

秀丽白虾卵母细胞不同发育阶段线粒体的变化

姜叶琴^{1,2}

(1. 湖州师范学院 生命科学院, 浙江 湖州 313000; 2. 中国水产科学研究院 细胞工程研究所, 浙江 湖州 313000)

摘要:采用透射电镜技术观察秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*)卵巢不同发育阶段卵母细胞线粒体的变化及其与卵黄发生的关系,结果显示,随着卵母细胞的发育,线粒体经历了数目以及结构上的系列变化。卵黄发生早期,卵母细胞内的线粒体数量急剧增多,形态各异,有椭圆形、圆球形等,线粒体嵴稀少;随后,细胞质中出现较多近椭圆形的线粒体群,嵴丰富,外膜光滑。连续切片观察表明,该时期线粒体尚未明显参与卵黄颗粒的形成。卵黄发生中期,卵母细胞内的线粒体的结构出现两大类群:一类线粒体呈长杆状或椭圆形,体积小,嵴丰富,内部基质暗,外膜光滑,主要功能是为卵母细胞发育提供能量;另一类线粒体体积大,呈圆球形,嵴逐渐退化,内部基质呈现电子透明状,外膜出现大小不一的波浪状。后一类线粒体膜内陷,出现明显的类似细胞内吞作用,参与卵黄颗粒的形成。被吞饮物主要为有膜性泡,包括波浪状膜的高尔基体分泌泡、光滑外膜的内质网囊泡以及小型线粒体。与此同时,卵母细胞质膜形成众多胞饮小泡,外来物质逐渐进入卵母细胞,通过高尔基体的加工,以分泌泡相互融合形式参与卵黄颗粒的形成。内吞作用所累积的卵黄颗粒占主要部分,因此在该时期卵母细胞卵黄颗粒的形成以外源性为主。在卵子发育后期,皮层区域出现具典型结构的线粒体,当这些线粒体参与皮层颗粒形成后,卵子逐渐成熟,整个卵母细胞中很难见到线粒体。卵母细胞内卵黄颗粒进一步形成并相互融合,整个卵细胞几乎全为卵黄颗粒占据,未见明显线粒体。

关键词:秀丽白虾;卵母细胞;线粒体;卵黄发生

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)01-0010-04

线粒体是产生能量的细胞器,其嵴的数量与排列方式依细胞代谢活动的强弱而异,嵴的多少与细胞氧化代谢成正比^[1]。在甲壳动物生殖细胞发生过程中,线粒体还参与了精子顶体、卵子卵黄颗粒的形成^[1-4]。因此,在生殖细胞中线粒体具有多种生物学功能。作者已对秀丽白虾(*Exopalaemon modestus*)卵巢滤泡细胞发育的超微结构作了基础性研究^[5],本研究着重探讨秀丽白虾卵母细胞发生过程中,线粒体数目、结构及分布位置的变化情况,以及线粒体参与卵黄颗粒形成的方式,旨在为甲壳动物卵母细胞发育规律积累基础资料。

1 材料与方法

2000年4月至2001年10月,每月从浙江省湖州市东街农贸市场采购平均尾重约1.60 g的活体秀丽白虾若干,放于冰水中带回实验室,供解剖使用。打开头胸甲后,迅速取出卵巢和输卵管,切成1 mm³的小块,分别用0.1 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲

液配制的2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,酒精系列脱水,国产环氧树脂812包埋,瑞典LKB2088超薄切片机制片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,JEM-1000CX II透射电镜观察拍照。

2 结果与分析

根据卵母细胞卵黄物质的来源及积累情况,把秀丽白虾卵子发生分为卵黄积累以内源性为主的发生早期、卵黄的积累以外源性为主的发生中期、后期以及成熟卵子4个阶段。

2.1 卵黄发生早期

线粒体通过分裂,数量急剧增多。增殖状态的线粒体形态各异,有椭圆形、圆球形、长喇叭虫状、螺旋状(图版I-1,2),线粒体嵴稀少。随后,细胞质中出现众多具有典型结构的线粒体群(图I-3);线粒体外形多呈近椭圆形,嵴丰富,外膜光滑。

