

栉孔扇贝卵发生的超微结构和细胞化学

刘卫东

(辽宁省海洋水产研究所 大连 116023)

摘要 对栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 的卵原细胞和卵母细胞发育过程的超微结构和细胞化学研究结果表明:卵原细胞的胞质中含大量的游离核糖体,细胞器不发达,蛋白质和 RNA 丰富而糖元贫乏;卵黄生成之前,卵母细胞中的核质膨大为生发泡;核仁发达,胞质中线粒体大为增多;卵黄体和 皮层颗粒首先出现于核周,接近线粒体聚集处;卵黄生成盛期,卵母细胞的胞质内具平行片层粗面内质网和同心圆状粗面内质网,它们是生成卵黄体和皮层颗粒的主要细胞器,线粒体和高尔基器也参与了这两种内含物的生成;微胞饮作用也为细胞的发育提供某些物质;卵黄体含蛋白质和糖元,皮层颗粒富含多糖类;卵黄膜形成始于卵黄生成初期,先是细胞游离端的胞质出现一个富含多糖的突起,突起部的质膜微绒毛化,微绒毛分泌产生由中性多糖构成的卵黄膜,继而向四周扩展,并于卵母细胞成熟时覆盖整个细胞;RNA 合成贯穿于卵母细胞的整个发育期,延续至卵黄生成结束之后,成熟分裂临近之时。

关键词 扇贝; 栉孔扇贝; 卵原细胞; 母细胞; 超微结构; 细胞化学

中图法分类号 Q954.432 : S944.43

ULTRASTRUCTURE AND CYTOCHEMISTRY OF EGG GENESIS IN SCALLOP *CHLAMYS FARRERI*

LIU Weidong

(Liaoning Marine Fisheries Research Institute, Dalian 116023)

Abstract The ultrastructure and cytochemistry of egg-genesis in scallop *Chlamys farreri* were studied. There were a lot of ribosomes and a few organelles in the cytoplasm. The cytoplasm of oogonium was rich in RNA and protein, but lack of glycogen. At previtellogenic stage, the nucleus of the oocyte expanded to become the germinal vesicle, nucleolus was flourishing and the number of mitochondria increased greatly in the cytoplasm. At early vitellogenic stage, yolk bodies and cortical granules appeared initially at perinuclear area where mitochondria gathered. When vitellogenic activity turned into intensive stage, both parallel lamellae and concentric lamellae of rough-surfaced endoplasmic reticulum appeared in the cytoplasm of oocyte and the two types of these organoids played an important role in the formations of yolk bodies and cortical granules. At the same time, the mitochondria and Golgi apparatus involved in this action too. Micropinocytotic activity provided some substances for the development of cell. The yolk body contained proteins and glycogen, and the cortical granule was rich in polysaccharide. Microvilli appeared on the plasmic membrane of the free end of the oocyte after the beginning of vitellogenesis, and the cytoplasm was projected at the same place. The projection was full of neutral polysaccharide and the microvilli secreted neutral polysaccharide to form vitelline membrane. This process gradually extended around, the vitelline membrane covered the whole cellular surface when the oocyte matured. The synthesis of RNA progressed throughout the whole developing course of the oocyte and continued to that time when vitellogenesis was finished and meiosis was approached.

Keywords scallop; *Chlamys farreri*; oogonium; oocyte; ultrastructure; cytochemistry

动物卵发生过程中细胞结构和化学成份的变化历来是发育生物学的重要课题。软体动物的种类繁多且不乏经济种,因而成为许多学者探讨上述问题的对象,其中超微结构的记载较多^[1~4],组织化学方面的著述较少^[5]。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国北方重要的经济动物。迄今仅廖承义等对其进行过生殖周期的组织学研究^[6]。本项工作以电镜和组织化学定位法为手段,对栉孔扇贝卵发生过程的细胞学和细胞化学进行了研究,以期有关课题研究的深入及栉孔扇贝人工繁殖技术的提高提供更多的基础知识。

