

文章编号: 1674-5566(2010)03-0289-07

## 外源 $17\beta$ -雌二醇对中华绒螯蟹 III ~IV 期卵巢发育以及内源雌激素水平的影响

沈蓓杰<sup>1,2</sup>, 杨筱珍<sup>1</sup>, 吴旭干<sup>1</sup>, 成永旭<sup>1</sup>, 唐本瑞<sup>2</sup>

(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. 宣城市宣州区水产局, 安徽 宣城 242000)

**摘要:** 研究了  $17\beta$ -雌二醇 ( $17\beta$ -E<sub>2</sub>) 对中华绒螯蟹卵巢发育以及内源雌激素水平的影响, 以期阐明中华绒螯蟹卵巢发育调控机理。给予性腺发育高峰期 (III ~IV 期) 的中华绒螯蟹雌蟹注射不同浓度  $17\beta$ -E<sub>2</sub> ( $10^{-3}$  mg/g,  $10^{-4}$  mg/g 和  $10^{-5}$  mg/g), 结果表明: 在卵巢发育 III 期 ~IV 期间,  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 有呈剂量依赖性促进中华绒螯蟹卵巢发育的特点, 表现为: 性腺指数增大, 卵母细胞发育快, 卵母细胞直径增大。中华绒螯蟹血淋巴中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量有随卵巢发育逐渐降低的趋势, 尤其在实验 30 d 后有明显的下降, 外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 能明显增加血淋巴中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量。中华绒螯蟹卵巢中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量有随卵巢的发育而迅速降低的特点, 外源注射  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 仅对 15 d 时的卵巢中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量有影响, 表现为随外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量的提高, 卵巢内  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量降低。对血淋巴和卵巢中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 的含量与性腺指数进行相关性分析后发现: 血淋巴和卵巢中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量与性腺指数均呈极显著负相关。结论: 外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 能促进卵巢发育, 能明显增加血淋巴中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量, 而降低 III 期<sub>1</sub> 卵巢内  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量。

**关键词:** 中华绒螯蟹;  $17\beta$ -雌二醇; 血淋巴; 卵巢

**中图分类号:** S 917      **文献标识码:** A

## The effects of exogenous $17\beta$ -estradiol on ovary development and on the level of endogenous $17\beta$ -estradiol in *Eriocheir sinensis*

SHEN Bei-jie<sup>1,2</sup>, YANG Xiao-zhen<sup>1</sup>, WU Xu-gan<sup>1</sup>, CHENG Yong-xu<sup>1</sup>, TANG Ben-ru<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Shanghai Ocean University,

Ministry of Education Shanghai 201306, China;

2. Xuancheng Xuanzhou Aquatic Products Bureau Xuancheng 242000, China)

**Abstract:** The effects of  $17\beta$ -estradiol on ovary development and on the level of  $17\beta$ -estradiol in *Eriocheir sinensis* were studied for explaining ovary development-controlling in *Eriocheir sinensis*. After injecting  $17\beta$ -estradiol into the *Eriocheir sinensis* (female) at large growth phase with doses of ( $10^{-3}$  mg/g,  $10^{-4}$  mg/g and  $10^{-5}$  mg/g), the results showed that between III<sub>1</sub> phase and IV phase of the ovary development the  $17\beta$ -estradiol can stimulate ovary development, increase the sexual gland index, quicken the oocyte development, enlarge the diameter of oocyte with the dose of  $17\beta$ -estradiol. The level of  $17\beta$ -estradiol in hemolymph

**收稿日期:** 2009-11-07

**基金项目:** 上海市科技兴农推广项目 (沪农科攻字 2008D2-4 和 2009D2-1); 国家自然科学基金 (30471349); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

**作者简介:** 沈蓓杰 (1983-), 男, 硕士, 主要从事甲壳动物繁殖方面的研究。E-mail: shenbeijie@163.com

**通讯作者:** 成永旭, Tel: 021-61900417, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

reduced with ovary developing especially after 30 d exogenous  $17\beta$ -estradiol can distinctly raise the level of  $17\beta$ -estradiol in hemolymph The level of  $17\beta$ -estradiol in ovary decreased rapidly with the ovary development Exogenous  $17\beta$ -estradiol affect the level of  $17\beta$ -estradiol in ovary only at 15 d showing the higher of exogenous  $17\beta$ -estradiol the larger of  $17\beta$ -estradiol decreasing extent in ovary Correlation analysis between the level of  $17\beta$ -estradiol in hemolymph and ovary and sexual gland inder showed that there was a significant negative correlation in them These results indicated that exogenous  $17\beta$ -estradiol can accelerate ovary developing significantly increase the level of  $17\beta$ -estradiol in hemolymph decrease the level of  $17\beta$ -estradiol in ovary at III<sub>1</sub> phase of the ovary development

