

文章编号: 1000-0615(2018)03-0366-10

DOI: 10.11964/jfc.20161010584

饲料磷脂对已交配和未交配雌性三疣梭子蟹卵巢发育、组织学和卵黄蛋白原表达的影响

丁立云^{1,2}, 付辉云², 侯迎梅¹, 霍雅雯¹,
孙蓬¹, 金敏¹, 周歧存^{1*}

(1. 宁波大学海洋学院, 鱼类营养研究室, 浙江宁波 315211;

2. 江西省水产科学研究所, 江西 南昌 330039)

摘要: 为探讨饲料磷脂对已交配和未交配雌性三疣梭子蟹卵巢发育、组织学结构和卵黄蛋白原基因表达的影响, 本研究采用2×2双因子随机区组设计(日粮类型: 0%和4%大豆卵磷脂; 三疣梭子蟹交配处理: 已交配和未交配), 共4个处理组, 以大豆卵磷脂0%和4%两种人工配合饲料分别投喂交配和未交配两组三疣梭子蟹雌蟹, 进行了为期12周的饲养实验。结果显示, 无论三疣梭子蟹是否交配, 饲料中添加4%大豆卵磷脂可显著增加三疣梭子蟹的卵巢指数, 提高血清中卵黄蛋白原、孕酮和雌二醇的浓度, 增大卵母细胞直径; 同时上调肝胰腺卵黄蛋白原mRNA相对表达量, 但无显著性差异, 肝胰腺指数呈现出和卵巢指数相反的趋势; 交配后的三疣梭子蟹卵巢指数、肝胰腺卵黄蛋白原mRNA表达量显著高于未交配组。组织学观察显示, 交配使得三疣梭子蟹卵母细胞沉积更丰富的卵黄颗粒, 促进卵母细胞成熟, 交配处理对肝胰腺指数和血清中卵黄蛋白原及孕酮的水平无显著性影响。此外, 饲料磷脂水平和交配处理的交互作用显著影响了三疣梭子蟹血清中类固醇激素孕酮和雌二醇的浓度。本实验结果显示, 饲料中大豆磷脂和交配处理均能促进雌性三疣梭子蟹的卵巢发育, 交配处理对卵母细胞成熟的促进作用更为明显。

关键词: 三疣梭子蟹; 大豆磷脂; 卵巢发育; 组织学; 卵黄蛋白原

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

磷脂是细胞膜的重要结构组分, 甲壳动物体内不能合成磷脂或合成量过少, 不能满足其正常生长和发育的需要^[1-2]。甲壳类动物成熟卵母细胞中积累的主要物质是卵黄体和脂肪滴, 卵黄体组成中约90%的物质是卵黄磷蛋白, 而卵黄磷蛋白主要由蛋白质(50%)、脂肪(48%)和碳水化合物(2%)组成, 其中脂肪组成中含量最高的脂类物质是磷脂^[3-4]。在卵巢发育过程中, 磷脂对脂类营养物质从肝胰腺经血淋巴转运到卵巢起着重要作用。已有的研究表明, 饲料中的磷脂

可以显著促进中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[5-6]、红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[7]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[8]等甲壳类动物的卵巢发育, 进而提高幼体体质量和生殖性能。交配是甲壳类动物两性生殖的重要生命行为。贾磊^[9]指出, 三疣梭子蟹在自然状态下, 生殖蜕壳后, 没有交配的雌蟹卵巢发育会停止, 因为交配是诱导甲壳类动物滤泡细胞向卵母细胞迁移和卵黄发生的前提。迄今为止, 有关磷脂和交配处理对甲壳类动物卵巢发育及卵黄发生的研

收稿日期: 2016-10-18 修回日期: 2017-04-11

资助项目: 国家自然科学基金(41476125); 浙江省重点研发计划项目(2017C02G1460834); 浙江省水产动物营养与饲料科技服务团队项目(ZJANFTST 2017-2); 浙江省重中之重一级学科建设项目

通信作者: 周歧存, E-mail: zhouqicun@nbu.edu.cn

究较少。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属于甲壳纲(Crustacea)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹属(*Portunus*),广泛分布于中国、日本和韩国沿海地区,其肉肥细嫩,味道鲜美,营养丰富,已成为我国重要海水养殖种类之一^[10-11]。国内外有关三疣梭子蟹饲料营养素方面的研究,主要集中在幼蟹对蛋白质^[12]、蛋能比^[13]、脂肪^[14]、氨基酸^[15]和脂肪酸^[16]的营养需求,而研究亲蟹较少,仅见高不饱和脂肪酸^[17]和花生四烯酸^[18]对三疣梭子蟹卵巢发育影响的公开报道。甲壳类动物亲体的营养状态极大地影响性腺成熟、繁殖性能、卵子和幼蟹的质量^[19-20]。因此,研究饲料营养素对甲壳类动物亲体卵巢发育的影响具有重要意义。本实验以大豆卵磷脂0%和4%2种人工配合饲料投喂交配和未交配2组三疣梭子蟹雌蟹12周,研究大豆卵磷脂对已交配和未交配三疣梭子蟹性腺指数、组织学结构和卵黄蛋白原基因表达的影响,以期三疣梭子蟹亲体配合饲料的生产提供指导,并为今后深入研究三疣梭子蟹生殖生理学和营养繁殖学提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2015年9月在浙江宁波象山选择身体健康、规格相近、未交配三疣梭子蟹雌蟹作为亲蟹,随后放入单体筐中进行养殖和交配,交配方法见卢少坤等^[21]。然后随机挑选健康、规格一致的已交配雌性三疣梭子蟹(mated crabs)和未交配雌性三疣梭子蟹(unmated crabs)各120只饲养于240个塑料饲养筐内(40 cm×40 cm×40 cm),待后续分组实验。

