

273-278

6

兽类学报 1995, 15 (4), 273—278

Acta Theriologica Sinica

5565.223

水貂卵母细胞发育过程中卵泡细胞的微细结构研究*

刘玉堂

秦鹏春

(东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨, 150040)

(东北农业大学生物工程系)

摘 要

本文应用光镜、电镜及组织化学方法对水貂 (*Mustela vison*) 卵丘形成过程进行了研究。结果表明, 在发育过程中, 卵泡细胞内含有圆形线粒体, 许多单个粗面内质网囊泡和丰富的核糖体, 高尔基复合体罕见。当卵泡细胞变成单层柱状时, 细胞内开始出现成团的微丝及一些直径 1—2 μm 的厚壁泡。在卵泡细胞膜上可见胞吐小泡以及细胞间夹有透明带物质, 表明卵泡细胞可能参与透明带的形成。随着卵泡腔的形成, 卵泡细胞开始出现含中性脂肪及磷脂的颗粒。卵泡细胞始终通过胞质突起与卵母细胞保持接触。在大的有腔卵泡晚期, 放射冠细胞发生伸展作用, 形成明显的放射状结构, 其它卵丘细胞也出现不同程度的伸展。在放射冠细胞伸展的胞质中可见许多微丝束及粗面内质网囊泡相间平行排列, 表明微丝的存在对卵泡细胞的伸展起着重要作用。卵丘细胞的扩展使整个卵丘细胞间隙加大充以透明质酸, 这将有利于以后的精子穿过并进入卵母细胞中。

关键词 水貂; 卵丘; 卵泡细胞; 形态结构; 组织化学

在哺乳动物中, 卵母细胞的生长、分化、成熟及受精的全过程, 始终与作为体细胞的卵泡细胞保持密切联系, 而这种联系实际上对卵母细胞及卵泡细胞的生长及分化都是很重要的。它能促进卵子发生的顺利完成 (Buccione 等, 1990)。精子与卵子结合之前必须穿透由来自卵泡的卵泡细胞及由它们分泌的细胞外基质组成的卵丘, 以及透明带。研究表明, 卵丘对精子的穿卵有多方面的影响 (Bavister, 1982; Cummins 等, 1986; Katz 等, 1986; Boatman 等, 1991; Ralt 等, 1991)。排卵前促性腺激素峰促进卵母细胞完成减数分裂的过程也伴随着卵丘的扩展。一些动物的体外实验已证实, 卵丘要依赖于卵母细胞产生的卵丘扩展促进因子 (Cumulus expansion enabling factor, CEEF) 才能完成其扩展作用以及卵丘细胞分泌透明质酸 (Eppig 等, 1993)。但在体内, 卵丘扩展与卵母细胞成熟之间的关系仍未搞清。要进一步弄清卵泡细胞对卵母细胞发育及受精的影响, 应当从显微及亚显微结构水平上去研究卵泡细胞发育过程中的结构变化及与卵母细胞发育、分化及受精之间的相互关系。在水貂有关这方面的研究, 迄今尚未见报道。本文研究了水貂卵丘细胞形成过程中的显微结构、超微结构及组织化学变化, 旨在为进一步研究哺乳动物受精机制以及水貂的卵子成熟提供基础资料。

* 本文于 1994 年 9 月 12 日收到, 1995 年 5 月 24 日收到修改稿

材料和方法

于3月初繁殖季节取10只1—2年生正常成熟美洲雌性黑水貂卵巢,分别做光镜、电镜样品制备。

光镜切片制备 卵巢在10%福尔马林溶液中固定。经水洗后,系列酒精脱水,石蜡包埋,7—8 μm 的连续切片, H·E 染色, 光镜观察。

组织化学切片制备 割取带有各种卵泡的卵巢小块于 Baker 氏甲醛钙液中固定, 恒冷切片机切 10—15 μm 的切片, 分别用油红 O 染色法示中性脂肪, 用酸性氧化苏木素法示磷脂 (陈啸梅等, 1982; 刘玉堂等, 1993), 光镜观察。

