

咪唑类物质 KK-42 对日本沼虾表皮矿化的影响

杜娟,张俊芳,岳凯迪,彭彦新,杨洪,宁黔冀

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:甲壳动物为了生长必须周期性地褪去旧表皮,新表皮的形成及矿化与蜕皮周期密切相关.前期研究发现, KK-42 能够缩短日本沼虾蜕皮周期、加速表皮的形成.为了进一步探究 KK-42 对表皮矿化的影响,以矿化相对稳定的蜕皮间期(C 期)头胸甲表皮为参照,选择蜕皮后 3, 6, 12 h 的头胸甲,采用扫描电镜/能谱仪法(SEM/EDX),在超微水平初步研究了表皮的矿化进程及 KK-42 处理对表皮矿化的影响.结果显示,对照组头胸甲表皮中钙、镁、磷信号在蜕皮后 3 h 开始出现, 6 h 钙、磷信号在上/外表皮的边缘处密集分布,此后逐渐向表皮内侧延伸.镁信号一直呈弥散状分布.半定量数据分析显示,与蜕皮后 3 h 相比, 6, 12 h 及 C 期表皮中,钙原子比例分别提高了 67.86% ($P < 0.01$), 402.78% ($P < 0.01$), 2 191.67% ($P < 0.01$); 镁原子比例分别提高了 95.92% ($P < 0.05$), 122.45% ($P < 0.05$), 165.31% ($P < 0.05$); 磷原子比例分别提高了 82.46% ($P < 0.05$), 205.26% ($P < 0.01$), 591.23% ($P < 0.01$).在 KK-42 处理组,蜕皮后 3, 6, 12 h,表皮中的钙、磷信号分布一直呈离散状,钙原子比例分别比对照组降低了 16.67% ($P > 0.05$), 45.54% ($P < 0.05$), 52.5% ($P < 0.01$),磷原子比例分别比对照组降低了 15.79% ($P > 0.05$), 45.19% ($P < 0.05$), 50% ($P < 0.01$); C 期表皮中的钙、磷信号出现密集现象,但信号强度比相应对照组分别低 31.88% ($P < 0.01$) 和 5.08% ($P > 0.05$). KK-42 处理后镁信号的分布和强度与对照组均无明显差异.结果表明:日本沼虾表皮的矿化始于蜕皮后 3 h, KK-42 处理能明显抑制日本沼虾头胸甲表皮的矿化,表皮中钙、磷的沉积显著降低.

关键词:日本沼虾;表皮;扫描电镜/能谱仪法;矿化;KK-42

中图分类号: S917

文献标志码: A

甲壳动物被覆坚硬的表皮,来维持身体结构和防御天敌.甲壳动物表皮是生物矿物典型代表,由外向内分为 3 层:上表皮、外表皮和内表皮.上表皮主要由脂类和蛋白质构成,而外表皮和内表皮由几丁质-蛋白质微纤维网架构成,矿化的主要成分是碳酸钙,以结晶方解石或无定形碳酸钙的形式存在,镁和磷的含量较低^[1-2].为了生长甲壳动物必须周期性地替换表皮^[3],因此,蜕皮周期和表皮的形成及矿化有密切的关系^[4].在蜕皮前期,原有旧表皮下形成新的上表皮和未矿化的新外表皮,旧表皮中一部分碳酸钙被重吸收;在蜕皮后期,内表皮形成的同时内、外表皮起始矿化^[5];间期表皮发育完全,高度矿化.如此周而复始,从而完成其生长发育.虽然矿化是从蜕皮后期开始,对于不同甲壳动物矿化起始的确切时间和矿化进程的报道尚未多见,且对于矿化的研究多集中于体型较大的甲壳动物,如美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[6-7],而关于体型较小的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)等甲壳动物的表皮矿化研究报道较少.

