

文章编号:1000-0615(2007)02-0171-07

中华绒螯蟹卵黄发生期卵母细胞和卵泡细胞超微结构观察

杨筱珍, 吴旭干, 成永旭, 于智勇, 南天佐

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 通过透射电镜技术观察了中华绒螯蟹第二次卵巢发育过程中卵巢的超微结构变化。结果表明:(1)中华绒螯蟹第二次卵巢发育过程中卵黄发生期可分为初期和后期;(2)卵黄发生初期(雌蟹第一次排卵后的16 d内),卵黄生成以卵母细胞内源性合成为主,此时卵母细胞胞质中存在大量内质网囊泡、高尔基体和线粒体,这些细胞器参与胞内卵黄物质的合成。内源性合成后期,卵母细胞膜形态多样,呈现触手状、波浪状和断裂状,为外源合成期做准备。此期卵泡细胞还未向卵母细胞靠近,两类细胞间存在着由淋巴细胞吐出的絮状物;(3)卵黄发生后期,首先为卵泡细胞与卵母细胞的结合阶段(排卵后16~21 d),此后,卵泡细胞胞质中含有大量内质网囊泡、卵黄颗粒和脂滴,卵母细胞与卵泡细胞膜变为链珠状便于物质交换,卵母细胞的卵黄合成能力减少,转由卵泡细胞进行外源性物质吸收和卵黄物质合成(21~36 d);(4)卵黄发生结束后,双层卵膜形成,卵黄体和脂肪滴均匀分布在卵母细胞胞质中。

关键词: 中华绒螯蟹;卵黄发生;卵母细胞;卵泡细胞;超微结构

中图分类号: Q 248; S 917.4

文献标识码: A

Ultrastructure of oocytes and follicular cells during vitellogenesis of *Eriocheir sinensis*

YANG Xiao-zhen, WU Xu-gan, CHENG Yong-xu, YU Zhi-yong, NAN Tian-zuo

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the ultrastructure of the *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards ovary during the secondary ovary development by transmission microscopy. The results showed that: (1) Vitellogenesis in the *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards can be divided into two stages: primary stage and secondary stage. (2) In primary stage (in 1–16 days after the first spawning), vitellogenesis was formed mainly by intro-oocytic yolk formation. Many vesicles of the endoplasmic reticulum, Golgi complex and mitochondria were present in the cytoplasm of oocytes, which involved in yolk formation. In the late primary vitellogenesis, the membrane of oocytes turned into various shapes such as hand, wave or broken-like, which were prepared for extra-oocytic yolk formation. The follicular cells were far away from oocytes. There were lots of flocculent dense bodies from lymphocytes distributed between the follicular cells

收稿日期:2006-08-01

资助项目:国家自然科学基金项目(30471349);上海市曙光计划(02-SG-40);上海市博士启动资金(05-212);上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介:杨筱珍(1977-),女,山东济南人,讲师,博士,主要从事水生动物生殖免疫方面的研究。Tel:021-65711346, E-mail: xzyang@shfu.edu.cn

通讯作者:成永旭, Tel:021-65711346, E-mail: yxcheng@shfu.edu.cn

and oocytes. (3) In secondary vitellogenesis, first, follicular cells combined with oocytes (in 16–21 days after the first spawning), then many vesicles of the endoplasmic reticulum, yolk and lipid droplets were present in the cytoplasm of follicular cells. A ball and chain structure formed in the interface of oocytes and follicular cells, so that large amount of material of the follicular cell could be directly taken into the oocytes. The ability of yolk formation of oocytes decreased significantly, while the extra-oocytic yolk formed by follicular cells in 21–36 days after the first spawning. (4) Two distinct layers were identified in matured oocyte surface. The matured oocytes were characterized by accumulation with irregular yolk bodies and lipid droplets which were scattered throughout the ooplasm.

