

文章编号: 1000-0615(2003)06-0545-05

## 日本沼虾胚胎发育不同阶段主要生化成分的变化

李 红, 赵云龙, 王 群, 罗 文, 堵南山

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

**摘要:** 为了解甲壳动物胚胎发育过程中主要营养物质消耗利用的规律, 采用生物化学方法测定了日本沼虾胚胎发育过程中 7 个发育期的主要生化成分。结果表明, 在日本沼虾胚胎发育过程中, 水分含量在早期无显著变化, 发育至蚤状幼体期达到最高。蛋白质含量在早期略有升高, 而从后无节幼体晚期开始下降。脂类含量则逐期下降, 只是在前蚤状幼体期有所升高。这表明在胚胎发育过程中, 脂类和蛋白质不仅在构建组织器官过程中起到重要作用, 且两者可能分别作为胚胎发育不同时期的主要能量来源。脂肪酸变化研究表明: DHA 主要参与细胞和亚细胞结构形成。亚油酸和亚麻酸的含量在胚胎发育过程中下降, 可能为胚胎发育提供能量, 并合成部分 DHA。 $\Sigma\omega-3$ HUFA 在前蚤状幼体期含量开始增加, 主要用于胚胎发育后期细胞结构的形成。棕榈油酸在蚤状幼体期含量骤然下降, 主要作为能量物质被消耗。日本沼虾胚胎发育不同阶段主要生化成分的变化与其组织、器官的发育关系密切。

**关键词:** 日本沼虾; 胚胎发育; 蛋白质含量; 脂类含量; 脂肪酸组成

**中图分类号:** S917; Q132.4      **文献标识码:** A

## Variations in biochemical composition during embryonic development of *Macrobrachium nipponense*

LI Hong, ZHAO Yun-long, WANG Qun, LUO Wen, DU Nan-shan

(College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract:** To study the metabolism of the main nutrition during embryonic development of the Crustacea, the variations in biochemical composition during embryonic development of *Macrobrachium nipponense* were determined by biochemical methods. The results showed that water content had a little change in the early stage of embryonic development, but reached the highest content at the zoea stage. Protein content increased in the early stage and began to decrease from the late stage of egg-metanauplius. The content of lipid decreased with the embryonic development stages and increased at the stage of egg-protozoa. All those indicated that protein and lipid were the main energy sources for the embryonic development of *M. nipponense*, and they also were the important sources for tissue differentiation and organization. Based on the variation of fatty acid composition, DHA participated in tissue differentiation and organization. The linoleic acid and linoleic acid offered energy for embryonic development, at the same time they synthesized DHA.  $\Sigma\omega-3$ HUFA was concerned with the forming of cells in the late stage of embryonic development. The palmitoleic acid was probably concerned with energy

**收稿日期:** 2002-09-12

**资助项目:** 国家自然科学基金(30270161)、高等学校博士点基金(20010269002) 和上海市曙光计划资助

**作者简介:** 李 红(1976-), 女, 山东淄博人, 实习研究员, 硕士, 从事发育生物学研究。现在上海市肿瘤研究所工作

**通讯简介:** 赵云龙(1963-), 男, 江苏江阴人, 教授, 博士生导师。E-mail: zhaoyunlong1963@263.net

metabolizing. The conclusion is that the variations in biochemical composition during embryonic development of *M. nipponense* closely correlate with the development of the tissue and organization.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; embryonic development; protein content; lipid content; fatty acid composition

胚胎发育的营养利用和形态发生密切相关,研究胚胎期营养与发生的相关性,已经成为当前虾蟹生殖生物学的一个重要内容<sup>[1-5]</sup>,但是甲壳动物虾蟹胚胎的发育存在其特殊性,如通常亲体抱卵孵化,正常卵子富含卵黄,发育期长等,因此针对甲壳动物胚胎发育的研究工作较少。日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*),俗称青虾或河虾,隶属甲壳纲,十足目,长臂虾科。我们在基本弄清日本沼虾胚胎发育过程中形态结构的变化规律的基础上,对各期胚胎的主要生化成分进行了测定及分析,并初步探讨了主要生化成分的变化与其胚胎形态结构发育的关系,以期丰富虾蟹胚胎发育研究的生物学内容。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

