

## 三疣梭子蟹卵巢发育期间孕激素受体的免疫识别与分布

陈 浩<sup>1</sup>, 吴旭干<sup>1</sup>, 刘智俊<sup>1</sup>, 成永旭<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学上海高校知识服务平台, 上海 201306)

**摘要:** 为探讨三疣梭子蟹卵巢发育过程中孕激素受体 (progesterin receptor, PR) 的调控作用, 采用免疫印迹和免疫组化方法, 首次对三疣梭子蟹卵巢、肝胰腺、大颚器、Y 器官、视神经节和胸神经团中的 PR 进行免疫识别和定位, 并系统研究了卵巢发育期间 PR 在这些器官中的分布和变化。结果表明: (1) 三疣梭子蟹视神经节中存在 PR 阳性条带, 分子量为 100 ku; (2) PR 仅在早期 (I ~ III 期) 生殖细胞胞质和后期 (III ~ V 期) 细胞核呈强阳性, 但在各期滤泡细胞中始终呈强阳性; (3) PR 阳性主要存在于 I ~ V 期肝胰腺 F 细胞和 III 期 R 细胞核中, 其余肝胰腺细胞中均无 PR 阳性; (4) 大颚器腺细胞中的 PR 阳性仅发现于 IV 期腺细胞胞质中, 各期 Y 器官腺细胞中均呈 PR 阴性; (5) 就视神经节而言, PR 主要存在于 III ~ V 期的神经细胞。就胸神经团而言, I ~ V 期神经细胞中的 PR 阳性呈增强趋势, 而 I ~ V 期神经髓质中 PR 始终呈 PR 强阳性。结果表明, 孕酮不仅可以通过与卵巢和肝胰腺中 PR 结合直接调控三疣梭子蟹的卵黄发生和卵巢发育, 还可能通过影响其它内分泌激素的合成和分泌来间接调控其卵巢发育。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 孕激素受体; 免疫印迹; 免疫组织化学; 卵巢发育

**中图分类号:** Q 952; S 917.4

**文献标志码:** A

孕酮 (progesterone) 是甲壳动物体内一种重要性类固醇激素<sup>[1-2]</sup>, 在其卵巢发育过程中起着十分重要的调控作用, 因此甲壳动物体内孕酮含量变化与其卵巢发育阶段具有一定的相关性<sup>[3-5]</sup>。进一步研究表明, 一定量的外源孕酮对甲壳动物雌体的卵巢发育、卵母细胞发育、卵黄发生和产卵具有促进作用<sup>[6-8]</sup>, 但是有关其作用机制所知甚少<sup>[2]</sup>。因此, 孕酮对甲壳动物卵巢发育的调控机制已成为无脊椎动物生殖生物学研究的热点和难点之一<sup>[9-10]</sup>。通过免疫组化方法已经确认拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 和欧洲淡水螯虾 (*Austropotamobius pallipes*) 等甲壳动物卵巢、肝胰腺和神经组织中存在孕激素受体<sup>[10-12]</sup>, 故推测孕酮对甲壳动物卵巢发育的调控主要是通过孕激素受体进行<sup>[13]</sup>。三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是一种重要的大型经济蟹类<sup>[14]</sup>,

其体内的孕酮含量与卵巢发育阶段密切相关<sup>[15]</sup>。实验采用免疫印迹和免疫组化方法对三疣梭子蟹雌体的孕激素受体进行了免疫识别和定位, 并系统研究了卵巢发育周期内卵巢、肝胰腺、大颚器、Y 器官、视神经节和胸神经团中 PR 的分布与变化, 旨在进一步认识三疣梭子蟹的生殖生理规律, 为探讨甲壳动物性类固醇激素的调控机制提供基础资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物与暂养

实验用蟹于 2010 年 8 月至 2011 年 5 月购自浙江象山渔港捕捞船, 每月挑选肢体健全的雌体 10 ~ 20 只用于实验, 体质量为 76 ~ 486 g, 甲壳宽为 5.1 ~ 10.5 cm。所有实验用蟹活体运输到上海海洋大学水产动物营养繁殖研究室, 在室内循

收稿日期: 2013-02-05 修回日期: 2013-04-08

资助项目: 国家自然科学基金项目 (41276158); 上海市自然科学基金项目 (12ZR1413000); 上海高校创新团队项目 (沪教科 2009-26); 上海高校知识服务平台 (ZF1206)

通信作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

环水系统中暂养两周,暂养水族箱体积为 178 L (长×宽×高为 75 cm×53 cm×45 cm),加水至 150 L,箱底部放置无毒 PVC 管(直径 18 cm,长 25 cm)作为隐蔽物,每箱放 2 只蟹,暂养期间每日下午 19:00 按照蟹体质量的 5%~10% 投喂鱿鱼,次日上午 10 点清理残饵和粪便。自然光照,盐度为 24,水温 20~24 °C, pH 7.0~9.0,溶氧 > 5 mg/L;氨氮 < 0.5 mg/L,亚硝酸盐 < 0.10 mg/L。实验用成年雌性小鼠卵巢由复旦大学生命科学学院赠与。

### 1.2 实验取样与卵巢分期

实验用蟹暂养后进行活体解剖。解剖前先用电子天平对蟹称重。解剖时分离出所有卵巢组织,准确称量并记录卵巢颜色,计算卵巢指数 ( $GSI/\% = 100 \times \text{卵巢质量}/\text{蟹质量}$ ),同时取小块卵巢、肝胰腺、大颚器、Y 器官、视神经节、胸神经团和肌肉,在 PBS 中漂洗后放入 Bouin 氏液固定。根据吴旭干等<sup>[14]</sup>的方法将三疣梭子蟹卵巢发育分为 5 期,各卵巢发育期均重复固定 3~5 个体的组织进行免疫组化研究,样品在 Bouin 氏液中固定 24 h 后进行酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后常规切片(厚度 5~7  $\mu\text{m}$ ),用于免疫组化分析。同时取卵巢处于 III 期雌体的视神经节和肌肉组织以及成年雌性小鼠卵巢(0.1 g 左右)加入 1 mL 蛋白提取液(产品编号:AR0101-30,武汉博士德生物工程有限公司)提取蛋白,提取方法按照试剂盒说明书进行。蛋白提取液离心后采用微量紫外分光光度计(型号:Q5000,美国 Quawell 公司生产)测定蛋白浓度,样品于 -70 °C 保存,用于免疫印记分析。

