

孕酮对克氏原螯虾大颚器激素生物合成的体外调控

陆剑锋^{1,2}, 白桦³, 成永旭², 赵维信²

(1. 合肥工业大学 生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090;
3. Department of Entomology, University of Kentucky Lexington, KY 40546, U.S.A.)

摘要:运用体外放射化学方法研究孕酮对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)大颚器官(MO)生物合成甲基法尼酯(MF)的调控作用。结果表明,低浓度孕酮(10 pmol/L, 100 pmol/L)对 MO 生物合成 MF 的抑制作用不明显;高浓度孕酮(1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L)对 MF 生物合成具有极显著的抑制作用($P < 0.01$)。表明较高的血淋巴孕酮水平对克氏原螯虾 MO 合成 MF 产生反馈抑制作用。研究中对涉及 MF 合成的眼柄-大颚器官-卵巢轴的调节机理作了探讨。[中国水产科学, 2006, 13(3): 471-474]

关键词:克氏原螯虾;大颚器官;甲基法尼酯;孕酮;负反馈

中图分类号:S968.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0471-04

十足目甲壳动物大颚器(mandibular organ, MO)是具有类似昆虫咽侧体(corpora allata, CA)功能的一个重要的内分泌器官^[1-2],能够合成和分泌甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF),这是一种昆虫保幼激素(juvenile hormone, JH)Ⅲ的非环氧化前体,能够促进雌性动物卵黄的发生,是甲壳动物的一种重要的性腺刺激激素^[3-4]。关于眼柄神经肽大颚器抑制激素(mandibular organ inhibiting hormone, MOIH)^[5-6]以及中枢神经递质包括一些生物胺类对 MO 生物合成 MF 速率的影响已有报道^[7],而类固醇激素对 MO 的调控作用,尚未查阅到可利用资料。本研究运用 MO 离体培育和体外放射化学方法研究了孕酮对 MO 激素生物合成的影响,目的在于进一步了解克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)MO 生物合成 MF 是否受靶器官激素的反馈影响,以丰富和完善甲壳动物生殖发育的基础理论,并对水产养殖生产实践具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

克氏原螯虾购于上海市杨浦区图门路菜市场,体长 8.10~11.00 cm,体质量 22.14~58.20 g,共 50 尾。实验前将克氏原螯虾放在实验室水族箱(65

cm×35 cm×50 cm)中充气暂养 1 周左右,按时投喂和定时换水排污。实验时从克氏原螯虾的大颚部位解剖取出 MO 进行体外培育。根据研究,克氏原螯虾处于卵黄发生期的 MO 细胞最活跃^[2],合成 MF 速率最高^[8],因此,本实验采用该时期的 MO 标本作为离体研究的对象。按卵黄发育状况分成初级卵黄发生期和次级卵黄发生期^[1-2],分别进行实验和测定。

1.2 甲基法尼酯合成速率的离体测定

将孕酮溶解于一定量无水乙醇制成储备液,然后将储备液用无菌螯虾生理盐水(NaCl 2.2%; KCl 0.084%; CaCl₂·2H₂O 0.31%; Na₂HPO₄ 0.014%)进行逐级稀释成一定浓度备用。处理组培养试管中添加孕酮至终浓度为 10 pmol/L、100 pmol/L、1 nmol/L、5 nmol/L、10 nmol/L 5 个浓度梯度组,对照组培养试管中不添加任何孕酮,最后按下述方法测定 MO 合成 MF 速率。

克氏原螯虾 MO 合成 MF 速率根据 Tobe 等^[9]的方法略加修改:在含有一定量³H-甲硫氨酸(³H-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,置于恒温培养箱中,30℃ 闭光无菌培养 3 h 后取出培养管,用大头针将 MO 从培养管中挑出。在培养管中

收稿日期:2005-06-07; 修订日期:2005-09-09。

基金项目:上海市教委重点学科基金项目(B991602);国家自然科学基金项目(30471349)。

作者简介:陆剑锋(1976-),男,博士,主要从事甲壳类和昆虫生理生化研究。E-mail:ljf@sjtu.ac.cn

通讯作者:赵维信。Tel:021-65710525; E-mail:wzhuo@shju.edu.cn

加入 300 μL 异辛烷,迅速震荡后 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,小心吸取上清液有机相 200 μL 于 1.5 mL 的 Appendorf 管中。每个 Appendorf 管中加入 1 mL 闪烁液,迅速震荡后放入闪烁杯中过夜,在 Beckman LS 6500 型液体闪烁仪上读数,计算测定结果。

