

细胞松弛素 B 对鲍受精卵超微结构的影响^{*}

孙振兴^① 王如才^② 姜明^② 刘晓云^②

(^①烟台师范学院生物学系 烟台 264025; ^②青岛海洋大学 青岛 266003)

摘要: 细胞松弛素 B(CB)作为一种微丝解聚剂,可用于诱导贝类三倍体,但由于其毒副作用导致了受精卵死亡和发育异常。通过透射电镜观察比较了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)正常受精卵与 CB 处理后的受精卵亚显微结构的变化,结果显示,CB 对线粒体等细胞器的破坏,造成了受精卵的代谢缺陷,是导致鲍受精卵孵化率低的原因之一。

关键词: 细胞松弛素 B;皱纹盘鲍;受精卵;细胞超微结构

中图分类号:S917,Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2002)05-14-04

Effect of Cytochalasin B on the Ultrastructure of Fertilized Eggs of Abalone (*Haliotis discus hannai*)

SUN Zhen-Xing^① WANG Ru-Cai^② JIANG Ming^② LIU Xiao-Yun^②

(^①Yantai Normal University Yantai 264025;

^②Ocean University of Qingdao Qingdao 266003, China)

Abstract: Cytochalasin B (CB) is an inhibitor of microfilament. It is extensively used for polyploid induction in shellfish. However because of its toxicity CB treatment often results death and abnormal development of the fertilized eggs. We have observed the ultrastructure of normal fertilized eggs and CB treated eggs of the abalone (*Haliotis discus hannai*), and compared normal and abnormal eggs with transmission electron microscope (TEM). The results indicate that CB breaks down cell organs such as mitochondria etc.; it causes the metabolic disturbance of fertilized eggs. This is one of the reasons how the low hatch rate of abalone fertilized eggs.

Key words: Cytochalasin B; Abalone (*Haliotis discus hannai*); Fertilized eggs; Ultrastructure

用细胞松弛素 B(cytochalasin B,以下简称 CB)处理受精卵是诱导海洋贝类三倍体的有效手段之一。但是,在诱导贝类三倍体的实践中已经注意到,由于 CB 处理的毒副作用导致受精卵死亡^[1]、胚胎发育迟缓^[2]或幼虫发育异常等^[3,4]。但对 CB 这种毒副作用的细胞学机制,目前国内外尚未见研究报道。

动物的个体发育是从精卵结合形成受精卵之时开始的。在诱导贝类三倍体时,CB 处理的直接作用对象也是受精卵。因此,在亚显微结构水平上探讨 CB 对贝类受精卵及其发育的影

响是很有必要的。皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 属腹足纲、鲍科,是一种重要的海洋经济贝类,近年来也进行了诱导三倍体的研究^[5]。笔者等在观察了皱纹盘鲍卵的超微结构的基础上^[6],对诱导皱纹盘鲍三倍体时,经不同浓度 CB 处理后的受精卵的超微结构变化进行了观

^{*} 国家高技术研究发展计划资助项目(No. 863819-0101);

第一作者介绍 孙振兴,男,45岁,教授,博士;研究方向:贝类遗传育种。

收稿日期:2001-11-01,修回日期:2002-03-04

察, 以期研究 CB 对海洋贝类早期发育的毒副作用提供细胞学方面的基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料来源 皱纹盘鲍的亲鲍取自烟台附近海区, 选用性腺发育成熟的 2~3 个雄鲍和 4~5 个雌鲍排放的精、卵, 经受精后作为实验材料。

1.2 实验步骤 实验组采用与 CB 诱导皱纹盘鲍三倍体时相同的浓度, 即 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 1.5 mg/L^[5], 对照组不含 CB。实验组与对照组的卵子同时受精, 实验组在受精后 10 min 将受精卵分别置于不同浓度 CB 海水溶液中处理 15 min 后, 再分别移入含有 100 μ l/L 的二甲基亚砷海水溶液中洗卵 30 min, 以除去残留在卵子表面的 CB, 然后将受精卵移入正常海水中并取样。取样时, 分别用吸管随机吸出部分受精卵, 用筛绢滤去海水后进行固定。各实验组与对照组的其余受精卵分别置于 1 000 ml 烧杯中, 在水温 20~21 $^{\circ}$ C 条件下孵化培育, 用以观察孵化率。

