第18卷 第3期 水生生物学报 Vol.18, No.3
1994 年 9 月 ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA Sept., 1994

鳗鲡繁殖生物学研究Ⅴ. 性类固醇激素诱导雌鳗促性腺激素(GtH)分泌和卵巢发育的作用*

林浩然 张梅丽 张素敏 陈练茜

(中山大学生物系,广州 510275)

提 要

多次注射雌二醇或睾酮对雌鳗促性腺激素(GtH)的合成与分泌活动以及卵巢发育都有明显的促进作用,其中睾酮的作用更较雌二醇显著;多次注射 LHRH-A 的促进作用则不明显。多次埋植雌二醇或睾酮都能促使脑垂体合成 GtH,但所取血清样品中的 GtH 含量都未见明显增加;多次埋植雌二醇后血清中卵黄蛋白原的含量明显增加,但卵巢 GSI 增长幅度小,表明埋植雌二醇虽能促使肝细胞合成卵黄蛋白原并释放到血液中,但未能全部渗入卵母细胞内;多次埋植睾酮后血清中的卵黄蛋白原含量虽未见明显增加,但卵巢明显发育长大,这表明埋植睾酮能促使肝细胞合成的卵黄蛋白原迅速地通过血液运送到卵巢,并渗入卵母细胞内。

关键词 促性腺激素,鳗鲡,繁殖生物学,性类固醇激素,卵巢发育

鳗鲡(*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel)人工繁殖的基本内容是诱导在蓄养条件的下海鳗性腺发育成熟,并产生能育的卵子和成活的幼苗。我国和日本的学者都曾多次注射外源促性腺激素(鲤或鲑鱼脑垂体匀浆液和人体绒毛膜促性腺激素等)促使鳗鲡性腺发育成熟,并诱导排精和排卵,受精卵能孵出幼苗,但最终未能成活[1,2]。

雌性类固醇激素或者可芳化为雌激素的雄性类固醇激素能对性未成熟的鲑鳟鱼类产生正反馈作用而促使脑垂体的 GtH 含量增加[3]。睾酮能促使未成熟的虹鳟性腺发育[4]。对欧洲鳗鲡(*A. anguilla*),多次注射雌二醇能使脑垂体的 GtH 含量增加[5];但只有雌二醇和多巴胺拮抗物 pimozide 或多巴胺合成抑制剂 L-α-甲基-多巴以及 LHRH-A 共同使用时,才能促使血浆的 GtH 含量增加和诱导卵巢发育[6]。我们的研究表明多次注射雌二醇能刺激下海鳗 GtH 的合成和分泌活动;并且证实鳗鲡和其他硬骨鱼类一样,GtH 的分泌活动受到下丘脑的神经内分泌双重调节,即促性腺激素释放激素刺激 GtH 的释放而多巴胺抑制 GtH 的分泌活动[7]。本文研究性类固醇激素特别是睾酮的急性处理(注射)和慢性处理(埋植)对雌鳗 GtH 的合成与分泌活动以及卵巢发育的作用,以寻求人工诱导雌鳗卵巢发育成熟的新途径。

* 加拿大国际发展研究中心(IDRC)资助项目。
1991 年 2 月 20 日收到。

1 材料和方法

从珠江口附近的下海鳗群中选取体质良好、个体适中的雌鳗(体长 550—800mm，体重 200—460g)，蓄养在中国水产科学院南海水产研究所海水实验室的人造海水闭路循环水池内。实验期间的水温为 12—27℃，盐度为 30‰左右。

LHRH-A(D-丙^{6}，脯^{9}-N-乙酰胺-LHRH)为浙江省宁波激素制品厂产品。Domperidone (DOM)为比利时 Janssen 公司赠品。雌二醇和甲基睾酮为西德 Serva 产品。各种激素和药物(雌二醇和睾酮先用 95%酒精溶解)均以鱼用生理盐水配制成注射液，肌肉注射。对照组注射鱼用生理盐水。进行埋植实验时，将含有 LHRH-A 200μg 的小丸埋入背部肌肉内；雌二醇、睾酮和硅塑料混合后制成长条，埋植在腹腔内。部份实验鱼用 1ml 注射器从尾部血管抽取血样，在 4℃中静置数小时后离心分离血清，保存在-25℃中以备测定 GtH 和卵黄蛋白原含量。实验结束时雌鳗均解剖取样并测定体肝脏和卵巢的重量；并取脑垂体在-25℃中冰冻保存，在测定 GtH 前称重，用匀浆器研磨，以巴比妥钠缓冲液稀释至 1mg／ml 的浓度，供放射免疫测定其 GtH 含量。脑垂体和血清 GtH 含量放射免疫测定法同前[8]。卵黄蛋白原采用血清中蛋白结合磷法间接测定[9,10]。

