

乌梢蛇卵泡不同发育期颗粒细胞的显微结构变化

梁刚 叶效林* 任耀辉

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要: 采用光学显微镜主要观察了乌梢蛇 (*Zaocys dhumnades*) 卵泡发育过程中颗粒细胞的显微结构变化。结果表明,乌梢蛇的滤泡前体细胞在形态、大小与嗜色性上均与生殖基的表面上皮相似;在原始卵泡期,卵母细胞周围的滤泡前体细胞围绕成一圈;在颗粒层细胞期的时期至时期,颗粒细胞分化为由小细胞、梨形细胞与中间型细胞构成的异型颗粒细胞;在时期,这些异型颗粒细胞又转变成为只有小细胞的同型颗粒细胞。乌梢蛇卵泡颗粒细胞来源于生殖基的表面上皮,其发育特征是首先由同型发育成为异型,再由异型转变为同型颗粒细胞,具有同源异型的特征。

关键词: 乌梢蛇; 卵泡; 颗粒细胞; 发育

中图分类号: Q954.43+2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)01-112-06

Microstructural Changes on Granulosa Cells during Follicular Development in *Zaocys dhumnades*

LIANG Gang YE Xiao-Lin* REN Yao-Hui

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The microstructure of granulosa cells during follicular development in *Zaocys dhumnades* was observed. The results showed that prefollicle cells were similar to the free surface epithelium of germinal bed in morphology, size and acidophilia/basophilia. At primordial follicle stage oocytes were surrounded by prefollicle cells. At granulosa cell stage, prefollicle cells transformed into small-size cells. At stage, granulosa cells differentiated into three kinds of heterogeneous granulosa cells which are different in morphology. At stage, the heterogeneous granulosa cells transformed into small-size homogeneous granulosa cells. In summary, the granulosa cells are derived from free surface epithelium of germinal bed, and homogeneous granulosa cells develop into heterogeneous ones, then back into homogeneous ones during follicle development in *Z. dhumnades*.

Key words: *Zaocys dhumnades*; Follicle; Granulosa cell; Development

乌梢蛇 (*Zaocys dhumnades*) 隶属于爬行纲蛇目游蛇科,为我国特有的常见大型无毒蛇类,分布于我国秦岭及淮河以南的广大地区,其垂直分布从沿海、沿江、沿湖低海拔地区到海拔 2 000 m 左右的山区,主要以蛙类为食^[1],在维持农林生态系统平衡方面具有重要的作用。目前,对乌梢蛇人工繁殖方面的研究较多,但主要集中在繁育技术和早期生长发育方面^[2-5]。本文观察了乌梢蛇卵泡发育过程中颗粒细胞形态学特征及其变化,这些工作不仅对于了解乌梢

蛇卵泡的发育规律、丰富脊椎动物生殖生物学内容具有重要的理论意义,而且对于乌梢蛇的人工饲养与繁殖、野生资源有效保护以及合理开发利用等也具有重要的实用价值。

基金项目 陕西师范大学校级重点科研项目;

*现在厦门五缘实验学校工作。

第一作者介绍 梁刚,男,副教授;研究方向:动物发育生物学;E-mail:lianggang@snnu.edu.cn。

收稿日期:2008-06-23,修回日期:2008-11-05

1 材料与方法

观察用乌梢蛇采于陕西省汉阴县磨子沟(32°53'26"N, 108°20'28"E),均为性成熟雌性个体,头体长+尾长(102~124)+(38~50)cm,体重229.8~366.9g。依据本实验室已有的研究结果,共取材5次,时间分别为1、5、6、7和12月的上旬。每次取材时选择健康活跃的乌梢蛇2条,首先称体重、测全长(头体长+尾长),之后用乙醚麻醉并断头处死,立即从腹部剖开体腔,取左右两侧卵巢,用0.6%的生理盐水清洗后,剥离出大小不同的卵泡及其周围组织,将其投入新配制的Bouin's液中固定24h以上。常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片,切片厚7 μ m。H.E染色,中性树胶封片。Motic BA 200光学显微镜观察、测量,Leica DFC 320显微镜数码拍照。