1.2 实验饲料

本实验以鱼粉、豆粕和磷虾粉为蛋白源,鱼油和豆油为脂肪源,配制成粗蛋白含量约为42%、粗脂肪含量约为13%的2种等氮等脂饲料,分为A组(添加0%大豆卵磷脂)和B组(添加4%大豆卵磷脂)。实验饲料配方及营养生化成分见表1和表2。复合维生素和矿物质为实验室自行配置,其他饲料原料均购自宁波天邦股份有限公司。所有原料粉碎后过80目筛,按比例添加混匀后,以双螺杆挤条机挤压并经饲料颗粒机进行制粒,饲料直径0.4 cm,长度1.5 cm,所制饲料

表1 实验饲料的原料组成及营养成分(干饲料)

Tab. 1 Ingredients and nutritional ingredient of experimental diets (dry matter) %

原料 ingredients	饲料中大豆磷脂水平 dietary soy lecithin levels	
	A (0%)	B (4%)
鱼粉 fish meal	32.00	32.00
豆粕 soybean meal	25.00	25.00
面粉 wheat flour	22.20	22.20
磷虾粉 krill meal	5.00	5.00
鱼油 fish oil	1.00	1.00
豆油 soybean oil	8.00	4.00
大豆卵磷脂 soy lecithin ¹	0.00	4.00
复合矿物质 mineral mix ²	1.00	1.00
复合维生素 vitamin mix ²	1.50	1.50
氯化胆碱 choline chloride	0.30	0.30
磷酸二氢钙 Ca (H ₂ PO ₄) ₂	1.50	1.50
胆固醇 cholesterol	0.50	0.50
海藻酸钠 sodium alginate	2.00	2.00
营养成分 nutritional ingredient		
粗蛋白 crude protein	42.29	42.34
粗脂肪 crude lipid	13.33	13.26
灰分 ash	9.96	9.86
干物质 dry matter	90.21	90.12

注: 1.大豆磷脂油,符合国标GB/T 23878-2009,购于宁波天邦股份有限公司,丙酮不溶物为63.3%; 2.复合矿物质和复合维生素配方组成参照Jin等^[15]

Notes: 1.liquid soy lecithin (63.3% acetone insoluble), supplied by Ningbo Tech-Bank Corp., Ningbo, China; 2.Vitamin premix and mineral premix were based on Jin *et al*^[15]

90 °C熟化30 min, 阴凉处风干, 于-20 °C下密封保存备用。

1.3 实验设计及饲养管理

实验采用2×2双因子随机区组设计: 三疣梭子蟹(已交配和未交配), 日粮类型(0%和4%大豆卵磷脂)。选择规格相近的已交配和未交配的雌性三疣梭子蟹各120只, 分别随机等分为2个处理组, 共4个处理组, 每个处理设3个重复, 每个重复20只蟹, 共240只梭子蟹饲养于240个塑料饲养筐内(40 cm×40 cm×40 cm), 塑料饲养筐随机放置于3个4 m×8 m的水泥池中。实验开始前统一用

表2 实验饲料的脂肪酸组成
Tab. 2 Fatty acid compositions (total fatty acids) of the experimental diets %

脂肪酸 fatty acids	饲料中大豆磷脂水平 dietary soy lecithin levels	
	A (0%)	B (4%)
C12:0	0.03	0.37
C14:0	2.37	2.59
C16:0	13.31	15.50
C18:0	5.63	5.54
C20:0	0.55	0.47
C22:0	0.59	0.48
C24:0	0.20	0.12
ΣSFA	22.69	25.07
C14:1n-3	0.10	0.11
C16:1n-7	2.34	2.37
C18:1n-7	2.58	2.44
C18:1n-9	19.03	18.16
C20:1n-7	0.56	0.55
C20:1n-9	2.96	2.99
C22:1n-9	4.92	5.03
ΣMUFA	32.49	31.65
C16:2n-6	0.02	0.03
C18:2n-6	28.66	28.21
C18:3n-6	0.10	0.08
C20:2n-6	0.16	0.15
C20:3n-6	0.03	0.03
C20:4n-6	0.30	0.28
C22:5n-6	0.12	0.09
Σn-6	29.39	28.87
C18:3n-3	4.71	3.88
C18:4n-3	0.89	0.74
C20:3n-3	0.07	0.08
C20:4n-3	0.26	0.25
C20:5n-3	3.27	3.04
C22:5n-3	0.58	0.71
C22:6n-3	5.64	5.72
Σn-3	15.42	14.42
ΣPUFA	44.81	43.29
ΣHUFA	10.27	10.20

0%大豆卵磷脂组饲料驯化一周,实验开始后每天投喂1次,日投喂量为其体质量的3%~5%。实验期间水温20~26 °C,溶解氧6.5~7.0 mg/L、氨氮浓度≤0.5 mg/L、pH 7.8~8.2,盐度26~28,2~3 d换水1次,每次换水量约为30%,实验为期12周。

1.4 样品采集与分析

饲料常规成分和脂肪酸检测 参照侯迎梅等^[22]方法,分别测定饲料中的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和脂肪酸含量。

