

## KK-42 对日本沼虾 $D_3$ 期头胸甲表皮结构的影响

吕艳杰, 陈香丽, 郭爱莲, 王 佩, 宁黔冀\*

(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 为探讨 KK-42 缩短日本沼虾幼虾蜕皮周期的机制, 实验采用组织学方法观察了幼虾头胸甲表皮结构, 定量测定了肝胰腺 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)的活力。将体长  $(3.3 \pm 0.5)$  cm 的日本沼虾随机分为两组, 分别用  $1.95 \times 10^{-4}$  mol/L 的 KK-42 溶液(实验组)或不含 KK-42 的溶液(对照组)浸泡处理 1 min 之后, 选取处于蜕皮前期  $D_3$  期的日本沼虾, 观察头胸甲表皮结构, 测定肝胰腺 NAGase 活力。结果显示, KK-42 处理后第 1 天, 头胸甲外表皮厚度与对照组相比显著增长 42.83%; 第 3 天和第 9 天, 内表皮的厚度同比提高 70.72%、77.27%, 整个头胸甲的厚度同比显著增厚。KK-42 处理后第 3 天, 上皮细胞的高度比对照组提高 31.69%。KK-42 处理后 6、12 和 24 h, NAGase 活力分别比相应的对照组升高 42.53%、34.28% 和 18.36%。研究表明, KK-42 处理可显著增加  $D_3$  期日本沼虾头胸甲外骨骼的厚度, 提高肝胰腺 NAGase 活力。

**关键词:** 日本沼虾; KK-42; 头胸甲; NAGase

**中图分类号:** Q 174; S 968.2

**文献标志码:** A

甲壳动物坚硬的表皮是对外界恶劣环境的适应性结果, 由上皮细胞层衍生而来, 自内而外分为基膜、上皮细胞层和外骨骼 3 层, 与动物的运动、生长发育、繁殖以及捕食等习性密切相关<sup>[1]</sup>。对斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[2]</sup> 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的研究表明<sup>[3]</sup>, 蜕皮间期的表皮自外而内由四层结构组成: 上表皮、外表皮、内表皮和膜质层。上表皮一般最薄, 外表皮和内表皮的厚度则因物种而异, 通常蟹类外表皮相对较厚, 内表皮次之, 而虾类则正好相反, 膜质层则并不是所有的甲壳动物都有。

几丁质是构成表皮的主要成分, 甲壳动物的生长伴随着旧表皮降解和新表皮生成, 其蜕皮过程与几丁质酶系密切相关。几丁质首先被几丁质内切酶和外切酶降解为二糖, 后经 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶 (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, NAGase) 脱氢形成 N-乙酰基葡萄糖苷, 最终被用于新表皮形成, 协助甲壳动物顺利完成周期性的

蜕皮<sup>[4]</sup>。

KK-42 属咪唑类衍生物, 作为一种昆虫生长调节剂, KK-42 可以诱导家蚕 (*Bombyx mori*) 提前变态, 提高幼虫体质量增长率<sup>[5]</sup>。甲壳动物的生长发育与昆虫相似, 前期研究表明, 适宜浓度的 KK-42 处理能显著促进凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)<sup>[6]</sup> 及日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 幼虾的生长。动物的生长通过周期性的蜕皮实现, 新旧表皮更替是蜕皮的重要事件, 表皮结构在蜕皮周期中呈不断变化。据报道, 在蜕皮前期, 由于内表皮的降解和上皮细胞的重吸收, 外骨骼结构在该时期的变化比较剧烈<sup>[7-8]</sup>。据此, 本实验以蜕皮前期 (尤其是  $D_3$  期) 日本沼虾幼虾为材料, 组织学方法观察了头胸甲表皮结构, 紫外吸收法定量分析了该时期肝胰腺 NAGase 在 KK-42 处理前后活力变化, 旨在为阐明 KK-42 缩短日本沼虾幼虾蜕皮周期的机制积累资料。

收稿日期: 2014-06-10 修回日期: 2014-10-10

资助项目: 国家自然科学基金(30940008); 河南省基础与前沿技术研究项目(142300410021)