依据Klosterman对蜥蜴(*Gerrhonotus coeruleus*)卵泡发育的分期^[6],本文将乌梢蛇卵泡发育也划分为卵原细胞期、卵黄形成前期、卵黄形成期与成熟期4个时期进行描述。由于乌梢蛇卵黄形成前期持续时间较长、形态结构变化较为复杂,本文又依据蔡亚非等对无蹼壁虎(*Gekko swinhoni*)卵黄发生前的分期方法^[7],将乌梢蛇的卵黄形成前期划分为原始卵泡期与颗粒层细胞期,其中颗粒层细胞期又进一步分为时期~。

2 结果

在本文5次观察的乌梢蛇卵巢切片中,均见到了卵原细胞期与卵黄形成前期的卵泡,而卵黄形成期的卵泡仅见于6月份的切片中。

2.1 卵原细胞期(oogonium stage) 乌梢蛇的卵原细胞只见于生殖基(geminal bed)中,通常单个或三五成群分布,排列比较紧密(图版:1)。生殖基是生殖上皮在卵巢局部向外突起结构,其表面上皮为单层立方或扁平细胞,细胞小,细胞核较大,呈强嗜碱性。生殖基与卵巢基质之间有一层厚约3 μ m的基膜,使得二者分离。生殖基由卵原细胞、原始卵泡及滤泡前体

细胞(prefollicle cells)等组成,其中滤泡前体细胞呈立方或扁平状,细胞小,细胞核较大,呈强嗜碱性(图版:1,2)。

2.2 卵黄形成前期(previtellogenic stage)

2.2.1 原始卵泡期 该期的卵泡仍然位于生殖基内。初级卵母细胞形成后,生殖基中的一些滤泡前体细胞首尾相连围绕在卵母细胞周围,与卵母细胞共同构成原始卵泡。原始卵泡周围的滤泡细胞为单层扁平或立方状,细胞核多呈长梭形,位于细胞中央。原始卵泡中央的卵母细胞呈圆形,直径约29 μ m;细胞核圆形、相对较大,直径约14 μ m;细胞质比较丰富,呈弱嗜碱性(图版:2)。

2.2.2 颗粒层细胞期 时期的卵泡位于卵巢基质中。卵母细胞质地均匀。滤泡细胞为单层立方上皮,整体上呈颗粒状,因此又称为颗粒细胞,此时的颗粒细胞较小,又叫做小细胞(small cell)。其细胞核相对较大,直径约4 μ m,呈强嗜碱性,几乎占满整个细胞。该期未见到透明带与鞘膜细胞的分化(图版:2)。

时期的卵泡仍位于卵巢基质中。卵母细胞体积进一步增加,卵母细胞与颗粒细胞之间已经形成一薄层呈弱嗜酸性的透明带,厚约1 μ m。此时颗粒细胞有2~3层细胞,在形态上可以明显地区分为2种细胞:小细胞与梨形细胞(pyriiform cell)(图版:3)。该期的小细胞与时期的小细胞在形态与嗜色性上相似,可见于颗粒细胞的各层,但以外层数量较多,靠近透明带处次之。梨形细胞主要分布于颗粒细胞层的中层,数量较少,细胞较大,直径约19 μ m;细胞质均匀,呈弱嗜碱性;细胞核较大,直径约10 μ m,与细胞质嗜色性接近,有1~2个明显的大核仁。此外,在颗粒细胞层的外侧可见到1~2层鞘膜细胞,该细胞呈长梭形。

时期的卵泡大多数已经突向甚至进入卵巢腔内。卵母细胞进一步增大,细胞质中可见大量呈嗜酸性的卵黄颗粒。透明带嗜酸性增强,厚度进一步增加,达7 μ m左右。此时颗粒细胞有4~12层,在形态上明显地分化为3种细胞:小细胞、梨形细胞和中间型细胞

(intermediate cell), 这 3 种颗粒细胞质均呈嗜碱性, 以小细胞嗜碱性最强, 中间型细胞次之, 梨形细胞最弱。小细胞分散分布于颗粒细胞层内, 但以靠近鞘膜细胞与透明带处较多; 细胞呈圆形, 较小, 直径 $5 \sim 7 \mu\text{m}$; 细胞核大而圆。中间型细胞主要分布于靠近透明带处, 呈圆形或多角形; 比小细胞大, 直径约 $11 \mu\text{m}$; 细胞核大, 核仁明显。梨形细胞分布于颗粒细胞层的中层, 呈梨形、圆形与瓶状, 较时期的体积更大且数量多, 直径约 $21 \mu\text{m}$, 最大可达 $28 \mu\text{m}$, (图版 :4, 5)。此外, 鞘膜细胞层较时期明显增厚, 且在鞘膜细胞之间可见较多胶原纤维和微血管。

