

催产时鳊卵磷酸酶活性的变化 及其与排卵的关系

周定刚 郑维明 钟妮娜

(四川农业大学, 雅安 625000)

提 要

本实验采用 Gomori 组织化学法和磷酸苯二钠法, 分别检测黄鳊卵 ALP、ACP 的细胞定位和活性变化。结果表明, 催产后 72h, ALP 活性显著高于临近注射时(Oh), 催产后 48h 和 96h ($p < 0.05$); 临产前(催产后 96h), ACP 活性极显著高于试验组其它各时程 ($p < 0.01$)。提示 ALP 和 ACP 活性增强与卵母细胞成熟、排放有直接关系。本研究为探索排卵机制提供资料。

关键词 催产, 磷酸酶活性, 排卵

排卵是多因素控制的生理活动过程, 其机理至今仍不十分明了。关于下丘脑-垂体-性腺轴对鱼类排卵的调控作用, 国内外已有不少报道, 但也有资料认为滤泡破裂和卵母细胞游离排出并不受垂体支配^[1]。因此, 研究激素与酶, 尤其是酶与排卵的关系, 是探索排卵机制的重要途径。超微结构的研究证实, 某些硬骨鱼类接近排卵时, 其鞘膜细胞内存在微丝等收缩成分; 滤泡细胞和卵母细胞的微绒毛要各自从卵膜上缩回, 并在滤泡和卵膜之间形成空隙^[2-4]。Oshiro 等(1975)观察到, 排卵前已完成胚泡破裂(GVBD)的泥鳅, 其卵母细胞周围具有蛋白酶活性, 此活性并不存在于尚未成熟的卵母细胞^[5], 揭示鱼类卵母细胞的成熟、排放可能也包含有蛋白酶的作用。至于磷酸酶与排卵的关系, 国外未见报道, 在我国与此有关的研究仅局限于金鱼、草鱼等少数鲤科鱼类^[6,7]。因此, 仍需积累大量资料才能对该种酶类在排卵中的作用作出较为准确的论证。本文以黄鳊为研究对象, 目的在于探索催产过程中碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)的活性变化规律, 及其与卵母细胞成熟、排放之间的关系, 以有助于了解排卵机制。

材料与方法

1990 年 6 月, 于黄鳊繁殖季节随机选择性成熟亲鳊 90 尾, 分为试验组和对照组。试验组按 $0.3\mu\text{g/g}$ 体重剂量注射 LHRH-A, 对照组仅注射生理盐水。

• 四川省科委应用基础理论资助项目。
1991 年 1 月 4 日收到。

分别于临近注射时(Oh)、催产后 24h、48h、72h 和 96h(临产前或排卵时)及排卵后采取新鲜卵样,冰冻切片(8—10 μ m),按 Gomori 组织化学方法检测 ALP 和 ACP 的细胞定位及活性变化。供生化测定的卵样,称取 0.5g,置组织均浆器内磨碎,加生理盐水稀释至 5ml,低温离心 40min(3000r/min, 4 $^{\circ}$ C),取上清液按磷酸苯二钠法测定 ALP 和 ACP 活性。

用 F 检验、q 检验和 t 检验分别比较试验组和对照组各时程间酶活性的差异程度。

结 果

采用 Gomori 组织化学法检测结果,黄鳝卵母细胞的 ALP 定位于滤泡细胞和放射带,ACP 仅定位于滤泡细胞中。据观察,临近注射时(Oh),ALP 和 ACP 均呈弱阳性反应(图版 I :1,4)。催产后 72h,滤泡膜和放射带内 ALP 活性显著增强(图版 I :2),排卵后明显减弱(图版 I :3)。ACP 活性,在催产 72h 内无明显变化,直到临产前(催产后 96h)才显著增强(图版 I :5),排卵后又明显减弱(图版 I :6)。

