

中华绒螯蟹卵巢和胚胎发育期脂类在卵黄物质中存在的形态及其变化

成永旭

堵南山 赖伟

(厦门大学海洋系 厦门 361005)

(华东师范大学生物系 上海 200062)

摘 要 脂类在中华绒螯蟹成熟卵子中以两种形态存在:脂肪滴(L)和卵黄体(Y),前者为中性脂,卵黄体中的脂类主要是磷脂。L和Y几乎充满整个成熟卵子,且交互分布,开始它们间以许多致密小颗粒(sg)间隔,直到两者的分布无界限分割。L和Y的形态也各有变化。L和Y的分布和变化可以作为卵子成熟度的标志。

胚胎发育期L和Y的分布发生了显著的变化,两者呈网状分布,L近圆形,为网状卵黄物质的网眼。在胚胎发育过程中,与卵黄物质相邻接的是合胞体,并以此来吸收L和Y。

卵巢快速发育时期,是卵黄发生旺期,卵是以Y的积极合成为特征的,象成熟卵子和胚胎发育卵中的特征性的L极为少见。

关键词 中华绒螯蟹 卵黄 脂类 卵巢 胚胎

十足类甲壳动物卵巢快速发育是卵黄物质大量积累时期,其中积累的主要物质之一是脂类^[1~4],这些脂类将是胚胎发育重要的能源物质,且脂类积累的数量和质量对胚胎发育有很大的影响^[5~8]。自然状况下,中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)8~11月是卵巢快速发育时期,12月进入成熟阶段,并持续到次年4

月^[9]。所以,掌握卵巢发育这一阶段及胚胎发育期卵黄脂类物质的形态及变化,对于了解十足类甲壳动物的生殖和生理状况,都有比较重要的意义。

第一作者介绍:成永旭,男,32岁,讲师,博士;

收稿日期:1997-02-27,修回日期:1997-09-15

1 材料和方法

1.1 实验用蟹 取于崇明县前卫村中华绒螯蟹繁殖基地。9月份蟹平均重 57g, 性腺指数在 2.8~3.6。12月成熟蟹重 50~150g 不等, 性腺指数在 10.3~13.2 之间。各期抱卵蟹取自抱卵蟹池, 根据抱卵时间和光镜镜检把胚胎发育分为刚抱卵期(卵裂期)、原肠期(透明区占 1/3)、眼点期及心跳期(80 次/分钟)。

1.2 组织学观察 取一小块新鲜卵巢及不同胚胎发育期的卵子, 放入福尔马林-钙溶液(固定脂肪比较好)中固定 3 天以上, 接着取固定材料少许于涂布有甘油明胶的载玻片上, 再用另一玻片压挤材料使其破裂, 卵黄均匀分布在玻片上, 于 30℃ 恒温箱中烘干, 然后按下列方法进行组化染色: 中性脂肪用 Cain 氏耐尔蓝法, 可使中性脂肪染成红色; 磷脂用 Menschidk (1953) 改进的硫酸耐尔蓝法, 可使磷脂染成蓝色。

1.3 透射电镜观察 取 1mm³ 体积大小的组织块, 经双固定(2.5% 戊二醛和 1% 锇酸)后, 梯度酒精脱水至 90%, 然后换丙酮包埋, Spurr's 1969 包埋剂包埋, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM100 CXII 透射电镜观察。

2 结果

2.1 组织化学结果 无论在成熟卵巢的卵中或各期抱卵蟹的胚胎中, 既有磷脂也有中性脂, 并交互分布。不过可能由于压片的缘故, 被压挤成的卵黄物质颗粒中, 磷脂(PL)于颗粒的中部, 被染成蓝色, 呈“O”型分布, 由这种 O 型体组成卵黄体(Y), 中部透明的部分可能主要是蛋白质。中性脂(NL)成片分布于这种颗粒的周围, 被染成红色, 由被挤压出的 NL 小球(脂肪滴 L)可断定它们也是由脂肪滴形成的(图版 II: 21 见封三)。由此可见, 磷脂在卵黄物质中是存在于卵黄体中, 中性脂以脂肪滴的形式存在于卵黄物质中。

