

罗氏沼虾胸神经节中 促进卵母细胞发育的激素的初步分离*

孙继贤 廖家遗

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

提 要 罗氏沼虾成虾的胸神经节匀浆经 Sephadex-G50 柱层析所得第 2 个峰, 再经 HPLC 分离得到 9 个组分. 第 1 个组分和罗氏沼虾 III 期卵巢小块一起体外培养 36h, 可使卵母细胞的直径较对照组非常显著地增大 ($P < 0.01$), 这种增大卵母细胞直径的能力随该组分中蛋白质浓度的增加而增加. 在该组分中的激素分子量在 1.3kDa 左右. 结果显示罗氏沼虾胸神经节能分泌促进卵母细胞发育的激素.

关键词 罗氏沼虾 胸神经节 卵母细胞发育 激素 分离

分类号 Q575+

Otsu^[1]及 Hinsch 和 Bennent^[2]发现将蟹的胸神经节植入蟹体内可以加速同种蟹的卵巢发育; Yano^[3]将美洲龙螯虾 (*Homarus americanus*) 的胸神经节植入南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 体内能促进其卵巢发育; Eastman-Reks 和 Fingerman^[4]将繁殖活跃期蟹的胸神经节的抽提液注入同种蟹体内可使其性腺体重指数增加, 而非繁殖活跃期蟹的胸神经节的抽提液却无此作用. Takayanagi 等^[5]发现胸神经节的抽提液能使体外培养的虾卵母细胞直径增大, 注射入虾体内也使其卵巢发育加快. 这些研究结果均提示虾、蟹胸神经节可分泌促进其性腺发育的激素 (gonad-stimulating hormone, GSH), 但尚未见对其进行分离的报道. 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 是一种重要的淡水经济虾类, 对其脑中的促性腺激素已有报道^[6], 但对其胸神经节中促进卵巢发育的激素却未见任何的报道.

1 材料与方 法

1.1 胸神经节抽提液制备

罗氏沼虾成虾购自市场. 冰浴后解剖出胸神经节. 冰浴下匀浆. 低温离心, 上清液加 79%-85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 低温离心 15min, 速度 15000 转/min. 沉淀加 PBS 溶解. 重复沉淀、离心、溶解 2 次, 最后溶液为胸神经节抽提液. 该溶液为每 mL 含 500 个胸神经节的抽提物. -40°C 保存.

1.2 活性组分分离

* 国家自然科学基金资助项目 (30070105).

2001-08-28 收稿; 2002-11-10 收修稿. 孙继贤, 男, 1973 年, 助教, 现在广州中医药大学工作.

将上述抽提液 1.5mL 上 Sephadex-G50 柱 ($\Phi 1.6\text{cm} \times 50\text{cm}$), 用 $0.01\text{mol/L NH}_4\text{HCO}_3$ 洗脱, 流速 12mL/h . 合并所得第 2 个峰各管, 冰冻干燥. 加双蒸水溶解, 用紫外吸收法测定蛋白浓度为 5.2mg/mL . 再经高效液相色谱仪 (HP1100 型, 惠浦公司生产), 用 Carbonhydrate analysis 柱 ($3.9\text{mm} \times 390\text{mm}$, Waters) 洗脱, 上样量 $200\ \mu\text{L}$ /次, 流速 0.8mL/min . 洗脱液: B 液: 乙腈 (含 0.05% 三氟乙酸), C 液: 0.05% 三氟乙酸的水溶液. 按大的峰区分组分, 共得 9 个组分, 分别人工收集. 各组分分别冻干, 用双蒸水稀释至每毫升含 500 个胸神经节的 HPLC 产物 (简称 HPLC 产物), -40°C 保存.

