

## 中华绒螯蟹离体卵巢发育的调控作用

崔青曼<sup>1,2</sup>, 袁春营<sup>2</sup>, 吴婷婷<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 河北农业大学 水产学院, 河北 秦皇岛 066003)

**摘要:**通过卵巢离体实验研究性激素、大豆黄酮、生物胺及神经组织对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)卵巢发育的影响。结果表明,雌二醇可显著地增大卵巢发生前期、初级卵巢发生期和次级卵巢发生期卵巢卵母细胞的直径,黄体酮可显著增大卵巢发生前期卵巢卵母细胞直径,对初级卵巢发生期和次级卵巢发生期的卵母细胞直径有极显著地促进作用;大豆黄酮具有增大卵母细胞直径的作用,但作用不显著;脑和胸神经团对卵巢发生前期、初级卵巢发生期的卵母细胞直径有显著增大作用,对于次级卵巢发生期卵母细胞直径有极显著增大作用;视神经节作用不明显;5-羟色胺通过脑可显著促进卵巢发生前期、初级卵巢发生期卵巢卵母细胞直径的增大,极显著促进次级卵巢发生期卵巢卵母细胞直径的增大,还通过胸神经节极显著增大各期卵巢的卵母细胞直径;多巴胺作用不明显。

**关键词:**中华绒螯蟹;卵巢发育;性激素;大豆黄酮;生物胺;神经组织

**中图分类号:**S961 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0487-05

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的水产养殖技术日渐成熟,但基础理论研究比较薄弱,尤其是生殖神经内分泌调控方面的研究不多,吴萍等<sup>[1]</sup>研究指出,中华绒螯蟹精巢发育、精子发生与促雄腺的结构变化密切相关,促雄腺对精巢的发育及精子的发生有着促进乃至决定作用;罗荣兰等<sup>[2]</sup>对青春蜕皮后的雌蟹用外源20-羟蜕皮酮连续处理3周(2 μg/d),发现实验组卵巢/肝胰脏质量比和卵巢/体重质量比的比值明显超过对照组;用17α-甲基睾丸酮和17β-雌二醇注射雄蟹,发现17α-甲基睾丸酮可促进中华绒螯蟹幼蟹精巢发育,17β-雌二醇对精巢发育有抑制作用<sup>[3]</sup>。给幼蟹注射黄体酮药物,可使中华绒螯蟹卵巢的卵母细胞直径极显著高于对照组<sup>[4]</sup>。为系统阐明中华绒螯蟹生殖机理,以及生殖内分泌调控在其繁殖和生长过程中的作用,本实验在离体条件下研究了性激素、大豆黄酮、生物胺及神经器官等对中华绒螯蟹卵巢发育的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

中华绒螯蟹(以下简称河蟹)于7~10月购自市场,数量8只,体重46.3~116 g。放于通气良好的水泥池内暂养4~6 d。逐个称重和测量体长、体宽。解剖前于1%高锰酸钾溶液中浸泡0.5 h,无菌条件下75%酒精消毒,活体解剖取出

不同发育阶段的卵巢,成熟系数以(卵巢重量/体重)×100%计算,并确定卵巢发育分期<sup>[5]</sup>。实验用蟹的有关生物学参数见表1。

激素17β-雌二醇为Fluka公司产品。黄体酮为市售成品,用少量无水乙醇溶解。大豆黄酮为南京农业大学动物医学院生理实验室友好赠送。5-羟色胺为Sigma产品,多巴胺为Fluka产品。M199为Gibco公司产品。