该期处于初级卵母细胞前期,核物质通过核孔进入胞质^[5],启动了卵母细胞胞质的发育。部分核

收稿日期:2004-04-06; 修订日期:2004-07-06。

作者简介:姜叶琴(1970-),女,讲师,主要从事甲壳类研究。E-mail: jypq@hute.zj.cn

物质开始沉积在内质网囊泡中(图版I-2),卵黄颗粒的形成以内源性为主。线粒体尚未明显参与卵黄颗粒的形成。

2.2 卵黄发生中期

线粒体的结构出现分化,一类线粒体呈长杆状或椭圆形,体积小,嵴丰富,内部基质暗,外膜光滑(图版I-4),主要功能是为卵母细胞发育提供能量。而另一类体积大,呈圆球形,嵴逐渐退化,内部基质呈现电子透明状,外膜出现大小不一的波浪状(图版I-4)。后一类线粒体膜内陷出现明显的类似细胞内吞作用,参与卵黄颗粒的形成(图版I-4、5、6)。被吞饮物有膜包被,包括波浪状膜的高尔基体分泌泡、光滑外膜的内质网囊泡以及线粒体。

此时胞质中近质膜处高尔基体丰富(图版I-5、6)。高尔基体顺面紧邻质膜,有大量电子密度较低的小泡,反面有许多大的电子密度高的分泌泡,分泌泡单层外膜也呈波浪状。卵母细胞质膜形成众多胞饮小泡,外来物质逐渐进入卵母细胞,通过高尔基体的加工,以分泌泡相互融合形式参与卵黄颗粒的形成(图版I-6)。卵母细胞卵黄颗粒的形成以外源性为主。

2.3 卵黄发生后期

卵母细胞内卵黄颗粒进一步形成并相互融合,整个卵细胞几乎全为卵黄颗粒占据,未见明显细胞器。卵黄颗粒有脂滴和蛋白卵黄2种。卵母细胞卵黄膜已形成,大量电子密度很高的颗粒物质通过卵黄膜中的指状通道进入卵母细胞直接与卵黄颗粒融合(图版II-7、8)。

2.4 卵子成熟期

在卵子即将成熟时,皮层开始形成。此时,在卵黄膜内方又出现了结构典型的线粒体。预示卵母细胞发育进入了最后的大量耗能阶段。同时部分线粒体还与其他皮层颗粒融合参与皮层颗粒的形成(图版II-9)。成熟卵子中,在皮层颗粒间和卵黄颗粒间很难见到线粒体(图版II-7、8、10)。

3 讨论

3.1 线粒体数量、结构的规律性变化

由于卵母细胞发育是一个旺盛的物质合成过程,需要大量的能量保证,因而在卵黄发生早期,线粒体数量急剧增多是必然的。而随着卵母细胞的发育成熟,能耗降低,线粒体数量减少,嵴减少。线粒体数量的多少以及结构状态反映了细胞代谢的活跃

程度,这种变化规律在动物卵子发生中普遍存在^[6-7]。但在秀丽白虾卵母细胞发育过程中,线粒体还起着形成卵黄颗粒的重要作用。因而,在卵黄发生中期,一部分线粒体结构发生变化:嵴减少,体积增大,外膜波浪状,外形变成圆球形。这种结构的线粒体氧化磷酸化功能低下,却为卵黄颗粒的形成提供了结构保证。在软体动物缢蛏(*Sinanovacula constricta*)卵母细胞的研究中也发现了二型性的线粒体^[8]。线粒体结构的异化是其功能分化的基础。卵母细胞发育早期线粒体的增生是为后续卵母细胞能量供应及卵黄颗粒发育做双重准备。

