

3 种鲈形目鱼类精子发生早期的超微结构研究*

石 戈 刘雪珠 王健鑫 王日昕

(浙江海洋学院海洋科学学院 舟山 316004)

提要 采用透射电镜技术,研究了 3 种鲈形目鱼类褐菖鲈 *Sebastiscus marmoratus*、黑鲷 *Sparus macrocephalus* 及平鲷 *Rhabdosargus sarba* (Forsk.) 精子发生早期精原细胞、初级精母细胞及次级精母细胞的超显微结构变化。结果表明,3 种鱼生精细胞形态结构及代谢活动变化主要体现在核的变化、线粒体数目与结构的变化及高尔基体和溶酶体的行为变化。3 种鱼核的变化基本一致:细胞核由近圆形或椭圆形转变为多角形;核质逐渐浓缩;核仁从明显结构至完全消失。褐菖鲈精原细胞时期线粒体分布较多,并出现拟染色质与线粒体相粘附;而平鲷与黑鲷精原细胞时期的线粒体分布较少,无拟染色质。3 种鱼高尔基体与溶酶体的变化也有相似性。黑鲷的初级精母细胞中还观察到典型的环层状的髓样小体的结构。

关键词 褐菖鲈,黑鲷,平鲷,生精细胞,超微结构

中图分类号 Q954

从 20 世纪 50 年代开始,电镜技术不断推广,同时辅以生化技术与分子生物学技术,使鱼类生殖生物学的研究跃上了一个新的台阶。近几年来,有关雄性硬骨鱼类生殖生物学的研究主要涉及以下内容:精巢发育及周期研究(江寰新等,2004);精子发生的一般过程(尤永隆等,2001);精子结构各部分的来源及其演变和在精子发生过程中的作用(尤永隆等,2001);有关硬骨鱼类精细胞及精子的超微结构的报道已有不少,但从精原细胞到次级精母细胞这一过程的结构变化研究甚少或粗略(林丹军等,1998;刘雪珠等,2004)。本文中作者采用透射电镜技术(TEM),结合已有的研究成果,研究了 3 种鱼类精子发生过程中精原细胞、初级精母细胞及次级精母细胞的结构特征变化,旨在丰富硬骨鱼类的生殖生物学基础理论,同时也为今后深入系统地研究硬骨鱼类精子发生提供细胞生物学基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选用 3 种鱼类,即褐菖 鲈 *Sebastiscus*

marmoratus、黑鲷 *Sparus macrocephalus* 及平鲷 *Rhabdosargus sarba* (Forsk.)。三者都是经济价值较高的鲈形目(Perciformes)硬骨鱼,前者属于杜父鱼亚目(Cottoidei)、科(Scorpaenidae)、菖属(*Sebastiscus*);后两者属鲈形亚目(Percoidei)、鲷科(Sparidae),其中黑鲷属于鲷属(*Sparus*),平鲷属于平鲷属(*Rhabdosargus*)。褐菖 和平鲷采自定海海鲜品市场,黑鲷采自宁波奉化海水养殖场。每次采得材料后,即刻带回实验室,活体解剖用。褐菖 体长 9—12cm,体重 105—178g;平鲷体长 17—20cm,体重 215—245g;黑鲷体长 15—18cm,体重 197—230g。

1.2 方 法

将采得的材料迅速剖开腹部取出整个精巢,滴加 pH 为 7.4 的磷酸缓冲液,分前、中、后切取小块组织。取得的组织块置入安培瓶中用 2.5% 戊二醛(4)固定过夜,翌日转入 1% 钨酸后固定 2h(戊二醛钨酸均用 0.1mol/L、pH 为 7.4 的缓冲液配制),然后用乙醇梯度脱水(30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% × 3),Epon812 环氧树脂渗

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目资助,2003AA623020 号;浙江省重大科技专项重点项目资助,2006C12010 号;浙江省科技厅项目资助,2004c26046 号。石 戈,副教授,E-mail: shige2046312@163.com

通讯作者:王日昕,教授,E-mail: wangrixin@163.com

收稿日期:2005-04-08,收修改稿日期:2005-09-12

透并包埋, LKB- 型超薄切片机切片(切片厚度为 300—500Å), 醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, H-600A 透射电镜(TEM)观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 精原细胞