#### 1.2 实验方法

解剖中华绒螯蟹取出脑、胸神经团,一对视神经节,连同卵巢在含100 IU/mL青霉素的PBS中洗涤数次。培养所用卵巢均切成约1 mm<sup>2</sup>小块,培养物接种于10 mL培养瓶中(含M199培养液3 mL,含20%小牛血清、100 IU/mL青霉素、100 μg/mL链霉素),在接种有卵巢小块的培养瓶中分别加入外源激素(黄体酮10<sup>-8</sup> mol/L,雌二醇1 nmol/L,大豆黄酮10 g/L)及神经递质(1 μg/g体重多巴胺、5-羟色胺),以了解对性腺发育的作用情况,空白对照组仅加入3 mL培养液及卵巢小块。将1个脑、一个胸神经团、1对视神经节分别与卵巢小块共培养,在上述培养瓶中分别加入多巴胺和5-羟色胺,了解这些物质是否通过神经器官调节性腺发育及对这些神经器官的影响,同时设对照组。黑暗条件下置于振荡器中培养,振荡频率为50~60 r/min,培养温度为26~27℃,培养时间为24 h。

收稿日期:2004-11-29; 修订日期:2005-02-03。

基金项目:河北省教委项目资助(2004319)。

作者简介:崔青曼(1964-),教授,博士研究生,主要从事水生生物学教学与科研工作。Tel:0335-3150038。E-mail:cqm@163.com

通讯作者:吴婷婷。Tel:0510-5554552。E-mail:wutt@frc.ac.cn

表1 实验河蟹的生物学参数

Tab.1 Biological parameters of experimental crabs

样品编号 Sample No.	体长×体宽/cm <sup>2</sup> Length×Width	体重/g Body weight	卵巢发育时期 Ovary development stage	卵巢重/g Ovary weight	成熟系数% Maturity coefficient
A1	4.5×4.8	46.3	卵黄发生前期 Yolk genesis prophase	0.233	0.503
A2	4.9×5.1	54.8	卵黄发生前期 Yolk genesis prophase	0.250	0.456
A3	5.0×5.3	59.8	卵黄发生前期 Yolk genesis prophase	0.287	0.480
B1	4.9×5.2	62.0	初级卵黄发生期 Primary yolk genesis phase	1.282	2.068
B2	6.3×6.6	116.0	初级卵黄发生期 Primary yolk genesis phase	2.529	2.180
C1	5.1×5.4	79.1	次级卵黄发生期 Secondary yolk genesis phase	5.879	7.432
C2	6.1×6.3	109	次级卵黄发生期 Secondary yolk genesis phase	8.499	7.797

注:编号为1的河蟹卵巢用于激素影响实验,其他用于生物学影响实验。

Note: No. 1's ovary used for hormone influence experiments, others used for biological amines influence experiments.

### 1.3 显微观察与统计

培养后卵巢小块于波恩氏液中固定24 h,系列酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片6~7 μm、苏木精-伊红染色<sup>[4]</sup>, Olympus显微镜观察并测量卵母细胞直径,细胞直径以(细胞短径+细胞长径)/2计算,各实验组随机选择50个卵母细胞。实验数据采用t检验、方差分析和均数间多重比较进行统计学处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发育期卵巢卵母细胞

中华绒螯蟹不同发育期卵巢卵母细胞见图版1:卵黄发生前期卵母细胞胞体渐成卵圆形,胞径50 μm左右,核显著

增大形成胚泡(图版1-1);初级卵黄发生期卵母细胞胞体呈多边形,胞径95 μm左右,卵黄颗粒开始从边缘积累(图版1-2);次级卵黄发生期卵母细胞胞体继续增大至直径300 μm左右,卵黄颗粒继续增粗(图版1-3)。

### 2.2 性激素及大豆黄酮对不同发育期卵巢发育的影响

黄体酮、17β-雌二醇以及大豆黄酮对不同发育期中华绒螯蟹卵巢卵母细胞直径影响的结果见表2。从表2可看出:雌二醇可显著地增大卵黄发生前期、初级卵黄发生期和次级卵黄发生期卵巢卵母细胞直径( $P<0.05$ ),黄体酮可显著增大卵黄发生前期卵巢卵母细胞直径( $P<0.05$ ),对初级卵黄发生期和次级卵黄发生期的卵母细胞直径有极显著地促进作用( $P<0.01$ ),大豆黄酮具有增大卵母细胞直径的作用,但作用不显著。

