

* 研究简讯 *

锯缘青蟹(*Scylla serrata*)脑中
FSH 和 LH 的免疫识别*

叶海辉 黄辉洋 李少菁 王桂忠

厦门大学海洋系, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005

摘要 为研究甲壳动物卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)的存在与分布, 我们应用免疫细胞化学技术对 FSH 和 LH 在锯缘青蟹(*Scylla serrata*)脑中的分布进行了定位研究。结果显示: 在近成熟期雌蟹和精子细胞期雄蟹脑中检测到 FSH 中等免疫阳性反应和 LH 弱免疫阳性反应, 免疫阳性细胞分布在前脑的前中胞体群和后脑的后侧胞体群。发育早期雌蟹和精原细胞期雄蟹未见 FSH 和 LH 免疫阳性反应。研究结果表明: FSH 和 LH 存在于锯缘青蟹脑中并具有发育阶段特异性, 可能参与性腺发育及精卵成熟的调节。

关键词 锯缘青蟹 脑 卵泡刺激素 黄体生成素 免疫细胞化学

1963年, Otsu 首次报道溪蟹(*Potamon dehaani*)的胸神经节具有性腺刺激激素(GSH), 能够刺激性腺发育^[1]。后来 Gomez 将束腹蟹(*Parathelphusa hydrodromus*)的脑移植入其他个体, 同样促进了性腺发育, 表明脑也是 GSH 的释放来源^[2]。进一步研究发现, 灼烧前脑导致促雄腺和精巢退化, 因此前脑被确认为 GSH 的重要合成场所^[3]。此后的离体实验更加证实了 GSH 对性腺发育的刺激作用和脑、胸神经节是 GSH 合成与释放来源^[4,5]。GSH 的化学结构迄今尚不清楚, 仅知日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)GSH 的分子质量约为 1—2 ku^[6], 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) GSH 的分子质量在 7 ku 以下, 属于蛋白质类^[7]。

在脊椎动物, 垂体前叶分泌的促性腺激素(GTH)由卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)组成, FSH 和 LH 通过与生殖腺细胞膜上的受体结

合, 从而刺激性腺发育及类固醇(雌激素、雄激素)产生, 对精卵发生起到重要调节作用^[8]。Zukowska 报道, 注射来源于脊椎动物的 FSH 和 LH 对褐虾(*Crangon crangon*)卵母细胞生长有促进作用^[9]。甲壳动物体内是否具有 FSH 和 LH, 甲壳动物 GSH 和脊椎动物 GTH 之间关系如何, 迄今在国内外都未见报道。锯缘青蟹(*Scylla serrata*)是我国南方重要的经济蟹类, 李少菁等已对其生殖生物学进行了详细的研究^[10]。本文旨在用免疫细胞化学方法, 研究 FSH 和 LH 在锯缘青蟹脑中的精确定位及表达状况, 并探讨 GSH 和 GTH 之间的关系。该研究对于理解甲壳动物生殖神经内分泌作用具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 取材与切片

锯缘青蟹体长 5.6—9.0 cm, 按性腺发育的分期

2005-09-26 收稿, 2005-12-10 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30300269)

E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

标准^[11, 12], 雌蟹处于卵巢发育早期或近成熟期; 雄蟹处于精巢发育的精原细胞期或精子细胞期, 各期3只。在冰冷的磷酸盐生理缓冲液中迅速解剖出锯缘青蟹的脑, 10%中性福尔马林液固定4—6 h(4℃), 常规石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度8 μm, 间隔取片, 按顺序贴片。

1.2 主要试剂

鼠抗 FSH 和鼠抗 LH 单克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品。链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫细胞化学试剂盒(SABC Kit)购自武汉博士德生物工程有限公司。3', 3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)为 Sigma 公司产品。

1.3 免疫细胞化学主要程序

切片脱蜡后在 3% H₂O₂/PBS 溶液中室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性。滴加正常山羊血清(1:10)室温孵育 10 min, 封闭非特异性反应部位。滴加鼠抗 FSH 或 LH 抗体(稀释度均为 1:100), 37℃ 孵育 1.5 h; 滴加即用型生物素标记的羊抗鼠抗体, 37℃ 孵育 30 min; 滴加即用型链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 37℃ 孵育 30 min。然后用 0.06% DAB-0.03% H₂O₂ 显色 10 min, 苏木精复染。阴性对照实验采用相邻切片, 以正常羊血清代替第一抗体, 同步进行上述免疫细胞化学反应程序。根据染色深浅, 将免疫反应强度分为: + + + 为强免疫阳性反应, 显深棕色; + + 为中等反应, 显棕色; + 为弱反应, 显浅棕色; - 为阴性反应, 无显色。

