

天然雌核发育银鲫卵子控制异源 精核发育的受精学机制*

岳振宇 蒋一珪 单仕新 丁 军

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

作者对两性融合生殖鱼和雌核发育银鲫脱膜卵受精的精核发育进行了观察, 并采用鱼类卵子无细胞系对以上两类卵质提取物体外诱导经 Triton-X100 处理的精子及其发育进行了初步研究, 结果表明在两性融合生殖型脱膜鱼卵中精核通过解凝最终形成原核, 而在雌核发育的银鲫脱膜卵子中部分精核体积虽有一定程度的增加, 但始终没有观察到原核的发育; 在体外诱导实验中, 经 Triton-X100 处理的精子在两类卵质提取物中充分发育, 都出现了类似体内原核的状态。该现象提示在银鲫卵质中存在有促使精核形成原核的因子, 但在正常受精状态下, 由于银鲫卵质促使精核核膜解体的功能的异常, 使覆盖精子头部的核膜不能象在两性融合生殖受精卵子中进行崩解, 精核进一步的原核发育受到抑制。另外, 建立体外诱导系统的重要意义, 在于它为研究雌核发育调控的分子学机制提供了一条有效途径。

关键词 雌核发育, 精核, 无细胞系, 核膜, 银鲫

在鱼类中已证实两性融合生殖的受精过程中入卵精子的核膜必须先行解体, 接着致密精核的染色质疏松、解凝, 然后形成雄性原核^[1,2]。然而在天然雌核发育银鲫卵子的受精过程中, 异源精子通过受精孔道进入卵子后, 精核一直保持固缩的状态^[3,4]; 精子进入剥去卵膜的银鲫卵子后部分精核体积有所增加, 但最终很少能观察到雄性原核的生成^[5]。另外, 采用显微注射去污剂 Triton-X100 处理精子的方法, 在两性融合生殖型鱼卵中观察到注射精核原核化发育的同时, 却较少观察到银鲫卵中有原核出现。该现象很容易使人想到两类卵质在诱导精核发育上的功能差异, 并假设是由于银鲫卵质中缺乏促精子核化的因子所致^[5,6]。但更详细的过程仍是不清楚的。

目前, 精核在早期受精过程中较为深入的有关发育事件的研究大多是通过体外卵质提取物(无细胞系, cell-free system)培育脱膜精核实验进行的。在哺乳类、两栖类以及无脊椎动物海胆等开展了广泛的研究^[7-11], 发展迅速。Eng^[9]和 Brown^[8]等分别在海胆和爪蟾卵中提取到一个与精核解凝以及形成原核有关的蛋白质组分, 标志着该领域真正进入了分子水平阶段。

* 获国家自然科学基金(39170602)、湖北自然科学基金(87J17)和中国科学院院长基金特别支持项目资助。
1992年6月23日收到。

作者注意到, 银鲫卵特殊的受精现象将使它成为研究精核早期受精行为的一个非常有用的材料。本实验在细胞学观察的基础上, 试图建立鱼类卵子的体外诱导系统, 希望由此来分析天然雌核发育银鲫和两性融合生殖鱼卵质诱导精核发育功能上的差异, 为研究调控鱼类天然雌核发育的因子提供一个有效手段。

1 材料与方法

1.1 鱼卵和精子的获得

天然雌核发育银鲫 [*Carassius auratus gibelio* (Bloch)] 和两性融合生殖鱼红鲤 (*Cyprinus carpio* red variety) 及红鲫 (*Carassius auratus* red variety) 均由中国科学院水生生物研究所官桥试验场提供。在繁殖季节通过人工催产获得新鲜的鱼卵和精液。

1.2 银鲫和两性融合生殖鱼卵脱膜后再受精

受精组合: 银鲫♀ × 红鲤♂, 红鲤♀ × 红鲤♂, 红鲫♀ × 红鲫♂。

新鲜的未受精鱼卵用脱膜液 (0.25% trypsin, 0.4% urea, 0.85% NaCl)^[12] 处理, 获得裸卵, 经生理盐水洗涤, 立即与精液湿法受精, 将受精卵移入含 Holtfreter's 液和铺有琼脂层的培养皿中发育 (水温 18—20℃)。受精后每隔 5 min 取材, 到 8-cell 期为止。材料用 Bouin's 液固定。

1.3 银鲫和两性融合生殖鱼卵卵质提取物体外培育精核

1.3.1 卵质提取物的制取 成熟未受精卵用冷的卵质缓冲液 (OB, ooplasmic buffer, 250mmol/L Sucrose, 100mmol/L KCl, 30mmol/L MgSO₄, 2mmol/L β-巯基乙醇, 25mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4)^[10] 漂洗一次后, 装满于含冷的 OB 液的 2ml 的离心管中, 吸去多余的溶液, 在常温下离心 15min (7000—9000g), 收集卵子的重质层 (含蓝色色素)。

