

• 研究简报 •

细鳞鱼卵巢滤泡细胞的发育及功能

牟振波¹, 徐革锋¹, 杨双英²

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 东北农业大学 动物科技学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 通过光镜和透射电镜对细鳞鱼 (*Brachymystax lenok*) 的卵巢滤泡细胞进行了研究。结果表明, 滤泡细胞起源于非生殖细胞, 并且其整个发育过程可分为 4 个时期: 零散细胞期、单层扁平细胞期、多层扁平细胞期和颗粒细胞分泌期。滤泡细胞在初级卵母细胞早期并不具备任何功能, 到卵母细胞卵黄积累初期, 滤泡细胞上皮协同其合成部分卵膜; 卵黄积累旺盛时期, 滤泡细胞在此过程中起到信号介导、物质转运和储存的作用; 在卵巢退化阶段, 滤泡细胞与未发育的卵母细胞形成闭锁卵泡, 对卵细胞残体和碎片还具有吞噬、消化等作用。[中国水产科学, 2008, 15(1): 167-171]

关键词: 细鳞鱼; 卵巢; 滤泡细胞; 闭锁细胞

中图分类号: Q959

文献标识号: A

文章编号: 1005-8737-(2008)01-0167-05

硬骨鱼滤泡细胞伴随着卵母细胞的生长与成熟的全过程, 其生理功能对卵子发生具有重要意义。方永强等^[1]在对文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 卵巢滤泡细胞进行研究中发现, 该细胞与类固醇激素的生物合成有关。方永强等^[1-2]对文昌鱼和卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 卵子发生过程中的滤泡细胞进行了描述, 并在对鲮 (*Mugil cephalus*) 早期卵子发生的研究中详细描述了滤泡层的颗粒细胞^[3]。Cruz-Landim 和 Cruz-Höfling^[4]在对 *Pseudotyllosurus microps* 卵巢和滤泡上皮的超微结构研究中描述了滤泡细胞及其上皮的功能。贾林芝和张育辉^[5]、Andrad 等^[6]、Ravaglia 和 Maggese^[7]、方展强等^[8]和魏刚等^[9-10]也对滤泡细胞的形态和结构进行了研究。本课题组曾对细鳞鱼 (*Brachymystax lenok*) 的卵黄发生进行了研究^[11], 而本研究侧重于对细鳞鱼滤泡细胞的研究, 其目的在于分析和探讨滤泡细胞发生的过程和机制, 同时对滤泡细胞的显微和超微结构进行观察, 并分析其生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

细鳞鱼取自中国水产科学研究院黑龙江水产

研究所渤海冷水性鱼试验站。稚鱼和幼鱼分别为上浮后 40~45 日龄和 80~120 日龄; 叉长 3.75~6.57 cm, 体质量 0.44~2.57 g, 两个日龄段的鱼各 10 尾; 雌性成鱼为人工养殖 (3 龄) 和野生采捕 (3~4 龄), 叉长为 26.20~36.40 cm, 体质量 178.00~610.00 g, 共 10 尾, 分别于 2004 年 10 月至 2005 年 5 月份进行样品采集。

1.2 样品制备

随机捞取健康的实验鱼活体解剖, 用 pH7.2 的磷酸缓冲液将性腺样品血渍冲净, 立即固定。其中一部分制成小于 1.0 mm³ 的样品块, 用 2.5% 戊二醛固定, Epon812 包埋, Ultracut E 型超薄切片机切片, 再经培养后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, JEM-1200EX 型电子显微镜观察; 另一部分切取 0.5 cm³ 大小的样品块, 用 Bouin's 氏液固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察。

1.3 滤泡细胞的时期划分

卵巢滤泡细胞的分期主要参照方永强和 Welsch^[12] 关于其时期划分的主张, 再结合 Andrad 等^[6] 和张耀光等^[13] 的研究进行必要修改, 根据滤泡细胞出现的时间、数量、大小和分布状况以及细胞功能进行时相划分。

收稿日期: 2006-12-19; 修订日期: 2007-06-13.

