

鲤 胚 胎 孵 化 腺 细 胞¹⁾

张天荫 翟玉梅 封树芒 潘忠宗 刘廷礼²⁾

(山东大学生物系, 济南 250100)

提 要

鲤胚胎孵化腺为单细胞腺体, 发生于外胚层, 可特异地被 PAS 染色。最早可在眼色素期检验出孵化腺细胞 (Hatching gland cell, HGC) 它们主要分布在头部腹面及头部与卵黄囊连接处。开始, HGC 位于表皮细胞下面, 随发育迁移到胚胎表面。根据扫描和透射电镜观察, 在分泌孵化酶的前后, HGC 区表面细胞呈鸡冠花状和疣状两种突起。前者系 HGC 处于分泌孵化酶期间; 后者系 HGC 业已完成分泌作用, 由于相邻的表皮细胞活动而形成的。HGC 内富有粗面内质网、线粒体、核糖体和高尔基体, 并由后者合成酶原颗粒。HGC 在完成分泌作用后, 仍留在表皮中, 以后逐渐退化, 但在孵化后 30h 仍可见残留的 HGC。

关键词 鲤, 孵化腺细胞, 亚显微结构

与鱼类胚胎孵化有关的因素很多, 但主要是依靠胚胎本身孵化腺细胞 (Hatching gland cell, HGC) 分泌的孵化酶。对此, 曾有一些学者作了综述^[3,5,10]。从光镜水平对不同鱼类胚胎 HGC 的发生和形态特征有许多论述, 但从亚显微结构阐明鱼类胚胎 HGC 的发生和特征, 仅在几种鱼类有所报道^[6-9]。

本文是对鲤 (*Cyprinus capio*) 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。

材 料 和 方 法

自然受精的鲤卵在室温 (20—24℃) 下培养。发育时期是参照白鲢^[2]和鲫鱼以及金鱼^[4]的发育时期表, 根据鲤胚胎主要器官发生的特点去壳膜 (chorion) 后固定。光镜部分用 Bouin 氏液固定, 常规石蜡包埋, 切片 7μm, PAS 和 Mayer 氏酸性苏木精染色。扫描电镜部分以 4% 戊二醛固定, 制作样品前以磷酸盐缓冲液洗几次后, 以 1% 铼酸固定 0.5h, 梯度酒精脱水, 醋酸异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥, 喷镀, 置 Hitachi S 450 扫描电镜观察。透射电镜材料亦以 4% 戊二醛固定, 包埋前经磷酸盐缓冲液洗几次后, 以 1% 铼酸固定 1h, 经梯度酒精脱水, Epon 812 包埋, 超薄切片, 醋酸铀和枸橼酸铅双染色, 置 JEM 100 CX II 透射电镜观察。

1) 实验材料由山东省淡水研究所提供, 扫描电镜由沈阳农业大学电镜室协助拍摄, 一并致谢。

2) 刘廷礼在本校实验中心工作。

1988 年 4 月 8 日收到。

结 果

光镜部分

利用 PAS 染色法能明显地在胚胎表皮细胞中区分出 HGC, 后者特异地被染成红色(图版 I:1)。根据这一特点, HGC 最早可在眼色素期(受精后 42—43h)看到, 当胚胎发育到体色素期(受精后 64—65h) HGC 数达到最大, 约有 1 600—2 000 个。它们主要位于头部腹面的表皮中, 为单细胞腺体, 呈椭圆形, 长径为 14—20 μm , 短径为 9—14 μm , 其外覆盖一薄层的表皮细胞。HGC 细胞内充满圆形或椭圆形、呈 PAS 阳性的颗粒, 颗粒直径为 1.5—4 μm 之间(图版 I:2)。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, 核仁常位于核的中央。在孵化前, HGC 主要集中于头部腹面和头部以及卵黄囊连接处, 但有少量分散于心区和卵黄囊表皮中。在孵化后 30h, 在上述地区还能见到残余的 HGC (图版 I:3)。