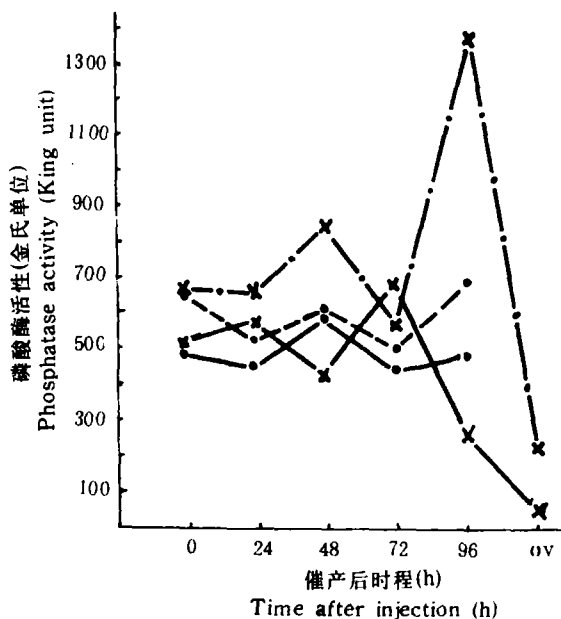


图1 催产后不同时期和磷酸酶活性变化的关系
Fig. 1 Relationship between phosphatase activity and time after injection

— · — · — · —
试验组 Treatment group (ACP)
- - - - -
对照组 Control group (ACP)
— × —
试验组 Treatment group (ALP)
— — —
对照组 Control group (ALP)

本实验生化测定与组化检测结果一致(图1)。ALP 活性,经统计学检验表明:(1)对照组各时程间无显著差异($p > 0.05$),试验组差异极显著($p < 0.01$);(2)催产后 72h,试验组 ALP 活性显著高于临近注射时(Oh)、催产后 48h、96h 和对照组($p < 0.05$);(3)排卵后,ALP 活性极显著低于试验组其它各时程($p < 0.01$)。

ACP 活性,经统计学检验结果:(1)对照组各时程间差异不显著($p > 0.05$),试验组存在极显著差异($p < 0.01$);(2)临产前(催产后 96h),ACP 活性高于对照组($p < 0.01$),极显著高于试验组其它各时程($p < 0.01$);(3)Oh、催产后 24h、48h 和 72h,ACP 活性无显著差异($p > 0.05$);(4)排卵后,ACP 活性明显减弱($p < 0.05$)。

讨 论

(一)关于 ALP 的作用问题

本研究表明,ALP 和 ACP 在黄鳝卵母细胞的分布部位和活性变化不尽相同,提示这两种酶可能具有不同的功能。据观察,ALP 活性不仅显示于滤泡膜而且亦显现于放射纹(图版 I:1,2),这与前人在草鱼的观察结果一致^[6]。黄鳝的放射纹是卵母细胞的微绒毛和滤泡细胞的突起相互伸入所形成^[8]。放射纹呈现 ALP 活性,可视为该酶定位于微绒毛的佐证。ALP 不仅定位于卵母细胞的微绒毛,而且也定位在其他动物的肾小管、肠粘膜和胎盘的微绒毛上^[9]。根据微绒毛的作用可以推测,ALP 的功能之一可能是加速物质的摄取和转运。据 Пехливанов(1989)报道,在活体内碱性磷酸酶作为磷蛋白磷酸酶起作用^[9]。磷蛋白磷酸酶可催化卵黄高磷蛋白脱磷酸化^[10],可见 ALP 与卵黄物质代谢有一定联系。据前人研究,鲫鱼第Ⅲ和第Ⅳ期卵母细胞外的滤泡膜均呈现极强的碱性磷酸酶反应^[11]。从本实验结果看,临近注射时(Oh),鳙卵的卵黄物质已积累到一定程度,滤泡膜和放射纹相应呈现 ALP 阳性反应(图版 I:1);催产后 72h,卵黄物质进一步积累,卵母细胞接近最终成熟,其 ALP 活性显著增强($p < 0.05$);排卵后,卵黄发生已告结束,卵母细胞达到最终成熟,ALP 活性又明显减弱($p < 0.01$)。表明 ALP 活性变化是与卵黄物质的代谢和卵母细胞的成熟过程相适应的。ALP 是一组催化磷酸单酯水解的酶类,在碱性条件下可使磷酸单酯水解生成乙醇和磷酸。ALP 活性增强,则可为 ATP 磷酸化形成 ATP 提供更多所需的无机磷酸。这与卵母细胞内线粒体所参与的物质氧化,以及微绒毛上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶所实现的主动转运机能有着直接、间接的关系。从以上可以看出,ALP 在卵母细胞成熟过程中,可能间接起着加速卵黄物质代谢和运输的作用。关于 ALP 的作用,本文以上观点与前人看法有所不同。曹泳清等认为,“卵泡细胞中碱性磷酸酶有利于激素的吸收和运转,因而有助于排卵”^[7]。我们认为,根据前人对金鱼所做工作,虽然可以明显看出具有诱导排卵能力的某些类固醇激素,一般都有提高卵泡细胞中 ALP 活性的功能。但是,ALP 活性增强反而会促进类固醇激素吸收、转运,似乎还需得到包括金鱼在内的相应实验的支持和印证。

