

中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类及脂肪酸组成

成永旭

堵南山 赖伟

(上海水产大学, 200090) (华东师范大学生物系, 上海 200062)

摘要 中华绒螯蟹成熟卵巢中的脂类以2种形态存在,即脂肪滴(L)和卵黄体(Y)。脂肪滴为中性脂,卵黄体主要是磷脂。成熟卵巢的总脂含量约占卵巢湿重的17.78%,且中性脂(NL)大于磷脂(PL)。成熟卵巢的NL依次主要由甘油三酯(TG)、胆固醇(SL)和胆固醇脂(Es)组成;PL主要由卵磷脂(PC)和脑磷脂(PE)组成,且PC含量高于PE。中华绒螯蟹成熟卵巢的NL和PL脂肪酸组成明显不同,PL短链的饱和与不饱和(<18个碳)含量显著低于NL($p < 0.01$),长链的多不饱和酸(>18个碳)含量显著高于NL($p < 0.01$),而一烯酸含量在这2种脂类中基本上无大变化。PL和NL的主要脂肪酸组成皆为:C 16:0、C 16:1、C 18:1、C 18:2、C 20:4、C 20:5 和 C 22:6。

关键词 中华绒螯蟹,脂类,卵巢

甲壳动物卵巢发育过程中,特别是卵黄大量积累时期,卵巢积累了大量的脂肪,它们是成熟卵子胚胎发育的重要能源物质^[1]。脂肪积累的数量和质量对胚胎发育有很大影响^[2,3],故成熟卵巢的脂类和脂肪酸组成在一定程度上决定了亲体的生殖力以及卵的发育和成活。中华绒螯蟹是我国的主要养殖蟹类,探讨和掌握其成熟卵巢脂类的一般组成及其在卵巢中存在的形态,有助于了解其生殖和生理状况,这在理论和应用上都有比较重要的意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

蟹取于上海崇明县前卫村和购于上海长风菜市场,性腺成熟度判定参照薛鲁征等^[4]的方法,随机取5只成熟蟹,蟹重50~150g。

1.2 测定项目和方法

1.2.1 组织学观察 取1小块新鲜成熟卵巢组织,放入福尔马林-钙溶液中固定3d以上,而后取出少许涂布于有甘油明胶的载玻片上,再用另一玻片压挤材料使卵细胞破裂,卵黄均匀分布在玻片上,

于30℃恒温箱中烘干,然后按下列方法进行组织化学染色:中性脂肪用Cain氏耐尔兰法,可使中性脂肪染成红色;磷脂用改进的硫酸耐尔兰法,可使磷脂染成蓝色。

1.2.2 透射电镜观察 取约1mm³的成熟卵巢块,经双重固定(2.5%戊二醛和1%锇酸)后,梯度酒精脱水至90%,然后换丙酮继续脱水,Spurrs' 1969包埋剂包埋,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。JEM 100 CXII透射电镜观察。

1.2.3 水分测定 取1小块新鲜卵巢组织,在60℃下烘16~18h,测定水分含量。

1.2.4 脂类分析

(1)总脂的提取 采用Folch等^[5]程序提取。抽提出的脂肪在0℃以下充氮气使有机溶剂挥发,然后再准确称重。抽提用组织材料为1g左右。

(2)总脂的分离 将总脂分离为中性脂肪和极性脂肪(主要是磷脂)。采用溶剂法(液-液分离法)^[6],其中的2个液相为石油醚(沸程90~120℃)和95%的含水甲醇。

