

研究简报

棉酚对金鱼生殖机能影响的研究

富惠光 叶继丹 卢彤岩 张 良

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

EFFECT OF GOSSYPOL ON REPRODUCTION OF GOLD FISH (*CARASSIUS AURATUS*)

Fu Huiguang, Ye Jidan, Lu Tongyan and Zhang Liang

(Heilongjiang Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070)

关键词 棉酚, 金鱼, 生殖

Key words Gossypol, Gold fish, Reproduction

棉酚是存在于棉籽中的一种有毒的多酚类化合物, 其对哺乳动物和人类的毒性作用已经研究得比较详尽, 但对鱼类的作用仅有少量的报道。我们的前期研究结果表明, 棉酚对鱼类的毒性作用因种类不同有很大的差异, 对鱼类的生殖机能的影响尚未见报道。为了确定棉酚对鱼类是否也有抗生育作用, 作者在本文研究了棉籽饼水平的棉酚对金鱼生殖机能的影响。

1 材料与方法

一年龄金鱼[*Carassius auratus*(Linnaeus)](体重 $26.8 \pm 5.6\text{g}$)放入两个 400L 配有持续充气、循环过滤和恒温控制的玻璃钢水槽中用商品配合饲料喂养驯化。用当地自来水每天换水四分之一。驯化两周后开始试验。在整个试验期间, 环境条件控制如下: 水温 $23-24^{\circ}\text{C}$, 人工照明每天 12h。溶解氧不低于 80% 饱和值, 氨氮不高于 $0.3\mu\text{g/L}$ 。

实验鱼使用自行配制的全价饵料饲养, 试验组用的饵料含 0.1% 乙酸棉酚, 对照组用的饵料除不含棉酚外, 其他成分与试验组相同, 具体的饵料成分见表 1。植物性材料如豆饼粉、麦麸、面粉等预先在 105°C 恒温烘 1h, 维生素使用医药等级, 矿物盐用分析纯试剂, 乙酸棉酚(纯度 99.99%, 中国医学科学院北京药物研究所提供)溶于乙醇后再与其他材料搅拌均匀置室温下制成颗粒。制成的饵料在冰箱内保存并在一个月内存完。试验鱼每隔半月称重一次以确定投饵量。日投饵率在开始的第一个月是 3.7%, 以后根据摄食状况逐步降低到 2.8%。每天观察并记录试验鱼的发情、交配和产卵行为。试验进行了四个月, 试验鱼日平均摄入棉酚量为 33.6mg/kg 体重。

表 1 对照组和实验组使用的饲料成分 (%)

Tab. 1 Feed composition for control and gossypol(GP) treated group

	对照组 Control	实验组 GP-treated
鱼粉 Fish meal	49.5	49.5
麦麸 Wheat bran	44.5	44.5
豆油 Soybean oil	2	2
复合维生素 Vitamin complex ^①	1	1
复合矿物质 Mineral complex ^②	3	3
乙酸棉酚 Gossypol acetate	0	0.1
纤维素 Cellulose	0.1	0

① 每公斤饲料含维生素 A, 3300 IU; D, 3300 IU; B1, 10mg; B2, 10mg; B6, 10mg; B12, 0.04mg; C, 330 mg; E, 100mg; K3, 10mg; 烟酸, 50mg; 泛酸钙, 30mg; 氯化胆硷, 800mg; 叶酸, 5mg; 肌醇, 200mg.

② 每公斤饲料含硫酸铜 2mg; 硫酸铁, 8mg; 硫酸镁, 40mg; 硫酸锰, 1.6mg; 硫酸锌, 1.6mg; 氯化钠, 1.6mg; 硫酸钴, 1.2 μ g; 硒酸钠, 0.4 μ g.

