

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

姚桂桂^{1,2}, 吴旭干¹, 成永旭^{1*}, 杨筱珍¹, 王春琳³

(1 上海高校水产养殖学 E- 研究院 上海海洋大学, 上海 200090; 2 杭州市农科院水产研究所, 浙江 杭州 310024; 3 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 通过生化分析和组织切片技术, 系统研究了东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育过程中肝胰腺指数(HSI)、主要生化成分和组织学结构的变化。结果表明: (1) 三疣梭子蟹第一次卵巢发育过程中 HSI 呈先上升后下降趋势, 最大值在 IV 期[7.46 ± 1.23 %], 最低值在 VI 期[4.62 ± 0.63 %]; (2) 三疣梭子蟹第一次卵巢发育过程中, 肝胰腺中的生化组成存在显著变化, I 期肝胰腺中水分含量高达 67.91%, 其他各期间无显著差异($P > 0.05$), 肝胰腺中脂肪/湿重含量呈先上升后下降趋势, I 期最低(13.48%), IV 期最高(24.24%); 肝胰腺中蛋白/湿重并无显著变化($P > 0.05$), 而总糖/湿重呈显著下降趋势($P < 0.05$); (3) 不同生理阶段雌体肝胰腺组织学存在两个较明显的变化—生殖蜕壳及产卵前后, I 期肝小管中 B 细胞占优势(约 50% 左右), R 细胞较细长, 肝小管内腔中存在大量食物残渣和脱落的 B 细胞顶泡等, 生殖蜕壳后(II 期后)的雌体肝胰腺中 R 细胞数量较多, 随着时间的推移 R 细胞逐渐饱满。产卵后雌体肝胰腺中的细胞间界限变得模糊, 部分肝小管的管腔开始自溶, 但是此时 B, F 细胞数量开始增多, 这说明随着春季东海海区水温的升高, 雌体开始恢复摄食, 以保证第二次卵巢发育的顺利进行。

关键词: 三疣梭子蟹; 肝胰脏; 不同生理阶段; 主要生化成分; 组织学结构

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2008)06-0122-10

1 引言

肝胰腺是甲壳动物的营养物质消化和储存器官, 与甲壳动物的生长发育和生殖具有密切的关系^[1-6], 一方面它可以合成和分泌消化酶对营养物质进行消化、吸收和储存, 从而影响甲壳动物的生长蜕壳和性腺发育^[4, 7-8], 另一方面它可以作为甲壳动物健康状况和生理状态的重要评价指标^[3, 9], 因此深入研究甲壳动物不同生理阶段的肝胰腺结构及其生化组成的变化, 有助于进一步认识肝胰腺的功能、判断其生理状态和营养状况^[7, 9-11]。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus* Miers) 是我国重要的海产经济蟹类, 在海洋捕捞和海水养殖业占有极其重要的地位^[12], 但是迄今有关三疣梭子蟹肝胰腺的研究较少, 有限的研究主要集中在溞状幼体和成体的肝胰腺结构及其细胞学观察^[11, 13-14], 尚未见到涉及不同性腺发育阶段肝胰腺中的主要生化成分变化与其组织结构之间的关系。鉴于此, 本文通过在舟山海区定点、定期连续采样, 研究了三疣梭子蟹生长和卵巢发育阶段的肝胰腺指数(Hepatosomatic Index, HSI)、卵巢指数(Gonadosomatic Index, GSI)及肝胰腺的组织学变化, 深

收稿日期: 2007-12-24; 修订日期: 2008-07-24。

基金项目: 上海市晨光计划项目(2007CG64); 国家 863 高技术研究发展计划项目(2006AA10A406); 农业部水产种质资源和养殖生态重点开放实验室开放课题(KF12006-3); 上海市教育委员会 E- 研究院建设项目(E03009); 上海市重点学科建设项目(Y1101)。

作者简介: 姚桂桂(1983—), 女, 浙江省天台县人, 硕士, 从事水产动物繁殖生物学的研究。ygg206@msn.com

* 通讯作者: 成永旭(1964—), 河南省济源市人, 教授, 博导, 主要从事水生动物繁殖学和养殖学的研究。E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

入探讨了肝胰腺中一般生化组成的变化和肝胰腺组织结构之间的关系,旨在进一步认识三疣梭子蟹肝胰腺的功能,同时也为深入研究其消化生理和繁殖生物学提供理论参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料和解剖

2006年7月至2007年5月,每月20日前后自舟山海区(30°~31°N, 122°~123°E)采样一次,所有样品均来自于舟山海区的捕捞船,每次随机采样10~20只,共采样114只。实验用蟹体重为62.5~400.3g,甲壳宽为9.85~16.38cm,所采样品活体运回实验室进行称重和解剖,取出体内的全部卵巢和肝胰腺,称重并计算GSI和HSI。GSI(%) = 卵巢重(g) × 100/

体重(g); HSI(%) = 肝胰腺重(g) × 100/ 体重(g)。参考吴旭干等^[15]的方法将三疣梭子蟹卵巢发育分为六期: I期, 生长阶段, 未交配, 腹部呈三角形, 很难发现卵巢, 卵巢中主要为卵原细胞; II期, 已交配, 卵巢呈乳白色细带状, 卵巢开始发育; III期, 卵巢淡黄或橘黄色带状, 开始进入外源性卵黄合成期; IV期, 卵巢橘红色; 体积继续增大, 卵巢发育加快; V期, 卵巢橘红色, 卵粒极明显, 卵巢发育基本成熟, 待产卵; VI期, 已排卵, 正在进行二次卵巢发育。参考吴旭干等^[15]的方法, 根据雌体生殖蜕壳、腹部特征和步足长度等挑选第一次卵巢发育的个体用于实验。各期样品的体重、甲壳长和甲壳宽见表1。解剖后立即镊取部分肝胰腺样品用Bouin's液固定, 其余样品于-70℃超低温冰箱中保存待生化成分测定。

