

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16136

三疣梭子蟹卵巢发育过程中雌二醇的免疫定位和变化

柳梅梅¹, 吴旭干¹, 潘杰¹, 成永旭^{1, 2}

1. 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;

2. 上海海洋大学 上海市水产动物遗传育种协同创新中心, 上海 201306

摘要: 雌二醇(*estradiol*, E₂)是甲壳动物体内重要的性类固醇激素, 对其卵巢发育和卵黄发生起着十分重要的调控作用。本实验采用免疫组织化学方法系统研究了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)卵巢发育过程中E₂在卵巢、肝胰腺、胸神经节、脑神经节和大颤器中的分布及变化。结果表明: (1) 蟹卵巢中E₂的免疫阳性主要分布于滤泡细胞和卵巢发育中后期的卵母细胞细胞质(II-V期), 卵巢发育过程中卵母细胞细胞质和细胞核中的E₂免疫阳性均为先上升后下降的趋势, 最大免疫阳性分别出现在IV期和II-III期, 滤泡细胞中始终存在较强的E₂免疫阳性; (2) 肝胰腺中的E₂免疫阳性主要分布于F细胞及R细胞细胞核中, R细胞细胞核中的E₂免疫阳性从III期开始显著下降, F细胞中始终存在较强的E₂免疫阳性; (3) 卵巢发育(I-V期)的神经组织, E₂主要分布于胸神经团的神经细胞和神经髓质以及脑神经节神经细胞细胞核内, 其中脑神经节神经细胞细胞核中始终保持着强免疫阳性, 卵巢发育早期(I-II期)胸神经团中的神经髓质中为E₂中等免疫阳性, 神经细胞中一直为弱免疫阳性; (4) 就大颤器而言, E₂强免疫阳性始终存在于大颤器腺细胞的核仁以及细胞核周围的细胞质内。以上结果表明, E₂在三疣梭子蟹卵巢、肝胰腺、神经组织和大颤器中广泛分布, 且免疫阳性与卵巢发育具有一定的相关性, E₂可能通过作用于多个靶器官来调控三疣梭子蟹的卵巢发育。

关键词: 三疣梭子蟹; 卵巢发育; 雌二醇; 免疫定位; 作用靶点

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)02-0239-09

性类固醇激素是一类调控甲壳动物生殖过程的重要性激素, 主要包括雌激素、孕激素和睾酮类^[1]。雌二醇(E₂)在甲壳动物卵巢发育过程中起着十分重要的调控作用^[2-3]。E₂在甲壳动物肝胰腺、卵巢、血淋巴和大颤器等组织中广泛分布^[2-5], 绝大多数甲壳动物卵巢发育期间卵巢、肝胰腺和血淋巴中E₂含量表现为先上升后下降的变化模式, E₂最高含量通常发生在外源性卵黄合成期的卵母细胞期^[3, 6-7], 且甲壳动物血淋巴和卵巢中的E₂含量与血淋巴中的卵黄磷蛋白(Vn)含量具有显著正相关性^[7-8]。进一步研究表明, 外源E₂可以促进多种甲壳动物的卵黄发生和卵巢发育^[9-11]。但是有

关其作用靶点和作用机制还所知甚少。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是中国重要的海水养殖经济蟹类, 池塘养殖雌体卵巢发育不良是影响该产业健康发展的瓶颈问题之一, 这严重影响了池塘养殖三疣梭子蟹的食用价值和经济效益^[12-13]。池塘养殖三疣梭子蟹卵巢发育不良可能与E₂分泌失调有关, 尽管先前的研究已经基本探明了三疣梭子蟹卵巢发育过程中E₂在卵巢、肝胰腺和血淋巴中的含量变化^[7], 但是尚不清楚E₂在这些组织中的组织学分布及其变化。深入理解E₂对三疣梭子蟹卵巢发育的调控路径, 首先需要探明三疣梭子蟹卵巢发育期间E₂的主要靶

收稿日期: 2016-04-26; 修订日期: 2016-05-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41276158); 上海市自然科学基金项目(12ZR1413000); 上海市科技兴农重点攻关项目[(沪农科攻字(2013)第 6-3 号)]; 上海市科技兴农推广项目[沪农科攻字(2016)第 1-1-8 号]; 上海市高峰学科建设项目(2012-62-0908); 浙江省东海海水养殖产业升级协同创新中心项目。

作者简介: 柳梅梅(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事甲壳动物繁殖生物学的研究. E-mail: 15105517287@163.com

通信作者: 吴旭干(1978-). E-mail: xgwu@shou.edu.cn

器官及其细胞学分布和变化。鉴于此,本实验采用免疫组织化学方法系统研究了三疣梭子蟹卵巢发育过程中 E₂ 在卵巢、肝胰腺、脑神经节、胸神经节和大颤器中的分布与变化,旨在了解 E₂ 的可能作用位点及其细胞学分布变化与卵巢发育的关系,为进一步探讨甲壳动物卵巢发育过程中 E₂ 的作用机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与暂养

实验用三疣梭子蟹取自于上海水产研究所启东养殖基地,采样时间为 2014 年 7 月至 2015 年 4 月,每月挑选 5~10 只肢体健全的雌蟹活体运输至上海海洋大学甲壳动物营养繁殖实验室,在室内循环水养殖系统中暂养两周后用于实验,雌蟹体重为 30~300 g,甲壳长 5.1~10.5 cm。暂养水族箱体积 195 L(长×宽×高为 130 cm×60 cm×25 cm),水体体积为 120 L 左右,箱底部铺 5 cm 厚的细沙供蟹潜伏,同时放置 2 段无毒 PVC 管(直径 18 cm,长 25 cm)作为隐蔽物,每箱放 5 只蟹,暂养期间每日 19:00 按照蟹体重的 5%~10% 投喂缢蛏,翌日 10:00 清理残饵和粪便,水源为曝气后的自来水和盐卤的混合物,自然光照,实验期间水温 16~28°C,盐度 21~25, pH 7.0~9.0, 溶氧>5 mg/L; 氨氮<0.5 mg/L, 亚硝酸盐<0.10 mg/L。