生物学参数的测定 实验结束后擦干体表水分,用电子天平称量梭子蟹的总重(精确到0.01 g),称重后立即进行活体解剖,取出卵巢和肝胰腺称重(精确到0.01 g)。按以下公式计算卵巢指数和肝胰腺指数:

卵巢指数(gonadosomatic index, GSI, %)=100×卵巢体质量/梭子蟹体质量

肝胰腺指数(hepatopancreas index, HSI, %)=100×肝胰腺体质量/梭子蟹体质量

血清中类固醇激素和卵黄蛋白原浓度的测定 每个重复随机取4只蟹,从第3步足抽取血液,分别放入1.5 mL离心管中,4 °C静置一夜,3000 r/min离心8 min,取上清液,用于孕酮(PG)、雌二醇(E₂)和卵黄蛋白原(VG)浓度的测定。PG、E₂和VG参照梭子蟹ELISA检测试剂盒说明书(上海源叶生物科技有限公司)进行测定。

卵巢组织学结构观察 采用Bouin氏液对卵巢组织进行固定48 h,酒精梯度脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片厚度5.0~7.0 μm,HE染色,中性数胶封片,在OLYMPUS CX-22显微镜下观察拍照。

卵黄蛋白原(VG)mRNA表达分析 按照Trizol试剂(全式金,中国)说明书提取三疣梭子蟹卵巢总RNA,分别用核酸定量检测仪ND-2000(NanoDrop,美国)和琼脂糖凝胶电泳检测RNA的浓度和质量。按照One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(全式金,中国)试剂盒说明书进行RNA反转录,合成cDNA第一链。

根据已知的三疣梭子蟹VG(GenBank序列号: DQ000638)和β-actin(GenBank序列号: JZ721736) cDNA序列采用Primer premier 5.0软件设计实时荧光定量PCR引物,检测引物特异性及扩增效率,筛选后每个基因各得到一对特异性引物,引物序列见表3,引物由深圳华大基因科技有限公司合成。

表3 实时荧光定量PCR引物序列信息

Tab. 3 Primers used in the real-time quantitative

RT-PCR analyses	
基因引物 primers	序列 sequences (5'→3')
VG-F	CGGTCCTGAGACGCTATT
VG-R	CTTCCTCGCAAACCAACA
β-actin-F	CCTGACTGCCTACCTCACCAA
β-actin-R	ATGCCGACAGATTCCATACCC

定量仪器为实时荧光定量PCR仪(Light-Cycler*96, Roche, Ltd, Swit), 实时定量PCR反应体系为20 μL, 上下游模版各1.0 μL, 10 μL的2×conc SYBR Green I Master (罗氏, 瑞士), 1 μL of cDNA模板和7 μL DEPC水。反应条件: 95 °C 2 min, 紧接着95 °C 15 s, 58 °C 10 s, 72 °C 10 s共45个循环。β-actin作为内参基因, 以投喂0%磷脂饲料的未交配三疣梭子蟹处理组表达量为1, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法运算得到表达量的比值。

1.5 数据统计与分析

实验数据以平均值±标准差表示(mean ± SD), 采用SPSS17.0中的多因变量多因素方差分析模型(GLM)对数据进行双因子方差分析。模型包括三疣梭子蟹交配处理(已交配和未交配)、日粮类型(0%和4%大豆卵磷脂)及二者的交互。以 $P < 0.05$ 为差异显著判断标准。

2 结果

2.1 饲料磷脂对已交配和未交配三疣梭子蟹卵巢指数和肝胰腺指数的影响

交配处理显著影响三疣梭子蟹的卵巢指数(GSI)($P < 0.05$), 对肝胰腺指数(HSI)无显著性影响($P > 0.05$); 已交配三疣梭子蟹卵巢指数显著高于未交配三疣梭子蟹($P < 0.05$)(表4)。饲料磷脂水平

显著影响已交配三疣梭子蟹的卵巢指数和肝胰腺指数($P < 0.05$), 对未交配蟹无显著性影响($P > 0.05$); 饲喂4%大豆磷脂饲料的已交配蟹的卵巢指数显著高于0%大豆磷脂组的已交配蟹($P < 0.05$), 肝胰腺指数呈相反趋势。交配处理和饲料大豆磷脂水平对卵巢指数和肝胰腺指数均没有互作关系。

2.2 饲料磷脂对已交配和未交配三疣梭子蟹血清卵黄蛋白原、孕酮和雌二醇水平的影响

饲料大豆磷脂水平显著影响了血清卵黄蛋白原、孕酮和雌二醇的浓度, 4%大豆磷脂组梭子蟹血清卵黄蛋白原、孕酮和雌二醇的浓度显著高于0%大豆磷脂组($P < 0.05$); 交配处理并未显著影响梭子蟹血清卵黄蛋白原和孕酮的浓度($P > 0.05$), 但对血清雌二醇产生显著性影响, 4%大豆磷脂已交配蟹显著高于未交配蟹($P < 0.05$)(表5)。交配处理和饲料大豆磷脂水平对血清卵黄蛋白原浓度没有互作关系, 但对孕酮和雌二醇浓度的影响有互作关系。

