

两种发育型鱼类卵母细胞成熟过程中 促精核发育现象的研究*

丁 军 蒋一珪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

采用实验细胞学技术, 比较研究了红鲤精核在雌核发育鱼类(银鲫)和两性融合发育鱼类(红鲤、彩鲫)卵母细胞成熟各阶段中的发育状况, 结果表明: 在两性融合发育鱼类中, 当卵母细胞发育到胚泡破裂期时, 精核开始解凝发育, 及至第一次成熟分裂中期后阶段, 高度解凝的精核才开始原核化, 相应地, 在雌核发育银鲫中, 精核也只有在与胚泡物质接触后, 才能开始解凝, 并且在三极纺锤体形成后期初步原核化, 但与两性融合发育鱼类相比, 精核的原核化程度明显降低。这些实验结果初步揭示, 在两性融合和雌核发育鱼类卵中均可产生促精核解凝和原核化的两类因子(SNDFs 和 SPDFs), 其中 SNDFs 的活性表达起始于卵母细胞胚泡破裂时期, 而 SPDFs 活性则产生于第一次成熟分裂中期后或三极纺锤体形成后阶段, 并且两性融合发育鱼类卵中的 SPDFs 活性远远高于雌核发育鱼类卵母细胞。

关键词 雌核发育银鲫, 两性融合发育鱼类, 卵母细胞, 促精核发育作用, 精核解凝因子, 精核原核化因子

脊椎动物的卵子受精后, 入卵精核的发育经了解凝和原核化两个主要过程^[4,5,6], 对两栖、哺乳类的研究发现, 在卵母细胞成熟过程中, 可逐渐产生促精核解凝和原核化的两类因子^[7,8,9,12,15,16]。类似的研究, 在鱼类中尚未见报道。

我们对雌核发育银鲫卵母细胞成熟过程的细胞学研究发现, 银鲫卵母细胞第一次成熟分裂有其特殊进程, 在整个第一次成熟分裂中没有第一极体外排的现象^[4]。而经历了这种特殊成熟进程的银鲫未受精卵与异源精子受精后, 入卵精核的解凝和原核化进程也受到阻碍^[3], 银鲫卵母细胞的特殊成熟进程与银鲫卵质中促精核发育因子的活性变化是否存在一定的关系值得进一步探讨。

本实验宗旨是通过追踪红鲤精核在雌核发育银鲫和两性融合发育鱼类卵母细胞中的变化情况, 来探讨①鱼类卵母细胞成熟过程中是否产生促精核发育的因子, 其活性变化如何; ②银鲫卵中抑制精核发育的现象与银鲫卵母细胞特殊成熟进程的关系。

* 本研究获国家自然科学基金(3860590)资助。
1988年11月30日收到。

材料及方法

(一) 实验材料及其制备

实验鱼[银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) (♀)、红鲤 (*Cyprinus carpio red variety*) (♀), (♂)、彩鲫 (*Carassius auratus coloured variety*) (♀)] 均取自本所官桥试验场。

1. 精核的制备

采用精子脱膜处理的方法 采集红鲤精液, 以 4—5 倍处理液¹⁾ 处理 13min, 1000r/min 离心 2min, 沉淀物加入稀释液²⁾, 洗涤一次, 再加入少量稀释液, 缓缓搅匀, 配成所需浓度, 于 4℃ 冰箱保存。

2. 成熟各阶段卵母细胞的获取

从注射过垂体激素的鱼(银鲫、彩鲫、红鲤)体内挖卵(每隔 2h 挖一次), 小心将卵移入 Holfreter 液, 挑选发育好的卵母细胞以备进行微量注射。

(二) 实验方法

用微量注射仪吸取少量红鲤精核, 注入上述保存在 Holfreter 液中的卵母细胞动物极内, 然后移至含 Holfreter 液的培养皿中发育 40min, 用 Bouin's 液固定, 连续石蜡切片 (8—10 μ m), De's 苏木精染色, 伊红复染, 光镜观察。