电镜切片标本制备 用刀片切取带有不同大小卵泡的 2 mm^2 以内的卵巢皮质小块, 以 2.5% 戊二醛 (pH7.2) 固定, 修块后用 1% 锇酸后固定, Epon812 包埋, 切成厚 0.5—2 μm 的半薄切片, 经碱性品红—亚甲基蓝法染色, 光镜下进行卵泡定位和分类, 超薄切片, 醋酸铀和枸橼酸铅染色, 透射电镜观察。

卵泡分类 按卵泡大小、颗粒细胞层数、透明带状况及卵泡腔是否出现, 把卵泡分成 4 个阶段 (刘玉堂等, 1992), 第 I 阶段为单层扁平颗粒细胞卵泡, 第 II 阶段为单层立方颗粒细胞卵泡, 第 III 阶段为多层颗粒细胞卵泡, 第 IV 阶段为有腔卵泡。

结 果

1. 光镜观察

单层扁平卵泡细胞呈扁平状, 核较致密。随着卵泡细胞恢复生长变为立方状, 此时核呈圆形, 染色变浅, 此阶段卵泡经常可见单个存在的暗色卵泡细胞, 其细胞质染色深暗与其相邻卵泡细胞区别明显, 暗细胞核往往较小, 而且形状不规则 (见图版 I—1)。随着卵泡细胞生长分裂成多层, 直至出现卵泡腔, 此时卵泡细胞可分成壁颗粒细胞和围绕卵母细胞周围的卵丘细胞, 在排卵前卵丘最内层的放射冠细胞出现同步伸长现象, 呈放射状排列, 其核远离透明带 (见图版 I—2)。

酸性氧化苏木素染色及油红 O 染色表明, 随着卵泡腔的出现, 含有磷脂及中性脂肪的颗粒在卵泡细胞中开始出现 (见图版 I—7)。

2. 电镜观察

第 I 阶段单层扁平卵泡细胞 卵泡细胞呈长扁形或纺锤形, 核为长扁圆形, 有时不甚规则, 沿核膜分布较多明显的异染色质, 核质比例大。细胞器主要位于核两侧的胞质中。可见少量的线粒体和附有少量核糖体的内质网囊池以及游离核糖体, 高尔基体罕见。卵泡细胞间及与卵母细胞间大部分平滑相贴, 偶尔在卵泡细胞与卵母细胞间可见窄窄的细胞间隙, 其内充满微绒毛。

第 II 阶段单层立方卵泡细胞 随着卵泡细胞变成立方状或柱状, 细胞核开始变圆或椭圆形, 异染色质减少。细胞器数量增加, 结构变得清晰。在一些卵泡内可见明暗卵泡细胞之分, 暗色卵泡细胞数量往往很少, 其胞质染色深暗, 但结构与其它明细胞相似。卵泡细胞与卵母细胞间出现宽度不一的裂隙, 其内充满短指状或长的微绒毛丛, 而在有些部分仍然相贴或以桥粒相连接。随着卵泡细胞与卵母细胞间的裂隙逐渐增加, 透明带物质沉积于其中。卵泡细胞间始终是平滑相贴。

当卵泡细胞变成柱状时,透明带基本已形成连续一层。卵泡细胞核呈圆形或椭圆形位于基底部,而细胞器多数位于靠近透明带的胞质中,在核两侧基底部也可见少量细胞器。此阶段线粒体基质变得比以前致密,线粒体经常由单个内质网囊池所围绕,游离核糖体丰富。此阶段卵泡细胞内开始出现一些厚壁空泡,此泡状结构膜内侧附着一薄层胶质样物质、使泡壁显得很厚(见图版 I-3),另外在卵泡细胞核附近出现大量的微丝束,面向卵母细胞部的质膜形成许多胞质突起。

第Ⅲ阶段多层卵泡细胞 卵泡细胞通过分裂增殖成多层,透明带已形成较厚的一层,中间部分的卵泡细胞多为圆形或椭圆形,细胞间逐渐出现空隙。其中可见微绒毛及卵泡液物质。核质比例仍然较大,胞质内线粒体多数为圆形或椭圆形,电子密度变低,嵴数量少,粗面内质网仍以长或短的囊池形式存在,而且经常包围着线粒体,游离核糖体丰富,未见高尔基复合体。在靠近卵泡基膜及透明带部分的卵泡细胞多呈柱状或长椭圆形。此阶段卵泡细胞内分布着一些直径约 1—2 μm 的厚壁空泡,在核周区域仍然可见成束的微丝(见图版 I-4)。在靠近透明带的卵泡细胞之间可见透明带物质沉积,以及在卵泡细胞膜上的许多胞吐小泡(见图版 I-5)。在此阶段卵泡细胞有突起,许多突起穿过透明带,形成泡状或盘状膨大与卵母细胞以桥粒连接,有时突起伸入卵母细胞深处,在盘状膨大内,经常可见圆形电子致密体(见图版 I-6)。

