

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16345

中华绒螯蟹蜕壳过程中螯足肌肉组织学及主要蛋白质含量变化

田志环^{1,2}, 焦传珍¹, 吴旭干², 成永旭²

1. 广东韶关学院 英东生命科学院, 广东 韶关 512005;

2. 上海海洋大学, 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 为探讨中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蜕皮过程中肌肉生长机制, 采用石蜡切片、电镜技术及生物化学方法, 以中华绒螯蟹幼蟹为对象, 研究了其蜕壳过程中螯足闭螯肌肌肉的显微结构、超微结构及主要蛋白质含量的变化。结果显示, 在蜕皮间期, 融足肌纤维充分伸展, 多核, 横截面呈不规则圆形或者多边形; 肌原纤维排列有序, 具有甲壳动物骨骼肌的典型特征, A 带、I 带及肌质网、二联体、线粒体等细胞器清晰可见。蜕皮前期, 肌纤维降解以致其横截面大小不一; 肌原纤维内部降解, 出现腐蚀性空洞。蜕皮之后, 在肌纤维末端的肌节处于超收缩状态, 这些肌节长度缩短至正常长度的 50%, 肌纤维典型结构消失, A 带、I 带模糊不易区分, 但肌质网、二联体、线粒体等结构仍然完整; 肌纤维中间部分的肌节结构正常如蜕皮间期。生物化学研究发现, 蜕皮前后螯足肌肉中肌原纤维蛋白和可溶性蛋白含量的变化同其结构特征的变化一致。本研究结果表明, 中华绒螯蟹蜕皮后螯足肌肉可能的一种生长机制是通过增加新的肌节来伸长, 动物刚蜕壳后, 这些新形成的肌节以超收缩的形式存在, 随着动物吸水身体膨大, 外骨骼伸展、硬化, 这些较短的肌节由于被拉伸而达到正常肌节的长度, 从而完成肌肉的生长。

关键词: 中华绒螯蟹; 融足肌肉; 组织学; 超微结构; 肌原纤维蛋白; 可溶性蛋白

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1072-07

甲壳动物由于体表覆盖坚硬的外骨骼, 其生长发育和蜕皮周期密切相关, 即通过蜕壳来完成肌肉的生长。对于龙虾、蟹类等外骨骼钙化程度较高的甲壳动物, 蜕皮前螯足肌肉通常发生可逆性萎缩, 以顺利从坚硬的外壳中蜕出, 蜕皮后萎缩的肌肉再恢复重建以适应新的宽大的外骨骼。这种现象最早发现于地蟹(*Gecarcinus lateralis*), 其蜕皮前螯足肌肉大约萎缩 40%^[1]。随后, 在普通滨蟹(*Carcinus maenas*)^[2]、天空蓝魔虾(*Cherax destructor*)^[3]、招潮蟹(*Uca pugnax*)^[4]等物种中陆续发现。通过对地蟹和天空蓝魔虾肌肉组织的超微结构观察, 显示蜕皮前萎缩的螯足, 出现肌丝降解的现象, 但肌纤维中的各种细胞器形态结构

完好, 融足的正常功能并不受影响, 说明蜕壳前螯足肌肉的萎缩是生理现象并非病理现象^[3, 5]。对于外骨骼钙化程度较轻的虾类, 蜕壳时肌肉萎缩现象并不明显。但是, 据 Cesar 等^[6]报道, 凡那滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在蜕壳过程中腹部肌肉仍出现了较为明显的组织学形态变化。目前, 甲壳动物蜕壳诱导肌肉生长的机制并不清楚, 仅 Haj 等^[7-8]报道刚刚蜕壳的美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)靠近外骨骼一端的肌纤维, 其肌节失去有序的形态结构, 推测在肌纤维生长区, 新增加的肌节首先以超收缩的形式存在, 随着动物吸水膨胀和外骨骼硬化转变为正常肌节。而国内未见有关于甲壳动物蜕壳前后肌纤维形态学变化的

收稿日期: 2016-11-20; 修订日期: 2017-01-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572635); 科技部港澳台科技合作专项项目(2014DFT30270); 上海市科学技术委员会科研项目(16DZ2281200); 上海高校水产学高峰学科建设项目(2015-62-0908); 上海市科技兴农推广项目[沪农科攻字(2016)第 1-1-8 号]; 韶关学院生态学重点扶持学科(230079030101).