电镜部分

1. 扫描电镜 在受精后 30h 发育到心跳期胚胎的表皮没有见到 HGC, 此时在将形成 HGC 区的表皮细胞表面呈相互交织的嵴状突起(图版 I:4)。发育到眼色素期, 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似一鸡冠花状突起(图版 I:5)。到体色素期, HGC 区的表皮细胞形成的突起有两种情况: 有的仍似鸡冠花状; 有的则呈大的疣状突起(图版 I:6)。根据超薄切片观察, 前者的 HGC 正处于向胚胎表面迁移或已位于表面(图版 I:7); 后者是 HGC 已完成其分泌作用, 被表皮细胞包在里面, 因而在胚胎表面成为一个大的疣状突起(图版 I:8)。此外, 还在体色素后期接近孵化时, 看到 HGC 在刚完成其分泌作用后在表面留下一个大的凹陷(图版 II:9)。在孵化后几小时, HGC 区的表皮细胞仍呈疣状突起(图版 II:10), 超薄切片表明, 这种突起完全由表皮细胞本身所形成, 在此细胞突起内可见许多微丝束(图版 II:11), 这些情况可能表明了在孵化前后, 位于 HGC 区的表皮细胞具有高度活动的能力。

2. 透射电镜 HGC 无论处于开始分化的眼色素期, 还是正在完成其分泌过程的孵化期, 整个 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。在 HGC 之间由表皮细胞形成的薄层相间隔。HGC 的核位于细胞基部, 呈椭圆形, 核的四周和中央有许多异染色质, 在核的上方有许多高尔基体、线粒体、粗面内质网和处于不同合成时期的酶原颗粒。此外, 在细胞四周还有大量的粗面内质网。在这些内质网表面密布着大量核糖体, 池内有致密的絮状物(图版 II:12)。在不同发育时期的 HGC 内均可见到高尔基体正在合成酶原颗粒的情况(图版 II:12)。因此, 在同一 HGC 中酶原颗粒的电子致密度是不一致的, 这表明它有一成熟过程。在每一个酶原颗粒外面均有膜包围, 颗粒之间有明显的界限。在胚胎发育到体色素期, 酶原颗粒充满了整个 HGC 中。

在体色素晚期, 部分 HGC 已迁移到胚胎表面, 酶原颗粒的膜开始部分消失, 颗粒彼此相连; 有部分 HGC 已开始从其细胞顶部向外释放其酶原颗粒。在胚胎孵化期, 业已完成分泌作用的 HGC 还留有少量的酶原颗粒(图版 I:8)。HGC 分泌作用完成后, 在

细胞内还有大量的线粒体, 它们常呈长柱状, 体积也较大(图版 II:13), 有时还能见到个别线粒体几乎贯穿于整个细胞之中。此外, 还有粗面内质网, 高尔基体和剩余的酶原颗粒。HGC 与其相邻的表皮细胞有许多桥粒连接(图版 II:13)。在孵化后 8h, HGC 均离开胚胎表面, 位于表皮细胞下面, 同时呈现出退化迹象: 核内异染色质大量增加, 溶酶体出现, 细胞器明显减少, 核质比例变小(图版 II:14)。至于 HGC 何时消失, 我们没有追溯下去。

讨 论

鲤 HGC 发生于胚胎的外胚层, 主要分布于头部腹面以及头部与卵黄囊连接处, 其数量随胚胎发育而增多。在各发育时期都没有见到有分裂相的 HGC, 这与其它鱼类是相同的^[7]。根据 PAS 染色可以明显地将 HGC 和其它细胞区分开, 并没有发现像 Oiji 和 Iga(1961)^[7] 报道的不同发育时期对同一染色方法有不同的染色反应。这也许由于我们采用不同的染色方法所致。

与许多鱼类一样^[9,11], 鲤 HGC 也位于表皮细胞下面, 随发育迁移到胚胎表面。在此过程中, 由于表皮细胞表面呈相互交织的嵴状突起, 当 HGC 逐渐向上迁移时, 致使该区的表皮细胞向外鼓起而成为鸡冠花状突起。到体色素期, 由于 HGC 不断长大使覆盖其上的一薄层表皮细胞彼此分开, 或利用表皮细胞之间的间隙导致 HGC 顶部直接位于胚胎表面, 以便使酶原颗粒直接分泌到卵周隙中。Yamamoto 等(1979)在青鳉 (*Oryzias latipes*) 曾提出相似的意见。根据扫描和透射电镜观察, 认为胚胎发育到体色素晚期, 即在孵化前 6—7h, HGC 就已开始分泌其孵化酶。在胚胎孵化时, 仍有部分 HGC 在分泌其孵化酶。所以, 鲤 HGC 的分泌孵化酶是陆续进行的。当 HGC 完成其分泌作用后, 在该处留下一个凹陷, 由于其相邻表皮细胞的活动把残留的 HGC 包裹起来, 以致在胚胎表面成为一个大的疣状突起。这种突起也可由表皮细胞本身所形成。这些情况大约是与表皮细胞内富有微丝有关, 这点与青鳉胚胎表皮细胞中有许多张力丝 (Tonofilament) 相似的。鲤与其它鱼类一样, HGC 内富有粗面内质网、线粒体、核糖体和高尔基体, 同样酶原颗粒也是由高尔基体合成的^[11]。在不同的发育时期, 都能看到 HGC 内高尔基体正在合成酶原颗粒, 所以在每一个 HGC 内的酶原颗粒的电子致密度是不一致的, 这表明酶原颗粒有一个成熟过程, 这与许多学者的报道是一致的^[11]。

