

草鱼孵化腺超微结构及孵化酶形成与释放的研究

王 蓉 晖

(湖南省生物研究所, 长沙 410081)

提 要

草鱼胚胎孵化腺为单细胞腺体, 发生于外胚层, 主要分布在胚胎头部及头部与卵黄囊连接处, 尤以眼睛腹下方最多且典型。其形成、释放酶的过程具有一定的规律性, 可划分为5个时期: 形成前期、迁移期、分泌期、衰退期和消失期。畸形胚胎头部表皮细胞中很少有HGC的分化或HGC分化不完全, 其形态结构也呈现畸形。

关键词 草鱼, 孵化腺细胞, 孵化酶, 超微结构

鱼类胚胎从卵膜中孵化出来主要依靠胚胎本身的孵化腺细胞(Hatching gland cell, 简称HGC, 下同)分泌的孵化酶, 对此曾有不少学者从显微水平对不同鱼类胚胎HGC的发生和特征有过论述, 但从亚显微结构阐明四大家鱼胚胎HGC的发生和特征及孵化酶的形成和释放则尚未见有报道。作者对草鱼胚胎HGC发生的形态特征及分泌孵化酶前后的形态变化进行了显微和亚显微结构方面的研究。旨在为鱼胚离开卵膜的机理提供亚显微结构的形态学依据, 也为畸形胚胎不能脱膜最终死于膜内找出原因。研究上述机理和原因, 其目的是为提高孵化率奠定更有说服力的理论基础和探讨更有效的技术措施。

1 材料和方法

收集人工催产、人工受精的草鱼受精卵, 置于室内静水孵化, 孵化水温分别控制在正常温度范围: 21—23℃、23—25℃、25—27℃、27—29℃及低温: 20—18℃、18—16℃、16—14℃七个温度段, 并参照草鱼胚胎发育时序图谱^[1], 进行解剖镜检, 确定发育时期, 从尾芽期开始取材, 每发育至一新时期取材1次, 直到体循环期止。光镜部分用Smith氏液或Bouin氏液固定, 常规石蜡包埋, 切片厚度为5—7μm, 用显示多糖类的PAS和常规的苏木精染色。透射电镜部分用2.5%戊二醛与1%锇酸双重固定, 0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗, 酒精梯度脱水, Epon 812包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色。日立H-600透射电镜观察。扫描电

镜材料亦以 2.5% 戊二醛与 1% 铁酸双固定, 磷酸缓冲液漂洗, 梯度酒精脱水, 醋酸异戊酯置换, CO_2 临界点干燥, 喷金, 日立 X-650 型扫描电镜观察。

2 结果与讨论

2.1 孵化腺细胞的分布位置、形态结构及数量

孵化腺是一种由表皮细胞分化而来的单细胞腺体, 这种腺体的分布因鱼的种类不同而有很大的变化。有的鱼类遍布全身体表各个部分, 如大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta* Walbaum)、虹鳟 (*Salmo gairdneri* Richardson) 和金鱼 (*Carassius auratus* L.) 等, 有的鱼类分布在口腔与咽喉, 如赤鱥 (*Fundulus heteroclitus* L.) 和阔尾鱥鱼 (*Oryzias latipes* Temminck et Schiegel); 还有的鱼类分布在嗅窝与躯体后端之间的背中线, 如小齿银鱼 (*Salanx microdon*)。但大多数鱼类的 HGC 分布在胚胎的头部、卵黄囊和口腔, 一般胚胎前半部多于后半部^[2-8]。

草鱼的 HGC 是一种临时性腺体。利用 PAS 染色法能明显地在胚胎表皮细胞中区分出 HGC, HGC 对 PAS 具有特殊的着色能力。根据这一特点, 作者可以清楚地看到, 草鱼 HGC 主要分布在鱼胚头部及头部与卵黄囊连接处, 尤以眼睛腹下方最多且典型 (图版 I: 1, 2)。在胚体中部及尾部均看不到 HGC。HGC 为单细胞腺体, 呈圆形或椭圆形 (图版 I: 3), 长径为 16—20 μm , 短径为 8—12 μm , HGC 内充满呈 PAS 阳性的颗粒, 约占整个细胞的 1/2 (图版 I: 3)。细胞核位于细胞基部, 呈椭圆形或新月形, 内有许多染色质颗粒。

