

文章编号:1004-7271(2004)01-0010-06

17 β -雌二醇对中华绒螯蟹促雄腺组织结构和超微结构的影响

汪桂玲, 韦荣编, 邱高峰

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用不同浓度的 17 β -雌二醇注射中华绒螯蟹雄性幼蟹,每隔 7d 注射 1 次,共注射 5 次,35d 后取样。利用组织切片技术和电镜技术研究了中华绒螯蟹促雄腺显微和超微结构的变化。常规石蜡切片显示,处理组的促雄腺细胞直径明显小于对照组,同时,电镜切片结果也表明在不同浓度的处理组,促雄腺在 β -雌二醇的影响下,腺细胞出现不同程度的退化,如腺细胞核变形,呈不规则的形状,核仁消失,核内异染色质增多等,而 8 μ g/g 体重的处理组效果最明显,细胞质内出现溶酶体,其它细胞器很少见。随着浓度的增加,17 β -雌二醇对中华绒螯蟹促雄腺的发育及分泌抑制作用愈明显。

关键词:中华绒螯蟹;17 β -雌二醇;促雄腺

中图分类号: S917 文献标识码: A

The effect of 17 β -estradiol on the tissue structure and ultrastructure of androgenic gland of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

WANG Gui-ling, WEI Rong-bian, QIU Gao-feng

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Different concentrations of 17 β -estradiol were injected every 7 days to the immature crabs *Eriocheir sinensis*, which weighted about 80 \pm 5g on an average. After being raised in laboratory for 35 days, the tissue structure and ultrastructure of the androgenic gland of treated crabs were studied with tissue section and electron microscope. Paraffin section showed the androgenic gland cell secretion in treated crabs appeared degenerated and a significant decrease in the diameter of the androgenic gland cell compared with controls. Moreover, the electron microscopy showed that the nucleus was deformed and no nucleolar, while the heterochromatin was increasing in different treatment groups and lysosomes were detected in the cytoplasm in 8 μ g/g group. The results demonstrated 6 and 8 μ g/g groups had very apparent effects on androgenic gland of *Eriocheir sinensis* H. Mile Edwards.

Key words: *Eriocheir sinensis*; 17 β -Estradiol; androgenic gland

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国特有的水产珍品,近年来,中华绒螯蟹的人工养殖在我国已颇具规模。由于在市场上,同样规格的雌蟹因营养价值高于雄蟹而倍受青睐,所以实现其单性

收稿日期: 2003-11-10

基金项目: 上海市教委重点学科重点科研项目资助(98-23),上海市教委水产养殖重点学科基金资助。

作者简介: 汪桂玲(1974-),女,陕西蓝田人,讲师,从事水产动物遗传育种研究。Tel: 021-65710705

化养殖对提高经济效益十分重要。控制中华绒螯蟹的性别是实现其单性化养殖的关键,而促雄腺(androgonic gland)对中华绒螯蟹的性别控制及性腺发育起重要作用。关于中华绒螯蟹促雄腺的结构和功能,邱高峰等^[1]进行了较系统的研究,但外源激素对中华绒螯蟹促雄腺有无影响尚未见报道。本文利用外源17 β -雌二醇注射雄性中华绒螯蟹雄性幼蟹,通过石蜡切片及超薄切片,观察17 β -雌二醇对中华绒螯蟹促雄腺的影响,旨在为进一步开展经济蟹类性别控制研究及实现单性化养殖提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 养殖条件

