

KK-42 对日本沼虾蜕皮前期外骨骼结构 及 NAGase 活力的影响

吕艳杰,陈香丽,宁黔冀

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要: 近期研究发现,适宜浓度的 KK-42 处理能显著缩短日本沼虾幼虾蜕皮周期. 新旧表皮的更替是蜕皮的重要事件,蜕皮前期是表皮外骨骼结构变化最剧烈的时期. 据此,从组织学水平观察了幼虾头胸甲外骨骼结构以及 KK-42 的影响,定量分析了肝胰腺 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)在 KK-42 处理后不同时间的活力. 将处于蜕皮前期(D₁₋₄)、体长(3.3±0.5) cm 的日本沼虾随机分为两组,分别用 1.95×10^{-4} mol·L⁻¹ 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,处理后不同时间,组织学方法观察头胸甲外骨骼结构,分光光度法测定肝胰腺 NAGase 活力. 结果显示, KK-42 处理后第 3 d, D₃ 期和 D₄ 期幼虾头胸甲表皮厚度与对照组相比分别提高 29.76% 和 35.23% ($P < 0.01$); KK-42 处理后 12 h, D₃ 期和 D₄ 期肝胰腺 NAGase 活力显著高于对照组. 结果表明, KK-42 处理可显著增加蜕皮前期日本沼虾头胸甲表皮外骨骼的厚度,并对肝胰腺 NAGase 活力具有诱导作用.

关键词: KK-42; 日本沼虾; 外骨骼结构; NAGase

中图分类号: Q174

文献标志码: A

甲壳动物坚硬的表皮是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^[1]. 对斑节对虾(*Penaeus monodon*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的研究显示^[2,3],蜕皮间期的外骨骼自外而内由四层非细胞结构组成:上表皮(epicuticle)、外表皮(exocuticle)、内表皮(endocuticle)和膜质层(membranous layer). 上表皮一般最薄,外表皮和内表皮的厚度则因物种而异,通常情况下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. 在构成表皮的多种有机物中,几丁质是一个主要组成成分,它的代谢过程与蜕皮息息相关^[3]. 参与甲壳动物几丁质代谢的酶很多,其中包括 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAGase),它是几丁质酶解途径的末端酶,可将几丁质分解形成 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖. 大量研究表明, NAGase 受蜕皮激素的调节,与甲壳动物顺利完成周期性蜕皮密切相关^[4-5].

我们实验室前期研究证明,适量浓度的 KK-42 处理能促进凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[6]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)幼虾的生长. 近期研究发现, KK-42 可缩短日本沼虾幼虾的蜕皮周期(结果未示),对血淋巴 20-羟蜕皮酮滴度有显著的刺激作用^[9]. 幼虾的生长通过周期性的蜕皮实现,新旧表皮的更替是蜕皮的重要事件,蜕皮前期是表皮结构变化最剧烈的时期^[7],据此,本文从组织学水平观察了幼虾头胸甲外骨骼结构以及 KK-42 的影响,定量分析了肝胰腺 NAGase 在 KK-42 处理后不同时间的活力,为阐明 KK-42 缩短日本沼虾蜕皮周期的机制积累资料.

收稿日期: 2014-09-04; **修回日期:** 2015-06-10.

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究项目(142300410021).

第 1 作者简介: 吕艳杰(1978—),河南新乡人,河南师范大学讲师,博士研究生,研究方向为甲壳动物生长发育的内分泌调控.

通信作者: 宁黔冀(1964—),河北邯郸人,河南师范大学教授,博士,研究方向:甲壳动物生长发育调控, E-mail: nqjnqj1964@163.com.

1 材料方法

1.1 实验材料

将500尾体长(3.3±0.5) cm的健康日本沼虾在实验室适应性暂养一周后,随机分为2组:处理组用 $1.95 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的KK-42溶液浸泡处理1 min^[5],取出,迅速控除水分后,按正常方式饲养;对照组用不含KK-42的溶液处理,方法同上.选取处于蜕皮前期不同阶段(D₁₋₂、D₃、D₄)(蜕皮周期的鉴定参照文献^[8])的幼虾进行组织学实验,在处理第3 d取头胸甲表皮组织,每个时间点3只动物,每个组织观察15张切片用于数据测量. KK-42处理后12 h,取蜕皮前期(D₁₋₄)幼虾的肝胰腺用于NAGase活力分析,实验均设置3个重复.