KK-42(1-苯甲基-5-[反-2,6-二甲基-1,5-庚二烯]咪唑)常被用作昆虫生长调节剂^[8],而甲壳动物的发育与昆虫具有相似性.前期研究表明, KK-42 能够缩短日本沼虾蜕皮周期^[9]以及加速表皮的形成^[10],为了进一步探究 KK-42 对表皮矿化的影响,本文选取蜕皮后以及矿化相对稳定的蜕皮间期(C 期)的日本沼虾,首次采用石蜡切片的扫描电镜(SEM)观察方法^[11]和 X-射线光电子能谱(EDX)分析,在超微水平研究 KK-42 对表皮矿化的影响,旨在为阐明 KK-42 缩短蜕皮周期、加速表皮形成的机制提供理论支持.

收稿日期: 2021-09-15; **修回日期:** 2022-11-05.

基金项目: 国家自然科学基金(31873047); 河南省自然科学基金(182300410033).

作者简介: 杜娟(1980—),女,安徽淮南人,河南师范大学博士生,研究方向为动物生理, E-mail: dujuan0313@126.com.

通信作者: 宁黔冀, E-mail: nqjnqj1964@163.com.

1 实验方法

1.1 材料及实验动物处理

选取健康日本沼虾(河南原阳黄寺渔场提供)幼虾(体长 2.0~2.5 cm),饲养于水族箱中,水温(25±1)℃,每日早晚各投喂 1 次,1 周后用于实验研究。

文献[12]的方法鉴定蜕皮周期。选取处于蜕皮前晚期的健康日本沼虾,逐只放于水族箱的网格中,每 2 h 观察一次。蜕皮后立即进行如下处理:12 只蜕皮后立即用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 溶液浸泡 1 min^[9]后迅速取出,为处理组;12 只蜕皮后立即用不含 KK-42 的溶液浸泡 1 min 后取出,为对照组。两组处理后继续于水族箱的网格中单独饲养,分别于蜕皮后 3,6,12 h 及进入 C 期时(蜕皮后 2 d)取鳃区头胸甲用于表皮矿化的研究。每组每个时间点取 3 只。

1.2 扫描电镜观察及能量色散 X-射线(EDAX)分析

将鳃区头胸甲剪成 4~6 mm 的小块,Davidson's fixative(DF)固定液^[13]于 4℃固定 24 h,流水冲洗 1 h,系列酒精脱水,正丁醇过夜透明,石蜡包埋,Leica 切片机(德国 Leica, RM2245)上行横切和矢状切,切片厚 6 μm,将蜡片贴于 14 mm×14 mm 盖玻片上烘干,经 60℃二甲苯脱蜡 3 d,更换 3 次二甲苯,将含材料的盖玻片贴于场发射扫描电镜(蔡司, SUPPA 40)用的样品台上,离子溅射仪(中科科仪, SBC-12)镀膜喷金后,用扫描电镜观察、拍摄并编号保存。将采集到的照片导入能谱分析软件(OXFORD INSTRUMENTS, X-MAX20),选择分辨率后进行面扫,采集时间为 300 s,采集后对结果进行分析。本次实验使用的标准样品为:Ca Wollastonite 1-Jun-1999 12:00 AM;Mg MgO 1-Jun-1999 12:00 AM;P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件中单因素方差(ANOVA)和 Duncan 检验法进行统计学分析,其中 $P < 0.05$ 表示显著性差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