中华绒螯蟹雄性32只,2000年7月13日购自上海市图门路农贸市场,体重 80 ± 5 g。暂养两三天后将存活下来的30只蟹随机分组,暂养于4个水族箱中(120cm \times 55cm \times 75cm)及3个塑料箱中,每个水族箱放养6只,水位高平均30cm,塑料箱每个放2只,水位稍低(表1)。水源为充分曝气一周以上的自来水,水可酌加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 及 NaOH 调pH至7.5~8.5范围。饲养时间为7月16~8月25日,水温未加控制为自然水温,未控制光周期。水中堆放瓦片且表面露出水面,冲气泵冲气,水箱中放养水花生,注意保持鲜活,及时整理腐败的枝叶,以防水质恶化。每天傍晚投饵一次,喂以田螺肉为主,辅以缢蛏、蛤蜊等贝类。每天早上吸污,平均每5天换水一次,视残饵及水质、天气情况而调整换水频率。

表1 各处理组注射的激素浓度($\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)及其对应的饲养水箱

Tab.1 Different concentrations of estradiol applied to specific groups with corresponding container codes

组别	激素浓度($\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)	水箱编号
A	0	1G
B	4	4G, 2X
C	6	3G, 6X
D	8	2G, 3X

1.2 实验分组和激素注射方法

实验用激素17 β -雌二醇购自上海生化试剂公司,为Fluka公司产品,1g分装。实验前将适量激素溶解在95%的酒精中,配成所需浓度。实际分组情况如下见表1,注射激素时,用50 μL 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,每7天注射1次,共注射5次。

1.3 处理方法

实验结束时,取出中华绒螯蟹,解剖取出射精管(上附着促雄腺)。

1.4 组织学、电镜样品制作与观察

将刚死亡不久或濒死的蟹解剖出射精管(上附着促雄腺)用Bouin's液固定。常规石蜡切片,切片厚约6~7 μm ,Delafield氏苏木精-伊红染色, Olympus BH-2型显微镜观察、拍照。将从部分射精管剥离出的促雄腺用于制作透射电镜制样,瑞典LKB-8800超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, JEM-100CX II透射电镜观察、拍照。

2 结果

不同浓度的17 β -雌二醇处理中华绒螯蟹对其促雄腺的发育及分泌有抑制作用,组织学和超微结构与对照组相比,促雄腺发生了明显的变化。

2.1 促雄腺变化的显微结构

中华绒螯蟹促雄腺一对,位于中华绒螯蟹近阴茎基部的射精管的外表面,呈不规则索状,以结缔组织膜与射精管相连,由腺泡细胞组成。取日期相近的对照组(A)及三个实验组(B、C、D)促雄腺切片,观

察并测量腺泡细胞直径(每组各观察30个细胞),结果表明,A组腺泡细胞直径在 $9.0 \sim 13.0 \mu\text{m}$ 之间,B组腺泡细胞扁平或不规则状,细胞核不明显,整个细胞呈空泡状,细胞直径在 $4 \sim 5 \mu\text{m}$ 之间(图版-1),C组腺泡细胞呈圆状或卵圆状,细胞核染色较深,清晰可见,细胞直径在 $2.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 之间(图版-2),D组腺泡细胞比较稀疏,细胞核不明显,整个细胞呈空泡状,细胞直径在 $3.5 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 之间(图版-3)。对对照组及三个实验组腺泡细胞直径大小作方差分析。方差结果显示:B与A,C与A,D与A组间均存在极显著差异($P < 0.01$),B组与C组间存在显著差异($P < 0.05$),D与B,D与C组间无显著差异($P > 0.05$)。由此可见,3种不同浓度激素对促雄腺细胞生长均有明显抑制作用, $4 \mu\text{g/g}$ 体重处理组与 $6 \mu\text{g/g}$ 体重处理组有显著差异, $6 \mu\text{g/g}$ 体重处理组与 $8 \mu\text{g/g}$ 体重处理组无显著差异。

2.2 促雄腺变化的超微结构

2.2.1 $4 \mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺变化的超微结构

电镜下可见细胞中内含物已排出,仅剩细胞核被挤压在一旁,变形呈各种形态如勺状、长椭圆状等,细胞质中其他细胞器已消失,呈一大空泡状(图版-4);有的区域可见细胞质交织在一起(图版-5)。根据邱高峰等^[1]对中华绒螯蟹促雄腺发育的研究,将其发育周期依次划分为:增殖期、合成期、分泌早期、分泌中期及分泌后期。结果表明,该处理组的促雄腺主要处于分泌中期。同正常分泌中期的促雄腺细胞的比较结果见表2。明显的变化是细胞质完全呈空泡状,整个细胞并未被完全破坏,细胞核变形,被挤压在一旁。