作者简介: 田志环(1971-), 博士, 副教授, 研究方向甲壳动物生长发育. E-mail: tianzhihuan@126.com

通信作者: 焦传珍, 教授, 研究方向海洋生物分子生物学. E-mail: jiaocz@gmail.com

报道。本研究以中国重要的养殖品种中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)为实验对象,研究其蜕皮前后螯足肌肉组织显微结构、超微结构及主要蛋白质含量的变化,一方面为探明甲壳动物蜕皮过程中肌肉的生长机制提供更多线索,以丰富动物肌肉生长发育理论;同时也为后续研究中华绒螯蟹蜕皮过程中肌肉生长在分子水平的变化及其调节机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1年生中华绒螯蟹幼蟹取自上海海洋大学崇明养殖基地,平均体重(8.24 ± 2.17)g。按照文献[9-10]的方法鉴定蜕皮周期,分别取蜕皮间期C期、蜕皮前晚期D₃₋₄期及蜕皮后期A-B期个体,按照图1所示,取螯足肌肉的闭螯肌进行研究。

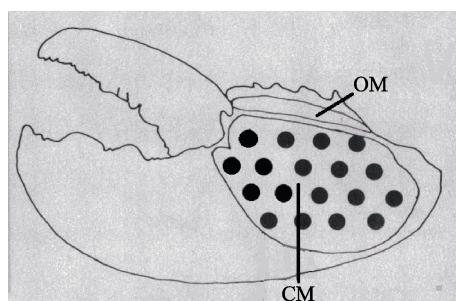


图1 中华绒螯蟹螯足肌肉示意图

OM: 开(螯)肌; CM: 闭(螯)肌。

Fig. 1 Diagram of the claw muscle of *Eriocheir sinensis*
OM: open muscle, CM: close muscle.

1.2 实验方法

1.2.1 组织学研究 随机取不同蜕皮时期的中华绒螯蟹各3只,按照图1所示取其肌肉组织,Bouin氏液固定24 h,系列酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,常规切片,切片厚度6~8 μm。苏木精-伊红染色,光学显微镜(Leica, RM2125 RTS)观察拍照。

1.2.2 超微结构研究 随机取不同蜕皮时期的中华绒螯蟹各3只,按照图1所示,取其肌肉组织,切成1 mm×1 mm×1 mm的小块,立即投入2.5%的戊二醛固定液中固定2~24 h,然后于1%锇酸固定2 h,环氧树脂包埋。常规超薄切片70~90 nm,2%柠檬酸铅和0.1%醋酸铀双重电子染色,透视

电子显微镜(JEM2100)观察拍照。

1.2.3 肌纤维蛋白与可溶性蛋白含量测定 按照Saito等^[11]的方法,略作改动:准确称取一定量的肌肉组织,按1:4(W/V)的比例加入0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.4),电动匀浆器匀浆2 min,4℃离心10 min(转速12000 r/min),收集上清液,重复上次步骤2次,合并上清液待测蛋白含量。收集可溶性蛋白提取后剩余的沉淀,按1:2(W/V)的比例加入含0.6 mol/L NaCl的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.4),电动匀浆器匀浆2 min,4℃离心10 min(转速12000 r/min),收集上清液,重复上次步骤2次,合并上清液测定蛋白含量。蛋白质含量测定试剂盒由南京建成生物公司提供。

1.2.4 数据处理 利用SPSS 17.0软件处理数据,采用单因素方差分析及多重比较,显著性水平设为0.05,数值以平均数±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 蜕壳间期正常的肌纤维