(二)关于 ACP 与排卵的关系

有关 ACP,前人对金鱼未作研究;在鲫鱼未测出该酶活性(石腊切片);在草鱼已有一些报道(中科院动物所内分泌研究室细胞组和长江所养殖研究室生殖组,1977;傅朝碧等,1983)。本文的组化检测结果与前人的报告一致^[6],但酶活性变化的观察结论不尽相同。据傅朝碧等报道,草鱼“从第一次临近注射激素开始,直到临产前,ACP 的活性持续上升”^[6]。而本文对黄鳝的观察结果是,只有排卵时(或临产前),ACP 活性才极显著增强($p < 0.01$),此阶段前其活性并无显著差异($p > 0.05$)。本文与前人所得结果不同,可能有以下原因:(1)不同种属鱼类,ACP 活性或许存在差异;(2)傅朝碧等虽对临产前草鱼卵样作过定性、定位检测,但未取该期卵样进行酶活性的生化测定,与其它各期缺乏定量比较,这对观察结果是有影响的;(3)在草鱼,整个试验未设对照组,试验组中的观察数据亦未经显著性检验,这也许会影响其结论的可靠程度。

据本实验检测,黄鳍的 ACP 仅定位于滤泡细胞,放射纹无此酶活性(图版 1:4—6)。如前所述,其活性只有在临产前或排卵时才极显著增强,说明它与排卵有密切联系。ACP 是细胞溶酶体的标志酶,它虽能催化磷酸单酯水解,但目前尚无依据证明它能直接分解消化滤泡的脂蛋白膜。有鉴于此,作者认为 ACP 活性增强,其作用之一是使溶酶体膜脆性增加或透性改变;当溶酶体膜在细胞内破裂时,溶酶体所释放的多种酶类,例如,磷脂酶、蛋白酶等则将整个滤泡细胞消化,从而使成熟卵子通过破裂的滤泡排出。这一推断是否正确,还有待今后实验论证。

