

# 文昌鱼精子发生的核孔复合体 冷冻蚀刻电镜观察\*

林加涵 林海宁 方永强<sup>†</sup>

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

<sup>†</sup>(国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

**提要** 1994—1996年每年3月、7月在厦门同安琼头海域采集雄性文昌鱼,采用冷冻蚀刻的常规技术,研究文昌鱼精子发生核孔复合体的变化规律。结果表明,在核孔复合体结构中很可能存在着作为运输物质的中央颗粒。各种生殖细胞中的核孔复合体的大小和密度不同,平均值约为:精原细胞( $60 \pm 1.20$ )nm, ( $2.9 \pm 0.04$ )孔/ $\mu\text{m}^2$ ;初级精母细胞( $76 \pm 1.80$ )nm, ( $4.8 \pm 0.05$ )孔/ $\mu\text{m}^2$ ;次级精母细胞( $72 \pm 1.30$ )nm, ( $4.6 \pm 0.03$ )孔/ $\mu\text{m}^2$ ;精细胞( $97 \pm 1.40$ )nm, ( $5.4 \pm 0.06$ )孔/ $\mu\text{m}^2$ 。这与细胞的生理功能有关。核孔复合体的分布具有明显的极性特点,主要集中在靠初级精母细胞的高尔基区一侧和靠精细胞的前顶体一侧的核膜上,表明了细胞核局部的功能差异。

**关键词** 文昌鱼 核孔复合体 冷冻蚀刻

**学科分类号** Q595.287

核孔复合体是核膜最为显著的特征(Watson, 1959),被认为是细胞核和细胞质之间进行物质交换的场所(Callan *et al.*, 1950),有关核孔复合体的研究报道较多(Wischnitzer, 1960; Franke, 1970; Maul, 1977)。核孔复合体的结构模型(Franke, 1970; Roberts *et al.*, 1970)已基本为学术界所公认。以前曾认为核孔复合体的分布是随机的,而Maul(1977)则认为它是出现在特定的位置上。关于哺乳类和鸟类精子发生中的核孔复合体已有许多研究(Werner, 1965; Koehler, 1977; 黄宗平等, 1983; 李月玲等, 1984),但有关头索类动物这方面的研究尚未见报道。林加涵等(1987)曾进行过文昌鱼精子发生过程中的超微结构研究,本文在此基础上,报告文昌鱼精子发生的核孔复合体冷冻蚀刻电镜观察研究结果,以期为进一步研究核孔复合体的变化规律积累资料。

## 1 材料和方法

实验用不同发育阶段的雄性文昌鱼(*Branchiostoma belcheri* Gray)于1994—1996年每年3月和7月采于厦门同安琼头海域。取性腺,按照冷冻蚀刻常规技术(应国华等, 1979)以2.5%戊二醛固定2h后,用缓冲液稍清洗和浸入30%甘油生理盐水中,置于冰箱中12—24h,再取出性腺投入液氮( $-196^\circ\text{C}$ )中迅速冻结,然后在真空度为 $2.67 \times 10^{-3}\text{Pa}$ 、温度为

\* 国家自然科学基金资助项目,39070129号。林加涵,男,出生于1939年4月,教授, Fax: 0086-0592-2086116

收稿日期: 1997-05-14, 收修改稿日期: 1998-09-03

-110℃的条件下,用冷冻蚀刻仪(BAF-400D型, BALZERS 公司)将样品迅速劈过,形成一个人工断面,继续恒冷并用铂和碳电镀制成复型膜,最后再分离、腐蚀和清洗,将复型膜捞取在铜网上,进行透射电子显微镜(JEM-100X型)观察、拍摄。各级生殖细胞各取50个细胞进行测量统计。

## 2 结果

### 2.1 核孔复合体的结构

大部分核膜在冷冻之后很容易被劈成内层和外层,内层上的膜颗粒比外层要密得多(图1: a, c)。文昌鱼精子发生过程中不同分化的细胞核的核孔复合体具有基本相似的结构,但是中央颗粒有时无法观察到,有时则能观察到(图1: d)。

### 2.2 核孔复合体的大小

核孔复合体在核膜外层呈圆形的凹陷,并有明显的界限,因此,能准确地测出其直径大小。通过对各种不同类型细胞进行大量测量后发现,精子发生过程中分化程度不同的细胞,其核孔直径也不同,平均值约为:精原细胞( $60 \pm 1.20$ ) nm(图1: a),初级精母细胞( $76 \pm 1.80$ ) nm(图1: b),次级精母细胞( $72 \pm 1.30$ ) nm(图1: c),精细胞( $97 \pm 1.40$ ) nm(图1: e)。