Key words: *Eriocheir sinensis*; vitellogenesis; oocytes; follicular cells; ultrastructure

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是我国重要的经济蟹类, 有关其卵巢发育规律的研究主要集中于组织学^[1]及超微结构^[2-4], 尚未见有关卵黄发育期间卵母细胞和卵泡细胞结构变化的报道。关于十足类甲壳动物卵巢卵黄发生的超微结构研究, 国内外多集中于卵母细胞卵黄发生过程和胞内卵黄体的形成途径, 并证实胞内很多细胞器都参与卵黄体的发生过程^[5-9], 有研究表明卵泡细胞在卵黄发生过程中亦有重要作用^[4, 10-11], 但有关卵泡细胞和卵黄物质发生的内在联系研究较少。鉴于此, 本文主要研究了中华绒螯蟹卵母细胞内卵黄发生过程和卵黄物质迅速积累阶段卵母细胞和卵泡细胞的超微结构特点, 以期从形态变化上揭示卵黄物质发生和迅速积累的机制。

1 材料与方法

1.1 实验用蟹和饲养管理

实验选用刚交配并一次抱卵中华绒螯蟹雌体, 卵巢已开始进入二次卵巢发育。选用卵巢第二次发育的雌体, 主要是考虑在相同发育起始点并在相同的温度条件下, 各抱卵蟹的卵巢发育时间基本一致, 比较同步。

具体操作如下: 2003 年 3–5 月间于上海瀛生实业有限公司育苗基地, 雌蟹在交配后 3 d 从亲蟹培育池中取出, 挑选四肢健全、体无外伤、活力较好、体质量 80~105 g 的抱卵蟹 120 只, 饲养于 3 只 10 m × 10 m × 1.5 m 的露天土池内, 每只池塘 40 只亲本, 盐度为 15, 每日投喂鲜活的缢蛏 (*Sinonovacula constricta*), 实验期间每周换水 50% 左右, 自然水温 13~20 °C, pH 值 7.5~8.5, $\text{NH}_4^+ \text{-N} < 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NO}_2^- \text{-N} < 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 取样和电镜切片

从亲蟹排卵开始, 每 3 天取 3 只抱卵蟹解剖, 迅速取出卵巢, 修块后用 2.5% 戊二醛固定 2~4 h, 用 pH 为 7.2 的磷酸缓冲液洗涤 3 次, 入 1% 锇酸后固定、经酒精梯度脱水至 90%, 转换丙酮, 以环氧树脂 812 包埋, 超薄切片经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM 100CX II 透射电子显微镜下观察并拍照, 整个取样一共持续 45 d。

2 结果

2.1 卵黄发生初期 (1~16 d)

卵黄发生前期和内分泌性卵黄合成期 (1~3 d) 排卵后第 1 天, 卵巢呈白色。排卵后 1~3 d 的卵巢, 主要由卵黄发生前期和内分泌性卵黄合成期的卵母细胞组成。卵黄发生前期卵母细胞核质比大, 核直径 17.9 μm , 单核仁且处于偏心位置, 核孔增多, 核膜念珠状 (图版 I-1)。紧靠核外膜的卵质中出现电子致密度较高的核仁类似物 (图版 I-1a), 其附近常伴有内质网囊泡存在, 部分囊泡正在形成卵黄颗粒 (图版 I-2)。胞质中有大量细胞器存在, 为内分泌性卵黄发生期做准备。

内分泌性卵黄合成期的卵母细胞, 皮层胞质内有大量正在合成卵黄的内质网囊泡, 囊泡间充斥着线粒体, 以为合成卵黄提供能量, 囊泡可相互不断融合形成更大的卵黄颗粒。与此同时, 胞质中出现同心圆结构的粗滑面内质网, 同心圆中心正在聚集形成卵黄体, 其膜外缘鼓出形成潴泡 (图版 I-3)。高尔基体数量丰富, 其边缘鼓起形成小泡, 并可在内质网囊泡内观察到大量小泡 (图版 I-4)。此时卵巢基膜经过第一次排卵后出现明显皱缩 (图版 I-5), 卵母细胞与卵泡细胞间有一定距离, 胞间有絮状物质正在向卵母细胞膜