时期 卵泡全部在卵巢腔内。卵母细胞直径继续增加, 细胞质中的卵黄颗粒与时期的在形态上基本相似。此期的主要特点是颗粒细胞层较薄而且只有一种形态的细胞, 这些细胞小而排列紧密, 细胞间隙不明显, 细胞质相对较少。该期颗粒细胞从形态与嗜色性等特征判断属于小细胞(图版 :6)。

2.3 卵黄形成期(vitellogenic stage) 乌梢蛇卵黄形成期的卵泡壁形态特征明显: 鞘膜细胞层及颗粒细胞层的厚度均较薄; 鞘膜细胞层内毛细血管增多; 颗粒细胞层仍仅有一种类型的小细胞(图版 :7)。卵母细胞质中充满着卵黄小板。

2.4 成熟期(mature stage) 在卵黄形成期结束后, 乌梢蛇的卵泡体积达到最大, 卵泡壁破裂而排卵。由于此过程历时短暂, 本文未观察到该期的卵泡。但在 6、7 月份乌梢蛇的输卵管中均得到了卵子。显微观察发现, 在卵子的细胞质中充满了圆形、近椭圆形、均质状并呈嗜碱性的卵黄小板。在卵子的外侧为透明带, 呈嗜酸性。在透明带的外层未见到有颗粒细胞, 而观察到一层厚的卵壳, 厚约 $305 \mu\text{m}$, 强嗜酸性, 为多层呈波浪状的纤维样结构(图版 :8)。

3 讨论

3.1 乌梢蛇卵泡颗粒细胞的来源 卵泡壁主要包括外层的鞘膜细胞层和内层的滤泡(颗粒)

细胞层。关于滤泡细胞的来源, 对硬骨鱼的研究较多。一些学者认为硬骨鱼类的滤泡细胞来源于卵原细胞^[8, 9], 刘筠等认为位于中央的卵原细胞发育为卵母细胞, 位于周围的卵原细胞发育成滤泡细胞^[9]。但是, 多数学者认为滤泡细胞来源于非生殖细胞^[10-13], 张耀光等和徐吉山均认为硬骨鱼滤泡细胞由卵巢基质的细胞而来^[10, 11]; Selman 等和 Grier 认为滤泡细胞来源于滤泡前体细胞^[12, 13], 而滤泡前体细胞又来源于卵巢生殖上皮, 当卵母细胞离开卵巢时, 滤泡前体细胞随卵母细胞一起离开、增殖, 且形成一层连续的围绕卵母细胞的上皮^[13]。有关滤泡细胞的来源, 在鸟类或爬行类中目前并不清楚^[14], Gilbert 与 Callebaut 分别认为鸟类滤泡细胞来源于胚胎时期卵巢的上皮细胞^[15]或者来源于体腔上皮^[16], Guraya 认为爬行类滤泡细胞可能来源于生殖基的表面上皮^[14]。

基于以下理由, 本文认为乌梢蛇卵泡颗粒细胞(小细胞、梨形细胞和中间型细胞)来源于生殖基的表面上皮。滤泡前体细胞在形态、大小与嗜色性上均与生殖基的表面上皮相似。对乌梢蛇卵巢的连续切片观察后注意到, 生殖基主要由卵原细胞、原始卵泡以及滤泡前体细胞组成。滤泡前体细胞与生殖基的表面上皮细胞均呈立方或扁平状, 细胞小, 细胞核较大, 呈强嗜碱性, 表明滤泡前体细胞与生殖基的表面上皮之间存在着密切关系。卵原细胞最早是在生殖基中分裂增殖的, 当卵原细胞发育到一定阶段成为卵母细胞后, 其周围的滤泡前体细胞首尾相连形成连续一圈包围在卵母细胞周围, 与卵母细胞共同构成了原始卵泡。在生殖基内形成的原始卵泡逐渐会穿过生殖基与卵巢基质之间的基膜, 进入卵巢基质。当原始卵泡开始发育后, 这些滤泡前体细胞首先分化成为小细胞, 随着卵泡继续发育, 这些小细胞的一部分会进一步分化形成梨形细胞和中间型细胞。