1 材料与方法

1.1 取材

扇贝标本于其发育期(2~6月份)采于大连近海,在实验室内培养2 d,剖取性腺,将每一个体的性腺分切3块,制成光镜和电镜标本。

1.2 电镜标本制作

超微结构研究用的标本固定于 $\varphi 2.5\%$ 戊二醛溶液,后固定于 $\varphi 1\%$ 锇酸溶液,Epon812环氧树脂包埋,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,JEM-200EX透射电镜观察并照相。

1.3 光镜标本制作

细胞化学研究用标本固定于Backer氏中性福尔马林和Carnoy氏固定液,24 h后脱水,石蜡切片 $\delta 7\sim 8\mu\text{m}$,茚三酮-Schiff法示蛋白质结合性氨基,Feulgen反应示DNA,Einason的倍花青-铬矾法示两种核酸。或以Pyrone Y染RNA,以上两种方法皆用RNA酶消化处理为对照。McManus的高碘酸-Schiff法(PAS)显示多糖,用唾液消化和Lillie的乙酰反应证明糖的性质^[7]。Olympus光学显微镜观察并摄像。

2 结果

2.1 超微结构

2.1.1 卵原细胞 卵原细胞的核膜平滑,核质电子密度较低,其中分布着电子致密的染色质颗粒。核仁出现于卵原细胞产生之后不久。胞质中有不发达的粗面内质网,丰富的游离核糖体,其他细胞器较少,细胞基部无褶皱(图版I:1)。

2.1.2 初级卵母细胞 可分为四个发育期:

①无卵黄期 此期卵母细胞近圆形,核膨大,约占全细胞的 $2/3$,成生发泡。核内染色质颗粒减少,核仁电子密度大,匀质。胞质中粗面内质网仍不发达,游离核糖体增多,线粒体大量出现,分布于核周和细胞基部。同时细胞基部形成众多褶皱(图版I:2)。

②卵黄形成初期 由于卵黄物质的生成,此期细胞开始向滤泡腔内生长。平行排列的粗面内质网较均匀地分布于胞质内。线粒体数量继续增多,成群地分布于核周及细胞基部。卵黄体和皮层颗粒首先出现于核周,与线粒体群接近。卵黄体电子密度较大,体积大小不等,大者 d 可达 $2\mu\text{m}$,有的外被单位膜,有的边界模糊,似正在形成中。皮层颗粒体积比卵黄体略大,呈中等电子密度,具特殊的条纹状或晶格状纹理,一端常有一小块电子致密区,外膜有或无。上述两种内含物多是各自成群分布于核周胞质的某一区域,相互混杂的不多(图版I:3)。卵黄膜开始形成,是此期的又一显著特征。在卵黄体出现之后,卵母细胞游离缘顶部胞质隆起,隆起部的质膜微绒毛化,卵黄膜出现,沾覆于微绒毛区的表面。随着卵母细胞的发育,卵黄膜形成区逐渐向四周扩展。刚形成的卵黄膜厚 $\delta\approx 1.8\mu\text{m}$,中等电子密度,近微绒毛处的电子密度略高。其下方的隆起部胞质为中等电子密度的形状不规则物质(图版I:4)。

③卵黄生成盛期 此期卵母细胞体积急剧增大;胞质中细胞器明显增多;近核区出现发达的平行状粗面内质网,由几层至二十几层的片层构成,其上密布核糖体。其周围有大量成熟度不同的卵黄体和皮层颗粒(图版I:5)。另外,在细胞游离侧的胞质中出现同心圆状粗面内质网,片层为封闭的环形,少则数层多则数十层,其上密布核糖体。它的内外同样有众多的成熟度不同的卵黄体和皮层颗粒,分布于两片层之间和同心圆的中心区(图版I:6)。发育中的卵黄体大小不等,有的中心区尚呈电子透明状态,有的周边电子密度低于中心

区,外膜是否形成也不一致。此期线粒体依然很多,分布范围比前期为广,但仍以细胞基部最为密集。线粒体演变为卵黄体的现象常可看到。先是线粒体外膜褶皱成波纹状,内部嵴溶解,其基质电子密度增大,最后变成卵黄体(图版 I:7)。胞质内亦有高尔基体出现,数量不大,每组由 3~6 层扁平囊组成,其成熟面包围着一个或几个尚未成熟的卵黄体,有的潴泡顶端已膨大。此外,此期卵母细胞基底部发现有微胞饮现象:该处质膜剧烈凹陷,质膜下方有一些电子致密的小球体。这些小球体外被单位膜, $d \approx 200 \text{ nm}$ 。与小球体相近的卵质深处,则有线粒体和卵黄体分布(图版 I:8)。细胞核结构无大变化。

