

生物胺对锯缘青蟹大颚器发育的调节作用^{*}

叶海辉^{1,2} 李少菁¹ 李祺福² 黄辉洋¹ 王桂忠¹

(¹ 厦门大学海洋系 厦门 361005)

(² 厦门大学生命科学学院细胞生物研究室 厦门 361005)

提要 雌性锯缘青蟹(*Scylla serrata*)于实验的第1天、第5天、第10天,分别注射100 μ L剂量为1 μ g/g体质量的5-HT、OA和DA,第15天解剖。结果表明,5-HT对锯缘青蟹大颚器发育具有显著的促进作用,OA和DA的作用不明显。经免疫细胞化学检测,大颚器内存在5-HT免疫阳性细胞,免疫阳性细胞多数为卵圆形,少数具有很长的胞突,该结果首次为5-HT参与大颚器的生理活动提供了形态学证据。

关键词 生物胺, 大颚器, 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)

中图分类号 Q45 **文献标识码** A **文章编码** 1000-3096(2003)04-0035-03

甲壳动物的大颚器(mandibular organ)又称为大颚腺,与昆虫的咽侧体(corpora allata)为同功器官,分泌的法呢烯酸甲酯(methyl farnesoate, MF)为昆虫保幼激素Ⅲ的非环氧化形式。MF能够刺激多种甲壳动物的蛋白质合成、蜕皮活动、性腺发育、形态发生和交配活动,已被确认为体内的一种重要激素^[1]。有关大颚器结构与功能的研究,已经成为甲壳动物内分泌学的一个研究热点。

生物胺广泛分布于动物体内,是一类重要的生命调节物质。生物胺对甲壳动物神经器官和蜕皮腺分泌活动的研究已有不少报道,而对大颚器影响作用的研究极少,仅见 Homola 等^[2]报道了5-HT、OA和DA对蜘蛛蟹(*Libinia emarginata*)大颚器MF合成的影响。锯缘青蟹是我国重要的海洋经济蟹类,开展生物胺生理作用的研究,对于了解锯缘青蟹生长、生殖的内分泌调节过程,以及规模化全人工培育调控技术的开发具有重要的意义。本文报道了生物胺对锯缘青蟹大颚器发育的调节作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、章鱼胺(octopamine, OA)为Sigma公司产品,多巴胺(dopamine, DA)为Fluka公司产品。5-HT、OA和DA溶液均由PBS(0.01 mol/L,含0.9% NaCl, pH7.4)配制而成。兔抗5-HT抗体、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物

酶试剂盒为美国Zymed公司产品, DAB为Sigma公司产品。

1.2 活体注射

雌性锯缘青蟹体长为64~65 mm, 体重160~174 g, 于2000年5月和2001年5月分批购自厦门农贸市场, 同批青蟹来自同一个养殖场, 为同期发育青蟹。暂养于水泥池(1 m×1 m×1 m), 搭盖蟹窝, 培养密度2~3只/m², 水深10 cm, 水温为21.4~22.7℃, 盐度为24~26, 充气泵用节电开关控制充气, 每日投喂鲜活的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*), 定期换水去污。

实验分5组, 每组5只锯缘青蟹。起始对照组(IC组)于实验第1天解剖; 同步对照组(PBS组), 于实验的第1天、第5天和第10天, 每只动物注射100 μ L的PBS, 注射部位为第5步足基节, 第15天解剖; 5-羟色胺组(5-HT组)、章鱼胺组(OA组)、多巴胺组(DA

^{*} 福建省重中之重项目“福建省海洋生物优良种质和生物活性物质的应用基础研究”; 高等学校博士学科点专项科研基金项目20010384010号。

第一作者: 叶海辉, 出生于1970年, 博士, 讲师, 从事甲壳动物生殖内分泌学研究。通讯地址: 厦门大学海洋系; 电话: 0592-2188471; E-mail: haihuiye@163.com