### 2.3 核孔复合体的密度

在文昌鱼精子发生过程中,随着细胞分化程度的不同,核孔的密度也有变化。经大量测量,各类型细胞的核孔密度平均值为:精原细胞( $2.9 \pm 0.04$ ) 孔/ $\mu\text{m}^2$ ,初级精母细胞( $4.8 \pm 0.05$ ) 孔/ $\mu\text{m}^2$ ,次级精母细胞( $4.6 \pm 0.03$ ) 孔/ $\mu\text{m}^2$ ,精细胞( $5.4 \pm 0.06$ ) 孔/ $\mu\text{m}^2$ 。

### 2.4 核孔复合体的分布

核孔复合体在同一个个体的不同类型细胞中的密度有所区别,在不同的生理状态下也有所不同。在同一个细胞中,核孔的分布并不是均匀一致的。林加涵等(1987)在文昌鱼精子发生过程中的超微结构研究中,已观察到在初级精母细胞的细胞核的顶部上方的细胞质中有一高尔基区,在冷冻蚀刻的细胞核正好靠近这一区的核孔密度比其它部分大得多。在精子形成的过程中,细胞核前方的高尔基区经过一系列复杂的变化形成顶体,最终形成顶体复合体。核孔正好集中在靠前顶体的核膜上,而在其它部分几乎没有(图1: d)。

## 3 分析与讨论

### 3.1 文昌鱼精子发生中核孔复合体的结构特点

文昌鱼精子发生过程中核孔复合体的结构与 Franke(1970)和 Roberts(1970)等分别提出的核孔复合体的结构模型基本一致。但是,本实验的观察结果并不能完全确定中央颗粒存在的可能性,这与 Maul(1977)的研究结果一致。Maul(1977)认为,这些颗粒如果被证明是核质运输中的物质,那么它们就不属于核孔复合体的组成部分了,作者赞同这一看法。核孔直径的大小,使核中的核糖体组成物完全可以通过,本文观察的结果支持这种可能性,正如 Callan 等(1950)所认为的,核孔是核质之间物质交换的场所。

### 3.2 文昌鱼精子发生中核孔复合体的大小和密度变化

Maul(1977)的研究结果表明,采用不同技术研究各种动物的不同组织细胞中核孔复合体的大小,会得出明显不同的结果。本文的研究结果表明,文昌鱼精子发生过程中各种不同分化阶段的细胞,其核孔的大小也是不同的。

