

doi: 10.7541/2014.17

壳聚糖-HCG 缓释制剂对鱼类生殖内分泌机能的影响

侯志帅 温海深 尹相菡

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 以壳聚糖为原料制备壳聚糖-HCG 缓释制剂, 进行激素埋植实验, 间隔一定时间检测雌和雄鱼性腺发育、血清主要性激素含量和繁殖内分泌相关基因表达特征。结果表明: 在埋植壳聚糖-HCG 缓释激素后, 雌鱼性成熟系数(*GSI*)、血清睾酮(*T*)水平、血清雌二醇(*E₂*)水平在 6—30d 内较对照组效果明显; 雄鱼 *GSI* 仅在第 6 天显著高于对照组, 血清 *T* 水平在第 2、第 14 天高于对照组。血清 *E₂* 水平在实验期间与对照组无显著差异。RT-PCR 结果显示: 性腺型 P450 芳香化酶(*CYP19A*)在性腺中表达丰富, 心脏中最少。雌鱼性腺 P450 芳香化酶(*CYP19A*)基因 mRNA 相对表达量在第 2、第 6 天显著高于对照组, 雄鱼在第 6 天显著高于对照, 雌鱼性腺雌激素受体 (*ER α*)基因 mRNA 相对表达量在 14—30d 显著高于对照组, 雄鱼在第 6 至第 21 天显著高于对照组。研究表明, 壳聚糖-HCG 缓释制剂一次埋植后可在 21d 内稳定持久地释放激素, 对调节鱼类的生殖机能具有良好的促进效果。

关键词: 缓释制剂; HCG; 壳聚糖; 性激素; 基因表达

中图分类号: S961.2; Q579.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)01-0129-08

硬骨鱼类繁殖过程是在下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴) 的整合调节控制下进行的。许多经济鱼类在人工养殖条件下脑垂体不能正常分泌和释放促性腺激素 (GtH), 因而性腺发育迟缓, 达不到性成熟或性成熟时间很长^[1, 2]。业已证明, 与激素投喂或是传统反复注射方法相比, 激素缓释制剂只需一次给予, 即可使血清激素浓度较长时间稳定在有效阈值, 显著提高脑垂体和血清 GtH 水平, 以及雌鱼 *E₂* 水平和雄鱼 *T* 水平, 既加快性腺发育, 又能减少操作次数、减轻对鱼体的刺激, 收到较好催产效果^[3]。前人研究表明, 传统的注射 HCG 诱导日本鳗鲡 (*Anguilla japonicus*) 性腺发育成熟需要连续处理几周, 采用缓释方法仅需 2—3 次^[4], 邓岳松等利用缓释激素对雌性日本鳗鲡催熟, *GSI* 平均增加 7.9%^[5], 后来实验证明对雄性日本鳗鲡也有促进性腺成熟效果^[6]。Barbaro, *et al.* 与 Mylonas, *et al.* 则证明缓释激素对亲鱼精卵质量、数量, 精子活度等均无不良影响^[7, 8]。

人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 是由 α 和 β 二聚体的糖蛋白组成, 分子量为 36700 的糖蛋白激素, 已被广泛用于硬骨鱼类的催产排卵^[9]。生殖内分泌的研究表明, HCG 的生理作用与脑垂体促黄体激素 (LH) 等同, 且没有种的特异性^[10, 11], 因而能与 LH 受体特异结合而促使卵巢排卵, 进而调节鱼类的生殖过程。

细胞色素 P450 芳香化酶 (Aromatase) 广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中, 其中性腺型芳香化酶 (*CYP19A*) 是硬骨鱼类雄激素睾酮 (*T*) 生物合成雌激素 (主要是雌二醇, *E₂*) 的生理过程中的关键酶和限速酶^[12, 13], 从而实现硬骨鱼性别转化、分化的生理调控^[14]。雌激素受体 (*ER α*) 是雌激素作用的通路, 启动雌激素应答元件转录, 从而发挥雌激素效应^[15] 并且对性腺的发育起到关键作用^[16]。

壳聚糖是几丁质 (Chitin) 经过脱乙酰作用所得到的, 与硫酸软骨素、透明质酸等物质结构类似, 在动物体内经过代谢, 降解为氨基葡萄糖, 有较好的生物相容性。对实验动物毒性较低并且可以被吸收

收稿日期: 2012-12-17; 修订日期: 2013-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41176122); 中国海洋大学国家大学生创新实验项目 (1111010603) 资助

作者简介: 侯志帅 (1990—), 男, 山东青岛人; 硕士; 研究方向为鱼类内分泌与生殖调控。E-mail: zhishuaihaida@163.com

通信作者: 温海深 (1963—), 男, 博士, 教授; E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

利用,是一种良好的药物释放载体^[17-19]。前人曾采用胆固醇和纤维素制备激素缓释剂,释放量存在显著个体差异;而乙烯和乙烯基乙酸聚合而成的激素缓释剂则难以降解^[1]。比较而言,壳聚糖在激素缓释剂应用方面的研究尚未见报道。

