

催产时黄鳢性类固醇激素含量变化的研究*

周定刚 郑维明 张大祥

(四川农业大学,雅安 625014)

提 要

本文首次报道哺乳动物促黄体生成素释放激素类似物(LHRH-A)诱导黄鳢排卵过程中,血浆雌二醇(E_2)、孕酮(P)和睾酮(T)含量变化的规律。根据172尾黄鳢血样放射免疫测定结果,试验组雌鱼于排卵前相继出现 E_2 和P浓度高峰($P < 0.01$);雄鱼于催产后24h出现T浓度峰值($P < 0.01$);试验组雌鱼的T含量与对照组无显著差异($P > 0.05$)。在对照组,雄鱼的 E_2 和P浓度及雄鱼的T含量差异不显著($P > 0.05$)。

关键词 黄鳢 LHRH-A,诱导排卵,类固醇激素,血浆雌二醇,孕酮,睾酮

人工合成的促黄体生成素释放激素类似物(LHRH-A)已被证明能促使一些硬骨鱼类促性腺激素(GtH)的分泌。性类固醇激素则在GtH诱导卵母细胞最终成熟和排卵过程中,起着中介作用^[1]。但是,不同种属鱼类对LHRH-A的反应敏感性不同。Crim等^[2]认为,鲑科鱼类对LHRH-A的敏感性比鲤科鱼类低;对黄鳢的催产试验^[3]间接表明,合鳃科鱼类对该类似物的敏感性亦低于鲤科鱼类。LHRH-A诱导黄鳢排卵所需剂量大、效应时间长,明显超过家鱼^[3];其作用机制有何特点,至今未见报道。

作者对采用LHRH-A催产期间,黄鳢[*Monopterus albus* (Zuiew)]血浆睾酮(Testosterone, T)、雌二醇(Estradiol, E_2)和孕酮(Progestsrone, P)含量的变化规律进行了研究,探索其与雄鱼排精及与雌鱼卵母细胞最终成熟的关系,为某些性类固醇激素作为黄鳢催产增效剂的可能性提供理论依据。

1 材料与方法

试验黄鳢于1990年6月初购自雅安市农贸市场,暂养于室外水泥池内。注射激素前,先按催产要求检查性腺发育状况^[3],试验结束后解剖观察,测定GSI值。对性腺成熟度较差的黄鳢,其血清不进行放射免疫测定。

试验前,将黄鳢随机分组,称重、编号。试验于1990年6月8—16日进行。水温20—22.5℃。试验组黄鳢,每尾按0.3 μ g/g体重剂量注射LHRH-A;对照组仅注射生理盐

* 四川省科委应用基础理论资助项目。本校101研究室协助放射免疫测定,特致谢意。
1992年1月18日收到;1994年10月28日修回。

水。注射后,分别于 7、24、48、72 和 96h 以及排卵时和产卵后从尾静脉采取血样,以备测定。试验组雄鱼 $GSI = 0.81 \pm 0.15$, 雌鱼 $GSI = 17.52 \pm 1.44$; 对照组雄鱼 $GSI = 0.56 \pm 0.09$, 雌鱼 $GSI = 17.96 \pm 2.04$ 。雄鱼检测注射前能挤出少量稀薄透明精液。共 172 尾黄鳢血样。其中, E₂ 36 尾、P 76 尾、T 60 尾。