蜕壳间期肌纤维充分伸展,截面呈椭圆形或者多边形,多核,细胞核位于肌膜(细胞膜)下方,并且肌纤维排列疏松、游离,不形成肌肉束(图2a)。在电子显微镜下,蜕壳间期的肌小节排列有序,肌节长度为(6.42 ± 0.26)μm,A、I带和Z线清晰可见,A带较长,大约占整个肌节长度的3/4,Z线弯曲不平,H带不明显。肌质网,二连体等分布在肌原纤维之间(图2b),细胞核和大量线粒体分布在肌浆外围(图2c)

2.2 蜕壳前萎缩的肌纤维

在蜕壳前晚期D₃₋₄期,由于肌肉萎缩,肌纤维横截面大小不一(图3a)。电子显微镜观察显示:肌原纤维内部粗细肌丝都有所降解,使其出现空洞。即便如此,但肌小节的正常结构并未遭到破坏,仍然排列有序,细胞核、肌质网、线粒体及二联体等细胞器结构完整,保持正常的形态和位置(图3b)。

2.3 蜕壳后未伸展的肌纤维

在蜕壳后A-B期,肌纤维在组织学层面表现为排列紧密、皱缩(图4a)。电子显微镜观察显示:肌纤维末端的肌节明显缩短,处于“超收缩”状态,其肌节长度大约是正常肌节的,50%为(3.32 ± 0.18)μm。

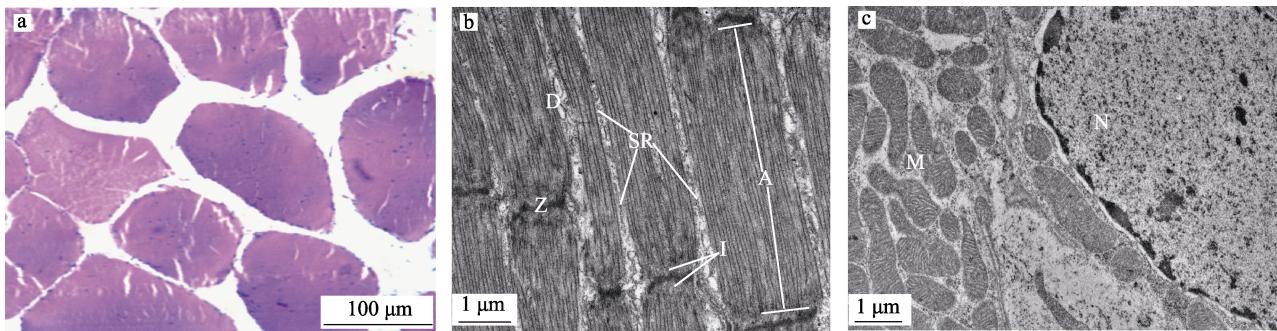


图 2 中华绒螯蟹蜕皮间期正常的螯足肌纤维

- a. 光镜横切面; b. 电镜纵切, 示肌节和肌质网(SR), 二连体(D), A 带(A)和 I 带(I);
c. 电镜纵切, 示细胞膜下面的细胞核(N)和大量线粒体(M).

Fig. 2 Normal claw close muscle of *Eriocheir sinensis* in inter-molt stage

- a. Light micrograph of the muscle cross section. b. Longitudinal section of a fiber in which a Z tube makes dyad (D) contact with sarcoplasmic reticulum (SR), and the sarcomeres are generally in register; A band (A) and I band (I) are indicated. c. Nucleus (N) and mitochondria (M) in peripheral sarcoplasm.