金鱼(*Carassius auratus* L. var, 俗称 goldfish), 属鲤形目, 鲤科, 鲤亚科, 鲫属。具有繁殖能力强、性成熟早、多次产卵等特征, 通常被用作模式物种来研究^[20, 21]。本论文采用壳聚糖制备人绒毛膜激素缓释制剂(Chitin-HCG), 以繁殖内分泌模式动物金鱼(*Carassius auratus* L. var)为研究对象, 观察 Chitin-HCG 缓释制剂对金鱼生殖内分泌机能及对生殖相关基因表达的影响, 以期从理论上阐述缓释催产激素对鱼类各生理指标的调节方式, 为今后制备经济鱼类缓释激素制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源

在青岛市某金鱼养殖场采集同一批受精卵所孵化的一龄锦金鱼, 共 180 尾, 其中雌鱼 90 尾, 雄鱼 90 尾, 体长为 (7.76 ± 0.76) cm, 体质量为 (50.60 ± 8.94) g, 雌雄金鱼均为第一次生殖周期。由中国海洋大学海洋生命学院生物化学实验室提供直径约为 $(50-150)$ μm 的壳聚糖微球, 金鱼暂养于规格为 $40\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 35\text{ cm}$ 的玻璃水族箱中, 每箱 15 尾, 每两箱为一个实验组, 每天投喂配合饲料 2 次, 充气, 全循环流水; 暂养与养殖期间光照周期为 12:12, 水温为 $(18.21 \pm 1.95)^\circ\text{C}$; pH 为 7.84—8.12; 硬度为 4.46 mmol/L; 溶解氧为 (7.62 ± 0.56) mg/L。在实验开始时, 暂养金鱼性腺与自然状态下金鱼性腺发育同步, 采用石蜡包埋与 HE 染色进行性腺组织结构观察, 雌性金鱼卵母细胞处在大生长期晚期(III 卵巢)见图 1A, 雄性金鱼精巢精小叶腔内充满大量的精子细胞(IV 期精巢)见图 1B。

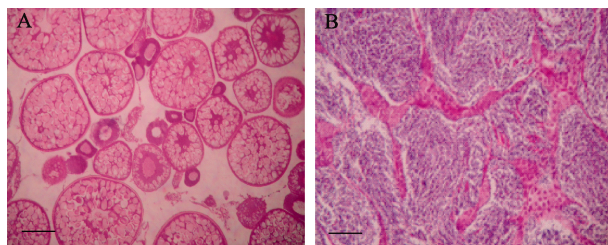


图 1 金鱼卵巢(A)和精巢(B)切片(比例尺=70 μm)

Fig. 1 Histological sections in the ovary III (A) and the testis IV (B) of female and male Goldfish (*Carassius auratus* L. var) (Scale=70 μm)

1.2 实验方法

实验分组及取样 实验分三组进行: A 组: 对照组, 一次性注射 0.7% 生理盐水 200 μL , 实验鱼类数量为 60 尾, 雌雄鱼各半; B 组: 壳聚糖-HCG 缓释制剂埋植组(简称缓释制剂埋植组), 参照邓岳松^[2]埋植 1% 壳聚糖-HCG 缓释激素 200 μL (含 HCG200IU), 实验鱼 60 尾, 雌雄鱼各半; C 组: HCG 注射组, 一次性注射 HCG 200 μL (500IU/L), 实验鱼数量为 60 尾, 雌雄各半。

对于对照组和 HCG 注射组实验鱼, 通过胸鳍基部进行生理盐水和 HCG 注射, 壳聚糖-HCG 缓释制剂埋植组, 将预先制作好的缓释微球与生理盐水制成悬浊液后, 用眼科手术刀将腹膜划开 2 mm 进行腹腔埋植, 伤口用抗生素处理。通过预实验, 确定最佳实验时间为 30d, 并根据预实验采样结果确定在埋植第 0、第 2、第 6、第 14、第 21、第 30 天, 取样 5 尾金鱼。采样前用 MS-222 进行麻醉 10min ($1/30000$ 浓度), 尾静脉取血, 分离血清; 解剖取出精巢、卵巢组织, 部分置于波恩试液中固定, 将性腺、肝脏等组织立即放入经 RNASE-FREE 处理过的 EP 管中, 在液氮罐中暂时保存, 转移于 -80°C 超低温冰箱中长期保存用于 RNA 提取。计算金鱼性成熟系数(Gonadosomatic index, GSI)=性腺重/鱼体全重。

血清激素测定 采用放射性同位素(^{125}I)标记的放射免疫测定法(RIA), 将天津九鼎医学生物有限公司生产的试剂盒测定方法进行改进, 即半微量测定: 将标准曲线的最低浓度(10 ng/dl 和 10 pg/mL)用 0 标准液稀释到 1 ng/dl 或 1 pg/mL, 然后再采用半微量法(^{125}I 标记物、标准品浓度、第一和第二抗体加半量)测定。采用 1min 计数 cpm, 所得到的结果被 2 除。

