

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00299

## 渗透胁迫对中华绒螯蟹胚胎生化组成及消化酶活性的影响

王瑞芳<sup>1,2</sup>, 庄平<sup>1,2</sup>, 黄晓荣<sup>1</sup>, 冯广朋<sup>1</sup>, 章龙珍<sup>1</sup>, 陆建学<sup>1</sup>, 王海华<sup>1,3</sup>, 王好<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业资源与生态重点开放实验室, 上海 200090;
2. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;
3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:** 研究了高参与低渗胁迫对离体培养的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)不同发育期胚胎中生化成分含量及消化酶活性的影响。结果显示: 从原肠期发育到出膜前期, 对照组(盐度 15)胚胎中蛋白含量降低( $P<0.05$ )、胰蛋白酶与胃蛋白酶活性升高( $P<0.05$ ), 脂类含量( $P>0.05$ )和脂肪酶活性( $P<0.05$ )降低, 碳水化合物含量和淀粉酶活性均在眼点期升高( $P<0.05$ )而在出膜前又降低( $P<0.05$ ); 低渗胁迫引起胚胎蛋白含量降低( $P<0.05$ ), 而高渗胁迫导致胚胎蛋白含量升高( $P<0.05$ ); 高渗胁迫对胚胎脂类含量无显著影响( $P>0.05$ ), 而低渗胁迫引起出膜前期胚胎中脂类含量显著降低( $P<0.05$ ); 高、低渗胁迫对胚胎碳水化合物含量均无显著影响( $P>0.05$ ); 除高、低渗胁迫均显著降低眼点期胚胎淀粉酶活性( $P<0.05$ )而引起出膜前期胚胎胰蛋白酶活性略降低( $P>0.05$ )外, 低渗胁迫导致不同发育时期胚胎消化酶活性升高, 而高渗胁迫导致酶活性降低; 除脂肪酶外, 渗透胁迫对原肠期胚胎消化酶活性的影响均具有显著性( $P<0.05$ )。研究结果说明, 蛋白质和脂类是中华绒螯蟹胚胎发育过程中重要的能源物质与结构物质, 渗透胁迫通过改变中华绒螯蟹胚胎消化酶的活性进而影响胚胎对卵黄物质的分解与利用, 最终影响胚胎的发育。本实验结果提示, 河口盐度过高或过低均可能对中华绒螯蟹早期胚胎的发育及后期幼体的质量产生潜在的不利影响。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 胚胎发育; 盐度; 渗透胁迫; 消化酶; 生化成分

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0299-09

抱卵孵育的虾蟹类其胚胎发育通常以卵内的卵黄作为营养来源<sup>[1]</sup>。卵黄主要由蛋白、游离氨基酸、脂类和碳水化合物组成<sup>[2]</sup>。对机体生化组成的研究可以了解个体或组织对能源物质的储存和利用情况。胚胎发育过程中对卵黄能源物质的分解、利用与消化酶的种类、活性直接相关。由于潮汐及河流的冲淡水作用, 河口盐度具有时空变化的特征, 生活在河口环境中的水生动物经常会经历或长或短时间的渗透压胁迫。对多种甲壳类的研究表明, 游离氨基酸在细胞内渗透调节的过程中发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>, 因此, 盐度的变化可能会改变氨基酸的代谢, 从而影响体内蛋白质

的组成。细胞外的渗透调节主要是由鳃从外界环境主动吸收或排出  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  而实现, 而离子的主动吸收需要消耗能量, 需要动员体内一些高能化合物如脂类以提供能量, 而这些调节均可能导致体内生化成分发生改变。到目前为止, 国内外已对多种甲壳类胚胎<sup>[1,4-5]</sup>、幼体<sup>[6-7]</sup>的生化组成以及胚胎发育过程中消化酶活性的变化<sup>[8-12]</sup>进行了研究, 但关于渗透环境胁迫是否影响胚胎对卵黄物质的分解、利用未见报道。

中华绒螯蟹具有生殖洄游的生活习性, 其胚胎及幼体的发育在河口环境中完成。已有研究表明, 河口蟹胚胎发育过程中经历的盐度显著影响

收稿日期: 2012-08-03; 修订日期: 2012-10-19.

基金项目: 国家 973 计划项目(2010CB429005); 国家公益性行业(农业)科研专项(200903048-07, 201203065); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(东海水产研究所 2011M08).

作者简介: 王瑞芳(1984-), 博士研究生, 主要从事水生动物生理生态学与行为生态学研究. E-mail: RFWang019@gmail.com

通信作者: 庄平, 研究员. E-mail: pzhuang@online.sh.cn

后期幼体的生化成分, 从而影响幼体质量<sup>[13-16]</sup>, 而这些卵黄物质的改变与相应消化酶活性的变化密切相关。本试验通过测定渗透胁迫后中华绒螯蟹不同发育期胚胎中蛋白、脂肪和碳水化合物含量以及胃蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性的变化, 以期了解河口发育的甲壳类胚胎对能源物质的利用策略, 从能源物质分解、利用的角度探索渗透环境影响甲壳类胚胎发育的生化机制, 并为评估长江口盐度变动对中华绒螯蟹野生资源的潜在影响提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 中华绒螯蟹胚胎