第Ⅳ阶段有腔卵泡细胞 此阶段卵泡细胞结构基本上与Ⅲ期相似,由于卵泡液的不分泌,卵泡细胞间的空隙加大,出现一些小卵泡腔,小卵泡腔逐渐聚合形成大的卵泡腔。在接近透明带的一层卵泡细胞仍呈柱状、排列较紧密,核位于远离透明带的一侧,在胞质中随意分布着弯弯曲曲的粗面内质网囊池、线粒体、游离核糖体以及微丝束。在此期间仍可见到卵泡细胞伸出的突起附着于卵母细胞上,并以桥粒样结构连接,此处卵母细胞膜上还可见到吞饮现象(见图版 I-6)。在接近排卵的大有腔卵泡内,可见到卵丘放射冠细胞靠近透明带部分的胞质极度伸展(可达 40 μm),形成前端细,后端粗的长纺锤形,这些伸展了的放射冠细胞在透明带外排列成十分明显的放射状(见图版 I-2)。在这些伸长的胞质中有许多微丝束及粗面内质网囊池平行于细胞长轴相间排列,在其中还分布着厚壁泡及线粒体,此时放射冠细胞之间的空隙加大,可达 1—2 μm ,其它卵丘细胞也呈现不同程度的伸展状态,使得整个卵丘细胞之间的空隙加大。

讨 论

在卵母细胞生长期间卵泡细胞为其提供营养和信息起着关键的作用(Moor, 1983),卵母细胞通过周围卵泡细胞做媒介摄取小分子代谢物,如能量底物,核苷酸和氨基酸等(Buccione 等, 1990; Brower 等, 1982; Colonna 等, 1983; Cross 等, 1974),人们也发现要使卵母细胞在体外生长必须保持或重建卵母细胞—卵泡细胞间连接。可以说卵泡细胞的存在对于调控卵母细胞的生长是必要的。在水貂卵泡生长期间,始终能见到卵泡细胞通过胞质突起与卵母细胞保持接触,这样的连接结构,在其它动物中同样也都存在(Anderson 等, 1960; Baca 等, 1967; Hope, 1965; 谭景和等, 1992年),在接触处的卵膜上有时还能见到吞饮小泡,表明水貂卵泡细胞与卵母细胞间的营养运输还可通过吞饮方式来完成,有人在兔卵泡卵母细胞中也见到此种结构(Anderson, 1972)。在水貂卵泡细胞的胞质突起中含有的致密球状结构其作用还不清楚,在其它动物的研究中未见有人提到这种结构。

透明带及卵泡液的形成都与卵泡细胞的分泌活动有关,这在很早以前就有人通过放射性自显影,在其它动物中得到证实(Bostrum等,1952; Zachariae, 1957)。已知在一些动物卵泡生长期卵泡细胞一般都具有分泌细胞的形态特征(Zamboni, 1972),例如在罗猴(Hope, 1965),大鼠(Bjorkman, 1962)的卵泡细胞中都具有发达的高尔基复合体。在水貂卵泡发育过程中,卵泡细胞中虽然未见到高尔基复合体,但能看到邻近透明带的卵泡细胞间出现透明带物质的沉积以及在卵泡细胞膜上具有胞吐小泡,根据这些可推测水貂卵泡细胞不仅参与了卵泡液的形成,还可能参与了透明带的形成。

在水貂卵泡细胞中出现的厚壁小泡其作用并不清楚。在其它动物如金色仓鼠中也见到过类似的泡状结构,但Weakley(1966)认为它们是脂滴,而在水貂卵泡细胞中的这种小泡从超微结构上看并不同于一般的脂滴。光镜氧化苏木素染色及油红O染色表明含有磷脂及中性脂肪的结构仅在卵泡腔形成后的卵泡细胞中出现。从出现时间上看这两种结构还无法吻合,不过磷脂及中性脂肪出现的时间恰好与雌激素合成时间相一致。还有另一种可能性,即这些厚壁泡只有在有腔卵泡阶段才积累达到通过这种光镜组化方法能显示出来的程度。