### 1.3 主要试剂

**免疫印迹试剂** 一抗为兔抗人 PR 多克隆抗体(抗 C-末端,产品编号 sc-538)购于美国 Santa Cruz 生物公司;全蛋白提取试剂盒(AR0101-30)、彩色预染标准蛋白(AR1113)、PMSF(AR1178)、TBS(AR0187)、二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(BA1054)、上样缓冲液(AR1112)、DAB 显色试剂盒(AR1021)均购于武汉博士德生物工程有限公司。

**免疫组化试剂** 一抗同免疫印迹;二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体工作液(PV-6001)和一抗稀释液(ZLI-9028)购于北京中杉金桥生物技术公司;3% 双氧水(AR1108)、DAB 显色试剂盒

(AR1022)、0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0,产品编号 AR0024)以及 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2~7.6,产品编号 AR0030)购于武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.4 免疫印迹

将蛋白提取物与上样缓冲液按 4:1 (体积比)混合后沸水变性 10 min。分别取样品和标准蛋白 20  $\mu\text{L}$  及 5  $\mu\text{L}$  进行 SDS-PAGE 电泳。浓缩胶浓度为 5%,电压为 100 V;分离胶浓度为 10%,电压为 110 V。电泳后分离胶用转膜仪(型号:BG-VER-Mini,北京百晶生物技术有限公司生产)在 150 mA 电流下转膜 70~100 min。然后将膜用 TBS 浸洗后置于 5% 的脱脂奶粉溶液中,在室温下用脱色摇床上摇动封闭 1 h。用 TBST 浸洗后,加入一抗(体积比 1:200)4 °C 下摇床孵育 12 h;TBST 浸洗,二抗(体积比 1:500)室温下孵育 2 h;TBST 浸洗,DAB 显色,数码相机拍照后采用 BioRad imagelab V3.0 软件计算 PR 分子量。

### 1.5 免疫组织化学

石蜡切片常规脱蜡至水后,浸入枸橼酸盐缓冲液中用电磁炉加热(94 °C)进行抗原修复 15 min,自然冷却至室温后取出切片用 PBS 洗涤 3 次(2~5 min/次)。再用 3% 双氧水室温处理 20 min 以抑制内源性过氧化物酶的活性,PBS 洗涤 3 次(2~5 min/次)后滴加 PR 抗体(稀释体积比 1:50),4 °C 孵育过夜(18 h)。PBS 洗 3 次后(5 min/次)滴加二抗工作液,37 °C 条件下孵育 30 min;DAB 显色 15 min,蒸馏水洗涤后采用酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后在 Leica DM2500 显微镜下观察和拍照。根据染色的深浅,将阳性强弱分为强阳性、中等阳性、弱阳性和阴性,分别记为“+++”、“++”、“+”和“-”。

## 2 结果

### 2.1 PR 的免疫印迹

采用兔抗人的孕激素受体(PR)多克隆抗体进行三疣梭子蟹雌体 PR 的免疫印迹实验(图 1),在分子量约为 100 ku 处得到一条免疫阳性条带,采用牛血清蛋白和梭子蟹肌肉作为同步对照,结果为阴性,采用成年雌性小鼠卵巢作为阳性对照,在大约 90 ku 处得到一条免疫阳性条带。

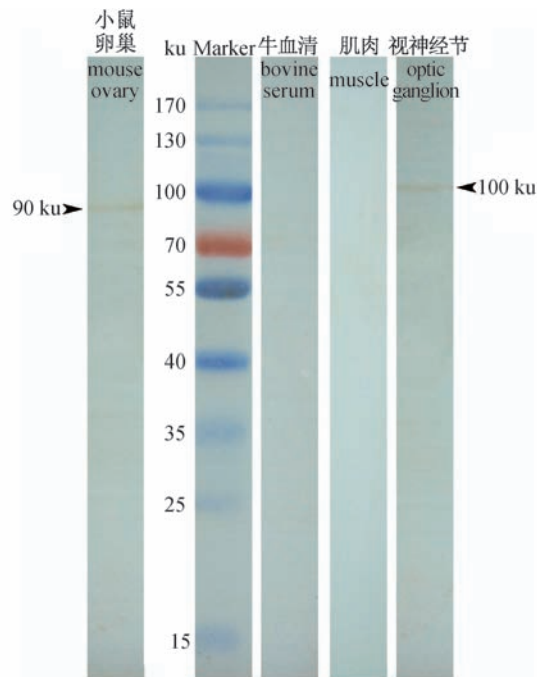


图1 三疣梭子蟹视神经节和肌肉的 PR 免疫印迹分析

Fig.1 Western-blotting results of optic ganglia and muscle in the ovarian stage III *P. trituberculatus*

## 2.2 PR 在卵巢中分布和变化

PR 主要分布于三疣梭子蟹卵巢中的滤泡细胞、早期卵母细胞细胞质 (I ~ III 期) 和后期卵母细胞核 (III ~ V 期), 不同卵巢发育期卵巢中的 PR 分布和阳性强度也有所不同 (表 1)。I 期卵巢中以卵原细胞为主, 生发区可见大量滤泡细胞, 此时滤泡细胞和卵原细胞质均呈 PR 强阳性, 卵原细胞核呈 PR 弱阳性 (图版 I -1); II 期卵巢中以内源性卵黄合成期卵母细胞 (EN) 和卵黄合成前卵母细胞 (PRO) 为主, 生发区间的滤泡细胞