通信作者: 宁黔冀, E-mail: ningqianji1964@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

日本沼虾捕捞于河南原阳黄寺渔场,选取体长( $3.3 \pm 0.5$ ) cm、体质量 0.3 g 左右的健康虾,饲养于水族箱(规格:130 cm  $\times$  110 cm  $\times$  120 cm),水深 80 cm,水温( $20 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,每天早晚各投喂一次,日换水量 30%,实验室饲养一周后用于实验研究。

将 500 尾健康日本沼虾随机分为 2 组:处理组用  $1.95 \times 10^{-4}$  mol/L 的 KK-42 溶液浸泡处理 1 min<sup>[5]</sup>,取出,迅速控除水分后,立刻投入到水族箱中,按正常方式饲养;对照组用不含 KK-42 的溶液处理,方法同上。选取处于蜕皮前期  $D_3$  期的幼虾进行组织学实验,分别于处理后 1、3、5、7、9 d 取材,每个时间点取 3 只虾的头胸甲表皮,每个组织选取 15 张切片用于数据测量。KK-42 处理后 0、6、12、24 h,取  $D_3$  期幼虾肝胰腺用于 NAGase 活力分析,实验均设置 3 个重复。

### 1.2 实验方法

头胸甲组织形态的观察 取  $D_3$  期头胸

甲表皮,剪成 1~2 mm 的小块,DF(Davidson's fixative)固定液固定 48 h,每天更换一次固定液,流水冲洗 1 h<sup>[7]</sup>。3% 琼脂预包埋后,系列酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,常规切片,切片厚度 7  $\mu\text{m}$ ,过碘酸-Schiff (PAS) 和苏木精染色。

肝胰腺 NAGase 活力的测定 参照文献 [9] 的方法。

## 2 结果

### 2.1 $D_3$ 期日本沼虾头胸甲表皮的结构

头胸甲表皮自内而外分为两层,即上皮细胞层和外骨骼。上皮细胞层为排列紧密的单层细胞(图 1-a), $D_3$  期外骨骼自外而内分为 4 层:上表皮、外表皮、内表皮和新形成的上表皮层(图 1-b)。经 PAS 和苏木精染色后,上表皮呈红色,着色较深,为匀质结构;外表皮呈紫红色,且有分层现象,几丁质纤维排列较为紧密;内表皮呈粉红色,也具有分层现象,但排列较为疏松。

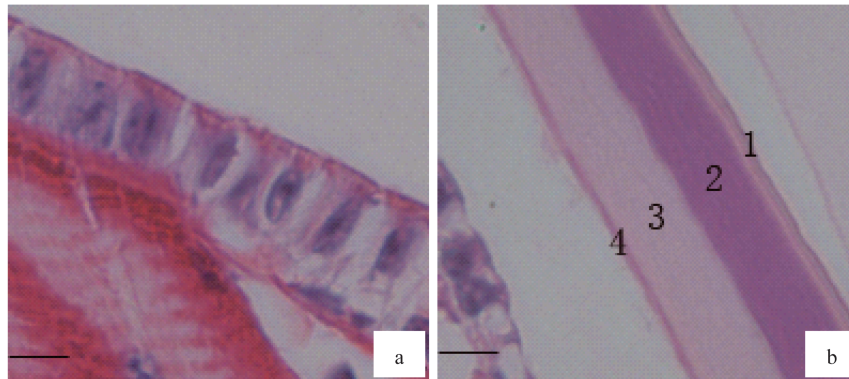


图 1 蜕皮前期  $D_3$  期日本沼虾头胸甲表皮结构

(a) 上皮细胞层; (b) 外骨骼各层, 1~4 分别示上表皮、外表皮、内表皮、新上表皮。标尺 10  $\mu\text{m}$

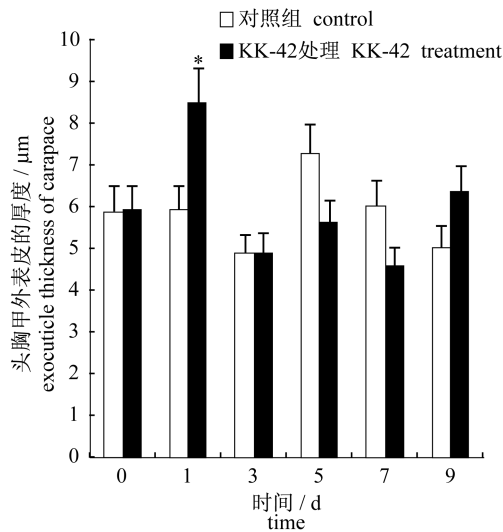
Fig. 1 The histological structure of carapace cuticle in *M. nipponense* during premolt  $D_3$  stage

