

简报

# 生物胺对雌性锯缘青蟹生殖神经内分泌的调控作用\*

叶海辉 李少菁<sup>†1)</sup> 李祺福<sup>††</sup> 黄辉洋<sup>†</sup> 王桂忠<sup>†</sup>

(厦门大学生命科学学院细胞生物学研究室;厦门大学海洋系 厦门 361005)

<sup>†</sup>(厦门大学海洋系 厦门 361005)

<sup>††</sup>(厦门大学生命科学学院细胞生物学研究室 厦门 361005)

**提要** 采用活体注射和体外培养方法,进行生物胺调控雌性锯缘青蟹生殖神经内分泌的研究。结果表明,锯缘青蟹于实验的第 1 天,第 5 天,第 10 天,分别注射 100 $\mu$ l 剂量为 1 $\mu$ g/g 体重的 5 羟色胺(5-HT)、章鱼胺(OA)和多巴胺(DA),第 15 天解剖;其中 5-HT 对卵巢发育具有显著的促进作用,OA 和 DA 的作用不明显。离体条件下,将脑、胸神经团、视神经节分别与卵巢小块进行联合培养,每个实验组分别加入 PBS 与 1 $\mu$ g/g 体重的 5-HT、OA、DA、HA(组胺)和 NE(去甲肾上腺素),发现卵巢发育的促进作用与 5-HT 刺激了脑和胸神经团的分泌活动有关。

**关键词** 生物胺,锯缘青蟹,卵巢发育,神经内分泌

**中图分类号** Q592

甲壳动物生殖活动受到神经系统和内分泌系统等方面的调控,其中,视神经节、脑和胸神经节对性腺发育具有重要的调节作用。视神经节中的 X 器-窦腺复合体含有性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH),脑和胸神经节能够分泌性腺刺激激素(gonad-stimulating hormone, GSH)。一般认为,GIH 和 GSH 对雌性甲壳动物卵巢发育具有直接的作用;而雄性甲壳动物,则还需通过促雄腺(androgenic gland)分泌的激素再作用于精巢。生物胺是一类重要的生物活性物质,广泛分布于甲壳动物的神经系统和外周器官,参与了体色变化、蜕皮活动、骨骼肌收缩、糖类代谢等生理过程。近年来,据美国 Tulane 大学 Finger-man 课题组的报道,生物胺还参与了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)和大西洋招潮蟹(*Uca pugilator*)的生殖神经内分泌过程,其中 5-羟色胺能够刺激脑、胸神经节分泌 GSH,从而促进性腺发育;而多巴胺对性腺发育的抑制作用可能与抑制 GSH 分泌和/或促进 GIH 分泌有关(Fingerman, 1997)。迄今生物胺对海洋动物生理作用的研究尚少(张涛等, 2002)。锯缘青蟹(*Scylla serrata*)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

\* 福建省重中之重“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”项目资助 1998—2002 年;高等学校博士学科点专项科研基金项目资助,20010384010 号。叶海辉,男,出生于 1970 年 10 月,博士,讲师,E-mail: haihuiye@163.com

1) 通讯作者

收稿日期:2002-05-18,收修改稿日期:2002-12-11

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技术的开发具有重要的意义。文中报道了 5-羟色胺、章鱼胺、多巴胺、组胺和去甲肾上腺素对锯缘青蟹卵巢发育的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、章鱼胺(octopamine, OA)、组胺(histamine, HA)和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)为 Sigma 公司产品,多巴胺(dopamine, DA)为 Fluka 公司产品。M199 为 Gibco 公司产品,小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司。5-HT、OA、HA、NE 和 DA 溶液均由 PBS(0.01mol/L, 含 0.9% NaCl, pH=7.4)配制而成。Bouin's 液中的饱和苦味酸由 PBS 配制而成。

### 1.2 活体注射

**1.2.1 暂养方法** 锯缘青蟹体长为 64—65mm, 体重 160—174g, 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, 为同期发育个体。锯缘青蟹暂养于水泥池(1m × 1m × 1m), 搭盖蟹窝, 培养密度 2—3 只/m<sup>2</sup>, 水深 10cm, 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。

