第11卷 第2期　　水生生物学报　　Vol. 11, No. 2
1987 年 6 月　　ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA　　June, 1987

团头鲂血清中雌二醇含量测定方法的改进和周年变化规律的研究*

赵维信　姜仁良　黄世蕉
（上海水产大学）

提　要

采用加热处理的方法代替了用有机溶剂进行血清样品抽提的繁琐步骤，为鱼类血清雌二醇(E_2)放射免疫测定摸索了一种简单易行的方法。

对团头鲂（*Megalobrama amblycephala*）雌鱼血清中 E_2 含量的周年变化进行了测定。1—4 月血清 E_2 含量逐渐上升，1 月份为全年最低值（0.61±0.28ng/ml），4 月份达到最高值（5.63±0.85ng/ml），之后，血清 E_2 含量明显下降。10—12 月 E_2 水平维持在 1.62±0.20 ng/ml 左右，形成一个持续三个月的小峰。

卵巢成熟系数与血清 E_2 含量的变化，两者之间呈正相关，$r = 0.6089$。并呈现出 E_2 含量的升高先于成熟系数的增长，E_2 含量在产卵季节前一个月达到高峰值。表明血清 E_2 含量的变化与性腺在早春的发育生长密切相关，而与性腺晚期的发育成熟关系不大。10—12 月的一个小峰与产后性腺的复发，即性腺再度进入卵黄发生期有关。

关键词　团头鲂　血清　雌鱼　雌二醇　测定方法

有关鱼类性激素的研究已越来越为从事鱼类养殖，特别是从事鱼类繁殖工作的人们所重视。国外关于鱼类雌二醇（E_2）的研究已在不少国家相继开展，我国在这方面的研究是从 1982 年开始的。我们运用国产的 E_2 放射免疫测定药箱，对一些鲤科鱼类进行了研究。国内不论在人类或鱼类性类固醇激素的放射免疫测定中，都是采用先将血清样品（或血浆）进行化学抽提后后再进行常规放射免疫测定的，这一方法操作繁琐，而且整个测定持续的时间也较长。本研究在改进测定方法方面进行了试探和摸索，初步建立了一个运用国内 E_2 放射免疫药箱，直接测定血清中 E_2 的方法。并用此方法进行了团头鲂（*Megalobrama amblycephala*）血清 E_2 年周期的测定，从而了解 E_2 的年变化规律，探索在生殖周期中的生理作用，为掌握我国主要养殖鱼类的繁殖机理和提出科学养鱼的方法和手段提供必要的理论依据。

材料与方法

（一）试验鱼

1984 年 1 月至 12 月于江苏平望养殖场，每月随机采取第一次性成熟的团头鲂雌鱼

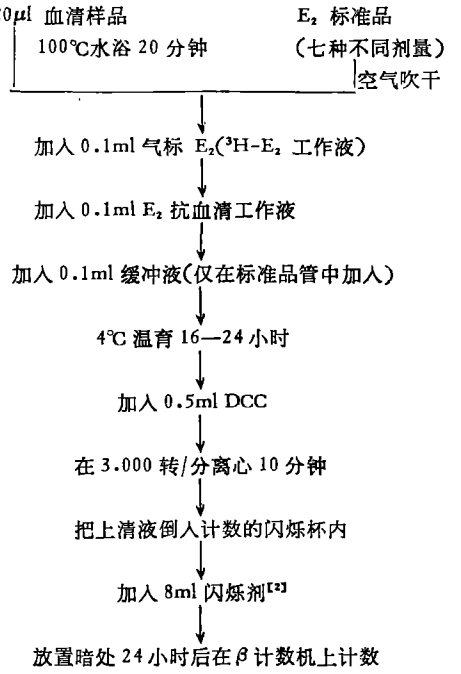
* 本文承蒙谭玉钧教授审阅。参加本试验工作的还有沈漪和赵福生同学。
1986 年 5 月 17 日收到。

10—14 尾，体重 250—700 克，从尾动脉抽血，制备成血清后，保存在−40℃ 待测定。同时记录取血样鱼的体长、体重和性腺的重量以及肉眼直接观察的性腺发育状况。

（二）测定方法

采用上海市内分泌研究所生产的 E_2 放射免疫测定药箱，按 Hunt[6] 和 Scott[12] 等方法略加修改。样品不经化学抽提和纯化，仅用加热处理样品后，就进行常规放射免疫测定。即准确吸取 20 微升（μl）血清样品于测定管中，放在 100℃ 水浴中进行热处理 20 分钟，待冷却后加入缓冲液 0.1 毫升，在旋转搅拌器上旋转 1 分钟，以后各操作步骤同常规放射免疫测定[1]。

