

文章编号: 1004 - 7271(2008)03 - 0268 - 06

## 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

沈蓓杰, 杨筱珍, 吴旭干, 常国亮, 成永旭

(上海水产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 200090)

**摘要:**通过观察性腺指数、性腺颜色和卵母细胞长径的变化来评价17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹卵巢发育的影响。分别用 $10^{-5}$  mg/g和 $10^{-1}$  mg/g剂量17 $\alpha$ -羟基孕酮注射性腺发育即将启动的性早熟中华绒螯蟹(九月初),共注射2次,间隔时间为15 d。研究发现:17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹外部特征(壳长和壳宽)没有明显影响,但较高剂量组 $10^{-1}$  mg/g剂量组能明显促进性早熟中华绒螯蟹卵巢的早期发育(15 d),卵巢指数和卵母细胞长径均比对照组有显著性增高( $P < 0.05$ )。本实验结果表明,外源给予孕酮能促进性早熟中华绒螯蟹性腺的早期发育。

**关键词:**性早熟中华绒螯蟹; 17 $\alpha$ -羟基孕酮; 卵巢发育

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Preliminary study on the effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone on main features and ovarian growth of precocious *Eriocheir sinensis*

SHEN Bei-jie, YANG Xiao-zhen, WU Xu-gan, CHANG Guo-Liang, CHENG Yong-xu  
(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Fisheries University,  
Ministry of Education, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Use of gonado-somatic index (GSI), the change of color of gonad and the diameter of the oocytes were employed for evaluating of the effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone on main features and ovarian growth of precocious *Eriocheir sinensis*. The precocious *Eriocheir sinensis* with immature gonad (collected in Sept. ), were injected with 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone at the doses of  $10^{-5}$  and  $10^{-1}$  mg/g on the beginning and on the 15th day of experiment. Results showed that: no significant changes of main features (the length and width of carapace) in precocious *Eriocheir sinensis* were observed by administering 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone. For the precocious *Eriocheir sinensis* that received the high dose of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone ( $10^{-1}$  mg/g), GSI and the diameter of the oocytes were increased significantly ( $P < 0.05$ ) in comparison with the control group. 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone mainly induces early ovarian development. From the results, it is clear that the exogenous hydroxyprogesterone induces ovarian growth in the precocious *Eriocheir sinensis*.

收稿日期: 2007-04-05

基金项目: 上海市科委基础研究重点项目(04JC14067); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字2005D4-3); 国家自然科学基金(399002); 上海市博士启动资金(05-212); 上海市重点学科建设项目(Y1101); 上海市优青基金(170401)

作者简介: 沈蓓杰(1983-), 男, 江苏南京人, 硕士研究生, 专业方向为水生动物生殖生理。Tel: 021-65711346, E-mail: aaweaawe2002@yahoo.com.cn

通讯作者: 成永旭, Tel: 021-65711346, E-mail: yxcheng@shfu.edu.cn

**Key words:** precocious *Eriocheir sinensis*; 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone; ovarian growth; main feature

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹,是我国重要的甲壳类经济动物,也是我国甲壳类动物养殖业的支柱产业之一。近几年有关中华绒螯蟹的性早熟给中华绒螯蟹养殖产业所带来的严重危害已越来越受到重视<sup>[1-3]</sup>。但有关中华绒螯蟹性早熟形成的机理还不十分清楚。目前已有大量报道发现外源雌激素能促进甲壳类动物的性腺发育<sup>[4-6]</sup>,而国内近期的研究也发现性早熟中华绒螯蟹内源性雌激素明显高于同期正常蟹<sup>[3]</sup>,而有关外源雌激素对性早熟中华绒螯蟹性腺发育有何影响还不清楚,本研究将观察外源17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹卵巢发育影响,为弄清雌激素在中华绒螯蟹性早熟中的作用奠定基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物饲养

2006年9月初从江苏南通莱亚养殖场购一龄,刚完成生殖脱壳,卵巢发育即将启动的性早熟中华绒螯蟹<sup>[7-8]</sup>135只,体重约为(16.2 $\pm$ 2)g。暂养两天后,分别养于14个水族箱中(120cm $\times$ 55cm $\times$ 75cm),平均每个水族箱放养10只<sup>[9]</sup>,水位高约15cm。水源为充分曝气48h以上的自来水,自然水温,自然光照饲养。水中堆放瓦片或大片PC管便于蟹体躲藏。每天投喂新鲜田螺肉一次。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。

