

# 中华绒螯蟹促雄腺的结构与功能

邱高峰 吴 萍 楼允东

(上海水产大学渔业学院, 200090)

**摘 要** 应用组织切片、组织化学、电镜及体外培养技术研究了中华绒螯蟹促雄腺的结构与功能。结果表明,中华绒螯蟹促雄腺 1 对,呈不规则索状,位于近阴茎基部射精管的表面,由许多实心腺泡组成;腺体结构与个体精巢发育周期密切相关,可明显划分为增殖期、合成期和分泌期 3 个发育时期;腺细胞以全浆方式分泌激素,茛三酮—Schiff 反应、磷钼酸法反应呈阳性,推断分泌激素中主要含蛋白质和脂类 2 种化学成分;体外共培养实验证明,促雄腺具有促进精子发生与排放及抑制卵母细胞成熟的功能。

**关键词** 中华绒螯蟹, 促雄腺, 结构, 功能

## Structure and function of the androgenic gland in *Eriocheir sinensis*

Qiu Gaofeng, Wu Ping, Lou Yundong

(College of Fisheries, Shanghai Fisheries University, 200090)

**ABSTRACT** Structure and function of the androgenic gland in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*, were studied with tissue section, histochemistry, electron microscope and culture *in vitro* techniques from April 1996 to March 1997. A pair of androgenic glands were located on the surface of the subterminal portion of the ejaculatory duct near the base of penis. The cords of the gland tissue consisted of many gland alveoluses. The structure of the gland changed greatly with the testis development cycle. The developmental cytology of the gland cells can be distinctly divided into three stages: proliferation phase, synthesis phase and secretion phase. The gland secreted in a holocrine fashion. The androgenic gland hormone is composed primarily of protein and lipid as indicated by positive reaction to Ninhydrin-Schiff and phosphomolybdic acid. Spermatogenesis can be accelerated and oocyte development can be inhibited by the androgenic glands when cultured *in vitro*.

**KEYWORDS** *Eriocheir sinensis*, androgenic gland, structure, function

促雄腺( androgenic gland) 又译作造雄腺, 是甲壳动物特有的内分泌器官, 只存在雄体, 对个体性别决定及性腺发育起着重要作用。Charniaux-Cotton 首先在端足类跳钩虾( *Orchestia gammarella* ) 中发现该腺体<sup>[1]</sup>, 并对其结构和功能进行过详细研究<sup>[2]</sup>, 随后其它学者在十足类也报道了促雄腺的存在<sup>[3-9]</sup>。近年来, 利用促雄腺切除和移植技术已获得了高比例的罗氏沼虾( *Macrobrachium rosenbergii* ) 单性后代<sup>[10, 11]</sup>, 为经济虾类单性化养殖生产奠定了基础。本文应用组织切片、组织化学、电镜及组织培养技术对中华绒螯蟹( *Eriocheir sinensis* ) 促雄腺结构和功能进行了较系统的研究, 对于进一步开展经济蟹类性别控制研究和单性化养殖生产在理论和实践上均具有重要意义。

上海市教委重点学科研究基金资助项目(中华绒螯蟹性别分化与性别控制的研究), 科 98-23 号。

第一作者简介: 邱高峰, 男, 1965 年 3 月生, 理学博士, 副教授。Tel: 021-65710705, E-mail: qingf@online.sh.cn

收稿日期: 1998-09-04

# 1 材料和方法

## 1.1 材料来源

中华绒螯蟹于1996年4月~1997年4月分批取自上海水产大学南汇养殖场和上海市图们路农贸市场。

## 1.2 结构观察

活体解剖取出雄体射精管,组织学研究用样品以 Bouin 氏液固定,常规石蜡包埋,切片厚 6~7 $\mu$ m, Delafield 氏苏木精与伊红对比染色;组织化学用样品以 Carnoy 氏液固定,Feulgen 反应显示核酸,PAS 反应显示多糖,茚三酮—Schiff 反应显示蛋白质,脂类显示用磷钼酸法,样品以 Baker 氏液固定;透射电镜样品先用 2.5%戊二醛固定,然后在解剖镜下剥离促雄腺,再以 1%锇酸后固定(两种固定液均用 0.1mol/L、pH 7.2 磷酸缓冲液配制),Epon812 包埋,LKB-8800 超薄切片机切片,醋酸铀与柠檬酸铅双重染色,于 JEM-100C XI 透射电镜观察、拍照。