(a) epithelial cell layer; (b) layered structure of carapace exoskeleton, 1-4 representing epicuticle, exocuticle, endocuticle and newly-formed epicuticle, bar = 10  $\mu\text{m}$

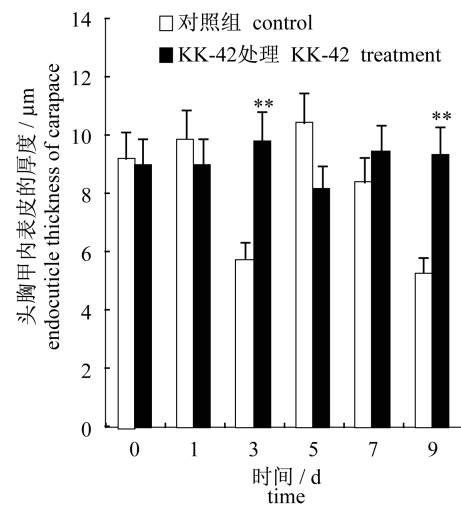
### 2.2 KK-42 对 $D_3$ 期日本沼虾头胸甲表皮结构的影响

KK-42 对上皮细胞高度和头胸甲厚度具有显著的影响。处理后第 1 天,上皮细胞的高度 [ $(8.44 \pm 1.41) \mu\text{m}$ ] 与对照组 [ $(8.55 \pm 1.12) \mu\text{m}$ ] 无显著性差异;而外表皮的厚度同比提高了 42.83%,其他两组无统计学意义上的差异(图

2)。第 3 天,上皮细胞的高度 [ $(10.34 \pm 0.89) \mu\text{m}$ ] 比对照组 [ $(7.85 \pm 0.51) \mu\text{m}$ ] 增加 31.69% ( $P < 0.05$ ),内表皮的厚度同比提高了 70.72%。第 9 天,内表皮的厚度同比增加 77.27% (图 3,图 4)。第 3、9 天,头胸甲的总厚度也相应增加 38.69%、52.23% (图 5)。

图2 KK-42对D<sub>3</sub>期日本沼虾

头胸甲外表皮厚度的影响

“\*”表示与相应的对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ )Fig. 2 The effect of KK-42 on exocuticle thickness of carapace in D<sub>3</sub> stage *M. nipponense*\*  $P < 0.05$ , vs control group at the same time图3 KK-42对D<sub>3</sub>期日本沼虾

头胸甲内表皮厚度的影响

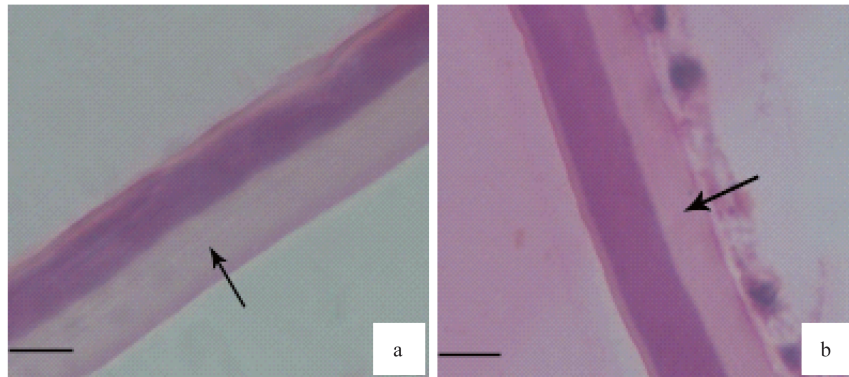
“\*\*”表示与相应的对照组相比有极显著差异( $P < 0.01$ )Fig. 3 The effect of KK-42 on endocuticle thickness of carapace in D<sub>3</sub> stage *M. nipponense*\*\*  $P < 0.01$ , vs control group at the same time