2.2 电镜观察

2.2.1 卵巢快速发育阶段卵黄脂类物质的形

态和变化

在卵黄发生的旺期, 卵中常可见到大量的囊泡(v), 这些囊泡可能是内质网高度分化形成的, 泡内含物是卵黄体合成的区域, 可见不同发生程度的卵黄体和一些电子致密小颗粒(Sg), 这些 Sg 直接参与卵黄体的形成。囊泡周边由极细微的膜性颗粒(sg)组成, 这些颗粒可能由核糖体特化形成, 它的作用可能是在整个卵中合成卵黄体物质 Sg, 然后向囊泡中不断输入, 另外也可能起到一种框架作用, 以保证卵黄体发展的空间, 以适应卵黄体的快速形成(图版 I: 1 见封 2, 下同)

随着囊泡中的卵黄体的发育和增大, 卵黄体逐步充满囊泡, 相邻的卵黄体间有的进行融合, 形成较大的卵黄体。未进行融合的卵黄体间仍由膜性颗粒 sg 间隔(见图 I: 2)。

卵黄体大量形成时, 也常可见有滤泡细胞吞及滤泡细胞物质向卵中扩散, 参与卵黄体的形成(图版 I: 3)。

在卵黄发生的旺期, 偶尔可见极少量的脂肪滴在囊泡中形成(图版 I: 4)。总之, 在这一时期, 卵仅以卵黄体 Y 的积极合成为特征, 很难见到象下述成熟卵或胚胎中的特征性脂肪滴 L。

在中华绒螯蟹成熟卵中, 是以大量脂肪滴(L)的出现为特征的, 卵黄体(Y)和 L, 几乎充满了整个细胞, 并交互分布, 但情况又略有不同:

成熟不久的卵中, Y 和 L 都基本上呈规则的圆形或椭圆型, 大都被 Sg 或 sg 包围或相互间隔, L 间有融合趋势(图版 I: 5, 7)。卵膜厚而平直, 滤泡细胞因解体而变得透明(图版 I: 5)。Y 的电子致密度也各不相同, 这可能与 Y 的浓缩和其中的磷脂成分不同有关。另外在成熟卵子的卵周围细胞质中也可见成堆的皮层颗粒(图版 I: 5)。以后, 卵的进一步成熟, Y 的形状出现不规则, 且电子致密度大大提高, L 仍基本为椭圆型, (图版 I: 6, 8, 9), 卵膜变的致密, 滤泡细胞萎缩(图版 I: 6)。不规则的 Y 的形成, 其一可能由间隔 Y 和 L 的 sg 颗粒经过

自身的凝聚作用(图版 I : 6 和图版 II : 10 sy 见封 3, 下同), 再进一步浓缩形成卵中较小的卵黄体(如图版 I : 9 和图版 II : 10 中较小的 Y); 其二可能是由于间隔 Y 和 L 的 sg 颗粒(如图版 I : 7 中 Y 和周围的 L 间的 sg)逐步浓缩, 并“粘贴”在临近的 Y 上, 而使原来规则的 Y 变得不规则(如形成类似图版 I : 8 中 Y1 的形状)。卵的再进一步成熟, 由于 L 间的不断融合和 sg 颗粒的不断“粘贴”和自身的凝集浓缩, Y 和 L 间基本上无界限分割, L 也由于融合以及和不规则的 Y 的直接接触也变得无规则, 卵黄物质因此结合的更加紧密(图版 II : 10, 11)。