## 1.3 体外培养

实验蟹于通气良好的水族箱内暂养 4~6 天,解剖前以 1%高锰酸钾溶液浸泡 0.5h,在无菌条件下,用 75%酒精进行表面消毒后,旋即解剖取出性成熟河蟹的促雄腺、不同发育期的卵巢和精巢,于 Hank 氏液洗涤数次,切成 1mm<sup>3</sup> 大小的组织块,依贴壁法将促雄腺分别与不同发育期的精、卵巢接种于 5.5cm × 2.8cm 的培养瓶中进行共培养,同时每一实验组设一对照组,不加促雄腺进行单独培养,培养液采用 M199(华美生物工程公司产品),在该培养基中加入 20%小牛血清、100IU/mL 青霉素和 100 $\mu$ g/mL 的链霉素,于 5%CO<sub>2</sub> 的二氧化碳培养箱中(28℃)静止培养,每 2 天更换新鲜培养液一次,于倒置显微镜下观察培养情况。

# 2 结果

## 2.1 促雄腺的结构及发育

中华绒螯蟹促雄腺 1 对,位于近阴茎基部射精管的外表面,呈不规则索状,长约 4~6mm,在射精管表面上各部位分布不均。组织学观察表明,促雄腺以结缔组织膜与射精管相连,由许多实心腺泡组成,其间分布有血窦(图版 I-1)。随着个体年龄及繁殖周期变化,促雄腺的结构各异,其发育过程具体可划分为以下 3 个时期。

**增殖期** 多见于 5~6 月份 1 龄蟹(黄蟹)个体的促雄腺,此期促雄腺体积小(图版 I-2),腺细胞尚未聚集形成腺泡结构,细胞界限明显,体积小,直径约 6~8 $\mu$ m,细胞核嗜碱性强,可观察到有丝分裂相,腺细胞通过有丝分裂使其数目增加。

**合成期** 与增殖期相比,此期促雄腺及其腺细胞体积均明显增大,从射精管横切面观察,腺体可占管壁肌层 1/3 左右,腺细胞圆形或卵圆形,直径约 9~13 $\mu$ m,腺体由典型的腺泡组成(图版 I-2),细胞核圆形,较大,Feulgen 反应阳性,核仁 1~2 个,位于核中央或沿核膜内侧分布。核内染色质疏松呈絮状,沿核膜内缘排列,细胞质呈弱酸性,物质合成活动旺盛,含有发达的粗面内质网和丰富的游离核糖核蛋白体,在核周围近粗面内质网处线粒体分布较丰富,呈球状和棒槌状,内有扁平横嵴(图版 II-3),此外,细胞质中还分布有少量高尔基复合体,后者周围具许多圆形或不规则形小泡,小泡内含有高电子密度颗粒物质,但尚未形成完整的分泌颗粒(图版 II-4)。

**分泌期** 10 月份以后,年龄 1 龄以上的个体(绿蟹),促雄腺发育得更大,在射精管横切面上其最大处可占管壁肌层的 1/2~2/3 以上,沿管壁四周分布的面积也有所增大(图版 I-5)。根据腺细胞显微

和超显微结构的变化,又可进一步分为早、中、后三期。

**分泌早期** 腺体内具有2种形态结构类型的腺细胞,它们明显分布在腺体中的不同区域(图版I-5,6)。一种腺细胞与合成期腺细胞结构相类似,核大而圆,具有典型的细胞结构特征;另一种腺细胞无明显细胞界限,核较小,并开始固缩化,细胞中除了充满电子密度极高的分泌颗粒外(图版II-7,8),内质网等细胞器很少见,腺体内血窦扩大,内含嗜碱性颗粒。

**分泌中期** 在腺体内只有一种结构类型的腺细胞,细胞内仅剩已完全固缩化的细胞核以及核周围细胞质中出现的大小不一的空泡,细胞质中其它细胞器已消失(图版I-9,10;图版II-11)。

**分泌后期** 腺细胞已完全破碎,释放出其内含物,细胞核也不复存在,整个促雄腺呈泡状化,腺体与射精管肌层的连接变得疏松,极易从射精管表面上脱落下来(图版II-12)。

## 2.2 促雄腺的组织化学

Feulgen 反应显示,仅促雄腺腺泡细胞核呈红色,为阳性反应,腺泡细胞质和血窦等为阴性反应。促雄腺细胞 PAS 反应结果为阴性,说明不含多糖类物质;茚三酮——Schiff 反应呈淡红色,为阳性结果;磷钼酸法反应呈绿色,亦为阳性结果,由此可推断,促雄腺的分泌物中含有蛋白质和脂类2种化学成分,而不含多糖和核酸类物质。

