

外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾 卵母细胞的离体诱导作用

赵维信 贾江

安苗

(上海水产大学, 200090)

(贵州省水产研究所, 贵阳 550000)

提 要 使用四种类固醇激素,两种保幼激素类似物(JHA)和眼柄提取物进行罗氏沼虾离体卵巢小块培育,于25℃培育24h后切片并进行光镜观察。发现17 α -羟孕酮、孕酮和JHA-ZR515对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($P < 0.01$)。高浓度雌二醇对卵黄发生前期卵母细胞卵径增大也有明显刺激作用($P < 0.01$);高浓度JHA-ZR512对成熟前卵巢卵母细胞卵径增大有显著作用($P < 0.05$)。蜕皮激素对卵径增大无作用($P > 0.05$)。眼柄提取物对卵黄发生期卵母细胞则有抑制作用,使卵径明显减小($P < 0.05$)。研究结果表明,罗氏沼虾的卵巢发育受孕激素和保幼激素样物质的直接作用。

关键词 罗氏沼虾,卵母细胞离体培育,类固醇激素,保幼激素类似物,眼柄提取物

摘除眼柄诱导雌虾卵巢成熟的方法,由于手术破坏和去除了该动物的主要神经激素中心,尤其是去除了性腺抑制激素(GIH)的天然来源,结果导致去眼柄虾迅速地、不停地性腺发育,孵出的幼体存活率降低。近年来的离体研究表明某些类固醇激素和类固醇激素能诱导范氏对虾(*Penaeus vannamei*)卵母细胞生长和卵黄合成[Tsukimura和Kamemoto, 1991; Quackenbush, 1992]。近年,我国在应用合成激素提高日本沼虾[虞冰如等,1990]和罗氏沼虾[魏华、赵维信,1992;赵维信等,1995;李广丽、朱春华,1996]产卵率方面已有报道。但关于淡水虾类卵母细胞的离体诱导研究在国内外还未见专门报道。为了进一步了解激素对罗氏沼虾卵巢的作用,本研究采用离体培育的方法,试图阐明外源激素对卵巢是否有直接作用,并比较各种激素离体诱导卵母细胞发育的效果。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)取自上海市东海水产养殖公司罗氏沼虾育苗工厂,为越冬亲虾。实验前暂养在经充分曝气的自来水中,水温维持在24—25℃,投喂颗粒饲料。实验当天用消毒的镊子和解剖刀从罗氏沼虾头胸部取出卵巢,放入4℃螯虾生理盐溶液[李永才,1989]中漂洗,其中含青霉素钾60mg/100ml。然后将每尾虾的卵巢切割成约为3×4mm的小块。实验用4尾雌虾的有关生物学参数见表1。

表1 实验虾的生物学参数

Tab. 1 The biological parameters of experimental prawn *Macrobrachium rosenbergii*

编号	体长(cm)	体重(g)	卵巢发育时期	卵巢重(g)	成熟系数(%)
A	10.20	25.44	次级卵黄发生期	0.35	1.38
B	10.30	26.05	卵黄发生前期	0.13	0.50
C	9.70	24.42	初级卵黄发生期	0.25	1.02
D	11.20	26.72	成熟前卵巢	1.07	4.00

1.2 激素

类固醇激素为孕酮、 17α -羟孕酮、雌二醇和蜕皮激素,均为市售成品。类萜激素为保幼激素类似物 ZR-515(JHA-ZR515)和保幼激素类似物 ZR-512(JHA-ZR512),分别由中科院昆虫研究所和江苏省激素研究所赠送。眼柄粗提液的制备采用硫酸铵法:2个罗氏沼虾眼柄,加入1ml 磷酸缓冲液匀浆,所得到的匀浆液再加入3倍体积的冷饱和硫酸铵溶液,4000转/分离心10min。弃去上清液,保留沉淀,加入冷磷酸缓冲液1ml,置于4℃冰箱保存备用。