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD03B08-3); 黑龙江省科技攻关项目 (GC03B511; GA06B203-4).

作者简介: 牟振波 (1961-), 副研究员, 主要从事鱼类养殖研究. Tel: 0451-84602266; E-mail: mouzhenbo@163.com

2 结果与分析

观察显示,卵巢滤泡细胞随着卵母细胞卵黄的发生而开始分化。根据观察结果,本研究将与卵黄发生的4个阶段(卵黄发生前、卵黄生成、成熟期卵巢和卵泡闭锁)相对应的滤泡细胞发育划分为零散细胞期、单层扁平细胞期、多层扁平细胞期和颗粒细胞分泌期。

2.1 滤泡细胞的分化

上浮后40~45 d的稚鱼卵巢开始分化,卵原细胞表面只见滤泡上皮(图I-1);上浮80 d的稚鱼卵巢产卵板上仅见零散的鞘细胞;上浮125 d的幼鱼卵母细胞表面已分化出单个的滤泡细胞,即该时期卵巢发育进入I期。

2.2 卵黄发生前的滤泡细胞

I期卵巢中的卵母细胞处于卵黄发生早期,在其外周的滤泡上皮中已分化出柱状或不规则形状的单个滤泡细胞,呈零散分布,属零散细胞期。随着卵母细胞的不断发育,滤泡细胞数目增多,细胞直径1~8 μm ,具有多个核仁。卵母细胞发育至初级生长期中后期,在其外围是滤泡层、胶原纤维层和鞘膜层(图I-2),这些层结构共同形成功能性单位,即卵巢—卵泡。该时期滤泡细胞呈扁平形,单层结构排列,细胞核呈长棒状;胞质中有大量微丝、高尔基体、内质网和膜性小泡;相邻滤泡细胞胞质相接触的地方有紧密连接(图I-3),它们不断形成连续的膜结构环绕在卵母细胞周围,此时期为单层扁平细胞期。该时期滤泡层没有观察到闭锁结构;卵膜没有明显的分化迹象,但在卵母细胞外微绒毛基部出现了电子物质沉积。

2.3 卵黄积累期的滤泡细胞

随着初级卵母细胞内的卵黄不断积累,滤泡进入多层扁平滤泡膜细胞期,滤泡层发育到2~3层,细胞数量增多,细胞内具有丰富的内质网和高尔基体。而且在富含胶原纤维的基膜与细胞质膜之间开始形成单层扁平细胞层(图I-4)。随着卵母细胞不断向质膜与滤泡层之间伸出微绒毛,并连同滤泡细胞一起在他们之间分泌一些电子密度高的物质形成放射带,且与滤泡细胞连接十分紧密,两者之间不存在非细胞的结构物质(图I-5)。当卵母细胞进入卵黄大量积累阶段,其滤泡细胞因内含分泌颗粒而被称为颗粒细胞(图I-6),其形态变为长立方形,表明立方体颗粒细胞期开始,胞质

中有线粒体、粗面内质网和高尔基体,内质网尤为丰富。在卵黄进入旺盛时期,颗粒细胞由立方体状变成高柱状,细胞核明显不规则,胞质中有各种发达的细胞器。该时期在卵母细胞与颗粒细胞之间有许多具有连接作用的微绒毛通道,放射带不断增厚,由于微绒毛穿越放射带使卵膜分层结构模糊,但形成了许多微绒毛通道,其排列结构呈“蜂窝状”(图I-7)。

2.4 成熟期卵巢的颗粒细胞

当卵母细胞发育为成熟卵子,滤泡膜脱去。卵母细胞外仅见细胞质膜和放射膜。滤泡层变成多泡松散结构(图I-8),颗粒细胞层变成了合泡体,并进入了颗粒细胞分泌期,鞘细胞层中的外源性卵黄颗粒基本排空,留下了许多泡状群,鞘细胞核也开始萎缩变形(图I-9)。