2.3 饲料磷脂对已交配和未交配三疣梭子蟹肝胰腺卵黄蛋白原表达的影响

交配处理显著影响了三疣梭子蟹肝胰腺卵黄蛋白原(VG)的相对表达量($P < 0.05$), 已交配三疣梭子蟹肝胰腺VG mRNA的表达量显著高于未交配三疣梭子蟹($P < 0.05$); 4%大豆磷脂组肝胰腺VG mRNA的表达量相对于0%大豆磷脂组有增加的趋势, 但差异不显著($P > 0.05$)(图1)。交配处理和饲料大豆磷脂水平对肝胰腺VG mRNA的表达量没有互作关系。

2.4 饲料磷脂对已交配和未交配三疣梭子蟹卵巢组织学结构的影响

饲料磷脂和交配处理均在不同程度影响着梭子蟹卵巢的组织学结构, 未交配0%大豆磷脂

表4 饲料磷脂对已交配和未交配雌性三疣梭子蟹卵巢指数和肝胰腺指数的影响

Tab. 4 Effect of dietary soy lecithin on the GSI and HSI of mated and unmated female *P. trituberculatus* for 12 weeks

项目 items	已交配蟹 mated crab		未交配蟹 unmated crab		P-value		
	A (0%)	B (4%)	A (0%)	B (4%)	日粮 dietary	交配 mating	交互 interaction
肝胰腺指数 HSI	7.54±0.18	7.08±0.15	7.52±0.07	7.42±0.31	0.037	0.190	0.160
卵巢指数 GSI	1.85±0.37 ^b	2.64±0.60 ^c	0.86±0.06 ^a	1.05±0.15 ^a	0.048	0.000	0.188

注: 同一行数据上不同字母表示存在显著差异($P < 0.05$), 下同

Notes: Values in the same line with different lowercase superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), the same below

表5 饲料磷脂对已交配和未交配雌性三疣梭子蟹血清卵黄蛋白原、孕酮和雌二醇水平的影响

Tab. 5 Effect of dietary soy lecithin on the VG, PG and E₂ levels in serum of mated and unmated female

		<i>P. trituberculatus</i> for 12 weeks				P-value		
项目 items		已交配蟹 mated crab		未交配蟹 unmated crab		日粮 dietary	交配 mating	交互 interaction
		A (0%)	B (4%)	A (0%)	B (4%)			
卵黄蛋白原/(ng/mL)	vitellogenin	87.38±30.17 ^{ab}	132.83±8.88 ^b	63.08±29.77 ^a	91.35±24.66 ^{ab}	0.034	0.052	0.567
孕酮/(pg/mL)	progesterone	355.07±22.03 ^a	461.07±17.24 ^c	405.07±19.22 ^{ab}	440.40±20.88 ^{bc}	0.000	0.238	0.015
雌二醇/(pg/mL)	estradiol	35.28±2.29 ^a	50.04±3.48 ^b	36.55±1.85 ^a	40.17±2.47 ^a	0.000	0.021	0.006

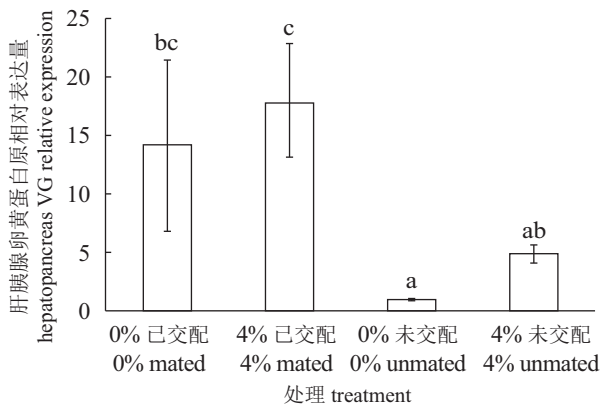


图1 饲料磷脂对已交配和未交配雌性三疣梭子蟹肝胰腺卵黄蛋白原表达的影响

Fig. 1 Effect of dietary soy lecithin on the VG mRNA in hepatopancreas of mated and unmated female *P. trituberculatus* for 12 weeks

处理组以内源性卵黄合成期的卵母细胞(EN)为主, 少部分卵母细胞已经发育到外源性卵黄合成期(EX), 滤泡细胞(FC)较少, 正向卵母细胞迁移(图2-a); 未交配4%大豆磷脂处理组区域内的内源性卵黄合成期的卵母细胞和外源性卵黄合成期的卵母细胞直径均大于未交配0%大豆磷脂处理组, 可见明显的卵黄颗粒(Y), 滤泡细胞排布并贴近在卵母细胞周围(图2-b); 已交配0%大豆磷脂处理组以近成熟的卵母细胞(NO)为主且有大量的卵黄颗粒, 仍能可见少量的内源性卵黄合成期的卵母细胞, 滤泡细胞消失(图2-c); 已交配4%大豆磷脂处理组卵母细胞直径大于已交配0%大豆磷脂处理组, 区域内的内源性卵黄合成期的卵母细胞少于已交配0%大豆磷脂处理组(图2-d)。综合分析显示, 交配处理显著促进了梭子蟹卵母细胞的成熟, 而添加大豆磷脂可促进滤泡细胞向卵母细胞迁移, 增大卵母细胞直径, 同样有促进卵母细胞成熟的趋势。