1.3 数据处理

采用 t 检验,方差分析进行实验数据处理。

2 结果

2.1 孕酮对初级卵黄发生期的克氏原螯虾 MO 合成 MF 速率的影响

初级卵黄发生期的克氏原螯虾体质量 22.14~54.80 g,体长 8.10~10.60 cm,成熟系数约 0.2%,肝指数约 7.5%。图 1 显示,对照组克氏原螯虾 MO 合成 MF 速率为 $(6.11 \pm 0.96) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$,低浓度孕酮处理组(10 pmol/L 和 100 pmol/L)对 MO 合成 MF 速率 $[(5.23 \pm 1.44) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$ 和 $(4.91 \pm 1.09) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}]$ 虽有一定的降低,但抑制作用与对照组 MO 合成 MF 速率之间无显著差异($P>0.05$);高浓度孕酮处理组(1 nmol/L)对 MO 合成 MF 速率极显著降低($P<0.01$),其 MF 合成速率为 $(3.09 \pm 0.28) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$,与对照组 MO 合成 MF 速率相比降低了 49.43%。

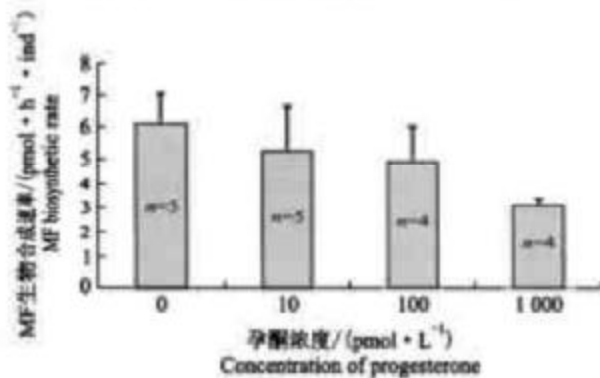


图1 孕酮对初级卵黄发生期克氏原螯虾 MO 离体合成 MF 的影响

Fig.1 Effects of progesterone on MF biosynthetic rate of MO in *P. clarkii* during primary vitellogenesis in vitro assay

2.2 孕酮对次级卵黄发生期的克氏原螯虾 MO 合成 MF 速率的影响

次级卵黄发生期的克氏原螯虾体质量 37.34~58.20 g,体长 9.50~11.00 cm,成熟系数约 0.5%,

肝指数约 5.5%。图 2 显示,对照组克氏原螯虾 MO 合成 MF 速率为 $(12.57 \pm 5.20) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$,而处理组克氏原螯虾 MO 随孕酮浓度增加(1 nmol/L 、5 nmol/L 、10 nmol/L)合成 MF 速率均呈极显著下降趋势 $[(6.97 \pm 1.85) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$ 、 $(4.82 \pm 1.94) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}$ 、 $(93.55 \pm 0.76) \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}]$ 。与对照组比较,差异十分显著($P<0.01$)。1 nmol/L 孕酮对 MO 合成 MF 速率的抑制率为 44.55%,5 nmol/L 的抑制率为 61.65%,10 nmol/L 的抑制率为 71.76%。

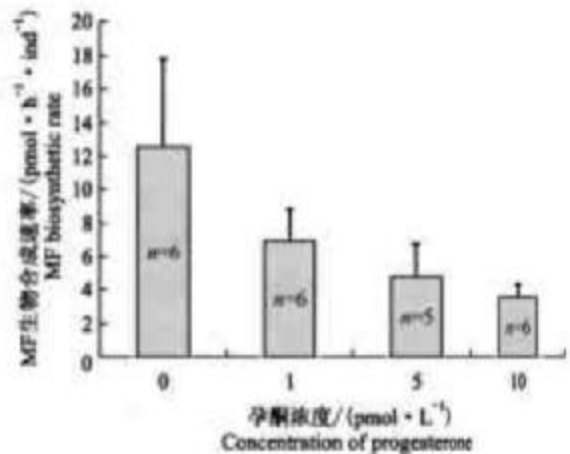


图2 孕酮对次级卵黄发生期克氏原螯虾 MO 离体合成 MF 的影响

Fig.2 Effects of progesterone on MF biosynthetic rate of MO in *P. clarkii* during secondary vitellogenesis in vitro assay

3 讨论

在十足目甲壳动物的相关组织中存在一定浓度的孕酮已是一个不争的事实。在美国龙螯虾 (*Homarus americanus*)^[10]、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)^[11]、中国对虾 (*Penaeus chinensis*)^[12] 和远东长额虾 (*Pandalus kessleri*)^[13] 的卵巢、肝胰腺和血淋巴中分别检测到孕酮含量。另外,已证明日本龙虾 (*Panulirus japonicus*) 能将标记的胆固醇在体内转化成 17 α -羟孕酮 (17 α -hydroxyprogesterone)^[14],三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的离体卵巢能将孕酮转化成 17 α -羟孕酮、孕酮和脱氧皮质酮^[15]。这些研究结果表明,虾、蟹类甲壳动物的卵巢不仅能合成孕酮,而且具有多种类固醇生物合成的酶类,能将孕酮进一步转化成其他类固醇激素。已知克氏原螯虾 MO 合成和分泌