Key words: *Eriocheir sinensis*  $17\beta$ -estradiol hemolymph ovary

激素是调节性腺发育的重要生理指标,目前国内外已发现一些对甲壳动物性腺发育起作用的激素,如甲基法尼酯(Methyl Farnesate MF)、保幼激素(Juvenile Hormone JH)和性腺抑制激素(Gonad-Inhibiting Hormone)等,其中性类固醇激素中的雌激素(Estrogen)对性腺发育的影响尤为重要<sup>[1-2]</sup>。Jeng<sup>[3]</sup>和Hazel<sup>[4]</sup>是最早确定在甲壳动物中存在雌激素的,后来研究者认为内源性雌激素会影响甲壳动物的蜕壳、性早熟<sup>[5-6]</sup>以及卵黄形成<sup>[7]</sup>。也有研究发现通过给予外源雌激素,可以促进刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)<sup>[8]</sup>、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[9]</sup>、近缘新对虾(*Metapenaeus affinis*)<sup>[10]</sup>和性早熟中华绒螯蟹<sup>[11]</sup>等多种甲壳类动物的卵巢发育。最近研究表明,雌激素样环境内分泌干扰物(Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals EEDCs),可以干扰动物体内分泌调节,影响动物的生长繁殖<sup>[12]</sup>,导致甲壳动物蜕皮和发育受抑制、雄性器官萎缩、性分化受阻甚至发生性逆转现象<sup>[13-15]</sup>。但迄今为止,有关外源雌激素对中华绒螯蟹卵巢发育影响的研究尚未见报道。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是中国特有的重要经济蟹类,对其性腺发育的研究将直接影响其繁殖及经济效益。因此,本研究通过给予性腺发育高峰期(大生长期,每年的9-11月)的河蟹  $17\beta$ 雌二醇( $17\beta$ -E<sub>2</sub>),观察其对卵巢发育和内源(血清和卵巢)雌二醇含量的影响,以期弄清内外源雌激素间关系及其对甲壳动物性腺发育的影响提供理论依据,为河蟹性腺发育激素调控的研究提供基础资料,同时也为研究环境内分泌干扰物对甲壳类动物繁殖生存的影响奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验蟹

2007年9月中旬购入江苏南通莱亚养殖厂雌性河蟹320只,体质量(58.07±8.27)g,头胸甲长(4.83±0.22)cm,头胸甲宽(5.27±0.23)cm。

### 1.2 养殖条件

暂养1周后,其中20只作为基础样解剖。其余300只蟹分为5组,每组蟹60只,养于江苏南通莱亚养殖场水泥池(300cm×300cm×200cm)中,水位高平均为30cm,水源为沉淀1周并充分曝气的上清河水。水温为自然水温,日常光照。每个池子平均沿壁堆放表面露出水面的瓦片40个,充气泵充气。每天早晚各投饵1次,饵料为南通巴大饲料厂生产的河蟹专用饲料。每天早上吸污,平均5d换水1/2,整个实验时间为60d。

### 1.3 实验分组及河蟹注射

实验共分5组,分别为对照组(正常饲喂,不做任何处理)、佐剂组(注射与激素组药物等体积的苯甲酸苄酯)和3个激素组(不同浓度的 $17\beta$ -E<sub>2</sub>,其浓度分别为 $10^{-3}$ mg/g、 $10^{-4}$ mg/g和 $10^{-5}$ mg/g)。激素组用佐剂苯甲酸苄酯与 $17\beta$ -E<sub>2</sub>(1:1.7)配制<sup>[16]</sup>, $17\beta$ -E<sub>2</sub>购自Sigma公司。将实验药物用100μL微量注射器由中华绒螯蟹的第三步足基节与底节的关节膜处注射入肌肉中,第1次注射记为0d(基础样),以后每隔15d注射1次,并采样1次,每次采样8只左右,共注射4次。每次采样均提取血淋巴(剪去大螯提取)用于 $17\beta$ -E<sub>2</sub>测定。取完整卵巢,并计算其卵巢的性腺指数(I<sub>s</sub>)为

$$I_s = W_0 / W \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $W_0$  为卵巢重 (g);  $W$  为体重 (g)。

随后取约 0.2 g 卵巢用于  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 测定, 并固定部分卵巢用于组织切片观察。

#### 1.4 卵巢组织切片制作与观察

每次取样时, 观察卵巢颜色, 并取部分组织固定于 Bouin's 液中。经酒精梯度脱水, 二甲苯透明后, 石蜡包埋 (56~58℃)。Leica RM2016 型切片机连续切片, 切片厚度 5.0~7.0 μm。H-E 染色, 在 Olympus BH-2 显微镜下观察拍照。参考薛鲁征等<sup>[17-18]</sup>对正常中华绒螯蟹卵巢的分期方法, 将中华绒螯蟹卵巢发育分为 5 个期, 观察每一阶段卵巢中的主要卵母细胞类型, 并对该类细胞进行细胞直径和核质比的测量, 核质比的测量公式为

$$P_N = V_n / V_c \quad (2)$$

式中:  $P_N$  为核质比;  $V_n$  为核的体积 (cm<sup>3</sup>);  $V_c$  为细胞的体积 (cm<sup>3</sup>)。