靠近。卵母细胞膜完整,膜上附着小颗粒物质,有的细胞膜出现锁链状结构。胞间有少量淋巴细胞的分布,有些淋巴细胞正在吐出内含物,内含物质中有许多线粒体(图版 I-6)。

内源性卵黄合成后期(3~16 d) 排卵后 3~16 d,卵巢颜色为淡黄色。此时的卵巢主要由内源性卵黄合成期的卵母细胞组成,卵母细胞膜形态呈现多样化。卵母细胞皮层胞质中含有丰富的内质网囊泡,内质网囊泡正在大量合成卵黄物质(图版 I-7),而且不同透明区也在融合。同时,在这些透明区域里,可见原来的内质网囊泡中的卵黄物质已凝聚成卵黄球(图版 I-7),在卵黄球的周围有大量致密小颗粒向卵黄球集结。许多弧形粗面内质网也在合成卵黄物质(图版 I-7a),大量的线粒体位于附近为其提供能量(图版 I-7)。此时卵母细胞内的卵黄颗粒最大的直径有 1 μm 。

此期卵母细胞膜出现了多种形态。卵母细胞膜呈触手状突起,以便将胞外的物质卷入胞质以供合成卵黄物质之用(图版 I-8);部分卵母细胞膜出现断裂状,以便更容易接纳外源物质(图版 I-9);有些卵母细胞由于膜外附着有大量高密度颗粒而呈波浪状(图版 I-10)。卵母细胞的这些形态变化,将为外源卵黄合成期奠定基础,此时卵泡细胞还未向卵母细胞近旁移动。

2.2 卵黄发生后期(16~36 d)

卵泡细胞与卵母细胞结合阶段(16~21 d) 卵巢为淡红色。卵母细胞质膜皱缩加剧,呈现巨大的波浪状(图版 II-1)。皮层胞质内卵黄合成依然活跃,内质网囊泡的互相融合加速,出现很多大型囊泡。胞间出现大量未与卵母细胞结合的卵泡细胞,其内含有大量卵黄颗粒(图版 II-2)、脂肪滴、内质网囊泡(图版 II-4)及线粒体,说明卵泡细胞在结合之前已有丰富的营养物质与细胞器结构基础。

随后大量卵泡细胞向卵母细胞区迁移,穿插卵母细胞间,卵泡细胞起初卵圆形,膜平直,在接触卵母细胞表面后变为单层扁平细胞,接触后,卵母细胞膜皱褶消失,二者交界处的膜较为平整(图版 II-3)。

外源性卵黄合成期(21~36 d) 在排卵后 21~36 d,卵巢呈肉红色。卵泡细胞与卵母细胞结合后,膜交界处呈链珠状(图版 II-4)。两种细胞的物质交换以胞吞作用为主。卵泡细胞取代卵

母细胞膜成为接受外源物质的通道,卵泡细胞内含丰富细胞器,并以内吞方式大量吸收胞外的絮状物质,并将转化为卵黄物质,再转运到卵母细胞内(图版 II-4)。

2.3 卵黄合成后卵内的结构特征(45 d)

在外源性卵黄合成后期,卵泡细胞取代卵母细胞从胞间质吸收养分。卵泡膜变得更加平展,最薄处 1 μm 左右,与卵母细胞交界处膜呈链珠状(图版 II-5)。卵母细胞胞质中充满了大量的体积大且颗粒均匀的卵黄颗粒,也有大量油滴(L)均匀分布(图版 II-5)。此时,卵泡细胞膜与卵母细胞完全融合,高电子密度卵黄膜已形成(图版 II-6),整个卵膜分为内外两层。

