

莫桑比克非鲫卵壳膜形成的电镜观察*

王爱民

(新疆大学生物系, 乌鲁木齐 830046)

提要 于1986年9—12月对取自湖北省水产研究所实验鱼网箱中的莫桑比克非鲫, 运用透射电镜观察卵子发生中卵壳膜的形成过程。结果表明, 随着卵母细胞的生长, 在卵母细胞和颗粒细胞之间先后出现3层结构, 即 Z_1 , Z_2 和 Z_3 ; 初步确定: Z_1 可能由颗粒细胞分泌形成, Z_2 和 Z_3 由卵母细胞分泌形成, 最终 Z_1 , Z_2 和 Z_3 融为一体成为卵壳膜。对卵壳膜的结构特征及其与特殊的生殖习性——衔卵孵化的关系的分析认为, 衔卵孵化导致卵壳膜的厚度降低。

关键词 莫桑比克非鲫 卵子发生 卵壳膜 透射电镜

在硬骨鱼的卵子发生中, 卵母细胞和周围的颗粒细胞间常出现特殊的胞外基质, 并由之构成卵壳膜。卵壳膜不但能够保护卵子和早期胚胎, 而且对促成单精受精起重要作用; 卵壳膜的结构特点又反映了鱼类对不同生态环境的适应性 (Laale, 1980)。有关硬骨鱼卵壳膜的形成过程, 国外已做了不少工作 (Anderson, 1967; Flegler, 1977; Tesoriero, 1978; Stehr, et al., 1983), 但国内尚未见这方面的报道。本文报道莫桑比克非鲫卵壳膜形成的电镜结果, 以期为进一步探讨莫桑比克非鲫的繁殖特性提供科学依据。

1 材料和方法

莫桑比克非鲫 (*Oreochromis mossambicus*) 于1986年9—12月取自湖北省水产研究所实验鱼网箱, 均为第一次产卵前不同发育时期的雌鱼, 取各期卵巢做实验材料 (王爱民, 1991)。剖腹取出卵巢, 切成 1.5mm^3 的组织块, 用 0.2mol/L 的二甲胺缓冲液 ($\text{pH} = 7.4$, 含8%蔗糖) 配制的2.5%戊二醛和1%锇酸双固定。IV期卵巢内卵母细胞较大, 挑出周围结构不受损伤的卵母细胞, 以乙醇系列脱水, Epon 812树脂包埋, LKB型超薄切片机切片, 常规醋酸铀和柠檬酸铅复染, JEM-100cx型电镜观察和拍照。

硬骨鱼的卵子发生需经增殖、生长和成熟3个阶段, 由于卵壳膜的形成主要在生长期, 因此, 本研究仅限于观察卵巢内生长期的卵母细胞和周围颗粒细胞变化与卵壳膜形成的关系。

2 观察结果

对莫桑比克非鲫卵子发生生长期的透射电镜观察结果表明, 卵壳膜的形成过程有以下数个阶段。

* 本工作系作者硕士论文的一部分。承蒙武汉大学吴熙载教授和何海平教授的悉心指导; 张起麟先生给予技术帮助, 均此一并志谢。

收稿日期: 1992年7月20日, 接受日期: 1993年2月19日。

直径为 $40\mu\text{m}$ 的卵母细胞被 2—3 个极扁平的颗粒细胞紧密包裹,两者之间无间隙;当卵母细胞直径达 $70\mu\text{m}$ 时,卵母细胞和颗粒细胞以及颗粒细胞彼此之间出现分离,卵母细胞表面出现微绒毛,颗粒细胞的胞体表面生出许多突起伸向卵母细胞,形成许多叶状突及枝状突起。

卵母细胞直径为 $120\mu\text{m}$ 时,颗粒细胞内粗面内质网高度发达,细胞质内含有大量的电子致密的核糖体,胞质突起变成许多粗绒毛(直径约 $0.1\mu\text{m}$),其末端膨大为 $0.2\mu\text{m}$;卵母细胞内的线粒体数量增加,细胞表面的微绒毛(直径 $0.08\mu\text{m}$)同颗粒细胞的粗绒毛相互交错,粗绒毛的末端周围出现许多电子致密颗粒(图版 I:1 箭头所示)。

当卵母细胞直径为 $120\text{—}250\mu\text{m}$ 时,卵母细胞出现皮质泡,周围颗粒细胞的内质网仍发达,卵母细胞的微绒毛明显增多,在同颗粒细胞的粗绒毛交错的区域已具厚度为 $1.0\mu\text{m}$ 的绒絮状层,这是卵壳膜最先形成的部分,称 Z_1 层(图版 I:2);同时在卵母细胞微绒毛之间的基部质膜外表面出现电子致密度高的物质,这是卵壳膜形成的第二层,称为 Z_2 (图版 I:3)。在卵母细胞近质膜的皮质部分能见到两种结构不同的膜小泡,一种直径 90nm 、被膜光滑、内含电子致密物质,称为致密核心小泡;另一种粗面膜小泡,直径 130nm ,内含物致密度低,由微胞饮作用形成,因此称为微胞饮泡(图版 I:3,长箭头所示)。