3.2 线粒体参与卵黄颗粒及皮层颗粒的形成

线粒体参与卵黄颗粒的形成多有报道,但卵黄物质是通过何种方式进入线粒体的,物种间有一定的差异。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)卵母细胞线粒体沉积卵黄物质的途径是:线粒体外的致密颗粒穿过外膜顺着内膜向腔中凸起的管状嵴进入线粒体腔^[4]。泥螺(*Bullacta exarata*)线粒体外膜呈波浪状或破裂,增大通透性以便卵黄物质的进入^[9]。而长毛对虾(*Penaeus penicillatus*)只见到线粒体基质逐渐蛋白化^[3]。本研究明确发现秀丽白虾卵母细胞线粒体通过类似细胞内吞作用积累卵黄(图版I-4)。同时发现,胞质中膜性胞器的融合广泛存在,包括线粒体之间的融合(图版I-5),高尔基体分泌泡的相互融合(图版I-6),高尔基体分泌泡与线粒体的融合(图版I-4)以及内质网囊泡与线粒体的融合(图版I-4)。以上融合方式提示:内质网、高尔基体、线粒体在卵黄颗粒的形成中有一定的相互联系,至少部分内质网囊泡和高尔基体分泌泡是通过与线粒体融合而参与卵黄颗粒的形成。同时这些膜性胞器的融合也为线粒体及卵黄颗粒体积的增大提供了形态学依据。

与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)一样^[10],在卵子即将成熟时,秀丽白虾卵母细胞皮层形成区域出现了典型结构的线粒体(图版II-9),这说明皮层形成是卵母细胞一个相对活跃的生理过程。同时出现线粒体与皮层颗粒融合参与皮层颗粒的形成(图版II-9),从一定程度上解释了皮层区域线粒体的最后去向。

3.3 线粒体分布位置的变化

在整个卵子发育过程中,线粒体的分布位置呈现规律性变化。在卵黄发生早期,线粒体主要位于卵核外周,此时卵黄颗粒的形成以内源性为主。而

在卵黄发生的中后期,卵黄形成以外源性为主时,卵质膜内侧出现大量线粒体,在近质膜的高尔基体附近,线粒体更是丰富(图版I-6)。以上线粒体分布位置的变化,反映了在直径相对大的卵母细胞质中,耗能及卵黄颗粒形成在时空上的不一致。

致谢:本文初稿得到湖州师范学院张念慈教授审阅和指导,谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 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[J].动物学报,1997,43(2):113-118.
- [2] 杨万喜.日本沼虾三种细胞器在精子发生过程中变化的研究[J].应用与环境生物学报,1998,4(1):49-54.
- [3] 洪永根.长毛对虾卵子发生的研究: I. 卵黄发生[J].海洋与湖泊,1992,23(3):280-284.
- [4] 王玉凤,堵南山,赖 伟.罗氏沼虾卵母细胞细胞器与卵黄发生的关系[J].水生生物学报,1999,23(1):24-28.
- [5] 姜叶琴,姚健萍,杨万喜.秀丽白虾卵母细胞不同发育阶段细胞细胞的超微结构[J].动物学研究,2003,24(4):287-292.
- [6] 赖素芬.丽蟾青蟹卵母细胞的卵黄发生[J].厦门大学学报(自然科学版),1995,34(3):430-436.
- [7] Kevin J.,Craig M. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the methane-seep mollusk *Bathynereis naticoides* (Gastropoda: Neritidae) from the Louisiana Slope[J]. Invertebrate Biology, 1997,116(4):299-312.
- [8] 上官步敏,刘正琮.缙蛭卵母细胞卵黄发生过程的超微结构研究[J].海洋与湖泊,1995,26(1):48-52.
- [9] 应雪萍,杨万喜.泥螺卵黄发生过程中线粒体的变化[J].动物学研究,2001,22(5):379-382.
- [10] 堵南山,赖 伟,姜叶琴.中华绒螯蟹卵子皮层反应的初步研究[J].动物学报,1997,43(4):337-343.

