

河川沙塘鳢孵化腺的超微结构*

罗颖,胡先成,翁敏婵

(重庆师范大学 重庆市动物生物学重点实验室,重庆 400047)

摘要:为进一步了解河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)胚胎早期发育过程中孵化腺(Hatching gland, HG)的发生及其超微结构,采用透射电镜观察了河川沙塘鳢胚胎早期发育过程中心跳期、眼晶体形成期、血液循环期、眼黑色素出现期、孵化前期、初孵仔鱼期等6个不同时期的孵化腺超微结构。观察结果显示,河川沙塘鳢的孵化腺为单细胞腺体,最早可在眼晶体形成期观察到孵化腺细胞(Hatching gland cells, HGCs),主要分布于头部腹面、头部与卵黄囊连接处及其卵黄囊前腹面;当胚胎发育至血液循环期时,HGCs不仅在形态上达到最大,数量上急剧增多,而且分布更广泛;胚胎发育进入眼黑色素出现期时,可以观察到处于不同合成时期的酶原颗粒,每个酶原颗粒外面均有膜包围,颗粒之间有明显的界限;当胚胎发育至孵化前期时,HGCs在数量上达到最多,并且可以观察到呈圆球形、直径约为0.25~1.00 μm的孵化酶颗粒自HGCs顶部的开口向外分泌,这些颗粒有的以单体形式存在,有些则粘结成团;初孵仔鱼期,HGCs分泌作用已经完成,它们离开胚胎表面,移至表皮细胞下方并逐渐衰退。以上结果表明,河川沙塘鳢孵化酶颗粒有一个成熟过程,成熟的孵化酶颗粒主要通过外倾方式向卵周隙中分泌以帮助胚胎的孵化破膜。

关键词:河川沙塘鳢 孵化腺 超微结构

中图分类号:Q954

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2009)04-0020-05

鱼类胚胎的孵化破膜是胚胎发育过程中的一个关键环节,如果不能适时破膜,胚胎发育就会终止,因此是否适时破膜成为制约其种族繁衍的一个重要因子。孵化破膜包括胚胎孵化腺细胞(Hatching gland cells, HGCs)所产生和分泌的孵化酶(Hatching enzyme, HE)对卵膜的消化和胚胎通过自身运动使其从部分被消化的卵膜中脱出这两个阶段^[1],但起决定性作用的还是HGCs所产生和分泌的孵化酶^[2-4]。

鱼类的孵化腺(Hatching gland, HG)一般由单细胞腺组成,出现于胚胎特定的发育阶段,至胚胎孵出后的特定时期消失^[5]。孵化酶是胚胎的HGCs所分泌的特异性酶^[6],首先被包装成分泌颗粒,随后被分泌到卵周隙中,从而与卵膜接触并对其进行消化降解。关于鱼类HG和孵化酶的研究最早开始于1910年,日本学者森脇幾茂(Moriwaki)首次证明了鱼类孵化酶的存在。而后的研究主要集中在HGCs的形态、分布、出现的时间及迁移,孵化酶的分离、纯化、生化特性及功能上^[7-10]。随着现代生物技术的发展,关于HGCs、孵化酶的研究不断深入。已有不少

学者从显微结构和亚显微结构对几种鱼类HGCs的发生和特征进行了研究,但从超微结构阐明鱼类胚胎HGCs的发生和特征,仅在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤鱼(*Cyprinus capio*)、黄海太平洋鲱(*Clupea pallasii*)等少数种类有过报道^[11-15]。

河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)属于鲈形目(Perciformes)沙塘鳢科(Odontobutidae),俗名塘鳢鱼,为淡水底栖小型肉食性鱼类。其个体虽小,但肉嫩刺少,味道鲜美,深受江浙、沪、闽等地人们的喜爱,是一种具有重要经济价值的淡水鱼类。在对河川沙塘鳢的生物学、胚胎发育、器官发育、HG亚显微结构观察等研究基础上^[16-21],本文进一步对胚胎发育过程中HGCs的发生及其超微结构进行了观察,以期阐明鱼类的孵化机制提供更为丰富的基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