**1.2.2 分组实验** 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 100μl 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 组), 注射液分别为 100μl 的 5-HT、OA、DA (剂量 1μg/g 体重), 其余步骤同 PBS 组。实验重复一次。

### 1.3 离体培养

**1.3.1 实验条件** 锯缘青蟹体长为 72—73mm, 体重为 197—210g, 卵巢处于发育早期, 购自同一养殖场, 为同期发育的个体。实验蟹于通气良好的水族箱内暂养 4—6d。解剖前, 于 1%高锰酸钾浸泡 0.5h, 在无菌条件下用 75%酒精进行表面消毒。迅速解剖出脑、胸神经团、视神经节和卵巢, 于含 100IU/ml 青霉素的 PBS 中洗涤数次。培养所用的卵巢均切成约 1mm<sup>3</sup> 大小的小块。培养物接种于 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶中, M199 细胞培养液 2ml (含 20%小牛血清、100IU/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素和 50μg/ml 卡那霉素)。黑暗条件下置于振荡器中培养, 振荡频率为 50—60r/min, 培养温度为 26—27℃, 培养时间为 24h。

**1.3.2 器官培养方式** 接种有卵巢小块的培养瓶中分别加入 PBS 与 1μg/g 体重的 5-HT、OA、DA、HA 和 NE, 以了解生物胺对卵巢发育是否具有直接作用。

将 1 个脑、1 个胸神经团和 1 对视神经节分别与卵巢小块联合培养, 在上述培养瓶中分别加入 PBS 与 1μg/g 体重的 5-HT、OA、DA、HA 和 NE, 以了解生物胺通过神经器官的分泌活动, 从而调节卵巢发育的过程。

### 1.4 观察与统计

卵巢指数以(卵巢重量/体重) × 100 计算; 卵巢样品于 Bouin's 液固定, 系列酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚度 6—8μm, 按 Ehrlich's 苏木精-伊红法进行染色。Olympus BH2 型显微镜下观察并测量卵母细胞, 细胞直径以(细胞短径 + 细胞长径)/2 计算。活体

注射中各实验组随机统计细胞数量均为 100 个,合并两次实验的数据;离体培养中各实验组随机统计卵母细胞数量均为 120 个,实验数据采用  $t$  检验、方差分析和均数间多重比较进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 活体注射

与起始对照组(IC组)相比,同步对照组(PBS组)的卵巢指数和卵母细胞直径均有增大,二者之间差异极其显著( $p < 0.01$ ),反映了本实验条件下锯缘青蟹卵巢发育的过程,同时也说明该暂养条件是适宜的。在 PBS、5-HT、OA 和 DA 四个注射实验组中,5-HT 组卵巢指数为  $0.137 \pm 0.012$ ,卵母细胞直径为  $(38.14 \pm 4.99)\mu\text{m}$ ,与 PBS 组相比,二者之间差异极其显著( $p < 0.01$ ),OA、DA 组和 PBS 组之间差异不显著,表明 5-HT 对卵巢发育具有促进作用,OA 和 DA 对卵巢发育作用不明显,见表 1。

表 1 注射生物胺对锯缘青蟹卵巢发育的影响

Tab. 1 Ovarian development of *Scylla serrata* after injections of biogenic amines

项 目	IC	PBS	5-HT	OA	DA
卵巢指数	$0.056 \pm 0.006a$	$0.083 \pm 0.009b$	$0.137 \pm 0.012c$	$0.086 \pm 0.001b$	$0.078 \pm 0.009b$
卵母细胞直径( $\mu\text{m}$ )	$19.88 \pm 3.61a$	$23.43 \pm 4.15b$	$38.14 \pm 4.99c$	$23.36 \pm 4.67b$	$22.94 \pm 4.60b$