扫描电镜观察可以看到, 在形成 HGC 的表面, 表皮细胞中央向外鼓起形似花状突起 (图版 I: 5)。

HGC 的电子致密度较其四周的表皮细胞大, 因此, 在电镜下较易找到。通过透射电镜, 可以看到, 酶原颗粒充满于细胞的中上部, 呈圆形或椭圆形, 颗粒直径约为 0.5—1.4 μm 之间, 每一个酶原颗粒外面均有膜包围, 颗粒之间有明显的界限 (图版 I: 7)。这与鲤鱼不同, 鲤鱼在分泌期, 酶原颗粒的膜消失, 彼此相连^[3]。在同一 HGC 中酶原颗粒的电子致密度是不一致的, 这表明它有一个成熟过程, 各个酶原颗粒处于不同的合成时期 (图版 I: 7)。这与某些学者的报道是一致的^[2]。当充满酶原颗粒时, 细胞核被挤到细胞的基部, 核的四周和中央有许多异染色质。另外, 在核的四周, 分泌颗粒的下方有许多粗面内质网和线粒体, 并可以看到高尔基体位于颗粒的基部, 粗面内质网表面密布着大量核糖体 (图版 I: 7)。

HGC 的绝对数量视卵膜的强度而定^[4], 即卵膜愈坚实, 腺体的数量愈多; 反之, 则愈少。例如: 台湾大麻哈鱼多达 4000 个, 而小齿银鱼只有 300—400 个。有些鱼类没有 HGC, 张孝威 (1948) 的研究表明^[4], 鳊亚科鱼类孵化特别早, 孵化时没有酶参加作用, 全靠胚体本身的长大, 在头顶处突破卵壳而出。根据作者的实验研究, 草鱼胚胎从肌肉效应期发育至出膜期, 这一阶段 HGC 的数量随胚胎发育而增多, 在出膜前期, 数量达最大值, 约为 700—1000 个, 之后, HGC 开始衰退、萎缩, 数量逐渐减少。这说明草鱼的 HGC 是一种临时性腺体, 它因鱼苗孵化的需要而产生, 也随使命地完成而退化。

2.2 草鱼孵化酶形成和释放的消长规律

草鱼 HGC 及其形成和释放孵化酶具有一定的特点和规律性, 可将其整个过程划分为 5 个时期: (1) 形成前期, 指 HGC 形成之前的阶段; (2) 迁移期, 指表皮细胞已分化形成 HGC, 此时的 HGC 位于表皮细胞下面, 随后向胚胎表面迁移, 但还未开始酶的分泌活动; (3) 分泌期, HGC 已迁移到胚胎表面, 开始大量分泌酶颗粒; (4) 衰退期, 分泌作用已完成, HGC 开始衰退; (5) 消失期, HGC 从表皮细胞中消失。具体描述如下。

2.2.1 形成前期 从受精卵开始, 直至晶体出现期, 这一阶段 HGC 还未形成, 在胚胎表皮细胞中未见被 PAS 染成红色的 HGC。扫描电镜观察可见在将形成 HGC 区的表皮细胞表面, 有许多相互交织的小的嵴状突起(图版 I: 4)。