1.3 活性检测

1.3.1 HPLC 产物不同组分对罗氏沼虾离体培养卵母细胞直径的作用 由于 HPLC 产物第 2 组分用于其它实验, 已不够用于此实验, 故本实验仅用 HPLC 产物的 1, 3-9 共 8 个组分来筛选其中有无活性组分.

调节对照组分 (罗氏沼虾肌肉抽提液) 的蛋白质浓度与 HPLC 产物各组分中的最高蛋白浓度相等 ($35.8\ \mu\text{g/mL}$, 相当于每 mL 含有 12.5 个胸神经节的 HPLC 产物). $0.2\ \mu\text{m}$ 的滤膜除菌后, 各取 $100\ \mu\text{L}$ 加入 24 孔培养板的不同小孔中. 选取卵巢发育为 III 期^[7] 的罗氏沼虾, 体表消毒后解剖出卵巢, 用生理盐水冲洗后, 取中间膨大的部分均分成约 $2\text{mm} \times 2\text{mm} \times 3\text{mm}$ 小块, 放入各小孔中, 对照组和实验组均采用同尾虾的卵巢小块. 在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养 36h. 共 5 尾虾. 培养结束后, 吸出培养液, 在小孔中加入含 5% 福尔马林的虾生理盐水固定. 然后, 取出卵母细胞置于编了号的培养小皿中, 用双盲法对培养皿重新编号 (实验者不知道新编号与旧号码之间的关系), 在各皿中随机选取 15 个较大的卵母细胞, 于当日在解剖显微镜下用显微测微尺测量直径.

1.3.2 不同蛋白浓度的 HPLC 活性组分促卵母细胞的直径增大作用 HPLC 活性组分终浓度设三个梯度: $28.6\ \mu\text{g/mL}$, $14.3\ \mu\text{g/mL}$, $7.2\ \mu\text{g/mL}$. 对照组 1 为实验刚开始时未作培养的虾卵母细胞直径, 对照组 2 (罗氏沼虾肌肉抽提液) 蛋白浓度为 $28.6\ \mu\text{g/mL}$. 培养方法和卵母细胞直径测量同 1.3.1.

1.4 活性组分的分子量测定

用 REFLEX-III 基体辅助激光解析电离飞行时间质谱仪 (德国 BRUKER 公司生产), 方法参照 Wainwright et al^[8]. 以 HCCA (2-羟基 4-羟基肉桂酸) 为基体, 加速电压 25KV , 上样品量 $10\ \mu\text{L}$, 以脑啡肽作为分子量参照物, 记录质谱图, 确定分子量.

2 结果

2.1 活性组分分离

图 1 所示: 经凝胶层析所得的第二个峰的样品再经 HPLC 后产生许多组分, 其中 1、2、3、6、7、9 组分的峰最突出.

2.2 活性检测

2.2.1 HPLC 不同组分对培养的卵母细胞直径的作用 由 HPLC 产物第 1、3、4、5、6、7、8、9 组分进行离体培养实验的结果 (图 2) 看出, 第 1 组分经 36h 与卵巢共培养后卵母细胞直径达 $470.0 \pm 3.2\ \mu\text{m}$, 其余组分与卵巢共培养后卵母细胞直径仅达 $388.8 \pm 5.4\ \mu\text{m}$.

414.8±11.9 μm, 对照组仅为 385.4±9.7 μm, HPLC 产物第一组分促卵母细胞直径增大作用与其它组分和对照组的作用之间存在非常显著差异 (P<0.01)。因此, 第 1 组分为可使体外培养的卵母细胞直径增大的活性组分。