## 2.3 促雄腺与性腺的体外共培养

促雄腺分别与不同发育时期性腺于体外共培养的实验结果如表1,促雄腺对于发育中期精巢内的初级精母细胞发育生成精细胞具有促进作用,同时也能加速成熟精巢内生精小管中精子的排放;与此相反,促雄腺对卵巢中卵母细胞的生长和发育却具有抑制作用。

表1 促雄腺与不同发育时期性腺于体外共培养

Tab.1 Androgen gland cultured with gonads at different developmental stage *in vitro*

培养组合	培养时间	培养结果
促雄腺+发育中期精巢	7天	精细胞与次级精母细胞占多数
发育中期精巢(对照)	7天	初级精母细胞占绝大多数
促雄腺+成熟精巢	7天	生精小管中精子排空
成熟精巢(对照)	7天	生精小管中含大量精子
促雄腺+第IV期卵巢	3~7天	卵径较培养前无显著差别( $P > 0.05$ )
第IV期卵巢(对照)	3~7天	卵径较培养前显著增大( $P < 0.05$ )
促雄腺+第II期卵巢	7天	小生长期I 初级卵母细胞,胞质嗜碱性强,卵径约 $10\mu\text{m}$
第II期卵巢(对照)	7天	小生长期II 初级卵母细胞,胞质嗜碱性弱,卵径约 $17\mu\text{m}$

## 3 讨论

### 3.1 中华绒螯蟹促雄腺的位置与形态

过去的观点认为中华绒螯蟹的副性腺即为促雄腺<sup>[12]</sup>,本研究结果表明促雄腺与副性腺是两个完全不同的结构,它们的位置也各不相同,促雄腺位于近阴茎基部的射精管表面,呈不规则索状,分泌物通过血窦直接进入血液循环,为内分泌器官,而副性腺位于贮精囊与射精管的交界处,为细长分枝的管状腺,其分泌物通过盲管的另一端开口进入射精管腔内,是一种外分泌腺,属于雄性生殖系统结构的一部分。

### 3.2 促雄腺的结构与性腺发育周期

黄蟹阶段的1秋龄蟹(5~6月份),促雄腺体积小,处于增殖期,腺细胞主要进行有丝分裂使其数量增多。随着个体的生长发育,促雄腺体积逐渐增大,且腺细胞体积也明显增大,相互聚集形成腺泡,腺细

胞内粗面内质网、高尔基复合体、游离核糖体进行活跃的物质合成活动,至绿蟹阶段,已形成许多电子密度高的分泌颗粒。腺细胞分泌活动旺盛,一部分腺细胞膜破裂,以全浆分泌方式释放其内含颗粒,腺细胞因此而解体,同时另一部分腺细胞仍为非分泌型细胞,能不断形成新的分泌型细胞,使促雄腺在绿蟹阶段(繁殖期)的分泌作用得以维持。

处于黄蟹阶段的中华绒螯蟹,精巢发育缓慢,为透明2小团,直径约为5mm左右,不足1g,但在转变为绿蟹后,自寒露至立冬,性腺迅速发育,体积与重量猛增,这与促雄腺的分泌活动相一致。黄蟹阶段由于促雄腺处于增殖期,不具分泌功能,故性腺发育迟缓,始终为幼稚型,进入绿蟹阶段后,促雄腺分泌功能旺盛,激发精巢由幼稚型向成熟型转变,体积剧增,副性腺也变得很发达,促雄腺与精巢的体外培养实验结果,进一步证实了促雄腺具有促进精巢发育成熟的功能。

