

## 二硫苏糖醇对刺参卵母细胞体外成熟的影响

庞振国<sup>1,2</sup> 孙慧玲<sup>3</sup> 常亚青<sup>4\*</sup> 于佳平<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

(<sup>3</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>4</sup>大连海洋大学农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 116023)

**摘 要** 用海星鞘神经提取液和二硫苏糖醇对刺参卵母细胞进行了体外人工促熟研究。结果显示,二硫苏糖醇对刺参卵母细胞具有明显的促熟作用。刺参卵母细胞包被在滤泡中发育,卵母细胞通过动物极的卵突起连接到单层细胞构成滤泡膜上,充分发育的卵母细胞处于生发泡期,染色质凝集在核仁周围,处于生发泡期的卵母细胞在海水中不会自发成熟。用二硫苏糖醇处理充分发育的卵母细胞 20 min,卵母细胞的生发泡开始移动,并锚定在卵母细胞的动物极,继而出现生发泡破裂。此后,减数分裂重新启动,第一、二极体分别排出。但海星鞘神经提取液对刺参卵母细胞没有促熟作用。实验表明,二硫苏糖醇浓度在  $10^{-5} \sim 10^{-1}$  mol/L 范围内,均可促使刺参卵母细胞发生生发泡破裂, $10^{-2}$  mol/L 时诱导卵母细胞成熟率可达 90% 以上。

**关键词** 刺参 卵母细胞 体外促熟 二硫苏糖醇

**中图分类号** S968.9 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0082-08

## DTT induction of oocyte maturation for sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Slenka)

PANG Zhen-guo<sup>1,2</sup> SUN Hui-ling<sup>3</sup> CHANG Ya-qing<sup>4\*</sup> YU Jia-ping<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup>Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(<sup>3</sup>Yellow Sea Fisheries Research Insititute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>4</sup>Key Laboratory of Mariculture, Dalian Ocean University, 116023)

**ABSTRACT** Water-extracts of radial nerves from starfish and dithiothreitol (DTT) were used to induce the oocyte maturation for sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Slenka). Although radial nerve extracts failed to induce oocyte maturation for sea cucumber, breakdown of germinal vesicles and subsequent meiotic behavior of chromosomes were induced by the treatment with DTT. Oocytes of the sea cucumber *A. japonicus* were arrested at the germinal vesicle (GV) stage and did not start maturation spontaneously. After being treated with DTT for

国家 863 课题项目(2006AA10A411)和国家自然科学基金项目(31072230)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

收稿日期: 2009-01-07; 接受日期: 2010-06-21

作者简介: 庞振国(1981-), 男, 博士研究生, 主要从事海洋生物技术研究。E-mail: panishvan@yahoo.com.cn

20 min, the GV began to migrate to the animal pole of the oocyte, then the GV broke down, which is called germinal vesicle breakdown (GVBD). Meiosis of the oocyte reinitiated and two polar bodies protruded out successively. DTT with the concentration of  $10^{-1} \sim 10^{-5}$  mol/L successfully induced GVBD. Maturation percentage reached 90% when the concentration of the DTT solution was  $10^{-2}$  mol/L. Oocytes induced to maturation could be fertilized, while they could not develop normally.

**KEY WORDS** *Apostichopus japonicus* (Slenka) Oocyte Germinal vesicle  
Meiosis Dithiothreitol

刺参 *Apostichopus japonicus* (Slenka) 自 20 世纪 80 年代人工繁殖技术取得成功以来, 已经成为我国重要的海水养殖对象之一, 但其基础繁殖生物学尤其是排卵前后卵母细胞成熟的研究却非常缺乏。由于刺参卵母细胞成熟在排卵前很短的时间内发生, 而且整个过程在体内进行, 因此给相关方面的研究造成极大的困难。就目前来说, 在自然状态下研究卵母细胞在刺参体内的成熟过程尚不够现实, 比较科学可靠的方法是通过体外诱导启动其减数分裂来再现体内卵母细胞的成熟过程。

卵母细胞的成熟作用最明显的标志是生发泡的破裂和减数分裂的重启动 (Miyazaki *et al.* 2000)。诱导动物卵母细胞减数分裂启动的激素具有种的特异性。对海参而言, 卵母细胞在生殖管中处于生发泡阶段, 直至排放之前生发泡破裂。正常排放卵子被抑制在第 1 次减数分裂中期, 待受精作用完成后继续完成减数分裂 (Miyazaki *et al.* 2005)。虽然可以通过多种方法诱导海参排卵, 但是诱导海参卵母细胞成熟的内源性物质目前尚不清楚。Smiley (1988) 从美国刺参 *Stichopus californicus* 的卵巢中提取出卵母细胞促减数分裂重启动因子, 并确定其化学结构类似于 2-甲基 8-氨基腺嘌呤, Smiley 因此推测这种化合物即为海参纲动物的促成熟因子, 然而到目前为止, 并没有实验证据支持此结论。