血清样用石油醚抽提。E₂、P 和 T 的含量用上海内分泌所生产的 RIA 药盒测定。

用方差分析 (F 检验) 和多重比较 (T 法) 确定各个试验组之间血浆性类固醇含量的显著性差异; 用 t-检验法比较试验组和对照组的差异程度。

2 结果

LHRH-A 诱导黄鳢排卵期间, 血浆 E₂、P 和 T 浓度的变化如图 1-4 所示。结果表明, 试验组雌鱼血浆 E₂ 浓度于催产后 7h 显著增高 ($95.33 \pm 31.39 \text{ pg/ml}$, $P < 0.05$), 24h 达到高峰 ($132.67 \pm 70.15 \text{ pg/ml}$, $P < 0.01$); P 浓度于催产后 24h 明显上升 ($9.66 \pm 3.32 \text{ ng/ml}$, $P < 0.05$), 48h 极显著升高 ($13.31 \pm 6.01 \text{ ng/ml}$, $P < 0.01$); 临产前 (催产后 96h), 以上两种激素的浓度均逐渐下降至临近注射时水平 (E₂ 为 $8.33 \pm 1.53 \text{ pg/ml}$; P 为 $4.23 \pm 1.66 \text{ ng/ml}$)。在对照组, E₂ 和 P 浓度均无显著差异 ($P > 0.05$)。试验组雄鱼血浆的 T 浓度于催产后 24h 出现峰值 ($13.67 \pm 6.03 \text{ ng/ml}$, $P < 0.01$), 以后渐次回降到注射前水平 ($1.57 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$)。试验组雌鱼血浆 T 浓度变化与对照组相同, 均在试验开始 24h 极显著升高 (前者为 $19.30 \pm 1.23 \text{ ng/ml}$; 后者为 $16.50 \pm 1.66 \text{ ng/ml}$), 48h 仍维持较高浓度 (试验组 T 为 $15.60 \pm 2.30 \text{ ng/ml}$; 对照组为 $14.10 \pm 1.38 \text{ ng/ml}$), 96h 降低至较

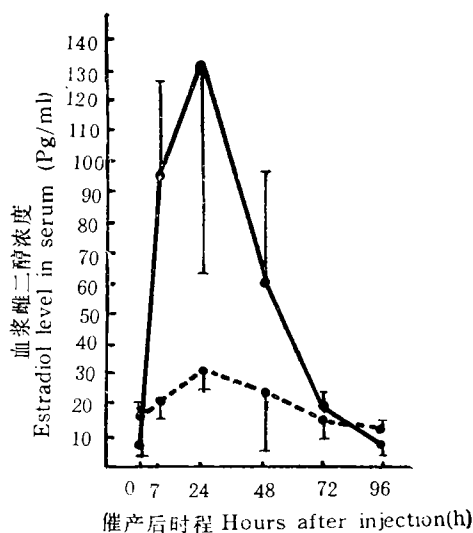


图 1 注射 LHRH-A 前后雌黄鳢血浆 E₂ 浓度的变化

Fig. 1 Changes of estradiol (E₂) levels in serum during spawning induced with LHRH-A in female *Monopterus albus*.

——试验组 (Treated)对照组 (Control)

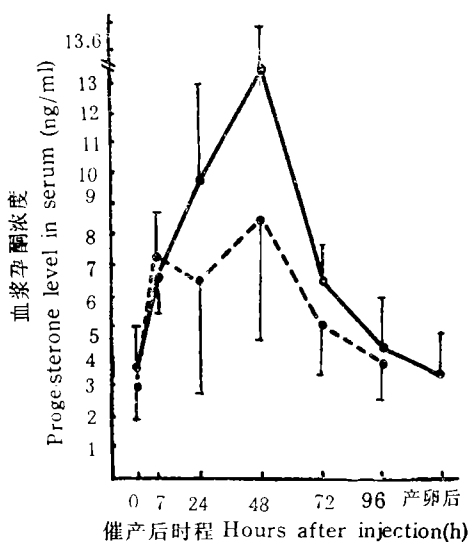


图 2 注射 LHRH-A 前后雌黄鳢血浆 P 浓度的变化

Fig. 2 Changes of progesterone (P) levels in serum during spawning induced with LHRH-A in female *Monopterus albus*.