图4 KK-42处理后第9天头胸甲内表皮厚度的变化

(a)处理组;(b)对照组,箭头示内表皮,标尺10 μm

Fig. 4 The change of endocuticle thickness of exoskeleton on the ninth day after KK-42 treatment

(a) KK-42 treatment group; (b) control group, arrow pointing endocuticle, bar = 10 μm

### 2.3 KK-42对D<sub>3</sub>期日本沼虾肝胰腺NAGase活力的诱导作用

在实验观察期间,对照组NAGase活力呈波动性变化,各时间点之间无显著差异;KK-42处理后6、12和24 h,肝胰腺NAGase活力比对照组显著提高42.53% ( $P < 0.01$ )、34.28% ( $P < 0.01$ )和18.36% ( $P < 0.05$ ) (图6)。

## 3 讨论

对于日本沼虾等甲壳动物来说,蜕皮前期是蜕皮周期中各种生理功能非常活跃的阶段,依表

皮结构变化又将其细分为D<sub>0</sub>~D<sub>4</sub>期<sup>[10]</sup>,实验结果显示,KK-42处理后D<sub>3</sub>期头胸甲表皮结构的变化较为明显,故选用此期幼虾作为实验材料。据报道,处于D<sub>3</sub>期的斑节对虾,上皮细胞对糖类、几丁质、钙盐等物质的重吸收已基本完成,开始分泌形成新的上表皮<sup>[7]</sup>,与本实验结果一致。

对多种甲壳动物的研究表明,NAGase活性的变化与蜕皮周期密切相关,尽管其变化规律在物种间不尽相同。水蚤(*Daphnia magna*)NAGase活性在蜕皮前0~6 h酶活力达最高峰<sup>[11]</sup>;处于蜕皮前期D<sub>3</sub>~D<sub>4</sub>期的招潮蟹(*Uca pugilator*)

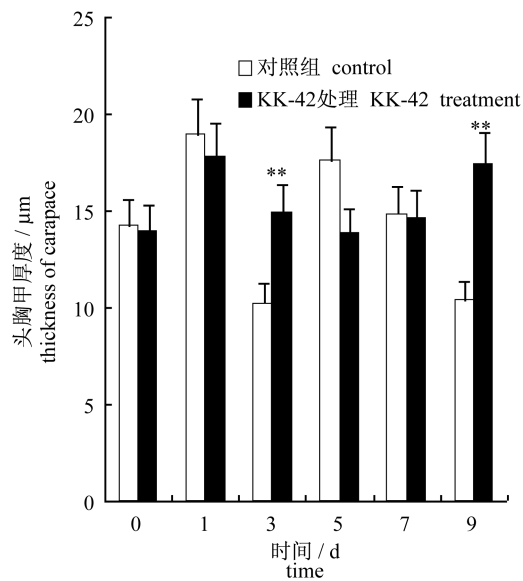


图5 KK-42 对  $D_3$  期日本沼虾头胸甲总厚度的影响

\*\* 表示与相应的对照组相比有极显著差异 ( $P < 0.01$ )

Fig. 5 The effect of KK-42 on the whole thickness of carapace in  $D_3$  stage *M. nipponense*

\*\*  $P < 0.01$ , vs control group at the same time

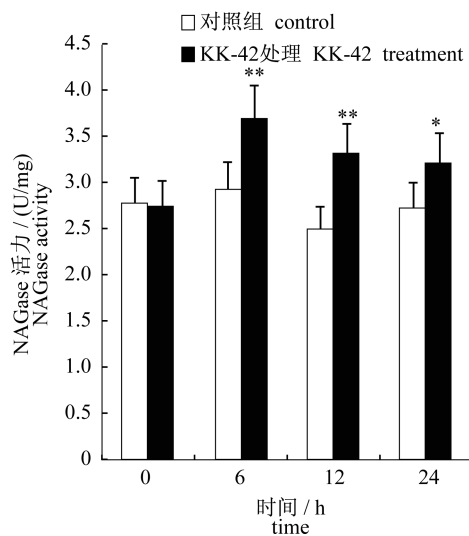


图6 KK-42 对  $D_3$  期日本沼虾肝胰腺 NAGase 活力的诱导

\* 表示与相应的对照组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ),

\*\* 表示与相应的对照组比有极显著差异 ( $P < 0.01$ )