目前, 卵母细胞促成熟因子研究较为成功的棘皮动物是海星纲 Asteroidea (Shirai 1973; Nemoto *et al.* 1980; Hirai 1988; Kishimoto 1999; Nusco 2002; Mita *et al.* 2007)。海星鞘神经提取液能诱导海星及海胆卵子的成熟和排放 (Shirai 1973; Haruo 1974)。海星鞘神经肽作用于海星生殖腺中的滤泡细胞, 诱使滤泡细胞生成第 2 种诱导因子, 这种直接诱导因子被证明是 1-甲基腺嘌呤 (1-MeAde)。但有报道证明, 1-MeAde 对海参卵母细胞并没有促熟作用 (Maruyama 1980)。

Maruyama (1980) 报道二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 和二巯基丙醇 (2, 3-Dimercapto-1-propanol, BAL) 能够促进两种黑海参 (*Holothuria leucospilota* 和 *H. pardalis*) 卵母细胞的成熟, 并用海星鞘神经提取物对包括刺参在内的多种海参进行了促熟实验, 证明海星鞘神经提取物在滤泡存在的情况下能够诱导 *H. leucospilota*, *H. pervicax*, *H. moebi* 和 *H. pardalis* 等几种黑海参卵母细胞的成熟, 但并未对刺参的实验结果进行描述 (Maruyama 1985)。本实验用二硫苏糖醇和海星鞘神经提取物对刺参卵母细胞进行了体外促熟研究, 以确定这两种物质对刺参卵母细胞体外成熟的影响, 并观察了卵母细胞在体外的成熟过程。

## 1 材料和方法

### 1.1 刺参卵母细胞和精子的获得

刺参于 2007 年 8 月取自辽宁省獐子岛附近海域, 在大连水产学院海水养殖实验室暂养。解剖取得成熟性腺, 并在海水中漂洗 3 次, 用解剖剪将性腺剪成 2 cm 左右小段, 并用尖头镊子将生殖管沿纵轴撕开, 200 目筛绢收集获得的卵母细胞, 海水中冲洗 3 次, 每次 10 min。部分卵母细胞通过无  $\text{Ca}^{2+}$  海水处理去除滤泡。刺参精子通过解剖取得, 剪取少量精巢小管, 用滤纸吸干水分, 置于培养皿中,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 使用时加海水稀释。

## 1.2 处理药物配制及电镜样品制备

DTT 购自上海生物工程技术服务有限公司,过滤海水配制成 0.1 mol/L 母液,4°C 冰箱保存。解剖获得的卵母细胞及滤泡透射、扫描电镜样品制备参照庞振国等(2006)的方法。

## 1.3 海星鞘神经提取液的制备

实验用海星 *Asterina pectinifera* 采自青岛市栈桥附近海域,将海星腕足沿纵轴剪开,用尖头镊子撕取鞘神经,滤纸吸取多余水分后称重,加入蒸馏水后置于玻璃匀浆器中匀浆,然后离心(10 000 g,10min,4 °C),取上清液,整个过程在冰上进行,提取的神经液稀释成 2 mg/ml 的母液于-20°C 冰箱中保存备用。

## 1.4 滤泡悬液的制备

从刚刚解剖获得的新鲜生殖管中获取大约  $10^6$  个卵母细胞置于 40 ml 的无  $\text{Ca}^{2+}$  海水中,并且用吸管反复吹打 20 min 以提高卵母细胞脱滤泡率,待卵母细胞沉降后取上清液,1 500 g,15 min 离心收集滤泡,加入 20 ml 过滤海水后制成滤泡悬浮液母液。

## 1.5 卵母细胞的药物处理

实验在 24 孔细胞培养板中进行,脱去滤泡的卵母细胞加入过滤海水保持卵母细胞浓度 200~400 个/ml,药物处理后,每隔 10 min 取样于显微镜下观察生发泡破裂情况,并取样用甲醛固定液固定,固定后的样片经 0.01 mol/L 的 DAPI 染液染色,轻轻压片后在 Olympus 荧光显微镜下观察并拍照,所有实验在 23 °C 水温下进行。

### 1.5.1 海星鞘神经提取液单独处理

设置 4 组海星鞘神经提取液的浓度梯度,分别为  $2$ 、 $2 \times 10^{-1}$ 、 $2 \times 10^{-2}$ 、 $2 \times 10^{-3}$  mg/ml 和 1 个过滤海水对照组,每组浓度设 4 个平行。

### 1.5.2 海星鞘神经提取液加滤泡悬浮液处理

在海星鞘神经提取液的每个浓度梯度中分别加 5 ml 的滤泡悬浮液。

### 1.5.3 二硫苏糖醇处理

DTT 浓度梯度设置为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 5 个浓度梯度和 1 个海水对照组,每组浓度设 4 个平行。

