

外源性卵黄蛋白对鳗鲡 GTH 细胞和 卵母细胞超微结构的影响

姜仁良 吴嘉敏 高兵

(上海水产大学渔业学院, 200090)

提 要 外源性卵黄蛋白与鲤鱼垂体(CPG)加绒毛膜促性腺激素(HCG)混合注射(试验组)对鳗鲡具有明显的催热作用,卵巢成熟系数平均为 $56.17 \pm 11.74\%$,是对照组(CPG加HCG组)的2.87倍。试验组脑垂体促性腺激素细胞(GTH细胞)中除含有数量较多的小分泌颗粒外,球状分泌颗粒增加,内质网池扩大;卵母细胞直径为450.0微米,双层滤泡膜和放射带充分发育。对照组GTH细胞的球状分泌颗粒直径和内质网扩大均小于试验组;卵母细胞直径为270.0微米。而饲养在海水中75天,未经注射催情药物的雌鳗,脑垂体GTH细胞仅有小分泌颗粒,未见球状分泌颗粒,卵母细胞的放射带正在形成,胞内开始出现脂肪油球。试验结果表明,外源性卵黄蛋白与CPG加HCG混合注射有明显协同作用,对卵母细胞成熟有显著促进作用。

关键词 鳗鲡,外源性卵黄蛋白,促性腺激素细胞,卵母细胞

近年来,鳗鲡(*Anguilla japonica*)人工繁殖研究已取得显著进展,特别是催热和催情产卵方面通过各种激素的诱导作用,已能获得性腺发育完全成熟的雌,雄鳗鲡[王义强等,1980]。但对鳗鲡在人工催熟过程中不同催情药物对性腺发育以及脑垂体GTH细胞变化的超微结构研究甚少。林浩然等对鳗鲡人工催熟过程中性腺发育和脑垂体GTH细胞的超微结构进行过研究[林浩然等,1983,1987],但对性腺发育与垂体GTH细胞的变化未作相应同步观察。本文采用外源性卵黄蛋白对鳗鲡卵巢发育和脑垂体GTH分泌细胞的影响进行了电子显微镜观察,直至目前为止,国内外还未见有报导。其目的是从这些超微结构变化中进一步揭示外源性卵黄蛋白对鳗鲡的催熟作用,这对了解雌性鳗鲡性腺发育规律和探求出一种对鳗鲡最有效的催情剂组合有一定意义。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和注射剂量

取三只海水循环封闭系统的水族箱,水温控制在 $23-24^{\circ}\text{C}$,海水比重为1.0185。试验分三组,每组10尾雌鳗鲡,体重为147.0-502.6克,体长为50.0-66.0厘米。未经注射催情药物组-I,饲养在海水中;对照组-II,注射鲤鱼垂体(CPG)加HCG;试验组-III,注射CPG加HCG和外源性卵黄蛋白[姜仁良等,1993]。II组和III组各注射五次,注射时间间隔为15天,每次注射剂

量;CPG 1.5毫克/公斤·鱼;HCG 250·I·U/公斤·鱼;外源性卵黄蛋白5.0毫克/公斤·鱼。

1.2 电镜观察材料

经过75天的人工催熟试验,各组随机取样3尾鳗鲡,解剖取脑垂体的中腺垂体部分和卵巢,用2.5%戊二醛溶液固定(4℃,2小时以上),再用缓冲液洗去戊二醛,2%锇酸固定,乙醇梯度脱水,电镜包埋剂 Epon 812包埋,LKB 超薄切片机薄切片,切片厚度800A,醋酸铀和柠檬酸铅染色,JEM-100B 透射电子显微镜观察。

2 试验结果

2.1 外源性卵黄蛋白对鳗鲡卵巢成熟系数(GSI)的影响

经五次注射,试验组-Ⅱ,鳗鲡的卵巢成熟系数平均为 $56.17 \pm 11.74\%$,明显高于对照组-I ($19.6 \pm 1.14\%$)和未经注射催情药物组-I ($0.31 \pm 0.03\%$),见表。