根据胚胎形态结构发育特征,将日本沼虾胚胎的发育过程分为7个时期:卵裂期、囊胚期、原肠期、前无节幼体期、后无节幼体期、前溞状幼体期和溞状幼体期。本研究取材从卵裂期开始,至溞状幼体期结束,其中根据后无节幼体期和前溞状幼体期发育时间较长的特点,分别将这2个时期人为地划分为早期和晚期,因此共采集了9个时期的样品。每期取卵1g左右,分3组,于-20℃冰箱保存备用。

### 1.2 方法

总蛋白质含量按刘宗柱等<sup>[6]</sup>改进的凯氏定氮法测定。总脂含量测定采用 Bligh 和 Dyes<sup>[7]</sup>的方法。脂肪酸分析采用毛细管气相色谱法,采用分流进样系统(split injection system);载气为氮气;柱内压为60kPa;分流比为50:1;检测器及进样口温度为300℃;柱温采用程序升温法,最高温度为280℃;检测器为氢火焰离子检测器;分析柱为HP-5(非极性)。对各脂肪酸的定性是依据在相同色谱条件下,以标准脂肪酸的保留时间来确定。

## 2 结果

### 2.1 胚胎发育不同阶段水分含量的变化

日本沼虾胚胎卵裂期的水分含量为62.11%,在囊胚期、原肠期和前无节幼体期没有明显变化,分别为61.88%、60.54%和61.27%。而在后无节幼体早期略有下降,为55.89%,之后的后无节幼体晚期、前溞状幼体早期及前溞状幼体晚期未见显著变化,分别为56.44%、56.77%和59.33%。但从前溞状幼体晚期到溞状幼体期胚胎水分含量明显升高,由59.33%增至76.80%,增幅达29.45%(图1)。

### 2.2 胚胎发育不同阶段总蛋白质含量的变化

日本沼虾在胚胎发育早期蛋白质的平均含量(干重)没有明显变化,卵裂期为54.13%,囊胚期为56.53%,原肠期为55.81%,前无节幼体期为58.22%。后无节幼体早期和后无节幼体晚期中蛋白质含量略有升高,为63.07%和64.46%,分别较前一时期增加了8.33%和2.20%。但从后无节幼体晚期到溞状幼体期,蛋白质含量不断下降,前溞状幼体早期为57.43%,前溞状幼体晚期为51.98%,溞状幼体期为42.28%,分别较前一时期减少了10.91%、9.49%、18.66%。其中从前溞状幼体晚期到溞状幼体期蛋白质含量的降幅最大(图2)。

## 2.3 胚胎发育不同阶段脂类和脂肪酸组成的变化

### 2.3.1 脂类的变化

在日本沼虾胚胎发育过程中,总脂占胚胎干重的百分含量出现规律性的变化,处于卵裂期的胚胎总脂含量较高,为 26.68%。随着胚胎发育的进行,脂类含量逐渐降低,囊胚期、原肠期、前无节幼体期、后无节幼体早期、后无节幼体晚期和前溞状幼体早期的总脂含量依次为 25.42%、22.19%、19.03%、18.00%、15.45% 和 15.78%。至前溞状幼体晚期,总脂含量上升为 21.30%,增幅达 34.98%。胚胎接近孵化时,总脂含量又下降为 15.85%(图 3)。