所用抱卵中华绒螯蟹由江苏省启东市金海岸水产研究所提供。2010 年 11-12 月收集二龄的雌、雄中华绒螯蟹各若干只暂养于水泥池中并进行营养强化(投喂沙蚕), 温室越冬。2011 年 3 月按照 2:1(个体数)的比例将雌、雄抱卵蟹混合使其交配(盐度 15)。交配后挑选附肢健全、卵质好的抱卵蟹 30 只, 壳宽(60.24±3.21) cm。以低温湿法运输到东海水产研究所, 平均分置到 3 个圆形循环玻璃水族缸中(直径 1.5 m, 高 80 cm)。水族缸提前用 KMnO<sub>4</sub> 浸泡、清洗, 之后配置盐度 15 的半咸水且用 300 目网过滤并曝气 1 d 以上, 同时在水族缸中加入 50 mg/L 的甲醛防止胚胎发生水霉病、聚缩虫病。暂养期间在水族缸底部搭建瓦片为抱卵蟹提供隐蔽及栖息场所。每天 18:00 按照体质量 5% 投喂新鲜螺肉并于次日 8:00 清除缸底残饵与粪便。抱卵蟹培育期间持续充氧, 保持自然光照, 水温控制在(20±1)°C。根据王吉桥等<sup>[17]</sup>对中华绒螯蟹胚胎发育的分期, 鉴定出初到实验室时胚胎处于细胞分裂期, 之后隔天检查胚胎发育情况, 选取原肠期、眼点期、出膜前期共 3 个发育时期的胚胎用于实验。

### 1.2 实验设计

实验在可控温实验室内的玻璃培养皿中(直径 8.5 cm, 高 1.4 cm)进行, 设置 1(低渗胁迫组)、15(对照组)、35(高渗胁迫组)3 个盐度组, 经镜检胚胎发育到原肠期、眼点期、出膜前期时用尖头

小镊子从卵块上取一定量胚胎直接暴露在上述 3 个盐度组中进行离体培养, 每盐度组 5 个重复(胚胎来源于 5 只抱卵蟹), 每一重复组的培养皿中加入 50 mL 实验液, 为避免水体蒸发对盐度的影响试验过程中每隔 6 h 更换 1/2 实验溶液。盐度暴露后 24 h 从每重复组中取一定量胚胎湿样, 用滤纸吸干胚胎表面水分, 放入 1.5 mL 离心管中, 置于 -80°C 冰箱中保存用于胚胎生化成分含量及消化酶活性的测定。胚胎培养过程中保持自然光照, 水温控制在(22±1)°C。

### 1.3 生化成分含量测定

**蛋白含量(mg/mL):** 采用考马斯亮蓝微量蛋白测定法, 用试剂盒进行测定(南京建成)。称取适量胚胎湿样, 加入 9 倍体积 0.86% 的生理盐水, 超声波细胞破碎, 将破碎后的组织液 1 000 r, 离心 5 min, 上清液用于蛋白含量测定, 本实验中胚胎蛋白含量在稀释 20 倍后落入试剂盒的线性测定范围之内。

**总脂含量(g/mL×10 倍稀释的初酶液):** 依据 Bligh 和 Dyer 的重量法(gravimetrically)<sup>[18]</sup> 参照 Sibert 等<sup>[5]</sup>的方法进行测定。取一定量胚胎湿样, 称重, 加入 9 倍体积的磷酸盐缓冲液(pH 7.4), 用超声波细胞破碎仪破碎细胞, 制成细胞匀浆液, 混匀后吸取 1 mL 细胞匀浆液加入到 2.5 mL 的甲醇/氯仿(2:1, 体积比)混合液中, 充分混匀后在 4°C 下静置 1 h 使其分层, 分层后用密闭移液器移出脂肪层, 放入预先称重的干燥瓶中, 置通风处自然风干, 在精确分析天平上称重剩余脂肪的重量。

**碳水化合物(mg/L):** 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定。称取胚胎湿样, 加入 9 倍体积磷酸缓冲液(pH 7.4), 超声波细胞破碎, 10 000 r, 离心 30 min, 上清液用于碳水化合物含量的测定。测定时取葡萄糖标准溶液、酶液、去离子水(对照组)各 0.1 mL, 分别加入 0.3 mL 的 DNS 试剂(3, 5 二硝基水杨酸 1%, 苯酚 0.2%, 亚硫酸钠 0.05%, 氢氧化钠 1%, 酒石酸钾钠 20%), 沸水煮沸 15 min 后显色, 冷却后加去离子水稀释到 2.5 mL, 550 nm 下测定吸光度值, 以对照组调零, 用葡萄糖标准溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/L)作标准曲线, 计

算碳水化合物含量。

#### 1.4 消化酶活性测定

胚胎在冰上解冻后称重, 加入 10 倍体积的 pH6.98(0.025 mol/L)的磷酸缓冲液, 在超声波细胞破碎仪上破碎细胞。细胞破碎后将初酶液混匀, 取一定量的酶液直接测定脂肪酶活性, 剩余初酶液 10 000 r, 4℃, 离心 30 min, 上清液用于胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶活性及蛋白含量的测定。消化酶活性的测定参照杨志彪等的方法进行<sup>[19]</sup>, 蛋白含量的测定方法同 1.3。

在 37℃ 下每分钟水解干酪素所产生 1 μg 酪氨酸作为一个胃蛋白酶活力单位 U(μg/min); 胰蛋白酶活力单位与胃蛋白酶一致; 在 25℃ 条件下, 每分钟催化淀粉生成 1 μg 麦芽糖作为一个淀粉酶活力单位 U(μg/min); 37℃ 下, 每分钟催化产生 1 μmol 脂肪酸作为一个脂肪酶活力单位 U(μmol/min)。酶的比活力: 所测以上各种酶的活力单位(U)除以相应的可溶性蛋白含量(mg)即为酶的比活力, 以 U/mg protein 表示。