1.3 离体培育

孕酮、 17α -羟孕酮和雌二醇分别溶解于一定量无水乙醇,制成贮备液;JHA-ZR515溶解于一定量丙酮,制成贮备液。然后将各种贮备液、蜕皮激素、JHA-ZR512和眼柄粗提液,用螯虾生理盐溶液进行逐级稀释成一定浓度备用。组织培养液为 HEPES-生理盐溶液,含青霉素钾6mg/100ml。在直径3cm 的小培养皿中加入2ml 激素液或眼柄粗提液,1ml 培养液。最终组织培养液中孕酮、 17α -羟孕酮和雌二醇的浓度各自分别为10pM 和1nM;蜕皮激素、JHA-ZR515、JHA-ZR512和眼柄粗提液浓度各自为1:100,000(1:10万)和1:100, HEPES 浓度为5nM。然后放入卵巢小块,培养皿置于 25 ± 0.5 ℃的水浴中培育24小时。同时设空白对照组,含卵巢小块和3ml 培养液,无激素。

1.4 卵巢组织切片制作

经24小时培育后的卵巢组织小块分别用 Kahle 氏液(福尔马林108ml、无水乙醇270ml、冰醋酸18ml、蒸馏水540ml)固定24小时,然后用70%乙醇漂洗24小时。按常规方法制成石蜡切片,伊红-苏木精染色。在光镜下观察,随机选择10个较大的卵母细胞进行卵径(长径)测量,计算平均值和标准差,并进行显著性检验(t 检验)。

2 结果

外源激素和眼柄粗提液对罗氏沼虾离体培育卵母细胞卵径的影响见表2。

试验中所用的两种孕激素,孕酮和 17α -羟孕酮,不论是低浓度(10pM)或高浓度(1nM)对罗氏沼虾卵黄发生前期卵巢和次级卵黄发生期卵巢均有刺激作用,使卵母细胞直径极显著增大($P<0.001$)。雌二醇仅在高浓度条件下,对卵黄发生前期卵母细胞卵径增大有极显著作用($P<0.01$);低浓度对卵母细胞卵径增大则无显著性($P>0.05$)。蜕皮激素无论是低浓度或高浓度对卵母细胞卵径增大均无显著性($P>0.05$)。两种类萜激素,其中 JHA-ZR515低浓度($1:10^5$)和高浓度($1:10^2$)组对各个发育时期的卵巢均有刺激作用,使卵母细胞直径极显著增大($P<0.01$)。JHA-ZR512在高浓度条件下,对成熟前卵巢卵母细胞卵径增大有显著作用($P<$

0.05); 低浓度对初级卵黄发生期卵母细胞卵径增大无显著性($P > 0.05$)。眼柄粗提液低浓度($1:10^5$)和高浓度($1:10^2$)组对罗氏沼虾初级卵黄发生期和成熟前卵巢有抑制作用,使卵母细胞卵径显著减小($P < 0.05$)。

表2 外源激素和眼柄粗提液对罗氏沼虾离体卵母细胞卵径的影响

Tab. 2 In vitro effects of exogenous hormones and eyestalk extracts on the oocyte diameters of *M. rosenbergii*

激素名称	浓度	卵巢小块	卵径(μm)	t 检验
孕酮	10pM	A	85.7 \pm 7.5	$P < 0.001(+)$
17 α -羟孕酮	10pM	A	109.2 \pm 2.2	$P < 0.001(+)$
雌二醇	10pM	A	79.9 \pm 10.1	$P > 0.05$
蜕皮激素	$1:10^5$	A	83.1 \pm 10.3	$P > 0.05$
JHA-ZR515	$1:10^5$	A	86.6 \pm 10.3	$P < 0.01(+)$
对照组	0	A	75.8 \pm 10.0	
孕酮	1nM	B	45.9 \pm 5.9	$P < 0.001(+)$
17 α -羟孕酮	1nM	B	46.2 \pm 3.8	$P < 0.001(+)$
雌二醇	1nM	B	39.1 \pm 3.7	$P < 0.01(+)$
蜕皮激素	$1:10^2$	B	35.7 \pm 2.6	$P > 0.05$
JHA-ZR515	$1:10^2$	B	38.2 \pm 3.3	$P < 0.01(+)$
对照组	0	B	34.5 \pm 3.0	
JHA-ZR515	$1:10^5$	C	61.6 \pm 9.3	$P < 0.001(+)$
JHA-ZR512	$1:10^5$	C	53.8 \pm 11.4	$P > 0.05$
眼柄粗提液	$1:10^5$	C	32.2 \pm 4.8	$P < 0.05(-)$
对照组	0	C	44.8 \pm 7.4	
JHA-ZR515	$1:10^2$	D	257.3 \pm 23.1	$P < 0.01(+)$
JHA-ZR512	$1:10^2$	D	245.9 \pm 40.4	$P < 0.05(+)$
眼柄粗提液	$1:10^2$	D	174.8 \pm 32.9	$P < 0.05(-)$
对照组	0	D	207.5 \pm 32.5	