褐菖 细胞整体略显狭长、而平鲷和黑鲷的精原细胞在形态结构特征上有一定的相似性, 细胞均为卵圆形。三者的细胞核都较大(褐菖 一般细胞长径为 12 μm , 短径为 6—7 μm , 核长径约为 5 μm , 短径约为 2—3 μm ; 平鲷细胞一般长径约为 10 μm , 短径约为 8 μm , 核长径约为 6.5 μm , 短径约为 6 μm ; 黑鲷的核长径约为 5 μm , 短径约为 2 μm), 核仁明显, 三者都位于靠近核膜侧, 核质为分散的匀质, 核膜明显, 内、外层核膜之间的间隙较小(图 1b、c、e); 褐菖 细胞质近核处具拟染色质, 其线粒体与拟染色质相粘附, 表现为 B 型生精细胞(SGB)的特征(图 1a), 黑鲷和平鲷精原细胞中不明显, 为 A 型生精细胞(SGA)。拟染色质是性细胞特有的细胞器, 在精原细胞中数量最多, 体积最大。黑鲷精原细胞的胞质中有丰富的核糖体颗粒分布, 且可清晰见到粗面内质网(图 1c), 而在褐菖 和平鲷中不明显。褐菖 的精原细胞中线粒体分布较多且呈内嵴稀少的囊泡

状(图 1a), 平鲷和黑鲷精原细胞核膜与质膜之间的胞质中也分布着线粒体, 但量较少且没有明显的囊泡状结构(图 1c、e)。黑鲷精原细胞后期阶段, 核内出现部分块状染色质, 且在紧贴核膜内侧出现一环带状染色质(图 1d), 线粒体数明显增高, 在核外周出现若干空泡结构。说明精原细胞后期阶段细胞的代谢活动明显增加。

2.2 初级精母细胞

褐菖 初级精母细胞细胞核形状为近圆形, 染色质以颗粒状或团块状附在核膜内缘以及不均匀地分布于核质中, 核仁由明显转变为不明显至消失。胞质中可见有滑面内质网和大量的单层膜包围的溶酶体, 溶酶体体积较大, 电子密度高, 内容物丰富(图 2a)。拟染色质消失, 线粒体基质密度增高, 内嵴增多。

黑鲷和平鲷初级精母细胞核由精原细胞时期的卵圆形转变为不规则的多角形, 核仁消失; 核内染色质大部分聚集成块状, 小部分染色质仍以颗粒状形式存在, 紧帖核内膜有一圈染色质分布(图 2b、d、g)。胞质中, 可观察到线粒体、滑面内质网和粗面内质网等细胞器, 核糖体颗粒较多。线粒体数量比精原细胞时期明显增多, 内部基质密度增加, 内嵴明显比精原细胞时期丰富