#### 1.5 数据分析统计方法

蛋白含量=(测定管 OD 值-空白管 OD 值)/(标准管 OD 值-空白管 OD 值)×标准管浓度(0.563 mg/mL)

脂类含量=脂肪干重/mL 10% 匀浆液

碳水化合物含量: 根据葡萄糖标准溶液与其 OD<sub>550</sub> 的对应关系, 绘制出标准曲线, 求出回归方程, 计算测定管中碳水化合物的含量。回归方程:  $y=0.1435x-0.0187$ ,  $R^2=0.9925$

试验所有数据均用平均值±标准误表示, 采用 SPSS16.0 进行统计分析, 用单因素方差分析 (ANOVA) 及 Tukey's HSD 法对不同发育时期以及渗透胁迫后生化成分含量与消化酶活性进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 渗透胁迫对不同发育期胚胎生化成分含量的影响

随着胚胎的发育, 对照组(盐度 15)胚胎中蛋白含量显著降低( $P<0.05$ ), 脂类含量呈现降低的趋势, 但各发育时期间无显著差异( $P>0.05$ ), 碳

水化合物含量在眼点期显著升高( $P<0.05$ ), 在胚胎发育到出膜前期时又显著降低( $P<0.05$ ), 但仍显著高于原肠期( $P<0.05$ ) (表 1)。

高渗胁迫引起原肠期、眼点期、出膜前期胚胎中蛋白含量显著升高( $P<0.05$ ), 而低渗胁迫导致胚胎中蛋白含量显著降低( $P<0.05$ ); 高渗胁迫引起不同发育期胚胎中脂类含量略升高, 但未表现出显著性( $P>0.05$ ), 而低渗胁迫引起不同发育期胚胎中脂类含量降低, 且在出膜前期表现出显著性( $P<0.05$ )。高、低渗胁迫对 3 个发育时期胚胎中碳水化合物含量均无显著影响(表 1)。

### 2.2 渗透胁迫对不同发育期胚胎消化酶活性的影响

随着胚胎的发育, 对照组胚胎胃蛋白酶与胰蛋白酶活性在眼点期显著升高( $P<0.05$ ), 其中胰蛋白酶活性升高了约 6 倍( $P<0.05$ ), 两种蛋白酶活性在出膜前期略升高但与眼点期相比无显著差异( $P>0.05$ ); 淀粉酶活性在眼点期显著升高( $P<0.05$ ), 而在出膜前期又显著降低到原肠期时的水平( $P<0.05$ ); 脂肪酶活性随着胚胎的发育逐渐降低, 出膜前期胚胎中脂肪酶活性显著低于原肠期胚胎脂肪酶活性( $P<0.05$ ) (表 2)。

低渗胁迫引起原肠期、眼点期胚胎胃蛋白酶活性与 3 个发育时期胚胎胰蛋白酶活性升高, 而高渗胁迫则引起 3 个发育时期胚胎胃蛋白酶与胰蛋白酶活性降低, 但渗透胁迫效应仅在原肠期表现出显著性( $P<0.05$ ); 低渗胁迫引起原肠期( $P<0.05$ )与出膜前期( $P>0.05$ )胚胎淀粉酶活性升高, 而高渗胁迫引起酶活性降低, 眼点期胚胎淀粉酶活性在高、低渗胁迫后均显著降低( $P<0.05$ ); 低渗胁迫提高胚胎脂肪酶活性而高渗胁迫则抑制胚胎脂肪酶活性, 但与对照组相比, 高、低渗胁迫对胚胎脂肪酶活性的影响均未表现出显著性( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 中华绒螯蟹胚胎发育过程中生化成分含量与消化酶活性的变化

抱卵虾蟹类胚胎的发育在母体的附肢上进行, 在胚胎发育过程中母体对胚胎起到一定的保护作用

表 1 渗透胁迫对不同发育时期中华绒螯蟹胚胎生化成分的影响

Tab. 1 Developmental changes of biochemical composition in the eggs of *E. sinensis* under osmotic stress $\bar{x} \pm SE; n=5$ 

发育时期 stage	盐度 salinity	蛋白/(mg·mL <sup>-1</sup> ) protein	脂类/(g·mL <sup>-1</sup> ×10 crude enzyme) lipid	碳水化合物/(mg·mL <sup>-1</sup> ) carbohydrate
原肠期 gastrula	1	1.36±0.074*	0.0121±0.0014	0.160±0.0067
	15	1.52±0.069 <sup>A</sup>	0.0127±0.0003 <sup>A</sup>	0.170±0.0080 <sup>A</sup>
	35	1.68±0.023*	0.0130±0.0015	0.174±0.0035
眼点期 eyespot	1	1.32±0.041*	0.0098±0.0018	0.250±0.0357
	15	1.44±0.027 <sup>B</sup>	0.0112±0.0018 <sup>A</sup>	0.238±0.0287 <sup>B</sup>
	35	1.52±0.080*	0.0118±0.0037*	0.231±0.0090
出膜前期 pre-hatching	1	1.18±0.042*	0.0092±0.0013*	0.223±0.0155
	15	1.24±0.061 <sup>C</sup>	0.0112±0.0006 <sup>A</sup>	0.210±0.0079 <sup>C</sup>
	35	1.40±0.054*	0.0114±0.0007	0.220±0.0174

注: 同一发育时期内“\*”代表与对照组(盐度 15)相比具有显著性差异( $P < 0.05$ ); 不同上标大写字母代表对照组不同发育期存在显著差异( $P < 0.05$ ), 反之代表无显著差异。

Note: “\*” indicates statistically significant differences compared with control group ( $P < 0.05$ ). Different capital letters denotes significant differences between developmental stages.