1.2 实验方法

外骨骼组织形态的观察:取D₁₋₂、D₃、D₄期的日本沼虾头胸甲表皮组织,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^[9]. 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 μm,过碘酸-Schiff(PAS)和苏木精染色.

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的测定:日本沼虾幼虾肝胰腺NAGase活力的测定参照文献^[5]的方法.简言之,按1:3比例向肝胰腺中加入预冷的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液,匀浆,离心(12 000 r·min⁻¹, 10 min),上清液即为粗酶液. 2 ml的反应体系包含 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷、20 μL酶液,37℃反应10 min, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH终止反应,分光光度计测定波长405 nm处的OD值.

2 结果

2.1 蜕皮前期日本沼虾头胸甲外骨骼的结构

日本沼虾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,蜕皮前期与蜕皮间期相比,上皮细胞层增厚有所增加;蜕皮前期的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.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,着色较浅.在蜕皮前期的早期(D₁₋₂期),内表皮被染成浅粉色,处理组与对照组之间各层结构比较接近,着色和厚度无明显差异(图1:a和d).到蜕皮前晚期的D₃期,新形成的上表皮着色加深,外表皮和内表皮有所增厚(图1:b和e).至D₄期,新上表皮结构清晰可见,处理组外骨骼各层结构的厚度较D₃期均有明显增加,且与对照组相比,变化较为显著(图1:c和f).

2.2 KK-42对蜕皮前期日本沼虾头胸甲外骨骼厚度的影响

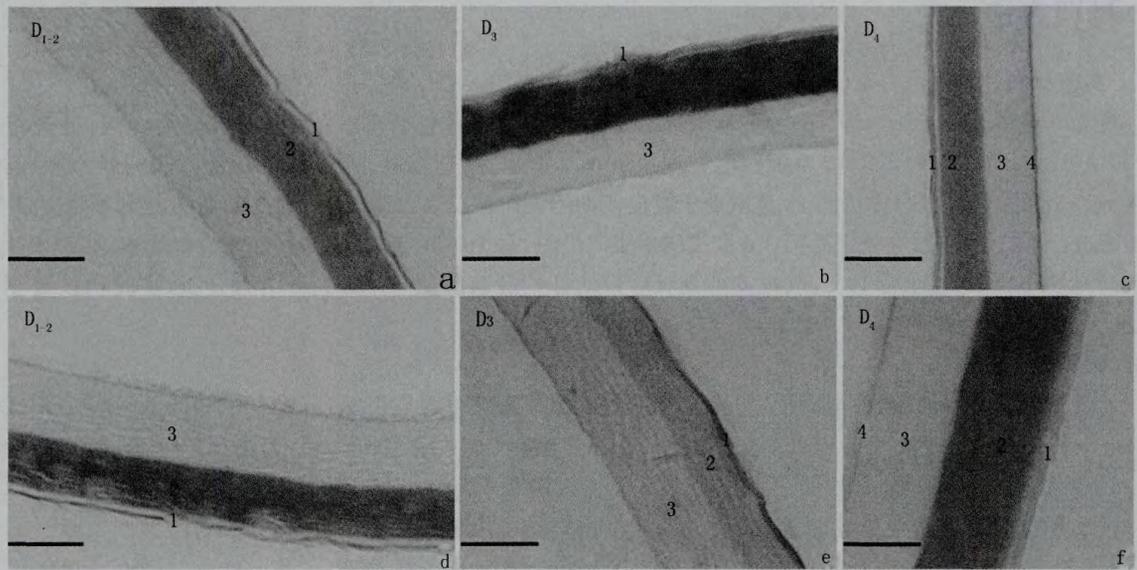
KK-42处理后第3 d,在蜕皮前期的早期D₁₋₂期,处理组与对照组相比无统计学差异;D₃期处理组内表皮厚度明显增加,上表皮和外表皮变化不明显(图1:b、d),外骨骼总厚度增加29.76%($P < 0.01$);D₄期,处理组上表皮、外表皮和内表皮较对照组均有所增厚(图1:e、f),外骨骼总厚度增加35.23%($P < 0.01$)达到极显著差异.