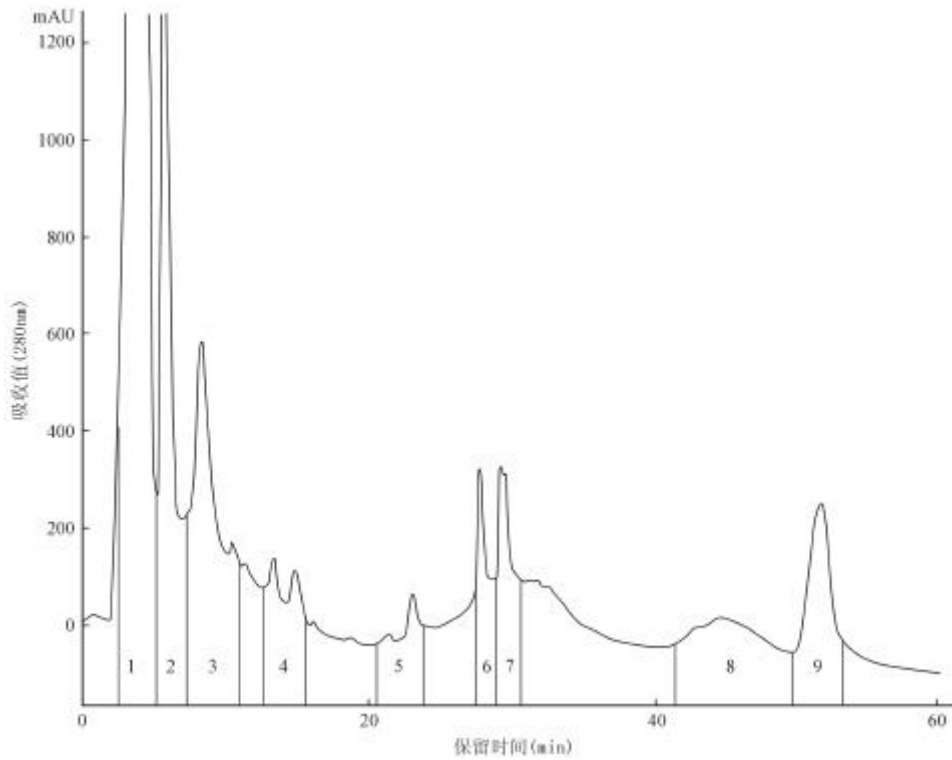


图 1 罗氏沼虾胸神经节抽提液经 Sephadex G-50 分离所得第 2 个峰再经 HPLC 分离的色谱图
Fig. 1 HPLC on a carbohydrate analysis column of the second peak from Sephadex G-50 chromatography of thoracic ganglion extracts of *M. rosenbergii*

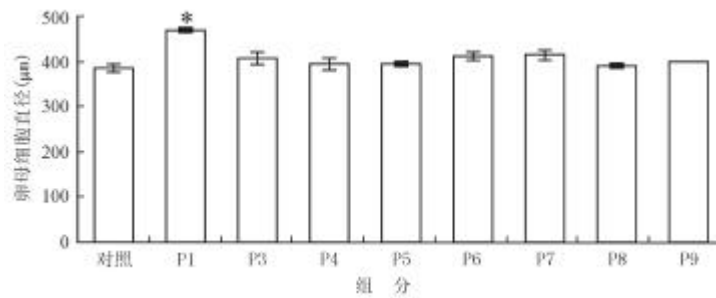


图 2 罗氏沼虾胸神经节 HPLC 各组分对离体卵母细胞直径的作用
Fig.2 Effects on oocyte diameter in vitro of HPLC fractions from thoracic ganglion extracts of *M. rosenbergii* (number of prawn:5, oocyte number of each prawn:15) *P<0.01

2.2.2 不同蛋白浓度的 HPLC 活性组分促体外培养的卵母细胞直径增大的作用 由图 3 可看出, HPLC 活性组分(第 1 组分)促卵母细胞直径增大的作用随着培养所用组分的蛋白浓度的增加而增加. 蛋白浓度为 7.2、14.3 和 28.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的活性组分使培养的卵母细胞直径分别达到 395.3 ± 12.9 、 436.3 ± 23.8 和 $457.9 \pm 7.7 \mu\text{m}$, 与对照组 1 的 325.7 ± 4.7 、对照组 2 的 $342.5 \pm 6.5 \mu\text{m}$ 之间存在显著 ($P < 0.05$) 或非常显著的差异 ($P < 0.01$). 这些结果再一次证明经 HPLC 所得第 1 活性组分具有促进体外培养的卵母细胞直径增大的作用.