已开始向生发区内迁移, 部分已分布于卵母细胞周围, 此时 PR 的阳性反应定位于卵母细胞的胞质及滤泡细胞 (图版 I -2, 2a, 3), 卵母细胞核 PR 阳性较弱 (表 1); III 期卵巢中以外源性卵母细胞 (EX) 为主, 此时滤泡细胞已完成对卵母细胞的包裹, 有时生发区中心仍可见少量 EN, 此阶段 PR 阳性物质主要分布于 EN 细胞质、核仁及 EX 的核仁 (图版 I -4), 此阶段的滤泡细胞仍呈 PR 强阳性 (图版 I -4b), 但 EX 的细胞质 PR 阳性较弱; IV 期卵巢中以近成熟期卵母细胞 (NO) 为主, 滤泡细胞紧贴在 NO 周围, 此时卵母细胞的胞核 (图版 I -5), 以及胞膜中的滤泡细胞均呈 PR 强阳性 (图版 I -5c); V 期卵巢中主要为成熟的卵母细胞 (MO), 此时 PR 免疫阳性反应主要在成熟卵母细胞的胞核, 此外胞膜也有较弱的 PR 阳性反应 (图版 I -6)。用卵巢发育 III 期的三疣梭子蟹肌肉作为阴性对照, 没有发现任何 PR 阳性反应 (图版 II -6)。

## 2.3 PR 在肝胰腺中分布和变化

三疣梭子蟹雌体肝胰腺由许多具有盲端的肝小管组成, 肝小管主要由胚细胞 (E)、泡状细胞 (B)、吸收细胞 (R) 和纤维细胞 (F) 这 4 种上皮细胞构成, PR 免疫阳性反应主要分布于 F 细胞胞质、F 细胞核及 R 细胞核 (表 1, 图版 II 中 1-5)。I 期肝胰腺中仅 F 细胞呈 PR 强阳性 (图版 II -1); II 期肝胰腺 F 细胞为 PR 强阳性, 其余细胞均为 PR 阴性 (图版 II -2); III 期肝胰腺 F 细胞和 R 细胞核均为 PR 中等阳性 (图版 II -3); IV 期肝胰腺仅 F 细胞呈 PR 中等阳性 (图版 II -4); V 期肝胰腺也仅 F 细胞呈 PR 中等阳性 (图版 II -5)。

表 1 三疣梭子蟹卵巢发育期间卵巢和肝胰腺细胞中的 PR 分布和变化  
Tab.1 The distribution and change of PR in the ovary and hepatopancreas during the ovarian development of *P. trituberculatus*

卵巢分期 ovarian stage	细胞类型 cellular type				
	滤泡细胞 follicle cell	生殖细胞细胞质 cytoplasm of germ	生殖细胞核 nucleus of germ	R 细胞核 nucleus of resorptive cell	F 细胞细胞质和核 cytoplasm and nucleus of fibrillar cell
I	+++	+++	+	-	+++
II	+++	+++	+	-	+++
III	+++	+++	+++	+++	++
IV	+++	-	+++	-	++
V	+++	-	+++	-	++

注:“+++”表示强阳性,“++”表示中等阳性,“+”表示弱阳性,“-”表示阴性。以下注释同此。

Notes:“+++”means strongly positive,“++”means moderately positive,“+”means weakly positive,“-”means negative. The same as the following.

## 2.4 PR 在大颚器和 Y 器官中的分布和变化

大颚器和 Y 器官是三疣梭子蟹两种重要的生殖内分泌器官,其细胞中的 PR 阳性在不同卵巢发育阶段也有一定程度的变化。大颚器由许多小叶组成,小叶内大颚器腺细胞排列紧密,细胞核大而圆,卵巢发育过程中,PR 阳性物质仅出现在

IV 期大颚器腺细胞胞核周围的胞质(图版 II-7),为 PR 强阳性。Y 器官由许多不规则的小叶组成,在小叶间隙和小叶内部均有血管(HC)、血窦(HS)和血细胞(He),Y 器官腺细胞排列紧密,核呈卵圆形,核仁不明显,PR 阳性仅见 Y 器官内的血细胞(表 2,图版 II-8,9)。

表 2 三疣梭子蟹卵巢发育期间大颚器、Y 器官和神经组织中的 PR 分布和变化  
Tab.2 The distribution and change of PR in the mandibular organ, Y-organ and nervous tissues during the ovarian development of *P. trituberculatus*

卵巢分期 ovarian stage	器官类型 organic type					
	大颚器腺细胞 gland cell of mandibular organ	Y 器官 Y-organ		视神经节 optic ganglia	胸神经团 thoracic ganglion mass	
		腺细胞 gland cell	血细胞 hemocyte	神经细胞 nerve cell	神经细胞 nerve cell	神经髓质 nerve medulla
I	-	-	++	-	+	+++
II	-	-	++	-	++	+++
III	-	-	++	+	++	+++
IV	+++	-	++	++	+++	+++
V	-	-	+++	+++	+++	+++

## 2.5 PR 在视神经节和胸神经团中的分布和变化

三疣梭子蟹视神经节由视神经层、视外髓、视内髓和视端髓组成。PR 免疫阳性物质主要出现于卵巢 III ~ V 期的神经细胞的细胞核中(图版 II-11,12,13),而 I ~ II 期神经细胞没有 PR 阳性反应(表 2,图版 II-10)。胸神经团由食道下神经节、胸神经节和腹神经节愈合而成。卵巢发育 I ~ V 期,胸神经团的细胞质和神经髓质均呈 PR 阳性(图版 II,14-18),其中神经细胞胞质的 PR 阳性在卵巢 I ~ V 期呈增强趋势,而在 I ~ V 期胸神经团的神经髓质中始终呈 PR 强阳性(表 2)。