2.3 KK-42对蜕皮前期日本沼虾肝胰腺NAGase活力的诱导作用

在实验观察期间,对照组NAGase活力在蜕皮前期的不同阶段呈波动性变化;KK-42处理后12 h,处于D₃期和D₄期的日本沼虾肝胰腺NAGase活力与对照组相比,均有所提高,达到极显著和显著性差异(图3).

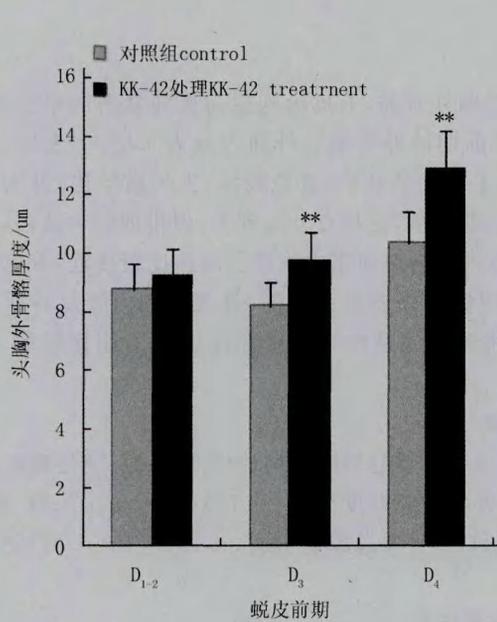
3 讨论

甲壳动物的表皮结构在蜕皮间期逐渐趋于稳定,进入到蜕皮前期,伴随着新表皮的形成,原有的旧表皮分解速度开始加快,结构也发生相应的变化.前期研究表明,在KK-42处理后第3 d,处于D₃期的幼虾表皮厚度明显增加^[10],因此,本文选择第3 d作为表皮外骨骼结构观察的时间点.结果显示,KK-42可明显增加

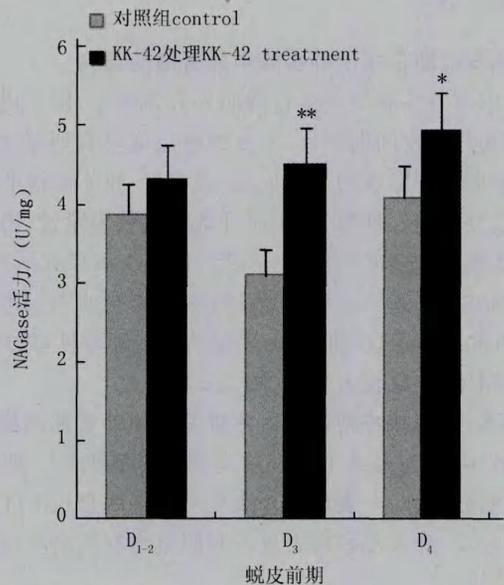


D1-2, D3, D4: 蜕皮前期的各个阶段; a、b、c: 对照组; d、e、f: KK-42处理组; 1: 上表皮; 2: 外表皮; 3: 内表皮; 4: 新上表皮; 标尺: 10 μm

图 1 蜕皮前期日本沼虾头胸甲外骨骼组织结构



“**”表示与相应的对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$)
图 2 KK-42对蜕皮前期日本沼虾头胸甲外骨骼厚度的影响



“**”表示与相应的对照组比有极显著差异 ($P < 0.01$);
“*”表示与相应的对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)
图 3 KK-42对蜕皮前期日本沼虾肝胰腺NAGase活力的诱导