3 讨论

本研究采用0%和4%的大豆磷脂饲喂已交配和未交配三疣梭子蟹12周, 发现磷脂和交配处理对三疣梭子蟹的卵巢发育具有不同程度的促进作用。在本实验中, 饲料中添加磷脂显著提高了梭子蟹的卵巢指数, 而卵巢指数可作为评价甲壳类动物性腺发育状况优劣的可靠指标, 表明磷脂可显著促进梭子蟹的卵巢发育, 这与饲料中高水平的大豆磷脂显著提高了中华绒螯蟹^[6]、红螯光壳螯虾^[7]和日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[23]等甲壳类动物性腺指数的研究结果一致。交配是一个复杂的生理过程, 研究发现, 与正常交配的绿盲蝽(*Apolysgus lucorum*)相比, 未交配的绿盲蝽卵巢发育相对迟缓, 而且卵量较少^[24-25]。与本实验类似, 交配后的三疣梭子蟹卵巢指数显著高于未交配三疣梭子蟹, 其主要原因可能是雌性三疣梭子蟹一生只交配一次^[26], 交配时, 雄蟹将精荚传递到雌蟹的纳精囊中, 而纳精囊与卵巢发育关系密切^[27], 在不到2个月的时间内, 囊内物质可基本消退, 纳精囊所占的空间完全被卵巢利用^[26, 28-29], 从而促进卵巢的发育。虾蟹在卵巢发育阶段, 肝胰腺中营养物质向卵巢持续转运使得肝胰腺指数和卵巢指数呈负相关。本研究显示, 在已交配蟹中, 4%大豆磷脂组中的卵巢指数显著高于0%大豆磷脂组, 而肝胰腺指数相对更小, 呈相反趋势。类似的结果在中华绒螯蟹^[6]、红螯光壳螯虾^[30]和凡纳滨对虾^[31]中也有报道。

卵黄蛋白原是卵黄蛋白的前体, 是卵黄发生期由特定组织形成的一种大分子量的磷脂糖蛋白^[32], 与脊椎动物载脂蛋白B及微粒体甘油三酯转运蛋白同属于古老的脂肪转运蛋白超家族^[33-34]。研究发现, 高含量的磷脂能够结合更多

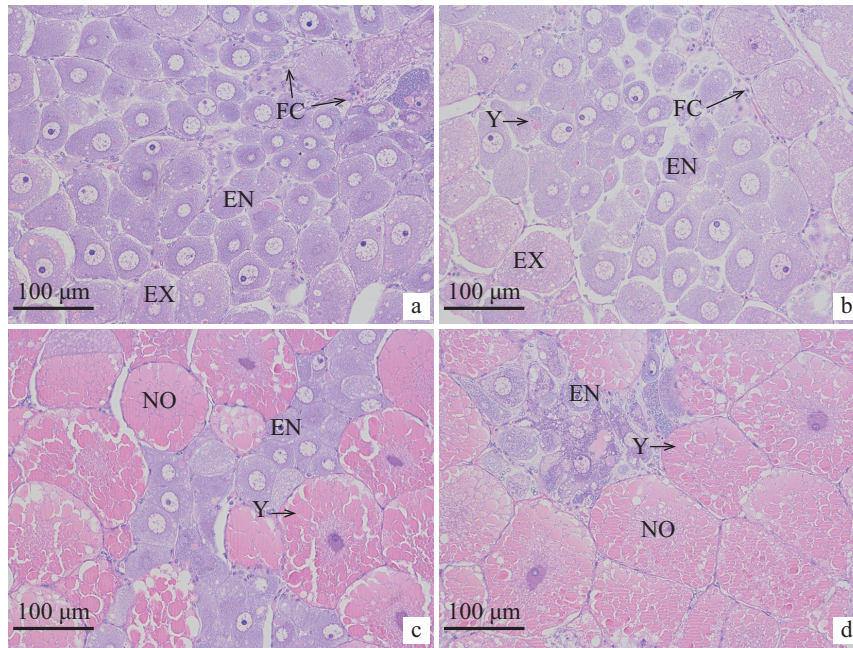


图2 饲料磷脂对已交配与未交配雌性三疣梭子蟹卵巢组织学结构的影响

a. 未交配0%大豆磷脂处理组; b. 未交配4%大豆磷脂处理组; c. 已交配0%大豆磷脂处理组; d. 已交配4%大豆磷脂处理组; FC. 滤泡细胞; EN. 内源性卵黄合成期的卵母细胞; EX. 外源性卵黄合成期的卵母细胞; Y. 卵黄颗粒; NO. 近成熟的卵母细胞

Fig. 2 Effect of dietary soy lecithin on the ovary histological structure of mated and unmated female *P. trituberculatus* for 12 weeks

a, b and c, d represent treatment of diets 0% and 4% soy lecithin fed to unmated crabs (a, b) and mated crabs (c, d) respectively; FC, follicle cells; EN, endogenous vitellogenic oocytes; EX, exogenous vitellogenic oocytes; Y, yolk globules; NO, nearly-mature oocytes