表2 $4 \mu\text{g/g}$ 体重处理浓度对促雄腺细胞的影响

Tab.2 The influence of $4 \mu\text{g/g}$ concentrations of estradiol on the androgenic gland

	正常分泌中期的腺细胞	$4 \mu\text{g/g}$ 处理组的腺细胞
细胞质	出现大小不一的空泡	完全呈空泡
细胞核	固缩化,位于细胞近中央	变形,被挤压在一旁
细胞器	消失	消失

2.2.2 $6 \mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺变化的超微结构

电镜切片显示大多数细胞核出现固缩化,而且严重变形,出现各种畸形如勺状等,细胞核周围出现发达线粒体(内有扁平横嵴),但内质网少见(图版-6);也有少量正常细胞核,呈卵圆形,细胞核周围除出现球状线粒体(内有扁平横嵴)外,还具有发达内质网、大小不一的空泡及少量高电子密度颗粒(图版-7)。此时腺细胞处于合成期。同正常合成期的促雄腺细胞比较结果见表3。

表3 $6 \mu\text{g/g}$ 处理浓度对促雄腺细胞的影响

Tab.3 The influence of $6 \mu\text{g/g}$ concentrations of estradiol on the androgenic gland

	正常合成期的腺细胞	$6 \mu\text{g/g}$ 处理组的腺细胞
细胞质	出现圆形或不规则小空泡	不规则小空泡
细胞核	圆形或卵圆形	变形,出现各种畸形
核仁	1-2个	消失
细胞器	线粒体、内质网发达	线粒体发达

2.2.3 $8 \mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺变化的超微结构

电镜切片显示大多数细胞核变形并深度固缩化,核内染色质分布不均,异染色质增多,分布在边缘,常染色质分布在异染色质内侧(图版-8),核周围出现大小不一的空泡及分泌颗粒(图版-9),并出现溶酶体(图版-10),此时腺细胞处于分泌中期。同正常分泌中期的促雄腺细胞的比较结果见表4。溶酶体的出现,异染色质增多,说明细胞分泌下降。

表 4 8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理浓度对促雄腺细胞的影响Tab.4 The influence of 8 $\mu\text{g/g}$ concentrations of estradiol on the androgenic gland

	正常分泌中期的腺细胞	8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组的腺细胞
染色质	均匀分布	核内染色质分布不均, 异染色质增多
细胞核	固缩化 球形或卵圆形	固缩化并变形
细胞器	消失	出现溶酶体

3 讨论

3.1 外源激素的作用机理

多细胞真核生物的一些基因表达常受内外激素的控制,许多激素如雌激素和雄激素等都可以诱导某些基因的转录^[2]。雌激素与受体蛋白结合才能产生效应, Jensen 等发现了激素受体蛋白,并提出了两步机理学说,即类固醇激素在靶细胞中以高亲和力与特定的受体蛋白专一性结合,然后进入细胞核,通过识别其靶基因 DNA 上的顺式作用成分(激素应答成分, HRE),并与之结合,从而导致某些特定基因的激活或抑制。雌激素与动物体不同器官受体作用机制可能不同,尚不完全明了^[3]。对虾体内已证明存在接受外源激素的机制或受体^[4]。有实验表明,中华绒螯蟹血淋巴中含有 17 β -雌二醇和睾酮,其含量变化和生殖腺发育及繁殖有密切关系^[5,6],所以可以推测在中华绒螯蟹促雄腺上存在类固醇激素的结合受体,受体的敏感度与激素种类及浓度有关。当激素的种类与浓度适中时,激素与受体相结合,促进或抑制促雄腺的分泌,从而可影响精巢的发育,促进或抑制雄性生殖细胞的成熟。促雄腺以全浆分泌方式分泌激素,促雄腺激素直接来源是高尔基体和粗面内质网,处理组细胞中,高尔基体和粗面内质网少见,说明分泌活动下降。