1.3 电镜样品制备与观察 实验材料经 2.5% 戊二醛预固定, 1% 锇酸后固定; 乙醇梯度脱水, Epon 812 环氧树脂包埋; LKB 超薄切片机切片, 最后用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。日立 H-7000 型透射电镜观察拍照, 各组分别观察了 30~40 个细胞。

1.4 孵化率的计算 孵化率是受精后 14 小时, 正常孵化的担轮幼虫数占受精卵总数的百分率。

2 结 果

2.1 鲍正常受精卵的超显微结构 皱纹盘鲍的卵子为均黄卵。在鲍受精卵的卵质中, 均匀分布着大量电子密度很深的卵黄颗粒 (yolk granules) 和一些体积较大、电子密度均匀的无定形膜包裹的脂滴 (lipid droplet), 在卵黄颗粒与脂滴之间充满着游离状态的核糖体颗粒 (图版 I:1)。

鲍的卵质中有许多线粒体 (mitochondrion),

正常线粒体具有双层膜结构, 外膜明显, 内膜内褶形成短管状的嵴, 线粒体内部充满电子密度较小的基质, 基质中含有致密的嗜锇颗粒 (图版 I:2)。

2.2 不同浓度 CB 处理后的鲍受精卵超微结构的变化 皱纹盘鲍的受精卵在浓度为 0.5 mg/L 的 CB 海水溶液中处理 15 min 后, 观察到的各种细胞器的结构无明显变化, 大多数线粒体结构正常, 但可见个别线粒体外膜破损 (图版 I:2)。

CB 浓度为 1.0 mg/L 时, 线粒体的外膜开始溶解, 内嵴部分瓦解; 高尔基复合体 (Golgi complex) 的膜囊结构出现异常 (图版 I:3); 脂滴的电子密度变得不均匀, 部分脂滴的不定形膜出现萎缩, 卵黄颗粒与脂滴之间的游离核糖体受到破坏 (图版 I:4)。

CB 浓度为 1.5 mg/L 时, 脂滴的不定形膜萎缩加剧 (图版 I:5); 线粒体双层膜明显溶解, 基质变为大而不规则的絮状致密物, 整个线粒体趋于解体; 卵质中的游离核糖体进一步散失, 同时可见个别卵黄颗粒表面的限制性被膜破损呈模糊状 (图版 I:6)。

2.3 不同浓度 CB 处理后鲍受精卵的孵化率

各实验组的受精卵经 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 1.5 mg/L 的 CB 处理后, 其孵化率分别为 71.8%、75.0%、67.3%, 而对照组的孵化率为 84.2%。虽然实验组的孵化率与 CB 处理浓度不呈明显的负相关, 但各实验组的孵化率均低于对照组。

3 讨 论

3.1 CB 对鲍受精卵的毒性效应 用 CB 处理受精卵时, 由于 CB 抑制了在细胞分裂中起重要作用的微丝的聚合, 使细胞质的运动受到抑制, 在减数分裂时无法形成分裂沟, 从而阻止了极体的释放, 使染色体加倍形成多倍体。当 CB 作用于微丝的同时, 也会对受精卵内的其它细胞器产生一定影响。从本研究的观察结果中可以看出, 线粒体对 CB 的毒性作用较为敏感。当 CB 浓度为 0.5 mg/L 时, 即有个别线粒体出

现外膜破损的现象,随着 CB 浓度的增大,线粒体双层膜溶解、基质变为絮状致密物,导致线粒体的瓦解。此外,CB 的毒性作用还导致了脂滴萎缩,并使高尔基复合体、游离核糖体受到破坏。

细胞结构是功能的单位,结构受到破坏必然导致功能的障碍。线粒体是细胞氧化的中心,是细胞能量的供应站,它担负着细胞的代谢作用,向机体提供能量,因为三磷酸腺苷(ATP)的合成是通过线粒体的氧化磷酸化实现的;线粒体的嵴则与细胞呼吸强度有很大关系。因此,线粒体的损伤必然影响受精卵发育过程中的能量代谢和呼吸作用,导致受精卵的代谢缺陷。