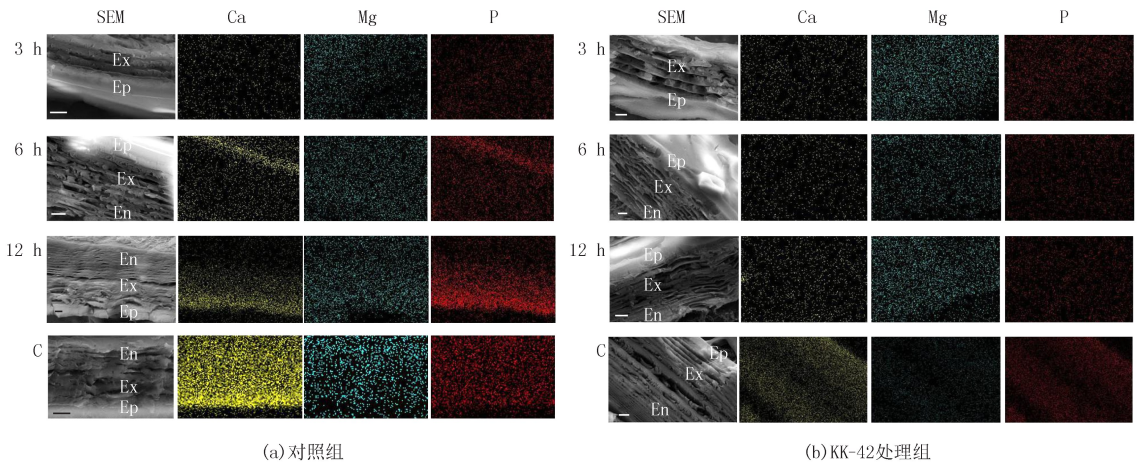
2 结果

2.1 日本沼虾头胸甲表皮的矿化进程

蜕皮后 3 h,钙信号已在上表皮和外表皮均匀分布,但较为稀疏(图 1(a));蜕皮后 6 h,钙信号在上表皮和外表皮的交界处密集分布(图 1(a)),提示表皮矿化速率加快;至 12 h,上、外表皮交界处密集分布的钙信号区域增厚,并向外表皮内侧的方向延伸(图 1(a));进入 C 期时,钙信号密集分布于头胸甲表皮的各层,外表皮中钙信号尤为强烈(图 1(a))。镁信号在蜕皮后期及 C 期始终呈弥散状分布,而磷信号分布模式与钙信号相同(图 1(a))。半定量数据分析支持能谱元素分布图的观察结果(图 2)。与蜕皮后 3 h 相比,6,12 h 及 C 期表皮中钙、镁、磷原子比例均相应增加,其中,钙原子比例分别提高了 67.86% ($P > 0.01$),402.78% ($P < 0.01$),2191.67% ($P < 0.01$) (图 2(a)),镁原子比例分别提高了 95.92% ($P < 0.05$),122.45% ($P < 0.05$),165.31% ($P < 0.05$) (图 2(b)),磷原子比例分别提高了 82.46% ($P < 0.05$),205.26% ($P < 0.01$),591.23% ($P < 0.01$) (图 2(c)),表明表皮中钙、镁、磷含量逐渐增多,表皮逐渐矿化。

2.2 KK-42 对头胸甲表皮矿化的影响

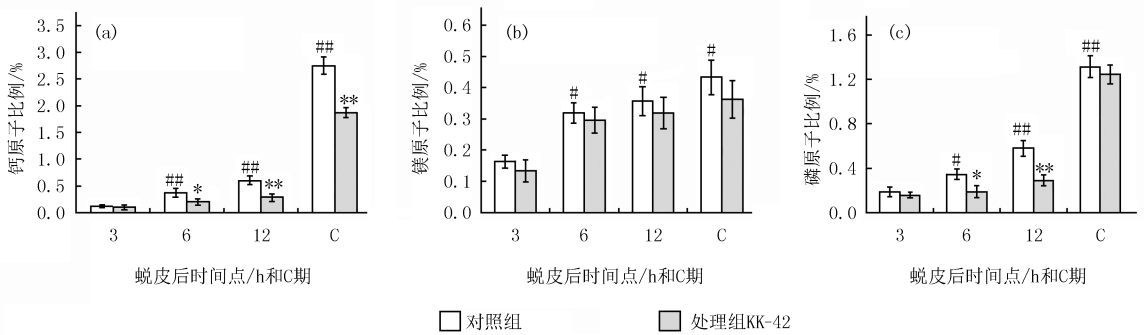
SEM 观察结果显示,处理组头胸甲表皮在厚度、板层结构及层数、板层中孔道形状方面与对照组均无明显差异,但钙、磷信号的分布和强度与对照组相比有明显差异。蜕皮后 3~12 h,头胸甲表皮中的钙、磷信号一直呈离散状分布,表明矿化程度较低(图 1(b)),钙原子比例分别比对照组降低了 16.67% ($P > 0.05$),45.54% ($P < 0.05$),52.5% ($P < 0.01$),磷原子比例分别比对照组降低了 15.79% ($P > 0.05$),45.19% ($P < 0.05$),50% ($P < 0.01$);C 期钙、磷信号在内、外表皮密集分布,但钙、磷信号强度比相应的对照组低 31.88% ($P < 0.01$) (图 2(a)) 和 5.08% ($P > 0.05$) (图 2(c))。KK-42 处理后镁信号的分布和强度与对照组均无明显差异。结果显示 KK-42 处理能抑制日本沼虾蜕皮后头胸甲表皮的矿化。