### 3.3 促雄腺激素的化学性质

促雄腺细胞分泌的物质称为促雄腺激素(androgonic gland hormone, AGH)。由于AGH量甚微以及分离、鉴定技术上的困难,迄今对AGH的化学结构仍不清楚,对AGH的化学性质也无统一论,归纳起来,存在二种观点,一种观点认为,AGH为脂类化合物,主要证据是从普通滨蟹(*Carcinus maena*)的促雄腺中分离出一种类萜化合物(脂类)<sup>[13]</sup>,其中的二种化学成分即六氢法呢丙酮(hexahydrofarnesylacetone)和法呢丙酮(farnesylacetone)被鉴定为活性成分<sup>[14-16]</sup>,必须指出的是,这种活性成分的鉴定是以对跳钩虾卵黄发生抑制作用为标准的。此外,促雄腺的体外培养实验证明促雄腺组织内能掺入乙酸或甲羟戊酸形成法呢丙酮,后者能够阻止有放射线标记的亮氨酸掺入培养中卵巢,影响卵巢中的某些功能<sup>[13]</sup>,但未报道卵巢能否转变为精巢。另一种观点认为AGH为蛋白质或多肽类物质。从寻常球鼠妇(*Armadillidium vulgare*)的促雄腺中分离得到一类蛋白质<sup>[17]</sup>,分子量分别为15 000~17 000 D<sup>[18]</sup>和1 200~8 000 D<sup>[19]</sup>,这些蛋白质既可使同种雌性个体第二性征雄性化,也可使卵巢向精巢转变<sup>[20]</sup>,而同时分离出的一种脂类化合物,却不能促进精子发育。本研究虽然未进行AGH的分离纯化工作,但组织化学实验证明促雄腺分泌物中含有蛋白质和脂类二种化学成分,同时对促雄腺细胞超微结构研究发现,腺细胞结构特征更象脊椎动物内分泌的蛋白质分泌细胞,而不是类固醇分泌细胞,例如,细胞中粗面内质网发达及含少量高尔基复合体。因此作者认为AGH中含有蛋白质和脂类二种成分,但活性成分可能主要是蛋白质或肽类物质。