表 2 渗透胁迫对不同发育时期中华绒螯蟹胚胎消化酶活性的影响

Tab. 2 Developmental changes of digestive enzyme activities in the eggs of *E. sinensis* under osmotic stress $\bar{x} \pm SE; n=5$ 

发育时期 stage	盐度 salinity	胃蛋白酶/(U·mg <sup>-1</sup> ) pepsin	胰蛋白酶/(U·mg <sup>-1</sup> ) trypsin	淀粉酶/(U·mg <sup>-1</sup> ) amylase	脂肪酶/(U·mg <sup>-1</sup> ) lipase
原肠期 gastrula	1	0.0336±0.000*	0.00097±0.0000*	1.066±0.015*	0.0011±0.0002
	15	0.0307±0.000 <sup>A</sup>	0.00079±0.0000 <sup>A</sup>	0.880±0.048 <sup>A</sup>	0.0008±0.0001
	35	0.0279±0.000*	0.00066±0.0000*	0.827±0.025	0.0006±0.0001
眼点期 eyespot	1	0.0446±0.0033	0.00696±0.0007	0.511±0.028*	0.0074±0.0001
	15	0.0427±0.0031 <sup>B</sup>	0.00627±0.0006 <sup>B</sup>	1.361±0.107 <sup>B</sup>	0.0058±0.0002
	35	0.0421±0.0026	0.00607±0.0005	0.395±0.024*	0.0037±0.0001
出膜前期 pre-hatching	1	0.0461±0.0007	0.00768±0.0002	1.016±0.078	0.0025±0.0000
	15	0.0484±0.0016 <sup>B</sup>	0.00718±0.0003 <sup>B</sup>	0.832±0.056 <sup>A</sup>	0.0022±0.0000
	35	0.0478±0.0004	0.00700±0.0000	0.726±0.093	0.0019±0.0000

注: 同一发育时期内“\*”代表与对照组(盐度 15)相比具有显著性差异( $P < 0.05$ ); 不同大写上标字母代表对照组不同发育期存在显著差异( $P < 0.05$ ), 反之代表无显著差异。

Note: “\*” indicates statistically significant differences compared with control group ( $P < 0.05$ ). Different capital letters denotes significant differences between developmental stages.

用, 为胚胎发育提供适宜的环境, 但母体与胚胎之间无营养物质的交流, 胚胎发育所需的能源物质以及组织、器官形成的结构物质均由胚胎中的卵黄提供。卵黄主要由蛋白、游离氨基酸、脂类和碳水化合物组成<sup>[20]</sup>。胚胎中营养物质的含量主要受到产卵前母体营养物质的积累程度和胚胎发育过程中对营养物质利用的影响。对胚胎卵黄物质中不同营养成分的分解、利用与相应消化酶的存在与活性直接相关。卵黄中的蛋白质主要由胃

蛋白酶、胰蛋白酶将其水解为多肽和氨基酸, 氨基酸或重新合成新的蛋白质为胚胎发育提供能源或用于形成组织、器官, 抑或进一步分解, 产生 ATP 为胚胎发育提供能量, 也可以转化成胚胎发育需要的脂类和碳水化合物。淀粉酶将胚胎卵黄中的碳水化合物(多糖)水解为单糖类物质, 为胚胎发育供能。脂肪酶用于将卵黄中的甘油三酯水解为甘油和脂肪酸, 为胚胎发育供能或用于膜结构的形成。

蛋白质和脂类是甲壳类胚胎发育过程中最重要的能源物质, 而蛋白质同时也是组成组织、器官的主要结构物质。本实验中发现, 从原肠期到出膜前期, 中华绒螯蟹胚胎中蛋白含量显著降低, 这与对虾(*Macrobrachium borellii*)<sup>[21]</sup>、双齿扇蟹(*Xantho bidentatus*)<sup>[4]</sup>、挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)<sup>[22]</sup>、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)<sup>[11]</sup>等的研究结果一致。对甲壳类胚胎组织学的研究表明, 在原肠期以前胚胎主要以卵裂的形式形成细胞, 从原肠期开始各器官的原基相继形成, 随后形成复杂的组织和器官<sup>[23]</sup>, 对营养物质的利用也逐步增强。对中华绒螯蟹胚胎发育的研究显示, 原肠期之后中华绒螯蟹胚胎相继形成 3 对附肢原基、视叶原基、头胸甲原基, 并逐步发育成附肢、复眼、头胸甲, 之后心脏原基形成、心脏开始跳动<sup>[23]</sup>, 这些器官的发育形成均需要消耗大量的能量, 因此, 本实验中降低的卵黄蛋白被分解用于组织、器官的形成并为之提供能量。蛋白质降解后的含氮物质为氨, 田华梅等<sup>[1]</sup>认为, 由于氨极易溶于水, 因此, 在水中完成胚胎发育的甲壳类如中华绒螯蟹更倾向于利用蛋白质作为能源物质。本实验中同时发现, 伴随着蛋白含量的降低中华绒螯蟹胚胎中两种蛋白消化酶胃蛋白酶和胰蛋白酶活性到眼点期显著升高, 出膜前期仍保持较高活性水平, 这一结果与 Luo 等<sup>[11]</sup>对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究结果一致, 表明从原肠期开始蛋白酶 mRNA 合成增强, 酶活性升高, 促进卵黄蛋白的水解, 以满足各组织器官形成过程中对能量的需求。出膜前期胚胎中仍具有较高的蛋白酶活性可能是为初孵蚤状幼体的摄食及之后的蜕壳做准备, 以满足幼体发育过程中对更多能量的需求。胃蛋白酶与胰蛋白酶是两种主要的蛋白消化酶, 关于这两种消化酶在甲壳类胚胎、幼体对蛋白的水解过程中发挥作用的重要性存在不同的研究结果。对南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[24]</sup>、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)<sup>[25]</sup>、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)<sup>[26]</sup>幼体消化酶的研究中指出胰蛋白酶的活力大于胃蛋白酶活力, 而对罗氏沼虾<sup>[11]</sup>、中华绒螯蟹<sup>[1]</sup>胚

