

文章编号: 1004 - 7271(2005)04 - 0460 - 04

·研究简报·

# 性早熟前后中华绒螯蟹血淋巴中总蛋白和 高密度脂蛋白水平的比较

## Comparisons on total protein and high-density lipoprotein level in hemolymph of *Eriocheir sinensis* before and after precocity

陈再忠, 成永旭, 王 武

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

CHEN Zai-zhong, CHENG Yong-xu, WANG Wu

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

关键词: 中华绒螯蟹; 性早熟蟹; 未成熟蟹; 血淋巴; 总蛋白; 高密度脂蛋白

Key words: *Eriocheir sinensis*; precocious crab; immature crab; hemolymph; total protein; high-density lipoprotein

中图分类号: S 917 文献标识码: A

研究发现, 在进入卵巢快速发育期后, 斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 卵巢中甘油三脂 (TG)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 和磷脂酰胆碱 (PC) 含量都有所升高, 而与此同时, 肝胰腺中的脂类 (主要是 TG 及 PC) 含量却下降<sup>[1]</sup>。这说明, 在卵母细胞发育期间, 肝胰腺中有一部分脂类转运到了卵巢。由于脂类不溶于水, 因而, 在血淋巴中必须与蛋白质结合, 以脂蛋白的形式转运。研究者已从甲壳动物的血淋巴中分离出了三种脂蛋白, 而它们都属于高密度脂蛋白 (HDL) 和极高密度脂蛋白 (VHDL)<sup>[2-13]</sup>, 其中一种高密度脂蛋白是雌性特有的蛋黄卵白源, 而其它两种高密度脂蛋白 (LP1 和 VHDL) 在两性中很普遍。

中华绒螯蟹在性早熟过程中, 血淋巴中的总蛋白以及高密度脂蛋白含量, 也可能有一定的变化规律; 而且, 目前关于雄性甲壳动物这方面的研究还比较少, 因此, 本实验对中华绒螯蟹性早熟前后血淋巴中总蛋白和高密度脂蛋白的含量进行了测定, 并计算和比较了两者的比值, 以期从中找出中华绒螯蟹性早熟过程中这方面存在的内在规律和两者的差异, 从而更好地阐释和控制性早熟现象。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

本实验自 2000 年 8 月至 11 月在上海崇明县富民农场进行。将当年大眼幼体培育成的幼蟹养殖在崇明县富民农场的池塘 (12 m<sup>2</sup>/个, 放养密度 50 只/m<sup>2</sup>) 内, 每 15 天换一次水, 晚上 5:00 投喂一次自行配

收稿日期: 2005-03-22

基金项目: 上海市教委重点学科资助项目 (B991602); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 陈再忠 (1973 -), 男, 安徽明光人, 博士, 主要从事集约化水产养殖和繁殖生物学研究。Tel: 021 - 65710883, E-mail: chenzz@shfu.edu.cn

通讯作者: 成永旭 (1964 -), 男, 河南济源人, 博士后, 主要从事水产动物增殖和营养繁殖学研究。E-mail: yxcheng@shfu.edu.cn。

制的颗粒饲料,投饵量为蟹重的 3%~5%。经过三个月的饲养,得到性早熟前后的雌雄蟹,运回校生态楼暂养 1 周,以备实验。

## 1.2 血淋巴总蛋白和高密度脂蛋白含量的测定

### 1.2.1 ACD 抗凝剂的制备

用 Hang Ping FA1104 天平准确称取柠檬酸三钠 1.32 g、柠檬酸 0.44 g、无水葡萄糖 1.47 g,置于三角烧瓶内,先用 70~80 °C 新鲜蒸馏水 100 mL 溶解,再加入 0.1~0.2 g 活性炭,搅拌后静置 10 min,定性滤纸过滤,贮存于 4 °C 冰箱中待用。

### 1.2.2 样品处理

从中华绒螯蟹第三步足基部关节处用 1.0 mL 注射器(4# 针头)抽取 0.5 mL 血淋巴,立即置于装有 0.5 mL ACD 抗凝剂的 1.5 mL PE 管内,混合均匀,置于 4 °C 冰箱中保存待测。