黄色、蓝色和红色分别代表钙、镁和磷信号, Ep: 上表皮; Ex: 外表皮; En: 内表皮; C: 间期。

图1 蜕皮后期和C期日本沼虾头胸甲扫描电镜图及钙、镁、磷元素分布(在线彩图)

Fig.1 SEM images and corresponding EDX maps of the elemental distributions of calcium, magnesium and phosphorous within the carapace in *M. nipponense* during postmolt and C stage (colour online)



$n=3$ /组/时间点; “*” “**” 分别表示与相应的对照组相比有显著 ($P<0.05$) 或极显著差异 ($P<0.01$); “#” “##” 表示与蜕皮后 3 h 对照组相比有显著 ($P<0.05$) 或极显著差异 ($P<0.01$)。

图2 KK-42处理对蜕皮周期不同阶段头胸甲表皮中钙、镁、磷含量的影响

Fig.2 Effect of KK-42 treatment on the contents of calcium, magnesium and phosphorous in carapace cuticle during different molt stage

3 讨论

快速发展的电镜能谱技术能够测试元素周期表中几乎所有的元素,并能给出所测元素的浓度值,元素含量分析误差小于 5%^[14],因此采用该方法检测日本沼虾表皮中钙元素含量,以此来分析表皮矿化进程。

矿化是甲壳动物表皮独有的特征,其过程受到严谨的时空调节;表皮矿化的空间调节最典型的例证是甲壳动物身体的不同部位矿化程度不同;矿化必定是从动物脱去旧表皮后开始,这是表皮矿化时序性调节的典型例证。不同甲壳动物表皮矿化的时程差异较大,如蓝蟹(*C. sapidus*)表皮在蜕皮后 3 h 即沿着上表皮/外表皮边界出现密集钙信号,并向逐渐外表皮内侧延伸^[15]。而本研究发现日本沼虾在蜕皮后 6 h,上/外表皮的边缘处才开始出现密集钙信号(图 1(a))。在甲壳动物表皮中,磷酸盐的主要作用是和无定形碳酸钙共沉淀以稳定其结构^[16]。本研究发现蜕皮后日本沼虾表皮中磷元素的分布及含量变化趋势与钙元素相同,进一步验证了此观点。

甲壳动物表皮中大部分成分是无机物,主要是碳酸钙,一小部分是有机物,主要是几丁质、蛋白质等有机基质,通常认为有机基质特别是蛋白质可以调节生物矿物的沉积^[3]。表皮中的蛋白质种类较多,其中分布最广泛且与表皮厚度、蜕皮周期关系最为密切的蛋白质,因能与几丁质结合构成表皮结构支架,所以被称为几