基因表达 ①性腺总 RNA 的提取及 RNA 中 DNA 去除: 随机选取金鱼各 3 尾, 用 RNAiso Reagent 法抽提总 RNA, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度。以 DNaseI 酶去除基因组 DNA。②RNA 反转录为 cDNA: 根据 TaKaRa 公司的 M-MLV 反转录体系进行 cDNA 第一链的合成。合成的 cDNA 保存于 -20°C 备用。反转录体系如下: RNA 2 μg , Oligo-dT18 4 μL , 补充 RNase-free 水至 13 μL , 进行 cDNA 第一链的合成。70 $^\circ\text{C}$ 加热 10min, 后迅速在冰上冷却。继续加入 M-MLV Buffer 5 μL , M-MLV 1 μL , Rnase inhibitor 1 μL , dNTPs 5 μL 。经过 37 $^\circ\text{C}$ 60min, 70 $^\circ\text{C}$ 15min, 95 $^\circ\text{C}$ 加

热 5min, 结束反应。③CYP19A 基因和 ER α 基因 mRNA 扩增: 取所需检测的组织样品 cDNA 1 μ L 作为模板进行 PCR 扩增。实验所需的 3 对 PCR 特异性引物由 Primer 5.0 软件设计(表 1), 选择含量丰富、稳定, RT-PCR 背景丰富的 18S rRNA 作为反应的内参照物。取 5 μ L 的 PCR 产物进行电泳。对电泳结果采用 Tanon GIS 凝胶图像处理系统进行分析。

表 1 金鱼性腺芳香化酶基因(CYP19A)、雌激素受体(ER α)和 18S 基因的表达所用引物

Tab. 1 Primers used for goldfish CYP19A, Era and 18S gene mRNA expression analysis

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
CYP19A F	AGTCCGCACCTTTTACGC
CYP19A R	TCCACTACAATGCACCGC
ER α F	GCGACGGGACTGAGTGATA
ER α R	TTGGACGACAGGTACTGGATT
18S rRNA F	CCTGAGAAACGGCTACCACATC
18S rRNA R	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG

数据统计与分析 用 SPSS 13.0 软件对相同采样时间点的雌、雄鱼各组数据进行 Duncan 氏多重比较, 所得结果采用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。

2 结果

2.1 HCG 缓释制剂对金鱼性腺发育的影响

HCG-壳聚糖微球埋植组和 HCG 注射组雌性金鱼性成熟系数的变动趋势均呈现先升高后下降(图 2), 性成熟系数在缓释制剂埋植后第 14 至第 30 天显著高于对照组($P<0.05$)。对于雄性金鱼性成熟系数, HCG-壳聚糖微球埋植组在埋植后第 6 天显著高于对照组和 HCG 埋植组($P<0.05$)并达到最高值; HCG 注射组在整个实验期间呈现先上升再下降的变动趋

势(图 2)。

2.2 HCG 缓释制剂对金鱼血清激素水平的影响

HCG 缓释制剂对金鱼血清睾酮(T)水平的影响

实验期间, 雌性金鱼血清睾酮水平在 HCG 缓释制剂的作用下呈现规律性变动, 波动范围为 2.18—11.386 ng/dl。HCG 缓释制剂埋植组血清睾酮水平在缓释制剂埋植后第 6 至第 21 天显著高于对照组($P<0.05$), 在埋植后第 21、第 30 天显著高于 HCG 注射组($P<0.05$)且第 21 天出现最高值; 埋植后第 6 天 HCG 注射组血清睾酮最高值出现。HCG 缓释制剂埋植组、HCG 注射组血清睾酮水平在实验期间随时间均呈现出先升后降的变化趋势(图 3)。雄性金鱼血清睾酮水平在 HCG 缓释制剂作用下也呈现规律性的变动, 变动范围为 13.11—76.22 ng/d。其中, HCG 缓释制剂埋植组在缓释制剂埋植后第 2、第 14 天显著高于对照组($P<0.05$), 在第 2 天显著低于 HCG 注射组($P<0.05$), 在第 14 天出现最大值; HCG 注射组最高值出现于埋植后第 2 天, 最低值出现在第 6 天。HCG-壳聚糖微球埋植组、HCG 注射组均呈现出先升高后下降的变化趋势(图 3)。

HCG 缓释制剂对金鱼血清雌二醇(E₂)水平的影响

HCG 缓释制剂埋植组、HCG 注射组血清雌二醇水平在整个实验期间随时间的变化呈现先升后降的趋势, 水平波动在 3.570—24.36 pg/mL。在雌鱼中, HCG 缓释制剂埋植组在埋植后第 6 至第 30 天显著高于对照组($P<0.05$), 在埋植后第 14 至第 21 天显著高于 HCG 注射组($P<0.05$), 缓释制剂埋植后第 14 天出现最高值; HCG 注射组血清雌二醇水平最高值出现于注射后第 2 天(图 4)。雄性金鱼血清雌二醇水平在 1.74—6.77 pg/mL 变动。HCG 缓释制剂埋植