### 1.2.3 测定方法

总蛋白含量的测定 用日立 7150 型生化分析仪进行双缩脲法测定。

高密度脂蛋白(HDL)测定 利用 OLYMPUS AU1000 生化分析仪进行酶法(选择遮蔽法)分析。

## 1.3 数据分析

采用 Statistica/w 5.0 软件系统<sup>[14]</sup>进行显著性检验: $P > 0.05$ ,为差异不显著; $P < 0.05$ ,为差异显著; $P < 0.01$ ,为差异极显著。

## 2 结果

本实验对早熟和未成熟雌雄蟹血淋巴中的总蛋白和高密度脂蛋白的浓度进行了检测、计算,结果如表 1 所示。

表 1 性早熟前后雌雄蟹血淋巴中的总蛋白、高密度脂蛋白浓度

Tab.1 The concentrations of total protein and high-density lipoprotein in the hemolymph of *Eriocheir sinensis* before and after precocity

	样品数	体重 (g)	总蛋白 (g/L)	高密度脂蛋白 (g/L)	高密度脂蛋白/总蛋白 (%)
早熟雌蟹	30	24.202 ± 9.531 <sup>a</sup>	35.833 ± 12.460 <sup>a</sup>	0.206 ± 0.104 <sup>a</sup>	0.565 ± 0.224 <sup>a</sup>
未成熟雌蟹	36	9.501 ± 2.365 <sup>b</sup>	41.947 ± 8.985 <sup>b</sup>	0.245 ± 0.090 <sup>a</sup>	0.570 ± 0.135 <sup>a</sup>
早熟雄蟹	33	25.672 ± 6.910 <sup>a</sup>	45.000 ± 11.745 <sup>a</sup>	0.238 ± 0.110 <sup>a</sup>	0.521 ± 0.195 <sup>a</sup>
未成熟雄蟹	38	9.911 ± 2.428 <sup>b</sup>	39.632 ± 6.874 <sup>bc</sup>	0.236 ± 0.098 <sup>a</sup>	0.582 ± 0.173 <sup>a</sup>

注:表中同一列数据标注不同上标,表示差异显著( $P < 0.05$ )

在检测的四组蟹中,血淋巴总蛋白浓度的变化趋势为:早熟雄蟹 > 未成熟雌蟹 > 未成熟雄蟹 > 早熟雌蟹。进而,对四组蟹血淋巴总蛋白浓度进行的  $t$ -检验结果还表明:早熟雌蟹与早熟雄蟹差异极显著( $P < 0.01$ ),而早熟雄蟹与未成熟雄蟹、早熟雌蟹与未成熟雌蟹间也在统计学上差异显著( $P < 0.05$ )。

血淋巴中高密度脂蛋白浓度在早熟雌蟹与未成熟雌蟹、早熟雄蟹与未成熟雄蟹间的的变化趋势与以上总蛋白浓度的变化趋势完全一致,即早熟雄蟹 > 未成熟雄蟹 > 未成熟雌蟹 > 早熟雌蟹。不过, $t$ -检验结果表明:早熟雄蟹、早熟雌蟹、未成熟雄蟹和未成熟雌蟹间均显著不差异( $P > 0.05$ )。

另外,高密度脂蛋白在总蛋白中的比例虽然在四组蟹中有一个从未成熟雄蟹到未成熟雌蟹、早熟雌蟹和早熟雄蟹的下降趋势,但其值相差不太大,基本趋于一致。而且  $t$ -检验结果也表明,四者都均差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 血淋巴总蛋白含量

##### 3.1.1 早熟雌蟹和未成熟雌蟹的比较

在本试验中,早熟雌蟹中血淋巴总蛋白含量(35.833 g/L)显著低于未成熟雌蟹(41.947 g/L),这是与其它甲壳动物中的研究结果相一致的<sup>[15,16]</sup>。通常情况下,未成熟个体在生长过程中,代谢较为旺盛,摄入的外源蛋白质不断被肠道消化吸收进入血淋巴,再运送到各组织中用于生长、代谢和储存,这样,血淋巴蛋白不断积累从而达到比较高的水平;进入性腺发育阶段,由于摄食活动减弱,体内的外源蛋白质摄入减少,而与此同时,卵原细胞的生长和卵母细胞的卵黄积累都需要消耗大量的蛋白质,以参与细胞骨架和卵黄蛋白的形成,这样,外源蛋白质不足以满足性腺发育和机体代谢的需要,从而导致血淋巴中总蛋白水平下降。