Mitochondrial changes during vitellogenesis in oocytes of *Exopalaemon modestus*

JIANG Ye-qin^{1,2}

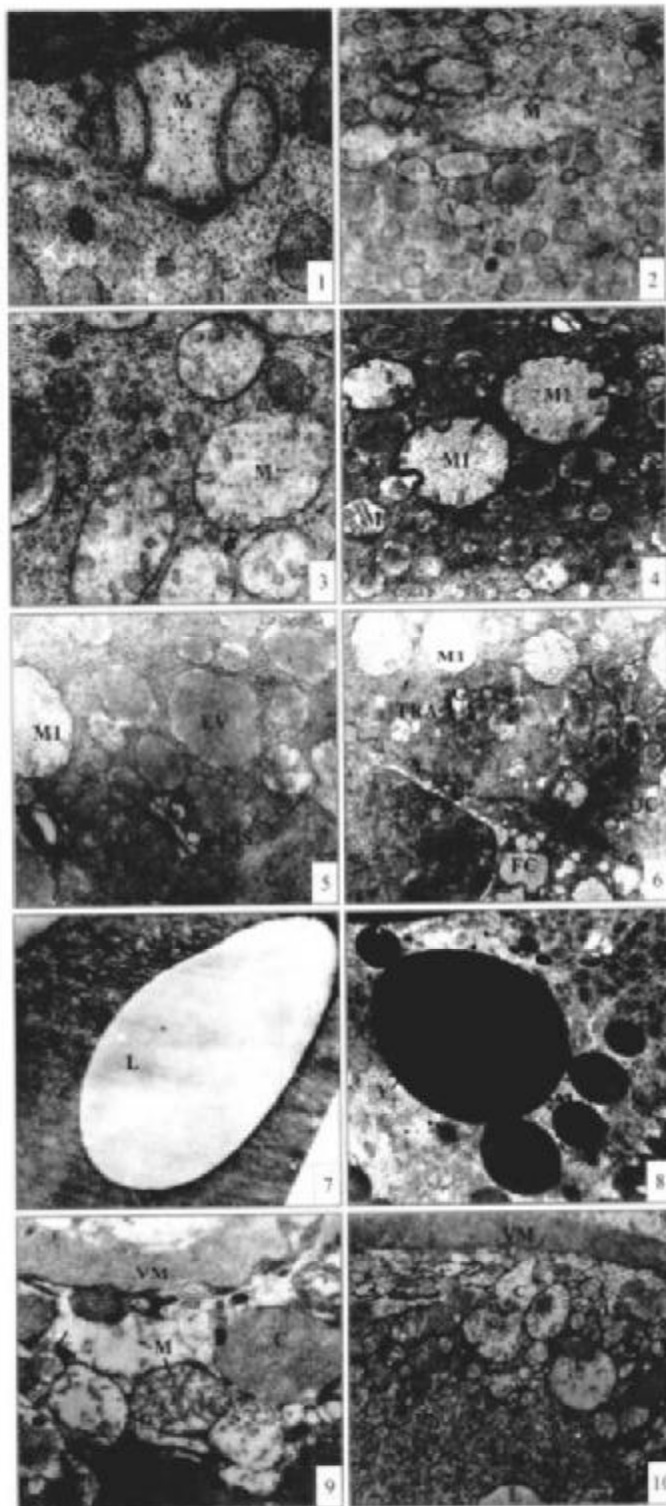
(1. College of Life Science, Huzhou Normal College, Huzhou, 313000, China; 2. Institute of Cyto-engineering, Chinese Academy of Fishery Sciences & Huzhou Normal College, Huzhou 313000, China)