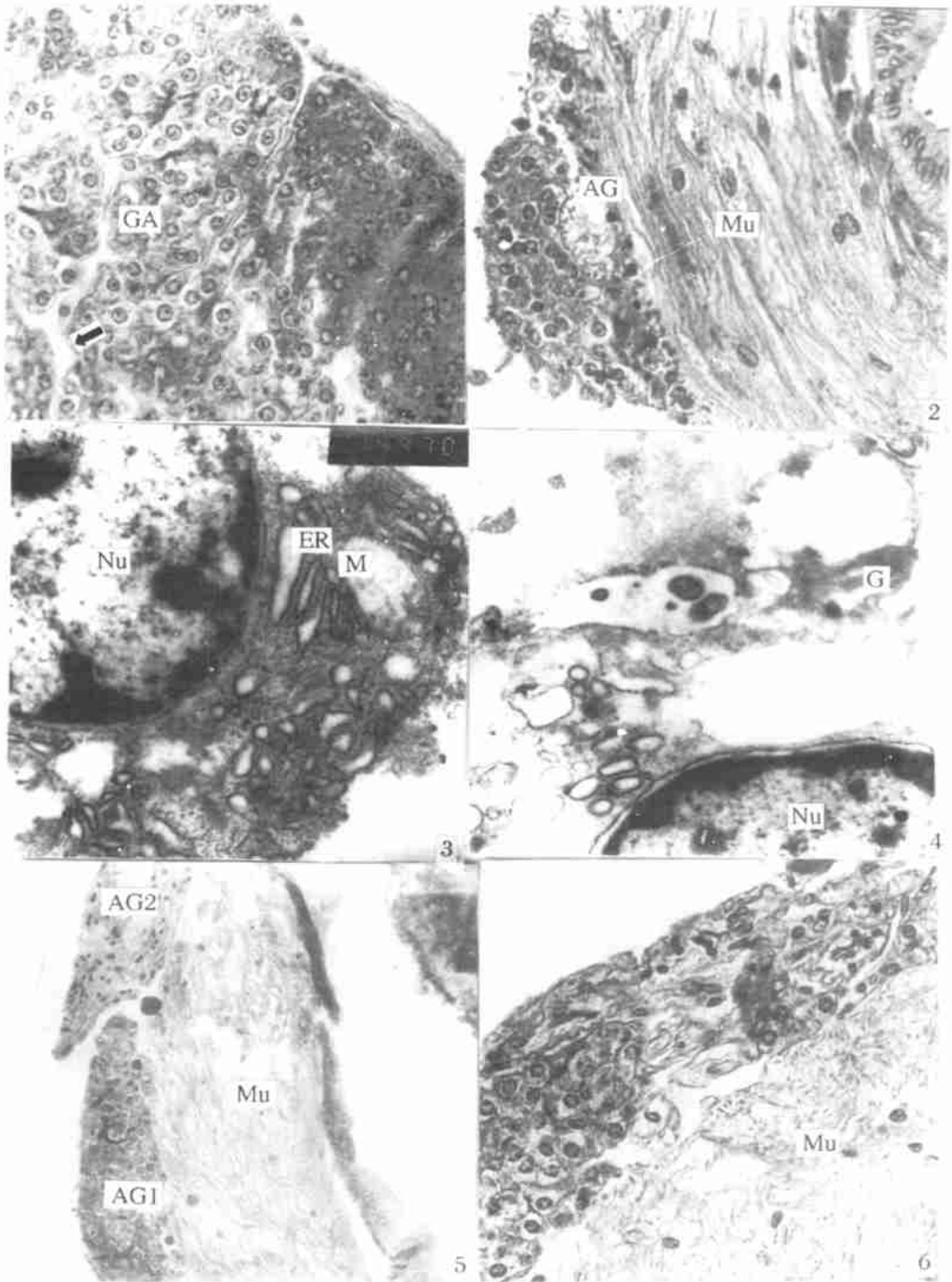
### 3.4 促雄腺的功能与性别控制

早在1954年,Chamianx-Cotton通过促雄腺切除和移植技术对端足类促雄腺的功能进行了详细研究,结果证明促雄腺具有使性腺向雄性发育的功能<sup>[1]</sup>。移植了促雄腺的雌性跳钩虾,其体内卵巢退化,而精巢开始形成,雌性第二性征也向雄性转变。本研究通过促雄腺与性腺体外共培养实验表明,促雄腺能促进精巢中精子发生和排放,而对卵巢中卵母细胞的生长、发育却具有抑制作用,至于卵巢发育被抑制后能否转变为精巢,由于目前虾蟹类组织培养技术的困难,培养的组织仅存活了7天,故本研究对共培养的卵巢将来的发育命运尚无法定论,有待进行促雄腺移植实验确定。但从对日本绒螯蟹进行的促雄腺移植实验结果可知,移植了促雄腺的雌蟹虽然雄性化不完全(可能由于被移植个体年龄偏大),但雌性腹肢发生退化,出现了雄性交接器,从而说明促雄腺同样可以促使雌蟹向雄性方向发育<sup>[21]</sup>。

由于脊椎动物的性激素对虾类的性别决定不能产生影响<sup>[22]</sup>,故利用促雄腺切除和移植技术进行性别控制研究具有特别重要的意义。国外学者利用该技术已经获得了较大数量、高比例的罗氏沼虾单性后代<sup>[10]</sup>,单性化养殖生产已成为可能,此外,通过促雄腺移植和常规杂交技术,对于研究虾蟹类性别决定遗传机制也具有重要作用。由于大多数虾蟹类有丝分裂染色体数目多且体积小(呈点状),核型分析困难,要鉴别性染色体并非易事<sup>[23]</sup>,若利用促雄腺移植后产生的生理上雄性(遗传上雌性)的个体与正常雌体杂交,通过统计后代雌雄性别比例,就可推断个体的性别遗传机制及性染色体类型。