表2 性激素及大豆黄酮对中华绒螯蟹不同发育期卵巢卵母细胞直径的作用

Tab.2 Effects of sex hormones and daidzein on oocyte diameter of crabs ovary at different development phase

分组 Group	项目 Item	浓度 Concentration	卵径/μm( $\bar{X} \pm SD$ ) Oocyte diameter
A1	对照 Control	0	52.75 ± 4.20
	雌二醇 Estradiol	1 nmol/L	56.15 ± 2.57 *
	黄体酮 Progesterone	10 <sup>-9</sup> mol/L	56.45 ± 1.58 *
	大豆黄酮 Daidzein	10 g/L	54.55 ± 4.01
B1	对照 Control	0	95.50 ± 4.22
	雌二醇 Estradiol	1 nmol/L	103.00 ± 9.74 *
	黄体酮 Progesterone	10 <sup>-9</sup> mol/L	104.45 ± 7.47 * *
	大豆黄酮 Daidzein	10 g/L	98.85 ± 4.17
C1	对照 Control	0	304.10 ± 15.64
	雌二醇 Estradiol	1 nmol/L	319.03 ± 14.29 *
	黄体酮 Progesterone	10 <sup>-9</sup> mol/L	324.23 ± 15.19 * *
	大豆黄酮 Daidzein	10 g/L	313.15 ± 16.77

注:与对照组相比,\*表示显著性差异( $P<0.05$ ),\*\*表示极显著性差异( $P<0.01$ )。

Note: Compared with the control, \* means significant difference ( $P<0.05$ ), \*\* extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

### 2.3 生物胺对不同发育期共同培养神经器官与卵巢大小的影响

本研究采用在甲壳动物体内广泛存在的神经递质—5-羟色胺和多巴胺,以探讨对不同发育期卵巢发育的影响。结果见表3。从表3可看出,添加5-羟色胺和多巴胺的卵巢与对照组相比,各期卵母细胞直径均没有明显变化,表明5-羟色胺和多巴胺对卵巢发育没有直接的促进作用;在脑、胸神经团和卵巢的共同培养实验中,脑和胸神经团对卵巢发

生前期、初级卵黄发生期的卵母细胞直径有显著增大作用( $P < 0.05$ ),对于次级卵黄发生期卵母细胞直径有极显著增大作用( $P < 0.01$ );5-羟色胺通过脑可显著促进卵黄发生前期、初级卵黄发生期卵巢卵母细胞直径的增大( $P < 0.05$ ),极显著促进次级卵黄发生期卵巢卵母细胞直径的增大( $P < 0.01$ ),还通过胸神经节极显著增大各期卵巢的卵母细胞直径( $P < 0.01$ );多巴胺抑制作用不明显;视神经节和卵巢的共培养实验中,实验组的卵母细胞直径均没有明显变化。

表3 生物胺对不同发育期中华绒螯蟹共同培养神经器官与卵巢直径的影响

Tab.3 Effects of biological amines on diameters of nervous organs of crab cultured with ovary at different development phase

分组 Group	生物胺 Biological amines	卵巢小块 Ovary tablet	脑+卵巢 Brain+ovary	胸神经团+卵巢 Thoracic ganglion+ovary	视神经节+卵巢 Optic ganglion+ovary
A2-A3	对照组 Control	49.50 ± 3.34	54.20 ± 5.10a	53.60 ± 3.56a	49.05 ± 2.51
	多巴胺 Dopamine	48.63 ± 3.75	53.53 ± 4.97	52.63 ± 3.87	48.73 ± 4.17
	5-羟色胺 5-Hydroxytryptamine	49.53 ± 1.98	59.15 ± 2.67*	59.95 ± 4.20**	50.10 ± 1.98
B2	对照组 Control	95.13 ± 6.93	104.63 ± 10.87a	102.88 ± 5.27a	94.25 ± 5.18
	多巴胺 Dopamine	93.75 ± 6.54	105.63 ± 4.57	103.13 ± 9.25	94.78 ± 2.53
	5-羟色胺 5-Hydroxytryptamine	95.38 ± 3.82	116.38 ± 6.60*	114.75 ± 8.07**	95.70 ± 4.74
C2	对照组 Control	260.3 ± 22.86	291.23 ± 20.12b	293.90 ± 11.69b	255.00 ± 22.78
	多巴胺 Dopamine	263.65 ± 22.82	284.65 ± 23.11	286.30 ± 22.86	256.78 ± 22.04
	5-羟色胺 5-Hydroxytryptamine	265.23 ± 16.31	322.10 ± 23.01**	325.50 ± 22.10**	258.70 ± 23.25