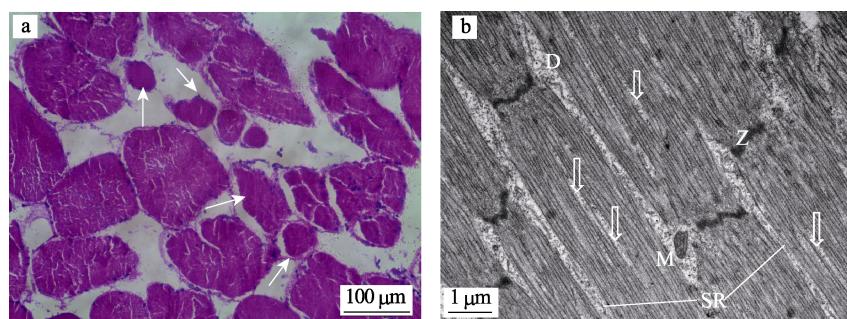


图 3 中华绒螯蟹蜕皮前萎缩的螯足肌纤维

- a. 光镜横切, 箭头示一系列横截面大小不一的肌纤维; b. 电镜纵切, 箭头示肌原纤维内部粗肌丝降解形成的空洞, 肌质网(SR)和二联体(D)完好.

Fig. 3 Atrophied claw close muscle of *Eriocheir sinensis* in later pre-molt stage

- a. Light micrograph of the muscle cross section, the cross-sectional area of muscle fibers shows a variety of inequality in size due to proecdysial muscle atrophy (arrowheads). b. Longitudinal section of a fiber showing areas of erosion (arrowheads); dyad (D) and sarcoplasmic reticulum (SR) appear normal.

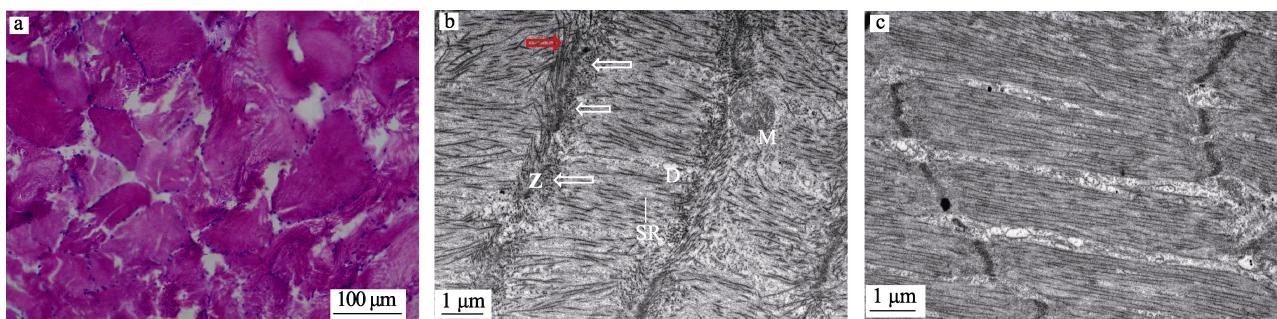


图 4 中华绒螯蟹蜕皮后未伸展的螯足肌纤维

- a. 光镜横切, 示肌纤维皱缩、密集; b. 电镜纵切, 示处于超收缩状态的肌纤维, 肌丝未形成有序结构, 粗肌丝在 Z 线附近明显加厚、缠绕(白色箭头)或者拱起(红色箭头), 肌质网(SR)、二联体(D)和线粒体(M)标识如图; c. 电镜纵切, 示肌纤维中间的肌节, 处于相对正常状态.

Fig. 4 Unexpanded claw close muscle of *Eriocheir sinensis* in post-molt stage

- a. Light micrograph of the muscle cross section, fibers are compacting and shrinking, with fiber walls contracted.
b. Longitudinal section of a fiber at the end regions showing the lack of organization of the filaments into clear bands; obvious evidences of coiling and thickening of the thick filaments have been found at the Z line (white arrowheads) or they bent back at the region of the Z line (red arrowheads); sarcoplasmic reticulum (SR), dyad (D) and mitochondria (M) are present at this stage.
c. Longitudinal section in the middle region of the fiber showing the sarcomeres with “normal” appearance as inter-molt stage.