河川沙塘鳢亲鱼购自上海市铜川路水产品集贸市场。采用干法授精获得受精卵,将消除粘性的受

* 收稿日期 2009-03-28 修回日期 2009-05-31

资助项目:重庆市教委科研项目(No. KJ090827);重庆市动物生物学重点实验室项目(No. 0402);重庆师范大学重点科研项目(No. 08XLB001)

作者简介:罗颖,女,硕士研究生,研究方向为鱼类发育生物学,通讯作者:胡先成, E-mail: hwx@cqnu.edu.cn

精卵置于室内水族箱中,在18~24℃的室温条件下静水孵化,每天换水两次。根据河川沙塘鳢胚胎发育分期表观察活体胚胎发育各期至孵化^[19],从心跳期开始,其余分别在眼晶体期、血液循环期、眼黑色素出现期、孵化前期和初孵仔鱼期共6个时期各取样1次。

1.2 方法

将样本放入4℃预冷的2.5%戊二醛和1.0%锇酸中进行双重固定,0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗;丙酮梯度系列脱水,每次15 min;环氧树脂包埋;LKB-V型超薄切片机下切出约1~2 μm厚的半薄切片,在光镜下确定孵化腺的位置,然后切出约50 nm厚的超薄切片,经醋酸铀和柠檬酸铅分别染色10 min,在飞利浦TECNAI-10型透射式电子显微镜下观察。

2 结果

2.1 心跳期

从受精卵开始发育至心跳期的这一阶段,在胚胎表皮细胞中未观察到与表皮细胞形态有较大差异的HGCs。即在该时期并无HGCs出现。

2.2 眼晶体形成期

胚胎发育至眼晶体形成期时,HGCs开始出现,主要分布在胚体头部腹面及其与卵黄囊连接处。处于此时期(包括随后完成其分泌过程的孵化前期)的HGCs的电子密度较周围表皮细胞大,在形态上也与其有较大的差异,但此时期的HGCs在数量上较少。在电镜下,孵化腺细胞内的孵化酶颗粒呈现出电子不一致的现象(图版1:1)。同时,在其细胞核的四周还有溶酶体(图版1:2)、高尔基体(图版1:3)、粗面内质网和大量的线粒体(图版1:4)的出现。这些内质网表面密布有大量核糖体,内有致密的絮状物。在高尔基体周围有分泌泡和分泌颗粒出现(图版1:3)。

2.3 血液循环期

当胚胎发育至血液循环期时,HGCs不仅在形态上达到最大,而且数量上也增多,主要分布于头部两侧、头部腹面及其与卵黄囊连接处。在形态上,HGCs大多为椭圆形,短径为5~8 μm,长径为7~12 μm,为单层细胞。同时,在其细胞核四周存在大量的粗面内质网(图版1:5),粗面内质网的表面密布着大量核糖体(图版1:6)。

2.4 眼色素出现期

胚胎进一步发育进入眼黑色素出现期,此时期

大量的HGCs出现在胚胎头部两侧、头部腹面及其与卵黄囊连接处、卵黄囊前腹面。HGCs的核位于细胞基部,呈椭圆形,核仁明显,在核的上方有许多线粒体和内质网,线粒体常呈长柱形,体积较大(图版1:7~8)。此外,还可以观察到处于不同合成时期的酶原颗粒,每个酶原颗粒外面均有膜包围,颗粒之间有明显的界限。溶酶体在此时期也还能够观察到。