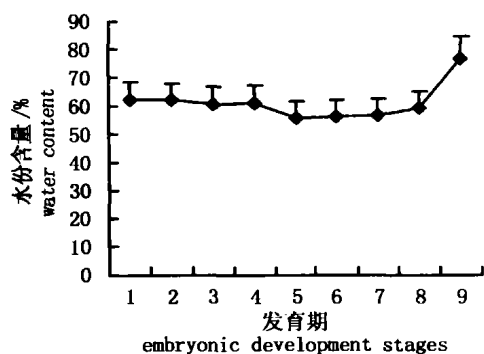


图 1 水分含量变化趋势  
Fig.1 The variation of water content

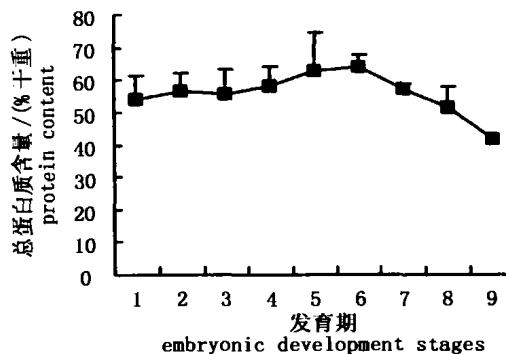


图 2 蛋白质含量变化趋势  
Fig.2 The variation of protein content

1. 卵裂期;2.囊胚期;3.原肠期;4.前无节幼体期;5.后无节幼体早期;  
6.后无节幼体晚期;7.前溞状幼体早期;8.前溞状幼体晚期;9.溞状幼体期

1. cleavage stage;2. blastula stage;3. gastrula stage;4. egg-nauplius stage;5. early stage of egg-metanauplius;  
6. late stage of egg-metanauplius;7. early stage of egg-protozoa;8. late stage of egg-protozoa;9. zoea stage

### 2.3.2 脂肪酸的组成及变化

由表 1 可见,在日本沼虾各期胚胎中,软脂酸(C16:0)、亚油酸(C18:2 $\omega$ 6)、亚麻酸(C18:3 $\omega$ 3)、EPA(C20:5 $\omega$ 3)、棕榈油酸(C16:1 $\omega$ 7)、油酸(C18:1 $\omega$ 9)及硬脂酸(C18:0)等占主要比例。

5 个时期的 DHA(C22:6 $\omega$ 3)的含量变化较明显。在前无节幼体期 DHA 含量比原肠期增加了约 1 倍左右,之后各期均略有增加,但幅度很小。亚油酸和亚麻酸的含量在胚胎发育过程中一直呈下降趋势。 $\Sigma\omega$ -3HUFA 在胚胎发育早期各期胚胎中的含量变化不大,在前溞状幼体晚期和溞状幼体期含量有所升高。软脂酸在原肠期的含量为 17.04%,后无节幼体期为 17.96%,其变化不明显;在前溞状幼体晚期,软脂酸的含量开始升高,至溞状幼体期升至最高点 25.43%,约比原肠期增加了 49.30%。 $\Sigma$ SFA 的变化趋势与软脂酸类似。在胚胎从原肠期发育至后无节幼体期的过程中,棕榈油酸含量一直呈上升趋势,但在溞状幼体期其含量骤然下降(表 1)。

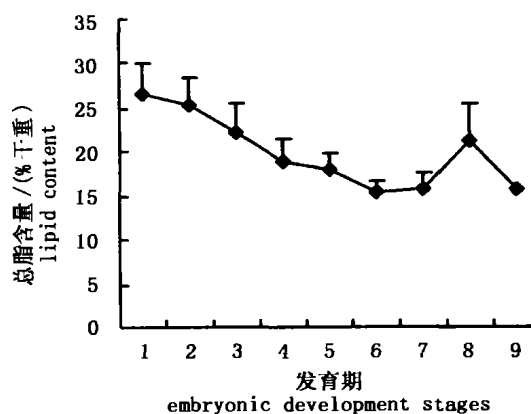


图 3 脂类含量变化趋势  
Fig.3 The variation of lipid content

1. 卵裂期;2.囊胚期;3.原肠期;4.前无节幼体期;5.后无节幼体早期;  
6.后无节幼体晚期;7.前溞状幼体早期;8.前溞状幼体晚期;9.溞状幼体期

1. cleavage stage;2. blastula stage;3. gastrula stage;4. egg-nauplius stage;5. early stage of egg-metanauplius;6. late stage of egg-metanauplius;7. early stage of egg-protozoa;8. late stage of egg-protozoa;9. zoea stage