(3)中性脂肪和磷脂的分离和定性 用薄层层析法(TLC法)。中性脂用一步或两步TLC法^[7]。磷脂用Skispki法^[8]。染色用钼酸铵显色法,在展层后

的硅胶板, 喷此显色剂显色后, 所有磷脂和中性脂均显棕色斑点。

(4) 标准脂肪 甘油三酯、胆固醇、棕榈酸、脑磷脂和卵磷脂购于 Sigma 公司。

(5) 脂肪酸组成分析 用毛细管气相色谱法。气相色谱仪: 岛津 GC-17A; 微机记录仪: C-R7A; 混合型标准脂肪酸甲酯购于 Sigma 公司。

2 结果

2.1 电镜观察

中华绒螯蟹成熟卵细胞中, 几乎充满了卵黄体(Y)和脂肪滴(L)。组织化学结果表明, L 是中性脂, Y 中的脂类主要为磷脂。L 与 Y 交互分布, 排列紧密(图版 I-3, 4) 或较疏散(图版 I-5), 不同的分布区域, 时有 L>Y(图版 I-4) 或 L<Y(图版 I-3)。

2.2 卵巢脂类的生化组成分析

中华绒螯蟹成熟卵巢的总脂肪含量约为 17.

78%, 且中性脂含量大于极性脂含量(表 1)。

表 1 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类组成(5 只蟹的平均值)
Table 1 Lipid compositions of mature ovary of Chinese crab
Eriocheir sinensis (n=5)

| 性腺指数/% gonad index | 总脂: 卵 巢湿重/% gross lipid/ovary wet weight | 总脂: 卵 巢干重/% gross lipid/ ovary dry weight | 中性脂: 总脂/% neutral lipid/ gross lipid |
|--------------------------|---|---|--|
| 12.14 ± 1.60 | 17.78 ± 3.51 | 30.82 ± 3.77 | 65.28 ± 4.20 |

成熟卵巢中, NL 依次主要由甘油三酯(TG)、胆固醇(SL)和少量胆固醇脂(Es)组成(图版 I-2); PL 主要由 2 种磷脂组成, 即卵磷脂(PC)和脑磷脂(PE), 且 PC 含量高于 PE(图版 I-1)。

中华绒螯蟹成熟卵巢的 NL 和 PL 的脂肪酸组成明显不同(表 2), PL 短链的饱和及不饱和脂肪酸(<18 个碳)含量显著低于 NL, 长链的多不饱和脂肪酸(>18 个碳)含量显著高于 NL, 而一烯酸含量在这 2 种脂类中基本上无大变化。

表 2 中华绒螯蟹成熟卵巢中性脂和磷脂的脂肪酸组成(n: 蟹样数量)

Table 2 Fatty acid compositions of neutral and polar lipid in mature ovaries of Chinese crab *E. sinensis*

| name | PL (n=4) mean ± SD | NL (n=4) mean ± SD | Pt | 显著性 | name | PL (n=4) mean ± SD | NL (n=4) mean ± SD | Pt | 显著性 |
|-------|-----------------------|-----------------------|-------|-----|-------|-----------------------|-----------------------|--------|-----|
| C14:0 | 0.897 ± 0.819 | 1.608 ± 0.600 | 0.119 | | C20:4 | 5.862 ± 1.351 | 3.830 ± 1.136 | 0.030 | * |
| C16:0 | 8.710 ± 0.917 | 15.334 ± 0.582 | 0.000 | ** | C20:5 | 10.635 ± 0.722 | 6.487 ± 1.291 | 0.001 | ** |
| C16:1 | 5.516 ± 0.802 | 9.151 ± 1.631 | 0.004 | ** | C22:3 | 1.157 ± 0.405 | 0.007 ± 0.005 | 0.004 | ** |
| C17:0 | 0.730 ± 0.376 | 0.482 ± 0.276 | 0.200 | | C22:4 | 0.806 ± 0.270 | 0.333 ± 0.043 | 0.040 | |
| C18:1 | 38.826 ± 4.237 | 39.851 ± 4.067 | 0.369 | | C22:5 | 1.449 ± 0.593 | 0.484 ± 0.088 | 0.021 | * |
| C18:2 | 11.366 ± 2.441 | 11.625 ± 2.525 | 0.444 | | C22:6 | 8.069 ± 1.317 | 4.108 ± 0.906 | 0.001 | ** |
| C18:3 | 2.401 ± 0.122 | 2.600 ± 0.128 | 0.032 | * | 饱和酸 | 9.69 ± 0.74 | 17.57 ± 1.15 | 0.0001 | ** |
| C20:1 | 2.423 ± 1.173 | 0.831 ± 0.078 | 0.035 | * | 一烯酸 | 46.00 ± 3.56 | 48.41 ± 4.15 | 0.2017 | |
| C20:2 | 1.296 ± 0.872 | 1.088 ± 0.435 | 0.342 | | 多不饱和酸 | 44.00 ± 4.71 | 28.88 ± 2.54 | 0.0024 | ** |