另外,这种肌节的肌丝排列失去了正常的形态,粗肌丝在Z线附近缠绕、加厚或者拱起(图4b)。肌纤维中间的肌节,则相对“正常”一些,类似于蜕皮间期(图4c)。不过,无论哪种肌节,其细胞核、肌质网、线粒体及二联体等细胞器结构完整,保持正常的形态和位置。

2.4 蜕壳前后螯足肌肉肌原纤维蛋白和可溶性蛋白含量的变化

从蜕皮后A-B期到蜕皮间期,肌原纤维蛋白含量显著上升($P<0.05$),一直到蜕皮前晚期保持稳定。可溶性蛋白含量则显示不同的变化趋势,在蜕皮前晚期D₃₋₄期达到最高($P<0.05$),于蜕皮后A-B期显著降低($P<0.05$),然后逐步回升到蜕皮间期水平(图5)。

3 讨论

通常来说,甲壳动物肌纤维根据肌节长度可以分为长肌节纤维、短肌节纤维和混合纤维^[12],长肌节纤维肌节长度 $>6\mu\text{m}$,A带较长,Z线弯曲,多数情况下并不和肌丝垂直。因为这种肌纤维细肌丝较长,静息状态下能够在肌节中部互相接触,所以H带不明显^[13]。短肌节纤维肌节长度 $<4\mu\text{m}$,A带比较短,Z线平直,垂直肌丝,H带明显。混合肌节纤维特征处于二者之间,肌节长度在4~6μm之间^[14-16],与其他十足目甲壳动物一样^[3, 5],中华绒螯蟹螯足的闭螯肌是由长肌节纤维组成,这种肌纤维收缩缓慢,但十分有力^[17]。处于蜕皮间期的动物,运动和取食都非常活跃,肌纤维充分伸展,肌丝排列整齐有序。

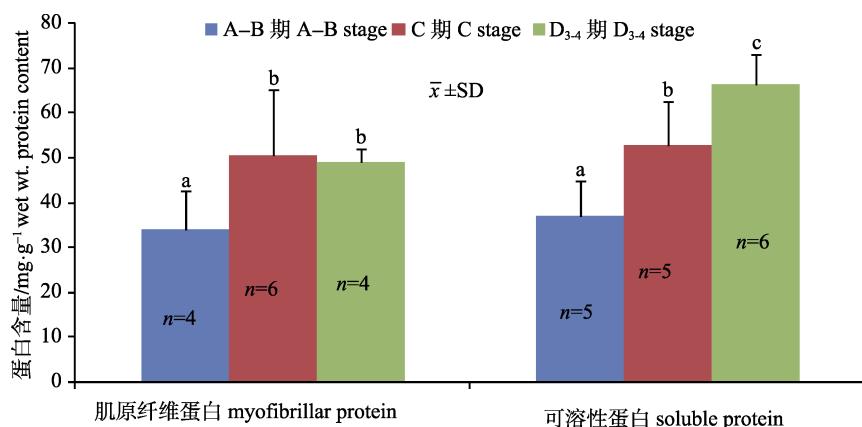


图5 中华绒螯蟹蜕壳过程中螯足肌肉肌原纤维蛋白和可溶性蛋白含量的变化
标准差上方不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Changes in myofibrillar and soluble protein contents in claw close muscle of *Eriocheir sinensis* during the molt cycle.
Different letters above the error bars indicate significant differences ($P<0.05$).

甲壳动物的肌纤维,一端固定在甲壳上,另一端固定于表皮内突。动物蜕壳之后,新的外骨骼较柔软,随着柔软的外骨骼逐渐钙化,肌纤维必须调整它的长度来适应增大了的外骨骼。对于龙虾和蟹等外骨骼钙化程度较高的种类,螯足和身体连接处的关节较窄,肥大的螯足在狭小的关节处蜕皮比较困难,因此,蜕皮前螯足肌肉通常发生可逆性萎缩,以顺利从坚硬的外壳中蜕出。在地蟹(*Gecarcinus lateralis*),蜕皮前螯足肌肉大约萎缩40%^[1, 18],在中华绒螯蟹,我们清楚地观察到蜕壳前肌纤维横截面积减小,及由于肌丝降