表1 不同生理阶段三疣梭子蟹雌体的体重、甲壳长和甲壳宽

分期	I	II	III	IV	V	VI
样本量	21	25	22	19	14	13
体重/g	150.76±28.47 ^a	250.81±88.92 ^b	261.22±57.25 ^b	285.30±18.47 ^{bc}	321.94±38.37 ^c	278.67±41.52 ^{bc}
甲壳长/cm	6.05±0.34 ^a	7.53±0.91 ^b	7.61±0.57 ^b	7.78±0.27 ^b	8.18±0.71 ^b	8.39±0.25 ^b
甲壳宽/cm	10.99±0.66 ^a	12.94±1.77 ^b	12.94±1.10 ^b	13.10±0.47 ^b	13.52±1.11 ^b	13.73±0.93 ^b

注: 同行数据右上标中不含有相同字母代表组间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 生化分析

根据AOAC标准方法^[16]采用凯氏定氮法测定样品中的蛋白质含量; 按Folch法^[17]用氯仿和甲醇混和液(体积比为2:1)提取组织中脂肪; 碳水化合物提取按照Holland et al.^[18]的方法, 采用苯酚-硫酸法测定碳水化合物含量, 标样为葡萄糖; 取0.5g左右的湿样于70℃下烘干测定水分含量。每期样品均重复测定6~8只亲本。

2.3 组织切片

根据采样时间和卵巢发育情况, 采用Bouin's液对每期肝胰腺组织进行固定, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋(56~58℃), Leica RM2016型切片机连续切片, 切片厚度5.0~7.0μm, H.E染色, 在Olympus DX-2显微镜下观察拍照。在显微镜下将肝胰腺细胞分为4类: 胚细胞(embryonic cell, E)、泡状细胞(blister-like cell, B)、吸收细胞(resorptive cell, R)和纤维细胞(fibrillar cell, F)^[18], 并测量统计切片上四种肝胰腺细胞最大长径、宽径及其对应的核径和核仁长, 由于肝胰腺细胞是柱状细

胞, 故细胞的横切面只能反映细胞的宽度或横切面直径, 所以本实验中主要统计切片中有核细胞纵切面的各项参数。每期肝胰腺各重复3~5个样品, 每个样品至少统计10张切片。

2.4 数据分析

采用SPSS 13.0软件对实验数据进行统计分析, 用Levene法进行方差齐性检验, 当不满足齐性方差时, 对百分比数据进行反正弦或者平方根处理, 采用ANOVA对实验结果进行方差分析, 采用Tukey's法进行多重比较, 取 $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果与分析

3.1 三疣梭子蟹雌体不同生理阶段的肝胰腺指数和卵巢指数变化

由表2可知, 三疣梭子蟹卵巢发育I~V期过程中, GSI显著增长, 其中III~IV期和IV~V期两个阶段的生长较快, 第一次产卵后卵巢发育很不同步, GSI在3.33%~11.65%之间, 变异系数高达46.58%。不同卵巢发育阶段HSI也存在显著变

化,生殖蜕壳前的 HSI 较低,且个体间差异较大,变化范围在 3.10% ~ 11.46%,近生殖蜕壳雌体的 HSI 通常在 8% ~ 11%,这明显高于 I 期的平均值

(6.51% ± 2.14%, 见表 2),卵巢由 IV~ V 期和 V~ VI 期过程中,HSI 均出现了显著下降,下降幅度在 19.08% ~ 23.45% 之间。

表 2 三疣梭子蟹雌体不同生理阶段的肝胰腺指数和卵巢指数变化

分期	I	II	III	IV	V	VI
卵巢指数(%)	0.36 ± 0.16 ^a	0.79 ± 0.30 ^b	3.27 ± 1.83	7.20 ± 1.52 ^c	13.8 ± 1.97 ^d	8.35 ± 3.89 ^{cd}
卵巢指数范围(%)	0.09~ 0.51	0.81~ 1.34	1.36~ 5.45	4.90~ 10.18	11.35~ 17.4	3.33~ 11.65
肝胰腺指数(%)	6.51 ± 2.14 ^{ab}	6.87 ± 1.06 ^a	7.35 ± 1.09 ^a	7.46 ± 1.23 ^a	5.71 ± 0.81 ^b	4.62 ± 0.63 ^c
肝胰腺指数范围(%)	3.10~ 11.46	5.02~ 8.51	5.31~ 8.21	3.58~ 8.90	4.39~ 7.39	4.11~ 5.29

注:同行数据右上标中不含有相同字母代表组间差异显著($P < 0.05$)。

3.2 三疣梭子蟹雌体不同生理阶段的肝胰腺中的主要生化成分变化

表 3 为三疣梭子蟹雌体不同生理阶段的肝胰腺中主要生化成分的变化。不同生理阶段肝胰腺中的水分含量变化显著,生殖蜕壳前(卵巢发育处于 I 期)的肝胰腺中水分含量高达 67.91%,卵巢发育旺期(IV 期)的肝胰腺中水分含量最低,仅为 56.05%。肝胰腺中的脂肪/组织湿重在 13% ~ 24% 之间,其中 I 期最低,仅为 13.48% ± 5.48%,IV 期最高达

24.24% ± 5.14%,而肝胰腺中的脂肪/组织干重差异不大,仅 IV 期显著高于 I 期($P < 0.05$),其他各期间并无显著差异。肝胰腺中的蛋白/组织湿重并无显著差异,均在 10% ~ 13% 之间,但肝胰腺中的蛋白/组织干重存在显著差异,其中 I 期最高,V 期最低。就肝胰腺中的总糖/组织湿重而言,V 期显著低于 I ~ IV 期,仅为 0.60% ± 0.18%,其余各期均在 1% 左右,各期肝胰腺中的总糖/组织干重的变化规律与总糖/组织湿重类似。

表 3 不同生理阶段肝胰腺指数、卵巢指数和生化组成的变化(%)