1.2 实验取样与卵巢分期

实验用蟹暂养 1 周后进行活体解剖,解剖前将实验用蟹在冰上麻醉后吸干体表水分,然后称重并测量其甲壳长、甲壳宽。解剖后取出所有的卵巢和肝胰腺组织,准确称重并记录,据此计算卵巢指数(GSI=卵巢质量/蟹质量×100%)。同时取小块卵巢、肝胰腺、大颤器、Y 器官、视神经节、脑神经节、胸神经团和肌肉, PBS 漂洗后固定在 4% 多聚甲醛中(PFA),4°C 过夜^[14]。根据吴旭干等^[16]的方法将三疣梭子蟹卵巢发育分为 5 期。每个卵巢发育期均重复固定 3~5 只雌蟹的不同组织,以便进行后续免疫组化研究。

1.3 主要试剂

一抗为小鼠抗 E₂ 单克隆抗体(货号: ab131413)购自英国 Abcom 生物公司;二抗为浓缩型 SABC-FITC(小鼠 IgG)试剂盒(货号: SA1062)、0.01 mol/L

PBS 缓冲液(pH 7.2~7.6, 货号: AR0030)购自武汉博士德生物工程有限公司;3% 双氧水(货号: A501976-0500)购自生工生物(上海)股份有限公司。

1.4 免疫组化

取 4°C PFA 过夜固定后的组织进行蔗糖梯度脱水,OCT 包埋后于-20°C^[16]的条件下进行连续切片(Leica 切片机,型号: Leica CM1950, 德国 Leica 公司生产),切片厚度为 5~7 μm。PBS 洗涤 5 min 后用 0.3% 的双氧水室温处理 20 min 以抑制内源性过氧化物酶的活性。PBS 洗涤 3 次(2~5 min/次)后再用 10% 正常浓缩山羊血清(PBS 配制)孵育 1 h 以封闭非特异性的吸附位点,从而降低非特异性的背景染色。PBS 洗涤 3 次(2~5 min/次)后滴加 E₂ 抗体(稀释体积比 1:50),4°C 孵育过夜(18 h)。PBS 漂洗 3 次后(2~5 min/次)滴加生物素化羊抗小鼠 IgG(稀释体积比 1:100),37°C 条件下孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次后(2 min/次),滴加链霉亲和素-生物素复合物-FITC(稀释体积比 1:100),37°C 条件下孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次后(5 min/次)后于 Leica DM4000B(DFC550)智能型倒置荧光显微镜下观察效果。观察后的切片用蒸馏水洗涤后采用苏木精-伊红复染,最后中性树胶封片以用于染色对照。根据染色的深浅,将免疫阳性分为强免疫阳性、中等免疫阳性、弱免疫阳性、阴性,分别记为“+++”、“++”、“+”和“-”。同时另取 Bouin 氏液固定的组织进行常规 HE 染色,以用于组织学观察,具体方法参照吴旭干等^[16]的实验方法。

2 结果与分析

2.1 E₂ 在卵巢中的分布和变化

在卵巢发育期间, E₂ 在卵母细胞细胞核和细胞质中的分布和阳性强度不同,但滤泡细胞中则一直呈 E₂ 强阳性(表 1)。I 期卵巢中,卵原细胞内无 E₂ 阳性存在(图版 I-1); II 期卵巢中,卵母细胞的细胞质和细胞核中开始出现阳性,分别呈 E₂ 弱阳性和中等阳性(图版 I-3); III 期卵巢中,卵母细胞的细胞核增强至 E₂ 中等阳性,而细胞质阳性不变(图版 I-5); IV 期卵巢中卵母细胞的细胞质增强至 E₂ 强阳性,而细胞核的 E₂ 阳性则减弱至弱阳性(图版 I-7); V 期卵巢中,由于核偏位未发现细胞

核, 而细胞质中 E₂ 阳性减弱至中等阳性(图版 I-9)。

2.2 E₂ 在肝胰腺中的分布和变化

在卵巢发育期间, 肝胰腺中 F 细胞的 E₂ 阳性不随卵巢发育而改变, 一直呈 E₂ 强阳性反应(表 1, 图版 I-11~19)。而在 R 细胞核早期(I-III 期)呈 E₂ 强阳性(图版 I-11, 13, 15), IV 期时减弱至 E₂ 中等阳性(图版 I-17); V 期继续减弱至 E₂ 弱阳性。

2.3 E₂ 在神经组织和大颚器中的分布和变化

在卵巢发育期间, E₂ 主要分布于胸神经团的神经细胞和神经髓质(表 2, 图版 II-1~10), 其中神经髓质中 E₂ 阳性随着卵巢发育呈增强的趋势, 而神经细胞中则始终呈 E₂ 弱阳性(表 2)。在脑神经节中, E₂ 阳性出现于脑神经节神经细胞的细胞核内, 并始终保持强阳性反应(表 2, 图版 II-11~18)。

