

文章编号:1000 - 0615(2005)05 - 0630 - 05

性早熟中华绒螯蟹肝胰腺与 性腺的酸性和碱性磷酸酶活性

陈再忠, 王 武, 成永旭

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用磷酸苯二钠法在 520 nm 波长测定了未成熟、早熟和正常成熟中华绒螯蟹肝胰腺与性腺中的酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)。结果表明:(1)各组蟹肝胰腺 ACP 和 ALP 活性都显著高于性腺;(2)早熟蟹肝胰腺中 ACP 活性都显著高于未成熟蟹而低于正常成熟蟹,在各发育阶段没有性别差异,但是,早熟雌蟹和正常成熟雌蟹卵巢中 ACP 活性都较早熟雄蟹和正常雄蟹精巢低,早熟与正常成熟个体没有差异;(3)早熟雌蟹肝胰腺 ALP 活性显著高于未成熟和正常成熟雌蟹,而与三组雄蟹处于同一水平,但是,早熟和正常成熟雌雄蟹的性腺中 ALP 活性没有显著差异。由此得出结论:(1)性腺发育所需营养物质的动员或合成主要与肝胰腺 ACP 有关;(2)性早熟的发生与肝胰腺中 ACP 和 ALP 活性的显著升高有关。

关键词:中华绒螯蟹;肝胰腺;性腺;性早熟蟹;磷酸酶

中图分类号:S917 文献标识码:A

The activity of acid and alkaline phosphatase in hepatopancreas and gonads of precocious *Eriocheir sinensis*

CHEN Zai-zhong, WANG Wu, CHENG Yong-xu

(College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The activities of ACP and ALP in hepatopancreas and gonads of immature, precocious and normally mature *Eriocheir sinensis* were assayed at 520nm wave length. Firstly, the activities of ACP and ALP in hepatopancreas were significantly higher than those in gonads. Secondly, the activities of ACP in hepatopancreas of precocious crabs were significantly higher than those of immature crabs, but lower than those of normally mature crabs, and no sexual difference existed. However, the activities of ACP in ovaries of precocious and normally mature female crabs were correspondingly lower than those in testes of precocious and normally mature male crabs. There was no difference between precocious and normally mature crabs. Thirdly, the activities of ALP in hepatopancreas of precocious female crabs were significantly higher than those of immature and normally mature female crabs, but at the same level as three groups of male crabs. However, there was no significantly difference between the activities of ALP in gonads of precocious and normally mature crabs. Therefore, the following could be concluded: (1) mobilization or synthesis of those nutrients required by gonads was related to ACP in hepatopancreas; (2) onset of precocity was related to significant elevation of activities of ACP and ALP.

Key words: *Eriocheir sinensis*; hepatopancreas; gonad; precocious crab; phosphatase

酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是动物体内重要

的酶类,它们不仅可以分解正磷酸单酯而为机体的磷代谢和核酸代谢提供磷酸基团^[1,2],而且与

收稿日期:2005-03-28

资助项目:上海市教委重点学科资助项目“中华绒螯蟹性早熟机理的研究”(B991602);上海市重点学科建设项目资助(Y1101)

作者简介:陈再忠(1973-),男,安徽明光人,博士,从事集约化水产养殖和繁殖生物学研究。Tel:021-65710883

通讯作者:王 武, E-mail:wwang@shfu.edu.cn

动物体营养物质的消化、吸收以及分泌有关^[3-5]。另外,它们还参与蜕壳^[6,7]、性腺发育^[8-11]、核酸代谢^[12]以及脂类代谢^[13]等过程。

在甲壳动物中,研究者已经分别就 ACP 和 ALP 的分布^[7,14-17]以及生化特性^[18-23]进行了多方面研究,但是在机体的代谢方面还未见报道。

据叶恭银^[12]对天蚕脂肪体和性腺、Cahu 等^[13]对舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 消化道的研究结果,ACP 和 ALP 活性受温度、保幼激素、蜕皮激素以及饲料脂类水平和脂肪酸组成变化的影响,而这些因素被认为是中华绒螯蟹性早熟的主要影响因子。有鉴于此,本试验对未成熟、早熟以及正常成熟中华绒螯蟹肝胰腺和性腺中 ACP 和 ALP 活性进行了测定,旨在揭示这两种酶在中华绒螯蟹体内的分布及其在性成熟过程中的变化,以便探讨其在性早熟形成中的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 当年性成熟蜕壳前后的雌雄个体(文中分别称“未成熟”和“早熟”)与正常成熟个体(文中称“正常成熟”),于 2001 年 10-12 月采自上海市崇明县富民农场养蟹基地(试验蟹的数量和体重见表 1)。

