第 23 卷第 4 期
1999 年 12 月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol. 23, No. 4
Dec., 1999

中国对虾大颚器官超微结构及保幼激素 III类似物的分离

ULTRASTRUCTURE OF MANDIBULAR ORGAN AND ISOLATION OF JUVENILE HORMONE III ANALOGUE IN *PENAEUS CHINENSIS*

王在照　任自力[1]　相建海　王良臣[1]　崔同昌[1]　郭世宜[1]　王秀玲
（中国科学院海洋研究所，青岛　266071）
（南开大学生命科学院，天津　300071）[1]
WANG Zai-Zhao, REN Zi-Li[1], XIANG Jian-Hai, WANG Liang-Chen[1],
CUI Tong-Chang[1], GUO Shi-Yi[1], WANG Xiu-Ling
(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao*　266071)
(*College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin*　300071)[1]

关键词　中国对虾，大颚器官，保幼激素 III类似物，分离
KEYWORD　*Penaeus chinesis*, Mandibular organ, Juvenile hormone III analogue, Isolation

甲壳动物内分泌学的研究起步较晚但发展迅速，LeRoux[1968] 首次对蓝蟹（*Callinectes sapidu*）的大颚器官（MO）进行了描述。Laufer 等[1987] 人确定了 MO 的分泌产物是法呢酸甲酯（MF），它是一种倍半萜类化合物，它的化学结构与昆虫的保幼激素 III相似，为保幼激素 III的去半环氧基形式。目前已证明，有 25 种以上的甲壳动物的 MO 能够合成 MF[Laufer 等 1993]，但尚未见中国对虾大颚器官及其分泌物的报道。MF 被认为是甲壳动物的保幼激素，它对甲壳动物的生长发育和生殖有调节作用。实验证明，大颚器官的移植能明显缩短甲壳动物的蜕皮周期；蜕皮周期中各期大颚器官在亚显微结构上变化很大。在雌性甲壳动物的血淋巴中 MF 水平的高低与卵巢活动周期密切相关，有证据表明，MF 能够促进卵巢活动周期中卵黄的发生，在雄性个体血淋巴 MF 水平与其生殖系统的发育程度和生殖行为的活跃性密切相关。本文报道了中国对虾大颚器官亚显微结构及保幼激素 III类似物的分离，以期为中国对虾内分泌学研究提供科学依据，指导对虾的繁殖育苗。

1　材料和方法

1.1　材料来源

于 1996 年 7 月从天津市大港滨海养虾场的养殖池中现场采集养殖中国对虾，现场解剖它们的大颚器官

国家海洋 863 计划资助项目（对虾多倍体育种和性控技术研究），819－01－05 号、国家攀登 B 计划资助项目（对虾繁殖的内分泌调控及生理功能和性控机理的研究），PDB6－2－1 号。
收稿日期：1998－09－29

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

并采集血淋巴,冷冻后带回实验室于－20℃下保存。

1.2 超薄切片及电子显微镜技术

中国对虾大颚器官位于大颚与附着大颚外展肌的几丁质腱的连接部位,在解剖镜下将其取下,用2.5%的戊二醛和1%的锇酸双固定,缓冲液漂洗后用丙酮脱水,然后用国产环氧树脂618包埋,用超薄切片机切片,然后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅复染色,在 Philips EM400ST 透射电镜下观察并摄影。

1.3 血淋巴和大颚器官中保幼激素类似物样品的制备和分析

用注射器(1.0mL)从对虾的心脏部位抽取血淋巴,按其体长将所抽取的血淋巴分为两组:抽取49尾平均体长为5.6cm的对虾,获血淋巴3.2mL;抽取平均体长为6.2cm的对虾23尾,获血淋巴1.7mL。在血淋巴中加入适量生理盐水,采用三相提取法[Borst 和 Tsukimura 1991],把血淋巴中的JHⅢ类似物提取出来,即将血淋巴液∶乙腈∶己烷按2.0mL∶2.5mL∶0.5mL的比例加入培养管,充分摇动混合,冰浴后做简短的离心(1000g×5min),离心完毕每个离心管有三层液体,从上到下依次为己烷、乙腈和水溶液,JHⅢ类似物于己烷层中,第一次抽提后再重复一次。提取大颚器官中的JHⅢ类似物,解剖平均体长为5.6cm的对虾24尾,取其MO加入2.0mL生理盐水充分匀浆,按比例加入生理盐水、乙腈和己烷,采用同样的方法抽提JHⅢ类似物。