2.5 孵化前期

当胚胎发育至孵化前期时(孵出前3 d),HGCs体积变大,形状呈圆形或椭圆形,孵化酶颗粒逐渐增多,充满HGCs中上部,核被挤到细胞的基部(图版1:9)。此时期,HGCs在数量上达到最多,但形态上由于HGCs已经大量地分泌孵化酶颗粒而变小。当胚胎发育至孵出前1 d时,HGCs的孵化酶颗粒大多已分泌出去,细胞变小且呈扁圆形。在电镜下,可清楚看到酶原颗粒正在释放之中(图版1:9),这些孵化酶颗粒有的以单体形式存在,有些则粘结成团。其形状为圆球形,直径为0.25~1.0 μm,这种分泌颗粒是通过外倾作用进行排放的,属于全浆分泌方式。

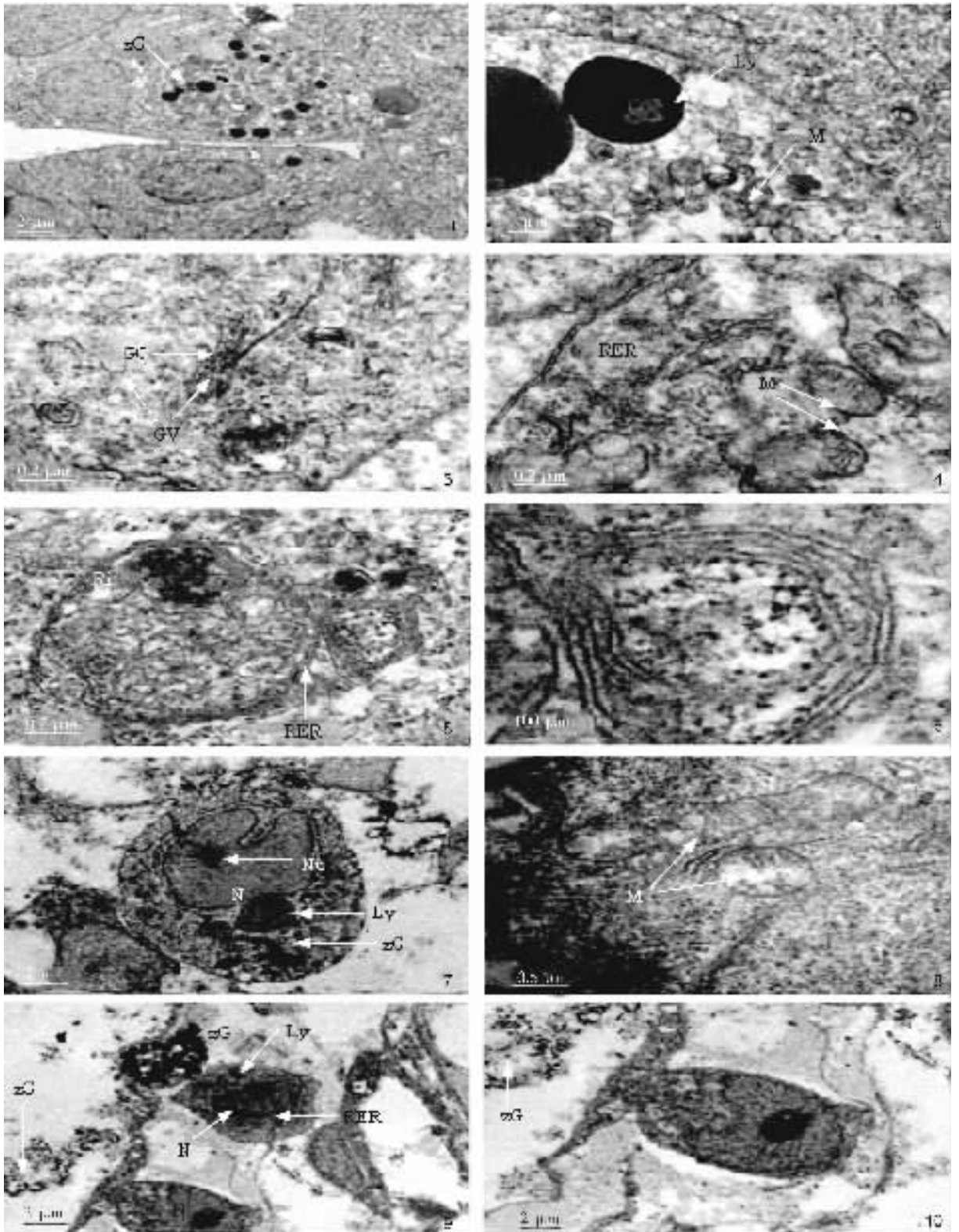
2.6 初孵仔鱼

在此阶段,HGCs分泌作用已经完成,它们离开胚胎表面,并逐渐衰退。分泌作用刚刚完成时,HGCs内还有粗面内质网和大量的线粒体,线粒体呈长柱形,体积也较大(图版1:10)。和前3个时期一样,此时期的HGCs中也有溶酶体出现。

3 讨论

河川沙塘鳢的HGCs是发生于胚胎外胚层的单细胞腺体^[1,2],主要分布于胚胎头部腹面、头部和卵黄囊连接处以及卵黄囊的前腹面。HGCs在其眼晶体形成期开始出现,随着胚胎的发育,其数量急剧增多,当胚胎发育至眼黑色素出现期时,HGCs的数量达到900~1200个^[2]。不同鱼类HGCs的数量是不同的,其数量与其卵膜的强度相关^[11]。

无论处于开始分化的眼晶体形成期,还是正在完成其分泌过程的孵化前期,河川沙塘鳢的HGCs的电子密度均较其周围的表皮细胞大,而且其形态结构也与表皮细胞有较大的差异,因此在电镜下容易观察到。和其它鱼类一样^[20,22-23],河川沙塘鳢HGCs的核位于细胞基部,呈椭圆形,核仁常位于核的中央,核的中央和边缘有许多异染色质。另外,在其核的四周和分泌颗粒的下方有许多粗面内质网和线粒体,并可以看到高尔基体和处于不同时期