## 3 讨论

### 3.1 PR 的种类及分子量

实验采用兔抗人的 PR 多克隆抗体进行免疫印迹(western-blotting)实验,在三疣梭子蟹视神经节内仅发现一个 PR 免疫条带,这与拟穴青蟹<sup>[10]</sup>、欧洲淡水螯虾(*Austropotamobius pallipes*)<sup>[11]</sup>和章鱼(*Octopus vulgaris*)<sup>[16]</sup>等无脊椎动物的研究结果基本一致。在人类和鸡等脊椎动物中通常存在 2~3 个 PR,是由于同一基因可变剪切后转录和翻译生成的不同分子量的 PR<sup>[17-18]</sup>,这些 PR 的生理功能也有所不同<sup>[19]</sup>。实验结果表明,三疣梭子蟹视神经节中 PR 的分子量为 100 ku 左右,这高于拟穴青蟹和欧洲淡水

螯虾的 PR 分子量,前后两者分别是 70 与 80 ku<sup>[10-11]</sup>。

### 3.2 PR 分布及变化与卵巢发育的关系

研究表明,三疣梭子蟹卵巢发育过程中卵巢、肝胰腺和血淋巴中均存在孕酮,且在卵巢发育早期(I ~ II 期)肝胰腺和卵巢中的孕酮含量较高<sup>[15]</sup>,由于孕酮只有与其受体结合才能发挥生理调控作用<sup>[20]</sup>,这暗示三疣梭子蟹卵巢和肝胰腺中可能存在孕激素受体来调控卵巢发育及卵黄发生。实验结果表明,三疣梭子蟹卵巢发育过程中滤泡细胞和生殖细胞核中始终存在孕激素受体,且卵母细胞核中的 PR 阳性在卵巢发育中后期(II ~ III 期)呈增强趋势,但卵母细胞胞质中后期(IV 和 V 期)不存在 PR,而滤泡细胞中的 PR 阳性始终较强,没有随着卵巢发育而发生变化。造成这种变化的原因有:(1)滤泡细胞可能是甲壳动物孕激素的主要合成场所之一<sup>[21]</sup>,由于孕激素的诱导导致滤泡细胞中大量表达产生 PR,卵巢发育早期卵巢中的孕激素和 PR 结合后促进卵原细胞到卵母细胞分化和早期卵黄合成<sup>[4,11]</sup>,三疣梭子蟹雌体后期卵巢中的孕酮含量相对较低是由于卵母细胞体积增大所致,实际上卵巢发育后期滤泡细胞仍然需要大量合成孕酮来促进卵母细胞最终成熟和排卵<sup>[6,22]</sup>。因此,三疣梭子蟹卵巢发育过程中雌体滤泡细胞中均存在较高含量的孕酮和

PR;(2)卵巢发育后期(IV~V期),卵母细胞质中的孕酮已经和PR结合后从卵母细胞细胞质迁移到细胞核上<sup>[23-25]</sup>,因此三疣梭子蟹卵巢发育后期卵母细胞核上存在较强的PR阳性。三疣梭子蟹卵巢发育后期卵黄蛋白原(Vg)主要是由胰腺合成,最后在卵巢中加工成卵黄磷蛋白(Vn)<sup>[26-27]</sup>,因此,三疣梭子蟹卵巢发育后期卵母细胞质中的PR阳性较弱,因此孕酮和PR主要作用于甲壳动物早期卵黄合成<sup>[12]</sup>。

胰腺不仅是甲壳动物营养物质的消化吸收和储存器官,且对甲壳动物生殖内分泌具有极其重要的作用<sup>[26]</sup>,三疣梭子蟹卵巢发育期间,胰腺中一直具有较高含量的孕酮<sup>[15]</sup>,且卵巢发育中后期(III~IV期)胰腺是卵黄蛋白原(Vg)的重要合成场所<sup>[27]</sup>。实验结果表明,各期胰腺F细胞胞质和细胞核中均存在PR阳性物质,这可能与胰腺是孕酮的合成部位之一有关<sup>[28]</sup>,孕酮与PR结合后不仅可以调控卵原细胞分化和卵黄合成<sup>[12]</sup>,且可以促进生发泡破裂和产卵<sup>[6,22]</sup>。

大颚器是甲壳动物特有的内分泌器官<sup>[29]</sup>,在卵巢发育过程中的主要功能是合成和分泌甲基法尼酯(methyl farnesoate, MF)调节卵巢发育,实验首次发现三疣梭子蟹大颚器中存在PR,这暗示孕酮可能通过影响MF的合成来调控甲壳动物卵巢发育,有研究表明过量的孕酮会抑制克氏原螯虾大颚器中的MF合成<sup>[30]</sup>。先前对甲壳动物大颚器的研究表明,大颚器具有粗面内质网结构,可能可以分泌孕酮等类固醇激素,这些类固醇激素和MF可能存在反馈机制<sup>[30-31]</sup>。三疣梭子蟹卵巢发育期间Y器官呈退化的非分泌状态<sup>[32]</sup>,故Y器官腺细胞中没有发现PR阳性物质,这暗示Y器官可能不是孕酮的作用靶器官。视神经节与胸神经团都是甲壳动物重要的神经内分泌器官,它们可以分泌多种神经激素调控甲壳动物性腺发育<sup>[33-34]</sup>。三疣梭子蟹视神经节与胸神经团中均存在PR阳性反应,这暗示PR可能参与三疣梭子蟹雌体卵巢发育的神经内分泌的生理调控。

### 3.3 孕激素及PR对卵巢发育的作用机制

大量研究表明,孕激素对脊椎动物的卵巢发育和卵黄发生存在两种作用模式——基因组模式和非基因组模式<sup>[23]</sup>。所谓基因组作用模式就是孕激素与细胞内孕激素受体蛋白结合形成复合体转移至细胞核,通过与细胞核中靶基因上游的孕