注:a,b分别表示各神经器官与对照组比较  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。\*、\*\*分别表示神经递质与相应对照组相比较  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, a and b mean that each nerve organ has significant and very significant difference respectively; compared with corresponding control, \* and \*\* mean that biological amines have significant and very significant differences respectively.

### 3 讨论

实验证明脊椎动物的性激素是可以促进甲壳动物卵巢发育的。廖家造等<sup>[7]</sup>发现,  $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-12}$  mol/L 黄体酮可使体外培养的罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergi*) II 期和 III 期卵巢的卵母细胞直径显著增大或非常显著地增大,而这 2 种浓度的黄体酮对 I 期和 IV 期卵巢的卵母细胞直径都无增大作用;  $17\alpha$ -孕酮、孕酮对罗氏沼虾卵黄发生前期和卵黄发生期卵母细胞卵径增大均有极显著刺激作用,高浓度雌二醇对卵黄发生前期卵母细胞卵径增大有明显刺激作用<sup>[8]</sup>;用 100 ng/g 的  $17\alpha$ -孕酮和 5-羟色胺注射亲虾对对虾卵巢的发育有明显的刺激作用,生殖指数分别比对照组增加了 50.0% 和 44.7%<sup>[9]</sup>。本研究也充分证实了这一点,即黄体酮可显著增大卵黄发生期卵巢卵母细胞直径,对初级卵黄发生期和次级卵黄发生期的卵母细胞直径有极显著地促进作用;大豆黄酮为异黄酮类植物雌激素,是一种天然的有效活性成分,具有增大中华绒螯蟹卵巢卵母细胞直径的作用,但作用不显著。

早期的神经器官摘除和移植实验揭示眼柄视神经节存在性腺抑制激素 GIH (gonad-inhibiting hormone),而脑和胸

神经节具有性腺刺激激素 GSH (gonad-stimulating hormone), GSH 的分子量 1-2 kD,为多肽。初步分离和活性检测了罗氏沼虾脑促性腺激素,发现 63-65 组分可显著促进体外培养的罗氏沼虾卵巢的总蛋白合成,进行日本沼虾 (*M. nipponense*) 肌肉注射可显著促进卵巢发育;将罗氏沼虾胸神经节匀浆经柱层析所得第一个组分和罗氏沼虾 III 期卵巢小块一起体外培养 36 h,可使卵母细胞直径较对照组极显著增大,并确定组分激素分子量 1.3 kD 左右<sup>[10-11]</sup>;将处于生殖期的脑、胸神经节抽提物注射或器官直接移植入另一甲壳动物成体中,能显著促进卵巢发育<sup>[12-14]</sup>;组织共培养表明,在锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 卵巢发育过程中脑和胸神经团分泌的性腺刺激激素逐渐增强,对卵母细胞的生长具有直接的刺激作用<sup>[15]</sup>;将成熟雌蜘蛛蟹 (*Libinia emarginata*) 胸神经节埋入未成熟雌蟹体内,可使卵巢重量成倍增加及促进卵黄粒的分化<sup>[16]</sup>。同样本研究采用组织共培养法研究了蟹脑、胸神经团和视神经节对卵巢发育的调节作用,发现脑和胸神经团对卵黄发生前期、初级卵黄发生期的卵母细胞直径有显著增大作用,对于次级卵黄发生期卵母细胞直径有极显著增大作用,视神经节作用不明显,初步证明了中华绒螯蟹脑、胸神经节可分泌促性腺激素。