Pt: T 检验值, Pt>0.05 为不显著; Pt<0.05 为显著(*); Pt<0.01 为极显著(**)。

Pt: value of T-test. Pt>0.05, insignificant; Pt<0.05, significant; Pt<0.01, extremely significant.

PL 和 NL 的主要脂肪酸组成皆为: C 16:0、C 16:1、C 18:1、C 18:2、C 20:4、C 20:5 和 C 22:6(表 2)。

3 讨论

3.1 成熟卵子的形态和超微结构 堵南山等^[9]已有详述, 但未详细讨论脂类在卵细胞中存在的形态, 作者通过组织化学和超微结构观察, 发现脂类在成熟卵子中主要以 2 种形式存在, 即以中性脂的形式存在于脂肪滴中或以磷脂的形式存在于卵黄体内,

磷脂与卵黄蛋白结合形成卵黄体。

3.2 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂肪含量 约占卵巢湿重的 17.78%, 这大大高于一些生活在沿岸浅海中的十足类, 如日本对虾(*Penaeus japonicus*)为 7.54%^[11], 米勒腹对虾(*Pleoticus muelleri*)为 5.7%^[10], 多毛对虾(*Penaeus setiferus*)为 5.5%^[12], 招潮蟹属(*Uca tanger*)为 10.46%(占卵巢干重 19.7%)^[13]等, 而较接近于淡水的一些十足类, 如泥污鲸螯虾(*Orconectes limosus*)为 15.5%^[14], 沼虾(*Macrobrachium borellii*)为 15%~29%^[15]等。这

种脂肪含量的差异, Herring^[3]认为与成熟卵巢卵子的尺寸有密切关系, 成熟卵子大, 其脂肪含量较高, 未来的胚胎发育时间就相对较长, 胚胎发育以后幼体所经历的阶段就少。

3.3 中华绒螯蟹成熟卵巢的 PL 和 NL PL 含量低于 NL, 这类似于日本对虾(*P. japonicus*)成熟卵巢^[11], 但不同于其它一些十足类, 如桃红对虾(*Penaeus duorarum*)、普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[16]和米勒腹对虾(*Pleoticus muelleri*)^[17], 这些种类卵巢的 PL 含量都远大于 NL。十足类成熟卵巢的 NL 和 PL 的高低变幅与其环境以及成熟卵子以后胚胎发育的关系, 有待进一步研究。作者认为, 它可能对成熟卵子以后的胚胎发育形式和行程有重要影响。因为甲壳动物胚胎发育所需的能量主要由卵中脂肪供给^[1], 而卵巢的 PL 和 NL 在胚胎发育过程中的作用可能是不同的, 中性脂作为胚胎发育的主要能源物质, 决定着胚胎发育的时间和行程, 所以胚胎发育行程长的种类, 其中性脂的含量都较高。如上所述, 其卵也较大, 它们通常属淡水、陆生或深海种类。磷脂可能主要作为胚胎发育的结构组份被利用。

中华绒螯蟹成熟卵巢的 PL 和 NL 的脂类组成基本类似于其它的十足类甲壳动物, PL 主要含 PC 和 PE, NL 主要由 TG、SL 及其少量 Es 构成, 只是 SL 的含量较高。其中 PL 和 NL 的脂肪酸组成明显不同, PL 具有含量较多的长链多不饱和脂肪酸和含量较少的短链脂肪酸, 这与其它甲壳动物种类基本相同^[11, 17], 所不同的是, PL 和 NL 中 C18:1 脂肪酸的百分含量均大大高于其它种类, C20:4 的含量也相对较高。