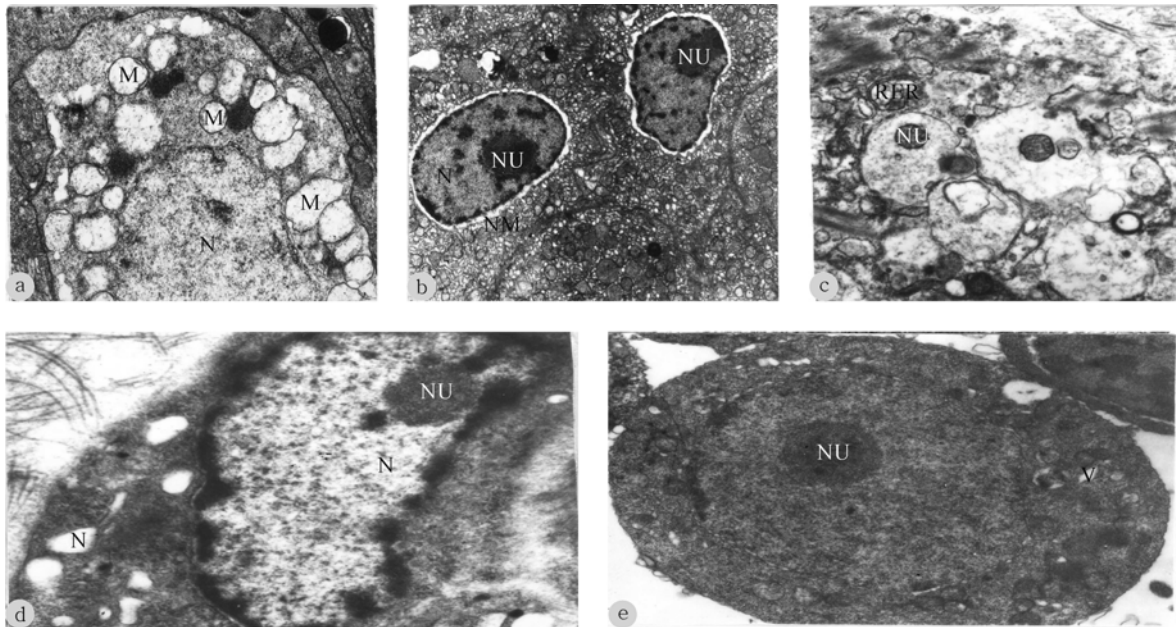


图 1 3种鲈形目鱼类精原细胞的超显微结构

Fig. 1 The ultrastructure of spermatogonia in three Perciformes

a. 褐菖 精原细胞, 示胞质中拟染色质与线粒体相连(10000 \times); b. 褐菖 精原细胞, 示核膜囊泡化, 核内核仁明显, 染色质颗粒状分布(10000 \times); c. 黑鲷精原细胞, 示核内核仁明显, 胞质中粗面内质网(7500 \times); d. 黑鲷精原细胞, 示近核膜侧染色质呈带状分布, 胞质中有空泡(10000 \times); e. 平鲷精原细胞, 示核仁(6000 \times). M: 线粒体; V: 空泡; N: 细胞核; CB: 拟染色质; NU: 核仁; RER: 粗面内质网; NM: 核膜