生物胺广泛地分布于甲壳动物体内,研究发现5-羟色胺和多巴胺分别具有促进和抑制卵巢发育的效应,其作用机理是通过调控神经器官中神经递质和神经抑制剂的释放,从而影响卵巢发育<sup>[17]</sup>。给大西洋招潮蟹(*Uca pugilator*)注射5-HT受体阻滞剂LY53857,卵巢发育受到抑制;注射5-HT激动剂fenfluramine和fluoxetine,卵巢指数和卵母细胞直径显著增大<sup>[18-19]</sup>;给大西洋招潮蟹分别注射DA拮抗剂spiperone和激动剂ADTN,对精巢发育各表现为促进和抑制作用<sup>[20]</sup>。Kulkarni<sup>[21]</sup>用15 ng/g的5-羟色胺注射克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),发现卵巢指数和卵径分别比对照组增加了52.86%和56.56%,同时发现5-羟色胺对卵巢的促进作用是间接的,当把它加入体外培养液与卵巢组织共同进行体外培养,卵巢发育与对照组并无多大差异,因此推测5-羟色胺的作用靶器官是胸、脑神经组织,促使它们分泌卵黄生成激素。注射5-羟色胺对锯缘青蟹卵巢发育具有显著的促进作用,离体培养时添加5-羟色胺能刺激锯缘青蟹脑和胸神经团分泌促进卵巢发育的物质,从而促进卵母细胞生长<sup>[22]</sup>。本研究发现在离体条件下5-羟色胺对单独培养的卵巢没有直接的促进作用,当脑和胸神经团分别与卵巢共培养时,通过脑可显著促进卵黄发生前期、初级卵黄发生期卵母细胞直径的增大,极显著促进次级卵黄发生期卵母细胞直径的增大,还通过胸神经团极显著增大各期卵巢的卵母细胞直径。多巴胺抑制作用不明显。

#### 参考文献:

- [1] 吴萍,邱高峰,楼允东. 中华绒螯蟹促雄腺结构变化对精子发生的影响[J]. 水产学杂志, 2002, 15(1): 88-92.
- [2] 罗蒙兰,王雨兰,曹梅讯. 中华绒螯蟹血淋巴20-羟基蜕皮酮诱发蜕皮和卵巢发育的作用[J]. 动物学报, 1990, 36(2): 157-164.
- [3] 康祝江,刘志民,周可新. 外源类固醇激素对中华绒螯蟹幼蟹精巢发育影响的初步研究[J]. 东海海洋, 1998, 16(1): 39-43.
- [4] 崔青曼,袁春营,吴婷婷. 腺体切除及注射黄体酮对中华绒螯蟹幼蟹卵巢发育的影响[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 30-34.
- [5] 顾志敏,何林岗. 中华绒螯蟹卵巢发育周期的组织学细胞学观察[J]. 海洋与湖泊, 1997, 28(2): 138-145.
- [6] 葛福生,杜慧琴,陈海明,等. 组织切片技术[M]. 北京:人民教育出版社, 1980. 98-107.
- [7] 廖家道,张艳,秦照萍. 影响离体蟹促两种招潮蟹卵巢发育作用的一些因素[J]. 海洋湖泊通报, 2002, 4: 32-37.
- [8] 赵维信,贾江,安苗. 外源激素和眼柄抽提物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(4): 221-224.
- [9] 蔡生力,杨从海. 体外注射激素对中国对虾卵巢发育的影响[J]. 中山大学学报, 2000, 39(增刊): 91-95.
- [10] 廖家道,张艳,孙继贤,等. 罗氏沼虾脑促性腺激素的初步分离及活性检测[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 5-10.
- [11] 孙继贤,廖家道. 罗氏沼虾胸神经节中促进卵母细胞发育的激素的初步分离[J]. 湖泊科学, 2003, 15(1): 63-68.
- [12] Yano I, Tsukimura B, Sweeney J N, et al. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion [J]. J World Aquacult Soc, 1988, 19: 204-209.
- [13] Eastman Reke S, Fingerman M. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth in vivo and in vitro in the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 79A: 679-684.
- [14] Takayanagi H, Yamamoto Y, Yakeda N. An ovary-stimulating factor in the shrimp, *Paratya compressa* [J]. J Exp Zool, 1986, 240: 203-209.
- [15] 金朱兴,叶海群,李少青. 锯缘青蟹神经器官对卵巢发育的调节作用: 离体实验[J]. 海洋科学, 2003, 27(1): 72-74.
- [16] Hirsch G W, Bennett D C. Vitellogenesis stimulated by thoracic ganglion implants into desalinated immature spider crabs, *Libinia emarginata* [J]. Tissue Cell, 1979, 11(2): 345-350.
- [17] Fingerman M. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal in decapod crustaceans [J]. Invert Reprod Develop, 1997, 31(1-3): 47-54.
- [18] Richardson H G, Deeganman M, Fingerman M. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 99c: 53-56.
- [19] Kulkarni G K, Fingerman M. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. Comp Biochem Physiol, 1992a, 101c: 419-423.
- [20] Sarojini R, Nagabhusharam R, Devi M, et al. Dopaminergic inhibition of 5-hydroxytryptamine-stimulated testicular maturation in the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 111c: 287-292.
- [21] Kulkarni G K, Nagabhusharam R, Amaldoss G, et al. 5-hydroxytryptamine stimulation of the ovary in the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Am Zool, 1991, 31: 115A.
- [22] 叶海群,李少青,李祺福,等. 生物胺对雌性锯缘青蟹神经内分泌的调控作用[J]. 海洋与湖泊, 2003, 34(3): 329-333.