丁质结合蛋白(Chitin-Binding Proteins, CBPs),由表皮上皮细胞合成并分泌进入表皮,参与新表皮的形成^[17]。迄今为止,已经在甲壳动物表皮中鉴定出多种与矿化相关的几丁质结合蛋白,如在克氏原螯虾表皮中纯化出含 65 个氨基酸残基的钙化相关肽-2(calcification-associated peptide, CAP-2)^[4],CAP-2 基因主要在蜕皮后期表达,该蛋白在体外能与几丁质结合,并且具有抑制碳酸钙沉积的能力,因此推测 CAP-2 可能作为表皮钙化过程的成核剂;日本对虾表皮中的 crustocalcin(CCN)^[18]蛋白能通过诱导成核促进表皮中碳酸钙晶体的形成,其 mRNA 主要表达于蜕皮后期。这些研究表明蜕皮后期表皮中的几丁质结合蛋白能控制表皮的钙化。本研究结果显示, KK-42 处理导致日本沼虾头胸甲表皮矿化时程的延迟和矿化程度的减弱,这可能与 KK-42 处理能显著抑制某些 CBPs 基因在蜕皮后期表皮中的表达有关^[19],具体机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] ABEHSERA S, ZACCAI S, MITTELMAN B, et al. CPAP3 proteins in the mineralized cuticle of a decapod crustacean[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: e2430.
- [2] ROSEN MN, BARAN KA, SISON JN, et al. Mechanical Resistance in Decapod Claw Denticles: Contribution of Structure and Composition [J]. *Acta Biomater*, 2020, 110: 196-207.
- [3] NAGASAWA H. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization[J]. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2012, 4(2): 711-720.
- [4] INOUE H, OHIRA T, OZAKI N, et al. A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 318(3): 649-654.
- [5] SUZUKI M, SUGISAKA-NOBAYASHI A, KOGURE T, et al. Structural and functional analyses of a strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the exoskeleton of the crayfish *Procambarus clarkii* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(2): 361-368.
- [6] 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.
- [7] RAABE D, SACHS C, ROMANO P. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material [J]. *Acta Materialia*, 2005, 53(15): 4281-4292.
- [8] YUNGEN M, BHARATHI D. Effect of anti-juvenile hormone agent, KK-42 on the incorporation rate of radioactive *Glycine* and biosynthesis of silk proteins of silkworm, *Bombyx mori* L [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2009, 91(3): 485-491.
- [9] GUAN J Y, LV Y J, ZHANG Y, et al. A shortening effect of KK-42 on the moult cycle of juvenile *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) (Decapoda, Palaemonidae) [J]. *Crustaceana*, 2016, 89(1): 85-95.
- [10] 宁黔冀, 杨洪, 黄进, 等. 抗保幼激素 KK-42 对日本对虾生长发育的影响 [J]. *海洋通报*, 2002, 21(1): 92-96.
- [10] NING Q J, YANG H, HUANG J, et al. Effect of anti-juvenile hormone KK-42 on the growth and development of *Penaeus japonicus* [J]. *Marine Science Bulletin*, 2002, 21(1): 92-96.
- [11] 杜娟, 张俊芳, 郑征帆, 等. 日本沼虾蜕皮过程中头胸甲外骨骼超微结构的改变 [J]. *中国水产科学*, 2018, 25(2): 301-307.
- [11] DU J, ZHANG J F, ZHENG Z F, et al. Changes in the ultrastructure of the carapace during the molt cycle of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 301-307.
- [12] PROMWIKORN W, KIRIRAT P, INTASARO P, et al. Changes in integument histology and protein expression related to the molting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 148(1): 20-31.
- [13] LATENDRESSE J R, WARBRITTON A R, JONASSEN H, et al. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid [J]. *Toxicologic Pathology*, 2002, 30(4): 524-533.
- [14] 殷晓. 扫描电镜能谱法测定独居石中铈、镧、钍等元素的含量 [J]. *地质与资源*, 2015, 24(5): 501-506.
- [14] YIN X. Content determination of cerium, lanthanum, thorium and other elements in monazite with sem-eds analysis [J]. *Geology and Resources*, 2015, 24(5): 501-506.
- [15] DILLAMAN R, HEQUEMBOURG S, GAY M. Early pattern of calcification in the dorsal carapace of the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Journal of Morphology*, 2005, 263(3): 356-374.
- [16] BENTOV S, AFLALO E D, TYNYAKOV J, et al. Calcium phosphate mineralization is widely applied in crustacean mandibles [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: e22118.
- [17] VITTORI M, GANTAR I. The origin of microscopic spheres on the exoskeleton of the woodlouse *Porcellionides pruinosus* (Crustacea: Isopoda) and their effect on its hydrophobicity [J]. *Arthropod Structure & Development*, 2020, 58: e100968.
- [18] INOUE H, OHIRA T, OZAKI N. Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 755-765.