3.2 乌梢蛇卵泡颗粒细胞的发育特征 随着卵母细胞的生长与成熟, 乌梢蛇颗粒细胞的形态与结构均发生了较大的变化。在卵原细胞

期,其周围尚未形成颗粒细胞。在原始卵泡期,卵母细胞周围的滤泡前体细胞围绕成一圈。在颗粒层细胞期的时期,这些滤泡前体细胞发育成为小细胞;在时期,颗粒细胞开始分化为由小细胞和梨形细胞构成的异型颗粒细胞;在时期,颗粒细胞进一步分化为3种类型的异型颗粒细胞:小细胞、梨形细胞和中间型细胞;在时期,这些异型颗粒细胞又转变成为同型的颗粒细胞——小细胞。在卵黄形成期,只有由小细胞组成的颗粒细胞。综上所述,乌梢蛇的颗粒细胞均来源于生殖基的表面上皮,其发育特征是首先由同型颗粒细胞发育成为异型颗粒细胞,再由异型颗粒细胞转变成为同型颗粒细胞,表明了乌梢蛇颗粒细胞发育具有同源型的特征。

乌梢蛇的卵泡在发育过程中出现异型颗粒细胞的现象,在其他一些胎生和卵胎生的有鳞类中也有报道^[14,17,18],Klosterman认为异型颗粒细胞是有鳞类动物所独有的特征,只是在不同物种之间存在一定差异^[6]。一般认为,蜥蜴类的小细胞首先分化为中间型细胞,中间型细胞的一部分进一步分化为梨形细胞^[19,20]。但蔡亚非在观察了无蹼壁虎颗粒细胞的变化后表明,异型颗粒细胞首先出现的是梨形细胞,以后才出现中间型细胞^[7]。本文在观察乌梢蛇颗粒细胞的发育时注意到,开始只有小细胞,随后在颗粒细胞层的中层分化出了梨形细胞,接着在原来小细胞的位置(主要在靠近透明带处)进一步分化出了中间型细胞。依据小细胞、梨形细胞与中间型细胞出现的时间、位置及形态特点等方面进行综合分析,本文认为乌梢蛇的梨形细胞和中间型细胞均是从小细胞分化形成的。看来乌梢蛇梨形细胞的来源与蜥蜴类的不完全相同,这种差异可能是由于物种不同所造成的,表明了有鳞类异型颗粒细胞发育具有多样性的特征。

Motta等研究表明,在蜥蜴类的3种颗粒细胞中,中间型细胞和梨形细胞在卵子发生过程中起到非常重要的作用,它们可以合成各种各样的物质,通过细胞间桥运输到卵母细胞中,参

与外源性卵黄的生成^[21]。在乌梢蛇卵子发生过程中,成熟卵泡内最终积累了大量的卵黄小体,异型颗粒细胞出现的意义也可能在于合成与运输卵黄物质,参与外源性卵黄的生成。

