

# 克氏原螯虾卵黄发生过程中卵巢 和大颚器孕酮含量的变化

赵维信 白桦 马晓萍

(上海水产大学渔业学院, 200090)

**摘要** 运用放射免疫测定法,研究克氏原螯虾卵黄发生过程中卵巢和大颚器的孕酮含量变化。其中次级卵黄发生早期的卵巢孕酮含量最高,卵黄发生前期卵巢孕酮含量次之,次级卵黄发生中期的卵巢孕酮含量显著降低,产后期卵巢检测不出孕酮含量。表明随着卵巢的成熟和产卵,卵巢中的孕酮含量逐渐下降,推测孕酮与卵黄发生的启动有关。而在不同发育时期的大颚器中均未能测到孕酮。

**关键词** 克氏原螯虾,孕酮,卵巢,大颚器

**中图分类号** S917

国内外有关虾、蟹等是否具有合成和分泌类固醇激素的组织的研究十分少见。Quinitio 等[1991]在远东长额虾(*Pandalus kessleri*)的年生生殖周期血淋巴中检测到孕酮含量变化。另外, Couch 等[1987]在美国龙螯虾(*Homarus americanus*)的卵巢和大颚器中测定了孕酮和雌二醇的含量。本研究以克氏原螯虾为研究对象,运用放射免疫方法(RIA)测定大颚器和卵巢中的孕酮含量,旨在揭示孕酮在克氏原螯虾性腺发育过程中的作用,试图为阐明虾类的生殖生理机制提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)购于本市杨浦区图门路菜市场。主要为体色暗红的隔年虾。实验前将螯虾逐尾称体重和测量体长(眼柄基部至尾柄末端),活体解剖取出不同发育阶段的大颚器和全部卵巢经称重后计算成熟系数(GSI),并根据李胜和赵维信[1999]方法确定卵巢的发育时期。分别解剖卵黄发生前期、次级卵黄发生早期、次级卵黄发生中期以及产后期(未见抱卵和抱仔,卵巢内有少量桔黄色卵粒残留)的螯虾共46尾。

### 1.2 卵巢和大颚器的粗提取

解剖取下克氏原螯虾卵巢准确称重后迅速放入玻璃匀浆器中,每尾卵巢为一个样本进行

匀浆, 卵巢重量为0.17~0.80g。解剖取下的大颚器以2对为一个样本进行匀浆。然后分别加入4℃乙酸乙酯(其中卵巢加入1.5mL, 大颚器加入1.0mL), 匀浆捣碎, 接着将匀浆液全部倒入离心管, 3000转/min离心10min, 将上清液倒入一玻璃小瓶, 往沉淀中再加入乙酸乙酯2mL, 再经充分匀浆后离心, 合并上清液, 在40℃水浴中用空气泵吹干, 加入明胶磷酸缓冲液2mL溶解提取物, 旋涡混合器混匀, 即为卵巢或大颚器的粗提取液, 置于-15℃以下保存备用。

### 1.3 样品的抽提率校正

在加入不同时期的卵巢或大颚器的匀浆器中, 加入100 $\mu$ L  $^3$ H-孕酮工作液, 混匀后在室温下放置30min。按照样品抽提同样处理, 吹干后卵巢和大颚器提取物用2mL明胶磷酸缓冲液溶解提取物。取500 $\mu$ L该提取液放入闪烁杯中加人闪烁剂8mL进行记数。计算抽提率, 抽提率(%)=抽提管读数 $\times$ 4/总计数管读数。

### 1.4 孕酮的放射免疫测定法

参照生物制品研究所的孕酮放射免疫测定药盒说明书进行测定。取出冻结的卵巢和大颚器的粗提样品, 解冻后取500 $\mu$ L样品进行放射免疫测定。分别加入 $^3$ H-孕酮100 $\mu$ L和孕酮抗体100 $\mu$ l后, 将样品测定管在4℃温育16~24小时, 然后在各测定管中加入葡聚糖-活性炭分离剂(D. C. C)200 $\mu$ l, 冰浴30分钟后, 3000转离心后将上清液倒入闪烁杯中, 加入8mL闪烁液, 混旋。室温过夜, 最后用Beckmen液闪仪进行计数测定。