Fig. 6 The inductive effect of KK-42 on the hepatopancreas NAGase activity in  $D_3$  stage *M. nipponense*

\*  $P < 0.05$ , vs control group at the same time, \*\*  $P < 0.01$ , vs control group at the same time

肝胰腺 NAGase 活力显著高于  $D_{0-1}$  期,而蜕皮后 A-B 期和间期 C 期酶活力均较低<sup>[4]</sup>;在锯齿长臂虾 (*Palaemon serratus*) 表皮中,酶活力峰出现在蜕皮前期的  $D_1$  和  $D_2$  期<sup>[12]</sup>。本实验结果表明,在实验观察期间,  $D_3$  期日本沼虾幼虾肝胰腺 NAGase 活力呈波动性变化,各时间点间差异不显著,而 KK-42 处理能显著提高酶活力,该作用可能与 KK-42 上调 NAGase 基因 mRNA 表达有关<sup>[13]</sup>,也可能是通过提高动物血淋巴中蜕皮激素的滴度间接实现<sup>[14]</sup>。

KK-42 处理后第 1 天,头胸甲外表皮厚度与对照组相比显著增加,推测可能与 KK-42 诱导 NAGase 活力有关,肝胰腺合成分泌的 NAGase 蛋白可能通过某种途径(如血淋巴)运输至外骨骼,加快了外表皮中几丁质的降解,形成的产物 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖提高了组织的渗透压,促进了外表皮对水的吸收,导致外表皮短时间内明显增厚。第 3、9 天, KK-42 处理组头胸甲内表皮的厚度较对照组显著提高,推测可能是内表皮中的糖类有机物被降解重吸收后,其中的几丁质纤维因为失去相互间的联系而变得更加松散<sup>[15]</sup>。另外,上皮细胞高度的增加提示其重吸收作用加强。头胸甲表皮总厚度的增高,应该是外表皮和内表皮厚度增加的结果。增厚的表皮是否做为蜕皮提前“启动”的物质条件之一,尚待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Yang W X, Zhou H. Primary study on the histology of exoskeleton of female pleopod in *Eriocheir sinensis* [J]. Dong Hai Marine Science, 2000, 18 (3): 29 - 34. [杨万喜,周宏. 中华绒螯蟹雌体腹肢外骨骼组织学初步研究. 东海海洋, 2000, 18 (3): 29 - 34.]
- [2] Waraporn P, Piyakorn B, Pornpimol K. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2005, 27 (3): 499 - 509.
- [3] Tian Z H, Kang X J, Jiao C Z. Structural and constituent changes in integument during the molt cycle of Chinese mitten crab *Eriocheir Sinensis* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37 (5): 899 - 904. [田志环,康现江,焦传珍. 中华绒螯蟹蜕皮过程中体壁结构和主要成分的变化. 水生生物学报, 2013, 37 (5): 899 - 904.]