此外,细胞中的脂滴可以转化为脂蛋白,发育为脂质卵黄粒(lipoprotein yolk);核糖体是细胞内蛋白质生物合成的重要场所,在蛋白质合成中起着装配机的作用;高尔基复合体具有对蛋白质修饰加工、并将蛋白质分选后送往细胞不同部位的功能。因此,这些细胞结构受到破坏,对受精卵的发育无疑是有害的。

3.2 CB 对鲍受精卵发育的影响 本研究采用的 CB 浓度,与笔者用 CB 诱导鲍三倍体时的浓度完全一致。实验表明,CB 浓度为 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 1.5 mg/L 时,都能使鲍受精卵形成三倍体,但随着 CB 浓度的增大,虽然三倍体诱导率提高了,但受精卵的孵化率却呈下降趋势^[5]。本实验中,经上述三组 CB 浓度处理过的受精卵,其孵化率也都明显低于对照组,这说明 CB 对鲍受精卵的发育确有明显的影响。

结合本文的观察结果分析,CB 导致鲍受精卵发育异常的原因,一方面可能与线粒体、高尔基复合体等细胞器受到一定程度损伤而引起的代谢障碍有关;另一方面因为鲍在发育早期阶

段,没有外源性营养,完全依靠自身的卵黄颗粒营养,当卵黄物质受到破坏时,必然对发育带来不良影响。但由于 CB 对鲍受精卵作用的不均一性,受精卵受到的毒害程度也不同,因而对早期发育的影响也有一定差异。陈大元等^[7]在研究卵裂的有丝分裂器旋转机制时观察到,经 CB 处理过的文昌鱼受精卵有卵裂异常现象,表明 CB 对海洋动物的受精卵确有一定的毒副作用。内村等^[4]认为由于 CB 的作用,一部分肌动蛋白纤维被破坏后分化产生的异常细胞,可能是 CB 导致贝类幼虫发育畸形的原因之一。本文的观察结果与上述结论是相吻合的。笔者认为,CB 对线粒体、脂滴等细胞结构的破坏,造成了受精卵的代谢缺陷,从而导致鲍受精卵和胚胎发育异常,这也是 CB 诱导鲍三倍体时,影响三倍体孵化率的重要原因之一。