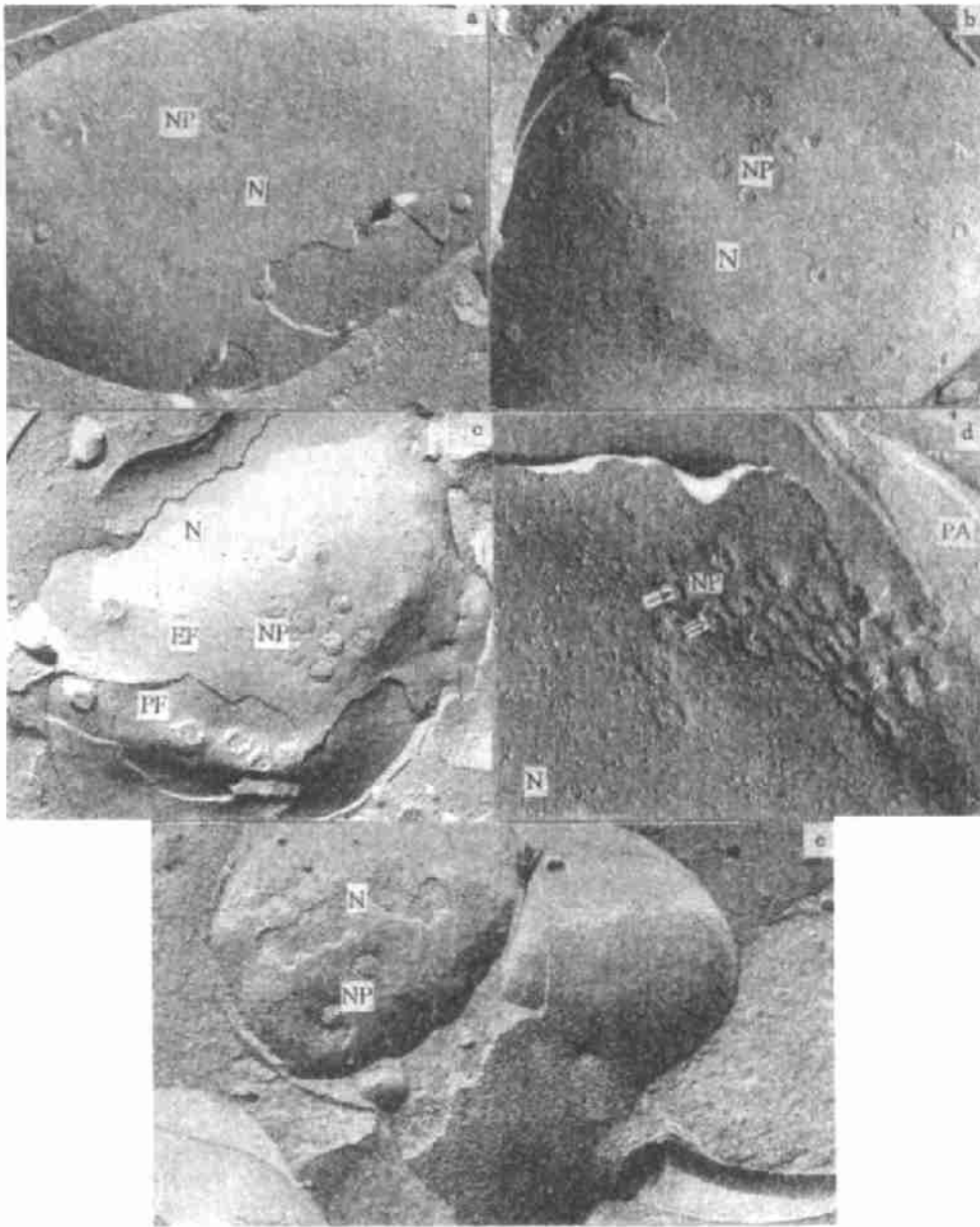


图 1 文昌鱼生殖细胞核孔复合体的大小和密度

Fig.1 The size and density of the nuclear pore complex of germ cell of *Branchiostoma belcheri* Gray

a. 精原细胞核孔复合体的大小和密度,  $\times 49\ 000$ ; b. 初级精母细胞核孔复合体的大小和密度,  $\times 42\ 500$ ; c. 次级精母细胞核孔复合体的大小和密度:  $\times 42\ 500$ ; d. 精细胞变态时核孔复合体集于靠前顶体方向的核膜上:  $\times 49\ 300$ ; e. 精细胞晚期的核孔复合体:  $\times 51\ 000$ . N: 核; NP: 核孔复合体, PF: PF面, EF: EF面, PA: 前顶体; ↑: 一个中央颗粒; ↑↑: 二个中央颗粒

本文结果表明,不同分化阶段的细胞中核孔的密度不同,这一点与 Maul(1977)的结

论一致,但本文得出的变化范围较小。核孔密度的明显变化不仅存在不同分化细胞,而且也存在于不同生理状态动物的同类型细胞中,这表明核孔是一种动态变化的结构,正如 Maul 所指出的,核孔可能消失和重新形成,尤其在有丝分裂的过程中。

从核孔的直径和密度的变化可以看出它们之间有一定的正相关性,而这种正相关性可明显促进核质交换,增强细胞的代谢能力。初级精母细胞的核孔比精原细胞和次级精母细胞的大而密,这是因为初级精母细胞必须为减数分裂提出所需的物质,而且具有较强的代谢能力。由次级精母细胞分裂而来的精细胞,主要是为形成顶体而准备的,因此核孔更大更密。作者推测,此阶段大而密的核孔功能可能是为顶体形成输送物质,有利于核内染色质的脱水浓缩,促进大量水分和其它物质的外流。

### 3.3 文昌鱼精子发生中核孔复合体的分布状况

核孔已经不再被认为是随机分布的,而是出现在特定的位置(Maul, 1977),本文观察的结果完全证实了这种观点。在文昌鱼精细胞中,靠近高尔基区或前顶体处的核孔密度远高于其它部分。高尔基区是细胞内强烈的氧化还原中心(黄宗平等, 1983),因此,作者认为靠近这一区域密集分布的核孔可能与其功能密切相关。由于实验条件和方法所限,对核孔的生理功能仅仅是一种猜测。在精细胞变态早期,核孔分布于靠前顶体的核膜上,呈明显的极性排列(图 1: d),这一结果与 Werner(1965)所观察到的核孔复合体似乎是集中在形成顶体帽的核前端的结果相一致。

