

文章编号: 1000-0615(2003)01-0057-05

早熟期间中华绒螯蟹肝胰腺指数、 肝脂含量及脂肪酸组成的变化

陈再忠, 成永旭, 王 武

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要: 实验采用称量法和气相色谱法分别测定了性早熟前后中华绒螯蟹的肝胰腺指数(HI)、肝脂含量(LC)和肝胰腺脂肪酸组成。雌雄蟹的HI和LC在早熟前后的变化趋势一致,都是早熟个体低于未成熟个体。在性早熟前,雌雄蟹的肝胰腺脂肪酸组成基本一致,只是雌蟹中 $C_{20:5n-3}$ 较高($P < 0.05$)。然而,对早熟前后的个体作比较时,发现雌雄蟹变化情况有很大差异:(1)早熟雌蟹中 $C_{16:1n-7}$ 、 $C_{16:0}$ 和 $C_{18:0}$ 高于未成熟雌蟹($P < 0.01$),而 $C_{20:5n-3}$ 、 $C_{20:4n-6}$ 和 $C_{22:6n-3}$ 则低于后者($P < 0.01$);(2)早熟雄蟹中 $C_{18:1}$ 高于未成熟雄蟹($P < 0.05$),而 $C_{14:0}$ ($P < 0.05$)、 $C_{16:1n-7}$ ($P < 0.05$)和 $C_{20:5n-3}$ ($P < 0.01$)皆低于后者。以上结果表明:雌雄蟹在性早熟前后存在肝胰腺脂肪酸组成变化的差异,且 $C_{20:5n-3}$ 可能主要参与成熟蜕壳和膜的构建,而 $C_{22:6n-3}$ 可能主要参与卵巢发育和卵黄的发生。

关键词: 中华绒螯蟹; 性早熟; 肝胰腺; 肝胰腺指数; 肝脂含量; 脂肪酸组成

中图分类号: S917; Q246 文献标识码: A

Changes of hepatopancreas index, lipid content and fatty acid composition in *Eriocheir sinensis* during precocity

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

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The hepatopancreas index(HI), lipid content(LC) and fatty acid composition in *Eriocheir sinensis* before and after the precocity, were compared by gravimetry and gas chromatography. The results showed that HI and lipid content both decreased after the precocious molt, regardless of their sex. As for fatty acid composition of hepatopancreas, immature male and female individuals were very similar, except for $C_{20:5n-3}$ significantly higher in the latter ($P < 0.05$). However, it varied with the sex when the precocious and immature crabs were compared. In female, the percentage content of $C_{16:1n-7}$, $C_{16:0}$ and $C_{18:0}$ were significantly higher in precocious individuals, but that of $C_{20:4n-6}$, $C_{20:5n-3}$ (EPA) and $C_{22:6n-3}$ (DHA) significantly lower($P < 0.01$). And in male, there was only $C_{18:1}$ significantly higher ($P < 0.05$) in precocious individuals while $C_{14:0}$ ($P < 0.05$), $C_{16:1n-7}$ ($P < 0.05$) and $C_{20:5n-3}$ ($P < 0.01$) lower. According to the results, it might come to the conclusions

收稿日期: 2002-02-26

基金项目: 上海市教育委员会重点学科项目

作者简介: 陈再忠(1973-), 男, 安徽明光人, 博士研究生, 主要从事集约化水产养殖方面的研究。Tel: 021-65710522, E-mail: chenzaizhong@263.net

通讯作者: 成永旭(1964-), 男, 河南济源人, 博士, 教授, 主要从事水产动物营养繁殖方面的研究。Tel: 021-65711346, E-mail: yxCheng@shfu.edu.cn

that EPA is very important during precocious molt and construction of membranes, while DHA mainly participates in the development of ovary and vitellogenesis.