2.2.2 迁移期 在肌肉效应期, 胚胎眼囊腹下方表皮加厚, 开始分化形成孵化腺单细胞。在电镜下, 可清楚看到, 此时 HGC 内的酶原颗粒数量很少, 稀疏地散布在 HGC 内, 细胞核占据了细胞一半的空间, 且核与酶颗粒并列排列(图版 I: 6)。发育至孵化前期, HGC 开始饱满, 呈圆形或椭圆形, 紧密而整齐地排列在一薄层表皮细胞下面, 酶原颗粒数量增多, 充满 HGC 中上部, 颗粒之间有明显的界限, 核被挤到细胞的基部(图版 I: 7)。由于 HGC 的形成和长大, 并渐向胚胎表面迁移, 以致该区表皮细胞的中央向外鼓起形成花状的突起(图版 I: 5), 但此时的表皮还没有与外界形成开口, 说明还未开始酶的分泌活动。

2.2.3 分泌期 从出膜前期发育至眼色素出现期, 这一阶段 HGC 已挤到两表皮细胞间并形成许多开口, 开始大量分泌酶原颗粒。在出膜期, 光镜观察其横切面, 可清楚地看到 HGC 明显大于表皮细胞, 并与表皮细胞相间排列于胚胎表面, 被染成红色的颗粒集中于细胞顶端开口处(图版 I: 3)。透射电镜观察, 可清楚看到已迁移到胚胎表面的 HGC, 其中有些酶原颗粒的膜已和细胞膜融合, 酶原颗粒正在释放之中(图版 II: 14)。这种分泌颗粒是以外倾作用进行排放, 属于全浆分泌方式, 这与某些学者在其它鱼类的报道相似^[2-3]。在表皮细胞的间隙间有许多孔洞(图版 I: 9), 即为 HGC 在胚胎表面的开口, 在部分孔洞附近还残留有一些分泌物。出膜后 1—2h, 红色颗粒在 HGC 中所占比例明显减少, 部分 HGC 开始出现空泡, 随着进一步发育, 空泡逐渐增多。透射电镜下可观察到, 还未排完的酶原颗粒集中于细胞的顶端, 颗粒下方出现许多分泌完毕后留下的空泡(图版 II: 18)。

2.2.4 衰退期 在此阶段, HGC 分泌作用已完成, 它们离开胚胎表面, 位移至表皮细胞下方并逐渐衰退。在光镜下, 基本上看不到细胞内被染成红色的颗粒。在透射电镜下则可明显地看到 HGC 呈现出退化迹象。在眼色素出现中期, 分泌作用刚刚完成, HGC 内还有粗面内质网和大量的线粒体, 线粒体常呈长柱形, 体积也较大(图版 II: 15)。此外, 溶酶体开始出现(图版 II: 15)。发育至眼色素出现末期, 则 HGC 退化迹象明显, 核内异染色质大量增加, 细胞器明显减少, 核质比例变小(图版 II: 16)。扫描电镜观察, 则可看到, 由于腺细胞的衰退, 表皮细胞轻微下陷, 表皮细胞间隙间用于分泌酶颗粒的孔洞消失, 而代之以许多突起(图版 I: 10), 这种突起可能由表皮细胞本身所形成。

2.2.5 消失期 从体循环期开始, HGC 逐渐从表皮细胞中消失。扫描电镜观察可看到

表皮细胞已恢复平整, 细胞与细胞之间连接紧密, 无异常现象(图版 I: 8)。HGC 的退化和从表皮细胞中消失与细胞内逐渐出现的溶酶体有关。

2.3 温度对孵化酶形成和释放的影响

孵化腺的分泌活动, 酶的形成及释放与水温有密切的关系, 在草鱼胚胎发育适宜温度范围内(20—29℃), 腺体分泌正常, 酶能及时形成并释放, 使胚胎能顺利地从卵膜内孵化出来。如果温度偏低(20℃以下), 腺体分泌受阻, 其结果是胚胎发育的速度与脱膜的时间不能一致, 孵化酶对卵膜的溶解减薄作用不能及时跟上, 部分或全部胚胎不能破膜而出, 导致中途死亡于膜中。