3 讨论

3.1 卵黄发生初期

在实验中,中华绒螯蟹第二次发育的卵巢中并未发现多核共质体,可能由于卵原细胞在第一次排卵前已经完成分裂增殖过程,所以在排卵后第 1 天的采样中并未发现多核共质体^[10]。

在中华绒螯蟹第二次卵巢发育中,卵黄合成前期的卵母细胞胞质中核仁类似物的出现,以及在胞质中形成丰富的、致密的核糖体被认为是卵母细胞早期发育的特点^[12]。实际上在所谓的卵黄发生早期(early vitellogenesis)已开始自体形成极少量卵黄物质,该现象在甲壳动物(包括中华绒螯蟹的第一次卵巢发育卵母细胞的发生)中也较为普遍^[4, 11],这说明中华绒螯蟹第一与第二次卵巢发育中卵黄合成前期卵母细胞的卵黄合成特点基本一致。

中华绒螯蟹第二次卵巢发育中,卵母细胞内源性卵黄的形成与卵母细胞胞质中含有丰富细胞器如核糖体、内质网囊泡、高尔基体和线粒体等密切相关。实验中发现卵黄合成早期卵母细胞胞浆中出现大量的内质网囊泡,并伴有大量的卵黄物质的合成,因此,认为内质网囊泡的大量出现可以作为中华绒螯蟹第二次卵巢发育的内源性卵黄合成的全面启动标志,这一点与锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[10]和美洲龙虾(*Homarus americanus*)^[12]不同,这些动物卵黄发生初期卵黄合成全面启动开始于卵泡细胞向卵母细胞的迁移。中华绒螯蟹第二次卵巢发育中,卵黄物质发生开始时,卵黄颗粒直径仅 34~68 nm,经过 21 d(此后卵泡细胞与卵

母细胞开始结合),卵黄颗粒直径已有 $1\ \mu\text{m}$,说明在卵泡细胞向卵母细胞迁移前卵母细胞内进行了激烈的卵黄物质合成活动。

此外,本研究发现中华绒螯蟹第二次卵巢发育中的卵泡细胞向卵母细胞迁移时序晚于第一次卵巢发育^[2]。在中华绒螯蟹第一次卵巢发育过程中,卵泡细胞在卵黄发生前期就出现在卵母细胞的周围^[2],而在第二次卵巢发育中,卵黄发生初期卵泡细胞还未向卵母细胞迁移,出现这种差异的具体原因尚不清楚。中华绒螯蟹第二次卵巢发育的卵黄发生早期(雌蟹第一次排卵后1~3d),胞间絮状物质的形成可能与淋巴细胞内容物的释放有关,这说明中华绒螯蟹第二次卵巢发育中外源性卵黄物质的形成也有从血淋巴中摄入的途径,这与中华绒螯蟹第一次卵巢发育中的外源卵黄形成途径相似^[4]。

3.2 卵黄发生后期

中华绒螯蟹第二次卵巢发育中外源卵黄物质的合成,主要由卵泡细胞直接参与。此期卵泡细胞和卵母细胞膜均出现明显的变化,其中卵母细胞膜形态多样性更为明显,卵泡细胞向卵母细胞迁移的过程中,有些卵母细胞膜呈波浪状,有些膜部分破裂,当卵泡细胞结合到卵母细胞表面以后,卵泡细胞膜呈扁平状,此时卵母细胞膜形成链锁状结构,这些膜结构的变化可能便于吸收外源物质,这些结构的形成大大提高了卵母细胞从卵泡细胞吸收卵黄物质的效率。卵膜如此多样化的变化在中华绒螯蟹第一次卵巢发育^[2]和锯缘青蟹^[10]等甲壳动物中并未发现。本研究发现卵黄发生后期卵泡细胞中存在着大量正在合成卵黄物质的内质网囊泡,这可能说明卵泡细胞能以内吞方式吸收胞外絮状物质,然后将其转化为卵黄物质转运到卵母细胞内,而锯缘青蟹卵泡细胞并无任何与卵黄蛋白合成有关的细胞器,其作用仅为传递外源物质于卵母细胞内^[10]。完全成熟的卵母细胞中,卵黄体与脂肪滴在卵母细胞中交互分布,这与其它甲壳动物成熟卵母细胞的形态特征基本一致^[6,10]。