2.2.2 胚胎发育期胚胎内卵黄脂类物质的形态及变化

不同胚胎发育期的 Y 和 L, 无论是卵裂期(图版 II : 12)、原肠期(图版 II : 13)、眼点出现期(图版 II : 17)或是心跳期(图版 II : 18), 在胚胎内的分布基本一致, 即都呈网状分布, L 近圆形, 好似镶嵌在 Y 中, 组成网状结构的网眼。这种分布与成熟卵子相比发生了较为显著的变化。有时 L 间也有融合现象(图版 II : 17, 18)。网状分布的 L 和 Y, 在分布区内, 有时 L 占主要(图版 II : 17, 18), 有时 Y 占主要(图版 II : 12, 13)。

在胚胎发育过程中, 与卵黄物质相邻接的是合胞体, 有许多细胞核分布其间(图版 II : 13, 14, 15), 胚胎发育后期的合胞体细胞核(图版 II : 15)明显大于前期发育的细胞核(图版 II : 14), 且核间充满了物质。有时在合胞体的内部, 也有 L 存在(图版 II : 16)。

胚胎发育后期, 眼点出现以后, 胚胎的卵膜渗透性极度降低, 观察卵膜有三层组成, 从外向内电子致密度依次递增(图版 II : 19, 20)。最外层易于脱离(图版 II : 20)。最内一层厚而致密。这三层卵膜的来源不清楚。

3 讨 论

3.1 组织化学结果表明, 卵黄脂类物质的存在形态有两种, 一种以中性脂的形式存在于脂肪滴中, 另一种以磷脂的形式存在于卵黄体内, 卵

黄体的另一主要组分是卵黄蛋白。卵黄体中的磷脂主要有两种: 脑磷脂和卵磷脂, 约占成熟卵巢总脂类的 37% 左右, 中性脂主要是甘油三酯, 此外还有胆固醇。

3.2 尽管目前对十足类甲壳动物卵发育已有较多的了解, 但大多只限于卵黄体, 尤其是卵黄脂蛋白的起源和积累^[2, 10~17], 但极少注意脂肪滴的起源与形成部位。对于中华绒螯蟹来讲, 在卵黄发生的旺期, 卵中均以卵黄体的积极合成为特征的, 仅能见到少量的脂肪滴, 脂肪滴的大量形成是在此之后, 可能是在卵黄发生旺期的最后阶段, 因此在成熟卵子中出现了大量脂肪滴。大量脂肪滴的出现是卵成熟的标志。类似的情况有兰蟹 *Callinectes sapidus*^[18]、寄居蟹 *Coenobita clypeatus*^[2]。但有的脂肪滴的大量形成是在卵黄发生之前, 如日本对虾 *Penaeus japonicus*^[17]。在卵中, 脂肪滴于卵黄体合成先后大量出现的差异, 与其生殖生理上的关系还有待于深入研究。对于中华绒螯蟹, 卵黄发生旺期少量脂肪滴的形成可能与内质网有关(图版 I : 4), 但到目前为止都还没有直接的证据说明脂肪滴的大量形成与某种胞器的关系, 颜素芬等^[12]推测与线粒体可能有关, 而 Lee and Walker^[18]认为滤泡细胞与脂肪滴的形成直接相关, 并推测, 某些种类的十足类甲壳动物, 在卵中大量形成的脂肪滴可能源于肝胰腺, 因为这些种类的肝胰腺脂肪在卵巢脂类之前达到高峰。其具体的过程是: 肝胰腺的脂肪滴(主要是甘油三酯)首先转化为磷脂, 通过血淋巴脂蛋白运输到滤泡细胞, 在滤泡细胞中在再转化为甘油三酯, 形成脂肪滴, 扩散到卵。另外, 也有实验证实卵黄体中的磷脂组分也可由肝胰腺合成^[19]。

3.3 目前我们仍对十足类甲壳动物卵黄发生的最后阶段和成熟卵子的细胞结构了解甚少, 这方面有限的研究也只是瞬间的成熟卵子的形态和超微结构^[2, 10], 而且至今还没有胚胎发育期卵黄物质的形态变化的报道, 主要原因是这些阶段胚胎还富于大量的卵黄, 在电镜的制片方面有相当的困难。