其中体积为

$$V = 0.523 W^2 L \quad (3)$$

式中:  $W$  为最大宽度 (cm);  $L$  为最大长度 (cm)<sup>[19]</sup>。每组的卵巢重复 3~5 个样品, 每个样品至少统计 5 张切片。

#### 1.5 血淋巴和卵巢中 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度的测定

取血淋巴 0.5 mL 置于 2 mL 的离心管中, 在血凝固前迅速注入 1 mL 4℃ 的乙酸乙酯, 振荡混匀, 经 3 000~3 500 r/min 离心 10 min 后, 吸取上清液 1.2 mL 沉淀再用相同方法抽取离心一次, 合并二次上清液, 45℃ 水浴下吹干, 用 1 mL 明胶磷酸缓冲液 GPBS 溶解, 分装后, 置 -20℃ 低温保存<sup>[5, 20]</sup>, 此样品用于血淋巴中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度的测定。卵巢样品的处理与血淋巴相似, 只是在离心前需称取 0.2 g 的卵巢置于玻璃匀浆器中, 加入 2 mL 的乙酸乙酯后快速制成匀浆液。 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度的测定采用放射免疫测定方法, 试剂盒购于深圳拉尔文生物技术有限公司。

#### 1.6 数据分析

采用 SPSS 11.0 软件对实验数据进行统计分析, 用 Levene 法进行方差齐性检验, 不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或者平方根处理, 采用 One-way ANOVA 对实验结果进行方差分析, 采用 DUNCAN 法进行多重比较, 采用 Bivariate

进行相关性分析, 取  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为极显著, 在 EXCEL 上绘制相关图表。

## 2 结果

### 2.1 卵巢组织学

对同一时期, 不同处理组卵巢组织结构进行观察后发现, 各组卵巢结构存在明显差异 (表 1)。在整个处理时间内, 对照组与佐剂组卵巢结构基本保持一致, 均由 15 d 的Ⅲ期<sub>1</sub> 卵巢, 发育为 30 d 至 60 d 的Ⅲ期<sub>2</sub> 卵巢。虽然从 30 d 至 60 d 近 20 d 的时间内, 卵巢发育分期没有变化, 均为Ⅲ期<sub>2</sub>, 但其内主要的细胞类型即外源性卵黄合成期卵母细胞的直径却逐渐增大, 由 30 d 的 211 μm 增至 60 d 的 272 μm。实验组, 经不同剂量  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 处理后, 同一时期, 卵巢发育明显快于对照组和佐剂组, 这表明  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 对卵巢发育有促进的作用, 并且对剂量的依赖性呈增高的趋势。如图版 I 中, 在第 1 次注射 15 d 后,  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 最高剂量组 (10<sup>-3</sup> mg/g 体重) 卵巢快速发育为Ⅲ期<sub>2</sub>, 卵母细胞以外源性卵黄合成期卵母细胞为主, 直径可达 149 μm 左右, 而其余各组均维持在卵巢Ⅲ期<sub>1</sub>, 卵母细胞仍为内源性卵黄合成期卵母细胞, 直径平均仅为 91 μm 左右。最高剂量组与其余各组在卵母细胞直径上存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。其次, 在 45 d 采样时, 仍然是最高剂量组卵巢先发育到Ⅳ期, 卵母细胞已发育到成熟前期, 而其余各组均处在卵巢发育的Ⅲ期<sub>2</sub>,  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 各浓度组卵母细胞平均直径已达 267 μm, 而对照和佐剂组仅为 220 μm。当最后一次采样时即 60 d 时, 虽然  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 各组卵巢发育均已达Ⅳ期, 卵母细胞均已发育为成熟前期卵母细胞, 但此时  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 各浓度组卵母细胞直径明显大于对照组, 分别约为 296 μm 和 272 μm ( $P < 0.05$ ),  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 各浓度组中以最高浓度组卵母细胞的直径为最大, 约为 305 μm。

### 2.2 血淋巴和卵巢中 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量及其与性腺指数的相关性分析

#### 2.2.1 血淋巴中 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量

河蟹血淋巴中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量, 无论是对照组还是  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 各浓度组均有随卵巢发育逐渐降低的趋势, 尤其在实验 30 d 后有明显的下降, 其中对照组血淋巴中的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 由 0 d 的 3.75 ng/mL 迅

速降至 30 d 的 0.85 ng/mL 在 60 d 的时候降到了 0.67 ng/mL。外源注射  $17\beta\text{-E}_2$  能明显提高河蟹血淋巴中  $17\beta\text{-E}_2$  含量, 在第 1 次注射 15 d 后最高剂量组血淋巴中的  $17\beta\text{-E}_2$  就比对照组提高 0.5 ng/mL 大约提高了 20%。血淋巴中  $17\beta\text{-E}_2$  含量有呈外源  $17\beta\text{-E}_2$  剂量依赖性增高趋势, 其中