3.3 卵黄膜形成

中华绒螯蟹第二次卵巢发育的卵黄合成阶段,卵母细胞质膜外未形成卵膜,这样便于外源物质直接通过卵母细胞质膜进入卵母细胞内参与卵黄合成,直到卵母细胞内卵黄合成和积累基本完

成时,卵黄膜才逐渐形成。中华绒螯蟹卵黄膜由两层组成,外层电子密度高,内层较低,这和其他蟹类的卵膜结构基本一致^[3],但在两层膜起源的问题上,存在不少争议^[4,10,13],作者同意成永旭等^[10]的观点,即外层膜起源于卵泡细胞,而内层膜起源于卵母细胞本身。

参考文献:

- [1] 薛鲁征,堵南山,赖伟. 雌性生殖系统的组织学研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1987, 3: 88-97.
- [2] 邱高峰,陶铜静. 中华绒螯蟹卵黄发生的超微结构研究[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 9-13.
- [3] 堵南山,赖伟,南春容,等. 中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究[J]. 动物学报, 1995, 41(3): 229-234.
- [4] 堵南山,赖伟,陈鹏程,等. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究[J]. 动物学报, 1999, 45(1): 88-92.
- [5] Corinne C, Michel B. Differentiation of cytoplasmic organelles and storage of yolk during vitellogenesis in *Hemidiaptomus ingens* and *Mixodiaptomus kupelwieseri* (Copepoda, Calanoida) [J]. Journal of Morphology, 1993, 217: 87-103.
- [6] Beams H W, Kessel R G. Ultrastructure and vitellogenesis in the oocyte of the crustacean, *Oniscus asellus* [J]. J Submicrosc Cytol, 1980, 12: 17-27.
- [7] Kessel R G. Mechanisms of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocyte [J]. Z Zellforsch, 1968, 89: 17-38.
- [8] Rankin S M, Davis R W. Ultrastructure of oocyte of the shrimp, *Penaeus vannamei*; cortical specialization formation [J]. Tissue Cell, 1990, 22: 879-893.
- [9] 吴长功,相建海,刘瑞玉. 鹰爪虾卵子激活及卵裂的研究[J]. 动物学报, 2000, 46(1): 64-70.
- [10] 成永旭,李少菁,王桂忠,等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵母细胞和卵泡细胞之间的结构变化[J]. 动物学报, 2002, 48(1): 80-92.
- [11] Komm B S, Hinsch G W. Oogenesis in the terrestrial hermit crab, *Coenobita lypeatus* II. Vitellogenesis [J]. Journal of Morphology, 1987, 192: 269-277.
- [12] Schade M L, Shivers R R. Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocyte during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*.

An electron microscope-protein tracer study [J].

Journal of Morphology, 1980, 163:13-26.

形态学特征[J]. 动物学报, 2004, 50(5):873-

877.