分期	I	II	III	IV	V	VI
水分/组织湿重	67.91 ± 6.61 ^b	61.25 ± 7.90 ^{ab}	62.96 ± 7.36 ^{ab}	56.05 ± 4.96 ^a	59.52 ± 3.67 ^a	63.73 ± 6.74 ^{ab}
脂肪/组织湿重	13.48 ± 5.48 ^a	17.88 ± 4.93 ^{ab}	20.32 ± 4.36 ^{bc}	24.24 ± 5.14 ^c	21.15 ± 4.79 ^{bc}	18.22 ± 4.25 ^{abc}
脂肪/组织干重	40.27 ± 6.01 ^a	48.45 ± 6.65 ^{ab}	46.67 ± 3.97 ^{ab}	55.13 ± 6.27 ^b	49.44 ± 6.61 ^{ab}	49.17 ± 5.52 ^{ab}
蛋白/组织湿重	10.50 ± 1.63	12.64 ± 1.66	12.15 ± 1.45	12.66 ± 0.80	10.81 ± 0.96	11.95 ± 0.93
蛋白/组织干重	35.38 ± 2.97 ^b	31.58 ± 3.80 ^{ab}	38.70 ± 5.60 ^b	29.35 ± 3.67 ^a	27.03 ± 3.90 ^a	34.25 ± 4.92 ^{ab}
总糖/组织湿重	1.17 ± 0.20 ^b	1.08 ± 0.40 ^b	0.97 ± 0.21 ^b	0.93 ± 0.35 ^b	0.60 ± 0.18 ^a	0.88 ± 0.38 ^{ab}
总糖/组织干重	3.25 ± 0.43 ^c	2.74 ± 0.61 ^{bc}	2.62 ± 0.38 ^{bc}	2.15 ± 0.31 ^{ab}	1.62 ± 0.35 ^a	2.44 ± 0.58 ^b

注:同行数据右上标中不含有相同字母代表组间差异显著($P < 0.05$)。

3.3 三疣梭子蟹雌体不同生理阶段的肝胰腺组织学观察

三疣梭子蟹的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,肝小管横切的内腔面呈多角形,以四角星形居多(见图 1-1, *),内腔中常可发现脱落的 B 细胞顶泡和 R 细胞(见图 1-2)。根据肝小管盲端与肝导管距离的远近可将肝小管分为三个区域:盲端(远端)、中段和

近端(基部),4 种肝胰腺细胞(上皮细胞)在肝小管中的分布及主要特征如下:

E 细胞为未分化的细胞,呈强嗜碱性,集中于肝小管盲端,并逐渐分化成 R 或 F 细胞(见图 1-3),部分 E 细胞正在进行有丝分裂,可观察到姐妹染色单体分离后向两极迁移的现象(图 1-3, a)。

