

长江华溪蟹卵子发生的细胞化学研究*

王 兰

陈丽梅

(山西大学生命科学系 太原 030006) (山西省生物研究所 太原 030006)

李春源

(中国辐射防护研究院 太原 030006)

摘 要 利用细胞化学的方法,对长江华溪蟹卵子发生过程中,核酸、蛋白质、糖类及脂类的变化进行了研究,结果表明:核酸从卵原细胞到卵母细胞的发育进程中逐渐分散;蛋白质的量不断增加;脂类物质也在慢慢积累;伴随着发育,在成熟的卵母细胞质内充满 PAS 阳性反应的卵黄颗粒。

关键词 长江华溪蟹 细胞化学 卵子发生

卵子含大量供早期胚胎发育所需的营养物质卵黄,在动物个体发育中起着不可替代的重要作用。就十足类甲壳动物卵子发生而言,前人作过一些研究,但有关细胞化学方面的报道极少^[1],尤其是淡水蟹类,迄今为止,国内外未见报道。作者在研究了长江华溪蟹精子发生的一系列过程之后^[2~5],又对卵子发生进行了研究。本文先报道卵子发生过程中细胞内主要生物大分子的发生特点及变化规律。

1 材料和方法

1.1 材 料 实验用的材料于 1994 年 5 月采自安徽省宁国县。

1.2 方 法 取不同发育阶段的活性雌蟹做解剖,快速取出卵巢,切成小段,用 Carnoy 氏液和中性福尔马林固定,常规石蜡包埋。包埋好的材料分别于 1994 年 10~11 月和 1996 年 3~5 月,在华东师范大学生物学系和山西大学生命科学系进行具体实验操作。石蜡切片厚 5~7 μm 。

1.3 细胞内主要生物大分子的细胞化学染色方法如下:

Feulgen 反应示脱氧核糖核酸(DNA),对照不经 60℃ 1mol/L HCl 水解。

Brachet 反应示核糖核酸(RNA),对照经 37℃ 1mol/L HCl 水解 3 小时。

PAS 反应示糖类;对照以乙酰化阻断,再用 KOH 还原和唾液淀粉酶消化;PAS-Alcian 反应示中性和酸性粘多糖。

汞溴酚兰(HgBPB)法示蛋白质;茚三酮-Schiff 法示结合性氨基(-NH₂);对二甲基氨基苯甲醛(P-DMAB)法示色氨酸;坂口反应示精氨酸;Million 反应示酪氨酸。

苏丹黑染色法示结合性脂类。

2 结 果

根据细胞的大小形态,细胞质内容物的多少,卵黄颗粒的出现与否以及滤泡细胞在卵母细胞外围的分布情况,长江华溪蟹卵子发生的细胞化学变化主要可分为三个时期:卵原细胞期、卵黄发生前的卵母细胞期和卵黄发生的卵母细胞期。

现将卵子发生各时期主要的细胞化学变化分述如下:

2.1 核 酸

2.1.1 脱氧核糖核酸(DNA) Feulgen 反应显示,长江华溪蟹卵原细胞的染色质被 Schiff 试剂染成红紫色,呈强阳性反应,但细胞质则不

* 山西省自然科学基金资助项目 No.961018;

第一作者介绍:王 兰,女,37 岁,副教授,博士;

收稿日期:1998-04-06,修回日期:1998-06-08

被染色,呈阴性反应。卵黄发生前的卵母细胞相当于卵原细胞而言,Feulgen 反应有所减弱,细胞核中的阳性反应物以细丝状或颗粒状的形态分散于整个核中,细胞质主要表现阴性反应,但偶尔可见 1~2 个被 Schiff 试剂染成红色的小颗粒。卵黄发生的卵母细胞,细胞核的阳性反应随着卵母细胞的逐渐成熟大幅度减弱,有的则明显呈阴性反应,但细胞质为阳性反应。

滤泡细胞对 Feulgen 反应呈阳性。

2.1.2 核糖核酸(RNA) Brachet 反应显示,长江华溪蟹卵原细胞的核仁呈弱的嗜派若宁性,但细胞质不具有此性质,呈 Brachet 阴性反应。卵黄发生前的卵母细胞,核仁和细胞质均呈现强阳性反应。而在卵黄发生的卵母细胞中,核仁和细胞质的阳性反应有所减弱,其中核仁表现得更明显一些。此外,围绕着细胞核的一薄层细胞质,Brachet 反应阳性较强。

