

KK-42对日本沼虾幼虾蜕皮周期的影响及其可能机制

关建义^{1,2}, 吕艳杰¹, 张宇¹, 宁黔冀^{1*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007;

2. 新乡医学院生命科学技术学院, 河南新乡 453003)

摘要: 为了探索KK-42对日本沼虾幼虾蜕皮周期的影响及其可能的机制, 以水产基地自行繁殖的2月龄幼虾(体长1.2~2.0 cm)为材料, 捕捞后暂养于流水养殖水槽, 水温(26±1) °C, 每天投喂2次, 1周后用于实验研究。用 1.95×10^{-4} mol/L的KK-42溶液(处理组)或不含KK-42溶液(对照组)浸润1 min, 取出, 一部分用于幼虾生长速率、蜕皮周期的测定; 从剩余部分中选择处于蜕皮间期(C)和蜕皮前期(D)的幼虾, Real-time PCR分析表皮几丁质酶1基因(*Mnchi-1*)的转录水平, 同时进行表皮几丁质酶的活力测定。在实验观察期间, KK-42处理组平均体质量均显著高于对照组, 体质量增长率的升高出现在处理后的前2周。随着幼虾的生长, 蜕皮周期的持续时间均趋于延长, 在4个连续测定的蜕皮周期中, KK-42处理能明显缩短前2个周期的时程, 分别从(8.70±1.07)、(9.81±0.43)d/周期缩短为(6.93±0.97)、(8.11±1.20)d/周期。KK-42处理可显著上调C期表皮*Mnchi-1*的表达, 在第3、6和9 h, 其mRNA水平比对照组高10倍以上, 酶活性同比提高2倍以上; KK-42对D期的影响相对较弱, 该基因的表达水平及酶活性仅在12 h显著升高。结果表明, KK-42能显著诱导D期、尤其是C期表皮*Mnchi-1*基因的表达, 提高几丁质酶活性, 推测幼虾对旧表皮的分解提前至C期, 这可能是KK-42缩短幼虾的蜕皮周期、促进其生长的分子机制之一。

关键词: 日本沼虾; KK-42; 蜕皮周期; 几丁质酶

中图分类号: Q 459; S 917.4

文献标志码: A

甲壳动物的生长与周期性的蜕皮密切相关, 蜕皮周期包括蜕皮前期(D)、蜕皮期(E)、蜕皮后期(A、B)和蜕皮间期(C)^[1]。不同物种蜕皮周期的时程存在差异, 同一个物种, 该时程一般随龄期的增长而延长, 如1、3和6月龄凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 蜕皮周期的持续时间逐渐增加, 各月龄间差异显著^[2]。

几丁质是构成甲壳动物表皮的主要成分之一, 参与几丁质降解的几丁质酶(chitinase, Chi)通过分解旧表皮而与体壁的新旧更替密切相关。因此, 几丁质酶作为甲壳动物不可或缺的酶, 备受国内外学者的关注。早期对大型溞(*Daphnia*

magna)、大西洋砂招潮蟹(*Uca pugilator*)、锯额长臂虾(*Palaemon serratus*)的研究表明, 表皮几丁质酶活力在D期^[3]或蜕皮后期^[4]达到峰值。近年来, 对几丁质酶基因的研究报道逐渐增多, 从日本对虾(*Penaeus japonicus*)肝胰腺、表皮中克隆出3种几丁质酶基因(*Pjchi-1*、*Pjchi-2*、*Pjchi-3*), 其中, *Pjchi-2*是表皮组织的特异基因, 被认为参与蜕皮过程^[5]。源自斑节对虾(*P. monodon*)鳃、眼柄、表皮的几丁质酶*Pmchi-2*基因, 以及中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)幼虾肝胰腺几丁质酶*Fcchi-1*和*Fcchi-3*基因, 其表达水平在动物蜕皮周期的不同阶段呈明显的波动性变化, 认为它

收稿日期: 2015-05-05 修回日期: 2016-04-15

资助项目: 河南省基础与前沿技术研究(142300410021); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A240003)

通信作者: 宁黔冀, E-mail: nqjnqj1964@163.com

们可能直接参与蜕皮进程^[6-7]。目前, 研究者们已经从凡纳滨对虾^[8]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[9]体内分别克隆出7种、6种几丁质酶基因, 它们各自的功能, 尤其在蜕皮中的作用正在被深入研究。