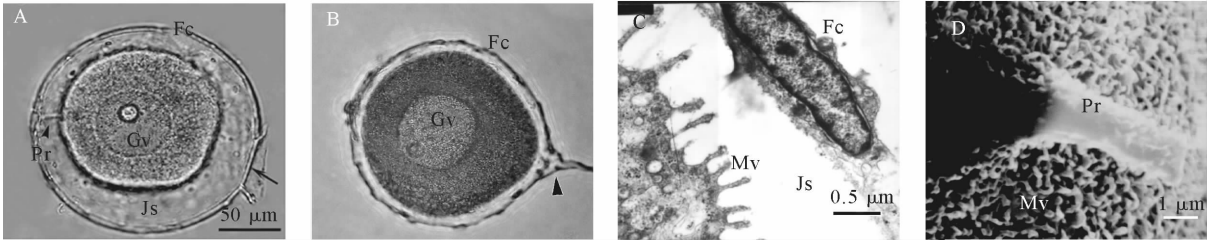
## 1.6 不同时期卵母细胞的受精能力检测

通过镜检观察取不同发育及成熟阶段的卵母细胞,用稀释的精子对促熟的卵母细胞进行受精实验,通过受精膜的举起现象观察是否能够成功受精及受精后的发育情况。

## 2 结果

### 2.1 未成熟的卵母细胞

刺参的卵母细胞包被在滤泡膜中发育,而滤泡膜是由单层滤泡细胞连接构成的,卵母细胞和滤泡之间充满卵胶层。卵母细胞表面大量微绒毛伸向卵胶层并且通过一个明显的突起连接到滤泡上。而滤泡膜又通过一层上皮细胞构成的索状连接组织固定在生殖管壁上,细胞突起和索状连接组织处的细胞基部构成了卵母细胞的顶部——基部轴(图 1)。充分发育后的刺参卵母细胞处于减数分裂前期 I,此时的卵母细胞最明显的特征是具有一个特化的巨大细胞核,直径约 50  $\mu\text{m}$ ,具有储存减数分裂必需物质的作用,细胞核通常有 1~3 个核仁,这时的细胞核被称作生发泡。此时,DAPI 染色显示,聚缩的染色质分布在核仁周围。处于这一时期的卵母细胞到排放之前一直被抑制在减数分裂前期 I,直至排卵临近时发生生发泡破裂,减数分裂重新启动(图 2、图 3、图 4)。

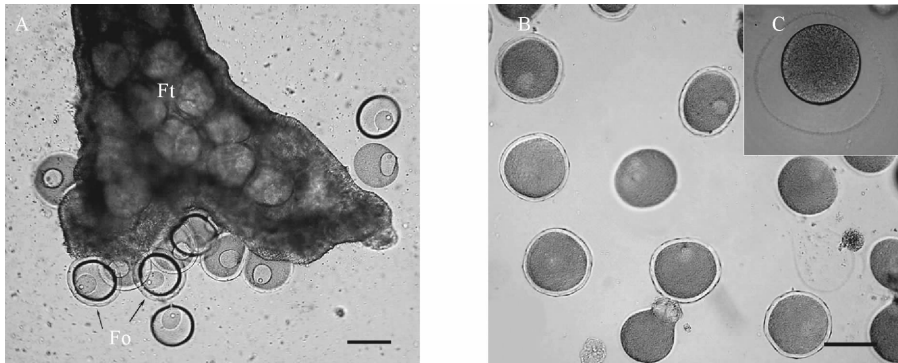


A. 发育中的卵母细胞。卵母细胞体积尚小,表面突起较细。生发泡位于卵母细胞中央,卵母细胞通过表面突起连接于滤泡膜上,滤泡膜和卵母细胞间有一层卵胶层,箭头示断裂的索状连接组织  
 B. 充分发育的卵母细胞。箭头处示完整的连接组织,滤泡膜通过索状连接组织连接在生殖管壁上  
 C. 卵母细胞与滤泡细胞超微结构,卵母细胞表面有大量微绒毛,滤泡细胞为单层上皮细胞  
 D. 卵母细胞表面突起,顶部凹陷为卵母细胞与滤泡膜连接处  
 Pr: 卵母细胞突起; GV:生发泡; Js:卵胶层; Fc:滤泡; Mv:微绒毛

A. Developing oocyte located in a follicle, the oocyte is relatively small and the protuberance is thin. The oocyte connects to the follicle *via* a protuberance, there is a jelly space between the follicle and the oocyte, arrow shows broken canal-shaped connect structure  
 B. Fully grown oocyte. Arrow shows intact connect structure, the follicle connects to gonad wall *via* the structure  
 C. Ultrastructure of the oocyte and the follicle, many microvilli protrude from the surface of the oocyte into the jelly space  
 D. Oocyte protuberance by scanning electron microscope, the concaved top is the connection place  
 Pr: Protruberance; GV: Geminal vesicle; Js: Jelly space; Fc: Follicle; Mv: Microvilli