用HPLC方法分析,所用仪器为岛津LC－4A高效液相色谱分析仪,色谱柱为250mm×4.6mm I.D的硅胶柱(5μm－硅胶),流动相为含1.3%的己烷,流速为0.8mL/min,用岛津SPD－1紫外分光光度检测仪检测(检测波长:220nm),JHⅢ标准品为Sigma产品(纯度为72%)。保持分析和检测条件恒定,当压力稳定后对Ⅲ标准品和各个样品连续分析,记录JHⅢ与其类似物的保留时间,用岛津色谱分析软件EZChrom(version2.1)计算它们的峰面积。

2 结果

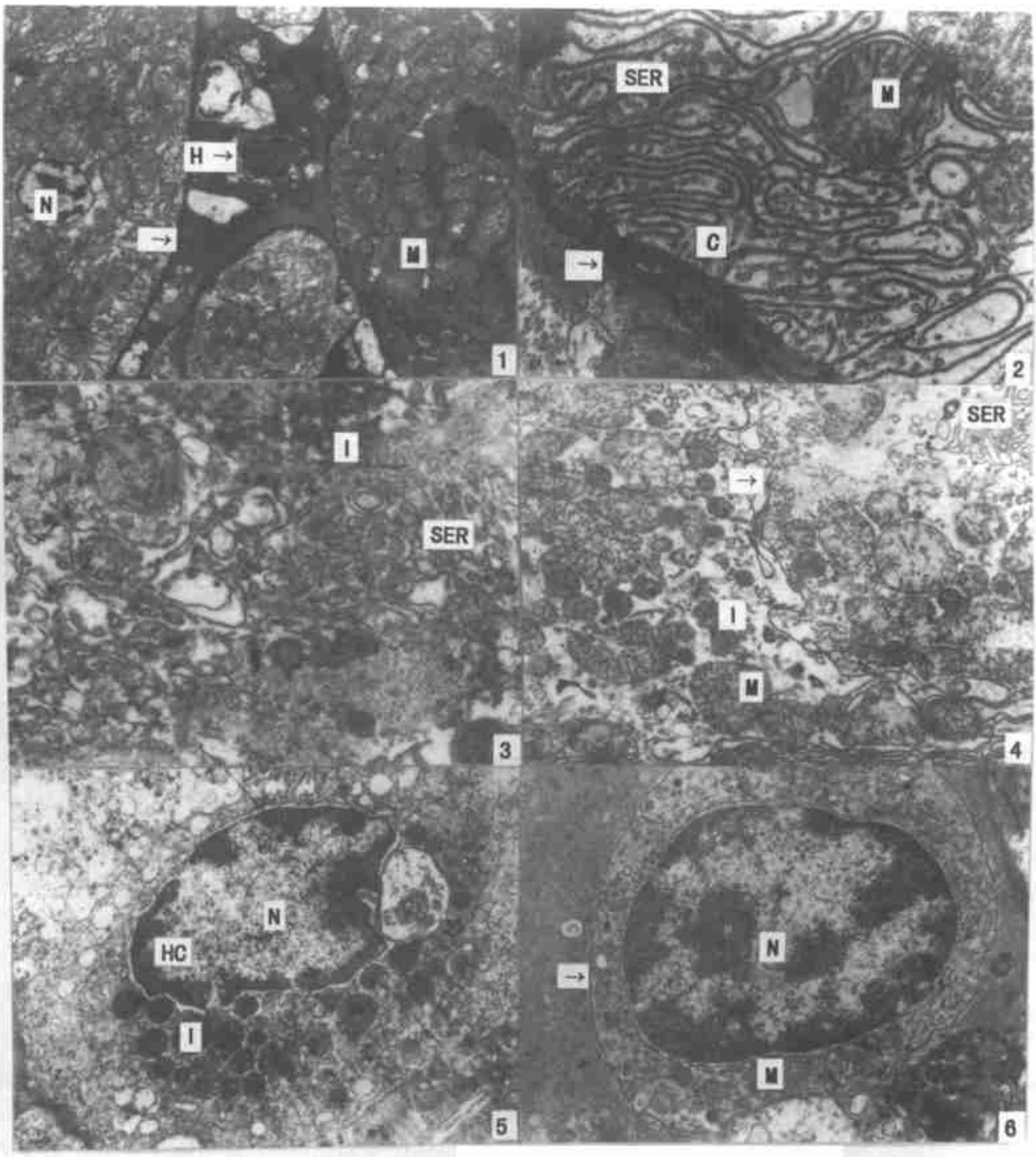
2.1 中国对虾大颚器官超薄切片的电镜观察结果

MO位于大颚与其附着大颚外展肌的几丁质腱的连接部位基部,它由许多腺细胞团组成,在腺细胞间有血淋巴管和血淋巴窦(图版－1),MO的腺细胞在靠近血淋巴窦壁的部位,细胞膜有丰富的内陷和皱褶,有些陷入细胞质的膜质结构包裹着一些细胞器如线粒体、小泡状内质网,这些膜质结构都以双层膜的形式存在(图版－2)。细胞中的细胞器大量增生,其内质网全为滑面型的,这些内质网形状各异,在有些细胞中是广泛分布的小泡状内质网(图版－2),在另一些细胞中为网状的滑面内质网,在有些网状的滑面内质网之间偶尔有脂肪颗粒(图版－3、4);线粒体的数量很大,尽管它们的形状和大小有很大差异,但它们有一个共同特点:除了具有常见的片状嵴外,还存在管状嵴,有时在线粒体之间有脂肪颗粒(图版－4)。