结 果

(一) 红鲤精核在两性融合发育鱼类(红鲤和彩鲫)卵母细胞成熟各阶段中的发育状况

已证实, 两性融合发育鱼类的卵母细胞成熟过程主要经过卵母细胞胚泡破裂前期、卵母细胞胚泡破裂期、成熟单星光和成熟多星光期、第一次成熟分裂中期、第一次成熟分裂后期和末期、第二次成熟分裂中期(卵母细胞成熟)等六个阶段。

1. 卵母细胞胚泡破裂前期 注入的红鲤精核未能与胚泡物质接触, 呈固缩状态, 精核平均直径约为 2.0 μ m (图版 I: 1, 2)。

2. 卵母细胞胚泡破裂期 随着卵母细胞核液大量外溢, 注入精核开始略为解凝, 精核发生形变, 体积有所膨胀, 平均直径约为 3.0 μ m (图版 I: 3)。

3. 卵母细胞从胚泡破裂发育至成熟多星光后期 在同一卵母细胞中, 注入精核有两种发育状态: ①精核处于低程度的解凝状态, 精核体积略比其在卵母细胞胚泡破裂期时大, 并伴随出现微弱星光(图版 I: 4)。②精核处于较明显的解凝状态, 体积更加膨胀, 核内一些染色颗粒隐约可见, 精子星光明显(图版 I: 5—6)。在成熟程度较低的卵中, 多存在第①类精核, 而在成熟程度较高的卵中, 则多存在第②类精核, 由此可见, 卵母细胞中促

1) 处理液: 0.05%, TritonX-100 加入稀释液至 100ml。

2) 稀释液: 4mmol/L CaCl₂ 溶于 0.85% NaCl₂ 溶液中。

精核解凝发育的能力是随卵母细胞成熟度的增高而增加的。

4. 卵母细胞成熟分裂中期 在同一卵母细胞中,注入精核有三种发育状态:① 精核高度解凝,体积显著增大,星光也更加明显,其核内染色颗粒清晰可辨(图版 I:7—9)。② 精核发育成结构松散、着色很淡的染色质团(图版 I:10)。③ 精核呈现初步原核化状态(图版 I:11)。在中期纺锤体形成初期,注入精核的发育状况主要呈现①状态,较少②状态,极少③状态;而在中期纺锤体形成后期,精核发育状况则以②、③状态为主。

5. 卵母细胞成熟后期及末期(第一极体外排前后) 注入精核绝大多数明显原核化,精子星光亦显著发育(图版 I:12)。精原核体积随卵子发育逐渐增加。

6. 在已成熟的卵子中 处于动物极卵质中的精核大部分都能正常原核化,一对星光附着于精原核两端(图版 I:13),精核大小与正常受精发育的雄性原核(图版 I:14)体积相当。

(二) 红鲤精核在银鲫卵母细胞成熟各阶段中的发育状况

已有研究结果表明,银鲫卵母细胞成熟过程主要经过卵母细胞胚泡破裂前期、卵母细胞胚泡破裂期、成熟单星光和成熟多星光期(染色体分三群)、三板纺锤体形成、转变、形成正常中期纺锤体并最终排卵(卵母细胞成熟)等几个阶段:

1. 银鲫卵母细胞胚泡破裂期前 注入精核均处于不解凝状态,精核呈致密点状,平均直径为 $2.0\mu\text{m}$ (图版 II:15)。

2. 卵母细胞胚泡破裂期 随着核液大量外溢,注入精核开始初步解凝,精核体积略为膨胀并发生形变(图版 II:16)。

3. 卵母细胞由成熟单星光发育至三板纺锤体形成初期 注入精核明显解凝,其程度逐渐增高(图版 II:17—19)。

4. 卵母细胞由三板纺锤体转变为正常中期纺锤体并最终排卵 注入精核大部分开始处于高度解凝状态(图版 II:20),也有少数精核分别呈现松散的、着色很淡的染色质团(图版 II:20)和初步原核化的现象(图版 II:21);未观察到精核高度原核化的现象。

5. 银鲫成熟卵中 注入精核一般均呈现高度解凝状态(图版 II:22)或初步原核化状态(图版 II:23),但有些在卵中发育时间较长的精核却出现了核化(nucleation)现象,而该现象都出现在胞质分裂沟(plasmic cleavage furrow)形成后(图版 II:24),因此,这种核化现象可能是由于子核(daughter nucleus)的形成机制所控制。