的卵黄蛋白原, 从而促进了卵黄物质在卵母细胞中的积累^[35-37]。本实验中, 无论梭子蟹是否交配, 4%大豆磷脂组中的卵黄蛋白原浓度均高于0%大豆磷脂组。同本实验一致, 张颖等^[38]发现, 施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)后备亲鱼血清中卵黄蛋白原浓度随日粮卵磷脂的添加水平和时间增加而升高。甲壳动物可以通过性腺抑制激素和性腺刺激激素的相互拮抗作用对卵黄发生及卵巢发育进行调控^[39]。此外, 孕酮和雌二醇也是参与卵黄发生重要的类固醇激素, 在卵巢发育过程中可以与细胞中雌激素反应元件结合直接调控肝胰腺和卵巢中卵黄蛋白原mRNA的表达, 从而影响卵黄物质的积累^[40-41]。与卵黄蛋白原浓度表现相同, 本研究中, 梭子蟹血清中孕酮和雌二醇在4%大豆磷脂组中具有更高的水平。表明磷脂可通过影响梭子蟹血清类固醇激素的水平, 从而促进卵黄发生和卵巢发育。在大多数动物卵黄发生机制研究中发现, 外源磷脂经与卵母细胞中的受体结合后, 将作为卵黄物质沉积在卵巢中, 继而通过对内分泌激素合成和分泌的调节, 影响卵巢的发育和成熟^[30, 42-43]。

VG mRNA表达丰度是衡量甲壳动物卵巢发育状态的一个敏感指标。Yang等^[44]研究表明, 三疣梭子蟹卵黄蛋白原主要在卵黄发生期的雌性肝胰腺中表达, 所以本研究采用肝胰腺中VG mRNA表达来评价饲料磷脂和交配处理对三疣梭子蟹卵黄发生的影响。本实验中, 已交配三疣梭子蟹肝胰腺VG mRNA的表达量显著高于未交配三疣梭子蟹, 表明交配处理对三疣梭子蟹卵巢发育影响显著。对昆虫的研究显示, 交配过程中, 雄虫会向雌虫体内转移许多具有生理效应的物质, 包括精液、营养和激素类物质, 从而促进交配雌虫的性腺发育和卵子发生^[45]。三疣梭子蟹交配时精英具有的活性物质尚不清楚, 有待进一步探究。研究认为, 甲壳动物肝胰腺中合成卵黄蛋白原, 然后释放至血淋巴, 被卵母细胞吸收^[46]。本研究中, 已交配梭子蟹肝胰腺VG mRNA表达水平显著高于未交配蟹, 而血清中VG浓度在已交配蟹和未交配蟹之间未产生显著差异, 产生这一现象是因为mRNA存在贮存、转运、降解、翻译调控和产物的翻译后加工^[47], 使得基因表达水平难以准确反映蛋白质的质与

量。龚群等^[48]研究力竭运动前后大鼠(*Rattus norvegicus*)脑中海马谷氨酸受体NR2A蛋白含量和基因表达的变化,发现NR2A蛋白含量和其基因表达的变化趋势不一致,认为基因表达对蛋白质含量的调控可能具有延迟性。张艳^[49]研究卵巢发育期间梭子蟹肝胰腺VG mRNA和血淋巴VG浓度的变化,也发现Ⅳ期肝胰腺VG mRNA表达水平显著高于Ⅲ2期,而血淋巴VG浓度在Ⅳ期和Ⅲ2期之间无显著性差异。

综上所述,饲料中的大豆磷脂和交配处理均能促进雌性三疣梭子蟹的卵巢发育。组织学观察显示,交配处理显著促进了梭子蟹卵母细胞的成熟,而添加大豆磷脂可促进滤泡细胞向卵母细胞迁移,增大卵母细胞直径,同样有促进卵母细胞成熟的趋势。

参考文献:

- [1] Kanazawa A, Teshima S, Sakamoto, M. Effects of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on the growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae[J]. Aquaculture, 1985, 50(1-2): 39-49.
- [2] National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp[M]. Washington, DC: National Academies Press, 2011.
- [3] Lee R F, Walker A. Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1995, 271(5): 401-412.
- [4] 吴旭干, 于智勇, 成永旭, 等. 4组生物饵料对中华绒螯蟹Z₄到大眼幼体生长发育和脂肪酸组成的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(6): 911-918.
Wu X G, Yu Z Y, Cheng Y X, et al. Effect of four groups of live feeds on larval development, growth (from Z₄ to Megalopa) and fatty acid composition of *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(6): 911-918(in Chinese).
- [5] Wu X G, Cheng Y X, Sui L Y, et al. Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock[J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 602-613.
- [6] Sui L Y, Wu X G, Wille M, et al. Effect of dietary soybean lecithin on reproductive performance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) broodstock[J]. Aquaculture International, 2009, 17(1): 45-56.
- [7] Wang L M, Zuo D, Lv W W, et al. Effects of dietary soybean lecithin on gonadal development and vitellogenin mRNA expression in the female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens) at first maturation[J]. Aquaculture Research, 2013, 44(8): 1167-1176.
- [8] Cahu C, Guillaume J C, Stéphan G, et al. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets[J]. Aquaculture, 1994, 126(1-2): 159-170.
- [9] 贾磊. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)卵巢发育的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
Jia L. Preliminary Study on the ovary development of the crab *Portunus trituberculatus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008 (in Chinese).
- [10] Dan S, Oshiro M, Ashidate M, et al. Starvation of *Artemia* in larval rearing water affects post-larval survival and morphology of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Brachyura, Portunidae)[J]. Aquaculture, 2016, 452: 407-415.
- [11] Pan L Q, Hu D X, Liu M Q, et al. Molecular cloning and sequence analysis of two carbonic anhydrase in the swimming crab *Portunus trituberculatus* and its expression in response to salinity and pH stress[J]. Gene, 2016, 576(1): 347-357.
- [12] Jin M, Zhou Q C, Zhang W, et al. Dietary protein requirements of the juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. Aquaculture, 2013, 414-415: 303-308.
- [13] Huo Y W, Jin M, Zhou P P, et al. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. Aquaculture, 2014, 434: 151-158.
- [14] 韩涛, 王骥腾, 胡水鑫, 等. 饲料脂肪水平对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)幼蟹生长及体组成的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1276-1281.
Han T, Wang J T, Hu S X, et al. Effect of dietary lipid level on growth and body composition of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(5): 1276-1281(in Chinese).
- [15] Jin M, Wang M Q, Huo Y W, et al. Dietary lysine requirement of juvenile swimming crab, *Portunus trituber-*