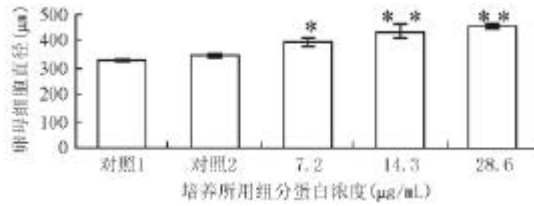


图 3 罗氏沼虾不同蛋白浓度的胸神经节 HPLC 活性组分(第 1 组分)对离体卵母细胞直径的作用
 Fig.3 Effects on oocyte diameter in vitro of different protein concentration of HPLC active fraction from thoracic ganglion extracts of *M.rosenbergii*.(prawn number:5; oocyte number of each prawn:15) * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.3 活性组分(第 1 组分)的分子量

根据激光飞行时间质谱图(图 4), 可知活性组份的分子量为 1.3kDa 左右.

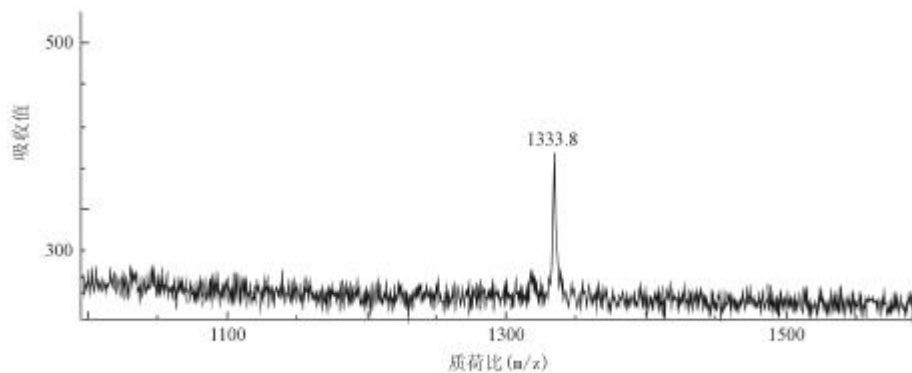


图 4 HPLC 活性组分(第 1 组分)的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱图
 Fig.4 Profile of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry of the HPLC active fraction

3 讨论

卵母细胞直径的增大一直普遍认为是卵母细胞发育和卵巢发育得到促进的标志^[5, 9]. 本研究中, 罗氏沼虾胸神经节抽提液经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、凝胶层析、HPLC 所得的第 1 组分使离体培养的卵母细胞较对照组明显增大, 并且此增大作用随组分中蛋白浓度的增加

而增加, 这说明第 1 组分中含有可促进卵母细胞发育的蛋白质类激素, 而且该激素可以直接作用于卵母细胞或通过包围卵母细胞的滤泡细胞作用于卵母细胞. 这一结果和 Takayanagi 等^[5]和 Sarojini 等^[9]用胸神经节和卵巢小块一起体外培养所得结果是一致的.

印度对虾 (*P. indicus*) 的脑和胸神经节的神经分泌细胞的分泌活动和卵巢的发育密切相关^[10], 即卵巢未成熟的虾, 其神经分泌细胞多处于分泌的静止期; 而卵巢在成熟和已成熟的虾, 其神经分泌细胞多处于分泌的活跃期. 神经分泌活动的变化和卵巢发育相关的现象在一种沼虾 (*M. lankesteri*)^[11]和一种溪蟹 (*Potamon kooloense*)^[12]的发育过程中也观察到. 这些研究结果和本研究以及 Hinsch 和 Bennent^[2]、Yano^[3]、Eastman-Reks 和 Fingerman^[4]、Takayanagi 等^[5]的研究结果都表明虾和蟹的胸神经节是能分泌促进卵巢发育的激素 (GSH) 的. 有证据显示虾脑也分泌促进卵巢发育的激素^[6,13]. 与此相反, 虾蟹眼柄中的 X 器官却能分泌性腺抑制激素 (gonad-inhibiting hormone, GIH)^[14,15], 它抑制卵巢的发育, 此种激素已经分离纯化出来了. 这就表明, 可能和许多其他动物一样, 虾蟹的卵巢发育也是受作用相反的两种激素调节的.