3.2 不同浓度的 17 β -雌二醇对促雄腺影响

不同处理组腺细胞直径方差分析结果表明, B 与 A, C 与 A, D 与 A 组间均存在极显著差异, B 与 C 组间存在显著差异, D 与 B, D 与 C 组间无显著差异。由此可见,和对照组相比较, 3 种不同浓度激素对促雄腺细胞生长均有明显抑制作用。4 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组与 6 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组有显著差异, 6 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组与 8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组无显著差异。6 $\mu\text{g/g}$ 处理组腺泡细胞直径变化最大,为 2.5-3 μm ,比 8 $\mu\text{g/g}$ 处理组腺泡细胞直径 3.5-5 μm 还要小,这可能与 8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组的蟹已蜕壳有关。因为,同时买进的一批蟹大小上差异虽然不大,但生殖系统的发育并不完全一致,开始处理时,促雄腺的发育已有差异,分泌期的细胞直径大于合成期。而结合促雄腺的显微及超微结构看, 6 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组的促雄腺处于合成期, 8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺处于分泌期。从上述结果可以看出,当用浓度大于 4 $\mu\text{g/g}$ 体重的外源激素 17 β -雌二醇处理时,促雄腺上的受体被激活,激素与受体相结合,从而抑制促雄腺细胞生长。超微结构显示 4 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组与 8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺发育均处于分泌中期, 4 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组腺细胞的特征与对照组相近,只是细胞核出现了变形,而 8 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺细胞与对照组相比出现了明显的退化特征如异染色质增多,细胞内出现溶酶体等。6 $\mu\text{g/g}$ 体重处理组促雄腺发育均处于合成期,腺细胞出现两种形态,大多数细胞变形也有少数正常细胞,说明该浓度 17 β -雌二醇对合成期的促雄腺发育有抑制作用,但抑制作用并不完全。由此可见,随着浓度的增加,其抑制效果越明显。另外,在各处理组中,腺细胞核出现了不同程度的畸形,推测原因可能是 17 β -雌二醇与促雄腺细胞上的特异受体结合抑制其正常的发育从而出现各种畸形。Nagabhushanam 等^[7]注射丙酸睾酮(TSP)及乙酸睾酮(TSA)于哈氏仿对虾体内,发现处理组对虾的促雄腺细胞生长过度,出现畸形,细胞质是密集的不规则颗粒,细胞及核的直径均有明显增长。由此可见,一定剂量的外源类固醇激素可通过与腺细胞上的特异受体结合抑制或刺激其正常的发育和功能而使腺细胞出现不同程度的畸形。