B 细胞主要分布于肝小管中段,少量分布于基部(图 1-4),B 细胞顶部多有一个较大的顶泡向管腔内突出(图 1-5)。B 细胞主要有两种形态,一部分 B

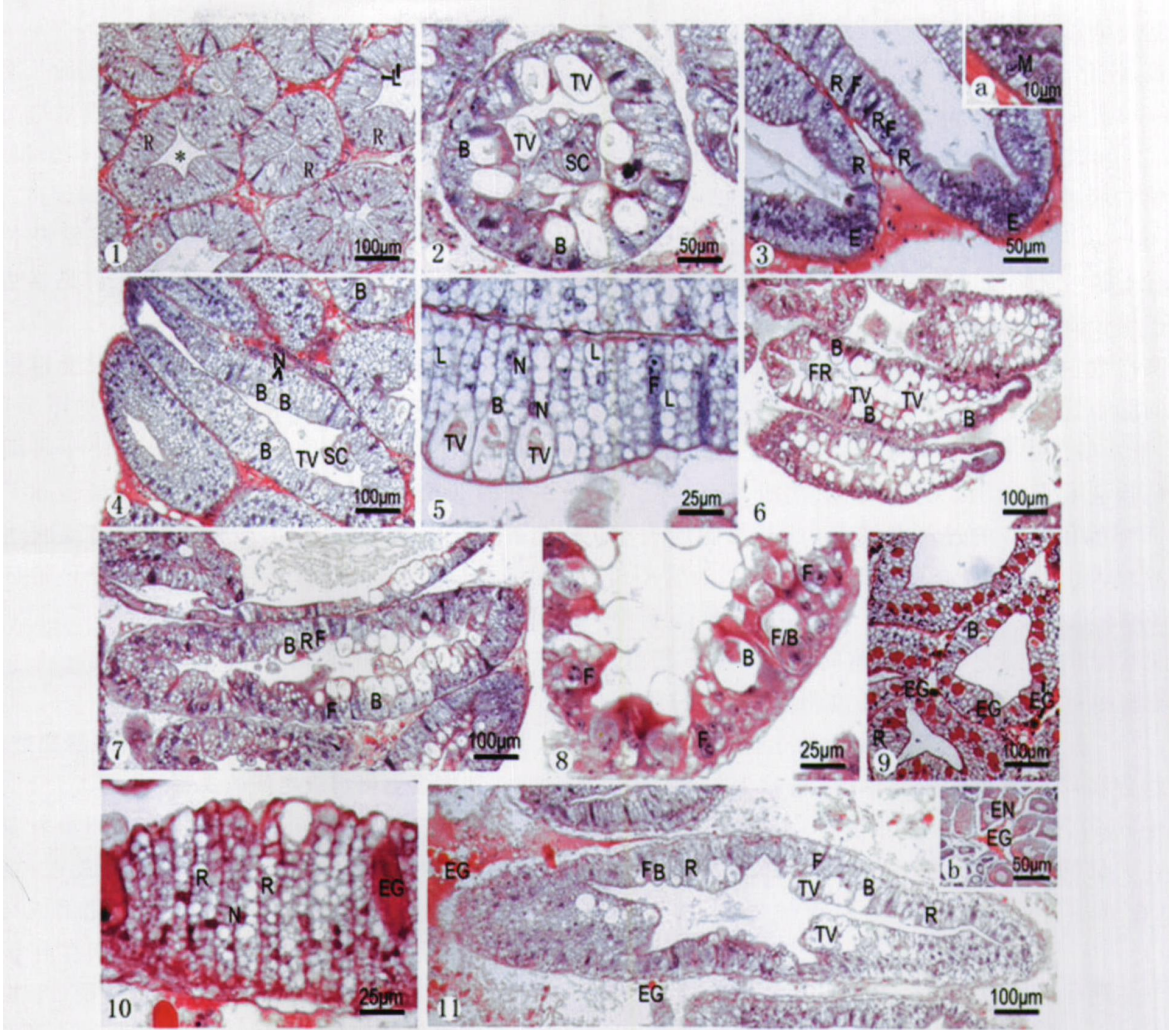


图 1

1 I 期晚期肝小管横切, 示内腔面呈多角星形; 2 I 期晚期肝小管横切, 示管腔中可见脱落的细胞; 3 I 期晚期肝小管盲端纵切, 可见 E 细胞转化为 R, F, 3-a 盲端正正在有丝分裂的 E 细胞; 4 I 期晚期肝小管整体纵切, B 细胞主要分布在中部; 5 I 期晚期肝小管中的 B 细胞放大, 示 B 细胞顶泡和细胞核; 6. I 期早期肝小管整体纵切, 示 B 细胞占优势; 7 I 期晚期肝小管整体纵切, 示 F 细胞和 B 细胞; 8 I 期早期肝小管横切, 示管腔中 F 细胞及 F/B 的过渡态细胞; 9 I 期晚期肝小管横切, 示肝小管和肝小管间的嗜酸性细胞; 10 II 期肝小管中的 R 细胞; 11 II 期肝小管整体纵切, 示 B,

F 细胞较 I 期明显减少, 11-b II 期卵巢中也存在这种嗜酸性颗粒

*: 管腔; R: 吸收细胞; L: 脂滴; B: 泡状细胞; TV: 泡状细胞的顶泡; F: 纤维细胞; BL: 基膜; F/B: F/B 过渡态的细胞; E: 胚细胞; EG: 嗜酸性颗粒; IM: 内膜; M: 胚细胞的有丝分裂; N: 细胞核; SC: 脱落的细胞; FR: 食物残渣; AL: 自溶的管腔

细胞中的顶泡体积较小, 这种 B 细胞平均高度为 $(86.30 \pm 10.87) \mu\text{m}$, 细胞基部平均宽则为 $(11.55 \pm 3.29) \mu\text{m}$ (图 1-5); 另一部分 B 细胞中的顶泡较大, 占 B 细胞体积的绝大部分, 这种 B 细胞的胞质及核位于顶泡基部, 该类细胞的平均高度为 $(50.17 \pm 8.64) \mu\text{m}$ (图 1-2)。两种类型 B 细胞的顶泡平均宽度、核径和核仁长均无显著差异, 分别为 $24.6, 6.8, 1.8 \mu\text{m}$ 左右。

R 细胞的数量在肝小管中占优势, 细胞内充满

脂滴, 由于切片过程中采用酒精脱水, 故大部分脂类被溶解, 所以 R 细胞中的脂滴通常呈透明空泡状 (图 1-1), 不同 R 细胞的高度和宽度相差较大, 其高度通常在 $9.74 \sim 141.23 \mu\text{m}$ 之间, 平均值为 $(70.07 \pm 21.06) \mu\text{m}$, 宽介于 $4.11 \sim 48.3 \mu\text{m}$ 之间, 平均为 $(14.40 \pm 4.73) \mu\text{m}$, 平均核径长为 $(7.23 \pm 1.09) \mu\text{m}$, 而平均核仁长为 $(2.25 \pm 0.50) \mu\text{m}$ 。

F 细胞主要分布在 R, B 细胞之间 (见图 1-7),

其胞质呈强嗜碱性,细胞核较 R 和 B 大且圆, F 细胞高则介于 15.30 ~ 85.50 μm 之间,平均高(40.13 \pm 14.02) μm ,而 F 细胞宽在 6.61 ~ 29.50 μm 之间,平均值为(14.75 \pm 4.42) μm ,核径和核仁径平均长度分别为(9.98 \pm 1.92) μm 和(3.00 \pm 0.80) μm 。

I 期 此阶段三疣梭子蟹雌体尚未生殖蜕壳,处于生长阶段,此时卵巢指数通常小于 0.15%,肝胰腺指数主要在 6% ~ 8% 之间。此阶段大部分个体的肝小管中 B 细胞占优势,约 50% 左右(见图 1-6),肝小管的内腔中常可发现食物残渣和脱落的 B 细胞顶泡及 R 细胞(见图 1-2),此阶段也可见大量 F 细胞和 F/B 的过渡态细胞,且 F 细胞的大小差异较大(见图 1-8)。另一部分个体中,通常 GSI 在 0.25% 左右,HSI 在 6% ~ 9% 之间,肝小管中可见大量的 R 细胞,在 R 细胞间可见一些 F 细胞, B 细胞相对少一些,主要集中在肝小管中段(见图 1-4, 7)。此外,一些近生殖蜕壳的个体,通常肝胰腺指数和卵巢指数均较高(GSI 大于 0.35%, HSI 大于 9%),肝胰腺的一些细胞中(类似于 F 细胞)存在大量的强嗜酸性颗粒(细胞),嵌于 R 细胞之间,在肝小管间亦可见这种强嗜酸性颗粒(见图 1-9)。

II 期 此期肝胰腺的肝小管中 R 细胞较多,占 80% 以上,且大多数 R 细胞较 I 期(生殖蜕壳前)的更加细长(见图 1-10),高度介于 74.67 ~ 141.23 μm 之间,平均高为(101.58 \pm 16.75) μm ;细胞平均宽为(12.55 \pm 3.61) μm 。此阶段,肝小管中的 B, F 细胞的数量较生殖蜕壳前明显减少(见图 1-11),此时卵母细胞主要处于内源性卵黄发生期(GSI = 0.61),卵母细胞间存在部分强嗜酸性的颗粒(见图 1-11, b),而肝小管间和肝小管的某些细胞中亦可发现大量这种颗粒,(图 2-1)。

III 期 此期肝细胞的嗜碱性强于 I 和 II 期,肝胰腺的基膜和管腔内膜较前两期增厚(见图 2-2)。在 III 期肝胰腺纵切图中可见大量的 B 细胞集中在近端和中端, F 细胞分散在 R, B 细胞之间。此期肝小管中仍然以 R 细胞为主, B, F 细胞的数量比 II 期肝胰腺有所增加(见图 2-2)。