对中华绒螯蟹来讲,卵成熟以后其卵黄物质内部在形态上还是略有变化的,不同的形态可能反映成熟卵子的成熟度的细微差别。此外,还应注意的是围绕在脂肪滴和卵黄体间的sg颗粒的变化。它可能来源于内质网的核糖蛋白颗粒,在卵黄体大量形成时制造和运输用于合成卵黄体的物质,但自身可能一直到卵发育成熟以后,才通过自身的凝集和浓缩参与卵黄体的形成,也正是由于sg颗粒的这些变化,导致脂肪滴泡的融合和不规则卵黄体的形成,以致于卵完全成熟时卵黄体和脂肪滴的无间隔紧密分布,卵的体积也因此可能变小。

从超微结构来看,胚胎发育的卵黄物质分布与成熟卵相比,发生了较显著的变化,卵黄体和脂肪滴呈网状分布。这可能是在胚胎发育时由于卵裂等引起了卵黄物质的重新分布,以利于胚胎发育所利用。

胚胎发育时对卵黄物质的利用是以合胞体的形式吸收的,在合胞体细胞核物质的引导和编码下,把吸收的卵黄物质迅速转化为胚胎建成所需的大量物质,以适应胚胎的快速发育。合胞体对卵黄物质的吸收是就近逐块“啄”取的,因此,卵黄体中的磷脂组分和中性脂的脂肪滴,不会由于胚胎发育的进行而改变它们各自的脂肪酸组成,变化的是磷脂或中性脂在胚胎中的相对含量。

此外,在实验中发现,刚刚排出的卵(胚胎),卵膜的通透性很大,发育至眼点出现以后,通透性极端降低,以致于在制作电镜片时,固定用的醋酸长时间不能透入,必须用针把卵膜穿洞,再延长固定时间才行。电镜观察,此时的卵膜有三层,内膜致密而厚实,这大概是透性弱的缘故。同一发育期的死卵通透性依然很强。这种膜透性的变化与胚胎发育的关系有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Jeckel, W. H., J. E. Aizpun, V. J. Moreno Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleuticus muelleri* Bate. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989, **92B**:271-276
- 2 Komm, B. S., G. W. Hiasch, Oogenesis in the terrestrial-hermit crab, *Coemobita clypeatus* II. vitellogenesis. *J. morphology*, 1987, **192**:269-277
- 3 Mourente, G. A. Medina, S. Gonzalez, A. Rodriguez Changes in lipid and fatty acids contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri*, during maturation. *Mar. Bio.*, 1994, **121**:187-197
- 4 Teshima, S., A. Kanazawa Variation in lipid composition-ssuring the ovarian maturation of the prawn. *Bull. Japan. Soc. Scr. Fish.*, 1983, **49**:957-962
- 5 Herring, P. J. Size density and lipid content of some decapod eggs. *Deep. Sea. Res.*, 1974a, **21**:91-94
- 6 Herring, P. J. Observation on the embryonic development of some deep-living decapod crustaceans with particular reference to species of *Acanthephyra*. *Mar. Biology*, 1974b, **25**:25-33
- 7 Pandian, T. J. Changes in chemical composition and caloric content of developing eggs of the shrimp *Crangon crangon*. *Helgo. Wiss. Meeresunters.*, 1967, **16**:216-2234
- 8 Clarke, A., J. H. Brown, L. J. Holmes the biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergi* relation to embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990, **96b**:505-511
- 9 薛鲁征,堵南山,赖伟.中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究.华东师范大学学报(自然科学版),1987, **3**:88-96
- 10 堵南山,赖伟,南春容,姜焕伟.中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究.动物学报,1995, **41**:229-234.
- 11 洪水根.长毛对虾卵子发生的研究 II.海洋与湖泊,1992, **23**:280-284
- 12 颜素芬,上官步敏,李少菁.锯缘青蟹卵子发生的超微结构研究.厦门大学报(自然科学版),1994, **33**:231-236
- 13 Beams, H. W., R. G. Kessel Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. *J. Cell Bio.*, 1963, **18**:621-664
- 14 Browdy, C. L., M. Fainzilber, M. Ton, Y. Loya, E. Lubzens Vitellin synthesis in relation to oogenesis *in vitro* incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus*. *J. Exp. Zool.*, 1990, **255**:205-215
- 15 Lui, C. W., J. D. O'Connor Biosynthesis of crustacean lipovitellin. 3. The incorporation of labelled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *J. Pachygrapsus crassipes*. *J. Exp. Zool.*, 1977, **199**:105-108
- 16 Schade, M. L., R. R. Shivers Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocyte during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope-protein tracer study. *J. Morph.*, 1980, **163**:13-26