注:同一行数值后面的不同英文字母,代表差异极其显著程度

### 2.2 离体实验

离体培养时,添加 5-HT、OA、DA、HA 和 NE 的卵巢与对照组(PBS 组)相比,卵母细胞直径均没有明显变化,各组之间差异不显著。表明 5-HT、OA、DA、HA 和 NE 对卵巢发育没有直接的促进作用。在脑、胸神经团和卵巢的联合培养实验中,5-HT 组卵母细胞直径分别为  $(47.97 \pm 9.61)\mu\text{m}$  和  $(52.61 \pm 9.35)\mu\text{m}$ ,与 PBS 组差异极其显著( $p < 0.01$ ),而除 5-HT 组以外的其他 5 组之间差异不显著。表明 5-HT 能够刺激锯缘青蟹脑和胸神经团分泌促进卵巢发育的物质,从而促进卵母细胞生长;而 OA、DA、HA 和 NE 对脑和胸神经团中该物质的释放没有明显的作用。视神经节和卵巢的联合培养实验中,6 个实验组的卵母细胞直径均没有明显变化,各组之间差异不显著。上述结果如表 2 所示。

表 2 生物胺对锯缘青蟹神经器官与卵巢联合培养的影响

Tab. 2 Effects of biogenic amines on nervous organs of *Scylla serrata* cultured with ovary *in vitro*

项 目	卵 巢	脑 + 卵巢	胸神经团 + 卵巢	视神经节 + 卵巢
PBS	$26.45 \pm 3.27$	$36.15 \pm 7.62$	$35.14 \pm 8.60$	$28.12 \pm 8.60$
5-HT	$26.83 \pm 3.75$	$47.97 \pm 9.61^*$	$52.61 \pm 9.35^*$	$29.10 \pm 8.52$
OA	$27.32 \pm 3.46$	$37.64 \pm 7.22$	$37.21 \pm 8.11$	$27.34 \pm 8.57$
DA	$27.14 \pm 3.32$	$33.86 \pm 6.58$	$33.67 \pm 7.72$	$27.22 \pm 8.41$
HA	$27.18 \pm 3.21$	$36.74 \pm 7.49$	$37.93 \pm 8.32$	$27.87 \pm 7.11$
NE	$26.75 \pm 3.67$	$36.45 \pm 7.34$	$37.54 \pm 7.26$	$27.63 \pm 6.93$

\* 代表与对照组差异极其显著

### 3 讨论与结语

生物胺广泛地分布于甲壳动物体内,利用高效液相色谱和免疫细胞化学已从神经系统和血淋巴中检测出 5-HT、OA、DA、HA 和 NE 的分布。研究发现,5-HT 和 DA 分别具有促进和抑制卵巢发育的效应,其作用机理是通过调控神经器官中 GSH/GIH 的释放,从而影响卵巢发育(Fingerman, 1997)。锯缘青蟹注射 5-HT 后,卵巢指数和卵母细胞直径均有显著增加。离体条件下,5-HT 对单独培养的卵巢没有直接的促进作用;当脑和胸神经团分别与卵巢联合培养时,5-HT 组卵母细胞生长显著加快。表明锯缘青蟹脑和胸神经团存在一种促进卵巢发育的物质,5-HT 刺激了该物质的分泌,从而间接地促进卵母细胞生长。这种促进卵巢发育的物质,可能就是甲壳动物的 GSH。最近,作者在锯缘青蟹的脑、胸神经团和视神经节已检测出 5-HT 神经细胞<sup>1)</sup>,进一步为 5-HT 参与神经生殖内分泌活动提供了形态学佐证。锯缘青蟹注射 DA 后,经过 15 天的暂养,与同步对照组(PBS 组)相比,卵巢指数和卵母细胞直径略有抑制作用,但未达到统计学上的差异水平,可能与 DA 剂量偏少或该期卵巢对 DA 尚不敏感有关。OA、HA 和 NE 对卵巢发育几乎没有影响,提示这 3 种生物胺与生殖神经内分泌活动的关系不很密切。