④成熟期 卵母细胞的胞质中留有不甚发达的单片层粗面内质网,片层较宽,形状不很规则(图版 I:9)。线粒体较多,多分布于核周。核糖体比以前更密集。卵黄体充满全胞质。在胞质较深处产生的皮层颗粒已移到卵膜之下,形成 $\delta 1.7 \mu\text{m}$ 的皮层区。卵黄膜已覆盖全细胞, δ 增为 $2 \mu\text{m}$ 。核膜一改前期的平滑状,出现许多突起,伸向胞质,核膜的外表面密布核糖体(图版 I:10)。核仁中出现大的核仁液泡,形成环状核仁(图版 I:11),直至核与核周的活动终止,细胞即临近成熟分裂。

2.2 细胞化学

2.2.1 卵原细胞 Feulgen 法测 DNA,仅染色质呈较强阳性,其余皆呈阴性反应,说明染色质富含 DNA。倍花青-铬矾和 Pyronin Y 染色中呈强和较强阳性的核仁和胞质,经 RNA 酶消化皆呈阴性,说明其中确含丰富和较丰富的 RNA。茚三酮-Schiff 法测结合性氨基,全细胞呈阳性,核周有少量颗粒阳性最强,核仁和远核区胞质次之,核质阳性最弱。PAS 法测多糖,胞质呈弱阳性,核质和核仁中少量颗粒呈极弱阳性,唾液消化可使胞质和核仁的阳性进一步减弱,说明其中含糖元。

2.2.2 卵母细胞

①无卵黄期 此期各种组化测定结果与卵原细胞无明显差异。

②卵黄生成初期 卵母细胞核中呈 Feulgen 阳性反应的染色质为细颗粒和细丝状(与电镜观察结果一致)。核仁乃是细胞中含 RNA 最丰富的结构。胞质中 RNA 密度比以前降低。茚三酮-Schiff 反应结果表明,细胞游离侧的核周胞质中出现结合性氨基十分丰富的区域,切片中呈半月形(图版 II:3)。PAS 反应的结果是:胞质的阳性反应增强。刚形成的卵黄膜和卵黄膜之下的胞质隆起部皆呈强阳性。卵黄膜中的 PAS 强阳性物质不被唾液消化,乙酰化后呈阴性,经 KOH 溶液去乙酰化之后恢复强阳性,说明这种物质是中性多糖。卵黄之下层胞质隆起处的 PAS 强阳性物质部分地被唾液消化,乙酰化-还原反应的结果与卵黄膜同,说明其中兼含糖元和中性多糖。

③卵黄生成盛期 此期卵母细胞 Feulgen 反应的结果与前期一致。RNA 呈色结果的显著特点是:可看出同心圆状内质网呈现为强阳性的环形结构(图版 II:4)。核周胞质中也存在新月形的强阳性区域(与电镜下观察到的平行状内质网的集中区相一致)(图版 II:5)。可见两种形态的内质网均含很丰富的 RNA。细胞质中呈茚三酮-Schiff 强阳性反应的区域较前一期扩大,说明蛋白质的积累在增加。PAS 法测定结果表明,呈强阳性的卵黄膜厚度有所增加,且随着卵黄膜面积的扩大,胞质中的 PAS 强阳性物质(包括糖元)由动物极向植物极方向发展。

④成熟期 卵母细胞呈 Feulgen 阳性反应的染色质比前期更分散。胞质 RNA 较前期更浓密。在核膜内外,皆有弥散状 RNA。有的细胞的核周围绕着一圈 RNA 浓密区(图版 II:8)。卵黄膜不含核酸。茚三酮-Schiff 反应显示,此期整个细胞质皆含丰富的结合性氨基(图版 II:6),卵黄体和皮层颗粒含蛋白质。卵黄膜呈茚三酮-Schiff 阴性反应,说明不含蛋白质。此期 PAS 反应结果:卵黄膜呈极强阳性,胞质呈较均匀的强阳性,皮层颗粒阳性反应略强于卵黄体;对照实验表明,胞质(包括上述两种内涵物)中糖元和中性多糖同时存在。