以 30 d 时最为明显, 而后逐渐减弱, 到了 60 d 仅最高剂量组比对照组有显著升高 ( $P < 0.05$ ), 此时也是最高剂量组在各处理时期中对血淋巴中  $17\beta\text{-E}_2$  含量影响最大的时期, 相对于对照组最高剂量组  $17\beta\text{-E}_2$  含量提高了 120%, 而在 30 d 和 45 d 该剂量组分别比对照组升高了 100% 和 92% (图 1)。

表 1 外源  $17\beta\text{-E}_2$  对中华绒螯蟹卵巢发育的影响 (n=8)

Tab 1 Exogenous  $17\beta\text{-E}_2$  effect on the ovary development of *Eriocheir sinensis* (n=8)

实验天数 (d)	实验组	性腺指数 (%)	多数卵母细胞时期及卵巢分期	多数卵母细胞时期直径 ( $\mu\text{m}$ )	核质比
0	基础样	0.6±0.1	卵巢乳白色, 内源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>1</sub>	74.11±9.47	0.033±0.001
15	10 <sup>-3</sup> 组	3.4±0.9 <sup>a</sup>	卵巢棕色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	149.07±14.41 <sup>a</sup>	0.007±0.003 <sup>a</sup>
	10 <sup>-4</sup> 组	1.6±0.7 <sup>b</sup>	卵巢肉色, 内源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>1</sub>	102.21±7.03 <sup>b</sup>	0.018±0.003 <sup>b</sup>
	10 <sup>-5</sup> 组	1.7±0.7 <sup>b</sup>	卵巢土黄色, 内源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>1</sub>	86.47±15.92 <sup>b</sup>	0.02±0.007 <sup>b</sup>
	对照组	1.3±0.8 <sup>b</sup>	卵巢白色, 内源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>1</sub>	86.91±8.98 <sup>b</sup>	0.02±0.01 <sup>b</sup>
	佐剂组	1.4±0.9 <sup>b</sup>	卵巢白色, 内源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>1</sub>	89.85±13.40 <sup>b</sup>	0.03±0.01 <sup>b</sup>
30	10 <sup>-3</sup> 组	5.9±1.3 <sup>b</sup>	卵巢褐色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	230.06±10.47 <sup>a</sup>	0.001±0.000 1 <sup>a</sup>
	10 <sup>-4</sup> 组	4.8±0.8 <sup>ab</sup>	卵巢棕色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	223.38±18.74 <sup>a</sup>	0.001±0.000 2 <sup>ab</sup>
	10 <sup>-5</sup> 组	4.7±1.0 <sup>ab</sup>	卵巢棕色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	213.37±13.43 <sup>a</sup>	0.001±0.0001 <sup>ab</sup>
	对照组	3.6±1.7 <sup>a</sup>	卵巢棕色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	211.79±10.91 <sup>a</sup>	0.002±0.000 5 <sup>b</sup>
	佐剂组	3.9±1.2 <sup>a</sup>	卵巢棕色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	194.98±39.44 <sup>a</sup>	0.002±0.000 1 <sup>b</sup>
45	10 <sup>-3</sup> 组	6.3±1.1 <sup>b</sup>	卵巢紫褐色, 成熟前期卵母细胞, IV 期	282.26±14.07 <sup>a</sup>	0.000 7±0.000 2 <sup>a</sup>
	10 <sup>-4</sup> 组	5.6±0.7 <sup>ab</sup>	卵巢褐色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	255.90±14.46 <sup>a</sup>	0.000 8±0.000 2 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup> 组	5.2±1.4 <sup>ab</sup>	卵巢褐色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	262.94±15.00 <sup>a</sup>	0.000 9±0.000 3 <sup>a</sup>
	对照组	3.8±1.5 <sup>a</sup>	卵巢褐色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	219.36±6.95 <sup>b</sup>	0.001 8±0.000 4 <sup>a</sup>
	佐剂组	4.0±1.1 <sup>a</sup>	卵巢褐色, 外源性卵黄合成期卵母细胞, III 期 <sub>2</sub>	220.98±21.11 <sup>b</sup>	0.001 9±0.001 <sup>a</sup>
60	10 <sup>-3</sup> 组	7.2±0.9 <sup>b</sup>	卵巢紫紫色, 成熟前期卵母细胞, IV 期	305.39±5.87 <sup>a</sup>	0.000 5±0.000 1 <sup>a</sup>
	10 <sup>-4</sup> 组	6.9±1.4 <sup>ab</sup>	卵巢紫褐色, 成熟前期卵母细胞, IV 期	288.16±18.38 <sup>ab</sup>	0.000 9±0.000 4 <sup>a</sup>
	10 <sup>-5</sup> 组	6.9±0.9 <sup>ab</sup>	卵巢紫褐色, 成熟前期卵母细胞, IV 期	294.57±10.24 <sup>ab</sup>	0.000 9±0.000 4 <sup>a</sup>
	对照组	5.6±1.3 <sup>a</sup>	卵巢紫褐色, 成熟前期卵母细胞, IV 期	272.91±2.53 <sup>b</sup>	0.002±0.000 2 <sup>b</sup>
	佐剂组	5.6±1.4 <sup>a</sup>	卵巢紫褐色, 成熟前期卵母细胞, IV 期	271.97±4.14 <sup>b</sup>	0.002±0.000 2 <sup>b</sup>