### 1.2 试验分组及药物处理

试验分为3组,每组45只,实验共进行30d,共注射2次,取样3次,每次取样各组取样只数为15只。试验组为2组,以蓖麻油和苯甲酸苄酯(1:1.7)作佐剂将17 $\alpha$ -羟基孕酮(Sigma公司)分别配成浓度为10<sup>-1</sup>mg/g和10<sup>-5</sup>mg/g溶液,对照组为佐剂对照组(注射同样体积的佐剂)<sup>[4]</sup>。注射激素时,每次用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相应浓度溶液10 $\mu$ L入肌肉中,第1次注射记为0d,隔15d后又注射1次,共注射2次。

### 1.3 试验取样和组织学观察

在0、10和30d将各组中15只蟹处死,测量壳长和壳宽(精确度0.1mm)。将卵巢取出后称重,计算卵巢指数(GSI%),卵巢指数=卵巢重(g)/体重(g) $\times$ 100%。

卵巢取出后,先进行形态与颜色初步观察,然后于Bouin氏液固定24h,经常规脱水、透明、石蜡包埋和5 $\mu$ m厚连续切片,常规H.E染色,OlympusBH-2显微镜观察拍照。参考薛鲁征等<sup>[10]</sup>对正常中华绒螯蟹卵巢的分期方法,我们将早熟中华绒螯蟹卵巢发育分为三个阶段:第1阶段为卵巢发育早期相当于正常蟹I期和II期卵巢,卵巢呈乳白色细带状;第2阶段为卵巢发育期相当于正常蟹III期卵巢,卵巢呈淡黄或土黄色;第3阶段相当于正常蟹的IV期和V期,卵巢呈橘红色,卵粒极为明显,待产卵。统计各期卵巢中25个卵母细胞卵径<sup>[4]</sup>,依据Medina等<sup>[11]</sup>的方法,统计切片中有核卵母细胞的长径,每期卵巢各重复3~5个样品。

### 1.4 数据分析

采用SPSS13.0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ANOVA对实验结果进行方差分析,采用Tukey氏法进行多重比较,取 $P < 0.05$ 为差异显著,在EXCEL上绘制相关图表。

## 2 结果

### 2.1 主要体征变化

经二次注射不同剂量17 $\alpha$ -羟基孕酮后,性早熟中华绒螯蟹主要体征壳长和壳宽与对照组没有明显

不同( $P > 0.05$ ),并且从 0 天至 30 天间,各组中华绒螯蟹壳长和壳宽也没有明显变化(表 1、2)。

表 1 17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹壳长影响 (cm) ( $\bar{x} \pm SD, n = 15$ )

Tab.1 The effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone on the length of carapace of precocious *Eriocheir sinensis*

药物浓度 (mg/g)	天数 (d)		
	0	15	30
对照组	3.23 $\pm$ 0.21	3.12 $\pm$ 0.16	3.02 $\pm$ 0.11
10 <sup>-1</sup>	3.18 $\pm$ 0.17	3.19 $\pm$ 0.17	2.83 $\pm$ 0.12
10 <sup>-5</sup>	3.12 $\pm$ 0.21	3.13 $\pm$ 0.18	3.08 $\pm$ 0.14

表 2 17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹壳宽的影响 (cm) ( $\bar{x} \pm SD, n = 15$ )

Tab.2 The effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone on the width of carapace of precocious *Eriocheir sinensis*

药物浓度 (mg/g)	天数 (d)		
	0	15	30
对照组	3.44 $\pm$ 0.18	3.59 $\pm$ 0.54	3.12 $\pm$ 0.2
10 <sup>-1</sup>	3.2 $\pm$ 0.48	3.23 $\pm$ 0.19	3.31 $\pm$ 0.2
10 <sup>-5</sup>	3.3 $\pm$ 0.18	3.34 $\pm$ 0.19	3.12 $\pm$ 0.17

### 2.2 卵巢外部特征和性腺指数

每次取材将卵巢取出后,进行形态与颜色初步观察后发现,对照组和给药组第 1 次注射时即 0 d,卵巢均呈乳白色细带状,为卵巢发育的第 1 阶段。注射 15 d 后,对照组和 10<sup>-5</sup> mg/g 组卵巢均呈土黄色或深土黄色,卵巢发育为第 2 阶段,而此时 10<sup>-1</sup> mg/g 组卵巢发育为第 3 阶段。到 30 d 后各组卵巢均呈橘红色为卵巢发育的第 3 阶段。