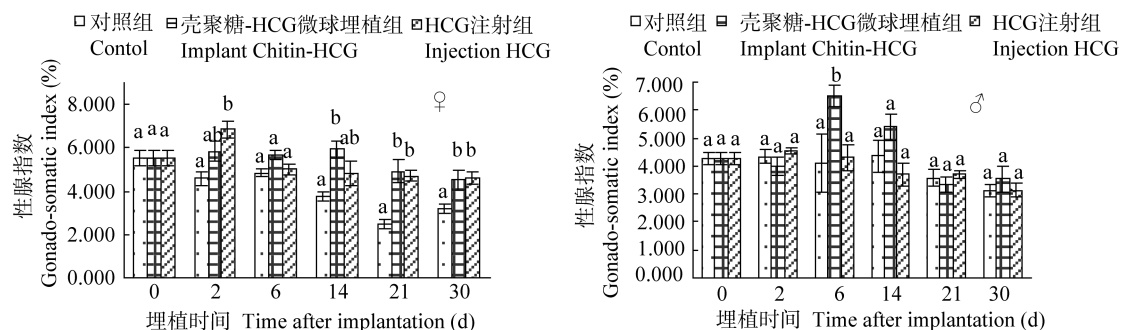


图 2 实验期间受试鱼性成熟系数变动

Fig. 2 The changes of gonad somatic index of male and female goldfish during experiments

图 中所标注的不同字母为存在显著性差异($P<0.05$); 下同

Different letters indicate significant difference ($P<0.05$), $n=3$; the same applies below

组在埋植后第 2 天显著低于 HCG 注射组($P<0.05$), 缓释制剂埋植后第 14 天最高值出现; HCG 注射组在

处理后第 2 至第 14 天显著高于对照组($P<0.05$), 其最高值出现于注射后第 2 天(图 4)。

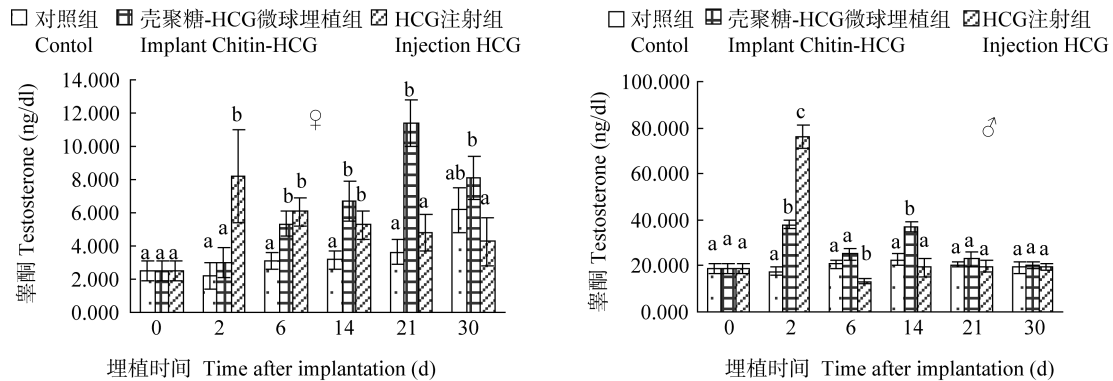


图 3 实验期间受试鱼血浆睾酮(T)含量变动

Fig. 3 The levels of serum testosterone of male and female goldfish during experiments

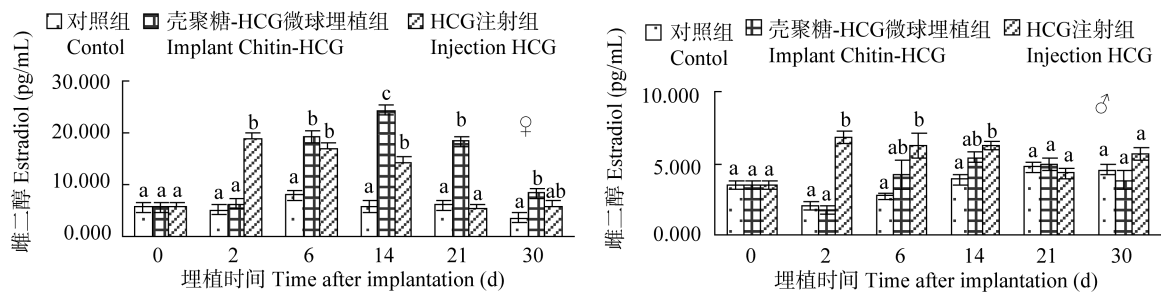


图 4 实验期间受试鱼雌二醇(E₂)含量变动

Fig. 4 The levels of serum estradiol of male and female goldfish during experiments

2.3 HCG 缓释制剂对金鱼性腺基因相对表达量的影响

CYP19A 基因在各组织中的表达 取正常的金鱼的卵巢、精巢、脑、肝脏、肠、心、脾、肾、鳃和肌肉 10 个组织, 用半定量 RT-PCR 的方法测定 CYP19A 基因的表达情况。如图 5 所示, 该基因在上述 10 种组织中都有表达, 但是表达量有所差异: 性腺中表达丰富, 心脏中最少。

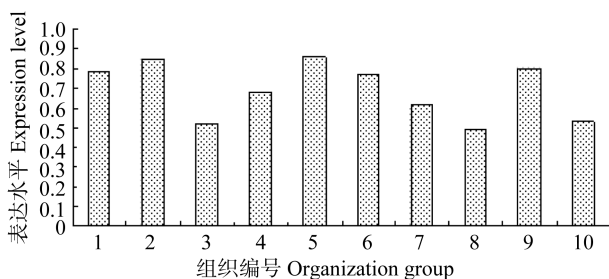


图 5 CYP19A 基因 mRNA 在金鱼各组织表达

Fig. 5 The expression of CYP19A gene in the tissues of the goldfish
1. 精巢; 2. 卵巢; 3. 鳃; 4. 肠; 5. 肝; 6. 肌肉; 7. 脑; 8. 心; 9. 脾; 10. 肾
1. testis, 2. ovary, 3. gill, 4. intestine, 5. liver, 6. muscle, 7. brain, 8. heart, 9. spleen, 10. kidney