注: 同列上标小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

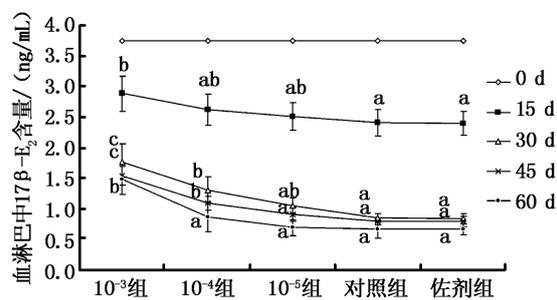


图 1 不同剂量  $17\beta\text{-E}_2$  对雌蟹血淋巴中  $17\beta\text{-E}_2$  含量影响  
Fig 1 The effect of different dose of  $17\beta\text{-E}_2$  on the level of  $17\beta\text{-E}_2$  in hemolymph of female *Eriocheir sinensis*

### 2.2.2 卵巢中 $17\beta\text{-E}_2$ 含量

无论是对照组还是  $17\beta\text{-E}_2$  各浓度组, 河蟹卵巢中  $17\beta\text{-E}_2$  含量均有随卵巢的发育而迅速降低的特点, 尤其在 0~15 d 间 (下降约为 1.15 ng/g)

和 15~30 d 间 (下降约为 3.74 ng/g) 有明显降低, 在 60 d 后卵巢中的  $17\beta\text{-E}_2$  含量约为 0.88 ng/g 左右。外源注射  $17\beta\text{-E}_2$  仅对 15 d 时的卵巢中  $17\beta\text{-E}_2$  含量有影响, 表现为随外源  $17\beta\text{-E}_2$  含量的提高, 卵巢  $17\beta\text{-E}_2$  含量降低幅度增大, 其中最高剂量组 (4.83 ng/g) 比对照组 (6.34 ng/g) 卵巢中  $17\beta\text{-E}_2$  减少了 24%, 两组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 2.2.3 血淋巴和卵巢中 $17\beta\text{-E}_2$ 的含量与性腺指数的相关性分析

在 15~60 d 整个实验期间, 各组血淋巴和卵巢中  $17\beta\text{-E}_2$  含量与性腺指数均呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ )。即随着河蟹卵巢的发育, 性腺指数的增加, 其血淋巴和卵巢中  $17\beta\text{-E}_2$  含量均会相应减少 (表 2)。

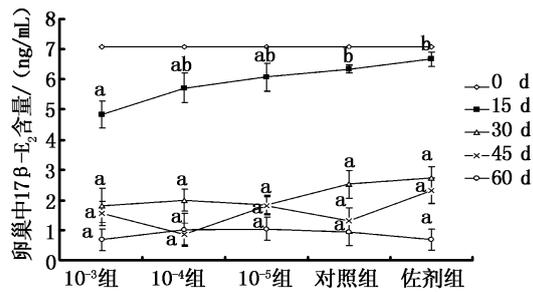


图 2 不同剂量  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 给予对雌蟹卵巢中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量影响

Fig 2 The effect of different dose of  $17\beta$ -E<sub>2</sub> on the level of  $17\beta$ -E<sub>2</sub> in ovary of female *Eriocheir sinensis*

表 2 血淋巴和卵巢中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量与性腺指数相关性分析 (n=20)

Tab. 2 Correlation analysis of the level of  $17\beta$ -E<sub>2</sub> between I<sub>GS</sub> and hemolymph or I<sub>GS</sub> and ovary (n=20)

实验组	血淋巴中 $17\beta$ -E <sub>2</sub> 浓度与性腺指数相关性 (P<0.01)	卵巢中 $17\beta$ -E <sub>2</sub> 含量与性腺指数相关性 (P<0.01)
10 <sup>-3</sup> 组	-0.87	-0.87
10 <sup>-4</sup> 组	-0.86	-0.85
10 <sup>-5</sup> 组	-0.76	-0.78
对照组	-0.71	-0.67
佐剂组	-0.80	-0.64