在水貂卵泡发育晚期,放射冠细胞的伸展及卵丘的扩展十分明显,这可使卵母细胞周围的卵丘细胞之间的距离加大,分泌出透明质酸,将有利于受精时的精子穿透。有实验表明过早排卵,可以导致卵丘的不成熟,它能影响精子的动力穿透(Leibfried等, 1983),也许卵丘的这种不成熟是指放射冠及卵丘细胞还未完成伸展作用,这样卵泡细胞间的距离小,可能对精子的穿透有阻碍作用。在第I阶段,卵泡细胞近核处出现成堆的微丝,据报道在大鼠(Christiansen等, 1969),兔(Motta等, 1974),及羊(Tassell等, 1980)的卵泡细胞中也普遍存在着这种微丝。在水貂中,这些微丝束在单层立方或柱状卵泡细胞和放射冠细胞中最多。微丝的存在对卵泡细胞的支持作用是很必要的,在卵母细胞发育过程中其体积有一个明显的增长,而且卵泡细胞也要不断的增殖,整个卵泡就要向外扩展,这必然要克服来自卵巢其它细胞的反作用压力,才能使整个卵泡达到体积增大,这必然要求卵泡细胞具有骨架结构,来适应这种卵泡的扩展运动。放射冠细胞的伸展及卵丘的扩展,微丝的存在起着很重要的支持作用,这从伸展后的水貂放射冠细胞内见到的许多与纵轴平行的微丝束及粗面内质网囊泡可以表明其有这种作用,这在其它动物的研究中尚未见有人提到过。

参 考 文 献

- 刘玉堂, 秦鹏春. 1992. 水貂初级卵母细胞发育过程中细胞器变化的电镜观察. 解剖学杂志, 15 (6): 452—454.
- 刘玉堂, 秦鹏春. 1993. 水貂卵母细胞发育过程中脂滴的形态学及组织化学变化的研究. 东北农学院学报, 24 (4): 382—387.
- 陈啸梅, 周文郁, 彭俊云, 朱莲第, 王乃英. 1982. 组织化学手册. 北京, 人民卫生出版社, 93—94.
- 谭景和, 孙青原, 杨增明, 秦鹏春. 1992. 山羊卵母细胞发育的超微结构研究. 解剖学报, 23 (1): 106—110.
- Anderson E, Beams H V. 1960. Cytological observations on the fine structure of the guinea pig ovary with special reference to the oögonium, primary oocyte and associated follicle cells. *J Ultrastruct Res*, 3: 432—446.
- Anderson E. 1972. The localization of acid phosphatase and the uptake of horseradish peroxidase in the oocyte and follicle cells of mammals. In: Biggers J D, Schuetz A W, editors. *Oogenesis*. Baltimore: University Park Press, 87—117.
- Baca M, Zamboni L. 1967. The fine structure of human follicular oocytes. *J Ultrastruct Res*, 19: 354—381.