外源性卵黄蛋白对雌鳗 GSI 的影响
Effects of exogenous yolk protein on GSI in female eel

组 别	体重 (克)	体长 (厘米)	卵巢重 (克)	GSI (%)
未经注射催情药物组-I	187.5	52.0	0.6	0.32
	181.4	51.5	0.5	0.28
	170.5	50.0	0.6	0.35
	179.8 ± 8.61	51.2 ± 1.04	0.57 ± 0.06	0.31 ± 0.03
对照组-I	316.2	59.0	66.2	20.9
	295.0	57.0	56.4	19.1
	304.0	59.0	57.1	18.8
	305.1 ± 10.64	58.3 ± 1.15	59.9 ± 5.47	19.6 ± 1.14
试验组-Ⅱ	191.0	63.0	115.5	60.5
	147.0	57.0	85.0	57.8
	502.6	65.0	219.6	43.7
	280.2 ± 193.86	61.7 ± 4.16	140.0 ± 70.57	56.17 ± 11.74

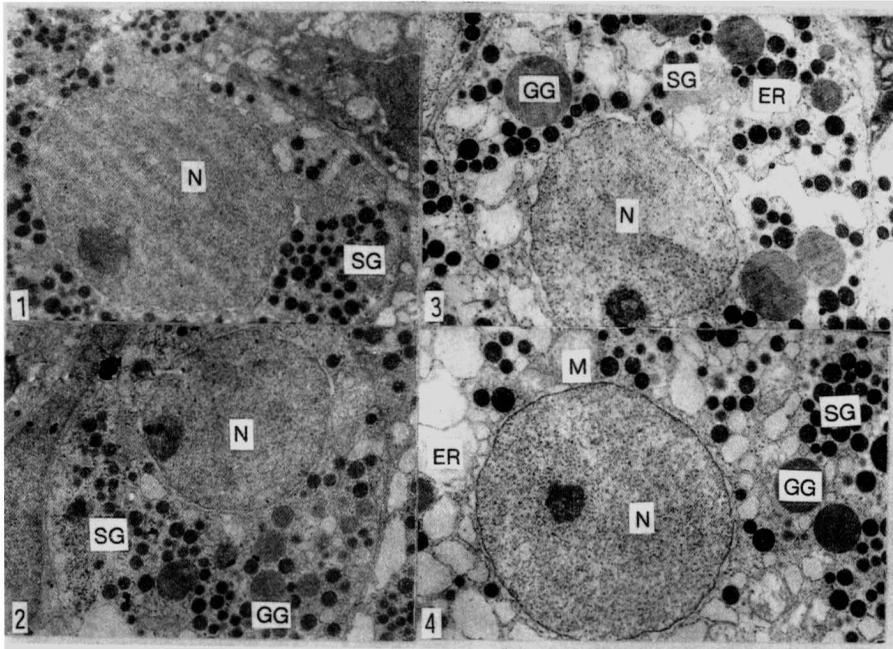
2.2 GTH 细胞超微结构变化

I 组鳗鲡脑垂体中的 GTH 细胞一般呈圆形或卵圆形,细胞间有膜隔开,胞核圆形较大。胞质内仅有小分泌颗粒,其形状呈圆形、棒形等,电子密度较高。胞内存在少量内质网,线粒体(图版 I—1)。对照组 GTH 细胞间界限清晰,胞核呈圆形而较大,此时胞质内出现体积小,电子密度高的小分泌颗粒在增生,而电子密度较低的球状分泌颗粒开始出现。内质网和线粒体开始活跃(图版 I—2)。试验组 GTH 细胞内球状分泌颗粒显著增加,变大并显示出新增生的球状分泌颗粒出现,电子密度低(图版 I—3)。在有些 GTH 细胞,球状分泌颗粒则在逐渐减少,小分泌颗粒增多。内质网也丰富,散布于细胞质中,并相互连结占有较大空间,逐渐扩大,线粒体活跃(图 I—4)。

2.3 卵母细胞超微结构变化

未经注射催情药物组,卵巢中卵母细胞呈椭圆形或圆形,细胞直径约50.0微米,核径为30.0微米,卵膜外为初生滤泡膜,内层出现清晰的微绒毛。有些卵母细胞的胞质内开始被锇酸染成

成黑色的脂肪油球(图版Ⅱ-1,2)。对照组卵母细胞近圆形,直径280.0微米,核径60.0微米。放射带已形成,滤泡膜为双层滤泡结构(鞘膜细胞和颗粒细胞),胞内开始出现卵黄颗粒(直径为8.0-12.0微米)和脂肪油球(图版Ⅱ-3,4)。试验组卵母细胞椭圆形或圆形,直径450.0微米,核径85.0微米,胞质内布满较大的卵黄颗粒(直径为26.0微米)和大小不等的脂肪油球。卵膜的放射带清晰,鞘膜细胞和颗粒细胞得到充分发育(图版Ⅱ5,6)。



