

两组不同饲料对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 卵巢发育及卵黄发生的激素调控*

陆剑锋^{1,2} 常国亮^{2,3} 吴旭干² 杨筱珍² 赵维信² 成永旭²

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院 合肥 230009; 2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306; 3. 淮阴师范学院生命科学学院 淮阴 223300)

提要 甲壳动物的卵巢发育及卵黄发生受到体内各种内分泌激素的调控。本文研究了两组不同饲料—脂类营养平衡组(A组, 含有磷脂和HUFA)和不平衡组(B组, 缺乏磷脂和HUFA)对中华绒螯蟹卵巢发育及卵黄发生的激素调控, 运用放射免疫法和放射化学法分别测定了处于不同卵黄发生期的中华绒螯蟹的肝胰腺、卵巢、血淋巴中孕酮(PG)、雌二醇(E₂)的含量及中华绒螯蟹大颚器(MO)合成与分泌甲基法尼酯(MF)的速率。结果表明: 1) 中华绒螯蟹体内三种组织(肝胰腺、卵巢和血淋巴)中均存在PG和E₂, PG可能为E₂的前体; 2) 早熟蟹的MO合成MF速率远远大于正常发育的幼蟹, MF的大量合成与分泌是促使早熟蟹产生的主要内分泌因素; 3) B组饲料(含猪油)喂养的河蟹其MO合成MF的速率均高于A组饲料(含鱼油), 且B组饲料的早熟蟹转化PG速度比B组饲料的早熟蟹快; 4) PG和E₂的脂类结合部位能结合外源性卵黄蛋白原(V_g), 通过血淋巴的运输被卵泡细胞胞吞, 最终与卵母细胞内的内源性V_g结合, 共同形成卵黄体; 5) 多不饱和脂肪酸(如EPA和DHA)可能会抑制类固醇激素的产生。研究表明, MF是中华绒螯蟹的促性腺激素, 具有促使PG合成和E₂转化的作用, 它们共同诱导河蟹卵巢发育及卵黄发生。

关键词 中华绒螯蟹, 卵巢发育, 卵黄发生, 早熟, 孕酮, 雌二醇, 甲基法尼酯
中图分类号 S963

卵生脊椎动物的卵黄蛋白合成与卵母细胞成熟通常由多激素系统控制, 其中包括各种不同的类固醇激素(Wallace *et al.*, 1981)。与卵生脊椎动物相似, 在甲壳动物体内同样也能检测到类固醇激素(陆剑锋等, 2001)。研究表明, 雌激素、孕激素等类固醇激素存在于甲壳动物的肝胰腺、卵巢、血淋巴等组织中, 但它们的确切作用机制或模式仍然不是很清楚(Warrier *et al.*, 2001)。此外, 甲壳动物生殖内分泌也有着自身的特点, 如虾蟹类的生殖和发育还受到一种特殊的腺体——大颚器(mandibular organ, MO)分泌活动的调控。Laufer等(1987)认为甲壳动物的MO中含

有昆虫保幼激素样(juvenile hormone analog, JHA)的化合物——甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF)。MF是一种类萜, 属类脂, 具有类似胆固醇的构造, MO的超微结构呈现脊椎动物类固醇合成细胞的特征(赵维信等, 1998)。JH是昆虫咽侧体分泌的一种特有激素, 在昆虫发育过程中起重要调节作用, 其中之一是促进卵子发育, 被认为是昆虫的促性腺激素(Wyatt *et al.*, 1996)。MF不仅在分子结构上与JH III相似, 而且生理功能也与JH III非常相似, 因此MF被称为是甲壳动物的JH(Nagaraju, 2007)。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(简称河蟹)是我国

* 国家自然科学基金项目, 30901110号、30471349号; 上海市农委攻关项目, 沪农科推字(2008)第2-4号、(2009)第2-1号; 上海高校创新团队(第二期)资助, 2010—2012; 国家农业科技成果转化基金项目, 2009GB2C300156号。陆剑锋, 博士, 副研究员, E-mail: luji@sibs.ac.cn

通讯作者: 成永旭, 教授, E-mail: yxcheng@shfu.edu.cn
收稿日期: 2009-12-10, 收修改稿日期: 2010-03-12

一种重要的经济蟹类。但在河蟹规模化养殖过程中不断有较大比例的性早熟现象发生,严重制约了河蟹养殖业的健康发展。早熟蟹属于低质蟹类,一般当年达到性成熟,体重通常为 15—35g,且死亡率高,严重影响河蟹生产效益的提高(张列士等, 2001)。河蟹性早熟的发生是一个极其复杂的调控过程,可能受多种激素的共同作用和养殖环境因素的综合影响,阐明河蟹性早熟的生理机制尚需大量的基础研究工作。吴嘉敏等(2001)报道早熟蟹与血淋巴和性腺中雌二醇水平有关,早熟蟹血淋巴雌二醇水平明显高于正常发育蟹。赵维信等(2003)报道早熟蟹与 MF 的过量分泌有关,早熟蟹 MO 提早发育,大量合成和分泌 MF(刺激性腺发育成熟)是导致河蟹性早熟的主要内分泌因素。MO 的研究已经成为当今甲壳动物内分泌学研究的一个热点,但 MO 分泌 MF 是否与其它类固醇激素之间的调控存在一定的关联,还有待进一步研究。