鲤的 HGC 在完成其分泌作用后, 与白斑狗鱼 (*Eoxys lucius* L.) 一样仍留在胚胎表皮中^[9]。在孵化期鲤的 HGC 与表皮细胞之间有许多桥粒连接, 这就从结构上也正说明了这点。而鲑科鱼 (*Salmonoids*) HGC 在分泌作用完成后与表皮细胞脱离而消失^[11]。这可能与 Bouvet (1976)^[4] 在鳟 (*Salmo trutta* fario L.) 发现胚胎孵化时其表皮 (periderm) 要从胚胎表面脱落有关。至于鲤 HGC 的退化大约与细胞内逐渐出现溶酶体有关, 也许与细胞内剩余的酶原颗粒有关。后一原因 Shoots 等 (1982)^[9] 白斑在狗鱼 HGC 退化时曾提出过。

参 考 文 献

- [1] 李璞等, 1959。鲤鱼和金鱼胚胎发育的分期。动物学报, 11(2): 145—157。
- [2] 曲淑惠等, 1980。动物胚胎学。267—268页。高等教育出版社。
- [3] 楼允东, 1965。鱼类的孵化酶。动物学杂志, 7(3): 97—101。
- [4] Bouvet, J., 1976 Enveloping layer and periderm of the trout embryo (*Salmo trutta* fario L.). *Cell Tiss. Res.* 170: 367—382.
- [5] Ishida, J., 1985. Hatching enzyme: past, present and future. *Zool. Sci.* 2: 1—10.
- [6] Iuchi, I., Yamamoto M., and Yamagami, K., 1982. Presence of active hatching enzyme in the secretory granule of prehatching medaka embryo. *Dev. Growth Diff.* 24(2): 135—143.
- [7] Ouchi, M. and Iga, T., 1961. On the specific affinity to some dyes of granules of the hatching gland cells in carp embryo. *Zool. Mag.* 70(10): 34—38.
- [8] Rosenthal, H. and Iwai, T., 1979. Hatching glands in herring embryo. *Marine Ecol.* 1: 123—127.
- [9] Schoots, A. F. M., Opstelten R. J. G., and Denuse, J. M., 1982. Hatching in the pike *Esox lucius* L.: Evidence for a single hatching enzyme and its immunocytochemical localization in specialized hatching gland cells. *Dev. Biol.* 89(1): 48—55.
- [10] Yamagami, K. M., 1981. Mechanism of hatching in fish: Secretion of hatching enzyme and enzymatic choriolysis. *Amer. Zool.* 21: 459—471.
- [11] Yokoya, S. and Ebina, Y., 1976. Hatching glands in Salmonid fish, *Salmo gairdneri*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis* and *Salvelinus pluvius*. *Cell Tiss. Res.* 172: 529—540.