从 0 至 30 d 各组性早熟中华绒螯蟹性腺指数均有明显增高趋势,但各组性腺指数增高趋势较为一致,但在 17 $\alpha$ -羟基孕酮 10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组,性腺指数增高在第 1 次注射后较为明显,与对照组和 10<sup>-5</sup> mg/g 剂量组有显著差异( $P < 0.05$ )。第 1 次注射后性早熟中华绒螯蟹性腺指数有随 17 $\alpha$ -羟基孕酮作用剂量升高而升高的趋势。但第 2 次注射后即 15 天后,各组间性腺指数无明显变化(图 1)。

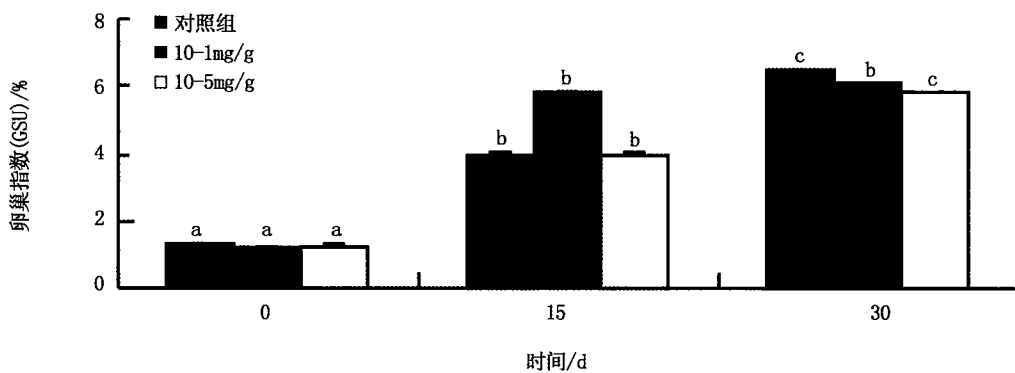


图 1 不同 17- $\alpha$  羟基孕酮剂量对性早熟中华绒螯蟹卵巢指数的影响

Fig.1 The effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone at different doses on gonad index of precocious *Eriocheir sinensis*

注:柱上不同字母代表同一组在不同天数间差异显著( $P < 0.05$ )

### 2.3 卵巢组织结构观察

对不同剂量组 17 $\alpha$ -羟基孕酮和对照组卵巢组织结构进行光镜观察后发现:10<sup>-5</sup> mg/g 剂量组卵巢结构在 30 d 的发育中与对照组基本保持一致,而 10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组与对照组卵巢发育有较大不同。对 10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组与对照组卵母细胞长径进行统计后发现,在 15 d 时 10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组卵母细胞长径(209.29  $\pm$  12.84  $\mu$ m)约为对照组(74.52  $\pm$  12.84  $\mu$ m)的 3 倍,两组间有显著差异( $P < 0.05$ )(图 2)。对

10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组和对照组卵巢组织结构进行观察发现:结缔组织外膜伸入卵巢组织,将卵巢组织分割成许多个小区,性早熟中华绒螯蟹 0 d 卵巢可见明显的生发小区(图版-1, \*),小区内分布大量滤泡细胞、卵原细胞和卵黄合成早期的卵母细胞,卵黄合成早期的卵母细胞长径约为(34.75 ± 7.86)  $\mu\text{m}$ ,胞质较少且嗜碱性较高(图版-1, 箭头),而在近卵巢外膜处的卵母细胞,胞体较大已达到(78 ± 12.07)  $\mu\text{m}$ ,胞质嗜酸性增强(图版-1, 黑三角)。15 d 后对照组卵巢组织卵母细胞逐渐增大,近中央与外周的卵母细胞直径分别约为(37.5 ± 10.34)  $\mu\text{m}$  和(113.18 ± 14.37)  $\mu\text{m}$ ,此时的滤泡细胞已向卵母细胞周围迁移(图版-2, 箭头),10<sup>-5</sup> mg/g 剂量组卵巢组织形态与对照组相似(图版-3),而注射 17 $\alpha$ -羟基孕酮 10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组卵巢组织主要以近成熟的卵母细胞组成,卵母细胞长径可达到(209.29 ± 12.84)  $\mu\text{m}$ ,胞质中充满大量卵黄颗粒,此时的卵黄颗粒直径约为(10.37 ± 3.15)  $\mu\text{m}$ (图版-4)。30 天后对照组、10<sup>-5</sup> mg/g 和 10<sup>-1</sup> mg/g 剂量组卵巢组织均已发育到近成熟阶段,卵巢中的卵母细胞长径均为 200  $\mu\text{m}$  左右,胞浆更加嗜酸性,卵黄颗粒体积进一步增大,长径已达(17.1 ± 13.25)  $\mu\text{m}$ (图版-5 ~ 7)。