参 考 文 献

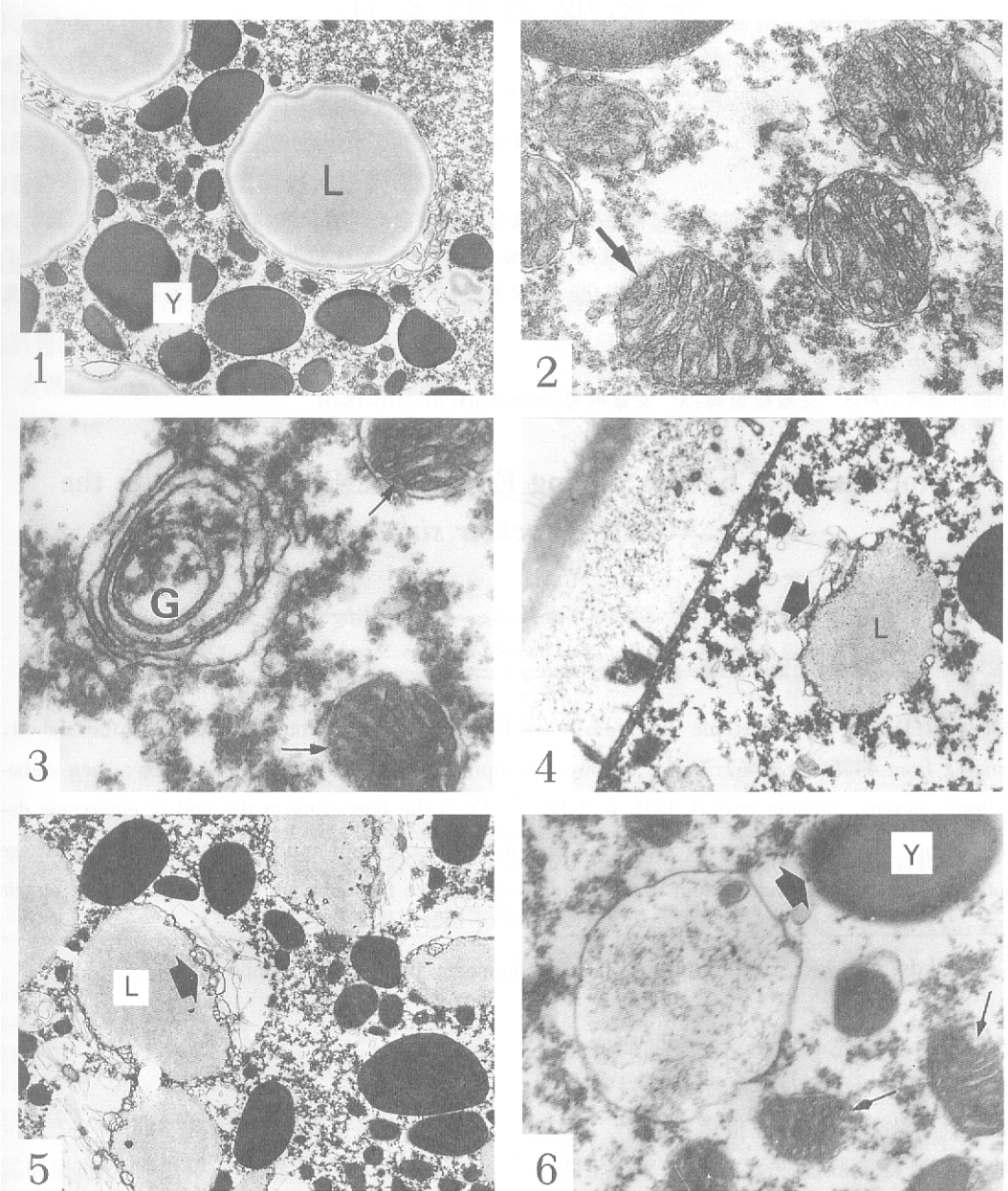
- [1] Downing S L, Allen S K Jr. Induced triploidy in the Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 1987, **61**: 1 ~ 15.
- [2] Wada K T, Komaru A, Uchimura Y. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 1989, **76**: 11 ~ 19.
- [3] Barber B J, Mann R, Allen S K Jr. Optimization of triploid induction for the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture*, 1992, **106**: 21 ~ 26.
- [4] 内村佑之,平田智法,阿部俊之助. サイトカラシン B の副作用を受けたアコヤガイ胚の発生段階. 水産増殖, 1994, **42**(3): 447 ~ 452.
- [5] 孙振兴,李诺,宋志乐等. 皱纹盘鲍三倍体诱导条件及其室内饲养试验. 水产学报, 1993, **17**(3): 243 ~ 248.
- [6] 孙振兴,王如才,姜明等. 皱纹盘鲍卵的形态与超显微结构. 中国水产科学, 1997, **4**(1): 68 ~ 74.
- [7] 陈大元,宋祥芬,赵学坤等. 卵裂的有丝分裂器的旋转与染色体运动机制的研究. 科学通报, 1989, **34**(3): 217 ~ 219.

孙振兴等:细胞松弛素 B 对鲍受精卵超微结构的影响

图版 I

SUN Zhen-Xing *et al.*: Effect of Cytochalasin B on the Ultrastructure of FertilizedEggs of the Abalone (*Haliotis discus hannai*)

Plate I



1. 正常受精卵中的卵黄颗粒和脂滴,其间充满核糖体 $\times 6400$; 2. 0.5 mg/L 的 CB 处理后,个别线粒体的外膜受损(箭头所示) $\times 40500$; 3. 1.0 mg/L 的 CB 处理后,高尔基复合体结构异常、线粒体双层膜溶解(箭头所示) $\times 40000$;

4. 1.0 mg/L 的 CB 处理后,脂滴的不定形膜出现萎缩(宽箭头所示) $\times 7000$; 5. 1.5 mg/L 的 CB 处理后,脂滴萎缩加剧(宽箭头所示) $\times 7000$;

6. 1.5 mg/L 的 CB 处理后,线粒体趋于解体(细箭头所示),卵黄颗粒的被膜呈模糊状(宽箭头所示) $\times 34000$

Y: 卵黄颗粒; L: 脂滴; G: 高尔基复合体