图 1 卵母细胞、表面突起、滤泡膜及索状连接组织

Fig. 1 Oocyte, oocyte protuberance, follicle and canal-shaped connect structure

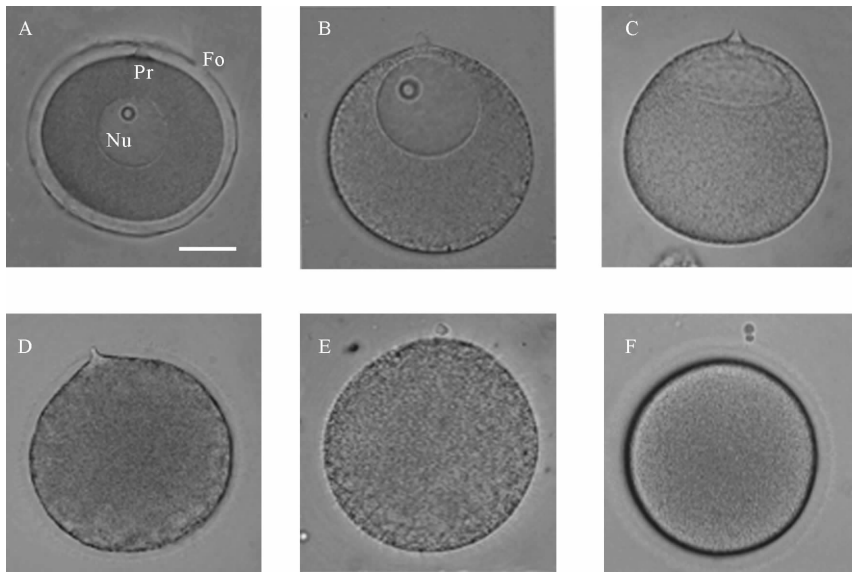


A. 从刺参卵巢生殖小管中解剖出的卵母细胞处于生发泡期,卵母细胞表面包被有一层滤泡(Fo),生发泡位于卵母细胞中央或靠近一侧的位置。Bar=150 μm  
 B. 未成熟的卵母细胞在 10<sup>-2</sup> mol/L 的 DTT 溶液中处理 20 min,生发泡大部分已经开始破裂。Bar=50 μm  
 C. 成熟过程中个别卵母细胞有受精膜举起的现象  
 Ft: 成熟生殖小管;Fo:滤泡

A. Oocytes excised from the ovary are arrested in the GV stage. There is a small tip on one side of the oocyte which connects the oocyte and the follicle folding it. Some oocytes complete the ovulation, germinal vesicles locate in the center or eccentric position of the oocyte. Bar=150 μm  
 B. After being treated in DTT solution with the concentration of 10<sup>-2</sup> mol/L for 20 min, most of immatured oocytes have started the GVBD, the membrane of the GV breaks down and the chromatin locates in the animal pole of the oocyte. Bar=50 μm  
 C. "Fertilization membrane" would be occasionally raised up during the oocyte maturation  
 Ft: Female procreation tubule;Fo: Follicle

图 2 刺参生殖小管中解剖出的卵母细胞和 DTT 对卵母细胞的促熟作用

Fig. 2 Maturation induction of oocytes excised from ovary tubules by DTT solution

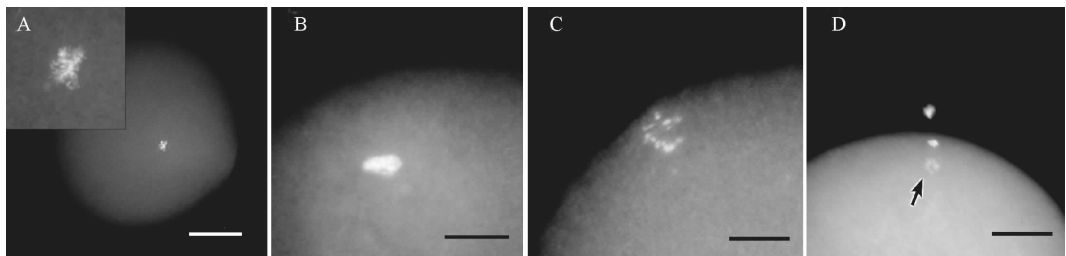


- A. 处于减数分裂前期的刺参卵母细胞。Bar=50  $\mu\text{m}$  B. 已经完成脱滤泡作用的卵母细胞,生发泡向动物极方向发生移动  
 C. 生发泡移动过程中,形状发生改变,由球形变为椭圆形,面向动物极的生发泡膜变平,核仁已经裂解消失  
 D. 生发泡破裂已经完成。卵突所处的动物极附近缺少卵黄 E. 第一极体从动物极排出  
 F. 排出第二极体 Pr: 卵突;Nu: 细胞核;Fo: 滤泡