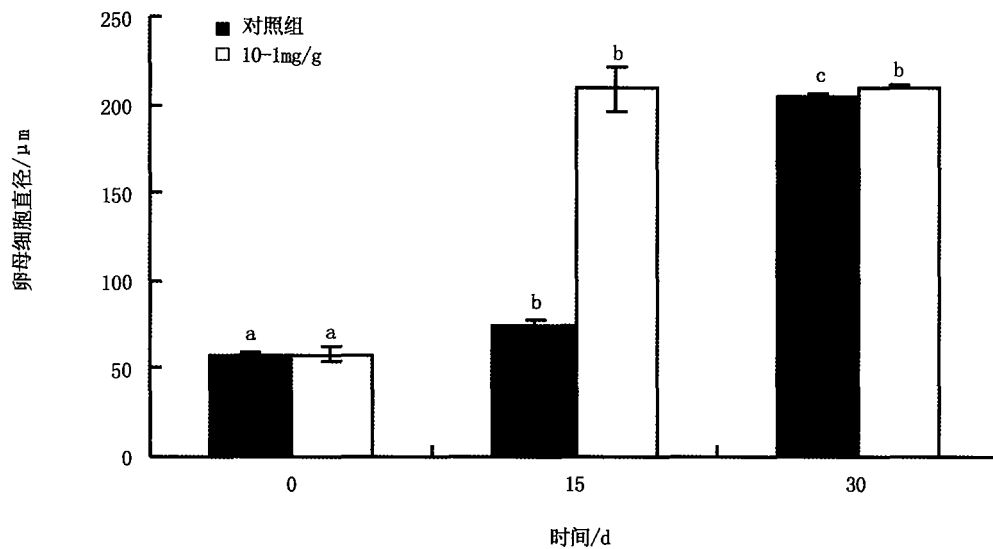


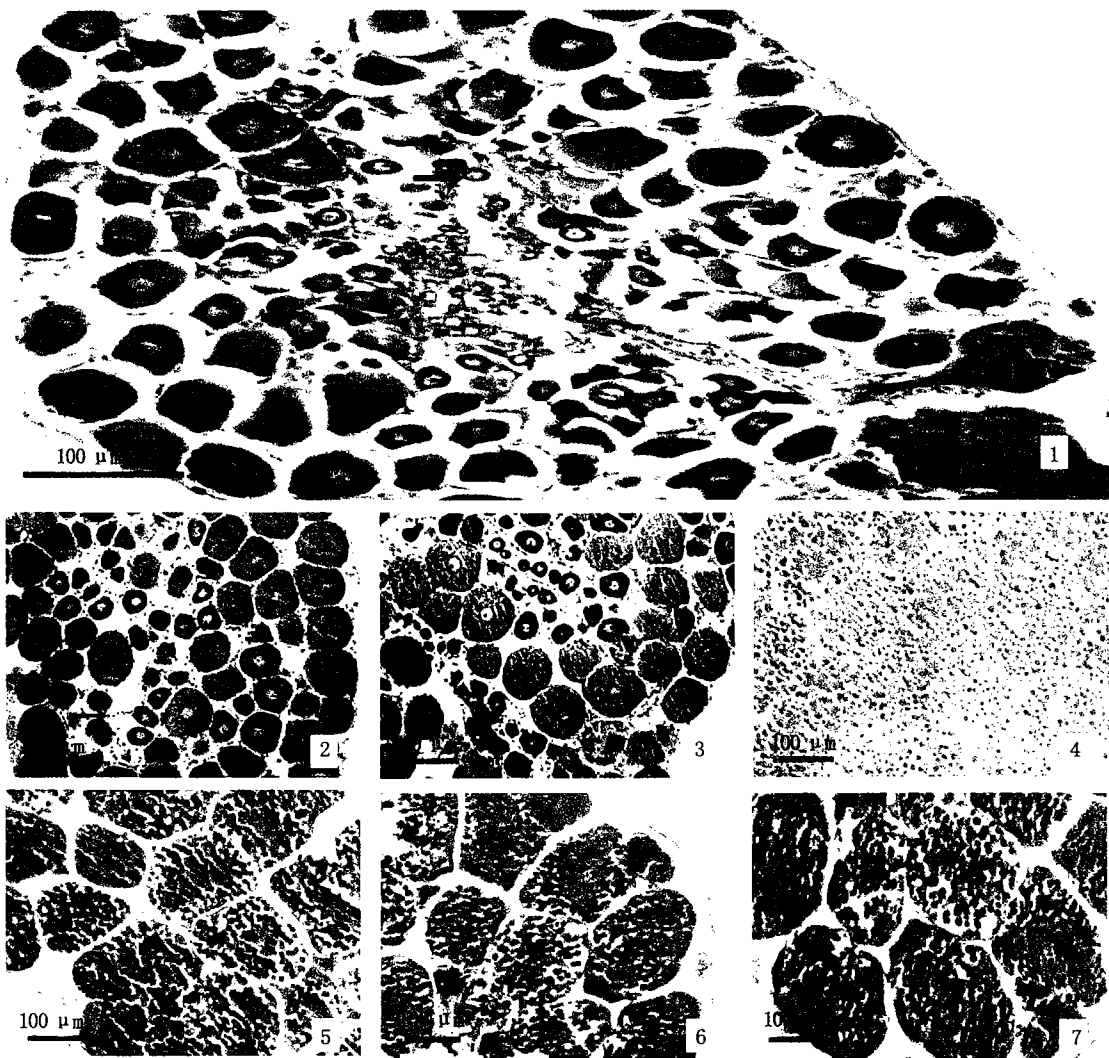
图2 10<sup>-5</sup> mol/crab 剂量 17- $\alpha$  羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹卵母细胞长径的影响

