

线纹海马(*Hippocampus erectus*)性腺特异性结构与生殖细胞发育特征研究*

陈灵珍^{1,2}, 秦耿^{1,3}, 王信¹, 刘雅莉¹, 肖旺红^{1,2}, 林强^{1,2,3}

1. 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 51030

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458

摘要: 海马属(*Hippocampus*)鱼类具有独特的雄性育儿繁殖方式, 其卵巢和精巢结构也极其独特。本研究系统阐明了线纹海马(*Hippocampus erectus*)的性腺及生殖细胞的发育特征, 根据组织学结构和细胞形态学变化特征, 将线纹海马的精巢和卵巢发育过程均分为 6 个时期。其中, 卵巢发育方式为不同步成熟型, 期卵巢只包含第 时相卵母细胞, 包括卵原细胞和早期初级卵母细胞($d < 20 \mu\text{m}$); 期卵巢开始出现第 时相卵母细胞($d = 20 \sim 140 \mu\text{m}$); 期卵巢卵母细胞数量显著增多, 体积增大, 并开始出现第 时相卵母细胞($d = 140 \sim 260 \mu\text{m}$), 此时细胞内开始出现皮质小泡、卵黄颗粒和卵黄膜;

期卵巢开始出现第 时相卵母细胞($d = 260 \sim 1100 \mu\text{m}$), 卵黄颗粒充满整个细胞质, 形成过渡期的卵黄球; 期卵巢出现大量第 时相成熟卵母细胞($d = 1100 \sim 2000 \mu\text{m}$), 细胞内形成流动性卵黄囊; 期卵巢为排卵不久后的卵巢, 卵母细胞数量显著减少。线纹海马精巢属于非限制型小叶精巢, 期精巢主要含精原细胞, 核大, 含一到多个核仁; 期精巢开始形成精小囊, 囊内出现初级精母细胞; 期精巢呈乳白色, 开始出现次级精母细胞; 期精巢体积较 期时显著增大, 开始出现精子细胞, 并逐渐移向中央生精腔; 期精巢内含大量的成熟精子, 随时准备释放。精子释放后精巢进入 期, 残留少量精细胞在生精腔中。组织化学反应结果显示, 氨基酸、蛋白质和脂肪的信号在卵母细胞的细胞质、卵黄囊中呈阳性, 且随着卵母细胞的发育而增强。本研究结果为进一步探索海马属鱼类雄性繁殖策略提供了重要的基础数据。

关键词: 线纹海马; 性腺发育; 组织结构; 卵巢; 精巢

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2020)06-0093-10

Distinct structures of gonads and germ cell development of lined seahorse, *Hippocampus erectus*

CHEN Lingzhen^{1,2}, QIN Geng^{1,3}, WANG Xin¹, LIU Yali¹, XIAO Wanghong^{1,2}, LIN Qiang^{1,2,3}

1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China

收稿日期: 2020-02-02; 修订日期: 2020-03-11。林强编辑

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1403003); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)重大专项团队项目(GML2019ZD0407); 广东省自然科学基金(2017A030313249)

作者简介: 陈灵珍(1993—), 广东省广州市人, 硕士, 从事海洋鱼类生殖生理与发育生物学研究。email: chenlingzhen17@mailsucas.ac.cn

通信作者: 林强, 研究员。email: linqiang@scsio.ac.cn

*感谢鲁东大学孙虎山教授提供实验技术支持。

Received date: 2020-02-02; **Revised date:** 2020-03-11. Editor: LIN Qiang

Foundation item: the National Key Research and Development Program (2016YFC1403003); Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (GML2019ZD0407); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030313249).

Corresponding author: LIN Qiang. email: linqiang@scsio.ac.cn

Acknowledgment: The authors thank Professor SUN Hushan for assistance with histochemical experiments.

Abstract: Seahorses (Genus *Hippocampus*) have not only peculiar reproductive strategy of male pregnancy but also unique ovarian and testis structures. Developmental characteristics of the ovary and testis as well as the germ cells of the lined seahorse (*Hippocampus erectus*) were clarified in the present study. Based on the histological structure and morphological features, we described six stages of gonadal development of lined seahorse. Seahorses have an asynchronous ovarian developmental characteristic. The stage I ovary contained only oogonia and early meiotic oocytes ($d < 20 \mu\text{m}$). In the stage II ovary, phase I oocytes ($d = 20\text{--}140 \mu\text{m}$) began to appear. In the stage III ovary, the number and volume of the phase II oocytes ($d = 140\text{--}260 \mu\text{m}$) were increased remarkably. The vitellogenic oocytes ($d = 260\text{--}1100 \mu\text{m}$), in which transitional yolk sphere was accumulated, could be observed in the stage IV ovary. Phase III maturational oocytes ($d = 1100\text{--}2000 \mu\text{m}$), which were characterized by highly compact vitelline envelope and fluid yolk mass, were observed in the stage V ovary. The ovary shortly after ovulation with decrement of the number of oocytes was stage VI ovary. The testis of the lined seahorse is of the unrestricted lobular type. Stage I testis mainly contained spermatogonia with large nuclear and one or more nucleolus. In the stage II testis, the spermatocyst began to appear, inside of which were the primary spermatocytes with smaller nuclear. The secondary spermatocytes were first present in the stage III testis. In the stage IV testis, the volume of testis was increased significantly and the matured spermatids appeared. Large scale of mature spermatozoa was restricted into the testicular lumen and ready to be released in the stage V testis. The stage VI testis was vascularized with few spermatozoa or spermatocytes in the lumen. Further histochemical analysis showed that the amino acid and fat were positive in the cytoplasm and yolk mass of oocytes, and accumulated with the oocytes development. Generally, our results provide basic evidence for further understanding of male pregnancy strategies of seahorses.

Key words: *Hippocampus erectus*; gonad development; histological structure; ovary; testis

海龙科(Syngnathidae)鱼类是动物界唯一采用雄性卵胎生繁殖策略的鱼类,雌鱼在交配过程中将成熟卵子排入雄鱼育儿袋内,卵子在育儿袋内受精后完成其胚胎发育过程(Whittington et al, 2015; Lin et al, 2016)。其中,海马(Genus *Hippocampus*)的育儿袋结构最为复杂,具有类似哺乳动物子宫的大部分功能(Stölting et al, 2007; Chen et al, 2020)。前期研究发现,与雄性育儿繁殖策略相适应,海马不仅具有独特的育儿袋,同时具有特异的性腺结构(Stölting et al, 2007)。Selman 等(1991)最早对线纹海马(*Hippocampus erectus*)的卵巢结构进行研究,发现线纹海马的卵巢结构与绝大多数硬骨鱼类不一样,具有两条生殖嵴,且生殖细胞排列规则、整齐,这种结构在硬骨鱼类中比较少见。Biagi 等(2016)发现长吻海马(*Hippocampus guttulatus*)的精巢结构与其他硬骨鱼类相比具有特殊性,阐明其精巢横切面结构为囊型,中央含单个生精腔,精子发生过程的前半部分在精小囊中进行,后半部分在精腔中进行。其独特的精巢形态学与组织学结构特征与之前已报道的海龙科鱼类 *Syngnathus abaster* 相似(Carcupino et al, 2002)。因此,海马特异性性腺结构的分子调控及进化机制成为当前海龙科鱼类研究的重要课题,而认识独特性腺结构的发育和形成过程是探究以上问题