- culatus*[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 1-7.
- [16] 张稳, 谢奉军, 金敏, 等. 饲料中n-3高不饱和脂肪酸含量对三疣梭子蟹幼蟹生长性能及脂肪酸组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(5): 1254-1264.
- Zhang W, Xie F J, Jin M, *et al.* Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acid content on growth performance and fatty acid composition of juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(5): 1254-1264(in Chinese).
- [17] 丰浪. 高不饱和脂肪酸(HUFA)对三疣梭子蟹卵巢发育、内分泌激素以及组织生化组成的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Feng L. The effect of dietary HUFA on the ovary development, endocrine hormones and tissue biochemical composition of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [18] 杨印蹊. 饲料中添加花生四烯酸对三疣梭子蟹卵巢发育及成蟹品质的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Yang Y P. The effects of dietary supplement of Arachidonic acid on ovary development and nutritional quality of swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [19] Lavens P, Sorgeloos P. Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 169-176.
- [20] Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S, *et al.* Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock[J]. *Aquaculture*, 2010, 301(1-4): 78-84.
- [21] 卢少坤, 李荣华, 母昌考, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)低盐耐受性和体重的遗传参数估计及其相关分析[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(5): 1040-1045.
- Lu S K, Li R H, Mu C K, *et al.* Estimation on genetic parameters for low salinity tolerance and body weight of *Portunus trituberculatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1040-1045(in Chinese).
- [22] 侯迎梅, 袁野, 陆游, 等. 三疣梭子蟹幼蟹对大豆卵磷脂的需要量[J]. *水产学报*, 2016, 40(11): 1735-1764.
- Hou Y M, Yuan Y, Lu Y, *et al.* Dietary soy lecithin requirement of the juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(11): 1735-1764(in Chinese).
- [23] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S I, *et al.* Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of kuruma prawn[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59(2): 345-351.
- [24] 董吉卫, 陆宴辉, 杨益众. 绿盲蝽成虫的产卵行为与习性[J]. *应用昆虫学报*, 2012, 49(3): 591-595.
- Dong J W, Lu Y H, Yang Y Z. Oviposition behavior of adult female *Apolygus lucorum*[J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2012, 49(3): 591-595(in Chinese).
- [25] 苑伟. 食物和交配对绿盲蝽卵巢发育影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- Yuan W. Effect of diet and mating status on ovarian development in an omnivorous bug *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese).
- [26] 宣富君, 管卫兵, 戴小杰, 等. 东海三疣梭子蟹纳精囊形态结构与内含物的变化[J]. *动物学杂志*, 2009, 44(2): 1-11.
- Xuan F J, Guan W B, Dai X J, *et al.* Structure and content of spermathecae of *Portunus trituberculatus* from East China sea[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2009, 44(2): 1-11(in Chinese).
- [27] 王兰, 李春源. 长江华溪蟹纳精囊与卵巢发育周期的关系[J]. *动物学研究*, 1999, 20(1): 36-40.
- Wang L, Li C Y. Study on spermatheca of the freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense* (Butt)[J]. *Zoological Research*, 1999, 20(1): 36-40(in Chinese).
- [28] Hines A H, Jivoff P R, Bushmann P J, *et al.* Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. *Bulletin of Marine Science*, 2003, 72(2): 287-310.
- [29] Wolcott D L, Hopkins C W B, Wolcott T G. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: effects of male mating history, male size, and season[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 319(1-2): 43-55.
- [30] 王兰梅, 李嘉尧, 王丹丽, 等. 饲料中大豆磷脂对红螯光壳螯虾性腺发育期营养物质积累的影响[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 381-391.
- Wang L M, Li J Y, Wang D L, *et al.* Effects of dietary soybean lecithin on nutrient accumulation during gonadal development in the female *Cherax quadricarinatus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 381-391(in Chinese).