在卵巢发育期间, E₂ 强阳性始终存在于大颚器腺细胞的核仁以及细胞核周围的细胞质内(表 2, 图版 II-19)。

3 讨论

3.1 E₂ 的分布变化与卵巢发育的关系

先前研究表明, 三疣梭子蟹卵巢发育过程中, E₂ 在卵巢、肝胰腺和血淋巴中的含量呈先上升后下降的趋势, 卵巢和血淋巴中的 E₂ 含量在外源性卵黄合成早期(卵巢 III 期)和卵黄发生旺季(IV 期)都很高, 肝胰腺中的 E₂ 含量仅在卵巢 III 期达到峰值, 此后迅速下降^[7]。本研究发现, 在三疣梭子蟹卵巢发育过程中, 卵母细胞中的 E₂ 免疫阳性同样呈现出先上升后下降的趋势, 且在卵巢发育 IV 期卵母细胞的细胞质内达到最大免疫阳性, 这与其卵巢中的 E₂ 含量变化规律相一致; 卵母细胞细胞核内的免疫阳性则在卵巢 II 期和 III 期最强, 此后便开始下降, 这可能是因为三疣梭子蟹卵巢发育 III 期后, 肝胰腺成为最主要的卵黄合成位点^[8, 17], 因此与卵母细胞细胞核结合的 E₂ 有所下降; 三疣梭子蟹卵巢发育过程中(V 期滤泡被积压很难发

表 1 三疣梭子蟹卵巢发育期间卵巢和肝胰腺细胞中的 E₂ 分布和变化

Tab. 1 The distribution and change of E₂ on the ovary and hepatopancreas during the ovarian development of *P. trituberculatus*

卵巢分期 ovarian stage	细胞类型 cellular type				
	滤泡细胞 follicle cell	生殖细胞胞质 cytoplasm of germ	生殖细胞核 nucleus of germ	R 细胞核 nucleus of resorptive cell	F 细胞胞质和胞核 cytoplasm and nucleus of fibrillar cell
I	+++	-	-	+++	+++
II	+++	+	++	+++	+++
III	+++	++	++	+++	+++
IV	+++	+++	+	++	+++
V	NF	++	NF	+	+++

注: “+++”表示强免疫阳性, “++”表示中等免疫阳性, “+”表示弱免疫阳性, “-”表示阴性; “NF”表示未发现。

Note: “+++” means strongly positive; “++” means moderately positive; “+” means weakly positive; “-” means negative. “NF” means not findable.