激素反应元件(PRE)结合直接调控肝胰腺和卵巢中Vg基因或其它相关基因的表达,从而影响卵细胞发生和卵巢发育,这种孕激素受体称之为核受体(nPR)<sup>[23,35]</sup>。非基因组作用模式也称为膜受体作用模式,是指孕激素通过与细胞膜上孕激素受体蛋白结合后,在几分甚至几秒内直接激活细胞内的信号通路,如改变细胞内的cAMP、MAKP和Ca<sup>2+</sup>等第二信使的浓度,从而改变细胞内蛋白功能和调控基因表达,最终影响卵巢发育,这种孕激素受体称之为膜受体(mPR)<sup>[23,36]</sup>。孕酮是一种生物活性较强的天然孕激素,在动物体类固醇代谢中起着关键的呈上启下作用<sup>[37]</sup>,因此孕酮对动物生殖的调控引起了广泛的关注<sup>[38-41]</sup>。有关孕酮对甲壳动物卵巢发育的调控研究主要集中于外源孕酮对其卵巢发育和卵黄发生的影响<sup>[7,12,42]</sup>,有关其作用机理的研究极少。近年来,采用免疫组化方法已经确认拟穴青蟹和淡水螯虾等甲壳动物体卵巢和胰腺中存在孕激素核受体蛋白(nPR)<sup>[11,21]</sup>,实验结果表明nPR在三疣梭子蟹卵巢、胰腺、大颚器、Y器官和神经组织中广泛存在,且随着卵巢发育,nPR的阳性强弱发生一定的变化,这暗示三疣梭子蟹卵巢发育过程中nPR起着重要的调节作用。最近,斑节对虾(*Penaeus monodon*)的孕激素膜受体基因(Pm-p23)已经被克隆,且该蛋白在卵巢发育二期表达水平最高<sup>[13]</sup>。因此,推测孕激素对甲壳动物的卵巢发育的调控也存在基因组作用模式和非基因组作用模式两种方式。实验结果表明,三疣梭子蟹孕激素核受体也存在于大颚器和神经组织中,这暗示三疣梭子蟹nPR可能通过调控神经多肽和甲基法尼酯等激素的合成与释放来间接调控卵巢发育,类似的现象在鱼类中已经被证实<sup>[43]</sup>。

### 参考文献:

- [1] Lafont R, Mathieu M. Steroids in aquatic invertebrates [J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16 (1): 109 - 130.
- [2] Köhler H R, Kloas W, Schirling M, et al. Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates [J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16 (1): 131 - 143.
- [3] Quintio E T, Yamauchi K, Hara A, et al. Profiles of progesterone-and estradiol-like substances in the hemolymph of female *Pandalus kessleri* during an

- annual reproductive cycle [ J ]. General and Comparative Endocrinology, 1991, 81 ( 3 ): 343 - 348.
- [ 4 ] Warriar S R, Tirumalai R, Subramoniam T. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 $\beta$  and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata* [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2001, 130(2):283 - 294.
- [ 5 ] Martins J, Ribeiro K, Rangel-Figueiredo T, et al. Reproductive cycle, ovarian development, and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [ J ]. Journal of Crustacean Biology, 2007, 27(2):220 - 228.
- [ 6 ] Yano I. Induced ovarian maturation and spawning in greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis*, by progesterone [ J ]. Aquaculture, 1985, 47 ( 2 - 3 ): 223 - 229.
- [ 7 ] Ramachandra Reddy P, Kiranmayi P, Thanuja Kumari K, et al. 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone induced ovarian growth and vitellogenesis in the freshwater rice field crab *Oziotelphusa senex senex* [ J ]. Aquaculture, 2006, 254(1 - 4):768 - 775.
- [ 8 ] Meunpol O, Iam-Pai S, Suthikrai W, et al. Identification of progesterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development in vitro [ J ]. Aquaculture, 2007, 270 ( 1 - 4 ):485 - 492.
- [ 9 ] Ye H H, Huang H Y, Song P, et al. The identification and distribution of progesterone receptors in the brain and thoracic ganglion in the mud crab *Scylla paramamosain* ( Crustacea: Decapoda: Brachyura ) [ J ]. Invertebrate Neuroscience, 2010, 10(1):11 - 16.
- [ 10 ] 宋萍,叶海辉,王桂忠,等.拟穴青蟹视神经节孕酮受体的免疫识别[J].厦门大学学报:自然科学版, 2010, 49(2):282 - 285.
- [ 11 ] Paolucci M, Di Cristo C, Di Cosmo A. Immunological evidence for progesterone and estradiol receptors in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* [ J ]. Molecular Reproduction and Development, 2002, 63 ( 1 ): 55 - 62.
- [ 12 ] Coccia E, De Lisa E, Di Cristo C, et al. Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus* [ J ]. The Biological Bulletin, 2010, 218(1):36 - 47.
- [ 13 ] Preechaphol R, Klinbunga S, Ponza P, et al. Isolation and characterization of progesterone receptor-related protein p23 (*Pm-p23*) differentially expressed during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [ J ]. Aquaculture, 2010, 308 ( suppl. 1 ):S75 - S82.
- [ 14 ] 吴旭干,姚桂桂,杨筱珍,等.东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J].海洋学报, 2007, 29 ( 4 ):120 - 127.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] Di Cosmo A, Paolucci M, Di Cristo C, et al. Progesterone receptor in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*: Characterization and immunolocalization [ J ]. Molecular Reproduction and Development, 1998, 50(4):451 - 460.
- [ 17 ] Wei L L, Miner R. Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D [ J ]. Cancer Research, 1994, 54 ( 2 ):340 - 343.
- [ 18 ] Wei L L, Norris B M, Baker C J. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR ( C ), forms heterodimers with PR ( B ) but interferes in PR ( B )-DNA binding [ J ]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 62 ( 4 ): 287 - 297.
- [ 19 ] Conneely O M, Mulac-Jericevic B, Lydon J P. Progesterone-dependant regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms [ J ]. Steroids, 2003, 68 ( 10 - 13 ): 771 - 778.
- [ 20 ] 方永强,翁幼竹,胡晓霞.性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布[J].动物学报, 2001, 47(4):398 - 403.
- [ 21 ] Ye H H, Song P, Ma J, et al. Changes in progesterone levels and distribution of progesterone receptor during vitellogenesis in the female mud crab (*Scylla paramamosain*) [ J ]. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 2010, 43(1):25 - 35.
- [ 22 ] 虞冰如,沈竑,范永志,等.人工诱导青虾成熟和产卵[J].水产科技情报, 1990, 3:66 - 68.
- [ 23 ] Thomas P, Tubbs C, Berg H, et al. Sex steroid hormone receptors in fish ovaries [ M ] // Babin P J, Cerdà J, Lubzens E. The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications. Berlin: Springer Netherlands, 2007:203 - 233.
- [ 24 ] Thomas P. Rapid, nongenomic steroid actions