表 1 试验蟹的数量和体重

Tab.1 Sample number and body weight of the tested crabs

组别 group	编号 abbrev. number	样品数	体重(g) weight
未成熟雌蟹 immature female crab	UFC	36	9.501 ±2.365
早熟雌蟹 precocious female crab	PFC	30	24.202 ±9.531
正常成熟雌蟹 normally mature female crab	NFC	30	123.629 ±23.540
未成熟雄蟹 immature male crab	UMC	38	9.911 ±2.428
早熟雄蟹 precocious male crab	PMC	33	25.672 ±6.910
正常成熟雄蟹 normally mature male crab	NMC	30	169.033 ±24.508

1.2 样品处理

称取肝胰腺或性腺新鲜组织 0.3 g,放入玻璃匀浆器中,然后加入 5 l(V/W)的 0.1 mol L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.4),在冰水浴中匀浆数分钟

后,倒入 1.5 mL Eppendorff 管中,于 4 °C 冰箱中抽提 1 h 后,在台式高速冷冻离心机中 0~4 °C 下以 15 000 r·min⁻¹离心 20 min,离心后的上清液即可用于酶活性的测定。

1.3 酶活性的测定

碱性磷酸酶(ALP) 参照李影林^[24],采用磷酸苯二钠法测定。0.1 mol L⁻¹碳酸缓冲液(pH 10.0):取无水碳酸钠 6.36 g,碳酸氢钠 3.26 g,加少量蒸馏水溶解,定容至 1000 mL。0.01 mol L⁻¹磷酸苯二钠底物液:取磷酸苯二钠 2.18 g,溶于 1000 mL 蒸馏水中,迅速煮沸,冷却后加氯仿 4 mL,置冰箱中备用。碱性溶液:取 0.5 mol L⁻¹氢氧化钠 8 mL 与 0.5 mol L⁻¹碳酸氢钠溶液 12 mL 混合。

标准曲线是由酚标准液替代样品液,再加底物液,按上述程序测定,得出光吸收值与酶活力金氏单位的关系而建立,标准曲线为: $y = 0.2944 + 51.1625x$ ($r^2 = 0.9971$),其中 y 为酶活力金氏单位(U·mL⁻¹), x 为光吸收值。

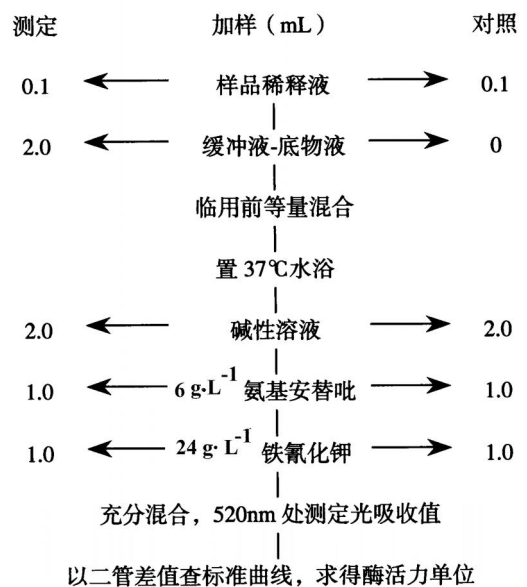


图 1 碱性磷酸酶(或酸性磷酸酶)活力的测定步骤

Fig.1 The mensuration of activity of alkaline (or acid) phosphatase

酸性磷酸酶(ACP) 0.1 mol L⁻¹柠檬酸缓冲液(pH 4.9):取柠檬酸 21 g 溶于少量蒸馏水中,加 1 mol L⁻¹NaOH 188 mL,用蒸馏水稀释至 500 mL,调节校正 pH 至 4.9,加数滴氯仿,置冰箱中保存备用。碱性溶液:取 0.5 mol L⁻¹氢氧化钠

10 mL 与 0.5 mol L^{-1} 碳酸氢钠 10 mL 等量混合。活力测定和标准曲线制备时,缓冲液改用柠檬酸缓冲液。其它同测定碱性磷酸酶的活力测定。标准曲线为: $y = 0.5331 + 51.324x$ ($r^2 = 0.9963$), 其中 y 为酶活力金氏单位 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$), x 为光吸收值。