1. 眼晶体形成期, 不同电子致密度的酶颗粒, $\times 3700$ 2. 眼晶体形成期的溶酶体, $\times 12500$ 3. 眼晶体形成期正合成酶颗粒的高尔基体及线粒体, $\times 30000$ 4. 眼晶体形成期 HGC 内大量的线粒体, $\times 30000$ 5. 血液循环期 HGC 内大量的内质网及核糖体, $\times 39000$; 6. 血液循环期 HGC 内质网内致密的絮状物, $\times 135000$ 7. 眼色素出现期的 HGC, $\times 6200$ 8. 眼色素出现期 HGC 内的大型线粒体, $\times 24000$. 9. 孵化前期分泌孵化酶颗粒的 HGC, $\times 6200$; 10. 初孵仔鱼期完成分泌作用的 HGC, $\times 6200$

zG 孵化酶颗粒 ; Ri 核糖体 ; RER 粗面内质网 ; GC 高尔基复合体 ; GV 高尔基液泡 ; Ly 溶酶体 ; M 线粒体 ; N 细胞核 ; Nu 核仁

图版 I 河川沙塘鳢孵化腺的超微结构

Plate I The ultrastructure of the hatching gland in *Odontobutis potamophila*

期的孵化酶颗粒;并且在同一个 HGC 中,其孵化酶颗粒的电子致密度不一致,表明各个孵化酶颗粒处于不同的合成时期,同时也意味着其孵化酶颗粒有一个成熟过程。这与许多学者的报道一致^[20,22]。