通过饲料营养的调控来防止河蟹性早熟,操作灵活方便,在实际生产中可能更具有可行性(张列士等, 2002)。早期的研究表明,饲料中缺乏 HUFA 和 PL 会影响幼蟹对其他脂类成分和脂肪酸的吸收和利用,进而会对幼蟹的内分泌和生殖蜕壳造成一定的影响(常国亮等, 2008)。本研究采用两组不同饲料来饲养河蟹(直至产生性早熟蟹),运用放射免疫法(RIA)测定肝胰腺、卵巢和血淋巴组织中的孕酮和雌二醇含量,运用放射化学法(RCA)测定 MO 合成与分泌 MF 的速率,旨在揭示类固醇和类固醇激素在河蟹性腺发育过程中的作用及不同饲料对河蟹体内生殖激素变动的的影响,并试图从饲料营养学和生殖内分泌学两个不同的角度来阐明河蟹性早熟的生理机制,为今后河蟹养殖生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)于 2006 年

9—12 月份取自江苏南通莱亚水产有限公司的扣蟹养殖基地,饲养期间一直投喂两组不同营养配比的实验饲料(表 2)。由于饲料营养的不平衡,河蟹个体分化现象较为严重,考虑到同批次的蟹体规格不同会导致其激素分泌水平差异较大,因此为了排除采样不均而引起检测数据上的无可比性,本实验遵循“同批次(即同月)选取同规格(大小和重量)的正常发育幼蟹或性早熟蟹”的采样原则,每批次解剖 16 只雌蟹,每组各选取 8 只,相关的生物学参数见表 1。当年 9—10 月份的大部分雌蟹是正常发育幼蟹,性腺还处于发育早期(卵原细胞期),仅有极少量出现性早熟(初级卵黄发生期),但 11—12 月份的雌蟹则大部分处于性早熟,性腺处于次级卵黄发生中后期。

1.2 实验饲料

实验饲料原料组成及生化成分见表 2,分为 A 组(添加鱼油和磷脂,脂类营养相对平衡)和 B 组(添加猪油,缺乏磷脂和 HUFA)。复合维生素和矿物质为实验室自行配置,所有饲料原料均购自上海生化试剂有限公司。所有原料按比例添加后用蒸馏水混合均匀进行制粒,饲料直径 0.15cm,长度 1cm。所制饲料在 25℃ 下风干 48h,于 -20℃ 冰柜中密封保存备用。

1.3 类固醇激素的抽提和样品处理

解剖河蟹,按如下方法对其肝胰、卵巢和血淋巴进行类固醇激素的抽提和样品处理。

肝胰腺、卵巢抽提:称取 0.2—0.5g 雌蟹卵巢或肝胰腺,每只河蟹为一个样本,分别置于玻璃匀浆器中充分匀浆,注入 4 的乙酸乙酯 1.5—2ml, 3000—3500r/min 离心 5—10min,吸取上清液置于 1.5ml 的 Eppendorf 管,往匀浆沉淀中再加 1.5—2ml 4 的乙酸乙酯,离心后合并上清液,即为肝胰腺和卵巢的抽提物。

血淋巴抽提:抽取 0.2—0.5ml 雌蟹血淋巴样品,每只河蟹为一个样本,置于 1.5ml 的 Eppendorf 管,迅速注入 4 的乙酸乙酯 1ml, 3000—3500r/min 离心 5—10min,吸取上清液置于另一个 Eppendorf 管,往血淋

表 1 正常发育和性早熟雌蟹的生物学参数($n = 16$)
Tab.1 Biological parameters of normal and precocious female crabs ($n = 16$)

月份	体长(cm)	体宽(cm)	体重(g)	GSI(%)	卵巢发育分期	MO 颜色及形态
9	1.78±0.17	1.95±0.20	3.29±0.90	—	卵原细胞早期	白色透明(条状)
10	1.82±0.13	2.02±0.15	3.34±0.71	—	卵原细胞早期	白色透明(条状)
11	3.39±0.14	3.68±0.14	21.6±2.70	6.95±1.98	卵黄发生中期	淡土黄色(团絮状)
12	3.28±0.20	3.56±0.22	20.09±3.73	10.04±1.08	卵黄发生后期	淡土黄色(团絮状)

表 2 两组不同实验饲料的原料组成及生化成分
Tab.2 Ingredients and biochemical composition of two different experimental diets