咪唑类物质KK-42曾被用作昆虫生长调节剂^[10]。已有研究指出, 适宜浓度的KK-42处理能显著促进凡纳滨对虾幼虾的生长^[11]。进一步研究表明, 该物质对日本沼虾幼虾也有同样的效应。蜕皮是日本沼虾幼虾生长的必要途径, 本研究以幼虾为材料, 在连续观察、测定4个蜕皮周期的基础上, 采用real-time PCR和生化方法测定了KK-42处理前后表皮几丁质酶基因(*Mnchi-1*)表达水平及其酶活性的变化, 进一步分析了上述变化与蜕皮周期时程的关系, 为阐明KK-42促生长机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

KK-42由烟台大学应用化学系提供(含量≥95%)。日本沼虾由河南师范大学水产基地自行繁育。捕捞1000尾体长1.2~2.0 cm、平均体质量0.048 g的2月龄幼虾暂养于流水养殖水槽(Φ 800 mm, 高1200 mm, 上海海圣工贸有限公司), 水温(26±1) °C, 每天投喂2次, 1周后用于实验研究。幼虾随机平均分为2组: 处理组用1.95×10⁻⁴ mol/L的KK-42溶液浸泡处理1 min, 取出后迅速去除水分, 立刻投入到养殖水槽中, 按正常方式饲养; 对照组用不含KK-42的溶液处理, 方法同上。

1.2 日本沼虾幼虾生长率的测定

从上述实验材料中随机挑选处理组和对照组幼虾各300尾, 分别投入到流水养殖水槽中, 按正常方式饲养; 每组每周随机取20尾虾称重, 重复3次, 连续11周。计算平均体质量及体质量增长率。

平均体质量(g)=所选虾总体质量(g)/所取虾总数(尾)

$$\text{体质量平均增长率(\%)} = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100$$

式中, W_2 、 W_1 分别为实验1周后和开始时的平均体质量。

1.3 日本沼虾幼虾蜕皮周期的测定

分别从上述材料中随机挑选处理组和对照组各32尾虾, 单独饲养在放置于流水养殖水槽的小网箱(20 cm×20 cm×20 cm)中, 按正常方式饲养。对每个小网箱及对应的幼虾进行编号并设置记录表格, 每6 h观察1次(0.25 d), 发现蜕皮及时取出并记录时间, 2次连续蜕皮之间的时间计为一个完整的蜕皮周期, 包括蜕皮前期(D)、蜕皮期(E)、蜕皮后期(A、B)和蜕皮间期(C)。从幼虾第1次蜕皮开始计时, 连续观察4个蜕皮周期。

1.4 日本沼虾几丁质酶基因*Mnchi-1*表达分析

在KK-42处理后0、3、6、9、12、24和48 h, 分别取处于C期和D期的幼虾置于冰上, 每9只一组, 快速剥离表皮, TRIzol一步法提取总RNA, 用RNase-Free DNase (Promega, USA)去除总RNA中残留的基因组DNA, 以oligo (dT)18为引物反转录合成cDNA第一链作为模板。目前已从日本沼虾中克隆出6种几丁质酶基因, 而组织特异性表达显示只有几丁质酶-1基因参与了蜕皮, 其他的几个基因主要参与消化及免疫^[9]。根据从表皮中克隆出的日本沼虾几丁质酶-1(*Mnchi-1*)全长(KF887953.1)和18S rRNA(DQ531769.1)的cDNA序列设计目的基因引物(表1), 对处于不同蜕皮阶段期(C、D)的处理和对照组基因表达进行相对定量分析。Real-time PCR依照SYRB Premix Ex TaqTM (TaKaRa)试剂盒进行。20 μL体系中包括SYRB Premix Ex TaqTM 10.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL, cDNA模板2.0 μL, ROX Reference Dye 0.4 μL, ddH₂O 6.8 μL。反应条件: 95 °C 30 s, 1个

表1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

目的基因 gene	引物序列(5'-3') primers sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	扩增片段/bp amplification fragment
<i>Mnchi-1</i>	P1: ACACCATTCTATGCCCGCAC P2: AGTTTGAGGCTGTCTGGGTC	60	200
18S rRNA	P1: TGTACGGGTGACGGAGAA P2: CATTCCAATTACGCAGACTCGG	60	200

循环; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40个循环。每组设3次重复, 以18S rRNA作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因的相对转录量, 结果表示为平均值±标准差, 实验数据采用SPSS 10.0软件运用t检验法进行显著性统计分析($P < 0.05$)。

