

# 中华绒螯蟹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮、 17 $\beta$ -雌二醇和睾酮含量的变动<sup>\*1</sup>

姜仁良 谭玉钧 吴嘉敏 阎希柱<sup>\*2</sup> 包祥生 姚继明

(上海水产大学, 200090)

(安徽省滁州市水产研究所, 239074)

**摘要** 河蟹在蜕壳前, 血淋巴中 20-羟基蜕皮酮 (20-HE) 含量达到最高峰—— $116.16 \pm 32.96 \text{ ng/ml}$ ; 蜕壳时降入低谷—— $7.09 \pm 1.39 \text{ ng/ml}$ ; 蜕壳后仍然很低。血淋巴中 20-HE 调控着河蟹的蜕壳周期。雌性河蟹卵母细胞进入大生长期, 9 月份血淋巴中 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) 出现峰值—— $3.62 \pm 1.11 \text{ ng/ml}$ , 促进了卵母细胞的卵黄积累。雄性河蟹 10 月份血淋巴中睾酮 (T) 含量开始上升, 至 12 月份达到  $2.15 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$ , 诱导精巢发育成熟。雌性河蟹血淋巴中 20-HE 含量在 5 月和 8 月各出现一个峰值, 分别为  $13.15 \pm 6.99$  和  $15.80 \pm 7.40 \text{ ng/ml}$ ; 雄性河蟹则在 6 月和 9 月各出现一个峰值, 分别为  $20.25 \pm 13.58$  和  $14.00 \pm 9.48 \text{ ng/ml}$ 。雌、雄河蟹同在 2 月份为全年最低值, 分别为  $3.75 \pm 3.38$  和  $3.63 \pm 1.78 \text{ ng/ml}$ 。实验结果阐明了雌、雄河蟹 5、6 月份血淋巴中 20-HE 出现的峰值与生长有关; 8、9 月份出现的峰值与青春蜕壳、早期性腺发育相联系。

**关键词** 中华绒螯蟹, 20-羟基蜕皮酮, 17 $\beta$ -雌二醇, 睾酮, 放射免疫测定

中华绒螯蟹 (*Erriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是我国一种重要经济蟹类。近年来, 各地广泛开展了人工蟹苗的培育和成蟹的养殖。为了增加养殖产量, 极需了解河蟹的生殖、生长与蜕壳的生理生态变化的规律性, 而此种动态的规律性变化又无不与河蟹释放和分泌的激素调控密切相关。过去国内外学者, 曾对甲壳动物的激素进行过研究<sup>[1, 6, 12, 13, 14]</sup>, 但是, 涉及河蟹血淋巴中激素的生理变化研究论著甚少<sup>[2]</sup>。为此, 我们对中华绒螯蟹血淋巴中 20-HE、17 $\beta$ -E<sub>2</sub> 和 T 含量的变动以及一个蜕壳周期前、后的 20-HE 含量变化进行了研究, 揭示了河蟹生长发育和性腺成熟过程中这些激素的动态变化, 为掌握河蟹生长规律, 制订合理的养殖技术措施, 提供科学依据。

## 材料与方 法

**1. 材 料** 中华绒螯蟹血淋巴样品从 1989 年 4 月至 1990 年 4 月止, 取自安徽滁州市水产研究所河蟹养殖基地。每月中旬取雌、雄硬壳河蟹各 10 只; 河蟹蜕壳周期是在实验室分组饲养取样, 同时也取池塘样品。河蟹样品经称重和测量体长后, 用微量注射器在第三步足基节关节膜处抽取血淋巴 0.2ml 溶于 1ml 甲醇, 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 3000 转/分, 离心 10 分钟后, 倒出上清液, 重复一次, 合并上清液, 置 70 $^{\circ}\text{C}$

\*1: 本校淡水渔业专业 1990 届张宪中、刘文平同学参加部分工作, 谨致谢意。

\*2: 阎希柱现在黑龙江水产研究所。

收稿年月: 1991 年 8 月; 1992 年 1 月修改。

水浴中蒸干后加 1ml GPBS(0.1%明胶, 0.1M)溶解, 涡流混匀, 分装置 $-20^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱备用。