讨 论

(一) 鱼类卵母细胞成熟过程中促精核发育因子及其活性变化

在两栖、哺乳类卵母细胞成熟过程中,可逐渐产生促精核解凝和原核化的作用,该作用分别受控于精核解凝因子(sperm nucleus decondensed factors, SNDFs)和精核原核化因子(sperm pronucleus developmental factors, SPDFs)^[9-14]。我们的研究同样揭示,鱼类卵母细胞在其成熟过程中,也会逐渐产生促精核解凝和原核化的作用,并且这两种促精核发育作用分别起始于卵母细胞的不同发育阶段,可见,在鱼类卵母细胞中也存在类似于两栖、哺乳类卵中的调控精核发育的因子,我们亦暂称之为精核解凝因子和精核原核化

因子。

在两性融核发育鱼类和雌核发育银鲫中,注入卵母细胞的精核在与胚泡物质接触后,均可进入解凝状态,并且随着卵母细胞逐步成熟,精核的解凝程度也逐渐增高,最终在卵母细胞第一次成熟分裂中期达到高度解凝状态。由此可以推断,鱼类卵母细胞中精核解凝因子(SNDFs)的活性起始于卵母细胞胚泡破裂时期,并随卵母细胞成熟度的增大而增高,直至卵母细胞第一次成熟分裂中期时达到最高。与此相应,上述两种发育类型的鱼类卵母细胞也均可促精核原核化,该作用起始于第一次成熟分裂中期后或三极纺锤体形成后。其中在两性融合发育鱼类中,精核原核化程度随卵母细胞的成熟而逐渐增高,并在完全成熟的卵中达到最高。而雌核发育银鲫卵中,促精核原核化作用活性始终很低,精核仅能达到初步原核化的状态。这表明,两类鱼卵母细胞中的SPDFs活性分别产生于第一次成熟分裂中期后或三极纺锤体形成后阶段;两性融合发育鱼类卵母细胞中的SPDFs活性随卵的成熟度增大而增高,在完全成熟的卵中达到最高;而雌核发育银鲫卵母细胞中,SPDFs活性很低,在卵母细胞成熟过程中活性变化不大。

(二) 银鲫卵母细胞特殊成熟进程与精核原核化因子低活性之间的关系

对两栖、哺乳类等研究证实,卵母细胞中的SNDFs和SPDFs没有种属特异性^[6,11,12,15],同样本实验结果表明,红鲤精核在彩鲫、红鲤卵中具有相同的发育行为,其卵母细胞成熟过程中产生的SNDFs和SPDFs也未表现出种属特异性。因此也可以认为,红鲤精核在银鲫卵中不能正常原核化与其精卵间存在的种属差异无关。

对哺乳类的研究发现,解凝精核的原核化受卵母细胞是否可以正常完成第一次成熟分裂的制约,第一次成熟分裂的任一过程出现异常,都会导致精核原核化受到阻碍^[16]。银鲫卵母细胞具有异常的第一次成熟分裂,它主要通过染色体分三群,三极纺锤体形成,转变最终形成正常的中期纺锤体来代替正常成熟分裂的^[1],因此可以推论,银鲫卵母细胞的异常成熟分裂也有可能干扰精核正常的原核化过程,进而导致银鲫卵中精核原核化因子的低活性。

(三) 银鲫卵母细胞中SNDFs和SPDFs与银鲫卵抑制精核发育的“两级控制”作用的关系

对雌核发育银鲫受精生物学的研究表明,银鲫卵可以阻止入卵精核的正常发育^[2],关于其抑制作用机制曾提出过“两级控制”假说:即抑制作用是通过初级控制(primary control)和次级控制(secondary control)来完成的,其中初级控制可抑制异源精核的解凝,而次级控制则部分抑制精核的原核化^[3],从银鲫卵质与两性融合发育鱼类卵质有相同的SNDFs活性这一点事实来看,银鲫卵的初级控制作用与其内精核解凝因子没有必然的联系,而仅受其受精孔区域的特殊性的影响^[3]。相反由于精核原核化因子的低活性,精核在银鲫卵质中只能低度原核化,从而产生了次级控制作用。