2.3.1 正常温度范围 草鱼孵化的正常温度范围为20—29℃, 在此温度范围内, 水温愈高, 胚胎发育的速度愈快, HGC的产生及形成、释放酶的速度也愈快(表1)。酶的及时形成与释放, 与胚胎的发育速度及脱膜时间保持一致, 从而保证了胚胎从卵膜中顺利地孵化出来。

表1 正常温度范围内及低温条件下, 孵化酶形成情况与水温、发育时间的关系

Tab.1 The relationship between water temperature, growth time and formation of hatching enzyme within and below the normal temperature range

发育的时间 (时: 分) Growth time (h: min)	酶形成情况 Formation of hatching enzyme	初 始 Beginning	最 大 值 Maximum value	停 止 Stop
		(肌肉效应期) (muscle effect stage)	(出膜前期) (pr-incubation stage)	(眼色素期) (eye-pigmented stage)
水温 Temperature of water				
正常温度 Within normal temperature range	27—29℃	15:30	20:55	24:45
	25—27℃	18:10	23:35	27:35
	23—25℃	20:50	26:15	31:35
	21—23℃	22:15	30:00	36:25
低 温 below the normal temperature	18—20℃	38:40	42:40	58:55
	16—18℃	45:25	58:15	70:15
	14—16℃	无孵化腺细胞的产生 无酶的形成、释放		

2.3.2 低温 在低温(20℃以下)条件下, 鱼胚发育缓慢, 胚体比正常胚体小, 死亡率和致畸率都很高。14—16℃, 胚胎不能正常发育脱膜, 当发育至囊胚中期(受精后15h 15min), 有33%的胚胎死亡, 发育至囊胚晚期(受精后20h 30min), 60%的胚胎死亡, 发育至原肠早期(受精后23h 10min), 只剩下25%左右的活胚, 进入原肠期后, 胚胎死亡数减少, 但仍在继续死亡, 当发育至原肠晚期(受精后26h 10min), 只剩下10—15%的活胚。在以后的发育中, 大约每过2h, 剩余胚胎约有7%死亡, 一直发育至体节出现期(受精后56h 40min), 胚胎全部死亡。所以, 在14—16℃的低温下, 草鱼胚胎不能正常发育, 没有HGC的产生, 更不可能有酶的形成和释放。16—

18℃，只有胚胎总数的30%能正常发育脱膜。当发育至原肠期(受精后20h 30min)，有半数胚胎死亡，以后死亡个数逐渐减少。18—20℃，胚胎总数的70%能正常发育。低温条件下，酶形成情况与水温、发育时间的关系可见表1。

草鱼胚胎发育的最低临界温度为16℃，16℃以下，胚胎孵化率为0，在16—20℃的低温条件下，胚胎发育缓慢，死亡率及致畸率随温度降低而升高，HGC形成、释放孵化酶的速度，随温度降低而减慢，胚胎孵化率也随温度降低而降低。

2.4 正常胚胎与畸形胚胎孵化腺细胞形态结构及孵化酶形成、释放的比较以及畸形胚胎不能脱膜的原因

鱼类胚胎发育产生畸形的原因非常复杂，有内在原因，也有外在原因^[1]。内在原因主要来自卵子的“过熟”或“衰老”的精子，而外在原因则与水温、pH值和溶氧量等环境因素有关。水温过高或过低是造成鱼胚畸形的重要原因，水温31℃以上或18℃以下极易形成畸形胚胎。在孵化期最常见的畸形胚胎是弓背或弯尾，同时卵黄囊的形成也不能与胚胎的伸直相适应，一直维持在神经胚期的椭圆形结构。所以，弓背、弯尾和卵黄囊膨大是畸形胚胎的三大特点。作者经过两年来的实验研究，发现草鱼孵化期的畸形胚胎不论是何种因素所造成，头部表皮细胞都不分化为HGC或HGC分化不完全，酶分泌活动受阻，胚胎发育速度与脱膜时间不能保持一致，孵化酶对卵膜的溶解作用不能及时跟上，胚胎不能破膜而出，导致中途死亡于膜内，这与刘筠^[1]报道的情况相同。光镜观察，可以看到，畸形胚胎头部被PAS染色法染成红色的HGC数量很少，零星地散布在表皮细胞中，而且HGC内被染成红色的物质也很少，HGC形状不规则。透射电镜观察，则可更清晰地观察到畸形胚胎的HGC形态结构与正常胚胎的不同之处：