2 结果

2.1 多次注射雌二醇或睾酮对雌鳗 GtH 的合成与分泌和卵巢发育的作用及其与 LHRH-A 作用的比较

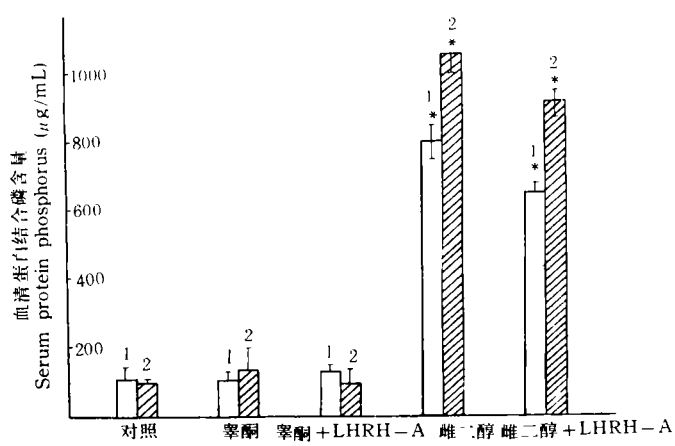


图 1　多次注射 LHRH-A、雌二醇或睾酮后雌鳗血清的 GtH 含量。

Fig.1　Effects of multiple injections of LHRH-A, 17β-estradiol or testosterone on serum GtH levels in the eel.

1. 第 7 次注射后 18h　18h after 7th injection; 2. 第 14 次注射后 8h　8h after 14th injection; 3. 第 14 次注射后 24h　24h after 14th injection. * 显著高于对照组　Significantly higher than the values in the control; ** 显著高于 LHRH-A 组和雌二醇组($p<0.05$)　significantly higher than the values in the LHRH-A and estradiol groups.

将雌鳗分为 4 组，分别注射生理盐水，雌二醇(2μg / g 体重)，睾酮(5μg / g 体重)或 LHRH-A(0.1μg / g 体重)；每周注射 3 次，共注射 14 次；在第 7 次注射后 18h 及第 14 次注射后 8h 和 24h 分别抽取血液样品测定 GtH 和卵黄蛋白原含量；实验结束时测定 GSI 值，取脑垂体测定 GtH 含量。

2.1.1 血清的 GtH 含量 如图 1 所示，多次注射雌二醇或睾酮后血清 GtH 的含量较对照组明显增高，其中注射 14 次后 8h 取样，睾酮组的 GtH 含量明显高于同时取样的雌二醇组。多次注射 LHRH-A 对雌鳗血清的 GtH 含量没有影响，和对照组的相同。

2.1.2 脑垂体的 GtH 含量 表 1 表示多次注射雌二醇和睾酮后雌鳗脑垂体的 GtH 含量都有大幅度的明显升高；注射 LHRH-A 后对脑垂体的 GtH 含量没有明显影响。

表 1 LHRH-A，雌二醇或睾酮注射 14 次后(每次间隔 3d)雌鳗脑垂体的 GtH 含量

Tab.1 Effects of 14 injections of LHRH-A, 17β-estradiol or testosterone on pituitary GtH levels in the eel.

组 合 Treatment	尾 数 Number of fish	脑垂体 GtH 含量 Pituitary GtH (ng / mg)
对 照 Control	4	58 ± 13
LHRH-A	5	124 ± 21
雌二醇 17β-estradiol	5	326 ± 23*
睾 酮 Testosterone	5	341 ± 32*

* 显著高于对照组和 LHRH-A 组 Significantly higher than values in the Control and LHRH-A group.