MF 受眼柄视神经节分泌的一种神经肽—大颚器抑制激素(MOIH)的控制^[5-6]。近年,Rodrigues 等^[16]报道了在体外采用高浓度 17 α - 羟孕酮(15 μ mol/L)与克氏原螯虾的 MO 和卵巢三者联合培养时,发现 MO 对卵巢的刺激作用被 17 α - 羟孕酮所抑制。而本研究采用直接检测 MF 合成速率的方法确证了克氏原螯虾 MO 在一定浓度孕酮影响下能显著降低 MF 合成速率,说明在卵巢发育的一定阶段,一定浓度的孕酮(>1 nmol/L)对 MO 合成 MF 有直接的抑制作用。卵黄发生过程中卵巢合成的孕酮,大部分被转化成 17 α - 羟孕酮^[15],主要用于刺激十足目甲壳动物的肝胰腺或卵巢的滤泡细胞(follicular cell)(随种类而不同)合成卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)^[17-18]。这时期血淋巴中孕酮水平较低^[12-13],对 MO 合成 MF 的抑制作用则较弱,对 MF 的促性腺作用的抑制也较弱。当卵巢发育至卵黄发生末期或成熟期,这时卵黄蛋白原合成已接近完成,卵巢合成孕酮的能力虽然有所降低^[11-12],但由于被卵巢利用转化成 17 α - 羟孕酮的量减少(由于 17 α - 羟孕酮酶活性减弱)或直接被肝胰腺和卵巢本身利用的减少,以至于使此时卵巢合成的孕酮主要进入循环血淋巴,导致血淋巴孕酮水平升高^[11-12],并主要反馈作用于 MO,抑制了 MF 生物合成。卵黄发生末期和成熟期 MF 生物合成水平降低,这与克氏原螯虾和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在卵黄发生末期和成熟期,MF 合成速率明显降低^[8, 19]和成熟期的 MO 细胞直径减小^[2, 20]是相吻合的。

根据已有的研究资料^[1-2, 6, 8, 11],MF 生物合成与分泌的调节涉及眼柄视神经节端髓的 X-器官—大颚器官(MO)—卵巢轴。克氏原螯虾卵黄发生前期,眼柄视神经节端髓以大型细胞为主,胞质内含物丰富,视神经节抽提物对 MF 合成的抑制作用较卵黄发生期的强^[6],表明卵黄发生前,MO 合成 MF 主要受眼柄神经肽抑制因子(MOIH)的控制。而卵黄发生期的眼柄视神经节端髓以小型细胞为主,视神经节抽提物对 MF 合成的抑制作用明显减弱^[6],MO 迅速发育并大量合成和分泌 MF,刺激卵巢发育,卵巢孕酮合成增加并大量转化成 17 α - 羟孕酮,从而促进卵黄发生。而卵黄发生末期和成熟期,由于血淋巴中孕酮水平升高,产生对 MO 合成 MF 负反馈作用,抑制 MF 合成,表明卵黄发生末期和成熟期 MF 合成降低主要受 MF 靶器激素—卵巢分泌的孕酮的反馈抑制作用的结果,从而构成克氏原螯虾

生殖周期中 MO 发育和 MF 合成的周期性变化。图 3 是作者在多年有关克氏原螯虾眼柄、大颚器和卵巢内分泌研究基础上试图提出的关于克氏原螯虾大颚器激素—MF 生物合成和分泌调节机制的示意图。关于脊椎动物的激素反馈系统研究已很广泛,但无脊椎动物这方面的研究还很少涉及,至于孕酮对眼柄神经肽(MOIH)的合成与分泌是否也存在反馈作用,尚有待进一步研究。

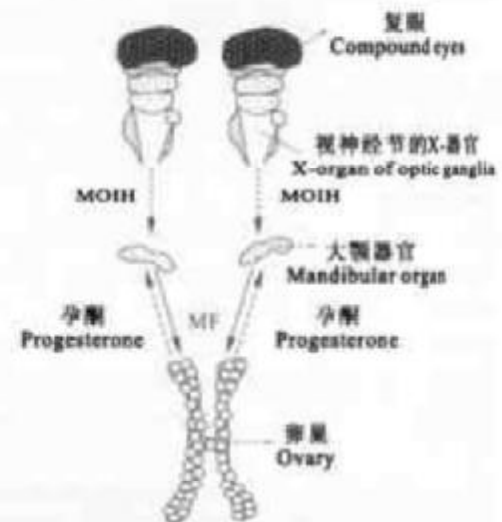


图3 克氏原螯虾甲基法尼酯(MF)生物合成与分泌调节机制示意图

注:实线—促进作用;虚线—抑制作用;MF—甲基法尼酯;MOIH—大颚器抑制激素。

Fig.3 A summary diagram of the regulation mechanisms of methyl farnesate (MF) biosynthesis and secretion in *Procambarus clarkii*

Note: Solid line means stimulatory effect; broken line means inhibitory effect. MF—methyl farnesate; MOIH—mandibular organ inhibiting hormone.