试验进行到四个月(122d)时,将试验鱼取出在 0.1% 苯氧乙醇水溶液中麻醉后,称重,尾静脉采血。血液经 10000r/min 离心 4min,取血浆在 -80℃ 保存,在一个月內做测定。取精巢立即放在波恩氏液中固定做组织学检查。为防止试验鱼因受捕捉刺激不同而影响血浆皮质醇激素的测定结果,作者采用顺序捕捉方法(Sequence capture),即顺序在对照和实验组每次取五尾鱼麻醉采血以保证对照鱼和实验鱼受到相等的捕捉刺激。

血浆睾酮和皮质醇的测定 血浆的睾酮和皮质醇含量用上海内分泌研究所生产的药盒在 LKB 液体闪烁仪上进行测定。测得的数据先进行单方差分析,然后进行 t 检验。

精巢的组织学检查 精巢在波恩氏液中固定,乙醇系列脱水后石蜡包埋。7 μ m 切片,苏木精、伊红染色,在光学显微镜下观察摄影。

2 结果

在整个试验期间,饲喂含棉酚饲料的金鱼在摄食行为上与对照组相似。实验进行一个月后,两组的

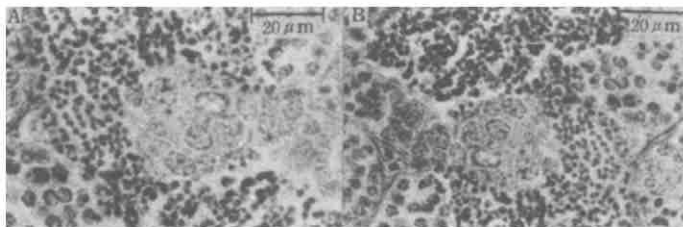


图 1 用含 0.1% 乙酸棉酚的配合饲料饲养四个月后的金鱼的精巢的光镜照片

Fig.1 Light micrographs of testis of gold fish fed with formulated feed containing 0.1% gossypol acetate for four months

(a:对照鱼的精巢 Testis of control fish; b:棉酚处理的金鱼的精巢 Testis of gossypol treated gold fish)

鱼都开始了交配和产卵。其中对照组产卵四次,实验组产卵五次。将产出的卵进行人工孵化,结果都能达到 75%以上的孵化率。试验结束前从对照组和实验组各随机取三尾雄鱼麻醉后采精,镜检发现三尾鱼的精子都活动正常。实验结束时对雌鱼的卵巢剖检的结果发现有各发育时期的卵巢。对雄鱼的精巢进行组织学检查,可以清楚地看到具有正常结构的精原细胞、精母细胞、精细胞和间质细胞,储精囊内也可见到成群发育成熟的精子,显示出正常的繁殖期精巢结构(图 1)。

血浆睾酮和皮质醇的测定结果见表 2,从表 2 可看出棉酚处理组和对照组的血浆睾酮和血浆皮质醇的浓度都没有显著差异。

表 2 棉酚对金鱼血浆睾酮和血浆皮质醇的影响

Tab. 2 Effect of gossypol (GP) on plasma testosterone and cortisol level of gold fish

	血浆睾酮(ng / ml)Plasma testosterone	血浆皮质醇(ng / ml)Plasma cortisol
	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
对照组 Control	87.92 ± 14.14	37.53 ± 3.39
实验组 GP-treated	91.96 ± 14.60	44.06 ± 3.41

表 3 用含 0.1%乙酸棉酚的饵料饲养金鱼的生长情况

Tab. 3 Growth parameters of gold fish fed with diet containing 0.1% gossypol acetate (GP)

	初重 W_i	末重 W_f	饵料系数 Coefficient of feed	相对增长率 * Gain	特定增长率 * * Special growth rate
对照组 Control	26.6	54.4	5.05	105	54
实验组 GP-treated	27.0	55.8	4.94	107	55

W_i = initial weight, W_f = final weight.