胎消化酶的研究中发现胃蛋白酶活性显著高于胰蛋白酶活性, 本实验结果与后者一致。这可能表明胚胎主要通过胃蛋白酶水解卵黄蛋白为胚胎发育提供能量, 而胰蛋白酶在幼体对蛋白的水解过程中发挥主要作用。

卵黄中的脂类是高能化合物, 为胚胎发育、生长提供能量, 同时脂类中的磷脂是组成细胞膜结构的重要物质, 因此, 脂类同样具有维持细胞膜结构和生理功能完整性的重要作用。到目前为止, 已测定了多种甲壳类胚胎中脂类的含量, 但关于脂类是否是胚胎发育过程中主要的供能物质仍存在争议。田华梅<sup>[1]</sup>对不同发育期中华绒螯蟹胚胎中生化成分的研究显示, 从受精卵到卵内第一无节幼体期, 胚胎中脂类含量无显著变化, 认为在此阶段脂类不是主要的能源物质, 但后期随着胚胎的进一步发育, 脂类含量增加。Babu<sup>[4]</sup>对双齿扇蟹的研究表明, 发育前期(I 期到 IV 期)胚胎中脂类含量无显著变化, IV 期后脂类含量显著降低, 这与双齿扇蟹胚胎发育过程中内部组织、器官的分化一致, 这一结果也与 Álvarez-Fernández 等<sup>[22]</sup>对挪威海螯虾的研究结果一致。而其他学者的研究也得出了脂类含量随着胚胎的发育逐渐降低的结果<sup>[10-11]</sup>。本实验结果显示, 随着胚胎的发育, 中华绒螯蟹胚胎中脂类含量略降低、脂肪酶活性显著下降, 这表明从原肠期到出膜前期, 脂类作为重要的能源物质被分解利用, 随着胚胎的进一步发育, 胚胎中剩余脂类含量逐渐降低, 脂肪酶活性也适应性的调低。本试验中从原肠期到出膜前期中华绒螯蟹胚胎中脂肪酶活性降低与 Yao 等<sup>[10]</sup>对罗氏沼虾胚胎发育过程中消化酶活性的研究结果一致, 而与锯缘青蟹<sup>[11]</sup>、中华绒螯蟹<sup>[1]</sup>的研究结果相反。不同学者的研究结果存在差异除了与初孵幼体的食性相关外, 可能仍与脂肪酶活性的测定方法及所用底物的不同有关。中华绒螯蟹胚胎中脂肪酶活性在四种消化酶中最低, 这与对其他虾蟹类胚胎、幼体、成体消化酶活性的研究结果一致<sup>[4,6,22]</sup>。已有研究中多数学者认为组织中脂肪酶活性较低与反应底物不佳或测定方法灵敏度不高有关。也有学者认为可能是生物本身

脂肪酶活力很低甚至无活力,而以酯酶消化脂类<sup>[4]</sup>。作者认为,因脂类是高能化合物,分解较少的脂类即可产生相对高的能量,因此较低的脂肪酶活性可能已可以满足机体对脂类利用的需求。

对许多水生无脊椎动物如甲壳类、双壳类、头足类等的研究中显示,胚胎中蛋白、脂类的含量显著高于碳水化合物的含量,表明碳水化合物并不是胚胎发育过程中主要的能源物质<sup>[27-29]</sup>。在胚胎发育过程中,大部分碳水化合物用于构建甲壳类的几丁质外骨骼<sup>[4]</sup>。关于碳水化合物在十足目甲壳类胚胎发育过程中的作用以及变化趋势在不同种类的研究中有着不一致的结果。Babu<sup>[4]</sup>的研究显示双齿扇蟹胚胎发育过程中总碳水化合物含量逐渐降低,Yao 等研究也表明罗氏沼虾胚胎发育过程中碳水化合物含量降低<sup>[10]</sup>,而对虾胚胎发育过程中碳水化合物含量逐渐升高<sup>[11]</sup>。中华绒螯蟹胚胎中碳水化合物含量在发育前期无显著变化,后期则升高<sup>[1]</sup>;而挪威海螯虾胚胎中碳水化合物含量在胚胎发育前期无显著变化,发育后期略降低<sup>[22]</sup>。本实验中中华绒螯蟹胚胎中淀粉酶活性和碳水化合物含量均在眼点期显著升高,出膜前期又显著降低。作者认为,眼点期碳水化合物含量升高可能是由其他营养物质转化而来,以储备足够的碳水化合物用于之后头胸甲、附肢的形成,与此相应,眼点期淀粉酶活性显著升高用于对多糖进行分解利用。而出膜前期胚胎中碳水化合物含量又降低,这可能显示部分碳水化合物被作为能源物质而消耗。蛋白、脂类、碳水化合物在十足目甲壳类胚胎发育过程中的消长变化主要与种类、胚胎发育方式、生活史、发育阶段及其栖息地环境有关。