HCG 缓释制剂对金鱼性腺 CYP19A 基因 mRNA 相对表达的影响

HCG 缓释制剂埋植组、HCG 注射组 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量在整个实验过程中随时间变化出现了先升高后下降的变化趋势。雌性金鱼 HCG 缓释制剂埋植组 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量在埋植后第 2 至第 6 天显著高于对照组($P<0.05$), 其最高值出现在埋植后第 2 天; HCG 注射组 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量在注射后第 6 天出现最高值(图 6)。HCG 缓释制剂埋植组在埋植后第 6 天金鱼精巢中 CYP19A 基因 mRNA 相对表达量显著高于对照组($P<0.05$), 在其余各样品采集时间点与对照组和 HCG 注射组均没有出现显著性差异, 其最高值出现于缓释制剂埋植后第 6 天; HCG 注射组在各样品采集时间点均没有与对照组出现显著性差异, 其最高值出现于埋植后第 6 天(图 6)。

HCG 缓释制剂对金鱼性腺 ERα 基因 mRNA 相对表达量的影响

HCG 缓释制剂埋植组、HCG 注射组雌性金鱼卵巢 ERα 基因 mRNA 相对表达量随时间变化呈现先升高后下降的变化趋势(图 7)。HCG 缓释制剂埋植组在埋植后第 14 至第 30 天显著高于

对照组($P<0.05$), 在埋植后第 6 天显著低于 HCG 注射组($P<0.05$), 在埋植后第 14 至第 30 天显著高于 HCG 注射组($P<0.05$), 其相对表达量最高值出现于缓释制剂埋植后第 14 天; HCG 注射组 *ERα* 基因 mRNA 相对表达量的最高值出现于注射后第 6 天。HCG 缓释制剂埋植组、HCG 注射组对雄性金鱼精

巢 *ERα* 基因 mRNA 相对表达量在整个实验过程中随时间的变化呈现先升高后下降的变化趋势(图 7)。HCG 缓释制剂埋植组在埋植后第 6 至第 21 天显著高于对照组($P<0.05$), 其最高值出现于埋植后第 14 天; HCG 注射组 *ERα* 基因 mRNA 相对表达量在注射后第 21 天出现最高值。

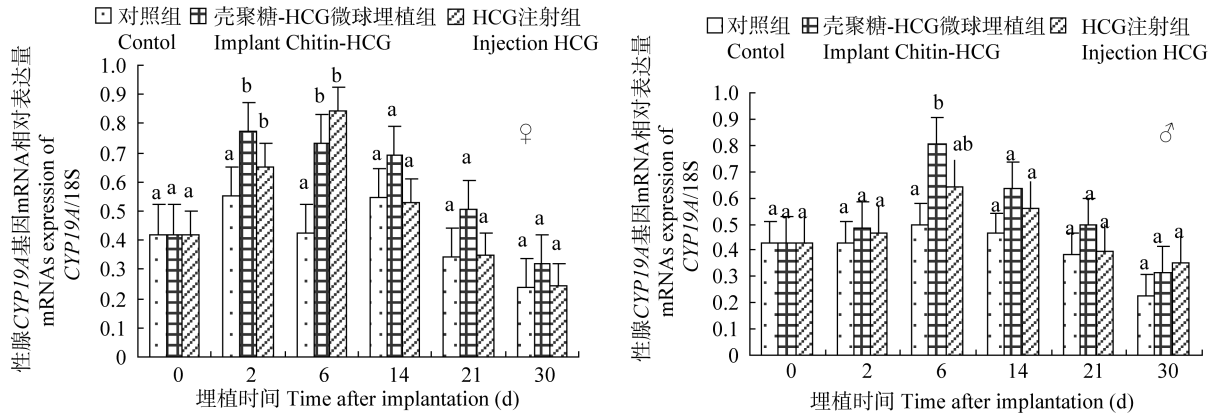


图 6 实验期间受试鱼 *CYP19A* 基因 mRNA 相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *CYP19A* in male and female goldfish during experiments

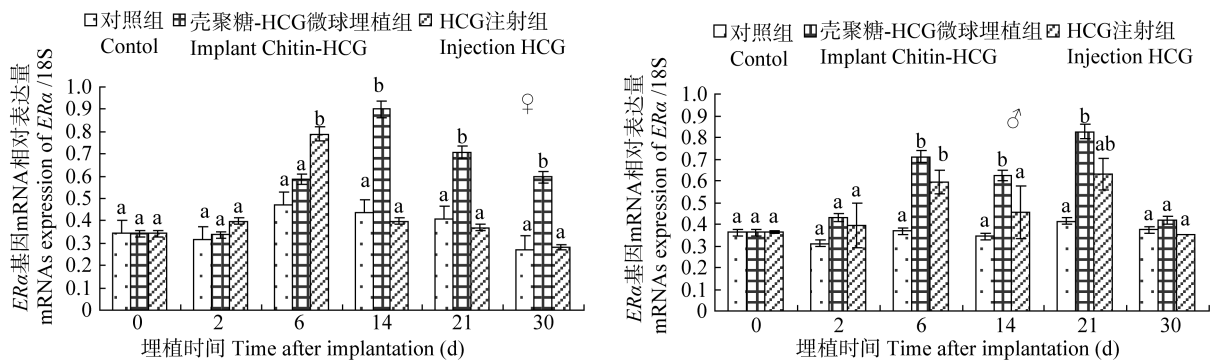


图 7 实验期间受试鱼 *ERα* 基因 mRNA 相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *ERα* mRNA in male and female goldfish during experiments