1.3.2 精子的处理 用冷的生理盐水洗涤新鲜精液, 离心收集沉淀, 加入处理液 (0.05% Triton-100, 0.85% NaCl), 15min 后离心, 洗涤两次, 最后悬浮在含 8mmol/L CaCl₂ 的生理盐水中, 浓度为 10⁵—10⁸/ml。

1.3.3 卵质提取物体外培育精核 培育按照以下组合: 银鲫卵与红鲤精子、红鲤卵与红鲤精子、红鲫卵与红鲫精子。取卵质提取物重质层 80μl 与处理精子 20μl 混合均匀, 滴入 40 孔细胞培养板的孔内, 常温下发育。每隔 30min 取材涂片, 自然干燥后用冷的固定液 (乙醇: 乙酸 = 3: 1) 处理 30min。另外分别以 OB 液培育处理精子、卵质提取物培育未处理的精子实验为对照。

1.4 细胞学观察

Bouin's 液固定的材料在 24h 之内换入 70% 酒精内。酒精逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚度 9μm, Delafields hematoxylin 染色, eosin 复染; 涂片后固定的材料进行常规 Feulgen 染色, Schiff's 溶液染色 1h, 封片, 镜检。

2 结果

2.1 雌核发育银鲫和两性融合生殖鱼 (红鲤、红鲫) 脱膜受精卵内精核发育的差异

细胞学观察表明, 无论是银鲫还是红鲤、红鲫的脱膜卵受精, 都表现为多精受精。在

两性融合生殖鱼红鲤和红鲫脱膜卵中的大多数精核都经历了解凝[图版 I:1]和原核化发育[图版 I:2], 最终形成的雄性原核与未脱膜卵受精中的雄性原核在形态上没有区别。但是, 精核发育速度却明显迟于对照的未脱膜卵受精中的精核。

在银鲫脱膜受精卵中, 各精核的发育有所不同。部分精核从受精起始到 8-cell 期一直维持固缩圆点状, 着色深, 而另外一些精核从受精 20min 左右开始, 体积有所增加, 着色性降低, 表现出一定程度的解凝[图版 I:3], 但极少有精核发育成原核状态。一直到 8-cell 期为止, 精核解凝的程度仍是有限的, 远远低于原核的状态。

在观察中, 作者注意到银鲫脱膜卵中发生解凝的精核普遍与两性融合生殖鱼红鲤、红鲫脱膜受精卵中精核的发育状态存在着差异: 在两性融合生殖鱼卵中, 各解凝精核呈现出极不规则的多角状, 随着核质逐渐疏松, 核边缘由光滑变得较为粗糙[图版 I:1], 预示着精核核膜的解体; 而银鲫卵中部分解凝的精核虽然体积增加了, 但大多数表现出较规则的圆形或椭圆形, 膜边缘清晰光滑, 核质的疏松程度有限[图版 I:3,4]。至卵裂以后, 精核的这种状态没有多大变化[图版 I:4]。

2.2 雌核发育银鲫和两性融合生殖鱼(红鲤、红鲫)卵质提取物体外诱导精核的发育

经过 Triton-X100 处理后的精子, 表面膜层被破坏, 出现皱褶、松弛的状态[图版 I:5], 使精核易与外界因子发生作用。实验中以卵质提取物对未处理的精子进行培育时, 精核不能解凝。

经处理后的精子分别在雌核发育银鲫和两性融合生殖鱼(红鲤、红鲫)卵质提取物中培育, 经过一段时间, 精核的体积都逐渐增大, 结构疏松[图版 I:6,8], 最终能形成直径约为 10—12 μ 的核[图版 I:7,9], 大约相当于在两性融合生殖鱼受精卵中完全发育的雄性原核。精核在两种卵质提取物中的发育行为没有出现明显的差别。但精核在两性融合生殖鱼卵中开始出现解凝和形成原核的平均时间(1—2h)早于雌核发育银鲫卵中精核相应发育的平均时间(1.5—2.5h)。仅用卵质缓冲液培育处理的精子, 经 4h 的培育和观察, 没有发现精核的变化[图版 I:10]。¹⁾

3 讨论

Iwamatsu 等^[1]观察了精子进入青鳉[*Oryzias latipes* (Temminck et Schlegel)]脱膜卵的细微过程, 发现精子头部首先接触微绒毛或卵质突起, 然后包被于卵内, 精子头部的质膜可与卵子质膜直接接触而融合。作者在银鲫和红鲫的脱膜受精过程的扫描电镜研究中也观察到类似的现象¹⁾。精子进入卵子时, 由于质膜和卵子质膜融合而失去质膜。但在形成雄性原核之前, 精核还必须经过核膜的崩解(breakdown)、致密精核的疏松(dispersion)和重新形成新的核膜等形态上的变化^[1,2]。根据实验结果, 在银鲫脱膜卵的多精受精中, 异源精子进入卵子后脱去质膜, 部分精核尽管出现一定程度的解凝, 体积有所增加, 但与两性融合生殖鱼中精核的解凝形态表现出一定差异, 显示出保留有膜状结构的迹象, 至卵裂后也无多大变化。与之不同的是, 在两性融合生殖鱼卵子内, 大多精核一

1) 岳振宇: 中国科学院水生生物研究所硕士毕业论文。(两性融合生殖鱼类和雌核发育银鲫卵质诱导精核发育的比较研究, 1991.9.)