Key words: *Eriocheir sinensis*; precocity; hepatopancreas; hepatopancreas index; lipid content; fatty acid composition

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是我国最重要的养殖蟹类, 肉质鲜美、营养丰富。然而, 近年来在 1 龄蟹种的培育过程中, 性早熟蟹十分普遍, 使养殖的经济效益和生产积极性严重受挫; 同时, 这些小规格蟹充斥市场并有部分参与苗种繁育, 在很大程度上制约了中华绒螯蟹生长优势的发挥。

1995 年以来, 中华绒螯蟹的性早熟问题已受到研究者的普遍关注, 但由于其研究方法和研究手段大多侧重于生产性摸索与经验性积累, 因此未能从根本上有所突破; 不过, 经过多年的研究, 人们已基本上达成共识——温度和营养是导致中华绒螯蟹性早熟的主要影响因子。直到上世纪 90 年代末, 研究者分别从蛋白质、胆固醇、维生素 C 和 E 等营养因子^[1,2] 方面着手, 开始性早熟机理方面的研究。

鉴于脂肪酸(尤其不饱和脂肪酸)在十足类甲壳动物性成熟过程中起着相当重要的作用^[3-6], 且肝胰腺是脂肪酸储存和加工的主要器官^[7-9], 因此本试验对性早熟前后中华绒螯蟹的肝胰腺指数、肝脂含量及脂肪酸组成的变化进行了研究, 以便进一步探讨性早熟现象的发生机理, 为人为控制性早熟提供一些理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验蟹

实验自 2000 年 8 月至 11 月在上海崇明县富民农场进行。将当年大眼幼体培育成的幼蟹养殖在池塘($12\text{m}^2 \cdot \text{个}^{-1}$, 放养密度每平方米 50 只)内, 每 15 天换水 1/3, 每天下午 5:00 投喂自行配制的颗粒饲料, 投饵量为蟹重的 3%~5%。经过 3 个月的饲养, 得到性早熟前后的雌雄蟹, 运回校生态楼暂养 1 周, 以备实验。

1.2 形态参数的测量

1.2.1 肝胰腺指数

实验蟹取回后, 在电子天平上称重(精确度 0.0001g), 然后打开背甲, 用手术镊取出肝胰腺、称重, 计算肝胰腺指数。

$$\text{肝胰腺指数(HI, \%)} = \frac{\text{肝胰腺湿重}}{\text{体湿重}} \times 100$$

1.2.2 肝脂含量

按文献[10]的方法测定肝脂含量。取出肝胰腺, 混匀, 从中取出约 1g 置于 25mL 玻璃试管中, 用 20 倍体积的氯仿-甲醇液(2:1, V/V) 抽提; 24h 后用真空泵于三角漏斗中抽滤, 所得滤液移入 25mL 玻璃试管中, 并加入 1/5 体积的蒸馏水, 混合均匀, 静置分层; 分层后, 弃去上层, 将留有下层(黄色透明液)的玻璃试管用真空泵抽干, 准确称取脂肪干重。

$$\text{肝脂含量(LC, \%)} = \frac{\text{脂肪干重}}{\text{脂肪干重} + \text{抽滤后肝胰腺干重}} \times 100.$$

1.3 脂肪酸分析

1.3.1 脂肪酸甲酯化

向装有真空干燥脂肪的玻璃试管中, 加入 1mL KOH-甲醇溶液和 1mL 苯-石油醚(1:1) 溶液处理 15min, 然后加入 8mL 蒸馏水, 混匀, 静置分层, 约 20min。取上层于 1.5mL PE 管中, 准备气相色谱分析。

1.3.2 参数设置

所用气相色谱仪为 Agilent 6890 系列气相色谱系统, 毛细管柱为 30.0m × 0.25mm (温度上限为 325℃) 的 HP-5, 5% Phenyl Methyl Siloxane, 型号为 Agilent 19091J-413; 进样器温度为 300℃; 检测器温度为

300℃; 起始温度为 60℃, 保留 2min, 然后以 20℃·min⁻¹ 的速度升至 150℃, 再以 4℃·min⁻¹ 的速度升至 280℃, 共计 39min; H₂ 流速为 40mL·min⁻¹, 空气流速为 400mL·min⁻¹, 补偿气体 N₂ 流速为 35mL·min⁻¹, 分流比为 1:100; 压力为 60kPa。

1.3.3 脂肪酸标准试剂曲线的制定

所有脂肪酸标准样品均购自 Sigma 公司, 用正己烷配制成一定浓度, 在同样的参数条件下, 分别在一定的洗脱时间形成峰, 并借此作为脂肪酸的定性依据。脂肪酸的定量采用面积归一化法。