- initiated at the cell surface; Lessons from studies with fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28 (1-4): 3-12.
- [25] Pinter J, Thomas P. Characterization of a progesterone receptor in the ovary of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* [J]. *Biology of Reproduction*, 1995, 52(3): 667-675.
- [26] 姚桂桂, 吴旭干, 成永旭, 等. 东海三疣梭子蟹雌体不同生理阶段肝胰腺的生化组成与其组织学结构的关系 [J]. *海洋学报*, 2008, 30(6): 122-131.
- [27] 张艳, 吴旭干, 杨帆, 等. 三疣梭子蟹卵黄磷蛋白纯化及其 ELISA 测定方法 [J]. *水产学报*, 2011, 35(8): 1146-1157.
- [28] Swevers L, Lambert J G D, De Loof A. Synthesis and metabolism of vertebrate-type steroids by tissues of insects: A critical evaluation [J]. *Experientia*, 1991, 47(7): 687-698.
- [29] Nagaraju G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 39-54.
- [30] 陆剑锋, 白桦, 成永旭, 等. 孕酮对克氏原螯虾大颚器激素生物合成的体外调控 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 471-474.
- [31] 蔡生力, 赵维信, 杨丛海. 中国明对虾大颚器的组织学及孕酮和雌二醇的检测 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(2): 290-296.
- [32] 刘智俊. 三疣梭子蟹卵巢发育期间主要内分泌器官组织学变化 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [33] Ye H H, Huang H Y, Wang G Z, *et al.* Occurrence of gonadotropins like substance in the thoracic ganglion mass of the mud crab, *Scylla paramamosain* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2009, 28(5): 76-80.
- [34] Nagaraju G P C. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(13-16): 3-16.
- [35] O'Connell L A, Ding J H, Ryan M J, *et al.* Neural distribution of the nuclear progesterone receptor in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus* [J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2011, 41(3): 137-147.
- [36] Gellersen B, Fernandes M S, Brosens J J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction [J]. *Human Reproduction Update*, 2009, 15(1): 119-138.
- [37] Janer G, Porte C. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates [J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16(1): 145-160.
- [38] Stout E P, La Clair J J, Snell T W, *et al.* Conservation of progesterone hormone function in invertebrate reproduction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11859-11864.
- [39] Katsu Y, Ichikawa R, Ikeuchi T, *et al.* Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen, and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (*Pseudemys nelsoni*) [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(1): 161-173.
- [40] Rekawiecki R, Kowalik M K, Kotwica J. Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract [J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2011, 14(1): 149-158.
- [41] Hammouche S B, Remana S, Exbrayat J M. Immunolocalization of hepatic estrogen and progesterone receptors in the female lizard *Uromastyx acanthinura* [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2012, 335(7): 445-453.
- [42] 赵维信, 贾江, 安苗. 外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用 [J]. *上海水产大学学报*, 1996, 5(4): 221-225.
- [43] Trudeau V L, Murthy C K, Habibi H R, *et al.* Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary [J]. *Biology of Reproduction*, 1993, 48(2): 300-307.

## Immunorecognition and distribution of progestin receptor in the swimming crab *Portunus trituberculatus* during ovarian development

CHEN Hao<sup>1</sup>, WU Xugan<sup>1</sup>, LIU Zhijun<sup>1</sup>, CHENG Yongxu<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