度表现出极不规则的多角状,核边缘粗糙,无膜状结构,实际反映出核膜的解体。

在体外诱导的实验中,用 Triton-X100 处理精子时,精子表面质膜被破坏,另外核膜有可能受到一定的损伤。在这种情况下,精核近乎“裸露”,如果外界培养物中有诱导精核解凝和形成原核的因子,在适宜的条件下,精核就能疏松、解凝,并形成原核。实验结果证实,精子经 Triton-X100 处理,在雌核发育银鲫和两性融合生殖鱼卵质提取物中充分发育后,大量形成原核。这说明一方面银鲫卵质可能存在有促精核解凝和形成原核的因子,另一方面联系精核进入银鲫脱膜卵后核外仍然保留着膜状结构的现象,有理由认为精核之所以在银鲫卵中不能形成原核,是因为精核核膜的阻碍作用。由此可推论,在正常受精条件下,异源精子通过受精孔进入银鲫卵子内,精核的核膜不能解体,从而“束缚”了精核更进一步的发育行为。值得注意的是,精核在银鲫卵质提取物中形成原核所需时间比在两性融合生殖鱼卵质中长一些,这极有可能是由于后者卵质中存在有促使精核核膜解体的功能,从而加快了核膜崩解的进程;而在银鲫卵质中则缺乏这种正常功能,单由外界因子损伤了核膜后使其解体。有证据表明,在两性融合生殖鱼的受精过程中,精核核膜的解体是在很短的时间内发生的^[10]。

CaaT^[13]观察显微注射 Triton-X100 处理的精子在银鲫卵中发育时也发现了原核的生成,由此得出了由于精子头部被一些膜层覆盖,因此影响了卵子功能因子作用的假设;另外一些实验结论曾将银鲫卵中精核不能形成原核的原因一般地归结于银鲫卵中缺乏促精核原核化因子^[6]。本实验结果可以明确地看到,正常情况下的银鲫受精卵质在促使精核核膜解体的功能上是异常的,尽管在卵质中存在有诱导精核原核化发育的因子,却无法行使正常功能使精核形成原核。

银鲫卵子抑制异源精核的发育可能是不稳定的,某些外界条件的改变使银卵受精过程表现为两性融合生殖。Takai 和 Ojima 报道在三倍体银鲫(Triploid ginbuna)^[14]卵受精后约 15—39min 内进行低温处理,雌核接受了来自异源父本的一套染色体,结果子代为四倍体。另外,在三倍体银鲫的人工繁殖群体中也发现了极少数异源四倍体^[15]。这一现象反映出在特定条件下精核的受精发育发生了解凝和原核化,并能与雌核接合。在此,冷处理或其他外界条件的改变有可能使银鲫卵质恢复了促精核核膜解体的功能,或者改变并损伤了精核核膜的结构,使其解体;接着,在银鲫卵质中促精核解凝和形成原核的因子作用下发育成雄性原核。在资料表明来源不同的精子(同源或异源)在银鲫受精卵中的细胞学变化有所不同,精核的解凝或原核化发育程度上不一致^[16,17]。根据本实验结果,一种可能的解释是,来源不同的精子其核膜结构可能存在差别,在异常的银鲫卵质功能影响下,进而发生不同的发育行为。但以上假设有待于分子学依据的证实。

自 Lohka 和 Masui^[10]建立了无细胞系,从体外诱导精核发育后,对于早期受精过程中精核发育的生化研究迅速发展起来,在哺乳类、两栖类和海胆等中证实了与 Ca^{2+} 的激活^[18]、S—S 的还原^[19]、磷酸化作用^[7]以及有关蛋白酶的相关性,目前已初步分离到了诱导精核形成原核的蛋白组分^[8]。本实验对无细胞系的建立进行了初步探索,期望借此方法对鱼类中天然雌核发育现象进行更深入的研究。作者相信,通过对比雌核发育银鲫和两性融合生殖鱼卵质诱导功能上的差异,并联系特定外界因子的影响,揭示鱼类中天然雌核发育的受精分子机制已为期不远。