1.4 数据处理

采用 Statistica/w 5.0 软件系统进行显著性检验: $P > 0.05$ 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 早熟与未成熟蟹的肝胰腺指数(HI)与肝脂含量(LC)的差异

肝胰腺是十足类甲壳动物的代谢中心, 通过 HI 的测定, 可以反映出动物个体的营养状态、发育阶段以及蜕壳阶段。表 1 显示, 早熟雌蟹与早熟雄蟹、未成熟雌蟹与未成熟雄蟹的体重均无统计学上的差异, 但 HI 和 LC 差异较大。早熟雌蟹的 HI 和 LC 分别为 5.78% 和 33.88%, 都显著低于未成熟雌蟹的 9.08% 和 43.69%。雄蟹与雌蟹相类似, 早熟雄蟹的 HI 和 LC 分别为 6.76% 和 25.87%, 显著低于未成熟雄蟹的 8.84% 和 32.29%。未成熟雌、雄蟹相比, 两者的 HI 差异不显著, 但未成熟雌蟹的 LC 显著高于未成熟雄蟹。早熟雌、雄蟹相比, 两者的 HI 虽然在数值上较为接近, 但统计分析表明, 早熟雌蟹显著低于早熟雄蟹; LC 却恰恰相反。至于早熟雌蟹与未成熟雄蟹的 LC 相比, 却在统计学上没有显著差异。

表 1 早熟与未成熟蟹的肝胰腺指数(HI)与肝脂含量(LC)

Tab. 1 HI and LC of hepatopancreas in precocious and immature *Eriocheir sinensis*

组别 group	样品数 individuals	体重 weight (g)	HI (%)	LC (%)
PF	38	24.57±8.97 ^a	5.78±0.17 ^c	33.88±1.44 ^b
IF	40	9.40±2.35 ^b	9.08±0.13 ^a	43.69±2.01 ^a
PM	39	26.53±7.23 ^a	6.76±0.18 ^b	25.87±2.65 ^c
IM	40	9.93±2.47 ^b	8.84±0.12 ^a	32.29±1.94 ^b

注: (1) PF: 早熟雌蟹; IF: 未成熟雌蟹; PM: 早熟雄蟹; IM: 未成熟雄蟹; (2) 同列数值上标相同, 表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Notes: (1) PF: precocious female crab; IF: immature female crab; PM: precocious male crab; IM: immature male crab; (2) values in a column with a common letter are not significantly different ($P > 0.05$)

2.2 早熟与未成熟蟹的肝胰腺脂肪酸组成的差异

早熟雌蟹与未成熟雌蟹、早熟雄蟹与未成熟雄蟹肝胰腺主要脂肪酸的百分组成见表 2。

2.2.1 早熟雌蟹和未成熟雌蟹的差异

早熟雌蟹与未成熟雌蟹相比: 前者的 C_{16:1n-7}、C_{16:0} 和 C_{18:0} 都显著高于后者 ($P < 0.01$), C_{20:5n-3}、C_{20:4n-6} 和 C_{22:6n-3} 都显著低于后者 ($P < 0.01$), 而 C_{14:0}、C_{18:3n-3}、C_{18:2n-6}、C_{18:1} 在两者间没有显著差异 ($P > 0.05$); 早熟雌蟹的饱和脂肪酸总量显著高于未成熟雌蟹 ($P < 0.01$); 单烯酸在两者间没有显著差异 ($P > 0.05$); 前者的 n-3 系列高不饱和脂肪酸总量显著低于后者 ($P < 0.01$), 而 n-6 系列差异不显著 ($P > 0.05$), n-6/n-3 之比却是早熟雌蟹高于未成熟雌蟹 ($P < 0.05$)。

2.2.2 早熟雄蟹和未成熟雄蟹的差异

早熟雄蟹与未成熟雄蟹相比: 前者的 C_{18:1} 显著高于后者 ($P < 0.05$), C_{14:0} ($P < 0.05$)、C_{16:1n-7} ($P < 0.05$) 和 C_{20:5n-3} ($P < 0.01$) 显著低于后者, 而 C_{16:0}、C_{18:3n-3}、C_{18:2n-6}、C_{18:0}、C_{20:4n-6} 和 C_{22:6n-3} 在两者间没有显著差异 ($P > 0.05$); 饱和脂肪酸总量、单烯酸总量、n-3 系列和 n-6 系列高不饱和脂肪酸以及 n-