- [ 4 ] Enmin Z, Milton F. Patterns of N-acetyl-b-glucosaminidase isoenzymes in the epidermis and hepatopancreas and induction of N-acetyl-b-glucosaminidase activity by 20-hydroxyecdysone in the fiddler crab, *Uca pugilator* [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1999, 124 ( 3 ): 345 - 349.
- [ 5 ] Banerjee K, Deb D C. Effects of KK-42, an imidazole derivative, on rearing and reproductive performance of *Bombyx mori* L. during the hot, wet season [ J ]. International Journal of Tropical Insect Science, 1999, 19(1) : 85 - 90.
- [ 6 ] 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) : 422 - 426.
- [ 7 ] Zhou F, Wu Z W, Wang M L, *et al.* Structure and mechanical properties of pincers of lobster (*Procambarus clarkii*) and crab (*Eriocheir Sinensis*) [ J ]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2010, 3(6) : 454 - 463.
- [ 8 ] Skinner D M. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle [ J ]. Biological Bulletin, 1962, 123(3) : 635 - 647.
- [ 9 ] Huang X H, Wang S K, Huang Y F, *et al.* Preliminary purification and some properties of  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase from *Macrobrachium nipponense* [ J ]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(6) : 804 - 808. [ 黄小红, 王寿昆, 黄一帆, 等. 日本沼虾 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶初步纯化及部分性质 [ J ]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6) : 804 - 808. ]
- [ 10 ] Peebles J B. A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii* [ J ]. Aquaculture, 1977, 12(2) : 173 - 180.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] Spindler B M, Van W A, Spindler K D, *et al.* 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.
- [ 13 ] Xiao X C, Yang H, Ning Q J, *et al.* The effect of KK-42 on the expression of nutritional storage-associated enzymes in the shrimp *Litopenaeus vannamei* [ J ]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2) : 388 - 392. [ 夏西超, 杨洪, 宁黔冀, 等. KK-42 对凡纳滨对虾物质储备相关酶类基因表达的影响. 水生生物学报, 2013, 37(2) : 388 - 392. ]
- [ 14 ] Liu F, Chen X L, Guo A L, *et al.* Effect of KK-42 on ecdysone and ecdysteroid receptor mRNA in *Macrobrachium nipponense* [ J ]. Journal of Henan Normal University: Natural Science, 2013, 4(41) : 124 - 127. [ 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. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 4(41) : 124 - 127. ]
- [ 15 ] Pratoomchat B, Sawangwong P, Guedes R, *et al.* Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle [ J ]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 293(4) : 414 - 426.

## Effect of KK-42 on the carapace structure in *Macrobrachium nipponense* during premolt D<sub>3</sub> stage

LÜ Yanjie, CHEN Xiangli, GUO Ailian, WANG Pei, NING Qianji\*

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** In order to research the possible mechanism that the duration of molting cycle of the juvenile prawn *Macrobrachium nipponense* was shortened by KK-42, the cuticle structure of carapace was investigated by the histological method and the N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) activity from hepatopancreas was quantitatively analyzed using ultraviolet absorption method before and after KK-42 treatment. The prawns with body length of  $(3.3 \pm 0.5)$  cm were randomly divided into two groups: KK-42 treatment group and control one. The prawns were soaked for 1 min in KK-42 solution at a concentration of  $1.95 \times 10^{-4}$  mol/L (KK-42 treatment group) or 0 mol/L (control group), respectively. Afterwards, the carapaces derived from late premolt (D<sub>3</sub>) prawns were chosen to be used for histological observation and thickness measurement of layered exoskeleton, meanwhile, the hepatopancreas NAGase activity in stage D<sub>3</sub> *M. nipponense* was quantitatively analyzed. The results showed that the exocuticle thickness of carapace significantly increased by 42.83% compared with the corresponding control on 1<sup>st</sup> day after KK-42 treatment, and the endocuticle thickness as well as the whole exoskeleton thickness significantly increased by 70.72% ( $P < 0.01$ ), 77.27% ( $P < 0.01$ ) and 38.69% ( $P < 0.01$ ), 52.23% ( $P < 0.01$ ), respectively, compared to the corresponding control on the 3<sup>rd</sup> day and the 9<sup>th</sup> day after KK-42 treatment. A 31.69% rise in the height of epithelial cells was obtained on the 3<sup>rd</sup> day after KK-42 treatment compared with the corresponding control. The NAGase activity significantly increased by 42.53% ( $P < 0.01$ ), 34.28% ( $P < 0.01$ ) and 18.36% ( $P < 0.05$ ), respectively, at 6 h, 12 h and 24 h after KK-42 administration compared to the corresponding control. The results reveal that KK-42 treatment can significantly increase the cuticle thickness of carapace, and promote NAGase activity from hepatopancreas.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; KK-42; carapace; NAGase

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