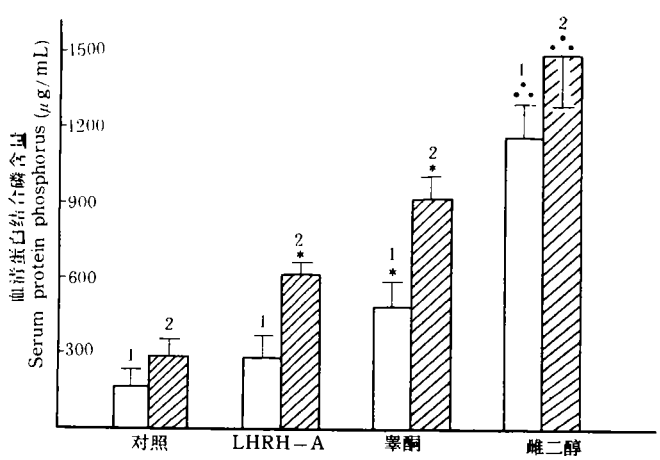


图 2 多次注射 LHRH-A、雌二醇或睾酮后雌鳗血清的蛋白结合磷含量。

Fig.2 Effects of multiple injections of LHRH-A, 17β-estradiol or testosterone on the levels of serum protein phosphorus in the eel.

1. 第 7 次注射之后 After 7 injections; 2. 第 14 次注射之后 After 14 injections. *显著高于对照组 Significantly higher than the values in the control; **显著高于 LHRH-A 组和睾酮组 ($p < 0.05$) significantly higher than the values in other groups.

2.1.3 卵巢发育状况和血液中卵黄蛋白原含量 图 2 表示血清中蛋白结合磷的含量，可

以看到雌二醇对促进肝细胞合成卵黄蛋白原的作用最明显,睾酮次之,而 LHRH-A 注射 14 次之后亦有一定的促进作用。

表 2 列出实验结束时各组雌鳗的 GSI 平均值,其中睾酮组卵巢发育最好,GSI 达 6.80±0.84%,显著高于其他各组;雌二醇组和 LHRH-A 组的 GSI 相近,都略有增高,和对照组有显著差别。

表 2　LHRH-A、雌二醇或睾酮注射 14 次后(每次间隔 3d)雌鳗的肝体系数和性腺成熟系数

Tab.2　The hepatosomatic index and gonadosomatic index in the eel after 14 injections (every 3d) of LHRH-A, 17β-estradiol and testosterone.

组　合 Treatment	尾　数 Number of fish	肝体系数(%) Hepatosomatic index	性腺成熟系数(%) Gonadosomatic index
对　照	4	1.23±0.08	0.89±0.04
LHRH-A	5	1.77±0.02	1.40±0.26*
雌二醇	5	4.32±0.26**	2.25±0.18*
睾　酮	5	2.75±0.13	6.80±0.84**

* 显著高于对照组 Significantly higher than values in the control ($p<0.01$).

* * 显著高于其他各组 Significantly higher than values in the other groups ($p<0.01$).

总的看来,多次注射雌二醇或睾酮对雌鳗 GtH 的合成和分泌以及卵巢发育都有明显的促进作用,睾酮的作用较雌二醇明显些;而多次注射 LHRH-A 的促进作用不明显。

2.2　不同激素的埋植对雌鳗 GtH 的合成与分泌和卵巢发育的作用

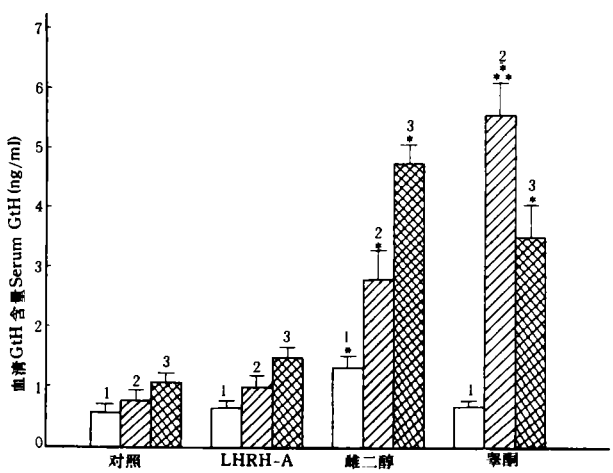


图 3　埋植睾酮、雌二醇以及 LHRH-A 后雌鳗血清的蛋白结合磷含量。

Fig.3　The levels of serum protein phosphorus in eel after implant of 17β-estradiol, testosterone or LHRH-A.