参 考 文 献

- [1] B. J. 哈维和 W. S. 霍尔著,林浩然,林鼎译。鱼类人工诱导繁殖的理论和实践。北京:农业出版社,1984:1—64。
- [2] Hirose K. The ultrastructure of the ovarian follicle of medaka, *Oryzias latipes*, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 1972, **123**:316—329.
- [3] Iwamatsu T, Ohta T. Fine structure of loach oocytes during maturation *in vitro*. *Dev., Growth Differ.*, 1977, **19**:213—226.
- [4] Pendergrass P, Schroeder P. The ultrastructure of the thecal cell of the teleost, *Oryzias latipes*, during ovulation *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 1976, **47**:229—233.
- [5] Oshiro T., Hibiya T. Presence of ovulation-inducing enzymes in ovarian follicle of loach. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 1975, **41**:115.
- [6] 傅朝碧等。草鱼卵球成熟、排放与碱性磷酸酶、酸性磷酸酶关系的研究。淡水渔业,1983,(1):24—26。
- [7] 曹泳清等。激素与碱性磷酸酶的关系及其在鱼类排卵中的作用。科学通报,1963,(6):59—63。
- [8] 刘修业等。黄鳍性逆转时生殖腺的组织学与超微结构的变化。水生生物学报,1990, **14**(2):166—169。
- [9] Бл. Пехливанов, Т. Цветкова, Т. Липерков, М. Чичовска. ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА [ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ] Лабораторное дело, 1989, **11**:4—7.
- [10] L. 特雷格著,邹继超译。类固醇激素生物合成代谢作用。北京:科学出版社,1980:155—212。
- [11] 朱洪文,李新人。鲫鱼卵发生过程中细胞学和组织化学的研究。动物学报,1963, **15**(3):348—353。

RELATIONSHIP BETWEEN OOCYTE PHOSPHATASE ACTIVITY AND OVULATION AFTER INDUCED SPAWNING IN *MONOPTERUS ALBUS*

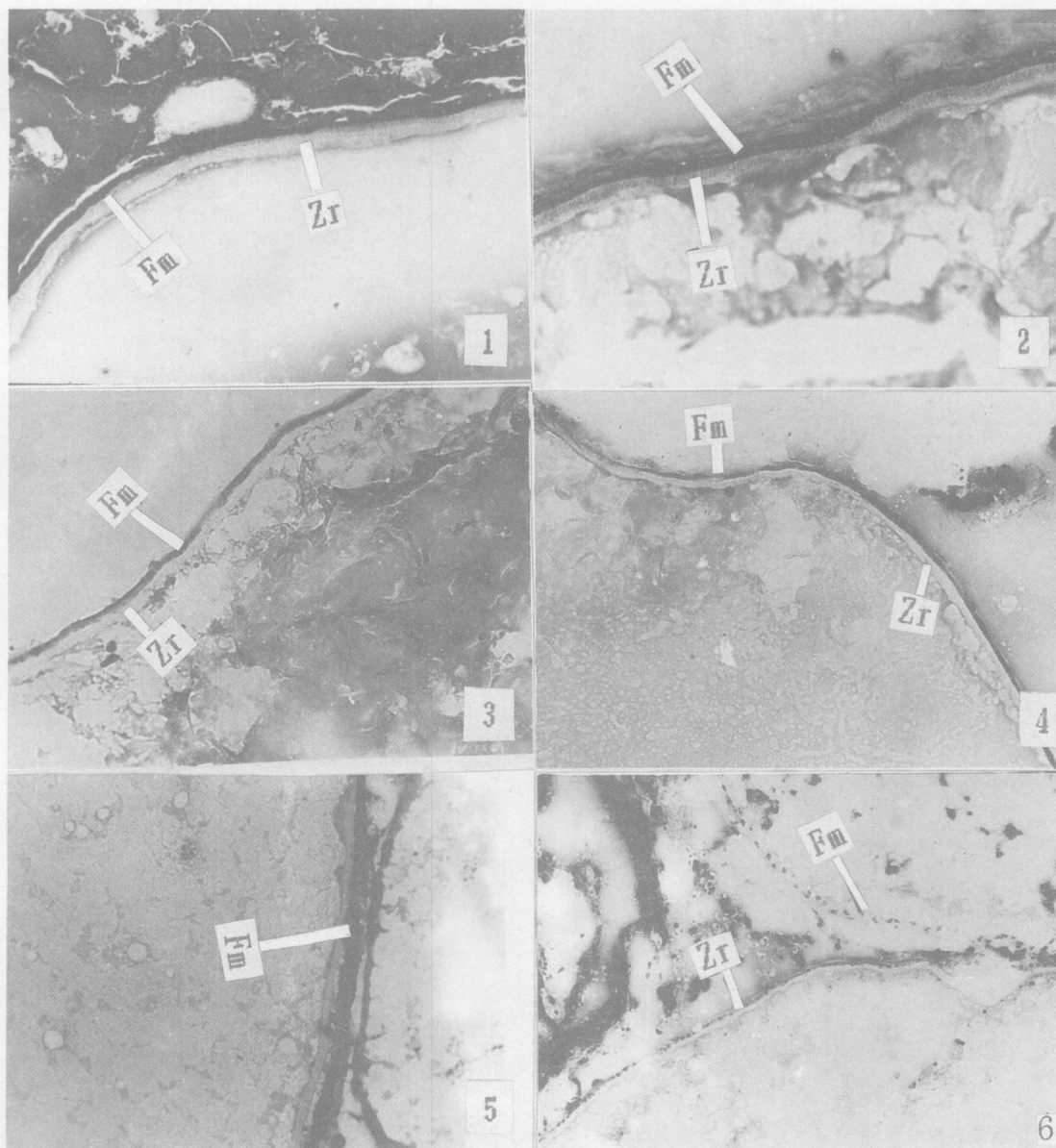
Zhou Dinggang Zheng Weiming and Zhong Nina