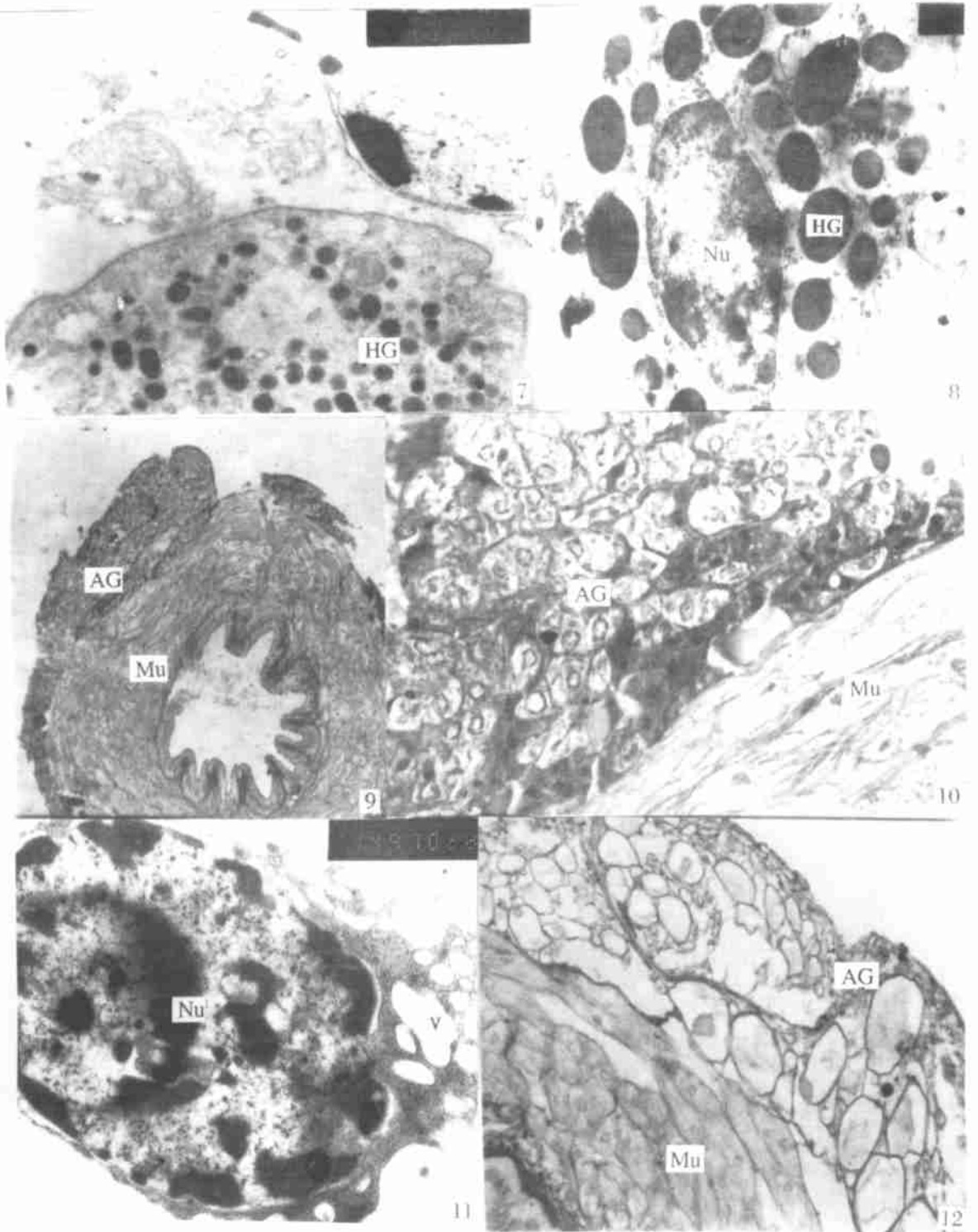
## 参 考 文 献

- 1 Chamiaux-Cotton H. D couverte chez un Crustac Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la diff renciation des caract res sexuels primaires et s condairees males. C R Acad Sci Paris, 1954, 239: 780~ 782
- 2 Chamiaux-Cotton H. Le d terminisme hormonal des caract res sexuels d' *Orchestia gammarella* (Crustac Amphipode). C R Acad Sci Paris, 1955, 240: 1487~ 1489
- 3 Demeusy N, Veillet A. Influence de l' ablation des p oncules oculaires sur la glande androg ne de *Carinus maenas*. L. Compt Rend Acad Sci, 1958, 246: 1104~ 1107
- 4 King D D. Fine structure of the androgenic gland of the crab *Pachygrapsus crassipes*. Gen Comp Endocrin, 1964, 4: 533~ 544
- 5 Nagamine C, Knight A W, Maggent A, et al. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysia prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induced feminization in a nonhemaphroditic decapod. Gen Comp Endocrin, 1980, 41: 423~ 441
- 6 Nakamura K, Matsuaki N, Yonekura K I. Organogenesis of genital organs and androgenic gland in the kuruma prawn. Bull Jap Soc Sci Fish, 1992, 58(12): 2261~ 2267
- 7 李 霞, 李嘉泳. 中国对虾内分泌器官的一新发现——促雄性腺. 大连水产学院学报, 1993, 8(4): 17~ 21
- 8 李富花, 相建海. 中国对虾促雄腺形态结构和功能的初步研究. 科学通报, 1996, 41(15): 1418~ 1422
- 9 邱高峰, 堵南山, 赖 伟. 日本沼虾雄性生殖系统的研究——雄性生殖系统的结构及发育. 上海水产大学学报, 1995, 4(2): 107~ 111.
- 10 Sagi A, Cohen D, Milne Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Gen Comp Endocrin, 1990, 77: 15~ 22
- 11 Malecha S R, Nevin P A, Phyllis H, et al. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquac, 1992, 105: 201~ 218
- 12 堵南山, 赖 伟, 薛鲁征. 中华绒螯蟹雄性生殖系统的组织学研究. 动物学报, 1988, 34(4): 329~ 333
- 13 Berreux-Bonnenfant J, Meusy J J, Ferezou J P, et al. Recherches sur la s cr tio de la glande androg ne des Crustac s Malacostrac s Purification d'une substance activit androg ne. C R Acad Sci Ser, 1973, 277: 971~ 974
- 14 Ferezou J P, Berreux-Bonnenfant J, Meusy J J, et al. 6, 10, 14-Trimethylpentadecan-2-one and 6, 10, 14-trimethyl-5-trans, 9-trans, 13-pentadecatrien-2-one from the androgenic glands of the male crab *Carcinus maenas*. Experientia, 1977a, 33: 290