的基础。

目前关于海马精巢和卵巢的研究主要涉及性腺组织学特征、生殖能力、环境因素对性腺发育的影响等方面(Selman et al, 1991; Lin et al, 2012),而关于海马性腺和生殖细胞发育过程等方面尚没有明确的研究。性腺的发育过程是鱼类繁殖与种群延续的生理基础,与物种自身的繁殖行为密切相关。鱼类原始生殖细胞出现于胚胎发育早期,以不同方式迁移至生殖嵴,与生殖上皮共同形成原始性腺,之后分化形成精巢或卵巢(Lubzens et al, 2010)。鱼类性腺发育与分化表现为解剖学和细胞学两个方面(Strüssmann et al, 2002)。解剖学方面主要是生殖腺的结构变化,包括生精导管、卵巢腔的有无等;细胞学方面包括卵(精)原细胞和卵(精)母细胞等生殖细胞的分裂增殖和发育成熟。通常生殖细胞的分化发生在解剖学分化之后(刘晨斌 等, 2019)。划分性腺发育时期和生殖细胞发育时相是认识鱼类性腺发育过程最简单有效的量化方法,目前国内外关于性腺发育时期划分的标准众多,不同的学者对鱼类卵巢发育的分期也不相同,从 4~8 个时期不等(徐钢春等, 2017)。国内学者多采用刘筠(1993)的分期标准,以性腺组织学特征为基础,结合细胞形态学及生理学特征,把性腺发育分为 6 个时期。此外,鱼类卵细

胞中含有丰富的营养物质如蛋白质、脂类和多糖等(Kamler, 2008), 能够为受精后的早期胚胎发育提供重要的能量来源, 在个体早期发育中起重要的作用(Eldridge et al, 1983)。目前, 关于雄海马在雄性育儿过程中是否为胚胎提供营养供给尚存在争议(Stölting et al, 2007), 研究生殖细胞中不同营养物质的组成、分布特征, 能够为探索海马胚胎发育的营养来源提供参考依据。虽然已有关于虎尾海马(*H. comes*)卵细胞中氨基酸、脂肪酸组分及含量特征的报道(Lin et al, 2008, 2012), 但目前尚没有对海马不同发育时相卵细胞中营养物质的含量变化及分布特征的相关研究。据此, 本研究以线纹海马为研究对象, 基于组织学和组织化学方法, 对不同生长时期海马的性腺结构、性腺及生殖细胞发育特征进行了系统研究, 以期深入解析海马独特性腺结构的发生机制提供依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验用海马

实验用线纹海马取自深圳海马养殖基地, 于中国科学院南海海洋研究所水生生物养殖实验平台进行养殖, 实验时间为 2019 年 3—11 月, 采用室内半开放式循环水养殖, 水温为 21~25℃, 海水盐度为 30‰~34‰, 光照为 2000~4000lux, 光照周期为 12h : 12h, 2 月龄之前主要投喂活体卤虫, 之后逐渐驯化以冰冻糠虾为主, 每天投喂 2 次, 时间分别为 9 : 00 和 16 : 00。

1.2 实验方法

为获取连续发育时期的性腺样本, 对不同生长时期的海马进行采样和测量, 在幼鱼孵化后第 1 天至第 49 天, 每间隔 7 天取样一次; 50 天至 270 天期间, 每隔 15 天取样一次, 每次取样不低于 10 尾。取样方法如下: 海马冰水麻醉, 测量体重, 解剖获得性腺, 于 Bouin 溶液固定 24~48h 后, 换 75%乙醇溶液保存; 其中, 小个体海马直接整体固定, 固定样品采用常规石蜡包埋、切片(5μm)、苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)。同时选取不同发育时期性腺进行组织化学染色, 脂肪采用油红 O 染色法检测, 红色沉淀为阳性(陈敬文 等, 2016), 氨基酸采用茚三酮检测法, 紫色沉淀为阳性(甄贞 等, 2014)。组织学切片采用 ZEISS 显微镜镜检、拍照。

2 结果

2.1 线纹海马不同生长时期性腺形态学结构特征

初生海马(孵化后 1 日龄)体长为 1.01cm, 体重

约为 0.005g, 未观察到明显性腺。约在 21 日龄左右, 海马开始出现典型的性腺结构, 肉眼只能够观察到卵巢。30 日龄左右能够通过肉眼观察到雌雄性腺。孵化 55 日龄后, 海马精巢与卵巢的形态学开始发生显著变化, 解剖镜下可清晰分辨。90 日龄左右, 大多数卵巢出现明显的卵黄颗粒, 呈橘黄色。90~180 日龄, 海马体重快速增长, 雌鱼卵巢体积发生明显增长, 颜色逐渐转向橘黄色或橘红色, 该时期的雄鱼精巢快速延长、膨胀, 颜色过渡到为乳白色。线纹海马在 90~180 日龄体重增长率也最大, 平均增重率为 $0.084\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$, 同时, 体长增长也较快, 平均体长增长率为 $0.058\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$, 其性腺发育速率加快。180 日龄后, 海马体重增长速度逐渐减缓, 卵巢和精巢发育成熟, 卵巢饱满, 颗粒感明显, 呈深橘黄色或橘红色, 挤压腹部可产出卵子, 精巢充盈, 可观察到交配行为和怀孕现象(表 1)。

2.2 海马不同时期的卵巢结构与发育特征

以线纹海马卵细胞发育特征为基础, 结合卵巢自身的组织学发育特征, 将线纹海马卵巢发育分为—I—VI 期(图 1)。

期卵巢: 卵巢透明, 细丝状, 紧贴体腔内壁, 卵巢膜较薄, 横切面为三角形, 含两个生殖嵴, 生殖嵴内主要含有第 I 时相的生殖细胞, 包括卵原细胞和早期初级卵母细胞。细胞数量较少, 多为圆形或椭圆形。

期卵巢: 卵巢肉粉色, 带状至圆柱状, 较 I 期卵巢粗, 卵巢膜薄, 初级卵母细胞数量明显增多, 为初级卵母细胞的小生长时期, 同时存在第 I、II 时相卵母细胞, 以第 II 时相卵母细胞为主, 第 II 时相卵母细胞为椭圆形, 单层、鳞片状的滤泡细胞开始形成。