参 考 文 献

- 1 Otsu T. Bihormonal control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*. *Embryologia*, 1963,8:1-20
- 2 Hinsch G W, Bennent D C. Vitellogenesis stimulated by thoracic ganglion implants into destalked immature spider crab, *Libinia emarginata*. *Tissue and Cell*, 1979, 11 :345-351
- 3 Yano I, Tsukimura B, Sweeney J N, et al. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. *J World Aquacul So*, 1988, 19:204-209
- 4 Eastman-Reks 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 Takayanagi H, Yamamoto Y, Takeda N. An ovary-stimulating factor in the shrimp, *Paratya compressa*. *J Exp Zool*, 1986, 240:203-209
- 6 廖家遗, 张艳, 孙继贤等, 罗氏沼虾脑促性腺素的初步分离及活性检测. *水产学报*, 2001, 25 (1): 5-10
- 7 Damrongphol P, Eangchuan N, Poolsanguan B. Spawning cycle and oocyte maturation in laboratory-maintained giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*, 1991, 95:347-357
- 8 Wainwright G, Webster S G, Wilkinson MC, et al. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. *J Biol Biochem*, 1996, 271 (22):12749-12754
- 9 Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M. Mode of action of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine in stimulating ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: an in vivo and in vitro study. *J Exp Zool*, 1995, 271:395-400
- 10 Mohamed K S, Diwan A D. Neuroendocrine regulation of ovarian maturation in the Indian white prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Aquaculture*, 1991, 98:381-393
- 11 Rao Ch N, Shakuntala K, Reddy S R. Studies on the neurosecretion of thoracic ganglion in relation to reproduction of female *Macrobrachium lankesteri* (de Man). *Proc Indian Acad Sci (Anim Sci)*, 1981, 90:503-511
- 12 Joshi P C. Neurosecretion of brain and thoracic ganglion and its relation to reproduction in the female crab *Potamon kooloense* (Rathbun). *Proc Indian Acad Sc (Anim Sci)*, 1989, 98 (1):41-49

- 13 Yano I. Ultraintensive culture and maturation in captivity of penaeid shrimp. In: McVey J P, ed. CRC handbook of mariculture: Crustacean aquaculture. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1993: 289-313
- 14 Quackenbush L S, Herrnkind W F. Partial characterization of eyestalk hormones controlling molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus argus*. J Crust Biol, 1983, 3: 34-44
- 15 Soyez D, Van Deijner J E, Matin M. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*. J Exp Zool, 1987, -: 479-484

Preliminary Isolation of A Hormone Stimulating Oocyte Development from Thoracic Ganglion of the Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

SUN Jixian & LIAO Jiayi

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, P.R.China)

Abstract

The extracts of thoracic ganglion from adult *Macrobrachium rosenbergii* were chromatographed on a Sephadex G-50 column, the resulting second peak was further isolated by HPLC, and 9 fractions were obtained. Among the fractions only the first fraction significantly increased the oocyte diameter *in vitro* of the stage III ovary in *M. rosenbergii*. The increasing effects were depended on the protein concentration of the fraction for culture. The molecular weight of the substance in the fraction 1 was about 1.3kDa. The results show that the thoracic ganglion of *M. rosenbergii* can secrete peptide hormone which stimulates the oocyte development of the prawn.

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*; thoracic ganglion; oocyte development; Hormone; isolation