### 3 讨论

#### 3.1 内源 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 与卵巢发育的关系

目前虽然在对河蟹<sup>[20]</sup>、中国对虾 (Chinese shrimp)<sup>[21]</sup>、美国龙虾 (Homarus Americanus lobster)<sup>[22]</sup>和锯缘青蟹 (Scylla serrata)<sup>[23]</sup>等甲壳动物内源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 与卵巢发育的关系的研究中,均发现卵巢和血淋巴中  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量与卵巢的性腺指数存在负相关,即当卵巢不断发育,性腺指数不断升高时,卵巢和血淋巴内  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量却逐渐降低,但这些研究并没有对卵巢内细胞组成进行细致研究。本研究发现河蟹卵巢发育高峰期 (III ~IV 期),卵巢内  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量与卵巢的性腺指数也存在负相关,对各时期卵母细胞组成及细胞形态进行细致分析后发现,卵巢内  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量与卵巢中卵母细胞种类有关。当卵母细胞由内源卵黄合成期卵母细胞向外源性卵黄合成期卵母细胞发育时,卵巢和血淋巴内均需要较高的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 水平。有研究推测  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 有助于卵母细胞核与细胞质之间卵黄物质的交换,即内源性卵黄体的

积累和大量外部卵黄蛋白原 (Vitellogenin Vg) 转移到卵巢<sup>[24-25]</sup>,本实验从  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量变动上证实了相关推测。

#### 3.2 外源 $17\beta$ -E<sub>2</sub> 对卵巢发育的影响

研究发现,外源的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 可以提高卵巢的性腺指数,增大卵母细胞直径,表现为在 15 d 时 10<sup>-3</sup>组河蟹卵巢的性腺指数和卵母细胞直径都显著大于其余组 (P<0.05),在 45 d 时,其性腺指数和主要卵母细胞直径也显著大于对照组 (P<0.05)。有关雌激素能促进卵母细胞直径增大,已在多种十足类甲壳动物被证实,如在哈氏仿对虾 (Parapenaeopsis hardwickii)<sup>[26]</sup>,色拉淡水蟹 (Oziotelphusa senex senex)<sup>[16]</sup>和刀额新对虾 (Metapenaeus ensis)<sup>[8]</sup>,而 Tsukimura 和 Kamemoto 则认为孕酮对范氏对虾 (Penaeus vannamei)<sup>[27]</sup>离体卵巢卵径增大无作用,这可能是由于所用剂量低的缘故。进一步研究发现不同剂量的外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 注射后,其能明显促进河蟹卵母细胞成熟,卵巢分期加快,表现为最高剂量 10<sup>-3</sup>组河蟹 15 d 时卵巢就发育到以外源性卵黄合成期卵母细胞为主的 III 期,45 d 发育到了以成熟前期卵母细胞为主的 IV 期,而其余各组在相同时间里均比最高剂量组发育慢 1 期。这与 17 羟基孕酮 20 d 能促进中国对虾卵巢由 II ~III 期发育到 III ~IV 期<sup>[28]</sup>;雌二醇作用近缘新对虾,使其卵巢快速发育到以卵黄化的卵母细胞为主的 IV 期的结果相类似<sup>[10]</sup>。由此表明,和大多数雌激素可以促进卵巢发育一样<sup>[29]</sup>,外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 可以促进中华绒螯蟹卵巢的发育。据推测外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 注射后,转变为其体内血淋巴中的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量,本研究结果也证实,血淋巴内  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 的含量随外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 浓度的增加而增加。研究表明血淋巴中的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量的增加,将有助于卵黄蛋白原从肝胰腺通过血淋巴转移到卵巢中<sup>[30-31]</sup>,为卵母细胞发育提供了充足的脂类能量,由此促进了卵母细胞直径增大,加速了卵母细胞的成熟,导致性腺指数增加,从而促使了卵巢发育,这可能解释了外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 促进卵巢发育一个原因。15 d 的 10<sup>-3</sup>组卵巢中的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量是显著小于其它组的,可能是外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 无法转变为卵巢中的  $17\beta$ -E<sub>2</sub>,而此时 10<sup>-3</sup>组卵巢发育到了 III 期,此期卵巢中的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 含量是显著小于其它组的。而注射外源的  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 虽然可以促进卵巢的发育,但这种促进

