

# 哲罗鱼(*Hucho taimen*)卵巢滤泡细胞 发生的超微结构研究\*

张永泉 尹家胜 杜佳 张颖 佟广香

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070)

**提要** 采用透射电镜技术,进行了哲罗鱼卵巢滤泡细胞发育的研究。结果表明,哲罗鱼滤泡细胞发育分为 5 个时期:零散滤泡膜细胞期、单层扁平滤泡膜细胞期、多层扁平滤泡膜细胞期、颗粒细胞分泌期和颗粒细胞退化期。滤泡细胞经卵巢基质细胞分化,由卵巢边缘经“穿梭包围运动”将卵母细胞包裹。早期滤泡细胞在卵母细胞外侧呈连续单层排列,并不具备任何功能,随着卵母细胞发育,滤泡细胞分化成具有功能性的三层结构,随后滤泡细胞协同卵母细胞合成部分卵膜。当卵黄积累旺盛时,滤泡细胞参与了外源性卵黄物质的运输、加工和修饰,鞘细胞间大量的微丝具有协助卵巢排卵的作用。在卵巢排卵后,滤泡细胞与未发育的卵母细胞形成闭锁卵泡,对卵细胞残体和碎片还具有吞噬、消化等作用。

**关键词** 哲罗鱼,卵巢,滤泡细胞,超微结构

**中图分类号** S963

哲罗鱼(*Hucho taimen*)系鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、哲罗鱼属(*Hucho*),是我国珍稀名贵土著鱼类,主要分布在额尔齐斯河、黑龙江、乌苏里江、喀纳斯湖等(张觉民,1995),由于近年来对生物资源的过度开发利用、环境污染等原因,其自然生存受到了严重破坏。目前该物种在我国的分布区域日益缩小,种群数量逐渐减少,其野生资源已经基本枯竭,被编入《中国濒危动物红皮书》(乐佩琦等,1998)。随着我国对自然资源保护的高度重视和养殖业开发高档新品种迫切需要,现已展开哲罗鱼资源调查(梁利群等,2004)、人工繁殖(徐伟等,2003)和发育生物学(张永泉等,2010)等大量研究工作。在硬骨鱼类卵子发生过程中,滤泡细胞伴随着卵母细胞生长的整个过程,其结构和生理功能的变化对卵子发生具有重要意义。国内外学者对青鳉(*Oryzias latipes*) (Nagahama, 1983)、黄彩蓝斜纹鳉(*Epiplatys spilargyreus*) (Thiaw et al, 1992)、鲮鱼(*Mugil cephalus* Linnaeu)(方

永强等,2001)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)(李怀梅等,1994)、细鳞鱼(*Brachymystax leno*)(牟振波等,2008)等物种滤泡细胞的起源、结构组成和功能进行了大量的研究。关于哲罗鱼滤泡细胞的相关研究,国内外尚未见报道。该研究主要从超微结构水平对哲罗鱼卵子发生过程中滤泡细胞发生进行系统的观察,同时探讨了滤泡细胞发生的机制和生理功能,旨在丰富和完善硬骨鱼类生殖内分泌学的研究内容,并为哲罗鱼的繁殖、资源保护与利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鱼取自黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站,分别为2005年5月、2006年5月、2007年5月、2008年5月和2009年5月人工繁殖后培育得到的4+、3+、2+、1+和不足一龄的哲罗鱼,采样时间为2009年7月26日—2010年7月30日,其中不足

\* 国家“十二五”科技支撑计划,2012BAD25B10号;农业部公益性行业科研专项,201003055号。张永泉,硕士,助理研究员, E-mail: atai0805@163.com

通讯作者:尹家胜,研究员, E-mail: xwsc20@tom.com

收稿日期:2011-12-26,收修改稿日期:2012-02-18

一龄的哲罗鱼每间隔 1 个月采集 1 次, 每次 10 尾, 3+、2+和 1+鱼每间隔 3 个月采集 1 次, 4+的鱼每 2 个月采集 1 次。

## 1.2 样品的制备

取健康的实验鱼活体解剖, 获得性腺样品, 所采集样品均用 pH 7.2 的磷酸缓冲液(PBS)清洗, 立即用 2.5% 戊二醛固定, 之后用锇酸再固定, Epon812 包埋, 恒温培养箱中聚合, Ultracut E 型超薄切片机制片, 切片经培养后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, JEM-1200EX 型电子显微镜观察拍照。