注:表内括弧中的“+”号表示促进作用,“-”号表示抑制作用。

3 讨论

近年来有关激素在对虾卵母细胞卵黄发生的研究指出,两类化合物,即类固醇激素和类萜激素对卵巢有刺激作用。本研究证实17 α -羟孕酮和JHA-ZR515对卵巢有极显著的直接刺激作用,这与Tsukimura和Kamemoto[1991],发现17 α -羟孕酮、甲基法尼酸(methyl farnesoate)和保幼激素Ⅲ对范氏对虾离体卵巢有直接刺激作用相类似。本研究关于孕酮和雌二醇的刺激作用与Quackenbush[1992]在范氏对虾的结果基本一致,与罗氏沼虾情况相似,只有较大剂量的雌二醇(10^{-3} — 10^{-5})对范氏对虾离体卵巢卵黄合成有显著作用($P < 0.05$),而低剂

量雌二醇(10^{-6} — 10^{-9})则无作用;并发现孕酮的作用优于雌二醇。但在 Tsukimura 和 Kamemoto[1991]的研究中,孕酮对范氏对虾离体卵巢卵径增大无作用,这可能是由于所使用的剂量较低。相比较,孕酮对罗氏沼虾的有效剂量较范氏对虾(10^{-6} 以上)低得多。蜕皮酮(ecdysterone)对范氏对虾离体卵巢卵黄合成无作用[Quackenbush[1992],这与我们用蜕皮激素对罗氏沼虾离体卵母细胞卵径增大无作用相似。甲壳动物具有合成脊椎动物类型的类固醇激素的能力已在一些种类被证实,如刺螯虾(*Panularis japonica*)能将放射性标记的胆固醇在活体内转化成 17α -羟孕酮[Kanazawa 和 Teshima,1971];一种蟹(*Portunus trituberculatus*)的离体卵巢能将孕酮转化成 17α -羟孕酮[Teshima 和 Kanazawa,1971]。活体研究表明,给早期卵黄发生的日本对虾(*Penaeus japonicus*)注射 17α -羟孕酮,48小时后血清中卵黄蛋白原(Vg)浓度增加9.6倍,表明 17α -羟孕酮刺激 Vg 合成和释放进入血淋巴[Yano,1987]。作者在1993和1995年采用 17α -羟孕酮浸浴罗氏沼虾获得60%产卵率;给日本沼虾[虞冰如等,1990]和罗氏沼虾[李广丽、朱春华,1996]注射孕酮使产卵率显著提高。离体和活体研究结果表明,孕酮和 17α -羟孕酮可能是虾体内诱导卵母细胞生长和卵黄发生的自然激素。