3 讨论

基于纳米缓释微球激素制作标准, 考虑到鲤科鱼 HCG 用量标准^[22, 23], 结合养殖生产实践经验, 本实验确定缓释载体与催产激素使用量为 10-20:1(含 HCG200IU)。结果表明, Chitin-HCG 缓释纳米微球能够通过正反馈途径促进金鱼性腺发育, 在埋植 30d 时间内, 雌鱼 *GSI* 显著升高, 能显著诱导血清睾酮和雌二醇分泌, 证明 Chitin-HCG 缓释纳米微球激素的效果长久且稳定。

雌性金鱼实验期间性腺 *CYP19A* 基因 mRNA 相对表达量在第 2、第 6 天显著高于对照组, 在 14—30d 仍高于对照组却无显著性差异, 血清中雌二醇

也在第 6 天后显著高于对照组, 由于无法测量金鱼血清中 *GtH* 浓度, 推测是缓释激素促进了垂体释放 *GtH*, 进而 *GtH* 作用卵巢膜细胞合成雌激素前体(睾酮), 再经颗粒细胞层芳香化为雌二醇。雌二醇可以作用于肝脏合成卵黄原蛋白, 而 *CYP19A* 是雌激素的生成关键酶和限速酶^[13], 催化雄激素(尤其是睾酮)转化为雌二醇^[24, 25], 血清雌二醇含量和 *CYP19A* 基因 mRNA 相对表达量的显著升高, 说明 Chitin-HCG 缓释激素能较好的促进雌性金鱼卵巢的发育, 特别是 III-IV 时卵黄的积累。*ERα* 是雌激素(雌二醇)的作用通路, 雌激素通过雌激素受体(*ERα*)可以刺激催乳素, 生长激素等激素的分泌^[26]。*ERα*

mRNA 相对表达量在 14—30d 显著高于对照组, 验证了 Chitin-HCG 对金鱼的生殖生长有促进作用。作为雌二醇的前体物质, 雌性金鱼血清睾酮水平在 14—30d 时间内显著升高, 说明埋植缓释 HCG 制剂能显著提高血清睾酮浓度。林浩然在其所著的《鱼类生理学》中曾指出 GtH 促使卵巢膜细胞产生大量睾酮, 用睾酮做底物和颗粒细胞层孵育, 可产生大量雌二醇^[27]。赵会宏等研究了斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 卵巢发育过程血清性类固醇激变化, 结果进入生殖季节斜带石斑鱼体内的雌二醇及睾酮含量增长迅速^[28]; 张利红等对性未成熟的雌性日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 进行 ADSD (睾酮前体物质) 埋植, 显著促进了埋植雌鱼性腺发育^[29]。

雄鱼 GSI、性腺 CYP-19A 基因 mRNA 相对表达量在第 6 天均显著高于对照组, 杨艳平对许氏平鲈 (*Sebastes schlegelii*) 精巢进行免疫组织化学分析, 结果能分泌雄激素的精巢间质细胞对芳香化酶抗体有较强免疫阳性^[30]。本实验在一定程度上验证了 CYP19A 对雄鱼的精巢发育有积极的生理作用, 但是雄鱼血清睾酮被脑型芳香化酶 (CYP19B) 芳香化为雌二醇, 因此 CYP19A 如何作用于雌二醇进而调节精巢发育有待于进一步研究。雄性金鱼 *ERα* 基因 mRNA 相对表达量在 6—21d 显著高于对照组, 与温海深等的研究相似, 即 E_2 与其受体结合后对精巢发育起到关键作用的结果相符^[16], 进而促进雄鱼性腺发育。

另外, CYP19A 基因 mRNA 在性腺、肝、脾中表达丰富, 猜测 CYP19A 有较为广泛的生理功能, 其在肝脾, 甚至肌肉中的作用机理值得我们进一步探究。值得注意的是, CYP19A 在脑中也有表达, 但表达量低于性腺, 徐跑等^[31]研究黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 也曾发现 CYP19B (脑型芳香化酶) 表达量为丘脑>垂体>端脑>性腺。两种芳香化酶互相的作用机制也为进一步的探究提供了思路。

非缓释的 HCG 注射组, 对金鱼生殖内分泌也起到了一定的调控效果, 但是持续时间较短, 如图 3 中注射第 2、第 6 天后的雄鱼血清睾酮水平, 药物浓度急速达到峰值, 然后骤降, 相关数据表现出极大地波动性, 血清激素水平的剧烈波动不仅不能够起到较好的促进性腺发育的效果, 反而会对鱼体产生胁迫作用。因此, 与传统的注射方式比较, Chitin-HCG 缓释激素可以长久、稳定地对金鱼性腺发