##### 3.1.2 早熟雄蟹和未成熟雄蟹比较

在本试验中,早熟雄蟹血淋巴中的总蛋白含量为 45.000 g/L,显著高于未成熟雄蟹的血淋巴总蛋白含量(39.632 g/L),这一结果正好与雌蟹中的情况相反。这表明:雄蟹在性腺发育过程中,虽然也需要消耗大量蛋白质用于细胞骨架的形成和激素的分泌,但并不象雌蟹那样消耗大量的蛋白质合成卵黄蛋白,因此总的蛋白消耗量相对较少,而且低于机体内的蛋白积累和合成水平。这也从另一方面表明:雄性精巢的发育程度与血淋巴总蛋白浓度可能没有内在的必然联系<sup>[16]</sup>。

##### 3.1.3 早熟雌蟹和早熟雄蟹比较

本试验发现:早熟雌蟹血淋巴中总蛋白水平显著低于早熟雄蟹,这一结果与吴嘉敏和姜新耀<sup>[16]</sup>的结论相似。

一般而言,动物的性腺开始发育时,蛋白质的需求和消耗会迅速增加。对于雌蟹,不仅性腺发育需要消耗蛋白质用于细胞膜的形成,而且更大量的蛋白质是用于卵黄蛋白的形成。相比之下,雄蟹虽然也消耗部分蛋白质用于细胞构架,但摄入的蛋白质足以补充这一部分,且仍然可以在血淋巴中富集。这反映了雌雄蟹在性腺发育过程中对血淋巴蛋白利用情况的不同。

#### 3.2 血淋巴高密度脂蛋白含量

##### 3.2.1 早熟雌蟹和未成熟雌蟹的比较

雌蟹在发育过程中,脂类物质不断在肝胰腺中积累,磷脂运输至血淋巴中形成高密度脂蛋白再分布于各组织。营养物质在肝胰腺中积累到一定量时,卵母细胞开始发育,虽然肝胰腺中的脂类物质在血淋巴中又形成了高密度脂蛋白,仅少量补充了因卵巢发育而大量利用的高密度脂蛋白。因此,早熟雌蟹的高密度脂蛋白量(0.206 g/L)比未成熟雌蟹的(0.245 g/L)少,但差异不显著( $P > 0.05$ )。

##### 3.2.2 早熟雄蟹和未成熟雄蟹的比较

实验表明,早熟雄蟹血淋巴中高密度脂蛋白的浓度(0.238 g/L)略高于未成熟雄蟹(0.236 g/L)。这可能是因为在性腺发育时,其精母细胞不需要消耗大量的高密度脂蛋白,而同时在生长过程中又可从饵料中不断获得脂类物质,而与蛋白质结合形成高密度脂蛋白,在血淋巴中不断富集,从而出现本实验的研究结果。

##### 3.2.3 早熟雌蟹和早熟雄蟹的比较

中华绒螯蟹从饵料中获得的磷脂与蛋白质结合形成高密度脂蛋白。雌蟹在卵巢发育过程中大量利用高密度脂蛋白,而雄蟹在精巢发育时仅利用少量的高密度脂蛋白,从而早熟雌蟹的高密度脂蛋白量(0.206 g/L)比早熟雄蟹的(0.238 g/L)少。

#### 3.3 高密度脂蛋白/总蛋白的比值

肝胰腺是脂类储存和对脂类进行加工的主要器官<sup>[15,17,18]</sup>,是脂类代谢中心,它对甲壳动物的生长和发育以及生殖都有举足轻重的作用。在河蟹生长前期,性腺没有进入快速发育期,其摄食的营养成分