期卵巢: 卵巢淡橘黄色, 圆柱状或蛹状, 卵巢进一步增大, 卵巢膜增厚, 可见卵巢膜上的血管, 此时为初级卵母细胞的大生长时期, 同时存在第 I—II 时相卵母细胞, 以第 II 时相卵母细胞为主, 细胞为椭圆形, 细胞内膜边缘开始出现卵黄颗粒并向中央聚集, 卵黄颗粒清晰可见, 卵母细胞被两层滤泡膜包围。

期卵巢: 卵巢深橘黄色, 蛹状, 体积显著增大, 占据腹腔的大部分空间, 卵巢膜继续增厚, 卵母细胞直径增大, 卵母细胞数量增多, 由第 I—II 时相卵母细胞组成, 以第 II 时相卵母细胞为主, 一般为椭圆形, 卵黄颗粒饱满并充满整个细胞质, 此阶段为卵黄颗粒积累及卵黄生成的完成阶段, 卵粒可从卵巢上分离, 卵巢膜继续增厚, 同时产生辐射纹。

表 1 线纹海马不同生长时期性腺形态学特征
Tab. 1 Morphological characteristics of gonads at different development stages of lined seahorse *H. erectus*

生长时期/d	体重/g	体长/cm	卵巢	精巢
14	0.03 ± 0.01	2.20 ± 0.13	性腺不可见	性腺不可见
21	0.04 ± 0.01	2.59 ± 0.10	肉眼可见	肉眼不可见
30	0.15 ± 0.02	3.37 ± 0.74	肉眼可见	肉眼可见
40	0.33 ± 0.14	4.52 ± 0.70	性腺细丝状, 透明, 组织切片可辨	性腺细丝状, 透明, 组织切片可辨
55	0.41 ± 0.07	5.11 ± 0.41	肉粉色, 性腺增粗, 细丝状, 肉眼可辨	透明, 性腺增长, 细丝状, 肉眼可辨
70	0.55 ± 0.08	5.55 ± 0.20	肉粉色至浅黄色, 性腺带状, 较精巢略短	透明, 性腺增长, 带状
90	2.14 ± 0.73	8.36 ± 0.93	淡橘色, 性腺增粗, 圆柱状, 较短, 含少量卵黄颗粒	乳白色, 性腺增粗增长, 管状, 结缔组织增多
120	4.42 ± 0.80	9.75 ± 1.93	橘色, 性腺增大, 蛹状, 卵黄颗粒增多, 但不能分离	乳白色, 性腺进一步增长、增粗, 管状, 结缔组织增厚
150	5.08 ± 1.74	10.01 ± 0.77	深橘色, 性腺体积进一步增大, 蛹状, 卵黄颗粒增多, 饱满	乳白色, 性腺依然在增粗、增长, 长管状, 结缔组织增厚, 肉眼可见血管
180	9.67 ± 1.28	13.58 ± 0.65	橘红色, 性腺体积进一步增大, 蛹状, 卵粒饱满, 卵子可从卵巢中挤出	乳白色, 性腺圆管状, 较粗, 精液可从精巢中挤出, 肉眼可见血管
250	10.30 ± 0.19	13.80 ± 0.22	深橘红色, 性腺体积变小, 松弛, 含皱缩空泡, 含卵黄颗粒, 但不能分离	乳白色, 性腺圆管状, 较粗, 肉眼可见血管

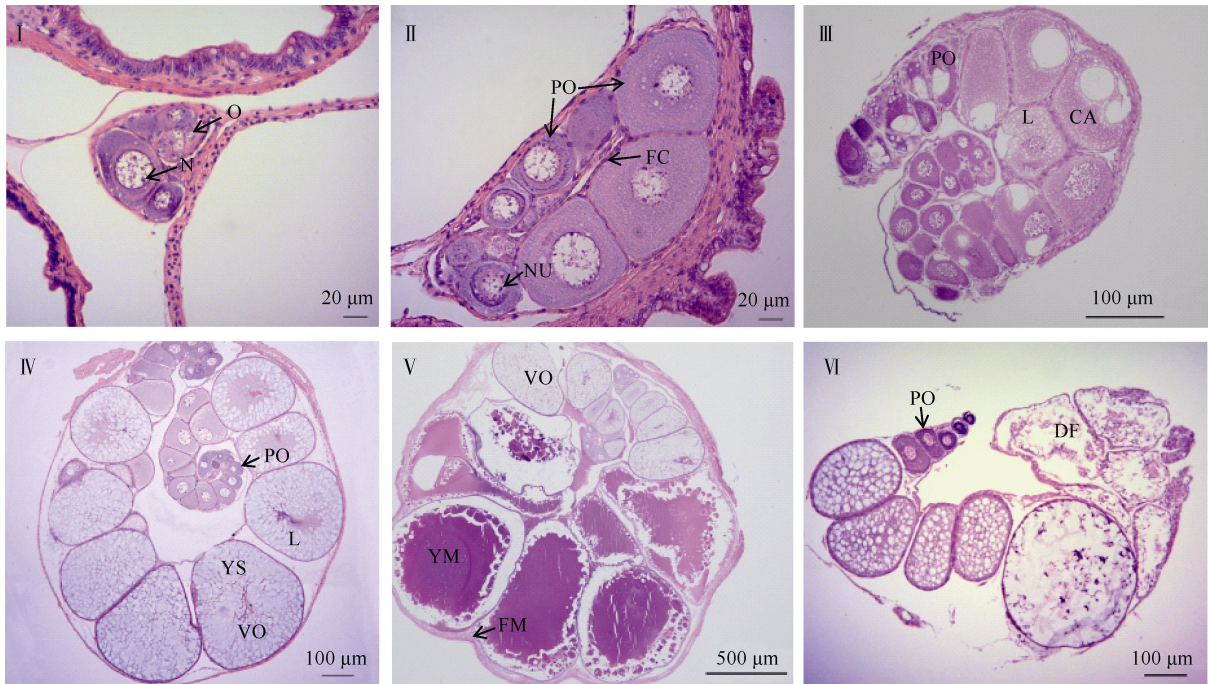


图 1 线纹海马不同发育时期卵巢的组织学结构
CA: 皮质小泡; DF: 退化的滤泡细胞; FC: 滤泡细胞; FM: 滤泡膜; L: 脂滴; N: 细胞核; NU: 核仁; O: 卵原细胞; PO: 初级卵母细胞; VO: 含卵黄颗粒卵母细胞; YM: 卵黄囊; YS: 卵黄球。
Fig. 1 Histological structures of different stages of *H. erectus* ovaries. CA: cortical alveoli; DF: degenerated follicle cell; FC: follicle cell; FM: follicle membrane; L: lipid droplet; N: nuclear; Nu: nucleolus; O: oogonia; PO: primary oocyte; VO: vitellogenic oocyte; YM : yolk mass; YS: yolk sphere.