参 考 文 献

- [1] Iwamatsu, T. and T. Ohta. Electron microscopic observation on sperm penetration and pronuclear formation in the fish egg. *J. of Exp. Zool.* 1978, **205**: 157—180.
- [2] Wolenski, J.S., and N.H. Hart. Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg. *J. of Exp. Zool.* 1987, **243**: 259—273.
- [3] 小林弘(杨兴棋译). 鲫鱼的分类以及银鲫中所见到的雌核发育的细胞遗传学研究. 淡水渔业 1981(1):36—40.
- [4] 俞豪祥. 银鲫雌核发育的细胞学观察. 水生生物学集刊 1982, 7: 481—487.
- [5] 葛伟, 蒋一庄. 雌核发育银鲫抑制异源精子原核化的作用模式初探. 水生生物学报 1985, 9(3): 203—208.
- [6] 岳振宇等. 雌核发育和两性融合生殖鱼卵调控精核受精发育的生化特性研究. 水生生物学报 1996, **20**(2): 164—173.
- [7] Brown, D.B., et al. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg. *J. of Exp. Zool.* 1987, **242**: 215—231.
- [8] Brown, D.B., et al. Partial purification of *Xenopus laevis* egg extract factor(s) that induce swelling in permeabilized human sperm *J. of Exp. Zool.* 1991, **258**: 263—272.
- [9] Eng, L.A. and C.B. Metz. Sperm head decondensation by a high molecular weight fraction of sea urchin egg homogenate. *J. of Exp. Zool.* 1980, **212**: 159—167.
- [10] Iwao, Y. and C. Katagiri. In vitro induction of sperm nucleus decondensation by cytosol from mature toad eggs. *J. of Exp. Zool.* 1984, **230**: 115—124.
- [11] Lohka, M.J., and Y. Masui. Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components *Sciences*, 1984, **220**: 719—721.
- [12] Yamaha E. et al. A method for dechoriation in goldfish *Carassius auratus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1986, **52**(11): 1929—1934.
- [13] СааТ, Т.В., О механизме исключения из развития хроматика спермия у гиногенетической Формы серебряного карася. In: "Eksperimentaalbioloogia" (U. Sutrop. Editor) Harku, Eesti NSV TA Eksperim-entalbioloogia Instituut. 1985 P.64—68.
- [14] Takai, A. and Y. Ojima. Tetraploidy appeared in the offspring of triploid ginebuna *Carassius auratus langsdorfii*. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 1983, **59**: 347—350.
- [15] 桂建芳等. 异育银鲫人工繁育群体中复合四倍体的发现及其育种潜力. 科学通报 1992(7): 646—648.
- [16] 葛伟, 蒋一庄. 人工转性异育银鲫精子在两性融合型和雌核发育型卵质中的发育特征及其应用意义. 水生生物学报 1990, 14(2): 108—112.
- [17] 葛伟, 蒋一庄. 雌核发育银鲫的受精生物学研究——天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论. 水生生物学报 1992, **15**(2): 97—100.
- [18] Lohka, M.J., and Y. Masui. Effects of Ca^{2+} ions on the formation of metaphase chromosomes and sperm pronuclei in cell-free preparations from unactivated *Rana pipiens* eggs. *Dev. Biol.* 1984, **103**: 434—442.
- [19] Perreault, S.D., et al. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev. Biol.* 1984, **101**: 160—167.

THE REGULATED DEVELOPMENT OF HETEROLOGOUS SPERM NUCLEUS BY EGGS OF NATURAL GYNOGENETIC SILVER CRUCIAN CARP (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO*) DURING FERTILIZATION

Yue Zhenyu, Jiang Yigui, Shan Shixin and Ding Jun

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

The cytological behavior of sperm was observed after the sperm incorporated into dechorionated eggs of gynogenetic Silver crucian carp (*Carassius gibelio*) and bisexual fish (*Carassius auratus* red variety or *Cyprinus carpio* red variety). In bisexual dechorionated eggs the sperm nuclei may undergo decondensing and developed into pronuclei. By contrast, although a few heterologous sperm nuclei became to some extent enlarged the pronuclei did not appear all. Furthermore, the established cell-free system from extraction of two types of eggs were employed to incubate the Triton-X100 treated sperm. The sperm nuclei in the two types of extractions were fully developed, and then became the form of pronucleus, indicating that there are some factors responsible for sperm nucleus swelling and male pronucleus formation in gynogenetic Silver crucian carp eggs. However, when heterologous sperm entered intact gynogenetic eggs through micropyle, the nuclear envelope of sperm failed to breakdown due to the abnormality of relative function in cytoplasm of the egg, and the further development was thus inhibited. The significance of setting-up cell free system lies in that an efficient approach can be established to analyse the molecular mechanism by which the natural gynogenesis was regulated during fertilization.

Key words Gynogenesis, Sperm nucleus, Cell-free system, Nuclear envelope, Silver crucian carp