- Bavister B D. 1982. Evidence for a role of post-ovulatory cumulus components in fertilizing supporting fertilizing ability of hamster Spermatozoa. *J Androl*, 3: 365—372.
- Bjorkman N. 1962. A study of the ultrastructure of the granulosa cell of the rat ovary. *Acta Anat*, 51: 125—147.
- Boatman D E, Robbins R S. 1991. Detection of a soluble acrosome reaction-inducing factor, different from serum albumin, associated with the ovulated egg-cumulus complex. *Mol Reprod Dev*, 30: 396—401.
- Bostrum H, Odeblad E. 1952. Autoradiographic observation on the uptake of S^{35} in the genital organs of the female rat and rabbit after injection of labeled sodium sulphate. *Acta Endocr*, 10: 89.
- Brower P T, Shultz R M. 1982. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes, existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev Biol*, 90: 144—153.
- Buccione R, Schroeder A C, Eppig J J. 1990. Interaction between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, 43: 543—547.
- Christiansen A K, Gillim S W. 1969. The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cells, with emphasis on those of the gonads. In: Mckerns K W, editor. *The Gonads*. New York, *Appleton Century Crofts*, 415—488.
- Colonna R, Mangis F. 1983. Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biol Reprod*, 28: 797—803.
- Crosa P C, Brinster R L. 1974. Leucine uptake and incorporation at three stages of mouse oocyte maturation. *Exp Cell Res*, 86: 43—46.
- Cummins J M, Yanagimachi R. 1986. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res*, 15: 187—212.
- Eppig J J, Peters AHFM, Telfer E E, Wigglesworth K. 1993. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro, preliminary characterization of the factor. *Mol Reprod Dev*, 34: 450—456.
- Hope J. 1965. The fine structure of the developing follicle of the Rhesus ovary. *J Ultrastruct Res*, 12: 592—610.
- Katz D F, Cherr G N, Lambert H. 1986. The evolution of hamster *Mesocricetus auratus* sperm motility during capacitation and interaction with the ovum investments in vitro. *Gamete Res*, 14: 333—346.
- Leibfried M I, Bavister B D. 1983. Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters. *J Exp Zool*, 226: 481—485.
- Moor R M. 1983. Contact, signalling and co-operation between follicle cells and dictyate oocytes in mammals. In: McLaren A, Wyllie C C, editors. *Current Problems in Germ Cell Differentiation*. London: Cambridge University Press, 307—324.
- Motta P, Didio L J A. 1974. Microfilaments in granulosa cells during follicular development and transformation in corpus luteum in the rabbit ovary. *J Submicrosc. Cytol*, 6: 15—27.
- Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, Garbers D, Eisenbach M. 1991. Sperm attraction to a follicular factor (a) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 2840—2844.
- Tassell R, Kennedy J P. 1980. Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb—fine structure and histochemistry. *Aust J Biol Sci*, 33: 675—687.
- Weakley B S. 1966. Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (*Mesocricetus-auratus*). *J Anat*, 100: 503—534.
- Zachariae F. 1957. Studies on the mechanism of ovulation, autoradiographic investigation on the uptake of radioactive sulfate (S^{35}) into the ovarian follicular mucopoly saccharides. *Acta Endocr*, 26: 215.
- Zamboni L. 1972. Comparative studies on the ultrastructure of mammalian oocytes. In: Biggers J D, Schuetz A W, editors. *Oogenesis*. Baltimore, University Park Press, 5—45.

STUDIES ON THE FINE STRUCTURE OF THE FOLLICLE CELLS IN THE DEVELOPMENT OF OOCYTES OF MINK

LIU Yutang

(College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin, 150040)

QIN Pengchun

(Department of Biotechnology of Northeast Agricultural University)

Abstract

In this paper, formation of cumulus oophorus in mink (*Mustela vison*) were studied by light, electron microscope and histochemical techniques. Result showed that, during development of follicle cells, some round mitochondria with few cristae, numerous single rough endoplasmic reticulum cisternae and abundant free ribosomes present in the cytoplasm, few Golgi complex were seen. Stacks of microfilaments and some vesicles (1–2 μm in diameter) that have a thin coat within it's membrane occur as the follicle cell are unilaminar columnar. Exocytosis could be observed on the plasma membrane of follicle cells, and sometimes zona pellucida material is sandwiched in between these cells adjacent to the oocyte. It indicated that follicle cell might participate in formation of zona pellucida also. As the formation of the antrum, the granules that contain phospholipid and neutral fat start to occur within follicle cells. During whole development, the follicle cell processes extend through the zona pellucida to anchor on the plasma membrane of the oocyte by means of intercellular attachments. In the later phase of the large antrum follicles, the corona radiate cells extend and make a obvious radial shape, opposing against the outer aspect of the zona pellucida. The extension appear in other cumulus cell in varying degrees too. Sheaves of microfilaments alternate with rough endoplasmic reticulum cisternae, and they run parallel to major axis within the extended cytoplasm of the corona radiate cells. It indicated that microfilaments play a great role in the extension of follicle cells. The extension of cumulus cells make whole cumulus oophorus turn into porous and filled with hyaluronic acid. It would be advantageous to sperm's penetration and getting into oocyte afterwards.

Key words Mink; Cumulus oophorus; Follicle cells; Morphological structure; Histochemistry