图版 I plate I

1. 未经注射催情药物组,GTH 细胞小分泌颗粒($\times 20000$);2. 对照组,GTH 细胞球状分泌颗粒出现($\times 20000$);试验组;3示 GTH 细胞球状分泌颗粒增多,内质网扩大($\times 20000$);4示 GTH 细胞球状分泌颗粒减少,小分泌颗粒增多,内质网扩大($\times 20000$)。

3 讨论

试验组外源性卵黄蛋白协同 HCG 和 CPG 具有非常显著的催熟作用,诱导卵母细胞很快积累卵黄,使雌性鳊鲌成熟系数在75天内迅速上升,平均为 $56.17 \pm 11.74\%$,比对照组提高2.87倍,这可能是鳊鲌通过卵母细胞胞饮作用能直接吸收外源性卵黄蛋白,因为它与鳊鲌卵黄蛋白原在结构上的相似性[Hara,1980]。王浩等[1989]用黄鳝雌性特异蛋白复合物能促进黄鳝性腺发育,在催产剂中混加雌性特异蛋白复合物的试验组比不混加组,卵巢成熟系数平均提高0.77倍,与本试验得出同样结果。为此,表明外源性卵黄蛋白具有诱导鳊鲌卵巢快速发育成熟的作用。

图版 II plate II

未经注射催情药物组:1. 脂肪油球($\times 20000$);2. 卵母细胞质膜出现微绒毛($\times 32000$);对照组:3. 卵黄颗粒和脂肪油球($\times 20000$);4. 放射带和滤泡膜($\times 20000$)试验组:5. 胞内充满卵黄颗粒和脂肪油球($\times 32000$);6. 鞘膜细胞和颗粒细胞充分发育($\times 32000$)。

N 核 SG 小分泌颗粒 GG 球状分泌颗粒 ER 内质网 M 线粒体 AD 脂肪油球 V 微绒毛 Y 卵黄颗粒 TC 鞘膜细胞 GC 颗粒细胞 ZR 放射带。

未经注射催情药物组的鳗鲡已在海水中饲养75天后,脑垂体 GTH 细胞受到海水较长时间刺激与刚下海的鳗鲡比较,GTH 细胞有差别,胞内贮存小分泌颗粒,电子密度高。胞内出现脂肪油球表示着卵黄积累开始。鳗鲡与硬骨鱼类不同,其卵母细胞卵黄积累是以脂肪卵黄——脂肪油球开始[山本喜一郎,1974],而不是以碳水化合物卵黄——液泡形式开始。本试验结果表明,鳗鲡是以脂肪油球开始积累卵黄。这时,卵黄膜出现较为丰富的微绒毛,表示放射带正在形成,为今后卵母细胞微胞饮作用创造条件。但长期蓄养在海水中不经激素处理的鳗鲡,卵巢不可能进一步,发育,仅停留在性腺发育第Ⅲ期[林鼎等,1984]。对照组由于注射了 CPG 加 HCG 之后,小分泌颗粒增生,球状分泌颗粒开始出现,内质网和线粒体开始活跃;与此同时,卵母细胞双层滤泡膜发育,放射带明显,胞内出现卵黄颗粒和脂肪油球,鳗鲡卵巢开始向成熟方向发育,但尚未达到最后成熟。而试验组由于外源性卵黄蛋白与鳗鲡卵黄蛋白原的同源性,当进入血液,可能通过卵母细胞微胞饮作用直接吸收,随后由于卵母细胞发育,滤泡膜细胞分泌雌二醇增加,因此对垂体 GTH 细胞反馈作用加强[Dufour,1983;Ollirerean,1979],GTH 细胞的发育和合成活动的加强,这可能是外源性卵黄蛋白促进卵细胞卵黄积累增加的原因。所以既有对卵母细胞卵黄积累的直接作用,也具有对 GTH 细胞的间接作用,作者这一分析,尚需作进一步实验来证实。

青鱼,草鱼[刘筠,1993]和鳗鲡[林浩然,1983]垂体 GTH 超微结构研究都揭示有大小两种分泌颗粒,本研究观察也与其一致。但在海水中饲养75天,未经注射催熟药物的雌鳗垂体 GTH 细胞中未见球状分泌颗粒,仅见较多小分泌颗粒,而林浩然等[1983]对珠江口附近下海