操作程序



本试验采用美国贝克曼（Beckman）公司 L 9800 型液体闪烁计数机计数。按本方法测定的灵敏度（最小检测值）为 8.7 微微克（pg）。E_2 抗血清的特异性，与雌酮和雌三醇的交叉反应已在前文报道[1]。血清样品经加热处理后，蛋白质激素均被灭活，同时使血清中呈结合状态的 E^2 转变成游离状态。

结 果

（一）用加热处理样品所测结果的鉴定

1. 精密度（批间差异）鉴定

用一混合血清，作 5 倍稀释（1:5）后，分别取 10，25，50 和 100μl 作重复测定。证明批间重复性良好，平均变异系数为 10.35%（表 1）。

表 1　团头鲂血清中 E_2 含量（pg）的重复测定

Tab. 1　The repeat that of serum E_2 level(pg)

测定日期 date of measurement	10μl	25μl	50μl	100μl
4月21日 on 21th. April	13.0	33.0	62.0	113.0
5月25日 on 25th. May	13.2	28.9	46.0	98.0
平均值±mean±SD	13.1±0.14	31.0±2.90	54.0±11.30	105.5±10.60
变异系数% coefficient of variation	1.1	9.4	20.9	10.0

2. 正确性鉴定

（1）回收率测定　取 0.1ml 稀释的团头鲂血清，分别加入含有 25pg 和 50pg E_2 标准品的测定管中，然后放入 100℃ 水浴加热 20 分钟，（测定管口塞紧），加热后按常规加试剂测定。平均回收率为 94.45%（表 2）。

表 2　E_2 回收率测定

Tab. 2　The recovery test of E_2

	25pg group 含25pg组 (n = 4)	50pg group 含50pg组 (n = 4)	无标准品组(本底) free standards group (n = 2)
实际平均测定值 the average value of measurement	27.38	56.97	5.75
平均回收率(%) the average rate of recovery	86.5	102.4	

说明实际测定值与欲测样品中的客观值基本一致，用加热处理样品，并没有使样品中的 E_2 免疫活性丧失，反映了实际测定值的正确性。

（2）样品稀释试验　同一血清样品经不同倍比稀释后，所测结果基本一致，变异系数为 6.4%，证明本方法的可靠性（表 3）。

表 3　血清样品的稀释试验

Tab. 3　Dilution test of serum sample.

稀释倍数 times of dilution	实测含量 level of measurement	平均值±标准差 mean±SD (ng/ml)	变异系数 coefficient of variation(%)
1:5	5.7	6.25±0.40	6.4%
1:10	6.2		
1:20	6.6		
1:50	6.5		

3. 加热法与用乙酸乙酯抽提法测定结果的比较

6 个血清样品同时分别用加热法处理和用乙酸乙酯抽提后，各自进行常规放射免疫测定，所测结果经 t 检验，$p > 0.05$，说明加热法处理样品后，最后所测结果与用经典抽

提法后所测结果比较，差异不显著，证明该方法的可行性(表 4)。

表 4 加热法与乙酸乙酯抽提法测定 E_2 结果的比较

Tab. 4 A comparison of E_2 level by heating and by extraction with ethyl acetate.

样品处理法 sample treatment	平均值± SD mean±SD (n) (ng/ml)	T 检验 t test
加热法 heating	0.99±0.31(6)	
抽提法 extraction	1.29±0.33(6)	P>0.05

表 5 水温、雌性团头鲂血清 E_2 浓度和成熟系数的周年变化

Tab. 5 Annual changes of water temperature, serum E_2 concentration and gonadal development in female blunt snout bream.

月 份 Month	尾数 No.	水温 Temp. (℃)	血清 E_2 浓度 Concentration of serum E_2 M±SD (ng/ml)	成熟系数 gonadosomatic index M±SD	性腺分期 stage of gonad
1	10	5.5	0.610±0.28	1.66±0.26	III
2	12	6	1.151±0.26	1.28±0.40	III
3	14	9	3.737±1.00	2.06±0.24	III
4	9	16	5.634±0.85	6.71±2.41	IV
5	11	22	1.625±0.37	19.4±4.81	IV
6	12	27	2.656±0.60	19.7±2.70	IV
7	13	30	1.704±0.38	18.1±3.17	IV
8	13	—	—	11.5±6.50	IV, VI
9	9	24	0.739±0.25	1.93±1.34	II, VI
10	14	21	1.693±0.30	1.34±0.39	III
11	12	15	1.622±0.14	1.52±0.46	III
12	13	10	1.625±0.32	1.28±0.59	III