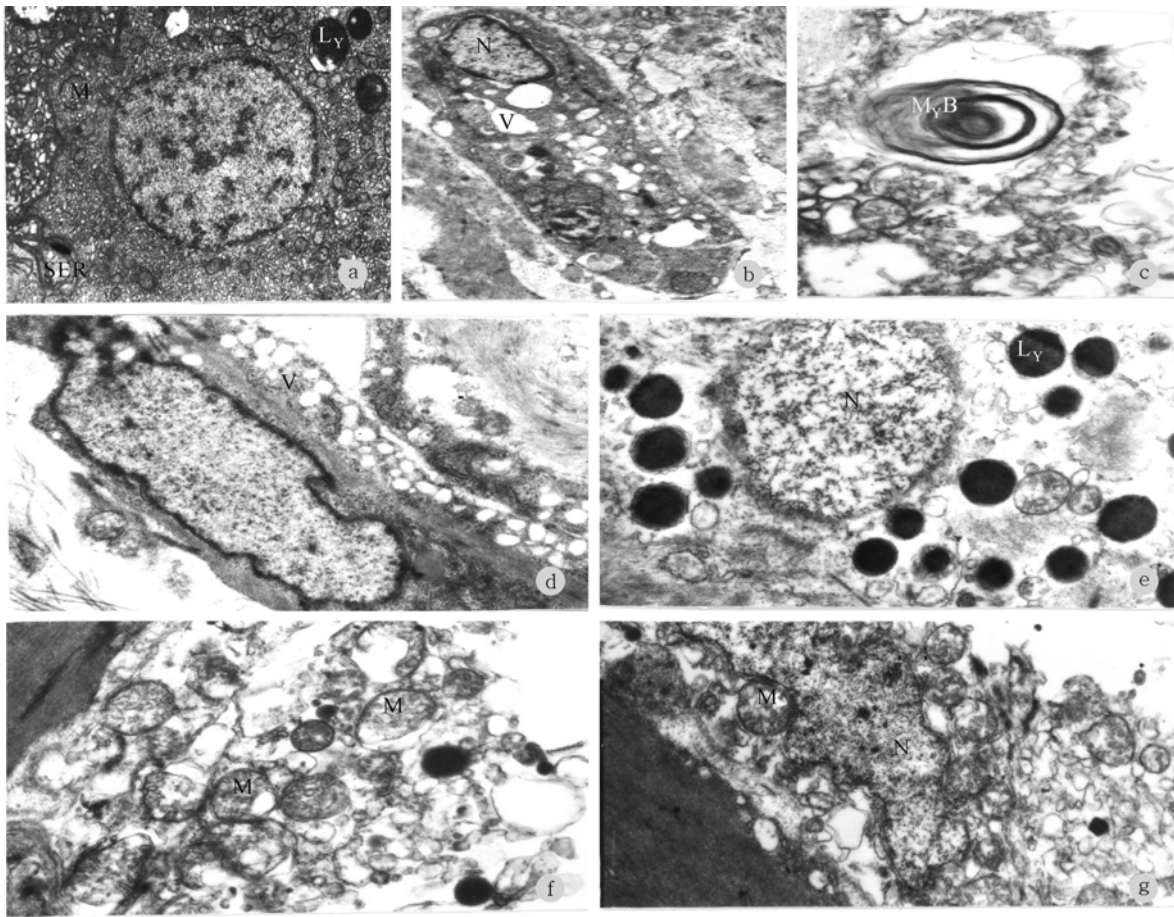


图 2 3 种鲈形目鱼类初级精母细胞的超显微结构

Fig. 2 The ultrastructure of primary spermatocyte in three Perciformes

a. 褐菖 初级精母细胞, 示核内染色质块状分布, 胞质中滑面内质网, 溶有酶体(6000 \times); b. 黑鲷初级精母细胞, 示核内染色质沿核膜内侧分布, 胞质中囊泡(5000 \times); c. 黑鲷初级精母细胞, 示胞质中髓样小体; d. 平鲷初级精母细胞, 示核及胞质中囊泡丰富(7500 \times); e. 黑鲷初级精母细胞, 示胞质中溶酶体丰富(7500 \times); f. 平鲷初级精母细胞, 示胞质中线粒体丰富(10500 \times); g. 黑鲷初级精细胞, 示核形不规则, 核内染色质颗粒状分布, 胞质中线粒体多且内嵴丰富(7500 \times)。M: 线粒体; V: 空泡; L_Y: 溶酶体; N: 细胞核; SER: 滑面内质网; M_YB: 髓样小体

(图 2f、g); 细胞质中存在较多的透明的空泡, 可能是高尔基体分泌的囊泡(图 2b、d)。溶酶体密度较高, 内容物丰富(图 2d、e); 黑鲷胞质中还可见典型的髓样小体(myelinoid body)结构, 这是自噬小体(autophagosome)中的物质(如线粒体、内质网等)消化不掉的部分被保留在溶酶体内形成的环层状的残余小体(residual body)的形状(图 2c)。

2.3 次级精母细胞

褐菖 次级精母细胞核体形状还是不甚规则, 胞核呈多角形, 位于胞质一端, 核内染色质浓缩聚集成大小不同的块状结构, 分布于核的中央及核膜内侧(图 3a)。胞质中线粒体分布丰富, 体积较大, 内容物丰富。胞质中溶酶体的活动最为旺盛, 可见有次级溶酶体正在吞噬线粒体及细胞质基质, 形成大量的包裹溶酶体(wrapping lysome); 在胞质中还见有圆形的致密体。胞质中

的部分溶酶体可能通过吞噬作用积累内含物, 然后通过迁移等参与精子的形成。

胞质中可见有滑面内质网和核糖体分布, 但未见有典型的高尔基体结构, 高尔基体分泌的电子密度透明的空泡仍有较多分布。

黑鲷和平鲷次级精母细胞胞核亦呈多角形; 核内染色质浓缩聚集成大块。胞质中的线粒体数量较少但体积较大, 内容物也较丰富(图 3b、c)。黑鲷溶酶体活动旺盛, 可见正在进行吞噬活动的次级溶酶体和囊状溶酶体; 高尔基体形态结构典型, 位于近核处, 由 3—4 层扁平的膜囊构成, 膜囊形状呈弓形, 膜囊两端的泡状突起明显可见, 并在凸面(顺面, cisface)和凹面(反面, transface)可见有囊泡, 凸面的囊泡较大, 是分泌泡, 其内含物将来形成溶酶体以及细胞内其它结构(图 3b)。