鳗鲡垂体 GTH 细胞观察发现有的 GTH 细胞中仅有小分泌颗粒,有的 GTH 细胞中则大、小分泌颗粒兼有,这可能是自然洄游下海与人工环境饲养的不同,后者造成 GTH 细胞机能较差,未出现球状分泌颗粒。凡经注射催熟药物的鳗鲡垂体 GTH 细胞,不论是试验组,还是对照组都出现球状分泌颗粒,前者数量较后者为多,而此时卵母细胞出现卵黄颗粒,卵母细胞直径增大,表明球状分泌颗粒出现与卵黄颗粒的形成有关。而小分泌颗粒出现较早,在未进入卵黄颗粒积累阶段的 GTH 细胞中就已出现。本研究表明,海水人工饲养仅能刺激 GTH 细胞的小分泌颗粒形成,而注射催情药物混加外源性卵黄蛋白更能刺激 GTH 细胞球状分泌颗粒更多的形成,促进卵母细胞更快地积累卵黄颗粒。

参 考 文 献

- [1] 王浩等,1989. 雌性特异蛋白复合物促黄鳍性腺发育,提高黄鳍孵化率. 水产学报, 13(4), 353-355.
- [2] 王义强等,1980. 河鳗人工繁殖的初步研究. 水产学报, 4(2), 147-156.
- [3] 刘筠, 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 农业出版社, 47.
- [4] 林鼎等, 1984. 鳗鲡繁殖生物学研究 III 鳗鲡性腺发育组织学和细胞学研究. 水生生物集刊, 8(2), 157-164.
- [5] 林浩然等, 1983. 鳗鲡繁殖生物学研究 I. 下海雌鳗脑垂体超显微构造的研究. 水生生物集刊, 8(1), 33-39.
- [6] ——, 1987. 鳗鲡繁殖生物学研究 IV, 人工催熟过程中下海鳗鲡的 GTH 分泌活动、性腺发育状况和脑垂体 GTH 细胞的超显微结构. 水生生物学报, 11(4), 320-327.
- [7] 姜仁良等, 1993. 鳗鲡卵黄蛋白的生物效应. 上海水产大学学报, 2(4), 201-205.
- [8] 山本喜一郎ほか, 1974. 日本产ウナギ (*Anguilla japonica*) の卵形成について. 日本水产学会誌, 40(1), 9-15.
- [9] Dufour, S. et al., 1983. Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive in European freshwater eel *Anguilla anguilla* L. Gen. Comp. Endocrinol., 52(2):190-197.
- [10] Hara, A. et al., 1980. Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Comp. Biochem. Physiol., 65(B), 315-320.
- [11] Oliverean, M. et al., 1979. Estradiol-positive feedback on gonadotropin (GtH) cells in freshwater male silver eel. Gen. Comp. Endocrinol., 39(2), 247-261.

EFFECTS OF EXOGENOUS YOLK PROTEIN ON THE ULTRASTRUCTURES OF GONADOTROPIC CELL AND OOCYTE IN ELL (*ANGUILLA JAPONICA*)

Jiang Ren-liang, Wu Jia-min and Gao Bing
(Fisheries College, SFU, 200090)

ABSTRACT A intraperitoneal injection with exogenous yolk protein combining with carp pituitary gland (CPG) and human chorionic gonadotropin (HCG) were given to eel (*Anguilla japonica*) periodically. The gonadosomatic index (GSI) of treated (group reached to $56.17 \pm 11.74\%$; it was 2.87 times of the control group (CPG+HCG). Both small secretory granules and globular secretory granules and endoplasmic reticulum enlargements were showed in gonadotropic cells (GTH cells) of treated eel. The average diameter of oocyte was $450.0\mu\text{m}$, two layers of follicular membrane and radiate zone were well developed. Both the diameter of globular secretory granules and endoplasmic reticulum enlargement in control

group were smaller than that of treated group and the average diameter of oocyte was 270.0 μm . While the eels were reared in seawater for 75 days without any injection, it was only small secretory granules appearance in GTH cells; the radiate zone of oocyte has not formed, some lipid globules appeared in oocyte cytoplasm. These results indicated that the exogenous yolk protein has a synergetic effects with CPG and HCG mixed injection and it shows a significantly promotive effects in oocyte maturation of eel.

KEYWORDS *Anguilla japonica*, exogenous yolk protein, GTH cell, oocyte