成分(% DW)	成分及组成(%)		脂肪酸	脂肪酸组成(%)	
	A 组	B 组		A 组	B 组
酪蛋白	41	41	14:0	5.69	3.88
糊精	25.64	25.64	15:0	0.68	0.54
褐藻胶	3	3	16:0	21.79	24.19
复合维生素	2	2	17:0	0.56	0.53
矿物质	3	3	18:0	4.51	14.26
胆固醇	0.5	0.5	SFA	33.48	43.40
甘氨酸	0.5	0.5			
甜菜碱	0.15	0.15	14:1n-7	2.51	2.38
酵母提取物	4	4	16:1n-5	0.54	0.32
纤维素	8	8	16:1n-7	5.86	2.88
肌醇	0.6	0.6	17:1	0.34	0.41
维生素 C	0.5	0.5	18:1	14.74	34.00
维生素 E	0.1	0.1	20:1	2.01	0.83
氯化胆碱	1	1	MUFA	25.46	40.50
BHT	0.01	0.01			
鳕鱼肝油	6	—	18:2n-6	16.29	10.00
大豆卵磷脂	4	—	18:4n-3	1.69	0.22
猪油	—	10	18:3n-3	2.64	0.83
			20:2n-6	0.22	0.46
组成			20:5n-3 EPA	6.63	0.65
水分(%)	8.36	8.90	20:4n-6 AA	0.59	0.38
粗蛋白(% DW)	39.50	40.89	22:5n3	0.90	0.15
总脂(% DW)	10.60	11.64	22:6n-3 DHA	6.11	0.70
粗纤维(% DW)	7.52	7.41	PUFA	34.53	13.37
灰分(% DW)	4.04	4.50	n-3PUFA	18.33	2.55
磷脂(% DW)	4.53	0.39	n-6PUFA	17.11	10.89
胆固醇(% DW)	0.36	0.40	n-6/n-3	0.93	4.32
HUFA (% DW)	1.08	0.18	HUFA	14.59	1.92

注: “DW”表示干重

巴沉淀中再添加 4 的乙酸乙酯 0.5ml, 离心合并上清液, 即为血淋巴抽提物。

抽提样品处理: 将装有样品上清液的 Eppendorf 管置于 45 水浴中加热挥发(或氮吹仪吹干), 去除上清液中的乙酸乙酯溶剂, 然后加入 5%明胶磷酸缓冲液(GPBS)1ml 溶解提取物, 用漩涡混合器混匀后于 -20 冰箱中保存备用。

1.4 类固醇激素(孕酮、雌二醇)浓度的放射免疫(RIA)测定

孕酮、雌二醇参照放射免疫分析药盒(北京科美东雅生物技术有限公司)进行测定。

方法灵敏度: 分别为 $\leq 0.05\text{ng/ml}$ 和 $\leq 3\text{pg/ml}$;

抗血清特异性: 孕酮抗血清与孕烯醇酮、雄稀二酮、雌二醇的交叉反应率分别为 0.03%、0.01%、0.01%; 雌二醇抗血清与雌三醇、雌酮、孕酮、睾酮的交叉反应率分别为 0.09%、0.7%、0.01%、0.01%; 标记物放射性总活度: 均为 74kBq/瓶。

测定步骤: 取出冻结的肝胰腺、卵巢、血淋巴的粗提物, 解冻后取 100 μl 样品注入放免管, 加入 ^{125}I -孕酮和孕酮抗体(或 ^{125}I -雌二醇和雌二醇抗体), 用漩涡混合器混匀, 37 水浴 30min, 然后在各管中加入分离剂(使游离抗原与抗原抗体复合物分离), 充分混匀后离心沉淀, 3500r/min 离心 25—30min, 立即吸去上清液, 在 GC-911 型全自动 计数仪(中国科技大学)

上读数。根据各管样品在每分钟的放射性计数(CPM 值), 计算出样品含量。

1.5 类固醇激素(甲基法尼酯)合成速率的放射化学(RCA)测定

参照赵维信等(2003)建立的体外放射化学测定法, 该法是在 Tobe 等(1989)对昆虫 JH 滴度测定法的基础上进行的改进。

测定步骤: 在含有一定量 $^3\text{H-Met}$ 的每个无菌玻璃培养试管中(每管含缺少甲硫氨酸的 TC 199 培养基 100 μl)放入 1 个 MO, 30 闭光无菌培养 3h 后取出培养管, 用大头针将 MO 从培养管中挑出。在培养管中加入 300 μl 异辛烷, 迅速震荡后 3000r/min 离心 10min, 小心吸取上清液有机相 200 μl 于 1.5ml 的 Eppendorf 管中。每个 Eppendorf 管中加入 1ml 闪烁液, 震荡后放入闪烁杯后过夜, 在 LS 6500 型液体闪烁仪(Beckman)上读数。根据各管样品在每分钟的衰变数据(DPM 值), 计算出测定结果。

1.6 数据统计

采用 t 检验和 ANOVA 方差分析进行实验数据处理和差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 两组不同饲料对雌蟹类固醇激素(甲基法尼酯, MF)分泌的影响

同一饲料组喂养的幼蟹在 9—12 月份的 MF 分泌规律相似(表 3), 9—10 月份均较低, 11 月份达到峰值, 12 月份呈下降趋势。此外, 11—12 月份性早熟蟹的 MF 分泌速率均显著高于 9—10 月份幼蟹, 这与 MO 颜色、形态变化相一致(表 1)。

比较两不同饲料组引起 MF 分泌速率的差异, 可以发现 B 组的 MF 分泌速率均略高于 A 组(表 3)。9 月份差异不显著($P>0.05$); 10 月份差异显著($P<0.05$),