(Sichuan Agricultural University, Yaan 625000)

Abstract

Ninety sexually mature fish (*Monopterus albus*) were selected and divided into the experimental and control group. After LHRH-A was injected, the enzyme sites and changes in the activity of the alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) in the oocytes of *M. albus* were determined using Gomori histochemical method and king-Altman method, respectively. The result shows that ALP is located in the folliculi and zona radiata while ACP is located only in the folliculi. When the oocytes are reaching final maturation (72 hours after injection), ALP activity in the experimental group is significantly higher than that in the control group ($p < 0.01$). In the experimental group, the ALP activity of 72 h is also significantly higher than that at 0, 48 and 96 h after injection ($p < 0.05$). Prior to spawning (96 hours after injection), ACP activity in the experimental group is higher than that in the control group ($p < 0.01$); it is also significantly higher than that in the experimental group at other times ($p < 0.01$). Both ALP activity and ACP activity decrease significantly after spawning ($p < 0.05$). It is suggested that the increase in ALP and ACP activity bears direct relationship to the maturation and spawning of oocytes after injection.

Key words Induced spawning, Phosphatase activity, Ovulation



图示黄鳊卵母细胞的一部分, 示滤泡膜(Fm)和放射带(Zr)磷酸酶活性。1. 示临近注射时(Oh)滤泡膜和放射带 ALP 阳性反应, $\times 2430$; 2. 示催产后 72h, 滤泡膜和放射带 ALP 活性显著增强, $\times 2430$; 3. 示排卵后, 放射带 ALP 活性明显减弱, $\times 1215$; 4. 示临近注射时(Oh), 滤泡膜 ACP 阳性反应, $\times 1215$; 5. 示临产前(催产后 96h)滤泡膜 ACP 活性显著增强, $\times 1215$; 6. 示排卵后, ACP 活性明显减弱, $\times 1215$

Part of the oocyte in *M. albus*, showing phosphatase activity at the folliculus membrane (Fm) and zona radiata (Zr), 1. Positive reaction of ALP on folliculus membrane (Fm) and zona radiata (Zr) at O h (just before injection), $\times 2430$; 2. ALP activity on Fm and Zr increased significantly 72 h after injection, $\times 2430$; 3. ALP activity on Zr decreased after ovulation, $\times 1215$; 4. Positive reaction of ACP on Fm at O h, $\times 1215$; 5. ACP activity increased on Fm significantly prior to spawning (96 h after injection), $\times 1215$; 6. ACP activity on Fm decreased after ovulation, $\times 1215$