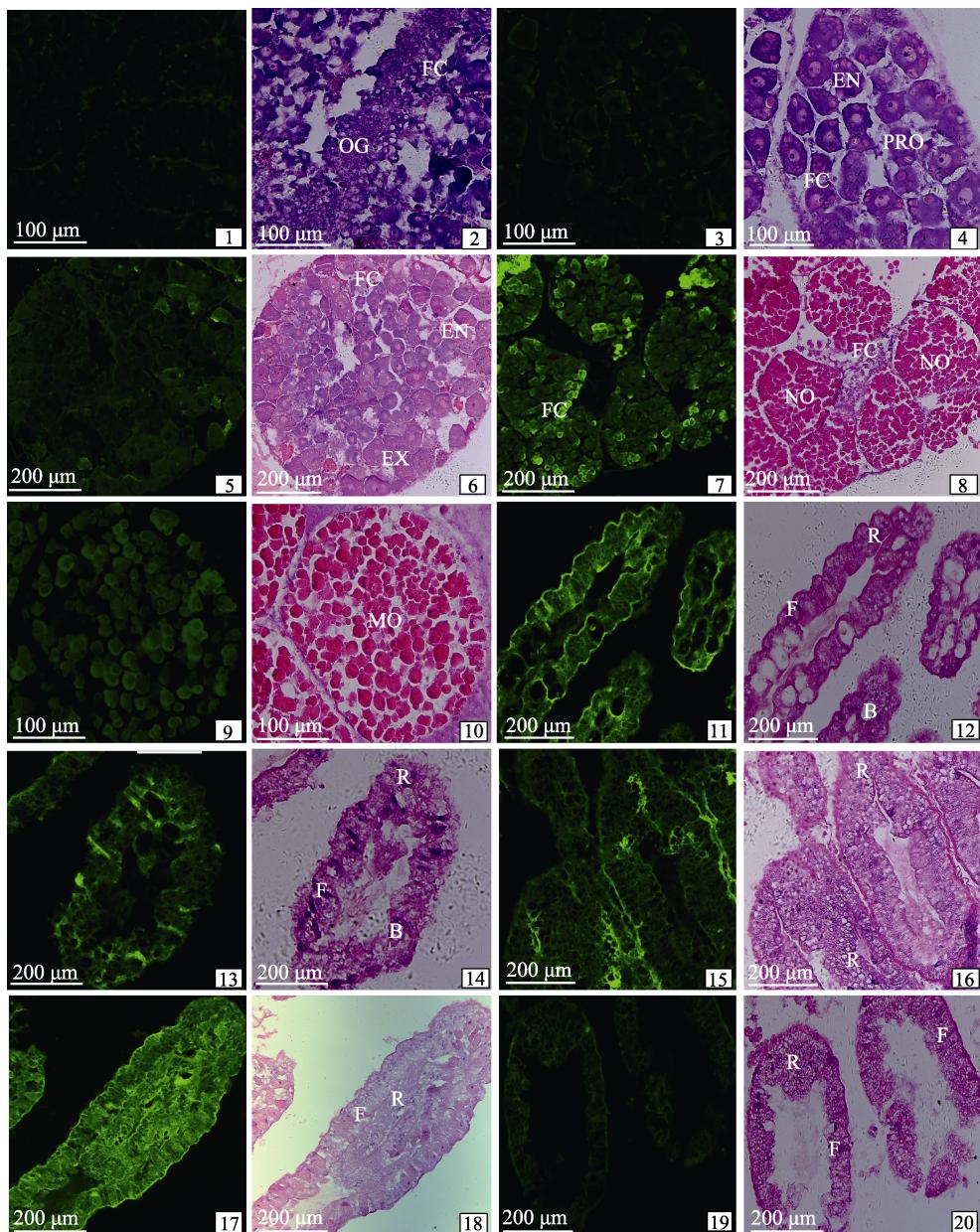
表 2 三疣梭子蟹卵巢发育期间胸、脑神经节和大颚器中的 E₂ 分布和变化

Tab. 2 The distribution and change of E₂ on the thoracic ganglion, brain ganglion and the mandibular organ during the ovarian development of *P. trituberculatus*

卵巢分期 ovarian stage	组织类型 tissue type				
	大颚器腺细胞 gland cell of mandibular organ	胸神经节 thoracic ganglion		脑神经节 brain ganglion	
		神经细胞 nerval cell	神经髓质 nerve medulla	神经细胞细胞核 nucleus of nerval cell	
I	+++	+	++	+++	
II	+++	+	++	+++	
III	+++	+	+++	+++	
IV	+++	+	+++	+++	
V	+++	+	+++	+++	

注: “+++”表示强免疫阳性, “++”表示中等免疫阳性, “+”表示弱免疫阳性,

Note: “+++” means strongly positive; “++” means moderately positive; “+” means weakly positive.



图版 I 三疣梭子蟹卵巢发育过程中各期卵巢和肝胰腺中 E₂ 的免疫阳性分布

1. I 期卵巢(荧光显色); 2. I 期卵巢(HE); 3. II 期卵巢(荧光显色); 4. II 期卵巢(HE); 5. III 期卵巢(荧光显色); 6. III 期卵巢(HE); 7. IV 期卵巢(荧光显色); 8. IV 期卵巢(HE); 9. V 期卵巢(荧光显色); 10. V 期卵巢(HE); 11. I 期肝胰腺(HE); 12. I 期肝胰腺(HE); 13. II 期肝胰腺(荧光显色); 14. II 期肝胰腺(HE); 15. III 期肝胰腺(荧光显色); 16. III 期肝胰腺(HE); 17. IV 期肝胰腺(荧光显色); 18. IV 期肝胰腺(HE); 19. V 期肝胰腺(荧光显色); 20. V 期肝胰腺(HE)

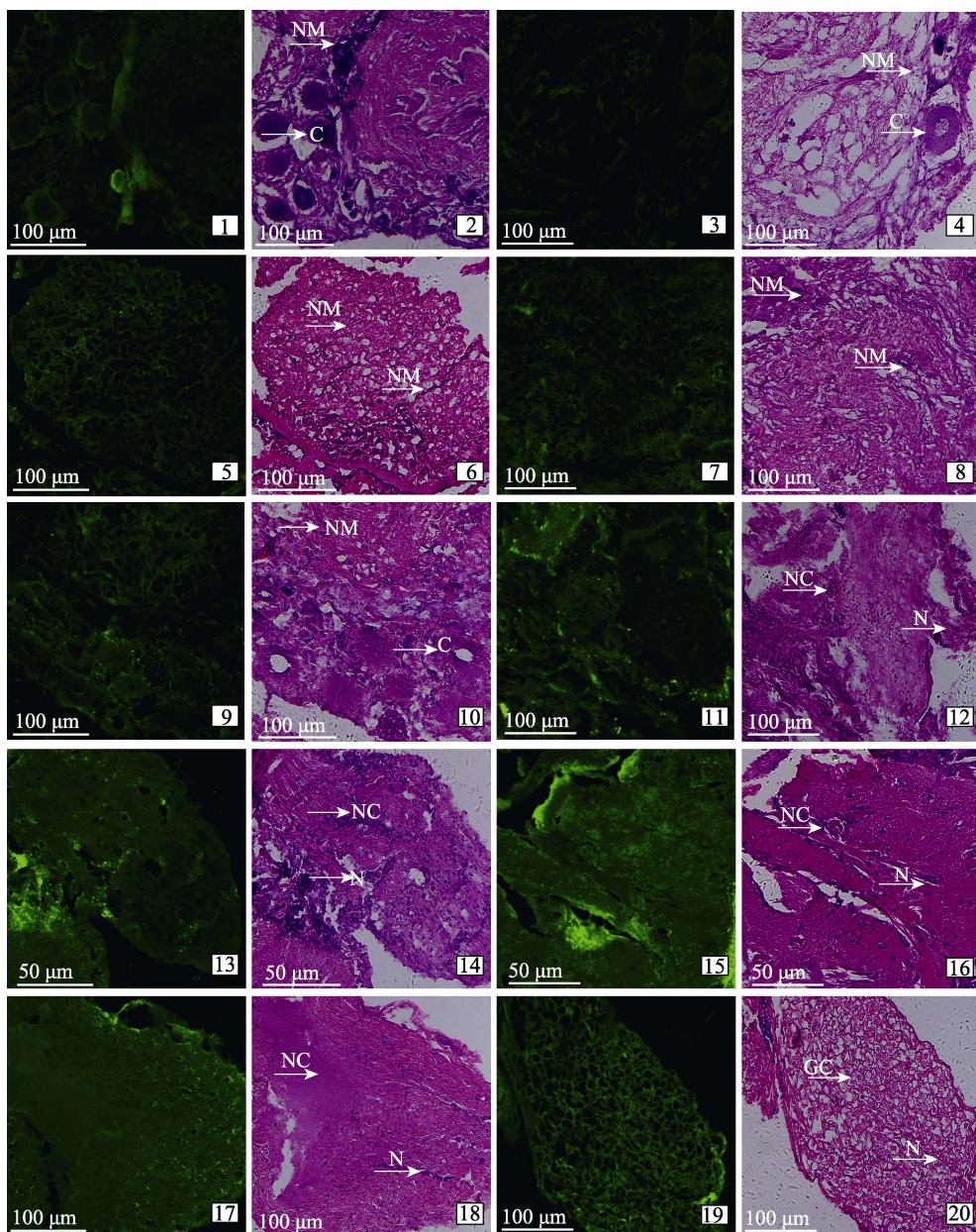
B: 泡状细胞; EN: 内源性卵黄合成前卵母细胞; EX: 外源性卵黄合成前卵母细胞; F: 纤维细胞; FC: 滤泡细胞;