1.4 数据处理

显著性分析采用 Statistica 5.0/w 软件中的独立样本 t -检验法: $P > 0.05$, 为差异不显著; $P < 0.05$, 为差异显著; $P < 0.01$, 为差异极显著。

2 结果

2.1 肝胰腺中 ACP 和 ALP 的活性

未成熟雌蟹、早熟雌蟹与正常成熟雌蟹比较 3 组雌蟹肝胰腺中 ACP 活性的测定结果(图 2)。未成熟雌蟹、早熟雌蟹和正常成熟雌蟹的肝胰腺 ACP 活性分别为 $5.460 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $31.477 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $74.641 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。进而, t -检验结果显示,未成熟雌蟹显著低于早熟雌蟹 ($P < 0.01$) 和正常成熟雌蟹 ($P < 0.01$), 且早熟雌蟹显著低于正常成熟雌蟹 ($P < 0.01$)。

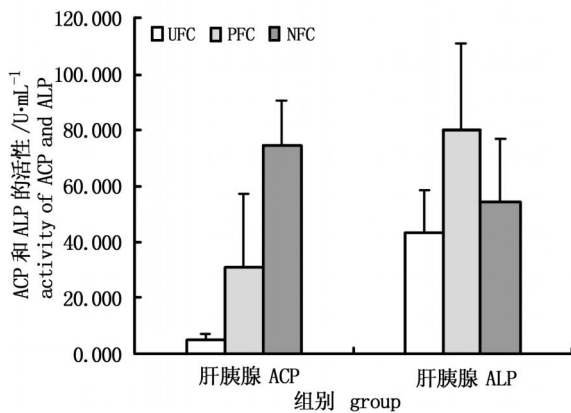


图 2 雌蟹肝胰腺的 ACP 和 ALP 活性

Fig. 2 Activity of ACP and ALP in hepatopancreas of female crabs

雌蟹肝胰腺中 ALP 活性的测定结果,见图 2。未成熟雌蟹、早熟雌蟹和正常成熟雌蟹的肝胰腺 ALP 活性分别为 $43.603 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $81.049 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $54.634 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。 t -检验结果表明,早熟雌蟹显著高于未成熟雌蟹和正常成熟雌蟹,而未成熟雌蟹与正常成熟雌蟹差异不显著。

未成熟雄蟹、早熟雄蟹与正常成熟雄蟹比较 未成熟雄蟹、早熟雄蟹和正常成熟雄蟹的肝胰腺 ACP 活性分别为 $17.398 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $34.330 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $75.257 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其大小顺序与雌蟹相似(如图 3 所示;参见图 2)。经 t -检验,未成熟雄蟹显著低于早熟雄蟹 ($P < 0.05$) 和正常成熟雄蟹 ($P < 0.01$), 且早熟雄蟹显著低于正常成熟雄蟹 ($P < 0.05$)。

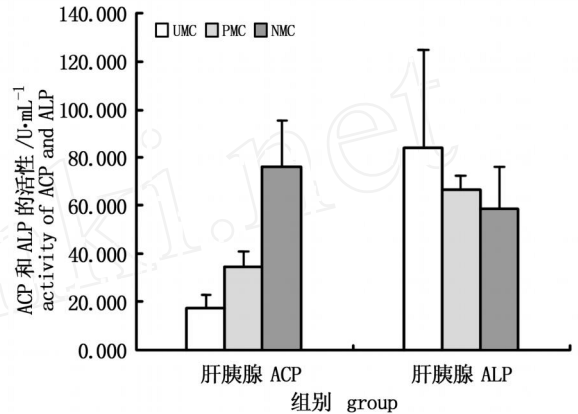


图 3 雄蟹肝胰腺的 ACP 和 ALP 活性

Fig. 3 Activity of ACP and ALP in hepatopancreas of male crabs

然而,雄蟹肝胰腺中 ALP 的活性却与雌蟹大不相同(如图 3;参见图 2),其顺序依次为 $84.498 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $67.189 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $58.911 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而且在统计学上差异不显著。