直径为 $250\mu\text{m}$ 的卵母细胞的细胞核周围已出球卵黄球,卵母细胞表面的微绒毛在数量和长度上均增加,长达 $1.3\mu\text{m}$, Z_2 的厚度似乎已达到最大,约 $0.3\mu\text{m}$,不再增加;在 Z_2 的下方出现一层网丝状结构(图版 I:4,长箭头所示),这是卵壳膜形成的第三层,称为 Z_3 层(图版 I:5),卵母细胞皮质区致密核心小泡(图版 I:4,短箭头所示)和微胞饮泡增多。

卵母细胞直径由 $250\mu\text{m}$ 变为 $1000\mu\text{m}$,系生长最为迅速的时期。卵母细胞内最显著的变化为卵黄球不断增加和变大,网丝状结构不断由卵母细胞表面向外增生使卵壳膜的 Z_3 厚度持续增加。活跃的微胞饮作用和大量的致密核心小泡在皮质区清晰可见(图版 I:5,6)。

卵母细胞直径达 $1500\mu\text{m}$ 时,卵母细胞内充满卵黄球,周围的颗粒细胞呈长扁形,排列紧密,但同卵壳膜之间有 $0.4\text{—}0.7\mu\text{m}$ 的间隙。 Z_1 附着在颗粒细胞表面,为少而不连续的小块状(图版 I:7,短箭头所示); Z_2 致密,厚度仅 $0.08\mu\text{m}$,紧贴于 Z_3 表面(图版 I:7,长箭头所示); Z_3 致密化,但具不均匀的层次,其厚度达 $3.0\mu\text{m}$ 。同时,颗粒细胞的粗绒毛和卵母细胞的微绒毛萎缩。

直径达 $2000\mu\text{m}$ 的卵母细胞已完成生长过程,细胞内具大量的卵黄球,周围颗粒细胞体积增大,细胞间无间隙,原来块状的 Z_1 和极薄的 Z_2 已不能同 Z_3 区分; Z_3 变成明暗交错的多层状,整个卵壳膜的厚度达 $4.5\mu\text{m}$,同外侧的颗粒细胞和内侧的卵母细胞紧密相贴,无间隙(图版 I:8)。绒毛萎缩后,在卵壳膜上留下许多孔小管,直径约为 $0.3\mu\text{m}$;两孔小管之间的距离为 $1.0\text{—}1.5\mu\text{m}$;孔小管的密度为每 $1.5\mu\text{m}^2$ 有一个孔小管(图版 I:9)。

3 讨论与结论

3.1 卵壳膜的形成方式与物质来源的关系 本研究表明,莫桑比克非鲫的卵壳膜形成

先后出现 3 层结构, Z_1 首先出现在卵母细胞和颗粒细胞绒毛的交界处, 组成的物质稀疏、絮状, 此时颗粒细胞表现为强烈的蛋白质合成能力, 其粗绒毛的末端周围有密集的颗粒物, 并且在其下方的 Z_2 达到最大厚度时, Z_1 的厚度仍能增加, 因此, 不排除颗粒细胞产生 Z_1 的可能性。在 Z_2 和 Z_3 出现时, 卵母细胞皮质部分出现微胞饮小泡和致密核心小泡。活跃的微胞饮作用已证实为卵母细胞大量吸收外源性卵黄前体蛋白形成卵黄球的过程¹⁾。致密核心小泡的分泌迹象, 及其物质的组成在形态上与 Z_2 和 Z_3 的相似性均表明, 致密核心小泡参与了 Z_2 和 Z_3 的形成, 其分泌过程有待于细胞化学或免疫细胞化学的进一步研究。Anderson (1967) 对海龙和海马的研究表明, 形成卵壳膜的物质是由卵母细胞的内质网合成, 然后通过高尔基复合体的包装形成小泡, 最后小泡分泌其内含物于微绒毛间形成卵壳膜。Tesoriero (1977; 1978) 在研究青鳉的卵壳膜形成时发现, 皮质区有两种类型的单位膜小泡: 粗面被膜的微胞饮泡和光滑被膜的致密核心小泡, 并证实了前者与外源性卵黄的吸收有关, 后者参与卵壳膜的形成。在有些鱼类的卵壳膜中, 除内层由卵母细胞形成外, 颗粒细胞参与了外层的形成 (Stehr et al., 1983; Емельянова, 1989)。Begovac 等 (1989) 通过纯化海龙卵壳膜的主要蛋白成份, 制备单克隆抗体来辨别其细胞来源, 结果表明, 卵壳膜的成份来自滤泡(卵母细胞和颗粒细胞), 并且否定了卵壳膜的成份来自肝脏的观点 (Hamazaki et al., 1985)。这说明硬骨鱼卵壳膜的形成方式与物质来源均较复杂, 象莫桑比克非鲫这种以卵母细胞和颗粒细胞共同分泌物质形成卵壳膜的方式可能是硬骨鱼卵壳膜形成的基本方式。