表1 日本沼虾胚胎发育不同阶段脂类的脂肪酸组成比较

Tab.1 Fatty acid composition of total lipids for embryonic developmental stages of *M. nipponense*

脂肪酸 fatty acid	原肠期 gastrula stage	前无节幼体期 egg-nauplius stage	后无节幼体期 egg-metanauplius stage	前溞状幼体期 egg-protzoeca stage	溞状幼体 zoea stage
C14:0	1.52	1.43	1.56	1.96	2.16
C16:1 $\omega$ 7	7.99	7.19	9.39	9.30	6.34
C16:0	17.04	17.28	17.96	21.83	25.43
C18:2 $\omega$ 6	24.11	23.55	20.17	17.37	14.25
C18:3 $\omega$ 3	20.65	19.59	20.49	16.67	16.78
C18:1 $\omega$ 9	5.65	6.02	6.70	7.12	8.11
C18:0	6.29	7.21	6.74	5.77	7.01
C20:5 $\omega$ 3	12.71	11.27	11.56	13.99	14.28
C20:3 $\omega$ 3	2.22	3.11	1.58	2.46	1.63
C20:0	0.24	0.29	-	-	0.42
C22:6 $\omega$ 3	1.59	3.07	3.85	3.51	3.58
$\Sigma$ SFA	25.09	26.21	26.26	29.58	35.02
$\Sigma\omega-3$ HUFA	16.51	17.45	16.99	19.96	19.49

注:脂肪酸表示方法, A:B $\omega$ C。A:碳原子数;B:双键数;C:从烷基末端数第一个双键位置。 $\Sigma$ SFA为饱和脂肪酸含量总和; $\Sigma\omega-3$ HUFA为 $\omega-3$ 系列高不饱和脂肪酸含量总和;“-”表示未检出

Notes: denotation for fatty acid: A:B $\omega$ C. A: the number of carbon atoms; B: the number of double bonds; C: the position of the first double bond from the alkyl.  $\Sigma$ SFA: the summation of saturated fatty acid;  $\Sigma\omega-3$ HUFA: the summation of  $\omega-3$  high unsaturated fatty acid. “-” means unfound

### 3 讨论

日本沼虾的胚胎发育与其他甲壳动物相类似<sup>[8-9]</sup>,随着发育的进行,构成组织或器官的细胞增多,水分的含量也会随之增加。但发育至最后一期溞状幼体期,卵内胚胎通常吸入大量的水份,以增加自身的体积,以便突破卵膜,从卵内孵出。因此,日本沼虾的溞状幼体期出现了水份的大幅上升,而其它时期则缓慢增加。

脂类是甲壳动物的主要能量物质,同时也是胚胎发育中组织、器官的构建物质。日本沼虾在前溞状幼体期前脂类含量的迅速降低,与胚胎发育过程中能量物质的消耗以及组织、器官的不断形成有关。进入前溞状幼体期后,脂类含量出现了大幅上升。而日本沼虾胚胎形态学的研究表明该期是胚胎器官形成比较关键的时期,期间复眼色素开始出现,心脏形成,神经系统和消化系统也不断完善。而锯缘青蟹胚胎发育的研究<sup>[4]</sup>同样发现,复眼色素形成期脂类含量升高,且复眼色素带的主要成分是脂类物质。因此,日本沼虾脂类含量在此期的增加与组织、器官的进一步分化<sup>[1]</sup>有关,同时后期的出膜孵化也需要消耗大量的能量物质,继而在溞状幼体期又出现了大幅的下降。