1. 第一次埋植后 15d　15 d after the first implant; 2. 第一次埋植后 30d　30d after the first implant.　*显著高于其他组($p<0.05$)。

将雌鳗分为 5 组,分别在体内埋植雌二醇(50μg / g 体重),睾酮(50μg / g 体重),雌二醇+LHRH-A(200μg / 尾鱼),睾酮+LHRH-A(200μg / 尾鱼),和对照组。实验共进

行 60d，每 15d 埋植激素一次，共埋植 4 次；第 4 次埋植后的第 15d 将雌鳗解剖取样。

2.2.1 对雌鳗血清中卵黄蛋白原含量和卵巢发育的作用 从图 3 所示的雌鳗血清中蛋白结合磷含量可以看到，埋植雌二醇或雌二醇+LHRH-A 两组鱼血清中卵黄蛋白原的含量为对照组的 10 倍左右，表明雌二醇能促使雌鳗肝细胞合成卵黄蛋白原并释放到血液中。埋植睾酮或睾酮+LHRH-A，雌鳗血液中卵黄蛋白原含量和对照组相比都没有明显差别。

表 3 雌二醇或睾酮单独埋植或者和 LHRH-A 同时埋植 4 次(15d 1 次)后雌鳗的肝体系数和性腺成熟系数

Tab.3 The hepatosomatic index and gonadosomatic index in the eel after 4 implantations (every 15d) of 17β-estradiol or testosterone alone, or in combination with LHRH-A

组 合 Treatment	尾 数 Number of fish	肝体系数(%) Hepatosomatic index	性腺成熟系数(%) Gonadosomatic index
对 照 Control	5	1.17 ± 0.07	1.27 ± 0.11
雌二醇 17β-estradiol	5	3.41 ± 0.28**	2.50 ± 0.29*
雌二醇+LHRH-A 17β-estradiol+LHRH-A	5	2.68 ± 0.43*	2.11 ± 0.22*
睾 酮 Testosterone	5	2.19 ± 0.29*	11.30 ± 0.56**
睾酮+LHRH-A Testosterone+LHRH-A	5	1.79 ± 0.19	9.30 ± 1.12**

注：*，** 均同表 2 注 See legend to Tab.2

表 4 埋植睾酮、雌二醇以及 LHRH-A 后雌鳗脑垂体的 GtH 含量

Tab.4 The levels of pituitary GtH in eel after implant of 17β-estradiol, testosterone or LHRH-A

组 合 Treatment	尾 数 Number of fish	脑垂体 GtH 含量 Pituitary GtH (ng / mg)
对 照 Control	4	52 ± 12
雌二醇 17β-estradiol	4	480 ± 80*
睾 酮 Testosterone	4	1560 ± 185**
雌二醇+LHRH-A 17β-estradiol+LHRH-A	4	456 ± 77*
睾酮+LHRH-A Testosterone+LHRH-A	4	1525 ± 134**

注：*，** 同表 2 注 See legend to Tab.2

表 3 表明雌二醇组和雌二醇+LHRH-A 组雌鳗卵巢虽然比对照组有明显增长,但幅度相当小;而睾酮组和睾酮+LHRH-A 组雌鳗的卵巢明显发育长大,GSI 分别达到 11.3%和 9.3%,为对照组的 8.9 倍和 7.3 倍。此外,雌二醇组和雌二醇+LHRH-A 组雌鳗的肝体系数都比对照组的大,解剖后亦见到肝脏明显肿大;而睾酮组和睾酮+LHRH-A 组雌鳗的肝体系数不明显增大。

2.2.2 对雌鳗脑垂体和血清 GtH 含量的影响 从表 4 可以看到,单独埋植雌二醇、睾酮或者加上 LHRH-A 都能促使脑垂体合成 GtH,使脑垂体 GtH 含量比对照组明显升高;但睾酮促使脑垂体合成 GtH 的作用要比雌二醇显著得多。单独埋植雌二醇或睾酮,或者加上 LHRH-A 后的第 7d 到第 30d 期间,血清中 GtH 含量和对照组相比都没有明显差别,处于 0.72-1.75ng/ml 的范围内。