此外,腺细胞的细胞核都很规则,在靠近核膜内侧染色较深的为异染色质。腺细胞之间的血淋巴窦中存在血淋巴,血淋巴细胞形状差别明显,一部分细胞的细胞核不规则,异染色质集中在核膜附近,细胞质相对较多,在这些细胞中多数有脂肪颗粒(图版－5);另一部分细胞的细胞核很规则,细胞质相对较少,细胞质中无脂肪颗粒(图版－6)。

2.2 血淋巴和大颚器官中保幼激素类似物的分析

在流速、温度、压力及检测波长保持一致的情况下进行HPLC分析,当色谱分析仪处于稳定状态时,分析标准品和各个样品,分析每个样品所用时间为30～40min。先分析标准品JHⅢ,它的保留时间为3.675 min,记录其峰面积(图1－a);对平均体长5.6cm的一组对虾的血淋巴的己烷提取液进行HPLC分析,其保留时间为3.929min,记录峰面积(图1－b);对平均体长为6.2cm的一组对虾的血淋巴己烷提取液进行HPLC分析,其保留时间是3.894 min,记录峰面积(图1－c);对平均体长5.6cm的对虾MO的己烷提取液进行HPLC分析,其保留时间接近3.929 min,记录其峰面积(图1－d)。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c



图版　中国对虾大颚器官的腺细胞及血淋巴细胞形态特征

Plate　The morphology of gland cell and hemolymph cell in mandibular organ in *P. chinesis*