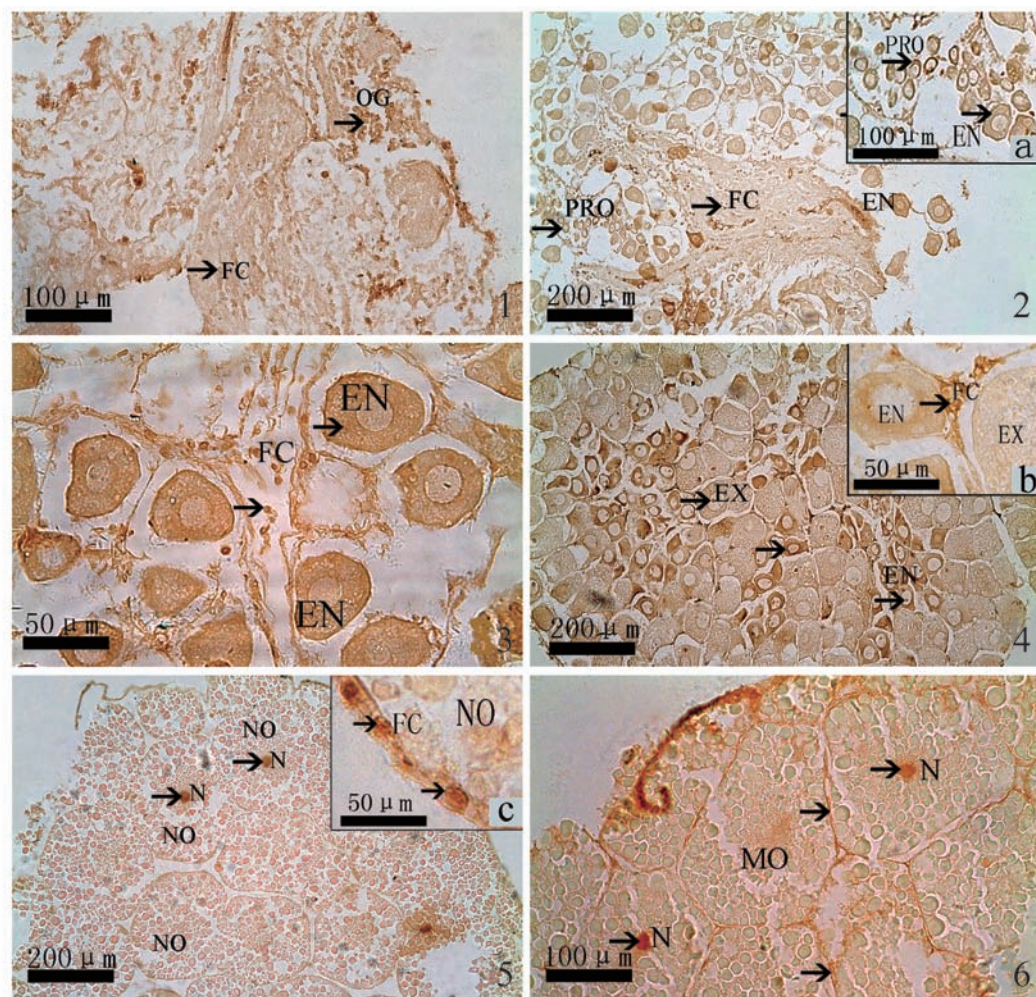
2. Shanghai Universities Knowledge Service Platform, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Progesterone is one of very important sex steroid hormones, which plays an important role during the ovarian development of crustaceans. In vertebrate, progesterone regulates the reproduction generally via progestin receptor (PR). Previous studies have shown PR is present in the ovary, hepatopancreas and nervous tissues for some crustacean species. The swimming crab, *Portunus trituberculatus*, is a commercially important fisheries resource and mariculture species in East Asian countries. The better understanding of reproductive mechanism would potentially benefit artificial propagation as well as fisheries management of *P. trituberculatus*. The present study was conducted to immunorecognize and immunolocalize PR in the ovary, hepatopancreas, mandibular organ, Y-organ, optic ganglia and thoracic ganglion mass of female *P. trituberculatus* via Western-blotting and immunohistochemistry. Then, the change and distribution of PR was also investigated in these tissues during the ovarian development of female *P. trituberculatus*. The results showed that PR with an apparent molecular weight of 100 ku was identified in the optic ganglia of female *P. trituberculatus*. By means of immunohistochemistry, PR was detected in the ovary, hepatopancreas, mandibular organ, optic ganglia and thoracic ganglion mass. During the ovarian development of female *P. trituberculatus*, the follicle cells were stained with strongly positive PR at each ovarian stage. As for the germinal cells, the strongly positive PR only existed in the cytoplasm from the early ovarian developmental stages, including stages I, II and III, while the strongly positive PR was stained in the nucleus of germinal cells during the stage III to stage V. For the female hepatopancreas, PR was mainly localized in the cytoplasm and nucleus of the fibrillar cell at all ovarian developmental stages, and PR was also present in the nucleus of stage III resorptive cell. On the contrary, no positive PR-like substance was found in the other types of hepatopancreas cells, such as blister-like cell and embryonic cell during the ovarian development of female *P. trituberculatus*. As for the endocrine organ, PR was only localized in the cellular cytoplasm of the stage IV mandibular organ while positive PR-like substance was not found in the gland cell of Y-organ. Moreover, PR-like substance was also detected in the nervous tissues of female *P. trituberculatus*. As for the optic ganglia, PR was mainly localized in nerve cells from stage III to stage V. In addition, PR was also localized in the thoracic ganglion mass. Nerve cell and nerve medulla were stained positively with PR-antibody from the ovarian stage I to stage V. In conclusion, these results suggest that progesterone not only can regulate the vitellogenesis and ovarian development directly via interacting with PR in ovary and hepatopancreas, but also may indirectly modulate ovarian development through the synthesis and secretion of other endocrine hormones.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; progestin receptor; Western-blotting; immunohistochemistry; ovarian development

**Corresponding author:** CHENG Yongxu. E-mail: yxcheng@shou.edu.cn





图版 I 三疣梭子蟹卵巢发育过程中各期卵巢中 PR 的阳性分布

1. I 期卵巢; 2. II 期卵巢, 2a, PRO 与 EN 放大显示; 3. II 期卵巢, FC 正在向卵母细胞迁移; 4. III 期卵巢, 4b, FC 已分布在 EN 与 EX 周围; 5. IV 期卵巢, 5c, FC 已分布在 NO 周围; 6. V 期卵巢。  
OG: 卵原细胞; PRO: 卵黄合成前卵母细胞; EN: 内源性卵黄合成期卵母细胞; EX: 外源性卵黄合成期卵母细胞; NO: 近成熟期卵母细胞; MO: 成熟卵母细胞; FC: 滤泡细胞; N: 细胞核。

**Plate I The distribution of positive PR in the ovary during the ovarian development of *P. trituberculatus***

1. ovary at stage I; 2. ovary at stage II, 2a. the magnification of PRO and EN; 3. ovary at stage II, the follicle cells were moving to oocytes; 4. ovary at stage III, 4b. EN and EX were surrounded by follicle cells; 5. ovary at stage IV, 5c. NO was closely surrounded by follicle cells; 6. ovary at stage V.

OG: oogonium; PRO: previtellogenic oocyte; EN: endogenous vitellogenic oocyte; EX: exogenous vitellogenic oocyte; NO: nearly mature oocytes; MO: mature oocyte; FC: follicle cell; N: nucleus.

