

锯缘青蟹神经器官对卵巢发育的调节作用:离体实验*

金朱兴¹ 叶海辉^{1,2} 李少菁¹ 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学研究室 厦门 361005)

提要 器官联合培养研究表明,锯缘青蟹(*Scylla serrata*)的脑和胸神经团分泌的性腺刺激激素(GSH)对卵母细胞的生长具有直接的促进作用,对视神经节则没有显著的影响。在卵巢发育过程中,脑和胸神经团GSH的生物活性逐渐增强。

关键词 卵巢发育,神经器官,锯缘青蟹(*Scylla serrata*),离体实验

中图分类号 Q42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)01-0072-03

早期的神经器官摘除和移植实验揭示,眼柄视神经节存在性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH),而脑和胸神经节具有性腺刺激激素(gonad-stimulating hormone, GSH)。近10年来,有关GIH结构、cDNA序列和神经分泌细胞定位的研究,证实了视神经节的X器是GIH的合成中心。GSH的分子量约为1 000~2 000 u,也是多肽,化学结构尚不清楚。国内廖家遗等^[1]对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)脑GSH进行了初步分离和活性检测研究。本实验采用器官联合培养法,研究了锯缘青蟹脑、胸神经团和视神经节对卵巢发育的调节作用,以利于阐明锯缘青蟹的生殖调控神经内分泌过程,丰富甲壳动物神经内分泌学的内容。

1 材料和方法

1.1 实验材料

锯缘青蟹体长58~85 mm,体质量115~430 g,投喂鲜活的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*),于通气良好的水族箱内暂养4~6 d。锯缘青蟹卵巢发育周期划分参照上官步敏等^[2]。

1.2 体外培养

锯缘青蟹于1%高锰酸钾(质量分数)浸泡0.5 h,尔后在无菌条件下用75%酒精(质量分数)进行表面消毒。迅速解剖出脑、胸神经团、视神经节和卵巢,于含100 IU/mL青霉素的PBS中洗涤数次。培养所用的卵巢均切成约1 mm³大小的小块,将1个脑、1个胸神经团、1对视神经节以及大小与神经器官相仿的肌肉组织分别与卵巢小块联合培养。培养物接种于25 cm²

的培养瓶中,M99细胞培养液(GIBCO产品)体积为2 mL,含20%(质量分数)小牛血清(购自杭州四季青生物工程有限公司)、100 IU/mL青霉素、100 mg/L链霉素和50 mg/L卡那霉素。黑暗条件下置于振荡器中培养,振荡频率为50~60 r/min,培养温度为26~27℃,培养时间为24 h。

1.3 观察

培养24 h后,卵巢样品于Bouin's液固定,石蜡包埋,切片厚度6~8 μm,按Ehrlich's苏木精-伊红法进行染色。Olympus BH2型显微镜下观察,每个实验组测量200个卵母细胞,细胞直径以1/2(细胞短径+细胞长径)计算,差异显著性检验用t检验法。

2 结果

2.1 不同发育期的神经器官对卵巢发育的调控作用

锯缘青蟹的神经器官与卵巢经24 h体外联合培养后,脑和胸神经团对卵母细胞的生长均有促进作用。二者对卵母细胞生长的促进作用,在发育早期(Ⅱ期)的晚期组达到显著水平($P < 0.05$),在其余3个实验组达到极显著水平($P < 0.01$)。视神经节对卵母细胞的生长未见明显的促进或抑制作用,见表1。

* 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:金朱兴,出生于1975年,硕士研究生,从事甲壳动物内分泌学研究。电话:0592-2188471

收稿日期:2002-02-27;修回日期:2002-05-13

表 1 神经器官与不同发育期卵巢的体外联合培养
Tab.1 Nervous organs cultured with ovaries at different stage in vitro

卵巢周期	联合培养方式	卵母细胞直径(μm)
发育早期的晚期 体长64 mm	B + O	19.78 $\pm$ 2.66
	Th + O	19.56 $\pm$ 2.76
	E + O	18.14 $\pm$ 2.54
	M + O	17.48 $\pm$ 1.96
发育期 体长83 mm	B + O	49.64 $\pm$ 8.37
	Th + O	50.14 $\pm$ 8.94
	E + O	37.74 $\pm$ 4.74
	M + O	32.12 $\pm$ 5.45
将成熟期 体长75 mm	B + O	172.98 $\pm$ 22.86
	Th + O	173.38 $\pm$ 21.60
	E + O	118.13 $\pm$ 12.91
	M + O	116.48 $\pm$ 11.40
成熟期 体长64 mm	B + O	215.25 $\pm$ 24.77
	Th + O	223.30 $\pm$ 22.51
	E + O	190.15 $\pm$ 20.42
	M + O	193.80 $\pm$ 18.70

B:脑; Th:胸神经团; E:视神经节; O:卵巢; M:肌肉

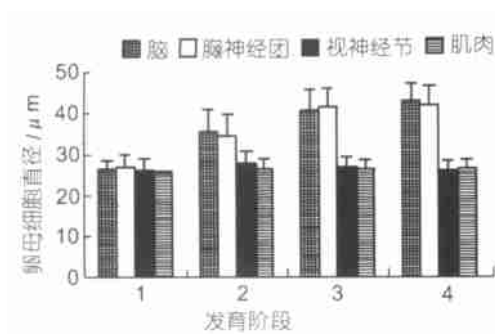


图 1 不同发育周期的神经器官与发育早期卵巢的体外联合培养

Fig.1 The nervous organs during different developmental stages cultured with ovary at developing stage in vitro