期卵巢：卵巢深橘红色，体积最大，呈蛹状，表面有弹性，卵巢由第 — 时相卵母细胞组成，以第 时相卵母细胞为主，占卵巢体积四分之三以上，卵母细胞中央充满卵黄颗粒，两条白色的生殖嵴在黄色的背景下非常明显，卵母细胞周围的滤泡细胞显著增大，为方形，卵母细胞完成第一次成

熟分裂，随时可从滤泡中释放排出。
VI期卵巢：卵巢暗橘红色，为产卵不久后的卵巢，体积明显变小，松弛、扁瘪，呈倒三角形，卵母细胞数量显著减少，主要以第 、 、 时相卵母细胞为主，但数量较少，同时存在排空或退化的皱缩滤泡。

2.3 海马不同时相卵母细胞的生长特征

卵巢内卵母细胞的不同发育时相可根据细胞大小、核质比大小、细胞形状、细胞器及营养物质的变化等进行划分, 据此, 线纹海马卵母细胞的发育过程可分为 — 时相(图 2)。

第 时相: 细胞直径为 $<10\mu\text{m}$, 为卵原细胞, 细胞接近圆形, 核质比较大, 染色质浓缩, 细胞之间相互紧密排列, 无明确的细胞界限, 细胞数量较少, 只存在生殖嵴内; 脂肪染色为阴性, 氨基酸染色为细胞质为阳性(蓝紫色)。

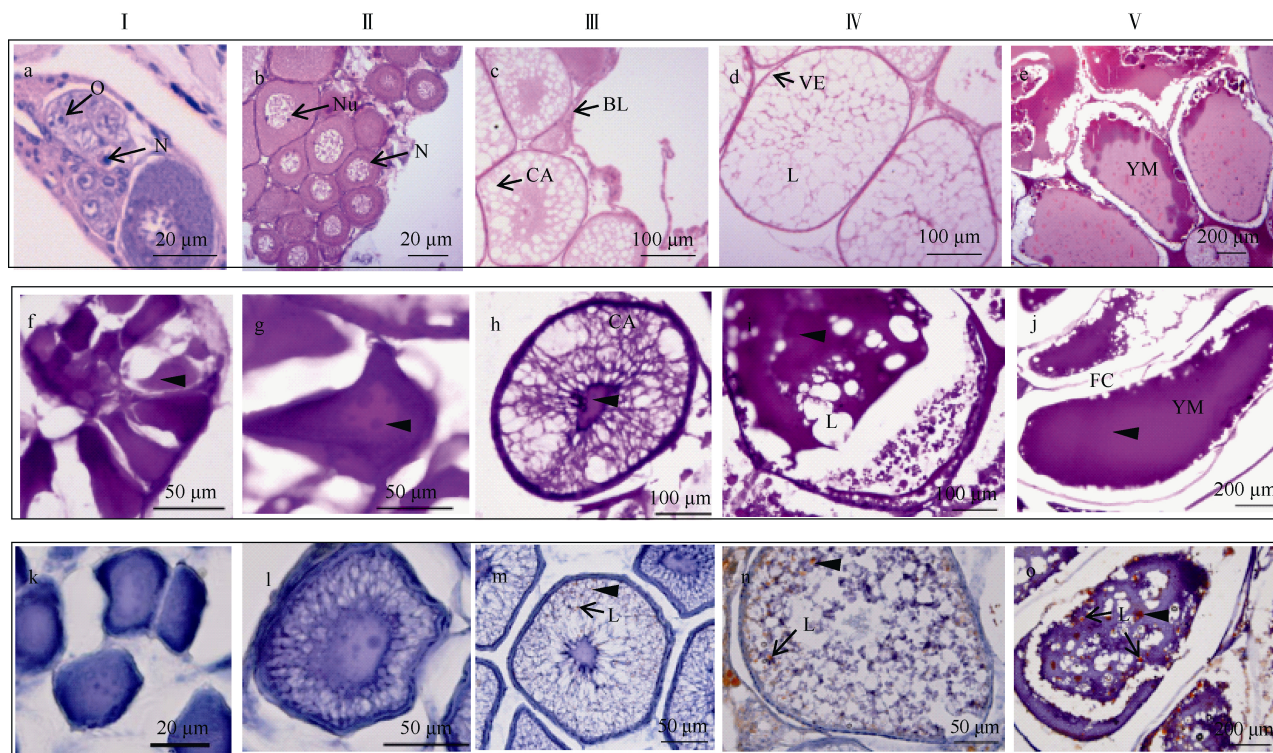


图 2 线纹海马不同发育时相卵母细胞的组织学及组织化学特征

a—e: HE 染色; f—j: 氨基酸染色; k—o: 脂肪染色; BL: 基膜; CA: 皮质小泡; FC: 滤泡细胞; L: 脂滴; N: 细胞核; Nu: 核仁; O: 卵原细胞; VE: 卵黄膜; YM: 卵黄囊; 小三角形代表氨基酸和脂肪阳性信号

Fig. 2 Histological and biochemical analysis of different stages of oocytes in *H. erectus*. (a-e) hematoxylin and eosin staining; (f-j) staining of amino acid; (k-o) staining of fat. BL: basal lamina; CA: cortical alveoli; FC: follicle cell; L: lipid droplet; N: nuclear; Nu: nucleolus; O: oogonia; VE: vitellogenic envelope; YM: yolk mass. Small triangles represent signals of amino acid and fat

第 时相: 细胞直径为 $10\sim140\mu\text{m}$, 第 时相卵母细胞又进一步划分为第 a 时相和第 b 时相, 其中第 a 时相卵母细胞的细胞直径为 $10\sim20\mu\text{m}$, 为第一次减数分裂前期的卵母细胞, 或叫早期生殖细胞, 仍存在生殖嵴内, 细胞大小与卵原细胞接近, 但核质比相对第 时相的稍小一些, 细胞核较圆, 可看到联会复合体和核仁, 此时为卵母细胞的染色质-核仁生长时期; 第 b 时相卵母细胞的细胞直径为 $20\sim140\mu\text{m}$, 细胞为圆形或椭圆形, 细胞质逐渐增大, 核质比变小, 细胞核周围的核仁增多, 细胞外周开始形成早期鳞片状滤泡细胞, 卵母细胞逐渐离开生殖嵴, 此时为卵母细胞的小生长期(或核仁外周的生长期)。脂肪染色显示为阴性, 氨基酸染色显示, 卵母细胞的细胞质为阳性(蓝紫色)。

第 时相: 细胞直径为 $140\sim260\mu\text{m}$, 细胞为椭圆形, 此阶段为卵母细胞的大生长期, 细胞质继续增大, 核质比小, 核内仍见多个核仁, 细胞内开始出现皮质小泡、油滴和卵黄颗粒, 细胞边缘形成卵黄膜, 卵母细胞外形成两层鳞片状滤泡膜; 脂肪染色显示油滴中为阳性(橙红色颗粒), 且主要集中在细胞边缘, 氨基酸染色显示, 卵母细胞的细胞质为阳性(紫色), 皮质小泡为阴性。