- A. Immature oocytes. Fully grown oocyte is spherical with the diameter of 140~160  $\mu\text{m}$ , a specialized nuclear locates in its center which is named as germinal vesicle. 1~3 nucleoli locate in the GV. The oocyte is folded by a layer of follicle, a plasmic protrusion with a length of about 10  $\mu\text{m}$  locates on the surface of the animal pole region of the oocyte, very few yolk is found in it. The oocyte is connected to the follicle by this protrusion. Bar=50  $\mu\text{m}$   
 B. Oocytes which have completed the ovulation, The GV moves to the animal pole  
 C. The shape of the GV changes from spherical to oval during its migration, the membrane facing to the animal pole flattened, the nucleoli have vanished  
 D. Oocytes have completed the GV migration. Cytoplasm near the animal pole and the protrusion is lack of yolk  
 E. The first polar body extrudes from the site where the former oocyte protuberance once located in  
 F. The second polar body extrudes from the place where the first polar body extruded  
 Pr: Protuberance;Nu: Nuclear;Fo: Follicle

图3 刺参卵母细胞的体外成熟过程

Fig. 3 Process of artificial induced maturation



- A. 生发泡破裂前,卵母细胞处于第1次减数分裂前期。Bar=50  $\mu\text{m}$  B. 第1次减数分裂中期,染色体排列于赤道板上。Bar=50  $\mu\text{m}$   
 C. 第1次减数分裂后期,染色体发生分离。Bar=50  $\mu\text{m}$   
 D. 第2次减数分裂后期。第一极体已经排出,第二极体即将排出,单倍体的雌原核形成(箭头)

- A. Before GVBD, the oocyte is at prophase I; pachytene stage, the diameter of condensed chromosomes is about 5~8  $\mu\text{m}$ . Bar=50  $\mu\text{m}$   
 B. Oocytes at metaphase I. The chromosomes are arrayed on the nuclear plate. Bar=50  $\mu\text{m}$   
 C. Oocytes at anaphase I. The picture shows the separation of homologous chromosomes  
 D. Oocytes at anaphase II. The first polar body has been released and the second polar body is about to extrude out. The female pronucleus has formed (arrow)

图4 刺参卵母细胞减数分裂过程中的染色体行为

Fig. 4 Behavior of Chromosomes during the meiosis

## 2.2 促熟结果

生发泡未破裂时,卵母细胞不具有受精能力,未成熟卵母细胞最明显标志是完整的生发泡,而刺参的卵母细胞在天然海水中并不会发生自发成熟。用吸管吹打虽然能使生发泡的形状变得不规则,但也不能使生发泡发生破裂。本次实验中,所有 3 种处理的海水对照组均未观测到生发泡破裂现象,而经海星鞘神经提取液和鞘神经提取液加滤泡悬浮液处理的卵母细胞在所有梯度浓度下处理 2h 后,也未发现生发泡破裂情况,说明海星鞘神经提取液无论滤泡存在与否都未对卵母细胞的成熟产生作用,与之相对应的是二硫苏糖醇的处理的确可以诱导卵母细胞的减数分裂。当 DTT 溶液的浓度处于  $10^{-1} \sim 10^{-3}$  mol/L 之间时,对刺参卵母细胞的促熟作用较为明显;当 DTT 浓度在  $10^{-2}$  mol/L 左右时,卵母细胞的成熟率可以达到 90% 以上;但当 DTT 浓度低于  $10^{-4}$  mol/L 或者接近  $10^{-1}$  mol/L 时,卵母细胞成熟率显著降低。DTT 浓度和卵母细胞成熟诱导率的关系如图 5 所示。一个值得注意的现象是个别刺参卵母细胞在 DTT 诱导的成熟过程中有类似于“受精膜”举起的现象(图 2),其他种的海参也有类似的报道(Maruyama 1981)。这种“受精膜”是否与卵子受精后形成的受精膜相同尚待确定。

## 2.3 卵母细胞的成熟过程

刚刚解剖出的卵母细胞,生发泡位于中心或稍微靠近细胞一端的位置,加入 DTT 溶液后,卵母细胞成熟开始,其明显的标志是生发泡开始移向卵母细胞的一侧的细胞膜,从 DTT 开始处理到生发泡移动到卵突一端细胞膜下,整个过程大约需要 10~15 min,生发泡移动过程中,其形状发生改变,从规则的球形变为椭球形,最后固定细胞膜下,近细胞膜的核膜变平,整个生发泡成为半球形。在此过程中,核仁发生裂解,生发泡移动完成后,核仁已经完全消失(图 3)。