IV 期 此期为卵黄合成旺期,肝小管中的 F 细胞较少,内腔中仍存在大量脱落的 B 细胞顶泡(见图 2-3)。此期肝小管细胞中已很难发现 I 期和 II 期所见的强嗜酸性颗粒,但肝小管间仍可见这种颗

粒(见图 2-3, a)。

V 期 成熟期肝胰腺管腔内膜厚度比前几期略薄(见图 2-4),此阶段 R 细胞数量较多,其平均高度为(60.70 \pm 12.49) μm ,平均宽为(13.03 \pm 2.00) μm ,细胞间界限开始模糊(见图 2-4, 5)。大多数的肝小管的纵切面和横切中均很难发现 F 细胞,存在部分 B 细胞,肝小管间仅偶尔可见强嗜酸性颗粒(见图 2-5, 6)。

VI 期 产卵后肝小管中的细胞界限变得更加模糊, R 细胞数量较多,比 V 期更细长(见图 2-7),平均宽仅为(11.42 \pm 2.32) μm ,显著小于 III 期至 V 期的 R 细胞宽。此阶段肝小管中 B 细胞和 F 细胞数量开始增多,管腔中可见大量内陷或脱落的细胞群(见图 2-8),部分肝小管的管腔开始自溶(见图 2-9)。

4 讨论

4.1 三疣梭子蟹雌体不同生理阶段肝胰腺指数及其主要生化组成之间的关系

本文首次研究了三疣梭子蟹雌体卵巢发育过程中肝胰腺指数及其生化组成变化的关系,结果表明三疣梭子蟹雌体 HSI 及其主要生化组成与卵巢发育阶段、食物条件和季节变化之间存在很大的相关性。三疣梭子蟹雌体生殖蜕壳前(生长阶段)肝胰腺指数较低,且肝胰腺中脂肪含量明显低于其他各期,这可能是由于在生长阶段(6-9 月, I 期)三疣梭子蟹肝胰腺主要执行消化和吸收功能,吸收的营养物质大部分转运至肌肉等组织用于其生长,所以肝胰腺中储存的营养物质较少,故 HSI 及其脂肪含量均较低(见表 2, 3)。三疣梭子蟹雌体的 HSI 和脂肪含量在 III ~ IV 期达到最大值,此后开始下降, HSI 在 VI 期达最低值,这是因为三疣梭子蟹属于浅海生活的温带海水蟹类,冬季栖息海区的水温较低,食物相对较少^[19],所以三疣梭子蟹尤其是雌体通常秋季(9-11 月)在肝胰腺中储存较多的脂肪等营养物质供冬季和早春的卵巢发育^[15]。相似的现象在挪威龙虾(*Nep hrops norvegicus*)^[6]和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[2]中也有发现。另一方面,10-11 月份雌体生殖蜕壳已经完成,生长已经基本停止,而此阶段卵巢发育速度较慢^[15],故从食物中吸收的营养物质相当部分直接储存于肝胰腺中,所以 HSI 及其脂肪含量在 II ~ III 期有所升高(见表 2, 3)。但是,招潮蟹