3 讨论

据记载,贝类卵发生过程中物质的合成和贮积活动有多种细胞器的参与^[2,4]。栉孔扇贝卵发生过程细胞器活动的特点可归纳如下三点:1)在卵黄生成之前 首先是线粒体数量大增,并集中于细胞基部和核周,前者与滤泡组织相近,是物质输入的通道,后者与胞核相邻,显然为胞质中物质合成的中心区。而且,其数量随着

卵黄生成作用的增强而增多。可见,线粒体在卵黄等物质合成中的作用之重要。线粒体不仅为物质合成变化提供能量,而且还直接演变成卵黄体,同一现象在僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata* Born)和缢蛏(*Sinonovacula constricta*)卵母细胞中发现过^[2,4]。2)粗面内质网在较长时间处于较稳定的状态,直至卵黄生成盛期才迅速发展,且出现同心圆排列的形态。应指出,内质网的 RNA 含量十分丰富,可推测蛋白质的合成相当强烈。而且从卵黄体和皮层颗粒出现的位置可以看出粗面内质网在这两种内涵物形成中至关重要的作用。同心圆状粗面内质网的作用在卵黄体、脂类形成过程的作用在一种指笠贝(*Acmaea digitalis*)^[8]和栉江瑶(*Atrina pectinata* Linne)^[3]卵母细胞中发现过。但本项工作未涉及脂类,因此,该问题尚待进一步探讨。3)在栉孔扇贝卵母细胞发育的整个过程中,高尔基器的数量不多,显然它不可能承担大量的内涵物成形的任务,只能认为它起了辅助性工作。各种细胞器之间如何协同工作,我们对于这问题知之甚少。通过微泡饮作用进入细胞的物质、功能我们也缺乏认识。

栉孔扇贝卵母细胞中 RNA 的合成几乎贯穿细胞发育全过程。在卵黄生成结束之后,核仁出现液泡,进入更活跃的状态。核膜产生突起,其内外弥散着 RNA,核糖体密布核膜之上,说明此期 RNA 合成有所增强,直至成熟分裂临近。由此看来,卵母细胞中的 RNA 有一部分参加卵黄蛋白质的合成,另一部分则贮存于细胞中,将在受精和胚胎发育中起作用。

卵黄膜的产生与质膜微绒毛化的相关现象在紫贻贝(*Mytilus edulis*)^[1]和一种腹足类(*Ilyanassa obsoleta*)^[9]的卵母细胞已有记述。我们通过对栉孔扇贝卵黄膜形成过程的观察,认为,质膜的微绒毛化,显然是适应增强分泌功能的形态变化,卵黄膜产生于微绒毛的分泌活动(图版 I:12)。

致谢 本项研究经陈倬研究员、王国恩副教授指导,特致谢意!

参考文献

- Humphreys WJ. Electron microscope studies on egg of *Mytilus edulis*. *J. Ultrastruct. Res.* 1962,7:467~487
- Lin JH(林加涵), Wang DY(汪德耀). Studies on ultrastructure of oocyte in the formation of yolk granules in oyster. *Journal of Xiamen University(Natural Science)* 厦门大学学报自然科学版. 1983,22(3):355~363
- 方永强, 齐襄, 栉江瑶卵母细胞发育成熟过程中的超微结构研究. *海洋学报*. 1987,9(5):612~616
- Shangguan BM(上官步敏), Liu YC(刘玉琮). Ultrastructural studies on the formation of yolk globule of the oocyte in *Sinonovacula constricta*. *Oceanologia et Limnologia Sinica(海洋与湖沼)*. 1995,26(1):48~52
- Bedford L. The electron microscopy and cytochemistry of oogenesis and the cytochemistry of embryonic development of the prosobranch gastropod *Bembicium nanum* L. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1966,15(1):15~37
- Liao CY(廖承义), Xu YF(徐应馥), Wang YL(王远隆). Reproductive cycle of the scallop *Chlamys farreri* at Qingdao. *Journal of Fisheries of China(水产学报)*. 1983,7(1):1~13
- Lillie R.D. and H.M. Fullmer, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1976
- Kessel R.G. Differentiation of *Acmaea digitalis* oocytes with special reference to lipid-poly-ribosome relationship, *J. Morphol.*, 1982, 171:225~243
- Taylor GT, Anderson E. Cytochemical and fine structural analysis of oogenesis in the gastropod *Ilyanassa obsoleta*, 1969, *J. Morphol.* 129:211~248