育产生促进作用。壳聚糖微球作为经济鱼类缓释激素载体使用, 有较好的生物相容性, 不会对埋植鱼体产生胁迫反应, 还可以使激素在鱼体的释放形成有效的浓度梯度, 促进药物吸收, 起到保持药物活性, 提高药物稳定性的作用, 从而促进经济鱼类性腺发育。

参考文献:

- [1] Wen H S, Lin H R. Study advance on induction of gonadal development & maturation and reproductive performance by sustained hormone-releasing delivery systems in marine fishes [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(2): 177—182 [温海深, 林浩然. 激素缓释剂诱导海水养殖鱼类性腺发育成熟与生殖行为的研究进展. 中国水产科学, 2002, 9(2): 177—182]
- [2] Deng Y S. The hormone implant technology of fish gonadal development and maturation [J]. *Reservoir Fisheries*, 1998, 6(1): 13—14 [邓岳松. 鱼类激素埋植催熟技术. 水利渔业, 1998, 6(1): 13—14]
- [3] Shu H, Liu X C, Lin H R. Sustained administration of LHRH-A promotes sex steroid hormone secretion, testicular development and spermiation in male *Epinephelus akaara* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(4): 432—440 [舒虎, 刘晓春, 林浩然. LHRH-A 缓释剂促进雄性赤点石斑鱼性类固醇激素分泌和精巢发育与排精的研究. 水产学报, 2005, 29(4): 432—440]
- [4] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 17: 163—169
- [5] Deng Y S, Ling H R, Xie J. Induction of gonadal development and maturation in *Anguilla japonica* by injection of HCG & CPE—containing wow emulsion [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(2): 44—47 [邓岳松, 林浩然, 谢骏. 注射含 HCG 和 CPE 的 WOW 复乳诱导日本鳗性腺发育成熟的研究. 中国水产科学, 2001, 8(2): 44—47]
- [6] Deng Y S, Lin H R. Development and maturation of GONAD Japanese eel, *Anguilla japonica* induced by injection of gelatin—sodium carboxymethyl cellulose—microcapsule [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2000, 24(4): 34—37 [邓岳松, 林浩然. 埋植雄烯二酮一次诱导雄性日本鳗性腺发育成熟的研究. 海洋科学, 2000, 24(4): 34—37]
- [7] Barbaro A, Francescon A, Bozzato G, et al. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by long-acting GnRH agonist and it's effects on egg quality and daily timing of spawning [J]. *Aquaculture*, 1997, 154: 349—359
- [8] Sorbera L A, Mylonas C C, Zanuy S, et al. Sustained