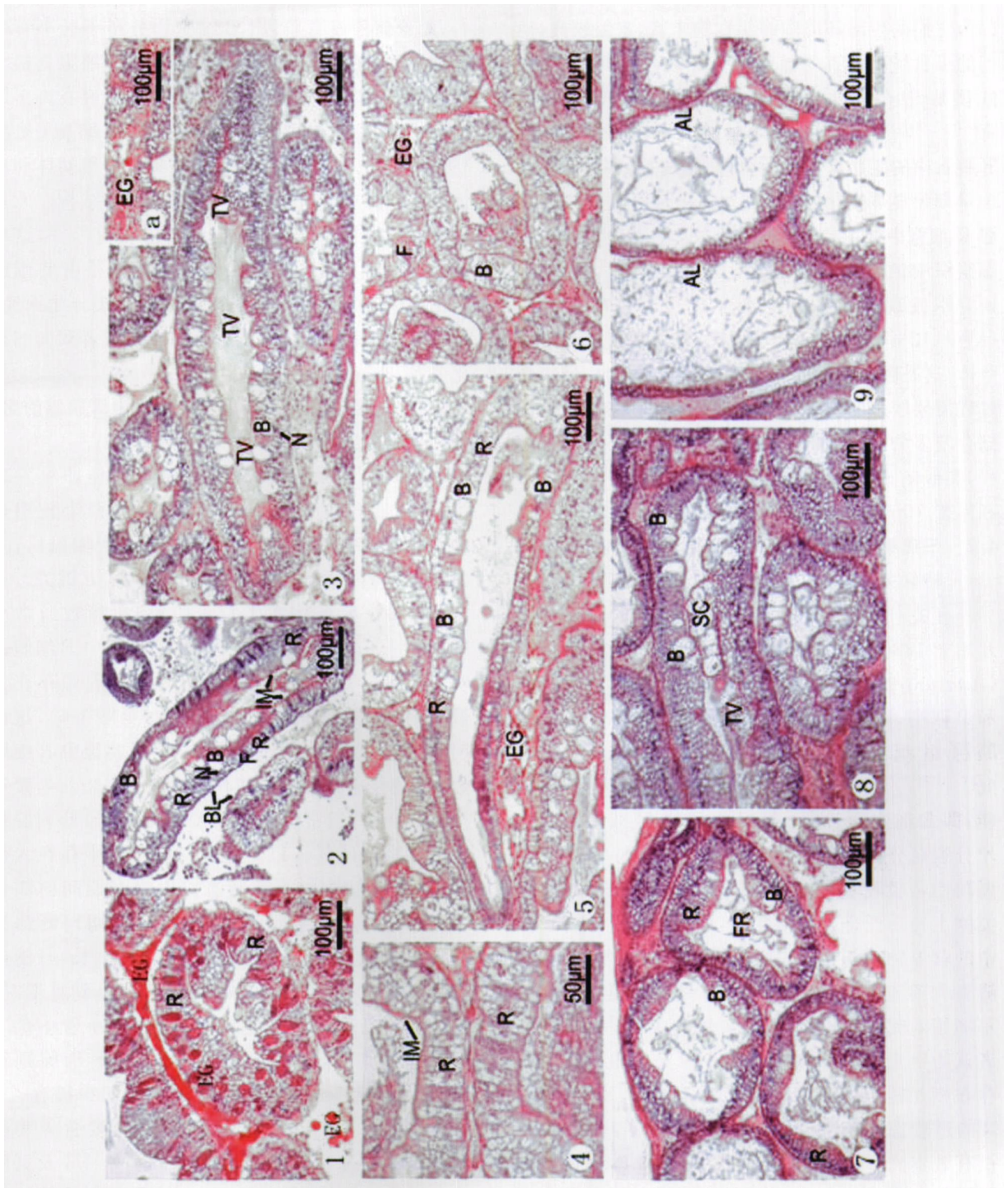


图 2

1 II期肝小管横切, 示肝小管间和肝小管中存在大量嗜酸性颗粒; 2 III期肝小管整体纵切, 示 R, B, F 细胞; 3 IV期肝小管整体纵切, 示脱落的 B 细胞顶泡, 3a 肝小管间的嗜酸性颗粒; 4 V期肝小管横切, 示 R 细胞增多和管腔; 5 V期肝小管整体纵切, 示肝小管细胞间的界限开始模糊, F 细胞极少; 6 V期肝小管横切, 示肝小管间偶见嗜酸性颗粒(蟹 41 补 H, $\times 10$); 7 VI期肝小管中横切, 示 R 细胞变得细长; 8 VI期肝小管部分纵切, 示

B 细胞增多和脱落的细胞群; 9 VI期肝小管横切, 示自溶的管腔

(*Uca annulipes*)^[20]、远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)^[20]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[21]和

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[22]等热带种类在卵巢发育期间 HSI 并没有显著减小, 这可能是

因为它们的生活环境中终年食物丰富,水温较高,他们的摄食情况没有明显的季节变动,故没有必要在肝胰腺中存储大量营养物质供此后的卵巢发育^[15, 20-21]。尽管三疣梭子蟹雌体在卵黄合成旺期肝胰腺中的脂肪含量有所下降,蛋白/肝胰腺湿重的含量却无显著变化,这是因为脂肪是甲壳动物肝胰腺 R 细胞中的主要储存物质,所以甲壳动物肝胰腺湿组织中的蛋白含量通常比较稳定^[6,9]。此外,本研究中发现近生殖蜕壳前三疣梭子蟹雌体 HSI (8%~12%) 通常要高于蜕壳间期和刚刚蜕壳后的个体,这是因为蟹类蜕壳期间通常停止摄食,但蜕壳过程需要较多的能量,蜕壳前雌体必须在肝胰腺中储存较多的营养物质(脂类)才能顺利完成蜕壳过程,类似的现象在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和岸蟹(*Carcinus maenas*)中也有发现^[24-25]。

4.2 三疣梭子蟹雌体四种肝胰腺细胞的功能及转化关系

有关十足目甲壳动物肝胰腺细胞的研究最早开始于 1880 年, JACOBS 等^[26]首次将土耳其螯虾(*Astacus leptodactylus*)的肝胰腺细胞分为 E, R, F 和 B 四类,随后许多学者对于不同甲壳动物的肝胰腺组织学和细胞分类进行了大量的研究^[7-8, 27-29],进一步阐明了四种肝胰腺细胞的功能,即 E 细胞位于肝小管盲端,作为胚细胞进行有丝分裂后分化产生另外三种肝胰腺细胞, R 细胞主要功能是吸收和贮存脂滴、肝糖原和钙等物质, F 细胞主要功能是合成消化酶, B 细胞主要吸收管腔中的营养物质进行胞内消化,并将无法消化的残渣裹入顶泡中,排到管腔中^[7-8, 30-35]。但是,有关不同细胞间的转化关系存在较大争议,一些研究者认为甲壳动物肝胰腺中 F, B 和 R 细胞之间可能存在相互转化关系,因为他们观察到 F/B, R/B, F/R 的过渡态细胞^[27-29, 36-37],另外有一些研究者并没有观察到过渡态细胞,认为 F, B 和 R 细胞之间不可能存在相互转化关系,它们都直接来源于 E 细胞,同时认为 F 细胞只能合成和分泌酶原到管腔中, B 细胞通过吸收管腔内的食物和消化酶进行消化^[7-8, 38]。造成这种差异的原因,是因为他们采用的研究动物不同,即使同一研究对象不同的生长阶段和生理状况也会影响他们的研究结果,故这些研究结果在一定程度上缺乏可比性。

本研究结果表明,三疣梭子蟹雌体肝小管盲端(靠近 E 细胞处)通常有 R, F 细胞分布(见图 1-3,

4),无论何种发育阶段, B 细胞均分布于肝小管中端和近端(见图 1-4, 6, 7),这说明由 E 细胞直接分化形成 B 细胞的可能性极小,而且本研究在许多肝小管中观察到类似于 F/B 的过渡态细胞(见图 1-8),此外电镜观察结果表明,三疣梭子蟹幼体和成体的肝胰腺中 F, B 细胞具有较相似的结构—大量的粗面内质网、游离核糖体和分泌颗粒^[13, 37],这些结果说明三疣梭子蟹的 B 细胞很可能是由 F 细胞转化而成,而不太可能是由 E 细胞直接分化而来,至于 F/R 和 B/R 之间是否存在单向或者双向的转化关系,有待于进一步深入研究。