### 1.5 数据统计

本实验中, 孕酮测定的标准曲线经logit转换成直线后得出回归方程( $y' = a + bx'$ ), 实测样品的结合率代入 $x = \log^{-1}[(a - \text{logit}B/B_0)/b]$ 公式, 计算出样品的孕酮含量。数据经生物统计处理求P值, 进行显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 卵巢和大颚器孕酮抽提率

大颚器孕酮的平均抽提率为46.88%, 卵巢孕酮的平均抽提率为73.23%。

### 2.2 卵黄发生过程中卵巢和大颚器孕酮含量

本实验分别取卵黄发生前期(GSI=0.19 $\pm$ 0.02%)、次级卵黄发生早期(GSI=1.77 $\pm$ 0.26%)、次级卵黄发生中期(GSI=4.09 $\pm$ 1.87%)和产后期(GSI=0.30 $\pm$ 0.03%)的克氏原螯虾卵巢进行研究。克氏原螯虾不同发育时期卵巢的孕酮含量见表1。次级卵黄发生早期的卵巢孕酮含量最高(3101.94 $\pm$ 2294.17pg/g), 卵黄发生前期的卵巢孕酮含量(1796.71 $\pm$ 386.17pg/p)略低于次级卵黄发生早期, 但两者间不存在显著性差异( $P > 0.05$ ); 次级卵黄发生中期卵巢孕酮含量(492.73 $\pm$ 569.08pg/p)明显下降, 与次级卵黄发生早期比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。而产后期未检测到孕酮含量。

测定了三个时期的大颚器孕酮含量, 即次级卵黄发生早期、次级卵黄发生中期和产后期。

各时期大颚器中均未能检测到孕酮(见表1)。

表1 克氏原螯虾卵黄发生过程中卵巢和大颚器的孕酮含量  
Tab. 1 Progesterone contents of ovary and mandibular organ  
in crayfish during the vitellogenesis

卵巢发育时期	成熟系数	卵巢孕酮含量(pg/g)	大颚器孕酮含量(pg/个)
卵黄发生前期	0.19±0.02	1796.71±386.17(3)	—
次级卵黄发生早期	1.77±0.26	3101.94±2294.17(5)	ND(2)*
次级卵黄发生中期	4.09±1.87	492.73±569.08(5)	ND(4)*
产后期	0.30±0.03	ND(7)	ND(7)*

注:ND表示孕酮含量检测不出。\*表示每个样本为4个大颚器。

### 3 讨论

本实验结果表明,克氏原螯虾的卵巢组织中含有孕酮(一种类固醇激素)。并发现在次级卵黄发生早期(次级卵黄发生的开始阶段),卵巢孕酮含量较高,进入次级卵黄发生中期则明显下降,并随着卵巢发育成熟到产卵,孕酮含量不断下降。产卵后的卵巢孕酮含量已低得检测不出;发现一个已接近成熟期的卵巢样品(GSI=7.2%)的孕酮含量仅为91.90pg/g,表明随成熟系数的不断增大,卵巢孕酮含量减少。Quinitio等[1991]对远东长额虾年生殖周期中血淋巴孕酮水平的研究发现,血淋巴孕酮水平在卵黄发生的开始阶段上升,而在卵黄发生的高峰阶段下降。另外,从一种丰年虫(*Artemia* sp.)的整体提取物中,也发现较高的孕酮含量是处于卵黄发生周期的开始,而相当低的孕酮含量则存在于卵黄发生的过程中[Van Beek和De Loof 1998]。以上这些类似的研究结果表明甲壳动物生殖周期中孕酮水平升高与刺激卵黄发生的启动密切相关。有关应用外源孕激素的研究也发现,注射孕酮能诱导日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) [虞冰如等 1990]和罗氏沼虾(*M. rosenbergii*) [李广丽和朱春华 1996]卵巢发育并产卵;17 $\alpha$ -羟孕酮能刺激范氏对虾(*Penaeus vannamei*) [Tsukunura和Kamemoto 1991]和罗氏沼虾 [赵维信等 1996]离体卵母细胞卵径增大;以及诱导克氏原螯虾离体卵巢总RNA含量增加 [赵维信和李胜 1998];Yano [1987]发现给日本对虾(*P. japonicus*)注射17 $\alpha$ -羟孕酮后,血清中卵黄蛋白原浓度增加数倍。由此可见,孕激素参与虾类的卵巢发育调控。已证明三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的卵巢能将孕酮转化成17 $\alpha$ -羟孕酮、甾酮和脱氧皮质酮 [Teshima和Kanazawa 1971]。因此,卵黄发生高峰阶段孕酮含量减少,可能是由于孕酮已转化成卵子发育所必须的其他类固醇激素。