1.5 表皮几丁质酶活力测定

几丁质酶活力的测定参照Rojas-Avelizapa等^[12]的方法略有改进。在KK-42处理后, 于0、3、6、9、12、24和48 h分别取处于C期和D期的幼虾置于冰上, 每9只一组, 快速剥离表皮, 匀浆, 4 °C下12 000 r/min离心10 min, 上清液即为粗酶液。以虾源几丁质(Sigma公司)作为反应底物, 测定OD_{520 nm}值。每组设3个重复。

2 结果

2.1 KK-42对日本沼虾幼虾生长的促进作用

KK-42对幼虾的生长具有明显的促进作用。第1周, 处理组平均体质量显著高于对照组($P < 0.05$), 自第2周开始, 2组间体质量均存在极显著差异(图1); KK-42的作用以前2周最为显著, 平均体质量增长率分别提高了18.34%和16.02%(图2)。

2.2 KK-42对日本沼虾幼虾蜕皮周期的影响

随着幼虾的生长, 蜕皮周期的持续时间延长, 在观察记录蜕皮的过程中对照组和处理组均有3只死亡, 再除去个别蜕皮无规律性的个体, 对照组和处理组各有25只参与了蜕皮周期的数据处理, 对照组平均依次为(8.70±1.07)、(9.81±0.43)、(11.08±1.06)和(12.43±1.04)d/周期。处理组也呈现同样的规律, KK-42主要影响前2个蜕皮周期, 其时程分别缩短至(6.93±0.97)和(8.11±1.20)d/周期(图3)。

2.3 KK-42对日本沼虾幼虾表皮Mnchi-1表达的影响

处于C期的幼虾, 表皮Mnchi-1基因的转录水平很低; KK-42可明显诱导其表达, 处理后3 h快速升高, 9 h达到峰值, 同比增加10倍以上(图4-a)。D期该基因的表达水平有所提高, KK-42对Mnchi-1表达的上调效应较弱, 只在12 h表现出显著的差异($P < 0.05$)(图4-b)。

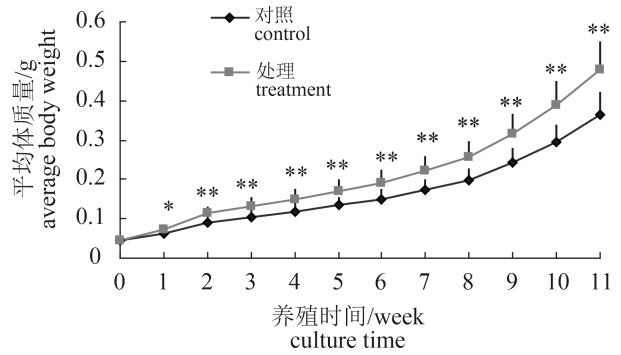


图1 KK-42对日本沼虾幼虾生长的促进作用

*. 与对照组相比, $P < 0.05$; **. 与对照组相比, $P < 0.01$ 。下同

Fig. 1 The growth-promoting effect of KK-42 on juvenile *M. nipponense*

*. $P < 0.05$ vs control group at the same time; **. $P < 0.01$ vs control group at the same time. The same below