Fig. 2 The effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone at 10<sup>-5</sup> mol/crab dose on the diameter of the oocytes of precocious *Eriocheir sinensis*  
注:柱上不同字母代表同一组在不同天数间差异显著( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

中华绒螯蟹是我国特有的甲壳类经济动物。随着人工养殖河蟹的推广,在各地养殖过程中普遍发生一龄蟹性早熟现象。性早熟蟹是指幼蟹培育过程中性腺当年发育成熟,比正常的性成熟年龄提早 1 年,早熟蟹的产生直接制约了河蟹养殖业的发展,给生产带来了巨大损失<sup>[1]</sup>。导致河蟹性早熟发生的机制非常复杂,其真正的机理还不清楚。目前已有越来越多的学者关注内分泌调节在甲壳类动物性腺发育过程中所起到的调节作用<sup>[12-13]</sup>。这些研究发现内源性雌激素与性腺发育有明显的相关性,在河蟹性早熟过程中也发现性早熟河蟹血清中雌二醇含量明显比正常河蟹高<sup>[3]</sup>,说明内源性雌激素与性早熟的形成密切相关,而有关外源雌激素对早熟中华绒螯蟹性腺发育有何影响还不清楚。

观察性腺指数、性腺颜色和卵母细胞长径的变化是判断甲壳类动物卵巢发育状况和发育阶段的常用方法之一<sup>[4,14-15]</sup>,本研究就是通过这样的观察来评价外源雌激素-17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹卵巢发育的影响。有关外源激素对甲壳类动物性腺发育的影响,目前说法不一,Rodriguez 等<sup>[16]</sup>研究发现 17 $\alpha$ -羟基孕酮和 17 $\beta$ -雌二醇能抑制克氏原螯虾 (*P. clarkii*) 生殖系统发育,而 Andersen 等<sup>[17]</sup>认为雌



图版 17- $\alpha$  羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹卵巢组织结构的影响

Plate The effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone on ovarian histological structure of precocious *Eriocheir sinensis*

1. 0 d 对照组卵巢, 中央为生发带 (\* 示), 卵黄合成早期卵母细胞(箭头示), 卵巢周边卵母细胞(黑三角示); 2. 15 d 对照组卵巢, 滤泡细胞(箭头示); 3. 15 d  $10^{-5}$  mg/g 剂量组卵巢; 4. 15 d  $10^{-1}$  mg/g 剂量组卵巢; 5. 30 d 对照组卵巢; 6. 30 d  $10^{-5}$  mg/g 剂量组卵巢; 7. 30 d  $10^{-1}$  mg/g 剂量组卵巢