THE HATCHING GLAND CELL OF CARP (*CYPRINUS CARPIO*) EMBRYO

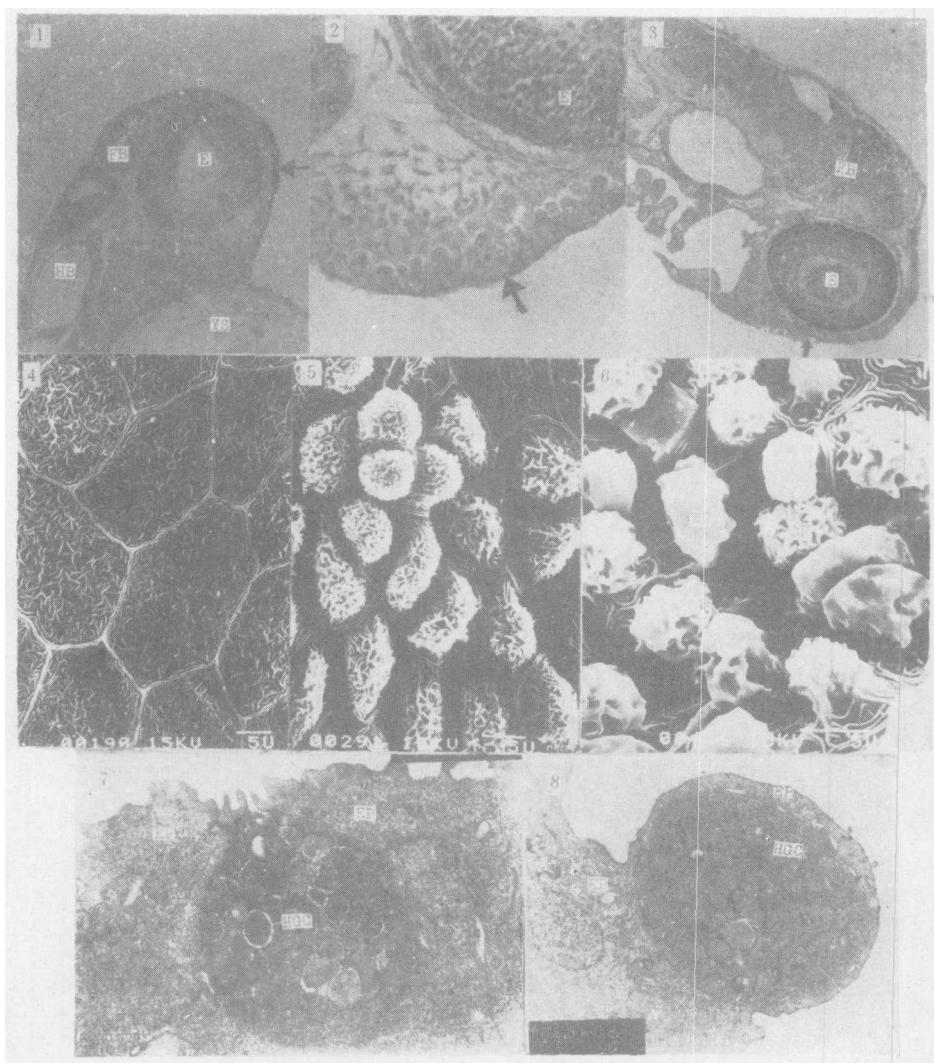
Zhang Tianyin Zhai Yumei Feng Shumang Pan Zhongzong and Liu Tingli

(Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract

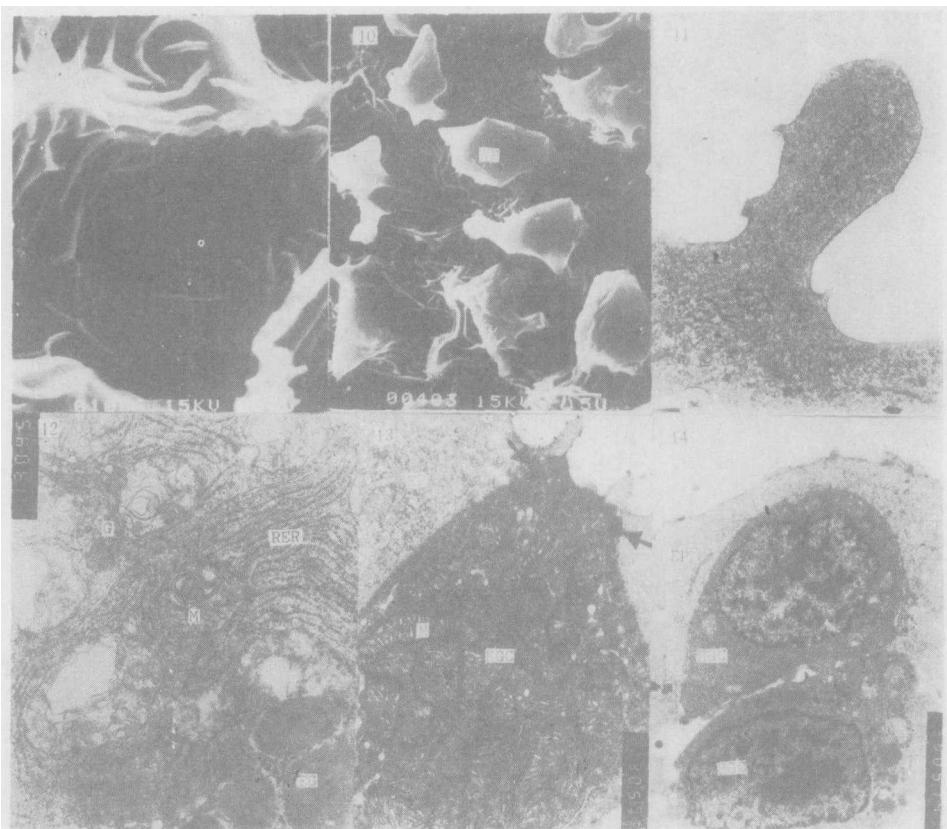
The hatching gland of the carp embryo was an unicellular gland. It originated from the ectoderm. The earliest stage at which the hatching gland cell (HGC) can be detected with PAS specific staining was the eye-pigmented stage. The HGCs were majorly located in the ventral part of the head and in the jointing region between head and yolk sac. Originally, HGCs were beneath the epidermal cells. During development, they migrated to the surface of the embryo. Based on observations with SEM and TEM, the epidermal cells in HGC region had two kinds of processes, one cockscomb-like and the other wart-like before and after the enzyme secretion. The former was present before and during the period of secretion; the latter appeared after the secretion period, and accounted for the movement of the epidermal cells in this region. HGCs were rich in RER, mitochondria, ribosomes and Golgi complexes in which the proenzyme granules were formed. After the period of enzyme secretion, HGCs still remained in the epithelium and gradually degenerated with the development of the embryo. However, they could still be seen 30 hours after hatching.