Babu<sup>[1]</sup>对双齿扇蟹的研究表明,蛋白质在胚胎组织的分化和器官的形成,尤其是角质层、肌肉、消化和神经系统等的形成过程中起重要作用。与脂类的变化趋势不同,蛋白质含量在胚胎发育早期呈小幅上升趋势,而至后无节幼体晚期后开始大幅下降。胚胎发育前期各种重要的器官系统尚未形成,组织、器官形成的速度慢,因此蛋白质作为组织分化和器官形成的构建物质,其消耗可能小于卵黄蛋白的分解,因此蛋白质处于少量的累积状态;而进入后期后,胚胎发育速度明显加快,肌肉、消化、神经等系统大量形成,因而蛋白质被大量消耗。此外,从后无节幼体晚期和前溞状幼体期早期脂类含量的持平并随之上升以及同一时期蛋白质含量的大幅下降可以看出,胚胎发育后期大量的能量消耗已经由脂类转向了蛋白质,这为复眼色素等的形成提供了有力的保障。由此可见,在日本沼虾的胚胎发育过程中,脂类和蛋白质分别充当了不同时期胚胎发育的主要能量来源。这一结论与 Heras 等<sup>[10]</sup>的结论相一致,但与双齿扇蟹<sup>[1]</sup>和锯缘青蟹<sup>[4]</sup>不同,其原因很可能与动物胚胎在不同环境下对各种生化物质(包括蛋白质、脂类、糖类等)的利用情况不同有关<sup>[1]</sup>。双齿扇蟹和锯缘青蟹均为海洋性甲壳动物,生活在热带和亚热带地区<sup>[4]</sup>;而日本沼虾为纯淡水甲壳动物,主要生活在温带地区<sup>[11]</sup>。

已有研究证实,日本对虾<sup>[12]</sup>和中国对虾<sup>[13]</sup>胚胎中软脂酸、棕榈油酸、油酸、EPA及DHA等占主要

比例,白对虾<sup>[14]</sup>主要脂肪酸的组成除软脂酸、棕榈油酸、油酸、DHA 等,还有花生四烯酸,而不含 EPA。至于日本沼虾各期胚胎中脂肪酸组成与以上个体相比又有所不同,以软脂酸、亚油酸、亚麻酸、EPA、棕榈油酸、油酸及硬脂酸等为主,DHA 含量则相对较低。由此可见,虾类胚胎中主要脂肪酸的组成存在种的差异,这可能与不同虾类所经历的胚胎发育时间的长短有关<sup>[15]</sup>。对虾类的胚胎在自然水温下发育一般不超过一天;而日本沼虾的胚胎发育需历时 25d 左右。

实验结果表明,日本沼虾各期胚胎的脂肪酸组成没有显著的变化,这与成永旭等<sup>[5]</sup>对河蟹胚胎发育的研究结果类似,但各期胚胎的脂肪酸的相对含量呈现出一定的差异。

十足目甲壳动物具有利用亚油酸和亚麻酸部分合成 EPA 和 DHA 的能力<sup>[16]</sup>。日本沼虾胚胎中亚油酸和亚麻酸的含量一直呈下降趋势,尤其是亚油酸下降幅度较大,这可能与亚油酸和亚麻酸转化成 DHA 和 EPA 有关,而胚胎发育后期 DHA 和 EPA 含量的增加也证实了这种可能性。研究表明 EPA 和 DHA 主要存在于虾体的细胞和亚细胞结构中,是虾体组织的重要组成部分<sup>[12]</sup>,且 DHA 与甲壳动物的中枢神经系统发育和胚胎孵化关系密切<sup>[2]</sup>。