图版说明

图版 I: 1. 卵原细胞, ×4000 2. 卵母细胞无卵黄期, ×5000 3. 卵母细胞卵黄生成初期, ×12K; 示核周胞质的卵黄体(YG)、皮层颗粒(CG). 4. 卵母细胞卵黄生成初期, ×4000; 示细胞游离缘胞质突起, 质膜微绒毛化和卵黄膜的生成. 5. 卵母细胞卵黄生成盛期, ×800; 示核周粗面内质网(RER)、卵黄体(YG)、皮层颗粒(CG). 6. 卵母细胞卵黄生成盛期, ×4000; 示同心圆状内质网(RER). 7. 卵母细胞卵黄生成盛期, ×15K; 示线粒体(M)演变成卵黄体. 8. 卵母细胞卵黄生成盛期, ×10K; 示细胞基部微泡饮现象. 9. 卵母细胞成熟期, ×6000; 示卵黄膜(VM)、皮层区的皮层颗粒(CG)和粗面内质网(RER). 10. 卵母细胞成熟期, ×10K; 示核膜的泡状突起. 11. 卵母细胞成熟期, ×5000; 示核仁中液泡. 12. 卵母细胞膜微绒毛分泌物参入卵黄膜, ×7500.

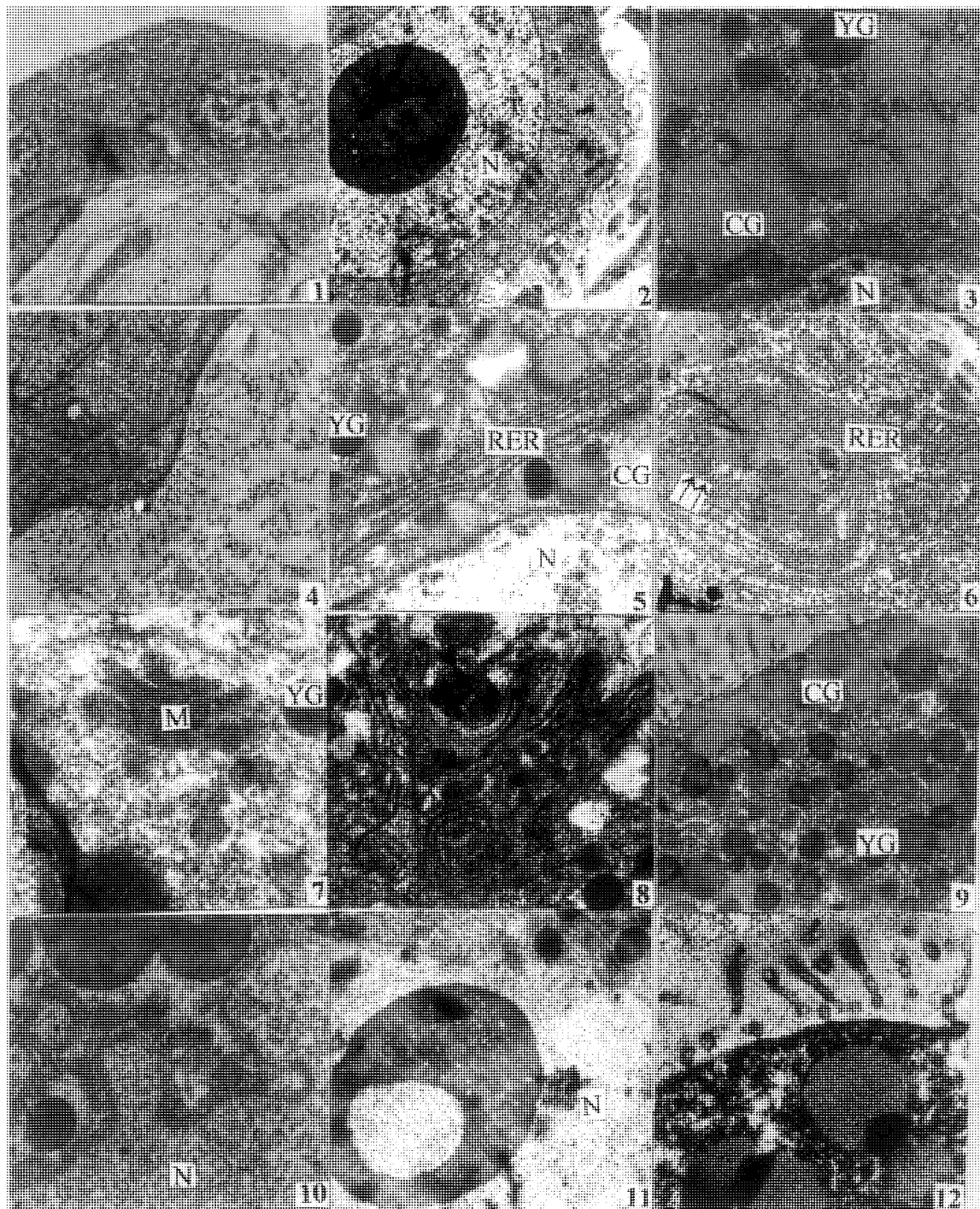
图版 II: 1. 卵原细胞(桔花青-铬矾), ×600. 2. 卵母细胞卵黄生成初期(PAS); 示卵黄膜形成 ×300. 3. 卵母细

