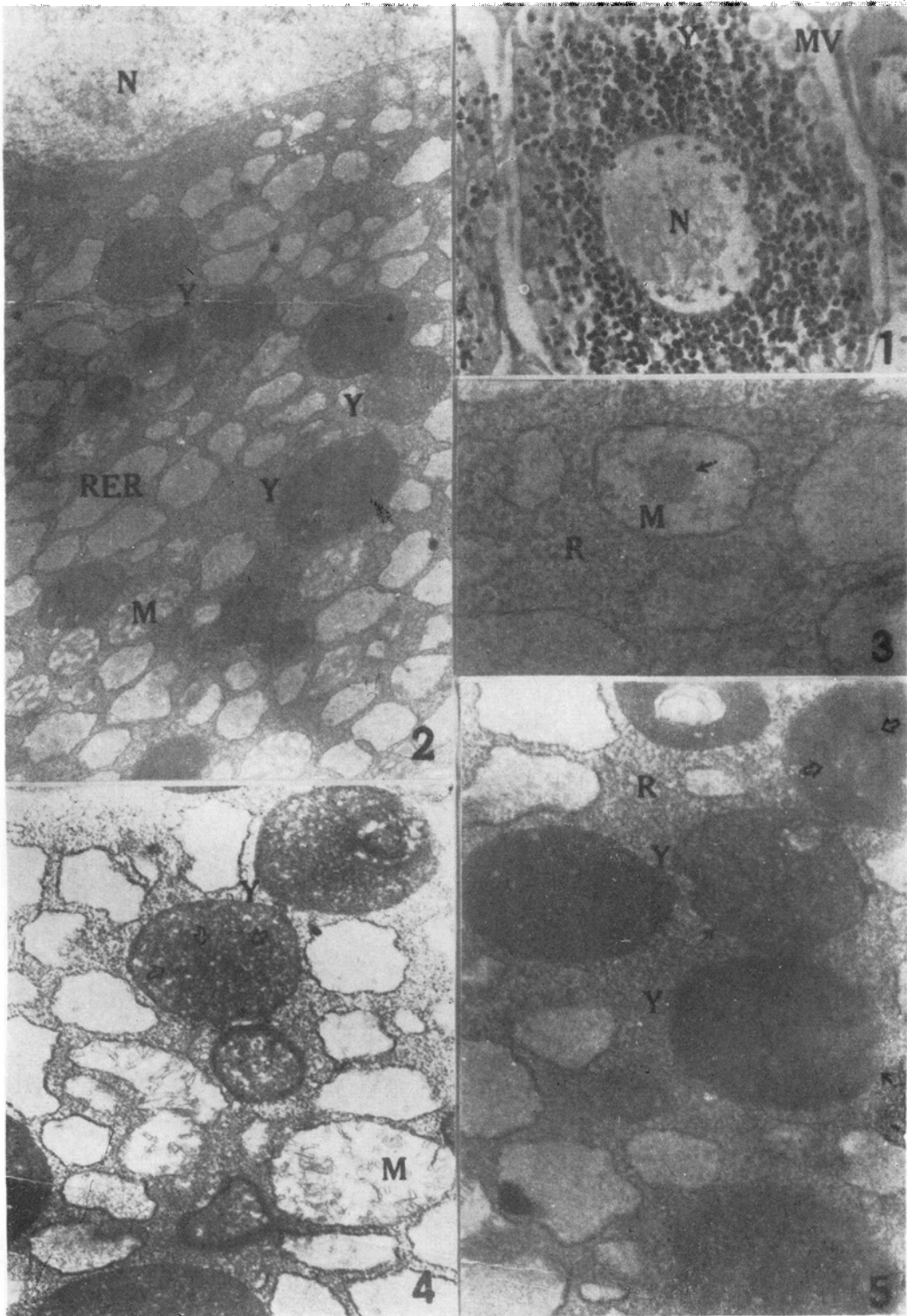
2. Golgi vacuoles are the main elements involved in the formation of yolk granules. Some of the Golgi vacuoles are involved in the formation of yolk granules, others in the formation of lipid granules.

3. Vesicles of endoplasmic reticulum (ER) are also major organelles involved in the formation of yolk granules.

4. A main characteristic of vitellogenesis in *P. penicillatus* lysosomes can also be involved in the formation of yolk granules.