3.3 促雄腺与精子的发生

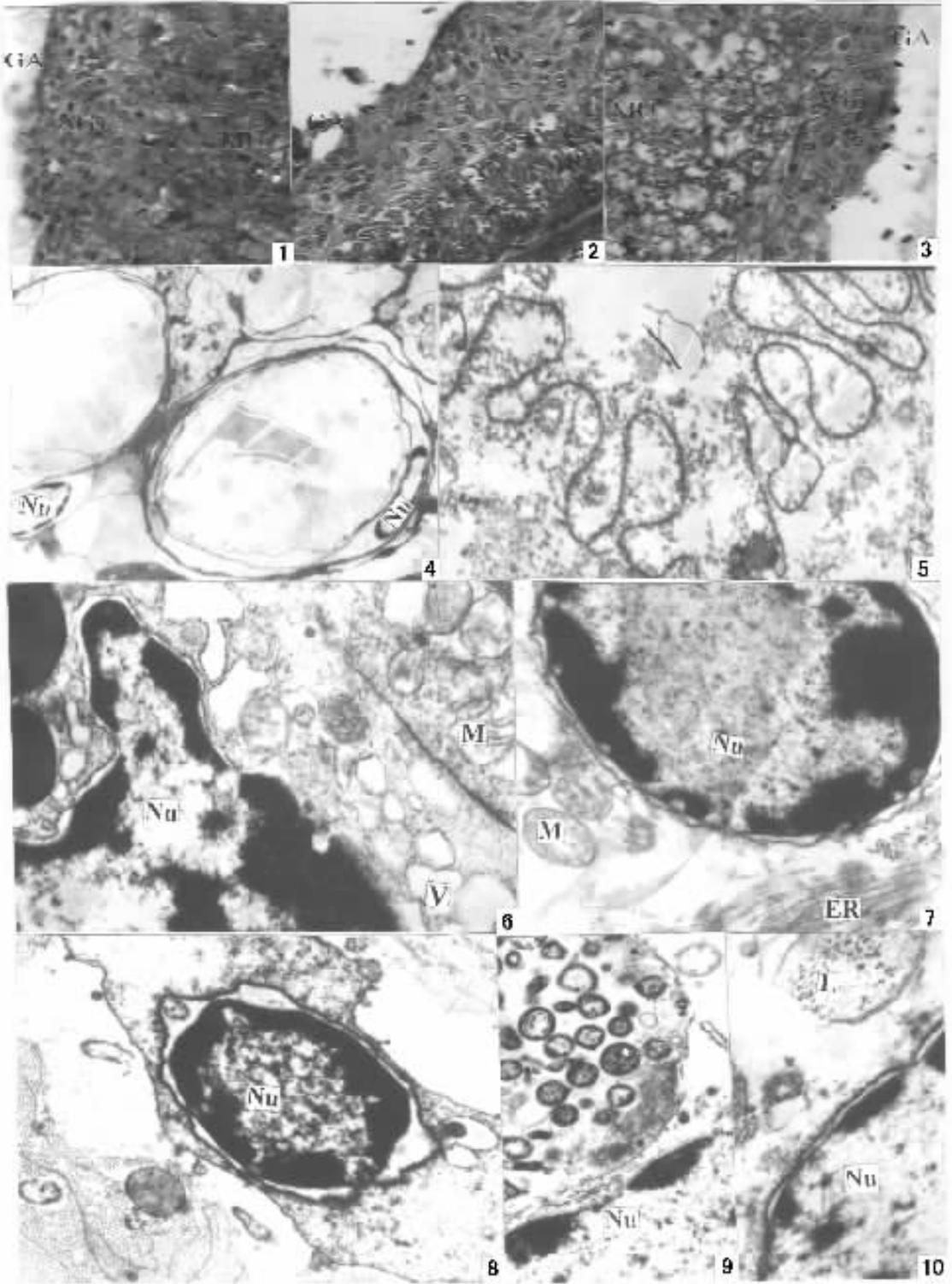
促雄腺是甲壳动物特有的内分泌腺,是软甲亚纲甲壳动物雄性激素的唯一来源^[8]。促雄腺分泌的