参 考 文 献

- [1] 丁军,蒋一珪,1991。雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤卵母细胞成熟的细胞学比较研究。水生生物学报,15(2): 97-103。
- [2] 俞豪祥,1982。银鲫雌核发育的细胞学观察,水生生物学集刊,7(4): 481-487。
- [3] 葛伟,蒋一珪,1985。雌核发育银鲫卵抑制异源精子原核化的作用模式初探。水生生物学报9(3): 203-209。

- [4] Berrios, M., Bedford, J. M., 1979. Oocyte maturation: aberrant postfusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. *J. Cell Sci.*, **39**: 1—12.
- [5] Balakier, H., Andrzej, K., Tarkowski, 1980. The role of germinal vesicle karyoplasm in the development of male pronucleus in the mouse, *Exp. Cell Res.*, **128**: 79—85.
- [6] David, B., Emily J. Blake, Debra J. Wolgemuth, 1987, Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Exp. Zool.*, **242**: 215—231.
- [7] Da-yuan, C., Frank J. Longo, 1983. Sperm nucleus dispersion coordinate with meiotic maturation in fertilized *Spisula solidissima* eggs. *Dev. Biol.*, **99**: 217—224.
- [8] Hirai, S. 1981. Cytoplasmic maturity revealed by the structured changes in incorporated spermatozoon during the course of starfish oocyte maturation. *Dev. Growth Differ.*, **23**: 465—478.
- [9] Inwamatsu, T. 1972. Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fert.*, **31**: 237—247.
- [10] Katagiri, C., Megumi Moriya, 1976. Spermatozoon response to the toad oocytes matured after removal of germinal vesicle. *Dev. Biol.*, **50**: 235—241.
- [11] Keita, Ohsumi, Chiaki Katagiri, Ryuzo Yanagimachi, 1986. Development of pronuclei from human spermatozoa injected microsurgically into Frog (*Xenopus laevis*) eggs. *J. Exp. Zool.*, **237**: 319—325.
- [12] Lohka, M. T., Masui, Y., 1983. Formation in vitro sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science*, **220**: 719—721.
- [13] Moriya, M., Katagiri, C. 1976. Microinjection of toad sperm into oocytes undergoing maturation division. *Dev. Growth. Differ.*, **18**: 349—356.
- [14] Noriko, Usur., 1976. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastructured Res.*, **57**: 276—288.
- [15] Schuetz, A. W., Frank, J. Longo, 1981. Hormone-cytoplasmic interaction controlling sperm nuclear decondensation and male pronuclear development in starfish oocytes. *J. Exp. Zool.*, **215**: 107—111.
- [16] Yamashita, M., 1985. Electron microscopic analysis of the sperm nuclear changes in meiosis inhibited eggs of the Brittle-star (*Amphiphoilis kochii*). *J. Exp. Zool.*, **235**: 105—117.