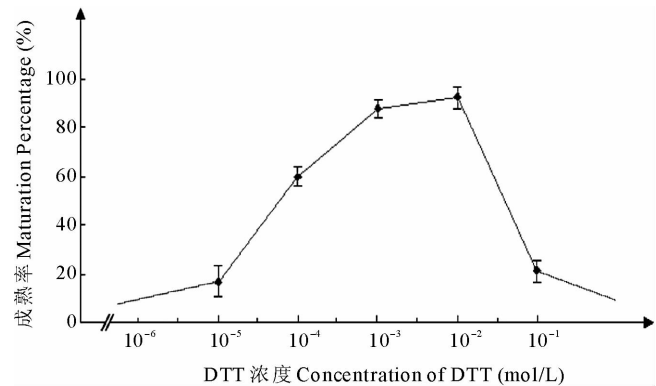
DTT 诱导的减数分裂启动后,染色质聚集在卵母细胞的一端,之后进入减数分裂中期 I,染色体重新排列于赤道板上,然后同源染色体发生分离,第一极体从卵母细胞突起处排出,从生发泡破裂到第一极体排出需要 20 min 左右,而后随着第 2 次减数分裂的完成,第二极体从第一极体下方排出,从第一极体排出到第二极体排出的过程大约需要 20 min(图 4)。

## 2.4 不同成熟阶段的卵母细胞受精及正常卵裂的能力

收集处于不同成熟阶段的人工促熟卵母细胞,过滤海水冲洗后加入刺参精子进行人工授精。结果表明,卵母细胞只有在生发泡破裂之后才有受精能力,从生发泡破裂到第二极体排出前的整个减数分裂过程中,卵母细胞在人工受精后都具有受精膜举起的现象,其受精率没有明显差别,均可达 90% 以上,但只有在第一极体排出前受精的卵母细胞才能发生卵裂。遗憾的是,人工促熟的卵母细胞受精后形成的胚胎似乎并不能正常发育,作者通过多次实验,最多只得到了 8 细胞期的胚胎,之后便出现畸形并停止细胞分裂。

## 3 讨论

正常卵母细胞的发育与成熟过程伴有几次发育停滞状态,第 1 次停滞状态是第 1 次减数分裂前期,称作前期停滞的卵母细胞,刺参卵巢小管中解剖出的卵母细胞就处在这个时期,此时期卵母细胞的重要标志是具有特化的细胞核,也就是生发泡(Germinal vesicle, GV),所以此时期又叫做生发泡期。第 2 个停滞是卵母细胞成



注:DTT 浓度在  $10^{-5} \sim 10^{-1}$  mol/L 之间对卵母细胞具有促熟作用,在  $10^{-2}$  mol/L 时,诱导率在 90% 以上。图中各点表示每组 DTT 浓度 4 个平行卵母细胞成熟率的平均值±标准误差

Note: DTT solution with the concentration between  $10^{-5} \sim 10^{-1}$  mol/L induced the oocyte maturation; the maturation percentage reached 90% when the concentration is  $10^{-2}$  mol/L. Plot shows the maturation percentage (mean±STD)

图 5 不同浓度 DTT 溶液对卵母细胞的促熟率

Fig. 5 Oocyte maturation percentage induced by DTT at different concentrations (number of samples  $n=7$ )

熟至第 2 次减数分裂中期,在该期维持较长时间,直到精子入卵或受其他的人工刺激。自然界中,有一部分动物如一些软体动物,棘皮动物,海鞘类,它们的卵母细胞只成熟到第 1 次减数分裂期就接受精子受精,受精后排出第一极体,继而完成第 2 次减数分裂(楼允东 1979)。促成成熟因子(Maturation promoting factor, MPF)是调节卵母细胞成熟的核心环节(陈大元 2000),有关 MPF 在细胞周期中的调节机制,在无脊椎动物海星中报道较多。海星鞘神经肽作为性腺刺激物质(Gonad-stimulating substance, GSS),作用于海星生殖腺中的滤泡,诱使滤泡细胞生成促成成熟因子(MPF),这种促成成熟因子被证明是 1-MeAde,将 MPF(1-MeAde)注射入生发泡时期的海星卵母细胞后,不需要蛋白质的合成过程,由活性的 MPF 直接激活大量卵母细胞中储存的前体 MPF(陈大元 2000),因此可以在短时间内启动减数分裂。已有的研究证明,海星鞘神经提取液可以诱导 30 多种海星的卵母细胞(Kanatani 1973),不同种的海星鞘神经提取液对各种海星卵母细胞的促熟作用并没有特异性,因而 1-MeAde 被认为是海星纲动物卵母细胞的通用促熟因子。此外,1-MeAde 还可以诱导其他的棘皮动物如海胆卵母细胞的生发泡破裂(Haruo 1974)。Maruyama(1985)报道了海星鞘神经提取液在滤泡细胞存在的情况下可以诱导 *H. leucospilota*, *H. pervicax*, *H. moebi*, *H. pardalis* 等黑海参卵母细胞的成熟,但对脱去滤泡的卵母细胞无效,因此推测滤泡细胞能产生某种诱导卵母细胞成熟的诱导因子。