MO: 成熟卵母细胞; N: 细胞核; NO: 近成熟期卵母细胞; PRO: 卵黄合成前卵母细胞; OG: 卵原细胞; R: 吸收细胞。

Plate I Distribution of positive estradiol in the ovary and hepatopancreas during the ovarian development of *P. trituberculatus*
1. ovary at stage I (fluorescence staining); 2. ovary at stage I (HE); 3. ovary at stage II (fluorescence staining); 4. ovary at stage II (HE); 5. ovary at stage III (fluorescence staining); 6. ovary at stage III (HE); 7. ovary at stage IV (fluorescence staining); 8. ovary at stage IV (HE); 9. ovary at stage V (fluorescence staining); 10. ovary at stage V (HE); 11. hepatopancreas at stage I (fluorescence staining); 12. hepatopancreas at stage I(HE); 13. hepatopancreas at stage II (fluorescence staining); 14. hepatopancreas at stage II (HE); 15. hepatopancreas at stage III (fluorescence staining); 16. hepatopancreas at stage III (HE); 17. hepatopancreas at stage IV (fluorescence staining); 18. hepatopancreas at stage IV (HE); 19. hepatopancreas at stage V (fluorescence staining); 20. hepatopancreas at stage V (HE).

B: blisterlike cells; EN: endogenous vitellogenic oocyte; EX: exogenous vitellogenic oocyte; F: fibrillar cell; FC: follicular cell;

MO: mature oocyte; N: nucleus; NO: nearly mature oocytes; PRO: previtellogenic oocyte; OG: oogonium; R: resorptive cell.



图版II 三疣梭子蟹卵巢发育过程中各期胸神经节、脑神经节和大颤器中 E_2 的免疫阳性分布

1. I期胸神经节(荧光显色); 2. I期胸神经节(HE); 3. II期胸神经节(荧光显色); 4. II期胸神经节(HE); 5. III期胸神经节(荧光显色); 6. III期胸神经节(HE); 7. IV期胸神经节(荧光显色); 8. IV期胸神经节(HE); 9. V期胸神经节(荧光显色); 10. V期胸神经节(HE); 11. II期脑神经节(荧光显色); 12. II期脑神经节(HE); 13. III期脑神经节(荧光显色); 14. III期脑神经节(HE); 15. IV期脑神经节(荧光显色); 16. IV期脑神经节(HE); 17. V期脑神经节(荧光显色); 18. V期脑神经节(HE); 19. III期大颤器(荧光显色); 20. III期大颤器(HE). NC: 神经细胞; NM: 神经髓质; C: 细胞质; GC: 腺细胞; N: 细胞核.

Plate II The distribution of positive estradiol in the nervous tissues and mandibular organ during the ovarian development of *P. trituberculatus*
 1. thoracic ganglion at stage I (fluorescence staining); 2. thoracic ganglion at stage I (HE); 3. thoracic ganglion at stage II (fluorescence staining);
 4. thoracic ganglion at stage II (HE); 5. thoracic ganglion at stage III (fluorescence staining); 6. thoracic ganglion at stage III (HE);
 7. thoracic ganglion at stage IV (fluorescence staining); 8. thoracic ganglion at stage IV (HE); 9. thoracic ganglion at stage V
 (fluorescence staining); 10. thoracic ganglion at stage V (HE); 11. brain ganglion at stage II (fluorescence staining); 12. brain
 ganglion at stage II (HE); 13. brain ganglion at stage III (fluorescence staining); 14. brain ganglion at stage III (HE); 15. brain
 ganglion at stage IV (fluorescence staining); 16. brain ganglion at stage IV (HE); 17. brain ganglion at stage V (fluorescence staining);
 18. brain ganglion at stage V (HE); 19. mandibular organ at stage III (fluorescence staining); 20. mandibular organ at stage III (HE).

NC: nerve cells; NM: nerve medulla; C: cytoplasm; GC: gland cell; N: nucleus.