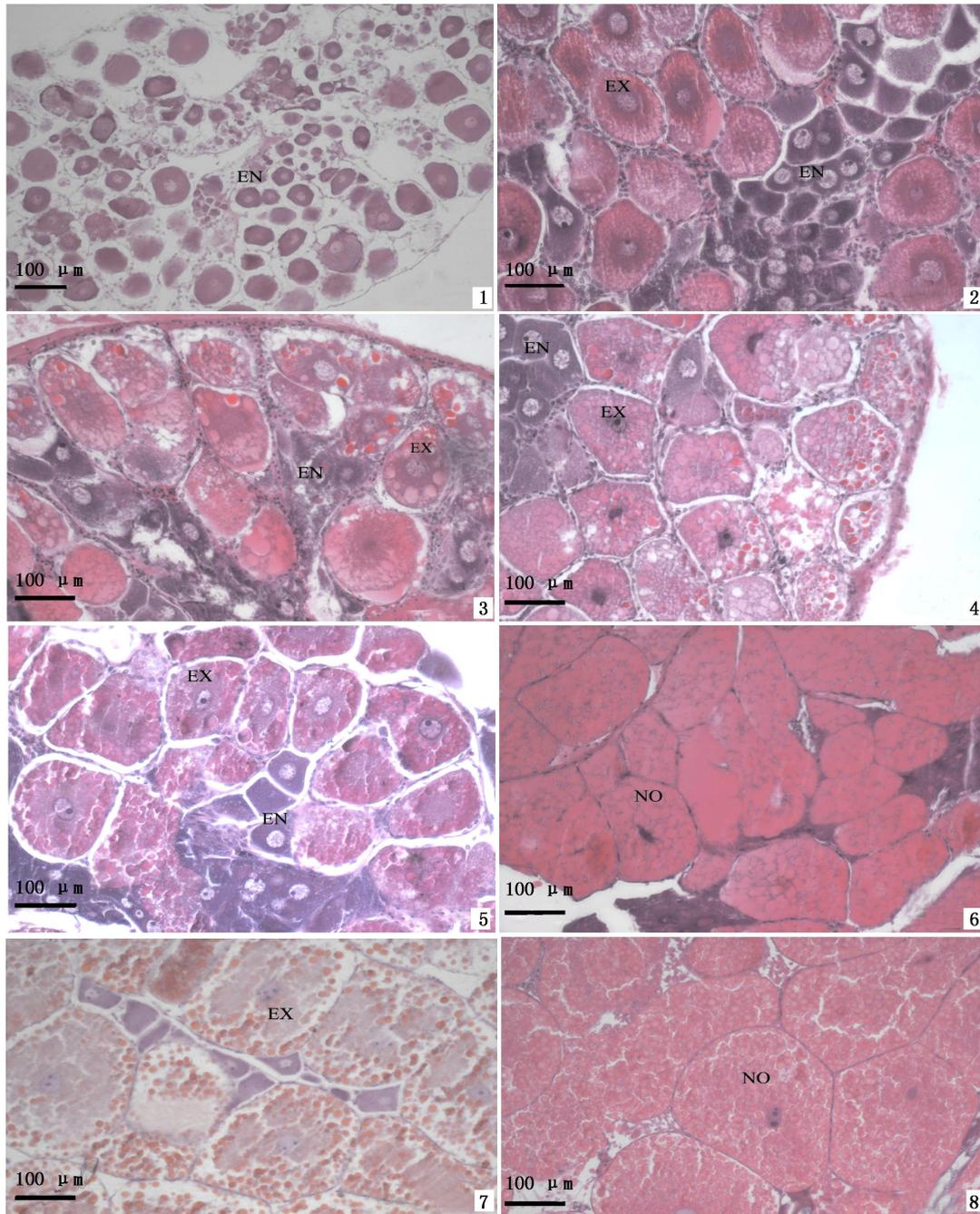
作用对卵巢发育期是有选择性的,  $10^{-3}$ 组从实验开始就促进卵巢快速发育, 使卵巢快速发育到Ⅳ期。而  $10^{-4}$ 组,  $10^{-5}$ 组只在Ⅲ期, Ⅳ期的时候才对卵巢发育有明显的促进作用。这和廖家遗的结果相类似, 认为黄体酮对罗氏沼虾的卵巢发育有选择性的, 注射黄体酮只能使罗氏沼虾Ⅱ期, Ⅲ期卵巢卵母细胞直径增大, 而对Ⅰ期, Ⅳ期卵巢无影响<sup>[32]</sup>。究其原因, 这种选择性可能与卵巢发育不同时期卵母细胞对营养的需求水平以及其自身的理化成分有关。