4.3 三疣梭子蟹雌体卵巢发育过程中肝胰腺的组织学变化及原因

本研究结果表明,三疣梭子蟹雌体卵巢发育过程中,其肝胰腺的组织学结构存在两个较明显的变化,分别发生在生殖蜕壳前后和产卵前后,这与卵巢发育、所处季节及食物条件密切相关。通常三疣梭子蟹雌体在生长阶段(卵巢指数通常小于 0.15%)的肝胰腺指数较小,肝小管中 B 细胞占明显优势(约 50%左右),肝小管的内腔中存在大量食物残渣和脱落的 B 细胞顶泡(见图 1-6),这说明此阶段摄食、消化比较旺盛;但肝胰腺中 R 细胞数量较少,这说明脂肪储存较少(见表 3)。当接近生殖蜕壳时(通常卵巢指数大于 0.3%),肝胰腺指数明显升高(8%~11%之间),肝小管中存在大量的 R 细胞,细胞内充满脂滴以供蜕壳期间的能量消耗^[24-25],刚生殖蜕壳后的雌体(II 期),肝胰腺的 R 细胞数量较多,但是 R 细胞比较细长,且胞内储存的脂滴不太饱满(见图 1-10),但是到 III 期时, R 细胞已经变得比较饱满。此后,肝小管中的 R 细胞变得细长,其表面出现内陷, B, F 细胞则很少,这是因为三疣梭子蟹越冬过程中很少摄食^[19],但是其卵巢仍然在进一步发育,其主要营养和能量可能直接来源于肝胰腺储存^[15],故 HSI 及其脂肪含量有所下降(见表 2, 3)。尽管产卵后雌体肝胰腺中的细胞间界限变得更加模糊(见图 2-7),部分肝小管的管腔开始自溶(见图 2-9),但是此时 B, F 细胞数量开始增多(图 2-8),这说明随着春季海区水温的升高,雌体开始恢复摄食,以保证第二次卵巢发育的顺利进行^[39]。

由于三疣梭子蟹雌体肝胰腺 R 细胞的形态和脂滴多少可以直观反映其营养状况,特别是脂类营养情况,因此可以采用 R 细胞来判断肝胰腺的

营养状况和饲料的营养价值^[2-5,9]。Al-Mohanna and Nott^[29]采用不同的饲料投喂短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*),发现B细胞的大泡中,未消化内含物数量明显不同,建议采用B细胞的大泡内未消化的食物残渣的多少来评价甲壳动物对饲料的利用程度,但是朱丽岩等^[14]认为大泡中通过胞饮吸收进来的食物和食物残渣很难区分,因此采用B细胞的大泡很难客观评价饲料的利用程度,本研究发现在组织学研究中不能有效区分大泡中刚吸收进来的食物和食物残渣。

此外,在三疣梭子蟹雌体I期末至II期过程中肝胰腺的一些细胞(类似于F细胞)、R细胞间和不同肝小管间可见大量强嗜酸性颗粒(H.E染色的颜

色和外观类似于卵黄颗粒)(见图1-9,10,11,图2-1,2),这种颗粒在同期卵巢中也可发现(见图1-11,b);此后的发育过程中,尽管肝小管间还可见这种颗粒,但是肝胰腺细胞中很难再发现这种颗粒,这可能暗示三疣梭子蟹卵巢发育早期肝胰腺具有较强的卵黄合成能力,卵黄合成旺期肝胰腺的合成有所下降。有研究表明尽管蟹类卵巢和肝胰腺中均可合成卵黄物质^[40],但是卵巢发育中期(II至III期)肝胰腺中的卵黄合成能力最大,其后便开始显著下降,这种卵黄合成的调控主要通过甲基法尼脂(methyl farnesoate, MF)对卵黄蛋白原合成基因的表达(VgmRNA)来进行调控^[41-42],相同的机制在三疣梭子蟹雌体卵巢发育过程中可能也存在。

参考文献:

- [1] MIKAMI S, GREENWOOD J G. Functional morphology and cytology of the phyllosomal digestive system of *Stomatopoda ciliatus* and *Panulirus japonicus* (Decapoda) [J]. *Crustaceana*, 1994, 67: 212-225
- [2] 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
- [3] 成永旭, 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹幼体肝胰腺细胞结构变化与其营养状况的关系: I. 溞状幼体期I期的研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(4): 576-581
- [4] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹肝胰腺R和F细胞及其脂类贮存的电镜研究[J]. *动物学报*, 2000, 46(1): 8-13
- [5] 李富花, 李少菁. 锯缘青蟹幼体肝胰腺的观察研究[J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(1): 29-34
- [6] ROSA R, NUMES M L. Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal [J]. *Marine Biology*, 2002, 141: 1001-1009
- [7] VOGT G, STOCKER W, STORCH V, et al. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. [J]. *Histochemistry*, 1989, 91: 373-381
- [8] VOGT G. Life cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda) [J]. *Zoology*, 1994, 114: 83-101.
- [9] VOGT G, STORCH V, QUINITIO E T, et al. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda) [J]. *Aquaculture*, 1985, 48: 1-12
- [10] MOURENTE G, MEDINA A, GONZALEZ S, et al. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiidae) during maturation [J]. *Marine Biology*, 1994, 121: 187-197.
- [11] 李太武. 三疣梭子蟹肝脏的结构研究[J]. *海洋与湖沼*, 1996, 27(5): 471-477.
- [12] 谢忠明, 刘洪军, 冯蕾. 海水经济蟹类养殖技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 15-27.
- [13] 李太武, 苏秀榕. 三疣梭子蟹消化系统的组织学研究[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 1994, 17(3): 230-237.
- [14] 朱丽岩, 郑家声, 王梅林, 等. 三疣梭子蟹幼体中肠腺发育的组织学和细胞学研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(4): 631-636
- [15] 吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹卵巢发育规律的研究[J]. *海洋学报*, 2007, 29(4): 120-128
- [16] WILLIAMS S. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 14th [M]. Washington: Science Press, 1984: 1018
- [17] FOLCH J, LEES M, STANLEY G H S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226: 497-509
- [18] HOLLAND D L, CABBOTT P A. A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae [J]. *Journal of Marine Biology Association of UK*, 1971, 51: 659-668
- [19] 张宝琳, 相建海. 长江口海区三疣梭子蟹和细点圆趾蟹食性生态因子的研究[J]. *海洋科学*, 1991, 5: 60-64
- [20] PILLAY K K, NAIR N B. Observations on the biochemical changes in the gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus*, and *Metapenaeus affinis* during the reproductive cycle [J]. *Marine Biology*, 1973, 18: 167-198
- [21] WOUTERS R, MOLINA C, LAVENS P, et al. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different