本研究在克氏原螯虾的次级卵黄发生早期、次级卵黄发生中期和产后期的大颚器中均未检测到孕酮含量。Couch等[1987]运用放射免疫方法在美国龙螯虾的大颚器中检测到一定含量的孕酮,而且卵巢未发育时期的大颚器孕酮含量与卵巢发育时期的大颚器孕酮含量差别不大,这与本实验的结果有差异。本实验在大颚器取样时,以两对大颚器为一份样品进行提取,也可能由于取样太少造成检测不出,然而赵维信和李胜[1998]关于克氏原螯大颚器的超微结构研究中,认为大颚器只有一种激素合成和分泌细胞。Laufer等[1987]以及Ding和Tobe[1991]证实十足目甲壳动物的大颚器合成甲基法尼酯(MF)——一种昆虫保幼激素Ⅲ的前体,因此认为十足目甲壳动物的大颚器是类似昆虫咽侧体的内分泌器官。由于MF与保幼激素相似,为一种类萜激素,属类脂,一种类似构建胆固醇的化合物,因此大颚器细胞的超微结构显示充分发

育的光面内质网和线粒体,这与合成类固醇激素细胞的超微结构相似。但大颚器细胞具特有的褶皱细胞膜结构和结构变化多样的线粒体[赵维信和李胜 1998]。总之,关于大颚器是否能合成类固醇激素还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 李 胜,赵维信. 1999. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化. 上海水产大学学报,8(1):12~18
- 李广丽,朱春华. 1996. 三种药物诱导罗氏沼虾产卵. 上海水产大学学报,5(1):23~29
- 赵维信,贾 江,安 苗. 1996. 外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的高体诱导作用. 上海水产大学学报,5(4):221~225
- 赵维信,李 胜. 1998. 克氏原螯虾大颚器的超微结构研究. 水产学报,22(4):303~308
- 虞冰如,沈 竑,范永志等. 1990. 人工诱导青虾成熟和产卵. 水产科技情报,(3):66~68
- Couch E F, Hagino N, Lee J W. 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. *Comp Biochem Physiol*, 87A:765~770
- Ding Q, Tobe S S. 1991. Production of farnesoic acid and methyl farnesoate by mandibular organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Insect Biochem*, 21:285~291
- Laufer H, Borst D, Carrasco F C, et al. 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science*, 235:202~205
- Quinitio E T, Yamauchi K, Hara A, et al. 1991. Profiles of progesterone and estradiol-like substances in the hemolymph of female *Pandalus kessleri* during an annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol*, 81:343~348
- Teshima S I, Kanazawa A. 1971. Bioconversion of progesterone by ovaries of carb, *Portunus trituberculatus*. *Gen Comp Endocrinol*, 17:152~157
- Tsukimura B, Kamemoto F I. 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 92:59~66
- Van Beek E, De Loof A. 1988. Radioimmunological determinations of concentrations of six C<sub>21</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>18</sub> steroids during the reproductive cycle of female *Artemia* sp. (Crustacea: Anostraca). *Comp Biochem Physiol*, A89:595~599
- Yano I. 1987. Effects of 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 61:49~57