——试验组 (Treated)对照组 (Control)

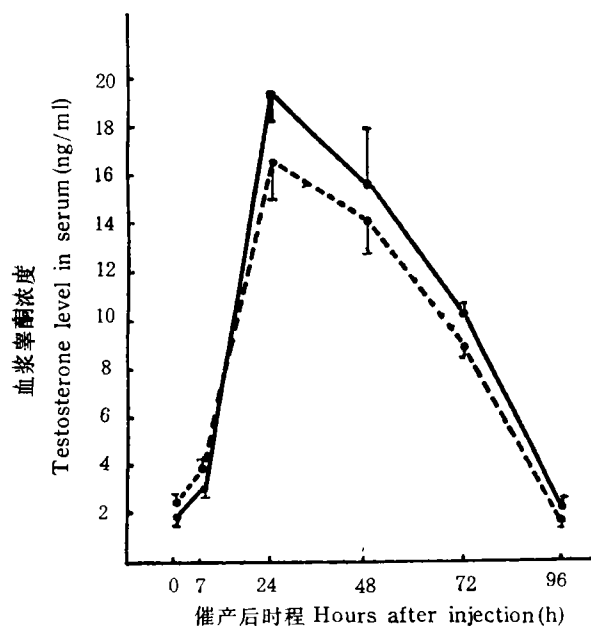


图3 注射 LHRH-A 前后雌黄鳍鱔血浆T浓度的变化

Fig. 3 Changes of testosterone (T) levels in serum during spawning induced with LHRH-A in female *Monopterus albus*

——试验组 (Treated)对照组 (Control)

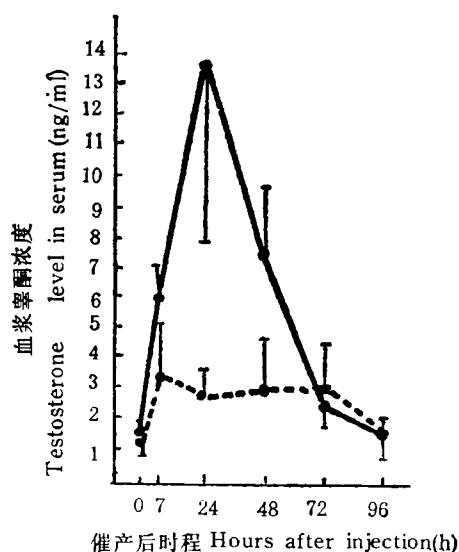


图4 注射 LHRH-A 前后雄黄鳍鱔血浆T浓度的变化

Fig. 4 Changes of T levels in serum during spawning induced with LHRH-A in male *Monopterus albus*

——试验组 (Treated)对照组 (Control)

低水平(分别为 2.10 ± 0.23 和 $1.80 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$)。经 t 检验表明,试验组和对照组 T 浓度差异不显著 ($P > 0.05$)。催产 96h 时,试验组雌鱼排卵率为 60% (96h 后排卵的鱼未计入内);对照组为零。

3 讨论

3.1 关于睾酮(T)的作用

根据本试验结果,试验组和对照组雌鱼的 T 含量均于注射后 24h 和 48h 极显著升高 ($P < 0.01$), 48h 后逐渐降低,其变化过程基本相似(图 3)。经 t 检验表明,试验组雌鱼的 T 含量与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。以上结果一方面说明,性腺已发育成熟的雌黄鳍,其 E_2 的主要前体——T 在起初一段时间内仍有明显上升趋势;另一方面说明,注射 LHRH-A 后雌鱼 T 值无显著变化, T 在诱导排卵过程中作用不大。

在本试验中,雄鱼的情况与雌鱼有所不同。雄黄鳍注射 LHRH-A 后 24h, 其 T 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 此时轻压黄鳍腹部可挤出比注射前更多的精液。提示 LHRH-A 能间接或直接刺激睾酮分泌, 并促使雄鱼排精。作者曾给已达性成熟的雄鱼直接注射丙酸睾丸素,证实该激素亦有促使雄鱼排精的作用。但经镜检发现,在雄鱼排出的精液中,有的含有成熟精子,有的则未见精子或仅含有少数无尾、断尾和双尾等畸形精子。这提示,雄激素对精子发生 (Spermatogenesis) 和释离 (Spermiation) 的具体作用和调控问题较为复杂,还有待进一步研究。