在 4 种消化酶中,中华绒螯蟹胚胎淀粉酶活性最高、脂肪酶活性最低,胰蛋白酶与胃蛋白酶活性居中,这与对锯缘青蟹<sup>[12]</sup>、罗氏沼虾<sup>[10]</sup>胚胎消化酶的研究结果类似,这似乎与十足目甲壳类胚胎中较高的脂类含量、较低的碳水化合物含量<sup>[1,4,30]</sup>相矛盾。Rodriguez 等<sup>[31]</sup>认为,因胚胎中碳水化合物含量较低,较高的淀粉酶活性可能可以提高碳水化合物的利用效率。Hirche 和 Anger<sup>[32]</sup>

指出,蜘蛛蟹(*Hyas araneus*)幼体中较高的淀粉酶活力与其饲料中较低的碳水化合物水平是不相符,因此,肉食性蜘蛛蟹幼体中的淀粉酶可能是物种进化过程中部分草食性幼体发育的残余部分。与其他消化酶相比,较高的淀粉酶活性在成熟中华绒螯蟹的肝胰腺中也被检测到<sup>[33]</sup>。胚胎中积累的卵黄营养物质来源于母体性腺,而性腺中营养物质最终来源于肝胰腺,肝胰腺是消化酶分泌的主要场所,因此,作者认为,胚胎中较高的淀粉酶活性也可能与母体有关。

### 3.2 盐度对中华绒螯蟹胚胎生化成分及消化酶活性的影响

盐度影响甲壳类早期幼体对营养物质的积累已被广泛报道。研究显示,将黄道蟹(*Cancer pagurus*)、欧洲龙虾(*Homarus gammarus*)、普通滨蟹(*Carcinus maenas*)、颗粒张口蟹(*Chasmagnathus granulata*)I 期蚤状幼体暴露在低盐环境下均会导致幼体干重减轻,蛋白、脂类含量降低<sup>[7]</sup>;海水蟹普通滨蟹 I 期蚤状幼体干重、C、N 含量随着盐度的降低而降低<sup>[6]</sup>。本研究中也发现,低盐引起中华绒螯蟹胚胎中蛋白含量、总脂含量降低而高盐引起其含量增加。到目前为止,虽然没有关于渗透胁迫是否影响甲壳类胚胎对能源物质利用的直接研究,但已有研究指出,胚胎孵化过程中所经历的盐度显著影响初孵幼体中能源物质的含量,从而影响幼体的耐饥饿能力、活动性,结果影响后期生长<sup>[13-14,16]</sup>。在低盐下孵化的胚胎其出膜幼体的生物能量较低<sup>[15]</sup>,幼体存活率降低、发育时间延长,生长减缓<sup>[14]</sup>、耐饥饿能力减弱<sup>[13]</sup>。相反,高盐下发育的胚胎其孵出幼体具有较高的生物能量、存活率和较快的发育速度<sup>[16]</sup>。本研究中低渗胁迫引起中华绒螯蟹胚胎蛋白、脂类含量降低,其原因之一可能是由于环境水体渗透压低于胚胎内渗透压时,环境中水份被动进入胚胎引起胚胎渗透压降低,因此,胚胎需要进行有效的水平衡调节以完成正常的发育。早期胚胎中蛋白质、脂类可能被分解为小分子有机物以提高胚胎内渗透压。而胚胎发育到晚期时一些渗透压调节组织(离子调节细胞)或器官(鳃)已逐步形成,胚胎能通过离

子调节细胞或组织从环境中主动吸收离子以调高胚胎卵周液渗透压, 而这一过程需要消耗能量。因此, 低渗胁迫后蛋白可能被蛋白酶分解为游离氨基酸用于维持胚胎内的高渗状态, 而脂类可能被脂肪酶分解主要用于提供能量。水是生命活动的基础物质, 在低渗环境下外界水体进入胚胎, 引起胚胎代谢加快, 发育加速, 而蛋白和脂类作为重要的结构物质或能源物质可能被水解消耗而降低, 这在本研究中也得到证实。本研究结果显示, 低渗胁迫后胚胎中消化酶活性升高, 升高的消化酶活性可提高胚胎对卵黄物质的利用效率; 相反, 当外界水体渗透压高于胚胎内渗透压时将导致胚胎内水份流失, 胚胎发育延缓, 消化酶活性降低, 对能源物质的利用效率降低, 导致卵黄蛋白、脂类滞留在胚胎中。环境盐度影响机体消化酶活性近年来在甲壳类成体的研究中也曾被报道。Li 等<sup>[34]</sup>认为, 在极端盐度下南美白对虾肝胰腺胰蛋白酶和淀粉酶活性升高使动物可以从食物中摄取更多的能量以补偿渗透压调节过程中能量的消耗。Asaso 等<sup>[35]</sup>的研究中发现, 盐度 10 时张口蟹(*Neohelice granulata*)肝胰腺淀粉酶活性显著高于盐度 35 时, 指出在低盐环境下机体对淀粉的消化能力提高, 体内葡萄糖含量升高为各组织、器官在低渗环境下的渗透压调节提供能量。