## 2 结果与分析

根据哲罗鱼滤泡细胞在卵巢发育过程中出现的时间、数量、大小和分布状况以及细胞结构和功能, 同时参照 Andrade 等(2001)、方展强等(1995)和牟振波等(2008)关于其时期划分的观点, 将哲罗鱼滤泡细胞的发育分成零散滤泡膜细胞期、单层扁平滤泡膜细胞期、多层扁平滤泡膜细胞期、颗粒细胞分泌期和颗粒细胞退化期。

### 2.1 零散滤泡膜细胞期

哲罗鱼上浮后 50—60d 性腺开始分化, 出现大量的卵原细胞, 细胞直径在 3—12 $\mu\text{m}$ , 细胞核较大, 核仁分布在细胞核中部, 此时卵原细胞的外侧只有薄薄的一层结缔组织膜, 尚无滤泡细胞存在(图 1a)。随着卵原细胞不断发育, 其外围的结缔组织膜增厚, 开始有卵巢基质细胞分化出早期滤泡细胞, 并在不断大量分裂增殖, 刚形成的滤泡细胞尚未成层排列, 零散分布于卵原细胞团外侧, 部分滤泡细胞有向卵原细胞中间运动的趋势, 也称“穿梭包围运动”, 此时卵原细胞和滤泡细胞差异明显, 卵原细胞核大、圆(直径 3—5 $\mu\text{m}$ )、胞质相对滤泡细胞较多, 而滤泡细胞内胞质较少, 细胞器不发达只发现少量线粒体, 细胞核较大占据细胞绝大部分, 细胞核呈长椭圆形, 长轴为短轴的 2—3 倍(长轴直径 5—8 $\mu\text{m}$ , 短轴直径 2—3 $\mu\text{m}$ )(图 1b)。

### 2.2 单层扁平滤泡膜细胞期

随着卵原细胞进一步发育成初级卵母细胞期细胞, 细胞直径达到 15 $\mu\text{m}$  以上。单层扁平滤泡膜细胞期早期, 滤泡细胞经过大量增殖和穿梭包围运动, 在卵母细胞外侧呈现松散的包围状, 此时滤泡细胞核大小差异较大(图 1c)。随着卵母细胞的发育, 滤泡细胞在卵母细胞外侧呈明显连续单层排列, 完全将卵母细胞包裹, 此时滤泡细胞呈扁平长梭形, 细胞内部

胞质依然很少, 但胞质中线粒体数目有所增加, 其绝大部分仍由细胞核占据, 细胞核呈长梭形长轴为短轴的 3—5 倍(长轴直径 6—10 $\mu\text{m}$ , 短轴直径 1—2 $\mu\text{m}$ )(图 1d)。

### 2.3 多层扁平滤泡膜细胞期

当卵母细胞发育到 时相中后期滤泡层进入多层扁平细胞期, 此时卵母细胞外侧包裹着 2—3 层细胞, 呈扁平状, 细胞内部分布大量线粒体(图 1e)。图 1f 所示, 当卵母细胞发育到 时相后期和 时相, 其外侧滤泡层明显分三层结构, 最外层为鞘膜层, 鞘膜层主要有细胞核较大扁平的鞘细胞组成; 中间层又称基层, 主要由胶原纤维组成; 最内层由扁平滤泡细胞组成, 此时滤泡细胞核依然很大, 但胞质增加, 内部除分布大量的线粒体外, 出现了内质网和多层环形片层结构(图 1g), 胞质形成指状突起的微绒毛, 不断向卵母细胞质膜伸出, 此时卵母细胞也不断向质膜与滤泡层之间伸出微绒毛, 且与滤泡细胞连接十分紧密, 两者之间不存在非细胞的结构物质(图 1h), 这三层结构共同形成功能性膜单位, 即卵巢——卵泡, 此时卵母细胞外侧细胞结构才可称之为滤泡膜。相邻滤泡膜相接触的地方有紧密连接(图 1i)。