孵化酶颗粒充满于 HGCs 的中上部,呈圆球形,其分泌颗粒合成的过程是从粗面内质网到高尔基体,再到浓缩泡,最后形成分泌颗粒。在河川沙塘鳢的 HGCs 中不存在早期分泌颗粒与晚期分泌颗粒形态不一的现象,这与黄海太平洋鲱(*Clupea pallasii*)的研究结果有所不同^[13]。其颗粒直径在 0.25 ~ 1.00 μm 之间,孵化酶颗粒之间有的以单体存在,有的相互粘结成团,这与鲤鱼的孵化酶颗粒不同。后者在其孵化酶分泌期,其孵化酶颗粒彼此相连^[22]。在孵化前期,HGCs 迁移到胚胎表面,其中某些 HGCs 的顶部出现开口。孵化酶颗粒即从顶部的开口通过外倾方式向外分泌,其分泌过程是陆续进行的,部分完成分泌作用的 HGCs 还留有少量的孵化酶颗粒及大量呈长柱状的线粒体。此外,还有留有粗面内质网,高尔基体等。此时释放出的酶原颗粒即可消化卵膜的内层,保留薄且脆的外层,接着胚胎只需通过一定的运动即可破膜而出,完成孵化作用。如果没有 HGCs 产生的孵化酶对卵膜内层的消化,胚胎就不可能破膜孵化,因此,胚胎本身的 HGCs 产生和分泌的孵化酶在孵化过程中起决定性的作用。

HGCs 的退化与消失可能与其细胞内存在的溶酶体^[22]或者残留的孵化酶颗粒^[24]有关,但其机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Shida L, Hatching J. Enzyme past, present and future[J]. Zool sci, 1985, 2(1):1-10.
- [2] 胡先成, 周忠良, 赵云龙, 等. 河川沙塘鳢孵化腺的发生及孵化酶的分泌[J]. 动物学报, 2007, 53(3):511-518.
- [3] 樊廷俊. 非洲爪蟾两种孵化酶分子对卵黄膜作用机制的探讨[J]. 动物学报, 2000, 46(3):308-313.
- [4] 樊廷俊, 片桐千明, 箕田康一, 等. 非洲爪蟾孵化酶的 cDNA 结构及其部分生物化学特性的研究[J]. 生物工程学报, 1998, 14(3):287-293.
- [5] 张奇, 赵红雪, 吴旭东, 等. 鱼类孵化酶及鱼类人工孵化提前脱膜问题探讨[J]. 内陆水产, 2005, 5:19-20.
- [6] 樊廷俊, 史振平. 鱼类孵化酶的研究进展及其应用前景[J]. 海洋湖沼通报, 2002, 1:48-56.
- [7] Inohaya K, Yasumasu S, Araki K, et al. Species-dependent migrating of fish hatching gland cells that express astacin-like proteases in common[J]. Dev Growth Differ, 1997, 39(2):191-197.
- [8] Yasumasu S, Shimada H, Inohaya K, et al. Different exon-intron organization of the genes for two astacin-like proteases, high choriolytic enzyme(choriolysin H) and low choriolytic enzyme(choriolysin L), the constituents of the fish hatching enzyme[J]. Eur J Biochem, 1996, 237(3):752-758.
- [9] Yasumasu S, Juchi I, Yamagami K. Isolation and some properties of low choriolytic enzyme (LCE), a component of the hatching enzyme of the teleost *Oryzias latipes*[J]. J Biochem, 1989, 105:212-218.
- [10] Hagenmaier H E. The hatching process in fish embryos IV: the enzymological properties of a highly purified enzyme(chorionase) from the hatching fluid of the rainbow trout *Salmo gairdneri* rich[J]. Comp Biochem Physiol B, 1974, 49(2):313-24.
- [11] 楼允东. 鱼类的孵化酶[J]. 动物学杂志, 1965, 7(3):97-101.
- [12] Yamagami K M. Mechanism of hatching in fish: secretion of hatching enzymic and enzymic chociolysis[J]. Amer Zool, 1981, 1:459-471.
- [13] 阎淑珍. 黄海去太平洋鲱孵化腺及其分泌颗粒的扫描电镜观察[J]. 海洋与湖沼, 1991, 22(4):300-303.
- [14] Yamamoto M, Yamagami K. Electron microscopic studies on choriolysis by the hatching enzyme of the teleost *Oryzias latipes*[J]. Dev Biol, 1975, 43:313-321.
- [15] Yamamoto M, Juchi I, Yamagami K. Ultrastructural changes of the teleostean hatching gland cell during natural and electrically induced precocious secretion[J]. Dev Biol, 1979, 68:162-174.
- [16] 胡先成, 孙帼英. 河川沙塘鳢消化系统的发育及仔、稚、幼鱼摄食的研究[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(2):75-82.
- [17] 胡先成. 河川沙塘鳢的器官发育[J]. 重庆师范学院学报(自然科学版), 1996, 13(1):27-31.
- [18] 孙帼英, 郭学彦. 太湖河川沙塘鳢的生物学研究[J]. 水产学报, 1996, 20(3):193-202.
- [19] 谢仰杰, 孙帼英. 河川沙塘鳢的胚胎和胚后发育以及温度对胚胎发育的影响[J]. 厦门水产学院学报, 1996, 18(1):55-62.
- [20] 王蓉晖. 草鱼孵化腺超微结构及孵化酶形成与释放的研究[J]. 水生生物学报, 1997, 21(1):64-70.
- [21] 胡先成, 周忠良, 赵云龙, 等. 扫描电镜观察河川沙塘鳢孵化腺及其孵化酶颗粒[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2007, 24(2):66.
- [22] 张天荫, 翟玉梅, 封树芒, 等. 鲤胚胎孵化腺细胞[J]. 水