本研究中渗透胁迫对胚胎中碳水化合物的含量的影响不显著, 可能表明碳水化合物并不是中华绒螯蟹胚胎发育过程中的主要的能源物质。研究认为, 碳水化合物在胚胎发育过程中主要用于构建甲壳类的几丁质外骨骼<sup>[4]</sup>。本研究发现, 低渗胁迫加快胚胎发育而高渗胁迫导致胚胎发育减慢, 发育速度的差异影响胚胎中几丁质外壳的形成时间, 这可能影响同一时间胚胎中碳水化合物的含量, 但由于胚胎中碳水化合物含量远低于蛋白、脂类含量, 这可能导致误差较大, 不同盐度下胚胎碳水化合物含量未表现出显著性差异。此外, 本研究发现, 低渗胁迫对原肠期胚胎消化酶活性的影响具有显著性, 而从眼点期开始, 低渗胁迫对消化酶(除淀粉酶外)活性的影响不显著, 这可能显示中华绒螯蟹胚胎从眼点期开始已具备较强

的高渗调节能力, 但这一推断仍需要今后进一步研究证实。

#### 4 结论

蛋白质及脂类是中华绒螯蟹胚胎发育过程中重要的能源物质与结构物质, 极低盐度会加速胚胎卵黄中蛋白、脂类的分解与利用, 可能会导致初孵幼体中剩余能源物质减少, 引起初孵幼体质量较差, 而极高盐度抑制胚胎卵黄物质的分解与利用, 导致代谢减弱, 营养物质滞留, 可能引起出膜时间推迟或无法孵化出膜, 因此, 极高或极低的盐度均可能通过影响胚胎对能源物质的分解利用, 进而对中华绒螯蟹幼体资源的质量与数量造成潜在的影响。

#### 参考文献:

- [1] 田华梅. 中华绒螯蟹胚胎营养与发生相关性的初步研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2002: 1-45.
- [2] Mellinger J. Les réserves lipidiques de l'oeuf des poissons [J]. *Année Biol*, 1995, 34: 63-90.
- [3] McNamara J C, Rose J C, Greene L J, et al. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (crustacea, decapoda) during long-term salinity acclimation [J]. *Mar Fresh Behavio Physiol*, 2004, 3(37): 193-208.
- [4] Babu D E. Observations on the embryonic development and energy source in the crab *Xantho bidentatus* [J]. *Mar Biol*, 1987, 95(1): 123-127.
- [5] Sibert V, Ouellet P, Brethes J C. Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle [J]. *Mar Biol*, 2004, 144: 1075-1086.
- [6] Anger K. Patterns of growth and chemical composition in decapod crustacean larvae [J]. *Invert Reprod Develop*, 1998, 33: 159-176.
- [7] Torres G, Gimenez L, Anger K. Effects of reduced salinity on the biochemical composition (lipid, protein) of zoeal decapod crustacean larvae [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 277: 43-60.
- [8] Biesiot P M. Changes in midgut gland morphology and digestive enzyme activities associated with development in early stages of the American Lobster *Homarus americanus* [C]. Vol 1. Institute of Technology, Woods Hole Oceanography Institution, Woods Hole, Massachusetts, 1998: 1-10.