(1) HGC排列不规则：正常胚胎的HGC，紧密而整齐地排列在鱼胚头部表面，成单层；而畸形胚胎的HGC不是排列成单层，而是集中而重叠地堆积在某个窄小的区域(图版II: 19)。这种排列方式大大缩小了HGC直接与外界的接触面积，不利于酶的外排。(2)酶原颗粒形状畸形：正常胚胎酶原颗粒充满后，呈饱满的圆形或椭圆形，外有膜包围；畸形胚胎的酶原颗粒大部分没有充满，在膜与酶之间可以清楚地看到一段空隙(图版II: 13)，所以，即使有少量酶原颗粒的释放，其内所含的酶量也是极有限的，不能满足脱膜的要求。(3)酶原颗粒数量稀少：正常胚胎酶原颗粒数量多，且集中于细胞的中上部，核被挤到细胞的基部，畸形胚胎的酶原颗粒数量少，位于细胞的一侧，核位于另一侧，二者并列排列(图版II: 17)，这样也不利于酶的排放。(4)HGC不能移至胚胎表面：正常胚胎在分泌期，HGC已迁移至胚胎的表面，而畸形胚胎HGC始终不能迁移至胚胎的最表面，上面总有一层较厚的结构覆盖(图版II: 17)，这就大大阻碍了酶颗粒的分泌。表面扫描则可看到，孵化前期畸形胚胎在形成HGC的表面，在某个窄小的区域内，表皮细胞中央向外鼓起，形成较小的花状突起(图版I: 11)，它们明显小于正常胚胎迁移期所形成的突起。发育至分泌期，表皮细胞中央向外明显突出，小的花状突起发展为大的突起，但是始终看不到或极少见到表皮与外界形成的开口(图版I: 12)。这说明畸形胚胎虽然也有HGC的形成，但没有或很少有酶的分泌活动。当然，正常胚胎由于温度过低(20℃以下)，脱膜速度也不能与胚胎发育时序同步。但正常胚胎仍有正常HGC的产生和分化，仅由于温度过低的原因，HGC产生、分泌酶的速度大大减

慢, 孵化酶对卵膜的溶解减薄作用不能跟上胚胎发育的速度, 以致胚胎不能破膜而出, 中途死亡于膜内。这与畸形胚胎不分化或分化为畸形的HGC不同。

参 考 文 献

- [1] 刘筠, 中国养殖鱼类繁殖生理学。第87—89页, 北京: 农业出版社。1993。
- [2] 张天荫, 动物胚胎的孵化。动物学通报, 1990, 11: 19—20。
- [3] 张天荫等, 鲤胚胎孵化腺细胞。水生生物学报, 1991, 15(1): 53—56。
- [4] 楼允东, 鱼类的孵化酶。动物学杂志, 1965, 7(3): 97—101。
- [5] Schools, A. F. M.; Opstelten, R. J. G. and Denuce, J. M. Hatching in the pike *Esox Lucius* L: Evidence for a single hatching enzyme and its immunocytochemical localization in specialized hatching gland cells. *Dev Biol.* 1982, 89(1): 48—55.
- [6] Yamamoto, M. Hatching gland and hatching enzyme. In: *Medaka (killifish) Biology and Strain*. T. Yamamoto, ed. Keigaku Publio. Co. Tokyo. pp. 73—79. 1975.
- [7] Yamamoto, M.; Iuchi, I. and Yamagami, K. Ultrastructural changes of the teleostean hatching gland cell during natural and electrically induced precocious secretion. *Dev Biol.* 1979, 68: 162—174.
- [8] Perry, M. M. and Waddington, C. H. The ultrastructure of the cement gland in *Xenopus laevis*. *J. Cell. Sci.* 1966, 1: 193—200.