2 结果

免疫细胞化学研究结果如表 1 所示。在近成熟期雌蟹和精子细胞期雄蟹脑中呈现 FSH 中等免疫阳性反应和 LH 弱免疫阳性反应。在发育早期雌蟹和精原细胞期雄蟹为免疫阴性反应。对照实验为阴性。FSH 免疫阳性物质棕色, LH 免疫阳性物质浅棕色, 免疫阳性物质定位在细胞质中; 神经纤维极少呈免疫阳性。FSH 和 LH 免疫阳性细胞主要分布在前脑的前中胞体群(图 1(a), (b)), 两种免疫阳性细胞在后脑的后侧胞体群也有少量分布(图 1(c), (d))。

表 1 FSH 和 LH 免疫阳性物质在锯缘青蟹脑中的表达

抗体	雌性		雄性	
	发育早期	近成熟期	精原细胞期	精子细胞期
FSH	-	++	-	++
LH	-	+	-	+

++ 为中等免疫阳性反应; + 为弱免疫阳性反应; - 为免疫阴性反应

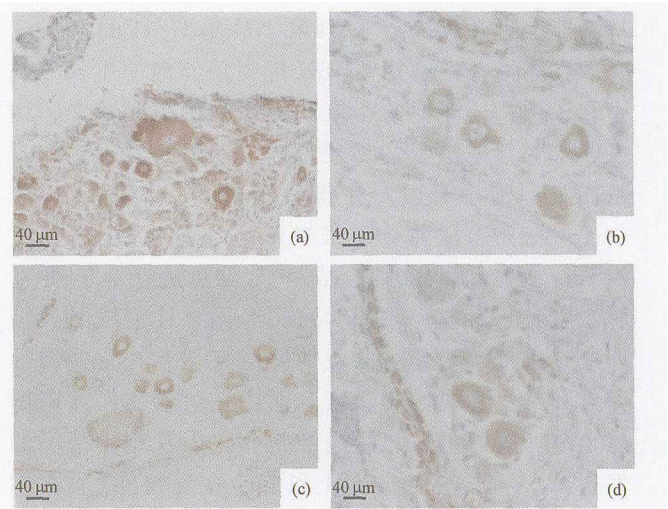


图 1 锯缘青蟹脑中 FSH 和 LH 免疫阳性细胞

(a) 前脑中前中胞体群中的 FSH 免疫阳性细胞; (b) 前脑中前中胞体群中的 LH 免疫阳性细胞; (c) 后脑后侧胞体群的 FSH 免疫阳性细胞; (d) 后脑后侧胞体群的 LH 免疫阳性细胞

3 讨论

有实验表明, 注射外源 FSH 和 LH 能够刺激褐虾(*Crangon crangon*) 卵母细胞生长^[9]。甲壳动物能否自主合成 FSH 和 LH 尚未见报道。本研究应用脊椎动物抗体和免疫细胞化学技术, 从锯缘青蟹体内检测到 FSH 和 LH 免疫阳性反应, 阐明了甲壳动物可以自主合成 FSH 和 LH, 即含有脊椎动物 GTH 样物质; 揭示了锯缘青蟹与脊椎动物的 FSH, LH 在分子结构上具有相当高的同源性。鉴于在蟋蟀(*Periplaneta americana*)^[13]、白蚁(*Reticulitermes aculabialis*)^[14]等昆虫脑内也检测出 FSH 和 LH, 我们认为节肢动物存在 FSH 和 LH 参与的生殖神经内分泌调节机制。

本研究观察到 FSH 和 LH 免疫阳性细胞主要分布于前脑, 与前脑是 GSH 的重要合成场所的报道一致^[3], 提示 FSH 和 LH 可能是甲壳动物 GSH

的组分. 离体实验表明, 锯缘青蟹脑中 GSH 生物活性与性腺发育周期有关: 在发育早期 GSH 生物活性很弱, 随着卵巢发育成熟, GSH 生物活性逐步增强^[15]. 本研究中, 发育早期的雌蟹和精原细胞期的雄蟹, 检测不到阳性反应, 而在近成熟期雌蟹和精子细胞期雄蟹均有 FSH 与 LH 阳性反应. FSH 和 LH 的阶段性和表达与 GSH 生物活性变化一致, 从功能上进一步提示 FSH 和 LH 是 GSH 的组分.