## 参 考 文 献

- 李月玲,张庆长,1984. 家鸽精母细胞核膜和核孔复合体的初步观察. 细胞生物学杂志, 6: 42—43
- 应国华,雷建章,王静一等,1979. 冷冻复型电镜技术. 中华物理医学杂志, 1: 28
- 林加涵,陈细法,汪德耀,1987. 文昌鱼精子发生过程中的超微结构研究. 海洋与湖沼, 18: 432—436
- 黄宗平,汪德耀,李文镇等,1983. 北京鸭精子发生的核孔复合体冷冻蚀刻电子显微镜观察. 中国科学, 9: 796—801
- Callan H G, Tomlin S G, 1950. Experimental studies on amphibian oocyte nuclei I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. Proc R Soc London (Ser. B), 137:367—378
- Franke W W, 1970. On the universality of nuclear pore complex structure. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 105: 405—429
- Koehler J K, 1977. Fine structure of spermatozoa of the Asiatic Musk shrew, *Suncus murinus*. Am J Anat, 149:135
- Maul G G, 1977. The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution. Int Rer Cytol, 6:75—186
- Roberts K, Northcote A, 1970. Structure of the nuclear pore in higher plant. Nature (London), 228:385—386
- Watson M L, 1959. Futher observations on the nuclear envelope of the animal cell. J Biophys Biochem Cytol, 6:147
- Werner G, 1965. Untersuchungen Uber Die Spermiogenese Beim Sandlauffr, *cicindela campestris*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 66:255—275
- Wischnitzer S, 1960. The ultrastructure of the nucleus and nuclocytoplasmic relations. Int Rer Cytol, 10:137—162

## OBSERVATION OF NUCLEAR PORE COMPLEX ON SPERMATOGENESIS OF AMPHIOXUS (*BRANCHIOSTOMA BELCHERI* GRAY) WITH FREEZE-ETCHING

LIN Jia-han, LIN Hai-ning, FANG Yong-qiang<sup>†</sup>

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

<sup>†</sup>(Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, 361005)

**Abstract** This research work was undertaken from Mar., 1994 to Sep., 1996 in Xiamen with the *Branchiostoma belcheri* Gray obtained from the sea area of Qiongtou, Tongan, Xiamen every Mar. and July. The nuclear pore complex was studied in spermatogenesis of amphioxus (*Branchiostoma belcheri* Gray) with freeze-etching of electron microscope. The procedures are as follows. The amphioxus was fixed by 2.5% glutaraldehyde for 2 hours, washed by buffer, immersed in 30% glucerine physiological saline, stored in refrigerator for 12—24 hours; then the sexual grand was taken out, fast frozen in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), splited by BAF-400D freezing etcher ( $-110^{\circ}\text{C}$ ,  $2.67 \times 10^{-3}$  Pa), sprayed with platinum and carbon, and observed by TEM. The results show that the central granules which are probably associated with the transport of material may or may not exist in the nuclear pore complex structure. The size and density of the nuclear pore complex in different reproductive cells are different, which is apparently concerned with the physiological function of the cells. The average diameter of nuclear pore complex of spermatogonium, primary spermatocyte, secondary spermatocyte and spermatid are  $(60 \pm 1.20)\text{nm}$ ,  $(76 \pm 1.80)\text{nm}$ ,  $(72 \pm 1.30)\text{nm}$ ,  $(97 \pm 1.40)\text{nm}$ , respectively. The average density of nuclear pore complex of spermatogonium, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid are  $(2.9 \pm 0.04)$  pore /  $\mu\text{m}^2$ ,  $(4.8 \pm 0.05)$  pore /  $\mu\text{m}^2$ ,  $(4.6 \pm 0.03)$  pore /  $\mu\text{m}^2$ ,  $(5.4 \pm 0.06)$  pore /  $\mu\text{m}^2$ , respectively. The nuclear pore complex is centralized on one side of the nuclear membrane, close to the Golgi zone of the primary spermatocyte and the front acrosome of the spermatid, appearing in an obvious polar arrangement; this shows the difference in the function of different parts of the nucleus.

**Key words** *Branchiostoma belcheri* Gray Nuclear pore complex Freeze-etching

**Subject classification number** Q595.287