解造成的肌原纤维内部出现空洞,这种现象在地蟹^[3]和天空蓝魔虾(*Cherax destructor*)^[5]都曾观察到。值得注意的是,在萎缩的肌纤维中,肌原纤维的正常结构并未破坏,部分肌丝的降解并未打乱其余肌丝的正常组织形态,细胞核、线粒体、肌质网及二联体、三联体等细胞器结构完整无损,显示甲壳动物蜕皮前的这种肌肉萎缩并非病理现象,肌纤维仍然具有正常的生理功能。实际上,萎缩的螯足仍保持着正常的功能,只是肌纤维收缩的强度小于蜕皮间期的正常肌纤维^[3]。

刚刚蜕皮后的动物,其肌纤维排列较密、皱

缩, 没有完全伸展, 肌纤维末端的肌节处于超收缩状态。肌纤维的“超收缩”是一种有趣的现象, 在甲壳动物如藤壶(*Balanus nubilus*)^[19]和克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)^[20]、昆虫的幼虫^[21]及脊椎动物^[22]肌肉中都有发现。神经性的超收缩, 在 Z 线上出现孔洞, 邻近肌节的粗肌丝从其中穿过, 并互相重叠交织, 从而导致肌节长度大约缩短 60%; 而非神经引起的超收缩, 由于 Z 线位置不出现孔洞, 粗肌丝无从穿过, 在 Z 线处拱起、弯曲或者加厚^[13]。非常明显, 中华绒螯蟹刚刚蜕皮后观察到的这种肌节的超收缩是非神经性的, 粗肌丝在 Z 线位置缠绕、盘曲, 以致纵切面呈现点状或者拱起(图 4b)。这种现象或许和甲壳动物蜕皮后肌肉生长有关, 无脊椎动物肌肉纵向生长一般通过增加新的肌节或者已有肌节的伸长来完成^[3]。长肌节肌肉纤维纵向生长的一种可能机制就是在肌纤维末端增加新的肌节, 这些新的肌节在动物刚刚蜕皮、甲壳还比较柔软时作为比较短的肌节存在, 随着甲壳的硬化, 柔软的外骨骼由于动物吸水而伸展, 处于超收缩状态的新的肌节随之被拉长到已有肌节的长度, 在这一过程中完成肌肉的生长。目前并不清楚新的肌节是增加在肌纤维的甲壳一端还是表皮内突一端, 或者两端同时增加^[12]。这种超收缩现象在刚刚蜕皮的美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)中也有发现^[7-8]。本实验中笔者虽然不确定这些超收缩的肌节来自哪一端(外骨骼一端还是表皮内突一端), 但实验结果为进一步探讨甲壳动物肌肉生长机制提供了线索。

甲壳动物新合成的肌节蛋白不仅是肌肉生长的原料, 还要恢复重建腐蚀掉的肌丝, 已有报道美洲螯龙虾在蜕壳前后总蛋白合成速率相对于蜕壳间期有所增加^[23]。在本研究中, 中华绒螯蟹蜕壳过程中肌原纤维蛋白和可溶性蛋白的含量变化和形态结构特征的变化一致。肌原纤维蛋白是肌肉组织中的主要蛋白, 包括肌球蛋白、肌动蛋白、肌钙蛋白及原肌球蛋白等, 组装成了肌纤维的收缩装置。从蜕皮后到蜕皮间期, 肌原纤维蛋白含量显著升高, 意味着肌节蛋白迅速合成、组装成完整的结构来适应增大了的外骨骼。在蜕壳前, 肌原纤维蛋白含量不再增加, 甚至略有降低, 这

显示在蟹类鳌足中蜕壳前蛋白质合成速率增加并不意味着肌肉质量的增加, 因为此时蛋白质降解速率也是增加的^[23]。在美洲螯龙虾, 蜕皮前萎缩的鳌足肌肉中降解蛋白质的蛋白水解酶活性增加了 2 倍多^[24], 最终结果是肌肉总质量降低, 从而鳌足顺利蜕出。目前, 已证实 Ca^{2+} 依赖的蛋白水解系统和泛素依赖的蛋白水解系统在萎缩的鳌足肌肉中都被激活^[25]。在中华绒螯蟹蜕皮前的鳌足肌肉中, 水溶性蛋白含量显著升高, 正是因为此时动物要合成各种酶类、调节因子及受体; 蜕壳后, 可溶性蛋白含量降至最低, 然后逐渐恢复到蜕皮间期水平, 这一过程也正是肌肉纤维生长的过程。