3.2 关于雌二醇 (E_2) 的作用

某些离体研究结果表明,雌激素通常对诱导卵母细胞最终成熟是无效的^[4]。尽管如此离体试验和其它研究方法一样难免有它的局限性。因此,在离体研究的基础上,仍有必要结合整体试验探讨雌激素的作用。本试验运用 LHRH-A 诱导排卵期间,黄鳝血浆 E_2 水平于催产后 7h 持续上升,24h 达到高峰,临产前降至最低水平(图 1)。 $17\beta-E_2$ 的含量变化规律与卵黄的形成、积累密切相关^[5]。催产初期黄鳝 E_2 含量迅速升高,是否与诱导肝脏合成卵黄蛋白原,以加速卵黄物质积累和卵黄发生完成有关,还有待证实。临产前 E_2 含量显著下降,说明该激素对诱导卵母细胞最终成熟无直接作用。这与前人在其它鱼类的离体研究结果^[4]一致。

据作者研究,可供催产的黄鳝其卵巢发育一般处于卵黄发生晚期阶段¹⁾。在卵黄发生完成前,鳝卵的胚泡已从卵母细胞中心偏移;而在另一些鱼类,直到卵黄发生完成时,胚泡才开始偏移细胞中心位置^[6]。胚泡偏移至胚孔处的动物极,乃是与卵母细胞最终成熟有关的可见变化之一。从上述胚泡发生偏移的不同情况可见,不同种属鱼类卵母细胞的最终成熟并不都是从卵黄发生完成后始动的。黄鳝即是如此。这也许是催产初期黄鳝血浆 E_2 浓度仍维持于较高水平的原因。

本试验结果不同于前人在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 和鲢 [(*Hypophthalmichthys molitrix* (Curier et Valerxiennes))] 所观察到的现象。团头鲂,经催产后 $17\beta-E_2$ 显著下降^[5];鲢,变化不显著^[7]。由于鲤科鱼类和黄鳝卵母细胞最终成熟经历的时间不同(鲤科鱼类催产 20h 左右达到成熟排卵^[7];而黄鳝则需 1—8 天^[3]),加之催产时彼此性腺成熟状况、激素注射剂量和采血取样时间等存在差别,对以上不同结果很难进行直接比较。

3.3 关于孕酮 (P) 的作用

本试验表明,运用 LHRH-A 诱导黄鳝排卵期间,其血浆 P 浓度于催产后 24h 明显上升 ($P < 0.05$),48h 极显著升高 ($P < 0.01$),临产前(催产后 96h)下降至注射时水平。

表 1 LHRH-A 和 $17\alpha-P$ 结合注射诱导黄鳝排卵的效应

(21.5—25°C, 1991 年 6 月)

Tab. 1 Effects of different dosages of $17\alpha-P$ in combination with LHRH-A on ovulation of female *Monopterus albus*
(Water temperature 21.5—25°C, June, 1991)

组别 Group No.	试验鱼数 No. of fish	激素注射剂量 ($\mu\text{g/g}$) Hormone and its dosage ($\mu\text{g/g}$)	排卵鱼数 No. of ovulated fish	排卵率 (%) Percentage ovulation (%)	效应时间 (h) Response time (h)
1	8	LHRH-A0.1	4	50	113—120
2	9	LHRH-A 0.1 + $17\alpha-P0.1$	5	56	113—122
3	7	LHRH-A 0.1 + $17\alpha-P1$	4	57	26—56
4	6	LHRH-A 0.1 + $17\alpha-P10$	0	0	
5	5	$17\alpha-P10$	0	0	
6	6	PS	0	0	

1) 周定刚等,黄鳝卵巢发育的研究(待发表)

提示该激素与黄鳍卵母细胞最终成熟可能存在某种关系。Chan 和 Phillips (1969)^[8], 利用薄层色谱法曾检测出繁殖季节初期的黄鳍卵巢存在孕稀醇酮和 17α -羟孕酮。当孕稀醇酮向合成孕酮途径转变时, 首先是有 3β -羟- Δ^5 类固醇脱氢酶 (3β -HSD) 参加^[9]。Tang 等, 在黄鳍卵黄发生期间测出其卵母细胞有 3β -HSD 活性^[10]。因此, 有理由认为在黄鳍卵巢内, 孕稀醇酮可合成孕酮后再代谢为 17α -羟孕酮 (17α -P)。本文作者之一, 曾运用 LHRH-A 和 17α -P 结合注射诱导黄鳍排卵(表 1)。