实验证明,无论滤泡存在与否,海星鞘神经提取液对刺参卵母细胞都不具有促熟作用,说明刺参卵母细胞成熟的内源性诱导物质与这 4 种黑海参并不相同。另一方面,DTT 对刺参卵母细胞具有明显地促熟作用。已经有报道证明 DTT 对海星卵母细胞也具有促熟作用(Vacquier *et al.* 1972)。虽然目前对 DTT 诱导海星的卵母细胞成熟的机制尚不清楚,但在海星卵母细胞的研究中发现,1-MeAde 对海星卵母细胞的促熟作用能够被一些可与巯基基因反应的双硫键化合物抑制,而 DTT 等巯基化合物能够解除这些成熟诱导抑制剂的影响,说明巯基基因对海星卵母细胞的成熟启动具有重要的作用(Kishimoto *et al.* 1973);另外,1-MeAde 能够明显提高海星卵母细胞皮层中巯基蛋白的含量(Kishimoto *et al.* 1976),虽然 1-MeAde 并不能诱导刺参卵母细胞的成熟,但 DTT 可以使刺参卵母细胞出现生发泡破裂并重新启动其减数分裂。依据本实验结果,作者推测,刺参的体内成熟诱导因子也可以提高卵母细胞皮层巯基蛋白的浓度,而这一过程可能是棘皮类动物卵母细胞成熟的必要步骤。

正常排放的刺参卵子生发泡已经破裂,但卵母细胞的减数分裂并没有持续进行,而是被抑制在减数分裂中期 I。未受精的卵子在海水中浸泡 5 h 后逐渐发生畸形和裂解,期间观察不到极体放出的现象,直到受精之后,减数分裂才又被启动,这样正常卵母细胞的发育过程就存在两个停滞阶段。第 1 阶段是卵母细胞充分发育后到自然排卵或者人工刺激排卵之前,此阶段的卵母细胞一直处于生发泡时期,虽然此时染色质已经发生聚缩,但荧光显微镜观察染色质被固定在生发泡内核仁的周围,因核膜未破裂,中心体无法通过微丝与染色质结合,故而减数分裂无法进行。排卵前期生发泡发生破裂,内容物释放到卵母细胞质中,染色质凝集排列在卵母细胞的一侧。如果卵子排放后没有成功受精,则减数分裂不会继续自发启动,这个抑制阶段可以称作成熟过程的第 2 次停滞。因此作者认为,刺参卵母细胞内的促成成熟因子的浓度或者活性从排卵前到受精前的阶段经历了短期提升后又迅速被抑制的过程,受精作用发生后促成成熟因子的浓度或者活性又迅速被提升,引起减数分裂的继续进行。本次实验发现,经过 DTT 处理的卵母细胞在生发泡发生裂解后,并不会停滞在减数分裂中期,而是继续进行减数分裂,这在另一方面说明外源性的 DTT 对卵母细胞的促熟作用因不受自身的调控作用而持续进行,直至第二极体排出。

刺参卵母细胞一个非常重要的特征是表面具有一个细胞质突起,这个细胞质突起具有几个特点:(1)刺参卵母细胞通过这个突起连接到滤泡膜上并且在滤泡中发育;(2)在卵母细胞成熟过程中,生发泡向这个突起的方向移动并最终固定在突起处的细胞膜下发生生发泡破裂;(3)表面突起处是第一、二极体的排出位置。这些特征显示这个细胞质突起标定了刺参卵母细胞的动物极。其他海参种类也有类似的细胞结构,Smiley 等(1985)报道经过体外诱导处理的美国刺参卵母细胞,其脱滤泡过程起始于表面突起刺穿滤泡膜。Miyazaki 等(2005)在研究中将黑海参 *H. moebi* 卵母细胞的表面突起称作动物极突起。可以推测表面突起是海参纲动物卵母细胞的共有特征。应当注意的是刺参卵母细胞表面突起与贝类动物卵母细胞的卵柄是不同的,贝类动物卵柄的形成开始于卵黄发生期,卵母细胞基部突起伸长形成卵柄附着于生殖腺壁上(Eckelbarger *et al.* 1999)。而刺参卵母细胞表面突起位于细胞顶部,卵母细胞通过这个突起连接在单层滤泡细胞形成的球状滤泡膜上。滤泡膜与连接卵母细胞表面突起的相反位置有一层上皮细胞形成的索状连接组织将滤泡膜连同卵母细

胞一起固定在生殖管壁上。因而刺参卵母细胞表面突起和索状连接结构处相对应的位置就标定了卵母细胞的顶部—基部轴。因为刺参卵母细胞表面突起又是极体排放的位置,因而这个顶部—基部轴在减数分裂过程中便转化成卵子的动物极—植物极轴,从而在受精卵发育过程中又转化为胚胎的前后轴(Smiley *et al.* 1985)。刺参卵母细胞在发生过程中的极性起源机制,尚待进一步深入研究。