* $100 \times (\text{末重} - \text{初重}) / \text{初重}$

* * (%) = $(\ln W_f - \ln W_i) / d$ d = 天数

表 3 列出了经过四个月饲养后对照组和实验组的初重、终重、相对增长率、特定增长率和饵料系数,从表中的数据可以看出,用含 0.1%棉酚的饵料饲养四个月的金鱼的生长率和饵料系数都不低于对照鱼。

3 讨论

因为作者前期的工作说明了棉籽水平的棉酚对罗非鱼、鲤鱼和金鱼没有毒性作用,也不影响上述鱼类的营养生长,所以作者以金鱼为代表探索棉酚是否对鲤科鱼类的生殖机能有拮抗作用。棉酚对哺乳动物的抗生育作用已经研究得比较详尽。棉酚破坏睾丸生精上皮,造成死精、少精和无精子症^[1],对附睾^[2, 3]等雄性附属生殖器官也有不同程度的不利影响。但是棉酚对鱼类的生殖机能的影响尚缺乏研究。从研究结果得知,用含 0.1%棉酚的饵料饲喂金鱼四个月,不影响金鱼的生殖行为,棉酚处理的金鱼仍能正常交配并能产生正常出膜的卵。这在整体上说明雌雄两性的生殖机能都没有受到影响。在实验结束时剖检可发现各发育期的卵巢。对睾丸的组织学检查发现精原细胞、精母细胞、精细胞及储精囊内的精子都呈正常状态,没有哺乳动物发生的生精上皮坏死的现象。血浆睾酮的测定结果也证实棉酚不影响

金鱼的血浆睾酮的水平,组织学检查也发现睾丸间质细胞呈正常形态。上述研究结果说明棉酚对金鱼没有对哺乳动物的抑制垂体-生殖腺轴^[4]、直接破坏睾丸生精上皮^[1]的药理作用。人类日口服棉酚 0.3mg/kg 体重两个月、豚鼠日口服 20mg/kg 体重 56d 就可引起无精症^[5]。而金鱼日食用棉酚 33.6mg/kg 体重达 4 个月之久精巢的生精机能不受影响。棉籽饼中棉酚的含量是 0.03—0.05%,在本实验使用了含棉酚 0.1%的饵料。由此可以得出结论,较长时间用棉籽饲养金鱼不影响其生殖行为和机能。

下丘脑-垂体-肾上腺轴的应激反应导致血液皮质醇的升高是动物对不良环境和拥挤条件适应的一种生理学反应,也见于鱼类对毒物的适应过程。近来皮质醇水平的测定也用于确定放养密度的一个指标。棉酚处理的金鱼的血浆皮质醇浓度与对照组没有显著差异说明所用的棉酚浓度对金鱼没有过大的刺激,或者金鱼对此浓度的棉酚能够适应。这也与作者观察到的食用含 0.1%棉酚饵料的金鱼的生长率不受影响的结果相符。

由于对棉酚节育性能的积极利用没有成功,棉酚的毒性和抗生育作用就成了利用棉籽饼这一植物蛋白源的障碍。棉酚对哺乳类家畜的毒性和抗雄性生育作用限制了棉籽饼的饲料应用。鲤、金鱼等鲤科鱼类对棉酚有较强的抗性,本文又证实了棉酚对金鱼没有上述抗雄性生育的药理作用。这在理论上证明了棉籽饼用于水产养殖的可行性。尽管目前已经有了棉籽饼的去毒方法,但现行的硫酸亚铁浸泡法不仅易造成水溶性营养成分的损失,还使去毒后的产品有过量的铁。去毒工艺也增加了饲料成本。用棉籽饼直接饲养抗毒的养殖鱼类无疑是利用棉籽饲料源的合理方法。

参 考 文 献

- [1] 薛社普. 棉酚抗生育作用的研究——男用节育药棉酚的实验研究. 北京: 卫生出版社. 1983: 216—224.
- [2] Bhiwgade D A, Nair I N. Ultrastructural and biochemical changes in epididymis and vas deferens of gossypol treated rats. *Indian J Exp. Biol.* 1989, **27**(6): 510—518.
- [3] Soufir J C, et al. Gossypol-induced modifications in the microenvironment of rat epididymal spermatozoa. *J Reprod. Fertil.* 1989, **86**(2): 427—434.
- [4] Nair I N, Bhiwgade D A. Effect of gossypol on pituitary reproductive axis ultrastructural and biochemical studies. *Indian J Exp. Biol.* 1990, **28**(8): 724—732.
- [5] Liu G, Lyle K C, Cao J. Clinical trial of gossypol as a male contraceptive drug., Part 1. efficacy study. *Fertil. Steril.* 1987, **48**(3): 459—462.