### 2.4 颗粒细胞分泌期

当卵母细胞发育到 时相, 也是卵母细胞进入卵黄大量积累阶段, 其滤泡膜发生明显变化, 形成典型多层膜结构, 由内向外依次为放射带、颗粒细胞层、基层和鞘细胞层(图 1j)。随着卵母细胞的不断发育, 在卵母细胞和颗粒细胞间的放射带不断增厚, 放射带间有许多具有连接作用的呈蜂窝状的微绒毛通道; 放射带和基膜层间的滤泡细胞因内含分泌颗粒而被称为颗粒细胞, 其形态也由原来的扁平长梭形变成立方形颗粒状(细胞核长轴直径 4—6 $\mu\text{m}$ , 短轴 2—4 $\mu\text{m}$ ), 随着卵母细胞的进一步发育, 颗粒细胞内密集分布着大量的内质网和线粒体, 部分线粒体开始出现空泡化, 分泌一些颗粒物质, 同时在胞质边缘处发现大量细丝状胶质物质(图 1k); 此时将颗粒细胞层和鞘细胞层分隔开的基质层胶原纤维开始溶解; 最外层的鞘细胞层细胞变小, 分布大量的红细胞, 与基质层紧密相连, 在外源性卵黄积累旺盛时期在鞘细胞之间可见大量的由血液运输而来的卵黄前体颗粒和发达的微丝结构(图 1l)。