6/n-3 之比都差异不显著($P > 0.05$)。

表2 早熟与未成熟雌雄蟹的肝胰腺脂肪酸组成

Tab.2 Fatty acid composition of hepatopancreas in precocious and immature crabs

脂肪酸 fatty acid	试验蟹组别 group of crabs tested			
	PF (N= 10)	IF (N= 19)	PM (N= 11)	IM (N= 17)
C _{14:0}	1.54 ± 0.04 ^{ab}	1.52 ± 0.04 ^a	1.32 ± 0.08 ^b	1.53 ± 0.06 ^a
C _{16:1n-7}	10.28 ± 0.32 ^a	8.69 ± 0.23 ^{bc}	8.10 ± 0.29 ^c	8.71 ± 0.17 ^b
C _{16:0}	17.32 ± 0.27 ^a	16.02 ± 0.20 ^b	15.87 ± 0.38 ^b	16.39 ± 0.26 ^b
C _{18:3n-3}	0.28 ± 0.06 ^{ab}	0.33 ± 0.05 ^a	0.17 ± 0.05 ^b	0.30 ± 0.02 ^{ab}
C _{18:2n-6}	11.16 ± 3.20 ^a	8.44 ± 1.99 ^a	6.23 ± 2.83 ^a	10.70 ± 2.15 ^a
C _{18:1}	30.33 ± 3.84 ^{ab}	30.05 ± 1.55 ^{ab}	34.20 ± 2.99 ^a	27.52 ± 1.45 ^b
C _{18:0}	2.78 ± 0.10 ^a	2.14 ± 0.06 ^b	2.27 ± 0.08 ^b	2.27 ± 0.08 ^b
C _{20:5n-3}	2.41 ± 0.24 ^c	4.09 ± 0.14 ^a	2.92 ± 0.19 ^c	3.70 ± 0.15 ^b
C _{20:4n-6}	3.71 ± 0.34 ^c	5.96 ± 0.17 ^a	4.75 ± 0.56 ^{bc}	5.16 ± 0.40 ^{ab}
C _{22:6n-3}	2.83 ± 0.40 ^c	6.04 ± 0.36 ^a	4.67 ± 0.55 ^b	5.09 ± 0.62 ^{ab}
ΣSFA	21.73 ± 0.30 ^a	19.33 ± 0.22 ^b	19.76 ± 0.38 ^b	20.23 ± 0.28 ^b
Σ1n	40.62 ± 3.99 ^a	37.16 ± 1.64 ^a	43.79 ± 3.04 ^a	39.10 ± 1.35 ^a
Σn-3HUFA	5.52 ± 0.65 ^c	11.11 ± 0.51 ^a	7.97 ± 0.69 ^b	9.66 ± 0.76 ^{ab}
Σn-6HUFA	14.87 ± 3.14 ^a	15.53 ± 1.95 ^a	10.64 ± 2.79 ^a	15.96 ± 1.82 ^a
n-6/n-3	2.83 ± 0.66 ^a	1.51 ± 0.23 ^b	1.43 ± 0.41 ^{ab}	1.98 ± 0.31 ^{ab}

注: (1) N: 样品数; SFA: 饱和脂肪酸; 1n: 单烯酸; HUFA: 高不饱和脂肪酸; (2) 同行数值上标相同, 表示差异不显著($P > 0.05$)

Notes: (1) N: individuals; SFA: saturated fatty acid; 1n: monoenoic fatty acid; HUFA: highly unsaturated fatty acid; (2) values in a row with a common letter are not significantly different ($P > 0.05$)