STUDIES ON THE PHENOMENA OF STIMULATING THE DEVELOPMENT OF SPERM NUCLEUS DURING OOCYTE MATURATION IN TWO TYPES OF FISHES

Din Jun and Jiang Yigui

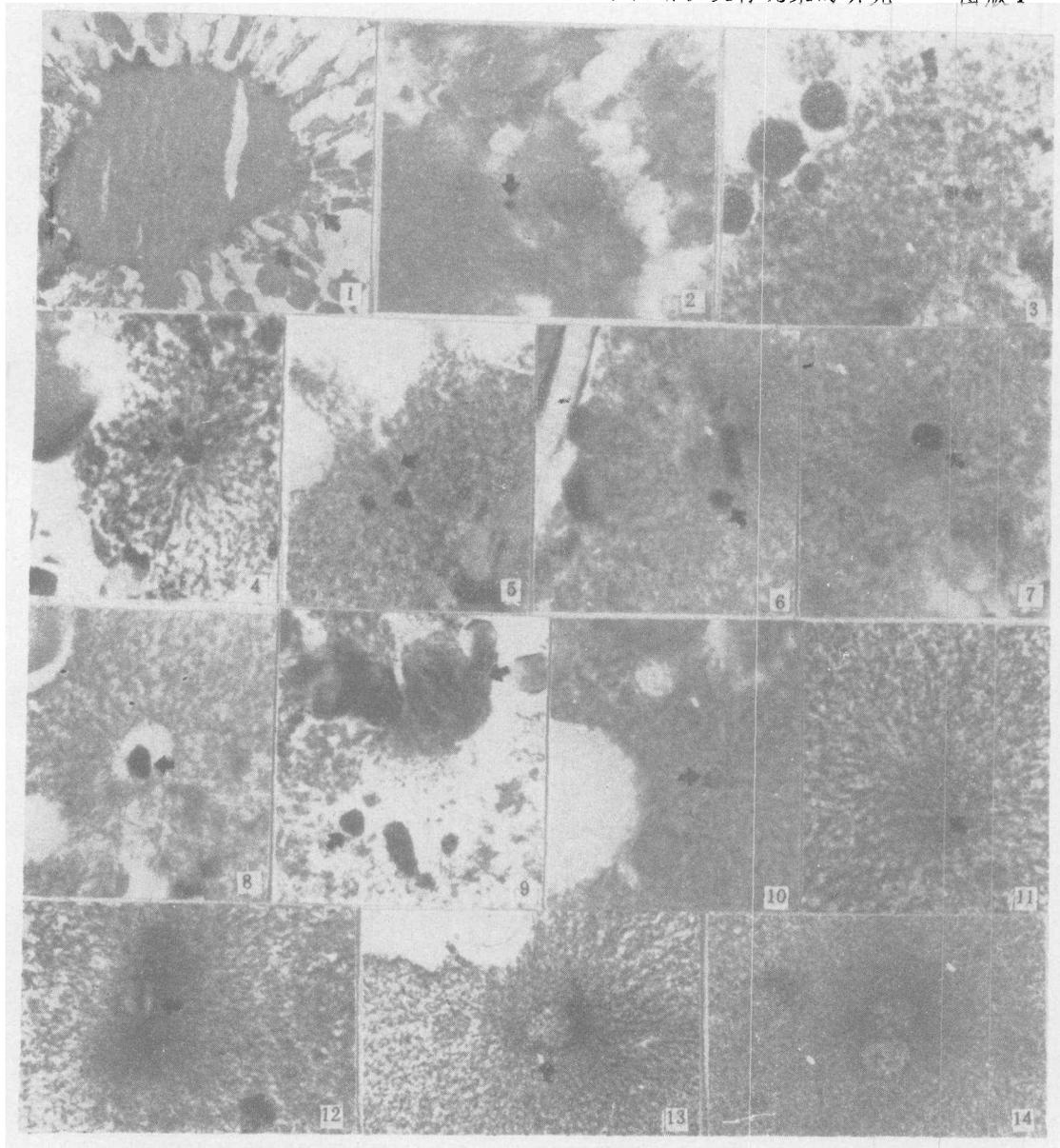
(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Abstract

Using the experimental cytological methods, we studied the development of the injected red carp (*Cyprinus carpio* red variety) sperm nuclei in the oocytes at different stages of maturation in the amphimictic fishes [red carp and colored goldfish (*Carassius auratus* colored variety)] and the gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). The results showed that, in the oocytes of amphimictic and gynogeneic fishes, the decondensation of injected sperm nuclei began at the same time (GVBD), but their pronucleation started at the later metaphase of the meiosis I and the later phase of the formation of the tripolar spindle respectively. In oocytes of the gynogenetic crucian carp, the decondensed degree of the sperm nuclei was same as those in the amphimictic fishes, but their pronucleated degree was much lower. Based on those results, we concluded that, during the oocyte maturation in red carp and colored goldfish, two types of factors could be produced successfully. One type controls the decondensation of sperm nucleus (termed sperm nucleus decondensation factors: SNDFs), while the other controls pronucleation (termed sperm pronucleus developmental factors: SPDFs). During the oocyte maturation in the gynogenetic crucian carp, the activities of the SNDFs were the same as those in the amphimictic fishes, but the activities of SPDFs were very low. The expression of the activities of SNDFs in the ova of both amphimictic and gynogenetic fishes is related to the GV materials, but the expression of the activities of SPDFs is different between two types of fishes. The activities of SPDFs appear to bear an important relationship to the normal completion of meiosis I. The gynogenetic crucian carps, which have the abnormal meiosis I, show reduced activities of SPDFs.