### 2.5 颗粒细胞退化期

当卵母细胞发育成熟达到 时相末期, 其脱离滤泡膜, 外层仅见胶质膜。颗粒细胞的退化主要分为

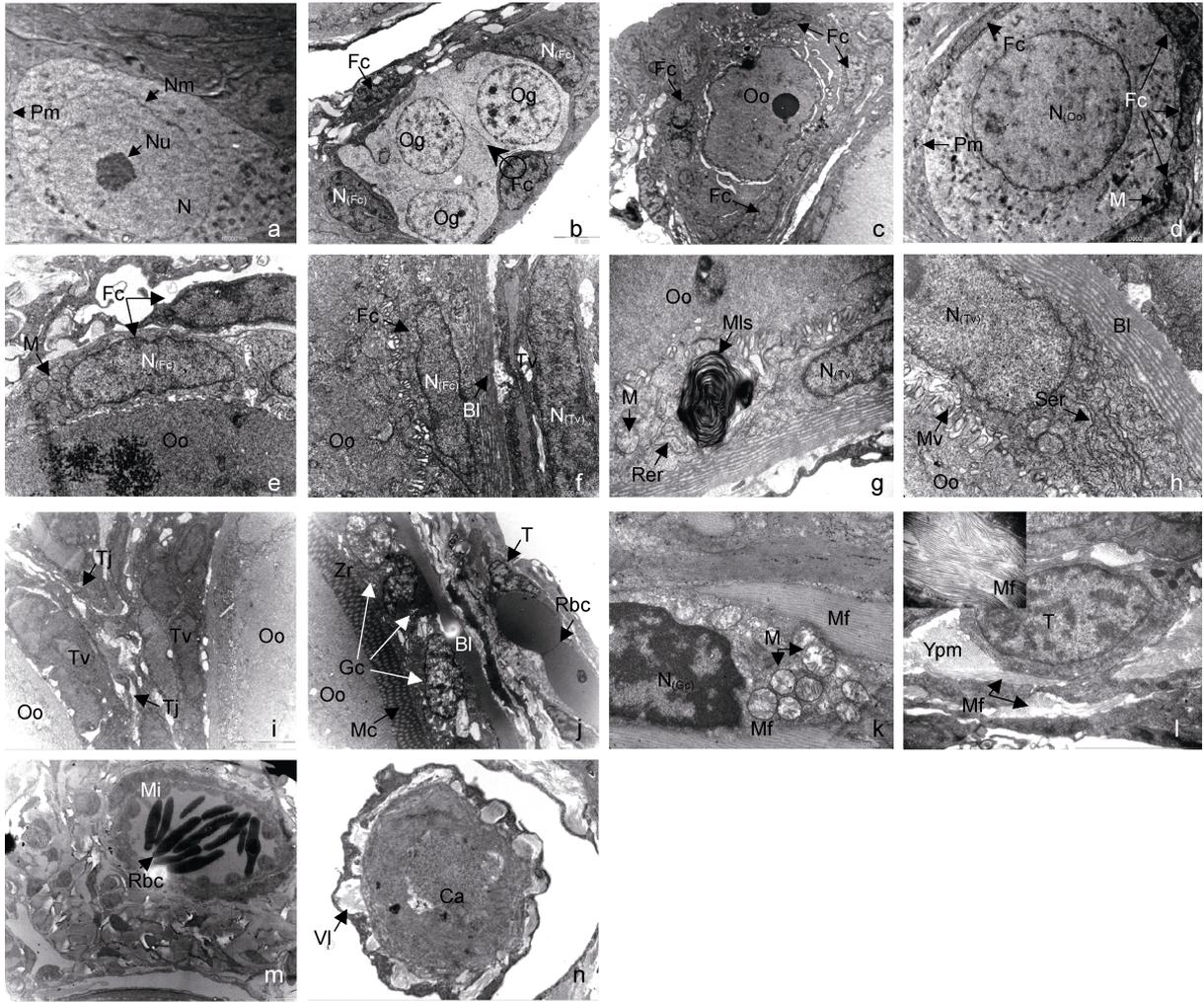


图1 哲罗鱼滤泡细胞超微结构

Fig.1 Ultrastructure of follicular cell of *H. taimen*

a. 卵原细胞,  $\times 1900$ ; b. 零散滤泡细胞包裹卵原细胞团,  $\times 1700$ ; c. 滤泡细胞对卵原细胞形成初步包裹,  $\times 900$ ; d. 单层扁平滤泡细胞,  $\times 1800$ ; e. 多层滤泡细胞,  $\times 4000$ ; f. 滤泡膜的三层结构,  $\times 4000$ ; g. 滤泡细胞内多层环形片层结构,  $\times 6000$ ; h. 质膜与滤泡膜的微绒毛,  $\times 8000$ ; i. 滤泡层间的紧密连接,  $\times 1800$ ; j. 滤泡膜的典型多层结构,  $\times 1300$ ; k. 颗粒细胞,  $\times 8000$ ; l. 鞘细胞和微丝,  $\times 2700$ ; m. 萎缩滤泡层间微血管,  $\times 900$ ; n. 闭锁细胞,  $\times 1000$ 。N. 细胞核; Nu. 核仁; Nm. 核膜; Pm. 质膜; Fc. 滤泡细胞; N(Fc). 滤泡细胞核; Og. 卵原细胞; Oo. 卵母细胞; N(Oo). 卵母细胞核; M. 线粒体; Tv. 鞘膜层; N(Tv). 鞘细胞核; Bl. 基层; Rer. 粗面内质网; Mls. 多层环形片层结构; Mv. 微绒毛; Ser. 滑面内质网; Tj. 紧密连接; Gc. 颗粒细胞; T. 鞘膜细胞; Zr. 放射带; Rbc. 红细胞; Mc. 微绒毛通道; Mf. 微丝; Ypm. 卵黄前体颗粒; Mi. 微血管; Vl. 空泡; Ca. 闭锁卵泡

两种情况: 第一种是成熟雌鱼排卵后, 卵巢充血, 滤泡膜间出现大量微血管, 血管内有大量的红细胞, 产卵板之间有破裂的空泡, 颗粒细胞层变成多泡松散结构, 鞘细胞层中的外源性卵黄颗粒基本排空, 留下了许多泡状群, 鞘细胞核也开始萎缩变形, 其中微丝结构断裂消失(图 1m); 第二种是当卵巢排卵后, 部分尚未发育完全的卵母细胞外层仍被滤泡膜包裹, 形成闭锁卵泡, 随后闭锁卵泡中颗粒细胞变成吞噬细胞进入卵子消化卵黄, 滤泡膜鞘细胞间丰富的微丝结构消失, 在滤泡膜和卵母细胞质膜间形成许多空

泡, 最后退化的卵母细胞萎缩消失, 卵膜模糊而后断裂, 胶液化的卵黄崩溃呈不规则块状(图 1n)。

### 3 讨论

#### 3.1 滤泡细胞的起源

滤泡细胞伴随着卵母细胞生长的整个过程, 其结构和生理功能的变化对卵子发生具有重要意义, 关于卵母细胞的起源国内外的学者有着不同的观点。湖南师范学院生物系鱼类研究小组(1975)认为青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 卵巢中位于四周的卵原细