5. Yolk granules can be formed directly in ooplasm of vitellogenic oocytes.

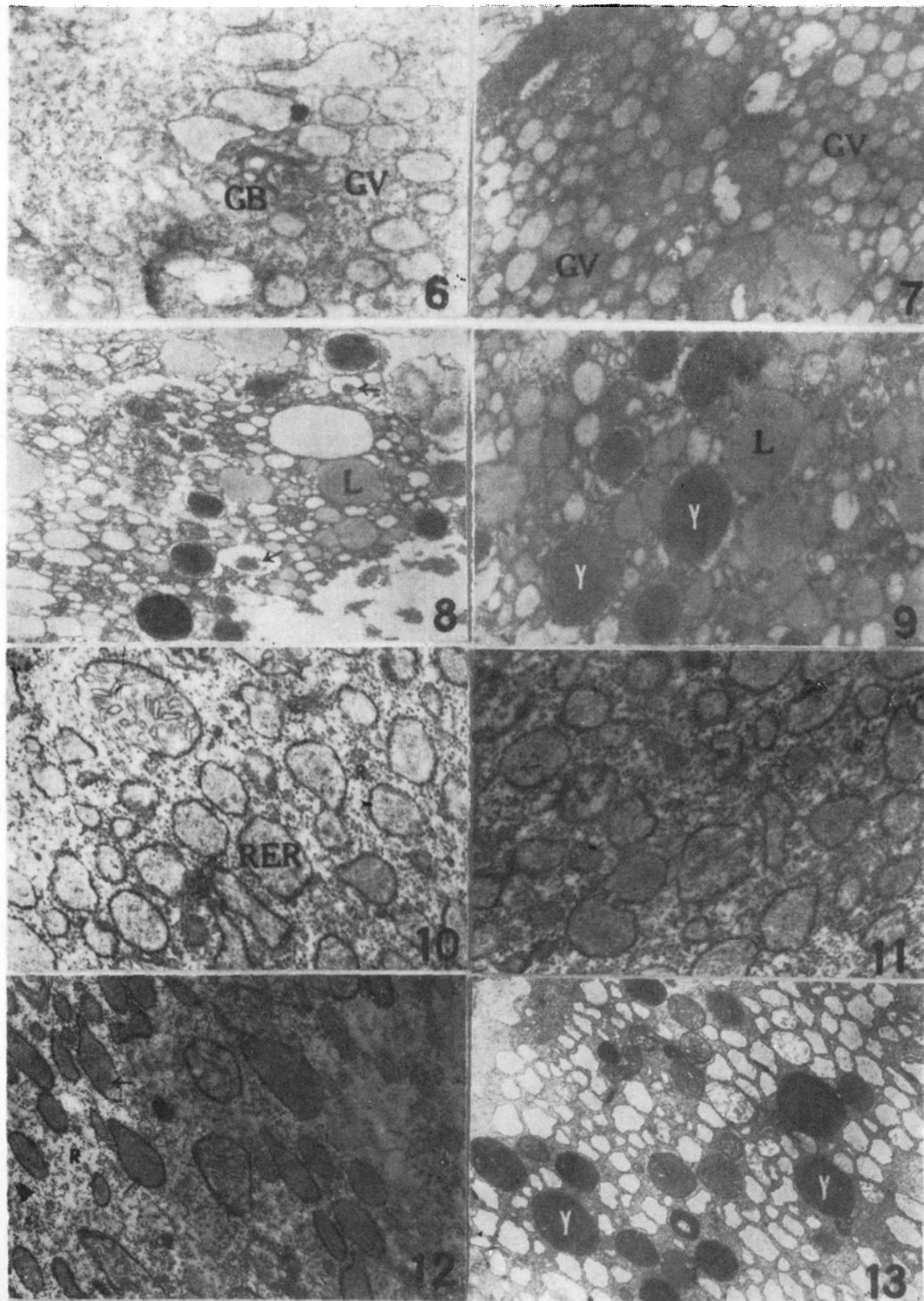
**Key words** Prawn *Penaeus penicillatus*, Vitellogenesis, Yolk granules.



线粒体参与卵黄粒形成的过程

The processes wherein mitochondria are involved in the formation of yolk granules