[13] 薛俊增, 吴惠仙. 三疣梭子蟹卵附着机制及相关

图版说明 Explanation of Plates

图版 I 中华绒螯蟹第二次卵巢发育过程中卵黄发生初期卵巢的超微结构的变化

1. 卵黄合成初期卵母细胞核膜(↓)及胞浆中核仁类似物(↓), a. 放大的胞浆中核仁类似物(↓); 2. 卵黄合成初期卵母细胞胞质中大量的内质网囊泡(*); 部分内质网囊泡正在形成卵黄颗粒(↓); 3. 同心圆状粗面内质网(*)和由同心圆状粗面内质网形成的潴泡(↓); 4. 鼓出许多小泡的高尔基体(↓)和含有小泡的内质网囊泡(*); 5. 卵巢基膜收缩(↓)和卵母细胞与卵泡细胞间絮状物质(↓); 6. 淋巴细胞释放胞内的物质(↓); 7. 卵母细胞胞质中内质网囊泡正在形成卵黄颗粒(↓); 内质网囊泡中的卵黄物质已凝聚成卵黄球(Y); a. 正在合成卵黄物质的弧形粗面内质网(↓); 8. 卵母细胞胞膜呈触手状(↓); 内质网囊泡正在形成卵黄颗粒(*); 9. 卵母细胞胞膜部分断裂(↓); 完整细胞膜(↓); 10. 卵母细胞胞膜上附着大量的颗粒状物质(*)

图版 II 中华绒螯蟹第二次卵巢发育过程中卵黄发生后期卵巢的超微结构的变化

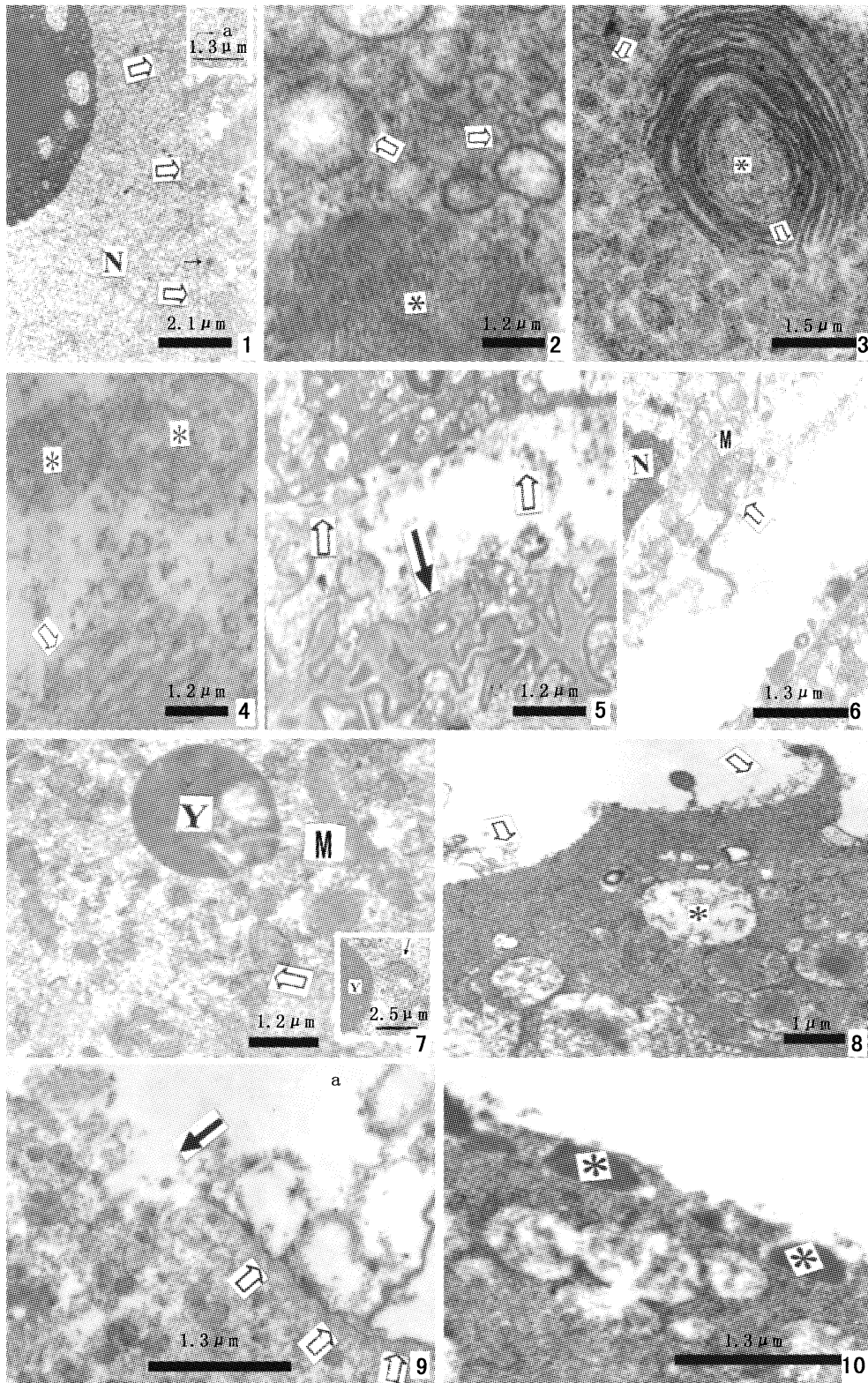
1. 波浪状卵母细胞膜(↓); 2. 卵泡细胞正在向卵母细胞靠近, 胞膜呈波浪状(↓); 3. 卵泡细胞与卵母细胞结合后膜平展(↓); 4. 卵泡细胞与卵母细胞的交界膜呈现链珠状(↓), 卵泡细胞胞质中含有脂滴(L)和内质网囊泡(*); 5. 卵泡细胞与卵母细胞的交界膜呈现链珠状(↓), 卵母细胞胞质中含有脂滴(L); 6. 成熟卵细胞膜(↓); N: 细胞核; Y: 卵黄体; M: 线粒体; F: 卵泡细胞