表 3 两组不同饲料对雌蟹 MF 分泌的影响($n=8$)
Tab.3 Effects of two different experimental diets on MF secretion in female crabs ($n=8$)

月份	MF 分泌速率[pmol/(h·ind)]	
	A 组(含鱼油)	B 组(含猪油)
9	11.52±5.57 ^{a1}	14.92±7.97 ^{a1}
10	9.87±3.85 ^{a1}	13.57±6.59 ^{a2}
11	24.15±6.33 ^{b1}	28.55±8.84 ^{b2}
12	16.73±7.64 ^{c1}	18.35±6.21 ^{c1}

注: 同一饲料组比较, 字母不同表示差异显著($P<0.05$), 字母相同表示差异不显著($P>0.05$); 不同饲料组比较, 数字不同表示差异显著($P<0.05$), 数字相同表示差异不显著($P>0.05$)。下同

分别为(9.87±3.85)和(13.57±6.59)pmol/(h·ind); 11 月份差异显著($P<0.05$), 分别为(24.15±6.33)和(28.55±8.84)pmol/(h·ind); 12 月份差异不显著($P>0.05$)。

2.2 两组不同饲料对雌蟹孕激素(孕酮, PG)变动的的影响

9—10 月份, AB 两组不同饲料对幼蟹 PG 变动的的影响相似, 由于幼蟹的性腺发育尚处于痕迹状态, 所以没有取到足够的卵巢组织进行样品测定(表 4)。9 月份, 除卵巢组织中未测定 PG 外, 两组饲料喂养的幼蟹在其它两种组织(肝胰腺和血淋巴)中均未能检测到 PG; 10 月份在肝胰腺和血淋巴两种组织中有检测到 PG, 但 PG 处于很微量的水平, 浓度均较低。A 组为(0.04±0.01)ng/g 肝胰腺和(0.02±0.02)ng/ml 血淋巴, B 组为(0.04±0.02)ng/g 肝胰腺和(0.02±0.01)ng/ml 血淋巴, AB 两组饲料相同组织(肝胰腺或血淋巴)的浓度无显著性差异($P>0.05$)。

11 月份雌蟹 PG 含量逐渐升高, 12 月份又明显回落(表 4)。11 月份在三种组织中均有检测到 PG, 且卵巢中 PG 含量均显著高于肝胰腺($P<0.05$), A 组达(2.01±0.33)ng/g 卵巢, B 组达(2.53±0.66)ng/g 卵巢, 血淋巴

表 4 两组不同饲料对河蟹 PG 变动的的影响($n=8$)
Tab.4 Effects of two different experimental diets on PG secretion in female crabs ($n=8$)

月份	A 组(含鱼油)			B 组(含猪油)		
	肝胰腺(ng/g)	卵巢(ng/g)	血淋巴(ng/ml)	肝胰腺(ng/g)	卵巢(ng/g)	血淋巴(ng/ml)
9	—(未检出)	—(未测定)	—(未检出)	—(未检出)	—(未测定)	—(未检出)
10	0.04±0.01 ¹	—(未测定)	0.02±0.02 ²	0.04±0.02 ¹	—(未测定)	0.02±0.01 ²
11	0.52±0.18 ^{a3}	2.53±0.66 ^{b5}	1.11±0.34 ⁶	0.35±0.09 ^{a4}	2.01±0.33 ^{b5}	1.65±0.21 ⁶
12	—(未检出)	0.25±0.06 ⁷	0.68±0.52 ⁹	—(未检出)	0.10±0.05 ⁸	0.32±0.18 ¹⁰

注: 同一饲料组不同激素比较: 字母不同表示差异显著($P<0.05$), 字母相同表示差异不显著($P>0.05$); 因为单位不同(ng/g 和 ng/ml), 血淋巴和肝胰腺、血淋巴和性腺的激素均未作差异分析。不同饲料组中相同组织的比较: 数字不同表示差异显著($P<0.05$), 数字相同表示差异不显著($P>0.05$); 同组饲料同一激素不同月份比较: 数字不同表示差异显著($P<0.05$), 数字相同表示差异不显著($P>0.05$)

中 PG 含量无显著性差异($P>0.05$)。12 月份各组织中 PG 浓度显著下降, 肝胰腺中未能检测到 PG, 仅在卵巢和血淋巴中有检测到, 且两组饲料相同组织的浓度存在显著性差异($P<0.05$)。

2.3 两组不同饲料对河蟹雌激素(雌二醇, E_2)变动的的影响

9—10 月份, 除卵巢组织中未测定 E_2 外, 在两不同饲料组喂养的幼蟹体内均未能检测到 E_2 , 而 11—12 月份的性早熟蟹在三种组织中均能检测到 E_2 (表 5)。