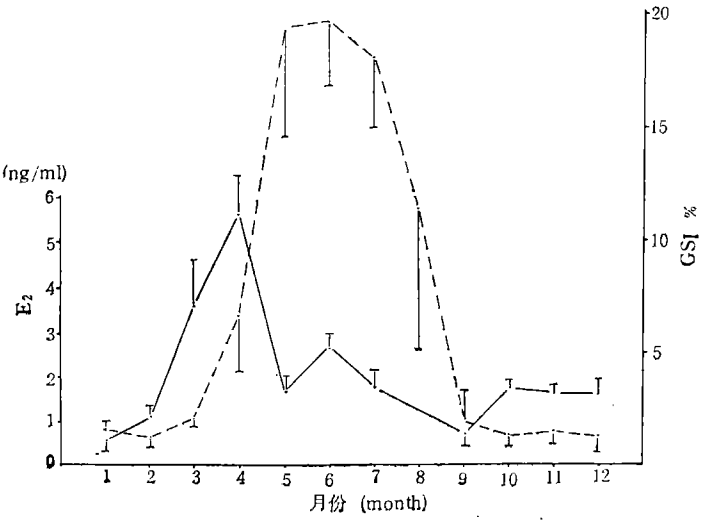


图 1 雌性团头鲂血清 E_2 浓度和成熟系数 (GSI%) 的周年变化

Fig. 1 The annual cycle of serum E_2 concentration and gonadosomatic index (GSI%) in female blunt snout bream

（二）团头鲂雌鱼血清 E_2 的年周期变化及其与性腺发育的关系

1 至 4 月份血清 E_2 含量从全年最低值（0.61 ± 0.28ng/ml）逐渐上升，到 4 月份达到全年最高值（5.63±0.85ng/ml），E_2 的高峰值出现在产卵季节前一个月。繁殖季节（5、6 月份）血清 E_2 的含量分别为 1.63 ± 0.37 和 2.66 ± 0.60ng/ml。9 月份 E_2 血清浓度已接近最低值。而 10 月份开始 E_2 含量又稍有升高，持续三个月（10、11、12 月份）维持在很相仿的水平上，约为 1.62±0.20ng/ml。

全年血清 E_2 含量与卵巢成熟系数（GSI%）的变化呈正相关，$r = 0.6089$，其中 1 至 4 月份的相关系数 $r = 0.8389$，5 至 12 月份的相关系数 $r = 0.3789$（图 1、表 5）。

讨　论

一个方法的正确性，应该反映在实际测得的量是真正代表了该种物质在样品中的实际含量。回收率试验证明，在加有 E_2 标准品 25pg 和 50pg 的血清中，经 100℃ 水浴处理后，对 E_2 含量几乎无影响。作者曾将各种不同剂量的 E_2 标准品系列，一组进行 100℃ 水浴处理，另一组不作水浴加热处理，所得标准曲线无明显差别，也说明 100℃ 水浴处理并没有破坏 E_2 的免疫活性。

我们还发现血清样品在水浴中处理的温度较低，或没有达到水沸腾的情况下，经 20 分钟处理后，所测得的 E_2 含量偏低，这可能是血清中 E_2 结合球蛋白没有被充分破坏所引起的，在水浴温度低的情况下，延长样品在水浴中的处理时间，也可达到同样的目的。鲑鳟鱼类血样在 70℃ 水浴中，处理 1 小时也同样达到使蛋白质灭活的目的[12]。