3.4 关于脂类的合成与摄取 甲壳动物自身不能合成胆固醇^[18], 从头合成磷脂和长链不饱和脂肪酸的能力也极有限^[19, 20], 而这些物质在成熟卵巢中具有相当的含量, 因此在卵巢成熟过程中必须从外界摄取, 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, 并进一步影响胚胎发育。有关不同脂肪源及脂肪酸对卵巢成熟发育的影响尚待深入研究。

参 考 文 献

1 Clarke A, et al. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergi* in relation to embryonic development. *Comp*

Biochem Physiol, 1990, 96B: 505-511

2 Clarke A, et al. Lipid biochemistry and reproductive biology in two species of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda). *Mar Biol*, 1985, 88: 247-263

3 Herring P J. Size density and lipid content of some decapod eggs. *Deep Sea Res*, 1974a, 21: 91-94

4 薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 1987, 3: 88-96

5 Folch J M Less, G H Sloanestlanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem*, 1957, 226: 497-509

6 Nichol B W. *New Biochemical Separations*. James A T, et al. (ed) *Co LTD*. 1964. 321-337

7 Skipski V P, Smolowe A F, Sullivan R C, et al. Separation of lipid class by TLC. *Biochem Biophys Acta*, 1965, 106: 386-402

8 Skipski V P, R F Peterson, M Burday. Quantitative analysis of phospholipids by TLC. *Biophys Acta*, 1964, 515: 209-237

9 堵南山, 赖伟, 南春容, 等. 中华绒螯蟹成熟卵形态和超微结构的研究. *动物学报*, 1995, 41: 229-234

11 Teshima S, Kanazawa A, Koshio S, Horinouchi. Lipid metabolism of the prawn *P. japonicus* during maturation: Variation in lipid profiles of the ovary and hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol*, 1989, 92B: 45-49

12 Castille F L, A L Lawrence. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus*. *J Crusta Bio*, 1989, 9: 202-211

13 Mourente G, et al. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* during maturation. *Mar Bio*, 1994, 121: 121-187

14 Collatz K G. Das Lipidspektrum des flussdebes *Orconectes limosus* und seine jahreszeitlichen veränderungen. *Z vergl physiol*, 1969, 65: 274-290

15 Gonzalez-Baro M R, Pollero R J. Lipid characterization and distribution among tissues of the freshwater crustacean *Macrobrachium borellii* during annual cycle. *Comp Biochem Physiol*, 1988, 91B: 711-715

16 Gehring W R. Maturation changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp, *Penaeus duorarum*. *Comp Biochem Physiol*, 1974, 49A: 511-524

17 Jeckel W H, Aizpun J E, Moreno V J. Biochemical composition, lipid classes and fatty acids in the ovary of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. *Comp Biochem Physiol*, 1989, 92B: 271-276

18 Castell J K, et al. Cholesterol requirement of juvenile American lobster *Homarus americanus*. *J Fish Res Board Can*, 1975, 38: 1431-1435

19 D'Abrahamo I. R, et al. Relationship between dietary PC and serum cholesterol in the lobster *Homarus sp.* *Mar Bio*, 1982, 67: 231-235