11 月份, 两组性早熟蟹的卵巢中 E_2 浓度显著升高($P<0.05$), B 组饲料喂养的性早熟蟹达 $(0.65\pm 0.22)\text{ng/g}$ 卵巢, A 组达 $(0.52\pm 0.18)\text{ng/g}$ 卵巢, 约为肝胰腺中 E_2 浓度的 2.5 倍, 但血淋巴中的 E_2 浓度相对较低; 12 月份, 性早熟蟹的血淋巴中的 E_2 浓度均迅速上升, B 组达 $(0.67\pm 0.20)\text{ng/ml}$ 血淋巴, A 组达 $(0.55\pm 0.15)\text{ng/ml}$ 血淋巴, 显著高于 11 月份, 约为 11 月份的 2 倍, 而肝胰腺和卵巢中的 E_2 浓度则呈现急剧下降的趋势。

表 5 两组不同饲料组对河蟹 E_2 变动的的影响($n=8$)
Tab.5 Effects of two different experimental diets on E_2 secretion in female crabs ($n=8$)

月份	A 组(含鱼油)			B 组(含猪油)		
	肝胰腺(ng/g)	卵巢(ng/g)	血淋巴(ng/ml)	肝胰腺(ng/g)	卵巢(ng/g)	血淋巴(ng/ml)
9	—(未检出)	—(未测定)	—(未检出)	—(未检出)	—(未测定)	—(未检出)
10	—(未检出)	—(未测定)	—(未检出)	—(未检出)	—(未测定)	—(未检出)
11	$0.21\pm 0.06^{\text{a1}}$	$0.52\pm 0.18^{\text{b2}}$	$0.30\pm 0.09^{\text{c3}}$	$0.25\pm 0.08^{\text{a1}}$	$0.65\pm 0.22^{\text{b2}}$	$0.35\pm 0.16^{\text{c3}}$
12	$0.08\pm 0.01^{\text{a4}}$	$0.20\pm 0.05^{\text{b5}}$	$0.55\pm 0.15^{\text{c6}}$	$0.06\pm 0.04^{\text{a4}}$	$0.15\pm 0.06^{\text{b5}}$	$0.67\pm 0.20^{\text{c7}}$

3 讨论

本实验结果表明, 河蟹与其它甲壳动物相似(蔡生力等, 2001), 在其体内的三种组织(肝胰腺、卵巢和血淋巴)中均存在 PG、 E_2 。未发育蟹和早熟蟹的 MO 合成与分泌 MF 的规律与早期的研究结果相一致(赵维信等, 2003)。

3.1 河蟹体内激素(MF 与 PG、 E_2)之间的关系

甲壳动物 MO 分泌的 MF 在分子结构和生理功能上与昆虫 JH III 相似, 被称为是甲壳动物的 JH, 这已是一个不争的事实。MF 的主要生理功能(Homola *et al.*, 1997): (1) 生殖作用, 与性腺发育相关, 刺激精巢发育和卵黄启动; (2) 变态作用, 与蛋白激酶 C(PKC)相关, 可以延滞或诱导幼体变态; (3) 蜕皮作用, 与蜕皮激素(20-羟基蜕皮酮, 20-HE)含量变动相关, 可以诱导蜕皮发生或缩短蜕皮周期; (4) 蛋白代谢, 与总 DNA、RNA 含量相关, 可以促进总蛋白合成。这些生理功能均与甲壳动物的性腺发育直接相关, 因此 MF 也被认为是甲壳动物的促性腺激素(Laufer *et al.*, 1998; 陆剑锋等, 2001)。由表 3、表 4 和表 5 中三种激素的数据变动情况可知, 河蟹体内最先开始合成与分泌的是类固醇激素 MF, 之后是 PG, 最后是 E_2 , 即类固醇激素的合成与分泌可能迟于类固醇激素。9 月份幼蟹的 MO 分泌 MF 的速率均已超过 $10\text{pmol}/(\text{h}\cdot\text{ind})$, 此时幼蟹体内还检测不到 PG 和 E_2 的水平, 当幼蟹进

一步发育至 10 月份后才从肝胰腺和血淋巴组织中检测到低浓度水平的 PG(分别为 0.04ng/g 和 0.02ng/ml)(表 4)。相比之下, E_2 水平的出现又比 PG 滞后, 因为 9—10 月份同期的幼蟹的体内均未能检测到 E_2 (表 5)。Couch 等(1987)研究认为甲壳动物 PG 可能是其它类固醇激素的前体, 暗示甲壳动物与两栖类和鱼类等脊椎动物相似, 体内 PG 可以转化为 E_2 , 这也解释了在本实验中河蟹体内的 E_2 水平为什么会比 PG 滞后的原因。根据本实验的研究结果, 结合我们以前发表的文章(赵维信等, 2003), 进一步支持 MF 是河蟹促性腺激素的观点, 即河蟹的卵巢发育最初是由 MF 对性腺的刺激作用来启动卵黄的发生。此外, 在河蟹体内不管是 PG 还是 E_2 , 卵巢中的激素水平先升高达到峰值, 之后是血淋巴中的激素逐渐升高, 而肝胰腺中的激素升高后又迅速降低至无法检测。作者推测 MF 是通过促使卵巢合成与分泌 PG, 然后通过血淋巴的运输作用将 PG 转移至肝胰腺, 并同时转化为 E_2 。