人工合成的 JHA-ZR515和 JHA-ZR512具有昆虫保幼激素活性,两者的结构略有不同,生物学活力有差别。罗氏沼虾离体(本研究)和活体[魏 华、赵维信,1992;赵维信等,1995]研究表明,卵巢对 JHA-ZR515的反应很敏感,而高浓度 JHA-ZR512才对罗氏沼虾离体成熟前卵巢有作用。已知具成熟卵巢的美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)的大颚器和血淋巴中含有孕酮和雌二醇[Couch 等,1987],还发现多种十足目甲壳动物的大颚器合成和分泌甲基法尼酸[Laufer 等,1987;Borst 等,1987],而甲基法尼酸具有昆虫保幼激素的活力。这些研究结果提示,大颚器分泌的孕酮直接作用卵巢,孕酮可能在卵巢滤泡细胞(follicle cells)中被转化成 17α -羟孕酮作为一种卵黄蛋白原刺激卵巢激素(VSOH)或 VSOH 的前体,刺激滤泡细胞合成 Vg(Yano 和 Chinzei,1987),Vg 合成后立即被释放进入血淋巴,然后 Vg 再被卵巢吸收并积累在发育的卵母细胞中形成卵黄。尚不清楚大颚器分泌的类固醇激素(甲基法尼酸)在促进卵黄发生过程中究竟如何起作用?与类固醇激素的关系是什么?有待进一步研究。罗氏沼虾眼柄提取物对卵母细胞卵径增大有抑制作用,这与范氏对虾眼柄提取物抑制离体卵巢卵黄合成[Quackenbush,1992]相一致。表明罗氏沼虾眼柄提取物具有生殖腺抑制激素(GIH)活性,直接参与罗氏沼虾生殖腺发育调控。

参 考 文 献

- [1] 李永才(主编),1989.动物生理及比较生理实验,285—293.高等教育出版社(京)。
- [2] 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。
- [3] 赵维信等,1995.人工诱导罗氏沼虾同步产卵与卵巢组织学研究.水产学报,19(4):289—296。
- [4] 虞冰如等,1990.人工诱导青虾成熟和产卵.水产科技情报,(3):66—68。
- [5] 魏 华、赵维信,1992.保幼激素类似物及 17α -羟孕酮对罗氏沼虾的产卵作用.上海水产大学学报,1(1—2):66—70。
- [6] Borst, D. W. et al., 1987. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. *Insect Biochem.*, 17:1123—1127.
- [7] Couch, E. F. et al., 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americanus* with developing and immature ovaries. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 87:765—770.
- [8] Kanazawa, A. and S. Teshima., 1971. In vivo conversion of cholesterol to steroid hormones in the spiny lobster, *Panularis japonica*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 37:891—898.
- [9] Laufer, H. et al., 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science*, 235:202—

205.

- [10] Quackenbush, L. S., 1992, Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.*, A, **103**:711-714.
- [11] Teshima, S. and A. Kanazawa., 1971. Biocconversion of progesterone by the ovaries of crab, *Portunus trituberculatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **17**:152-157.
- [12] Tsukimura, B. and F. I. Kamemoto., 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp. *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **92**:59-66.
- [13] Yano, I., 1987. Effect of 17 α -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **61**:49-57.
- [14] Yano, I and Y. Chinzei., 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, B, **86**:213-218.

IN VITRO INDUCTION EFFECTS OF EXOGENOUS HORMONES AND EYESTALK EXTRACTS ON THE OOCYTES OF *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

Zhao Wei-xin and Jia jiang

(Shanghai Fisheries University, 200090)

An Miao

(Fisheries Research Institute of Guizhou Province
Guiyang 550000)

ABSTRACT The ovarian fragments of *Macrobrachium rosenbergii* in vitro incubation with four steroids, two juvenile hormone analogues (JHA) and extracts of eyestalk in have been conducted. At 25°C for 24h incubation, the diameters of maximum oocytes were measured under the light microscope. 17 α -hydroxyprogesterone, progesterone and JHA-ZR515 showed significant stimulation ($P < 0.01$) on oocyte diameter increase at the stages of previtellogenesis and vitellogenesis. High concentration of oestradiol had a significant stimulation ($P < 0.01$) on oocyte diameter increase at the previtellogenesis stage. Also high concentration of JHA-ZR512 stimulated ($P < 0.05$) oocyte enlargement at prematuration stage. Ecdysone did not affect oocyte diameter. Extracts of eyestalk showed a inhibition on oocyte at the vitellogenesis stage, oocyte diameter was decreased ($P < 0.05$). These results showed that the ovarian development of *M. rosenbergii* was stimulated directly by progestogen and juvenile hormone-like compounds.

KEYWORDS *Macrobrachium rosenbergii*, oocyte incubation *in vitro*, steroids, juvenile hormone analogues, eyestalk extracts