2. 测定方法 血淋巴中 20-HE 测定采用放射免疫药盒<sup>[7]</sup>;  $17\beta\text{-E}_2$  和  $\text{T}^{125}$ <sup>[8]</sup>测定的具体操作略加改进。碘标和氚标分别采用 FJ-2008 型  $\gamma$  免疫计数仪和 Beckmen LS9800 型液闪计数仪测定。样品激素含量按放射免疫常规测定回归方程计算求得:

$$20\text{-HE 标准曲线回归方程为 } X = \log^{-1} \left[ 5.3209 - 2.3327 \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} \right] r = -0.997.$$

$$17\beta\text{-E}_2 \text{ 标准曲线回归方程为 } X = \log^{-1} \left[ 5.8017 - 3.1354 \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} \right] r = -0.997.$$

$$\text{T 标准曲线回归方程为 } X = \log^{-1} \left[ 1.9657 - 0.4999 \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} \right] r = -0.996.$$

### 3. 实验方法学鉴定

(1) 河蟹血淋巴中 20-HE 抽提率试验 取 0.2ml 血淋巴加入 1ml 甲醇, 再加  $^{125}\text{I}$ -20-HE(25000 cpm), 充分混匀, 3000 转/分离心, 测上清液 cpm 数, 合并二次 cpm, 与总脉冲数相比, 抽提率为  $98.36 \pm 0.93\%$  ( $N=10$ )。

(2) 河蟹血淋巴中 20-HE、 $17\beta\text{-E}_2$  和 T 的回收率试验 分别取 100 至 500pg 不同量 20-HE、 $17\beta\text{-E}_2$  和 T 标准品, 各管分别加入河蟹血淋巴 100 $\mu\text{l}$  样品, 抽提后, 测定回收量。回收率分别为  $96.21 \pm 2.87\%$ 、 $96.58 \pm 8.24\%$  和  $93.24 \pm 7.24\%$ , 变异系数分别为 2.98%、8.53% 和 7.76%。回收率越小, 变异系数越小, 方法的准确性程度越高。

(3) 河蟹血淋巴中 20-HE、 $17\beta\text{-E}_2$  和 T 平行性试验 用河蟹血淋巴样品倍比稀释成不同体积: 50 $\mu\text{l}$ 、100 $\mu\text{l}$ 、150 $\mu\text{l}$ 、200 $\mu\text{l}$ , 进行检测。经  $t$  检验,  $t$  值各组对比都小于 2,  $P > 0.05$ , 差异都不显著, 方法精确性良好。

(4) 20-HE 抗血清与  $17\beta\text{-E}_2$  和 T 的交叉试验 在已知血淋巴 20-HE 含量的样品中分别加入  $17\beta\text{-E}_2$  和 T 的标准品, 进行交叉反应试验, 结果表明,  $17\beta\text{-E}_2$  交叉量为  $7.59 \pm 2.53\%$  ( $N=10$ ); T 交叉量为  $3.09 \pm 2.88\%$  ( $N=10$ )。

## 实 验 结 果

### (一) 河蟹蜕壳前、后血淋巴中 20-HE 含量的变化

对蜕壳前 3 天, 蜕壳前、后 1 至 2 天和正在蜕壳的河蟹血淋巴中 20-HE 含量进行检测, 结果见表。河蟹在蜕壳前 1 至 2 天内, 20-HE 达到最高峰值—— $116.16 \pm 32.96\text{ng/ml}$ , 正在蜕壳的河蟹 20-HE 含量急剧下降, 进入低谷—— $7.09 \pm 1.39\text{ng/ml}$ , 蜕壳后 1 至 2 天, 仍然处于低水平—— $8.37 \pm 0.54\text{ng/ml}$ , 蜕壳前 1 至 2 天内与正在蜕壳的河蟹血淋巴中 20-HE 含量经  $t$  检验,  $P < 0.001$ , 差异非常显著。