3.2 脂类营养组成对河蟹体内激素的影响

两组不同饲料对河蟹体内激素变动的差异比较: 从 MF 的分泌速率来看, B 组饲料(含猪油)喂养的河蟹其 MO 分泌 MF 的速率均高于 A 组饲料(含鱼油)(表 3), 在 10 月份(发育早期)和 11 月份(卵黄发生中期)均存在显著差异; 从表 4 可知, B 组早熟蟹的血淋巴中 PG 水平下降的较快, 卵黄发生后(12 月份)降至 $(0.32\pm 0.18)\text{ng/ml}$, 与 A 组早熟蟹 $[(0.68\pm 0.52)\text{ng/ml}]$ 相

比差异显著($P < 0.05$), 推测与 B 组早熟蟹转化 PG 速度比 A 组快有关。表 5 中的数据充分证实了这一推论, B 组早熟蟹的血淋巴中 E_2 浓度上升最快 $[(0.67 \pm 0.20) \text{ng/ml}]$, 与 A 组 $[(0.55 \pm 0.15) \text{ng/ml}]$ 相比差异显著($P < 0.05$)。

为什么不同饲料会引起河蟹体内激素变动的差异?可能是由于不同饲料(脂类等营养素组成的差异)会影响甲壳动物的性激素合成,特别是磷脂和胆固醇对虾蟹类的成活和生长有重要影响,并与其蜕皮、生殖等生命活动密切相关。在脊椎动物中,胆固醇为类固醇激素的前体,但甲壳动物自身不能合成胆固醇,从头合成磷脂和长链不饱和脂肪酸(PUFA)的能力也极有限,而这些物质在成熟卵巢中具有相当的含量,因而在卵巢成熟过程中必须要通过外界饵料进行添加补充,从外界饵料中摄取足够的量,以满足其生长发育的需要(成永旭等,1999)。若外界环境中这些脂肪酸不能满足卵巢成熟过程的需要,则可能影响卵巢的成熟,并进一步影响胚胎的发育。饲料中添加适量的磷脂和 HUFA 有利于提高幼体的成活率和增重率,且磷脂的添加有利于 HUFA 的吸收和利用(Kanazawa *et al*, 1985; Thompson *et al*, 2003)。HUFA 对于蟹类幼体发育、变态和成活的作用具有极其重要的作用, DHA 主要与蚤状幼体变态速度和生长有关,而 EPA 主要与成活率有关(Takeuchi *et al*, 1999; Suprayudi *et al*, 2004)。EPA 和 DHA 在体内还能抑制胆固醇的合成,增加胆固醇排泄的作用(蔡双莲等,2003)。在本实验中,两组饲料含有的胆固醇(类固醇激素的前体)总量分别为 0.40%和 0.36%,因此两组饲料在胆固醇水平上无显著性差异($P > 0.05$),但 A 组饲料(含鱼油)含有丰富的 PUFA,如 EPA 和 DHA 的含量分别为 6.63%和 6.11%,而 B 组饲料(含猪油)的 EPA 和 DHA 的含量仅为 0.65 和 0.70%,A 组饲料中还添加了 4%的磷脂,更加有利于 PUFA 的吸收和利用。随着河蟹的生长发育,体内由 MO 合成与分泌的 MF 水平不断上升,将进一步促进孕酮的合成和雌二醇的转化。当 A 组饲料被河蟹摄入后,在磷脂的作用下 PUFA 被迅速吸收和利用,高含量的 EPA 和 DHA 将抑制其胆固醇的利用,使得 A 组饲料喂养的河蟹合成类固醇含量较低,而 B 组饲料则因为低含量的 EPA 和 DHA(且不含磷脂)对胆固醇利用的抑制作用较弱,其类固醇合成量相对较高,类固醇转化速率也比 A

组高(表 3 和 4)。因此 B 组饲料(含猪油)比 A 组(含鱼油)饲料喂养的河蟹激素含量相对较高,这也是为什么 B 组饲料易引起河蟹性早熟的主要原因之一,这与陈再忠(2002)¹⁾的研究结果相一致。对于某些鱼类(如金鱼)的研究表明, EPA 和 DHA 同样能够抑制类固醇激素的产生(Wade *et al*, 1991),花生四烯酸(AA)由于能被转化为前列腺素(PGE)反而能刺激类固醇激素的产生(Van Der Kraak *et al*, 1990),但 AA 的这种转化作用可以部分地被 EPA 和 DHA 阻遏, EPA 和 DHA 还可以抑制 PGE 和促性腺激素(Wade *et al*, 1994)。对某些哺乳动物(如鼠类)AA 则能抑制促黄体生成素的产生(Lopez-Ruiz *et al*, 1992)。