[19] 苗泽龙.日本沼虾 CBPs 基因的克隆及 KK-42 对其表达的诱导效应[D].新乡:河南师范大学,2018.

MIAO Z L.Gene cloning of chitin-binding proteins from *Macrobrachium nipponense* and induction effect of KK-42 on expression[D]. Xinxiang:Henan Normal University,2018.

Effect of imidazole derivative KK-42 on mineralization of the cuticle in *Macrobrachium nipponense*

Du Juan, Zhang Junfang, Yue Kaidi, Peng Yanxin, Yang Hong, Ning Qianji

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Crustaceans have to replace the old cuticle periodically to permit their growth, thus the molt cycle is closely related to the formation and mineralization of the new cuticle. In previous studies we found that KK-42 treatment could shorten molt cycle and accelerate the formation of the cuticle in *Macrobrachium nipponense*. To explore the possible mechanism of KK-42, carapaces at 3, 6 and 12 h were employed to investigate calcification of cuticle and the effect of KK-42 treatment on calcification at ultrastructural level using the observation of paraffin section by scanning electron microscope-energy dispersive spectrometer (SEM-EDS) with reference of carapaces at intermolt(C stage)during which mineralization of the cuticle is relatively stable. The results showed that calcium magnesium and phosphorous signals began to appear in the cuticle at 3 h after ecdysis. Calcium and phosphorous signals became dense and extended from the epicuticle/exocuticle boundary to the inner side of cuticle in control group at 6 h after ecdysis. Magnesium signals were dispersively distributed. Semi-quantitative data analysis showed that, compared with control group of 3 h after ecdysis, at 6, 12 h after molting and C stage, atomic percent of calcium increased by 67.86% ($P < 0.01$), 402.78% ($P < 0.01$) and 2 191.67% ($P < 0.01$) respectively, atomic percent of magnesium increased by 95.92% ($P < 0.05$), 122.45% ($P < 0.05$), 165.31% ($P < 0.05$) respectively, atomic percent of phosphorous improved by 82.46% ($P < 0.05$), 205.26% ($P < 0.01$), 591.23% ($P < 0.01$) respectively. In KK-42 treatment group, the distribution of calcium and phosphorous signals in cuticle was discrete during 3, 6, 12 h after ecdysis. Compared with the corresponding control group, atomic percent of calcium decreased by 16.67% ($P > 0.05$), 45.54% ($P < 0.05$) and 52.5% ($P < 0.01$) respectively, atomic percent of magnesium decreased by 15.79% ($P > 0.05$), 45.19% ($P < 0.05$), 50% ($P < 0.01$) respectively. Calcium and magnesium signals were dense until C stage, but the signal intensity was 31.88% ($P < 0.01$) and 5.08% ($P > 0.05$) lower than that in control group respectively. No significant difference in the distribution and intensity of magnesium signals was observed between the control and treatment group. The results indicated that mineralization of cuticle in *M. nipponense* started in 3 h after molt, and KK-42 treatment could significantly inhibit the mineralization of carapace cuticle, for deposition of calcium and phosphorous in the cuticle decreased significantly.

Keywords: *Macrobrachium nipponense*; the cuticle; SEM-EDS; mineralization; KK-42

[责任编辑 刘洋 杨浦]