表 1 河蟹蜕壳前后血淋巴中 20-HE 含量的变化

Table 1 Changes of hemolymph 20-HE level before and after molt in *Eriocheir sinensis*

蜕壳时期	血淋巴中 20-HE 含量 (ng/ml)(样品数)	P
蜕壳前 3 天	$69.99 \pm 21.58(4)$	<0.001
蜕壳前 1-2 天	$116.16 \pm 32.96(12)$	
正在蜕壳	$7.09 \pm 1.39(3)$	
蜕壳后 1-2 天	$8.37 \pm 0.54(4)$	

(二) 河蟹血淋巴中 17β-E<sub>2</sub> 和 T 含量的变化

雌性河蟹血淋巴中 17β-E<sub>2</sub> 含量在全年的 6 月和 9 月分别出现二个峰值—— $3.79 \pm 1.09 \text{ ng/ml}$  和  $3.62 \pm 1.11 \text{ ng/ml}$ 。9 月后开始下降, 至翌年 4 月一直处于低水平。卵巢的成熟系数(GSI), 与此相反, 从 9 月份开始逐渐上升, 至翌年 2 月份, GSI 达到最高峰——7.86%(图 1)。雌性河蟹血淋巴中 17β-E<sub>2</sub> 含量从 9 月至翌年 2 月与 GSI 经相关显著性检验, 呈负相关,  $P < 0.05$ , 相关显著。雄性河蟹血淋巴中 T 的含量在全年的 7、8 月份形成第一峰值, 为  $4.18 \pm 1.60$ 、 $3.90 \pm 2.09 \text{ ng/ml}$ , 12 月份形成第二峰值—— $2.15 \pm 0.28 \text{ ng/ml}$ ; 精巢从 9 月份开始发育, 至翌年 1 月, GSI 达最高值——5.58%(图 2)。

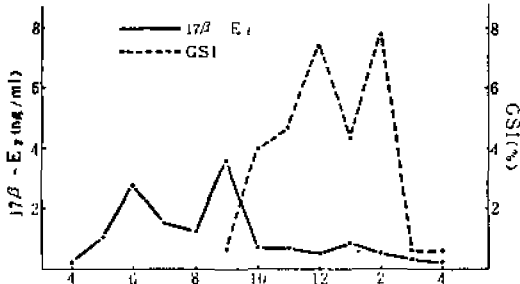


图 1 雌蟹血淋巴中 17β-E<sub>2</sub> 与卵巢 GSI 的关系  
Fig. 1 The relationship between hemolymph 17β-E<sub>2</sub> levels and GSI in female *Eriocheir sinensis*

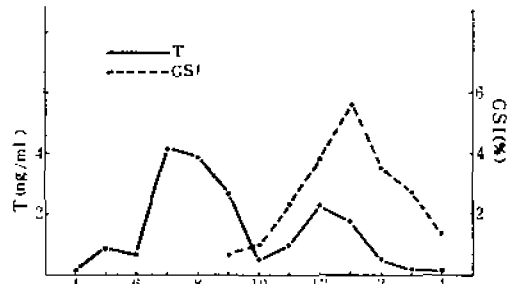


图 2 雄蟹血淋巴中 T 与 GSI 的关系  
Fig. 2 The relationship between hemolymph T levels and GSI in male *E. sinensis*

(三) 河蟹血淋巴中 20-HE 含量的周年变化

河蟹血淋巴中 20-HE 含量的周年变化见图 3。雌性河蟹血淋巴中 20-HE 含量在全年 5 月和 8 月出现二个高值—— $13.15 \pm 6.99 \text{ ng/ml}$  和  $15.80 \pm 7.40 \text{ ng/ml}$ , 9 月至 11 月维持在一个比较高的水平, 但与 8 月相比, 仍然处于下降趋势, 12 月之后, 明显下降, 至 2 月降至最低值—— $3.75 \pm 3.38 \text{ ng/ml}$ 。雄性河蟹在全年的 6 月和 9 月出现二个峰值—— $20.25 \pm 13.58 \text{ ng/ml}$  和  $14.00 \pm 9.48 \text{ ng/ml}$ , 3 月开始呈上升趋势, 9 月后开始下降, 与雌性河蟹一样, 同在 2 月为全年最低值—— $3.68 \pm 1.78 \text{ ng/ml}$ 。