Key words

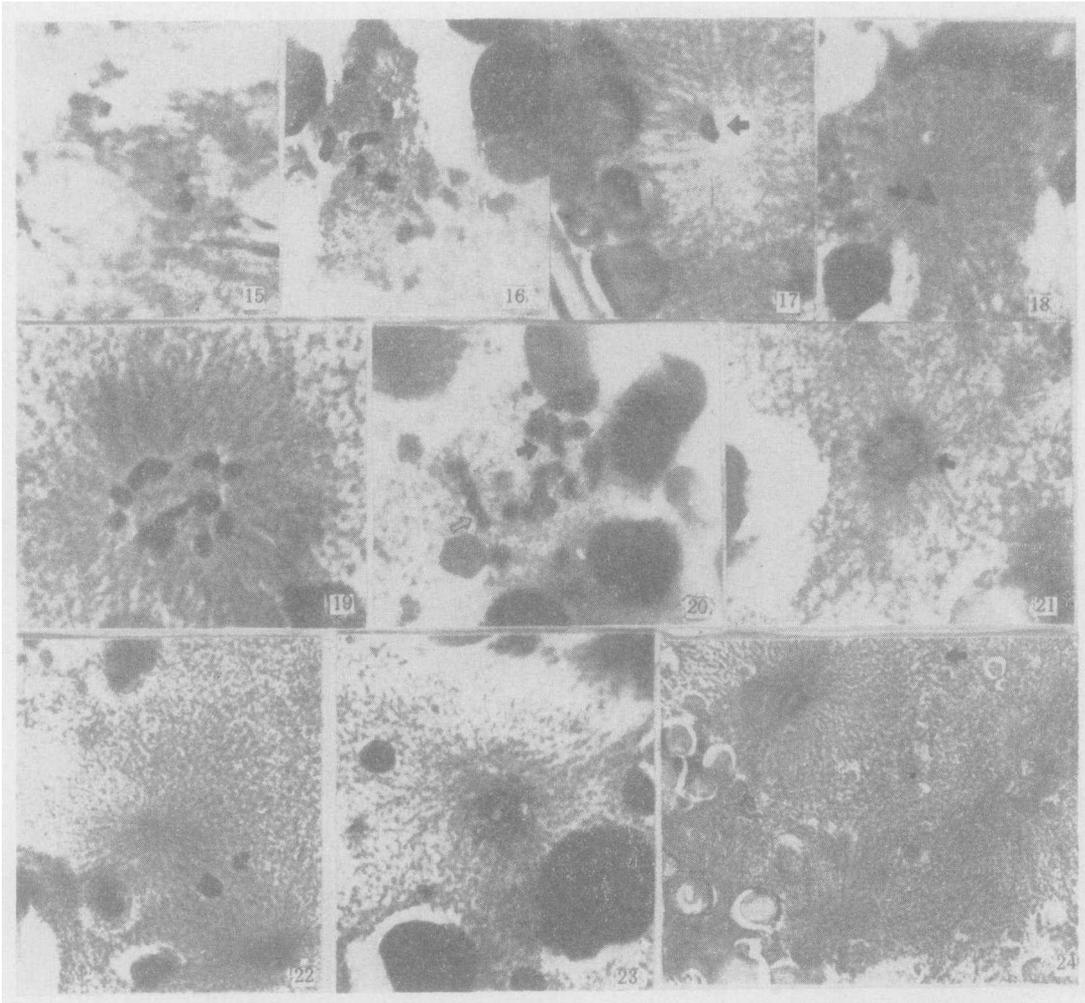
Gynogenetic Crucian Carp, Amphimictic Fishes, Oocytes, Stimulating the Development of Sperm Nuclei SNDFs, SPDFs