1 Jeckel, W. H., J. E. Aizpun, V. J. Moreno Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleuticus muelleri* Bate. *Comp. Biochem.*

- 17 Yano, I. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mar. Bio.*, 1988, **99**:547~553
- 18 Lee, R. F., A., Walker Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.*, 1995, **271**:401
- 19 Munoz, G., S. Donghi, H., Censola Vitellogenesis in the crayfish *Rhynchocinetes typus*; Role of hepatopancreas in lipid yolk biosynthesis. *Cellular and molecular biology*, 1990, **36**:531-536

ON THE ULTRASTRUCTURE OF YOLK LIPID DISTRIBUTION AND ITS CHANGES DURING THE CHINESE CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS* OVARIAN MATURATION AND EMBRYONIC DEVELOPMENT

CHENG Yong-Xu

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

DU Nan-Shan LAI Wei

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

ABSTRACT Histochemistry result indicates that neutral lipid of the yolk materials is mainly present as lipid droplets, and phospholipid is mainly contained in the yolk bodies.

In the stage of ovarian fast development, most oocytes are characterized by active yolk body (Y) synthesis, only a little lipid droplets(L) accumulation can be seen in those oocytes.

In contrast with the development oocytes, the large amount of lipid droplets are present in mature oocytes of *Eriocheir sinensis*. L and Y are distributed alternately and occupied almost cytoplasm of oocytes. There are some variation in the shape of L and Y which may represent the different degrees of mature oocytes.

Significantly ultrastructure changes on Y and L distribution was observed in the mature oocytes and embryonic eggs. Y and L form in net like structure in all embryonic stages, this type of distribution may be suitable for the use of yolk materials. Yolk materials was absorbed by combined cells which may be responsible for the rapid embryonic development.

KEY WORDS *Eriocheir sinensis* yolk lipid ovary embryonic development

图版说明(Explanation of the plate)