本文承原中科院上海昆虫研究所昆虫内分泌学专家朱湘雄研究员审阅并提出宝贵意见,谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 赵维信,李 胜. 克氏原螯虾大颚器对卵巢发育的影响[J]. 水产学报, 1999, 23(3): 229-233.
- [2] 李 胜,赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 12-18.
- [3] Laufer H, Borst D, Baker F C, et al. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean[J]. Science, 1987, 235: 202-205.
- [4] Laufer H, Biggers W J, Ahl J S B. Stimulation of ovarian maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* by methyl farnesate

- [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 111:113-118.
- [5] Wainwright G, Webster S G, Wilkinson M C, et al. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*[J]. *J Biol Chem*, 1996, 27(22):12 749-12 754.
- [6] 赵维信,白桦,陆剑锋. 克氏原螯虾大颚器生物合成甲基法尼醇的调控[J]. *水产学报*, 2002, 26(增):1-7.
- [7] Fingerman M, Nagabhushanam R, Srejinini R, et al. Biogenic amines in crustaceans: identification, location, and roles[J]. *J Crust Biol*, 1994, 14(3):413-437.
- [8] 赵维信,白桦. 克氏原螯虾大颚器合成甲基法尼醇的研究[J]. *水产学报*, 2001, 25(3):193-196.
- [9] Tobe S S, Yong D A, Khoo H W. Production of methyl farnesoate by the mandibular organ of the mud crab, *Scylla serrata*: validation of a radiochemical assay[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1989, 73(3):342-353.
- [10] Couch E F, Hagino N, Lee J W. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1987, 87A:765-770.
- [11] 赵维信,白桦,马晓辉. 克氏原螯虾卵巢发育过程中卵黄和大颚器孕酮含量的变化[J]. *上海水产大学学报*, 1999, 8(3):232-235.
- [12] 蔡生力,赵维信,李德典,等. 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[J]. *水产学报*, 2001, 25(4):304-310.
- [13] Quinto E T, Yamauchi K, Hara A, et al. Profiles of progesterone and estradiol-like substances in the hemolymph of female *Pandalus hesleri* during the annual reproductive cycle[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 81:343-348.
- [14] Kanazawa A, Teshima S. *In vitro* conversion of cholesterol to steroid hormones in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1971, 37:891-898.
- [15] Teshima S, Kanazawa A. Bioconversion of progesterone by the ovaries of crab, *Portunus trituberculatus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1971, 17:152-157.
- [16] Rodriguez E M, Lopez Greco L S, Medesani D A, et al. Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 125(1):34-40.
- [17] Yano I, Chinai Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1987, 86(2):213-218.
- [18] Yano I. Effects of 17 α -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1987, 61:49-57.
- [19] 赵维信,陆剑锋. 中华绒螯蟹大颚器激素生物合成与性早熟的关系[J]. *水产学报*, 2003, 27(4):289-294.
- [20] 赵维信,陆剑锋. 早熟和正常中华绒螯蟹大颚器发育及超微结构[J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(1):5-9.

In vitro regulation of hormone biosynthesis of mandibular organ by progesterone in crayfish, *Procambarus clarkii*

LU Jian-feng^{1,2}, BAI Hua³, CHENG Yong-xu², ZHAO Wei-xin²

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. Department of Entomology, University of Kentucky Lexington, KY 40546, U.S.A)

Abstract: *In vitro* regulation of hormone biosynthesis of MO by progesterone in *Procambarus clarkii* was investigated by using radiochemical method. It was found that lower concentration of progesterone (10 pmol/L, 100 pmol/L) had no conspicuously effect on MO, but higher concentration of progesterone (1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L) showed significant inhibitory effect on MO ($P < 0.01$), which suggested higher level of progesterone in haemolymph had a negative feedback or inhibitory effect on MF biosynthesis of MO. A regulation mechanism of eyestalk-mandibular organ-ovary axis on MF biosynthesis was also discussed in this paper. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3):471-474]

Key words: *Procambarus clarkii*; mandibular organ; methyl farnesoate; progesterone; negative feedback