1. MO 腺细胞和血淋巴窦的电镜观察: N, 腺细胞的细胞核; M, 细胞质中的线粒体; →, 血巴淋窦; H→, 血淋巴细胞; × 3450 2. 腺细胞的细胞膜陷于细胞质形成的膜质结构: M, 线粒体; SER, 小泡状滑面内质网; C, 伸入细胞质的膜质结构; →血淋巴窦壁; × 16500 3. 腺细胞内的滑面内质网: SER, 网状滑面内质网; I, 染色较深的脂肪颗粒; × 16500 4. 细胞内形状大小各异的线粒体: →细胞膜; M, 具有片状嵴和管状嵴的线粒体; I, 脂肪颗粒; SER, 滑面内质网; × 8350 5. 血淋巴内具有脂肪颗粒的血淋巴细胞: I, 脂肪颗粒; HC, 异染色质; × 10500 6. 血淋巴内无颗粒的血淋巴细胞: N, 细胞核; M, 线粒体; →, 细胞膜; × 13500

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

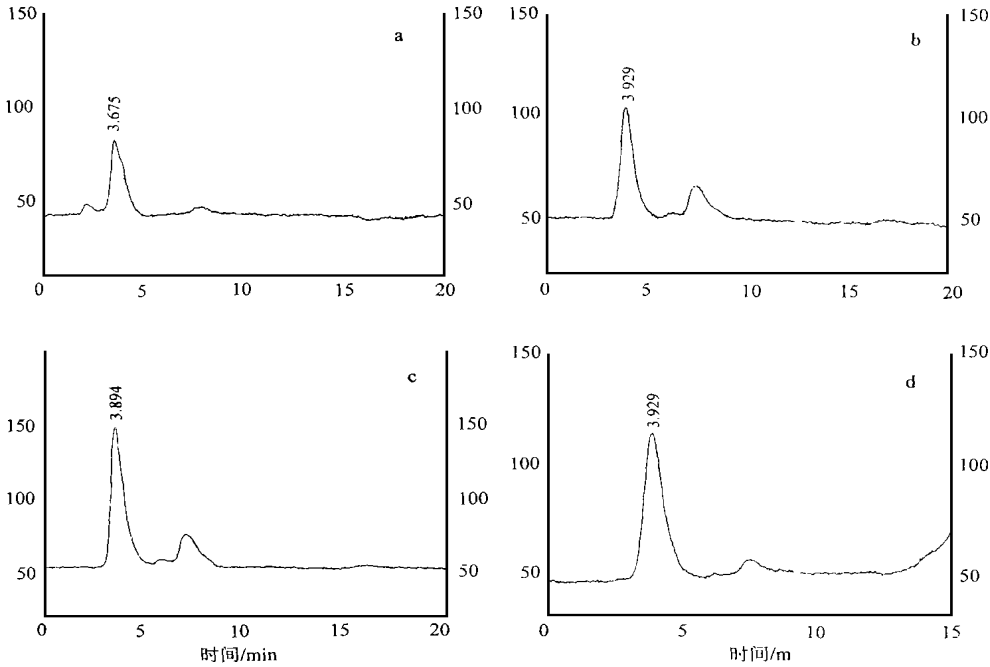


图 1 JH Ⅲ及中国对虾血淋巴和 MO 提取物的 HPLC 分离图

Fig. 1 HPLC of JH Ⅲ and extracts from hemolymph and MO of *P. chinensis*

a. JHⅢ; 保留时间为 3.675 min; b. 平均体长为 6.2cm 的对虾血淋巴提取物, 保留时间为 3.929 min; c. 平均体长为 5.6cm 的对虾血淋巴提取物, 保留时间为 3.894 min; d. 大颚器官提取物(取自平均体长为 5.6cm 对虾), 保留时间为 3.929 min。