激素能促进甲壳类动物性腺成熟和产卵。在对拟对虾属的海对虾(*Parapenaeopsis hardwickii*)和裹肢蟹属的淡水蟹(*Oziotelphusa senex senex*)<sup>[4]</sup>的研究中均发现孕酮能明显促进卵巢发育。我们的研究也发现17 $\alpha$ -羟基孕酮对性早熟中华绒螯蟹外部特征(全壳长和全壳宽)没有明显影响,但较高剂量组 $10^{-1}$  mg/g剂量组能明显促进性早熟中华绒螯蟹的卵巢发育,并主要对性早熟中华绒螯蟹卵巢发育早期的影响较为明显。虽然本研究的结果与Reddy等<sup>[4]</sup>在对裹肢蟹属的淡水蟹研究相似,但也有不同之处,如外源给予两种剂量17 $\alpha$ -羟基孕酮( $10^{-8}$ 和 $10^{-7}$  mol/crab)均能明显促进裹肢蟹属的淡水蟹卵巢发育,卵巢指数和卵母细胞长径均比对照组高。究其原因可能有以下几个方面:(1)可能由蟹种类和规格不同造成。裹肢蟹属的淡水蟹( $32 \pm 2$  g)比性早熟中华绒螯蟹体重( $16.2 \pm 2$  g)大,而卵母细胞直径(最大的仅为65~80  $\mu$ m)却比性早熟中华绒螯蟹(200  $\mu$ m以上)小。(2)可能与蟹性腺发育所处状态不同有关。Reddy等<sup>[4]</sup>选用的是卵巢未启动期的裹肢蟹属的淡水蟹,故实验前后对照组性腺指数基本保持不变约为0.068 2%,而本实验所选用的是即将启动而尚未启动的性早熟中华绒螯蟹,因此本实验开始后对照

组的卵巢组织也出现了逐步的发育,由 0 d 的 1.3% 升高到 30 d 的 6.5%。(3)可能与给药途径不同有关。Reddy 等<sup>[4]</sup>对褙肢蟹属的淡水蟹给药时间是每间隔 7 d 注射 1 次,整个给药时间为 35 d。综上所述,我们支持外源雌激素对不同甲壳类动物性腺发育影响不一致与动物种类和动物所处条件不一致的观点。

#### 参考文献:

- [1] 金 刚,李钟杰,方榕乐,等. 早熟河蟹的养殖生态学及渔业价值评估[J]. 水生生物学报,1998,22(2):143-1471.
- [2] 张列士,徐琴英. 自然及养殖水体河蟹性成熟和性早熟的研究[J]. 水产科技情报,2001,28(3):106-1111.
- [3] 魏 薇,魏 华,刘 青. 中华绒螯蟹体内的雌二醇对性早熟的影响[J]. 水产学报,2005,9(6):862-865.
- [4] Reddy P R, Kiranmayi 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,2006,254:768-775.
- [5] Yane I. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp, *Metapenaeus nensis*, by progesterone[J]. Aquaculture,1985,47:223-229.
- [6] Yane I. Effect of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*[J]. Aquaculture,1987,61:49-57.
- [7] 李晨虹,王成辉,李思发. 中华绒螯蟹性早熟的早期判别[J]. 水产科技情报,1998,25(2):73-76.
- [8] 金 刚,李钟杰. 一秋龄性成熟中华绒螯蟹的生物学——1. 外部形态特征及性腺变化[J]. 湖泊科学,1999,11(1):52-56.
- [9] 于志勇,吴旭干,成永旭,等. 中华绒螯蟹第二次卵巢发育期间卵巢和肝胰腺中主要生化成分的变化[J]. 水生生物学报,2007,31(6):45-52.
- [10] 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.
- [11] Medina A, Vila Y, Mourente G, et al. A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775)[J]. Aquaculture,1996,148:63-75.
- [12] 姜仁良,谭玉钧,吴嘉敏,等. 中华绒螯蟹血淋巴中 20-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.
- [13] Warriar S R, Tirumalai 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,2001,130A:283-294.
- [14] Haley S R. Reproductive cycling in the ghost crab, *Ocypode quadrata* (Fabricius) (Brachyura; Ocypodidae)[J]. Crustaceana,1972,23:1-11.
- [15] Chandran M R. Studies on the crab, *Charybdis variegata*: I. Reproduction and maturation cycle in relation to breeding periodicities[J]. Proc Indian Acad Sci,1968,67:215-223.
- [16] Rodriguez E M, Lopez-Greck L S, Medesani D A, et al. Effects of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis[J]. Gen Comp Endocrinol,2002,125:34-40.
- [17] Kulakarni G K, Nagabhushanam R, Joshi P K. Effect of progesterone on ovarian maturation in a marine penaeid prawn *Parapenaeopsis hardwickii*[J]. Indian J Exp Biol,1979,17:986-987.