由于伴随着周期性的萎缩现象, 甲壳动物肌肉生长不同于其他动物的典型的肌肉生长模式。目前, 调节甲壳动物肌肉萎缩及重建的分子机制并不清楚, 本研究从组织学和超微结构方面描绘了鳌足肌肉蜕壳前后的形态特征, 初步定量了其肌原纤维蛋白和可溶性蛋白的变化, 今后将进一步研究蜕壳前后肌纤维基因的表达变化及其调节机制。

参考文献:

- [1] Skinner D M. Breakdown and reformation of somatic muscle during the molt cycle of the land crab, *Gecarcinus lateralis*[J]. *J Exp Zool*, 1966, 163(2): 115-123.
- [2] Schmiege D L, Ridgway R L, Moffett S B. Ultrastructure of autotomy-induced atrophy of muscles in the crab *Carcinus maenas*[J]. *Can J Zool*, 1992, 70(5): 841-851.
- [3] West J M, Humphris D C, Stephenson D G. Characterization of ultrastructural and contractile activation properties of crustacean (*Cherax destructor*) muscle fibres during claw regeneration and moulting[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995, 16(3): 267-284.
- [4] Ismail S Z M, Mykles D L. Differential molt-induced atrophy in the dimorphic claws of male fiddler crabs, *Uca pugnax*[J]. *J Exp Zool*, 1992, 263: 18-31.
- [5] Mykles D L, Skinner D M. Preferential loss of thin filaments during molt-induced atrophy in crab claw muscle[J]. *J Ultrastruct Res*, 1981, 75(3): 314-325.
- [6] Cesar J R D O, Zhao B, Malecha S, et al. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*, during the molt cycle[J]. *Aquaculture*,