## CHANGES OF PROGESTERONE CONTENTS OF OVARY AND MANDIBULAR ORGAN IN *PROCAMBARUS CLARKII* DURING THE VITELLOGENESIS

ZHAO Wei-Xin, BAI Hua, MA Xiao-Ping  
(Fisheries College, SFU, 200090)

**ABSTRACT** The changes of progesterone contents of ovary and mandibular organ in crayfish, *Procambarus clarkii* during the vitellogenesis were studied by using of radioimmunoassay. The progesterone contents increased at early second vitellogenesis stage and decreased significantly at the mid second vitellogenesis stage; the progesterone content

of post spawning stage was undetective. These results indicated that the ovarian progesterone contents decreased during the mid second vitellogenesis, maturation and spawning. These findings suggest that progesterone content increase is related to the onset of the vitellogenesis. The progesterone content in mandibular organs at different developing stage was all undetective.

**KEYWORDS** *Procambarus clarkii*, progesterone, ovary, mandibular organ

## 欢迎订阅2000年度《水产科技情报》杂志

《水产科技情报》杂志创刊于1973年,是由上海市水产研究所、上海市水产学会主办的技术类刊物,双月刊,16开,48页,国内外公开发行,发行面广。近年来,先后被列为“全国水产、渔业类核心期刊”、“上海市科技类核心期刊”,并获得“第一届上海市优秀科技期刊”、“第一届全国优秀科技期刊三等奖”、“第一届全国优秀水产报刊二等奖”、“第二届上海市优秀科技期刊一等奖”、“第二届全国优秀科技期刊三等奖”、“第二届全国优秀水产报刊一等奖”等奖励。编辑部还荣获上海市广告业“1996~1997年度‘重信誉、创优质服务’先进单位”称号。

本刊辟有综述、增养殖、水产资源、饲料研究、水产品加工、病害防治、渔业环境、渔业经济、水产捕捞等栏目,新辟以水产养殖为主的专题讲座栏目。今后,本刊将继续保持传统特色,海淡水兼顾,科工贸结合,汇各地信息,纳百家之长;同时进一步适应市场需求,加大信息量,增加名特优新产品养殖方面的内容,为渔业生产和渔业现代化建设服务。

邮发代号4-204,每册定价4.00元,全年订费24.00元。如邮局订阅不便,也可直接汇款至编辑部订阅。

本刊承接各类渔业商品广告,涂塑封页,彩色、双色、单色插页,设计独到,制作精良,欢迎中外企业惠顾。

编辑部地址:上海市佳木斯路265号, 邮政编码:200433, 联系人:侯妙福,

电 话:(021)65483215×24,65489796, 传 真:(021)65489796。

## 《北京水产》征订启事

《北京水产》以其自身的特色及针对性强的独特发行渠道,日益受到各级领导及广大读者的好评和喜爱,其影响力和知名度日益提高。《北京水产》辟有实用技术与推广、鱼病防治、水产品与健康、渔文化、会议信息等栏目,此外在休闲渔业、观赏鱼、观赏水族方面,日显其特色,是全国水产杂志中最关注观赏鱼、水族的一份杂志,设有北京观赏、水族会员俱乐部,并在北京、天津、广州、南京等各城市的各大中观赏鱼市设立代销点。每年举办有全年优秀稿件评选、观赏鱼征文比赛并出一本专集等活动,栏目灵活,内容丰富,活动多多。《北京水产》为双月刊,56页,自办发行,可随时订阅,请直接通过邮局汇款编辑部收即可,全年共25元。

地址:北京市丰台区水外角门路18号 邮编:100075

电话:010-87257465 传真:010-87257464