一般认为性成熟的无脊椎动物和卵生脊椎动物分别在血淋巴和血浆中含有卵黄蛋白的前身物——卵黄蛋白前体，这是由 E_2 诱发产生的一种雌性特异蛋白。卵生脊椎动物卵巢产生的雌激素，特别是 E_2 诱发肝细胞合成一种多肽物质，然后沿高尔基体的膜系统和粗糙内质网，经由脂化作用，糖化作用和磷酸化作用转化成一种二聚体形式的前身蛋白，即卵黄蛋白前体，然后被分泌进入血液循环。血液中的卵黄蛋白前体再被结合到卵母细胞中，进一步转变成卵黄蛋白——卵黄高磷蛋白和卵黄脂磷蛋白。这在硬骨鱼类也不例外，硬骨鱼类具有合成雌激素的能力，这从离体培育鲑鳟鱼类卵巢匀浆和分离的卵巢滤泡，能将氚标的雄烯二酮或睾酮转变成 E_2[7]，以及用纯化的大麻哈鱼促性腺激素（SG-G100）刺激离体大西洋鲑（*Salnro salar*）卵巢滤泡产生 E_2[3,14] 得以证明。日本学者 Kagawa 等，离体培育金鱼（*Carassius auratus*）的早期（卵黄发生期）卵巢滤泡[8]，在人绒毛膜促性腺激素（HCG）的刺激下产生 E_2，而晚期的卵巢滤泡则对 HCG 的刺激反应不明显。本研究测得的 E_2 峰值位于性腺成熟系数达到最大值的前一个月，即 4 月份，而当时的成熟系仅为 6.7%。Kagawa 选用的卵黄发生期的卵泡直径在 0.51 ± 0.01mm 和 0.69 ± 0.01 mm时，HCG 明显刺激 E_2 产量增加，后者 E_2 的产量约为前者的 5 倍；而直径为 0.97 ± 0.01mm 的卵泡，对 HCG 几乎无反应，E_2 的产量与无 HCG 刺激的对照组相差不大。这与本研究所测得的结果，在成熟系数为 6.7% 的 4 月份，E_2 的血清水平远远高于成熟系数为 1.4% 左右时的血清 E_2 水平，和成熟系数达到最大值时的 5、6 月份的 E_2 水平是相

一致的。鲑鳟鱼类[3,4,5,11,12,14]，鲽鱼[13]和鲤鱼(未发表)血浆或血清中 E_2 的峰也都是在产卵季节前一个月（或至少一个月)。 鲤鱼在 E_2 含量达到峰值时的成熟系数已较高。 约为20%，这可能与鲤鱼怀卵量较团头鲂高，和鲤鱼性腺一般处于第 IV 期过冬，繁殖季节较早有关。

10 月份团头鲂血清 E_2 水平略有升高，10、11、12 月份 E_2 都维持在相仿的水平，形成一个持续的小峰，这可能与产卵后性腺的复发有关。对鲤鱼的研究发现在 11 月份有个小峰（未发表)。 Bchemen 等的研究中，也发现虹鳟（*Salmo gairdneri*）在 7 月份有个小峰[4]。可以认为 E_2 对性腺复发的发动作用，是当卵母细胞发育到具有两层结构的滤泡膜时[2]，E_2 的合成和分泌得以增加[10]，促使卵母细胞中形成卵黄泡[9]，从而进入大生长期，而较低的 E_2 水平就能激起和维持这一发动作用。早春开始再形成第二个主要的峰，此时，血液中卵黄蛋白前体的含量不断升高[4,5]，卵泡生长加速，卵母细胞中出现卵黄颗粒沉积并逐渐增加.但卵泡生长成熟后期，4至 5 月份，当大量卵黄蛋白前体被迅速结合入卵母细胞时，E_2 却明显下降，这与此时卵泡中芳化酶活力的显著下降有关[4]。说明卵黄蛋白前体从肝中转移到卵母细胞中不受 E_2 的直接作用，E_2 的直接作用可能是刺激卵黄蛋白前体在肝脏中大量合成。所以 E_2 水平的上升总是先于血液中卵黄蛋白前体的升高[4]，总是先于成熟系数的增长。至于 E_2 在繁殖季节迅速下降，使 E_2 对垂体促性腺激素（GTH)的负反馈作用减小[1]，将有利于 GTH 释放量的迅速增加。6 月份，E_2 出现一个明显的波动，这可能是 5 至 6 月份卵巢中出现一批晚发育的 III 期卵母细胞，这些卵泡分泌 E_2，欲刺激肝脏继续合成卵黄蛋白前体，因而出现一个 E_2 分泌量增加的波动，但由于此时水温过高（平均 27℃)，已不宜于芳化酶的活动，使 E_2 合成受抑，分泌量迅速下降，从而使这一部分晚发育的 III 期卵母细胞发育迟缓。

早春水温低，机体生长受阻抑，但由于 E_2 分泌活跃，机体内部积聚的营养物质大量动用作为合成卵黄蛋白前体的原料，由此可见，2至 4 月份加强亲鱼培育，增加投饵，是对有足够营养物质用于转化的物质保证，是性腺发育好坏的关键时刻。本研究为产前强化培育亲鱼措施的制定，提供了科学依据。E_2 年周期研究同时也指出了秋季(9、10、11 月)培育的必要性，秋季的 E_2 水平虽然不及 3、4 月份，但 10 月份的 E_2 水平较 9 月份有较大的升高，说明此时性腺内分泌活动加强，正欲发动卵母细胞进入卵黄发生期，使 II 期卵巢发育到 III 期卵巢过冬[2]，所以秋季培育也是不容忽视的。