- [31] Palacios E, Ibarra A M, Racotta I S. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock[J]. Aquaculture, 2000, 185(3-4): 353-371.
- [32] García C F, Heras H. Vitellogenin and Lipovitellin from the prawn *Macrobrachium borellii* as hydrocarbon pollution biomarker[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(8): 1631-1636.
- [33] Babin P J, Bogerd J, Kooiman F P, *et al.* Apolipoprotein II / I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor[J]. Journal of Molecular Evolution, 1999, 49(1): 150-160.
- [34] Avarre J C, Lubzens E, Babin P J. Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II / I and vertebrate apolipoprotein B[J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7: 3.
- [35] Copeland P A, Sumpter J P, Walker T K, *et al.* Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1986, 83(2): 487-493.
- [36] Babin P J. Binding of thyroxine and 3, 5, 3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 1992, 262(5): 712-720.
- [37] Marina P, Salvatore V, Maria M D F, *et al.* Effect of 17 β -estradiol and progesterone on vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata* Risso 1810 (Elasmobranchii: Torpediniformes): Studies on females and on estrogen-treated males[J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 157(2): 125-132.
- [38] 张颖, 孙慧武, 徐伟, 等. 饲料卵磷脂对施氏鲟血清卵黄蛋白原、卵径及性类固醇激素水平的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 783-790.
Zhang Y, Sun H W, Xu W, *et al.* Effects of phospholipids content in reserved brood diets on egg diameter performance, plasma sex steroids and vitellogenin levels in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 783-790(in Chinese).
- [39] 廖家遗, 张艳, 孙继贤, 等. 罗氏沼虾脑促性腺激素的初步分离及活性检测[J]. 水产学报, 2001, 25(1): 5-10.
Liao J Y, Zhang Y, Sun J X, *et al.* Partial isolation and bioassay of gonad-stimulating hormone from the brain of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(1): 5-10(in Chinese).
- [40] Warriar S R, Tirumalai R, Subramoniam T. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2001, 130(2): 283-294.
- [41] Cai S L, Zhao W X, Li D S, *et al.* Profile of progesterone and estradiol in hepatopancreas, ovary, and hemolymph of shrimp *Penaeus chinensis* during reproduction cycle[J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(4): 304-310.
- [42] Castellano C A, Audet I, Laforest J P, *et al.* Fish oil diets alter the phospholipid balance, fatty acid composition, and steroid hormone concentrations in testes of adult pigs[J]. Theriogenology, 2011, 76(6): 1134-1145.
- [43] Tocher D R, Bendiksen E Å, Campbell P J, *et al.* The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish[J]. Aquaculture, 2008, 280(1-4): 21-34.
- [44] Yang F, Xu H T, Dai Z M, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 142(4): 456-464.
- [45] 华荣胜, 戚志良, 时连根. 昆虫交配因子的研究进展[J]. 科技通报, 2010, 26(4): 556-559.
Hua R S, Qi Z L, Shi L G. Advance of insect mating factor[J]. Bulletin of Science and Technology, 2010, 26(4): 556-559(in Chinese).
- [46] Thongda W, Chung J S, Tsutsui N, *et al.* Seasonal variations in reproductive activity of the blue crab, *Callinectes sapidus*: vitellogenin expression and levels of vitellogenin in the hemolymph during ovarian development[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015, 179: 35-43.
- [47] 龙娟, 杨晓红, 于桂宝. 微生物蛋白组学的发展及前景[J]. 生物技术通报, 2006(增): 91-94, 99.
Long J, Yang X H, Yu G B. Development and prospect of microbial proteomics[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(suppl): 91-94, 99 (in Chinese).
- [48] 龚群, 张蕴琨. 力竭运动后大鼠海马脑区谷氨酸受体

- NR2A蛋白含量和基因表达的变化[J]. 中国运动医学杂志, 2006, 25(4): 420-423.
- Gong Q, Zhang Y K. Changes in protein content and gene expression of NMDA receptor 2A in rats' hippocampus after exhaustive exercise[J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2006, 25(4): 420-423(in Chinese).
- [49] 张艳. 三疣梭子蟹卵巢发育期间卵黄蛋白原(Vg)、卵黄磷蛋白(Vn)及Vg-mRNA表达的变化研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Zhang Y. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin and vitellogenin gene expression during the ovarian development of swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).

Effects of dietary soy lecithin on the ovary development, histology and vitellogenin gene expression in mated and unmated female swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

DING Liyun^{1,2}, FU Huiyun², HOU Yingmei¹, HUO Yawen¹,
SUN Peng¹, JIN Min¹, ZHOU Qicun^{1*}

(1. Laboratory of Fish Nutrition, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Jiangxi Fisheries Research Institute, Nanchang 330039, China)

Abstract: A 12-week experiment was conducted to evaluate the effects of dietary soy lecithin on ovary development, gonadal histology and vitellogenin mRNA expression of swimming crab. 2×2 double-factor random block design was used to arrange 0% or 4% soy lecithin for mated or unmated female swimming crab, respectively. The results indicated that crabs fed the diets containing 4% soy lecithin had significantly higher gonadosomatic index (GSI), oocyte diameter, the levels of serum vitellogenin and sex steroids than those fed the unsupplemented with soy lecithin diets. Hepatopancreatic vitellogenin mRNA expression increased with dietary soy lecithin increasing from 0% to 4%. The results of hepatosomatic index (HSI) showed a reverse trend with GSI. Mated female crabs exhibited higher hepatopancreatic vitellogenin mRNA expression than unmated female crabs. Furthermore, the mated female crabs had higher ovarian yolk granules in number and size than those unmated female crabs. Mating treatment did not affect HSI, serum vitellogenin (VG) and progesterone (PG) contents. The interaction of dietary soy lecithin and mating on serum progesterone (PG) and estradiol (E₂) contents was identified. In conclusion, the dietary soy lecithin and mating stimulated had a positive effect on ovarian development in swimming crab broodstock, and mating stimulated had a more beneficial effect on promoting oocyte maturation.

Key words: *Portunus trituberculatus*; soy lecithin; ovary development; gonadal histology; vitellogenin

Corresponding author: ZHOU Qicun. E-mail: zhouqicun@nbu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41476125); Key Research Program of Zhejiang Province of China (2017C02G1460834); Zhejiang Aquaculture Nutrition & Feed Technology Service Team (ZJANFTST 2017-2); Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture in Ningbo University