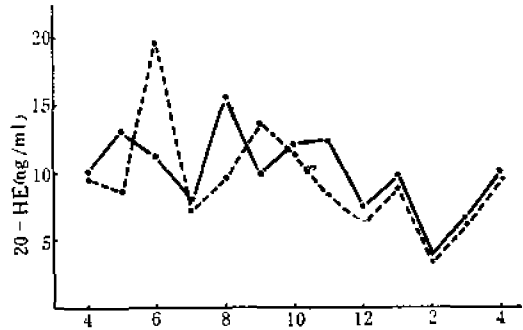


图 3 河蟹血淋巴中 20-HE 含量的周年变化  
Fig. 3 Annual changes of hemolymph 20-HE levels in *E. sinensis*  
-----雄      ——雌

讨 论

(一) 河蟹的蜕壳周期 河蟹蜕壳周期性现象, 系由体内血淋巴中 20-HE 来调节控制的, 随着 20-HE 的升高, 引起河蟹体内发生与蜕壳有关的一系列结构上和生理上的变化。例如, 壳体开始行钙的再吸收, 形成新壳的最外层, 并造成断裂, 留下适当空间, 准备

自旧壳脱出。河蟹蜕壳前1—2天,血淋巴中20-HE达到最高峰,正在蜕壳的河蟹血淋巴中的20-HE处于最低值,蜕壳后1—2天仍然处于低水平。实验结果表明,河蟹在蜕壳前血淋巴中20-HE浓度的升高是河蟹行将蜕壳的生理指标。这一周期性蜕壳现象,在甲壳动物的其他种类也同样存在,例如对虾<sup>[15]</sup>、龙虾<sup>[18,16]</sup>在蜕壳前血淋巴中20-HE的动态变化与蜕壳密切相关。只有当20-HE浓度升高了,蜕壳才有可能进行。另外,通过对河蟹蜕壳观察,发现10克左右的河蟹,在7、8月份约15天为一个蜕壳周期,一秋龄河蟹经7至9次蜕壳,可长成125克至150克的二秋龄河蟹。

(二)河蟹血淋巴中 $17\beta-E_2$ 和T浓度的变化 雌蟹从9月至翌年2月血淋巴中 $17\beta-E_2$ 含量与卵巢的GSI,经相关显著性检验,呈显著的负相关。在9月份血淋巴中 $17\beta-E_2$ 含量出现全年最高峰—— $3.62 \pm 1.11\text{ng/ml}$ ,正是河蟹卵母细胞大生长期开始<sup>[9]</sup>,卵巢的GSI还很低,至10月份开始, $17\beta-E_2$ 处于低水平时,卵巢的GSI则逐渐增大。与此同时,在卵巢GSI增高过程中,发现肝脏重量下降<sup>[6]</sup>,表现出肝脏营养物质明显地向卵巢转化,肝脏中卵黄前体似乎和鱼类一样,也是由 $17\beta-E_2$ 诱发进行的<sup>[9]</sup>;而雄蟹精巢成熟过程中,就不呈现肝脏重量明显下降的趋势。雄蟹血淋巴中T的含量与精巢的GSI存在一定的关系(见图2),从10月份开始,血淋巴中T的含量开始上升,至12月份达到峰值—— $2.15 \pm 0.28\text{ng/ml}$ ,与此同时,精巢的GSI也开始逐渐上升,至翌年1月,精巢的GSI达到最高值——5.58%时,血淋巴中T的含量开始回落,说明血淋巴中T含量的升高较GSI峰值出现提早了一个月,起到诱发精巢发育的作用。雄蟹7、8、9月份出现T的峰值,可能与新陈代谢强度相联系,一般血淋巴中高浓度T的含量,具有提高代谢强度,促进河蟹生长的作用。至于雌蟹6月份出现的 $17\beta-E_2$ 峰值,原因尚不清楚。雌、雄河蟹血淋巴中 $17\beta-E_2$ 和T的含量动态变化,揭示了河蟹青春蜕壳后,诱导性腺发育可能是 $17\beta-E_2$ 和T性甾体激素的作用。在美国龙虾卵内发现 $17\beta-E_2$ <sup>[12]</sup>,并在雄性腺和血淋巴中发现睾酮<sup>[10]</sup>,说明甲壳动物也具有 $17\beta-E_2$ 和T,并且对性腺发育有一定的影响。