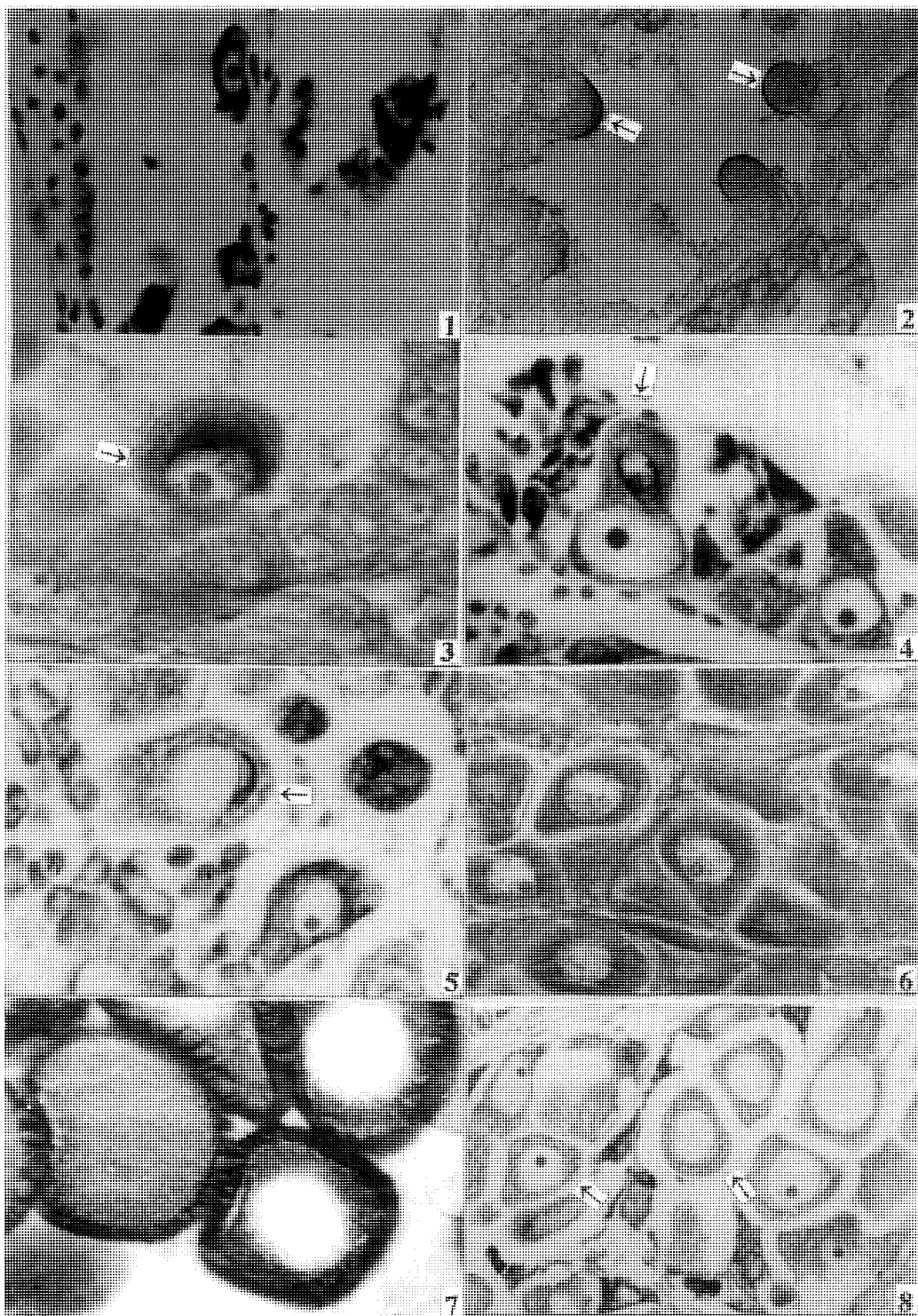
胞卵黄生成初期(茚三酮-Schiff):示核周的结合性胺基, $\times 600$. 4. 卵母细胞卵黄生成盛期(桔花青-铬矾):示胞质内强阳性同心圆状内质网, $\times 600$. 5. 卵母细胞卵黄生成盛期(桔花青-铬矾):示核周内质网, $\times 600$. 6. 卵母细胞成熟期(茚三酮-Schiff), $\times 300$. 7. 卵母细胞成熟期(PAS), $\times 600$. 8. 卵母细胞成熟期(桔花青-铬矾),示核周高密度 RNA 区. $\times 300$.