激素称促雄腺激素,其对于发育中期的精巢内的初级精母细胞具有促进作用,同时也能加速成熟精巢内生精小管中精子的排放,而对于卵母细胞的发育则有抑制作用。吴萍等^[9]对中华绒螯蟹精子发生过程及促雄腺结构变化的光镜与电镜观察表明,中华绒螯蟹的精巢发育、精子发生与促雄腺的结构变化密切相关,促雄腺处于发育起始阶段时,精巢内尚未有精细胞形成,生精小管内以初级精母细胞与次级精母细胞占优势;当促雄腺处于分泌期时,精巢内精子形成并成熟释放;河蟹繁殖后,促雄腺处于退化状态。由此可见,促雄腺激素的分泌与甲壳动物精子的发生之间存在一定的关系,即可以促进精子的发生。在本实验中,通过注射不同浓度的 17β -雌二醇,发现雌激素对中华绒螯蟹精子的发生分布及精巢的内部结构有不同的影响,同时对促雄腺的分泌活动也有不同程度的影响。由此可见, 17β -雌二醇通过抑制促雄腺分泌促雄腺激素进而影响精子的发生。在一些十足类,促雄腺激素并不是精子形成过程中的唯一调节者,因为,即使不存在促雄腺仍可完成精子的发生,其原因是另一种因子 β -蜕皮激素的调节^[10]。中华绒螯蟹精子的发生是否也存在另外的调节因子,这有待以后的进一步研究。

本文研究过程中,得到了楼允东教授的大力支持和帮助,在此致以诚挚的谢意!

参考文献:

- [1] 邱高峰,吴萍,楼允东. 中华绒螯蟹促雄腺结构与功能的研究[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 108 - 112.
- [2] 王亚馥,戴灼华. 遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [3] 邱东茹,吴振斌. 环境雌激素对动物和人体的影响及其作用机制[J]. 水生生物学报, 1997, 21(4): 365 - 374.
- [4] 廖家遗. 外源性激素对对虾卵巢发育作用[J]. 动物学杂志, 1993(2): 56 - 58.
- [5] 姜仁良. 中华绒螯蟹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮、 17β -雌二醇和睾酮含量的波动[J]. 水产学报, 1992, 16(2): 101 - 106.
- [6] Quintio E T. Profile of progesterone and estradiol-like substance in the himolymph of female *Pandalus kessleri* during an annual reproductive cycle. Gen Comp[J]. Endocrinol, 1991, 81: 343 - 348.
- [7] Nagabhushanam R, Kulkarni G K. Effect of exogenous testosterone on the androgenic gland and test of a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis arduichi*[J]. Aquaculture, 1981, 23: 19 - 27.
- [8] Robin J, Fowler, Brain V, et al. The structure and function of the androgenic gland in *Cherax estuor*(Decapoda: Parastacidae)[J]. Aquaculture, 1999, 171: 135 - 148.
- [9] 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.
- [10] Payen G G. The androgenic gland of shrimp *Penaeus japonicus*-Description, role, and control by the yestalk[J]. Gen Comp Endocrinol, 1982, 46: 384 - 388.



图版 Plate

1. 4 μ g/g 体重激素处理组中的促雄腺中呈扁平或不规则的腺泡细胞, 细胞核不明显, $\times 400$; 2. 6 μ g/g 体重处理组的促雄腺, 其腺泡细胞呈圆形或卵圆形, 细胞核明显, $\times 400$; 3. 8 μ g/g 体重激素处理组促雄腺, 其腺细胞稀疏, 细胞核不明显, $\times 400$; 4. 5. 4 μ g/g 体重激素处理组的促雄腺, 4. 示分泌中期促雄腺细胞中内含物已排出, 仅剩细胞核被压挤在一旁, $\times 5800$; 5. 示分泌中期部分区域促雄腺细胞质交联在一体, $\times 14000$; 6. 7. 6 μ g/g 体重激素处理组的促雄腺, 6. 示合成期促雄腺细胞核变形, 出现发达线粒体, $\times 19000$; 7. 示合成期少数正常促雄腺细胞, $\times 19000$; 8. 9. 10. 8 μ g/g 体重激素处理组的促雄腺, 8. 示分泌中期促雄腺细胞核内染色质分布不均, $\times 19000$; 9. 示分泌中期促雄腺细胞核周围的空泡及分泌颗粒, $\times 14000$; 10. 分泌中期促雄腺细胞出现溶酶体, $\times 29000$.

GA 腺泡, AG 促雄腺, Mu 射精管壁肌层, Nu 细胞核, ER: 内质网, M 线粒体, V 大小泡, L 溶酶体