表 5 睾酮或睾酮+LHRH-A 埋植 7 次后雌鳗卵巢的发育状况

Tab.5 The hepatosomatic index and gonadosomatic index in the eel after 7 implantations (every 15 d) of testosterone alone or in combination with LHRH-A

组　合 Treatment	尾　数 Number of fish	肝体系数(%) Hepatosomatic index	性腺成熟系数(%) Gonadosomatic index
对　照	4	1.95±0.15	6.44±0.51(5.9—7.9)
睾　酮	10	2.11±0.18	21.13±2.41(16.2—39.8)*
睾酮+LHRH-A	5	2.14±0.22	19.85±1.94(15.5—24.2)*

注: * 同表 1 注　See legend to Tab.1

2.3 注射睾酮+LHRH-A 和埋植睾酮+LHRH-A 对促进雌鳗卵巢发育作用的比较

在 80d 内经过注射睾酮+LHRH-A 16 次或埋植睾酮+LHRH-A 6 次后,雌鳗卵巢发育的进展相似,GSI 分别达到 14.47±1.62%和 16.37±1.69%,表明这两种给药方式都能有效的促进卵巢发育。另一次实验的结果(表 5)是:睾酮单独埋植或和 LHRH-A 一起埋植 7 次后,雌鳗的 GSI 分别达到 21.13±2.41%和 19.85±1.94%,卵巢发育得最好的 1 尾,GSI 达到 39.8%,卵巢充分发育,卵母细胞充满卵黄颗粒,已接近排卵前的状态。

3 讨论

虽然 Dufour 等曾报道注射睾酮对欧洲鳗脑垂体 GtH 含量没有明显影响,本研究表明注射或埋植睾酮有效的促使我国的日本鳗脑垂体的 GtH 合成,且埋植睾酮的效果比埋植雌二醇的明显。Crim 等曾认为在未成熟的虹鳟,雄激素能促使脑垂体的 GtH 合成是芳化酶的作用,将睾酮芳化为雌二醇[11]。睾酮对雌鳗脑垂体 GtH 合成的显著促进作用可能就是这种芳化作用的反映。今后有必要进一步研究睾酮刺激雌鳗脑垂体 GtH 细胞的作用机理。

本研究还发现多次注射或埋植睾酮能有效的诱导雌鳗卵巢发育。雌二醇虽能促使肝细胞合成卵黄蛋白原与释放到血液中,但卵巢的发育(表现为 GSI 的增长)都不明显;而且雌鳗肝脏明显肿大,实验期间的死亡率亦较高。这表明直接给以外源雌二醇似乎未能

完全协调雌鳗在卵巢发育过程中的各种激素作用机理，而睾酮经过芳化后所产生的作用较能符合雌鳗在卵巢发育成熟过程的生理要求。这方面的机理问题还有待深入研究。此外，本研究还发现睾酮和 LHRH-A 的协同作用并未对脑垂体的 GtH 合成或卵巢发育有任何促进，其效果和单独使用睾酮一样。这和 Crim 等对未成熟虹鳟单独埋植睾酮小囊或者加上 LHRH-A 都能同样提高脑垂体 GtH 含量的结果相似[4]，表明对性未成熟的鱼类，LHRH-A 的作用并不明显。

多次注射睾酮或雌二醇后 8 和 24h，雌鳗血清的 GtH 含量明显增加；但埋植睾酮或雌二醇后虽然促使脑垂体的 GtH 合成和卵巢发育，但所取血清样品的 GtH 含量却和对照组一样，未见升高。这可能是因为最早取血样时间是埋植后的第 5d，尽管血清 GtH 含量确有提高以促使卵巢发育，而取样时间不适宜以致未能反映血清中 GtH 含量的变化。