2.5 卵泡闭锁期的颗粒细胞

成熟雌鱼人工采卵后,卵巢内还可以观察到正在被吸收的初级时相卵母细胞,它们被滤泡层重新覆盖,形成闭锁卵泡(图I-10);而未发育到成熟卵子的卵母细胞体积大幅度缩小,细胞内卵黄颗粒液化结成板状;卵巢排卵后,产卵板之间有破裂的空滤泡膜,退化的鞘膜细胞层隆起,其中毛细血管发达。闭锁卵泡中的颗粒细胞变成吞噬细胞进入卵子消化卵黄,形成许多空泡,最后退化的卵母细胞萎缩消失,卵膜模糊而起断裂,胶液化的卵黄崩溃呈不规则块状。

3 讨论

3.1 滤泡细胞的发育特点和功能

国内大部分学者认为,硬骨鱼类的滤泡细胞起源于非生殖细胞^[13-16],即由卵巢基质分化而来;而少数学者认为,滤泡细胞来源于卵原细胞^[17]。West^[18]和Grier^[19]通过组织化学和超微结构观察认为,浆细胞和生殖细胞共同形成了覆盖卵母细胞表层的滤泡上皮。在对细鳞鱼早期卵原细胞外周超微结构的观察过程中,未见有滤泡细胞,只发现了一层非常薄的滤泡上皮。随着卵母细胞外周出现结缔组织膜,滤泡细胞也在其周围零散出现,早期有1~2个;到卵母细胞的初级生长期早期才形成单层扁平滤泡细胞层,而后在其外层分化出鞘膜细胞层和颗粒细胞层。根据滤泡细胞的出现时间、位置和形态结构,他们极有可能来源于卵巢基质细胞。细鳞鱼滤泡细胞的发育在伴随着卵母细胞生长与成熟的过

程中,其形态、大小和内部结构发生了很多变化,有如下显著特征:细胞数量经历了由少数零散分布到单独层结构,再由层结构分化出鞘膜层,并不断分化形成多层结构;早期在胞内只含有线粒体,中、后期出现高度发达的内质网、高尔基体,到多层期出现细胞间紧密连接。在滤泡细胞的成熟过程中,滤泡细胞与卵母细胞一同参与了卵膜的形成,并在卵黄积累期还起到了物质转运的功能。

3.2 滤泡细胞与卵黄发生的关系

细鳞鱼滤泡细胞的发育伴随着卵母细胞生长与成熟的过程,并直接关系着卵黄积累的质量。在卵黄发生早期,滤泡细胞开始由卵巢基质的非生殖细胞分化,但此时它并不参与卵母细胞的卵黄发生。当卵母细胞进入初级生长期,滤泡细胞不但与卵母细胞开始一同参与合成卵膜,并为卵黄的最初积累进行准备;随着滤泡层开始多层化,滤泡细胞的结构和功能均发生巨大变化,成为具有分泌功能的颗粒细胞,并不断将来自于肝脏的卵黄蛋白源物质进行加工和修饰,继而转运至卵母细胞内进行卵黄积累。而当卵巢发育至产卵期时,有许多未发育成熟的卵母细胞将变成卵泡闭锁,此时胞外的颗粒细胞将空泡化形成吞噬泡,进入卵母细胞消化胞内的卵黄物质。进而可以看出滤泡细胞不但能够辅助卵黄发生,还能作为产卵后卵巢的重要细胞介质,对未发育或者过熟卵母细胞进行重吸收,帮助卵巢恢复到Ⅱ期。这对于下一个周期的卵巢发育具有极大意义,如果重吸收不理想将影响翌年卵巢的成熟,且会不同程度的影响卵子质量和产卵效果。因此,掌握滤泡细胞的发育及功能对于更深入研究卵母细胞发育具有极大指导意义。

