

维生素 C 对中华绒螯蟹雄性生殖的影响*

王 群 丁银娣 赵云龙 陈立侨**

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要: 采用不同 Vc 的人工配合饲料,研究了 Vc 对中华绒螯蟹雄性生殖的影响。实验分为 5 组,其添加量分别为 0 mg/100 g 饲料(实验 1 组)、200 mg/100 g 饲料(实验 2 组)、400 mg/100 g 饲料(实验 3 组)、600 mg/100 g 饲料(实验 4 组)和 800 mg/100 g 饲料(实验 5 组),实验为期 50 d。结果如下:1)肝胰腺、精巢和副性腺中 Vc 的积累量以实验 3 组最高,分别为 2.261 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ 、10.217 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$ 、7.661 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$; 2)肝体指数和性腺指数以实验 3 组最高,分别为 0.052 3 和 0.026 8; 3)增重率同样以实验 3 组最高,实验 1 组最低,分别为 31.33% 和 2.12%; 4)睾酮含量以实验 2 组最高,为 1.257 ng/ml,但实验 3 组的睾酮含量与实验 2 组接近; 5)SOD 酶活性与其 Vc 含量呈负相关,且精巢和副性腺的酶活性高于肝胰腺。结果表明:适量添加 Vc 可促进雄蟹肝胰腺、精巢和副性腺对 Vc 的积累,同时可促进精巢的发育及睾酮的分泌,而过量添加可能会对精巢的发育产生不良影响;河蟹体内的抗氧化系统之间存在着相互的协调和平衡,生殖期性腺对其自身的抗氧化保护需求要高于其它组织。

关键词: 中华绒螯蟹;雄性;生殖;维生素 C

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)02-01-05

Influence of Dietary Vitamin C on Reproduction of Male Chinese Mitten-handed Crab (*Eriocheir sinensis*)

WANG Qun DING Yin-Di ZHAO Yun-Long CHEN Li-Qiao

(College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The influence of dietary vitamin C (Vc) on reproduction of male Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) was studied. Different levels of Vc were supplemented in diets, in order to clarify the effect of Vc on male reproduction. There were 5 groups in the experiment, and the Vc supplement levels were 0 mg/100 g feed (group 1), 200 mg/100 g feed (group 2), 400 mg/100 g feed (group 3), 600 mg/100 g feed (group 4), and 800 mg/100 g feed (group 5), respectively. Male crabs weighted 70 ~ 80 g on average were separately fed with one of the test diets. The feeding experiment was carried out indoor for 50 days. The results showed that 1) Vc contents of hepatopancreas, testis, and glandula accessoria in group 3 were 2.261 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$, 10.217 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$, and 7.661 $\mu\text{g}/\text{mg prot}$, respectively, higher than those of the other groups; 2) Hepatopancreas indexes and GSI in group 3 were the highest (0.052 3 and 0.026 8) among the five groups; 3) The rate of weight gain of group 3 (23.28%) was the highest and the group 1 was the lowest (12.5%); 4) The concentration of testosterone in group 2 was the highest (1.257 ng/ml), followed by group 3;

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30271012, 30300265);

** 通讯作者;

第一作者介绍 王群, 35 岁, 男, 副教授, 博士; 从事甲壳动物生殖生物学研究; E-mail: qwang@bio.ecnu.edu.cn.

收稿日期: 2003-04-20, 修回日期: 2004-02-02

5) The SOD activity of each tissue had a negative correlation with the content of Vc and SOD activity in testis and glandula accessoria was higher than that in hepatopancreas. The data suggest that a proper supplement of dietary Vc is beneficial to Vc accumulation in hepatopancreas, gonad and glandula accessoria, and apparently stimulates both gonad development and sex hormone secretion. Antioxidation systems interact with each other in harmony and balance in this species, and gonad needs more antioxi daant protection than other tissues after the gonad gets matured.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Male; Reproduction; Vitamin C

维生素是机体维持正常生理功能所必需的营养素, 虾蟹等大部分水生动物由于缺乏古洛糖酸内脂氧化酶(gulonolactone oxidase), 而不能合成维生素 C(vitamin C, Vc)^[1,2], 必需由食物提供。Vc 不仅对虾蟹正常代谢活动、生长和抗病力等具有重要作用^[3], 而且可通过影响性激素的合成来调节其生殖过程^[4]。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的淡水经济蟹, 研究 Vc 对中华绒螯蟹雄性生殖的影响, 可为亲蟹培育中人工饵料的配制及生殖期的营养强化提供理论依据。