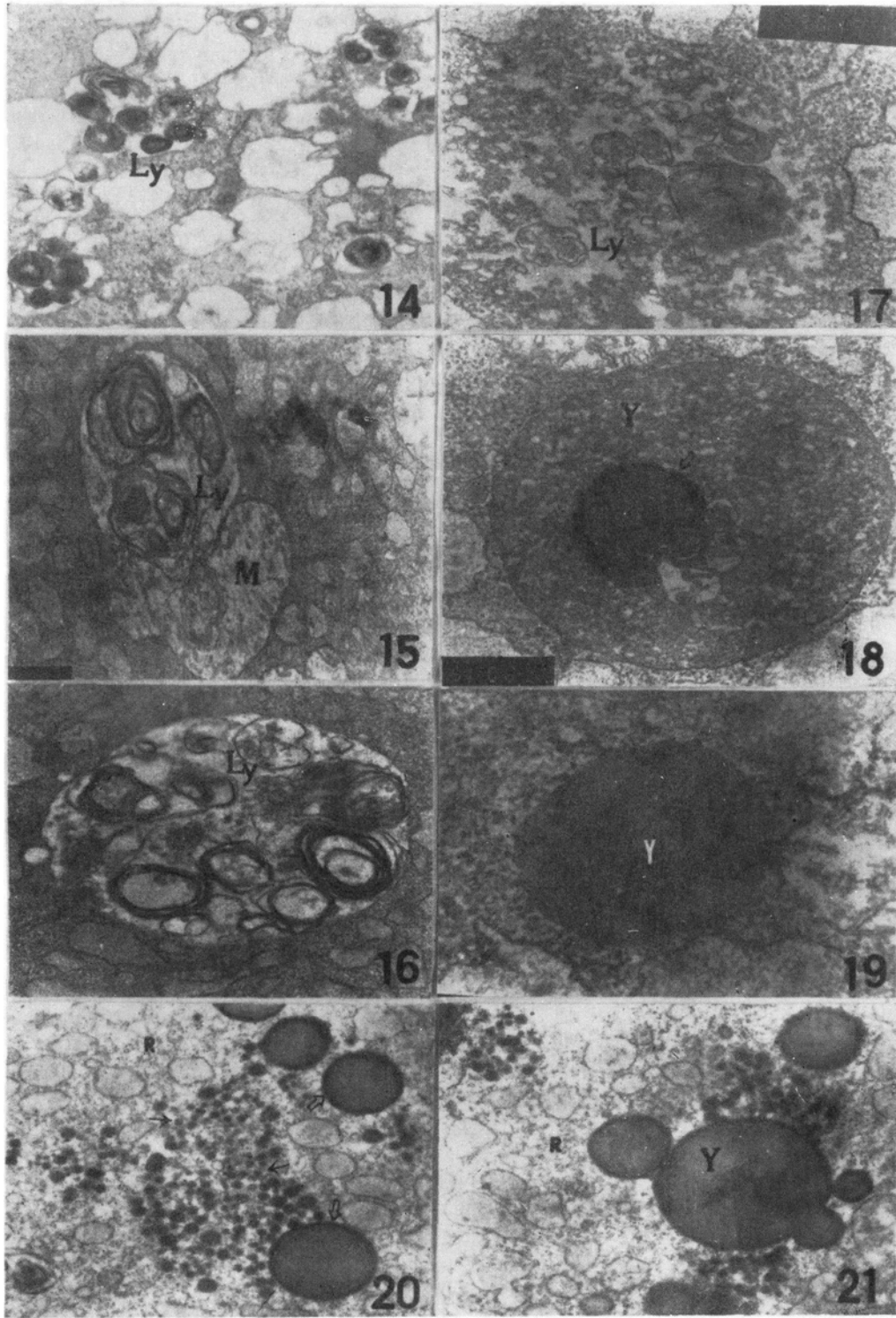
1. 卵黄发生后期卵母细胞的光镜照片(汞-溴酚蓝染色): N为细胞核, MV为粘液泡,  $\times 450$ 。2, 3, 4, 5. 各为卵黄发生的卵母细胞的一部分: 2. 示卵黄粒最先在细胞核外围的卵质中出现, 其中M为线粒体, RER为粗糙型内质网, Y为卵黄粒,  $\times 11520$ ; 3, 4, 5. 示卵黄蛋白在线粒体中沉积和形成卵黄粒的过程, 3.  $\times 46400$ , 4.  $\times 22400$ ; 5.  $\times 30400$ 。



高尔基液泡及粗糙型内质网参与卵黄粒形成的过程

The processes wherein Golgi vacuoles and RER are involved in the formation of yolk granules

6,7,8,9. 示由高尔基体形成高尔基液泡及卵黄蛋白在高尔基液泡沉积形成卵黄粒的过程: GB 为高尔基体, GV 为高尔基液泡, L 为脂肪粒; 6.  $\times 19000$ , 7.  $\times 10000$ , 8.  $\times 10000$ , 9.  $\times 19000$ . 10, 11, 12, 13. 示由粗糙型内质网形成卵黄粒的过程: R 为核糖体; 10.  $\times 19000$ , 11.  $\times 19000$ , 12.  $\times 14000$ , 13.  $\times 19000$ .