- 15 Ferezou J P, Berreux-Bonnenfant J, Tekitek A, et al. Biologically active lipids from the androgenic gland of the crab *Carcinus maenas*. In: Faulkner D J, Fenical W H, eds. Marine natural products chemistry, Plenum Press, New York, 1977b, 361~ 366
- 16 Berreux-Bonnenfant J, Lawrence F. Comparative effect of farnesylacetone on macromolecular synthesis in gonads of crustaceans. Gen Comp Endocrin, 1984, 54: 462~ 468
- 17 Hasegawa Y, Fukushima K H, Katakura Y. Isolation and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Gen Comp Endocrin, 1987, 67: 101~ 110
- 18 Katakura Y, Fujimaki Y, Unno K. Partial purification and characterization of androgenic gland hormone from the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. Ann Zool Jap, 1975, 48(4): 203~ 209
- 19 Juchault P, Legrand J J, Maissiat J. Present state of knowledge on the chemical nature of the androgenic hormone in higher crustaceans. In: Hoffman J, Porchet M, eds. Biosynthesis metabolism and mode of action of invertebrate hormones, Springer-Verlag, Berlin, 1984, 155~ 160
- 20 Katakura Y, Hasegawa Y. Masculinization of females of the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, following injections of an active extract of the androgenic gland. Gen Comp Endocrinol, 1983, 48: 57~ 62
- 21 李大雄, 山崎文雄. 造雄腺移植による雌 *Eriocheir japonicus* の部分的雄性化. 水产增殖, 1993, 41(3): 311~ 319
- 22 吴仲庆. 17-β雌二醇对长毛对虾生长的影响. 海洋科学, 1990, 2(2): 53~ 55
- 23 邱高峰. 罗氏沼虾核型及长臂虾亚科核型演化关系的探讨. 水产学报, 1996, 20(4) 294~ 300



1. 合成期的促雄腺, 示腺泡及血窦(箭头),  $\times 300$ ; 2. 增殖期的促雄腺,  $\times 100$ ; 3. 合成早期的促雄腺中含丰富的内质网、少量高尔基体和线粒体,  $\times 14\ 000$ (透射电镜照片); 4. 合成期促雄腺细胞中腺泡进行活跃合成活动,  $\times 14\ 000$ (透射电镜照片); 5. 分泌早期的促雄腺, 两个不同区域已分离,  $\times 100$ ; 6. 分泌早期的促雄腺, 两种类型的腺细胞分布在两个不同区域,  $\times 150$ 。

GA: 腺泡, AG: 促雄腺, Mu: 射精管壁肌层, Nu: 细胞核, ER: 内质网, AG1、AG2: 两个区域的腺细胞, G: 高尔基体, M: 线粒体



7,8.分泌早期促雄腺细胞中充满高电子密度颗粒,×7 200(透射电镜照片); 9.分泌中期的促雄腺,×60; 10.图5促雄腺放大,×300;11.分泌中期促雄腺细胞破裂,仅剩细胞核及其周围的大小泡,×14 000(透射电镜照片); 12.分泌后期的促雄腺,腺泡中内含物排空,呈现泡状化现象,×200。

HG:高电子密度颗粒,Nu:细胞核,Mu:射精管壁肌层,AG:促雄腺,V:大小泡