从上表可见, 17α -P 不具有提高黄鳍排卵率的效应 ($P > 0.05$); 但较高剂量的 17α -P (例如 $1\mu\text{g/g}$ 体重) 则可使排卵效应时间明显缩短(由 113—120h 缩短为 26—56h)。提示该激素有促使卵母细胞预先成熟的作用。

在本试验中, P 含量于临产前明显降低, 表明 P 与刺激卵母细胞最终成熟无直接联系; 尽管如此, P 可以代谢为 17α -P; 排卵前 P 含量显著升高(图 2)的作用, 是否与临产前使其代谢物— 17α -P 维持于较高水平以间接促使卵母细胞最终成熟有关, 值得研究。

参 考 文 献

- [1] Jalabert B. *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 1976, **33**: 974—988.
- [2] Crim L W, et al. Control of gonadotropic hormone release in trout: influence of synthetic LH-RH and LH-RH analogues *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.*, 1981, **28**: 129—135.
- [3] 周定刚等. 人工诱导黄鳍排卵的初步研究. *水生生物学报*, 1990, **14**(3): 280—282.
- [4] Van Ree G E, Lok D, Bosman G. *In vitro* induction of nuclear breakdown in oocytes of the zebrafish *Brachydanio rerio* (Ham. Buch.), Effects of the composition of the medium and of protein and steroid hormones. *Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C*. 1977, **80**: 353—371.
- [5] 姜仁良等. 促黄体生成素释放激素类似物对团头鲂血清中促性腺激素和 17β -雌二醇含量变动的研究. *水产学报*, 1986, **10**(2): 185—193.
- [6] Yamazaki, F. Endocrinological studies on the reproduction of the female goldfish, *Carassius auratus*. L., with special reference to the function of the pituitary gland. *Mem Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 1965, **13**: 1—64.
- [7] 赵维信等. 诱导鲢排卵时性类固醇含量的变化. *水生生物学报*, 1988, **12**(3): 212—218.
- [8] Chan, S. T. H., and Phillips, J. G. The biosynthesis of steroids by the gonads of the ricefield eel *Monopterus albus* at various phases during natural sex reversal. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1969 **12**: 619—636.
- [9] L. 特雷格著, 邹继超译. 类固醇生物合成代谢作用. 北京: 科学出版社, 1980: 57.
- [10] Tang F, Chan S T H, Lofts, B. Δ^5 - 3β -hydroxy-steroid dehydrogenase activities in the ovaries of the ricefield eel, *Monopterus albus*. *Experientia* 1974a, **30**: 316—317.

CHANGES OF SEX STEROIDS IN *MONOPTERUS ALBUS* DURING ITS SPAWNING INDUCED WITH INJECTION OF LHRH-A

Zhou Dinggang, Zheng Weiming and Zhang Daxiang

(Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract

This paper reports, for the first time, the changes in concentrations of estradiol (E_2), progesterone (P) and testosterone (T) in serum of *Monopterus albus* during the spawning induced with injection of LHRH-A (mammalian luteinizing hormone-releasing hormone analogues). The female fish injected with LHRH-A (0.3 $\mu\text{g}/\text{gram}$ body weight) exhibited a significant increase ($P < 0.05$) in serum E_2 content seven hrs after injection (A.I.). The E_2 content reached its peak level 24 hrs A. I. The progesterone content showed also a similar increase: a significant rise in serum P content was observed 24 hrs A. I. ($P < 0.05$) and a more significant rise 48 hrs A. I. ($P < 0.01$). However, during the course of ovulation concentrations of E_2 and P decreased gradually towards their levels observed before injection. Changes in testosterone concentration showed a somewhat different pattern in serum of the male fish injected with LHRH-A: the peak concentration level of T was detected 24 hrs A.I when spermiation took place and the T content decreased to its original level after spermiation. The theoretical basis was therefore presented on the use of sex steroids as an agent to induce spawning of *M. albus*.

Key words *Monopterus albus*, LHRH-A induced spawning, Steroids, Estradiol, Progesterone, Testosterone