参 考 文 献

- [1] 刘凌云,郑光美编著.普通动物学(第三版).北京:高等教育出版社,1997,478.
- [2] 黄接棠,黄松.乌梢蛇幼蛇的人工饲养.蛇志,2001,13(1):78~80.
- [3] 张含藻,陈学康,胡周强.人工养殖乌梢蛇生物学特性观察.中药材,1990,13(2):12~13.
- [4] 刘军,钟福生,周剑涛等.乌梢蛇的人工孵化试验.蛇志,2004,16(4):1~4.
- [5] 叶红,唐鑫生,胡建国等.乌梢蛇的人工孵化与冬眠前的人工饲养.四川动物,2005,24(2):216~217.
- [6] Klosterman L L. Ultrastructural and quantitative dynamics of the granulosa of ovarian follicles of the lizard *Cerrhonotus coeruleus* (Family Anguidae). *Journal of Morphology*, 1987, 192:125~144.
- [7] 蔡亚非,李君,陈壁辉.无蹼壁虎(*Gekko swinhonis*) 卵泡发育的研究.生命科学研究,1999,3(1):58~63.
- [8] 朱洗,陈兆熙,王幽兰.金鱼和鳊鱼卵球受精的细胞学研究.实验生物学报,1960,7(1-2):29~46.
- [9] 刘筠编著.中国养殖鱼类繁殖生理学.北京:农业出版社,1993,20~73.
- [10] 张耀光,谢小军.南方鲈卵巢滤泡细胞和卵膜生成的组织学研究.动物学研究,1995,16(2):166~172.
- [11] 徐吉山,王德寿,张耀光.大鳍鱮卵巢滤泡细胞发育的组织学研究.大理学院学报,2007,6(6):10~14.
- [12] Selman K,Wallace R A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 1989,6(2):211~231.
- [13] Grier H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook. *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). *Journal of Morphology*, 2000,243(3):265~281.
- [14] Guraya S S. Ovarian follicles in reptiles and birds. In:Farner D S ed. *Zoophysiology*. Berlin:Springer-Verlag,1989,6~21.
- [15] Gilbert A B. Female genital organs. In:King A S,McLelland J eds. *Form and Function in Birds*. New York:Academic Press,1979,237~360.
- [16] Callebaut M. Origin of ovarian follicle cells in birds. *Cellular and Molecular Life Science*, 1976,32(10):1337~1339.
- [17] Hubert J. Origin and development of oocyte. In:Gans C,Billett F,Maderson P F A eds. *Biology of the Reptilia*. New York:John Wiley and Sons,1985,42~74.

- [18] Uribe M D C A, Portales G L B, Guillette Jr L J. Ovarian folliculogenesis in the oviparous Mexican Lizard *Ctenosaura pectinata*. *Journal of Morphology*, 1996, **230**(1) :99 ~ 112.
- [19] Prisco M, Salvatore V, Maurizio R, *et al.* Ovarian follicle cells in *Torpedo marmorata* synthesize vitellogenin. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, **67**(4) :424 ~ 429.
- [20] Andreuccetti P, Taddei C, Filosa S. Intercellular bridges between follicle cells and oocyte during the differentiation of follicular epithelium in *Lacerta sicula* Raf. *Journal of Cell Science*, 1978, **33**(1) :341 ~ 350.
- [21] Motta C M, Filosa S, Andreuccetti P. Role of pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. *The Journal of Experimental Zoology*, 1995, **273**:267 ~ 256.

图 版 说 明

1. 乌梢蛇的生殖基, $\times 400$; 2. 生殖基中卵原细胞及原始卵泡期和颗粒层细胞期时期的卵泡, $\times 200$; 3. 颗粒层细胞期时期的卵泡, $\times 200$; 4. 颗粒层细胞期时期的卵泡, $\times 400$; 5. 颗粒层细胞期时期的卵泡, $\times 400$; 6. 颗粒层细胞期时期的卵泡, $\times 400$; 7. 卵黄发生期的卵泡, $\times 400$; 8. 输卵管内的成熟卵, $\times 400$ 。

Gb. 生殖基; Og. 卵原细胞; Ge. 生殖上皮; Bm. 基膜; Oo. 卵母细胞; Pf. 滤泡前体细胞; S. 小细胞; N. 卵母细胞核; I. 中间型细胞; P. 梨形细胞; Z. 透明带; T. 鞘膜细胞; y. 卵黄颗粒; Y. 卵黄小板; Es. 卵壳。

Explanation of Plate

1. Germinal bed in the ovary of *Z. dhumnades*, $\times 400$; 2. Oogonium and Follicle at stage in germinal bed of *Z. dhumnades*, $\times 200$; 3. Follicle at stage in *Z. dhumnades*, $\times 200$; 4. Follicle at stage in *Z. dhumnades*, $\times 400$; 5. Follicle at stage in *Z. dhumnades*, $\times 400$; 6. Follicle at stage in *Z. dhumnades*, $\times 400$; 7. Follicle of *Z. dhumnades* in vitellogenetic stage, $\times 400$; 8. The mature ovum of *Z. dhumnades* in oviduct, $\times 400$.

Gb. Germinal bed; Og. Oogonium; Ge. Germinal epithelium; Bm. Basal membrane; Oo. Oocyte; Pf. Prefollicle cells; S. Small cells; N. Nucleolus of oocyte; I. Intermediate cells; P. Pyriform cells; Z. Zona pellucida; T. Thecal cells; y. Yolk granules; Y. Yolk platelet; Es. Egg shell.