收稿日期: 2002-05-15; 修回日期: 2002-10-10

组), 注射液分别为 100 μ L 的 5-HT, OA, DA(剂量为 1 μ g/g 体质量), 其余步骤同 PBS 组。实验重复一次。

大颚器样品于 Bouin's 液固定, 石蜡切片, 厚度 6~8 μ m, 按 Ehrlich's 苏木精-伊红法染色。Olympus BH2 型显微镜下观察并测量大颚器细胞, 细胞直径以 1/2(细胞短径+细胞长径) 计算。各实验组随机统计大颚器细胞数量均为 120 个, 合并两次实验的数据, 差异显著性检验用 *t* 检验法。

1.3 免疫细胞化学

锯缘青蟹 16 只, 体长 44~86 mm, 体质量 38~320 g, 雌雄兼有, 购自厦门农贸市场。迅速解剖出大颚器, 于 Bouin's 液固定, 石蜡包埋, 切片厚度 6 μ m。切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 甲醇溶液处理 10 min; 10% 正常山羊血清封闭 10 min; 5-HT 抗体稀释度 1:50, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h; 即用型生物素标记的羊抗兔抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h; 即用型链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h; DAB H_2O_2 显色。对照实验以正常山羊血清或 PBS 代替 5-HT 抗体, 同步进行上述免疫细胞化学反应程序。Olympus BH2 型显微镜下观察并摄影。

2 结果

2.1 活体注射

在 IC, PBS, 5-HT, OA 和 DA 5 个实验组之间, 5-HT 组大颚器细胞直径为 $24.11 \mu\text{m} \pm 2.51 \mu\text{m}$, 大于其它 4 组, 差异极其显著 ($P < 0.01$), 而其它 4 组之间差异不显著, 表明 5-HT 能够促进大颚器细胞的发育, OA 和 DA 对大颚器细胞发育的作用不明显, 见图 1。

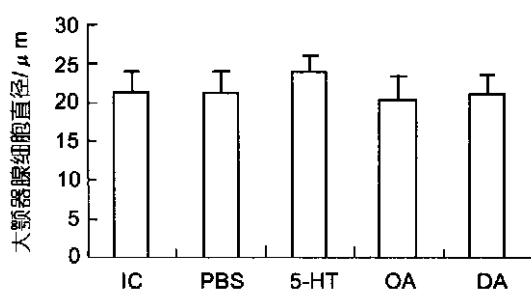


图 1 注射生物胺对锯缘青蟹大颚器发育的影响
Fig.1 Mean sizes of mandibular gland cells of *Scylla serrata* after injections of biogenic amines

2.2 免疫细胞化学

大颚器腺细胞体积大, 直径 15~33 μ m, 细胞核

圆形, 6~10 μ m, 核仁清晰, 1~4 个, 异染色质少, 近核内膜分布。5-HT 免疫阳性细胞散布于腺细胞之间, 整个胞质呈棕色或胞质内有许多黑褐色的颗粒, 其大小形态与腺细胞明显不同。抗体对照组结果为阴性。免疫阳性细胞除较多的卵圆形细胞外, 还经常观察到柱形和多边形细胞, 有的细胞具有很长的胞突, 末端膨大, 内含阳性颗粒物质, 延伸到邻近的大颚器腺细胞膜上(图 2)。

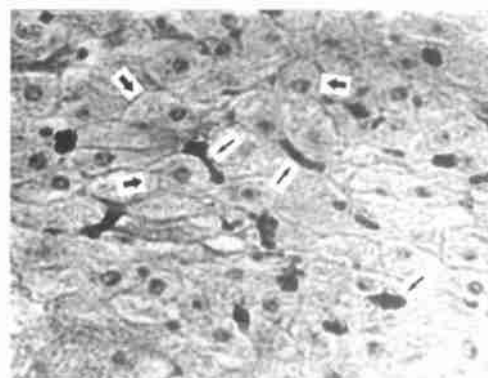


图 2 锯缘青蟹大颚器中的 5-HT 免疫阳性细胞
Fig.2 5-HTlike immunoreactive cells in mandibular glands of *Scylla serrata*
5-HT 免疫阳性细胞(↑); 大颚器腺细胞(⬆), ×330
5-HTlike immunoreactive cell(↑); mandibular gland cell (⬆), ×330