雌蟹与雄蟹比较 试验不仅对不同阶段雌或雄蟹肝胰腺的 ACP 和 ALP 活性进行比较,而且也同一阶段雌雄蟹进行了比较。未成熟雌雄蟹的 ACP 活性(分别为 $5.460 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $17.398 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 差异极显著 ($P < 0.01$), 但 ALP 活性差异不显著。另外,早熟雌雄蟹以及正常成熟雌雄蟹中这两个参数都没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 性腺中 ACP 和 ALP 的活性

早熟雌蟹与正常成熟雌蟹比较 试验结果表明,早熟雌蟹与正常成熟雌蟹中卵巢 ACP 活性分别为 $6.954 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5.999 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、ALP 活性分别为 $11.192 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $7.994 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 4)。尽管这两个参数都是早熟雌蟹稍高于正常成熟雌蟹,但经 t -检验,都没有显著差异 ($P > 0.05$)。

早熟雄蟹与正常成熟雄蟹比较 与雌蟹中情形基本相似,早熟雄蟹精巢中 ACP 活性和

ALP 活性(分别为 $26.012 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $12.356 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)都高于正常成熟雄蟹(分别为 $16.331 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $8.706 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$),不过,它们在统计学上都没有显著差异($P > 0.05$) (图 5)。

雌蟹与雄蟹比较 早熟雌蟹卵巢与早熟雄蟹精巢相比,前者的 ACP 活性(为 $6.954 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) (图 4)显著低于后者的 $26.012 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 5) ($P < 0.01$),不过,ALP 在两者间没有显著差异。

正常成熟雌蟹卵巢与正常成熟雄蟹精巢的比较情况,与早熟雌雄蟹性腺的情况一致。

2.3 肝胰腺与性腺 ACP 和 ALP 的活性比较

早熟雌、雄蟹、正常成熟雌、雄蟹各自的肝胰腺与性腺相比,肝胰腺中的 ACP 活性和 ALP 活性都显著高于性腺(图 2 ~ 图 5) ($P < 0.01$)。

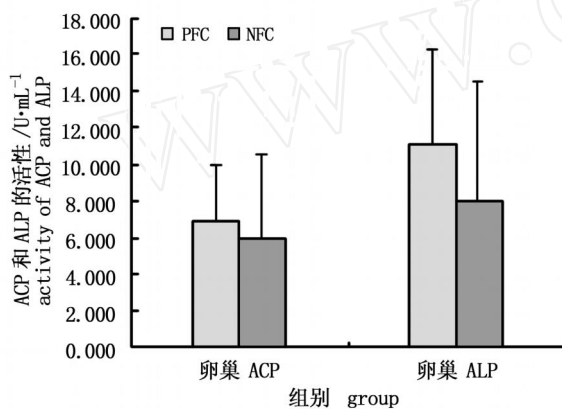


图 4 雌蟹卵巢的 ACP 和 ALP 活性

Fig. 4 Activity of ACP and ALP in ovary of female crabs

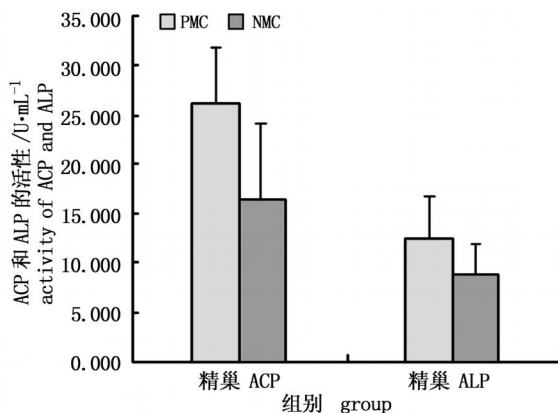


图 5 雄蟹精巢的 ACP 和 ALP 活性

Fig. 5 Activity of ACP and ALP in testis of male crabs

3 讨论

3.1 各组蟹肝胰腺与性腺中的 ACP 活性

在动物体内,ACP 参与生化反应的反应式为:正磷酸单酯 + H_2O 醇 + 正磷酸,其最适 pH 为 $4.9 \sim 5.0$ ^[11]。该酶能够广泛催化水解各种磷酸单酯与磷蛋白,但不能水解磷酸二酯,其抑制剂有酒石酸、氟化物、草酸、甲醛和 Cu^{2+} 等。