3.3 激素对河蟹卵黄发生的作用

甲壳动物卵黄的主要成分是卵黄磷蛋白(Vn),根据来源不同分为内源性卵黄和外源性卵黄两种,通常把卵母细胞内合成卵黄物质的过程称为初级卵黄发生,把胞饮(或胞吞)方式形成卵黄物质的过程称为次级卵黄发生(穆淑梅等,2004)。来自胞饮的卵黄物质被认为是卵黄蛋白原(Vg),是 Vn 的前体物,两者有着相似的细胞化学特性和免疫原性。堵南山等(1999)通过细胞超微结构直接观察到卵巢卵母细胞内源性 Vg 及卵黄体的逐渐形成,验证了外源性 Vg 直接或间接地转入卵母细胞内,认为肝胰腺可能会产生 Vg; Li 等(2006)通过编码 Vg 的 mRNA 在不同组织中的表达情况,证实了河蟹卵巢和肝胰腺均能合成 Vg,肝胰腺是卵巢外 Vg 合成的场所。对于外源性 Vg,河蟹主要以两种不同的方式摄取 Vg,首先是卵母细胞以胞吞的方式直接接纳,其次通过卵(滤)泡细胞被卵母细胞间接接纳(堵南山等,1995)。类固醇激素(PG 和 E_2)是胆固醇的衍生物,它的脂类结合位置能够结合 Vg,通过结合 Vg,这些疏水性分子在循环系统中(如血淋巴)变得更加可溶; Vn 是 Vg 的水解产物, Vn 同样可以结合类固醇激素,结合类固醇激素的 Vn 是在 Vg 从血淋巴运输到卵母细胞的过程中形成的(Warrier *et al*, 2001)。因此从肝胰腺转入血淋巴的 Vg 能够与类固醇激素结合,结合 Vg 类固醇激素通过血淋巴的运输作用转移至卵巢,再通过卵泡细胞的胞吞作用(由卵母细胞表面的受体介导)间接摄取 Vg。在本实验中,河蟹血淋巴中的 E_2 水平在卵黄发生后期(此时卵泡细胞层已经形成)不断上升(表 5),高浓度的 E_2 将肝胰腺合成的 Vg 通过血淋巴运输至卵泡细胞,

1) 陈再忠, 2002. 中华绒螯蟹性早熟及其机理的研究. 上海: 上海水产大学博士学位论文, 1—35

最后由卵泡细胞的胞吞作用迅速转移进卵母细胞。血淋巴中的 PG 也会以类似的方式运输 V_g, 但卵黄发生后期 PG 水平迅速下降, 推测卵黄积累的最后阶段可能由 E₂ 来完成, 即 E₂ 可能具有催熟卵母细胞的作用。作者认为河蟹通过以上的多种方式来达到卵母细胞完成外源性 V_g 的积累过程, 并最终和内源性 V_g 结合形成成熟的卵母细胞。

综上所述, 河蟹体内的各种性激素如类固醇激素和类固醇激素, 与卵巢发育或卵黄形成密切相关, 这些激素在不同阶段起着不同作用, 而且不同激素的作用有一定的积聚效应(accumulative effect), 它们互相作用共同完成对河蟹卵巢发育及卵黄发生的诱导。但有关不同的脂肪源或脂肪酸对河蟹卵巢成熟发育及对性激素合成的影响机制(如 EPA 和 DHA 对 AA 的调节)仍然不是很清楚, 尚待今后进一步的深入研究。