2.2.3 雌雄蟹的差异

早熟雌蟹与早熟雄蟹相比: 前者的 C_{16:1n-7}、C_{16:0}和 C_{18:0}显著高于后者($P < 0.01$), C_{22:6n-3}显著低于后者($P < 0.01$), 而 C_{14:0}、C_{18:3n-3}、C_{18:2n-6}、C_{18:1}、C_{20:5n-3}、C_{20:4n-6}在两者间没有显著差异($P > 0.05$); 早熟雌蟹的饱和脂肪酸总量显著高于早熟雄蟹($P < 0.01$); 单烯酸在两者间没有显著差异($P > 0.05$); 前者的 n-3 系列高不饱和脂肪酸总量显著低于后者($P < 0.05$), 而 n-6 系列以及 n-6/n-3 之比差异不显著($P > 0.05$)。

未成熟雌蟹与未成熟雄蟹相比, 肝胰腺的脂肪酸组成极为相似: 脂肪酸中唯有 C_{20:5n-3}差异显著($P < 0.05$), 为前者高于后者(分别约为 4.093% 和 3.701%), 而饱和脂肪酸、单烯酸、n-3 系列和 n-6 系列以及 n-6/n-3 之比都没有显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 早熟雌蟹和未成熟雌蟹的比较

成永旭等^[9]曾对 9 月的 2 龄未成熟雌蟹和 12 月的 2 龄成熟雌蟹(即正常成熟雌蟹)进行比较, 发现它们的 HI 分别为 6.56% 和 3.77%。在本项研究中, 未成熟雌蟹和早熟雌蟹的 HI 分别为 9.08% 和 5.78%, 可见性早熟与正常成熟期间中华绒螯蟹 HI 的变化极为相似。这些结果说明: 无论性早熟抑或正常成熟, 都有大量肝胰腺中贮存的营养物质被消耗或转运到其它组织。

进而, 试验发现早熟雌蟹肝胰腺的 LC 显著低于未成熟雌蟹(分别为 33.88% 和 43.69%), 这一变化趋势也类似于正常成熟与 2 龄未成熟雌蟹的比较结果^[9], 不过, 它们中 LC 分别只有 28.13% 和 34.37%。然而, 这些都进一步说明, 肝胰腺中被消耗或转运的营养物质有相当一部分是脂类。

在肝胰腺的脂肪酸组成上, 早熟雌蟹的 C_{16:1n-7}、C_{16:0}和 C_{18:0}高于未成熟雌蟹, 而 C_{20:5n-3}、C_{20:4n-6}和 C_{22:6n-3}低于后者。这说明在脂类转运过程中, 肝胰腺中转运出的脂肪酸主要是高度不饱和脂肪酸(特别是 C_{20:5n-3}、C_{20:4n-6}和 C_{22:6n-3}), 结果肝胰腺中饱和脂肪酸含量升高而 n-3 系列高不饱和脂肪酸含量

下降。据已有的资料^[7,9]表明,在卵巢发育过程中,卵中不断积累高不饱和脂肪酸,如 $C_{20\ 5n-3}$ 和 $C_{22\ 6n-3}$,从而为胚胎的正常发育奠定物质基础。由此可见,性早熟与正常成熟过程一样,都有高不饱和脂肪酸自肝胰腺向卵巢转运。

3.2 早熟雄蟹和未成熟雄蟹的比较

至今,关于中华绒螯蟹雄性个体的肝胰腺生化组成,还未见报道。在本项研究中,雄蟹的 HI 与 LC 变化与雌蟹基本相似,不过,其变化幅度低于雌蟹。这说明在性早熟过程中,雄蟹同样要消耗或转运部分肝胰腺脂类到精巢等组织中去,只是精巢对脂类的利用不如卵巢高。

与未成熟雄蟹相比,早熟雄蟹肝胰腺中的 $C_{18\ 1}$ 较高,而 $C_{14\ 0}$ 、 $C_{16\ 1n-7}$ 和 $C_{20\ 5n-3}$ 较低。由此可见,雌雄蟹在性早熟过程中肝胰腺的脂肪酸变化差异很大。就高不饱和脂肪酸而言,雄蟹中仅有 $C_{20\ 5n-3}$ 下降。这说明在雄蟹早熟蜕壳和性腺发育过程中,用于细胞膜和细胞器膜构建、精巢以及附属器官发育的高不饱和脂肪酸主要为 $C_{20\ 5n-3}$ 。然而,由于对雄性甲壳动物研究较少,以上结论还有待进一步证实。