## Regulation action of *Eriocheir sinensis* ovarian development in vitro

CUI Qing-man<sup>1,2</sup>, YUAN Chun-ying<sup>2</sup>, WU Ting-ting<sup>1</sup>

(1. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China; 2. College of Fisheries, Agricultural University of Hebei, Qinhuangdao 066003, China)

**Abstract:** The effects of sex hormone, daidzein, biological amines and nerve organ on the ovarian development of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) were studied in vitro. The results showed that estradiol could increase oocyte diameter significantly in yolk genesis prophase, primary yolk genesis phase and secondary yolk genesis phase; progesterone could increase oocyte diameter significantly in yolk genesis prophase, showing extremely significant stimulation on oocyte diameter in primary yolk genesis phase and secondary yolk genesis phase; daidzein could increase oocyte diameter, but had no notable role; brain and thoracic ganglion showed extremely significant stimulation on oocyte diameter in yolk genesis prophase and primary yolk genesis phase, and showed extremely significant stimulation on oocyte diameter in secondary yolk genesis phase; optic ganglion had not notable role; 5-hydroxytryptamine stimulated oocyte diameter significantly in yolk genesis prophase and primary yolk genesis phase and showed extremely significant stimulation on oocyte diameter in secondary yolk genesis phase through brain, and increased oocyte diameter extremely significantly in each periods through thoracic ganglion; dopamine did not have notable role.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; ovarian development; sex hormone; daidzein; biological amines; nervous tissue

**Corresponding author:** WU Ting-ting. E-mail: wutt@ffrc.ac.cn



图版 I

1: 中华绒螯蟹卵黄发生前期卵母细胞, ×200; 2: 中华绒螯蟹初级卵黄发生期卵母细胞, ×200; 3: 中华绒螯蟹次级卵黄发生期卵母细胞, ×100.

Plate I

1: Oocyte of *Eriocheir sinensis* in yolk genesis prophase, ×200; 2: Oocyte of *Eriocheir sinensis* in primary yolk genesis phase, ×200; 3: Oocyte of *Eriocheir sinensis* in secondary yolk genesis phase, ×100.