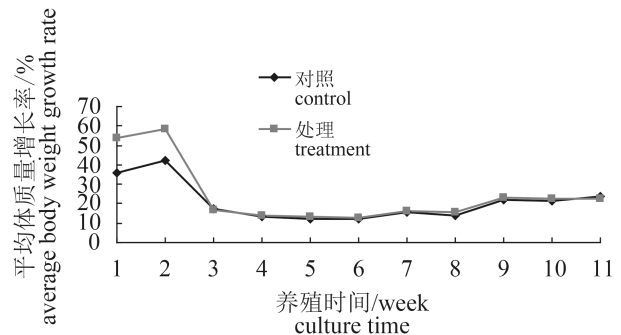


图2 KK-42对日本沼虾幼虾体质量增长率的影响

Fig. 2 The effect of KK-42 on weight growth rate of juvenile *M. nipponense*

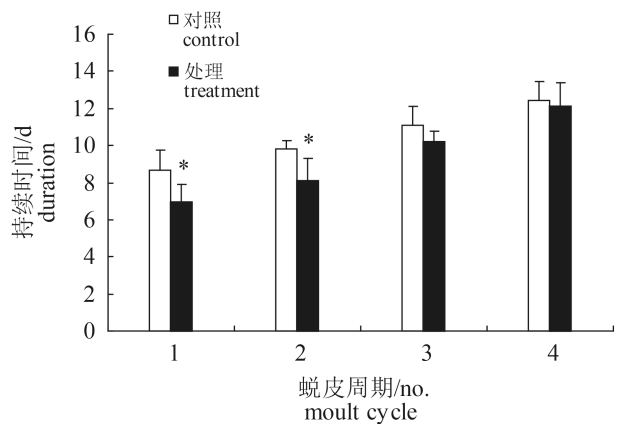


图3 KK-42对日本沼虾幼虾不同蜕皮周期时长的影响

Fig. 3 Effect of KK-42 on the duration of molting period for juvenile *M. nipponense*

2.4 KK-42对表皮几丁质酶活力的影响

在实验期间, 对照组几丁质酶活力变化没有

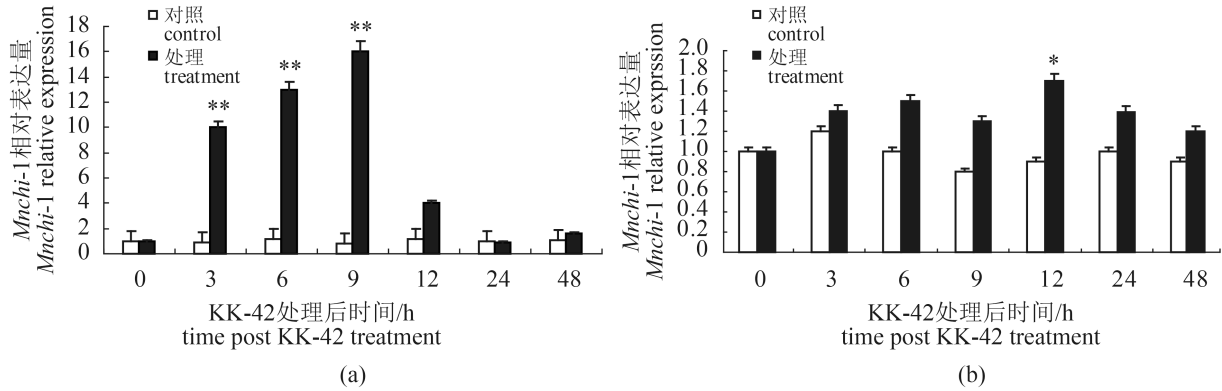


图4 KK-42对C期(a)、D期(b)日本沼虾幼虾表皮Mnchi-1表达的诱导(n=9)

Fig. 4 The induction of Mnchi-1 expression in juvenile M. nipponense cuticle at the C (a) or D (b) stage by KK-42

统计学意义的差异。KK-42处理对C期酶活性的诱导更明显，处理后3 h酶活力快速升高，9 h达

到峰值(图5-a)。对于D期，酶活力只在12 h显著升高(图5-b)。

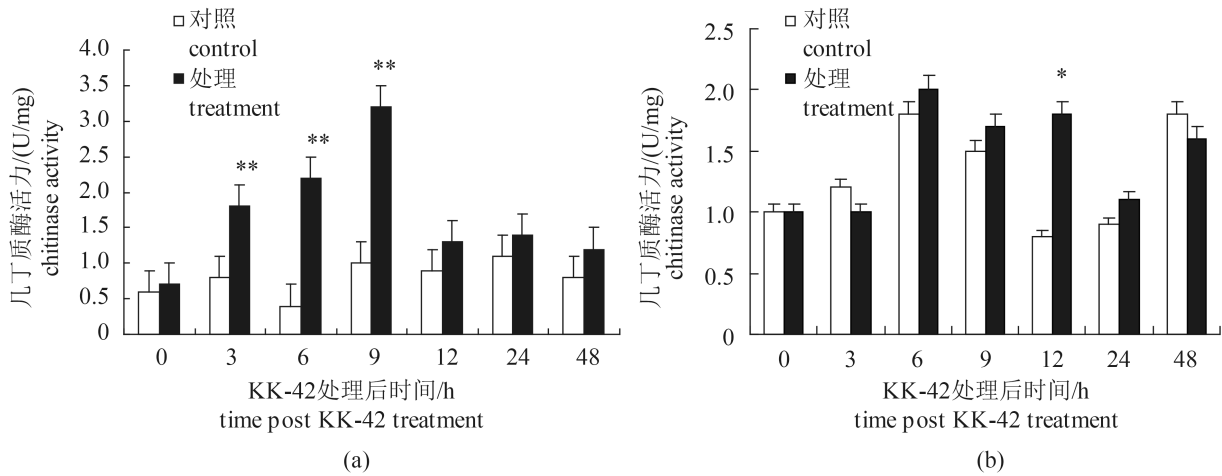


图5 KK-42处理的日本沼虾幼虾表皮C期(a)、D期(b)几丁质酶活力的变化(n=9)