3 讨论

生物胺广布于甲壳动物的中枢神经系统 and 外周器官内, 可作为神经递质/神经调质或激素对甲壳动物生殖活动、蜕皮活动、血糖浓度、色素迁移和肌肉收缩等均有一定的调节作用, 是一类重要的生物活性物质^[3]。活体注射和体外培养实验表明, 5-HT 能够刺激大西洋招潮蟹 (*Uca pugilator*) 和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的卵巢成熟, 其机理被认为是 5-HT 作为神经递质促进了脑和胸神经节内性腺刺激激素 (gonadostimulating hormone, GSH) 的释放^[4]。

据我们观察, 随着锯缘青蟹大颚器发育, 其腺细胞直径逐渐增大。在本研究的 5 种生物胺中, 注射 5-HT 后, 锯缘青蟹大颚器细胞直径显著增大, 表明 5-HT 对大颚器的发育具有刺激作用。应用免疫细胞化学检测, 我们首次发现大颚器内存在 5-HT 免疫阳性细胞, 这些细胞极可能以内分泌或旁分泌方式作用

于腺细胞。生殖旺盛期锯缘青蟹大颚器 5-HT 免疫阳性细胞数量最多,进一步提示了 5-HT 与大颚器的分泌活动有关。免疫细胞化学的研究结果为 5-HT 参与大颚器的生理活动提供了形态学证据。由此看来,甲壳动物的 5-HT 不仅作为神经递质刺激脑和胸神经节释放 GSH,而且可以作为激素促使大颚器的发育与分泌活动,进而促使性腺发育。在以往的活体注射研究中,将性腺发育仅仅归因于 5-HT 刺激了 GSH 的释放,是有失偏颇的。5-HT 在生殖活动中的贡献尚需得到进一步的重视。迄今,有关生物胺对大颚器调节作用的研究尚少。据 Homola 等^[2]报道,离体条件下,浓度为 10^{-8} mol/L 的 5-HT 和 10^{-5} mol/L 的 OA 均能抑制蜘蛛蟹大颚器 MF 的合成,而 10^{-6} mol/L 的 DA 则没有作用。5-HT 和 OA 对不同甲壳动物大颚器分泌活动调节作用的差别,或许与大颚器发育状态,生物胺处理剂量,生物胺受体类型的差异等原因有关。根据

本实验结果,DA 和 OA 与锯缘青蟹大颚器细胞发育的关系不很密切。

参考文献

- 1 Homola E, Chang E S. Methyl farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of functions. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 117(3): 347-356
- 2 Homola E, Landau M, Laufer H. The effects of biogenic amines on methyl farnesoate synthesis by disaggregated mandibular organ cells from the spider crab, *Libinia emarginata*, *American Zoologist*, 1989, 29: 61 A
- 3 Fingerman M, Nagabhushanam R, Sarojini R, et al. Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *J Crust Biol*, 1994, 14(3): 413-437
- 4 Fingerman M. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal in decapod crustaceans. *Invert Reprod Develop*, 1997, 31(1): 47-54

ROLES OF BIOGENIC AMINE IN STIMULATING THE DEVELOPMENT OF THE MANDIBULAR GLAND IN MUD CRAB, *Scylla serrata*

YE Hai Hui^{1,2} LI Shao Jing¹ LI Qi Fu² HUANG Hui Yang¹ WANG Gui Zhong¹

(¹ Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005)

(² Laboratory of Cell Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Received: May, 15, 2002

Key Words: Biogenic amine, Mandibular glands, *Scylla serrata*

Abstracts

The possibility that biogenic amines affect mandibular gland development in the female mud crab, *Scylla serrata*, was investigated. Females were given injections of 5-hydroxytryptamine (5-HT), octopamine (OA) or dopamine (DA) whose dose is 100 μ L and body weight 1 μ g/g on day 1, 5 and 10 and were sacrificed on day 15. Crab given 5-HT showed significant increases in size of mandibular gland cells over the concurrent controls, while OA and DA did not significantly affect the gland cell size. 5-HT like immunoreactive cells were detected in the mandibular glands, most of which are round, while few have long cytoplasmic processes. 5-HT immunoreactive cells existing in the mandibular glands of crustaceans are reported for the first time.

(本文编辑:刘珊珊)