在雌性脊椎动物, FSH 能促使卵泡的生长、发育和成熟, 还能促使卵巢颗粒细胞产生雌激素和诱发卵子对其他激素的敏感性; LH 能促使成熟卵子从卵巢卵泡中释放. 在雄性脊椎动物, FSH 促使 Sertoli 细胞合成并分泌雄激素结合蛋白; LH 调节 Leydig 细胞的雄激素合成^[8]. 昆虫脑中也有促性腺激素(尚未清楚其化学结构), 昆虫性腺成熟及精卵成熟也依赖脑分泌的促性腺激素调节, 它能诱导卵巢和精巢合成蜕皮激素, 而蜕皮激素能促使脂肪体合成卵黄原蛋白、卵泡细胞分化以及刺激精子的发生^[16]. 锯缘青蟹 FSH 和 LH 在生殖期(成熟期雌蟹和精子细胞期雄蟹)均有表达, 预示着其对精卵发生的重要性. 在锯缘青蟹卵巢发育的近成熟期, 卵母细胞已经形成并积累大量卵黄物质, 细胞体积迅速增大并发育为成熟卵, 卵泡进一步生长发育成熟^[17,18]. 此期 FSH 表达较高, 显示 FSH 参与卵母细胞发育、卵黄发生以及卵泡的发育成熟. 近成熟期锯缘青蟹 LH 表达较弱, 则可能与 LH 排卵的功能有关, 推测进入成熟期和排卵期, LH 将有较强的表达. 在精子细胞期雄蟹, FSH 和 LH 都有阳性表达, 应与精母细胞成熟及精子形成有关. 锯缘青蟹 FSH 和 LH 的作用机制是否与脊椎动物抑或昆虫相似, 很值得进一步研究.

根据 FSH, LH 在锯缘青蟹脑中的分布与表达, 以及 FSH, LH 和 GSH, GTH 之间关系的探讨, 我们认为: (1) 锯缘青蟹 GSH 的组分含有 FSH 和 LH; (2) 锯缘青蟹与脊椎动物的 FSH, LH 在分子结构上具有相当高的同源性; (3) 甲壳动物 GSH 和脊椎动物 GTH 应是同物不同名的关系, 建议将甲壳动物 GSH 改名为 GTH.

参 考 文 献

1 Ostu T. Biohormonal control of sexual cycle in the freshwater

- crab, *Potamon dehaani*. Embryologia, 1963, 8: 1—20
- 2 Gomez R. Acceleration of development of gonads by implantation of brain in the crab, *Parathelphusa hydrodromus*. Naturwissenschaften, 1965, 52: 216
- 3 Fingerman M. Endocrine mechanism of crustacean. J Crust Biol. 1987, 7(1): 1—24
- 4 EastmanReks S, Fingerman M. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comp Biochem Physiol. 1984, 79A: 679—684
- 5 Kulkarni G K, Glade L, Fingerman M. Oogenesis and effects of neuroendocrine tissue on *in vitro* synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). J Crust Biol, 1991, 11: 513—522
- 6 Yano I. Ultraintensive culture and maturation in captivity of penaeid shrimp. In: CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture. 2nd ed. Vol 1, Boca Raton: CRC Press, 1993. 289—313
- 7 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. 水产学报, 2001, 25(1): 5—10
- 8 陈大元. 受精生物学. 北京: 科学出版社, 2000, 20—22
- 9 Zukowska A M. Effect of hypophyseal gonadotropins (FSH and LH) on the ovaries on the sand shrimp *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). Marine Biology, 1981, 63(3): 241—248
- 10 李少菁, 王桂忠. 锯缘青蟹繁殖生物学及人工育苗和养成技术的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 552—565
- 11 上官步敏, 刘正琮, 李少菁. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察. 水产学报, 1991, 15(2): 96—101
- 12 叶海辉, 李少菁, 黄辉洋, 等. 锯缘青蟹精巢发育的组织学研究. 动物学研究, 2002, 23(2): 141—144
- 13 Verhaert P, De Loof A. Substances resembling peptides of the vertebrate gonadotropin system occur in the central nervous system of *Periplaneta americana* L: Immunocytological and some biological evidence. Insect Biochemistry, 1986, 16(1): 191—197
- 14 苏晓红, 奚耕思, 李 柯. 促性腺激素在白蚁脑中的免疫细胞化学定位. 动物学报, 2004, 50(2): 240—244
- 15 金朱兴, 叶海辉, 李少菁, 等. 锯缘青蟹神经器官对卵巢发育的调节作用: 离体实验. 海洋科学, 2003, 27(1): 77—79
- 16 De Loof A, Baggerman G, Breuer M, et al. Gonadotropins in insects: An overview. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 2001, 47(3): 129—138
- 17 颜素芬, 李少菁. 上官步敏. 锯缘青蟹卵母细胞的卵黄发生. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(3): 430—436
- 18 成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵母细胞和卵泡细胞之间的结构变化. 动物学报, 2002, 48(1): 80—92