- administration of GnRH a increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1996, **276**: 361—368
- [9] Malison J A, Procarione L S, Kayes T B, *et al.* Induction of out-of-season spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*) [J]. *Aquaculture*, 1998, **163**: 151—161
- [10] Ziecik A J, Derecka K, Gawronska B, *et al.* Non-gonadal LH/hCG receptors in pig: functional importance and parallels to human [J]. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2001, **19**: 19—30
- [11] Rao C V. An over view of the past, present, and future of non-gonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine [J]. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2001, **19**: 7—17.
- [12] Huang W, Zhou L, Liu J X, *et al.* The CYP19A1A promoter of red-spotted grouper directs the expression of GFP in early primary gonad cells of zebrafish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(3): 502—508 [黄伟, 周莉, 刘静霞, 等. 赤点石斑鱼卵型芳香化酶基因启动子调控绿色荧光蛋白在斑马鱼早期生殖腺中的表达. 水生生物学报, 2010, **34**(3): 502—508]
- [13] Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, *et al.* Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rain-bow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, **54**(2): 154—162
- [14] Nakamara M, Kobayashi T, Chang X, *et al.* Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, **281**: 362—372
- [15] Weigel N L, Zhang Y X. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors [J]. *Molecular Medicine*, 1998, **76**: 469—479
- [16] Wen H S, Wang L S. Studies on physiology function on testosterone and 17 β estradiol and it's receptors during testis development of *Hexagrammos otakii* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, **39**(5): 903—907 [温海深, 王连顺. 大泷六线鱼睾酮和雌二醇及其受体在精巢发育中的生理作用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, **39**(5): 903—907]
- [17] Yao Z A, Wu H G, Xing F Y. The progress of the application of chitosan in tissue engineer [J]. *China Biotechnology*, 2003, **23**(10): 32—36 [姚子昂, 吴海歌, 邢福有. 壳聚糖在组织工程中应用的研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, **23**(10): 32—36]
- [18] Zhu G F, Zhao L H. The progress about study of N-acetylchito-oligosaccharides and chito-oligosaccharides [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2001, **19**(1): 43—46 [竺国芳, 赵鲁杭. 几丁寡糖和壳寡糖的研究进展. 中国海洋药物, 2001, **19**(1): 43—46]
- [19] Jeon Y J, Park P T, Kim S K. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor [J]. *Carbohydr Polym*, 2001, **44**(1): 71—76
- [20] Wan A, An S Q, Hua T M. A neuroanatomical study of the black dragoneye's retina and optic tectum in comparison with the red crucian's [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(1): 100—105 [万安, 安树青, 华田苗. 墨龙江红鲫的视网膜和视盖解剖结构比较. 水生生物学报, 2013, **37**(1): 100—105]
- [21] Liu J, Fu S J, Hu W F. Tissue-special and developmental expressions of patterns of PP2A-A α/β in goldfish and zebrafish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **35**(3): 393—399 [刘姣, 付淑君, 胡雯峰. PP2A—A α/β 在金鱼及斑马鱼发育中的分化表达模式. 水生生物学报, 2013, **35**(3): 393—399]
- [22] Xiong P C. The reasonable use of fish oxytocin [J]. *Rural Animal-Production Technology*, 2000, (12): 11—12 [熊谱成. 鱼类催产剂的合理使用. 农村养殖技术, 2000, (12): 11—12]
- [23] Li S M. Practical of Goldfish Breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press. 1995, 18—36 [李素梅. 实用养金鱼大全. 北京: 中国农业出版社. 1995, 18—36]
- [24] Tong S K, Chung B C. Analysis of zebrafish cyp19 promoters [J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, **86**: 381—386
- [25] Liu X L, Wang Q, Jia L Z. Alterations in testicular histology and the mRNAs of enzymes responsible for sex steroid synthesis in the zebrafish *Danio rerio* exposed to nonyphenol [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, **31**(11): 2523—2529 [刘晓丽, 汪奇, 贾林芝. 壬基酚对斑马鱼精巢组织及性激素合成酶基因表达的影响. 环境科学学报, 2011, **31**(11): 2523—2529]
- [26] Guo J, Zhang S J, Tang Q P. Biological function of estrogen receptors in pituitary [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, (10): 976—979 [郭军, 章双杰, 汤青萍. 雌激素受体在垂体中的作用. 生命科学, 2011, (10): 976—979]
- [27] Lin H R. Fish Physiology [M]. Zhongshan University Press. 2011, 300—301 [林浩然. 鱼类生理学. 中山大学出版社. 2011, 300—301]
- [28] Zhao H H, Liu X C, Liufu Y Z. Seasonal cycles of ovarian development and serum sex steroid levels of female grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, **42**(6): 56—63 [赵会宏, 刘晓春, 刘付永忠. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化. 中山大学学报, 2003, **42**(6): 56—63]
- [29] Zhang L H, Zhang W M, Lin H R. The feedback effects of 4-androstene-3, 17-dione and 17 α -methyl-testosterone on gonadal development in the female *Anguilla japonica* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, **24**(5): 407—411 [张利红, 张为民, 林浩然. 雄烯二酮和甲基睾酮诱导雌性日本鳗鲡性腺发育的反馈调节作用. 水产学报, 2000, **24**(5): 407—411]
- [30] Yang Y P. Studies on reproduction Physiological function of the P450arom in rockfish (*Sebastes schlegelii*) [D]. Graduate

Student Degree Thesis of Ocean University, Qingdao. 2010

[杨艳平. P450 芳香化酶在许氏平鲉繁殖生理中的作用研究. 中国海洋大学研究生学位论文, 青岛. 2010]

[31] Xu P, Yu J H. Molecular cloning of neural P450arom and its

expression in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(5): 591—598 [徐跑, 俞菊华.

黄颡鱼脑 P450 芳香化酶基因的克隆和组织表达. 水产学报, 2005, 29(5): 591—598]

STUDIES ON THE EFFECTS OF SUSTAINED-RELEASE DELIVERY SYSTEMS OF CHITIN-HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (CHITIN-HCG) ON REPRODUCTION ENDOCRINE FUNCTION OF GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS* L. VAR)

HOU Zhi-Shuai, WEN Hai-Shen and YIN Xiang-Han

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: With Sustained-release delivery systems of Chitin-Human Chorionic Gonadotropin (Chitin-HCG), at regular intervals after implantation of Chitin-HCG, we detected the gonadal developments, the levels of major sex hormones in serum and the relative expression levels of genes for reproduction endocrine function of female and male fish. The results showed that implanted the Chitin-HCG, the gonado-somatic index (*GSI*), levels of testosterone (T) and estradiol (E_2) of female fish were more effective than the controlled group from the 6th day to the 30th day. The *GSI* of male fish was significantly higher than the controlled group only at the 6th day after implantation. The levels of testosterone (T) of male fish were significantly higher than the controlled group at the 2nd and the 14th day after implantation and the levels of estradiol (E_2) of male fish showed no significant difference with the controlled group. With the RT-PCR, it showed that the content of the relative expression level of *CYP19A* mRNA was the most significant in gonad and the least significant in heart. The result of RT-PCR showed that the relative expression level of *CYP19A* mRNA in gonad of female fish was significantly higher than the controlled group at the 2nd and the 6th day after implantation, and that of the male fish was significantly higher than the controlled group at the 6th day after implantation. The relative expression level of *ER α* mRNA in gonad of female fish was significantly higher than the controlled group from the 14th day to 30th day after implantation, and that of the male fish was significantly higher than the controlled group from the 6th day to the 21st day after implantation. In conclusion, after implantation of Chitin-HCG, the HCG can be released steadily and regularly in 21 days, promoting and regulating the reproduction endocrine function of fish.

Key words: Sustained-release delivery systems; HCG; Chitin; Sex hormone; Gene expression