D₃、D₄期幼虾表皮外骨骼的厚度,而对D₁₋₂期的影响不大(图2),这可能与KK-42对肝胰腺NAGase活力的诱导有关(图3).NAGase是几丁质降解的限速酶,肝胰腺合成分泌的NAGase蛋白可能通过某种途径(如血淋巴)运输至表皮,加快了外表皮中几丁质的降解,形成的产物N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖提高了组织的渗透压,促进了表皮外骨骼(主要是外表皮和内表皮)对水的吸收,导致表皮外骨骼显著增厚.对地蟹(*Gecarcinus lateralis*)的研究发现,蜕皮前期上皮细胞高度逐渐增加,提示细胞的代谢活动增强^[11],我们也发现此时期表皮上皮细胞的高度增加(结果未示),推测源自该细胞的NAGase活力升高;另外,甲壳动物内表皮中的部分有机物、糖类等,在D₀₋₂期被蜕皮液降解^[2-3],其中的几丁质纤维因失去相互间的联系而变得较为松

散,这可能也是D₃,D₄期表皮外骨骼增厚的原因之一,有待于今后亚显微水平的观察研究.本实验室前期研究发现,KK-42处理能显著缩短日本沼虾幼虾的蜕皮周期,增厚的表皮外骨骼是否作为蜕皮提前“启动”的物质条件之一,尚待进一步研究.

总之,研究结果表明,KK-42对蜕皮前期日本沼虾幼虾肝胰腺NAGase活力有显著的诱导作用,这可能是其增加D期幼虾表皮外骨骼厚度的机制之一.

参 考 文 献

- [1] 杨万喜,周宏.中华绒螯蟹雌体腹肢外骨骼组织学初步研究[J].东海海洋,2000,18(3):29-34.
- [2] Waraporn P, Piyakorn B, and 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] 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[J].水生生物学报,2013,37(5):899-904.
- [4] 张继平.锯缘青蟹N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的性质及活力调控的研究[D].福建:厦门大学,2006.
- [5] 黄小红,王寿昆,黄一帆,陈宏惠.日本沼虾N-乙酰-β-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.
- [6] Ning Q J, Fu S G, Xu X J, He J T. 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] 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[J].河南师范大学学报:自然科学版,2013,41(4):124-127.
- [8] Promwikorn W, Kirirat P, Thaweethamseewee P. Index of molt staging in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) [J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology,2004,26(5):765-772.
- [9] Zhou F, Wu Z, Wang M, 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.
- [10] 吕艳杰,陈香丽,郭爱莲,等.KK-42对日本沼虾D₃期头胸甲表皮结构的影响[J].水产学报,2014,38(12):1964-1969.
- [11] Skinner D M. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle[J]. Biological Bulletin,1962,123(3):635-647.

Effect of KK-42 on the Exoskeleton Structure and NAGase Activity in *Macrobrachium Nipponense* During Premolt

LYU Yanjie, CHEN Xiangli, NING Qianji

(College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang 453002, China)

Abstract: Our current study shows that the duration of molting cycle is shortened by KK-42 in the juvenile prawn *Macrobrachium nipponense*. One of the key events during molting cycle is the replacement of old cuticle with a new one. During premolt the cuticle structure changes considerably, thus 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. Prawns with body length of (3.3±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 1.95×10⁻⁴ mol·L⁻¹ (KK-42 treatment group) or 0 mol L⁻¹ (control group), respectively. Afterwards, the carapaces derived from stage D₁₋₂, D₃ or D₄ prawns were separately chosen to be used to histological observation and thickness measurement of layered exoskeleton, meanwhile, the hepatopancreas NAGase activity was quantitatively analyzed. The results showed that the exoskeleton thickness of carapace at stage D₃ and stage D₄ significantly increased by 29.76% (P<0.01) and 35.23% (P<0.01) compared with the corresponding control at the 3rd day after KK-42 treatment. The NAGase activity at stage D₃ and stage D₄ significantly increased at 12 h after KK-42 administration compared to the corresponding control. The results reveal that KK-42 treatment can significantly increase the cuticle thickness of exoskeleton, and promote NAGase activity from hepatopancreas.

Keywords: KK-42; *Macrobrachium nipponense*; exoskeleton structure; NAGase