现)滤泡细胞中始终存在强 E₂ 免疫阳性,这是因为滤泡细胞是甲壳动物 E₂ 或卵黄蛋白原(Vg)的合成或中转位点之一^[18-20],滤泡细胞中的 E₂ 可能参与调控滤泡中的卵黄蛋白原的合成和运输^[21-22]。

肝胰腺不仅是甲壳动物的消化吸收和营养物质储存器官,而且是甲壳动物外源性 Vg 的合成场所^[8, 17, 23-24],但到目前为止尚不清楚肝胰腺中的何种细胞可以合成 Vg。本研究结果表明,在三疣梭子蟹卵巢发育过程中 R 细胞核中的免疫阳性呈现出下降趋势,这可能与两个原因有关:(1)三疣梭子蟹卵巢发育过程中肝胰腺中 E₂ 含量在卵巢发育 III-V 期为显著下降趋势^[7],故 R 细胞中的 E₂ 免疫阳性降低。(2)卵巢发育中期 R 细胞早期可能具有一定的 Vg 合成能力,需要一定的 E₂ 通过核受体作用机制合成 Vg,但是卵巢发育后期主要功能为存储脂肪,因此此时肝胰腺中 E₂ 含量降低^[11, 17];卵巢发育过程中,F 细胞质和核均呈现较强的 E₂ 免疫阳性,这是因为 F 细胞可能是三疣梭子蟹肝胰腺中 Vg 合成的主要场所,卵巢发育中后期 Vg 在 F 细胞中始终存在^[11]。

脑神经节和胸神经节是甲壳动物非常重要的神经内分泌器官,其分泌的促性腺激素(GSH)在卵巢发育过程中起到非常重要的调节作用^[25-27]。研究表明,甲壳类的 GSH 可能包含有促卵泡激素(FSH)和黄体生成素(LH)样物质,两者协同作用,以刺激卵巢 E₂ 的分泌^[28]。在本研究中,E₂ 免疫阳性一直存在于脑神经节中的神经细胞的细胞核,可能的原因是雌激素通过作用于脑神经节中的受体,直接或间接激发促性腺激素释放激素(GnRH)的分泌,从而调控性腺发育,类似的研究在鱼类上已经被证明^[29]。大颚器是甲壳动物重要的生殖内分泌器官,其分泌的甲基法尼酯(MF)在甲壳动物生殖繁育、蜕皮和幼体发育等生理活动中起到十分重要的作用^[30-32]。有研究表明在蜘蛛蟹的性腺中可检测到 MF 结合蛋白的存在,这就表明性腺可能是 MF 的靶器官^[33]。此外,高浓度的 E₂ 可抑制大颚器中 MF 的合成^[34],而三疣梭子蟹大颚器腺细胞中始终存在 E₂ 免疫阳性,这暗示 E₂ 可能通过调节 MF 的合成来调控甲壳动物的卵巢发育,具体调控机制有待进一步研究。

3.2 E₂ 在卵巢发育过程中的可能作用机制

研究表明,甲壳动物卵巢发育受到 E₂ 的调控作用^[9],但相关的作用机制不详^[35]。大量脊椎动物的研究结果表明,雌激素调控卵巢发育和卵黄发生主要通过基因组(核受体模式)和非基因组(膜受体模式)两种途径^[36-38]。尽管通过免疫组化和 Western Blotting 已经发现三疣梭子蟹两种雌激素核受体类似物免疫阳性的存在^[11],但迄今为止节肢动物基因组中尚未发现雌激素核受体的基因序列,且未见一种节肢动物的核受体基因被功能性的确认^[35, 39]。有研究认为,节肢动物在进化过程中丢失了雌激素受体^[40]。

雌激素相关受体基因(estrogen-related receptor, ERR)与 ER 具有非常高的同源性,尤其是在 DNA 结合域上^[41]。研究表明,在人肿瘤细胞中,ERR 以单体或者二聚体的形态与 ER 通过竞争结合细胞内的 DNA 位点和辅助因子来干扰 ER 的转录活动^[42]。此外,ERR 还可与共激活因子 PGC-1α 相互作用参与细胞线粒体的生物合成、氧化磷酸化和脂类代谢中^[43]。在果蝇(*Drosophila melanogaster*)胚胎 ERR 突变体中,ERR 的缺失并不会影响正常的胚胎发育和一龄幼体的发育,但会导致二龄幼体的代谢功能下降进而致死^[44]。尽管 ERR 不能与 E₂ 相结合,但其在哺乳动物和鱼类的性腺发育、胚胎发生以及能量代谢等生殖生长过程中起着十分关键的调控作用^[45-46],其 mRNA 的表达水平受到 E₂ 的调控^[47-48],但硬骨鱼类和哺乳动物的 ERR-mRNA 表达水平对外源 E₂ 的响应有所不同。而三疣梭子蟹的 ERR 基因 cDNA 全长已被克隆,且 ERR-mRNA 表达水平受到外源 E₂ 的调控,这暗示 E₂ 可能是通过 ERR 信号通路来调节三疣梭子蟹卵巢发育。在本研究结果发现,E₂ 在三疣梭子蟹卵巢、肝胰腺、神经组织和大颚器中广泛分布,且免疫阳性与卵巢发育具有一定的相关性,由此推测 E₂ 可能通过作用于多个靶器官来调节激素的分泌,从而参与 ERR 信号通路来调节卵巢发育。

参考文献

- [1] Lu J F, Zhao W X. Effect and regulation of reproductive hormones on ovary in decapod crustacean[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2001, 10(2): 166-171. [陆剑锋, 赵维信. 十足目甲壳动物生殖激素对卵巢的作用及其