研究表明,大西洋招潮蟹注射 5-HT 受体阻遏剂 LY53857,卵巢发育受到抑制;注射 5-HT 激动剂 fenfluramine 和 fluoxetine,卵巢指数和卵母细胞直径显著增大(Richardson *et al*, 1991; Kulkarni *et al*, 1992a)。克氏原螯虾注射 5-HT 受体阻遏剂 LY53857 和 5-HT 神经毒素 5, 6-dihydroxytryptamine 后,卵巢发育同样受到抑制,注射 5-HT 激动剂 fenfluramine 和 fluoxetine 则能明显地诱导卵巢成熟(Kulkarni *et al*, 1992b)。大西洋招潮蟹分别注射 DA 拮抗剂 spiperone 和激动剂 ADTN,对精巢发育各自表现为促进和抑制作用(Sarajini *et al*, 1995)。鉴于 5-HT 对性腺发育的促进作用和 DA 的抑制作用,以及生物胺激动剂和拮抗剂的效应。作者认为,在甲壳动物人工育苗生产上,为了诱导亲体性腺成熟和产卵,可以如下操作:(1) 注射 5-HT 和相应的激动剂;(2) 注射 DA 的拮抗剂;(3) 将以上两种方法联合使用。当然,由于物种的差异和性腺发育周期的不同,具体的注射剂量和注射方法还需进一步探索。生物胺价格低廉,易于购买,对亲体的处理方法简单易行,在虾蟹亲体催熟过程中将具有极大的应用前景。

### 参 考 文 献

- 张 涛, 阙华勇, 杨红生等, 2002. 海湾扇贝幼虫变态过程中体内神经递质含量的变化. 海洋与湖沼, 33(3): 239—244
- Fingerman M, 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal in decapod crustaceans. *Invert Reprod Develop*, 31(1—3): 47—54
- Kulkarni G K, Fingerman M, 1992a. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp Biochem Physiol*, 101C: 419—423
- Kulkarni G K, Nagabhushanam R, Amaldoss G *et al*, 1992b. *In vivo* stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Grard), by 5-hydroxytryptamine. *Invert Reprod Develop*, 21(3): 231—240
- Richardson H G, Deecaraman M, Fingerman M, 1991. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca*

1) 黄辉洋, 2001. 锯缘青蟹(*Scylla serrata*)神经系统和消化系统内分泌细胞的研究. 厦门大学博士学位论文

*pugilator*. *Comp Biochem Physiol*, 99C: 53—56

Sarojini R, Nagabhushanam R, Devi M *et al*, 1995, Dopaminergic inhibition of 5-hydroxytryptamine-stimulated testicular maturation in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp Biochem Physiol*, 111C: 287—292

## THE EFFECTS OF BIOGENIC AMINES ON OVARIAN DEVELOPMENT IN THE MUD CRAB, *SCYLLA SERRATA*

YE Hai-Hui, LI Shao-Jing<sup>†</sup>, LI Qi-Fu<sup>††</sup>, HUANG Hui-Yang<sup>†</sup>, WANG Gui-Zhong<sup>†</sup>

(*Laboratory of Cell Biology, School of Life Science, Xiamen University; Department of Oceanography,  
Xiamen University, Xiamen, 361005*)

<sup>†</sup>(*Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005*)

<sup>††</sup>(*Laboratory of Cell Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, 361005*)

**Abstract** The possibility that biogenic amines affect ovarian development in the female mud crab, *Scylla serrata*, was investigated. Females were administered 1μg/g body weight of 5-hydroxytryptamine (5-HT), octopamine (OA) or dopamine (DA) on days 1, 5 and 10 and were sacrificed on day 15. Crabs given 5-HT showed significant increases in ovarian index and oocyte size over the concurrent controls, while OA and DA did not significantly affect either the ovarian index or oocyte size. *In vitro* study indicates that none of 5-HT, OA, DA, histamine (HA) and norepinephrine (NE) has direct stimulation over the ovarian development. 5-HT stimulates the ovarian development, presumably by triggering release of gonad-stimulating hormone in the brain and the thoracic ganglion, while the other 4 amines have no evident effects upon the brain, the thoracic ganglion and optic ganglion.

**Key words** Biogenic amine, *Scylla serrata*, Ovarian development, Neurosecretion