Explanation of plates

Plates I : 1. The oogonium of the scallop, $\times 4000$. 2. The previtellogenic oocyte, $\times 5000$. 3. Yolk oides(YG) & cortical granules(CG) located perinuclear cytoplasm in the oocyte at early vitellogenic phase, $\times 12k$. 4. Microvilli appeared, vitellin membrane and projection formed on the free end of oocyte at early vitellogenic phase, $\times 4000$. 5. rER, yolk bodies(YB), cortical granules(CG) in early vitellogenic phase, $\times 8000$. 6. The concentric lamellae of rER in the oocyte at intensive vitellogenic stage, $\times 4000$. 7. Mitochondria changed into yolk bodies during intensive vitellogenic stage, $\times 15k$. 8. Micropinocytotic activity occurs at the basic region of oocyte (intensive vitellogenic stage), $\times 10k$. 9. The mature oocyte, showing vitelline membrane(VM), cortical granules(CG) and rER, $\times 6000$. 10. The mature oocyte, showing bulbi-like processes of the nuclear membrane, $\times 10k$. 11. Nucleolar visicle occurs in the mature stage of the oocyte, $\times 5000$. 12. The secretion of microvilli permeates vitellin membrane, $\times 7500$.

Plates II : 1. The oogonia, Gallocyanin, $\times 600$. 2. The oocytes at early phase of vitellogenesis, showing vitelline membrane forms, PAS, $\times 300$. 3. The oocytes (early phase of vitellogenesis), Ninhydrin-Schiff reaction, $\times 600$. 4. The oocytes (intensive phase of vitellogenesis), showing concentric lamellar loops of rER with high density of RNA, Gallocyanin, $\times 600$. 5. The oocytes(intensive phase of vitellogenesis), showing high density of RNA at perinuclear zone, Gallocyanin, $\times 600$. 6. The mature oocytes, Ninhydrin-Schiff, $\times 300$. 7. The mature oocytes, PAS, $\times 600$. 8. High density of RNA arrounds the nuclear membrane in the mature oocytes, Gallocyanin, $\times 300$.





see explanation at the end of text