- [1] 调控[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 166–171.]
- [2] Quinitio E T, Hara A, Yamauchi K, et al. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1994, 109(1): 21–26.
- [3] Huang H Y, Ye H H, Han S Z, et al. Profiles of gonadotropins and steroid hormone-like substances in the hemolymph of mud crab *Scylla paramamosain* during the reproduction cycle[J]. Mar Freshw Behav Physiol, 2009, 42(4): 297–305.
- [4] Ye H H, Ai C X, Huang H Y, et al. Advances on reproductive physiology of crabs[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2006, 45(z2): 170–175. [叶海辉, 艾春香, 黄辉洋, 等. 蟹类生殖生理学研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(z2): 170–175.]
- [5] Cai S L, Zhao W X, Yang C H. Detection of progesterone and estradiol, and observation of histology in the mandibular organ of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(2): 290–296. [蔡生力, 赵维信, 杨丛海. 中国明对虾大颤器的组织学及孕酮和雌二醇的检测[J]. 水生生物学报, 2007, 31(2): 290–296.]
- [6] Martins J, Coimbra J. Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. J Crustac Biol, 2009, 27(2): 220–228.
- [7] Feng L. The effect of dietary HUFA on the ovary development, endocrine hormones and tissue biochemical composition of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011: 1–81. [丰浪. 高不饱和脂肪酸(HUFA)对三疣梭子蟹卵巢发育、内分泌激素以及组织生化组成的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011: 1–81.]
- [8] Zhang Y. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin and vitellogenin gene expression during the ovarian development of swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011: 1–76. [张艳. 三疣梭子蟹卵巢发育期间卵黄蛋白原(Vg)、卵黄磷蛋白(Vn)及 Vg-mRNA 表达的变化研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 1–76.]
- [9] Yano I, Hoshino R. Effects of 17 β -estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*)[J]. Compar Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2006, 144(1): 18–23.
- [10] Shen B J, Yang X Z, Wu X G, et al. The effects of exogenous 17 β -estradiol on ovary development and on the level of endogenous 17 β -estradiol in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(3): 289–295. [沈蓓杰, 杨筱珍, 吴旭干, 等. 外源 17 β -E₂ 对中华绒螯蟹 III–IV 期卵巢发育以及内源雌激素水平的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(3): 289–295.]
- [11] Liu Z J. A study on estrogen and its estrogen related receptor during the ovarian development of swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 1–73. [刘智俊. 三疣梭子蟹卵巢发育期间雌激素受体分布变化及雌激素离体调控的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 1–73.]
- [12] Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S, et al. Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock[J]. Aquaculture, 2010, 301: 78–84.
- [13] Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S, et al. Reproductive performance and offspring quality of the first and the second brood of female swimming crab, *Portunus trituberculatus* broodstock[J]. Aquaculture, 2010, 303: 94–100.
- [14] Newton S S, Dow A, Terwilliger R, et al. A simplified method for combined immunohistochemistry and in-situ hybridization in fresh-frozen, cryocut mouse brain sections[J]. Rev Árvore, 2002, 38(3): 214–219.
- [15] Osada M, Tawarayama H, Mori K. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2004, 139(1): 123–128.
- [16] Wu X G, Yao G G, Yang X Z, et al. A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 29(4): 120–128. [吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(4): 120–128.]
- [17] Yao G G, Wu X G, Cheng Y X, et al. The changes of histology and main biochemical composition in the hepatopancreas at the different physiological stages of *Portunus trituberculatus* in East China Sea[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(6): 122–131. [姚桂桂, 吴旭干, 成永旭, 等. 东海三疣梭子蟹雌体不同生理阶段肝胰腺的生化组成与其组织学结构的关系[J]. 海洋学报, 2008, 30(6): 122–131.]
- [18] 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 A: Physiol, 1987, 87(3): 765–770.
- [19] Summavielle T, Monteiro P R R, Reis-Henriques M A, et al. In vitro metabolism of steroid hormones by ovary and hepatopancreas of the crustacean Penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. Sci Mar, 2003, 67(3): 299–306.
- [20] Jia X, Chen Y, Zou Z, et al. Characterization and expression profile of vitellogenin gene from *Scylla paramamosain*[J]. Gene, 2013, 520(2): 119–130.
- [21] Cheng Y X, Li S J, Wang G Z, et al. Structural modulation of the area between oocytes and follicular cells during vitellogenesis of the mud crab(*Scylla serrata*)[J]. Acta Zoologica