1 材料与方法

实验用蟹购自上海青浦, 均为一秋龄个体, 经实验室驯养一周后, 挑选出附肢健全、活力强

的雄性扣蟹 100 只, 随机分成 5 组, 每组 20 只, 规格见表 1。分别饲养于 45 cm × 45 cm × 40 cm 的无毒聚乙烯塑料箱中, 水深 10 ~ 15 cm, 自然光照及水温, 按常规法进行饲养管理。实验 1 组为未添加 Vc 组, 实验 2 组 Vc 添加量为 200 mg/100 g 饲料, 实验 3 组为 400 mg/100 g 饲料, 实验 4 组为 600 mg/100 g 饲料, 实验 5 组为 800 mg/100 g 饲料, 实验组饲料组成成分见表 1。每组设 2 个平行。实验始于 10 月 4 日, 为期 50 d。

增重率(%) = (实验结束后体重 - 实验前体重)/实验前体重;

性腺指数 = (精巢 + 输精管 + 副性腺)重量/体重;

肝体指数 = 肝胰腺重量/体重。

表 1 各实验组河蟹体重及饲料组分

饲料组成 (%)	蟹平均体重(g)				
	75.84 ± 13.16 (1 组)	74.83 ± 12.39 (2 组)	79.49 ± 12.03 (3 组)	78.17 ± 7.63 (4 组)	74.11 ± 7.41 (5 组)
酪蛋白	20	20	20	20	20
糊精	23	23	23	23	23
鱼粉	30	30	30	30	30
纤维素	16	15.8	15.6	15.4	15.2
混合矿 ^①	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
甘氨酸	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
氯化胆碱	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
胆固醇	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
鱼油	3	3	3	3	3
卵磷脂	1	1	1	1	1
粘合剂	2	2	2	2	2
复合维生素 ^②	2	2	2	2	2
Vc ^③	0	0.2	0.4	0.6	0.8

①每 100 g 混合矿含: NaH₂PO₄ 10.0 g; KH₂PO₄ 21.5 g; Ca(H₂PO₄)₂ · 2H₂O 26.5 g; CaCO₃ 10.5 g; Ca-Lactate 16.5 g; MgSO₄ · 7H₂O 10.0 g; AlCl₃ · 2H₂O 1.2 g; ZnSO₄ · 7H₂O 0.511 g; Fe-citrate 0.061 g; MnSO₄ · 4H₂O 0.143 g; KI 0.058 g; CoCl₂ · 6H₂O 0.176 g; KCl 2.8 g, CuCl₂ 0.051 g;

②复合维生素采用上海湘大新杨兽药有限公司生产的新杨维他, 每 1 000 g 含: Va 5 400 万 IU, Vd₃ 1 080 万 IU, Ve 20 000 IU, Vk₃ 5 000 mg, Vb₁ 2 000 mg, Vb₂ 15 000 mg, Vb₁₂ 30 mg, 泛酸钙 25 000 mg, 烟酸 30 000 mg, 叶酸 500 mg, 生物素 10 mg, 乙氧基喹啉 100 mg, 水分 ≤ 10%;

③Vc 采用浙江杭州高成生物营养技术有限公司生产的高稳西(稳定型维生素 C 微囊, 含量 93%)

睾酮含量的测定:用微量注射器从第三步足基部关节膜处抽取血淋巴 0.2 ml,溶于 1 ml 甲醇,4℃ 冰箱过夜,4 000 r/min 离心后取出上清液,重复一次,合并上清液,置 70℃ 水浴蒸干,加 1 ml GPBS(1% 明胶,0.1 mol/L),涡流混匀,-70℃ 低温冷藏待测。具体方法参见姜仁良等的方法^[5]。

睾酮含量测定采用美国 DSL-10-4000 ACTIVE™ Testosterone EIA 试剂盒,方法详见该产品说明书。其批内误差和批间误差的测定方法如下:任意配置两个睾酮含量不同的样品,其中一个样品含量相对较高(H),另一个样品含量相对较低(L)。用该试剂盒分别测定两个未知睾酮含量的样品,批内误差重复 16 次,批间误差测定 10 块板,然后计算批内误差和批间误差,结果见表 2。

表 2 睾酮试剂盒的批内误差和批间误差

	批内误差 (n = 16)		批间误差 (n = 10)	
	L	H	L	H
测定含量的平均值(ng)	0.63	2.42	0.66	7.61
测定含量的标准差	0.03	0.12	0.03	0.21
变异系数(%)	5.3	4.8	4.8	2.8
平均变异系数(%)	5.1		3.8	