(三)河蟹血淋巴中20-HE含量的周年变化 如图3所示,雌、雄河蟹血淋巴中20-HE分别在5、6月呈现一个峰值,这与该时期水温逐渐回升,促进蜕壳和加速生长有关。例如,6月份雌、雄河蟹相对增重率较大,分别为330.24%和276.09%,生长基本上呈直线上升,显示了这阶段的河蟹快速生长无不与20-HE浓度水平升高有关。9、10月份河蟹准备生殖洄游,由黄蟹(幼蟹)完成最后一次蜕壳(即青春蜕壳)变态为绿蟹。在黄蟹阶段性腺处在幼龄时期,雌蟹卵巢的GSI为0.51%;雄蟹精巢的GSI为0.61%。河蟹青春蜕壳来临之前,体内血淋巴中20-HE浓度先行升高,雌蟹在8月份为 $15.80 \pm 7.40\text{ng/ml}$ ,雄蟹在9月份为 $14.00 \pm 9.48\text{ng/ml}$ ,引起河蟹生理上一系列变化,导致青春蜕壳。蜕壳后的绿蟹,性腺开始迅速发育,GSI迅速上升,雌蟹为3.93%,雄蟹为1.03%。这说明青春蜕壳前,河蟹血淋巴中20-HE的峰值与早期性腺发育有关。青春蜕壳后,20-HE下降,标志着雌蟹卵母细胞从小生长期转入大生长期<sup>[9]</sup>,卵黄迅速积累开始;而雄蟹精巢增长迅速,形成大量成熟精子<sup>[8]</sup>。实验结果揭示了5—9月份是河蟹生长的最佳季节,从5月份开始正值水温逐渐回升,如果营养、生态等条件得以满足,河蟹的生长主要取决于20-HE在体内的调控。因此,为了提高河蟹养殖产量,在提供河蟹的饲料中添加一定量

的20-H<sub>E</sub>,使蜕壳频数增加,既能促进河蟹生长,加大个体重量,增大上市规格,又能达到同步蜕壳的目的,减少非同步蜕壳而造成的相互残杀,减少死亡率,这为进一步开发河蟹养殖业提供了理论依据和新的资料。