到目前为止,已经见于报道的 DTT 促熟的卵母细胞受精后可以正常发育的海参种类有 *H. leucospilota*、*H. pardalis*、*H. pervica*、*H. moebi*、*Actinopyga echinite*(Maruyama 1980; Chen *et al.* 1991),都属于楯手目 Aspidochirotida、海参科 Holothuriidae,而刺参属于楯手目、刺参科 Stichopodidae,DTT 诱导后的卵母细胞受精后不能正常发育是否与物种对 DTT 毒性的耐受性不同有关,尚有待探讨。

## 参 考 文 献

- 陈大元. 2000. 受精生物学-受精机制与生殖工程. 北京: 科学出版社
- 楼允东. 1979. 组织胚胎学(第二版). 北京. 中国农业出版社
- 庞振国,孙慧玲,燕敬平,于东祥,方建光,姜明. 2006. 刺参精子发生的超微结构研究. 海洋水产研究,27(3): 26~31
- Chen, C. P., Hsu, H. W., and Deng, D. C. 1991. Comparison of larval development and growth of the sea cucumber *Actinopyga echinites*: Ovary-induced ova and DTT-induced ova. *Mar. Biol.* 109: 453~457
- Eckelbarger, K. J., and Young, C. M. 1999. Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve (*Bathymodiolus childressi*) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Mar. Biol.* 135: 635~646
- Haruo, K. 1974. Presence of 1-methyladenine in sea urchin gonad and its relation to oocyte maturation. *Dev. Growth Differ.* 16: 159~170
- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A. L., Kanatani, H., and Koide, S. S. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.* 245: 318~321
- Kanatani, H. H. 1973. Maturation-inducing substance in starfishes. *Int. Rev. Cytol.* 35: 253~298
- Kishimoto, T. 1999. Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Dev. Biol.* 214: 1~8
- Kishimoto, T. T., and Kanatani, H. H. 1973. Induction of starfish oocyte maturation by disulfide-reducing agents. *Exp. Cell Res.* 82: 296~302
- Kishimoto, T. T., Cayer, M. M. L., and Kanatani, H. H. 1976. Starfish oocyte maturation and reduction of disulfide-bond on oocyte surface. *Exp. Cell Res.* 101: 104~110
- Maruyama, Y. K. 1980. Artificial induction of oocyte maturation and development in the sea cucumbers *Holothuria leucospilota* and *Holothuria pardalis*. *Biol. Bull.* 158: 339~348
- Maruyama, Y. K. 1981. Precocious breakdown of the germinal vesicle induces parthenogenetic development in sea cucumbers. *Biol. Bull.* 161: 382~391
- Maruyama, Y. K. 1985. Holothurian oocyte maturation induced by radial nerve. *Biol. Bull.* 168: 249~262
- Mita, M., Yamamoto, K., Yoshikuni, M., Ohno, K., and Nagahama, Y. 2007. Preliminary study on the receptor of gonad-stimulating substance (GSS) as a gonadotropin of starfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 299~301
- Miyazaki, A., Kamitsubo, E., and Nemoto, S. I. 2000. Premeiotic aster as a device to anchor the germinal vesicle to the cell surface of the presumptive animal pole in starfish oocytes. *Dev. Biol.* 218: 161~171
- Miyazaki, A., Kato, K. H., and Nemoto, S. 2005. Role of microtubules and centrosomes in the eccentric relocation of the germinal vesicle upon meiosis reinitiation in sea cucumber oocytes. *Dev. Biol.* 280: 237~247
- Nemoto, S., Yoneda, M., and Uemura, I. 1980. Marked decrease in the rigidity of starfish oocytes induced by 1-methyladenine. *Dev. Growth Differ.* 22: 315~325
- Nusco, G. A., Lim, D., Sabala, P., and Santella, L. 2002.  $Ca^{2+}$  Response to cADPr during maturation and fertilization of starfish oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290: 1 015~1 021
- Santella, L., Riso, L. D., Gagnaniello, G., and Kyozuka, K. 1999. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by insP3-Mediated  $Ca^{2+}$  release. *Exp. Cell Res.* 248: 567~574
- Smiley, S., and Cloney, R. A. 1985. Ovulation and fine structure of the sea cucumber *Stichopus californicus* (Echinodermata: holothuriidae) fecund ovary tubes. *Biol. Bull.* 169: 342~364
- Smiley, S. 1988. Investigation into purification and identification of the oocyte maturation hormone of *Stichopus californicus* (Holothuroidea: Echinodermata). In *Echinoderm Biology* (Editor. Burke, R. D. *et al.*) pp. 541~549, Balkema, Rott
- Shirai, H. 1973. Effects of methionine and s-adenosylmethionine on production of 1-methyladenine in starfish follicle cells. *Dev. Growth Differ.* 15: 307~313
- Vacquier, V. D., Tegner, M. J., and Epel, D. 1972. Protease activity establishes the block against polyspermy in sea urchin eggs. *Nature*, 240: 352~353