试验结果表明,早熟雌蟹和早熟雄蟹的肝胰腺 ACP 活性分别为未成熟雌蟹和未成熟雄蟹的 5.765 倍和 1.973 倍(且未成熟雌蟹显著低于未成熟雄蟹),但只占正常成熟雌雄蟹的 42.171% 和 45.617%。然而,早熟与正常成熟蟹的肝胰腺 ACP 活性却没有性别差异。由此可以看出:(1) 无论性早熟还是正常成熟,雌雄蟹肝胰腺中的脂类代谢和/或核酸代谢都有一个明显的增强过程,说明性腺发育必需的营养物质与肝胰腺储备物质的动员或合成关系密切;(2) 成熟雌雄蟹的代谢水平基本一致;(3) 正常成熟个体的代谢水平高于早熟个体,表明正常成熟的卵巢和精巢所需的营养物质可能多于早熟的卵巢和精巢。

与肝胰腺不同,早熟与正常成熟雌蟹或雄蟹性腺 ACP 活性间没有显著差异,不过,雌蟹卵巢 ACP 活性都相应低于雄蟹精巢(如早熟雌蟹卵巢 ACP 活性为早熟雄蟹精巢的 26.734%,而正常成熟雌蟹卵巢 ACP 活性也仅为正常成熟雄蟹精巢的 36.734%)。这点与 Baccetti^[25]关于昆虫精细胞的研究结果相似,不过,对于中华绒螯蟹的精子是否象昆虫精子那样在鞭毛轴丝基质中富含 ACP,尚需进一步确证。

将早熟与正常成熟的雌雄蟹各自的肝胰腺与性腺作比较,发现其肝胰腺的 ACP 活性都显著高于性腺($P < 0.01$)。牟海津等^[26]在栉孔扇贝 (*Chlamys farreii*) 也得到类似结果。Jadhav 等^[17]则对各个季节雄性招潮 *Uca (Celuca) lactea annulipes* 的各种组织进行研究,结果所有季节肝胰腺的 ACP 活性都高于其它组织。这说明肝胰腺是动物体的主要代谢中心。

3.2 各组蟹肝胰腺与性腺中的 ALP 活性

ALP 在动物机体内的反应式为:正磷酸单酯 + 正磷酸 + 乙醇,其最适 pH 为 $8 \sim 10$ 。它能催化水解磷酸单酯、磷酸核苷以及 6-磷酸糖等,然而也不能水解磷酸二酯类。另外,它还能水解焦磷

酸酯及伯醇、仲醇、糖醇、环化醇、酚以及胺之类的磷酸酯^[1]。激活剂有 Mg^{2+} (最适浓度 10^{-3} 克分子浓度) 和 Mn^{2+} , 而磷酸盐、 Zn^{2+} 、 Be^{2+} 、 AsO_4^{4-} 、 CN^- 、草酸盐、巯基化合物、L-苯丙氨酸、L-半胱氨酸以及 L-色氨酸都对它的活性有一定的抑制作用。相比于 ACP, ALP 方面的研究更为广泛, 并且已从多个种类的组织中被有效地分离、提纯并作特性鉴定^[2,7-11,13,18-20]。

在本试验的研究结果中, 肝胰腺 ALP 活性在中华绒螯蟹的各个发育阶段没有性别差异, 说明 ALP 与性腺的发育没有关系。早熟与正常成熟雌雄蟹的性腺 ALP 活性没有显著差异, 则进一步表明 ALP 与性腺发育所需的物质代谢无关。不过, 在对早熟与正常成熟蟹各自的肝胰腺与性腺作比较时, 肝胰腺中的 ALP 活性都显著高于性腺 ($P < 0.01$), 这也与栉孔扇贝中的研究结果^[26]相似的。

参考文献:

- [1] 缪辉南, 陈石根(译). 酶法分析手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
- [2] 陈清西, 张喆, 庄总来, 等. 锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分理化性质研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(4): 362 - 367.
- [3] Boucaud-Camou E. Localization of enzymatic activities involved in digestion in *Sepia officinalis* L [J]. Arch Zool Exp Gen, 1974, 115(1): 5 - 27.
- [4] Hackert-Korde K. Histological and histochemical studies on the kidney of stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. 3. Behaviour of various phosphates in association with secretion[J]. Z Mikrosk Anat Forsch, 1976, 90(1): 192 - 199.
- [5] 绳秀珍, 刘晓云, 任素莲, 等. 栉孔扇贝 (*Chlamys (Azumapekten) farveri*) 消化盲囊的组织学和组织化学的研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(3): 361 - 367.
- [6] Barnes H, Blackstock J. Seasonal changes in the non-specific phosphatase activities and their relation to other metabolic activities in *Balanus balanoides* (L.) and *B. balanus* (L.) [A]. Ninth European Marine Biology Symposium [C]. Aberdeen, UK: Aberdeen University Press, 1975.
- [7] Frank J R, Sulkin S D, Morgan R P. Biochemical changes during larval development of the xanthid crab *Rhithropanopeus harrisi* 1. Protein, total lipid, alkaline phosphatase, and glutamic oxaloacetic transaminase [J]. Mar Biol, 1975, 32(2): 105 - 111.
- [8] Shaffi S A, Jafri A K. The activity of acid and alkaline phosphatases in the eggs of some freshwater teleosts [J]. Indian J Fish, 1974, 21(1): 296 - 298.
- [9] Shaffi S A, Jafri A K, Khawaja D K. Distribution of acid and alkaline phosphatase activity in the gastrointestinal tract of the freshwater catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) [J]. Broteria, 1974, 43(1-2): 39 - 44.
- [10] Shaffi S A, Jafri A K, Khawaja D K. Alkaline phosphatase activity in the ovary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) during maturation [J]. Curr Sci, 1974, 43(2): 51.
- [11] 王锐, 张士瑾. 碱性磷酸酶在文昌鱼体内的分布[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(1): 81 - 84.
- [12] 叶恭银. 珍贵绢丝昆虫蚕生殖生理的研究 - 内生生殖器官的发育及其调控因子[D]. 浙江农业大学博士论文, 1996.
- [13] Cahu C L, Zambonino I J L, Corraze G, et al. Dietary lipid level affects fatty acid composition and hydrolase activities of intestinal brush border membrane in seabass [J]. Fish Physiol Biochem, 2000, 23(2): 165 - 172.
- [14] Monin M A, Rangneker P V. Histochemical localization of acid and alkaline phosphatases and glucose-6-phosphatase of the hepatopancreas of the crab, *Scylla serrata* (Forsk.) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1974, 14(1): 1 - 16.
- [15] Miyawaki M, Taketomi Y. Histochemical studies on the phosphatases in the kidney of the crayfish, *Procambarus clarki* [J]. Kumamoto J Sci Biol, 1974, 12(1): 23 - 29.
- [16] Rana S V S. Histological and histochemical studies on the mandibular gland of fresh water crab, *Paratelpusa masoniana* [J]. Biol Zentralbl, 1975, 94(6): 695 - 701.
- [17] Jadhav S, Ragunathan M G, Deecaraman M. Phosphatase activity of the male crab *Uca (Celuca) lactea annulipes* with respect to seasons [J]. J Ecotoxicol Environ Monitoring, 1997, 7(4): 225 - 228.
- [18] Rodriguez D, van Wormhoudt A, Gal Y L. Separation, properties, localization and nycthemeral variations of a DNase, a phosphodiesterase, a RNase and an alkaline phosphatase from the hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea, Natantia) [J]. Comp Biochem Physiol A, 1976, 54(1): 181 - 191.
- [19] Shih H H, Chen S N. Influence of four drugs on alkaline phosphatase of postlarval giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda) [J]. COA FISH SER, 1995, (53): 37 - 46.
- [20] 陈清西, 陈素丽, 石艳. 长毛对虾碱性磷酸酶性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(2): 257 - 261.
- [21] Elumalai M, Rani E F, Balasubramanian M P. Effect of naphthalene on phosphatases and esterase in muscle and testes of male *Scylla serrata* [J]. BIOMED LETT, 1996, 54(213): 39 - 43.
- [22] 杨佩真, 陈素丽, 陈清西. 长毛对虾酸性磷酸酶不可逆失活过程中的底物保护研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1998, 37(1): 94 - 98.
- [23] Elumalai M, Balasubramanian M P. Effect of naphthalene on phosphatases and esterase in muscle and ovary of intermoult marine edible female crab, *Scylla serrata* [J]. Water Air Soil Pollut, 1999, 111(1-4): 371 - 376.
- [24] 李影林. 临床医学检验手册[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1987.
- [25] Baccetti B. Insect sperm cell [J]. Advance in Insect Physiology, 1972, 9: 315 - 397.
- [26] 牟海津, 江晓璐, 刘树青, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 1999, 29(3): 463 - 468.