在 80d 内注射睾酮 16 次(5d／次)或埋植睾酮 6 次(15d／次)后雌鳗卵巢发育的进展相似，GSI 都在 15%左右，这证明埋植方法有与注射方法同样的效果；而且以间隔时间较长的慢性给药方式具有操作简便，对实验鱼损伤较小，适宜于对鱼做长时间处理等优点，在实际应用中有一定的优越性。睾酮埋植 7 次后(处理时间 105d)，雌鳗的 GSI 平均达到 20%左右，其中 1 尾达到 39.8%，卵巢中已有卵黄发生基本完成的卵母细胞，完全达到使用鲤脑垂体注射 20 次左右(处理时间约 140d)所取得的诱导雌鳗卵巢发育成熟的效果。这表明睾酮埋植有可能诱导雌鳗卵巢发育成熟达到接近排卵前的阶段。

参 考 文 献

[1] 王义强等。河鳗人工繁殖的初步研究。水产学报，1980，4(2)：147—156.

[2] Yamauchi K, Yamamoto K. Experiments on artificial maturation and fertilization of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). In: C. J. J. Richter and H. J. Th. Goos (Editors), Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Netherlands: Pudoc, Wageningen, 1982: 185—189.

[3] Peter R E. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In: W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (Editors), Fish Physiology, Vol. IX, Part A. New York: Academic Press, 1983: 97—135.

[4] Grim L W, Evans D M. Influence of testosterone and / or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol. Reprod.*, 1983, **29**: 137—142.

[5] Dufour S, Delerue-Le B N, Fontaine Y A. Effects of steroid hormone on pituiatry immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1983, **52**: 190—197.

[6] Dufour S, et al. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen. Comp. Endocrinol*, 1988, **70**: 20—30.

[7] Lin H R, et al. Effects of sex steroids, (D-Ala^6, Pro^9-N-ethylamide)-LHRH (LHRH-A) and domperidone (DOM) on gonadotropin secretion in female silver eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. The Second Asian Fisheries Forum, Hirano R. and I. Hanyu (eds.). Asian Fisheries Society, Philippines, Manila. 1990: 591—594.

[8] 林浩然等 鳗鲡繁殖生物学研究 Ⅳ.人工催熟过程中下海鳗的GtH分泌活动、性腺发育状况和脑垂体GtH细胞的超显微结构。水生生物学报，1987，**11**(4)：320—328.

[9] Chen P S, Toribara, Jr. T. Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*. 1956, **28** (11): 1756—1758.

[10] Wallace R R, Jared D W. Studies on amphibian yolk. IV. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic female and estrogen-treated males of *Xenopus leavis*. *Can. J. Biochem.*, 1968, **46**: 953—959.

[11] Crim L W, Peter R E, Billard R. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout

pituitary in response to estrogen or aromatizabde androgen steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1981, **44**: 374—381.

STUDIES ON THE BREEDING BIOLOGY OF THE EEL (*ANGUILLA JAPONICA* TEMMINCK & SCHLEGEL)

V. Effects of sex steroids on gonadotropin synthesis and secretion, as well as ovarian development in female silver eel.

Lin Haoran, Zhang Meili, Zhang Sumin and Chen Lianxi

(*Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou* 510275)

Abstract

The effects of sex steroids on gonadotropin (GtH) synthesis and release as well as ovarian development in female silver eels were investigated. Multiple injections of 17β–estradiol or testosterone stimulated GtH synthesis and secretion as well as ovarian development; testosterone was more effective than estradiol in this respect. Multiple injections of LHRH–A were ineffective on pituitary GtH content and ovarian development. Multiple implantations of 17β–estradiol or testosterone stimulated the increase n pituitary GtH content; but no significant changes in serum GtH levels were detected at the sampling times. Multiple implantations of 17β–estradiol resulted in a marked increase in serum vitellogenin content, but ovarian development was not significantly stimulated; multiple implantations of testosterone were effective in stimulating an increase in ovarian development, although there were no significant differences in the serum vitellogenin level when compared with the controls. Multiple implantations of testosterone in combination with LHRH–A did not stimulate further increase in pituitary GtH content or ovarian development. In a given duration of experiment, the effects of multiple implantations of testosterone in stimulating ovarian development were similar to those of multiple injections of testosterone. These results demonstrate that serial implantations of testosterone alone can stimulate the brain–pituitaryovary axis of the eel to enhance GtH synthesis in the pituitary and to induce ovarian development.

Key words Gonadotropin, Eel, Reproduction biology, Sex steroid, Ovarian development