参 考 文 献

[1] 姜仁良、黄世蕉、赵维信、周洪琪，1986。促黄体释放激素类似物 (LRH - A) 诱发团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 产卵时血清中促性腺激素和 17B-雌二醇含量的动态研究。 水产学报，**10**(2)： 185—193。

[2] 柯鸿文，1975。一种优良淡水鱼——团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 的繁殖和饲养。 水生生物学集刊，**5**(3)： 293—314。

[3] 赵维信、R. S. Wright, 1986。 促性腺激素 (GTH) 诱发大西洋鲑 (*Salmo Salar*) 卵黄发生期卵巢滤泡释放性类固醇激素的离体研究。水产学报，10(4)： 389—394。

[4] van Bohemen, C. G. and J. G. D. Lambert, 1981. Estrogen synthesis in relation to estrone, estradiol and vitellogenin plasma levels during the reproductive cycle of the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrino.*, **45**: 105—114.

[5] Crim, L. W. and D. R. Idler, 1978. Plasma gonadotropin, estradiol and vitellogenin and gonad phosvitin levels in relation to the seasonal reproductive cycle of female brown trout. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*,

18(4): 1001—1005.

[6] Hunt, S. M. V., Simpson, T. H. and R. S. Wrigbt, 1982. Seasonal changes in the levels of 11-oxotestosterone and testosterone in the serum of mace salmon *Salmo salar* L. and their relationship to growth and maturation cycle. *J. Fish Biol.*, **20**: 105—119.

[7] Kagawa, H., Young, G., Adachi, S. and Y. Nagahama, 1982. Estradial-17β production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles role of the thecal and granulose cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **47**: 440—448.

[8] Kagawa, H., Young, G. and Y. Nagahama, 1984. In vitro estrodiol-17β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassaius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **54**: 139—143.

[9] Khoo, K. H., 1979. The bistochemistry and endocrine control of vitellogenesis in goldfish ovary *Can. J. Zool.*, **57**: 617—626.

[10] Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. In Hoar, W. S., Randall D. J. and E. M. Donaldson (ed.): Fish Physiology Vol. IX. pp. 223—275. New York Academic Press.

[11] Scott, A. P., Bye, V. J. and S. M. Baynes, 1980. Seasonal variations in sex steroids of female rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, **17**: 587—592.

[12] Scott, A. P., Sumpter, J. P. and P. A. Hardiman, 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **49**: 128—134.

[13] Wingfield, J. C. and A. S. Grimn, 1977. Seasonal changes in plasma cortisol, testosterone and oestradiol-17β in plaice, *Pleuroneetes platessa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **31**: 1—11.

[14] Zhao, W. X. and R. S. Wright, 1985. The course of steroid release by intact ovarian follicles of Atlantic salmon (*Salmo salar*) incubated in vitro with and without gonadotrophin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **57**: 274—280.

AN IMPROVED METHOD FOR THE RADIOIMMUNOASSAY OF OESTRADIOL AND A STUDY OF ANNUAL CYCLE OF SERUM OESTRADIOL IN FEMALE BLUNT SNOUT BREAM (*MEGALOBRAMA AMBLYCEPHALA*)

Zhao Weixin, Jiang Renliang and Huang Shijiao

(*Shanghai Fisheries University*)

Abstract

A rapid assay for the radioimmunoassay of oestradiol (E_2) is develop by using heating to denature protein in serum sample and to replace the chemicals for extraction. This procedure consumes much less time and samples.

Levels of E_2 in serum of adult female blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) were measured throughout the annual reproductive cycle. From January to Apirl, the E_2 levels increased from a minimun (0.61 ± 0.28 ng/ml) to a maximum (5.63 ± 0.85 ng/ml). After that period it declined except a slight increase from October to December, measuring around 1.62 ± 0.20 ng/ml. A positive correlation ($r = 0.6089$) was found between serum E_2 level and gonadosomatic index, and the increase of the E_2 level was earlier than that of the gonadosomatic index. The peak level of E_2 was estimated a month before spawning whereas the average E_2 level in spawning season (May to June) was 2.1 ng/ml. The results show that a significant changes of annual serum E_2 level in blunt snout bream occurs before spawning and indicate that the E_2 is correlated to gonadal development in early spring, but not to its final developmental stage. The slight increase of E_2 in autumn may signify the gonadal recrudescence and vitellogenesis. Thus, the present study provides scientific basis for the necessity of the intensive culture in autumn and spring.

Key words *Megalobrama amblycephala,* serum, female bream, oestradiol, determine method