长链多不饱和脂肪酸是对虾组织中的细胞膜等结构的重要组成部分,随着对虾的生长发育,其比例不断增加<sup>[13]</sup>。而日本沼虾长链多不饱和脂肪酸( $\Sigma\omega-3$ HUFA)的含量在前溞状幼体期开始增加,表明组织器官在前溞状幼体期后大量形成,并处于不断完善之中。软脂酸和 $\Sigma$ SFA 的含量在胚胎发育后期升高,其原因有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Babu D E. Observations on the embryonic development and energy source in the crab *Xantho bidentatus*[J]. Mar Biol, 1987, 95:123 - 127.
- [ 2 ] Calark A H, Brown H L. The biochemical composition of eggs from *Macrobrachium rosenbergii* in relation to embryonic development[J]. Comp Biochem Physiol, 1990, 96B: 505 - 511.
- [ 3 ] Costlow J D. Free amino acids in developing stages of two crabs *Callinectes sapidus* Rathbun and *Rithropanopeus harrisi* (Gould) [J]. Acta Embryol Morphol Exp, 1996, 9: 44 - 55.
- [ 4 ] Wang G Z, Tang H, Li S J, et al. Biochemical composition for mud crab *Scylla serrata* during embryonic development[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1995, 14(3):280 - 283. [王桂忠,汤 鸿,李少菁,等. 锯缘青蟹胚胎发育过程中主要生化组成[J]. 台湾海峡, 1995, 14(3):280 - 283.]
- [ 5 ] Chen Y X, Du N S, Lai W. Lipid composition variation during the embryonic development in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 1998, (Special Issue of Zoology): 32 - 36. [成永旭,堵南山,赖 伟. 中华绒螯蟹胚胎不同发育阶段脂类及脂肪酸组成的变化[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1998, (动物学专辑): 32 - 36.]
- [ 6 ] Liu Z Z, Zhu F H, Xu Y L, et al. Improvement in Kjeldahl's method determining protein content of flounder muscle[J]. Experiments and Techniques, 1999, 6:1 - 3. [刘宗柱,朱凤华,徐永立,等. 凯氏定氮法测定牙鲆肌肉粗蛋白含量方法的改进[J]. 实验与技术, 1999, 6:1 - 3.]
- [ 7 ] Nichols B W. New biochemical separations[M]. Tokyo: Science House, 1964. 321 - 337.
- [ 8 ] Pandian T J. Ecophysiological studies on the developing eggs and embryos of the European lobster *Homarus gammarus*[J]. Mar Biol, 1970, 5: 153 - 167.
- [ 9 ] Pandian T J. Yolk utilisation and hatching time in the Canadian lobster *Homarus americanus*[J]. Mar Biol, 1970, 7: 249 - 254.
- [ 10 ] Heras. Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*[J]. Lipids, 2000, 35(6): 645 - 651.
- [ 11 ] Du N S. Carcinology( II)[M]. Beijing: Science Press, 1993. 675 - 914. [堵南山. 甲壳动物学(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 675 - 914.]
- [ 12 ] Tesbima S, Kanazawa A. Variation in lipid composition during the larval development of the prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. Mem Fac Fish. Kagoshima Univ, 1982, 31: 205 - 212.
- [ 13 ] Ji W J. Fatty acid changes during larval development of *Penaeus chinensis*[J]. J Fish Sci China, 1996, 3(4):29 - 34. [季文娟. 中国对虾幼体发育各阶段脂肪酸组成的研究[J]. 中国水产科学, 1996, 3(4):29 - 34.]
- [ 14 ] Ward G D, Middleditch B S, Missler S R, et al. Fatty acid change during larval development of *Penaeus setiferus*[J]. Proc World Maricul Soc, 1979, 10: 464 - 471.
- [ 15 ] Zhang Z F, Liao C Y, Wang H L, et al. Studies on embryonic development of *Penaeus japonicus*[J]. J Fish China, 1997, 21(2): 201 - 215. [张志峰,廖承义,王海林,等. 中国对虾胚胎发育的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(2): 201 - 215.]
- [ 16 ] Jones D A, Kanazawa A, Ono K. Studies on nutritional requirement of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microcapsulated diets[J]. Mar Biol, 1979, 54:261 - 267.