主要贮存在肝胰脏,其营养成分经血淋巴运输。随着生长发育,当营养积累到一定程度即进入卵黄形成过程中后,肝胰腺的这些脂类就通过血淋巴不断的运入正在发育的卵母细胞内;中性脂以脂肪滴的形式弥布于各部分卵质中,而磷脂则结合在卵黄体内。而且,由于脂类(主要是磷脂)的疏水性,它们在河蟹血淋巴中与蛋白质结合而以高密度脂蛋白的形式运输。这样,早熟雌蟹血淋巴中总蛋白水平不断降低,同时,高密度脂蛋白也不断在脂类运输中被利用。从表 1 中可以看出,尽管早熟与未成熟雌蟹血淋巴中的总蛋白和高密度脂蛋白水平都有差异,但高密度脂蛋白占总蛋白的比例在两者间却没有显著差异,说明两者以一定的比例下降。

早熟雄蟹高密度脂蛋白占总蛋白比例(0.521%)和未成熟雄蟹的 0.582% 没有显著差异。然而,表 1 显示出雄性与雌性相反的变化趋势:雄蟹在性早熟后血淋巴中总蛋白和高密度脂蛋白水平都明显高于未成熟个体,而早熟雌蟹血淋巴中总蛋白和高密度脂蛋白水平却明显下降,但高密度脂蛋白占总蛋白的比例在性早熟前后在两种性别中却趋于一致,即:早熟雌蟹低于未成熟雌蟹、早熟雄蟹低于未成熟雄蟹,这表明:无论是雄蟹还是雌蟹,在进入性成熟阶段后,虽然血淋巴中总蛋白和高密度脂蛋白水平有所上升或下降,但总蛋白中的高密度脂蛋白含量仍然维持在一定比例。

#### 参考文献:

- [1] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S, *et al.* Effects of dietary phospholipids and n-3 high unsaturated fatty acid on ovarian development of kuruma prawn[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1993, 59(2): 345-351.
- [2] Lee R F, Puppione D L. Serum lipoprotein in the spiny lobster, *Panulirus interuptus*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1978, 59B: 239-243.
- [3] Teshima S, Kanazawa A. Transport of dietary lipids and role of serum lipoprotein in the prawn[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1980, 46(1): 51-55.
- [4] Teshima S, Kanazawa A. Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1980, 46(1): 57-62.
- [5] Puppione D L, Jensen D F, O'Connor J D. Physicochemical study of rock crab lipoproteins[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 875: 563-568.
- [6] Spaziani E, Havel R J, Hamilton R L, *et al.* Properties of serum high-density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1986, 85B: 307-314.
- [7] Lee R F, Puppione D L. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: lipoprotein II associated with vitellogenesis[J]. *J Exp Zool*, 1988, 248: 278-289.
- [8] Lee R. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates[J]. *Adv Comp Environ Physiol*, 1991, 7: 187-207.
- [9] Chen C C, Chen S N. Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant prawn *Penaeus monodon*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1993, 106B: 141-146.
- [10] Komatsu M, Ando S, Teshima S I. Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of crustacean[J]. *J Exp Zool*, 1993, 266: 257-265.
- [11] Hall M, Vanheusden M C, Soderhall K. Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216: 939-946.
- [12] Lubzens E, Ravid T, Khayat M, *et al.* Isolation and characterization of the high-density lipoproteins from the hemolymph and ovary of the Penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus*(de Haan): apoproteins and lipids[J]. *J Exp Zool*, 1997, 278(6): 339-348.
- [13] Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Higuera-Ciapara I. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins[J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 177-189.
- [14] StatSoft Inc. STATISTICA for Windows (Computer program manual)[M]. Tulsa, OK: StatSoft Inc, 1995.
- [15] Vogt G, Storch V, Quinto E T, *et al.* Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda)[J]. *Aquaculture*, 1985, 48: 1-2.
- [16] 吴嘉敏,姜新耀. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺的总蛋白含量与性早熟的关系[J]. *水产学报*, 2000, 24(4): 306-311.
- [17] Luzzi R F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscles network[J]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1971, 113: 420-440.
- [18] Mikami S, Greenwood J G. Functional morphology and cytology of the phyllosomal digestive system of *Sivacus ciliatus* and *Panulirus japonicus* (Decapoda)[J]. *Crustaceana*, 1994, 67: 212-225.