生生物学报 ,1991 ,15(1) 53-56.

[23] Yokoya S ,Yukiko E. Hatching gland in salmonid fish[J].

Cell Tisi Res ,1976 ,172 :529-540.

[24] Schoots A F M ,Opstelten R J G ,Denuee J M. Hatching in

the pike *Eosx lucius* L. :evidence for a single hating enzyme and its immunocytochemical localization in specialized ha- tching gland cells[J]. Dev Biol ,1982 ,89(1) : 48-55.

The Ultrastructure of the Hatching Gland of *Odontobutis potamophila*

LUO Ying , HU Xian-cheng , WENG Min-chan

(Key Laboratory of Animal Biology , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract : To further investigation of the development and the ultrastructure of the hatching gland(HG) of *Odontobutis potamophila* during its embryonic and post-embryonic development , the hatching gland is examined with transmission electron microscopy (TEM) at heart beating stage , lens formation stage , blood circulation stage , eye pigmentation stage , pre-hatching stage and larval fish just after hatching stage of its embryonic and post-embryonic development. The hatching gland is unicellular and detected first at the stage of lens formation. The hatching gland cells(HGCs) are located in the ventral of the head , the joint region between the head and yolk sac , and the ventral of the yolk sac. At the blood circulation stage , the number and the volume of HGCs increase significantly , and HGCs spread more widely with the development of the embryo ; When the embryo reaches the eye pigmentation stage zymogen granules at different stages are detected , and every one of the zymogen granule is wrapped by membrane , so that the limit between others can be distinguished significantly ; When the embryo reaches the pre-hatching stage , the hatching enzyme granules are secreted into the perivitelline space from the top of HGCs. The secreted granules are spherical and 0. 25 ~ 1. 00 μm in diameter. Some of the secreted granules are monomer and the others get together. The hatching enzyme was dissolved in the perivitelline fluid , where it gains access to the egg envelope and digests the inner layer of egg envelope ; At the larval fish just after hatching stage , the secretion of HGCs have finished and HGCs have gradually disappeared from epidermis. The results show that the hatching enzymes of *Odontobutis potamophila* gradually matured during its embryonic and post-embryonic development , and the mature hatching enzymes are excreted from the open of the HGCs to the perivitelline space for the embryo hatching.

Key words : *Odontobutis potamophila* ; hatching gland ; ultrastructure

(责任编辑 方 兴)