3 讨论及结论

与前人报道的其它甲壳动物的 MO 腺细胞的特点[Hinsch 和 Al Hajj 1975, Bazin 1976, Yudin 等 1980] 相似, 中国对虾 MO 腺细胞中含有大量的滑面型内质网, 这与脊椎动物和无脊椎动物分泌甾体类激素的细胞相同[Christensen 和 Gillim 1969, Locke 1972], 在这些滑面内质网上有合成甾类物质的酶类, 从而有利于甾类激素的合成; 在 MO 腺细胞中有大量的线粒体, 这些线粒体具有不同的大小和形状, 它们的嵴既有片状的也有管状的, 这样的线粒体在哺乳动物合成甾体激素的细胞中大量出现, 它们参与甾体物质的合成, 因此, MO 腺细胞中的这些线粒体可能有利于 JHⅢ的合成; 腺细胞的细胞膜在靠近血淋巴窦的部位有大量膜质的内陷和皱褶, 这样的膜质结构是对内分泌活动的一种适应[Hinsch 和 Al Hajj 1975], 这样的结构能极大地增加腺细胞与血淋巴之间的有效接触面积, 有利于腺细胞与血淋巴之间代谢物质的交换, 有利于胞吐作用或渗透作用, 使腺细胞分泌的 JH Ⅲ类似物更容易释放到血淋巴中。

在分析和检测条件完全一致的情况下进行 HPLC 分析, 血淋巴和 MO 中的物质与 JH Ⅲ标准品的出峰时间相近, 可以推测这种物质是类似 JH Ⅲ的化合物(图 1—b 和 c 的小峰是在提取过程中混杂的少量脂肪类物质)。通过与 JH Ⅲ标准品的峰面积比较, 计算出体长分别为 5.6cm 和 6.2cm 的中国对虾血淋巴中的 JH Ⅲ类似物分别是 84.3μg/尾和 95.5μg/尾, 而体长 5.6cm 的对虾 MO 中 JH Ⅲ类似物为 155.8μg/尾, 这一数值几乎是血淋巴中的两倍, 通过这一比较及对 MO 腺细胞适于分泌的超微结构的观察可以推测 MO 是 JH Ⅲ类似物的合成场所。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

从血淋巴和 MO 中提取 JH III 类似物采用三相提取法, 提取物进行 HPLC 分析, 用紫外分光光度计检测(检测波长: 220nm), 这种方法能检测最低浓度为 250ng/mL 的 JH III[Borst 和 Tsukimura 1991], 采用三相提取法按一定比例在血淋巴或 MO 中加入适量的生理盐水、乙腈和己烷, 经过适当处理, 绝大多数 JH III 都抽提到己烷中, 其回收率可达 95% 以上, 更为重要的是这种方法能最大限度地减少样品中的紫外吸收物质, 通过薄层层析分析表明三相提取除去了溶入己烷中的脂肪酸和固醇并大大降低甘油三酯水平, 三相提取后再采用 HPLC 分析为测定 JH III 提供了一套非常灵敏的方法, JH III 的定量不受溶液量的影响, 这种方法的灵敏性已通过气相色谱—质谱分析得到验证, 采用这种方法检测中国对虾的 JH III 类似物是可信的。

参　考　文　献

Bazin F. 1976. Mise en evidence des caracteres cytologiques des glandes steroidogenes dans les glandes mandibulaires et les glandes Y du crabe *Carcinus maenas* (L.) normal et epedoncule. C R Acad Sci, Paris. 282 D: 739~741

Borst D, Tsukimura B. 1991. Method for measuring hemolymph levels of methyl farnesoate by HPLC. J Chromatogr, 545: 71~78

Christensen A K, Gillim S W. 1969. The correlation of fine structure and function in steroid secreting cell, with emphasis on those of the gonads. In: Mchem K W, ed, The Glands. Appleton Century Crofts, New York. 415~488

Hinsch G W, Al Hajji H. 1975. The ecdysial gland of the spider crab Libinia emarginata. Biol Bull, 143: 358~366

Laufer H, Borst D, Baker F C, et al. 1987. Identification of a juvenile hormone in crustacean reproduction. Amer Zool, 33: 365~374

LeRoux A. 1968 Desciption d' organes mandibulaire nouveaux chez les crustaces decapodes. C R Acad Sci, Paris. 266: 1414~1417

Locke. 1972. The sertoli cell. Gen Comp, Endocrinol, 3(Suppl): 636~648

Yudin A L, Diener R A, Clark W H, et al. 1980. Mandibular gland of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Biol Bull. 159: 760~772

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c