3.3 滤泡细胞对卵巢卵泡发育的介导作用

卵巢内细胞间的通讯应分为间接与直接两种方式。以体循环远程分泌、旁分泌或自分泌方式经第二信使途径完成一系列生理、生化功能的调节方式称为间接通讯;而以细胞间的间隙连接(Gap junction)为途径进行的细胞间直接信息交流,称为直接通讯,即间隙连接细胞间通讯。本研究发现,细鳞鱼卵巢中的激素合成与卵黄积累的信号传输主要依靠细胞间的直接通讯;但卵巢中每个卵泡单元均处于无血管的微环境中,卵母细胞的发育主要依靠缝隙连接完成能量代谢与物质交换,传递内分泌和旁分泌的生长因子。而卵泡发育又是一个以形态变化为特征的生长过程,同时伴随着卵泡功能

的分化,原始卵泡一旦启动生长,便是一个连续不断的发育和分化过程,要么变成优势卵泡,使卵子成熟与排放,要么中途闭锁^[20]。因此,卵泡细胞间的缝隙连接对于卵泡的发育以及甾类激素的分泌显得尤为重要。一般颗粒细胞是通过缝隙连接持续低水平发送cAMP信号至卵母细胞,从而使卵母细胞滞留在减数分裂阶段。此外,再通过促黄体激素(LH)诱导信号途径(也是一种缝隙连接)使卵母细胞最终成熟^[21-23]。

参考文献:

- [1] 方永强, Welsch U. 文昌鱼卵子发生中成熟分裂时卵母细胞的超微结构研究[J]. 动物学报, 1996, 42(4): 354-360.
- [2] 方永强, 戴燕玉, 洪桂英. 卵形鲳鲹早期卵子发生显微及超微结构的研究[J]. 台湾海峡, 1996, 15(4): 407-411.
- [3] 方永强, 翁幼竹, 洪万树等. 鲳鱼早期卵子发生的超微结构研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(6): 583-589.
- [4] Cruz-Landim C, Cruz-Höfling M A. Ultrastructure of Ovarian Follicular Epithelium of the Amazonian Fish *Pseudotyrannoceros microps* (Teleostei: Belontiidae) [J]. Morpholog Histochem Characteriz Intercellular Deposits Rev Brasil Biol, 1999, 61(1): 133-140.
- [5] 贾林芝, 张育辉. 山溪鲃卵巢滤泡细胞的显微与超微结构[J]. 动物学研究, 2000, 21(5): 419-421.
- [6] Andrade R F, Bazzoli N, Rizzo E, et al. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae) [J]. Tissue Cell, 2001, 33(5): 524-532.
- [7] Ravaglia M A, Maggese M C. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei; synbranchidae), ovarian anatomy, stages of oocyte development and microple structure [J]. Biocell, 2002, 26(3): 325-337.
- [8] 方展强, 郑文彪, 马广超, 等. 鲇卵膜形成和卵黄发生的超微结构观察[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2002, 2: 25-30.
- [9] 魏刚, 戴大临, 黄林, 等. 大鳍鲩初级卵母细胞的超微结构[J]. 西南农业大学学报, 2003, 25(4): 339-341.
- [10] 魏刚, 戴大临, 蒲德永, 等. 大鳍鲩的早期卵子发生的超微结构[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 29(2): 273-277.
- [11] 徐革锋, 陈松波, 牟振波. 细鳞鱼的卵黄发生[J]. 中国水产