胞分化成滤泡细胞, 中央的卵原细胞分化成卵母细胞。杨筱珍等(2009)报道日本新糠虾(*Neomysis japonica*)认为滤泡细胞与卵细胞同时发育于生殖上皮, 并随卵细胞的迁移而逐渐包绕; Grier(2000)研究认为锯盖鱼(*Centropomus undecimalis*)卵母细胞表层的滤泡上皮由浆细胞和生殖细胞共同形成。但大多数学者(Nakamura, 1982; 张耀光等, 1995; 方永强等, 2001; 牟振波等, 2008)均认为滤泡细胞起源于非生殖细胞, 即由卵巢基质分化而来。作者在研究中发现卵原细胞早期, 其外侧只有薄薄的一层结缔组织膜, 尚无滤泡细胞的存在, 随着卵原细胞不断发育, 在卵原细胞外围, 结缔组织膜增厚, 开始出现早期滤泡细胞, 并在不断大量分裂增殖, 此时卵原细胞核大而圆直径为3—5 $\mu\text{m}$ , 滤泡细胞核呈长椭圆形长轴为短轴的2—3倍(长轴直径5—8 $\mu\text{m}$ , 短轴直径2—3 $\mu\text{m}$ ), 这说明哲罗鱼卵巢滤泡细胞非生殖细胞, 二者之间存在一定的差异。同时作者观察到刚形成的滤泡细胞尚零散分布于卵原细胞团外侧, 部分卵巢边缘的滤泡细胞有向卵原细胞中间运动的趋势, 逐步将一个个的卵原细胞包绕, 作者首次将之称为“穿梭包围运动”。经过上述观察作者得出哲罗鱼卵巢滤泡细胞来源基质细胞的分化, 而非生殖细胞, 此观点也与 Nakamura(1982)对白斑红点鲑(*Salvelinus leucomaenis*)、牟振波等(2008)对细鳞鱼和方永强等(1995)对文昌鱼(*Branchiostoma belcheri* Gray)的报道相一致, 而与杨筱珍等(2009)对日本新糠虾和 Grier(2000)对锯盖鱼的报道截然不同, 具体原因作者推断可能因物种间的差异, 但其详细机理还有待进一步研究。

### 3.2 滤泡细胞的功能

滤泡细胞自分化以后始终随着卵母细胞的发育成熟和退化, 因此在这个相对漫长的过程中, 它的功能也表现在多个方面(施琼芳, 1992)。Thiaw 等(1992)报道黄彩蓝斜纹鳞滤泡细胞内的线粒体, 由于内脊消失而形成的囊泡, 对退化的卵母细胞具有二次包裹和吞噬的功能; Mercy 等(1982)、张耀光等(1995)和 Takano 等(1982)认为卵母细胞的精孔细胞由滤泡细胞分化而成; Nagahama(1983)应用电镜观察发现滤泡细胞是孔雀鱼(*Iebistes mticulatus*)、青鳞合成类固醇激素的重要部位; 张耀光等(1995)报道南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)卵巢的滤泡细胞分泌形成次级卵膜; 洪水根等(1988)、李怀梅等(1994)、Grier(2000)和牟振波等(2008)大多数学者认为滤泡细胞具有合成和运输外源性卵黄前体物质的作用。

本研究过程中发现哲罗鱼卵巢滤泡膜发育到颗粒细胞分泌期, 颗粒细胞内除分泌一些颗粒物质外, 在细胞质边缘处出现大量细丝状胶质物质, 作者认为此胶质物质参与合成了卵母细胞的卵膜, 此观点与张耀光等(1995)对南方鲇的报道相同。当发育到多层扁平滤泡膜细胞期, 在滤泡膜内侧的扁平滤泡细胞内部除分布大量的线粒体, 开始出现内质网和多层环形片层结构, 作者认为此结构应该为外源性卵黄物质加工和修饰的场所。当滤泡细胞发育到颗粒细胞分泌后期鞘膜层分布大量的红细胞, 在外源性卵黄积累旺盛时期在鞘细胞之间可见大量的有血液运输而来的卵黄前体颗粒。因此, 作者认为哲罗鱼滤泡层不但参与外源性卵黄物质的运输, 同时还具有加工和修饰的功能。

颗粒细胞分泌期的鞘细胞间除发现大量的卵黄前体颗粒, 还发现丰富的微丝结构, 但当卵巢排卵后无论是否排除卵母细胞, 鞘细胞内的微丝结构都断裂消失, 因此作者推断此微丝结构应该具有协助卵巢排卵的作用。此发现也与郑曙明等(1993)对铜鱼(*Coreius heterodon*)和 Wourms(1976)黑带珠鳞(*Cynolebias melanotaenia*)的报道相一致。