**图版 II 说明**

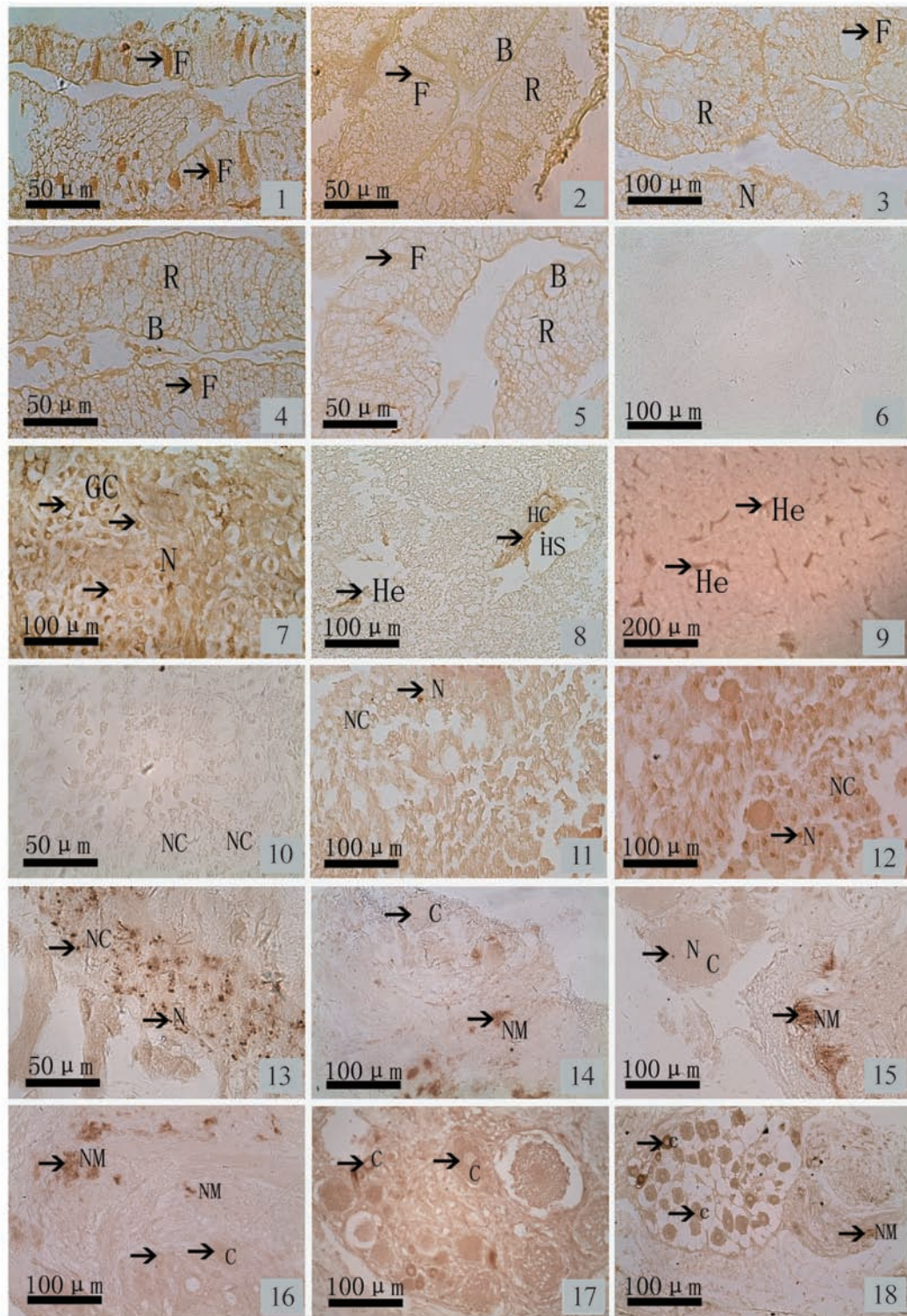
1. I 期肝胰腺; 2. II 期肝胰腺; 3. III 期肝胰腺; 4. IV 期肝胰腺; 5. V 期肝胰腺; 6. III 期肌肉; 7. IV 期大颚器; 8. III 期 Y 器官; 9. V 期 Y 器官; 10. II 期视神经节; 11. III 期视神经节; 12. IV 期视神经节; 13. V 期视神经节; 14. I 期胸神经团; 15. II 期胸神经团; 16. III 期胸神经团; 17. IV 期胸神经团; 18. V 期胸神经团。

R: 吸收细胞; B: 泡状细胞; F: 纤维细胞; N: 细胞核; GC: 腺细胞; He: 血细胞; HS: 血窦; HC: 血管; NC: 神经细胞; NM: 神经髓质; C: 细胞质。

**Explanation of Plate II**

1. hepatopancreas at ovarian stage I; 2. hepatopancreas at ovarian stage II; 3. hepatopancreas at ovarian stage III; 4. hepatopancreas at ovarian stage IV; 5. hepatopancreas at ovarian stage V; 6. muscle at ovarian stage III; 7. mandibular organ at ovarian stage IV; 8. Y-organ at ovarian stage III; 9. Y-organ at ovarian stage V; 10. optic ganglia at ovarian stage II; 11. optic ganglia at ovarian stage III; 12. optic ganglia at ovarian stage IV; 13. thoracic ganglion mass at ovarian stage V; 14. thoracic ganglion mass at ovarian stage I; 15. thoracic ganglion mass at ovarian stage II; 16. thoracic ganglion mass at ovarian stage III; 17. thoracic ganglion mass at ovarian stage IV; 18. thoracic ganglion mass at ovarian stage V.

R: resorptive cell; B: blister like cells; F: fibrillar cells; N: nucleus; GC: gland cell; He: hemocyte; HS: hemolymph sinus; HC: hemolymph channel; NC: nerve cells; NM: nerve medulla; C: cytoplasm.



图版 II 三疣梭子蟹卵巢发育过程中各期肝胰腺、大颚器、Y 器官、  
视神经节和胸神经团的 PR 免疫阳性分布

Plate II The distribution of positive PR in the hepatopancreas, mandibular organ,  
Y-organ, optic ganglia and thoracic ganglion mass during the  
ovarian development of *P. trituberculatus*