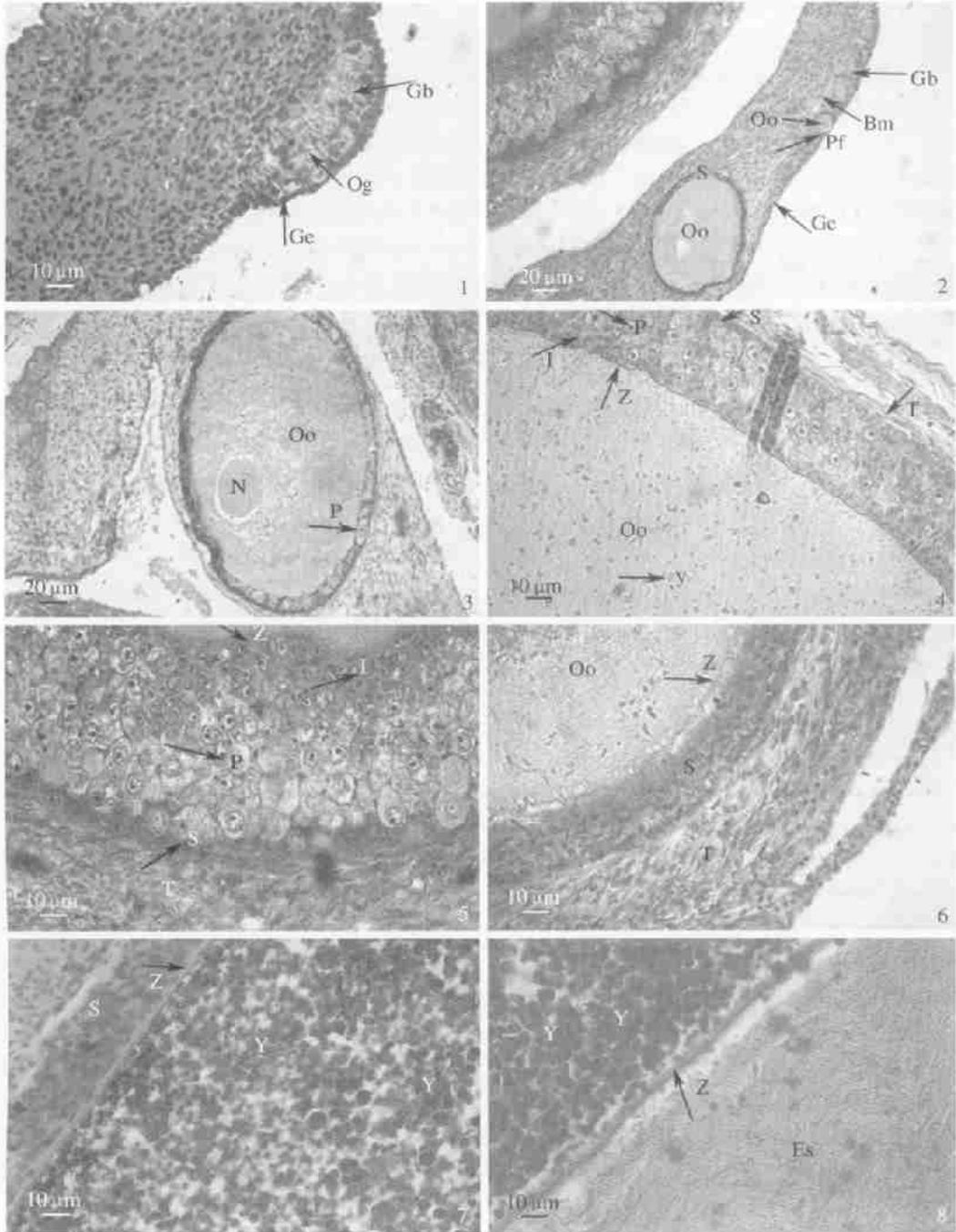
梁 刚等:乌梢蛇卵泡不同发育期颗粒细胞的显微结构变化

图版

LIANG Gang *et al.* :Microstructural Changes on Granulosa Cells during Follicular

Development on *Zaocys dhumnades*

Plate



图版说明见文后