注入精核在两性融合发育鱼类卵母细胞成熟各阶段中的发育行为：1. 示卵母细胞中的胚泡和注入精核（已发育40'，未解凝，箭头所示）， $\times 140$ ；2. 胚泡破裂前期，注入精核呈未解凝状态（箭头所示）， $\times 750$ ；3. 胚泡破裂期，注入精核与溢出胚泡的核液接触，开始略为解凝（箭头所示）， $\times 750$ ；4—6. 在胚泡破裂至成熟多星光后期阶段，注入精核分别呈现低度解凝状态（图4，箭头所示）和较高度度的解凝状态（图5—6，箭头所示）， $\times 750$ ；7—11. 在成熟分裂中期（图9，上箭头示），注入精核分别呈高度解凝状态（图7—9，箭头所示）、染色质团（图10，箭头所示）和初步原核化状态（图11，箭头所示）， $\times 750$ ；12. 在成熟分裂后期和末期，注入精核明显核化（箭头所示）， $\times 750$ ；13. 在成熟卵中，注入精核原核化（箭头所示）， $\times 750$ ；14. 正常受精卵中的雌、雄原核（箭头所示）， $\times 750$

Development of the injected red carp sperm nuclei in the oocytes of different stages of maturation in amphimictic fishes: 1. GV and the injected sperm nuclei (condensation, arrows), $\times 140$; 2. Before GVBD (germinal vesicle breakdown), the injected sperm nuclei condensed (arrow), $\times 750$; 3. After GVBD, the sperm nuclei decondensed slightly (arrow), $\times 750$; 4—6. From the end of GVBD to the later stage of polyaster of maturation, the sperm nuclei appeared the state of low or slightly high degree of decondensation respectively (arrows), $\times 750$; 7—11. At the metaphase of the meiosis I, the sperm nuclei appeared the state of high degree of decondensation (arrow) or the mass of chromatin (arrow) or the state of primary pronucleus (arrow) respectively, $\times 750$; 12. From the anaphase to telophase of the meiosis I, the sperm nuclei pronucleated distintively (arrow), $\times 750$; 13. In matured eggs, the sperm nuclei formed pronuclei (arrows), $\times 750$; 14. At the fertilized eggs, the male and female pronuclei began to fuse together (arrow), $\times 750$

At the fertilized eggs, the male and female pronuclei began to fuse together (arrow), $\times 750$



注入精核在雌核发育银鲫卵母细胞成熟各阶段中的发育行为：15. 胚泡破裂前，精核呈未解凝状态（箭头所示）， $\times 750$ ；16. 胚泡破裂期，精核开始解凝（箭头所示）， $\times 750$ ；17—19. 从成熟单星光发育至三极纺锤体形成初期，精核解凝程度逐渐增高（箭头所示）， $\times 750$ ；20—21. 三极纺锤体转变为正常中期纺锤体并最终排卵，精核分别呈高度解凝状态（图 20，箭头示）、染色质团（图 20，白箭头示）和初步原核化现象（图 21，箭头所示）， $\times 750$ ；22—23. 成熟卵中，精核呈高度解凝状态（图 22，箭头所示）和初步原核化状态（图 23，箭头所示）， $\times 750$ ；24. 在成熟卵中发育时间过长的精核呈核化状态（箭头分别示卵裂沟和核化的精核）， $\times 750$

Development of the injected red carp sperm nuclei in the oocytes of different stages of maturation in gynogenetic crucian carp; 15. Before GVBD, the sperm nuclei condensed (arrow), $\times 750$; 16. After GVBD, the sperm nuclei decondensed slightly (arrow), $\times 750$; 17—19. From the stage of monoaster to the formation of the tripolar spindle, the decondensed degree of the sperm nuclei (arrows) increased gradually, $\times 750$; 20—21. During the tripolar spindle transforming into normal spindle and ovulation, the sperm nuclei appeared the state of high degree of decondensation (arrow) or the mass of chromatin (arrow) or the state of primary pronucleation (arrow) respectively, $\times 750$; 22—23. In matured eggs, the sperm nuclei decondensed in highly degree (arrow) or pronucleated primarily (arrows) respectively, $\times 750$; 24. In matured eggs' the sperm nuclei began nucleation (lower arrow) due to the long developmental times at the eggs' plasma (upper arrow indicated the cleavage furrow), $\times 750$