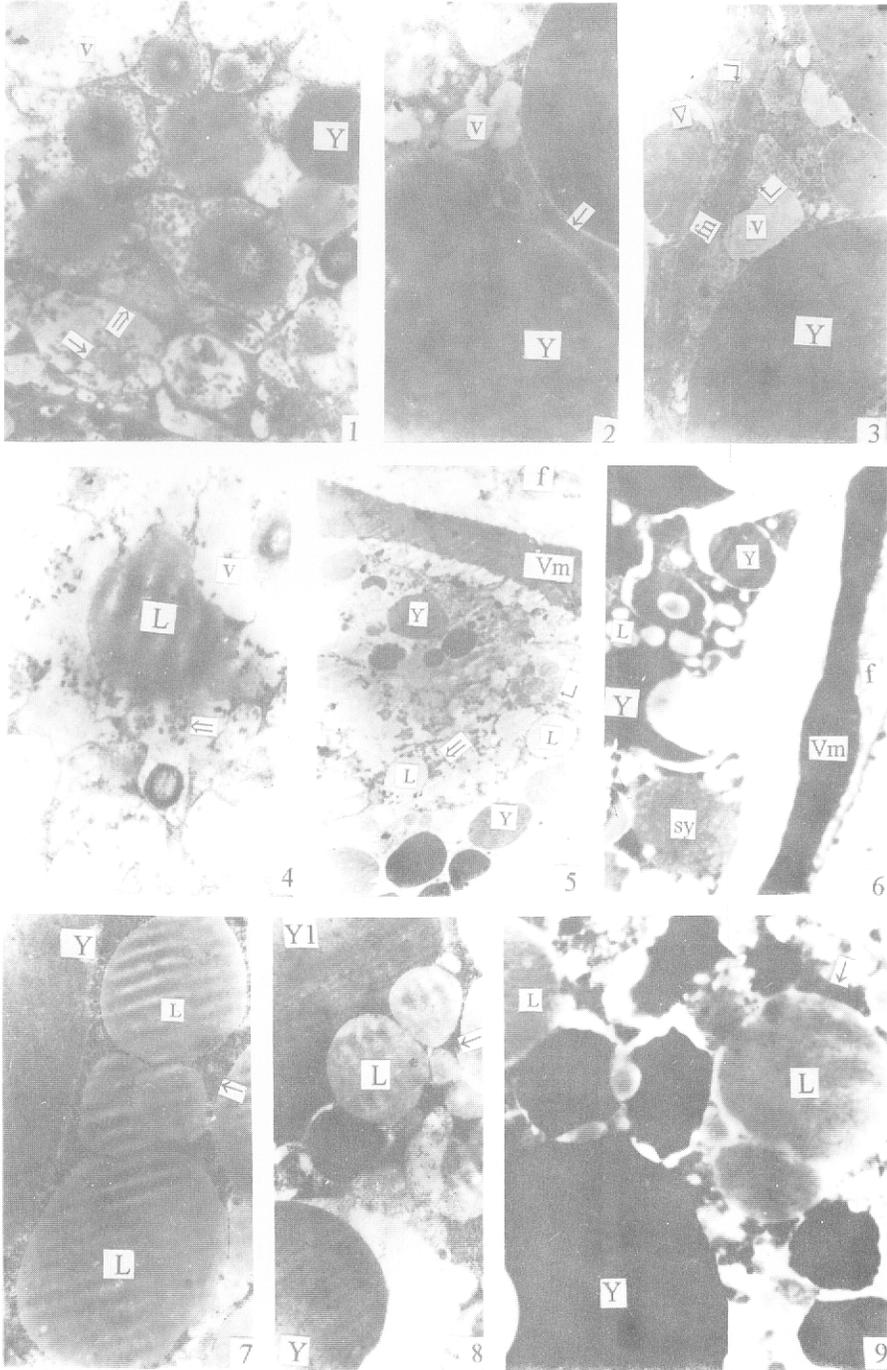
图 1~4 卵黄发生旺盛期的卵细胞, 示卵黄体的大量形成(oocyte in the fast vitellogenesis, showing the large amount of yolk materials formed in it)