Abstract: To elucidate the morphological mechanisms of vitellogenesis of caridean shrimp *Exopalaemon modestus*, electron microscopic technique was used. During the whole process of oogenesis, dramatic changes including numbers and structure of mitochondria occurred in the oocyte cytoplasm. At the early stage of vitellogenesis, the number of mitochondria in oocyte cytoplasm increased rapidly, and the shapes of mitochondria are ellipsoid and oval. The number of cristae in the mitochondria is small. A lot of typical ellipsoid mitochondria appeared later at this stage, and the number of cristae is increased. The outer membranes of mitochondria are smooth. The observation on continuous sections shows that mitochondria do not participate in the vitellogenesis at this stage. At mid-stage of vitellogenesis, there are two groups of mitochondria. In one of the types, the mitochondria are long-stick-like or ellipsoid with small volumes. They are rich of cristae, and the matrix in the mitochondria is dark. The outer membrane is smooth. The principal function of mitochondria at this stage is to supply energy. In the second type, the mitochondria are spherical or globular in shape, the cristae gradually disappeared, and the inner matrix is electron-transparent. The outer membrane is wave-like in shape. The inner membranes of this type of mitochondria participate in vitellogenesis directly by endocytosis. Membranous vesicles include those from Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and even from small mitochondria. Meanwhile, exogenous vitellogenesis occurs by forming a lot of endocytosis vesicles. Exogenous pre-yolk materials were transported into oocyte. These pre-yolk materials were transported to Golgi apparatus and were modified there. Mature yolk materials were excreted by Golgi body. Most yolk was accumulated by endocytosis of oocyte. At late stage of vitellogenesis, typical mitochondria can only be seen in the cortex, and then disappeared. Yolk granules began to fuse later. The oocyte cytoplasm is full of yolk. No typical mitochondria was observed.

Key words: *Exopalaemon modestus*; oocyte; mitochondrion; vitellogenesis

姜叶琴:秀丽白虾卵母细胞不同发育阶段线粒体的变化

JIANG Ye-qin: Mitochondrial changes during vitellogenesis in oocytes of *Eupalaemon modestus*



图版 I Plate I

图版 I 说明

1: 卵黄发生早期, 正在分裂的线粒体, $\times 12\ 000$ 。2: 卵黄发生早期, 正在分裂的线粒体, $\times 30\ 000$ 。3: 线粒体分裂后形成的线粒体群, $\times 17\ 000$ 。4: 线粒体通过内吞作用沉积卵黄物质, $\times 12\ 000$ 。5: 线粒体的相互融合 ($\downarrow$), $\times 12\ 000$ 。6: 高尔基分泌泡相互融合 ($\downarrow$), $\times 10\ 000$ 。7: 卵黄形成后期卵母细胞质内的脂滴, $\times 20\ 000$ 。8: 正在增大的蛋白卵黄颗粒, $\times 5\ 000$ 。9: 皮层区域线粒体, 线粒体参与皮层颗粒的形成 ($\downarrow$), $\times 15\ 000$ 。10: 成熟卵子的皮层, $\times 5\ 000$ 。

C—皮层; CIS—高尔基体顺面; FC—滤泡细胞; EV—分泌泡; G—高尔基体; L—脂滴; M—线粒体; MI—参与卵黄颗粒形成的线粒体; OC—卵母细胞; TRA—高尔基体反面; V—囊泡 Vesicle; VM—卵黄膜; Y—卵黄颗粒。

Explanation of Plate I

1: Dividing mitochondria, $\times 12\ 000$ 。2: Dividing mitochondria, $\times 30\ 000$ 。3: Mitochondria groups formed after mitochondria dividing, $\times 17\ 000$ 。4: Yolk gathered in mitochondria by endocytosis, $\times 12\ 000$ 。5: Mitochondria are fusing together ($\downarrow$), $\times 12\ 000$ 。6: Secretory vesicles from Golgi body are fusing together ($\downarrow$), $\times 10\ 000$ 。7: A lipid granule in a oocyte after yolk formation, $\times 20\ 000$ 。8: A growing yolk granule, $\times 5\ 000$ 。9: Mitochondria in cortical areas, a mitochondrion fusing with cortical granule ($\downarrow$), $\times 15\ 000$ 。10: Cortex in mature oocyte, $\times 5\ 000$ 。

C—Cortex; CIS—Cis face; FC—Follicular cell; EV—Secretory vesicle; G—Golgi body; L—Lipid; M—Mitochondria; MI—Mitochondria developing into yolk granules; OC—Oocyte; TRA—Golgi body, trans face; V—Vesicle; VM—Vitelline membrane; Y—Yolk granules。