- 2006, 261(2): 688–694.
- [7] Haj A J E, Houlihan D F. Growth of lobster leg muscle fibers over inter-molt and molt[J]. *J Crust Biol*, 1984, 4(4): 536–545.
- [8] Haj A J E. Regulation of muscle growth and sarcomeric protein gene expression over the inter molt cycle[J]. *Integr Comp Biol*, 1999, 39(3): 570–579.
- [9] Tian Z H, Kang X J, Mu S M. The molt stages and the hepatopancreas contents of lipids, glycogen and some selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish Sci*, 2012, 78(1): 67–74.
- [10] Kang X J, Tian Z H, Wu J L, et al. Molt stages and changes in digestive enzyme activity in hepatopancreas during molt cycle of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 806–812. [康现江, 田志环, 吴江立, 等. 中华绒螯蟹蜕皮周期及蜕皮过程中肝胰腺消化酶活性变化[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 806–812.]
- [11] Saito T, Iso N, Mizuno H, et al. Effect of thermal treatment on extraction of proteins from meats[J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1983, 49(10): 1569–1572.
- [12] West J M. Ultrastructural and contractile activation properties of crustacean muscle fibers over the moult cycle[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1997, 117(3): 525–527.
- [13] Hoyle G, Mclear J H. Mechanism of supercontraction in a striated muscle fiber[J]. *J Cell Biol*, 1965, 26(2): 621–640.
- [14] Govind C K, Bevengut M, Pearce J. Lobster swimmerets: Muscle fiber composition and membrane definition of excitatory synapses in a predominantly fast system[J]. *J Exp Zool*, 1995, 272(1): 13–24.
- [15] Brandt P W, Reuben J P, Girardier L, et al. Correlated morphological and physiological studies on isolated single muscle fibers: I Fine structure of the crayfish muscle fiber[J]. *J Cell Biol*, 1968, 38(1): 115–129.
- [16] Crabtree R L, Sherman R G. Ultrastructural characterization of superficial and deep flexor muscles in the crayfish thorax[J]. *Can J Zool*, 1981, 59(3): 357–363.
- [17] Lang F, Ogonowski M M, Costello W J, et al. Neurotrophic influence on lobster skeletal muscle[J]. *Science*, 1980, 207(4428): 325–327.
- [18] Mykles D L, Skinner D M. Muscle atrophy and restoration during molting[J]. *Crust Iss*, 1985, 3: 31–46.
- [19] Hoyle G, Mcneill P A, Selverston A I. Ultrastructure of barnacle giant muscle fibers[J]. *J Cell Biol*, 1973, 56(1): 74–91.
- [20] Benzonana G, Campanella C, Gabbiani G. Supercontraction in crayfish muscle: Correlation with a peculiar actin localization[J]. *Histochemistry*, 1979, 60(1): 21–41.
- [21] Carnevali M D C. Z-line and supercontraction in the hydraulic muscular systems of insect larvae[J]. *J Exp Zool*, 1978, 203(1): 15–29.
- [22] Heizmann C W, Bläuenstein I E, Eppenberger H M. Comparison of the localization of several muscle proteins in relaxed and contracted myofibrils[J]. *Experientia*, 1978, 34(1): 38–40.
- [23] Covi J A, Bader B D, Chang E S, et al. Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a myostatin-like factor during atrophy induced by molting or unweighting[J]. *J Exp Biol*, 2010, 213(1): 172–183.
- [24] Mykles D L, Skinner D M. Molt cycle-associated changes in calcium-dependent proteinase activity that degrades actin and myosin in crustacean muscle[J]. *Dev Biol*, 1982, 92(2): 386–397.
- [25] Mykles D L. Proteolytic processes underlying molt-induced claw muscle atrophy in decapod crustaceans[J]. *Integr Comp Biol*, 1999, 39(3): 541–551.

Changes in histology and protein content in claw closer muscle of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* during the molt cycle

TIAN Zhihuan^{1,2}, JIAO Chuanzhen¹, WU Xugan², CHENG Yongxu²

1. College of Yingdong Life Science, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources of Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To characterize the changes in the protein content and tissue structure of the claw closer muscle of *Eriocheir sinensis* during the molt cycle, muscles harvested at various stages during the molt cycle were studied using paraffin section histology, electron microscopy, and biochemical methods. The results showed that the histology of the claw closer muscle changed noticeably during the molt cycle. The fibers and myofibrils were fully expanded in the inter-molt stage, and the cross-sectional area resembled an irregular circle or polygon with many nuclei under the sarcolemma. The sarcomeres were generally in register in this stage. During the later pre-molt stage, the cross-sectional area of fibers showed a wide size distribution owing to pro-ecdysial muscle atrophy, and many eroded areas appeared within the myofibrils. In the post-molt stage, the muscle fibers were compacting and shrinking. At the ends of the fibers, some sarcomeres were in a state of super-contraction, leading to the sarcomere shortening its resting length by up to 50%, whereas sarcomeres in the middle region of the fiber showed a “normal” appearance, with a typical arrangement of thick and thin filaments in the inter-molt stage. Biochemical experiments determined that the myofibrillar protein and soluble protein content in the claw closer muscle fluctuated and the results agreed well with the observed structural changes. The results indicate that the claw closer muscle of *E. sinensis* may increase in length during the molt cycle by adding new sarcomeres to the ends of the myofibrils. These new sarcomeres would begin as shorter sarcomeres when the carapace is very soft immediately after ecdysis. Then, as the carapace becomes hardened, the new exoskeleton would be stretched by the absorption of water and the super-contracted new sarcomeres would elongate to the length of the already-existing sarcomeres within the myofibril, resulting in muscle growth.

Key words: *Eriocheir sinensis*; claw closer muscle; histology; ultrastructure; myofibrillar protein; soluble protein

Corresponding author: JIAO Chuanzhen. E-mail: jiaocz@gmail.com