THE ULTRASTRUCTURE RESEARCH OF THE HATCHING GLAND CELL OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) AND THE FORMING AND SECRETING OF HATCHING ENZYME

Wang Ronghui

(Institute of Biology, Hunan, Changsha, 410081)

Abstract

The hatching gland of the grass carp was unicellular and originated from the ectoderm. The hatching gland cell (HGCs) were mainly located in the head end in the joint region between head and yolk sac, especially in the ventral below the eyes. The period of forming and secreting of the enzyme showed a pattern of some regularities, and could be divided into five stages: pr-formation stage, movable stage, secretory stage, degenerative stage and disappearing stage. The deformed embryo had little differentiation of HGC or with incomplete differentiation.

Key words Grass carp, Hatching gland cell, Hatching enzyme, Ultrastructure

图 版 说 明

图 版 I

1. 示位于眼睛腹下方的 HGC (箭头), $\times 85$; 2. 示 HGC 的位置, 3. 箭头示 HGC $\times 850$; 4. 形成前期 HGC 区的表皮细胞的扫描电镜, $\times 2000$; 5. 示 HGC 区的表皮细胞呈花状突起, $\times 2000$; 6. 肌肉效应期 HGC 超微结构, 箭头示酶颗粒, $\times 8000$; 7. 孵化前期 HGC 超微结构, $\times 10000$; 8. 消失期 HGC 区表皮细胞的扫描电镜, $\times 2000$; 9. 示 HGC 在胚胎表面的开口, $\times 2000$; 10. 示完成分泌作用后 HGC 区的表皮细胞, $\times 2000$; 11. 畸胎孵化前期表皮细胞表面小的花状突起, $\times 2000$; 12. 畸胎分泌期表皮细胞表面大的花状突起, $\times 2000$

1. The arrow indicating the HGCs located in the ventral below eyes. $\times 85$; 2. The arrow indicating the location of HGCs. 3. The arrow indicating HGC. $\times 850$; 4. SEM of the epidermal cells in the HGC region at the pr-formation stage. $\times 2000$; 5. SEM of the flower-like processes on the surface of the epidermal cell in HGC region. $\times 2000$; 6. Ultrastructure of HGC at the muscle-effect stage. The arrow indicating enzyme granules. $\times 8000$; 7. Ultrastructure of HGC before hatching. $\times 10000$; 8. SEM of the epidermal cells in the HGC region at the disappearing stage. $\times 2000$; 9. The cavities of HGC on the surface of embryo. $\times 2000$; 10. SEM of the epidermal cells in the HGC region after secretion. $\times 2000$; 11. SEM of the small flower-like processes in the surface of the epidermal cell of deformed embryo before hatching. $\times 2000$; 12. SEM of the big flower-like processes in the surface of the epidermal cell of deformed embryo at the secreting stage. $\times 2000$

图 版 II

13. 畸形的酶颗粒, $\times 8000$; 14. 箭头示酶颗粒排放过程, $\times 10000$; 15. 眼色素出现中期的 HGC, $\times 10000$; 16. 退化中的 HGC, $\times 10000$; 17. 畸胎 HGC 的超微结构, $\times 8000$; 18. 示出膜 1-2hr HGC 超微结构, $\times 8000$; 19. 示排列畸形的 HGC, $\times 4000$
13. The deformed enzyme granules. $\times 8000$; 14. The arrow indicating the secreting of enzyme granules. $\times 10000$; 15. HGC at the middle stage of eye pigment. $\times 10000$; 16. The degenerating HGC. $\times 10000$; 17. Ultrastructure of HGC of deformed embryo. $\times 8000$; 18. 1-2 hours after hatching showing, ultrastructure of HGC. $\times 8000$; 19. Showing HGCs in disordered arrangement. $\times 4000$