第 时相: 细胞直径为 $260\sim1100\mu\text{m}$, 卵母细胞质增大, 核质比较小, 细胞一般为椭圆形, 皮质小泡充满整个细胞质, 中间含有较多油球且体积变大, 同时, 此阶段为卵黄颗粒生成的完成阶段, 卵黄颗粒充满整个核外空间, 形成过渡期的卵黄球, 细胞颜色为深橘色, 卵母细胞外周的滤泡变成方形。脂

肪染色显示油滴中为强阳性,橙红色颗粒增多,且体积增大,并逐渐转移至细胞中央,同时,氨基酸染色显示,卵母细胞的细胞质为强阳性(深紫色),皮质小泡和油滴为阴性。

第 时相:细胞直径为 1100~2000 μm ,早期接近成熟卵子的状态,细胞为椭圆形,后期是成熟的卵细胞,细胞为梨形;卵黄膜变厚且结实,不易破,卵黄颗粒在此阶段相互融合,集聚成片,形成流动性卵黄囊,细胞颜色为橘红色,细胞核位置偏移至动物极,油滴在动物极积聚,核孔溶解、消失,同时,卵母细胞外被的滤泡细胞体积显著增大;脂肪染色显示橙红色阳性颗粒在油滴中增多,且体积增大,几乎遍布细胞中央,氨基酸染色显示,卵母细胞中卵黄囊为强阳性(深紫色),滤泡细胞为阴性。

2.4 海马不同时期的精巢结构与发育特征

线纹海马的精巢发育同样分为 6 个时期,即—I—VI时期(图 3)。

期精巢:精巢透明,细线状,紧贴体腔内侧,肉眼难以区分雌雄。生殖层主要含精原细胞,细胞为圆形,细胞核大且染色较深,精原细胞直径为 4.63~6.21 μm 。

期精巢:精巢透明,带状,性腺进一步增长,较卵巢长,精腔增大,肉眼可辨雌雄。肌肉层和基膜增多,生精层精囊里出现初级精母细胞,呈椭圆形,体积较精原细胞小,细胞核染色较深,含明显的联会复合物。

期精巢:精巢半透明、乳白色、管状,性腺继续增粗增长,次级精母细胞开始出现且逐渐增多,体积较初级精母细胞小,细胞核明显,深蓝色且染色较深,细胞直径为 4.66~4.95 μm 。

期精巢:精巢半透明、乳白色、管状,性腺进一步增长、增粗,体积较 期增大。生精层含较多的精母细胞,开始出现精子细胞,且数量增多,逐渐移向中央的生精腔进一步发育成精子。

期精巢:精巢外观饱满膨胀,乳白色,管状,精子细胞发育为成熟精子,精腔中含大量的成熟精子准备释放,精巢横切面可见大量粘稠状、乳白色精子溢出,成熟精子的细胞核较精母细胞的明显,染色较深,为深蓝色。

VI期精巢:精巢乳白色,充血明显,略带红血丝,皱缩,体积略变小,精腔中的精子较少,生精上皮层含少量精母细胞,继续发育为成熟的精子。

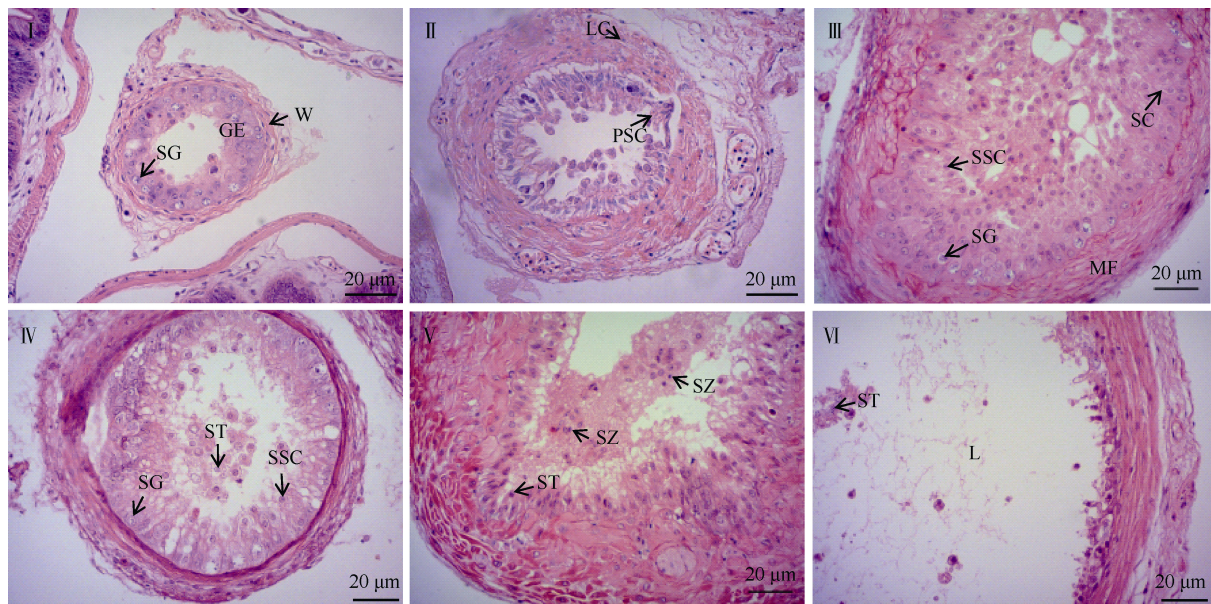


图 3 线纹海马不同发育时期精巢的组织学结构

GE: 生殖上皮; L: 精腔; MF: 肌肉纤维; PSC: 初级精母细胞; SC: 支持细胞; SG: 精原细胞; SSC: 次级精母细胞; ST: 精子细胞; SZ: 精子; W: 精巢膜

Fig. 3 Histological structures of different stages of *H. erectus* testis. GE: germinal epithelium; L: lumen; MF: muscle fibres; PSC: primary spermatocyte; SC: sertoli cell; SG: spermatogonia; SSC: secondary spermatocyte; ST: spermatid; SZ: spermatozoa; W: wall

3 讨论

在鱼类中,当原始生殖细胞迁移至性腺原基并与其共同构成原始性腺后,性腺才开始发育和分化(Xu et al, 2010)。雌鱼早期性腺分化的标志是卵原细胞开始进行减数分裂或腹膜腔里形成卵巢腔和输卵管(林浩然, 2011)。本研究在 21 日龄海马中即观察到卵巢,未观察到疑似混合性腺,且不存在类似斑马鱼的未分化卵巢样生殖腺(juvenile ovary) (Orban et al, 2009),推测海马的精巢和卵巢极有可能是由原始性腺直接分化而成。长吻海马在孵化后 5 日龄就能通过第一个卵原细胞分辨卵巢(Ofelio et al, 2018),海马 *H. reidi* 孵化后 16 日龄出现明显的卵巢结构(Novelli et al, 2015)。本研究发现,线纹海马的性腺发育比以上海马种类稍晚,在孵化后 21 日龄才开始出现典型的性腺结构,30~40 日龄左右可通过组织学清晰辨别卵巢和精巢。而斑马鱼的性腺分化发生在孵化后 20~30 日龄左右(Uchida et al, 2002; 王晶 等, 2011),大黄鱼在孵化后 20 日龄形成原始性腺,50 日龄左右性腺开始分化(游秀容 等, 2012),说明不同物种的性腺的形成及发育时间存在明显差异。此外,线纹海马卵巢发育与体重增长具有一定正相关性,与大多数鱼类报道相一致(游秀容 等, 2012)。