综上所述, 外源  $17\beta\text{-E}_2$  可以促进中华绒螯蟹雌蟹卵巢发育和卵母细胞的生长, 可以增加血淋巴中  $17\beta\text{-E}_2$  含量, 而降低卵巢内  $17\beta\text{-E}_2$  含量。但关于  $17\beta\text{-E}_2$  的来源, 以及作用方式还需进一步探讨。是来自孕酮的转化, 还是来自雌激素分泌细胞分泌, 是通过与受体结合产生相关基因调节, 还是通过其它的酶催化形成一定的复合物还有待于进一步证实。此外, 虽然本研究的发现雌激素, 能促进河蟹卵巢发育, 但其对河蟹产卵, 卵孵化率, 成活率产生影响如何, 仍需进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 廖家遗, 张艳. 甲壳动物的类固醇激素及其对卵巢发育的作用 [J]. 动物学杂志, 1999, 34(5): 35—37.
- [2] 廖家遗. 影响虾蟹卵巢发育的激素 [J]. 海洋科学, 1994, (2): 12—14.
- [3] Jeng S S, Wan W C, Chang C F. Existence of an estrogen-like compound in the ovary of the shrimp *Penaeus chinensis* [J]. Gen Comp Endocrinol 1978, 36: 211—214.
- [4] Hazel C M. Steroidogenesis in the Female Crab *Carcinus maenas* [J]. University of Liverpool 1986, 81—121.
- [5] 吴嘉敏, 姜新耀. 中华绒螯蟹血淋巴钙离子和  $17\beta$ 雌二醇浓度与性早熟的关系 [J]. 水产学报, 2001, 25(2): 112—115.
- [6] 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(8): 289—294.
- [7] 蔡生力, 杨丛海.  $17\alpha$ 羟基孕酮对离体培养的对虾卵巢组织发育的促进作用 [J]. 海洋水产研究, 2000, 21(2): 7—8.
- [8] Yano I. Induced ovarian maturation and spawning in creasy-back shrimp *Metapenaeus ensis* by progesterone [J]. Aquaculture 1985, 47: 223—229.
- [9] 李广丽, 朱春华. 三种药物诱导罗氏沼虾产卵 [J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 23—29.
- [10] Sarojini R, Yalakshmi K, Sanbhashivarao S. Stimulation of oogenesis in the marine shrimp *Metapenaeus affinis* by steroids [J]. Uttar Pradesh J Zool 1986, 7: 63—69.
- [11] 沈蓓杰, 杨筱珍, 成永旭, 等.  $17\alpha$ 羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹主要体征和卵巢发育影响的初步观察 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(5): 268—273.
- [12] Kavelock R J. Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA sponsored workshop [J]. Environ Health Perspect 1996, 104: 715—740.
- [13] René Lafont, Michel Mathieu. Steroids in aquatic invertebrates [J]. Ecotoxicology 2007, 16: 109—130.
- [14] 朱丽岩, 齐亚超, 刘光兴. 海洋环境中内分泌干扰物对无脊椎动物的影响 [J]. 环境科学研究, 2004, 6(5): 27—31.
- [15] 康现江, 王所安. 高等甲壳动物性别决定机制及其性逆转 [J]. 动物学杂志, 1998, 33(3): 43—46.
- [16] Reddy P R, Kianmayi P, Kumari K T, et al.  $17\alpha$ -Hydroxyprogesterone induced ovarian growth and vitellogenesis in the fresh water rice field crab *Oziotelphusa senex senex* [J]. Aquaculture 2006, 254(4): 768—775.
- [17] 薛鲁征, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 1987, (3): 88—96.
- [18] Okumura T, Aida K. Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fisheries Science 2000, 66: 678—685.
- [19] Talbot P. The ovary of the lobster *Homarus americanus* I. Architecture of the mature ovary [J]. Ultrastruct Bio 1981, 76: 235—248.
- [20] 姜仁良, 谭玉钧, 吴嘉敏, 等. 中华绒螯蟹血淋巴中  $20\alpha$ 羟基蜕皮酮、 $17\beta$ 雌二醇和睾酮含量的变动 [J]. 水产学报, 1992, 16(2): 101—106.
- [21] 蔡生力, 赵维信, 李德尚, 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.
- [22] Couch E F, Hagino N, Lee J W, et al. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster *Homarus americanus* with developing and immature ovaries [J]. Comp Biochem Physiol 1987, 87A(3): 765—770.
- [23] Warriar S R, Tinumalai R, Subramoniam T. Occurrence of vertebrate steroids estradiol  $17\beta$  and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata* [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2001, 130(2): 283—294.
- [24] 堵南山, 赖伟, 陈鹏程, 等. 中华绒螯蟹卵黄形成的研究 [J]. 动物学报, 1999, 45(1): 88—92.
- [25] 堵南山. 中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究 [J]. 动物学报, 1988, 34(4): 329—333.
- [26] Kulakami G K, Nagabhushanam R, Joshi P K. Effect of progesterone on ovarian maturation in a marine penaeid prawn *Penaeus indicus* [J]. Indian J Exp Biol 1979, 17: 986—987.

- [27] Tsukinura B, Kamemoto F I. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretion in the shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture* 1991, 92: 59-66.
- [28] 蔡生力,杨丛海. 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.
- [29] 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调控 [J]. *上海水产大学学报*, 2001, 10(2): 166-171.
- [30] 孙海峰,王兰,曲运波. 甲壳动物卵黄磷蛋白研究进展 [J]. *山西大学学报:自然科学版*, 2000, 23(4): 369-372.
- [31] 张士瑾,孙旭彤,李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展 [J]. *海洋科学*, 2002, 26(7): 32-35.
- [32] 廖家遗,张艳,秦照萍,等. 影响黄体酮促两种沼虾卵巢发育作用的一些因素 [J]. *海洋湖沼通报*, 2002, (4): 32-37.



图版 I 外源  $17\beta$ -E<sub>2</sub> 对中华绒螯蟹卵巢结构的影响

Plate I The effects of exogenous  $17\beta$ -estradiol on the structure of ovary in *Eriocheir sinensis*

1. 15 d 对照组; 2. 15 d  $10^{-3}$  组; 3. 30 d 对照组; 4. 30 d  $10^{-3}$  组; 5. 45 d 对照组; 6. 45 d  $10^{-3}$  组; 7. 60 d 对照组; 8. 60 d  $10^{-3}$  组;  
EN: 内源卵黄合成期卵母细胞; EX: 外源卵黄合成期卵母细胞; NO: 成熟前期卵母细胞