滤泡细胞在 Brachet 反应中同样呈阳性。

2.2 糖类 PAS 反应显示,长江华溪蟹卵原细胞呈阴性。卵黄发生前的卵母细胞中部分区域出现品红色的小颗粒。在卵黄发生的卵母细胞质内,布满了 PAS 阳性反应的卵黄颗粒,且表现为从细胞核外缘渐渐地向四周扩散,最后整个细胞质均呈红色的现象。

滤泡细胞也呈 PAS 阳性反应。

在 PAS-乙酰化的对照中,以上各阳性反应

均变为阴性,经 KOH 还原后又恢复成阳性。如果经唾液消化,其阳性反应略有减弱,说明其中含有的是粘多糖。另外,在 PAS-Alcian 反应中还显示,在卵母细胞时期,细胞核、膜系呈兰紫色,表明酸性粘多糖含量较多,而细胞质呈红色,表明中性粘多糖含量较多。

2.3 蛋白质 汞-溴酚兰(HgBPB)法显示,长江华溪蟹卵子发生中,从卵原细胞到卵黄发生的卵母细胞,中性蛋白质的含量逐渐增高。茚三酮-Schiff 反应对结合性氨基的显示结果和 Millon 反应对酪氨酸的显示结果与 HgBPB 法类似,阳性反应呈上升趋势。P-DMAB 反应和坂口反应对色氨酸和精氨酸含量的显示经历了一个从阴性到阳性的过程。

滤泡细胞中含有一定量的蛋白质和氨基酸。

2.4 脂类(结合性脂类) 苏丹黑染色显示,长江华溪蟹卵子发生中,卵原细胞期苏丹黑染色几乎呈阴性;卵黄发生前的卵母细胞,反应略呈阳性;进入卵黄发生的卵母细胞,苏丹黑反应由阳性转为较强阳性,表明细胞内已有大量的结合性脂类的存在。

滤泡细胞苏丹黑染色略呈黑色,为阳性反应。

以上结果见表 1。

表 1 长江华溪蟹卵子发生的细胞化学研究结果

所测物质	组化方法	卵原细胞		卵黄发生前的卵母细胞			卵黄发生的卵母细胞			滤泡细胞		
		细胞核		细胞核		细胞质	细胞核		细胞质	细胞核	细胞质	
		染色质	核仁	染色质	核仁		染色质	核仁				
DNA	Feulgen	+++	-	-	++	+	+(-)	+	-	+	+++	-
RNA	Brachet	-	+	-	-	+++	+++	-	+	++	-	++
糖类	PAS	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+	++
	PAS-乙酰化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PAS-乙酰化-KOH	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++
	PAS-唾液消化	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+	++
	PAS-Alcian 蓝	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	++
蛋白质	HgBPB	+	+	+	+	++	++	+	++	+++	+	++
	茚三酮-Schiff	+	+	+	++	+	++	+++	++	+++	+	++
色氨酸	P-DMAB	-	-	-	-	-	+	-	+	++	-	+
精氨酸	坂口反应	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	+
酪氨酸	Million	-	+	+	+	++	++	+	+++	++	-	+
结合性脂类	苏丹黑	-	-	-	-	-	+	+	+	++	-	+

+++ 强阳性; ++, 中强阳性; +, 阳性; -, 阴性。

3 讨 论

3.1 长江华溪蟹卵子发生的初期(卵原细胞和刚形成的卵母细胞),核内染色质对 Feulgen 反应表现出强阳性反应。之后,卵母细胞继续发育,染色质的反应由强变弱。而细胞质的情况恰好相反。这一现象在许多动物中曾有过报道,且分别作了不同的解释^[6-8]。作者的观点是:在卵子发生过程中,由于卵母细胞核经历了强烈膨胀为卵核的阶段,使 DNA 被冲淡,因此表现出 Feulgen 反应强度的减弱,产生了明显的视觉效应。另外,染色质 DNA 在卵子发生中有些被排列到细胞质中的情况也能造成核内 DNA 量的减少。但是,在卵子发生时,DNA 一直存在并保持总量的不变^[9]。综上所述、遗传信息必须被保存并加以实现,才能确保物种相对的稳定性。