3.2 卵壳膜形成的分层变化 在莫桑比克非鲫的卵壳膜形成中, Z_1 , Z_2 和 Z_3 依次出现, 早期分层明显, 但在卵壳膜形成的后期, 分层已不明显, Z_1 浓缩为零散的小块状, Z_2 致密化形成极薄的一块, Z_3 从疏松的网丝状结构融合致密而形成均匀的结构, 最终 3 层融为一体, 整个卵壳膜变成明暗交错的多层状结构。

海龙、海马 (Anderson, 1967) 以及白鲢 (Емельянова, 1979) 的卵壳膜形成方式同本文的莫桑比克非鲫相似, 先后出现 3 层结构, Z_1 和 Z_2 变薄甚至消失, Z_3 成为卵壳膜的主体; 大西洋鳕卵壳膜的 3 层结构在卵子发生后期未发生改变 (Kjesbu et al., 1989); 斑马鱼成熟卵子的卵壳膜为结构明显不同的 3 层 (Hart, 1983); 另一些鱼类的卵壳膜仅有内外两层结构 (Flegler, 1977)。这说明硬骨鱼卵壳膜的形成均存在分层及变化的过程, 不同鱼卵壳膜的分层及变化表现各异。

3.3 卵壳膜的形态与繁殖特性的关系 Stehr 等 (1989) 认为, 鱼类卵壳膜的形态差异代表了鱼类产卵及胚胎发育生态环境的差异, 至少在海洋鱼类, 沉性卵的卵壳膜厚度远远大于浮性卵; 卵胎生鱼类的卵壳膜明显地比卵生鱼类的卵壳膜薄 (Flegler, 1977); 胚胎孵化期短鱼类, 其卵壳膜趋于变薄 (Hart, 1983)。把莫桑比克非鲫的卵壳膜厚度 ($4.5\mu\text{m}$) 同其它已研究过的淡水鱼比较, 如鲂 ($9.0-16.5\mu\text{m}$) (王瑞霞等, 1982)、白鲢 ($5.0-7.0\mu\text{m}$) (Емельянова, 1979)、鲮条 ($9.0\mu\text{m}$) (Емельянова, 1989), 莫桑比克非鲫的卵壳膜较薄。这可能同莫桑比克非鲫特殊的繁殖习性有关, 非鲫属于衔卵孵化的鱼类, 早期胚胎发育在母体口腔中完成, 因此, 口腔的保护作用使卵壳膜固有的保护作用降

1) 王爱民, 1994, 莫桑比克非鲫卵黄形成的电镜观察。

低,导致卵壳膜的厚度降低。

参 考 文 献

- 王爱民,1991,莫桑比克非鲫卵子发生的扫描电镜观察,新疆大学学报(自然科学版),8(1): 79—83。
 王瑞霞等,1982,鲂鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察,水产学报,6(4): 313—320。
 Anderson, E., 1967, The formation of the primary envelope during oocyte differentiation in teleosts, *J. Cell Biol.*, **35**:193—212。
 Begovac, P.C. et al., 1989, Majjo vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and associated with the Z₃ layer, *J. Exp. Zool.*, **251**:56—73。
 Flegler, C., 1977, Electron microscopic studies on the development of the chorion of the viviparous teleost *Dermogenys pusillus* (Hemirhamphidae), *Cell Tissue Res.*, **179**:255—270。
 Hamazaki, T. et al., 1985, A spawning female—specific substance reactive to anti-chorion (egg-envelope) glycoprotein antibody in the teleost, *Oryzias latipes*, *J. Exp. Zool.*, **235**: 269—279。
 Hart, N.H., 1983, Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*, *J. Exp. Zool.*, **227**: 277—296。
 Kjesbu, O.S. et al., 1989, Oogenesis in cod, *Gadus morhua* L., studied by light and electron microscopy, *J. Fish Biol.*, **34**:735—746。
 Laale, H.W., 1980, The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review, *Copeia*, **2**: 210—226。
 Stehr, C.M. et al., 1983, The development of the hexagonally structured egg envelope of the C-O sole (*Pleuronichthys coenosus*), *J. Morphol.*, **178**:267—284。
 Stehr, K. et al., 1989, The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder, *Platichthys stellatus* (Pallas), and pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum), *Cell Tissue Res.*, **202**:347—356。
 Tesoriero, J.V., 1977, Formation of the chorion (zone pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes* I. Morphology of early oogenesis, *J. Ultrastruct. Res.*, **59**: 282—291。
 Tesoriero, J.V., 1978, Formation of the chorion (zone pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes* III. Autoradiography of H³-roline incorporation, *J. Ultrastruct. Res.*, **64**: 315—326。
 Емельянова, Н.Г., 1979, Электронно-микроскопическое исследование развития яйцевых оболочек и фолликула белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix*, *Вопр. Ихтиологии*, **19**(2): 338—354。
 Емельянова, Н.Г., 1989, Электронно-микроскопическое исследование развития яйцевой оболочки у востробрышки *Hemiculter leucisculus* и необычность ее дефинитивного строения, *Вопр. Ихтиологии*, **29**(4): 671—675。