- stages of sexual maturation [J]. *Aquaculture*, 2001, 198: 307—323
- [22] CAVALLIRO, MONTAKANT, LAVENS P, et al. Variation in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii*(deMan) females during maturation[J]. *Aquaculture*, 2001, 193: 311—324
- [23] 于志勇, 吴旭干, 成永旭, 等. 中华绒螯蟹第二次卵巢发育过程中肝胰腺和卵巢中主要生化成分的变化[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 45—52
- [24] HEATH J R, BARME S. Some changes in biochemical composition with season and during the molt cycle of the common shore crab, *Carcinus maenas*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1970, 5: 199—233
- [25] 张文军, 贺诗水, 成永旭, 等. 蜕壳前后中华绒螯蟹幼蟹肝胰腺脂肪酸组成的变化[J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 31(增刊): 24—27
- [26] JACOBS W. Untersuchungen über die cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*[J]. *Cell and Tissue Research*, 1928, 8: 1—62
- [27] AL-MOHANNA S Y, NOTT J A, LANE D J W. M-midgut cells in the hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844(Decapoda, Natantia)[J]. *Crustaceans*, 1985, 48(3): 260—268
- [28] AL-MOHANNA S Y, NOTT J A, LANE D J W. Mitotic E- and secretory F-cell in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Journal of Marine Biology Association of UK*, 1985, 65: 901—910
- [29] AL-MOHANNA S Y, NOTT J A. B-cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) [J]. *Journal of Marine Biology Association of UK*, 1986, 66: 403—414
- [30] DAVIS L D, BURNETT A L. A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish[J]. *Development Biology*, 1964, 10: 122—153
- [31] STANIER J E, WOODHOUSE M A, GRIFFIN R L. The fine structure of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (L.) (Decapoda: Brachyura) [J]. *Crustaceans*, 1968, 14: 56—66
- [32] LOIZZI R F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network[J]. *Z Zellforsch*, 1971, 113: 420—440
- [33] LOIZZI R F, PETERSON D R. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1971, 39B: 227—236
- [34] HOPKIN S P, NOTT J A. Some observations on concentrically structured, intracellular granules in the hepatopancreas of the shore crab *Carcinus Maenas*(L.)[J]. *Journal of Marine Biology Association of UK*, 1979, 59: 867—877
- [35] HOPKIN S P, NOTT J A. Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas*(L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas [J]. *Journal of Marine Biology Association of UK*, 1980, 60: 891—907
- [36] CACECI T, NECK K F, LEWIS D H, et al. Ultrastructure of the hepatopancreas of the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda)[J]. *Journal of Marine Biology Association of UK*, 1988, 68: 323—337
- [37] 朱丽岩, 郑家声, 王梅林, 等. 三疣梭子蟹幼体中肠腺发育的组织学和细胞学研究[J]. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(4): 631—636
- [38] OGUURA K. Midgut gland cells accumulating iron or copper in the crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Annot Zool Japon*, 1959, 32: 133—142
- [39] 姚桂桂, 吴旭干, 杨筱珍, 等. 三疣梭子蟹卵巢的第二次发育特征[J]. *动物学研究*, 2007, 29(4): 423—429
- [40] LI K, CHEN L Q, LI E C, et al. The site of vitellogenin synthesis in Chinese mitten handed crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006, 143B: 453—458
- [41] MAK A S, CHOI C L, TSUI S H, et al. Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: hepatopancreas-specific expression and farnesic acid stimulation of vitellogenin gene expression[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, 70: 288—300
- [42] CHAN S M, MAK A S, TSUL S H, et al. Vitellogenesis in the red crab, *Charybdis feriatus*: Contributions from small vitellogenin transcripts (CfVg) and farnesic acid stimulation of CfVg expression[J]. *Annals New York Academy Science*, 2005, 1040: 74—79

The changes of histology and main biochemical composition in the hepatopancreas at the different physiological stages of *Portunus trituberculatus* in East China Sea

YAO Gui-gui^{1,2}, WU Xu-gan¹, CHENG Yong-xu¹, YANG Xiao-zhen¹, WANG Chun-lin³

(1 Institute of Shanghai High Education of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China; 2 Institute of Fisheries, Hangzhou Academy of Agriculture Science, Hangzhou 310024, China; 3 College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the changes in the hepatosomatic index (HSI), the main biochemical compositions and its histological feature of *Portunus trituberculatus* at the different physiological stages in East Sea by biochemical determination and histological examination. Furthermore, the relationship between changing histology and main biochemical composition in the hepatopancreas were also discussed in the end of this paper. The results showed that: (1) During the ovarian maturation, the HSI increased to $(7.46 \pm 1.23)\%$ at stage IV, then decreased to $(4.62 \pm 0.63)\%$ at stage VI; (2) Although the stable protein level (10%~12% wet weight) could be found in wet hepatopancreas during the ovarian development, there were significant differences in the other main biochemical compositions during the course of ovarian maturation. The highest water content of the hepatopancreas could be found at the stage I, which reached 67.91%. Then, the total lipid (TL) content based on wet hepatopancreas appeared as the trend of "low—high—low". The peak TL content (24.24% wet weight) was found at stage IV in wet hepatopancreas, while the lowest TL content was only 13.48% at stage I. Moreover, the carbohydrate content of wet hepatopancreas decreased slightly except for stage I. (3) The significant changes of hepatopancreatic histology happened in the reproductive molting and spawning stages in female crabs. In early stage I (before reproductive molting), B cells dominated in the hepatopancreatic tubules while R cells seemed slender. Meanwhile, the abundant food residue and vacuoles sloughed off by B cells were found in tubule lumens of the hepatopancreas. In stage II (after reproductive molting), the numbers of R cells increased significantly, which were filled with lipid droplets with ovarian development. After spawning, the boundary of many hepatopancreatic cells became unclear or even mixed. However, there were more B and F cells on the hepatopancreas than before, which suggested that crabs restart feeding to ensure the second ovarian development as the water temperature increased.

Key words: *Portunus trituberculatus*; hepatopancreas; different physiological stages; biochemical composition; histological feature