1. 发育早期的初期; 2. 发育早期的晚期; 3. 将成熟期; 4. 成熟期
1. begining in early-developing stage, 2. late in early-developing stage, 3. nearly-ripe stage, 4. ripe stage

2.2 不同卵巢周期的神经器官对同一周期卵巢的调控作用

从图 1 可见,除了对发育早期(II 期)的初期未见明显影响外,锯缘青蟹的脑和胸神经团对卵母细胞的生长均有促进作用 ($P < 0.01$)。随着卵巢发育,锯缘青蟹的脑和胸神经团对卵母细胞生长的促进作用逐渐增强,表明脑和胸神经团中 GSH 生物活性逐步上升。视神经节对卵母细胞生长未见影响。

3 讨论

脊椎动物通过脑—脑垂体—性腺轴调节生殖活动,即感觉器官将外界环境的刺激传至脑,下脑分泌促性腺激素释放激素,激发脑垂体分泌促性腺激素作用于性腺并促进性腺分泌性类固醇激素,以促使性腺成熟与排出精子和卵子。与此不同,甲壳动物的脑、胸神经节和视神经节分泌的神经肽直接参与了生殖调控过程。

本实验结果表明,在离体条件下,除了对发育早期(II 期)的初期未见明显影响外,锯缘青蟹脑和胸神经团对其余各期卵母细胞的生长均有显著的促进作用。由此作者认为,锯缘青蟹的脑和胸神经团是 GSH 的来源, GSH 对卵母细胞生长具有直接的促进作用。Kulkarni 等^[3]通过离体实验,也曾发现克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 脑、胸神经节中 GSH 对卵巢发育的促进作用。处于卵巢发育早期(II 期)初期的锯缘青蟹,此时脑和胸神经团中 GSH 的分泌活动尚弱,未能激活卵原细胞大量分化成为卵母细胞;随着卵巢发育,脑和胸神经团中 GSH 合成与分泌活动的逐渐增强,进而促进卵巢发育。据 Shangguan 等^[4]的观察,锯缘青蟹胸神经团中 C_4 细胞与 GSH 的形成和释放有关,其分泌活动随卵巢发育而增强,在卵巢发育期和将成熟期最活跃。上述研究结果表明锯缘青蟹 GSH 在性腺发育较早的时期,生物活性较低,随着 GSH 分泌活动的增强,卵巢逐渐发育,即 GSH 的功能与性腺周期有关。迄今,甲壳动物 GSH 的化学结构尚不清楚,有关甲壳动物 GSH 的研究,对于了解甲壳动物的生殖内分泌具有重要的意义。

通常认为,视神经节中 X 器- 窦腺复合体是 GSH 合成与释放的来源。切除眼柄可以诱导性腺早熟,在养殖生产上已有广泛的应用。锯缘青蟹视神经节 X 器中, C_3 细胞的分泌活动随卵巢的发育而降低,在卵巢发育期和将成熟期最低,表明了该细胞与 GSH 的形成

和分泌有关^[4]。研究表明,美洲螯龙虾 (*Homans americanus*) 窦腺中的甲壳动物高血糖素 (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) 有 CHHA 和 CHHB 两种形式,用两种 CHHB 异构体进行同种体外活性检测,发现 CHHB 能够促进卵巢对卵黄蛋白原的吸收;CHHB 对雌性无小长臂虾 (*Palaeomonetes varians*) 的非卵黄发生期进行异种体内活性检测,对生殖活动也具有促进作用^[5]。因此,眼柄视神经节对生殖活动的调节极可能具有两面性,既存在促进性腺发育的一面,也存在抑制性腺发育的一面。离体条件下,锯缘青蟹眼柄视神经节对卵母细胞生长未见明显的促进或抑制作用,可能与眼柄视神经节的这种特性有关;也可能与离体培养时间较短,对照组卵母细胞未能充分生长,从而造成视神经节的抑制作用不明显有关。

参考文献

- 1 廖家遗,张艳,孙继贤,等.罗氏沼虾脑促性腺激素的初步分离及活性检测.水产学报,2001,25(1):5-10
- 2 上官步敏,刘正琮,李少菁.锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察.水产学报,1991,15(2):96-103
- 3 Kulkarni G. K, Glade L, Fingerman M. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissue on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). J Crust Biol, 1991(11): 513-522
- 4 Shangguan B, Li S. Cytological studies on neurosecretory cell of the Xorgan in *Scylla serrata*. Acta Oceanol Sinica, 1995, 14(2): 283-290
- 5 Van Herp F. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in crustacean. Invert Reprod Develop, 1992 (22): 21-30

ROLE OF NERVOUS ORGANS IN STIMULATING OVARIAN MATURATION IN THE MUD CRAB, *Scylla serrata*: AN IN VITRO STUDY

JIN Zhu Xing¹ YE Hai Hui^{1,2} LI Shao Jing¹ 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: Feb., 27, 2002

Key Words: Ovary development, Nervous organs, *Scylla serrata*; In vitro study

Abstract

In vitro study shows that the brain and the thoracic ganglion in female crabs are the source of gonadstimulating hormone (GSH) which have direct stimulation upon the ovarian maturation, while the optical ganglion has no remarkable effect. The activities of GSH in the brain and the thoracic ganglion enhance during the ovarian development.

(本文编辑:刘珊珊)