- 科学,2007,14(3): 377-382.
- [12] 方永强, Welsch U. 文昌鱼卵巢中滤泡细胞超微结构及功能的研究[J]. 中国科学(B集),1995,25(10): 1 079-1 085.
- [13] 张耀光, 杨桂枝, 金丽. 南方鲇卵巢滤泡细胞和卵膜生成的超微结构研究[J]. 西南师范大学学报,2004,29(6): 1 009-1 015.
- [14] 张耀光, 谢小军. 南方鲇卵巢滤泡细胞和卵膜生成的组织学研究[J]. 动物学研究,1995,16(2): 166-172.
- [15] 徐吉山. 大鳍鲩卵子发生的研究[D]. 重庆: 西南师范大学, 2002.
- [16] 张贤芳. 圆口铜鱼卵巢发育及卵子发生的初步研究[D]. 重庆: 西南师范大学,2002: 14-70.
- [17] 刘筠. 养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社,1993: 23-32.
- [18] West G. Methods of Assessing Ovarian Development in Fishes: a Review[J]. Aust J Mar Freshw Res,1990,41: 199-222.
- [19] Grier H J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centromidae) [J]. J Morphol,2000,243: 265-281.
- [20] 李芳, 郑月慧, 郑莉萍. 生长因子对卵泡发育调节作用的研究进展[J]. 江西医学院学报,2005,45(5): 169-171.
- [21] Kidder G M, Mhawi A A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis[J]. Reproduction,2002,123(5): 613-620.
- [22] Fuente De La R, Eppig J J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling[J]. Dev Biol,2001,229(1): 224-236.
- [23] Cecconi S, Ciccarelli C, Barberi M, et al. Granulosa cell-oocyte interactions[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2004,115(Suppl): 19-22.

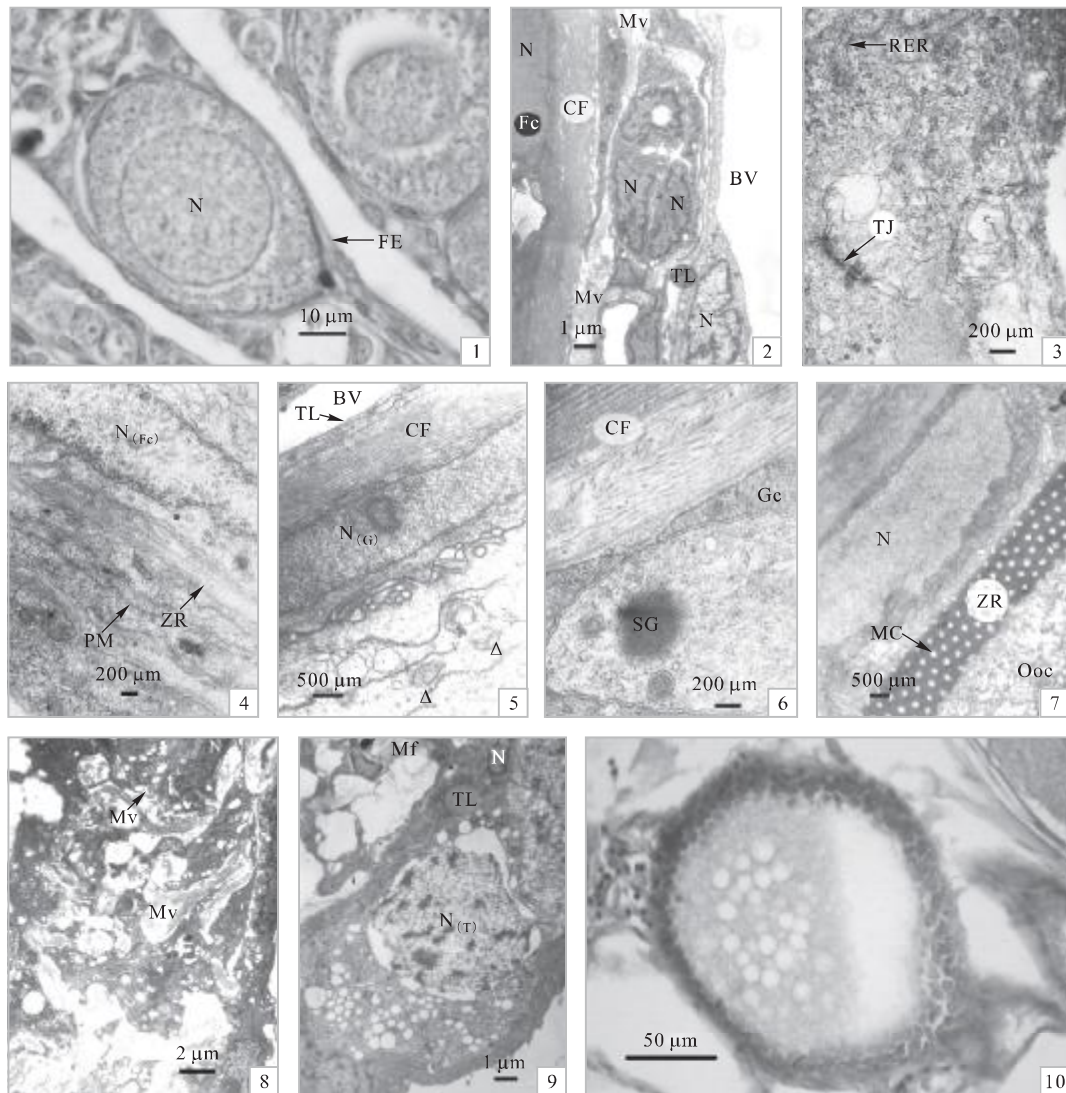
Development and function of ovarian follicular cells in *Brachymystax lenok*