Vc 含量、SOD 酶活性的测定采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,具体方法详见产品说明书。

2 结 果

2.1 肝胰腺、精巢和副性腺 Vc 含量及增重率的变化 肝胰腺、精巢和副性腺的 Vc 含量均以实验 3 组最高,实验 1 组最低,各组间对 Vc 的积累存在明显差异。实验 1 组肝胰腺含量仅为 1.262 μg/mg prot,而实验 3 组为 2.261 μg/mg prot,约为实验 1 组的 1.8 倍;实验 1 组精巢含量为 4.97 μg/mg prot,实验 3 组为 10.217 μg/mg prot,是实验 1 组的 2.1 倍;实验 1 组副性腺含量为 2.509 μg/mg prot,实验 3 组为 7.661 μg/mg prot,是实验 1 组的 3.1 倍。此外,同组间肝胰腺、精巢和副性腺对 Vc 的积累也存在明显差异,实验 3 组精巢和副性腺 Vc 含量分别为同组

肝胰腺含量的 4.5 倍和 3.4 倍左右(图 1)。

增重率以实验 3 组最高,为 23.28%;其次是实验 2 组,为 17.16%;实验 4 组、实验 5 组和实验 1 组的增重率较为接近,都明显低于实验 3 组,其中实验 1 组最低,仅为 12.5%,约为实验 3 组的 1/2(图 2)。

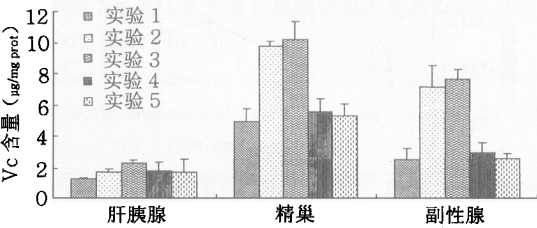


图 1 肝胰腺、精巢和副性腺内 Vc 含量的变化

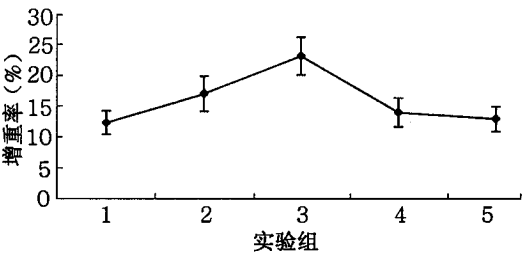


图 2 各实验组增重率的变化

2.2 肝体、性腺指数及睾酮含量的变化 肝体指数和性腺指数均以实验 3 组最高。实验 3 组肝体指数为 0.052 3,实验 2 组为 0.051 8,而实验 4 组和实验 5 组略低于实验 1 组,其中实验 5 组最低,仅为 0.044 7,占实验 3 组的 85.5%(图 3)。实验 3 组性腺指数最高,为 0.026 8,其次是实验 4 组,为 0.025 2,其余依次为实验 2 和实验 1 组,实验 5 组最低,为 0.022 3,占实验 3 组的 83.2%(图 4)。未添加 Vc 的实验 1 组的肝体指数要高于实验 4 组和实验 5 组,而其性腺指数虽低于实验 4 组,但仍高于实验 5 组。

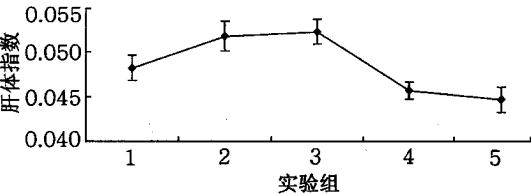


图 3 肝体指数的变化

睾酮含量以实验2组最高,为1.257 ng/ml,其次是实验3组,为1.154 ng/ml,实验1、4、5组较为接近,分别为0.9 ng/ml、0.839 ng/ml和0.804 ng/ml,分别占实验2组的71.6%、66.7%和64.0%(图5)。