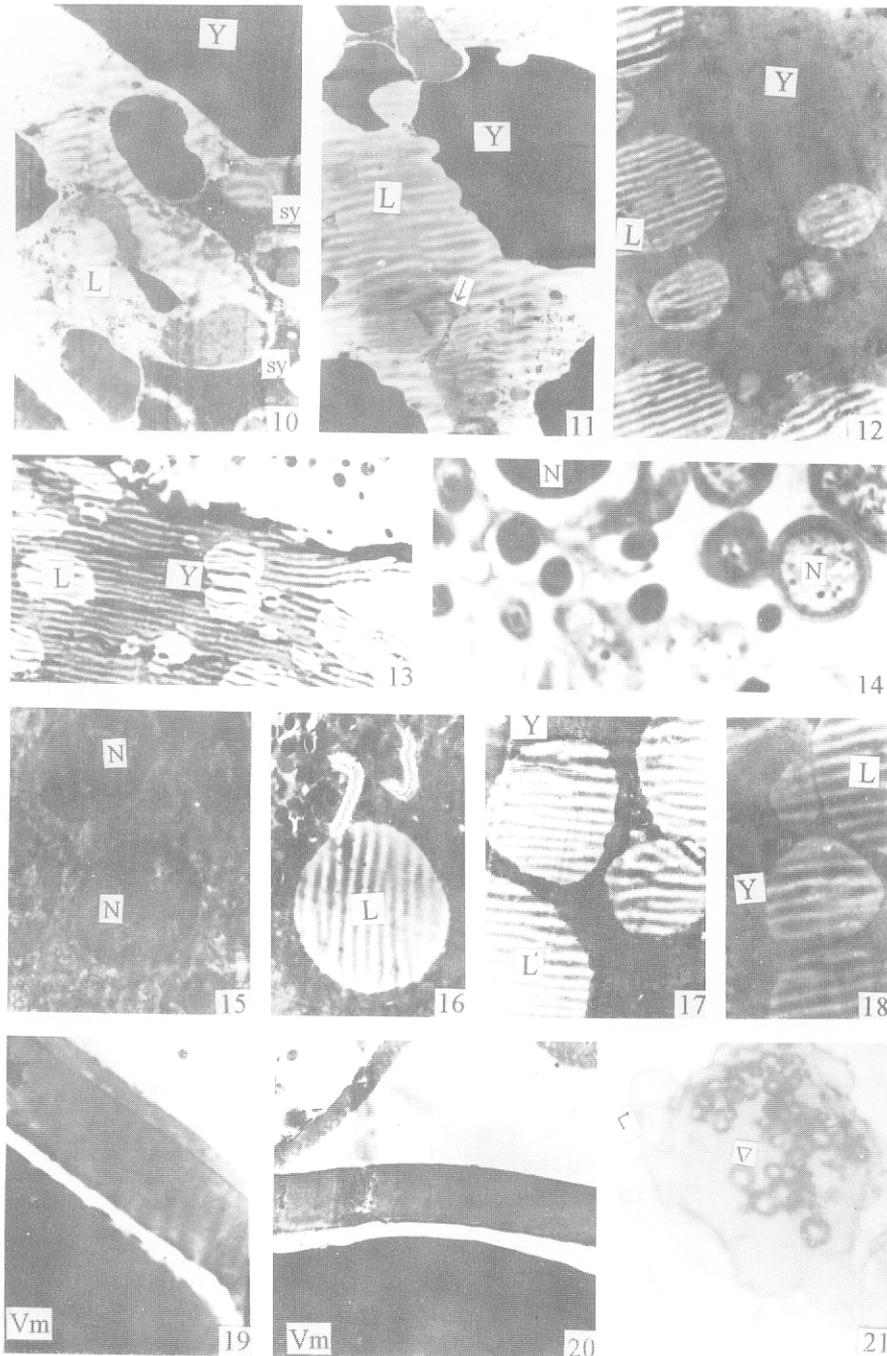
图 1 囊泡(V)中 Y 的形成(Yolk bodies are accumulated in vesicle) × 5000; 图 2 Y 的融合(showing the fusion of yolk bodies) × 5000; 图 3 滤泡细胞的胞吞(endocytosis of the follicle cell)“▽”和胞中物质(↓)向卵 Y 附近的囊泡(V)中的扩散(↘)(the material in the follicle cell is moving to the vesicle around the egg membrane × 1200; 图 4 囊泡中 L 的形成(yolk body formation in the vesicle) × 8000

图 5~11 成熟卵, 示 Y 和 L 的分布变化(Mature eggs, showing the distribution changes of yolk body and lipid droplet)

图 5 × 2500; 图 6 × 3000; 图 7 × 5000; 图 8 × 3000; 图 9 × 3000; 图 10 × 2500; 图 11 × 3000

图 12~20 不同胚胎发育期的卵内 Y 和 L 的分布、合胞体细胞核和卵膜结构(The distribution of Y and L in eggs, the





图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)