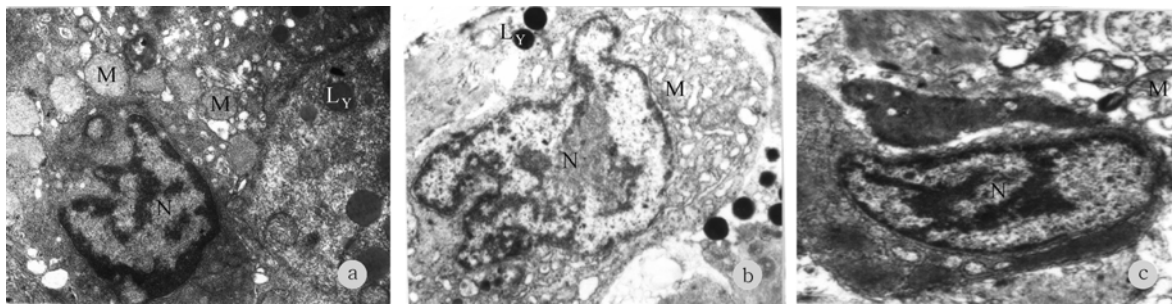


图3 3种鲈形目鱼类次级精母细胞的超显微结构

Fig. 3 The ultrastructure of secondary spermatocyte in three Perciformes

a. 褐菖 次级精母细胞, 示细胞核不规则, 核内染色质团块状分布, 胞质中线粒体及溶酶体(15000 \times); b. 黑鲷次级精母细胞, 示细胞核不规则, 核内染色质团块状; 胞质中高尔基体, 线粒体及溶酶体(7500 \times); c. 平鲷次级精母细胞, 示细胞核, 核周隙明显, 核内染色质团块状分布(7500 \times)。M: 线粒体; Ly: 溶酶体; N: 细胞核; G: 高尔基体

3 讨论

核的变化与生精细胞的发育时期及生理活动有关, 本研究结果表明 3 种鱼类核的变化具有很大的一致性。平鲷、黑鲷及褐菖 的精母细胞核由近圆形或椭圆形转变为多角形; 精原细胞中核质为分散的匀质, 转变为初级精母细胞后核内染色质的浓缩程度明显增加, 主要集中分布于核中央和核膜内侧; 核仁从精原细胞期的明显结构转变为初级精母细胞后期的弥散状直至次级精母细胞期完全消失。精母细胞早期阶段, 内外膜之间的核周隙较小, 随着细胞的发育, 核膜囊泡化在初级精母细胞和次级精母细胞阶段显著, 核孔复合物增多。说明此时期核内各种 RNA 和核糖体通过核孔进入细胞质中, 以保证细胞大量合成各类蛋白质所需原料的供应。

生精细胞发育时期, 除核形变化在 3 种鱼类中出现一致性外, 高尔基体与溶酶体的变化也有相似的变化。在褐菖 精原细胞、初级精母细胞时期可见有少量大的分泌泡, 在次级精母细胞的细胞质中则有许多大小不同的电子密度透明的囊泡, 可以认为这些囊泡来自高尔基体的分泌活动。在黑鲷和平鲷初级精母细胞和次级精母细胞时期都可看到大量的大小不同的透明的囊泡; 黑鲷次级精母细胞中见到典型的高尔基体基本结构。3 种鱼类的精母细胞胞质中, 溶酶体以囊泡状或致密体的形式存在, 黑鲷的初级精母细胞中存在大量的致密体, 还观察到典型的环层状的髓样小体的结构。许多动物精子发生与高尔基体及溶酶体的行为有关(Browler, 1984; Hermo *et al*, 1980; Tang *et al*, 1982; 黄勃等, 2006), 这两种细胞器在鱼类精子形成过程中起到何种作用, 尚待