- Sinica, 2002, 48(1): 80–92. [成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵母细胞和卵泡细胞之间的结构变化[J]. 动物学报, 2002, 48(1): 80–92.]
- [22] Lu J F, Chang G L, Wu X G, et al. Hormonal regulations of ovarian development and vitellogenesis in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* feed on two different diets[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(4): 505–512. [陆剑锋, 常国亮, 吴旭干, 等. 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[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 505–512.]
- [23] Lee F Y, Chang C F. The concentrations of vitellogenin (Vitelillin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Comp Biochem Physiol A: Physiol*, 1997, 117(4): 433–439.
- [24] Soroka Y, Milner Y, Sagi A. The hepatopancreas as a site of yolk protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Invert Reprod Dev*, 2000, 37(1): 61–68.
- [25] Mazurová E, Hilscherová K, Triebskorn R, et al. Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants[J]. *Biologia*, 2008, 63(2): 139–150.
- [26] Raviv S, Parnes S, Sagi A. Coordination of reproduction and molt in decapods[M] //Mente E. Reproductive Biology of Crustaceans: Case Studies of Decapod Crustaceans. Science Publishers, 2008: 365–390.
- [27] Nagaraju G P C. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview[J]. *J Exp Biol*, 2011, 214(1): 3–16.
- [28] Ye H H, Huang H Y, Li S J, et al. Immunological recognition of FSH and LH in the brain ganglion of the mud crab, *Scylla serrata*[J]. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(6): 768–770. [叶海辉, 黄辉洋, 李少菁, 等. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)脑中 FSH 和 LH 的免疫识别[J]. 自然科学进展, 2006, 16(6): 768–770.]
- [29] Kalló I, Butler J A, Barkovics-Kalló M, et al. Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen[J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13(9): 741–748.
- [30] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. Mandibular organ: its relation to body weight sex molt and reproduction in the crab *Oziotelphusa senex senex* Fabricius (1791)[J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 603–612.
- [31] Nagaraju G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? [J]. *Aquaculture*, 2007, 272: 39–54.
- [32] Li S, Zhao W X. Mandibular organ and methyl farnesoate in crustacean[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, 9(3): 240–244. [李胜, 赵维信. 甲壳动物的大颚器和甲基法尼酯[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(3): 240–244.]
- [33] Takáč P, Ahl J S B, Laufer H. Methyl farnesoate binding proteins in tissues of the spider crab, *Libinia emarginata*[J]. *Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem*, 1998, 120(4): 769–775.
- [34] Lu J F, Bai H, Cheng Y X, et al. In vitro regulation of hormone biosynthesis of mandibular organ by progesterone in crayfish, *Procambarus clarkia*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(3): 476–479. [陆剑锋, 白桦, 成永旭, 等. 孕酮对克氏原螯虾大颚器激素生物合成的体外调控[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 476–479.]
- [35] Köhler H R, Kloas W, Schirling M, et al. Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates[J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16(1): 131–143.
- [36] Kim K H, Moriarty K, Bender J R. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors[J]. *Steroids*, 2008, 70: 382–387.
- [37] Thomas P, Tubbs C, Berg H, et al. The Fish Oocyte[M]. Amsterdam: Springer, 2007: 203–233.
- [38] Liu X, Zhu P, Sham K W, et al. Identification of a membrane estrogen receptor in zebrafish with homology to mammalian GPER and its high expression in early germ cells of the testis [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(6): 1253–1261.
- [39] Colbourne J K, Pfrender M E, Gilbert D, et al. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*[J]. *Science*, 2011, 331(6017): 555–561.
- [40] Thornton J W, Need E, Crews D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: Ancient origin of estrogen signaling[J]. *Science*, 2003, 301(5640): 1714–1717.
- [41] Giguère V. To ERR in the estrogen pathway[J]. *Trends Endocrinol Metabol*, 2002, 13(5): 220–225.
- [42] Cheung C P, Yu S, Wong K B, et al. Expression and functional study of estrogen receptor-related receptors in human prostatic cells and tissues[J]. *J Clin Endocrinol Metabol*, 2005, 90(3): 1830–1844.
- [43] Tremblay A M, Giguère V. The NR3B subgroup: an ovERRview[J]. *Nucl Recept Signal*, 2007, 5: e009.
- [44] Tennessen J M, Baker K D, Lam G, et al. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth[J]. *Cell Metabol*, 2011, 13(2): 139–148.
- [45] Danielsen M, Hinck L, Ringold G. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor[J]. *Cell*, 1989, 57(7): 1131–1138.
- [46] Deblois G, Giguère V. Functional and physiological genomics of estrogen-related receptors (ERRs) in health and disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1812(8): 1032–1040.
- [47] Liu D, Zhang Z, Gladwell W, et al. Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(11): 4894–4904.
- [48] Tarrant A M, Greytak S R, Callard G V, et al. Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: diversity, expression, and estrogen responsiveness[J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 37(1): 105–120.

Immunolocalization and changes in 17 β -estradiol in *Portunus trituberculatus* during ovarian development

LIU Meimei¹, WU Xugan¹, PAN Jie¹, CHENG Yongxu^{1,2}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Collaborative Innovation Center of Aquatic Animal Breeding Center Certified by the Shanghai Municipal Education Commission; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: 17 β -Estradiol (E₂) is among the most important sex steroid hormones during ovarian development and vitellogenesis in crustaceans. In this study, an immunofluorescence assay was used to identify the immunopositive distribution and variations in E₂ in the ovary, hepatopancreas, thoracic ganglia, brain ganglion, and the mandibular organ during ovarian development in the swimming crab, *Portunus trituberculatus*. The results showed that E₂ was mainly distributed in the follicular cells and the cytoplasm of late-stage oocytes (II–V). Follicular cells stained strongly positive for E₂ at all ovarian stages; the immunoreactivities of E₂ in the oocyte cytoplasm and nucleus trended as “low-high-low”, and maximum positive staining appeared during ovarian stage IV and stages II–III, respectively. In the hepatopancreas, E₂-positive staining was mainly distributed in F cells and R nuclei, and E₂ immunoreactivity in the R nucleus tended to decrease from stages III to IV. However, strong positive E₂ immunoreactivity was always detected in F cells at all ovarian stages. E₂ was mainly distributed in neurons, the nerve medulla of thoracic ganglia, and cell nuclei of cerebral ganglion nerve cells during the early stages of ovarian development (I–II). E₂ immunoreactivity in the nerve medulla of the thoracic ganglion was moderately positive, whereas neurons were always weakly positive. Strong positive E₂ staining was always distributed in the nuclei of mandibular gland cells and the cytoplasm around mandibular gland cellnuclei. These results suggest that E₂ is widely distributed in the ovary, hepatopancreas, thoracic ganglion, cerebral ganglion, and mandibular gland of *P. trituberculatus*, and a correlation was detected between E₂ immunoreactivity and ovarian developmental stage. E₂ may act through multiple target organs to regulate ovarian development in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; ovarian development; estradiol; immunolocalization; action target

Corresponding author: WU Xugan. E-mail: xgwu@shou.edu.cn