绝大多数硬骨鱼类如斑马鱼、青鳉等,其卵巢的早期生殖细胞镶嵌分布于成熟的卵母细胞中,生殖细胞分布散乱、无规则(Takahashi et al, 2013)。然而,海龙科的卵巢结构独特,与绝大多数硬骨鱼类不同,海龙科卵巢具有犹如“干细胞区”的生殖嵴,能够源源不断地产生生殖细胞,并且这些生殖细胞按成熟度有规律地围绕生殖嵴呈双螺旋排列。不同海龙科鱼类的生殖嵴数量不同,某些海龙科鱼类如 *S. typhle*、*S. scovelli*、*S. schlegeli*、*Hippichthys spicifer* 等,每个卵巢中只含有一个生殖嵴,而部分海龙科鱼类含有两个生殖嵴(Begovac et al, 1988; Sogabe et al, 2013)。线纹海马每个卵巢中均含有两个生殖嵴,生殖嵴中只含有卵原细胞和早期初级卵母细胞,细胞之间相互紧密排列。卵母细胞完成第一次减数分裂前期的分化后,逐渐离开生殖嵴,同时外周开始形成滤泡细胞,卵母细胞在独立的滤泡细胞中继续分化、成熟。这种特殊的卵巢结构使线纹海马成为研究早期生殖细胞分裂、分化等重要过程分子调控机制的理想材料。

最早有学者提出,把鱼类卵巢发育过程分为 6

个时期,施琅芳(1988)在之前的分期基础上,提出了更进一步的观点,即除数量比例外,还可以按照不同时相卵母细胞所占的体积进行分期。刘筠(1993)认为鱼类卵巢分期应以卵细胞成熟等级为标准,结合卵巢细胞学及生理学数据进行划分。目前,关于卵巢分期国内外还没有统一的标准,本研究按照刘筠的分期标准,将线纹海马卵巢发育分为 6 个时期,该结果与海马近缘物种薛氏海龙的性腺分期方法非常相似(黄玉喜 等, 2018)。与此相对应,以卵细胞的发育程度、营养物质的积累状况为依据,本研究将线纹海马卵细胞的发育过程分为 5 个时相,与斑马鱼、海龙 *Syngnathus scovelli* 等物种的划分方式类似(Begovac et al, 1988; Selman, 1993)。线纹海马性腺及卵母细胞的发育比已报道的长吻海马较晚。长吻海马孵化后 5 日龄即可看到卵巢里的第一个卵原细胞,60 日龄卵母细胞即可达到皮质小泡的发育阶段,随后雌性很快达到性成熟(Ofelio et al, 2018)。

鱼类卵巢按照卵母细胞的发育情况分为同步成熟型和不同步成熟型(Selman et al, 1989)。同步成熟型卵巢一年一次产卵,且繁殖期较短,如大马哈鱼、草鱼、鳊鱼、鳙鱼等(林浩然, 2011);不同步性成熟卵巢一般存在于多批产卵型鱼类,如鲤鱼、鲮鱼、小丑鱼、圆斑星鲽、青石斑鱼等(Nagahama et al, 1983; Nejedly et al, 2004; 徐永江 等, 2011)。线纹海马卵巢发育为不同步成熟型,除 I 期卵巢外,海马 — VI 期卵巢均存在不同发育时相的卵母细胞,即使排卵后的 VI 期卵巢也依然存在三个时相(—)的卵母细胞,这些未成熟的卵母细胞将继续发育成熟,为雌海马再次交配做准备。海马特殊的卵巢结构可能与其一年多次产卵方式相适应(Sogabe et al, 2013),类似现象已经在日本海马及薛氏海龙中报道(左镇生 等, 1985; 黄玉喜 等, 2018)。

绝大多数卵生鱼类胚胎发育的营养供给主要来自卵细胞中的卵黄颗粒(Kamle, 2008),但海马是一种雄性卵胎生的鱼类,其受精及胚胎发育均在雄性育儿袋内完成(Whittington et al, 2015; Lin et al, 2016),海马胚胎发育所需的营养物质可能同时来源于父体育儿袋与母体卵黄的营养(Whittington et al, 2015)。卵黄是鱼类卵母细胞的主要成分,海马的卵细胞与众多海洋鱼类的相比,其卵黄所占比例较大。长吻海马卵细胞中卵黄体积占整个卵细胞体积的 $59.0 \pm 9.5\%$ (Planas et al, 2010),在海马 *H. reidi* 中可达 68% (Silveira, 2005)。研究发现,海马卵细胞的脂质含量不仅直接影响卵细胞的

存活率,并且影响受精后胚胎发育的营养供应(Saavedra et al, 2014, 2016)。之前的研究表明,海马成熟卵细胞直径一般为0.9~2.0mm (Foster et al, 2004)。本研究发现,线纹海马的成熟卵细胞长径达2mm,在已报道的海马种类中是卵细胞较大的一种,这可能与人工繁育过程中线纹海马仔鱼的成活率较高有一定的相关性,较大的卵细胞以及占比较高的卵黄能够为胚胎发育以及仔鱼的存活提供重要的物质基础,从而产生更大的初生幼鱼。茛三酮反应能够检测大部分的氨基酸及蛋白质(Friedman, 2004)。本研究中,紫色的氨基酸/蛋白质信号能够在卵母细胞的细胞质和卵黄囊中检测到,说明线纹海马卵黄的主要营养成分之一是氨基酸/蛋白质,该结果与长吻海马及大多数卵生鱼类的结果相似(Kamler, 2008; Planas et al, 2010)。脂肪信号在第一时相卵母细胞的油滴中显示为阳性,且随着油滴的增大而增强,证明线纹海马卵母细胞的油滴为脂质性油滴,该结果与Begovac等(1988)描述的大多数硬骨鱼类的结果一致。因此,本研究中的氨基酸和脂肪组织化学染色结果表明,线纹海马卵细胞中卵黄的主要营养成分为氨基酸、蛋白质和脂质,推测线纹海马早期胚胎发育的营养来源很可能跟其他卵生鱼类一样,主要依靠卵黄中的营养物质。