20 Teshima S, et al. Ability for bioconversion of n-3 fatty acids in fish and crustaceans. *Oceanis*, 1992, 18: 67-75

Lipid compositions of mature ovary in Chinese crab

Cheng Yongxu

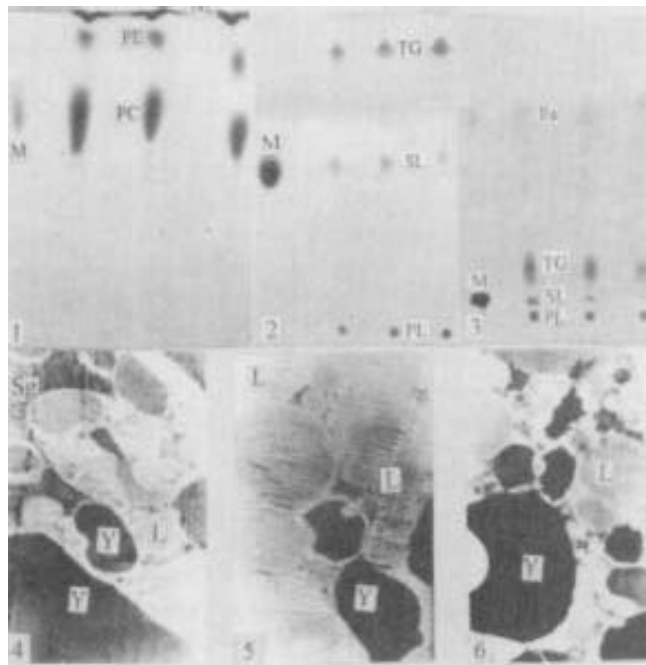
(Shanghai Fisheries University, 361005)

Du Nanshan Lai Wei

(Biological Department, East China Normal University, Shanghai, 200062)

Abstract In mature ovaries of Chinese crab *Eriocheir sinensis*, the total lipids in December make up about 17.78% of ovary wet weight, and the amount of neutral lipids (NL) is greater than that of polar lipids (PL). NL are mainly composed of triacylglycerils(TG), free and steryl sterols, while PL mainly phosphatidylcholine PC and phosphatidylethanolamim (PE), and the propotion of PC is higher than that of PE. The distributions of fatty acids in PL and NL are significantly different that PL contains long chain polyunsaturated acids(principally C 20:5 and C 22:6) relatively more than NL does. But their principal fatty acids are both C 16:0, C 16:1, C 18:1, C 18:2, C 20:4, C 20:5 and C 22:6.

Key words *Eriocheir sinensis*, ovary, lipid



图版 I 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类及脂肪酸组成

Plate I Lipid compositions of mature ovary in Chinese crab *Eriocheir sinensis*

图版说明:

1-3: 脂类的薄层层析(TLC)图, 各图均有3个样品。Thin layer chromatograms (TLC) of lipids with 3 samples each picture.

1. 成熟卵巢磷脂的 TLC 图, 总脂 1920 μg 。M: 标准样, NL: 中性脂, PE: 脑磷脂, PC: 卵磷脂。

TLCs of mature ovarian polar lipids, total lipids 1920 μg . M: mark; NL: neutral lipid; PE: phosphatidylethanolamine; PC: phosphatidylcholine.

2. 成熟卵巢中性脂 TLC 图(两步法), 总脂 480 μg 。M: 标准样, TG: 甘油三酯, SL: 胆固醇, PL: 磷脂。TLCs of mature ovarian neutral lipids (two-step), total lipids 480 μg . M: mark; TG: triacylglycerol; SL: free cholesterol; PL: polar lipid.

3. 成熟卵巢中性脂 TLC 图(一步法), 总脂 480 μg 。Es: 胆固醇酯, 其它同 2。TLCs of mature ovarian neutral lipids (one-step), total lipids 480 μg . Es: ester sterol, the others same as picture 2.

4-6: 成熟卵巢卵子中卵黄体(Y)和脂肪滴(L)分布的超微结构观察, $\times 5000$ 。Ultra-structure of yolk bodies(Y) and lipid droplets(L) in mature oocytes.

4. L 与 Y 交互分布, 排列紧密, 且 $L < Y$ 。L and Y distributed alternately and tightly, $L < Y$.

5. L 与 Y 排列紧密, 且 $L > Y$ 。L and Y distributed alternately and tightly, $L > Y$.

6. L 和 Y 排列疏散。L and Y distributed loosely.