Key words *Cyprinus carpio*, Hatching gland cell, Ultrastructure.



1. 体色素早期 HGC 呈 PAS 阳性反应(指针),(60×); 眼(E); 前脑(FB); 后脑(HB); 卵黄囊(YS);
 2. 体色素晚期 HGC (指针)(201×); 3. 孵化后, 残余的 HGC (指针)(51×); 4. 心跳期 HGC 区的表皮细胞的扫描电镜; 5. 眼色素期 HGC 区表皮细胞呈鸡冠花状突起; 6. 体色素期 HGC 区表皮细胞的两种突起: 鸡冠花状(CP) 和疣状(WP); 7. 体色素晚期 HGC 正迁移到胚胎表面。表皮细胞(EP) (10K); 8. 完成分泌后的 HGC 被表皮细胞包裹(7.6K)

1. At the early stage of body pigment, HGCs were positive in PAS reaction (60×); Eye (E); Forebrain (FB); Hindbrain (HB); Yolk sac (YS); 2. The arrow showed the HGCs at the late stage of body pigment. (201×); 3. The arrow showed the remnant HGCs after hatching, (51×); 4. SEM of the epidermal cells in the HGC region at the heart-beating stage; 5. SEM of the cockscomb-like processes in the surface of the epidermal cell in HGC region at the stage of eye pigment; 6. At the stage of body pigment, there were two kinds of processes on the surface of the epidermal cell in HGC region: cockscomb-like (CP) and wart-like (WP); 7. At the late stage of body pigment HGCs were migrating to the surface of embryo. Epidermal cell, (EP), (10K); 8. HGC was enclosed by an epidermal cell(EP) after secretion. (7.6 K)



9. HGC 完成分泌后留下的凹陷; 10. 孵化后 HGC 区表皮细胞的疣状突起 (WP); 11. 孵化后表皮细胞突起内有许多微丝束 (8.2K); 12. 体色素早期的 HGC, 指针示高尔基体 (G) 正在合成酶原颗粒 (EG), 粗面内质网 (RER) 池内有絮状物 (31K)。线粒体 (M); 13. 刚孵化 HGC 酶原颗粒均已排完, HGC 与表皮细胞之间的桥粒连接 (指针) (19.2K); 14. 退化中的 HGC (8.1K)

9. The pit left in the surface of a HGC after secretion; 10. The warty processes (WP) of the epidermal cell in the HGC region after hatching; 11. A number of bundles of microfilaments were present in the process of the epidermal cell in HGC region after hatching. (8.2K); 12. The proenzyme granules (EG) were formed by Golgi complex (G) (arrow) and there were flocculent materials in the cisternae of the rough endoplasmic reticulum (RER) in the HGC at the early stage of body pigment. (31K). Mitochondria (M); 13. All the enzyme granules had been released and there were desmosome junctions between the HGC and the epidermal cells (arrow) just after hatching. (19.2K). Mitochondria (M); 14. The degenerating HGCs, Epidermal cell (EP). (8.1K)