Fig. 5 The effect of KK-42 on the cuticle chitinase activity in M. nipponense at the C (a) or D (b) stage

3 讨论

本研究表明，KK-42能显著提高日本沼虾幼虾的生长，与凡纳滨对虾的研究结果一致^[11]。坚硬的表皮限制了幼虾的生长，所以蜕皮是生长的唯一途径，新生表皮周期性地代替蜕去的旧表皮，从而完成跳跃式生长，一个完整的蜕皮周期介于连续的2次蜕皮之间。在连续测定的4个蜕皮周期中，在数据处理上除去了养殖中死亡的和个别蜕皮规律性不太好的个体，保证了数据的科学性，发现KK-42能明显缩短前2个周期的时程(图3)，这可能是该物质促进幼虾生长的重要原因之一。甲壳动物的蜕皮周期受蜕皮激素的直接调控，位于眼柄X-器官—窦腺复合体

(XO)分泌蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)调控由Y-器官(YO)分泌的蜕皮激素(MH)，Covi等^[13]研究表明，幼普通滨蟹(Carcinus maenas)(壳宽5~25 mm, CW)在眼柄切除后失去了分泌MIH的主源，导致YO激活，增加了蜕皮间期MH的滴度，从而缩短了蜕皮间期。本实验前期研究显示，KK-42可显著提高日本沼虾血淋巴中20-羟蜕皮酮(20-hydroxydsone, 20E)的滴度，并诱导肝胰腺中蜕皮激素受体(EcR和RXR)的基因转录^[14]，这可能调节了包括几丁质酶在内的下游基因的表达及导致酶活性提高，加速了新旧表皮的更替^[7]。

在一个蜕皮周期中，C期和D期是持续时间相对较长且多种与蜕皮有关的酶活性逐渐由低

到高显著变化的2个时期,因此,选择这2个时期来研究参与日本沼虾蜕皮的*Mnchi-1*基因的表达及几丁质酶活性变化。旧表皮的降解与新表皮的形成主要发生在D期,而C期时新的表皮已形成^[15]。据报道,在正常情况下D期的不同亚期(substage),几丁质酶基因的表达及酶活性波动较大,峰值出现在D₃亚期,而整个C期变化不大^[7]。为了便于研究KK-42处理对D期几丁质酶及其基因表达的影响,选择同一亚期(D₃)与对照组进行比较分析。对照组D期*Mnchi-1*的表达及酶活性未见大的波动,原因可能是选取的材料均处于D₃期。实验首次发现, KK-42处理可明显上调C期*Mnchi-1*在表皮中的表达,诱导酶活性升高(图4,图5),这可能是KK-42通过提高日本沼虾血淋巴20E滴度间接实现的,推测该效应可能提前“启动”了幼虾对旧表皮的分解,导致C期缩短,从而影响到蜕皮周期;实验还发现, KK-42处理可显著增加D₃期日本沼虾表皮厚度,这可能为动物提前蜕皮奠定了物质基础^[16]。与C期相比, KK-42对D期的影响明显减弱,且上述2项指标仅在12 h显著升高(图4,图5),这可能是蜕皮过程提前启动的结果。

综上所述, KK-42能明显上调日本沼虾幼虾C期*Mnchi-1*在表皮中的表达,诱导酶活性,这可能是其缩短幼虾蜕皮周期,进而促进生长的机制之一。

参考文献:

- [1] Chan S M, Rankin S M, Keeley L L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose[J]. *Biology Bulletin*, 1988, 175(2): 185-192.
- [2] de Oliveira C J R, Zhao B P, Malecha S, *et al.* Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 688-694.
- [3] Espie P J, Roff J C. Characterization of chitinase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux[J]. *Physiological Zoology*, 1995, 68(5): 727-748.
- [4] Spindler-Barth M, Van Wormhoudt A, Spindler K D. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle[J]. *Marine Biology*, 1990, 106(1): 49-52.
- [5] Watanabe T, Kono M, Aida K, *et al.* Purification and molecular cloning of a chitinase expressed in the hepatopancreas of the penaeid prawn *Penaeus japonicus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1382(2): 181-185.
- [6] Proespraiwong P, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 156(2): 86-96.
- [7] Priya T A J, Li F H, Zhang J Q, *et al.* Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on *E75* and chitinase gene expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 121-129.
- [8] Huang Q S, Yan J H, Tang J Y, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75-81.
- [9] Zhang S Y, Jiang S F, Xiong Y W, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167: 30-40.
- [10] Yungen M, Bharathi D. Effect of anti-juvenile hormone agent, KK-42 on the incorporation rate of radioactive glycine and biosynthesis of silk proteins of silkworm, *Bombyx mori* L[J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2009, 91(3): 485-491.
- [11] Ning Q J, Fu S G, Xu X J, *et al.* A new and practical application of JH antagonist KK-42 to promoting growth of shrimp *Penaeus schmitti*[J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1-4): 422-426.
- [12] Rojas-Avelizapa L I, Cruz-Camarillo R, Guerrero M I, *et al.* Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999, 15(2): 299-308.
- [13] Covi J A, Bader B D, Chang E S, *et al.* Molt cycle regulation of protein synthesis in skeletal muscle of the

- blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, and the differential expression of a myostatin-like factor during atrophy induced by molting or unweighting[J]. *Journal Experimental Biology*, 2010, 213(1): 172-183.
- [14] 刘方, 陈香丽, 郭爱莲, 等. KK-42对日本沼虾蜕皮激素及其受体表达的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(4): 124-127.
- Liu F, Chen X L, Guo A L, *et al.* The effect of KK-42 on ecdysone and ecdysteroid receptor mRNA in *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, 41(4): 124-127 (in Chinese).
- [15] Promwikorn W, Kirirat P, Thaweethamsewee P. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, 26(5): 765-772.
- [16] 吕艳杰, 陈香丽, 郭爱莲, 等. KK-42对日本沼虾D₃期头胸甲表皮结构的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 1964-1969.
- Lü Y J, Chen X L, Gou A L, *et al.* Effect of KK-42 on the carapace structure in *Macrobrachium nipponense* during premolt D₃ stage[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 1964-1969 (in Chinese).

Effect of KK-42 on the molt cycle of juvenile *Macrobrachium nipponense* and its possible mechanism

GUAN Jianyi^{1,2}, LÜ Yanjie¹, ZHANG Yu¹, NING Qianji^{1*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. School of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To explore the effect of KK-42 on the molt cycle of juvenile *Macrobrachium nipponense* and its possible mechanism, the juvenile prawns (1.2–2.0 cm long) were collected from our aquaculture ground, and acclimated at (26±1) °C in running-water tanks in the laboratory and fed twice daily for 1 week before the experiments. The prawns were administered with KK-42 at a concentration of 0 (control group) or 1.95×10⁻⁴ mol/L (treatment group) for 1 min, respectively. A portion of them were used to measure the growth rate and molt cycle of juvenile prawns; and the rest, being at intermolt stage (C) and premolt stage (D), were used to analyze quantitatively cuticular chitinase1 gene (*Mnchi-1*) mRNA level and the chitinase activity. The results showed that the average weight of treatment group was significantly higher than that of the control one, and its growth rate increased significantly in the first two weeks after KK-42 treatment. The duration of molting period tended to prolong following the growth of juvenile prawns, and that was shortened by KK-42 treatment at the first two cycles among four consecutively-determined molt cycles, from (8.70±1.07), (9.81±0.43)d/ molt cycle to (6.93±0.97), (8.11±1.20)d/ molt cycle, respectively. The cuticular *Mnchi-1* mRNA level as well as the chitinase activity in the stage C increased by more than 10 and 2 times, respectively, at 3, 6 and 9 h after KK-42 treatment, but those in the stage D, only had a modest rise at 12 h. The results display that KK-42 can importantly up-regulate the cuticular *Mnchi-1* gene expression and chitinase activity in stage C and D, which may result in the old cuticle degradation to be triggered in stage C, suggesting one of the molecular mechanisms of KK-42 of shortening molt cycle and promoting growth effect for juvenile *M. nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; KK-42; molt cycle; chitinase

Corresponding author: NING Qianji. E-mail: ningqianji1964@163.com

Funding projects: Basic Science and Frontier Technology Planning Project of Henan Province (142300410021); Key Project of Science and Technology Research of Henan Province Educational Commission (14A240003)