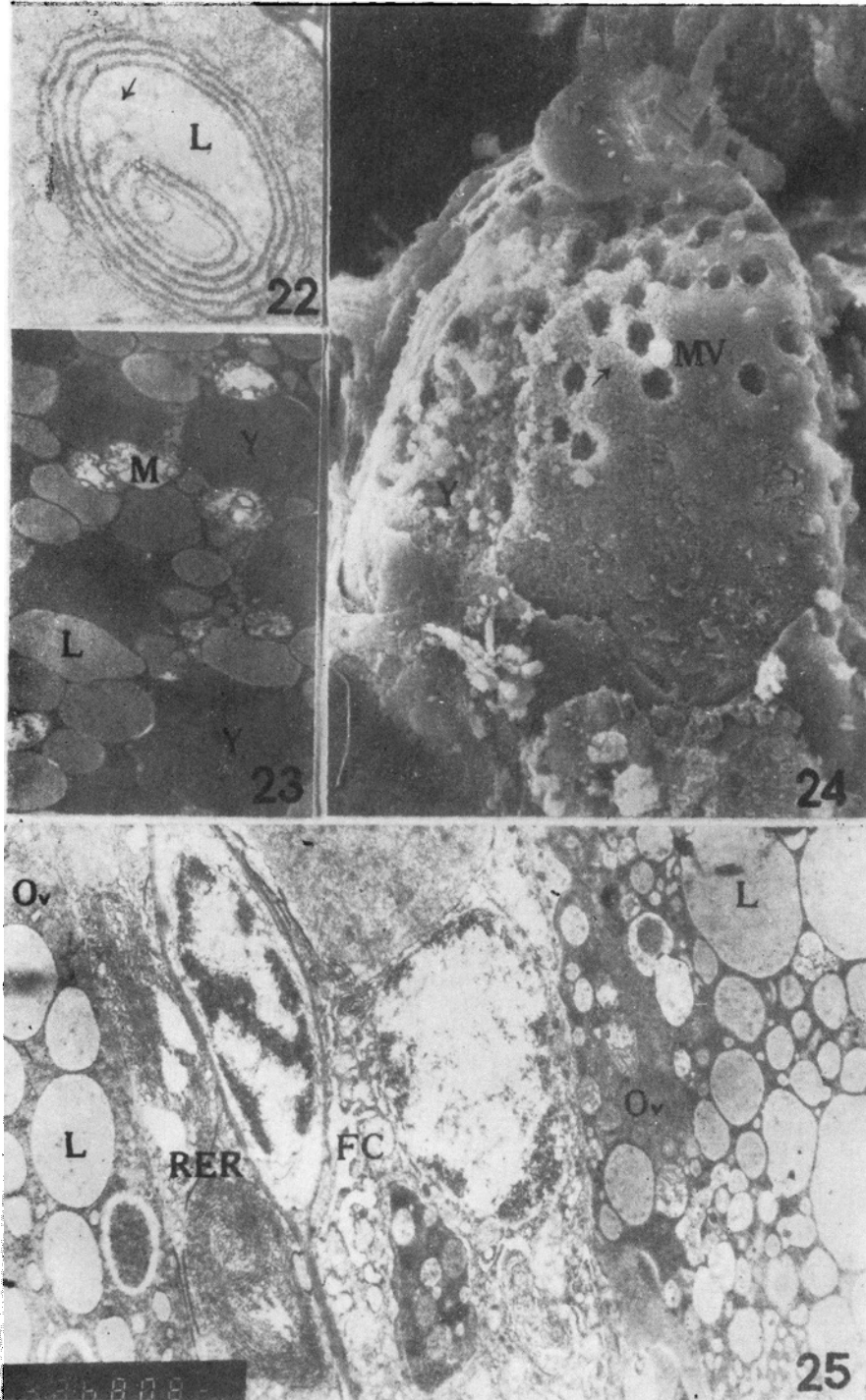


溶酶体及核糖体参与卵黄粒形成的过程

The processes wherein lysosomes and ribosomes are involved in the formation of yolk granules

14,15,16,17,18,19. 示由溶酶体演变成卵黄粒的过程: Ly 为溶酶体; 14.  $\times 11000$ , 15.  $\times 14000$ , 16.  $\times 19000$ , 17.  $\times 29000$ , 18.  $\times 29000$ , 19.  $\times 48000$ . 20,21. 示卵黄粒直接在卵质中形成的过程; 20.  $\times 14000$ , 21.  $\times 14000$ .





其他有关电镜照片说明

Other electron micrographs

22. 示脂肪粒正在一堆环状粗糙型内质网中间形成,  $\times 14000$ 。23. 示卵黄发生后期, 卵质中大部分为卵黄粒和脂肪粒所充满, 其间还存留有线粒体;  $\times 4800$ 。24. 去掉卵外膜的卵子扫描电镜照片, 卵上半部的凹陷为粘液泡脱落后留下的痕迹; MV 为粘液泡;  $\times 800$ 。25. 示两个卵黄发生的卵母细胞外的滤泡细胞, 其中可见滤泡细胞质中发达的粗糙型内质网; FC 为滤泡细胞; Ov 为卵黄发生的卵母细胞;  $\times 7700$ 。符号意义全文同。