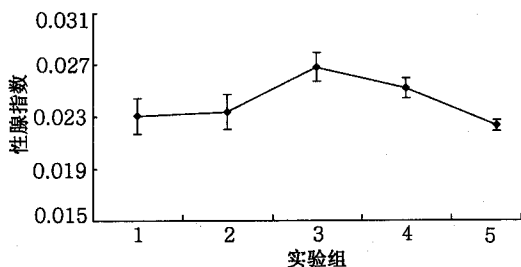


图4 性腺指数的变化

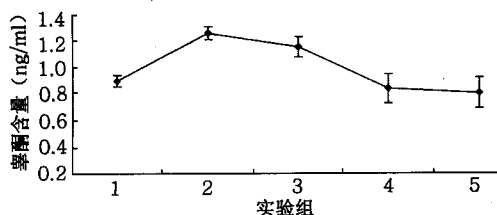


图5 血淋巴睾酮含量的变化

2.3 肝胰腺、精巢和副性腺 SOD 酶活性的变化 各组间肝胰腺、精巢和副性腺的 SOD 酶活性均以实验3组最低,分别为0.795 U/mg prot、9.623 U/mg prot和5.457 U/mg prot,而最高酶活性均出现在实验1组,分别为2.062 U/mg prot、19.351 U/mg prot和12.003 U/mg prot。实验1组肝胰腺、精巢和副性腺酶活性分别是实验3组对应器官酶活性的2.6倍、2.0倍和2.2倍。SOD 酶活性的变化规律正好和 Vc 含量的变化相反,即相应器官中 Vc 含量高的实验组其对应的 SOD 酶活性低,反之则高。组内肝胰腺、精

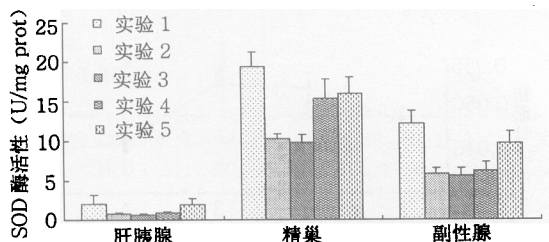


图6 肝胰腺、精巢和副性腺 SOD 活性的变化

巢和副性腺的 SOD 酶活性也同样存在差异,肝胰腺的 SOD 活性明显低于精巢和副性腺(图6)。

3 讨论

3.1 Vc 在体内的积累及对生长的影响 饵料 Vc 含量的增加,一定程度上会提高水产动物体内的 Vc 含量并达到饱和^[6,7],但当 Vc 含量大大超过其生理需求量时,则可直接从尿液中大量排出,而其吸收率也将随添加量的增大而减少^[8]。本研究的结果与上述结论相同,雄性中华绒螯蟹肝胰腺、精巢和副性腺内 Vc 含量同样随饵料 Vc 含量的增加而增加,并达到饱和(实验3组),而过量添加亦导致了上述器官中 Vc 含量的急剧下降(实验4、5组)。此外,本研究还发现肝胰腺、精巢和副性腺的 Vc 积累量存在差异,精巢和副性腺的积累明显大于肝胰腺,表明精巢和副性腺对 Vc 的需求要大于肝胰腺,这可能与实验雄蟹正处于生殖期(10~11月),需大量的 Vc 以提高精巢和生殖产物的抗氧化能力,保证精子的质量有关。

研究表明,Vc 可影响脱壳后甲壳动物外骨骼的硬化^[9],同时还可作为一种辅助因子加快蜕皮时胶原蛋白的形成^[10],从而影响甲壳类的蜕皮频率和蜕皮周期。在对美洲龙虾(*Homarus americanus*)的研究中发现,脱壳前其体内 Vc 含量会急剧增加^[11]。因此,Vc 对保证甲壳动物的顺利蜕皮,从而促进其快速生长具有重要作用^[9,12~15],但一旦超过其生理需要,则会对生长发育产生抑制作用^[7,16]。而本研究中增重率在一定范围内随饵料 Vc 添加量的增加而增加现象,进一步证实了 Vc 对河蟹生长发育的促进作用。当过量添加后,河蟹体内 Vc 的积累量和增重率的急剧下降,表明过量的 Vc 确实会抑制河蟹对 Vc 的吸收,并间接影响其生长发育。因此,适量的 Vc 对河蟹的生长发育是必需的。

3.2 Vc 对生殖的影响 目前的研究证实,Vc 可显著提高雄性动物的精子数、精子密度、排精量,降低畸形精子率和死精率^[17],同时与矿物质吸收和代谢之间存在一种相互的作用,这种

作用能影响甲壳动物性腺的发育^[18]。因此,Vc 与甲壳动物的生殖密切相关,这在许多甲壳动物雌体的研究中已经得到证实^[6]。

中华绒螯蟹雄蟹肝体指数和性腺指数与其肝胰腺和精巢的 Vc 含量有关,即在一定范围内,肝胰腺和精巢中 Vc 含量较高时,其相应的值也高,反之则低,说明 Vc 能促进肝胰腺和精巢的发育;但当 Vc 过量时,肝体指数和性腺指数均快速下降,提示过量的 Vc 对精巢和肝胰腺的发育可能产生抑制作用。从两者的下降幅度来看,过量 Vc 对肝胰腺的损伤作用要大于精巢,这与肝胰腺的功能有关。肝胰腺是河蟹体内营养物质贮存的主要场所,而精巢中的 Vc 则是经肝胰腺转运并贮存于精巢内的。