3.3 雌雄蟹的比较

由表 1 可见,未成熟雌雄蟹间 HI 没有差异,而早熟雌蟹低于早熟雄蟹,这主要是两方面因素造成的:其一,早熟雌蟹消耗肝胰腺中营养物质的量多于早熟雄蟹;其二,雌蟹的性腺指数增幅高于雄蟹。不过,早熟雌蟹的 LC 高于早熟雄蟹(分别为 33.88% 和 25.87%),并不能说明雌蟹在性早熟过程中所消耗的肝脂低于雄蟹,事实上恰恰相反。因为早熟雌蟹肝胰腺 LC 比未成熟雌蟹下降了 9.81%,而雄蟹中下降幅度为 6.42%。另外,在早熟蜕壳之前,雌蟹肝胰腺中脂类的积累速度高于雄蟹;在早熟蜕壳以及性腺发育期间,HI 和 LC 变化趋势基本一致,但下降幅度雌蟹高于雄蟹。

在对早熟雌蟹与早熟雄蟹的肝胰腺脂肪酸组成比较时,发现早熟雌蟹的 $C_{22\ 6n-3}$ 低于早熟雄蟹,而未成熟雌雄蟹差异不显著,这说明 $C_{22\ 6n-3}$ 在雌蟹卵巢发育和卵子形成中所起的作用比雄蟹中重要。

鉴于以上的比较结果,推测 $C_{20\ 5n-3}$ 主要参与成熟蜕壳以及膜的形成,而 $C_{22\ 6n-3}$ 主要参与卵巢发育和卵黄的形成。

参考文献:

- [1] Zhu Y Z, Zhang G Y, Wang J J, et al. Suitable ratio between animal and vegetable protein in formulated pellet and its correlation with growth and pre-maturation of young crab [J]. Fisheries Science & Technology Information, 1999, 26(1): 21- 24. [朱雅珠, 张根玉, 王建军, 等. 饲料中适宜的动植物蛋白比与河蟹蟹种生长和性早熟相关[J]. 水产科技情报, 1999, 26(1): 21- 24.]
- [2] He Z K, Yin J, Zhu Y Z. Co-relation between density, nutrition and growth pre-maturation of young mitten crab [J]. Fisheries Science & Technology Information, 1999, 26(2): 73- 75. [何正侃, 印 骏, 朱雅珠. 密度、营养与河蟹蟹种生长及性早熟之间的相互关系[J]. 水产科技情报, 1999, 26(2): 73- 75.]
- [3] Teshima S, Kanazawa A, Sasada H. Nutritional value of dietary cholesterol and other sterols to larval prawn, *Penaeus japonicus* Bate [J]. Aquac, 1983, 31: 159- 167.
- [4] Lautier J, Lagarrigue J G. Lipid metabolism of the crab *Pachygrapsus marmoratus* during vitellogenesis [J]. Biochem Syst Ecol, 1988, 16: 203- 212.
- [5] Alava V R, Kanazawa A, Teshima S, et al. Effects of dietary phospholipids and ω -3 high unsaturated fatty acid on ovarian development of kuruma prawn [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1993, 59(2): 345- 351.
- [6] Mourente G, Medina A, Gonzalez S, et al. Variation in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* [J]. Aquac, 1995, 130: 187- 199.
- [7] Vogt G, Storch V, Quintio E T, et al. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda) [J]. Aquac, 1985, 48: 1- 12.
- [8] Mkami S, Greenwood J G. Functional morphology and cytology of the phyllosomal digestive system of *Sivacus ciliatus* and *Panulirus japonicus* (Decapoda) [J]. Crustaceana, 1994, 67: 212- 225.
- [9] Cheng Y X, Du N S, Lai W. Lipid composition in hepatopancreas of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* at different stages [J]. Acta Zool Sin, 1998, 44(4): 420- 429. [成永旭, 堵南山, 赖 伟. 不同阶段中华绒螯蟹肝胰腺的脂类及脂肪酸组成[J]. 动物学报, 1998, 44(4): 420- 429.]
- [10] Folch J, Lees M, Sbane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. J Biol Chem, 1957, 276: 497- 509.