- graphic Institution, Woods Hole, MA. 1986: 233–237.
- [9] Subramoniam T. Yolk utilization and esterase activity in the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards) [M]// Wenner A M, Kuris A M. Crustacean Egg Production. Crustacean Issues, Vol 7. Rotterdam: Balkema Press, 1991: 19–29.
- [10] Yao J J, Zhao Y L, Wang Q, et al. Biochemical compositions and digestive enzyme activities during the embryonic development of prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquaculture, 2006, 253(1–4): 573–582.
- [11] Luo W, Zhao Y L, Yao J J. Biochemical composition and digestive enzyme activities during the embryonic development of the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* [J]. Crustaceana, 2008, 81(8): 897–915.
- [12] 李少菁, 王贵忠, 汤鸿, 等. 锯缘青蟹胚胎发育过程中几种消化酶活性的比较研究[J]. 厦门大学学报, 1995, 34(6): 970–974.
- [13] Giménez L. Effects of prehatching salinity and initial larval biomass on survival and duration of development in the zoea I of the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, under nutritional stress [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 270(1): 93–110.
- [14] Gimenez L, Torres G. Larval growth in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*: The importance of salinity experienced during embryonic development, and the initial larval biomass [J]. Mar Biol, 2002, 141(5): 877–885.
- [15] Giménez L, Anger K. Relationships among salinity, egg size, embryonic development, and larval biomass in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2001, 260(2): 241–257.
- [16] Giménez L, Anger K. Larval performance in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, is a consequence of both larval and embryonic experience [J]. Mar Ecol Prog Ser, 2003, 249: 251–264.
- [17] 王吉桥, 张涛, 佟鹰, 等. 不同发育期中华绒螯蟹胚胎离体孵化和幼体培育的研究[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(3): 192–197.
- [18] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37: 911–917.
- [19] 杨志彪, 赵云龙, 周忠良, 等. 水体铜对中华绒螯蟹体内铜分布和消化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 496–501.
- [20] Mellinger J. Les réserves lipidiques de l'oeuf des poissons [J]. Annee Biol, 1995, 34: 63–90.
- [21] Heras H. Mecanismo de Transporte Hemolinfático de Lípidos en *Octopus tewelchus* d'Orb. 1835 [D]. La Plata: University of La Plata, 1990: 206.
- [22] Álvarez-Fernández I, Rotllant G, Company J B, et al. Biochemical characterization of eggs of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Nephropidae), during the embryonic development [R]. Glasgow: Sixth International Crustacean Congress, 2005.
- [23] 黄晓荣, 庄平, 章龙珍, 等. 中华绒螯蟹胚胎发育及几种代谢酶活性的变化[J]. 水产学报, 2011, 2(35): 192–199.
- [24] 王淑红, 陈昌生, 刘志勇, 等. 南美白对虾幼体消化酶活力的初步研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(3): 389–392.
- [25] 汤鸿, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹幼体消化酶活力[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1995, 34(1): 88–93.
- [26] 潘鲁青, 王奎琪. 三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(3): 246–251.
- [27] Holland D L. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates [C]// Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology. London: Academic Press, 1978: 85–123.
- [28] Pandian T J, Schumann K H. Chemical composition and caloric content of egg and zoea of the hermit crab *eupagurus bernhardus* [J]. Helgol Mar Res, 1967, 3(16): 225–230.
- [29] Whyte J N C, Bourne N, Ginther N G, et al. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1992, 163: 13–29.
- [30] García-Guerrero M. Proximate biochemical variations in eggs of the prawn *Macrobrachium americanum* (Bate, 1869) during its embryonic development [J]. Aquac Res, 2009, 40(5): 575–581.
- [31] Rodriguez A, Le Vay L, Mourente G, et al. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae [J]. Mar Biol, 1994, 118(1): 45–51.
- [32] Hirche H J, Anger K. Digestive enzyme activities during larval development of Hyas *aroneus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1987, 87B(2): 297–302.
- [33] 周永奎, 刘力鹤, 陈立侨, 等. 卵巢发育过程中河蟹肝胰腺消化酶活力的变化[J]. 水利渔业, 2005, 25(2): 19–21.
- [34] Li E, Chen L, Zeng C, et al. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities [J]. Aquaculture,

2008, 274(1): 80–86.

[35] Asaro A, Valle J C D, Mañanes A A L. Amylase, maltase and sucrase activities in hepatopancreas of the euryhaline crab

*Neohelice granulata* (Decapoda: Brachyura: Varunidae): partial characterization and response to low environmental salinity [J]. *Sci Mar*, 2011, 75(3): 517–524.

## Developmental changes of biochemical composition and digestive enzyme activity in the eggs of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, under osmotic stress

WANG Ruifang<sup>1,2</sup>, ZHUANG Ping<sup>1,2</sup>, HUANG Xiaorong<sup>1</sup>, FENG Guangpeng<sup>1</sup>, ZHANG Longzhen<sup>1</sup>, LU Jianxue<sup>1</sup>, WANG Haihua<sup>1,3</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China;

2. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** Embryonic development of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, is completed in estuaries where they are exposed to frequent and abrupt changes in environmental salinity. Biochemical composition (carbohydrates, proteins and lipids) content and digestive enzyme (amylase, lipase, pepsin and trypsin) activity were determined in three developmental stages (gastrula, eyespot and pre-hatching stage) of *E. sinensis* eggs under hyper- or hypo-osmotic stress. Increases in pepsin and trypsin activity ( $P < 0.05$ ) and decreases in protein ( $P < 0.05$ ), lipid content ( $P > 0.05$ ) and lipase activity ( $P < 0.05$ ) in the eggs of the control group were noticed during embryonic development. Total carbohydrate content and amylase activity increased at the eyespot stage ( $P < 0.05$ ), whereas they reduced during the pre-hatching stages ( $P < 0.05$ ). The protein content during all three developmental stages decreased under hyper-osmotic stress while it increased under hypo-osmotic stress ( $P < 0.05$ ). Total lipid content was unaffected by hyper-osmotic stress at any developmental stage, whereas it reduced significantly at the pre-hatching stage under hypo-osmotic stress ( $P < 0.05$ ). Total carbohydrate content did not show any significant variation after osmotic stress. Hyper-osmotic stress reduced enzyme activity at the three developmental stages; however, hypo-osmotic stress enhanced it, with the exception of reducing amylase activity in the eyespot stage ( $P < 0.05$ ) and trypsin activity in the pre-hatching stage under both hyper- and hypo-osmotic stress ( $P > 0.05$ ). With the exception of lipase, the effect of salinity changes on digestive enzymes was only statistically significant during the gastrula stage ( $P < 0.05$ ). We suggest that proteins and lipids are important structural materials of embryonic development and provide energy for this process. Osmotic stress changed the activity of digestive enzymes, which further affects the use of yolk substances, and consequently affects embryonic development. Extremely high or low salinity in estuaries potentially affects the embryonic development of *E. sinensis*, especially under salt-water encroachment.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; embryonic development; salinity; osmotic stress; digestive enzymes; biochemical composition

**Corresponding author:** ZHUANG Ping. E-mail: pzhuang@online.sh.cn