MOU Zhen-bo¹, XU Ge-feng¹, YANG Shuang-ying²

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. College of Animal Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The ovarian follicular cells of *Brachymystax lenok* were studied by light and transmission electron microscopies. The results show that follicular cells originate from non-germ cells, and its whole development process can be divided into four stages: scattered cell stage, unilayer flat cell stage, multilayer flat cell stage and granule cell secretion stage. At early primary oocyte stages follicular cells don't have any function; at early yolk accumulating stages follicular cells and follicular cell endepidermis synthesize part egg envelope coordinately; at yolk-quickly-accumulating stages, follicular cells play a role in signal media, as well as material conveying and storing; at ovaries degenerating stages follicular cells and undeveloped oocytes become corpora atretica, and have the function of phagocytosing and digesting ovotid fragment. [Journal of Fishery Sciences of China,2008,15(1): 167-171]

Key words: *Brachymystax lenok*; ovary; follicular cell; atretic cells



图版 I

1. 卵原细胞; 2. 卵母细胞外滤泡层; 3. 紧密连接; 4. 单层扁平滤泡细胞 (▲: 多泡体); 5. 放射带与滤泡细胞的紧密连接; 6. 颗粒细胞; 7. 蜂窝结构; 8. 滤泡层中的多泡松散结构; 9. 萎缩变形的鞘细胞; 10. 闭锁卵泡; BV: 血管; CF: 胶原纤维; Fc: 滤泡细胞; FE: 滤泡上皮; Gc: 颗粒细胞; MC: 微绒毛通道; Mf: 微丝; Mv: 微绒毛; N: 细胞核; Ooc: 卵母细胞; PM: 细胞质膜; SG: 分泌颗粒; T: 鞘膜细胞; TJ: 紧密连接; TL: 鞘膜层; ZR: 放射带。

Plate I

1. Oogonium; 2. Follicle of the oocyte; 3. Tight junction; 4. Thin and flat monolayer follicle cell (▲: Multivesicular); 5. Tight junction between zone radiate and follicle cell; 6. Granular cell; 7. Honeycomb appearance structure in zone radiate; 8. Loose alveol-structure in the follicle layer; 9. Degenerative sheath cell; 10. Corpora atretica; BV: Blood vessel; CF: Collagen fiber; Fc: Follicular cell; FE: Follicular epithelium; Gc: Granular cell; Gc: granular cell; MC: Microvilli heath cell tunnel; Mf: Microfilament; Mv: Microvilli; N: Nucleus; Ooc: Oocyte; PM: Plasma membrane; SG: secretory granule; T: Theca cell; TJ: Tight junction; TL: Theca layer; ZR: Zone radiate.