Vc 可调节性激素的生物合成^[4],在胆固醇合成雄性激素的过程中,Vc 还充当了许多酶促反应的协同因子和调节因子,从而间接影响性激素的生物合成^[8]。本研究结果发现,雄蟹体内 Vc 含量与睾酮的分泌密切相关,适量添加 Vc 可促进雄性激素的分泌,而过量的 Vc 同样可以抑制性激素的分泌。

3.3 Vc 的抗氧化作用 Vc 是一种天然的抗氧化剂,具有较强的抗氧化保护作用。从雄蟹肝胰腺、精巢和副性腺 SOD 酶活性来看,Vc 在相应器官的累积量与其 SOD 酶活性呈负相关,即 Vc 含量高,则相应的 SOD 酶活性低。这说明机体内抗氧化系统是一个动态平衡的体系,各抗氧化系统之间可以相互协调并达到平衡,以便有效保护机体的正常代谢和生长发育。此外,与 Vc 含量相似,精巢和副性腺 SOD 的活性亦明显高于肝胰腺,这进一步证实了生殖期生殖腺和生殖细胞需较强的抗氧化保护。

参 考 文 献

- [1] Chatterjee I B. Evolution and biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 1973, **182**:1 271 ~ 1 272.
- [2] Dabrowski K. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture*, 1990, **84**:61 ~ 70.
- [3] Lightner D V, Huntner B, Magarelli P C Jr, et al. Ascorbic acid: Nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc World Maricul Soc*, 1979, **10**: 513 ~ 528.
- [4] Levine M, Morita K. Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitam Horm*, 1985, **42**:1 ~ 64.
- [5] 姜仁良,谭玉钧,吴嘉敏等.中华绒螯蟹血淋巴中 20-羟基蜕皮酮、17 β -雌二醇和睾酮含量的变动. *水产学报*, 1992, **16**(2):101 ~ 106.
- [6] Alava V R, Kamazawa A. Effect of dietary Vitamin A, E and C on the ovarian development of *Penaeus japonicus*. *Bull Jap Soc Sei Fish*, 1993, **59**:1 235 ~ 1 241.
- [7] 徐志昌,刘铁斌,雷清新等.中国对虾(*Penaeus chinensis*)维生素营养的研究 V. 中国对虾维生素 C 营养. *青岛海洋大学学报*, 1994, **24**(3):364 ~ 372.
- [8] 姚建国,周岩民.动物维生素 C 营养的研究进展. *饲料博览*, 2000, **6**:37 ~ 39.
- [9] Guary M, Kanazawa A, Tanaka N, et al. Nutritional requirement of Prawn - VI. Requirements for ascorbic acid. *Mem Fac Fish, Kagoshima Univ*, 1976, **25**: 53 ~ 57.
- [10] Merchie G, Lavens P, Sorgeloos P. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, 1997, **155**: 165 ~ 181.
- [11] Kean J C, Castell J D, Trider D J. Juvenile lobster (*Homarus americanus*) do not require dietary ascorbic acid. *Aquact Europ*, 1985, **38**: 368 ~ 370.
- [12] Kanazawa A. Nutrition of Penaeid Prawn and Shrimp. Aquaculture Department of Southeast Asian Fisheries Development Center, Iloilo, Philippines, 1985, 123 ~ 130.
- [13] 王安利,毋学全,凌利英.中国对虾配合饲料中维生素 C 添加量的研究. *海洋与湖沼*, 1996, **27**(4):368 ~ 372.
- [14] 马钰,张道波,马琳等.中国对虾幼体维生素 C 需求量的研究. *上海水产大学学报*, 1998(增刊):118 ~ 122.
- [15] 马钰,张道波,马琳等.饲料添加包膜维生素 C 和维生素 C 磷酸镁盐对中国对虾幼虾的影响. *海洋与湖沼*, 1999, **30**(3):273 ~ 277.
- [16] 韩阿寿,梁亚全,高淳仁等.斑节对虾对磷酸酯化维生素 C 的需求量研究. *水产学报*, 1996, **20**(1):88 ~ 91.
- [17] 刘国晓.维生素 C 对种公鸡精液质量的影响. *广东畜牧兽医科技*, 1999, **24**(1):12 ~ 14.
- [18] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J Shellfish Research*, 1990, **9**(1): 1 ~ 28.