硬骨鱼类精巢分化的标志包括精原细胞的出现、精(原)精母细胞排列结构的变化、精小叶的形成、精小管等睾丸脉管系统的分化等(尹洪滨等, 2008; Nakamura et al, 1998)。斑马鱼的精巢最早于35日龄由卵巢样性腺分化而成(王晶等, 2011),大黄鱼精巢分化时间较晚,直至95日龄精巢才开始分化(游秀容等, 2012)。本研究中,线纹海马于孵化后21日龄未能通过肉眼观察到精巢,推测可能由于性腺非常细小而未能观察到,精巢于孵化后30日龄左右能通过肉眼观察到,略晚于卵巢,这与大多数研究报道雌性性腺分化要早于雄鱼的现象相一致(Nishimura et al, 2014)。

目前国内外对精巢发育时期的划分也存在多种观点。本研究根据精巢形态学、组织学及不同时相生殖细胞的发育特征,将线纹海马的精巢发育过程分为6个时期,该分期方法与报道的薛氏海龙的类似(黄玉喜等, 2018)。硬骨鱼类的精巢可分为小管型和小叶型(Biagi et al, 2016),绝大部分硬骨鱼类精巢属于小叶型(Parenti et al, 2004)。线纹海马精巢没有典型的小管型分支,整个精巢呈空心囊状,含有精小囊结构,属于非限制型小叶精巢,与其他海龙科鱼类如*S. abaster*、*S. typhle*、*S. tenuirostris*、*S. acus*、*H. kuda*和*H. guttatalus*等类似(Biagi et al, 2016; Piras et al, 2016)。小叶型又分为半囊成熟型和全囊成熟型,绝大多数硬骨鱼类的精子成熟方式属于全囊成熟型(cystic):从精原细胞至精子,同一阶段的生殖细胞存在于同一个精小囊(cyst)中,不同生殖细胞之间有细胞桥连接,含精子细胞的精小囊破裂,精子释放至精腔中(Van Look et al, 2007; Biagi et al, 2016)。线纹海马精子成熟方式与绝大多数硬骨鱼类不同,类似半囊成熟型(semicystic type):精小囊存在于生殖上皮,精小囊中只含有精原细胞和初级精母细胞,生殖细胞之间没有细胞桥连接,待初级精母细胞进一步分化,精小囊破裂,次级精母细胞在腔中继续发育成熟至成熟精子,最终移至精腔中等待释放。这种半囊成熟型的精子发生方式产生的精子数量较少(Kvarnemo et al, 2004)。由于海马的育幼行为由雄性承担,为了减少能量输出,海马每次繁殖时只产生较少数量的精子,这种行为被认为是一种在进化过程中减少能耗的策略(Biagi et al, 2016)。

综上所述,本研究基于组织学和细胞形态学特征对线纹海马卵巢和精巢的发育时期进行了划分,并结合组织化学方法探讨了生殖细胞的发育过程和营养物质的变化特征,研究结果有助于提高对海马繁殖生物学的认知,为后续深入探索海马属鱼类性腺发育的分子调控机制提供了生物学依据。

参考文献 References

- 陈敬文, 游淑源, 王天娟, 等, 2016. 三种不同脂肪染色方法的比较[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 25(3): 273-276.
CHEN JINGWEN, YOU SHUYUAN, WANG TIANWA, et al, 2016. Comparison of three different fat staining methods[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 25(3): 273-276 (in Chinese with English abstract).
- 黄玉喜, 陈平, 张秀梅, 2018. 青岛斋堂岛附近海域薛氏海龙繁殖生物学[J]. 中国水产科学, 25(2): 384-394. HUANG YUXI, CHEN PING, ZHANG XIUMEI, 2018. Reproductive biology of *Syngnathus schlegelii* on the coast of Zhaitang Island[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 25(2): 384-394 (in Chinese with English abstract).
- 林浩然, 2011. 鱼类生理学[M]. 广州: 中山大学出版社: 292-295. LIN HAORAN, 2011. Fish physiology[M]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press: 292-295 (in Chinese with English abstract).

- 刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等, 2019. 鱼类性腺发育研究进展[J]. 水产学杂志, 32(1): 46–54. LIU CHENBIN, XU GEFENG, HUANG TIANQING, et al, 2019. A review of research progress on gonadal development in fish[J]. Chinese Journal of Fisheries, 32(1): 46–54 (in Chinese with English abstract).
- 刘筠, 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 中国农业出版社: 20–73. LIU JUN, 1993. Propagation physiology of main cultivated fish in China[M]. Beijing: China Agriculture Press: 20–73 (in Chinese with English abstract).
- 倪娜, 柳学周, 徐永江, 等, 2011. 条斑星鲽卵巢发育规律和性类固醇激素周年变化研究[J]. 渔业科学进展, 32(3): 16–25. NI NA, LIU XUEZHOU, XU YONGJIANG, et al, 2011. The study of gonadal development and steroid hormone annual change in barfin flounder *Yerasper moseri*[J]. Marine Fisheries Research, 32(3): 16–25 (in Chinese with English abstract).
- 施璟芳, 1988. 鱼类性腺发育研究新进展[J]. 水生生物学报, 12(3): 248–258. SHI QUANFANG, 1988. Recent advances in the studies on gonad development in fishes[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 12(3): 248–258 (in Chinese with English abstract).
- 王晶, 王冰, 李纪同, 等, 2011. 斑马鱼性腺发育的组织学观察[J]. 基因组学与应用生物, 30(2): 168–174. WANG JING, WANG BING, LI JITONG, et al, 2011. Histological observation of zebrafish gonad development[J]. Genomics and Applied Biology, 30(2): 168–174 (in Chinese with English abstract).
- 徐钢春, 鲍明明, 杜富宽, 等, 2017. 鱼类性腺发育及产卵类型研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 14(6): 43–48.
- 尹洪滨, 贾中贺, 姚道霞, 等, 2008. 黄颡鱼性腺分化的组织学观察[J]. 动物学杂志, 43(6): 103–108. YIN HONG BIN, JIA ZHONG HE, YAO DAO XIA, et al, 2008. Sex differentiation in pelteobagrus fulvidraco[J]. Chinese Journal of zoology, 43(6): 103–108 (in Chinese with English abstract).
- 游秀容, 蔡明夷, 姜永华, 等, 2012. 大黄鱼性腺性别分化的组织学观察[J]. 水产学报, 36(7): 1057–1064. YOU XIURONG, CAI MINGYI, JIANG YONGHUA, et al, 2012. Histological observation on gonadal sex differentiation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. Journal of Fisheries of China, 36(7): 1057–1064 (in Chinese with English abstract).
- 甄贞, 曲波, 姜毓君, 等, 2014. 中国荷斯坦牛乳腺不同发育时期乳腺细胞内大分子成分变化研究[J]. 东北农业大学学报, 45(4): 71–77. ZHEN ZHEN, QU BO, JIANG YUJUN, et al, 2014. Study on changes of macromolecular components during different developmental stages of Chinese Holstein mammary gland[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 45(4): 71–77 (in Chinese with English abstract).
- 左镇生, 司兆青, 鲁秀红, 等, 1985. 日本海马卵巢发育规律的初步研究[J]. 水产科学, 4(3): 18–21.
- BEGOVAR P C, WALLACE R A, 1988. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*[J]. Journal of Morphology, 197(3): 353–369.
- BIAGI F, PIRAS F, FARINA V, et al, 2016. Testis structure, spermatogenesis and sperm morphology in pipefishes of the genus *Syngnathus*[J]. Acta Zoologica, 97(1): 90–101.
- CARCUPINO M, BALDACCI A, MAZZINI M, et al, 2002. Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses: a morphological and ultrastructural comparative study on three anatomically different pouches[J]. Journal of Fish Biology, 61(6): 1465–1480.
- CHEN XIYANG, YI YUNHAI, YOU XINXIN, et al, 2020. High-throughput identification of putative antimicrobial peptides from multi-omics data of the lined seahorse (*Hippocampus erectus*)[J]. Marine Drugs, 18(1): 30.
- ELDRIDGE M B, JOSEPH J D, TABERSKI K M, et al, 1983. Lipid and fatty acid composition of the endogenous energy sources of striped bass (*Morone saxatilis*) eggs[J]. Lipids, 18(8): 510–513.
- FOSTER J S, VINCENT A C J, 2004. Life history and ecology of seahorses: Implications for conservation and management[J]. Journal of Fish Biology, 65(1): 1–61.
- FRIEDMAN M, 2004. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(3): 385–406.
- KAMLER E, 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 18(2): 143–200.
- KVARNEMO C, SIMMONS L W, 2004. Testes investment and spawning mode in pipefishes and seahorses (*Syngnathidae*)[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 83(3): 369–376.
- LIN QIANG, LIN JUNDA, LU JUNYI, et al, 2008. Biochemical composition of six seahorse species, *Hippocampus* sp., from the Chinese Coast[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 39(2): 225–234.
- LIN QIANG, LI GANG, QIN GENG, et al, 2012. The dynamics of reproductive rate, off spring survivorship and growth in the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810[J]. Biology Open, 1(4): 391–396.
- LIN QIANG, FAN SHAOHUA, ZHANG YANHONG, et al, 2016. The seahorse genome and the evolution of its specialized morphology[J]. Nature, 540(7633): 395–399.
- LUBZENS E, YOUNG G, BOBE J, et al, 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed[J]. General & Comparative Endocrinology, 165(3): 367–389.
- NAGAHAMA Y, HIROSE K, YOUNG G, et al, 1983. Relative *in vitro* effectiveness of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 51(1): 15–23.
- NAKAMURA M, KOBAYASHI T, CHANG X T, et al, 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish[J]. Journal of Experimental Zoology, 281(5): 362–372.
- NEJEDLI S, PETRINEC Z, KUŽIR S, et al, 2004. Annual oscillation of ovarian morphology in european pilchard (*Sardina pilchardus* Walbaum) in the northern adriatic sea[J].