### 参 考 文 献

- 方永强, Welsch U, 1995. 文昌鱼卵巢中滤泡细胞超微结构及功能的研究. 中国科学(B 辑), 25(10): 1079—1085
- 方永强, 翁幼竹, 洪万树等, 2001. 鲮鱼早期卵子发生的超微结构研究. 水生生物学报, 25(6): 583—589
- 乐佩琦, 陈宜瑜, 1998. 中国濒危动物(鱼类)红皮书. 北京: 科学出版社, 29—31
- 牟振波, 徐革锋, 杨双英, 2008. 细鳞鱼卵巢滤泡细胞的发育及功能. 中国水产科学, 15(1): 167—171
- 李怀梅, 张乃禹, 1994. 中国对虾卵母细胞发育的初步研究. 海洋与湖沼, 25(3): 243—249
- 杨筱珍, 王金峰, 杨丽娜等, 2009. 日本新糠虾(*Neomysis japonica*)卵巢发育与卵子发生. 海洋与湖沼, 40(3): 338—346
- 张永泉, 刘奕, 尹家胜等, 2010. 哲罗鱼消化系统胚后发育的形态学和组织学研究. 海洋与湖沼, 41(3): 422—428
- 张觉民, 1995. 黑龙江鱼类志. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 50—52
- 张耀光, 谢小军, 1995. 南方鲇卵巢滤泡细胞和卵膜生成的组织学研究. 动物学研究, 16(2): 166—172
- 郑曙明, 熊金沫, 1993. 铜鱼卵巢的显微和超微结构的研究. 武汉大学学报: 自然科学版, 39(3): 103—109
- 施琼芳, 1992. 我国鱼类生殖生理学研究概况. 海洋与湖沼, 23(3): 325—332
- 洪水根, 林加涵, 陈细法等, 1988. 长毛对虾卵子发生的研究.

- 海洋与湖沼, 19(4): 301—306
- 徐伟, 尹家胜, 姜作发, 2003. 哲罗鱼人工繁育技术的初步研究. 中国水产科学, 10(1): 26—30
- 梁利群, 常玉梅, 董崇智等, 2004. 微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性分析. 水产学报, 28(3): 241—245
- 湖南师范学院生物系鱼类研究小组, 1975. 青鱼性腺发育的研究. 水生生物学集刊, 5(4): 471—484
- Andrade R F, Bazzoli N, Rizzo E *et al*, 2001. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). *Tissue Cell*, 33(5): 524—532
- Grier H J, 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol*, 243(3): 265—281
- Mercy T V A, Padmanabhan K G, Pillai N K, 1982. Morphological studies of the oocytes of the blind catfish *Horaglanis krishnai* Menon. *Zoologischer Anzeiger*, 200: 211—223
- Nagahama Y, 1983. The functional morphology of teleost gonad. *Fish Physiology*, 6: 223—275
- Nakamura M, 1982. Gonadal sex differentiation in white spotted charr *Salvelinus leucomaenis*. *Japanese Journal of Ichthyology*, 28(4): 431—436
- Takano K, Ohta H, 1982. Ultrastructure of Micropylar Cells in the Ovarian Follicles of the Pond Smelt, *Hypomesus transpacificus nipponensis*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 33(2): 65—78
- Thiaw O T, Mattei X, 1992. Natural degenerating mitochondria in ovarian follicles of a cyprinodontidae fish, *Epiplatys spilargyreus* (teleost). *Molecular Reproduction and Development*, 32(1): 67—72
- Wourms J P, 1976. Annual fish oogenesis: I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelope. *Developmental Biology*, 50(2): 338—354

## STUDY ON DEVELOPMENTAL ULTRASTRUCTURE OF FOLLICULAR CELLS IN OVARY OF *HUCHO TAIMEN*

ZHANG Yong-Quan, YIN Jia-Sheng, DU Jia, ZHANG Ying, TONG Guang-Xiang  
(Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin, 150070)

**Abstract** The development of follicular cells in ovary of *Hucho taimen* was studied by transmission electron microscope. The results showed that the development process of follicular cell could be divided into five stages: scattered follicle membranate cells stage, monolayer applanate follicle membranate cells stage, multi-layers applanate follicle membranate cells stage, granulosa cell secretion stage and granulosa cell degeneration stage. Follicular cell that was differentiated from stroma cell of ovary wrapped oocyte in shuttle and envelope of motion from edge of ovary. The outside of oocyte was lined with continuous monolayer pristine follicular cells, which didn't have any function, with the development of oocyte, follicular cells differentiated to be obvious three-layered structure, whereafter, follicular cells synthesized part of egg membrane in coordination with oocyte. When yolk amassed vigorously, follicular cell participated in transportation, processing and modified of exogenous yolk material, the considerable microfilament of sheath cell assisted ovulation of ovary. After ovulation, follicular cell formed atretic follicle with nulli-developmental oocyte to phagocytize and digeste residuum and fragment of ovotid.

**Key words** *Hucho taimen*, Ovary, Follicular cell, Ultrastructure