致谢 原中国科技大学陈勇平博士(现为美国华盛顿大学博士后)协助类固醇激素(PG 和 E₂)和类固醇激素(MF)的检测工作, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 成永旭, 堵南山, 赖 伟, 1999. 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类及脂肪酸组成. 中国水产科学, 6(1): 79—81
- 吴嘉敏, 姜新耀, 2001. 中华绒螯蟹血淋巴钙离子和 17-雌二醇浓度与性早熟的关系. 水产学报, 25(2): 112—115
- 张列士, 李 军, 2002. 中华绒螯蟹增养殖技术. 北京: 金盾出版社, 124—303
- 张列士, 徐琴英, 2001. 自然及养殖水体河蟹性成熟和性早熟的研究. 水产科技情报, 28(3): 106—111
- 陆剑锋, 赵维信, 2001. 十足目甲壳动物生殖激素对卵巢的作用及其调控. 上海水产大学学报, 10(2): 166—169
- 赵维信, 李 胜, 1998. 克氏原螯虾大颚器的超微结构研究. 水产学报, 22(4): 303—308
- 赵维信, 陆剑锋, 2003. 中华绒螯蟹大颚器激素生物合成与性早熟的关系. 水产学报, 27(4): 289—295
- 堵南山, 赖 伟, 陈鹏程等, 1999. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究. 动物学报, 45(1): 88—92
- 堵南山, 赖 伟, 南春容等, 1995. 中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究. 动物学报, 41(3): 229—234
- 常国亮, 吴旭干, 成永旭等, 2008. 不同脂类营养对中华绒螯蟹幼蟹生长、成活、肝胰腺指数和生化成分的影响. 海洋与湖沼, 39(3): 276—283
- 蔡双莲, 李 敏, 2003. 多不饱和脂肪酸的研究进展. 生命科学, 7(4): 289—292
- 蔡生力, 赵维信, 李德尚等, 2001. 中国对虾肝胰腺、卵巢及血淋巴中的孕酮和雌二醇含量的生殖周期变化. 水产学报, 25(4): 304—310
- 穆淑梅, 康现江, 牛建章等, 2004. 甲壳动物卵黄发生及其激素调控研究进展. 海洋科学, 28(6): 66—70
- Couch E F, Hagino N, Lee J W *et al*, 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. Comp Biochem Physiol, 87(3): 765—770
- Homola E, Chang E S, 1997. Methyl farnesoate: Crustacean juvenile hormone in search of function. Comp Biochem Physiol, 117(3): 347—356
- Kanazawa A, Teshima S, Sakamoto M *et al*, 1985. Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on the growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. Aquaculture, 50: 39—49
- Laufer H, Biggers W J, Ahl J S B, 1998. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesoate. Gen Comp Endocrinol, 111: 113—118
- Laufer H, Borst D W, Baker F C *et al*, 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. Science, 235: 202—205
- Li K, Chen L Q, Zhou Z L *et al*, 2006. The site of vitellogenin synthesis in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*. Com Biochem Physiol Part B, 143: 453—458
- Lopez-Ruiz M P, Choi M S K, Rose M P *et al*, 1992. Direct effect of arachidonic acid on protein kinase C and LH-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells: Evidence for tonic inhibitory control of steroidogenesis by protein kinase C. Endocrinology, 130: 1122—1130
- Nagaraju G P C, 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? Aquaculture, 272(1—4): 39—54
- Suprayudi M A, Takeuchi T, Hamasaki K *et al*, 2004. Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: implication of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. Aquaculture, 231: 403—416
- Takeuchi T, Satoh N, Sekiya S *et al*, 1999. The effect of EPA and DHA on the molting rate of larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 65(6): 998—1004
- Thompson K, Muzinic L, Christian T *et al*, 2003. Lecithin requirements of juvenile American red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Aquaculture Nutr, 9: 223—230
- Tobe S S, Yong D A, Khoo H W, 1989. Production of methyl farnesoate by the mandibular organ of the mud crab, *Scylla serrata*: validation of a radiochemical assay. Gen Comp Endocrinol, 73(3): 342—353
- Van Der Kraak G, Chang J P, 1990. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory follicles. Gen Comp Endocrinol, 77: 221—228
- Wade M G, Van Der Kraak G J, 1991. The control of testicular androgen production in the goldfish: effects of activators of different intracellular signaling pathways. Gen Comp Endocrinol, 83: 337—344
- Wade M G, Van Der Kraak G, Gerrits M *et al*, 1994. The release and steroidogenic action of polyunsaturated fatty acids in the

- goldfish testis. *Biol Reprod*, 51: 131—139
- Wallace C M, Selman K, 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleost. *Am Zool*, 21: 335—343
- Warrier S R, Tirumalai R, Subramoniam T, 2001. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp Biochem Physiol Part A*, 130: 283—294
- Wyatt G R, Davey K D, 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone . Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv Insect Physiol*, 26: 1—156

HORMONAL REGULATIONS OF OVARIAN DEVELOPMENT AND VITELLOGENESIS IN CHINESE MITTEN CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS* FED ON TWO DIFFERENT DIETS

LU Jian-Feng^{1,2}, CHANG Guo-Liang^{2,3}, WU Xu-Gan², YANG Xiao-Zhen²,
ZHAO Wei-Xin², CHENG Yong-Xu²

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, 230009; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai, 201306; 3. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaiyin, 223300)

Abstract In crustaceans, ovarian development and vitellogenesis are known to be regulated by circulating hormones. This study examined the hormonal regulations of ovarian development and vitellogenesis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed on two different diets (group A, lipid nutrition balance; group B, lipid nutrition unbalance). The concentrations of progesterone (PG) and estradiol (E₂) in the hepatopancreas, ovary, and hemolymph of *E. sinensis* were measured at different vitellogenic stages by radioimmunoassay. Methyl farnesoate (MF), biosynthesized and secreted by mandibular organ (MO), were analyzed by radiochemical method. The main results were as follows: 1) Occurrence of PG and E₂ in the hepatopancreas, ovary and hemolymph, and PG might be the precursor of E₂; 2) MF biosynthesis rates of precocious crabs were markedly higher than those of normal juvenile crabs, and large amounts of MF biosynthesized and secreted by MO were the endocrine basis for precocity; 3) MF biosynthesis rates of group B (diets containing pork lard) were higher than those of group A (diets containing fish oil and soy lecithin), and conversion rates of PG to E₂ of group B were also higher than those of group A; 4) PG and E₂ possibly bound to Exogenous vitellogenin (Vg) at their lipid binding sites, and were then transported via haemolymph to follicle cells via receptor-mediated endocytosis, and finally integrated with endogenous Vg of oocytes, resulting in their incorporation into the yolk; 5) PUFA such as EPA and DHA might inhibit the production of steroid hormone. Results of this study indicated that MF might act as a gonadotropin which stimulated PG synthesis and E₂ conversion, and these three hormones together induced ovarian development and vitellogenesis.

Key words *Eriocheir sinensis*, Ovarian development, Vitellogenesis, Precocity, Progesterone, Estradiol, Methyl farnesoate