- Veterinarski Arhiv, 74(2): 97–106.
- NISHIMURA T, TANAKA M, 2014. Gonadal development in fish[J]. Sexual Development, 8(5): 252–261.
- NOVELLI B, SOCORRO J A, CABALLERO M J, et al, 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 41(5): 1233–1251.
- OFELIO C, DÍAZ A O, RADAELLI G, et al, 2018. Histological development of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus* during ontogeny[J]. Journal of Fish Biology, 93(1): 72–87.
- ORBAN L, SREENIVASAN R, OLSSON P E, 2009. Long and winding roads: testis differentiation in zebrafish[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 312(1–2): 35–41.
- PARENTI L R, GRIER H J, 2004. Evolution and Phylogeny of Gonad Morphology in Bony Fishes[J]. Integrative and Comparative Biology, 44(5):333–348.
- PIRAS F, BIAGI F, TADDEI A R, et al, 2016. Male gonads morphology, spermatogenesis and sperm ultrastructure of the seahorse *Hippocampus guttulatus* (Syngnathidae)[J]. Acta Zoologica, 97(3): 325–333.
- PLANAS M, QUINTAS P, CHAMORRO A, et al, 2010. Female maturation, egg characteristics and fatty acids profile in the seahorse *Hippocampus guttulatus*[J]. Animal Reproduction Science, 122(1–2): 66–73.
- SAAVEDRA M, MASDEU M, HALE P, et al, 2014. Dietary fatty acid enrichment increases egg size and quality of yellow seahorse *Hippocampus kuda*[J]. Animal Reproduction Science, 145(1–2): 54–61.
- SAAVEDRA M, BATISTA H, POUSÃO-FERREIRA P, 2016. Dietary fatty acid enrichment during the spawning season increases egg viability and quality in *Hippocampus hippocampus*[J]. Aquaculture Nutrition, 22: 343–351.
- SELMAN K, WALLACE R A, 1989. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts[J]. Zoological Science, 6: 211–231.
- SELMAN K, WALLACE R A, PLAYER D, 1991. Ovary of the seahorse, *Hippocampus erectus*[J]. Journal of Morphology, 209(3): 285–304.
- SELMAN K, WALLACE R A, SARKA A, et al, 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*[J]. Journal of Morphology, 218: 203–224.
- SILVEIRA R B, 2005. Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracáipe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil[D]. Brasil: Universidade Católica do Rio Grande do Sul: 1–111.
- SOGABE A, TAKATA H, KOBAYASHI Y, 2013. Ovarian structure and mode of egg production in the seaweed pipefish *Syngnathus schlegeli* (Syngnathidae)[J]. Ichthyological Research, 60(1): 85–88.
- STÖLTING K N, WILSON A B, 2007. Male pregnancy in seahorses and pipefish: beyond the mammalian model[J]. BioEssays, 29(9): 884–896.
- STRÜSSMANN C A, NAKAMURA M, 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 26(1): 13–29.
- TAKAHASHI T, FUJIMORI C, HAGIWARA A, et al, 2013. Recent advances in the understanding of teleost medaka ovulation: the roles of proteases and prostaglandins[J]. Zoological Science, 30(4): 239–247.
- UCHIDA D, YAMASHIT M, KITANO T, et al, 2002. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish[J]. The Journal of Experimental Biology, 205: 711–718.
- VAN LOOK K J W, DZYUBA B, CLIFFE A, et al, 2007. Dimorphic sperm and the unlikely route to fertilisation in the yellow seahorse[J]. Journal of Experimental Biology, 210(3): 432–437.
- WHITTINGTON C M, GRIFFITH O W, QI WEIHONG, et al, 2015. Seahorse brood pouch transcriptome reveals common genes associated with vertebrate pregnancy[J]. Molecular Biology & Evolution, 32(12): 3114–3131.
- XU HONGYAN, LI MINGYOU, GUI JIANFANG, et al, 2010. Fish germ cells[J]. Science China Life Sciences, 53(4): 435–446.