3.2 显示 RNA 的 Brachet 反应在长江华溪蟹卵子发生中表现出一定的特点。卵原细胞期,细胞质中没有可觉察的 RNA;进入卵黄发生前的卵母细胞期,核仁和细胞质的 RNA 含量达到最高;卵黄发生时,核仁和细胞质的 RNA 含量有降低的倾向,其中核仁表现得更明显一些。这一事实说明,核仁内 RNA 的含量与细胞质内蛋白质的合成之间存在着十分密切的关系。再有,卵子发生中 Brachet 反应表现出的阳性强度的降低,是因为卵子体形聚增使 RNA 相对被稀释的结果,并不意味着 RNA 含量减少。更确切地说,在整个卵子发生进程中,RNA 的含量其实是增加的,只是到了晚期,由于卵子的生长比 RNA 的合成进行得快,所以显得 RNA 在减少^[9]。RNA 的增加与卵黄发生中形成大量的蛋白质有关,具体地讲,为卵黄颗粒的大量合成准备了物质条件,这一点在蛋白质的增加中也得到了证实。

3.3 长江华溪蟹卵母细胞中糖类出现在滤泡细胞形成之后,这时的卵母细胞呈 PAS 阳性。作者认为,这一现象指出了滤泡细胞具有极其明显的合成活动,并且在卵母细胞的营养中起重要作用。滤泡细胞从环境中吸收低分子量的物质,合成为较高化合物,然后送入卵母细胞中。这里需要指出的是,滤泡细胞仅仅提供合成的最初步骤,而合成的最后阶段是在卵母细胞本身中发生的。此外,实验中还观察到,滤泡细胞的层数逐步减少,这种现象在昆虫中颇为常见,所有滤泡细胞都在被正在生长的卵母细胞所吞噬,并被卵子细胞质所同化^[10]。这是滤泡细胞向卵母细胞提供营养的又一解释。

参 考 文 献

- 1 洪水根,朱 燕.长毛对虾卵子发生的细胞化学研究.海洋学报,1990,121(2):231~235
- 2 王 兰,堵南山,赖 伟.长江华溪蟹精子发生过程中线粒体的超微结构研究.动物学报,1997,43(2):113~118
- 3 王 兰,堵南山,赖 伟.长江华溪蟹输精管的超微结构与精荚形成的研究.海洋与湖泊,1996,27(4):373~379
- 4 王 兰.溪蟹研究动态.华东师范大学学报(自然科学版),1996,12:111~115
- 5 王 兰,堵南山,赖 伟.长江华溪蟹精子发生的组织学研究.第二届全国水产青年学术研讨会论文集,1996,26~30
- 6 P. C. 瑞温,李汝祺等译.卵子发生.北京:科学出版社,1965.108~119
- 7 Bennett, J. The cytochemistry of *Limulus* eggs. *Biol. Bull.*, 1979, 156:142~156
- 8 Bonhag, P. F. Histochemical studies of the ovarion nurse tissue and oocytes of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). *J. Morph.*, 1995, 96:381
- 9 J. 布拉舍,严绍颐等译.发生的生物化学.北京:科学出版社,1964.4~39
- 10 Schrader, F., C. Leuchtenberger. The origin of certain nutritive substances in the egg of Hemiptera. *Exp Cell Res.*, 1952, 3:136

**CYTOCHEMICAL INVESTIGATIONS ON OOGENESIS OF
THE FRESHWATER CRAB *SINOPOTAMOIN*
*YANGTSEKIENSE***

WANG Lan

(*Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

CHEN Li-Mei

(*Shanxi Institute of Biology, Taiyuan 030006, China*)

LI Chun-Yuan

(*China Institute of Radiation Protection, Taiyuan 030006, China*)

ABSTRACT Cytochemical studies on oogenesis of *S. yungtsekiense* reveal that nucleic acids(DNA and RNA)are gradually scattered from oogonia to oocytes in the fresh water crab. In oogonia and oocytes of previtellogenesis, PAS and Sudanblack reactions are nearly negative. As the maturation of oocytes proceeds, a great deal of protein and some amino acids or lipids are produced in the cells. There are a lots of PAS-positive yolk globules in mature oocytes.

KEY WORDS *Sinopotamon yungtsekiense* Cytochemistry Oogenesis