进一步深入探讨。

线粒体的数目与行为变化与细胞的机能状态有关。本研究的电镜观察表明: 褐菖 精原细胞时期线粒体分布较多, 但其内嵴稀少, 呈囊泡状, 并出现拟染色质与线粒体相粘附。而平鲷与黑鲷精原细胞时期的线粒体在胞质中的分布分散且数目较少, 无拟染色质。到初级精母细胞时期 3 种鱼类的线粒体都出现内嵴增加、基质中电子密度增高的变化。线粒体是细胞生命活动的供能者, 初级精母细胞时期线粒体数目的增加、内嵴增多及分布位置的改变与细胞的进一步分化有关, 从这一时期起, 细胞生命活动越来越旺盛, 对能量的需求急剧上升。但到次级精母细胞时期平鲷与黑鲷线粒体数目明显减少, 线粒体融合现象明显; 褐菖 线粒体数目没有显著减少的现象。在最终精子结构中, 褐菖 的线粒体数要多于平鲷和黑鲷(刘雪珠等, 2004)。褐菖 是一种卵胎生、体内受精类型的鱼类; 平鲷和黑鲷都为卵生、体外受精类型。一般认为体内受精鱼类精子的线粒体比较多(Gardiner, 1978)。生精细胞中线粒体的变化是否与鱼类受精类型有关, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 尤永隆, 林丹军, 1997. 大黄鱼精子的超微结构. 动物学报, 43(2): 119—126
 尤永隆, 林丹军, 陈莲云, 2001. 大黄鱼的精子发生. 动物学研究, 22(6): 461—466
 刘雪珠, 杨万喜, 2004. 平鲷精子的超显微结构. 东海海洋, 22(1): 43—48
 江寰新, 尤永隆, 林丹军等, 2004. 中华乌塘鳢鱼精巢的形态结构观察. 福建农林大学学报, 33(1): 89—93
 林丹军, 尤永隆, 1998. 褐菖 精细胞晚期的变化及精子结构研究. 动物学研究, 19(5): 359—366

- 黄 勃, 邓中日, 向 东等, 2006. 我国海域耳鲍(*Haliotis asinina*)精子发生的超微结构研究. 海洋与湖沼, 37(5):401—405
- Browler L W, 1984. Development Biology. USA: CBS College Publishing, 217—419
- Gardiner D M, 1978. Fine structure of the spermatozoon of the viviparous teleost, *Cymatogaster aggregata*. Fish Biol, 13: 435—438
- Hermo L, Rambourg A, Clermont Y, 1980. Three-dimensional architecture of the cortical region of the Golgi apparatus. The American Journal of Anatomy, 157: 357—373
- Tang X M, Lalli M F, Clermont Y, 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. Am J Anat, 163: 283—294

THE ULTRASTRUCTURE OF THREE PERCIFORMES DURING PRIMARY SPERMATOGENESIS

SHI Ge, LIU Xue-Zhu, WANG Jian-Xin, WANG Ri-Xin
(Ocean Science College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

Abstract The ultrastructure of spermatogonias, primary spermatocytes and secondary spermatocyte in *Sebastes marmoratus*, *Sparus macrocephalus* and *Rhabdosargus sarba* (Forskai) was studied in transmission electron microscopy. Difference was shown in nucleus form and the number of mitochondria, and the secretion of Golgi body and morphological differentiation of lysosome were also observed.

The deference in nucleus form depended on developmental and physiological activities. In early spermatogenesis, nuclear structure of three species is very similar. The shape of spermatocytes changed from round or ellipse to polygon. Chromatins concentrated gradually and dispersed in karyotin or inner karothece in spermatocytes stage. Nucleolus shrank, dispersed, and finally disappeared. In spermatocytes stage, nuclei membrane vesiculation was significant and the number of nucleopore complexes increased, which are good for transporting RNA and ribosomes into cytoplasm to ensure material supply for synthesizing proteins.

Some similar features were shown in ultrastructure of organelles of *S. marmoratus*, *S. macrocephalus* and *R. sarba* (Forskai) during primary spermatogenesis. The mitochondria with developed ridges dispersed sharply in spermatocytes stage, and they were small and the cristae were undeveloped in spermatogonia stage. The lysosomes were in shape of vesicle in high electron-density. Chromatoid bodies linking mitochondrins were observed only in the cytoplasm of *S. marmoratus*, and no Golgi body was found in cytoplasm of *S. marmoratus*. Typical Golgi body and myelinoid body were observed in cytoplasm of *S. macrocephalus*.

Key words *Sebastes marmoratus*, *Sparus macrocephalus*, *Rhabdosargus sarba* (Forskai), Spermatogenic cell, Ultrastructure