### 参 考 文 献

- [1] 郑重,1989.甲壳动物激素的研究.台湾海峡,8(4):287—298.
- [2] 罗荣生等,1990.中华绒螯蟹血淋巴20-羟基蜕皮酮诱发蜕皮和卵巢发育的作用.动物学报,36(2):157—164.
- [3] 姜仁良等,1986.促黄体生成素释放激素类似物对团头鲂血清中促性腺激素和17 $\beta$ -雌二醇含量变动的研究.水产学报,10(2):185—198.
- [4] 赵维信等,1988.诱导鲢排卵时性类固醇激素含量的变化.水生生物学报,12(3):212—218.
- [5] 赵乃刚等,1988.河蟹人工繁殖与增养殖,60—61.安徽科学技术出版社(合肥).
- [6] 梁琰园等,1982.摘除眼柄诱导中国对虾性腺成熟和提前产卵的初步研究.海洋与湖沼,14(2):138—147.
- [7] 曹梅讯等,1980.20-羟基蜕皮酮的放射免疫分析法及其在蓖麻蚕蛹上的应用.昆虫学研究集刊,第一集,1—6.上海科技出版社.
- [8] 培南山等,1988.中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究.动物学报,34(4):329—333.
- [9] 薛鲁征等,1987.中华绒螯蟹雌性生殖系统的组织学研究.华东师范大学学报(自然科学版),(9):88—96.
- [10] Burns, B. G. et al., 1984. Isolation and identification of testosterone from the serum and testes of the American lobster (*Homarus americanus*). Gen. Comp. Endocrinol., 54: 429—432.
- [11] John, F. McCarthy et al., 1977. Proecdysial changes in serum ecdysone titers, gastrolith formation, and limb regeneration following molt by Hmb autotomy and/or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. Gen. Comp. Endocrinol., 33: 278—292.
- [12] Lisk, R. D., 1961. Estradiol-17 $\beta$  in the eggs of the American lobster, *Homarus americanus*. Can. J. Biochem. Physiol., 39: 659—662.
- [13] Quackenbush, L. S. and W. F. Herrkind, 1981. Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea: Palinuridae): Effect of eyestalk ablation. Comp. Biochem. Physiol., 69(A): 523—527.
- [14] Stevenson, J. R. et al., 1979. Ecdysone titers during the molt cycle of the crayfish *Orconectes sanborni*. Gen. Comp. Endocrinol., 39: 20—25.
- [15] Takuji, Okumura et al., 1989. Hemolymph ecdysteroid levels during the molt cycle in the Kurum prawn *Penaeus japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(12): 2091—2098.

## CHANGES OF HEMOLYMPH 20-HYDROXYECDYSONE 17 $\beta$ -OESTRADIOL AND TESTOSTERONE LEVELS IN *ERIOCHEIR SINENSIS*

Jiang Renliang, Tan Yujun, Wu Jiamin and Yan Xizhu

(Shanghai Fisheries University, 200090)

Bao Xiangsheng and Yao Jiming

(Chushou Fisheries Research Institute of Anhui Province, 238074)

**ABSTRACT** Hemolymph 20-hydroxyecdysone (20-H<sub>E</sub>), 17 $\beta$ -oestradiol (17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) and testosterone (T) level changes in *Eriocheir sinensis* were measured by radioimmunoassay (RIA). 1—2 days before molt stage, the hemolymph

20-HE reached to peak level of  $116.16 \pm 32.96 \text{ ng/ml}$ ; the lowest level of  $7.09 \pm 1.39 \text{ ng/ml}$  was found at the molt stage, 1—2 days after molt, the 20-HE level was still lower. In female crab, the peak level of hemolymph  $17\beta\text{-E}_2$  showed in September and reached to  $2.15 \pm 0.28 \text{ ng/ml}$  in Decembers ( $3.62 \pm 1.11 \text{ ng/ml}$ ) with the vitelline accumulation of oocyte, afterwards  $17\beta\text{-E}_2$  levels were lower. In male crab, hemolymph T level began to raise in October and reached to  $2.15 \pm 0.28 \text{ ng/ml}$  in December, it induced the development and maturation of testes. During an annual cycle, the hemolymph 20-HE in female peaked in May and August ( $13.15 \pm 6.99 \text{ ng/ml}$  and  $15.80 \pm 7.40 \text{ ng/ml}$ ); the hemolymph 20-HE in male peaked in June and September ( $20.25 \pm 13.58 \text{ ng/ml}$  and  $14.00 \pm 9.48 \text{ ng/ml}$ ). The lowest level of hemolymph 20-HE of both female and male were in February ( $3.75 \pm 3.38 \text{ ng/ml}$  and  $3.68 \pm 1.78 \text{ ng/ml}$ ). These results indicated that peak levels of hemolymph 20-HE in May (female) and June (male) were related to growth, peak levels in August (female) and September (male) were related to reproductive molt and early gonad development

**KEYWORDS** *Eriocheir sinensis*, 20-hydroxyecdysone,  $17\beta\text{-estradiol}$ , testosterone, RIA