图版 I 莫桑比克非鲫卵壳膜形成的各阶段电镜观察结果

Plate I Electron microscopic observations on stages of the formation of chorion (egg envelope) of *Oreochromis mossambicus*

1. 直径为 120 μm 的卵母细胞(O)及周围结构,示颗粒细胞(G)粗绒毛膨大末端周围的电子致密颗粒(箭头);BM,滤泡的基膜;T,精膜细胞; $\times 10\ 000$ 。2. 直径为 150 μm 的卵母细胞,已形成 Z₁;其下方出现的电子致密层(箭头示)为 Z₂ 的形成; $\times 14\ 000$ 。3. 直径为 200 μm 的卵母细胞,示 Z₂ 的形成;短箭头示致密核心小泡;长箭头示微胞饮泡; $\times 29\ 000$ 。4. 直径为 250 μm 的卵母细胞, Z₂ 下方出现网丝状结构(长箭头);短箭头示致密核心小泡; $\times 19\ 000$ 。5. 直径为 500 μm 的卵母细胞, Z₃ 增厚;短箭头示致密核心小泡;长箭头为微胞饮泡; $\times 19\ 000$ 。6. 直径为 800 μm 的卵母细胞,示 Z₃ 不断增厚; $\times 18\ 000$ 。7. 直径为 1 500 μm 的卵母细胞, Z₁ 呈散块状(短箭头); Z₂ 为薄而致密的一层(长箭头); Z₃ 厚,为明暗交错的多层状结构; $\times 10\ 000$ 。8. 直径为 2 000 μm 的卵母细胞,示横切的卵壳膜呈明暗交错的多层状结构; $\times 7\ 200$ 。9. 直径为 2 000 μm 的卵母细胞,示切向切面的卵壳膜; $\times 5\ 800$ 。

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON THE FORMATION OF CHORION (EGG ENVELOPE) OF *ORECHROMIS MOSSAMBICUS*

Wang Aimin

(Department of Biology, Xinjiang University, Wulumuqi 830046)

ABSTRACT

The formation of chorion (egg envelope) of *Oreochromis mossambicus* which was offered by Hubei Fisheries Research Institute has been observed by transmission electron microscope from September to December 1986. The results are as follows:

1. The structure of chorion undergoes several changes when it is formed during oocyte development. A trilaminar appearance is produced successively. For convenience of description, the portions are referred to Zone 1, 2 and 3 respectively. Zone 1 first appears as a homogeneous electron-lucent layer between the microvilli of oocyte and macrovilli of granulosa cells. Zone 2 is immediately beneath Zone 1, and consists of an extremely electron opaque materials. Zone 3 is subjacent to Zone 2. It is the largest and most complex of the three zones, and consists of amorphous materials organized in a reticular-like network. It has been preliminarily confirmed that Zone 1 is formed by granulosa cells, Zone 2 and 3 are secreted by oocyte itself with the dense core vesicles.

2. During the late period of oocyte growth, the chorion compacts. As the compaction occurs, Zone 1 turn into a lot of small pieces, Zone 2 becomes a thin dense layer, and Zone 3 becomes a thick multiple lamellae. The main part of the chorion is composed of the Zone 3.

3. Thickness of the chorion in *O. mossambicus* is $4.5\mu\text{m}$ and it is thinner than those of other fresh water teleosts which have been studied. The reduction of thickness in the chorion is closely related to the special reproductive manner, that is, oral hatching embryos.

Key words *Oreochromis mossambicus* Oogenesis Chorion (Egg envelope)
Transmission electron microscope