Plate I The ultrastructure of the *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards secondary developmental ovary during the primary stage

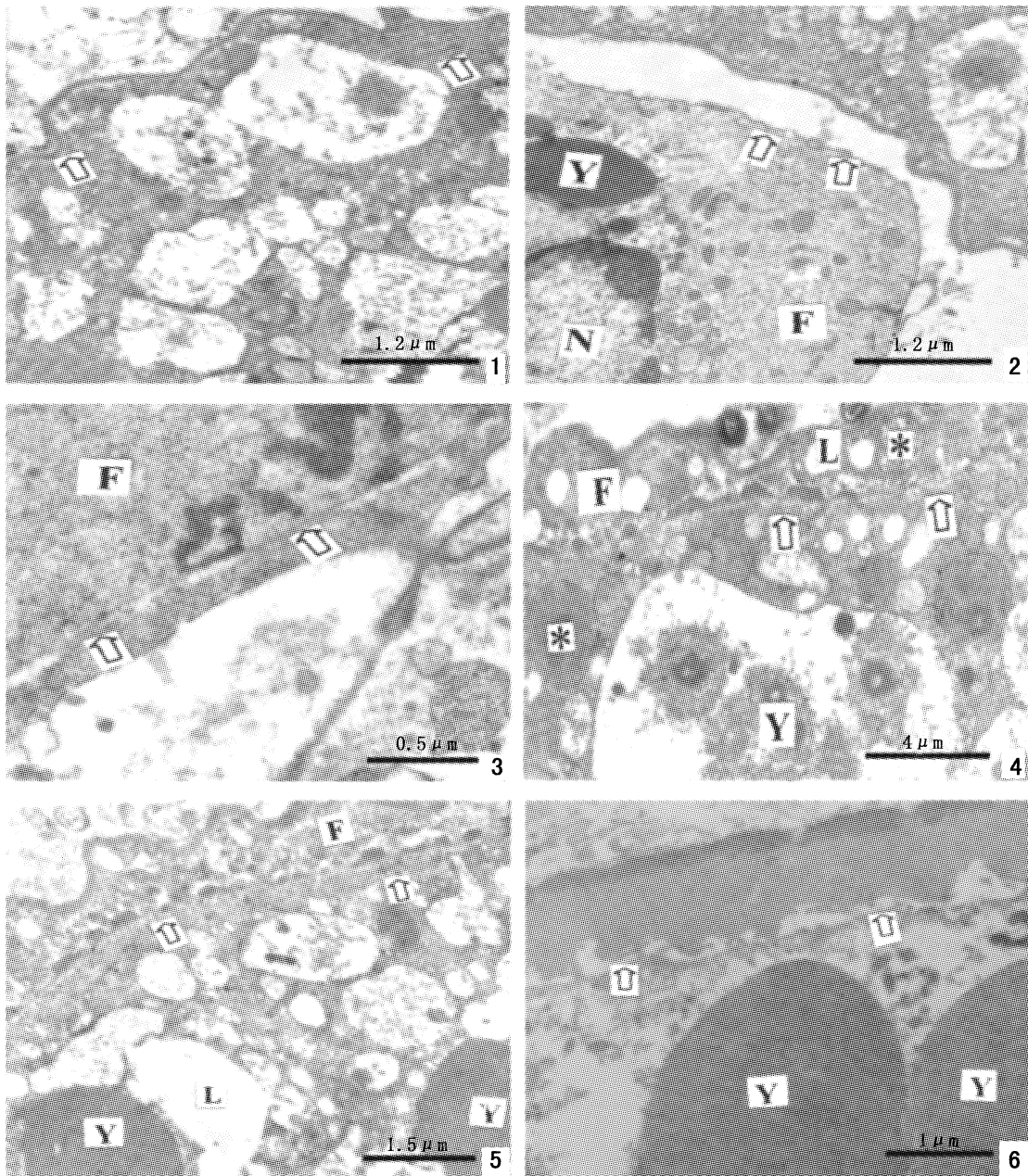
1. Membrane of oocyte nucleus(↓) and nucleolus-liked substance(↓) in ooplasm during primary vitellogenesis, a. Nucleolus-liked substance in ooplasm(↓); 2. Many vesicles of the endoplamic reticulum(*) in ooplasm during primary vitellogenesis, yolk formation in vesicles of the endoplamic reticulum(↓); 3. Loop-liked endoplamic reticulum(*) and many vesicles formed by Loop-liked endoplamic reticulum(↓); 4. Many vesicles in surface of Golgi complex(↓) and many Vesicles in endoplamic reticulum(*); 5. Shrinkage of ovary basal membrane(↓) and flocculent substance distributed between the follicular cells and oocytes(↓); 6. Lymphocyte releases flocculent dense bodies from cytoplasm(↓); 7. Vitellogenesis in vesicles of the endoplamic reticulum in ooplasm(↓); Ball-liked yolk forming in vesicles of the endoplamic reticulum(Y); a. Vitellogenesis in arc-liked endoplamic reticulum(↓); 8. Tentacle-liked ooplasmic membrane(↓); Vitellogenesis in vesicles of the endoplamic reticulum(*); 9. Membrane of oocyte ruptured(↓); The integral membrane of oocyte(↓); 10. Granule-liked substances adhere to membrane of oocyte(*)

Plate II The ultrastructure of the *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards secondary developmental ovary during the secondary stage

1. Wave-liked membrane of oocyte(↓); 2. Wave-liked membrane of follicular cell movement towards the surface of oocyte(↓); 3. Plane follicular cell membrane adhered to the surface of oocyte(↓); 4. Chain structure formed in the interface of oocyte and follicular cell(↓); Many vesicles of the endoplamic reticulum(*) and lipid droplets(L) were present in the cytoplasm of follicular cells; 5. Chain structure formed in the interface of oocyte and follicular cell(↓); lipid droplets(L) were present in the ooplasm; 6. Membrane of mature oocyte(↓); N: nucleus; Y: yolk; M: mitochondrion; F: follicular cells



图版 I Plate I



图版 II Plate II